

Title	インフルエンザウイルス - レンサ球菌の混合感染による重症肺炎発症機構の解析
Author(s)	高原, 悠樹
Citation	平成27年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書. 2016
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/54640">https://hdl.handle.net/11094/54640</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 平成 27 年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書

ふりがな 氏 名	たかはら ゆうき 高原 悠樹	学部 学科	歯学部 歯学科	学年	4 年
ふりがな 共 同 研究者名		学部 学科		学年	年
					年
アドバイザー教員 氏名	住友 倫子	所属	歯学部 口腔細菌学教室		
研究課題名	インフルエンザウイルス・レンサ球菌の混合感染による重症肺炎発症機構の解析				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。				

### 【研究目的】

インフルエンザに合併する細菌性肺炎の症例数は、原発性ウイルス性肺炎のそれよりも多く、インフルエンザ関連死の大部分を占める。実際、1918年に世界中で大流行したスペイン風邪による死亡例の多くが二次的に感染した細菌性肺炎が原因であったとい報告されている。また、2009年のH1N1新型インフルエンザパンデミックで実施された疫学研究から、インフルエンザに合併する細菌性肺炎の重要性が再認識されている。

化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) は咽頭炎の起病菌として知られているが、重症例では、軟部組織壊死や多臓器不全を伴う致死率の高い劇症型レンサ球菌感染症を惹き起こす。これまでに、インフルエンザウイルスの先行感染は、劇症型レンサ球菌感染症の一因であることが明らかになっている<sup>1,2)</sup>。一方で、化膿レンサ球菌感染症はインフルエンザと同様に、寒冷期に多く流行することから、インフルエンザに関連する重症肺炎の発症と本菌の関連性が注目されている。

小胞体に局在する分子シャペロン gp96 は、C型肝炎ウイルスやヒトヘルペスウイルスなどの感染により、Toll様受容体 (TLRs) やインテグリンとともにストレスタンパクとして細胞表層へ誘導される<sup>3,4)</sup>。マスターシャペロンとしてアピカル部位に表出した gp96 は、髄膜炎菌やリステリア菌などの病原因子に対するレセプターとなり、種々の細胞内シグナル伝達を誘導する<sup>7)</sup>。それゆえ、インフルエンザウイルス感染により gp96 が細胞表層に露出されるのであれば、化膿レンサ球菌の組織深部への侵入が誘発されるのではないかと推測した。

本研究では、A型インフルエンザウイルス感染に伴い細胞表層での発現が誘導される宿主分子に着目し、続発する化膿レンサ球菌感染による重症肺炎の発症への関与を検討した。

### 【研究計画】

本研究では、以下の3点の実験項目について、解析を行うことを目的とした。

1. インフルエンザウイルス感染が宿主の咽頭上皮細胞もしくは肺胞上皮細胞における gp96 の局在に及ぼす影響を検討する。
2. インフルエンザウイルス感染細胞への化膿レンサ球菌の侵入を解析し、gp96 の局在と菌体侵入能との関連性について明らかにする。
3. Gp96 と結合する化膿レンサ球菌の菌体表層分子を検索する。

### 【研究方法】

1. インフルエンザウイルス感染で gp96 が細胞膜表層に出てくるかどうか

肺胞上皮細胞 (A549 細胞) もしくは咽頭上皮細胞 (Detroit 562 細胞) に A 型インフルエンザウイルス A/FM/1/47 株 (H1N1) を 36 時間感染させ、免疫蛍光抗体法で観察した。細胞の免疫蛍光染色には、一次抗体として、抗 Gp96 抗体 (ラットモノクローナル抗体, Enzo) および抗 E-カドヘリン抗体 (マウスモノクローナル抗体, R&D) を、二次抗体として、Alexa Fluor 594-標識抗ラット IgG 抗体 (Molecular Probe) および Alexa Fluor 488-標識抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probe) を使用した。

2. インフルエンザウイルス感染細胞への化膿レンサ球菌の付着試験

A549 細胞を 24-well プレートで 3 日間培養した。この上皮細胞に A 型インフルエンザウイルス A/FM/1/47 株 (H1N1) ( $10^6$  pfu) を感染させ、36 時間後に化膿レンサ球菌 NIH35 株 (M28) ( $10^5$  cfu) を感染させた。感染 2 時間後に未付着の菌体を PBS で洗浄し、滅菌蒸留水で細胞をバーストさせた。PBS で 10 倍段階希釈系列を作製し、THY 寒天平板培地 (Todd-Hewitt 培地 (BD biosciences), 0.2% 酵母エキス (BD biosciences), 1.5% 寒天 (和光純薬)) に塗布した。24 時間後に、寒天培地上に生育したコロニー数をカウントし、上皮細胞に付着した細菌数を解析した。

3. Gp96 と結合する菌体表層分子の検索

Gp96 の細胞外ドメインに対する組換え Gp96 は、N 末端側に His6 タグを付与した組換えタンパクを大腸菌 BL21-CodonPlus 株 (Agilent Technologies) に発現させ、菌体破碎液からアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。化膿レンサ球菌 NIH35 株から N-acetylmuramidase (Sigma Aldrich) やプロテアーゼ阻害剤 (Roche) 等を含む溶解緩衝液を用いて表層画分を抽出し、組換え Gp96 もしくはコントロールタンパクと反応させた。抗 His6 タグ抗体を用いた免疫沈降法により、Gp96 と相互作用する菌体表層分子を回収し、質量分析により同定した。

【研究成果】

1. ウイルス感染細胞における Gp96 の局在

A549 細胞もしくは Detroit 562 細胞にインフルエンザウイルスを感染させ、感染 36 時間後の細胞を免疫蛍光抗体法で観察した。その結果、小胞体に局在する分子シャペロンである Gp96 が IAV 感染に伴い、ストレスタンパクとして細胞表層へ誘導されることを確認した。また、ウイルス感染細胞もしくは非感染細胞に、EGFP 発現化膿レンサ球菌 NIH35 株を感染させた結果、ウイルス感染細胞では、Gp96 発現部位における菌体の付着が認められた。

2. ウイルス感染細胞への化膿レンサ球菌の付着に対する Gp96 阻害剤の効果

インフルエンザウイルス感染細胞もしくは非感染細胞に、化膿レンサ球菌を感染させ、感染 2 時間後における菌体付着量を検討した (図 1)。インフルエンザウイルス感染細胞への菌体付着量はウイルス非感染細胞と比較して有意に増加した。一方で、ウイルス感染細胞への菌体の付着量は添加した Gp96 阻害剤の濃度依存的に、非感染細胞への付着と同等レベルまで減少した。これらの結果から、インフルエンザウイルス感染により細胞表層に誘導された Gp96 を受容体として、化膿レンサ球菌が宿主細胞に付着・侵入する可能性が示唆された。

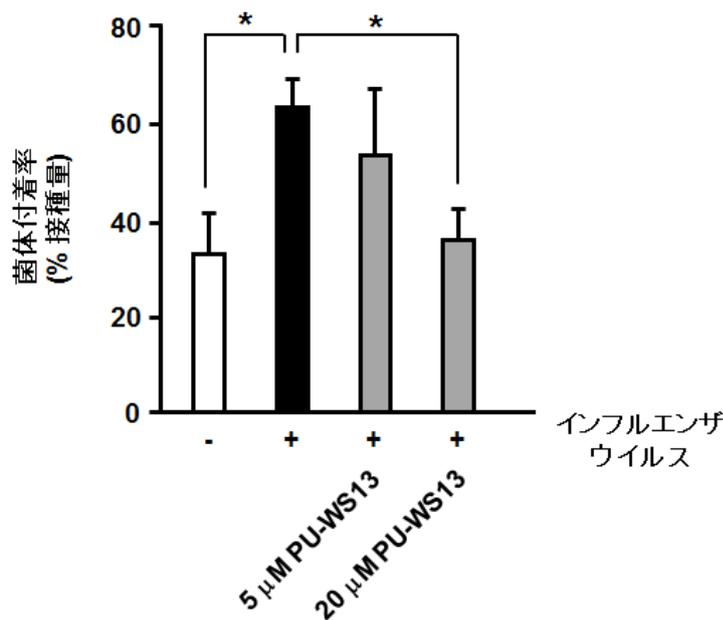


図 1. ウイルス感染細胞への化膿レンサ球菌の付着率

A549 細胞にインフルエンザウイルスを Gp96 阻害剤 (PU-WS13) 存在下もしくは非存在下で 36 時間感染させた。次に、化膿レンサ球菌を感染させ、感染 2 時間後に上皮細胞に付着した菌数を測定した。

### 3. Gp96 と結合する菌体表層タンパクの検索

化膿レンサ球菌の菌体表層タンパクと組換え Gp96 を反応させ、抗 His6 タグ抗体を用いた免疫沈降法により、Gp96 と相互作用する菌体表層分子を回収した。その結果、組換え Gp96 と特異的に結合する菌体表層分子として、約 37 kDa のタンパクが検出された。現在、質量分析によりタンパクの同定を行っている。

以上の結果から、インフルエンザウイルス感染により上皮アピカル部位に表出した Gp96 は、化膿レンサ球菌の付着因子に対する宿主レセプターとして機能することで菌体付着を亢進させ、侵襲性を高めることが示唆された。

#### 【参考文献】

- 1) Okamoto S, et al.: Influenza A virus-infected hosts boost an invasive type of *Streptococcus pyogenes* infection in mice. *J Virol*, 77: 4104, 2003.
- 2) Okamoto S, et al.: Vaccination with formalin-inactivated influenza vaccine protects mice against lethal influenza *Streptococcus pyogenes* superinfection. *Vaccine*, 22: 2887, 2004.
- 3) Prusty et al. : GP96 interacts with HHV-6 during viral entry and directs it for cellular degradation. *PLoS one* 9: e113962, 2014.
- 4) Kim et al. : Degradation of AIMP1/p43 induced by hepatitis C virus E2 to upregulation of TGF- $\beta$  signaling and increase in surface expression of gp96. *PLoS one* 9: e96302, 2014.