

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：35303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659528

研究課題名(和文) 網羅的スクリーニングによる肺炎クラミジア抗原の分子探索とワクチン開発の展開

研究課題名(英文) Genomic screening for Chlamydophila pneumoniae-specific antigens and development of vaccines

研究代表者

尾内 一信 (OUCHI, Kazunobu)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：80351899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新たな診断用抗原、ワクチンの開発を目指し、肺炎クラミジア患者血清中に存在する抗体が認識する分子の網羅的スクリーニングを行った。455個の肺炎クラミジア分子を解析した結果、58個の分子を見出すことに成功した。また、感染ステージ特異的に発現する分子を見出すことにも成功した。これらの分子を組み合わせることで、新たな血清診断法やワクチンの開発につながる可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：To identify novel specific antigens from Chlamydophila pneumoniae, we screened 455 genes with unknown function in the genome of C. pneumoniae J138 by using serum samples from C. pneumoniae-infected patients. From this comprehensive analysis, 58 clones were identified as antigens. These results have provided useful information for the development of new serological tools for the diagnosis for C. pneumoniae infections and for the development of vaccines in future.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：肺炎クラミジア 血清学診断法

1. 研究開始当初の背景

市中肺炎の主な起因菌である肺炎クラミジアは、集団生活を開始する小児期に初感染し、成人では抗体保有率が60%以上にのぼる普遍的な疾患である。さらにヒトは肺炎クラミジアに対して終生免疫を持つことはなく、持続感染又は繰り返し感染をすることが知られており、呼吸器疾患だけでなく動脈硬化症、アルツハイマー病など他の疾患との関連性も示唆されている。現在、市販されているELISAキットでは、肺炎クラミジア抗原として、基本小体由来の外膜蛋白質やLPSが利用されているが、抗原の違いにより、擬陽性やキット間で診断結果に矛盾を生じることがある。また、これまで肺炎クラミジア感染予防を目指し、肺炎クラミジア主要外膜蛋白(MOMP)の変領域がワクチン候補抗原として注目されてきたが、有効なワクチンの開発にも成功していない。申請者が分離した肺炎クラミジア J138 株は、日本学術振興会未来開拓学術研究推進事業「病原性微生物のゲノム解析」(H9-H13年度)において、申請者のグループが全ゲノム情報を解読し、1069個の遺伝子のうち約半数が機能未知遺伝子であることを明らかにした。さらに、分担者である岸は挑戦的萌芽研究(H19-21年度)「酵母発現系を用いた病原菌エフェクターの網羅的スクリーニングシステムの開発」により肺炎クラミジア機能未知蛋白質455個を酵母で発現させるシステムの構築に成功している。現在の診断法では、持続感染、繰り返し感染の区別をする方法はなく、また治療に用いられる抗菌薬では、細胞内に寄生し続ける肺炎クラミジアに対する効果的な除菌方法は存在しない。そこで、本研究は、肺炎クラミジア特異的抗原分子の同定と、それを利用した血清学的診断法の確立、さらには初のワクチン作製を目標に研究を進めて行く。

2. 研究の目的

(1) 高感度の血清学的診断法の開発

現在、肺炎クラミジア診断方法の一つとして用いられている血清学的診断法は、手法が簡便であるために広く利用されているものの、肺炎クラミジアのいかなる分子に対する抗体を認識しているか明らかでなく、感度もPCR法による遺伝学的診断と比較すると劣る。血清学的診断法及び遺伝学的診断法を併用している施設は少なく、より正確な診断を下すには二つの方法の併用が必要となる。そこで、より『高感度』で、かつ『感染ステージに特異的な診断法』の確立を目指す。

(2) 感染ステージ特異的診断法の開発

肺炎クラミジアは持続感染を起こすものの、現在の血清学的診断だけでは感染ステージの同定は困難である。持続感染により、喘息等の呼吸器疾患だけでなく、動脈硬化症など様々な疾患の発症リスクを増加させているこ

