

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791022

研究課題名(和文) 経口ルートによる豚連鎖球菌感染症の発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) The mechanisms of *S. suis* intestinal translocation from the gut to the blood circulation

研究代表者

中山 達哉 (Nakayama, Tatsuya)

大阪大学・グローバルコラボレーションセンター・特任助教

研究者番号：80552158

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)：本研究では豚連鎖球菌による経口ルートによる感染に着目して、本菌の腸管から血中移行を果たすメカニズムを本菌が産生するSLY毒素とともに調べた。マウスループモデルからSLY欠損株では血中移行を果たす菌株は非常に少なく、組換えSLY単独でも血中移行を引き起こす。またSLYは腸管上皮組織に細胞傷害性を与え、バリア破壊を引き起こしていることが判明した。一方でトランスウェルを用いた実験でも同様な現象が見られるのに加え、SLY低濃度時に細胞骨格への働きかけ、またカルパインの誘導による細胞間隙蛋白の減弱が見られた。SLYのこのような働きにより細胞が弱体化しバリア破壊が引き起こされることが判明した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate how *S. suis* disrupts intestinal cells and translocates from the gut to the blood circulation. In mouse model, the wild-type (WT) *S. suis* strain or the suilysin gene-knockout (*sly*) *S. suis* strain with FITC-dextran (FD) was inoculated to the intestinal loop. The number of bacteria in the blood and the translocation of FD from the intestinal lumen to the blood stream were determined in mice after WT strain inoculation. Moreover, the WT strain prompted a higher expression of pro-inflammatory cytokines than the *sly* strain did. The mechanisms of disrupt intestinal cell was investigated by using transwell system. The cell barrier was rapidly disrupted by infection with WT strain. Besides, it found that low SLY concentration performed to make a hole in the cell, and influenced the cytoskeleton, while SLY induced calpain which attenuated paracellular proteins. Based on these findings, SLY helps *S. suis* to disrupt intestinal cell barrier.

研究分野：病原微生物

キーワード：豚連鎖球菌 コレステロール依存性細胞溶解毒素 スイリシン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 我々の疫学研究により、本菌による感染症患者の多くが生ブタ肉を摂食している事実から経口ルートからの感染が推測されるが、実験室レベルでそれは実証されていない。また、本菌感染症の感染ルートについて、今まで創傷感染によるものが主となっており、摂食による腸管ルートからの感染について、ほとんど研究は行われてなかった。

(2) 本菌、病原因子として様々な報告があるが、本研究ではその中でもコレステロール依存性細胞溶解毒素(CDC)のグループであるスイリシン(SLY)に焦点を当てた、SLYによる腸管上皮細胞への影響について、報告はなくその関係性の報告は新規性があるものと考えられた。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究ではマウス腸管ループモデル及びトランスウェルシステムを用い、マクロからミクロの視点で本菌による腸管バリア機構の破たん及び血中移行への解明を行う。

(2) さらに本菌が産生するSLYの腸管上皮細胞への影響を明らかにし、腸管バリア破たんにおけるSLYの役割を明確にする。

## 3. 研究の方法

(1) 組換えSLY、不活化組換えSLYの作製

本菌が産生するSLYについて組換え体の作製を行い、またコレステロール結合サイトを置換させた不活化スイリシンの組換え体の作製を行った。これらは大腸菌を用いて、組換え遺伝子をクローニングし、組換え体を発現させ、精製を行い実験に用いた。

(2) マウス腸管ループモデルの作製

7週令メスのC3Hマウスを1週間慣らし飼育をしたのち、小腸を約5cmの長さで両端を結索し、菌液 $10^8$ CFUをFITC-dextranとともに注入した。注入後1、3、6時間後に採血及び腸の解析を行った。

(3) トランスウェルシステムの構築

Caco-2、CDMK細胞を用い、トランスウェルpore size  $3.0\mu\text{m}$ に播種しコーティングを行う。膜電位、約1.5を越えたものを感染実験に使用可能とした。感染後、菌の透過数の定量及び細胞の解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 本研究のために組換えSLY、不活化組換えSLYの作製を行った。これらは本菌が産生するSLYと同じ分子量である55kDaを示し、また、SLY抗体によりSLYが検出できたこと、赤血球を使った溶血テストにおいて適切に溶血、非溶血を示したことにより、組換え及び不活化組換えSLYは作製できた。これら組換えSLYを用い、毒素の熱に対する安定性を

