

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 13 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460545

研究課題名(和文) A群溶血性レンサ球菌の強毒化機構の解析

研究課題名(英文) Virulence mechanisms in hypervirulent strains of group A streptococci

研究代表者

松井 英則 (Matsui, Hidenori)

北里大学・感染制御科学府・講師

研究者番号：30219373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：1人の化膿性髄膜炎患者よりemm1のA群レンサ球菌の強毒株と弱毒株を分離した。強毒株はrocAの1塩基置換によるアンバー変位の挿入が認められた。強毒株に構成的に発現するrocA遺伝子を導入すると、病原因子の発現が低下することから、rocAの変位がcovR(負の制御因子)制御下の病原遺伝子の発現を活性化したと思われる。一方、CD46トランスジェニックマウスの後肢足蹠部にレンサ球菌ショック素症候群の患者から分離されたGAS472株(emm1)を感染させると、骨髄細胞からRANKLの過剰な発現を誘導し、破骨細胞を高度に活性化した。その結果、感染局所の骨破壊及び全身の骨量の減少を誘導した。

研究成果の概要(英文)：Virulent and avirulent strains of group A streptococcus (GAS) emm type 1 were simultaneously isolated from a single patient suffering from streptococcal meningitis. The whole-genome sequencing and comparative genomic analysis revealed the possibility that a spontaneous point mutation in the rocA gene led to the hypervirulent phenotype of emm1 GAS associated with the suppression of covR expression. Meanwhile, the emm1 GAS strain GAS472 was isolated from a patient suffering from streptococcal toxic shock-like syndrome. CD46 transgenic (Tg) mice developed necrotizing fasciitis associated with osteoclast-mediated progressive and severe bone destruction in the hind paws after subcutaneous infection with GAS472. GAS472 infection induced expression of the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) in heterogeneous bone marrow cells. Therefore, GAS472 infection induced local bone erosion and systemic bone loss in CD46 Tg mice.

研究分野：細菌学(含真菌学)

キーワード：細菌 感染症 CD46 マウス感染モデル レンサ球菌 レンサ球菌毒素性ショック症候群 骨破壊 RANKL

1. 研究開始当初の背景

(1) 劇症型の A 群 β 溶血性レンサ球菌 (group A streptococcus, GAS or *Streptococcus pyogenes*) 感染症 (いわゆる、ヒト食いバクテリア症、五類感染症) の平成 24 年の患者数は、前年の 1.6 倍であった。更に平成 24 年の患者数は、9 月上旬までで、前年の同期より 23 人も増加していた。劇症型 GAS 感染症は、感染が発覚した患者の約 30% が亡くなる恐ろしい病気であるが、GAS の強毒化機構は、まだ解明されていない。平成 19 年度～21 年度の厚生労働科学研究補助金 (新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)、研究課題「新規に発生しているレンサ球菌による劇症型感染症の臨床的・細菌学的解析と診断・治療法に関する研究」、研究代表者：砂川慶介 (北里大学、北里生命科学研究所・教授) により、臨床と基礎の両面から GAS 研究が展開された。研究成果は、平成 22 年～24 年度の研究代表者である生方公子 (北里大学、北里生命科学研究所・教授) により、ホームページで公開されている

(<http://strep.umin.jp/index.html>)。

(2) 国立感染症研究所の池辺らは、過去に日米で分離された GAS を多数解析した結果、遺伝子の発現を負に制御している二成分制御系の *csrS/csrR* (別名 *covS/covR*) ともう一つの制御系の *rgg* の片方あるいは両方の変異により、多数の病原遺伝子が過剰発現することが GAS の強毒化機構であると報告した (Ikebe *et al.*, *PLoS Pathog.*, 6, e1000832, 2010)。そこで、我々も、本邦において劇症型感染症との強い相関が報告されている *emm1* (M1 型) GAS について、2006 年以降の臨床分離株の遺伝子の変異を調べたが、強毒株と弱毒株間に *csrS/csrR* と *rgg* 遺伝子の塩基配列の差は、認められなかった。

(3) 同一の化膿性髄膜炎の患者から 2 種類の

emm1 (M1 型) GAS を分離した (ムコイド株と非ムコイド株)。感染実験により両株の病原性を調べたところ、強毒株 (ムコイド株, MTB313 と命名) と弱毒株 (非ムコイド株, MTB314 と命名) に分かれた。マウスの皮下感染による LD₅₀ 値で、両株の間に約 10² CFU の開きがあった。そこで両株のゲノムのドラフト配列を比較すると、強毒株にのみ、*rocA* (*csrR* の発現を正に調節) 遺伝子の 1 塩基置換による終止コドン (アンバー変異) の挿入が確認された。

(4) GAS はヒトに特異的に感染する菌である。その理由は菌体外層の M 蛋白質がヒト CD46 を受容体とするからである。マウスでは CD46 は精巢特異的に発現しており、またヒトとの相同性も低い (46%)。そこで、平成 19 年度～21 年度の厚生労働科学研究補助金「新規に発生しているレンサ球菌による劇症型感染症の臨床的・細菌学的解析と診断・治療法に関する研究」の研究分担者の松井英則 (北里大学、北里生命科学研究所・講師) は、ヒトと同じく全身の組織で発現している CD46 トランスジェニック (Tg) マウスに GAS を感染させることで、ヒトの病態に類似の劇症型感染モデルを構築した (Matsui *et al.*, *Infect Immun.*, 77, 4806-4814, 2009; Matsui *et al.*, *J. Med. Microbiol.*, 60, 128-134, 2011)。レンサ球菌毒素性ショック症候群

(streptococcal toxic shock syndrome; STSS) の患者より分離した GAS472 株を CD46 Tg マウスに感染させると、通常のマウスでは見られない壊死性筋膜炎を伴った劇症型 GAS 感染症を再現した。更に、GAS472 感染の CD46 Tg マウスの下肢では、急激な骨破壊が認められた。一方、肺血症の患者から分離された *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) RE378 株を感染させた CD46 Tg マウスは、破骨細胞の活性化を伴った、重篤な化膿性関節炎を誘発した (Yoshida *et al.*, *J. Med.*

2. 研究の目的

(1) 次世代 DNA シーケンサーを用いた GAS 臨床分離株のゲノム解析結果を基にした比較ゲノム解析により、GAS の強毒化機構を解明する。

(2) CD46 Tg マウス感染実験の組織化学的解析により、劇症型 GAS 感染症惹起機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 法令及び研究倫理規定

- ① 第二種使用等拡散防止措置確認
松井 英則 24 受分科振第 2876 号 (平成 25 年 4 月 3 日) 「ヒト CD46 トランスジェニックマウスを用いた遺伝子組換えレンサ球菌の感染モデルの構築」
- ② 遺伝子組換え実験機関承認
松井英則 承認番号 2760, 3402 「ヒト CD46 トランスジェニックマウスを用いたレンサ球菌劇症型感染症の感染モデルの構築」、承認番号 2536, 3050
「*Streptococcus pyogenes*, *S. agalactiae* および *S. dysgalactiae* supsp. *equisimilis* の病原性因子の同定および機能解析」
- ③ 北里大学動物実験
松井英則 承認番号 13-010, 14-010, 15-008 「ヒト CD46 発現トランスジェニック (hCD46Tg) マウスを用いたレンサ球菌感染モデルの構築」
- ④ 北里大学病原体等利用届
松井英則 届出番号 LBS-1-25-90, LBS-1-26-117, LBS-1-27-146
- ⑤ CITI 受講
松井英則 コース01 責任ある研究行為：基礎編 修了証 No. 4518292
コース 02 人を対象とした研究：基礎

(2) 菌株及び感染実験

GAS の臨床分離株として、同一の髄膜炎の患者の髄液から分離された MTB313 と MTB314 (*emm1* GAS)。次に、MTB314 の *rocA* の全長を pLZ12-Km2 (北里大学薬学部・岡田信彦教授から譲渡) に挿入後 (pRocA と命名)、MTB313 への導入株 (MAT101 と命名)。同時に pLZ12-Km2 を MTB313 への導入株 (MAT100 と命名)。更に、STSS 患者の血液から分離された GAS472 (*emm1* GAS)。最後に、GAS472 の *emm1* 遺伝子を欠損させた MAT301。SDSE の臨床分離株としては、敗血症患者から分離された、RE378 (*stG6792.3*) と STSS 患者から分離された GGS_124 (*stG480.0*)。GAS 及び SDSE は、THY 培地 (0.2% の酵母抽出物を含むトッド・ヒューイット) を用いて、CO₂ インキュベーター中で静置培養を行った。感染に際しては、対数増殖期の菌を 6-8 週齢の CD46 Tg マウス (米国ワシントン大学、J. P. Atkinson 教授から譲渡) の下肢の足蹠部 (footpad) に麻酔下で投与した (5x10⁵~1x10⁷ CFU/40 µL BSG [0.01%のゼラチンを含む PBS, pH7.4]/mouse)。CD46 Tg マウスは、CD46 と NK1.1 の発現を指標として、C57BL/6J マウスと 10 代交配を続けた。

