

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17317

研究課題名(和文) A群レンサ球菌による小児咽頭炎重症化機構の分子解析

研究課題名(英文) Molecular analysis of infectious spreading mechanisms of children's pharyngitis by group A streptococcus

研究代表者

黒澤 美絵 (Kurosawa, Mie)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：70792282

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)：A群レンサ球菌による咽頭炎は学童期の小児に多く発症し、近年では国内における患者報告数が急増している。そのA群レンサ球菌はCAMP factor (CF) という毒素を細胞外に分泌する。本研究ではまず、細菌毒素CFがA群レンサ球菌の咽頭上皮細胞への付着・侵入を促進することを示した。次いで、細菌毒素CFは毒素単独では細胞膜に局在するが、A群レンサ球菌をさらに感染させると細胞室内に移行することが明らかとなった。さらに、細菌毒素CFは貪食に関する細胞内シグナルを活性化させることも提示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、A群レンサ球菌による咽頭炎予防のためのワクチンは実用化されていない。本申請研究は、A群レンサ球菌の産生する細菌毒素CFにより本菌の咽頭上皮細胞への付着・侵入が亢進することで本菌の組織内侵入が惹起され、咽頭炎発症の一助となることが示唆された。本結果より、細菌毒素CFを抗原とする咽頭炎予防ワクチン開発の可能性が示された。本申請研究の成功を通じて、小児における咽頭炎発症ならびに重症化の予防研究へ発展させ、歯科学が主導となり口腔関連感染症の医療費削減にも寄与し、社会的な貢献を果たしたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：Group A streptococcus is a bacterium that causes children's pharyngitis, and recently, the number of patient-reported has increased rapidly in Japan. Group A streptococcus secretes CAMP factor. In this study, we revealed that CAMP factor promoted streptococcal adhesion and invasion in pharyngeal epithelial cells. CAMP factor initially localized on the cell membranes and then became internalized in the cytosol following bacterial infection. Additionally, CAMP factor activated signaling pathway that involved in phagocytosis.

研究分野：小児歯科学

キーワード：小児 咽頭炎 A群レンサ球菌

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

小児は免疫機能が未成熟なため、病原微生物に対して易感染性であることが多い。A群レンサ球菌による咽頭炎は、口腔および鼻腔を感染起点とする疾患であり、小児が罹患する咽頭炎のうち15～30%はA群レンサ球菌が原因であるとされる。2000年代の我が国では、A群レンサ球菌性の咽頭炎小児患者の報告者数は、年間約10万であった。しかしながら、2010年以降は年間約20万、そして2015年では40万を超えたと推計されている。さらに、A群レンサ球菌感染症に続発する侵襲性病態患者とその死亡者数も、集計以来の最高値を毎年更新している。そのため、A群レンサ球菌感染症の発症機構の解明と病因論に基づいた有効な制御法の確立が望まれている。一方で、医科領域における研究は活発でなく、口腔を経由して感染が成立するため、国内外で歯学研究者がA群レンサ球菌の中心的な研究を担っている。

### 2. 研究の目的

研究代表者が研究テーマとしているレンサ球菌属は、ヒトの口腔や鼻腔から感染し、齲蝕・咽頭炎・肺炎等を引き起こす。その中でも、A群レンサ球菌は小児が罹患する咽頭炎の主要な起因微生物である。また、A群レンサ球菌に続発する劇症型レンサ球菌感染症の患者数ならびにその死亡者数も、年々増加の一途をたどっている。しかしながら、わが国の医学領域では、同菌の病原性に関する分子解析を行う医学研究者はほとんどいない。さらに、同菌はインフルエンザウイルスに似た多彩なバリエーションを有しているため、全てのA群レンサ球菌に効果的なワクチンの開発ができず、現在は感染後に抗菌薬による治療を行うことが多い。A群レンサ球菌性の咽頭炎ではペニシリン系抗菌薬が第一選択になるが、抗菌薬の頻用により、今後ペニシリン耐性菌が増加する可能性はある。そこで、本研究では、A群レンサ球菌感染症の発症機構の解明と病因論に基づいた有効な制御法開発の基盤確立を目指すこととした。

A群レンサ球菌は、宿主免疫細胞の機能を低下させる多様な病原因子を産生することにより、組織内への侵入と増殖を可能にし、各種の毒素性因子を発現させることで感染を拡大すると考えられる。本申請の対象であるA群レンサ球菌は、細菌毒素CFを有している。しかし、細菌毒素CFは他細菌の溶血反応の補助的な増強作用が1990年代に報告されているのみであり、近年は詳細な機能解析は行われていなかった。そこで申請者は、分子生物学の新手法でA群レンサ球菌の細菌毒素CFが免疫細胞に及ぼす影響について研究を進めた。その結果、細菌毒素CFはマクロファージ細胞に対して、細胞周期を停止させることで空胞を形成し、そして貪食能を低下させることを明らかにした（図1：Kurosawa. et al., *Microbes Infect.* 18: 118-27, 2016）。

皮膚に尋常性痤瘡を惹起することで知られるアクネ菌も、細菌毒素CFを保有しており、赤血球膜に多量体を形成し、他細菌の溶血反応を増強することが明らかにされている。アクネ菌の細菌毒素CFは、A群レンサ球菌の細菌毒素CFと高いアミノ酸相同性を示すことが報告されているほか、ヒト細胞への菌の侵入を促進することも明らかにされている。そこで、申請者は咽頭炎発症の第一段階であるヒト咽頭上皮細胞へのA群レンサ球菌の付着・侵入に細菌毒素CFが関与しているという仮説を立て、検証することとした。

### 3. 研究の方法

劇症型レンサ球菌感染症患者から分離されたA群レンサ球菌SSI-9株およびA群レンサ球菌の細菌毒素CF遺伝子欠失株を実験に供した。

- 1) ヒト咽頭癌由来Detroit562細胞にA群レンサ球菌SSI-9株のCF遺伝子欠失株を血清無添加の条件下で2時間感染させた。同細胞に付着・侵入した菌を羊血液寒天培地に播種し、コロニーカウント法で菌数を測定した。
- 2) Detroit562細胞に細菌毒素CFの組換え体を1時間作用させた後、A群レンサ球菌CF遺伝子欠失株を血清無添加の条件下で2時間感染させた。同細胞に付着・侵入した菌を羊血液寒天培地に播種し、コロニーカウント法で菌数を測定した。
- 3) Detroit562細胞に細菌毒素CFの組換え体を1時間作用させた後、A群レンサ球菌CF遺伝子欠失株を2時間感染させた。同細胞に対して、抗CF抗体を用いた免疫染色を行い細菌毒素CFの局在を共焦点レーザー顕微鏡にて蛍光イメージング解析した。
- 4) 異物が細胞内に侵入する際に関連があるとされる細胞の食作用亢進(PI3K/Akt経路に

における関連酵素の活性評価)に着目し、細菌毒素 CF による Detroit562 細胞の細胞膜変化について生化学的に解析した。Detroit562 細胞に A 群レンサ球菌 SSI-9 野生株、CF 遺伝子欠失株、または細菌毒素 CF の組換え体を 0~15 分作用させ、その細胞溶解物に対して western blotting 解析を行った。

5) 4)と同様の条件下にて ELISA 解析を行い、PI3K 活性化および Akt リン酸化の定量評価を行った。

#### 4. 研究成果

1) CFSE にて染色し緑色に可視化した A 群レンサ球菌野生株およびフィブロネクチン結合タンパク欠失株(ネガティブコントロール)では、細胞への付着・侵入した菌が多く認められたが、細菌毒素 CF 欠失株では付着・侵入した菌が少なかった(図 1A)。また、コロニーカウント法の結果においても、A 群レンサ球菌 CF 遺伝子欠失株では野生株と比較して、Detroit562 細胞への付着と侵入菌数が有意に少なかった(図 1B)。これらの結果より、血清無添加の条件下において細菌毒素 CF が Detroit562 細胞への付着・侵入に関与している可能性が示唆された。

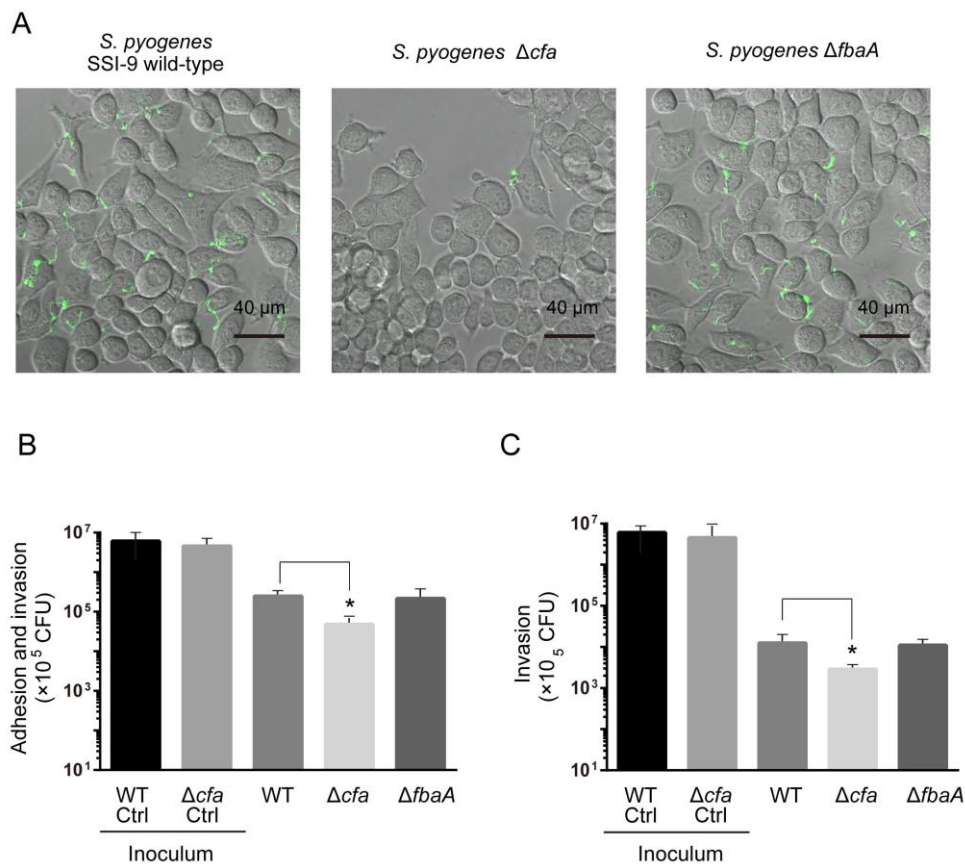


図 1: A 群レンサ球菌の Detroit562 細胞への付着・侵入 (*S. pyogenes*; A 群レンサ球菌、WT; 野生型、 $\Delta cfa$ ; 細菌毒素 CF 欠失株、 $\Delta fbaA$ ; A 群レンサ球菌フィブロネクチン結合タンパク欠失株)

2) 血清無添加の条件下において、A 群レンサ球菌 CF 遺伝子欠失株の Detroit562 細胞への侵入数は細菌毒素 CF の添加濃度依存的に増加した(図 2)。しかしながら、血清を添加した条件下では細胞への侵入菌数に有意な差は認められなかった。咽頭や鼻腔には血清が存在している可能性が低いことを考えると、細菌毒素 CF は従来の血清依存型の付着・侵入因子による新たな機序の付着・侵入因子である可能性がある。

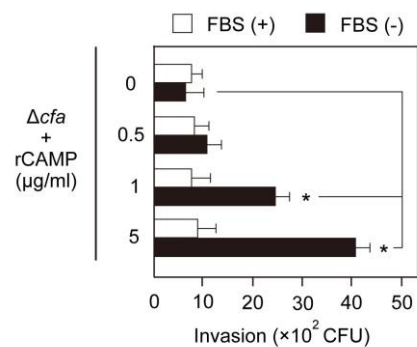


図 2: Detroit562 細胞への A 群レンサ球菌の付着侵入における細菌毒素 CF の影響 (FBS; ウシ胎児血清、rCAMP; 細菌毒素 CF)

- 3) 血清無添加の条件下で細菌毒素 CF 単独で **Detroit562** 細胞に作用させると、細菌毒素 CF は細胞膜上に集積した (図 3A)。しかしながら、血清を添加した条件では細菌毒素 CF の集積は認められなかった。また、細胞に細菌毒素 CF と A 群レンサ球菌 CF 遺伝子欠失株を作用させると、細胞膜上に集積していた細菌毒素 CF は細胞内に侵入した (図 3B)。

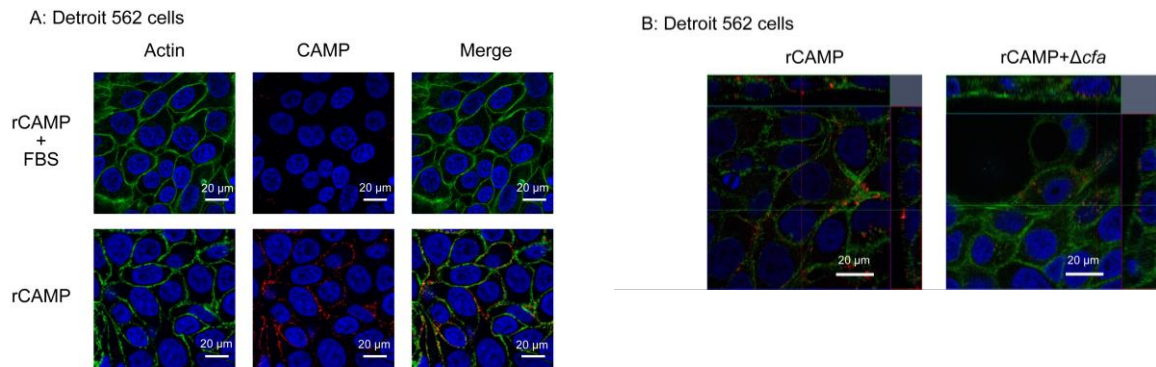


図 3 : Detroit562 細胞における細菌毒素 CF の局在

- 4) A 群レンサ球菌 CF 遺伝子欠失株感染細胞内において Akt のリン酸化はほとんど認められなかった (図 4A)。しかしながら、A 群レンサ球菌 SSI-9 野生株または細菌毒素 CF を作用させた細胞では、Akt のリン酸化が観察された。さらに、PI3K 阻害剤 (LY294002) の添加により、Detroit562 細胞内の Akt リン酸化は抑制された (図 4B)。
- 5) ELISA において、A 群レンサ球菌 SSI-9 野生株または細菌毒素 CF を作用させた Detroit562 細胞では、PI3K の活性化、および Akt のリン酸化が認められた (図 4C, F)。さらに、PI3K 阻害剤 (LY294002、Wortmannin)、および Akt 阻害剤 (MK-2206) の添加により、Detroit562 細胞内の PI3K 活性化および Akt リン酸化は抑制された (図 4D, E, G, H)。

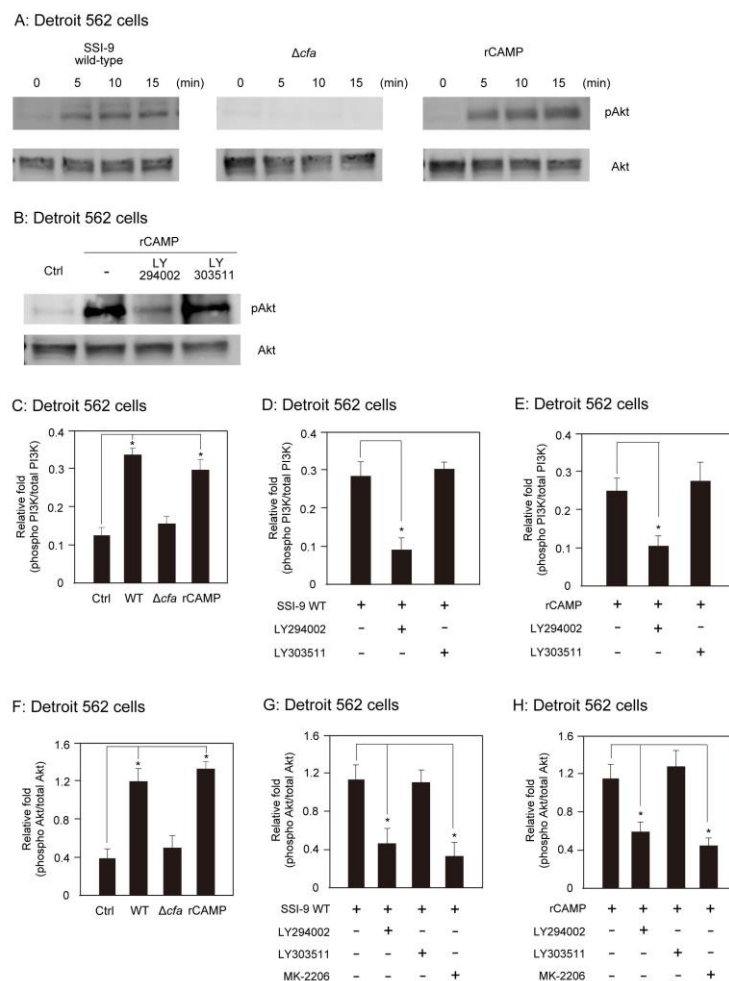


図 4: 細菌毒素 CF による Detroit562 細胞の PI3K/Akt 経路の活性化

以上の結果より、A 群レンサ球菌の細菌毒素 CF は、咽頭上皮細胞の PI3K/Akt 経路を活性化することにより、同菌の細胞内への付着・侵入を亢進させることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 4 件）全て査読有り

(1) Kurosawa M, Oda M, Domon H, Isono T, Nakamura Y, Saitoh I, Hayasaki H, Yamaguchi M, Kawabata S, Terao Y: *Streptococcus pyogenes* CAMP factor promotes calcium ion uptake in RAW264.7 cells. *Microbiol Immunol* 62(10): 617-623, 2018.

(2) Oda M, Kurosawa M, Yamamoto H, Domon H, Kimura T, Isono T, Maekawa T, Hayashi N, Yamada N, Furue Y, Kai D, Terao Y : Sulfated vizantin induces formation of macrophage extracellular traps. *Microbiol Immunol* 62(5): 310-316, 2018.

(3) Kurosawa M, Oda M, Domon H, Isono T, Nakamura Y, Saitoh I, Hayasaki H, Yamaguchi M, Kawabata S, Terao Y: *Streptococcus pyogenes* CAMP factor promotes bacterial adhesion and invasion in pharyngeal epithelial cells without serum via PI3K/Akt signaling pathway. *Microbes Infect* 20(1): 9-18, 2018.

(4) Oda M, Domon H, Kurosawa M, Isono T, Maekawa T, Yamaguchi M, Kawabata S, Terao Y: *Streptococcus pyogenes* phospholipase A2 induces the expression of adhesion molecules on human umbilical vein endothelial cells and aorta of mice. *Front Cell Infect Microbiol* 7:300, doi: 10.3389/fcimb.2017.00300, 2017.

〔学会発表〕（計 2 件）

(1) 黒澤美絵, 小田真隆, 土門久哲, 齊藤一誠, 早崎治明, 寺尾 豊 : *Streptococcus pyogenes* の咽頭上皮細胞株への付着・侵入における CAMP factor と PI3K/Akt 経路との関連. 第 49 回レンサ球菌研究会, 新潟, 2017 年 6 月 17 日.

(2) 黒澤美絵 : 小児の口腔と感染症との関わり. 第 56 回新潟県小児保健研究会, 新潟, 2017 年 9 月 6 日.

〔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

<http://www.dent.niigata-u.ac.jp/pedo/pedo.html>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

研究代表者氏名 :

新潟大学

研究者番号 :

※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。