

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860330

研究課題名(和文) G群レンサ球菌産生溶血因子が惹起する劇症型感染症の発症機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of severe invasive group G streptococcal infections

研究代表者

渡邊 真弥 (Watanabe, Shinya)

独立行政法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：60614956

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)：近年の疫学調査により、劇症型感染症をはじめとするG群レンサ球菌による侵襲性感染症が増加していることが明らかとなっている。我々は、マウス感染モデルとマイクロアレイを用いて、G群レンサ球菌が侵襲性感染症を発症する際に発現上昇している遺伝子群を特定した。転写調節因子 $csrS$ 遺伝子破壊株は溶血因子の発現が亢進しており、 $csrS$ 破壊株感染マウスが全身性溶血症状をきたしていた。国内流行型のstG6792分離株は他の分離株と比較して、溶血因子の産生量が高かった。本研究により、G群レンサ球菌が侵襲性感染症を引き起こす際に、溶血因子が重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Recent epidemiological studies reveal that invasive infections caused by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE), which has Lancefield group G or C antigens, have been increasing in Asia, Europe and the US. The mechanisms and key virulence factors by which SDSE causes invasive diseases are poorly understood. We analyzed the SDSE transcriptome in vivo during intraperitoneal infection in mice using the SDSE specific microarray. The data indicated that SDSE virulence factors were induced during infection. We also created a deletion mutant of $csrS$ encoding a global negative virulence gene regulator and the mutant induced severe systemic hemolysis in mice. The most frequently isolated stG6792 strains secreted abundant SLS and SLO rather than other SDSE emm types. Our findings suggest that these virulence factors might play an important role in invasive diseases induced by SDSE.

研究分野：細菌学・感染症学

キーワード：G群レンサ球菌 マウス感染モデル 侵襲性感染症 溶血毒素 ストレプトリジンS

1. 研究開始当初の背景

劇症型感染症を含む重篤な侵襲性レンサ球菌感染症は、容態が重篤で症状が急変するため、集中管理や外科的処置を必要とする難治性疾患である。近年の疫学調査より、これまで病原性が乏しいと考えられていた G 群および C 群レンサ球菌 (*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*: SDSE) による侵襲性感染症が増加していることが明らかになっている。しかし、G 群レンサ球菌の高病原性に関連する分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。

当研究部では、侵襲性感染症を引き起こした G 群レンサ球菌 SDSE のゲノム配列を世界に先駆けて決定し、SDSE は、SDSE と同様に劇症型レンサ球菌感染症を含む侵襲性感染症の起原菌である A 群レンサ球菌 (GAS) と近縁であることを明らかにした。しかし、SDSE は、GAS と共通の病原因子を数多く持つにも関わらず、GAS が劇症型レンサ球菌感染症を引き起こす際に重要だと言われているプロテアーゼ SpeB やヒアルロン酸莢膜を持っていない。このことから、SDSE は GAS と異なる侵襲性感染症発症機構を持っていることが示唆されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウスレンサ球菌侵襲性感染症モデルを用いて、G 群レンサ球菌が、溶血因子であるストレプトリジン S を含む病原因子を複合的に作用させて侵襲性感染症を発症するメカニズムを明らかにすることである。さらに、未だゲノムが未解明であるランズフィールド型別が C 群である SDSE の全ゲノム解析を行い、G 群の SDSE と比較することにより、SDSE が共通してもつ病原因子を明らかにする。

3. 研究の方法

侵襲性レンサ球菌感染症から分離された GGS124 株のゲノム配列を元に、SDSE 特異的マイクロアレイを作成した。G 群レンサ球菌を ddY マウスの腹腔に投与し、経時的に回収した菌から RNA を抽出し、SDSE 特異的マイクロアレイを用いて発現解析を行った。G 群レンサ球菌の抑制性転写調節因子をコードしている *csrS* 遺伝子を破壊した株を作成した。*csrS* 破壊株をマウス感染モデルとマイクロアレイを用いて発現解析を行った。*csrS* 破壊株感染マウスの全身性溶血現象を明らかにするために、感染マウスから採血し溶血症状を評価した。さらに、腎臓組織切片を作成し病理学的に解析した。この溶血現象の臨床的意義を評価するために、国内の SDSE 臨床分離株 83 株のストレプトリジン S とストレプトリジン 0 の産生量を測定した。これらの臨床分離株の *csrSR* 遺伝子の配列を決定した。*csrS* に変異が挿入されている臨床分離株に、GGS124 株の *csrS* を相補させ、*csrS* により転写調節している因子を、次世代シーケンサ

ーを用いた RNA-seq により特定した。未だゲノム解析が行われていない C 群レンサ球菌株 SDSE167 株の全ゲノム配列を決定した。

4. 研究成果

本研究で我々は、マウス感染モデルとマイクロアレイを用いて、侵襲性感染症発症時における SDSE 遺伝子の網羅的発現解析を行った。その結果、感染 2 時間後にストレプトリジン 0 (SLO) 遺伝子が高発現しており、さらに 4 時間後以降に SLS オペロンの発現が上昇していることが明らかになった (図 1)。

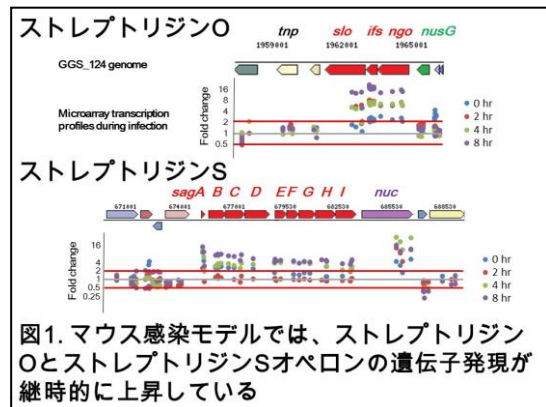


図1. マウス感染モデルでは、ストレプトリジン O とストレプトリジン S オペロンの遺伝子発現が継続的に上昇している

次に、G 群レンサ球菌の病原因子の抑制性転写調節因子をコードしている *csrS* 遺伝子を破壊した株を用いて、親株と同様にマウスの腹腔に投与してマイクロアレイ解析を行った。その結果、*csrS* 破壊株では SLS オペロンの発現が投与前から上昇していた。*csrS* 破壊株をマウスに投与すると著名な血尿が認められ、さらに同菌接種後のマウスから血液を採取したところ、明瞭な溶血が認められた。また代表的な臓器として腎臓の観察を行ったところ、*csrS* 破壊株では、腎臓肥大を認め、腎臓組織切片の観察では血腫が確認された。これらは、SLS の溶血毒素としての活性によるマウスでの全身性溶血現象が強調されたと考えられた。

さらに、この溶血現象の臨床的意義を評価するため、SDSE 臨床分離株 83 株において SLS と SLO、およびそれ以外の溶血活性の定量を行った。その結果、国内流行型の stG6792 分離株は他の型の分離株と比較して、SLS と SLO の産生量が有意に高いことが明らかになった (図 2)。上記のことをまとめて、*Journal of Infectious Diseases* 誌上で報告した。

臨床分離株 83 株の中で、*csrS* に変異が挿入され機能が破壊されていると推測される株が 2 株存在した。これら 2 株と新たに本邦で侵襲性感染症患者から臨床分離された *csrS* に変異が挿入されていた 1 株を用いて、GGS124 株の *csrS* をレンサ球菌用のプラスミドへクローニングし、*csrS* が壊れている臨床分離株に形質転換させた。臨床分離株の全ゲノム解析はまだ行われていないため、次世代シーケンサーを用いて RNA-seq による遺伝

子発現解析を行った。3株のうち、2株が GGS124株の *csrS*により相補されたことが確認された。その2株と GGS124株の *csrS*破壊株を比較したところ、溶血因子ストレプトリジン0を含む8遺伝子が共通して発現上昇していた。このことから、SDSEの侵襲性感染症発症にはこれらの因子が重要であることが示唆された。

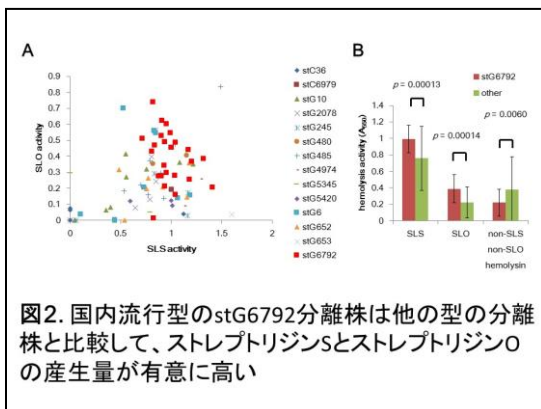


図2. 国内流行型のstG6792分離株は他の型の分離株と比較して、ストレプトリジンSとストレプトリジンOの産生量が有意に高い

未だゲノムが未解明である C 群レンサ球菌 SDSE の全ゲノム解析を行った。ゲノム配列が公表されている 4 株の G 群レンサ球菌 SDSE のゲノムと比較したところ、SDSE は共通して約 90%以上の相同性をそれぞれ示していた。すべての SDSE 株は、GAS が有する病原因子プロテアーゼ SpeB とヒアルロン酸莢膜を有していなかった。さらに、C 群レンサ球菌は、G 群と比較して糖合成酵素が異なっており、これらが細胞表面の抗原性に寄与していると推測された。これらのことをまとめて、Genome Biology and Evolution 誌上で発表した。

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 3 件)

- (1) Shinya Watanabe, Yumi Shimomura, Kimiko Ubukata, Teruo Kirikae and Tohru Miyoshi-Akiyama. Concomitant regulations of host tissues-destructing virulence factors and carbohydrate metabolisms during invasive diseases in group G Streptococcus. *The Journal of Infectious Diseases*. 208 (9), 1482-1493. (2013).
- (2) Shinya Watanabe, Teruo Kirikae, Tohru Miyoshi-Akiyama. Complete genome sequence of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* 167 carrying Lancefield group C antigen, and comparative genomics of *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*

strains. *Genome Biology and Evolution*. 5 (9), 1644-1651. (2013).

- (3) 渡邊真弥, 秋山 徹. ゲノム解析に基づく劇症型レンサ球菌感染症の分子疫学. 化学療法の領域. 特集 1. いわゆるヒト喰いバクテリアと劇症型感染症 2013 年 7 月号 Vol. 29 No. 7 p41-47 (p1423-1429). 医薬ジャーナル社

[学会発表] (計 7 件)

- (1) Watanabe, S., Kirikae, T., and Miyoshi-Akiyama, T. The Transcriptional Responses of Group G Streptococci to Various Stress Conditions. *In 114th General Meeting of American Society for Microbiology*. The Boston Convention & Exhibition Center (Boston, Massachusetts, USA). May 17-20, 2014. Poster presentation.
- (2) 渡邊真弥, 切替照雄, 秋山 徹 Regulatory Network Analysis of Group A Streptococci during Sevier Invasive Diseases 第 88 回日本細菌学会総会, WS2 オミックス研究と微生物, 長良川国際会議場, 岐阜県岐阜市 2015 年 3 月 26 日~28 日 (口頭発表+ポスター発表)
- (3) Watanabe, S., Kirikae, T., and Miyoshi-Akiyama, T. Transcriptomic Profiling of Group G Streptococci Using a Murine Infection Model. *In 113th General Meeting of American Society for Microbiology*. Colorado Convention Center (Denver, Colorado, USA). May 18-21, 2013. Poster presentation.
- (4) 渡邊真弥, 生方公子, 切替照雄, 秋山 徹 Molecular mechanisms of invasive diseases induced by group G streptococci 第 87 回日本細菌学会総会, タワーホテル船堀, 東京都江戸川区 2014 年 3 月 26 日~28 日 (ポスター発表)
- (5) 渡邊真弥, 切替照雄, 秋山 徹 Lancefield C 群抗原を保有する *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* 167 株の完全ゲノム配列 第 87 回日本細菌学会総会, タワーホテル船堀, 東京都江戸川区 2014 年 3 月 26 日~28 日 (ポスター発表)
- (6) 渡邊真弥, 切替照雄, 秋山 徹 G 群レンサ球菌による劇症型レンサ球菌感染症発症機構の解明 第 7 回細菌学若手コロッセウム 広島エアポートホテル, 広島

県三原市 2013 年 8 月 7 日～9 日（口頭
発表）

- (7) ○渡邊真弥, 切替照雄, 秋山徹 マウス
感染モデルを用いた G 群レンサ球菌の二
成分制御因子 CsrRS の解析 **第 22 回**
Lancefield レンサ球菌研究会 ホテル
島根イン青山 パインコート I・II, 東京
都港区 2013 年 6 月 28 日～29 日（口頭
発表）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rincgm.jp/individual/lab03/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 真弥 (Shinya Watanabe)

国立国際医療研究センター研究所・感染制
御研究部・上級研究員（現・自治医科大学・
医学部・講師）

研究者番号：60614956