

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12912

研究課題名(和文)黄色ブドウ球菌感染症の超早期発見・超早期治療を実現する新規診療法の基盤構築

研究課題名(英文) Study on novel diagnostic approach for early detection and early treatment of staphylococcus aureus infectious disease

研究代表者

濱田 浩幸 (Hamada, Hiroyuki)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：80346840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：コンピュータシミュレーション技術を用いて、黄色ブドウ球菌の病原性発現過程を解析した。黄色ブドウ球菌の病原性遺伝子発現レベルが潜伏期間後期に顕著な揺らぎを示した。生物物理学の観点から、その揺らぎの増大は病原性発現の予兆と見なされた。そして、この揺らぎの増大の阻害は、黄色ブドウ球菌の病原性発現を抑制した。その阻害技術の構築は、黄色ブドウ球菌を静菌状態に維持する新しい治療方策の開発に貢献する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The pathogenic expression process of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) was mathematically analyzed by employing numerical simulation techniques. The pathogenic gene expression level showed a significant fluctuation in the late incubation period. From a perspective of biophysics, the increasing in fluctuation was identified a presymptom of pathogenic expression. Moreover, an inhibition of the fluctuation arrested the pathogenic expression. The realization of the inhibition could contribute to a development of novel therapeutic system which maintains *S. aureus* in bacteriostatic condition.

研究分野：システム生物学、医用工学

キーワード：黄色ブドウ球菌 感染症 病原性発現 早期発見 早期治療 数理解析 揺らぎ 状態遷移

1. 研究開始当初の背景

カテーテルなどの留置式医療器具や人工心臓弁などの植込み型医療機器は人類の生存率向上に大きく貢献している。しかしながら、これらの機器の適用が敗血症などの致死感染を引き起こすという深刻な問題は未だ解決できていない。これらの感染症の起因菌として黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) が特定されている (Archer, 1998)。黄色ブドウ球菌は自らが分泌する細菌間シグナル伝達物質 (Auto inducer peptide: AIP) の細胞外濃度の上昇に伴い病原性を発現する (Miller, 2001)。その AIP 産生能は positive feedback 機構を実装する Accessory Gene Regulator (AGR) system により調節される。故に、治療着手の遅れは感染症の難治化を招く (Jabbari, 2010)。また、黄色ブドウ球菌の感染症治療では、薬剤耐性菌出現の観点から抗生物質の多用が禁忌とされ、これもまた、難治化および感染拡大の要因となる。このような背景の下、世界中の医療機関において、1) 黄色ブドウ球菌感染症の予兆の逸早い捕捉、2) 短期かつ低投与量の抗生物質治療による感染症の沈静化、の双方を実現する超早期発見・超早期治療の新しい診療支援システムの開発が求められている。

応募者は生命システムの動的挙動の解明に興味を持ち、これまでに様々な生命現象の状態遷移過程を精査してきた。そして、状態遷移の事前事象として『揺らぎの極大化』を見出した。例えば、心拍動間隔の揺らぎの極大化 (不整脈) を経て心停止が起こる、残存腎機能の日差の極大化を経て末期腎不全に陥るなどである。これらの事例は、生命システムの機能や構成因子 (化学種) 濃度の揺らぎの極大化が健康から疾病への状態遷移の予兆となりうることを暗示している。黄色ブドウ球菌の病原性発現において、このような揺らぎを特定し、その揺らぎの促進因子 (状態遷移の支配因子) の振舞いを抑制する方法を構築すれば、超早期発見・超早期治療の新しい診療支援システムの開発を具体化できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、数理解析技術を用いて、黄色ブドウ球菌の病原性発現における『揺らぎと状態遷移の関係』を精査し、病原性発現を抑制する方策を検討する。具体的には、黄色ブドウ球菌の病原性発現過程を表現する数理モデルを構築し、菌体内化学種濃度の変動の確率的数値シミュレーションを実践する。そして、菌体内化学種濃度の揺らぎの極大化と黄色ブドウ球菌の病原性発現の関係を精査し、揺らぎが病原性発現の予兆と見なせるか否かを検討する。最後に、その予兆の発現を抑制する生化学反応過程 (創薬標的) を探索する。

3. 研究の方法

(1) 黄色ブドウ球菌の病原性遺伝子発現システム

黄色ブドウ球菌の病原性遺伝子の発現は AGR system により制御されている (図 1)。AGR system は、主に 4 つのタンパク質 (AgrB, AgrD, AgrC および AgrA) から構成される。AgrB は AgrD を AIP に修飾し、AIP を細胞外へ放出する。細胞外 AIP 濃度が上昇すると、細胞膜の AgrC 受容体が細胞外 AIP と結合する。そして、AIP と結合した AgrC 受容体は細胞内 AgrA をリン酸化する。リン酸化された AgrA は病原性遺伝子群 (例: hld 溶血毒遺伝子) と AgrB, AgrD, AgrC および AgrA の遺伝子 (agrBDCA) の発現を強化する。つまり、細胞外 AIP 濃度の上昇が AGR システムの活性を高める。この positive feedback 効果が極めて短時間で亢進されるため、治療着手の遅れが生じることとなる (Miller, 2001)。

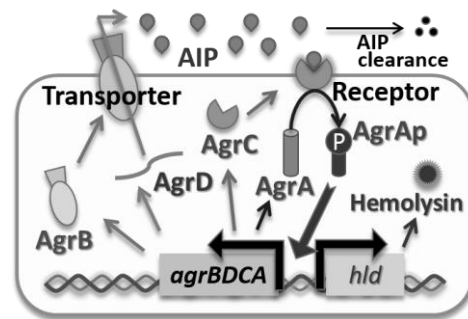


図 1 黄色ブドウ球菌 AGR system
細菌間シグナル伝達物質 AIP を自己分泌し、病原性遺伝子発現を強化する。

(2) 黄色ブドウ球菌 AGR system の数理モデルの構築と病原性発現の数値解析

AGR system の反応スキーム (図 1) に基づき、まず、一般質量作用則に従う常微分方程式系の数理モデルを構築した。ここで、病原性遺伝子の発現レベルが Microscopic zone (少数) から Macroscopic zone (多数) へ遷移することに注目すると、Microscopic zone のシステム動態の理解に不可欠な確率性を考慮する必要がある。そこで、Langevin 型確率微分方程式系を用いて数理モデルを改変した。そして、細胞外に分泌された AIP の細胞間輸送現象を表現するため、反応-拡散方程式を導入した。この数理モデルを用いて、AIP による細菌間のシグナル伝達と細菌内 AGR system の動態を同時に解き (Motomura, 2016)、1 細菌レベルと細菌集団レベルの病原性発現の状態遷移を解析した。なお、評価項目は Microscopic zone と Mesoscopic zone (少数と多数の中間状態) の境界で観測される病原性遺伝子発現レベルの揺らぎの極大化とした。

(3) 病原性発現の予兆を抑制する生化学反応過程の探索

AGR system の構成因子の転写・翻訳・ホールディングの過程と構成因子間の反応過程の全速度定数を個別に基準値の 0 ~ 200% の範囲で 10% ごとに変更し、各速度定数が Microscopic zone と Mesoscopic zone の境界で観測される病原性遺伝子発現レベルの揺らぎの極大化におよぼす影響を評価した。具体的には、速度定数に基準値を用いた場合の揺らぎのピーク時刻 (Tc) と速度定数を変更した場合のそれ (Tt) の比を用いて影響度 (=Tc/Tt) を解析した。影響度の大きい順に速度定数を並べ、Microscopic zone と Mesoscopic zone の境界で観測される病原性遺伝子発現レベルの揺らぎの極大化を促進する速度定数を特定した。その速度定数が関わる生化学反応過程 (創薬標的) を操作する方策を検討した。

4. 研究成果

(1) 病原性遺伝子発現レベルの推移

黄色ブドウ球菌の病原性発現阻害の基本的な考え方は、AIP を連続的に除去する (清潔にする) ことである (AIP clearance: 図 1 参照)。そして、AIP clearance で静菌状態を維持できない場合は、抗生物質を適用する。図 2A は黄色ブドウ球菌の病原性遺伝子発現

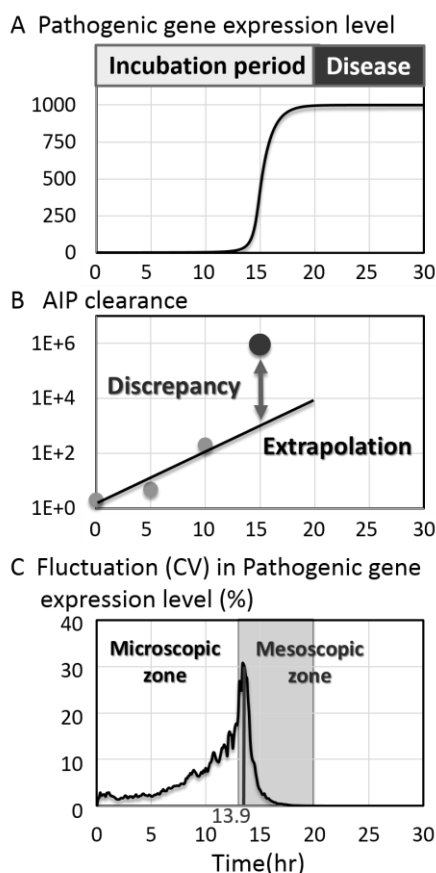


図 2 黄色ブドウ球菌の病原性発現の挙動

- (A) 病原性遺伝子発現レベルの遷移
- (B) 病原性抑制に要する AIP clearance
- (C) 病原性遺伝子発現レベルの揺らぎ

レベルの経時変化と感染症の治療指針に基づく潜伏期間 (Incubation period) を示す。図 2B は治療着手時ごとに求めた病原性発現阻害に必要な治療強度 AIP clearance を示す。治療着手の遅れと共に治療強度を高める必要があるが、Time 15hr は潜伏期間中かつ病原性遺伝子発現レベルが低値であるにもかかわらず (図 2A)、その治療強度は Time 1, 5, 10hr の強度に基づく外挿値をはるかに上回った (図 2B)。つまり、Time 15hr は既に疾病状態 (Disease) に遷移していた。この所見は『既存の診断法では感染症の早期発見が難しい』ことを暗示した。

(2) 病原性遺伝子発現レベルの揺らぎと状態遷移の関係

図 2C は黄色ブドウ球菌の病原性遺伝子発現レベルの揺らぎの経時変化を示す。その揺らぎは時間とともに増大し、病原性遺伝子発現開始時近傍 (Time 13.9hr: Microscopic zone と Mesoscopic zone の境界) で極大となった。図 3 は状態遷移のシナリオを示す。黄色ブドウ球菌は病原性未発現状態 (図 3A) から発現状態 (図 3C) へ遷移する。細胞外 AIP 濃度の増加は 2 つの井戸 (ベイスン) を浅くし、黄色ブドウ球菌の自由度を大きくする。その結果、黄色ブドウ球菌の構成因子の揺らぎ (図 3A~C 内の fluctuation) は徐々に増大し、状態遷移時に極大となる (図 3B)。黄色ブドウ球菌が病原性発現状態に遷移すると、揺らぎは極小化する (図 3C)。この状態遷移中の揺らぎの変化の考察から、図 2C に観られる病原性遺伝子発現レベルの揺らぎの極大化が病原性発現の予兆であると考えた。

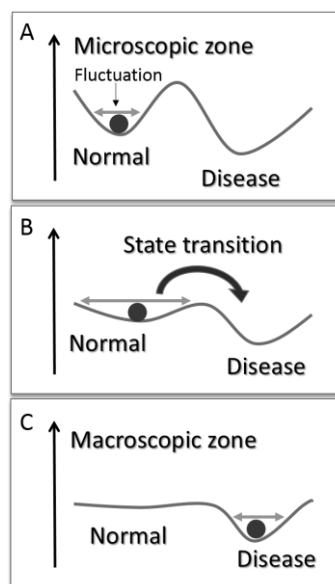


図 3 黄色ブドウ球菌の病原性の状態遷移

- (A) 病原性発現前 (系の揺らぎ小)
- (B) 状態遷移臨界点 (系の揺らぎ大)
- (C) 病原性発現後 (系の揺らぎ小)

(3) 病原性遺伝子発現レベルの揺らぎの極大化を抑制する生化学反応過程の探索

数理モデルに含まれる反応速度定数が病原性遺伝子発現レベルの揺らぎにおよぼす影響を網羅的に精査し、揺らぎの極大化を促進する5つの生化学反応過程を特定した。これらのうち以下3つは細胞内の生化学反応過程に関係するものであった。1) AgrAのリン酸化の促進、2) 翻訳促進、3) タンパク質分解過程の阻害。これらを抑制するためには、抗生物質の適用が不可欠であった。一方、以下2つは細胞外の生化学反応過程に関係するものであった。1) AIP clearanceの低下、2) AIPとAgrCの結合促進。AIP clearanceについては、4. 研究成果(1) 病原性遺伝子発現レベルの推移に示したように、AIP clearanceを高めることは、現在の感染症の診療指針においても有効と考えられている。一方、AIPとAgrCの結合については、病原性遺伝子発現レベルの揺らぎの極大化を抑制するために、これらの結合の阻害が望まれた。これらの結合の阻害を実現する方策を構築すれば、黄色ブドウ球菌の静菌状態の維持制御法を確立できる可能性がある。

(4) まとめ

統計力学および生物物理学の観点から黄色ブドウ球菌の病原性発現の状態遷移過程を考察し、感染症の予兆を探索した。そして、黄色ブドウ球菌の病原性発現初期に病原性遺伝子の発現レベルに顕著な揺らぎを特定した。この揺らぎは病原性発現の予兆と見なされた。この揺らぎの極大化を抑制する方策の1つとして、AIPとAgrCの結合阻害が提案された。この阻害を実現すれば、黄色ブドウ球菌の静菌状態の維持制御法を確立できる可能性がある。

<引用文献>

- ① Archer G. L., Staphylococcus aureus: a well-armed pathogen. Clin. Infect. Dis. 26, 1998, 1179-1181.
- ② Miller M. B., and Bassler B. L. Quorum sensing in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 55, 2001, 165-199.
- ③ Jabbari S., King J. R., Koerber A. J., and Williams P. Mathematical modelling of the agr operon in Staphylococcus aureus. J. Math. Biol. 61, 2010, 17-54.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① Yohei Motomura, Hiroyuki Hamada, and Masahiro Okamoto, An Effective Numerical Calculation Method for Multi Time-Scale Mathematical Models in Systems Biology, Applied Mathematics, 査読有, 7, 2016, 2241-2268, DOI: 10.4236/am.2016.717178.

[学会発表] (計10件)

- ① 濱田 浩幸, 岡本 正宏, 黄色ブドウ球菌の病原性発現予兆を超早期に特定する方法の開発, 日本透析医学会学術委員会・血液浄化に関する新技術検討小委員会, 2018.
- ② 濱田 浩幸, 浅村健太, 出口真里, 岡本諒太, 花井 泰三, 岡本 正宏, 数理システム生物学に基づく黄色ブドウ球菌病原性発現兆候の早期特定と早期治療, 第69回日本生物工学会大会, 2017.
- ③ 濱田 浩幸, 岡本 正宏, 山下 明泰, ワークショップ「ハイブリッド人工臓器と治療薬モニタリング」: 治療システムの開発における細胞レベルの数理解析の有用性, 第55回日本人工臓器学会大会, 2017.
- ④ Hiroyuki Hamada, and Masahiro Okamoto, Mathematical analysis of early detection and early treatment for Staphylococcus aureus pathogenic expression, The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs, 2017.
- ⑤ 濱田 浩幸, 岡本 正宏, 数理解析に基づく黄色ブドウ球菌病原性発現の早期抑制法の検討, 第62回日本透析医学会学術集会・総会, 2017.
- ⑥ 濱田 浩幸, 岡本 正宏, 黄色ブドウ球菌感染症の早期発見に関する数理解析, 第54回日本人工臓器学会大会, 2016.
- ⑦ Hiroyuki Hamada, and Masahiro Okamoto, Mathematical Analysis of Early Detection and Early Treatment for Staphylococcus Aureus Infectious Disease, The 34th International Society of Blood Purification 2016, 2016.
- ⑧ 濱田 浩幸, 岡本 正宏, 黄色ブドウ球菌病原性発現の早期発見・早期治療の数理解析, 日本透析医学会学術委員会・血液浄化に関する新技術検討小委員会, 2016.

[その他]

ホームページ等

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K001660/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 浩幸 (HAMADA, Hiroyuki)

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号: 80346840