(3) ゲノム解析

菌体のゲノム DNA の精製には、UltraClean Microbial DNA Isolation kit (MO バイオ) を用いた。塩基配列の決定は、454 GS Junior Titanium System を使い、アノテーション解析には、MiGAP (DDBJ) を用いた (北里生命科学研究所・吉田春乃助手)。更に、比較ゲノム解析には、オー・ソログ解析に基づいた RECOG (基礎生物学研究所) を用いた。

(4) 生化学実験

分泌蛋白質の検出には、SDS ポリアクリル

アミドゲル電気泳動に続きウエスタンブロットティングを行った。ヒアルロン酸莢膜の定量は、Stains-All 法を用いた。蛋白質分解活性の測定には、アゾカゼインを基質とした。DNAse 活性の測定には、λ DNA を基質とした。溶血活性の測定には、O 型の血液（コージンバイオ）を用いた。

(5) 免疫組織化学

感染マウスの下肢骨をホルマリン固定後に脱灰 (0.5 M EDTA, 5 日間) を行った。パラフィン包埋後に、マイクロトームで 5 μm の骨標本を調製し、酵素抗体染色あるいは TRAP 染色を行った。ALP/TRAP 二重染色に際しては、骨検体をアルコール固定・脱水・脱脂の後に MMA 樹脂包埋又は GMA 樹脂包埋を行った。大量の染色標本の画像全体の取り込みには、Nano Zoomer XR (浜松ホトニクス) を用いた (慶應大・医・共同利用室)。

(6) その他

マイクロ CT 解析には、CT Scanner R_mCT2 (理学メカトロニクス) を用いた (慶應大・医・共同利用室)。統計処理は、GraphPad Prism 6 を用いた。両側 T 検定で p 値 0.05 以下を有意差とした。

4. 研究成果

(1) GAS *rocA* 遺伝子変異に起因する病原性の惹起機構

MTB313, MTB314, GAS472 の 3 株は、センサー遺伝子 *csrS* に変異が挿入された強毒株であった。MTB313 (Acc. No. AP014572) と MTB314 (Acc. No. AP014585) のゲノム配列を比較すると *rocA* 以外に、MTB314 において *sic* 遺伝子上に 9 塩基 (3 アミノ酸残基) の欠損が認められた。しかし、*rocA* の相補性試験の結果から、*sic* の変異は菌の病原性には関与しないと結論づけた。

図 1. 増殖曲線 (A)。ヒアルロン酸莢膜の産生 (B, C)。

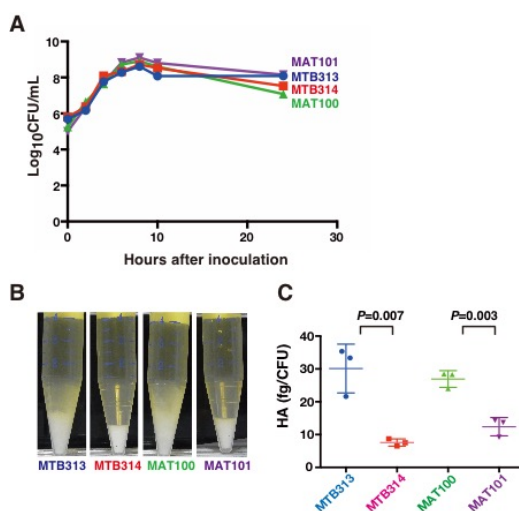


図 2. 分泌蛋白質の SDS-PAGE (A) とウエスタンブロットティング (B, C)。分子量マーカー (レーン 1, 6); MTB313 (レーン 2, 7, 11); MTB314 (レーン 3, 8, 12); MTB100 (レーン 4, 9, 13); MTB101 (レーン 5, 10, 14)、←, SpeB; ←, SL0。分泌蛋白質の蛋白質分解活性 (D)。分泌蛋白質の溶血活性 (E)。

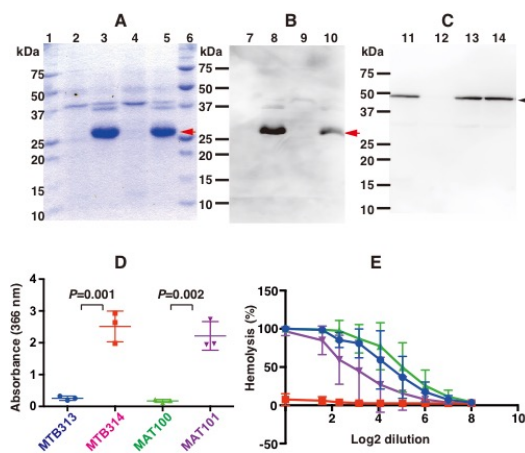
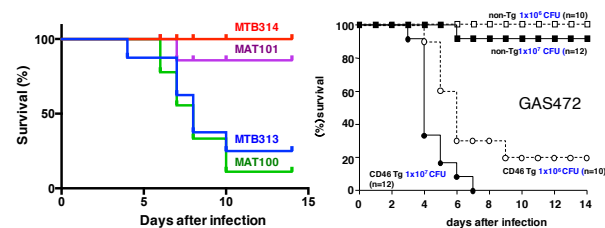


図 3. CD46 Tg マウスに対する致死曲線 (1×10^7 CFU 投与)。



(2) CD46 T マウスの皮下感染モデルの致死性
SDSEにはGASに保存されたスーパー抗原が欠損している。GGS_124のゲノムには、6個のファージ遺伝子が存在しているが、RE378は1個のみである。その結果、CD46 Tg マウスに対する致死率は以下の通りとなった (1x10⁷ CFU 投与後2週間)。GAS472 100% > MTB313 75% > GGS_124 33.3%, > RE378 0%。

(3) 骨破壊機構

図4. GAS472の皮下感染3日後のCD46 Tg マウスへの急激な骨破壊。



図5. GAS472のCD46 Tg マウスへの皮下感染後の下肢骨と膝下リンパ節におけるRANKLの発現量の増加とオステオプロテゲリン (OPG)の発現量の減少。

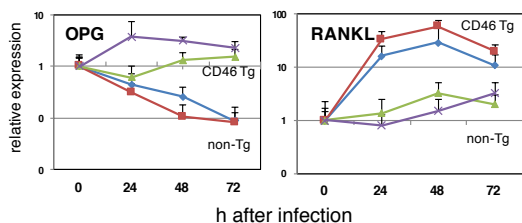


図6. GAS472のCD46 Tg マウスへの皮下感染3日後の大腿骨における骨量の23%の減少、破骨細胞活性化による頸骨の海面骨の吸収。

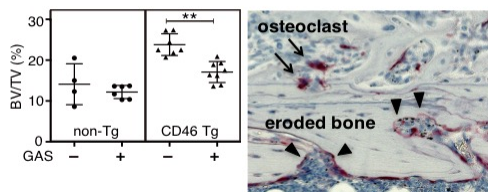


図7. RANKL抗体投与による骨破壊の阻止。

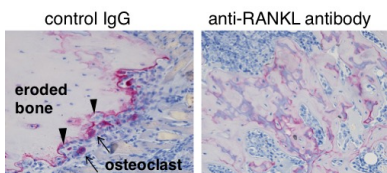
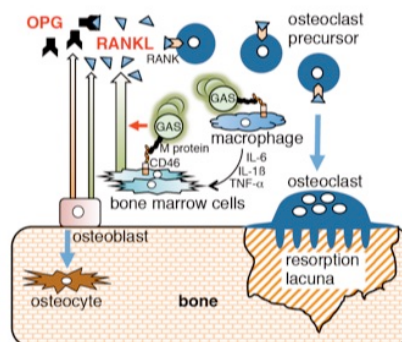


図8. GAS感染による骨破壊モデル (皮膚および軟部組織から感染したGASは、血液に侵入後に骨髄内の血管を破壊し滲出する。繊維芽細胞を含む骨髄内の細胞のCD46にGASが付着し、その刺激により大量のRANKLが発現する。骨髄中の破骨前駆細胞は、RANKLにより活性型破骨細胞に分化し、海綿骨から皮質骨に向かって急激な骨吸収を生じる。骨髄内の細胞のRANKL発現は、マクロファージからの炎症性サイトカインによっても励起される。この急激な骨破壊は、抗RANKL抗体の感染前の投与により予防できる)。



5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計3件; *責任著者)

- ① *Matsui, H., Nakatani, Y., Yoshida, H., Takizawa, A., Takeuchi, O., Øverby, A., Takahashi, T., Murayama, S. Y., and Matsuo, K. Flesh-eating *Streptococcus pyogenes* triggers the expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand. 査読有, *Cell. Microbiol.*, 22 Mar., 2016. DOI: 10.1111/cmi.12581
- ② Yoshida, H., Takahashi, T., Nakamura, M., Øverby, A., Takahashi, T., Ubukata, K., and *Matsui, H. A highly susceptible CD46 transgenic mouse model of subcutaneous infection with *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*. 査読有, *J. Infect. Chemother.* 22, 229-234, 2016. DOI:

10.1016/j.jiac.2016.01.001

- ③ Yoshida, H., Ishigaki, Y., Takizawa, A., Moro, K., Kishi, Y., Takahashi, T., and ***Matsui, H.** Comparative genomics of the mucoid and nonmucoid strains of *Streptococcus pyogenes*, isolated from the same patient with streptococcal meningitis. 査読有, *Genome Announc.*, 3, e00221-15, 2015. DOI: 10.1128/genomeA.00221-15

[学会発表] (計 8 件)

- ① **Matsui, H.**, Yoshida, H., Takeuchi, O., and Murayama, S.Y. Hypervirulent GAS infection leads to systemic bone loss in a humanized mouse model. 第 89 回日本細菌学会総会. 大阪国際交流センター (大阪府大阪市). 2016 年 3 月 23 ~25 日.
- ② **Matsui, H.**, Yoshida, H., Takeuchi, O., and Murayama, S.Y. GAS infection promotes a vicious cycle of bone loss through imbalanced bone remodeling. 第 88 回日本細菌学会総会. 長良川国際会議場 (岐阜県岐阜市). 2015 年 3 月 26 ~28 日.
- ③ Yoshida, H., and **Matsui, H.** Gene conversion from a low-virulence to hypervirulence of *S. pyogenes* during infection. 第 88 回日本細菌学会総会. 長良川国際会議場 (岐阜県岐阜市). 2015 年 3 月 26~28 日.
- ④ **松井英則**, 吉田春乃, 生方公子, 高橋孝. CD46 トランスジェニックマウスを用いた劇症型 A 群レンサ球菌感染による骨破壊機構の解析. 第 88 回日本感染症学会学術集会・第 62 回日本化学療法学会総会合同学会 学術総会. ヒルトン福岡シーホーク (福岡県福岡市). 2014 年 6 月 18 ~20 日.
- ⑤ **Matsui, H.**, Yoshida, H., and Takeuchi, O. CD46 Tg mouse model of osteoclastic bone resorption caused by s.c. infection with GAS. 第 87 回日本細菌学会総会. タワーホール船堀 (東京都江戸川区). 2014 年 3 月 26~28 日.
- ⑥ **Matsui, H.** Takizawa, A., and Takeuchi, O. *Streptococcus pyogenes* infection causes necrotizing fasciitis along with severe bone destruction promoted by receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL)-induced osteoclastogenesis in CD46 transgenic mice. 第 42 回日本免疫学会学術集会 幕張メッセ (千葉県千葉市). 2013 年 12 月 11~13 日.
- ⑦ Yoshida, H. **Matsui, H.** and Takahashi, T. Comparative genome analysis of *Streptococcus pyogenes* MTB313 and MTB314, isolated from a patient suffering from acute streptococcal meningitis. 第 36 回日本分子生物学会年会. 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市). 2013 年 12 月 3~6 日.
- ⑧ 吉田春乃, **松井英則**, 的場時代, 新井和明, 高橋孝. 髄膜炎由来レンサ球菌株の強毒化に及ぼす *rocA* 遺伝子の影響. 第 87 回日本感染症学会・第 61 回日本化学療法学会 合同学会 学術集会. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市). 2013 年 6 月 5 ~6 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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