

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 23日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21790425

研究課題名（和文）マウスモデルを用いた A 群連鎖球菌劇症型感染症の発症抑制

研究課題名（英文）In vivo suppression of the toxicity in the invasive M-1 group A Streptococcal isolates.

研究代表者

立野 一郎 (Ichiro Tatsuno)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：50311642

研究成果の概要（和文）：マウス感染モデルを用いて A 群連鎖球菌による劇症型感染症の発症を抑制する方法について研究を行なった。その結果、（1）菌体外分泌毒素 Nga の NADase 活性を抑制する方法により菌の病原性を一定レベル低下させることに成功した。（2）Nga は NADase 依存的な毒素活性に加えて、NADase 非依存的な何らかの機能を保持している可能性があることを明らかにした。（3）発症抑制の標的として、Nga 以外の菌体成分についての知見を得ることができた。

研究成果の概要（英文）： I have studied about in vivo suppression of the toxicity in the invasive M-1 group A Streptococcal isolates, using mouse infection model. As results, (1) I could partially suppressed the toxicity in an invasive M-1 group A Streptococcal isolate, suppressing the NADase activity of Nga protein which is secreted toxin; (2) I have presented the supportive evidence that Nga (also known as SPN) has a NADase-independent function; (3) I provided other potential targets to suppress the Streptococcal virulence.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：A 群連鎖球菌、A 群レンサ球菌、人喰いバクテリア

1. 研究開始当初の背景

A 群連鎖球菌は、古くから咽頭炎、猩紅熱などの原因菌として知られていたが、近年劇症型感染症の起原菌となる例が報告されるようになってきた。この病気は、全身の様々な臓器の重篤な病態を引き起こすが、

中でも筋肉が急に腫れ数時間から数日のうちにどんどん壊死していく壊死性筋膜炎は典型的な症状である。また、抗生物質の大量投与を初めとする様々な治療が施されても、半数近くが亡くなってしまう恐ろしい病気である (Clin Microbiol Rev, 2000, 1

3:470-511)。病気の分子機構は未だ不明な点が多いが、病原因子は大きく2種類に分類することが可能である。前者は、宿主を攻撃する毒素などである。後者は、宿主による攻撃から身を守る防御因子である。本菌によって菌体外に分泌されるNga (別名SPN) は培養細胞を用いたin vitro の実験において細胞障害活性を示したことから、宿主攻撃毒素のひとつとして注目されるようになった(Cell 2001, 104: 143-152)。この毒素活性の本体はNgaのNADase活性に依存していると考えられている。このような菌の特徴を抑制することができれば病原性を低下させることができる可能性がある。

本菌による劇症型感染症の研究に関しては、良好な動物モデル (J. Clin. Invest, 1998, 102: 550-560) が存在する。そのモデルにおいて、菌液を脇腹の皮内 (或いは皮下) に投与されたマウスが発症するとヒトに対する劇症型感染症に類似した症状を示し (投与部位周辺組織の壊死から菌血症を伴う全身感染症)、最終的に死に至る。そこで当研究室では、9種類の臨床分離株を用いてマウス感染実験を行なったところ、培養上清中のNADase活性とマウスの致死率 (1週間観察) の間に正の相関関係があることを示す結果が得られた。更に、2番目に高い致死率 (約90%) を示したGT01株 (1番はCR01株の100%) のnga 遺伝子を破壊すると発症率、致死率共0%に低下した (細菌学会総会 2008 京都にて発表済)。この結果は、Nga の活性を完全に抑制することが出来れば菌の病原性を理論上 0% まで抑制可能であることを示唆している。

ところで、Ngaは細菌自身にとっても毒性を発揮するので、菌自身はIFSタンパク質を発現することによりNga の毒性を中和する。ただし、IFSは分泌されない (PLOS pathogens 2005, 1: 362-372)。そこで、ヒスチジンのタグを付与した組み換えIFSタンパク質 (His-IFS) を大腸菌で発現させ精製した。His-IFS を菌液と共にマウスに接種し1週間での致死率を記録した結果、GT01株+His-IFSを投与したマウスの致死率 47% (7/15) はGT01株+溶出液 (control) を投与したマウスの致死率 89% (8/9) に比べて低

かった (Logrank test: $P < 0.05$)。この結果について、IFSがNgaの毒素活性を阻害した結果であろうと予測していたが、それほど単純な話ではないことが明らかになってきた。His-IFSは大腸菌から精製されたものであるが精製度は100%ではない。予備実験の結果、IFSに加えて大腸菌の菌体成分の内少なくとも2種類 (少なくとも1つはLPS) が致死率改善効果に寄与している可能性があることが示唆された。

前述のとおり、本菌の病原因子のもう一方の柱は、宿主による攻撃から身を守る防御因子である。以前より、一般的に細菌が生体内に侵入し感染巣を形成した場合当然見られるべき白血球の浸潤が、本菌の場合観察されないことが知られていた。その後の研究により菌はケモカインを分解するタンパク質分解酵素の分泌、補体の活性化阻止、オプソニン化阻止など様々な手段を駆使して好中球が活性化されるのを阻害していることが明らかになってきた (Infection and Immunity Mar. 2008, vol. 76: 978-985)。それ故、LPSの効果は菌側の「免疫機構の活性化阻止」戦略を破綻させた結果ではないかと推察する。

2. 研究の目的

マウス感染モデルを用いて、A群連鎖球菌による劇症型感染症の発症を抑制する方法について研究した。

(1) 前項に記載したとおり、予備実験では溶出液をコントロールとしてHis-IFSの効果を評価していた。その結果、得られた防御効果がHis-IFS以外の因子によるものである可能性を排除できなかった。そこで、コントロールとして無関係のタンパク質を使用し再評価した。

(2) 大腸菌の菌体成分の一つであるLPSが致死率改善効果に寄与している可能性について検討した。この実験において、強力な免疫誘導物質であるLPSを菌体の周りに高濃度で存在させることにより強制的に免疫機構を活性化させることを期待している。

(3) 上記「強制的な免疫機構の活性化」の手法が成功しなかった原因を調べることを

目的とした。これまでマウス感染モデルを用いて、菌投与 (input) 後のマウスの致死率、体重変動など (output) を観察してきた。しかし、“input” から “output” へ至る途中経過 (菌の体内動態等) の情報が不足している。例えば「投与後、菌がマウスの特定の部位で増殖している」などの情報が得られれば、免疫刺激物質の投与方法を改良できるかもしれない。

In vivo imaging の手法 (この時期に国内で使用可能になってきた) を用いると、マウス体内での菌の3次元的位置や病原因子の発現レベルの変化などを測定することが可能になる。その為には、菌を2種類の蛍光 (赤と緑) でラベルする必要がある。

(4) 「研究開始当初の背景」の項に記述したように「Ngaの活性を完全に抑制することが出来れば菌の病原性を理論上 0% まで抑制可能」という仮説に基づいて、研究を行ってきた。しかし、本研究期間中に他のグループから「Nga はNADase依存的な毒素活性に加えて、非依存的な機能を保有する可能性がある」という結果が報告された (J Bacteriol. 2010 Jul;192(14):3735-46)。もしこれが本当であれば、NgaのNADase活性をいくら中和しても限定的な効果しか得られない可能性がある。そこで、このNgaのNADase非依存的な機能が本当に存在するのかについて検討した。

(5) 上記のとおり、Ngaを標的にするのみでは本研究課題を達成することができない可能性がある。この問題に対処するため以下の研究を計画した。本菌のtwo component regulatory systemを構成するセンサータンパク質の欠損株 (13種類) の多くが、マウスに投与した際野生株に比較して病原性が変化した (第85回日本細菌学会)。中でもCovSは、病原因子の多くを負に制御することが知られている。マグネシウムイオンがCovSのリガンドと作用するという論文が存在する (Mol Microbiol. 2007 Aug;65(3):671-83) が、リガンドとして他の物質が作用する可能性に関しては不明である。もし、ヒトに投与可能な他のリガンドが存在すれば、そのリガンドでCovSを活性化することにより「劇症型感染症の発症を抑制」できる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) A 群レンサ球菌は当研究室で保有する劇症型感染症患者由来の臨床分離株 GT01 株を使用した。ヒスチジンのタグを付与した組み

換え IFS タンパク質 (His-IFS) を菌液と共にマウス (3 週齢の ICR) の左脇腹皮内に接種し、1 週間での致死率を記録した。コントロールとして、大腸菌のアスパラギン酸レセプターのカルボキシル側領域 (His-TarC) を使用した。

(2) A群レンサ球菌は当研究室で保有する劇症型感染症患者由来の臨床分離株のGT01株、及びCR01株を使用した (菌株の特徴については下記の雑誌論文6参照)。

(3) GFP (緑色蛍光) 或いは、DsRed2 (赤色蛍光) の遺伝子をレンサ球菌と大腸菌のシャトルベクター (pLZ12-Km2) にサブクローニングした。得られたプラスミドを本菌にエレクトロポレーションによって導入した。プロモータとして、*recA*, *covRS*, *nga* 遺伝子上流配列を使用した。

(4) 本菌にはNADase活性を持つNgaをコードする株とNADase活性持たないNgaをコードする株の2種類が存在する。NADase 活性の有無は330番目のアミノ酸がグリシンとアスパラギン酸のどちらであるかによって規定される (Microbiology. 2007 Dec;153(Pt 12):4253-60)。最初に全塩基配列が決定されたSF370株はNADase negativeのNgaをコードする株の代表である。①SF370株のNgaを解析するために nga_{SF370} 遺伝子をPCR法によって増幅し、得られた産物を市販のクローニングベクター (pGEM-T easy) を用いて大腸菌にクローニングした。②SF370の nga_{SF370} 欠損株を作成し、マウス感染モデルを用いて病原性を評価した。

(5) 培地に Mg^{2+} を添加した培地を用いると、*covS* 欠損株と親株 (野生株) 間でcapsule合成酵素とIL-8分解酵素の発現に差が見られるが、 Mg^{2+} 無添加の培地ではその差は見られない (Mol Microbiol. 2007 Aug;65(3):671-83)。この手法を参考に、 Mg^{2+} 無添加の培地を使用し、5% CO_2 濃度と無調整 (NA, Natural Air) の状態での菌の増殖能を比較した。

4. 研究成果

(1) His-IFSの投与群のマウス致死率は、83% (10 death/12 trial) → 42% (5/12) に改善した (Logrank test: $P < 0.05$)。この研究により、①Ngaが生体内で病原因子として機能していること。②Ngaのを中和する物質は、治療薬として期待できることが示された。詳細は下記の雑誌論文6に記載した。

(2) 大腸菌由来のLPS (Sigmaより購入)の効果をテストしたが、統計的に有為な差を得るまでには至っていない。加えて、同様の効果を期待してFCA (Freund's complete adjuvant), Zymosan A, CpG motif (DNA), CTB (コレラ毒素のBサブユニット)をテストしたが、統計的に優位な効果を確認することができなかった。【考察】病原体は宿主の免疫機構を不活化しようとしている。これに対抗するため、「強制的に免疫機構を活性化する」という手法を考えた。同様の手法を用いた実験は知り得る限り過去になされておらず、理論的には有効であると思われたが、実際行われた実験では有効性を確認することができなかった。「何故失敗したのか」、「実験方法を工夫することで有効性を実証できるようになる可能性が残されているのか」についてさらに研究していく必要があると思われる。

(3) 蛍光ラベルすることに成功した。赤色蛍光は、緑色蛍光に比べて弱い蛍光しか示さなかった。【考察】コントロールとして、同様の手法で蛍光ラベルした大腸菌を用いてin vivo imaging (night OWL, ベルトール社)のテストを実施した。この結果から、A群レンサ球菌の蛍光強度はin vivo imagingには不十分であると予想された。問題を改善するためには、「高コピーベクターの使用」、「強力なプロモーターの使用」等が一般的に考えられる。しかし、「使用できるベクターの種類」、「プロモーター強度」などに関する情報は、大腸菌に比べて不十分である。今後は、本菌に関する基礎的な研究を行い、(上記のような)基本的な情報を蓄積していく必要がある。

(4) ①クローニングされた *nga_{SF370}* 遺伝子には必ず変異が入っていた。コントロールとして使用した本菌の他の遺伝子 (或いは non-coding region) の場合との比較から、*nga_{SF370}* が大腸菌に対して毒性を発揮することが示唆された。②親株を投与した場合の致死率 14% (2/14)、これに対して欠損株の場合は 36% (5/14) であった (Logrank test: $p=0.214$)。【考察】 (i) 確かに *Nga* は、NADase 非依存的な機能を有する可能性が高い。(ii) しかし、その機能はマウスに対する病原性に直接関係のあるものではなかった (しかし、ヒトに対する病原性に関与している可能性は否定されていない)。詳細は下記の雑誌論文9に記載した。

(5) SF370株において5%CO₂条件下で増殖させると親株と *covS* 欠損株ではその増殖能に差が見られない。しかし、NA条件下では *covS* 欠損株の増殖能が低下した。【考察】 *CovS* はマグネシウムイオン以外の因子もリガンドとして認識する可能性が示された。今後は、新規のリガンドを同定するためさらに研究を重ねる必要があると考えられる。詳細は、下記の雑誌論文10に記載した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計10件)

- ① Tatsuno I, Isaka M, Hasegawa T. Characterization of NADase-inactive NAD⁺ glycohydrolase in *Streptococcus pyogenes*. *Advances in Microbiology*. 査読あり、2013 Mar;3(1):91-100. doi: 10.4236/aim.2013.31015
- ② Tatsuno I, Okada R, Zhang Y, Isaka M, Hasegawa T. Partial loss of *CovS* function in *Streptococcus pyogenes* causes severe invasive disease. *BMC Res Notes*. 査読あり、2013 Mar 28;6(1):126. doi: 10.1186/1756-0500-6-126
- ③ Matsumoto M, Suzuki M, Hirose K, Hiramatsu R, Minagawa H, Minami M, Tatsuno I, Okamoto A, Ohta M, Hasegawa T. Variation in M protein production among *Streptococcus pyogenes* strains according to emm genotype. *Microbiol Immunol*. 査読あり、2011 Jun;55(6):379-87. doi: 10.1111/j.1348-0421.2011.00329.x.
- ④ Ichikawa M, Minami M, Isaka M, Tatsuno I, Hasegawa T. Analysis of two-component sensor proteins involved in the response to acid stimuli in *Streptococcus pyogenes*.

- Microbiology. 査読あり、2011
Nov;157(Pt 11):3187-94. doi:
10.1099/mic.0.050534-0
- ⑤ Minami M, Kamimura T, Isaka M, Tatsuno I, Ohta M, Hasegawa T.
Clindamycin-induced CovS-mediated
regulation of the production of
virulent exoproteins streptolysin O,
NAD glycohydrolase, and streptokinase
in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob
Agents Chemother.* 査読あり、2010
Jan;54(1):98-102. Epub 2009 Oct 5.
doi: 10.1128/AAC.00804-09.
- ⑥ Hasegawa T, Minami M, Okamoto A,
Tatsuno I, Isaka M, Ohta M.
Characterization of a
virulence-associated and
cell-wall-located DNase of
Streptococcus pyogenes. *Microbiology.*
査読あり、2010 Jan;156(Pt 1):184-90.
Epub 2009 Oct 22. doi:
10.1099/mic.0.031955-0.
- ⑦ Minami M, Wakimoto Y, Matsumoto M,
Matsui H, Kubota Y, Okada A, Isaka M,
Tatsuno I, Tanaka Y, Hasegawa T.
Characterization of *Streptococcus
pyogenes* isolated from
balanoposthitis patients presumably
transmitted by penile-oral sexual
intercourse. *Curr Microbiol.* 査読あり、
2010. Aug;61(2):101-5. Epub 2010 Jan
28. doi: 10.1007/s00284-010-9581-x.
- ⑧ Hasegawa T, Okamoto A, Kamimura T,
Tatsuno I, Hashikawa SN, Yabutani M,
Matsumoto M, Yamada K, Isaka M, Minami
M, Ohta M. Detection of invasive
protein profile of *Streptococcus
pyogenes* M1 isolates from pharyngitis
patients. *APMIS.* 査読あり、2010
Mar;118(3):167-78. doi:
10.1111/j.1600-0463.2009.02574.x.
- ⑨ Tatsuno I, Isaka M, Minami M, Hasegawa
T. NADase as a target molecule of in
vivo suppression of the toxicity in the
invasive M-1 group A *Streptococcal*
isolates. *BMC Microbiol.* 査読あり、
2010 May 17;10:144. doi:
10.1186/1471-2180-10-144.
- ⑩ Minami M, Ohmori D, Tatsuno I, Isaka M,
Kawamura Y, Ohta M, Hasegawa T. The
streptococcal inhibitor of complement
(SIC) protects *Streptococcus pyogenes*
from bacteriocin-like inhibitory
substance (BLIS) from *Streptococcus
salivarius*. *FEMS Microbiol Lett.* 査読
あり、2009 Sep;298(1):67-73. doi:
10.1111/j.1574-6968.2009.01696.x.
- [学会発表] (計9件)
- ① 立野一郎、他(3名) A群レンサ球菌 *csrS*
遺伝子の変異と菌の病原性に関する研
究、日本細菌学会・中部支部総会、201
2年11月9日、金沢大学医学類十全講堂(石
川県)
- ② 立野一郎、他(4名) Analysis of two c
omponent regulatory systems in *S.
pyogenes*. 第85回日本細菌学会、2012
年3月29日、長崎新聞文化ホール(長崎
県)
- ③ 立野一郎、他(3名) A群レンサ球菌にお
ける二成分制御系因子の解析、日本細菌
学会・中部支部総会、2011年10月21日、
名古屋大学(愛知県)
6. 研究組織
(1) 研究代表者
立野 一郎 (Ichiro Tatsuno)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 50311642