

Title	化膿レンサ球菌の分泌型プロテアーゼSpeBによる皮膚感染症発症メカニズムの解析
Author(s)	毛利, 泰士
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/61650">https://doi.org/10.18910/61650</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏名 (毛利 泰士)

論文題名

化膿レンサ球菌の分泌型プロテアーゼSpeBによる皮膚感染症発症メカニズムの解析

論文内容の要旨

## 【研究目的】

化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) は咽頭炎や膿痂疹などの局所性疾患から、軟部組織壊死や多臓器不全を伴う劇症型レンサ球菌感染症まで幅広い病態を惹起する。*S. pyogenes* が皮膚の創傷部位から感染した場合、痂皮性膿痂疹や丹毒などの強い炎症を伴う化膿性病変を形成する。

化膿性病変の形成には、*S. pyogenes* の病原因子による細胞間接着分子の破壊が関与すると考えられる。これまで、*S. pyogenes* が産生する溶血毒素ストレプトリジンS やシステインプロテアーゼ SpeB がタイトジャンクションおよびアドヘレンスジャンクションの構成タンパク質を分解し、菌体の上皮バリア突破に関与することが報告されてきた。しかし、*S. pyogenes* がデスモソームによる細胞間接着に及ぼす影響は明らかになっていない。

デスモソーム構成タンパク質であるデスモグレイン1 (Dsg1) とデスモグレイン3 (Dsg3) は、カドヘリンスーパーファミリーに属し、表皮バリア機能の維持に寄与する。また、天疱瘡や *Staphylococcus aureus* による水疱性膿痂疹の発症には、Dsg1 または Dsg3 の接着障害が関与する。本研究では、デスモグレインによる細胞間接着を傷害する *S. pyogenes* の病原因子を検索し、*S. pyogenes* 皮膚感染症における病態形成との関連を解析した。

## 【材料および方法】

1. デスモグレイン分解に関与する *S. pyogenes* 病原因子の検索

アミノ基末端側にヒスチジンタグを付与したDsg1 および Dsg3 の細胞外ドメインの組換えタンパク質 (rDsg1, rDsg3) を *Escherichia coli* BL21-CodonPlus (DE3) -RIPL 株に発現させ、菌体破砕液から Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。10種の *S. pyogenes* 臨床分離株の培養上清と rDsg1 もしくは rDsg3 を 37°C で 3 時間反応させた。rDsg1 と rDsg3 の分解は、それぞれ抗 Dsg1 抗体と抗 Dsg3 抗体を用いたウエスタンブロット法で解析した。また、種々のプロテアーゼ阻害剤を用いて rDsg1 と rDsg3 の分解に関与するプロテアーゼを検索した。

rDsg1 と rDsg3 を分解すると推測されたプロテアーゼの組換えタンパク質、ならびに親株として *S. pyogenes* NIH35 株 (M28, 劇症型レンサ球菌感染症由来株) と 591 株 (M49, 皮膚疾患由来株) を用いた遺伝子欠失株および復帰変異株株を作製し、デスモグレインの分解に関与する *S. pyogenes* の病原因子を同定した。

## 2. マウス経皮感染実験

6~8週齢の C57BL/6J 雌マウスの背部を除毛した。除毛 2 日後に、*S. pyogenes* の菌懸濁液 ( $5 \times 10^8$  CFU) を、1 cm

角のガーゼパッチによりマウスの背部に留置した後、ドレッシング材で固定した。感染 3 日後に安楽死させ、皮膚病変の重症度を肉眼所見と HE 染色像から評価した。また、抗 *S. pyogenes* Group A Carbohydrate 抗体と抗 Dsg1 抗体または抗 Dsg3 抗体を用いた免疫組織化学染色により、感染組織中での Dsg1 と Dsg3 の分解および菌体の侵入を解析した。さらに感染 12 もしくは 72 時間後に皮膚組織を採取、破碎し、*S. pyogenes* の皮膚定着率を検討した。

#### 【結果および考察】

1. 供試した10種の *S. pyogenes* 臨床分離株のうち6菌株の培養上清について、rDsg1 および rDsg3 の分解能が認められた。また、rDsg1 と rDsg3 の分解は、システインプロテアーゼ阻害剤 (*N*-エチルマレイミド, E-64) を培養上清に添加することにより抑制された。一方、セリンプロテアーゼ阻害剤 (AEBSF, ベンズアミジン塩酸塩), アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤 (ペプスタチン), およびメタロプロテアーゼ阻害剤 (バスタチン, EDTA) は培養上清による rDsg1 および rDsg3 の分解に影響を及ぼさなかった。これらの結果から、*S. pyogenes* 培養上清による Dsg1 と Dsg3 の分解にシステインプロテアーゼが関与することが示唆された。

*S. pyogenes* が分泌するシステインプロテアーゼ SpeB は宿主の細胞外マトリックスタンパク質、補体関連因子のほか、*S. pyogenes* の菌体表層タンパク質を分解し、病態形成に関与することが報告されている。そこで、*speB* 欠失が培養上清によるデスモグレイン分解に及ぼす影響を検討した。その結果、*S. pyogenes* の培養上清による rDsg1 と rDsg3 の分解は *speB* 欠失により完全に阻害された。一方で、復帰変異株の培養上清は野生株と同等の rDsg1, rDsg3 分解活性を示した。また、rSpeB は濃度依存的に rDsg1 と rDsg3 を分解することを確認した。以上の結果から、*S. pyogenes* の分泌型システインプロテアーゼ SpeB が Dsg1 および Dsg3 の細胞外ドメインを分解することが明らかとなった。

2. マウス経皮感染モデルにおいて SpeB が皮膚病変形成に及ぼす影響を検討した結果、野生株もしくは復帰変異株感染マウスでは、皮膚の紅斑と浮腫を伴う化膿性病変が観察された。また、野生株および復帰変異株感染マウスの皮膚組織の HE 染色像では、感染部位における潰瘍形成と炎症細胞の浸潤を認めた。一方、 $\Delta$ *speB* 株感染マウスでは皮膚病変の形成が抑制された。感染 12 時間後の各菌株の皮膚定着率は有意差を認めなかったが、感染 72 時間後では、野生株と復帰変異株の皮膚定着率は $\Delta$ *speB* 株のそれと比較して有意に高かった。

免疫組織化学染色像において、野生株もしくは復帰変異株感染マウスでは、菌体が表皮から真皮浅層にかけて観察され、菌体の局在部位において Dsg1 と Dsg3 の染色性の低下を認めた。一方、*speB* 欠失株感染マウスでは、菌体は表皮の表層に局限し、Dsg1 と Dsg3 の染色性は保持された。これらの *in vivo* 実験の結果から、SpeB によるデスモグレインの分解が皮膚病変形成に関与することを証明した。

#### 【結論】

*S. pyogenes* の分泌型システインプロテアーゼ SpeB は、デスモソーム構成タンパク質である Dsg1 と Dsg3 の細胞外ドメインを分解し、菌体の組織深部への侵入を誘導することにより、皮膚感染症発症に寄与することが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 毛利 泰士 )		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教 授 川端 重忠
	副 査	教 授 仲野 和彦
	副 査	准教授 久保庭 雅恵
	副 査	講 師 高橋 雄介
<p><b>論文審査の結果の要旨</b></p> <p>本研究では、デスモソーム構成タンパク質であるデスモグレイン 1 (Dsg1) または Dsg3 を分解する化膿レンサ球菌 (<i>Streptococcus pyogenes</i>) の病原因子を検索し、<i>S. pyogenes</i> 皮膚感染症における病態形成との関連を検討した。Dsg1 と Dsg3 の組換えタンパク質を用いた解析により、<i>S. pyogenes</i> が産生する分泌型システインプロテアーゼ SpeB が Dsg1 と Dsg3 の細胞外ドメインを分解することが示された。さらに、新規の <i>S. pyogenes</i> 経皮感染マウスモデルを構築し、SpeB が皮膚病変形成に及ぼす影響を検討した結果、SpeB が感染部位における Dsg1 および Dsg3 の分解、ならびに、化膿性皮膚病変の形成に関与することが明らかとなった。以上の結果より、SpeB は細胞間接着分子群を分解し、化膿性皮膚病変の形成に寄与することが示唆された。</p> <p>よって、博士 (歯学) の学位論文として価値のあるものと認める。</p>		