

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590463

研究課題名(和文) 腸管外病原性大腸菌の新規好中球機能阻害因子の検索と機能解析

研究課題名(英文) Investigation of Inhibitory effect of Extra-Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* against human neutrophils

研究代表者 大西 真 (OHNISHI, MAKOTO)

国立感染症研究所 細菌第一部 部長

研究者番号：10233214

研究成果の概要(和文)：

腸管外病原性大腸菌の好中球貪食抵抗性に関して解析を行ない、CK17株が高い血清耐性および好中球貪食抵抗性を示すことを明らかにした。K1莢膜産生性が好中球貪食抵抗性に関与しているが、血清耐性には関与していないことが示された。K1莢膜によるC3分子あるいはIgGの沈着抑制による機構が推察された。

研究成果の概要(英文)：

Molecular mechanism of Extra-Intestinal pathogenic *Escherichia coli* was investigated. The strain CK17, which is UPEC O2, showed extra high resistant to serum treatment and also resistant to human neutrophils phagocytosis. K1 capsule was responsible to PMN resistant, but not serum resistance. C3 molecule and IgG could not bind K1-produceing CK17. The mechanism of K1-independent serum resistant remains unsolved.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,600,000	0	1,600,000
21年度	1,400,000	0	1,400,000
22年度	700,000	0	700,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	0	3,700,000

研究分野：細菌感染症学

科研費の分科・細目：基礎医学 細菌学(含真菌学)

キーワード：大腸菌、好中球、病原性、

1. 研究開始当初の背景

病原性大腸菌には、下痢病原性大腸菌と、尿路感染症、敗血症、髄膜炎を引き起こす腸管外病原性大腸菌が存在する。種々の病原因子が同定されてきているが、未だ充分な解析は進んでいない。

単純性急性膀胱炎のほとんどは膿尿を示す。膀胱内腔へ白血球の浸潤があるにもかかわらず、感染を制御出来ていないことを考えると大腸菌側になんらかの防御機構があ

ることが想定される。

膀胱への定着に関してはI型線毛が重要な病原因子として同定されている。また、宿主の防御系としては好中球の浸潤と殺菌機構が重要と考えられているが、一部の尿路病原性大腸菌は毒素因子(Cnf-1)の作用により殺菌機構から回避していることが報告されている。しかしながら、*cnf-1* 遺伝子保有率は30%程度に留まるため、他の病原因子が存在している可能性が高い。

申請書らは、単純性急性膀胱炎患者から分離された大腸菌を収集し、それらの性状を解析している。その中で、以下のことを明らかにしてきた。

尿路感染由来大腸菌は系統 B 2 大腸菌が 80% を占めるが、それらの菌株を MLST によってさらに分類すると、8 つのサブグループに分けられる。系統 B 2 尿路感染由来大腸菌の 95% がこのいずれかに属する。

系統 B 2 尿路病原性大腸菌株間で明確な系統的区別が可能であることが示されたので、申請者らはそれぞれの系統における宿主免疫系に対する抵抗性に差異が存在することを仮定し、好中球食食・殺菌機能に対する抵抗性に関して予備的な検討を行い、

(1) 非動化 10% 血漿処理した場合、K12 株と比べ明らかに高い好中球抵抗性を示す大腸菌サブグループが存在すること、(2) 10% 血漿処理した場合は、菌株によって大きく好中球食食・殺菌機能に対する抵抗性が異なることを見いだした。いずれの場合も *cnf-1* 遺伝子の有無との関連はみとめられないことが明らかになってきた。

2. 研究の目的

好中球抵抗性と系統 B 2 尿路病原性大腸菌との関連を詳細に解析し、あらたな病原機構を明らかにすることを目的として以下の項目について検討を行う。系統ごとに臨床由来株を選定し体系的に解析を行うとともに、抵抗性の高い菌株に関しては個別解析を目指す。

系統 B 2 の 8 つのサブグループから各 3 株ずつ菌株を選定し、計 24 株の菌株に対して以下を検討する。

- (1) 血清耐性度の確認
- (2) 好中球食食・殺菌機能に対する抵抗性
- (3) 大腸菌に対する好中球の反応

3. 研究の方法

菌株の収集

国立感染症研究所においてコレクションされた尿路感染症由来大腸菌を MLST 解析で分類した後解析に用いた。CK17 の K1 莢膜非産生株 (*kpsF* 欠失株) を実験に用いた。

