

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460555

研究課題名(和文) 次世代肺炎球菌ワクチンの開発に必要な病原因子・宿主因子に関する分子基盤の確立

研究課題名(英文) Establishment of the molecular bases for development of the next-generation Streptococcus pneumoniae vaccine

研究代表者

小川 道永 (OGAWA, Michinaga)

国立感染症研究所・その他部局等・室長

研究者番号：80361624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では肺炎球菌の病原因子の機能と菌と宿主細胞との相互作用を明らかにすることを目指した。

肺炎球菌の保有する40種類の病原因子を欠失させた変異株を作製し、細胞内生残性を解析した結果、14種類の細胞内低生残性株を得る事が出来た。さらに、肺炎球菌感染細胞において、菌と58種類のRabタンパク質との共局在性について解析した結果、10種類のRabタンパク質が肺炎球菌を内包するエンドソームと共局在することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, I aimed at revealing the function of the pneumococcal virulence factor and the interaction of intracellular pneumococci and host cells.

As a result of intracellular survivability test using 40 kinds of gene-targeted deletion mutants, it was revealed that 14 pneumococcal virulence factors play pivotal role in the survivability of pneumococci in host cells.

Next, I examined 58 kinds of Rab proteins in their co-localization with intracellular pneumococci, and 10 Rab protein were revealed to be targeted to the endosomes engulfing pneumococci.

研究分野：細菌学

キーワード：肺炎球菌 病原性 次世代ワクチン

1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) はヒトの鼻腔、咽頭など上気道部に常在する日和見感染菌である。小児や高齢者では肺炎、敗血症、髄膜炎などの侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) を引き起こす。抗生物質による治療が有効だが、薬剤耐性菌が近年増加し社会問題化している。現在、我が国では成人用の 23 価ポリサッカライドワクチンおよび小児用の 7 価結合型ワクチンが導入され、一定の効果を上げているが、ワクチン接種患者においてワクチンがカバーしていない血清型の菌の検出頻度が増加する「血清型交代現象」が大きな問題となっている。このことから、血清型に依存しない次世代肺炎球菌ワクチンの開発が急務である。

次世代肺炎球菌ワクチンの開発には肺炎球菌感染症の発症に關する菌側・宿主側の因子について分子レベルでの解析データを蓄積し、肺炎球菌感染メカニズムを理解するための分子基盤を確立することが必須である。ゲノム解析の結果から、肺炎球菌は 70 種類以上の病原因子を保持していると予想されているが、分子レベルでその機能が報告されているものはごく一部に限られ、大部分の病原因子の機能は不明な点が多く残されている。

一方、宿主の粘膜には様々な防御機構が構築され、微生物の侵入を阻止している。病原細菌はこれらのバリアを巧妙に回避・抑制し、局所あるいは全身で増殖しさまざまな疾患を引き起こす。肺炎球菌は日和見感染菌であるが、バリア機構が未発達な小児やバリア機能が低下した高齢者では髄膜炎や敗血症などの侵襲性感染を引き起こす。宿主バリア機構の中でも肺炎球菌の上皮細胞内での肺炎球菌の病原性に関する分子レベルでの解析は殆ど進んでいないのが現状である。

2. 研究の目的

肺炎球菌は小児や高齢者では敗血症、髄膜炎などの侵襲性感染症を引き起こす。近年、肺炎球菌ワクチンの接種による「血清型交代現象」が問題となっており、荚膜多糖以外を抗原とする次世代ワクチンの開発が急務である。本研究では「肺炎球菌感染の成立に必要な菌側・宿主側因子の同定および解析」を行い、肺炎球菌感染発症の基本メカニズムを分子レベルで解明し、次世代肺炎球菌ワクチン開発、および新規治療法開発のための分子基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 病原因子の異所的発現による機能解析

本研究では、宿主細胞の細胞質に移行した肺炎球菌の表層病原因子がどのような機能を持つのかについて解析するための一次スクリーニングとして、肺炎球菌のゲノム情報から菌体表層に局在・または分泌されることが予想される 54 種類の病原因子を対象に GFP

タンパク質との融合タンパク質発現ベクターを作成し、それらを HeLa と mcherry-LC3 を発現させた BHK 細胞に異所的に発現させ、病原因子の細胞内局在性、オートファジー誘導性について共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。

(2) 肺炎球菌の各病原因子欠失変異株の細胞内生残性の検討

42 種類の肺炎球菌病原因子を欠損させた変異株を作成し、MEF 細胞 (マウス胎児繊維芽細胞) を用いて細胞内生残性を検討した。MEF 細胞に $\text{moi}=100$ になるように調製した肺炎球菌懸濁液をアプライし、1,000 rpm、5 min、室温で遠心後、5% CO_2 存在下、37 で 1 時間培養した。PBS (phosphate buffered saline) で 2 回洗浄後、ゲンタマイシン、ペニシリンを添加した培地を各ウェルに添加し細胞外の菌を殺菌した後に PBS で 3 回洗浄し、この時を感染 0 時間と定めた。PBS で洗浄後に、DMEM/10% FCS 培地に交換し、5% CO_2 存在下、37 で 2 時間培養した。感染 0、2 時間のサンプルの細胞内から菌体を回収し、細胞内菌数を cfu (colony forming unit) により求めた。各菌株の生残性は、各々の菌に対して $\{(\text{感染 2 時間後の細胞内菌数}) \times 100 / (\text{感染 0 時間での細胞内菌数 (侵入菌数)})\}$ を算出し、その値について野生株を 100 とした時の相対値で比較した。

(3) 宿主細胞内に侵入した肺炎球菌と Rab タンパク質との共局在性解析

58 種類の GFP-Rab タンパク質発現ベクターをそれぞれトランスフェクションした BHK 細胞に肺炎球菌を $\text{moi}=100$ で感染させ、1,000 rpm、5 min、室温で遠心後、5% CO_2 存在下、37 で 20 分間培養した。PBS で 2 回洗浄後、DMEM/10% FCS 培地に交換し、5% CO_2 存在下、37 でさらに 40 分間培養した。200 のゲンタマイシンを添加した DMEM/10% FCS 培地で 30 分間細胞外の菌を殺菌した後、100 のゲンタマイシンを添加した DMEM/10% FCS 培地中で 1 または 2 時間培養した。培養後、4% パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液 (和光純薬) を用いて室温で 15 分間固定後に PBS で 3 回洗浄し、抗肺炎球菌抗体を用いた免疫染色を行い共焦点レーザー顕微鏡による観察に供した。

4. 研究成果

(1) 病原因子の異所的発現による機能解析

肺炎球菌の保有する病原因子のうち菌体表層に局在、または分泌されていることが予想される病原因子 54 種類を GFP 融合タンパク質として HeLa 細胞に発現させた結果、各病原因子は細胞質、核内、核膜、小胞体 (ER) または細胞接着斑での発現が認められた。一部の病原因子は細胞質で凝集体を形成していた。しかし、特定のオルガネラへの局在や細胞死などは観察されず、局在解析のみからそ

の機能を類推することはできなかつた。一方で、細胞接着斑に局在する病原因子 Spr001 とパンクタ (細胞質内の斑点) を形成する病原因子 Spr002 を見出した。

(2) 肺炎球菌の各病原因子欠失変異株の細胞内生残性の検討

肺炎球菌の 42 種類の病原因子に関して欠失変異株を作製しそれらを MEF 細胞に感染させ、細胞内生残性を野生株 (WT) と比較することにより解析した。その結果、細胞内生残性が WT と比較して顕著に低下する株を 15 株同定することができた。実験 (1) で細胞接着斑に局在する病原因子 Spr001 を欠失した株の細胞内生残性は WT と同程度だったが、パンクタを形成する病原因子 Spr002 を欠失した株は細胞内生残性が低下することを見出した。野生株と比較して細胞内生残性が低下した変異株 15 株の解析を今後行う予定である。

(3) 宿主細胞内に侵入した肺炎球菌と Rab タンパク質との共局在性解析

58 種類の GFP-Rab タンパク質発現ベクターを用いて、各 Rab タンパク質を発現させた培養細胞に、肺炎球菌を感染させ、菌を内包するエンドソームと各種 GFP-Rab タンパク質との経時的な局在性について現在解析を行った結果、10 種類の Rab タンパク質が肺炎球菌を内包するエンドソームと共局在することを見出した。それぞれの Rab タンパク質が肺炎球菌感染により菌を内包するエンドソームにリクルートされる意義について今後解析を行う予定である。

本研究の成果から細胞内に侵入した肺炎球菌と宿主細胞との相互作用の一端が明らかになった。今後、本研究の成果を元に肺炎球菌の細胞内生残に必要な病原因子の機能、肺炎球菌の排除に關与する宿主防御機構を明らかにする予定である。

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 9 件)

1. Klionsky, DJ et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). **Autophagy**. 12:1-222. (2016)
doi: 10.1080/15548627.2015.1100356.
2. Ikebe, T., K. Tominaga, T. Shima, R. Okuno, H. Kubota, K. Ogata, K. Chiba, C. Katsukawa, H. Ohya, Y. Tada, N. Okabe, H. Watanabe, M. Ogawa, M. Ohnishi and the Working Group for Beta-haemolytic Streptococci in Japan, Increased prevalence of group A streptococcus isolates in

streptococcal toxic shock syndrome cases in Japan from 2010 to 2012. **Epidemiol Infect.** 143:864-72. (2015)
doi: 10.1017/S0950268814001265.

3. Ikebe, T., Chiba, K., Shima, T., Masuda, C., Okuno, R., Ohya, H., Ogata, K., Katsukawa, C., Kawahara, R., Tominaga, K., Yabata, J., Tada, Y., Okabe, N., Watanabe, H., Chang, B., Ogawa, M., Ohnishi, M.; Working group for beta-hemolytic streptococci in Japan. Evaluation of streptococcal toxic shock-like syndrome caused by group B streptococcus in adults in Japan between 2009 and 2013. **J Infect Chemother**. 21:207-11. (2015)
doi: 10.1016/j.jiac.2014.12.002.
4. Rinchai, D., Riyapa, D., Buddhisa, S., Utispan, K., Titball, R. W., Stevens, M. P., Stevens, J. M., Ogawa, M., Tanida, I., Koike, M., Uchiyama, Y., Ato, M. and Lertmemongkolchai, G., Macroautophagy is essential for killing of intracellular *Burkholderia pseudomallei* in human neutrophils. **Autophagy**. 11:748-55. (2015)
doi: 10.1080/15548627.2015.1040969.
5. 小川道永, 病原細菌と宿主オートファジーとの攻防、**化学と生物**, 53:389-397. (2015)
6. Suzuki, S., Mimuro, H., Kim, M., Ogawa, M., Ashida, H., Toyotome, T., Franchi, L., Suzuki, M., Sanada, T., Suzuki, T., Tsutsui, H., Núñez, G., Sasakawa, C. *Shigella* IpaH7.8 E3 ubiquitin ligase targets glomulin and activates inflammasomes to demolish macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 111: E4254-63. (2014)
doi: 10.1073/pnas.1324021111.
7. Kiga, K., Mimuro, H., Suzuki, M., Shinozaki, A., Kobayashi, T., Sanada, T., Kim, M., Ogawa, M., Iwasaki, Y. W., Kayo, H., Fukuda-Yuzawa, Y., Yashiro, M., Fukayama, M., Fukao, T., and Sasakawa, C. Epigenetic silencing of miR-210 increases the proliferation of gastric epithelium during chronic *Helicobacter pylori* infection. **Nat. Commun.** 5:4497. (2014)
doi: 10.1038/ncomms5497.
8. Harada-Hada, K., Harada, K., Kato, F., Hisatsune, J., Tanida, I., Ogawa, M., Asano, S., Sugai, M., Hirata M., & Kanematsu, T. Phospholipase

C-related catalytically inactive protein participates in the autophagic elimination of *Staphylococcus aureus* infecting mouse embryonic fibroblasts. **PLoS One**. 9: e98285. (2014)
doi: 10.1371/journal.pone.0098285.

9. Chang, SY., Lee, SN., Yang, JY., Kim, DW., Yoon, JH., Ko, HJ., Ogawa, M., Sasakawa, C. & Kweon, MN. Autophagy controls an intrinsic host defense to bacteria by promoting epithelial cell survival: a murine model. **PLoS One**. 8:e81095. (2013)
doi: 10.1371/journal.pone.0081095
10. Kobayashi, T., Ogawa, M., Sanada, T., Mimuro, H., Kim, M., Ashida, H., Akakura, R., Yoshida, M., Kawalec, M., Reichhart, J., Mizushima, T. & Sasakawa, C. A bacterial caspase inhibitor antagonizes inflammatory cell death and promotes epithelial infection. **Cell Host Microbe**. 13:570-583. (2013)
doi: 10.1016/j.chom.2013.04.012.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 小川道永、病原細菌に対するオートファジー認識機構とその阻害機構、第 88 回日本細菌学会総会、長良川国際会議場、2015 年 3 月 26 日
2. 鈴木志穂、三室仁美、小川道永、芦田浩、鈴木仁人、真田貴人、笹川千尋、*Shigella* IpaH7.8 E3ubiquitin ligase targets Glomulin to activate inflammasomes、第 88 回日本細菌学会総会、長良川国際会議場、2015 年 3 月 27 日
3. 小川道永、病原菌に対するオートファジー認識機構とその阻害機構- 病原細菌と xenophagy との攻防 -、第 87 回日本生化学会大会、京都、2014 年 10 月 15 日
4. 小川道永、細胞内侵入細菌と選択的オートファジーの攻防、第 24 回日本生体防御学会学術総会、熊本、2013 年 7 月 11 日

〔図書〕(計 1 件)

1. 肺炎球菌の基礎 (金澤實、大石和徳編、肺炎球菌ワクチンの新しい展開 改訂 4 版) 医薬ジャーナル社 (2015)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

小川道永 (OGAWA Michinaga)
国立感染症研究所細菌第一部第三室・室長
研究者番号 : 80361624

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :