

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670469

研究課題名(和文) 侵襲性感染症由来A群レンサ球菌が保有する細胞間透過能に係わる宿主因子の同定

研究課題名(英文) Identification of host factors contributing to host intercellular translocation of Group A Streptococci which causes invasive infections

研究代表者

高橋 孝 (Takahashi, Takashi)

北里大学・大学院感染制御科学府・教授

研究者番号：00292855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：病原細菌(A群レンサ球菌)感染に関するデータベース(宿主情報/病原体情報)・細胞実験・動物実験を通じて、強毒菌株と弱毒菌株が選別された。同弱毒菌株における結果と比較することにより、同強毒菌株が保有する細胞間透過能に係わる有意な病原因子(rocA遺伝子の変異)、同細胞間透過能に係わる有意な宿主因子(Gstp1遺伝子発現の亢進)に関する知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：We selected high-virulent and low-virulent Group A streptococcal strains through the database concerning patients and pathogen characteristics, experiment assessing host intercellular translocation, and experiment using human CD46-transgenic mice, in order to clarify the pathological conditions of invasive streptococcal infections. As compared with those of the low-virulent strain, there were significant virulence factor (substitution of rocA gene) and host factor (up-regulation of Gstp1 gene expression), which contributed to host intercellular translocation of the high-virulent strain.

研究分野：感染症学、臨床微生物学、感染制御学

キーワード：細菌 侵襲性感染症 細胞間透過 ゲノム 病原因子 宿主因子

1. 研究開始当初の背景

(1) A 群溶血性レンサ球菌 (Group A Streptococcus, GAS; S. pyogenes)は非侵襲性の局所感染症である扁桃炎・膿痂疹を呈するのみならず、播種性の侵襲性感染症も惹起する。侵襲性レンサ球菌感染症 (Invasive streptococcal infection, ISI)は無菌的臨床検体(主に血液等)より溶血性レンサ球菌が分離されたものと定義され、その中でさらに重篤な臨床像(ショック・多臓器障害)を生じるものとして劇症型レンサ球菌感染症 (Streptococcal toxic shock syndrome, STSS)があり、STSSの死亡率は30-40%とされている。STSSを含めたISIは播種性の重篤な疾患ではあるが、未だその病態機構は決定されていない。

その理由として、GASはその病原因子が多岐に亘ることから多数の病原因子による疾患病態機構の同定には同因子の網羅的解析が必要となる点とSTSSの臨床像に類似しているモデル動物の実験系が乏しい点が挙げられる。さらに、ISIにおける宿主因子の明確な関与も十分に解明されていないのが現状である。

(2) 研究代表者・研究分担者・連携研究者は、これまでの研究実績として、強毒型GAS株を用いた全ゲノム解読を通じて特徴的な塩基置換を見いだしている。さらに、GASが付着する宿主細胞側の受容体であるヒトCD46を保有(human CD46-transgenic, hCD46-Tg)するマウスの足蹠に臨床分離株を接種することで皮膚軟部組織の壊死と共に感染後数日以内で死亡する動物実験系を確立している。

そこで、細胞実験・動物実験を通じて、GASの宿主細胞間透過能とそれに係わる病原因子・宿主因子からISIの病態に迫りたいという本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では当該研究期間において以下の項目を明らかにすることを目的とする。

- (1) GAS 臨床分離株における細胞間透過能・病原性を保有する菌株
- (2) 同菌株における細胞間透過能に係わる病原因子
- (3) 同菌株における細胞間透過能に係わる宿主因子
- (4) 同病原因子・宿主因子の阻害による細胞間透過能の変動

3. 研究の方法

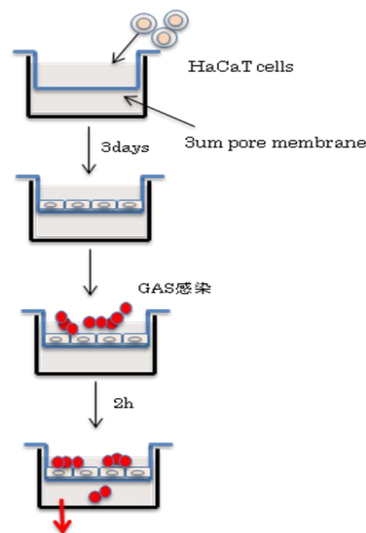
平成25年度(1年目)および平成26年度(2年目)において以下のように本研究を展開する。

<1年目> 細胞/動物実験を通じた細胞間透過能・病原性を保有する強毒菌株の選別 探索的なアプローチを用いた細胞間透過能に係わる病原因子の推定とその検証

<2年目> 強毒菌株が保有する細胞間透過

能・病原性に係わる宿主因子の網羅的な探索 同宿主因子の阻害を介した強毒菌株における細胞間透過能の変動

(1) **細胞間透過能・病原性を保有する強毒菌株の選別**：研究室保存菌株に関する情報と患者情報を収集しているデータベース(連結不可能匿名化済み)を活用して、STSSを含むISIの有無(患者情報)および培養上での集落ムコイド形成の有無(菌株情報)に基づいて候補株を選別した。ポア膜上に単層化したヒト皮膚角質細胞(HaCaT cells)に選定菌株を添加して、下層チャンバーまで透過した菌数の算定により細胞間透過能を評価した(図1)。



下層培地 Translocation(%)  
 plating = 下層GAS(CFU)/添加GAS(CFU) × 100

図1 細胞間透過能を評価する細胞実験

さらに、細胞間透過能を有する選定菌株をhCD46-Tgマウスの足蹠に接種して、病原性(致死性・局所の壊死等)を確かめた。

(2) **細胞間透過能に係わる病原因子の探索と検証**：(1)にて選別した強毒菌株を用いて全ゲノム解読を実施した。強毒株が保有するムコイド形成能の評価として、ヒアルロン酸(ムコイド構成物質)の産生量を測定した。また、強毒株と弱毒対照株間の発現プロファイルの相違を確認するために、二次元電気泳動を行った。さらに、同強毒株に対する遺伝子組換え株を作製し、同作製株が保有する細胞間透過能・hCD46-Tgマウスへの足蹠接種による病原性を評価した。

(3) **強毒菌株の細胞間透過能・病原性に係わる宿主因子の探索**：前年度において、細胞間透過能・病原性を有する強毒菌株として選別し、細胞間透過能に係わる病原因子が探索された、ムコイド型株を活用した。同ムコイド型強毒株が皮膚角質細胞による単層間を通過する際、非ムコイド型弱毒対照株による細胞間透過と比較して、その発現が20倍以上亢進または減弱する宿主因子に関して遺伝子発現用 microarray を用いて網羅的に探索

した。さらに、同強毒菌株を hCD46-Tg マウスの足蹠に接種して、感染局所の宿主因子に関して同 microarray を用いて探索した。細胞実験/動物実験を通じて共有される宿主因子を抽出した。

(4) **宿主因子の阻害を介した強毒菌株における細胞間透過能の変動**：(3)にて抽出された宿主遺伝子を活用して Pathway 解析による遺伝子 network の構築を試みた。同 network 上の中心に位置する宿主遺伝子を選定した。RNA 干渉により同遺伝子発現が減弱した皮膚角質細胞を作製して、同ムコイド型強毒株が保有する細胞間透過能が変動するか否かを検証した。

#### 4. 研究成果

当該研究期間において以下の研究成果が得られた。

(1) **細胞間透過能・病原性を保有する強毒菌株の選別**：前述のデータベースを介して ISI 由来 76 株 (STSS 由来 24 株を含む) が抽出された。同皮膚角質細胞単層間での高透過性および hCD46-Tg マウスへの足蹠接種による局所病態・致死性の評価により、ムコイド形成を保持する強毒株 (髄膜炎由来株・STSS 由来株) を選定するに至った。また、低透過性・低病原性を示した非ムコイド形成株が弱毒対照株として設定された。

(2) **細胞間透過能に係わる病原因子の探索と検証**：同ムコイド型強毒株と同非ムコイド型弱毒対照株との比較ゲノム解析を通じて、強毒株が保有する *rocA* 遺伝子領域における塩基置換 (464 番目：G A 置換による終止コドンとなるフレームシフト) を発見した。同強毒株が保有する形質の定量評価として、ヒアルロン酸産生量の亢進が確認された。また、二次元電気泳動により、同強毒株と同弱毒対照株間での特異な発現因子の差異も認められた。さらに、同弱毒対照株から抽出した *rocA* 遺伝子を同強毒株へ導入することで相補株を作製した。同相補株を用いた細胞/動物実験では、細胞間透過能の低下・マウス接種足蹠での病原性 (局所壊死) の減弱を観察できた。同相補株では、ヒアルロン酸産生量の低下も見られた。

以上の結果から、*rocA* 領域における有意な塩基置換は菌体最外層におけるムコイド形成能の亢進を惹起し、単層細胞間の透過能および生体への病原性を増強させる可能性が示唆された。本研究で得られた *rocA* 領域での変異に関する知見は文献情報データベース上新規性がある。

(3) **強毒菌株の細胞間透過能・病原性に係わる宿主因子の探索**：細胞実験/動物実験を通じて共有される宿主因子に関して、その発現が亢進する抽出因子として Gstp1 遺伝子・ケラチン (Krt)/ケラチン関連因子 (Krtap) 遺

子ファミリー等、その発現が減弱する抽出因子としてイオン結合遺伝子・受容体活性遺伝子・酵素活性遺伝子等が認められた。

(4) **宿主因子の阻害を介した強毒菌株における細胞間透過能の変動**：同 Pathway 解析により、Gstp1 遺伝子を中心とし、その下流で発現が亢進する Krt/Krtap 遺伝子ファミリーによる network が構築された (図 2)。

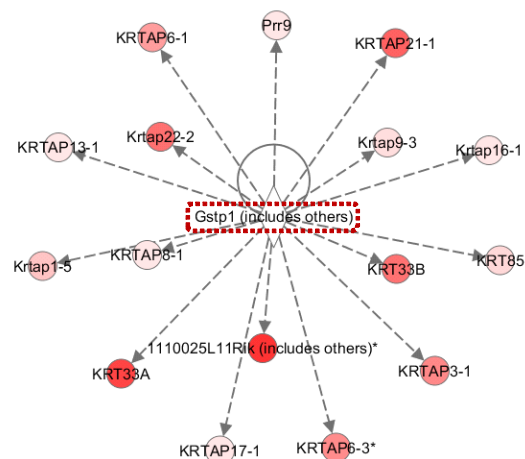


図 2 Pathway 解析による遺伝子 network の構築図

同 network 上の中心に位置する Gstp1 遺伝子が阻害対象となる宿主因子として選定された。RNA 干渉を介して同遺伝子発現が減弱した皮膚角質細胞を作製した所、同ムコイド型強毒株による細胞間透過能の低下を確認できた。

以上の結果から、ムコイド型強毒株が有する細胞間透過能に係わる宿主因子のひとつとして Gstp1 が存在する可能性が示唆された。本研究で得られた同宿主因子に関する所見は文献情報データベース上新規性がある。

(5) 今後の展望として、以下の点が挙げられる。Gstp1 に対する polyclonal 抗体を作製する。hCD46-Tg マウス足蹠への同ムコイド型強毒株の感染前 感染同時 感染後に同抗体を局所あるいは血中へ投与することで、病態 (致死性・局所の壊死等) の改善を呈するか否かを解析する。同実験を通じて、同強毒株が有するマウス病原性に係わる宿主因子としての Gstp1 の可能性を検証することができる。

#### 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 6 件)

Matoba T, Nakatani Y, Arai K, Matsui H, Yoshida H, Takahashi T. Interleukin-1 $\beta$  response of peritoneal macrophages to *Streptococcus pyogenes* exposure: differential response to living and heat-killed bacteria. *J Exp Clin Med*

査読有 5, 2013, 227-230.  
DOI: 10.1016/j.jecm.2013.10.011  
Kakuta R, Yano H, Hidaka H, Miyazaki H, Irimada M, Oda K, Arai K, Ozawa D, Takahashi T, Kaku M, Katori Y. Severe acute otitis media caused by mucoid *Streptococcus pyogenes* in a previously healthy adult. *Tohoku J Exp Med* 査読有 232, 2014, 301-304.

DOI: 10.1620/tjem.232.301  
高橋 孝, 吉田春乃, 松井英則. 溶血性連鎖球菌と化膿性関節炎. *Medical Practice* 査読無 31, 2014, 147.

Shibayama A, Tamaki M, Nagasawa H, Nakamata S, Nakamori Y, Yoshida H, Takahashi T. Necrotizing fasciitis caused by infection with *Streptococcus pyogenes* harboring *emm* genotype 11 and sequence type 403. *J Exp Clin Med* 査読有 6, 2014, 166-167.

DOI: 10.1016/j.jecm.2014.07.001  
Yoshida H, Ishigaki Y, Takizawa A, Moro K, Kishi Y, Takahashi T, Matsui H. Comparative genomics of the mucoid and nonmucoid strains of *Streptococcus pyogenes*, isolated from the same patient with streptococcal meningitis. *Genome Announc* 査読有 3, 2015, e00221-15.

