



| | |
|--------------|---|
| Title | 細胞間隙経路を介した化膿レンサ球菌の上皮バリア突破機構 |
| Author(s) | 住友, 倫子 |
| Citation | 大阪大学歯学雑誌. 2015, 60(1), p. 15-19 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/60665 |
| rights | |
| Note | |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

細胞間隙経路を介した化膿レンサ球菌の上皮バリア突破機構

住 友 倫 子*

(平成 27 年 7 月 30 日受付)

はじめに

レンサ球菌 (*Streptococcus*) 属の血液寒天培地における溶血反応は 3 種 (α , β , γ 型) の性状に分類される。この中でも、やや黄色味を帯びた完全溶血の透明帯を生じる β 溶血性レンサ球菌には医学的に重要な菌種が含まれ、単に溶レン菌と呼ばれることが多い。レンサ球菌属は、細胞壁の多糖抗原性に基づくランズフィールドの群別法により、A ~ V 群 (I と J は欠番) に分類される。臨床的に最も分離される率が高いのは A 群であり、化膿レンサ球菌 *S. pyogenes* (Group A *Streptococcus*: GAS) が属する。

化膿レンサ球菌は咽頭炎、扁桃炎、膿痂疹などの局所性化膿疾患や、猩紅熱などの毒素性疾患の起原因である。また、二次性続発疾患としてリウマチ熱や急性糸球体腎炎を惹起する場合もあるが、抗生物質の開発に伴い、先進国における続発症の発症率は急速に低下した。一方、1980 年代後半より、本菌が血液や深部組織に侵入する侵襲性レンサ球菌感染症、さらには壊死性筋膜炎やショック症状を伴う劇症型レンサ球菌感染症 (streptococcal toxic shock syndrome: STSS) が報告されるようになった。STSS では軟部組織壊死や循環・多臓器不全が認められ、致死率は 30 ~ 40% に及ぶ。それゆえ、化膿レンサ球菌はいわゆる「ヒト喰いバクテリア」として恐れられている。

化膿レンサ球菌がヒトに STSS を発症させるためには、生体内に侵入後、宿主の多様な感染防御を回避し、血流を介して全身に伝播することが重要であると考えられている。皮膚や粘膜の上皮細胞層は極性を形成することにより、第一線で病原体の侵入を阻止する物理バリアとして機能するが、化膿レンサ球菌はこの堅牢な上皮バリアを突破し、組織内に侵入する戦略を兼ね備えている。本稿では、化膿レンサ球菌がどのような病原因子を駆使して上皮バリアを突破するかについて、我々のグループの成果を含めて概説する。

細胞内経路を介したメカニズム

上皮細胞層では、タイトジャンクション、アドヘレンスジャンクション、デスモソームから構成される特殊な細胞間接着システムが発達し、上皮の極性形成・維持を行うことにより、生体内への病原体侵入に対するバリア機能を担っている¹⁾。化膿レンサ球菌が上皮バリアを超えて組織内に侵入する経路として、細胞内を通過する経路と細胞間隙を通過する経路の 2 つが挙げられる。化膿レンサ球菌は一般的に細胞侵入性細菌ではないと考えられていたが、STSS の出現に伴い、細胞内侵入に関する研究が世界中で進められてきた。一般的に、細胞内に侵入した微生物は、細胞内殺菌システムにより消化分解される。しかし、大量の菌体が細胞

* 大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子感染制御学講座 (口腔細菌学教室)

本総説の一部内容は、平成 27 年 1 月 8 日に開催された大阪大学歯学会第 119 回例会において、平成 26 年度弓倉学術奨励賞の受賞講演 (対象論文: Sumitomo, T. *et al.*, (2013) Group A streptococcal cysteine protease cleaves epithelial junctions and contributes to bacterial translocation. *J Biol Chem*, **288**, 13317-13324.) として発表した。本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金 (18073011, 20390465, 20791336, 21791786, 2189048) の支援のもと行われた。

内に侵入した場合、宿主上皮に細胞死が誘導され、菌体の組織深部への侵入を促すと考えられる^{2,3)}。これまでに、細胞内への侵入に関与する因子として、フィブロネクチン (Fn) 結合タンパクや M タンパク、コラーゲン様表層タンパクなどが報告されている⁴⁻⁶⁾。特に、咽頭上皮からの侵入メカニズムについては、菌体表層に発現する Fn 結合タンパクと細胞外液に豊富に存在する可溶性 Fn の相互作用が組織侵入性に関与することが報告され、感染防御抗原としての Fn 結合タンパクの可能性に期待が寄せられている⁷⁾。

溶血毒素による宿主細胞間接着傷害

組織侵入性を示す病原細菌の多くは、宿主細胞間接着を傷害する分子群を発現し、これが感染の進行、重篤度、および病態発症に深く関与することが示されている。化膿レンサ球菌に罹患した患者の咽頭や皮膚では化膿性疾患を呈する病態が多く認められることから、本菌が細胞間接着と上皮の極性を担う分子群を傷害し、上皮細胞の恒常性を破壊させると推測されてきた。ヒアルロン酸を主成分とする菌体表層分子である莢膜は、宿主上皮のヒアルロン酸レセプターである CD44 に結合する⁸⁾。これに伴い、Rac1 シグナル伝達経路に依存的な細胞膜の波打ち現象や細胞間接着分子の分解などの細胞骨格の再構成が起こり、菌体は開いた細胞間隙部位から上皮バリアを突破する。しかし、上皮細胞間接着を傷害する全ての菌株が莢膜を発現するわけではないことから、莢膜以外の因子の関与も示唆されてきた。

我々のグループは、トランスポゾン挿入変異ライブラリーを用いたスクリーニングから、 β 溶血性を担う溶血毒素ストレプトリジン S (SLS) が上皮細胞間の接着分子を傷害し、化膿レンサ球菌の上皮バリア通過に寄与することを見出した⁹⁾。興味深いことに、SLS は直接的に細胞間接着分子を傷害するのではなく、生体内で広範に発現するカルシウムイオン依存性のシステインプロテアーゼであるカルパインを活性化し、細胞膜部位への移行を誘導する。その後、細胞間隙部位に誘導されたカルパインのプロテアーゼ活性により細胞間接着分子である E-カドヘリンやオクルディンが分解され、本菌は細胞間隙経路から上皮バリアを突破すると考えられる。

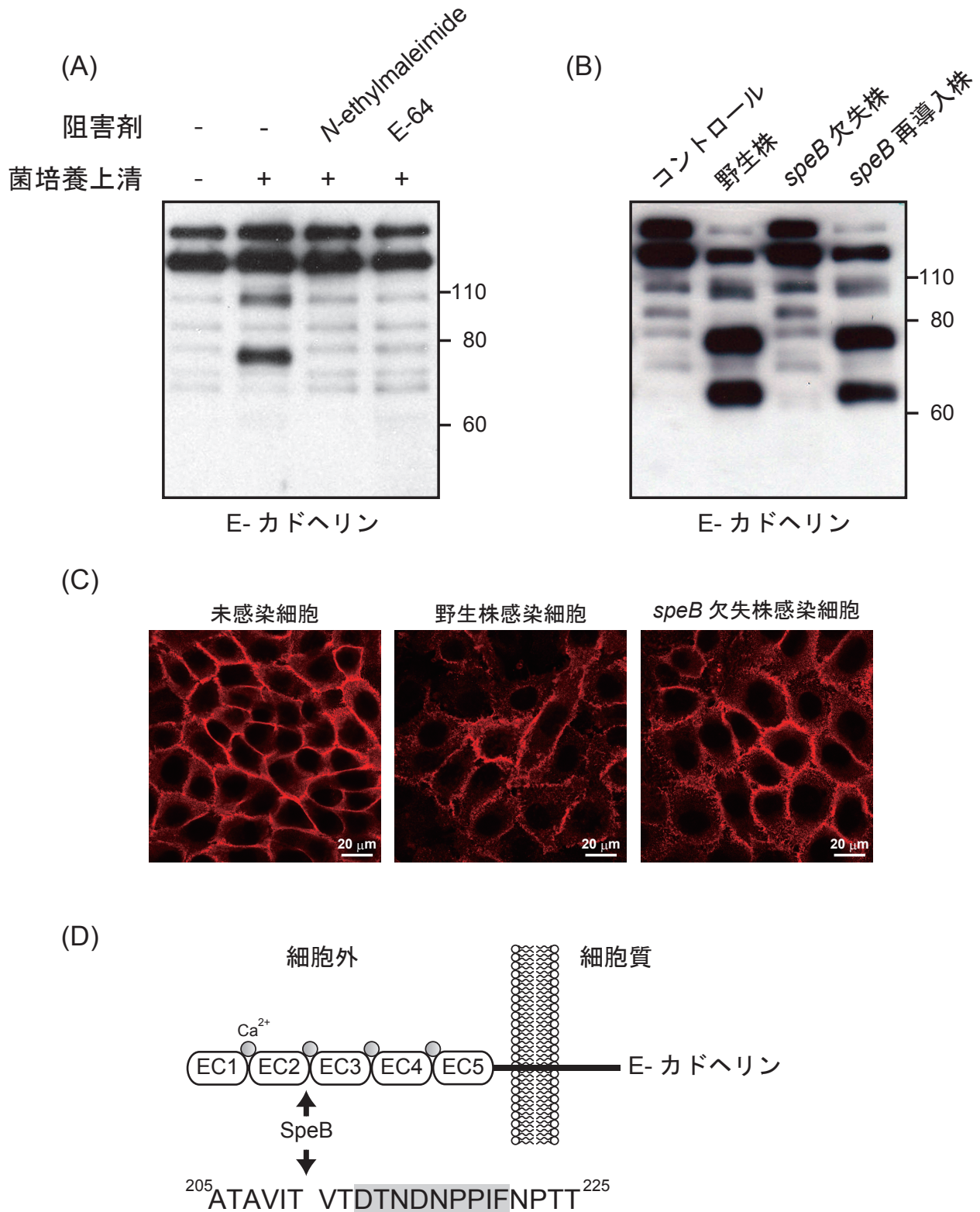
化膿レンサ球菌は SLS および Streptolysin O (SLO) の 2 種の溶血毒素産生する。レンサ球菌ではグラム陰

性菌で認められる宿主機能改変機構は存在しないと考えられてきた。しかし、2001 年に化膿レンサ球菌が SLO により宿主上皮細胞膜上に形成した孔から NAD グリコヒドラーゼ (SPN) を注入し、上皮細胞死を誘導することが報告された¹⁰⁾。SLO による孔形成作用や SPN により産生される cyclic ADP-ribose (cADPR) は、宿主細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる。従って、SLO による膜傷害作用や SPN による cADPR の産生もまたカルパインの活性化を誘導し、細胞間接着傷害に寄与する可能性があると推察される。

分泌型プロテアーゼによる宿主細胞間接着傷害

化膿レンサ球菌感染症の発症過程において、本菌は毒素やスーパー抗原、プロテアーゼなどの多彩な病原因子を産生する。化膿レンサ球菌感染症における宿主細胞間接着傷害には、SLS による宿主プロテアーゼの活性化だけでなく、菌由来プロテアーゼによる直接的な分解も関与すると推察された。実際、STSS 由来株および局所性化膿性疾患由来株の培養上清とアドヘレンスジャンクション構成タンパクである E-カドヘリンの細胞外ドメインを含む組換え体を反応させた結果、いくつかの臨床分離株の培養上清は高い E-カドヘリン分解活性を示した¹¹⁾。この E-カドヘリン分解活性はシステインプロテアーゼ阻害剤により完全に抑制されたことから、化膿レンサ球菌の分泌型システインプロテアーゼが E-カドヘリンの分解に関与することが示唆された (図 1A)。

化膿レンサ球菌が産生する代表的な分泌型システインプロテアーゼ Streptococcal pyrogenic exotoxin B (SpeB) は、42 kDa の酵素前駆体として産生された後、自己触媒作用により 28 kDa の活性型プロテアーゼとなる¹²⁾。スペクトルの広いエンドペプチダーゼ活性を有する SpeB は、宿主の細胞外マトリックスタンパク、イムノグロブリン、補体構成成分だけでなく、自身が産生するタンパク群も分解し、化膿レンサ球菌感染症の病態発症メカニズムに深く関与することが報告されている^{13,14)}。しかし、SpeB による細胞間接着傷害と病態発症機構との関連は不明であった。そこで、STSS 患者由来 NIH35 株を親株として、SpeB をコードする *speB* の欠失株およびその再導入株を作製し、E-カドヘリン分解に及ぼす SpeB の影響を検討した。野生株の培養上清による E-カドヘリンの分解は *speB* 欠失により抑制され、*speB* 再導入により野生株と同等レベルまで回

図1 *SpeB* による宿主細胞間接着分子の傷害

(A) STSS 患者由来株の培養上清と E-カドヘリン細胞外ドメインを含む組換え体を 37°C で 3 時間反応させた後、E-カドヘリンの分解をウエスタンブロット法で解析した。(B) 野生株、*speB* 欠失株もしくは *speB* 再導入株の培養上清と E-カドヘリンを 37°C で 3 時間反応させた。(C) 腸管上皮細胞 Caco-2 に野生株もしくは *speB* 欠失株を 4 時間感染させた。E-カドヘリンは抗 E-カドヘリン抗体および Alexa Fluor 594 標識抗マウス IgG 抗体で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。(D) *SpeB* は E-カドヘリン細胞外ドメイン EC2・EC3 間を分解する。網掛け部分は EC2 と EC3 間のカルシウムイオン結合部位を示す。

復することを確認した (図 1B, C)。また, SpeB は E-カドヘリン細胞外ドメイン EC2・EC3 間のカルシウム結合領域を分解し, 宿主細胞間接着を傷害することを明らかにした (図 1D)。さらに, ヒト腸管上皮細胞 Caco-2 をトランスウェルフィルターシステムで培養した上皮バリアの *in vitro* モデルを用いて, 化膿レンサ球菌の上皮バリア通過能を評価した。*speB* 欠失株の上皮バリア通過能は野生株と比較して有意に低下したが, *speB* の再導入により野生株と同等レベルまで回復した。以上の結果から, SpeB による宿主細胞間接着傷害は, 細胞間隙経路を介した化膿レンサ球菌の上皮バリア通過に寄与することが示唆された。

おわりに

本稿では, 化膿レンサ球菌が感染初期段階において, どのような病原因子を駆使して宿主上皮の恒常性を破綻させ, 上皮バリアを突破するかを概説した (図 2)¹⁵⁾。しかし, 莢膜, SLS, SpeB の発現株が必ずしも重篤な病態と関連しているわけではないことから, 宿主側の易感染性素因などもまた, 発症メカニズムを理解するうえで重要である。近年, 上皮バリアの破綻は感染症だけでなく, 炎症やアレルギー疾患などの原因であることが指摘されている。化膿レンサ球菌の感染部位である皮膚や粘膜のバリアシステムの恒常性は, 上皮細胞, 免疫細胞, および常在細菌叢の連携により維持されていることが明らかになってきた。化膿レンサ球菌の病

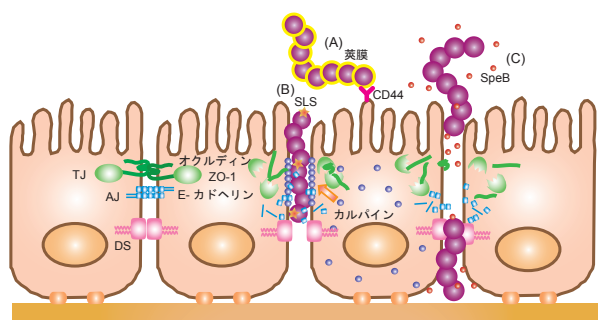


図 2 細胞間隙経路を介した化膿レンサ球菌の上皮バリア突破機構

上皮細胞間の最頂端では, タイトジャンクション (TJ), アドヘレンスジャンクション (AJ), デスモソーム (DS) から構成される細胞間接着システムが発達し, 病原体の侵入に対する物理バリアとして機能している。化膿レンサ球菌は (A) 莢膜, (B) SLS, (C) SpeB の作用により, 宿主上皮細胞間接着を傷害し, 細胞間隙部位から上皮バリアを突破する。

原因因子とバリアシステムがどのような均衡を経てヒトに感染を成立させるかについての全貌解明は今後の課題である。

謝 辞

本稿で概説した研究を遂行するにあたり, 多大なるご指導とご助言を賜りました大阪大学大学院歯学研究科 口腔細菌学教室 川端重忠教授に心より感謝申し上げます。また, 多くのご助言とご協力をいただきました共同研究の先生方および口腔細菌学教室の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) Hartsock, A. and Nelson, W.J. (2008): Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*, **1778**, 660-669.
- 2) Nakagawa, I., Nakata, M., Kawabata, S. and Hamada, S. (2001): Cytochrome *c*-mediated caspase-9 activation triggers apoptosis in *Streptococcus pyogenes*-infected epithelial cells. *Cell Microbiol*, **3**, 395-405.
- 3) Cywes Bentley, C., Hakansson, A., Christianson, J. and Wessels, M.R. (2005): Extracellular group A *Streptococcus* induces keratinocyte apoptosis by dysregulating calcium signalling. *Cell Microbiol*, **7**, 945-955.
- 4) Ozeri, V., Rosenshine, I., Ben-Ze' Ev, A., Bokoch, G.M., Jou, T.S. and Hanski, E. (2001): *De novo* formation of focal complex-like structures in host cells by invading *Streptococci*. *Mol Microbiol*, **41**, 561-573.
- 5) Okada, N., Liszewski, M.K., Atkinson, J.P. and Caparon, M. (1995): Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A *streptococcus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 2489-2493.
- 6) Caswell, C.C., Lukomska, E., Seo, N.S., Höök, M. and Lukowski, S. (2007): Sc11-dependent internalization of group A *Streptococcus* via direct interactions with the $\alpha_2\beta_1$ integrin enhances pathogen survival and re-emergence. *Mol Microbiol*, **64**, 1319-1331.
- 7) Terao, Y., Okamoto, S., Kataoka, K., Hamada, S. and Kawabata, S. (2005): Protective immunity against *Streptococcus pyogenes* challenge in mice after immunization with fibronectin-binding protein. *J Infect Dis*, **192**, 2081-2091.
- 8) Cywes, C. and Wessels, M.R. (2001): Group A *Streptococcus* tissue invasion by CD44-mediated cell signaling. *Nature*, **414**, 648-652.

- 9) Sumitomo, T., Nakata, M., Higashino, M., Jin, Y., Terao, Y., Fujinaga, Y. and Kawabata, S. (2011): Streptolysin S contributes to group A streptococcal translocation across an epithelial barrier. *J Biol Chem*, **286**, 2750–2761.
- 10) Madden, J.C., Ruiz, N. and Caparo, M. (2001): Cytolysin-mediated translocation (CMT): a functional equivalent of type III secretion in gram-positive bacteria. *Cell*, **104**, 143–152.
- 11) Sumitomo, T., Nakata, M., Higashino, M., Terao, Y. and Kawabata, S. (2013): Group A streptococcal cysteine protease cleaves epithelial junctions and contributes to bacterial translocation. *J Biol Chem*, **288**, 13317–13324.
- 12) Carroll, R.K. and Musser, J.M. (2011): From transcription to activation: how group A *streptococcus*, the flesh-eating pathogen, regulates SpeB cysteine protease production. *Mol Microbiol*, **81**, 588–601.
- 13) Chiang-Ni, C. and Wu, J.J. (2008): Effects of streptococcal pyrogenic exotoxin B on pathogenesis of *Streptococcus pyogenes*. *J Formos Med Assoc*, **107**, 677–685.
- 14) Nelson, D.C., Garbe, J. and Collin, M. (2011): Cysteine proteinase SpeB from *Streptococcus pyogenes* – a potent modifier of immunologically important host and bacterial proteins. *Biol Chem*, **392**, 1077–1088.
- 15) Sumitomo, T. (2015) Group A *Streptococcus* translocates across an epithelial barrier via degradation of intercellular junctions. *J Oral Biosci*, **57**, 135–138.