

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09953

研究課題名(和文) 劇症型肺炎球菌感染症の発症メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of pathogenic mechanism of fulminant pneumococcal infection

研究代表者

常 彬 (CHANG, BIN)

国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官

研究者番号：50370961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：肺炎球菌の劇症型感染症を引き起こすメカニズムを解明するために、ゲノム解析やin vitroとin vivo試験など、様々な側面からの解析を行ってきた。しかし、劇症型感染症および非劇症型感染症に由来する肺炎球菌株の間には明確な違いはみられなかった。劇症型肺炎球菌感染症の発症に、宿主側のファクターが重要な役割を果たすことが考えられる。一方、細菌の病原性を評価するために広く使われている実験系が肺炎球菌に適していない可能性も否定できない。In vivoの実験では、径鼻感染によりC57BL/6 マウスの22F型肺炎球菌の病原性を評価できるため、今後は22F型肺炎球菌を中心に解析を進める予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

(1)肺炎球菌の発症機構の解析により、宿主側のファクターが重要な役割を果たす可能性を見出した。また、劇症型肺炎球菌感染症から多く分離される23F、22F、10A、6Bなど血清型は肺炎球菌ワクチンに含まれているため、予防接種による感染症予防の重要性を再認識でき、今後発信する科学的根拠になる。

(2)本研究はゲノム解析やin vitroとin vivoなどさまざまな実験方法によって肺炎球菌を解析してきた、今後の研究の基礎となる。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the mechanism of Streptococcus pneumoniae that causes fulminant infections, we carried out various analysis from aspects such as genome analysis, in vitro, and in vivo experiments. However, no clear difference could be found between pneumococcal strains isolated from fulminant and non-fulminant infections. It has been suggested that host factors play an important role in the development of fulminant pneumococcal infection. On the other hand, it cannot be denied that the experimental methods widely used for the pathogenicity of bacteria are not suitable for S. pneumoniae. Since the pathogenicity of 22F pneumococci could be evaluated in C57BL/6 mice using nasal administration, we plan to proceed with the analysis focusing on 22F pneumococci in the future.

研究分野：医歯薬学

キーワード：感染症防御学 肺炎球菌 劇症型肺炎球菌感染症 病原性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)は血液培地上で 溶血性を示すグラム陽性球菌で、中耳炎、肺炎、菌血症、髄膜炎などを引き起こす臨床的重要な細菌である。本菌の病原因子として、これまでに莢膜、付着因子、pneumolysin、proteinase などが報告されていた。そのうち、莢膜は食細胞による貪食から免れる役割を果たし、肺炎球菌感染が成立するためにもっとも重要な病原因子と考えられている。

肺炎球菌による感染症は有効な抗生物質の治療によって症状は改善する症例が多いが、近年、劇症型感染症例が多く見られる傾向があり、本菌の性状や病原性について大きな変化があった可能性が示唆される。劇症型感染症の特徴として、肺炎など感染巣がなく突然に発症する、症状の進行が極めて急速で発症から数日以内に死亡するケースが多く見られる。その発症メカニズムを説明するには、

1. 劇症型感染を起こす肺炎球菌の莢膜は特種で、宿主の好中球の貪食に抵抗する作用が強い
2. 薬剤耐性度が高いために難治であり重症化する
3. 宿主側要因として、脾臓摘出術後などのリスクがある患者において、免疫力が低下したため、肺炎球菌感染症が迅速に広がり、劇症化する

など仮説が出されている。しかし、我々が劇症型感染症から分離された肺炎球菌 25 株を解析したところ、これらの菌株は特定の血清型に属さず、莢膜を有しない肺炎球菌による症例もあった。劇症型感染症から分離された肺炎球菌の約 70% の株はペニシリン感受性で、ヒト末梢血由来白血球の貪食に強い抵抗作用は認められなかった。さらに、25 症例中の 23 例 (92%) はリスクがない健常人に突然発症したものであった。また、これらの劇症型感染症例中の約 20% の症例は、他の症状が出現する前に、急激に軟部組織壊死がみられた電撃性紫斑病であった。肺炎球菌は環境には存在せず、また皮膚の常在菌ではないため、このような感染を起こす本菌の感染経路および発症メカニズムは未解決であり、実態を解明することが求められていた。

2. 研究の目的

肺炎球菌による電撃性紫斑病を含む重症化する劇症型感染症の発症機構や肺炎球菌の病原性変化の分子基盤にはまだ説明できない多くのものが残され、病原性を評価できる解析方法は設立されていない。そこで、本研究は劇症型肺炎球菌感染症発症における宿主-細菌相互作用および重症化に係る病原因子について解明できる方法を探索し、研究基盤を作ることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は劇症型肺炎球菌感染症の発症メカニズムの解明およびそれに関連する病原因子を明らかにすることを最終目標として、以下の解析を行った。

1) 全ゲノム解析：

劇症型肺炎球菌感染症由来肺炎球菌のゲノム情報を手がかりに肺炎球菌感染症を重症化する病原因子を探索した。

2) 軟部組織感染における宿主-細菌相互作用の解析：

劇症型感染症由来肺炎球菌、特に電撃性紫斑病から分離された株およびそれらと同一の血清型と Sequence type (ST) タイプを示す非劇症由来肺炎球菌のあいだで、ヒト血管内皮系培養細胞への侵入や細胞内増殖に違いがあるかどうかを調べた。

3) 劇症型肺炎球菌感染症の発症における宿主-細菌相互作用の解析：

劇症型肺炎球菌感染症由来肺炎球菌およびそれらと同一の血清型と ST タイプを示す非劇症由来肺炎球菌のあいだで、炎症反応に関連するサイトカインやケモカインなどの宿主細胞性因子の役割を解明することによって、劇症型肺炎球菌感染症の発症における宿主-細菌相互作用を解明した。

4) 動物感染実験モデルに関する研究：

肺炎球菌が引き起す劇症型感染症に関与するサイトカインやケモカインに応じて、適切なマウスを選択し、肺炎球菌が引き起す劇症型感染症の動物感染モデルの作成および解析を行った。

4. 研究成果

1) 次世代シーケンサーを用いた全ゲノム比較解析

劇症型感染症例より分離された 21 株の肺炎球菌の血清型、薬剤感受性、ST タイプおよび Clonal complex (CC) を決定した (表 1)。また、健常者の後鼻腔から、劇症型感染症患者由来菌と同じ血清型および同一の ST タイプまたは同一の CC タイプを有する肺炎球菌 24 株を選定した。これらの劇症型感染症患者由来 21 株および保菌者由来 24 株の肺炎球菌のゲノム DNA を精製し、次世代シーケンサーによる全ゲノムの解読を行った。得られた配列情報をアセンブリし、他の細菌に比べて、肺炎球菌のゲノムに繰り返しシーケンスやトランスポゾンが多く存在することが明らかとなった。また、肺炎球菌の GC 含量は約 40%で、4 コピーの 5S、16S と 23S rRNA を保有していることが明らかになった。菌株によって、Open reading frames (ORF) の数が異なるが、約 2,000 個 ORF をコードしていた。劇症型感染症例由来株と非劇症型感染症例由来株の ORF の保有状況を比較し、劇症型感染症由来肺炎球菌にあって、非劇症型感染症由来肺炎球菌にはない特異的な ORF の探索を行った。しかし、菌株による ORF の保有状況は多様であり、劇症型感染症由来株に特異的な ORF を抽出できなかった。さらに、肺炎球菌の病原性に関連すると報告されているファクターのアミノ酸配列を比較し、劇症型感染症由来株にあり、非劇症型感染症由来株では異なる配列または機能しない病原因子などについて探索を行ったが、特異的な病原因子が特定できなかった。

表 1. 劇症型感染症例由来肺炎球菌の血清型、ペニシリン G に対する MIC、Sequence type (ST) および Clonal complex (CC)

Case no.	Year of isolation	Serotype of <i>S. pneumoniae</i>	MIC to PCG ($\mu\text{g/mL}$)	ST	CC
C1	2004	10A	0.06	5236	5236
C2	2004	19F	2	7774	236
C3	2003	22F	0.25	7158	7158
C4	2004	4	0.06	246	246
C5	2004	22F	0.06	6875	5236
C6	2006	10A	≤ 0.015	5236	5236
C7	2007	23F	0.25	1437	1437
C8	2007	19A	0.03	2331	2331
C9	2008	4	≤ 0.015	7776	7776
C10	2008	untypeable	≤ 0.015	5872	5872
C11	2008	23F	1	242	242
C12	2010	23F	1	5246	338
C13	2010	23F	1	242	242
C14	2011	6A	0.12	3787	3787
C15	2011	23F	0.5	1437	1437
C16	2011	3	0.06	180	180
C17	2011	19A	0.06	3111	3111
C18	2011	6B	0.06	2983	2983
C19	2012	6B	0.06	2983	2983
C20	2012	22F	≤ 0.015	433	433
C21	2013	10A	0.03	5236	5236

2) 軟部組織感染における宿主-細菌相互作用の解析

肺炎球菌の劇症型感染症を引き起こすメカニズムを解明するため、ヒト好中球系細胞に分化させた HL60 細胞およびヒト血管内皮系培養細胞 EA.hy 926 細胞を用いて感染実験を行った。劇症型感染症患者および保菌者由来の同一の血清型と ST タイプ肺炎球菌を培養細胞に感染させ、細胞内での生存性を比較した。その結果、莢膜をもつだけで、肺炎球菌は各培養細胞の貪食を防御し、細胞内に侵入できにくくなっている。細胞内菌数が少ないため、再現性も取れにくく、生存性を比較することは十分にできなかった。培養細胞に侵入しやすくするために、肺炎球菌の各莢膜抗原に特異的な抗血清を用いて、その抗原性をブロックする前処理を行った。抗原性をブロックした劇症型感染症患者および保菌者由来肺炎球菌を、さらに HL60 および EA.hy 926 細胞に感染させ、細胞への侵入率が高まるかどうか、安定した侵入率が得られるかどうかを評価した。その結果、細胞に侵入できる菌数の増加が認められず、生存性に変化が見られなかった。

