

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 感染症研究国際展開戦略プログラム
(英語) Japan Initiative for Global Research Network on Infectious Diseases
- 研究開発課題名： (日本語) インド国を拠点とした下痢症感染症の予防・診断・創薬における国際協同研究
(英語) International collaborative studies on the prevention, diagnosis, and drug discovery for diarrheal infectious diseases in India
- 研究開発担当者 (日本語) 大学院医歯薬学総合研究科 社会環境生命科学専攻 教授 三好 伸一
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences,
Division of Social and Environmental Sciences
Professor, Shin-ichi Miyoshi
- 実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

インド国を拠点とした下痢症感染症の予防-診断-創薬における国際協同研究

三好 伸一

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 社会環境生命科学専攻

下痢症の積極的動向調査：感染症病院の入院患者及び小児病院の外来患者を対象とした動向調査をコルカタ市で継続実施し、平成 27 年度までと同様の結果を得た。また、平成 27 年度に開発した 10 種類の細菌を対象とした新検査法については、臨床材料（下痢便）に応用できることを確認した。ゲノム情報のデータベース化に関しては、国立感染症研究所等と連携して、インド国で単離されたコレラ菌 240 株及びロタウイルス 345 株からゲノム情報を取得・解析し、その結果を Web 上で公開する準備を整えた。

安価な経口ワクチンの開発研究（抗菌ペプチドアナログの免疫増強作用）：鉄負荷マウスモデルを用いた *in vivo* 実験によって、新規に合成した抗菌ペプチド VG16KRKP が、腸チフス成分ワクチン候補物質の感染防御効果を高める作用、つまりアジュバント作用を有することを確認した。また、ヒト大腸上皮細胞が分泌する抗菌ペプチド LL-37 が、病原ビブリオの鞭毛蛋白質の発現を抑制し、運動装置である鞭毛の形成を阻害し得ることを明らかにした。

コレラ菌の環境適応に関する研究：VBNC コレラ菌の研究に関しては、VBNC コレラ菌に特徴的な 2 種類の蛋白質の VBNC 化への寄与を検討するため、各々の遺伝子を破壊した変異株を作製し、VBNC への移行速度を野生株と比較した。その結果、変異株では VBNC 菌へと移行する速度が低下していた。一方、代謝酵素（キチナーゼやプロテアーゼ）の環境適応及び病原性への関与に関しては、キチン分解系酵素群に対する正の調節因子 ChiS の欠損変異株、ChiS の負の調節因子の欠損変異株、及び ChiS の相補株を作製し、運動性と腸管粘膜侵入性、腸管上皮付着性、腸管病原性を比較した。その結果、キチナーゼ等を産生しない ChiS 欠損変異株では、全ての能力が有意に低下していた。さらに、プロテアーゼの産生調節に関しては、グリココール酸等の胆汁酸成分はプロテアーゼ産生には影響を与えないが、下痢毒作用を有する溶血毒素に結合し、プロテアーゼによる毒素の分解・不活性化を阻害することを明らかにした。

下痢原因微生物等の変異、病原性、薬剤耐性に関する研究：新型コレラ菌に関しては、ゲノム情報を取得した 82 株（臨床株 80 株、環境株 2 株）について、薬剤耐性遺伝子等の保有状況を調べた。その結果、ほとんどの菌株が複数の薬剤耐性遺伝子、及び薬剤耐性遺伝子の伝達に関連する SXT element を保有していた。ロタウイルスに関しては、マウスを用いた *in vivo* 実験により、I 型インターフェロン産生誘導に基づく、コルジセピンのロタウイルス排除作用を証明した。また、I 型インターフェロンの産生誘導が、RIG-I に依存していることも明らかにした。さらには、バイカリンについても I 型インターフェロンの産生誘導作用、及び抗ロタウイルス作用を認めた。ジアルジア原虫に関しては、酸化ストレスに曝されることによって、アラキドン酸カスケードが活性化され、プロスタグランジン E2 が産生されることを明らかにした。

英文

International collaborative studies on the prevention, diagnosis, and drug discovery for diarrheal infectious diseases in India

Shin-ichi Miyoshi

Division of Social and Environmental Sciences

Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University

Active surveillance of diarrheal infectious diseases: The surveillance of hospitalized patients at the Infectious Disease Hospital and outpatients at the Children Hospital was continued in Kolkata, India. The result obtained was similar to that of previous surveillance.

In addition, a new method developed in 2015 for detection of 10 bacterial species was found to be useful for diarrheal stool samples.

For the genome database, 240 *Vibrio cholerae* O1 strains and 345 rotavirus strains, which have been isolated in India, were analyzed.

Development of the oral vaccine (the immunomodulating actions of antimicrobial peptides): In the *in vivo* experiments using the iron-loaded mouse model, the newly synthesized antimicrobial peptide (VG16KRKP) showed to the significant adjuvant effect. Namely, the peptide enhanced the protective potential of the candidate of the typhoid component vaccine.

On the other hand, a natural antimicrobial peptide (LL-37), which is secreted by human colon epithelial cells, revealed to inhibit the expression of the genes encoding components of flagella in human pathogenic *Vibrio* species including *V. mimicus*, suggesting LL37 can reduce the bacterial mobility and pathogenicity.

Studies on environmental adaptation of *V. cholerae* O1: To study functions of two proteins of which production is increased in VBNC cells, the gene of each protein was disrupted, and the time course to become the VBNC state was examined. It was revealed that both disruptants converted to the VBNC state more slowly than the wild type strain.

For the study of the chitinase in the bacterial pathogenicity, the mutant of the positive regulator (ChiS), the mutant of negative regulator for ChiS, and ChiS complement were prepared. Thereafter, the motility, the ability to penetrate the intestinal mucus layer and to attach to the intestinal epithelial cells, and the enteropathogenicity were compared. The results showed that all of the abilities were significantly reduced in the ChiS-mutant, suggesting significant roles of chitinase in the bacterial pathogenicity.

In addition, in *V. mimicus*, the bile salt components such as glycocholate were found to bind to the enterotoxin hemolysin and protect the toxin from digestion by the protease. However, the bile salt components did not regulate the protease production.

Studies on mutation, pathogenicity, drug resistance of microorganisms causing diarrheal diseases: A total of 82 *V. cholerae* O1 strains, of which genome were analyzed, were tested

whether they have the genes related to drug resistance. The results showed that most strains had multiple drug resistance genes and the SXT element that mediates the transmission of the drug resistance genes.

In rotavirus, by using the *in vivo* mouse model, cordycepin could reduce the virus by induction of type I interferon production. Additionally, the induction of type I interferon production was shown to be dependent on RIG-I. Baicalin was also found to induce the production of type I interferon and to have the anti-rotavirus activity.

In *Giardia lamblia*, it was demonstrated that, by exposure to the oxidative stress, the arachidonic acid cascade was activated and prostaglandin E₂ was produced.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 8 件)

1. Debnath A, Sabui S, Wajima T, Hamabata T, Banerjee R, Chatterjee NS. Functional role of N- and C-terminal amino acids in structural subunits of colonization factor CS6 expressed by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198, 1429-41.
2. Chowdhury G, Joshi S, Bhattacharya S, Sakar U, Birajdar B, Bhattacharyya A, Shinoda S, Ramamurthy T. Extraintestinal infections caused by non-toxigenic *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7, 144.
3. Takahashi E, Fujinami C, Kuroda T, Takeuchi Y, Miyoshi S, Arimoto S, Negishi T, Okamoto K. Indolo[3,2-b]quinoline derivatives suppressed the hemolytic activity of β -pore forming toxins, aerolysin-like hemolysin produced by *Aeromonas sobria* and α -hemolysin produced by *Staphylococcus aureus*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2016, 39, 114-20.
4. Ghosh R, Sharma NC, Halder K, Bhadra RK, Chowdhury G, Pazhani GP, Shinoda S, Mukhopadhyay AK, Nair GB, Ramamurthy T. Phenotypic and genetic heterogeneity in *Vibrio cholerae* O139 isolated from cholera cases in Delhi, India during 2001-2006. *Frontiers in Microbiology*. 2016, 7, 1250.
5. Chourashi R, Mondal M, Sinha R, Debnath A, Das S, Koley H, Nabendu Sekhar Chatterjee NS. Role of a sensor histidine kinase ChiS of *Vibrio cholerae* in pathogenesis. *International Journal of Medical Microbiology*. 2016, 306, 657-65.
6. Abdel-Sattar E-S, Miyoshi S, Elgaml A. Regulation of *Vibrio mimicus* metalloprotease (VMP) production by the quorum-sensing master regulatory protein, LuxR. *Journal of Basic Microbiology*. 2016, 56, 1051-8.
7. Elgaml A, Miyoshi S. Regulation systems of protease and hemolysin production in *Vibrio vulnificus*. *Microbiology and Immunology*. 2017, 61, 1-11.
8. Imamura D, Morita M, Sekizuka T, Mizuno T, Takemura T, Yamashiro T, Chowdhury G, Pazhani GP, Mukhopadhyay AK, Ramamurthy T, Miyoshi S, Kuroda M, Shinoda S, Ohnishi M. Comparative genome analysis of VSP-II and SNPs reveals heterogenic variation in contemporary strains of *Vibrio cholerae* O1 isolated from cholera patients in Kolkata, India. *PloS Neglected Tropical Diseases*. 2017, 11, e0005386.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Whole genome analysis reveals heterogeneity of VSP-II and genetic shifts of *Vibrio cholerae* O1 clinical isolates in Kolkata India, ポスター, Imamura D, Morita M, Sekizuka T, Mizuno T, Takemura T, Yamashiro T, Mukhopadhyay A, Ramamurthy T, Miyoshi S, Kuroda M, Ohnishi M, Shinoda S, The 7th *Vibrio* conference 2016, Roscoff, France, 2016/3/29-4/1, 国外.
2. Modulation of the bacterial virulence by proteolytic enzymes, 口頭, Miyoshi S, The 7th *Vibrio* conference 2016, 2016/3/29-4/1, Roscoff, France, 国外.
3. Effects of disruption of genes expressed during VBNC phase of *Vibrio cholerae* on survival under starvation, 口頭, 今村 大輔, 水野 環, 三好 伸一, 篠田 純男, 日米コレラ部会 (日米医学協力研究会コレラ・細菌性腸管感染症専門部会) 日本側総会, 2016/8/5 京都, 国内.
4. Functional role of N- and C-terminal amino acids in the structural subunits of colonization factor CS6 expressed by enterotoxigenic *Escherichia coli*, ポスター, Debnath A, Chatterjee NS, Miyoshi S, Shinoda S, The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2016/9/6-9, Awaji, 国内.
5. Collaborative research of diarrheal diseases in South Asia, Shinoda S, Imamura D, Mukhopadhyay AK, 口頭, The 6th Indo-Japan international symposium: overcoming intractable infectious diseases prevalent in Asian countries, 2016/9/23-24, Goa, India, 国外.
6. 日本および諸外国の感染症: アジア・アフリカの状況を中心にして, 口頭, 篠田 純男, 日本防菌防黴学会第 43 回年次大会, 2016/9/26-27, 東京, 国内.
7. コレラ菌を含むビブリオ・コレレの水環境汚染に関する日印両国での比較研究, ポスター, 三好 伸一, 水野 環, 吉川 真矢, 河瀬 朋華, 今村 大輔, 篠田 純男, 日本防菌防黴学会第 43 回年次大会, 2016/9/26-27, 東京, 国内.
8. インドコルカタ市の環境水由来の *Vibrio cholerae* 環境分離株の Pathogenicity island の多様性, ポスター, 水野 環, 今村 大輔, 三好 伸一, Mukhopadhyay AK, 篠田 純男, 日本防菌防黴学会第 43 回年次大会, 2016/9/26-27, 東京, 国内.
9. 腸炎ビブリオの新規抗菌物質排出ポンプの解析, 口頭, 森田 大地, 三好 伸一, 黒田 照夫, 第 69 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2016/10/15-16, 高松, 国内.
10. インド・コルカタにおけるコレラ流行株の特徴と変化, 口頭, 今村 大輔, Sarkar A, Nag D, Koley H, 森田 昌知, 大西 真, 水野 環, 三好 伸一, 篠田 純男, 第 50 回腸炎ビブリオシンポジウム, 2016/10/20-21, 大阪, 国内.
11. 腸炎ビブリオの Na⁺耐性機構に関わる遺伝子の同定, 口頭, 春木 裕里恵, 三好 伸一, 黒田 照夫, 第 50 回腸炎ビブリオシンポジウム, 2016/10/20-21, 大阪, 国内.
12. Properties of exotoxins produced by *Aeromonas* species, 口頭, Okamoto K, Miyoshi S, Shinoda S, Gut Microbiome 2016: an international perspective, 2016/10/21-22, Karnataka, India, 国外.
13. Effects of disruption of genes expressed during VBNC phase of *Vibrio cholerae* on survival under starvation, ポスター, Imamura D, Mizuno T, Miyoshi S, Shinoda S, US-Japan Cooperative Medical Sciences Program. The 19th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim. US-Japan Joint Panel Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections, 2017/2/7-10, Seoul, Korea, 国外.

14. コレラ菌 VBNC 細胞に特異的なタンパク質の探索とその解析, 口頭, 今村 大輔, 新興・再感染症制御プロジェクト 新興再興事業・J-GRID 合同シンポジウム『感染症研究連携のフロンティア』プログラム, 2017/3/16, 東京, 国内.
15. コルカタ市で単離された *Vibrio cholerae* の環境分離株及び臨床分離株の病原因子の比較研究, ポスター, 水野 環, 森田 大地, Mukhopadhyay AK, 今村 大輔, 篠田 純男, 三好 伸一, 第 90 回日本細菌学会総会, 2017/3/19-21, 仙台, 国内.
16. Effects of disruption of genes expressed during VBNC phase of *Vibrio cholerae* on survival under starvation, ポスター, 今村 大輔, Sakar A, 森田 大地, 水野 環, 岡本 敬の介, 三好 伸一, 篠田 純男, 第 90 回日本細菌学会総会, 2017/3/19-21, 仙台, 国内.
17. コルカタ市において臨床及び環境水より分離された *Vibrio cholerae* の保有する抗薬剤耐性遺伝子の解析, ポスター, 森田 大地, 水野 環, 今村 大輔, Mukhopadhyay AK, 三好 伸一, 篠田 純男, 岡本 敬の介, 第 90 回日本細菌学会総会, 2017/3/19-21, 仙台, 国内.
18. ベンガル地方で分離されたコレラ菌流行株の比較ゲノム解析, ポスター, 森田 昌知, 荒川 英二, 泉谷 秀昌, Alam M, 今村 大輔, 篠田 純男, 大西 真, 第 90 回日本細菌学会総会, 2017/3/19-21, 仙台, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 主要赤痢菌 6 種混合標品経口赤痢ワクチン候補に, 三好 伸一, 科学新聞, 2016/3/18, 国内.
2. 赤痢ワクチン開発加速, 三好 伸一, 山陽新聞, 2016/6/27, 国内.
3. グローバル時代の感染症とその対策, 三好 伸一, 岡山健康講座 2016: やさしい保健と健康の話, 2016/9/15, 国内.

(4) 特許出願

該当事項なし。