The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	https://doi.org/10.18910/61650
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

学位論文

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

大阪大学大学院歯学研究科　口腔科学専攻

特別支援歯科学講座（障害者歯科学）

毛利　泰士

本論文の要旨の一部は，第 3 回 口腔微生物研究会 (2015 年 9 月 11 日，新潟)，第 57 回 歯科基礎医学会学術大会 (2015 年 9 月 11～13 日，新潟)，第 68 回 日本細菌学会関西支部総会 (2015 年 11 月 28 日，京都)，第 89 回 日本細菌学会総会 (2016 年 3 月 18～20 日，大阪), 第 69 回 日本細菌学会関西支部総会 (2016 年 11 月 19 日, 大阪) において発表した.

要約

化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) は，咽頭炎や膿痂疹をはじめとする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化膿レンサ球菌感染症 (Streptococcal toxic shock syndrome; STSS) まで幅広い臨床症状を惹起する．*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化膿性病変が形成される．この病変の形成には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* が産生する病原因子は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することが報告されてきた．しかし，本菌が産生する病原因子がデスモソーム構造に影響を与えるかについての報告は未だない．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) は表皮バリアの維持に機能する．Dsg1 と Dsg3 の機能障害は天疱瘡や水疱性膿痂疹の発症に関与することが明らかになっている．しかし，Dsg の機能障害を起こす *S. pyogenes* の病原因子は不明である．本研究では，Dsg1 と Dsg3 の細胞外ドメインを分解する *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のメカニズムを解析した．

Dsg1 および Dsg3 の細胞外ドメインの組換えタンパク質 (rDsg1，rDsg3) を作製し，*S. pyogenes* 臨床分離株 10 菌株の培養上清とそれぞれ反応させた．その結果，複数の臨床分離株の培養上清による rDsg1 と rDsg3 の分解が認められた．種々のプロテアーゼ阻害剤を用いて rDsg1 と rDsg3 の分解を担うプロテアーゼを検索した結果，分泌型システインプロテアーゼ SpeB の関与が示唆された．*S. pyogenes* NIH35 株 (STSS 由来株) と 591 株 (皮膚疾患由来株) を親株として *speB* 欠失株および復帰変異株を作製し，培養上清による rDsg1 および rDsg3 の分解を解析した結果，*speB* 欠失株の培養上清は rDsg1 および rDsg3 に対する分解能

を示さなかった．さらに，SpeB の組換えタンパク質は，濃度依存的に rDsg1 および rDsg3 を分解した．

SpeB によるデスモグレイン分解が皮膚病変形成に及ぼす影響をマウス経皮感染実験により検討した．*S. pyogenes* の菌懸濁液をマウス背部に留置し，感染 3 日後の病変部位を採取して HE 染色を行った．野生株感染マウスおよび復帰変異株感染マウスの皮膚組織では，感染部位における潰瘍形成と炎症細胞の浸潤が確認されたが，*speB* 欠失株感染マウスでは皮膚病変の形成が抑制された．また，抗 Dsg1 抗体と抗 Dsg3 抗体を用いた免疫組織化学染色により，病変部位における Dsg1 と Dsg3 の分解を検討した．その結果，野生株もしくは復帰変異株を感染させたマウスでは，真皮への菌体の侵入と Dsg1 および 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，Dsg1 と Dsg3 の構造が保たれ，菌体は表皮の表層部で観察された．

以上の結果から，*S. pyogenes* が分泌する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 および Dsg3 を分解することにより，膿痂疹などの皮膚感染症発症に寄与することが示唆された．

はじめに

化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) は血液寒天培地上でβ溶血を呈するグラム陽性球菌である．ヒトを唯一の宿主とし，咽頭や皮膚から高頻度に分離される．*S. pyogenes* 皮膚感染症は発展途上国の小児で頻繁に認められ，患者数は世界で 1 億 1000 万人以上であると推計されている [1]．皮膚表層への感染により生じる痂皮性膿痂疹では，下肢または顔面の皮膚を好発部位として，紅斑を伴う水疱または膿疱が発症する．その後，短期間のうちに膿疱は自壊し，厚い痂皮が形成される [2]．さらに，化膿レンサ球菌性膿痂疹に続発して急性糸球体腎炎が発症する場合があり，発展途上国の小児と高齢者に対する高い罹患率と死亡率が問題になっている [3].

皮膚では，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)，デスモソームから構成される細胞間接着構造によりバリア機能が維持されている．デスモソーム構成タンパク質であるデスモグレイン (Dsg) は，カドヘリンスーパーファミリーに属する分子量 約 160 kDa の 1 回膜貫通型タンパク質である．アミノ基末端側の細胞外ドメインには，約 110 アミノ酸からなる繰り返し配列 (Extracellular cadherin domain: EC1～EC4) を有するドメイン構造が存在する. 隣接する細胞間の表層に発現する Dsg 分子は対合する方向で EC1 を介して接着面を形成し，上皮のバリア機能に寄与する [4].

Dsg は 4 種のアイソフォームが存在し，それぞれの発現パターンは組織ごとに異なる [5]. 表皮では，デスモグレイン 1 (Dsg1) とデスモグレイン 3 (Dsg3) がそれぞれ有核細胞層の全層と基底層に限局して発現する [6]．両分子の機能障害は皮膚疾患の発症に関与する [7]．皮膚に水疱やびらんが形成される天疱瘡では，自己抗体の発生により Dsg1 または Dsg3 の機能が障害される [8, 9]．また，黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の感染に起因する水疱性

膿痂疹では，*S. aureus* が産生する表皮剥脱毒素 (Exfoliative toxin; ET) のタンパク質分解活性により，Dsg1 の細胞外ドメインが特異的に切断される．その結果，顆粒層の裂隙を伴う水疱が形成される [10].

S. pyogenes が産生する莢膜，溶血毒素 Streptolysin S (SLS)，およびシステインプロテアーゼ streptococcal pyrogenic exotoxin B (SpeB) はTJの構成タンパク質であるオクルディンやAJを構成する E-カドヘリンの分解を引き起こす [11-13]．しかし，*S. pyogenes* の病原因子による細胞間接着の傷害が痂皮性膿痂疹の発症に及ぼす影響は不明である.

本研究では，デスモソームを傷害する *S. pyogenes* 病原因子を同定し，皮膚病態の形成との関連を *S. pyogenes* 経皮感染マウスモデルを用いて検証することを目的とした. その結果, *S. pyogenes* の分泌型システインプロテアーゼ SpeB による Dsg1 および Dsg3 の細胞外ドメインの分解が炎症性皮膚病変の形成に関与することを示した.

材料と方法

1. 使用菌株および培養方法

本研究で使用した *S. pyogenes* 菌株を表 1 に示した．臨床分離株の一部は東邦大学 村井貞子 博士 (現 日本赤十字秋田看護大学)，東京女子医科大学 菊池 賢 博士，および国立感染症研究所 渡邉 治雄 博士から分与された [14-16]．*S. pyogenes* の培養には，0.2% (w/v) Yeast Extract (Becton Dickinson and Company，Franklin Lakes，NJ，USA) を添加した Todd-Hewitt (Becton Dickinson and Company) (THY) 液体培地，または 1.5% (w/v) 寒天 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を含む THY 寒天平板培地を使用した. *Escherichia coli* BL21-CodonPlus (DE3) -RIPL 株 (Agilent Technologies，Santa Clara，CA，USA) は Luria-Bertani (LB; ナカライテスク，京都) 液体培地を用いて振盪培養した．組換え大腸菌の選択にはアンピシリン (100 μg/ml)，クロラムフェニコール (34 μg/ml)，およびカナマイシン (25 μg/ml) を用いた．*S. pyogenes* 変異株の選択には，スペクチノマイシン (100 μg/ml) を使用した．

表 1. 本研究で使用した *S. pyogenes* 臨床分離株

M 血清型	菌株	由来	入手先または参考文献
M1	SSI-9	STSS	村井博士
M1	SF370	創傷感染	17
M3	SSI-1	STSS	村井博士
M3	TW3358	咽頭炎	菊池博士
M12	30	STSS	渡邉博士
M12	TW3337	咽頭炎	菊池博士
M28	NIH35	STSS	渡邉博士
M28	TW3339	咽頭炎	菊池博士
M49	NZ131	急性糸球体腎炎	18
M49	591	皮膚感染症	19

STSS; 劇症型レンサ球菌感染症

2. *speB* 欠失株および復帰変異株の作製

S. pyogenes 591 株または NIH35 株を親株とした *speB* 欠失株 (Δ*speB*) および復帰変異株 (Wr) の作製は温度感受性プラスミド pSET4s を用いて行った [12, 20]. pSET4s は東京大学 関崎 勉 博士，動物衛生研究所 高松 大輔 博士から分与された [21]. *speB* 遺伝子の上流と下流の染色体領域を 2 対のプライマーセット (表 2，speBkoF1/R1，speBkoF2/R2) を用いた PCR 法で増幅した. 得られた 2 種の PCR 産物を鋳型 DNA とし, プライマー speBkoF1/speBkoR2 を用いてオーバーラッピング PCR 法を行った．PCR 産物と pSET4s を *Bam*H I と *Pst* I (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) で消化した後，DNA ligase (タカラバイオ，滋賀) の存在下で 16°C で 6 時間反応させ，*speB* 欠失株作製用プラスミドを構築した.

S. pyogenes 591 株または NIH35 株に得られたプラスミドを形質転換した．形質転換は, Gene Pulser II 装置 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いたエレクトロポレーション法により行った [22]．続いて，28°C で 5 時間の培養を THY 液体培地で行った．菌液をスペクチノマイシン含有 THY 寒天培地上に播種し，28°C で組換え体を選択した．*S. pyogenes* では pSET4s は 37°C で複製しないため, 組換え体を 37°C でスペクチノマイシン含有 THY 寒天培地上に 2 度の継代を行い，染色体 DNA 外のプラスミドを喪失させるとともに，染色体 DNA へのプラスミドの組換えを誘導した. 得られたコロニーを抗菌薬不含の THY 寒天培地に播種し, 28°C で培養することにより相同組換えを誘導した．28°C で 5 回の継代を行った後，スペクチノマイシン感受性であるクローンを選択し, プライマーセット checkF/checkR を用いたコロニーPCR 法と電気泳動により，*speB* 遺伝子の欠失もしくは野生遺伝子型への復帰を確認した.

表 2. 欠失株作製に使用したプライマー

プライマー名	プライマー塩基配列 (5'-3')
speBkoF1	GCGGATCCTGTTTAATCGAAATGTTTTTTGAATGC
speBkoR1	ACTTTGGTAACCGTTGAAGCCCATTTTTTTTATACCTCTTTC
speBkoF2	GAAAGAGGTATAAAAAAAATGGGCTTCAACGGTTACCAAAGT
speBkoR2	AACTGCAGGTCTTAAAGGATGTACCGTATTGG
checkF	AGAAACTCATCAACATTGACATTC
checkR	GCATATTCGACTAATTTTGTGAGG

3. 組換えタンパク質の作製

Dsg1 と Dsg3 の細胞外ドメインの組換えタンパク質を作製した (図 1). ヒト皮膚角化細胞 (HaCaT) の mRNA を PureLink® RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて抽出した．続いて，SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Thermo Fisher Scientific) を用い，オリゴ $(dT)_{20}$ プライマーと 50°C で 50 分間反応させ逆転写反応を行い，cDNA を合成した．Dsg1 および Dsg3 の細胞外ドメインをコードする配列に特異的なプライマー (表 3) を用い，合成した cDNA を鋳型として PCR を行った．得られた PCR 産物を *Bam*H I と *Kpn* I (New England Biolabs) で処理し, 同制限酵素で処理した pQE30 (Qiagen, Hilden, Germany) に挿入し，発現プラスミドを構築した．作製したプラスミドと pREP4 ベクター (Qiagen) を *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) -RIPL 株に形質転換し，アミノ基末端にヒスチジンタグを付与した rDsg1 もしくは rDsg3 発現菌株を作製した．組換え体を 37°C で対数増殖期 (OD_{600} = 0.4) まで培養し，イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG，終濃度 1 mM) を添加後，5 時間の培養により組換えタンパク質の発現を誘導した．回収した菌体をプロテアーゼインヒビターカクテル (complete EDTA-free; Roche, Switzerland) と終濃度 1 mg/ml のリゾチーム (Roche) を含む溶菌緩衝液 (50 mM NaH_2PO_4，300 mM NaCl，10 mM イミダゾール，pH 8.0) に懸濁し，氷上で 30 分間反応させた．そして，超音波破砕機

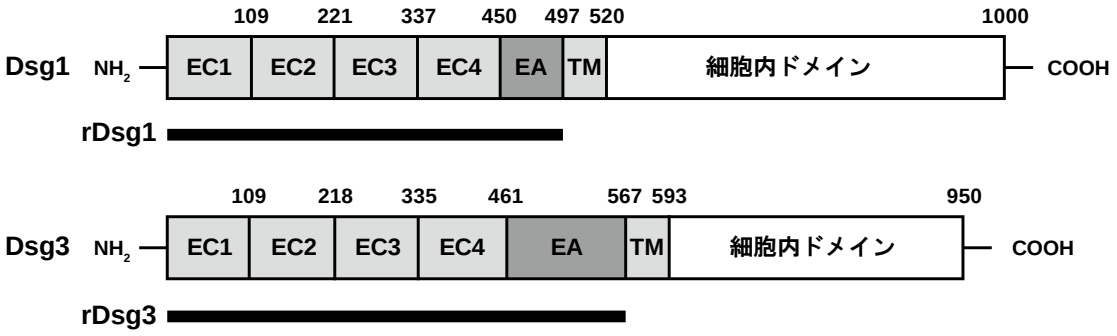

図 1. Dsg 細胞外ドメインの組換えタンパク質の作製

Dsg1 および Dsg3 のドメイン構造を示す．太線 (**—**) で示す，細胞外ドメインの組換えタンパク質 (rDsg1, rDsg3) を作製した．EC: 細胞外カドヘリンドメイン，EA: 細胞外アンカードメイン，TM: 膜貫通ドメイン．

表 3. 組換えタンパク質作製に使用したプライマー

プライマー名	プライマー塩基配列 (5'-3')
rDsg1F	CGGGATCCGAATGGATCAAGTTCGCAGCAGCCTGTCG
rDsg1R	GGGGTACCATGCACATTGTCTGATAACAAATCTTTGGCTCCG
rDsg3F	CGGGATCCGAATGGGTGAAATTTGCCAAACCCTGC
rDsg3R	GGGGTACCGCGGCCTGAGTGCGGCCTGCCATACCTGG

(UD-201; トミー精工，東京) を用いて破砕 (Output 6, Duty 40) した後，遠心分離 (9000 × *g*, 20 分間，4°C) を行った．得られた上清画分をニッケルニトリロ三酢酸アガロースアフィニティークロマトグラフィー (Qiagen)で精製した．精製後の組換えタンパク質は，Amicon Ultra-4 (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を用いた限外濾過により濃縮した後に，リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS; 137 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH_2PO_4) を用いて透析した. 精製タンパク質の濃度は BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) で測定した.

組換え SpeB タンパク質の作製は，過去の報告に基づいて行った [23].

4. *S. pyogenes* 培養上清による Dsg 分解能の解析

37°C で一晩培養した 6 ml の *S. pyogenes* 菌液を遠心分離 (4500 × *g*, 5 分間, 4°C) し，上清画分を回収した.

S. pyogenes 培養上清による Dsg 分解は, ウエスタンブロット法により解析した. *S. pyogenes* 培養上清 10 µl と 0.5 µg の rDsg1 もしくは rDsg3 を 37°C で 3 時間反応させた．続いて，サンプルと等量の 2 × サンプルバッファー [0.1 M Tris-HCl, pH 6.8, 20% (v/v) グリセロール, 4% (w/v) SDS，12% (v/v) β-メルカプトエタノール，0.002% (w/v) ブロモフェノールブルー] を添加し，100°C で 5 分間の熱処理を行った．そして，ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により各検体を 12% (v/v) アクリルアミドゲルに展開した．セミドライ式ウェスタンブロッティング装置 (Bio-Rad) で検体タンパク質をポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (Merck Millipore) へ 10 V 一定で転写した後, ブロッキング溶液 (ブロックエース®; メグミルク，東京) に浸漬し，4°C で一晩振盪した．続いて，PVDF 膜を 0.05% (v/v) Tween 20 含有リン酸緩衝生理食塩水 (PBST) で 3 回洗浄した後，PBST で希釈したマウス抗ヒト Desmoglein 1 抗体 (1:2000, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) またはマウス抗ヒト Desmoglein 3 抗体 (1:2000，R&D Systems) と室温で 1 時間反応させた．PVDF 膜を PBST 10 ml で 3 回洗浄した後，二次抗体としてホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗マウス IgG 抗体 (1:2000，Cell Signaling Technology，Danvers，MA，USA) と室温で 1 時間反応させた．PBST で 3 回洗浄した後，Pierce Western Blotting Substrate Plus (Thermo Fisher Scientific) と反応させて生じた化学発光をレントゲンフィルム (富士フィルム，東京) に投影し，現像した.

Dsg1 と Dsg3 を分解する *S. pyogenes* のプロテアーゼを検索するため，*S. pyogenes* 培養上清を *N*-エチルマレイミド (1 mM)，E-64 (10 µM)，フッ化 4- (2-アミノエチル) ベンゼンスル

ホニル (AEBSF) (1 mM)，ベンズアミジン塩酸塩 (1 mM)，ペプスタチン (1.5 μM)，ベスタチン (1 mM)，またはエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) (1 mM) (Sigma-Aldrich) と室温で 30 分間反応させた後，同様にウェスタンブロット法で培養上清の Dsg 分解能を解析した.

5. SpeB による Dsg 分解能の解析

rSpeB (10，20，50，100，200，500，または 1000 nM) と終濃度 10 mM のジチオトレイトールを室温で 30 分間反応させて rSpeB を活性化した．rSpeB (10～1000 nM，10 μl PBS) と rDsg1 もしくは rDsg3 (0.5 μg，10 μl PBS) を 37°C で 3 時間反応させた．サンプルと等量の 2 × サンプルバッファーと混和して 100°C で 5 分間の熱処理を行った後，抗 Dsg1 抗体または抗 Dsg3 抗体を用いたウェスタンブロット解析で SpeB の Dsg 分解能を検討した.

6. マウス経皮感染実験

Nakamura らの方法に従ってマウス経皮感染モデルを構築し, SpeB が皮膚病変形成に及ぼす影響を検討した [24]．6~8 週齢の C57BL/6J 雌マウス (日本エスエルシー，浜松) の背部をトリマー (大東電機工業，大阪) と除毛クリーム (Veet®; RB ジャパン，東京) を用いて除毛した．除毛 2 日後，100 μl の菌懸濁液 (5×10^8 コロニー形成単位; Colony forming unit，CFU) を 1 cm 角のガーゼパッチ (川本産業，大阪) によりマウス背部に留置し，ドレッシング材 (Tegaderm™; 3M, St. Paul, MN, USA) で固定した. 以上の処置は麻酔下で行った. 麻酔には, 0.3 mg/kg マウス体重 塩酸メデトミジン (ドミトール; 日本全薬工業，福島)，4.0 mg/kg マウス体重 ミダゾラム (ドルミカム; アステラス製薬，東京)，5.0 mg/kg マウス体重 酒石酸ブトルファノール (ベトルファール; Meiji Seika ファルマ，東京) の三種混合麻酔薬を腹腔内に投与した. 感染 3 日後に, ペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル; 共立製薬,

東京) の腹腔内投与 (243 mg/kg マウス体重) により安楽死させた.

7. 皮膚病変スコアの算定

肉眼所見から，皮膚病変の重症度をスコア化した [25]．紅斑，浮腫，びらん，および化膿の程度について，各症状を伴う皮膚の面積を基に，無症状を 0，最も症状の強いものを 4 とする 5 段階スケールで評価し，4 項目の合計を各マウスの皮膚病変スコアとした．なお，本実験に関与しない第三者が皮膚病変の評価を行った.

8. ヘマトキシリン・エオジン染色

採取したマウス組織の病変部位を 10% 中性緩衝ホルマリン液 (和光純薬，大阪) に浸漬させ, 室温で一晩の固定を行った. パラフィン包埋したサンプルから 3 μm 厚切片を作製し, 脱パラフィンして水洗後にヘマトキシリン染色液とエオジン染色液で染色した．エタノールで脱水後にスライドガラスに封入し, 正立顕微鏡 (CX41; オリンパス, 東京) で観察した.

9. 免疫組織化学染色

パラフィン包埋されたマウス皮膚組織に脱パラフィン処理を施した．水洗後，EasyLyse™ (Dako, Glostrup, Denmark) を用いた抗原賦活化を 100°C で 20 分間行った．室温で自然冷却後，ブロッキングワン (ナカライテスク，京都) により 4°C で一晩ブロッキングした．一次抗体として，ヤギ抗 *S. pyogenes* Group A Carbohydrate 抗体 (Abcam, Cambridge, UK)，ウサギ抗 Desmoglein 1 抗体 (1:100，Abcam)，またはウサギ抗 Desmoglein 3 抗体 (1:100，Bioss Antibodies，Woburn，MA，USA) と 4°C で一晩反応させた．PBST で 3 回洗浄した後，二次抗体として，Alexa Fluor® 488 標識抗ヤギ IgG 抗体または Alexa Fluor® 647 標識抗ウサギ IgG

抗体 (1:500，Thermo Fisher Scientific) と室温で 1 時間反応させた．PBST で 3 回洗浄し，Hoechst® 33342 (1:100，Thermo Fisher Scientific) により核を蛍光染色した．封入後，蛍光顕微鏡 (Axio Observer.D1; Zeiss，Jena，Germany) で観察した．

10. *S. pyogenes* 皮膚定着率の算定

経皮感染 12 もしくは 72 時間後にマウス皮膚組織を採取し，ジルコニア/シリカビーズ (Biospec Products, Bartlesville, OK, USA) と 1 ml の PBS を含むチューブに加え, MagNA Lyser Instrument (Roche) で破砕 (5000 rpm, 30 秒間, 2 回) した. 懸濁液を PBS で希釈し, 5% (v/v) 羊脱繊維血液 (日本バイオテスト研究所, 東京) を含む THY 血液寒天培地に播種した. 37°C で 24 時間培養後, β 溶血を呈するコロニー数を *S. pyogenes* として計数し, 接種 CFU に対する百分率を皮膚定着率として算出した.

11. 統計処理

全ての実験は 3 回以上行った．皮膚病変スコアについて，GraphPad Prism Version 7.02 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用いて，Kruskal–Wallis/ Dunn 検定により各群間の有意差を検討した．皮膚定着率の検定には Student の *t* 検定を用いた．$p < 0.05$ を有意差ありとした.

12. 実験承認

本研究は, 大阪大学遺伝子組換え実験委員会 (承認番号：3398-1), 病原体等取扱安全管理委員会 [病原体所持承認番号; 23 (歯学研究科) -7], 大阪大学動物実験委員会 (承認番号：動歯-26-014-2) の承認を得て行った.

結果

1. Dsg1 および Dsg3 を分解する *S. pyogenes* プロテアーゼの検索

S. pyogenes は菌体表層に発現する M タンパクの抗原性と遺伝子塩基配列の違いから，150 種を超える血清型に分類される [26]．臨床分離頻度が高い M 血清型の菌株から，侵襲性疾患由来株 [SSI-9 (M1)，SSI-1 (M3)，30 (M12) および NIH35 (M28) 株] または非侵襲性疾患由来株 [SF370 (M1)，TW3358 (M3)，TW3337 (M12)，TW3339 (M28)，NZ131 (M49)および 591 (M49) 株] の培養上清を採取し，ウェスタンブロット法で rDsg1 および rDsg3 の分解能を解析した (図 2). rDsg1 および rDsg3 の全長はそれぞれ約 60 kDa 付近のバンドとして検出された．SF370，30，TW3337，NIH35，TW3339 または 591 株の培養上清と反応させた試料では，rDsg1 の全長を示すバンドの検出量が低下した．さらに，SF370 または NIH35 株の培養上清で処理した試料では分解産物を反映すると考えられる微弱なバンドが 50 kDa から 60 kDa 付近に確認された．rDsg3 の全長を示すバンドは 30，TW3337，NIH35，TW3339 または 591 株の培養上清との反応により検出量が低下した．これらのサンプルにおいて，rDsg3 の分解産物を示す明瞭なバンドは認められなかった. SF370 株の培養上清と rDsg3 の反応により，rDsg1 での場合とは異なり，rDsg3 の全長バンドの検出量に明らかな変化は認められなかったが，40 kDa から 60 kDa 付近に分解産物を示すラダーバンドが検出された．これらの結果から，*S. pyogenes* 培養上清中のプロテアーゼが Dsg1 および Dsg3 を分解する可能性が示唆された.

次に，Dsg1 と Dsg3 の分解を担うプロテアーゼを検索するため，*S. pyogenes* 591 株 (皮膚疾患由来) の培養上清を各種プロテアーゼ阻害剤で処理し，rDsg1 および rDsg3 の分解を解析した (図 3A). その結果，システインプロテアーゼ阻害剤である *N*-エチルマレイミドもし

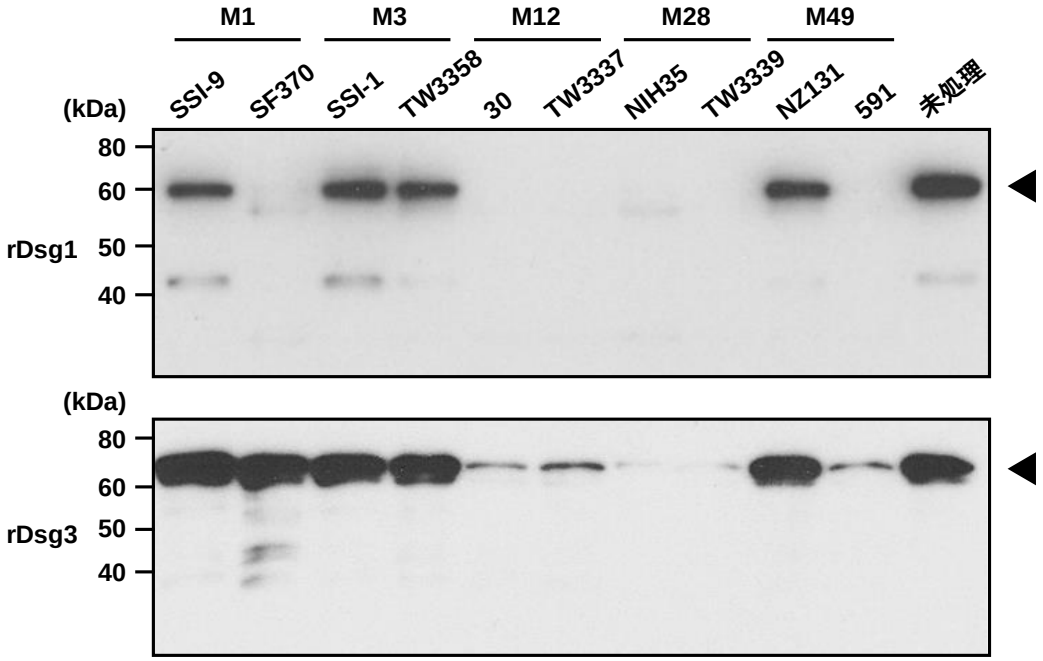

図 2. ***S. pyogenes*** **臨床分離株培養上清による Dsg の分解**

10 種の臨床分離株から調製した培養上清を rDsg1 または rDsg3 と 37ºC で 3 時間反応させた．rDsg1 と rDsg3 の分解は抗 Dsg1 抗体と抗 Dsg3 抗体を用いたウェスタンブロット法で解析した．黒矢じり (◂) は rDsg1 または rDsg3 の細胞外ドメインの全長を示す.

くは E-64 の添加により，rDsg1 および rDsg3 の分解は抑制された．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 (ベスタチン, 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．また，591 株と同様に，*S. pyogenes* NIH35 株 (侵襲性疾患由来) の培養上清による rDsg1 および rDsg3 の分解は，システインプロテアーゼ阻害剤の添加により抑制された (図 3B).

S. pyogenes が産生するシステインプロテアーゼとして，SpeB と Immunoglobulin G-degrading enzyme of *S. pyogenes* (IdeS) がこれまでに報告されている [27, 28]．システインプロテアーゼ阻害剤である E-64 は SpeB のプロテアーゼ活性を特異的に阻害し，IdeS に作用しない [28]．したがって，SpeB が rDsg1 および rDsg3 を分解する可能性が示唆された.

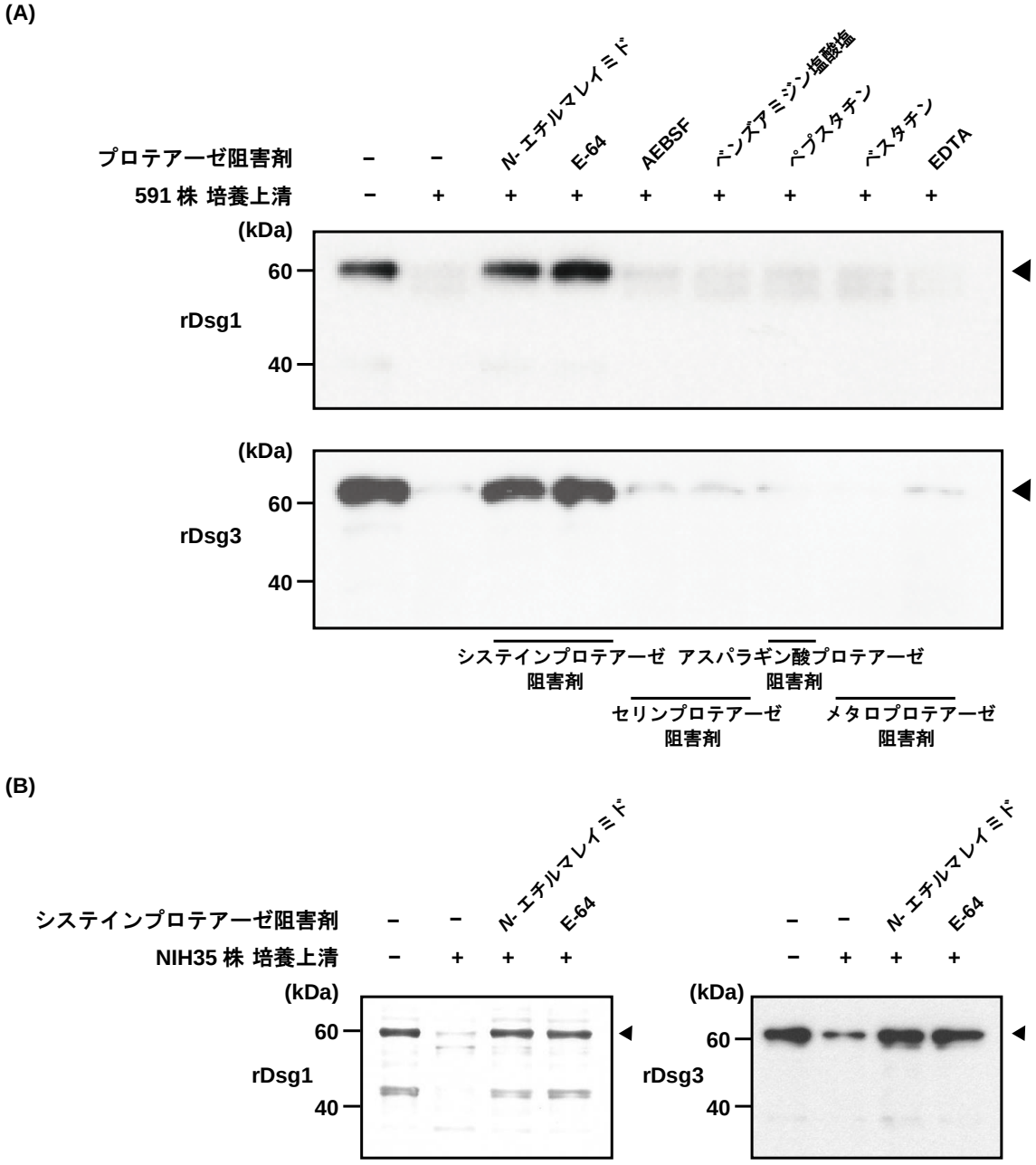

図 3. Dsg 分解に関与するプロテアーゼの検索

S. pyogenes 591 株 (A) または NIH35 株 (B) の培養上清をプロテアーゼ阻害剤存在下もしくは非存在下に室温で 30 分間静置した後，rDsg1 または rDsg3 と 37ºC で 3 時間反応させた．抗 Dsg1 抗体または抗 Dsg3 抗体を用いたウェスタンブロット法により, rDsg1 と rDsg3 の分解を解析した. 黒矢じり (◀) は rDsg1 または rDsg3 の全長を示す.

2. SpeB による Dsg1 および Dsg3 の分解

SpeB は宿主の細胞外マトリックスタンパク質[29]，細胞間接着分子[13]，補体関連因子[23, 30]のほか，*S. pyogenes* の菌体表層タンパク質を分解し[31-33]，病態形成に関与する．

培養上清中の SpeB が Dsg1 および Dsg3 の分解に及ぼす影響を検討するため, NIH35 株と 591 株を親株とし, *speB* 欠失株と復帰変異株を作製した. 各菌株の増殖速度を比較した結果, 有意差は認めなかった (図 4). 培養上清による rDsg1 および rDsg3 分解を解析した結果，両菌株の野生株の培養上清との反応で認められた rDsg1 と rDsg3 の分解は，*speB* 欠失株では認められなかった (図 5A). 野生株と復帰変異株の培養上清に SpeB 活性の差を認めなかった[13].

次に, 所定濃度の rSpeB を rDsg1 または rDsg3 と反応させ, SpeB による分解を検討した (図 5B). その結果，rSpeB の濃度に依存して，rDsg1 および rDsg3 の全長を示すバンドの検出量が低下した．さらに，rDsg1 に 50～500 nM の rSpeB を反応させた試料と rDsg3 に 200～1000 nM の rSpeB を反応させた試料において，37 kDa 付近に分解バンドを認めた．これらの結果から，SpeB が Dsg1 と Dsg3 の細胞外ドメインを直接的に分解することが明らかになった．

3. SpeB が皮膚病変形成に及ぼす影響

SpeB が皮膚病変の形成に及ぼす影響を，マウス経皮感染モデルを用いて解析した．C57BL/6J マウスの背部に *S. pyogenes* の菌懸濁液を定着させ，3 日後に皮膚の状態を観察した．野生株感染および復帰変異株感染マウスの皮膚の肉眼所見では，炎症を伴う化膿性病変を認めた (図 6A). 一方，*speB* 欠失株感染マウスでは，感染部位の一部に発赤とびらんを認めたが，病変形成は野生株感染マウスと比較して抑制された．各マウスの皮膚病変の重

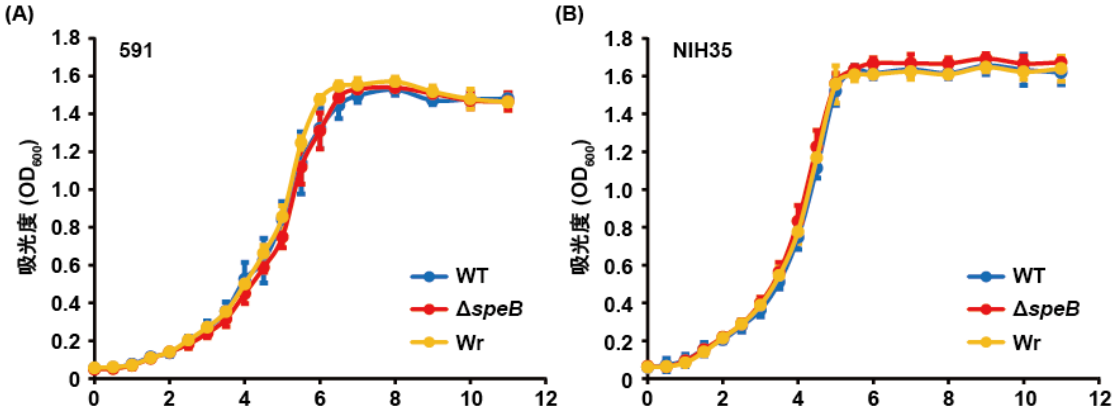

図 4. *S. pyogenes* 591 株および NIH35 株の増殖曲線

S. pyogenes 591 株 (A) および NIH35 株 (B) の野生株 (WT), *speB* (Δ*speB*) 欠失株または復帰変異株 (Wr) を THY 液体培地を用いて 37°C で培養し，波長 600 nm における吸光度を測定した.

症度をスコア化したところ，野生株感染マウスおよび復帰変異株感染マウスと比較して，*speB* 欠失株感染群の皮膚病変スコアは有意に減少した ($p < 0.05$) (図 5B). 皮膚病変における菌量を算出した結果，感染 12 時間後のマウス皮膚への各菌株の定着率に有意差を認めなかった (図 6C). しかし感染 72 時間後では，野生株と復帰変異株の皮膚定着率は *speB* 欠失株のそれと比較して有意に高かった ($p < 0.05$) (図 6D).

HE 染色を用いた病理組織学的解析では，野生株感染マウスと復帰変異株感染マウスに表皮の細胞内浮腫，細胞間浮腫，および潰瘍形成を認めた．また，潰瘍部では，核塵または菌体と考えられる好塩基性の濃染部位が観察されたほか，表皮から真皮の深層にかけて好中球を主体とした炎症細胞の浸潤を認めた．*speB* 欠失株感染マウスでは，表皮の一部に肥厚を認めたが，潰瘍は形成されなかった．さらに，真皮の深層に炎症細胞浸潤を認めたが，真皮浅層や表皮内への炎症細胞浸潤は軽度であった (図 6E). これらの結果から，SpeB が炎症性皮膚病変の形成に関与することが示唆された.

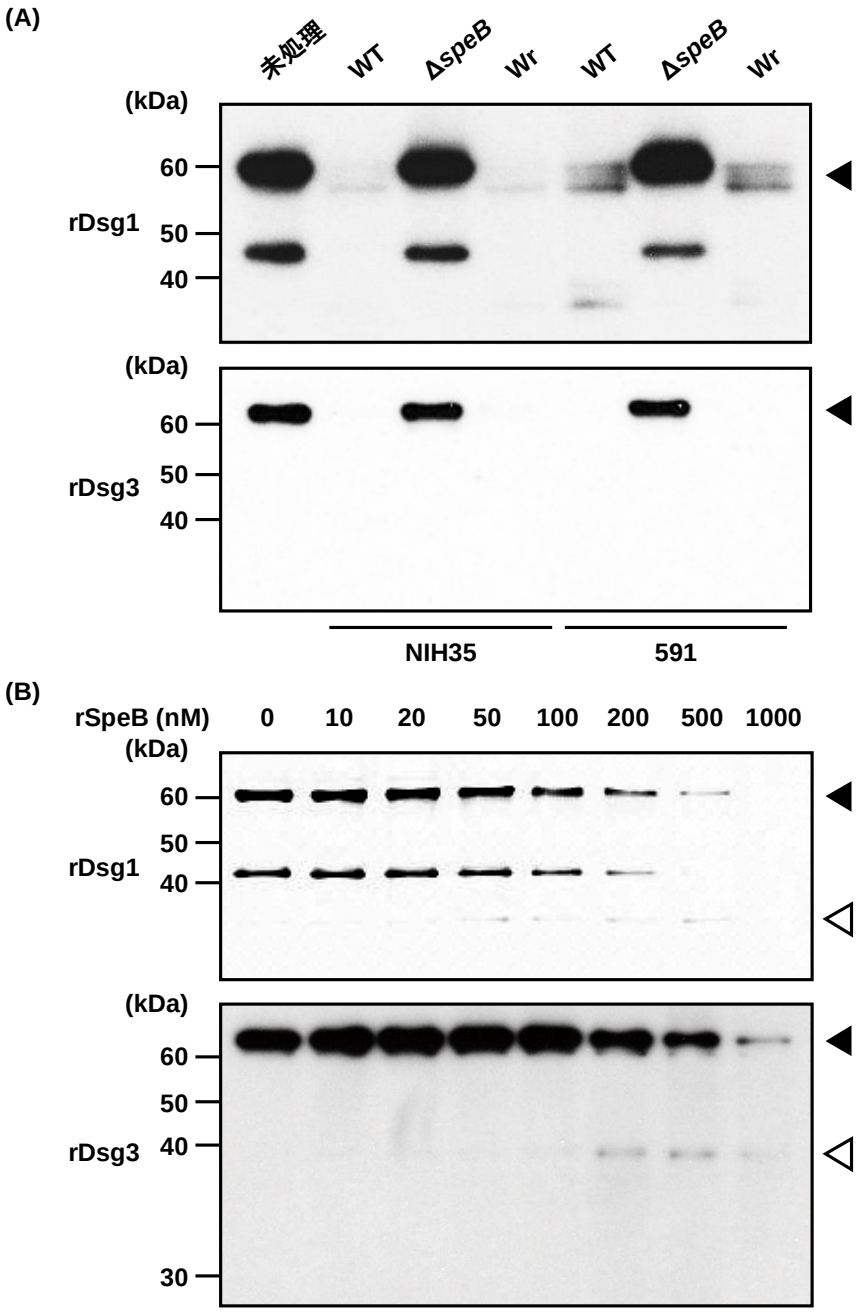

図 5. システインプロテアーゼ SpeB による Dsg 分解

(A) 野生株 (WT), *speB* 欠失株 (Δ*speB*), または復帰変異株 (Wr) の培養上清を rDsg1, rDsg3 と 37ºC で 3 時間反応させた. rDsg1 と rDsg3 の分解を抗 Dsg1 抗体と抗 Dsg3 抗体を用いたウェスタンブロット法で解析した. (B) 所定濃度の rSpeB を rDsg1 または rDsg3 と 37°C で 3 時間反応させ, rDsg1 と rDsg3 の分解をウェスタンブロット法で解析した. 黒矢じり (◀) は rDsg1 と rDsg3 の全長を示す. 白矢じり (◁) は分解産物を反映するバンドを示す.

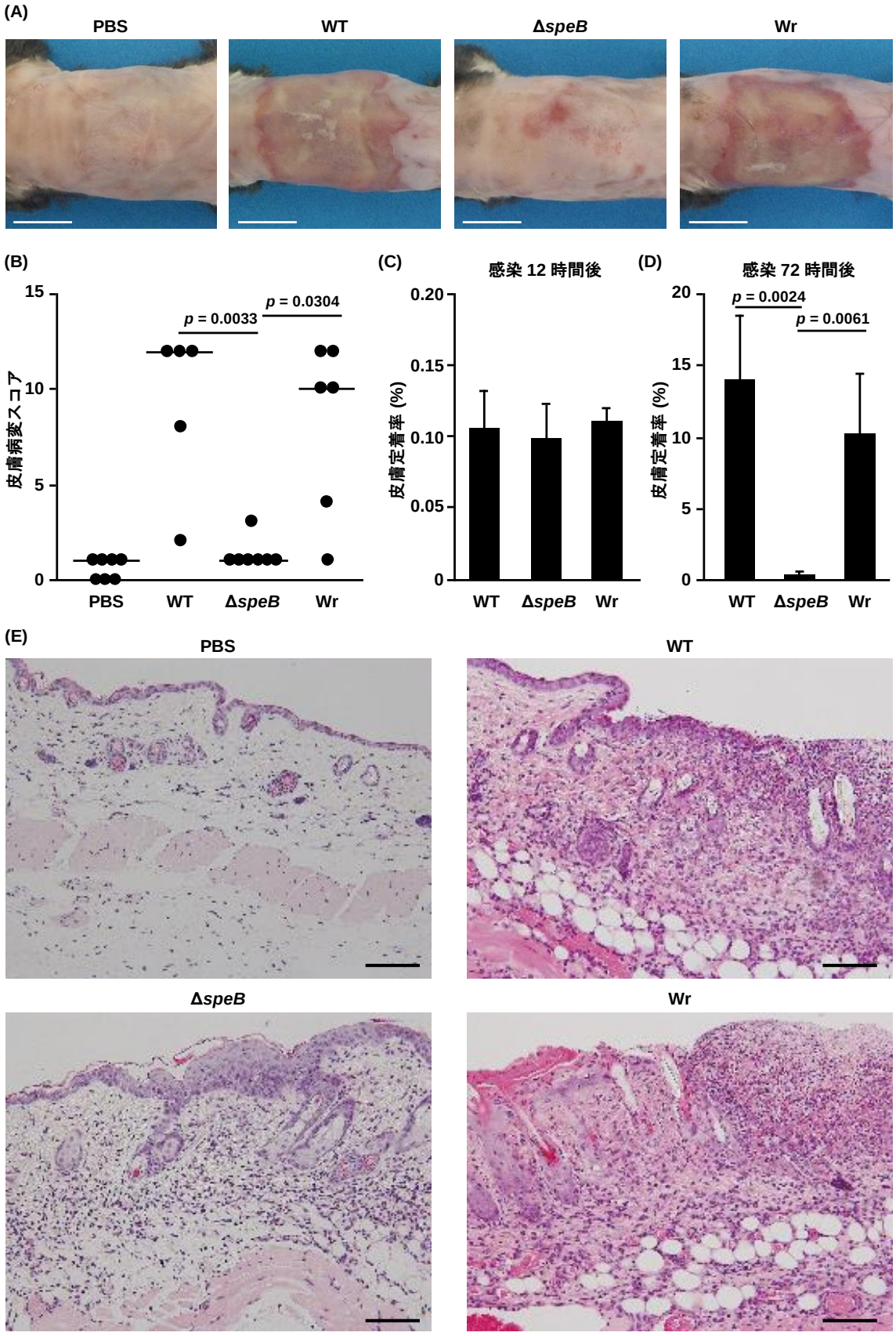
(A)
PBS
WT
ΔspeB
Wr
(B)
皮膚病変スコア
15
10
5
0
p = 0.0033
p = 0.0304
PBS
WT
ΔspeB
Wr
(C)
感染 12 時間後
皮膚定着率 (%)
0.20
0.15
0.10
0.05
0
WT
ΔspeB
Wr
(D)
感染 72 時間後
皮膚定着率 (%)
20
15
10
5
0
p = 0.0024
p = 0.0061
WT
ΔspeB
Wr
(E)
PBS
WT
ΔspeB
Wr

図 6. *S. pyogenes* 経皮感染による皮膚病変の形成

(A) 6～8 週齢の C57BL/6J 雌マウスの背部に *S. pyogenes* の菌懸濁液 (5×10^8 CFU) を 1 cm 角のガーゼパッチにより留置した．感染 3 日後の皮膚の肉眼像の典型例を示す．スケールバー, 1 cm. (B) 皮膚病変について，紅斑，浮腫，びらん，および化膿の程度をスコア化し 4 項目の合計を各マウスの皮膚病変スコアとした. シンボルは各マウスの皮膚病変スコアを, 水平線は中央値を示す. 統計解析は Kruskal-Wallis/ Dunn 検定により行った．(C) 感染 12 時間後のマウスの皮膚病変部位における CFU 数を算出した．皮膚定着率は接種 CFU 数に対する百分率で示す. 図中の縦棒は 8 匹のマウスの平均値を，バーは標準誤差を示す. (D) 感染 72 時間後のマウス皮膚組織への *S. pyogenes* の定着率を算出した．図中の縦棒はそれぞれ，野生株 (WT) 感染マウス 5 匹，*speB* 欠失株 (Δ*speB*) 感染マウス 7 匹，または復帰変異株 (Wr) 感染マウス 6 匹の平均値を，バーは標準誤差を示す．統計解析は Student の *t* 検定により行った．(E) 感染 3 日後の病変部位を採取しホルマリン固定およびパラフィン包埋後にヘマトキシリン・エオジン染色を行った．スケールバー, 100 μm.

4. マウス皮膚病変における SpeB による Dsg 分解

S. pyogenes 感染マウス皮膚組織での Dsg1 および Dsg3 の分解を免疫組織化学染色法により解析した．野生株または復帰変異株感染マウスでは，表皮における Dsg1 の染色性が低下した. *speB* 欠失株感染マウスでは Dsg1 の染色性が保たれていたが, 表皮の肥厚を認めた (図 7)．また，Dsg3 を蛍光染色した野生株感染マウスと復帰変異株の組織切片では，Dsg1 と同様に，表皮の Dsg3 染色性は低下した．一方，*speB* 欠失株感染マウスでは Dsg3 の染色性が保持された (図 8).

また, 野生株または復帰変異株を感染させたマウスの組織切片では, Dsg1 および Dsg3 の染色性低下が認められた部位に沿って，表皮から真皮浅層への菌体の侵入が確認された．一方，*speB* 欠失株感染マウスにおいて，菌体は表皮の表層に限局し，菌体の真皮への侵入は認められなかった.

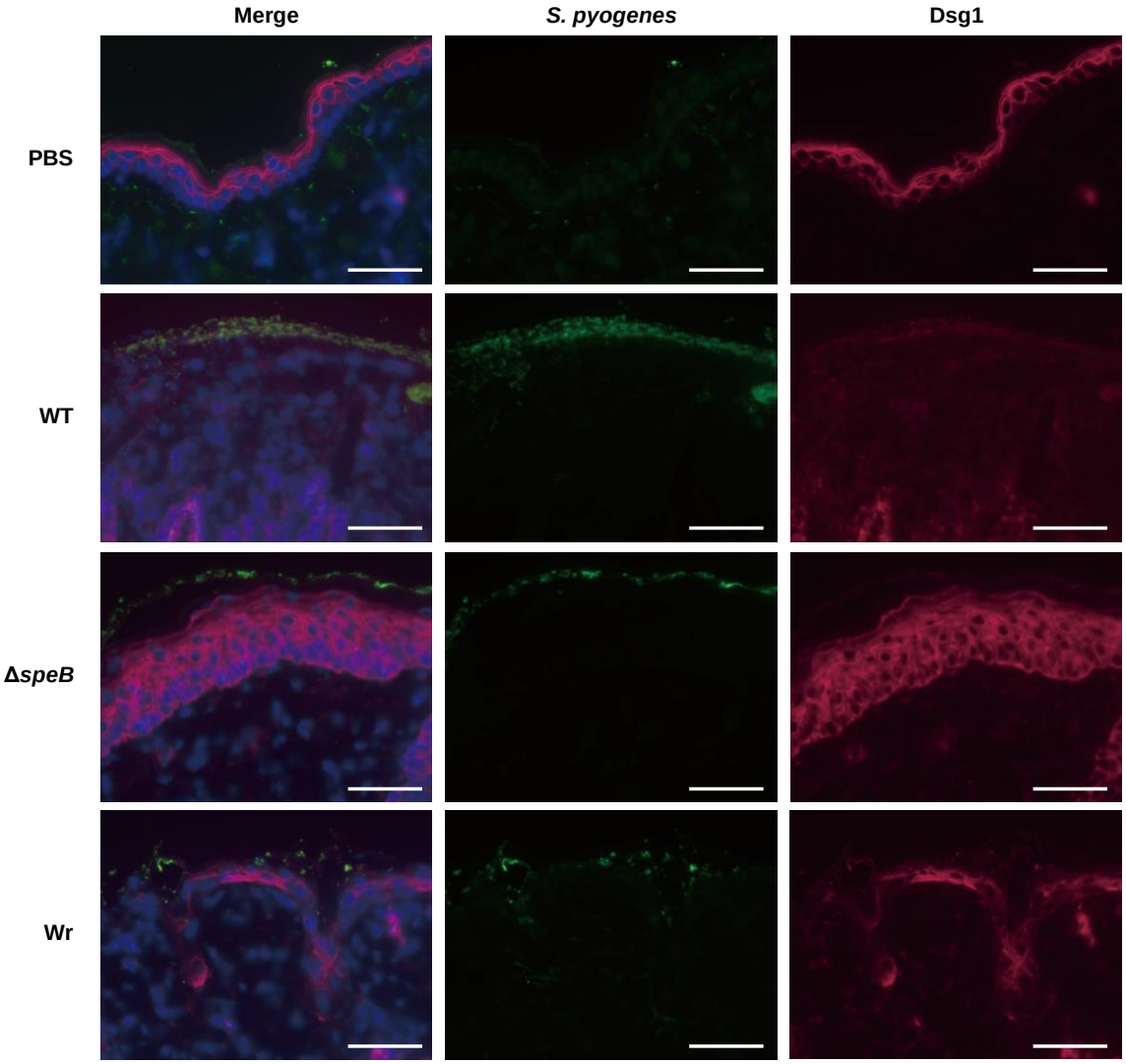

図 7．マウス皮膚病変における Dsg1 の分解

感染 3 日後の皮膚病変を免疫組織化学染色し，蛍光顕微鏡で観察した．菌体 (緑) はヤギ抗 *S. pyogenes* Group A Carbohydrate 抗体と Alexa Fluor 488 標識抗ヤギ IgG 抗体で標識した．Dsg1 (赤) はウサギ抗 Desmoglein 1 抗体と Alexa Fluor 594 標識抗ウサギ IgG 抗体で標識した. DNA の蛍光染色は Hoechst 33342 を用いて行った．スケールバー, 50 μm.

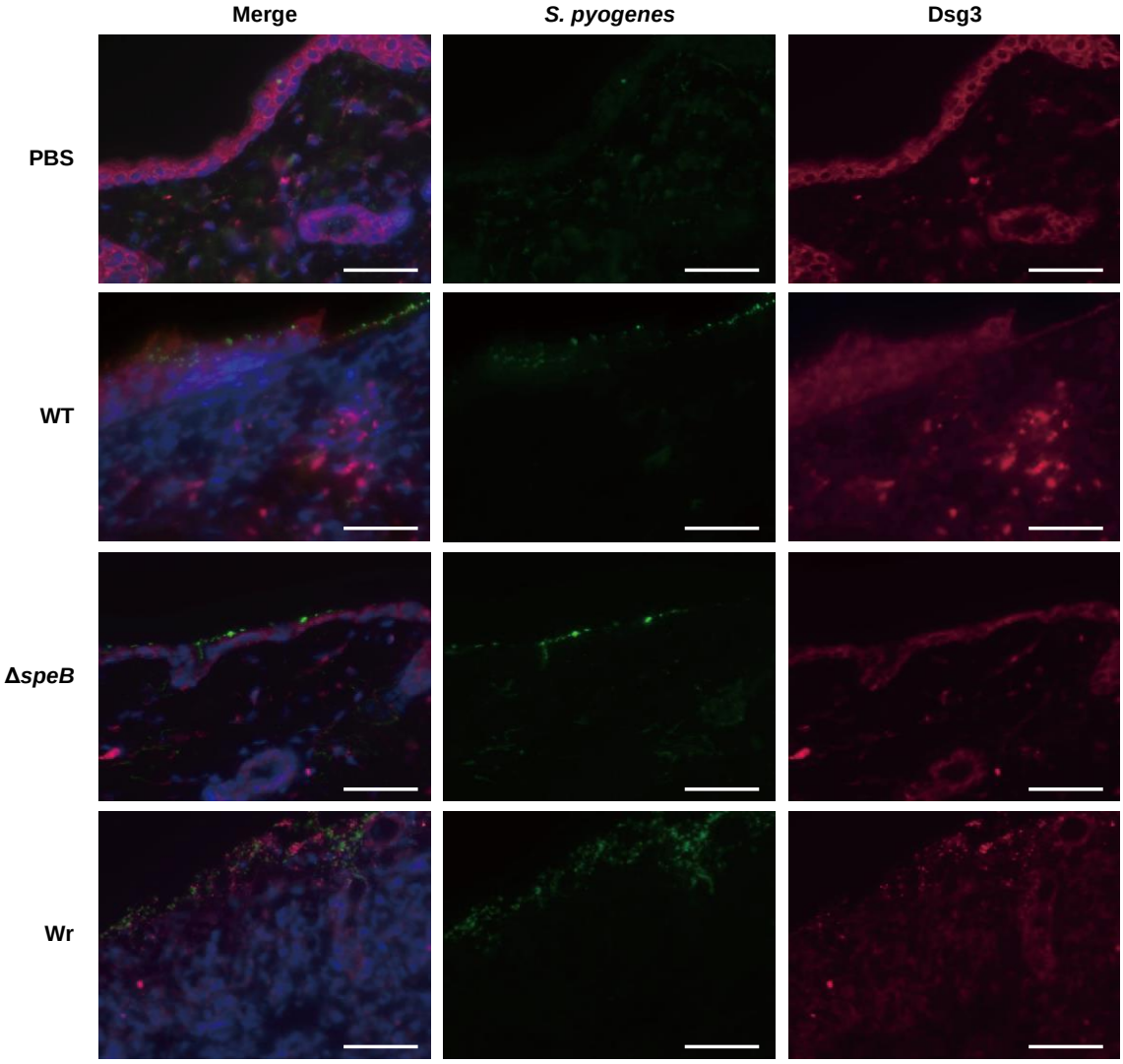

図 8. マウス皮膚病変における Dsg3 の分解

感染 3 日後の皮膚病変を免疫組織化学染色し，蛍光顕微鏡で観察した．菌体 (緑) はヤギ抗 *S. pyogenes* Group A Carbohydrate 抗体と Alexa Fluor 488 標識抗ヤギ IgG 抗体で標識した．Dsg3 (赤) はウサギ抗 Desmoglein 3 抗体と Alexa Fluor 594 標識抗ウサギ IgG 抗体で標識した. DNA の蛍光染色は Hoechst 33342 を用いて行った．スケールバー, 50 μm.

考察

S. pyogenes 皮膚感染症は外傷，湿疹，虫刺症等に続発するだけでなく，健常皮膚においても発症する [34]．これまでに *S. pyogenes* マウス皮膚感染モデルとして，皮内もしくは皮下に菌懸濁液を刺入する方法が用いられてきたが [35]，ヒトでは *S. pyogenes* が皮膚症状の発症に先行して健常皮膚に定着するため [36]，今回の経皮感染モデルは，より実際の病態に近いと考えられる．一方，ガーゼパッチによりマウスの皮膚に *S. pyogenes* を留置する方法がマウス膿痂疹モデルとして報告されている [37]．しかしながら，ヒト新生児の皮膚を移植した免疫不全マウスを用いることや，感染前にマウスの皮膚をメス刃で傷つける必要があることなど，技術的に困難な点があった．本研究の経皮感染モデルでは，除毛作業により目視では確認されない程度に角質層が傷害された可能性は考えられるが，表皮構造は保持されていたことから，*S. pyogenes* 皮膚感染症の新たなモデルとして応用できることが示された．

皮膚では細胞間接着構造により極性とバリア機能が維持されるため，細菌の病原因子による細胞間接着の傷害が皮膚感染症の発症に関連すると考えられる．これまで，*S. pyogenes* のコラーゲン結合タンパク質 Collagen-binding protein of group A streptococci (Cpa) や，プラスミノーゲン結合タンパク質 Plasminogen-binding M protein (PAM)，線毛構成タンパク質 Fibronectin- and collagen-binding T-antigen (FctA) の変異株により，マウス皮膚への病変形成能は低下することが報告されている [38-41]．Cpa や PAM，FctA はケラチノサイトへの付着や自然免疫の回避，バイオフィルムの形成に寄与し，その結果，皮膚病変の形成に関与すると考えられてきた [38-41]．しかし，*S. pyogenes* の病原因子による細胞間接着障害と皮膚病態の関連は不明である．本研究では，*S. pyogenes* が分泌するシステインプロテアーゼ SpeB が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することを明らか

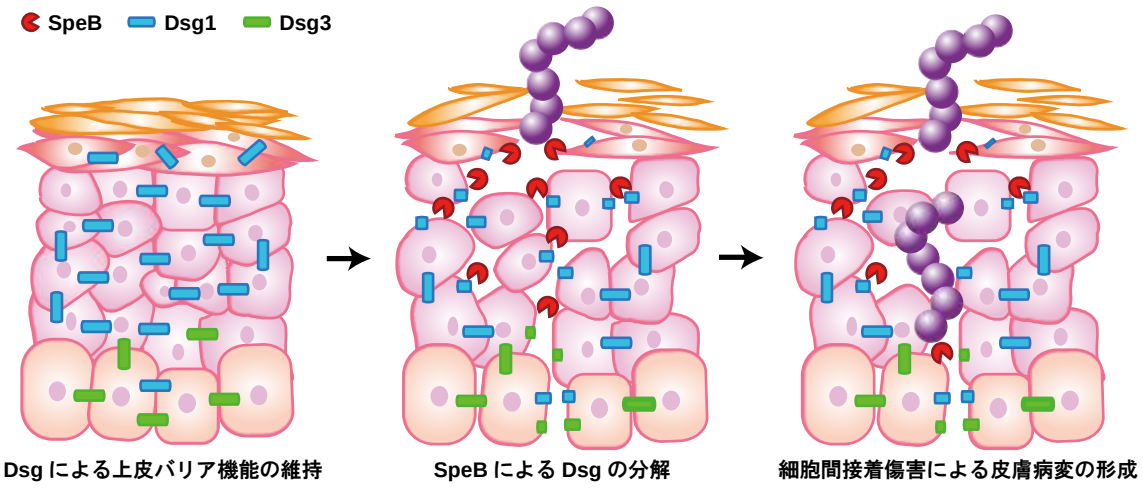

図 8. SpeB による *S. pyogenes* 皮膚感染症発症メカニズム

デスモソーム構成タンパク質である Dsg1 と Dsg3 は皮膚のバリア機能の維持に寄与する．SpeB は Dsg1 と Dsg3 の細胞外ドメインの分解および菌体の組織深部への侵入を誘導し，その結果，皮膚病変の形成に寄与すると考えられる．

にした．さらに，マウス経皮感染モデルにおいて，SpeB が皮膚病変の形成に寄与することを証明した (図 8).

S. pyogenes 臨床分離株の培養上清による Dsg1 および Dsg3 の分解を検討した結果，各菌株の Dsg 分解活性と，M 型または由来する疾患に明確な関連は認められなかった．*speB* 遺伝子は全ての *S. pyogenes* 株で保存されているが，SpeB 産生量は菌株依存性に異なる [42]．供試した TW3337 株，30 株，NIH35 株，TW3339 株，および 591 株は，高い SpeB 活性を呈するという報告と一致して，Dsg1 と Dsg3 に対する高い分解能を示した [13]．一方，SSI-9 株，SSI-1 株，TW3358 株，および NZ131 株の SpeB 活性は低く，Dsg1 と Dsg3 に対する分解能も低かった．したがって，SpeB は Dsg1 と Dsg3 を切断する主な *S. pyogenes* の因子であることが示唆された．また，SF370 株は，SpeB 活性が低いにも関わらず，高い Dsg1 分解活性を

示した．この結果から，SpeB は Dsg3 と比較して，Dsg1 への親和性がより高い可能性が示唆された．

S. aureus の感染に起因する水疱性膿痂疹は小水疱やびらんを主な症状とし，*S. pyogenes* の痂皮性膿痂疹と比較して病変の進行が緩徐である．実際，本研究と同じマウス経皮感染モデルを用いた過去の報告では, *S. aureus* 感染 7 日後に顕著な皮膚病変が観察されている [23]. 本研究では，*S. pyogenes* は感染 3 日後に最大病巣を形成した．*S. aureus* の皮膚病変形成機構を担う病原因子である ET は，基質特異性の高いセリンプロテアーゼである．ET は Dsg1 の細胞外ドメイン上に存在する 381 番目のグルタミン酸の直後を特異的に切断し，顆粒層の裂隙を伴う水疱を形成する [10]．一方，*S. pyogenes* を主な起因菌とする膿痂疹では，疼痛を伴う化膿性皮疹を生じ, 膿疱は短期間に自壊して痂皮を形成する [2]．しかしながら，*S. pyogenes* による病態形成の詳細な機構は不明であった. 本研究の結果から, SpeB による Dsg1 と Dsg3 の分解が皮膚病変の形成に関与することが明らかとなった．本研究において，200～500 nM の rSpeB と反応させた rDsg1 と rDsg3 は分解され，37 kDa の分解産物が観察された．Dsg1 および Dsg3 の細胞外ドメインの推定分子量から，EC3 と EC4 の間が切断されて生じた EC1-EC3 断片であることが推察された．さらに，高濃度 (1 μM) の rSpeB と反応させた試料では, 分解産物を反映するバンドが免疫ブロット解析で認められなかった．この結果から，SpeB は Dsg1 および Dsg3 を複数の部位で切断し，低分子量の断片にまで分解することが示唆された. Dsg はカドヘリンスーパーファミリーに属するカルシウム依存性の細胞間接着分子である．E-カドヘリンと同様に，各細胞外ドメインの連結部に保存されたカルシウム結合モチーフを有する [43, 44]．SpeB による E-カドヘリン細胞外ドメインの分解は，EC2 と EC3 間のカルシウム結合部位でおこる [13]．それゆえ SpeB は，E-カドヘリンと同様に，Dsg1 と Dsg3 のカルシウム結合部位を標的として分解することが示唆された．さらに，SpeB は Dsg

だけでなく, それぞれ TJ と AJ の構成分子であるオクルディンと E-カドヘリンを分解する [13]. したがって，*S. aureus* の ET とは異なり，SpeB の基質スペクトルは広範であると考えられる．これらの結果から，*S. pyogenes* による痂皮性膿痂疹が水疱性膿痂疹と比較して短期間に進行し，膿疱や痂皮の形成に至るメカニズムに SpeB による細胞間接着分子群の分解が関与すると示唆された.

SpeB による細胞間接着の傷害は *S. pyogenes* の上皮バリア突破に寄与することが，上皮細胞バリアの *in vitro* モデルで証明されてきた [13]. 本研究では，SpeB が *in vivo* における菌体の上皮バリア突破に関与することを明らかにした．すなわち，野生株と復帰変異株は Dsg1 および Dsg3 を分解し真皮浅層まで侵入するが, *speB* 欠失株は表皮の表層に限局することを観察した．免疫組織化学染色像から，*speB* 欠失株感染マウスの皮膚病変において検出された菌体は, 野生株もしくは復帰変異株感染マウスと比較して少なかった．この結果から，SpeB が *S. pyogenes* の皮膚への菌定着に寄与する可能性が考えられた．そこで，感染 12 時間後および 72 時間後に病変部位を採取し，菌量を検討した．感染 12 時間後では，各株感染群の間で顕著な差を認めなかった. しかし, 感染 72 時間後では, *speB* 欠失株感染群と比較して, 野生株および復帰変異株感染群における菌数は有意に増加した. SpeB は補体関連因子 [23, 30], ケモカイン [45] を分解し，自然免疫の回避に寄与することがマウス皮下感染モデルで報告されてきた．したがって，SpeB による宿主免疫の回避は，*speB* 欠失株感染マウスにおいて皮膚病変の形成が抑制された要因の一つである可能性が示唆された.

マウス経皮感染モデルにおいて，*speB* 欠失株を感染させたマウスに表皮の肥厚が観察された．ヒトにおいて *S. pyogenes* 感染により皮膚が肥厚する疾患として，滴状乾癬が報告されている [46]．乾癬では，掻痒を伴う角化性紅斑が全身の皮膚に生じる．Th17 細胞が産生するインターロイキン 17 (IL-17) と IL-22 により JAK/STAT シグナル誘導を介して角化細胞の

分化異常を引き起こす[46, 47]. 咽頭への *S. pyogenes* 感染に伴う Th17 細胞による免疫応答の誘導[48]，および感染により生じた自己抗体の交差反応[49, 50]が乾癬の皮膚病態形成に関与すると考えられている．したがって，*speB* 欠失株感染マウスで観察された表皮の肥厚には，*S. pyogenes* 感染に対する Th17 応答が関与する可能性があり，今後の検討が必要である．

S. pyogenes は，咽頭炎や膿痂疹などの局所性疾患だけでなく，致死率の高い壊死性筋膜炎や STSS を惹き起こすことがあり，その侵入門戸の一つが皮膚である[1, 2]．皮膚表層に定着した *S. pyogenes* が組織深部に侵入するメカニズムには不明な点が多い. 本研究の結果から，SpeB による細胞間接着分子の分解が皮膚病態の形成に関与することが明らかとなった．しかし，全ての皮膚感染症由来株が高い SpeB 活性を示すわけではなく，他の病原因子の関与も推察される．今後，本研究で確立した *S. pyogenes* 経皮感染モデルを用いて，*S. pyogenes* 皮膚感染症の発症と重症化に関わる新たな病原因子を検索することで, *S. pyogenes* 感染症の予防法および制御法を確立できると考える．

謝辞

本研究を行う機会を与えて頂き，終始ご懇意なるご指導とご鞭撻を賜りました口腔分子感染制御学講座 川端 重忠 教授に深甚なる感謝の意を表します．本研究を遂行するにあたり，直接のご指導とご鞭撻ならびに多くのご教示を賜りました口腔分子感染制御学講座 住友 倫子 助教に心より感謝し，篤く御礼申し上げます．多大なるご支援を賜りました障害者歯科治療部 秋山 茂久 准教授に深く御礼申し上げます．また，様々なご助言とご高閲を賜りました口腔分子感染制御学講座 中田 匡宣 准教授，山口 雅也 助教に謹んで感謝の意を表します.

本研究を進めるにあたり，組換え SpeB 作製に際してご協力を賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科 微生物感染症学分野 寺尾 豊 教授に拝謝申し上げます．マウス経皮感染実験についてご協力を賜りました千葉大学大学院 医学研究院 皮膚科学教室 松岡 悠美助教，中川 誠太郎 先生に感謝申し上げます．また，ご支援をいただきました障害者歯科治療部 村上 旬平 講師に感謝申し上げます．さまざまなご教示をいただきました口腔分子感染制御学講座 本多 真理子 博士に感謝致します．そして，口腔分子感染制御学講座での研究を薦めて下さった大阪大学 名誉教授 森崎 市治郎 先生に心より御礼申し上げます.

最後に，本研究を行うに際し，ご理解とご協力を賜りました口腔分子感染制御学講座ならびに障害者歯科治療部の皆様に篤く御礼申し上げます.

参考文献

1. Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M (2005) The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect. Dis*. **5**: 685-694.
2. Hartman-Adams H, Banvard C, Juckett G (2014) Impetigo: diagnosis and treatment. *Am. Fam. Physician* **90**: 229-235.
3. Rodriguez-Iturbe B, Musser JM (2008) The current state of poststreptococcal glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**: 1855-1864.
4. Boggon TJ, Murray J, Chappuis-Flament S, Wong E, Gumbiner BM, Shapiro L (2002) C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* **296**: 1308-1313.
5. Elias PM, Matsuyoshi N, Wu H, Lin C, Wang ZH, Brown BE, Stanley JR (2001) Desmoglein isoform distribution affects stratum corneum structure and function. *J. Cell. Biol.* **153**: 243-249.
6. Shirakata Y, Amagai M, Hanakawa Y, Nishikawa T, Hashimoto K (1998) Lack of mucosal involvement in pemphigus foliaceus may be due to low expression of desmoglein 1. *J. Invest. Dermatol.* **110**: 76–78.
7. Amagai M, Stanley JR (2012) Desmoglein as a target in skin disease and beyond. *J. Invest. Dermatol.* **132**: 776–784.
8. Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR (1991) Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* **67**: 869-877
9. Amagai M, Koch PJ, Nishikawa T, Stanley JR (1996) Pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) is localized in the lower epidermis, the site of blister formation in patients. *J. Invest. Dermatol.* **106**: 351-355
10. Hanakawa Y, Schechter NM, Lin C, Garza L, Li H, Yamaguchi T, Fudaba Y, Nishifuji K, Sugai M, Amagai M, Stanley JR (2002) Molecular mechanisms of blister formation in bullous impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. *J. Clin. Invest.* **110**: 53-60.
11. Cywes C, Wessels MR (2001) Group A *Streptococcus* tissue invasion by CD44-mediated cell signalling. *Nature* **414**: 648-652.
12. Sumitomo T, Nakata M, Higashino M, Jin Y, Terao Y, Fujinaga Y, Kawabata S (2011) Streptolysin S contributes to group A streptococcal translocation across an epithelial barrier. *J. Biol. Chem.* **286**: 2750-2761.
13. Sumitomo T, Nakata M, Higashino M, Terao Y, Kawabata S (2013) Group A streptococcal cysteine protease cleaves epithelial junctions and contributes to bacterial translocation. *J. Biol.*

Chem. **288**: 13317-13324.

14. Terao Y, Kawabata S, Kunitomo E, Murakami J, Nakagawa I, Hamada S (2001) Fba, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus pyogenes*, promotes bacterial entry into epithelial cells, and the *fba* gene is positively transcribed under the Mga regulator. *Mol. Microbiol.* **42**: 75-86.
15. Murakami J, Kawabata S, Terao Y, Kikuchi K, Totsuka K, Tamaru A, Katsukawa C, Moriya K, Nakagawa I, Morisaki I, Hamada S (2002) Distribution of *emm* genotypes and superantigen genes of *Streptococcus pyogenes* isolated in Japan, 1994-9. *Epidemiol. Infect.* **128**: 397-404.
16. Inagaki Y, Myouga F, Kawabata H, Yamai S, Watanabe H (2000) Genomic differences in *Streptococcus pyogenes* serotype M3 between recent isolates associated with toxic shock-like syndrome and past clinical isolates. *J. Infect. Dis.* **181**: 975-983.
17. Ferretti JJ, McShan WM, Ajdic D, Savic DJ, Savic G, Lyon K, Primeaux C, Sezate S, Suvorov AN, Kenton S, Lai HS, Lin SP, Qian Y, Jia HG, Najar FZ, Ren Q, Zhu H, Song L, White J, Yuan X, Clifton SW, Roe BA, McLaughlin R (2001) Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**: 4658-4663.
18. McShan WM, Ferretti JJ, Karasawa T, Suvorov AN, Lin S, Qin B, Jia H, Kenton S, Najar F, Wu H, Scott J, Roe BA, Savic DJ (2008) Genome sequence of a nephritogenic and highly transformable M49 strain of *Streptococcus pyogenes*. *J. Bacteriol.* **190**: 7773-7785.
19. Beyer-Sehlmeyer G, Kreikemeyer B, Hörster A, Podbielski A (2005) Analysis of the growth phase-associated transcriptome of *Streptococcus pyogenes*. *Int. J. Med. Microbiol.* **295**: 161-177.
20. Nakata M, Kimura KR, Sumitomo T, Wada S, Sugauchi A, Oiki E, Higashino M, Kreikemeyer B, Podbielski A, Okahashi N, Hamada S, Isoda R, Terao Y, Kawabata S (2011) Assembly mechanism of FCT region type 1 pili in serotype M6 *Streptococcus pyogenes*. *J. Biol. Chem.* **286**: 37566-37577.
21. Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T (2001) Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*. *Plasmid* **46**: 140-148.
22. Caparon MG, Scott JR (1991) Genetic manipulation of pathogenic streptococci. *Methods Enzymol.* **204** :556-586.
23. Terao Y, Mori Y, Yamaguchi M, Shimizu Y, Ooe K, Hamada S, Kawabata S (2008) Group A streptococcal cysteine protease degrades C3 (C3b) and contributes to evasion of innate immunity. *J. Biol. Chem.* **283**: 6253-6260.
24. Nakamura Y, Oscherwitz J, Cease KB, Chan SM, Muñoz-Planillo R, Hasegawa M, Villaruz AE,

Cheung GY, McGavin MJ, Travers JB, Otto M, Inohara N, Núñez G (2013) *Staphylococcus* δ-toxin induces allergic skin disease by activating mast cells. *Nature* **503**: 397-401.

25. Leung DY, Hirsch RL, Schneider L, Moody C, Takaoka R, Li SH, Meyerson LA, Mariam SG, Goldstein G, Hanifin JM (1990) Thymopentin therapy reduces the clinical severity of atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **85**: 927-933.
26. McMillan DJ, Drèze PA, Vu T, Bessen DE, Guglielmini J, Steer AC, Carapetis JR, Van Melderen L, Sriprakash KS, Smeesters PR (2013) Updated model of group A Streptococcus M proteins based on a comprehensive worldwide study. *Clin. Microbiol. Infect.* **19**: E222–E229.
27. Elliott SD (1945) A proteolytic enzyme produced by group A streptococci with special reference to its effect on the type-specific M antigen. *J. Exp. Med.* **81**: 573–592.
28. von Pawel-Rammingen U, Johansson BP, Björck L (2002) IdeS, a novel streptococcal cysteine proteinase with unique specificity for immunoglobulin G. *EMBO J.* **21**: 1607–1615.
29. Kapur V, Topouzis S, Majesky MW, Li LL, Hamrick MR, Hamill RJ, Patti JM, Musser JM (1993) A conserved *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease cleaves human fibronectin and degrades vitronectin. *Microb. Pathog.* **15**: 327-346.
30. Honda-Ogawa M, Ogawa T, Terao Y, Sumitomo T, Nakata M, Ikebe K, Maeda Y, Kawabata S (2013) Cysteine proteinase from *Streptococcus pyogenes* enables evasion of innate immunity via degradation of complement factors. *J. Biol. Chem.* **288**: 15854-15864.
31. Berge A, Björck L (1995) Streptococcal cysteine proteinase releases biologically active fragments of streptococcal surface proteins. *J. Biol. Chem.* **270**: 9862–9867.
32. Chaussee MS, Cole RL, van Putten JP (2000) Streptococcal erythrogenic toxin B abrogates fibronectin-dependent internalization of *Streptococcus pyogenes* by cultured mammalian cells. *Infect. Immun.* **68**: 3226–3232.
33. Raeder R, Woischnik M, Podbielski A, Boyle MD (1998) A secreted streptococcal cysteine protease can cleave a surface-expressed M1 protein and alter the immunoglobulin binding properties. *Res. Microbiol.* **149**: 539–548.
34. Cole C, Gazewood J (2007) Diagnosis and treatment of impetigo. *Am. Fam. Physician* **75**: 859-864.
35. Bunce C, Wheeler L, Reed G, Musser J, Barg N (1992) Murine model of cutaneous infection with gram-positive cocci. *Infect. Immun.* **60**: 2636–2640.
36. Ferrieri P, Dajani AS, Wannamaker LW, Chapman SS (1972) Natural history of impetigo. I. Site sequence of acquisition and familial patterns of spread of cutaneous streptococci. *J. Clin. Invest.* **51**: 2851-2862.

37. Scaramuzzino DA, McNiff JM, Bessen DE (2000) Humanized *in vivo* model for streptococcal impetigo. *Infect. Immun.* **68**: 2880–2887.

38. Luo F, Lizano S, Banik S, Zhang H, Bessen DE (2008) Role of Mga in group A streptococcal infection at the skin epithelium. *Microb. Pathog.* **45**: 217-224.

39. Svensson MD, Sjöbring U, Luo F, Bessen DE (2002) Roles of the plasminogen activator streptokinase and the plasminogen-associated M protein in an experimental model for streptococcal impetigo. *Microbiology* **148**: 3933-3945.

40. Kreikemeyer B, Nakata M, Oehmcke S, Gschwendtner C, Normann J, Podbielski A (2005) *Streptococcus pyogenes* collagen type I-binding Cpa surface protein. Expression profile, binding characteristics, biological functions, and potential clinical impact. *J. Biol. Chem.* **280**: 33228-33239.

41. Nakata M, Köller T, Moritz K, Ribardo D, Jonas L, McIver KS, Sumitomo T, Terao Y, Kawabata S, Podbielski A, Kreikemeyer B (2009) Mode of expression and functional characterization of FCT-3 pilus region-encoded proteins in *Streptococcus pyogenes* serotype M49. *Infect. Immun.* **77**: 32-44

42. Chaussee MS, Liu J, Stevens DL, Ferretti JJ (1996) Genetic and phenotypic diversity among isolates of *Streptococcus pyogenes* from invasive infections. *J. Infect. Dis.* **173**: 901-908.

43. Chitaev NA, Troyanovsky SM (1997) Direct Ca^{2+}-dependent heterophilic interaction between desmosomal cadherins, desmoglein and desmocollin, contributes to cell–cell adhesion. *J. Cell Biol.* **138**: 193–201.

44. Hanakawa Y, Selwood T, Woo D, Lin C, Schechter NM, Stanley JR (2003) Calcium-dependent conformation of desmoglein 1 is required for its cleavage by exfoliative toxin. *J. Invest. Dermatol.* **121**: 383-389.

45. Egesten A, Olin AI, Linge HM, Yadav M, Mörgelin M, Karlsson A, Collin M (2009) SpeB of *Streptococcus pyogenes* differentially modulates antibacterial and receptor activating properties of human chemokines. *PLoS One* **4**: e4769.

46. Telfer NR, Chalmers RJ, Whale K, Colman G (1992) The role of streptococcal infection in the initiation of guttate psoriasis. *Arch. Dermatol.* **128**: 39-42.

47. Wolk K, Witte E, Wallace E, Döcke WD, Kunz S, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Sabat R (2006) IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur. J. Immunol.* **36**: 1309-1323.

48. Dileepan T, Smith ED, Knowland D, Hsu M, Platt M, Bittner-Eddy P, Cohen B, Southern P,

Latimer E, Harley E, Agalliu D, Cleary PP (2016) Group A *Streptococcus* intranasal infection promotes CNS infiltration by streptococcal-specific Th17 cells. *J. Clin. Invest.* **126**: 303-317.

49. Ruiz-Romeu E, Ferran M, Sagristà M, Gómez J, Giménez-Arnau A, Herszenyi K, Hóllo P, Celada A, Pujol R, Santamaria-Babí LF (2016) *Streptococcus pyogenes*-induced cutaneous lymphocyte antigen-positive T cell-dependent epidermal cell activation triggers T_H17 responses in patients with guttate psoriasis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **138**: 491-499.
50. Valdimarsson H, Thorleifsdottir RH, Sigurdardottir SL, Gudjonsson JE, Johnston A (2009) Psoriasis - as an autoimmune disease caused by molecular mimicry. *Trends Immunol.* **30**: 494-501.