

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09068

研究課題名(和文)細菌の細胞間情報伝達機構を阻害する薬剤による人工関節感染の治療に関する探索研究

研究課題名(英文)Basic research on therapy of prosthetic joint infection by anti-quorum sensing drugs

研究代表者

宮本 比呂志(MIYAMOTO, Hiroshi)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：40229894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：人工関節感染の原因は、インプラント表面に細菌バイオフィーム(BF)が形成されることにある。ミリセチンが濃度依存的にTi合金の表面で形成されるMRSAのBF形成を抑制することが明らかになった。ミリセチンと同様のガロイル基をもつ没食子酸およびそのエステル誘導体のポリスチレン上のMRSAのBF形成への影響を検討した。その結果、BF形成が没食子酸エチルエステルで抑制されることが判明した。in vivo 蛍光・発光システムを使用してこの効果が生体内でも発揮されるか検討中である。没食子酸エチルエステルが人工関節表面のMRSA感染を予防または治療できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クオラムセンシング機構と呼ばれる「細菌の細胞間情報伝達機構(コミュニケーションシステム)」がバイオフィーム形成に深く関連していることに着目して、従来の抗菌剤(無機物、有機物、化学療法剤)と異なった「QS阻害剤」によるバイオフィームの制御を目指した本研究は斬新である。米国疾病管理予防センターは「手術部位感染予防のためのガイドライン(2017年)」内で「人工関節置換術におけるバイオフィーム形成もしくは手術部位感染の予防のためのバイオフィーム制御薬を評価した研究を見つけることができなかった(未解決問題)」と報告している。本研究は国内外で解決が待たれている非常に重要な研究課題に挑戦した研究である。

研究成果の概要(英文)：Implantable medical device-related infections are caused by bacterial biofilm formation on these devices and are difficult to treat because of their resistance to antibiotics and immune cells.

In this study, anti-biofilm formation activities of several agents (myricetin, gallic acid, ethyl gallate, butyl gallate, and isoamyl gallate) were tested on polystyrene plates and/or titanium plates. As the results, butyl/isoamyl gallate inhibits MRSA biofilm formation dose dependently in vitro. Using IVIS rat infection models, the anti-biofilm formation activities of butyl/isoamyl gallate in vivo are investigating now.

研究分野：細菌学

キーワード：バイオフィーム クオラムセンシング 人工関節感染

1. 研究開始当初の背景

近年、病原細菌の薬剤耐性化傾向から、これまでの抗菌薬とは異なる新たな創薬のターゲット分子の探索が進められている。その中で「クオラムセンシング (QS) 機構」と呼ばれる細菌の細胞間情報伝達機構 (コミュニケーションシステム) に注目が集まっている。孤立無縁に生きているかに見える単細胞生物である細菌も、それぞれがフェロモンのような物質 (オートインデューサー) を産生して、お互いにコミュニケーションをとりながら、集団行動を引き起こしている現象が次々と明らかにされている。多くの細菌は QS 機構により病原性が制御されており、特に難治化に関わるバイオフィーム形成との関連も示されている。QS 阻害薬は、治療に難渋している細菌バイオフィームによる人工関節感染の予防または治療薬として非常に有力ではないかと考えられる。

2. 研究の目的

人工関節などのインプラントを用いた外科手術においては、手術部位感染 (SSI) を併発すると、感染部位が骨内に及ぶため治療に難渋することが多い。人工関節感染が難治性である最大の原因は、術後にインプラント表面に形成される細菌バイオフィームである。一旦、細菌バイオフィームが形成されるとバイオフィームに包まれた細菌群は生体の免疫能や抗菌薬の作用から免れることが可能となる。本研究では人工関節表面の MRSA バイオフィームの形成を阻害、または除去するバイオフィーム制御薬 (バイオフィーム分散剤、QS 阻害薬) を探索し、有効な薬剤と既存抗菌薬の併用も考慮に入れて、将来的に臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) MRSA バイオフィームをポリスチレン上に形成させる。

試験片に患者由来株で、バイオフィーム形成能をもつ MRSA (UOEH-6 株) を感染させて培養し、ポリスチレン上に MRSA バイオフィームを形成させる。

(2) クリスタルレッド染色および Film Tracer Calcein Red-Orange Biofilm Stain (Invitrogen) を使用して形成されたバイオフィームを蛍光染色し、デジタル蛍光顕微鏡、共焦点レーザーを使用してバイオフィームの形態を観察した後、試験片 1 枚につき任意に 7 か所を選び 50 倍で写真撮影する。