3) 動物感染実験モデルに関する研究

肺炎球菌の生存性を評価する *in vitro* での実験では、劇症型肺炎球菌感染症および非劇症型肺炎球菌感染症由来菌株の細胞内生存性を比較できなかったため、マウスを用いて *in vivo* 実験を実施した。劇症型肺炎球菌感染症から分離された血清型 23F (5 株)、22F (4 株)、10A (2

株)、6A (1 株)、6B (1 株) 型肺炎球菌計 13 株を、C57BL/6 マウスへ経鼻感染し、14 日間のマウスの体重減少および生死を観察した。その結果、すべての 23F、10A 型肺炎球菌に感染したマウスには明らかな変化がみられなかった。22F 型肺炎球菌の 4 株のうち 3 株および 6A 型肺炎球菌 1 株に感染した後、マウスの死亡および体重減少が観察された。22F 型肺炎球菌の残りの 1 株に感染した後のマウスの変化は観察されなかった。6B 型肺炎球菌による感染後、体重減少は 1 匹のマウスでのみ観察され、マウスの個体差による可能性があると考えられた。以上の結果から、22F 型肺炎球菌の病原性は C57BL/6 マウスの経鼻感染により評価可能である。今後、劇症型肺炎球菌感染症および非劇症型肺炎球菌感染症由来肺炎球菌のマウスでの病原性の違いをさらに検討する予定である。

4) 劇症型肺炎球菌感染症の発症における宿主-細菌相互作用の解析

肺炎球菌の感染による宿主側の防御反応を調べるために、マウスマクロファージ様培養細胞である J774.1 を用いて、*in vivo* の実験で強い病原性を示した 22F 型肺炎球菌の培養細胞におけるサイトカインの mRNA の発現量の評価を行った。IL-6 が肺炎球菌感染によって誘発されることはよく知られているため、まず IL-6 の発現量を測定した。その結果、IL-6 の発現量は感染した肺炎球菌の菌量に依存していた。しかし、劇症型肺炎球菌感染症および非劇症型肺炎球菌感染症由来株による IL-6 の発現量はほぼ同じで、菌株間には差がなかった (図 1)。今後、肺炎球菌の株数、細胞の種類、サイトカインやケモカインなどの宿主細胞性因子の種類を増やしてさらに検討する必要がある。

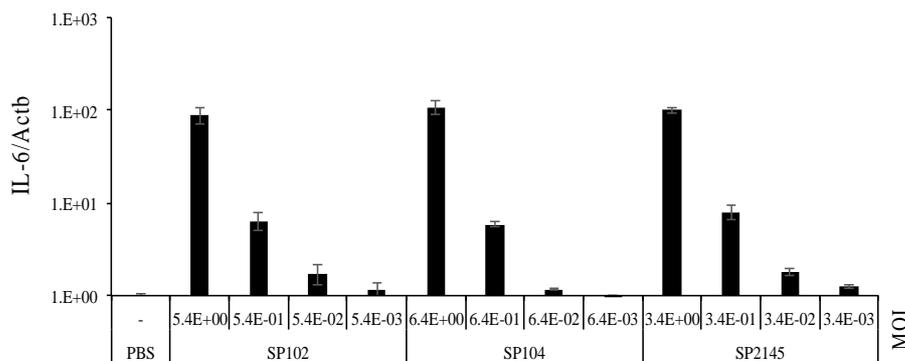


図1. 22F 血清型肺炎球菌によるサイトカイン IL-6 の誘発

本研究は肺炎球菌の劇症型感染症を引き起こすメカニズムを解明するために、ゲノム解読や *in vitro* と *in vivo* 試験など、様々な側面からの解析を行ってきた。しかし、劇症型感染症および非劇症型感染症由来肺炎球菌株の間には明確な違いは認められなかった。劇症型肺炎球菌感染症の発症に、宿主側のファクターが重要な役割を果たすことが示唆され、宿主側に焦点を当て解析を継続する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Chang B, Morita M, Lee K, Ohnishi M	4. 巻 8
2. 論文標題 Complete genome sequence of a sequence type 4846 Streptococcus pneumoniae serotype 12F strain isolated from a meningitis case in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e01632-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.01632-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chang B, Morita M, Lee KI, Ohnishi M	4. 巻 56
2. 論文標題 Whole-Genome Sequence Analysis of Streptococcus pneumoniae Strains That Cause Hospital-Acquired Pneumonia Infections	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Microbiology	6. 最初と最後の頁 e01822-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1128/JCM.01822-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----