

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18258

研究課題名（和文）細菌接着におけるホスホリルコリンの関与と新たな治療法の開発に関する研究

研究課題名（英文）Impact of Phosphorylcholine Expression on the Adherence and Invasion of *Streptococcus pyogenes* to Epithelial Cells

研究代表者

井内 寛之（Iuchi, Hiroyuki）

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：90645285

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）：化膿連鎖球菌の8つの臨床株を培養し、蛍光活性化セルソーティングを使用してPC発現を測定した。化膿連鎖球菌の表面に発現するPCの発現は各株で異なり、同じemm遺伝子型でも異なっていた。Detroit 562細胞を用いて細菌の付着と浸潤を調べた。抗PC特異的モノクローナル抗体（TEPC-15）を使用して細菌のPCを阻害し、PAF-Rアンタゴニスト（ABT-491）を使用して細胞 PAF-R を阻害した。細菌接着実験および細胞内侵入実験ともに、TEPC-15およびABT-491の阻害効果と化膿連鎖球菌におけるPC発現との間に有意な負の相関関係が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺炎球菌やインフルエンザ菌に対してワクチン接種が義務化され侵襲性の感染症が減少してきている。しかしながら、ワクチン株以外の感染は減少せず、耐性菌の問題や無莢膜インフルエンザ菌についてはワクチンの効果はない。また、化膿連鎖球菌に対するワクチンの開発はなされていない。ホスホリルコリン(PC)はすべてのグラム陽性および陰性菌の細胞壁の構成成分であり、血小板活性化因子受容体を介して細菌の上皮への接着や細胞内侵入に関し、PCの発現は肺炎球菌やインフルエンザ菌の病原性と相関することが知られている。今回初めて化膿連鎖球菌とPC発現の相関を発見した。上気道感染症に対するワクチン開発に大いなる一歩となる。

研究成果の概要（英文）：Eight clinical strains of *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) were cultured, and Phosphorylcholine (PC) expression was measured using fluorescence-activated cell sorting. The level of PC expressed on the *S. pyogenes* surfaces differed in each strain and differed even in the same emm genotype. Bacterial adherence and invasion were examined using Detroit 562 cells. An anti-PC-specific monoclonal antibody (TEPC-15) was used to inhibit bacterial PC, and the platelet-activating factor receptor (PAF-R) antagonist (ABT-491) was used to inhibit cellular PAF-R. Adherence assay experiments showed a significant negative correlation between TEPC-15 and ABT-491 inhibitory effects and PC expression in *S. pyogenes*. Similarly, intracellular invasion assay experiments showed a significant negative correlation between TEPC-15 and ABT-491 inhibitory effects and PC expression in *S. pyogenes*. This study suggests that *S. pyogenes* is involved in cell adhesion and invasion by PC.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：連鎖球菌 ホスホリルコリン 血小板活性化因子受容体 ワクチン 上気道感染症

1. 研究開始当初の背景

7 価および 13 価の結合型肺炎球菌ワクチン (PCV7, PCV13: プレベナー®) は小児の侵襲性肺炎球菌感染症ならびに耐性菌による難治化症例を減少させた。急性中耳炎に対しても鼓膜切開の頻度が減少したことが報告されているが、急性中耳炎全体の予防効果は 6 % と低く、血清型置換やインフルエンザ菌による急性中耳炎の増加が問題となっている。また、2013 年に定期接種化されたインフルエンザ菌 b 型に対するワクチン (Hib ワクチン, アクトヒブ®) も髄膜炎などの侵襲性感染症には優れた予防効果を示したが、中耳炎の起炎菌となるのは莢膜を持たない NTHi であるため、このワクチンは中耳炎には無効である。そのため、高病原性の Spn や NTHi に対する有効な新たな細菌感染予防対策が急務である。さらに、細胞内に寄生する連鎖球菌は、一旦は抗菌薬で軽快してもすぐに扁桃炎を繰り返す反復性扁桃炎さらには扁桃周囲膿瘍を罹患する症例がある。そのため、上気道感染症に対して広域スペクトラムのワクチン開発が必要である。

2. 研究の目的

細菌感染予防のターゲットとして、Spn の細胞表層に存在する蛋白抗原である Pneumococcal surface protein A (PspA) や NTHi の外膜蛋白である P6、そして、我々が注目している PC がある。PC はすべてのグラム陽性および陰性菌の細胞壁の構成成分であり、これを経粘膜投与することで粘膜免疫応答が誘導され、ワクチンとしての応用に期待が寄せられている。また、PC は血小板活性化因子受容体 (PAF-R) を介して細菌の上皮への接着や細胞内侵入する。PC は Spn および NTHi を含む多種多様な病原体の構成成分であり、PC の発現が高い Spn は低発現の PC より侵襲性の感染を引き起こし、NTHi の PC 発現は滲出性中耳炎患者の鼻咽頭における NTHi の長期定着に関与するなど、PC の発現が Spn および NTHi の病原性と相関することが知られている。しかしながら、連鎖球菌について PC 発現と病原性についてはよく知られていない。そのため、PC と連鎖球菌の病原性を証明することができれば、上気道感染症に対するワクチン開発に大いなる一歩を踏み出すことができると考えている。そこで、今回は連鎖球菌の PC 発現とその細胞接着・細胞内侵入の関係性について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

細菌培養

当病院の慢性扁桃炎患者の扁桃から連鎖球菌を採取した。細菌をスキムミルクに -80 で保存し、使用前日にヒツジ血液寒天培地で 37 の 5%CO₂ インキュベーターで一晩インキュベートした。0.5%ウシ血清アルブミンリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄した後、580 nm で光学密度を測定し、コロニー形成単位 (CFU) を決定した。S. pyogenes の濃度は、1.0 × 10⁸ CFU/mL に調整した。

細胞培養

ヒト咽頭癌上皮細胞であるDetroit 562 細胞を最少必須培地で 37 の 5%CO₂ インキュベーターで培養した。細胞を回収した後、96 穴組織培養プレートに 1 穴あたり 2 × 10⁴ 個の細胞を置き、37 の 5%CO₂ インキュベーターで 48 時間培養した。

溶連菌の PC 発現

PC 発現は、蛍光活性化セルソーティングによる平均蛍光強度 (MFI) を使用して測定した。血液寒天培地で一晩培養した菌を PBS で 1.0 × 10⁸CFU/mL に調整した。PC 特異的モノクローナルマウス IgA 抗体を 4 で 4 時間インキュベートした。最後に、細菌をフルオレセインイソチオシアネート標識ヤギ抗マウス抗体とともに 20 で 30 分間インキュベートした。

溶連菌の emm 遺伝子型

M タンパク質をコードする emm 遺伝子は、米国疾病管理予防センターが推奨するプロトコールに従って測定した。

細菌接着方法

細菌をヒツジ血液寒天培地で 37 の 5%CO₂ インキュベーターで一晩培養した。細菌 (1.0 × 10⁵CFU/mL) を 96 穴プレートに投与し、37 の 5%CO₂ インキュベーター内で 2 時間付着させた。各穴を 200 μL の PBS で 10 回洗浄し、細胞に付着しなかった細菌を除去した。次に、100 μL のサポニンで処理し、各穴から 100 μL の溶液をヒツジ血液寒天プレートに播種しました。37 の 5% CO₂ インキュベーターで 12 時間のインキュベーション後、コロニー数を計測しコントロールとした。細菌の付着に対する PC 特異的 IgA の効果を調べるために、細菌の PC を TEPC-15 で 37

の 5%CO₂ インキュベーター内で 1 時間処理し、コロニーの数を計測した。さらに、デトロイト 562 細胞の表面に発現した PAF-R は、PAF-R アンタゴニスト (ABT-491) で処理し、37 °C の 5%CO₂ インキュベーターで 5 時間培養し、コロニーの数を計測した。

細胞内侵入方法

細菌をヒツジ血液寒天培地で 37 °C の 5%CO₂ インキュベーターで一晩培養した。細菌 (1.0 × 10⁸CFU/mL) を 96 穴プレートに投与し、37 °C の 5%CO₂ インキュベーター内で 6 時間培養し細菌を細胞内に侵入させた。ゲンタマイシンを各穴に投与し、細胞に接着している細菌を処理した。各穴を 200 μL の PBS で 10 回洗浄し、細胞に付着しなかった細菌を除去した。次に、100 μL のサポニンで処理し、各穴から 100 μL の溶液をヒツジ血液寒天プレートに播種した。37 °C の 5% CO₂ インキュベーターで 12 時間のインキュベーション後、コロニー数を計測しコントロールとした。細菌の付着に対する PC 特異的 IgA の効果を調べるために、細菌の PC を TEPC-15 で 37 °C の 5%CO₂ インキュベーター内で 1 時間処理し、コロニーの数を計測した。さらに、デトロイト 562 細胞の表面に発現した PAF-R は、PAF-R アンタゴニスト (ABT-491) で処理し、37 °C の 5%CO₂ インキュベーターで 5 時間培養し、コロニーの数を計測した。

4 . 研究成果

溶連菌の PC 発現と *emm* 遺伝子型

全ての溶連菌で PC は発現していたが、発現強度は各株で異なっていた。遺伝子型別では、*emm75* が 4 菌株と、*emm89*、*emm28*、*emm12*、および *emm11* がそれぞれ 1 つの菌株であった。さらに PC の発現は *emm75* 株で高い傾向にあり、同じ *emm75* 株でも PC の発現は異なっていた。

細菌付着に対する TEPC-15 の濃度別阻害効果

50、10、および 5 μg/mL の TEPC-15 で処理した溶連菌の数は有意に減少した ($p < 0.05$) が、100 および 1 μg/mL の TEPC-15 で処理した溶連菌は減少しなかった。これらの結果に基づいて、10 μg/mL の TEPC-15 を使用した。

細菌付着に対する ABT-491 の濃度別阻害効果

50、25、および 10 μg/mL の ABT-491 で溶連菌の数は有意に減少した ($p < 0.05$) が、5 および 1 μg/mL の ABT-491 で処理した溶連菌は減少しなかった。これらの結果に基づいて、10 μg/mL の ABT-491 を使用した。

細菌付着に対する TEPC-15 および ABT-491 の阻害効果

各細菌の PC 発現と細胞に付着した細菌の数との間に有意な正の相関を認めた ($r = 0.76$, $p < 0.05$)。さらに、接着した *emm75* の数は、他の *emm* 遺伝子型よりも有意に高かった ($p < 0.05$)。各細菌の PC 発現と、TEPC-15 で処理した後の接着した細菌数との間には、有意な負の相関を認めた ($r = -0.76$, $p = 0.03$)。さらに、ABT-491 で処理した後の接着した細菌数との間には負の相関を認めた ($r = -0.73$, $p = 0.04$)。

細胞内侵入に対する TEPC-15 および ABT-491 の阻害効果

各細菌の PC 発現と細胞内に侵入した細菌の数との間に有意な正の相関を認めた ($r = 0.94$, $p < 0.05$)。さらに、細胞内に侵入した *emm75* の数は、他の *emm* 遺伝子型よりも有意に高かった ($p < 0.05$)。各細菌の PC 発現と、TEPC-15 で処理した後の細胞内に侵入した細菌数との間には、有意な負の相関を認めた ($r = -0.83$, $p = 0.01$)。さらに、ABT-491 で処理した後に細胞内に侵入した細菌数との間には負の相関を認めた ($r = -0.90$, $p < 0.05$)。

結語

この研究は、溶連菌に PC が発現していることを示しており、同じ *emm* 遺伝子型であってもその発現は異なっていた。PC と PAF-R が連鎖球菌の細胞接着と細胞内侵入に関与していることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iuchi Hiroyuki, Ohori Junichiro, Kiyama Satoshi, Imuta Naoko, Nishi Junichiro, Kurono Yuichi, Yamashita Masaru	4. 巻 21
2. 論文標題 Effectiveness of antibacterial agents against cell-invading bacteria such as Streptococcus pyogenes and Haemophilus influenzae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Microbiology	6. 最初と最後の頁 148~148
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12866-021-02217-y	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 Iuchi Hiroyuki, Ohori Junichiro, Matsuzaki Hisahiro, Tokushige Takeshi, Toge Sakiko, Yamashita Masaru	4. 巻 10
2. 論文標題 Impact of Phosphorylcholine Expression on the Adherence and Invasion of Streptococcus pyogenes to Epithelial Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 527 ~ 527
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms10030527	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
---------	---------