

令和元年6月17日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05185

研究課題名(和文)ブドウ球菌スーパー抗原毒素の生体内環境に適応した病原戦略の解明

研究課題名(英文) Pathogenic strategy of staphylococcal superantigens in microenvironment of tissues and organs

研究代表者

中根 明夫 (Nakane, Akio)

弘前大学・医学研究科・特任教授

研究者番号：30164239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：黄色ブドウ球菌が産生するスーパー抗原毒素TSST-1の観点から、黄色ブドウ球菌と宿主の攻防機序について解析し、以下の成果を得た。

(1) TSST-1結合タンパク質としてseptin family分子を同定し、TSST-1との相互作用を介してオートファジーを抑制することを示し、septin family分子の黄色ブドウ球菌感染における関与を検討している。(2) いわゆる「タンポン病」のモデルとして、黄色ブドウ球菌の経膣感染マウスモデルを確立・解析した結果、菌は子宮内に留まるものの、そこで産生されたTSST-1が全身に伝播し、全身炎症(毒素性ショック症候群)を引き起こすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌感染症に対し抗菌薬が大いに貢献してきた一方、薬剤耐性菌が大きな脅威となり、2050年には薬剤耐性菌感染症による死亡者ががんによる死亡者を上まると予測されている。多剤耐性黄色ブドウ球菌であるMRSAはその代表格である。黄色ブドウ球菌の病原性は極端に高いわけではなく、むしろ私たちと共存すべく進化している。従って、MRSA感染症の制御には黄色ブドウ球菌と私たちの免疫系との攻防・協調メカニズムを知ることが必須である。私たちは、黄色ブドウ球菌の代表的な病原因子であるTSST-1を基点に、黄色ブドウ球菌と私たちの相互作用の全容を明らかにすべく研究を続けている。本研究は、その一端を解明したものである。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1), a superantigenic toxin, produced by *Staphylococcus aureus* during infection.

(1) We identified a septin family molecule as the TSST-1-binding protein. It was suggested that TSST-1 suppresses autophagy by interacting with the septin family molecule. We are now investigating the role of the septin family molecule in *S. aureus* infection. (2) We established the staphylococcal cervicovaginal infection mouse as a model of "so-called Tampon disease". It was suggested that TSST-1, which is produced in uterine, translocates to bloodstream and onsets systemic inflammation like toxic shock syndrome, although *S. aureus* remains in uterine.

研究分野：細菌学

キーワード：黄色ブドウ球菌 TSST-1 毒素性ショック症候群 オートファジー 経膣感染

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医療関連感染は相変わらず大きな問題であり、その中でも最大の原因微生物は HA-MRSA (病院獲得型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌) や CA-MRSA (市中獲得型 MRSA) として大きな問題となっている。黄色ブドウ球菌は極端にピルレンスが高いわけではないが、ヒトや動物に上手に適応することにより常在化あるいは持続感染を引き起こし、宿主防御の綻びを縫って重篤な病態を形成する賢くて厄介な病原体である。黄色ブドウ球菌では外毒素などさまざまな病原因子が発見されているが、詳細な感染メカニズムについては不明の部分が多いのが現状である。

本研究者は、ブドウ球菌スーパー抗原毒素の代表である TSST-1 が上皮細胞に対しスーパー抗原活性非依存的にオートファジー抑制作用を示すことを明らかにした。

TSST-1 は TSS の原因毒素として発見された。TSS は TSST-1 のスーパー抗原活性に起因する自己免疫様炎症性疾患であり、発熱、低血圧、びまん性紅斑性発疹を主徴とし、DIC や多臓器不全に発展する。TSS の原因として生理中のタンポンの使用がリスクであることが注目され、「タンポン病」として一般に知られている。しかしながら、膣における黄色ブドウ球菌の感染と TSST-1 の動態についてはほとんど知見がない。一方、黄色ブドウ球菌の生体内微小環境も TSST-1 に大きく影響し、宿主が平熱状態より発熱環境において TSST-1 産生性が亢進する。TSS の要因として膣における黄色ブドウ球菌の常在性が大きいと考えられる。黄色ブドウ球菌は皮膚や粘膜に常在しやすく、細胞表層に付着するだけでなく粘膜上皮細胞では細胞内増殖を起こす。細胞質における細菌と宿主細胞の攻防にはオートファジー (ゼノファジー) が大きく関わっている。黄色ブドウ球菌におけるオートファジーの役割については細胞質の菌の排除に関与する、

2. 研究の目的

本研究者は、ヒト上皮細胞において黄色ブドウ球菌が産生するスーパー抗原毒素である TSST-1 がオートファジーを抑制することを明らかにした。これまでの知見で黄色ブドウ球菌感染においてオートファジーは殺菌的に働き感染防御に関与しているという説と、逆に黄色ブドウ球菌の細胞内生存延びては持続感染の成立・維持に関与しているという、相反する仮説が報告されている。本研究は、どちらの仮説が正しいのかを検証する。一方、TSST-1 は毒素性ショック症候群 (TSS) の原因毒素であり、別名「タンポン病」とも言われているが、黄色ブドウ球菌の経膣感染と局所における TSST-1 産生および TSS に至る TSST-1 の動態や病態形成メカニズムについてはほとんど知られていない。本研究のもう一つの目的はこの点にある。本研究は、TSST-1 の異なる機能の生体レベルの役割を解明し、黄色ブドウ球菌の感染戦略を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 黄色ブドウ球菌: *Staphylococcus aureus* 834 株 (野生型 TSST-1 産生臨床分離株), *tst* 株 (834 株の TSST-1 産生欠損株), RN/pJE 株【RN4220 (TSST-1 非産生株、非病原性株) にベクター-pJE のみを挿入した対照株】, RN/*mtst* 株【スーパー抗原活性欠損 TSST-1 (mTSST-1) 遺伝子を RN4220 株) に発現させた株】を用いた。これらを、tryptic soy broth あるいは tryptic soy agar (TSA) で 37℃, 16 時間培養し実験に供した。
- (2) 細胞レベルの黄色ブドウ球菌感染: HeLa229 細胞に黄色ブドウ球菌野生型あるいは変異菌株を m.o.i. 10 ないし 100 で添加し、菌の接着、侵入の解析、細胞内菌数の解析の解析を行った。細胞内菌数は、感染細胞を洗浄後、0.5% 3-[(3-cholamido propyl) dimethylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS) で破壊した。これを TSA に接種し、細胞内菌数を計測した。
- (3) TSST-1 宿主結合タンパク質の分離・同定: TSST-1 の標的タンパク質を Far-Western プロットにより検出した。HeLa229 細胞の全タンパク質に対して二次元ゲル電気泳動を行った後 PVDF 膜に転写し、TSST-1 と共にインキュベートした。結合した TSST-1 を抗 TSST-1 抗体で

検出した。さらに TSST-1 結合タンパク質を LCMS/MS により分析し、同定した。

- (4) TSST-1 結合タンパク質遺伝子の解析：TSST-1 結合タンパク質の遺伝子を pEGFP-C2 プラスミドに挿入し、次いで Lipofectamine 2000 を用いて HeLa 229 細胞に導入した。24 時間後、緑色蛍光を共焦点顕微鏡下で確認した。遺伝子サイレンシングは RNA 干渉によって行った。標的遺伝子に対する siRNA を Hi-PerFect トランスフェクション試薬により HeLa 229 細胞に導入した。
- (5) オートファジーの評価：HeLa229 細胞を TSST-1 処理あるいは黄色ブドウ球菌感染させ、オートファジーマーカー (LC3)、リソソームマーカー (LAMP2, LysoTracker) の分布と発現量について共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。また LC-I から LC-II の変換量を Western blot により測定した。
- (6) TSST-1 結合タンパク質のコンディショナルノックアウトマウスの作製：TSST-1 結合タンパク質が septin ファミリー分子であったため、その分子のコンディショナルノックアウトマウスの作製を Cre-LoxP 法により行った。Heterologous Septin^{flox/WT} マウスの作製は 筑波大学生命科学動物資源センターに委託した。Septin^{flox/WT} を交配させ、Septin^{flox/flox} マウスを作製した。次に、ケラチノサイト発現コンディショナルマウスを作製するために、Septin^{flox/flox} マウスを K5Cre マウス【熊本大学生命資源研究・支援センター 技術開発分野 (CARD) より恵与】と交配させ、Septin^{flox/WT}::K5Cre マウスを得た。現在、Septin^{flox/flox}::K5Cre マウスを作製中である。
- (7) Atg5 コンディショナルノックアウトマウスの作製：オートファジー関連分子である Atg5 の Atg5^{flox/flox} マウスを K5Cre マウスと交配させ、Atg5^{flox/WT}::K5Cre マウスを得た。さらにこれらのマウスを交配し、Atg5^{flox/flox}::K5Cre を得た。
- (8) TSST-1 の経膈投与と経膈感染：12 週齢の雌性 C57BL/6 マウス (日本クレア) を混合麻酔薬 (medetomidine, midazolam, medetomidine) の腹腔内投与により麻酔し、NSET device (Paratechs Corp. in Lexington, KY) を用いて、rTSST-1 10 µg/3 µl あるいは黄色ブドウ球菌 1 × 10⁷ CFU/3 µl を経膈投与した。
- (9) TSST-1 と IFN-γ の測定：TSST-1 や黄色ブドウ球菌の経膈投与後、マウスの血清、子宮、脾臓を採取し、臓器については 0.5% CHAPS を含む PBS 中でホモジナイズ後、血清および臓器ホモジネート上清中の TSST-1 と IFN-γ を ELISA で定量した。
- (10) 組織学的評価：黄色ブドウ球菌を経膈投与 24 時間後子宮を摘出し、固定後切片を作製し、hematoxylin and eosin 染色およびグラム染色を行った。
- (11) 黄色ブドウ球菌を経膈投与 24 時間後子宮を摘出し、PBS 中でホモジナイズ後、tryptic soy 寒天平板に接種し、37 °C、24 時間培養後に生じたコロニーを数え、CFU を算出した。

4. 研究成果

(1) TSST-1 結合タンパク質の同定と性質：

HeLa 229 細胞全タンパク質の far-Western プロットにおいて、TSST-1 は約 50 KDa、pI8.0 の分子と結合する可能性が認められた。LC-MS/MS 解析で得られたアミノ酸配列のデータベース検索により、この分子は septin ファミリー分子であることが示された。プルダウンアッセイから、本分子と TSST-1 の直接結合が示された。GFP-septin 発現 HeLa 229 細胞において TSST-1 と septin の共局在が認められた。また、septin はオートファゴソームを包囲するような局在を示したが、TSST-1 処理細胞ではオートファジー抑制に伴い septin 量が低下した。さらに、septin 発現をサイレンシングした HeLa 229 細胞は、TSST-1

のオートファジー抑制作用が認められなかった。以上の結果より, septin と TSST-1 はオートファジー調節において密接に相互作用を示すことが示唆された。

(2) Septin コンディショナルマウスの作製:

オートファジー調節における Septin 及び TSST-1 との相互作用を知るために, Cre-LoxP 法により全身の septin ノックアウトマウスの作製を試みたが, homologous マウスは胎生致死を示した。そこで, コンディショナルマウス作製に切り替え, Septin^{flox/flox} マウスを作製し, ケラチノサイト発現コンディショナルマウスの作製を行っているところである。

(3) Atg5 コンディショナルマウスの作製:

オートファゴソーム形成の必須分子である Atg5^{flox/flox} マウスを導入し, ケラチノサイト発現コンディショナルマウスの作製を行った。Atg5^{flox/flox}::K5Cre マウスでは黄色ブドウ球菌を皮膚感染させた場合, 野生マウスに比べ菌の排除能が低下していた。この結果は, オートファジー欠損あるいはオートファジー抑制状態では, 黄色ブドウ球菌感染が促進される可能性が考えられる。

(4) マウスにおける黄色ブドウ球菌経膈感染における TSST-1 による全身炎症誘導:

本研究者は初めて, NSET device を用いて経膈感染マウスの作製に成功した。 *S. aureus* 834 株 (野生型 TSST-1 産生株) あるいは *tst* 株 (834 株の TSST-1 産生欠損株) を経膈感染させたところ, 両株とも子宮では同程度に検出されたが, 脾臓, 肝臓, 腎臓では検出されず, 全身伝播は行われなかった。一方, 感染 24 時間後に IFN- γ は 834 株感染では脾臓で検出された。834 株感染では子宮で産生された TSST-1 が脾臓に移行した。さらに, rTSST-1 を経膈投与すると, 投与 24 時間後に子宮, 脾臓, 血中で検出された。スーパー抗原活性が欠損している mTSST-1 の経膈投与の体内分布は rTSST-1 と同様であったが, IFN- γ は検出されなかった。これらの結果は, 菌そのものではなく局所で産生された TSST-1 が体内分布し, スーパー抗原活性を発揮し, 全身炎症を起こす可能性を示唆している。

(5) 黄色ブドウ球菌経膈感染におけるオートファジーの関与:

本研究者は, TSST-1 によるオートファジー抑制にはスーパー抗原活性は関与しないことを報告している¹⁾。そこで, 感染に対するスーパー抗原活性のバイアスを排除するため mTSST-1 発現黄色ブドウ球菌を用いて, 経膈感染に対する TSST-1 がオートファジーに及ぼす影響を検討した。RN/pJE 株あるいは RN/*mtst* 株を経膈投与し, 24 時間後の子宮の菌数及び炎症は RN/pJE 株に比べ RN/*mtst* 株で顕著であったが, オートファジー (LC-11) は N/*mtst* 株で抑制状態にあった。これらの結果から, TSST-1 のオートファジー抑制は, 子宮上皮の感染を促進する可能性を示唆している。

従って, 黄色ブドウ球菌感染においてオートファジーは殺菌的に働き感染防御に関与している可能性が示唆される。

参考文献

1) Asano K, Asano Y, Ono HK, Nakane A. Suppression of starvation-induced autophagy by recombinant toxic shock syndrome toxin-1 in epithelial cells. PLoS One 9(11), e113018, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0113018.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

Ono HK Hirose S, Narita K, Sugiyama M, Asano K, Hu D-L, Nakane A. Histamine release from intestinal mast cells induced by staphylococcal enterotoxin A (SEA) evokes vomiting reflex in common marmoset. PLoS Pathog, 査読有, 15(5), 2019, e1007803 (on line journal,

オープンアクセス). doi.org/10.1371/ journal.ppat.1007803.

Fang R, Cui J, Cui T, Guo H, Ono HK, Park C-H, Okamura M, Nakane A, Hu D-L. Staphylococcal enterotoxin C is an important virulence factor for mastitis. *Toxins*, 査読有, 11(3), 2019, 141 (on line journal, オープンアクセス), doi:10.3390/toxins11030141.

Ono HK, Hachiya N, Suzuki Y, Naito I, Hirose S, Asano K, Omoe K, Nakane A, Hu D-L. Development of an immunoassay for detection of staphylococcal enterotoxin-like J, a non-characterized toxin. *Toxins*, 査読有, 10(11), 2018, 458 (on line journal, オープンアクセス), doi.org/10.3390/toxins10110458.

Asano K, Narita K, Hirose S, Nakane A. Contribution of toxic shock syndrome toxin-1 to systemic inflammation investigated by a mouse model of cervicovaginal infection with *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol*, 査読有, 207(5-6), 2018, 297-306, 2018. Oct 13. doi 10.1007/s00430-018-0551-4.

Hirose S, Narita K, Asano K, Nakane A. Salmon cartilage proteoglycan promotes the healing process of *Staphylococcus aureus*-infected wound. *Heliyon*, 査読有, 4(3), 2018, e00587 (on line journal, オープンアクセス), doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00587.

Narita K, Asano K, Morimoto Y, Igarashi T, Hamblin MR, Dai T, Nakane A. Disinfection and healing effects of 222-nm UVC light on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in mouse wounds. *J Photochem Photobiol B Biology*, 査読有, 178(1), 2018, 10-18 (オープンアクセス), doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.10.030.

Hu D-L, Ono HK, Isayama S, Okada R, Okamura M, Lei LC, Liu ZS, Zhang X-C, Liu MY, Cui JC, Nakane A. Biological characteristics of staphylococcal enterotoxin Q and its potential risk for food poisoning. *J Appl Microbiol*, 査読有, 122(6), 2017, 1672-1679 (オープンアクセス), doi:10.1111/jam.13462.

Narita K, Asano K, Nakane A. IL-17A plays an important role in protection induced by vaccination with fibronectin-binding domain of fibronectin-binding protein A against *Staphylococcus aureus* infection. *Med Microbiol Immunol*, 査読有, 296(3), 2017, 225-234 (オープンアクセス), doi:10.1007/s00430-017-0499-9.

Asano K, Nakane A. Interplay between autophagy and pathogenic bacteria: Toxins secreted by *Staphylococcus aureus* and their impact on autophagy. *Horosaki Med J*, 査読有, 67(2-4), 2017, 115-128.

Ono HK, Hirose S, Naito I, Sato'o Y, Asano K, Hu D-L, Omoe K, Nakane A. The emetic activity of staphylococcal enterotoxins, SEK, SEL, SEM, SEN and SEO in a small emetic animal model, the house musk shrew. *Microbiol Immunol*, 査読有, 61(1), 2017, 12-16, Doi: 10.1111/1348-0421.12460.

[学会発表](計11件)

浅野クリスナ, 中根明夫. Role of toxic shock syndrome toxin-1 on tampon-related toxic shock syndrome. 第92回日本細菌学会総会, 2019年4月23日-25日, 札幌コンベンションセンター(札幌市).

Asano K, Nakane A. Establishment of a mouse cervicovaginal infection model to investigate the role of toxic shock syndrome toxin-1 on uterine infection of *Staphylococcus aureus*. 第63回日本ブドウ球菌研究会 2018年8月31日-9月1日, 鹿児島大学(鹿児島市).

Asano K, Nakane A. Contribution of toxic shock syndrome toxin-1 to tampon-related toxic shock syndrome investigated by a mouse model of cervicovaginal infection. 18TH International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections, 2018年8月23日-26日, The Maersk Tower (Copenhagen, Denmark) .

Asano K, Nakane A. Systemic distribution of TSST-1 investigated by vaginocervical infection of mouse model. 第91回日本細菌学会総会, 2018年3月27日-29日, 福岡国際会議場(福岡市) .

Asano K, Nakane A. Establishment of a mouse uterine infection model of *Staphylococcus aureus* for studying a role of toxic shock syndrome toxin-1. 第46回日本免疫学会総会 2017年12月12日-14日, 仙台国際センター(仙台市) .

Asano K, Nakane A. Novel function of toxic shock syndrome toxin-1 contributes to autophagy and *Staphylococcus aureus* infection. (シンポジウム), 第62回日本ブドウ球菌研究会, 2017年9月1日-2日, 北里大学獣医学部(青森県十和田市) .

Asano K, Nakane A. Effect of toxic shock syndrome toxin-1 on *Staphylococcus aureus* infections in uterine and skin mouse models. IUMS 2017 Singapore International Union of Microbiological Societies, 2017年8月17日-21日, Sands Expo Convention Centre (Singapore).

Asano K, Nakane A. Impact of toxic shock syndrome toxin-1 on autophagy and skin infection of *Staphylococcus aureus*. The 8th International Symposium on Autophagy, 2017年5月29日-6月1日, Nara Kasugano International Forum Iraka (奈良市) .

Asano K, Nakane A. Role of toxic shock syndrome toxin-1 on cervical and skin infections of *Staphylococcus aureus*. 第90回日本細菌学会総会 2017年3月19日-21日, 仙台国際センター(仙台市) .

Asano K, Nakane A. Toxic shock syndrome toxin-1 contributes to *Staphylococcus aureus* infection mediated by autophagy suppression. 17TH International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections 2016年8月30日-9月2日, Nine Tree Convension Gwanghwamun (Seoul, Korea).

Asano K, Nakane A. Manipulation of autophagy by toxic shock syndrome toxin 1 contributes to *Staphylococcus aureus* infection. The 13th Korea-Japan International Symposium on Microbiology, 2016年5月13日, The K-Hotel (Gyeongju, Korea).

[その他]

ホームページ等

感染生体防御学講座、生体高分子健康科学講座

<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~mai/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：浅野クリスナ

ローマ字氏名：(Asano Krisana)

研究協力者氏名：小野久弥

ローマ字氏名：(Ono Hisaya)

研究協力者氏名：成田浩司

ローマ字氏名：(Narita Kouji)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。