

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06158

研究課題名(和文) 化膿レンサ球菌感染症における好中球細胞外トラップ分解産物の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of neutrophil extracellular traps degradation product in Streptococcus pyogenes infections

研究代表者

田中 基嗣 (Tanaka, Mototsugu)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：40755740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：先行研究で用いた化膿レンサ球菌菌株の全ゲノム解析を実施し、好中球細胞外トラップ分解産物(NETDP)産生に関与している可能性があるDNase遺伝子を3つ、また新規に5'-nucleotidase遺伝子(領域)を2つ選定した。このうち4種類の欠損変異株の作製に成功したが、いずれもDNase作用が残存した。またNETDPの細胞毒性評価系において、細菌培養液上清と比較して高い細胞毒性が示唆されたものの、NETDPを含む細菌培養液上清に菌体が混入して測定値が高値となることが判明した。今後、上記5つの遺伝子(領域)の重複欠損菌株を作製し、混入菌体の影響の少ない実験系でNETDP産生関与因子を精査する。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the whole-genome sequences of Streptococcus pyogenes that was used in our preliminary experiments. Based on bioinformatics analysis, we identified 3 genes coding DNases (SdaD2, endA, spd) and novel 2 DNA regions coding 5'-nucleotidase that potentially degrade neutrophil extracellular traps (NETs) to yield NETs degradation product (NETDP). We have succeeded to generate deletion mutants of 4 genes of them. The DNase activity analysis showed that the strains still possessed substantial DNase activities. We also investigated the effect of the residual bacteria in the assay system prepared from supernatants of NETs co-cultivated with bacteria. Now we are trying to establish deletion mutants of dual or triple genes of the targets to analyze the effect of NETDP production.

研究分野：内科学

キーワード：化膿レンサ球菌 好中球細胞外トラップ DNase

1. 研究開始当初の背景

化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) は、咽頭扁桃炎、伝染性膿痂疹、毒素性ショック症候群、壊死性筋膜炎、敗血症等の原因菌であり、続発症ではリウマチ性心疾患や溶連菌感染後糸球体腎炎が知られている。本菌に関連して、全世界で少なくとも毎年約 50 万人以上が死亡しているが、多種多様な臨床病態を説明する機序は解明されていない。

近年、宿主自然免疫機構の中心的存在を担う好中球の強力な殺菌機序として、好中球細胞外トラップ (Neutrophil extracellular traps: NETs) が新たに報告された。Sepsis の病態では、NETs はその強力な殺菌能力を発揮し、極めて重要な生体防御網を成しているが、NETs は生体にとっても有害となる可能性が報告されている。これまでの研究で、NETs が関連する病態として、血管内皮障害、肝機能障害、血栓形成等が報告されている。ヒトでは、ANCA 関連血管炎の腎組織半月体内に NETs を同定したものや、SLE 患者で NETs 分解能が低下している患者群がみられ、これがループス腎炎発症に関連していることなどが報告されている。

化膿レンサ球菌は DNase を分泌することで NETs を分解し、殺菌を回避する能力を有している。NETs 分解に基づく化膿レンサ球菌の病原性解析は、*in vitro* および *in vivo* で多数報告されている。しかし、化膿レンサ球菌によって NETs が分解されて生じた NETs 分解産物 (NETs degradation product、NETDP) の意義は不明である。申請者の先行研究の中で、化膿レンサ球菌は NETs を分解して好中球自然免疫から逃れるだけでなく、NETDP を利用して鼻腔粘膜上皮細胞障害を惹起し、さらに NETDP を介して単球・マクロファージを細胞死させることが示唆された。そこで申請者は、NETDP の細胞毒性の観点から、様々な病態を呈する化膿レンサ球菌の病原性を解明することを着想した。

2. 研究の目的

NETDP 構成成分の中から、細胞毒性を有する責任分子 (NETDP-X) を同定するために、NETDP-X 産生に寄与する菌体因子同定を行う。

3. 研究の方法

(1) NETDP 非産生菌株の作製

申請者が先行研究において用いた化膿レンサ球菌菌株の全ゲノム解析を実施した。次に、バイオインフォマティクスにより、NETDP 産生に関与が疑われる候補遺伝子を検索した。さらに、遺伝子工学的操作により NETDP 非産生菌株を新たに作製した。

(2) NETDP-X の機能解析

健康人末梢血中から Ficoll-paque 液を用いて分離した非活性化好中球を、Phorbol myristate acetate (PMA) で刺激して NETs を産生させた。次に、化膿レンサ球菌菌液へ

NETs を添加して共培養し、遠心分離にて NETDP を含む細菌培養液上清を得た。DNA 分解活性は、化膿レンサ球菌を Herring sperm 由来 dsDNA と共培養して、picogreen assay にて DNA 量を定量し、ベースラインに対する DNA 変化量を比で示した。

(3) 細胞毒性評価系

NETDP を含む細菌培養液上清を、A549 細胞および THP1 細胞に添加して、4 時間培養し、Trypan blue 染色法を用いて光学顕微鏡下に目視で死細胞をカウントした。対照として、化膿レンサ球菌細菌培養液上清、および Herring sperm 由来 dsDNA を共培養した細菌培養液上清を用いた。

4. 研究成果

(1) 化膿レンサ球菌全ゲノム解析

化膿レンサ球菌は、菌株によって DNA 配列にバリエーションがあることから、まず、先行研究で使用した菌株 (ATCC11434) の全ゲノム解析に用いるゲノムを調製した。当該化膿レンサ球菌菌株を一夜培養し、ペレットダウンした後に、細胞壁分解酵素である mutanolysin 200U/mL を加えて 37℃、3 時間培養した後に、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN 社) の標準プロトコールに従って化膿レンサ球菌の genomic DNA を精製した。次世代シーケンサーを用いた全ゲノム配列は、共同研究者である九州大学林哲也教授および小椋義俊准教授に解析していただいた。

(2) NETDP 産生に関わる候補遺伝子 (領域) の網羅的探索

得られたゲノム配列情報をもとに、バイオインフォマティクスを利用して、NETs 分解に関与する可能性のある DNase を構成する候補遺伝子を網羅的に探索した。既報の化膿レンサ球菌 DNA 配列情報から類似した菌株 (MGAS5005 株) を選出し、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) および Pfam30.0 DNase ドメインデータベースにある DNase 配列データ検索により、DNase を構成する細菌側の候補遺伝子として SdaD2、endA、spd、spd3 を見出した。このうち当該菌株は、前述の全ゲノム解析結果から、SdaD2、endA、spd の 3 遺伝子を有していることを確認した。

これに加え、細胞毒性を有する DNA 代謝産物として報告されている deoxyadenosine 産生に関わる代謝酵素である 5'-nucleotidase に相当する新規の 2 つの候補遺伝子領域についても NETDP 産生に関与している可能性があると考えた。

(3) 欠損変異株作製

合計 5 つの遺伝子 (領域) について、欠損変異株作製を試みた。臨床分離株である当該菌株は、カナマイシン耐性を獲得していたため、クロストリジウム由来クロラムフェニコール耐性遺伝子の挿入により遺伝子破壊株

を作製することとした。まず、標的遺伝子 ORF の上流および下流の各 500 塩基長を、クロストリジウム由来クロラムフェニコール耐性遺伝子の上流および下流にそれぞれ挿入したプラスミド保有する組換え大腸菌を構築した。遺伝子配列の影響で通常の組換え操作が困難な配列については、Thermo fisher 社の Gene Art (人工遺伝子合成) を利用した。構築した薬剤耐性遺伝子を含む linear DNA をエレクトロポレーション法により化膿レンサ球菌へ導入することを試みたが、相補配列部分が短いためか、遺伝子欠損変異株を作製することができなかった。最終的に、温度感受性ベクターを用いて標的遺伝子領域を消去する方法を選択したところ、5 つの遺伝子 (領域) のうち 4 つについて欠損変異株を作製することができた。これら遺伝子欠損変異株の作製は、共同研究者の京都大学中川一路教授にご支援いただいた。これら 4 種類の DNase または nuclease 欠損菌株は、液体培地内で野生株と同等の生育曲線を示した (図 1)。

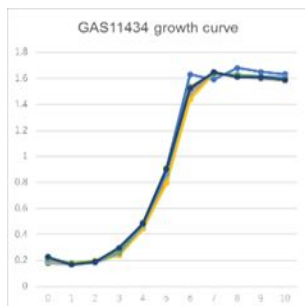


図 1: 化膿レンサ球菌生育曲線。THB-neo 液体培地内において、作製した欠損変異株は、いずれも野生型菌株と同様の生育曲線を示した (縦軸: OD₆₀₀、横軸: 時間)。

作製した欠損変異株の DNA 分解能について、Herring sperm dsDNA を用いて検討した。その結果、培養時間に比例して野生株と概ね類似した DNA 分解作用を示した (図 2)。

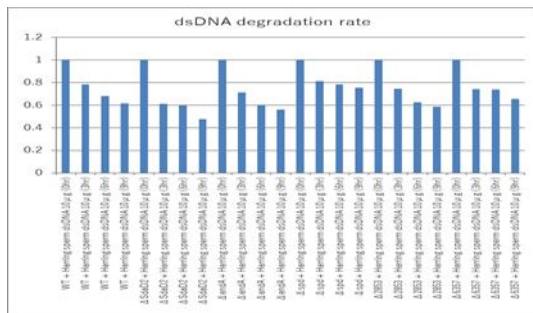


図 2: 化膿レンサ球菌の DNA 分解能。作製した欠損変異株はいずれも培養時間に比例してニシン精子由来 dsDNA を分解し、野生型 (WT) に類似した傾向がみられた。

従って、作製した 4 遺伝子産物以外の因子か、もしくは複数の DNase の協調作用により、細胞毒性責任分子が産生される可能性が考えられた。現在、候補遺伝子の重複欠損菌株を作製中である。

(4) 細胞毒性評価系の改良

より精密な活性測定を実現させるために、細胞毒性評価について再検討した。まず、ヒト好中球を PMA で刺激して NET-DNA を抽出した (図 3)。

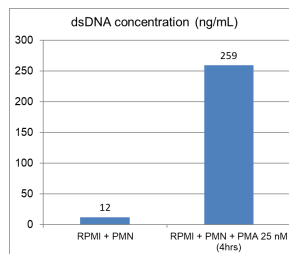


図 3: NETs 由来 DNA (NET-DNA) の抽出。PMA を添加し、ヒト好中球 4×10^6 個/mL を 4 時間培養し、遠心分離上清中の NET-DNA 量を測定した (Picogreen assay)。

次に、NET-DNA を化膿レンサ球菌と共培養し、高速遠心分離にて NETDP を含む細菌培養液上清を得た後、これを培養細胞株に添加して死細胞割合をカウントした。その結果、NETDP が化膿レンサ球菌培養上清単独と比較して、高い細胞毒性を有することが示唆された (図 4)。

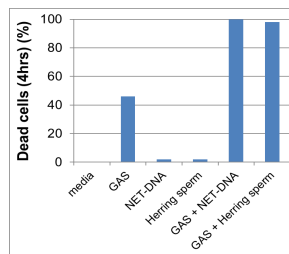


図 4: ヒト単球細胞株において、化膿レンサ球菌培養液 (GAS) NET-DNA 液、およびニシン精子由来 dsDNA 液 (Herring sperm) をそれぞれ単独または組み合わせて共培養したところ、化膿レンサ球菌単独 (GAS) と比較して、NET-DNA を添加した培養液 (GAS + NET-DNA) 化膿レンサ球菌にニシン精子由来 dsDNA を添加した培養液 (GAS + Herring sperm) では死細胞の割合が上昇した。

しかし精査の結果、細胞毒性評価系に用いた NETDP を含む細菌培養液上清画分に、化膿レンサ球菌が混入してしまい、菌体そのものの因子による細胞死の影響が見られる可能性が考えられた。そこで超遠心分離 (100,000xg) による菌体除去を試みたが、超遠心分離によっても菌体の混入が認められた。フィルター処理の可能性も検討したが、高分子量の NET-DNA と菌体を分離することが困難であった。そこで、超遠心分離により可能な限り混入する菌体を除去したのちに、抗生物質の添加により混入菌体を死滅させた標品を細胞毒性評価に用いることとした。

次に、細胞毒性評価における生細胞カウント方法の改良も検討した。本実験系では、PMA 刺激によって NETs を放出して細胞死した好中球の上清を用いているため、LDH 放出アッ

セイ法や ^{51}Cr 放出アッセイ法は不適であり、Trypan blue 染色を行って光学顕微鏡下に目視で測定していた。しかし、目視による評価には一定時間を要するため標品の劣化が生じること、またカウント結果にバイアスが生じ得ることから、自動細胞計数装置 Countess™ II FL Automated Cell Counter (Thermo fisher 社) を導入し、適切な計数条件を検討した。

(5) まとめ

当初の予定通り、当該化膿レンサ球菌菌株の全ゲノム解析を実施し、NETDP 産生に關与している可能性がある DNase 遺伝子を 3 つ、また新規に 5' -nucleotidase 遺伝子(領域)を 2 つ抽出することができた。化膿レンサ球菌臨床分離株の欠損変異株作製を試み、5 種類のうち 4 種類のみ作製した。これらの欠損変異株を用いた DNA 分解活性評価の結果、いずれの欠損変異株も顕著な DNase 作用が残存していた。今後、上記 5 つの遺伝子(領域)すべての重複欠損菌株を作製する予定である。また、NETDP を含む細菌培養液上清から菌体のみを除去して、細胞毒性を適切に評価する方法を検討する必要がある。その後、鼻粘膜上皮細胞障害モデルマウスおよび培養細胞株を用いて、野生型菌株と欠損変異株の表現型の差異を評価し、HPLC および MALDI/TOF-MS 質量分析により NETDP-X を同定する。

5. 主な発表論文等

なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 基嗣 (TANAKA、Mototsugu)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：40755740