

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：32667

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890219

研究課題名（和文）

口腔レンサ球菌による感染性心内膜炎の予防薬の開発および発症リスク診断法の確立

研究課題名（英文）

Identified a novel preventive agents for infective endocarditis

研究代表者

田代 有美子 (TASHIRO YUMIKO)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：30434145

研究成果の概要（和文）：

感染性心内膜炎は病原体が心臓の内膜に感染する事で、心内膜での疣贅の形成、敗血症、血管塞栓などの症状を起こす病気である。この病気は心疾患をもつ方に起こりやすく、この方が一過性の敗血症を生じる可能性のある出血を伴う手術や処置を受ける際は、抗菌薬投与による予防が必要となる。しかしながら、歯科処置の際の抗菌薬投与による予防は、非常に少数例で予防に成功する可能性があるのみである。そこで、本研究では抗菌薬投与以外の新たな感染性心内膜炎に対する予防処置の確立を目的とした。口腔レンサ球菌の一種である *Streptococcus gordonii* は、口腔内における歯垢の形成や、それに続く歯肉炎の発症に関与しているのみならず、感染性心内膜炎の原因菌としても知られている。*S. gordonii* による感染性心内膜炎の発症には、菌体表層に発現するシアル酸結合性アドヘジン(Hsa)が重要な役割を担っている事が明らかとなっている。そこで、Hsa とシアル酸との結合を阻害する化合物の探索を試みた。赤血球凝集反応法を用い 9600 個の化合物をスクリーニングした結果、3 個の化合物で菌体による赤血球凝集反応の阻害がみられた。また、Hsa のシアル酸結合領域である NR2 領域と GST との融合タンパク質 GST-HsaNR2 を用いたシアル酸結合実験では、先に得られた 3 個の化合物のうち、1 個の化合物で NR2 領域とシアル酸との結合の阻害活性がみられた。以上の結果より、9600 個の化合物中から 1 個の候補薬を得る事ができた。

研究成果の概要（英文）：

Infective endocarditis is an infection of the heart valves that causes the vegetation formation on the inner layer of the heart, sepsis, and thromboembolism. While infective endocarditis occurs in apparently healthy people, certain congenital heart defects increase its risk. Then, it needs to administrate of antibacterial agents to high-risk patient before medical treatment accompanied with bleeding. Unfortunately, there are few effects of administration of antibacterial agents before dental treatment. In this study, we identified a novel preventive agent for infective endocarditis. *Streptococcus gordonii* is one of viridans group streptococci and component of the normal microbial flora of human oral cavity. It plays significant roles as pioneer colonizers in the development of dental plaque. In addition, *S. gordonii* is also well known for its ability to colonize damaged heart valves and is the most frequently identified bacteria as primary etiological agents of infective endocarditis. An Hsa, is a surface protein of *S. gordonii* and binds to α 2-3-link sialic acid-containing proteins, contributes to pathogenesis of infective endocarditis. In present study, we identified a novel compound to inhibit Hsa sialic acid binding activity. To identify Hsa inhibitors, we performed a screening of 9600 compounds by using hemagglutination assay. We identified 3 compounds as initial hits in the screening. Next, we examined their inhibition activity of GST-HsaNR2 binding to 3'-sialyllactose. Among these candidate compounds, No.2 showed more potent Hsa inhibition activity. In this study, we obtained one of candidate compound from chemical library.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形態系基礎歯科学

キーワード：微生物学

1. 研究開始当初の背景

感染性心内膜炎は病原体が心臓の内膜に感染することで、心内膜での疣贅の形成、敗血症、血管塞栓、心障害、脳障害などの症状を呈する疾患である。感染性心内膜炎の 45～80 %が *viridans group* に属するレンサ球菌によって引き起こされる。発症には、心疾患に伴う異常血流や、人工弁置換術による異物の影響で生じた非細菌性血栓性心内膜炎 (nonbacterial thrombotic endocarditis, NBTE) が重要と考えられている。出血を伴う処置や手術により一過性の菌血症が生じると、NBTE の部位に菌が付着、増殖し、感染性心内膜炎となる。そのため、ハイリスクの患者には口腔内歯科処置の際にも抗菌薬投与による感染性心内膜炎の予防が必要となる。しかしながら、歯科処置の際の抗菌薬投与による予防は、非常に少数例で予防に成功する可能性があるのみである。

2. 研究の目的

口腔レンサ球菌の一種である *Streptococcus gordonii* は、口腔における歯垢の形成や、それに続く歯肉炎の発症に関与しているのみならず、感染性心内膜炎の原因菌として知られている。

当研究室では、赤血球凝集活性をもつ *S. gordonii* の菌株の一つとして DL1 株を取り上げ、赤血球凝集を起こすアドヘジンの単離・機能解析を行った。その結果、この活性は DL1 の菌体表層に発現する Hsa によることを明らかにし、Hsa をコードする遺伝子として *hsa* 遺伝子を単離した。さらに、Hsa は $\alpha 2-3$ 結合のシアル酸を末端にもつ複合糖質に特異的な付着活性があることも示した。

これまでの研究で、この Hsa が *S. gordonii* の口腔内への定着に関与しているだけでなく、血小板、単球、好中球、マクロファージといった血球系細胞との結合に関与してい

ることが明らかとなっている。

さらに、心疾患モデルラットを用いた感染性心内膜炎モデル実験により、Hsa が *S. gordonii* による感染性心内膜炎の発症に関与していることも明らかとなっている。

そこで本研究では、抗菌薬投与以外の感染性心内膜炎に対する新たな予防処置を確立するために、Hsa のシアル酸結合能を阻害する薬の探索を行った。

3. 研究の方法

これまでの研究で、Hsa とシアル酸との結合に Hsa の NR2 領域が関与している事が明らかとなっている。現在、Hsa の NR2 領域と glutathione S-transferase (GST) との融合タンパク質 GST-HsaNR2 を発現・精製することが可能である。そこで、GST-HsaNR2 を用いて大量の薬剤スクリーニングを行い、その結果得られた薬剤を用い菌体と宿主細胞との結合阻害実験を行った。

(1) Hsa の NR2 領域と結合する薬剤のスクリーニング：Hsa の NR2 領域を介したシアル酸結合能を阻害する薬剤を探索するため、赤血球凝集反応法を用いて GST-HsaNR2 と赤血球との結合を阻害する薬剤のスクリーニングを行った。

(2) 候補薬による Hsa とシアル酸との結合阻害活性の確認：(1)の方法で得られた薬剤によって GST-HsaNR2 と 3' -sialyllactose との結合が阻害されるかをドットプロット法により検討した。

(3) Hsa 阻害薬が他の菌にも有効であるかの検討：感染性心内膜炎の病巣には *Staphylococcus aureus* や *Streptococcus sanguinis* も多くみられる。また、これらの菌においても Hsa のカウンターパートが保存

されている。そこで、(1)の方法で得られた Hsa 阻害薬がこれらの菌と血球細胞との結合を阻害するかを赤血球凝集反応法により検討した。

(4) HsaNR2 領域内のシアル酸結合部位の特定：これまでの研究で、Hsa の NR2 領域がシアル酸との結合に関与していることが明らかとなっている。しかしながら、シアル酸との結合に関与する NR2 領域内のアミノ酸残基は明らかとなっていない。そこで、このことを明らかとするために、まず NR2 領域のアルギニンに点変異の入った GST-HsaNR2 タンパク質を精製し、これを用いて赤血球凝集反応法やシアル酸との結合実験を行うことで、シアル酸との結合に関わる HsaNR2 領域内のアミノ酸残基を特定した。

4. 研究成果

(1) Hsa の NR2 領域と結合する薬剤のスクリーニング：Hsa の NR2 領域を介したシアル酸結合能を阻害する薬剤を探索するため、東京大学創薬オープンイノベーションセンターより薬剤の提供を受け、赤血球凝集反応法を用いて GST-HsaNR2 と赤血球との結合を阻害する薬剤のスクリーニングを行った。9600 個の薬剤をスクリーニングした結果、410 個の薬剤で GST-HsaNR2 による赤血球凝集反応の阻害がみられた。

次に、得られた 410 個の薬剤により *S. gordonii* と赤血球との結合が阻害されるかを上述と同様の方法で調べた。その結果、410 個の薬剤のうち 3 個の薬剤で *S. gordonii* による赤血球凝集反応の阻害がみられた。

(2) 候補薬による Hsa とシアル酸との結合阻害活性の確認：得られた候補薬 (No. 1, No. 2, No. 3) を用いて Hsa のシアル酸結合能の阻害効果を検討した。本薬剤により GST-HsaNR2 と 3'-sialyllactose と結合が阻害されるかをドットプロット法で確認した結果、薬剤 No. 2 で顕著な阻害効果が見られた。また、この薬剤が Hsa の NR2 と結合していることも明らかとなった。

(3) Hsa 阻害薬が他の菌にも有効であるかの検討：(2)の実験で強い活性を示した薬剤 No. 2 が他の菌にも有効であるかを検討した。赤血球凝集反応法を用いて阻害効果を検討した結果、*S. gordonii* DL1 だけでなく *S. gordonii* TIGR、*S. gordonii* SK6、*S. gordonii* 臨床分離株 (2 株)、*S. sanguinis* 10556、*S. sanguinis* SK1 による赤血球凝集反応も阻害することが明らかとなった。

(4) HsaNR2 領域内のシアル酸結合部位の特定：Hsa の NR2 領域内でシアル酸との結合に

関与するアミノ酸残基を明らかにするために、まず NR2 領域のアルギニンに点変異の入った 7 種類の GST-HsaNR2 タンパク質 (GST-HsaNR2*) を精製した。次にこのタンパク質を用いて赤血球凝集反応法を行った結果、2 種類の変異タンパク質で凝集活性の消失がみられた。さらに、ELISA 法を用いてこの 2 種類の GST-HsaNR2* とシアル酸との結合を確認したところ、2 種類ともにシアル酸との結合力が弱くなっていることが明らかとなった。

以上の結果より、9600 個の薬剤の中から 1 個の感染性心内膜炎予防薬の候補薬を得ることができた。

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：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田代 有美子 (TASHIRO YUMIKO)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：30434145

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：