とが示唆されており、持続感染の有無を明らかにすることは重要である。本研究では、年齢や感染ステージごとに患者血清によって検出される分子を同定することにより、肺炎クラミジアの持続感染または過去に感染があったかの診断に有用な手段となることが想定される。さらに初感染・慢性感染の違いも同定することができる初めての診断法の開発に繋がる可能性がある。

(3) ワクチン開発への道筋をつける

ワクチン開発には、ヒトの免疫系が認識できる特異的抗原分子の同定が不可欠である。本研究で選出された抗原分子の中には、この候補分子が含まれている可能性が非常に高く、ワクチン候補となりうる分子の探索を行う。

3. 研究の方法

(1) 患者血清により認識される肺炎クラミジア機能未知蛋白質分子の探索

肺炎クラミジア機能未知分子455個にGFPを融合させた分子を酵母に発現させ、患者血清が認識する肺炎クラミジア分子をウェスタンブロット法により、網羅的に探索する。ヒト血清には酵母蛋白質を認識する抗体がわずかに存在するものの、そのレベルは十分に低い。これに対し、本研究では抗原候補となるクラミジア蛋白質を大量に酵母で発現させることにより、ヒト由来抗酵母蛋白質抗体によるシグナルは十分低く抑えられ、十分な検討が可能となる。

(2) 免疫グロブリンアイソタイプ間での違いの探索

肺炎クラミジアは、繰り返し感染、持続感染を起こすと考えられている。そこで、免疫グロブリンアイソタイプ間で、抗原の認識に差があるかを検討する。(1)にて用いた酵母抽出蛋白質、患者血清を用い、二次抗体に、各アイソタイプ特異的抗体を用いることで、どの抗原を、どの免疫グロブリンアイソタイプが認識しているか、解析を行う。

(3) 抗原分子の機能解析、発現時期の解析

肺炎クラミジア患者由来の抗体が認識する肺炎クラミジア分子を見出したならば、それら分子に対する特異的抗体の作製を行う。これにより、肺炎クラミジアのどの感染ステージにおいて、発現が亢進する蛋白質であるかを解析する。また、作製した抗体に中和抗体としての機能があるかを解析する。

4. 研究成果

(1) 患者血清により認識される肺炎クラミジア分子の探索結果

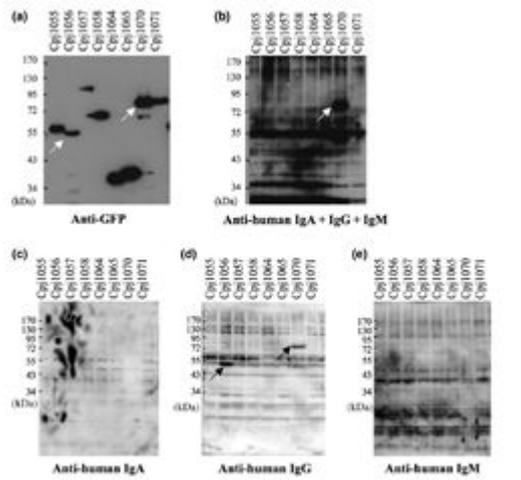


図 1: 酵母を用いた解析結果 (FEMS Microbiol Lett. 2012 Apr; 329(2): 168-76. より抜粋)

肺炎クラミジア分子 455 個について、小児肺炎クラミジア初感染患者 8 名、成人慢性閉塞性肺疾患患者約 350 名の血清を用いて解析を行った。その結果、合計 58 個の肺炎クラミジア分子がいずれかの患者血清により認識されることがわかった (図 1)。

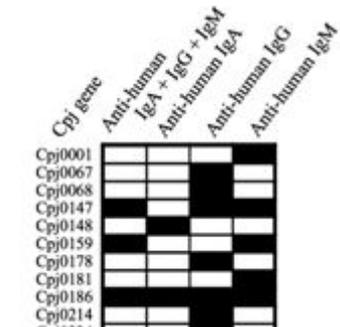


図 2: 免疫グロブリンアイソタイプ特異的認識 (FEMS Microbiol Lett. 2012 Apr; 329(2): 168-76. より一部抜粋)

さらに、免疫グロブリン特異的な認識の違いを解析した。その結果、全てのアイソタイプにより認識される分子や、アイソタイプ特異的に認識される分子を見出すことに成功した (図 2)。現段階において、これらの分子機能は不明であるが、他のクラミジア属細菌との相同性により推測すると、その多くが、菌体そのものを構成する分子ではなく、感染に必要なエフェクター分子である可能性が高いことも明らかとなった。

(2) 抗原分子の発現時期および機能解析

次に、(1) で見出した肺炎クラミジア分子の中で、他のクラミジア属にはなく、肺炎クラミジア特異的に分子に注目し、個々の分子について解析をすすめた。

Fke034 の発現時期

Fke034 は分子量約 30kDa の蛋白質で、肺炎クラミジア特異的蛋白質の 1 つである。この分子に対する特異的抗体を作製し、感染細胞における発現時期の解析を、免疫染色法にて行った (図 3)。

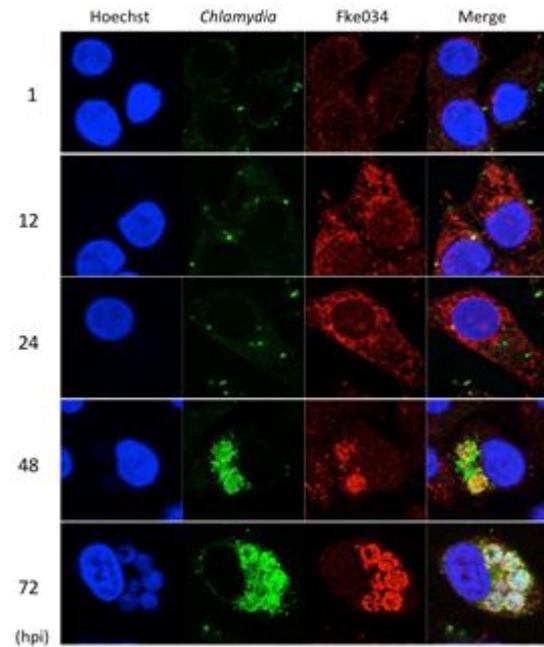


図 3: 肺炎クラミジア感染細胞における Fke034 の動態

その結果、Fke034 は、感染後、非常に速やかに宿主細胞へと注入され、約 24 時間、宿主細胞内に検出される。その後、Fke034 は、肺炎クラミジア菌体内での発現は持続するものの、宿主細胞内からは消失する。すなわち、Fke034 は、宿主細胞へ侵入直後から感染初期にかけて、その蛋白質の発現が大きく亢進していることが考えられる。

Fke063 の機能解析と発現時期

Fke034 と同様に肺炎クラミジア特異的分子である、Fke063 は約 20kDa の蛋白質である。この分子は感染後 12-24 時間頃に宿主細胞内に移行していることが、同様の方法にて明らかになることができた。さらに、この分子について、免疫電子顕微鏡法により、菌体内での局在を解析した (図 4)。

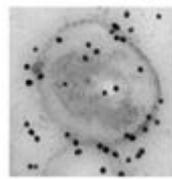


図 4: 肺炎クラミジア基本小体を免疫電子顕微鏡法により解析

その結果、Fke063 は菌体内部にも存在するが、菌体表面にも検出することができた。そこで、抗 Fke063 特異的抗体が、中和抗体として機能するか検討を行った。抗 Fke063 特異的抗体と肺炎クラミジアを混合し、ヒト細胞

胞へ感染させると、対照群と比較して、感染効率が約半分に低下することを確認した。

(3) 今後の展望

本研究により、患者抗体によって認識される新たな抗原分子を見出すことに成功した。しかし、健常人における肺炎クラミジア感染の症状は通常の風邪程度であり、また大部分は自然治癒することから、初感染患者の血清を十分に集めることが困難であった。そこで、今後も、初感染患者の血清が入手でき次第、抗原探索を持続して行っていく予定である。

また、本研究においては2種類の肺炎クラミジア特異的分子についての機能解析を進めてきた。いずれも感染初期に、その分子の発現が亢進している可能性が示された。これらの分子を肺炎クラミジア患者血清中で特異的に検出することができたならば、現在も体内で感染が拡大していることを意味する。本研究においては見出すことができなかったが、感染中期～後期にかけて発現が亢進する肺炎クラミジア分子を見出したならば、持続感染を診断することが可能となるだろう。本研究において見出した、58個分子については、さらに解析を進め、感染ステージ特異的な診断方法の確立を目指す。

これまでは、菌体表面は、外膜蛋白質やLPSなどで覆われていると考えられてきており、これらの分子に対する中和抗体の作製が試みられてきた。しかし、本研究により、Fke063のように、菌体表面にも存在するエフェクター分子の存在が明らかとなった。このことは、中和抗体を作製するにあたり、新たな標的分子を探索するにあたり重要な結果である。抗Fke063特異的抗体では、約半分程度までしか感染を抑制することができなかった。しかし、他の肺炎クラミジア分子に対する抗体も混合して使用することにより、さらなる感染予防効果を示すことが期待できる。今後も、個々の肺炎クラミジア分子について、機能解析を進めることで、感染戦略を明らかにするとともに、高感度診断法の開発ならびに、ワクチン作製の実現化に取り組んでいく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Yasui Y, Yanatori I, Kawai Y, Miura K, Suminami Y, Hirota T, Tamari M, Ouchi K, Kishi F. Genomic screening for *Chlamydia pneumoniae*-specific antigens using serum samples from patients with primary infection. *FEMS Microbiol Lett.* 2012 Apr;329(2):168-76. 査読有, doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02520.x.

〔学会発表〕(計5件)

安井ゆみこ, 築取いずみ, 岸文雄 宿主細胞の小胞輸送システムを制御する肺炎

クラミジアエフェクター分子の探索 第87回日本細菌学会総会 2014/03/26 東京都江戸川区)

築取いずみ, 安井ゆみこ, 三浦公志郎, 岸文雄 PACSIN2に結合する肺炎クラミジア特異的エフェクター分子 第86回日本生化学会大会 2013/09/13 (神奈川県横浜市)

Yasui Y, Yanatori I, Miura K, Ouchi K and Kishi F. Genomic screening for *Chlamydia pneumoniae* antigens using sera from the patients. CBRs 2013: 6th Biennial Meeting of the Chlamydia Basic Research Society 2013/03/20 (San Antonio, USA)

安井ゆみこ, 築取いずみ, 河合泰宏, 三浦公志郎, 屋内一信, 岸文雄 肺炎クラミジア特異抗原の網羅的スクリーニング 第29回日本クラミジア研究会 2011/09/04 (岐阜市)

Yasui Y, Yanatori I, Kawai Y, Miura K, Katayama A, Ouchi K, and Kishi F. IDENTIFICATION OF CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE-SPECIFIC ANTIGENS USING SERA FROM CHILDREN ACUTE RESPIRATORY INFECTION International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress 2011/09/10 (北海道札幌市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾内 一信 (OUCHI, Kazunobu)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号: 80351899

(2) 研究分担者

岸 文雄 (KISHI, Fumio)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40153077

三浦 公志郎 (MIURA, Koshiro)
九州女子大学・家政学部・教授
研究者番号: 30284243

築取いずみ (YANATORI, Izumi)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号: 40454847