

研究課題別評価

1 研究課題名:ゲノム情報を応用した A 群レンサ球菌感染症制御法の確立

2 研究者氏名:川端 重忠

グループメンバー:寺尾 豊(研究期間:H14.4.1~H16.3.31)

3 研究の狙い:

A 群レンサ球菌(group A streptococci: GAS)は、ヒトの咽頭部より感染し、咽頭炎、扁桃炎、肺炎などの上・下気道炎を引き起こす。本来は咽頭炎などの局所の炎症にとどまるが、無菌であるべき血液や筋肉、内臓に GAS が侵入する侵襲型レンサ球菌感染症が報告されるようになった。この致死率は 10%程度とされる。さらに、軟部組織壊死や多臓器不全等を引き起こす劇症型 A 群レンサ球菌感染症(streptococcal toxic shock syndrome: STSS)が新たに出現してきた。同感染症は感染症法の 5 類感染症に分類され、STSS 患者の致死率は 40%を越える。急速な病態進行や発症の機構が不明なことから、予防法や治療法は今のところ確立されていない。2001 年に米国オクラホマ大学のグループにより GAS の全ゲノム情報が公開された。そこで、グラム陽性菌の膜貫通型タンパクにみられる LPXTG モチーフなどの配列をプローブとし、未知の機能性タンパクを同定し、侵襲型感染症の発症機構の解明をめざした。同時に劇症化 GAS 感染症のマウスモデル実験系を確立し、劇症化に関わる GAS 以外の因子についても検討を加えた。

4 研究成果:

我々は、GAS の組織侵襲因子や感染拡散因子などについて、GASゲノムデータベース(M タンパクの血清型である M1 型、M3 型、M18 型)を活用して、新規の機能性タンパクを同定し、解析を行った。たとえば、STSS 発症患者から分離された M3 型菌の菌体表層には、グラム陽性菌の表層タンパクの C 末端に存在する LPXTG モチーフをもつ未知のタンパクが認められた。このタンパク FbaB はフィブロネクチンと強い親和性を有し、M3 型菌における主要な細胞侵入因子であること、世界各地から分離された M3 型 GAS 菌株を調べたところ劇症型分離株のみに FbaB タンパクの発現が認められたことなどから、FbaB は M3 型菌の劇症化因子のひとつであることが明らかとなった。GAS の菌体表層抽出画分より、新規の IgG 結合タンパクである Sib35 を同定した。Sib35 はその中央領域から C 末端側にかけてロイシンジッパー様モチーフを有しており、同部分を含めた領域に IgG が結合することが認められた。Sib35 は IgG に対して高い親和性を示した。Sib35 は直接 B 細胞に会合し、細胞分裂を促した。完全なロイシンジッパー構造(LXXXXXXXXLXXXXXXXXL)を有するタンパクをデータベース検索した結果、候補タンパク LZP を見いだした。LZP は Sib35 よりもさらに強力な B 細胞マイトジェン活性を有しており、その活性は LPS とほぼ同等であった。マウス脾臓細胞に LZP を添加すると、IFN- γ 、TNF- α 、IL-6、IL-12 の産生が非添加群と比較して明らかに亢進した。

呼吸器感染症の代表的な原因微生物であるインフルエンザウイルスと GAS の重感染モデル系の構築と侵襲因子の解析を行った。マウスに非致死量のインフルエンザウイルスを経鼻感染後、同じく非致死量の GAS を感染させたところ、90%以上のマウスが感染死した。同ウイルスと細菌の重感染は、抗ウイルスヘマグルチニン抗体で完全に阻害され、マウスの致死も回避された。電子顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡によって、GAS 菌体周辺には多数のインフルエンザウイルスが付着することを明らかにした。インフルエンザウイルスが肺において感染の足場をつくり、二次的に GAS が感染することにより、微生物の病原性が相乗的に亢進することを示した。この重感染モデル系を用いて、GAS 菌側の致死因子を探索した。各病原因子欠失株をインフルエンザウイ

ルス感染マウスに感染させ致死率を算定したところ、莢膜を欠失させた GAS はインフルエンザウイルス感染上皮細胞への付着が最も減弱し、さらにウイルスとの直接結合も低下した。これらの事実は、GAS 莢膜はインフルエンザ感染細胞への付着と感染動物の致死作用において極めて重要な機能を果たしていることを示している。

5 自己評価:

GAS 感染症の重症化因子の一つとして、インフルエンザウイルスによる先行感染が重要であるという成果は、当初目標よりもかなり早く達成できた。さらに、細菌とウイルスとの結合に関与する双方のリガンド(レセプター)も同定できた。インフルエンザウイルス以外の呼吸器感染に関わるウイルスと GAS との混合感染系についても詳細に検討を加える必要がある。

GASゲノム情報から新規病原因子を同定する計画について、初期の段階(1年目)で、候補遺伝子(タンパク)を数多く抽出、選択した。大腸菌による組換えタンパクや不活化変異株などの作製に苦労したターゲット遺伝子もあったものの、総じて順調に新規遺伝子群の機能解析を遂行できた。3年の研究期間は過ぎたが、性状解析中の遺伝子もいくつか残っており、今後継続して研究を進める予定である。

GAS の全ゲノム解析によると、1,750 の遺伝子が存在すると推定されるが、未だその 1/3 については機能が未知である。GAS のように炎症性疾患から非炎症性疾患まで幅広い疾患を引き起こす細菌は、病原性を発揮する術を幾通りも備えていると思われる。また、ゲノムサイズも大腸菌の半分程度であり、各種細菌のなかでもかなりコンパクトである。1つのタンパクが複数の機能を有している例も珍しくなく、GASにおいても限られたタンパクを有効に作用させている様子が想像され、これらの機構をさらに解明したいと考えている。

6 研究総括の見解:

A 群レンサ球菌の中でヒトに重篤な症状を起こす侵襲型レンサ球菌及び劇症型 A 群レンサ球菌について、発症機構や劇症化に関わる宿主因子の解明を目指した研究である。A 群レンサ球菌の重症化因子の一つとして、インフルエンザウイルスによる先行感染が重要であることを示したことは高く評価できる。また A 群レンサ球菌の全ゲノム情報から新規病原因子を同定することにも成功しており、今後さらなる発展が期待できる。

7 主な論文等:

主な論文

1. Kawabata S, Tamura Y, Murakami J, Terao Y, Nakagawa I, and Hamada S. (2002) A novel, anchorless streptococcal surface protein that binds to human immunoglobulins. *Biochem Biophys Res Commun* 296: 1329-1333.
2. Terao Y, Kawabata S, Nakata M, Nakagawa I, and Hamada S. (2002) Molecular characterization of a novel fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes* strains isolated from toxic shock-like syndrome patients. *J Biol Chem* 277: 47428-47435.
3. Okahashi N, Sakurai A, Nakagawa I, Fujiwara T, Kawabata S, Amano A, and Hamada S. (2003) Infection of *Streptococcus pyogenes* induces receptor activator of NF- κ B ligand expression in mouse osteoblastic cells. *Infect Immun* 71: 948-955.
4. Okamoto S, Kawabata S, Nakagawa I, Goto T, Sano K, Okuno Y, and Hamada S. (2003) Influenza A virus-infected hosts boost the outbreak of invasive group A *Streptococcus* infections in mice. *J Virol* 77: 4104-4112.
5. Okamoto S, Kawabata S, Fujitaka H, Uehira T, Okuno Y, and Hamada S. (2004) Vaccination with formalin-inactivated influenza vaccine protects mice against lethal

influenza-*Streptococcus pyogenes* superinfection. *Vaccine* 22: 2887-2893.

6. Okamoto S, Kawabata S, Terao Y, Okuno Y, and Hamada S. (2004) *Streptococcus pyogenes* capsule is required for adhesion of bacteria to virus-infected alveolar epithelial cells and lethal invasive bacteria-viral superinfection. *Infect Immun* 72: 6068-6075.
7. Okamoto S, Tamura Y, Terao Y, Hamada S, and Kawabata S. Systemic immunization with streptococcal immunoglobulin-binding protein Sib35 induces protective immunity against group A *Streptococcus* challenge in mice. *Vaccine* in press.

総説, 著書

1. Okamoto S, Kawabata S, Nakagawa I, Okuno Y, Goto T, Sano K, and Hamada S. (2004) A model of invasive type of *Streptococcus pyogenes* infection after intranasal superinfection in influenza A virus-infected mice. *Options for the Control of Influenza V* edited by Kawaoka Y. Elsevier B.V., 733-736.
2. 岡本成史, 浜田茂幸, 川端重忠. (2003) 肺上皮におけるインフルエンザウイルスとレンサ球菌並行感染による重症化メカニズムの解明. *感染・炎症・免疫*. 33:68-70.
3. 川端重忠. (2004) インフルエンザウイルスと A 群レンサ球菌の協調作用. *最新医学*. 59: 2348-2351.
4. 浜田茂幸, 中川一路, 川端重忠. (2005) 劇症型感染症をひき起こす A 群レンサ球菌のゲノム解析と病原性因子. *蛋白質核酸酵素*. 50:253-261.

招待講演

1. Kawabata S. Molecular aspects of invasive group A *Streptococcus* infections induced by superinfection with influenza virus. The 7th Korea-Japan International Symposium on Microbiology. October, 2004. Seoul, Korea.
2. 川端重忠. 宿主免疫応答からの回避する A 群化膿レンサ球菌の分子機構. シンポジウム「病原性グラム陽性球菌感染の分子病態」第 76 回日本細菌学会総会. 2003 年 4 月, 熊本.
3. 川端重忠. レンサ球菌の宿主細胞侵入因子の同定と制御. シンポジウム「さきがけ研究における制御」第 3 回計測自動制御学会. 2003 年 5 月, 神戸.
4. 川端重忠. 侵襲型 A 群レンサ球菌感染症の発症因子. 特別講演. 第 13 回ランスフィールドレンサ球菌研究会. 2004 年 6 月, 東京.

特許

新規レンサ球菌タンパク質抗原(公開番号 特開 2004-321010)

受賞

2005 年 4 月 日本細菌学会小林六造記念賞