

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860286

研究課題名(和文) 気道の求心性神経を対象とした百日咳における咳嗽発作発症機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of bacteria-host neuron interactions to study the mechanism of whooping cough

研究代表者

新澤 直明(Shinzawa, Naoaki)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：10583015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：百日咳は咳発作を主徴とする百日咳による細菌性感染症であるが、その咳発作の発症機構は明らかにされていない。百日咳の咳発作が百日咳菌と気道感覚神経との相互作用によるものではないかという仮説を検証するため、百日咳菌に代表されるボルデテラ属菌による宿主神経への神経刺激作用の解析を行った。ラット後根神経節神経を用いたカルシウムイメージングを行ったところ、ボルデテラ属菌の菌体破砕液によるラット感覚神経への特異的な神経作用は観察されなかった。本研究の手法では、ボルデテラ属菌による宿主神経との相互作用解析を解明することはできなかった。

研究成果の概要(英文)：Whooping cough is a respiratory infectious disease caused by *Bordetella pertussis*. Infection results in a severe cough illness, however the mechanism is still uncovered. We hypothesized that direct stimulation of host tracheal sensory neuron by *B. pertussis* induce coughing during infection. To investigate this, we performed calcium imaging analysis to examine the interaction between bacterial lysates and rat sensory neurons. However, the specific neural stimulation by coughing-inducing bacterial lysates was not identified. In this work, we could not analyze the host neuron-bacteria interaction.

研究分野：病原細菌の分子生物学

キーワード：百日咳 感覚神経 カルシウムイメージング

1. 研究開始当初の背景

百日咳は、百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) の上部気道感染によって起こる伝染性の疾病である。患者は本症で特徴的な発作性の咳嗽により無呼吸状態に陥るためチアノーゼや痙攣、さらには脳症を起こし、重篤な場合は死に至る。WHO によると、本疾患により毎年世界で約 20 万人が死亡している。主に発展途上国での乳幼児感染が最も問題視されているが、先進国においても乳幼児期に接種したワクチン効果の減弱した青年期の感染や、ワクチン成分と抗原性の異なる抗原変異株の出現で罹患数が増加しており、再興感染症の一つに挙げられている。百日咳の重要な症状である発作性咳嗽の発症機構は全く明らかにされていない。

2. 研究の目的

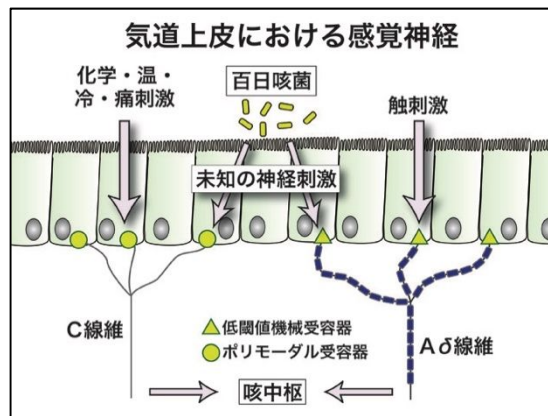
咳発作の原因が未解明である理由の一つとして、咳嗽発作の動物モデルが存在しなかったことが挙げられる。研究代表者は、百日咳菌およびその近縁種と種々の動物の組み合わせで感染実験を繰り返した結果、百日咳菌よりも広い宿主域を持つ気管支敗血症菌とラットの組み合わせで、簡便に咳発作を再現する感染動物モデルを確立することに成功している。気管支敗血症菌は、広範な種類の哺乳動物に感染して百日咳類似の咳嗽発作を起こし、かつ多くの病原因子を百日咳菌と共有するため、百日咳菌の格好のモデル菌種として知られている。また、百日咳菌は、ラットに慢性感染はしないものの、大量に接種した場合は同様に咳嗽発作が誘導されることも確認している。

一般的な咳発作は、粘液や化学物質によって気道の求心性感覚神経が刺激されることで誘発される。研究代表者は、上記ラット感染モデルの解析により、生菌だけでなく菌体抽出物の鼻腔内投与でも咳嗽発作は誘導され、咳嗽発作を起こしている宿主の気道には炎症像や組織障害は観察されないことを初めて明らかにしている。つまり、ボルデテラ属菌による咳嗽発作は気道の炎症や組織障害によるものではなく、神経性の症状である可能性が高い。また、百日咳は、気道から菌が排除されたあとも長期間持続する可塑性に乏しい症状である。研究代表者は、ラット感染モデルでも同様に、菌体排除後も咳嗽発作が続くことを見出している。以上のことから、研究代表者は、百日咳の咳嗽発作は、細菌によって求心性感覚神経が何らかの不可逆的な修飾を受けて過敏になるために起こると考えた(右上図)。そこで、ラット感染モデルにおける咳嗽発作を対象として、その神経作用機構の解明を目指すこととした。

3. 研究の方法

(1)ラット感覚神経を用いたカルシウムイメージング系の確立

ボルデテラ属菌はラット気道感染時に咳



嗽反射を誘導する。その気道神経への刺激を詳細に解析するため、*in vitro*での神経イメージング系の確立を行った。カルシウム指示薬は Fura-2 (同仁化学) を用いた。Fura-2 は細胞の大きさや自家蛍光に影響を受けずに、細胞内 Ca^{2+} 濃度を検出可能であり、既にラット NG 神経の Ca^{2+} イメージングに用いられている。

ラット感覚神経を後根神経節から外科的に取り出し、感覚神経の初代培養系を確立した。次に、初代培養系とカルシウム指示薬を組み合わせることでカルシウムイメージング系を構築した。

(2) 気管支敗血症菌の菌体破砕液による咳発作誘導能の検討

in vitro 解析を簡便にするため、菌体破砕液が咳発作誘導能を持つか否かをラット咳発作モデルによって検討した。病原因子を恒常的に産生する気管支敗血症菌の変異株 Bvg-plus 株と病原因子を産生しない変異株 Bvg-minus 株を用いて、その菌体破砕液による咳発作能を検討した。

(3) 気管支敗血症菌の菌体破砕液を用いたカルシウムイメージング系による神経刺激作用の解析

気管支敗血症菌の Bvg-plus 株と Bvg-minus 株の菌体破砕液を用いて、(1)で構築したカルシウムイメージングを行い、菌体破砕液によるラット感覚神経への神経刺激作用を観察した。

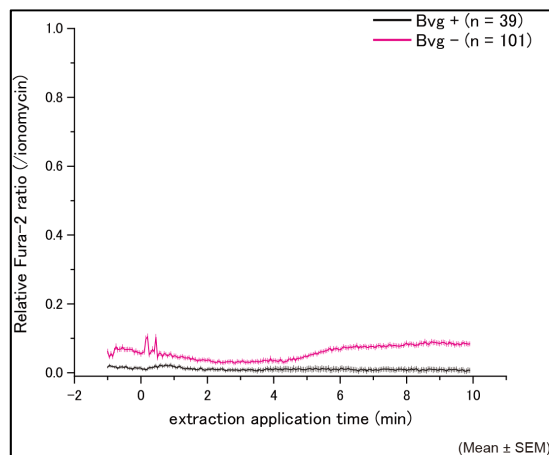
4. 研究成果

初年度は後根神経節の感覚神経 (DRG ニューロン) の初代培養系とカルシウムイメージング系の確立を行った。初代培養系は、当初は細胞の生存率が悪くイメージングに使用できなかったが、(1)血液灌流後に解剖する、(2)解剖液を二酸化炭素で緩衝する、(3)余計な組織を混入させないために、実体顕微鏡下で解剖する、等の工夫によって、生存率が良い初代培養系の構築が可能となった。DRG ニューロンの初代培養系では Fura-2 による Ratiometric 解析によって、TRPV1 リガンドであるカプサイシンおよび TRPA1 リガンドである AITC による細胞内カルシウム濃度の上昇を観察することに成功した。

第二年度は、菌体破砕液による咳発作能の

検討を行った。DRG ニューロンの観察は数十分という単位で行うため、生菌の感染は難しい。そのため、菌体破砕液でのカルシウムイメージングを行うため、菌体破砕液がラットに咳発作を誘導するか検討する必要があった。ボルデテラ属菌の病原因子はBvgASという二成分制御系によって調節されている。そのセンサーキナーゼであるBvgSに変異を導入することで、BvgASが常に活性化しているBvg-plus株と、全く活性化しないBvg-minus株を、咳モデルで使用している気管支敗血症菌S798株を遺伝学的背景として新たに作製した。これらの株の菌体破砕液を作製し、ラットに計5日間接種した。その結果、生菌の感染と同様に、Bvg-plus株の菌体破砕液ラットは咳発作を誘導した。一方、Bvg-minus株の菌体破砕液は咳発作を誘導しなかった。

次に、これらの菌体破砕液を用いて、DRGニューロンへの神経刺激作用を解析した。その結果、Bvg-plus株およびBvg-minus株の菌体破砕液は微弱ながら同程度に神経刺激作用を示した(下図)。これは、菌体由来成分による非特異的な神経刺激作用であると推測される。両者で差が観察されなかったことから、この実験系では、Bvg-plus株の菌体破砕液に含まれるであろう咳発作誘導因子が神経刺激作用を持つか否かを解析することは不可能であると結論づけた。



本研究課題の研究成果は、ラット DRG ニューロンのカルシウムイメージング系を確立したことにある。このことは、咳発作誘導因子をラット咳発作モデルの解析から同定した後に、カルシウムイメージング系によってその神経刺激作用を解析することに繋がる。また、当初の目的とは異なるが菌体破砕液による咳発作誘導能を発見したことは今後の咳発作機構の解明に大いに役立つと考えられる。

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3件)

1. Nishikawa S, Shinzawa N, Nakamura K, Ishigaki K, Abe H, Horiguchi Y,

The *bvg*-repressed gene *brtA*, encoding biofilm-associated surface adhesin, is expressed during host infection by *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol. Immunol.* 2016 Feb;60(2):93-105. doi: 10.1111/1348-0421.12356. 査読有

2. Abe H, Kamitani S, Fukui-Miyazaki A, Shinzawa N, Nakamura K, Horiguchi Y.

Detection of genes expressed in *Bordetella bronchiseptica* colonizing rat trachea by in vivo expressed-tag immunoprecipitation method. *Microbiol Immunol.* 2015 May;59(5):249-61. doi: 10.1111/1348-0421.12247. 査読有

3. Okada K, Abe H, Ike F, Ogura Y, Hayashi T, Fukui-Miyazaki A, Nakamura K, Shinzawa N, Horiguchi Y.

Polymorphisms influencing expression of dermonecrotic toxin in *Bordetella bronchiseptica*. *PLoS One.* 2015 Feb 2;10(2):e0116604. doi: 10.1371/journal.pone.0116604.

eCollection 2015. 査読有

[学会発表](計12件)

1. Ishigaki K, Nishikawa S, Shinzawa N,

Horiguchi Y. Development of the novel genomic integration system to study the host tropism of *Bordetella* spp. 11th International *Bordetella* Symposium 2016年4月6日 アルゼンチン・ブエノスアイレス

2. 福井理、戸嶋ひろ野、新澤直明、中村佳司、安倍裕順、堀口安彦 百日咳菌が産生するアデニレートサイクラーゼ毒素は気道の組織傷害を引き起こす 第89回日本細菌学会総会 2016年3月25日 大阪府

3. 新澤直明、鈴木孝一朗、元岡大祐、中村昇太、堀口安彦 In vivo RNA-seq revealed infection-linked expression pattern of *Bordetella pertussis* within host. 第89回日本細菌学会総会 2016年3月24日 大阪府

4. 中村佳司、神谷重樹、安倍裕順、新澤直明、堀口安彦 百日咳の病態発生機序解明に向けた感染動物モデルの確立 第89回日本細菌学会総会 2016年3月23日 大阪府

5. 石垣佳祐、新澤直明、堀口安彦 ボルデテラ属菌の宿主特異性決定機構解明に向けたゲノム相補システムの開発 第89回日本細菌学会総会 2016年3月23日 大阪府

6. 新居佑規、中村佳司、鈴木孝一朗、安倍裕順、新澤直明、堀口安彦 Analysis of roles of pertussis toxin in infection. 第89回日本細菌学会総会 2016年3月23日 大阪府

7. 石垣佳祐、新澤直明、堀口安彦 ボルデテラ属菌の宿主特異性決定機構解明に向け

たゲノム相補システムの開発 第9回細菌学
若手コロッセウム 2015年11月23
日 鹿児島県

8. Nishikawa S, Shinzawa N, Ishigaki K, Abe
H, Horiguchi Y Biofilm-associated
Bordetella RTX surface adhesin (BrtA) is
expressed during animal infection. The
14th Awaji International Forum on
Infection and Immunity 2015年9月1
0日 兵庫県

9. 福井理、戸嶋ひろ野、新澤直明、安倍裕
順、堀口安彦 *Bordetella pertussis*
adenylate cyclase toxin (ACT), but not *B.*
bronchiseptica ACT, participates in
severe tissue damage. 第4回感染症若手フ
ォーラム 2015年9月8日 兵庫県

10. 照屋志帆乃、中村佳司、福井理、安倍裕
順、新澤直明、堀口安彦 An attempt to
identify the receptor for *Bordetella*
dermonecrotic toxin. 第88回日本細菌学会
総会 2015年3月27日 岐阜県

11. 西川明芳、新澤直明、安倍裕順、福井理、
堀口安彦 Biofilm-associated *Bordetella*
RTX surface adhesin (BrtA) is expressed
during animal infection. 第88回日本細菌
学会総会 2015年3月26日 岐阜県

12. 石垣佳祐、新澤直明、堀口安彦
Construction of BAC-based vector for
genomic complementation of *Bordetella*
spp.. 第88回日本細菌学会総会 2015
年3月26日 岐阜県

〔その他〕

ホームページ等

<http://bactox1.biken.osaka-u.ac.jp/LabWeb/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

新澤 直明 (SHINZAWA, Naoaki)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：10583015

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：