

令和 4 年 4 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23053

研究課題名(和文)肺炎球菌の菌体表層タンパク質BgaAが病態発症に果たす役割の解析

研究課題名(英文) Role of pneumococcal cell surface protein, BgaA, in the pathogenic process

研究代表者

竹村 萌 (Takemura, Moe)

大阪大学・歯学研究科・特任研究員

研究者番号：20876635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：肺炎球菌は、肺炎、髄膜炎、敗血症などの侵襲性疾患の主要な原因菌として知られている。本研究では、敗血症における病原因子としてのBgaAの役割を評価するために、in vitroおよびin vivoのアッセイを実施した。その結果、BgaAが宿主の組織障害や血液凝固を誘導する多機能な病原因子として機能していることが示唆された。すなわち、BgaAは肺炎球菌感染症を制御するための創薬やワクチン開発の魅力的なターゲットとなる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺炎球菌の病原因子において、血液凝固に寄与する分子を初めて報告した。これまでに細菌感染において、宿主の血液凝固反応は注目されてこなかった。今後、本研究で実施した手法を応用することで、他の敗血症の原因菌となる病態解明につながることを期待される。また、糖鎖分解酵素であるBgaAは肺炎球菌で広く保存されており、有効な創薬標的となりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus pneumoniae is known as a major causative agent of invasive diseases such as pneumonia, meningitis, and sepsis. In this study, in vitro and in vivo assays were performed to evaluate the role of BgaA as a virulence factor in sepsis. The results suggest that BgaA functions as a multifunctional virulence factor that induces tissue damage and blood coagulation in the host. In other words, the results suggest that BgaA may be an attractive target for drug discovery and vaccine development to control pneumococcal infection.

研究分野：細菌学

キーワード：肺炎球菌 敗血症 BgaA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌は呼吸器感染症の主要な起因菌であり、ヒトの口腔および鼻咽腔粘膜に常在している。免疫の未発達や低下などの要因により、菌血症を伴わない肺炎、中耳炎、副鼻腔炎を含む非侵襲性感染症を発症させる。さらに、本菌が血中への侵入により血行性に伝播し、遠隔臓器で定着・増殖することにより、菌血症を伴う肺炎、髄膜炎、敗血症などの侵襲性肺炎球菌感染症を惹き起こす。侵襲性感染症は主に5歳以下の小児と65歳以上の高齢者に偏り、高齢者での致死率は約10%にも及ぶ。世界的に年間約2億症例の肺炎球菌性肺炎が発生し、死亡者数は約120～150万人に及ぶ(GBD 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators, Lancet Infect. Dis. 18: 1191-1210, 2018)。

本菌は莢膜多糖の抗原性から約90種の血清型に分類される。これまで、ワクチン抗原として、分離頻度が高い血清型群の莢膜多糖が選択されてきた。この多価莢膜多糖体ワクチンは予防効果をもたらしたが、莢膜合成遺伝子群の変化をともなう血清型変化や置換が世界的に認められており、現行ワクチンに担保されない血清型による侵襲性感染症の発生率が増加している。したがって、肺炎球菌の病態発症に関連し、かつ菌株間で保存され抗原性が高い分泌タンパク質を抗原とする新規ワクチンの開発が必要である。そこで、細胞壁に共有結合で架橋される菌体表層タンパク質を検討した。そして、既報の肺炎球菌ゲノム配列で保存され、詳細な機能が未知であるβ-ガラクトシダーゼ BgaA に着目した。BgaA が病態増悪機構にどのように関与するかについて不明であり、ワクチン抗原としての有効性は未知である。

2. 研究の目的

本申請研究では、機能未知である BgaA が肺炎球菌感染症の重篤化に関与するかについて解明するとともに、ワクチン抗原としての可能性を明らかにすることを目的とした。肺炎球菌の細胞壁架橋型表層タンパク質は、菌体の宿主への付着、定着後の栄養素獲得、菌体凝集、免疫回避などの感染初期に関わる重要な機能を担っている。しかし、定着した菌体が血中に侵入し全身に伝播する過程において、いかに細胞壁架橋型表層タンパク質が病原性に関与するかについての詳細は不明である。侵襲性肺炎球菌感染症に至る病態増悪期において、血液中での菌の増殖、好中球による殺菌からの回避、血管内皮細胞への付着や侵入、血管内皮障害による出血や凝固亢進などの過程に糖分解活性を有する BgaA が関与するという仮説を立てた。したがって、細菌細胞外に出される糖分解酵素が様々な宿主因子に対して生物活性を発揮し、病態増悪機構に関与すると仮定した点に独自性と創造性を有する。

3. 研究の方法

1. 肺炎球菌の *bgaA* 遺伝子欠失株の作製

敗血症由来の臨床分離株である TIGR4 株(野生株)を用いて *bgaA* 欠失株を作製する。*bgaA* の上流と下流の DNA の間にスペクチノマイシン耐性遺伝子を挿入した DNA 断片を作製し、コンピテンス刺激ペプチドを用いた形質転換を行う。スペクチノマイシン含有培地で選択し、遺伝子の欠失を PCR により確認する。

2. 全血、血清、好中球殺菌試験

野生株および *bgaA* 遺伝子欠失株をヒト血液、血清、あるいは好中球と混和し、経時的に生存菌数を算定することにより、生存菌数や好中球に対する各菌株の抗貪食能を比較する。また、マウスの血液と好中球を用いる殺菌試験も同様に行う。

3. ヒト培養細胞への付着・侵入試験

野生株および *bgaA* 遺伝子欠失株をヒト肺胞上皮培養細胞あるいは肺微小血管内皮細胞に感染させ、経時的に破砕液を調製し、段階希釈液を寒天培地に播種する。培養後に生育するコロニー数から菌体付着・侵入率を算出し、比較する。

