

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04075

研究課題名(和文)百日咳菌の咳誘発性病原因子の探索と咳誘発機構の解明

研究課題名(英文)Study on the mechanism of paroxysmal coughing seen in pertussis

研究代表者

堀口 安彦(Horiguchi, Yasuhiko)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：00183939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：百日咳は百日咳菌感染による発作性咳嗽(咳発作)を主徴とする呼吸器感染症である。本研究課題ではマウス感染モデルを用いて、百日咳菌による咳発症メカニズムの解明を目指した。その結果、咳発作には百日咳菌の3種の病原因子、A、B、Cが関わっており、Cが咳発作のトリガーとなり、その増幅と持続にはA因子が必要で、B因子は修飾的に咳発作を増幅することが判った。さらに、A-C因子を百日咳菌から精製して投与したところ、生菌感染あるいは菌体破砕液投与と同程度の咳発作が見られた。この結果から、A-C因子が咳発作因子であることが確定的となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果からマウスの咳発作に必要な百日咳菌の病原因子が3種類同定でき、それぞれの咳発作メカニズムに関わるヒエラルキーもある程度予想できるまでになった。動物の咳反射応答のメカニズムにはまだ不明な点が多いが、基本的な経路のいくつかは明らかにされつつある。これらの既知の咳反射応答の経路に百日咳菌病原因子がどのように関わるのかについては、今後の大きな研究課題である。百日咳菌病原因子の機能解析を通じた成果は、百日咳の咳発作の原因療法の解析に道を拓くほか、基礎生命科学の面から見て動物の咳反射応答の全容解明に貢献するものと期待できる。

研究成果の概要(英文)：Whooping cough, Bordetella pertussis infection, is characterized by paroxysmal cough, the mechanism of which has not been studied because of lack of a versatile animal model reproducing the cough. In this study, we established an experimental mouse model to reproduce the coughing by B. pertussis infection. By using this model, we identified three distinct bacterial virulence factors, which were tentatively designated A, B, and C as the causative agents for the cough. When intranasally administered, purified preparations of the three factors produced coughing in mice, indicating these three factors were necessary and sufficient to cause coughing. Further analyses demonstrated that factor C triggers to evoke coughing and factor A amplifies and sustains the factor C-evoked signals. Factor B was considered to exacerbate the effect of factor C.

研究分野：細菌学

キーワード：百日咳菌 発作性咳嗽 動物モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

百日咳は百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) によって起こる特徴的な咳発作を伴う呼吸器感染症である。WHO によると本疾患による死亡者は年間約 20-30 万人におよぶ。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者数が増加しており、いわゆる再興感染症の一つに挙げられている。百日咳で見られる咳発作は患者に多大な負荷を強い、ときに死因に直結するがその発症機構は現在まで不明である。そのため臨床現場では、咳発作には対症療法を持って処置せざるを得ないのが現状である。

百日咳菌が分類されるボルデテラ属では、百日咳菌以外にパラ百日咳菌 (*B. parapertussis*) と気管支敗血症菌 (*B. bronchiseptica*) が気道感染性の病原性細菌 (classical *Bordetella*) として知られており、百日咳菌と同様に感染宿主に咳発作を起こす。そのためボルデテラ属細菌による咳発作の原因因子は、これらの三種の菌が共通して産生する相同性の高い病原因子 (仮に「咳毒素」と呼ばれる因子) であろうと予測されていたが、その本態は全く不明であった。百日咳菌はヒトに特化した病原細菌であるために、百日咳の咳発作を再現する汎用性の高い動物モデルの確立がきわめてむずかしい。このことが百日咳の感染や咳症状の解析を進める上での障害となっていた。

一方、申請者らは百日咳菌に比べて広範な宿主域を持つ気管支敗血症菌に着目し、ラット、マウス、モルモットなど汎用性の高い実験小動物と気管支敗血症菌との組み合わせで感染実験を検討した結果、簡便に咳発作を再現する気管支敗血症菌感染ラットモデルの確立に成功した。気管支敗血症菌は多くの病原因子を百日咳菌と共有するため百日咳菌のモデル菌種としてもよく利用されている。さらにこのラット感染モデルにおいて、咳発作をほとんど起こさない気管支敗血症菌の自発変異株を分離し、これを利用して咳発作発症機構の解析を実施した (平成 23-25 年度・26-28 年度科学研究費補助金基盤研究(B)課題)。その結果、この自発変異株の変異責任遺伝子は抗シグマ因子をコードする *bspR* であり、BspR の下流で転写制御を受ける遺伝子が本菌による咳発作に関与することが明らかとなった。

一方、申請者らが開発したラット感染モデルでは、百日咳菌の大量投与でも咳発作を再現することができるので、百日咳菌の *bspR* 欠損株を感染モデルに用いたところ、予想外なことに *bspR* 欠損株は野生型と同等の咳発作を誘発した。また百日咳の咳発作は百日咳菌抗原による免疫で予防できることが知られているが、この抗原で免疫したラットに気管支敗血症菌を感染させた場合は、免疫・非免疫にかかわらず同等に咳発作が見られた。これらの結果は、気管支敗血症菌と百日咳菌による咳誘発メカニズムが必ずしも同一ではないことを示している。そこで申請者らは、ボルデテラ属細菌による咳発作の発症機構の全容を解明するためには、気管支敗血症菌による解析とは別に、百日咳菌を用いた咳発作の解析が必要であると考え、気管支敗血症菌における BspR の下流因子の同定を進める一方で、これに併行して百日咳菌の感染動物モデルの確立にも着手した。この目的のため、これまでの一連の研究で得られたノウハウを利用して検討したところ、ある特定の系統のマウスが百日咳菌感染に応答して再現よく咳発作を示すことを発見した (特許出願:特願 2016-197288)。このことにより、気管支敗血症菌をモデルに用いるまでもなく、百日咳菌を利用した動物実験で咳発作の発症メカニズムを解析する道が拓かれた。

2. 研究の目的

本研究課題では、上述の百日咳菌によるマウス感染モデル (当申請では BpC (*B. pertussis* cough) モデルと呼ぶ) を利用して、百日咳菌による咳発作に関与する病原因子を同定し、その

構造と機能を明らかにして咳発作の発症機構を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) BpCモデルに用いる百日咳菌株の検討

当研究室で保存する実験室内標準株や臨床分離株から菌体破砕液を作製し、それぞれの咳誘発能を BpC モデルにおいて比較した。

(2) 既知病原因子が咳発症に関与するかどうかの検討

18323株を親株として、既知の主要病原因子（アデニル酸サイクラーゼ毒素、百日咳毒素、壊死毒素、繊維状赤血球凝集素など）の欠失変異株を作製し、それぞれの菌体破砕液の咳誘発能を検討した。

(3) ボルデテラの非病原性の表現型を持つBvg⁻相と病原性のあるBvg⁺相の咳誘発能の比較

百日咳菌を含む classical *Bordetella* は非病原性とされるBvg⁻相と病原性とされるBvg⁺相の間で相変化する。一般に相変化は生育環境の変化によって起こるが、環境応答シグナル伝達分子であるBvgSに変異を挿入することによって、恒常的なBvg⁻株とBvg⁺株をそれぞれ人為的に作製することができる。そこで、作製した恒常的 Bvg⁻ 株および Bvg⁺ 株から菌体破砕液を作製し、BpCモデルにおいて咳誘発能を検討した。

(4) 百日咳菌投与による咳発症の諸条件検討

さらに野生型を含めた種々の変異菌株の生菌および菌体破砕液をBpCモデルに供試し、候補となる病原因子を絞り込んだ。また、56°C1時間等の条件で熱処理した菌体破砕液、あるいは種々の試薬によって処理した菌体破砕液をBpCモデルに供し、それぞれについても咳誘発能を検討した。

4. 研究成果

BpC モデルにおいて、当研究室で保有する百日咳菌株間の咳誘導能を比較したところ、標準株の一つである 18323 株の咳誘導能が優れて高いことがわかった。そこで本株を使用して、咳誘導能の詳細を検討することにした。

BpC モデルでは、生菌感染のみならず菌体破砕液の鼻腔内投与によってもマウスが発咳することを発見した。このことにより、遺伝子欠損百日咳菌の感染のみならず、菌体成分を組み合わせることで発咳の解析が可能となった。その結果、以下の事項が明らかとなった。

咳誘発に関わる細菌成分を3種類を同定した。そのうち2種はタンパク質(AおよびB)で1種は非タンパク成分(C)であった。AあるいはCを欠損させた菌を感染させた場合、咳は全く起こらず、Bを欠損させた場合は咳の頻度が著しく低下した。それぞれの因子の基本的機能はこれまでに明らかにされているので、それらの特異的阻害剤を発咳モデルで併用したところ、咳の回数が有意に低下した。さらにそれぞれの作用機序に関連する分子のノックアウトマウスを作製して発咳を調べたところ、いずれも発咳が消失あるいは著しく低下した。

さらに、A因子、B因子、C因子を百日咳菌から精製し、それぞれの組み合わせで動物実験に供したところ、それぞれ単独投与ではほとんど発咳がなく、A因子とC因子の組み合わせで中程度の発咳が見られ、ここにB因子を加えることにより、生菌感染あるいは菌体破砕液投与と同程度の発咳が見られた。この結果から、A-C因子が発咳因子であることが確定的となった。以上の結果を総合して、C因子が発咳のトリガーとなり、発咳の著しい増幅と持続にはA因子が必要であ

り、B 因子は修飾的に発咳を増幅することが判った。

さらに、この研究過程において、我が国のワクチン親株である百日咳菌 Tohama 株はマウスに咳を誘発しないことを発見した。A-C 因子に基づく解析を進めたところ、Tohama 株の 3 因子の投与でも発咳を再現することができたが、同株の菌体破碎液では発咳はほとんど見られなかった。この結果から、Tohama 株の菌体破碎液には 3 因子のいずれかあるいは全ての働きを抑制する因子が存在することが考えられた。

本研究の成果からマウスの咳発作に必要な百日咳菌の病原因子が 3 種類同定でき、それぞれの咳発作メカニズムに関わるヒエラルキーもある程度予想できるまでになった。動物の咳反射応答のメカニズムにはまだ不明な点が多いが、基本的な経路のいくつかは明らかにされつつある。これらの既知の咳反射応答の経路に百日咳菌病原因子がどのように関わるのかについては、今後の大きな研究課題である。百日咳菌病原因子の機能解析を通じた成果は、百日咳の咳発作の原因療法の解析に道を拓くほか、基礎生命科学の面から見て動物の咳反射応答の全容解明に貢献するものと期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hiramatsu Yukihiko, Suzuki Koichiro, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Horiguchi Yasuhiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Expression of small RNAs of Bordetella pertussis colonizing murine tracheas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12791	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Teruya Shihono, Hiramatsu Yukihiko, Nakamura Keiji, Fukui-Miyazaki Aya, Tsukamoto Kentaro, Shinoda Noriko, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Ishigaki Keisuke, Shinzawa Naoaki, Nishida Takashi, Sugihara Fuminori, Maeda Yusuke, Horiguchi Yasuhiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Bordetella Dermonecrotic Toxin Is a Neurotropic Virulence Factor That Uses CaV3.1 as the Cell Surface Receptor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e03146-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mBio.03146-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hiramatsu Yukihiko, Osada Oka Mayuko, Horiguchi Yasuhiko	4. 巻 63
2. 論文標題 Bordet Gengou agar medium supplemented with albumin containing biologics for cultivation of bordetellae	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 513 ~ 516
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12742	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Keiji, Shinoda Noriko, Hiramatsu Yukihiko, Ohnishi Shinya, Kamitani Shigeki, Ogura Yoshitoshi, Hayashi Tetsuya, Horiguchi Yasuhiko	4. 巻 4
2. 論文標題 BspR/BtrA, an Anti- Factor, Regulates the Ability of Bordetella bronchiseptica To Cause Cough in Rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e00093-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mSphere.00093-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fukui-Miyazaki Aya, Toshima Hirono, Hiramatsu Yukihiro, Okada Keisuke, Nakamura Keiji, Ishigaki Keisuke, Shinzawa Naoaki, Abe Hiroyuki, Horiguchi Yasuhiko	4. 巻 9
2. 論文標題 The Eukaryotic Host Factor 14-3-3 Inactivates Adenylate Cyclase Toxins of <i>Bordetella bronchiseptica</i> and <i>B. pertussis</i> , but Not <i>B. pertussis</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e00628-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.00628-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishigaki Keisuke, Shinzawa Naoaki, Nishikawa Sayaka, Suzuki Koichiro, Fukui-Miyazaki Aya, Horiguchi Yasuhiko	4. 巻 3
2. 論文標題 Ectopic Expression of O Antigen in <i>Bordetella pertussis</i> by a Novel Genomic Integration System	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e00417-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mSphere.00417-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Dendi Krisna Nugraha, 山口博之, 堀口安彦
2. 発表標題 <i>Bordetella bronchiseptica</i> utilizes <i>Acanthamoeba castellanii</i> as a temporal niche
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平松征洋, 岡真優子, 堀口安彦
2. 発表標題 Modification of Bordet-Gengou agar medium for cultivation of <i>bordetellae</i>
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平松征洋、岡真優子、堀口安彦
2. 発表標題 ボルデテラ属細菌培養用Bordet-Gengou培地の改良
3. 学会等名 第72回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平松征洋、照屋志帆乃、中村佳司、福井理、塚本健太郎、堀口安彦
2. 発表標題 Identification of Bordetella dermonecrotic toxin recepto
3. 学会等名 The 18th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 照屋志帆乃、平松征洋、篠田典子、塚本健太郎、中村佳司、石垣圭祐、堀口安彦
2. 発表標題 ボルデテラ壊死毒 (DNT) の受容体同定を通じた百日咳病態の解析
3. 学会等名 第66回トキシシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shihono Teruya, Yukihiro Hiramatsu, Noriko Shinoda, Kentao Tsukamoto, Keiji Nakamura, Aya Fukui-Miyazaki, Keisuke Ishigaki, Yasuhiko Horiguchi
2. 発表標題 entification of Bordetella dermonecrotic toxin receptor
3. 学会等名 ETOX19 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 照屋志帆乃、平松征洋、篠田典子、塚本健太郎、中村佳司、福井理、石垣佳祐、新澤直明、堀口安彦
2. 発表標題 Identification of Bordetella dermonecrotic toxin receptor
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 照屋志帆乃、中村佳司、石垣佳祐、新澤直明、堀口安彦
2. 発表標題 ボルデテラ壊死毒(DNA) の細胞受容体同定
3. 学会等名 第65回トキシシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 照屋志帆乃、塚本健太郎、福井理、中村佳司、石垣佳祐、新澤直明、堀口安彦
2. 発表標題 受容体同定を通じたボルデテラ壊死毒(DNT) の標的組織探索
3. 学会等名 第71回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野田直記、平松征洋、照屋志帆乃、鈴木孝一郎、堀口安彦
2. 発表標題 百日咳菌のV型分泌装置Vag8の機能的解析
3. 学会等名 第71回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keisuke Ishigaki, Naoaki Shinzawa, Sayaka Nishikawa, Koishiro Suzuki, Yasuhiko Horiguchi
2. 発表標題 Ectopic Expression of O Antigen in Bordetella pertussis by a Novel Genomic Integration System
3. 学会等名 The 16th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 百日咳に対する鎮咳薬および百日咳に対する鎮咳薬のスクリーニング法	発明者 堀口安彦、平松征洋	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-087332	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	杉浦 孔明 (Sugiura Koumei) (60470473)	国立研究開発法人情報通信研究機構・先進的音声翻訳研究開発推進センター先進的音声技術研究室・主任研究員 (82636)	
研究協力者	新澤 直明 (Shinzawa Naoaki)		