

# 論文題目 溶血性レンサ球菌が保有する病原性機構の解明

所属研究機関等 学校法人北里研究所 大村智記念研究所 感染症学研究室

氏名 吉田 春乃

【背景】 *Streptococcus* 属の細菌のうち  $\beta$  溶血性を示す *S. pyogenes* (group A streptococcus : GAS), *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) はいずれもヒトの身近に存在し、咽頭炎・猩紅熱・レンサ球菌性トキシックショック症候群 (STSS) 等の感染症を惹起する。しかしながら、それら溶血性レンサ球菌はヒトや伴侶動物に常在菌として定着することも知られており、病原性の発揮には何らかの調節機構が働いていることが予想されている。

GAS では膜タンパク質である M protein の構造による M type と特定の病態の関連が指摘されており、M18 は急性リウマチ熱、M1 及び M3 は致死的な感染症に多く見られることが報告されている。特に M1 型 GAS においては二成分調節因子である CovR/S の変異が高病原性の原因であると考えられている。しかし、GAS, SDSE ともに各病原因子の感染における役割には不明な点が多く、定着と感染を分ける条件、感染が深化し侵襲性感染へと至る機構は未だ明らかになっていない。

同様に  $\beta$  溶血性を示す *S. canis* は、家畜や伴侶動物から分離されるが、これら動物と濃厚な接触のあったヒトに感染し菌血症等を起こすことが示されている。*S. canis* は 1986 年に初めて報告され、病原性に関わる因子としては M-like protein (SCM) のみが同定されているが SCM type と病原性の関連等は未だ明らかとなっていない。我が国の高齢化と伴侶動物の室内化により *S. canis* のヒトへの感染機会は増加すると考えられ、病原性の解明が必要である。

【目的】 申請者は溶血性レンサ球菌感染症の予防・治療等を通じた感染制御を目指し、その端緒として同菌の病原性機構に着目し以下の研究を行なった。

1. GAS の調節因子 *rocA* 遺伝子のナンセンス変異が病原性に与える影響の解明
2. STSS 患者より分離された SDSE である GGS\_124 株の、ヒト CD46Tg マウスにおける病態の観察
3. 国内で伴侶動物及びヒトから分離された *S. canis* の分子特性と細胞内在性の関連の解明

## 【方法】

1. 同一の髄膜炎患者より、転写調節因子 *rocA* に変異を持つ MTB313 株と、同遺伝子に変異を持たない MTB314 株を分離し 2015 年に報告した。本研究で

は *rocA* の変異による転写調節の変動が GAS の病原性に及ぼす影響を検討するため、以下の実験を行った。

まず MTB314 の持つ完全長の *rocA* を MTB313 に導入した相補株 MAT101 とベクターのみの対照株・MAT100 を作製し、対数増殖期における遺伝子発現をマイクロアレイを用い網羅的に比較した。次いで、MTB313 がムコイド株であることから、GAS 菌体表面に存在するヒアルロン酸を定量し比較した。溶血因子である Streptolysin O (SLO) のタンパク質発現量と溶血活性、システインプロテアーゼ *SpeB* 発現とその活性を測定した。ヒト CD46Tg マウスの後ろ足に 4 株を  $1 \times 10^7$  CFU 皮下注射し、15 日間の致死率を測定し比較した。

2. 1 と同様の Tg マウス実験系を用いてヒトの侵襲性感染症の病態を再現する SDSE 感染モデル系の確立を試み、GGs\_124 株を Tg マウスの後ろ足に  $1 \times 10^7$  CFU 皮下注射し、感染後 35 日間の生死および病態を観察した。

3. 伴侶動物およびヒトから分離された *S. canis* 42 株と参照株 1 株を用い、ヒトへの感染能力の指標としてヒト大腸癌細胞 Caco-2 内への内在化率を試験し比較を行った。加えて、皮膚からの感染を想定しヒト表皮角化細胞 HaCaT を用いて同様の検討を行った。また病原性の指標の一つとして 43 株の溶血活性を測定した。

同時に SCM の分子型・Multi Locus Sequencing Typing (MLST) による ST・薬剤感受性および薬剤耐性遺伝子型と、細胞内在性との関連性について解析し、ヒトに対し高い病原性を示す可能性のあるグループが存在するかを検討した。

## 【結果】

1. 対数増殖期における 4 株の遺伝子発現を比較した結果、*rocA* 変異を有する MTB313 では *sclA* (collagen-like protein), *hasABC* (hyaluronic acid synthesis operon), *spyCEP* (interleukin-8 protease), *slo*, *spyA* (peptidase C5), *sic* (inhibitor of complement protein), *ska* (streptokinase) の発現が MTB314 に比べ 2 倍以上上昇していた。

一方で、*speB* (streptococcal pyogenic exotoxin B), *rgg* (regulator gene of glucosyltransferase; *ropB*) の発現量は、MTB314 の方が高かった。

以上の結果はリアルタイム PCR によっても再現され、相補株 MAT101 は対照株 MAT100 と比較し、ほとんどの病原因子において MTB313 と同様に MTB314 より高い遺伝子発現を再現したが、pRocA 導入によって *speB* の発現量は回復しなかった。

マイクロアレイ、リアルタイム PCR により MTB313 と MTB314 の間で発現量の違いが示唆された病原因子について、タンパク質発現および活性の定量を行った。MTB313, 314, MAT101, 100 の菌体表面ヒアルロン酸量は、MTB313 と MAT101 では MTB314 と MAT100 に比べ有意に多いことが示された。また、菌培養液の上清に分泌された溶血因子 SLO の発現量は MTB313 上清ではバンドとして検出されたが、MTB314 上清では検出できなかった。同様に菌培養液の上清を用いヒト血液に対する溶血活性測定したところ、MTB313 上清には量依存的な溶血活性が見られたが、MTB314 上清には活性が見られなかった。SpeB は MTB313 上清では検出されない一方で MTB314 上清には多量に分泌しており、タンパク質分解活性も同様であった。

MTB313 を感染させた CD46Tg マウスは 15 日間の死亡率が 75%であったが、MTB314 を感染させた Tg マウスの死亡率は 0%であった。MTB313 に pRocA を導入した MAT101 感染マウスの死亡率は 11%だった。

2. ヒト CD46Tg マウスと WT マウス後足に GGS\_124 株を皮下注射し、感染 3 日後の生菌数を測定したところ、肝臓・脾臓・腎臓では Tg マウスのみ生菌の存在が示された。膝窩リンパ節に含まれる菌数は Tg マウスと WT マウスで差はなかった。感染 35 日後の死亡率は CD46Tg マウスが 33.3%だったのに対し、WT マウスでは 0%であった。

CD46Tg マウスの感染局所である左後足は皮下注射をしていない右後足と比べて腫れと発赤を示し、足首関節腔には肉芽組織が観察された。

3. Caco-2 細胞 100 個あたりに取り込まれた菌数を計測し、対照株である ATCC12394 (SDSE)を基準とした場合、分離株によって内在化率に差がある結果となった。Fold 値 200 を超える株は全体 43 株のうち 19 株だった。Caco-2 において高内在性を示した 5 株と、低内在性を示した 4 株について HaCaT 細胞を用いて同様に内在化を測定した結果、Caco-2 細胞での結果が再現された。

分離株の分子特性と内在性の関連を検討したところ、Type10, 11 の SCM を有する株は、その他の型の SCM を有する株に比べ有意に高内在性を示すことが明らかとなった。MLST では ST21, 41 に分類される株がその他の株と比べ有意に高内在性を示すことが明らかとなった。

同じ株を用いヒツジ赤血球に対する溶血活性を測定した結果、溶血を示す 545nm での吸光度が 0.7 付近を示す 24 株と 0.5 付近を示す 19 株に大別されたが、溶血活性と細胞への内在性との関連は見られなかった。

【考察】

1. GAS の保有する二成分調節因子 CovR/S は *hasA*, *ska*, *sagA* 等の病原遺伝子の発現を抑制的に調節している。CovS に変異を持つ GAS は高い病原性を示すことが知られており、調節因子の変異が表現型に与える影響は重要である。RocA は CovR/S 系の機能を調節するアクセサリ因子と考えられており、膜貫通ドメイン、二量体化ドメイン、ヒスチジンリン酸転移ドメイン及び擬似ヒスチジンキナーゼドメインを有する。これにより RocA は膜上の CovS と相互作用し、CovS による CovR のリン酸化を増強、下流の転写抑制をもたらすと考えられている。

MTB313 は *rocA* 遺伝子に G464A 変異を有しており、これはナンセンス変異のため遺伝子の途中で転写が終了すると予想される。MTB313 で見られたムコイド型コロニーと高いヒアルロン酸分泌は、RocA 変異が *hasA* の高発現を誘導していた結果と一致している。GAS の莢膜を覆うヒアルロン酸は、白血球による補体を媒介とした食作用からの回避に寄与しており、MTB313 がヒト CD46Tg マウスに対し高い致死性を示した原因の一つである可能性がある。

2. GAS の M protein は、菌体表層に突出した C 領域がヒト細胞表面の CD46 と結合することでケラチノサイトへの付着を仲介する。SDSE は GAS と類似した M protein を有していることから、以前の研究で、CD46Tg マウスへの SDSE 感染による、ヒトの侵襲性感染症を再現するモデルの確立を試み、多臓器不全の患者より分離された RE378 を用い感染実験を行った。しかし関節炎を発症し、致死率は 0%であった。そこで本研究では STSS より分離された GGS\_124 を用いて再度侵襲性感染症モデル構築を試みた。

感染の結果、CD46Tg マウスでは臓器内に生菌が確認され、致死率は WT マウスに比べ有意に高かった。このことから、Tg マウスでは CD46 が受容体となり GGS\_124 が全身に広がり、組織の損傷と膿瘍の形成を通じて死に至ったと考えられ、ヒトの侵襲性感染症に近いモデルと言える。

3. *S. canis* では M protein 類似分子 SCM が同定されており、可変領域に欠失・挿入を含む多様性が観察されていることから、病原遺伝子の配列による特性のグループ化が可能であると予想されている。GAS や SDSE の M protein で示されているように、*S. canis* の SCM も宿主細胞への付着と内在化に寄与する可能性があると考えた。培養細胞を用いた検討の結果、type10, 11 の SCM を有する株が統計的に有意に高い内在性を示し、ST21, 41 の遺伝子型を示す株でも同様に内在性が高い結果となった。

今後は本研究で見られた、細胞への内在化がヒトの病態にどう関連している

かを明らかにする必要がある。

以上の研究を総括する。GAS 分離株に見られた自然発生的な RocA の変異が病原因子群の発現プロファイルを変化させ、侵襲性感染の原因になり得ることを示した。GAS 同様、侵襲性 SDSE 感染症由来の菌株を用いた CD46Tg マウス感染モデルがヒト病態を再現できることを示した。さらに、*S. canis* 分離株のうち type10,11 SCM を有する株と ST21,41 の遺伝的背景を持つ株に、*in vitro* での高い細胞内在性という表現型を見出した。

溶血性レンサ球菌の感染機構には、宿主生物種への適応、病原因子の水平伝播、感染進行に対する各病原因子の役割等、感染制御の対象になり得る過程に不明な点が多く、宿主と菌の相互作用を詳細に明らかにしていく必要があると考える。