

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07561

研究課題名（和文）新たな百日咳ワクチンの開発に向けて-外膜ベシクルと宿主細胞の相互作用

研究課題名（英文）Interaction between outer membrane vesicles and host cells- targeting the development of a new pertussis vaccine

研究代表者

花輪 智子（Hanawa, Tomoko）

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：80255405

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：メンブレンベシクル（MV）は細菌が分泌する小胞であり病原性の発現に関与している。百日咳菌により分泌される外膜ベシクル（OMV）は、新たなワクチンとして注目されていることから本研究では浮遊菌とバイオフィーム（BF）由来のOMVに含まれているタンパク質を比較した。その結果、共通に含まれている病原因子が見つかった他含まれている病原因子の種類に違いが認められた。また、これらのOMVはマクロファージ系培養細胞株であるJ774および肺胞上皮細胞であるA549に対して細胞毒性を示した。以上の結果から、浮遊菌とBF由来のOMVはどちらも病原性に関与しているものの役割が異なっている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

OMVについては真核細胞の放出する小胞であるエクソゾームとの類似点も多く、近年多くの発見があった。中でも細菌のバイオフィームからのベシクルの分泌にはファージ由来のエンドライシンが関与する新たな機構が発見された。従って、百日咳菌のバイオフィームから放出されるOMVは浮遊菌から放出されるOMVとは異なる機構分泌されることが予想された。本研究の成果は百日咳ワクチンの開発に重要な知見となる。

研究成果の概要（英文）：Membrane vesicle (MV) is a vesicle with a diameter of 30-250 nm secreted by bacterial cells and contains virulence factors. Therefore, outer membrane vesicles (OMVs) which secreted by Gram-negative bacteria such as *B. pertussis* are attracted for their application in vaccines.

In this study, we compared the proteins in OMVs released from planktonic bacterial cells to those from biofilms. Accordingly, OMVs commonly contained the Vag8, which relates to serum resistance. On the other hand, OMVs of planktonic bacteria contained significantly more adenylate cyclase toxin than those of biofilms. On the other hand, OMVs released from biofilms contained several colonization factors. Additionally, both OMVs secreted from planktonic cells and biofilm showed cytotoxicity to J774, mouse macrophage-like cell and A549, an alveolar epithelial cell. These results suggest that the OMVs released by bacteria have different roles on the pathogenicity.

研究分野：感染症学

キーワード：ワクチン 外膜ベシクル 百日咳 定着 バイオフィーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌が分泌するメンブレンベシクル (MV) は直径 30-250 nm の小胞であり DNA、RNA や病原因子などを含む。これらの分子を細菌同士や宿主の細胞に運搬することで様々な生理機能や病原性の発現に関与している。MV は分泌機構の違いにより分類されているが、近年では細菌の O 型分泌系とされている。百日咳菌などのグラム陰性菌により分泌される MV は通常外膜に包まれていることから外膜ベシクル (OMV) とよばれる。

百日咳は小児の急性呼吸器感染症を引き起こし死に至ることもあるためワクチンの定期接種が行われている。しかし近年、ワクチン既接種の成人の感染が問題となっており、ワクチンの効果の低減が指摘されている。そこで本課題では、急性期に放出される OMV として浮遊細菌から放出される OMV と慢性疾患と深く関わっているバイオフィームから放出される OMV に着目し、感染における役割を明らかにし新たなワクチン開発に繋げることを考えた。

OMV には免疫原性があることからワクチンの候補とされ、百日咳菌の分泌する OMV も新たなワクチンとして注目されている。一方、百日咳菌の OMV の病原性における役割は明らかにされていない。現在、百日咳ワクチンとして解析されている OMV は超音波処理により放出されるものであり、細菌独自の機構により分泌されるものではない。本研究では菌が保有する機構により分泌される OMV について、含有されている病原因子とその生物活性に注目した。

2. 研究の目的

百日咳菌を静置培養すると培養液表面に浮遊型バイオフィーム (ペリクル) が形成され、この培養液中に OMV が含まれている。また、このペリクル由来 OMV の密度は、振とう培養した培養液中の OMV と密度が異なっており、さらに繊維状血球凝集素 (FHA) が豊富に含まれている。この様に、OMV はその由来により特徴があり、それらは病原性発現において異なる役割を担っている可能性が考えられる。

百日咳菌は宿主に侵入するとマクロファージに貪食されて殺菌される。しかし種々の病原因子によりマクロファージの機能を修飾することで免疫系を攪乱し、定着することが可能である。マクロファージに貪食により細胞表層ストレス応答は亢進すると予想され、この細胞表層ストレス由来 OMV はマクロファージとの相互作用に関与する可能性が考えられる。一方、バイオフィームは気道への定着に重要であることから上皮細胞や免疫系細胞との相互作用に関与する可能性が考えられる。この様に、細菌が宿主内微小環境に定着して種々の OMV を分泌し、それぞれ異なる役割を担うことで病原性を制御している可能性が考えられる。

本研究では OMV ワクチンの開発を推進する目的で、細胞表層ストレス応答およびペリクルに由来する OMV を用いて宿主細胞との相互作用を解析した。

3. 研究の方法

(1) OMV の調製：培養液を遠心分離、ろ過して細菌細胞を除去し、超遠心分離で OMV を調製した。細胞表層ストレス応答は RNA ポリメラーゼ サブユニットである RpoE が担うため、aniRpoE である RseA を欠損させると RpoE は常に活性化する。この rseA 変異株を振とう培養し、細胞表層ストレス由来の OMV を調製した。

(2) OMV の性状および含有タンパク質の解析：百日咳菌のペリクル由来 OMV は振とう培養した菌由来の OMV と含有タンパク質の種類および密度が異なる。そこでそれぞれの OMV の性状を詳細に解析した。

i. OMV の形態および生化学的性状：OMV の密度は OptiPrep™ を用いた密度勾配遠心法、粒子径はゼータサイザーにより測定した。OMV 量は、タンパク質量および膜に含まれる脂質量としてそれぞれ Bradford 法および脂質特異的蛍光色素である FM4-64 により定量する。微小構造は透過型電子顕微鏡により観察した。

ii. 含有タンパク質の解析：OMV に含まれるタンパク質を SDS-PAGE およびイムノブロットングで解析した。OptiPrep 密度勾配遠心法により精製して Nano LC-MS/MS 分析で得られたデータを Proteome Discoverer 2.4 (Thermo Fisher Scientific) を用いて解析した。

(3) OMV 中の病原因子の生物活性および局在：OMV に含まれる病原因子の生物活性および局在を調査した。また、OMV の細胞毒性を MTT アッセイにより調べた。さらに各病原因子に対する抗体を用いて蛍光顕微鏡または免疫電子顕微鏡により局在を解析した。

(4) OMV と宿主細胞との相互作用：OMV とマクロファージおよび上皮細胞との相互作用を検討した。ヒト肺胞上皮細胞株 A549 または J774.1 などのマクロファージ細胞株に、蛍光標識した OMV を添加し、形態の変化、培養上清中の産生される IL-1 などのサイトカイン産生量および菌の付着能や貪食能を測定した。また、OMV の細胞への取り込みを蛍光顕微鏡により観察した。

4. 研究成果

バイオフィルム由来の OMV のサイズの中央値は 102.5 nm であったのに対して浮遊菌由来の OMV は 94.9 nm でありサイズの違いが認められた。含有タンパク質を解析した結果、定着に関わる因子、毒素などが複数検出された。中でも補体阻害因子である Vag8 および BrkA 等はどちらの OMV にも含まれていた。浮遊菌由来の OMV に特異的に含まれる病原因子は FimB および BopD の 2 種が同定された。一方 BF 由来 OMV に特異的なタンパク質には繊維状赤血球凝集素 (FHA)、アデニル酸シクラーゼ毒素 (ACT)、FhaS および SphB 1 など、主として付着因子が含まれており、浮遊菌由来の OMV との違いが見られた。また、これらの OMV はマウスマクロファージ様細胞である J774 および肺胞上皮細胞である A549 に対して細胞毒性を示した。

OMV に含まれる病原因子の違いは、それぞれの OMV の病原性発現における役割を考察する上で重要と考えられる。今回の結果から BF 由来の OMV は本菌の定着に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masataka Goto , Tomoko Hanawa , Akio Abe , Asaomi Kuwae	4. 巻 202
2. 論文標題 Transcriptional Downregulation of a Type III Secretion System under Reducing Conditions in <i>Bordetella pertussis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 e00400-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JB.00400-20	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 Masataka Goto, Akio Abe, Tomoko Hanawa, Masato Suzuki, Asaomi Kuwae	4. 巻 10
2. 論文標題 Bcr4 Is a Chaperone for the Inner Rod Protein in the <i>Bordetella</i> Type III Secretion System	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiol Spectrum	6. 最初と最後の頁 e0144322
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/spectrum.01443-22.	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 後藤雅貴、桑江朝臣、花輪智子、阿部章夫
2. 発表標題 気管支敗血症が産生するBcr4によるIII型分泌装置制御機構の解析
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 花輪智子、米澤英雄、大崎敬子、神谷茂
2. 発表標題 百日咳菌メンブレンベシクルに含まれるタンパク質の網羅的解析
3. 学会等名 第69回日本感染症学会東日本地方会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 花輪智子、浦地一成、桑江麻臣、阿部章夫、米澤英雄、大崎敬子、北条史、神谷茂、三戸部治郎
2. 発表標題 百日咳菌の浮遊菌およびバイオフィルム形成菌から分泌されるメンブレンベシクルに含まれる病原因子
3. 学会等名 第94回 日本細菌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 花輪智子、浦地 一成、米澤 英雄、蔵田 訓、大崎 敬子、北条 史、神谷茂
2. 発表標題 百日咳菌の外膜ベシクルに含まれる病原因子の解析
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019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
研究 分担者	阿部 章夫 (Abe Akio) (50184205)	北里大学・感染制御科学府・教授 (32607)	
研究 分担者	桑江 朝臣 (Kuwaie Asaomi) (60337996)	北里大学・感染制御科学府・准教授 (32607)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------