

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390125
 研究課題名（和文） 細菌プロテアーゼ抑制を基盤としたグラム陽性菌敗血症治療法の開発に関する研究
 研究課題名（英文） Development of gram-positive bacteria sepsis therapy by inhibition of bacterial proteases.
 研究代表者
 今村 隆寿（IMAMURA TAKAHISA）
 熊本大学・大学院医学薬学研究部・准教授
 研究者番号：20176499

研究成果の概要：黄色ブドウ球菌放出病原プロテアーゼ staphopain A と B の立体構造に基づいて活性中心部の鍵穴に当てはまる化学物質を 30 万種類程度の試薬リストからコンピュータを使ってドッキング計算より選出し、阻害効果を調べた。Staphopain B については K_i 値が数 $10\mu\text{M}$ 程度の阻害物質しか得られなかったが、A に対して最も強い阻害効果をもつ chemical #11 は、 K_i 値 $1.3\mu\text{M}$ で拮抗型阻害を示し、本菌敗血症性ショック発症に直結する staphopain A の血管漏出作用を $20\mu\text{M}$ でほぼ完全に抑制した。さらに他の細菌や細胞、血漿由来のプロテアーゼに対してもその種類や基質特異性とは無関係に阻害効果がみられたことから、プロテアーゼが関係する疾患への治療を含めた多方面への応用性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	9,500,000	2,850,000	12,350,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：黄色ブドウ球菌、プロテアーゼ、阻害剤、血管漏出、敗血症性ショック

1. 研究開始当初の背景

新興・再興感染症の発生、耐性菌の出現など、感染症は依然大きな医療対象であり、特に死亡率が高い敗血症性ショックの治療法開発は緊急の課題である。黄色ブドウ球菌は普遍的に存在する病原菌であり、グラム陽性菌による敗血症性ショックの主要な原因菌である。黄色ブドウ球菌感染では MRSA 等の耐性菌の出現の問題があり、抗生物質に代わる新たな感染症治療薬が求められている。

2. 研究の目的

黄色ブドウ球菌の産生・放出するプロテアー

ゼ staphopains が重要な病原因子であり、ショックに直結する血管漏出と血圧低下を誘導することを示し、敗血症性ショックの病態に貢献していることを明らかにした。そこで、staphopains の阻害剤を開発してショック関連作用抑制効果を示し、プロテアーゼ阻害剤が本菌敗血症性ショック治療薬として有用であることを明らかにする。

3. 研究の方法

Staphopains の精製：黄色ブドウ球菌培養上清から、種々のカラムクロマトグラフィによって staphopain A と B を

SDS-PAGE ゲルによる解析で単一バンドになるまで精製した。

Staphopains に対する抑制活性の測定：抑制活性のスクリーニングのために、各 staphopain 10 nM に対し、10 μM で抑制効果がみられる化学物質を選出して K_i 値を求めた。抑制効果のみられた物質の情報を加えてコンピュータによる抑制物質のさらなる探索を行った。staphopain A 5 nM、staphopain B 10 nM が蛍光基質 Z-Leu-Leu-Glu-MCA (167 μM) と Z-Phe-Arg-MCA (167 μM) を各々水解する活性に対して得られた化学物質 2 μM の抑制効果を調べた。Staphopain A の種々の濃度の Z-Leu-Leu-Glu-MCA (s) に対する水解速度 (v) を抑制物質 2 μM 存在下と非存在下で測定した。1/v vs. 1/s プロットのグラフを作成し、そのパターンから阻害形式を明らかにした。また、種々の基質濃度における水解速度からコンピュータを使った Taylor 展開を併用する最小自乗法 (Sakoda & Hiromi, 1976) で K_m 値、阻害物質存在下の K_m 値 ($K_{m,app}$) を求めた。阻害形式が拮抗型であったことから、 K_i 値は、 $K_{m,app} = K_m (1 + i/K_i)$ から i に 2 μM を代入して求めた。プロテアーゼ活性による水解で放出される AMC 量は励起波長 380 nm、蛍光波長 440 nm で蛍光分光光度計にて測定した。

IC_{50} によるプロテアーゼ抑制効果の比較：種々の濃度の阻害物質の存在下でプロテアーゼが各々に特異的な基質を水解する速度を測定し阻害物質非存在下の 50% の速度になる阻害物質の濃度を調べた。

Staphopain A 血管漏出抑制効果の測定：モルモットにエバンスブルー (80 mg/kg 体重) を静脈注射し、即座に剃毛した背部にサンプル 100 μl を皮内注射した。10 分後モルモットを脱血死させ、背部皮膚を剥離して注射部を切り出し、3 ml のホルムアミドに浸して 60°C、48 時間でエバンスブルーを抽出し、620 nm の吸光度で定量した。

Staphopains 阻害物質の探索：既に明らかになっている staphopains の立体構造に基づいたプロテアーゼ活性中心部の鍵穴に当てはまる化学物質を 30 万種類程度の試薬リストからコンピュータを使ってドッキング計算より選出し、上位の物質を阻害物質候補としてプロテアーゼ抑制活性測定の対象とした。

4. 研究成果

Staphopains 阻害候補物質の選出：Staphopains の立体構造に基づいてドッキング計算より staphopain A と B に対して上位 40 種類と 90 種類を選出し、プロテ

アーゼ阻害活性測定により K_i 値数 μM から数 10 μM の阻害活性を持つ物質が各々 3 種類と 4 種類得られた。これらの物質の情報を選出の条件に加えてさらに強力な阻害物質探索を行い、その候補物質の上位から入手可能な 14 種類と 9 種類をそれぞれ staphopain A と B の阻害物質対象とした。

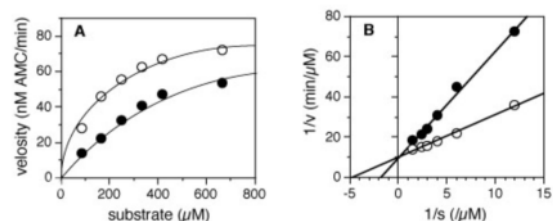
Staphopains 酵素活性抑制作用：Staphopain A に対しては、表 1 に示すように自家蛍光のため蛍光基質では測定不能であった #8 を除き、13 種類すべてに抑制効果が認められた。なかでも chemical #11 は最も抑制効果が強かったので、さらに検討を行った。一方、staphopain B の方では 5 種類に抑制がみられたものの K_i 値は数 10 μM で、最初の選出で得られた抑制物質より抑制効果の強い化合物は得られなかった。

表 1. Staphopain A (5nM) に対する抑制効果

chemicals (2 μM)	Residual activity (%)
#1	87
#2	91
#3	68
#4	74
#5	85
#6	84
#7	44
#8	自家蛍光で測定不能
#9	74
#10	79
#11	30
#12	81
#13	63
#14	58

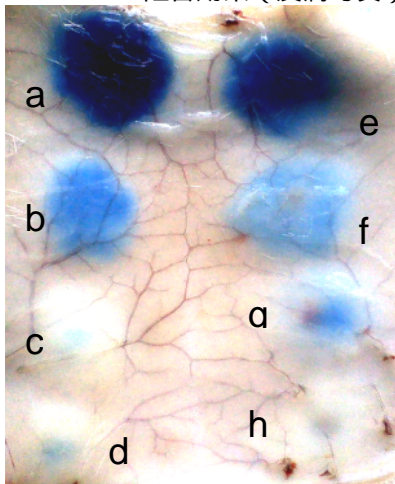
Chemical #11 の staphopain A 活性抑制形式：図 1A で示すように、chemical #11 (2 μM) によって K_m 値は 188 μM から 483 μM に増大した。これらの値から得られた K_i 値 1.3 μM は、最初に選出した chemicals の K_i 値 7 ~ 数 10 μM より小さいことから chemical #11 はこれまで調べた staphopain A 阻害物質の中で最も強力であることがわかった。さらに図 1B の 1/v vs. 1/s プロットのグラフで示されるように、両直線が同じ y 軸の 1 点で交わることから、その阻害形式は拮抗型であることが明らかとなった。この結果は chemical #11 が staphopain A 阻害剤として *in vivo* でも応用可能である事を示唆する。

図 1



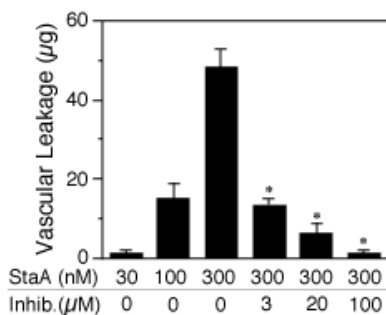
Chemical #11 の staphopain A 血管漏出作用抑制効果： Staphopain A に対する阻害剤としての chemical #11 の *in vivo* における効果の 1 つとして敗血症ショックに直結する血管漏出作用への効果を調べると、図 2 A に示すように chemical #11 は濃度に比例して staphopain A の血管漏出作用を抑制することがわかった。漏出したエバンスブルーを抽出して活性を定量すると、図 2 B に示すように staphopain A 300 nM の血管漏出活性は chemical #11 の 3 μ M (図 2 A-e) で約 1/3 にまで抑制され、20 μ M (図 2A-f) でさらにその半分に、100 μ M (図 2A-g) でほぼ完全に消失した。chemical #11 は 100 μ M (図 2A-h) では血管漏出活性はみられなかった。この結果は chemical #11 が staphopain A 阻害剤として *in vivo* でも有効であることを示す。

図 2 A. Staphopain A の血管漏出活性と chemical #11 の阻害効果 (皮膚写真)



a, staphopain A 300nM; b, staphopain A 100nM; c, staphopain A 30nM; d, 10mM Tris-HCl buffer, pH 7.3, 150mM NaCl; e, staphopain A 300 nM + chemical #11 3 μ M; f, staphopain A 300 nM + chemical #11 20 μ M; g, staphopain A 300 nM + chemical #11 100 μ M; h, chemical #11 300 μ M.

図 2 B. Staphopain A の血管漏出活性と chemical #11 の阻害効果 (抽出エバンスブルーの定量)



*, $P < 0.01$ vs. staphopain A 300nM のみ ($n = 3$).

Chemical #11 の他のプロテアーゼに対する抑制効果 (表 2): Chemical #11 は staphopain B に対しても A とほぼ同様の阻害効果を示した。細菌由来の同じシステインプロテアーゼでファミリーが異なる gingipain R および K に対しても、ほぼ同じ IC_{50} の値であった。膵臓由来のセリンプロテアーゼには IC_{50} はやや高いが阻害効果がみられた。肝臓由来のシステインプロテアーゼの cathepsin B やと血漿由来凝固因子でセリンプロテアーゼのトロンピンには阻害効果は弱かったが、線溶プロテアーゼの plasmin には効果的であり、しかも植物由来のシステインプロテアーゼに対して最も強い阻害効果を示した。これらの結果は、chemical #11 がプロテアーゼの種類や基質特異性に無関係に阻害効果を発揮することが明らかになった。

表 2. Chemical #11 の種々のプロテアーゼに対する阻害効果

protease	IC_{50} (μ M)
staphopain A (10nM)	1.8
staphopain B (10nM)	2.5
V8 serine protease (50nM)	11.0
gingipain R (0.1nM)	2.8
gingipain K (5nM)	1.8
pancreatic elastase (3nM)	3.5
pancreatic trypsin (3nM)	3.0
pancreatic -chymotrypsin (1nM)	4.5
pancreatic kallikrein (3nM)	6.0
cathepsin B (5nM)	0.4
thrombin (0.1nM)	36.0
plasmin (10nM)	1.4
papain (10 μ g)	0.3

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 17 件)

1. Wada, Y., Kikuchi, K., & Imamura, T. A fatal hypotension by sildenafil in an end-stage renal disease patient with hypertension and abnormal pharmacokinetics of the medicine. *Nephrology* 14: 357-358, 2009, 査読有
2. Yasuhara, R., Miyamoto, Y., Takami, M., Imamura, T., Potempa, J., Yoshimura, K., & Kamijo, R. Lysine-specific gingipain promotes lipopolysaccharides- and

- active vitamin D₃-induced osteoclast differentiation by degrading osteoprotegerin. *Biochem. J.* 419: 159-166, 2009, 査読有
3. Kitamoto, Y., Nakamura, E., Kudo, S., Tokunaga, H., Murakami, E., Noguchi, K., & Imamura, T. Thrombin in synovial fluid as a marker of synovial inflammation: a definite measurement by ELISA and correlation with VEGF. *Clinica Chimica Acta* 398: 159-160, 2008, 査読有
 4. Wada, Y., Takahashi, W., Latifpour, J., Weiss, R. M., Matsumoto, K., Matsui, K., Yamada, G., and *Imamura, T. Prostate expression of endothelins and their receptors in rat growth. *Reprod. Fert. Develop.* 20: 750-759, 2008, 査読有
 5. Nitta, H., Imamura, T., Wada, Y., Irie, A., Kobayashi, H., Okamoto, K., & Baba, H. Production of C5a by ASP, a serine protease released from *Aeromonas sobria*. *J. Immunol.* 181: 3602-3608, 2008, 査読有
 6. Imamura, T., Nitta, H., Wada, Y., Kobayashi, H., & Okamoto, K. Impaired plasma clotting induction through fibrinogen degradation by ASP, a serine protease released from *Aeromonas sobria*. *FEMS Microbiol. Lett.* 284: 35-42, 2008, 査読有
 7. Kitamoto, Y., Taguma, Y., Arizono, K., & Imamura, T. Anti-VEGF therapy for crescentic glomerulonephritis? *Am. J. Kidney Dis.* 51: 710-711, 2008, 査読有
 8. Nitta, H., Hirota, M., Ohkado, A., Motomura, Y., Chikamoto, A., Shibata, M., Takamori, H., Kanemitsu, K., Imamura, T., Yamamoto, T., & Baba, H. Coexistence of serous cystadenoma and ductal adenocarcinoma in the pancreas: A case report and literature review. *Pancreas* 36: 218-219, 2008, 査読有
 9. Wada, Y., Kikuchi, K., Kikkawa, H., & Imamura, T. Low serum PSA levels of diabetes mellitus-caused end-stage renal disease patients. *Nephrol. Dial. Transpl. Plus* 1: 58-59, 2008, 査読有
 10. Wada, Y., Kikuchi, K., Suenaga, T., Imamura, T., Matsumoto, K., & Kodama, K. Modified technique for improving tubeless cutaneous ureterostomy using the Ariyoshi method. *Int. J. Urol.* 15: 144-150, 2008, 査読有
 11. Nitta, H., Kobayashi, H., Irie, A., Baba, H., Okamoto, K., & Imamura, T. Activation of prothrombin by ASP, a serine protease released from *Aeromonas sobria*. *FEBS Lett.* 581: 5935-5939, 2007, 査読有
 12. Yamazaki, Y., Nakano, Y., Imamura, T., & Morita, T. Augmentation of vascular permeability of VEGF is enhanced by KDR-binding proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355: 693-699, 2007, 査読有
 13. Imamura, T., Kobayashi, H., Khan, R., Nitta, H., & Okamoto, K. Induction of vascular leakage through kinin release by a serine proteinase from *Aeromonas sobria*. *J. Immunol.* 177: 8723-8729, 2006, 査読有
 14. Into, T., Inomata, M., Kanno, Y., Matsuyama, T., Machigashira, M., Izumi, Y., Imamura, T., Nakashima, M., Noguchi, T., & Matsushita, K. Arginine-specific gingipains from *Porphyromonas gingivalis* deprive protective functions of secretory leukocyte inhibitor in periodontal tissue. *Clin. Exp. Immunol.* 145: 545-554, 2006, 査読有
 15. Lai, Z.-F., Imamura, T., Koike, N., and Kitamoto, Y. Urokinase immobilization suppresses inflammatory responses to polyurethane tubes implanted in rabbit muscles. *J. Biomed. Mater. Res.* 76A: 81-85, 2006, 査読有
 16. Matsushita, K., Imamura, T., Tomikawa, M., Tanchaen, S., Tatsuyama, S., & Maruyama, I. DX-9065a inhibits proinflammatory events induced by gingipains and factor Xa. *J. Periodont. Res.* 41: 148-156, 2006, 査読有
 17. Matsushita, K., Imamura, T., Tanchaen, S., Tatsuyama, S., Tomikawa, M., Travis, J., Potempa, J., Torii, M., & Maruyama, I. Selective inhibition of *Porphyromonas gingivalis* growth by a factor Xa inhibitor, DX-9065a. *J. Periodont. Res.* 41: 171-176, 2006, 査読有
- [学会発表](計32件)
1. 内場光浩: DICの病態把握における FDP と D-ダイマーの意味. 第55回日本臨床検査医学会総会 平成20年11月27-30日, 名古屋.
 2. 内場光浩: ALアミロイドーシスにおける過剰線溶と病態形成における uPA の関与. 第31回日本血栓止血学会学術集会 平成20年11月20-22日, 大阪.
 3. 今村隆寿: *Aeromonas sobria* セリンブ

- ロテアーゼ ASP による血漿凝固促進とトロンピン産生. 第31回日本血栓止血学会学術集会 平成20年11月20-22日, 大阪.
4. 今村隆寿: *Aeromonas sobria* セリンプロテアーゼによる血漿漏出とその機序. 第11回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会 平成18年8月25-26日, 仙台.
 5. Imamura, T.: Induction of blood coagulation and fibrinolysis by cysteine proteinases from *Staphylococcus aureus*: A new mechanism of disseminated intravascular coagulation. 5th International Conference on Cysteine Proteinases and Their Inhibitors: From structure to regulation and biology September 2-6, 2006, Portoroz, Slovenia.
 6. 北本康則: 尿を用いた腎炎病態のリアルタイム解析-トロンピン活性の重要性- 第53回日本臨床検査医学会学術集会 平成18年11月11日, 弘前.
 7. 内場光浩: AL アミロイドーシスの過剰線溶および病態形成には形質細胞からの uPA が関与している. 第19回九州血管血栓フォーラム 平成20年11月8-9日, 鹿児島.
 8. 立津 央: uPA 産生形質細胞により過剰線溶をきたしたALアミロイドーシス. 第90回日本血液学会総会 平成20年10月10-12日, 京都.
 9. 今村隆寿: *Aeromonas sobria* セリンプロテアーゼのプロトロンピン活性化による血液凝固誘導作用. 第13回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会 平成20年8月22-23日, 大阪.
 10. 新田英利: 黄色ブドウ球菌、MRSA 産生 protease による敗血症性ショックおよびDIC発症のメカニズム. 第63回日本消化器外科学会 平成20年7月16-18日, 札幌.
 11. Uchiba, M.: Role of uPA in excessive fibrinolysis observed in AL-amyloidosis. XIXth International Congress on Fibrinolysis and Proteolysis July 6-10, 2008, Viena, Austria.
 12. 上田直子: ハブ毒中で単独で作用する補体活性化因子の構造と機能について. 第52回毒素シンポジウム 平成20年7月2-4日, 山梨県山中湖村.
 13. 今村隆寿: *Aeromonas sobria* 放出セリンプロテアーゼの C5a 産生活性. 第97回日本病理学会総会 平成20年5月15-17日, 金沢.
 14. 新田英利: 黄色ブドウ球菌, MRSA 産生 protease による DIC 発症のメカニズム. 第108回日本外科学会 平成20年5月16日, 長崎.
 15. 和田孝浩: 糖尿病性末期腎不全患者の PSA 低値と前立腺癌低罹患率: 血液透析患者の原疾患別比較. 第96回日本泌尿器科学会総会 平成20年4月25-27日, 横浜.
 16. 鈴木美緒: ハブ毒中の新規な C3/C5 コンバーターゼの精製と緒性質. 第30回日本分子生物学会年会, 第80回日本生化学会大会合同大会 平成19年12月11-15日, 横浜.
 17. 北本康則: 尿トロンピンの ATIII 難抑制性と腎炎部血管外凝固反応活性化依存性. 第30回日本血栓止血学会学術集会 平成19年11月15-17日, 三重.
 18. Imamura, T.: Production of C5a by a serine proteinase from *Aeromonas sobria*, leading to Neutrophil Migration and vascular leakage. 4th International Symposium of Proteolysis October 20-24, 2007, Patras, Greece.
 19. 今村隆寿: *Aeromonas sobria* セリンプロテアーゼによるアナフィラトキシン C5a の産生. 第12回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会 平成19年8月3-4日, 大阪.
 20. Yamazaki, Y.: Augmentation of vascular permeability of vascular endothelial growth factor (VEGF) is enhanced by VEGF receptor 2-binding proteins. XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis July 6-12, 2007, Geneva, Switzerland.
 21. Imamura, T.: Induction of vascular leakage and plasma clotting by a serine proteinase from *Aeromonas sobria*. Xth International Symposium on Proteinase Inhibitors and Biological Control June 23-27, 2007, Portoroz, Slovenia.
 22. Nitta, H.: Induction of coagulation by a serine protease from *Aeromonas sobria* through activation of prothrombin. 8th World Congress of Inflammation June 16-20, 2007, Copenhagen, Denmark.
 23. 新田英利: 胆嚢炎および胆嚢癌における 8-nitroguanine の発現とその意義. 第107回日本外科学会 平成19年4月13日, 大阪.
 24. 今村隆寿: *Aeromonas sobria* セリンプロテアーゼの凝固・線溶作用とその機序. 第96回日本病理学会総会 平成19年3月13-15日, 大阪.
 25. 北本康則: 尿トロンピン測定による腎炎病巣での凝固反応活性化とその制御の解析. 第7回TTMフォーラム 平成19年3

- 月 10 日, 東京.
26. Lai, Z.-F. : Urokinase suppresses mononuclear and eosinophilic leukocyte infiltration in a rabbit model. 46th Annual Meeting of The American Society for Cell Biology December 9-13, 2006, San Diego, USA
 27. 今村隆寿: *Aeromonas sobria* セリンプロテアーゼのキニン遊離を介した血管漏出と血圧低下作用. 第 80 回日本細菌学会総会 平成 18 年 3 月 25-27 日, 大阪.
 28. Yamazaki, Y. : Snake venom VEGF-F is a most potent inducer of vascular permeability. XVth World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins July 23-28, 2006, Glasgow, UK.
 29. 北本康則: 尿トロンピン、CD14+16+細胞、oil red 陽性細胞測定による増殖性腎炎のネフロン傷害の解析. 第 49 回日本腎臓学会学術総会 平成 17 年 6 月 14-16 日, 東京.
 30. 北本康則: 腎炎治療のリアルタイムマーカー, 尿トロンピン. 第 51 回日本腎臓学会学術総会 平成 18 年 5 月 30 日, 福岡.
 31. 北本康則: 尿トロンピン解析におよぼす腎組織, 血管内, および尿中での血液凝固反応とその制御. 第 50 回日本腎臓学会学術総会 平成 18 年 5 月 27 日, 浜松.
 32. 今村隆寿: *Aeromonas sobria* セリンプロテアーゼの血管透過性亢進作用とその機序. 第 95 回日本病理学会総会 平成 18 年 4 月 30-5 月 2 日, 東京.

〔図書〕(計 1 件)

1. 今村隆寿: カリクレイン・キニン系・炎症・再生医学 2008 年 朝倉書店出版

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 癌細胞 C5a 産生プロテアーゼおよび C5a 受容体をターゲットにした癌治療法
発明者: 今村隆寿、新田英利
権利者: 熊本大学長
種類: 発明
番号: 08079A09
出願年月日: 2009 年 3 月 6 日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ: <http://www.kumamoto-u.ac.jp/seeds/seeds/61580016/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 隆寿 (IMAMURA TAKAHISA)
熊本大学・大学院医学薬学研究部・
分子病理学分野・准教授
研究者番号: 20176499

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 梅山 秀明 (UMEYAMA HIDEAKI) 北里大学・薬学部・教授 研究者番号: 20050619 (平成 18・19 年度は分担研究者)