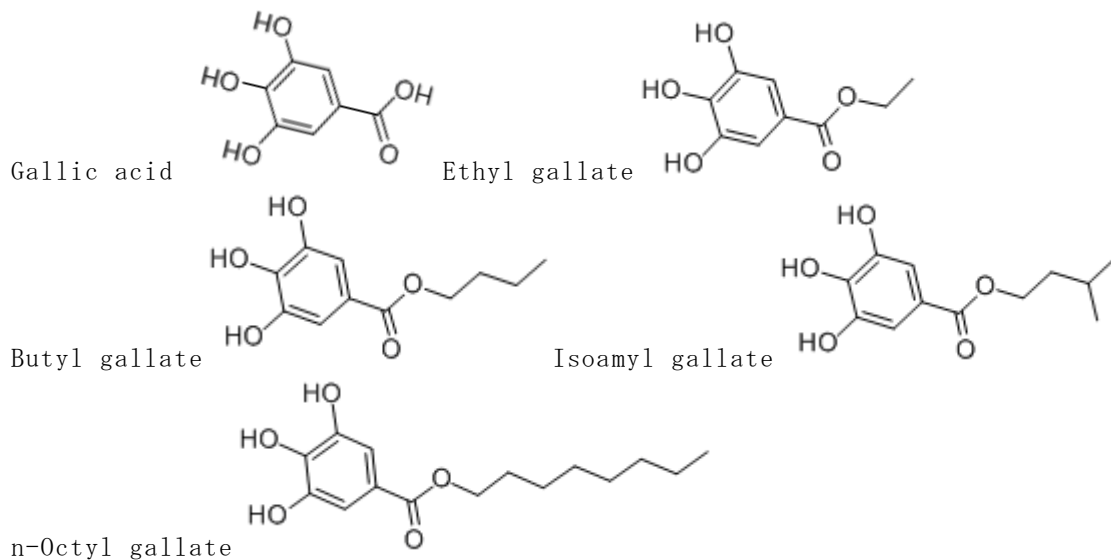
(3) この画像を画像解析ソフト (Image J) で解析し、バイオフィーム被覆率を算出して、バイオフィーム形成を定量化する。

(4) バイオフィーム形成阻害効果の高い阻害薬を探索し、有効性が期待される薬物についてラット動物実験を開始する。

4. 研究成果

菌体外マトリクスは多糖体や細胞外 DNA、蛋白質から成るため、これらを分解する薬剤がバイオフィーム阻害剤としてあげられる。RIP やノルゲスメートなど複数の薬剤でスク

リーニング試験をおこなった。RIP やノルゲスメートは効果がなかった（図 2、図 3）が、ブドウ、ベリー、果物、野菜、ハーブなどに含まれている抗酸化作用を持つフラボノールのミリセチンは、Ti 合金表面の MRSA バイオフィーム形成を抑制することが明らかとなった。そこで、ミリセチンと同様にガロイル基をもつ没食子酸およびその 4 種類のエステル誘導体のポリスチレン上での MRSA バイオフィーム形成への影響を調べた。

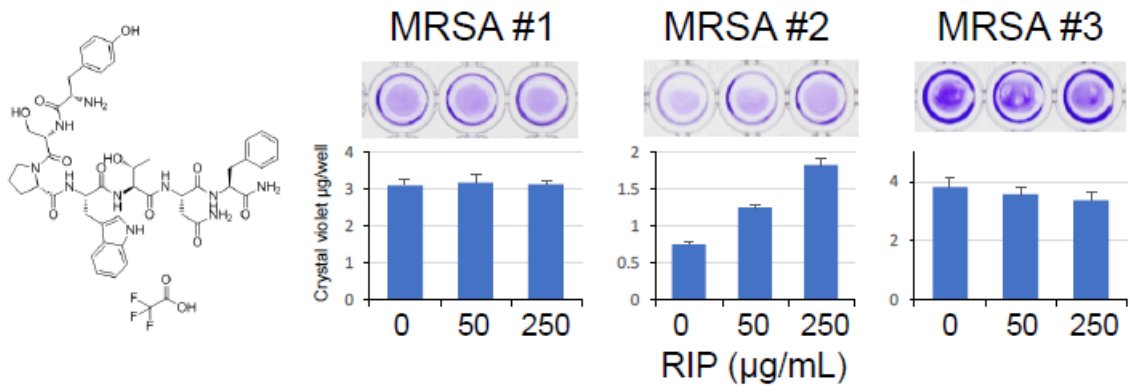


MRSA 株でのバイオフィーム抑制効果を確認するために、96 well plate（ポリスチレン）で 24 時間、静置培養し、クリスタルバイオレット染色にてバイオフィームを定量した。その結果、没食子酸は MRSA バイオフィーム形成を抑制せず、没食子酸イソアミル/オクチルは菌の増殖そのものを阻害した。一方、没食子酸エチル/ブチルは菌の増殖を抑制しないが、バイオフィームの形成は抑制した（図 4）。そこで、人工関節材料である Ti 合金の表面で形成される MRSA バイオフィームに対する没食子酸エチル/ブチルのバイオフィーム抑制効果を調べた。その結果、Ti 合金表面の MRSA バイオフィーム形成が没食子酸エチルエステルで用量依存的に顕著に抑制されることが明らかになった（図 5）。

没食子酸は種々の植物に含まれるポリフェノールで、油脂やバターの前酸化防止剤として使用される食品添加物である。アルキル基は疎水性、ガロイル基は親水性の両媒介性である。MRSA の細胞膜に作用して接着因子を阻害することでバイオフィーム形成を抑制している可能性がある。

没食子酸エチルエステルがどのような機序で、MRSA バイオフィーム形成を抑制しているのか明らかにするとともに、生体内でも効果を発揮するのかを *in vivo* 蛍光・発光システムを使用した動物実験等で確認する必要がある。バイオフィーム形成抑制機序の解明には、没食子酸エチルエステルをビオチン標識してどのような種類の菌体タンパクと結合・相互作用しているのか調べるのが有効と期待される。

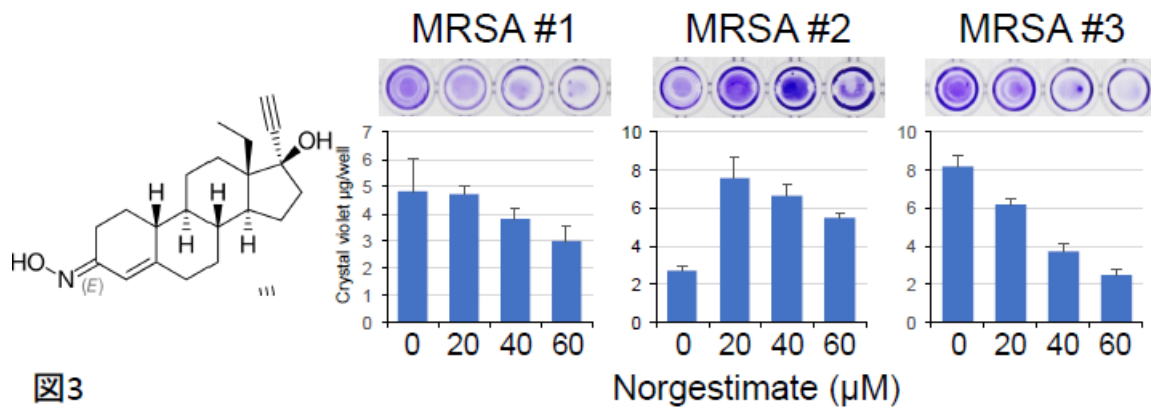
RIP, RNAIII-Inhibiting Peptide



☒ 2

 [96 well polystyrene plate]
 10^5 MRSA / 0.2 mL Tryptosoy broth \pm RIP $\xrightarrow[37^\circ\text{C}, 24\text{ h}]{\text{(静置)}}$ Crystal violet 染色
 (0.5% glucose)

Norgestimate



☒ 3

 [96 well polystyrene plate]
 10^5 MRSA / 0.2 mL Tryptosoy broth \pm Norgestimate $\xrightarrow[37^\circ\text{C}, 24\text{ h}]{\text{(静置)}}$ Crystal violet 染色
 (0.5% glucose)

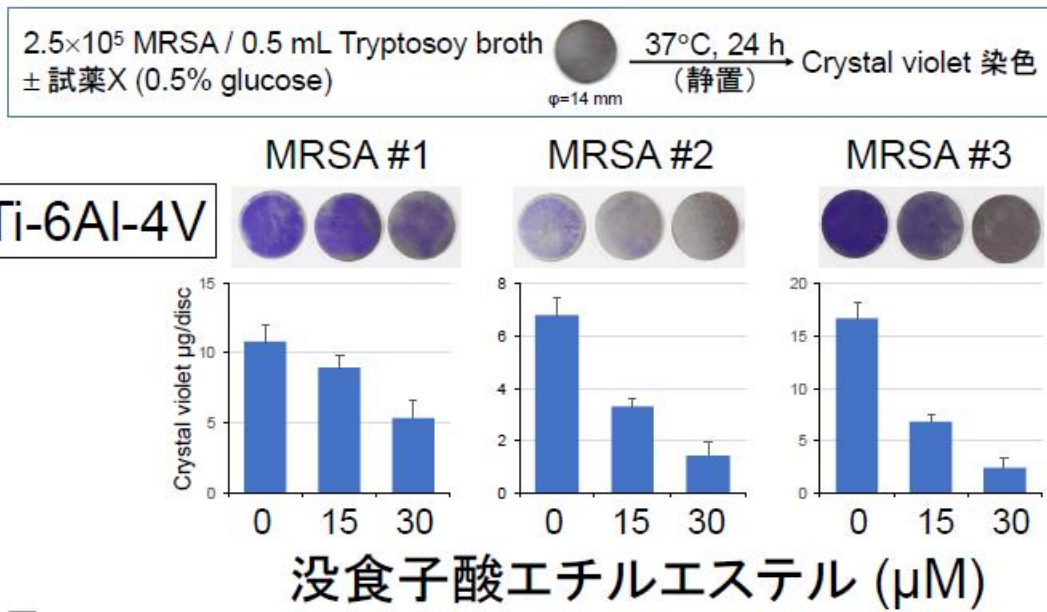


図4

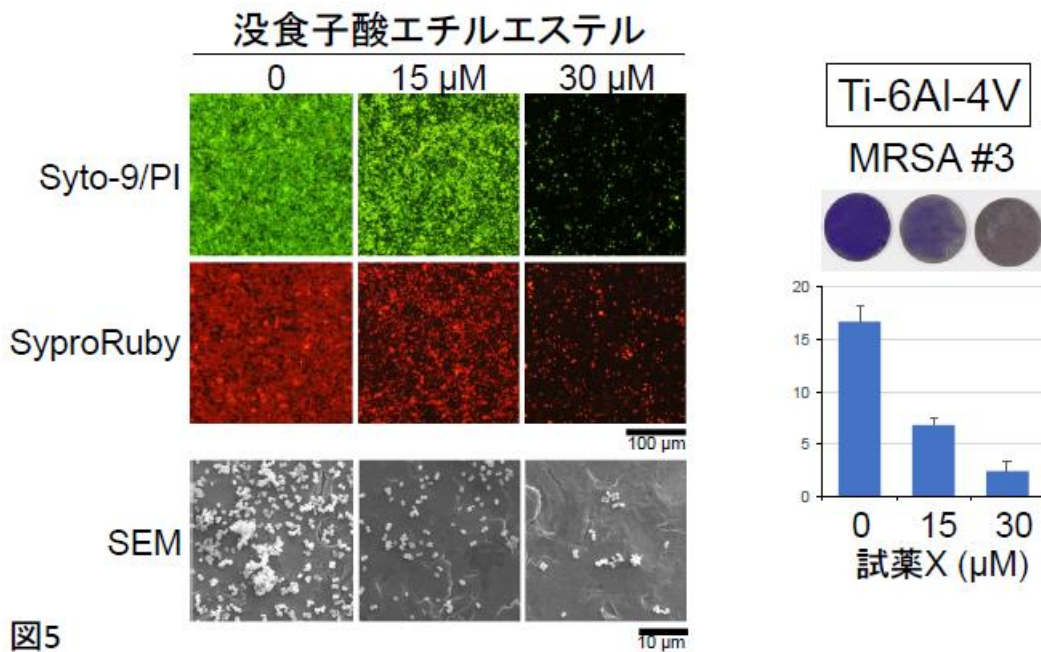


図5

(引用文献)

Dell'Acqua GI, Giacometti A, Cirioni O.: Suppression of drug-resistant Staphylococcal Infections by the quorum-sensing inhibitor RNAIII-inhibiting peptide. *J Infect Dis.* 190:318-320(2004).

Arita-Morioka K, Yamanaka K, Mizunoe Y. : Novel strategy for biofilm inhibition by using small molecules targeting molecular chaperone DnaK. *Antimicrob Agents Chemother.* 59:633-641(2015).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 高蒲池 健夫 (SHOBUIKE Takeo) | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |