

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791029

研究課題名(和文)黄色ブドウ球菌感染症をコントロールする緊縮制御ネットワークの総括的解明

研究課題名(英文) Investigation of infection of Staphylococcus aureus controlled by network for stringent regulation

研究代表者

片山 由紀 (Katayama, Yuki)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：60365591

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)：難治MRSA感染症が再燃する原因には、増殖の遅い新規表現型のVISA が関与していたことを世界で初めて見だし“slow-VISA”と名付け新しい概念を確立した。Slow-VISA は1)増殖が遅く、2)VISA よりVancomycinの耐性度が高く、3)その耐性度が不安定であった。さらにSNPs解析でその耐性化機構を検討した結果slow-VISA で見いだされた変異は、緊縮応答関連の遺伝子やrpoB、「プリン・ピリミジン合成経路 解糖系 細胞合成系」の pathwayに関与する遺伝子上に見いだされた。緊縮応答に関係するrpoB 遺伝子が、MRSA感染症の再燃に関与していることは示唆された。

研究成果の概要(英文)：The Vancomycin(VCM)-intermediate Staphylococcus aureus (VISA) strains generally grow slowly, and form colonies on VCM-containing agar-plates after 48 h of incubation in population analysis. However, we have found a curious group of VISA strains whose colonies appear only after 72 h incubation. We designated them ‘slow-VISA’ (sVISA). As compared to extant VISA strains, sVISA strains had prolonged doubling-times and unstable resistance and growth phenotype. Whole genome sequencing of a representative sVISA strain Mu3-6R-P, which was obtained from hVISA strain Mu3 by selection with 6 mg/L of VCM, revealed a single mutation (R512P), in the rpoB gene encoding beta subunit of RNA polymerase (RNAP), as the responsible mutation for the sVISA phenotype. The sVISA strain had VCM MIC of 16 mg/L. However, after two days of drug-free passage, it generated large colonies, which showed hVISA phenotype carrying mutations (R512L)

研究分野：感染症 微生物

キーワード：MRSA バンコマイシン耐性 黄色ブドウ球菌 院内感染症 slow-VISA VISA

1. 研究開始当初の背景

世界で初めて黄色ブドウ球菌感染症の「薬剤耐性と病原性をコントロールする緊縮制御ネットワークの全貌」を分子レベルで解明する。細菌には潜在的に機能を発現するシステム“緊縮応答”があるが、その機能は未だ分からない。しかし今年、申請者らは、この緊縮応答が黄色ブドウ球菌の薬剤耐性化に関与していた事を初めて見出した。また、この緊縮応答は病原性にも重要な役割を担っていると報告されたが、まだその経路がはっきりしていない。そこで、この緊縮応答を含む緊縮制御ネットワーク機構を明らかにすれば、黄色ブドウ球菌の化学療法と感染制御に新しい概念が生

「問題」 黄色ブドウ球菌感染症の難治化 / 薬剤耐性化と強毒病原性

成果1:世界で初めて、黄色ブドウ球菌3株(親株、耐性株、強毒株)の全ゲノムを決定→比較ゲノム解析とマイクロアレイを駆使した結果、種々の薬剤耐性化や感染宿主の免疫を攪乱する遺伝子(群)を見いだした。更にこれら遺伝子(群)の同質遺伝的変異株を作成し、薬剤耐性・病原性に関する調節遺伝子ネットワークを見いだした。(Baba 2002, Kuroda2001, Kuroda 2003)

「原因」 既知の薬剤耐性 / 病原遺伝子他に、遺伝子発現ネットワークが関与していることを突き止めた。

「解決」 黄色ブドウ球菌のネットワークの全貌を明らかにし、新規の薬剤耐性化 / 病原性機構を解明する。

解決1: グローバル調節遺伝子の解明

成果2: グローバル調節遺伝子 *vraSR* が、βラクタム剤耐性化に関与していた(Kuroda 2003)。
成果3: その変異遺伝子 *vraS**, *graR** が、βラクタム剤のうえにバンコマイシン耐性化にも関与していた(感受性株に変異を導入して証明)。臨床由来の耐性株からも変異が検出された(Katayama2009, Neo2008, Cui2009)。

成果4: 3段階あるバンコマイシンの耐性機序を解明。VSSA(バンコマイシン感受性菌)に、*m srR*, *vraS*, *graR*, *ppoB*, *sa2102* 遺伝子の変異を導入して、段階的な耐性機序を証明した。世界初。(世界微生物学会発表ICAAC 2014, katayama論文作成中)

まれ、将来必ず感染治療学に貢献できるので申請した。

本研究の起点

成果5: *ppoB* 遺伝子の変異が、バンコマイシン(Matsuo 2011, Watanabe2011)以外にβラクタム剤高度耐性化(oxacillin MIC=6→256変化)にも関与していた(同質遺伝的変異株により証明, *Ajba* 論文作成中)。*ppoB*の変異は rifampicin 耐性株で報告されているが、その他薬剤では世界初。

解決2: 緊縮制御ネットワークの解明(本研究)

本研究までの成果

成果6: *ppoB* (RNA polymerase β-subunitをコード)の変異により、緊縮制御ネットワーク関連遺伝子の転写活性が変化していた(Microarrayによる)。特に *ppGpp*(グアノシン四リン酸)合成関連の遺伝子に変化が見られた。

成果7: *ppoB* 変異により、緊縮制御ネットワークを担う *ppGpp* の量が変化していた。

本研究の申請

本研究: 緊縮応答の遺伝子発現メディエータ *ppGpp* による病原性と薬剤耐性化、代謝活性変化を解明。

解明すれば: 世界で初めて黄色ブドウ球菌のネットワーク全貌が見いだされ、その感染症治療に応用出来る。例) 黄色ブドウ球菌の生存、病原性・薬剤耐性発現に negative な干渉をひきおこす薬物を探索し、緊縮応答を制御する薬剤(デコイニン等)による新しい化学療法に期待ができる。既存の薬剤が懸る。

2. 研究の目的

『目的: 新規抗生剤を開発しても、必ず薬剤耐性菌の問題が生じる「いたちごっこ」の世界を変えたい。』そのために、世界で初めて難治性感染症である感染症の「生体内における薬剤耐性と病原性をコントロールする緊縮制御ネットワークの全貌」を分子レベルで解明し、難治感染症 MRSA の再燃と耐性菌出現の新規メカニズムを解明し、新しい予防法、診断、治療の開発を行う。さらに「緊縮制御ネットワーク」の全貌がわかれば、それに関連した昔の既存の薬(デコイニン等)を復活させ、創薬基盤の研究につなげる。実際に申請者が属する研究室では、昔の抗生剤を甦らせた経験があり「Reverse Antibiotics 現象」(Hiramatsu et al, Int.J. Antimicrob. Agents 2012)を報告しているので、とりかかることができる。

RNA ポリメラーゼβサブユニットをコードする *rpoB* 遺伝子は、緊縮制御ネットワークの関連遺伝子である。細菌は栄養飢餓でアミノ酸が欠乏すると、タンパク合成が停止し、ppGpp を合成する。そしてこの合成されたppGpp が RNA ポリメラーゼβサブユニットやそのプロモーター領域に結合すると、遺伝子における転写活性が質と量の両面で変化し、その結果、病原性、薬剤耐性化および代謝経路の変化が生じることがわかりつつある。

申請者らは、黄色ブドウ球菌のさまざまな *rpoB* 遺伝子の変異株を用いて薬剤耐性化を検討したところ、*rpoB* 遺伝子の変異により、菌の表現型が変わり、増殖速度の低下、自己融解酵素の活性化、薬剤耐性化が認められた。増殖速度の低下から small colony を形成することから、slow-VISA と命名した。また、抗生物質βラクタム剤、バンコマイシン、リネゾリド、ダプトマイシンの耐性化も見られ、それと相関して細胞壁の肥厚、自己融解酵素の活性化が見られたので、これらの代謝に関わるメカニズムに参与している事が示唆された。

3. 研究の方法

1) 薬剤耐性：MIC測定による薬剤感受性プロファイリング、薬剤耐性化に伴う細胞壁肥厚の電子顕微鏡観察、自己融解酵素活性の測定。

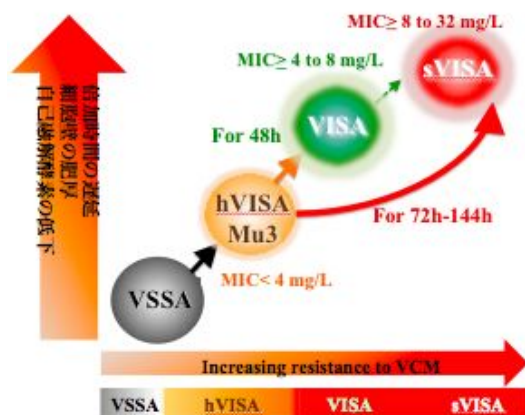
2) Small Colony slow-VISA の検討。増殖速度や、表現型の安定性を測る。

3) マイクロアレイ解析による転写プロファイル作成、全ゲノム塩基配列の決定とSNP 解析。

3. 研究成果

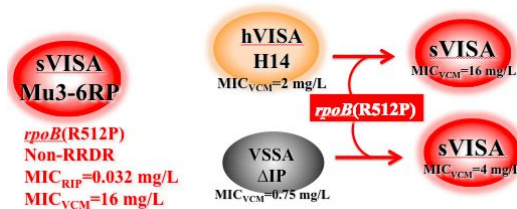
rpoB の変異により、抗生物質βラクタム剤、バンコマイシン、リネゾリド、ダプトマイシンの耐性化も見られ、それと相関して細胞壁の肥厚、自己融解酵素の活性化が見られたので、これらの代謝に関わるメカニズムに参与している事が示唆された。もともと *rpoB* は

リファンピシン耐性に関与していることのみが報告されていたため、今回、新しい事象を見出した。

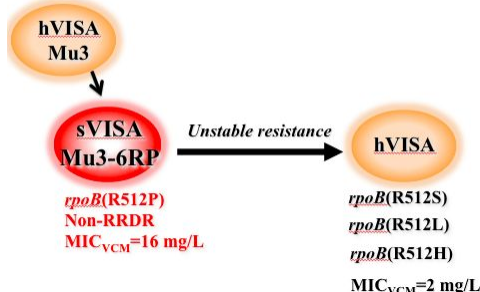


上図：MRSAにおけるバンコマイシン耐性化の機序。VISAのバンコマイシン耐性化機構の詳細はまだわかっていない。バンコマイシン耐性化メカニズムの解析について世界で100報以上に及ぶ論文が公表されており、現段階では、特定の耐性遺伝子は報告されておらず、細胞壁合成や自己融解酵素に関与するさまざまな調節遺伝子や遺伝子が複雑に関与している事が報告されている(Gardete et al, The Journal of clinical investigation 2014, Hiramatsu et al, Journal of Global Antimicrobial resistance 2014 など)。その現状のなか、私はVSSA(バンコマイシン感受性黄色ブドウ球菌)からバンコマイシン耐

4) A representative sVISA strain Mu3-6R-P had a single mutation, *rpoB*(R512P), in the *rpoB* gene encoding beta-subunit of RNA polymerase (RNAP), as the responsible mutation for the sVISA phenotype.

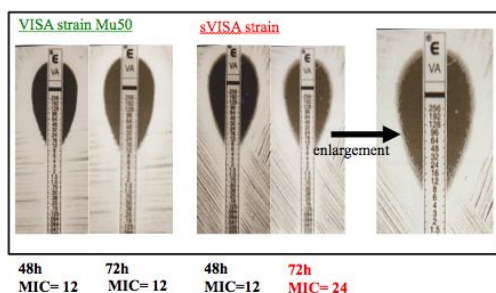


4) Revertant hVISA from strain slow-VISA showed a single amino-acid substitution only in *rpoB*(R512S or R512L or R512H).



性獲得するまでには、3つのステップがあり、今回、世界で初めて、slow-VISA (sVISA)の存在を見いだした。

また、バンコマイシン中間耐性黄色ブドウ球菌 (VISA) のなかで、新規表現型のsVISAを見出した。slow-VISA は、一般の VISA よりバンコマイシンの耐性度が非常に高い。(下図：E-test)



この薬剤耐性化と感染症再燃のメカニズムを検討したところ、緊縮応答システムを担う *rpoB* 遺伝子の変異が関与していたことを世界で初めて見いだした (ICAAC [国際化学療法学会] 2014 にて発表、論文作成中)。さらにこの *rpoB* 遺伝子の変異は、リファンピシン、 β -ラクタム剤やダプトマイシンを含む多剤耐性化にも関連していることも見いだした (Aiba *et al* AAC 2013, Matsuo *et al* AAC 2015)。バンコマイシン治療が奏功しないのにもかかわらず患部からVISA が検出されない理由には、sVISA が関わっている可能性が示唆され、今後、臨床分離株においてこれらを検出していく、作成した変異構築株の表現型を解析するppGpp 合成変化の認められた薬剤選択変異株について、変異個所を検出する。

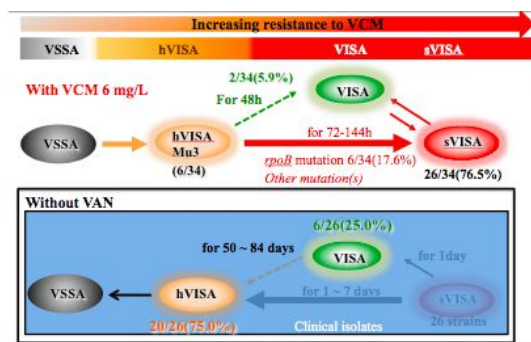
slow-VISA の耐性化には、細菌に共通して存在する ”緊縮制御ネットワーク” に関連する遺伝子の変異が関与していることを次世代ゲノムシーケンスによるSNPs解析により見いだした。この変異は、バンコマイシンだけではなく、その他の薬剤の耐性化にも寄与していたので、今後プロテオーム解析とメタボローム解析によりslow-VISAによる病原性・薬剤耐性化機構を明らかにすれば、黄色

ブドウ球菌の化学療法と感染制御に新しい概念が生まれ、将来必ず感染治療学に貢献できる。さらに ”緊縮制御ネットワーク” に関連した昔の既存の薬 (デコイニン等など) を復活させることができる。

さらに最近、私はこの slow-VISA が生体内で感染している治療中のときと、生体外で分離されたときでは表現型と遺伝型が変化していたことを、次世代シーケンサーによる SNPs 解析で明らかにした。これらの違いには、「緊縮応答システムのネットワーク」が関与していたことが示唆された。

『問題解決への道』

新規抗生剤を開発しても、必ず多剤耐性菌の問題が生じる。この問題を解決する為に、本研究では、難治性多剤耐性MRSA出現と再燃のメカニズムを slow-VISA を使って分子レベルのネットワークで解明する。また、院内や市中における slow-VISA の疫学調査をして保菌率や抗生剤による出現率を検討していく。これら研究を遂行すれば MRSA 再燃の機構や、臨床で蔓延している実態が明らかとなり、臨床の現場における新たな多剤耐性菌の出現と再燃を制御して、抗生剤による化学療法の失敗を克服できる。



『将来の展望：本助成金により、化学療法の失敗を減らすことができる。』

MRSA の保菌者に対する不要な抗菌薬の投与を減らし、耐性菌出現、及びさらなる蔓延に歯止めをかけることができる。』

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 1 1 件)

1) Keiichi Hiramatsu, Yuki Katayama, Miki Matsuo, Yoshifumi Aiba, Michie Saito, Tomomi Hishinuma and Akira Iwamoto. Vancomycin-Intermediate Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Global Antimicrobial resistance* JGAR 2(4) 213-224 (2014). 査読あり。CI: 1.

2) Michie Saito, Yuki Katayama, Tomomi Hishinuma, Akira Iwamoto, Yoshifumi Aiba, Kyoko Kuwahara-Arai, Longzhu Cui, Miki Matsuo, Nanae Aritaka^c and Keiichi Hiramatsu. 'Slow VISA' (sVISA), a novel phenotype of vancomycin resistance, obtained *in vitro* from hVISA strain Mu3. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(9):5024-5035 (2014). 査読あり。IF:4.598, CI:2.
Michie Saito and Yuki Katayama contribute equally to this study.

3) Yoshifumi Aiba, Yuki Katayama, Tomomi Hishinuma, Hiroko Murakami-Kuroda, Longzhu Cui, and Keiichi Hiramatsu. Mutation of RNA polymerase β -subunit gene promotes hetero-to-homo conversion of β -lactam resistance of MRSA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.57(10):4861-4871

(2013). 査読あり。IF:4.598, CI:7.

Corresponding Author Yuki Katayama,

4) Yuki Katayama, Tadashi Baba, Miwa Sekine, Minoru Fukuda, and Keiichi Hiramatsu. Beta-hemolysin promotes skin colonization of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*,195(6):1194-1203.

(2013). 査読あり。IF:3.298, CI:8.

5) Yuki Katayama, Tomomi Hishinuma, Akira Iwamoto, Michie Saito, Yoshifumi Aiba, Takashi Sasaki, and Keiichi Hiramatsu, Characterization of slow-VISA a novel phenotype of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. 54th ICAAC, Washington DC, category C, C-1383, session 157 (2014). 査読有り。

[学会発表] (計 1 1 件) 代表者発表のみ

1 . < 招聘 > Yuki Katayama,

場所 : University of California San Francisco (UCSF), Division of Infectious Diseases meeting

発表内容 「 Characterization of 'slow VISA', a novel phenotype of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. 」 2014.8.30

2 . < 国際学会 >

1) Yuki Katayama, Miwa Sekine Tomomi Hishinuma and Keiichi Hiramatsu. 16th ISSSI (International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infection), Complete reconstitution of vancomycin-intermediate resistance of Mu50 in a vancomycin-susceptible

Staphylococcus aureus strain. Chicago, IL, US. Aug.26-29 (2014). (POSTER).

2.) Yuki Katayama, Tomomi Hishinuma, Michie Sato, Akira Iwamoto, Yoshifumi Aiba Takashi Sasaki and Keiichi Hiramatsu. ICAAC2014 (International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy), Characterization of 'slow VISA', a novel phenotype of vancomycin resistance in Staphylococcus aureus. Washington DC, US. Sep.5-9 (2014). (POSTER).

< 国内学会 >

3. . Yuki Katayama, Tomomi Hishinuma, Yoshifumi Aiba, Takashi Sasaki, Miwa Sekine, Takashi Sasaki, Miki Matsuo and Keiichi Hiramatsu. なぜ難治性 MRSA 感染症は再燃するのか。第 16 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム。2015.5.13 (東京) (口頭と POSTER)

4. . Yuki Katayama, Tomomi Hishinuma, Yoshifumi Aiba, Takashi Sasaki, Miwa Sekine, Takashi Sasaki, Miki Matsuo and Keiichi Hiramatsu. Characterization of A Novel Class of VISA Phenotype 'slow VISA' derived from hVISA Strain Mu3. 第 63 回日本化学療法学会総会。2015.6.4-6 (東京) (口頭)

5. . Yuki Katayama, Tomomi Hishinuma, Akira Iwamoto, Yoshifumi Aiba, Takashi Sasaki, Miki Matsuo and Keiichi Hiramatsu. Characterization of 'slow VISA' a novel phenotype of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. 第 88 回日本細菌学会総会。2015.3.26-28 (岐阜) (POSTER).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山 由紀 (KATAYAMA, Yuki)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号 : 60365591