調べた結果、60-10分でSLYは容易に壊れることが判明した。これは豚連鎖球菌のみならず、肺炎球菌やB群連鎖球菌のCDC毒素でも同じ現象を示すことからCDC毒素の特徴である可能性が高い。

(2) マウスループモデルを用いた感染実験の結果、本菌感染後、野生株では徐々に絨毛が破壊されており、一方でSLY欠損株では、絨毛に変化がないことが判明した。

同様に病理スコア解析から、野生株に感染した組織の方が、SLY欠損株に感染した株よりも炎症スコアが高いことが判明した。加えて炎症性サイトカインの発現を見たところ、野生株を感染させた組織ではTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6とすべてにおいてSLY欠損株を感染させた組織よりも高かった。一方で感染させた際、血中への菌の移行量を調べた結果では、野生株がSLY欠損株よりも多く血中へ透過していたことが判明し、同様にFITC-デキストラン(FD)を計測した結果でも野生株がSLY欠損株よりも多く透過していた。

免疫染色により感染時間と菌の局在を調べた結果、野生株は6時間後には粘膜固有層まで到達していることが判明したのに対し、SLY欠損株はほとんどが上皮細胞に接着しているか、絨毛内に若干侵入する程度であった。また野生株による絨毛の破壊はTunnel Assayより傷害性であることが判明した。

次に組換えSLYのみをループに注入すると、濃度依存的に絨毛は破壊されFDは多く血中へ移行することが判明し、一方で不活化SLYだと、障害性は一切なかった。SLYは本菌が血中へ移行するに重要な要因であることが判明した。

(3) 培養細胞を使用するトランスウェルシステムでは、その特性より本菌感染後の詳細な細胞の状態が観察や実験によって明らかになる。本菌感染後15時間で、電位が下がり始めると同時に菌が透過することが判明した。しかしながら、透過初期の時間帯では細胞傷害性も細胞生存率も変化がないことが判明した。しかしながらSLY欠損株では36時間でも電位は下がらず、細胞傷害性はなく、細胞生存率は高いことが判明した。感染15時間後の細胞間隙の蛋白を調べた結果、ZO-1、E-cadherinにおいて、野生株で著しく減少しているのに対して、SLY欠損株では減少していないのが判明した。共焦点顕微鏡、透過型電子顕微鏡で観察しても、細胞間隙に多く本菌が集まって抜けていることが確認された。組換えSLYを使い、同様にトランスウェルに滴下し電位の変化を調べると、SLY濃度依存的に電位は下がり、FDを透過させることが判明した。同様に細胞間隙蛋白の発現をみるとSLY濃度依存的にZO-1、E-cadherinは減少することが判明した。加えてSLYはTLR4に刺激を与え、Ca $^{2+}$ を介しcalpainによって細胞間隙の結合を弱めることを明らかとした。

また一方で、SLY は RhoA-GTPase を刺激することが判明した。これにより細胞骨格にダメージを与えると推察できる。

#### (4) 本研究のまとめ

組換え SLY を作製することによって SLY の役割が明確となった。本菌による腸管から血中移行へは SLY の存在が大きく、SLY が細胞傷害性を上皮細胞に与えバリア破壊を引き起こしていることがマウスループモデルから明確となった。また、豚連鎖球菌のみならず、連鎖球菌産生 CDC で同様な結果を示すことが判明した。さらにバリア破壊メカニズムを明確にするためにトランスウェルシステムを用い明らかとした。本菌による感染初期の SLY 濃度は低いと予想され、それゆえに感染初期の SLY の役割は pore forming を行い細胞内へ浸透することだと考える。細胞内に入った SLY は細胞骨格に影響を与える。(他の CDC でも同様な現象が報告されている。) これにより、細胞の細菌への抵抗性を弱める効果があると考えられる。一方で SLY は TLR に刺激を与え、Ca<sup>2+</sup>を介し calpain によって Tight Junction の結合を弱めることが判明した。

これにより、菌の細胞間隙からの侵入を促進することになると考えられる。実際に感染後の菌の挙動をみても菌が細胞間隙に多く局在していることは、既に観察されており、本結果が裏付けていると考えられる。今まで CDC による腸管上皮への影響を調べた報告はない。しかしながらグラム陽性菌では CDC を保持している菌は多く、同様な CDC の特徴により病態を引き起こすケースが他にあるかもしれない。それゆえに本結果は本菌及び他の CDC 産生菌の防御に応用できるかもしれない。

#### <引用文献>

D. Takeuchi, A. Kerdsin, A. Pienpringam, P. Loetthong, S. Samerchea, P. Luangsuk, K. Khamisara, N. Wongwan, P. Areeratana, P. Chiranairadul, S. Lertchayanti, S. Petcharat, A. Yowang, P. Chaiwongsaen, T. Nakayama, Y. Akeda, S. Hamada, P. Sawanpany alert, S. Dejsirilert and K. Oishi.  
Population-based study of Streptococcus suis infection in human in Phayao province in Northern Thailand.  
PLOS One 2012 年 7 巻 e31265

Al. Iliev, JR. Djannatian, R. Nau, TJ. Mitchell, FS. Wouters.  
Cholesterol-dependent actin remodeling via RhoA and Rac1 activation by the Streptococcus pneumoniae toxin pneumolysin.

Proc natl Acad Sci USA 2007 年 104 巻 2897-902.

#### 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5件)

T. Nakayama, H. Ezoe.

Heat incubation inactivates streptococcal exotoxins and recombinant cholesterol-dependent cytolysins: suilysin, pneumolysin and streptolysin O. Current Microbiology. 査読有り 2014 年 69 巻 pp690-8.

T. Nakayama, J. Zhao, D. Takeuchi, A. Kerdsin, P. Chiranairadul, P.

Areeratana, P. Loetthong, A.

Pienpringam, Y. Akeda and K. Oishi.

Colloidal gold-based immunochromatographic strip test compromising optimized combinations of anti-S.suis capsular polysaccharide polyclonal antibodies for detection of Streptococcus suis. Biosensors and Bioelectronics. 査読有り 2014 年 60 巻 pp175-9.

D. Takeuchi, Y. Akeda, T. Nakayama, A. Kerdsin, Y. Sano, T. Kaneda, S. Hamada, S. Dejsirilert and K. Oishi

The contribution of suilysin to the pathogenesis to Streptococcus suis meningitis. Journal of Infectious Disease. 査読有り 2014 年 209 巻 pp1509-19.

T. Nakayama, D. Takeuchi, T.

Matsumura, Y. Akeda, Y. Fujinaga and K. Oishi.

Alcohol consumption promotes the  
Intestinal translocation of  
*Streptococcus suis* infections.

Microbial Pathogenicity 査読有り  
2013年 65巻 pp14-20.

T. Nakayama and K. Oishi

Influence of coffee and  
galacto-oligosaccharide consumption  
on intestinal microbiota and the host  
responses. FEMS Microbiology Letters.  
査読有り 2013年 343巻 pp161-8.

〔学会発表〕(計4件)

中山 達哉  
「Suilysin plays an important role in  
intestinal translocation in the mouse loop  
model」  
S. suis symposium 2013年8月13日  
北京(中国)

中山 達哉  
「豚連鎖球菌毒素、スイリシンの腸管バリア  
破壊に関する研究」  
日本感染症学会 2013年11月6日  
大阪国際会議場(大阪府大阪市)

中山 達哉  
「タイにおける豚連鎖球菌感染症に対する  
迅速診断キットの開発」  
日本細菌学会 2014年3月28日  
タワーホール船堀(東京都江戸川区)

中山 達哉  
「豚連鎖球菌産生コレステロール依存性細胞  
溶解毒素による腸管上皮細胞への影響に  
ついて」  
日本食品衛生学会 2014年12月5日  
金沢歌劇座(石川県金沢市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0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0件)

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

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
中山 達哉 (NAKAYAMA Tatsuya)  
大阪大学・グローバルコラボレーションセ  
ンター・特任助教  
研究者番号：80552158

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：