

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791336
 研究課題名 (和文) 細胞間隙経路を介した A 群レンサ球菌の上皮バリア突破機構の解析
 研究課題名 (英文) Group A streptococci translocates across epithelial barrier via intercellular junction cleavage
 研究代表者
 住友 倫子 (SUMITOMO TOMOKO)
 大阪大学・大学院歯学研究科・助教
 研究者番号：50423421

研究成果の概要 (和文) : A 群レンサ球菌 (GAS) 劇症型感染症等の侵襲性疾患は、病原性細菌が宿主組織内に侵入し、増殖することにより発症すると考えられている。本研究では、GAS が細胞間隙を通過し、組織内へ侵入する経路に関与する因子の同定を行い、GAS の上皮バリア突破機構を解析した。その結果、GAS は細胞間結合タンパクの分解により上皮バリアを突破し、その機序には GAS の溶血毒素であるストレプトリジン S、および宿主のプロテアーゼであるカルパインが関与することが明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : Group A *Streptococcus pyogenes* (GAS) is a human pathogen that causes local suppurative infections and severe invasive diseases. Systemic dissemination of GAS is initiated by bacterial penetration of the epithelial barrier of the pharynx or damaged skin. In this study, our data indicate a potential function of Streptolysin S that facilitates GAS invasion into deeper tissue via degradation of epithelial intercellular junctions in concert with the host cysteine protease calpain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：レンサ球菌，病原因子，組織侵入，細胞間隙，上皮バリア

1. 研究開始当初の背景

A 群レンサ球菌 (GAS; Group A streptococci) は咽頭や皮膚を初期感染部位とし、扁桃炎や膿疱疹などの局所性化膿性疾患や、時として、軟部組織壊死や多臓器不全を伴う劇症型レンサ球菌感染症 (STSS) を惹き

起こす。GAS は、病原性に関与する因子が多岐にわたるため、様々な解剖学的部位に多彩な病態を惹き起こす。世界各国において、病態発症機序や病原因子に関する研究が行われているにもかかわらず、効果的な治療法あるいは予防法の確立には至っていない。近年、

多数の病原性細菌において、宿主上皮および内皮の細胞間結合との選択的な相互作用が結合組織への侵入および病態発症に関与していることが報告されている。事実、ピロリ菌、リステリア菌、黄色ブドウ球菌などの病原性細菌では、菌体表層タンパクや菌体外プロテアーゼが細胞間接着因子と特異的に結合し、感染症の進行、重篤度、および病態発症に深く関与することが示されている (Iraj, S. *et al.*, *Nature*, 447: 330-333, 2007; Schubert, W. D. *et al.*, *Cell*, 111: 825-836, 2002; Amagai, M., *J. Am. Acad. Dermatol.*, 48: 244-252, 2003)。しかしながら、GASの組織侵入機構と宿主細胞間接着因子の関連性についての報告は莢膜を介する経路のみであり、病態発症との関連性を指摘する報告は未だなされていない (Colette, C. *et al.*, *Nature*, 414: 648-652, 2001)。そこで、本申請研究では、細胞間隙経路を介した GAS の組織内への侵入に関与する新規病原因子の検索を目的とした。

2. 研究の目的

GASはヒトの咽頭炎や扁桃炎の起原菌として知られるが、時として、軟部組織壊死や多臓器不全を伴う劇症型レンサ球菌感染症 (STSS) を惹起する。STSS等の侵襲性疾患は、病原性細菌が宿主組織内に侵入し、増殖することにより発症すると考えられている。GASの代表的な付着・侵入因子であるフィブロネクチン (Fn) 結合タンパクは、宿主体液に含まれる可溶性Fnを介して宿主細胞との相互作用し、組織侵襲性に関与する。しかしながら、膿瘍や致死性の高い侵襲性GAS感染症の初期感染部位の一つと考えられている皮膚組織は可溶性Fnで覆われていないため、Fn 結合タンパク以外の因子が関与すると考えられる。近年、多数の病原性細菌において、菌体表層タンパクや菌体外プロテアーゼが宿主細胞間接着因子と特異的に結合し、感染の進行、重篤度、および病態発症に深く関与することが示されている。化膿性疾患を伴うGAS感染症の病態から、GASが上皮細胞の極性と細胞間接着装置を破壊し、正常な上皮の構築を破壊させる因子を備えていることが推測される。しかしながら、GASの組織侵入機構と宿主細胞間接着因子の関連性に関する報告は莢膜を介する経路のみであり、全ての侵襲性GAS株で莢膜発現量と組織侵入能に関連性があるわけではない。本研究では、トランスポゾン挿入変異ライブラリーを用いたスクリーニングから、細胞間隙経路を介したGASの組織侵入に寄与する細菌因子を同定し、GASの上皮バリア突破機構の解析を試みた。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株

劇症型GAS感染症患者由来の *Streptococcus pyogenes* SSI-9株 (M1型)、SSI-1株 (M3型)、#30株 (M12型)、NIH35株 (M28型)は、東邦大学名誉教授 村井貞子先生、国立感染症研究所副所長 渡邊治雄先生より分与された。各GAS株の莢膜欠失株は、ヒアルロン酸合成酵素をコードする *hasA* 遺伝子にカナマイシン耐性カセットを挿入することにより変異株を得た (5)。また、SLSをコードする *sagA* 遺伝子欠失株および再導入株は温度感受性ベクター pSET4s (東京大学教授 関崎勉先生から供与された)を用いて作製した。さらに、EGFP遺伝子を組み込んだpAT-18ベクターを各GAS株に導入し、EGFP発現GAS株を作製した。

(2) GASの上皮バリア通過能の測定

ヒト大腸由来上皮細胞 (Caco-2)をミリセルセルカルチャーインサート (3 μ m pore-size; Millipore) で培養した。経上皮電気抵抗値 (TER) が400–500 Ω cm²に達したモノレイヤーを上皮細胞バリアの *in vitro*モデルとして用いた。この上皮バリアモデルの細胞数に対して、GAS菌体が1:10になるように、アピカル部位に感染させた。感染2時間後に、セルカルチャーインサートをMEMで3回洗浄後、アピカル側とバソラテラル側に20% FBS含有MEMを添加し、さらに培養した。所定時間培養後、下部チャンバーの培養液を寒天平板培地へ播種し、37°Cで一晩培養を行った後、生育したコロニー数から上皮バリアを通過した菌数を算定した。

(3) 莢膜ヒアルロン酸産生量の測定

対数増殖期 ($A_{600}=0.4$)のGASを回収し、PBSで3回洗浄した。65°Cで30分間熱処理した後、懸濁液を遠心分離 (13000 g)し、上清を回収した。上清中に遊離したヒアルロン酸量は、ヒアルロナン酵素結合免疫吸着法キット (Echelon Biosciences)で測定した。

(4) 感染細胞におけるGAS局在部位の観察

Caco-2の細胞数に対して、GAS菌体が1:10になるように培養液へ添加した。感染2時間後に、PBSで3回洗浄した後、20% FBS含有MEMを添加し、さらに培養した。所定時間培養後、4% パラホルムアルデヒドで固定し、0.1% Triton X-100含有PBSで浸透化処理を行った。GAS感染細胞を5% 牛血清アルブミンでブロッキングし、抗ヒトE-カドヘリン抗マウス抗体 (Invitrogen)と反応させた後、Alexa Fluor 647標識ヤギ抗マウス IgG抗体 (Invitrogen)を反応させた。さらに、Alexa Fluor 594標識ファロイジン (Invitrogen)と反応させた後、蛍光退色防止液 (Vectashield; Vector Laboratories)を添加

してスライドガラス上に封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510; Carl Zeiss) で観察した。

(5) 感染細胞におけるタイトジャンクション、アドヘレンスジャンクション構成タンパクのウエスタンブロット解析

Caco-2の細胞数に対して、GAS菌体が1:10になるように培養液に加え、2時間感染させた。未附着菌体をPBSで3回洗浄した後、20% FBS含有MEMを添加し、さらに培養した。感染6時間後の細胞をPBSで3回洗浄した後、6% 2-メルカプトエタノール含有Laemmliゲルローディングバッファーで溶解した。細胞ライセートをSDS-PAGEで展開し、PVDF膜へ転写した。ブロッキング操作後、抗ヒトE-カドヘリン抗マウス抗体、抗ヒトオクルディン抗ウサギ抗体 (Invitrogen)、抗ヒトZO-1抗マウス抗体 (Invitrogen)、抗ヒトJAM-1抗マウス抗体 (Becton Dickinson)を反応させた。二次抗体として、HRP標識抗マウスIgG、もしくはHRP標識抗ウサギIgGを用い、ECL試薬 (GE Amersham) と医療用レントゲンフィルムにより検出を行った。

(6) トランスポゾン挿入変異株の作製と上皮バリア突破に寄与するGAS因子の同定

ストレプトマイシン含有寒天培地で馴養培養することで、ストレプトマイシンに対する耐性を付与したGAS NIH35を受容菌として使用した。また、供与菌として、トランスポゾン Tn916を有する *Enterococcus faecalis* CG110を用いた。対数増殖期 ($A_{600}=0.4$)のGAS菌体と *E. faecalis* 菌体を50:1で混合し、血液寒天培地上に載せたHybond-N ナイロンメンブレン (0.2 μm pore-size; GE Healthcare)に混合液を吸収させた。37°Cで一晩培養後、メンブレンから菌体を回収し、ストレプトマイシン・テトラサイクリン含有血液寒天培地で選択することにより、Tn916挿入GAS変異株を1000株取得した。作製したトランスポゾン挿入変異ライブラリーを用いて、上記2.と同様のアッセイを行い、各変異株の上皮バリアモデル通過能の低下を指標としたスクリーニングを行った。上皮バリア通過能の低下が認められたトランスポゾン挿入変異株について、NIH35株ゲノム上のTn916挿入部位の上流と下流の遺伝子をpGEM-Tベクター (Promega) に挿入し、塩基配列を決定した。

4. 研究成果

(1) GASの上皮バリア突破機構には莢膜以外の因子も関与する

GASの上皮バリア通過能に莢膜ヒア

ロン酸が必須であることを検討するために、劇症型GAS感染症由来のSSI-9株 (M1)、SSI-1株 (M3)、#30株 (M12)、NIH35株 (M28)とその莢膜欠失株 (ΔhasA)の上皮バリア通過能を測定した (図1)。感染6時間後において、SSI-9株は上皮バリア通過能を示さなかったが、SSI-1株および#30株は高い上皮バリア通過能を示した。SSI-1株と#30株の上皮バリア通過能は、莢膜欠失により著しく低下したことから、莢膜依存的に上皮バリアを突破することが示唆された。一方、NIH35株は他の株と比較して、莢膜産生量が低いにも関わらず、高い上皮バリア通過能を示した。以上の結果より、NIH35株の上皮バリア突破機構には莢膜以外の因子が関与することが推察された。

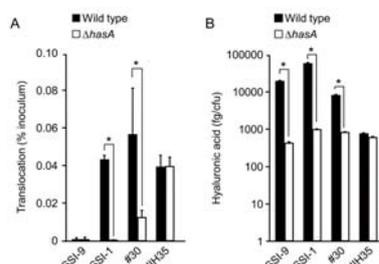


図1. 莢膜がGASの上皮バリア通過能に及ぼす影響 (A) 上皮細胞バリアモデルに劇症型GAS感染症由来株、およびその莢膜欠失株を感染させ、感染6時間におけるGAS上皮バリア通過能を測定した。*有意差有り、 $P < 0.01$ 。

(B) 上皮細胞バリアモデルに劇症型GAS感染症由来株、およびその莢膜欠失株が産生する莢膜ヒアルロン酸量をELISA法で測定した。*有意差有り、 $P < 0.01$ 。

(2) GASは細胞間隙部位に局在し、細胞間結合タンパクの分解を誘導する
莢膜非依存的な上皮バリア突破機構について検討するために、莢膜産生量が低いにも関わらず高い上皮バリア通過能を有するNIH35株について解析を進めた。Caco-2細胞にEGFP発現NIH35株を6時間感染させた後、抗E-カドヘリン抗体で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、GAS感染細胞では細胞間隙部位へのGASの局在、および細胞間結合タンパクであるE-カドヘリンの染色性の低下が認められた (図2A)。さらに、ウエスタンブロット解析から、GAS感染6時間後の細胞では、タイトジャンクション (TJ) 形成タンパクであるオクルディンと、アドヘレンスジャンクション (AJ) 形成タンパクであるE-カドヘリンの分解が確認された (図2B)。以上の結果から、GASは細胞間結合タンパクの分解により上皮バリアを突破することが示唆された。

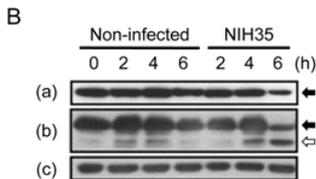
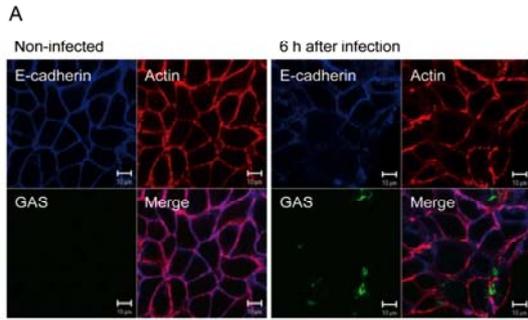


図2. 細胞間隙部位への GAS の局在と細胞間結合タンパクの分解

(A) Caco-2 細胞に EGFP 発現 NIH35 株 (緑) を 6 時間感染させた。E-カドヘリン (青) は抗 E-カドヘリン抗体および Alexa Fluor 647 標識抗体で染色した。F-アクチンは Alexa Fluor 594 標識ファロイジン (赤) で染色した。(B) Caco-2 細胞に NIH35 株を感染させた。所定時間感染後の細胞からタンパクを回収し、抗 E-カドヘリン抗体 (a)、抗オクルディン抗体 (b) を用いてウエスタンブロット解析を行った。β-アクチン (c) はコントロールとして示した。黒矢印はタンパクの全長を表すバンドを、白矢印は分解されたタンパクのバンドを示す。

(3) SLSはGASの上皮バリア通過能および細胞間結合タンパクの分解能に関与する

GASの上皮バリア突破機構に寄与する細菌因子を同定するために、莢膜の有無に関わらず高い上皮バリア通過能を示す、NIH35株のトランスポゾン挿入変異ライブラリーを作製し、各変異株の上皮バリアモデル通過能の低下を指標としたスクリーニングを行った。その結果、溶血毒素であるストレプトリジンS (SLS) をコードする *sa* *gA* 遺伝子のプロモーター領域にトランスポゾンが挿入された変異株は、上皮バリアモデル通過能が有意に低下することを確認した。そこで、*sagA* 遺伝子の in-frame 欠失株およびその再導入株を作製し、GASの上皮バリア通過能および細胞間結合タンパク分解能に及ぼすSLSの影響について検討した。*sagA* 欠失株の上皮バリア通過能は、野生株と比較して有意に低下し、再導入株では野生株と同等まで回復した (図3A)。また、TJのintegrityの指標であるTER測定結果から、*sagA* 欠失株感染細胞におけるTJの破壊は抑制されていることが示された (図3B)。さらに、*sagA* 欠失により細胞間結合タンパクであるE-カドヘリン、オクルディン、JAM-1の分解は著しく抑制された (図3C)。以上の結果より、GASの上皮バリア突破機構、およびNIH35株が誘導する細

胞間結合タンパクの破壊にはSLSが関与することが強く示唆された。

次に、GASの細胞間隙部位への局在に及ぼすSLSの影響について、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した (図4)。野生株感染細胞では菌体が細胞間隙を介して深部まで侵入していたが、*sagA* 欠失株感染細胞では細胞のアピカル部位への菌体の局在が認められた。これらの結果から、SLSはGASの細胞間隙部位への局在ではなく、細胞間隙通過能に寄与することが推察された。

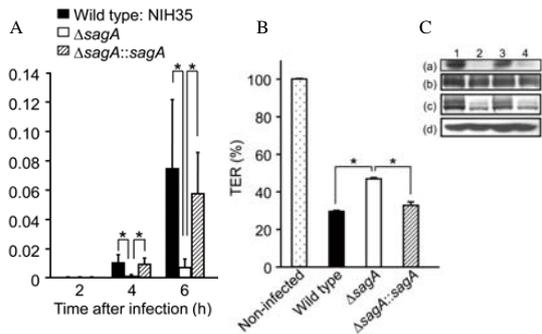


図3. SLSはGASの上皮バリア突破機構に関与する (A) SLSがGASの上皮バリア通過能に及ぼす影響。上皮細胞バリアモデルに NIH35 株、*sagA* 遺伝子欠失株、およびその再導入株を感染させ、GAS 上皮バリア通過能を測定した。*有意差有り、 $P < 0.01$ 。

(B) GAS 感染が caco-2 細胞の TER に及ぼす影響。上皮細胞バリアモデルに NIH35 株、*sagA* 遺伝子欠失株、およびその再導入株を感染させ、感染 6 時間後の細胞の TER を測定した。*有意差有り、 $P < 0.01$ 。

(C) Caco-2 細胞に NIH35 株、*sagA* 遺伝子欠失株、およびその再導入株を感染させた。感染 6 時間後の細胞からタンパクを回収し、抗 E-カドヘリン抗体 (a)、抗オクルディン抗体 (b)、抗 JAM-1 抗体 (c) を用いてウエスタンブロット解析を行った。β-アクチン (d) はコントロールとして示した。

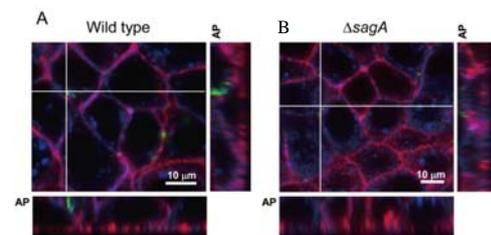


図4. SLSはGASの細胞間隙通過能に関与する Caco-2 細胞に EGFP 発現 NIH35 株 (A: 緑)、および *sagA* 遺伝子欠失株 (B: 緑) を 4 時間感染させた。E-カドヘリン (青) は抗 E-カドヘリン抗体および Alexa Fluor 647 標識抗体で染色した。F-アクチンは Alexa Fluor 594 標識ファロイジン (赤) で染色した。

(4) SLSが誘導するGASの上皮バリア突破機構には、宿主プロテアーゼが関与する

SLSが誘導する宿主細胞間相互作用に着目し、GASの上皮バリア突破機構に宿主プロテアーゼが関与するか否かを検討した。宿主細胞内システインプロテアーゼであるカルパ

インに対する阻害剤で処理した上皮バリアモデルに、NIH35株、およびそのSLS欠失株を感染させ、GASの上皮バリア通過能および感染細胞の経上皮電気抵抗値(TER)を測定した。図5に示したように、SLS欠失株の上皮バリア通過能は、カルパイン阻害剤の有無に関係なく一定であった。一方、野生株の上皮バリア通過能は、カルパイン阻害剤の添加により低下し、感染細胞におけるTERの低下は抑制された。以上の結果より、SLSが誘導するGASの上皮バリア突破機構には宿主プロテアーゼであるカルパインが関与することを明らかにした。

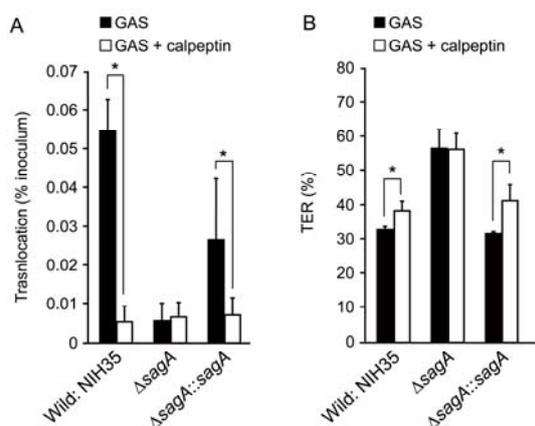


図5. SLSが誘導するGASの上皮バリア突破機構には、宿主プロテアーゼが関与する

(A) カルパイン阻害剤がGASの上皮バリア通過能に及ぼす影響。カルペプチンで処理した上皮細胞バリアモデルにNIH35株、*sagA*遺伝子欠失株、およびその再導入株を感染させ、GAS上皮バリア通過能を測定した。*有意差有り、 $P < 0.01$ 。

(B) カルパイン阻害剤がGAS感染細胞のTERに及ぼす影響。カルペプチンで処理した上皮細胞バリアモデルにNIH35株、*sagA*遺伝子欠失株、およびその再導入株を感染させ、感染6時間後の細胞のTERを測定した。*有意差有り、 $P < 0.01$ 。

本研究において、GASは細胞間結合タンパクの分解により上皮バリアを突破すること、また、その突破機構にはGASのSLS、および宿主のプロテアーゼが関与することを見出した。これらの知見を基に、GAS感染による細胞間の接着障害と病態発症との関連性を検索することで、疑似病態を示す感染症に共通の予防法ならびに治療法を確立する基盤となることが期待できる。

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2件)

- ① Okahashi N, Nakata M, Sakurai A, Terao Y, Hoshino T, Yamaguchi M, Isoda R, Sumitomo T, Nakano K, Kawabata S, and Ooshima T. 2010. Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to fibronectin and contribute to cell adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* 391(2): 1192-1196.
- ② Nakata M, Köller T, Moritz K, Ribardo D, Jonas L, McIver KS, Sumitomo T, Terao Y, Kawabata S, Podbielski A, and Kreikemeyer B. 2009. Mode of expression and functional characterization of FCT-3 pilus region encoded proteins in the *Streptococcus pyogenes* serotype M49. *Infect Immun* 77(1): 32-44.

[学会発表] (計10件)

- ① 住友倫子, 中田匡宣, 東野美晴, 寺尾豊, 川端重忠. A群レンサ球菌の上皮バリア突破機構に関与する宿主プロテアーゼの解析. 第83回日本細菌学会総会. 2010年3月27-29日, 横浜市.
- ② 住友倫子, 中田匡宣, 東野美晴, 寺尾豊, 川端重忠. A群レンサ球菌の上皮バリア突破機構に関与する宿主プロテアーゼの検索. 第7回感染症沖縄フォーラム. 2010年2月11-13日. 沖縄国民年金健康センター.
- ③ Sumitomo T, Nakata M, Terao Y, and Kawabata S. Group A Streptococci translocates across epithelial barrier via intercellular junction cleavage. 109th General Meeting of American Society for Microbiology. May 17-21, 2009. Philadelphia, USA.

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

住友倫子 (SUMITOMO TOMOKO)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 50423421