

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月12日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20790345

研究課題名（和文） 劇症型溶連菌感染症臨床分離株で発現が増加している毒素の機能とその発現機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of function of increasing toxin in the streptococcal toxic shock syndrome clinical isolates and of the regulation

研究代表者

池辺 忠義（TADAYOSHI IKEBE）

国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官

研究者番号：20333362

研究成果の概要（和文）：

劇症型溶連菌感染症(STSS)は、発病からの病状の進行が急激かつ劇的で、いったん発病すると数十時間以内に、死に至る可能性の高いことが知られている。本研究において、劇症型溶連菌感染症臨床分離株で、新たに *rgg* 遺伝子に変異があることを見出した。マウスモデルにおいて、この *rgg* 変異株は、致死性が高く、様々な臓器に障害を与え、ヒトの好中球を殺傷することが明らかとなった。STSS 株と非侵襲性感染株における *rgg* 遺伝子の変異頻度を調べた結果、劇症型溶連菌感染症臨床分離株の約 25% を占めていた。また、咽頭炎などの非劇症型感染臨床分離株では、1.7% しかこの遺伝子に変異が見られず、有意に劇症型感染臨床分離株において *rgg* 遺伝子に変異がみられることが判明した。このことから、この *rgg* 遺伝子の変異は、劇症型感染症に重要な役割をしていることが考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Streptococcal toxic shock syndrome (STSS) is a severe invasive infection characterized by the sudden onset of shock and multiorgan failure; it has a high mortality rate. In the present study, mutations of another negative regulator, *rgg*, were also found in clinical isolates of STSS patients. The *rgg* mutants from STSS clinical isolates enhanced lethality and impaired various organs in the mouse models and precluded their being killed by human neutrophils. When we assessed the mutation frequency of *rgg* gene among *S. pyogenes* isolates from STSS and non-invasive infections, about 25% of the STSS isolates had mutations of *rgg* gene, while isolates from patients with non-invasive disease had significantly fewer mutations in this gene (1.7%). The results of the present study suggest that mutations in the negative regulators *csrS/csrR* and *rgg* of *S. pyogenes* are crucial factors in the pathogenesis of STSS, as they lead to the overproduction of multiple virulence factors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	800,000	0	800,000
2009年度	900,000	0	900,000
2010年度	900,000	0	900,000
2011年度	700,000	0	700,000
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：病原性

1. 研究開始当初の背景

劇症型溶連菌感染症は、発病からの病状の

進行が急激かつ劇的で、いったん発病すると数十時間以内に、死に至る可能性の高いこと

が知られている。この感染症を引き起こす主な原因菌は、咽頭炎や猩紅熱などを引き起こすA群レンサ球菌である。しかしながら、劇症型溶連菌感染症を引き起こしたA群レンサ球菌と咽頭炎などを引き起こした臨床分離株との違いは、明らかでなかった。近年、動物実験において、マウス中で生き残った株を調べた結果、*csrR/csrS* 遺伝子に突然変異が起きていることが明らかとなり、毒素としてDNaseの機能が重要である事が報告されている(文献6)。我々は、日本で分離された劇症型溶連菌臨床分離株に *csrR/csrS* 遺伝子に変異が起きているか調べた結果、一部の劇症型溶連菌感染症臨床分離株においても変異が確認されたが、半数以上の劇症型溶連菌感染症臨床分離株において、*csrR/csrS* 遺伝子に変異が起きていないことが判明した(unpublished result)。また、*csrR/csrS* 遺伝子に変異が起きていた劇症型溶連菌感染症臨床分離株であっても、必ずしもDNaseの発現量や活性が高いとはかぎらない(DNaseの活性がみられない株もある)ことが判明した(unpublished result)。これらの結果は、*csrR/csrS* 遺伝子以外の突然変異でも劇症型溶連菌感染症を引き起こし、DNaseが必ずしも劇症型溶連菌感染症を引き起こすのに必須ではないことを示唆している。

2. 研究の目的

csrR/csrS 遺伝子以外に劇症型溶連菌感染症臨床分離株においてどのような遺伝子に突然変異を起しており、この変異により毒素の発現にどのような影響を与えているか、また、どのような毒素が劇症型溶連菌感染症の発症に重要なのかを明らかにし、劇症型溶連菌感染症の病態にどのように影響を与えているか解明することを目的とする。

3. 研究の方法

1. 生物材料と培養方法

劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株は、国立感染症研究所と地方衛生研究所からなる衛生微生物技術協議会レファレンスセンターシステムに集められた164株を用いた。劇症型溶血性レンサ球菌感染症の診断基準は、Working Group on Severe Streptococcal Infections (1993) Defining the group A streptococcal toxic shock syndrome. JAMA 269:390-391. に従った。A群レンサ球菌の生育には、固形培地としてコロンビア5%羊血液寒天培地(Becton Dickinson)、液体培地としてTodd Hewitt Broth (Becton Dickinson)を用いた。スペクチノマイシンは、sigmaより購入し、50 µg/mlの濃度で使用した。

2. ゲノムDNAの調製

血液寒天培地に塗末した菌株をTE (pH8.0)に懸たく後、mutanolysin (Sigma)を添加し、37°Cで1時間処理した後、DNA精製キット

を用いて精製した。

3. 塩基配列の決定

Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzerを用いて、塩基配列を決定した。

4. RNAの抽出とRT-PCR

*S. pyogenes*をTHY培地で37°CでOD600=0.75まで培養し、RNeasy Mini extraction kit (Qiagen)を用いて、total RNAを抽出した。RT-PCRは、PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa Shuzo)を用いて行った。

5. 動物実験

1x10⁷個の*S. pyogenes*を腹腔内に0.5 ml接種し、7日間の生存曲線を調べた。

4. 研究成果

(1) 劇症型溶連菌感染症臨床分離株の分泌蛋白質を調べたところ、共通して、ストレプトリジンO (SLO)の分泌量が、咽頭炎などの非劇症型感染症臨床分離株と比較して、高いことが判明した。今までの研究で、劇症型感染症臨床分離株において、二成分制御系のセンサー蛋白質であるCsrに変異があることが分かっているが、劇症型感染症臨床分離株の中には、この*csrS*遺伝子に変異がみられない株が存在することが明らかとなった。そこで、分子疫学上クローナルである劇症型溶連菌感染症臨床分離株NIH1と咽頭炎患者分離株患者K33のゲノムを比較するため、それぞれのゲノムDNAを抽出し、一塩基多型解析(SNPs解析)を行った。それぞれの株におけるゲノムの塩基配列の違いを見出した後、リシーケンスによりゲノム上の塩基配列の違いを決定した結果、劇症型溶連菌感染症臨床分離株において、共通して転写因子をコードする*rgg*遺伝子に変異が起きていることが判明した。

(2) 劇症型溶連菌感染症臨床分離株において、どの程度この遺伝子に変異が起きているか調べるため、この*rgg*遺伝子を含む領域をPCRにより増幅し、塩基配列を決定した。*rgg*遺伝子の変異は、劇症型溶連菌感染症臨床分離株の約25%を占めていた。また、咽頭炎などの非劇症型感染症臨床分離株では、1.7%しかこの遺伝子に変異が見られず、有意に劇症型感染症臨床分離株において*rgg*遺伝子に変異がみられることが判明した。このことから、この*rgg*遺伝子の変異は、劇症型感染症に重要な役割をしていることが考えられた。

(3) 劇症型溶連菌感染症臨床分離株

(NIH34)、咽頭炎患者分離株(K33)をもとに、劇症型溶連菌感染症臨床分離株にintactの*rgg*遺伝子を導入した相補株(NIH34*rgg+*)、咽頭炎患者分離株の*rgg*遺伝子を破壊した株(K33*rgg*)を作成した。これらの株についてマウスに対する生存曲線を調べた。その結果、*rgg*遺伝子に変異のある株(NIH34, K33*rgg*)は、変異のない株(K33, NIH34*rgg+*)に比べて致死

率が高いことが判明した。また、それぞれの菌を腹腔内に接種し、1日後の腎臓を摘出し、ホルマリン固定後、HE染色により、それぞれの臓器の病理像を観察した結果、*rgg* 遺伝子に変異がある株(NIH34, K33*rgg*)を接種したマウスで菌の集積がみられ、その周りに細胞の壊死がみられた。それぞれの菌を皮下接種した後、マウスの腫脹の大きさを経時的に測定した結果、*rgg* 遺伝子に変異がある株(NIH34, K33*rgg*)を接種したマウスのほうが、変異のない株に比べ、腫脹が広がり、病巣が広範囲に広がっていることが判明した。劇症型感染症では、好中球の浸潤がみられないことが臨床的にみられる。そこで、好中球に対する影響を調べた結果、*rgg* 遺伝子の変異株において、好中球の殺傷能の増加がみられた。このことから、*rgg* 遺伝子の変異は、分子疫学的にも、マウスを用いた動物実験においても、劇症型感染症に重要な役割をしていることが示唆された。

