

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590256

研究課題名（和文）生体防御機構を基盤とした腸管出血性大腸菌 O157 感染症の予防・治療法の開発

研究課題名（英文）Development of prevention and treatment methods for infection by enterohemorrhagic Escherichia coli O157 based on bio-protective mechanisms

研究代表者

小林英幸（KOBAYSHI HIDEYUKI）

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：40148953

研究成果の概要（和文）：

BCG にペロ毒素の B-サブユニット遺伝子を組み込んだに対するワクチンを作成した。このワクチンをマウスに投与しておく、腸管出血性大腸菌の経口感染による致死率が減少したことにより、このワクチンの有用性が確認された。

一方、培養ヒト脳血管内皮細胞にペロ毒素を添加すると、多種の生理活性ペプチドの発現が変化した。サイトカインの発現が大きく上昇し、ペロ毒素により脳血管内皮細胞と白血球との相互作用が変化することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We have developed a novel vaccine using a recombinant BCG expressing the verotoxin B-subunit. The immunized mice with this vaccine survived longer than the nonvaccinated mice, confirming the validity of this vaccine.

On the other hand, the expression of various bioactive peptides in the brain microvascular endothelial cells was changed by verotoxin. The expression of cytokines was increased suggesting that the interaction between brain microvascular endothelial cells and the leukocytes was changed by verotoxin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：腸管出血性大腸菌、ペロ毒素、感染症、ワクチン、BCG、遺伝子組み換え、生理活性ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

O157 感染症の典型的臨床像は出血性大腸炎であるが、急性脳症や溶血性尿毒症症候群へと重症化すると、死亡率が非常に高まる危

険な感染症である。現在、O157 感染症に対する確立された治療法はない。O157 によって急性脳症に移行すると、回復困難となり、抗生物質は無効であり、多くは死亡する。

○157 感染症に対する治療法として、体内のベロ毒素を吸着する方法が考えられ、ベロ毒素結合物質や抗ベロ毒素抗体が開発されているが、これらはベロ毒素を完全に吸着して無毒化することは出来ない。

よって、○157 感染症を予防するためには、能動免疫でベロ毒素に対して長期間抗体を作るワクチンが必要であり、ベロ毒素が体内に侵入した後でも効果のある新たな治療法は、ベロ毒素による生体の防御性機構と障害性機構を利用することが有効であるという着想に至った。

## 2. 研究の目的

ベロ毒素 B-サブユニットに対するワクチンを作成して、その効果を明らかにする。

また、○157 感染によって生じる急性脳症の治療薬を開発するため、ベロ毒素によって脳微小血管内皮細胞で発現が変化する細胞生存性に働く生理活性ペプチドと、細胞障害性に働く生理活性ペプチドを網羅的に検索し、それらの効果を判定する。さらに、ベロ毒素とペプチドによる細胞内情報伝達機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1)

① *Bacillus Camette-Guérin* (BCG) にベロ毒素の B-サブユニット遺伝子を組み込んだに対するワクチンを作成し、その *in vivo* での有効性を明らかにする。

② この BCG ワクチンの実用化を目指し BCG の宿主 - ベクター系の改良を行う。

### (2)

ベロ毒素によって脳微小血管内皮細胞で発現が上昇し細胞防御性に働く生理活性ペプチドと、細胞障害性に働く生理活性ペプチドを網羅的に検索することにより、同定し、これらの生理作用を細胞生物学的に明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1)

① ベロ毒素 2 型 (Stx2) のレセプター結合部位である Stx2B サブユニットの遺伝子を *Mycobacterium bovis* BCG ワクチン株に発現させ、これをワクチンとして用いることにより生体内で Stx2B サブユニットに対する血中 IgG、および腸管の分泌型 IgA を産生させようとした。BCG 株での発現ベクターとして、*Mycobacterium kansasii* の

α 抗原遺伝子を有するベクターを用い、Stx2B サブユニット遺伝子をベクターに組み込み、組み換えプラスミドを構築した。組み換えプラスミドを BCG に導入して形質転換し、イムノブロットによりこの組み換え BCG が α 抗原との融合タンパク質として Stx2B を発現することを確認した。この Stx2B 発現 BCG をマウスに免疫すると、2 回目の追加免疫から 2 週間後に血中の抗 Stx2B-IgG レベルが上昇し、4 週間後に糞便中の抗 Stx2B-IgA レベルが上昇した。対照マウスは、強力な致死活性を有する Stx2d を産生する大腸菌 091 : H21 B2F1 株の感染により、すべて死亡したが、組み換え BCG を免疫されたマウスは、半数以上が生存した。また、このワクチンの有効性は、消化管における IgA レベル上昇作用によるところが大きいと考えられた。これらの結果から、Stx2B 発現 BCG の有効性がマウスモデルで確認された。

### ②

#### ・ BCG 宿主 - ベクター系の構築

pAL5000 複製起点を含む 3 kb 断片とカナマイシン耐性遺伝子カセットを持つ大きさ 6.3 kb の pUC19 由来プラスミドを作製した。このプラスミド出発点として縮小化を図った。そして BCG において複製できる最小プラスミドとして 5.5 kb のプラスミドを得た。このプラスミドのカナマイシン耐性遺伝子とチミジル酸合成酵素遺伝子を入れ替えたプラスミド pNN を作製した。

次に BCG Tokyo 株のゲノムからチミジル酸合成遺伝子を含む領域 5 kb を PCR 法により増幅し、pBlueScriptII (-) にクローニングした。このプラスミド中のチミジル酸合成遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子とスクロース感受性遺伝子を入れ替え、組換え用プラスミドとした。これを環状の状態に BCG に導入し、相同組換えによりチミジル酸合成遺伝子領域にプラスミド全長が挿入されたカナマイシン耐性株を得た。この株を継代し、再度の相同組換えによりスクロース感受性からスクロース耐性に変化した株を選択した。そして PCR 法及びサザンハイブリッド法によりゲノムからチミジル酸合成遺伝子が欠失していることを確認し、thyX(-) 株とした。成分の異なる数種の培地を用いて thyX(-) 株の増殖を検討したところ、thyX(-) 株は特定の培地で増殖しないことが確認された。

thyX(-) 株を pNN で形質転換したところ、種々の培地において BCG Tokyo 株と同じ増殖を示したことから、thyX(-) 株 - pNN は新たな宿主 - ベクターシステムとして利用できる可能性が示された。pNN にベロ毒素遺伝子を挿入した株の作製を進めている。

・BCG ワクチンの多様性

現行のBCGのロット中に含まれる菌全体における遺伝学的多様性を、塩基配列を解読することにより検討したところ、集団としての大きな変異としてゲノム上に7か所の点変異が存在することが明らかとなった。このうち6か所はタンパク質をコードしている遺伝子中に存在し、さらにその中の1つはアミノ酸に変異を及ぼすものであった。培地成分がサブタイプのポピュレーションの変化に影響を与えるかについて検討したところ、特定の成分が大きく影響している可能性が示された。

(2)

培養ヒト脳血管内皮細胞にベロ毒素を添加し、発現変化する遺伝子をマイクロアレイで経時的に測定した。その結果、ベロ毒素によって、多種の生理活性ペプチドの発現が変化することが判明した。インターロイキン(IL) 6等のサイトカイン、その中でもCXCモチーフを持つケモカインの発現が大きく上昇し、ベロ毒素により脳血管内皮細胞と白血球のオートクリン・パラクリンに働く相互作用が変化することが示唆された。シグナル解析で、IL6経路が活性化されていることが判明した。一方、転写因子ATFファミリーやfos等の初期応答遺伝子の発現もベロ毒素によって上昇することが明らかとなった。

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 7 件)

1. Amran M. Y., Fujii J., Suzuki S. O., Kolling G. L., Villanueva A. M., Kainuma M., Kobayashi H., Kameyama H. and Yoshida S.: Investigation of Encephalopathy Caused by Shiga Toxin 2c-Producing *Escherichia coli* Infection in Mice. **PLoS One** 8, e58959, 2013. 査読あり  
10.1371/journal.pone.0058959

2. Osada-Oka M, Tateishi Y, Hirayama Y, Ozeki Y, Niki M, Kitada S, Maekura R, Tsujimura K, Koide Y, Ohara N., Yamamoto T, Kobayashi K, Matsumoto S.: Antigen 85A and mycobacterial DNA-binding protein 1 are targets of immunoglobulin G in individuals with past tuberculosis. **Microbiol. Immunol.** 57, 30-37, 2013. 査

読あり 10.1111/j.1348-0421

3. Fujii J., Naito M., Yutsudo T., Heatherly D., Yamada T., Kobayashi H., Yoshida S. and Obrig T.: Protection by recombinant Bacillus Calmette-Guérin vaccine expression Shiga toxin 2B subunit against Shiga toxin producing *Escherichia coli* in mice. **Clin. Vac. Immunol.** 19, 1932-1937, 2012. 査読あり 10.1128/CVI.00473-12

4. Ohara N.: Current progress in tuberculosis and recombinant BCG vaccines. **J. Oral. Biosci.** 54, 92-95, 2012. 査読あり  
<http://www.journaloforalbiosciences.org/>

5. Naka T., Maeda S., Niki M., Ohara N., Yamamoto S., Yano I., Maeyama J., Ogura H., Kobayashi K., Fujiwara N.: Lipid phenotype of two distinct subpopulations of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin Tokyo 172 substrain. **J. Biol. Chem.** 286, 44153-44161, 2011. 査読あり

6. Yahagi, A., Umemura, M., Tamura, T., Kariyone, A., Begum, M.D., Kawakami, K., Okamoto, Y., Hamada, S., Oshiro, K., Kohama, H., Arakawa, T., Ohara, N., Takatsu, K., Matsuzaki, G.: Suppressed induction of mycobacterial antigen-specific Th1-type CD4+ T cells in the lung after pulmonary mycobacterial infection. **Int. Immunol.**, 22, 307-318, 2010. 査読あり 10.1093/intimm/dxq010

7. 小林英幸, 森井宏幸: アグリニン (キラーワード解説). **日薬理誌** 135, 215-216, 2010. 査読あり <http://www.pharmacol.or.jp/>

[学会発表] (計 33 件)

1. Fujii J., Mizoue T., Nakada Y., Ugajin S., Naya Y., Nakamura T., Saitoh K., Maruyama Y., Tada Y., Okabe N. and Yoshida S.: Risk factors for hemolytic uremic syndrome caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in Japan. 8<sup>th</sup> International Symposium on Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infection. 2012年5月06日-9日 RAI Forum Complex, Amsterdam, The Netherlands

2. Amran MY, Fujii J, Yoshida S: Effectiveness azithromycin and/or Chinese medicine in the early and late stage of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*-infected mouse models. 8<sup>th</sup> International Symposium on Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infection, 2012年5月06日-9日 RAI Forum Complex, Amsterdam, The Netherlands

3. 佐藤法仁, 阿戸学, 黒田誠, 山崎利雄, 松村隆之, 関塚剛史, 中山真彰, 井上哲圭, 本田尚子, 土田耕三, 小林和夫, 大原直也. 結核菌/BCGのストレプトマイシン耐性・依存性に関する新たな知見. 第82回実験結核研究会 2012年05月09日、広島国際会議場、広島

4. 岡部真裕子, 大原直也, 藤原永年, 中崇, 阿戸学, 小林和夫. 抗酸菌のsliding motilityと非食細胞への取り込みの関連性. 第82回実験結核研究会 2012年05月09日、広島国際会議場、広島

5. 佐藤法仁, 山崎利雄, 小林和夫, 大原直也. ストレプトマイシン依存性結核菌18bの依存性に関与する遺伝子変異の解明と新たなストレプトマイシン耐性を誘導する変異の発見. 第87回日本結核病学会総会 2012年05月10日-11日、広島国際会議場、広島

6. 藤原永年, 中崇, 前田伸司, 柴田満, 仁木満美子, 大原直也, 前山順一, 矢野郁也, 山本三郎. BCG Tokyo type I, II株の形態及び脂質分子の分布と機能. 第87回日本結核病学会総会 2012年05月10日-11日、広島国際会議場、広島

7. 花村菜月, 堀田康弘, 小川賢二, 八木哲也, 西森敬, 大原直也, 藤原永年, 前田伸司, 山崎利雄, 伊藤佐生智, 瀧井猛将. Mycobacterium avium亜種(avium・hominissuis)間での酸性環境下における菌体外pH上昇に関与するアンモニア産生経路の研究. 第87回日本結核病学会総会 2012年05月10日-11日、広島国際会議場、広島

8. Naka, T., Maeda S., Niki M., Ohara N., Yamamoto S., Yano I., Maeyama J., Ogura H., Kobayashi K., Shibata M., and Fujiwara N. Lipid Phenotypes of Two Distinct

Subpopulations of Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin Tokyo 172 Substrain and their Host Responses. American Society for Microbiology 112th General Meeting, 2012年06月16日-19日, Moscone Center, San Francisco, U.S.A.

9. Fujii J, Amran MY, Yoshida S: Investigation of acute encephalopathy caused by Shiga toxin 2c-producing enterohemorrhagic *E. coli* O157 in mice. U.S.-Japan cooperative medical science program, 2012年12月12日-14日 Chiba University, Chiba Japan

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林英幸 (KOBAYASHI HIDEYUKI)  
産業医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 40148953

### (2) 研究分担者

森井宏幸 (MORII HIROYUKI)  
産業医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 60141743

藤井潤 (FUJII JUN)  
鳥取大学・医学部・教授  
研究者番号: 60271441

大原直也  
岡山大学・医歯薬総合研究科・教授  
研究者番号: 70223930

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: