

Uemura O, Honda M, Matsuyama T, Ishikura K, Hataya H, Nagai T, Ikezumi Y, Fujita N, Ito S, Iijima K	The Japanese Society for Pediatric Nephrology, the Committee of Measures for Pediatric CKD. Is the new Schwartz equation derived from serum creatinine and body length suitable for evaluation of renal function in Japanese children?	Eur J Pediatr.	171	1401-1404	2012
Ikezumi Y, Honda M, Matsuyama T, Ishikura K, Hataya H, Yata N, Nagai T, Fujita N, Ito S, Iijima K, Kaneko T, Uemura O	Establishment of a normal reference value for serum β 2 microglobulin in Japanese children: reevaluation of its clinical usefulness.	Clin Exp Nephrol.	17	1576-1583	2013
Ishikura K, Yoshikawa N, Nakazato H, Sasaki S, Iijima K, Nakanishi K, Matsuyama T, Ito S, Yata N, Ando T, Honda M	for the Japanese Study Group of Renal Disease in Children. Two-Year Follow-Up of a Prospective Clinical Trial of Cyclosporine for Frequently Relapsing Nephrotic Syndrome in Children	Clin J Am Soc Nephrol.	7	1576-1583	2012

Harada T, Ito S, Mori M, Yokota S	Anatomical condition mimicking superior mesenteric artery syndrome might cause duodenal involvement in Henoch-Schönlein purpura.	Pediatr Int	54	579,	2012
-----------------------------------	--	-------------	----	------	------

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

重症の腸管出血性大腸菌感染症の病原性因子及び

診療の標準化に関する研究

(H24-新興-一般-012)

別冊 研究成果の刊行物

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大西 真

平成25年(2013年) 3月

別紙4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ	
八尋 錦之助	腸管出血性大腸菌の病原性発現機構	化学療法研究会	化学療法の領域 6月号	医薬ジャーナル	日本	2012	45-52
Yahiro, K., J. Moss, and M. Noda	Cytotoxin SubAB (Chapter 694)	Neil D. Rawlings and Guy Salvesen. Rawlings	Handbook of Proteolytic Enzymes, 3 rd Edition	Elsevier	イギリス	2013	3155-61
水口 雅	急性脳炎・急性脳症	五十嵐隆	小児・思春期診療最新マニュアル	日本医師会	東京	2012	S227-228

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Iguchi A, Iyoda S, Ohnishi M, on behalf of the EHEC Study Group	Molecular characterization reveals three distinct clonal groups among clinical Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> of serogroup O103	J. Clin. Microbiol.	50	2894-2900	2012
大西 真	腸管出血性大腸菌 O104 による大規模集団食中毒事例.	J Vet Med.	65	364-368	2012
大西 真、伊豫田淳.	腸管出血性大腸菌の多様性	感染炎症免疫	42	2-11	2012
大西 真	腸管感染症の細菌の動向と疫学	臨床と微生物	40	99-104	2013

勢戸 和子	0157 以外の志賀毒素産生性大腸菌の重要性	FFI ジャーナル	217	67-75	2012
勢戸 和子, 伊豫田 淳, 寺嶋淳	腸管出血性大腸菌の迅速診断法と確定診断	小児科臨床	65	2583-2587	2012
T. Ooka, E. Tokuoka, M. Fukuhara, T. Nagamura, Y. Ogura, K. Aisawa, S. Harada, T. Hayashi	A human outbreak case associated with <i>Escherichia albertii</i> .	Emerg. Infect. Dis.	19(1)	144-146	2013
林 哲也	同じ病原菌種内の菌株の違いをゲノムからみる：病原性大腸菌を例として.	Neuroinfection	17(1)	26-34	2012
小椋義俊, 林 哲也	腸管出血性大腸菌における病原性のゲノム進化	感染・炎症・免疫	42	182-195	2012
小椋義俊, 大岡唯祐, 林 哲也	腸管出血性大腸菌 O111 の進化と病原性	神経内科	76(2)	155-163	2012
Tsutsuki, H., K. Yahiro, K. Suzuki, A. Suto, K. Ogura, S. Nagasawa, H. Ihara, T. Shimizu, H. Nakajima, J. Moss, and M. Noda.	Subtilase cytotoxin enhances <i>E. coli</i> survival in macrophages by suppression of nitric oxide production through the inhibition of NF-kappaB activation.	Infect Immun	80	3939-3954	2012

Takami H, Taniguchi T, Moriya Y, Kuwahara T, Kanehisa M, Goto S.	Evaluation method for the potential functionome harbored in the genome and metagenome.	BMC Genomics	13	699	2012
Wakimoto S, Nakayama-Imao hji H, Ichimura M, Morita H, Hirakawa H, Hayashi T, Yasutomo K, Kuwahara T.	PhoB regulates the survival of <i>Bacteroides</i> <i>fragilis</i> in peritoneal abscesses.	PLoS One	8	e53829	2013
Ito S, Kemei K, Ogura M, Udagawa T, Fujinaga S, Saito M, Sako M, Iijima K	Survey of rituximab treatment for childhood-onset refractory nephrotic syndrome.	Pediatr Nephrol	28,	:257-64	2013
Ito S	Disease Course in Childhood Steroid Sensitive Nephrotic Syndrome Is it Changeable.	Ind Pediatr.	J49	868-9	2012
Noda S, Ogura M, Tsutsumi A, Udagawa T, Kamei K, Matsuoka K, Kitamura H, Atsumi T, Ito S.	Thrombotic microangiopathy due to multiple autoantibodies related to antiphospholipid syndrome	Pediatr Nephrol	27	681-5	2012
Sato M, Ito S, Ogura M, Kamei K, Miyairi I, Miyata I, Higuchi M, Matsuoka K	Atypical Pneumocystis jiroveci pneumonia with multiple nodular granulomas after rituximab for refractory nephrotic syndrome.	Pediatr Nephrol.	28	145-9	2013

Sakamoto S, Kasahara M, Fukuda A, Tanaka H, Kakiuchi T, Karaki C, Kanazawa H, Kamei K, <u>Ito S</u> , Nakazawa A	Pediatric liver-kidney transplantation for hepatorenal fibrocystic disease from a living donor.	Pediatr Transplant.	16	99-102	2012
<u>Ito S</u> , Kamei K, Ogura M, Udagawa T, Fujinaga S, Saito M, Sakoi M, Iijima K	Survey of rituximab treatment for childhood-onset refractory nephrotic syndrome.	Pediatr Nephrol	28,	:257-64	2013
Iijima K, Someya T, <u>Ito S</u> , Nozu K, Nakanishi K, Matsuoka K, Ohashi H, Nagata M, Kamei K, Sasaki S.	Focal segmental glomerulosclerosis in patients with complete deletion of one WT1 allele	Pediatrics.	129	e1621-5,	2012
Uemura O, Honda M, Matsuyama T, Ishikura K, Hataya H, Nagai T, Ikezumi Y, Fujita N, <u>Ito S</u> , Iijima K	The Japanese Society for Pediatric Nephrology, the Committee of Measures for Pediatric CKD. Is the new Schwartz equation derived from serum creatinine and body length suitable for evaluation of renal function in Japanese children?	Eur J Pediatr.	171	1401-1404	2012

Ikezumi Y, Honda M, Matsuyama T, Ishikura K, Hataya H, Yata N, Nagai T, Fujita N, <u>Ito</u> <u>S</u> , Iijima K, Kaneko T, Uemura O	Establishment of a normal reference value for serum $\beta 2$ microglobulin in Japanese children: reevaluation of its clinical usefulness.	Clin Exp Nephrol.	17	1576-1583	2013
Ishikura K, Yoshikawa N, Nakazato H, Sasaki S, Iijima K, Nakanishi K, Matsuyama T, <u>Ito S</u> , Yata N, Ando T, Honda M	for the Japanese Study Group of Renal Disease in Children. Two-Year Follow-Up of a Prospective Clinical Trial of Cyclosporine for Frequently Relapsing Nephrotic Syndrome in Children	Clin J Am Soc Nephrol.	7	1576-1583	2012
Harada T, <u>Ito</u> <u>S</u> , Mori M, Yokota S	Anatomical condition mimicking superior mesenteric artery syndrome might cause duodenal involvement in Henoch-Schönlein purpura.	Pediatr Int	54	579,	2012
Saitoh M, Shinohara M, Hoshino H, Kubota M, Amemiya K, Takanashi JL, Hwang SK, Hirose S, <u>Mizuguchi M</u> .	Mutations of the <i>SCN1A</i> gene in acute encephalopathy.	Epilepsia	53 (3)	558-564	2012

Hoshino A, Saitoh M, Oka A, Okumura A, Kubota M, Saito Y, Takanashi JI, Hirose S, Yamagata T, Yamanouchi H, Mizuguchi M.	Epidemiology of acute encephalopathy in Japan, with emphasis on the association of viruses and syndromes.	Brain and Development	34(5)	337-343	2012
Bergamino L, Capra V, Biancheri R, Rossi A, Tacchella A, Ambrosini L, Mizuguchi M, Saitoh M, Marazzi MG.	Immunomodulatory therapy in recurrent acute necrotizing encephalopathy ANE1: Is it useful?	Brain and Development	34(5)	384-391	2012
水口 雅	急性脳症の診断と治療	小児内科	44(9)	1486-1489	2012
水口 雅	序：けいれん重積型 (二相性)急性脳症 のオーバービュー	小児科臨床	65(9)	1941-1945	2012
水口 雅	[知っておきたい小 児科の知識-専門医 の診方・治し方] 熱 性けいれんと髄膜 炎・脳炎・脳症	耳鼻咽喉 科・頭頸部外 科	84(12)	927-930	2012
水口 雅	序-急性脳炎・脳症研 究の最近の進歩	小児内科	45(2)	172-175	2013

3. 腸管出血性大腸菌の病原性発現機構

八尋 錦之助*

病原性大腸菌 O157:H7 を代表とする腸管出血性大腸菌 (EHEC) は、出血性大腸炎、下痢、重篤な場合には、溶血性尿毒症症候群 (HUS)、脳症を引き起こす。これまで多くの研究から、これら重篤な症状を引き起こす EHEC の主要な病原因子は本菌の産生する志賀毒素 (Stx1/Stx2) であることが報告されている。最近、non-O157 型の EHEC 感染においては、志賀毒素に加えて、重症化に関与する新たな病原因子として subtilase cytotoxin (SubAB) が同定された。

Key Words: 腸管出血性大腸菌/病原因子/毒素

I はじめに

出血性の下痢を引き起こした患者から分離された Stx 産生型 EHEC (腸管出血性大腸菌) の血清型は 500 種にも上るが、多くの国々で O157 型の血清型によるものが大部分を占めており、しばしば重篤な病態を引き起こすことが知られている。最近、non-O157 型の血清型 (O26, O46, O103, O111, O145) による症例も増加傾向にある¹⁾。

II EHEC のゲノムの特徴

EHEC のゲノム解析、マイクロアレイによる遺伝子発現比較解析による遺伝子レベルでの解析により、EHEC のゲノム構造の多様性が明らかにされた。林らのグループが精力的にこの解析を行っている。彼らの報告によると、非病原性大腸菌のゲノムと比較して、O157 EHEC に特異的に保持されている 1.4 Mb の領域には 1,700 以上の遺伝子が存在し、この中に志賀毒素を始めとする数多くの病原遺伝子が見出されている。これらの毒素遺伝子はそれぞれ菌の染色体上に溶原化して潜んでいる stx1 ファージ、stx2 ファージゲノム上

に存在し運ばれる。さらに、non-O157 EHEC は O157 EHEC と異なる進化系統を示すにもかかわらず、病原遺伝子を含め多くの遺伝子を共通に保持ことがわかっている^{2) 3)}。

III EHEC の病原因子

1. 志賀毒素 (Stx) の構造と機能

食物や水を介して腸管に到達した EHEC は相同性の高い 2 つのタイプの志賀毒素 (Stx1 と Stx2) を両方、あるいは片方を産生する。Stx は毒性責任領域である 1 分子の A サブユニットと宿主認識領域である B サブユニット 5 分子からなる (表)。B サブユニットは細胞膜表面の糖脂質グロボトリアオシルセラミド Gb3 を受容体とし、毒素の細胞内侵入に関与している^{1) 3)}。

A サブユニットの RNA-N-グリコシダーゼ活性は 60S リボソームの失活を促し、タンパク合成阻害活性により種々の細胞に対し細胞死 (アポトーシス) を誘導する。最近、Stx のタンパク質合成阻害により小胞体内に蓄積した unfolding タンパク質が小胞体ストレスを引き起こし、下流の抗アポトーシス因子の抑制を誘導していることが報告さ

Characterization of EHEC-produced virulence factors

*千葉大学大学院医学研究院病原分子制御学 特任准教授 Kinnosuke Yahiro

表 Stx1 と Stx2 の比較

	Stx1	Stx2
Aサブユニット (アミノ酸残基数)	315	319
Bサブユニット (アミノ酸残基数)	89	89
構造	AB5	AB5
バリエーションの存在	なし	あり
発現のためのプロモーター	Stx1プロモーター	フェージ後期プロモーター
発現亢進因子	低鉄イオン等	紫外線, 抗生物質等
発現時期	対数増殖期	定常期
産生後の分布	菌体内	菌対外
マウスに対する毒性比較	弱い	強い

Stx1 と Stx2 はいずれも毒性責任領域である1分子のAサブユニットと宿主認識領域であるBサブユニット5分子からなる。産生されたStx1は菌体内に留まるのに対し、Stx2は菌体外へ放出される。また、Stx2のほうがStx1よりもマウスに対する致死活性が強い。
(文献4より一部改変)

れている^{11, 31)}。

産生されたStx1は菌体内に留まるのに対し、Stx2は菌体外へ放出される。また、Stx2産生株のほうがHUS(溶血性尿毒症症候群)になるリスクが高いと示唆されている。EHECは細胞侵入性や腸管上皮を通過する能力をもたないことから、放出されたStxが腸管で吸収された後、血流に乗って標的臓器に到達することで障害を引き起こしていると考えられている³¹⁾。多形核好中球(PMNs)は12~24時間という短い寿命だが、Stx2はPMNsの自発的なアポトーシスの抑制による延命、機能障害(ミエロペルオキシダーゼの減少など)を引き起こすことが報告されている。Stx2はPMNsを「運び屋」として利用し、毒素の拡散を防ぎ、標的臓器の細胞へ移行して機能障害を惹起していると推察されるが、詳細なメカニズムに関してさらなる研究が必要である¹¹⁾。

本毒素は腎臓の糸球体血管内皮細胞を傷害(ア

ポトーシス)し(図1)、血栓性微小血管症(微小血栓形成)による溶血性貧血、血小板減少、急性腎不全を症状とするHUSを引き起こすことが知られている。また最近、Morigiらは、Stxによる過剰なC3補体活性化により産生したアナフィラトキシンC3aに依存したP-セレクトチンを介した機構が微小血栓形成に関与していることを報告している³¹⁾。

Stxによる脳障害に関する研究はおもに動物(ウサギやマウス)を用いて行われており、①Stx2の投与がBlood-Brainバリアを破壊すること、②ウサギの中樞神経系でのアポトーシスが認められるにもかかわらず、必ずしもGb3と局在が一致していないこと、③炎症性サイトカインが強く誘導されていることが報告されている。以上のことから、Stxによる神経細胞のアポトーシスは誘導されたサイトカイン等によって引き起こされているのではないかと推察されている。しかし、

EHEC(腸管出血性大腸菌)

HUS(溶血性尿毒症症候群)

PMNs(多形核好中球)

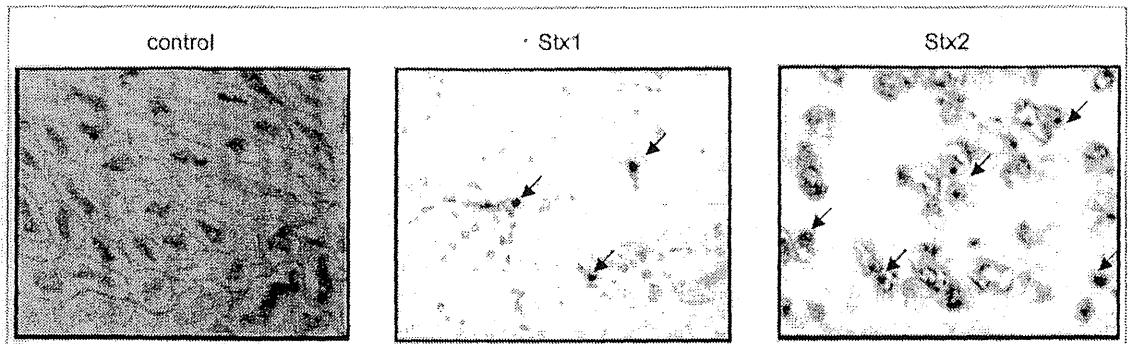


図1 志賀毒素 (Stx1 あるいは Stx2) を注射 48 時間後のマウスの腎臓における TUNEL アッセイによるアポトーシスの検出

Stx2 を注射したほうが Stx1 と比べ、多くのアポトーシスを起こした細胞を認める (矢印)。

(筆者提供)

どのように Blood-Brain バリアを通り抜け、脳細胞を破壊するのか詳細なメカニズムは不明である¹⁾。

オートファジーは自己成分消化システムであり、恒常的な代謝回転に寄与しているが、環境の変化に応じて、オルガネラの量的調節や栄養成分枯渇時の栄養源確保、さらに細胞内に侵入した病原体を異物として認識・分解する重要な宿主防御システムのひとつであることが知られており、現在、活発に研究が進められている分野である²⁾。最近、Stx (Stx1 と Stx2) が毒素感受性細胞に対して小胞体ストレスを引き起こし、さらにアポトーシスとオートファジー両方を誘導すること、また、非感受性細胞に対しては Stx は細胞内侵入後、lysosome に移送され、アポトーシスシグナル分子の活性化なしにオートファジーを誘導することが明らかとなった。このオートファジーの形成は Stx の B サブユニットのみでも誘導されることから、膜結合によるシグナル伝達機構が関与していると推察されるが、その機構はまだ不明である³⁾。

2. 3型分泌装置

LEE (the locus of enterocyte effacement) 病原性遺伝子群にコードされる 3 型分泌系 (T3SS)

LEE (the locus of enterocyte effacement)

Tir (translocate intimin receptor)

SubAB (subtilase cytotoxin)

によって腸管への付着に関与するエフェクター (translocate intimin receptor: Tir, EspFu/TccP 等) を直接、細胞内に注入する。注入された Tir は細胞表面に露出して EHEC の外膜タンパク質 intimin と結合することで菌体と腸管細胞との接着を仲介し、attaching-and-effacing (A/E) lesion という台座形成を誘導する。O157:H7 株においては intimin が接着に必要であることがわがっている³⁾。

その一方、intimin をもたない志賀毒素産生 non-O157 型が HUS を引き起こす例が報告されている。³⁾ これらの菌は intimin を介さずに腸管上皮細胞に接着し志賀毒素等の病原因子を分泌することで障害を引き起こしていると考えられる (図 2)。

3. Non-O157 EHEC で見出された新規毒素

Subtilase cytotoxin (SubAB) は 2004 年に HUS を発症した患者より分離された志賀毒素産生株 O113:H21 98NK2 株で同定された毒素である。これまでの疫学的調査から SubAB は O157 血清型 EHEC ではほとんど検出されず、志賀毒素産生性 non-O157 EHEC の約 25% で検出されている⁹⁾。

T3SS (病原性遺伝子群にコードされる 3 型分泌系)

A/E (attaching-and-effacing)

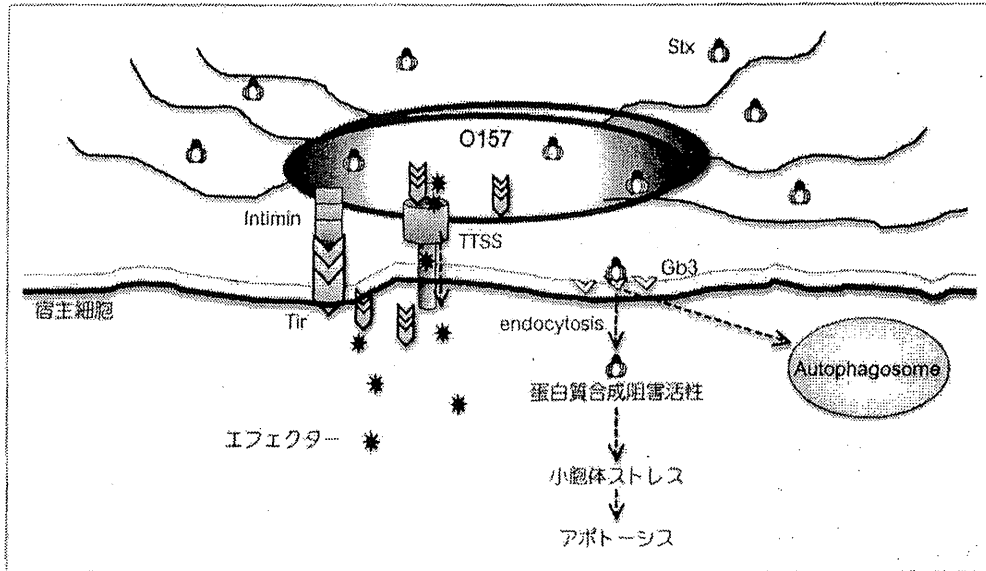


図2 O157型 EHEC の病原因子と宿主応答

O157 はタイプⅢ分泌装置(TTSS)によりエフェクタータンパク質を細胞内に直接注入する。エフェクタータンパク質のひとつである Tir は菌体の intimin と結合することで菌体の細胞との接着に働く。志賀毒素 (Stx) は受容体 Gb3 に結合しエンドサイトーシスで細胞内に取り込まれた後、細胞死を誘導する。一方、結合シグナルによりオートファジーを誘導する。(文献3, 7より改変)

(1) Subtilase cytotoxin (SubAB) の性状と機能

SubAB は枯草菌が産生する subtilase と類似の アミノ酸配列をもつセリンプロテアーゼであり、毒素活性発現に必須な領域である A サブユニット (35kDa) ひとつと、標的細胞を認識する B サブユニット (13kDa) 5 つから構成される AB₅ 型毒素である。志賀毒素の受容体が糖脂質グロボトリアオシルセラミド Gb3 であるのに対し、SubAB の受容体はインテグリン等の膜タンパクに修飾された末端糖鎖シアル酸である¹⁰⁾。最近、SubAB の結晶構造が解明されるとともに、SubAB は末端糖鎖シアル酸のひとつである Neu5Gc に高い親和性をもつことが報告された¹¹⁾。ヒトは Neu5Gc 合成酵素をもたないことから、食事などによって摂取された Neu5Gc が標的細胞表面に露呈し SubAB と結合すると推察されている。この報告は確かに SubAB が宿主への結合に際して糖鎖が重要であることを示唆している。

SubAB は標的細胞に侵入した後、A サブユニットのプロテアーゼ活性によりシャペロンタンパク質 BiP/GRP78 を 44 kDa と 28 kDa の 2 つの断

片に切断し (図3 A), unfolding protein の蓄積による小胞体ストレスを引き起こし、一過性のタンパク合成阻害、細胞周期の停止、細胞障害を誘導する。小胞体において、BiP は小胞体膜通過時におけるタンパク質のフォールディングの制御を担う重要なタンパク質であり、小胞体ストレス障害の軽減機構に関与することが知られている。

SubAB は種々の細胞に対して顕著な増殖抑制と細胞死 (アポトーシス) を誘導する (図3 B)。SubAB によるヒト培養細胞に対するアポトーシスは、Bcl2 ファミリータンパク質である Bax, Bak の構造変化をともなうミトコンドリアでの複合体形成によるチトクローム c の放出、そして、apoptosome の形成に続くカスパーゼに依存したアポトーシスであることが示唆されている (図3 C, D)^{12) 13)}。Bax, Bak ノックアウトマウス由来 MEF 細胞においても同様の結果が報告されている¹⁴⁾。

最近、我々は、SubAB による BiP の切断にともない、小胞体ストレスセンサータンパク質のひとつである double-stranded RNA-activated

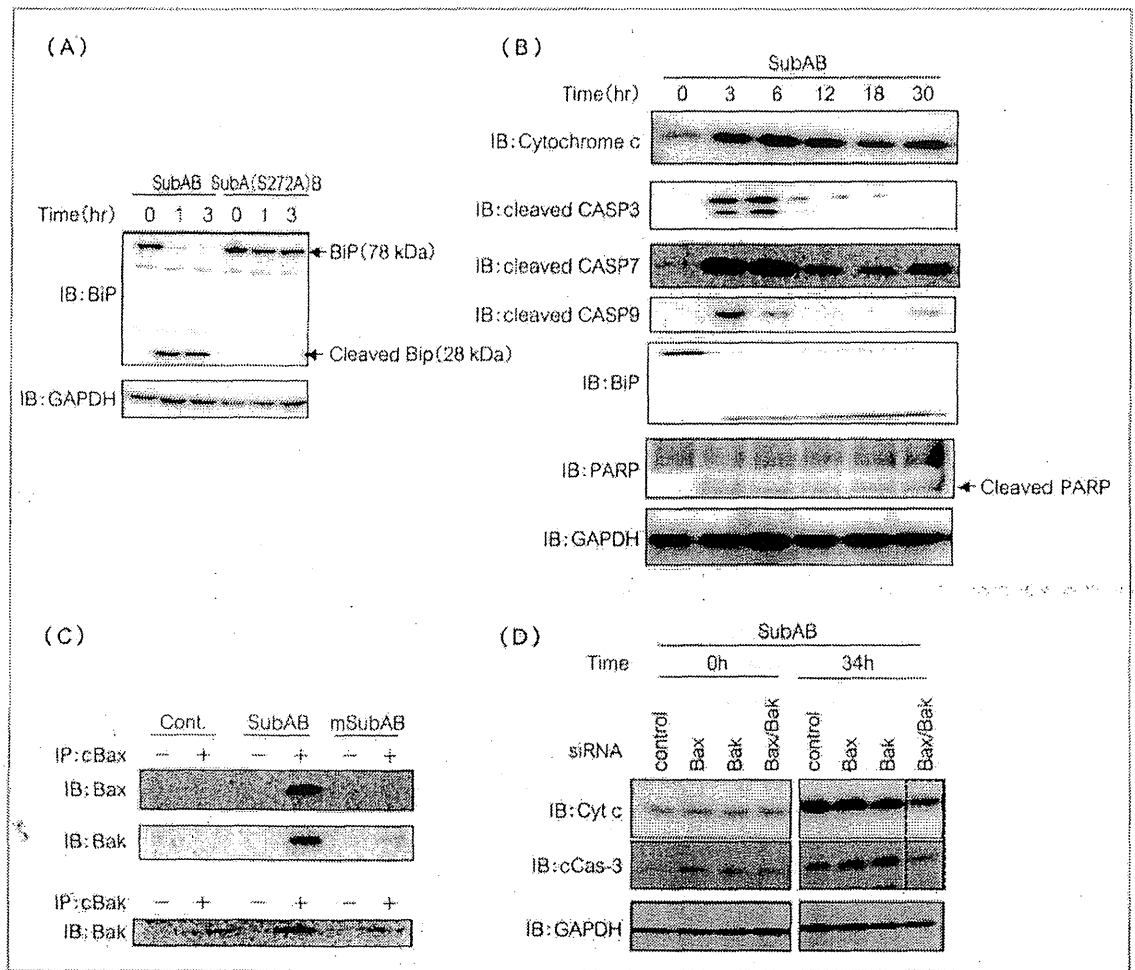


図3 SubABによるBiP/GRP78の切断とカスパーゼの活性化

(A) HeLa細胞にSubABあるいは活性中心を変異させたSubA(S272A)Bを加えインキュベーションすると、1時間でBiPの切断が認められる。変異体では認められない。

(B) SubAB処理により、3時間後にはチトクロームcの細胞質への放出、各カスパーゼの活性化、PARPの切断が認められる。

(C) SubABによるBax/Bakの構造変化と複合体形成。SubAB処理後、構造変化したBax/Bakを特異的に認識する抗体を用い免疫沈降を行った。SubAB処理によりBax/Bakの構造変化と複合体形成を認めた。

(D) SubABによるBax/Bak依存性的アポトーシス。Bax/Bak発現抑制した細胞では、SubABによるチトクロームcの放出、カスパーゼの活性化を抑制した(点線囲み)。Bax単独、Bak単独の発現抑制ではSubABによるアポトーシスシグナルを抑制できない。(文献12, 13より一部改変)

protein kinase-like ER kinase (PERK) を介したシグナル伝達がカスパーゼの活性化依存性的アポトーシス機構を制御していることを明らかにした。つまり、PERKの発現抑制はSubABによるアポトーシス誘導伝達機構 (Bax/Bakの構造変

化、チトクロームcの放出、カスパーゼの活性化) を抑制する (図4)。これはMEF細胞でも同様の結果を得ており、SubABのアポトーシスの初期シグナルがPERKを介することを示唆するものである (投稿中)。

PERK (protein kinase-like ER kinase)

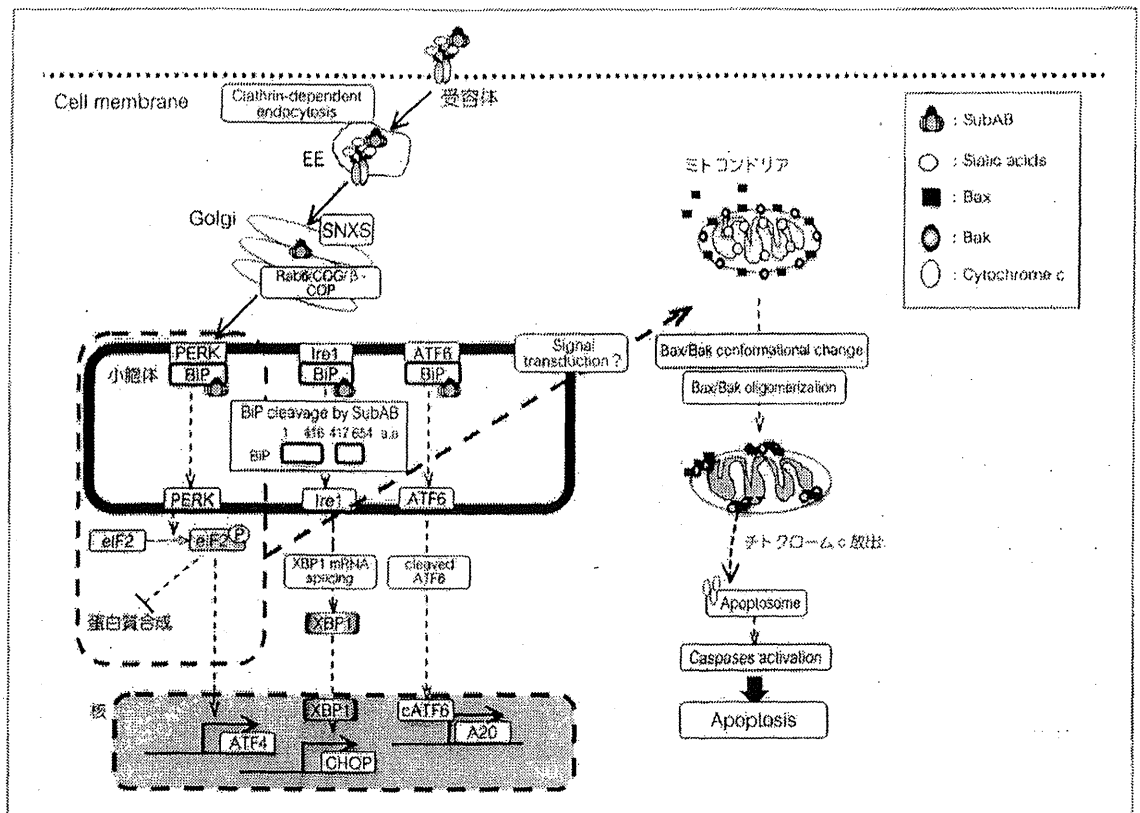


図4 SubABによるアポトーシス機構

EHEC より分泌された SubAB は細胞表層の受容体に結合後、エンドサイトーシスにより取り込まれた後、ゴルジ体を経由し小胞体に移行する。小胞体の BiP の切断は小胞体ストレスセンサータンパク質 (ATF6, Ire1, PERK) を活性化し、種々のシグナルを下流に伝える。PERK を介したシグナルがアポトーシス活性化を誘導し、Bcl2 ファミリータンパク質の Bax/Bak の構造変化を促し、ミトコンドリアからのチトクローム c の放出、カスパーゼの活性化を亢進する。

EHEC : 腸管出血性大腸菌, PERK : protein kinase-like ER kinase

(文献 12 より一部改変)

また、我々は LPS で活性化されたマクロファージが産生する一酸化窒素 (NO) を SubAB が抑制することを見出した。NO は宿主の自然免疫系において強力な殺菌剤となることが知られており、EHEC の感染や病原性発現に対して NO は宿主側の重要な感染防御因子である。その作用機序として、SubAB は LPS 刺激による NF- κ B (nuclear factor-kappa-B) の核内移行、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) プロモーター領域への結合活性を抑制することで、iNOS の発現が阻害されると考えられる (投稿中)。これまでに、NO が

EHEC の SOS 反応を抑制し Stx2 の産生を抑制することが報告され¹⁰⁾、EHEC の病原性発現においても NO が宿主の感染防御因子として重要であることが示唆されている。本研究の結果は、SubAB 産生 EHEC がマクロファージからの NO 産生を抑制することで感染の成立と病原性の発現を促進していると考えられる。

以上のように、SubAB は宿主細胞に対し Stx と同様、さまざまなシグナルを誘導し、宿主の恒常性の破綻を引き起こし病態の悪化に寄与していると考えられる。

NF- κ B (nuclear factor-kappa-B)

iNOS (誘導型一酸化窒素合成酵素)

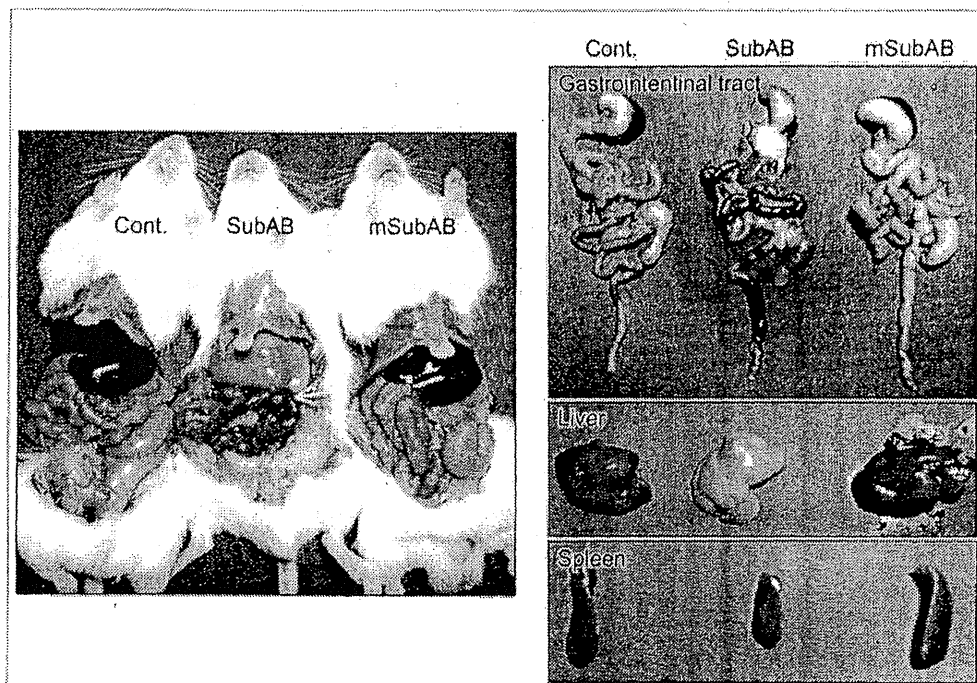


図5 SubAB注射48時間後のマウスの開腹所見

SubABより、上部消化管内に大量の出血、肝臓の白色化、脾臓の萎縮を認める。変異体 mSubAB、コントロールでは変化を認めない。(文献 17 より一部改変)

(2) SubABのマウスに対する病態発現

ヒトにおける SubAB と病態形成の関連性は今なお不明である。これまで、SubAB がマウスに対して、小脳、腎臓および肝臓での病変を引き起こすことが報告され¹⁹⁾、さらに、SubAB の腹腔内投与により Stx でみられる HUS 特有の血小板減少、腎障害、さらには微小管における血栓、脾臓の萎縮、そして肝臓、腎臓、脾臓でのアポトーシスが誘導されて3~4日で死に至ることが報告された。つまり、SubAB による BiP の切断による小胞体ストレスが多臓器不全を引き起こし、マウスを死に至らしめると考えられている¹⁹⁾。

我々も SubAB による病態変化を詳細に究明した。マウスは48~72時間のあいだで死に至り、腎障害(メサンギウムの増加)、血小板減少、脾臓の萎縮を示し、生化学的解析データなどが前述の報告とほぼ同様の結果であった。しかし、腎臓におけるアポトーシス、血栓形成などを観察することができなかった。また、血液凝固障害、炎症をともなう上部消化管からの大量出血、さらには

種々のサイトカインの誘導を新たに確認した(図5)。つまり、SubAB によるマウスの直接的な死因は微小な血栓形成やアポトーシスによるものではなく、上部消化管の炎症をともなう大量出血により死に至るのではないかと考えられた¹⁹⁾。

今後、non-O157型の志賀毒素産生菌感染における SubAB による腸管炎症、血小板減少のメカニズム、さらに、志賀毒素との相関による病態悪化のメカニズム等の究明が必要である。

IV おわりに

腸管出血性大腸菌の主要な病原因子としての Stx、加えて、今回紹介した non-O157型が産生する新規の SubAB 毒素が関与すると思われる出血性大腸炎、さらには重篤な病態である HUS を発症するメカニズムはいまだ不明である。今後、これら毒素の宿主応答機構を解明する上で、細胞や実験動物を使った基礎研究に加え、臨床的知見に基づく解析が不可欠である。

文 献

- 1) Tesh VL : Induction of apoptosis by Shiga toxins. *Future Microbiol* **5** (3) : 431-453, 2010.
- 2) Ogura Y : Genomic analyses of mechanisms of virulence evolution in enterohemorrhagic *E. coli* and enteropathogenic *E. coli*. *Nihon Saikingaku Zasshi* **66** (2) : 175-186, 2011.
- 3) Mohawk KL, O'Brien AD : Mouse models of *Escherichia coli* O157 : H7 infection and shiga toxin injection. *J Biomed Biotechnol* **2011** : 258185, 2011.
- 4) Shimizu T : Expression and extracellular release of Shiga toxin in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Nihon Saikingaku Zasshi* **65** (2-4) : 297-308, 2010.
- 5) Morigi M, et al : Alternative pathway activation of complement by Shiga toxin promotes exuberant C3a formation that triggers microvascular thrombosis. *J Immunol* **187** (1) : 172-180, 2011.
- 6) He C, Klionsky DJ : Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* **43** : 67-93, 2009.
- 7) Lee MS, et al : Shiga toxins induce autophagy leading to differential signalling pathways in toxin-sensitive and toxin-resistant human cells. *Cell Microbiol* **13** (10) : 1479-1496, 2011
- 8) Paton AW, et al : Molecular characterization of a Shiga toxinogenic *Escherichia coli* O113 : H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* **37** (10) : 3357-3361, 1999.
- 9) Bentancor A, et al : Profile of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats and genetic relationships with isolates from cattle, meat and humans. *Vet Microbiol* **156** (3-4) : 336-342, 2012.
- 10) Yahiro K, et al : Identification of subtilase cytotoxin (SubAB) receptors whose signaling, in association with SubAB-induced BiP cleavage, is responsible for apoptosis in HeLa cells. *Infect Immun* **79** (2) : 617-627, 2011.
- 11) Byres E, et al : Incorporation of a non-human glycan mediates human susceptibility to a bacterial toxin. *Nature* **456** (7222) : 648-652, 2008.
- 12) Yahiro K, et al : Subtilase cytotoxin induces apoptosis in HeLa cells by mitochondrial permeabilization via activation of Bax/Bak, independent of C/EBF-homologue protein (CHOP), Irf1alpha or JNK signaling. *Microb Pathog* **49** (4) : 153-163, 2010.
- 13) Matsuura G, et al : Novel subtilase cytotoxin produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli* induces apoptosis in vero cells via mitochondrial membrane damage. *Infect Immun* **77** (7) : 2919-2924, 2009.
- 14) May KL, Paton JC, Paton AW : *Escherichia coli* subtilase cytotoxin induces apoptosis regulated by host Bcl-2 family proteins Bax/Bak. *Infect Immun* **78** (11) : 4691-4696, 2010.
- 15) Vareille M, et al : Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **104** (24) : 10199-10204, 2007.
- 16) Paton AW, et al : A new family of potent AB (5) cytotoxins produced by Shiga toxinogenic *Escherichia coli*. *J Exp Med* **200** (1) : 35-46, 2004.
- 17) Wang H, Paton JC, Paton AW : Pathologic changes in mice induced by subtilase cytotoxin, a potent new *Escherichia coli* AB5 toxin that targets the endoplasmic reticulum. *J Infect Dis* **196** (7) : 1093-1101, 2007.
- 18) Furukawa T, et al : Fatal hemorrhage induced by subtilase cytotoxin from Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Microb Pathog* **50** (3-4) : 159-167, 2011.



**Molecular Characterization Reveals Three
Distinct Clonal Groups among Clinical
Shiga Toxin-Producing Escherichia coli
Strains of Serogroup O103**

Atsushi Iguchi, Sunao Iyoda and Makoto Ohnishi
J. Clin. Microbiol. 2012, 50(9):2894. DOI:
10.1128/JCM.00789-12.
Published Ahead of Print 20 June 2012.

Updated information and services can be found at:
<http://jcm.asm.org/content/50/9/2894>

These include:

REFERENCES

This article cites 43 articles, 25 of which can be accessed free
at: <http://jcm.asm.org/content/50/9/2894#ref-list-1>

CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new
articles cite this article), [more»](#)

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

Journals.ASM.org

Molecular Characterization Reveals Three Distinct Clonal Groups among Clinical Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains of Serogroup O103

Atsushi Iguchi,^a Sunao Iyoda,^b and Makoto Ohnishi^b on behalf of the EHEC Study Group

Interdisciplinary Research Organization, University of Miyazaki, Miyazaki, Japan,^a and Department of Bacteriology I, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan^b

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is one of the most important groups of food-borne pathogens, and STEC strains belonging to the serotype O103:H2 can cause diarrhea, hemorrhagic colitis, and hemolytic-uremic syndrome in humans. STEC O103:non-H2 strains are also sometimes isolated from human patients, but their genetic characteristics and role in significant human enteric disease are not yet understood. Here, we investigated 17 STEC O103:non-H2 strains, including O103:H11, O103:H25, O103:HUT (UT [untypeable]), and O103:H– (nonmotile) isolated in Japan, and their characteristics were compared to those of STEC O103:H2 and other serotype STEC strains. Sequence analyses of *fliC* and *eae* genes revealed that strains possessed any of the following combinations: *fliC*-H2/*eae*-epsilon, *fliC*-H11/*eae*-beta1, and *fliC*-H25/*eae*-theta, where *fliC*-H2, -H11, and -H25 indicate *fliC* genes encoding H2, H11, and H25 flagella antigens, respectively, and *eae*-epsilon, -beta1, and -theta indicate *eae* genes encoding epsilon, beta1, and theta subclass intimins, respectively. Phylogenetic analysis based on the sequences of seven housekeeping genes demonstrated that the O103:H11/[*fliC*-H11] and O103:H25/[*fliC*-H25] strains formed two distinct groups, different from that of the O103:H2/[*fliC*-H2] strains. Interestingly, a group consisting of O103:H11 strains was closely related to STEC O26:H11, which is recognized as a most important non-O157 serotype, suggesting that the STEC O103:H11 and STEC O26:H11 clones evolved from a common ancestor. The multiplex PCR system for the rapid typing of STEC O103 strains described in the present study may aid clinical and epidemiological studies of the STEC O103:H2, O103:H11, and O103:H25 groups. In addition, our data provide further insights into the high variability of STEC strains with emerging new serotypes.

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is one of the most important groups of food-borne pathogens worldwide because it can cause gastroenteritis that may be complicated by hemorrhagic colitis or hemolytic-uremic syndrome (HUS) (21). STEC O157:H7 is the main serotype responsible for outbreaks and sporadic cases of hemorrhagic colitis and HUS, but non-O157 serogroups (such as O26, O103, O111, and O145) can also be associated with severe illness in humans (16, 32).

Serotype O103:H2 is one of the most frequently isolated non-O157 STEC. It was first identified as a causative agent of HUS in 1992 (19), and since then both outbreaks and sporadic cases of diarrhea and HUS caused by STEC O103:H2 have been reported worldwide (2, 7, 14, 20, 34). STEC O103 strains expressing H antigens other than H2 are sometimes isolated from human patients. Sporadic cases of human infections with O103:H11 in Japan (37) and Canada (38) have been described previously, and it was recently shown that O103:H25 was responsible for outbreaks of HUS in Norway (35). Thus, STEC O103:non-H2 serotype strains have also become a threat to public health.

Our previous studies (12, 13) demonstrated that *E. coli* strains with the same O serogroup but different H types sometimes belong to different evolutionary lineages. Furthermore, most STEC strains possess various combinations of virulence genes and exhibit allelic variations of some genes, such as the *stx* gene on lambda-like prophages and *eae* (encoding the adhesin intimin) on the locus of enterocyte effacement (LEE) element, which may affect the pathogenicity of strains. Because O103:H2 is a major serotype of STEC, the prevalence and genotypic characteristics of these strains have been investigated in detail; however, little is known about the characteristics of STEC O103:non-H2 strains.

The aim of the present study was to compare STEC O103:

non-H2 strains isolated from Japanese patients infected with STEC O103:H2 and other serotype STEC strains to identify their genetic characteristics and to explore their phylogenetic relationships to determine whether pathogenic non-H2 strains share similar molecular characteristics with other, better-characterized O103 strains.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. The relevant characteristics of the 22 STEC O103 strains, including five O103:H2 strains used in the present study, are listed in Table 1. The strains were isolated from patients with gastrointestinal disease (including diarrhea and hemorrhagic colitis) from 2007 to 2011 in various prefectures of Japan. O serogroups of each strain were determined by agglutination tests with the anti-O103 serum (Denka Seiken Co., Ltd., Tokyo, Japan) according to the manufacturer's instructions. H types were determined using a set of anti-H sera purchased from Statens Serum Institut (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark). Three STEC strains, O145:H– (092372), O121:H19 (071942), and O165:H– (071324), obtained from Osaka Prefectural Institute of Public Health and three different kinds of *E. coli* serotype strains, O128:H2 (100923), O130:H11 (102608), and O156:H25 (110085), obtained from Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences were used as controls for the phylogenetic analysis and the multiplex PCR assay described below, respec-

Received 2 April 2012. Returned for modification 4 May 2012.

Accepted 12 June 2012.

Published ahead of print 20 June 2012.

Address correspondence to Atsushi Iguchi, iguchi@med.miyazaki-u.ac.jp.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.00789-12