

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07002

研究課題名(和文) 肝臓・皮膚・腎臓の連関によるレンサ球菌感染症の重症化機構

研究課題名(英文) Increase in severity of Streptococcus infections through liver, skin and kidney linkages

研究代表者

小倉 康平 (Kohei, Ogura)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：00586612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年になり感染症例が多発しているレンサ球菌 *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) の病原性メカニズムは多くが不明である。本研究課題では、SDSEの新たな病原因子ならびに病原性発揮機構を明らかにすることを旨とし、各種性状解析、ゲノム解析、トランスクリプトーム解析を実施した。国内高頻度分離タイプSDSEのヒト血液成分存在下での接着性とそれに関与する線毛形成関連タンパク質を見いだした。また別の、国内高頻度分離タイプSDSEについては、毒素発現を制御する制御因子を選定した。以上より、SDSE固有の感染機構が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SDSEは、基礎研究による報告に比して臨床報告が非常に多く、近年では侵襲性SDSE感染症とアルコールによる肝疾患との関連が示唆されている。これらの疫学的研究は、SDSE感染症が肝臓や腎臓等の組織が連関して重症化するという仮説を支持するものであると言える。さらに、SDSEは高齢者や基礎疾患保有患者に対して強い病原性を発揮するが、迅速かつ適切な処置がなされない場合には若年者に対しても劇症型の症状を引き起こすことが多数報告されている。SDSEの重症化機構の詳細を明らかにすることで、SDSEのみならず劇症型レンサ球菌感染症全体の研究に貢献することができる。

研究成果の概要(英文)：Infections caused by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) have been increasingly reported in elderly individuals and those with underlying conditions, surpassing the incidence of other α -hemolytic streptococci. This research project focused on SDSE as a causative agent of severe infections, including fulminant hemolytic streptococcal disease (STSS).

We confirmed that CC17 type SDSE, the most prevalent type in Japan, exhibits strong adhesive properties in the presence of human serum components. Comprehensive gene expression analysis revealed the expression of genes encoding ciliogenesis-related proteins in serum-containing culture medium.

Analysis of the CC25 type SDSE prevalent in Japan revealed that two CC25 type SDSE strains with highly similar genome sequences (over 99.5%) express a toxin highly pathogenic to blood in significantly different amounts. Transcriptome analysis of both SDSE strains was conducted with the support of PAGS.

研究分野：細菌学

キーワード：レンサ球菌 病原因子 感染モデル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

レンサ球菌には、血液培地内で完全溶血性 (β 溶血) を示す菌種があり、中でもヒトへの高い病原性を示すものとして、ランズフィールド血清型判別により A 群に分類されるレンサ球菌 *Streptococcus pyogenes* (Group A streptococci, GAS) が、「人喰いバクテリア」として知られている。*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) は、主にランズフィールド G 群あるいは C 群の β 溶血性レンサ球菌であり、近年になりヒトへの感染が多く報告されてきている。GAS ならびに SDSE の両菌種は、平常時は常在菌として存在するが、咽頭や皮膚から宿主内に侵入し、咽頭炎や蜂窩織炎などの組織炎症、さらには敗血症、壊死性筋膜炎、劇症型溶血性レンサ球菌感染症などの重篤な侵襲性感染症を引き起こす。

SDSE は、GAS が保持するスーパー抗原、細胞外ヒアルロン酸カプセル合成酵素、プロテアーゼ (SpeB) をコードする遺伝子群を保持しないことから、弱毒性であると推測されていた。しかし近年の疫学的調査から、SDSE 感染症患者数は GAS のそれと比較して多いことが報告されていた。また SDSE 感染症例の特徴は、悪性腫瘍や糖尿病など基礎疾患を有している患者、および高齢な患者が多数を占める点であり、GAS 感染症例のそれとは大きく異なっていた (Wajima *et al. Emerg. Infect. Dis.* 2016)。応募者の研究グループは研究開始当初までに、SDSE が有する病原性発揮機構について主にマウスモデルを用いて解析し、以下の知見を得ていた。

