

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293227

研究課題名(和文) 劇症型細菌感染における好中球造血抑制機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of impaired granulopoiesis by streptococcus toxic shock

研究代表者

阿戸 学 (ATO, Manabu)

国立感染症研究所・その他部局等・その他

研究者番号：20392318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：劇症型溶血性レンサ球菌感染症は、急激にショック状態や多臓器不全が進行する致死性感染症である。劇症型感染マウスモデルを用いて、好中球減少時に末梢血中にリング状の核を持つ新規未熟骨髄系細胞が出現し、様々なサイトカインを産生して、宿主防御に絶大な効果を発揮することを見出した。そこで、当該細胞の分化機構および造血抑制機構を解析した。その結果、骨髄抑制下で当該細胞分化に必須な因子を同定することに成功した。また、ヒト患者末梢血にも同様のサイトカイン産生細胞が認められ、新規治療法への発展が期待される。加えて、好中球の食胞から細胞質への菌のエスケープを阻止する新規オートファジー様殺菌機構を同定した。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus toxic shock syndrome (STSS) is a serious and fatal infectious disease and is characteristic for sudden onset, progressive septic shock, and multiple organ failure. Here we show that a novel immature myeloid cells with ring-shaped nuclear appear in the peripheral blood in a mouse model of STSS. They give rise under granulocytopenia accompanied with this severe infection and produce variety of cytokines, resulting in protection from this infection. In human clinical cases, the similar immature myeloid cells with ring-shaped nuclear are recognized in the peripheral blood and produce significant amount of cytokines. We further analyze differentiation mechanism of those immature myeloid cells in the bone marrow using mice model, and identify essential factors in differentiation of these immature myeloid cells in that infection model. We also find a novel bactericidal pathway with autophagy in neutrophils, which blockage bacterial escape from phagosomes to cytosol.

研究分野：免疫学

キーワード：感染症防御学 細菌感染 好中球減少 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

敗血症および全身性の細菌感染症は、死亡率が高く、感染症の中でも最も重篤でかつ重要なものの一つである。宿主防御に関して、好中球は、全白血球の 60-70%を占め、細菌や真菌の急性感染に対する第一線の宿主防御細胞である。好中球は、骨髄において造血幹細胞から、前駆細胞を経て分化し、成熟すると末梢血液中で循環する。感染や炎症などの組織傷害がおこると、好中球は、局所から放出される様々な走化因子により炎症局所に遊走し、細菌の貪食と殺菌を行う。好中球は活性化によって寿命が延長され、炎症性サイトカイン、ケモカイン、活性酸素や蛋白分解酵素を大量に分泌し、組織の急性炎症と自然免疫に大きな役割を演じる。

一方、種々の細菌および細菌由来分子は、Toll 様受容体を通して骨髄造血系を活性化し、好中球を含む顆粒球の増殖を促す。同時に、細菌および細菌由来分子によって造血幹細胞(HSC)が直接活性化されて、増殖能を持つ多能性造血前駆細胞(MPP)への分化が促進されるとともに、リンパ球系、単球系への分化が抑制され、顆粒球系への分化が促進される。これらが、全身細菌感染症にみられる血液中好中球増多(emergency hematopoiesis)の機序とされている(Takizawa et al. Blood 2012)。

これに対し、重症敗血症の一部では逆に好中球数の減少を伴うことが知られている。この機序に関しては、1)好中球の細胞死、2)好中球の内皮細胞への接着増加、3)骨髄での emergency hematopoiesis の抑制(Rodriguez et al. Blood 2012)が想定されているが、詳細は不明である。

劇症型細菌感染症(いわゆる人食いバクテリア)は、通常の細菌感染と異なり、敗血症性ショック、壊死性筋膜炎、多臓器不全を伴う急速進行性の致死率の高い疾患である。この疾患は、伝播性に乏しく、感染局所における好中球の欠如を伴うことから、発症において菌側の因子だけではなく、宿主因子の存在が想定されている。我々は、劇症型溶血性レンサ球菌感染症の臨床分離株を 20 年にわたり収集し、通常の感染症を起こすレンサ球菌株と比較・解析することにより、我が国の劇症型感染分離株の半数以上に認められる特異的転写調節遺伝子を同定した。また、マウス感染モデルとヒト好中球 in vitro 感染系を用いて、この菌の遺伝子変化により発現が上昇した病原因子により、好中球のネクロシスや好中球遊走因子の分解が起こり、宿主防御を抑制することによって、劇症型レンサ球菌感染症の特徴的な病態が形成されるところを明らかにした。(Ato et al., **PLoS ONE** 2008, Ikebe et al., **PLoS Pathogens** 2010)。

事実、劇症型レンサ球菌感染症患者と通常のレンサ球菌感染症患者間では劇症型患者の好中球数は有意に少なく、また、好中球減

少の程度と劇症型感染の予後が相関することが疫学的に知られており(Erikson et al. Clin. Infect. Dis 1996)、好中球機能傷害が劇症型感染の重要な病態であるという申請者らの仮説が裏付けられていると考えられた。

2. 研究の目的

劇症型溶血性レンサ球菌感染症や重篤な敗血症において、しばしば重大な予後の原因となる好中球減少を伴うことが知られている。その主な機序として、好中球の直接障害や内皮細胞への接着亢進など、末梢血中の好中球への作用がこれまで考えられてきた。今回、我々は、劇症型感染マウスモデルの骨髄において、顆粒球造血の抑制と、感染に対して保護的に働く新規インターフェロン産生骨髄系未熟細胞の産生を見いだした。本研究では、これら骨髄造血の修飾機構を分子レベルで解析し、重篤な細菌感染症における病態形成への役割を明らかにした上で、感染に対する emerging hematopoiesis について新規知見の蓄積と、将来的な臨床への応用のための科学的基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

劇症型レンサ球菌感染症マウスモデルの骨髄における好中球分化の各段階の細胞分画の比率を詳細に調べることによって、どの分化段階で障害されているかを明らかにする。さらに、当該細胞群の増殖能、分化能、遊走能を解析して、どの機構が障害されているかを明らかにする。これらの情報と、当該細胞群のトランスクリプトーム解析によって、責任分子の候補を抽出し、遺伝子欠損動物の使用を通じて、各候補分子を評価し、劇症型レンサ球菌感染症モデルにおける好中球分化抑制機構を明らかにする。同時に、IMC の分化機構も合わせて検討する。

4. 研究成果

(1) 劇症型レンサ球菌感染症マウスモデルにおける IMC の分化機構

劇症型レンサ球菌感染症マウスモデルにおいて、骨髄中 IMC および、その前駆細胞と思われる細胞亜群 IMC-precursor: IMC-PC)を同定した。IMC-PC は IMC と異なり GM-CSF 依存性増殖能をもち、IMC まで分化すると骨髄から末梢循環中へ移動することが示唆された。また、分化に関与する因子をトランスクリプトーム解析した。その結果、幾つかのサイトカイン発現の関与が考えられた。実際 IFN ノックアウトマウスにおいては IMC の分化が障害されており、IFN または、そのシグナルの下流に関与する分子が、IMC の分化に必須であることが示唆された。さらに、劇症型感染マウスモデルのサイトカイン発現プロファイルを解析したところ、両者でインターロイキン(IL)-6 の高い産生が認められた。また、マウスモデルで IL-6 産生を確認したところ、末梢血中では IMC が IL-6 の

主たる産生細胞であること、IMC から産生される IL-6 が感染に宿主保護的に働くことが明らかになった(Matsumura et al 投稿準備中)。分化における関与については、IL-6 は IMC の分化には寄与しないが、IMC の機能に必須なサイトカインであることが明らかとなった。骨髄での血液細胞分化に関しては、劇症型レンサ球菌感染症マウスモデルにおいて、全体的に骨髄造血機能の低下がおこっており、中でも好中球産生が低下していることが示唆された。好中球分化抑制分子メカニズムに関しても、現在解析中である

(2) ヒト劇症型レンサ球菌感染症における IMC 様細胞の解析

ヒト劇症型レンサ球菌感染症患者においてマウスモデルで見られた IMC が存在するかどうかは、実際の感染病態の解明に重要である。そこで、まずヒト患者血漿中のサイトカイン産生レベルを解析したところ、血漿中の IFN 濃度は、ほとんどの症例で、軽度上昇もしくは産生が認められなかった。このことは、ヒト劇症型感染症はマウスモデルと異なり、IFN の産生が誘導されにくいことが考えられた(Yoshizawa et al 投稿準備中)。

