

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08056

研究課題名(和文) MRSA感染防御を誘導する新規自然免疫リガンドと受容体の同定

研究課題名(英文) Identification of innate immune ligands to induce the protection from MRSA infection

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：黄色ブドウ球菌感染において誘導されるIL-23はその感染防御に重要であるが、細菌性リガンド分子は明らかではない。我々は株化されたヒト樹状細胞を用い、IL-23の誘導能を検出するバイオアッセイ系を確立した。これにより黄色ブドウ球菌には細胞壁タイコ酸画分とそれ以外の、少なくとも2種のIL-23誘導物質があることが示唆された。細胞壁タイコ酸の合成変異株由来の細胞壁画分を用いた解析からは、IL-23分泌能に細胞壁タイコ酸の完全な修飾構造体は必要ないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Staphylococcus aureus infection induces IL-23 that is critical for its biological defense, however the bacterial ligand molecules for the IL-23-induction have been unknown. We established a bioassay system to evaluate the IL-23 inducing activity by using a cultured human dendritic cell line and found that there were at least two molecules for the induction; one was wall teichoic acids (WTA) and the other was unidentified. Biochemical analyses using cell wall fractions derived from WTA modification enzymes revealed that a complete modified structure of WTA was not necessary for the IL-23 secretion.

研究分野：微生物薬品化学

キーワード：細菌宿主相互作用 樹状細胞 黄色ブドウ球菌 免疫賦活化 細胞壁タイコ酸

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* はヒト病原菌として最も頻りに分離される細菌で、皮膚並びに軟組織の感染症、肺炎、敗血症等を引き起こす。本菌感染症の問題は、多剤耐性株の蔓延にある。特にメチシリン耐性の黄色ブドウ球菌 (MRSA) は入院患者のみならず市中の健康者からも高い頻度で見出され、MRSA 感染症に対して有効な抗生物質を見い出せず患者が死亡するケースも頻発している。新規治療・予防法としての黄色ブドウ球菌ワクチン開発に向けて、これまでに様々な抗原が選択され研究が進められている。しかしながらこれまでの所、全ての単一抗原ワクチンの開発は失敗している。現在は複数の抗原を組み合わせたワクチンの開発が進行しているが、何れの抗原の組み合わせが良いのかの検討段階と言ってよい。有効なワクチンや新規予防・治療法を開発する上で、黄色ブドウ球菌感染症に対するヒトの生体防御機構の理解と、本菌による免疫系逃避のメカニズムの更なる究明が必要となっている。

黄色ブドウ球菌表層の細胞壁タイコ酸 (Wall teichoic acid: WTA) は、ペプチドグリカンに共有結合して存在する糖鎖の総称で、黄色ブドウ球菌を始めとするグラム陽性細菌に共通に存在する。黄色ブドウ球菌ではリピトールリン酸が 20 から 40 分子ほど重合し、その 2 位及び 4 位では D-alanine 及び N-acetyl glucosamine (GlcNAc) の付加を受けている。2010 年に我々はヒト成人血清中の高い抗 WTA 抗体価を報告し、2012 年にはヒト注射用 IgG (IVIg) から抗 WTA 抗体を affinity 精製し、この抗 WTA 抗体が黄色ブドウ球菌の好中球による貪食を誘導し、感染防御能を有することを報告した。さらに WTA 合成に関わる各遺伝子の黄色ブドウ球菌欠損体を作出し、抗 WTA 抗体による黄色ブドウ球菌認識と好中球による被貪食能を調べた結果、精製した抗 WTA 抗体画分は抗 -GlcNAc WTA 抗体を含まず、抗 -GlcNAc WTA 抗体を含み、抗 -GlcNAc WTA 抗体が菌のオプソニン化に重要であると分かった。

次に我々は WTA-ペプチドグリカン (PGN) 共有結合体が、マウスへの皮内接種により抗 WTA 抗体産生と、MRSA に対する感染防御能を誘導出来ることを見出した。続いて、WTA ワクチンの開発を念頭に、WTA-PGN 共有結合体ではなく、ペプチドグリカン部分を外した WTA を調製し免疫実験に用いた。すると抗 WTA 抗体価の上昇は小さく、MRSA 感染防御能は認められなかった。WTA と精製ペプチドグリカン部分を混ぜて投与しても回復せず、WTA はペプチドグリカンと共有結合体であることが高い感染防御能の誘導に必要であることを示唆する結果を得た。

これらの研究の過程で、WTA-PGN 共有結合体のマウス腹腔投与により樹状細胞から IL-23 が分泌されることを見出した。欠損マウスを用いた解析から、IL-23 は、IL-17A とともに黄色ブドウ球菌の感染防御に重要であることが報告されている (Cho *et al.* 2010)。IL-17 は、好中球の活性化や遊走に関わるサイトカイン・ケモカインや、抗菌ペプチドの発現誘導作用を持ち、感染 1 日以内のごく初期に IL-23 や IL-1 依存に誘導される。そこで、WTA-PGN 共有結合体は樹状細胞を刺激して IL-23 分泌を促進し、IL-23 は T 細胞を刺激して IL-17A 分泌を誘導し、黄色ブドウ球菌の好中球貪食と殺菌を促進するとの作業仮説を得た。

2. 研究の目的

本研究では、WTA-PGN 共有結合体による樹状細胞からの IL-23 分泌に着目する。IL-23 分泌活性を指標に WTA-PGN 共有結合体上の必須ドメイン構造を決定し、続いて樹状細胞に存在すると想定される WTA-PGN 共有結合体を認識する受容体の同定を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

細菌細胞壁の構成成分の精製は難しく、混入物の存在が実験結果の解釈をしばしば誤らせてきた。WTA-PGN 共有結合体が真に IL-23 の誘導因子かを検証をする目的で、WTA の生合成酵素の変異体から精製する WTA-PGN 共有結合体のなかに IL-23 分泌能を失うものがあるかを調べた。IL-23 分泌能の解析は株化された樹状細胞を用いた。樹状細胞の応答性が確認されたのち、Myd88 依存性であるかを調べるために anti-Myd88 shRNA 発現系の構築を試みた。

4. 研究成果

(1) 株化されたヒト樹状細胞株を用いた自然免疫リガンドの同定系の確立

株化されたヒト樹状細胞 2 種を入手し、黄色ブドウ球菌細胞壁画分による IL-23 の誘導能、および分泌能を qRT-PCR、及び ELISA によって測定し、検証した。同時に、IL-23 の誘導に関わる細菌性リガンドの必須構造領域の決定を目的として、細胞壁タイコ酸の合成に関わる黄色ブドウ球菌遺伝子の変異株を 6 株構築した。細胞壁画分は、フレンチプレスによる菌体破砕後、ペプチドグリカンと細胞壁タイコ酸を主な構成要素とする不溶性画分を得た。非特的に結合するタンパク質、脂質、核酸等は、界面活性剤を用いて不溶性画分より洗浄除去した。TLR2 のリガンドである細菌リポプロテインは、リポプロテインの脂質修飾の変異株を用いることにより除去した。

種々の条件検討の結果、樹状細胞株をサイトカインで前処理することにより、細胞壁画分による IL-23 の誘導能、分泌能が著しく増

大する条件が見出された。さらに、検証した細胞壁タイコ酸の変異株一株から調製した細胞壁画分では IL-23 分泌能が失われることが見出された。

先行研究ではマウス個体への細胞壁画分の投与によって樹状細胞から IL-23 が誘導されることを見出していたが、これを *in vitro* の実験系で再現できた。これにより、再現性良く、そして安価に、IL-23 の誘導に関わる細菌性リガンドの必須構造領域の決定、宿主受容体の同定を行うことが可能となった。

(2) IL-23 分泌に細胞壁タイコ酸の完全な修飾構造体は必要ではない

株化されたヒト樹状細胞株に対し、黄色ブドウ球菌細胞壁画分が IL-23 誘導能を有することを、mRNA レベル、タンパク質レベルで確認した。他のサイトカインについて調べたところ、IL-6 も分泌誘導されることが確認された。これらのサイトカインの誘導に関わる細胞側のシグナル分子を同定する目的で、遺伝子発現の抑制法を検討した。Anti-MYD88 shRNA を発現するレトロウイルス（ネオマイシン耐性）を作出し、ヒト樹状細胞に感染させてネオマイシンで選択した後に MYD88 の発現量を定量したところ、抑制率は最大で 50%程度で、期待に添うものではなかった。

IL-23 の誘導に関わる細菌性リガンド分子の同定を目的として、黄色ブドウ球菌の細胞壁タイコ酸の合成変異株を作出し利用してきた。細胞壁タイコ酸の変異株に一株について細胞壁画分に由来する可溶性画分を調製したところ、IL-23 分泌能が失われることが確認された。一方、細胞壁タイコ酸のある種の修飾酵素の欠損株は活性を保持しており、IL-23 分泌に細胞壁タイコ酸の完全な修飾構造体は必要ではないことが示唆された。

我々の予想に反し、可溶性の細胞壁タイコ酸画分の IL-23 分泌能は失われるにもかかわらず、粗抽出液画分では IL-23 分泌能が親株と同等に見出された。従って、IL-23 の誘導能を有する細菌性リガンドは、細胞壁タイコ酸以外にも存在し、少なくとも 2 種類あることが示唆された。IL-23 誘導能は細胞壁タイコ酸以外にも存在することが示唆されたので、この第 2 因子を、生化学的に同定することを試みた。第二因子は不溶性の細胞壁画分をペプチドグリカンを加水分解する lysozyme と lysostaphin で処理した可溶化後にも認められた。しかしながらカラムクロマトグラフィーの溶出画分にはその活性は検出できなかった。

(3) 不溶性細胞壁画分の高い感染防御能

本研究は WTA-PGN 共有結合体をマウス皮内接種後のサイトカイン群発現解析を起点とし、続いて WTA-PGN 共有結合体をマウス腹腔

に投与すると樹状細胞が IL-23 を分泌すること示唆する結果に着想を得て開始した。その再現性を調べている過程で、可溶化した細胞壁画分のマウス腹腔への投与は、可溶化前の不溶性の細胞壁画分に比べて MRSA 感染防御能が低いことが分かった。具体的には可溶性細胞壁画分でも不溶性細胞壁画分でも腹腔投与 12 時間後をピークとして腹腔への好中球や単球の浸潤が認められるものの、その程度は可溶性細胞壁画分では 1/4 以下に低下していた。好中球走化性因子と単球走化性因子の腹腔内量を比較したところ、いずれも不溶性細胞壁画分の投与後 3 時間をピークに腹腔内で認められるが、可溶化した細胞壁画分では 1/10 以下に低下した。次に細胞壁画分の腹腔投与後 12 時間後に MRSA 株を腹腔投与により感染させて、マウスの生死を 5 日後まで観察した。その結果、不溶性の細胞壁画分を摂取したマウスは 90% が MRSA 株による感染死を免れたが、可溶性画分を摂取したマウスは 30% に低下した。FITC にて蛍光修飾した不溶性の細胞壁画分は、腹腔への投与後にリンパ節に集積している様子が認められた。細胞壁には複数の自然免疫リガンドがあり、不溶性画分ではこれらがひとところに集まり、また拡散が妨げられ局所的な濃度が高まることが可溶性画分よりも不溶性の細胞壁画分が高い免疫誘導能をもたらす原因であるかもしれない。自然免疫リガンドを同定出来たのちの実用化に際しては、固相化した状態で用いるメリットを検討したい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Uchiyama J, Taniguchi M, Kurokawa K, Takemura-Uchiyama I, Ujihara T, Shimakura H, Sakaguchi Y, Murakami H, Sakaguchi M, Matsuzaki S. Adsorption of *Staphylococcus* viruses S13' and S24-1 on *Staphylococcus aureus* strains with different glycosidic linkage patterns of wall teichoic acids. *J Gen Virol.* 98 (8) 2171-2180 (2017) 査読有
DOI: 10.1099/jgv.0.000865

Kurokawa K, Takhashi K, Lee BL. The staphylococcal surface-glycopolymer wall teichoic acid (WTA) is crucial for complement activation and immunological defense against *Staphylococcus aureus* infection. *Immunobiology* 221 (10) 1091-101. (2016) 査読有
DOI: 10.1016/j.imbio.2016.06.003

Lee JH, Kim NH, Winstel V, Kurokawa K, Larsen J, An JH, Khan A, Seong MY, Lee MJ, Andersen PS, Peschel A, Lee BL. Surface glycopolymers are crucial for

in vitro anti-wall teichoic acid IgG-mediated complement activation and opsonophagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 83 (11) 4247-55. (2015) 査読有
DOI: 10.1128/IAI.00767-15

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 Vol. 53 (5) 319-325 (2015) 査読有
DOI:<https://doi.org/10.1271/kagakuto-seibutsu.53.319>

〔学会発表〕(計3件)

Uchiyama J, Taniguchi M, Kurokawa K, Takemura-Uchiyama I, Ujihara T, Shimakura H, Sakaguchi Y, Murakami H, Sakaguchi M, Matsuzaki S. Adsorption of *Staphylococcus* viruses S13' and S24-1 on *Staphylococcus aureus* strains with different glycosidic linkage patterns of wall teichoic acids. The 16th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 5-8th September 2017, (Awaji, Japan)

Uchiyama J, Kurokawa K, Takemura-Uchiyama I, Ujihara T, Sakaguchi Y, Sakaguchi M, Matsuzaki S. Analysis of adsorption of phages, S13' and S24-1, belonging to the family Podoviridae genus P68virus, using *Staphylococcus aureus* strains with different glycosidic linkage patterns of wall teichoic acids. International Union of Microbiology Societies (IUMS) 2017 congresses, 17-21th July 2017 (Singapore)

Lee JH, Kim NH, Kurokawa K, and Lee BL. Surface-glycopolymers are crucial for anti-WTA IgG-mediated complement activation and opsonophagocytosis of *Staphylococcus aureus*. 第52回日本補体学会学術集会、2015年8月21日(名古屋)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www1.niu.ac.jp/about/teacher/detail.html?tid=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：80304963

(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)

Massachusetts General Hospital・
Assistant Professor