

令和 4 年 5 月 2 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07067

研究課題名(和文)黄色ブドウ球菌毒素の新機能 - 免疫活性化作用と免疫アレルギー疾患発症増悪への関与 -

研究課題名(英文)The new functions of staphylococcal toxins -The immune activation and the involvement in allergic disorders-

研究代表者

伊藤 佐生智 (Itoh, Saotomo)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・准教授

研究者番号：70308013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：黄色ブドウ球菌とアレルギー発症増悪の関係が指摘されている。本研究では、毒素と Staphylococcal superantigen-like 12(SSL12)という2つの毒素がアレルギー性炎症において役割を果たす、マスト細胞と好塩基球を活性化することを明らかにした。またSSL12のマスト細胞の活性化にかかわる領域の特定も行った。これらの成果は黄色ブドウ球菌の常在とアレルギーの発症増悪の、黄色ブドウ球菌が産生する毒素を介した関係を示すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：機能未知であったSSL12のマスト細胞、好塩基球活性化という新たな生理機能を見出した。また溶血毒素、毒素の新たな生理機能を示した。

社会的意義：わが国の半数の国民が何らかのアレルギーに悩まされている。本研究は黄色ブドウ球菌毒素によるアレルギーの発症増悪のメカニズムの一つをしめすものである。またトキシドワクチンの開発など、細菌毒素を標的としたアレルギーの予防治療法の可能性を提示するものである。

研究成果の概要(英文)：Staphylococcus aureus is though to be associated with allergic disorders. In this study, We showed that two staphylococcal toxins, alpha-hemolysin and Staphylococcal superantigen-like 12 (SSL12) activate the important immune cells in the development of the allergic inflammation, mast cells and basophils. We also identified the responsible amino acid residues of SSL12 for mast cells activation. These results demonstrate the involvement of staphylococcal toxins in the development of allergic disorders.

研究分野：細菌学 免疫学

キーワード：黄色ブドウ球菌 細菌毒素 アレルギー マスト細胞 好塩基球

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌は免疫細胞や分子を標的としその機能をかく乱する多彩なタンパク質毒素を産生する。この中にはいまだ機能が不明なものが存在する。一方、黄色ブドウ球菌はアトピー性皮膚炎患部で高頻度に検出されるなど免疫アレルギー疾患との関係が指摘されている。本菌の産生する毒素が免疫を異常に活性化し、アトピー性皮膚炎のような免疫アレルギー疾患の発症・増悪に関わっている可能性は高い。しかしながらこれまではスーパー抗原以外に免疫を異常に活性化する毒素は見出されていない。疫学的な検討からもスーパー抗原による免疫活性化では本菌と免疫アレルギー疾患の関係は説明できていない。最近、本菌の産生するペプチド性溶血毒素、毒素がマスト細胞を活性化することが報告され、この毒素が本菌によるアトピー性皮膚炎の増悪因子であるという考えが受け入れられている。また私たちは Staphylococcal superantigen-like 12 がマスト細胞の活性化を惹起することを見出している。一方で黄色ブドウ球菌のこれら以外にも数十以上のタンパク質毒素を産生するがこれらが、マスト細胞や他の免疫細胞に対し活性化作用を示すかは示されていない。

2. 研究の目的

本研究では多彩な黄色ブドウ球菌毒素、免疫かく乱タンパク質より、免疫細胞に対し活性化作用を示す毒素を探索する。本研究では特に Type2 炎症反応において重要な免疫細胞である、マスト細胞と好塩基球を活性化する毒素の探索を行う。免疫活性化毒素を同定後は宿主側受容体の特定、毒素側の責任領域の特定を行うことで毒素の免疫活性化メカニズムを明らかにする。免疫アレルギー疾患の発症増悪という黄色ブドウ球菌毒素の新たな病原性を示すことを目的とする。

3. 研究の方法

マスト細胞と好塩基球はマウス骨髄を IL-3 存在下で培養することにより調整した。組み換え黄色ブドウ球菌毒素は大腸菌を宿主とし、組み換え His タグ融合タンパク質として調整した。組み換え毒素の生理活性をマスト細胞の活性化は脱顆粒と IL-6, IL-13 産生を指標として、好塩基球の活性化は IL-4 産生を指標として探索した。これらの細胞を活性化する機能を保持する毒素について、領域の入れ替え、点変異の導入により責任領域を特定した。

4. 研究成果

1) ヘモリジンによるマスト細胞活性化増強作用

まず始めに私たちは既知の黄色ブドウ球菌溶血毒素の組み換え体を調製し、マスト細胞に対する活性化作用、活性化の増強作用の有無を探索した。その結果溶血毒素ヘモリジンがマスト細胞に対し単独での脱顆粒の誘導を引き起こすことなく、イオノフォア、免疫複合体、毒素によって惹起される脱顆粒を増強することを見出した。ヘモリジンは標的細胞上において 7 量体からなる複合体を形成し、Stem 部分を標的細胞膜に嵌入することで膜孔を形成する。今回見出したヘモリジンによるマスト細胞の活性化増強作用は膜孔形成不全型の組み換え毒素では認められず、細胞内外の Na, K イオン組成を入れ替えた緩衝液中でも消失した。このことからヘモリジンは、膜孔を介したイオン流入出を制御することでマスト細胞の活性化増強作用を示すことが明らかになった。今回マスト細胞の活性化増強作用を検討した条件ではヘモリジンは細胞内酵素の漏出を惹起しなかった。今回の研究機関においては毒素による膜孔形成と脱顆粒の増強、細胞障害活性との関係を明らかにすることはできなかった。今後、膜孔形成とこれらの細胞機能への影響について検討を進める予定である。

2) SSL12 による好塩基球からの IL-4 産生誘導作用

好塩基球は血液中での存在比は極めて少ないが(全白血球の 0.5%), 内因性外因性の刺激により、Type 2 炎症反応の進展において重要な役割を果たすサイトカイン IL-4 を多量に産生する、アレルギー性炎症において重要な免疫細胞である。そこで 14 種からなる SSL の好塩基球に対する IL-4 産生誘導作用の有無を検討した、IL-3 存在下で二週間培養した骨髄細胞を各種 SSL で刺激した結果、SSL10, SSL12, SSL14 によって培養上清中の IL-4 の放出が認められた。この細胞集団は好塩基球とマスト細胞様の細胞集団を含む。この細胞集団より表面抗原特異的抗体と時期ビーズを用いて好塩基球を単離してこれらの SSL で刺激したところ、SSL12 によってのみ IL-4 産生が惹起された。以上のことから SSL12 は好塩基球からの IL-4 産生を惹起すること、SSL10 と SSL14 は好塩基球調整の過程で除去された細胞集団からの IL-4 産生を惹起することが示された。続いてマウスから単離した直後の骨髄細胞から T, B, 顆粒球, NK, マクロファージ, 赤血球系特異的な表面抗原に対する抗体と磁気ビーズを用いて好塩基球を濃縮したところ SSL12 刺激による IL-4 産生が認められ、この細胞集団から好塩基球を除去したところ SSL12 刺激による IL-4 産生は消失した。このことから SSL12 はマウス体内に生理的に存在する好塩基球に対して

も IL-4 産生を惹起することが示された。

3) SSL12 によるマスト細胞活性化の責任領域の特定

これまでの研究により SSL12 がマスト細胞と好塩基球の活性化を惹起することを示した。黄色ブドウ球菌が産生する SSL12 を中和するにより黄色ブドウ球菌によるアレルギー性炎症の増悪を抑制できる可能性がある。そこで、免疫原性を保持しつつ、生理活性を示さない SSL12 トキソイドを開発することを試みた。SSL12 とマスト細胞活性化能を示さないアレルの間で領域の入れ替えた変異タンパク質を調製し、マスト細胞の脱顆粒誘導活性を指標に責任アミノ酸の特定を行った結果、マスト細胞の活性化に必須であるアミノ酸残基を特定することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Taniguchi Keiichi, Hayashi Daisuke, Yasuda Naomi, Nakayama Mao, Yazawa Kaori, Ogawa Shouta, Miyatake Yuji, Suda Saki, Tomita Haruka, Tokuda Miki, Itoh Saotomo, Maeyama Jun-ichi, Ohara Naoya, Yamamoto Saburo, Hida Shigeaki, Onozaki Kikuo, Takii Takemasa	4. 巻 6
2. 論文標題 Comparative Study of the Susceptibility to Oxidative Stress between Two Types of Mycobacterium bovis BCG Tokyo 172	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e00111-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mSphere.00111-21	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 Nishiyama Saishi, Urabe Ayaka, Morikawa Arisa, Kobayashi Masato, Onozaki Kikuo, Itoh Saotomo, Hida Shigeaki	4. 巻 532
2. 論文標題 Staphylococcal superantigen-like 12 induces the production of interleukin 4 in murine basophils	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 200 ~ 204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.08.029	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金光東, 占部 彩花, 小林 正都, 北野 拓真, 滝藤 遥希, 緒方 郁奈, 井上 ひかる, 林 知仁, 大矢 進, 肥田 重明, 伊藤 佐生智
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌毒素 SSL12 によるマスト細胞の活性制御
3. 学会等名 フォーラム2020衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北野 拓真, 岸田 啓太郎, 松井 優佳, 瀧 伸介, 伊藤 佐生智, 肥田 重明
2. 発表標題 T 細胞依存的な好塩基球の IgE 抗体反応性増強作用と細胞内シグナル伝達
3. 学会等名 フォーラム2020衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤佑真、藤岡直人、伊藤佐生智、谷口俊一朗、肥田重明
2. 発表標題 ビフィズス菌を用いた新規 DDS の構築と安全性の検討
3. 学会等名 第32回 微生物シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀧井猛将、中山真央、安田直美、山田博之、大原直也、伊藤佐生智、肥田重明、小野寄菊夫
2. 発表標題 結核菌感染ヒト肺線維芽細胞の細胞死の解析
3. 学会等名 第32回 微生物シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷口 恵一、林 大介、安田 直美、中山 真央、伊藤 佐生智、山本 三郎、大原 直也、肥田 重明、小野寄 菊夫、瀧井 猛将
2. 発表標題 結核ワクチン BCG Tokyo 172 のサブタイプ間の酸化ストレス応答の違い
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤 佐生智、西山 彩史、占部 彩花、森川 ありさ、小林 正都、北野 拓真、肥田 重明
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌毒素SSL12によるマスト細胞・好塩基球の活性化
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷口 恵一、林 大介、小川 翔大、宮竹 佑治、安田 直美、中山 真央、伊藤 佐生智、前山 順一、大原 直也、山本 三郎、肥田 重明、小野寄 菊夫、瀧井 猛将
2. 発表標題 結核ワクチンBCG Tokyo172 type Iとtype II間の酸化ストレス応答の違い
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金光東，小林正都，北野拓真，滝藤遥希，林知仁，占部彩花，肥田重明，伊藤佐生智
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌毒素SSL12はマスト細胞を活性化する
3. 学会等名 第31回微生物シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤佐生智，金光東，小林正都，北野拓真，滝藤遥希，林知仁，井上ひかる，占部彩花，大矢進，肥田重明
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌のStaphylococcal superantigen-like (SSL) 12によるマスト細胞活性化作用
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoto Fujioka, Yuma Itoh, Shungo Sasaki, Saotomo Itoh, Shin'Ichiro Taniguchi, Shigeaki Hida
2. 発表標題 Immune modulation by Bifidobacteria-derived molecules
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前原 有紀子, 竹内 亮人, 北野 拓真, 瀧 伸介, 伊藤 佐生智, 肥田 重明
2. 発表標題 自然免疫細胞に対するスタチン系薬剤の影響
3. 学会等名 フォーラム2019衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ドイツ	German Cancer Research Center (DKFZ)		