

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591646

研究課題名(和文) 皮膚におけるパントンバレンタインロイコシジンの発現機構と病態形成の解明

研究課題名(英文) Investigation of expression regulation and pathological mechanism of Panton-valentine leukocidine in skin

研究代表者

山崎 修 (Yamasaki, Osamu)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：90294462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：パントンバレンタインロイコシジン(PVL)は黄色ブドウ球菌が産生する好中球により特異性の高い毒素で、PVL陽性の黄色ブドウ球菌はおできや市中肺炎に強く関連する。我々はPVL陽性のおできの特徴は基礎疾患のない若年者に多く、多発性で発赤が強いことを明らかにした。しかしながら、せつ腫症におけるPVLの役割は明らかではない。我々はPVLの毒素産生制御因子を解析し、PVLのケラチノサイト、線維化細胞、血管内皮細胞に与える影響について検討した。さらにせつ腫症におけるPVL変換ファージの多様性について調査した。

研究成果の概要(英文)：Panton-Valentine leukocidin (PVL) is a cytotoxin produced by *Staphylococcus aureus*, PVL exhibits very highly specific lytic activity against polymorphonuclear cells of human and rabbits. PVL gene-positive *S. aureus* is strongly associated with furunculosis and community-acquired necrotic pneumonia. We demonstrated PVL gene-positive *S. aureus* strains are involved in the development of multiple furuncles with more intense erythema, particularly in healthy young adults. However, the role of PVL in the development of furunculosis has not been fully elucidated. We analyzed regulatory factors of PVL toxin production and of the influence of PVL on keratinocytes, fibroblasts and endothelial cells. In addition, we investigated about PVL-carrying phage type in furunculosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：パントンバレンタインロイコシジン 皮膚細菌感染症 せつ 好中球 黄色ブドウ球菌

1. 研究開始当初の背景

(1) パントンバレンタイン型ロイコシジン (PVL) は黄色ブドウ球菌より産生される他のロイコシジンと比較し白血球に対してより高い特異性を示す毒素で、深在性皮膚感染症や市中肺炎では高率に検出される。2002年にPVL陽性とPVL陰性のブドウ球菌性市中肺炎の臨床的特徴を比較し、PVL陽性の場合、より重篤で致死的な壊死性肺炎が多いことが報告された。その後、欧米で蔓延した重篤な市中感染型(CA)-MRSAがPVL陽性のクローンが多かったため、その脅威がクローズアップされた一方で関連する動物実験においてCA-MRSAの病原性が全てPVLの強毒素によるものかどうか疑問視され始めた。さらにCA-MRSAの主要な病原因子は好中球の溶解や炎症の活性化を惹起するフェノール可溶性モジュリン(PSM)という低分子ペプチドであるとの報告もなされた。

(2) 我々は皮膚感染症においてPVL遺伝子陽性黄色ブドウ球菌はせつ・癩など深在性皮膚感染症では高率に検出され、その臨床的特徴は基礎疾患のない若年者に多く、発赤が強く、多発しやすいことを明らかにした。CA-MRSAの主要な病原因子であるかどうかは別として、PVL遺伝子の疫学的な偏りを重視して、皮膚の深在性の壊死性病変には強く関連していると考えている。さらに新規のPSMについてはほとんど研究されていない。

(3) PVLをウサギ皮膚に接種すると、普通のロイコシジンよりも発赤の強いせつ類似の病変を生じ、組織学的には好中球破壊と周囲の壊死像を認めた。この動物実験と我々の臨床的観察からは実際に病変部でも毒素が

発現していることが予想されるが、発現は確認されておらず、発現機構も不明である。

(4) PVLやPSMは好中球を崩壊させることは分かっている、動物実験の系でも壊死の範囲や致死率を指標としているが、実際には好中球以外の炎症細胞、ケラチノサイトや血管内皮細胞、さらに抗菌ペプチドなどが複雑に関与して壊死が生じていると推測している。さらに危惧されている皮膚病変から壊死性肺炎、敗血症などの全身感染症への進展や合併などについては疫学的にも不明なところが多い。

2. 研究の目的

黄色ブドウ球菌より産生されるPVLやPSMの皮膚病変部での発現機構と病態形成を解明し、侵襲性の全身性感染症との関係について調査する。

3. 研究の方法

(1) PVL、PSM毒素発現機構について、高発現株と動物モデルを使用して発現制御因子を決定する。

(2) PVL、PSMによる好中球以外の細胞への影響を培養細胞(単球、マクロファージ、ケラチノサイト、血管内皮細胞)を用い検討する。

(3) PVL、PSMのELISAシステムを構築し、臨床応用について検討する。

(4) 壊死性肺炎のなど全身性疾患への進展についての疫学調査を行う。

4. 研究成果

(1) 黄色ブドウ球菌のグローバルな毒素制御因子であるAgr、SigB、SarA遺伝子欠損株を作製し、*In vitro*ではSigB制御遺伝子を欠損させることで、PVL産生が高く、PVL産生の制御に関与していることが示唆された。しかしながら動物実験では、高発現株、標準株、陰性株と有意な差は認めず、実際の発現には特別な環境が必要であると考えた。

(2) ケラチノサイト、培養線維芽細胞、血管内皮細胞を使用し、PVL 毒素を暴露させ、IL-8 の産生について ELISA、RT-PCR で測定した。

PVL の線維芽細胞に与える影響

IL-8 の産生について 8h では有意差はなく、24h では LukF-PV、LukS-PV とともに control よりも有意に高かったが、ELISA では各群に有意差はなかった。

PVL のケラチノサイトに与える影響

IL-8 の産生について 8h で LukF-PV、LukS-PV とともに control よりも有意に高く、さらに LukF-PV+LukS-PV で相加作用が認められた。

PVL の血管内皮細胞に与える影響

IL-8 の産生について 8h で LukF-PV で control よりも有意に高く、さらに LukF-PV+LukS-PV で相加作用が認められた。ELISA では相加作用は認めなかった。

(3) PVL 産生黄色ブドウ球菌によるせつ腫症の組織学的検討した。PVL 産生黄色ブドウ球菌による皮膚感染症の臨床像が予想できるので、生検により組織学的検討を行うことが可能である。PVL 産生黄色ブドウ球菌によるせつ腫症の病理組織好中球浸潤が著明で毛包部の破壊や周囲の血管の壊死像が認められた。

(4) せつやせつ腫症由来の PVL 産生黄色ブドウ球菌について、ファージを誘発して、新たに分離された PVL 保有ファージのゲノムについてサザンハイブリダイゼーション及び部分的なシーケンスを解析し、既知の PVL 変換ファージと比較した。ファージのタイプを検討したが、多様性があり、臨床型とは関連しなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計30件)

Kamiya K, Yamasaki O, Tachikawa S, Iwatsuki K. A case of localized

cutaneous argyria in a silversmith. Eur J Dermatol 23(1):112-3, 2013. 査読有

Yamasaki O, Shibata H, Suzuki N, Ikeda K, Takeshima C, Otsuka M, Aoyama Y, Iwatsuki K. Granulocyte colony-stimulating factor-producing squamous cell carcinoma of the skin associated with epithelial-mesenchymal transition. Eur J Dermatol 23(3) 413-414, 2013. 査読有

Yamasaki O, Nagao Y, Sugiyama N, Otsuka M, Iwatsuki K. Surgical management of axillary necrotizing fasciitis: A case report. J Dermatol 2012; 39(3): 309-311. 査読有

Yamamoto T, Hirai Y, Miyake T, Yamasaki O, Morizane S, Iwatsuki K. Oculomucosal and gastrointestinal involvement in Epstein-Barr virus-associated hydroa vacciniforme. Eur J Dermatol 2012 22(3):380-3. 査読有

Yamasaki O, Takeshima C, Ikeda K, Suzuki N, Otsuka M, Kimata Y, Hirakawa S, Iwatsuki K. Stewart-Treves syndrome arising in patients with lymphaticovenular anastomosis for chronic lymphedema of the leg. Eur J Dermatol 22(4):545-6, 2012. 査読有

Miyake T, Yamasaki O, Sugiu M, Hamada T, Otsuka T, Yanai H, Morishita Y, Iwatsuki K. Primary signet-ring cell/histiocytoid carcinoma of the axilla expressing human epidermal growth factor receptor 2. J Dermatol: 39(12):1038-40, 2012. 査読有

Chen W, Obermayer-Pietsch B, Hong JB, Melnik BC, Yamasaki O, Dessinioti C, Ju Q, Liakou AI, Al-Khuzaei S, Katsambas A, Ring J, Zouboulis CC. Acne-associated syndromes: models for better understanding of acne pathogenesis. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2011 ;25(6):637-46. 査読有 Yamasaki O, Manabe K, Morimoto A, Iwatsuki K. Pustular erythema toxicum neonatorum in two siblings born to a mother with group B streptococcus colonization. Eur J Dermatol. 2011 ;21(2):271-2. 査読有 Yamasaki O, Morizane S, Aochi S, Ogawa K, Iwatsuki K. Granulysin-producing cytotoxic T cells in the mucocutaneous lesions of Behçet's disease: A distinct inflammatory response from erythema nodosum. Clin Exp Dermatol 2011, 36(8):903-7. 査読有

[学会発表](計 50件)

山崎修 . 市中感染型 MRSA 皮膚感染症における Panton-Valentine 型ロイコジンの伝播様式と治療戦略 . 難治性感染症を標的とした創薬研究教育推進事業平成 24 年度成果報告会 2013.2.8 岡山 Takiuchi M, Yamasaki O, Morizane S, Iwatsuki K. The role of Panton-Valentine leukocidin toxin in the pathogenesis of furunculosis. MRI, ART, ITP 国際シンポジウム. 2012.1.28-29, 牛窓 Yamasaki O, Tsuji K, Suzuki N, Suzuki D, Iwatsuki K. Staphylococcal enterotoxin B and lipopolysaccharide induced toxic shock syndrome in a case of burn patient. 15th International

Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections (ISSSI). In Lyon 2012, 8.26-30.

Yamasaki O, Hashimoto T, Nagao Y, Sugiyama N, Otsuka M, Iwatsuki K. Surgical management of axillary necrotizing fasciitis: A case report. 32nd Annual Congress of the International Society for Dermatologic Surgery (ISDS) 2011. 9 22-24, Heidelberg.

[図書](計24件)

山崎修 . 抗菌薬の正しい使い方 . 皮膚疾患最新の治療 . 2013-2014 . 南江堂, 東京, p5-9, 2013.

山崎修 . せつ . 「今日の臨床サポート」 <http://clinicalsup.jp/> Elsevier 2013.3

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山崎 修 (YAMASAKI OSAMU)
岡山大学・大学病院・講師
研究者番号 : 90294462

(2)研究分担者

森実真 (MORIZANE SHIN)
岡山大学・大学病院・助教
研究者番号 : 80423333

(3)連携研究者

金子淳 (KANEKO JUN)
東北大学・農学研究科・准教授
研究者番号 : 30221188