

平成30年6月5日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04734

研究課題名(和文) マウス糖尿病モデルを用いた劇症型レンサ球菌感染症に関する研究

研究課題名(英文) Pathogenicity of streptococcal toxic shock syndrome in a mouse model of diabetes

研究代表者

秋山 徹 (Miyoshi-Akiyama, Tohru)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・感染症免疫遺伝研究室長

研究者番号：20246466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis (SDSE)はA群レンサ球菌と同様に劇症型レンサ球菌感染症(STSS)の原因となる。本研究では、STSSのマウスモデルにおいてSDSEの病原性をGASと比較した。SDSE投与によりマウス血糖は特異的に上昇した。糖尿病モデルマウスでは非糖尿病マウスと比較してSDSE感受性が増加し、この時、IL-6などのサイトカインレベルもSDSE特異的に上昇した。IL-6KOマウスはGASには高感受性だったが、SDSEにはむしろ低感受性の傾向だった。以上の結果は、SDSEとGASが誘導する宿主応答が異なることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis (SDSE) causes severe invasive disease such as streptococcal toxic shock syndrome, similar to that caused by *S. pyogenes* (GAS). Here we analyzed the associations between the pathogenicity of SDSE and diabetes mellitus using a mice model and compared them with those of GAS. Intraperitoneal injection of SDSE into C57BL6/J mice induced a rapid rise in blood glucose concentrations within 4 h. The survival rates of mice injected with SDSE were significantly lower in mice with type 2 diabetes compared with nondiabetic mice. Injection of db/db mice with SDSE increased the concentrations of cytokines. When injected with a GAS strain, the survival rates of IL-6KO mice were lower compared with those of wild-type mice. In contrast, the survival rates of IL-6KO mice injected with SDSE were rather than high. These data reveal that the mechanisms underlying streptococcal infection differ between SDSE and GAS.

研究分野：細菌学・感染症学

キーワード：劇症型レンサ球菌感染症 マウスモデル 発現解析 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

Streptococcus dysgalactiae subsp. *equisimilis* (SDSE)は近年、侵襲性疾患の原因菌として注目されているレンサ球菌である。筆者等が実施してきた厚生労働省研究班の疫学調査では、劇症型レンサ球菌感染症 (STSS)を始めとする侵襲性疾患の原因菌として良く知られる A 群レンサ球菌 (GAS) よりも、SDSE による侵襲性疾患の発生数が多いことが明らかになっている。これらの侵襲性疾患は高齢者や糖尿病などの基礎疾患を有する患者が特に高リスクであり、これからの日本社会を考えるとその対策は重要である。SDSE は GAS と共に非常に重篤な症状を示す STSS から比較的良性的の咽頭炎まで非常に多彩な感染症の原因となる細菌である。特に STSS の致命率は高く、予後も不良であるため、これまでに主に GAS の STSS 発症機構について、細菌側の因子に関して精力的な研究が行われている。その結果、GAS は、侵入・定着・体内での拡散・発症と重症化、という感染の各ステップで、同菌が保有する多様な病原因子の発現を変化させることで宿主の免疫系などを回避しながら、病原性を発揮することが明らかになってきた。

一方、SDSE による研究は遅れており、筆者等が世界に先駆けて SDSE の全ゲノム配列を明らかにするまで、研究基盤となるゲノム配列情報すら利用可能ではなかった。この全ゲノム解析の結果、SDSE は GAS と 70% の遺伝子を共有し、非常に近縁であることが明らかになっている。そのため、GAS と SDSE の STSS 発症機構は極めて類似しているのではないかと予想された。しかしながら SDSE は GAS の重要病原因子として知られるシステインプロテイナーゼやヒアルロン酸合成酵素系、そして免疫細胞の異常活性化に寄与する機能性スーパー抗原といった GAS において重要な因子を欠落している。また SDSE の全遺伝子を搭載したカスタムマイクロアレイによるマウスモデルを用いた宿主内感染時の SDSE 遺伝子の発現解析では、SDSE は宿主感染時に Entner-Doudoroff 経路を利用し、炭水化物を獲得するという、GAS では見られない、特徴的な発現制御を行っていることを明らかにしている。これらの知見から、筆者等は SDSE が GAS とは異なる機構を利用して劇症型感染症を発生させているのではないかと考えた。

そこで予備的解析として、まずモデル構築を行った。糖尿病自然発症型マウスと薬剤誘発型糖尿病マウスにおいて、SDSE への感受性が野生型マウスに比べて、変化するかどうかを検討した。その結果、糖尿病発症マウスでは、SDSE に対する感受性が上昇することが明らかとなった。このことは、ヒト症例での疫学的知見の結果を良く反映しており、本モデルが SDSE 感染症解析に有用であることを示唆した。さらに、同マウスモデルにて、アジレント社マイクロアレイを用いて、

SDSE 感染後に採取した臓器における SDSE 感染時のマウス遺伝子発現変動の網羅解析を実施した。その結果、対照として使用した GAS や黄色ブドウ球菌感染時と比較して、SDSE 感染時の糖尿病マウスの発現プロファイルは、特異的な炎症性応答を示すことが明らかとなった。当該知見を実際に、SDSE や GAS を感染させたマウスの血清中サイトカインのマルチプレックス測定により検証し、蛋白質レベルでも SDSE 感染時に糖尿病マウスで炎症性応答が強く惹起されることを確認している。これらの知見は、SDSE が GAS とは異なる機構で宿主に影響していることを示唆する。

2. 研究の目的

SDSE は致命率の高い劇症型感染症 (STSS) の原因菌である。疫学調査の結果、その分離頻度は A 群レンサ球菌 (GAS) よりも高く、糖尿病などの基礎疾患を持つ高齢者で特に高頻度であることが明らかとなっている。糖尿病マウスでの予備解析の結果、野生型マウスと比較して、糖尿病マウスは GAS よりも SDSE に感受性であることが判明した。SDSE 感染時のマウス遺伝子発現を網羅解析したところ、野生型マウスと比較して、糖尿病マウスでは、炎症状態が亢進していることを示す SDSE 特異的プロファイルが得られた。糖尿病マウスでは、GAS 感染時よりも SDSE 感染時に炎症性サイトカイン産生が惹起された。本研究ではこのような SDSE 特異的な糖尿病マウスにおける高病原性の原因と責任分子を明らかにする本研究では、このような SDSE 特異的糖尿病マウスにおける高病原性の原因と責任分子を明らかにする。STSS のマウスモデルにおいて SDSE の病原性を GAS と比較する。

3. 研究の方法

SDSE と GAS の病原性を糖尿病マウスモデルにおいて比較し、予備試験で得られている SDSE に特徴的な炎症性プロファイルの要因を宿主側と細菌側の両面から特定する。炎症性プロファイルはマイクロアレイを利用した網羅解析にパスウェイ解析を併用し、重要経路の推定を行った上で、マルチプレックスサイトカインアッセイや転写因子のレポーターアッセイにより検証し、プロファイルを規定している主要因子を同定し、中和抗体による病態悪化抑制の可能性を検討する。予備試験で、SDSE は死菌状態でも SDSE に特異的なプロファイルを誘発可能であることが明らかになっている。またこれらの誘発因子はレンサ球菌の血清型抗原ではないことを示唆する知見も得ている。そこで、同プロファイルを誘導する SDSE 因子を、酵素による SDSE 菌体処理により分画した菌体成分において、絞り込み、順次精製を行って同定する。同因子の意義を

遺伝子破壊株実験で証明する。

4. 研究成果

サイトカインアッセイから特定した炎症プロファイルにおいて重要なサイトカインとして IL-6 を含むいくつかのサイトカインを同定した。これらのサイトカインは GAS 投与よりも SDSE 投与によるレベル上昇が顕著だった。SDSE 投与によりマウス血糖は特異的に上昇した。糖尿病モデルマウスでは、非糖尿病マウスと比較して SDSE 感受性が増加し(図 1, 2)、この時、IL-6 などのサイトカインレベルも SDSE 特異的に上昇した。IL-6KO マウスは GAS には高感受性だったが、SDSE にはむしろ低感受性の傾向だった。SDSE 投与時の宿主遺伝子発現パターンをマイクロアレイにより解析し、パスウェイ解析を実施したところ、複数のパスウェイの発現が上昇しており、これらの中には IL-6 などの発現上昇に関与する NOD2 経路も含まれていた。以上の結果は、SDSE と GAS が誘導する宿主応答が異なることを示唆する。

図1 STZ投与による糖尿病発症モデル

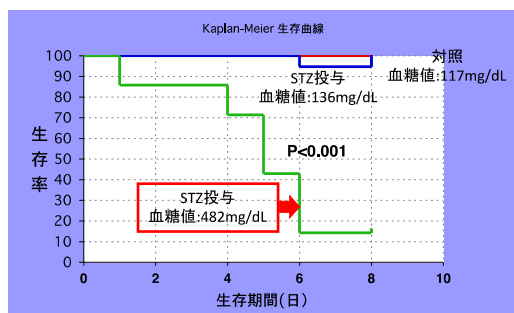
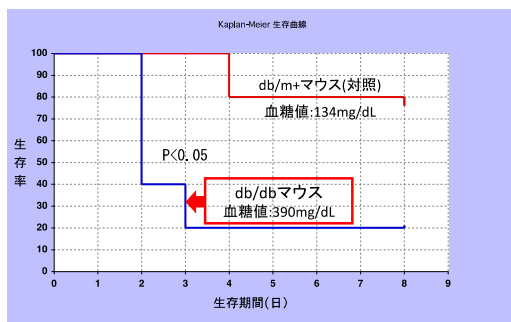


図2 糖尿病自然発症マウスモデル



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 6件)

1: Tohya M, Sekizaki T, Miyoshi-Akiyama T. Complete Genome Sequence of *Streptococcus ruminantium* sp. nov. GUT-187T (=DSM 104980T =JCM 31869T), the Type Strain of *S. ruminantium*, and Comparison with Genome Sequences of *Streptococcus suis* Strains. *Genome Biol Evol.* 2018 Apr 1;10(4):1180-1184. doi:

10.1093/gbe/evy078. PubMed PMID: 29659811; PubMed Central PMCID: PMC5913669.

2: Ogura K, Watanabe S, Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T. Complete Genome Sequence and Comparative Genomics of a *Streptococcus pyogenes* emm3 Strain M3-b isolated from a Japanese Patient with Streptococcal Toxic Shock Syndrome. *J Genomics.* 2017 Jul 1;5:71-74. doi: 10.7150/jgen.20915. eCollection 2017. PubMed PMID: 28698738; PubMed Central PMCID: PMC5504827.

3: Watanabe S, Takemoto N, Ogura K, Miyoshi-Akiyama T. Severe invasive streptococcal infection by *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *Microbiol Immunol.* 2016 Jan;60(1):1-9. doi: 10.1111/1348-0421.12334. Review. PubMed PMID: 26762200.

4. 次世代シーケンス(NGS)による劇症型レンサ球菌の病原性解析(総説). 竹本 訓彦, 小倉 康平, 渡邊 真弥, 秋山 徹. *日本化学療法学会雑誌* (1340-7007)65 巻 5 号 Page745-750(2017.09)

5. 患者報告数が増加した"人食いバクテリア"(解説). 秋山 徹. *Medical Technology* (0389-1887)44 巻 6 号 Page544-545(2016.06)

6. 【肺炎球菌感染症の今日的话题】肺炎球菌の細菌学的特徴とゲノム構造(解説/特集). 小倉 康平(国立国際医療研究センター研究所 病原微生物学研究室), 秋山 徹. *臨床と微生物* (0910-7029)43 巻 4 号 Page297-302(2016.07)

[学会発表](計 7件)

1. Comprehensive Transcriptome Analysis of Group A Streptococci Using the Murine Invasive Model Reveals a Key Gene Network Causing Severe Invasive Diseases. S. Watanabe, K. Ogura, T. Kirikae, T. Miyoshi-Akiyama *ASM Microbe* 2017.

2. *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* の感染と糖尿病の関係性に関する研究(Studies on relationship between *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* infection and diabetes mellitus)(英語) 小倉 康平. 秋山 徹 第 92 回日本細菌学会総会(2017.03)

3. A 群溶血性レンサ球菌(*Streptococcus pyogenes*)における新規病原性(制御)因子の探索 竹本 訓彦, 渡邊 真弥, 秋山 徹 第 92 回日本細菌学会総会(2017.03)

4. 感染症診断・治療・予防のブレイクスルーをめざして! オミクス解析を中心に 次世代シーケンスによる劇症型レンサ球菌の解析 秋山 徹. 第 63 回日本化学療法学会 東日本支部総会第 65 回日本感染症学会東日本地方会学術集会(2016.10)

5. Riboswitch による RNA 分解を介した遺伝子発現制御 竹本 訓彦, 渡邊 真弥, 田中裕也, 乾 将行, 秋山 徹 第 91 回日本細菌学会総会(2016.03)

6. A 群溶血性レンサ球菌のマウス感染モデルを用いた発現解析 渡邊 真弥, 切替 照雄, 秋山 徹 第 91 回日本細菌学会総会(2016.03)

7. A 群レンサ球菌の高病原化スイッチング (英語) 渡邊 真弥, 切替 照雄, 秋山 徹 第 88 回日本生化学会大会・第 38 回日本分子生物学会年会合同大会講演要旨集(2015.10)

〔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：
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

秋山 徹 (Tohru Miyoshi-Akiyama) 国立
研究開発法人・国立国際医療研究センター
研究所・特任研究部長
研究者番号：20246466

(2)研究分担者

無し()

研究者番号：

(3)連携研究者

無し()

研究者番号：

(4)研究協力者

無し()