

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790069

研究課題名(和文) ヒト常在性の細菌が糖尿病状態の宿主に感染するための病原性分子ネットワークの解明

研究課題名(英文) Molecular network of virulence factors in resident bacteria for infection against diabetic host

研究代表者

松本 靖彦 (Matsumoto, Yasuhiko)

東京大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：60508141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病患者はヒト常在性の細菌による感染症に罹患しやすい。これまで、ヒト常在性細菌が糖尿病患者に対して重篤な感染症を引き起こすメカニズムは不明であった。本研究で我々は、独自に開発した高血糖カイク感染モデルを用いて、高血糖状態のカイクを殺傷するために必要な黄色ブドウ球菌の新しい病原性遺伝子を三つ同定した。本研究から、細菌が糖尿病状態の宿主に対して病原性を示すための特定のシステムを有していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Diabetic patients are sensitive to infection caused by resident bacteria. However, molecular mechanisms of the resident bacteria for causing severe infectious diseases against diabetic patients are still unknown. In this study, we identified three genes, which were required for virulence of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) against hyperglycemic silkworms. Our findings suggest that bacteria possess specific system for infection against diabetic patients.

研究分野：細菌学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：細菌学 感染症 糖尿病 病原性遺伝子 カイク ヘム取り込み N-アセチルグルコサミン 黄色ブドウ球菌

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は慢性的な高血糖を主な特徴とする代謝障害疾患である。様々な治療薬が開発されているが、糖尿病患者の数は世界中で増加傾向にある。糖尿病患者は、特定の病原性細菌による感染症に対して感受性になることが報告されている。例えば、糖尿病患者における *Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌) による敗血症や足部潰瘍によるリスクは健常人に比べて高い。また糖尿病患者の足部潰瘍からは *Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌)、*Listeria monocytogenes* (リステリア)、*Salmonella typhimurium* (サルモネラ) などの特定の病原体が検出される。糖尿病患者の足部感染症による潰瘍のリスクファクターとして、糖尿病により起こる神経障害 (neuropathy)、血管障害 (vasculopathy)、免疫機能障害 (immunopathy) が挙げられる。特に、神経障害 (neuropathy) の発症が足部の感染症に大きく寄与している (Afsoon D. Roberts, et al, Seminars in Vascular Surgery, 2012)。実際に、特定の病原性細菌が神経障害を発症した糖尿病患者の足部に潰瘍を起こす。さらに、糖尿病マウスは黄色ブドウ球菌、緑膿菌、リステリアによる感染に対して健常なマウスより感受性であることが報告されている。これらの知見は、いくつかの細菌が糖尿病状態の宿主に感染しやすいことを示唆している。しかし、特定の病原性細菌が糖尿病宿主に起こる環境の変化に対応して、通常の宿主感染時とは異なる病原性発現システムを作動させていると推察されるが、その分子レベルの理解はなされていない。特定の細菌が糖尿病宿主内で生存するための環境応答機構を明らかにすることは、糖尿病患者に有効な細菌感染に対する治療法や予防法の開発に貢献すると期待される。

糖尿病宿主に対する病原性のための細菌の環境適応に関わる遺伝子の同定は、その分子機構を解明するために必要である。しかし、細菌の遺伝子のスクリーニングのためにマウスやラットなどの哺乳動物の糖尿病動物を大量に使用することは、高いコスト、飼育用のスペース、及び動物愛護の問題から困難であった。最近、我々は高グルコース餌の給餌によりカイコが高血糖となることを見出し、報告した (Matsumoto et al., 2011)。高血糖となったカイコにヒトインスリンを投与すると血糖値は低下する (Matsumoto et al., 2011)。また、インスリンに対する応答の分子機構は哺乳動物と昆虫の間で共通していることが知られている。従って、高血糖カイコはヒトの糖尿病のモデルとなると考えられる。一方、我々はこれまでにカイコを用いて、黄色ブドウ球菌、緑膿菌などの細菌ならびに *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* などの病原性真菌の感染モデル

を確立した。多数の動物個体を扱うことが容易であるカイコを用いることにより、病原体の病原性発現に必要な遺伝子を同定することが可能である。実際に我々は、カイコ感染モデルを用いて、黄色ブドウ球菌の新規病原性遺伝子 *cvfA*, *cvfB*, *cvfC*, *sarZ* を同定し、その遺伝子産物の機能に関する解析を行っている。そこで、我々はカイコの高血糖モデル、及び感染モデルが糖尿病宿主環境に適応するために必要な細菌の遺伝子の同定を通じた分子機構の解明に有用なのではないかと考えた。

2. 研究の目的

高血糖カイコ感染モデルを用いた糖尿病宿主感染に必要な病原性細菌の病原性遺伝子の同定である。

3. 研究の方法

(1) 高血糖カイコの飼育条件

抗生物質を含まない稚蚕人工飼料 (Silkmate) にグルコースを添加して、均一になるまで混合することにより高グルコース餌を作成した。5 令 1 日目のカイコ幼虫に高グルコース餌を 1.1g/匹の割合で 18-24 時間摂食させることにより高血糖カイコを飼育した。10% のグルコースを含む餌を高グルコース餌として使用した。カイコは 27 °C の条件にした安全キャビネット内で飼育した。

(2) カイコを用いた感染実験

基本的にはこれまでの方法に従ってカイコを飼育した (Hamamoto et al., 2004; Kaito et al., 2002)。適当な菌数になるように生理食塩水 (0.9% NaCl) を用いて菌液を希釈した。ピンセットで触っても動かないカイコを死亡したと判定した。感染から 24 時間後の生存率から、各種菌株のカイコに対する LD₅₀ を決定した。LD₅₀ を決定する際には、各投与菌量につき 5 匹ずつのカイコを使用した。LD₅₀ を決定する際には、生理食塩水を注射したカイコが全数生存しているのを確認した。

(3) 黄色ブドウ球菌に感染した高血糖カイコの病理組織解析

黄色ブドウ球菌野生株 (7 × 10⁶ CFU) を通常カイコモしくは高血糖カイコに注射した。体重が 1.0-1.2g のメスのカイコ個体を実験に使用した。感染から 24 時間後にカイコを 10 分間、氷の上に放置し麻酔した。氷で冷却した 4%ホルムアルデヒド 40ml にカイコを 3 匹回収した。作成したカイコの組織切片をグラム染色した。

(4) 糖尿病マウスを用いた感染実験

7-8 週齢の C57/BL6J のオスのマウスにストレプトゾトシン (Nacalai tesk) (7.5mg/ml, 500ul/匹) をマウス腹腔内に単回投与し、その後 1 週間飼育した。血糖値が 250mg/dL 以上になったマウスを糖尿病状態にあると判

断した。PBS で希釈した菌の一晩培養液を糖尿病マウスの尾静脈に注射した。注射後のマウスの生存数を経時的に測定した。また、ストレプトゾトシン処理を行っていないマウスを通常マウスとした。黄色ブドウ球菌のマウスに対する LD₅₀ を感染から 4 日後の点で決定した。

4. 研究成果

(1) 高血糖カイク感染モデルの確立

ヒトの糖尿病患者が高感受性となる病原性細菌として、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、サルモネラ、及びリステリアが知られている (Joshi et al., 1999; Kanafani et al., 2009)。また、糖尿病モデルマウスは、これらの細菌による感染に対して高感受性であることが報告されている (Ikejima et al., 2005; Park et al., 2009; Pezzulo et al.; Rich and Lee, 2005)。本研究で我々は最初に、高血糖にしたカイクがこれらの病原性細菌に高感受性であるかを検討した。黄色ブドウ球菌 Newman 株、緑膿菌 PA01 株、サルモネラ ATCC14028s 株、及びリステリア 104035 株をそれぞれカイクに注射し、カイクの生存数の経時変化を調べた。これらの細菌は、通常カイクよりも早く高血糖カイクを殺傷した (図 1)。また、菌液注射から 24 時間後においてカイクの半数を殺傷するために必要な菌数 (LD₅₀: 50% Lethal dose) を高血糖カイクと通常カイクで比較したところ、黄色ブドウ球菌 Newman 株、緑膿菌 PA01 株、サルモネラ ATCC14028s 株、及びリステリア 104035 株いずれについても、高血糖カイクに対する LD₅₀ は通常カイクに対する LD₅₀ よりも小さい値であった。これらの結果は、高血糖カイクが通常カイクよりもこれらの菌に高感受性であることを示唆している。一方、ヒトの日和見病原性細菌ではあるが、特に糖尿病患者に対して感染しやすいとは考えられていないマルトフィリア菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*) SM1 株では、高血糖カイクに対する LD₅₀ と通常カイクに対する LD₅₀ との間に

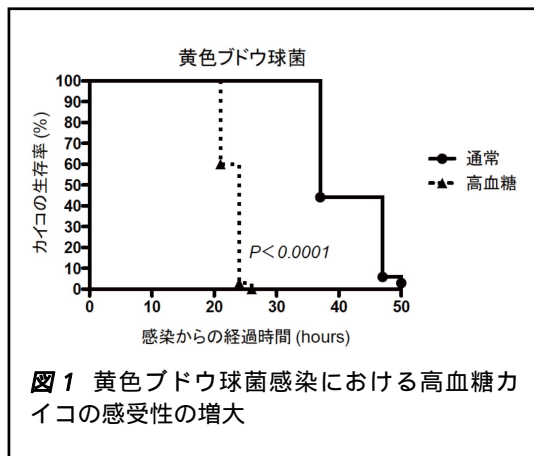


図 1 黄色ブドウ球菌感染における高血糖カイクの感受性の増大

差は認められなかった。

(2) 黄色ブドウ球菌の菌株間の通常カイク、及び高血糖カイクに対する病原性の違い

次に我々は、黄色ブドウ球菌の種々の臨床分離株、及び実験株について、高血糖カイク、及び通常カイクに対する病原性を比較した。高血糖カイク黄色ブドウ球菌臨床分離株 6 株 (MSSA3 株、MRSA3 株) の高血糖カイクに対する LD₅₀ はいずれも通常カイクに対する LD₅₀ よりも小さい値を示した (図 2)。すなわち、高血糖カイクは、これらの菌株に対して、高感受性であった。これに対して、黄色ブドウ球菌 N315 株の高血糖カイクに対する LD₅₀ と通常カイクに対する LD₅₀ との間には差は認められなかった。したがって、同じ黄色ブドウ球菌であっても、遺伝的背景の違いにより高血糖状態の宿主に対する病原性が異なっていると考えられる。これは、黄色ブドウ球菌には、高血糖宿主環境への適応の仕組みがあることを示唆している。

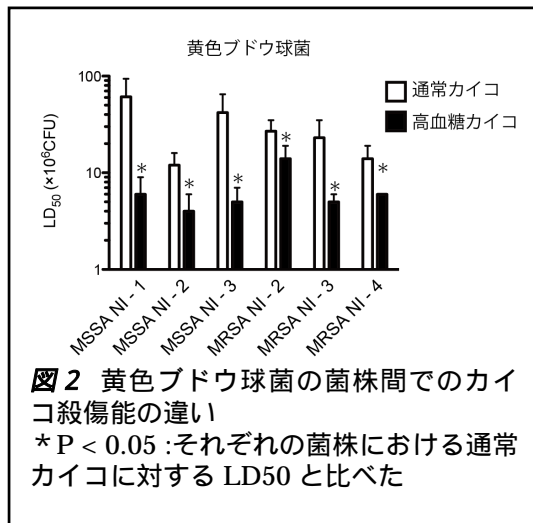


図 2 黄色ブドウ球菌の菌株間でのカイク殺傷能の違い
* P < 0.05 : それぞれの菌株における通常カイクに対する LD50 と比べた

(3) 高血糖カイクに対する病原性に必要な黄色ブドウ球菌の遺伝子の探索

同一菌種であっても高血糖カイクに対する病原性が異なるという黄色ブドウ球菌の実験株、及び臨床分離株の結果から我々は、黄色ブドウ球菌が遺伝子発現の調節により高血糖状態の宿主環境に適応しているのではないかと考えた。それゆえ、我々は、黄色ブドウ球菌の実験株である Newman 株の遺伝子破壊株ライブラリーと高血糖カイク感染モデルを用いて、高血糖カイクに対する殺傷力に寄与する黄色ブドウ球菌の遺伝子の同定を試みた。その結果、我々は、いくつかの遺伝子破壊株が高血糖カイクに対する殺傷に要する時間は長くなるが、通常カイクに対するそれは変化しないことを見出した ()。細胞表面タンパク質をコードする

iron-regulated surface determinant A (*isdA*) 遺伝子 (Clarke et al., 2004)、GGDEF domain containing protein from *Staphylococci* (*gdpS*) 遺伝子 (Shang et al., 2009)、及び機能未知の遺伝子である SA0525 遺伝子は、高血糖カイコに対する病原性に必要な遺伝子として同定された。我々は、SA0525 遺伝子を hyperglycemic-state-dependent virulence factor against silkworm A (*hdvA*) と名付けた。*isdA* 破壊株、*gdpS* 破壊株、*hdvA* 破壊株がカイコの半数を殺傷するために必要な菌数 (LD₅₀) は野生株に比べて多かった。これに対してこれらの遺伝子破壊株の通常カイコに対する LD₅₀ は野生株と差がなかった。したがって、これらの遺伝子は、通常カイコを殺傷するには必要ないが、高血糖カイコを殺傷するのに必要であると考えられた。

