

平成30年 4月23日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460521

研究課題名(和文) インフルエンザ菌の気道上皮細胞内寄生と細胞傷害性T細胞応答の解析

研究課題名(英文) The analysis of Haemophilus influenzae in alveolar epithelium cells and cytotoxic T-cell responses against the bacteria

研究代表者

永田 年 (Nagata, Toshi)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：90275024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：無莢膜型インフルエンザ菌(NTHi)の気道上皮細胞内に侵入することをヒト気道上皮細胞株であるBEAS-2B細胞株を用いて確認し、NTHiの細胞内侵入の分子機構について研究をおこなった。その結果、NTHiは、ビトロネクチンに付着することを確認した。この付着はNTHiのプロテインEの84-108番目のアミノ酸からなるペプチドの前処理で阻害された。この阻害の程度はペプチド濃度依存的であった。同様にNTHiのBEAS-2B細胞内への侵入もペプチドの濃度依存的に阻害された。このことからNTHiの気道上皮細胞への侵入は、宿主のビトロネクチン、NTHiのプロテインEが関与した過程であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We confirmed that some strains of NTHi (Nontypeable Haemophilus influenzae) invade human bronchial epithelial cells (BEAS-2B cell line) and studied the molecular mechanisms of the invasion. The results of our study showed NTHi attached on vitronectin which exists on bronchial epithelial cells. The attachment was inhibited with pretreatment of the peptide derived from 84-108 amino acid residues of NTHi protein E. The degree of the inhibition depended on the concentration of the peptide added. In addition, NTHi invasion into bronchial epithelial cells was also inhibited in the peptide concentration-dependent manner. These results indicate that the invasion of NTHi into bronchial epithelial cells is a process in which both vitronectin on the epithelial cells and NTHi protein E are involved.

研究分野：感染免疫学

キーワード：インフルエンザ菌 気道上皮細胞 ビトロネクチン プロテインE

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD)は、主要な慢性呼吸器疾患であり、現在我が国の死因の第10位である。またWHOは2020年までにCOPDは世界で第3位の死因になると予測しており、緊急に対策が必要な疾患であるといえる。COPDの発生・進展には、気道内に存在する細菌に対する感受性が関与することが示唆されている。COPD患者に最も共通に認められる細菌は、莢膜をもたないインフルエンザ菌 (NTHi)であり、COPDの主要な増悪因子であると考えられている (Moghaddam et al., Int J COPD, 2011)。従来、NTHiは細胞外寄生細菌と考えられていたが、近年、NTHiが気道上皮細胞に侵入し、細胞内で「代謝活性はあるが増殖しない状態 (休眠状態)」で生存しうることが報告された (Morey et al., Microbiology, 2011)。細胞内に寄生したNTHiによる気道内刺激が、気道の炎症を引き起こすと考えられる。また細胞内に潜伏しているNTHiが再活性化し増殖を開始すると、COPDの状態が増悪するものと考えられる。COPDは慢性的な気道炎症が病態上重要であり、特にCD8陽性細胞傷害性T細胞 (CD8+ CTL)、好中球の浸潤が特徴的である。COPD患者あるいは健常者の末梢血をNTHi生菌と共培養すると、ともにNTHi特異的CTLが誘導されてくるが、健常者ではNTHi特異的にIFN- γ 産生CTLが誘導されるのに比べ、COPD患者ではIFN- γ 産生量が低いことが報告されており、NTHiに対するCTL応答がCOPDの進展の阻止に重要であることが示唆されている (King et al., Clin Exp Immunol, 2008)。

インフルエンザ菌 (Rd株)の全ゲノム配列は、細菌種としてはじめて1995年に報告されている (Fleischmann et al., Science, 1995)。またその後複数のNTHi菌株のゲノム配列が解析された。それによるとインフルエンザ菌は1,700個から1,900個の遺伝子を

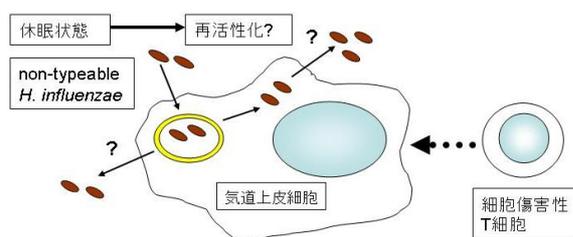
もっていることが明らかになった。このうち、インフルエンザ菌の主要な抗原と考えられているのは外膜タンパク (outer membrane proteins)であり、特にP6タンパクは、すべてのインフルエンザ菌が共通に保有し、そのアミノ酸配列はインフルエンザ菌種間で100%保存されている。ラットにP6タンパクを経鼻免疫すると気道内インフルエンザ菌数が減少することが報告されており (Kyd et al., Infect Immun, 1995)、P6タンパクはインフルエンザ菌に対する免疫応答の主要な標的分子であり最も期待できるワクチンの成分分子であるといえる。これまでP6タンパクに対する抗体およびT細胞応答の報告はあるが (McMahon et al., Vaccine, 2005 他)、T細胞応答の報告はすべてCD4+ ヘルパーT細胞応答に関するものであり、CD8+ CTL応答に関するものは存在しない。NTHiが気道内で細胞内寄生して存在することを考えると、CD8+ CTL応答は重要な感染防御免疫応答と考えられる。

申請者は、これまで細胞内寄生細菌であるリステリア (*Listeria monocytogenes*) および結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) のT細胞応答の解析をおこなってきた (reviewed in Nagata et al., J Biomed Biotechnol, 2010; Nagata and Koide, Nihon Saikingaku Zasshi, 2010)。特に、これら細胞内寄生細菌抗原特異的CD8+ CTL応答の標的となる、マウスおよびヒトT細胞エピープの同定を、遺伝子免疫 (DNA ワクチン) の手法を用いて行っている。

ヒトT細胞エピープの同定は、ヒトHLA遺伝子トランスジェニック (Tg) マウスに抗原遺伝子を免疫することによって行ってきた (Aoshi et al., Infect Immun, 2008; Wang et al., Vaccine, 2010)。今回の研究では、これらの研究で培ってきた実験手法を、インフルエンザ菌に対する免疫応答の解析に活用したいと考えた。

2. 研究の目的

インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) は、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 等の呼吸器感染症や中耳炎等の耳鼻咽喉科領域感染症の原因となる臨床的に重要な細菌である。最近、莢膜をもたないインフルエンザ菌 (non-typeable *Haemophilus influenzae*; NTHi) が、COPD の増悪に関与することが示唆されている。NTHi は気道上皮細胞内で増殖することが報告されているがその詳細は明らかでない。本研究の目的は、COPD 増悪との関連が推測される NTHi の細胞内寄生およびその再活性化の機構を明らかにし、さらに細胞内 NTHi の除去に有効であると考えられる NTHi 特異的細胞傷害性 T 細胞のターゲットである NTHi 外膜タンパク P6 のヒト T 細胞エピトープを同定し、COPD に対する有効なワクチン開発に資することである。



作業仮説の概念図
気道上皮細胞内 NTHi の再活性化が COPD の増悪を引き起こす。有効な CTL 応答で細胞内 NTHi を殺滅できれば COPD の増悪を回避できる。

3. 研究の方法

(1) NTHi の気道上皮細胞内寄生の確認

NTHi が、気道上皮細胞内に侵入し、そこで生存できることをヒト気道上皮細胞株である BEAS-2B 細胞株を用いて確認する。気道上皮細胞株の培養には既存の CO₂ インキュベーターを用いる。NTHi 菌株は、ATCC 保存株 2 種および浜松医科大学附属病院臨床分離株数種を用いる。NTHi を LIVE/DEAD BacLight 細菌染色キット

(Molecular Probes 社) を用い生きたまま染色した後、BEAS-2B 細胞に感染させその局在を経時的に観察する。観察には既存の蛍光顕微鏡 (BIOREVO BZ-9000; Keyence 社) を用いる。なお感染細胞の食胞 (ファゴソーム) は LysoTracker 試薬 (Molecular Probes 社) を用いて染色する。また細胞内の生存細菌数は、NTHi 感染細胞を回収しそれをチョコレート寒天平板培地にプレATING すること (平板プレート法) により計測する。なお NTHi 感染後、細胞外の細菌は細胞内浸透性のない抗菌薬 gentamicin で殺菌する。

(2) NTHi の気道上皮細胞内生存持続期間の確認

NTHi が気道上皮細胞内に寄生し、安定に維持されるための期間を明らかにする。それと平行して、細胞内 NTHi に対する各種抗菌薬の効果を検討する。

(3) 気道上皮細胞内 NTHi の再活性化の確認

NTHi が気道上皮細胞内に寄生し、安定に維持されるための期間を明らかにする。具体的には、NTHi を気道上皮細胞株に感染させた後、感染後 10 日程度まで毎日、細胞を回収しそれをチョコレート寒天平板培地にプレATING することにより、その中の生存細菌数を確認する。

(4) NTHi 抗原に対する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 応答の解析

インフルエンザ菌は 1,700 個から 1,900 個の遺伝子をもっていることが明らかになった。このうち、インフルエンザ菌の主要な抗原と考えられているのは外膜タンパク (outer membrane proteins) であり、特に P6 タンパクは、すべてのインフルエンザ菌が共通に保有し、そのアミノ酸配列はインフルエンザ菌種間で 100% 保存されている。そこで、NTHi P6 抗原に対する CTL 応答の解析を行う。NTHi P6 遺伝子を PCR 法により増幅し真核

細胞での発現プラスミドを構築する。HLA-A2 (ヒト MHC クラス I 抗原) トランスジェニックマウスにこの P6 遺伝子発現プラスミドを遺伝子免疫し免疫マウスの CTL 応答を検討する予定である。

4. 研究成果

(1) NTHi の気道上皮細胞内寄生の確認

NTHi 菌株として、ATCC 保存株 1 種 (ATCC19418) および浜松医科大学附属病院臨床分離株 1 種 (HUSM0481) を用いた。BEAS-2B 細胞に NTHi を感染させた 2 時間後に、ゲンタマイシン処理にて細胞外細菌を殺滅した。蛍光染色後の顕微鏡観察にて、細胞内侵入菌数を計数した。また細胞内の生存細菌数は、NTHi 感染細胞を回収しそれをチョコレート寒天平板培地に塗布して 1 晩培養後のコロニー数を計数することでも評価した (平板プレート法)。

その結果、ATCC19418 株の BEAS-2B 細胞内への侵入割合は $26.4 \pm 4.1\%$ 、HUSM0481 株の BEAS-2B 細胞内への侵入割合は $24.0 \pm 2.8\%$ であった (図 1 B)。また加えた細菌に対する BEAS-2B 細胞内侵入細菌の割合は ATCC19418 株は $5.17 \pm 1.11\%$ 、HUSM0481 株は $5.97 \pm 2.66\%$ であった (図 1 C)。

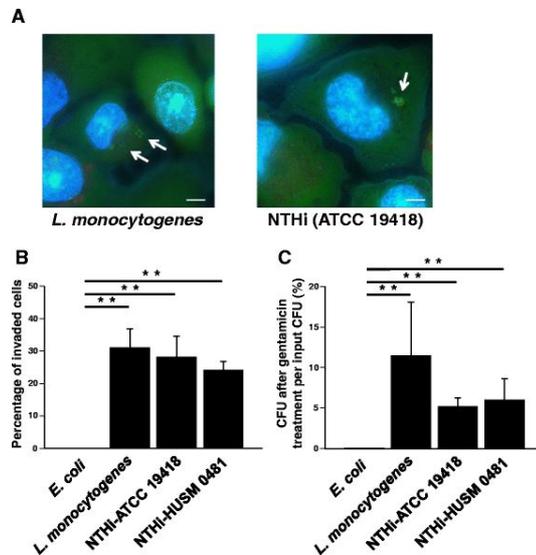


図 1 . NTHi の気道上皮細胞への侵入

またビトロネクチンが、NTHi の細胞表面への付着、細胞内侵入に関与していることを確認するため、プラスチックプレートにコートしたビトロネクチンに NTHi が付着するかを検討した。その結果、NTHi は、ビトロネクチンに付着することを確認した。

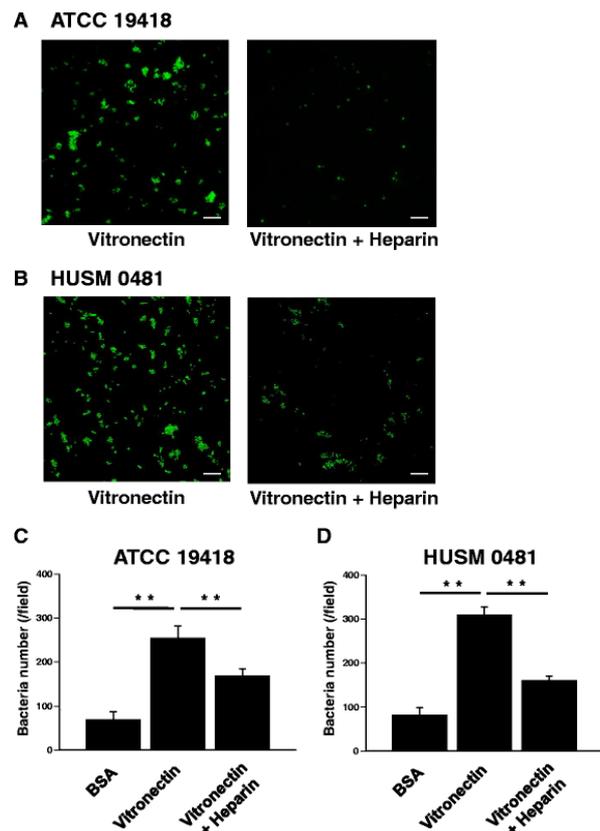


図 2 . NTHi のビトロネクチンへの結合

この付着は NTHi のプロテイン E の 84-108 番目のアミノ酸からなるペプチド (PE⁸⁴⁻¹⁰⁸) の前処理で阻害された。この阻害の程度は PE⁸⁴⁻¹⁰⁸ ペプチドの濃度依存的であった。

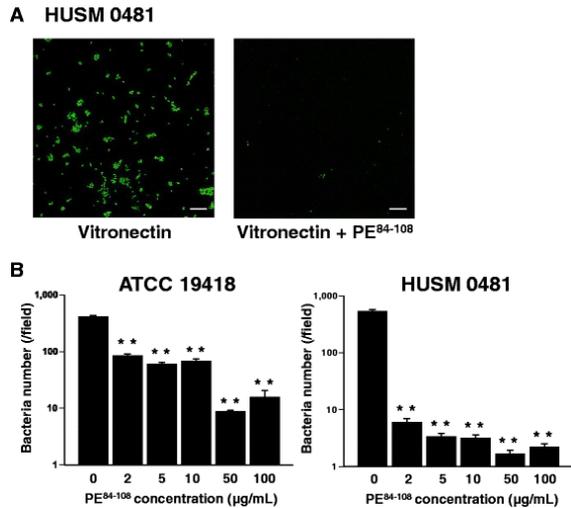


図3 . NTHi のビトロネクチンへの結合のプロテイン E ペプチド (PE⁸⁴⁻¹⁰⁸) による阻害効果

同様に、NTHi の BEAS-2B 細胞内への侵入も、PE⁸⁴⁻¹⁰⁸ ペプチドの濃度依存的に阻害された。

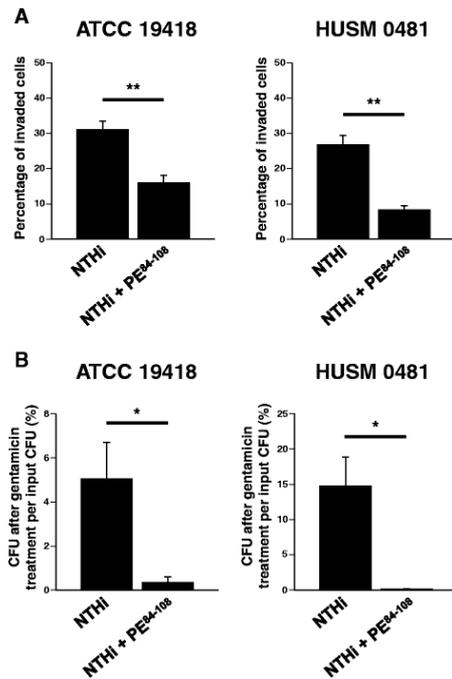


図4 . NTHi の BEAS-2B 細胞内への侵入に対する PE⁸⁴⁻¹⁰⁸ ペプチドの阻害効果

このことから、NTHi の気道上皮細胞への侵入は、宿主のビトロネクチン、NTHi のプロテイン E が関与した過程であることが明らかとなった。

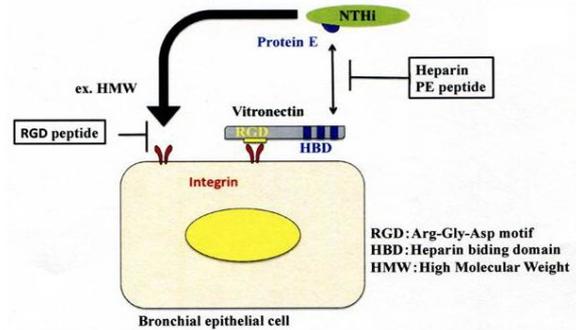


図5 . NTHi の BEAS-2B 細胞内への侵入機構のまとめ

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Tani S, Nagata T, et al. (他 15 名、8 番目): Digoxin attenuates murine experimental colitis by downregulating Inframm Bowel Dis, 23(5), 728-738, 2017, 査読有.
2. Satake Y, Nagata T, Enomoto N, et al. (他 13 名、5 番目・7 番目): Type-1 polarised dendritic cells are a potent immunogen against *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis, 21(5), 523-530, 2017, 査読有.
3. Oishi S, Nagata T, et al. (他 10 名、8 番目): M2 polarization of murine peritoneal macrophages induces regulatory cytokine production and suppresses T-cell proliferation. Immunology, 149 (3): 320-328, 2016, 査読有.

4. Ikeda M, Enomoto N, Hashimoto D, Fujisawa T, Inui N, Nakamura Y, Suda T, Nagata T: Nontypeable *Haemophilus influenzae* exploits the interaction between protein-E and vitronectin for the adherence and invasion to bronchial epithelial cells. BMC Microbiol., 15: 263, 2015, 査読有.
5. Matsui Y, Shimatani M, Kuzuhara K, Miyazaki Y, Horiuchi T, Tajima Y, Yano K, Nagata T: Three-year prospective, observational study of central line-associated bloodstream infections in a 600-bed Japanese acute care hospital. Am. J. Infect. Control, 43: 404-408, 2015, 査読有.
6. 瀬戸真太郎, 永田 年, 堀井俊伸, 小出幸夫: 結核菌ファゴソームの分子解剖. 日本細菌学雑誌, 69 (3): 513-525, 2014, 査読有.

〔学会発表〕(計 4 件)

〔国際学会〕(計 1 件)

1. Ikeda M, Enomoto N, Fujisawa T, Inui N, Nakamura Y, Suda T, Nagata T: Nontypeable *Haemophilus influenzae* invades bronchial epithelial cells via protein E and vitronectin. American Thoracic Society 2015 International Conference, May 15-20, 2015, Denver, USA.

〔国内学会〕 (計 3 件)

1. Ikeda M, Enomoto N, Nagura O, Suda T, Nagata T: Analysis of mechanisms by which nontypeable *Haemophilus influenzae* strains invade bronchial epithelial cells. 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会, 2015 年 4 月 17 ~ 19 日、東京.
2. Ikeda M, Enomoto N, Nagura O, Nagata T, Suda T. 浜松医科学シンポジウム, 2016 年 3 月 11 日、浜松.
3. 池田政輝、榎本紀之、須田隆文、永田 年: 非莢膜型インフルエンザ菌の気道上皮細胞侵入機構の解析. 第 98 回日本細菌学会関東支部総会、2016 年 10 月 29・30 日、東京.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

6. 研究組織
(1) 研究代表者
永田 年 (NAGATA TOSHI)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90275024
- (2) 研究分担者
榎本紀之 (ENOMOTO NORIYUKI)
浜松医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50436961