

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08080

研究課題名(和文)牛呼吸器病症候群における複数病原体感染による重症化機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of severity for bovine respiratory diseases couples with polymicrobial infection

研究代表者

岡林 環樹 (Tamaki, Okabayashi)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：10359995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：牛呼吸器症候群(BRDC)の重症化機序を明らかにするために、牛呼吸器上皮細胞を樹立し、牛RSウイルス(BRSV)感染時の*Pasteurella multocida*(PM)の付着性について調べた。正常状態では、牛の上部気道の喉頭由来上皮細胞では、下部よりもPM付着性が高かった。しかしBRSV感染状態では喉頭上皮細胞におけるPM付着性は低下し、下部気道の気管、肺胞由来上皮細胞でのPM付着が増強された。これらの結果は、上部気道では、正常状態では細菌感染に対する防御壁と機能するが、BRSV感染時にはその防御壁の解放が起こり、下部気道での細菌付着亢進を起し、BRDCの重症化に繋がることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

牛呼吸器症候群(BRDC)は、それぞれの病原体に対するワクチン、抗菌薬治療が可能にも関わらず、牛産業界においてもっとも大きな経済被害を引き起こす疾病の一つである。現在までに、複合感染による重症化機序は明らかにされていなかった。我々の研究では、世界で初めて牛呼吸器上皮細胞培養系の樹立に成功し、実験室内での病原性解明を可能にしたことは本分野における大きな躍進であると考えられる。

また、これらの上皮細胞系を用いたBRSVとPMの複合感染による重症化機序を分子レベルで解明したことは、学術的にはもちろん、今後の牛産業界における新たな診断・予防・治療研究に対する基盤情報として社会に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Bovine respiratory disease complex (BRDC) is a major disease affecting the global cattle industry. Bovine respiratory syncytial virus (BRSV) is a primary causative agent of BRDC and *Pasteurella multocida* (PM) was the most common bacterial agent paired with virus in BRDC. We established bovine respiratory epithelial cell (BRECs) from trachea (bTECs), bronchus (bBECs) and lung epithelial cells (bLECs) of adult Japanese black cattle and performed comparative analyses to examine the interaction between BRSV and PM. PM adherences to BRSV-infected bBECs and bLECs were significantly higher ( $p < 0.05$ ) than those on BRSV-infected bTECs. Interestingly, PM adherence on uninfected bTECs was significantly higher than those on bBECs and bLECs.

These results suggested that BRSV infection plays an important role for bacterial adherences in lung. While, upper respiratory epithelial cells efficiently capture PM as a “gateway” of respiratory tract.

研究分野：ウイルス感染症

キーワード：牛呼吸器症候群 牛RSウイルス パスツレラ 複合感染 呼吸器上皮細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

牛呼吸器症候(BRDC)の集団発生は、子牛を中心に爆発的な感染拡大をおこし、畜産業に多大な被害を及ぼす。その背景には、近年の多頭飼育による密飼いが呼吸器感染症の集団発生の要因となっていることが報告されている。また、ウイルス感染は無症状、軽症であることが多いためキャリア牛の検出が難しく、このことが子牛への BRDC 感染を防ぎきれない要因となっている。しかし、牛を用いた感染実験の実施は難しく、また、牛呼吸器に由来する細胞も樹立されておらず、in vivo/in vitro における研究が進んでいない状態であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、BRDC に関連する複数の病原体の存在を、ウイルス、細菌ともに明らかにし、これらの複数の病原体が、呼吸器感染時の侵入門戸となる牛呼吸器上皮細胞において、どのような相互関係にあるのかを、明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

宮崎県およびその周辺県の農場から牛の鼻腔スワブを採取し(n=101)、BRDC に関連する病原体、牛 RS ウイルス(BRSV)、牛ウイルス性下痢ウイルス、牛パラインフルエンザ 3 型、牛ヘルペスウイルス 1 型、*Pasteurella multocida*、*Mannheimia haemolytica*、*Histophilus somni*、*Mycoplasma bovis* のの遺伝子を標的とした RT-PCR を実施し、複合感染の実態について明らかにした。牛呼吸器症候群の実態を明らかにするために、牛呼吸器由来上皮細胞株の樹立に取り組んだ。宮崎県食肉検査処理場から健康牛(黒毛牛 N=3)から喉頭、気管支、肺胞器官を入手し、喉頭、気管支、肺胞上皮細胞の初代培養系を作製した。これらの上皮細胞列に牛 RS ウイルス(BRSV)を先行感染させ、パストレラの付着性への影響を比較した。その時の誘導されるサイトカインの mRNA を測定した。BRSV 感染時に、各細胞列にて影響を受ける細胞表面蛋白質を特定するために、BRSV 感染細胞を用いたプロテオーム解析を行った。これらの影響を受ける蛋白質の発現をウエスタンブロットにて確認した。BRSV の感染によって発現影響を受ける細胞表面蛋白質のパストレラ付着への影響を調べるために、それぞれの蛋白質に対して、特異的抗体処理、siRNA、プラスミド構築による過剰発現系細胞の樹立を行った。

### 4. 研究成果

BRDC 病原体遺伝子陽性率は 81%であり、陽性検体中の 57%から 2 種以上の病原体遺伝子が検出できた。2 種類以上の病原体遺伝子が検出された検体において、ウイルスと細菌の組み合わせが 49%を占めた。これらのウイルスと細菌の複合検出検体の組み合わせとしては、BRSV とパストレラの組み合わせが多くみられた。そのため、BRSV とパストレラの混合感染について検討した。

宮崎県食肉検査処理場から健康牛(黒毛牛 N=3)の喉頭、気管支、肺胞器官を入手し、気管上皮、気管支上皮、肺胞上皮細胞の初代培養系を作製した。これらの細胞は、継代 4 代目で 95%以上が上皮細胞であることを上皮細胞特異的蛋白質パンサイトケラチンの発現量を測定することにより確認した。また 20 代目まで細胞生存性に影響なく継代することを確認した。

BRSV 感染後、喉頭、気管上皮細胞では細胞変性効果は観察できなかったが、肺胞上皮細胞においては顕著な合体体の形成がみられた。また肺胞上皮細胞における炎症性サイトカイン mRNA(IL-1、IL-6)の発現は、気管上皮細胞よりも有意に高かった。

これらの BRSV 感染呼吸器由来上皮細胞におけるパストレラの付着性について検討した。下部気道由来の気管支上皮細胞、肺胞上皮細胞においては、ウイルス感染日数に依存して、パストレラの付着性亢進が確認できた。これに対して、上部気道由来の気管上皮細胞においては、ウイルス感染日数が経過するにつれてパストレラの付着性が減少するという相反する結果が得られた。以上の結果より、牛の上部気道由来上皮細胞と下部気道由来上皮細胞においては BRSV 感受性、および BRSV 感染後の二次感染を想定したパストレラの付着性に大きな違いがあることを明らかにした。

牛呼吸器上皮細胞における牛 RS ウイルス(BRSV)感染時のパストレラの付着性に関連する細胞表面分子について検討した。BRSV が感染した喉頭、気管、肺胞由来上皮細胞を対象としたプロテオミクス解析を実施し、BRSV 感染により影響を受ける細胞表面分子を網羅的にスクリーニングした。喉頭上皮細胞では、BRSV 感染により ICAM-1 の発現が有意に抑制された。また肺胞上皮細胞では PAF 受容体の発現が他の細胞よりも有意に亢進された。喉頭上皮細胞において、ICAM-1 機能をその特異的抗体や siRNA により抑制すると、PM 付着能が低下することを確認した。このことは、ウイルス感染がない状態では喉頭上皮細胞が ICAM-1 を介して PM を結合するが、BRSV 感染により ICAM-1 発現が抑制されて、それに伴い PM が下部気道に流れる可能性を示唆した。この結果上部気道では ICAM-1 を介して、下部気道への細菌侵入を防ぐ "Gateway" 機能があり、その機能が BRSV により破綻することを明らかにした。また、下部気道の肺胞上皮細胞では BRSV 感染により亢進された PFA 受容体は、その特異抗体、siRNA、阻害剤によりその機能を抑制すると、PM が結合しなくなることを確認した。またウシ由来 PAF 受容体遺伝子をクローニングし、その発現プラスミドを導入した細胞においては、PM の結合能が亢進していることを確認し、PM と PAF

受容体とが単独で結合することを確認した。つまり BRSV 感染が PAF 受容体発現を亢進し、PM の結合を促進することかによる、BRDC の重症化に導く可能性を示唆した。このように BRSV 感染は、上部気道では細菌感染に対する防御壁を解放し、下部気道では細菌付着亢進により BRDC の重症化を促していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Putu Eka Sudaryatma, Kimika Nakamura, Hirohisa Mekata, Satoshi Sekiguchi, Meiko Kubo, Ikuo Kobayashi, Mawar Subangkit, Yoshitaka Goto, Tamaki Okabayashi	4. 巻 220
2. 論文標題 Bovine Respiratory Syncytial Virus Infection Enhances Pasteurella multocida Adherence on Respiratory Epithelial Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Veterinary Microbiology	6. 最初と最後の頁 33-38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.04.031">https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.04.031</a>	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 該当する

1. 著者名 Sudaryatma Putu Eka, Mekata Hirohisa, Kubo Meiko, Subangkit Mawar, Goto Yoshitaka, Okabayashi Tamaki	4. 巻 235
2. 論文標題 Co-infection of epithelial cells established from the upper and lower bovine respiratory tract with bovine respiratory syncytial virus and bacteria	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Veterinary Microbiology	6. 最初と最後の頁 80～85
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vetmic.2019.06.010	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 Putu E. Sudaratma, Akatsuki Saito, Hirohisa Mekata, Meiko Kubo, Wacharapong Fahkrajang, Eugene Mazimpaka, Tamaki Okabayashi	4. 巻 in press
2. 論文標題 Bovine respiratory syncytial virus enhances the adherence of Pasteurella multocida to bovine lower respiratory epithelial cells by up regulating platelet-activating factor receptor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2020.01676	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Putu Eka Sudaryatma, Nakamura Kimika, Mekata Hirohisa, Sekiguchi Satoshi, Kubo Akiko, Kobayashi Ikuo, Mawar Subangkit, Goto Yoshitaka, Okabayashi Tamaki
2. 発表標題 Bovine Respiratory Syncytial Virus Infection enhances Pasteurella multocida Adherence on Respiratory Epithelial Cell Lines
3. 学会等名 The 30th World Buiatrics Congress 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村公香、Puts Eka Sudaratma、目堅博久、関口敏、小林郁雄、Mawar Subangkit、後藤義孝、岡林環樹
2. 発表標題 牛RSウイルス感染呼吸器上皮細胞におけるPasteurella multocida付着性の増強
3. 学会等名 平成29年度獣医学術九州地区学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Puts Eka Sudaratma、中村公香、目堅博久、関口敏、小林郁雄、Mawar Subangkit、後藤義孝、岡林環樹
2. 発表標題 Enhancement of Pasteurella multocida Adherence on Respiratory Epithelial Cell Lines by Bovine Respiratory Syncytial Virus Infection
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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