

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460554

研究課題名(和文) 劇症型溶レン菌感染症起因株で特異的にみられる新規の変異遺伝子の同定および解析

研究課題名(英文) Identification and analysis of mutation genes found specifically in streptococcal toxic shock syndrome isolates

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：A群レンサ球菌は、咽頭炎等ありふれた病気から劇症型溶血性レンサ球菌感染症(STSS)のような重篤な病気を引き起こす。以前の研究で、STSS患者分離株は病原遺伝子を負に制御しているCsrS/CsrRやRggに高頻度で変異が存在することを明らかにした。本研究でこれら以外にどのような変異があるか調べた結果、新たに病原性遺伝子の発現を上昇させる変異(sic遺伝子のプロモーター変異)を見出した。この変異株はマウスへの致死性を上昇させ、この変異はSTSS患者分離株の方が咽頭由来株より有意にみられることが判明した。以上の結果から、sicプロモーターの変異はSTSSの病原性に重要な役割を持つことが考えられた。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus pyogenes (group A Streptococcus; GAS) is a widespread human pathogen and causes streptococcal toxic shock syndrome (STSS). STSS isolates have been previously shown to have high frequency mutations in the csrS/csrR (covS/covR) and/or rgg (ropB) genes, which are negative regulators of virulence. However, these mutations were found at low frequencies in emm1-genotyped isolates, the most prevalent STSS genotype. We sought to detect causal mutations of enhanced virulence in emm1 isolates lacking mutation(s) in the csrS/csrR and rgg genes. Two mutations associated with elevated virulence were found in the sic (a virulence gene) promoter and the csrR promoter. In vivo contribution of the sic promoter to pathogenicity and lethality was confirmed in a GAS mouse model. Frequency of the sic promoter mutation was significantly higher in STSS emm1 isolates than in non-invasive STSS isolates. Thus, this mutation plays a key role in the dynamics of virulence and STSS pathogenesis.

研究分野：細菌学

キーワード：劇症型溶血性レンサ球菌感染症 レンサ球菌

1. 研究開始当初の背景

劇症型溶血性レンサ球菌感染症(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は壊死性筋膜炎、ショック症状、急性腎不全、ARDS、DIC、多臓器不全などを起こし、死に至る可能性が高いことが知られている。この STSS は、1987 年に米国で最初に報告され、その後ヨーロッパやアジアからも報告されている。日本における最初の典型的な症例は 1992 年に報告されており、年間 100 人を超える患者が確認されている。そして、このうち約 30-50%が死亡しており、きわめて致死率の高い感染症である。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(*Streptococcus pyogenes*) である。しかしながら、STSS を引き起こした *S. pyogenes* と咽頭炎などを引き起こした分離株との違いは、明らかでなかった。

S. pyogenes は、抗原性の違いから 100 以上もの *emm* 型に分類される。この中で、STSS は、主として *emm1* や *emm3* 型の *S. pyogenes* によって引き起こされることが日本ばかりでなく、世界中で報告されている(文献 2-5)。日本においては、その後、*emm3* 型株による STSS は減少し、現在、*emm1* 型が全体の 40-60%を占めている(文献 2, 6)。

我々は、日本で分離された STSS 患者分離株(STSS 株)と咽頭炎等を引き起こした非侵襲性感染症分離株(non-invasive 株, NI 株)を比較した結果、STSS 株において制御因子をコードする *csrR/csrS* 遺伝子、*rgg* 遺伝子に有意に変異があることを明らかにした(文献 1)。これらの変異は、STSS 株の 57.3%を占めていた。しかしながら、*emm3* 型では、約 85%の STSS 株で変異がみられたが、最も分離比率の高い *emm1* 型株では、約 39%の株でしか変異がみられなかった(図 1)。このことから、*emm1* 型株において、*csrS/csrR* 遺伝子や *rgg* 遺伝子以外に病原性を上昇させているものがあることが考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、STSS 株において、*csrR/csrS* 遺伝子や *rgg* 遺伝子以外にどのような遺伝子に変異があり、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を明らかにし、STSS にどのような毒素が関与し、病態にどのような影響を与えているかを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. *emm* 遺伝子型別

CDC のホームページの方法に従い、primer 1 (TATT (C/G) GCTTAGAAAATTAA)、primer 2 (GCAAGTCTTCAGCTTGTT) を用いて、PCR により増幅する。PCR 産物を High Pure PCR Product purification kit (Roche) で精製し、*emm* seq2 (TATTCGCTTAGAAAATTAAAACAGG) プライマーを用いて塩基配列を決定した。決定した塩基配列を Blast-*emm* 検索サイト (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepblast.htm>) に入力し、*emm* 遺伝子型を決定した。

4. 研究成果

遺伝子発現の上昇

csrR/csrS 遺伝子や *rgg* 遺伝子に変異がみられなかった *emm1* 型の STSS 株 44 株と非侵襲性感染分離株 3 株から RNA を抽出し、5 つの証言因子をコードする遺伝子に対する定量 RT-PCR を行った。その結果、2 種類の発現パターンがあることが判明した。

csrS/csrR プロモーターの変異

これら発現が上昇した株について *csrR/csrS* 遺伝子や *rgg* 遺伝子のプロモーター領域の塩基配列を決定した結果、2 株において *csrS/csrR* 遺伝子のプロモーターに変異があることが判明した。

sic プロモーターの変異

6 株においては、*sic* 遺伝子のみ発現が上昇していた。そこで *sic* 遺伝子のプロモーター領域の塩基配列を決定した結果、6-bp の挿入配列がみられ、発現を調べた結果、この挿入により *sic* 遺伝子の発現が上昇したことが判明した。*Sic* 遺伝子は *emm1* 型に特異的にみられることから、*emm1* 型の *sic* 遺伝子のプロモーターの塩基配列を調べた結果、全部で 10 株において同じ位置に同じ配列の挿入配列が見られた。一方、非侵襲性感染分離株においては、このようなプロモーターの変異は見られなかった。*Sic* 遺伝子の変異は劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株において特異的にみられることが判明した。

マウスモデルにおける *sic* プロモーター変異の影響

非侵襲性感染分離株の *sic* プロモーターの変異株を作製し、マウスの腹腔内に菌を接種し、生存曲線を作製した。その結果、*sic* プロモ

一ター変異株は、変異のない株に比べて、有意に致死性が上昇することが判明した。

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8件)

1. Kaneko M, Maruta M, Shikata H, Hanayama M, Ikebe T. Acute abdomen due to group A streptococcus bacteremia caused by an isolate with a mutation in the *csrS* gene. J Infect Chemother. 21 (11): 816-819 (2015)
2. Ikebe T, Tominaga K, Shima T, Okuno R, Kubota H, Ogata K, Chiba K, Katsukawa C, Ohya H, Tada Y, Okabe N, Watanabe H, Ogawa M, Ohnishi M, Working Group for Beta-hemolytic Streptococci in Japan. Increased prevalence of group A streptococcus isolates in streptococcal toxic shock syndrome cases in Japan from 2010-2012. Epidemiol Infect 143 (4): 864-872 (2015).
3. Ikebe T, Chiba K, Shima T, Masuda C, Okuno R, Ohya H, Ogata K, Katsukawa C, Kawahara R, Tominaga K, Yabata J, Tada Y, Okabe N, Watanabe H, Chang B, Ogawa M, Ohnishi M, the Working group for beta-hemolytic streptococci in Japan. Evaluation of streptococcal toxic shock-like syndrome caused by group B streptococcus in adults in Japan between 2009 and 2013. J Infect Chemother 21 (3): 207-211 (2015).
4. Kohayagawa Y, Ishitobi N, Yamamori Y, Wakuri M, Sano C, Tominaga K, Ikebe T. Streptococcal toxic shock syndrome from necrotizing soft-tissue infection of the breast caused by a mucoid type strain. J Infect Chemother 21 (2): 144-147 (2015).
5. Okamoto F, Murakami K, Maeda E, Oishi A, Etoh Y, Kaida M, Makigusa M, Nakashima K, Jinnouchi Y, Takemoto H, Kakegawa H, Yamasaki C, Manabe S, Sasaki M, Ogata K, Ikebe T, Sera N. A Foodborne outbreak of group A streptococcal infection in Fukuoka prefecture, Japan. Jpn J Infect Dis. 67 (4): 321-322 (2014).
6. Morimoto M, Tamura S, Hayakawa T, Yamanishi H, Nakamoto C, Nakamoto H, Ikebe T, Nakano Y, Fujimoto T. Phlegmonous gastritis associated with group A streptococcal toxic shock syndrome. Intern Med 53 (22): 2639-2642 (2014).
7. Sanderson-Smith M, Oliveira D, Guglielmini J, McMillan D, Vu T, Holien J, Henningham A, Steer A, Bessen D, Dale J, Curtis N, Beall B, Walker M, Parker M, Carapetis J, Melderer L, Sriprakash K, Smeesters P, the M Protein Study Group. A systematic and functional classification of *Streptococcus pyogenes* that serves as a new tool for molecular typing and vaccine development. J Infect Dis 210 (8): 1325-1338 (2014)
8. McMillan DJ, Drèze P, Vu T, Bessen DE, Guglielmini J, Steer AC, Carapetis JR, Melderer LV, Sriprakash KS, Smeesters PR, The M Protein Study Group. Updated model of group A *Streptococcus* M proteins based on a comprehensive worldwide study. Clin Microbiol Infect 19 (5): E222-E229 (2013). doi: 10.1111/1469-0691.12134.

[学会発表](計8件)

1. 池辺忠義. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症(ワークショップ: 侵襲性細菌感染症-原因菌ごとの現状と今後取り組むべき共通の課題-). 第89回日本細菌学会総会、大阪、2016年3月23-25日.
2. 松村隆之、池辺忠義、大西真、阿戸学. The defensive role of IL-6-producing immature myeloid cells in group A streptococcal infections. 第89回日本細菌学会総会、大阪、2016年3月23-25日.
3. 池辺忠義、緒方喜久代、大屋日登美、河原隆二、奥野ルミ、久保田寛顕、内谷友美、矢端順子、多田有希、岡部信彦、常彬、渡邊治雄、大西真. 2009-2013年における劇症型B群レンサ球菌感染症の検討. 第89回日本感染症学会学術講演会、京都、2015年4月16-17日.
4. 吉澤定子、池辺忠義、福井悠人、石井良和、館田一博. 当院における劇症型溶血性レンサ球菌感染症の臨床的特徴と免疫学的検討. 第89回日本感染症学会学術講演会、京都、2015年4月16-17日.
5. 金子政彦、丸田雅樹、池辺忠義. 致死の経過を辿った *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) による劇症型溶血性連鎖球菌感染症の3例. 第85回日本感染症学会西日本地方会学術集会、奈良、2015年10月15-17日.
6. 池辺忠義、奥野ルミ、緒方喜久代、大屋日登美、渡邊治雄、小川道永、大西真. Increase of group A *streptococcus* isolates in streptococcal toxic

shock syndrome cases in Japan. 第 87 回日本細菌学会総会、東京、2014 年 3 月 26-28 日.

7. 松村隆之、池辺忠義、阿戸学. The defensive role of immature myeloid cells in severe invasive group A *Streptococcus* infections. 第 87 回日本細菌学会総会、東京、2014 年 3 月 26-28 日.
8. 土屋勅、松村隆之、池辺忠義、小林和夫、阿戸学. *Fat-1* transgenic mice are more susceptible to severe invasive group A *Streptococcus* infections. 第 87 回日本細菌学会総会、東京、2014 年 3 月 26-28 日.

〔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
なし

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

阿戸学 (ATO Manabu)

国立感染症研究所・免疫部・部長

研究者番号：20392318