

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22790959

研究課題名(和文) 劇症型溶血性レンサ球菌感染症における新規インターフェロン産生細胞の機能解析

研究課題名(英文) The protective role of a novel population of interferon-gamma-producing cells in severe invasive group A streptococcal infections

研究代表者

松村 隆之 (Matsumura, Takayuki)

国立感染症研究所・免疫部・研究員

研究者番号：50434379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：免疫細胞の一種が、重症の劇症型溶血性レンサ球菌感染症の初期段階を防御しうることが判明した。この新知見は、この免疫細胞がこの感染症の重大な副作用である好中球減少を補償できることを示唆している。今回我々は、骨髄系細胞の一種でリング状の核を有し自然免疫を活性化するインターフェロン(IFN- $\gamma$ )を産生する細胞を同定した。この細胞をマウスに導入する実験を行い、重症レンサ球菌感染症に対する防御効果が賦与されることを明らかにした。これに対して、IFN- $\gamma$ の投与は感染マウスの生存を延長できなかった。以上の知見は、この骨髄系細胞の一種が重症細菌感染症に対する初期防御で重要な役割を演じていることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Cytokine-activated neutrophils are known to be essential for protection against group A Streptococcus (GAS) infections. However, during severe invasive GAS infections that accompanied with neutropenia, it remains unclear which factors are protective against such infections, and which cell population is the source of them. Here we show that mice infected with severe invasive GAS isolates, but not with non-invasive GAS isolates, exhibit high concentrations of plasma IFN- $\gamma$  during the early stage of infection. IFN- $\gamma$  is necessary to protect mice, and is produced by a novel population of GM-CSF-dependent immature myeloid cells with ring-shaped nuclei (IFN- $\gamma$ -producing immature myeloid cells; gIMCs). These gIMCs express monocyte and granulocyte markers, and also produce nitric oxide. The adoptive transfer of gIMCs ameliorates infection in wild-type and IFN- $\gamma$ -deficient mice. Our results indicate that gIMCs have a protective role during the early stage of severe invasive GAS infections.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：感染症防御学 劇症型溶血性レンサ球菌感染症 IFN-

### 1. 研究開始当初の背景

劇症型溶血性レンサ球菌感染症(感染症法:五類全数把握感染症)は、米国では1987年に、日本では1992年に最初に報告されて以来、現在までに500人を超える患者が確認され、このうち約40%が死亡しているというきわめて致死率の高い感染症である。病態の進行が急激かつ劇的で、数十時間以内に急性腎不全、ARDS、DIC、多臓器不全、軟部組織壊死を引き起こし、患者をショック症状から死に至らしめる。劇症型溶血性レンサ球菌感染症の大部分がA群レンサ球菌(Group A *Streptococcus*; GAS)である *Streptococcus pyogenes* 感染によって起こる。上気道炎、猩紅熱、蜂窩織炎などのそれまでの溶血性レンサ球菌感染症と全く異なる病型を示すことから、レンサ球菌が新規病原因子発現を獲得、あるいは既知病原因子の発現が上昇して劇症型感染を引き起こすと考えられてきたが、これまで劇症型感染の発症や病態を説明できる単一のレンサ球菌病原因子は報告されていない。一方、劇症型感染の疫学的特徴として、集団発生が極めてまれで、高齢男性や生活習慣病などの危険因子があり、宿主要因の関与があると考えられている。

申請者は近年、劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株の一部において、様々な病原因子の発現誘導シグナルを負に制御するタンパク質 rgg に遺伝子変異があることを見出した。そこでマウスに emm3 型の非劇症型感染臨床分離レンサ球菌株(K33)、 rgg 遺伝子を変異させた K33 (K33 rgg)、 劇症型感染臨床分離レンサ球菌株(NIH34)、 正常な rgg 遺伝子を導入した NIH34 (NIH34 rgg+)を腹腔内感染させたところ、 K33 rgg および NIH34 感染においてのみ、感染早期から高い死亡率を示すことが明らかとなった。すなわち、変異した rgg を持つ菌株は劇症型感染を引き起こし、正常な rgg を持つ菌株は非劇症型感染を引き起こすことが明らかとなった。したがって、 rgg 変異が溶血性レンサ球菌側の劇症型感染要因の一つであると考えられた。

また劇症型感染マウスにおいては、感染早期から血中 IFN- $\gamma$  産生量が増加することが確認された。同様に、ヒト劇症型感染例では、血中 IFN- $\gamma$  産生量が顕著に増加していることが判明した。驚くべきことに、いずれのヒトおよびマウス血中においても IL-1、TNF- $\alpha$ 、IL-17 などの炎症性サイトカインはほとんど検出されなかった。以上の結果から、IFN- $\gamma$  が劇症型感染における宿主要因の一つであると考えられた。これまで、GAS 感染におけるサイトカインは、GAS の産生するスーパー抗原により活性化されたT細胞から大量に産生され、宿主に負の影響を与えたと考えられてきたが、劇症型 GAS 感染における宿主防御因子やその産生細胞については不明な点が多い。そこで、申請者は劇症型レンサ球菌感染症における IFN- $\gamma$  産生細胞を探索する

ことにした。

### 2. 研究の目的

本研究では、劇症型レンサ球菌感染において新規 IFN- $\gamma$  産生細胞を同定する。また、抗 IFN- $\gamma$  中和抗体投与マウス、IFN- $\gamma$  投与マウスおよび IFN- $\gamma$  欠損マウスを用いた解析により、劇症型レンサ球菌感染症の発症と病態に対して、IFN- $\gamma$  が促進的あるいは抑制的に働くか否かを解明し、劇症型感染における IFN- $\gamma$  産生細胞の役割を明らかにする。本研究の目標は非劇症型および劇症型感染における宿主応答の相違を解明して、宿主応答の分子機構の理解を深め、その知見を応用した劇症型感染症の制御を目指すことである。

### 3. 研究の方法

フローサイトメトリ解析および細胞分離解析を用いた解析により、劇症型レンサ球菌感染において IFN- $\gamma$  を産生する細胞を同定し、血中 IFN- $\gamma$  産生増強の原因が、複数の産生細胞のためなのか、あるいは単一の産生細胞のためなのかを明らかにする。また、抗 IFN- $\gamma$  中和抗体投与マウス、IFN- $\gamma$  投与マウスおよび IFN- $\gamma$  欠損マウスを用いて、劇症型レンサ球菌感染症の発症と病態に対して、IFN- $\gamma$  が促進的あるいは抑制的に働くか否かを検証し、劇症型感染の発症と病態に対する IFN- $\gamma$  産生細胞の役割を明らかにする。

### 4. 研究成果

抗 IFN- $\gamma$  中和抗体投与マウスや IFN- $\gamma$  欠損マウスに劇症型 GAS を感染させると、コントロールマウスと比べ早期に死亡したことから、劇症型 GAS 感染症において IFN- $\gamma$  は宿主防御に必須な因子の一つであると考えられた。また、RAG1 欠損マウス(成熟したT細胞やB細胞が欠損しているマウス)を用いた解析から、感染早期の IFN- $\gamma$  はT細胞非依存的に産生されること、劇症型 GAS 感染 RAG1 欠損マウスは野生型マウスと同等の生存率を示すことが明らかとなり、T細胞は本感染症の宿主防御には寄与しないことが示唆された。さらに詳細なフローサイトメトリ解析の結果、感染5日後まではT細胞またはNK細胞からの顕著な IFN- $\gamma$  産生は認められず、劇症型 GAS 感染早期における IFN- $\gamma$  産生細胞は、環状核を有し、顆粒球と単球の両方のマーカーを発現することが明らかとなった。この IFN- $\gamma$  産生細胞は、G-CSF ではなく GM-CSF 依存的に分葉核を有する細胞に分化することから、新規の未熟骨髄系細胞(IFN- $\gamma$ -producing immature myeloid cells;  $\gamma$ IMCs)であることが示唆された。また、 $\gamma$ IMCs は、未熟骨髄系細胞亜群の一つである Myeloid-derived suppressor cells のようなT細胞免疫抑制能を持たないことが示された。さらに、 $\gamma$ IMCs を GAS 感染マウスに移入することにより、劇症型 GAS 感染マウスの生存率と菌のクリアランスが著しく改善した。

以上の結果から、 $\gamma$ IMCs は劇症型溶血性レンサ球菌感染早期において宿主防御に寄与する新規細胞集団であると考えられた。しかしながら、IFN- $\gamma$ 投与マウスでは菌クリアランスは改善されるものの生存率の改善は認められず、 $\gamma$ IMCs が産生する IFN- $\gamma$ 以外の宿主防御因子および GAS 抵抗因子等の存在が示唆された。

#### 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4件)

Ikebe T, Ato M, Matsumura T, Hasegawa H, Sata T, Kobayashi K, Watanabe H, Highly frequent mutations in negative regulators of multiple virulence genes in group A streptococcal toxic shock syndrome isolates, *PLoS Pathogens*, 査読有, 6(4), 2010, doi: 10.1371/journal.ppat.1000832.

Matsumura T, Oyama M, Kozuka-Hata H, Ishikawa K, Inoue T, Muta T, Semba K, Inoue J, Identification of BCAP-(L) as a negative regulator of the TLR signaling-induced production of IL-6 and IL-10 in macrophages by tyrosine phosphoproteomics, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 400, 2010, 265-270.

Matsumura T, Ato M, Ikebe T, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K, Interferon- $\gamma$ -producing immature myeloid cells confer protection against severe invasive group A *Streptococcus* infections, *Nature Communications*, 査読有, 3:678, 2012, doi: 10.1038/ncomms1677

Fukuda T, Matsumura T, Ato M, Hamasaki M, Nishiuchi Y, Murakami Y, Maeda Y, Yoshimori T, Matsumoto S, Kobayashi K, Kinoshita T, Morita YS, Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis, *mBio*, 査読有, 4(1), 2013, doi: 10.1128/mBio.00472-12.

[学会発表](計8件)

Matsumura T, Ikebe T, Watanabe H, Kobayashi K, Ato M, The defensive role of interferon- $\gamma$  produced by myeloid cells in invasive group A *Streptococcus* infection, 18<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2010, 平成22年5月20日, 熊本

Matsumura T, Ikebe T, Watanabe H, Kobayashi K, Ato M, Identification of IFN- $\gamma$  producing cells in severe invasive group A streptococcal infection, 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 平成22年8月25日, 神戸

松村隆之、池辺忠義、大西真、渡邊治雄、小林和夫、阿戸学, 劇症型溶血性レンサ球菌感染症における環状核骨髄系細胞の保護的役割, 第9回感染症沖縄フォーラム, 平成23年2月10日, 沖縄

Matsumura T, Ikebe T, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K, Ato M, A novel interferon- $\gamma$ -producing subpopulation of immature myeloid cells confers protection from severe invasive group A *Streptococcus* infections, Joint International Meeting of The 76th Annual Meeting of the Japanese Society for Interferon and Cytokine Research and The 19th International Symposium of Macrophage Molecular and Cell Biology 2011 (JSICR-MMCB 2011), 2011年5月25日, 大阪

Matsumura T, Ikebe T, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K, Ato M, The protective role of a novel population of interferon- $\gamma$ -producing cells in severe invasive group A streptococcal infections, XVIII Lancefield International Symposium, 2011年9月8日, Palermo, Italy

Matsumura T, Ikebe T, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K, Ato M, IFN- $\gamma$ -producing immature myeloid cells confer protection against severe invasive group A streptococcal infections in mice, 第40回日本免疫学会総会・学術集会, 2011年11月29日, 千葉

Matsumura T, Ikebe T, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K, Ato M, The defensive role of interferon- $\gamma$ -producing immature myeloid cells in severe invasive group A *Streptococcus* infections, *IMMUNOLOGY* 2012, 99th Annual Meeting The American Association of Immunologists, 2012年05月04日~2012年05月08日, Boston, MA, USA

松村隆之、池辺忠義、大西真、渡邊治雄、小林和夫、阿戸学, 劇症型A群レンサ球菌感染症におけるIFN- $\gamma$ 産生未成熟骨髄系細胞の役割, 第6回細菌学若手コロッセウム, 2012年08月08日~2012年08月10日, 東京

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
インターフェロン を産生する未熟骨髄系  
細胞は劇症型 A 群レンサ球菌感染に対して  
防御的に働く  
<http://www.nih.go.jp/niid/ja/basic-science/immunology/1717-imm-2012-001.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松村 隆之 (Takayuki Matsumura)  
国立感染症研究所・免疫部・研究員  
研究者番号：50434379

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：