

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461519

研究課題名(和文) A群連鎖球菌保有各種病原因子による免疫応答解析に基づくDNAワクチン作製基礎研究

研究課題名(英文) DNA vaccine production fundamental Study based on the immune response analysis by group A hemolytic streptococcus held various pathogenic factor

研究代表者

新井 和明 (ARAI, KAZUAKI)

北里大学・生命科学研究所・講座研究員

研究者番号：30547386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：A群溶血性連鎖球菌感染症は軽微な咽頭炎から重篤となる劇症型連鎖球菌感染症と種々の病態を示す。我々は各種病原因子に注目し、菌株から病原因子が含まれる蛋白分画を精製し、それをマウスの骨髄細胞をGM-CSFでマクロファージ、樹状細胞に分化させた細胞に作用させた。細胞から遊離される多種のサイトカインやケモカインのmRNAをqRT-PCRで、またその産生蛋白を蛍光磁性マイクロビーズを使ったEIA法により検出した。その結果、炎症性サイトカインであるTNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-12p40、KC(CXCL2)の発現が生菌で顕著にまたIL-6、iNOS、KC、MIP-2の上昇も見られた。

研究成果の概要(英文)：Group A hemolytic streptococcus shows a fulminant streptococcal infection and a variety of pathological conditions become severe from mild pharyngitis. We focus on its various pathogenic agents, to purify the protein fraction containing the causative agent of the particular strain, and it is differentiated cells collected from mouse bone marrow macrophages GM-CSF, dendritic cells allowed to act on. A variety of cytokines and chemokine mRNA released from the cells by qRT-PCR, also detected the production of protein from both sides by the EIA method using the fluorescent magnetic microbeads. As a result, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-12p40, KC (CXCL2) significantly also IL-6, iNOS expression in viable cell, KC, elevated MIP-2 is a inflammatory cytokine It was also observed.

研究分野：感染症内科学

キーワード：A群溶血性連鎖球菌 サイトカイン ケモカイン 病原性 炎症 CpG-ODN DNAワクチン

1. 研究当初の背景

(1) 本邦においてA群溶血性連鎖球菌(A群溶蓮菌: *Streptococcus pyogenes*) 感染症は咽頭炎の原因微生物として5類感染症の小児科定点届出数は年間15万人から27万人におよんでいる。猩紅熱、膿痂疹等の軽度な非浸襲性感染症もある。しかし極めて病態の進行が早い劇症型溶蓮菌感染症の原因微生物として5類の全数把握感染症届出の対象であり、2011年から年間届出数は増加している。

(2) A群溶蓮菌はマクロライド耐性、テトラサイクリン耐性(Arai K, et al, 51st ICAAC, Chicago)フルオロキノロン耐性(Arai K, et al. J Antimicrob Chemother 66: 494-8, 2011)が出現し微増しつつある。またペニシリン耐性は現在ないもののその出現が危惧される。

(3) A群溶蓮菌感染に続発するリウマチ熱は心筋炎をはじめとする心疾患を引き起こす。日本、欧米等の先進国では10万人当たり0.23から1.88人と低い、開発途上国では千人あたり1.2から150人とリウマチ性心疾患の発生率は極めて高い。(Catherine Oliver. JAntimicrob Chemother 25: 13-21, 2000)。この疾患を撲滅することは開発途上国のみならず先進国でも望まれる世界的な課題である。

2. 研究目的

A群溶血性連鎖球菌(A群溶蓮菌: *Streptococcus pyogenes*) 感染症は多様な病態を示す。その病原因子は多種にわたり、それぞれの役割、特に関連性はすべて解明されていない。その中で劇症型溶蓮菌感染症(人食いバクテリア)は重要である。いまだにワクチンによる予防は確立されていない。本研究では以下の項目を解析することにより、予防法の確立を目指す。

マクロライド耐性A群溶蓮菌の研究を進める過程で各種病原因子関連遺伝子の解析を行なった。*emm* 遺伝子によってコードされる細胞への付着に関係ある表面に存在するM蛋白とその他の病原因子関連遺伝子の解析を進めた。その結果を下記の表に示す(新井等第86回日本感染症学会、長崎)。CDC(米国疾病対策センター)のデータベースには約150種の*emm* 遺伝子(M蛋白)が録されている。

従来のワクチン作製研究はこれを抗原としてきたが、経年的、諸外国によって流行株

が変化することが支障となり多価ワクチンの作製が出来なかった。A群溶蓮菌は病原因子であるストレプトリジンO(SLO)、発赤毒素(SpeA, SpeB, SpeC, SpeF, SpeG, SpeH, SpeJ)、増殖毒素(SmeZ)、ストレプトリジンO(SLO)、ストレプトリジンS(SagA)、スーパー抗原(SSA)等が存在する。また細胞への付着因子であるフィブロネクチン結合蛋白(Fbp)フィブリノーゲン結合蛋白等、多種類存在し、劇症型溶蓮菌感染症の急激な病状の進行はこれらの病原因子が総合的かつ連携して働いていると思われる。これら多くの病原遺伝子を遺伝子操作により、近年可能となりつつあるDNAワクチンの手法を用い、普遍的な予防ワクチンを作製することを目的とする。

(1) 各種病態におけるA群溶蓮菌臨床分離の病原因子とその関連遺伝子の保有状況の調査

(2) 各種病原因子とその複数組み合わせによる免疫応答の解析

(3) 免疫応答の解析の結果による予防DNAワクチン作成プロトコール

3. 研究方法

(1) A群溶蓮菌菌株の収集と保存

2012年8月から2013年7月までの1年間でA群溶蓮菌2,698株と2014年8月から2015年7月までの1年間で1,964菌株を収集した。5%ヒツジ血液それらはブレインハートインフュージョン液体培地とグリセリンを1対1の割合で混合した保存用の培地1mlに懸濁し、-80℃のディープフリーザーで保存した。また韓国、慶尚国立大学病院で収集した菌171株も同様に保存した。

(2) 収集菌株の病原因子解析

収集菌株の幾つかを選択し、前述の発赤毒素6種類、SmeZ、SLO、SSA、SagAをコードする遺伝子をPCR法により検出した。

(3) 菌株の薬剤感受性試験とMLSTの実施

韓国株の薬剤感受性検査を実施し、168株についてマクロライド系薬を始めとする全11薬剤について最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。そして日本株と比較した。その際マクロライド耐性遺伝子である*ermA*、*ermB*、*mefA* 遺伝子、分子疫学的比較手法としてMultilocus Sequence Typing (MLST)を実施した。

(4)限外ろ過器による培養液の粗分画

病原遺伝子の保有状況に従い、それぞれの株を 5%ヒツジ血液加トリプチケースソイ寒天培地 (コージンバイオ) で培養し、それを Todd-Hewitt broth(Difco) と NCTC135 Medium(Sigma)で 3 日間培養した。それを限外ろ過器 Vivaspin20-10K、-30K、-50K を使用し、蛋白粗分画 <10kDa、10 ~ 30kDa、30 ~ 50kDa、>50kDa を得た。

(5) マウス培養細胞への GAS 菌体および蛋白粗分画の添加と培養細胞の各種サイトカイン・ケモカインの発現

BALB/C マウスの大腿骨、脛骨から骨髓を採取し、GM-CSF(Sigma)を添加した RPMI1640 medium(Sigma):10%FCS(Bioclone),2ME(ナカライテスク)、PC/SM(ナカライテスク)にて 8 日間、5%炭酸ガスにて培養した。そして RPMI1640 培養液にて洗浄し、GM-CSF(Sigma)を除去した。48 ウエル浮遊細胞用培養プレート (住友ベークライト) の各ウエルに生菌、死菌は約 2×10^7 個/ウエル、蛋白粗分画は 100ng/well 添加し、3 日間培養した。その培養液からアイソジェン (ニッポンジーン) にて TotalRNA を抽出した。それを PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ) にて cDNA に逆転写し、それをテンプレートとして各種サイトカイン、ケモカインの qRT-PCR で行った。

(6)サイトカイン・ケモカイン蛋白の定量

8 項目のサイトカイン・ケモカインを同時に検出する xMAP テクノロジーを利用した Luminex100 を使用し測定した。

4. 研究成果

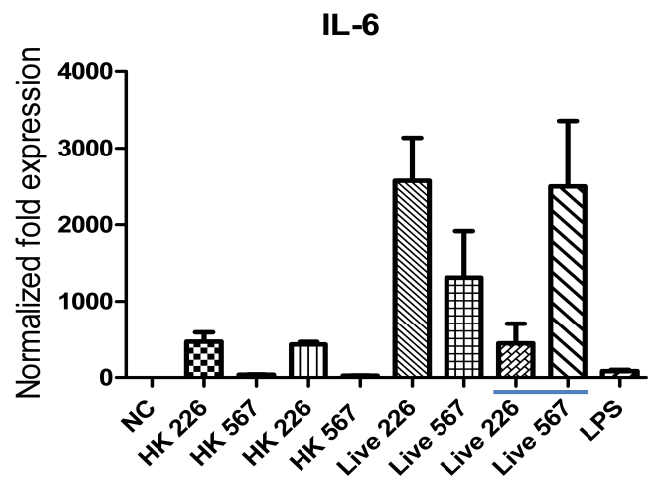
(1) 収集した 5 つの菌株について病原因子を調べたところ全ての菌株が持っていたのは発赤毒素 B(SpeB)とストレプトリジン O(Slo)であった。(表 1)

表 1 各種菌株と病原因子保有状況

No	em	sp	sp	sp	sp	sp	sp	sp	sm	sl	ss	sa
	m	eA	eB	eC	eF	eG	eH	eJ	eZ	o	a	gA
226	1	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+
515	7	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
567	6	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
1205	4	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
1206	1	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+

(2) 韓国のマクロライド耐性 A 群溶連菌と日本の同株の疫学的な比較を行った。その結果、日本株は多様性が有り韓国株が解析数が多いのに比較し、その数は少ないが MLST のタイプは多かった。また耐性遺伝子である ermA は韓国株からは検出されなかった。(発表論文を参照)

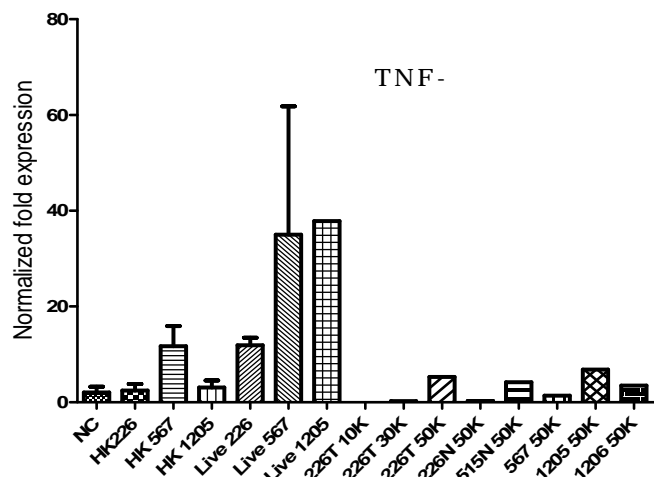
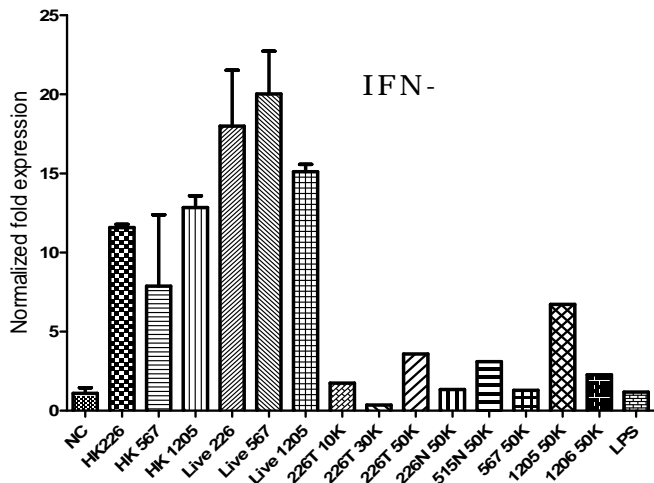
(3) マウス骨髓細胞 (BM-cell) に生菌、死菌、そして蛋白粗分画 qRT-PCR によるサイトカイン・ケモカインの測定を行った結果、臨床分離された GAS は株毎に、宿主細胞に及ぼす応答 (TNF 刺激性など) が異なっていた。ペニシリン、ストレプトマイシン添加よりアンピシリン添加溶媒で BM-cell 由来の mRNA の増加が観察される分子 (MIP-2、IL-15 など) が存在した。KC、MIP-2 は細胞の炎症に大きく関与するケモカインと言われ TNF- α 、IL-6、chemokines などの mRNA 発現は加熱死菌化 (70 $^{\circ}$ C、70 分) した GAS 菌体よりも生菌を添加した場合に顕著であった。GAS 生菌添加後の BM-cell 細胞内で mRNA 発現が最も増加したのは IL-1 で、IL-6、iNOS、KC、MIP-2 などがこれに次いでいた。



GAS 由来の蛋白添加により BM-cell 由来 IL-18 の mRNA が増加した。

GAS 由来の蛋白分画は株により炎症惹起性が異なり、特に TNF や IL-6 の刺激性/抑制性を解析する必要があると考えられた。GAS は菌株ごとに産生蛋白の種類に多様性が有り、それらに応答するサイトカインに違いがある。

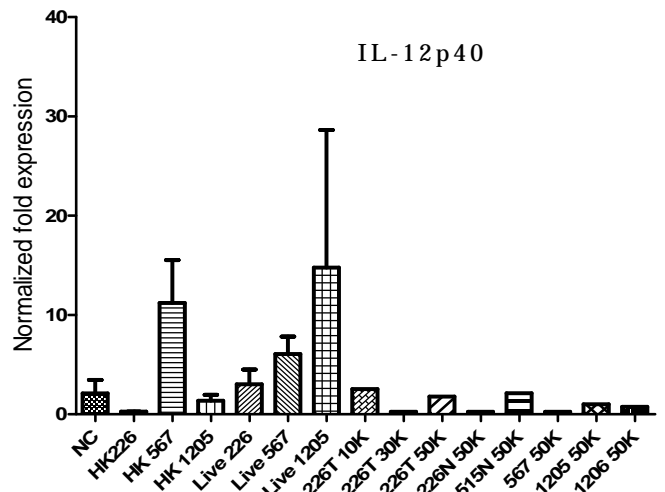
Th1 タイプの炎症に関与する TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-12p40、KC(CXCL2)の発現が生菌で顕著に見られた。



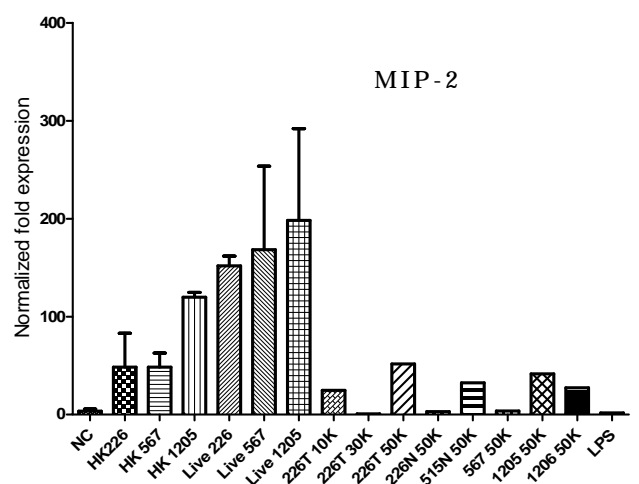
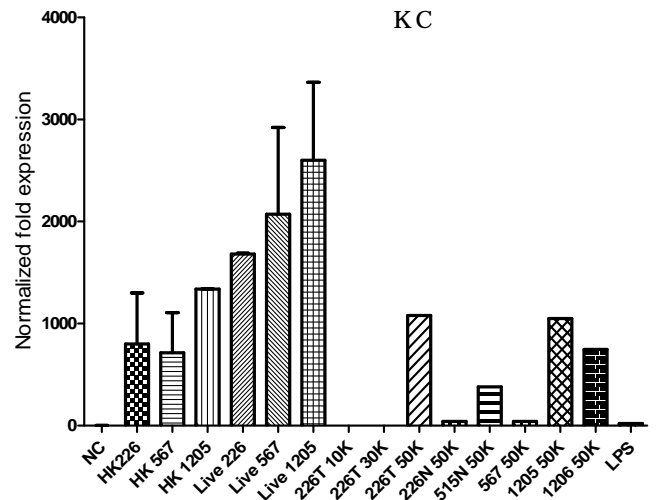
また生菌程ではないが、50kDa以上の粗分画でIL-1の上昇が見られた。生菌、死菌、粗分画に対し、細胞は多くの免疫応答が存在する。各粗分画に対し細胞の反応性が判明したが、それらの結果を元にどの粗分画の精製度を高めて行きたい。今回はマウスの骨髄細胞を用いたが、今後ヒトの細胞との反応をより精製精度を高めて行きたい。またB細胞については検討しなかったが今後進めて行きたい。

(4) A群溶連菌を使用した病原性を定量化する検査法の検討についてであるが、微生物の宿主に対する病原性の検査法は確立されてはいない。そこで我々はその確立を目指し、軽微な咽頭炎から重篤な壊死性菌膜炎等、多数の病態を示すA群溶血性連鎖球菌を使用し、それをマウス骨髄細胞から分化誘導した単球系細胞に反応させ、そこから産生するサイトカイン、ケモカインを定量解析することで病原性の定量化を試みたので報告する。

菌株により応答する炎症関連分子であるサイトカイン、ケモカイン等に違いがある。



生菌を添加した単球やマクロファージに対しqRT-PCRを実施することにより、TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6、IL-12p40、KC、MIP-2の発現見られ炎症の程度がわかる。IL-1 β 、KCの発現が50kDa以上の分画で特に見られ、炎症を捉えることが出来る。

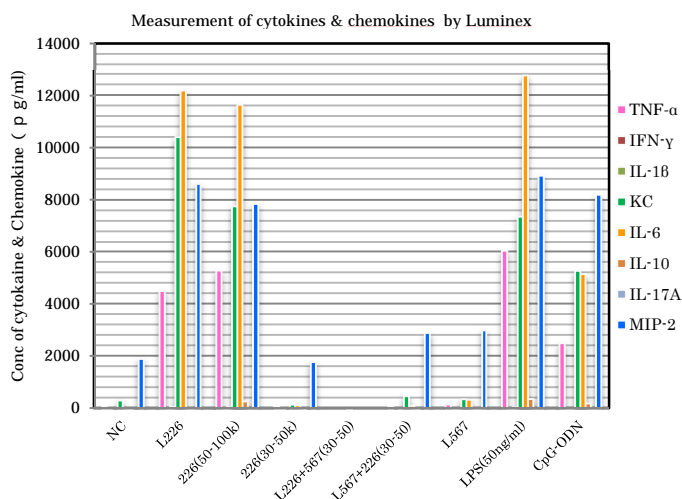


1種類のサイトカイン等の炎症関連物質ではなく、複数の炎症関連分子組み合わせ、定量化することで病原性を検査できる。

マウスの骨髄細胞を用いたが、採血した血液よりヒトのリンパ球を集めそれに細菌抽

出抗原を添加し、リンパ球から産生する各種サイトカイン、ケモカイン等を定量することによりヒトへの応用が可能であることが示唆された。

(5)近年多くの研究室で使用されているルミネックス 100 は遊離したサイトカイン・ケモカインの定量に有用性があった。この機器はきわめて感度が優れ、短時間で結果が出る事も優れている。Luminex を使用する際、BM-cell に DNA ワクチンアジュバントと言われる CpG-ODN を添加したところ IL-6 の増加が見られた。これは DNA ワクチンを作成する際必要なものである事が判明した。



5. 主な発表論文

[雑誌論文]

Takashi Takahashi, Kazuaki Arai, Dong-Hyun Lee, Eun-Ha Koh, Haruno Yoshida, Hisakazu Yano, Mitsuo Kaku and Sun-joo Kim. Epidermiological Study of Erythromycin-Resistant *Streptococcus pyogenes* from Korea and Japan by emm Genotyping and Multilocus Sequence Typing. Ann Lab Med. 査読有、2016;36:1-6 DOI 10.3343/al.m.2016.36.1.9

[学会発表]

Yamamoto N, Nakamura K, Arai K, Dela Cruz C, Machida T, Ogura Y, Abe Y, Iseki K, Askenase P and Kanemitsu K. IL-13- dependent bio makers with liver inflammatory differentiation after pneumococcal sepsis during rapid inflammatory phase. International Congress Immunology 2016. Aug 21 ~ 26. Melbourne Convention and Exhibition Center (Australia, Melbourne-city)

新井和明, 山本夏男, 吉田春乃, 仲村究, 大花昇, 金光敬二, 高橋孝. A 群溶血性連鎖球菌を使用した病原性を定量化する検査法の検討. 第 27 回日本臨床微生物学会. 2016 年 1 月 29 日 ~ 1 月 31 日. 仙台国際センター (宮城県仙台市)

山本夏男, 新井和明, 吉田春乃, 仲村究, 大花昇, 高橋孝, 金光敬二. A 群溶連菌由来 30kDa 蛋白産物が IL-6 及び MALP-3 の早期反応系におよぼす役割. 第 62 回日本化学療法東日本支部総会・第 64 回日本感染症学会東日本地方会学術総会. 2015 年 10 月 21 日 ~ 23 日. 札幌ロイトンホテル (北海道, 札幌市)

新井和明, 山本夏男, 吉田春乃, 仲村究, 大花昇, 金光敬二, 高橋孝. A 群溶血性連鎖球菌の蛋白粗分画による Th1 タイプの炎症を惹起する機序の解明. 第 62 回日本化学療法東日本支部総会・第 64 回日本感染症学会東日本地方会学術総会. 2015 年 10 月 21 日 ~ 23 日. 札幌ロイトンホテル (北海道, 札幌市)

山本夏男, 新井和明, 吉田春乃, 仲村究, 大花昇, 高橋孝, 金光敬二. A 群溶連菌由来の低分子産物に应答する宿主細胞の分子機構. 第 69 回日本細菌学会東北支部総会. 2015 年 8 月 21 日 ~ 8 月 22 日. 郡山ビッグアイ (福島県, 郡山市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 和明 (ARAI, Kazuaki)
北里大学・生命科学研究所・講座研究員
研究者番号: 3 0 5 4 7 3 8 6

(2) 研究分担者

山本 夏男 (YAMAMOTO, Natuo)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 5 0 4 6 6 5 6 2

高橋 孝 (TAKAHASHI, Takashi)
北里大学・感染制御科学府・教授
研究者番号: 0 0 2 9 2 8 5 5