4. マウス感染実験

野生株および *bgaA* 遺伝子欠失株をマウスに経鼻感染もしくは経静脈感染させ、それぞれ肺炎モデル、敗血症モデルとする。感染 14 日後まで、マウスの体重と生存を経時的に観察する。各臓器中の菌数を測定することにより、細菌の全身伝播効率を検討する。また、各臓器の組織標本を作製し、病理検査を行う。さらに、血液を採取し、血液凝固能を測定する。

5. 血小板凝集能の測定

野生株および *bgaA* 遺伝子欠失株をマウスに経静脈感染させた敗血症モデルを用いる。マウスの血液を採取し、血小板凝集能測定装置を用いて血小板凝集能を測定し、感染による血小板凝集能の変化を評価する。

4. 研究成果

まず、ヒト血液由来の臨床分離株である肺炎球菌の TIGR4 株を用いて、*bgaA* 欠失株を作製した。TIGR4 野生株および *bgaA* 遺伝子欠失株をヒト血液、血清、あるいは好中球と混和し、経時的に生存菌数を算定することにより、生存菌数や好中球に対する各菌株の抗貪食能を比較した。その結果、*bgaA* 遺伝子欠失株は野生株と比較して有意に生存率が低下した。次に TIGR4 野生株および *bgaA* 遺伝子欠失株をヒト肺胞上皮培養細胞とヒト脳微小血管内皮細胞に感染させ、経時的に破碎液を調製し、段階希釈液を寒天培地に播種することで細菌の細胞への付着率を算出した。ヒト肺胞上皮細胞とヒト脳微小血管内皮細胞ともに、*bgaA* 遺伝子欠失株が野生株と比較して有意に低い付着率を示した。次に野生株と *bgaA* 欠失株を用いて、それぞれマウスに経静脈感染を行うことで敗血症モデルとした。その結果、*bgaA* 欠失株感染群が、野生株感染群と比較して致死率が有意に低下した。一方で、感染後 24 時間ならびに 36 時間後にマウスの血液、脳、肺、肝臓、脾臓、腎臓の菌数を比較したところ、両群に有意差は認められなかった。宿主応答の差を調べるため、感染後 12 時間、24 時間、36 時間の血液について RNA-seq 解析を行った。Pathway 解析を行ったところ、感染 12 時間後では野生株感染群と *bgaA* 欠失株感染群で有意な差は認められなかった。感染 24 時間後では、野生株感染群と *bgaA* 欠失株感染群を比較すると、Toll like receptor や NOD-like receptor などの自然免疫応答のシグナル経路に有意差が認められた。すなわち、*bgaA* 欠失株感染群と比較して、野生株感染群は自然免疫応答が抑制されていることが示唆された。感染 36 時間後では、自然免疫応答に加えて DNA 複製やリボソーム生合成などの Pathway に有意な差が認められた。次に、感染 36 時間後のマウス各臓器について HE 染色を行い、組織像を比較したところ、野生株感染群では、*bgaA* 欠失株感染群と比較して、肺や肝臓、腎臓において、顕著な血管の傷害が認められた。さらに、感染 36 時間後のマウス血液について凝固に関わる因子としてフィブリノーゲン量とプロトロンビン時間、血小板凝集能を測定した。その結果、プロトロンビン時間は非感染群、野生株感染群、*bgaA* 欠失株感染群で有意な差は認められなかった。一方で、フィブリノーゲン量は野生株感染群で、非感染群および *bgaA* 欠失株感染群よりも有意に増加した。また、野生株感染群は非感染群、*bgaA* 欠失株感染群として血小板凝集能が低下していた。

bgaA 遺伝子について分子系統解析を行ったところ、他のレンサ球菌種では、一部の株が *bgaA* オルソログを持ち、多様性があるのに対して、肺炎球菌はほぼすべての株が BgaA を持つとともに多様性が低いことが示された。さらに、BgaA において進化的に変異が制限されているコドンに着目したところ、ループ構造上のプロリン残基が多く存在した。プロリンは主鎖が取れる角度が制限されているため、構造を rigid にする働きを持つ。すなわち、タンパク質の構造の安定性に寄与していると考えられる。また、活性中心を構成する残基についても進化的な保存性が高く、ポケットの構造を崩さない変異が選択されていることが示唆される。

これらの結果から、*bgaA* の欠失により、*in vitro* のモデルにおいて菌の血液中での生存能、ならびに肺胞上皮細胞および血管内皮細胞への付着・侵入能が低下することが示唆された。また、BgaA はマウス生体内における菌の伝播には寄与しないが、宿主の血管傷害を引き起こすとともに血液凝固を活性化させることで病原因子として働く可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamaguchi Masaya, Takemura Moe, Higashi Kotaro, Goto Kana, Hirose Yujiro, Sumitomo Tomoko, Nakata Masanobu, Uzawa Narikazu, Kawabata Shigetada	4. 巻 11
2. 論文標題 Role of BgaA as a Pneumococcal Virulence Factor Elucidated by Molecular Evolutionary Analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 582437
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2020.582437	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yamaguchi M, Takemura M, Higashi K, Goto K, Hirose Y, Sumitomo T, Nakata M, Uzawa N, Kawabata S	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Frontiers Media SA	5. 総ページ数 258
3. 書名 Evolutionary Mechanisms of Infectious Diseases (Role of BgaA as a pneumococcal virulence factor elucidated by molecular evolutionary analysis: p40-50)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学 大学院歯学研究科 口腔細菌学教室 https://web.dent.osaka-u.ac.jp/mcrbio/
--

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------