

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03579

研究課題名(和文) ゲノム進化予測による薬剤耐性菌発生防止に向けた研究

研究課題名(英文) Reserch for within-host bacterial evolution leading to increased antimicrobial resistance

研究代表者

相原 正宗 (Aihara, Masamune)

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：30748843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：新たな薬剤耐性細菌は抗菌薬投与中の患者体内などストレス環境下で発生していると推測されるが、生体内におけるその進化過程については未だ謎が多く残されている。本研究ではまず、抗菌薬投与中の患者体内で時を追うごとに薬剤耐性を強化させた臨床分離細菌の全ゲノム配列を構築し、これに診療情報を付与することで細菌の宿主内ゲノム進化のトレーサビリティに特化した小規模データベースを構築した。これを基に症例間の相互比較を行い、1)グローバル転写因子の活性化と2)遺伝子(ゲノム)増幅につながるゲノム変化が共通因子として認められ、したがって、これらの機能抑制が薬剤耐性細菌の新規発生阻止に寄与する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤耐性細菌の蔓延は治療選択や感染管理など医療現場のさまざまな面において既に困難を引き起こしており、国境を越えた薬剤耐性対策は公衆衛生における喫緊の課題に位置付けられている。抗菌薬は現在の医療において不可欠であるが、その使用は患者体内での薬剤耐性菌発生リスクを高めるというジレンマが常に付きまとう。本研究は、細菌がどのようなプロセスを経て患者体内で薬剤耐性を獲得・強化するかを明らかにすることを目的として行われた研究であり、その研究成果は今後、医療行為と細菌の両視点からより適切な薬剤耐性対策を模索するための基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Although the emergence of antimicrobial resistant bacteria has occurred under stress conditions, such as within-patients administered antibiotics, the in vivo processes of their evolution remain largely unexplored. In this study, to trace the bacterial genome evolution leading to increased antimicrobial resistance, we analyzed whole-genome sequences of clinical isolates that were consecutively isolated from each patient and gradually increased drug-resistance. By comparing between the cases, we identified that the activation of global transcription factors and the gene (genome) amplification were commonly occurred in these processes, indicating that the prevention of these alterations may inhibit the emergence of novel antimicrobial resistant bacteria.

研究分野：臨床微生物学

キーワード：薬剤耐性 細菌 宿主内ゲノム進化 ゲノミクス 抗菌薬

1. 研究開始当初の背景

細菌における薬剤耐性はその生存を脅かすストレス環境下で獲得される性質であり、世界で増大する抗菌薬消費は薬剤耐性細菌の顕在化・多様化に寄与していると考えられる。多種多様な薬剤耐性菌の蔓延は治療選択肢の制限など、ヒトの健康維持に対し負の影響が大きく、したがって、薬剤耐性対策は世界全体で取り組むべき課題であるとの認識が強まっている。本邦においても2016年から開始された薬剤耐性・アクションプランに代表される薬剤耐性対策がすでに実践されており、例えば、薬剤耐性細菌の新規発生を抑制するため、臨床では抗菌薬適正使用など「医療行為」に焦点をおいた対策が励行されている。しかし、抗菌薬投与中の患者体内で起こる環境変化にうまく適応できる細菌はどのような遺伝的背景を持っているのか、患者体内ではどのような段階を経て細菌自身の性質変化(=薬剤耐性獲得とそれを支える統合的な変化)が起きているのか、どのようにして獲得した薬剤耐性は維持・強化されているのかなど、生体内における「細菌」の変化については明らかにされていない点が多く残されている。

2. 研究の目的

細菌が薬剤耐性を獲得する過程でコアとなる変化を抽出できれば、薬剤耐性菌の新規発生を抑える策を講じるための「細菌」側の情報としての活用できるかもしれない。そこで、本研究ではまず、世界保健機構により最も優先して対処すべき薬剤耐性菌に位置付けられ、本邦でも薬剤耐性化への懸念が強まっている腸内細菌目細菌を対象に、広域抗菌薬カルバペネム耐性に至った細菌のゲノム変化の過程を症例ごとに解析した。さらに、症例ごとの解析で集められたゲノム進化情報と臨床情報を相互補完した小規模データベースを活用して症例間比較を行い、薬剤耐性進化のコアとなる変化を探索した。

3. 研究の方法

菌株および患者情報の収集：九州大学病院における診療の一環として同一患者から経時的に提出された臨床サンプルから同院検査部にて分離された腸内細菌目細菌のうち、各種抗菌薬に対する耐性が徐々に強化され、最終的にカルバペネム耐性と判定された一連の臨床分離株をカルテ情報から抽出した。そのうち、同院検査部のディープフリーザー内で保管されている菌株を解析対象とした。また、これらの菌株が分離された患者の抗菌薬投与歴や他の検査情報を電子カルテから抽出した。(報告書作成現在、2症例計7株；症例A, *Klebsiella pneumoniae* 2株 <Kp1, Kp2>；症例B, *K. pneumoniae* 5株 <KpWEA1, KpWEA2, KpWEA3, KpWEA4-1, KpWEA4-2>の解析結果のみを公開しており、それらの解析結果を下記の研究成果として記載する)

