

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K14974

研究課題名(和文)新規化膿レンサ球菌性扁桃炎モデルによる好中球細胞外トラップ分解産物の病原性解析

研究課題名(英文) Roles of neutrophil extracellular trap degradation products in Group A Streptococcus pharyngitis

研究代表者

田中 基嗣 (TANAKA, MOTOTSUGU)

新潟大学・医歯学総合病院・准教授

研究者番号：40755740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：化膿レンサ球菌(GAS)は、DNaseを分泌して好中球細胞外トラップ(NETs)を分解し、宿主感染防御を回避するが、GAS扁桃炎におけるNET分解産物の役割は不明であった。申請者は、GASを経鼻感染させた致死性マウスモデルを構築し、GAS感染によるコロニー形成及び鼻粘膜上皮細胞アポトーシスが好中球除去によって軽減することを見出した。次に、DNase(-)菌株では野生型と比較して致死率が著しく低下することを確認した。さらに、GAS-NETs共培養で得られたNET分解産物のヒト単球系細胞に対する細胞毒性を観察した。本研究結果から、GASは、NET分解産物を感染に利用し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

化膿レンサ球菌(GAS)は、ヒトに感染して様々な疾患を引き起こす病原性細菌である。特に急性扁桃炎が多く、腎疾患の発症や増悪にも関与することが知られている。GASは、好中球の強力な殺菌機序である好中球細胞外トラップ(NETs)を分解する能力を有しているが、GAS扁桃炎におけるNET分解産物の役割については解明されていなかった。申請者は、GASをマウスに経鼻感染させた扁桃炎モデルとヒトの白血球を用いた実験を行い、NET分解産物がGAS扁桃炎に重要であることを見出した。本研究によって、GAS感染で発動する好中球の感染防御機構を適切に制御することがGAS扁桃炎の治療ターゲットになる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Group A Streptococcus (GAS) secretes deoxyribonucleases (DNase) and evades host defence by degrading neutrophil extracellular traps (NETs). However, limited information is available on the roles of NET degradation products in GAS pharyngitis. In this study, we modified a mouse model of GAS pharyngitis and revealed an essential role for DNase in this model. A significant apoptosis of the nasal mucosa was induced by intranasal infection, however, in neutrophil-depleted mice, GAS colonization and damage to the nasal mucosa were significantly decreased. Furthermore, mice infected with DNase-knockout GAS mutants (spd(-), endA(-), and sdaD2(-)) survived significantly better than those infected with wild-type GAS. In addition, the supernatants of digested NETs enhanced GAS-induced cell death in vitro. These results indicate that NET degradation products may contribute to the establishment of pharyngeal infection caused by GAS.

研究分野：内科学

キーワード：化膿レンサ球菌 好中球細胞外トラップ Group A streptococcus Streptococcus pyogenes NETs DNase

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

Group A *Streptococcus* (GAS) は、ヒト咽頭粘膜や皮膚等の上皮細胞へ感染して咽頭扁桃炎や伝染性膿痂疹を生じ、時に毒素性ショック症候群、壊死性筋膜炎、敗血症等の極めて重篤な急性感染症を呈する(Cole, Barnett, Nizet, & Walker, 2011; Cunningham, 2000)。また、遠隔臓器にリウマチ性心疾患や溶連菌感染後糸球体腎炎等の続発性自己免疫疾患を生じる。これまで GAS の有する様々な病原因子が明らかにされてきたが、抗菌薬が普及した後も発展途上国を中心として GAS 感染症によって全世界で毎年約 50 万人以上が死亡している(Carapetis, Steer, Mulholland, & Weber, 2005)。

GAS 感染症の中で最も多いのが咽頭扁桃炎 (Pharyngitis) であり、年間罹患者数は世界で 6 億人超ともいわれる(Carapetis et al., 2005)。所感染症である GAS pharyngitis は、通常は抗菌薬で治療可能な非致死性疾患であるが、米国における小児の咽頭痛の 20~30%及び成人の咽頭痛の 5~15%の原因といわれ、その経済的損失は最大で年間 5 億 4 千万ドルにも上るとの試算もある(Shulman et al., 2012)。

GAS の局所感染成立には、感染初期の上皮細胞障害と宿主自然免疫応答の回避が不可欠である。GAS は、感染した上皮細胞にアポトーシス又はゼノファジーによる細胞死を誘導する(Tsatsaronis, Walker, & Sanderson-Smith, 2014)。これに対して宿主は GAS を排除しようとするが、GAS は、以下のような複数の宿主自然免疫応答の回避機序を有している。(1) Streptolysin O によって好中球及びマクロファージをアポトーシスさせる(Timmer et al., 2009)。(2) IL-8 protease によって、白血球遊走因子である IL-8 を分解する(Edwards et al., 2005)。(3) Streptococcal inhibitor of complement によって抗菌ペプチドの作用を阻害する(Fernie-King et al., 2001)。(4) ヒアルロン酸莢膜によってオプソニン化を阻害する(Dale, Washburn, Marques, & Wessels, 1996; Wessels, Moses, Goldberg, & DiCesare, 1991)。(5) Streptokinase によってプラスミンを活性化する(Sun et al., 2004)。(6) さらに、近年では GAS の分泌する DNase によって、好中球の Neutrophil extracellular traps (NETs) を溶解することがわかっている(Buchanan et al., 2006; Li et al., 2010; Sumby et al., 2005; Walker et al., 2007)。

NETs は、好中球が自身の DNA の線維網を細胞外に放出して細菌を捕捉し死滅させる殺菌機序である(Brinkmann et al., 2004)。NETs には、エラスターゼやヒストンなど、様々なタンパク質分解酵素や抗微生物活性を持つタンパク質が含まれ、各種細菌や真菌、原生動物に対して高い抗微生物活性を示す。しかしながら、GAS pharyngitis における GAS と NETs の関係はよく知られておらず、GAS によって分解された NETs の意義も不明である。

2. 研究の目的

鼻咽頭 GAS 感染マウスモデルを新規に構築し、感染初期の自然免疫応答と上皮細胞障害のメカニズムにおける NETs の役割と GAS によって分解された NETs の意義を明らかにする。

3. 研究の方法

1) GAS 菌株

ヒト咽頭由来 GAS である ATCC11434 株 (*Streptococcus pyogenes* ATCC® 11434) を使用した。比較対照として、ヒト血液由来 GAS90226 株 (米国ミネソタ大学細菌学教室 Cleary P. Patrick 教授より供与) を使用した。GAS は、THB-neo 液体培地を用いて、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。ATCC11434 の全ゲノム解析を実施して DNase を同定し、温度感受性ベクターを用いて DNase 欠損株 (シングルノックアウト) を作製した。

2) GAS pharyngitis モデル構築

主たる実験には、6~7 週齢、雄性 C57BL/6 マウス (日本エスエルシー社) を使用した。麻酔したマウスを仰臥位とし、対数増殖期の GAS 5×10^8 cfu/15 μ L を 7.5 μ L ずつ左右の鼻腔へ滴下し、自然吸入させた。感染局所菌数は、摘出した上顎洞粘膜組織をホモジナイズして血液寒天培地上に播種してコロニー数として計測した。

3) マウス鼻腔粘膜組織切片作製と免疫染色

全採血による安楽殺後に鼻咽頭を切離して、4% パラホルムアルデヒドで固定し、10% EDTA 液で5日間以上脱灰処理を行い、6 μm 厚の凍結切片とした。GAS、好中球、マクロファージの三者免疫染色は、一次抗体として、ヤギ由来抗 GAS 抗体 (ab9191、Abcam 社)、ウサギ由来抗 MPO 抗体 (ab45977、Abcam 社)、ラット由来抗 F4/80 抗体 (Bio-Rad 社) を用いた。二次抗体として、ロバ由来抗ヤギ IgG-Cy5 抗体、ヤギ由来抗ウサギ IgG-TRITC 抗体、ヤギ由来抗ウサギ IgG-FITC 抗体、及び DAPI を用いた。観察には、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss 社, LSM510) を用いた。

4) 上皮細胞アポトーシスの定量

アポトーシス細胞の検出に DeadEnd Fluorometric TUNEL System® (Promega 社) を用い、DAPI 及び Wheat Germ Agglutinin (WGA) Alexa Fluor 555 Conjugate® (Life technologies 社) にて対比染色を行った。上皮細胞アポトーシスの定量化は、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて単位面積あたりの TUNEL 陽性細胞数を比較検討した。上皮細胞障害範囲の定量化は、篩骨洞迷宮内粘膜上皮全長に対する WGA 陽性上皮長の比で求めた。

5) マウスからの好中球及びマクロファージの除去

好中球除去は、マウスに抗 Ly-6G 抗体 (1A8 clone®, Bio X cell 社) 500 $\mu\text{g}/\text{body}$ を腹腔内投与し、対照群には IgG 抗体 (2A3 clone®) 500 $\mu\text{g}/\text{body}$ を投与した。マクロファージは、clodronate liposome® (ClodronateLiposomes.com 社) 10 $\mu\text{L}/\text{g}$ ・体重を静脈内注射することにより除去した。対照群には、等量の対照 liposome 静脈内投与を投与した。標的細胞の除去効率は、BD FACS Aria を用いたフローサイトメトリー解析により確認した。

6) NETs 惹起と分解

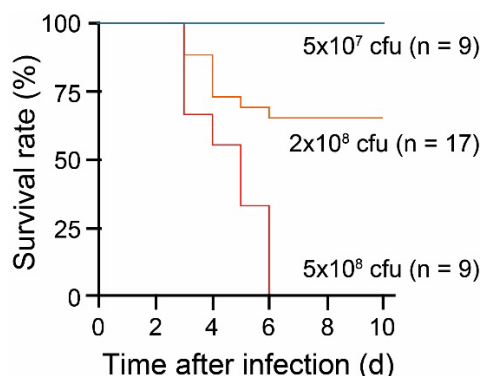
Ficoll-Hypaque 混合溶液 (DS Pharma Biomedical 社、モノ・ポリ分離溶液®) を用いて、健常人血液からヒト好中球を分離した。好中球 1×10^6 cells/mL に対して、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA、Sigma 社) を終濃度 25 nM となるように加え、4 時間後に遠心分離して、上清中の NET-DNA 値を Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay® (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて測定した。NET-DNA 溶液に GAS を加えて 12 時間培養し、遠心分離した上清中に NET-DNA 分解産物を得た。NET-DNA の比較対照として、Herring-sperm dsDNA (Sigma 社) を用いた。

