

ゲノム解析に基づく院内感染原因菌の病原性評価のための情報基盤の確立

●菅井 基行¹⁾ ◆後藤 直正²⁾

1) 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 2) 京都薬科大学

<研究の目的と進め方>

院内感染は病院内で抵抗力の低下した患者が感染、発症する感染症である。近年、我が国では薬剤耐性菌であるMRSAや緑膿菌による院内感染が多発し、またセラチア等のグラム陰性桿菌の点滴溶液や医療器具の汚染による事故が大きな社会問題となっている。本研究は主に黄色ブドウ球菌、セラチア、緑膿菌の全ゲノムを研究対象として、それぞれの院内感染発症のメカニズムを明らかにし、その病原性の多様性や薬剤耐性を遺伝子セット（各種毒素遺伝子、各種病原因子遺伝子、薬剤耐性遺伝子など）あるいは遺伝子発現系の違いとして明らかにすることを目的とする。このため1)異なる病原性を示すゲノタイプに特徴的なゲノム情報を明らかにし、2)環境変化に伴う遺伝子発現制御の解析を行い、3)院内感染の予防、同感染症の治療に役立つシーズの発掘、院内感染サーベイランス用チップを開発するための基盤データを得ることを目的としている。

<2008年度の研究の当初計画>

【黄色ブドウ球菌】1)CGH解析を終えた代表株の病原性評価としてマウスを用いた解析を開始する。マウスとしては獲得免疫系を欠損したrag-KOマウス、自然免疫系を欠損したmyd88-KOマウスを使用し、親株と併せて評価する。2)CGH解析を終えた代表株について毒素遺伝子、病原因子遺伝子を中心にアレイ、定量PCRを用いた発現解析を行い、臨床症状の重篤度との関連性の有無を検討する。3)臨床分離株の中で唯一、十分な株が得られていなかったfurunculosis由来株と健康人鼻腔由来株が得られたため、これらのPFGE解析、CGH解析、カイコ、マウス病原性評価を行う。4)CGH解析の結果から既に配列が決定されている株とかなりゲノム配列が異なることが予想され、特徴的臨床像を呈する臨床分離株を選択して、服部班の協力を得て配列解析を行う。

【黄色ブドウ球菌と緑膿菌】呼吸器感染症において臨床の現場でしばしば観察される、先行で感染している黄色ブドウ球菌が緑膿菌に取って代わられる菌交代現象が知られている。この現象は従来、抗菌薬治療による黄色ブドウ球菌の消滅と新たに緑膿菌の定着が起こる結果であると考えられてきた。抗菌薬作用のない環境下での黄色ブドウ球菌と緑膿菌間の拮抗、共生関係について二成分制御系遺伝子を網羅的に欠失させた黄色ブドウ球菌株およびすでに構築した緑膿菌のTn挿入変異株バンクを用いて解析を行い、臨床的に重要な菌交代現象の解析を行う。

【緑膿菌】MLST分子系統解析をもとに、MDRPの発生メカニズムを変異修復機構に機能するmutSやmutLなどの遺伝子群の解析から明らかにする。また、ゲノム情報を基盤にした緑膿菌の経腸管敗血症の成立機構の解析を開始する。

【セラチア】マクロファージ内での食菌抵抗性を明らかにするために、ヒドロキシラジカルやスーパーオキシドの消去に働く遺伝子群のノックアウトおよび高発現により検証し、セラチアの生体内抵抗因子の解析を行う。

また、最近、点滴液のセラチア菌汚染によるアウトブレイクが発生した。この再発防止には、低栄養環境での本菌の適応と増

殖の機構を明らかにすることが必要である。すでに構築したIVET実験系およびTn挿入変異株バンクを駆使し、この問題に対処する。

<2008年度の成果>

【黄色ブドウ球菌】1)臨床分離株の解析—臨床分離株の中で唯一、十分な株数が得られなかったfurunculosis由来株と健康人の鼻腔由来株の分与を受けた。Furunculosis由来株についてはPFGE解析、CGH解析、カイコを用いた病原性評価を行い。既に行った他の臨床分離株のデータと合わせて、全部で我が国の臨床分離株代表株をPFGEタイプで41クラスターに属する176株とした。これらの株について採取部位、院内感染か市中感染か、カイコ実験の病原性、mecA遺伝子保有の有無、各種蛋白毒素遺伝子の保有状況を評価した。その結果、①臨床分離株はゲノタイプにより、市中感染型と院内感染型に分かれること、②市中感染型は腸管毒素のレパートリーが少なく、院内感染型は腸管毒素のレパートリーが多い事、③院内感染型の多くはSEC, TSST-1を産生するが、市中感染型は特定のクラスターのみがSEC, TSST-1を産生する事、④SEA, SEBを保有する株は特定の系の株にのみ認められる事、⑤院内感染型の株は比較的カイコに対する病原性が低い株が多く、市中感染型の株は逆にカイコに対する病原性が強いこと、⑥市中感染型の株はchp, scn, sakのいずれかが欠損しているのに対し、院内感染型の株は、3者が揃っていること、⑦アトピー由来の株はmecA遺伝子を保有していないことなどが明らかとなった。2)クラス識別—臨床分離株のCGH解析データをもとに、疾患特異的な遺伝子セットの検出を目的で、クラス識別を行った。その結果、敗血症を起こした株に特有の69遺伝子、アトピー性皮膚炎から分離される株に特有の193遺伝子、水疱性膿痂疹のうち、膿痂疹から分離される株に特有の149遺伝子、SSSSから分離される株に特有の135遺伝子を見出した。3)MLST—臨床分離株代表株のMLST解析を行った。4)水疱性膿痂疹のin vivoモデル—昨年度から継続して水疱性膿痂疹の水疱形成に関わる毒素ETA, ETBの発現を制御するグローバルレギュロンsigB, SarA, SarS、二成分制御系因子ArlS, SaeRS, agrの関連性を試験管内でのET産生性、ならびに新生児マウスを用いたin vivoモデルの評価を変異株を用いて明らかにした。また、その過程で新たにETの産生に影響する2つの新規転写因子を同定した。この転写因子遺伝子の欠失は試験管内ではET産生に大きな影響を与えないが、in vivoモデルで著しく強いET産生による水疱形成を示すし、in vivoにおいて重要な役割を担う転写因子と考えられた。

【緑膿菌】①MLST系統解析からすでに見出されたMDRP(多剤耐性緑膿菌)のクラスターに属する株ではmutLの変異が多いこと、またrifampicin耐性株の出現頻度が高いことを見出した。これらの結果は抗菌薬耐性に関与する染色体上遺伝子の変異がMDRPで多いことを示唆している。②イヌ腎上皮由来MDCKおよびヒト結腸癌由来Caco-2細胞モノレイヤからのシグナルに対して、緑膿菌では3型分泌装置(TTSS)およびそのエフェクター群および4型線毛遺伝子群の発現の顕著な上昇がマイクロアレイ

実験で見出された。これをベースに TTSS およびエフェクター遺伝子のノックアウト、*E. coli* Two-hybridization 法、Pull-down assay を行うことにより、エフェクターと相互作用する宿主タンパク質を同定し、エフェクターとの結合による阻害によって、モノレイヤ細胞間の結合が開裂することを見出した。

【セラチア菌】①私たちのグループでゲノム配列を決定したヒト血液由来 SM39 株および Sanger (England) で行われたショウジョウバエ由来 DB11 株との比較ゲノム解析から、ファージによって特異的な遺伝子群が付加されていることを見出した。また、DB11 はカイコおよびマウス敗血症モデルでの致死活性が SM39 よりも高いことが観察された。この結果は、培養下でのエンドトキシン (LPS) 遊離が DB11 で高いことから裏付けられる結果であった。②本菌の生体内環境適応能を明らかにすることを目的として、in vivo expression technology (IVET) 実験系を構築し、カイコを感染モデルとして解析を行ってきたところ、少なくとも 38 種の遺伝子群の特異的な発現を見出した。その中には、ヒドロキシラジカルやスーパーオキシドの消去に働く遺伝子群が含まれていた。これはセラチアがカイコ生体内のマクロファージなどの食細胞に抵抗していることを示唆している。

【黄色ブドウ球菌と緑膿菌】黄色ブドウ球菌二成分制御系一既に作成した黄色ブドウ球菌二成分制御系の網羅的欠失変異株を用いて、緑膿菌存在下で増殖抑制がかかる株を探索した結果、TCS2, ArlRS, AgrCA, TCS5 で増殖抑制が認められた。また同様の変異株を用いて、黄色ブドウ球菌培養上清中クオラムセンシング (QS) 阻害物質の *C. violaceum* 増殖抑制活性を測定し、TCS2, arlRS で QS 阻害物質の産生促進、agr, TCS5 で QS 阻害物質の産生抑制を認めた。黄色ブドウ球菌の系統一系統解析の結果、我が国の臨床分離株の代表として PFGE 解析により見いだされた 41 のクラスターからクラスターごとに複数株を選択し、緑膿菌 PAO1 株存在下での増殖抑制の程度を調べた結果、院内感染型の株に優位に多く、緑膿菌に対して高感受性を示す株があり、市中感染型の株は逆に低感受性を示す株が多い事が明らかとなった。緑膿菌の産生する黄色ブドウ球菌増殖抑制因子の探索一緑膿菌 PAO1 株の Tn ライブラリーから黄色ブドウ球菌に対する増殖抑制を喪失あるいは減弱した株をスクリーニングし、変異株の Tn 挿入位置の同定を行った。現在までに① PQS の合成系、② QS の合成系、③ LasA、④ hypothetical gene が検出されている。

<国内外での成果の位置づけ>

【黄色ブドウ球菌】大規模な臨床分離株を用いた系統解析に基づく詳細な解析と疾病との関連性に関する研究は国内外を問わず、行われていない。その意味で今回の研究は感染症研究の新たな方向性を示したものと考えている。また、応用面において表題ともなっている院内感染型の黄色ブドウ球菌の中に、敗血症を起こす頻度が高いクラスターが見いだされていることから、クラス分類の精度を上げて、スクリーニングに用いる遺伝子候補を特定することが期待される。

【緑膿菌】米国およびスペインでの Cystic fibrosis (CF) 患者での緑膿菌慢性感染症から分離される多剤耐性株で *mutS* の変異が大きな役割を果たしていることがすでに報告されている。一方、日本で分離された non-CF MDRP では *mutL* が大きな役割を果たしていることは日本独自の MDRP 株が臨床で広がっている知見を提供する。また、上皮組織侵入 (トランスロケーション) による緑膿菌血液感染は欧米で盛んに行われているが、当グループでのアレイ研究によって透過・侵入のメカニズムをダイナミックに解析できる端緒となると考えられる。

【セラチア菌】医療デバイスを介した本菌の血液感染成立メカニズムの理解に MLST 系統解析およびゲノム配列を基盤にした

SM39 および DB11 との比較ゲノム解析は大きく貢献するものと思われる。

【黄色ブドウ球菌と緑膿菌】呼吸器感染症の臨床の現場でしばしば観察される、黄色ブドウ球菌から緑膿菌への菌交代現象に従来報告されている緑膿菌が産生する 3-oxo-C12-HSL とは異なる物質が関与すること、黄色ブドウ球菌の特定の系統が緑膿菌の増殖抑制作用に強い感受性を示すことが明らかとなった。黄色ブドウ球菌の系統解析、比較ゲノム解析で蓄積した情報と緑膿菌のゲノム情報を基に、病原細菌間の関わり、コミュニケーションを解析する新たな研究テーマになると考えられる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

【黄色ブドウ球菌】rag-KO マウスを用いた病原性評価一rag-KO マウスの繁殖に思いのほか手間取り、予備実験の開始が著しく遅れた。また、病原性評価法として尾静脈投与法、腹腔投与法の習熟に手間取り、本実験の開始が遅れたため、年度内での実験終了は難しいと思われ、次年度にずれ込むことになった。

<今後の課題>

【黄色ブドウ球菌】クラス識別一黄色ブドウ球菌の保有する遺伝子の中で、特定の疾病との関連性を示す遺伝子セットの抽出はサーベイランス用チップを開発する上で最も重要である。本年に試行したクラス識別の精度を上げるために CGH 解析を行う臨床分離株の N 数を増やし、遺伝子候補を特定する必要がある。ゲノムアイランドの解析一本研究で確定した代表臨床分離株について、ゲノムアイランドの解析を進め、新規の病原因子の探索を行う。ゲノム配列決定一既に国内外で 13 株の黄色ブドウ球菌のゲノム塩基配列が決定され、あるいは進行中である。しかし、その多くが院内感染型と考えられる。CGH 解析の結果から、黄色ブドウ球菌の代表臨床分離株についてゲノム配列決定を進めることが重要と思われる。マウスによる病原性評価一rag-KO マウスを用いた病原性評価を終了する。

【緑膿菌】アレイ実験および Tn 挿入変異株バンクを駆使して、緑膿菌のトランスロケーションによる血液感染のメカニズムを明らかにする。このためにトランスロケーションの過程を (i) 上皮細胞への接近、(ii) 上皮細胞への付着およびエフェクターの注入、(iii) 透過に分け、それぞれの過程で働く遺伝子群の解析および裏づけ実験を行う。

【セラチア菌】SM39 および DB11 との比較ゲノム解析をさらに推進し、血液感染を起こしやすい株の検出法の開発を行うと同時に、エンドトキシン遊離のメカニズムを明らかにする。

【黄色ブドウ球菌と緑膿菌】緑膿菌、黄色ブドウ球菌の産生する増殖阻害物質の探索と単離を行う。

<成果公表リスト>

1)論文/プロシーディング

1.0901161441

Ouhara, K., Komatsuzawa, H., Kawai, T., Nishi, H., Fujiwara, T., Fujiue, Y., Kuwabara, M., Sayama, K., Sugai, M.: Increased resistance to cationic antimicrobial peptide LL-37 in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*.: J. Antimicrob. Chemother. 61, 1266-1269, 2008.

2.0801301649

Nishifuji, K., Sugai, M., Amagai, M.: Staphylococcal exfoliative toxins: "molecular scissors" of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals.: J. Dermatol. Sci. 49, 21-31, 2008. 1236(2005).