ゲノムアセンブリおよび配列変化の抽出：イルミナ社の Miseq もしくは HiSeq により得られたペアエンドショートリードのクオリティーチェックを行なったのち、Platanus Bを用いてドラフトゲノムを構築した。また、必要に応じて Oxford Nanopore Technologies社の MinIONを用いたロングリードと上述のショートリードの hybrid assembly を Unicyclerにより行い、完全長ゲノムによる比較解析を行なった。各症例内における配列変化(SNV, In/Del)は Mummer 等を用いて抽出した。

薬剤耐性遺伝子の検索およびコピー数解析：上述のとおり構築したドラフトゲノムおよび完全長ゲノムに含まれ、後天的に獲得された既知の薬剤耐性遺伝子を web 解析ツール ResFinder により探索した。薬剤耐性遺伝子のコピー数を測定するため、標的遺伝子に対するプライマー/プローブを用いたデジタル PCR により絶対定量解析を行った。

薬剤耐性機構の解析：ゲノム比較解析により認められた配列変化が引き起こす薬剤耐性機構を確認するため、各菌株から抽出した標的遺伝子の mRNA 発現をリアルタイム PCR により相対定量解析した。mRNA の発現変化に起因するタンパク質発現の変化を確認するため、各菌株から総タンパク質を抽出後、独自に作製した標的タンパク質に対する抗体を用いてウエスタンブロットングによるタンパク質発現量の相対定量解析を行った。また、細菌外膜を抽出することで、抗菌薬の流入・排出に関与する外膜局在タンパク質の発現プロファイリングを行った。

ゲノム増幅機構の解析：薬剤耐性遺伝子を含むプラスミドゲノムの増幅パターン解析にロングリードを活用した。また、各菌株よりアルカリプレップで抽出したプラスミドを含む染

色体外 DNA は、Pulsed-field gel electrophoresis もしくは Field-inversion gel electrophoresis によりプロファイリングした。

4 . 研究成果

症例 A の解析結果；

抗菌薬が持続投与されている症例 A の入院後 72 日目と 105 日目の血液培養サンプルから 2 株の *K. pneumoniae*(Kp1, Kp2) を分離した。Kp1 は抗菌薬全般に感受性であったのに対し、Kp2 はカルバペネムを含む多剤に耐性を示した。2 株のドラフトゲノムを比較したところ、*mdoH*, *ramR* および *ompK36* の P-35 にのみゲノム配列の相違を認めた。したがって、2 株は同系統であり、Kp1 から Kp2 へと進化する過程で多剤耐性を獲得したことが示唆された。Kp2 でのみ認められたグローバル転写因子 RamA のレプレッサー RamR における 1 アミノ酸残基挿入はレプレッサーとしての機能を喪失させ、RamA の過剰発現を誘導し、その制御下にある外膜主要 Porin OmpK35 の発現減少と RND 型トランスポーターの発現増加を引き起こしていた。外膜主要 Porin 遺伝子 *ompK36* の P-35 における SNV はその発現を 1/10 以下に減弱させていた。すなわち、Kp2 は宿主内ゲノム進化により抗菌薬流入・排出を変化させることでカルバペネムを含む複数薬剤に耐性化していることを明らかにした。

(Aihara et al., *J Antimicrob. Chemother.*, 2021)

症例 B の解析結果；

抗菌薬継続投与中の症例 B から採取された臨床検体から経時的に分離された 5 株の *bla*_{CTX-M-14} 陽性 *K. pneumoniae* (KpWEA1, KpWEA2, KpWEA3, KpWEA4-1, KpWEA4-2) を解析した。KpWEA1 と KpWEA2 の感受性は ESBL 発現を反映した典型的なものであったが、KpWEA3 から KpWEA4-1, KpWEA4-2 へと進むにつれ多剤耐性の表現型が強化されていった。全 5 株の完全長ゲノム比較により、この 5 株が同一クローナリティを示すことが確認されたとともに、KpWEA1 が辿った進化の過程を明らかにすることができた。その一部として、症例 A との共通点について挙げる。薬剤耐性が一段増強された KpWEA3 では、症例 A と同様に *ramR* の変異に起因する RamA の過剰発現が起きていた。その後、別々に分離された KpWEA4-1 と KpWEA4-2 では症例 A と同じく *OmpK36* の発現低下を認めたが、2 株で *ompK36* 上に導入された変異は異なっており、*OmpK36* の発現低下は症例 B の体内での生存に必須の遺伝子変化であったことが示唆された。この一連の結果から、抗菌薬膜の透過性低下に至る過程は段階的に起きていることが示され、したがって、症例 A でも同様の過程を辿った可能性が高いと考えられる。加えて、KpWEA3 以降の株では *bla*_{CTX-M-14} をコードするプラスミドにおいて、同遺伝子を挟むように配置された挿入配列 IS26 によって形成された 36.5 kb に及ぶ pseudocompound transposon (PCTn) がプラスミド上でタンデムに増幅されていることを見つけた。さらに詳細に解析することで、隣あった PCTn 配列間の RecA 依存的な相同組み換えにより自律複製能を持たない環状 DNA (=translocatable unit (TU)) が細菌内で生み出されることも明らかにした。つまり、本症例の細菌体内では PCTn の並列重複化と TU の形成が絶えず起こるといふ、極めて動的なゲノム増幅様式により薬剤耐性遺伝子のコピー数が増えており、それに伴って薬剤耐性遺伝子産物による量依存的な薬剤耐性増強効果を生み出していることを明らかにした。

(Yoshino and Aihara et al., *mSphere*, 2021, Aihara and Gotoh et al., *Communications Biology*, 2024)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 2件）

1. 著者名 Aihara Masamune, Gotoh Yasuhiro, Shirahama Saki, Matsushima Yuichi, Uchiyama Takeshi, Kang Dongchon, Hayashi Tetsuya	4. 巻 7
2. 論文標題 Generation and maintenance of the circularized multimeric IS26-associated translocatable unit encoding multidrug resistance	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 597
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-024-06312-4	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 相原正宗、柳澤由佳子、西凜佳子、山下有加、木部泰志、清祐麻紀子、堀田多恵子	4. 巻 33
2. 論文標題 Polymyxin B nonapeptide を用いたカルバペネム低感受性腸内細菌目細菌における 抗菌薬膜透過性低下の検出	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本臨床微生物学会雑誌	6. 最初と最後の頁 296 ~ 301
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 無
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 Yoshino Mai, Aihara Masamune, Gotoh Yasuhiro, Akimoto Masaru, Tatsuhara Wakana, Kiyosuke Makiko, Matsushima Yuichi, Uchiyama Takeshi, Hayashi Tetsuya, Kang Dongchon	4. 巻 6
2. 論文標題 Stepwise Evolution of a Klebsiella pneumoniae Clone within a Host Leading to Increased Multidrug Resistance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 00734-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mSphere.00734-21	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 Aihara Masamune, Nishida Ruriko, Akimoto Masaru, Gotoh Yasuhiro, Kiyosuke Makiko, Uchiyama Takeshi, Nishioka Mitsuaki, Matsushima Yuichi, Hayashi Tetsuya, Kang Dongchon	4. 巻 76
2. 論文標題 Within-host evolution of a Klebsiella pneumoniae clone: selected mutations associated with the alteration of outer membrane protein expression conferred multidrug resistance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Antimicrobial Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 362 ~ 369
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jac/dkaa439	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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 相原正宗, 清祐麻紀子
2. 発表標題 肺炎桿菌の膜透過性低下に起因する耐性獲得と代謝関連遺伝子の代償的变化
3. 学会等名 第92回日本感染症学会西日本地方会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳澤由佳子, 相原正宗, 木部泰志, 清祐麻紀子, 堀田多恵子, 赤司 浩一
2. 発表標題 Polymyxin B nonapeptideを用いた腸内細菌目細菌における抗菌薬膜透過性低下の検出
3. 学会等名 日本医療検査科学会第54回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 相原正宗, 白濱早紀, 清祐麻紀子, 堀田多恵子
2. 発表標題 臨床分離Klebsiella pneumoniaeにおける薬剤耐性遺伝子の増幅と耐性強化
3. 学会等名 第34回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 相原正宗
2. 発表標題 血液培養検査ガイド第2版改定のポイント～臨床の現場で生かすには～同定・感受性検査の現状
3. 学会等名 第34回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 相原正宗, 後藤恭宏, 林哲也, 康東天
2. 発表標題 抗菌薬投与患者体内において段階的に薬剤耐性が強化されたKlebsiella pneumoniae ST628の解析
3. 学会等名 九州微生物研究フォーラム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相原正宗, 清祐麻紀子, 堀田多恵子, 康東天
2. 発表標題 同一患者内におけるKlebsiella pneumoniaeの 薬剤高度耐性獲得過程の解析
3. 学会等名 第68回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相原正宗, 柳澤由佳子, 山下 有加, 木部 泰志, 清祐 麻紀子, 堀田 多恵子, 康 東天
2. 発表標題 抗菌薬膜透過性低下によるカルバペネム耐性腸内細菌目細菌 検出におけるpolymyxin B nonapeptideの有用性評価
3. 学会等名 日本医療検査科学会 第53回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相原正宗
2. 発表標題 当院の人材育成の現状と工夫
3. 学会等名 日本医療検査科学会 第53回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相原正宗 清祐麻紀子 康東天
2. 発表標題 同一患者血液培養から経時的に検出されたKlebsiella pneumoniae 2株の全ゲノム比較解析
3. 学会等名 第30回福岡県医学検査学会
4. 発表年 2020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	後藤 恭宏 (Gotoh Yasuhiro) (20558358)	九州大学・医学研究院・助教 (17102)	
研究分担者	松島 雄一 (Matsushima Yuichi) (20571342)	大阪大学・大学院理学研究科・招へい教員 (14401)	

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
---------	---------