(4) この *rgg* 遺伝子の変異によって、どのような病原性遺伝子の発現が上昇するか調べるため、咽頭炎患者分離株、劇症型溶連菌感染症臨床分離株、咽頭炎患者分離株の *rgg* 遺伝子変異株、*intact* の *rgg* 遺伝子を劇症型溶連菌感染症臨床分離株に導入した相補株から RNA を抽出し、RT-PCR を行った。その結果、*rgg* 遺伝子に変異がある株において、細胞障害毒素をコードする *slo*, *nga* 遺伝子、ストレプトキナーゼをコードする *ska* 遺伝子、コラーゲン様タンパクをコードする *sclA* や *sclB* 遺伝子遺伝子の発現が上昇していた。一方、*csrS* 遺伝子変異株で上昇していた IL-8 プロテアーゼをコードする *scpC* 遺伝子は、*rgg* 遺伝子の変異にかかわらず発現の上昇は見られなかった。このことは、マウスへ菌を接種したときみられた腎臓の病理像の結果と一致するものであった。また、*csrS* 変異株同様、*rgg* 変異株においても、溶血毒素をコードする *sagA* 遺伝子やシステインプロテアーゼをコードする *speB* 遺伝子の発現量が、減少していた。

(5) *rgg* 遺伝子変異株で遺伝子発現が上昇する病原性因子に注目し、これらの病原性因子が、マウスの致死性にどれだけ寄与しているか調べることを目的とした。まず、*slo*, *nga*, *ska*, *grab* 遺伝子の破壊株を作製した。これら破壊株をマウスの腹腔内に接種した結果、*slo*, *nga*, *ska* 破壊株では、マウスの致死性が減少したが、*grab* 遺伝子の変異株では、致死性の減少は見られなかった。これら *slo*, *nga*, *ska* 遺伝子は、*csrS* 変異株でも上昇することから、劇症型感染症の病原性に重要な因子であることが考えられた。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Matsumura T, Ato M, Ikebe T, Ohnishi M, Watanabe H, Kazuo Kobayashi. Interferon- γ -producing immature myeloid cells confer protection against severe invasive group A *Streptococcus* infections. *Nat Commun* 査読有、3:678, 2012. doi: 10.1038/ncomms1677.
2. Ikebe T, Ato M, Matsumura T, Hasegawa H, Sata T, Kobayashi K, Watanabe H. Highly frequent mutations in negative regulators of multiple virulence genes in group A streptococcal toxic shock syndrome isolates. *PLoS Pathog* 査読有、6: e1000832, 2010. doi: 10.1371/journal.ppat.1000832
3. Ikebe T, Wada A, Oguro Y, Ogata K, Katsukawa C, Isobe J, Shima T, Suzuki R, Ohya H, Tominaga K, Okuno R, Uchitani Y, Watanabe H, The Working Group for β -hemolytic *Streptococci* in Japan. Emergence of clindamycin-resistant *Streptococcus pyogenes* isolates obtained from patients with severe invasive infections in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 査読有、63: 304-305, 2010.
4. Ikebe T, Oguro Y, Ogata K, Katsukawa C, Isobe J, Shima T, Suzuki R, Ohya H, Tominaga K, Okuno R, Uchitani Y, Tada Y, Okabe N, Watanabe H, The Working Group for β -hemolytic *Streptococci* in Japan. Surveillance of severe invasive group G streptococcal infections during 2002–2008 in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 査読有、63: 372-375, 2010.
5. Yamada T, Yamada T, Yamamura MK, Katabami K, Hayakawa M, Tomaru U, Shimada S, Morikawa M, Seki T, Ariga S, Ishikawa K, Ikebe T, Gando S, Minakami H. Invasive group A streptococcal infection in pregnancy. *J Infect.* 査読有、60: 417-424, 2010.
6. 池辺忠義、阿戸学、小林和夫、渡辺治雄. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症の発症機序—菌の免疫回避機構と菌の特性—. *感染症学雑誌*、査読無、83: 485-489, 2009.
7. Matsumoto M, Yamaguchi I, Sasano M, Hori M, Ikezaki K, Shimizu S, Nishiyama Y, Sato N, Tsuchiya H, Suzuki M, Minagawa H, Working Group for Beta-Haemolytic Streptococci in Japan. T serotyping of *Streptococcus pyogenes* in Aichi Prefecture, Japan isolated between 2003 and 2007. *Jpn J Infect Dis.* 査読有、62: 168-169, 2009.
8. Ato M, Ikebe T, Kawabata H, Takemori T,

Watanabe H. Incompetence of neutrophils to invasive group A *streptococcus* is attributed to induction of plural virulence factors by dysfunction of a regulator. PLoS ONE 査読有、3 : e3455, 2008. doi: 10.1371/journal.pone.0003455.

9. Tanaka, D., Isobe, J., Watahiki, M., Nagai, Y., Katsukawa, C., Kawahara, R., Endoh, M., Okuno, R., Kumagai, N., Matsumoto, M., Morikawa, Y., Ikebe, T., Watanabe, H., and the Working Group for Group A Streptococci in Japan. Genetic features of clinical isolates of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* possessing Lancefield's group A antigen. J. Clin. Microbiol. 査読有、46: 1526-1529, 2008.

[学会発表] (計 24 件)

1. 池辺忠義, 溶血性レンサ球菌による劇症型感染症の細菌学的解析. 平成 23 年度第 21 回学会賞受賞者特別講演会、2012 年 1 月 27 日、東京
2. 池辺忠義, 劇症型 A 群レンサ球菌感染症臨床分離株における遺伝子発現制御因子の変異. 第 94 回日本細菌学会関東支部総会-若手対象ワークショップ: 細菌学の新たな潮流-, 2011 年 10 月 6-7 日、東京.
3. 池辺忠義, 小黒祐子, 嶋智子, 奥野ルミ, 大屋日登美, 勝川千尋, 富永潔, 緒方喜久代, 大西真, 渡邊治雄. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症分離株でみられたクリンダマイシン耐性株の増加. 第 20 回 Lancefield レンサ球菌研究会および第 43 回レンサ球菌感染症研究会合同学会、2011 年 6 月 17-18 日、愛知.
4. Ikebe T, Katsukawa C, Ohya H, Suzuki R, Oguro Y, Tominaga K, Shima T, Isobe J, Ogata K, Okuno R, Fujimoto T, Tada Y, Okabe N, Ohnishi M, Watanabe H, The Working Group for β -hemolytic Streptococci in Japan. Molecular Epidemiology of group A *Streptococcus* isolated from patients with severe invasive infections in Japan during 2004-2010. XVIII Lancefield International Symposium. 2011 September 4-8 Italy, Palermo.
5. Matsumura T, Ikebe T, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K, Ato M. The protective role of a novel population of interferon- γ producing cells in severe invasive Group A streptococcal infections. XVIII Lancefield International Symposium. 2011 September 4-8. Italy, Palermo.
6. Ato M, Ikebe T, Matsumura T, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K. Contact with group A *Streptococcus* isolated from severe invasive infections induces rapid necrosis of human neutrophils. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011/9/6-16, Sapporo.
7. Matsumura T, Ikebe T, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K, Ato M. A novel interferon- γ -producing subpopulations of immature myeloid cells confers protection from severe invasive group A *Streptococcus* infections. (The Joint International Meeting of The 76th Annual Meeting of the Japanese Society for Interferon and Cytokine Research, and The 19th International Symposium of Macrophage Molecular and Cell Biology 2011, 2011 May 25-27, Osaka
8. 池辺忠義, 阿戸学, 松村隆之, 長谷川秀樹, 小黒祐子, 嶋智子, 奥野ルミ, 大屋日登美, 勝川千尋, 富永潔, 緒方喜久代, 佐多徹太郎, 小林和夫, 大西真, 渡邊治雄. 劇症型溶レン菌感染症臨床分離株で高頻度でみられる負の転写制御因子の変異. 第 19 回 Lancefield レンサ球菌研究会および第 42 回レンサ球菌感染症研究会合同学会、2010 年 6 月 25-26 日、東京.
9. 松村隆之, 池辺忠義, 大西真, 渡邊治雄, 小林和夫, 阿戸学. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症における環状核骨髄系細胞の保護的役割. 第 9 回感染症沖縄フォーラム、2011 年 2 月 10-12 日、沖縄.
10. 外山雅美, 長野則之, 長野由紀子, 池辺忠義, 和田昭仁, 荒川宜親. *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* による初めてのヒト侵襲性感染症例. 第 19 回 Lancefield レンサ球菌研究会および第 42 回レンサ球菌感染症研究会合同学会、2010 年 6 月 25-26 日、東京.
11. Matsumura T, Ikebe T, Watanabe H, Kobayashi K, Ato M. The defensive role of interferon- γ produced by myeloid cells in invasive group A *Streptococcus* infection. 18th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages, 2010 年 5 月 20-21 日、熊本.
12. Matsumura T, Ikebe T, Watanabe H, Kobayashi K, Ato M. Identification of IFN-gamma producing cells in severe invasive group A streptococcal infection. 14th International Congress of Immunology, 2010 年 8 月 22-27 日、神戸.
13. 池辺忠義, 緒方喜久代, 奥野ルミ, 嶋智子, 大屋日登美, 渡邊治雄. 日本における劇症型溶血性レンサ球菌感染症臨床分離株の *emm* 遺伝子型と *csrS* 遺伝子の変異頻度. 第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3 月 27-29 日、横浜.
14. 池辺忠義. 劇症型レンサ球菌感染症の重篤化に関わる病原因子の解明. 第 21 回日本臨床微生物学会総会、2010 年 1 月 30-31 日、東京.
15. 松村隆之, 池辺忠義, 渡邊治雄, 小

- 林和夫, 阿戸学. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症におけるインターフェロン γ 産生細胞の解析. 第8回感染症沖縄フォーラム, 2010年2月11-13日, 沖縄.
16. 阿戸学, 松村隆之, 池辺忠義, 渡邊治雄, 小林和夫. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症における遺伝子発現調節因子の変異と好中球傷害. 第8回感染症沖縄フォーラム, 2010年2月11-13日, 沖縄.
17. 池辺忠義, 阿戸学, 川端寛樹, 小林和夫, 渡邊治雄. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症臨床分離株における *csrS* 変異の解析. 第82回日本細菌学会総会, 2009年3月12-14日, 愛知.
18. 阿戸学, 池辺忠義, 渡邊治雄, 小林和夫. 劇症型感染分離溶血性レンサ球菌株はストレプトリジンOおよび接触依存的にヒト好中球を傷害する. 第82回日本細菌学会総会, 2009年3月12-14日, 愛知.
19. 泉福英信, 池辺忠義, 河原井武人, 渡邊治雄. *Streptococcus pyogenes* におけるバイオフィルム形成遺伝子の検討. 第82回日本細菌学会総会, 2009年3月12-14日, 愛知.
20. 長野則之, 池辺忠義, 和田昭仁, 長野由紀子, 諏訪直生, 外山雅美, 荒川宜親. *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* による初めてのヒト侵襲性感染症例. 第83回日本感染症学会総会, 2009年4月23-24日, 東京.
21. 松村隆之, 池辺忠義, 渡邊治雄, 小林和夫, 阿戸学. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株によるヒト好中球ネクロシス誘導機構の解析. 第7回感染症沖縄フォーラム, 2009, 2月12-14日, 沖縄.
22. Matsumura, T., Ikebe, T., Watanabe, H., Kobayashi, K. Ato, M. Involvement of IFN- γ and IL-6 in severe invasive group A *streptococcus* infection. 17th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophage. 2009/07/03-04. Ishikawa.
23. Ikebe, T., Ato, M., Kobayashi, K., Watanabe, H. Impairment of global regulatory network of *Streptococcus pyogenes* virulence genes provokes neutrophil incompetence and subsequent streptococcal toxic shock-like syndrome. Forum of the network of research centers on infectious diseases. 2008/10/6. Hanoi.
24. 池辺忠義. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症の発症機序. 第82回日本感染症学会総会, 2008/4/17-18, 島根.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池辺 忠義 (IKEBE TADAYOSHI)
国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官
研究者番号 : 20333362

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :