

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	弘前大学大学院医学研究科感染生体防御学講座 氏名 浅野 クリスナ
(論文題目) <b>Suppression of starvation-induced autophagy by recombinant toxic shock syndrome toxin-1 in epithelial cells</b> (遺伝子組換え毒素性ショック症候群毒素-1による上皮細胞の飢餓誘導オートファジーの抑制)	
<p><i>Staphylococcus aureus</i> (以下黄色ブドウ球菌)は、生命に関わる症状を含む様々な感染症状の原因となる重要なヒト病原体である。従来本菌は細胞外増殖菌として扱われてきたが、近年では、細胞内への侵入と増殖が報告されており、ケラチノサイト、線維芽細胞、内皮細胞、上皮細胞などの様々な非免疫性貪食細胞に感染することが知られている。本菌感染機構においては、酵素及び毒素を含む様々な病原因子が重要な役割をもつ。</p> <p>毒素性ショック症候群毒素-1(以下 TSST-1)は黄色ブドウ球菌により産生される発熱性スーパー抗原の 1 つで、宿主免疫系を強く賦活するメカニズムが明らかになっている。この毒素は、抗原提示細胞の主要組織適合複合体クラス II 分子と、V<math>\beta</math> element を有する T 細胞受容体の間で架橋を形成し、T 細胞の盛んな増殖と非制御性の炎症性サイトカイン放出を惹起する。一方近年の報告では、TSST-1 が内皮細胞及び上皮細胞の未知の受容体に結合し、細胞内に侵入することが示唆された。加えて、マウスに遺伝子組換え TSST-1(以下 rTSST-1)で免疫すると、黄色ブドウ球菌感染に対して予防効果を示すことが明らかとなった。この際、TSST-1 特異的な抗体が TSST-1 のスーパー抗原活性を中和するだけではなく、TSST-1 特異的細胞性免疫により宿主組織における細菌の増殖を抑制していると考えられ、TSST-1 がスーパー抗原活性以外の生物活性をもつことが示唆された。病原性細菌が宿主細胞に感染する過程では、宿主防御機構であるオートファジーが誘導され、細胞内の細菌はライソゾームに捕捉・分解される。これに対して、病原菌の中には、オートファジーを回避あるいは破綻させて、自身の増殖を促進する戦略をもつものが報告されているが、黄色ブドウ球菌とオートファジー機構の相互作用については不明であった。そこで本研究では、TSST-1 の上皮細胞オートファジーに対する作用について解析を行った。</p> <p>宿主細胞のオートファゴソームを可視化するため、ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa 229 に EGFP-hLC3 を導入した。これを飢餓条件で培養すると、オートファゴソームの形成を示す GFP-LC3 のスポットが、通常の培養条件に比べ著明に増加した。これらは、rTSST-1 の添加で明らかに減少し、TSST-1 が HeLa 229 においてオートファゴソーム形成を抑制することが示唆された。この際、rTSST-1 はオートファゴソームとライソゾームの融合を促進しなかった。さらに、ライソゾーム酵素に対する阻害剤の添加では、rTSST-1 によるオートファゴソームの減少は回復しなかった。これらの結果から、rTSST-1 はオートファゴソームライソゾームの融合とオートファゴソーム分解を促進していないと考えられた。また、rTSST-1 によるオートファジー抑制効果を LC3 の免疫染色と電子顕微鏡観察により形態的に確認した。ウェスタンブロッティングでは、rTSST-1 は細胞内の LC3-II の蓄積を用量依存的に抑制しており、同様の効果はオートファジー誘導剤の rapamycin を添加した場合も確認された。TSST-1 のオートファジー抑制効果をさらに検証するため、pEGFP-hLC3 を導入した HeLa 229 に野生型黄色ブドウ球菌(以下 WT)と TSST-1 欠損型黄色ブドウ球菌(以下 <math>\Delta</math> <i>tst</i>)を感</p>	

染させ、細胞内の GFP-LC3 を示すスポット量を解析した。この結果、 $\Delta tst$  では WT に比べ GFP-LC3 のスポットが多く分布していた。これより、TSST-1 を産生する黄色ブドウ球菌が感染過程にオートファジーを抑制することが示唆された。 $\Delta tst$  感染での GFP-LC3 スポットの増加は、ヒト腎臓上皮細胞株 HEK293 とヒト小腸上皮細胞株 407 でも見出された。また、黄色ブドウ球菌の感染におけるオートファジー抑制効果をウェスタンブロットティングで解析した結果、 $\Delta tst$  を感染させた宿主細胞内での LC3-II の蓄積は、rTSST-1 の添加により減少した。さらに、オートファゴゾーム抑制が TSST-1 のスーパー抗原活性によるものかを検証するため、LC-3-II の蓄積を誘導した HeLa 229 に rTSST-1、スーパー抗原活性欠損 TSST-1(以下 mTSST-1)、及び他のスーパー抗原である黄色ブドウ球菌エンテロトキシン (SEA、SEB、SEC) を添加した。この結果 rTSST-1 と mTSST-1 は同様のオートファジー抑制活性を示した一方、SEA、SEB、SEC はいずれも、オートファジー抑制効果を示さなかった。これらの結果から、TSST-1 のオートファジー抑制効果は本毒素に特異的であり、スーパー抗原活性が関与しない新たな機能であることが明らかになった。

TSST-1 によるオートファジー抑制効果の意義については今後解明が待たれるが、黄色ブドウ球菌の感染に貢献している可能性がある。本菌は健常人に常在する細菌として知られ、宿主の免疫応答を逃れるため粘膜上皮表面や細胞内に潜在する戦略をもつ。特に、細胞内に侵入後は、宿主の細胞死を誘導せず共存しながら細胞内宿主防御機構を回避あるいは不活性化するため、オートファジーをダウンレギュレートする必要があると考えられる。従って、TSST-1 によるオートファジー抑制効果は本菌が細胞内に潜在するための重要な戦略の 1 つである可能性があり、今後さらに検証を進める予定である。