

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460536

研究課題名(和文)黄色ブドウ球菌における表現型スイッチングと持続感染の成立について

研究課題名(英文)Phenotypic switching and establishment of persistent infection in *S. aureus*

研究代表者

崔 龍洙 (Cui, Longzhu)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：50306932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究を通じて、目的とした持続感染設立メカニズムについて、以下のような結論を得た。1) 感染初期にLCVsが産生した毒素が組織を障害して至適な感染の場を作り、2) 感染中期にLCVsがバイオフィルムを形成することで強固な防護壁に囲まれた感染巣を構築し、3) 感染後期に菌が免疫回避に有利なSCVsと化学療法に抵抗するLCVsの2つの性質を使い分けることで持続感染が成立するという感染モデルが考えられる。即ち、本菌の表現型スイッチングが、生体防御の回避能力を持つSCV型を維持したことで長期間に渡る持続感染が維持できる遺伝学的要因であると結論付けた。

研究成果の概要(英文)：The following conclusions were drawn through this study on the mechanism of the establishment of persistent infection by SCV vs LCV switching in *Staphylococcus aureus*: 1) Toxin produced by LCVs at the early stage of infection damages tissues and creates a site of optimal infection; 2) LCVs form a biofilm during mid-infection, so that the infected lesion surrounded by a strong protective barrier. In other words, infection model in which persistent infection is established by properly using the two characteristics of SCVs which the bacteria favor against immune evasion and LCVs which resists chemotherapy during the infection.

研究分野：感染症

キーワード：黄色ブドウ球菌 持続感染 表現型スイッチング

1. 研究開始当初の背景

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は、その薬剤耐性や持続感染能力などにより、臨床現場においてしばしば難治性感染を引き起こす。本研究課題の申請当時、申請者は、黄色ブドウ球菌のβ-ラクタム剤耐性と感性、溶血毒素の産生と非産生、small colony variant (SCV) と Large colony variant(LCV)などの全く“正反対”の表現型が大規模ゲノムの可逆的な逆位(Flip-Flop 逆位)により switching する事を見出していた。また、その switching が、細菌のヘテロ性質の発現と維持に関与していることを明らかにし、研究結果をまとめアメリカ科学アカデミー紀要(PNAS)に発表していた[Cui, PNAS 2012;109: E1647-1656]。本課題の申請は、その研究を更に推進・発展させるための計画であった。

細菌の SCV は持続感染の起因菌として注目視されている。近年、我々研究グループが某大学病院の術後感染患者から分離した MRSA A1 株は、三年半に渡って持続感染を引き起こしていた。当該株は典型的な SCV であるが、培養すると約 0.1%の頻度で LCV を生み出す。またその LCV を分離し、培養すると更に高い頻度(10%)で SCV へ逆遷移する。得られた SCV を 30 代に渡って継代培養を繰り返しても子孫株に LCV が含まれ、また同様な実験を LCV より出発してもその子孫株に SCV が出現する。その原因は、SCV と LCV 間に全ゲノムの約 1/2 の断片が頻繁に可逆的に逆位することと、環境に応じてその逆位の頻度が異なっていることが分かった。つまり、可逆的なゲノムの逆位が、異なった表現型を有するヘテロ細胞集団を作り、その一部の細胞集団が環境の変化に応じて生存すると解釈が出来た [Cui, PNAS 2012;109: E1647-1656]。

我々は、上記の様な可逆的なゲノム逆位、表現型スイッチング及びヘテロ集団の形成が、生体防御の回避能力を持つ SCV 型と正常な増殖能を持つ LCV 型の性質を融合させたため、“万全な治療”にも関わらず、長期間を渡る持続感染が続いたものと考えていた。当症例の三年半にも続いた持続感染と A1 株の有する上記の特徴を勘案すると、細菌の表現型スイッチングこそが持続感染成立の理由であると考え、本研究を通じて、その持続感染成立の分子メカニズムを明らかにし、治療法の開発のための研究基盤を構築する。

2. 研究の目的

本研究は、この表現型スイッチングと持続感染成立との関係を分子レベルにおいて明らかにし、持続感染や感染再燃の理解に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 同一臨床分離株由来の SCV 株 A1 と LCV

である A2 株で見られた事像を確認するため、他の臨床分離株 MRSA 1 用いて、培養細胞感染実験を行った。

2) 次に、マウス慢性感染モデルを用いて同様な実験を行い、SCV と LCV の持続性や両者の比、バイオフィーム形成能などの変化を観察した。

3) 線虫カエノラブリディティス・エレガンス (C. elegans)を用いる感染実験で SCV と LCV の病原性について検討を行った。

4. 研究成果

培養細胞感染実験の結果

A) 培養上皮細胞(A549)の MRSA 持続感染モデルを構築し、MRSA の細胞内の感染を観察した所、感染は1月程まで続くことを確認した。(図 1 A, B)。

B) 持続感染細胞から回収した菌のほとんどが SCV であった。また感染菌は A1 由来以外の LCV でも、感染中に経時的に SCV へ遷移していた(図 1B)。

C) 感染細胞(A549)から回収した SCV は、一回の継代培養で LCV 型へ逆遷移した(図 1C)。この結果は、臨床現場で SCV 発見の難しさを裏付けている。また、この結果は MRSA 5 株を用いて確認した。

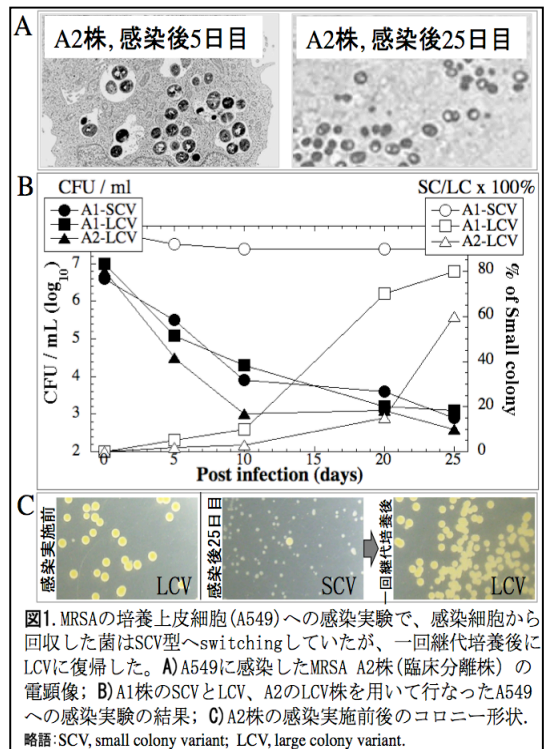


図1. MRSAの培養上皮細胞(A549)への感染実験で、感染細胞から回収した菌はSCV型へswitchingしていたが、一回継代培養後にLCVに復帰した。A) A549に感染したMRSA A2株(臨床分離株)の電顕像; B) A1株のSCVとLCV、A2のLCV株を用いて行なったA549への感染実験の結果; C) A2株の感染実施前後のコロニー形状。略語: SCV, small colony variant; LCV, large colony variant.

マウス慢性感染モデルの実験結果

更なる実験で、持続感染の成立には SCVs と NCVs の共存が必須であるという実験結果を得た:

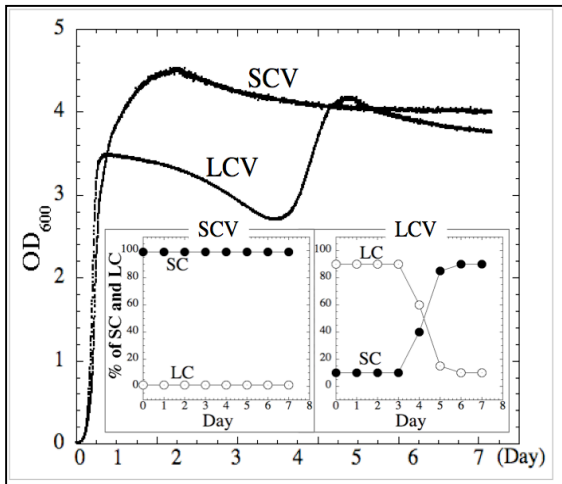


図2. A1株を回分培養(batch culture)するとそのSCVのSC:LC比は変化しないが、LCVのSC:LC比は3日以後急激な変化を見せた。  
 略語: SCV, small colony variant; LCV, large colony variant; SC, small colony; LC, large colony

A) マウス慢性感染モデルで、SCVs を感染させた場合には4週間で生体から菌が消失したが、細胞障害性(毒素産生性)のNCVs(表)を感染させた場合には4週間にも渡る持続感染が成立した(図3)。しかし、この時、感染巣中の菌はほぼ SCVs に変化していた。

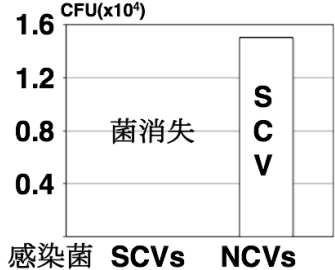


図3. 感染菌と持続感染。感染マウス腎臓中の生菌数。NCVs では持続感染が成立する。

B) 一方、細菌のバイオフィーム(菌を守る防護壁)形成能は NCVs の方が SCVs よりも高かったが(図4a)、バイオフィーム中の菌も図3と同様、一部が SCVs に変化していた(図4b)。

C) また、感染期間中の菌のタイプを経時的に観察すると、SCVs 感染の場合では全期間で SCVs が分離されたが(図5a)、NCVs 感染の場合では感染経過とともに SCVs の割合が増えていった(図5b右)。このことは SCVs の方が NCVs よりも免疫回避能が高いためと考え

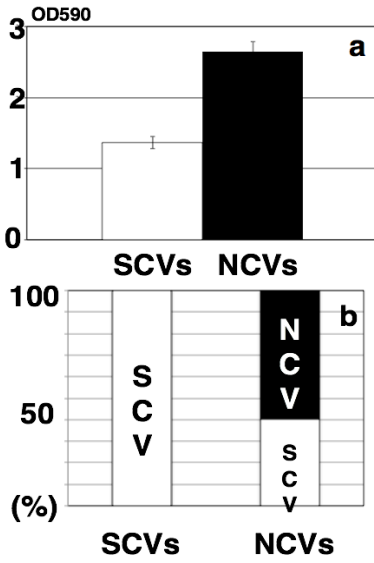


図4: バイオフィーム形成能と菌タイプ。a) NCVsの方がバイオフィーム形成能力は高い。b) バイオフィーム中にはSCVsが出現する。

られる。一方、NCVs の感染後、化学療法(イミペネムを投与)を行うと一度は SCVs に変化した菌が再度耐性菌である NCVs(表)に再変化する(図5c)。

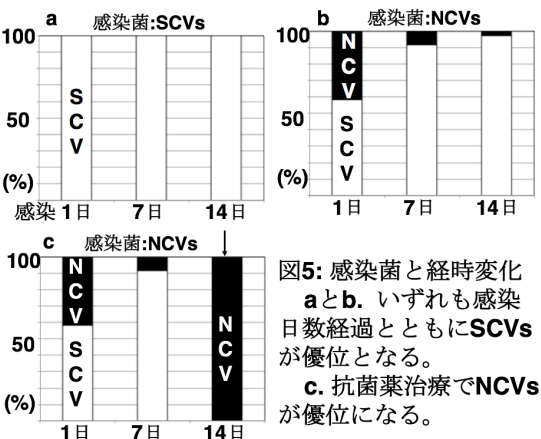


図5: 感染菌と経時変化  
 aとb. いずれも感染日数経過とともにSCVsが優位となる。  
 c. 抗菌薬治療でNCVsが優位になる。

以上の結果から感染初期に NCVs が産生した毒素が組織を障害し、至適な感染の場を作り、感染中期に NCVs がバイオフィームを形成することで強固な防護壁に囲まれた感染巣を構築する。また、感染後期に菌が免疫回避に有利な SCVs と化学療法に抵抗する NCVs の2つの性質を使い分けることで持続感染が成立するという感染モデルが考えられる。上記の結果は、過去の先行研究では重要視されていなかった NCVs が、SCVs と同様に持続感染において重要な役割を担っている可能性を示唆する。また元来持続感染中の菌は宿主および治療から、ひたすら逃げ隠れするだけだと信じ込まれていたが、実際には菌が周囲の環境を察知しつつ、非常にダイナミックにその性質を変えている可能性も示唆する。

本研究を通じて、目的とした持続感染設立機能の解明について、持続感染の成立には SCVs と LCVs の共存が必須であるとの所見を得ることができた。その実験的なエビデンスとして、1) マウス慢性感染モデルを用いると、SCVs を感染させた場合には4週間で生体から菌が消失したが、細胞障害性(毒素産生性)のLCVs を感染させた場合では4週間にも渡る持続感染が成立した。この時、感染巣中の菌はほぼ SCVs に変化していたことも分かってきた。2) 菌のバイオフィーム(菌を守る防護壁)の形成能は LCVs の方が SCVs よりも高かったが、バイオフィーム中の菌も一部が SCVs に変化していた。3) 感染期間中の菌のタイプを経時的に観察すると、SCVs 感染の場合では全期間で SCVs が分離されたが、LCVs 感染の場合では感染経過とともに SCVs の割合が増えていった。これは SCVs の方が LCVs よりも免疫回避能が高いためと考えられる。一方、LCVs の感染後、化学療法を行うと一度は SCVs に変化した菌が再度耐性菌である LCVs に再変化する。また、線虫カエノラブディティス・エレガンス (C. elegans) のブドウ球菌感染モデルでは、LCVs 感染組では4日目に全匹が死亡したに対し、SCV 感染組は10日まで感染が続いた。

以上の結果から、1) 感染初期に LCVs が産生した毒素が組織を障害し、至適な感染の場を作り、2) 感染中期に LCVs がバイオフィルムを形成することで強固な防護壁に囲まれた感染巣を構築し、3) 感染後期に菌が免疫回避に有利な SCVs と化学療法に抵抗する LCVs の 2 つの性質を使い分けることで持続感染が成立するという感染モデルが考えられる。以上の結果は、過去の先行研究では重要視されていなかった LCVs が、SCVs と同様に持続感染において重要な役割を担っている可能性を示唆する。即ち、本菌の表現型スイッチングが、生体防御の回避能力を持つ SCV 型を維持したことで長期間を渡る持続感染が成立した遺伝学的要因であると結論付けた。

#### 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. Tan XE, Neoh HM, Looi ML, Tan TL, Hussin S, Cui L, Hiramatsu K and Jamal R. Comparative proteomics profiling reveals down-regulation of *Staphylococcus aureus* virulence in achieving intermediate vancomycin resistance. *Malaysian Journal of Microbiology*, Vol 12(6) Special Issue 2016, pp. 498-505.
2. Tan XE, Neoh HM, Looi ML, Chin SF, Cui L, Hiramatsu K, Hussin S, Jamal R. Activated ADI pathway: the initiator of intermediate vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Can J Microbiol*. 2016 Oct 19:1-5.
3. Watanabe S, Sasahara T, Arai N, Sasaki K, Aiba Y, Sato'o Y, and Cui L. Complete genome sequence of *Streptococcus pyogenes* strain JMUB1235 isolated from an acute phlegmonous gastritis patient. *Genome Announc* 4(5):e01133-16.
4. Sato'o Y, Aiba Y, Kiga K, Watanabe S, Sasahara T, Hayakawa Y, Cui L. Optimized universal protocol for electroporation of both coagulase-positive and -negative *Staphylococci*. *J Microbiol Methods*. 2018. 146:25-32.

[学会発表] (計 7 件)

1. Longzhu Cui & Hui-min Neoh. Reversible Chromosome Inversion and Staphylococcal SCV. Poster. Gordon Research Conference on Staphylococcal Diseases, July 11-18, 2015. Renaissance Tuscany Il Ciocco, Lucca (Barga), Italy.

2. 崔龍洙、藤上理奈、松井秀仁、花木秀明. 黄色ブドウ球菌の 23S rRNA 遺伝子 G2576T 変異の簡易検出方法. 第 63 回日本化学療法学会総会. 2015 年 6 月 4 日 ~ 6 日. 東京プラザホテル新宿
3. Persistent infections of *Staphylococcus aureus*: an insight into the formation of small colony variants (SCV) and its virulence in the *Caenorhabditis elegans* infection model. ポスター. Hui-min Neoh, Xin Ee Tan1, Ling Fei Tee, Rosniza Mohamad Hussain, Toh Leong Tan, Longzhu Cui, Rahman Jamal. 17th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections. Seoul, South Korean, Aug 30-Sep 2, 2016.
4. Genomic analysis of *Staphylococcus capitis* resistant to glycopeptide antibiotics. ポスター. Yusuke Sato'o, Mitsutaka Shoji, Shinya Watanabe, Ken Kikuchi, Keiichi Hiramatsu, Longzhu Cui. 17th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections. Seoul, South Korean, Aug 30-Sep 2, 2016.
5. Yusuke Sato'o, Mitsutaka Shoji, Shinya Watanabe, Ken Kikuchi, Keiichi Hiramatsu, Longzhu Cui. Genome analysis of *Staphylococcus capitis* resistant to glycopeptide antibiotics. 第 89 回日本細菌学会総会 2016 年 3 月 大阪
6. Oxacillin 感性を示す *mecA* 陽性黄色ブドウ球菌の Oxacillin 感性化機構の解明. 口頭. 渡邊真弥, Tanit Boonsiri, Kanate Thitianapakorn, 相羽由詞, 佐藤祐介, 氣賀恒太朗, 李峰宇, 笹原鉄平, 崔龍洙. 第 6 2 回日本ブドウ球菌研究会. 口頭. 2017/9/1. 国内 (北里大学獣医学部・講堂)
7. Genetic mechanism of high susceptibility to beta-lactam in Oxacillin-susceptible Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. ポスター. 渡邊真弥, Tanit Boonsiri, Kanate Thitianapakorn, 相羽由詞, 佐藤祐介, 氣賀恒太朗, 笹原鉄平, 崔龍洙. 2018/3/27. 第 91 回日本細菌学会総会. 国内 (福岡)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

自治医科大学細菌学部門の HP :

<http://www.jichi.ac.jp/bacteriology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

崔龍洙 (Longzhu Cui)

自治医科大学・医学部・細菌学部門・教授

研究者番号：50306932