

令和元年6月11日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21396

研究課題名(和文) 顕在化しつつある無莢膜型肺炎球菌の病原性の解明

研究課題名(英文) Molecular characterization of non-encapsulated Pneumococci

研究代表者

輪島 丈明 (Wajima, Takeaki)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00516669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：PspK保持無莢膜株の出現と増加が報告されている。そこで、この要因を明らかにするため研究を行った。まず、pspKを耐性遺伝子に置換した株を作成した。この株のゲノムと莢膜保持株を混合したところ、高頻度で莢膜の脱落が認められた。また、莢膜脱落株は保持株と比較し、フィットネスが高かった。さらに、pspK保持無莢膜株の貪食抵抗性、付着能、バイオフィーム形成能を検討した。その結果、pspK保持株は貪食抵抗性が低かったが、付着能とバイオフィーム形成能が高かった。すなわち、莢膜保持株はpspKの獲得により無莢膜化し、無莢膜株はフィットネス、定着性、バイオフィーム形成能が高いことで増加したことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺炎球菌の無莢膜型株はこれまで病原性がないとされほとんど注目されてこなかった。しかし、ワクチンの導入とともにpspK保持無莢膜株が顕在化してきている。本研究から、莢膜保持株は無莢膜株のゲノムDNAを取り込み、容易に無莢膜化すること、無莢膜型株は莢膜保持株と比較し、フィットネス、付着性、バイオフィーム形成能が高く生存しやすいことが示唆された。すなわち、本研究結果は、無莢膜株がワクチンからのエスケープ機構になることを示唆するものであり、無莢膜株にも注目すべきであることを示すものである。

研究成果の概要(英文)：pspK-harboring nonencapsulated pneumococci (pspK+NESP) have emerged, and their occurrence has been gradually increasing. This study aimed to determine the cause of the spread of pspK+NESP. First, a pspK-deletion strain (pspK) was constructed by replacing pspK with ermB. Purified genomic DNA from pspK was mixed with encapsulated pneumococci. Consequently, the capsule region was lost, and the encapsulated strain became NESP. The NESP strain has a higher fitness than that of the parent strain. Resistance to phagocytosis by macrophages, ability to adhere to epithelial cells, and biofilm formation were also assessed. pspK+NESP did not show resistance to phagocytosis, but did show greater epithelial cell adherence and biofilm formation. Taken together, encapsulated pneumococci can become NESP by acquiring pspK, and the increasing prevalence of NESP could be attributed to greater fitness, host cell adherence, and biofilm formation.

研究分野：臨床微生物学、感染症学

キーワード：無莢膜型肺炎球菌 形質転換 PspK ワクチン

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

1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌は小児において髄膜炎、肺炎、敗血症などを引き起こし、世界中で年間 70 から 100 万人が死亡している。本菌は莢膜を持つ菌(莢膜保持株)と持たない菌(無莢膜株)が存在し、莢膜は病原因子として重要である。実際、グリフィスによる肺炎球菌の形質転換の証明は、莢膜保持株は病原性が高く、無莢膜株は病原性がないことを利用したものであった。すなわち、無莢膜株は病原性がないとされ、ほとんど注目されていない。しかし、無莢膜株による結膜炎や中耳炎の感染症が報告されている。

肺炎球菌では、重症感染症を防ぐために 7 価、13 価の莢膜結合型ワクチンが定期接種化されている。我々は、ワクチンの有用性を調査するために、肺炎球菌の臨床分離株を経年的に収集し、莢膜型の変化を調査してきた。これまで諸外国で報告されている通り、ワクチン導入に伴い、ワクチンに含まれている型(ワクチン型)の有意な減少とワクチンに含まれていない型(非ワクチン型)の有意な増加が認められた。さらに、非ワクチン型中の無莢膜株の割合が増加していることを見出した。

この無莢膜株の莢膜型コード領域を解析すると、2012 年に報告された *pspK* がトランスポゾンに挟まれた状態で、莢膜決定領域に存在していた。PspK は、これまでの報告で病原性因子としてはたらくことが示唆されている。すなわち、肺炎球菌が莢膜を失い PspK を獲得することは、肺炎球菌のワクチンに対するエスケープ機構である可能性が考えられる。

2. 研究の目的

無莢膜株の *pspK* 獲得が肺炎球菌のワクチンからのエスケープ機構であると仮定すると、PspK は莢膜と類似した機能(貪食抵抗性など)を保持していると考えられる。また、PspK は表層タンパク質であり、組織付着性などにも寄与している可能性が考えられる。そこで、本研究では、PspK に着目し、生体内での機能を明らかにすることを 1 つ目の目的とする。

さらに、肺炎球菌は自然形質転換能を持ち外来遺伝子を獲得しやすいことが知られている。そこで、莢膜の脱落と *pspK* の獲得が起こり得るのか否かを肺炎球菌の自然形質転換能を利用して、*in vitro* で検証することを 2 つ目の目的とする。

すなわち、これらを明らかにすることで、*pspK* 獲得が肺炎球菌のワクチンからのエスケープ機構となり得るのか否かを解明することを目指す。

3. 研究の方法

1. *pspK* 欠損株の作成

PspK の付着性、貪食抵抗性に対する寄与を検討するために、肺炎球菌の形質転換能を利用し、*pspK* を保持した無莢膜株の *pspK* の欠損株を作成した(図 1)。まず、*pspK* の上流と下流の相同性配列を PCR で増幅させたのち、エリスロマイシン耐性遺伝子 *ermB* と連結させ、相同性配列を含んだエリスロマイシン耐性カセットを作成した。作成したカセットをコンピテンス刺激因子(CSP)存在下で無莢膜型肺炎球菌に形質転換し、相同組換えを起こさせ、クリンダマイシン含有培地で選択することで欠損株を得た。

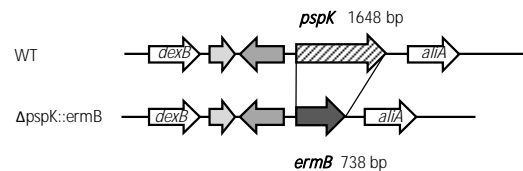


図 1. 欠損株作成

2. 貪食抵抗性、付着性の確認

pspK 欠損株と野生株を用いて貪食抵抗性と付着性に関する寄与を明らかにするために、マクロファージによる貪食抵抗性ならびに上皮細胞に対する付着性を検討した。貪食抵抗性は、ヒトマクロファージ細胞株 THP-1 と菌を共培養し、ゲンタマイシンアッセイにより細胞内の菌数及びその経時的推移を検討した。さらに、共焦点レーザー顕微鏡を用い、貪食像を観察した。上皮細胞付着性に関しては、A549 細胞に対する付着性を検討した。

3. バイオフィーム形成能

pspK のバイオフィーム形成に対する寄与を検討するために、クリスタルバイオレット法でバイオフィーム形成能を検討した。

4. PspK の精製

PspK の相互作用因子を同定するために、GST タグ融合タンパク質を作成した。シグナルペプチドを除いた *pspK* を pGEX-4T にクローニングし、GST タグ融合タンパク質として大腸菌 BL21 で発現させ、グルタチオンカラムを用い GST-PspK を精製した。さらに、thrombin を用いてタグを除去し、ウサギに免疫することで抗 PspK ポリクローナル抗体を作成した。

5. 莢膜型と無莢膜型株ゲノムでの組換え頻度の測定

実際に、莢膜保持株の莢膜が脱落して *pspK* の獲得が起こるのか否か検討するために、*pspK* 欠損株のゲノム DNA を抽出し、CPS 共存下で莢膜保持株と混合したのち、クリンダマイシン含有培地に塗抹した。得られた株について、莢膜領域のシークエンスを行うとともに、莢膜染色、

抗血清をもちいた凝集反応により莢膜の有無を検討した。

4. 研究成果

1. *pspK* 欠損株の作成と莢膜保持株の無莢膜化

pspK の ORF を *ermB* に置換した株 ($\Delta pspK$) を作成した。さらに、 $\Delta pspK$ のゲノム DNA 抽出しを各種莢膜保持株と共存させ、形質転換を起こさせたところ、 10^{-4} から 10^{-5} と高頻度に *ermB* 保持株が得られた (表 1)。この形質転換体について、コロニー形態を観察したところ、無莢膜株に特有のラフ型のコロニーを形成していた。さらに、ヒス染色により莢膜を染色したところ、いずれの形質転換体も莢膜を保持しておらず、無莢膜化したことが明らかとなった (莢膜脱落株)。

表 1. 無莢膜株ゲノムを用いた無莢膜化頻度

Strain	Serotype	Frequency (\pm SD)
SP3564	19F	$8.74 \pm 6.53 \times 10^{-5}$
SP2727	14	$1.94 \pm 2.45 \times 10^{-4}$
R6	None	$2.47 \pm 2.95 \times 10^{-4}$

さらに、莢膜脱落株と親株を比較したところ、莢膜脱落株は親株と比較し、増殖能が高いことがあきらかとなった。すなわち、莢膜脱落株は、Fitness が高いことが示された。

2. *pspK* の貪食抵抗性、付着性に対する影響

作成した *pspK* 保持無莢膜株、 $\Delta pspK$ 、莢膜保持株、莢膜脱落株を用いてヒトマクロファージ細胞株 THP-1 に対する貪食抵抗性ならびにヒト肺胞上皮細胞株 A549 細胞に対する付着性を検討した。その結果、莢膜保持株は貪食抵抗性が認められたものの、無莢膜株は *pspK* の有無にかかわらず、貪食された。同様に、無莢膜株を用いた場合、共焦点レーザー顕微鏡で貪食像が認められた。一方で、付着性に関しては、莢膜保持株より莢膜脱落株が有意に付着し、*pspK* 保持株はさらに付着性が高いことが明らかとなった (図 2)。

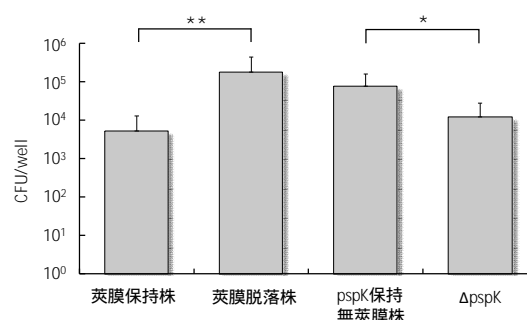


図 2. A549 細胞に対する付着性

3. バイオフィーム形成能

バイオフィーム形成能を検討したところ、無莢膜株は莢膜保持株よりも形成能が高かった。しかし、*pspK* の有無で形成能に変化はなく、*pspK* 以外にバイオフィーム形成に関与する因子があることが示唆された。

以上のことから、莢膜保持は、肺炎球菌にとって宿主内での貪食抵抗性が与えられる一方で、fitness cost が上がることが示された。また、莢膜保持株は近年増加している *pspK* 保持無莢膜株のゲノムを取り込むことで容易に無莢膜化することが明らかとなった。*pspK* を保有することで付着性が高まることから、fitness の高さと付着性の高さが *pspK* 保持無莢膜株の増加要因となっていることが示唆された。今後は、*pspK* 保持無莢膜株の病原性について明らかにする必要がありと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

1. Seyama S, Wajima T, Nakaminami H, Noguchi N. Clarythromycin resistance mechanisms of epidemic β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*, 66, 2016, 3207-3210. (査読有り) DOI: 10.1128/AAC.00163-16
2. Morozumi M, Wajima T, Takata M, Iwata S, Ubukata K. Molecular characteristics of group B Streptococci isolated from adults with invasive infections in Japan. *J Clin Microbiol*, 54, 2016, 2695-2700. (査読有り) DOI: 10.1128/JCM.001183-16
3. Yamada T, Wajima T, Nakaminami H, Kobayashi K, Ikoshi H, Noguchi N. The modified Gingyo-san, a Chinese herbal medicine, has direct antibacterial effects against respiratory pathogens. *BMC Complement Altern Med*, 16, 2016, 463. (査読有り) DOI: 10.1186/s12906-016-1431-3
4. Seyama S, Wajima T, Yanagisawa Y, Nakaminami H, Ushio M, Fujii T, Noguchi N. Rise in *Haemophilus influenzae* with reduced quinolone susceptibility and development of a simple screening method. *Pediatr Infect Dis J*, 36, 2017, 263-266. (査読有り) DOI: 10.1097/INF.0000000000001415
5. Seyama S, Wajima T, Nakaminami H, Noguchi N. Amino acid substitution in the major

- multidrug efflux transporter protein *acrB* contributes to low susceptibility to azithromycin in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 61, 2017, e01337-17. (査読有り)
DOI: 10.1128/AAC.01337-17
6. Noguchi N, Fukuzawa M, Wajima T, Yokose K, Suzuki M, Nakaminami H, Kawai T, Moriyasu F, Sasatsu M. Specific clones of *Staphylococcus lugdunensis* may be associated with colon carcinoma. *J Infect Public Health*, 11, 2018, 39-42. (査読有り)
DOI: 10.1016/j.jiph.2017.03.012
 7. Hara N, Wajima T, Seyama S, Tanaka E, Shirai A, Shibata M, Natsume Y, Shiro H, Noguchi N. Isolation of multidrug-resistant *Haemophilus influenzae* harbouring multiple exogenous genes from a patient diagnosed with acute sinusitis. *J Infect Chemother*, 25, 2019, 385-387. (査読有り)
DOI: 10.1016/j.jiac.2018.09.015
 8. Tanaka E, Hara N, Wajima T, Ochiai S, Seyama S, Shirai A, Shibata M, Shiro H, Natsume Y, Noguchi N. Emergence of *Haemophilus influenzae* with low susceptibility to quinolones and persistence in tosufloxacin treatment. *J Glob Antimicrob Resist*, 2019, in press. (査読有り)
DOI: 10.1016/j.jgar.2019.01.017
 9. Suzuki S, Osato R, Wajima T, Hasebe T, Ishikawa H, Mitsumori H, Nakaminami H, Noguchi N. The impact of the introduction of a 13-valent pneumococcal vaccine on pneumococcal serotypes of non-invasive isolates from 2007 to 2016 at a teaching hospital in Japan. *J Med Microb*, 2019, in press. (査読有り)
DOI: 10.1099/jmm.0.000992

[学会発表](計 15 件)

1. 鬼怒川 玲奈、輪島 文明、山田 哲也、猪越 英明、野口 雅久. 田七人參エキス末は抗化膿レンサ球菌活性を有する. 第 60 回 日本薬学会関東支部会. 2016.
2. 石川 春奈、輪島 文明、野口 雅久. 相同組換えによる肺炎球菌の無莢膜化メカニズム. 日本薬学会第 137 年会. 2017.
3. 三森 ひかり、輪島 文明、野口 雅久. 口腔内レンサ球菌から肺炎球菌へのキノロン耐性の伝播. 日本薬学会第 137 年会. 2017.
4. 佐伯 成美、輪島 文明、瀬山 翔史、中南 秀将、野口 雅久. 臨床分離されたβ溶血性レンサ球菌の分子疫学的特徴と薬剤耐性伝播. 日本薬学会第 137 年会. 2017.
5. 瀬山 翔史、輪島 文明、中南 秀将、野口 雅久. The 327th amino acid substitution of AcrB in *Haemophilus influenzae* confers to azithromycin resistance. 第 90 回 日本細菌学会総会. 2017.
6. Svensson M, Snäll J, Wajima T, Siemens N, Bergsten H, Norrby-Teglund A. Using human organotypic skin model to severe streptococcal infection. 20th Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal diseases, 2017.
7. Schwarz-Linek U, Yu W-H C, Ackermann K, Bode BE, Farndale RW, Wajima T, Norrby-Teglund A. Not a coiled coil: structural and functional characterization of the hypervariable region of M3. 20th Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal diseases, 2017.
8. Seyama S, Wajima T, Nakaminami H, Noguchi N. Amino acid substitution of AcrB contributes to azithromycin resistance in *Haemophilus influenzae*. FEMS2017, 2017.
9. Nakaminami H, Ito A, Takadama S, Wajima T, Fujii T, Noguchi N. Emergence of novel ST5 clones contributes to dynamic clonal change of healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Japan. ASM Microb 2017, 2017.
10. 瀬山 翔史、輪島 文明、野口 雅久. Macrolide 低曝露による clarythromycin 耐性 *Haemophilus influenzae* の高頻度出現. 第 65 回日本化学療法学会総会, 2017.
11. 鈴木 詩織、輪島 文明、中南 秀将、野口 雅久. ワクチン導入前後における肺炎球菌の莢膜型と薬剤感受性の変化. 日本薬学会第 138 年会, 2018.
12. 輪島 文明、石川 春奈、鈴木 詩織、中南 秀将、野口 雅久. 13 価肺炎球菌結合型ワクチン導入以後に顕在化した無莢膜型肺炎球菌の特徴. 第 30 回微生物シンポジウム, 2018.
13. Wajima T, Ishikawa H, Suzuki S, Matsuzawa AI, Nakaminami H, Noguchi N. non-encapsulation of pneumococci as a potential evasion mechanism from vaccines. IDweek2018, 2018.
14. 輪島 文明、野口 雅久. *pspK* 領域獲得は肺炎球菌の無莢膜化を引き起こす. 第 67 回 日本感染症学会東日本地方会学術集会, 2018.
15. 松澤 茜、輪島 文明、鈴木 詩織、野口 雅久. PspK 保有無莢膜型肺炎球菌は定着しうるか - 莢膜保持株との比較解析 -. 日本薬学会第 139 年会, 2019.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。