2 型糖尿病モデルマウスへの高い病原性：本菌株を 2 型糖尿病モデル (*db/db*) マウス腹腔内に投与すると、コントロール (*db/+* ヘテロ) マウスと比較して有意に高い致死性を示し、SDSE 感染 *db/db* マウス血清内では炎症性サイトカインならびに血管炎症性マーカー Pentraxin-3 値の上昇等、GAS 投与では観察されない挙動を示した (Ogura *et al. Front. Microbiol.* 2018)。

流行型ごとに異なる病原性発揮機構：国内あるいは国外で流行型の SDSE 株は、それぞれが特徴的な溶血活性・細胞外構造形成・抗食食性・皮膚定着性・増殖性を示したことから、流行型株それぞれが発揮する異なる病原性機構が明らかになった (Matsue *et al. Front. Microbiol.* 2020)。

病原性に関与する SDSE ヒアルロン酸分解酵素：SDSE は、ヒアルロン酸カプセルを産生しない一方で、ヒアルロン酸分解酵素 HyID を大量に放出することで、宿主皮膚や創部周辺で生育し、SDSE 感染による宿主障害性を惹起していることが明らかになった (Nguyen *et al. Front. Microbiol.* 2020)。

以上のように、応募者グループによる研究から SDSE 固有の病原性発揮機構については明らかにされてきていたが、一方で加齢や基礎疾患と重症化とを直接的に結びつける知見については得られていなかった。加齢や慢性疾患等により皮膚の生理機能が低下する一方で、SDSE ヒアルロン酸分解酵素のターゲットとなる皮膚ヒアルロン酸量は年齢により変化しない (Meyer *et al. Invest. Dermatol.* 1994)。また、SDSE は咽頭ならびに皮膚に常在するが、咽頭炎と比較して解放創や蜂窩織炎等皮膚患者から非常に多く分離される。これらの報告から、SDSE は皮膚からの感染が主となる可能性が非常に高いと推察されていた。

2. 研究の目的

本研究は「易感染状態皮膚上で SDSE はどのような挙動を示すのか?」「皮膚感染に直接的に関わる SDSE 新規病原因子は存在するのか?」「皮膚感染後 SDSE は体内でどのような挙動を示すのか?」の 3 つそれぞれについて解析することとした。具体的には、ゲノミクスの (ゲノム構造解析・トランスクリプトーム解析) 手法により SDSE 新規病原因子を探索することを第一の目的とした。さらに、種マウスモデルや細胞株を用いて解析し、それらの知見を併せることで SDSE

重症化の体系を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

SDSEには機能不明ORFが多く存在し、皮膚定着に関わる因子や皮膚からの侵襲に関与する因子は不明な点が多かった。SDSEはその遺伝子タイプ（Multilocus sequence typing, MLST）により分類される。そのゲノム構造全体に大規模なレアレンジメントは観察されないものの、MLSTのタイプ（Clonal complex, CC）が異なるもの同士では機能不明ORFの保持・非保持が、遺伝子タイプ間で異なるため、SDSE全種類に共通の病原性を捉えることが困難であった。そこで本研究では、本邦で特に分離頻度が高いタイプで（CC17型ならびにCC25型）且つ激症型レンサ球菌感染症由来の分離株を用いて、それぞれのタイプが有する固有の性状について、*in vitro*および*in vivo*での解析を進めると同時に、ゲノム解析・遺伝子発現解析（トランスクリプトーム）により皮膚感染に関与するSDSE固有の新規接着因子・病原因子候補を選定した。

尚、本研究は金沢大学・京都大学の組換えDNA実験安全委員会、金沢大学動物実験委員会、および金沢大学・京都大学の研究倫理審査委員会の承認を受けて実施した。

4. 研究成果

【CC17型 SDSE ゲノムの決定ならびに固有遺伝子の抽出】

近隣病院の STSS 患者血液から分離された激症型レンサ球菌原因菌のうち、10 株中の 8 株を SDSE が占め、さらにその中の 4 株は CC17 型、2 株は CC25 型と分類された。そこで、CC17 および 25 の SDSE 株のゲノム DNA を抽出し、Illumina 社 MiSeq と Oxford Nanopore technologies 社 MinION の 2 種の次世代シーケンサーに供し、得られたショートリードとロングリードのデータをアセンブルすることで、ゲノム配列を決定した。得られたゲノムデータを用いて比較ゲノム解析を実施し、CC17 型のみが保有する遺伝子を抽出した。抽出された各遺伝子についてタンパク解析ツールで機能推定を行い、病原性への関与が疑われる CC17 固有因子として、新規なレギュレーター、バクテリオシン（抗菌タンパク質）、およびアデニレートシクラーゼが選出された。候補遺伝子を欠損させた株をそれぞれ作製後、その欠損が遺伝子発現に与える影響を RNA-Seq により解析した。その結果、レギュレーターを欠損させた株では、その近傍に配置されたオペロンの発現が大幅に増大していた。しかし、そのオペロンがコードするタンパク質は、病原性よりも細菌自体の増殖に関与することが推察された。また、バクテリオシン候補遺伝子を欠損すると、その下流の既知バクテリオシンの遺伝子発現が大幅に増大したが、CC17 SDSE 野生株ならびにバクテリオシン候補遺伝子欠損株の培養上清中での他の細菌種の生育速度・最終菌体濃度に有意な差は観察されなかった。アデニレートシクラーゼ遺伝子欠損は、他の遺伝子発現に大きな影響を与えなかった。

【ヒト血清存在下で強い接着性を発揮する CC17 型 SDSE】

申請者らによる先行研究から、SDSE の細胞外構造は型ごとに異なることが明らかにされていたことから、CC17 型の細胞外構造は接着能を有することで、感染症の成立に寄与するという仮説を着想した。そこで複数の型 SDSE を用いて接着能定量実験を行ったところ、通常細菌培地中ではいずれの型の SDSE も接着能を有していたが、ヒト血清成分含有培地中では、他の型では接着能が消失していたのに対して、CC17 型は接着能を保持していた。このことから、ヒト由来成分存在下で CC17 型のみが有する接着能は、その高い感染性と関連することが示唆された。

【CC17 型 SDSE が他の細菌の増殖に与える影響】

CC17 型 SDSE 固有の病原因子抽出から、細菌増殖を抑制する分子（抗菌ペプチド）が選定された。そこで、SDSE の産生物質が含まれた培地で各種細菌を培養し、その増殖に SDSE 産生物質が与える影響を解析した。その結果、CC17 型株は他の型と比較して、ある種のグラム陰性菌の増殖を顕著に抑制することを明らかにした。このことから、CC17 型株は宿主内で抗菌ペプチドを放出し他の常在細菌の増殖を抑制することで、自身の増殖に適した環境を構築している可能性が示された。

【トランスクリプトームによる流行型 SDSE の病原因子探索（CC17 型）】

これまでの結果（結果 1-3）から見出された CC17 型 SDSE 固有の遺伝学的・生化学的性状について、それらの性状を司る遺伝子（RNA）発現を解析することを目的として、網羅的発現解析（RNA-seq）を実施した。その方法としては、細菌 RNA を抽出し、リボソーム RNA を除去した後、合成した cDNA を次世代シーケンサーに供することでリードデータを取得した。そのデータを RNA 解析用パイプラインに投入し、定量的発現変動データを得た。

まず、接着能に関連する因子を探索するために、ヒト血清成分含有培地中での発現を CC17 型と他の型とで比較した結果、CC17 型では線毛形成関連タンパク質をコードすると機能推定された遺伝子群（オペロン）の発現が有意に上昇していたことから、このオペロンが接着能に関与することが考えられた。次に、細菌増殖を抑制する抗菌ペプチド（結果 3）をコードする遺伝子を欠損させた株（欠損株）を野生株と比較したところ、欠損株では欠損させた遺伝子とは異なる抗菌ペプチドの発現量が相補的に上昇していたことから、CC17 型 SDSE は、異なる抗菌ペプチドの発現を個体内で調節することで、他の細菌に影響を与えていることが示唆された。

【トランスクリプトームによる流行型 SDSE の病原因子探索（CC25 型）】

CC25 型 SDSE についての解析を進めていく中で、ドラフトゲノム上非常に近いにもかかわらず（ANI > 99.8%）マウス血流感染時の病原性が異なる SDSE ペア（高病原性 A 株・低病原性 B 株）が見出された。レンサ球菌感染症の重症化メカニズムを明らかにする上では、病原因子の発現機構が鍵となる。2022 年度に先進ゲノム支援を受け RNA-seq を実施し、高病原性・低病原性 SDSE ペア間での比較定量解析から、病原性の高低を司る因子を探索した（表 1）。

細菌培養培地を用いた際には、既知の病原性関連レギュレータはペア間で大きな差は見られないが、レンサ球菌の主要な病原因子である Streptolysin O、Streptolysin S、ならびに 5 peptidase などの遺伝子が A 株で高発現していた。一方で、ある種の遺伝子群にゲノム配列上のプロモータ領域あるいは遺伝子配列にわずかな差が見られ、その遺伝子発現量は B 株で高い傾向にあった。さらに、A 株と B 株が共通して保持する遺伝子について、Transcriptome per million (TPM) を比較した結果（カイ二乗検定）、TPM が大きく異なる遺伝子が抽出された（図 1）。今後は、この遺伝子がコードするタンパク質に着目し、皮膚感染症における新規な

	A株			B株		
	up regulation	down regulation	total	up regulation	down regulation	total
Deseq2	623	430	1,053	461	288	749
edgeR	649	405	1,054	472	276	748

表 1. 二株間の発現挙動の差異

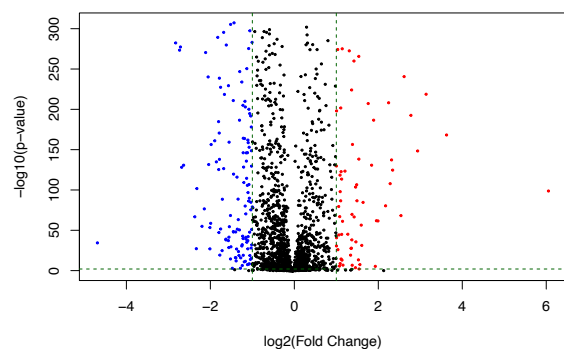


図 1. 二株間で共通する遺伝子の発現変動（カイ二乗検定）

病原因子を同定していく。

【血中感染時の挙動】

SDSE をマウス尾静脈に注射し、その後の各臓器への集積を解析した結果、SDSE は腎臓に集積し、さらにその菌数が増加するというデータが研究代表者のグループにより得られていた。本申請課題では、その実験の再現性が確認できた。また、CC25 型 (A 株) のマウス体内集積量は、激症型感染症由来 *Streptococcus pyogenes* 株と比較して多く、特に肝臓ならびに脾臓での差が顕著であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Yamazaki Ayaka, Ogura Kohei, Minami Kana, Ogai Kazuhiro, Horiguchi Tomomi, Okamoto Shigefumi, Mukai Kanae	4. 巻 13
2. 論文標題 Oral microbiome changes associated with the menstrual cycle in healthy young adult females	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 1119602-1119602
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2023.1119602	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 -

