

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591479

研究課題名(和文)多剤耐性緑膿菌感染症を制御する新しいシステムの構築 - RNAiによる耐性遺伝子阻害

研究課題名(英文) New approaches against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection using RNA interfering

研究代表者

平松 和史 (Hiramatsu, Kazufumi)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：80301381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：多剤耐性緑膿菌に対するRNA干渉によるIMP-1産生抑制効果について検討した。siRNAの菌体への取り込みを検討すると非修飾siRNAでは十分な取り込みを認めなかったが、コレステロール修飾siRNAでは多くの菌体に取り込まれていた。さらにコレステロール修飾siRNA + セフトアジジムと菌を培養すると菌の増殖を認め、siRNAの効果は認めなかった。一方で、10種類のsiRNAとセフトアジジム及び菌を同時に混合培養するとコントロール群に比べ1/10程度の菌の増殖抑制効果を認めていた。こうした結果はsiRNAによるIMP-1産生緑膿菌感染症治療への応用の可能性を示唆しているものと思われた。

研究成果の概要(英文)：IMP-1 producing multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP)-infection is critical problem because there is no effective agents without colistin. RNA interfering (RNAi) has been known to suppress the targeted protein expression in eucaryocytes. In order to suppress IMP-1 production from MDRP, we synthesized short interfering RNAs (siRNAs) to IMP-1 and evaluated effect of those siRNA against production of IMP-1. Although non-labeled siRNA was not incorporated to *P. aeruginosa* sufficiently, cholesterol-modified siRNA entered into the cells. When IMP-1 producing *P. aeruginosa* was incubated with cholesterol modified siRNA and ceftazidime, the bacterial cell counts increased. However when 10 types of siRNAs and ceftazidime incubated with bacteria simultaneously, cell counts decreased to one-tenth compared with control. These results suggested a possibility of RNAi against treatment of IMP-1 producing MDRP infections.

研究分野：感染症内科学

キーワード：緑膿菌 siRNA IMP-1

### 1. 研究開始当初の背景

近年、緑膿菌やアシネトバクターをはじめとするグラム陰性桿菌の抗菌薬への多剤耐性化は、感染症治療において重要な問題となっている。全国で分離される緑膿菌の2%前後が多剤耐性緑膿菌であるとする報告があり、本菌が易感染宿主における感染症の原因菌となった場合、その治療法は非常に限られた薬剤しかないのが現状である。多剤耐性緑膿菌感染症治療に現在用いられているポリペプチド系薬は、腎毒性をはじめとする副作用の強さの問題やこれら薬剤に対する耐性化の懸念などから、より安全で、有効な多剤耐性緑膿菌感染症に対する治療法の開発が急務となっている。

我が国において分離される多剤耐性緑膿菌の多くはメタロラクタマーゼ(MBL)の一種であるIMP-1産生性の緑膿菌である。こうした現状からIMP-1の活性を阻害する薬剤やIMP-1の産生を抑制する物質の開発が本菌感染症の抑制のために重要である。IMP-1阻害物質としては2メルカプトプロピオン酸などが知られているが、生体内に投与できる薬剤は現在のところ知られていない。

一方、主に抗ウイルス作用や抗癌作用において標的蛋白抑制効果のある簡便な方法としてRNA干渉(RNAi)が最近注目され、様々な検討が行われている。細菌に対するRNAiに対する論文は現在のところ少ないが、ブドウ球菌の毒素産生を抑制したとする報告や*mecA*の発現を抑制したとする報告があり、真核細胞だけでなく、原核細胞に対してもRNAiが作用し、その効果によって感染症を制御できる可能性がある。我々のこれまでの検討では緑膿菌線毛のtwitching motility抑制にRNAiが効果があることを示した(研究

代表者; 門田淳一: 基盤研究(C) 緑膿菌 Twitching motility の遺伝子機能阻害 RNAiによる治療)。このような結果は、RNAiによってグラム陰性桿菌である多剤耐性緑膿菌のIMP-1産生能を抑制することができる可能性があることを示唆している。RNAiによってIMP-1の産生を抑制できれば、RNAiと抗緑膿菌作用を有する抗菌薬を投与することで、多剤耐性緑膿菌感染症を制御することができるものと考えられ、本研究を行った。

### 2. 研究の目的

RNAiによる多剤耐性緑膿菌感染症の制御について検討することを本研究の目的とし、以下のことについて検討を行った。

(1) *in vitro*におけるshort interfering RNA(siRNA)への取り込み状況の検討

(2) *in vitro*における高効率なsiRNAの細菌への移入法の検討

(3) RNAiによるIMP-1産生抑制効果の検討

(4) *in vivo*におけるsiRNAによるIMP-1産生緑膿菌感染症に対する治療効果の検討

### 3. 研究の方法

(1) IMP-1遺伝子*bla<sub>IMP-1</sub>*に対するsiRNAの設計及び合成

効率よくIMP-1遺伝子*bla<sub>IMP-1</sub>*の発現を抑制するsiRNAを作成するために、*bla<sub>IMP-1</sub>*遺伝子塩基配列の中から様々な21塩基対の2本鎖siRNAを総計14種類作成した。その配列の決定は、Tushl Tらの方法(Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. Genes Dev 1999, 13:3191-3197)をもとに設計を行った。また、より高効率的にsiRNAが菌体内に取り込まれるようにコレステロール、メチオニンあるいはグルコースを修飾

したsiRNAを合成した。さらに菌体内への取り込み状況を確認するために蛍光染色したsiRNAの合成を行った。siRNA合成は外部委託業者に作成を依頼し合成した。

## (2) 菌株

本研究では臨床分離緑膿菌2株(OU-98039、OU-01062)を用いて実験を行った。いずれの菌株もセフトアジジム(CAZ)に対するMIC値は256 $\mu$ g/ml以上であり、IMP-1遺伝子 $bla_{IMP-1}$ を保有し、メタロラクタマーゼを産生していた。

## (3) siRNAの取り込み状況の確認

緑膿菌を10<sup>5</sup>CFU/mlとなるように10% trypticase soy brothで調整し、各siRNAを50nmol/lとなるように菌液と混合した。混合6時間後に共焦点レーザー蛍光顕微鏡で菌体の発光状況を検討することでsiRNAの菌への取り込みを評価した。

## (4) *in vitro*におけるsiRNAによるIMP-1産生緑膿菌に対する効果

緑膿菌を10<sup>5</sup>CFU/mlとなるように調整し、各siRNAを50nmolとなるように菌液と混合した。さらに64 $\mu$ g/mlとなるようにCAZを添加し、10% trypticase soy broth中で培養を行った。培養開始6、12、18、24時間後に検体を採取し、菌量の測定を行った。

## 4. 研究成果

### (1) siRNAの各種修飾による取り込みへの影響

蛍光標識したsiRNAを用いて緑膿菌株と6時間反応後、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて菌の観察を行った。図1Aに示すように何

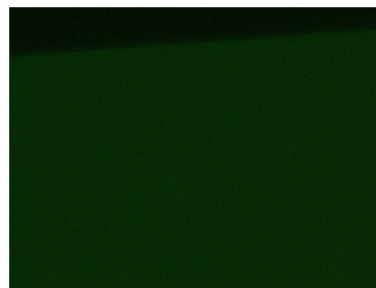


図1A 非修飾siRNA作用時の共焦点レーザー蛍光顕微鏡写真

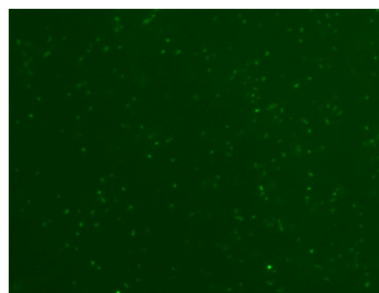


図1B コレステロール修飾siRNA作用時の共焦点レーザー蛍光顕微鏡写真

も修飾していないsiRNAでは蛍光発色はほとんど認められず、十分なsiRNAの取り込みが認められなかった。一方で、コレステロール修飾したsiRNAでは菌体ほぼ全てが蛍光発色を示しており、コレステロール修飾siRNAの方がより菌体内に取り込まれていることが考えられた。またグルコースやメチオニン修飾でも菌体は非修飾siRNAに比べると、より蛍光染色される割合は高くなっていた。これらsiRNAの取り込みの検討はOU-98039株、OU-01062株で検討したが、両株共に同様の結果であった。

### (2) コレステロール修飾siRNAによるCAZとの併用効果

菌体への取り込みの状況からコレステロールを修飾したsiRNAと抗菌薬であるCAZをIMP-1産生緑膿菌に作用させた。その後6、12時間後にそれぞれ菌液を採取し、菌量を測定した。その結果培地中に何も入っていないcontrol群とsiRNAのみを添加した群およびCAZのみを添加した群、いずれも同様に時間

の経過と共に菌量は徐々に増加し、12時間後には $10^7$ CFU/mlに達し、24時間後には $10^8 \sim 10^9$ CFU/mlとなっていた。一方で、 $64\mu\text{g/ml}$ のCAZとsiRNAを混和した緑膿菌においても他の3群同様の菌の増殖を認めていた(図2)。こうした結果は菌株OU-98039、OU-01062いずれの菌においても同様であり、さらに作成した14種類すべてのsiRNAにおいても同様の結果であり、増殖を抑制する効果は認めなかった。

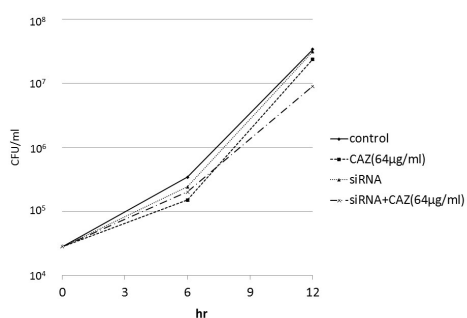


図2 コレステロール修飾siRNAとCAZによるIMP-1産生緑膿菌への増殖抑制効果

ところが、数回に分けて作成したコレステロール修飾siRNAにおいて、ある配列の1ロットのsiRNAでは顕著な増殖抑制効果を認めていた。同ロットのsiRNAではCAZと併用することで12時間後には菌量の著明な減少を認めていた。こうした結果は数回の実験で確認された。しかしながら、同じ配列のsiRNAを合成し直すと効果はまったく得られなかった。こうした結果は当該ロットに何らかのメタロβラクタマーゼ抑制因子が混入していたものと思われる。

### (3) メチオニンあるいはグルコース修飾siRNAとCAZとの混合培養による菌増殖抑制効果

コレステロール修飾によるsiRNAでは効果を認めなかったため、メチオニンやグルコースを修飾したsiRNAを用いて、CAZとの併用効

果をOU-98039を用いて検証した。メチオニン修飾siRNAにおいてもグルコース修飾siRNAにおいても多少のばらつきがあるもののCAZのみや非修飾siRNA+CAZ群と同様に菌の増殖を認めていた(図3)。こうした結果は修飾の違いによるsiRNA効果発現には影響がないことを示唆していた。

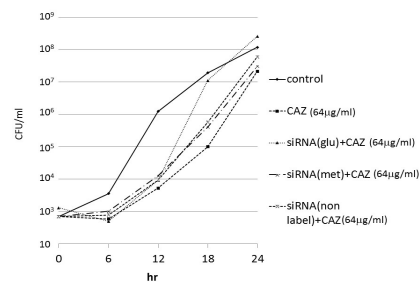


図3 各種修飾siRNAとCAZによるIMP-1産生緑膿菌への増殖抑制効果

### (4) 10種のコレステロール修飾siRNA同時投与による増殖抑制効果の検討

14種類作成したsiRNAを単独でCAZとともに作用させても、菌の増殖抑制効果を認めなかったことから、10種のsiRNAを同時に作用させた。10種類のsiRNAを菌液に投与し、 $64\mu\text{g/ml}$ となるようにCAZを作用させた。図4に示すようにわずかにコントロール群やCAZ単独、siRNA単独の群に比べて緑膿菌の増殖が抑制されていた。

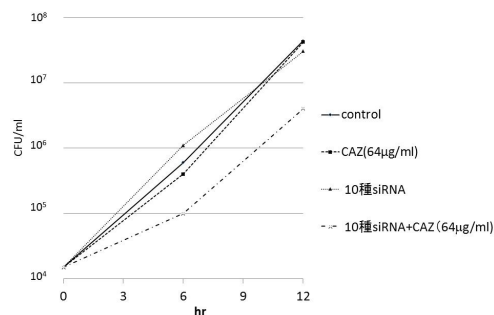


図4 コレステロール修飾の10種siRNAとCAZによるIMP-1産生緑膿菌への増殖抑制効果

しかしながら当初想定していたほどの菌量の十分な減少は認めなかったため、今後siRNAの濃度やsiRNAの配列の再設計などを行い、

検討を進めていく予定である。また本研究の目的にin vivoでの検討を記載していたが、in vitroでの検討で十分な効果が認められなかったため、in vivoでの検討は行えなかった。

研究者番号：

#### 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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

[その他]

なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

平松 和史 (HIRAMATSU KAZUFUMI)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：80301381

##### (2)研究分担者

門田 淳一 (KADOTA JUN-ICHI)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：50233838

##### (3)連携研究者

( )