

令和元年6月4日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09952

研究課題名(和文) 劇症型溶血性レンサ球菌感染症における未熟骨髄系細胞の宿主防御機構の解析

研究課題名(英文) Functional analysis of immature myeloid cells in severe invasive group A streptococcal infection

研究代表者

松村 隆之 (Matsumura, Takayuki)

国立感染症研究所・免疫部・主任研究官

研究者番号：50434379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：劇症型溶血性レンサ球菌感染症は約30%が死亡する致死率の高い感染症であり、その大部分がA群レンサ球菌感染によって引き起こされる。好中球減少を代償するインターフェロン産生未熟骨髄系細胞(IMCs)は、劇症型感染マウスにおいて宿主防御に寄与するが、その防御機構の詳細は不明であった。今回我々は、IMCsにおいてToll様受容体2によるレンサ球菌の感知によりインターロイキン6が誘導され、オートクラインおよびパラクラインにインターロイキン6が作用し、IMCs上のC型レクチン受容体Mincleが発現増強されることがインターフェロン産生に必須であるというシークエンシャル・センシング機構を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

劇症型溶血性レンサ球菌感染症は約30%が死亡する致死率の高い感染症であり、メディア等では「人食いバクテリア」と称されている。国内年間報告数は、1999～2010年では多くても100例前後で推移、2011～2013年では200例前後を推移していたが、2014年に260例を超えてから増加の一途をたどり、2018年には680例を超えた。したがって既存の抗生物質による治療に追加可能な新規治療法の開発が必要であると考えられる。本研究の成果は、劇症型感染マウスモデルにおいて、新規細胞による連続的なレンサ球菌の認識機構が感染をコントロールできる可能性を見出している。

研究成果の概要(英文)：Severe invasive group A Streptococcus (GAS) infection evades anti-bacterial immunity by attenuating the cellular components of innate immune responses. However, this loss of protection is compensated for by IFN- γ -producing immature myeloid cells (IMCs). Here, we demonstrate that IMCs provide this IFN- γ -mediated protection by sequentially sensing GAS through two distinct pattern recognition receptors. GAS is initially recognized by TLR2, which promptly induces IL-6 production in IMCs. IMC-derived IL-6 promotes the upregulation of a recently identified GAS-sensing receptor, macrophage-inducible C-type lectin (Mincle), in an autocrine or paracrine manner. Notably, blockade of IMC-derived IL-6 abrogates Mincle expression, downstream IFN- γ production, and IMC-mediated protection against severe invasive GAS infection. Thus, IMCs regulate host protective immunity against severe invasive GAS infection via a TLR2-IL-6-Mincle axis.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫学 細菌感染症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

劇症型溶血性レンサ球菌感染症(感染症法:五類全数把握感染症)は、約30%が死亡する致死率の高い感染症である。病態の進行が急激かつ劇的で、数十時間以内に多臓器不全、軟部組織壊死などを引き起こし、患者をショック症状から死に至らしめる。劇症型溶血性レンサ球菌感染症の大部分がA群レンサ球菌(Group A *Streptococcus*)である *Streptococcus pyogenes* の感染によって引き起こされる。また、ヒト劇症型感染例において血中インターフェロン(IFN)- γ 産生量が顕著に増加していることが判明した。同様に劇症型感染マウスモデルにおいても、感染早期から血中IFN- γ 産生量が増加することが確認された。さらに、抗IFN- γ 中和抗体投与マウスは劇症型感染に抵抗性が顕著に減弱することから、IFN- γ が劇症型感染における宿主防御因子の一つであると考えられた。これまでレンサ球菌感染におけるIFN- γ の産生は、レンサ球菌の産生するスーパー抗原により活性化されたT細胞や、種々の感染症においてIFN- γ を産生することが知られているNK細胞に依存すると考えられてきたが、申請者らはRAG1欠損マウス(組換え酵素であるRAG1遺伝子を欠損しているため、T細胞やB細胞が成熟するために必須であるVDJ組換えができずに分化が阻害され、成熟したT細胞やB細胞が欠損しているマウス)を用いた解析や、細胞表面抗原の詳細なフローサイトメトリー解析から、感染初期のIFN- γ はT細胞やNK細胞由来ではなく、リング状の核を有する新規未熟骨髄系細胞(IFN- γ -producing immature myeloid cells [γ IMCs])から産生されることを見出した。これらの結果は感染症におけるIFN- γ 産生は主にT細胞およびNK細胞依存的であるという従来の見解を覆す新発見である。さらにこの γ IMCsを養子細胞移植したマウスは劇症型感染に抵抗性を持つことが明らかとなり、劇症型溶血性レンサ球菌感染症において γ IMCsが宿主防御的に機能していることが明らかとなった。

