

令和 2 年 5 月 1 日現在

機関番号：34306
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K16230
研究課題名(和文) Bacterial immunity taxi を標的とした新視点からの感染制御

研究課題名(英文) Infection control targeting Bacterial immunity taxi

研究代表者

鴨志田 剛 (Kamoshida, Go)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：40707410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Acinetobacter baumannii が宿主免疫や抗菌薬から回避する機構と生体防御のせめぎ合いに焦点を当て研究を行った。まず、A. baumannii が新規感染防御機構である好中球細胞外トラップ(NETs)形成に与える影響を解析し、好中球の細胞接着を抑制することにより、NETs形成を阻害することを明らかにした。また、A. baumannii は、薬剤耐性を獲得しやすく、コリスチンに対しても標的であるLPS(リポ多糖)を欠損することで耐性を示した。しかし、LPS欠損菌株は、好中球が産生するリゾチームにより容易に排除されることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、好中球の新規感染防御機構である好中球細胞外トラップ(NETs)が注目を集めている。多くの病原性細菌が、NETsを誘導することが報告されているが、Acinetobacter baumannii は、病原性細菌であるにもかかわらず、NETs形成を阻害することを明らかにした。本研究は、病原性細菌がNETs形成を阻害することを示した最初の報告である。

A. baumannii は、多剤耐性グラム陰性菌による重篤感染症に最後の砦として使用されるコリスチンに対し、標的であるLPSを欠損することで耐性を示す。しかし、LPS欠損菌株は、宿主防御により排除されやすいことを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we researched that focused on the mechanism by which Acinetobacter baumannii avoid from host immune defense and anti-microbial drugs. First, we investigated the effect of A. baumannii on the formation of neutrophil extracellular traps (NETs), a novel neutrophil defense mechanism against bacteria. As a result, it was revealed that A. baumannii inhibits NETs formation by suppressing neutrophil adhesion. Also, A. baumannii easily acquires drug resistance, and frequently shows resistance to colistin, which targets LPS (lipopolysaccharide). Next, we investigated the mechanisms of resistance to colistin, and the clearance mechanism of the colistin-resistant strain. A. baumannii was found to be resistant to colistin by LPS-deficient, but easily killed by lysozyme produced by neutrophils. In this study, it is expected that some of the competition between A. baumannii-host will be clarified, contributing to treatment and control of the bacteria infection.

研究分野：細菌学

キーワード：アシネトバクター 好中球 細菌-宿主相互作用 NETs 細胞接着 コリスチン LPS リゾチーム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アシネトバクター属菌は、運動性の低いグラム陰性球桿菌で、自然界に広く分布する環境菌である。しかし、いったん院内に定着すると院内感染の原因菌となりやすい。特に *Acinetobacter baumannii* は、薬剤耐性を獲得しやすく、多剤に耐性を獲得した multidrug-resistant *Acinetobacter* (MDRA) は、スーパー耐性菌として、近年世界中の医療機関で問題になっている。MDRA は、WHO が公表した新規抗菌薬が緊急に必要な耐性菌のリストでも、最上位の緊急性「重大」にリストアップされた。欧米に比べると、日本国内での多剤耐性菌株の検出はまだ稀であるが、国際化の進む昨今、いつ大規模なアウトブレイクが起こっても不思議ではない。実際、薬剤耐性アシネトバクター感染症は、5 類全数報告疾患に指定され、日本でも注視され始めている。このような薬剤耐性菌の問題は、日本のみならず世界的に解決が求められている。しかし、新規抗菌薬の開発は現在暗礁に乗り上げており、このままでは、MDRA のような細菌に対する有効な治療薬がなくなる可能性が極めて高い。そこで、従来の抗菌薬開発や治療戦略とは異なった視点からの新規感染症治療戦略の開発が求められている。

2. 研究の目的

A. baumannii は、通常は無害であるが、易感染宿主において高頻度に重篤な肺炎や敗血症を引き起こすため、宿主免疫細胞との相互作用が重要であると考えられる。我々はこれまで、*A. baumannii* と好中球の相互作用を研究してきた。その結果、*A. baumannii* は、好中球に貪食されにくく、宿主免疫防御機構を回避していることを明らかにした。さらに、運動性が低い *A. baumannii* が、好中球に接着し、タクシーのように利用することで、敗血症や感染拡大を引き起こす新規細菌移動メカニズム“Bacterial immunity taxi”を発見した。このように、*A. baumannii* は、宿主免疫機構を巧みに回避/利用することで、生体内で生き残るユニークな病原性を多数有していることが示唆されている。本研究では、*A. baumannii* が、宿主防御機構や抗菌薬から回避するメカニズムを明らかにする。得られた知見を基に、細菌-宿主相互作用を標的とする新規感染症治療/制御法を開発することを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

1) 好中球がこれまで知られていたような感染防御機構に加え、自身の DNA の放出を伴う細胞死を引き起こし、好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps: NETs) とよばれる網目状のトラップを形成し、効率よく細菌を捕捉し、殺菌するという生体防御機構が発見された。これまで多くの病原性細菌で、NETs 形成を誘導することが報告されてきた。そこで、本研究では、*A. baumannii* の NETs 形成に与える影響を検討した。ヒト末梢血より精製した好中球を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で刺激することで NETs 形成を誘導した。その際、*A. baumannii* と共培養することで、細菌の NETs 形成に及ぼす影響を評価した。

2) コリスチンは、グラム陰性菌の細胞壁成分である LPS (lipopolysaccharide) を標的とする抗菌薬で、MDRA をはじめ多剤耐性グラム陰性菌による重篤感染症に最後の砦として使用される。しかし、*A. baumannii* は高頻度にコリスチンに耐性を示すことが報告されている。本研究では、細菌表面の LPS に着目し、*A. baumannii* がコリスチンに耐性を獲得する機序および耐性菌が宿主免疫細胞により排除されるメカニズムの詳細を解析した。*A. baumannii* を 10 µg/mL のコリスチンでセレクションすることで、コリスチン耐性株 CRAb (Colistin-Resistant *A. baumannii*) を得た。それら CRAb 株に対し、遺伝子変異の解析、LAL (Limulus Amebocyte Lysate) assay によるエンドトキシン量の評価、増殖実験を行った。次に、CRAb 株とヒト末梢血から精製した好中球を共培養し、好中球による CRAb 株のクリアランス能を評価した。

3) *A. baumannii* は、健康なヒトには害はないが、免疫の低下した患者に肺炎や敗血症、尿路感染、髄膜炎等を引き起こす。また、Bacterial immunity taxi による体内での感染拡大の詳細を明らかにするためにも、個体レベルで、感染症の病態を理解する必要がある。本研究では、マウス個体を用いた実験評価系の確立を行った。

4. 研究成果

1) *A. baumannii* が、好中球の新規感染防御機構である好中球細胞外トラップ (NETs) 形成に与える影響を解析した。その結果、好中球を *A. baumannii* と共培養することによって、PMA 誘導性の NETs 形成が顕著に阻害されることが明らかとなった (Fig. 1)。次に、この NETs 阻害メカニズムを細胞接着に注目し、好中球の接着実験を行った。好中球の接着能は、PMA 刺激によって増強するが、*A. baumannii* との共培養によりその増強が有意に抑制されることが示された。さらに、この好中球の接着抑制は、細胞表面に発現する細胞接着

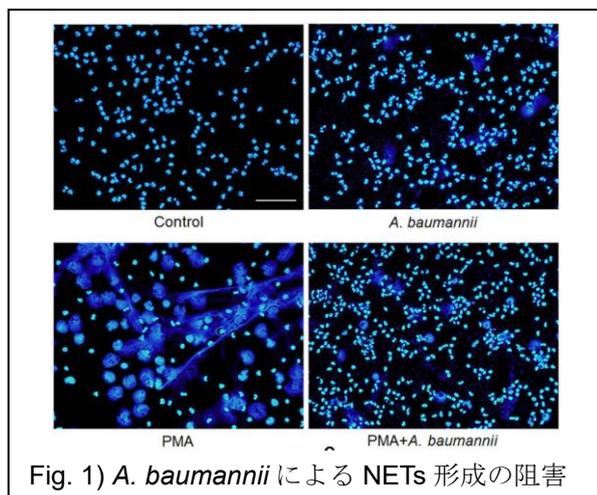


Fig. 1) *A. baumannii* による NETs 形成の阻害

分子 CD11a (LFA-1) の発現増加を, *A. baumannii* が抑制するためであることも明らかになった (Fig. 2). これまで多くの病原性細菌が NETs 形成を誘導することが報告されてきたが, 阻害/抑制作用は報告がなかった. 本研究は, 病原性細菌が NETs 形成を阻害することを示した最初の報告であり, この新規宿主免疫回避機構を投稿論文の形で発表した (Kamoshida et al., Front. Immunol. 2018).

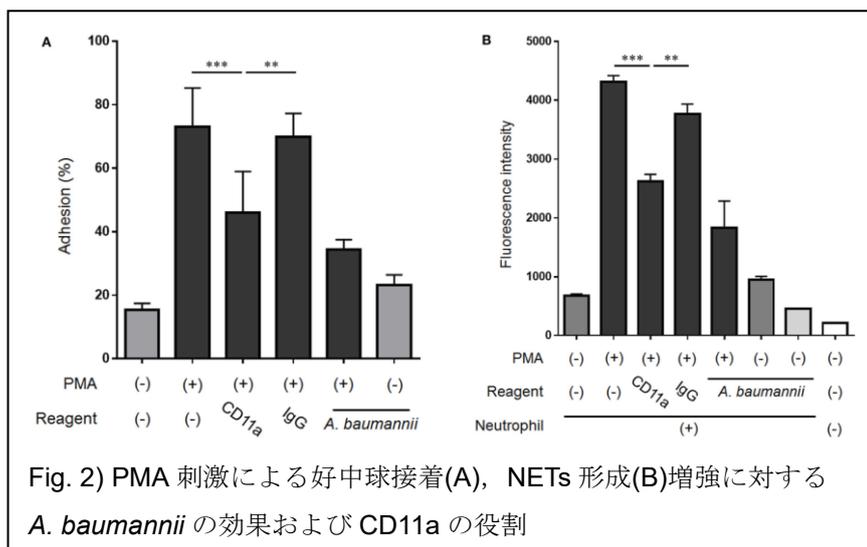


Fig. 2) PMA 刺激による好中球接着(A), NETs 形成(B)増強に対する *A. baumannii* の効果および CD11a の役割

さらに, 本研究結果で驚くべきは, 病原性細菌であるはずの *A. baumannii* が, NETs 形成を阻害することで, 好中球の寿命を延長させたことである. *A. baumannii* は, NETs 形成阻害により, 好中球の生存を延長し, 利用することで, 効率よく Bacterial immunity taxin を引き起こし, 生体内を移動していることが示唆された.

2) *A. baumannii* がコリスチンに耐性を獲得する機序および耐性菌の宿主免疫細胞による排除メカニズムの詳細を明らかにするために研究を行った. コリスチン処理により樹立した, コリスチン耐性 *A. baumannii* 株 (CRAb) のゲノムを解析したところ, LPS の生合成に関与する *lpxA, C, D* 遺伝子のいずれかに変異が認められ, LAL assay の結果からも, LPS を欠損していることが示された. LPS を欠損した CRAb 株は, 増殖能の著しい低下, β -ラクタム系抗菌薬や抗菌物質への感受性増加を示した (Fig. 3). さらに, それら CRAb 株および *lpxC* 遺伝子を相補した株に対する好中球のクリアランス能を解析した. その結果, 親株や相補株は, ほとんど殺菌されないのに対して, LPS を欠損した CRAb 株は, 好中球により顕著に殺菌された (Fig. 4). 好中球による CRAb 株殺菌のメカニズムを解析した結果, 好中球が産生するリゾチームがその一部を担っていることが明らかになった. 本研究成果は, 好中球減少症など免疫力が低下した患者での *A. baumannii* 感染症におけるコリスチンを用いた治療に役立つことが期待でき, 投稿論文の形で報告した (Kamoshida et al., Front. Microbiol. 2020).

TABLE 2 | Minimum inhibitory concentrations (MICs) of various antimicrobial drugs against lipopolysaccharide-deficient *Acinetobacter baumannii* strains.

	WT ATCC19606	CRAb-5 LPS-deficient	CRAb-LPS +intact lpxC	CRAb-mock +control vector
Colistin	0.5	>256	0.5	>256
Polymyxin B	0.25	128	0.5	64
Minocycline	0.25	0.125	0.25	0.06
Tigecycline	0.5	0.25	0.5	0.125
Sulbactam	0.5	0.5	0.5	0.5
Meropenem	0.5	0.007>	0.5	0.007>
Imipenem	8	1	8	1
Cefozopran	8	2	8	1
Amikacin	16	4	16	2
Ciprofloxacin	0.06	0.06	0.06	0.03

Drug concentrations are in $\mu\text{g/ml}$.

TABLE 3 | Bactericidal activity of various biomolecules against lipopolysaccharide-deficient *Acinetobacter baumannii* strains.

	WT	CRAb-5	CRAb-LPS	CRAb-mock
Lysozyme	>1000 $\mu\text{g/ml}$	0.6 $\mu\text{g/ml}$	>1000 $\mu\text{g/ml}$	0.6 $\mu\text{g/ml}$
Lactoferrin	>1000 $\mu\text{g/ml}$	1000 $\mu\text{g/ml}$	>1000 $\mu\text{g/ml}$	1000 $\mu\text{g/ml}$
LL-37	625 nM	2500 nM	625 nM	1250 nM
Human-Serum	40%	20%	20%	10%
H ₂ O ₂	0.02%	0.02%	0.02%	0.02%

Fig. 3) CRAb 株の抗菌薬(上), 抗菌物質(下)への感受性

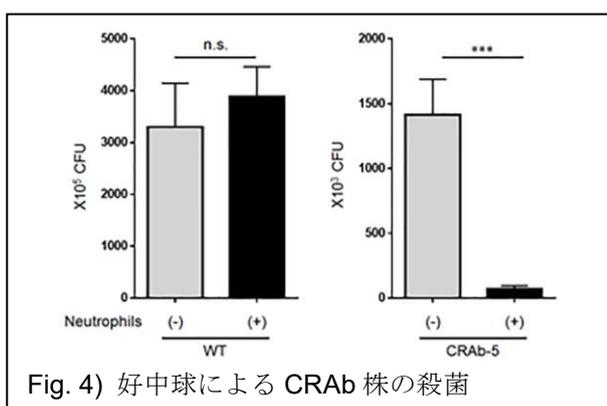


Fig. 4) 好中球による CRAb 株の殺菌

3) 個体レベルで, *A. baumannii* 感染症の病態を理解するため, マウスを用いた感染実験を行った. *A. baumannii* をマウス気管に投与し, 肺炎を引き起こし, その後敗血症を誘発する実験系の構築に成功した. この実験系を用いて, これまでに, 肺定着能が親株に比べ, 顕著に高い株を樹立することができた. 今後のさらに研究を進めることで, 本実験系を, *A. baumannii* による肺炎や敗血症のメカニズム解析, 薬効評価系に応用し, 治療・制御に繋げたい.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Go Kamoshida, Takuya Akaji, Norihiko Takemoto, Yusuke Suzuki, Yoshinori Sato, Daichi Kai, Taishi Hibino, Daiki Yamaguchi, Takane Kikuchi-Ueda, Satoshi Nishida, Yuka Unno, Shigeru Tansho-Nagakawa, Tsuneyuki Ubagai, Tohru Miyoshi-Akiyama, Masataka Oda and Yasuo Ono	4. 巻 17
2. 論文標題 Lipopolysaccharide-deficient <i>Acinetobacter baumannii</i> due to colistin resistance is killed by neutrophil-produced lysozyme	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.00573	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Atsushi Nakayama, Hideo Sato, Tenta Nakamura, Mai Hamada, Shuji Nagano, Shuhei Kameyama, Yui Furue, Naoki Hayashi, Go Kamoshida, Sangita Karanjit, Masataka Oda and Kousuke Namba	4. 巻 18
2. 論文標題 Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Side-Chain Derivatives based on Eurotiumide A	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Marine drugs	6. 最初と最後の頁 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/md1802009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Masataka Oda, Asushi Yokotani, Naoki Hayashi, Go Kamoshida	4. 巻 43
2. 論文標題 Role of Sphingomyelinase in the Pathogenesis of <i>Bacillus cereus</i> Infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 250-253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b19-00762	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kamoshida Go, Kikuchi-Ueda Takane, Nishida Satoshi, Tansho-Nagakawa Shigeru, Ubagai Tsuneyuki, Ono Yasuo	4. 巻 9
2. 論文標題 Pathogenic Bacterium <i>Acinetobacter baumannii</i> Inhibits the Formation of Neutrophil Extracellular Traps by Suppressing Neutrophil Adhesion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2018.00178	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kikuchi-Ueda Takane, Kamoshida Go, Ubagai Tsuneyuki, Nakano Ryuichi, Nakano Akiyo, Akuta Teruo, Hikosaka Kenji, Tansho-Nagakawa Shigeru, Kikuchi Hirotooshi, Ono Yasuo	4. 巻 222
2. 論文標題 The TNF- of mast cells induces pro-inflammatory responses during infection with Acinetobacter baumannii	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Immunobiology	6. 最初と最後の頁 1025-1034
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.imbio.2017.05.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kamoshida Go	4. 巻 65
2. 論文標題 Infection by Acinetobacter baumannii and host immunity A novel bacterial transport mechanism "Bacterial immunity taxi"	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 794-802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 赤路 卓哉, 鴨志田 剛, 鈴木 雄介, 西田 智, 上田 たかね, 佐藤 義則, 海野 雄加, 永川 茂, 祖母井 庸之, 斧 康雄
2. 発表標題 コリスチン耐性 Acinetobacter baumannii 菌株の樹立と性状解析
3. 学会等名 第93回 日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 雄介, 鴨志田 剛, 赤路 卓哉, 上田 たかね, 西田 智, 佐藤 義則, 海野 雄加, 永川 茂, 祖母井 庸之, 斧 康雄
2. 発表標題 コリスチン耐性 Acinetobacter baumannii と好中球の相互作用解析
3. 学会等名 第93回 日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鴨志田 剛
2. 発表標題 Acinetobacter baumannii の新規免疫攪乱機構
3. 学会等名 第92回 日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鴨志田 剛, 赤路 卓哉, 竹本 訓彦, 斧 康雄, 小田 真隆
2. 発表標題 リボ多糖を欠損した Acinetobacter baumannii の性状解析
3. 学会等名 第13回 細菌学若手コロッセウム in みやぎ蔵王
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鴨志田 剛, 赤路 卓哉, 竹本 訓彦, 鈴木 雄介, 上田 たかね, 西田 智, 佐藤 義則, 海野 雄加, 永川 茂, 祖母井 庸之, 秋山 徹, 小田 真隆, 斧 康雄
2. 発表標題 クリスチン耐性によりリボ多糖を欠損した Acinetobacter baumannii は好中球が産生するリゾチームにより殺菌される
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鴨志田 剛, 竹本 訓彦, 秋山 徹, 小田 真隆, 斧 康雄
2. 発表標題 リボ多糖を欠損した Acinetobacter baumannii は好中球由来リゾチームにより殺菌される
3. 学会等名 第93回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鴨志田 剛, 小田 真隆, 斧 康雄
2. 発表標題 細菌-宿主免疫相互作用からみた <i>Acinetobacter baumannii</i> の不思議な新規病原性
3. 学会等名 第94回 日本感染症学会総会・学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鴨志田 剛, 上田 たかね, 西田 智, 佐藤 義則, 海野 雄加, 永川 茂, 祖母井 庸之, 斧 康雄
2. 発表標題 <i>Acinetobacter baumannii</i> の好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps: NETs) 形成阻害
3. 学会等名 第92回 日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鴨志田 剛, 上田 たかね, 永川 茂, 西田 智, 祖母井 庸之, 斧 康雄
2. 発表標題 好中球接着抑制を介した <i>Acinetobacter baumannii</i> の neutrophil extracellular traps (NETs) 形成阻害
3. 学会等名 第19回 Pharmaco-Hematology シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鴨志田 剛, 斧 康雄
2. 発表標題 病原性細菌 <i>Acinetobacter baumannii</i> は neutrophil extracellular traps (NETs) 抑制を介して好中球の寿命を延長する
3. 学会等名 細菌学若手コロッセウム in OKAYAMA 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鴨志田 剛, 上田 たかね, 永川 茂, 西田 智, 祖母井 庸之, 斧 康雄
2. 発表標題 Acinetobacter baumannii は好中球感染防御機構を回避する ~好中球接着抑制を介した neutrophil extracellular traps (NETs) 形成阻害~
3. 学会等名 第30回微生物シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鴨志田 剛, 上田 たかね, 永川 茂, 西田 智, 祖母井 庸之, 斧 康雄
2. 発表標題 病原性細菌 Acinetobacter baumannii の好中球接着抑制による neutrophil extracellular traps (NETs) 形成阻害
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木 雄介, 鴨志田 剛, 赤路 卓哉, 上田 たかね, 西田 智, 佐藤 義則, 海野 雄加, 永川 茂, 祖母井 庸之, 竹本 訓彦, 秋山 徹, 斧 康雄
2. 発表標題 好中球とコリスチン耐性 Acinetobacter baumannii の相互作用
3. 学会等名 第101回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤路 卓哉, 鴨志田 剛, 鈴木 雄介, 竹本 訓彦, 西田 智, 上田 たかね, 佐藤 義則, 海野 雄加, 永川 茂, 祖母井 庸之, 秋山 徹, 斧 康雄
2. 発表標題 コリスチン耐性 Acinetobacter baumannii 菌株の樹立
3. 学会等名 第101回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鴨志田 剛, 上田 たかね, 西田 智, 永川 茂, 菊地 弘敏, 祖母井 庸之, 斧 康雄
2. 発表標題 無血清培養による好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps: NETs) 形成
3. 学会等名 第91回 日本感染症学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鴨志田 剛, 永川 茂, 上田 たかね, 中野 竜一, 彦坂 健児, 西田 智, 祖母井 庸之, 東 昌市, 斧 康雄
2. 発表標題 Acinetobacter baumannii の好中球を利用した新規細菌メカニズム Bacterial immunity taxi について
3. 学会等名 第29回 微生物シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Acinetobacter baumannii の新規病原因子
2. 発表標題 鴨志田 剛, 斧 康雄
3. 学会等名 第100回 日本細菌学会関東支部総会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鴨志田 剛, 斧 康雄
2. 発表標題 Acinetobacter baumannii は好中球をタクシーの様に利用する
3. 学会等名 第23回 MPO 研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鴨志田 剛, 上田 たかね, 西田 智, 永川 茂, 菊地 弘敏, 祖母井 庸之, 斧 康雄
2. 発表標題 Spontaneous formation of neutrophil extracellular traps in serum-free culture conditions
3. 学会等名 2017年度 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Go Kamoshida, Takane Ueda, Satoshi Nishida, Shigeru Nagakawa, Tsuneyuki Ubagai and Yasuo Ono
2. 発表標題 Pathogenic Acinetobacter baumannii inhibits the formation of neutrophil extracellular traps
3. 学会等名 第91回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----