

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：24405

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16650

研究課題名(和文) 難治性hvKP感染症に対する新たな治療戦略の確立に向けた基礎・応用研究

研究課題名(英文) The research to establish new therapeutic strategies for refractory hvKP infections

研究代表者

並川 浩己 (Namikawa, Hiroki)

大阪公立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60813417

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)：高病原性肺炎桿菌をRFPを含む培地で培養し、耐性変異株を5株取得し実験を行った。(1) 野生株と変異株のRFPによる粘性抑制度を比較した。(2) RFP耐性株の変異rpoBを野生型rpoBに置換し、粘性抑制度が野生株と同程度に戻るかを検証した。さらにmagAとrmpAの転写量や莢膜の厚さの変化も評価した。RFPに対する感受性は、変異株は生育阻害だけでなく、粘性抑制も受けにくいことが示された。RFP耐性株のrpoBを野生型のrpoBに置換したところ、粘性抑制への感受性が野生株と同等にまで戻ることが確認された。magAとrmpAの転写量および莢膜の厚さは、粘性レベルと関連していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RFPの粘性抑制作用はrpoBの機能抑制を介して生じるという仮説が強く裏付けられた。このことから難治性hvKP感染症に対する新たな治療戦略の確立に向けてまた一步前進したと考える。しかしながら、その作用機序やin vivoでの効果については、まだ多くの疑問が残されている。今後、さらに詳細な反応機構を解明し、RFPのユニークで有用な活性を利用した抗菌療法を開発することが必要である。

研究成果の概要(英文)：We aimed to determine whether RFP exerts this effect at sub-growth-inhibitory concentrations via its binding to RpoB. Five spontaneous RFP-resistant mutants (R1~5) were prepared from an hvKP clinical isolate and subjected to whole genome sequencing and mucoviscosity analyses. Subsequently, we created a rpoB mutant R6 and revertants with wild-type rpoB from R1~5 (named R1'~5'). We evaluated transcription levels of rmpA and the capsular polysaccharide polymerase gene magA and capsule thickness of R1~5 and R1'~5' grown without or with RFP. R1~5 all had non-synonymous point mutations in rpoB and were highly resistant to the bactericidal effects and anti-mucoviscous activity of RFP. While the properties of R6 were similar to those of R1~5, the responses of R1'~5' to RFP were identical to those of the wild type. rmpA and magA transcription levels and capsule thickness correlated well with the mucoviscosity levels. RFP exerts anti-mucoviscous activity by binding to RpoB.

研究分野：感染症学

キーワード：高病原性肺炎桿菌 RFP rpoB

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高病原性肺炎桿菌(hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: 以下 hvKp)による感染症が臨床問題となっている。その高病原性には、菌体外多糖から成る粘性の高い莢膜が関与する。以前、リファンピシン(RFP)が最小発育阻止濃度未満の濃度で hvKp の粘性を抑制することを報告したが、この作用がどのような機序で生じるのかは明らかとなっていない。

2. 研究の目的

RFP の hvKp に対する粘性抑制作用機序の解明を目的とした。

3. 研究の方法

RFP の粘性抑制作用は、rpoB の機能抑制を介して生じるという仮説を立て、rpoB の変異による RFP への耐性化が同薬剤による粘性抑制への感受性に影響を及ぼすかを検証した。

当院で臨床分離された hvKp 株(OCU_hvKp1)を 100 µg/mL の RFP を含む Mueller Hinton II 固体培地で培養し、RFP 耐性変異株を 5 株取得した。変異箇所をゲノム解析で特定するとともに、以下の実験を行った。(1) 野生株と変異株の RFP による粘性抑制への感受性を比較・検討した。粘性はオストワルド粘度計を用いた方法(Int. J. Antimicrob. Agents, 2019, 54:167-175)により評価した。(2) RFP 耐性株の変異 rpoB を野生型 rpoB に置換し、RFP による粘性抑制への感受性が野生株と同程度に戻るかを検証した。遺伝子の置換は、遺伝子破壊用の pKNOCK-Km ベクターに sacB と rpoB 断片を挿入したベクターを用い、2 段階の相同組換えにより行った。さらに、高粘性関与遺伝子である magA と rmpA の転写量や莢膜の厚さの変化を、それぞれ定量的逆転写 PCR 法とインディアンインクを用いた顕微鏡観察により評価した。

4. 研究成果

RFP 耐性変異株 5 株のゲノム解析にて、いずれの rpoB にもアミノ酸の置換を伴う変異を認められた(表 1 参照)。他に RFP 耐性への関与が疑われるような変異は認められなかった。野生株と変異株の RFP への感受性を比較した結果、変異株は生育阻害だけでなく、粘性抑制も受けにくいことが示された。RFP 耐性株の rpoB を野生型の rpoB に置換したところ、RFP による粘性抑制への感受性が野生株と同等にまで戻ることが確認された(図 1 参照)。さらに magA と rmpA の転写量および莢膜の厚さは、粘性レベルと相関していた(図 2 参照)。

以上の結果から、RFP の粘性抑制作用は rpoB の機能抑制を介して生じるという仮説が強く裏付けられた。しかしながら、その作用機序や in vivo での効果については、まだ多くの疑問が残されている。今後、さらに詳細な反応機構を解明し、RFP のユニークで有用な活性を利用した抗菌療法を開発することが必要である。

表 1 : 全ゲノム配列決定により明らかになった RFP 耐性自然発生変異株の変異

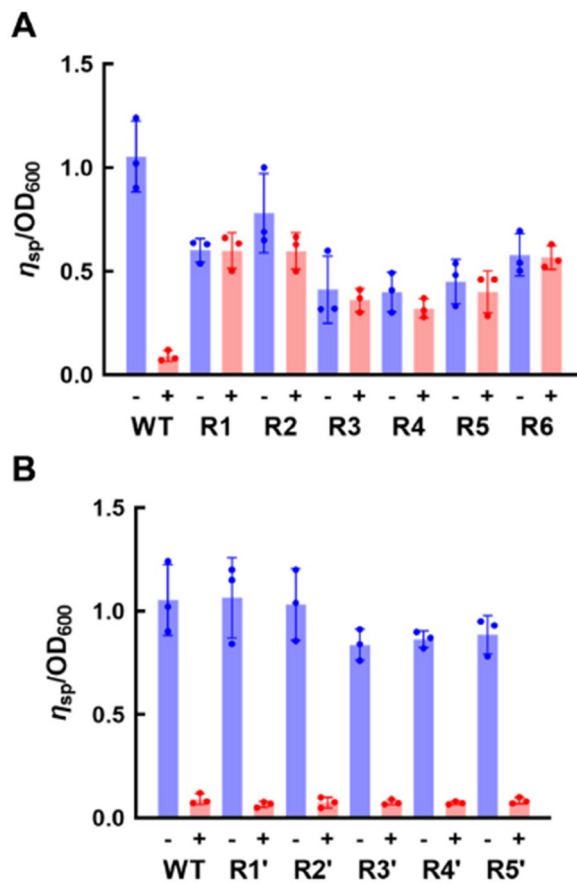
すべての変異体が *rpoB* の RFP 耐性決定領域において、非同義置換を有していることが判明した。R1、R2、R4 ゲノムには他の変異は見られなかったが、R3、R5 ゲノムには 2 つの付加的な変異を認めた。R3 と R5 は、仮想タンパク質をコードする遺伝子間領域で、繰り返し配列 (ATGGAAAT) の欠失があった。さらに R5 は分岐鎖アミノ酸輸送に関わるタンパク質である *LivM* をコードする遺伝子で同義置換を有していたが、RFP 耐性との関係は明らかでなかった。

Strain	Chromosome or plasmid	Position	Relevant gene	Nucleotide change	Amino acid change
R1	chromosome	5 171 865	<i>rpoB</i>	substitution (C→T)	H526Y
R2	chromosome	5 171 907	<i>rpoB</i>	substitution (T→C)	S512P
R3	chromosome	5 171 906	<i>rpoB</i>	substitution (C→T)	S512F
	plasmid	118 738	intergenic region	deletion (ATGGAAAT)	none
R4	chromosome	5 171 894	<i>rpoB</i>	substitution (A→G)	D516G
R5	chromosome	4 274 298	<i>livM</i>	substitution (G→T)	none
	chromosome	5 171 906	<i>rpoB</i>	substitution (C→T)	S512F
	plasmid	118 738	intergenic region	deletion (ATGGAAAT)	none

図 1 : RFP 耐性変異株 R1~6 (A) と復帰変異株 R1' ~5' (B) に対する抗粘液粘性効果の評価

A: RFP の存在下で粘性レベルが著明に低下した野生株とは異なり、耐性変異株の粘性レベルは、RFP による影響をほとんど受けなかった。このことは耐性変異株が、RFP の持つ抗粘性活性に対する耐性を獲得したことを示す。

B: 復帰変異株のいずれにおいても、野生株と同程度に RFP の持つ抗粘性活性に対する感受性を示した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tohda Mitsunori, Oinuma Ken-Ichi, Sakiyama Arata, Tsubouchi Taishi, Niki Mamiko, Namikawa Hiroki, Yamane Kenshi, Yamada Koichi, Watanabe Tetsuya, Asai Kazuhisa, Kakeya Hiroshi, Kaneko Yukihiko, Kawaguchi Tomoya	4. 巻 32
2. 論文標題 Rifampicin exerts anti-mucoviscous activity against hypervirulent Klebsiella pneumoniae via binding to the RNA polymerase subunit	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Global Antimicrobial Resistance	6. 最初と最後の頁 21~28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jgar.2022.11.018	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 東田 充功, 老沼 研一, 並川 浩己, 坪内 泰志, 山田 康一, 仁木 満美子, 渡辺 徹也, 浅井 一久, 掛屋 弘, 川口 知哉, 金子 幸弘
2. 発表標題 リファンピシンの高病原性肺炎桿菌に対する粘性抑制作用機序の解明
3. 学会等名 第64回 日本感染症学会中日本地方会
4. 発表年 2021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
研究協力者	東田 充功 (Tohda Mitsunori)	大阪公立大学・呼吸器内科学・大学院生 (24405)	
研究協力者	老沼 研一 (Oinuma Ken-Ichi)	大阪公立大学・細菌学・講師 (24405)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	榮山 新 (Sakiyama Arata)	大阪公立大学・細菌学・大学院生 (24405)	
研究協力者	坪内 泰志 (Tsubouchi Taishi)	大阪公立大学・細菌学・准教授 (24405)	
研究協力者	金子 幸弘 (Kaneko Yukihiro)	大阪公立大学・細菌学・教授 (24405)	

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