

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08244

研究課題名(和文) 無莢膜型インフルエンザ菌による侵襲性感染症の病態解析

研究課題名(英文) Pathogenesis of invasive infections caused by non typeable H. influenzae.

研究代表者

後藤 憲志 (Gotoh, Kenji)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：90572313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：無莢膜型インフルエンザ(NTHi)菌感染症による侵襲性感染症から分離された菌株は呼吸器から分離された菌株と比較して、バイオフィーム産生能が高かった。新生児の細菌性髄膜炎から分離された株はバイオフィーム産生を認めなかった。新生児と小児における侵襲性感染症の病態は異なることが示唆された。バイオフィームの構造解析では侵襲性感染症を引き起こした菌株では細胞外DNAが表面を覆っており、その中で生菌が多数存在していたが、呼吸器由来の菌株ではバイオフィームは産生するが、細胞外DNAが少なかった。この現象を確認するためHI1296遺伝子の発現解析を行ったが、やはり侵襲性感染症由来株の方が発現亢進を認めていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児だけでなく成人においても増加傾向にある侵襲性インフルエンザ菌感染症の病態解明の糸口になると考えられる。我々の研究結果からバイオフィームの解析に基づき治療戦略や予防法の確立に貢献できると考えられる。また、これらの菌株の分子生物学的特徴も明らかにできれば菌株の早期発見を行うことができ、感染症が起こった時の早期介入も可能となり治療成績の向上に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Strains isolated from invasive infections caused by non-capsular influenza (NTHi) bacteria infections had a higher biofilm-producing capacity compared to strains isolated from the respiratory tract. Strains isolated from bacterial meningitis in neonates did not show biofilm production. The results suggest that the pathogenesis of invasive infections in neonates and children differs. Structural analysis of biofilms showed that strains causing invasive infections had extracellular DNA covering their surfaces, in which a large number of viable bacteria were present, whereas strains of respiratory origin produced biofilms but had less extracellular DNA. Expression analysis of the HI1296 gene was performed to confirm this phenomenon, but again, the expression of the gene was higher in strains derived from invasive infections.

研究分野：小児感染症 予防接種 感染制御学

キーワード：侵襲性インフルエンザ菌感染症 無莢膜型インフルエンザ菌 バイオフィーム

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザ菌莢膜 b 型 (*Haemophilus influenzae* type b: Hib) ワクチン普及後に、Hib による重症な感染症である細菌性髄膜炎や急性喉頭蓋炎は著しく減少してきた。一方で莢膜型 b 型以外の莢膜型、もしくは莢膜を有さない無莢膜型侵襲性感染症が増加傾向である。現在福岡県の小児における侵襲性インフルエンザ菌感染症は小児人口 10 万人あたり年間 3-5 人で推移しており、その中でも約 98%以上が無莢膜型インフルエンザ菌 (nontypeable *Haemophilus influenzae*: NTHi) によるものである。

NTHi はバイオフィルムを産生し、3 歳未満の小児は鼻腔内に無症候性に保菌していることが多い。そのため中耳炎や肺炎等の呼吸器感染症の原因微生物となるが、莢膜を有さないため菌血症や細菌性髄膜炎を起こすことは稀である。バイオフィルムは菌が形成する菌体由来の DNA とシアル酸等のアミノ酸、および菌体を含む slime であり、quorum-sensing 機構によりバイオフィルム内の菌の形態や菌数は常に管理、維持されている。生体内で形成されたバイオフィルムは菌が内部に潜伏する事で生体の免疫、および抗菌薬を逃れ生存するシステムとなる。バイオフィルム内では物理的に薬剤移行性が低下する事と、増殖速度が低下し菌自体の薬剤感受性も低下する事から薬剤耐性菌の温床となっている。著しく顕在化してきている NTHi による侵襲性感染症の病態解明のため、侵襲性感染症由来の NTHi 株の特徴や病原因子の同定、解析を行い、侵襲性感染症に至る病態解明が急務である。

2. 研究の目的

これまでは NTHi の病原性に関して接着因子に基づいた研究が行われているが、接着因子の解析では病原性と関わるような結果は報告されていない。一方、本研究は細菌が生体内及び環境内で生存するためのシステムであるバイオフィルムに着目し、特に quorum-sensing 機構に基づいた侵襲性感染症に至る病原性のシステムを明らかにすることが目的である。

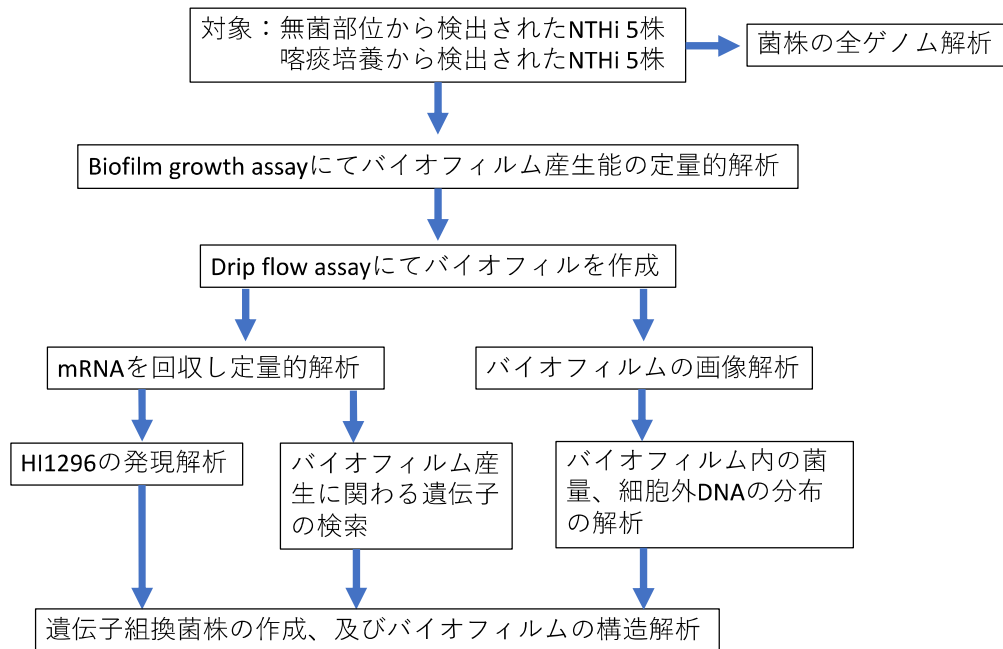
また新規抗菌薬の開発がほとんど行われていない現状を考慮すると、既存の抗菌薬でいかに耐性菌を誘導せずに感染症治療を行うかが人類にとって重要なことになると考えられる。前述の通り、NTHi が産生するバイオフィルムは難治化、薬剤耐性化、侵襲性感染症の全てに関わっている。バイオフィルム関連感染症に対する侵襲性感染症の予防、治療法の開発が急務であり、そのためにも quorum-sensing 機構に着目した NTHi 産生バイオフィルムの解析は、新たな切り口でその一旦を担うことができると考えられる。本研究により侵襲性感染症になるメカニズムが明らかになれば、治療及び予防薬に応用できる。

3. 研究の方法

呼吸器感染症および中耳炎の患者から分離された NTHi : 5 株と無菌部位から検出された侵襲性感染症由来 NTHi : 5 株 (新生児由来株 : 2 株含む) を用いてバイオフィルム作成を行った。バイオフィルムの総量を定量的に測定出来る 96well plate biofilm growth assay 法を用いて、呼吸器感染症由来の NTHi と侵襲性感染症由来の NTHi の biofilm 産生能を比較した。

Drip Flow biofilm growth assay 法でバイオフィルム構築中および成熟したバイオフィルム内から mRNA を回収し分泌型ヌクレアーゼをコードする遺伝子である HI1296 を Realtime PCR で定量的に比較した。また同時に MinION を用いてバイオフィルム内で侵襲性感染症分離株において高頻度で発現している遺伝子群の網羅的解析を行った。菌株形態の評価方法としてはスライドガラス上に形成されたバイオフィルムを Live/Dead 染色後に confocal microscopy と電子顕微鏡を用いて形態、体積、厚さ、生菌数の計測を行った。細胞外 DNA の解析として DRAQ5 で染色後、同様に形態、体積、厚さを計測した。

最終的に侵襲性感染症由来の HI1296 や網羅的解析で得られた quorum-sensing 機構に關与する候補遺伝子の遺伝子組換え株を作成し、表現系解析としてバイオフィルム産生能を評価した。また、これらの菌株を用い気道上皮細胞上でバイオフィルムを作成し、細胞浸潤の有無を confocal microscopy で解析した。これらの研究を令和 2 年から令和 4 年の 3 年間で行った。研究の立案およびバイオフィルムの実験は研究代表者の後藤憲志が行い、次世代シーケンサーでの解析は後藤憲志が行った。また、バイオフィルムの実験に関しては小児科助教の田中悠平、多々良一彰も一緒に行った。



4. 研究成果

令和2年度は、新生児の無菌部位から分離されたNTHiのバイオフィーム産生能をplate assay法を用いて解析した。新生児由来株は、小児由来侵襲性感染症由来のNTHiのbiofilm産生能と比較し著しくバイオフィーム産生能が低かった。この結果をふまえ、新生児侵襲性感染症由来NTHi：2株と新生児以外の侵襲性感染症由来NTHi：3株を用いてDrip Flow assay法での形態の評価を行った。菌株形態の評価方法としてcoverslip上に形成されたバイオフィームをLive/Dead染色後およびDRAQ5染色後にconfocal microscopyを用いて形態観測を行った。新生児侵襲性感染症由来NTHi産生バイオフィームは一部剥離を認めbiomassも少なかった。新生児以外の侵襲性感染症由来NTHi産生バイオフィームは培地の循環での影響をほとんど受けておらず、均一なバイオフィームが作成され、表面にextracellular DNAの皮膜を形成しているのが確認できた。生菌数、バイオフィームのaverage thickness、biomassも新生児由来株と比較し著しく高かった。新生児由来株はバイオフィーム産生とは異なるメカニズムで侵襲性感染症をきたしていると考えられた。一方、呼吸器感染症由来NTHi産生バイオフィームの解析ではDrip Flow assay法でもバイオフィームを産生することが確認できた。しかし侵襲性感染症由来株と異なり、バイオフィーム表面に細胞外DNAの膜様構造は確認できなかった。またバイオフィーム内の生菌数、average thickness、biomassも侵襲性感染症由来株と比較して少なく、バイオフィーム生成のメカニズムの違いが示唆された。

また、これらの結果からバイオフィーム制御システムとして細胞DNA、分泌型ヌクレアーゼがquorum-sensing機構に関わっている可能性が示唆され、侵襲性感染症発症に重要である可能性が高く、分泌型ヌクレアーゼをコードするHI1296遺伝子の発現解析を開始した。新生児以外の侵襲性感染症由来株においてはplanktonic phaseとバイオフィーム内のHI1296遺伝子の発現の比較においては100倍以上の差を認めており、バイオフィーム内の環境下で菌が有意に発現している遺伝子であることが確認できた。一方、新生児由来株においてはplanktonic phaseとbiofilm内においてHI1296の発現に関して、バイオフィーム内で発現を認めていたが、侵襲性感染症由来株ほどの差は認めなかった。

通常quorum-sensing機構は複数のauto-inducerで管理、維持されていることが多い。HI1296以外にもauto-inducerの候補を見つけるために、令和4年度はバイオフィーム内とplanktonic phaseにおける次世代シーケンサーを用いたRNA-Seq解析と、Realtime-PCRを用いた遺伝子の定量をさらに継続して行なった。HI1296以外にトリプトファン、インドール産成経路の遺伝子群がバイオフィーム内で高頻度に発現していることを確認したが、なぜトリプトファン、インドール産成経路がバイオフィーム産生能に影響しているのかは不明である。そのためトリプトファン、インドール産成経路の遺伝子群であるtrpA-Eの遺伝子欠損株をそれぞれ作成し、バイオフィームの表現系にどのように影響するのか現在検証を行なっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 KENJI GOTOH
2. 発表標題 ANALYSIS OF BIOFILM-PRODUCING ABILITY IN STRAINS DERIVED FROM INVASIVE NON-TYPEABLE HAEMOPHILUS INFLUENZAE INFECTIONS
3. 学会等名 Annual Meeting of the European Society For Paediatric Infectious Diseases 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022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	多々良 一彰 (Tatara Kazuaki) (30839006)	久留米大学・医学部・助教 (37104)	
研究分担者	田中 悠平 (Tanaka Yuhei) (70446102)	久留米大学・医学部・助教 (37104)	

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