



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

学位論文

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

大阪大学大学院歯学研究科 口腔科学専攻

顎口腔病因病態制御学講座 (口腔外科学第二教室)

竹村 萌

本論文の要旨の一部は、第 92 回 日本細菌学会総会（2019 年 4 月 23～25 日、札幌）、第 128 回 大阪大学歯学会（2019 年 7 月 25 日、大阪）、第 72 回 日本細菌学会関西支部総会（2019 年 11 月 16 日、大阪）において発表した。

要約

肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) は、呼吸器感染症の主要な原因菌である。肺炎に引き続いて、髄膜炎や敗血症などの致死性が高い侵襲性疾患を惹き起こす。本研究では、肺炎球菌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、*S. pneumoniae* の病態形成に果たす役割を解析した。

S. pneumoniae TIGR4 株を親株として *bgaA* 遺伝子欠失株を作製し、ヒトおよびマウス全血中での菌体生存能を検討した。野生株と比較して、*bgaA* 欠失株の生存能は両血液中において有意に低下した。また、肺胞上皮細胞 (A549)、肺微小血管内皮細胞 (HMVEC-L)、および脳微小血管内皮細胞 (hBMEC) を用いた菌体の付着・侵入試験にて、*bgaA* 欠失株は野生株と比較して、各細胞への有意に低い付着率および侵入率を呈した。次に、野生株もしくは *bgaA* 欠失株を CD-1 マウスに経鼻感染ならびに経静脈感染させ、それぞれ肺炎モデル、敗血症モデルとし、BgaA が病原性に及ぼす影響を検討した。マウス肺炎モデルにおいて、野生株感染群と *bgaA* 欠失株感染群の死亡率に有意差は認められなかった。一方、マウス敗血症モデルでは、野生株感染群と比較し、*bgaA* 欠失株感染群の死亡率は有意に減少した。さらに、敗血症モデルにおいて、野生株感染群と *bgaA* 欠失株感染群の臓器における菌数、および感染組織のヘマトキシリン・エオジン染色像を比較した。感染 36 時間後の血液、脳、肺、肝臓、脾臓、および腎臓における菌数を算定すると、野生株感染群と *bgaA* 欠失株感染群の各臓器における菌数に有意差を認めな

かった。しかし、感染 36 時間後のマウス各臓器の組織像を観察した結果、野生株感染

群の組織では、*bgaA* 欠失株感染群と比較して、顕著な出血と血管の閉塞が認められた。

さらに、血液凝固能試験において、野生株感染群では非感染群と比較してプロトロンビ

ン時間が短く、フィブリノーゲン量が多かったが、*bgaA* 欠失変異株感染群では非感染

群との間に有意な差は認められなかった。

以上の結果から、*in vitro* 感染モデルにおいて、*bgaA* 欠失により血液中での菌体生存

能、ならびに肺胞上皮細胞および血管内皮細胞への菌体付着・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、感染による血液凝固能の亢進が抑えら

れ、病原性は低下することが示唆された。

はじめに

肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) は、血液寒天培地上で α 溶血を呈するグラム陽性の双球菌である。ヒトの口腔および鼻咽腔粘膜に常在し、健常な成人では約 5~10% から、健常な小児では約 20~40% からそれぞれ分離される¹⁻³。また、*S. pneumoniae* は呼吸器感染症の主要な起因菌であり、菌血症を伴わない肺炎、中耳炎、副鼻腔炎などの非侵襲性感染症を発症させる⁴。さらに、本菌が粘膜バリアを超えて血液中に侵入し、血行性に臓器へ移行し増殖することで、主に小児や高齢者に菌血症を伴う肺炎、髄膜炎、敗血症などの侵襲性肺炎球菌感染症 (invasive pneumococcal disease; IPD) を惹き起こす。世界では年間に約 2 億症例の肺炎球菌性肺炎が発症し、死亡者数は約 120~150 万人におよぶ。このうち、約 34~39 万人は 5 歳未満の小児と推計されている^{4, 5}。日本における肺炎球菌感染症に対する治療には、経口薬としてペニシリン系薬、ペネム系薬、キノロン系薬が処方され、注射薬としてペニシリン系薬とセフェム系薬が用いられている。一方、重症例にはカルバペネム系薬が使用される⁶。しかし、近年では抗菌薬耐性菌の増加により抗菌薬の選択肢が狭まっている^{7, 8}。

肺炎球菌の血清型は、莢膜の抗原性により、少なくとも 97 種類以上に分類される^{3, 9}。現在、肺炎球菌感染症に対して、先進諸国において高頻度に IPD から分類される血清型を抗原として含む、多価莢膜多糖体ワクチンが世界的に使用されている。しかし、感染防御効果はワクチンに含まれる血清型に限局され、他の血清型に対する感染防

御効果は期待できない。また、ワクチンに含まれない血清型の分離頻度が増加するという血清型置換の問題も生じている^{10, 11}。このため、肺炎球菌感染症の病態発症機構の解明および菌株間で保存された抗原を用いた新たなワクチンの開発が求められている。

本研究では、外界と直接作用し、菌の病原性に重要な役割を果たすタンパク質として、菌体表層に局在するタンパク質に着目した。肺炎球菌の菌体表層タンパク質はその局在の機序に基づき、リポタンパク質、細胞壁架橋タンパク質、コリン結合タンパク質、および局在の機序不明のタンパク質に分類されている¹²。このうち、細胞壁架橋タンパク質は、細胞表層のトランスペプチダーゼにより認識される LPXTG モチーフを有し、細胞壁の遊離アミノ酸に共有結合で架橋される¹³。肺炎球菌の細胞壁架橋タンパク質には、好中球による貪食を抑制することで自然免疫回避に寄与する PfbA¹⁴、咽頭および肺胞上皮細胞への付着・侵入を促進する PclA¹⁵、鼻咽頭上皮細胞への菌体の付着、栄養素獲得や宿主免疫回避に関与するシアル酸分解酵素の NanA、BgaA、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ StrH¹⁶などの糖鎖分解酵素、ヒトトロンボスpongin-1 を菌体表層に誘導し上皮細胞への付着・侵入を促進する PavB¹⁷などの感染初期過程に重要な機能を担う分子群が存在する¹⁸⁻²⁰。

S. pneumoniae の細胞壁架橋タンパク質の一つである β ガラクトシダーゼ BgaA は菌体表層に発現し、糖鎖分解による炭素源の獲得や、咽頭、気管支、および肺胞上皮細胞への付着や、好中球によるオプソニン化貪食作用からの回避に寄与することが報告され

ている^{17, 21, 22}。しかし、BgaA が *in vivo* において病原性に果たす役割は明らかとなっていない。本研究では、細菌感染に関わる重要な機能を担っており、ワクチン標的になり得る細胞壁架橋タンパク質のうち、病原因子としての機能が不明である BgaA に着目し、*in vivo* と *in vitro* の感染モデルを用いて病態形成に果たす役割を解析した。その結果、*S. pneumoniae* の BgaA は、感染時の組織傷害と血液凝固を促進することで、敗血症における病原因子として働くことが示唆された。

材料と方法

1. 実験材料および培養方法

本研究で使用した菌株を表1に示した。 *S. pneumoniae* の培養には、0.2% (weight/volume, 以降w/v) Yeast Extract (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA) を添加した Todd-Hewitt 液体培地 (THY ; Becton, Dickinson and Company), または 1.5% (w/v) 寒天 (和光純薬, 大阪, 日本) を含む THY 寒天平板培地, あるいは 5% (w/v) 羊脱纖維血液 (日本バイオテスト研究所, 朝霞, 日本) を含む THY 血液寒天培地を用いて培養した。また, 必要に応じて, スペクチノマイシン (最終濃度 500 µg/ml) を添加して用いた。

ヒト肺胞上皮由来の細胞株 A549 (ATCC CCL-185) は, Dulbecco's Modified Eagle Medium (和光純薬) に 10% (volume/volume, 以降v/v) ウシ胎児血清 (Biowest, Nuaillé, France) を添加した培地にて培養した。ヒト脳微小血管内皮細胞株 (hBMEC) は, カリフォルニア大学サンディエゴ校の Victor Nizet 博士より分与を受けた。hBMEC の培養は, RPMI1640 (和光純薬) に 10% (v/v) ウシ胎児血清, 10% (v/v) Nu-serum (Corning, New York, USA), 1% (v/v) 非必須アミノ酸溶液 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) を添加した培地にて行った。正常ヒト肺微小血管内皮細胞 (HMVEC-L; Lonza, Walkersville, USA) は, EGM-2-MV Bullet Kit (Lonza) を用いて培養した。すべての細胞は 37 °C, 5% CO₂ 存在下で培養した。hBMEC は Collagen Type I (Corning) でコラーゲンコートした細胞用フラスコまたは 24 穴培養プレート (Corning) を用いて培養した。

表1. 本研究で使用した菌株

菌株	特徴	抗菌薬耐性	由来
<i>S. pneumoniae</i>			
TIGR4 株	莢膜血清型 4 型		23
$\Delta bgaA$ 株	TIGR4 株の <i>bgaA</i> 欠失 変異株	スペクチノマイシン	本研究

2. バイオインフォマティクス解析

2016年5月13日時点での全ゲノムが解読されている *S. pneumoniae* 28株の配列は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>) より入手し、全構造遺伝子から、LPXTGモチーフを有するタンパク質をコードする遺伝子を選出した。*S. pneumoniae* TIGR4 株のBgaAの機能ドメインは、ゲノム配列を NCBI の GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AE005672.3>) より入手し、MOTIF Search (<https://www.genome.jp/tools/motif/>) にて、P-fam (<http://pfam.xfam.org/>) と、Conserved Domain Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) を使用し、検索した^{24, 25}。

3. *bgaA* 欠失株の作製

S. pneumoniae TIGR4 株を親株とした *bgaA* 欠失変異株の作製は、PCR 産物を用いたダブルクロスオーバーによる相同組換えにより行った²⁶。*bgaA* 遺伝子の上流領域、下流

領域, およびスペクチノマイシン耐性遺伝子 *aad9* を PCR により連結させ, 形質転換を行った. 各遺伝子断片は, 特異的なプライマー (表 2: bgaA-uF / bgaA-uR, bgaA-*aad9*F / bgaA-*aad9*R, bgaA-dF / bgaA-dR) を用いて PCR で増幅した. オーバーラップ PCR 法で 3 領域の遺伝子断片を連結し, 精製した. Competence stimulating peptide (CSP) を用いた形質転換は, Bricker と Camilli らの方法に従って行った²⁷. *S. pneumoniae* TIGR4 株を形質転換用の改変 THY 液体培地 (1 mM CaCl₂, 0.5%グリシン, 0.2%ウシ血清アルブミン含有 THY 液体培地) で一晩培養し, 培養菌液 150 µl を改変 THY 培地 5 ml に添加後, 37 °Cで波長 600 nm における吸光度 (OD₆₀₀) が 0.03 に達するまで培養を行った. 培養菌液 1 ml に化学合成した CSP-2 (ニッピ・バイオマトリックス研究所, 取手, 日本) を最終濃度 500 ng/ml になるように添加し, 37°Cで 14 分培養した後に, 培養菌液 200 µl にオーバーラップ PCR 法にて得た DNA 断片を添加した. 形質転換を誘導するために 37°Cで 1 時間反応させた後に, THY 液体培地で 4 倍に希釀し, 37°Cでさらに 2 時間培養した. その後, スペクチノマイシン含有 THY 血液寒天培地に播種し, 組換え体を選択した. 生育したコロニーについて, *bgaA* 遺伝子上流領域のプライマーと下流領域のプライマーを用いたコロニーPCR 法を行い, *bgaA* 遺伝子の欠失を確認した. さらに, 菌体からゲノム DNA を Dr. GenTLE (from Yeast) High Recovery (タカラバイオ, 草津, 日本) を用いて抽出し, PCR 法による再確認を行った.

表2. 本研究で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')
bgaA-uF	TATGACTGGAGTATCGGATATTTGAATACTACGAACA
bgaA-uR	TACTTGATTGTTCTCAATTTTTATAATTTTTAAT
bgaA-aad9F	GTAAGTTGCTGTGGAGCTTGCT
bgaA-aad9R	TATTCAAATATATCCGATACTCCAGTCATACGGT
bgaA-dF	TTATAAAAAATTGAGAAAACAATCAAGTAGCTTCAAC
bgaA-dR	GGCTTGCCGCACTACCTGTACTTGG

4. THY 培地中における増殖速度の比較

S. pneumoniae 野生株, *bgaA* 欠失変異株を対数増殖期中期 ($OD_{600}=0.40$) まで培養し, 遠心分離 (4°C , $12,000 \times g$, 7 分間) により菌体を回収した. 菌体をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; 137 mM 塩化ナトリウム, 8.10 mM リン酸水素二ナトリウム, 2.68 mM 塩化カリウム, 1.47 mM リン酸二水素カリウム) にて 1 回洗浄した後, PBS に再懸濁し, OD_{600} を 0.40 に調整した. 5 ml の THY 培地に 150 μl の菌液を添加した後, 37°C で静置培養を行った. 定常期まで 30 分毎に OD_{600} の値を測定し, 得られたデータを増殖曲線とした.

5. β ガラクトシダーゼ活性の測定

β ガラクトシダーゼ活性の測定は, Kharat と Tomasz らの方法を改変し行った²⁸. *S. pneumoniae* 野生株と *bgaA* 欠失変異株を OD_{600} が 0.4 に達するまで培養し, 15 分間氷上で静置した. 培養液 1 ml を遠心分離 (4°C , $12,000 \times g$, 5 分間) し, 培養上清と菌体に分離した. 菌体を 0.1% Triton X-100 含有リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 100 μl で懸

濁した後, 900 μ l のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を添加し, 総量を 1 ml とした。培養上清と菌体懸濁液のそれぞれに 4 mg/ml の 2-Nitrophenyl β -D-Galactopyranoside (和光純薬) を 200 μ l 添加し, 37°Cで 30 分間反応させた後, 500 μ l の 1 M 炭酸ナトリウム水溶液の添加により反応を停止させた。 β ガラクトシダーゼ活性は, 以下の数式にて算出した²⁹。

$$\text{Miller Unit} = 100 \times \frac{\text{OD}_{420} - (1.75 \times \text{OD}_{550})}{(\text{t} \times \text{v} \times \text{OD}_{600})}$$

t は反応時間 (分), v は反応容量 (ml) を表す。

6. ヒトおよびマウス全血中における *S. pneumoniae* 生存能の検討

ヒトの血液は, 健常成人の肘正中皮静脈より採取した。マウスの血液は, 雌 6 週齢の CD-1 マウス (日本 SLC, 浜松, 日本) 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, 日本) を腹腔内投与 (150 mg/kg bw) することにより安楽死させた後, 心臓穿刺により採取した。凝固を防ぐため, ヒトおよびマウスの血液に最終濃度 30 units/ml となるようにヘパリン (持田製薬, 東京, 日本) を添加した。*S. pneumoniae* 野生株および *bgaA* 欠失変異株を対数増殖期中期 ($\text{OD}_{600} = 0.40$) まで培養し, 遠心分離 (4°C, 12,000 \times g, 7 分間) により菌体を回収した。菌体を PBS にて 1 回洗浄した後, PBS で懸濁し, 10^4 colony forming units (CFU) /ml に調整した。菌液 20 μ l と 180 μ l のヒト末梢血あるいはマウス血液を混和し, 37°C, 5% CO₂ 存在下で 1, 2, 3 時間培養し

た。この培養液を PBS で段階希釈した後、THY 血液寒天培地に播種し、37°Cで一晩培養し生育コロニー数を算定した。

7. ヒト好中球存在下における *S. pneumoniae* 生存能の検討

ヒト好中球を分離するため、ヒト血液を健常成人の肘正中皮静脈より採取し、最終濃度 30 units/ml となるようヘパリンを添加した。血球分離溶液 Polymorpheprep (Alere Technologies AS, Oslo, Norway) に血液を重層し、遠心分離 (25°C, 450 × g, 35 分間, ノーブレーキ) を行った。遠心後、上清を除去し、好中球層を分離した。PBS で洗浄した後、遠心分離 (25°C, 450 × g, 8 分間) を行った。遠心後、上清を除去し、ACK 緩衝液 [150 mM 塩化アンモニウム, 1 mM 炭酸水素カリウム, 0.1 mM エチレンジアミン四酢酸：EDTA (pH 7.2)] を加えて溶血処理を行い、赤血球を除去した。RPMI1640 培地で 2 回洗浄した後、RPMI1640 培地で再懸濁し、細胞数を計測した。好中球と混和した後の菌の生菌率を比較するため、 2×10^5 個の好中球に対して、対数増殖期中期 (OD₆₀₀ = 0.40) まで培養した 1×10^4 CFU の *S. pneumoniae* 野生株もしくは *bgaA* 欠失変異株を添加した。混和液を 37°C, 5% CO₂ 存在下で静置培養した。培養 1 時間、2 時間、3 時間後にそれぞれ各培養液を THY 血液寒天培地に播種した。37°Cで一晩培養した後に、生育コロニー数を算定し、感染時の菌数に対する割合を算出することで生存率とした。

8. ヒト培養細胞への *S. pneumoniae* の付着・侵入試験

ヒト培養細胞への *S. pneumoniae* の付着・侵入能は、ヒト肺胞上皮由来細胞 A549、ヒト脳微小血管内皮細胞 hBMEC、ヒト肺微小血管内皮細胞 HMVEC-L を用いて、以前に報告された方法に改変を加えて検討した^{26, 30, 31}。24 穴培養プレートの各ウェルに培養した 1×10^5 個の各細胞に、 5×10^6 CFU の対数増殖期中期 ($OD_{600}=0.40$) まで培養した *S. pneumoniae* 野生株もしくは *bgaA* 欠失変異株を感染させ、 37°C 、5% CO_2 存在下で 1 時間培養した。付着率を検討するため、PBS で 2 回洗浄を行い、細胞に付着していない *S. pneumoniae* を除去した後、0.2% EDTA および 0.025% Triton X-100 を含むトリプシン溶液（Thermo Fisher Science, Waltham, USA）を用いて細胞を回収した。侵入率を検討するため、感染 1 時間後の細胞を PBS で洗浄した後、最終濃度 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のゲンタマイシンを含有する各培地で 1 時間培養することにより、細胞外の *S. pneumoniae* を殺菌し、同様に細胞を回収した。得られた細胞懸濁液を PBS にて段階希釈し、THY 血液寒天培地上にそれぞれ播種した。一晩培養後に、生育コロニー数を計数し、菌体付着率および侵入率を感染菌数に対する付着菌数または侵入菌数の割合で算定した。

9. マウス感染試験

雌 6 週齢の CD-1 マウス（日本 SLC）に、対数増殖期中期 ($OD_{600}=0.40$) まで培養した *S. pneumoniae* 野生株もしくは *bgaA* 欠失変異株を、麻酔下で両鼻孔から 10^7 CFU 感染

させ、マウス肺炎モデルとした。マウス1匹あたり、塩酸メデトミジン 0.01 mg (ドミトール:日本全薬工業、郡山、日本), ミダゾラム 0.13 mg (ドルミカム:アステラス製薬、東京、日本), 酒石酸ブトルファノール 0.17 mg (ペトルファール:Meiji Seika ファルマ、東京、日本) の三種を混合して腹腔内に投与することで麻酔を行った。次に、同マウスに対数増殖期中期 ($OD_{600} = 0.40$) まで培養した 10^6 CFU の *S. pneumoniae* 野生株もしくは *bgaA* 欠失変異株を尾静脈から感染させ、マウス敗血症モデルとして使用した。両モデルとも感染 14 日後まで 12 時間毎に生存状態を確認した。マウス敗血症モデルでは、菌の全身への伝播状態を検討するため、経静脈感染 24 時間後および 36 時間後には、ソムノペンチルを腹腔内投与 (150 mg/kg bw) することで安楽死させ、心臓穿刺により血液を採取した。採血に続いて、PBS を用いた灌流により脱血処理した後、脳、肺、肝臓、脾臓、および腎臓を摘出した。各臓器をホモジネートし、PBS で段階希釈した後、THY 血液寒天培地に播種した。37°C, 5% CO₂ 存在下で一晩培養して生育したコロニー数を算定し、各臓器における菌数とした。

10. マウス組織像の観察

マウス敗血症モデルにおいて、各臓器の組織像をヘマトキシリソ・エオジン (HE) 染色した組織切片で観察した。感染 36 時間後に採取した脳、肺、肝臓、脾臓、腎臓の各組織を 4% 中性緩衝ホルマリン液 (ナカライトスク、京都、日本) に浸漬させ、室温で

一晩固定した。パラフィン包埋したサンプルから切片を作製し、脱パラフィン処理と水洗の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上に封入し、オールインワン顕微鏡 BZ-X710 (キーエンス、大阪、日本) で観察した。なお、組織像の評価は本研究に関与しない病理学者が行った。

11. マウス血液の凝固試験

マウス敗血症モデルにおいて、マウス血液を採取し、血液凝固試験を行った。感染 36 時間後に安楽死させた後、心臓穿刺により血液を採取し、クエン酸ナトリウム水溶液を最終濃度 11 mM となるように添加した。遠心分離（室温、 $3,000 \times g$ 、10 分間）し、血漿を採取した。血液凝固試験には、血液凝固分析装置 KC1 デルタ (Tcong Ireland Ltd., Wicklow, Ireland), プロトロンビン時間 (PT) キット、ならびにフィブリノーゲンキット (Sysmex、神戸、日本) を使用した。KC1 デルタを用い、血漿検体 50 μl を 37°C で 3 分間加温し、あらかじめ 37°C に加温した PT 試薬液 100 μl を加え凝固時間を測定した。フィブリノーゲン量は、オーレンベロナール緩衝液 (Sysmex) で 10 倍希釈した血漿検体 200 μl を 37°C で 3 分間加温し、あらかじめ 37°C に加温したトロンビン試薬 100 μl を加え凝固時間を測定することで算定した。

12. RNA シーケンス解析

マウス敗血症感染モデルにおいて, *S. pneumoniae* に対する宿主の応答を網羅的に解析するため, マウス血液から全 RNA を抽出し, RNA シーケンス (RNA-seq) 解析を行った. 感染 12, 24, 36 時間後のマウスを安楽死させた後, 心臓穿刺により血液を採取した. 採取した血液に最終濃度が 30 units/ml となるようにヘパリンを添加した. PureLink Total RNA Blood Purification Kit (Thermo Fisher Science) および DNase I, Amplification Grade (Thermo Fisher Science) を用い, グロビン mRNA を除去してマウスの白血球 RNA を採取した. Agilent 2100 バイオアナライザ (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) で RNA のクオリティチェックを行った. TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (illumina Inc., San Diego, USA) を用いて cDNA ライブラリーを調整し, Hiseq2500/3000 (illumina Inc.) にてシークエンス解析を行った. シークエンスされたリードを, TopHat プログラムおよび Cufflinks プログラムにて処理することでマウスゲノムへのマッピング, Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments (FPKM) の算出, および発現解析を行った. また, 得られた FPKM 値を用いて, iDEP (<http://bioinformatics.sdsu.edu/idep/>) により主成分分析, スキャッタープロットおよびヒートマップの描写を行った³².

13. 統計学的解析

全ての実験は、少なくとも 3 回以上実施した。実験データは、Graphpad Prism7 ソフトウェア (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) を用いて統計処理を行った。2 群間の比較には Mann-Whitney *U* 検定を、生存曲線の比較には Log-rank 検定を、3 群間の比較には Kruskal-Wallis 検定を用い、それぞれ $P < 0.05$ をもって有意差ありとした。

14. 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：4037）、病原体取扱安全管理制度委員会 [病原体保持承認番号：23（歯学研究科）-6]、大阪大学動物実験委員会（承認番号：動歯-28-002-0）、大阪大学倫理審査委員会（承認番号：H26-E43）の承認を得て行った。

結果

1. BgaA は *S. pneumoniae* 菌体における主たる β ガラクトシダーゼ活性を担う

bgaA 遺伝子は、全ゲノムが解読されている *S. pneumoniae* 28 株全てに存在し、そのうち 1 株でフレームシフト変異を認めた（図 1A）。*S. pneumoniae* の BgaA は、N-アセチルグルコサミンとガラクトースの β 1-4 結合を特異的に切断するエキソグリコシダーゼである³³。*S. pneumoniae* TIGR4 株の BgaA は、2233 アミノ酸からなり、7 種類のドメインまたはモチーフ配列を含んでいる（図 1B）。BgaA の N 末端領域にある Glycoside hydrolases 2 ドメインは β ガラクトシダーゼ酵素活性を、C 末端領域にある糖鎖結合モジュールはラクトースや *N*-Acetyl-D-lactosamine との結合を担うことが報告されている³⁴。

S. pneumoniae TIGR4 株を親株として、*bgaA* 遺伝子欠失株を作製し、*bgaA* 欠失変異が *S. pneumoniae* の β ガラクトシダーゼ活性に及ぼす影響を検討した。BgaA は *S. pneumoniae* の菌体表層に局在するため³⁵、菌体の β ガラクトシダーゼ活性を比較した。その結果、対数増殖期の *S. pneumoniae* 菌体における β ガラクトシダーゼ活性は、野生株と比較し有意に低下した（図 2A）。次に、BgaA が *S. pneumoniae* の増殖速度に影響を及ぼすかを検討するため、THY 培地中における 37°Cでの各菌株の増殖速度を比較した結果、野生株と *bgaA* 欠失変異株の間に有意な差は認められなかった（図 2B）。

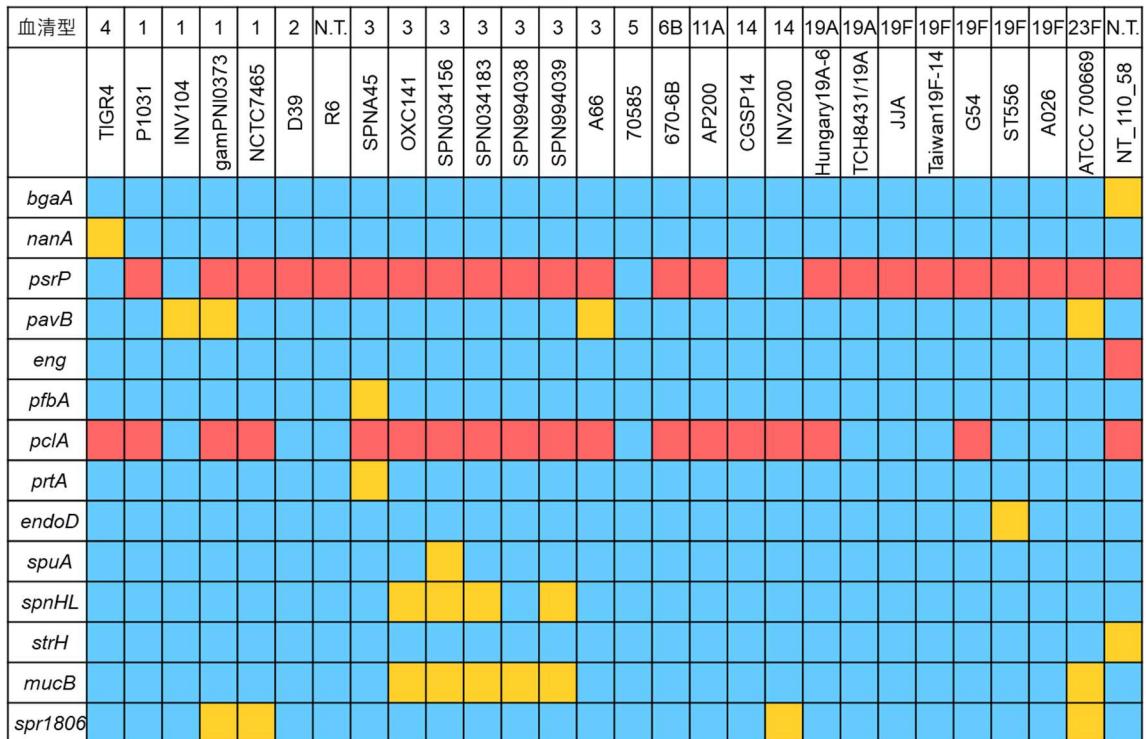
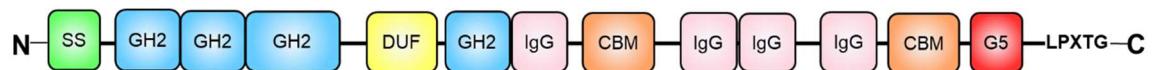
A**B**

図 1. BgaA の遺伝子分布とドメイン構造

A. 全ゲノムが解読された 28 株の *S. pneumoniae* における LPXTG モチーフを有するタンパク質をコードする遺伝子の分布を表す。水色：遺伝子の存在、黄色：フレームシフト変異、桃色：遺伝子の欠失。

B. *S. pneumoniae* TIGR4 株の BgaA のドメイン構造を示す。SS：シグナル配列、GH2：Glycoside hydrolases family 2 ドメイン、DUF：機能不明ドメイン、IgG：IgG 様ドメイン、CBM：糖鎖結合モジュール、G5：G5 ドメイン。

2. BgaA は血液中および好中球存在下における *S. pneumoniae* 生存能に寄与する

血液中における *S. pneumoniae* の生存に BgaA が果たす役割を解析するため、ヒトおよびマウス血液中での *S. pneumoniae* 野生株と *bgaA* 欠失変異株の生存能を

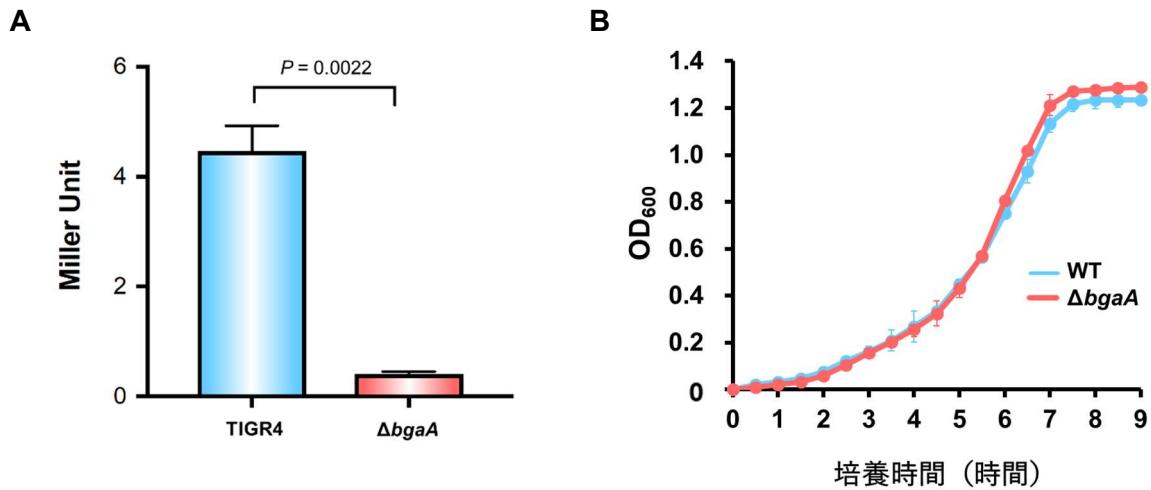


図2. *bgaA* 欠失変異株の β ガラクトシダーゼ活性と増殖曲線

A. *S. pneumoniae* 野生株 (WT), *bgaA* 欠失変異株 ($\Delta bgaA$) の菌体の β ガラクトシダーゼ活性を示す。各菌株を 37°Cで培養し、対数増殖期中期 ($OD_{600} = 0.40$) の酵素活性を測定した。3回の実験を行い、代表的なデータを示す。誤差バーは標準誤差を表す ($n = 6$)。有意差検定は、Mann-Whitney U 検定で行った。

B. WT, $\Delta bgaA$ の増殖曲線を示す。各菌株を THY 液体培地中、37°Cで培養し、波長 600 nm における吸光度を測定した。3回の実験を行い、代表的なデータを示す。誤差バーは標準誤差を表す ($n = 6$)。

比較した。培養 1 時間後では、野生株と *bgaA* 欠失変異株のヒト血液中での生存率に有意差を認めなかったが、2 時間後、3 時間後では *bgaA* 欠失により生存率は有意に低下

した (図 3A)。マウス血液中では、*bgaA* 欠失変異株の生存能は、野生株と比較して、

1, 2, 3 時間のすべての培養時間で、有意に低下した (図 3B)。したがって、BgaA は

S. pneumoniae の血液中での生存能に寄与することが示唆された。

次に、BgaA が好中球による殺菌からの回避に寄与するかについて検討するため、ヒ

ト末梢血から分離した好中球を用い、各菌株の生存試験を行った。培養 1 時間後では、

野生株と *bgaA* 欠失変異株の生存率に有意差を認めなかったが、2 時間後、3 時間後で

は、*bgaA* 欠失変異株の生存率は有意に低下した（図 4）。これらの結果から、BgaA は好中球による殺菌からの回避に寄与することが示唆された。

3. BgaA は上皮細胞および血管内皮細胞への付着・侵入に寄与する

BgaA が *S. pneumoniae* 感染時の上皮細胞および血管内皮細胞に対する付着因子として働くかを解析するため、ヒト肺胞上皮由来細胞 A549、ヒト脳微小血管内皮細胞 hBMEC、ヒト肺微小血管内皮細胞 HMVEC-L を用いて付着・侵入試験を行った。付着試験の結果、野生株と比較して、*bgaA* 欠失変異株の各細胞への付着率は有意に低下した（図 5A）。また、*bgaA* 欠失により、それぞれの細胞に対する侵入率は有意に低下した（図 5B）。これらの結果から、BgaA が肺胞上皮細胞および血管内皮細胞への付着・侵入に寄与する可能性が示された。

4. BgaA はマウス敗血症モデルにおいて病原因子として働く

BgaA が病原性に及ぼす影響を、マウス肺炎モデルおよび敗血症モデルにて検討した。マウス肺炎モデルでは、野生株感染群と比較して、*bgaA* 欠失変異株感染群の生存率は高い傾向にあったが、有意差を認めなかった（図 6A）。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（図 6B）。マウス敗血症モデルにおいて、BgaA が各臓器への菌体伝播に関与するかを検討するため、感染 24 時間後ならびに 36 時間後の血液、脳、肺、肝臓、脾臓、腎臓を摘出し、各臓器の菌数を比較した。

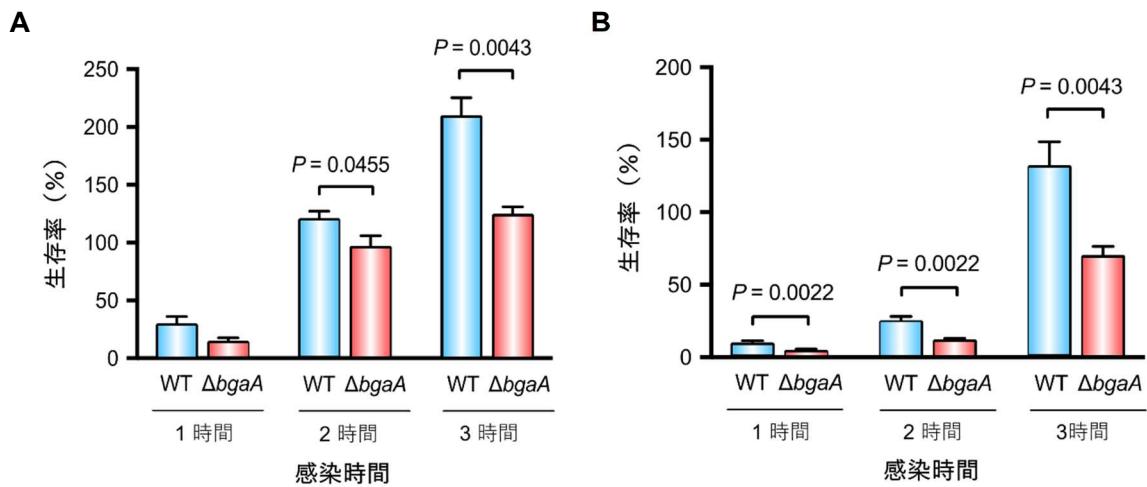


図3. 血液中における *S. pneumoniae* の生存率

A. ヒト血液中での生存能, B. マウス血液中での生存能. ヘパリン処理したヒトあるいはマウス血液 (180 μ l) に、約 1×10^4 CFU (20 μ l) の *S. pneumoniae* WT もしくは $\Delta bgaA$ を添加し、37°C, 5% CO₂ 条件下で 1, 2, 3 時間培養し、生存菌数を算定した。菌体生存率は、感染菌数に対する生育した菌数の割合で算出した。3回の実験を行い、代表的なデータを示す。グラフ中の縦棒は平均値を、誤差バーは標準誤差を表す (n=6)。有意差検定は、Mann-Whitney U 検定で行った。

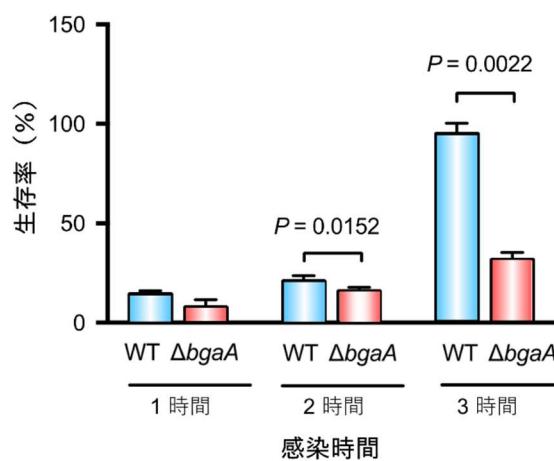


図4. 好中球存在下での *S. pneumoniae* 生存率

2×10^5 個のヒト好中球に、約 1×10^4 CFU の *S. pneumoniae* WT もしくは $\Delta bgaA$ を感染させた。37°C, 5% CO₂ 条件下で 1, 2, 3 時間培養し、生菌数を算定した。菌体生存率は、感染菌数に対する生育した菌数の割合で算出した。3回の実験を行い、代表的なデータを示す。グラフ中の縦棒は平均値を、誤差バーは標準誤差を表す。 (n=6) 有意差検定は、Mann-Whitney U 検定で行った。

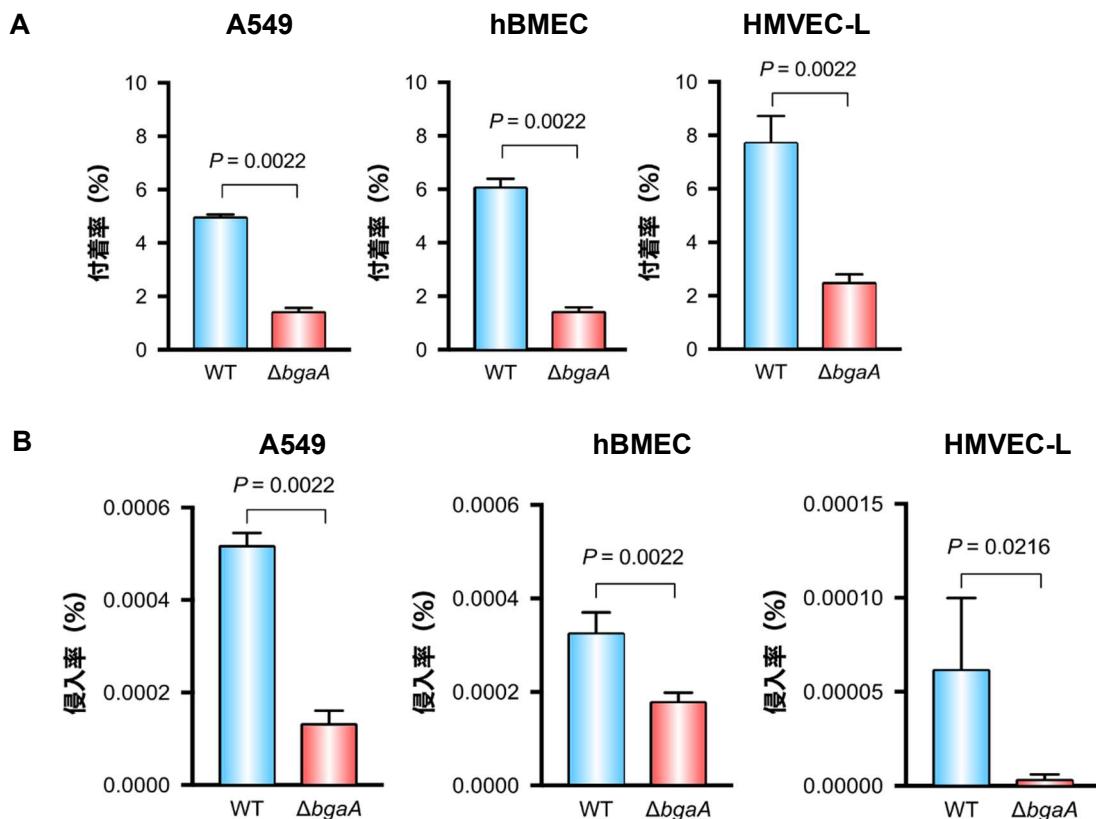


図 5. A549, hBMEC, および HMVEC-L への *S. pneumoniae* 付着・侵入試験

1 × 10⁵ 個のヒト培養細胞に, 5 × 10⁶ CFU の *S. pneumoniae* WT もしくは $\Delta bgaA$ を感染させ, 細胞に対する菌体付着率 (A) 菌体侵入率 (B) を感染菌数に対する割合でそれぞれ算定した (n = 6)。3 回の実験を行い, 代表的なデータを示す。グラフ中の縦棒は平均値を, 誤差バーは標準誤差を表す。

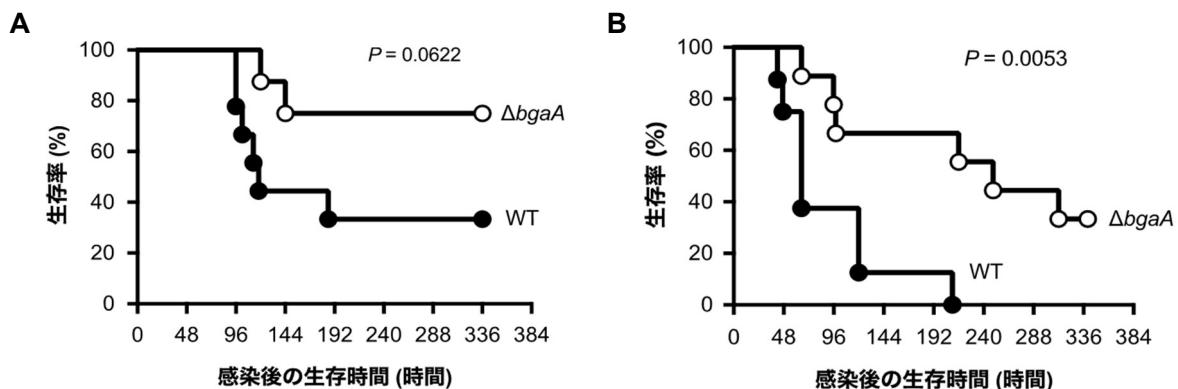


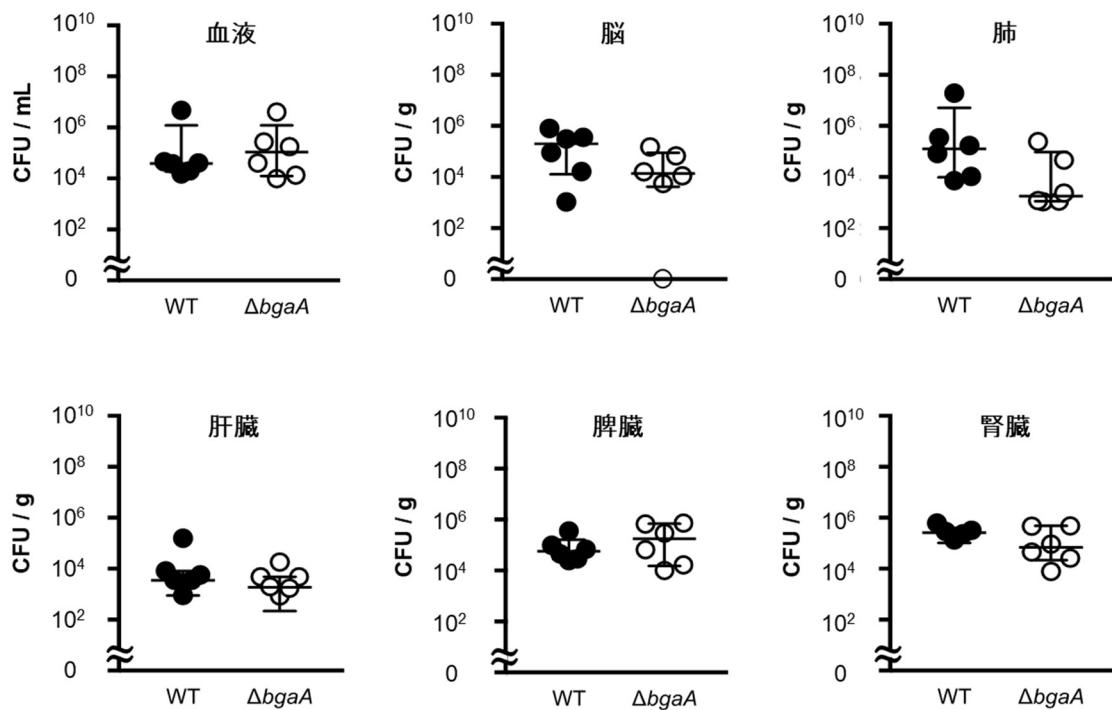
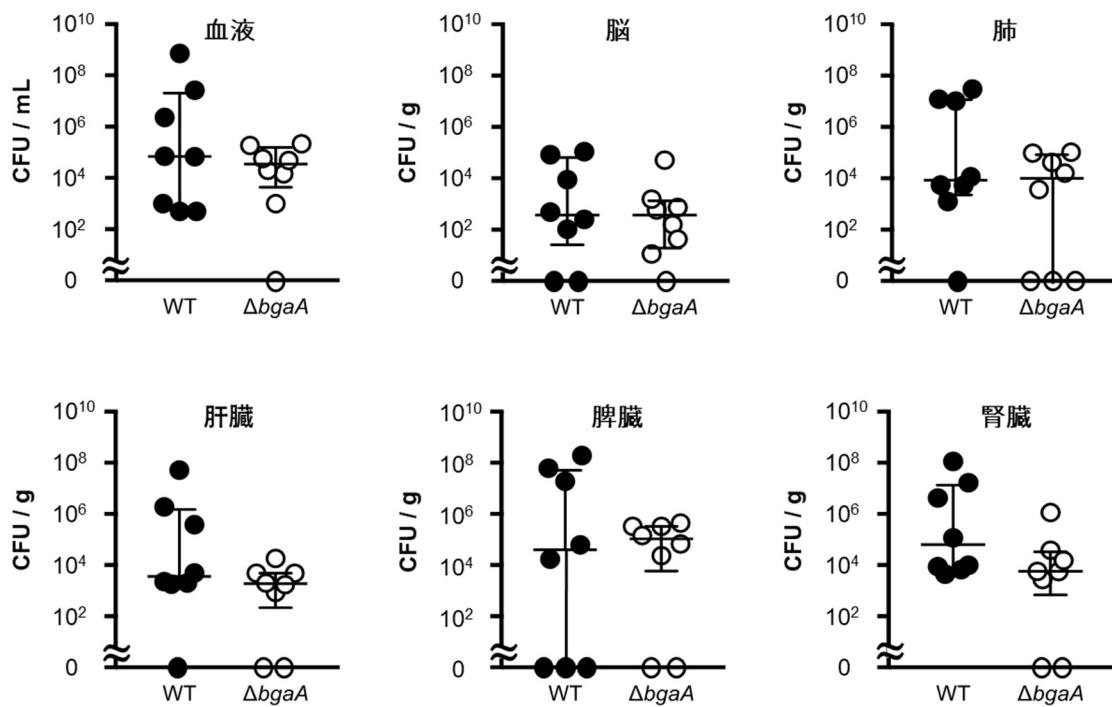
図 6. 肺炎モデル・敗血症モデルにおけるマウスの生存率

- A.** 肺炎モデルとして, 6 週齢の CD-1 マウスに 10⁷ CFU の *S. pneumoniae* WT または $\Delta bgaA$ を経鼻感染させた。グラフは感染後 14 日間のマウスの生存率を示す (n = 8)。
- B.** 敗血症モデルとして, 6 週齢の CD-1 マウスに 10⁶ CFU の *S. pneumoniae* WT または $\Delta bgaA$ を経静脈感染させた。グラフは感染後 14 日間のマウスの生存率を示す (n = 8)。
- 生存曲線の比較は, Log-rank 検定にて行った。

その結果、野生株感染群と *bgaA* 欠失変異株感染群の感染 24 時間後ならびに 36 時間後の各臓器の菌数に有意な差は認められなかった（図 7A, B）。一方で、血液凝固試験の結果から、野生株感染群における PT 値は、PBS コントロール群と比較し有意に低下し、フィブリノーゲン量は有意に増加した。*bgaA* 欠失変異株感染群では、PBS コントロール群と比較し PT 値およびフィブリノーゲン量ともに有意差は認めなかった（図 8）。

次に、感染 36 時間後における脳、肺、肝臓、脾臓、腎臓の HE 染色像について、病理組織学解析を行った。脳の組織切片では、野生株感染群と *bgaA* 欠失変異株感染群で炎症や出血に顕著な差は認められなかった。肺、肝臓、脾臓および腎臓組織切片では、野生株感染群では著明な出血が認められた。一方、*bgaA* 欠失変異株感染群の組織では、その傾向が減弱した。肺の組織切片では、*bgaA* 欠失変異株感染群と比較し、野生株感染群で肺胞腔内に赤血球の漏出が多く認められた。脾臓の組織切片では、野生株感染群で白脾髄の中心動脈の構造の破壊が認められた。腎臓の組織切片では、野生株感染群で皮質の腎小体の数が PBS コントロール群や *bgaA* 欠失変異株感染群と比較し減少しており、組織破壊を認めた（図 9）。

以上の結果より、BgaA は敗血症の際に、血管内皮細胞を傷害し出血を導くことにより血液凝固を促進し、病原因子として機能することが示唆された。

A**B****図 7. 経静脈感染後の全身への菌の伝播**

敗血症モデルを用い、感染後 24 時間 ($n=6$) (A) もしくは感染後 36 時間 ($n=8$) (B) の各臓器を摘出し、生育菌数を算定した。グラフ中の丸は各マウスにおける菌数を、誤差バーは中央値と四分位範囲を表す。統計解析は Mann-Whitney U 検定を行った。

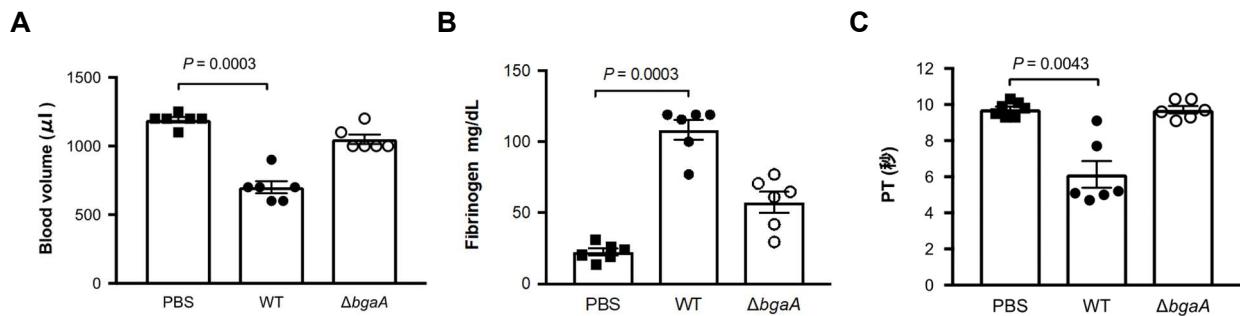
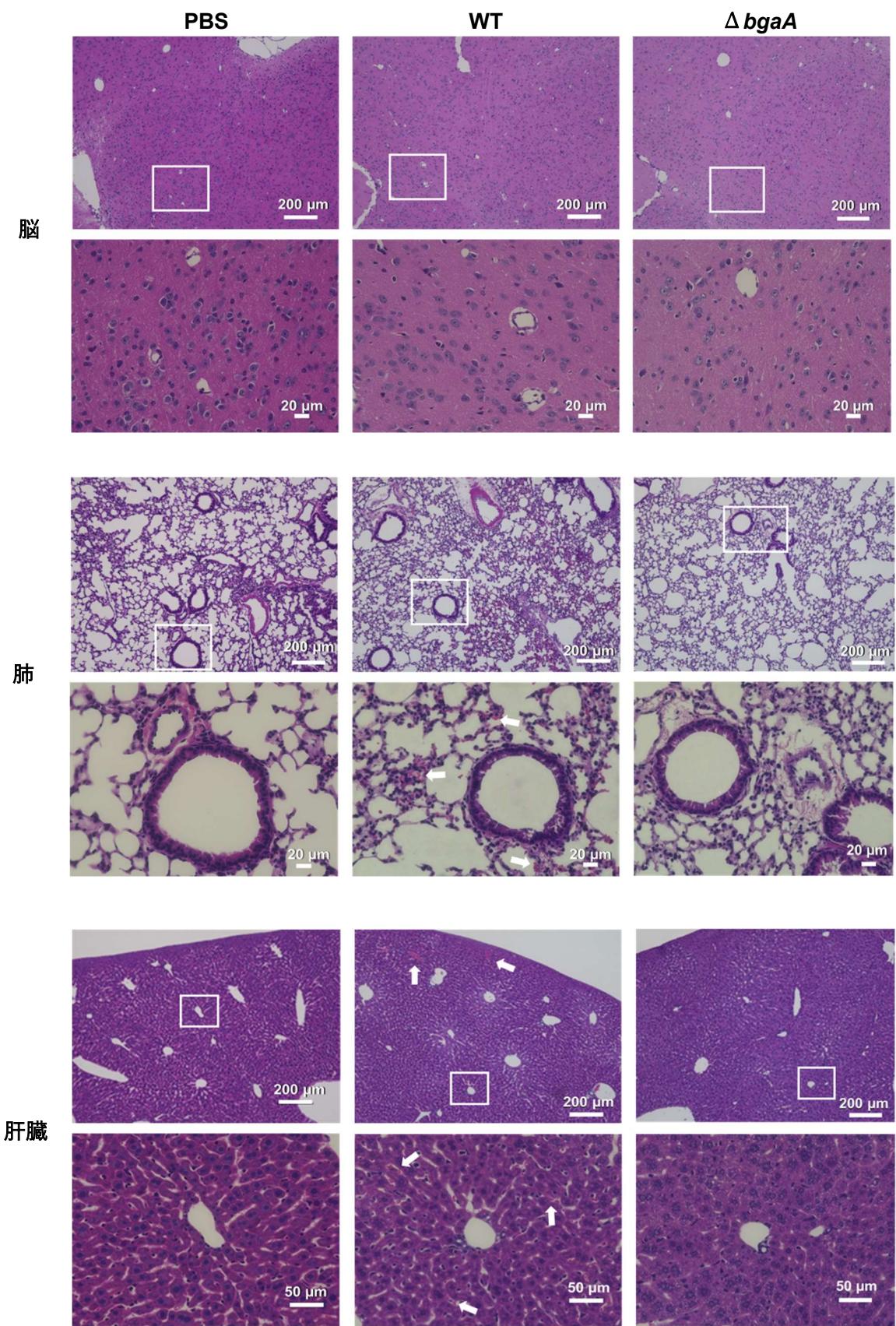


図 8. 敗血症モデルにおける血液凝固の評価

敗血症モデルを用い、感染後 36 時間の A. 採血量、B. フィブリノーゲン量、C. PT の測定を行った。3 回の実験を行い、代表的なデータを示す。グラフ中の記号は各マウスにおける値を、縦棒は平均値を、誤差バーは標準誤差を表す ($n = 6$)。有意差検定は、Kruskal-Wallis 検定で行った。

5. BgaA は *S. pneumoniae* 感染時における宿主免疫応答に影響を及ぼす

BgaA が敗血症モデルマウスの血液における転写応答に及ぼす影響を検討するため、感染後 12, 24, 36 時間に、PBS 投与群、野生株感染群、*bgaA* 欠失変異株感染群のマウス血液から白血球 RNA を分離し、RNA-seq 解析を行った。得られたマウス白血球の転写応答情報について、主成分分析にてデータの可視化を行った（図 10A）。PC1 のマイナス側に PBS コントロール群、0 付近に野生株感染群、プラス側に *bgaA* 欠失変異株感染群が分布した。野生株感染群と *bgaA* 欠失変異株感染群の分布は、感染 12 時間、24 時間後では明確な差を認めないが、感染 36 時間後では両者の分布に収束を認めた。感染 36 時間後の野生株感染群と *bgaA* 欠失変異株感染群の遺伝子発現量をスキャッタープロット解析（図 10B）およびヒートマップ（図 10C）で比較したところ、多くの遺伝子発現が変動していることが示された。感染 36 時間後で統計的な有意差が認められ、かつ



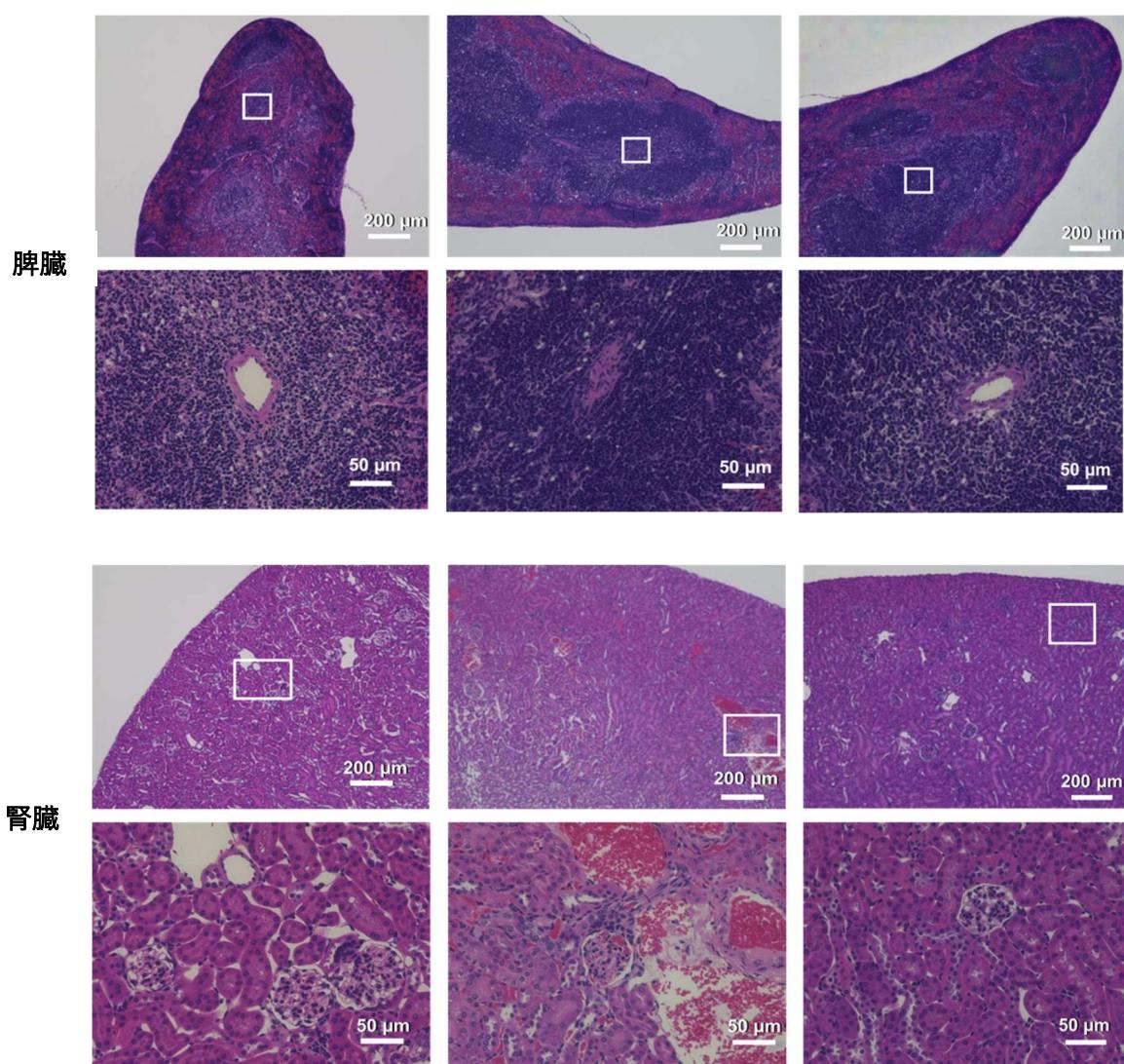


図9. 経静脈感染 36 時間後のマウス臓器組織像

経鼻感染 36 時間後に脳、肺、肝臓、脾臓、腎臓を回収し、ホルマリン固定およびパラフィン包埋の後にヘマトキシリン・エオジン染色を行った。各臓器の上段は弱拡大像、下段は強拡大像、白枠は強拡大した範囲を表す。白矢印は赤血球の漏出あるいは出血部位を示す。それぞれ代表的な像を示す。

変動量が大きい遺伝子について上方制御または下方制御された上位 20 遺伝子をそれぞ

れ表に示した（表 3, 4）。上方制御されている遺伝子群においては、インターフェロン

（IFN）によって誘導されるタンパク質をコードする遺伝子群に加え、C3 と結合する補体

B 因子やラクトフェリンなどの自然免疫に関与する分子をコードする遺伝子が存在

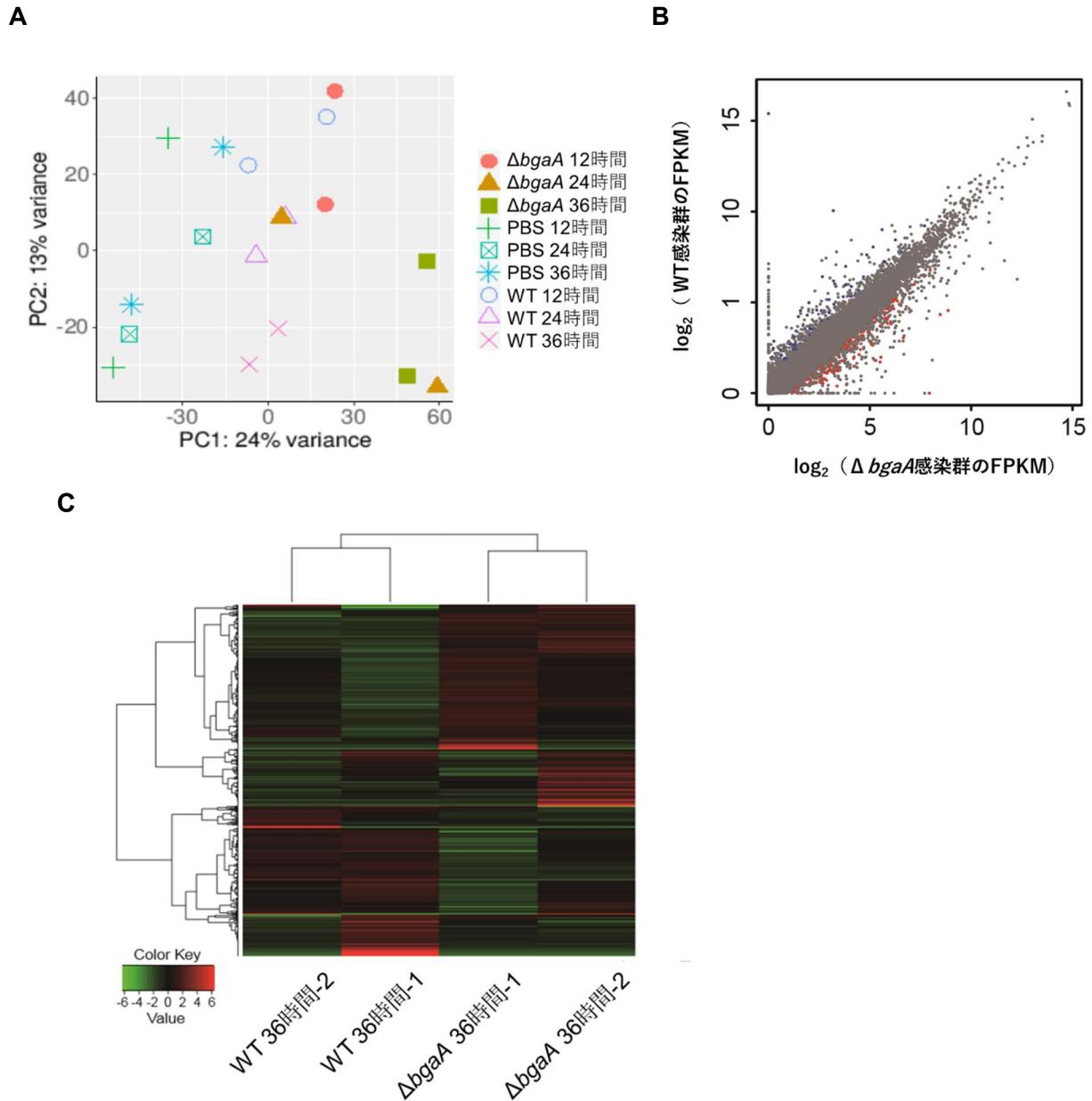


図 10. RNA-seq 解析による宿主の遺伝子変動

- A. 敗血症モデルマウスにおける感染後 12, 24, 36 時間の PBS コントロール群, WT 感染群, $\Delta bgaA$ 感染群 ($n=2$) の主成分分析を示す.
- B. 感染後 36 時間の $\Delta bgaA$ 感染群と WT 感染群を比較したスキャッタープロットを示す. 赤丸と青丸はそれぞれ統計的に有意に, かつ 2 倍以上上方制御または下方制御された遺伝子を示す.
- C. 感染後 36 時間の $\Delta bgaA$ 感染群と WT 感染群を比較し, 発現量上位 1000 遺伝子のヒートマップを示す. 色は Z-スコアを示す. 緑: 低発現, 赤: 高発現.

表 3-1. 感染 36 時間後に野生株感染群と比較して *bgaA* 欠失変異株感染群において上方制御されている上位 20 遺伝子

上方制御			
$\Delta bgaA / WT$ 36 時間			
遺伝子名	倍率変化	P 値	コードするタンパク質の種類
<i>Gm4951</i>	35.323	3.19E-02	IFN 誘導性 GTPase
<i>lisp1</i>	30.653	3.99E-02	IFN 誘導性 GTPase
<i>Cfb</i>	20.698	2.06E-02	補体 B 因子
<i>Tgtp2</i>	19.651	6.44E-03	IFN 誘導性 GTPase
<i>Serpina3g</i>	18.491	1.71E-02	セリンプロテアーゼインヒビター
<i>Gm12185</i>	17.606	3.20E-02	IFN 誘導性 GTPase
<i>Serpina3f</i>	15.773	3.57E-02	セリンプロテアーゼインヒビター
<i>Tgtp1</i>	15.501	7.93E-03	IFN 誘導性 GTPase
<i>Usp18</i>	13.837	4.78E-02	ユビキチン特異的プロテアーゼ
<i>Gbp4</i>	13.716	4.71E-03	グアニル酸結合タンパク質
<i>Ifit3</i>	13.027	4.34E-02	IFN 誘導性抗ウイルスタンパク質
<i>Cmpk2</i>	11.225	1.43E-02	ミトコンドリア UMP-CMP キナーゼ
<i>Socs1</i>	9.754	4.40E-02	サイトカイン転写抑制因子
<i>Mikl</i>	9.247	3.24E-02	偽キナーゼ
<i>Oasl1</i>	8.386	4.68E-02	二本鎖 RNA 結合タンパク質
<i>Kdr</i>	8.251	2.62E-02	VEGF 受容体
<i>Ms4a8a</i>	7.945	1.75E-02	膜貫通型リン酸化タンパク質
<i>Gm4841</i>	7.661	2.76E-02	IFN 誘導性 GTPase
<i>Mnda</i>	7.418	1.23E-02	IFN 誘導性タンパク質
<i>Ltf</i>	6.855	8.11E-03	ラクトフェリン

した。また、ネクロトーシスシグナルの基質をコードする *Mikl* およびアポトーシスの抑制に関わる分子をコードする *Kdr* といった遺伝子も大きく上方制御された。一方、下方制御されている遺伝子には、non-coding RNA や転写調整因子が複数存在した。また、B 細胞の成熟に関わるプレ B 細胞タンパク質や抗凝固作用および抗炎症作用を持つ

表 3-2. 感染 36 時間後に野生株感染群と比較して *bgaA* 欠失変異株感染群において下方制御されている上位 20 遺伝子

下方制御			
$\Delta bgaA / WT$ 36 時間			
遺伝子名	倍率変化	P 値	コードするタンパク質の種類または転写産物
<i>4930597A21Rik</i>	-7.662	1.31E-02	non-coding RNA
<i>Vpreb3</i>	-7.418	9.39E-03	プレ B 細胞タンパク質
<i>Pax5</i>	-7.234	4.11E-02	B 細胞特異的転写因子
<i>Gm4532</i>	-7.109	3.04E-03	non-coding RNA
<i>Thbd</i>	-7.083	3.78E-02	トロンボモジュリン
<i>Hes1</i>	-6.727	2.74E-02	Hes 群転写因子
<i>Cyb561</i>	-6.554	3.15E-02	チトクローム b561
<i>Fam196b</i>	-6.49	1.24E-03	機能未知のタンパク質
<i>Gal</i>	-6.449	8.25E-03	神経ペプチド
<i>Clec4b1</i>	-6.39	3.65E-02	C 型レクチン
<i>Rec114</i>	-6.289	2.34E-02	減数分裂期組換えタンパク質
<i>Lsmem1</i>	-6.111	2.84E-02	機能未知の一回膜貫通型タンパク質
<i>E130215H24Rik</i>	-6.016	4.09E-02	non-coding RNA
<i>Rgs2</i>	-5.862	1.95E-02	G タンパク質シグナル伝達調節因子
<i>Prss39</i>	-5.853	9.87E-03	不活性型セリンプロテアーゼ
<i>EII3</i>	-5.55	1.07E-02	RNA ポリメラーゼ伸長因子
<i>Mir17hg</i>	-5.526	1.58E-02	non-coding RNA
<i>Hfe</i>	-5.147	1.18E-03	恒常性鉄調節タンパク質
<i>C920021L13Rik</i>	-5.006	5.65E-03	non-coding RNA
<i>Bach2</i>	-4.779	1.97E-02	転写因子

トロンボモジュリンをコードする遺伝子が存在した。すなわち、野生株感染群では血液凝固が促進しているために宿主の抗凝固能が促進されている。また、*bgaA* の欠失により、*S. pneumoniae* 感染時における IFN 誘導性の分子群の発現が上昇するとともに、

ネクロトーシスが誘導される可能性が示された。

考察

本研究では、*S. pneumoniae* の菌体表層タンパク質のうち、詳細な機能が不明である BgaA に着目し、病態形成に果たす役割を解析した。*S. pneumoniae* 感染症の病態発症機構を理解するために、菌の組織への付着・侵入など感染成立の初期段階に関わる菌体表層タンパク質の機能解明は非常に重要である³⁶。*S. pneumoniae* は莢膜多糖が持つ負電荷により、宿主の負電荷を帯びたムコ多糖を含んだ粘液によるクリアランスを回避するとともに、オプソニン化貪食作用を回避し、気道粘膜へ定着する³⁷。そして、肺へ移行した後、炎症による組織破壊により血液中に侵入するとともに血行性に遠隔臓器に移行して増殖する。この過程で多くの菌体表層タンパク質が病態形成に寄与していることが報告してきた³⁸⁻⁴³。特に、*S. pneumoniae* は複数の糖鎖分解酵素により、宿主の N-結合型糖鎖を分解する。NanA はシアル酸とガラクトースの α 2-3 結合、 α 2-6 結合、および α 2-8 結合を切断する。BgaA はガラクトースと N-アセチルグルコサミンまたはグルコースの β 1-4 結合を切断し、StrH は N-アセチルグルコサミンとマンノースの β 1-2 結合を切断する。*S. pneumoniae* は糖鎖を分解することで、炭素源としての糖を獲得するとともに、付着に必要な何らかの受容体を露出させ定着を容易にする可能性が指摘されている³⁸。NanA は気道におけるコロニー形成、咽頭から肺への伝播に寄与するとともに、サイトカイン産生や脳微小血管内皮細胞を活性化させることで細菌の脳への侵入を促進する⁴⁴⁻⁴⁶。BgaA は、*S. pneumoniae* の莢膜血清型 2 型である D39 株と D39 株由来の無莢膜

型である R6 株において、咽頭上皮由来細胞 Detroit562 への菌体付着を、莢膜血清型 22F 型の C06_18 株では Detroit 562、ヒト気管支上皮細胞 16HBE14、A549 細胞への菌体の付着をそれぞれ酵素活性非依存的に促進することが報告されている^{21, 34}。本研究にて、TIGR4 株の BgaA が、上皮細胞である A549 細胞ならびに血管内皮細胞である hBMEC と HMVEC-L への付着および侵入因子として働くことが示された。BgaA は複数のドメイン構造をもつ巨大な表層タンパク質のため、酵素活性だけではなく、糖鎖結合能などの複数の機序で宿主と細菌の相互作用を引き起こしていると考えられる。

マウス敗血症モデルにおいて、*bgaA* 欠失株感染群の生存率が野生株感染群と比較して有意に高かった。一方で、感染 24 時間後および 36 時間後において、*S. pneumoniae* の各臓器への伝播に差は認められなかった。BgaA は C3b 補体によるオプソニン化に必要なヒト糖タンパク質である N-結合型糖鎖を脱グリコシル化することで好中球殺菌回避に寄与する²²。本研究では *in vitro* で血液中での菌の生存並びに、好中球の殺菌回避に BgaA が寄与していることが示された。しかし、敗血症モデルマウスにおける血液では感染 24 時間後および 36 時間後では菌数に有意差は認めなかった。感染 24 時間後から感染 36 時間後の菌数を経時的に比較すると、*bgaA* 欠失変異株感染群では 10^6 CFU を超えての菌の増殖を認めないが、野生株感染群では一部のマウスで 10^6 CFU より多い菌の増殖を認めた。また、各臓器の菌数に関しても同様の傾向が認められた。RNA-seq 解析の結果から、*bgaA* 欠失変異株感染群では IFN によって誘導される分子をコードする遺

伝子が多く上方制御されていた。IFN は抗ウイルス活性だけでなく抗菌活性にも重要な役割を果たし、宿主防御に働く⁴⁷。I型 IFN 受容体を欠失させたマウスでは、肺炎あるいは敗血症モデルで *S. pneumoniae* に対する感染防御能が抑制されることが報告されている^{48, 49}。また、*in vitro* の実験においては、外部から新たな細胞が遊走されることがなく、内皮細胞との相互作用なども存在しない。マウス感染モデルにおいて、*in vitro* で認められた血中における野生株と *bgaA* 欠失変異株の生存能の差は、宿主の血液以外の環境因子の違いや、免疫応答の差による影響を受け有意差を認めなくなったと考えられる。すなわち、マウスにおける病原性の差は、BgaA が持つ好中球による殺菌回避能が果たす役割は大きくない可能性が示された。

一般的に、敗血症は感染症によって重篤な臓器障害が引き起こされる状態と定義されている⁵⁰。敗血症では感染による過剰な炎症性サイトカインの産生が引き起こされ、血管内皮細胞の傷害に伴う末梢循環不全、多臓器不全や、凝固・線溶系の破綻、心機能障害によるショックに陥る⁵¹。本研究のマウス敗血症モデルにおいて、感染 36 時間後の心臓穿刺による採血量は PBS コントロール群および *bgaA* 欠失変異株感染群と比較し、野生株感染群で有意に低く、循環血液量が減少していることが示唆された。また、血液凝固検査の結果、PT 値の短縮およびフィブリノーゲン量の増加が認められた。PT は外因系血液凝固系のスクリーニングに用いられる。播種性血管内凝固症候群においては、組織因子の血中流入により PT の短縮が引き起こされる⁵²。フィブリノ

ーゲンは、出血時に血管内皮細胞の傷害部位においてフィブリノーゲンに転化することで止血機能を担っている。急性感染症において、フィブリノーゲンは血液中で増加して血液の粘性を増す⁵³。すなわち、*bgaA* 欠失変異株感染群と比較し、野生株感染群では、全身で組織変性が生じ血栓形成傾向が強いと考えられる。血小板は止血や凝固において重要な働きをし、感染における炎症応答や宿主防御にも関わる⁵⁴。*S. pneumoniae* は、血小板上の TLR2 や Fc γ RIIA やインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ などを介し血小板を活性化させ、血小板凝集を起こすことが報告されている^{55, 56}。ブタ IPD モデルで *S. pneumoniae* の病原因子では、Ply が血小板活性化や NETosis を促進することが報告されているが、詳細な機構は明らかとなっていない⁵⁷。また、NanA は ADP シグナル伝達に依存し血小板の表面からシアル酸を除去することで血小板反応性を亢進させる⁵⁸。BgaA によって切断可能な糖鎖が血小板に存在しており⁵⁹、BgaA が血小板の糖鎖修飾を変えすることで機能に影響を及ぼしている可能性がある。感染後の各臓器の HE 染色組織像ならびに血液凝固能試験の結果より、野生株感染群では、*bgaA* 欠失変異株感染群と比較し、血管構造の破壊と血液凝固能が促進されることで高い死亡率を示すことが示唆された。すなわち本研究により、BgaA は全身への *S. pneumoniae* の伝播や血中での増殖における影響は限定的であるが、組織内での出血に伴う末梢循環不全、多臓器不全、凝固・線溶系の破綻を亢進することで病原因子として働くことが示唆された。クローズドコロニーである CD-1 マウスを用いた RNA-seq の主成分分析の結果から、*S. pneumoniae* 感

染初期にはマウス個体ごとの転写応答に大きな差が認められるが、感染 36 時間後にはゲノムワイドな転写応答の変動が収束することが示唆された。本研究における経静脈感染の条件では、感染後 48 時間からマウスの死亡が認められたことから、感染初期では個体ごとに様々な応答が起きるが、マウスの死亡に至る過程で個体ごとの応答の差は少なくなる可能性が示された。また、*bgaA* 遺伝子欠失変異株感染群では、野生株感染群と比較してネクロトーシスシグナルの鍵となる基質である *Mlkl* を含む IFN 誘導性タンパク質をコードする遺伝子群の顕著な発現上昇が認められた。ネクロトーシスは、プロクラムされたネクローシスとして知られており⁶⁰、TNF- α や IFN などによって誘導され、RIPK3 と *Mlkl* 依存的に引き起こされることが報告されている^{61, 62}。*Mlkl* ノックアウトマウスでは野生型マウスよりも鼻腔に定着した TIGR4 の排除が遅かったことが報告されている。さらに、*Mlkl* が *S. pneumoniae* 感染時における抗体産生などの宿主の適応免疫の応答の開始に寄与することが示唆されている⁶³。BgaA の欠失によるマウス感染時の病原性の低下は、感染時の組織傷害や血液凝固能の変化に加えて、細胞死の様式の違いが寄与している可能性が考えられる。

現在、*S. pneumoniae* の菌体表層タンパク質を標的としたワクチン候補として PspC, PcpA, PhtD, PspA などを用いた臨床試験が実施されている⁶⁴⁻⁶⁶。ただし、*S. pneumoniae* の全ての菌株に対して有効な共通抗原は少なく、現行のワクチンの欠点を補うには不十分である。BgaA は、*S. pneumoniae* の多くの菌株に保存され、*S. pneumoniae* 感染症に対

して有効な感染防御抗原となる可能性がある。*S. pneumoniae* の病態発症には多様な分子が関与しているため^{36, 67}、他の抗原と混合し、多価抗原として免疫を行うことでさらなる防御能を示すとともに、ワクチンへの耐性化の確立を抑制することが期待できる。菌体表層に局在する新たな病原因子の同定は、今後のワクチン開発の可能性を広げるものであると考える。

S. pneumoniae は、新たな莢膜型あるいは高度耐性化した菌株の出現^{68, 69}、ワクチンの普及による血清型置換⁷⁰などの変化を示しており、環境に応じて進化してきている。新規抗菌薬の開発が停滞するなか^{71, 72}、ワクチンによる予防や病態発症機構の解明が非常に重要である。本研究において、*S. pneumoniae* の BgaA が、臓器の出血と組織傷害を促進し、血液凝固を亢進する病原因子であることが示唆された。また、RNA-seq 解析の結果より、BgaA は IFN などの抗菌物質の分泌に関わることで宿主の免疫応答にも関与する可能性が示唆された。BgaA による詳細な病態発症機構やワクチン抗原としての有効性および安全性について、今後さらなる研究を行うことにより新たな創薬につながると考える。

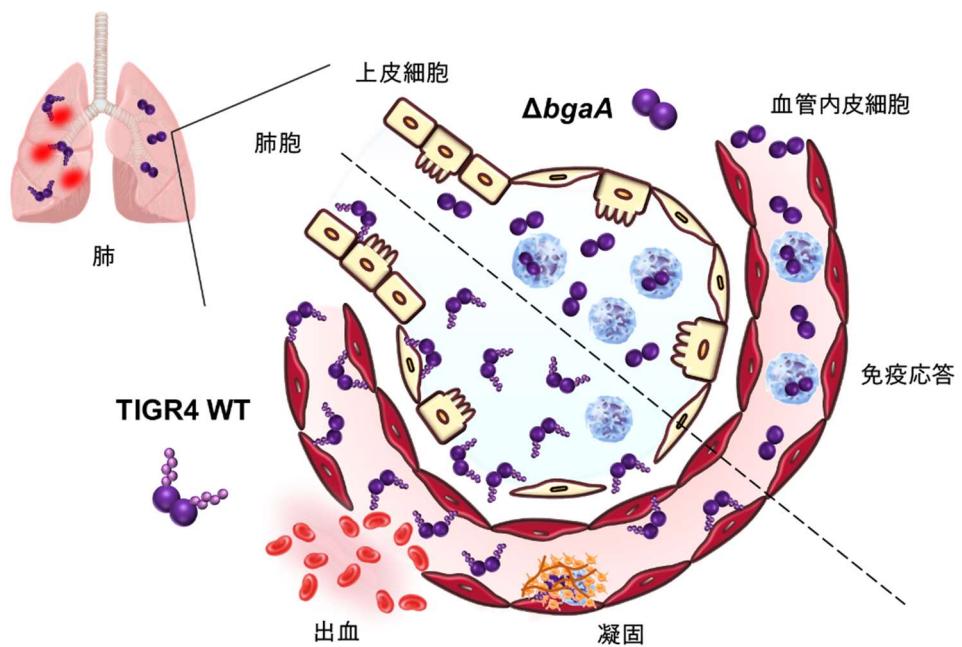


図 11. BgaA が *S. pneumoniae* の病態形成に果たす影響

S. pneumoniae の BgaA は、血液中での菌の増殖や、上皮細胞あるいは血管内皮細胞への付着・侵入を促進し、臓器の出血、凝固および組織傷害を誘導する病原因子として機能する。

謝辞

本研究の遂行にあたり、多大なる御指導と御教授を賜りました口腔分子感染制御学講座 口腔細菌学教室 川端重忠 教授に深甚なる謝意を心より表します。

本研究の進行の終始にわたり、御指導と御鞭撻を賜りました口腔分子感染制御学講座 口腔細菌学教室 山口雅也 助教に心より感謝し、篤く御礼申し上げます。本研究を行うに際し、様々な御指導を賜りました口腔分子感染制御学講座 口腔細菌学教室 広瀬雄二郎 特任助教に謹んで感謝の意を表します。また、本研究に対し多くの御教示を賜りました口腔分子感染制御学講座 口腔細菌学教室 中田匡宣 准教授ならびに住友倫子 講師に感謝申し上げます。

病理組織学的評価についてご協力を賜りました顎口腔病因病態制御学講座 口腔病理学教室 佐藤淳 講師に感謝申し上げます。そして、本研究を行う機会を与えてくださった、顎口腔病因病態制御学講座 口腔外科学第二教室 鵜澤成一 教授に心より御礼申し上げます。

最後に、本研究を行うに際し、御理解と御協力を頂きました口腔分子感染制御学講座 口腔細菌学教室ならびに顎口腔病因病態制御学講座 第二口腔外科学教室の皆様に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Otsuka T., Chang B., Shirai T., Iwaya A., Wada A., Yamanaka N., Okazaki M. SADO-study Working Group. (2013) Individual risk factors associated with nasopharyngeal colonization with *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*: A Japanese Birth Cohort Study. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **32**: 709-714.
2. Adegbola R.A., DeAntonio R., Hill P.C., Roca A., Usuf E., Hoet B., Greenwood B.M. (2014) Carriage of *Streptococcus pneumoniae* and other respiratory bacterial pathogens in low and lower-middle income countries: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* **9**: e103293.
3. Brooks L.R.K., Mias G.I. (2018) *Streptococcus pneumoniae*'s Virulence and Host Immunity: Aging, Diagnostics, and Prevention. *Front. Immunol.* **9**: 1366.
4. GBD 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators. (2018) Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect. Dis.* **18**: 1191-1210.
5. GBD 2015 LRI Collaborators. (2017) Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory tract infections in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Infect. Dis.* **17**: 1133-1161.
6. JAID/JSC感染症治療ガイドライン作成委員会. (2019) JAID/JSC感染症治療ガイド2019. 日本感染症学会・日本化学療法学会. 133.
7. Jacobs M.R., Good C.E., Beall B., Bajaksouzian S., Windau A.R., Whitney C.G. (2008) Changes in serotypes and antimicrobial susceptibility of invasive *Streptococcus pneumoniae* strains in Cleveland: a quarter century of experience. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 982-990.
8. McGee L., McDougal L., Zhou J., Spratt B.G., Tenover F.C., George R., Hakenbeck R., Hryniwicz W., Lefévre J.C., Tomasz A., Klugman K.P. (2001) Nomenclature of Major Antimicrobial-Resistant Clones of *Streptococcus pneumoniae* Defined by the Pneumococcal Molecular Epidemiology Network. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 2565-2571.
9. Geno K.A., Gilbert G.L., Song J.Y., Skovsted I.C., Klugman K.P., Jones C., Konradsen H.B., Nahm M.H. (2015) Pneumococcal capsules and their types: past, present, and future. *Clin. Microbiol. Rev.* **28**: 871-899.
10. Ladhani S.N., Collins S., Djennad A., Sheppard C.L., Borrow R., Fry N.K., Andrews N.J., Miller E., Ramsay M.E. (2018) Rapid increase in non-vaccine serotypes causing invasive pneumococcal disease in England and Wales, 2000-17: a prospective national observational cohort study. *Lancet Infect. Dis.* **18**: 441-451.

11. Noguchi S., Yatera K., Akata K., Chang B., Ikegami H., Hata R., Yamasaki K., Kawanami T., Mukae H. (2019) Distribution and annual changes in the proportion of *Streptococcus pneumoniae* serotypes in Japanese adults with pneumococcal pneumonia from 2011 to 2017. *J. Infect. Chemother.* **25**: 925-929.
12. Bergmann S., Hammerschmidt S. (2006) Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology*. **152**: 295-303.
13. Löfling J., Vimberg V., Battig P., Henriques-Normark B. (2010) Cellular interactions by LPxTG-anchored pneumococcal adhesins and their streptococcal homologues. *Cellular Microbiology*. **13**: 186-197.
14. Yamaguchi M., Hirose Y., Takemura M., Ono M., Sumitomo T., Nakata M., Terao Y., Kawabata S. (2019) *Streptococcus pneumoniae* Evades Host Cell Phagocytosis and Limits Host Mortality Through Its Cell Wall Anchoring Protein PfbA. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **9**: 301.
15. Paterson G.K., Nieminen L., Jefferies J.M., Mitchell T.J. (2008) PclA, a pneumococcal collagen-like protein with selected strain distribution, contributes to adherence and invasion of host cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **285**: 170-176.
16. Burnaugh A.M., Frantz L.J., King S.J. (2008) Growth of *Streptococcus pneumoniae* on human glycoconjugates is dependent upon the sequential activity of bacterial exoglycosidases. *J. Bacteriol.* **190**: 221-230.
17. Binsker U., Kohler T.P., Krauel K., Kohler S., Schwertz H., Hammerschmidt S. (2015) Pneumococcal Adhesins PavB and PspC Are Important for the Interplay with Human Thrombospondin-1. *J. Biol. Chem.* **290**: 14542-14555.
18. Bogaert D., De Groot R., Hermans P.W. (2004) *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect. Dis.* **4**: 144-154.
19. Pérez-Dorado I., Galan-Bartual S., Hermoso J.A. (2012) Pneumococcal surface proteins: when the whole is greater than the sum of its parts. *Molecular Oral Microbiology*. **27**: 221-245.
20. Andre G.O., Converso T.R., Politano W.R., Ferraz L.F., Ribeiro M.L., Leite L.C., Darrieux M. (2017) Role of *Streptococcus pneumoniae* Proteins in Evasion of Complement-Mediated Immunity. *Front. Microbiol.* **8**: 224.
21. Limoli D.H., Sladek J.A., Fuller L.A., Singh A.K., King S.J. (2011) BgaA acts as an adhesin to mediate attachment of some pneumococcal strains to human epithelial cells. *Microbiology*. **157**: 2369–2381.
22. Dalia A.B., Standish A.J., Weiser J.N. (2010) Three surface exoglycosidases from *Streptococcus pneumoniae*, NanA, BgaA, and StrH, promote resistance to opsonophagocytic killing by human neutrophils. *Infect. Immun.* **78**: 2108-2116.

23. Tettelin H., Nelson K.E., Paulsen I.T., Eisen J.A., Read T.D., Peterson S., Heidelberg J., DeBoy R.T., Haft D.H., Dodson R.J., Durkin A.S., Gwinn M., Kolonay J.F., Nelson W.C., Peterson J.D., Umayam L.A., White O., Salzberg S.L., Lewis M.R., Radune D., Holtzapple E., Khouri H., Wolf A.M., Utterback T.R., Hansen C.L., McDonald L.A., Feldblyum T.V., Angiuoli S., Dickinson T., Hickey E.K., Holt I.E., Loftus B.J., Yang F., Smith H.O., Venter J.C., Dougherty B.A., Morrison D.A., Hollingshead S.K., Fraser C.M. (2001) Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science*. **293**: 498-506.
24. Finn R.D., Bateman A., Clements J., Coggill P., Eberhardt R., Eddy S.R., Heger A., Hetherington K., Holm L., Mistry J., Sonnhammer E.L., Tate J., Punta M. (2014) Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res.* **42**: 222-230.
25. Marchler-Bauer A., Zheng C., Chitsaz F., Derbyshire M.K., Geer L.Y., Geer R.C., Gonzales N.R., Gwadz M., Hurwitz D.I., Lanczycki C.J., Lu F., Marchler G.H., Song J.S., Thanki N., Yamashita R.A., Zhang D., Bryant S.H. (2013) CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic Acids Res.* **41**: 348-352.
26. Yamaguchi M., Nakata M., Sumioka R., Hirose Y., Wada S., Akeda Y., Sumitomo T., Kawabata S. (2017) Zinc metalloproteinase ZmpC suppresses experimental pneumococcal meningitis by inhibiting bacterial invasion of central nervous systems. *Virulence*. **8**: 1516-1524.
27. Bricker A.L., Camilli A. (1999) Transformation of a type 4 encapsulated strain of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **172**: 131-135.
28. Kharat A.S., Tomasz A. (2003) Inactivation of the *srtA* gene affects localization of surface proteins and decreases adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to human pharyngeal cells *in vitro*. *Infect. Immun.* **71**: 2758-2765.
29. Yang Y., Koirala B., Sanchez L.A., Phillips N.R., Hamry S.R., Tal-Gan Y. (2017) Structure-Activity Relationships of the Competence Stimulating Peptides (CSPs) in *Streptococcus pneumoniae* Reveal Motifs Critical for Intra-group and Cross-group ComD Receptor Activation. *ACS Chem. Biol.* **12**: 1141-1151.
30. Ozeri V., Rosenshine I., Mosher D.F., Fässler R., Hanski E. (1998) Roles of integrins and fibronectin in the entry of *Streptococcus pyogenes* into cells via protein F1. *Mol. Microbiol.* **30**: 625-637.
31. Hirose Y., Yamaguchi M., Goto K., Sumitomo T., Nakata M., Kawabata S. (2018) Competence-induced protein Ccs4 facilitates pneumococcal invasion into brain tissue and virulence in meningitis. *Virulence*. **9**: 1576-1587.
32. Ge S.X., Son E.W., Yao R. (2018) iDEP: an integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics*. **19**: 534.
33. Zeleny R., Altmann F., Praznik W. (1997) A capillary electrophoretic study on the specificity

- of beta-galactosidases from *Aspergillus oryzar*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Canavalia ensiformis* (jack bean). *Anal. Biochem.* **246**: 96-101.
34. Singh A.K., Pluvinage B., Higgins M.A., Dalia A.B., Woodiga S.A., Flynn M., Lloyd A.R., Weiser J.N., Stubbs K.A., Boraston A.B., King S.J. (2014) Unravelling the multiple functions of the architecturally intricate *Streptococcus pneumoniae* β -galactosidase, BgaA. *PLoS Pathog.* **10**: e1004364.
 35. Zähner D., Hakenbeck R. (2000) The *Streptococcus pneumoniae* β -galactosidase is a surface protein. *J. Bacteriol.* **182**: 5919-5921.
 36. Kadioglu A., Weiser J.N., Paton J.C., Andrew P.W. (2008) The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 288-301.
 37. Nelson A.L., Roche A. M., Gould J.M., Chim K., Ratner A.J., Weiser J.N. (2007) Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect. Immun.* **75**: 83-90.
 38. King S.J., Hippe K.R., Weiser J.N. (2005) Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **59**: 961-974.
 39. Canvin J.R., Marvin A.P., Sivakumaran M., Paton J.C., Boulnois G.J., Andrew P.W., Mitchell T.J. (1995) The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicemia in mice infected with a type 2 pneumococcus. *J. Infect. Dis.* **172**: 119-123.
 40. Ren B., Szalai A.J., Hollingshead S.K., Briles D.E. (2004) Effects of PspA and Antibodies to PspA on Activation and Deposition of Complement on the Pneumococcal Surface. *Infect. Immun.* **72**: 114-122.
 41. Ren B., Li J., Genschmer K., Hollingshead S.K., Briles D.E. (2012) The absence of PspA or presence of antibody to PspA facilitates the complement-dependent phagocytosis of pneumococci *in vitro*. *Clin. Vaccine Immunol.* **19**: 1574-1582.
 42. Graham R.M., Paton J.C. (2006) Differential role of CbpA and PspA in modulation of *in vitro* CXC chemokine responses of respiratory epithelial cells to infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **74**: 6739-6749.
 43. Kanwal S., Jensch I., Palm G.J., Brönstrup M., Rohde M., Kohler T.P., Somplatzki D., Tegge W., Jenkinson H.F., Hammerschmidt S. (2017) Mapping the recognition domains of pneumococcal fibronectin-binding proteins PavA and PavB demonstrates a common pattern of molecular interactions with fibronectin type III repeats. *Mol. Microbiol.* **105**: 839-859.
 44. Manco S., Hernon F., Yesilkaya H., Paton J.C., Andrew P.W., Kadioglu A. (2006) Pneumococcal neuraminidases A and B both have essential roles during infection of the respiratory tract and sepsis. *Infect. Immun.* **74**: 4014-4020.

45. Banerjee A., Van Sorge N.M., Sheen T.R., Uchiyama S., Mitchell T.J., Doran K.S. (2010) Activation of brain endothelium by pneumococcal neuraminidase NanA promotes bacterial internalization. *Cell. Microbiol.* **12**: 1576-1588.
46. Uchiyama S., Carlin A.F., Khosravi A., Weiman S., Banerjee A., Quach D., Hightower G., Mitchell T.J., Doran K.S., Nizet V. (2009) The surface-anchored NanA protein promotes pneumococcal brain endothelial cell invasion. *J. Exp. Med.* **206**: 1845-1852.
47. MacMicking J.D. (2012) Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **12**: 367-382.
48. LeMessurier K.S., Häcker H., Chi L., Tuomanen E., Redecke V. (2013) Type I interferon protects against pneumococcal invasive disease by inhibiting bacterial transmigration across the lung. *PLoS Pathog.* **9**: e1003727.
49. Maier B.B., Hladik A., Lakovits K., Korosec A., Martins R., Kral J.B., Mesteri I., Strobl B., Müller M., Kalinke U., Merad M., Knapp S. (2016) Type I interferon promotes alveolar epithelial type II cell survival during pulmonary *Streptococcus pneumoniae* infection and sterile lung injury in mice. *Eur. J. Immunol.* **46**: 2175-2186.
50. 日本版敗血症診療ガイドライン 2016 作成特別委員会(2016) 日本敗血症診療ガイドライン 2016. 日本集中治療医学会・日本救急医学会合同.
51. Angus D.C., van der Poll T. (2013) Severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med.* **369**: 840.
52. 金井正光. (2015) 臨床検査法提要 第34版.金原出版株式会社. 395-397.
53. 金井正光. (2015) 臨床検査法提要 第34版.金原出版株式会社. 402.
54. Pigozzi L., Aron J.P., Ball J., Cecconi M. (2015) Understanding platelet dysfunction in sepsis. *Intensive Care Med.* **42**: 583-586.
55. Arman M., Krauel K., Tilley D.O., Weber C., Cox D., Greinacher A., Kerrigan S.W., Watson S.P. (2014) Amplification of bacteria-induced platelet activation is triggered by Fc γ RIIA, integrin α IIb β 3, and platelet factor 4. *Blood* **123**: 3166-3174.
56. Keane C., Tilley D., Cunningham A., Smolenski A., Kadioglu A., Cox D., Jenkinson H.F., Kerrigan S.W. (2010) Invasive *Streptococcus pneumoniae* trigger platelet activation via Toll-like receptor 2. *J. Thromb. Haemost.* **8**: 2757-2765.
57. Anderson R., Nel J.G., Feldman C. (2018) Multifaceted Role of Pneumolysin in the Pathogenesis of Myocardial Injury in Community-Acquired Pneumonia. *Int. J. Mol. Sci.* **19**: 1147.
58. Kullaya V., de Jonge M.I., Langereis J.D., van der Gaast-de Jongh C.E., Büll C., Adema G.J., Lefever D., Cremers A.J., Mmbaga B.T., de Groot P.G., de Mast Q., van der Ven A.J. (2018) Desialylation of Platelets by Pneumococcal Neuraminidase A Induces ADP-Dependent Platelet Hyperreactivity. *Infect. Immun.* **86**: e00213-18.

59. Crook M (1991) Sialic acid: its importance to platelet function in health and disease. *Platelets*. **2**: 1-10.
60. Chan F.K., Shisler J., Bixby J.G., Felices M., Zheng L., Appel M., Orenstein J., Moss B., Lenardo M.J. (2003) A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *J. Biol. Chem.* **278**: 51613-51621.
61. Thapa R.J., Basagoudanavar S.H., Nogusa S., Irrinki K., Mallilankaraman K., Slifker M.J., Beg A.A., Madesh M., Balachandran S. (2011) NF-kappaB protects cells from gamma interferon-induced RIP1-dependent necroptosis. *Mol. Cell Biol.* **31**: 2934-2946.
62. Sun L., Wang H., Wang Z., He S., Chen S., Liao D., Wang L., Yan J., Liu W., Lei X., Wang X. (2012) Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*. **148**: 213-227.
63. Riegler A.N., Brissac T., Gonzalez-Juarbe N., Orihuela C.J. (2019) Necroptotic Cell Death Promotes Adaptive Immunity Against Colonizing Pneumococci. *Front. Immunol.* **10**: 615.
64. Mann B., Thornton J., Heath R., Wade K.R., Tweten R.K., Gao G., El Kasmi K., Jordan J.B., Mitrea D.M., Kriwacki R., Maisonneuve J., Alderson M., Tuomanen E.I. (2014) Broadly protective protein-based pneumococcal vaccine composed of pneumolysin toxoid-CbpA peptide recombinant fusion protein. *J. Infect. Dis.* **209**: 1116-1125.
65. Bologa M., Kamtchoua T., Hopfer R., Sheng X., Hicks B., Bixler G., Hou V., Pehlic V., Yuan T., Gurunathan S. (2012) Safety and immunogenicity of pneumococcal protein vaccine candidates: monovalent choline-binding protein A (PcpA) vaccine and bivalent PcpA-pneumococcal histidine triad protein D vaccine. *Vaccine*. **30**: 7461-7468.
66. Berglund J., Vink P., Tavares Da Silva F., Lestrate P., Boutriau D. (2014) Safety, immunogenicity, and antibody persistence following an investigational *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* triple-protein vaccine in a phase 1 randomized controlled study in healthy adults. *Clin. Vaccine Immunol.* **21**: 56-65.
67. Subramanian K., Henriques-Normark B., Normark S. (2019) Emerging concepts in the pathogenesis of the *Streptococcus pneumoniae*: From nasopharyngeal colonizer to intracellular pathogen. *Cell. Microbiol.* **21**: e13077.
68. Calix J.J., Nahm M.H. (2010) A new pneumococcal serotype, 11E, has variably inactivated *wcjE* gene. *J. Infect. Dis.* **202**: 29-38.
69. Nakano S., Fujisawa T., Ito Y., Chang B., Matsumura Y., Yamamoto M., Nagao M., Suga S., Ohnishi M., Ichiyama S. (2018) Spread of Meropenem-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Serotype 15A-ST63 Clone in Japan, 2012-2014. *Emerging Infectious Diseases*. **24**: 275-283.
70. Ouldali N., Levy C., Varon E., Bonacorsi S., Béchet S., Cohen R., Angoulvant F., French Pediatric Meningitis Network. (2018) Incidence of paediatric pneumococcal meningitis and emergence of new serotypes: a time-series analysis of a 16-year French national survey.

Lancet Infect. Dis. **18**: 983-991.

71. CDC, US, Department of health and human services (2013) Antibiotic resistance threats in the US. 44.
72. Wohlleben W., Mast Y., Stegmann E., Ziemert N. (2016) Antibiotic drug discovery. *Microb. Biotechnol.* **9**: 541-548.