

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22590397

研究課題名(和文) 合成ステロイドCSAの感染症治療薬へのアプロ - チ

研究課題名(英文) The approach of synthetic steroid ceragenin to curative medicine for infectious diseases

研究代表者

磯貝 浩 (Isogai, Hiroshi)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50137436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：ステロイド環を有する抗菌剤であるCeragenin(CSA)は歯科材料に被覆および混合することで、それらの表層に細菌がバイオフィルムを形成することと被覆・混合したCSAが培養液中に浸出することで液中の細菌の増殖をも著明に抑制した。また、低濃度のCSAとブドウ球菌を混合して培養を繰り返しても耐性菌が誘導されなかった。さらに、がん細胞に対してアポト - シスを誘導することで抗腫瘍作用を示した。

研究成果の概要(英文)：Ceragenin (CSA) is the antibacterial material which has a steroid ring. CSA covered and mixed to a dental material. It controlled to bacterial biofilm formation on those surfaces and inhibited the bacterial growth in liquid by exuding in culture solution. Moreover, a bacterial resistant was not induced, even if staphylococcus was cultivated repeatedly in low-concentration of CSA. CSA showed the antitumor activity by inducing apoptosis to cancer cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：感染症 微生物 抗菌 CSA

1. 研究開始当初の背景

細菌感染症がいまだに制圧されていない背景には2つの大きな問題があるとされてきている。第1は感染症が治療できたとしても、細菌そのものが破壊されることによるショックをはじめとする様々な症状が出現すること。第2はMRSAやVRSAの出現が示すように、抗生物質が効かない耐性菌の出現である。しかし、これらの背景以上に地球上には、国家が貧困であるがゆえに抗生物質の購入がままならず、治療の機会を与えられずに命を落とす多くの患者が存在するという大きな問題がある。

耐性菌の出現が抗生物質使用の負の側面として問題視されてきている。特に、基礎疾患を有する患者では耐性菌の出現は致命的でさえある。しかし、耐性菌の問題はあったとしても、抗生物質は細菌感染症の治療に多くの貢献をしてきていることは事実である。実際、ほとんどの細菌感染症に対して抗生物質は有力な武器として使用され効果を発揮してきている。

発展途上国では細菌感染症が多くの生命を奪っているという現状がある。先進諸国では安価と考えられる抗生物質の価格も途上国においては入手が困難な医薬品が多い。そうした国々に、より安価で効果的な抗菌物質を開発し供給することで細菌感染症を罹患している多くの患者を救うことが必要である。さらに、途上国ではAIDS患者の日和見感染が大きな問題である。AIDS自体は逆転写酵素阻害により発症を遅らせることが可能になっているが、患者にとっては耐性菌による感染が致命的である。そうした患者では抗生物質が入手できたとしても有効な治療が困難である。

CSA13は安価に合成が可能な新規の合成抗菌物質であり、地球上の多くのヒトを対象に安価に供給できる可能性を持っている。CSA13の抗菌作用等を詳細に検討することで予防薬あるいは治療薬としての可能性を探る必要があった。

2. 研究の目的

新規合成のカチオン性合成抗菌ステロイドCSA13は、生体内で作られるCAP18/LL37と同様の作用機序と活性を有すると考えられる。CSA13について、(1)大量生産が可能であること、(2)生体内において、塩や蛋白分解酵素などの影響を受けないこと、(3)耐性菌の出現を誘導しないこと、(4)Vancomycinに

比べて100倍以上の活性をMRSAに対して示すように、強い抗菌活性を有すること、(5)高い安定性を持つため、コーティング加工が可能であることなどを明らかにしつつある。申請者らのこれまでの研究でCSA13は抗生物質に代わる感染症治療薬として広範な感染症に適応が可能であり、近い将来では感染症の主要な治療薬として広範に使用されることが期待できることが明らかにされてきた。

申請者らはこれまでに、局所の炎症制御においてカセリシジンファミリーの好中球由来抗菌タンパク(CAP18)の活性ドメインが内毒素の中和活性を有し、種々の炎症性サイトカインの産生を抑制することを証明した。この活性ドメインは粘膜上皮から分泌されるLL37と同様のシークエンスと構造を示し、腸内細菌由来のリポ多糖だけでなく、リポドAの構造が異なる細菌由来のリポ多糖やグラム陽性細菌のリポタイコ酸にも結合した。

CSA13についても、CAP18/LL37活性ドメイン領域の合成ペプチドと比較を行いながら、プロテアーゼ活性をもつ細菌に対する抗菌活性を調べたところ、非常に強い安定した活性を示すことを認めてきている。本研究では、CSA13による多種の臨床分離細菌株に対する抗菌活性を検討するとともに、バイオフィルム阻害作用についても検討した。

3. 研究の方法

(1)カチオン性抗菌ステロイド(CSA13)の合成

CSA13はステロイド環を有する化合物にトリペプチドをコンジュゲイトする固相法で合成を行った(海外共同研究者Dr. Paul B. Savage、Brigham Young University)。

(2)抗菌ペプチドの合成

ペプチドの合成は固相法で合成し、最終標品は高速液体クロマトグラフィー(逆相液体クロマトグラフィー)で精製した。合成ペプチドとしては活性ドメインの37残基と同様の活性を維持できる27残基とする。活性ドメインのアミノ酸シークエンスはFRKSKEKIGKEFK RIVQRIKDFL RNLVである。その他の抗菌ペプチドについても同様の手法で合成した。

遺伝子工学手法を用いた抗菌ペプチドの作成:ヒトCAP18の抗菌活性部分に対応する37個のアミノ酸に相当する核酸の塩基配列をPCR法で増幅した。次に、このPCR産物をpET SUMO VectorにTAクロニング法で挿入し、

大腸菌 BL21(DE3)を用いてリコンビナントタンパクを作成した。作成したタンパクをニッケルカラムで集め、タンパク分解酵素 (SUMOase) を作用させて結合している SUMO タンパクを切り離し、CAP18 ペプチドを得た。

(3) CSA13 によるバイオフィーム形成阻害に関する検討

CSA13 のバイオフィーム形成阻害を調べるとともに、抗菌ペプチドとの相互作用を検討した。バイオフィーム産生システムは *S. mutans* を主体とした口腔細菌とハイドロキシアパタイトを用いて調べた。すなわち、CSA13 をコートしたハイドロキシアパタイトとコートしていないハイドロキシアパタイトを用い、*S. mutans* によるそれらの表面へのバイオフィーム形成を比較した。さらに、歯科用セメントに CSA13 を混合しバイオフィームが形成されるかどうかを合わせて観察した。観察は培養後のハイドロキシアパタイトに付着した菌数を比較することで行った。さらに、走査型電子顕微鏡を用いてそれらの表面を観察することで、バイオフィーム形成の形態学的な形成状態を比較した。

(4) CSA13 の抗腫瘍作用の検討

CSA13 が細胞の増殖と細胞周期とに対してどのような影響を与えるかを検討した。ヒト大腸がん由来の HCT116 細胞と同じ細胞株から p53 を欠失させた細胞株を使用した。これらの細胞株の培養液中に各種濃度の CSA13 を混合させ、細胞増殖、細胞周期およびアポト - シスの誘導を検討した。

4. 研究成果

(1) CSA13 によるバイオフィーム形成阻害に関する検討

ハイドロキシアパタイト板 (HA 板) を *S. mutans* を培養している培養液中に置くと 24 時間後にはその表層にバイオフィームが形成された (2.5×10^5 / cm²)。一方、CSA13 で被覆した HA 板上では被覆した CSA13 が菌の付着を阻止し、バイオフィームは形成されなかった。また、培養液中の *S. mutans* 数も CSA13 で被覆した HA 板を沈めて培養した場合には被覆しなかった HA 板を沈めた場合と比較して有意に少なかった (表 1、表 2)。

表 1. Inhibition of *S. mutans* biofilm by thin film containing CSA-13

HA coated with	Number of viable bacteria / cm ² on a HA coupon
CSA-13	< 1.1×10 ^a
-	(2.5 ± 0.8)×10 ⁵

a. P<0.01, paired *t* test

表 2 Effect of CSA-13 coating on bacterial growth

Group	Culture with <i>S. mutans</i>	Absorbance of bacteria in BHI medium (OD620nm)
HA coated with CSA-13	+	0.165 ± 0.023 ^a
HA	+	1.008 ± 0.155 ^b
Medium only	+	0.838 ± 0.038
Background	-	0.007 ± 0.001

a. P<0.01, paired *t* test, significant inhibition

b. P<0.01, paired *t* test, significant enhancement

走査型電子顕微鏡による検索では、CSA-13 を被覆した HA 板上には細菌像が全く認められなかったが、被覆していない HA 板上には無数の細菌がバイオフィームを形成して認められた (図 1)。HA 板上の細菌数を計測したところ、CSA13 を被覆していない HA 板では 1 平方センチメートルあたり (3.3 ± 2.4) × 10⁵ 個の菌が計測されたが、被覆した HA 板では細菌が認められなかった。

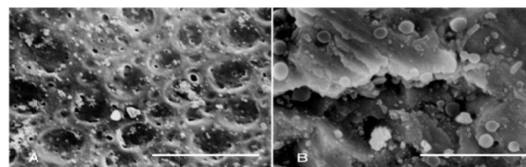


図 1. Inhibition of *S. mutans* adherence to HA coupon with film coating of CSA-13
A: No bacterial adherence on the surface of HA coupon with film coating of CSA-13, B: Many adhering bacteria on the surface of control HA coupon. Bars indicate 10µm

歯科用セメントにCSA13を混合した場合もHA板の結果と同様にCSA13を混合したセメントは細菌によるバイオフィーム形成を阻止した(表3)

表3 Inhibition of *S. mutans* biofilm on cement containing CSA-13

Cement with	No. of viable bacteria / cm ² on a cement coupon
CSA13	$(4.2 \pm 1.4) \times 10^3, a$
-	$(3.9 \pm 1.4) \times 10^5$

a. P<0.01, paired t test

(2) CSA13の抗腫瘍作用の検討

CSA13を培養液に加えると、ヒト大腸がん由来のHCT116細胞およびHCT116のp53欠損株ともにその増殖がCSA13の濃度に依存して抑制された(図2)。また、培養細胞中の生細胞の割合も濃度に依存して低下した。3および5μg/mlのCSA13を作用させた場合、野生株にはほとんど影響を与えなかったが、p53欠損株では5μg/mlで生細胞の割合が低下し始めた。CSA13を10μg/ml加えた際の生細胞の割合はHCT116野生株で30-60%、p53欠損株で30-40%であり、p53欠損株での生細胞の割合が有意に低くなった。

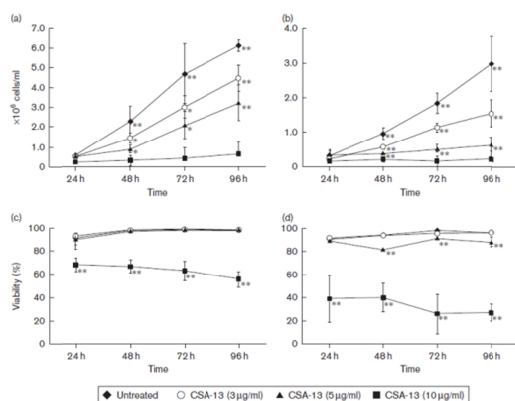


図2. Cell growth and viability of wild type and p53 null mutant of HCT116, treated with CSA-13. (a, b) Cell growth of wild type (a) and p53 null mutant of HCT116 (b) with varied concentrations of CSA-13. (c, d) Cell viability of wild type (c) and p53 null mutant of HCT116 (d). The mean values of the cells when treated with CSA-13 at 10 mg/ml (square), 5 mg/ml (triangle), and 3 mg/ml (circle) or without (control, diamond) were plotted. In all experiments, five samples were used for each measurement at 24, 48, 72, and 96 h to obtain the mean value and SD. *P<0.05; **P<0.01, statistical significance.

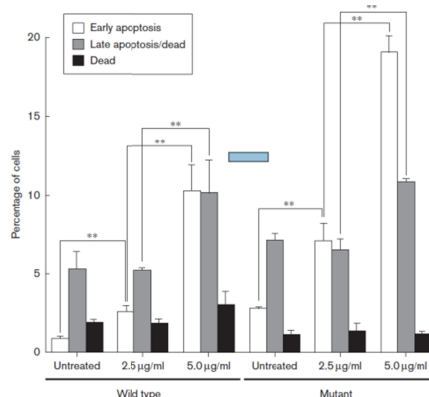


図3. Detection of apoptosis of wild type and p53 null mutant of HCT116 after the 96 h treatment of CSA-13. Cells were treated with CSA-13 for 96 h and apoptosis was detected. (a) Results of the combination assay of Annexin V binding and 7-AAD staining in intact HCT116 cells (upper left panel), HCT116 p53 mutant cells (lower left panel), HCT116 treated with 5 mg/ml of CSA-13 (upper right panel), and HCT116 p53 mutant treated with 5 mg/ml of CSA-13 (lower right panel). On the basis of the reactivity of Annexin V and fluorescence intensity of 7-AAD, the cells can be classified into four groups: dead, live, late apoptosis, and early apoptosis. Note that CSA-13 treatment induced the increased cell incidence of late apoptosis and early apoptosis. (b) Percentage of cells in early apoptosis [Annexin V (+) and 7-AAD (-), white bar], late apoptosis or dead [Annexin V (+) and 7-AAD (+), gray bar], and dead [Annexin V (-) and 7-AAD (+), black bar] fraction with the combination assay of Annexin V binding and 7-AAD staining. Triplicate samples were used to obtain the mean value and SD. **P<0.01, statistical significance.

CSA13による腫瘍細胞に対するアポト - シスの誘導については、早期のアポト - シスについてはp53欠損株で野生株に比較して強く誘導したが、後期のアポト - シスについては野生株と欠損株の間で有意な差は認められなかった(図3)。

5. 主な発表論文等 [雑誌論文](計5件)

Kuroda K., Fukuda T., Okumura K., Yoneyama H., Isogai H., Savage P.B., Isogai E., Ceragenin CSA-13 induces cell cycle arrest and antiproliferative effects in wild-type and p53 null mutant HCT116 colon cancer cells. *Anti Cancer Drags* (2013) 23: 826-834. 査読有 DOI: 10.1097/CAD.0b013e

3283634dd0.

Kuroda K., Suzuki R., Ihara K., Miyagi H., Watanabe H., Sato K., Mudenda B. H., Mubita C., Isogai N., Mulenga E., Moonga L., Isogai H., Fukuda T., Yoneyama H., and Isogai E., Detection of virulence genes of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. from fecal samples of Kafue lechwe (*Kobus lechwe kafuensis*) and pastoral cattle in the interface areas of Zambia. *African Journal of Microbiology Research* (2013) Vol. 7(6), pp. 504-508. 査読有 DOI: 10.5897/AJMR12.1753.

Kuroda K, Fukuda T, Yoneyama H, Katayama M, Isogai H., Okumura K, and Isogai E. Anti-proliferative effect of the analogue peptide of human Cathelicidin (hCAP18/LL-37) for the colon cancer derived cell line, HCT116 p53+/+ and p53-/-. *Oncology Reports* (2012) 28 : 829-834. 査読有 DOI: 10.3892/or.2012.1876. Epub 2012 Jun 19

Takagi S, Hayashi S, Takahashi K, Isogai H., Bai L, Yoneyama H, Ando T, Ito K, Isogai E. Antimicrobial activity of a bovine myeloid antimicrobial peptide (BMAP-28) against methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Anim Sci J.* (2012) 83, 482-486. 査読有 DOI: 10.1111/j.1740-0929.2011.00979.x. Epub 2011 Nov 16.

Shirai S, Takahashi K, Kohsaka S, Tsukamoto T, Isogai H., Kudo S, Sawa H, Nagashima K, Tanaka S. High expression of MeCP2 in JC virus-infected cells of progressive multifocal leukoencephalopathy brains *Neuropathology* (2011) 31: 38-41. 査読有 DOI: 10.1111/j.1440-1789.2010.01122.x.

[学会発表] (計 8 件)

Isogai, H., Isogai, E., Kuroda K., Bactericidal ability of recombinant peptide of cationic antimicrobial peptides. 18th World Congress on Advances in Oncology and 16th International Symposium on Molecular Medicine 2013年10月10-12日 イラクリオン、ギリシャ

Takagi S., Isogai E., Nishimura J., Bai L., Kuroda K., Suzuki R., Yoneyama H.,

Hayashi S., Isogai H., Characteristics of bovine myeloid antimicrobial peptide (BMAP-28) as active antimicrobials. 18th World Congress on Advances in Oncology and 16th International Symposium on Molecular Medicine 2013年10月10-12日 イラクリオン、ギリシャ

Isogai H., Isogai E. Correlation between levels of antibody against Lyme disease *Borrelia* and tick defensin in wild deer. 3rd International Symposium on Antimicrobial Peptides (Amp2012), June 13-15, 2012, Lille, France.

Kuroda K, Fukuda T, Yoneyama H, Katayama M, Isogai H., Okumura K, Isogai E. Analogue peptide of LL-37 induces anti-proliferative effect for colon cancer derived cell line, HCT116 p53+/+ and p53-/-. 3rd International Symposium on Antimicrobial Peptides (Amp2012), June 13-15, 2012, Lille, France.

Isogai E., Kuroda K, Seki S, Kitaichi N, Namba K, Ohno S, Yoneyama H, Isogai H. Serume and salivary levels of bioactive antimicrobial peptide LL-37 in Behcet 's disease and other ocular inflammatory diseases. 3rd International Symposium on Antimicrobial Peptides (Amp2012), June 13-15, 2012, Lille, France.

Isogai E., Saito T, Omura T, Isogai H., Okumura K, Hori H, Tsuruta H, Kurebayashi Y Antimicrobial activity of a bovine myeloid antimicrobial peptide (BMAP-28) against methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and prediction of the structure of BMAP-28 by homology modeling. Internatioal Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011年9月6日 札幌

Takagi S, Saito T, Ohmura T, Isogai H., Yoneyama H, Ando T, Bai L, Fukuda T, Kato Y, Nakai Y, Isogai E. Antimicrobial activity of a bovine myeloid antimicrobial peptide (BMAP-28) against methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and prediction of the structure of BMAP-28 by homology modeling. Internatioal

Union of Microbiological Societies 2011
Congress, 2011 年 9 月 6 日 札幌
Okumura K, Taira H, Kobayashi M,
Isogai E, Shibata T, Isogai H
Cathelicidin Antimicrobial Peptide,
LL-37 has Proangiogenic and
Angiostatic Activity in Human
Microvascular endothelial Cells.
Internatioal Union of Microbiological
Societies, 2011 Congress, 2011 年 9 月 6
日 札幌

[その他] (計 2 件)

磯貝恵美子、磯貝浩、小林美智代、奥村
一彦 消化管由来の病原および非病原細
菌を接種されたマウスにおける単一細
菌の定着と炎症性サイトカインおよび末
梢血細胞数 無菌生物 (2010) 40:
50-53.

磯貝浩、磯貝恵美子、奥村一彦、南場研
一、北市伸義、大野重昭、角館直樹 口
腔におけるカセリシジンファミリー - 抗菌
ペプチド CAP18/LL37 の微生物制御 無
菌生物 (2010) 40: 54-59.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯貝 浩 (ISOGAI Hiroshi)
札幌医科大学医学部・准教授
研究者番号：50137436

(2) 研究分担者

磯貝 恵美子 (ISOGAI Emiko)
東北大学大学院農学研究科・教授
研究者番号：80113570