

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 10 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590404

研究課題名（和文） 黄色ブドウ球菌の病原性発現におけるフィブロネクチン結合因子の役割

研究課題名（英文） Role of Fibronectin-Binding Proteins on Pathogenicity of infection of *Staphylococcus aureus*

研究代表者

進士 ひとみ (SHINJI HITOMI)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：30287247

研究成果の概要（和文）：

黄色ブドウ球菌のもつ結合因子ホモログ FnBPA, FnBPB の感染における役割について、両因子の一方あるいは双方を欠損した変異型菌株を作成し、細胞およびマウスへの感染実験を行い検討した。

マウスへの感染実験の結果、双方欠損株は致死感染を起こさず、体重低下も認められなかった。どちらか片方の欠損株の比較では、FnBPB 欠損株で、より重篤な体重減少が認められ、感染後の炎症応答や腎臓への菌の定着・増殖も、FnBPA 欠損株において顕著に低下した。

さらに FnBPA は、細胞への侵入および炎症応答の惹起に不可欠であったが、単独では野生型レベルの応答を惹起することはできなかった。

これらの結果から、FnBPA は黄色ブドウ球菌の感染において重要な働きを担っているものの、FnBPA/ FnBPB 双方が協調することで野生株にみられるような重篤な感染を引き起こすものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

The fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB, are important adhesins for *S. aureus* infection. We constructed *fnbA* and/or *fnbB* mutant strains from *S. aureus* SH1000, which possesses intact *rsbU*, and the role of these adhesins in *in vitro* and *in vivo* infections was studied. In intravenous infection, all *fnb* mutants caused a remarkable reduction in the colonization rate in kidneys and the mortality of mice. *fnbB* mutant caused a more severe decrease in body weight than that caused by *fnbA* mutant. Serum levels of IL-6 and NF- κ B activation in spleen cells were remarkably reduced in *fnbA* or *fnbA/fnbB* mutant infections; however, there was no significant reduction in *fnbB* mutant. In *in vitro* cellular infection, FnBPA was shown to be indispensable in adhesion and internalization into non-professional phagocytic cells, upon ingestion by inflammatory macrophages and NF- κ B activation. However, both FnBPs were required for efficient cellular responses. The results showed that FnBPA is more important for *in vitro* and *in vivo* infections; however, the cooperation between FnBPA and FnBPB is indispensable for the induction of severe infection resulting in septic death.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
平成 23 年度	400,000	120,000	520,000
平成 24 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：細菌学

科研費の分科・細目：6911

キーワード：黄色ブドウ球菌、感染、フィブロネクチン結合たんぱく質

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌は軽微な皮膚感染症から重篤な肺炎や心内膜、更には敗血症まで多彩な感染症を起こし得る病原菌である。特に化学療法剤に対して高度耐性を獲得した黄色ブドウ球菌は、院内感染における主要な起原菌となっている。従って、その感染機序を解明する事により、感染の予防および治療における多大な貢献が期待される。

黄色ブドウ球菌の有する接着因子のうちフィブロネクチンに結合する FnBP が宿主組織への定着において主要な役割を演じていると考えられた。更に、黄色ブドウ球菌は細胞外寄生性であると考えられて来たが、実際は種々の非貪食細胞に取込まれエンドソーム内で生残することが示され、この場合にも FnBP が関与すると報告され、接着のみならず細胞内侵入因子としても機能していると考えられた。一方、我々は FnBP が炎症性マクロファージによる貪食において $\alpha 5 \beta 1$ -インテグリンを介した貪食作用を誘導することを報告して来た。以上から、FnBP は宿主生体内で多彩な反応を惹起すると考えられた。

2. 研究の目的

臨床的に分離された黄色ブドウ球菌の 9 割以上がフィブロネクチン結合因子 FnBPA および FnBPB を保有している。菌の病原性は FnBPA/B ともに保有している株が一方のみを発現している株よりも高いとされていたが、これら 2 つのホモログの役割分担については明らかではなかった。

我々の検討では、2 つの FnBP ホモログのうち FnBPA のみを欠損させた変異株を炎症

性マクロファージに貪食させると、親株で認められたフィブロネクチンによるオプソニン様作用が全く認められなくなるという結果が得られており、少なくともマクロファージによる菌の排除に関する限り、2 つのホモログのうち FnBPA の寄与が主であると考えられた。

これまで菌の遺伝的解析に汎用されている親株には σ 因子の調節因子 *rsbU* に欠損があることが判っており、機能分子の発現が野生型と異なる可能性が大きいため、本研究では黄色ブドウ球菌の感染における接着因子 FnBPA および FnBPB の機能について完全な *rsbU* をもつ親株からシングルおよびダブルノックアウト株を作成し、マクロファージ、樹状細胞、繊維芽細胞、血管内皮細胞等による貪食/取り込みにおける各ホモログの機能と両者の共同性について検討し、さらに、マウスによる感染実験を行って *in vivo* における両因子の機能について明らかにすることを目的とした。

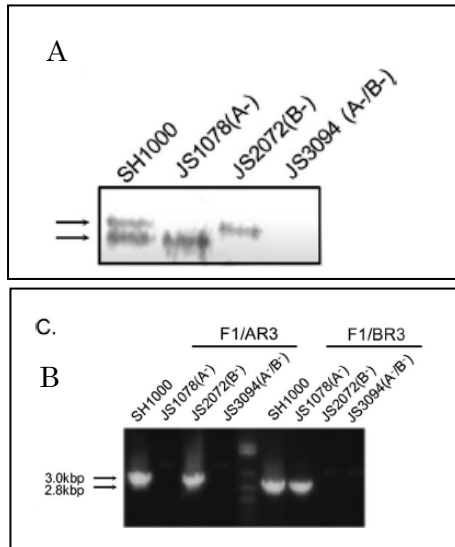
3. 研究の方法

野生型黄色ブドウ球菌株 SH1000 を親株として作成された 3 種類の変異株 FnBPA(-) 株、FnBPB(-) 株、FnBPA(-)/B(-) 株を用いて、炎症性マクロファージおよび各種組織細胞による菌の貪食、侵入や、炎症応答惹起の相違について、RT-PCR 法、EMSA 法を用いて検討した。更に、これらの菌をマウスに感染させた場合の生残率、体重変動、各種臓器への定着、炎症応答の相違について検討した。

4. 研究成果

(1) FnBP 変異株の作成

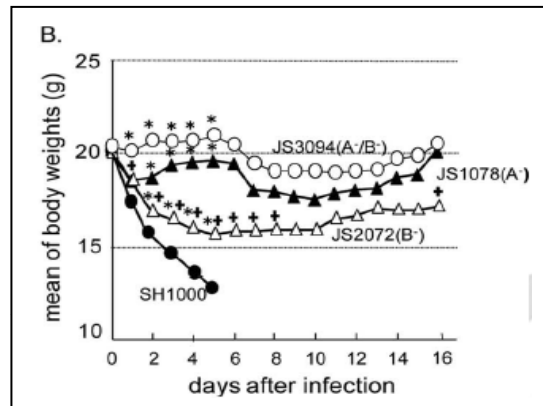
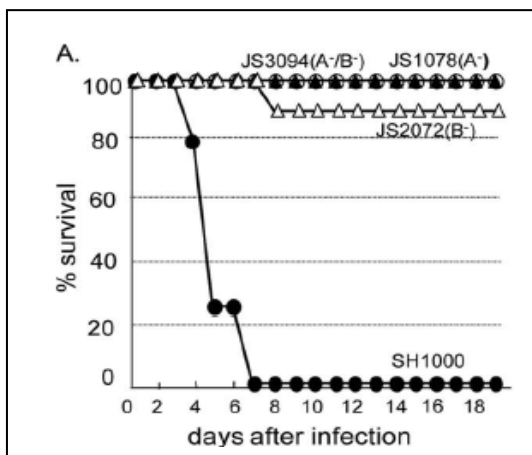
完全な *rsbU* を保有する黄色ブドウ球菌 SH1000 株にプラスミドを用いて相同組換えにより変異を導入し、FnBPA、FnBPB および FnBPA/ FnBPB ノックアウト株を作成した。図 A は、SH1000 株および得られた変異株細胞壁の FnBPA、FnBPB を、図 B は、FnBPA、FnBPB の mRNA 発現をみたものである。



親株では、同レベルの FnBPA、B の発現が認められるのに対し、変異株 JS1078(A-)では FnBPA が、JS2078(B-)では FnBPB が、JS3094(A-, B-)では両方が欠損していることがわかる。

(2) マウスへの感染における FnBPA, B の役割

BALB/c マウス (n=10~12) に、 5×10^7 CFU の菌を尾静脈内投与し、その後の生残率および体重変化について検討した。図 A には生残率を、図 B には体重変動の結果を示した。



た。JS1078 と JS2072 感染を比較すると、後者で体重低下と 10%の死亡が認められたが、前者では若干の体重の減少は認められたが、死亡したマウスはいなかった。これらの結果は、感染における FnBPA の寄与は FnBPB よりも大きいものの、親株レベルの感染を起こすためには、両因子の発現が必要であることを示唆する。

(3) 腎臓への菌の定着と増殖

表に尾静脈感染後、30 分および 24 時間での腎臓内菌数を示した。

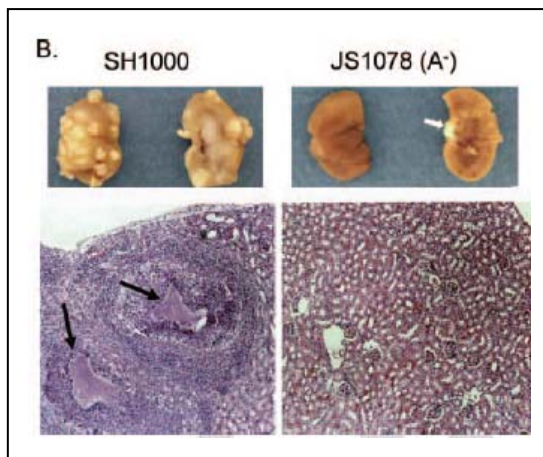
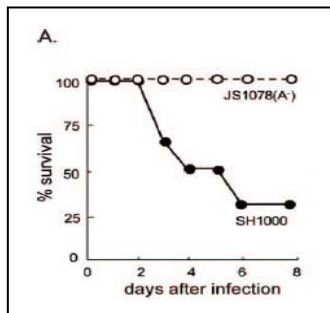
Strain	No. of CFU/kidney (10^4) at:	
	30 min	24 h
SH1000	8.1 ± 3.5 (a)	102 ± 66 (e)
JS1078 (A ⁻)	2.4 ± 1.0 (b)	0.3 ± 0.2 (f)
JS2072 (B ⁻)	2.9 ± 1.1 (c)	5.7 ± 7.5 (g)
JS3094 (A ⁻ /B ⁻)	1.2 ± 0.3 (d)	0.4 ± 0.2 (h)

^a BALB/c mice were intravenously infected with SH1000 or *fnb* mutant strains (5×10^7 CFU/head). After 30 min or 24 h, kidneys were removed and the number of bacteria in each kidney was analyzed. $P < 0.05$ for a versus d and c versus d, $P < 0.01$ for a versus c and e versus g, $P < 0.005$ for a versus b, and $P < 0.0001$ for e versus h.

感染 30 分後の腎内菌数は、親株に比べいずれの変異株も有意に減少し、JS1078、JS2072 株では親株の 1/3、JS3094 株では 1/7 であった。24 時間後には親株で 10 倍強の増殖を示したのに対し、JS2072 株では 2 倍、他の 2 株では 30 分時点より減少した。この結果は、

FnBPA の存在が菌の臓器への定着・増殖に必須であるが、両者の存在が感染後の増殖には必要であることを示す。

さらに後期の状態を観察するため、前述同様、下図 A に示した感染実験を行い、感染 7 日目に腎臓を摘出し、H & E 染色により様子を観察した(図 B)。

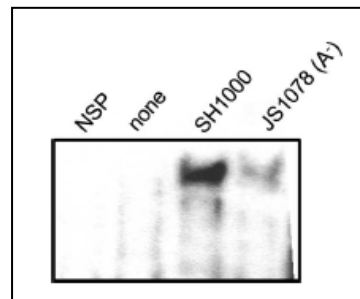


親株 SH1000 感染では、腎臓表層部に多数の膿瘍が認められ、内部には増殖した菌の塊とその周囲を取り巻く滲出細胞層が見られたが、JS1078 感染では、膿瘍は全く形成されていなかった。このことから、FnBPB 単独では、感染後、組織に定着し増殖することができないと考えられる。

(4) 感染後の炎症応答

最大の 2 次リンパ組織である脾臓における炎症応答を調べるため、感染 5 時間後に脾臓

を摘出、脾臓細胞核を調整し、炎症応答・抗微生物感染に重要な転写因子である NF- κ B の活性化を検討した。



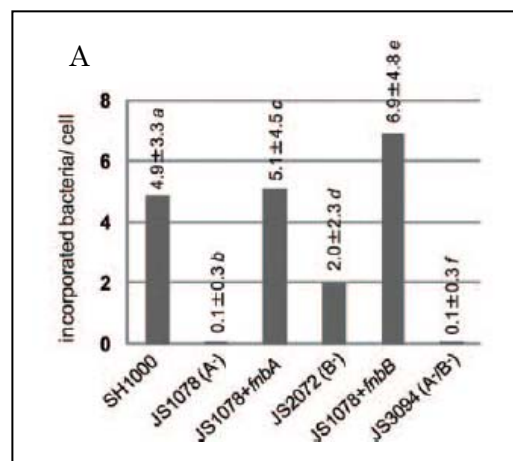
上図は、感染 5 時間後の腎細胞核における活性化 NF- κ B を EMSA 法により検出した結果である。SH1000 株感染では、多量の NF- κ B の活性化が認められたのに対し、JS1078 株では激減した。

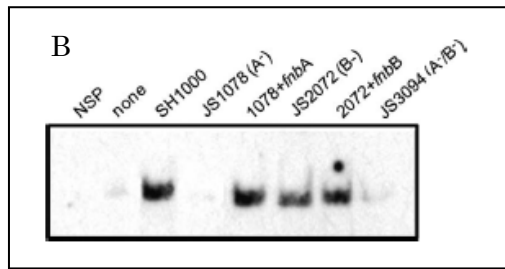
さらに、血清中に存在する炎症性サイトカイン IL-6 濃度を調べたところ、親株 SH1000 感染 5 時間後で $235 \pm 28 \text{ pg/ml}$ で平常時の 4 倍強の数値を示したが、変異株では減少し、特に JS1078 および JS3094 では親株の半分の値であった。

これらの結果は、感染後の炎症惹起においても、両因子の共存が重要であることを示す。

(5) 培養細胞への感染における菌の侵入と細胞の炎症応答

下図 A は、L-929 繊維芽細胞に菌を感染させた際の細胞内侵入菌数を、B には NF- κ B 活性化を示した(MOI=50、1 時間)。





親株 SH1000 感染では、細胞あたり 5 個の菌の侵入が観察されたが、JS1078、JS3094 ではほとんど侵入せず、JS2072 でも半減した。この低下は、プラスミドを用いてそれぞれの正常遺伝子を補完することにより回復した。また、NF- κ B の活性化も侵入菌数と関連していた。このことは、菌の侵入には FnBPA が不可欠であるが、両因子の共存が効率的な侵入と炎症応答に必要であることを示す。血管内皮細胞や炎症性マクロファージにおいても、同様の結果が得られた。

以上、in vivo、in vitro の検討結果より、黄色ブドウ球菌感染には FnBPA、FnBPB が不可欠であること、FnBPA が細胞や組織への感染において必須の役割を果たしていること、しかし、両者が協調的に働くことで重篤な感染症につながるということが明らかになった。

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)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① 進士ひとみ、黄色ブドウ球菌の血管内皮細胞への感染における Fibronectin-Bindind Protein A および B の関与、国際学院埼玉短期大学研究紀要、査読有、2013、第 34 号、pp79-83
- ② 進士ひとみ、近交系マウス BALB/c ち C57BL/6 における黄色ブドウ球菌感染症の重篤性の相違とその成因、国際学院埼玉短期大学研究紀要、査読有、第 33 号、2012、pp109-114
- ③ Sugimoto S, Iwase T, Tajima A, Shinji H, Mizunoe Y. Cloning, expression

and purification of extracellular serine protease Esp, a biofilm-degrading enzyme, from *Staphylococcus epidermidis*. J. Appl. Microbiol. vol.111, 2011, pp1406-1415, DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05167.x

- ④ Shinji H, Yoshizawa Y, Tajima A, Iwase T, Sugimoto S, Seki K, Mizunoe Y. Role of Fibronectin-Binding Proteins A and B in in vitro cellular and in vivo septic infections by *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. vol.79, pp2011, 2215-2223, DOI: 10.1128/IAI.00133-11
- ⑤ Iwase T, Uehara Y, Shinji H, Tajima A, Seo H, Takada K, Agata T, Mizunoe Y. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. Nature vol.465, 2010, pp346-334, DOI: 10.1038/nature09074

[学会発表] (計 4 件)

- ① 岩瀬忠行、田畠亜紀子、杉本真也、弘中一平、進士ひとみ、水之江義充 黄色ブドウ球菌のファイブロネクチン結合たんぱく質 FnBPA,FnBPB の in vitro,in vivo 感染における役割、2011、第 56 回 日本ブドウ球菌研究会
- ② Shinji H, Yoshizawa Y, Tajima A, Sugimoto S, Hironaka S, Mizunoe Y. Role of FnBPs in infection of *S. aureus*. 2010, The 14th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections.
- ③ 岩瀬忠行、進士ひとみ、田畠亜紀子、佐藤文哉、田村卓、米田穰、水之江義充、マウスおよびヒトからの ATP 分泌細菌の単離と同定、2010、第 83 回 日本細菌学会総会
- ④ 進士ひとみ、田畠亜紀子、岩瀬忠行、吉沢幸夫、水之江義充、黄色ブドウ球菌の接着因子 FnBPA および FnBPB の宿主細胞侵入性および in vivo 感染の成立における役割、2010、第 83 回 日本細菌学会総会

[図書] (計 1 件)

- ① 進士ひとみ、目で見る微生物学 vol.2 細菌の代謝・遺伝学、2011、医学映像教育センター刊

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

進士 ひとみ (SHINJI HITOMI)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：30287247