

## 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25年06月21日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591116

研究課題名（和文） 菌血症由来臨床分離細菌株を用いた好中球機能傷害機構の解析

研究課題名（英文） Mechanisms of impaired neutrophil functions by clinical isolates from bacteremia

研究代表者

阿戸 学 (ATO MANABU)

国立感染症研究所・免疫部・室長

研究者番号：20392318

研究成果の概要（和文）：

敗血症および全身性の細胞外細菌感染症は、外傷等の物理的侵襲のエピソードや基礎疾患を持たない健常人でも、種々の細菌の感染によって起こることが知られている。本研究は、敗血症または全身細菌感染症の臨床例より分離された菌株と、ヒト好中球とマウスモデルを用いたスクリーニングにより、好中球の防御機構修飾を分子レベルで解析し、新規好中球—細菌の相互作用と、防御修飾機構を明らかにすることを目的とした。その結果、劇症型レンサ球菌感染症分離株による接触性好中球傷害の分子機構、および類鼻疽の敗血症分離株が好中球細胞外トラップ(NETs)の放出を抑制する菌側病原因子を同定した。

研究成果の概要（英文）：

Sepsis and disseminated bacterial infection is caused by various bacteria and affected to not only compromised hosts but healthy people without apparent trauma. In this study, we aim to unveil a novel neutrophil-bacteria interaction which regulates host defense by analysis of modification of neutrophil defense functions by screening using human neutrophils and mouse models. Here we show that clinical isolates from severe invasive streptococcus infection have a license to kill neutrophils by streptolysin O, a pore-forming toxin in a contact-depending manner. We demonstrate that clinical isolates from septic melioidosis could suppress the release of neutrophil extracellular traps (NETs), which kill bacteria extracellularly. We further identified bacterial virulence factors responsible to modification of NETs release. These findings are expected to contribute to understanding pathogenesis of invasive bacteria infections.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	1,200,000	0	1,200,000
2012年度	700,000	0	700,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	0	2,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：感染症・免疫学・細菌

## 1. 研究開始当初の背景

敗血症および全身性の細菌感染症は、死亡率が高く、感染症の中でも最も重篤でかつ重要なものの一つであり、外傷、医原性等の物理的侵襲のエピソードや基礎疾患を持たない健常人でも、種々の細菌の感染によって起こることが知られている。このうち、細胞内寄生細菌では、細胞内寄生を可能にする殺菌回避機構について、その分子機構の解明に近づきつつある。一方、急性細菌感染症の第一線である好中球による防御に対する回避機構については、未だ不明な点が多い。

好中球は、全白血球の 60-70%を占め、細菌や真菌の急性感染に対する第一線の宿主防御細胞である。骨髄で産生され、成熟すると末梢血液中を循環するが、無刺激では数時間でアポトーシスに陥り循環から取り除かれる。感染や炎症などの組織傷害がおこると、好中球は局所より放出される CXC ケモカイン IL-8、補体由来のアナフィラトキシン C5a、ロイコトリエン B4 などの様々な走化因子により炎症局所に遊走し、活性化され、主として補体や抗体の結合によってオプソニン化された細菌の貪食と消化、殺菌を行う。また、好中球は活性化によって寿命が延長され、炎症性サイトカイン、ケモカイン、活性酸素や蛋白分解酵素を大量に分泌し、組織の急性炎症と自然免疫に大きな役割を演じる (Yamashiro et al. J Leukoc Biol. 2001)

我々は、敗血症または全身細菌感染症として、劇症型 A 群溶血性レンサ球菌感染症 (Ato et al. 2008)、類鼻疽 (Chancharoen et al. 2009)、腸管外病原性大腸菌感染症の臨床例より分離された菌株を用いて、*in vitro* でのヒト好中球機能傷害の検討と、マウスモデルを用いた研究をおこなってきた。その結果、これらの臨床分離株が、血清中の蛋白に対して殺菌抵抗性を生じるのみならず、好中球の防御機構である血管外遊走、菌の貪食機能、殺菌能の一部を阻害することにより、病原性を発揮する可能性を明らかにしてきた。例えば、劇症型レンサ球菌感染症由来の分離株の一部は、病原因子の発現を負に調節する *csrS* 遺伝子に機能欠損を引き起こす突然変異が生じた結果、好中球の遊走活性化因子である IL-8 を分解する酵素 *ScpC* の発現が上昇し、好中球の遊走と活性化を阻害する。同時に、好中球の細胞膜を直接傷害する溶血毒素ストレプトリシン O (SLO) 産生が亢進し、好中球を死に至らしめる。このような *in vitro* 病原性は、マウス *in vivo* 感染における感染致死率や血液中の菌の同定といったヒトの病態とよく相関し、マウスモデルとして使用することが可能であった。

## 2. 研究の目的

敗血症または全身細菌感染症の臨床例より分離された菌株と、ヒト好中球とマウスモデルを用いたスクリーニングにより、好中球の防御機構修飾を分子レベルで解析し、新規好中球-細菌の相互作用と、防御修飾機構を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

我々が確立した好中球機能の解析ツールを用いて、ゲノム情報が判明している全身感染分離株もしくは局所感染より分離された臨床分離株と、国立感染症研究所に保管されている全身感染症の臨床検体より分離された臨床分離株を用いて、ヒト好中球の機能検索法に菌を共存させることによって、好中球機能、エフェクター分子に対する抵抗性のスクリーニングを行う。好中球機能の抑制が確認された菌株に関しては、抑制を起こさない菌との、好中球との共培養系における遺伝子発現比較をマイクロアレイ法により解析することにより、候補遺伝子を同定し、その遺伝子産物が、宿主の機能分子、あるいは好中球シグナル伝達経路分子にどのように作用するかを同定する。

## 4. 研究成果

### (1) 劇症型レンサ球菌感染症における好中球傷害の分子機構

劇症型レンサ球菌感染症分離株において高発現している SLO が、好中球ネクロシスを誘導して、生体防御を傷害することを明らかにしていた。この接触を介する好中球傷害作用に係る分子を菌と好中球の共培養系で検索した。その結果、劇症型感染分離株による好中球ネクロシスは、活性化型 CD11b 分子に対する抗体の添加によって、最も効果的に阻害された。また、カルシウムイオンキレート剤である EDTA の添加によっても好中球ネクロシスが抑制された。さらに、菌をコラゲナーゼもしくはトリプシンで処理すると好中球ネクロシスは起きなかった。劇症型感染分離株に GFP を発現させて接触と好中球障害の関係を解析したところ、菌と接触した好中球のみが障害されていることが判明した。以上より、劇症型感染分離株は、コラーゲン様タンパクと CD11b を介して、カルシウム依存的に好中球表面に結合し、接触面で分泌する SLO により効果的に好中球傷害をもたらすことが示唆された。マウスに SLO 高発現重症感染症由来分離株を感染させた際に、末梢血および骨髄中の好中球系細胞が著しく減少することを見だし、*in vitro* での知見が *in vivo* 感染モデルにおいても実証された。同様な孔形成毒素を持つ重症感染症由来ブドウ球菌や腸管外病原性大腸菌に関して、

同様な機序が存在するか検討し、他の好中球機能を修飾するメカニズムに関しても、現在解析中である

### (2) 劇症型レンサ球菌感染症における好中球代替細胞の出現とその防御機構

宿主側の防御因子として、白血球減少を伴う劇症型感染マウスモデルの急性期において、顆粒球-単球コロニー刺激因子 (GM-CSF) 依存的に骨髄より血液中に放出され、感染部位に蓄積するリング状の核を持つ新規未熟骨髄系細胞群を同定した。この細胞群の特徴として、1)通常はTリンパ球やNK細胞から産生され、食細胞を活性化するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$  (IFN $\gamma$ )を産生するとともに、2)殺菌能をもつ一酸化窒素を産生するが、骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) のような3)獲得免疫抑制作用は認められない。この細胞群移入が重症レンサ球菌感染を劇的に改善することから、重症細菌感染症における白血球減少を補完する宿主防御因子であることが考えられた。同様な孔形成毒素を持つ重症感染症由来ブドウ球菌や腸管外病原性大腸菌に関して、同様に当該細胞誘導が認められるか否か、現在検討中である。

### (3) 類鼻疽菌により誘導される好中球細胞外トラップの修飾因子

近年、好中球は病原細菌を細胞内に取り込んで殺菌する他に、自身のDNAと顆粒内エフェクター分子を細胞外に放出し、捕えられた細菌を殺菌する機構 (Neutrophil extracellular Traps: NETs) が報告されている。しかし、菌血症由来の類鼻疽菌の生体防御にこの作用が関与しているか否か、また類鼻疽の発症危険因子である糖尿病とNETsの関係は不明であり、NETsの役割とその修飾因子を解析した。その結果、好中球は、類鼻疽菌に反応して時間依存的、菌量依存的にNETsを放出し、類鼻疽菌を殺菌することが明らかになった。NETsの放出には、NADPH酸化酵素活性が必要であったが、イノシトール三リン酸ナーゼ活性、Srcファミリーチロシンキナーゼ活性やMAPキナーゼ活性は不要であった。類鼻疽菌の病原因子であるIII型分泌装置分子Bsaや莢膜ポリサッカライドを欠損する株はNETs放出を増大させたことから、これらの菌側因子がNETsを負に制御していることが明らかとなった。さらに、糖尿病患者由来好中球は健常人由来の好中球と比べ、類鼻疽菌に反応して放出されるNETsの量が低下していた。以上のことから、類鼻疽菌はNETsの放出量を低下させることによって好中球による殺菌を回避する機構を備えていることと、糖尿病患者における発症危険因子の要因としてNETs放出応答の低下が関与してい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 Fukuda T, Matsumura T, Ato M, Hamasaki M, Nishiuchi Y, Murakami Y, Maeda Y, Yoshimori T, Matsumoto S, Kobayashi K, Kinoshita T, Morita Y. Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis. **mBio**. 2013 4(1):e00472-12. doi:10.1128/mBio.00472-1 査読有.
- ② 阿戸 学, 松村隆之, 池辺忠義. 2013. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症における菌側病原因子と好中球機能傷害の機序 化学療法の領域 私達の研究(121) 29(4):108-117. ISSN: 0913-2384.
- ③ 松村隆之, 阿戸 学, 小林和夫. 2012. 結核及び非定型抗酸菌感染症の診断 リウマチ科 解説 47(4):427-435.
- ④ Riyapa D, Buddhisa S, Korbsrisate S, Cuccui J, Wren B, Stevens M, Ato M, Lertmemongkolchai G. Neutrophil extracellular traps exhibit antibacterial activity against *Burkholderia pseudomallei* and are influenced by bacterial and host factors. **Infection and Immunity**. 2012 Nov;80(11):3921-9. doi: 10.1128/IAI.00806-12. 査読有.
- ⑤ Nakato G, Hase K, Suzuki M, Kimura M, Ato M, Hanazato M, Tobiume M, Horiuchi M, Atarashi R, Nishida N, Watarai M, Imaoka K, Ohno H. *Brucella abortus* exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor. **Journal of Immunology** 2012 Aug 15;189(4):1540-4. doi: 10.4049/jimmunol.1103332. 査読有.
- ⑥ Matsumura T, Ato M, Ikebe T, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K. Interferon- $\gamma$ -producing immature myeloid cells confer protection against severe invasive group A *Streptococcus* infections. **Nature Communications**. 2012 Feb;3, 678. doi: 10.1038/ncomms1677. 査読有.
- ⑦ Murase Y, Konnai S, Hidano A, Githaka NW, Ito T, Takano A, Kawabata H, Ato M, Tajima T, Tajima M, Onuma M, Murata S, Ohashi K. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in cattle and *Ixodes persulcatus* ticks. **Veterinary Microbiology**. 2011 May

5:149(3-4):504-7. doi:  
10.1016/j.vetmic.2010.11.025. 査  
読有.

- ⑧ Kobayashi K, Ato M, Matsumoto S. Global threads and the control of multi-drug resistant tuberculosis. **Journal of Disaster Research**. 2011 Apr;6(4):443-450. 査読有.
- ⑨ 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 Pathogens**. 2010 Apr 1;6(4):e1000832. doi:10.1371/journal.ppat.1000832. 査読有.

[学会発表] (計 10 件)

- ① Ato M. “Interferon-gamma-producing immature myeloid cells in severe Streptococcus infection. The Joint international Meeting of The 78th Meeting of the Japanese Society of Interferon and Cytokine Research and The 21st International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages. (東京 2013 年 5 月 20 日).
- ② Matsumura T, Ikebe T, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K, Ato M. The defensive role of a novel interferon- $\gamma$ -producing subpopulation of immature myeloid cells in severe invasive group A Streptococcus infections. 2012. 99<sup>th</sup> Annual meeting The American Society of Immunologists (米国 Boston, 2013 年 5 月).
- ③ Matsumura T, Kobayashi K, Ato M IFN- $\gamma$ -producing immature myeloid cells confer protection against severe invasive group A *Streptococcus* infections in mice. 第 40 回日本免疫学会学術集会 (千葉市, 2011 年 11 月 27-29 日).
- ④ Ato M. Regulatory genes of multiple virulence factors involved in severe invasive group A streptococcus infection. 2011. Singapore-Japan Joint Forum in Emerging Concepts in Microbiology (Singapore, 2011 年 11 月 15-16 日).
- ⑤ Ato M, Ikebe T, Matsumura T, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K. 2011. Contact with group A *Streptococcus* isolated from severe invasive infections induces rapid necrosis of human neutrophils. International Union of Microbiological Societies Congresses (札幌, 2011 年 9 月 6-10 日).
- ⑥ Matsumura T, Ikebe T, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K, Ato M. The protective role of a novel population of IFN-g-producing cells in severe invasive group A streptococcal infections. 2011. XVIII Lancefield International Symposium (Palermo, Italy, 2011 年 9 月 4-8 日).
- ⑦ Matsumura T, Ikebe T, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K, Ato M. A novel IFN-g-producing subpopulations of immature myeloid cells confers protection from severe invasive group A *Streptococcus* infections. 2011. 19th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (泉佐野市, 2011 年 5 月 25-27 日).
- ⑧ Ato M. Neutrophil dysfunctions by pathogenic bacteria. 2010. Symposium on High Throughput Approaches in Infection & Immunity (Hua Hin, Thailand, 2010 年 12 月 7 日).
- ⑨ Matsumura, T., Ikebe T, H. Watanabe, K. Kobayashi, and M. Ato. Identification of IFN-gamma producing cells in severe invasive group A streptococcal infection. 2010. 14th International Congress of Immunology (神戸, 2010 年 8 月 22-27 日).
- ⑩ Matsumura, T., Ikebe T, H. Watanabe, K. Kobayashi, and M. Ato. The defensive role of interferon- $\gamma$  produced by myeloid cells in invasive group A Streptococcus infection. 2010. 18th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (熊本, 2010 年 5 月 20-21 日).

[図書] (計 2 件)

- ① Matsumura T, Kobayashi K, Ato M. Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and their related cell subpopulations. The Research and Biology of Cancer. iConcept Press 2012. ISBN: 978-14775549-9-9.
- ② 免疫の事典 朝倉書店 桂 義元、河本宏、小安重夫、山本一彦 編集 2012. 阿戸学 「リケッチア」395、大西 真、阿戸学 「性感染症／性行為感染症」267-268.

[その他]

ホームページ等

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/from-imm/937-imm-02.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

阿戸 学 (ATO MANABU)

国立感染症研究所・免疫部・室長

研究者番号：20392318

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

大西 真 (OHNISHI MAKOTO)

国立感染症研究所・細菌第一部・部長

研究者番号：10233214

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

黒田 誠 (KURODA MAKOTO)

国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究

センター・センター長

研究者番号：80317411

飛梅 実 (TOBIUME MINORU)

国立感染症研究所・感染病理部・

主任研究官

研究者番号：60370962