その後の研究進展により、ヒト劇症型感染例および劇症型感染マウスモデルにおいて、血中IFN- γ 産生量だけでなくインターロイキン(IL)-6産生量も増大することが判明した。さらに、抗IL-6受容体中和抗体投与マウスおよびIL-6欠損マウスは劇症型感染に抵抗性が顕著に減弱することから、IL-6もまた劇症型感染における宿主防御因子の一つであると考えられた。*In vivo*と同様に、 γ IMCsはIFN- γ だけでなくIL-6を産生することが明らかとなった。また、IL-6欠損マウスを用いた半致死感染モデルにおいて γ IMCsを同定した。野生型マウス由来 γ IMCsを養子細胞移植したマウスにおいては劇症型感染に抵抗性を示したが、IL-6欠損マウス由来 γ IMCを養子細胞移植したマウスにおいては抵抗性を示さなかった。したがって、新規細胞由来のIFN- γ およびIL-6のいずれも劇症型感染における宿主防御に必須であることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、 γ IMCsによるA群レンサ球菌認識機構や各種サイトカイン産生機構を明らかにし、劇症型溶血性レンサ球菌感染症の防御免疫機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 野生型マウス由来 γ IMCsおよびIL-6欠損マウス由来 γ IMCsの相違点の解析

A群レンサ球菌はToll様受容体以外にも未だ同定されていない受容体によって認識されたと考えられている。さらに申請者らの研究から、IL-6欠損マウス由来 γ IMCsは、野生型マウス由来 γ IMCsとは異なりA群レンサ球菌に応答してIFN- γ を産生できないため、細胞応答に異常があることが示唆されている。そこでまず、野生型マウス由来 γ IMCsおよびIL-6欠損マウス由来 γ IMCsをフローサイトメトリーにて分離精製し、両者において劇症型レンサ球菌応答性の細胞内シグナル伝達や各種受容体の発現パターンを比較解析する。

2) 劇症型レンサ球菌応答に重要な受容体およびシグナル伝達経路の同定

1)において、細胞間で変化のあった受容体およびシグナル伝達分子が γ IMCsからのサイトカイン産生等にどのように関与するのか、中和抗体やロックアウト等の手法により明らかにする。また、IL-6を添加したIL-6欠損マウス由来 γ IMCsが、野生型マウス由来 γ IMCsと同様に劇症型レンサ球菌に対して細胞応答可能か否かを検討する。仮に細胞応答が正常に回復した場合は、IL-6が、 γ IMCsにおいて劇症型レンサ球菌に対する細胞応答に重要な受容体あるいはシグナル伝達分子の発現に関与するのかが明らかにする。それによって、 γ IMCsにおける劇症型レンサ球菌応答に重要な受容体およびシグナル伝達経路を同定し、さらにそれら受容体あるいはシグナル伝達分子の発現制御機構を明らかにする。

3) 野生型マウス由来 γ IMCsおよび各種欠損マウス由来 γ IMCsのRNA-seq解析

1)、2)においてターゲットとなった分子のロックアウトマウス由来の γ IMCsが、野生型 γ IMCsやIL-6欠損マウス由来 γ IMCsと比較可能な細胞系統であるか否かをRNA-seq解析にて評価する。また、他の自然免疫細胞や未熟骨髄系細胞との違いも明らかにする。

4. 研究成果

1) 野生型マウス由来 γ IMCsおよびIL-6欠損マウス由来 γ IMCsの相違点の解析

野生型マウス由来 γ IMCsおよびIL-6欠損マウス由来 γ IMCsにおいて、Toll様受容体や最近

我々が同定したりポライコ酸アンカーの受容体である Mincle の発現を比較した結果、 γ IMCs における Mincle 発現は IL-6 によって制御されていることが明らかとなった。

2) 劇症型レンサ球菌応答に重要な受容体およびシグナル伝達経路の同定

Mincle 欠損マウスにおいても、野生型マウスや IL-6 欠損マウスと同様に γ IMCs が誘導されることが明らかとなった。In vitro 解析により、野生型マウス由来 γ IMCs および各種欠損マウス由来 γ IMCs のサイトカイン産生を比較した結果、IFN- γ 産生は Mincle 発現およびその下流のシグナルに依存していることが示された。また中和抗体を用いた解析により、IL-6 産生は Toll 様受容体 2 による A 群レンサ球菌の認識に依存していることが示された。In vivo 解析により、劇症型感染 36 時間後に γ IMCs が誘導され、IL-6 を産生し、Mincle の発現上昇が誘導されること、感染 48 時間後にも IL-6 産生は持続され、さらに Mincle の発現が増加し、IFN- γ 産生が顕著に認められることが示された。さらに各種 γ IMCs の宿主防御能を養子細胞移植実験により解析した結果、野生型マウス由来 γ IMCs 以外は宿主防御能が欠如していることが示された。したがって、 γ IMCs における TLR2-IL-6-Mincle 軸による IFN- γ 産生が宿主防御に必須であることが示唆された。以上をまとめると、 γ IMCs における TLR2 および Mincle による A 群レンサ球菌のシークエンシャル・センシング機構が宿主防御に重要であることが明らかとなった。

3) 野生型 γ IMCs および各種欠損 γ IMCs の RNA-seq 解析

RNA-seq による PC 解析から、野生型 γ IMCs、IL-6 欠損 γ IMCs および Mincle 欠損 γ IMCs は同系統の細胞であると共に、各種未熟骨髄系細胞、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、肥満細胞等とは異なる新規細胞であることが確認された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Ikebe T, Matsumura T, Nihonmatsu H, Ohya H, Okuno R, Mitsui C, Kawahara R, Kameyama M, Sasaki M, Shimada N, Ato M, Ohnishi M. Spontaneous mutations in *Streptococcus pyogenes* isolates from streptococcal toxic shock syndrome patients play roles in virulence. *Sci Rep*. 2016 Jun 28;6:28761. doi: 10.1038/srep28761. 査読有

Imai T, Matsumura T, Mayer-Lambertz S, Wells CA, Ishikawa E, Butcher SK, Barnett TC, Walker MJ, Imamura A, Ishida H, Ikebe T, Miyamoto T, Ato M, Ohga S, Lepenies B, van Sorge NM, Yamasaki S. Lipoteichoic acid anchor triggers Mincle to drive protective immunity against invasive group A *Streptococcus* infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018 Nov 6;115(45):E10662-E10671. doi: 10.1073/pnas.1809100115. 査読有

Yoshizawa S, Matsumura T, Ikebe T, Ichibayashi R, Fukui Y, Satoh T, Tsubota T, Honda M, Ishii Y, Tateda K, Ato M. Streptococcal toxic shock syndrome caused by β -hemolytic streptococci: Clinical features and cytokine and chemokine analyses of 15 cases. *J Infect Chemother*. 2019 May;25(5):355-361. doi: 10.1016/j.jiac.2019.01.006. 査読有

Matsumura T, Ikebe T, Arikawa K, Hosokawa M, Aiko M, Iguchi A, Togashi I, Kai S, Ohara S, Ohara N, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K, Takeyama H, Yamasaki S, Takahashi Y, Ato M. Sequential sensing by TLR2 and Mincle directs immature myeloid cells to protect against invasive group A streptococcal infection in mice. *Cell Rep*. 2019 Apr 9;27(2):561-571.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.056. 査読有

[学会発表](計10件)

Takayuki Matsumura and Manabu Ato. IL-6-deficient immature myeloid cells do not contribute to an effective host defense during severe invasive group A streptococcal infections. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 2016

Takayuki Matsumura, Tadayoshi Ikebe, Makoto Ohnishi, and Manabu Ato. IL-6-deficient immature myeloid cells have no protective function against *Streptococcus* infection. 第90回日本細菌学会総会 2017

松村隆之、池辺忠義、大西真、阿戸学. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症における未熟骨髄系細胞の機能解析. 第100回日本細菌学会関東支部会総会 2017

Takayuki Matsumura and Manabu Ato. Balance of pro- and anti-inflammatory cytokines in immature myeloid cells involved in outcome of severe invasive group A *Streptococcus* infections. 第46回日本免疫学会総会・学術集会 2017

Takashi Imai, Takayuki Matsumura, Manabu Ato, Sho Yamasaki. Glycolipids in group A *Streptococcus* are recognized by Mincle to trigger host immune responses. 第46回日本免疫学会総会・学術集会 2017

松村隆之. A 群レンサ球菌感染制御における未熟骨髄系細胞の役割. 第17回微生物研究会「微生物分子生物学のフロンティア」 2018

Takashi Imai, Takayuki Matsumura, Tomofumi Miyamoto, Manabu Ato, Sho Yamasaki,

Shouichi Ohga. Critical role of Mincle in protection against invasive infection by group A Streptococcus. 第 50 回日本小児感染症学会総会・学術集会/第 9 回アジア小児感染症学会学術集会 2018

Takayuki Matsumura, Sho Yamasaki, Manabu Ato, and Yoshimasa Takahashi. The IL-6/Mincle axis in immature myeloid cells is critical to protect against severe invasive group A Streptococcus infection. 第 47 回日本免疫学会総会・学術集会 2018

Takashi Imai, Takayuki Matsumura, Manabu Ato, Tomofumi Miyamoto, Sho Yamasaki, Shouichi Ohga. Group A Streptococcus regulates host immune responses activated via Mincle by changing its lipoteichoic acid anchor. 第 93 回日本感染症学会総会・学術講演会 2019

Takayuki Matsumura, Tadayoshi Ikebe, Makoto Ohnishi, Sho Yamasaki, Yoshimasa Takahashi, and Manabu Ato. The TLR2-IL-6-Mincle axis is essential to protect against severe invasive streptococcal infection. 第 92 回日本細菌学会総会 2019

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/basic-science/465-immunology/8726-imm-2019-1.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：