The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	肺炎球菌のβガラクトシダーゼ BgaAが病態形成に果たす役割の解析
Author(s)	竹村, 萌
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/76278
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　竹　村　萌　　）	
論文題名	肺炎球菌のβガラクトシダーゼ BgaAが病態形成に果たす役割の解析

論文内容の要旨

【目的】

肺炎球菌は、mitis 群に分類されるグラム陽性のレンサ球菌である。肺炎球菌感染症は乳幼児および高齢者の主要な死因の一つであり、肺炎に引き続き髄膜炎や敗血症などの侵襲性疾患がしばしば惹き起こされる。現在、日本において 5 歳未満の小児および 65 歳以上の高齢者に対して、莢膜多糖体を抗原とした肺炎球菌ワクチンの定期接種が実施されている。ワクチン接種により侵襲性肺炎球菌感染症の罹患率は減少しているが、ワクチンの対象に含まれない血清型の分離頻度が増加するなどの問題点があり、病態発症機構の解明と新たな予防法の開発が急務となっている。本研究では、肺炎球菌の菌体表層タンパク質のうち、肺炎球菌の病原性との関連性について詳細が明らかになっていない β-ガラクトシダーゼ BgaA に着目し、病態形成に果たす役割を解析した。

【方法】

1．*bgaA* 遺伝子欠失株の作製

肺炎球菌感染症患者の血液由来である TIGR4 株を親株として、コンピテンス刺激ペプチドを用いた形質転換と相同組換えにより、*bgaA* 遺伝子欠失株を作製した。*bgaA* 遺伝子の欠失は、ゲノムDNAを用いたPCR法にて確認した。また、TIGR4 野生株と*bgaA* 遺伝子欠失株について、2-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosideを用いて BgaA の酵素活性を確認した。

2．*in vitro* における BgaA の機能の解析

血液中における菌の生存に BgaA が果たす役割を解析するため、ヒトもしくはマウス血液とTIGR4 野生株あるいは *bgaA* 欠失株を混和し、37°C、5% CO_2 存在下で 1～3 時間培養後の生菌率を比較した。また、ヒト肺胞上皮細胞 A549 株、ヒト肺微小血管内皮細胞（hPMEC）およびヒト脳微小血管内皮細胞（hBMEC）への菌の付着・侵入試験を行った。各培養細胞に野生株と *bgaA* 欠失株を MOI＝10で感染後、37°C、5% CO_2 条件下で 1 時間培養した。細胞を回収後、血液寒天培地に播種した。一晩培養後、生育菌数を算定し、付着率を算出した。侵入率を検討するため、感染 1 時間後にゲンタマイシンを添加し、さらに 1 時間培養し、細胞に付着する菌を殺菌した。細胞を回収後、血液寒天培地に播種した。一晩培養後、生育菌数を算定し、侵入率を算出した。

3．*in vivo* で BgaA が病原性に及ぼす影響の検討

メス 6 週齢 CD1 マウスに野生株と *bgaA* 欠失株を経鼻感染もしくは経静脈感染させ、それぞれ肺炎モデル、敗血症モデルとした。*bgaA*の欠失が病原性の変化に及ぼす影響を検討するため、感染後 2 週間のマウスの生存率を比較した。さらに、敗血症モデルにおいて菌の伝播を観察するため、感染 24 時間後および 36 時間後における血液、脳、肺、肝臓、脾臓、および腎臓中の菌数を比較した。血液の影響を排除するため、マウスを安楽死させた後にPBS で灌流して各臓器を摘出した。得られた臓器を粉砕し、懸濁液を血液寒天培地に播種することで生育菌数を算出した。また、感染後 36 時間後に脳、肺、肝臓、脾臓、および腎臓を摘出し、組織切片のヘマトキシリン・エオジン染色を行い、組織像を観察した。

【結果】

bgaA 遺伝子の欠失により、対数増殖期の肺炎球菌の菌体における β-ガラクトシダーゼ活性が 85% 低下した。ヒトおよびマウス全血殺菌試験で、*bgaA* 欠失株では野生株と比較して血液中での増殖能に有意な低下を認めた。ヒト培養細胞への菌の付着・侵入試験にて、*bgaA* 欠失株では野生株と比較してA549、hPMEC、および hBMECへの付着・侵入率は有意に低下した。マウス肺炎モデルでは、野生株感染群と比較して、*bgaA* 欠失株感染群は死亡率に有意な差はなかった。一方、マウス敗血症モデルでは、*bgaA* 欠失によりマウス生存率は有意に上昇した。マウス敗血症モデルにおいて、感染 24 時間後、ならびに 36 時間後の各臓器について、野生株感染マウスと *bgaA* 欠失株感染マウスの間に菌数の有意な差は認められなかった。感染 36 時間後の肺、肝臓、脾臓、腎臓の組織像では、*bgaA* 欠失株感染マウスと比較し、野生株感染マウスの組織では顕著な血管構造の破壊と出血が認められた。

【考察】

本研究の結果から、*bgaA* 欠失により、*in vitro* のモデルにおいて菌の血液中での生存能、ならびに肺胞上皮細胞および血管内皮細胞への付着・侵入能が低下することが示唆された。また、マウス敗血症モデルにおいて、*bgaA* 欠失によってマウス体内における菌の伝播に影響は認められなかった一方で、病原性が低下することが示唆された。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（竹　村　　萌　）		
論文審査担当者	（職）	氏　　名
	主 査　　教　授	川　端　重　忠
	副 査　　教　授	野　田　健　司
	副 査　　准教授	野　村　良　太
	副 査　　講　師	村　上　旬　平

論文審査の結果の要旨

本研究は，肺炎に引き続き髄膜炎や敗血症などの侵襲性肺炎球菌感染症を惹き起こす *Streptococcus pneumoniae* の菌体表層タンパク質である β-ガラクトシダーゼ BgaA に着目し，病態形成に果たす役割を解析したものである．ヒトおよびマウス血液，またはヒト好中球を用いた実験により，BgaA が血液中での生存や好中球貪食回避に寄与することを見いだした．また，BgaA が，ヒト肺胞上皮細胞，ヒト脳微小血管内皮細胞，ヒト肺微小血管内皮細胞への付着および侵入因子として働くことを示した．さらに，マウス敗血症モデルの結果から，BgaA が組織での出血や，凝固および組織傷害を誘導することを明らかにした．すなわち，*S. pneumoniae* の β-ガラクトシダーゼ BgaA が動物感染系モデルにおいて病原因子として働くことが示唆された．

以上より，本研究は博士（歯学）の学位に値するものと認める．