

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08842

研究課題名（和文）宿主免疫機構と細菌叢の作用を連携させた、細菌感染に対する新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel therapies for bacterial infections by linking the host immune mechanism with the action of the bacterial flora.

研究代表者

坂本 啓 (Sakamoto, Kei)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10528300

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）：本研究では、細菌感染症に対する治療の選択肢を増やすべく、細菌感染症の抗菌薬非依存的な治療法の開発を行った。開発にあたり、マウスを使用した動物実験を行い、大腸菌やその近縁である *Citrobacter rodentium*、肺炎桿菌、および黄色ブドウ球菌を使用した。大腸菌や *Citrobacter rodentium* は主に経口感染を、肺炎桿菌と黄色ブドウ球菌は経静脈感染を行った。*Citrobacter rodentium* のモデルでは、免疫グロブリンの経口投与による治療、黄色ブドウ球菌に対してはインフラマソームを制御する治療法の開発を行った。また、大腸菌のST131株の生物学的特性について報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗菌薬に耐性をもつ細菌（薬剤耐性菌）による感染症が世界的に問題になっている。しかし細菌感染症に対する治療法は、抗菌薬に依存する他ないのが現状である。この状況を打開するため、抗菌薬非依存的な細菌感染に対する治療法を開発する必要性に迫られている。本研究はこの問題の解決を目指し、細菌や宿主の生物学的特性を利用した治療法の開発に取り組んだ。

研究成果の概要（英文）：In this study, we sought to develop an antimicrobial-independent treatment for bacterial infections in order to increase treatment options for bacterial infections. Animal studies were conducted in mice and used *Escherichia coli* and its relatives *Citrobacter rodentium*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Staphylococcus aureus*. The *Escherichia coli* and *Citrobacter rodentium* infection models were primarily treated by oral administration of immunoglobulin. On the other hand, for *Staphylococcus aureus* infections, we developed an inflammasome-regulated therapy. We also reported on the biological characteristics of the ST131 strain of *E. coli*.

研究分野：細菌学

キーワード：細菌感染 敗血症 食中毒

## 1. 研究開始当初の背景

細菌の抗生物質への耐性獲得の早さと薬剤耐性菌の拡散のスピードは驚異的である。薬剤耐性は医療施設内でみられるような弱毒の細菌のみならず、病原性大腸菌やサルモネラのような市中感染型の強毒の細菌でも報告されている。特に、抗生物質の濫用が著しい発展途上国では、薬剤耐性菌による消化管感染症が蔓延している。そのような細菌が今、国境を越えて広がりつつある。更に、新薬の開発は細菌の薬剤耐性の獲得の早さに追いついておらず、事態は非常に深刻である。現時点で既に新薬の開発が耐性菌の出現に追いつかない危機的状況となっている。世界保健機関 (WHO) は、今後、薬剤耐性菌による死者が大幅に増加し、癌による死者を上回ると予測している。この問題が大きくなっている原因の根本には、細菌感染症の治療法が事実上抗菌薬のみであることが挙げられる。すなわち、現在、ほとんど抗生物質に依存している細菌感染症の治療法を変革する必要に迫られている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、抗菌薬の過度な依存状態にある細菌感染症に新たな治療選択肢を加えるものとして、抗菌薬非依存的な新規の治療を開発することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験系

マウス (C57BL6 系統) を使用した感染実験を行い、それに対する治療効果を判定した。菌種は *Escherichia coli* (*E.coli*)、*Citrobacter rodentium* (*C.rodentium*)、*Klebsiella pneumoniae* (*K.pneumoniae*)、*Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) を使用した。

### (2) 感染方法

*E.coli* については、経口感染および経静脈による全身感染を行った。*C.rodentium* については主に経口感染を行ったが、免疫誘導等の目的のために一部経静脈による全身感染を行った。*K.pneumoniae* については、主に経静脈による全身感染を行った。*S.aureus* については、経静脈による全身感染を行った。

### (3) 治療効果判定

経口感染モデルについては、糞便中に排出された菌数を計測することで判定を行った。全身感染モデルについては、感染後の生存率や臓器中から検出される菌数、あるいは炎症性サイトカインを計測することで判定を行った。

## 4. 研究成果

### (1) *C.rodentium* 感染抗病原体抗体の経口投与について

*C.rodentium* を経口感染したマウスから血清を採取し、別の *C.rodentium* 感染マウスに感染後 day5、day7、day19 に経口投与した (図1)。また、コントロールとして非感染マウスの血清を採取し、コントロール群の感染マウスに投与した。経口投与直前の菌数には感染血清投与群とコントロール群の差は認められなかった。投与開始後2日 (day7) において、感染血清投与群で有意に排菌数が低下し、投与終了後3日経過した後も引き続き排菌数は感染血清投与群で低下していた (図2)。

次に、感染したマウスの血清から精製した IgG を経口投与した。すると、血清投与時と同様に、day7 の時点で排菌数の低下を確認できた (図3)。

## 図1 実験方法

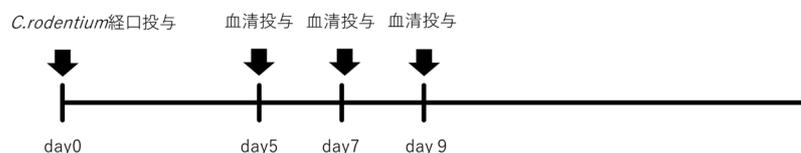


図 2 血清投与による菌数変化

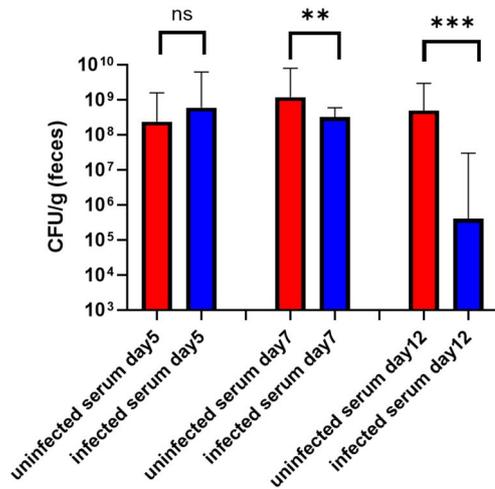
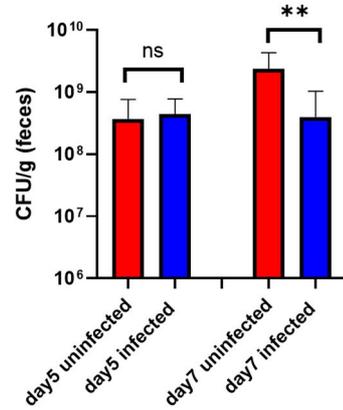


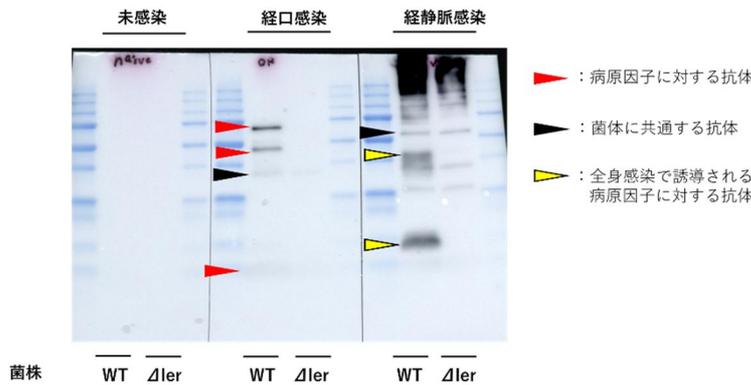
図 3 抗体投与による菌数変化



( 2 ) *C. rodentium* に対する抗病原体抗体の標的について

本研究の先行研究において我々は、*C. rodentium* の感染により誘導される抗体が病原因子を特異的に認識する傾向にあることを報告した。本研究においても同様に、感染後に誘導される抗体は病原因子を優先的に認識する傾向を示した。( 図 4 )。そこで標的分子を認識する中和抗体を作成するため、免疫学的手法や遺伝学的手法により標的分子を探索中である。

図 4 血清中の抗体が認識する菌体成分



( 3 ) *K. pneumoniae* に対する治療標的について

*K. pneumoniae* の臨床分離株をマウスに経静脈感染させ、重症度を判定した。死亡率や生存期間を基準に病原性を定義し、全ゲノム解析により高病原化に関連すると思われる遺伝子を抽出した。その結果、高病原株では鉄イオン獲得に関連する遺伝子を余分に保持している傾向が見られた。そこで、鉄イオン獲得機構を標的とした治療の可能性について検討を行った。しかし、鉄制限培養実験等を行ったところ、低病原性株と比べて鉄制限下での生育に有意差は認められず、該当遺伝子群の機能が病原性に作用している可能性は低いと考えられた。引き続き、治療標的となり得る因子について探索中である。

( 4 ) *S. aureus* 感染の治療標的について

*S. aureus* の敗血症の治療標的について検討を行った。*S. aureus* を経静脈的にマウスに感染させる敗血症モデルを採用した。先行研究から、*S. aureus* 感染時にはインフラマソームが過剰に活性化することが知られていたため、インフラマソームの活性化を制御することを目標に研究を行った。インフラマソームの活性化にはリン酸化シグナルも重要であることから、キナーゼ阻害薬によるスクリーニングを行い、複数の候補を選定した。引き続き標的候補について検討を行っている。

( 5 ) 大腸菌感染症について ( 引用文献 ( 1 ) )

長崎大学病院の泌尿器科で発症した菌血症の起炎菌となった大腸菌について、MLST による分類を行ったところ、全体の約 3 割が ST131 系統の株で、単独の系統では最多であった。更

に、ESBL 遺伝子陽性株や LVFX 耐性株に限定すると、過半数が ST131 系統であった(図 5)。更に、ST131 系統の大腸菌は、他の菌種から ESBL をコードするプラスミドを獲得しやすい傾向にあることが分かった(図 6)。

図 5 大腸菌の MLST と薬剤耐性状況(引用文献 1 より改変)

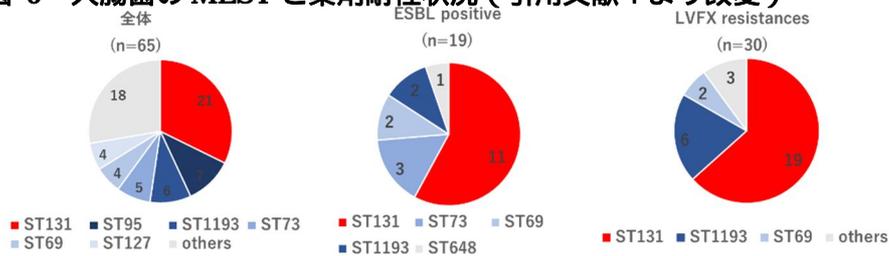


図 6 プラスミド供与菌種と接合伝達成功率(引用文献 1 より改変)

接合伝達の成功率

		Recipients											
		<i>E. coli</i> ST131					<i>E. coli</i> non-ST131						
		#282	#1925	#2148	#4537	#7787	#2239	#2630	#3764	#4901	#5465	#6579	#7541
Donors	<i>E. coli</i> #7478	0	0	16.7	0	0	0	0	33.3	0	9.1	0	0
	<i>K. pneumoniae</i> #508	0	0	50	33.3	50	0	0	0	0	0	0	18.2

(%) (%)

引用文献

(1) Kondo T, Sakamoto K, Morinaga Y, Miyata Y, Yanagihara K, Sakai H. Escherichia coli ST131 isolated from urological patients can acquire plasmid-mediated extended spectrum  $\beta$ -lactamase from other bacteria with high frequency. Int J Urol. 2022 Jun;29(6):587-594.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kosai Kosuke, Akamatsu Norihiko, Ota Kenji, Mitsumoto-Kaseida Fujiko, Sakamoto Kei, Hasegawa Hiroo, Izumikawa Koichi, Mukae Hiroshi, Yanagihara Katsunori	4. 巻 21
2. 論文標題 BioFire FilmArray Pneumonia Panel enhances detection of pathogens and antimicrobial resistance in lower respiratory tract specimens	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials	6. 最初と最後の頁 24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12941-022-00512-8	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 Ota Kenji, Kurahara Ryo, Tsukamoto Chie, Kawamoto Yasuhide, Akamatsu Norihiko, Sasaki Daisuke, Mitsumoto-Kaseida Fujiko, Sakamoto Kei, Kosai Kosuke, Hasegawa Hiroo, Yamamoto Kazuko, Izumikawa Koichi, Mukae Hiroshi, Yanagihara Katsunori	4. 巻 11
2. 論文標題 Performance of the GeneSoC Rapid PCR System in Detection of SARS-CoV-2 from Saliva Specimens	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e0325922
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/spectrum.03259-22	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 Ota Kenji, Murakami Satoshi, Ishihara Kaori, Sasaki Daisuke, Usui Tetsuya, Mitsumoto-Kaseida Fujiko, Sakamoto Kei, Mukae Hiroshi, Kohno Shigeru, Yanagihara Katsunori	4. 巻 13
2. 論文標題 Serological response to a third dose of SARS-CoV-2 vaccine according to previous infection history	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Vaccine: X	6. 最初と最後の頁 100282 ~ 100282
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jvacx.2023.100282	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 Kondo T, Sakamoto K, Morinaga Y, Miyata Y, Yanagihara K, Sakai H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Escherichia coli ST131 isolated from urological patients can acquire plasmid-mediated extended spectrum $\beta$ -lactamase from other bacteria with high frequency	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Urol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/iju.14845.	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 Kawamoto Y, Kaku N, Akamatsu N, Sakamoto K, Kosai K, Morinaga Y, Ohmagari N, Izumikawa K, Yamamoto Y, Mikamo H, Kaku M, Oishi K, Yanagihara K.	4. 巻 59
2. 論文標題 The surveillance of colistin resistance and mobilized colistin resistance genes in multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolated in Japan.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Antimicrob Agents.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijantimicag.2021.106480	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 Kaku N, Nishimura F, Shigeishi Y, Tachiki R, Sakai H, Sasaki D, Ota K, Sakamoto K, Kosai K, Hasegawa H, Izumikawa K, Ariyoshi K, Mukae H, Yasuda J, Morita K, Kohno S, Yanagihara K.	4. 巻 16
2. 論文標題 Performance of anti-SARS-CoV-2 antibody testing in asymptomatic or mild COVID-19 patients: A retrospective study in outbreak on a cruise ship.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0257452.	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 Kawamoto Y, Kosai K, Ota K, Uno N, Sakamoto K, Hasegawa H, Izumikawa K, Mukae H, Yanagihara K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Rapid detection and surveillance of cfiA-positive Bacteroides fragilis using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anaerobe.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anaerobe.2021	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 Ota K, Yanagihara K, Sasaki D, Kaku N, Uno N, Sakamoto K, Kosai K, Miyazaki T, Hasegawa H, Fujita A, Tashiro M, Tanaka T, Izumikawa K, Ariyoshi K, Mukae H, Yasuda J, Morita K, Kohno S.	4. 巻 16
2. 論文標題 Detection of SARS-CoV-2 using qRT-PCR in saliva obtained from asymptomatic or mild COVID-19 patients, comparative analysis with matched nasopharyngeal samples.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0252964.	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 Kaku N, Ota K, Sasaki D, Akamatsu N, Uno N, Sakamoto K, Kosai K, Hasegawa H, Izumikawa K, Mukae H, Yanagihara K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Had COVID-19 spread in the community before the first confirmed case in Nagasaki, Japan?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbes Infect.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.micinf.2021.104812.	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 Kaku N, Hashiguchi K, Akamatsu N, Wakigawa F, Matsuda J, Komaru K, Nakao T, Harada Y, Hara A, Uno N, Sakamoto K, Morinaga Y, Kitazaki T, Hasegawa H, Miyazaki T, Fukuda M, Izumikawa K, Mukae H, Yanagihara K.	4. 巻 40
2. 論文標題 Evaluation of a novel rapid TRC assay for the detection of influenza using nasopharyngeal swabs and gargle samples.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Eur J Clin Microbiol Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10096-021-04193-7.	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 Yasuhide Kawamoto, Yoshitomo Morinaga, Norihito Kaku, Naoki Uno, Kosuke Kosai, Kei Sakamoto, Hiroo Hasegawa, Katunori Yanagihara	4. 巻 9
2. 論文標題 A novel macrolide, solithromycin suppresses mucin overexpression induced by Pseudomonas aeruginosa LPS in airway epithelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Infect Chemother.	6. 最初と最後の頁 1008-1010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2020.06.014	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 Yamakawa T, Uno N, Sasaki D, Kaku N, Sakamoto K, Kosai K, Hasegawa H, Miyazaki Y, Yanagihara K.	4. 巻 19
2. 論文標題 A Methodology for Assessing Tumor Clonality of Adult T Cell Leukemia/Lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Ther Methods Clin Dev.	6. 最初と最後の頁 463-473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtm.2020.10.015	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 Kaku N, Hashiguchi K, Akamatsu N, Wakigawa F, Matsuda J, Komaru K, Nakao T, Harada Y, Hara A, Uno N, Sakamoto K, Morinaga Y, Kitazaki T, Hasegawa H, Miyazaki T, Fukuda M, Izumikawa K, Mukae H, Yanagihara K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Evaluation of a novel rapid TRC assay for the detection of influenza using nasopharyngeal swabs and gargle samples	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Eur J Clin Microbiol Infect Dis	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10096-021-04193-7	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 Kaku N, Ota K, Sasaki D, Akamatsu N, Uno N, Sakamoto K, Kosai K, Hasegawa H, Izumikawa K, Mukae H, Yanagihara K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Had COVID-19 spread in the community before the first confirmed case in Nagasaki, Japan?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbes Infect .	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.micinf.2021.104812	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6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂本啓
2. 発表標題 抗菌薬非依存的な新規治療戦略によるMRSA感染症に対する実験的治療
3. 学会等名 MRSAフォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂本啓
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌によるインフラマソーム 活性化の新規経路の発見と 治療標的としての可能性について
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第92回日本感染症学会西日本地方会学術集会・第65回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第70回日本化学療法学会西日本支部総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂本啓
2. 発表標題 嫌気性菌 ~体内の Majority 達~
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第92回日本感染症学会西日本地方会学術集会・第65回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第70回日本化学療法学会西日本支部総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂本 啓
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌の感染によるインフラマソーム活性化の新経路の探索
3. 学会等名 第91回日本感染症学会西日本地方会学術集会・第64回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第69回日本化学療法学会西日本支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂本 啓
2. 発表標題 腸内細菌叢による感染防御機構～基礎研究から臨床応用まで～
3. 学会等名 第90回日本感染症学会西日本地方会学術集会・第63回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第68回日本化学療法学会西日本支部総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kei Sakamoto, Yuko Tanishita, Hisateru Sekiya, Akito Ariyoshi, Daisuke Sasaki, Yoichiro Iwakura, Haruki Okamura, Katsunori Yanagihara, Gabriel Nunez, Hideki Hara
2. 発表標題 Seeking a new target for inflammasome inhibition to treat antimicrobial-resistant Staphylococcus aureus Infection
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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