

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2023
課題番号：20K16517
研究課題名（和文）薬剤耐性を起こす小型コロニー形成細菌のオミクス解析を用いた新たな治療戦略の確立

研究課題名（英文）Characterization of bacterial small-colony variants causing antimicrobial resistance using omics analysis and establishment of their microbiological assays

研究代表者
太田 悠介（Ota, Yusuke）
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：90868530
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、薬剤耐性に関わるsmall colony variant (SCV) の遺伝学的・臨床細菌学的特徴を明らかにし、SCVに対する適切な検出法や制御法を見出すことである。SCVとその親株を対象に全ゲノム解析を行い、SCV形成に関わる遺伝子変異を明らかにした。またRNAシーケンス解析により生物代謝や病原性に関わる遺伝子発現量変化を網羅的に示し、バイオフィーム等の病原性因子の表現型変化を実験的に明らかにした。更には上皮細胞やカイコを用いた感染実験を行い、SCV変化との関連を明らかにした。一方で従来の微生物検査にSCV発育に適したサプリメントを添加することで、SCV検査を最適化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤耐性対策は喫緊の課題で、様々なアクションプランが推進されているが、対策の一つとしてSCVsに着目した感染制御の研究はない。またSCVsのゲノム解析や表現型解析により多角的・網羅的に解析した研究はほとんどなく、本研究によりSCVsの解析データが蓄積され、適切な検出法や抗菌薬投与条件の設定も含めたSCVsの制御法を確立できれば、AMR対策の新たな戦略に繋がる。更にはSCVsの遺伝学的・臨床細菌学的な特徴を明らかにすることで、様々な菌種におけるSCVsの関与や、持続性・再発性感染症のようなSCVsの関与が疑われる感染症の病態理解が進み、新たな診断・治療法の開発につながる臨床的発展性が期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to characterize the genetics and phenotypic features of bacterial small colony variants (SCVs) involved in persistent infections and to develop an appropriate detection and control approach for SCVs. Whole-genome sequencing analysis was performed to identify genetic variants involved in SCV formation. RNA sequencing analysis was used to comprehensively demonstrate changes in gene expression levels related to metabolism and virulence. Phenotypic changes in virulence factors such as biofilms were experimentally revealed. Furthermore, infection experiments using epithelial cells and silkworms were conducted to clarify the relationship with SCV changes. On the other hand, SCV testing was optimized by adding supplements suitable for SCV growth to conventional microbiological tests.

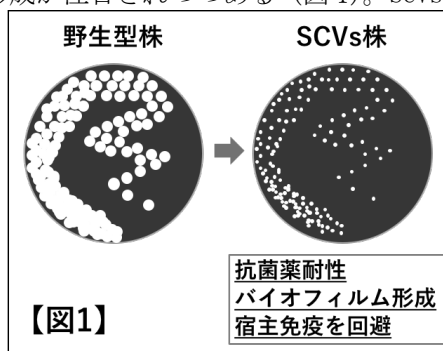
研究分野：細菌学

キーワード：小型コロニー形成細菌 薬剤耐性 全ゲノム解析 RNAシーケンス解析 臨床微生物検査 カイコ細菌感染モデル

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年、抗菌薬の不適切な使用により、感染症治療が困難となる薬剤耐性（Antimicrobial resistance：AMR）の病原微生物が急増している。2013年にはAMRに起因する死亡者数は世界で約70万人とされたが、何も対策を講じなければ2050年にはがんの死亡者数を超える1000万人の死亡者が想定され¹⁾、AMR対策は世界における喫緊の課題である。国際社会では、2015年に世界保健総会でAMRに対する国家行動計画の策定を求めたグローバル・アクション・プランが採択され、国内では2016年に厚生労働省がAMRに関する包括的な取り組み方針であるAMR対策アクションプランを発表し、AMR研究やAMRの微生物に対する予防・診断・治療手段を確保するための研究開発の促進を目標の一つに掲げた。AMRの発生機序の研究では、病原微生物の抗菌薬分解酵素の産生や外膜の変化等が以前から報告されてきた。近年、この発生機序の一つとして、病原微生物におけるSmall colony variants (SCVs)の形成が注目されつつある(図1)。SCVsとは何らかの代謝系の異常により小型で非典型的なコロニー形態を示す変異株の総称であり、多くの菌種でその存在が確認され、特に感染症例におけるSCVsの発生率は1~30%と決して稀な変異ではない²⁾。SCVsの形成は、抗菌薬への耐性化を誘導し、持続性または再発性の感染症を引き起こすとされ、更に強力なバイオフィーム形成能により生体内に長期間生残することが報告されている³⁾。したがって、SCVsの形成機構や機能を解明し、それを制御する方法を見出すことで、AMRに対する新たな治療戦略を確立できる可能性がある。しかし、現時点でSCVsの遺伝学的・臨床細菌学的特徴に関する報告は限られ、未だ十分な知見が得られていない。



2. 研究の目的

本研究の目的は、「SCVsの遺伝学的・臨床細菌学的特徴を明らかにし、適切な検出法や制御法を見出すことで、AMRに対する新たな治療戦略を確立する」ことである。

3. 研究の方法

1) ヘミン要求性 *Pseudomonas aeruginosa* SCVの性状解析及び新規検査法の構築

同検体より分離されたヘミン要求性を示す *P. aeruginosa* SCV及び *P. aeruginosa* 野生型株を対象とした。対象菌株について次世代シーケンサーによる全ゲノム解析を実施し、SCV形成の原因を比較検討した。またRNAシーケンスを実施し、遺伝子発現量の違いを網羅的に評価した。*P. aeruginosa* SCVと *P. aeruginosa* 野生型株をHBE1細胞に感染させ、培養上清中の炎症性サイトカインとlipopolysaccharide (LPS)をELISA法により測定し、結果を比較検討した。更に、*P. aeruginosa* SCVと *P. aeruginosa* 野生型株についてクリスタルバイオレット染色液を用いてバイオフィームの産生量を比較検討した。一方で、ヘミン要求性 *P. aeruginosa* SCVの適切な薬剤感受性検査法を構築するため、複数濃度のヘミン存在下での発育曲線を作成し、発育に必要なヘミンの最適濃度を決定した。Clinical and Laboratory Standards Instituteに準拠した微量液体希釈法による薬剤感受性の通常測定と、培養液にヘミンを添加した測定を行った。

2) 栄養要求性が不明な *Escherichia coli* SCVの性状解析

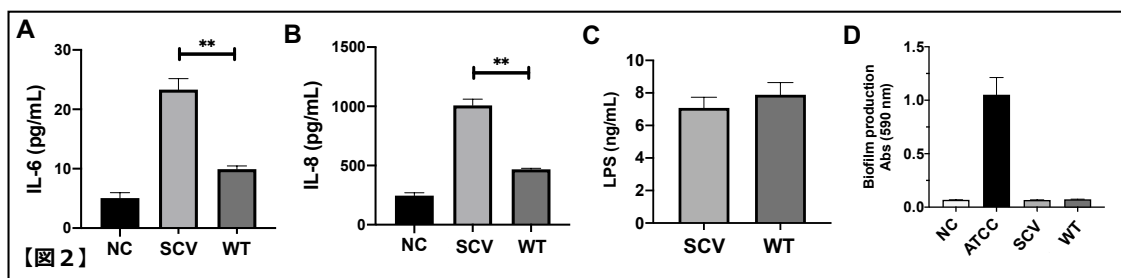
同検体より分離された栄養要求性が不明な *E. coli* SCV及び *E. coli* 野生型株を対象とした。対象菌株について次世代シーケンサーによる全ゲノム解析を実施し、SCV形成の原因を比較検討した。またRNAシーケンスを実施し、遺伝子発現量の違いを網羅的に評価した。RNAシーケンスデータの機能分類により、特に菌の生存戦略に関わる遺伝子を探索し、該当遺伝子について定量PCR法により妥当性を検証した。一方で *E. coli* SCVと *E. coli* 野生型株についてクリスタルバイオレット染色液を用いてバイオフィームの産生量を比較検討した。更には感染症モデルが構築されている生物であるカイコを使用し、SCV及びその野生型株を感染させ、その生存率を評価することでSCVの病原性を明らかにした。

4. 研究成果

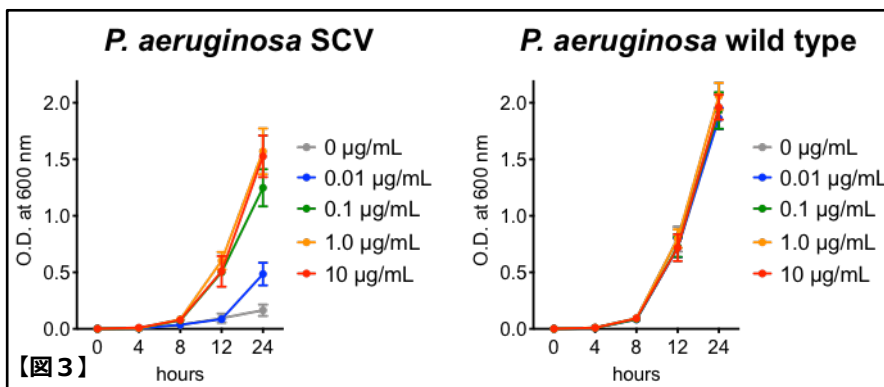
1) ヘミン要求性 *Pseudomonas aeruginosa* SCVの性状解析及び新規検査法の構築

P. aeruginosa SCVの全ゲノム解析では、SCV形成や薬剤耐性に関わる脂肪酸合成遺伝子、ミスマッチ修復遺伝子や薬剤耐性遺伝子において、既報にある変異を認めた一方、今まで報告のないアミノ酸合成遺伝子や膜輸送を制御する遺伝子等の変異を認め、SCV形成や薬剤耐性に関わる未知のメカニズムの存在を示唆する結果を得た。また *P. aeruginosa* SCVを対象に行ったRNAシーケンスでは、SCVについてヘム鉄の安定化に関わる遺伝子の発現量が大幅に増加していることが示され、上述の遺伝子変異との関連が示唆された。ELISA法による炎症性サイトカイン産生量の測定では、*P. aeruginosa* SCVについて野生型株と比べてIL-6及びIL-8の産生量が有意に

高く、SCV株の感染ではより強い炎症を引き起こすことが示唆された(図2AB)。LPS及びバイオフィルムの測定ではSCV株と野生型株の間で有意な差が認められなかったことから、SCV株による強い炎症反応の原因としてLPSやバイオフィルムの関与は否定的であった(図2CD)。



P. aeruginosa SCVの発育曲線では、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 及び10 $\mu\text{g/mL}$ のヘミン添加で野生型株と同等の発育性を示した(図3)。



P. aeruginosa SCVを対象に実施したCLSIに準拠した微量液体希釈法による薬剤感受性の通常測定では、発育不良により薬剤感受性結果が得られなかった一方で、1.0 $\mu\text{g/mL}$ のヘミン添加で行った微量液体希釈法による薬剤感受性検査では野生型株と同等の薬剤感受性結果が得られたことから、ヘミン要求性株の薬剤感受性測定ではヘミンを添加することで妥当な結果が得られる可能性が示された(表1)。

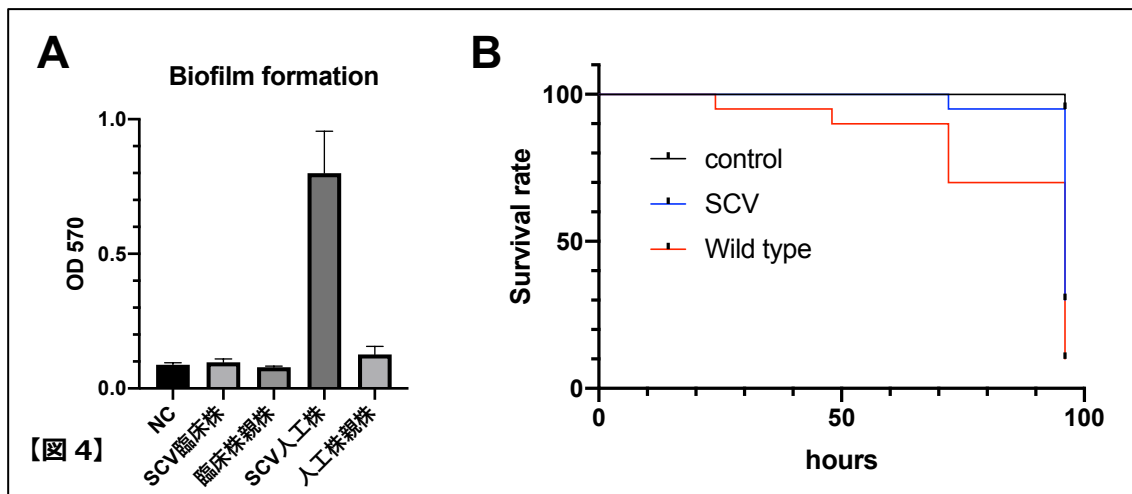
表1. 薬剤感受性検査

Antibiotics	Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/mL}$)				
	SCV	SCV with 1.0 $\mu\text{g/mL}$ hemin		Wild type	
Piperacillin	ND	64	I	16	S
Piperacillin/Tazobactam	ND	32	I	8	S
Cefoperazone/Sulbactam	ND	>32/16	R	16/8	S
Ceftazidime	ND	16	I	8	S
Cefozopran	ND	16	I	8	S
Cefepime	ND	>16	R	16	I
Aztreonam	ND	>16	R	16	I
Imipenem	ND	>8	R	>8	R
Meropenem	ND	8	R	8	R
Doripenem	ND	8	R	4	I
Ciprofloxacin	ND	1	S	1	S
Amikacin	ND	16	S	≤ 4	S
Fosfomycin	ND	16	I	>16	R
Colistin	ND	≤ 1	S	≤ 1	S

ND: not detected, S: susceptible, I: intermediate, R: resistant

2) 栄養要求性が不明な *Escherichia coli* SCV の性状解析

E. coli SCV の全ゲノム解析では、必須アミノ酸の生合成に関わる遺伝子やリボソームタンパクに関わる遺伝子についてフレームシフトなどの変異が認められた。RNA シーケンスデータから、SCV において外的要因などの環境ストレスに対する生育の制御に関わる遺伝子の発現量が大きく増加していた。SCV 人工モデルでは、臨床分離 SCV と同様にストレス応答に関わる遺伝子発現量に関して同様の傾向が認められた。一方でバイオフィーム形成量を制御する遺伝子発現量が、SCV において顕著に低下していた。バイオフィーム形性能確認試験により、SCV 人工株において親株と比較しバイオフィーム形成能の増強を確認した (図 3A)。またカイコを用いた感染実験では、野生型株の方が SCV 株と比べて短期間でより多くのカイコを死亡させた (図 3B)。これらの結果から、SCV 形成と環境ストレス制御遺伝子との関連が明らかとなり、またその変化はカイコの生存において感染初期の病原性を減弱させる可能性が示唆された。



<引用文献>

- ① de Kraker, et al. Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? PLoS Med. 2016. 13(11): e1002184.
- ② Proctor, et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. Nat Rev Microbiol. 2006. 4(4):295-305.
- ③ Donlan, et al. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev. 2002. 15(2):167-93.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	前川 真人 (Maekawa Masato)	浜松医科大学 (13802)	

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