

「百日咳における咳発作の発症機構の解明」

大阪大学微生物病研究所 堀口 安彦

1 研究の背景と目的

百日咳は百日咳菌感染によって起こる特徴的な発作性咳嗽（咳発作）を伴う呼吸器感染症である。WHOによると年間約20-30万人の本疾患による死亡者が報告されている。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。実際、我が国でも、これまでの百日咳の発生状況把握が全国3,000医療機関による定点観測であったところ、患者数増の警告を受けて2018年から全数把握に統計手法が変更されている。

百日咳患者にはマクロライド系の抗生剤が第一選択薬として本菌の排除に使用されているが、患者の負担になる上述の諸症状を緩和する治療方法は確立していない。さらに、我が国を含む世界各国でマクロライド耐性の本菌の分離が報告されており、米国疾病予防管理センター（CDC）は本菌の薬剤耐性化を潜在的脅威として注意を喚起している（CDC, Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019）。また、百日咳で見られる咳発作は患者に多大な負荷を強い、ときに死因のひとつとなるがその発症機構は不明で、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。原因療法開発の道を拓くには、咳発作の発症メカニズムの解明が必須である。一方、申請者らは百日咳菌の病原性を解析する過程で、特定の系統のマウスが人工的な百日咳感染に応答して再現よく咳発作を起こすことを発見した（特許出願中：特願2016-197288）。本研究課題では、このマウスモデルを活用して百日咳菌による咳発作の発症メカニズムの解析を行った。

2 研究方法・研究内容

○百日咳菌株と培養

百日咳菌18323株はBordet-Gengou寒天培地あるいはStainer-Scholte液体培地で常法どおり培養した。百日咳菌変異株作製のための各遺伝子はPCRで増幅し、大腸菌の汎用宿主株でクローニング、同じく大腸菌DH5 $\alpha$   $\lambda$ pir株を利用した三親接合法を用いて百日咳菌に導入し、相同組換えで遺伝子欠失あるいは置換したクローンを選択した（Hiramatsu et al., 2020; Nishikawa et al., 2016）。

○マウス咳の計数

6-10週齢のC57BL6系の雄マウスの鼻腔に種々の試料を麻酔下で投与し、任意の期間において1日に5分間、ビデオカメラでマウスの咳を記録した。記録した動画を実験の詳細を知らされない観察者が観察し、発咳音とマウスの姿勢から咳を判断して計数した。別途、一部の実験におけるマウスの発咳は全身プレチスモグラフ（容積計）で検出される特徴的な呼吸波形から同定した。観察者が計数した咳とプレチスモグラフにより検出した咳は、90.5%一致した。

○百日咳菌病原因子

百日咳菌のリポオリゴサッカライド（LOS）は本菌18323株から熱フェノー

ル法にて精製した(Minnick, 1994)。得られた標品の精製度およびエンドトキシン活性はそれぞれSDS ポリアクリルアミド電気泳動後の銀染色像とリムルステストで確認した。百日咳菌 Vag8 と百日咳毒素 (Ptx) は既報に従って精製した(Onoda et al., 2020; Skelton and Wong, 1990)。

### 3 研究成果

C57BL/6 マウスに百日咳菌 18323 株 ( $5 \times 10^6$  CFU) を経鼻投与したところ、投与後約 1 週間後からマウスは明確な音声と発咳姿勢で確認できる咳症状を呈した (図 1)。同様の発咳は菌体破砕液 (50  $\mu$ g/マウス) を 5 日間連続で経鼻投与した場合も、最初の投与から 5 日目以降に認められた。

そこで、各種の病原因子遺伝子を欠失した変異百日咳菌株を作製し、その菌体破砕液を同様にマウス鼻腔に投与して発咳の程度を検討したところ、本菌の LOS、Vag8、百日咳毒素 (Ptx) が協調してマウスに咳を起こすことがわかった。百日咳菌の LOS は一般のグラム陰性細菌のリポポリサッカライド (LPS) に相当する。そこで LPS と LOS で基本構造が共通する lipid A 部分に着目して、大腸菌由来の lipid A を LOS に代えて Vag8、Ptx とともに投与した場合も、咳応答が観察できた (図 2)。Ptx 単独、Ptx と Vag8 および LOS と Vag8 の組み合わせでは、発咳はほとんど起こらず、LOS と Ptx の組み合わせでは菌体破砕液の 3 分の 1 程度の数の発咳が認められた。以上の結果から、LOS と Ptx の作用によって咳応答が惹起され、Vag8 がこれを増悪させると考えられた。

次に、LOS-Vag8-Ptx による咳反射刺激のメカニズムの解析を試みた。動物の咳反射系路は多岐にわたっているため、あらかじめ系路を予測して解析を進めることは難しい。そこで、既知の咳反射系路を阻害する多種類の阻害剤を使用して、LOS-Vag8-PTx による咳応答が阻害される主要系路を探索した。ブラジキニン 2 型受容体 (B2R) の阻害剤と Transient Receptor Potential イオンチャネルのひとつである TRPV1 の阻害剤が、LOS-Vag8-Ptx 投与によるマウスの咳応答を阻害することがわかった。B2R 阻害剤と TRPV1 阻害剤を同時に投与しても、LOS-Vag8-Ptx による咳応答程度は単独の阻害剤投与の場合と同様であった。B2R は炎症性メディエーターのブラジキニンの受容体

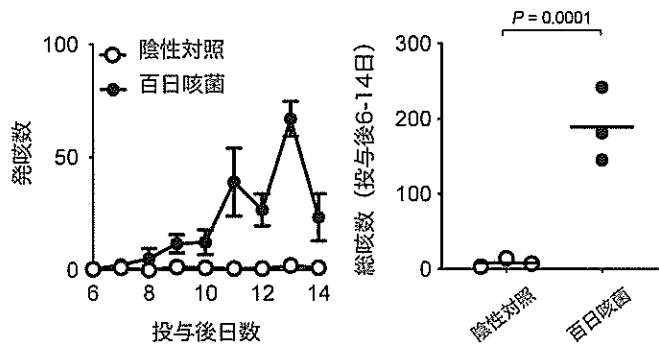


図 1: 百日咳菌投与マウスの咳応答. 咳数の経日変化 (左) と投与後 6-14 日間の総咳数 (右) を表す。

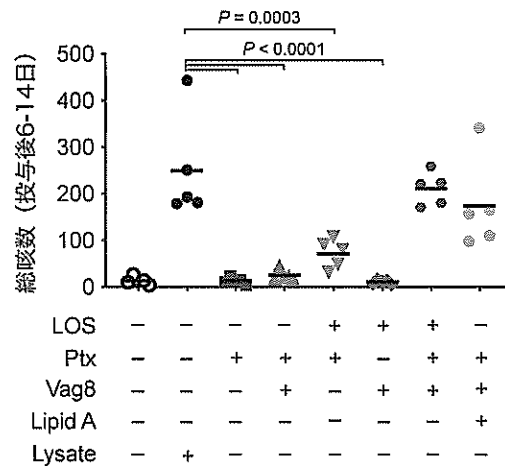


図 2: 百日咳菌成分の投与によるマウスの咳応答。

で、TRPV1は温度や物理的・化学的刺激に応答するセンサーとして知られており、咳反射に関わる神経線維の興奮伝導に関与し、その活性はブラジキニンによって制御を受けることが報告されている。そこで、ブラジキニンを生成しない *Kngr1* ノックアウトマウスや TRPV1 ノックアウトマウスに菌体破砕液や LOS-Vag8-Ptx を投与したところ、野生型マウスに比べて発咳数が半分に以下に低下することがわかった。このことから、B2R と TRPV1 は同一の系路上で LOS-Vag8-Ptx が誘発する咳反射に関与していることが考えられた。

LOS、Vag8、Ptx のそれぞれの役割をさらに解析したところ、LOS は Toll 様受容体 4 を介して感染局所でブラジキニンを生成させることがわかった。ブラジキニンは B2R を介して TRPV1 の興奮感受性を増大させるが、Ptx は TRPV1 の感受性を負に調節する Gi GTPase の機能を遮断して、TRPV1 の興奮性をさらに高めることがわかった (図 3)。また、TRPV1 の興奮感受性増大は Gq GTPase に共役した B2R から細胞内のプロテインキナーゼ C (PKC) 活性を通じて起こり、同時に Gi GTPase に共役した B2R からプロテインキナーゼ A 活性によって負に制御されることも確かめた。また Vag8 はブラジキニン生成過程のカリクレイン・キニン系のカスケードを負に調節する CI エステラーゼインヒビターを阻害して、ブラジキニンの生成レベルを高めていた (図 4)。

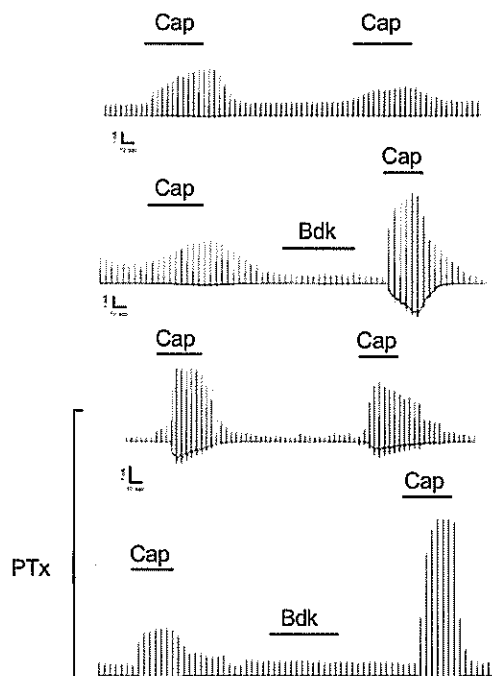


図 3: 全細胞パッチクランプ法を用いた TRPV1 活性の検出。遺伝子導入により B2R と TRPV1 を発現させた HEK293T 細胞に、一定のランブ電圧波に対する発生電流で TRPV1 の活性を評価した。通常は Cap の連続刺激で TRPV1 が低応答化する (最上段) が、ブラジキニンの処理により Cap への反応性が亢進 (二段目) し、さらに Ptx で前処理した細胞ではブラジキニンによる感受性亢進が増強する (四段目)。Ptx 処理のみでは、Cap の連続投与による低応答化は変わらない (三段目)。

