

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791961

研究課題名(和文) A群レンサ球菌による上皮バリア破壊機構の解析

研究課題名(英文) Group A Streptococcus translocates across an epithelial barrier

研究代表者

住友 倫子 (SUMITOMO, TOMOKO)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：50423421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：A群レンサ球菌が致死性の高い劇症型レンサ球菌感染症を発症させるためには、物理バリアである上皮細胞層を突破する必要がある。実際、初発感染部位である咽頭や皮膚に形成される化膿性病変の病理像から、本菌の病原因子による宿主上皮の細胞間接着障害が感染の成立に重要であると考えられている。本研究では、A群レンサ球菌の溶血毒素や菌体外プロテアーゼが宿主細胞間接着分子を分解し、上皮バリアを破綻させることを証明した。

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, culture supernatants of tested GAS strains showed proteolytic activity against human occludin and E-cadherin. We identified streptococcal pyrogenic exotoxin B (SpeB) as the proteolytic factor that cleaves E-cadherin in the region neighboring the calcium-binding sites within the extracellular domain. Of note, the wild type strain efficiently translocated across the epithelial monolayer along with cleavage of occludin and E-cadherin, whereas deletion of the speB gene compromised those activities. Taken together, our findings indicate that the proteolytic efficacy of SpeB in junctional degradation allows GAS to invade deeper into tissues.

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 上皮バリア 細胞間隙

1. 研究開始当初の背景

ヒトを唯一の宿主とする A 群レンサ球菌は、咽頭や皮膚を初発感染部位として、主に咽頭炎や膿痂疹などの局所性化膿性疾患を惹き起こす。また、二次性続発疾患としてリウマチ熱や急性糸球体腎炎を惹起する場合もあるが、抗生物質の開発に伴い、先進国における続発症の発症率は急速に低下した。一方、1980年代後半より、本菌の感染に起因する劇症型レンサ球菌感染症 (STSS) が報告されるようになった。STSS では軟部組織壊死や循環・多臓器不全を伴い、致死率は 30~40% に及ぶ。しかし、病態発症機序や病原因子に関する研究が世界各地で行われてきたにも関わらず、効果的な治療法や予防法の確立に至っていない。

2. 研究の目的

A 群レンサ球菌は STSS を発症させるため、物理バリアである上皮細胞層を突破する必要がある。実際、咽頭や皮膚に形成される化膿性病変の病理像から、本菌の病原因子による宿主上皮の細胞間接着障害が感染の成立に重要であると考えられている。我々は、複数の臨床分離株において、溶血毒素の一つである Streptolysin S (SLS) の産生に依存して上皮細胞間の接着分子であるオクルディンや E-カドヘリンが分解され、A 群レンサ球菌が上皮バリアを突破することを明らかにした (Sumitomo, T. *et al.* 2011. *J Biol Chem*, 286: 2750-2761)。興味深いことに、SLS はカルシウムイオン依存性の宿主細胞内システインプロテアーゼであるカルパインの細胞膜部位への移行を誘導した。その結果、カルパインによる細胞間接着分子の分解を伴い、A 群レンサ球菌は細胞間隙部位から上皮バリアを突破すると考えられた。また、A 群レンサ球菌感染細胞における細胞間接着分子の分解にはカルパインだけでなく、菌由来プロテアーゼの関与も推察された。

本研究では、A 群レンサ球菌感染による宿主上皮細胞間の接着障害に着目し、菌体外プロテアーゼによる直接的な細胞間接着分子の分解機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株

劇症型 A 群レンサ球菌感染症患者由来の *Streptococcus pyogenes* SSI-9 株 (M1 型)、SSI-1 株 (M3 型)、#30 株 (M12 型)、NIH35 株 (M28 型) および局所性化膿性疾患患者由来の SF370 株 (M1 型)、TW3358 株 (M3 型)、TW3337 株 (M12 型)、TW3339 株 (M28 型)、NZ131 株、591 株 (M49 型) を使用した。また、SpeB をコードする

speB 遺伝子欠失株および再導入株は温度感受性ベクター pSET4s を用いて作製した。

(2) 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 μm pore-size; Millipore) で培養した。経上皮電気抵抗値 (TER) が 400-500 Ωcm^2 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、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 で一晚培養を行った後、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) 細胞間接着分子分解能の測定

Caco-2、ヒト皮膚角化細胞 (HaCaT)、咽頭上皮細胞 (Detroit 562) の細胞数に対して、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、10% FBS 含有 MEM を添加し、さらに培養した。所定時間感染後の細胞を 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 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。

(4) 細胞間接着分子の分解に関与するプロテアーゼの検索

A 群レンサ球菌は THY 液体培地で一晚培養した。菌体の培養上清を各種プロテアーゼ阻害剤 (Sigma) で処理した後、細胞間接着分子である E-カドヘリンおよびオクルディンの組換え体と反応させた。組換え体の分解はウエスタンブロット法で解析し、分解部位を N 末端アミノ酸配列解析により同定した。

4. 研究成果

(1) A 群レンサ球菌の培養上清に含まれる SpeB が E-カドヘリンを分解する

A 群レンサ球菌の培養上清と E-カドヘリンの細胞外ドメインに対する組換え体を反応させ、培養上清による E-カドヘリンの分解を

検討した (Fig. 1) SF370 株, SSI-1 株, TW3358 株, 30 株, TW3337 株, NIH35 株, TW3339 株, 591 株の培養上清には高い E-カドヘリン分解活性が認められたが, SSI-9 株および NZ131 株は E-カドヘリン分解能を示さなかった。

高い E-カドヘリン分解能が認められた NIH35 株について, 各種プロテアーゼ阻害剤が培養上清の E-カドヘリン分解能に及ぼす影響を検討した (Fig. 2)。その結果, NIH35 株の培養上清による E-カドヘリンの分解はシステインプロテアーゼ阻害剤により抑制された。以上の結果から, A 群レンサ球菌の培養上清に含まれるシステインプロテアーゼが E-カドヘリンの分解に関与することが示唆された。

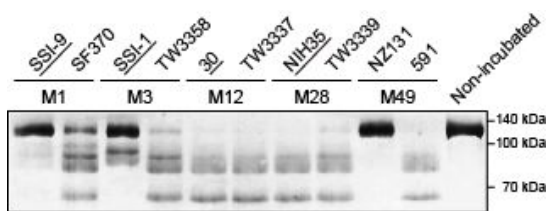


FIGURE 1. Cleavage of E-cadherin by GAS culture supernatant.

Culture supernatants from several GAS clinical isolates were incubated with the recombinant extracellular domain of E-cadherin for 6 h at 37°C. Sample proteins were separated by SDS-PAGE under a reducing condition and subjected to immunoblotting using an antibody against extracellular domain of E-cadherin and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. The signals were developed with a peroxidase substrate tetramethylbenzidine. GAS strains recovered from invasive disease were underlined.

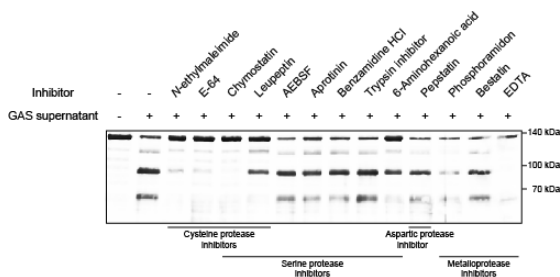


FIGURE 2. Cysteine protease contributes to cleavage of E-cadherin.

Culture supernatants from strain NIH35 were pretreated with several types of protease inhibitors for 30 min at room temperature, then incubated with recombinant E-cadherin for 6 h at 37°C. Sample proteins were separated by SDS-PAGE under a reducing condition and subjected to immunoblotting using an antibody against extracellular domain of E-cadherin and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. Immunoreactive bands were detected with a peroxidase substrate tetramethylbenzidine.

(2) SpeB は E-カドヘリンの細胞外ドメインを分解する

A 群レンサ球菌が産生する代表的なシステインプロテアーゼである streptococcal pyrogenic exotoxin B (SpeB) をコードする遺伝子 *speB* の in-frame 欠失株およびその再導入株を作製し, E-カドヘリン分解に及ぼす SpeB の影響を検討した。野生株の培養上清による E-カドヘリンの分解は *speB* 欠失により抑制され, *speB* 再導入により野生株と同等レベルまで回復することを確認した (Fig. 3A)。また, 各臨床分離株が産生する SpeB 量 (Fig. 3B) と培養上清による E-カドヘリン分解能 (Fig. 1) には相関関係が認められた。さらに, SpeB の組換え体は E-カドヘリンおよびオクルディンの組換え体を濃度依存的に分解した (Figs 3C & 3D)。SpeB は E-カドヘリンの細胞外ドメインである EC2 と EC3 間のカルシウム結合部位を分解することを確認した (Fig. 3C)。

