

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07133

研究課題名(和文) 高病原性レンサ球菌SDSE固有の病原性獲得メカニズム

研究課題名(英文) How beta-hemolytic streptococci SDSE exhibits pathogenicity

研究代表者

小倉 康平 (Ogura, Kohei)

金沢大学・新学術創成研究機構・助教

研究者番号：00586612

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)：高齢者への重篤な感染症例が近年になり急増している溶血性レンサ球菌 *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) について、その病原性発揮機構を解析した。SDSEは2型糖尿病モデルマウスに対して高い致死誘導性を示し、その際には血清中での顕著なサイトカイン放出が観察された。また、SDSEは皮膚ヒアルロン酸を分解する酵素を大量に放出することで栄養素として取り込み増殖することで病原性を発揮していた。さらに、流行型のSDSEは、細胞外構造や増殖機構などでそれぞれ固有の性状を有していた。以上より、SDSE固有の病原性発揮メカニズムが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢者や基礎疾患保有者に対して高い病原性を示す *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) については、これまでは *S. pyogenes* に似た性状を示す菌であると考えられていたが、本研究でSDSEが固有の特性を有することが明らかになった。SDSEが糖尿病モデルマウスに対して *S. pyogenes* と大きく異なる病原性を示すこと、SDSEが人の皮膚ヒアルロン酸を急速に分解し栄養とすること、その他様々なSDSEの新規な特徴を見出した。本研究によって得られた知見は、高病原性レンサ球菌SDSEが引き起こす感染症全容解明に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)： *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) causes severe invasive streptococcal infections, especially in elderly people and patients with diabetic mellitus. Although SDSE possesses a genome showing about 70% identity to *S. pyogenes*'s one, it remained unclear how SDSE exhibits pathogenicity. Our purpose in this study was to determine pathogenicity characteristics of SDSE. The survival rates of mice injected with SDSE were significantly lower in mice (db/db) with type 2 diabetes compared with non-diabetic mice. Injection of db/db mice with SDSE increased the concentrations of IL-6. SDSE released dramatically high concentrations of hyaluronate-degrading enzymes (hyaluronate lyase). We found the lyase plays important roles in nutrient acquisition from host skins, followed by the bacterial pathogenicity damaging host tissues. We revealed that two prevalent types of SDSE isolates exhibited different characteristics in cell wall structures, anti-phagocytosis, and attachment.

研究分野：細菌学

キーワード：レンサ球菌 病原性 糖尿病 ヒアルロン酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

レンサ球菌には、血液培地内で完全溶血性(溶血)を示すものがあり、その中でもヒトへの高い病原性を示すものとして A 群レンサ球菌 *Streptococcus pyogenes* (GAS) が古くから知られていた。C 群ならびに G 群レンサ球菌は、これまでヒトへの病原性が低いとされてきたが、両群レンサ球菌の一部である *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) がヒト感染症を引き起こすことが報告されており、その症例数は増大していた[1]。GAS ならびに SDSE 両菌種は、平常時は常在菌として存在するが、咽頭や皮膚あるいは腸管から宿主内に侵入し、蜂窩織炎などの組織炎症、さらには敗血症、壊死性筋膜炎、劇症型溶血性レンサ球菌感染症などの重篤な侵襲性感染症を引き起こす。一方で SDSE は、ヒト免疫を過剰活性化させるスーパー抗原遺伝子を保有しておらず、リウマチ熱などの GAS 感染症を惹起させない。しかしながら、SDSE を原因菌とする感染症例は増加しており、敗血症等により死亡・予後不良となるケースが多い。また SDSE 感染症例の特徴として、悪性腫瘍や糖尿病など基礎疾患を有していること、およびより高齢な患者が多数を占める点は、GAS 感染症と異なる。

2. 研究の目的

これまで、SDSE 感染症の機構は GAS のものと類似あるいは同一であるとされてきた。しかし、SDSE 感染症例の増加の要因や、GAS と感染者層が異なる理由については、不明な点が多い。SDSE は、ゲノムレベルで GAS と近縁(遺伝子相同性 70-80%)であり、溶血毒素ストレプトリジン、血液凝固阻害酵素ストレプトキナーゼなどの外毒素の他、菌体表層 M タンパク質等を共有している[2]。一方で、SDSE には機能不明の ORF が存在し、その中には GAS 以外の他の病原性細菌と相同性を示すものが多数含まれることが示されていた。SDSE と GAS との症例の違いならびにゲノムの差異から、SDSE が GAS と異なる固有の病原性発揮機構を有する可能性が考えられ、本研究では SDSE 固有の病原因子を同定し、その病原性メカニズムを決定することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、疫学調査により SDSE 感染との強い関連が指摘される糖尿病態について、マウスモデルを用いて解析した。次に、機能未知 ORF 探索により SDSE 新規病原因子を同定した。比較ゲノム解析に基づいて ORF を選定し、候補遺伝子の変異株を作製した。次に、候補遺伝子の変異による病原性変化について種々の実験系を用いて解析した。さらに、遺伝子変異株をマウスへ感染させ、組織障害性ならびに致死活性を解析し、同定された新規病原因子の性状を決定した。

4. 研究成果

2 型糖尿病モデルマウスへの高い病原性

激症型感染症由来 SDSE 株をマウス腹腔内に投与すると、マウス血糖値の急激な変動(大幅な上昇ならびに急落)が観察された。また、本菌株を 2 型糖尿病モデル (*db/db*) マウス腹腔内に投与すると、コントロール (*db/+* ヘテロ) マウスと比較して有意に高い致死性を示し(図 1)、SDSE 感染 *db/db* マウス血清内では炎症性サイトカインならびに血管炎症性マーカー Pentraxin-3 値の上昇等、GAS 投与では観察されない挙動を示した(図 2)。以上より、糖尿病モデルマウスに対する SDSE の病原性を明らかにした。

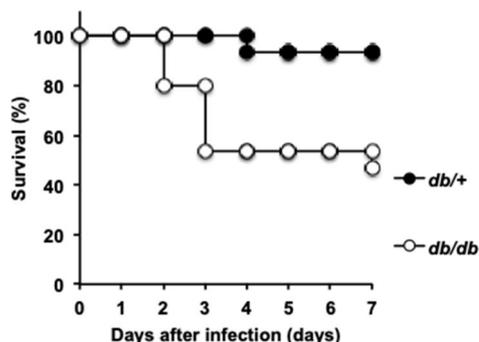


図 1. 2 型糖尿病モデル(*db/db*)マウスへの SDSE 致死誘導率

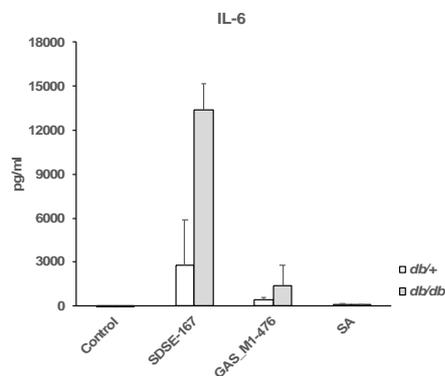


図 2. SDSE 感染 2 型糖尿病モデル(*db/db*) 血清中の IL-6 量

病原性に關する SDSE ヒアルロン酸分解酵素

ヒアルロン酸は、緑膿菌や GAS 等が産生する細菌カプセルの主要な構成成分であると同時に、哺乳類体内に広く分布する多糖であり、ヒトでは全体の約 50% が皮膚に存在する。SDSE は、ヒアルロン酸カプセルを産生しない一方で、高齢者・糖尿病患者皮膚 pH (~6.0、健常人は約 5.0) で高い酵素活性を保持する SDSE 固有のヒアルロン酸分解酵素 HylD を大量に放出することで、宿主ヒアルロン酸を分解・資化していた (図 3)。hylD 遺伝子破壊株では、腹腔内投与による致死活性が野生株と比較して大幅に低下した。マウス皮膚に形成させた創部に SDSE を感染させると、野生型は感染 2 日後創部周辺に観察されるが、hylD 遺伝子破壊株は消失していた (図 4)。以上から、SDSE は宿主皮膚ヒアルロン酸分解により創部周辺で生育し、感染を惹起していることが明らかになった。

