

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06979

研究課題名(和文) 独創的なマウスモデルを用いた劇症型レンサ球菌感染症の細菌側の発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the onset mechanism of streptococcal toxic shock syndrome on the bacterial side using an original mouse model

研究代表者

齋藤 光正 (Saito, Mitsumasa)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：00315087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：A群 溶血性レンサ球菌(GAS)が劇症型感染症(STSS)を引き起こすメカニズムを解明するために、マウスモデルを用いて解析した。4株のGASをそれぞれマウスに筋肉内注射したところ、感染20日後に一部のマウスが死亡した。これらのマウスの血液、筋肉および臓器から分離されたGASの遺伝子解析から、csrS または csrR に変異を有する強毒性株が筋肉注射部位に出現し、全身に播種することが示された。我々は、これらの変異がCovRタンパク質のリン酸化を阻害し、病原性遺伝子の発現抑制ができなくなる結果、病原性が増強するするという仮説を立てたが、リン酸化の阻害を実験的に証明することはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

劇症型レンサ球菌感染症は近年急増しているが、その発症メカニズムは未だに不明な点が多い。本研究においては、A群 溶血性レンサ球菌が劇症型感染症を引き起こす際に、感染局所において強毒化した変異株が出現し全身に播種されることをマウスモデルで証明した。そのメカニズムとして遺伝子突然変異が考えられるが、本研究の結果からは、これまで考えられていたcsrSまたはcsrRの変異だけでは説明ができなかった。A群 溶血性レンサ球菌の強毒化に直接関与している遺伝子変異は、csrS/csrR 以外に存在する可能性があることを見出した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism by which group A beta-hemolytic Streptococcus (GAS) induces severe toxicity syndrome (STSS), a mouse model was used. Four strains of GAS were injected intramuscularly into mice, and some mice died after 20 days of infection. Genetic analysis of GAS isolated from blood, muscle, and organs of these mice showed that highly virulent strains with mutations in csrS or csrR appeared at the site of muscle injection and disseminated systemically. We hypothesized, but were unable to prove experimentally, that these mutations inhibit phosphorylation of the CovR protein, resulting in failure to suppress expression of virulence genes and thus increased virulence.

研究分野：細菌学

キーワード：劇症型レンサ球菌感染症 A群 溶血性レンサ球菌 マウスモデル csrS/csrR 遺伝子突然変異 強毒化

1. 研究開始当初の背景

劇症型レンサ球菌感染症(STSS)は、主にA群溶血性レンサ球菌(以下GAS)によって引き起こされる。初期には、四肢の疼痛、腫脹、発熱、血圧低下などがみられ、発症後数十時間以内に軟部組織壊死、急性腎不全、成人型呼吸窮迫症候群、多臓器不全などが急速に出現し、わずか1日余りでショック状態から死に至る。わが国では1992年に第1例目が報告され、近年報告数が増加している。マスコミが「人食いバクテリア」とセンセーショナルに報道したこともあって脅威が広がっている。通常GASは、咽頭扁桃炎や膿痂疹を引き起こす程度でそれほど病原性は高くなく、小児では健康保菌者も多い。それが一体なぜ劇症化するのか、その発症メカニズムはまだ十分には解明されていない。

本疾患の病態解明が進まなかった原因の1つは、STSSを解析するのに適当な動物モデルが国内外に存在しなかったためと考えられる。GASはマウスに接種してもふつうは致死的とはならない。ところが申請者は、GAS SP2株 10^7 個をddYマウスに筋注して約20日前後より、GASの全身播種と軟部組織壊死が突然起こり、それまで無症状だったマウスが発症後約1日で死亡することを見出した。この病態はヒトのSTSSと酷似しており、STSSに最も近い動物モデルとして報告した(Saito M *et al. Microbiol Immunol*, 2001)。このマウスモデルのその後の解析により、宿主側の病態に関するさまざまな新知見が得られたが、GASが突然強毒化するメカニズムについては不明のままであった。

2010年、ヒトのSTSS患者からの臨床分離株には、CsrS/CsrRというタンパク質にアミノ酸変異が高率に見られることが報告された(Ikebe *et al. PLoS Pathog*, 2010)。CsrS/CsrRはGASの二成分制御系タンパク質で、遺伝子群の発現の約15%を直接的あるいは間接的に制御していることが知られている。このCsrS/CsrRが変異して機能を失うと、様々な病原遺伝子が一斉に過剰発現して強毒化することが予測される。そこで申請者は、変異のないGAS SP2株をマウスに筋注し、20日以降にSTSS様病態により死亡した15匹のマウスから全身播種したGASを分離して解析すると、全てCsrS/CsrRにアミノ酸変異が生じており、しかも変異の部位は多様であることを見出した(Otsuji *et al. Microb Pathog*, 2020)。これらの変異は感染局所において生じ、特定の変異を起こした強毒株のみが全身に播種されることも示唆された。このように、GASの強毒化変異が宿主生体内で自然に生じることを実験的に証明したのは世界初である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、STSS発症に至るまでの菌側の強毒化過程を解明することである。以下の2点を明らかにすることを目的とした。

- 1) 強毒化変異は、これまで研究に使用したSP2株以外のGASでも普遍的に生じる現象か。
- 2) マウス生体内で強毒化した変異株において、CsrS/CsrRの伝子変異が直接病原遺伝子の発現亢進に関与しているのか。

3. 研究の方法

- 1) GAS 4株(SP2株, ME198株, ME210株, ME1319株; いずれの株も接種前は*csrS/csrR* 遺伝子配列に変異が無いことを確認済み)について、それぞれ 10^7 を10匹のddYマウス(, 6週齢)の前肢に筋注した。感染後8週間にわたり、マウスの状態と体重をチェックした。接種後8日目に降にSTSSを発症したマウスはセボフルレン麻酔下に心臓穿刺してヘパリン加全採血を行い、頸椎脱臼により安楽死させた。筋注部位の筋肉および臓器(肝臓、脾臓、肺、および肉眼的に異常所見を認めたその他の臓器)を無菌的に摘出し、それぞれの一部を1 mLのリン酸バッファー生理食塩水(PBS)を加えてホモジナイズした。また、残りはホルムアルデヒド中で固定し、HE染色して病理学的検討を行った。
- 2) 上記の血液、筋肉、臓器の各サンプルをTHY寒天培地を用いて培養した。GASが分離された場合には、無作為に数コロニーずつを選択し、それぞれの菌株のDNAを抽出したのち、*csrS/csrR* 遺伝子をターゲットとしたPCRを行った。
- 3) PCR産物の塩基配列を決定し、それぞれの分離株の変異の有無を調べた。
- 4) STSSを発症したマウス由来の分離株のタンパク質を精製し、Phos-tag法を使ったWestern blottingにより、各菌株から抽出したCsrRタンパク質のリン酸化を評価した。

4. 研究成果

- 1) GAS 4株を筋注したddYマウスの生存

図に示すとおり、4つの菌株とも、接種後7日以内の急性期に死亡するマウスと、接種後20

日以上経過した遠隔期に死亡するマウスが存在した。遠隔期のみの死亡率は、SP2 株：100.0%、ME198 株：100.0%、ME210 株：88.9%、ME1319 株：57.1%であった。

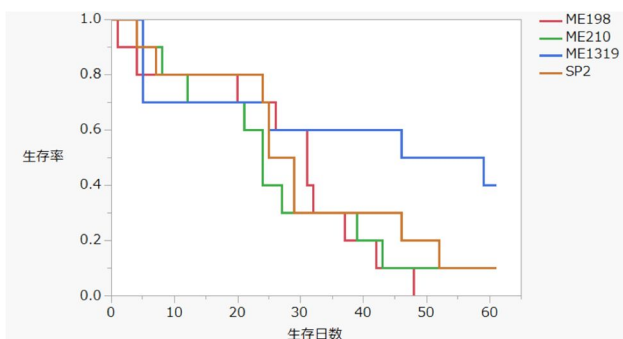


図 GAS 4 株を筋注した ddY マウスの生存曲線

なお、遠隔期に死亡したマウスの血液、脾臓、筋肉の GAS 陽性率は 4 株とも全て 100%であった。

これらの結果から、これまで研究に使用した SP2 株以外の GAS をマウスに感染させた場合にも、感染の遠隔期にマウスが死亡することが明らかになった。

2) 遠隔期死亡マウスから摘出した臓器の病理所見

4 株いずれにおいても、遠隔期死亡したマウスには、ヒトの STSS と酷似した以下のような病理学的所見を認めた。

筋注部位の筋肉：筋膜、筋繊維の炎症細胞浸潤と壊死

肝臓：血管周囲に炎症細胞浸潤

腎臓：出血と炎症細胞浸潤

脾臓：微細膿瘍形成

肺：間質の炎症細胞浸潤

その他：筋注部位から離れた筋肉にも筋膜、筋繊維の炎症細胞浸潤、膿瘍形成

これらの結果から、これまで研究に使用した SP2 株以外の GAS でも、マウスにヒトの STSS と酷似した病態を引き起こすことが示唆された。

3) 遠隔期死亡マウス由来の GAS の *csrS/csrR* 遺伝子変異

4 株いずれにおいても、遠隔期死亡したマウスから分離された GAS には次のような遺伝子変異が認められた。

SP2 株 (遠隔期死亡マウス由来分離株 8 株)：*csrR* 変異 6 株、*csrS* 変異 2 株

ME198 株 (遠隔期死亡マウス由来分離株 8 株)：*csrR* 変異 0 株、*csrS* 変異 8 株

ME210 株 (遠隔期死亡マウス由来分離株 6 株)：*csrR* 変異 0 株、*csrS* 変異 6 株

ME1319 株 (遠隔期死亡マウス由来分離株 4 株)：*csrR* 変異 3 株、*csrS* 変異 1 株

なお、*csrR* 遺伝子に変異があった 9 株のうち 2 株で R94C 変異を認めた。

これらの結果から、SP2 株以外の GAS でも、遠隔期死亡マウスからの分離株には *csrR* もしくは *csrS* のどちらかに必ず遺伝子変異が入っていることがわかった。マウス生体内で起こる GAS の強毒化変異は、GAS では普遍的に生じる現象であることが示唆された。

4) *csrS/csrR* 遺伝子変異株の CsrR タンパク質のリン酸化

CsrR タンパク質を精製し、ウサギに免疫して抗 CsrR 抗血清を得た。遠隔期死亡マウス由来分離株 計 26 株のうち、*csrR* 変異株 4 株について、Phos-tag 法を使った Western blotting により CsrR タンパク質のリン酸化を評価した。その結果、4 株ともリン酸化レベルは変異の入っていない親株と変わりなかった。

これらの結果から、マウス生体内で強毒化した変異株において、CsrS/CsrR の伝子変異が直接病原遺伝子の発現亢進に関与していることは証明できなかった。A群 溶血性レンサ球菌の強毒化に直接関与している遺伝子変異は、*csrS/csrR* 以外に存在する可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Maruoka Tsukasa, Nikaido Yasuhiko, Miyahara Satoshi, Katafuchi Eisuke, Inamasu Yoshinori, Ogawa Midori, Fukuda Kazumasa, Nakayama Toshiyuki, Horishita Takafumi, Saito Mitsumasa	4. 巻 15
2. 論文標題 Correlation between renal distribution of leptospires during the acute phase and chronic renal dysfunction in a hamster model of infection with <i>Leptospira interrogans</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Neglected Tropical Diseases	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) 10.1371/journal.pntd.0009410	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 Oyamada Yuji, Ozuru Ryo, Masuzawa Toshiyuki, Miyahara Satoshi, Nikaido Yasuhiko, Obata Fumiko, Saito Mitsumasa, Villanueva Sharon Yvette Angelina M., Fujii Jun	4. 巻 16
2. 論文標題 A machine learning model of microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	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) 10.1371/journal.pone.0259907	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 Yanagihara Yasutake, Villanueva Sharon Y. A. M., Nomura Naoki, Ohno Marumi, Sekiya Toshiki, Handabille Chimuka, Shingai Masashi, Higashi Hideaki, Yoshida Shin-ichi, Masuzawa Toshiyuki, Gloriani Nina G., Saito Mitsumasa, Kida Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 <i>Leptospira</i> Is an Environmental Bacterium That Grows in Waterlogged Soil	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	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) 10.1128/spectrum.02157-21	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 Honda Yuto, Ichikawa Ryosuke, Choi Yong Joon, Murakami Kensuke, Takahashi Kazuhiro, Noda Toshihiko, Sawada Kazuaki, Ishii Hiromu, Machida Katsuyuki, Ito Hiroyuki, Miyahara Satoshi, Nikaido Yasuhiko, Saito Mitsumasa	4. 巻 61
2. 論文標題 Detection system for Legionella bacteria using photogate-type optical sensor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 SD1010 ~ SD1010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/ac5a25	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 Inamasu Yoshinori, Nikaido Yasuhiko, Miyahara Satoshi, Maruoka Tsukasa, Takigawa Tomoya, Ogawa Midori, Nakayama Toshiyuki, Harada Masaru, Saito Mitsumasa	4. 巻 165
2. 論文標題 Dissemination of Leptospira into the intestinal tract resulting in fecal excretion in a hamster model of subcutaneous infection with Leptospira interrogans	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbial Pathogenesis	6. 最初と最後の頁 105481 ~ 105481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.micpath.2022.105481	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 Inamasu Yoshinori, Ogawa Midori, Saito Mitsumasa, Harada Masaru, Fukuda Kazumasa	4. 巻 27
2. 論文標題 <i>Helicobacter pylori</i> results in lysis and death after exposure to water	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Helicobacter	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) 10.1111/hel.12921	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 Shitozawa Yawaka, Haro Kaoru, Ogawa Midori, Miyawaki Akihiko, Saito Mitsumasa, Fukuda Kazumasa	4. 巻 12
2. 論文標題 Differences in the microbiota of oral rinse, lesion, and normal site samples from patients with mucosal abnormalities on the tongue	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-022-21031-8	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 HIGASHI Hidenori, OYABU Takako, NAGANO Chikage, KITAMURA Hiroko, KAWANAMI Shoko, SAITO Mitsumasa, HORIE Seichi	4. 巻 61
2. 論文標題 Measuring the effects of respiratory protective equipment and other protectors in preventing the scattering of vocalization droplets	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Industrial Health	6. 最初と最後の頁 432 ~ 445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2486/indhealth.2022-0180	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 Suzuki Katsunori, Saito Mitsumasa, Hanaki Hideaki	4. 巻 29
2. 論文標題 Increased copy number of 23S ribosomal RNA gene with point mutation in MRSA associated with linezolid resistance in a patient treated with long-term linezolid	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 481 ~ 484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2023.01.019	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 Asoh Tatsuma, Miyahara Satoshi, Villanueva Sharon Yvette Angelina M., Kanemaru Takaaki, Takigawa Tomoya, Mori Hiroshi, Gloriani Nina G., Yoshida Shin-ichi, Saito Mitsumasa	4. 巻 182
2. 論文標題 Protective role of stratum corneum in percutaneous Leptospira infection in a hamster model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbial Pathogenesis	6. 最初と最後の頁 106243 ~ 106243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.micpath.2023.106243	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 該当する

〔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
連携研究者	米田 哲 (YONEDA TORU) (10405251)	産業医科大学・医学部・診療助教 (37116)	
連携研究者	福田 和正 (FUKUDA KAZUMASA) (40389424)	産業医科大学・医学部・准教授 (37116)	
連携研究者	宮原 敏 (MIYAHARA SATOSHI) (50878329)	産業医科大学・医学部・講師 (37116)	

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