

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82729

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19289

研究課題名（和文）小児咽頭炎における宿主免疫干渉・重症化メカニズムの解明

研究課題名（英文）Analysis of host immune interference and aggravation mechanism in pediatric pharyngitis

研究代表者

穴山 美絵（黒澤美絵）（Anayama, Mie）

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター（臨床研究所）・臨床研究所・歯科医師

研究者番号：70792282

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）：学童期の小児が罹患する咽頭炎の主な原因菌であるA群レンサ球菌による咽頭炎の国内での患者報告数は激増している。そこで本申請研究では、A群レンサ球菌の保有する転写因子Lzpが宿主マクロファージのNrf2と拮抗的に結合することにより、炎症防御系遺伝子群の転写に影響を及ぼしていると仮説を立て、検索した。組換えLzpタンパクを作用させたマウスマクロファージのNrf2標的遺伝子の発現、活性酸素の産生量、および宿主の転写因子NF- $\kappa$ Bの活性解析を行った。本申請研究でA群レンサ球菌性咽頭炎が重症化する分子機構が解明され、ワクチンの開発に関する一案が報告できれば、社会的な貢献を果たすことができると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌性感染に対して抗菌薬を頻用した結果、世界的に薬剤耐性菌が増加した。このような背景があり、国連・欧米諸国・日本では、世界規模の緊急課題として薬剤耐性菌対策が採択された。このまま薬剤耐性菌の感染症に抜本対策が採られなければ、2050年には世界で毎年1,000万人以上の死者が生じることがWHOにて推計されている。また、耐性菌感染症による国内の経済損失は1兆円を超えると試算されている。本申請研究を通じて、小児における咽頭炎発症ならびに重症化の予防研究へ発展させ、抗菌薬の使用を減じることで、口腔関連感染症の医療費削減にも寄与し、社会的な貢献を果たしたいと考えている。

研究成果の概要（英文）：Group A streptococcus is a bacterium that causes children pharyngitis, and the number of patients has been increasing rapidly in Japan. In this study, we made a hypothesis that Group A streptococcal transcription factor Lzp bound antagonistically with host macrophage Nrf2 and affected the transcription of inflammatory defense genes, and investigated it. We analyzed the expression of Nrf2 target genes, the amount of reactive oxygen species production, and the activity of NF- $\kappa$ B in mouse macrophages exposed to recombinant Lzp protein. Elucidation of the molecular mechanisms that cause severe Group A Streptococcal pharyngitis will develop preventive research of the onset and severity of pharyngitis in children. Our study will be able to contribute to the reduction of antibiotic use.

研究分野：小児歯科学

キーワード：A群レンサ球菌 小児咽頭炎 炎症制御

## 1. 研究開始当初の背景

小児は免疫機能が未成熟なため、病原微生物に対して易感染性であることが多い。A 群レンサ球菌による咽頭炎は、口腔および鼻腔を感染起点とする疾患であり、小児が罹患する咽頭炎のうち 15～30% は A 群レンサ球菌が原因であるとされる。2000 年代の我が国では、A 群レンサ球菌性の咽頭炎小児患者の報告者数は、年間約 10 万であった。しかしながら、2010 年以降は年間約 20 万、そして 2015 年では 40 万を超えたと推計されている。さらに、A 群レンサ球菌感染症に続発する侵襲性病態患者とその死亡者数も、集計以来の最高値を毎年更新している。そのため、A 群レンサ球菌感染症の発症機構の解明と病因論に基づいた有効な制御法の確立が望まれている。一方で、医科領域における研究は活発でなく、口腔を經由して感染が成立するため、国内外で歯学研究者が A 群レンサ球菌の中心的な研究を担っている。

## 2. 研究の目的

A 群レンサ球菌は多様な血清型を有しているため、全ての A 群レンサ球菌に効果的なワクチンの開発ができず、現在は感染後に抗菌薬による治療を行うことが多い。近年では、マクロライド系抗菌薬の頻用により、マクロライド耐性菌が増加し続けている。A 群レンサ球菌性の咽頭炎ではペニシリン系抗菌薬が第一選択になり、現在ペニシリン耐性の A 群レンサ球菌は少ないものの、今後ともペニシリン系を頻用し続けた場合、ペニシリン耐性菌が増加する可能性はある。したがって、将来的には「予測医学・予防医学の普及」、すなわち A 群レンサ球菌感染症のワクチンを開発・導入することにより、疾患そのものの発生を防ぐことが必要になると考える。そこで、本研究では、A 群レンサ球菌感染症の発症機構の解明と病因論に基づいた有効な制御法開発の基盤確立、すなわち多くの A 群レンサ球菌の血清型で産生および分泌されるタンパク質を用いたワクチン開発を目指すこととした。

Nrf2 は自然免疫に関与する炎症制御系遺伝子を統一的に制御し、細胞の生存に必須な転写因子である。したがって、A 群レンサ球菌の産生するタンパク質が宿主の転写因子 Nrf2 を標的とすることは、A 群レンサ球菌性咽頭炎の炎症の増悪、ならびに感染拡大に寄与するものと推察される。本研究では、A 群レンサ球菌とヒト免疫系の間において、病原性が未解明であるが、A 群レンサ球菌のほぼ全ての菌株が発現しているロイシンジッパー型 Lzp タンパクに着目し、感染局所における炎症に対する影響にフォーカスを当て解明した。

## 3. 研究の方法

- 1) 転写因子 Nrf2 が炎症防御に関与する酵素群遺伝子の転写を調節することに着目し、Lzp タンパクによる Nrf2 標的遺伝子の発現制御について解析した。マウスマクロファージ由来 RAW 細胞に Lzp タンパクを 1 時間作用させ、その細胞溶解物に対して RT-PCR 解析を行った。
- 2) RAW 細胞に Lzp タンパクを 1 時間作用させ、活性酸素の産生量測定を行った。
- 3) 宿主の転写因子 NF- $\kappa$ B は、炎症性サイトカインや酸化ストレスにより活性化され、局所の炎症を増悪させるとの報告がある。そこで、RAW 細胞に Lzp タンパクを 1 時間作用させ、NF- $\kappa$ B の活性について ELISA 解析を行った。

## 4. 研究成果

これまでの A 群レンサ球菌に関する国内外の研究では、同菌の産生する毒素タンパク質が宿主の補体やサイトカインを分解することにより、感染局所への免疫担当細胞の遊走を阻害

するという報告や、補体の不活化により、同菌が宿主の自然免疫を回避し、感染拡大が惹起されるという報告が多い。そこで本研究では、既存の研究とは視点を変え、A 群レンサ球菌のタンパク質が、ヒト免疫系に直接干渉し、炎症制御系遺伝子の発現制御レベルで阻害するかを解析した。

Lzp は A 群レンサ球菌のほぼ全ての菌株で保有されており、同菌の菌体表層に発現、もしくは菌体外に分泌している Lzp は“ロイシンジッパー構造(LxxxxxxL)”からなる機能ドメインを有する。ロイシンジッパー構造は、 $\alpha$  ヘリックス構造を形成するアミノ酸中に 7 残基ごとにロイシンが繰り返し、ヘリックスの長軸に沿った面を 2 回転おきにロイシンが占める。同構造を有する分子は、そのロイシン残基を介して、2 本のヘリックスを束ねあわせるように嵌合することが知られている。この構造は、哺乳類では主として転写因子に広く存在し、ロイシンジッパーを介して相互に結合することが報告されている。マクロファージに存在する転写因子 Nrf2 も、ロイシンジッパー構造を有しており、同構造と Maf 因子とがヘテロ 2 量体を形成することで DNA に結合し、炎症防御に關与する遺伝子群の転写を調節することが示されている。そこで本研究では、A 群レンサ球菌のロイシンジッパー型 Lzp タンパクが宿主の転写因子 Nrf2 とヘテロ 2 量体を形成し、炎症防御系遺伝子群の転写を阻害し、感染局所での炎症増悪を惹起するのではないかと仮説を立てた。

A 群レンサ球菌由来 Lzp タンパクを作用させたマウスマクロファージ由来 RAW 細胞において、炎症防御に關与する Nrf2 標的遺伝子の発現低下、炎症の指標となる活性酸素産生量の増加、および炎症増悪に關与する転写因子 NF- $\kappa$ B の活性上昇が予想されたが、コントロールと比べて優位な差は得られなかった。実験系を確認するために、今後は Lzp タンパクと Nrf2 との結合の様相をフローサイトメトリー等を用いて解析し、結合を強める因子や条件の検索をする必要があると考える。その結果を踏まえて、将来的には Lzp タンパクをマウスの皮下に接種することにより Lzp 免疫化マウスの作製を行い、マウスの鼻腔に A 群レンサ球菌を感染させ、鼻腔組織における病態について、免疫組織学的に解析をし、Lzp を抗原とする咽頭炎予防ワクチン開発につながる一助になることを期待する。

さらに、申請者はヒト免疫細胞を傷害する A 群レンサ球菌由来の CAMP 毒素の分子機能解析を網羅的に行い、マクロファージ細胞や咽頭上皮細胞等への傷害機構を解明した (Kurosawa. *et al.*, *Microbes Infect.* 18: 118-127, 2016 / Kurosawa. *et al.*, *Microbes Infect.* 20: 9-18, 2018 / Kurosawa. *et al.*, *Microbiol. Immunol.* 62: 617-623, 2018)。そこで、同菌の Lzp タンパクおよび CAMP 毒素が協調して炎症増悪に關与するのではないかと、そしてトキシド型ワクチンの抗原候補となるのではないかと仮説を新たに立て、A 群レンサ球菌性咽頭炎が重症化する機構を分子生物学的に解明したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oda M, Kurosawa M, Yamamoto H, Domon H, Takenaka S, Ohsumi T, Maekawa T, Yamasaki N, Furue Y, Terao Y	4. 巻 64
2. 論文標題 Sulfated vizantin inhibits biofilm maturation by Streptococcus mutans	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and immunology	6. 最初と最後の頁 493 ~ 501
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12797	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
---------	---------