

令和元年6月21日現在

機関番号：13101
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：16K10016
研究課題名（和文）肺炎球菌の選択的除菌を目的としたアンチセンス療法の開発

研究課題名（英文）Selective antibacterial activity of peptide nucleic acid against *Streptococcus pneumoniae*

研究代表者
大塚 岳人（Otsuka, Taketo）
新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：20772007
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：新しい抗菌薬としてアンチセンス療法（ペプチド核酸：Peptide Nucleic Acid【PNA】）の開発を行った。特に細菌性肺炎・中耳炎の主要起炎菌である肺炎球菌を対象菌とした。さまざまな改良を加えた結果、肺炎球菌に対して効果の高いPNA（RFR-acpP-PNA2S）を同定できた（MIC 5 μ mol/L）。

研究成果の学術的意義や社会的意義
従来の抗菌薬はその濫用により耐性化が問題となっている。本研究で開発した新しい抗菌薬であるPNAは、肺炎球菌だけが持つ遺伝子配列をターゲットにすることで同菌を選択的に除菌することができる。

研究成果の概要（英文）：To assess antibacterial activity against *Streptococcus pneumoniae*, we designed PNA-peptides. A PNA-peptide（RFR-acpP-PNA2S）that targets acpP, has a 5 membrane-penetrating peptide and has a linker shows excellent activity against planktonic *Streptococcus pneumoniae*（MIC 5 μ mol/L）.

研究分野：感染症

キーワード：肺炎球菌 アンチセンス ペプチド核酸 必須遺伝子 薬剤耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児における細菌性肺炎や中耳炎の3大原因菌は、上咽頭に常在する肺炎球菌、インフルエンザ菌、モラキセラ・カタラーリスである。これらの菌が上咽頭に定着するステップを阻止できれば疾病の予防に直接的な効果が期待される。このステップ阻止には主に2つのアプローチ(抗菌薬とワクチン)がある【図1】。第1の抗菌薬は、常在菌叢を乱すばかりでなく耐性菌増加を引き起こすためメリットが少ないと結論された。加えて、上咽頭にバイオフィルムを形成した肺炎球菌の除菌が非常に困難であることもこのアプローチの効果を下げている。

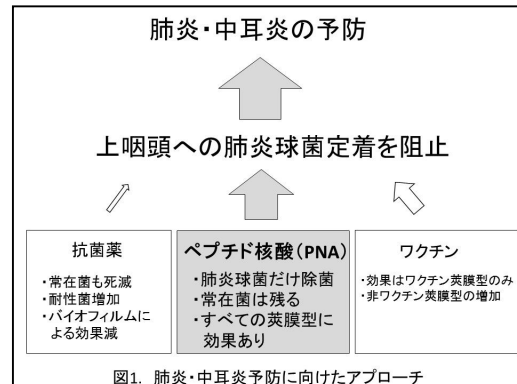
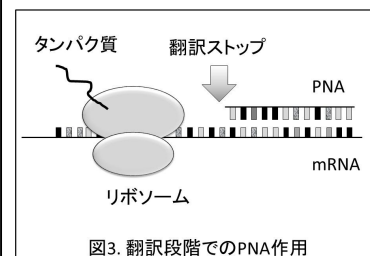
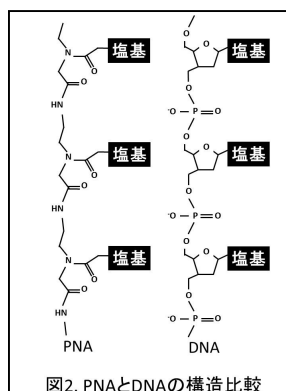


図1. 肺炎・中耳炎予防に向けたアプローチ

第2の小児用肺炎球菌結合型ワクチン(PCV)は小児の髄膜炎発症を劇減させた効果の高いワクチンである。にもかかわらず肺炎球菌は依然として肺炎・中耳炎の主要原因菌であり続けている。それは本ワクチンが適合する莢膜型(7~13種)に対して十分な効果を示す一方で、これを回避した非ワクチン莢膜型(残りの80種)による疾病が増加したためである。

以上から、(1)常在菌叢を残し肺炎球菌だけを除菌する、(2)すべての肺炎球菌莢膜型をカバーする、(3)バイオフィルム内の肺炎球菌にも効果がある、という条件を満たした新しいアプローチが必要である。

新規抗菌薬治療として期待されるアンチセンス療法は、人工的に合成したペプチド核酸(PNA)などを用いた遺伝子工学的アプローチである。PNAの構造はDNAに酷似しており【図2】、相補的配列を持つDNA/mRNAに結合することでタンパク質の合成を阻害する【図3】。PNAは1塩基の違いを認識する特異性を持ち、DNAに強く



結合する。したがって 人体に対する低毒性、常在菌叢への影響なし、という抗菌薬として理想的な長所を持つ物質である。しかもpH変化・ヌクレアーゼ・プロテイナーゼに対しても安定を保つ。病原微生物の必須タンパク質遺伝子をターゲットとしたPNAを投与することで、病原微生物の増殖を抑制、感染症の発症を予防できる。現在までに、インフルエンザ菌(Otsuka T, 研究業績1、5)、大腸菌、黄色ブドウ球菌、HIVウイルスなどの増殖抑制効果が証明されているが、肺炎球菌に対する効果については報告がない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「細菌性肺炎・中耳炎の主要起炎菌である肺炎球菌に対するアンチセンス療法(ペプチド核酸: Peptide Nucleic Acid 【PNA】)の開発」に向けた基礎研究である。肺炎球菌のPNAに対する感受性を測定し、PNAの新規抗菌薬としての効果を明らかにする。またPNAが常在菌叢には影響を及ぼさないこと、すべての肺炎球菌莢膜型をカバーすること、バイオフィルム内の肺炎球菌にも効果があることなどを証明する。加えてPNA耐性メカニズムを解明することで、臨床応用へと展開するための研究基盤を確立する。

3. 研究の方法

本研究では肺炎球菌に対するPNAの効果を明らかにするために以下の項目を解析した。

- 肺炎球菌の *acpP* 遺伝子をターゲットとした最適な PNA を作製した。
- 肺炎球菌に対する PNA 感受性試験 (MIC、MBC、MBEC) を行った。
- 継代培養法などを用いて PNA 耐性株を分離し、耐性メカニズムを解析した。

以上を PNA 開発の基礎データとして、臨床応用を前提とした次の研究へと展開する。

当初計画していた常在菌および肺炎球菌臨床株に対する PNA 感受性試験は行わなかった。

(1) ターゲット遺伝子の選定

ターゲット遺伝子は肺炎球菌生存に必須な *acpP* 遺伝子 (acyl carrier protein をエンコードし、脂肪酸代謝に関与する) とした。*acpP* 遺伝子は他菌種においても PNA のターゲットとして有効性が報告されている (Geller BL, 2005、Mitev GM, 2009)。PNA が結合する *acpP* 遺伝子の配列部位に変異がないか、本研究に使用するすべての菌株について PCR で増幅し塩基配列を決定した。以下の菌株を実験材料として使用した。

標準菌株：TIGR4 (莢膜血清型 4 型)、D39 (莢膜血清型 2 型)、R6 (D39 から作成された無莢膜型)。これらの菌株はアメリカ培養細胞系統保存機関 (ATCC) から購入した。

(2) PNA 構造の設計

最も効果が高い PNA 基礎配列は、ターゲット遺伝子の開始コドン付近で長さは 9-12 塩基と報告されている (Nielsen PE, 1999)。本研究では *acpP* 遺伝子の開始コドン前後で、変異を認めなかった 10-12 塩基を選定した。BLAST による相同性検索で当該塩基配列が他の報告株でも完全に一致すること (ターゲット箇所が保存されていること)、他の遺伝子と相同性がないこと (ターゲット箇所が重複しないこと) を確認した。この 5'末端側にリンカー (eg1, 8-amino-3, 6 dioxaoctanoic acid) を挟んで、細胞膜貫通ペプチドと PNA 基礎配列と結合させた。また特異性・低毒性を証明するため、PNA 基礎配列を並び替え、ターゲット遺伝子とは無関係な配列を持った対照 PNA も作成した。

(3) 薬剤感受性試験

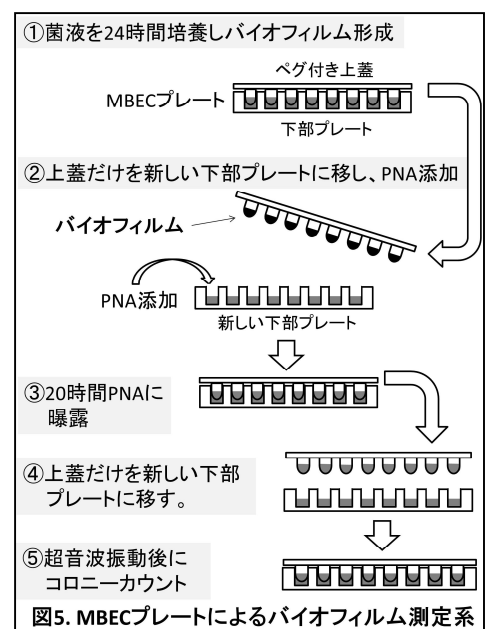
(3)a. 最小発育阻止濃度 (MIC) と最小殺菌濃度 (MBC) の測定

薬剤感受性試験の標準法である Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ガイドラインに準拠した微量液体希釈法で MIC と MBC を決定した。

(3)b. 最小バイオフィーム内細菌殺菌濃度 (MBEC) の測定

上蓋に突起 (ペグ) を持つバイオフィーム測定専用プレート (MBEC プレート【図 5】) を用いた。この MBEC プレートをを用いることでバイオフィーム構造外からの浮遊菌混入を避けることができる。

その後、ヒト気道上皮細胞 (H292 cell) をベースとしたバイオフィーム形成実験に変更し、MBEC を測定した。



(4) PNA 耐性メカニズムの解明

MIC の 1/4 濃度の PNA を添加した液体培地内で標準株を継代培養する手法で PNA 耐性株を分離した後、標準株と PNA 耐性株の全ゲノムを比較した。

4 . 研究成果

PNA基礎配列や膜貫通性ペプチドの組み合わせなどに改良を加え、合計26種類のPNAを設計し肺炎球菌のPNAに対する感受性測定を行った。その結果、抗菌作用の高いPNA (RFR-acpP-PNA2S) を同定できた (MIC 5 μ mol/L)。当該PNAは実験標準株4株に対して同等の抗菌作用を示した。

続いてRFR-acpP-PNA2Sを用いたバイオフィーム実験を行った。ヒト気道上皮細胞(H292 cell)をベースとしたバイオフィーム作成後に、PNAを曝露させその抗バイオフィーム作用を測定した。しかし、RFR-acpP-PNA2S濃度を40 μ mol/Lまで上げても抗バイオフィーム作用を認めなかった。

上記に並行してPNA耐性メカニズムを解明するために、PNA存在下で継代培養し耐性を誘導した株を分離した (MIC 20 μ mol/L)。耐性株と親株とのゲノム比較で責任遺伝子を推定し、ノックアウト株を作製する予定であったが、シーケンス結果には有意な変異を認めず、当該耐性株は遺伝子発現量の差異による耐性化と判断した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 大塚岳人、齋藤昭彦. アンチセンス薬剤とは何か? ~選択的除菌を可能にする新しい抗菌薬~. 第28回外来小児科学会年次集会. 2018年8月24-26日、東京
2. 大塚岳人、齋藤昭彦. アンチセンス薬剤は無莢膜型インフルエンザ菌にどのように作用するのか?. 第67回日本感染症学会東日本地方会 2018年10月24日~10月26日、東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし