

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460533

研究課題名(和文)アトピー性皮膚炎感染黄色ブドウ球菌の病原性基盤

研究課題名(英文)Virulence mechanism of atopic dermatitis-related *S. aureus*

研究代表者

菅井 基行 (Sugai, Motoyuki)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・教授

研究者番号：10201568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：AD由来株とnon-AD由来株のそれぞれのマウス固着菌数の比を解析した結果、AD由来株でFKOマウスに有意に固着していることが判明した。また蛍光AD株の作製を目指して発現プロモーターとしてsarA P1 promoter、そして、sod遺伝子のRBS配列に置き換えたプラスミドを作製することで、良好なGFP発現AD株が作製できた。AD由来株TF3378のドラフトゲノム配列を取得し、gap箇所をサンガー法によりclosingを行って、最終的に完全長のゲノム配列を得ることができた。他の株間とのゲノム比較解析した結果、AD由来株に特徴的な病原関連因子の候補となる幾つかの遺伝子を検出できた。

研究成果の概要(英文)：Comparison of adherent bacterial number of AD-derived *S. aureus* and non AD-derived *S. aureus* to the skin of FKO mouse indicated AD-derived *S. aureus* adhered more to the skin. We established an expression plasmid carrying sarA P1 promoter and RBS sequence of sod gene hooked with gfp and transformed AD-derived *S. aureus*. We also finished complete DNA sequencing of TF3378 (AD-derived) genome. Comparison with other finished sequences of *S. aureus* revealed some potential virulence-related genes specific to AD-derived *S. aureus*.

研究分野：Bacteriology

キーワード：S. aureus

1. 研究開始当初の背景

近年、アトピー性皮膚炎 (Atopic dermatitis, AD) の患者は増加傾向にあり、小児期のみではなく成人患者も増加している。AD 患者の患部からは黄色ブドウ球菌がほぼ 100%に近い確率で分離される事は周知である。しかしながら、AD 皮膚に感染する黄色ブドウ球菌の特性、アトピー素因を有する皮膚への黄色ブドウ球菌感染が皮膚炎の増悪化、菌の定着を招くのか、皮膚炎の状態が黄色ブドウ球菌の感染・定着を誘発するのかは明らかになっていない。これらを検証する為にはアトピー素因を持つ動物を用いた感染モデル実験が必要となる。

2. 研究の目的

代表的な皮膚感染症原因菌である黄色ブドウ球菌は、アトピー性皮膚炎 (Atopic dermatitis, AD) の増悪化にも関連し、難治化の要因の一つである。本研究は、黄色ブドウ球菌の AD 皮膚への菌の付着・定着性を、フィラグリン欠損マウスと野生型マウスを用いて検討し、AD 皮膚に感染する株特有の皮膚定着機構を解明することを目的とする。本研究の遂行により、AD 増悪化における黄色ブドウ球菌の初期の感染メカニズムを理解し、慢性疾患の予防的なコントロールにつながる情報基盤を確立する事ができると考えられる。

3. 研究の方法

・皮膚環境に対する適応性の解析

蛍光発色させた AD 由来株を用いて、FKG-KO マウスに感染させてアトピー皮膚環境への本株の適応性を他の株と比較解析する。また、AD 由来株の有する様々な皮膚環境因子に対する抵抗性を評価する。

・皮膚への固着性に関わる細菌側の因子の同定

FKG-KO マウスの皮膚上での AD 由来株の遺伝子発現パターンを野生型マウスと比較して菌固着に関連する因子を探索する。また、ゲノム比較解析から AD 由来株の皮膚固着形成機序についてアプローチする。

4. 研究成果

・皮膚環境に対する適応性の解析

ヘアレス FKG-KO, WT マウスを用いた皮膚付着/固着実験を行った。その結果、AD 由来株と non-AD 由来株における FKG-KO 及び WT マウス皮膚での付着能は、有意な差が認められなかった。しかしながら、AD 由来株と non-AD 由来株のそれぞれのマウス固着菌数の比を解析した結果、AD 由来株で FKG マウスに有意に固着していることが判明した。

これまでに蛍光 AD 株の作製が困難であったが、発現プロモーターとして *sarA* P1 promoter、そして、*sod* 遺伝子の RBS 配列に置き換えたプラスミドを作製することで、良

質な GFP 発現 AD 株が作製できた。

・皮膚への固着性に関わる細菌側の因子の同定

AD 由来株の固着能に関わる遺伝子を探索するため、また、AD 由来株で特徴的な病原関連遺伝子を探索するため、AD 由来株 TF3378 のドラフトゲノム配列を取得し、gap 箇所をサンガー法により closing を行って、最終的に完全長のゲノム配列を得ることができた。他の株間とのゲノム比較解析した結果、AD 由来株に特徴的な病原関連因子の候補となる幾つかの遺伝子を検出できた。そのうちのひとつとして、エンテロトキシン様因子をコードする遺伝子に着目し、組換え体を作製した。ヘアレス FKG-KO マウスを用いた病原性解析を行ったところ、血管拡張や産毛の脱毛反応が観察された。一般的に黄色ブドウ球菌の多くのエンテロトキシンはスーパー抗原活性により、種々のサイトカイン遊離を惹起する。この新規エンテロトキシン様因子も免疫応答の惹起による生体反応を引き起こしていることが考えられた。

詳細な病原性解析を進めるためには、AD 株の遺伝子組み換え変異株の作製が必要不可欠である。ところが、AD 株では常法の相同組み換え法による遺伝子欠損株の作製が困難であったので、新たな遺伝子改変技術として、CRISPR/Cas9 を用いて、時間を要したが黄色ブドウ球菌用に改変したシステムを構築できた。並行して、mRNA レベルで発現を抑制する CRISPRi 用プラスミドを作製し、様々な病原関連因子の発現を効率良くオフにすることも検証した (投稿中)。

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 12 件)

- 1) Ono, H.K., Sato'o, Y., Narita, K., Naito, I., Hirose, S., Hisatsune, J., Asano, K., Hu, D.L., Omoe, K., Sugai, M., Nakane, A. Identification and characterization of a novel Staphylococcal emetic toxin. Appl. Environ. Microbiol. 2015. 81:7034-7040.
- 2) Sato'o, Y., Hisatsune, J., Nagasako, Y., Ono, H.K., Omoe, K., Sugai, M. Positive regulation of Staphylococcal enterotoxin H by Rot (repressor of toxin) protein and its importance in linalcomplex 81 subtype 1 lineage-related food poisoning. Appl. Environ. Microbiol. 2015. 81:7782-7790.
- 3) Laborel-Preneron, E., Bianchi, P., Boralevi, F., Lehours, P., Frayssé, F., Morice-Picard, F., Sugai, M., Sato'o, Y., Badiou, C., Lina, G., Schmitt, AM., Redoules, D., Casas, C., Davrinche, C. Effects of the *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* serectomes isolated from the skin microbiota of atopic children on CD4+ T cell activation.

- PLoS One. 2015. 10:e0141067.
- 4) Horimukai K, Morita K, Narita M, Kondo M, Kitazawa H, Nozaki M, Shigematsu Y, Yoshida K, Niizeki H, Motomura K, Sago H, Takimoto T, Inoue E, Kamemura N, Kido H, Hisatsune J, Sugai M, Murota H, Katayama I, Sasaki T, Amagai M, Morita H, Matsuda A, Matsumoto K, Saito H, Ohy Y. Application of moisturizer to neonates prevents development of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014. 134:824-830.
 - 5) Harada-Hada K, Harada K, Kato F, Hisatsune J, Tanida I, Ogawa M, Asano S, Sugai M, Hirata M, Kanematsu T. Phospholipase C-related catalytically inactive protein participates in the autophagic elimination of *Staphylococcus aureus* infecting mouse embryonic fibroblasts. *PLoS One*. 2014. 9:e98285.
 - 6) Hagiya H, Hisatsune J, Kojima T, Shiota S, Naito H, Hagioka S, Morimoto N, Otsuka F, Sugai M. Comprehensive analysis of systemically disseminated SY8/non-USA300 type community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Intern Med*. 2014. 53:907-912.
 - 7) Kayama S, Shigemoto N, Shimizu W, Kuwahara R, Ikeda M, Ikebe K, Maeda K, Hisatsune J, Ohge H, Sugai. Tripoli metallo-beta-lactamase-1 (TMB-1)-producing *Acinetobacter* spp. With decreased resistance to imipenem in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2014. 58:2477-2478.
 - 8) Tatsukawa N., Hisatsune J., Hayashi I., Sugai M., Regulatory mechanism of cell wall protein Skip in *S. aureus*. 2014/8/26-8/29. Chicago Palmer House Hilton. USA.
 - 9) Hisatsune J., Murakami T., Tatsukawa N., Hayashi I., Sugai M. Skip, a cell wall protein of *S. aureus* for biphasic skin adhesion strategies. 16th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections. 2014/8/26-8/29. Chicago Palmer House Hilton. USA.
 - 10) Shigemoto N, Kayama S, Kuwahara R, Hisatsune J, Kato F, Nishio H, Yamasaki K, Wada Y, Sueda T, Ohge H, Sugai M., A novel metallo-beta-lactamase, IMP-34, in *Klebsiella* isolates with decreased resistance to imipenem. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 2013. 76:119-121.
 - 11) Kobayashi K, Hayashi I, Kouda S, Kato F, Fujiwara T, Kayama S, Hirakawa H, Itaha H, Ohge H, Gotoh N, Usui T, Matsubara A, Sugai M., Identification and characterization of a novel *aac(6)-lag* associated with the *bla_{IMP-1}*-integron in a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 2013. 8:e70557.

- 12) Hisatsune J, Hirakawa H, Yamaguchi T, Fudaba Y, Oshima K, Hattori M, Kato F, Kayama S, Sugai M. Emergence of *Staphylococcus aureus* carrying multiple drug resistance genes on a plasmid encoding exfoliative toxin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013. 57:6131-6140.

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1) 達川伸行, 久恒順三, 林幾江, 菅井基行. 黄色ブドウ球菌の表層タンパク質 Skip の発現制御機構の解析. 第 67 回日本細菌学会中国四国支部総会. 2014/10/4-5. 徳島文理大学
- 2) 久恒順三, 桑原隆一, 加藤文紀, 菅井基行. Impetigo/SSSS 原性 *S. aureus* pETB の薬剤耐性遺伝子獲得. 第 87 回日本細菌学会総会. 2014/3/26-28. 東京船堀

〔図書〕(計 1 件)

- 1) 久恒順三, 達川伸行, 佐藤祐介, 加藤文紀, 鹿山鎮男, 菅井基行 解説 黄色ブドウ球菌. 感染症内科. 科学評論社 2013. 1;275-285.

〔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
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/saikin/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅井 基行 (SUGAI MOTOYUKI)

広島大学大学院医歯薬保健学研究院・教授
研究者番号 : 10201568

(2) 研究分担者

久恒 順三 (HISATSUNE JUNZO)

広島大学大学院医歯薬保健学研究院・助教
研究者番号： 40513180

(3)連携研究者
()

研究者番号：