

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860808

研究課題名(和文)高IgE症候群モデルマウスを用いた黄色ブドウ球菌易感染性メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms of the susceptibility to staphylococcal infection in a mouse model of Hyper-IgE syndrome

研究代表者

和田 剛 (WADA, Takeshi)

徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・特任助教

研究者番号：80583418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：高IgE症候群患者の特徴である黄色ブドウ球菌に対する易感染性の原因を解明する為に、高IgE症候群モデルマウスを作製した。このマウスを解析したところ、野生型マウスに比べて黄色ブドウ球菌接種部位での好中球遊走因子の産生低下と、それに伴う好中球浸潤数の減少が観察されるとともに、CD3+TCR<sup>+</sup>細胞とCD3+CD4+細胞からのIL-17A産生低下が見られた。黄色ブドウ球菌に対する感染防御に好中球ならびにIL-17Aが重要な役割を果たしていることから、これらのことが高IgE症候群患者での黄色ブドウ球菌に対する易感染性に関与している可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：To investigate the molecular mechanism underlying the susceptibility to *S. aureus* infection in patients of Hyper-IgE syndrome (HIES), we established a mouse model of HIES. We found that recruitment of neutrophils and production of chemoattractants were impaired in the skin lesions of these mice infected with *S. aureus*. Furthermore, production of IL-17A by CD3+TCR<sup>+</sup> cells and CD3+CD4<sup>+</sup> cells were also decreased compared to WT mice. Since it has been reported that neutrophil and IL-17A are essential for elimination of *S. aureus*, impaired neutrophil response and IL-17A production might lead to the susceptibility to staphylococcal infection in HIES.

研究分野：免疫学

キーワード：高IgE症候群 黄色ブドウ球菌

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの免疫不全症である高 IgE 症候群は、50 年以上前にすでに報告されていたが、その原因ならびに病気の発症メカニズムは全く不明であった。しかし、2007 年に当研究室が世界に先駆けて、高 IgE 症候群の責任遺伝子として STAT3 を同定し、STAT3 のドミナントネガティブ(DN)変異がその主要な原因であることを見いだした (Minegishi ら, *Nature*, 2007)。

高 IgE 症候群は、黄色ブドウ球菌に対して易感染性を示し、黄色ブドウ球菌の反復感染が皮膚と肺に限局して起きる事が特徴として挙げられるが、その原因は完全には解明されていない。これまでに高 IgE 症候群の患者において、Th17 細胞の分化が障害されている (Milner ら, *Nature*, 2008) ことが報告されている。また、当研究室では、皮膚に存在する上皮細胞や気管支上皮細胞は、*in vitro* において、Th17 サイトカイン依存的に黄色ブドウ球菌抵抗物質を産生していることを報告しており (Minegishi ら, *J. Exp. Med.*, 2009) これらのことから高 IgE 症候群では皮膚や肺に黄色ブドウ球菌感染症が選択的に起こる可能性が考えられる。しかし、これらの *in vitro* の検討では、黄色ブドウ球菌感染局所の免疫応答をすべて再現することは出来ず、Th17 細胞の機能障害が黄色ブドウ球菌感染症を実際に引き起こしているかどうかは明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究では、当研究室で樹立した STAT3 の DN 変異体を全身に発現する高 IgE 症候群モデルマウス(以下、STAT3-DN マウスと表記)を用いて黄色ブドウ球菌の感染実験を行い、STAT3 の DN 変異がどのようにして、高 IgE 症候群患者でみられる黄色ブドウ球菌に対する易感染性を引き起こすのか、その原因を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

野生型(WT)マウス、STAT3-DN マウスの背中を剃毛後、オートクレーブテープにより tape stripping を 5 回繰り返す、黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus*, 表皮ブドウ球菌 *S. epidermidis*, 化膿連鎖球菌 *Streptococcus pyogenes* を接種した。接種部皮膚に形成される病変の肉眼的大きさを計測後、病変部のホモジネート液を作製し、培地にまき生菌数を求めた。さらに、病変部の切片を作製し Hematoxylin & Eosin 染色を行った。また、フローサイトメーターを用いて病変部に局在する細胞の解析ならびにリアルタイム PCR 法を用いて細胞誘引因子 (Cxcl1, Cxcl2) 発現量について測定した。黄色ブドウ球菌に対する易感染性に関わる責任細胞の同定を試みるために、ケラチノサイト特異的、または好中球特異的 Stat3-DN 発現マウスに前述の方法で *S. aureus* を接種した。

## 4. 研究成果

WT マウス、STAT3-DN マウスの皮膚に *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* を接種し、接種部皮膚に形成される病変の肉眼的大きさを計測し、さらに皮膚ホモジネート液を作製後、培地にまき、生えてくるコロニー数を計測した。その結果、*S. epidermidis* または *S. pyogenes* 接種時には、病変の大きさ、検出菌数ともに、WT マウスと STAT3-DN マウスとの間で有意差は認められなかったが、*S. aureus* 接種時には、STAT3-DN マウスにおいて、WT マウスと比較して病変部の増大が見られ、接種 7 日後の接種部位での検出菌数の増加がみられた (図 1)。

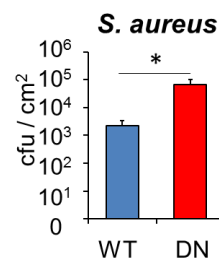


図1 接種7日後の黄色ブドウ球菌検出菌数

また、*S. aureus* 接種部の皮膚切片を HE 染

色で観察したところ、WT マウスに比べて STAT3-DN マウスでは細胞浸潤が弱く、フローサイトメトリーを用いた解析により、好中球の *S. aureus* 感染部位への浸潤が WT マウスに比べて、STAT3-DN マウスでは弱いことがわかった (図2)。

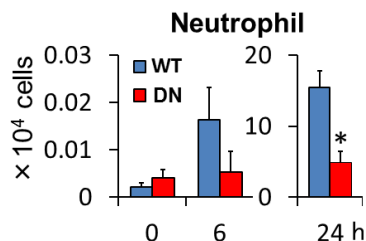


図2 感染部位における好中球数

*S. aureus* 感染部位の皮膚での好中球遊走因子 CXCL1、CXCL2 の発現を、時間を追って解析したところ、WT マウスに比べて、STAT3-DN マウスでは、発現量の低下が観察された。さらに、黄色ブドウ球菌排除に重要とされている IL-17 の産生について解析を行った。*S. aureus* 接種3日後の皮膚を採取し、CD3<sup>+</sup>TCR<sup>+</sup>細胞と CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞における IL-17A の産生をフローサイトメトリーを用いて解析を行ったところ、STAT3-DN マウスでは WT マウスに比べて IL-17A の産生が両細胞で低下していることが分かった (図3)。

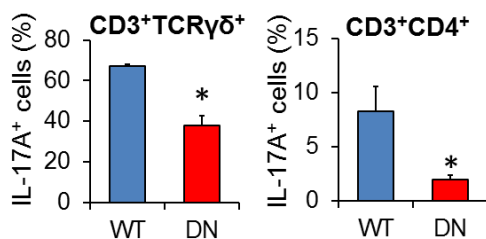


図3 CD3<sup>+</sup>TCR<sup>+</sup>γδ<sup>+</sup>細胞とCD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞におけるIL-17A産生の割合

*S. aureus* に対する易感染性が成立するためには、全身に STAT3 の DN 変異体が発現する必要があるのか、それとも特定の細胞に発現すれば病態が成立するのかを解析するために、好中球特異的、またはケラチノサイト特異的 STAT3-DN マウスに *S. aureus* を接種した。好中球特異的、またはケラチノサイト

特異的 STAT3-DN マウスは、両者とも WT マウスと比較して、感染病巣の増大は見られず、また接種7日後の接種部位での検出菌数の増加も認められなかった。

#### 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)

[学会発表](計 4 件)

Takeshi Wada, Exacerbation of oxazolone-induced atopic dermatitis in mouse model of hyper-IgE syndrome, The 5<sup>th</sup> Bizan Immunology Symposium at Tokushima University, 2016.3.4, 徳島大学(徳島県徳島市)

Takeshi Wada, Yumiko Nishikawa, Yoshiyuki Minegishi, Hyper-IgE syndrome model mice exhibit the susceptibility to *Staphylococcus aureus* infection, The 44<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2015.11.20, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Yumiko Nishikawa, Takeshi Wada and Yoshiyuki Minegishi, Dysregulation of T cell-dependent antibody response in a murine model of hyper IgE syndrome, The 44<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2015.11.20, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Takeshi Wada, Masako Saito, Yumiko Nishikawa and Yoshiyuki Minegishi, Analysis of the mechanisms of the susceptibility to staphylococcal infection in a mouse model of Hyper-IgE syndrome, The 43rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2014.12.12, 京都国際会議場(京都府京都市)

[図書](計 0 件)

[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  
徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター  
病態プロテオゲノム分野 HP  
<http://www.genome.tokushima-u.ac.jp/dmm/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

和田 剛 (WADA, Takeshi)  
徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・特任助教  
研究者番号：80583418

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし