

学位研究紹介

A群レンサ球菌の産生する CAMP factor は RAW264.7 細胞の貪食能を低下させる CAMP factor of Group A *Streptococcus* inhibits phagocytic activity of RAW264.7 cells

新潟大学大学院医歯学総合研究科 微生物感染症学分野、
小児歯科学分野

黒澤 美絵

Division of Microbiology and Infectious Diseases & Pediatric
Dentistry, Niigata University Graduate School of Medical and
Dental Sciences

Mie Kurosawa

【緒言】

A群レンサ球菌 *Streptococcus pyogenes* は、小児に多発する咽頭炎の起原菌として知られている。同菌は宿主免疫細胞の機能を低下させる、もしくは組織への侵入および組織内増殖をサポートする病原因子を産生することで感染を拡大させると考えられている。*S. pyogenes* が産生する CAMP factor は黄色ブドウ球菌の β -hemolysin による溶血作用を増強することが報告されているが、免疫細胞に対する作用については明らかにされていない。そこで本研究は、マクロファージ系細胞に対する CAMP factor の影響を解析した。

【方法】

1. *S. pyogenes* における CAMP factor の発現解析

日本人患者由来の *S. pyogenes* M1 型 (142 株, 144 株, 466 株, SSI-9 株) および M3 型 (SSI-1 株, TW3384 株, SSI-7 株, SSI-8 株) を Todd Hewitt Yeast Extract 培地にて 20 時間培養し、菌体と培養上清における CAMP factor 発現量について特異抗体を用いて解析した。また、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} あるいは 5% CO_2 存在下で *S. pyogenes* SSI-9 株を培養し、CAMP factor の発現量を調べた。

2. マウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞に対する組換え (r) CAMP factor の作用解析

RAW 細胞に rCAMP factor、熱処理をした rCAMP factor、および抗 CAMP factor 抗体にて中和した rCAMP factor を 37°C、24 時間、5% CO_2 条件下で作

用させた後、顕微鏡観察を行った。

3. rCAMP factor の RAW 細胞に対する細胞傷害性の検索

RAW 細胞に rCAMP factor を 24 時間作用させ、propidium iodide による細胞染色、細胞内外における乳酸デヒドロゲナーゼ量の測定、および MTT assay を行った。

4. RAW 細胞の細胞周期に対する CAMP factor の影響

RAW 細胞に CAMP factor を作用させ、Cell-Clock Cell Cycle Assay 試薬および蛍光顕微鏡にて、細胞周期に与える影響を解析した。

5. RAW 細胞の貪食能に対する CAMP factor の影響

RAW 細胞に CAMP factor を 24 時間作用させた後に *S. pyogenes* SSI-9 株を 1 時間感染させ、RAW 細胞の貪食能を測定した。また、CAMP factor を添加した RAW 細胞に貪食能力解析用蛍光試薬 (pHrodo Red *S. aureus* bioparticles) を 30 分反応させ、RAW 細胞の貪食能をデンストメトリー解析した。

【結果】

CAMP factor は、本実験で用いたすべての菌株において発現した。また、1 mM Ca^{2+} 、5 mM Mg^{2+} あるいは 5% CO_2 存在下では、CAMP factor 発現の上昇が認められた。

rCAMP factor を作用させた RAW 細胞では細胞質で空胞形成が認められ (図 1)、この空胞は rCAMP factor を加熱すること、および抗 CAMP factor 抗体にて中和することにより抑制された。また、rCAMP factor の添加は RAW 細胞の propidium iodide 陽性細胞率および細胞内外の乳酸デヒドロゲナーゼ量に影響を及ぼさなかったことから、rCAMP factor は RAW 細胞に対して外的傷害を惹起しないことが示された。しかしながら、MTT assay にて細胞内の酵素活性を比色定量し

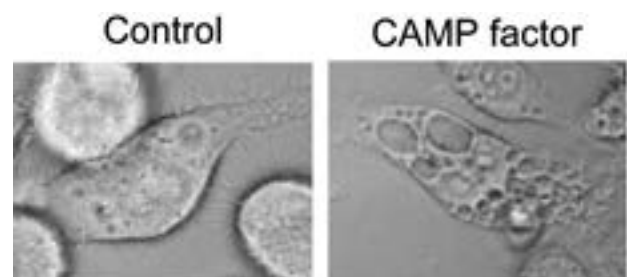


図 1: CAMP factor による RAW 細胞の空胞化 (Kurosawa et al. *Microbes Infect* 18 (2) : 118-27, 2016 改変)

たところ, rCAMP factor 処理濃度に依存して吸光度の値が低くなっており, かつ細胞数が有意に減少した。rCAMP factor が細胞増殖を抑制することが示唆されたことから, 細胞周期に与える影響について解析した。その結果, rCAMP factor 処理した RAW 細胞では G2 期停止状態の細胞が多く観察された。また, G2 期停止状態となり空胞を形成した RAW 細胞では, コントロール細胞に比べて *S. pyogenes* の付着・侵入割合が有意に低下していた。さらに, 空胞を形成した細胞では pHrodo Red *S. aureus* bioparticles の取り込み量が約 70% 低下した。このことより, CAMP factor が作用すると RAW 細胞の貪食能が低下することが示唆された。

【考察と結論】

Ca^{2+} , Mg^{2+} あるいは CO_2 存在下において *S. pyogenes* SSI-9 株の CAMP factor 発現が上昇したことから, 菌の組織侵入時に CAMP factor の発現が増加することが示唆された。また, 空胞形成毒素の多くは細胞死を惹起することが報告されているが, CAMP factor は RAW 細胞の細胞死を誘導することなく, 空胞形成および貪食能の低下を引き起こす。以上の結果より, CAMP factor

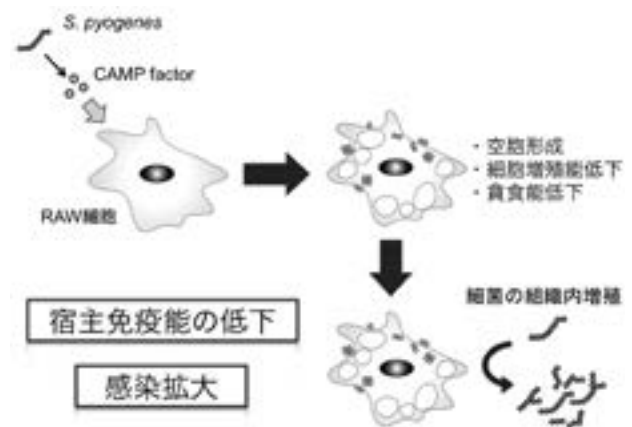


図2: *S. pyogenes* CAMP factor によるレンサ球菌感染症の感染拡大に関する仮説

は RAW264.7 細胞に疑似食胞と考えられる空胞を形成させることで, *S. pyogenes* に対する貪食能を低下させると推察した。そして, *S. pyogenes* の産生する CAMP factor はマクロファージ機能を低下させることにより, *S. pyogenes* の自然免疫からの回避および感染拡大に関与すると考えられる (図2)。