

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461511

研究課題名(和文) RNAiを用いた緑膿菌バイオフィーム感染症に対する新しい治療戦略

研究課題名(英文) New therapeutic strategy to biofilm formed infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*

研究代表者

平松 和史 (HIRAMATSU, Kazufumi)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：80301381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：緑膿菌バイオフィーム感染症に対するRNA干渉による抑制効果について検討した。グリコカリックス産生に重要な蛋白であるPsIA、PelAに対するsiRNAを合成した。コレステロール、メチオニン、グルコースなどで修飾したsiRNAは非修飾のsiRNAに比べ効率よく菌体に取り込まれていた。緑膿菌を付着させたシリコン片を各siRNAと培養し、シリコン片上のバイオフィーム量をクリスタルバイオレット法で測定した。siRNA作用群と非作用群を比較するとシリコン片上の生菌数に差は認めず、バイオフィーム量にも差を認めなかった。本研究においてはsiRNAがバイオフィーム形成を抑制するとの証明はできなかった。

研究成果の概要(英文)：RNA interfering (RNAi) has been known to suppress the targeted protein expression in eucaryocytes. We examined the potential of RNAi for the biofilm formed infection due to *Pseudomonas aeruginosa*. we synthesized short interfering RNAs (siRNAs) to PsIA, PelA and AlgU which were associated with production of glycocalyx and alginate. Although no modified siRNA was not incorporated to *P.aeruginosa* sufficiently, siRNAs modified with cholesterol, methionine or glucose were incorporated to the cells. Silicone pieces, which were adhered *P.aeruginosa*, were incubated with or without modified siRNAs. Quantities of biofilm on silicone pieces were examined by crystal violet method. Viable cell counts and quantities of biofilm were no significant differences between incubated with and without siRNA. We could not prove that siRNA against PelA and PsIA suppressed production of biofilm due to *P.aeruginosa*.

研究分野：感染症内科学

キーワード：緑膿菌 siRNA バイオフィーム グリコカリックス アルギン酸

## 1. 研究開始当初の背景

医療の高度化は、カテーテルなどの医療用異物が長期に亘り挿入される症例を増加させている。こうした状況に伴い緑膿菌をはじめとする細菌のバイオフィーム形成による感染症の慢性化、難治化は様々な領域において重要な問題となっている。バイオフィームは菌が産生するアルギン酸やグリコカリックスなどの多糖物質に生体のタンパク質などが重合し形成されている。完成したバイオフィームは極めて強固で、バイオフィーム内の菌のMICやMBCは通常の浮遊菌の1000倍にも達すると報告されている。こうしたことは通常の抗菌薬療法ではバイオフィーム内の菌を殺菌し、バイオフィームを排除することは困難であることを示している。

これまでにバイオフィーム形成菌に対する治療法の検索は様々な試みがなされている。その中の一つとして、バイオフィーム形成にはクォラムセンシングの関与が知られ、クォラムセンシングの阻害による効果が期待されるが、未だ有効な方法は証明されていない。またマクロライド系薬による検討が行われているが、完成したバイオフィームに対する効果は得られていない。

近年、抗ウイルス作用や抗腫瘍作用として標的蛋白合成を抑制する方法としてRNA干渉(RNAi)が注目されている。細菌に対するRNAiに関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る。私たちのこれまでの検討では、緑膿菌線毛の*twitching motility*抑制にRNAiが一部に有効であることを示した(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)。また多剤耐性緑膿菌のIMP1産生を一部抑制する可能性を明らかにした(研究代表者; 平松和史: 基盤研究(C) 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)。このような成果は、RNAiによってバイオフィーム形成を制御できる可能性を示唆し、こうした背景から本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

1) グリコカリックスやアルギン酸産生関連遺伝子に対するshort interfering RNA (siRNA) の設計と合成

グリコカリックス産生の関連遺伝子である*peIA*や*psIA*遺伝子やアルギン酸関連遺伝子*algU*の発現を効率よく抑制するsiRNAを設計し、合成を行う。

2) *in vitro*における高効率なsiRNAの細菌への移入法の検討

合成した各種siRNAに対して蛍光標識を行い、細菌内へのsiRNAの取り込み状況について解析を行う。さらにコレステロールやグルコース、アミノ酸などで付加したsiRNAを用いて効率よく細菌内へのsiRNAの移入が可能な方法の構築を行う。

3) *in vitro*におけるRNAiによるアルギン酸、グリコカリックス産生抑制効果の検討

合成した*PeIA*、*PslA*、*AlgU*に対するsiRNAのグリコカリックスやアルギン酸の産生抑制効果をクリスタルバイオレット法やHPLC法を用いて検討を行う。