#### 4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究成果により、百日咳の咳発作の発症メカニズムの一端が明らかにできた。本研究成果には、種々の阻害剤によって百日咳感染による咳発作が阻害できる事を示すデータも含まれている。このことは同等の阻害剤を薬剤として百日咳患者に用いることによって咳発作を緩和できる可能性を示しており、百日咳発作の原因療法開発のための基盤的知見が本研究によって提供されたと考えている。また本研究では、百日咳成分を用いることによって、世界で初めてカプサイシンやクエン酸などの咳誘発剤を使用しない自発的な咳の動物モデルを作製できることが示された。本動物モデルを利用することにより、まだ不明な点の多い動物の生理学的咳反射の研

究解析の新たな方法論が提供できた。

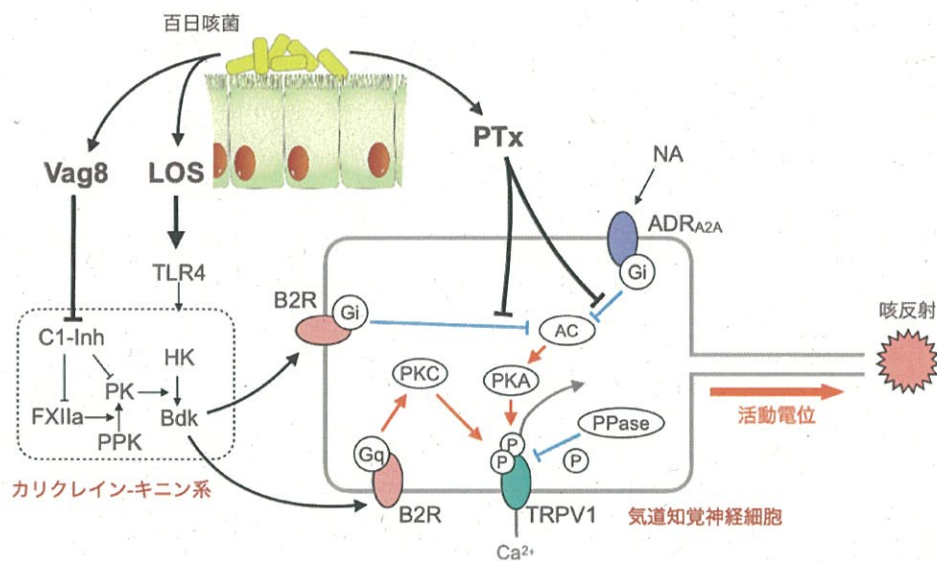


図4：百日咳菌成分による咳反射惹起メカニズム。TRPV1はそのリン酸化レベルで活性状態が調整されている。PKCによりリン酸化されると易活性状態になり、そのリン酸がフォスファターゼによって脱リン酸化されると脱感作（低応答化）する。一方、PKAはTRPV1の、PKCによってリン酸化される部位とは別の部位をリン酸化し、TRPV1の感受性を亢進させる。詳細は本文参照のこと。C1-Inh, C1エステラーゼインヒビター；FXIIa, 血液凝固系活性化第XII因子；PK, カリクレイン；PPK, プレカリクレイン；HK, 高分子キヌノーゲン；Bdk, ブラジキニン；TLR4, Toll様受容体。

#### 文献

Hiramatsu, Y., Suzuki, K., Motooka, D., Nakamura, S., and Horiguchi, Y. (2020). Expression of small RNAs of *Bordetella pertussis* colonizing murine tracheas. *Microbiology and Immunology* 64, 469–475.

Minnick, M.F. (1994). Identification of outer membrane proteins of *Bartonella bacilliformis*. *Infect Immun* 62, 2644–2648.

Nishikawa, S., Shinzawa, N., Nakamura, K., Ishigaki, K., Abe, H., and Horiguchi, Y. (2016). The byg-repressed gene *brtA*, encoding biofilm-associated surface adhesin, is expressed during host infection by *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiology and Immunology* 60, 93–105.

Onoda, N., Hiramatsu, Y., Teruya, S., Suzuki, K., and Horiguchi, Y. (2020). Identification of the minimum region of *Bordetella pertussis* Vag8 required for interaction with C1 inhibitor. *Microbiology and Immunology* 1348–0421.12799.

Skelton, S.K., and Wong, K.H. (1990). Simple, efficient purification of filamentous hemagglutinin and pertussis toxin from *Bordetella pertussis* by hydrophobic and affinity interaction. *J Clin Microbiol* 28, 1062–1065.