血清耐性能の測定

健康人ヒト血清をプールしたものをを用いて大腸菌の血清耐性の検討を行った。LB 培地を用いて OD600=0.2-0.3 まで大腸菌の培養を行った。PBS-Ca 溶液に懸濁後、最終濃度 10% あるいは 50% に血清を添加し 37°C で 2 h 静置培養を行った。その後直ちにサンプルを PBS 溶液を用いて希釈し、LB プレートを用いて CFU の計測を行った。コントロールとして同一ロットの血清を非動化し、同様の操作のもと解析を行った。

好中球と大腸菌の接着

緑色あるいは赤色タンパク発現大腸菌とヒト好中球を用いて、FACS 解析および蛍光顕微鏡観察を行なった。

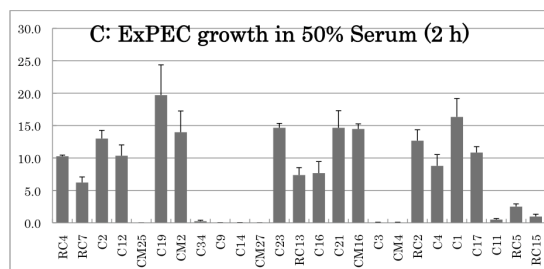
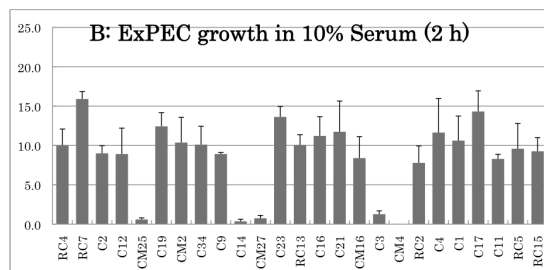
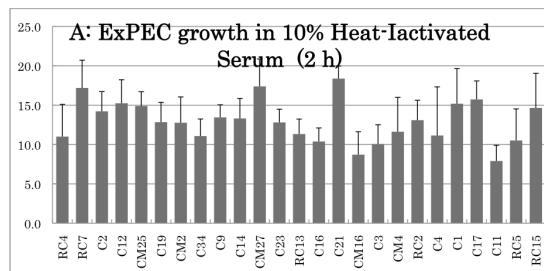
菌体沈着オプソニン分子の解析

菌体に沈着したオプソニン分子、補体および抗体の解析をウェスタン法ならびに FACS を用いて解析を行った。

4. 研究成果

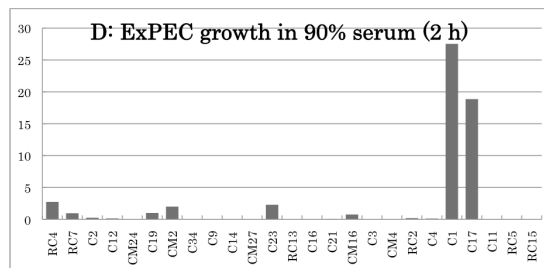
血清耐性度の確認

10% ヒト血清で 2 h 処理した場合 80% (25 株中 20 株) の菌株は血清中で増殖することが可能であった。B2_3 および B2_7 に属する菌株は血清感受性であり、サブグループによって



血清耐性が異なるという知見が得られた。

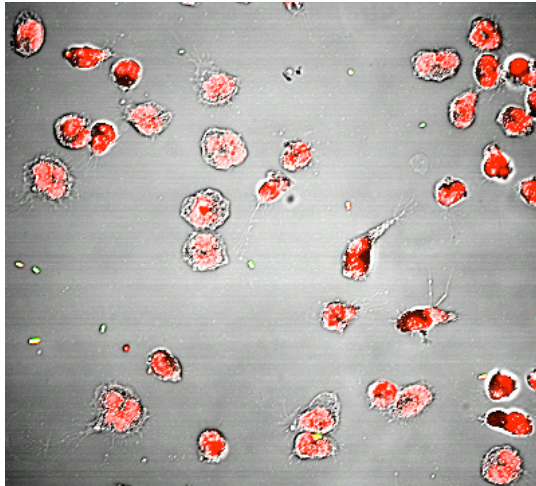
50% ヒト血清処理に対しても耐性を示す株が 15 株存在し、B2_1, B2_2, B2_4 に属する菌株および B2_6, B2_8 に属する菌株の一部であった (C)。また、その中で B2_8 に属する



血清群 O2 の 2 株は 90%血清中でも、増殖可能であり、著しく高い血清耐性を持つことが示された。

好中球食食・殺菌機能に対する抵抗性

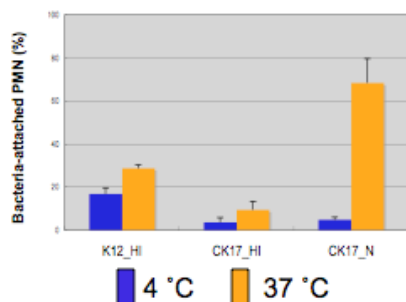
解析した株の中で、B2_8 に属する血清群 O2 の菌株の中で、高度血清耐性株の好中球



に対する食食抵抗性を検討したところ高い好中球食食抵抗株、CK17 株が見いだされた。

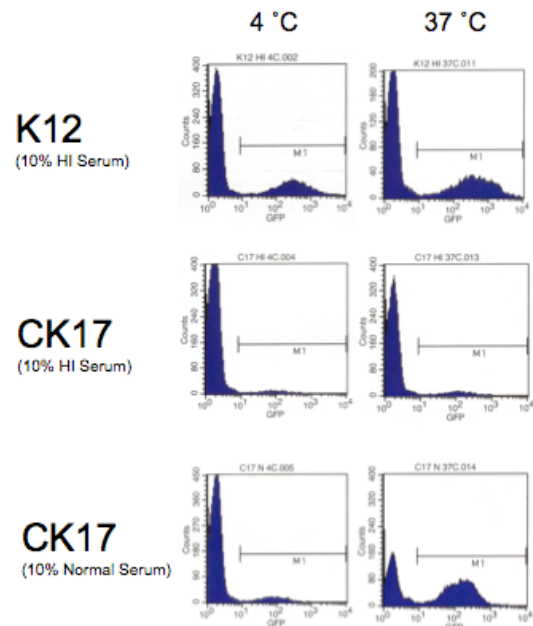
非オプソニン化大腸菌 K-12 は、好中球に食菌され生存率は 0.6 であったことと対照的に、CK17 はヒト好中球存在下において、生存率は非オプソニン化の場合に 6.90、オプソニン化した場合でも 3.54 と高値を示し、好中球の食菌作用に対する抵抗性が認められた。本条件で、CK17 による好中球の著しい細胞死は認められず、CK17 の好中球殺菌抵抗性は、細胞障害活性によるものでないと考えられた。また、好中球が GFP 発現 CK17 に近接する像が蛍光顕微鏡観察で認められたが、CK17 の食食はほとんど観察されなかった。

また、FACS を用いた好中球への接着効率と、温度の影響を検討した。



オプソニン化によって効率的に PMN は CK17 に接着することが認められ、温度依存的であることが示された。

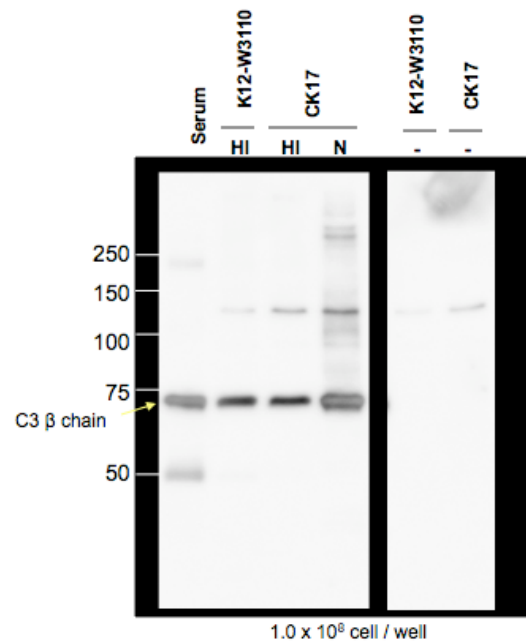
これらのことから、CK17 は好中球の食作用抑制機構を持つことが示唆された。



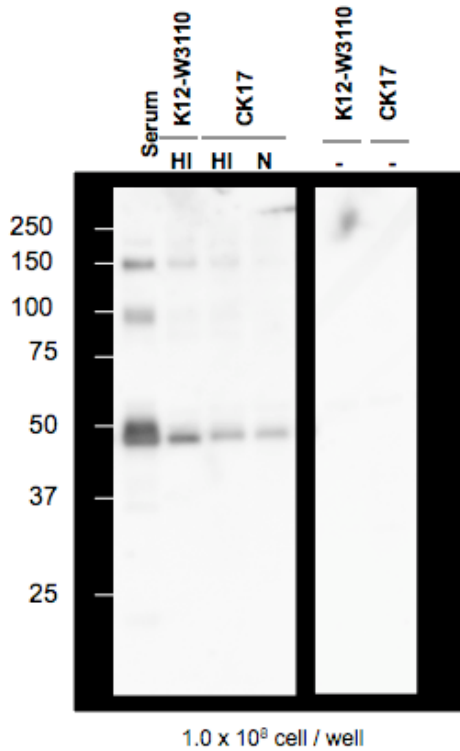
好中球食食・殺菌機能に対する抵抗メカニズムの解明

CK17 の好中球からの回避機構の検討を行うため、オプソニン化の状態を確認した。菌体に沈着したオプソニン分子、補体および抗体の解析をウエスタン法にて解析を行った。

Anti-C3 β chain Ab

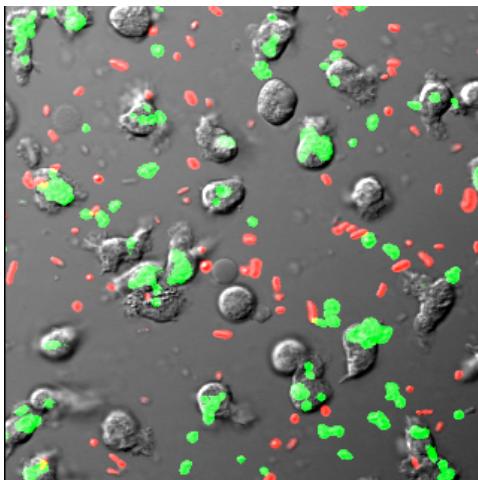


WB: Anti- human IgG γ chain Ab



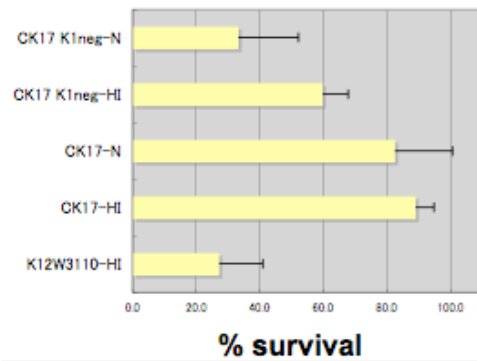
その結果、CK17においては補体 C3b あるいは iC3b, および IgG の沈着が認められた。

K12 株(GFP 発現)と CK17 株 (RFP 発現)との混在状態で好中球は K12 を選択的に貪食する像が観察された。つまり、CK17 の好中球貪食抵抗性は局所的なものであり、共存する K12 株の貪食までは抑制しないことが示された。CK17 は補体抵抗性を示すことを併せて考えると、CK17 に沈着する C3b あるいは iC3b はなんらかの機構でオプソニンとしても、殺菌作用をもつ補体複合体としても機能が発揮されていないことが示唆された。

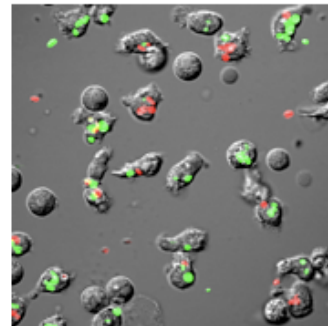


CK17 は K1 莢膜産生株である。K1 莢膜はその詳細な機構は未解明であるが、大腸菌に抗体のアクセスを阻害すること、補体の活性化を抑制し補体抵抗性および貪食機能抵抗性を示すことが知られている。CK17 株の K1 莢膜合成遺伝子の変異株を作成し、CK17 と比較検討した。変異株は好中球との接触が向上し、貪食される効率が上がった。

Survival of *E.coli* from PMN Killing
Human PMN (MOI = 0.2). Incubated for 30 min.

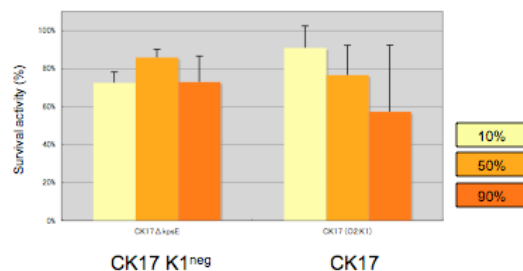


K12 W3110 (GFP)-HI plasma /
CK17 K1^{neg} (RFP)-normal plasma
Human PMN (MOI = 5 + 5)



これは抗体沈着の阻害、C3b あるいは iC3b の沈着の阻害が確認されたことから、CK17 好中球貪食抵抗性は K1 莢膜によるものと考えられた。

Serum resistant of CK17 K1^{neg} and CK17



しかしながら、K1 莢膜変異株においても高度血清耐性が維持されることから、新規の血清耐性機構を持つことが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

腸管外病原性大腸菌の好中球食菌作用抵抗性

大西 真、阿戸 学、志牟田健、渡邊治雄
日本細菌学会総会 2009, 3月(ワークショップ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 真 (OHNISHI, MAKOTO)

国立感染症研究所・細菌第一部・部長

研究者番号：1 0 2 3 3 2 1 4

(2) 研究分担者

阿戸 学 (ATO, MANABU)

国立感染症研究所・免疫部・室長

研究者番号：2 0 3 9 2 3 1 8