

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

柳井 真知

専攻分野：救急医学

コース：

指導教授：平 泰彦

主論文の題目：

Separately or Combined, LukG/LukH Is Functionally Unique Compared to Other Staphylococcal Bicomponent Leukotoxins
(LukG/LukH は黄色ブドウ球菌由来の他の二成分性白血球障害毒素と異なる特徴的な機能を持つ)

共著者：

Miguel A. Rocha, Anthony Z. Matolek, Archana Chintalacharuvu, Yasuhiko Taira, Koteswara Chintalacharuvu, David O. Beenhouwer

緒言

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*: *S. aureus*) は Panton-Valentine leukocidin (PVL)を代表としたさまざまな二成分性白血球障害毒素 (bicomponent leukotoxin: BCL) を産生する。*S. aureus* から分泌された二種類の外毒素が標的細胞膜上で複合体を形成することにより、細胞内へのカルシウムイオン (Ca^{2+}) 流入を促し、標的細胞膜に孔をあけ、さらにインターロイキン8 (IL-8)などの炎症性サイトカイン分泌を誘導して更なる組織障害を生じると考えられている (FBES Lett 552: 54-60, 2003)。本研究の目的は、2010年に新たに発見された *S. aureus* 由来の BCL である LukG/LukH に注目し、これまで発見され

ている BCL との違いや特徴を明らかにすることである。

方法

これまでに発見されている全ての BCL (PVL ; LukF-PV、LukS-PV、 γ ヘモリジン ; HlgA、HlgB、HlgC、LukDE ; LukD、LukE、LukGH ; LukG、LukH) のリコンビナントタンパクを精製し、ヒト末梢血由来の多核白血球に加え、次の点を比較検討した。①標的細胞内への Ca^{2+} 流入の経時的変化をカルシウム蛍光プローブである Fluo-4 を指標とし、イオノマイシンによる Ca^{2+} 流入と比較測定した。②細胞障害の程度はキットを用いた上清の LDH 濃度をトライトンによる完全な細胞融解時の LDH 濃度との比較で示した。③上清の IL-8 濃度を ELISA で測定し、さらに標的細胞における IL-8 の mRNA の発現を Reverse Transcription-PCR で示した。統計学的検定は t 検定または ANOVA (分散分析) で行った。

結果

LukG と LukH を同時に多核白血球に加えると (この場合を以後 LukGH と記載する) 経時的に細胞内 Ca^{2+} 濃度は増加したが、その程度は PVL (LukS-PV + LukF-PV) を多核白血球に加えた場合に比べ低く (10 分後の Ca^{2+} 流入 LukGH: 91%、PVL : 172%)、ピーク値の 50% の流入量に達するまでの時間も長かった (LukGH : 7.5 ± 0.6 分、PVL : 2.3 ± 0.2 分)。

逆に LukGH は PVL に比べ強い細胞障害性を示した (LukGH : 20 分後 5.0%、60 分後 24.7%、PVL : 20 分後 0.5%、60 分後 5.0%、 $p < 0.05$)。

カルシウムチャネル阻害薬 (メトキシベラパミル) で前処理した多核白血球を用いて同様の Ca^{2+} 流入試験を行ったところ、メトキシベラパミルの存在下では LukGH が惹起する Ca^{2+} の細胞内流入が阻害され (10 分後の Ca^{2+} 流入 メトキシベラパミル存在下 : 30.3%、非存在下 : 80.7%)。LukGH により誘導される Ca^{2+} 流入がカルシウムチャネルを介する可能性

が示唆された。LukG または LukH 単独では Ca^{2+} 流入、細胞障害作用を認めなかった。

LukG または LukH と、PVL、 γ ヘモリジン、LukDE の各単独成分とを組み合わせても多核白血球への Ca^{2+} 流入も、細胞障害も認めなかったことから LukG と LukH は互いの存在下でのみ Ca^{2+} 流入、細胞障害作用を發揮すると判断した。

LukGH を多核白血球に加えると、PVL に比べ有意に高い濃度の IL-8 が分泌された (LukGH: 4 時間後 278.5 pg/mL、8 時間後 1291.7 pg/mL、PVL: 4 時間後 63.9 pg/mL、8 時間後 520.7 pg/mL、 $p < 0.05$)。さらに LukG、LukH 単独でも多核白血球からの高い IL-8 分泌誘導を示した (LukG: 4 時間後 4013.2 pg/mL、8 時間後 19935.1 pg/mL、LukH: 4 時間後 5856.4 pg/mL、8 時間後 25418.2 pg/mL)。LukG、LukH 単独成分による IL-8 誘導作用は LukG、LukH に暴露させた多核白血球における IL-8 の mRNA 発現を RT-PCR で認めたことから裏付けられた。

NF κ B 阻害薬 (Bay11-7082) で前処理した多核白血球では IL-8 分泌が抑制されたことから LukG、LukH による IL-8 産生分泌機序に NF κ B 経路が関与する可能性が示唆された (LukG Bay11-7082 存在下: 4 時間後 3.0 pg/mL、8 時間後 49.5 pg/mL、非存在下: 4 時間後 3098.1 pg/mL、8 時間後 7354.8 pg/mL、LukH Bay11-7082 存在下: 4 時間後 10.4 pg/mL、8 時間後 57.6 pg/mL、非存在下: 4 時間後 2879.3 pg/mL、8 時間後 16158.8 pg/mL)。

考察

LukGH は多核白血球に対し強い細胞障害性を示し PVL よりは弱いものの Ca^{2+} 流入誘導作用を示した。さらに LukGH が PVL に比べ多核白血球からの有意に強い IL-8 分泌誘導作用を有すること、加えて LukG、LukH が単独でも多核白血球からの強力な IL-8 分泌誘導作用を持つことを本研

究は初めて示した。過去の研究では BCL は二成分が標的細胞膜上で複合体を形成して初めて作用を発揮するものであり、単独成分のみでは全く活性を持たないとされていた (Proc Natl Acad Sci USA; 107:5587-5592, 2010)。

さらに LukG、LukH による IL-8 遺伝子の転写活性化過程に転写因子である NF κ B が関わっている可能性を本研究は間接的ではあるが示した。

IL-8 は好中球の遊走や脱顆粒、血管内皮細胞への接着など多彩な作用を有する化学誘導物質である。LukG、LukH あるいは LukGH による強い IL-8 分泌誘導作用が菌自身あるいは感染宿主にとって利益または害となるのかについてはまだ明確でないが、LukG、LukH は PVL と異なりほとんどの黄色ブドウ球菌株から産生されるため (Cell Microbiology; 14: 1019-1036, 2012)、本研究が明らかにした LukGH の特徴は黄色ブドウ球菌の病原性を説明しうるものとして、臨床的に大きな意義を持つと考える。

結論

LukGH は①PVL に比べ強い細胞障害性を示すが Ca²⁺流入作用は弱く遅い ②LukG、LukH は他の BCL とは活性のあるペアを作らない ③LukGH、および LukG、LukH の単独成分は強い IL-8 産生誘導作用を示す、という 3 点において他の黄色ブドウ球菌由来 BCL と異なる特徴的な性質を有する。