

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 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590402

研究課題名（和文）黄色ブドウ球菌感染症の新規治療法開発をめざした病原性因子の複合的機能解析

研究課題名（英文） Integrated analyses of virulence factors from *Staphylococcus aureus* aiming to pursue novel pathogenic mechanisms and chemotherapy based on new concept.

研究代表者

馬場 理（BABA TADASHI）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30317458

研究成果の概要（和文）：黄色ブドウ球菌の赤血球溶解毒素として知られていたβ-ヘモリジンが、ヒトケラチノサイトを傷害する活性をもつことを見だし、これが皮膚に対する病原性因子であることを発見した。黄色ブドウ球菌感染が症状を増悪することが知られているアトピー性皮膚炎などのメカニズム解明に寄与すると期待される。また、放線菌が合成する物質 nybomycin が DNA 合成阻害薬キノロン耐性を獲得した変異型 DNA gyrase を特異的に阻害することによって耐性菌増殖を抑制することを見だし、新たな化学療法の道を拓くことができた。これらは当研究過程で得られた知見を元に、本研究枠外の他研究者と共同で得られた成果である。

研究成果の概要（英文）：On the way to pursue novel pathogenic mechanisms that can be candidates for targets of novel chemotherapy, I found β-hemolysin, known as an erythrolytic toxin from *Staphylococcus aureus*, damages human keratinocytes. This result suggests that the toxin is presumably involved in atopic dermatitis that is worsened by *S. aureus* infection, and the finding may lead to further understanding of the disease and its therapy. I also played part in research on re-evaluation of nybomycin, that had been isolated from actinobacteria over 50 years ago, and showed that the substance specifically inhibits function of mutated bacterial DNA gyrase that was no longer inactivated by fluoroquinolones, whereas nybomycin-resistant DNA gyrase acquired fluoroquinolone susceptibility, indicating fluoroquinolones and nybomycin have mutually complementary functions. Such substance against known antibiotic was designated 'reverse antibiotic', being expected to open new era of antibiotic chemotherapy. It should be noted that the results described above were obtained cooperative researches with scientists who were originally out of this project.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
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・細菌学(含真菌学)

キーワード：黄色ブドウ球菌、赤血球溶解毒素、 β -ヘモリジン、ヒトケラチノサイト、アトピー性皮膚炎、nybomycin、キノロン、gyrase

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* は、先進工業諸国に於ける主要な院内感染菌であり、敗血症・骨髄炎・肺炎・食中毒・とびひ・毒素性ショック症候群など多様な感染症をおこし、致命的な症状も引き起こす。さらにメチシリン耐性株（MRSA）など薬剤耐性株の蔓延により、この菌による感染症の克服が困難になってきている。特に近年では、壊死性肺炎などをもたらす、強毒性市中感染MRSAが急速に伝播している。

申請者らは、黄色ブドウ球菌のもたらす病原性の全体像を理解すべく、この菌の全ゲノム配列を世界に先駆けて解読した。さらに、強毒性市中感染MRSA株の全ゲノムも解読し、比較ゲノム解析を行った。その結果、この菌の病原性遺伝子は、水平伝播したと思われる遺伝子断片＝ゲノムアイランド（上図緑円が代表的な2つのゲノムアイランド ν Sa α ・ ν Sa β ）上にあり、そのゲノムアイランドは黄色ブドウ球菌に特異的に存在するにもかかわらず、株間で多型性を示すことを明らかにした。その多型性のため、同じ「黄色ブドウ球菌」であっても、その病原性遺伝子の組み合わせは、株によって異なることを明らかにしていた。

2. 研究の目的

黄色ブドウ球菌が産生する多種多様の病原性因子のうち、個別の機能については研究が進んでおり、スーパー抗原・血球溶解毒素・組織分解酵素・免疫修飾因子や組織結合タンパク質などが同定されている。しかし実際の感染症では、複数の因子が同時に機能しているはずであるが、どの因子同士が組み合わせられて発現すれば、どのような症状を引き起こすかについては、断片的な情報しかない。

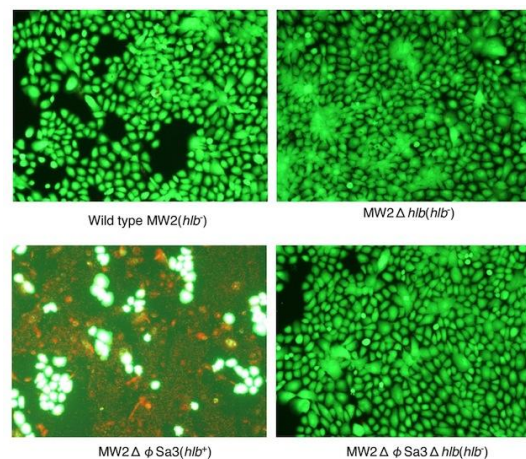
黄色ブドウ球菌が及ぼす病原性の全体像を理解するためには、各病原性因子が共同して機能した際、その組み合わせの相違により、どのような影響がヒト細胞にもたらされるかを知る必要がある。本研究では、(1) どの病原性遺伝子の組み合わせがどのような臨床症状を引き起こすか (2) その組み合わせと症状は、宿主によって異なるか、を追求し、この菌による感染症の全体像を明らかにする。さらにその結果から、(3) 新機軸による感染症治療薬開発をデザインし、黄色ブドウ球菌感染症の克服を目指す。

3. 研究の方法

強毒型黄色ブドウ球菌のゲノムアイランドや、既知の病原性遺伝子の単一・多重欠損変異株を、分離したヒト免疫細胞や組織培養細胞に感染させ、その影響を変異株と野生株との間で比較・評価することにより、特定の症状を引き起こす、黄色ブドウ球菌側の因子の組み合わせを考察する。具体的方法としては、菌の細胞接着能・細胞死の速度・サイトカイン産生性・免疫細胞に対する分化増殖能・貪食能などの差異を総合的に実験し、定量的評価を行う。

4. 研究成果

研究計画では、黄色ブドウ球菌から得られた欠損変異株シリーズを、野生株と対比させてヒト細胞に作用させて細胞致死性などを評価し、ある症状をもたら



す病原性遺伝子の組み合わせを考察する一方、黄色ブドウ球菌がなぜ3割の健常人に常在するのかを明らかにすることを目的にした。その過程で、従来の認識を覆す発見をすることができた。

強毒型黄色ブドウ球菌MW 2株は容易にマウスへの皮膚定着を起こさないが、低頻度で定着した黄色ブドウ球菌は、 β -ヘモリジン遺伝子を保持していることを見いだした。MW 2は β -ヘモリジン遺伝子に、ゲノムアイランドの一つであるファージが挿入されているため同遺伝子を発現しないが、ファージ欠失により発現するように変化したのである。そこで、 β -ヘモリジン遺伝子保持株と欠失株を作製してマウス皮膚定着実験を試みたところ、前者のみが効率的に定着することが示された。さらにマウスだけでなく、 β -ヘモリジン産生株はヒト皮膚角化細胞(ケラチノサイト)を特異的に傷害すること、さらに精製した β -ヘモリジンはケラチノサイトを傷害するが、白血球溶解毒素ではそれが起きないことを証明した。この結果は、黄色ブドウ球菌がヒト皮膚に定着してアトピー性皮膚炎などを起こすメカニズムを説明すると共に、健常人に定着したり、或いは感染症を発症する場合には、ファージの脱着によって β -ヘモリジン遺伝子のON/OFFをしていることを示唆している。 β -ヘモリジンは臨床分離黄色ブドウ球菌の一部にしか見いだされない事実も、上述の考察と合致する。なお、マウス皮膚定着実験は成果・論文欄の筆頭著者片山(順天堂大学助教)が、ヒトケラチノサイトを用いた研究および論文 corresponding author は本申請者が担当した。

【図】 β -ヘモリジンはヒトケラチノサイト傷害活性を持つ(左下)。

なお、上述の ν Sa α ・ ν Sa β の欠失変異株、

およびその2重変異株等も作製し、種々の培養細胞を用いた実験系に供したが、今までのところ野生型黄色ブドウ球菌と比較して、顕著な病原性の差は見いだされていない。標的となる細胞に特異性があるか、あるいは免疫系を含めた複数の細胞系が病原性の発揮に関与するのかもしれない、今後の検討課題である。

一方では、感染症治療を目的とした新薬の開発にも踏み出し、キノロン耐性菌にのみ奏功するNybomycinを再評価し、その機能がキノロン耐性変異型DNA topoisomeraseであることを生化学的に証明した。

【図】Nybomycinは変異型DNA topoisomerase II(Gyrase)活性を阻害し(下)、野生型(上)は阻害しない

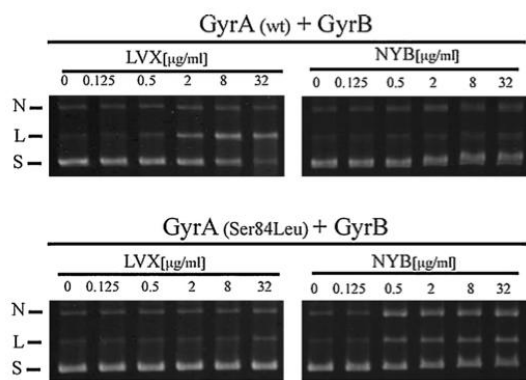
今後は、黄色ブドウ球菌特異的遺伝子がどのように働いて種々の病態を引き起こすのかについての研究をさらに進める一方、従来の発想に囚われない新規抗菌薬開発も進めたい。

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6件)

- ① Anh Tuan Vu, Tadashi Baba, Xue Chen, Tuan Anh Le, Hirokazu Kinoshita, Yang Xie, Seiji Kamijo, Keiichi Hiramatsu, Shigaku Ikeda, Hideoki Ogawa, Ko Okumura, Toshiro Takai. *Staphylococcus aureus* membrane and diacylated lipopeptide induce thymic stromal lymphopoietin in keratinocytes through the Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 pathway. *J. allergy clin immunol*. 126: 985-93, 2010.
- ② Kaito C, Saito Y, Nagano G, Ikuo M, Omae Y, Hanada Y, Han X, Kuwahara-Arai K, Hishinuma T, Baba T, Ito T, Hiramatsu K, Sekimizu K. Transcription and translation



products of the cytolysin gene psm-mec on the mobile genetic element SCCmec regulate *Staphylococcus aureus* virulence. *PLoS Pathg.* Feb 3; 7: e1001267, 2011

③ 関根 美和・馬場 理・片山 由紀・平松 啓一 黄色ブドウ球菌 MHC 様分子が貪食などの宿主免疫系に及ぼす影響について *順天堂医学* 57(3), 2011

④ Hiramatsu K, Igarashi M, Morimoto Y, Baba T, Umekita M, Akamatsu Y. Curing bacteria of antibiotic resistance: reverse antibiotics, a novel class of antibiotics in nature. *Int J Antimicrob Agents.* 39: 478-85, 2012.

⑤ Expression and Functional Characterization of Retinoic Acid-Inducible Gene-I-Like Receptors of Mast Cells in Response to Viral Infection. Fukuda M, Ushio H, Kawasaki J, Niyonsaba F, Takeuchi M, Baba T, Hiramatsu K, Okumura K, Ogawa H. *J Innate Immun.* 2012 Nov 21. [Epub ahead of print]

⑥ Katayama Y, Baba T, Sekine M, Fukuda M, and Hiramatsu K. Beta-hemolysin promotes skin colonization of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 195: 1194-1203, 2013.

[学会発表] (計 7 件)

- ① T. Baba, M. Sekine, Y. Katayama, M. Fukuda and K. Hiramatsu. Genomic islands in *Staphylococcus aureus* and their involvement in pathogenesis. International Union of Microbiological Societies Congresses 2011 (Sapporo, Japan)
- ② T. Baba, M. Sekine, M. Fukuda and K.

Hiramatsu. Two specific genomic islands found in *S. aureus* and their involvement in pathogenesis. 第 8 5 回日本細菌学会総会, 2012 (長崎)

- ③ M. Sekine, T. Baba, Y. Katayama and K. Hiramatsu. MHC analogues found in *S. aureus* affect phagocytosis and other immune responses. 第 8 5 回日本細菌学会総会, 2012 (長崎)
- ④ M. Fukuda, T. Baba and K. Hiramatsu. Pathogenicity of *S. aureus* VISA strains upon various cultured primary human tissue cells. 第 8 5 回日本細菌学会総会, 2012 (長崎)
- ⑤ K. Kikuchi, M. Matsuda, T. Baba, L. Cui and K. Hiramatsu. *Streptococcus intermedius* ゲノムにみられる microcompartment 遺伝子群と嫌気好性/炭酸ガス要求性との関連. 第 8 5 回日本細菌学会総会, 2012 (長崎)
- ⑥ Y. Morimoto, M. Igarashi, T. Baba, M. Umekita, Y. Akamatsu, K. Hiramatsu. Combined Use of Fluoroquinolone with Nybomycin, a Novel Category of Antibiotics “Reverse Antibiotic”. International Symposium on Antimicrobial Agents and Resistance 2013, 13 - 15 March 2013. Kuala Lumpur Convention Centre, Malaysia
- ⑦ Y. Morimoto, M. Igarashi, T. Baba, K. Hiramatsu. Antimicrobial activity of Nybomycin against *Escherichia coli*. The 28th International Congress of Chemotherapy. 5 - 8 June, 2013. Pacifico Yokohama, Kanagawa Japan.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

①

名称: 毒素検出方法

発明者: 大石金成 (デンカ生研) 馬場 理 (順天堂大学) 平松啓一 (順天堂大学) 中臣康雄 (デンカ生研)

権利者: デンカ生研・順天堂大学

種類: 細菌からの物質に対するもの [6] (C07K16/12) タンパク質, ポリペプチド (G01N33/53 D)

番号: 特開 2 0 1 3 - 0 5 3 1 5 4

出願年月日: 2012 年 12 月 04 日

国内外の別: 国際 (分類 C07K-016/12, G01N-033/53)

②

名称: 新規化合物、DNA ジャイレース阻害剤及びその用途

発明者: 平松啓一 (順天堂大学) 森本ゆふ (順天堂大学) 馬場 理 (順天堂大学) 早川勇夫 (順天堂大学)

権利者：順天堂大学
種類：細菌からの物質に対するもの
番号：特願 2013-88008
出願年月日：2013 年 3 月
国内外の別：国際（分類 C07K-016/12,
G01N-033/53）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 理 (BABA TADASHI)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：30317458