

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19174

研究課題名（和文）黄色ブドウ球菌が乳腺上皮細胞に寄生して感染防御バリアを脆弱化させる機構の解明

研究課題名（英文）Staphylococcus aureus parasitizes mammary epithelial cells to weaken the infection defense barrier.

研究代表者

小林 謙（Kobayashi, Ken）

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：30449003

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：泌乳期の乳腺上皮細胞は抗菌成分の分泌とタイトジャンクション（TJ）の形成を行い、微生物感染を防いでいる。しかし、黄色ブドウ球菌は細胞内寄生菌であり、その乳房炎は難治性である。本研究では、乳腺上皮細胞の細胞膜とアクチン線維、および細胞内寄生菌を蛍光標識し、細胞内寄生菌が乳腺上皮細胞に寄生する様子を観察した。その結果、細胞内寄生菌は細胞膜に包まれた状態で細胞内に侵入すること、細胞内寄生菌は細胞接着機構が不十分な乳腺上皮細胞に対して選択的に寄生することが示唆された。また、黄色ブドウ球菌由来のリポテイコ酸が細胞外から乳腺上皮細胞のTJバリアの脆弱化と乳成分産生能力の変化を引き起こすこともわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳牛の乳生産は乳房炎の発症によって著しく低下する。黄色ブドウ球菌は乳房炎起炎菌の一つであり、細胞内寄生菌でもある。また、黄色ブドウ球菌による乳房炎は難治性であることが知られている。従来、黄色ブドウ球菌の乳房炎治療に関する研究は細菌レベル、ウシ個体レベルで抗生物質を中心に行われてきた。しかし、本研究の結果、黄色ブドウ球菌などの細胞内寄生菌は細胞内と細胞外の両面から乳腺上皮細胞に作用し、感染拡大を進めている可能性が示された。今後、本研究の成果から得られた知見に基づき、黄色ブドウ球菌の感染拡大過程を明らかにすることによって、その過程を防ぐことによる効果的な治療法が導き出されると判断される。

研究成果の概要（英文）：Mammary epithelial cells (MECs) prevent microbial infection by secreting antimicrobial components and forming tight junctions (TJs) during lactation. However, Staphylococcus aureus is an intracellular parasite whose mastitis is intractable. In this study, we fluorescently labeled the cell membranes and actin fibers in MECs, which produce antimicrobial components and form TJs, and the cell wall in intracellular parasites for investigating how intracellular parasites parasitize MECs in vitro. The results showed that the intracellular parasites invade MECs while wrapped in the cell membrane and that the intracellular parasites selectively parasitize MECs with inadequate cell adhesion structures. We also found that lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus causes weakening the TJ barrier and alteration of the milk production ability in MECs in vitro.

研究分野：乳腺の細胞生理学

キーワード：乳腺上皮細胞 細胞内寄生 黄色ブドウ球菌 乳産生 タイトジャンクション

## 1. 研究開始当初の背景

泌乳期の乳腺上皮細胞はカゼイン、乳糖、乳脂質などの主要乳成分とともに抗菌成分を分泌し、乳腺内部の微生物感染を生化学的に防いでいる。また、泌乳期の乳腺上皮細胞は細胞間隙にタイトジャンクション (TJ) を形成し、微生物が上皮層を超えて体内に侵入することを物理的に防いでいる。すなわち、乳腺上皮細胞は多面的に微生物感染を防ぐ役割を担っているといえる。しかし、乳腺上皮細胞は温度、浸透圧、膨張圧、内因性・外因性の生理活性物質などの物理化学的な刺激によって容易に性状変化する細胞でもある。乳房炎起炎菌の黄色ブドウ菌も乳腺上皮細胞の性状変化を引き起こす要因の一つであり、黄色ブドウ球菌に感染した乳牛では、慢性的な炎症と乳産低下が誘導される。さらに、黄色ブドウ球菌による乳房炎は難治性であり、抗生物質の投与による治療効果が低いことも知られている。しかし、黄色ブドウ球菌がどのような機序で乳腺上皮細胞に負の作用を及ぼし、難治性の乳房炎を引き起こすのか、不明な点が多く残る。

近年、細胞内に寄生した原虫が宿主細胞の性状を細胞内部から操っていることが報告されている。例えば、宿主細胞の脂質合成経路やアミノ酸輸送体発現量を変化させ、宿主細胞の代謝産物を自らの増殖に有利な状況にする[1, 2]。また、細胞内にリン酸化酵素を分泌して宿主細胞の転写因子 (STAT3) を活性化させ、殺菌促進作用の IFN- $\gamma$  の分泌を阻害する[3]。すなわち、細胞内に侵入した原虫は、細胞内での生存や増殖に加えて、細胞外に存在する仲間を殺されにくくするため、宿主細胞の細胞内シグナル経路を意図的に操作していると考えられる。黄色ブドウ球菌も細胞内寄生することが広く知られている。しかし、黄色ブドウ球菌がどのように乳腺上皮細胞に寄生し、乳腺上皮細胞の感染防御機構にどのような影響を及ぼすのか、研究開始時点においてその詳細はわかっていなかった。

## 2. 研究の目的

黄色ブドウ球菌は難治性乳房炎を引き起こし、その治療のための抗生物質が薬剤耐性菌を誘発する。しかし、黄色ブドウ球菌の乳房炎がなぜ難治性なのか、その感染戦略の全容はわかっていない。そこで本研究では、『黄色ブドウ球菌は乳腺上皮細胞に寄生し、その感染防御バリアを細胞内部から崩壊させることで難治性乳房炎を引き起こす』と仮説を立て、その実証を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 乳腺上皮細胞の乳産生と TJ 形成を再現した培養モデルの作製

培養に供試する乳腺上皮細胞は非妊娠の ICR マウスより採取した。摘出した乳腺組織を細切した後、2.5 mg/ml collagenase (WAKO) を含む RPMI1640 培地を用いて酵素処理し、間質組織を分解した。得られた細胞懸濁液から細胞画分を回収後、トリプシン・EDTA 処理を施した。続いて、子牛血清を含む培地に懸濁し、低速遠心分離を行うことによって筋上皮細胞や脂肪細胞をほとんど含まない乳腺上皮細胞塊のペレットを得た。

乳腺上皮細胞塊を増殖培地で懸濁し、播種した。なお、増殖培地として 1%ペニシリン・ストレプトマイシン・グルタミン混合液 (Thermo Fisher)、5%ウシ胎児血清 (Boehringer Mannheim)、5  $\mu$ g/ml インシュリン (Sigma-Aldrich)、10 ng/ml 上皮成長因子 (EGF, Sigma-Aldrich) を含む RPMI-1640 培地を使用した。細胞懸濁液を Cell Culture Insert (24 well 用, Falcon, Corning) もしくは glass bottom dish (マツナミ) に播種した後、37°C、5%CO<sub>2</sub> に設定したインキュベーター内に移し、6 日間培養した。続いて、分化培地に交換し、2 日間培養して乳腺上皮細胞の乳分泌を誘導した。分化培地を交換した後、培養温度を 39°C に変更し、さらに 2 日間培養した。なお、分化培地として、1%ペニシリン・ストレプトマイシン・グルタミン混合液、1%ウシ胎児血清、10  $\mu$ g/ml インシュリン、10 ng/ml EGF、0.1%ウシ脳下垂体抽出物 (KURABO)、1  $\mu$ M デキサメタゾン (Sigma-Aldrich) を含む RPMI-1640 培地を使用した。分化培地で計 4 日間培養して乳分泌能力と TJ 形成を誘導した乳腺上皮細胞は、実験に応じて蛍光標識した細胞内寄生菌や黄色ブドウ球菌由来のリポタイコ酸 (LTA; Sigma-Aldrich) を含む培地でさらに培養し、ライブイメージング、免疫染色、およびウェスタンブロットに供試した。

### (2) 細胞内寄生菌の培養および蛍光標識

細胞内寄生菌として、研究室に凍結保管された黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*; SA) と ATCC より購入したストレプトコッカス・ウベリス (*Streptococcus uberis* Diernhofer; SU) を使用した。解凍後、液体培地 (TSB, BioKar) に懸濁し、TSB 寒天培地に播種した。一晚 37°C で培養した後、各コロニーから細菌を回収し、再度、同じ寒天培地に播種し、37°C で 24 時間培養した。培養後、得られたコロニーを回収し、乳腺上皮細胞用の RPMI-1640 培地で 2 回洗浄した。続いて、生きた細菌の細胞壁のペプチドグリカンに標識する RADA (R&D Systems) を最終濃度 25  $\mu$ M となるように分化培地に加えて細胞内寄生菌と懸濁し、遮光下、37°C で 2 時間インキュベートした。標識した細胞内寄生菌は乳腺上皮細胞用の分化培地で 2 回洗浄した後、乳腺上皮細胞層の頭頂部細胞膜側の培地に加えた。

### (3) 乳腺上皮細胞の細胞膜とアクチン線維の蛍光標識

乳腺上皮細胞の細胞膜は PlasMem Bright Green (同人化学) を用いて蛍光標識した。まず PlasMem Bright Green の原液を乳腺上皮細胞用の分化培地を用いて 200 倍希釈し、乳腺上皮細胞層の頭頂部細胞膜側の培地に加え、37°C で 20 分間培養した。蛍光標識した乳腺上皮細胞層を新しい分化培地を用いて 2 回洗浄した後、通常の分化培地を加えてインキュベーターに移し、一定時間経過後に共焦点レーザー顕微鏡 (Leica, TCS SP5, TCS SP8 STED 3X) を用いて観察した。

乳腺上皮細胞のアクチン線維は SiR-actin Kit (Cytoskeleton, Inc.) を用いて蛍光標識した。SiR-actin の 1 mM ストック溶液を 1000 倍希釈して分化培地に加え、乳腺上皮細胞層の頭頂部細胞膜側の培地に加え、37°C で 60 分間培養した。蛍光標識した乳腺上皮細胞層を新しい分化培地を用いて 2 回洗浄した後、通常の分化培地を加えてインキュベーターに移し、一定時間経過後に共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

#### (4) 黄色ブドウ球菌由来のリポタイコ酸が乳腺上皮細胞の乳産生能力と TJ バリアに及ぼす影響

乳腺上皮細胞層の頭頂部細胞膜側の培地に黄色ブドウ球菌由来のリポタイコ酸 (LTA) を最終濃度 0.5 µg/mL となるように加えた後、1 時間もしくは 24 時間培養した。培養後、細胞層を回収してウェスタンブロットおよび免疫染色に供試した。また、培地中に分泌された乳成分を解析するため、培地も回収した。TJ バリアを評価する際には、LTA 添加 1、3、6、12、24 時間後に電極を培地に挿入し、経上皮電気抵抗値を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞内寄生菌が乳腺上皮細胞に侵入する過程のライブイメージング

乳分泌能力と TJ 形成を誘導した乳腺上皮細胞の細胞膜 (緑) とアクチン線維 (シアン) を蛍光標識した後、細胞壁を赤色に蛍光標識した細胞内寄生菌を培地に加え、細胞内寄生菌の挙動を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

細胞内寄生菌を添加していない乳腺上皮細胞では、細胞密度によって細胞膜とアクチン線維の観察像が異なっていた。まず、密で隙間なく敷石状に並んだ乳腺上皮細胞層では、緑色に標識された側底部側の細胞膜が細胞の輪郭に沿って明瞭に観察され、頭頂部側と底部側の細胞膜の蛍光強度は弱く観察された (図 1)。その細胞内では脂肪滴もしくはエンドソームと推測される球状の構造物が緑色に観察された。また、蛍光標識したアクチン線維は乳腺上皮細胞の細胞膜内側に沿って観察された。特に乳腺上皮細胞の中ほどに Z 軸を合わせた観察像では、アクチン線維と細胞膜の蛍光反応の局在パターンはほぼ一致していた。一方、低密度で培養基質に接着・伸展している乳腺上皮細胞では、緑色の蛍光が細胞膜に沿って弱く、細胞内の球状構造物が強く観察された。アクチン線維は細胞質全体に緻密なネットワークとして観察される細胞、およびストレスファイバーと予想される直線状のアクチン線維が観察される細胞の二種類が存在していた。

細胞内寄生菌を添加して 30 分後に観察すると、密で隙間なく敷石状に並んだ乳腺上皮細胞層の一部の細胞では、細胞内部において赤色の細胞内寄生菌が緑色の膜様構造に包まれた状態で観察された (図 2)。細胞内の細胞内寄生菌はほとんど動いておらず、分単位の観察では静止状態を続けていた。一方、細胞外の培地中に浮遊している細菌は活発に動いており、緑色の膜様構造にも包まれていなかった。また、乳腺上皮細胞層の中には、細胞内に細菌が観察されない細胞も多く存在していた。対照的に、単独で培養基質に接着・伸展している乳腺上皮細胞の細胞内部では、ほとんどの場合で細胞内寄生菌が観察された。

細胞内寄生菌添加 1.5 時間後、乳腺上皮細胞内の細胞内寄生菌は 30 分後よりも多く観察された。また、密で隙間なく敷石状に並んだ乳腺上皮細胞層において、細胞内寄生菌を有する細胞では、アクチン線維の局在パターンが乱れ、細胞質に凝集して存在する場合も観察された。いずれの場合においても細胞内の細胞内寄生菌は緑色の膜様構造に包まれた状態で観察され、膜様構造に包まれていない状態の細胞内寄生菌は観察されなかった。

細胞内寄生菌を添加して 3 時間後、培地中の細菌を除去するため、分化培地で 5 回洗浄し、その後抗生物質を通常の 5 倍濃度で含む分化培地に交換して 24 時間培養した。共焦点顕微鏡で観察すると、細胞外 (培地中) に赤色の蛍光で標識された細菌はほとんど観察されなかった。乳腺上皮細胞内を観察すると、緑色の膜様構造に包まれている赤色の細胞内寄生菌、および包まれていない状態の細胞内寄生菌、どちらも観察された。膜様構造に包まれている細胞内寄生菌はほとんどの場合で細胞質内に単独で存在していたが、膜様構造に包まれていない細胞内寄生菌は数個が互いに連鎖している箇所も観察された。

以上の結果より、本研究で行った乳腺上皮細胞の細胞膜とアクチン線維、および細胞内寄生菌の蛍光標識によって、細胞内寄生菌が乳腺上皮細胞に寄生する様子をライブイメージングで捉えることができることがわかった。細胞内に存在している細胞内寄生菌は寄生初期において細胞膜由来成分に包まれていたことから、細胞内寄生菌は食作用などの機構によって細胞内に侵入することが推測される。また、感染 24 時間後の細胞内寄生菌が膜様構造無しで連鎖した状態で存在していたことから、細胞内寄生後には細胞質で増殖することが示唆される。さらに、乳腺上皮細胞の細胞密度によって細菌の侵入程度も異なって観察されたこと、細菌の寄生した乳腺上皮細胞ではアクチン線維の乱れが生じていたことから、細胞内寄生菌と乳腺上皮細胞の関係には細胞間の接着機構や細胞内の細胞骨格も関与しているのかもしれない。

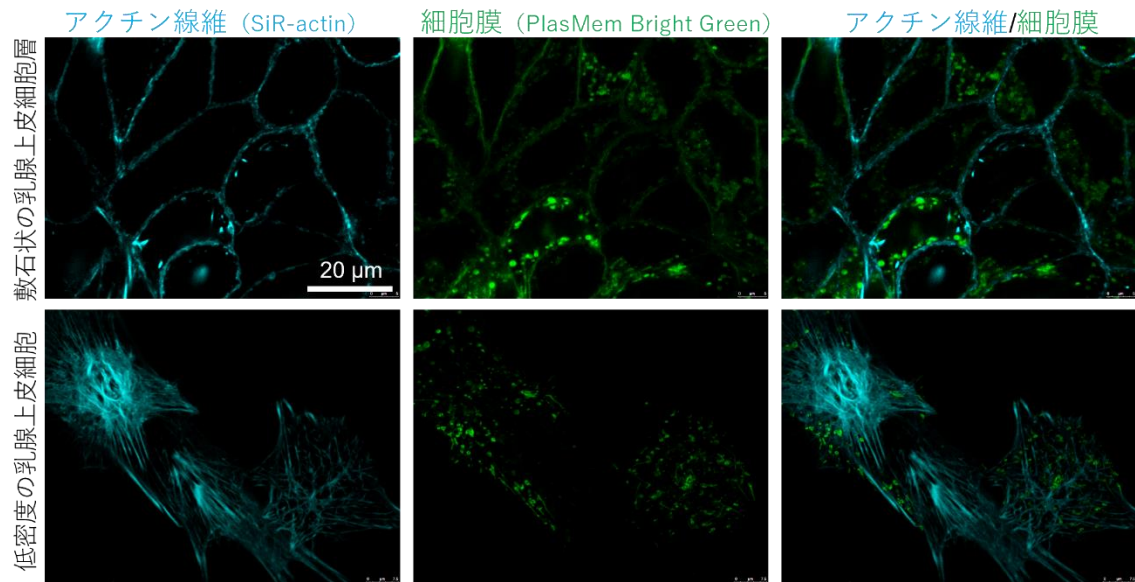


図1 アクチン線維と細胞膜を蛍光標識した乳腺上皮細胞

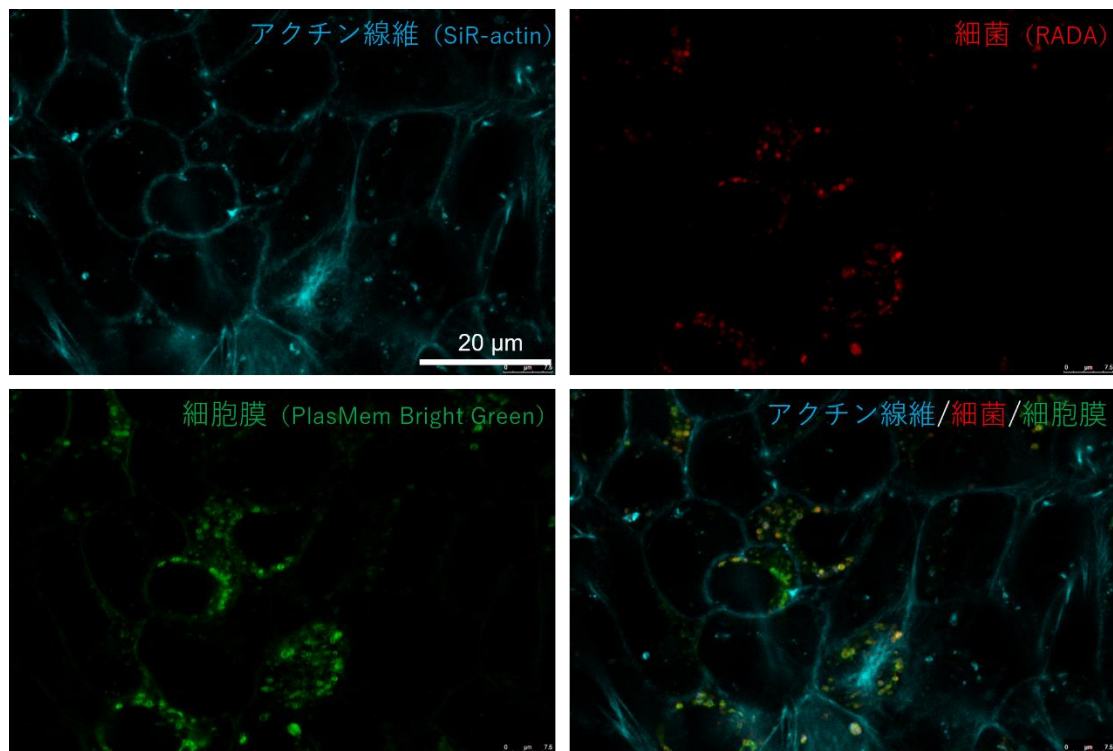


図2 蛍光標識した細菌と乳腺上皮細胞

## (2) LTA が乳腺上皮細胞の乳産生能力と TJ バリアに及ぼす影響

細胞内寄生菌と乳腺上皮細胞のライブイメージングの結果、細胞内寄生菌は細胞密度の低い細胞接着機構が不十分な乳腺上皮細胞に対して選択的に寄生していることが示唆された。また、黄色ブドウ球菌の細胞壁成分である LTA が血管内皮細胞の TJ バリアを弱めることも報告されている[4]。そこで、黄色ブドウ球菌は乳腺上皮細胞の細胞接着機構を細胞外から弱め、その後に細胞内寄生する可能性があると考え、LTA が乳腺上皮細胞の乳産生能力と TJ バリアに及ぼす影響を調べた。

乳分泌能力と TJ 形成を誘導した培養モデルの乳腺上皮細胞において、LTA 受容体である TLR2 は頭頂部側細胞膜に局在していた。同様の局在は泌乳期乳腺の乳腺胞上皮細胞でも観察された。続いて、頭頂部側細胞膜と接する培地に LTA を添加し、1 時間後、24 時間後の TJ 構成タンパク質である Claudin-3 (CLDN3)、CLDN4、および Occludin (OCLN) の発現パターンを調べた。免疫染色の結果、LTA 添加 1 時間後には乳腺上皮細胞の 3 細胞接点領域 (Tricellular region) において CLDN4 の局在が増加しており、24 時間後には CLDN4 の局在が 2 細胞接点領域 (Bicellular region) に広がっている様子が観察された (図3)。ウェスタンブロットの結果、CLDN4 発現量が LTA 処理 24 時間後に増加していることも確認された。続いて、TJ バリア機能を評価するた

め、乳腺上皮細胞層の経上皮電気抵抗値を測定した。その結果、TJ バリアは培養 1 時間後には弱くなり、9 時間後には一時的に回復するが、12 時間後には再び弱くなることが確認された。

乳腺上皮細胞はラクトフェリンなどの抗菌成分を分泌し、生化学的に感染を防いでいる。そこで、LTA が乳腺上皮細胞のラクトフェリン産生に及ぼす影響を調べた。その結果、細胞内ラクトフェリン量は LTA 処理 1 時間後に減少し、24 時間後には増加することがわかった。一方、ラクトフェリンの分泌量は LTA 処理によって変化しなかった。また、LTA 処理は  $\alpha$ s1-カゼインの細胞内量と分泌量を増加させ、 $\beta$ -カゼインの細胞内量と分泌量を減少させていた。

続いて、乳産生や TJ 形成に関与する細胞内のシグナル分子の発現レベルと活性化レベルを調べた。その結果、乳産生を上方調節するシグナル分子である STAT5 と Akt の不活性化、細胞増殖に関わるシグナル分子の ERK の活性化、炎症に関わるシグナル分子の STAT3、NF $\kappa$ B、p38、JNK、HSP27 の活性化が、LTA 処理 1 時間後には誘導されることがわかった。

これらの結果から、TLR2 を介して LTA と結合した乳腺上皮細胞では、短時間で多種多様な細胞内シグナル経路が活性化し、TJ バリアの脆弱化と乳成分産生能力の変化を誘導することがわかった[5]。また、前述のライブイメージングの結果、細胞間接着結合が不完全な乳腺上皮細胞に感染しやすい様子が観察された。以上のことを統合すると、黄色ブドウ球菌は細胞外で自身が感染しやすい状況を誘導し、細胞内に寄生すると考えられる。

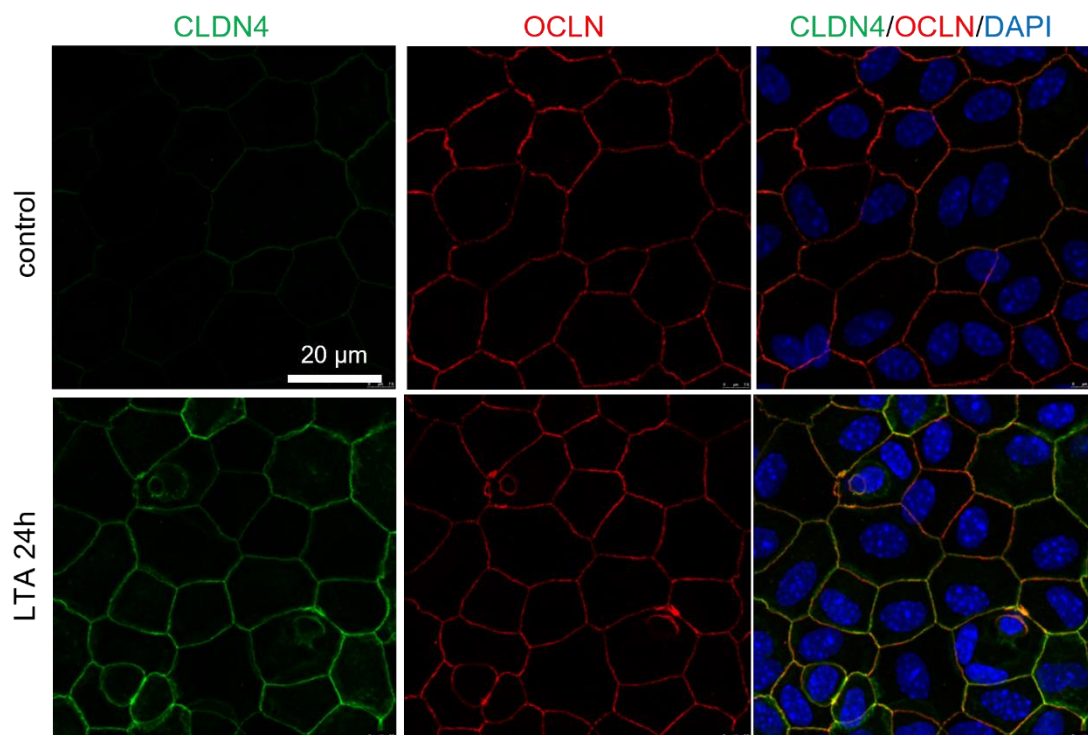


図3 LTA 処理後の乳腺上皮細胞における TJ タンパク質の局在

#### <引用文献>

1. Nolan, S.J., J.D. Romano, and I. Coppens, *Host lipid droplets: An important source of lipids salvaged by the intracellular parasite Toxoplasma gondii*. PLoS Pathog, 2017. **13**(6): p. e1006362.
2. Augusto, L., et al., *Regulation of arginine transport by GCN2 eIF2 kinase is important for replication of the intracellular parasite Toxoplasma gondii*. PLoS Pathog, 2019. **15**(6): p. e1007746.
3. Butcher, B.A., et al., *Toxoplasma gondii rhoptyr kinase ROP16 activates STAT3 and STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control*. PLoS Pathog, 2011. **7**(9): p. e1002236.
4. Boveri, M., et al., *Highly purified lipoteichoic acid from gram-positive bacteria induces in vitro blood-brain barrier disruption through glia activation: role of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide*. Neuroscience, 2006. **137**(4): p. 1193-209.
5. Kobayashi, K., et al., *Early effects of lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus on milk production-related signaling pathways in mouse mammary epithelial cells*. Exp Cell Res, 2022. **420**(1): p. 113352.

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 0件）

1. 著者名 Kobayashi K, Matsunaga K, Tsugami Y, Wakasa H, Nishimura T.	4. 巻 409
2. 論文標題 IL-1 is a key inflammatory cytokine that weakens lactation-specific tight junctions of mammary epithelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 112938
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yexcr.2021.112938.	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 -

1. 著者名 Kobayashi Ken, Omatsu Naoki, Han Liang, Shan-Ni Lu, Nishimura Takanori	4. 巻 420
2. 論文標題 Early effects of lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus on milk production-related signaling pathways in mouse mammary epithelial cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 113352 ~ 113352
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yexcr.2022.113352	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3件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林 謙
2. 発表標題 乳房炎について乳腺上皮細胞の視点から考える
3. 学会等名 第 164 回日本獣医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 カン セイ、呂 サンニ、小山 大空、西邑 隆徳、小林 謙
2. 発表標題 プロモクリプチンが乳腺上皮細胞の乳産生を低下させる機序に関する研究
3. 学会等名 第27回 日本乳房炎研究会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林 謙
2. 発表標題 乳腺上皮細胞における泌乳の調節機構
3. 学会等名 第126回日本小児科学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

細胞組織生物学研究室 <a href="http://lab.agr.hokudai.ac.jp/cell_tissue_biology/">http://lab.agr.hokudai.ac.jp/cell_tissue_biology/</a>
---

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
---------	---------