

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390419

研究課題名(和文) ナノライブイメージング技術を用いた新規免疫系 NETs 誘導因子の多次元解析

研究課題名(英文) Multi-dimensional analyses of a novel immune system NETs-inducer using nano live imaging technology

研究代表者

寺尾 豊 (Terao, Yutaka)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50397717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000 円、(間接経費) 4,380,000 円

研究成果の概要(和文)：好中球の新たな免疫系である「細胞外の異物捕獲系 (Neutrophil extracellular traps; NETs)」が報告されている。NETsは、直接的に感染微生物を破壊するだけでなく、運動する微生物を投網状の構造物で捕獲し、他の貪食細胞に提示する役割を果たす。しかしながら、NETsを誘導する微生物種についても、微生物の構成分子についても多くは不明である。そこで本研究では、「NETs免疫系」を作動させるレンサ球菌由来の因子を同定し、感染防御に寄与する免疫賦活剤としての可能性を検索する。最終的には、抗生物質と併用可能な感染症治療薬開発の基盤とすることを目指した。

研究成果の概要(英文)：Recently, it was reported that neutrophils equips a novel immune system against pathogenic microorganisms. And then, it was named neutrophils extracellular traps, NETs. NETs work to trap the pathogenic bacteria and to present toward macrophages and other native neutrophils. However, they were still unknown what molecules derived from pathogens induces NETs, and what receptor on neutrophil recognize the NETs-inducing molecule. Thus, we investigated to determine the molecules which induce NETs formation, and then how neutrophils recognize the NETs-inducing factor in this study. In addition, we examine the NETs-expressing neutrophils could eliminate major pathogenic bacteria, including *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, and *Staphylococcus aureus* in vitro assays.

研究分野：形態系基礎歯科学

科研費の分科・細目：口腔細菌学

キーワード：レンサ球菌

1. 研究開始当初の背景

数年前から、好中球の新たな免疫系である「細胞外の異物捕獲系 (Neutrophil extracellular traps; NETs)」が報告されている。平成 21～22 年度採択の若手研究 (A)「A 群レンサ球菌の免疫回避機構の時空間的バイオイメージング解析」において、レンサ球菌の菌体表層画分を添加すると、好中球が細胞死に伴い自己染色体を骨格とした NETs を伸張させることを明らかにしている。NETs は、直接的に感染微生物を破壊するだけでなく、運動する微生物を投網状の構造物で捕獲し、他の貪食細胞に提示する役割を果たす。しかしながら、NETs を誘導する微生物種についても、微生物の構成分子についても多くは不明である。そこで本研究では、「NETs 免疫系」を作動させるレンサ球菌由来の因子を同定し、感染防御に寄与する免疫賦活剤としての可能性を検索する。最終的には、抗生物質と併用可能な感染症治療薬開発の基盤とすることを目指す。

2. 研究の目的

昨今、新型の「スーパー抗生物質耐性菌」や新型インフルエンザ感染症が世界的に流行し、微生物の脅威とヒトの知恵がせめぎあう日々が続く。感染症対策が脚光を浴びている。しかしながら、わが国の感染症対策は先進諸国の中では遅れをとり、これらのスーパー耐性菌や新型インフルエンザの流行だけでなく、毎年、百日咳や麻疹等の流行を許している。わが国の死亡疾患の第4位には、感染症のひとつである「肺炎」が不動の地位を占め続けている。これらのことから、最近の新聞記事には「感染症後進国」とまで記載され、感染症対策の遅れが医師不足と並ぶ国民の社会保障の不安案件として認識されつつある。また、スーパー耐性菌以外の黄色ブドウ球菌や肺炎レンサ球菌も抗生物質に耐性を示す傾向が進行しており、抗生物質に頼ってきたわが国の医療体制に危機が迫っている。特に高齢者の割合が増加する近年では、他の疾病で入院した高齢者の抗生物質耐性菌による院

内感染が問題となっている。それにも関わらず、わが国の医学分野の研究対象は、免疫および腫瘍や再生医療等の特定領域にのみ集中している。その結果、感染症が大流行してから初めて、治療方法の確立はおろか治療に結びつく基礎的な研究成果の蓄積も不十分であるという現実に直面している。そこで、感染現象の基礎的な解析に基づく新規の感染症治療方法の研究こそが現在の重要課題であると考えた。NETs は、直接的に感染微生物を破壊するだけでなく、運動する微生物を網状の構造物で捕獲し、他の貪食細胞に提示する役割を果たす(図 2, 3)。しかしながら、NETs を誘導する微生物種についても、微生物の構成タンパク質についても多くは不明である。そこで、本基盤研究では、経時的に三次元 (= 多次元) 撮影した生理的条件下のナノスケール顕微鏡画像から「NETs 免疫系」を作動させるレンサ球菌由来の因子を同定し、感染防御のための免疫賦活剤としての可能性を検索する。最終的には、抗生物質と併用可能な感染症治療薬としての応用を目指す。

3. 研究の方法

病原性レンサ球菌の感染実験においては、好中球の ETosis 細胞死と、ETosis に伴う「細胞外の異物捕獲構造物 (Neutrophil extracellular traps; NETs)」による新規の免疫システムの作動が報告されているが、好中球に NETs を産生させるレンサ球菌由来物質は不明である。特に、レンサ球菌属の肺炎レンサ球菌感染症においては、感染肺組織に多量の好中球浸潤し、NETs 様構造物が展開されることが、申請者らのマウス予備実験、および臨床現場におけるヒト肺炎レンサ球菌感染症において確認されている。そこで、好中球 NETs 免疫システムの作動因子について、A 群レンサ球菌に加え肺炎レンサ球菌の分子群から同定を試みる。

方法論としては、超高速スキャン型原子間力顕微鏡システムを生物試料用に改良し、ナノスケールかつ生理的条件下で、三次元解析を

経時的に行う新規の実験手法を用いる。同計画が申請期間内に進捗しない場合に備え、研究室保有のタイムラプス型顕微鏡および共焦点蛍光レーザー顕微鏡、走査型電子顕微鏡を用いたバックアップ実験も平行して展開する。

4. 研究成果

三ヶ年計画の初年度は、研究計画全体で使用する試料の調整と各種顕微鏡の観察条件の至適化を中心に実施した。A 群および肺炎レンサ球菌の細胞壁画分、および分担研究者として参画している他の研究課題で得られた種々の病原因子の組換え体の余剰試料に加え、以下の手順でゲノム情報から推定される種々の細菌タンパクを組換え体として作製した。

- (1) レンサ球菌の菌体表層タンパクは、C 末端側に保存されたモチーフがある。そのモチーフを指標として、ゲノムデータベースから推定の A 群および肺炎レンサ球菌の菌体表層タンパクを選出し、組換えタンパクを作製した。この際、グラム陽性菌であるレンサ球菌属の組換えタンパクは、グラム陰性菌である大腸菌で発現・精製することが困難であると予測される。そこで本研究では、種々の宿主や発現ベクターを組み合わせて、肺炎レンサ球菌の組換えタンパク調整方法の最適化を試みた。そのために必要な無細胞組換えタンパク発現試薬類、およびグラム陽性菌発現宿主 *Bacillus subtilis* 発現系、酵母発現系を本研究費で購入し、至適化を実施した。
- (2) 続いて、上記手順(1)で作製した組換えタンパク溶液を、ヒト好中球に滴下した。この混合液を 37 °C で 1 時間培養した後、スライドガラスに塗抹し、高速スキャン型原子間力顕微鏡および蛍光顕微鏡試料とした。
- (3) NETs の構成物質は、好中球の染色体 DNA と内因性プロテアーゼであることが

明らかにされている。そこで、蛍光顕微鏡試料については、SYBRgreen 等の核酸結合性の蛍光試薬で染色した。そして、現況の顕微鏡下で、NETs 展開を認めるレンサ球菌の組換えタンパクの同定を行った。

- (4) さらに、上記手順(3)でスクリーニングしたレンサ球菌のタンパクに対応する遺伝子の欠失変異株を作製する。続いて、好中球の NETs 免疫系の作動変化ならびに微生物排除機序の変化について、現況の顕微鏡システムで解析した。
- (5) 計画 2 年目には、原子間力顕微鏡に超高速撮影機能ならびに高速画像解析機能を追加することを目指す。平成 21～22 年度採択の科学研究費補助金を用いた研究で、培養細胞や活性型タンパク、さらには生菌等の湿潤試料をナノスケールで観察する条件設定を確立することが可能となり始めていた。そこで、さらに条件を至適化し、初年度計画において選出したレンサ球菌が、好中球表層に作用し NETs 誘導を起こす過程を一分子ごとにリアルタイム画像で追跡し、超微細形態学的に解析した。
- (6) 一連の実験過程で得られた材料を用いて、NETs 発現に関与する好中球レセプターの検索も行った。
- (7) 本申請計画の最終年度では、初年度に構築したレンサ球菌の NETs 誘導因子の候補ライブラリー(組換え体、精製細胞壁、および遺伝子欠失変異株)を用いて、計画 2 年目に至適化した顕微鏡観察技術に供し、好中球 NETs 系を誘導する細菌因子の詳細な同定とメカニズム解析を試みた。
- (8) ヒト好中球にレンサ球菌の組換えタンパク、精製細胞壁、遺伝子欠失変異株(平成 23 年度に作製分)を添加し、平成 24 年度に至適化した顕微鏡システムで

NETs 誘導能を観察した。

(9) そして、得られた結果は、学会および学術誌で専門家を対象に報告した。さらに、新潟県下の小学校において、小学生を対象としたアウトリーチ授業を行った。

また、申請者が作成する研究室のホームページから、リアルタイムで広く国民に発信した。

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 23 件)

1. Nohara, F., Nagaya, K., Asai, H., Tsuchida, E., Okamoto, T., Hayashi, T., Sakata, H., Terao, Y., and Azuma, H.: Neonatal pleural empyema caused by *emm* type 6 group A streptococcus, *Pediatrics International*, *in press*. 査読有
2. Wakamatsu, R., Takenaka, S., Ohsumi, T., Terao, Y., Ohshima, H., and Okiji, T.: Penetration kinetics of four mouthrinses into *Streptococcus mutans* biofilms analyzed by direct time-lapse visualization. *Clin. Oral Invest.*, 8: 625-34, 2014. 査読有
3. Murakami, T., Saitoh, I., Inada, E., Kurosawa, M., Iwase, Y., Noguchi, H., Terao, Y., Yamasaki, Y., Hayasaki, H., and Sato, M.: STO feeder cells are useful for propagation of primarily cultured human deciduous dental pulp cells in view of elimination of contaminated bacteria and promotion of cellular outgrowth. *Cell Medicine*, 6: 75-81, 2013. 査読有
4. Yamaguchi, M., Terao, Y., Mori-Yamaguchi, M., Domon, H., Sakaue, Y., Yagi, T., Nishino, K., Yamaguchi, A., Nizet, V., and Kawabata, S.: *Streptococcus pneumoniae* invades erythrocytes and utilizes them to evade human innate immunity. *PLoS one*, 8: e77282, 2013. 査読有
5. Honda-Ogawa, M., Ogawa, T., Terao, Y., Sumitomo, T., Nakata, M., Ikebe, K., Maeda, Y., and Kawabata, S.: Cysteine proteinase from *Streptococcus pyogenes* enables to evade innate immunity via degradation of complement factors. *J. Biol. Chem.*, 288: 15854-64, 2013. 査読有
6. Sumitomo, T., Nakata, M., Higashino, M., Terao, Y., and Kawabata, S.: Group A streptococcal cysteine protease cleaves epithelial junctions and contributes to bacterial translocation. *J. Biol. Chem.*, 288: 13317-24, 2013. 査読有
7. Yamaguchi, M., Terao, Y., and Kawabata, S.: The virulence factors and pathogenic mechanisms on *Streptococcus pyogenes*. *Cell. Microbiol.*, 15: 503-511, 2013. 査読有
8. Okahashi, N., Nakata, M., Sumitomo, T., Terao, Y., and Kawabata, S.: Hydrogen peroxide produced by oral streptococci induces macrophage cell death. *PLoS one*, 8: e62563, 2013. 査読有
9. Ogawa T., Terao Y., Honda-Ogawa M., Hashimoto S., Ikebe K., Maeda Y., and Kawabata S.: MicroRNA fragments derived from *Streptococcus pyogenes* enable activation of neutrophil phagocytosis: in vitro study. *Microb. Infect.*, 15: 212-218, 2013. 査読有
10. Murakami, J., Terao, Y., Morisaki, I., Hamada, S., and Kawabata, S.: Group A streptococcus adheres to pharyngeal epithelial cells with salivary proline-rich proteins via GrpE chaperone protein. *J. Biol. Chem.*, 287: 22266-22275, 2012. 査読有
11. Mori, Y., Yamaguchi, M., Terao, Y., Hamada, S., Ooshima, T., and Kawabata, S.: -enolase of *Streptococcus pneumoniae* induces formation of neutrophil extracellular traps. *J. Biol. Chem.*, 287: 10472-10481, 2012. 査読有
12. Ogawa, T., Yamasaki, S., Honda, M., Terao, Y., Kawabata, S., and Maeda, Y.: Long-term survival of salivary streptococci on dental devices made of EVA.: *Int. J. Oral Science*, 4: 14-8, 2012. 査読有
13. Kimura, K. R., Nakata, M., Sumitomo, T.,

- Kreikemeyer, B., Podbielski, A., Terao, Y., and Kawabata, S.: Involvement of T6 pili in biofilm formation by serotype M6 *Streptococcus pyogenes*. *J. Bacteriol.*, 194: 804-812, 2012. 査読有
14. Sumitomo, T., Nakata, M., Yamaguchi, M., Terao, Y., and Kawabata, S.: S-carboxymethylcysteine inhibits adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human alveolar epithelial cells. *J. Med. Microbiol.*, 61: 101-108, 2012. 査読有
15. Nakata, M., Kimura, K. R., Sumitomo, T., Wada, S., Sugauchi, A., Oki, E., Higashino, M., Kreikemeyer, B., Podbielski, A., Okahashi, N., Hamada, S., Isoda, R., Terao, Y., and Kawabata, S.: Assembly mechanism of FCT type 1 pili in serotype M6 *Streptococcus pyogenes*. *J. Biol. Chem.*, 286: 37566-37577, 2011. 査読有
16. Okahashi, N., Okinaga T., Sakurai, A., Terao Y., Nakata M. Nakashima K., Shintani S., Kawabata S., Ooshima T., and Nishihara T.: *Streptococcus sanguinis* induces foam cell formation and cell death of macrophages in association with production of reactive oxygen species. *FEMS Microbiol. Lett.*, 323: 164-170, 2011. 査読有
17. Hoshino, T., Kondo, Y., Saito, K., Terao, Y., Okahashi, N., Kawabata, S., and Fujiwara, T.: Novel epitopic region of glucosyltransferase B from *Streptococcus mutans*. *Clin. Vaccine Immunol.*, 18: 1552-1561, 2011. 査読有
18. Baatarjav, T, Kataoka, K, Gilbert, R. S, Terao, Y., Fukui, M, Goto, M, Kawabata, S., Yamamoto, M, Fujihashi, K, and Ito, HO.: Mucosal immune features to phosphorylcholine by nasal Flt3 ligand cDNA-based vaccination. *Vaccine*, 79: 2819-2828, 2011. 査読有
19. Ogawa, T., Terao, Y., Okuni, H., Ninomiya, K., Sakata, H., Ikebe, K., Maeda, Y., and Kawabata, S.: Biofilm formation or internalization into epithelial cells enable *Streptococcus pyogenes* to evade antibiotic eradication in patients with pharyngitis. *Microb. Pathog.*, 51: 58-68, 2011. 査読有
20. Ogawa, T., Terao, Y., Sakata, H., Okuni, H., Ninomiya, K., Ikebe, K., Maeda, Y., and Kawabata, S.: Epidemiological characterization of *Streptococcus pyogenes* isolated from patients with multiple onsets of pharyngitis. *FEMS Microbiol. Lett.* 318: 143-151, 2011. 査読有
21. Kataoka, K., Fujihashi, K., Terao, Y., Gilbert, R. S., Sekine, S., Kobayashi, R., Fukuyama, Y., Kawabata, S., and Fujihashi, K. Oral-nasopharyngeal dendritic cells mediate T cell-independent IgA class switching on B-1 B cells. *PLoS one*, 6: e25396, 2011. 査読有
22. Okahashi, N., Nakata, M., Sakurai, A., Terao, Y., Hoshino, T., Yamaguchi, Y., Isoda, R., Sumitomo, T., Nakano, K., Kawabata, S., and Ooshima, T.: Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to salivary amylase and promote the biofilm formation. *Microb. Pathog.*, 50: 148-154, 2011. 査読有
23. Sumitomo, T., Nakata, M., Higashino, M., Jin Y., Terao, Y., Fujinaga, Y., and Kawabata, S. : Streptolysin S contributes to group A streptococcal translocation across an epithelial barrier. *J. Biol. Chem.*, 286: 2750-2761, 2011. 査読有
- (学会発表) (計 11 件)
1. 寺尾 豊, Lion Award 受賞講演, 第 55 回歯科基礎医学会学術大会, 岡山市, 平成 25 年 9 月 20~22 日.
 2. 寺尾 豊, バイオイメージング研究から始まる感染制御, 金沢医科大学大学院医学研究セミナー講演, 石川市, 平成 25 年 5 月 22 日.
 3. 本多 真理子, 寺尾 豊, 住友 倫子, 中田 匡宣, 川端 重忠, Molecular mechanisms of complement evasion by *Streptococcus pyogenes* cysteine protease SpeB, 第 86 回日

- 本細菌学会総会,平成25年3月18~20日,千葉市
4. Tomoko Sumitomo, Miharuru Higashino, Akari Kominami, Masanobu Nakata, Yutaka Terao, and Shigetada Kawabata, Group A streptococcal cysteine proteases, SpeB and Sib35, cleave epithelial junctions, 第86回日本細菌学会総会,平成25年3月18~20日,千葉市
 5. Masanobu Nakata, Tomoko Sumitomo, Yutaka Terao, Shigeyuki Hamada, and Shigetada Kawabata, Cell wall anchoring mechanism of FCT region type 3 pili in *Streptococcus pyogenes*, 第86回日本細菌学会総会,平成25年3月18~20日,千葉市.
 6. N. Okahashi, T. Okinaga, A. Sakurai, Y. Terao, M. Nakata, S. Kawabata, T. Nishihara, *Streptococcus sanguinis* induces foam cell formation and cell death of macrophages, 第86回日本細菌学会総会,平成25年3月18~20日,千葉市.
 7. 本多 真理子, 寺尾 豊, 住友 倫子, 中田 匡宣, 川端 重忠, ヒト補体免疫系回避機構における *Streptococcus pyogenes* 分泌型プロテアーゼ SpeB の機能解析, 第5回口腔環境制御,カテゴリー集会,平成25年2月1日,長崎市.
 8. 寺尾 豊, 細菌の感染制御に向けた次世代の基礎的研究展開,「第60回日本化学療法西日本支部総会」,「第55回日本感染症学会中日本地方会学術集会」,「第82回日本感染症学会西日本地方会学術集会」,三学会合同集会,平成24年11月6日,福岡市.
 9. 4. 本多 真理子, 寺尾 豊, 川端 重忠, *Streptococcus pyogenes* のシステインプロテアーゼ SpeB が補体免疫機構に及ぼす影響, 第65回日本細菌学会関西支部総会,平成24年11月17日,神戸市.
 10. 本多 真理子, 橋本 栄, 寺尾 豊, 川端 重忠, *Streptococcus pyogenes* のシステイン

プロテアーゼ SpeB による補体免疫回避機構の解析, 第21回 Lancefield レンサ球菌研究会平成24年6月8日,吹田市.

11. 森田 知里, 中田 匡宣, 木村 敬次 Richard, 住友 倫子, 寺尾 豊, 川端 重忠, T6線毛のバイオフィルム形成と菌体凝集への関与, 第21回 Lancefield レンサ球菌研究会,平成24年6月8日,吹田市.

〔図書〕(計2件)

1. 寺尾 豊. ナノスケールの研究を歯科医学に, 日本歯科評論,ヒョーロン・パブリッシャーズ社, 74: 9-11 2014.
2. 寺尾 豊. レンサ球菌感染症の予防・治療法の確立に向けた展望, 化学療法の領域, 医薬ジャーナル社, 29:1447-1453, 2013.

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dent.niigata-u.ac.jp/microbio/microbio.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺尾 豊 (TERAO Yutaka)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号:50397717

(2)研究分担者

川端 重忠 (KAWABATA Shigetada)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号:50273694

(3)研究分担者

中田 匡宣 (NAKATA Masanobu)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号:90444497