次に我々は黄色ブドウ球菌の *isdA* 遺伝子、*gdpS* 遺伝子ならびに *hdvA* 遺伝子がこの菌の糖尿病マウスに対する病原性に必要であるかを検討した。我々はストレプトゾトシン処理により作出した 型糖尿病マウスに、野生株、*isdA* 破壊株、*gdpS* 破壊株及び *hdvA* 破壊株を静脈注射により感染させ、生存率の経時

的な変化を調べた。黄色ブドウ球菌野生株に感染した糖尿病マウスは、通常のマウスよりも早く死亡した。さらに、*isdA* 破壊株、*gdpS* 破壊株および *hdvA* 破壊株の注射による糖尿病マウスの死亡は、野生株に比べて遅延していた。また *isdA* 破壊株の糖尿病マウスに対する LD₅₀ は野生株より上昇していた。これらの結果は高血糖カイコに対する病原性に必要であるとして探索された *isdA* 遺伝子、*gdpS* 遺伝子、及び *hdvA* 遺伝子が糖尿病マウスに対する病原性にも必要であることを示唆している。

(4)まとめ

本研究から、糖尿病宿主に感染するために必要な細菌の遺伝子が存在することが明らかとなった。これは、糖尿病宿主に感染しやすい病原性細菌が糖尿病宿主環境に適応し、病原性を発揮する特定のシステムを有していることを示唆している。同定された遺伝子の機能を解明することにより、細菌が糖尿病患者に感染するために利用している詳細な分子機構を明らかにできると期待できる。本研究を通じて、糖尿病患者の合併症の一つである感染症の発症、重篤化のシステムが理解でき、予防法や治療法の開発に貢献できると私は期待している。

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 4 件)

(1)

Evaluation of drug-induced tissue injury by measuring alanine aminotransferase (ALT) activity in silkworm hemolymph. Inagaki Y, Matsumoto Y, Kataoka K, Matsuhashi N, Sekimizu K.

BMC Pharmacol Toxicol. 13, 13, 2012

査読有り

DOI: 10.1186/2050-6511-13-13.

(2)

Evaluation of *Staphylococcus aureus* virulence factors using a silkworm model. Miyazaki S, Matsumoto Y, Sekimizu K, Kaito C.

FEMS Microbiol Lett , 326:116-24. 2012

査読有り

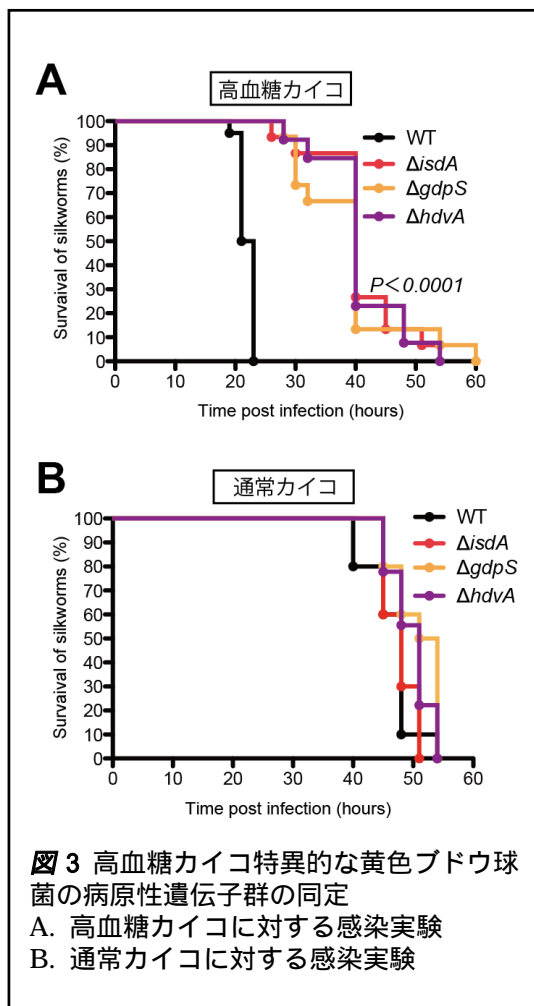
DOI: 10.1111/j.1574-6968.2011.02439.x.

(3)

Quantitative evaluation of cryptococcal pathogenesis and antifungal drugs using a silkworm infection model with *Cryptococcus neoformans*.

Matsumoto Y, Miyazaki S, Fukunaga DH, Shimizu K, Kawamoto S, Sekimizu K.

J Appl Microbiol., 112, 138-46. 2012



査読有り

DOI:10.1111/j.1365-2672.2011.05186.x.

(4)

腸管常在性真菌が腸管に定着する仕組みを探る

上野圭吾、松本靖彦、関水久、金城雄樹、知花博治

化学と生物, 50, 320-321, 2012

査読無し

URL:http://www.jsbba.or.jp/pub/journal_kasei/kasei_contents/vol50_5_2012.html

〔学会発表〕(計 25 件)

(1)

高血糖カイク感染モデルを用いた糖尿病宿主に対する感染に必要な細菌の遺伝子の同定

松本靖彦、宮崎真也、林陽平、坂上徹、石井雅樹、山岸徹、大西忠博、垣内力、関水久
第 6 回細菌学若手コロッセウム、八王子セミナーハウス、東京、2012年8月8-10日

(2)

Isd システムを介したヘムの獲得が糖尿病宿主に対する黄色ブドウ球菌の病原性に必要である

林陽平、松本靖彦、宮崎真也、坂上徹、石井雅樹、垣内力、関水久

第 6 回細菌学若手コロッセウム、八王子セミナーハウス、東京、2012年8月8-10日

(3)

Isd-mediated heme utilization in *Staphylococcus aureus* is required for infection in diabetic hosts

Yasuhiko Matsumoto, Shinya Miyazaki, Yohei Hayashi, Toru Sakagami, Masaki Ishii, Chikara Kaito, and Kazuhisa Sekimizu

第 11 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、淡路夢舞台国際会議場、兵庫、2012 年 9 月 11-14 日

(4)

黄色ブドウ球菌のヘム取り込み機構は、糖尿病状態の宿主に感染するために必要である

松本靖彦、宮崎真也、林陽平、石井雅樹、坂上徹、垣内力、関水久

第 57 回日本ブドウ球菌研究会、広島大学東京オフィス キャンパス・イノベーションセンター、東京、2012 年 9 月 21-22 日

(5)

メバロン酸はペプチドグリカン合成のための基質の前駆体として黄色ブドウ球菌の増殖に必要である

安川 淳一郎、松本 靖彦、林 陽平、宮崎 真也、関水 和久

第 95 回日本細菌学会関東支部会、ホテル日航東京、東京、2012 年 10 月 10-12 日

(6)

薬剤性組織障害の動物モデルとしてのカイ

コの有用性

稲垣善則、松本靖彦、浜本洋、片岡啓子、松橋直也、杉田拓也、植木拓朗、奥村秀信、関水久

第 25 回日本動物実験代替法学会、慶応義塾大学、東京、2012 年 12 月 7-9 日

(7)

Silkworm (カイコ) を用いた急性経口毒性試験代替法の開発

杉田拓也、植木拓朗、浜本洋、松本靖彦、関水久、奥村秀信、

第 25 回日本動物実験代替法学会、慶応義塾大学、東京、2012 年 12 月 7-9 日

(8)

Silkworm (カイコ) を用いた急性経口毒性試験代替法の投与方法の検討

植木拓朗、杉田拓也、浜本洋、松本靖彦、関水久、奥村秀信、

第 25 回日本動物実験代替法学会、慶応義塾大学、東京、2012 年 12 月 7-9 日

(9)

黄色ブドウ球菌の HMG-CoA レダクターゼの活性は基質によるアロステリック制御を受ける

安川淳一郎、松本靖彦、林陽平、宮崎真也、関水久

第 85 回日本生化学会大会、12 月 14 日～16 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡、福岡

(10)

カイコを用いた真菌感染症研究

Fungal infectious disease research using silkworm, *Bombyx mori*

松本靖彦、上野圭吾、清水公德、金城雄樹、知花博治、川本進、関水久

第 86 回日本細菌学会総会、幕張メッセ国際会議場、千葉、2013 年 3 月 18-20 日

(11)

Insulin signaling pathway contributes to increase of polyamines in response to hyperglycemia in silkworm, *Bombyx mori*.

Yasuhiko Matsumoto, Kyohei Higashi, Kazuei Igarashi, and Kazuhisa Sekimizu

Gordon Research Conferences –Polyamines –, 6 月 16-21 日, Waterville Valley Resort, Waterville Valley, NH, America

(12)

The role of glucose response system in infection of *Staphylococcus aureus*

石井雅樹、松本靖彦、林陽平、宮崎真也、坂上徹、垣内力、関水久

第 13 回東京大学生命科学シンポジウム、6 月 8 日、伊藤国際学術研究センター、東京

(13)

外膜構造の変化により非病原性大腸菌 K-12 株が高病原性化する

吉海周、若松愛、宮下惇嗣、松本靖彦、磯貝

隆夫、関水 和久、垣内 力
第 13 回東京大学生命科学シンポジウム、6 月 8 日、伊藤国際学術研究センター、東京 (14)
黄色ブドウ球菌のグルコース応答システムの感染における役割
石井雅樹、松本靖彦、林陽平、宮崎真也、坂上徹、垣内力、関水 和久
第 7 回細菌学若手コロッセウム、8 月 7-9 日、広島エアポートホテル、広島 (15)
LPS トランスポーターの変異による大腸菌の高病原性化
吉海 周、若松 愛、宮下 惇嗣、松本 靖彦、磯貝 隆夫、関水 和久、垣内 力
第 86 回日本生化学会大会、9 月 11 日～13 日、パシフィコ横浜、神奈川 (16)
黄色ブドウ球菌のグルコース応答システムを介した病原性発揮機構
石井 雅樹、松本靖彦、林陽平、宮崎真也、坂上徹、垣内力、関水 和久
第 12 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2013、9 月 14 日～15 日、東京大学本郷キャンパス、東京 (17)
黄色ブドウ球菌のグルコース応答を介した病原性調節機構
石井雅樹、松本靖彦、林陽平、宮崎真也、坂上徹、垣内力、関水 和久
第 58 回日本ブドウ球菌研究会、9 月 27-28 日、東京薬科大学、東京 (18)
黄色ブドウ球菌のN-アセチルグルコサミン代謝を介したグルコース応答性の病原性発揮機構
石井雅樹、松本靖彦、林陽平、宮崎真也、坂上徹、垣内力、関水 和久
第 96 回日本細菌学会関東支部総会、10 月 31 日-11 月 1 日、東京ドームホテル、東京 (19)
Niemann-Pick disease type C2 タンパク質は脂肪蓄積を促進する
安達健朗、石井健一、松本靖彦、林陽平、浜本洋、関水 和久
第 35 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、11 月 21 日～22 日、東京大学本郷キャンパス、東京 (20)
Silkworm を用いた急性経口毒性試験代替法の開発 第 2 報
杉田拓也、山本裕、植木拓朗、西田智、浜本洋、松本靖彦、関水 和久、奥村秀信
日本動物実験代替法学会第 26 回大会、12 月 19 日～21 日、京都テルサ、京都 (21)

薬剤性組織傷害評価モデルとしてのGFPトランスジェニックカイコの応用 .
稲垣 善則、松本 靖彦、松谷 安恵、瀬筒 秀樹、関水 和久
日本動物実験代替法学会第 26 回大会、12 月 19 日～21 日、京都テルサ、京都 (22)
糖毒性に対するポリアミン防御機構
Polyamine defense system against sugar-toxicity
松本靖彦、東恭平、五十嵐一衛、関水 和久
日本ポリアミン学会第 5 回年会、1 月 23～24 日、千葉科学大学防災シミュレーションセンター、千葉 (23)
無脊椎動物を用いた肺炎桿菌感染モデルによる臨床分離株の病原性評価
林陽平、松本靖彦、石井雅樹、龍野桂太、岡崎充宏、森屋恭爾、関水 和久
2014 年インターラボセミナー、1 月 25 日、東京大学本郷キャンパス、東京 (24)
The Mechanism of Glucose-dependent Virulence in *Staphylococcus aureus*
石井雅樹、松本靖彦、林陽平、宮崎真也、坂上徹、垣内力、関水 和久
第 3 回感染症若手フォーラム、2014 年 2 月 13-15 日、やすらぎ伊王島、長崎 (25)
糖尿病宿主に対する黄色ブドウ球菌の感染におけるグルコース応答機構の役割
石井雅樹、松本靖彦、宮崎真也、坂上徹、垣内力、関水 和久
第 87 回日本細菌学会総会、3 月 26-28 日、タワーホール船堀、東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ
<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~bisei/>

6 . 研究組織
(1) 研究代表者
松本靖彦 (MATSUMOTO YASUHIKO)

研究者番号 : 60508141

(2) 研究分担者
()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
()

研究者番号 :