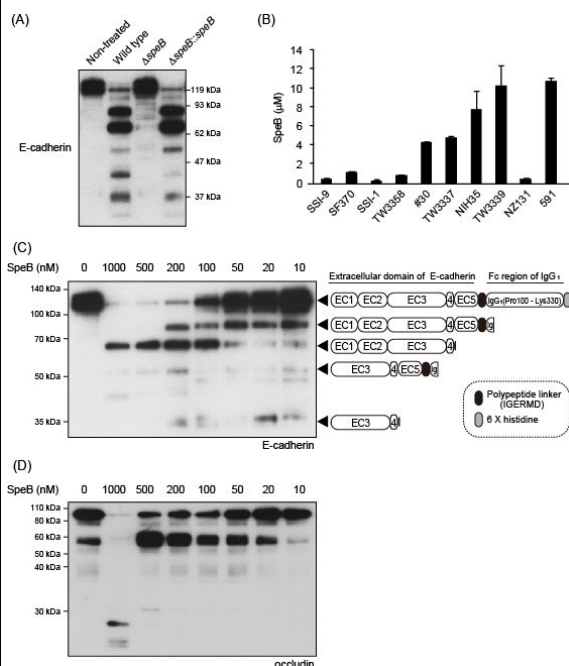


FIGURE 3. SpeB cleaves intercellular junctional proteins.

A, Recombinant E-cadherin was treated with culture supernatants from strain NIH35, an *speB* deletion mutant, and a complemented strain for 6 h at 37°C. Cleavage of E-cadherin was detected by Western blotting. B, SpeB activities present in the culture supernatants from several GAS clinical isolates were analyzed using FITC-labeled casein. For quantitative evaluation, the casein hydrolysis activity of recombinant SpeB was used to prepare a standard curve. To ensure the specificity of SpeB, the cysteine protease inhibitor E-64 was routinely added to selected samples. All experiments were performed six times with three technical repeats. Data are shown as the mean \pm SD of six samples from representative findings obtained in three independent experiments. C, Recombinant E-cadherin was incubated with various concentrations of recombinant SpeB for 6 h at

37°C. Cleavage of E-cadherin was detected by Western blotting. Five N-terminal residues in the cleavage fragments of E-cadherin were determined by peptide sequence analysis. Schema represents estimated cleavage fragments of E-cadherin. *D*, Full-length recombinant occludin was incubated with various concentrations of recombinant SpeB for 6 h at 37°C.

(3) A 群レンサ球菌感染細胞における細胞間接着分子の分解には SpeB が関与する

A 群レンサ球菌感染細胞における細胞間接着分子の分解に及ぼす SpeB の影響を検討するために, Caco-2 細胞, HaCaT 細胞, Detroit562 細胞に野生株, *speB* 欠失株およびその再導入株をそれぞれ感染させ, 感染細胞における E-カドヘリンおよびオクルディンの分解をウェスタンブロット法で解析した. 全ての細胞種において, 野生株感染細胞で確認された E-カドヘリンおよびオクルディンの分解は, *speB* 欠失により抑制された(Fig. 4).

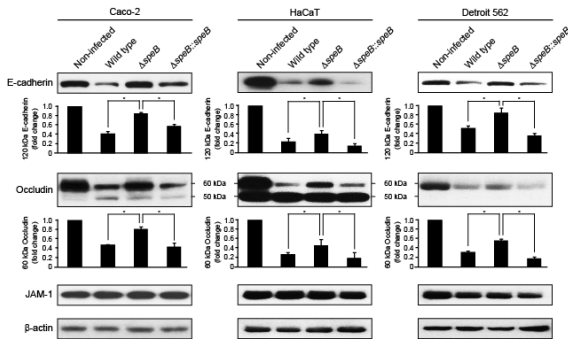


FIGURE 4. SpeB is related to GAS-induced destabilization of intercellular junctions.

Caco-2, HaCaT, and Detroit 562 cells were infected with strain NIH35, an *speB* deletion mutant, or a complemented strain at an MOI of 10 for 6 h (Caco-2, Detroit 562) or 8 h (HaCaT). Cleavage of E-cadherin, occludin, and JAM-1 was detected in whole cell lysates by Western blot analysis, with β -actin used as a loading control. The graphs below the representative blot show fold changes of band intensities of E-cadherin and occludin normalized to that of β -actin. Data are shown as the mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$.

(4) SpeB は A 群レンサ球菌の上皮バリア通過に関与する

A 群レンサ球菌の上皮バリア通過能に及ぼす SpeB の影響を検討するため, Caco-2 細胞の上皮バリアモデルに野生株, *speB* 欠失株およびその再導入株をそれぞれ感染させ, 上皮バリア通過能を評価した. NIH35 株の上皮バリア通過能は *speB* 欠失により抑制され, *speB* 再導入により野生株と同等レベルまで回復した (Fig. 5A). また, 30 株, TW3337 株, TW3339 株, 591 株についても, 野生株の上皮バリア通過能は *speB* 欠失により有意に低

下した (Fig. 5B). 以上の結果から, SpeB は細胞間接着分子を分解し, 細胞間隙経路からの菌体の上皮バリア突破に寄与することが示唆された.

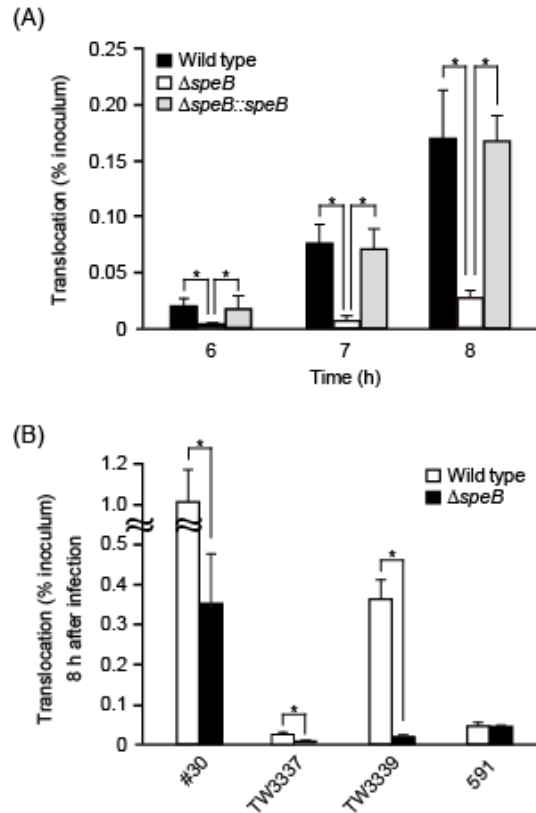


FIGURE 5. SpeB is involved in the process of GAS translocation.

Caco-2 cells were grown on Millicell filters, then infected with GAS strains at an MOI of 10 for 2 h. After removing non-adhered bacteria, the ability of the GAS strains to translocate across epithelial cells was assessed by examining medium samples obtained from the lower chambers at the indicated time of infection. Shown are results of translocation rates of strain NIH35 (A) and clinical isolates (B). Three experiments were performed and data are presented as the mean \pm SD of six samples from representative findings obtained in three independent experiments. * $P < 0.01$.

本研究では, A 群レンサ球菌の菌体外プロテアーゼである SpeB による直接的な細胞間接着分子の傷害だけでなく, 溶血毒素である SLS が宿主上皮細胞にカルシウムイオン依存的なカルパインの活性化を誘導し, 上皮バリアを破綻させることも証明した.

今後の研究において, 溶血毒素や菌体外プロテアーゼによる細胞間接着分子の障害と病態発症の関連性が動物モデルで証明されれば, 類似疾患を示す感染症の新たな治療法・感染防御法確立の基盤となると期待する.

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)