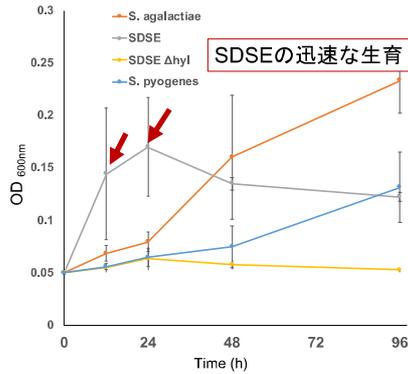


図 3. ヒアルロン酸を唯一の炭素源とした培地中の SDSE 生育

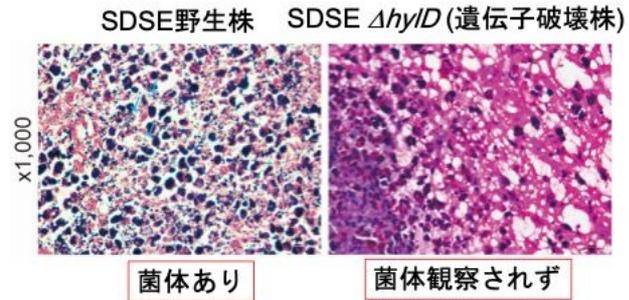


図 4. マウス背面創部に感染した SDSE の感染 2 日後における菌残存状態

流行型ごとに異なる病原性発揮機構

SDSE は、細胞外 M タンパク質をコードする遺伝子 emm の配列 (stG~あるいは stC~) ならびに MLST に基づく Clonal Complex (CC) 分類により型判別される。SDSE 流行型については、患者からの分離頻度と分離菌の病原性との相関は不明であった。そこで日本国内の最流行型である stG6792-CC17 型株 KNZ01 を解析した結果、血清存在下でバイオフィーム様の細胞外構造を形成するという特徴を有し (図 5)、またその形成には細胞壁アンカータンパク質 Cwap5 が必須であることを見出した。一方で、国内外で流行型である stG245-CC25 型株 KNZ03 は高い溶血活性を有し、また表皮由来細胞との接着依存的に増殖するという固有の特性を示した (図 6)。以上より、流行型 SDSE 株は、それぞれが異なる特徴を持つことで病原性を発揮することで、感染症起因菌として高頻度で分離されることが示された。

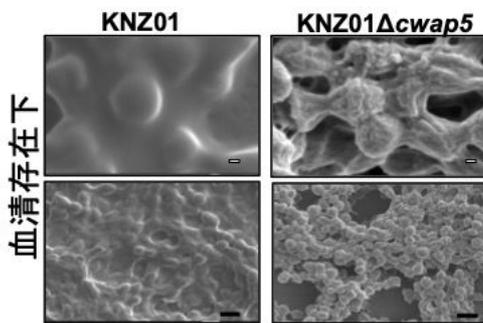


図 5. stG6792-CC17 型株 KNZ01 野生株と cwap5 遺伝子欠損株の細胞外構造

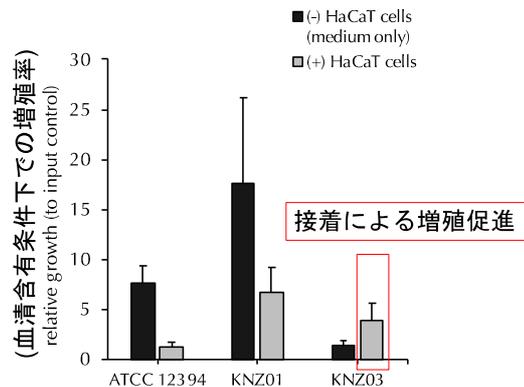


図 6. stG245-CC25 型株 KNZ03 の培養細胞接着時の増殖率上昇

<引用文献>

1. Wajima T, Morozumi M, Hanada S, Sunaoshi K, Chiba N, *et al.* Molecular Characterization of Invasive *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, Japan. *Emerg Infect Dis* 2016;22:247-54.
2. Watanabe S, Takemoto N, Ogura K, Miyoshi-Akiyama T. Severe invasive streptococcal infection by *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *Microbiol Immunol* 2016;60:1-9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 17件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Tsutsuki Hiroyasu, Ogura Kohei, Moss Joel, Yahiro Kinnosuke	4. 巻 64
2. 論文標題 Host response to the subtilase cytotoxin produced by locus of enterocyte effacement negative Shiga toxinogenic Escherichia coli	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 657 ~ 665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12841	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 Shibata Kana, Ogai Kazuhiro, Ogura Kohei, Urai Tamae, Aoki Miku, Arisandi Defa, Takahashi Natsuki, Okamoto Shigefumi, Sanada Hiromi, Sugama Junko	4. 巻 23
2. 論文標題 Skin Physiology and its Microbiome as Factors Associated with the Recurrence of Pressure Injuries	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological Research For Nursing	6. 最初と最後の頁 75 ~ 81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1099800420941100	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 Ogai Kazuhiro, Ogura Kohei, Ohgi Nozomi, Park Seohui, Aoki Miku, Urai Tamae, Nagase Satoshi, Okamoto Shigefumi, Sugama Junko	4. 巻 23
2. 論文標題 Stability of Skin Microbiome at Sacral Regions of Healthy Young Adults, Ambulatory Older Adults, and Bedridden Older Patients After 2 Years	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological Research For Nursing	6. 最初と最後の頁 82 ~ 90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1099800420941151	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 Shimizu Takeshi, Miyoshi-Akiyama Tohru, Ogura Kohei, Murata Shota, Ishige Shota, Kai Kiyohiro, Mitsutsuka Konosuke, Tomita Haruyoshi, Tanimoto Koichi, Matsumoto Akio	4. 巻 64
2. 論文標題 Effect of Sub-MICs of Macrolides on the Sensitivity of Pseudomonas aeruginosa Nitrosative Stress: Effectiveness against P. aeruginosa with and without Multidrug Resistance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 e01180-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.01180-20	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 Nguyen Van An, Ogura Kohei, Matsue Miki, Takemoto Norihiko, Mukai Kanae, Nakajima Yukari, Hoang Thuy Linh, Iwata Yasunori, Sakai Norihiko, Wada Takashi, Hashimoto Wataru, Okamoto Shigefumi, Ichimura Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Novel Hyaluronate Lyase Involved in Pathogenicity of Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 552418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.552418	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 -
1. 著者名 Yahiro Kinnosuke, Ogura Kohei, Goto Yoshiyuki, Iyoda Sunao, Kobayashi Tatsuya, Takeuchi Hiroki, Ohnishi Makoto, Moss Joel	4. 巻 10
2. 論文標題 Subtilase cytotoxin induces a novel form of Lipocalin 2, which promotes Shiga-toxicogenic Escherichia coli survival	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18943
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-76027-z	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 Ogura Kohei, Yahiro Kinnosuke, Moss Joel	4. 巻 13
2. 論文標題 Cell Death Signaling Pathway Induced by Cholix Toxin, a Cytotoxin and eEF2 ADP-Ribosyltransferase Produced by Vibrio cholerae	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 12~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins13010012	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 Fujii Taiga, Ohno Naoki, Sawazaki Takuto, Ogura Kohei, Miyati Tosiaki, Sugama Junko	4. 巻 -
2. 論文標題 Gravity magnetic resonance imaging measurement of muscle pump change accompanied by aging and posture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japan Journal of Nursing Science	6. 最初と最後の頁 e12407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jjns.12407	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 Ishihara Haruka, Ogura Kohei, Nguyen Van An, Miyoshi-Akiyama Tooru, Okamoto Shigefumi, Takemoto Norihiko	4. 巻 70
2. 論文標題 Comparative genome analysis of three Group A Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis strains isolated in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medical Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jmm.0.001322	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 Ogai Kazuhiro, Shibata Kana, Takahashi Natsuki, Ogura Kohei, Okamoto Shigefumi, Sugama Junko	4. 巻 21
2. 論文標題 Amplicon-based skin microbiome profiles collected by tape stripping with different adhesive film dressings: a comparative study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Microbiology	6. 最初と最後の頁 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12866-021-02122-4	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 -

1. 著者名 Matsue Miki, Ogura Kohei, Sugiyama Hironori, Miyoshi-Akiyama Tooru, Takemori-Sakai Yukiko, Iwata Yasunori, Wada Takashi, Okamoto Shigefumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Pathogenicity Characterization of Prevalent-Type Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis Strains	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.00097	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 -

1. 著者名 Ishihara Haruka, Ogura Kohei, Miyoshi Akiyama Tooru, Nakamura Masahiko, Kaya Hiroyasu, Okamoto Shigefumi	4. 巻 64
2. 論文標題 Prevalence and genomic characterization of Group A Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis isolated from patients with invasive infections in Toyama prefecture, Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 113 ~ 122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12760	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 Matsue Miki, Mori Yumiko, Nagase Satoshi, Sugiyama Yuta, Hirano Rika, Ogai Kazuhiro, Ogura Kohei, Kurihara Shin, Okamoto Shigefumi	4. 巻 28
2. 論文標題 Measuring the Antimicrobial Activity of Lauric Acid against Various Bacteria in Human Gut Microbiota Using a New Method	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Transplantation	6. 最初と最後の頁 1528 ~ 1541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0963689719881366	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 -

1. 著者名 Maekawa Shogo, Onizuka Satoru, Katagiri Sayaka, Hatasa Masahiro, Ohsugi Yujin, Sasaki Naoki, Watanabe Kazuki, Ohtsu Anri, Komazaki Rina, Ogura Kohei, Miyoshi-Akiyama Tohru, Iwata Takanori, Nitta Hiroshi, Izumi Yuichi	4. 巻 9
2. 論文標題 RNA sequencing for ligature induced periodontitis in mice revealed important role of S100A8 and S100A9 for periodontal destruction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14663
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50959-7	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 -

1. 著者名 Ogura Kohei, Shimada Kayo, Miyoshi-Akiyama Tohru	4. 巻 9
2. 論文標題 A multilocus sequence typing scheme of Pseudomonas putida for clinical and environmental isolates	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50299-6	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 -

1. 著者名 Ogura Kohei, Okumura Kayo, Shimizu Yukiko, Kirikae Teruo, Miyoshi-Akiyama Tohru	4. 巻 9
2. 論文標題 Pathogenicity Induced by Invasive Infection of Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis in a Mouse Model of Diabetes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 2128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2018.02128	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 -

1. 著者名 Yahiro Kinnosuke, Nagasawa Sayaka, Ichimura Kimitoshi, Takeuchi Hiroki, Ogura Kohei, Tsutsuki Hiroyasu, Shimizu Takeshi, Iyoda Sunao, Ohnishi Makoto, Iwase Hirotarō, Moss Joel, Noda Masatoshi	4. 巻 4
2. 論文標題 Mechanism of inhibition of Shiga-toxigenic Escherichia coli SubAB cytotoxicity by steroids and diacylglycerol analogues	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 4:22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41420-017-0007-4	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松榮美希、小倉康平、秋山 徹、岡本成史
2. 発表標題 流行型Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilisの病原性解析
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小倉康平、奥村香世、清水有紀子、切替照雄、秋山徹
2. 発表標題 糖尿病モデルマウスを用いた 溶血性レンサ球菌侵襲性感染症状についての研究
3. 学会等名 第55 回日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2018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

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