4) *in vitro*におけるsiRNAと抗菌薬併用効果

アルギン酸やグリコカリックス産生抑制効果を示したsiRNAを作用させたムコイド型または非ムコイド型緑膿菌に抗緑膿菌作用を有する抗菌薬を併用することで、バイオフィーム形成菌への抗菌効果について検討する。

5) *in vivo*におけるsiRNAと抗菌薬によるアルギン酸、グリコカリックス産生緑膿菌感染症に対する治療効果

*in vitro*においてアルギン酸、グリコカリックス産生を抑制し、抗菌薬との併用で薬剤感受性の回復を確認したsiRNA及び抗菌薬を用い、マウス腹腔内バイオフィーム感染モデルを用い*in vivo*での治療効果を検証する。

## 3. 研究の方法

(1) siRNA の設計及び作成

Tushl Tらの方法 (Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. *Genes Dev*1999, 13:3191-3197) を用いて*AlgU*、*PeIA*、*PslA*に対するsiRNAを作成した。また菌体への取り込み状況を確認

するために蛍光染色したそれぞれのsiRNAを合成した。オリゴヌクレオチド作成は外部企業にて作成を行った。

#### (2) 菌株

本研究においては非ムコイド株である緑膿菌PA01株を用いて検討を行った。

#### (3) *in vitro*におけるsiRNAの取り込み状況の確認とその最適条件の検索

緑膿菌を $10^5$ CFU/mlとなるように10% trypticase soy broth (TSB) で調整し、各siRNAを1, 5, 10, 50, 100nmol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観察し、siRNAの菌への取り込みの状況を評価した。

#### (4) バイオフィームに対するsiRNAによる発現量の比較検討

PA01株 $10^5$ CFU/mlの菌液中にシリコン片を45分間室温で静置し、菌をシリコン片上に付着させた。その後、シリコン片を50nmolのコレステロール、メチオニン、グルコース標識および非標識の各siRNAを含むTSB培地中で48時間培養した。培養後のシリコン片を取り出し、軽くPBSで洗浄し、1%クリスタルバイオレットで30分間染色を行った。その後、シリコン片をPBSにて3回軽く洗浄後、100%エタノールで脱色し、脱色液の吸光度 (OD=595nm) を測定した。数値はnegative controlであるsiRNA非含有培地中で緑膿菌付着シリコン片でのOD値を1とし、siRNA作用群と非作用群のOD値の比を計算し、各siRNAのバイオフィーム形成能を比較検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) siRNAの設計及び合成とsiRNAの修飾

以下の配列のsiRNA合成をそれぞれduplexとなるように行った。

Pe1A:5' GUUUCGAAGUGCUGCCGGATT

Ps1A1:5' GCAUGCACCUGGCCGAAUATT

Ps1A2:5' GACGUCUACUCCGACGAUATT

AlgU:5' GCGACCACGCCUGAAGGATT

Pe1A、Ps1A1、AlgUについては5'末端に蛍光色素を付加し、3'末端に修飾物質としてコレステロールを付加したものと非修飾のものを作成した。また、Ps1A2については、5'末端にコレステロール、グルコースまたはメチオニンを付加したものと非修飾ものを作成し、3'末端に蛍光色素を付加したオリゴヌクレオチドを作成した。

#### (2) siRNAの各種修飾による菌体への取り込みに対する効果

蛍光標識したsiRNAを用いて緑膿菌と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。何も修飾していないsiRNAでは蛍光発色をほとんど認めず、十分なsiRNAの取り込みを認めなかった。一方で、コレステロール修飾したsiRNAでは菌体のほとんど全てが蛍光発色しており、コレステロール修飾のsiRNAは、非修飾siRNAに比べて、より効率よく菌体に取り込まれていると判断された。

またコレステロール以外の修飾での取り込みの状況についても検証を行った。図1にグルコース修飾のsiRNAの取り込みの状況についての写真を示す。図1Aはグルコース修飾+蛍光標識siRNA Ps1A2と菌の反応後、位相差顕微鏡で観察、撮影したもので、図1Bは同じ検体を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察したものである。ほとんどの菌が蛍光染色されており、高効率にグルコース修飾siRNAが菌体内に取り込まれていることが明らかとなった。



図1 A グルコース+蛍光色素修飾siRNAを反応させた緑膿菌を位相差顕微鏡で観察

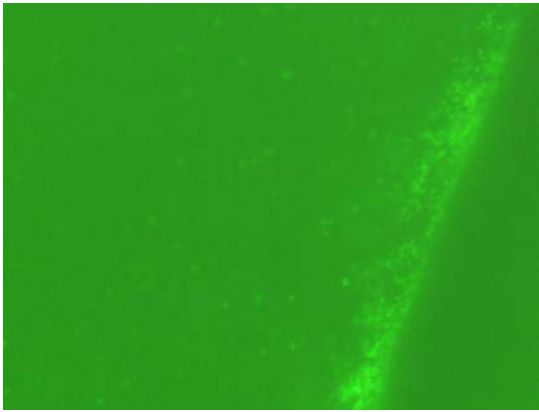


図1 B グルコース+蛍光色素修飾siRNAを反応させた緑膿菌を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察

またメチオニン修飾siRNAにおいても図2に示すようにコレステロールやグルコース修飾と同等に菌への取り込みを認めていた。



図2 A メチオニン+蛍光色素修飾siRNAを反応させた緑膿菌を位相差顕微鏡で観察

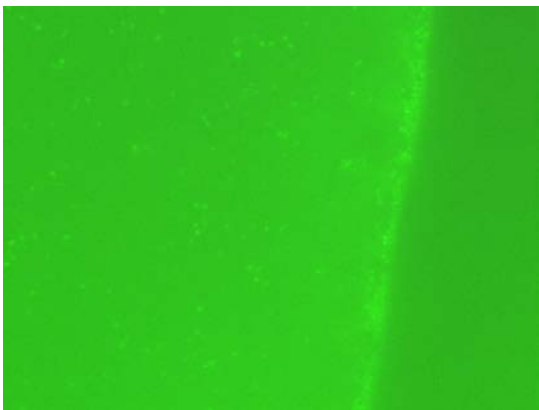


図2 B メチオニン+蛍光色素修飾siRNAを反応させた緑膿菌を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察

(2) Pe1A siRNAによるグリコカリックス産生に対する効果

菌体へのsiRNAの取り込みの状況からコレステロールを修飾したsiRNAをシリコン片上に付着させた緑膿菌の培養液に添加し、培養を行った。シリコン片上のバイオフィルム量をクリスタルバイオレット法で測定した。

クリスタルバイオレット法によるグリコカリックス産生量にsiRNA添加群、siRNA非添加群に差は認めなかった(図3)。またこの時の生菌数を検討したが、菌数にも各群において差は認めなかった。

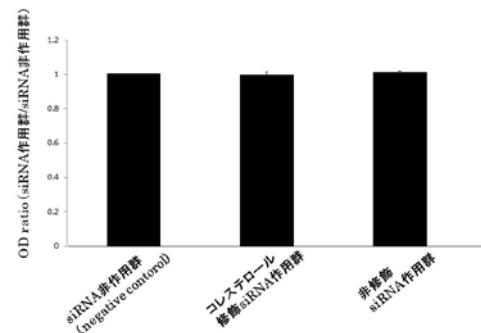


図3 Pe1Aに対するsiRNAのバイオフィルム産生抑制効果

このような結果から本検討で用いたPe1Aに対するsiRNAはグリコカリックスの産生を抑制できなかったものと評価された。

(2) PslA siRNAによるグリコカリックス産生に対する効果

PslAに対するsiRNAであるpslA1の効果をPe1Aと同様にクリスタルバイオレット法で検討した。Pe1A siRNAと同様にコレステロール修飾のPslA1はバイオフィルム産生の抑制効果を示さなかった。

またPslA2 siRNAに対してはコレステロール修飾以外に、グルコース修飾、メチオニン修飾のsiRNAを作成し、検討を行った。その結果を図4に示す。コレステロール、メチオニン、グルコース修飾いずれの群もsiRNA非添加群と同様のOD値であり、バイオフィルム量の抑制効果を見いだすことはできなかった。

こうした結果は今回用いたPslAに対するsiRNAではグリコカリックスの産生を抑制できなかったことを示していると考えられた。

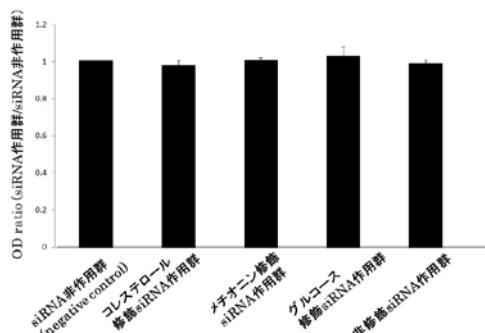


図4 Ps1Aに対するsiRNA (Ps1A2)のバイオフィルム産生抑制効果

PelAやPs1Aに対するsiRNAを合成し、その効果についてクリスタルバイオレット法で検証したが、十分な効果は得られなかった。このため当初目的としていた抗菌薬とsiRNAの併用効果の検討や*in vivo*でのsiRNAの効果の検証を行うことはできなかった。さらに配列の異なるPs1Aに対するsiRNAを合成し、今後も検討を進めて行く予定である。

アルギン酸の合成抑制効果については、siRNA合成は行ったものの、PelAやPs1Aに対する効果の検証を優先的に行ったことから、十分な検討が行えなかった。引き続きAlgUに対するsiRNAを用いた検討は行っていくこととしている。

## 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

平松 和史 (HIRAMATSU Kazufumi)  
 大分大学・医学部・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

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )