

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590465
 研究課題名（和文） 劇症型連鎖球菌感染症克服を目的とする連鎖球菌の宿主内拡散能の分子基盤に関する研究
 研究課題名（英文） Investigation of molecular basis of ability of Streptococcus to spread in the host system
 研究代表者
 秋山 徹
 国立国際医療センター（研究所）感染症制御研究部感染症免疫遺伝研究室・室長
 研究者番号：20246466

研究成果の概要：

本研究ではレンサ球菌の生体内拡散性規定因子を分子レベルで同定し、その機能を変異体菌株や遺伝子改変マウスを用いた実験にフィードバックすることで、劇症型レンサ球菌感染症の発症・重症化の機構の解明を試みる。レンサ球菌は既に複数菌株でゲノム解析が完了している。そこで菌体側の因子検索には感染モデルから回収したレンサ球菌についてその病原因子発現を遺伝子レベルで解析する。またマウスモデルでの *in vivo* 実験および培養細胞への定着性の低さを指標とする *in vitro* での拡散実験を行う。すでに構築済みの劇症型感染症のマウスモデルにおいて病原性の異なる菌株のパネルを用いてこれらを実施することで、菌のマウス病原性、病原因子発現、拡散性の3者間の相関解析を行い、多数存在するレンサ球菌病原因子の中から菌側因子を絞り込む。マウスの生体内拡散性と培養細胞付着性の間の関係を検討した結果、培養細胞に付着性の低い菌株はマウスにより高病原性であることを明らかにした。これらの高病原性株はマウスに腹腔内投与した場合にもマウス体内からの回収性が高かった。菌株間の病原因子発現レベルと培養細胞への付着性およびマウス病原性を比較したところ、付着性や病原性の差異と相関して発現変動する病原因子は認められなかった。これらの結果は、マウス高病原性株がマウス体内器官への付着性が低いことを示すものであり、劇症型感染症においては菌株の病原性は宿主細胞定着性よりもむしろ宿主内拡散性により反映されることを示すものである。またこのような宿主内拡散性は臨床分離株において一つの病原因子で規定されるのではなく、複数の因子の作用の総和と考えられることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：劇症型レンサ球菌感染症、STSS、A群レンサ球菌、マウスモデル、病原因子、付着性

1. 研究開始当初の背景

溶血性レンサ球菌は、A群レンサ球菌とも呼ばれ咽頭炎などの比較的良性的疾患から、死亡率の非常に高い劇症型A群レンサ球菌感染症(STSS)など非常に多彩な感染症の原因菌である。それらの中でもSTSSは致死率が50%に達し、世界で年間数十万人が発症する再興感染症である(Carapetis JR et al. Lancet Infect Dis 2005; 5:685-94)。STSSは菌が通常無菌である筋肉組織などを破壊していく様子から「人食いバクテリア」とも呼ばれ、このような侵襲性疾患の再興は感染症の恐ろしさを改めて認識させることとなった。溶血レンサ球菌レファレンスセンターの集計では国内で過去15年間に340例のSTSSが報告されており、国内症例の転帰も極めて不良であるので、STSSの発症機構解明は急務である。STSS発症には菌側の因子のみならず宿主側因子も重要な役割を果たしていると考えられているが、多くの研究にも関わらず未だその詳細は明らかにはなっておらず、またレンサ球菌に対するワクチンなども存在しないため、STSSの根治的な治療法は存在しない。典型的なレンサ球菌感染症だった小児の猩紅熱は化学療法の普及に伴い年々減少しているが、A群レンサ球菌感染者数自体は年間5万人を超えている(<http://idsc.nih.go.jp/pathogen/refer/str2005.pdf>)。これら感染者の存在はSTSS発症のためのレンサ球菌のリザーバとして機能すると考えられるので、STSSの脅威は存

在したままである。

筆者等はSTSS患者から臨床分離されたレンサ球菌、および対照となると考えられる咽頭炎より分離されたレンサ球菌のパネルを用いた実験を実施している。その成果としてSTSS由来菌は非STSS由来菌よりマウスにおいて高い致死毒性を示すことを明らかにした(業績7)。この結果は限定的ではあるが、マウスモデルが、前述の宿主側の個体差の要因を排除した条件でヒトのSTSS病態のモデルとして利用可能であり、STSSの発症機構や病態研究の有望なツールとなることを示すものである。

細菌感染症の発症機序は、原因菌の宿主への定着、侵襲、そして病態発症、という3段階に分けて考えることができる。STSSは、通常無菌であるはずの器官・臓器に多数の菌体が出現し、組織破壊が進行することがその特徴である。そのため、菌が皮膚や粘膜などの物理的障壁をどのようにして突破し、さらに好中球などによる排除を逃れて増殖を続け、病巣部位に多量に出現する機構を明らかにすることがSTSSの発症機構解明につながると考えられる。しかしながらレンサ球菌は他の病原性細菌と比べて、その病原性に関与する因子が非常に多彩であることが、STSS発症機構の解析を困難にしている。即ち、宿主への定着に関わる因子としては、少なくとも10種類以上の種々の細胞外マトリックス結合蛋白質、ヒアルロン酸夾膜が上げられる。またレン

サ球菌の持つプロテイナーゼ、DNase、ストレプトキナーゼ、そしてヒアルロニダーゼなどは宿主組織破壊や生体内拡散に寄与し、溶血毒素であるストレプトリジン O や S、スーパー抗原などの因子は病態の顕在化・重症化に関与していると考えられている。このような多因子による感染症発症機構の解明にはこれら因子の一元網羅的な解析が必須である。一方、筆者等は前述の菌のマウス腹腔内投与モデルとマウス病原性の異なるレンサ球菌のパネルを用いた予備的検討で、レンサ球菌のマウス病原性が、投与後 30 分〜3 時間程度のごく短時間の時点での腹腔内または循環血から回収される菌数と有意に相関することを見いだしている。このことは皮膚などの物理的障壁突破後の感染病態モデルである腹腔投与内モデルでの菌の病原性が、菌の組織への定着性や組織侵襲性などよりもむしろ、菌の生体内での拡散能力と直接相関することを示すものである。以下では菌が生体内の臓器などに定着・増殖して生体内に拡散する現象（一般に侵襲性と表現される）と、投与直後に菌が生体内に散布されていく現象を区別するため、後者を「菌の拡散性」と表現する。

2. 研究の目的

以上の点を踏まえ、本研究では菌の生体内拡散性規定因子を分子レベルで同定し、その機能を変異体菌株や遺伝子改変マウスを用いた実験にフィードバックすることで、劇症型レンサ球菌感染症の発症・重症化の機構の解明を試みる。

3. 研究の方法

レンサ球菌は既に複数菌株でゲノム解析が完了している。そこで菌体側の因子検索には感染モデルから回収したレンサ球菌についてその病原因子発現を遺伝子レベル

(リアルタイム PCR)および蛋白質レベル(2次元電気泳動後のウェスタンブロッティング)で解析する。またマウスモデルでの *in vivo* 実験および培養細胞への定着性の低さを指標とする *in vitro* での拡散実験を行う。これらの実験を前述のマウス病原性の異なる菌株のパネルを用いて実施することで、菌のマウス病原性、病原因子発現、拡散性の 3 者間の相関解析を行い、多数存在するレンサ球菌病原因子の中から菌側因子を絞り込む。菌側因子の絞り込みが完了すれば、同因子変異菌株を作成し、病原性変動を解析して、絞り込み結果の検証を行う。

一方、宿主側の菌拡散性に影響する因子の同定のためには、菌の拡散を阻害する宿主因子を同定する必要があると考えられる。菌拡散の阻害は一義的には菌が生体組織と結合し、容易に拡散できなくなることに相当すると思われる。この仮説を検証するため、培養細胞系への菌の付着性と菌のマウス病原性が相関するかどうかを検証する。予備試験では培養細胞への付着性の低い菌ほど、マウス病原性が高いという結果を得ており、この仮定は妥当である可能性が高い。そこでまず培養細胞レベルで菌付着性を規定している宿主因子を菌体を用いたアフィニティ精製系で同定する。同定された因子の意義を、可能なら当該因子ノックアウト動物、または当該因子に対する抗体を投与するモデルにて動物実験で検証する。

4. 研究成果

マウスの生体内拡散性と培養細胞付着性の間の関係を検討した結果、培養細胞に付着性の低い菌株はマウスにより高病原性であることを明らかにした。これらの高病原性株はマウスに腹腔内投与した場合にもマウス体内からの回収性が高かった (図 1)。

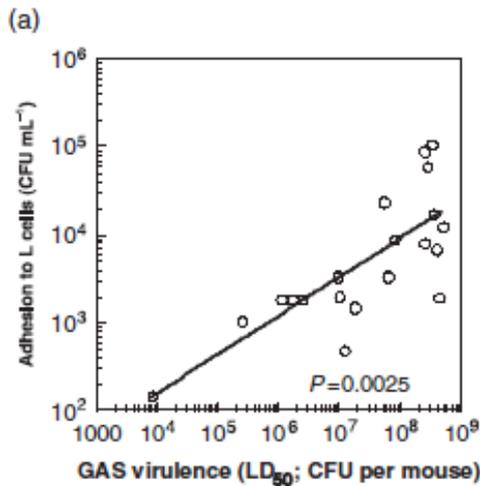


図1 レンサ球菌臨床分離株の Maus 病原性と培養細胞付着性の相関。横軸に Maus 病原性 (LD50 値、左側ほど高病原性)、縦軸に培養細胞付着性(上が高付着性)を表した。Maus 高病原性株は培養細胞に低付着性だった (文献 1 より改変)。

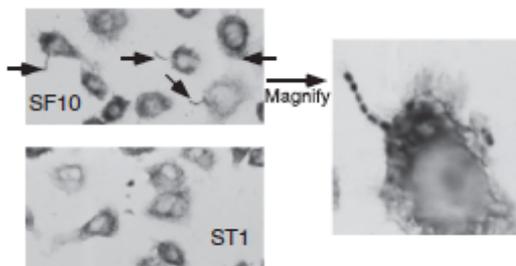


図2 劇症型レンサ球菌感染症由来株(ST1)と猩紅熱由来株(SF10)の培養細胞付着性。両菌株をそれぞれ同時間培養細胞とインキュベートし、洗浄後に染色して菌の有無を観察した。図 1 の結果と同様、低病原性株は培養細胞に高い付着性を示した (文献 1 より改変)。

菌株間の病原因子発現レベルと培養細胞への付着性および Maus 病原性を比較したところ、付着性や病原性の差異と相関して発現変動する病原因子は認められなかった。これらの結果は、Maus 高病原性株が Maus 体内

器官への付着性が低いことを示すものであり、劇症型感染症においては菌株の病原性は宿主細胞定着性よりもむしろ宿主内拡散性により反映されることを示すものである。またレンサ球菌の病原因子に対応したマイクロアレイでの解析などから、このような宿主内拡散性は臨床分離株において一つの病原因子で規定されるのではなく、複数の因子の作用の総和と考えられることが明らかとなった。

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 5 件)

1. Miyoshi-Akiyama T., Zhao J., Uchiyama T., Yagi J., Kirikae T. Positive correlation of low adhesion ability of group A streptococcus to mammalian cells with virulence in a mouse model. FEBS Microbiol. let. 2009. Accepted
2. Saarinen S., Kato H., Uchiyama T., Miyoshi-Akiyama T., Papageorgiou AC. Crystal structure of Streptococcus dysgalactiae-derived mitogen reveals a zinc-binding site and alterations in TcR binding. J. Mol. Biol. 373(5):1089-9 2007.
3. Zhao J, Hayashi T, Saarinen S, Papageorgiou AC, Kato H, Imanishi K, Kirikae T., Abe R, Uchiyama T, Miyoshi-Akiyama T. Cloning, expression, and characterization of the superantigen streptococcal pyrogenic exotoxin G from Streptococcus dysgalactiae. Infect Immun. 75(4):1721-9. 2007.
4. 下村有美、三好(秋山)徹. 劇症型感染症を引き起こすレンサ球菌の新たな病原因子 - ストレプトリジン 0 の宿主細胞への作用に

関する新発見-. 感染・炎症・免疫. 38(1) 73-75 2008.

5. 下村有美、三好(秋山)徹. A 群レンサ球菌の病原性機構における宿主細胞付着性の意義. 化学療法の領域. 24(6) 89-93 2008.

[学会発表] (計 6 件)

1. 下村有美, 花崎真一, 村山そう明, 生方公子, 八木淳二, 切替照雄, 秋山徹. *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* GGS_124 株のゲノム配列解析. 第 80 回日本細菌学会総会. 2009 年 3 月、京都
2. 奥村香世, 下村有美, 花崎真一, 切替照雄, 秋山徹. *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* のゲノム情報を利用したスーパー抗原遺伝子 *speG* およびその周辺遺伝子構造の解析. 第 80 回日本細菌学会総会. 2009 年 3 月、京都
3. Whole genome analysis of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* GGS_124 T. Miyoshi-Akiyama, Y. Shimomura, S. Murayama, K. Ubukata, J. Yagi, T. Kirikae. American Society of Microbiology, 108th General Meeting, Boston, 2008
4. *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* GGS_124 株のゲノム配列解析. 下村有美, 花崎真一. 村山そう明, 生方公子, 八木淳二, 切替照雄, 秋山徹. 第 80 回日本細菌学会総会、京都、2008
5. *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* のゲノム情報を利用したスーパー抗原遺伝子 *speG* およびその周辺遺伝子構造の解析. 奥村香世, 下村有美, 花崎真一, 切替照雄, 秋山徹. 第 55 回毒素シンポジウム山中湖、2008
6. *Streptococcus dysgalactiae* subsp.

equisimilis の *speG* および周辺領域に関する遺伝子構造の解析. 奥村香世, 下村有美, 花崎真一, 島田恭兵, 切替照雄, 秋山徹. 第 17 回 Lancefield レンサ球菌研究会 徳島、2008

[図書] (計 1 件)

1. 秋山 徹. レンサ球菌. バイオセーフティの事典-病原微生物とハザード対策の実際 - NPO 法人バイオメディカルサイエンス研究会編. 医学評論社(東京). 205-209 2008

[その他]

ホームページ等

<http://www.imej.go.jp/rese/top/j/publications.html#06>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 徹 (MIYOSHI-AKIYAMA TOHRU)
国立国際医療センター (研究所) 感染症制御
研究部 感染症免疫遺伝研究室・室長
研究者番号 : 20246466

(2) 研究分担者

切替 照雄 (KIRIKAE TERUO)
国立国際医療センター (研究所) 感染症制御
研究部・部長
研究者番号 : 50291963