

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00862

研究課題名(和文)細菌性毒素が誘導する各種疾病に対するポリフェノール類の制御機構の解明

研究課題名(英文)Inhibitory effects of polyphenol on bacterial toxin-induced inflammation

研究代表者

島村 裕子(Shimamura, Yuko)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：60452025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ブドウ球菌毒素(SEA)が誘導する慢性炎症、インスリン抵抗性等の発症に対するポリフェノールの機能性を明らかにすることを目的に研究を行った。その結果、(-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG)がSEAと相互作用することにより、gp130受容体とSEAの結合が阻害され、STAT3のリン酸化を抑制することが示唆された。また、SEAは、Th1細胞の応答を誘導し、特に糖尿病モデルマウスでは、SEAに対する感受性が高まることが示唆された。さらに、EGCGは、正常および糖尿病モデルマウスにおけるSEA誘導性炎症関連遺伝子の発現を抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、SEAのgp130受容体への結合およびSEAが誘発する慢性炎症、インスリン抵抗性に関与するSTAT3の活性化をカテキンが抑制することを明らかにした。gp130は炎症性サイトカインであるIL-6ファミリー共通の受容体であることから、カテキンにより、IL-6が関与する種々の炎症性疾患を軽減できる可能性がある。また、将来的に、SEAによるSTAT3活性化に起因する慢性炎症の分子メカニズムとそれに対するポリフェノールの影響を明らかにすることにより、細菌性毒素に起因する各種疾病の有効な予防・治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, the inhibitory effects of polyphenol on staphylococcal enterotoxin A (SEA)-induced inflammation and insulin resistance were examined. As a result, the interaction of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) with SEA inhibited the binding of gp130 receptor to SEA and reduced the phosphorylation of STAT3. SEA induced Th1 cytokines in mouse spleen cells. Especially in the diabetic mice, SEA strongly induced interferon-gamma expression. EGCG significantly decreased the expression of SEA-induced inflammation-related genes in both normal and diabetic model mice.

研究分野：食品衛生学、微生物学

キーワード：黄色ブドウ球菌 ブドウ球菌エンテロトキシンA ポリフェノール カテキン STAT3

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌が産生する細菌性スーパー抗原毒素である staphylococcal enterotoxin A (SEA) は、サイトカイン受容体 gp130 と結合して脂肪細胞内の STAT3 を活性化させ、インスリン抵抗性を引き起こす可能性が指摘されている (Banke *et al.*, 2014)。実際に、ウサギに黄色ブドウ球菌の産生するスーパー抗原毒素を投与することで、インスリン抵抗性、耐糖能障害および全身性の炎症等が現れ、II 型糖尿病とほぼ同じ状態になることも報告されている (Vu *et al.*, 2015)。したがって、SEA は、スーパー抗原活性による慢性炎症、自己免疫疾患だけでなく、II 型糖尿病におけるインスリン抵抗性にも関与することが示唆される。しかし、黄色ブドウ球菌が産生する SEA が糖尿病を引き起こすのか、または糖尿病状態が本菌の増殖を促しているのか、その詳細は未だ不明な点が多い。一方、ポリフェノールの摂取量が多い人ほど糖尿病の発症が少ないことが報告されており (Tresserra-Rimbau *et al.*, 2016)、SEA が誘導するインスリン抵抗性や II 型糖尿病の発症をポリフェノール類が抑制している可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

我々は、これまでに、植物食品由来のいくつかのポリフェノール類が黄色ブドウ球菌の産生する毒素 SEA と相互作用することにより、その毒素活性を抑制することを明らかにしている。そこで、これまでの成果を踏まえて、本研究では、SEA が誘導する慢性炎症、自己免疫疾患、インスリン抵抗性等の発症に対するポリフェノール類の生物学的機能性を明らかにすることを目的とした。また、SEA が誘導する各種疾病等の生体影響に対するポリフェノール類の制御メカニズムを解明することにより、将来的には、SEA に起因する各種疾病に対する新たな予防法の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) SEA とポリフェノールの相互作用

SEA とカテキン類 ((-)-epicatechin (EC)、(-)-epigallocatechin (EGC)、(-)-epicatechin gallate (ECG)、(-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG)) および EGCG のガロイル基の 3' または 4' 位の水酸基をメチル基で置換した (-)-EGC-3-(3''-O-methyl)gallate (3''-Me-EGCG) および (-)-EGC-3-(4''-O-methyl)gallate (4''-Me-EGCG) を混合し、37°C で 24 時間反応させた後、各試料の SEA との結合親和性の強さを調べた。また、Western blot 解析、表面プラズモン共鳴 (Biacore) および等温滴定型カロリメトリー (ITC) を用いて、カテキン類と SEA との相互作用について解析した。

#### (2) SEA により誘導される毒素活性機構およびポリフェノールによる阻害機構の解明

SEA による JAK/STAT 経路の活性化メカニズムを明らかにすることを目的に、C57BL/6J マウスより脾臓細胞を採取し、細胞に SEA を暴露させた際の Th1/Th2 バランスの変化および JAK/STAT 経路関連遺伝子の発現について、リアルタイム RT-PCR および DNA マイクロアレイを用いて解析した。また、SEA 誘導性 mRNA を制御する microRNA (miRNA) の発現について、miRNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。さらに、SEA 誘導性 JAK/STAT 経路関連遺伝子の発現に対する EGCG の影響を調べた。なお、各動物実験は、静岡県公立大学法人静岡県立大学における動物実験の指針 (承認番号 175160、185185 および 195220) に従い実施した。

#### (3) ポリフェノールによる gp130 と SEA の結合阻害および STAT3 活性化抑制能

マウス脾臓細胞に SEA と EGCG またはメチル化カテキンを加えてインキュベートした後、細胞中のリン酸化 STAT3 の発現量を抗-pSTAT3 抗体を用いた Western blot 法で測定した。さらに、protein thermal shift assay を用いて、EGCG と反応させた SEA と STAT3 を活性化する gp130 受容体との相互作用を解析した。

#### (4) インスリン抵抗性に伴う代謝プロファイル変化に対するポリフェノールの影響

インスリン抵抗性に伴う代謝プロファイルに及ぼすポリフェノールの影響を検討するために、ICR マウスに streptozotocin を投与して糖尿病モデルマウスを作製した。正常マウスおよび糖尿病モデルマウスから脾臓細胞を採取し、各細胞に SEA および EGCG を暴露させ、糖尿病状態時における SEA 誘導性遺伝子の発現変動とそれらに対する EGCG の抑制能について調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) SEA とポリフェノールの相互作用解析

Western blot 解析により、SEA の毒素活性発現部位とカテキンの相互作用を検討した。その結果、相互作用強度は、EGCG > ECG > EC の順であり (図 1 (a))、3''-Me-EGCG では、相互作用が認められなくなった (図 1 (b)) ことから、SEA と EGCG のガロイル基の 3' 位の水酸基が水素結合することが予想された。これらの結果より、カテキンの SEA の毒素活性発現部位との相互作用には、ガロイル基が関与することが示唆された。Biacore により、EGCG と SEA において相互作用が認められた (図 2 (a)、(b)) ことから、ITC を用いて、その相互作用様式を検討した。その結果、SEA と EGCG の相互作用により、発熱反応を生じ、EGCG は、SEA の複数の結合サイトと疎水的相互作用することが示唆された (図 2 (c)、(d))。

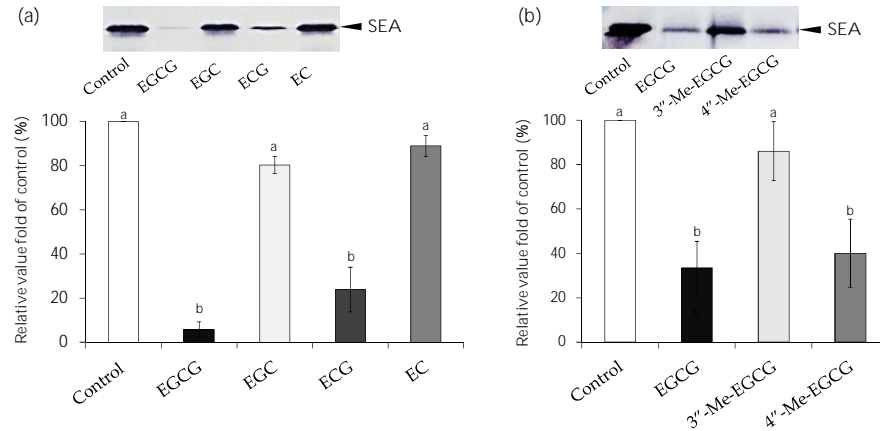


図 1: カテキン類とブドウ球菌エンテロトキシン A (SEA) 間の相互作用強度の比較 (a) 4 種のカテキンと SEA 間の相互作用, (b) EGCG またはメチル化 EGCG と SEA 間の相互作用. 異なるアルファベットの間に有意差あり (Tukey-Kramer 検定,  $p < 0.05$ ).

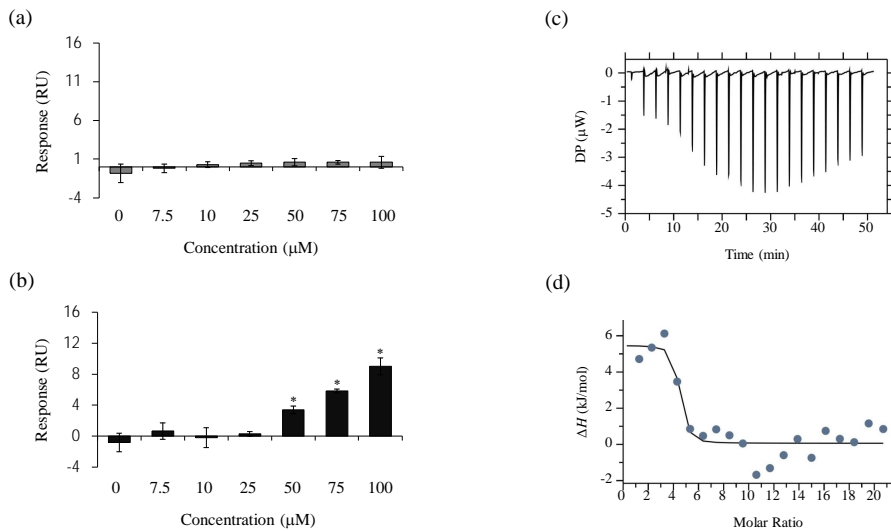


図 2: カテキン類とブドウ球菌エンテロトキシン A (SEA) の分子間相互作用解析 (a) SEA と EC との相互作用, (b) SEA と EGCG との相互作用. \* represents  $p < 0.05$  compared to the control, (c) SEA に EGCG を滴定したときのサーモグラム, (d) 各滴定の発生熱量をセル中のリガンド (EGCG) と標的分子 (SEA) のモル比に対してプロットすることにより得られた結合等温線.

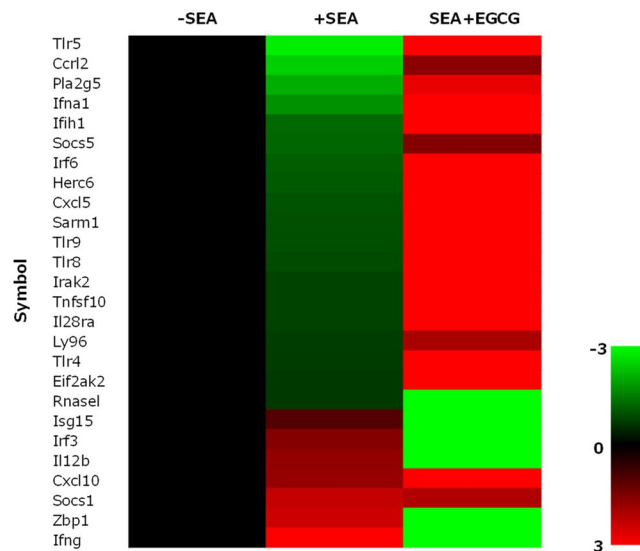


図 3: マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイル解析 SEA 誘導性遺伝子に対する EGCG の効果について, 発現比をヒートマップで表した. 緑は発現比が小さいことを, 赤は発現比が大きいことを示す.

## (2) SEA により誘導される毒素活性およびポリフェノールによる阻害機構の解明

リアルタイム RT-PCR およびマイクロアレイにより、マウス脾臓細胞への SEA の暴露は、Th1 細胞の応答を顕著に誘導した。これに対して、EGCG は、SEA により発現が誘導された炎症のメディエーターやネクロトーシス関連炎症遺伝子 (IL-12p40、ISG15、IRF3、IFN- $\gamma$ 、ZBP1 等) の発現量をダウンレギュレートさせた (図 3)。これらの結果より、EGCG は、SEA によって誘導された Th1 細胞の応答に対して負のフィードバック調節作用を有する可能性が示唆された。また、マウス脾臓細胞に SEA を暴露して、JAK/STAT 経路関連遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR で解析したところ、STAT3 およびその下流シグナル遺伝子である BNIP および SOCS1 の発現量が増加した (図 4)。さらに、SEA の暴露により発現が変動した miRNA について、miRNA ターゲット予測プログラムを用いて解析した結果、SEA の暴露により、23 の miRNA で JAK/STAT 経路の mRNA を調節しており (data not shown)、SEA がこれらの miRNA の発現調節を介して、STAT3 の発現量を増加させたことが予測された。

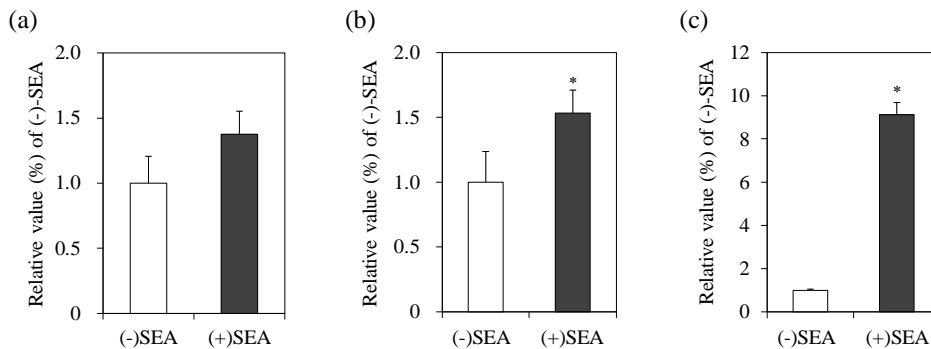


図 4: ブドウ球菌エンテロトキシン A (SEA) が誘導する JAK/STAT 経路関連遺伝子の発現 (a) STAT3 遺伝子, (b) BNIP3 遺伝子, (c) SOCS1 遺伝子. \*represents  $p < 0.05$ .

## (3) ポリフェノールによる STAT3 のリン酸化抑制能

マウス脾臓細胞に SEA を 6 時間暴露した際のリン酸化 STAT3 の発現について検討したところ、リン酸化 STAT3 (Tyr705) は、SEA の濃度依存的に有意に増加した (図 5 (a))。そこで、マウス脾臓細胞における SEA 誘導性リン酸化 STAT3 に対する EGCG の抑制能について検討した。その結果、SEA によって誘導されたリン酸化 STAT3 は、EGCG により有意に抑制された (図 5 (b))。SEA が誘導するリン酸化 STAT3 の抑制に、EGCG の構造内のいずれの水酸基が関与しているかを明らかにするために、メチル化カテキンを用いて検討した。その結果、SEA によって誘導されたリン酸化 STAT3 は、EGCG および 4''-Me-EGCG により抑制された (図 5 (c))。一方、3''-Me-EGCG は、STAT3 のリン酸化を抑制しなかった (図 5 (c)) ことから、EGCG のガロイル基の 3''位の水酸基が SEA 誘導性のリン酸化 STAT3 を抑制していることが示唆された。

## (4) EGCG と反応させた SEA と STAT3 を活性化する gp130 受容体との相互作用解析

Protein thermal shift assay を用いて、EGCG と反応させた SEA と STAT3 を活性化する gp130 受容体との相互作用を解析した。EGCG と反応させた SEA を添加した gp130 の melting temperature ( $T_m$ ) (51.09°C) と比較したところ、SEA のみを添加した gp130 の  $T_m$  (51.96°C) は、高温側にシフトした (protein thermal shift assay では、タンパク質にリガンド (ここでは EGCG) が結合すると構造安定性が増大し、 $T_m$  値は高温側にシフトする; 図 6 (a))。このことから、EGCG が SEA と相互作用することにより、gp130 受容体と SEA の結合が阻害され、STAT3 のリン酸化を抑制することが示唆された (図 6 (b))。

## (5) インスリン抵抗性に伴う代謝プロファイル変化に対するポリフェノールの影響

糖尿病モデルマウスの脾臓細胞に SEA を暴露させたところ、正常マウスに比べて IFN- $\gamma$  の発現量が有意に増加した (図 7 (a))。また、糖尿病モデルマウスの脾臓細胞に SEA と EGCG を暴露させたところ、SEA 誘導性の IFN- $\gamma$  の発現量が有意に抑制された (図 7 (b))。これらの結果より、SEA は、Th1 細胞の応答を顕著に誘導し、特に糖尿病状態時では、SEA に対する感受性が高まることを示唆された。また、EGCG は、正常および糖尿病モデルマウスにおける SEA 誘導性炎症関連遺伝子の発現を抑制した。今後の更なる研究により、病原性細菌と宿主の相互作用に基づく糖尿病悪化のメカニズムおよびポリフェノールを用いた治療への応用が期待される。

### < 引用文献 >

- Banke, E. *et al.*, *Metabolism*, 63(6), 2014, 831-840.
- Vu, Bao G. *et al.*, *MBio*, 6(2), 2015, e02554-14.
- Tresserra-Rimbau, A. *et al.*, *J. Nutr.*, 146(4), 2016, 767-777.

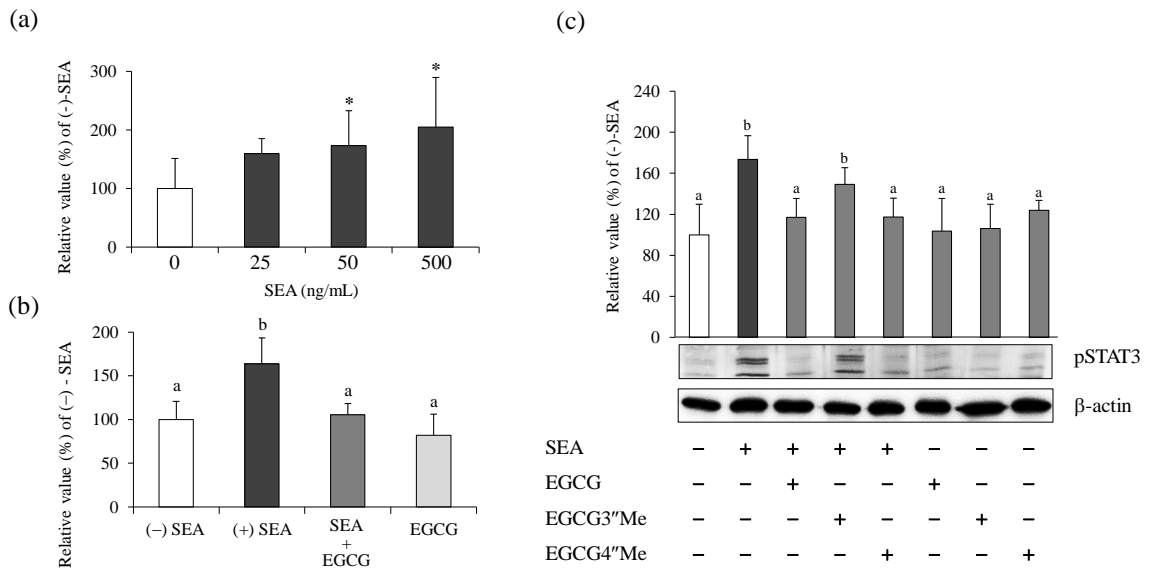


図 5: SEA 誘導 p-STAT3 に対する EGCG の効果  
 (a) SEA による p-STAT3 (Tyrosin705) のリン酸化, (b) SEA 誘導 p-STAT3 に対する EGCG の効果, (c) SEA 誘導 p-STAT3 に対する EGCG およびメチル化 EGCG の抑制効果. グラフは Western blot 解析の結果を数値化したものを示す. \*represents  $p < 0.05$  compared to (-)SEA. Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$  (異なるアルファベット間で有意差あり).

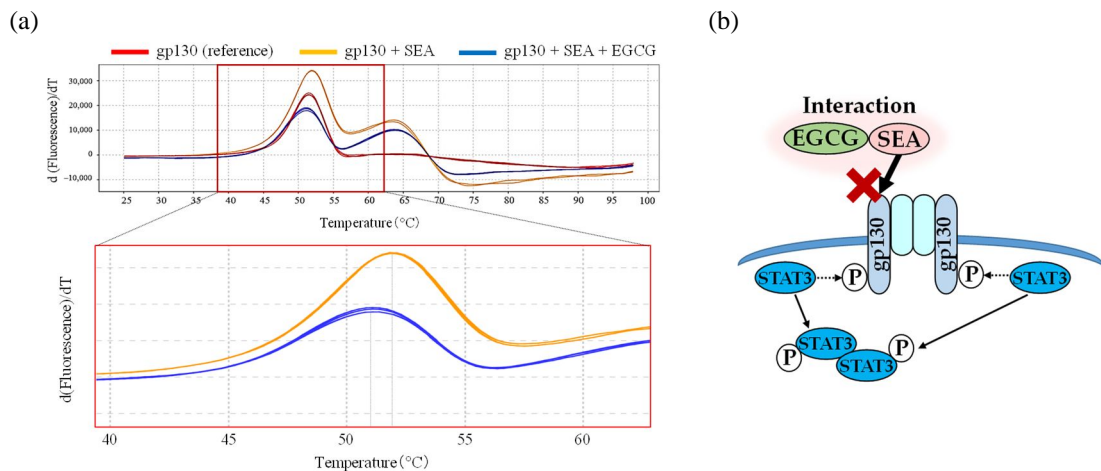


図 6: EGCG と反応させた SEA と gp130 受容体との相互作用解析  
 (a) Protein thermal shift assay における derivative プロット, (b) SEA による STAT3 活性化に対する EGCG の推定制御メカニズム.

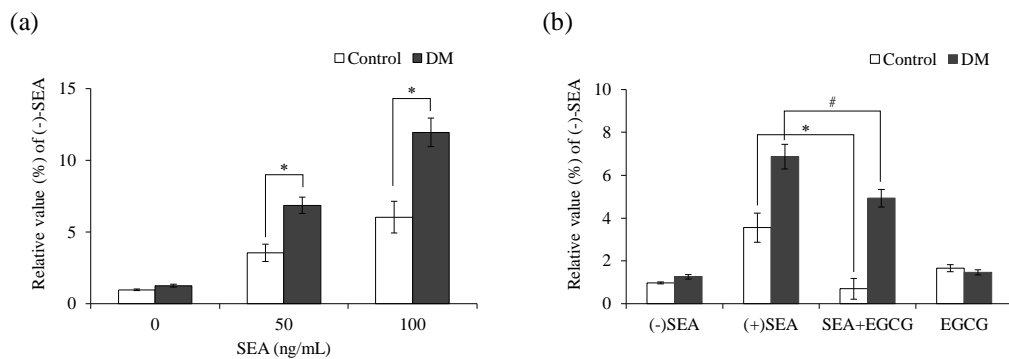


図 7: 糖尿病状態時における SEA 誘導性 IFN- $\gamma$  の発現変動とそれに対する EGCG の抑制能  
 (a) 正常マウス (control) と糖尿病モデルマウス (DM) における SEA 誘導性 IFN- $\gamma$  の発現量の比較, \*represents  $p < 0.05$  compared to control, (b) 正常マウス (control) と糖尿病モデルマウス (DM) における SEA 誘導性 IFN- $\gamma$  の発現に対する EGCG の効果. \*represents  $p < 0.05$  compared to control (+)SEA, #represents  $p < 0.05$  compared to DM (+)SEA.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shimamura Y, Utsumi M, Hirai C, Kurokawa A, Kan T, Ohashi N, Masuda S.	4. 巻 25(8)
2. 論文標題 Effect of (-)-epigallocatechin gallate to staphylococcal enterotoxin A on toxin activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1867
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25081867	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 島村 裕子, 増田 修一	4. 巻 Vol. 224(4)
2. 論文標題 ポリフェノール類による毒素型食中毒抑制メカニズムの解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FFIジャーナル	6. 最初と最後の頁 403-410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11501/3316744	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimamura Y, Utsumi M, Hirai C, Nakano S, Ito S, Tsuji A, Ishii T, Hosoya T, Kan T, Ohashi N, Masuda, S.	4. 巻 23(5)
2. 論文標題 Binding of catechins to staphylococcal enterotoxin A.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules23051125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimamura Y, Hirai C, Sugiyama Y, Shibata M, Ozaki J, Murata M, Ohashi N, Masuda S.	4. 巻 81(12)
2. 論文標題 Inhibitory effects of food additives derived from polyphenols on staphylococcal enterotoxin A production and biofilm formation by Staphylococcus aureus.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem.	6. 最初と最後の頁 2346-2352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2017.1395681	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimamura Y, Hirai C, Sugiyama Y, Utsumi M, Yanagida A, Murata M, Ohashi N, Masuda, S.	4. 巻 9(8)
2. 論文標題 Interaction between various apple procyanidin and staphylococcal enterotoxin A and their inhibitory effects on toxin activity.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins9080243	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計15件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 野秋 理奈, 市川 顕哉, 島村 裕子, 菅 敏幸, 増田 修一
2. 発表標題 免疫応答に及ぼす黄色ブドウ球菌毒素の影響およびカテキン類による制御機構の解明
3. 学会等名 第35回茶学術研究会総会・講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuko Shimamura, Ami Kurokawa, Mio Utsumi, Sohei Ito, Toshiyuki Kan, Shuichi Masuda
2. 発表標題 Effect of catechins on activation of JAK/STAT signaling pathway by staphylococcal enterotoxin A
3. 学会等名 The 9th International Conference on Polyphenols and Health (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野秋 理奈, 黒川 亜美, 島村 裕子, 伊藤 創平, 菅 敏幸, 増田 修一
2. 発表標題 ブドウ球菌毒素によるSTAT転写因子活性化に対するカテキンの制御メカニズムの解析
3. 学会等名 第13回日本ポリフェノール学会・第16回日本カテキン学会合同学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野秋 理奈, 黒川 亜美, 島村 裕子, 伊藤 創平, 菅 敏幸, 増田 修一
2. 発表標題 ブドウ球菌エンテロトキシンAによるJAK/STATシグナル伝達経路の活性化に対するカテキンの抑制効果
3. 学会等名 第8回食品薬学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒川 亜美, 島村 裕子, 伊藤 創平, 菅 敏幸, 大橋 典男, 増田 修一
2. 発表標題 SEAによるJAK/STAT系活性化機構およびカテキン類によるその抑制メカニズムの解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 油井 拓哉, 内海 未央, 島村 裕子, 増田 修一
2. 発表標題 各種化学物質および病原性細菌の同時暴露がそれぞれの毒性変化に及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒川 亜美, 島村 裕子, 伊藤 創平, 菅 敏幸, 増田 修一
2. 発表標題 ブドウ球菌毒素によるJAK/STAT系活性化機構およびカテキン類によるその抑制メカニズムの解析
3. 学会等名 第34回茶学術研究会総会・講演会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 黒川 亜美, 内海 未央, 島村 裕子, 大橋 典男, 増田 修一
2. 発表標題 ブドウ球菌エンテロトキシンA誘導性遺伝子の発現に対するカテキンの制御機構の解明
3. 学会等名 第23回日本フードファクター学会・第12回日本ポリフェノール学会・第15回日本カテキン学会合同学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内海 未央, 島村 裕子, 細谷 孝博, 辻 愛, 石井 剛志, 中野 祥吾, 伊藤 創平, 大橋 典男, 増田 修一
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌の毒素活性発現に対するカテキン類の抑制効果とその作用メカニズムの解明
3. 学会等名 第33回茶学術研究会総会・講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大石 南美, 島村 裕子, 小山 大介, 増田 修一
2. 発表標題 電解次亜水の各種食材に対する殺菌効果と品質への影響
3. 学会等名 平成29年度 日本食品科学工学会 中部支部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 内海 未央, 黒川 亜美, 島村 裕子, 中野 祥吾, 伊藤 創平, 菅 敏幸, 大橋 典男, 増田 修一
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌の毒素活性に対するカテキン類の制御機構の解明
3. 学会等名 第14回 日本カテキン学会年次学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂上 稔典, 平井 央子, 島村 裕子, 田中 弘文, 増田 修一
2. 発表標題 災害時における衛生管理方法に関する研究
3. 学会等名 第113回 日本食品衛生学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 油井 拓哉, 島村 裕子, 大橋 典男, 増田 修一
2. 発表標題 化学物質と細菌性毒素の同時暴露による毒性の変動
3. 学会等名 日本環境変異原学会 第46回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 油井 拓哉, 折原 杏奈, 島村 裕子, 大橋 典男, 増田 修一
2. 発表標題 ブドウ球菌毒素産生株の自己溶菌メカニズムの解明
3. 学会等名 公益社団法人 日本食品科学工学会 第64回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 内海 未央, 平井 央子, 島村 裕子, 伊藤 圭祐, 石井 剛志, 増田 修一
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌の毒素活性に対するカテキン類の制御機構の解明
3. 学会等名 第71回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	増田 修一  (Masuda Shuichi)  (40336657)	静岡県立大学・食品栄養科学部・教授    (23803)	