

令和 2 年 9 月 15 日現在

機関番号：35413

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15153

研究課題名(和文) Aeromonas属菌のbiofilm形成能の変化と病原性の解析

研究課題名(英文) Study on relationship between changes in biofilm formation and pathogenicity in Aeromonas spp.

研究代表者

清家 総史 (Seike, Soshi)

広島国際大学・薬学部・助教

研究者番号：90806275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)： Aeromonasは一般的に食中毒菌として知られているが、癌や肝疾患などの基礎疾患を有する患者において、予後不良の劇症型感染症を引き起こす。本菌は強い接着能(biofilm形成能)を有するが、主な感染病巣である腸管から、どのようにして感染拡大を起こすのかに着目し、腸管系の細胞株であるT84細胞を使用し菌と宿主の相互作用を主に解析した。

その結果、宿主細胞のT84細胞からタンパク質性のbiofilm形成抑制因子が遊離され、本菌のbiofilm形成を抑制していることが明らかとなった。これらの結果は、遊離菌の割合の増加が本菌の感染拡大の引き金となっている可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Aeromonasは一般的に食中毒菌として知られているが、我が国で増加している癌や肝疾患などの基礎疾患を有する患者において、しばしば予後不良で、急速に重篤化する感染症を引き起こす。これまで、本菌感染症の劇症化のメカニズムは不明であるが、病巣部における感染初期の宿主と菌の相互作用に着目した本研究により、本菌の感染拡大機構の一つの可能性を見つけることができた。今後、更なる解析は必要であるが、本研究が劇症化予防、あるいは治療に役立つことを期待する。

研究成果の概要(英文)： Aeromonas opportunistically causes severe infection on patient with underlying diseases such as cancer and liver disease. It has been reported that Aeromonas has a strong adhesive ability (by forming biofilm) in various environments. However, it is unclear how the bacteria spread the infection from the intestinal tract which is the initial infected lesion. In our project, we focus to investigate the biofilm formation state of Aeromonas in intestinal cells. In this study, we first analyzed the interaction between the bacteria and the intestinal cells using T84 cells.

As a result, it was found that some protein component was released from the T84 cells and it was inhibited the biofilm formation by Aeromonas. When biofilm formation is suppressed, the number of bacteria released in the intestinal tract is expected to increase. We therefore consider that the increase in the number of free bacteria may be closely related to the spread of infection after Aeromonas colonized in the intestine.

研究分野：細菌学

キーワード：Aeromonas biofilm バイオフィルム 腸管感染 病原性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Aeromonas は河川や汽水域に広く棲息するグラム陰性桿菌であり、*A. sobria* や *A. hydrophila* は食中毒起因菌に指定されている。しかし、これらの *Aeromonas* 属菌は食中毒のみならず、癌や肝硬変などを基礎疾患にもつ患者において、四肢の壊死を伴う劇症型感染症例も数多く報告されている。このような劇症型感染症においては適切な治療法がなく、予後も不良となるケースが多い。また、本菌は、あらゆる環境で強い接着能を示し、biofilm を形成することが報告されている。申請者は、本菌感染症の劇症化、特に腸管内への感染から如何なるプロセスを経ることで腸管外へと感染が進展するのかに注目し、そのメカニズムを探ることから本菌による劇症型感染症の予防、あるいは治療戦略を確立したいと考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は *Aeromonas* の腸管での挙動を明らかにし、本菌感染症の劇症化機序の解明を目指すことである。まずは、体内に侵入後の菌を想定し、*Aeromonas* の腸管上皮における biofilm 形成について調べるため、本申請研究では、培養細胞 (T84 細胞: ヒト結腸癌細胞株) をモデルとして使用し、感染の第一段階である腸管への菌の接着過程 (biofilm 形成初期) における宿主細胞との相互作用を中心に調べた。

3. 研究の方法

1) Biofilm 形成抑制因子の産生パターンを細胞株間で比較解析

所属する研究室が保有する細胞株 (T84 細胞, Caco2 細胞, HEK293 細胞, L929 細胞) を使用し、biofilm 形成抑制因子の産生パターン (どのような環境下で産生するのか、産生する細胞種の解析等) を解析する。Biofilm のバイオマスは 1% クリスタルバイオレット染色法により測定し、種々の細胞の培養上清による biofilm 形成抑制作用の強度を解析した。この解析により biofilm 形成抑制因子が特異的に産生されるのか、非特異的に産生されるのかを明らかにした。

2) Biofilm 形成抑制因子の同定

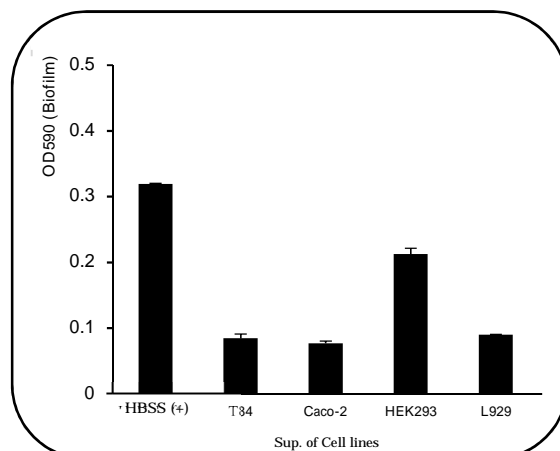
本研究課題を進める過程において、宿主細胞由来の biofilm 形成抑制因子は、50 kDa 以上のタンパク質分子ではないかと予想されたため、biofilm 形成抑制因子の産生細胞と、非産生細胞の培養上清を濃縮し、SDS-PAGE 後に銀染色を行い、biofilm 形成抑制作用を持つ培養細胞の培養上清で見られる特徴的なバンドを切り出し、nanoLC/MSMS 解析にて、biofilm 形成抑制因子の同定を試みた。また、因子の同定後、実際に同定したタンパク質分子が宿主細胞から遊離される量が、biofilm 形成抑制作用と相関関係があるのかについても、HEK293 細胞と T84 細胞を用いて比較検討を行った。

3) 宿主細胞由来 Biofilm 形成抑制因子の抑制メカニズム

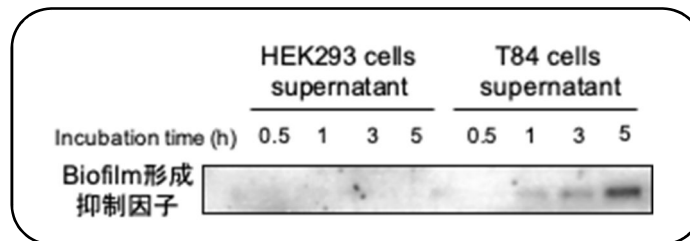
Biofilm は菌の接着から始まり、マイクロコロニーの形成、成熟という過程を経て形成される。本研究により同定された biofilm 形成抑制因子が菌の接着過程を抑制しているのか、あるいは、biofilm の成熟過程を抑制しているのかについてメカニズムの検討を行った。本菌と biofilm 形成抑制因子の作用させるタイミングを変え、検討を行った。

4. 研究成果

1) 研究室が保有する複数の細胞株 (T84 細胞, Caco2 細胞, HEK293 細胞, L929 細胞) の培養上清を本菌に作用させると、本菌の biofilm 形成阻害作用の作用強度が、細胞株ごとに異なることが判明した (下図)。この結果より biofilm 形成抑制因子の遊離パターンが細胞株により異なることが明らかになった。特に腸管系の細胞で biofilm 形成抑制作用が強くなる傾向を示すことが明らかとなった。



2) Biofilm 形成抑制作用が最も強かった腸管系の細胞の培養上清を濃縮後、カラムにより分画し、成分解析を行った結果、biofilm 形成抑制因子はタンパク質性の分子であることが判明した。また、濃縮液を SDS-PAGE により分画後、得られたバンドからタンパク質を抽出し nano-LCMSMS 解析により分析した結果、biofilm 形成抑制因子を同定することができた。同定したタンパク質のリコンビナントタンパク質で本菌の biofilm 形成阻害作用を確認すると、用量依存的に biofilm 形成抑制作用を示した。また、この因子の各種細胞からの遊離量を調べると、培養時間依存的に増加し（下図）、さらに、上図に示した biofilm 形成抑制作用強度と biofilm 形成抑制因子の遊離量との間で相関性が認められ、腸管系の細胞で biofilm 形成抑制因子の遊離が多く認められた。



3) 本 biofilm 形成抑制因子の作用メカニズムを検討した結果、宿主細胞由来の biofilm 形成抑制因子は本菌の biofilm の成熟過程ではなく、biofilm 形成初期の接着過程を阻害していることが明らかになった。また、この菌の接着過程の阻害様式が、物理的な要因なのか、生化学的な要因なのかについて検討すると、物理的な要因で菌の接着を阻害していることが明らかになった。これらの結果により、本タンパク質は本菌の初期の biofilm 形成過程を阻害していることが明らかになった。また、本因子の biofilm の分解能についても検討を行ったが、本因子は biofilm の分解作用を示さなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Seike Soshi, Takehara Masaya, Kobayashi Keiko, Nagahama Masahiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Clostridium perfringens Delta-Toxin Damages the Mouse Small Intestine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 232 ~ 232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins11040232	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 Kobayashi Hidetomo, Seike Soshi, Yamaguchi Masafumi, Ueda Mitsunobu, Takahashi Eizo, Okamoto Keinosuke, Yamanaka Hiroyasu	4. 巻 14
2. 論文標題 Aeromonas sobria serine protease decreases epithelial barrier function in T84 cells and accelerates bacterial translocation across the T84 monolayer in vitro	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0221344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0221344	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 Takehara Masaya, Seike Soshi, Sonobe Yuuta, Bandou Hiroto, Yokoyama Saki, Takagishi Teruhisa, Miyamoto Kazuaki, Kobayashi Keiko, Nagahama Masahiro	4. 巻 2
2. 論文標題 Clostridium perfringens -toxin impairs granulocyte colony-stimulating factor receptor-mediated granulocyte production while triggering septic shock	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-019-0280-2	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11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清家総史, 小林秀丈, 高橋栄造, 岡本敬の介, 山中浩泰
2. 発表標題 Aeromonasが形成するbiofilm成分の解析
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 清家総史, 小林秀丈, 上田充展, 前田龍人, 高橋栄造, 岡本敬の介, 山中浩泰
2. 発表標題 Aeromonas属菌が形成するbiofilmの構成成分の解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清家総史, 小林秀丈, 高橋栄造, 岡本敬の介, 山中浩泰
2. 発表標題 Aeromonas 属菌Biofilm の性状解析
3. 学会等名 第66 回トキシシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清家総史, 小林秀丈, 高橋栄造, 岡本敬の介, 山中浩泰
2. 発表標題 Aeromonas 属菌が形成するbiofilm の性状の解析
3. 学会等名 第72回日本細菌学会中国四国支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林秀丈, 清家総史, 上田充展, 高橋栄造, 岡本敬の介, 山中浩泰
2. 発表標題 Aeromonas hydrophila のマクロファージ内生に関する研究
3. 学会等名 第72回日本細菌学会中国四国支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林秀丈, 清家総史, 山口雅史, 高橋栄造, 岡本敬の介, 山中浩泰
2. 発表標題 Aeromonas serine protease decreases epithelial barrier function and promotes bacterial translocation
3. 学会等名 第93回細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前田 龍人, 小林 秀丈, 吉崎 瑞穂, 佐和 章弘, 岡野 太一, 木村 幸司, 清家 総史, 山中浩泰
2. 発表標題 呉地区の医療施設で分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の分子疫学解析
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上田充展, 小林秀丈, 清家総史, 高橋栄造, 岡本敬の介, 山中浩泰
2. 発表標題 病原Aeromonasのマクロファージ内生存機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清家総史, 小林秀丈, 上田充展, 高橋栄造, 岡本敬の介, 山中浩泰
2. 発表標題 Aeromonasの接着過程における宿主由来因子の影響
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田充展, 小林秀丈, 清家総史, 高橋栄造, 岡本敬の介, 山中浩泰
2. 発表標題 組織侵襲性Aeromonasによる腸管上皮細胞バリア破壊機構の 解析
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清家総史, 小林秀丈, 高橋栄造, 岡本敬の介, 山中浩泰
2. 発表標題 Aeromonasの接着に影響を与える宿主因子の探索
3. 学会等名 第71回日本細菌学会総会 中国・四国支部総会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----