

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17938

研究課題名（和文）Plasma-BF形成能がMRSA血流感染症に与える影響に関する検討

研究課題名（英文）Influence of Plasma-BF formation on MRSA bloodstream infection

研究代表者

山口 哲央（YAMAGUCHI, Tetsuo）

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：10408239

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）：MRSAによる血流感染症は時に難治性感染症となるが、その病態には、MRSAが作り出すbiofilm(BF)が影響していると考えられている。血漿を添加した培地を用いてMRSAを培養すると、通常の培地の場合と比べ、BFは厚みを増し、起伏に富んだ構造(plasma-BF)を呈する。本研究ではMRSAが形成するplasma-BFの構造・機能解析を行い、保有する接着因子・病原因子との相関を比較検討した。SCCmec typeIIと比べ、typeIVの方がplasma-BF形成能が高く、arcA、cna、もしくはfnbBを保有している株がよりplasma-BF形成能が高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MRSAによる血流感染症は治療抵抗性を示し難治化することも少なくない重篤な疾患である。特に近年では健康人に感染し病原性が高いと考えられている市中感染型MRSA（CA-MRSA）による血流感染症が増加しており、新たな対策が必要になってきている。本研究により、血流内におけるMRSAの動向が明らかとなり、血管内におけるMRSA-biofilm形成に関わる因子が明らかになりつつある。さらに研究を進めることで、MRSA血流感染症における新たな治療戦略の創出につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Bloodstream infections caused by MRSA are sometimes intractable, and the biofilm (BF) produced by MRSA is thought to play a role in the pathogenesis of these infections. When MRSA is cultured on medium supplemented with plasma, the BF becomes thicker and more rugged (plasma-BF) than in the case of normal medium. In this study, we analyzed the structure and function of plasma-BFs formed by MRSA, and compared the correlation with the adhesion and virulence factors possessed by MRSA. The strains harboring arcA, cna, or fnbB were more capable of forming plasma-BFs

研究分野：感染症

キーワード：MRSA CA-MRSA biofilm plasma-biofilm bloodstream infection

## 1. 研究開始当初の背景

### 本市中感染型 MRSA (CA-MRSA) による血流感染症

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) は、医療関連感染症の起病因菌として最も遭遇する機会の多い耐性菌の一つであるが、近年、健常人に感染症を引き起こす市中感染型 MRSA (community-associated MRSA: CA-MRSA) の広がりが世界各地で問題となっている。特に米国では強毒株が蔓延しており最も注意すべき耐性菌の一つとなっている (Deleo FR et al. Lancet. 2010)。CA-MRSA は主に皮膚・軟部組織感染症を引き起こすが、健常人に敗血症や髄膜炎、壊死性肺炎などの重症感染症を引き起こすことがある。従来、院内感染型 MRSA (hospital-associated MRSA: HA-MRSA) と比べ、病原性が高いと考えられ、遺伝子タイプにおいても全く異なることが分かってきている。我々は全国サーベイランスにより CA-MRSA 遺伝子タイプ (SCCmec typeIV) の MRSA が市中で広がってきていることを明らかにしている (Yamaguchi T et al. Microb. Drug Resist. 2015)。CA-MRSA は病院内にも侵入してきており、入院患者において特に血液培養から分離される CA-MRSA (SCCmec typeIV) が急増していることが分かってきた。MRSA による血流感染症は治療抵抗性を示し難治化することも少なくない重篤な疾患であり、CA-MRSA の増加は憂慮すべき重大な問題であるが、その理由はまだ明らかとなっていない。

### MRSA plasma-biofilm

MRSA による血流感染症の成立には様々な毒素産生とともに菌にとっては過酷な環境である血液中で身を守る biofilm (BF) の役割が大きいと考えられている。特に MRSA はフィブリノゲンを凝集させるコアグララーゼなどの血漿凝集素を産生するが、血漿中では凝固系蛋白を利用することで強固な BF を形成することが分かってきている。我々は、これまでに血漿を添加した培地を用いることで (*S. aureus*-plasma method: SAP method) 血管内における BF を再現することに成功している。血漿の存在により MRSA-BF は厚みを増し、起伏に富んだ剥がれやすい構造 (plasma-BF) を呈することが分かってきた (Sato A, Yamaguchi T et al. Microb. Drug Resist. 2019)。また、plasma-BF の形成能は菌株間で大きく異なっており、CA-MRSA 遺伝子タイプのクローン (SCCmec typeIV) は HA-MRSA 遺伝子タイプのクローン (SCCmec typeII) と比較し、plasma-BF の形成速度が早く、形成量が多いことを我々は明らかにしている。以上より、この plasma-BF 形成能の高さが血流感染症における CA-MRSA の病原性に影響している可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、SCCmec typeIV と typeII MRSA の plasma-BF 形成能と特徴を比較することで、これまでに明らかにされていない plasma-BF 形成の促進因子を推測する。候補因子に関しては遺伝子 knock out 株を作成後、plasma-BF 形成への影響を確認する。CA-MRSA による血流感染症の重症化メカニズムを解明し、最終的には plasma-BF 形成を阻害する治療ターゲットの特定を目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1) 対象株の全ゲノム解析による遺伝子比較

東邦大学医療センター大森病院・微生物検査室において 2015~2017 年の間に血液培養から分離された MRSA 株を対象に次世代シーケンサー (MiSeq: illumina 社) を用いて全ゲノム解析を行う。Multilocus Sequence Typing (MLST)、SCCmec typing、spa typing を始めとした各種タイピング、および病原因子遺伝子、接着因子の保有状況を調べる。Agr や Rna 等の遺伝子調節因子の変異も確認する。

### 2) Plasma-BF 形成能の評価

< Plasma-BF 作成法 : 下記方法を用いて Plasma-BF を作成し比較する >

\* *S. aureus*-plasma method: SAP method

96 穴のマイクロタイタープレートもしくはガラスディッシュを用いて、MRSA-BF を作成する。培地は TSB 培地にウサギ血漿を添加し使用する。血漿濃度は培地自体の凝集を避けるため 0.78% とする。観察は 6 時間後とし、途中 1 時間毎に培地を交換する (血漿含有)。培養後、クリスタルバイオレット染色法による BF 産生量の評価、もしくは COCRM 法による BF 構造の評価を行う。

\* フローセルモデル

フローセルに菌を接種・定着後、培地を 0.2ml/min で流しながら BF を作成する。血漿濃度は 0.39% とし、血漿の有無による BF 形成量の違いを観察する。COCRM 法を用いて plasma-BF の構造を観察する。

### 3) 遺伝子 knock out 株を用いた plasma-BF への影響

pKOR1 プラスミドを用いて候補因子の遺伝子 KO 株を作成する。対象としては血漿凝集素であるコアグララーゼ、クランピングファクターの他、接着因子として知られるコラーゲン付着因子 (CNA)、arginine catabolic mobile element (ACME) が含まれる。また、それまでの実験で新しく検出された plasma-BF 形成促進因子についても検討する。遺伝子 KO 株との比較により plasma-BF 形成への影響を明らかにする。

#### 4. 研究成果

##### 1) 遺伝子解析

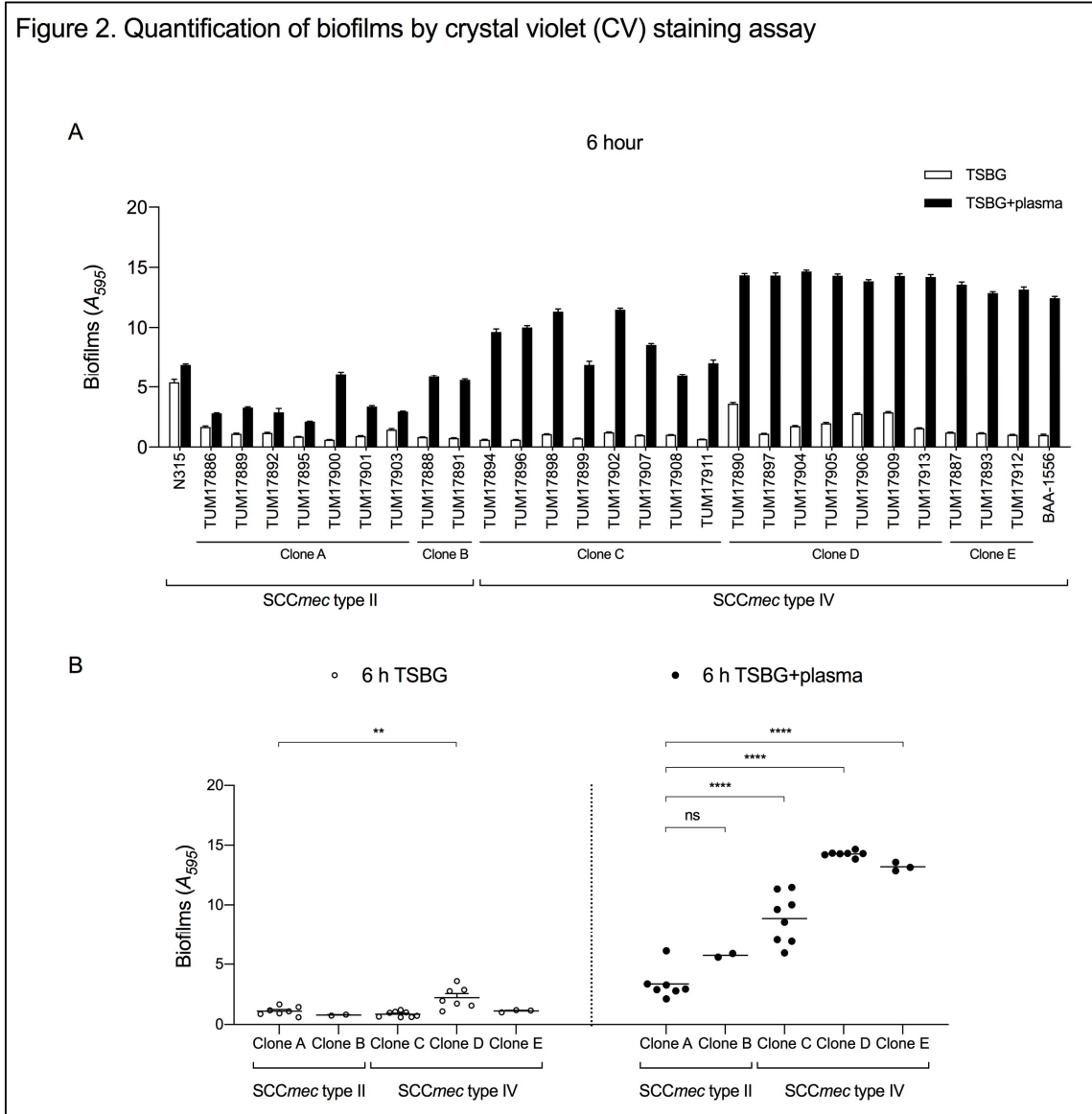
当施設において2015～2017年の間に血液培養から分離されたMRSA88株を対象にゲノム解析を行った。MLSTでは3つのclonal complex(CC1, CC5, およびCC8)に分けられ、SCC*mec* typingと病原因子・接着因子遺伝子の保有状況から、計5つのクローンに分けられた。キーとなる遺伝子としては*arcA* (ACME 遺伝子)、*cna*、*fnbB*の3つが挙げられた。Clone AはST5/SCC*mec* IIに分類され、HA-MRSAの代表的なクローンである、N315と同じ遺伝子学的特徴を持つ。Clone BはCC5であり、N315と同系列であるが、ST764であり、接着因子と考えられている*arcA*を保持する。Clone CはST8/SCC*mec* IVに分類され、日本におけるCA-MRSAの代表的クローンである、CA-MRSA/Jと同じ遺伝子学的特徴を持つ。Clone DはST1/SCC*mec* IVに分類され、日本の医療関連施設内で近年分離が増えているクローンである。Clone EはST8/SCC*mec* type IVに分類され、*arcA*を保持するCA-MRSAの代表的なクローンである、USA300と同じ遺伝子学的特徴を持つ。3つのCCの分布が均等であった2016年分離27株を用いてplasma-BFの検討を進めた。菌株の特徴は表1の通り。

表 1. Genomic characteristics of MRSA isolated from blood stream infections in 2016

No. of strains	Clone type	MLST	SCC <i>mec</i> type	Adherence gene					Virulence gene	
				<i>arcA</i>	<i>cna</i>	<i>fnbB</i>	<i>fnbA, fib, clfA, clfB, eno, and ebpS</i>	<i>bbp</i>	<i>lukSF-PV</i>	<i>tst</i>
Ref.	N315	ST5		-	-	-	+	-	-	+
7	A	ST5	II	-	-	-	+	-	-	+/-
2	B	ST764		+	-	-	+	-	-	-
-----										
8	C	ST8		-	-	+	+	-	-	+/-
7	D	ST1	IV	-	+	-	+	-	-	-
3	E	ST8		+	-	+	+	-	+	-
Ref.	BAA-1556	ST8		+	-	+	+	-	+	-

2) Biofilm 形成能の評価：

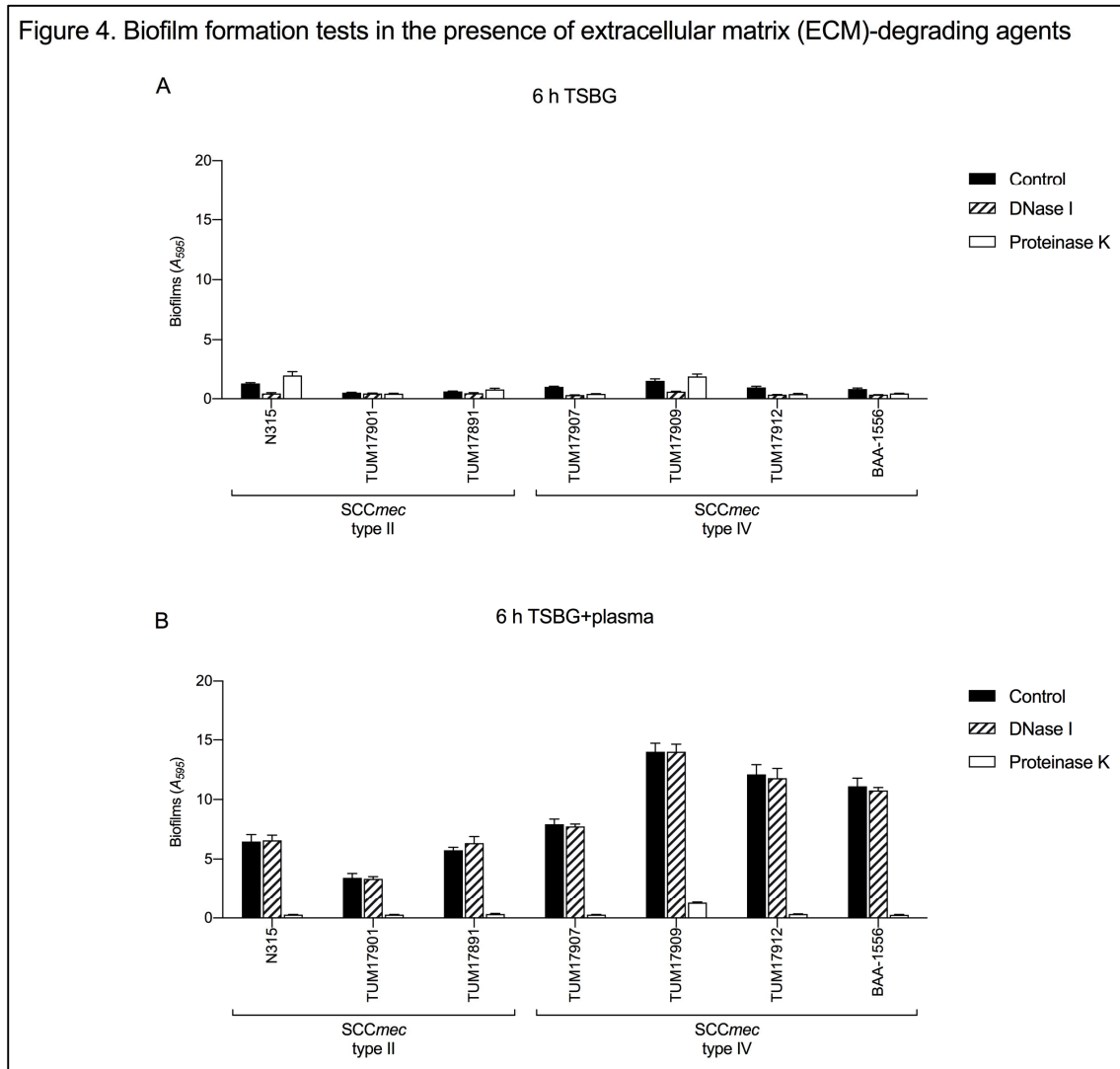
通常培地にて形成された biofilm と比べ、plasma 含有培地では、biofilm 形成量が大幅に増加し、SCC*mec* type IV の方が plasma-BF 形成能が高かった。さらに、接着因子の保有状況により plasma-BF 形成能に差が確認された。すなわち、*arcA*、*cna*、もしくは *fnbB* を保有している株がより plasma-BF 形成能が高かった。



(Hamada M, Yamaguchi T, et al. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2021)より転載.

また、plasma 非含有培地で形成された biofilm は DNase にて形成が大きく阻害されたのに対し、plasma-BF は proteinase A にて形成が大きく阻害された( figure 4. )。これは通常の biofilm 構成成分の主体が DNA であるのに対し、plasma-BF 構成成分の主体がタンパクであることを示している。plasma-BF が血漿中の凝固系タンパク質を利用して強固な biofilm を形成していることが示唆された。

Figure 4. Biofilm formation tests in the presence of extracellular matrix (ECM)-degrading agents



(Hamada M, Yamaguchi T, et al. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2021)より転載.

### 3) 遺伝子 knock out 株を用いた plasma-BF への影響 :

pKOR1 プラスミドを用いて、コラーゲン付着因子遺伝子 (*cna*)、ACME 遺伝子 (*arcA*) KO 株の作成を試みた。うち、*cna*-KO 株の作成に成功したが、研究期間中に全ての KO 株の作成と評価は困難であった。

以上、本研究では、菌血症由来 MRSA の遺伝子学的解析および biofilm 形成能の評価により、SCCmec type の違いおよび、ACME やコラーゲン付着因子の有無が plasma-BF 形成能に影響する可能性が示唆された。Plasma-BF は、時に重症化する CA-MRSA 菌血症の病態を反映している可能性がある。今回明らかとなった、plasma-BF 形成を促進する因子は MRSA 菌血症における新規治療戦略のターゲット候補と考えられる。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hamada Masakaze, Yamaguchi Tetsuo, Sato Ayami, Ono Daisuke, Aoki Kotaro, Kajiwara Chiaki, Kimura Soichiro, Maeda Tadashi, Sasaki Masakazu, Murakami Hinako, Ishii Yoshikazu, Tateda Kazuhiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Increased Incidence and Plasma-Biofilm Formation Ability of SCCmec Type IV Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Isolated From Patients With Bacteremia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2021.602833	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0件

〔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
---------	---------