

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580387

研究課題名（和文） ブドウ球菌由来表皮剥脱毒素に対する毒素中和抗体の作成

研究課題名（英文） Development of Neutralizing Antibodies against Staphylococcal Exfoliative Toxins

研究代表者

西藤 公司（NISHIFUJI KOJI）

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：20365422

研究成果の概要（和文）：本研究では、黄色ブドウ球菌由来表皮剥脱毒素 B（ETB）の基質特異性を決定する上で重要となる、毒素分子上のアミノ酸配列の決定を試みた。その結果、同配列が ETB 分子上の第 65-232 アミノ酸間に存在することが示唆された。またイヌ膿皮症の起原菌である *S. pseudintermedius* が産生する 2 種の ET が、イヌの表皮細胞間接着蛋白であるデスマoglein 1 を特異的に消化する蛋白であることを初めて証明した。

研究成果の概要（英文）：In this project, we revealed that amino acid motifs critical for substrate specificity of *Staphylococcus aureus* exfoliative toxin B (ETB) may be located between amino acid residues of 65-232. This project also revealed that two *S. pseudintermedius* ETs selectively digest canine desmoglein 1, a cell-cell adhesion molecule in canine epidermis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：感染症、ブドウ球菌、表皮剥脱毒素、デスマoglein、皮膚、膿痂疹、ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群、ブタ滲出性表皮炎

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 膿痂疹はヒトやイヌに発症する代表的な皮膚細菌感染症であり、ブドウ球菌が産生する表皮剥脱毒素（ET）により皮膚に局限した水疱、膿疱およびびらんを認める。ヒトでは膿痂疹の病因となる黄色ブドウ球菌が新生児に感染すると、全身に重度の表皮剥脱を認めてブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群

（SSSS）と呼ばれる病型を示す。またブタの代表的な皮膚感染症であるブタ滲出性表皮炎では、*Staphylococcus hyicus* が産生する ET により全身に重度の表皮剥脱を認める。ヒト SSSS およびブタ滲出性表皮炎では、抗生物質による適切な治療が施されないと致死的な経過をたどることも少なくない。しか

し近年では、ヒト SSSS ならびにブタ滲出性表皮炎の患者から、多剤耐性株のブドウ球菌が分離されたことが報告されつつあった。このことからヒト SSSS およびブタ滲出性表皮炎では、抗生物質の代替となる新規治療薬の開発が急務であると考えられた。

(2) 研究代表者らは過去の研究において、ヒト SSSS の病因となる 3 種の *S. aureus* 由来 ET (ETA, ETB, ETD) が、表皮細胞間接着に重要となるデスマグレイン 1 (Dsg1) を特異的に切断するユニークなセリンプロテアーゼであることを証明した。またブタ滲出性表皮炎の病因となる 4 種の *S. hyicus* 由来 ET (ExhA, ExhB, ExhC, ExhD) が、ブタ Dsg1 の切断能を有することを初めて証明した。さらに表皮剥脱毒素ファミリーが、原則として分離菌の宿主に由来する Dsg1 を特異的に切断することを示した。

これらの事実から、筆者らは ET 分子上に、ET の基質特異性を決定する上で重要となるアミノ酸モチーフが存在すると考えた。そしてこのモチーフを阻害する毒素中和抗体を作成することで、抗生物質の代替となる皮膚感染症の新規治療薬を開発することを着想するに至った。

## 2. 研究の目的

- (1) *S. aureus* ET と *S. hyicus* Exh との間で、アミノ酸残基を置換したキメラ毒素を作製し、ヒト Dsg1 の切断活性に重要となる ET 分子上のアミノ酸配列の決定を試みた。
- (2) イヌ膿皮症の病因となる 2 種の *S. pseudintermedius* 由来 ET が、イヌ Dsg1 の切断活性を有する蛋白かを解析したと共に、イヌ皮膚に膿皮症と同様の臨床病型を再現しうるかを解析した。

## 3. 研究の方法

- (1) *S. aureus* ETB と *S. hyicus* ExhB との間で、アミノ酸残基を置換したキメラ毒素を作製した。そして同毒素が、ヒト Dsg1 を切断しうるかを解析することで、ヒト Dsg1 の切断活性に重要となる ETA 分子上のアミノ酸配列の決定を試みた。
- (2) イヌ膿皮症の起因菌となる *S. Pseudintermedius* が産生する 2 種の ET について組換え蛋白を作製した。そして同蛋白が、イヌ Dsg1 の切断活性を有するかを解析すると共に、イヌに膿皮症と同様の臨床病型を再現しうるかを解析した。

## 4. 研究成果

(1) *S. aureus* ETB の基質特異性に重要となる毒素分子上のアミノ酸配列の同定

*S. aureus* ETB 分子上の第 65-232 アミノ酸を、*S. hyicus* ExhB の相同配列に置換したキメラ毒素を大腸菌の発現系により作成した (図 1A)。ウェスタンブロット法により、大腸菌の破碎物中にキメラ毒素が発現していることが確認された (図 1B)。

続いてキメラ毒素、ETB、ExhB を、バキュロウイルス発現系で作成した組換えヒト Dsg1 および組換えブタ Dsg1 と *in vitro* で反応させ、反応物中における組換え Dsg1 の分子量の変化をウェスタンブロット法により確認した (図 1C)。その結果、キメラ毒素はヒト Dsg1 を消化しなかったが、ブタ Dsg1 は消化した。一方で既報告通り、ETB はヒト Dsg1 およびブタ Dsg1 の両方を、ExhB はブタ Dsg1 のみを消化した。

さらに ETB 分子上の第 65-232 アミノ酸間の部分配列を、ExhB 分子上の相同配列に置換した複数のキメラ毒素の作成を試みたが、いずれも大腸菌の可溶性分画中に発現が認められなかった。

以上の結果より、ETB によるヒト Dsg1 の消化に必要なモチーフは、ETB 分子上の第 65-232 アミノ酸間に存在することが示唆された。ETB 分子の結晶構造解析に関する海外学術雑誌での既報告によると、ET の基質特異性は分子上の N 末端および C 末端に存在する  $\alpha$ -ヘリックス構造により決定される可能性が示唆されていた。しかし本研究の成果は、この仮説を覆すものであった。一方で本研究では ETB の基質特異性を決定するための詳細なアミノ酸モチーフを同定するには至らず、そのため同モチーフを標的とした毒素中和抗体を作成するには至らなかった。今後は毒素分子上のモチーフを再現した組換えペプチドを複数作成し、同ペプチドを用いた阻害実験による詳細なモチーフの決定が重要であると考えられた。

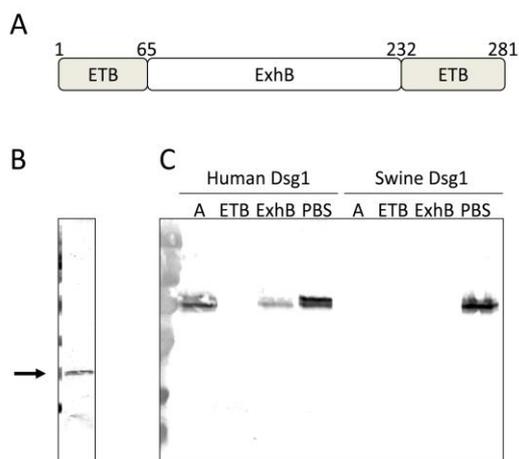


図1. ETB-ExhB キメラ毒素の作成。(A)キメラ毒素の模式図。(B) ウェスタンブロット方により、大腸菌の可溶性分画中にキメラ毒素が確認される。(C) キメラ毒素によるヒトおよびブタ Dsg1 の切断実験。ヒト Dsg1 の分子量は、キメラ毒素(A)および ExhB の存在下では変化しないが、ETB の存在下では Dsg1 が消失している。ブタ Dsg1 は、キメラ毒素、ETB または ExhB のいずれかが存在すると消失する。

(2) イヌ膿皮症の起 因 菌 である *S. pseudintermedius* が産生する ET の標的蛋白の解明

イヌ膿皮症の起 因 菌 である *S. pseudintermedius* が保有する 2 種の ET 遺伝子 (*expa*, *expb*) を PCR 法で単離し、大腸菌の発現系を用いてそれぞれの組換え毒素 (ExpA, ExpB) を作成した。組換え毒素を健康イヌの皮膚に投与したところ、いずれの毒素を投与した部位でも肉眼的に表皮剥脱が認められ、また病理組織学的に表皮顆粒層における角化細胞の離解が認められた (図2)。

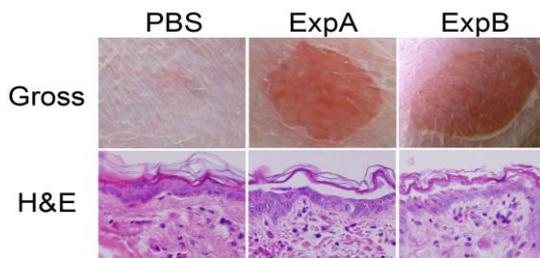


図2. ExpA および ExpB を投与した犬の皮膚における肉眼および病理組織学的所見。いずれの毒素を投与した皮膚でも、肉眼的に表皮剥脱が認められ (上段)、また病理組織学的に表皮顆粒層における角化細胞の離解が認められる。

続いて ExpA および ExpB を投与したイヌの皮膚において、Dsg1 および Dsg3 の発現に影響が及んでいるかを蛍光抗体法により確認した。その結果いずれかの毒素を投与したイヌの皮膚では、Dsg1 の染色性が消失したのに対し、Dsg3 の染色性には影響は認められなかった (図3)。

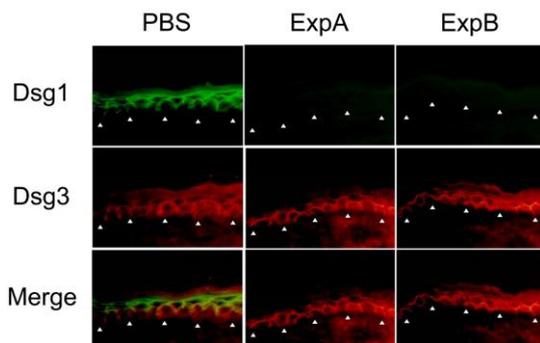


図3. ExpA および ExpB を投与した犬の皮膚にお

ける Dsg1 および Dsg3 の発現解析。いずれの毒素を投与した皮膚でも、Dsg1 の染色性が消失しているのに対し、Dsg3 の染色性には変化が認められない。

さらに ExpA および ExpB がイヌ Dsg1 を直接消化するかを解析するため、バキュロウイルス発現系で作成した組換えイヌ Dsg1 (cDsg1) および Dsg3 (cDsg3) と、各毒素とを *in vitro* で反応させ、組換えイヌ Dsg の分子量の変化をウェスタンブロット法で確認した。その結果、cDsg1 の分子量は ExpA または ExpB の存在下で低下したのに対し、cDsg3 の分子量はいずれの毒素の存在下でも変化しなかった (図4)。またいずれの毒素も、組換えヒト Dsg1 の分子量は変化させなかった (未掲載)。

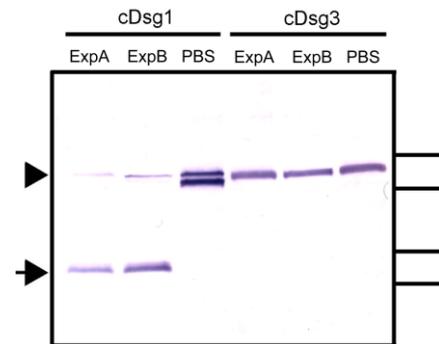


図4. ExpA および ExpB による組換えイヌ Dsg (cDsg) の消化。cDsg1 (矢頭) の分子量が ExpA および ExpB の存在下で低下している (矢印)。一方で cDsg3 の分子量は毒素の存在下で変化しない。

以上の結果は、これまで未知であったイヌ膿皮症の病態を初めて証明するものであるとともに、*S. pseudintermedius* の宿主特異性を決定する要因の一つとなる可能性が示唆された。同様の報告は国内外においても存在しなかったことから、本研究の成果は臨床獣医学分野に対して新しい知見を与えるものであるとともに、同菌種の公衆衛生的意義にも示唆を与えるものであった。今後は *S. pseudintermedius* が ExpA および ExpB 以外にも未知の ET 遺伝子を保有するかを解析すると共に、Exp を蛋白レベルで検出するためのアッセイ系の確率が必要であると考えられた。さらに cDsg1 の切断に重要となる Exp 分子上のアミノ酸モチーフを同定することで、イヌ皮膚感染症の新規治療法および予防法が確立されることが期待された。

## 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 5 件)

- ① Yori K, Futagawa-Saito K, Hisatsune J, Yamamoto M, Sekiguchi M, Ide K, Son WG,

- Olivry T, Sugai M, Fukuyasu T, Iwasaki T, Nishifuji K. Staphylococcus pseudintermedius exfoliative toxin EXI selectively digests canine desmoglein 1 and causes subcorneal clefts in canine epidermis. 査読有. **Vet Dermatol** 査読有. Vol. 22, No. 4, 319-326, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-3164.2011.00952.x.
- ② Iyori K, Hisatsune J, Kawakami T, Shibata S, Murayama N, Ide K, Nagata M, Fukata T, Iwasaki T, Oshima K, Hattori M, Sugai M, Nishifuji K. Identification of a novel Staphylococcus pseudintermedius exfoliative toxin gene and its prevalence in isolates from canines with pyoderma and healthy dogs. 査読有. **FEMS Microbiol Lett** 査読有. Vol. 312, No. 2, 169-175, 2010. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.02113.x.
- ③ Nishifuji K, Shimizu A, Ishiko A, Iwasaki T, Amagai M. Removal of amino-terminal extracellular domains of desmoglein 1 by staphylococcal exfoliative toxin is sufficient to initiate epidermal blister formation. **J Dermatol Sci** 査読有. Vol. 59, No. 3, 184-191, 2010. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092318111000232X>
- ④ Kawakami T, Shibata S, Murayama N, Nagata M, Nishifuji K, Iwasaki T, Fukata T. Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolated from dogs with pyoderma in Japan. **J Vet Med Sci** 査読有. Vol. 72, No. 12, 1615-1619, 2010. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/72/12/72\\_10-0172/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/72/12/72_10-0172/_article)
- ⑤ Ide K, Yamamoto W, Sato M, Yabuzoe A, Iwasaki T, Nishifuji K. Expression analysis of desmosomal components of the novel canine epidermal keratinocyte cell line (MSCEK). **J Vet Med Sci** 査読有. Vol. 72, No. 11, 1479-82, 2010. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/72/11/72\\_10-0089/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/72/11/72_10-0089/_article)
- [学会発表] (計 9 件)
- ① 山本真紀子、久恒順三、伊從慶太、菅井基行、南毅生、西藤公司：皮膚科二次診療施設で分離された *Staphylococcus pseudintermedius* における 3 種の表皮剥脱毒素遺伝子の保有率および毒素活性の比較解析. 第 15 回日本獣医皮膚科学会学術大会. 2012/03/18. 大宮
- ② 伊從慶太、豊田陽一、久恒順三、村山信雄、井手香織、永田雅彦、岩崎利郎、菅井基行、西藤公司：一次診療施設にて表在性膿皮症と診断された犬由来の *Staphylococcus pseudintermedius* における表皮剥脱毒素遺伝子の保有状況. 第 15 回日本獣医皮膚科学会学術大会. 2012/03/18. 大宮
- ③ 久恒順三、平川英樹、伊從慶太、西藤公司、大島健志郎、服部正平、菅井基行：犬膿皮症由来 *Staphylococcus pseudintermedius* 表皮剥脱毒素 ExpB 産生株の全ゲノム配列解析. 第 6 回日本ゲノム微生物学会年会. 2012/03/10. 東京
- ④ 西藤公司：犬の膿皮症における抗菌薬耐性菌の現状と考えられる対策. 第 31 回動物臨床医学会年次大会. 2010/11/20. 大阪
- ⑤ Iyori K, Futagawa-Saito K, Hisatsune J, Yamamoto M, Sekiguchi M, Ide K, Iwasaki T, Sugai M, Fukuyasu T, Nishifuji K： *Staphylococcus pseudintermedius* exfoliative toxins selectively digest canine desmoglein 1 and cause intraepidermal blisters in canine skin. North American Veterinary Dermatology Forum 2010. 2010/04/15. Portland, USA
- ⑥ 川上哲司、柴田早苗、林玲子、深町綾、村山信雄、永田雅彦、西藤公司、岩崎利郎、深田恒夫：膿皮症由来 *Staphylococcus pseudintermedius* における多剤耐性およびメチシリン耐性状況. 第 13 回日本獣医皮膚科学会学術大会. 2010/03/14. 東京
- ⑦ 西藤公司：深在性膿皮症 JSVIM/JSVCP 2010 年大会. 2010/02/13. 東京
- ⑧ 西藤公司：膿皮症の病態・診断・治療. 平成 21 年度日本獣医師会. 学会年次大会 2010/01/29. 宮崎
- ⑨ 川上哲司、野並崇志、林玲子、柴田早苗、村山信雄、永田雅彦、西藤公司、岩崎利郎、深田恒夫：膿皮症のイヌから分離した *Staphylococcus intermedius* group の抗菌薬耐性保有率. 第 147 回日本獣医学学会学術集会. 2009/04/02. 宇都宮
- [その他]  
ホームページ等  
<http://kenkyu-web.tuat.ac.jp/Profiles/15/0001474/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西藤 公司 (NISHIFUJI KOJI)  
東京農工大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号：20365422

(2) 研究分担者

岩崎 利郎 (IWASAKI TOSHIROH)  
東京農工大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：50262754

(3) 連携研究者

菅井 基行 (SUGAI MOTOYUKI)  
広島大学・医歯（薬）学総合研究科・教授  
研究者番号：10201568