

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22790412

研究課題名(和文) ヒト型マウスを用いた実験的劇症型G群レンサ球菌感染モデルの構築

研究課題名(英文) Development of a mouse model of the infection with *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*.

研究代表者

吉田 春乃 (Yoshida, Haruno)

北里大学・その他の研究科・助手

研究者番号：70563386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：G群レンサ球菌による劇症型感染症のマウス感染モデル構築のため、劇症型感染症患者から分離されたRE378株を、ヒトCD46トランスジェニックマウス足蹠に皮下注射した。その結果、感染マウスは28日後も生存していたが、顕著な化膿性関節炎を発症していた。関節では骨、軟骨組織に異常が見られ、破骨細胞による骨破壊が活発に起きていることが明らかになった。RE378と強毒型A群レンサ球菌MTB313の比較ゲノム解析を行った結果、宿主への付着および免疫系からの回避に関わる遺伝子が、G群レンサ球菌感染に特有の病態を生み出している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ankle arthritis was induced by a single subcutaneous infection of the *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* strain RE378, which was isolated from a patient suffering from multiple organ failure due to septicemia, into both hind footpads of human CD46-expressing transgenic(Tg) mice. The histopathological findings in the hind ankle sections of CD46 Tg mice showed the stimulation of osteoclast formation associated with inflammation of the synovial membrane. The comparative genome sequence analysis revealed that the 43 predicted virulence-related factors including putative adhesion proteins and nucleases.

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：レンサ球菌 劇症型感染症 SDSE 感染モデル動物

### 1. 研究開始当初の背景

溶血性レンサ球菌は、通常咽頭炎等の感染症状で知られるが、一部で「人食いバクテリア症」と呼ばれる致死率の高い劇症型感染症を引き起こす。溶血性レンサ球菌はその細胞壁に存在する C 多糖体の構造により A、B、C、G の各群に分類される。これまでの報告では劇症型感染症は専ら A 群レンサ球菌が原因であったが、近年 G 群レンサ球菌によるものが増えてきている。G 群レンサ球菌は従来ヒトに対する病原性そのものが低いと考えられてきた経緯があり、菌の変成による強毒化、あるいは高齢者の増加等に代表される患者の状態の変化が原因として考えられているが、その詳細は明らかとなっていない。

一方で、当グループは A 群レンサ球菌による劇症型感染症のヒトにおける病態を高度に反映した感染実験系を、ヒト CD46 トランスジェニックマウスを用いることで確立してきた。この感染マウスは骨壊死を伴う皮膚軟部組織の壊疽をおこし、一週間以内に多臓器不全で死亡する。

### 2. 研究の目的

当研究課題では、増加する「G 群レンサ球菌による劇症型感染症」の発症メカニズムを解明することを最終的な目的とした。そのために(1)、G 群レンサ球菌を用いたマウス感染実験系の確立(2)、確立した感染実験系を用い、A 群レンサ球菌感染症と G 群レンサ球菌に病態上の違いがあるのかを検証する。更に、(3)、違いが見いだされたならば、その違いをもたらすものは何かを分子(遺伝子)レベルで探索する。以上の三点を研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)レンサ球菌は本来マウスには感染しない。そこでヒトに感染する際に宿主側の受容体である CD46 を全身の細胞に発現させた遺伝子導入(トランスジェニック)マウスを用いる。用いる菌株は髄膜炎患者より分離された RE378 および GGS124 とする。菌の接種方法は、皮膚からの感染を模して足の裏に皮下注射する。感染後、感染部分と全身の様子を観察し、死亡率を測定。三週間後に解剖し、臓器内の生菌数を測定、採血し各種生化学的検査を行う。組織を採取し病理学的解析(切片の染色等)を行う。

(2)劇症型レンサ球菌感染症患者より分離された A 群レンサ球菌株 GAS472 および髄膜炎患者より分離された株である MTB313 の感染マウスについて、(1)と同様の実験を行い、結果を G 群感染マウスと比較する。

(3)G 群と A 群の代表的な強毒株の全ゲノム情報を取得し、内容を比較する。

### 4. 研究成果

(1)劇症型 G 群レンサ球菌感染症モデルの確立

生後 7 週から 10 週のオス hCD46 トランスジェニックマウス(Tg マウス)と、対照群として同年齢のオス C57B/6J マウスの後足裏に  $1 \times 10^7$  CFU の RE378、GGS124 を皮下注射した。

生存率; 28 日間の間、両菌株、対照群ともに死亡したマウスは 0 匹であった。RE378、GGS124 は hCD46Tg マウスに対して、致死的是ではないことが明らかになった。感染 3 日後から 5 日後にかけて、Tg マウス群、対照群の全てのマウスに、感染部位の足の腫脹がみられた。対照群では 14 日後に腫脹が軽減し、25 日後には感染前の状態に戻った。一方、Tg マウスは感染 14 日後、足裏の腫脹は軽減したものの、上部の足関節に炎症がみられ、歩行に困難をとともう程度の関節の変形が観察された(図 1-C 矢印)。この関節炎は 28 日後まで改善が見られなかった。

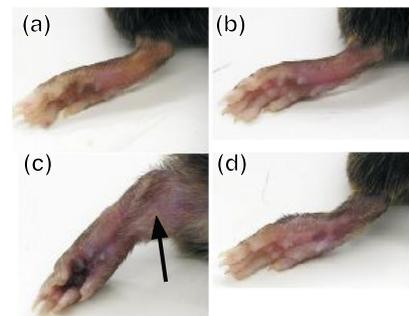


図 1. 感染 0 日と 28 日後の足

28 日後のマウスの肝臓、脾臓、腎臓、膝窩リンパ節に存在するレンサ球菌の数を測定した。各臓器を摘出後、生理食塩水中ですりつぶした組織懸濁液を一定量採取し、羊血液寒天培地に塗抹、37 5%CO<sub>2</sub> 環境下で一晩培養した。翌日生じたコロニー(周囲の溶血が見られるもの)を数え、全臓器中の菌数を計算した。その結果、hCD46Tg マウスでは肝臓、脾臓、腎臓に 10~100CFU 程度のレンサ球菌が生育していた一方で、対照群マウスでは菌が存在していなかった。感染部位に近い膝窩リンパ節では対照群にも菌の存在が認められたが、Tg マウス群の菌数に比較し、有為に少ない結果であった。また、採取した血清を用い肝機能、腎機能に関して生化学的分析を行ったが、Tg マウスと対照群の間で差は認められなかった。

hCD46Tg マウス群において高い確率で足の関節炎が見られたため、感染 28 日後のマウスの足関節について、病理学的解析を行った(図 2)。H&E 染色を行った後に関節部を観察すると、G 群レンサ球菌感染により関節炎を生じた Tg マウス(図 2-c)では関節の軟骨が変形し、炎症性細胞浸潤(黒矢印)と肉芽組織(滑膜パンヌス)の形成が見られた(白矢印)。これに対して、非感染の Tg マウス(図 2-a)、対照群(b)、感染させた対照群(d)ではいずれも見られなかった。

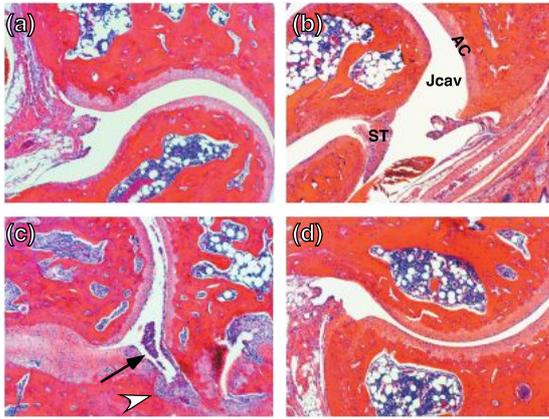


図.2 感染 28 日後マウスの関節 (H&E 染色)

この軟骨の変形に注目し、破骨細胞による骨分解の指標となる酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行った(図 3)。その結果、G 群レンサ球菌 RE378 を感染させた Tg マウスの関節では、対照群と比較して骨と軟骨が正常な層を形成していないこと(図 3-c)、更に骨と軟骨の表面に破骨細胞が多数存在し、骨破壊が起きていることが認められた(図 2-e 矢印)。非感染の Tg マウス(a)、対照群(b)、感染させた対照群(d)ではいずれも見られなかった。

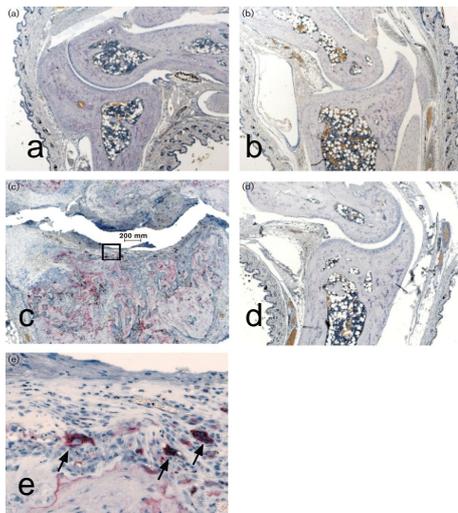


図.3 感染マウスの関節部 (TRAP 染色)

