

# 黄色ブドウ球菌のヒト大動脈内皮細胞への付着性の検討

丸山 元輝, 高倉 穂佳, 眞野 容子, 古谷 信彦

文京学院大学大学院 保健医療科学研究科

## 要旨

黄色ブドウ球菌は宿主細胞への付着を促進する microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) と呼ばれるアドヘシンを発現する。黄色ブドウ球菌による感染性心内膜炎 (infective endocarditis: IE) において、弁膜や大血管内膜への付着には MSCRAMM との関連性が示唆されているがその機序は明らかになっていない。本研究ではヒト大動脈内皮細胞への付着と MSCRAMM の関連性を調査するため、2020年に臨床より分離された血液、喀痰、尿由来株における MSCRAMM をコードする遺伝子の分布状況について PCR 法を用いて比較した。次いで、MSCRAMM をコードする遺伝子の保有パターンとヒト大動脈内皮細胞への細胞付着性及び細胞内移行性の関連性について検討した。臨床分離株では7種類の遺伝子の保有パターンが確認され、*cna*, *fnbA*, *clfA*, *ebpS* の保有パターンは最も高い細胞付着性を示した。しかし、MSCRAMM をコードする遺伝子の有無による細胞内移行性への影響は認められなかった。本研究は、臨床分離株における MSCRAMM をコードする遺伝子の保有パターンを明らかにした。

## キーワード

*Staphylococcus aureus*, 感染性心内膜炎, MSCRAMM-encoding genes

## 序論

感染性心内膜炎 (infective endocarditis: IE) は弁膜や心内膜、大血管内膜に細菌集簇を含む疣腫を形成し、菌血症、血管塞栓、心障害等の臨床症状を呈する全身性敗血症性疾患である。基礎心疾患を有し、尿路感染症、肺炎、蜂窩織炎等の菌血症を誘発する感染症を合併した場合、IEを発症する可能性が高いが、心疾患の既往がない場合にも発症することがある。近年では、糖尿病、癌などの悪性疾患、免疫抑制をきたす病態や治療に伴うIEが増加している。また、心臓植込み型デバイス感染等の医原性IE (health-care associated IE) も増加傾向である<sup>1)</sup>。

IEの主な原因菌の一種である黄色ブドウ球菌は、健康人の皮膚や鼻腔に常在するグラム陽性球菌である。人体に対し広範囲に影響を及ぼす病原体であり、表在性及び深在性皮膚感染症や全身性感染症、毒素型食中毒等を引き起こす。また、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) は医療関連感染を起こす代表的な細菌でもあり、院内で分離される耐性菌の中でも分離頻度が高い菌である<sup>2)</sup>。黄色ブドウ球菌に起因するIEの死亡率は20%以上、MRSAが原因菌である場合は

60%を超えるとの報告もある<sup>1)</sup>。また、黄色ブドウ球菌による菌血症患者の約5~30%にIEが認められる<sup>3,4)</sup>。

黄色ブドウ球菌の感染は宿主組織への付着から開始される。一部の細菌には他の細胞や物体表面への付着を促進する物質として、アドヘシンと呼ばれる細胞表面もしくは付属器官を構成する物質を持つことが確認されている。黄色ブドウ球菌が持つアドヘシンは、microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) と呼ばれる化学物質に分類され、宿主細胞への付着因子として作用する<sup>5)</sup>。黄色ブドウ球菌が持つMSCRAMMとして、*cna*がコードするcollagen adhesin, *fnbA*及び*fnbB*がコードするfibronectin-binding protein A及びB, *clfA*がコードするclumping factor A, *ebpS*がコードするelastin-binding protein等の菌体表層物質が知られている。また、collagen adhesinはcollagenに、fibronectin-binding protein A及びBはfibronectinに、clumping factor Aはfibrinogenに、elastin-binding proteinはelastinにそれぞれ結合する。

既報において、fibronectin-binding proteinの保有がラットにおける心臓弁へのコロニー形成に関与するなど、黄色ブドウ球菌によるIEにおいて、弁膜や心内膜、大血管内膜への付着にはMSCRAMMとの関連性が示唆されているが<sup>6,7)</sup>、

その機序は明らかになっていない。また、MRSAによる菌血症にはDaptomycin (DAP)などの抗菌薬を用いた治療が行われるが、高い細胞内移行性を有する黄色ブドウ球菌は内皮細胞へのエスケープ現象のため、抗菌薬が十分に作用しない可能性も指摘されている<sup>8,9)</sup>。このような観点からも、黄色ブドウ球菌が血液から分離された際、MSCRAMMをコードする遺伝子を確認することは重要であると考えられる。

本研究では、ヒト大動脈内皮細胞への付着とMSCRAMMの関連性を検討することを目的に臨床より分離された血液、喀痰、尿由来株におけるMSCRAMMをコードする遺伝子の分布状況について、PCR法を用いて比較した。次いで、MSCRAMMをコードする遺伝子の保有パターンとヒト大動脈内皮細胞への細胞付着性及び細胞内移行性の関連性について検討した。

## II. 方法

### 1. 使用菌株

MSCRAMM関連遺伝子の分布調査では、2020年に臨床より分離された血液由来株18株、尿由来株20株、喀痰由来株20株の黄色ブドウ球菌計58株を対象とした。

細胞付着性及び細胞内移行性の検討では、2020年に臨床より分離された遺伝子の保有パターンが異なるBGU1426, BGU1427, BGU1428, BGU1429, BGU1433, BGU1440, BGU1442の血液由来黄色ブドウ球菌7株及び2009年に臨床より分離され、MSCRAMMをコードする遺伝子の保有パターンが判明している血液由来黄色ブドウ球菌株BGU120を対象とした。BGU120は*fnbA*を保有しない血液由来黄色ブドウ球菌臨床分離株として使用した。

### 2. 使用細胞

細胞付着性及び細胞内移行性の検討では、ヒト大動脈内皮細胞 (Human Aortic Endothelial Cells: HAEC, ScienCell Research Laboratories, California, USA) を用いた。細胞培養に使用した培養液には非動化済み5% Fetal bovine serum (FBS) 及び1% Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS) 含有 Endothelial Cell Medium (ECM, ScienCell Research Laboratories) を用いて、6% CO<sub>2</sub>, 37°Cで培養を行った。

### 3. DNA抽出方法

被検菌は普通寒天培地 (日水製薬株式会社, 東京都, 日本) を用いて37°Cで一晩培養し, 0.1 mLの20 mg/L Lyso-staphin, recombinant (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪府, 日本) 溶液に懸濁した<sup>10)</sup>。その後100°C・10分加熱後, 4°C・5分・13000 rpmの条件で遠心した上清をtemplateとした。

### 4. MSCRAMM 関連遺伝子の分布調査

PCRにはTaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (タカラバイオ株式会社, 滋賀県, 日本) を使用し, 試薬にはNew England Biolabs (Massachusetts, USA) 製の10 × ThermoPol Reaction Buffer, Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix, Taq DNA Polymerase 及びTable 1に記載したPrimer (株式会社ファスマック, 神奈川県, 日本) を使用した。反応条件は, 初期熱変性: 94°C・5分を1サイクル, 熱変性: 94°C・1分, アニーリング: 55°C・1分, 伸長反応: 72°C・1分を25サイクルとした。その後, 1%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い, Ethidium Bromide Solution (Bio-Rad Laboratories, California, USA) で染色後, MSCRAMMをコードする*cna*<sup>11)</sup>, *fnbA*<sup>11)</sup>, *fnbB*<sup>5)</sup>, *clfA*<sup>5)</sup>, *ebpS*<sup>11)</sup>の有無を確認した。

Primer	Sequence 5' to 3'	Amplicon size ( bp )	Reference
<i>cna</i>	F: 5-AAAGCGTTGCCTAGTGGAGA-3	<b>192</b>	<b>9</b>
	R: 5-AGTGCCTTCCCAAACCTTTT-3		
<i>fnbA</i>	F: 5-CATAAATTGGGAGCAGCATCA-3	<b>128</b>	<b>9</b>
	R: 5-ATCAGCAGCTGAATTCCTCCATT-3		
<i>fnbB</i>	F: 5-GTAACAGCTAATGGTCGAATTGATACT-3	<b>523</b>	<b>5</b>
	R: 5-CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC-3		
<i>clfA</i>	F: 5-ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT-3	<b>288</b>	<b>5</b>
	R: 5-CGTTTCTTCCGTAGTTGCATTTG-3		
<i>ebpS</i>	F: 5-CATCCAGAACCAATCGAAGAC-3	<b>180</b>	<b>9</b>
	R: 5-AGTTACATCATCATGTTTATCTTTTG-3		

Table 1 Sequences and anticipated amplicon sizes for the primers used in this study.

## 5. 細胞付着性・細胞内移行性の検討

約  $4 \times 10^4$  個/mL の HAEC を 1 mL ずつ well に接種し、6% CO<sub>2</sub>、37°C で培養を行い、80% confluent に調整した。次に、McFarland 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) に調整した菌液を 10 倍に希釈したものを 1 mL 添加し、6% CO<sub>2</sub>、37°C で 3.5 時間培養を行った後、well 内を Phosphate buffered saline (PBS) で洗浄した。

細胞に付着及び細胞内に移行した菌数の算定では、0.5% に調整した Triton X-100 (ロシュ・ダイアグノスティック株式会社、東京都、日本) を 1 mL 添加し、室温で 20 分間静置し、HAEC の細胞膜を破壊し細胞内に移行した細菌を溶出させた。次に、溶液に含まれる菌数を塗抹平板培養法に準じ、Difco LB agar, Lennox (Becton, Dickinson and Company, New jersey, USA) を用いて算定を行った。

続いて次のとおり細胞内に移行した菌数のみを算定した。

Calcium Chloride Dihydrate (Ca として 50 mg/L、富士フイルム和光純薬株式会社、大阪府、日本) と DAP (32 mg/L、東京化成工業株式会社、東京都、日本) を添加した培養液 1 mL を細胞に 18 時間曝露させ (6% CO<sub>2</sub>、37°C)、細胞外に付着した細菌を殺菌した。その後、0.5% に調整した Triton X-100 を 1 mL 添加し、HAEC の細胞膜を破壊し細胞内に移行した細菌を溶出させ、LB agar を用いて菌数の算定を行った<sup>12-14)</sup>。

全体の菌数から細胞内に移行した菌数を引いたものを細胞付着した菌数とした。

なお、対照として、DAP を 32 mg/L に調整した HAEC を含まない well を使用し、細菌が殺菌されることを確認した。

各条件は 4 well で試験を行った。また、統計解析には IBM SPSS Statistics 25 (International Business Machines Corporation, New York, USA) を用いて一元配置分散分析による多重比較法を使用し、 $p < 0.05$  を統計的に有意と判断した。

## Ⅲ. 結果

### 1. MSCRAMM 関連遺伝子の分布調査

2020 年に分離された黄色ブドウ球菌において、*fnbA* は全株に保有が認められた。*cna*、*fnbB*、*clfA*、*ebpS* の保有率は血液由来株においてそれぞれ 16.7%、33.3%、94.4%、61.1% を、喀痰由来株ではそれぞれ 70.0%、10.0%、100.0%、85.0% を、尿由来株ではそれぞれ 55.0%、30.0%、100.0%、90.0% を示した。

次に、各由来株に確認された遺伝子の保有パターンとその割合を Table 2 に示した。2020 年に分離された黄色ブドウ球菌における MSCRAMM をコードする遺伝子の保有パターンは血液由来株で 7 種類、喀痰由来株で 4 種類、尿由来株で 4 種類認められた。最も多く確認された遺伝子の保有パターンは、血液由来株では *fnbA*、*clfA*、*ebpS* であり、全体の 38.9% を示した。喀痰由来株及び尿由来株では *cna*、*fnbA*、*clfA*、*ebpS* であり、全体の 65.0% と 45.0% を示した。

Strain	Isolation	Retention gene					Retention type of genotype		
		<i>cna</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	<i>clfA</i>	<i>ebpS</i>	blood (%)	sputum (%)	urine (%)
BGU1428	blood	—	○	—	○	○	38.9	20.0	15.0
BGU1427	blood	—	○	○	○	—	22.2	10.0	0.0
BGU1426	blood	—	○	○	○	○	11.1	0.0	30.0
BGU1433	blood	○	○	—	○	○	11.1	65.0	45.0
BGU1442	blood	—	○	—	○	—	5.6	0.0	0.0
BGU1429	blood	○	○	—	○	—	5.6	5.0	10.0
BGU1440	blood	—	○	—	—	—	5.6	0.0	0.0
BGU120	blood	○	—	—	○	○	—	—	—

Table 2 Retention types for the genes encoding MSCRAMM.

### 2. 細胞付着性及び細胞内移行性の検討

HAEC に対する細胞内移行性の結果を Fig. 1 に、細胞付着性の結果を Fig. 2 に示した。各遺伝子の保有パターンによる HAEC への細胞内移行性に有意差は認められなかった。

また、細胞内に移行した全株において、HAEC を含まない対照での発育は認められなかった。

HAEC に対し、最も高い細胞付着性を示したのは *cna*、*fnbA*、*clfA*、*ebpS* を保有する BGU1433 であり、*cna*、*clfA*、

*ebpS*を保有するBGU120及び*fnbA*, *clfA*, *ebpS*を保有するBGU1428, *fnbA*, *fnbB*, *clfA*, *ebpS*を保有するBGU1426, *fnbA*を保有するBGU1440の3株と比較し高い細胞付着性を示し, 多重比較法において $p < 0.05$ となり有意差を認めた. BGU1433の保有パターンは血液由来株で11.1%を占めていた. また, *fnbA*, *fnbB*, *clfA*を保有するBGU1427,

*fnbA*, *clfA*を保有するBGU1442, *cna*, *fnbA*, *clfA*を保有するBGU1429の3株は, BGU120と比較し高い細胞付着性を示し, 多重比較法において $p < 0.05$ となり有意差を認めた. BGU1428, BGU1426, BGU1440の3株は, BGU120と比較し高い細胞付着性を示したが, 多重比較法において $p > 0.05$ となり有意差は認められなかった.

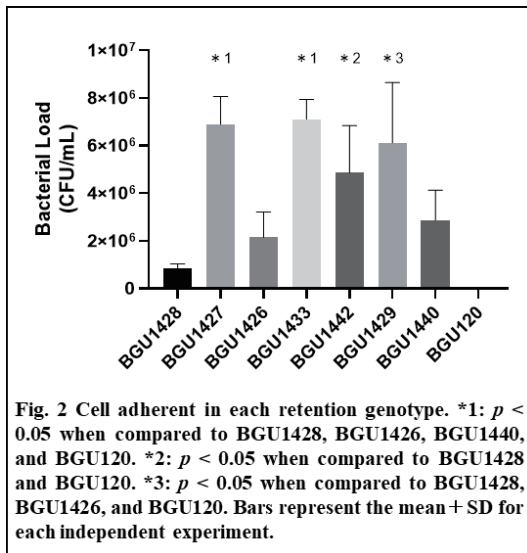


Fig. 2 Cell adherent in each retention genotype. \*1:  $p < 0.05$  when compared to BGU1428, BGU1426, BGU1440, and BGU120. \*2:  $p < 0.05$  when compared to BGU1428 and BGU120. \*3:  $p < 0.05$  when compared to BGU1428, BGU1426, and BGU120. Bars represent the mean + SD for each independent experiment.

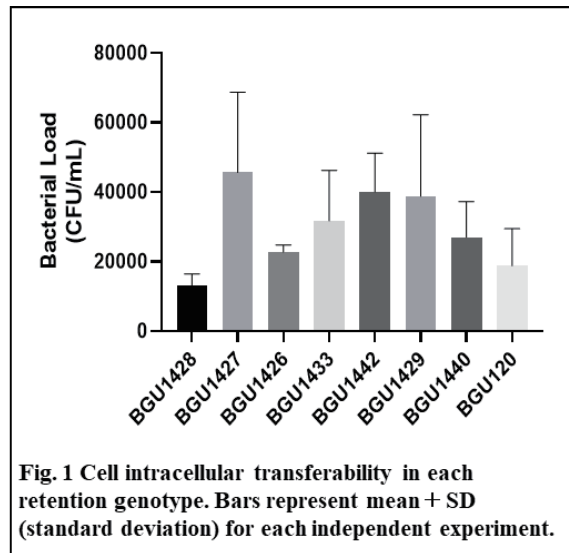


Fig. 1 Cell intracellular transferability in each retention genotype. Bars represent mean + SD (standard deviation) for each independent experiment.

