

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16648

研究課題名（和文）血液内における未知の生体内菌発育必須因子の同定および血流感染症特異的治療法の評価

研究課題名（英文）Identification of novel in vivo bacterial essential factors for blood stream infection-specific therapy

研究代表者

佐藤 豊孝（SATO, TOYOTAKA）

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：30756474

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：敗血症などの血流感染症は時に生命に関わる重篤な疾患であり、その多くが細菌感染症が原因とされる。本研究では、疾患敗血症などの血流感染症の成立に必要な病原菌の細菌因子の探索と同定を行い、複数の血液内での生存に必須な細菌因子を同定した。また、この細菌因子の働きを抑える化合物の同定にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、細菌感染症の中でも生命に重篤な影響を及ぼす可能性が高い敗血症などの血流感染症の発症に必要な細菌側の要因を詳細に解析したものである。よって、本研究によって発見された同定された細菌因子を抑制する物質は、新規の血流感染症治療薬となり得る可能性を秘めている。また、本研究によって明らかにされた血流感染症の成立に必要な細菌因子は将来的な新規の細菌性血流感染症治療の際の新たなターゲットになる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：Bloodstream infections such as sepsis are sometimes life-threatening and serious diseases, and most of them are caused by bacterial infections. In this study, we searched for and identified bacterial factors of pathogens necessary for the establishment of bloodstream infections such as the disease sepsis, and identified several bacterial factors essential for survival in the blood. We also succeeded in identifying compounds that suppress the function of these bacterial factors.

研究分野：細菌学

キーワード：細菌学 細菌感染症 薬剤耐性菌 血流感染症 生体内菌発育必須因子(vivoEF)

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

敗血症といった細菌性血流感染症は生命に関わる重篤な疾患であり、死亡率は増加の一途をたどっている。本要因には、高齢者数の増加に加え、耐性菌の多剤耐性化に伴う治療効果の遅延・減弱の影響も考えられ、今後も増加していくことが予想される。耐性菌による問題は世界共通の深刻なテーマである。英国などの試算では、耐性菌による死亡者数が 2050 年には現在のガンを抜き、死因の一位になることが危惧されている。しかし、新規抗菌薬の開発は減少の一途をたどり、我々の最近の研究では、チゲサイクリンやコリスチンといった多剤耐性菌への最終手段となる抗菌薬にも耐性を示す菌が臨床現場から分離されている。抗菌薬選択肢の減少もこの問題を深刻化させている。

申請者は新たな耐性菌を生み出さない多剤耐性菌感染症治療戦略の確立を最終目標とし、既存の抗菌物質の標的とは全く異なる細菌因子である『生体内菌発育必須因子(*vivoEF*) [*in vitro*では菌の生育・増殖には影響を与えないが、特定の生体内(組織や血液内などの感染部位)において菌の発育・増殖に大きな影響を与える因子 (*in vivo* bacterial Essential Factor = *vivoEF*)]』に着目した研究を行っている。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに独自のスクリーニング法を用いて血液内でのみ抗菌活性を示す化合物(*vivoEF* 阻害薬)を複数(31 化合物)同定した。本研究では『細菌学的な観点から既存抗菌薬の弱点を克服する術はあるのか?』という問いを掲げ、*vivoEF* 阻害薬を用いて多剤耐性菌が血流感染症を成立させる上で必須な未知の *vivoEF* を同定し、本 *vivoEF* (阻害薬)が多剤耐性菌を含めた細菌性血流感染症特異的治療薬・予防薬の有用な候補となり得るかを評価する。

3. 研究の方法

本研究では、*vivoEF* 阻害薬が作用する血液内での未知の *vivoEF* を同定することを目的に、*vivoEF* 阻害薬処理時に変動する遺伝子を RNA-Seq で網羅的に解析した。変動した遺伝子の中から血清抵抗性への関与する遺伝子を抽出し、それらの遺伝子欠損株を作成した。これら遺伝子欠損株を *in vitro* での血清感受性試験およびマウス全身感染モデルでの病原性の有無を評価した。

さらに、得られた *vivoEF* 阻害薬の高次評価として、血清特異的抗菌活性の評価、複数の菌株および多菌種(大腸菌、肺炎桿菌、*E. cloacae*、緑膿菌、アシネトバクター、MRSA)を用いた血清特異的な *vivoEF* 阻害効果を評価した。

4. 研究成果

本研究では、大腸菌と各 31 の血清特異的な *vivoEF* 阻害薬存在化で培養し、total RNA を抽出後 cDNA を合成し、これまでの研究成果で明らかにしてきた血清抵抗性関連性遺伝子の遺伝子発現量を qPCR にて測定した。その結果、24 の *vivoEF* 阻害薬にて本血清抵抗性関連性遺伝子の発現量が低下していた(図 1)。

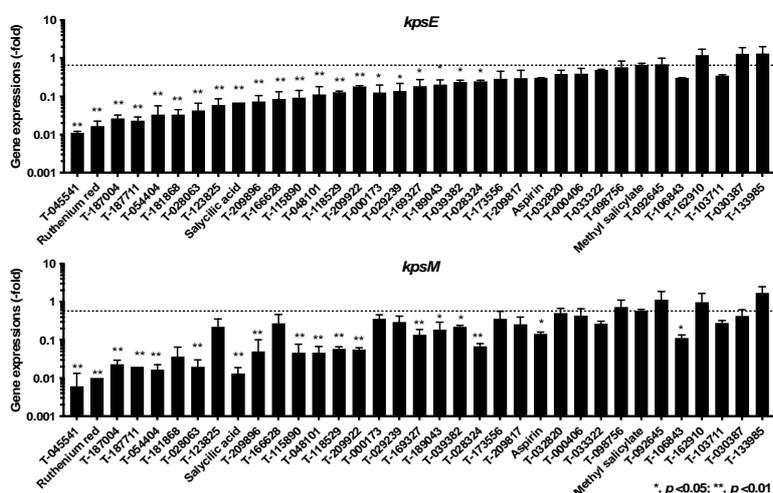


図 1. 31 の *vivoEF* 阻害薬における血清抵抗性関連遺伝子の発現量の測定(相対値, vs 無添加)

それ以外の7化合物を含む計15 vivoEF 阻害薬にて上記と同様な条件で RNA-Seq 解析を行った。(図2)。その結果これら vivoEF 阻害薬においては、その他の血清抵抗性遺伝子 (*lpp*, *rmID*, *wcaF*, *waaG*, *fbp*)の発現量の低下が認められた(図3)。

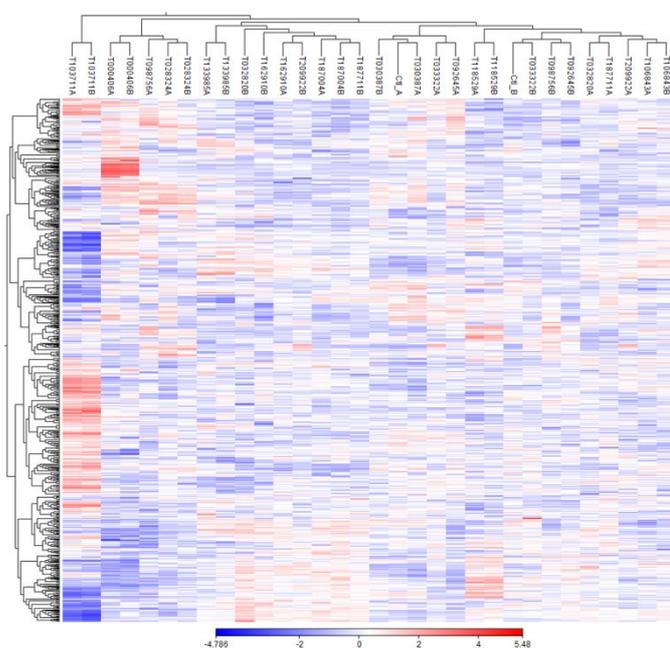


図2. vivoEF 阻害薬を用いた RNA-Seq 解析結果(Heat map)

Compound	<i>rfaH</i>	<i>nagA</i>	<i>pgm</i>	<i>tolQ</i>	<i>lpp</i>	<i>rmID</i>	<i>rmIB-1</i>	<i>rmIB-2</i>	<i>wcaF</i>	<i>bamB</i>	<i>walA</i>	<i>waaY</i>	<i>waaB</i>	<i>waaP</i>	<i>waaG-1</i>	<i>waaG-2</i>	<i>wecA</i>	<i>wecD</i>	<i>fbp</i>
T-000406	-1.189	1.0921	-1.028	1.1359	1.0278	-1.055	-1.131	-1.219	-1.692	1.2515	1.0921	-1.08	-1.078	1.0212	-1.083	1.0058	-1.1378	-1.2857	-1.3724
T-028324	-1.1913	1.08813	-1.0206	1.16365	-1.3182	-1.0416	-1.0596	1.01239	-1.55	-1.0113	1.07253	1.06125	-1.0523	1.05445	-1.0569	1.00903	-1.14461	-1.03526	-1.14724
T-030387	-1.1195	1.01807	-1.0307	1.03634	-1.0159	-1.1113	-1.146	1.00582	1.94986	-1.0704	-1.0352	-1.0124	-1.0763	-1.0476	-1.2341	-1.0855	-1.13825	-1.02294	-1.00847
T-033322	1.02448	1.02627	-1.0601	1.83178	-1.4957	1.02391	1.04923	-1.0276	-1.7196	1.00055	1.06157	1.15495	1.02555	1.10327	1.07748	1.00922	-1.02035	-1.00148	-1.11685
T-092645	-1.0498	-1.0396	-1.0009	1.17212	-1.8075	1.01611	1.02555	-1.0375	<b>-2.2027</b>	-1.0459	1.06455	1.14879	1.07666	1.13419	1.1076	-1.0172	-1.08479	-1.10976	-1.21025
T-098756	-1.0849	1.07267	1.01888	1.19486	<b>-2.5091</b>	1.1083	1.10847	-1.1378	1.42151	-1.018	-1.0128	1.14158	1.06618	1.13357	-1.0569	1.04899	-1.14461	-1.03526	-1.37142
T-103711	1.2799	-1.1312	-1.4421	1.05075	<b>-4.7158</b>	<b>-2.0436</b>	-1.9089	-1.2566	3.04594	-1.4708	-1.85	-1.2025	-1.4991	-1.2314	<b>-2.0905</b>	-1.2662	-1.27662	-1.21239	-1.50656
T-105843	-1.0911	-1.1864	-1.047	1.33807	<b>-2.0507</b>	1.22974	1.2144	1.00488	3.10108	1.15489	1.14924	1.20308	1.02254	1.13109	1.36218	1.07617	-1.00105	-1.01119	-1.26251
T-118529	-1.2681	1.05991	-1.0524	1.17089	<b>-2.2704</b>	-1.04	-1.0018	-1.0684	2.03493	-1.0225	-1.0119	1.00718	1.06372	1.043	1.13974	-1.0046	-1.11449	-1.04049	-1.17331
T-133985	-1.0481	-1.1797	1.03597	1.35071	-1.6768	-1.0886	1.08733	1.07335	1.74121	1.31976	1.39724	1.29892	1.05995	1.22473	1.34693	1.07929	1.066679	-1.00183	-1.03291
T-162910	-1.0025	-1.1805	1.01168	1.24172	<b>-2.7567</b>	-1.0324	1.12711	-1.0049	1.3946	1.05009	1.22758	1.42535	1.08189	1.1465	1.4324	1.01873	1.236697	-1.08362	-1.22253
T-187004	-1.1086	-1.2552	-1.117	1.18867	<b>-3.5772</b>	1.09146	1.16581	-1.1073	-1.7439	1.06033	1.40287	1.27539	1.15911	1.09384	1.58376	-1.0218	1.141983	-1.04628	-1.2397
T-187711	-1.1015	-1.14	-1.0712	1.17074	-1.6953	1.00036	1.05935	-1.0652	-1.0188	1.10572	1.21357	1.10547	1.04912	1.10484	1.39867	-1.0339	1.125648	-1.03736	-1.2574
T-209922	-1.1397	1.00929	-1.0847	1.27805	-1.9252	1.01346	1.07592	-1.0066	3.06118	1.1272	1.0161	1.18015	-1.0189	1.07566	1.28001	-1.0165	1.104308	1.045597	-1.56078
T-032820	-1.2527	-1.1583	1.00194	1.23968	<b>-2.1214</b>	1.1639	1.11123	1.02315	-1.7049	1.2327	1.22617	1.21164	1.05339	1.21797	1.46782	1.08628	1.09836	1.014605	-1.11673
RR	-1.1364	-1.3173	-1.9427	1.82167	<b>-18.245</b>	-1.2947	-1.55	-1.2448	220.821	2.43081	-1.3378	-1.6235	-1.1207	-1.0475	-1.3465	-1.0293	1.103288	-1.04877	<b>-3.56672</b>

図3. vivoEF 阻害剤によって有意に発現量が低下した血清抵抗性遺伝子(ピンクで表示)

大腸菌の転写因子欠損株の作出によって複数の転写因子が血清抵抗性に関与することを確認した(図4)

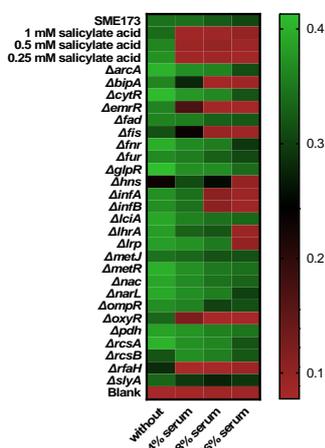


図4. 大腸菌 SME173 株における転写因子遺伝子欠損株での血清感受性の評価値は菌の増殖における濁度(OD600)で表記。

31 の *vivoEF* 阻害薬の高次評価を行ったところ、30 の *vivoEF* 阻害薬は大腸菌特異的な血清特異的な抗菌活性を示し(図 5)、この効果はカルバペネム耐性株やコリスチン耐性株においても良好な抗菌活性を示した。残り 1 つの *vivoEF* 阻害薬は大腸菌以外の多菌種(大腸菌、肺炎桿菌、*E. cloacae*、緑膿菌、アシネトバクター)においても良好な血清特異的抗菌活性を示した。これら *vivoEF* 阻害薬の *vivoEF* 阻害効果は一般培地や尿中では認められず、確かに血清特異的な抗菌活性であることを確認した(図 6)

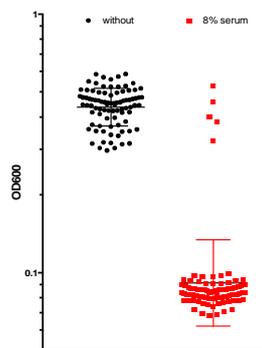


図 5. 血液由来大腸菌臨床分離株を用いた血清特異的 *vivoEF* 阻害効果の評価 (*vivoEF* 阻害薬であるサリチル酸を用いた 1 例)

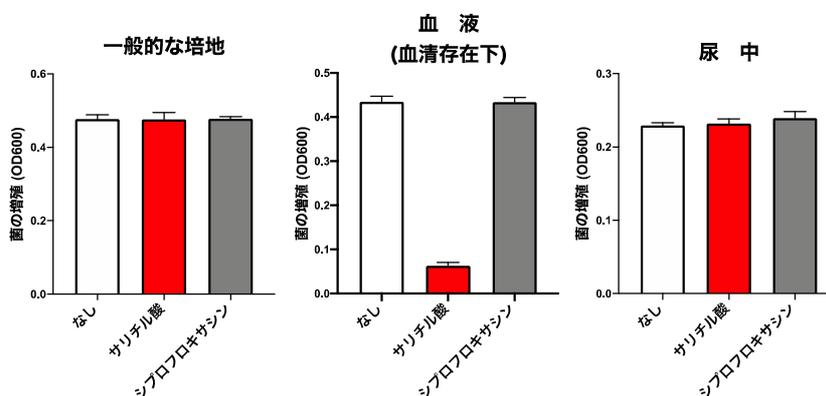


図 6. シプロフロキサシン耐性大腸菌を用いた血清特異的 *vivoEF* 阻害効果の評価 (*vivoEF* 阻害薬であるサリチル酸を用いた 1 例)

また、マウスにフルオロキノロン耐性大腸菌を感染させた全身感染モデルにて、*vivoEF* 阻害薬の 1 つであるサリチル酸で治療効果を得られることを確認した(図 7)。

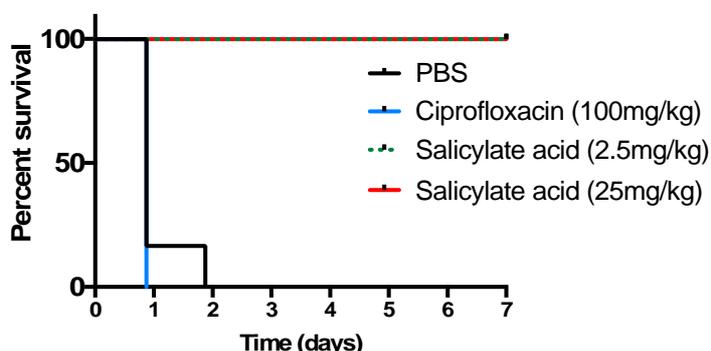


図 7. マウス全身感染モデルにおけるサリチル酸の *vivoEF* 阻害効果の評価

以上により、本研究では感染部位特異的に菌の生存・増殖に必須な因子(*vivoEF*)を複数同定し、これらを標的とした *vivoEF* 阻害薬の解析およびその有用性が確認できた。これらの結果は *vivoEF* が多剤耐性菌治療への新たなターゲットとなり得ることを示唆している。今後これらの知見をもとに *vivoEF* 阻害剤のさらなる解析と新規細菌感染症治療薬としての展開につなげていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohkoshi Yasuo, Sato Toyotaka, Murabayashi Hiromi, Sakai Kohei, Takakuwa Yasunari, Fukushima Yukari, Nakajima Chie, Suzuki Yasuhiko, Yokota Shin-ichi	4. 巻 S1341-321X(20)
2. 論文標題 Campylobacter upsaliensis isolated from a giant hepatic cyst	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 30063-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2020.02.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Yuuki, Sato Toyotaka, Fukushima Yukari, Nakajima Chie, Suzuki Yasuhiko, Takahashi Satoshi, Yokota Shin-ichi	4. 巻 online ahead of print
2. 論文標題 Contribution of $\beta$ -lactamase and efflux pump overproduction to tazobactam-piperacillin resistance in clinical isolates of Escherichia coli	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Antimicrobial Agents	6. 最初と最後の頁 105919 - 105919
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijantimicag.2020.105919	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Usui Masaru, Maruko Aika, Harada Michiko, Kawabata Fumi, Sudo Tsubasa, Noto Sayo, Sato Toyotaka, Shinagawa Masaaki, Takahashi Satoshi, Tamura Yutaka	4. 巻 61
2. 論文標題 Prevalence and characterization of Clostridioides difficile isolates from retail food products (vegetables and meats) in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anaerobe	6. 最初と最後の頁 102132 - 102132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anaerobe.2019.102132	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Honda Hiroyuki, Sato Toyotaka, Shinagawa Masaaki, Fukushima Yukari, Nakajima Chie, Suzuki Yasuhiko, Kuronuma Koji, Takahashi Satoshi, Takahashi Hiroki, Yokota Shin-ichi	4. 巻 64
2. 論文標題 In Vitro Derivation of Fluoroquinolone-Resistant Mutants from Multiple Lineages of Haemophilus influenzae and Identification of Mutations Associated with Fluoroquinolone Resistance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 e01500-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AAC.01500-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Kazuki, Sato Toyotaka, Hikiji Yuta, Katsuyama Akira, Matsumaru Takanori, Yakushiji Fumika, Yokota Shin-Ichi, Ichikawa Satoshi	4. 巻 39
2. 論文標題 Synthesis and biological evaluation of a MraY selective analogue of tunicamycins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 349-364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15257770.2019.1649696	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saeki Masachika, Sato Toyotaka, Furuya Daisuke, Yakuwa Yuki, Sato Yuki, Kobayashi Ryo, Ono Mayumi, Nirasawa Shinya, Tanaka Makito, Nakafuri Hiroataka, Nakae Mami, Shinagawa Masaaki, Asanuma Kouichi, Yanagihara Nozomi, Yokota Shin-ichi, Takahashi Satoshi	4. 巻 26
2. 論文標題 Clonality investigation of clinical Escherichia coli isolates by polymerase chain reaction-based open-reading frame typing method	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 38 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2019.06.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiyama Yoshiki, Takahashi Satoshi, Sato Toyotaka, Shinagawa Masaaki, Fukushima Yukari, Nakajima Chie, Suzuki Yasuhiko, Masumori Naoya, Yokota Shin-ichi	4. 巻 25
2. 論文標題 Evaluation of Susceptibilities to Carbapenems and Faropenem Against Cephalosporin-Resistant Neisseria gonorrhoeae Clinical Isolates with penA Mosaic Alleles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbial Drug Resistance	6. 最初と最後の頁 427 ~ 433
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mdr.2018.0263	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐藤 豊孝、小笠原徳子、霧島正浩、高橋 聡、横田 伸一
2. 発表標題 生体内菌発育必須因子(vivoEF)を標的とする感染部位特異的(ピンポイント)抗菌薬のスクリーニング
3. 学会等名 第68回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第66回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 豊孝、田村 豊、高橋 聡、横田 伸一
2. 発表標題 伴侶動物領域におけるESBL産生菌の現状
3. 学会等名 第68回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第66回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 豊孝、品川 雅明、高橋 聡、横田 伸一
2. 発表標題 人臨床検体から分離された腸内細菌科細菌のコリスチン感受性および分子遺伝学的解析
3. 学会等名 第67回日本化学療法学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 豊孝
2. 発表標題 既存抗菌薬の概念にとらわれない抗菌活性物質の検索とその評価
3. 学会等名 医薬品産業情報研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 豊孝
2. 発表標題 感染部位特異的細菌感染症治療法の確立に向けたvivoEF阻害剤の検索
3. 学会等名 BioJapan 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 豊孝、山本 聡、白石 宗、小笠原 徳子、高橋 聡、横田 伸一
2. 発表標題 生体内菌発育必須因子(vivoEF)に着目した細菌性血流感染症特異的vivoEF阻害剤の特性と作用メカニズムの解析
3. 学会等名 日本細菌学会北海道支部会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤豊孝, 山本聡、小笠原徳子、臼井優、鈴木仁人、林航、長野則之、土井洋平、田村豊、高橋聡、横田伸一
2. 発表標題 コリスチン耐性の付与が及ぼす大腸菌の病原性変化
3. 学会等名 第48回耐性菌研究会
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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