

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15979

研究課題名(和文)壊死性軟部組織感染症に関与する細菌因子の網羅的選抜と機能解析

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of bacterial pathogenic factors involved in necrotizing soft tissue infection

研究代表者

山崎 浩平 (Yamazaki, Kohei)

北里大学・獣医学部・講師

研究者番号：20836639

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)：Aeromonas hydrophilaはヒトの体内で素早く増殖し、軟部組織に重篤な壊死症を引き起こす。A. hydrophilaのゲノム上にトランスポゾン転移させ、変異株ライブラリーを作製し、病原性に関与する遺伝子を網羅的に選抜した。特に運動性、毒素、そして菌体外膜に関連する遺伝子が多く選抜され、これらの因子が病原性に関与することが明らかとなった。運動性は軟部組織中の拡散に必須であり、壊死範囲の急速な拡大に関与することが明らかとなった。また、A. hydrophilaが分泌する毒素および菌体外膜の欠損あるいは減少は宿主体内での増殖性に影響を及ぼすことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Aeromonas hydrophilaはヒトに重篤な軟部組織壊死症を引き起こす病原細菌である。A. hydrophila感染症は短時間内に重症化することが知られており、抗菌薬と併用可能な感染症制御法の確立が課題である。本研究は病原細菌が感染者体内で増殖するために必要な因子および病態を引き起こすために必要な因子の網羅的選抜をおこなった。本研究結果に基づくA. hydrophila感染症の病態形成機構の解明は、本菌による感染症の重症化を防ぐ治療法の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Aeromonas hydrophila rapidly proliferates in human patients, causing severe necrotizing soft tissue infection. To do a comprehensive analysis of pathogenic genes of A. hydrophila, we made mutants libraries that have a transposons-inserted genome. Genes related to motility, toxins, and the outer membrane of bacteria were detected, and these factors were involved in the pathogenicity of A. hydrophila. Motility was essential for a spread in soft tissues and involved in the rapid expansion of the lesion of necrosis. Deletion of a toxin and the outer membrane of A. hydrophila affected the proliferation in the host.

研究分野：感染症学

キーワード：Aeromonas 網羅的選抜 壊死性軟部組織感染症 運動性 毒素 菌体外膜 病原性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

A. hydrophila は河川、湖沼、およびその周辺の土壌等に広く分布し、経口感染に起因する下痢症や、創傷感染を引き起こす。本感染症はしばしば重症化し、四肢の軟部組織壊死症 (NSTI) や菌血症へ急激に進行する。NSTI の治療は起因菌を同定し適切な抗生剤を投与することが第一に行われるが、*A. hydrophila* は様々な抗生物質に耐性であることが知られている。さらに同じ *A. hydrophila* であっても株によって耐性機構が異なる (耐性を示す抗生剤が異なる) ことから、感染患者に対する薬剤の選択および薬剤のみでの根治が極めて困難である。そこで、抗生剤療法に加えて、体内菌数の低下を目的とした壊死組織の除去 (デブリードマン) が行われ、就労者の社会復帰という面からも問題である。細菌が細胞・組織を破壊することにより引き起こされる壊死症は感染局所の機能障害だけでなく、血流不全により抗生剤の浸潤を遮り、さらに感染患者の細菌を排除する免疫機構が血行性に移行することを妨害する。その結果、NSTI は免疫機能の低下を伴う基礎疾患をもつ患者でなくとも発症し、病態は急速に進行する。すなわち、*A. hydrophila* が壊死症を引き起こすために必須とする因子を同定し、それを抑えることが本感染症の治療に重要な役割を果たす。

2. 研究の目的

A. hydrophila 感染症に関する研究は経口感染に起因する下痢症の発病機序および病原因子の探索が中心に行われてきたが、NSTI に関する研究は殆ど行われていなかった。そのため、*A. hydrophila* が感染者体内、特に軟部組織においてどのような機構により増殖し、壊死症を引き起こしているのか全く明らかとなっていない。さらに、*A. hydrophila* は軟部組織の皮下組織や筋肉組織など、どこの部位で増殖するか、感染局所に免疫細胞の浸潤はあるのか等の病理学的特徴も不明のままであった。我々はマウスを用いて *A. hydrophila* による NSTI の病理学的特徴を明らかにするとともに、マウスモデルと次世代シーケンサーを用いた解析により *A. hydrophila* の病原因子の選抜を行った。

3. 研究の方法

(1) *A. hydrophila* 感染モデルの確立

ヒトの NSTI で認められる壊死症を発症するマウスモデルを確立するため、*A. hydrophila* の培養に用いる Luria-Bertani (LB) 培地の塩濃度、培養温度、および培養時間の決定を行った。

(2) 病理学組織学的解析

A. hydrophila に感染したマウスの病理学的特徴を明らかにするため、感染局所である大腿部を採取し、ヘマトキシリンエオジン染色を行った。

(3) トランスポゾンを用いた遺伝子破壊株の作製

病原因子の選抜のために、*A. hydrophila* のゲノムにトランスポゾン転移させ、遺伝子が破壊された株を作製した。トランスポゾンを保持するプラスミドを大腸菌から *A. hydrophila* に接合伝達させる際の培地と培養温度、そしてトランスポゾンを転移させる際の培養温度の検討を行い、高効率なトランスポゾン挿入変異株の作製条件を決定し、ゲノム上の予測遺伝子数 (約 4,300) の約 3 倍の約 13,000 クローンのトランスポゾン挿入変異株ライブラリーを作製した。

(4) 感染モデルマウスおよび次世代シーケンサーを用いた病原因子の網羅的選抜

作製した全てのトランスポゾン挿入変異株を培養後、マウスに感染させた。一定時間後に接種局所の筋肉および脾臓から菌を回収し、菌のゲノムを精製後、次世代シーケンサーを用い、Transposon insertion site direct sequencing (TraDIS) 法による解析を行った。TraDIS 法はトランスポゾンが挿入された *A. hydrophila* の遺伝子を同定可能であり、さらに変異株ライブラリーに含まれるクローン数を遺伝子数により定量することが可能である。*A. hydrophila* は壊死症を引き起こしつつ増殖後、創傷感染局所の菌数が高まると共に全身循環中に移行し菌血症を引き起こすことから、トランスポゾンにより病原性に関与する遺伝子が破壊された株は、野生株と比較して感染局所あるいは臓器中の菌数が低下する。

(5) 選抜された遺伝子の機能解析

(4) で宿主の筋肉あるいは脾臓中において著しく菌数が低下した遺伝子に関連する因子、および関連する複数の遺伝子が破壊された株がいずれも菌数が低下している因子を病原性に関与する重要な因子として選抜した。運動性、外分泌毒素、および菌体外膜に関連する遺伝子が多く選抜され、特に重要な因子であることが予測された。

運動性および外分泌毒素に関連する遺伝子を相同組み換えにより欠損させた株を作製し、解析に用いた。作製した遺伝子欠損株を HeLa 細胞に対する細胞傷害性試験および病理組織学的解析により解析を行った。

4. 研究成果

(1) *A. hydrophila* 感染による NSTI マウスモデルの構築

我々は *A. hydrophila* が最も活発な運動性を示す条件を最適な培養条件と考え、検討を行った。その結果、*A. hydrophila* は 1% の NaCl を含む LB 培地で 12 時間培養することで最も活発な運動性を示した。この *A. hydrophila* をマウスの右大腿部皮下に接種し、病態の観察を行った。マウスは感染後数時間で大腿部の腫脹と脱毛が認められた。感染 18 時間後には大腿部皮膚の脱落が認められ、エンドポイントに達する個体も認められた。生存したマウスは 72 時間以内に大腿部の広範囲の壊死が認められた。つまり、我々は *A. hydrophila* 感染によりヒトの NSTI の病態を再現したマウスモデルの構築に成功した。

(2) 効率的なトランスポゾン挿入変異株の作製

病原性に関与する遺伝子を選抜するため *A. hydrophila* のゲノム上にトランスポゾンを転移させ遺伝子を破壊した株の作製を行った。*A. hydrophila* は様々な抗菌薬に耐性を持つため、薬剤耐性遺伝子をマーカーとするトランスポゾン挿入変異株の分離が困難であった。我々はトランスポゾンが転移した変異株のみを確実に、最も多く分離可能な培地中に含まれるカナマイシン濃度の決定を行った。その結果、600 ng/mL のカナマイシンを添加した培地において最も効率よくトランスポゾン挿入変異株を分離可能であることが明らかとなった。そして、約 130,000 クローンのトランスポゾン挿入変異ライブラリーの作製に成功した。

(3) 病原性に関与する因子の網羅的選抜

作製した約 130,000 クローンのトランスポゾン挿入変異株をマウスの大腿部皮下に接種し、エンドポイントに達したマウスの大腿部筋肉および脾臓から菌を回収した。接種前のライブラリーおよびマウスから回収した菌のゲノムを精製し、TraDIS 法により解析を行った。その結果、運動性、外分泌毒素、および菌体外膜に関連する遺伝子破壊株が宿主体内で減少していることが明らかとなり、これらの因子が病原性に重要であることが示唆された。

そこで、運動性欠損株および外分泌毒素欠損株を作製後、マウスに接種し、致死性を比較した。運動性欠損株あるいは外分泌毒素欠損株に感染したマウスは野生株に感染したマウスと比較して生存時間が延長した。つまり、これらの因子は致死性に必須であり、病原性に不可欠な因子であることが明らかとなった。

(4) 運動性が病原性に与える影響の解析

運動性がどのように致死性に関与するか解析を行った。最初に、運動性の欠損が細胞傷害性に影響を与えるか否か調べるため、HeLa 細胞に運動性欠損株を感染させた。対照として用いた野生株は細胞傷害性を示し、毒素欠損株は細胞傷害性が低下していた(図 1)。運動性欠損株は野生株と同様に細胞傷害性を示した(図 1)。つまり、運動性の欠損により細胞傷害性は変化しないことが明らかとなった。

運動性の欠損が病原性に与える影響をしらべるため、マウスに野生株と運動性欠損株を感染させ、病態を比較した。感染 18 時間後の野生株感染マウスにおいては広範な接種部位の壊死が認められたのに対して、運動性欠損株に感染したマウスにおいては野生株に感染したマウスよりも狭い範囲の壊死が認められた(図 2)。この結果から、*A. hydrophila* の運動性は軟部組織中の拡散に必要であり、壊死範囲を拡大させるために必須であることが明らかとなった。この壊死範囲の拡大が最終的なマウスの致死時間にも影響することが明らかとなった。

図1:運動性欠損が細胞傷害性に与える影響

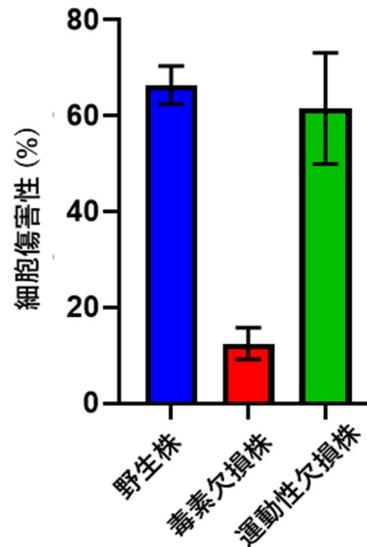
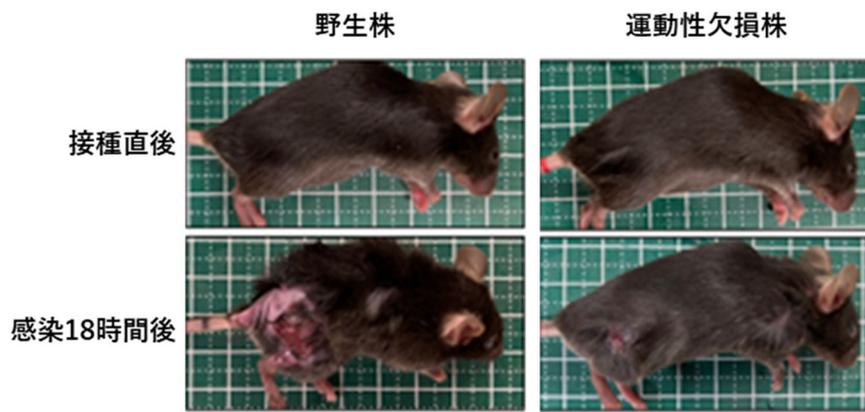


図2:運動性が病態形成に与える影響



本研究成果は以下の論文で報告した。

Yamazaki, K., Kashimoto, T., Niwano, A., Yamasaki, M., Nomura, M., Akeda, Y., and Ueno, S. 2020. Expansion of necrosis depending on hybrid motor-driven motility of *Aeromonas hydrophila* in a murine wound infection model. *Microorganisms*. Dec 22;9(1):10.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamazaki Kohei, Kashimoto Takashige, Niwano Ayuha, Yamasaki Moeko, Nomura Mayu, Akeda Yukihiko, Ueno Shunji	4. 巻 9
2. 論文標題 Expansion of Necrosis Depending on Hybrid Motor-Driven Motility of Aeromonas hydrophila in a Murine Wound Infection Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 10~10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms9010010	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山崎 浩平	4. 発行年 2021年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 6
3. 書名 Precision Medicine	

〔産業財産権〕

〔その他〕

北里大学獣医公衆衛生学研究室 http://www.vmas.kitasato-u.ac.jp/publichealth/

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