

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07098

研究課題名(和文) 尿路病原性大腸菌感染症に対する粘膜ワクチン候補物質の安全性に関わる基礎研究

研究課題名(英文) Basic research on the safety of mucosal vaccine candidate substances against urinary pathogenic Escherichia coli infection

研究代表者

倉園 久生 (KURAZONO, Hisao)

徳島大学・研究支援・産官学連携センター・教授

研究者番号：90186487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ワクチンを利用した新しいUPEC治療法を確立するには、UPECの病原因子に関して詳細なデータを収集し、USPをはじめとする病原因子の機能を十分に理解することが必要不可欠である。本研究では、USPの抗菌活性作用および細胞障害性を検討し、この分子が既報の類似分子とは異なる細胞障害性を示すことを明らかにした。また、UPECの遺伝学的基礎データを収集することを目的とし、薬剤感受性レベルが異なるUPEC株を用いてシーケンス解析を実施した。この解析により、薬剤耐性度が上昇するのにつれて変異が生じる遺伝子を同定し、レボフロキサシン耐性獲得において重要な役割を果たすことが予想される複数の遺伝子を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、以前よりその存在は知られていたが、機能に関してほとんど解明されていなかったUSPの持つ細胞障害性を明らかにした。また、我々はUSPが尿路病原性大腸菌の病原因子として重要な役割を果たすことを明らかにした。

尿路感染症の約8割は尿路病原性大腸菌が起因菌であることが報告されている。また、本症は高い再燃性を示すことから、抗生物質に頼らない新たな治療法の確立が期待されてきた。我々は本研究を通じて、UPECの病原因子の機能を明らかにし、次世代シーケンス解析によってUPECが薬剤耐性を獲得するのに鍵となる遺伝子変異を同定した。この2点の新知見は今後のUPEC対策に大きく貢献すると考える。

研究成果の概要(英文)：To establish a new vaccine-based UPEC treatment, it is essential to collect detailed data on the virulence factors of UPEC and fully understand the functions of virulence factors such as USP.

This study investigated the antibacterial activity and cytotoxicity of USP and clarified that this molecule exhibits cytotoxicity different from the similar molecules reported previously. Also, sequence analysis was performed using UPEC strains with different drug susceptibility levels to collect primary genetic data of UPEC. This analysis identified genes that mutate as drug resistance increased and found multiple genes that are expected to play an essential role in acquiring levofloxacin resistance.

研究分野：細菌学

キーワード：尿路病原性大腸菌 尿路感染症 薬剤耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌性尿路感染症、その起因菌の8割以上を占めるUPECの病原因子については多くの研究者が解析を行なっているが、既報のどの病原因子も際立った病原性と特異性を示せない。我々はこれまでの研究によってコレラ菌の病原因子の1つであるZOTと相同性を示すUSPを発見した。さらに、*usp* 遺伝子の下流には3つの短いオープンリーディングフレーム(OrfU1、OrfU2、OrfU3)の存在を明らかにした。これらの4遺伝子の配列は他の細菌ですでに報告された遺伝子と高い相同性を示したことから、USPはバクテリオシン、OrfU1からOrfU3はその阻害分子(Immunity protein)として機能することが予想された。しかしながら、USPおよびOrfU1からOrfU3の生物活性について等、それら分子の機能に関する詳細は明らかになっていない。

現在、UPEC感染症は抗生物質の投与によって治療がなされているが、本症は頻回な再燃性という特徴を有するため、薬剤耐性菌の出現が大きな問題になっている。この問題を解決するには、ワクチンを利用した新しいUPEC治療法を確立し、抗生物質に頼らない治療法を見出すことが有効であると考えられる。したがって、新たなワクチン開発を行うためにも、UPECの病原因子に関して詳細なデータを収集し、USPをはじめとする分子の機能を十分に理解することが必要不可欠である。

2. 研究の目的

USPについてはバクテリオシンとの相同性が報告されている一方で、USPは既知のバクテリオシンに見られる標的細胞認識に関わるドメインを持っていない。したがってUSPは、既知のバクテリオシンとは異なった生物活性を有する可能性がある。本研究では、USPの生物活性を明らかにし、USPを利用したワクチン創出のために必要な基盤的データを得ることを目的として、以下の解析、(1) USPの抗菌活性の検討、(2) USPの培養細胞に対する毒性の検討、(3) 抗USP抗体の作製および高感度ELISA系の構築、(4) 薬剤耐性度の異なるUPEC株を用いた全ゲノム配列解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 2018年度

【USPの抗菌活性および培養細胞に対する毒性に関する検討】

USPの抗菌活性については、健常なヒトの糞便から採取された大腸菌46株、大腸菌実験室株3株、腸内細菌科5菌種6株を標的として検討を行った。また、USPによる細胞障害性については、UPECの定着部位である腎臓、膀胱、前立腺に由来する8種類の株化細胞を用いて検討した。

(2) 2019年度

【抗USP抗体の作製および高感度ELISA系の確立】

USP蛋白質(以下、USP)を大量発現する組換え大腸菌(USP+orfU1/pET30a/BL21)の培養破砕上清から、Ni-キレートカラムを用いて精製USPを獲得した。精製USPを家兔に皮下投与して

抗USP血清を獲得し、さらに本血清より精製USP結合カラムを用いてUSP特異的IgGを精製した。得られた抗体の感度および特異性について、キャプチャー抗体0.3 μgの条件で間接ELISA法を構築し、精製USPおよび、ネガティブコントロールとして1 mg/mLのBSAを用いて検出感度および特異性の解析を行った。最後に、組換え大腸菌体内で産生されたUSPに対する検出能を検証するため、USP産生・非産生組み換え大腸菌株の培養液をソニケーション処理し、細胞破碎菌体についてELISA試験を行った。

(3) 2020年度

【UPEC 8株の次世代シーケンス解析】

実験には、尿路感染症患者より分離されたレボフロキサシン（LVFX）感受性株2株（GUC9_SおよびGFCS1_S）に加えて後述の方法で作製した薬剤耐性誘発株6株を使用した。薬剤耐性株は、親株であるGUC9_SおよびGFCS1_Sを低濃度のLVFXを添加した寒天培地で数日間培養し、発育したコロニーを初回より高濃度のLVFXを添加した寒天培地に継代し、この操作を数回繰り返すことによって、LVFX耐性が異なる菌株を得た。これらの菌株はLVFXのMICを測定し、MiSeqシステムを用いてシーケンス解析を行った後、得られたデータは現有の解析ソフト（CLC Genomics Workbench）およびWebアプリケーションを用いて変異箇所の検出等を実施した。

4. 研究成果

(1) 2018年度

2018年度はUSPの生物活性を明らかにする事を目的として、USPの抗菌活性について検討した。また、UPECの定着部位である尿路系に由来する株化細胞に対する傷害活性についても併せて検討を行った。

【結果および考察】

0.5% Agar内に播種した試供菌株に対してfree USPおよびUSP/OrfU1 complexを添加した際の発育阻止により抗菌活性の評価を行ったが、今回用いた全ての菌種において、free USPおよびUSP/OrfU1 complexによる発育阻止は観察されなかった。一方で、free USPおよびUSP/OrfU1 complexの培養細胞に対する障害活性について検討する目的で、UPECの定着部位である腎臓、膀胱、前立腺に由来する8種類の株化細胞を標的として細胞障害活性測定を行った。free USPおよびUSP/OrfU1 complexを培養細胞懸濁液に添加し、CO2インキュベーター内で24時間培養した後の標的細胞内のATP濃度の変化、および光学顕微鏡観察下での形態変化について解析を行った。その結果、全ての細胞種においてfree USPまたはUSP/OrfU1 complexの添加による細胞内ATP濃度の変化は観察されなかった。一方で、顕微鏡観察下においては、8種類の細胞のうちシリアンハムスター腎臓に由来するBHK21細胞においてfree USPまたはUSP/OrfU1 complexの添加によって顕著な細胞の接着阻害が観察された。本結果はUSPがアミノ酸配列の相同性から期待されていた原核細胞に対する障害活性とは異なる真核細胞に対する障害活性をもつという新たな可能性を示唆するものであった。

(2) 2019年度

2019年度は抗USP抗体を作出し、高感度なELISA法を構築することを目的とし研究を遂行した。

【結果および考察】

構築したELISA法は、ネガティブコントロールとして用いた1 mg/mLのBSAと反応しなかった一方

で、10 ng/mLの精製USPの検出が可能であった。

組み換え大腸菌株の培養上清を用いた実験では、USP産生菌と非産生菌との比較で有意な差が認められた。以上の結果より、得られたUSP特異的IgGは高い特異性および感度を持つものであると考えられる。本研究で構築したELISA系およびUSP特異的IgGは、今後USPが持つ病原性の解析の研究や臨床サンプルからのUPEC検出に役立つことが期待される。

(3) 2020 年度

2020年度はUPEC株の遺伝学的基礎データを収集することを目的とし、薬剤感受性レベルが異なるUPEC株を用いて次世代シーケンス解析を実施した。

【結果および考察】

今回 LVFX 耐性株を作製するために使用した親株の LVFX に対する MIC ($\mu\text{g/mL}$) は、どちらも GUC9_S (0.5)および GFCS1_S (0.5)であった。一方、本研究で作出した LVFX 耐性菌株の LVFX に対する MIC ($\mu\text{g/mL}$) はそれぞれ、GUC9_L(2)、GUC9_I (8)、GUC9_H (128)、GFCS1_L (2)、GFCS1_I (32)、GFCS1_H (128)で、高いLVFX耐性を獲得した菌株も作出できた。

これら8株のゲノム配列を多くの比較ゲノム解析での参照配列として使用実績のあるUPEC 536株の配列と比較し、変異箇所を特定したところ、20509の非同義置換および99029の同義置換、さらに、1647の挿入・欠失を見出した。また、薬剤耐性度が上昇するにつれて、変異が生じた箇所を選抜したところ、各菌株でそれぞれ、数十程度の遺伝子が該当し、GUC9系とGFCS1系の異なる遺伝背景を有する系統で共通する遺伝子にも変異が生じていることが明らかになった。個別の遺伝子の詳細については現在、論文執筆を行っている段階であるため報告を控えるが、これらの遺伝子変異がLVFX耐性獲得において重要な役割を果たすことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Togo Yoshikazu, Fukui Koji, Ueda Yasuo, Kanamaru Sojun, Shimizu Yosuke, Wada Koichiro, Sadahira Takuya, Yamada Yusuke, Matsumoto Masahiro, Hamasuna Ryoichi, Ishikawa Kiyohito, Takai Manabu, Maekawa Yuka, Yasuda Mitsuru, Kokura Koji, Kondoh Nobuyuki, Takiuchi Hidekazu, Yamamoto Shingo	4. 巻 27
2. 論文標題 Comparison of single and multiple dose cefazolin as prophylaxis for transurethral enucleation of prostate: A multicenter, prospective, randomized controlled trial by the Japanese Research Group for Urinary Tract Infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 244-248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.14181	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 Kanao Kobayashi, Shingo Yamamoto, Satoshi Takahashi, Kiyohito Ishikawa, Mitsuru Yasuda, Koichiro Wada, Ryoichi Hamasuna, Hiroshi Hayami, Shinichi Minamitani, Tetsuya Matsumoto, Hiroshi Kiyota, Kazuhiro Tateda, Junko Sato, Hideaki Hanaki, Naoya Masumori, Yoshiki Hiyama 他 45名	4. 巻 26
2. 論文標題 The third national Japanese antimicrobial susceptibility pattern surveillance program: Bacterial isolates from complicated urinary tract infection patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 418-428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2020.01.004	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 Choe Hyun-Sop, Lee Seung-Ju, Yang Stephen S, Hamasuna Ryoichi, Yamamoto Shingo, Cho Yong-Hyun, Matsumoto Tetsuro, the Committee for Development of the UAA-AAUS Guidelines for UTI and STI	4. 巻 25
2. 論文標題 Summary of the UAA-AAUS guidelines for urinary tract infections	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 175 ~ 185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.13493	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 該当する

1. 著者名 Eiki Yamasaki, Shigeru Matsuzawa, Kaoru Takeuchi, Yo Morimoto, Tetsuya Ikeda, Kayo Okumura, Hisao Kurazono	4. 巻 18
2. 論文標題 Rapid Serotyping of Salmonella Isolates Based on Single Nucleotide Polymorphism-Like Sequence Profiles of a Salmonella-Specific Gene	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Foodborne Pathogens and Disease	6. 最初と最後の頁 31-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/fpd.2020.2823	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 Kayo Okumura, Masako Kaido, Eiki Yamasaki, Yasumasa Akai, Hisao Kurazono, Shingo Yamamoto	4. 巻 9
2. 論文標題 Genomic Sequences of Uropathogenic Escherichia coli Strains with Various Fluoroquinolone Resistance Profiles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00199-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA .00199-20.	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 八尋錦之助、小倉康平、寺崎泰弘、宮城聡、山崎栄樹
2. 発表標題 ヒト肝臓細胞における新規 Cholix 結合膜蛋白質の同定と細胞致死機構の解明
3. 学会等名 第93回日本細菌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Eiki Yamasaki, Hisao Kurazono, Myo Thura Zaw, Kayo Okumura, Shingo Yamamoto
2. 発表標題 Uropathogenic specific protein gene, highly distributed in extraintestinal uropathogenic Escherichia coli isolated from both humans and companion animals, encodes a new member of H-N-H nuclease superfamily.
3. 学会等名 4th International Conference on One Medicine One Science (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究分担者	山崎 栄樹 (YAMASAKI Eiki) (40514708)	帯広畜産大学・動物・食品検査診断センター・准教授 (10105)	
研究分担者	奥村 香世 (OKUMURA Kayo) (70415561)	帯広畜産大学・畜産学部・准教授 (10105)	
研究分担者	山本 新吾 (YAMAMOTO Shingo) (80322741)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------