1. 著者名 Ogura Kohei, Endo Maho, Hase Takashi, Negami Hitomi, Tsuchiya Kohsuke, Nishiuchi Takumi, Suzuki Takeshi, Ogai Kazuhiro, Sanada Hiromi, Okamoto Shigefumi, Sugama Junko	4. 巻 20
2. 論文標題 Potential biomarker proteins for aspiration pneumonia detected by shotgun proteomics using buccal mucosa samples: a cross-sectional case control study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical Proteomics	6. 最初と最後の頁 9-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12014-023-09398-w	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 -

1. 著者名 Miyajima Yuna, Karashima Shigehiro, Ogai Kazuhiro, Taniguchi Kouki, Ogura Kohei, Kawakami Masaki, Nambo Hidetaka, Kometani Mitsuhiro, Aono Daisuke, Demura Masashi, Yoneda Takashi, Tsujiguchi Hiromasa, Hara Akinori, Nakamura Hiroyuki, Okamoto Shigefumi	4. 巻 12
2. 論文標題 Impact of gut microbiome on dyslipidemia in japanese adults: Assessment of the Shika-machi super preventive health examination results for causal inference	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 908997-908997
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2022.908997	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 -

1. 著者名 Ogura Kohei, Furuya Hiroka, Takahashi Natsuki, Shibata Kana, Endo Maho, Watanabe Shinya, Cui Longzhu, Miyoshi-Akiyama Tohru, Okamoto Shigefumi, Ogai Kazuhiro, Sugama Junko	4. 巻 13
2. 論文標題 Interspecies Regulation Between Staphylococcus caprae and Staphylococcus aureus Colonized on Healed Skin After Injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 818398
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2022.818398	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 -

1. 著者名 Ogura Kohei, Kaji Daiki, Sasaki Masakazu, Otsuka Yoshihito, Takemoto Norihiko, Miyoshi-Akiyama Tohru, Kikuchi Ken	4. 巻 28
2. 論文標題 Predominance of ST8 and CC1/spa-t1784 methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates in Japan and their genomic characteristics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Global Antimicrobial Resistance	6. 最初と最後の頁 195 ~ 202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jgar.2022.01.011	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 -

1. 著者名 Yahiro Kinnosuke, Ogura Kohei, Tsutsuki Hiroyasu, Iyoda Sunao, Ohnishi Makoto, Moss Joel	4. 巻 7
2. 論文標題 A novel endoplasmic stress mediator, Kelch domain containing 7B (KLHDC7B), increased Harakiri (HRK) in the SubAB-induced apoptosis signaling pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41420-021-00753-0	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 該当する

1. 著者名 Furuya Hiroka, Ogura Kohei, Takemoto Norihiko, Watanabe Shinya, Yamazaki Ayaka, Ogai Kazuhiro, Sugama Junko, Okamoto Shigefumi	4. 巻 67
2. 論文標題 A multilocus sequence typing method of Staphylococcus aureus DNAs in a sample from human skin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 438 ~ 446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.13094	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5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kohei Ogura, Hiroka Furuya, Natsuki Takahashi, Shigefumi Okamoto, Kazuhiro Ogai, Junko Sugama
2. 発表標題 Skin physiology and two staphylococci associated with the recurrence of pressure injuries
3. 学会等名 Skin Ageing & Challenges 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小倉康平、遠藤真穂、長谷剛志、土屋晃介、鈴木健之、大貝和裕、岡本成史
2. 発表標題 誤嚥性肺炎発症を検出する宿主側タンパク質マーカーの探索
3. 学会等名 第34回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小倉康平、古屋紘花、高橋夏樹、岡本成史、大貝 和裕、須釜 淳子
2. 発表標題 ヒト皮膚に常在するStaphylococcus caprae の病原性スイッチ
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小倉康平、古屋紘花、高橋夏樹、岡本成史、大貝和裕
2. 発表標題 癬痕部に定着するStaphylococcus aureusならびに Staphylococcus caprae
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小倉康平、高橋夏樹、古屋紘花、大貝和裕、岡本成史、須釜淳子
2. 発表標題 褥瘡癬痕部に定着するブドウ球菌属細菌
3. 学会等名 第51回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2022年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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