1. Okahashi N, Sumitomo T, Nakata M, Sakurai A, Kuwata H, and Kawabata S. 2014. Hydrogen peroxide contributes to the epithelial cell death induced by the oral mitis group of streptococci. *PLoS One* 9(1): e88136. doi:10.1371/journal.pone.0088136.
2. Honda-Ogawa M, Ogawa T, Terao Y, Sumitomo T, Nakata M, Ikebe K, Maeda Y, and Kawabata S. 2013. Cysteine proteinase from *Streptococcus pyogenes* enables evasion of innate immunity via degradation of complement factors. *J Biol Chem* 288(22): 15854-15864. doi: 10.1074/jbc.M113.469106.
3. Sumitomo T, Nakata M, Higashino M, Terao Y, and Kawabata S. 2013. Group A streptococcal cysteine protease cleaves epithelial junctions and contributes to bacterial translocation. *J Biol Chem* 288(19): 13317-13324. doi: 10.1074/jbc.M113.459875.
4. Okahashi N, Nakata M, Sumitomo T, Terao Y, and Kawabata S. 2013. Hydrogen peroxide produced by oral streptococci induces macrophage cell death. *PLoS One* 8(5): e62563. doi: 10.1371/journal.pone.0062563.
5. 住友倫子, 川端重忠. 2013. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症の発症に寄与する細菌因子. 特集「いわゆるヒト喰いバクテリアと劇症型感染症」. 化学療法の領域. 29 (7): 1430-1437 (48-55).

[学会発表](計 11 件)

1. 住友倫子, 東野美晴, 中田匡宣, 川端重忠. Group A *Streptococcus* translocates across epithelial barrier via tricellular tight junctions. 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26 ~ 28 日, 東京都江戸川区・タワーホール船堀.
2. 中田匡宣, 住友倫子, 浜田茂幸, 川端重忠. *Streptococcus pyogenes* が産生する FCT3 型線毛の発現調節機構の解析. ワークショップ「細菌の環境シグナル受容体と遺伝子調節ネットワーク」第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 27 ~ 28 日, 東京都江戸川区・タワーホール船堀.
3. 中田匡宣, 住友倫子, 浜田茂幸, 川端重忠. Regulation of pilous gene expression in FCT type 3 strain of *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus pyogenes* が産生する FCT3 型線毛の発現調節機構の解析). 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26 ~ 28 日, 東京都江戸川区・タワーホール船堀.
4. 森田知里, 住岡龍一, 中田匡宣, 住友倫子, 岡橋暢夫, 浜田茂幸, 川端重忠. Wall-anchored nuclease of *Streptococcus sanguinis* contributes to evasion of innate

immunity. 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26 ~ 28 日, 東京都江戸川区・タワーホール船堀.

5. 毛利泰士, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠. *Streptococcus pyogenes* の C3 様 ADP リボシルトランスフェラーゼ SpyA の機能解析 (Functional characterization of SpyA from *Streptococcus pyogenes*). 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26 ~ 28 日, 東京都江戸川区・タワーホール船堀.
6. 岡橋暢夫, 中田匡宣, 住友倫子, 寺尾豊, 川端重忠. 口腔レンサ球菌が産生する過酸化水素がマクロファージの細胞死を誘導する. 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26 ~ 28 日, 東京都江戸川区・タワーホール船堀.
7. 森田知里, 住岡龍一, 中田匡宣, 岡橋暢夫, 住友倫子, 川端重忠. *Streptococcus sanguinis* が産生するヌクレアーゼの機能解析. 第 66 回日本細菌学会関西支部総会, 2013 年 11 月 16 日, 吹田市・大阪大学微生物病研究所 谷口記念講堂.
8. 住友倫子, 中田匡宣, 寺尾豊, 川端重忠. A 群レンサ球菌は宿主カルパインの活性化を介して上皮バリアを突破する (Group A *Streptococcus* translocates across an epithelial barrier via calpain activation). 第 55 回歯科基礎医学会学術大会, 2013 年 9 月 20 ~ 22 日, 岡山市・岡山コンベンションセンター.
9. 森田知里, 住岡龍一, 中田匡宣, 岡橋暢夫, 住友倫子, 川端重忠. *Streptococcus sanguinis* の菌体表層ヌクレアーゼは自然免疫からの回避に寄与する (Extracellular nuclease form *Streptococcus sanguinis* contributes to evasion of innate immunity). 第 55 回歯科基礎医学会学術大会, 2013 年 9 月 20 ~ 22 日, 岡山市・岡山コンベンションセンター.
10. 住友倫子, 中田匡宣, 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關与する宿主プロテアーゼの解析. 第 22 回 Lancefield レンサ球菌研究会, 2013 年 6 月 28 ~ 29 日, 東京都港区・ホテル島根イン青山.
11. Sumitomo T, Nakata M, Higashino M, Terao Y, and Kawabata S. Group A streptococcal pyrogenic exotoxin B cleaves epithelial junctions and contributes to bacterial translocation. 113th General Meeting of American Society for Microbiology. May 18-21, 2013. Colorado Convention Center, Denver, CO, 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