

# 黄色ブドウ球菌免疫かく乱タンパク質を介した アトピー性疾患発症・増悪機構の解明

名古屋市立大学大学院薬学研究科医療機能薬学専攻 衛生化学分野

伊藤 佐生智

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) colonizes approximately 30% of the population asymptotically but causes various diseases such as food poisoning, suppurative disease, sepsis, or systemic infections. *S. aureus* is associated with atopic dermatitis (AD); it frequently colonizes in the skin of atopic dermatitis. *S. aureus* is notorious for producing a series of exotoxins and immune disturbing proteins, however none of the staphylococcal exotoxins except with  $\delta$ -toxin and phenol soluble modulins had been reported to activate mast cells and basophils, critical immune cells involved in the development of Th2 cell-mediated allergic inflammation such as atopic dermatitis. In this study, we aimed to identify staphylococcal exotoxins that activate mast cells and basophils. We found that  $\alpha$ -hemolysin, a principal small  $\beta$ -barrel pore-forming toxin, did not activate mast cells individually, but it augmented the degranulation induced by other stimuli. We showed that among 14 members of staphylococcal superantigen-like protein, SSL12 induced the degranulation and cytokine production of mast cell in an IgE-independent manner, and SSL12 evoked local inflammation in vivo. We also showed that SSL12 induced the production of IL-4 in bone marrow derived basophils and freshly isolated murine basophils in bone marrow cells. These results propose the novel immune regulatory activity of  $\alpha$ -hemolysin and SSL12 by activating mast cells and basophils that contributes to the development of allergic inflammation disorders such as atopic dermatitis.

## 1. 緒言

アトピー性皮膚炎は皮膚の炎症を伴う疾患であり、その炎症においてはマスト細胞が中心的な役割を果たしている。また血液中の存在割合は少ないが多量のIL-4を産生する好塩基球もアトピー性皮膚炎の病態形成に関与している。一方、黄色ブドウ球菌は一部の健常人においても検出される常在菌であるが、食中毒、化膿性疾患や敗血症の起原菌でもある。黄色ブドウ球菌はアトピー性皮膚炎患部で高頻度に検出されることが知られており、本菌とアトピー性皮膚炎との関連が指摘されている。黄色ブドウ球菌は溶血毒素ヘモリジンや白血球崩壊毒素ロイコシジン、MHCとTCRを非特異的に架橋してT細胞の非特異的活性化を引き起こすスーパー抗原、スーパー抗原活性も示す腸管毒素エンテロトキシンなど多彩な外毒素を産生する。さらに本菌はIgGのFc部に結合し、抗体の機能を阻害するProtein Aをはじめとする、多彩な免疫かく乱タンパク質を産生する。以前より黄色ブドウ球菌由来タンパク質がアトピー性皮膚炎の発症・増悪に関与している可能性が指摘されていたが、マスト細胞や好塩基球を活性化する毒素は見出されていなかった。最近黄色ブドウ球菌のペプチド性溶血毒素である $\delta$ 毒素やPSM (phenol soluble modulin) がマスト細胞

の脱顆粒を引き起こすことが示され<sup>1,2)</sup>、これらのペプチド性毒素がアトピー性皮膚炎増悪因子の一つであるという考えが受け入れられている。しかしながら他の黄色ブドウ球菌毒素もアトピー性皮膚炎の発症増悪に関与している可能性は依然残されている。本研究ではマスト細胞と好塩基球を活性化する黄色ブドウ球菌毒素を探索し、その生理機能を解析することで、黄色ブドウ球菌とアトピー性皮膚炎の毒素を介した関係を明らかにすることを目指した。

## 2. 方法

### 2.1. 組換え黄色ブドウ球菌毒素の調製

黄色ブドウ球菌毒素、免疫かく乱タンパク質は大腸菌を用いた組換えタンパク質として調整した。黄色ブドウ球菌 ATCC27733 株のゲノムより Primestar GxL (Takara) を用いて増幅後、発現プラスミド pCold-II (Takara) にクローニングした後、エンドキシンの産生能を欠いた ClearColi (Lucigen) に形質転換した。続いて IPTG 及びコールドショックにより組換え毒素を N 末端 6xHis 融合タンパク質として発現誘導した。大腸菌を回収し、超音波処理により破碎後、Niセファロース 6FF (GE healthcare) を用いて精製し、PBS に対して透析して調製した。

### 2.2. 好塩基球・マスト細胞の調製

マスト細胞は BALB/c マウス骨髄細胞を 10% FBS, ペニシリン, ストレプトマイシン, 2-メルカプトエタノール及びマウス IL-3 を添加した RPMI1640 培地で存在下 4 週間培養することにより調製した。好塩基球はマウス骨髄細胞を上述の条件で 2 週間培養したのち、c-Kit 陽性細胞をビオチン化抗 c-Kit 抗体 (BioLegend) とストレプトアビジン



Involvement of staphylococcal immune-disturbing proteins in atopic dermatitis

Saotomo Itoh

Department of Molecular and Cellular Health Science, Graduate School of Pharmaceutical Science, Nagoya City University

ンを共有結合した磁気ビーズ (IMAG Streptavidin Particles Plus DM, BD Bioscience) を用いて除去することにより調製した。調整したマスト細胞、好塩基球の確認はc-Kit及びFcεRIの発現をフローサイトメーター (FACD Verse, BD Bioscience) で解析することにより行った。

### 2. 3. マスト細胞, 好塩基球細胞機能に対する組換え毒素の影響

組換え毒素のマスト細胞の脱顆粒誘導活性及び細胞傷害活性は各々顆粒酵素β-ヘキソサミニダーゼ (βHex), 細胞質酵素乳酸脱水素酵素 (LDH) の放出により評価した。タイロド液に懸濁したマスト細胞 ( $1 \times 10^5$ /well) を毒素存在下で37°C, 30分インキュベート後, 遠心して上清を回収した。上清中のβHexの酵素活性をp-ニトロフェニル-N-アセチル-β-D-グルコピラノシド (富士フィルム) を基質として測定することで脱顆粒誘導活性を評価し, LDHの酵素活性をCytotoxicity LDH Assay Kit-WST (同仁化学) を用いて測定することで細胞傷害活性を評価した。好塩基球およびマスト細胞のサイトカインmRNAの発現は定量的RT-PCRにより評価した。10<sup>6</sup>の細胞を毒素で処理し, 3時間後に細胞を回収し, RNAを抽出した。全RNAをPrimescript RTMastermix (Takara) を用いて逆転写したのち, Thermal cycler Dice Real-Time System及びSYBR Green Premix Ex Taq Kit (Takara) を用いて個々のサイトカインmRNA発現量を測定した。サイトカインタンパク質はELISAにより測定した。10<sup>6</sup>の細胞を毒素で処理し, 24時間後に培養上清を回収し, 上清中のサイトカイン量をeBioscience ELISA Ready-SET Go (Thermo fisher) を用いて定量した。

### 2. 4. 組換え毒素による局所炎症誘導作用

毒素による局所炎症惹起作用はエバンスブルー漏出試験により評価した。BALB/cマウスに1%エバンスブルー溶液を尾静脈より投与し, 耳介に組換え毒素を皮内投与した。30分後, 血管からのエバンスブルーの漏出を観察した。写真撮影後, 耳介をホルムアルデヒドで抽出し, 620nmの吸収を測定することでエバンスブルー漏出量を評価した。

## 3. 結果

### 3. 1. 溶血毒素αヘモリジンによるマスト細胞の応答増強作用

αヘモリジン (Hla) は黄色ブドウ球菌の産生する代表的な溶血毒素であり, 標的細胞表面でホモ7量体からなる膜孔を形成し, 標的細胞を傷害する。Hlaはマスト細胞の活性化を惹起しないことがすでに報告されているが<sup>2)</sup>, 免疫複合体など他の刺激によるマスト細胞活性化に対する影響

は検証されていなかった。そこでHlaのマスト細胞の活性化に対する影響を解析した。先行研究と同様に, Hlaは30μg/mL以下の濃度でマスト細胞を傷害せず, 脱顆粒も誘導しなかった。一方でマスト細胞をIgE-抗原複合体, イオノフォアで処理した際に誘導される脱顆粒はHla存在下で2倍程度に増強された (図1AB)。この脱顆粒増強作用はHlaの濃度依存的であり, 10μg/mL以上のHlaの存在下で増強作用が観察された (図1C)。またHlaによる脱顆粒増強作用はカリウムイオンとナトリウムイオンの濃度を細胞内の濃度に一致させた緩衝液中では観察されなかった (図1D)。膜孔形成能を欠いた二つのHlaの変異体 (Hla (H35L); 溶血不全変異体, Hla (PSGS); 膜孔の本体であるβ-ステムに相当する領域をPSGSの4アミノ酸に置換した変異体) では脱顆粒増強能が認められなかった (図1E)。以上よりHlaは単独ではマスト細胞の脱顆粒を惹起しないが, 他の刺激によるマスト細胞の脱顆粒を増強すること, この脱顆粒増強作用にはHlaによる膜孔形成が必要であることが示された。

