

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：37303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893286

研究課題名(和文) グラム陽性細菌表層の共通抗原によるMRSA感染防御

研究課題名(英文) Protection against MRSA infection using conserved antigen among Gram-positive bacterial cell surface

研究代表者

黒川 健児 (KUROKAWA, KENJI)

長崎国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：80304963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)に対する感染防御に、グラム陽性細菌の表層に広く存在する細胞壁タイコ酸(WTA)に対する抗体が主要な役割を担うことを見出した。黄色ブドウ球菌WTAに対する抗体が非病原性細菌により誘導される場合があると予測し、MRSA株のWTAと免疫学的に交差する菌を探索した。その結果、Lactobacillus属の一種が免疫学的に交差する抗原を持つことを見出し、抗黄色ブドウ球菌WTA抗体を誘導する乳酸菌候補株が得られた。

研究成果の概要(英文)：Antibodies against wall teichoic acids (WTA) have major roles to protect against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infection. Because WTA is well distributed among GC-low content Gram-positive bacteria, we hypothesize if anti-S. aureus WTA antibodies may be induced by non-pathogenic bacteria. Here, we found that a lactic acid producing bacterium belong to Lactobacillus species had an antigen recognized by anti-S. aureus WTA antibodies. This is a candidate non-pathogenic strain that may induce anti-MRSA antibodies.

研究分野：微生物薬品化学

キーワード：細菌宿主相互作用 免疫賦活化 細胞壁タイコ酸 黄色ブドウ球菌

### 1. 研究開始当初の背景

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)に対する有効なワクチンの開発が切望されている。最近我々はグラム陽性菌に広く共通に存在する細胞壁タイコ酸(WTA)に対する抗体が黄色ブドウ球菌の感染防御に主要な役割を担っていることを見出した。WTAの構造は菌種間で類似していることから、黄色ブドウ球菌 WTA に対する抗体が非病原性の常在性細菌や乳酸菌種の WTA を抗原として誘導される場合があると推測される。そこで本研究では、MRSA 株の WTA と免疫学的に同一の WTA をもつグラム陽性菌に探索する。これらにより新しい MRSA 予防法を開発することを目指した。

### 2. 研究の目的

MRSA 株の WTA と免疫学的に同等の WTA を持つグラム陽性細菌を、食品にも利用される乳酸菌種を中心に収集し、探索し同定する。次に、同定したグラム陽性細菌から調製した WTA、あるいは当該菌の死菌を用いてマウスに免疫する時に、黄色ブドウ球菌 WTA に対する抗体を誘導しうるかを調べる。これらにより安心安全な MRSA ワクチン株の候補株を得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

抗黄色ブドウ球菌 WTA 抗体は、高度に精製した黄色ブドウ球菌 WTA に対する親和性に基づき、ヒト注射用イムノグロブリン製剤から精製した。精製した抗 WTA 抗体の黄色ブドウ球菌や乳酸菌への結合性は、FITC 標識された二次抗体を用いたフローサイトメトリー法により評価した。補体活性化能はヒト血清を用い、補体因子 C4 あるいは C3 の菌体表層への沈着をそれぞれに対する特異抗体を用いたフローサイトメトリー法により評価した。補体や抗体によりオプソニン化された細菌の貪食は、予め FITC 標識しておいた細菌とヒト血液より調製した多核白血球を用いて蛍光顕微鏡下で観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) 抗 WTA 抗体による黄色ブドウ球菌の感染防御の獲得

WTA は黄色ブドウ球菌表層の主要構成因子で、本菌の上皮組織への接着や抗菌ペプチド耐性化等を通じて感染成立に役割を担う分子である。ヒト補体レクチン経路の微生物認識分子であるマンノース結合レクチン MBL は黄色ブドウ球菌に結合して補体を活性化するが、我々はその際の標的分子が WTA であることを同定していた(Park et al. 2010)。興味深い事に、血清中の MBL が WTA に結合できるのは乳児期のみで、成人血清中の MBL は WTA に結合できない。生化学的解析の結果、それは抗 WTA 抗体が MBL の WTA への結合に競合するためであることを見出した。精製した抗

WTA 抗体は補体古典経路を活性化し、菌の好中球による貪食を促す感染防御能を示した。つまり乳児期には MBL を介したレクチン経路が、獲得免疫系が発達してくる幼児期以降は抗 WTA 抗体による古典経路が黄色ブドウ球菌を標的とする補体活性化の主要経路となることが分かった (Jun et al. 2012)。

これらの結果に基づいて、マウスへの WTA の接種により黄色ブドウ球菌に対する感染防御能が誘導できるかを調べた。すると確かに WTA の皮内投与に依存して抗 WTA 抗体が誘導され、かつ MRSA に対する感染防御能が誘導できることを見出し、これを報告した(雑誌論文)。