7) NET 分解産物の細胞毒性アッセイ

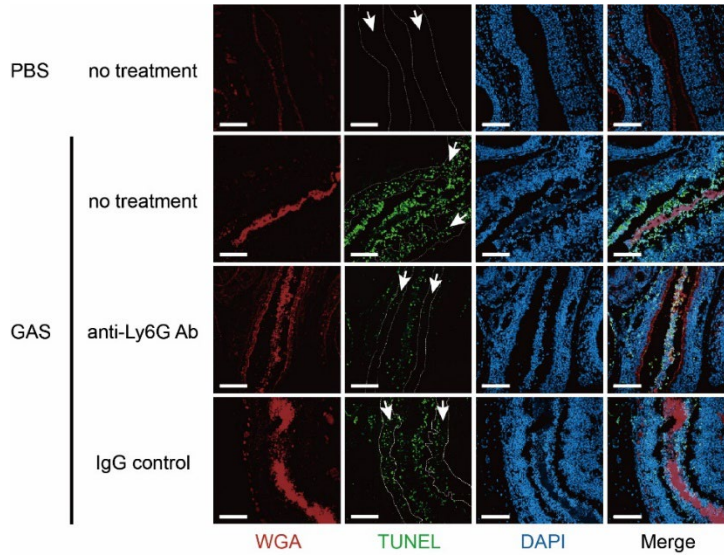
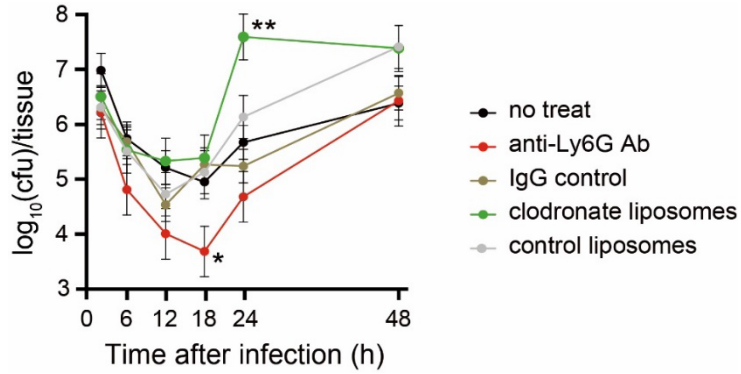
THP-1 細胞 1×10^5 cells を GAS 上清、NET-DNA 分解産物、又はニシン精子 dsDNA 分解産物とともに一夜培養し、死細胞をトリパンブルー (Sigma 社) で染色して光学顕微鏡で確認した。

4. 研究成果

1) 再現性の良い致死的な GAS pharyngitis モデルを新規に構築した。ATCC 11434 株を感染させた C57BL/6 マウスは、菌量に依存した致死率を示した (log-rank test; $p < 0.01$) .

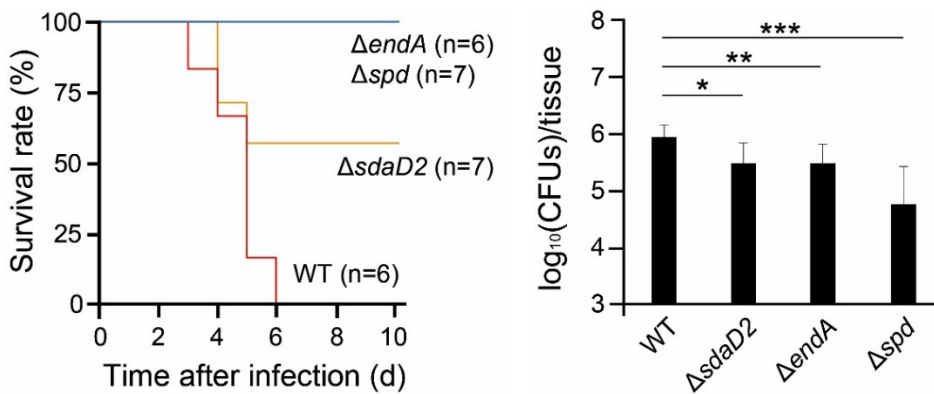


2) 局所感染領域の GAS 菌量は、好中球除去マウスで減少した。さらに、GAS 感染による鼻粘膜への損傷は、好中球を除去したマウスでは軽度であった。

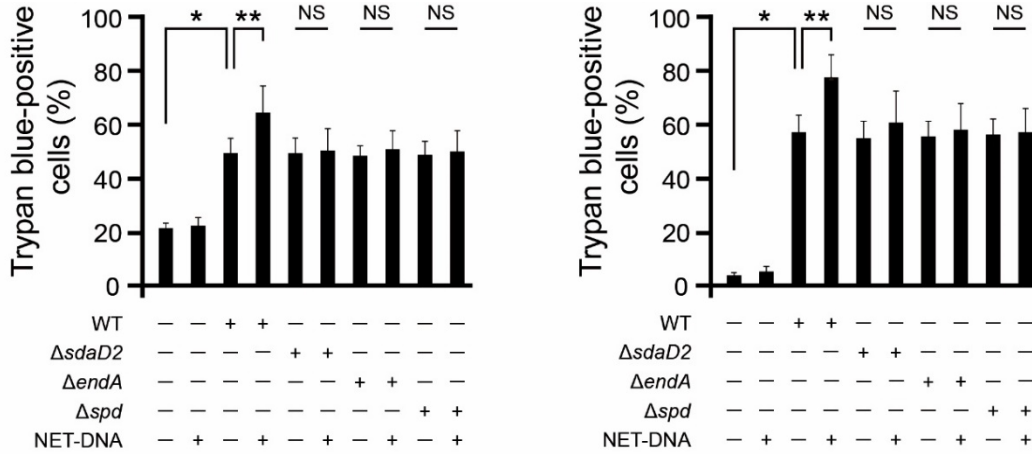


3) ATCC11434 株の全ゲノム解析を実施して、3 種類の DNase (*sdaD2*, *endA*, *spd*) を同定して、DNase 欠損株 (シングルノックアウト) を作製した。

4) GAS pharyngitis モデルにおいて、感染マウスの死亡率と局所細菌数は、DNase 欠損株で顕著に低下したことから、GAS の病原性における DNase の重要性が確認された。



5) NET-DNA 分解能を有する野生型菌株及び NET-DNA 分解能が著しく低下した DNase 欠損株 (シングルノックアウト) を用いて、GAS によって分解された NET-DNA がマクロファージ系 cell line である THP-1 細胞に対して細胞毒性を有することを発見した。このことから、NET-DNA 分解産物がマクロファージ細胞死を誘導することが示唆された。



まとめ) GAS 感染症で最も popular な GAS pharyngitis 動物モデルを構築し、GAS の分泌する複数の DNase が、GAS 病原性に重要な役割を担っていることを明らかにした。GAS は、NETs を分解して好中球による殺菌機構から逃れるだけでなく、NETs 分解を利用して、マクロファージに細胞死を誘導し、感染を拡大させることが示唆された。他方、本研究の限界として、NETs を in vivo で直接観察していないこと、本研究で作製した GAS pharyngitis モデルはヒトにおける GAS pharyngitis よりも重症であること、細胞毒性を有する NETs の最終分解産物を分子レベルで同定していないことであり、さらなる研究が必要である。

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 2件）

1. 著者名 Kinoshita-Daitoku Ryo, Kiga Kotaro, Miyakoshi Masatoshi, Otsubo Ryota, Ogura Yoshitoshi, Sanada Takahito, Bo Zhu, Phuoc Tuan Vo, Okano Tokuju, Iida Tamako, Yokomori Rui, Kuroda Eisuke, Hirukawa Sayaka, Tanaka Mototsugu, (中略) Mimuro Hitomi	4. 巻 12
2. 論文標題 A bacterial small RNA regulates the adaptation of Helicobacter pylori to the host environment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22317-7	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 Kinoshita-Daitoku Ryo, Kiga Kotaro, Sanada Takahito, Ogura Yoshitoshi, Bo Zhu, Iida Tamako, Yokomori Rui, Kuroda Eisuke, Tanaka Mototsugu, Sood Arpana, Suzuki Toshihiko, Nakai Kenta, Hayashi Tetsuya, Mimuro Hitomi	4. 巻 525
2. 論文標題 Mutational diversity in mutY deficient Helicobacter pylori and its effect on adaptation to the gastric environment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 806~811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.087	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 Mototsugu Tanaka, Ryo Kinoshita-Daitoku, Kotaro Kiga, Takahito Sanada, Bo Zhu, Tokuju Okano, Chihiro Aikawa, Tamako Iida, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Kosu Okubo, Miho Kurosawa, Junichi Hirahashi, Toshihiko Suzuki, Ichiro Nakagawa, Masaomi Nangaku & Hitomi Mimuro	4. 巻 10
2. 論文標題 Group A Streptococcus establishes pharynx infection by degrading the deoxyribonucleic acid of neutrophil extracellular traps	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3251-3261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-60306-w	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0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------