## 考察

血液由来黄色ブドウ球菌株における遺伝子の保有パターンは7種類確認され, 最も高い細胞付着性を示した遺伝子の保有パターンはBGU1433が持つ*cna*, *fnbA*, *clfA*, *ebpS*であった. これはHAECがcollagenとfibronectinを産生するため<sup>15-18)</sup>, 黄色ブドウ球菌の細胞付着性が高まったと考えられる.

本検討において, *clfA*は最も細胞付着性の高いBGU1433において確認されたが, BGU1440とBGU1442の比較において, 有意な細胞付着性の増加は認められなかった. *ebpS*も同じく最も細胞付着性の高いBGU1433において確認されたが, BGU1427とBGU1426の比較において細胞付着性の増加は認められなかった. また, 2番目に高い細胞付着性を示した*fnbA*, *fnbB*, *clfA*保有パターンと比較し, *fnbA*, *fnbB*, *clfA*, *ebpS*保有パターンは低い細胞付着性を示し, 多重比較法において有意差を認めた. 既報において, PeacockらはMSCRAMMの発現量の差により細胞付着性が変化する可能性があるとして報告しており<sup>19)</sup>, 本研究においても同様の現象が生じた可能性が考えられる.

HAECへの細胞内移行性において, 遺伝子の保有パター

ンによる有意差は認められなかった. 本結果は, MSCRAMMをコードする遺伝子の保有パターンとは別に, HAECによるphagocytosis等の細胞内への移行性に関与する因子が存在する可能性を示唆している.

他の黄色ブドウ球菌による細胞付着性の検討では, 1つのMSCRAMMに対し細胞や物質への付着性を評価することが多い. しかし, 臨床でのMSCRAMMによる細胞付着性の評価では複数のMSCRAMMによる相互作用を考慮することが重要であると考えられる.

## 結語

今回我々は, 遺伝子の保有状況が由来株ごとに異なることを明らかにした. また, HAECへの細胞付着性において, *cna*及び*fnbA*, *clfA*, *ebpS*の遺伝子の保有パターンを持つ株では高い細胞付着性を示すことを明らかにした. 従って, 本検討は黄色ブドウ球菌によるヒト大動脈内皮細胞への付着のメカニズムを解析する上での基礎的基盤となった.



## 参考文献

- 1) 日本循環器学会, 循環器病ガイドラインシリーズ2017年版: 感染性心内膜炎の予防と治療に関するガイドライン(2017年改訂版). URL: [http://www.j-circ.or.jp/guideline/pdf/JCS2017\\_nakatani\\_h.pdf](http://www.j-circ.or.jp/guideline/pdf/JCS2017_nakatani_h.pdf) (最終閲覧日 2021年10月23日)
- 2) 厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業トップページ: 公開情報, 検査部門 JANIS (一般向け) 既報・年報(2020年報), 2021. URL: [https://janis.mhlw.go.jp/report/open\\_report/2020/3/1/ken\\_Open\\_Report\\_202000.pdf](https://janis.mhlw.go.jp/report/open_report/2020/3/1/ken_Open_Report_202000.pdf) (最終閲覧日 2021年10月23日)
- 3) Rasmussen RV, Høst U, Arpi M, et al. Prevalence of infective endocarditis in patients with *Staphylococcus aureus* bacteraemia: the value of screening with echocardiography. *Eur J Echocardiogr* 2011; 12(6): 414-20.
- 4) Chang FY, MacDonald BB, Peacock JE Jr, et al. A prospective multicenter study of *Staphylococcus aureus* bacteremia: incidence of endocarditis, risk factors for mortality, and clinical impact of methicillin resistance. *Medicine (Baltimore)* 2003; 82(5): 322-32.
- 5) Tristan A, Ying L, Bes M, et al. Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. *J Clin Microbiol* 2003; 41(9): 4465-7.
- 6) Foster TJ. The remarkably multifunctional fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016; 35(12): 1923-31.
- 7) Que YA, Haefliger JA, Piroth L, et al. Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. *J Exp Med* 2005; 201(10): 1627-35.
- 8) 日本化学療法学会, 委員会報告ガイドライン: MRSAの治療ガイドライン改訂版2019. URL: [http://www.chemotherapy.or.jp/guideline/guideline\\_mrsa\\_2019.pdf](http://www.chemotherapy.or.jp/guideline/guideline_mrsa_2019.pdf) (最終閲覧日 2022年3月3日)
- 9) Krut O, Sommer H, Krönke M. Antibiotic-induced persistence of cytotoxic *Staphylococcus aureus* in non-phagocytic cells. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53(2): 167-73.
- 10) Chen L, Mediavilla JR, Oliveira DC, et al. Multiplex real-time PCR for rapid *Staphylococcal* cassette chromosome *mec* typing. *J Clin Microbiol* 2009; 47(11): 3692-706.
- 11) Ghasemian A, Najar Peerayeh S, Bakhshi B, et al. The Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMMs) Genes among Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* from Hospitalized Children. *Iran J Pathol* 2015; 10(4): 258-64.
- 12) Hamill RJ, Vann JM, Proctor RA. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. *Infect Immun* 1986; 54(3): 833-6.
- 13) Cortés G, Alvarez D, Saus C, et al. Role of lung epithelial cells in defense against *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. *Infect Immun* 2002; 70(3): 1075-80.
- 14) Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S25. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 25th informational supplement. 2015, Wayne, PA; CLSI.
- 15) Entenza JM, Moreillon P, Senn MM, et al. Role of sigmaB in the expression of *Staphylococcus aureus* cell wall adhesins ClfA and FnbA and contribution to infectivity in a rat model of experimental endocarditis. *Infect Immun* 2005; 73(2): 990-8.
- 16) Anderson DE, Hinds MT. Extracellular matrix production and regulation in micropatterned endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 427(1): 159-64.
- 17) Kumazaki T. Modulation of gene expression during aging of human vascular endothelial cells. *Hiroshima J Med Sci* 1993; 42(2): 97-100.
- 18) Plenz GA, Deng MC, Robenek H, et al. Vascular collagens: spotlight on the role of type VIII collagen in atherogenesis. *Atherosclerosis* 2003; 166(1): 1-11.
- 19) Peacock SJ, Foster TJ, Cameron BJ, et al. Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells. *Microbiology (Reading)* 1999; 145(Pt 12): 3477-86.

## Examination of Adhesiveness of *Staphylococcus Aureus* to Human Aortic Endothelial Cells

Genki Maruyama, Honoka Takakura, Yoko Mano, Nobuhiko Furuya

Graduate School of Health Care Science, Bunkyo Gakuin University

### Abstract

*Staphylococcus aureus* expresses adhesin, microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) and promotes adhesion to host cells. In infective endocarditis caused by *S. aureus*, attachment of the bacterium to the heart valve is associated with MSCRAMM. In the present study, we investigated the association between cell attachment and MSCRAMM in clinical isolates derived from blood, sputum, and urine. The distribution of MSCRAMM-encoding genes was assessed first. Human aortic endothelial cells were then exposed to strains selected based on the results of the distribution survey, and the effects of MSCRAMM-encoding gene retention patterns on cell adhesiveness and intracellular transferability determined. Seven types of gene retention pattern were confirmed in the clinical isolates; genotypes harboring *cna*, *fnbA*, *clfA*, and *ebpS* showed the highest levels of cell adhesiveness. No significant difference in intracellular transferability was detected between the retention genotypes with and without these genes. The results have identified the retention gene patterns for clinical isolates.

**Key words** ——— *Staphylococcus aureus*, infective endocarditis, MSCRAMM-encoding genes

Bunkyo Journal of Health Science Technology vol.15: 9-14