IFN 以外のマーカーで IMC を同定するために、劇症型感染マウスモデルと患者血漿のサイトカイン発現プロファイルを解析したところ、両者でインターロイキン(IL)-6 の高い産生が認められた。そこで、医療機関より同意を得て所得した患者末梢血スミアを検索した結果、白血球減少をきたす劇症型レンサ球菌感染症の複数の症例で IMC 様の外見を示す細胞が末梢血中に存在することが判明した。さらに詳細に比較、および同定用のバイオマーカーを探索するため、ヒト患者末梢血中に存在する IMC 用細胞を単離し、シングルセルトランスクリプトーム解析を現在検討中である。

(3) 好中球における新規オートファジー様殺菌機構の同定

レンサ球菌は、分泌型孔形成毒素であるストレプトリシン 0(SLO)によって、食胞から細胞質にエスケープして殺菌を回避する機構が知られている。しかし、好中球においては、SLO の産生が更新している劇症型レンサ球菌感染症分離株においても、食胞から細胞質へのエスケープは認められなかった。本分子機構を明らかにするため、同様に食胞から細胞質にエスケープすることが明らかになっている類鼻疽菌を用いて好中球のエスケープ阻止機構を解析した。その結果、類鼻疽菌もレンサ球菌同様好中球の食胞からエスケープできず、殺菌されることが判明した。この分子機構として、細菌を取り込んだ食胞の近傍に、オートファゴソーム様の構造物が出現し、食胞と融合し、最終的には内容を分解するリソソームと融合することによって、殺菌を行うということが判明した。本殺菌機構

はこれまでに報告がない新規細胞内殺菌機構であり、今後の詳細な解析による分子機構の解明と、感染症治療への応用が期待される。

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 20 件)

- 1) Ikebe T, Matsumura T, Nihonmatsu H, Ohya H, Okuno R, Mitsui C, Kawahara R, Kameyama M, Sasaki M, Shimada N, Ato M, Ohnishi M. Spontaneous mutations in *Streptococcus pyogenes* isolates from streptococcal toxic shock syndrome patients play roles in virulence. *Sci Rep*. In press.
- 2) Sato M, Sasaki N, Ato M, Hirakawa S, Sato K, Sato K. Microcirculation-on-a-chip: a microfluidic platform for assaying blood- and lymphatic-vessel permeability. *PLoS One*. 2015 Sep 2;10(9):e0137301. doi: 10.1371/journal.pone.0137301.
- 3) Buddhisa S, Rinchai D, Ato M, Bancroft G, Lertmemongkolchai G. Programmed Death-Ligand 1 on *Burkholderia pseudomallei* infected human polymorphonuclear neutrophils impairs T cell functions. *J Immunol*. 2015 May 1;194(9):4413-21. doi: 10.4049/jimmunol.1402417.
- 4) Rinchai D, Riyapa D, Buddhisa S, Utispan K, Titball RW, Stevens MP, Stevens JM, Ogawa M, Tanida I, Koike M, Uchiyama Y, Ato M*, Lertmemongkolchai G*. Macroautophagy is essential for killing of intracellular *Burkholderia pseudomallei* in human neutrophils. *Autophagy*. 2015 May 4;11(5) 748-755. doi: 10.1080/15548627.2015.1040969.
- 5) Kaneko M, Maruta M, Shikata H, Hanayama M, Ikebe T. Acute abdomen due to group A streptococcus bacteremia caused by an isolate with a mutation in the *csrS* gene. *J Infect Chemother*. 2015 Jul 10. pii: S1341-321X(15)00155-5. doi: 10.1016/j.jiac.2015.06.010.
- 6) Ikebe T, Chiba K, Shima T, Masuda C, Okuno R, Ohya H, Ogata K, Katsukawa C, Kawahara R, Tominaga K, Yabata J, Tada Y, Okabe N, Watanabe H, Chang B, Ogawa M, Ohnishi M; Working group for beta-hemolytic streptococci in Japan. Evaluation of streptococcal toxic shock-like syndrome caused by group B streptococcus in adults in Japan between 2009 and 2013. *J Infect Chemother*. 2015 Mar;21(3):207-11. doi: 10.1016/j.jiac.2014.12.002. Epub 2014 Dec 18.
- 7) Morimoto M, Tamura S, Hayakawa T,

- Yamanishi H, Nakamoto C, Nakamoto H, Ikebe T, Nakano Y, Fujimoto T. Phlegmonous gastritis associated with group A streptococcal toxic shock syndrome. *Intern Med.* 2014;53(22):2639-42. Epub 2014 Nov 15.
- 8) Kohayagawa Y, Ishitobi N, Yamamori Y, Wakuri M, Sano C, Tominaga K, Ikebe T. Streptococcal toxic shock syndrome from necrotizing soft-tissue infection of the breast caused by a mucoid type strain. *J Infect Chemother.* 2015 Feb;21(2):144-7. doi: 10.1016/j.jiac.2014.08.031. Epub 2014 Sep 30.
 - 9) Kudo F, Ikutani M, Seki Y, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T, Oshima K, Hattori M, Nakae S, Takatsu K, Takaki S. Interferon- γ Constrains Cytokine Production of Group 2 Innate Lymphoid Cells. *Immunology.* 2015 Oct 1. doi: 10.1111/imm.12537. [Epub ahead of print]
 - 10) Saleh MA, McMaster WG, Wu J, Norlander AE, Funt SA, Thabet SR, Kirabo A, Xiao L, Chen W, Itani HA, Michell D, Huan T, Zhang Y, Takaki S, Titze J, Levy D, Harrison DG, Madhur MS. Lymphocyte adaptor protein LNK deficiency exacerbates hypertension and end-organ inflammation. *J Clin Invest.* 2015 Mar 2;125(3):1189-202. doi: 10.1172/JCI76327.
 - 11) 阿戸 学、池辺忠義 . 劇症型溶血性レンサ球菌感染症の発症メカニズムと検査. *検査と技術* 44(1) 40-46. 2016
 - 12) 阿戸 学. 重症・劇症型感染症の診断と治療 劇症型溶血性レンサ球菌感染症. *感染症* 45(2) 77-83,73-76. 2015
 - 13) 阿戸 学、池辺忠義 . A 郡溶血性レンサ球菌の細菌学的特徴 こどもの感染症 3(2). 74-8. 2015
 - 14) 松村隆之、阿戸 学 . 劇症型溶血性レンサ球菌感染症における宿主免疫応答 *ファルマシア* 51(8) 760-64. 2015
 - 15) 阿戸 学. 重症・劇症型感染症の診断と治療 劇症型溶血性レンサ球菌感染症. *感染症* 45(2) 77-83,73-76. 2015.
 - 16) Mori T, Iwasaki Y, Seki Y, Iseki M, Katayama H, Yamamoto K, Takatsu K, Takaki S. Lnk/Sh2b3 controls the production and function of dendritic cells and regulates the induction of IFN- γ -producing T cells. *J Immunol.* 2014 Aug 15;193(4):1728-36. doi: 10.4049/jimmunol.1303243.
 - 17) 松村隆之、阿戸 学 . 2013 . 劇症型溶血性レンサ球菌感染症における宿主免疫応答 . *化学療法の領域* 29(7) 57-64.
 - 18) 阿戸 学、池辺忠義、渡邊治雄. 2013. 劇症型レンサ球菌感染症の分子メカニズム *日本臨床微生物学雑誌 総説* 23(2):79-86. ISSN 0917-5659.
 - 19) 阿戸 学、松村隆之、池辺忠義. 2013. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症における菌側病原因子と好中球機能傷害の機序 *化学療法の領域 私達の研究*(121) 29(4):108-117. ISSN: 0913-2384.
 - 20) Kewcharoenwong C, Rinchai D, Utispan K, Suwannasaen D, Bancroft G, Ato M*, Lertmemongkolchai G*. Glibenclamide reduces pro-inflammatory cytokine production by neutrophils of diabetes patients in response to bacterial infection. *Sci Rep.* 2013. 3:3363. doi: 10.1038/srep03363
- 〔学会発表〕(計 13 件)
- 【国際学会】
- 1) S. YOSHIZAWA, M. ATO, T. IKEBE, Y. FUKUI, T. TSUBOTA, M. HONDA, Y. ISHII, K. TATEDA. Streptococcal Toxic Shock Syndrome due to Beta-hemolytic Streptococci : Clinical Features and Cytokines/ Chemokines Analysis of the Cases. *IDSA 2014.* (Philadelphia, 米国、10 月)
 - 2) Manabu Ato, Takayuki Matsumura, Tadayoshi Ikebe, Makoto Ohnishi, Haruo Watanabe, Kazuo Kobayashi. Severe invasive group A streptococcus kills human neutrophils in contact- and Streptolysin O-dependent manner. *IUMS2014* (Montreal. カナダ、7 月)
 - 3) Ato, M. Roles of neutrophils and a related cell population in bacterial infections. The 50th Khon Kaen University and 36th Faculty of Associated Medical Sciences Anniversary Celebration Conference “2013 Infection & Immunity: From Basic to Translational Research” (Hua Hin、タイ王国、9 月)
 - 4) Ato, M. 2013. Toward understanding of pathophysiology of severe invasive bacterial infections. -from host immune evasion to disturbance of microcirculation-. *International Workshop on Biointerface and Biomedical Engineering*, 2013. (岡山、8 月)
 - 5) Matsumura, T., T. Ikebe, and M. Ato. 2013. Immature myeloid cells, which produce interferon-g and/or interleukin-6, play a protective role in severe invasive group A Streptococcus infections. *Joint Meeting: The 78th Meeting of the Japanese Society for Interferon and Cytokine Research and The 21th International Symposium of Macrophage Molecular and Cellular Biology 2013* (東京、5 月).
 - 6) Ato, M., T. Matsumura, and T. Ikebe. 2013. Interferon-g-producing immature myeloid cells in severe Streptococcus infection. *Joint Meeting: The 78th Meeting of the Japanese*

Society for Interferon and Cytokine Research and The 21th International Symposium of Macrophage Molecular and Cellular Biology 2013 (東京、5月)

【国内学会】

- 7) 阿戸学 溶連菌の病原性と劇症型レンサ球菌感染症への関与 第90回日本感染症学会総会(招待講演)2016.(仙台 4月)
- 8) 松村隆之, 池辺忠義, 大西真, 阿戸学 The defensive role of IL-6-producing immature myeloid cells in group A streptococcal infections. 2016 第89回日本細菌学会総会(大阪 3月)
- 9) Matsumura T, Ato M. Immature myeloid cells are the producers of protective factors in severe invasive group. 2015. (札幌 11月)
- 10) 松村隆之. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症における未熟骨髄系細胞の役割. 第15回 Pharmaco-Hematology Symposium 2014 (名古屋、5月).
- 11) Tsuchiya, T., T. Matsumura, T. Ikebe, K. Kobayashi, and M. Ato. 2014. Fat-1 transgenic mice are more susceptible to severe invasive group A Streptococcus infections. 第87回日本細菌学会総会(東京、3月)
- 12) Matsumura, T., T. Ikebe, and M. Ato. 2014. The defensive role of immature myeloid cells in severe invasive group A Streptococcus infections. 第87回日本細菌学会総会 2014(東京、3月)
- 13) 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IFN-g産生未熟骨髄系細胞の役割. 平成25年度北里大学メディカルセンター研究部門学術講演会2013.(埼玉、10月).

【図書】(計 1 件)

1. Matsumura T, Kobayashi K, Ato M. Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and their related cell subpopulations. **The Research and Biology of Cancer**. iConcept Press 2013. ISBN: 978-14775549-9-9.

【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：
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

阿戸学 (ATO Manabu)
国立感染症研究所 免疫部 部長
研究者番号：20392318

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

高木 智 (TAKAKI Satoshi)
国立国際医療研究センター 免疫制御研
究部 部長
研究者番号：10242116

池辺 忠義 (IKEBE Tadayoshi)
国立感染症研究所 細菌第一部 主任研
究官
研究者番号：20333362