

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450411

研究課題名(和文) ビブリオ・バルニフィカス生体内増殖因子の網羅的同定

研究課題名(英文) Comprehensive identification of virulence genes of *Vibrio vulnificus*

研究代表者

柏本 孝茂 (KASHIMOTO, Takashigie)

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号：50327459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ビブリオ・バルニフィカスは、人食いバクテリアと呼ばれ恐れられているが、通常、健康な人においては、免疫システムにより容易に排除される日和見感染症起因菌である。しかし、最近、健康な人に創傷感染し、感染局所で増殖して、極短時間内に筋肉の壊死などを引き起こす事例が増加している。健康な人において、全身循環で排除される本菌が感染局所でのみ増殖可能なメカニズムは不明であった。本研究の結果、ビブリオ・バルニフィカスは鞭毛の働きにより筋肉内へ侵入し、好中球からの貪食を逃れていること、侵入後に筋肉を溶解し、それらを栄養源として増殖することが明らかとなった。この筋肉内への侵入、筋肉の壊死と致死性は関連していた。

研究成果の概要(英文)：Vibrio vulnificus is generally eliminated by the immune system, are able to cause necrotizing fasciitis at local sites of infection in healthy individuals over a short duration of time via wound infection. However, the proliferative mechanisms of infecting bacteria and the rapid progression of symptoms during wound infection in healthy individuals have not been characterized. We identified two important findings. First, muscular tissue serves as a reservoir for the proliferation of *Vibrio vulnificus*, even in healthy hosts. The proliferation of infectious bacteria in muscular tissue is closely related to pathological progression, including fatal outcomes. Second, this is the first study to reveal the invasion of muscular tissue based on the proper control of flagellar motility as the most preemptive factor for immune evasion, which is initiated earlier than other key factors such as capsule and toxins.

研究分野：病原細菌学

キーワード：敗血症 創傷感染 免疫逃避 壊死 増殖機構 人食いバクテリア

### 1. 研究開始当初の背景

*Vibrio vulnificus* (以下 *V.v.*)は、ヒトに経口あるいは創傷感染し、組織の壊死や敗血症などの重篤な症状を引き起こす。*V.v.*の経口感染は、肝硬変、糖尿病、免疫不全症など免疫機能の低下に付随して発生し、感染者の95%が上記のように何らかの基礎疾患を持った患者である。一方で最近、創傷感染は感染者の80%以上が健康な人(基礎疾患の見当たらない人)であることが報告された。これらの事実は、*V.v.*が健康な人の免疫システムにより容易に排除され、全身循環中では増殖できない日和見感染症起因菌であるが、創傷感染においては健康な人であっても感染局所で増殖し、極短時間内に水腫や壊死性筋膜炎などを引き起こし得ることを示している。これまで、健康な人において、*V.v.*が健康な人の全身循環で排除されるが感染局所でのみ増殖可能なメカニズムは不明であった。本研究では、マウスの創傷感染モデルを作出し、*V.v.*が健康な人の感染局所で増殖するメカニズムの解明を試みた。

### 2. 研究の目的

健康な人における創傷感染部位での *V.v.*の増殖機構を解明すること。

### 3. 研究の方法

(1) 生体内増殖必須遺伝子の網羅的同定法である Signature tagged mutagenesis (STM) 法を確立する。

(2) マウス創傷感染モデルを作出する。

(3) 確立した STM 法を作出したマウス創傷感染モデルに適用し、創傷感染部位での増殖に必須の遺伝子を網羅的に同定し、それら遺伝子を Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)の分類に基づいて機能別に分類する。

(4) 機能分類から判明した、最も重要度の高い遺伝子(群)を選抜し、ロックアウト変異株を作出して、その機能の創傷感染における役割を明らかにする。

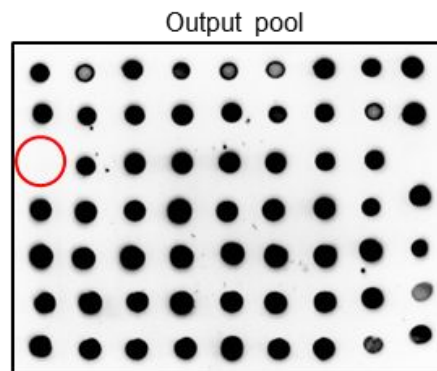
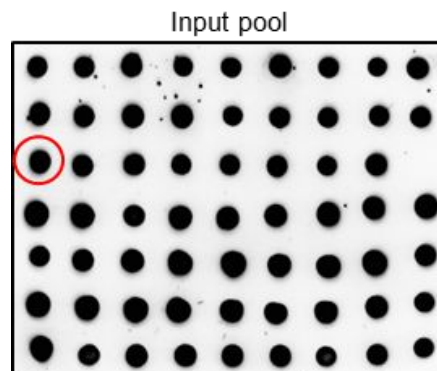
以上により、健康なマウスの創傷感染部位で *V.v.*が拡散および増殖に必須とする機能とその役割を明らかにする

### 4. 研究成果

#### (1) - STM 法の確立

63種類のそれぞれ異なったDNA配列をトランスポゾン内に配置したトランスポゾンコーディングプラスミドを63種類構築した。それらプラスミドを別々の大腸菌へ導入し、それぞれのトランスポゾンを接合伝達により、*V.v.*へ転移させた。一度の接合伝達で数千クローンのトランスポゾン変異株が取得可能となった。タグ1種類当たり、10株程度

の変異株を凍結保存し、63種類の異なったDNAタグを持った *V.v.*を培養し(Input pool)、マウスへ皮下接種した。マウスがエンドポイントに達したら、北里大学実験動物マニュアルに従い、直ちに安楽殺し、脾臓を採取してホモジナイズ後、臓器内で生存している *V.v.*を寒天培地に播種して回収した(Output pool)。Input poolとOutput poolに存在するトランスポゾン変異株をDNAタグ特異的ドットプロットにより比較した。Input poolには存在するが、Output poolで消失している変異株は、マウス体内で拡散・増殖できなかった変異株である(下図赤丸)。これら変異株を収集し、arbitrary primed polymerase chain reaction (AP-PCR)を利用して、ゲノム上に挿入されたトランスポゾンの挿入部位(遺伝子)を含む遺伝子断片を増幅してクローニング後、シーケンスした。得られたDNA配列を *V.v.*ゲノムデータベースと照合することでトランスポゾンの挿入により、破壊された遺伝子を同定した。これらの遺伝子は *V.v.*が生体内での拡散と増殖に必須とする遺伝子である。これら一連の過程を経て、莢膜に変異を持つ株など、実際に生体内増殖に必要とされていた既知の遺伝子に変異を持つ株が取得できた。これは、確立した STM 法が正しく



機能していることを示唆している。

#### (2) マウス創傷感染モデルの作出

マウスを用いた *V.v.*の創傷感染モデルを作出するため、マウスの大腿部皮下に *V.v.*を接種し、以下の項目によりモデルとしての妥当性を検討した。

プラスミドを導入した *V.v.*を大腿部皮下に

接種し、In vivo imaging system (IVIS)を用いて感染動態を観察した。

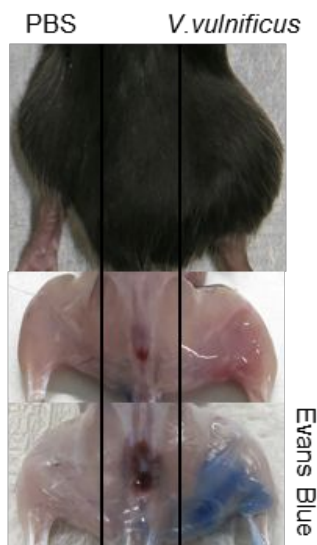
ヒトの創傷感染時に認められる、水腫の発生、好中球の遊走、皮膚、筋膜や筋肉などの軟部組織の壊死などが再現できるか、病理切片の観察と血清検査により検討した。

菌を接種した部位の筋肉を採取し、筋肉内へ侵入した菌数を測定した。

#### 結果

a) 皮下に接種された菌は、6 - 8 時間をピークとして接種部位で徐々に拡散しながら増殖した。

b) 水腫の発生は、エバンスブルー溶液を尾静脈から接種し、血管透過性の亢進部位において、血管外へエバンスブルー溶液が漏出することを利用し定量化した。菌接種局所のみ血管透過性の亢進が認められ、4 時間後に最大となった。これは外貌所見による接種部位の腫脹が観察される時間帯と一致していた(下図)。



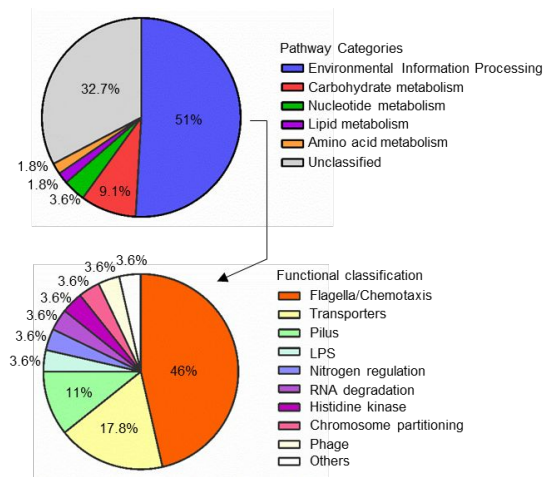
病理切片の観察の結果、好中球の皮下への遊走は4時間から認められ、時間経過とともに筋肉組織内へと移動していた。筋膜・筋肉組織の壊死は6時間から観察され、壊死部は、筋膜や筋肉表層から徐々に深部へと広がっていった。筋肉組織の崩壊に伴って血清中に漏出する Creatine kinase (CK)、Lactate dehydrogenase (LDH)と Aspartate transaminase (AST) を測定したところ、いずれも6時間から上昇が認められ、時間経過とともに上昇は続いた。これらの動態は組織切片における壊死像の広がりとも一致していた。

これらの結果から、ヒトの *V.v.*創傷感染時に認められるほとんどの臨床所見が観察され、マウス創傷感染モデルが有用であることが証明された。

#### (3) 生体内拡散・増殖必須遺伝子の網羅的同定とその機能分類

4000 を超えるトランスポゾン変異株のスク

リーニングの結果、70 の生体内拡散・増殖に必須の遺伝子を同定できた。それらを KEGG の遺伝子機能分類に基づいて分類したところ、外部情報処理群に属する遺伝子が全体の約 51% を占め(上円グラフの紫部分)、そのうち 46% が鞭毛の発現や回転制御に関する遺伝子であった(下円グラフのオレンジ部分)。これらのことは、*V.v.*の創傷感染において、鞭毛回転の適切な制御がマウス体内における *V.v.*の拡散や増殖に極めて重要であることを示唆していた(右上図)。

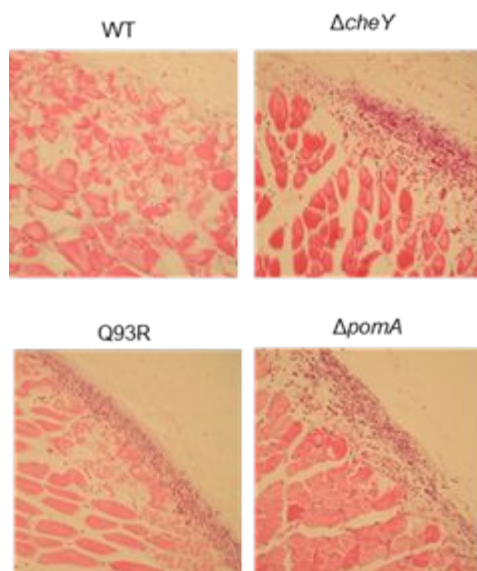


(4) そこで、鞭毛回転のモータータンパクである PomA を欠損させ、鞭毛は発現しているが回転しない株 (dPomA)、鞭毛回転方向の制御因子である CheY を欠損させ、鞭毛が反時計回りにしか回転しない株 (dCheY)、*cheY* に点変異を導入し、回転方向が時計回りに偏った株 (Q93R) を作製し、その感染動態を様々な面から野生株(WT)と比較した。

#### 結果

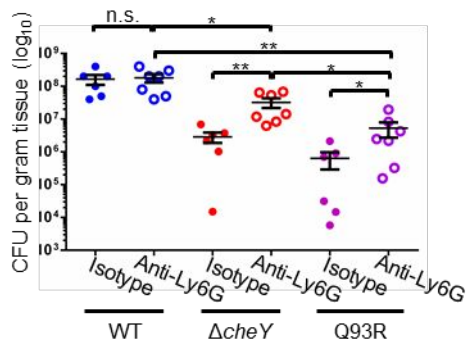
IVIS による観察の結果、皮下における拡散の程度は、WT > dCheY = Q93R > dPomA となり、皮下における拡散には鞭毛回転方向を適切にスイッチし、制御する能力が重要であることが分かった。筋肉内へ侵入した菌数は、WT > dCheY > Q93R = dPomA となり、皮下から筋肉内への侵入には、鞭毛の反時計回りへの回転がより重要であることが分かった。筋肉組織の崩壊の程度は、WT > dCheY > Q93R = dPomA となり、筋肉内へ侵入した菌数に依存していた。感染局所の病理組織切片の観察の結果、鞭毛回転を適切に制御できない3つの株(dCheY, Q93R, dPomA)を接種したマウスでは、菌接種部位の筋膜上に層となって好中球が浸潤、停滞している像が観察された。





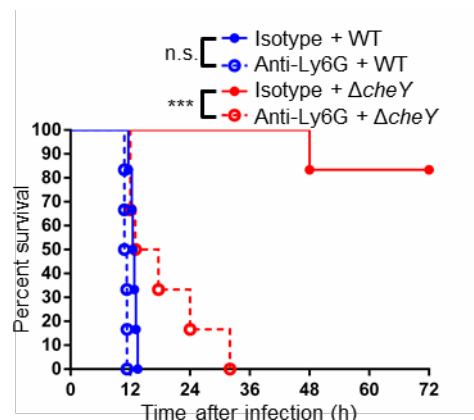
凍結切片により、*V.v.*の局在を調査した結果、好中球の停滞部位に一致して菌が存在していることが分かった。これらのことは、適切に鞭毛回転を制御できない変異株は、筋肉内への侵入効率が低下し、筋膜上で好中球による殺菌を受けることを示唆していた。

そこで、好中球の膜表面に特異的に発現するLy6Gに対するIgGをマウスに接種し、補体反応により好中球を破壊することで、好中球数の激減した好中球枯渇マウスを作製した。また、Ly6Gと同じサブクラスに属するが好中球を減少させないIsotypeコントロールIgGを接種したマウスも同様に作成し、両マウスにWT, dCheY, Q93R株をそれぞれ接種して、筋肉中の菌数とマウスに対する致死性を解析した。WTの筋肉中菌数は、好中球の枯渇の有無にかかわらず、変化はなかった。しかし、dCheYおよびQ93Rでは、好中球を枯渇させることで筋肉内菌数が上昇した(下図)。



それぞれの株を両マウスに接種し、カプランマイヤー生存曲線解析により、dCheYのマウスの致死性に与える影響を調査した結果、dCheYを接種したIsotypeコントロールマウスのほとんどが生存したのに対し、

Anti-Ly6Gを接種し、好中球を枯渇させたマウスにおいては、全てが死亡した(下図)。これらの結果は、上記、筋肉内菌数の結果に一致し、筋肉内菌数を反映しているものと考えられた。



### 結論

*V. vulnificus*は鞭毛運動により筋肉内へ侵入し、好中球からの貪食を逃れていること、筋肉内へ侵入後に筋肉組織を溶解し、それらを栄養源として増殖すること、筋肉内への侵入、筋肉の壊死と致死性は相関すること。以上3点を見出した。

### 要約

*V. vulnificus*にとって筋肉は、栄養源豊富なシェルターの役割を持つ重要な体内リザーバーであることが明らかとなった。

今後、主要鞭毛タンパクの受動免疫などによる鞭毛回転の阻止など、人為的鞭毛回転制御法が開発できれば、健康な人における本菌の創傷感染に対する増殖阻止ワクチンの開発に応用できる可能性がある。

### 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1件)

Kado T, Kashimoto T, Yamazaki K, and Ueno S. (2017) Importance of fumarate and nitrate reduction regulatory protein for intestinal proliferation of *Vibrio vulnificus*. FEMS Microbiol Lett. 364(1).

査読あり

DOI: 10.1093/femsle/fnw274.

[学会発表](計2件)

Federation of Korean Microbiological Societies 2016.

2016年11月4日. KINTEX, Seoul(韓国)

Kashimoto T.

Mechanisms of *V. vulnificus* wound infection. How does an opportunistic pathogen cause disease in healthy individuals?

ASM microbe 2016.

2016年6月19日. Boston convention and exhibition center, Boston, MA (米国)

Yamazaki K, Kashimoto T, Kado T, and Ueno S. Chemotactic motility of *V. vulnificus* is required for lethality in mice.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柏本 孝茂 (Takashige KASHIMOTO)

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号：50327459