

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2021
課題番号：19K07560
研究課題名(和文) ディフィシル菌バクテリオファージの宿主認識機構の解明及び治療と予防への応用

研究課題名(英文) Study for a molecular machinery of the host recognition by Clostridioides difficile phage to develop the advanced therapy

研究代表者
阪口 義彦 (Sakaguchi, Yoshihiko)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：70403491
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Clostridioides difficile感染症(CDI)は、抗菌薬関連下痢症・腸炎の1つであり、C. difficileが過剰に増殖することにより発症する。従って、原因となるC. difficileのみを特異的に殺菌する新規治療法の確立が急務である。本研究課題では、その治療候補としてバクテリオファージ(ファージ)に着目した。ファージは、宿主である細菌に対して特異的に結合し殺菌活性を示す。本課題において、推定した尾部吸着分子を発現・精製し、C. difficileに対する結合をELISAおよびウェスタンブロットにより解析したところ、濃度依存性的および時間依存性的な結合が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Clostridioides difficile感染症(CDI)は、米国では多くの罹患者が報告され、毎年多額な医療コストを費やしている。我が国でも同等またはそれ以上の発生率であると見積られている。また、米国疾病管理予防センター(CDC)は、C. difficileを“urgent threat”に分類している。このような危機的状況を受け、世界保健機関(WHO)および厚生労働省では、その対策として抗菌薬以外の方法による治療法等の開発に役立つ研究が推進されている。本研究が発展することにより、バクテリオファージの特性を有効に利用したCDIの新規治療法の開発につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Clostridioides difficile infection (CDI), which is caused by excessive proliferation of C. difficile, is one of the antibacterial drug-related diarrhea and enteritis. Therefore, it is important to develop a new and specific treatment method for C. difficile disinfection. The current study was focused on bacteriophage (phage) as a potential treatment. Phage binds specifically to the host bacterium and generates a bactericidal activity. In this study, the recombinant phage proteins were expressed and purified and the bindings between these proteins and C. difficile were examined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and western blot analysis. The results of the study showed a dose- and a time-dependent binding.

研究分野：病原細菌学

キーワード：Clostridioides difficile C. difficile感染症 バクテリオファージ 宿主特異性 尾部吸着分子
ディスプレイオシス 治療 予防

1. 研究開始当初の背景

Clostridioides (Clostridium) difficile 感染症 (CDI) は、抗菌薬の使用等により正常な腸内微生物叢が乱れ、*C. difficile* が過剰に増殖することにより発症する。CDI は、欧米では発生率の高い疾患として認識され、国内でも欧米と同等またはそれ以上に多いと推察される。特に、高齢者における発生率が高く、再発を繰り返すため治療が難渋する。抗菌薬による CDI の治療は、多種多様な腸内細菌を死滅させることがある。その結果、腸内環境の回復に時間がかかり、入院期間の長期化による Quality of Life (QOL) の著しい低下をもたらされる。CDI 治療では、バンコマイシンやメトロニダゾールなどの抗菌薬が有効であるが、有益な腸内微生物叢を攪乱させ、再び CDI が引き起こされることがある。従って、腸内微生物叢を攪乱せず、原因となる *C. difficile* のみを特異的に殺菌する CDI の新規治療法の確立が喫緊である。

2. 研究の目的

本研究課題では、バクテリオファージ (ファージ) の特性を利用した治療の有用性に着目し、ファージを有効に利用した CDI の新規治療法の確立を目指した。ファージは、宿主である細菌にのみ特異的に結合し殺菌活性を示す。その特異性は、鍵 (ファージ) と鍵穴 (細菌) のように厳密な関係であるが、その宿主認識機構は明らかでない。そこで、まずは、ファージ-宿主間相互作用の本体を十分に理解するため、推定したファージ尾部吸着分子の *C. difficile* への結合性について研究を行った。

3. 研究の方法

組換えタンパク質の発現・精製

C. difficile のバクテリオファージ (ファージ) のゲノム情報を基に、タンパク質の機能予測解析により数個の遺伝子が尾部吸着分子をコードしていると推察した。そこで、まずは 2 つの遺伝子 (*orfA* および *orfB*) について、大腸菌発現系により His 融合タンパク質 (His-ORFA, -ORFB) として発現させた。発現したそれぞれのタンパク質をアフィニティークロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーにより精製した。

C. difficile の調製

C. difficile をブレインハートインフュージョン (BHI) 培地を用いて、37 °C で一晩嫌氣的に培養した。嫌気培養は、嫌気チャンバー装置を用いて行った。培養液を集菌し

緩衝液で洗浄し、推定した尾部吸着分子の結合性の実験に使用した。

C. difficile ペプチドグリカンの精製

C. difficile を と同様の方法で培養し、集菌後、超音波処理により菌体を破碎した。その破碎液に Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) を添加し、100°C で 40 分間処理した。本処理液をプロナーゼにより溶液中に含まれるタンパク質を分解した。また、トリクロロ酢酸を添加し、100°C で 20 分間処理することで多糖を脱離した。さらに、ジエチルエーテル処理により脂質を除去しペプチドグリカン (PG) を調製した。

推定尾部吸着分子の *C. difficile* に対する結合性の解析

1) グラム染色法

96 穴マイクロプレートに精製した His 融合タンパク質 (His-ORFA, -ORFB) を固定した。これに で調製した *C. difficile* を嫌気的条件下で、35、30 分間反応させた。洗浄後、*C. difficile* をグラム染色し、光学顕微鏡によりその結合を観察した。

2) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

と で調製した *C. difficile* または精製 PG を 96 穴マイクロプレートに固定した。これに His 融合タンパク質 (His-ORFA, -ORFB) を 37 で 1 時間、一次抗体 (マウス His Tag モノクロナール抗体) を室温で 1 時間、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ (HRP) 標識二次抗体 (ヤギ抗マウス IgG) を室温で 1 時間反応させた。洗浄後、3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) を添加し発色させ、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度 (OD₄₅₀) を測定した。

3) ウェスタンブロット法

と で調製した *C. difficile* または精製 PG と His 融合タンパク質 (His-ORFA, -ORFB) を 37 で 30 分間反応させた。反応液を遠心により上清と沈渣に分け、それぞれをポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) し、ウェスタンブロット法により His-ORFA および His-OrfB の *C. difficile* または精製 PG に対する結合性を解析した。ウェスタンブロット法では、一次抗体 (マウス His Tag モノクロナール抗体)、HRP 標識二次抗体 (ヤギ抗マウス IgG) を用い、ECL Western blotting detection reagents により発色させた。

4. 研究成果

Clostridioides difficile ファージのゲノム情報を基に、他のファージのものとの相同性解

析およびタンパク質機能予測解析により、数個の遺伝子が尾部吸着分子をコードしている
と推察した。そこで、まずは 2 つの遺伝子 (*orfA* および *orfB*) を His 融合タンパク質
(His-ORFA, ORFB) として大腸菌で発現・精製した。その結果、His-ORFA は可溶性タ
ンパク質として精製することができたが、His-ORFB は不溶性画分に移行したため精製す
ることが困難となった。そこで、まずは、精製 His-ORFA について、*C. difficile* または精製
ペプチドグリカン (PG) に対する結合性を調べた。本結合性の解析は、1) グラム染色法、
2) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) および 3) ウエスタンブロット法の 3 つ
の手法により行った。グラム染色法においては、His-ORFA に対する *C. difficile* の結合を示
したが、十分な結合性が認められなかった。その原因は、グラム染色により His-ORFA ま
たは *C. difficile* が脱離している可能性が考えられた。そこで、ELISA により His-ORFA の
C. difficile または精製 PG に対する結合性を調べたところ、His-ORFA は濃度依存적および
時間依存的に *C. difficile* に結合することが分かった。その結合性を詳細に調べるため、ウ
エスタンブロット法を行った。その結果、His-ORFA は、*C. difficile* または精製 PG に対し
て同様の結合性を示したことから、His-ORFA が PG に特異的に結合することが判明した。
細菌の PG は、様々な成分により構成されている。現在、His-ORFA がどのような成分を
認識しているかを調べるため、解析を進めている。一方、His-ORFB についても同様の結
合性の解析を行ったが、精製濃度が十分ではなかったことから、His-ORFB の発現系を検
討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Gotoh Kazuyoshi, Sakaguchi Yoshihiko, Kato Haru, Osaki Hayato, Jodai Yasutaka, Wakuda Mitsutaka, Take Akira, Hayashi Shunji, Morita Eri, Sugie Takehiko, Ito Yoichiro, Ohmiya Naoki	4. 巻 73
2. 論文標題 Fecal microbiota transplantation as therapy for recurrent <i>Clostridioides difficile</i> infection is associated with amelioration of delirium and accompanied by changes in fecal microbiota and the metabolome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anaerobe	6. 最初と最後の頁 102502 ~ 102502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anaerobe.2021.102502	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 Sakaguchi, Y., Uchiyama, J., Take, A., Gotoh, K., Sakaguchi, M., Suzuki, T., Yamamoto, Y., Hosomi, K., Kohda, T., Mukamoto, M., Kozaki, S., Hayashi, S., Oguma, K.	4. 巻 66
2. 論文標題 Analysis of a plasmid encoding botulinum neurotoxin type G gene in <i>Clostridium argentinense</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anaerobe	6. 最初と最後の頁 102281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anaerobe.2020.102281	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18件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 阪口義彦、武 晃、後藤和義、山本由弥子、幸田知子、向本雅郁、小崎俊司、林 俊治、林 哲也、小熊恵二
2. 発表標題 C型とD型ボツリヌス毒素を支配するバクテリオファージの溶原化機構の解析
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武 晃、阪口義彦、稲橋佑起、後藤和義、林 俊治、加藤はる、大宮直木
2. 発表標題 食物およびヒト糞便から分離した放線菌の人工消化液での生残性
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阪口義彦、後藤和義、武 晃、尾崎隼人、城代康貴、和久田 光毅、林 俊治、加藤はる、大宮直木
2. 発表標題 せん妄を伴う再発性Clostridioides difficile感染症に対する糞便微生物移植療法～再発予防効果を示した症例の腸内微生物叢及びその代謝産物の解析～
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大宮直木、阪口義彦、加藤はる
2. 発表標題 再発性クロストリジウム・ディフィシル感染症に対する新鮮便・バンクドナー凍結便による好氣的糞便移植
3. 学会等名 日本消化器病学会東海支部例会第135回例会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武 晃、阪口義彦、稲橋佑起、後藤和義、林 俊治、加藤はる、大宮直木
2. 発表標題 根野菜からの放線菌の分離とその腸内環境生存能の評価
3. 学会等名 第35回日本放線菌学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阪口義彦、後藤和義、武 晃、尾崎隼人、城代康貴、和久田光毅、林 俊治、大宮直木、加藤はる
2. 発表標題 Clostridioides difficile感染症に対する糞便微生物移植の影響～ヒト腸内微生物叢及びメタボロームの解析～
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武 晃、阪口義彦、稲橋佑起、後藤和義、林 俊治、大宮直木、加藤はる