DOI: 10.1128/genomeA.00221-15  
高橋 孝, 吉田春乃. 壊死性筋膜炎の鑑別. *Medical Practice* 査読無 32, 2015, 694.

〔学会発表〕(計 10 件)

Takahashi T, Yoshida H, Arai K, Matsui H. Interleukin-1 $\beta$  response of peritoneal macrophages to *Streptococcus pyogenes* exposure: differential response to living and heat-killed bacteria. *2014 Beijing International Conference of Infection Control* Mar 21, 2014. Peking University First Hospital (Beijing, People's Republic of China).

高橋 孝, 新井和明. 劇症型感染症由来 A 群溶血性レンサ球菌曝露に伴う腹腔マクロファージにおけるサイトカイン応答: 死菌曝露との比較. *第 25 回日本臨床微生物学会総会* 2014 年 2 月 1 日~2 月 2 日. 名古屋国際会議場(名古屋市, 愛知).  
吉田春乃, 松井英則, 的場時代, 新井和明, 高橋 孝. 髄膜炎由来レンサ球菌株の強毒化に及ぼす *rocA* 遺伝子の影響. *第 87 回日本感染症学会学術講演会* 2013 年 6 月 5 日~6 月 6 日. パシフィコ横浜(横浜市, 神奈川).

吉田春乃, 松井英則, 高橋 孝. 髄膜炎由来レンサ球菌の強毒化に関わる分子メカニズムの解析. *第 36 回日本分子生物学*

学会年会 2013 年 12 月 3 日~12 月 5 日. 神戸国際展示場(神戸市, 兵庫).  
高橋 孝. 北里大学大学院における研究報告. *先端医療福祉開発研究会・第 105 回公開定例会* 2013 年 10 月 19 日. ちよだボランティアセンター(千代田区, 東京).

松井英則, 吉田春乃, 高橋 孝. CD46 トランスジェニックマウスを用いた劇症型 A 群レンサ球菌感染による骨破壊機構の解析. *第 88 回日本感染症学会学術講演会* 2014 年 6 月 18 日~6 月 20 日. ヒルトン福岡シーホーク(福岡市, 福岡).

新井和明, 吉田春乃, 奥住捷子, 松井英則, 高橋 孝. マクロライド耐性 A 群溶血性連鎖球菌における誘導型テリスロマイシン耐性検出の検討. *第 88 回日本感染症学会学術講演会* 2014 年 6 月 18 日~6 月 20 日. ヒルトン福岡シーホーク(福岡市, 福岡).

森 伸晃, 小山田吉孝, 樋口晶子, 青木泰子, 石 志紘, 高橋 孝. 疫学的因果関係が示唆された A 群 溶血性連鎖球菌性肺炎 2 症例の検討. *第 63 回日本感染症学会東日本地方会総会学術集会* 2014 年 10 月 29 日~10 月 31 日. 東京ドームホテル(文京区, 東京).

玉城貢, 柴山明義, 中森祥隆, 高橋 孝. 血液培養から検出された *Streptococcus pyogenes* (*emm11/ST403*) による壊死性筋膜炎の 1 例. *第 26 回日本臨床微生物学会総会・学術集会* 2015 年 1 月 31 日~2 月 1 日. 京王プラザホテル(新宿区, 東京).  
高橋 孝, 新井和明. A 群溶血性レンサ球菌による骨軟部組織感染巣における宿主遺伝子の網羅的解析. *第 26 回日本臨床微生物学会総会・学術集会* 2015 年 1 月 31 日~2 月 1 日. 京王プラザホテル(新宿区, 東京).

〔図書〕(計 1 件)

高橋 孝 他, アグネ承風社, 限りなく前進する NPO-医療・福祉・医工学の歩み-. (1) 劇症型溶血性レンサ球菌感染症/(2) 北里大学・感染症学研究室の研究. 2014, 105-108, 205-208.

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.kitasato-u.ac.jp/lisci/life/chart/LSI-lab15.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 孝 (TAKAHASHI, Takashi)  
北里大学・大学院感染制御科学府・教授  
研究者番号: 00292855

(2) 研究分担者

新井 和明 (ARAI, Kazuaki)

北里大学・北里生命科学研究所・研究員  
研究者番号：30547386

(3)連携研究者

松井 英則 (MATSUI, Hidenori)  
北里大学・大学院感染制御科学府・講師  
研究者番号：30219373

吉田 春乃 (YOSHIDA, Haruno)  
北里大学・大学院感染制御科学府・助手  
研究者番号：70563386