### 3. 2. Staphylococcal superantigen-like 12によるマスト細胞の活性化作用

黄色ブドウ球菌のStaphylococcal superantigen-like (SSL) ファミリーはスーパー抗原と類似の立体構造をとりながら, スーパー抗原活性を示さない14種からなる分泌毒素である。私たち及び海外のグループにより, SSLファミリーは種々の免疫関連分子を標的とし, その機能を阻害することで免疫回避に働く免疫かく乱タンパク質であることが示されている<sup>3)</sup>。しかしながらSSLファミリーのマスト細胞に対する作用は解析されていなかった。そこでSSLファミリーがマスト細胞を活性化するか否かを検討した。14種のSSLのうち, SSL1からSSL11及びSSL13はマスト細胞の脱顆粒を誘導しなかったが, SSL12はマスト細胞の脱顆粒を惹起し, SSL14もSSL12に比べ1/20程度であるが脱顆粒を誘導した (図2AB)。SSL12によるマスト細胞の脱顆粒の誘導は濃度依存的であり, 1.1μg/mL以上のSSL12によって有意に脱顆粒が誘導された (図2C)。先に報告されているδ毒素はマスト細胞に対しβHexと同時にLDHの漏出を引き起こしたが, SSL12は30μg/mLまでの濃度においてLDHの漏出を引き起こさなかった (図2D)。またSSL12はマスト細胞のIL-6及びIL-13のmRNAの発現とタンパク質分泌を誘導した (図2E-H)。さらにあらかじめエバンスブルーを静脈投与したマウスの耳介に10μgのSSL12を投与したところ, エバンスブルーの血管外への漏出が認められた (図3)。以上よりSSL12は直接マスト細胞を活性化し, 局所炎症を惹起することが示された。

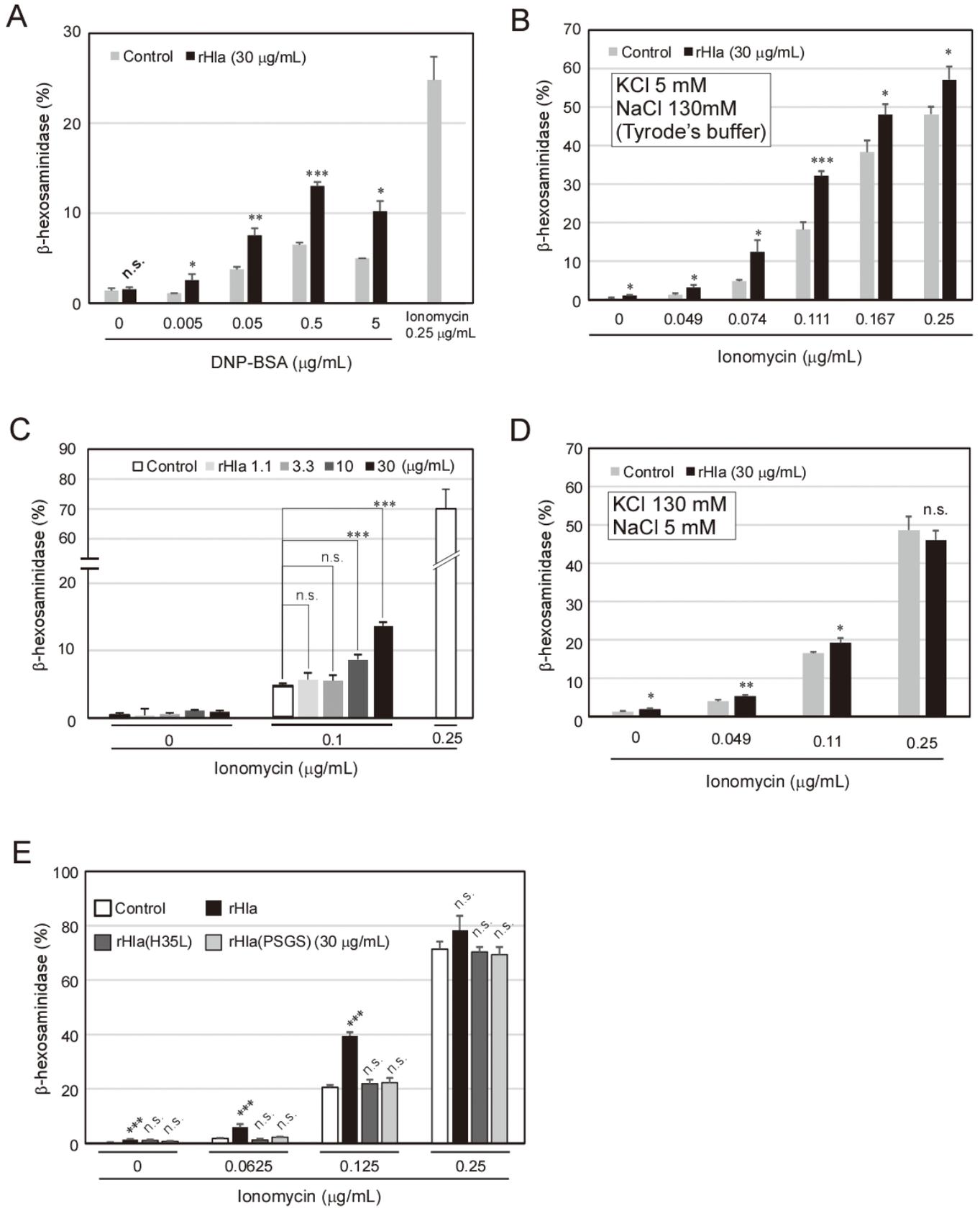


図1 Hlaによるマスト細胞の脱顆粒増強作用

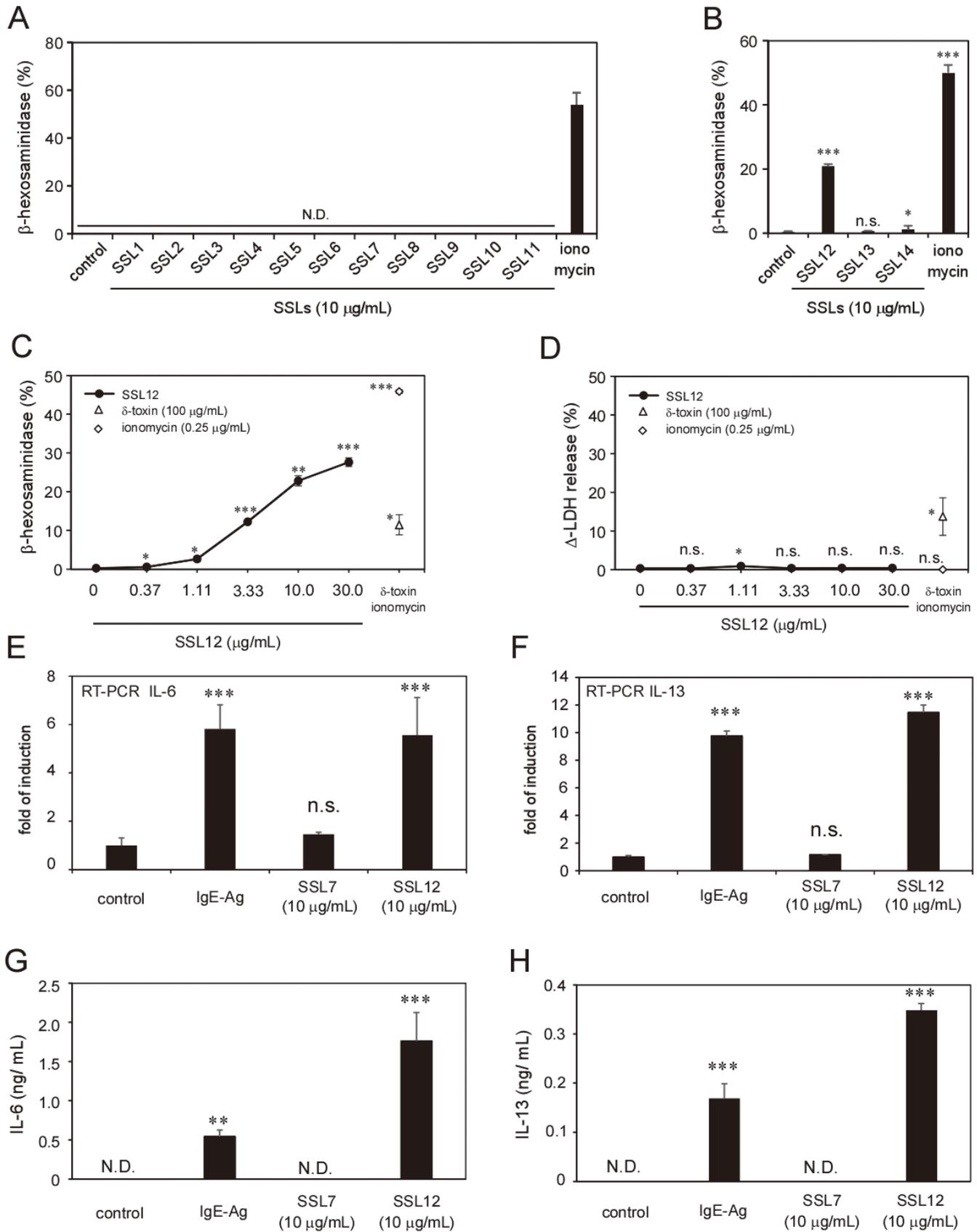


図2 SSL12によるマスト細胞の活性化

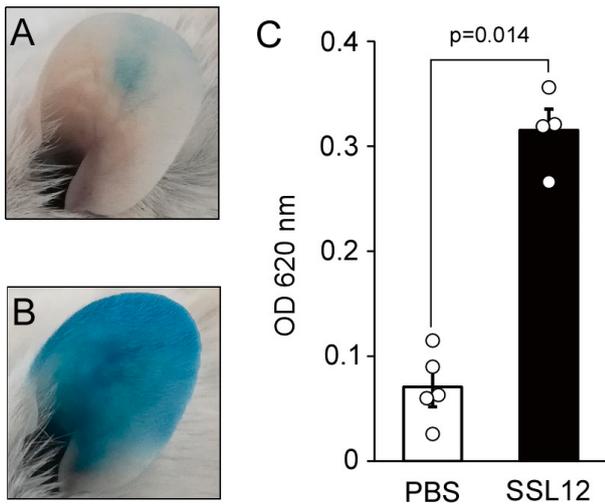


図3 SSL12の局所炎症誘導作用

### 3.3. SSL12による好塩基球からのIL-4産生の誘導

好塩基球の存在比率は血液中顆粒球の1%以下であるが、刺激に应答して大量のIL-4を産生することが知られている。好塩基球はIL-4産生を介してTh2型免疫反応を制御することからアトピー性皮膚炎への関与も示されている。そこでSSLファミリーが好塩基球を活性化するか否かを検討した。骨髓細胞を14日間IL-3存在下で培養することで、FcεRI (+) c-Kit (-) の好塩基球のフェノタイプを示す細胞に分化する(図4A)。このIL-3処理骨髓細胞を用いてSSLファミリーのIL-4誘導活性を検討した。SSL12で処理したIL-3処理骨髓細胞からIL-4の産生が認められ、SSL10, SSL14もSSL12と比して量は少ないがIL-4の誘導が認め

られた(図4B)。このIL-3処理骨髓細胞からc-Kit陽性細胞を除去して好塩基球を調製し(図4C), SSL10, SSL12, SSL14によるIL-4産生を評価したところ、SSL12のみが好塩基球からのIL-4産生を誘導した(図4D)。また熱処理したSSL12ではIL-4誘導能は認められなかった(図4E)。SSL12による好塩基球からのIL-4産生は濃度依存的であり、0.1 μg/mL以上のSSL12によって有意なIL-4産生が認められた(図4E)。SSL12によるIL-4産生はマウスより単離した直後の骨髓細胞においても認められた。以上よりSSL12は好塩基球からのIL-4産生を誘導することが示された。

## 4. 考察

本研究によりHlaは単独ではマスト細胞の傷害も活性化を引き起こさないが、他の刺激による脱顆粒を増強することが示された。変異型Hlaを用いた解析により、Hlaによるマスト細胞の脱顆粒増強作用にはHlaによる膜孔形成を必要とする。また細胞外のカリウム、ナトリウム組成を変更した条件での解析よりHlaによる脱顆粒の増強には、Hlaの形成した膜孔を介してのカチオンの流出入が必要である。マスト細胞が免疫複合体によって脱顆粒を誘導される際にはカリウムチャンネルK<sub>Ca</sub>3.1を介して細胞内のカリウムが流出し、その後のカルシウムイオンの流出と脱顆粒を促進することが知られている<sup>4)</sup>。マスト細胞に結合し、膜孔形成したHlaはイオンの通り道として機能し、カリウムの流出を促進することで脱顆粒を促進していると考えられる。

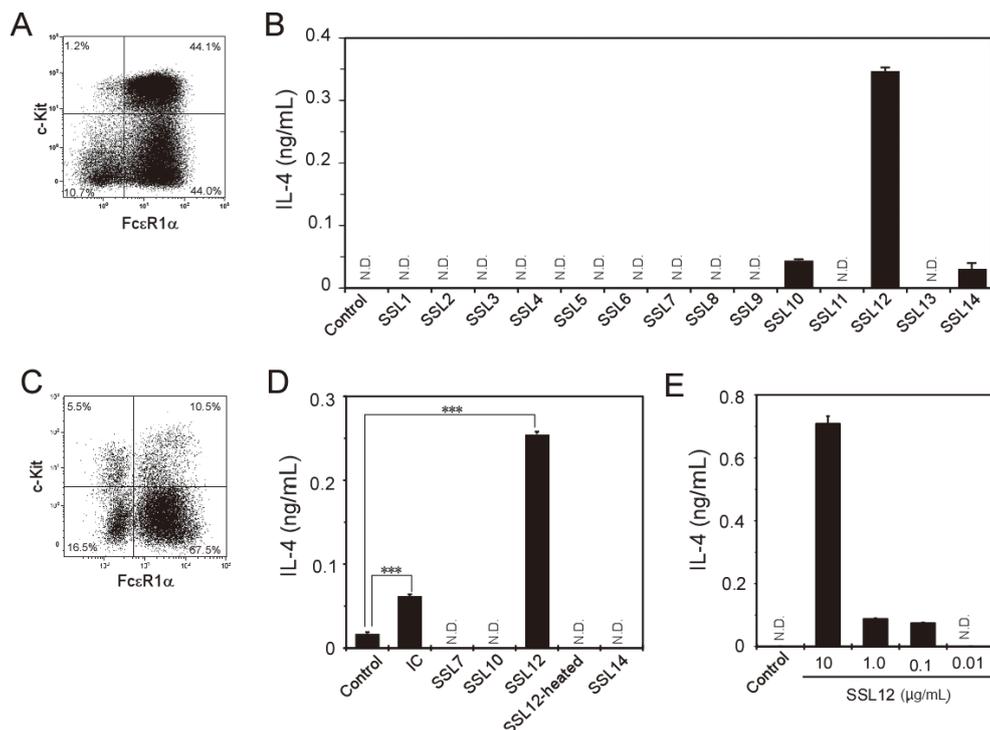


図4 SSL12による好塩基球からのIL-4産生

14種存在するSSLファミリーは構造的に類似性のない種々の免疫関連分子を標的とし、免疫かく乱作用を示すことが知られている。本研究によりSSLの一つSSL12がマスト細胞の脱顆粒とサイトカイン産生を誘導することが示された。マスト細胞を直接活性化する黄色ブドウ球菌毒素としてはペプチド性溶血毒素 $\delta$ 毒素とPhenol soluble modulinsが報告されている。 $\delta$ 毒素はマスト細胞に対し、脱顆粒と同時に膜傷害を引き起こすが、SSL12は膜傷害を引き起こさずに脱顆粒を誘導することから、SSL12は $\delta$ 毒素とは異なったメカニズムでマスト細胞を活性化していると考えられる。本研究で行った*in vitro*の実験はIgE及び抗原が存在しない条件下で行われている。したがってSSL12によるマスト細胞の活性化はIgE非依存的経路による。私たちはSSL12がマスト細胞の表面に結合すること、SSL12によるマスト細胞からのサイトカイン産生はチロシンキナーゼの阻害薬等で抑えられることを見出し、SSL12は何らかの受容体を介してマスト細胞を活性化していると考えられる。

本研究によりSSL12が好塩基球からのIL-4産生を誘導することも示された。好塩基球のIL-4産生を誘導する因子としてはIgE-抗原複合体、IL-3などのサイトカイン、寄生虫由来のプロテアーゼや細菌細胞壁成分などが知られている。本研究で見出したSSL12は細菌の外毒素としては初めてのIL-4誘導因子である。IL-3処理骨髓細胞を用いた解析ではSSL12だけでなくSSL10、SSL14も少ないながらIL-4を誘導したが、一方で調製した好塩基球においてはSSL12のみがIL-4を誘導した。したがってIL-3処理骨髓細胞におけるSSL10、SSL14によるIL-4産生は好塩基球の調製過程で除去されたc-Kit陽性細胞によるものであると考えられる。SSL14はマスト細胞においてSSL12の1/20程度であるが脱顆粒を誘導したこと、SSL10はIgG、プロトロンビンとホスファチジルセリンに結合することが報告されている。SSL10とSSL14は好塩基球以外の細胞に対し、SSL12とは異なった細胞に対してIL-4産生を誘導すると考えられる。SSL12は*in vitro*で調製した好塩基球だけでなく、好塩基球をわずか(0.5%)に含む、単離した直後の骨髓からもIL-4産生を誘導した。したがってSSL12は*in vivo*においてもIL-4産生を誘導しうると考えられる。SSL12による好塩基球からの*in vitro*でのIL-4産生の解析はIgE及び抗原が存在しない条件下で行われている。したがってSSL12はIgE非依存的に好塩基球を活性化すると考えられる。

## 5. 総括

本研究により、すでに報告されている $\delta$ 毒素やPhenol soluble modulinsだけでなく、黄色ブドウ球菌毒素HlaとSSL12が炎症のエフェクター細胞であるマスト細胞対

し活性化作用を示すことを明らかにできた。またSSL12が好塩基球を刺激してIL-4産生を誘導するという知見は、黄色ブドウ球菌が毒素を介して免疫応答をTh2優位に導き、免疫アレルギー疾患の発症増悪に関わる可能性を示すものである。今回見出した黄色ブドウ球菌毒素によるマスト細胞と好塩基球の活性化作用により、アトピー性皮膚炎と疾患患部での黄色ブドウ球菌の常在の関係を説明できる可能性がある。本研究の成果は、アトピー性皮膚炎をはじめとする免疫アレルギー性疾患の予防法、治療法の開発に寄与し、アレルギー患者の肉体・精神・社会的な健康の獲得・維持に貢献すると考えている。なお本報告書に記載した結果を含む内容で2019、2020年に論文発表を行った<sup>5-7)</sup>。

## (引用文献)

- 1) Nakamura Y, Oscherwitz J, Cease KB, Chan SM, Munoz-Planillo R, Hasegawa M, et al. Staphylococcus delta-toxin induces allergic skin disease by activating mast cells. *Nature*. 2013; 503 (7476) : 397-401.
- 2) Hodille E, Cuerq C, Badiou C, Bienvenu F, Steghens JP, Cartier R, et al. Delta Hemolysin and Phenol-Soluble Modulins, but Not Alpha Hemolysin or Pantone-Valentine Leukocidin, Induce Mast Cell Activation. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2016; 6: 180.
- 3) 伊藤佐生智. 黄色ブドウ球菌の産生する免疫かく乱毒素ファミリー staphylococcal superantigen-like proteins. *生化学*. 2017; 89 (6): 861-5.
- 4) Shumilina E, Lam RS, Wolbing F, Matzner N, Zemtsova IM, Sobiesiak M, et al. Blunted IgE-mediated activation of mast cells in mice lacking the  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel  $K_{Ca3.1}$ . *J Immunol*. 2008; 180 (12) : 8040-7.
- 5) Nishiyama S, Urabe A, Morikawa A, Kobayashi M, Onozaki K, Itoh S, et al. Staphylococcal superantigen-like 12 induces the production of interleukin 4 in murine basophils. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020; 532 (2): 200-4.
- 6) Hayashi K, Itoh S, Morikawa A, Onozaki K, Taki S, Tsuji T, et al. Staphylococcal alpha-hemolysin does not induce cell damage in murine mast cells but it augments the degranulation induced by FcepsilonRI cross-linking and ionomycin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019; 508 (1): 263-9.
- 7) Kobayashi M, Kitano T, Nishiyama S, Sanjo H, Onozaki K, Taki S, et al. Staphylococcal superantigen-like 12 activates murine bone marrow derived mast cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019; 511 (2): 350-5.