2. 発表標題 食物から分離した放線菌の腸内環境生存能の評価
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阪口義彦、後藤和義、武 晃、尾崎隼人、城代康貴、和久田光毅、林 俊治、加藤はる、大宮直木
2. 発表標題 糞便微生物移植によりClostridioides difficile感染症の再発予防効果を示した症例における腸内微生物叢及びその代謝産物の解析
3. 学会等名 第141年会日本薬学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sakaguchi, Y., Hosomi, K., Kohda, T., Umeda, K., Uchiyama, J., Take, A., Goto, K., Senoh, M., Hayashi, S., Kozaki, S., Mukamoto, M.
2. 発表標題 Analysis of botulinum neurotoxin type B6 gene-encoding plasmid in Clostridium botulinum type B
3. 学会等名 ASM microbe 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阪口義彦、後藤和義、妹尾充敏、武 晃、内山淳平、尾崎隼人、城代康貴、林 俊治、大宮直木、加藤はる
2. 発表標題 Clostridioides difficile感染症患者に対する糞便微生物移植の効果～ヒト腸内微生物叢およびメタボロームの解析～
3. 学会等名 第140年会日本薬学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阪口義彦、後藤和義、妹尾充敏、内山淳平、尾崎隼人、城代康貴、林 俊治、大宮直木、加藤はる
2. 発表標題 Analysis of gut microbiota and metabolite in Fecal transplantation for Clostridioides difficile infection
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 内山淳平、松井秀仁、那須川 忠弥、阪口義彦、水上 圭二郎、阪口雅弘、松崎茂展、花木秀明
2. 発表標題 Potential improvement of prenatal Group B Streptococcus screening using phages
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 阪口義彦、内山淳平
2. 発表標題 2018年日本細菌学会関東支部インターラボセミナー、第7回ファージ研究会合同大会開催報告
3. 学会等名 第102回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内山淳平、村上裕信、佐藤 礼一郎、曾川一幸、阪口義彦、島 綾香、石原玄基、阪口雅弘
2. 発表標題 ウシにおける外来性レトロウイルス感染による腸内細菌叢の解析
3. 学会等名 第102回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 那須川 忠弥、内山淳平、島倉秀勝、小方雅也、阪口義彦、福田 憲、松崎茂展
2. 発表標題 薬剤耐性に関するStreptococcus suisの膜小胞の研究
3. 学会等名 第102回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阪口義彦、後藤和義、妹尾充敏、武 晃、内山淳平、尾崎隼人、城代康貴、林 俊治、大宮直木、加藤はる
2. 発表標題 Analysis of gut microbiota and metabolite in fecal transplantation therapy for Clostridioides difficile infection
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内山淳平、村上裕信、佐藤 礼一郎、水上 圭二郎、鈴木武人、島 綾香、石原玄基、阪口義彦、曾川一幸、阪口雅弘
2. 発表標題 Analysis of gut microbiome in dairy cows infected with bovine leukemia virus
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本由弥子、丸濱功太郎、松香芳三、美間健彦、後藤和義、Arief Waskitho、横田憲治、阪口義彦、松下 治、小熊恵二
2. 発表標題 ボツリヌス神経毒素の三叉神経節での作用機構の解析
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 阪口義彦	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本防菌防黴学会	5. 総ページ数 6
3. 書名 日本防菌防黴学会誌	

1. 著者名 小熊惠二、堀田 博、林 俊治、笹原鉄平、阪口義彦、石戸 聡、迫 康仁、横田憲治、吉山裕規、藤田直久、山田雅夫、藤友 結実子、形山優子、中西雅樹、勝二郁男、松下 治	4. 発行年 2021年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 304
3. 書名 コンパクト微生物学（改訂第5版）	

〔産業財産権〕

〔その他〕

出願の可能性があるため、詳細な内容は伏せさせていただきます。

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	加藤 はる (Kato Haru) (00273136)	国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター・再任研究員 (82603)	

6. 研究組織（つづき）

	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	大宮 直木 (Ohmiya Naoki) (00335035)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	
研究分担者	内山 淳平 (Uchiyama Jumpei) (20574619)	岡山大学・学術研究院医歯薬学域・准教授 (32701)	
研究分担者	後藤 和義 (Gotoh Kazuyoshi) (20626593)	岡山大学・学術研究院医歯薬学域・助教 (15301)	
研究分担者	妹尾 充敏 (Senoh Mitsutoshi) (20646624)	国立感染症研究所・細菌第二部・室長 (82603)	
研究分担者	林 俊治 (Hayashi Shunji) (40260765)	北里大学・医学部・教授 (32607)	

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