次に抗 WTA 抗体が認識する抗原エピトープの同定を試みた。種々の WTA の生合成酵素の変異株を構築して検証したところ、WTA のリビトールリン酸鎖に アノマー結合で修飾している GlcNAc 修飾糖が抗体認識部位となっていることを同定し、これを報告した(雑誌論文)。

一方、WTA は免疫からの菌の逃避にも機能していることを見出した。即ち、ペプチドグリカン認識する抗体による補体活性化に対しては、WTA は抗ペプチドグリカン抗体の菌体への結合に阻害的に機能した(雑誌論文)。また、ペプチドグリカンに結合して好中球貪食を誘起するヒト血清タンパク質の血清アミロイド P 成分 (SAP) を同定したが、SAP のペプチドグリカンに対する結合にも WTA が阻害的に働くことを明らかにし、これを報告した(雑誌論文)。以上の結果は総説としてまとめ、雑誌論文として発表した。

#### (2) -GlcNAc WTA 抗原エピトープを持つ黄色ブドウ球菌株の拡がり

黄色ブドウ球菌種において WTA の構造多型が報告されている。-GlcNAc WTA を抗原とするワクチン開発の構想のもと、我々が同定した抗原エピトープである -GlcNAc WTA を持つ菌株の拡がりを調査した。黄色ブドウ球菌株 12 種を収集し、精製した抗 -GlcNAc WTA 抗体を用いて抗体依存の補体活性化能、並びに貪食誘導能を試験した。その結果、現在米国で拡大している MRSA 株である USA300 株や USA400 株は、いずれも -GlcNAc WTA をエピトープに持つことが判明した。一方、ドイツの共同研究者から提供を受けた ST395 株由来の PS187 株に対しては、抗 -GlcNAc WTA 抗体は作用しなかった。この結果は PS187 株の WTA の修飾糖が *N*-アセチルグルコサミンではなく *N*-アセチルガラクトサミンであること、さらにリビトールリン酸骨格ではなくグリセロールリン酸骨格を持つとの知見と矛盾しない。その他に、抗 -GlcNAc WTA 抗体に不応性の黄色ブドウ球菌株が 2 種見出された。そのうちの 1 種である Lowenstein 株は -GlcNAc 修飾酵素 TarS を持たないことが、PCR 解析から示唆された。もう一種 Smith

Diffuse 株は *tarS* 遺伝子を有しており、今後 WTA 構造の精査を含め原因の究明を行う計画である。

以上の結果から、 $\alpha$ -GlcNAc WTA を免疫原として用いる MRSA 感染防御の戦略は、現状で拡がりを見せている主要な MRSA 株に対して対処しうる一方、防御できない MRSA 株が一部あることが明らかとなった。特定の抗原を用いたワクチンが供せられ実際に効果を示す場合、その免疫系から逃避可能な MRSA 株が新たな拡がりを見せてくると推測されることから、WTA を抗原として用いるワクチン開発を進める際には、他価抗原として開発する必要があると考えられた。

### (3) MRSA 株の $\alpha$ -GlcNAc WTA と免疫学的に同じ構造を有する乳酸菌の探索

$\alpha$ -GlcNAc WTA を基盤とするワクチン開発の構想のもと、 $\alpha$ -GlcNAc WTA と免疫学的に同じ構造を有する乳酸菌の探索を行った。乳酸菌種は MRS 培地で培養し、固定して用いた。ヒト抗  $\alpha$ -GlcNAc WTA 抗体の乳酸菌への結合性をフローサイトメーターを用いて評価する方法を確立した。これにより公的研究機関から試験提供を受けた 132 株の乳酸菌種のうちの 1 株が、抗  $\alpha$ -GlcNAc WTA 抗体に対する結合性を有することを見出した。焼酎粕から分離されたこの株は、16S rRNA のシーケンス解析により *Lactobacillus* 属の一菌種と分かった。当該菌種においてデータベース登録されている複数株を対象に黄色ブドウ球菌の WTA 合成遺伝子群のホモログを調査した。その結果 WTA の連結領域やポリマー領域の合成酵素のホモログは見られず、この乳酸菌種は黄色ブドウ球菌とは異った構造の WTA を持つと考えられた。一方、糖転移酵素のホモログは見られることから、表層には  $\alpha$ -GlcNAc 付加を受けた糖鎖があり、それが抗  $\alpha$ -GlcNAc 抗体と結合していると推測される。これとは別の乳酸菌種の *Lactobacillus plantarum* はリピトールリン酸型の WTA を持つと報告され、ゲノム配列上も黄色ブドウ球菌 WTA の合成遺伝子のホモログを有する。この菌の分離株を入手したが、抗  $\alpha$ -GlcNAc 抗体への結合性は無かった。本研究により、抗黄色ブドウ球菌抗体を誘導しうる、乳酸菌種の候補株が得られたものとする。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 5 件)

黒川健児. ヒト血清による黄色ブドウ球菌の認識と貪食の誘導機構. 化学と生物 53 (5) 319-325 (2015) 査読有.

[https://katosei.jsbba.or.jp/index.php?aid=379&back\\_bn\\_show=101&bt=on](https://katosei.jsbba.or.jp/index.php?aid=379&back_bn_show=101&bt=on)

Kim MJ, Rah SY, An JH, Kurokawa K, Kim UH, Lee BL. Human anti-peptidoglycan-

IgG-mediated opsonophagocytosis is controlled by calcium mobilization in phorbol myristate acetate-treated U937 cells. *BMB Rep.* 48 (1) 36-41 (2015) 査読有.

<http://www.bmbreports.org/fulltext/bmbreports/view.php?vol=48&page=36>

Kurokawa K, Jung DJ, An JH, Fuchs K, Jeon YJ, Kim NH, Li X, Tateishi K, Park JA, Xia G, Matsushita M, Takahashi K, Park HJ, Peschel A, Lee BL. Glycoepitopes of staphylococcal wall teichoic acid govern complement-mediated opsonophagocytosis via human serum antibody and mannose-binding lectin. *J Biol Chem.* 288 (43), 30956-30968 (2013) 査読有.

DOI: 10.1074/jbc.M113.509893.

An JH, Kurokawa K, Jung DJ, Kim MJ, Kim CH, Fujimoto Y, Fukase K, Coggeshall KM, Lee BL. Human SAP is a novel peptidoglycan recognition protein that induces complement-independent phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.* 191 (6), 3319-3327 (2013) 査読有.

doi: 10.4049/jimmunol.1300940.

Takahashi K, Kurokawa K, Moyo P, Jung DJ, An JH, Chigweshe L, Paul E, Lee BL. Intradermal immunization with wall teichoic acid (WTA) elicits and augments an anti-WTA IgG response that protects mice from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection independent of mannose-binding lectin status. *PLoS One.* 8 (8), e69739 (2013) 査読有.

doi: 10.1371/journal.pone.0069739.

### 〔学会発表〕(計 8 件)

黒川健児、姫野勝. 微生物リガンドの同定によって垣間見る、細菌と自然免疫の攻防. 第 26 回微生物シンポジウム「微生物科学と医療のシンフォニー - 双方向の発展と大学の使命 -」. 2014 年 9 月 19-20 日. 都市センターホテル (東京)

Kurokawa K, Matsushita M, Takahashi K, Park HJ and Lee BL. Glycoepitopes of staphylococcal wall teichoic acid govern complement-mediated opsonophagocytosis via mannose-binding lectin and human serum antibody. The 16th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections. Aug 26-29, 2014 (Chicago, IL, USA)

Khan A, Lee MJ, Lee JH, Seong MY, Kurokawa K, Takahashi K, Ahn DH, Peschel A, and Lee BL. Novel staphylococcal wall teichoic acid (WTA)-derivative shows protective effects against USA300 MRSA infection in a murine model. The 16th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections. Aug 26-29, 2014 (Chicago, IL, USA)

Kim NH, Lee JH, Winstel V, Kurokawa K, An JH, Khan A, Seong MY, Lee MJ, Peschel A, and Lee BL. tarS-harboring *Staphylococcus aureus* strains are opsonophagocytosed by human anti-wall teichoic acid-IgG. The 16th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections. Aug 26-29, 2014 (Chicago, IL, USA)

黒川健児, 高橋和枝, 松下操, 姫野勝, 李副律. 黄色ブドウ球菌に対するレクチンと主要抗体は細胞壁タイコ酸の修飾糖をエピトープとする. 第59回日本ブドウ球菌研究会, 2014年8月4日. 東京農工大学(府中)

Kurokawa K. Complement classical and lectin pathways utilize *S. aureus* wall teichoic acid glycoepitopes. 第87回日本細菌学会総会, 2014年3月26日. タワーホール船堀(東京)

黒川健児. WTAをターゲットとした, MRSA感染症の予防と治療. 長崎ビジネス交流会. 2013年12月6日. 長崎県立総合体育館(長崎)

Kurokawa K, Jung DJ, An JH, Jeon YJ, Kim NH, Matsushita M, Himeno M, and Lee BL. Wall teichoic acid glycoepitopes govern innate and adaptive host defense against *Staphylococcus aureus*. 第86回日本生化学会大会, 2013年9月11-12日. パシフィコ横浜(横浜)

[その他]

ホームページ等

<http://www1.niu.ac.jp/about/teacher/detail.html?data%5Bid%5D=267>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒川 健児 (KUROKAWA KENJI)

長崎国際大学・薬学部・准教授

研究者番号:

### (2) 研究協力者

李 福律 (LEE BOK LEUL)

釜山大学校・薬学部・教授

高橋 和枝 (TAKAHASHI KAZUE)

Harvard Medical School・Massachusetts

General Hospital・Assistant Professor