

平成22年 5月25日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 年度～2009 年度
 課題番号：20790331
 研究課題名 (和文) Panton-Valentineロイコシジンの毒素活性発現メカニ
 ズムの解明
 研究課題名 (英文) Investigation of the cytolytic mechanisms of Panton-Valentine
 leukocidin
 研究代表者 西山晃史 (NISHIYAMA AKIHITO)
 新潟大学・医歯学系・助教
 研究者番号：80452069

研究成果の概要 (和文)：本研究では市中感染型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の産生する病原因子 Panton-Valentine ロイコシジン (PVL) の細胞膜マイクロドメイン lipid rafts 依存的な細胞障害メカニズムを明らかにした。Lipid rafts は PVL の膜孔形成に必須であるが、標的細胞認識に影響せず、従来のガングリオシド GM1 とは異なる新規レセプター分子の存在が示唆された。この、新規レセプターは毒素活性の中和に主眼をおいた創薬ターゲットとなる。

研究成果の概要 (英文)：Panton-Valentine leukocidin (PVL) is a virulence factor of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. We have demonstrated the lipid raft-mediated pore formation of PVL. Since integrity of lipid rafts did not affect on the recognition of target cells by PVL, novel PVL receptor(s), other than ganglioside GM1, is suggested. This receptor molecule may be a possible target of PVL inhibitor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学

キーワード：病原性、市中感染型 MRSA、深部感染

1. 研究開始当初の背景

市中感染型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (市中感染型 MRSA) は薬剤による圧力の少ない市中で感染を繰り返す新しいタイプの MRSA である。主に、病院と接点のない健康な小児や若い運動選手などが感染し、皮膚・軟部組織疾患 (SSTI) を惹起するが、一

部で重症化して致死性の市中肺炎、若年スポーツ選手の再燃性骨盤膿瘍などを引き起こす。しかしながら、市中感染型 MRSA による膿瘍、壊死性疾患等の発症メカニズムは未だ解明されていない。

市中感染型 MRSA は特徴として細胞障害毒素 Panton-Valentine ロイコシジン (PVL; LukS-PV、LukF-PV) を産生する。LukS-PV

および LukF-PV はそれぞれ水溶性モノマーとして菌体外に分泌される。その後、標的細胞（特に、好中球）に結合、細胞膜上で両成分が交互に並ぶ膜孔複合体（6～8量体）を形成し、細胞のネクロシスを誘導する。

PVL は壊死性病変誘導因子として考えられている。一方で、動物モデルでは病原性が証明できていない。壊死性肺炎では 2007 年にマウスモデルと MRSA の PVL ノックアウト変異株を用いた研究で PVL が壊死性病変の主要な誘導因子であることが示された (Labandera-Ray ら、2007)。一方で、敗血症及び皮下膿瘍のマウスモデルでは PVL と病原性の相関が見られなかった (Voyich ら、2006)。以上のような動物実験での混乱は、PVL の動物種に対する特異性に問題があるためと考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではヒトにおける PVL の病原性を証明するため、ヒト好中球に対する細胞障害メカニズムの詳細を明らかにすることを目的とした。特に PVL は lipid rafts に局在する ganglioside GM1 をレセプターとして認識すると考えられているため、lipid rafts の関与に注目した。さらに、血球系および非血球系細胞を用いて、PVL 活性を比較した。

3. 研究の方法

(1) わが国の PVL 産生市中感染型 MRSA の分子疫学

臨床との共同研究により、わが国で分離された市中感染型 MRSA の分子疫学調査を行った。遺伝型 (MLST、*spa* 型、PVL を含めた毒素遺伝子等)、薬剤耐性を試験した。必要に応じて患者の家族の調査も行った。(全ての実験系は新潟大学大学院医歯学総合研究科倫理委員会の承認を得ている。)

(2) MBCD によるヒト好中球からのコレステロールの抽出

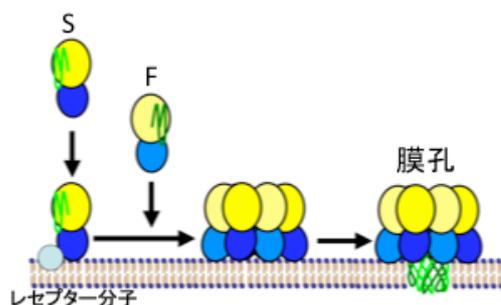


図1. PVLの細胞障害モデル

MBCD は細胞を傷害することなく細胞膜からコレステロール抽出する。コレステロールは lipid rafts を構成する脂質を接着する役割を果たしており、コレステロールを細胞膜から抽出すると、lipid rafts の機能が阻害される。図1に示す PVL の好中球障害活性に対する MBCD 処理の影響を試験した。

(3) Lipid rafts の分画

PVL が実際に lipid rafts に結合しているかどうか試験した。PVL-S はレセプター結合因子であり、PVL-S 単独でヒト好中球に結合する (図1)。一方、PVL-F は PVL-S 非存在下では好中球に結合できない。PVL-S は単独では膜孔を形成しない (PVL-F が必要である) (図1)。

そこで、表1の毒素の条件で反応を行った。

表1. Lipid rafts の分離条件

①	PVL-S, 4°C, 1 h → 洗浄 → 可溶化
②	PVL-S, 4°C, 1 h → 洗浄 → 37°C, 1 h → 可溶化
③	PVL-S, 4°C, 1 h → 洗浄 → PVL-F, 37°C, 1 h → 洗浄 → 可溶化
④	PVL-S, PVL-F, 37°C, 1 h → 洗浄 → 可溶化

PVL (PVL-S, PVL-F) をヒト好中球に作用させた後、細胞を Brij 58 で可溶化した。可溶化した好中球 lysate を 40% sucrose 液にし、遠心チューブに移した。さらに 36% Suc in TBS および 5% Suc を順次重層し、200,000 g, 4°C, 20 時間遠心した。上層から一定量ずつ分画した。

(3) IVIG による PVL の中和

LukS-PV を様々な濃度の IVIG と 37°C 15 分間前処理した後、ヒト好中球の作用させた。

4. 研究成果

(1) わが国の PVL 産生市中感染型 MRSA の分子疫学

臨床との共同研究により継続的に PVL 産生市中感染型 MRSA の分子疫学調査を行っている。その結果、日本国内で日本人の小児から初めて USA300 (ST8) クロームを分離した。北米から世界各地に流行が拡大した USA300 が日本にも侵入したことを証明した。一方、日本で分離した USA300 は一部の遺伝子型 (*spa* 型) と薬剤耐性が北米の代表的な USA300 とは異なっていることも明らか

かにした。

(2) PVL の細胞障害活性発現メカニズム

①MBCD による PVL 活性の阻害

PVL をヒト好中球に 10 nM および 200 nM、2 h で作用させると、それぞれ 89% および 90% の細胞でネクロシスを誘導した。一方、低濃度では IL-8、TNF- α 等のサイトカイン産生を誘導した。

好中球を MBCD (細胞膜コレステロール抽出薬) 処理することにより、PVL による好中球障害活性 (ネクロシス) が MBCD の濃度依存的に阻害された。PVL のヒト好中球への結合は MBCD 処理の影響を受けなかったため、PVL が細胞膜に結合した後のメカニズムに lipid rafts が関与していることが示唆された。

②Lipid rafts 画分からの PVL の分離

表 2 に示した条件で PVL を好中球に作用させ、lipid rafts を分画した。LukS-PV を単独で好中球に作用させると、細胞膜の流動性に関係なく、LukS-PV は lipid rafts から分離された (表 2. ①、②)。一方、LukS-PV が結合した好中球に LukF-PV を作用させると LukS-PV と LukF-PV による膜孔が lipid rafts 画分から分離された。

表 2. 各分画からの PVL の検出

		可溶性画分	Lipid rafts	孔形成
①	LukS-PV, 4°C, 1 h → 洗浄 → 可溶化	+	-	-
②	LukS-PV, 4°C, 1 h → 洗浄 → 37°C, 1 h → 可溶化	+	-	-
③	LukS-PV, 4°C, 1 h → 洗浄 → PVL-F, 37°C, 1 h → 洗浄 → 可溶化	+	+	+
④	LukS-PV, LukF-PV, 37°C, 1 h → 洗浄 → 可溶化	+	+	+

以上の結果から、LukS-PV はまず lipid rafts の周辺の細胞膜結合し、その後 LukS-PV が加わることで lipid rafts に蓄積して膜孔を形成することが考えられた。これまで、スフィンゴ脂質 GM1 や、GM1 に結合するコレラ毒素 B サブユニットによる活性の中和実験から、GM1 が LukS のレセプターであると考えられてきた。GM1 は前述の通り lipid rafts の構成成分である。しかしながら、本研究成果は明らかにこれまでの知見と矛盾している。現在、別の細胞種についても同様の解析を実施している。

(3) IVIG による PVL の中和活性

様々な濃度の IVIG (終濃度 0.08 – 20 mg/ml) 存在下で、精製した PVL または PVL 産生市中感染型 MRSA の培養上清をヒト好中球に添加した。その結果、PVL および培養上清ともに 2 mg/ml 以上 (正常なヒトの血中 IgG 濃度の約 5 倍に相当) の IVIG でヒト好中球障害活性を完全に中和した (図 2)。以上の結果から、IVIG は PVL 産生市中感染型 MRSA 感染の治療に有効である可能性が示唆された。

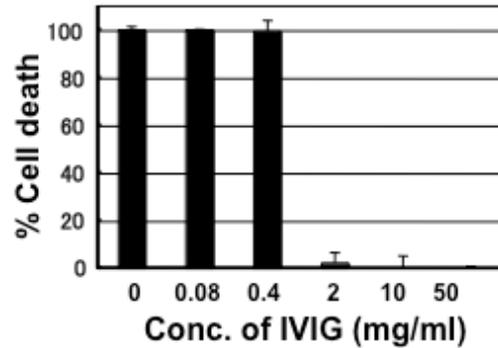


図 2. IVIG による PVL の中和活性

【まとめ・今後の点急展開】

(1) 本研究では lipid rafts を介した PVL の膜孔形成メカニズムを明らかにした。また、それと同時にこれまでの GM1 レセプター説とは矛盾した結果が得られた。本研究と過去のデータを総合すると、PVL-S はまず GM1 以外のレセプター分子を認識して lipid rafts の外側に結合した後、PVL-F との結合をシグナルに、lipid rafts に移動する。このとき GM1 と結合する。つまり、GM1 との結合は標的細胞への結合ではなく、例えば膜孔形成を誘導するためのコンフォメーション変化に関与しているのではないかと考えられる。新規レセプター分子の探索も含め、今後の研究課題である。これらの毒素作用機構の初期段階は毒素活性の中和を主眼においた創薬の標的となる。

(2) 世界的流行を見せている PVL 産生市中感染型 MRSA USA300 クロンのわが国への流入を初めて確認した。海外から流入するクロンは、より病原性が強い可能性があり、十分な監視と対策が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Yamamoto T, Nishiyama A, Takano T,

- Yabe S, Higuchi W, Razvina O, Shi D. 2010. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: community transmission, pathogenesis, and drug resistance. *J. Infect. Chemother.* In press. (Invited review)
2. Yabe S, Higuchi W, Iwao Y, Takano T, Razvina O, Reva I, Nishiyama A, Yamamoto T. 2010. Molecular typing of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from chickens and patients with gastritis or Guillain-Barré syndrome based on multilocus sequence types and pulsed-field gel electrophoresis patterns. *Microbiol. Immunol.* In press. (査読有り)
3. Higuchi W, Mimura S, Kurosawa Y, Takano T, Iwao Y, Yabe S, Razvina O, Nishiyama A, Ikeda-Dantsuji Y, Sakai F, Hanaki H, Yamamoto T. 2010. Emergence of the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone in a Japanese child, demonstrating multiple divergent strains in Japan. *J. Infect. Chemother.* In press. (査読有り)
4. 西山晃史, 高野智洋, 樋口渉, 山本達男: 「ブドウ球菌毒素」2010年、感染制御, Vol. 6 No. 1, p33 – 38. (査読無し)
5. 矢部静, 岩尾泰久, 高野智洋, 西山晃史, 山本達男: 「*Campylobacter jejuni* と *C. coli* の ST 型別 — グローバル分子疫学解析 —」2009年、日本カンピロバクター研究会誌, Vol. 2, p60 – 66. (査読無し)
6. Takano M, Ozaki K, Nitahara Y, Higuchi W, Takano T, Nishiyama A, Yamamoto T. 2009. *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* at the initial stage of influenza. *Pediatr. Int.* 51:687-695. (査読有り)
7. Ozaki K, Takano M, Higuchi W, Takano T, Yabe S, Nitahara Y, Nishiyama A, Yamamoto T. 2009. Genotypes, intrafamilial transmission, and virulence potential of nasal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from children in the community. *J. Infect. Chemother.* 15:84-91. (査読有り)
8. Reva I, Higuchi W, Takano T, Singur O, Ozaki K, Isobe H, Yabe S, Saito K, Baranovich T, Enany S, Otsuka T, Potapov V, Nishiyama A, Yamamoto T. 2009. A rapid screening method for Panton-Valentine leucocidin-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* belonging to multilocus sequence type 30 and its related clone using a combination of multiplex PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Infect. Chemother.* 15:75-83. (査読有り)
9. 山本達男, 西山晃史, 高野智洋, 樋口渉: 「CA-MRSA (PVL 産生株, USA300)」2009年3月、臨床と微生物, Vol. 36 No. 2, p103 – 108. (査読無し)
10. Tsuji S, Yamashita M, Hoffman DR, Nishiyama A, Shinohara T, Ohtsu T, Shibata Y. 2009. Capture of heat-killed *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin by intelectin-1 deposited on cell surfaces. *Glycobiology.* 19:518-526. (査読有り)
11. 山本達男, 西山晃史, 矢部静, 樋口渉: 「*Campylobacter jejuni* の構造」2008年、日本カンピロバクター研究会誌, Vol. 1, p23 – 27. (査読無し)
12. Nishiyama A, Shinohara T, Pantuso T, Tsuji S, Yamashita M, Shinohara S, Myrvik QN, Henriksen RA, Shibata Y. 2008. Depletion of cellular cholesterol enhances macrophage MAPK activation by chitin microparticles but not by heat-killed *Mycobacterium bovis* BCG. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 295:C341-349. (査読有り)
- [学会発表] (計 16 件)
1. 樋口 渉, Ivan Reva, Olga Razvina, 西山晃史, 高野智洋, 山本達男; 「胃癌関連 *Helicobacter pylori* cagPAI が示す特異構造」2010年4月6日、第84回日本感染症学会総会、京都
2. Olga Razvina, 矢部 静, 岩尾泰久, 樋口 渉, 高野智洋, 西山晃史, 山本達男; 「わが国の食中毒起因菌 *Campylobacter jejuni/coli* に関する分子疫学調査」2010年4月6日、第84回日本感染症学会総会、京都
3. 矢部 静, 樋口 渉, 岩尾泰久, 磯辺浩和, 高野智洋, 西山晃史, 山本達男; 「交通機関、公共施設、大学生に於けるメチシリン耐性ブドウ球菌 (MRSA, MRCNS) の分布調査」2010年4月5日、第84回日本感染症学会総会、京都
4. 高野智洋, 矢部 静, 樋口 渉, 岩尾泰久, 西山晃史, 山本達男; 「家族・親族を感染源とした PVL 陽性市中感染型 MRSA の高頻度再感染の実態と予防対策」2010年4月5日、第84回日本感染症学会総会、京都

5. Yabe S, Iwao Y, Higuchi W, Takano T, Nishiyama A, Razvina O, Yamamoto T. Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* – Global molecular epidemiology –. Colera & Other Bacterial Enteric Infections, 44th Annual Joint Panel Meeting of United States-Japan Cooperative Medical Science Program. San Diego, CA, U.S.A., 13th October, 2009.
6. Yamamoto T, Yabe S, Shi D, Higuchi W, Iwao Y, Isobe H, Takano T, Nishiyama A. Unique adherence characteristics of Panton-Valentine leucocidin-positive ST22 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from recurrent and/or multifocal cutaneous abscesses. Abstract (# L1-1672) presented at 49th ICAAC, San Francisco, CA, U.S.A., 15th September, 2009.
7. Yabe S, Higuchi W, Iwao Y, Shi D, Takano T, Nishiyama A, Yamamoto T. Current status of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci carriage in medical students and the transmission backgrounds in Japan. Abstract presented at 49th ICAAC, San Francisco, CA, U.S.A., 15th September, 2009.
8. Shi D, Higuchi W, Iwao Y, Saito K, Yabe S, Takano T, Nishiyama A, Yamamoto T. Two types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated alone or in combination with methicillin-susceptible *S. aureus* from bullous impetigo in Japan. Abstract (# C2-121) presented at 49th ICAAC, San Francisco, CA, U.S.A., 12th September, 2009.
9. Nishiyama A, Yabe S, Higuchi W, Takano T, Yamamoto T. Potent Anti-*Campylobacter jejuni* Activity of Carbapenems and the Mode of Action. Abstract (P-150) presented at 15th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter, and Related Organisms (CHRO2009), Niigata, Japan, 4th September, 2009.
10. Takano T, Higuchi W, Nishiyama A, Yoshida K, Kanda H, Yamamoto T. Potent ability of sitafloxacin (fluoroquinolone) as an anti-*Helicobacter pylori* agent. Abstract (P-172) presented at 15th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter, and Related Organisms (CHRO2009), Niigata, Japan, 4th September, 2009.
11. Higuchi W, Takano T, Nishiyama A, Reva I, Potapov V, Yamamoto T. Types of the *cagA* gene sequence, especially its tyrosine phosphorylation motif, of *Helicobacter pylori* strains from Russia. Abstract (P-136) presented at 15th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter, and Related Organisms (CHRO2009), Niigata, Japan, 4th September, 2009.
12. Reva I, Pererva O, Yabe S, Iwao Y, Higuchi W, Takano T, Nishiyama A, Taneike I, Nakagawa S, Potapov V, Yamamoto T. Molecular epidemiology of *Helicobacter pylori* isolated from Russia. Abstract (O11-5) presented at 15th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter, and Related Organisms (CHRO2009), Niigata, Japan, 4th September, 2009.
13. 矢部静、岩尾泰久、高野智洋、西山晃史、山本達男;「*Campylobacter jejuni* と *C. coli* の ST 型別 —グローバル分子疫学解析—」(シンポジウム) 2009 年 9 月 2 日、第 2 回日本カンピロバクター研究会総会、新潟
14. 岩尾泰久、矢部 静、高野智洋、西山晃史、山本達男;「わが国で分離された *Campylobacter jejuni* の ST 型解析」2009 年 9 月 2 日、第 2 回日本カンピロバクター研究会総会、新潟
15. 矢部静、樋口渉、レワ・イワン、高野智洋、西山晃史、山本達男;「カンピロバクター・ジェジュニの運動性と形態変化」2008 年 12 月 2 日、第 1 回日本カンピロバクター研究会総会、東京
16. 西山晃史、近幸吉、田邊嘉也、下条文武、山本達男;「ホスホマイシンの新しい作用の探索」2008 年 6 月 21 日、第 47 回新潟化学療法研究会、新潟
- [図書] (計 1 件)
1. 西山晃史、高野智洋、樋口渉、山本達男 著:「市中感染型 MRSA」、河野茂 編、医薬ジャーナル社、「MRSA –基礎・臨床・対策-」、2010 年、印刷中。
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 0 件)
- 名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 国内外の別 :

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
()

研究者番号：

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：