

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05012

研究課題名(和文) 菌血症の発症および全身伝播に関するレンサ球菌分子群の探索

研究課題名(英文) Exploration of streptococcal factors related with onset of bacteremia and systemic dissemination

研究代表者

川端 重忠 (KAWABATA, SHIGETADA)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：50273694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：侵襲性レンサ球菌感染症の病態発症過程において、菌体は血流を介して全身に伝播する。病原性レンサ球菌が初発感染部位から宿主免疫を回避し血流へ伝播する機構は完全には解明されていない。本研究では、侵襲性レンサ球菌感染症の原因とされる肺炎レンサ球菌、化膿レンサ球菌、ならびに口腔レンサ球菌の全身伝播機構について解析を行い、組織侵襲、免疫回避、および血液中での生存に関する細菌因子を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：During the onset of invasive streptococcal diseases, bacteria systemically disseminate via the bloodstream. The exact mechanism by which pathogenic streptococci evade host immunity and disseminate to the bloodstream remains elusive. In this study, we revealed factors of pathogenic streptococci, including *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, and oral streptococci, involved in tissue invasion, immune evasion, and bacterial survival in the blood stream.

研究分野：細菌学

キーワード：レンサ球菌

1. 研究開始当初の背景

肺炎レンサ球菌や *Streptococcus sanguinis* を含む mitis 群レンサ球菌および化膿レンサ球菌は菌血症の患者から頻りに単離される。これらのレンサ球菌種は様々な毒素、付着・侵入因子、および免疫回避因子を産生するため、宿主免疫機構から回避するとともに組織を侵襲すると考えられる。実際、宿主内での免疫回避と増殖により、肺炎レンサ球菌や化膿レンサ球菌は致死率の高い侵襲性感染症を惹起する。また、*Streptococcus sanguinis* は感染性心内膜炎の病巣から高頻度に分離される。しかし、これらの菌種の免疫回避機構、血流への侵入機構、および全身への伝播機構について、詳細は不明である。

これまで申請者らは病原性レンサ球菌の感染部位での定着・増殖機構と免疫回避機構に着目し、肺炎レンサ球菌や *S. sanguinis* の新規付着因子、免疫回避因子を同定し、機能・構造解析だけでなく、基礎データに基づく新規治療薬の検索を行ってきた (Sumitomo *et al*, *J. Med. Microbiol.*, 2012・Beulin DS *et al*, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2014)。A 群レンサ球菌についても同様に、付着・上皮バリア突破機構や補体免疫からの回避因子に関する研究を行い、病原性に関与する現象を見出してきた。しかしながら、これらの菌種が定着部位である上気道、皮膚、および口腔から如何に深部組織や血流に侵入し、全身へ感染を拡大させるかについて詳細は未だ不明であった。肺炎レンサ球菌や A 群レンサ球菌の血液中での生存に関わる主要な因子として莢膜を代表とする複数の因子が報告されてきた。しかし、莢膜を産生しない菌体が侵襲性疾患を起こすという可能性も報告されてきたことから (Sumitomo *et al*, *J. Biol. Chem.*, 2011・Flores *et al*, *MBio*, 2012・Henningham A *et al*, *J. Biol. Chem.*, 2014) 血中での菌体生存と血中への伝播には、新たな細菌因子の関与が示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究では、病原性レンサ球菌が感染を拡大させ、深部組織や血中に侵入する際に菌体生存に影響を及ぼす新規細菌因子の解明を試みた。

化膿レンサ球菌については、補体古典経路を介する溶菌への抵抗性に関与する化膿レンサ球菌の因子を挙げ、タンパク質分解酵素である PepO に着目し、その機能の解明を目的とした。また、化膿レンサ球菌の皮膚感染に伴い形成される化膿性病変の形成過程において細胞間接着分子の破壊が関与すると考えられる。これまで、化膿レンサ球菌が産生する病原因子がタイトジャンクションとアドヘレンスジャンクションの構成タンパク質を分解することが明らかになっていた。しかし、本菌の感染がデスモゾーム構造に与える影響は不明であったため、デスモゾームの傷害が化膿レンサ球菌の因子により惹き起こされるかについて検討した。

肺炎球菌は肺炎や中耳炎の主な起因菌であり、咽頭や上気道等より分離される。髄膜炎や敗血症などの侵襲性疾患を主に高齢者に惹起するため、超高齢社会を迎えた我が国において社会的問題となっている。肺炎球菌は血液中から脳組織へ伝播し、髄膜炎を起こす。本研究では、血中での菌体生存と脳組織への菌体伝播に関与する細菌因子を明らかにすることを目的とした。

日常の口腔清掃や歯科治療に伴って起こる一過性の菌血症は、特に心疾患患者等において感染性心内膜炎の原因になる。感染性心内膜炎の病巣から *Streptococcus sanguinis* を含む mitis 群口腔レンサ球菌は高頻度に分離される。本菌は、ピルビン酸オキシダーゼである SpxB により高濃度の過酸化水素を産生するが、血液中での本菌の生存への影響は不明であった。そこで、菌由来の過酸化水素が血中での菌体生存や好中球への細胞毒性に関与するかについて検討した。

3. 研究の方法

(1) 化膿レンサ球菌が産生する PepO の解析
臨床分離頻度が高い血清型について、培養上清、細胞壁画分、細胞質画分を調製し、抗 PepO 抗血清を用いて PepO の発現と局在をウェスタンブロット解析により検討した。次に、PepO とヒト IgG の親和性に着目した。組換え PepO タンパク質 (rPepO) とヒト IgG の親和性を競合 ELISA 法により検討するとともに、表面プラズモン共鳴法によっても解析を行った。rPepO をセンサーチップに固定し、ヒト IgG をアナライトとした。PepO が血清中での菌体生存能に影響するかについて検討するため、PepO 遺伝子欠失株を作製した。化膿レンサ球菌の野生株と PepO 遺伝子欠失株を 10% ヒト血清もしくは補体不活化血清と混和した。37°C で 3 時間のインキュベーションを行った混和液を寒天培地に播種し、生育した集落数から生菌数を算出した。また、血清中での野生株と PepO 遺伝子欠失株の菌形態を走査型電子顕微鏡により観察した。さらに、6 週齢の BALB/c マウスの側背部皮膚に対数増殖期の野生株もしくは PepO 遺伝子欠失株を感染させ、皮膚病変形成能を観察した。また、感染組織のホモジネートと感作ヒツジ赤血球中を混和し、赤血球の溶血により生じるヘモグロビン遊離を指標に補体活性化レベルを検討した。さらに、ホモジネート中の C1q 量をウェスタンブロット解析により検討した。

(2) 化膿レンサ球菌によるデスマゾーム破壊機構の解析

デスマグレイン構成タンパク質であるデスマグレイン 1 (Dsg1) とデスマグレイン 3 (Dsg3) の細胞外ドメインの組換えタンパク質を作製した。臨床分離株の培養上清と反応させた後、ウェスタンブロット法により Dsg1 および Dsg3 を検出した。反応系への各種プロテアーゼ阻害剤の添加により、分解が抑制されるかについて同様に検討した。SpeB の組

換えタンパク質と SpeB 遺伝子欠失株の作製を行い、SpeB 欠失による Dsg 分解能への影響を評価した。さらに、マウス経皮感染モデルにおいて、SpeB 遺伝子欠失による Dsg 分解能ならびに病態形成への影響を解析した。

(3) *Streptococcus sanguinis* が産生する過酸化水素の解析

S. sanguinis の SpxB 遺伝子欠失株と復帰変異株を作製し、ペルオキシダーゼ反応と発色基質を用いて培養上清中の過酸化水素産生量を定量した。健常ヒト末梢血もしくは好中球に各菌株を感染させ、経時的に菌体生存率を算出した。好中球に対する細胞毒性を乳酸デヒドロゲナーゼの遊離を指標に検討した。感染もしくは非感染好中球の DNA を蛍光染色した。また細胞外核酸の蛍光染色と蛍光強度の測定により、好中球由来の細胞外 DNA 量を評価した。過酸化水素が好中球の貪食能に与える影響についてギムザ染色像の観察により検討した。

(4) 肺炎球菌が産生するメタロプロテアーゼ ZmpC の解析

肺炎球菌の ZmpC 遺伝子欠失株を作製し、脳微小血管内皮細胞内への侵入能を *in vitro* の感染実験により解析した。髄膜炎モデルとして各菌株を尾静脈から感染させ、経時的に血中、脳、肺、肝臓、および脾臓における生菌数を評価した。

4. 研究成果

(1) 化膿レンサ球菌による補体免疫回避機構の解析

PepO は供試した全ての菌株で保存されており、主に培養上清と細胞質画分で発現が認められた。組換えタンパク質を用いた解析により、PepO は補体古典経路の上流で機能する C1q と親和性を有することが明らかになった。低 pH 条件下において、PepO は免疫グロブリンと競合して C1q と結合した。PepO 遺伝子の変異により、ヒト血清における菌体生存率は低下しただけでなく、菌体表面構造の

不均一性が電子顕微鏡像で観察された。マウス皮膚感染モデルにおいて、PepO 遺伝子変異株感染マウスの病巣は野生株感染の場合と比較して縮小した。また、野生株と比較して、PepO 遺伝子変異株の感染による病巣では補体活性の上昇とC1q検出量の減少が認められた。これらの結果から、PepO は補体免疫からの回避に寄与し、血中における菌体生存に關与することが示唆された。

(2) 化膿レンサ球菌の組織侵襲機構の解析

臨床分離株の培養上清がデスマグレイン構成タンパク質である Dsg1 および Dsg3 を分解するかについて検討した結果、両組換えタンパク質の分解が認められた。プロテアーゼ阻害剤を用いた解析により、システインプロテアーゼである SpeB の関与が考えられた。実際、SpeB 遺伝子欠失株の培養上清による Dsg の分解は認められなかった。また、組換え SpeB は濃度依存的に Dsg を分解した。マウス経皮感染モデルを用いて解析を行った結果、野生株感染により発生した病巣は紅斑、浮腫、びらん、および化膿を伴う病態を呈し、表皮下への菌体伝播が認められた。また、Dsg の染色性の低下を認めた。一方、SpeB 遺伝子の欠失により、病巣形成能と菌体伝播能は低下し、Dsg の染色性は保たれた。これらの結果から、化膿レンサ球菌は SpeB のプロテアーゼ活性により細胞間接着を破壊し深部組織へ伝播することが示唆された。

(3) 肺炎球菌が産生するメタロプロテアーゼ ZmpC の解析

ZmpC 遺伝子の変異により、脳微小血管内皮への侵入能は低下した。静脈内感染モデルを用いた解析から、ZmpC は血中における菌体生存率に影響を与えることが明らかになった。また ZmpC 遺伝子変異により、脳組織に侵入する菌数は増加し、マウス生存率は低下した。しかし、肺、肝臓、脾臓における菌数に差は認められなかった。したがって、ZmpC は血中での菌体生存と脳組織への菌体移行を抑

制することにより、肺炎球菌の病原性を低下させる可能性が示唆された。

(4) *S. sanguinis* が産生する過酸化水素の血中における菌体生存への影響

S. sanguinis 野生株もしくは復帰変異株の過酸化水素産生量は 2.9~3.5 mM であった。一方、SpxB 遺伝子欠失株では 0.9 mM に減少した。したがって、SpxB は *S. sanguinis* の過酸化水素産生を担う主要な因子であることが示唆された。次に、健康ヒト末梢血もしくは好中球に各菌株を感染させ、経時的に菌体生存率を算出した。SpxB 遺伝子欠失株の生存率は、野生株および復帰変異株のそれと比較して、減少した。したがって、過酸化水素は末梢血中および好中球存在下での菌体生存を促進することが示唆された。菌株の好中球に対する細胞毒性を検討した結果、野生株および復帰変異株と比較して、SpxB 遺伝子欠失株の細胞毒性は減少したため、過酸化水素は好中球に対して細胞毒性を有することが示唆された。好中球由来の細胞外核酸量は SpxB 遺伝子欠失により減少することが認められた。菌由来の過酸化水素が好中球の貪食能に与える影響について検討したところ、SpxB 遺伝子欠失株を感染させた好中球の菌体貪食数は、野生株もしくは復帰変異株を感染させた好中球と比較して、増加した。以上の結果から、*S. sanguinis* の SpxB により産生される過酸化水素は、血中での菌体生存率を上昇させ、好中球に対して細胞毒性を有することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 28 件)

Sumitomo T, Mori Y, Nakamura Y, Honda-Ogawa M, Nakagawa S, Yamaguchi M, Matsue H, Terao Y, Nakata M, Kawabata S. 2018. Streptococcal cysteine protease-mediated cleavage of desmogleins is involved in the pathogenesis of cutaneous infection. *Front Cell Infect Microbiol* 8:10. 査読有. doi: 10.3389/fcimb.2018.00010.

Kurosawa M, Oda M, Domon H, Isono T, Nakamura Y, Saitoh I, Hayasaki H, Yamaguchi M, Kawabata S, Terao Y. 2018. *Streptococcus*

pyogenes CAMP factor promotes bacterial adhesion and invasion in pharyngeal epithelial cells without serum via PI3K/Akt signaling pathway. *Microb Infect* 20:9-18. 査読有. doi: 10.1016/j.micinf.2017.09.007.

Yamaguchi M, Nakata M, Sumioka R, Hirose Y, Wada S, Akeda Y, Sumitomo T, Kawabata S. 2017. Zinc metalloproteinase ZmpC suppresses experimental pneumococcal meningitis by inhibiting bacterial invasion of central nervous systems. *Virulence* 8:1516-1524. 査読有. doi: 10.1080/21505594.2017.1328333.

Oda M, Domon H, Kurosawa M, Isono T, Maekawa T, Yamaguchi M, Kawabata S, Terao Y. 2017. *Streptococcus pyogenes* phospholipase A2 induces the expression of adhesion molecules on human umbilical vein endothelial cells and aorta of mice. *Front Cell Infect Microbiol* 7:300. 査読有. doi: 10.3389/fcimb.2017.00300.

Beulin DSJ, Radhakrishnan D, Suresh SC, Sadasivan C, Yamaguchi M, Kawabata S, Ponnuraj K. 2017. *Streptococcus pneumoniae* surface protein PfbA is a versatile multi-domain and multi-ligand-binding adhesin employing different binding mechanisms. *FEBS J* 284:3404-3421. 査読有. doi: 10.1111/febs.14200.

Ogawa-Honda M, Sumitomo T, Mori Y, Hamd DT, Ogawa T, Yamaguchi M, Nakata M, Kawabata S. 2017. *Streptococcus pyogenes* endopeptidase O contributes to evasion from complement-mediated bacteriolysis via binding to human complement factor C1q. *J Biol Chem* 292:4244-4254. 査読有. doi: 10.1074/jbc.M116.749275.

Sumioka R, Nakata M, Okahashi N, Li Y, Wada S, Yamaguchi M, Sumitomo T, Hayashi M, Kawabata S. 2017. *Streptococcus sanguinis* induces neutrophil cell death by production of hydrogen peroxide. *PLoS One* 12:e0172223. doi: 10.1371/journal.pone.0172223.

Yamaguchi M, Hirose Y, Nakata M, Uchiyama S, Yamaguchi Y, Goto K, Sumitomo T, Lewis A, Kawabata S, Nizet V. 2016. Evolutionary inactivation of a sialidase in group B *Streptococcus*. *Sci Rep* 6:28852. 査読有. doi: 10.1038/srep28852.

Okahashi N, Nakata M, Kuwata H, Kawabata S. 2016. *Streptococcus oralis* induces lysosomal impairment of macrophages via bacterial hydrogen peroxide. *Infect Immun* 84: 2042-2050. 査読有. doi: 10.1128/IAI.00134-16.

Oogai Y, Yamaguchi M, Kawada-Matsuo M, Sumitomo T, Kawabata S, Komatsuzawa H. 2016. Lysine and threonine biosynthesis from aspartate contributes to *Staphylococcus aureus* growth in calf serum. *Appl Environ Microbiol*

82:6150-6157. 査読有. doi:10.1128/AEM.01399-16.

[学会発表](計44件)

Hirose Y, Yamaguchi M, Goto K, Sumitomo T, Nakata M, Kawabata S. *Streptococcus pneumoniae* Ccs4 involved in penetration across blood-brain barrier and virulence in meningitis. 20th Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Disease, October16-20, 2017. Fiji.

Yamaguchi M, Hirose Y, Goto K, Sumitomo T, Nakata M, Kawabata S. *Streptococcus pneumoniae* evades host innate immunity through parallel β -helix protein PfbA. 20th Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Disease, October16-20, 2017. Fiji.

住友倫子, 中田匡宣, 山口雅也, 川端重忠: インフルエンザウイルス感染は化膿レンサ球菌の上皮バリア突破を亢進させる. 第90回日本細菌学会総会, 2017年3月19日~21日, 仙台.

山口雅也, 中田匡宣, 住岡龍一, 和田聖史, 広瀬雄二郎, 明田幸宏, 住友倫子, 川端重忠. 肺炎球菌のジンクメタロプロテアーゼの系統解析と髄膜炎発症に果たす役割の解明. 第90回日本細菌学会総会, 2017年3月19日~21日, 仙台.

岡橋暢夫, 中田匡宣, 住友倫子, 桜井敦朗, 桑田啓喜, 川端重忠. 口腔レンサ球菌が産生する過酸化水素は上皮細胞に対する細胞傷害性を有する. 第59回歯科基礎医学学会学術大会, 2017年9月16~18日, 長野.

本多真理子, 住友倫子, 山口雅也, 中田匡宣, 川端重忠. 化膿レンサ球菌の endopeptidase O と補体 C1q の相互作用が病原性に及ぼす影響. 第90回日本細菌学会総会, 2017年3月19~21日, 仙台.

山口雅也, 広瀬雄二郎, 明田幸宏, 住友倫子, 川端重忠. 肺炎球菌のメタロプロテアーゼ ZmpC は中枢系への菌の侵入を抑制する. 第91回日本感染症学会総会, 2017年4月6~8日, 東京.

Honda M, Sumitomo T, Mori Y, Yamaguchi M, Nakata M, Kawabata S. Involvement of Group A streptococcal endopeptidase O in evasion from complement-mediated bacteriolysis via binding to complement C1q. The 13th Korea-Japan International Symposium on Microbiology, May 12-13, 2016. Gyeongju city, Korea.

毛利泰士, 住友倫子, 本多真理子, 山口雅也, 寺尾豊, 中田匡宣, 川端重忠. *Streptococcus pyogenes* の分泌型システインプロテアーゼ SpeB によるデスモグレイン分解が皮膚感染症の発症に及ぼす影響. 第89回日本細菌学会総会, 2016年3月23~

25日, 大阪 .

毛利泰士, 住友倫子, 松岡悠美, 本多真理子, 山口雅也, 寺尾豊, 中田匡宣, 川端重忠. *Streptococcus pyogenes* による皮膚病変の形成機構に関する解析. 第 69 回 日本細菌学会関西支部総会, 2016 年 11 月 19 日, 大阪 .

中田匡宣, 住友倫子, 山口雅也, 川端重忠. 環境温度の変化に対する肺炎球菌の適応と血中における菌体生存の関連. 第 58 回 歯科基礎医学会学術大会, 2016 年 8 月 24 日 ~ 26 日, 札幌 .

岡橋暢夫, 中田匡宣, 桑田啓貴, 川端重忠. *Streptococcus oralis* 由来の過酸化水素はマクロファージのリソソームを障害する. 第 58 回 歯科基礎医学会学術大会, 2016 年 8 月 24 日 ~ 26 日, 札幌 .

本多真理子, 住友倫子, 毛利泰士, Dalia Hamd, 山口雅也, 中田匡宣, 川端重忠. *Streptococcus pyogenes* が産生する endopeptidase O と C1q の結合による補体免疫回避機構. 第 48 回 レンサ球菌研究会, 2016 年 7 月 8 ~ 9 日, 長崎 .

中田匡宣, 住友倫子, 山口雅也, 川端重忠. 培養温度の変化が肺炎球菌の血中での生存に及ぼす影響. 第 89 回 日本細菌学会総会, 2016 年 3 月 23 ~ 25 日, 大阪 .

本多真理子, 住友倫子, 毛利泰士, 山口雅也, 中田匡宣, 川端重忠. A 群レンサ球菌の endopeptidase O による補体 C1q を介した補体免疫回避機構. 第 89 回 日本細菌学会総会, 2016 年 3 月 23 ~ 25 日, 大阪 .

住岡龍一, 中田匡宣, 和田聖史, 岡橋暢夫, 住友倫子, 山口雅也, 林美加子, 川端重忠. *Streptococcus sanguinis* 由来の過酸化水素は好中球に NETs を誘導する. 第 89 回 日本細菌学会総会, 2016 年 3 月 23 日 ~ 25 日, 大阪 .

毛利泰士, 住友倫子, 本多真理子, 山口雅也, 寺尾豊, 中田匡宣, 川端重忠. *Streptococcus pyogenes* の分泌型システインプロテアーゼ SpeB によるデスモグレイン分解が皮膚感染症の発症に及ぼす影響. 第 89 回日本細菌学会総会, 2016 年 3 月 23 ~ 25 日, 大阪 .

毛利泰士, 住友倫子, 山口雅也, 中田匡宣, 寺尾豊, 川端重忠. *Streptococcus pyogenes* に起因する皮膚感染症の発症における SpeB の関与. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会 2015 年 9 月 11 日 ~ 13 日 新潟 .

毛利泰士, 住友倫子, 本多真理子, 山口雅也, 寺尾豊, 中田匡宣, 川端重忠. A 群レンサ球菌が産生する分泌型プロテアーゼによるデスモグレイン分解と皮膚病態発症の関連. 第 68 回日本細菌学会関西支部総会, 2015 年 11 月 28 日, 京都 .

Sumitomo T, Nakata M, Yamaguchi M, and Kawabata S. Group A *Streptococcus* penetrates across an epithelial barrier via tricellular tight junctions. 115th General Meeting of American Society for Microbiology. May 30-June 2,

2015. New Orleans, USA.

〔図書〕(計 9 件)

Yamaguchi M, Kawabata S. 2017. Streptococcal Enolase and Immune Evasion, In Moonlighting proteins, Novel virulence factors in bacterial infections, Ed: Henderson B. Wiley Science, 269-289.

中田匡宣, 川端重忠. 2017. レンサ球菌の病原因子, 特集「改めて考えるレンサ球菌感染症」. 医薬ジャーナル社, 化学療法の領域. 33: 1183-1190.

〔その他〕

ホームページ:

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~mcrbio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

住友 倫子 (SUMITOMO, Tomoko)
大阪大学・歯学研究科・講師
研究者番号: 50423421

山口 雅也 (YAMAGUCHI, Masaya)
大阪大学・歯学研究科・助教
研究者番号: 00714536

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