以上の結果を総括すると、hCD46Tg マウスは対照群に比べ、G 群レンサ球菌感染により肝臓・脾臓・腎臓への播種といった重篤な病態を示した。これは菌側の表層に存在する M タンパク質と宿主側の CD46 の相互作用によるものと考えられ、ヒト型 CD46Tg マウスを用いた感染モデルの構築が成功したと言える。一方でヒトの劇症型レンサ球菌感染症とは異なる病態も見られ、特に低い致死率と関節炎の惹起に関しては CD46Tg マウスに特有の症状と思われる。G 群レンサ球菌感染による化膿性関節炎は臨床でも報告されている。今回の感染実験系は、G 群レンサ球菌による

化膿性関節炎のモデルとして利用できると考えられる。

## (2) 劇症型 A 群レンサ球菌感染モデルとの病態比較

劇症型レンサ球菌感染症患者より分離した A 群レンサ球菌 GAS472 および髄膜炎患者より分離した MTB313 を用い、(1)と同様に hCD46Tg マウスと対照群マウスに感染実験を行った結果、Tg マウスは播種性血管内凝固症候群(DIC)を起こし、多臓器不全で一週間以内に全て死亡した。菌の皮下注射を行った足は赤く腫れた後、骨壊死を伴う皮膚軟部組織壊疽を起こしていた。(1)で述べた RE378 と GGS124 の感染結果との違いは 致死率(A 群が高く G 群は低い) A 群は皮膚軟部組織壊死を起こし、G 群では化膿性関節炎が起こる、という 2 点にまとめられる。今回の感染実験では、同じマウスを宿主としているため、これらの違いは菌株に由来すると考えられる。レンサ球菌の病原因子は多数存在することが知られている。宿主細胞への付着、免疫系への抵抗性、分泌毒素、タンパク質分解酵素、核酸分解酵素、宿主の免疫系に作用し炎症反応を引き起こすスーパー抗原等である。それぞれに関与する分子も同定されており、A 群レンサ球菌と G 群レンサ球菌の感染モデルにおける病態の違いを比較することで、病原性に関わる分子メカニズムの解明に繋がる可能性があると考えられた。

## (3) G 群レンサ球菌と A 群レンサ球菌の比較ゲノム解析

(2) で述べた点から、強毒型 G 群レンサ球菌(RE378, GGS124)と強毒型 A 群レンサ球菌(GAS472, MTB313)の病原性の違いを分子レベルで比較するために、両株のゲノムを比較した。SDSE は感染モデル構築に用いた RE378 を、GAS は感染モデルが既に存在する GAS472 と髄膜炎由来株である MTB313 を選んだ。RE378 は NCBI で公開中のデータを利用した。GAS472 については二回の全ゲノムシーケンスでいずれも良好な結果を得られず、全配列の決定には至らなかったが、MTB313 株については全ゲノムを決定し、DDBJ に登録を完了した(未公開)。RE378 と MTB313 の全遺伝子を比較したところ、RE378 に含まれ MTB313 に含まれない遺伝子の数は 805 であった。このうち、497 については他の A 群レンサ球菌に相同性の高い遺伝子が存在することが示唆された。また、既知遺伝子との相同性が低く、機能不明である遺伝子が 179 存在した。これらを除き、相同性検索によって RE378 の病原性に関連する可能性があるものは 43 遺伝子であった。転写調節因子が 20 種(2 組の two-component regulator を含む)、菌の宿主細胞への付着に関する因子が 7 種、菌の増殖および適応に関する遺伝子が 7 種、分泌タン

パク質(DNase 等)が2種であった。また、薬剤耐性に関わると考えられる遺伝子が7つ存在した。G群連鎖球菌の感染マウスが関節炎を生じたことから、菌の宿主細胞への付着や定着に関する7つの遺伝子が、A群とは違う病態をもたらしている可能性がある。また、28日後に臓器内(肝臓、脾臓、腎臓)に菌が生育していたことは、免疫系からの回避などが強化されている可能性を示唆している。今後の更なる研究のためには、上述の遺伝子群を詳細に調べる必要がある。特に、タンパク質の発現、その調節メカニズム等を分子生物学的手法(定量的PCR、マイクロアレイ、遺伝子組み換え体の作製)で詳細に明らかにする事で、感染時の分子動態の解明に、ひいてはそれぞれの菌や症状に適した治療方法の開発に役立つと考えられる。

#### 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 5件)

高橋 孝, 吉田春乃, 松井英則, 溶血性連鎖球菌と化膿性関節炎、Medical Practice、査読無、31(1) 2014年、p147.

Tokiyo Matoba, Yuriko Nakatani, Kazuaki Arai, Hidenori Matsui, Haruno Yoshida, Takashi Takahashi, Interleukin-1 Response of Peritoneal Macrophages to *Streptococcus pyogenes* Exposure: Differential Response to Living and Heat-killed Bacteria、Journal of Experimental & Clinical Medicine、査読有、5巻、2013、227- 230  
DOI: 10.1016/j.jecm.2013.10.011

松井英則, 吉田春乃, 高橋 孝, レンサ球菌性局所壊死における肥満細胞の役割. Medical Practice、査読無、29(2)、2012年、p340.

Haruno Yoshida, Hidenori Matsui, Somay Yamagata Murayama, Yasunari Takada, Koichi Matsuo, Tetsufumi Takahashi, Masahiko Nakamura, Kimiko Ubukata and Takashi Takahashi, A CD46 transgenic mouse model for studying the histopathology of arthritis caused by subcutaneous infection with *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*, Journal of Medical Microbiology、査読有、60巻、2011、1860-1868  
DOI: 10.1099/jmm.0.034108-0

Hidenori Matsui, Yukie Sekiya, Tetsufumi Takahashi, Masahiko Nakamura, Ken'ichi Imanishi, Haruno Yoshida, Somay Yamagata Murayama, Takashi Takahashi, Kanji Tsuchimoto, Takehiko Uchiyama, and

Kimiko Ubukata, Dermal mast cells reduce progressive tissue necrosis caused by subcutaneous infection with *Streptococcus pyogenes* in mice., Journal of Medical Microbiology、査読有、60巻、2011、128-134  
DOI: 10.1099/jmm.0.020495-0

[学会発表](計 6件)

Takashi Takahashi, Haruno Yoshida, Kazuaki Arai, and Hidenori Matsui, Interleukin-1b response of peritoneal macrophages to *Streptococcus pyogenes* exposure: differential response to living and heat-killed bacteria. Beijing International Conference of Infection Control, People's Republic of China、平成26年3月21日、北京(中国)

吉田春乃, 髄膜炎由来レンサ球菌の強毒化に関わる分子メカニズムの解析、第36回日本分子生物学会年会、平成25年12月5日、神戸国際展示場(兵庫県)

吉田春乃, *rocA*の1遺伝子変異による化膿レンサ球菌の高病原性化、第86回日本細菌学会総会、平成25年3月18日、幕張メッセ(千葉県)

Hidenori Matsui, Haruno Yoshida, Somay Y Murayama, Asako Takizawa, Osamu Takeuchi, Tetsufumi Takahashi, Masahiko Nakamura, Ken'ichi Imanishi, Takehiko Uchiyama, Takashi Takahashi, and Kimiko Ubukata, CD46 transgenic mouse model of acute severe invasive infections caused by *Streptococcus pyogenes*. International Union of Microbiological Societies 2011、平成23年9月7日、札幌コンベンションセンター(北海道)

吉田春乃, 劇症型A群溶血性レンサ球菌感染症による骨壊死の解析、第85回日本感染症学会総会学術講演会、平成23年4月22日、ザ・プリンス パークタワー(東京都)

松井英則, 吉田春乃, CD46トランスジェニックマウスを用いた *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) 感染モデルの構築、第84回日本感染症学会総会、平成22年4月5日、京都大学医学部芝欄会館(京都府)

[その他]

北里大学感染制御科学府 感染症学研究室  
<http://www.kitasato-u.ac.jp/lisci/life/chart/LSI-lab15.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 春乃 (Haruno Yoshida)  
北里大学 感染制御科学府 助手  
研究者番号 : 70563386

(3)連携研究者

高橋 孝 (Takashi Takahashi)  
北里大学 感染制御科学府 教授  
研究者番号 : 00292855

松井 英則 (Hidenori Matsui)

北里大学 感染制御科学府 講師  
研究者番号 : 30219373

村山-山縣 琮明

(Somay Yamagata-Murayama)  
日本大学 薬学部 薬学科 准教授  
研究者番号 : 60183654