

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670816

研究課題名(和文)細菌性バイオフィルムの固着を阻害する新規化合物の作製と感染制御効果の検索

研究課題名(英文)The synthesis of new compounds that reveals anti-bacterial biofilm activity

研究代表者

寺尾 豊(Terao, Yutaka)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50397717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：免疫活性化作用を示すジフテリア菌脂質トレハロース-6,6-ジコリノミコレートに着目し、150種の類縁体を合成して構造活性相関研究を行い、最近、構造の単純化と抗癌作用を増強させた糖脂質Vizantinを創製した。Vizantinの生物活性を検索したところ、固着緑膿菌に対して殺菌作用を有することが示唆された。そこで、Vizantinの細菌性バイオフィルム形成阻害・平滑面への菌体付着に対する効果について、う蝕原因菌であるミュータンス菌、および院内感染症の起因細菌MRSAを用いて検討し、バイオフィルム阻害効果を有する臨床応用可能なVizantin誘導体の作製を図ることにした。

研究成果の概要(英文)：We have been investigated (2R, 3R)-trehalose-6,6 -dicorynomycolate, and we named the material as a "Vizantin". It revealed immunostimulating properties and anti-cancer response in vitro assays. In this present Challenging Exploratory Research, we synthesized or modified the insoluble Vizantin to soluble analogues, and then we used them for the analyses to search anti-bacterial biofilm molecules. The biochemical and imaging assays demonstrated that one of the Vizantin analogues inhibited *Streptococcus mutans* biofilm formation.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：口腔細菌

1. 研究開始当初の背景

生体の防御機構を司る「免疫系」は、体内に侵入した病原性細菌や癌細胞の表面構造を特異的に認識して作動する。古くから、その性質を逆手に利用することで、菌体由来成分を免疫療法薬(免疫賦活剤)として医療に応用する試みが展開されてきた。ヒト型結核菌の抽出物として知られる丸山ワクチンをはじめ、溶レン菌の乾燥菌体を主成分とするピシバニールがその例であり、皮膚結核菌の治療薬、癌化学療法の併用薬として、それぞれが使用されている。しかしながら、これらの免疫療法薬は、有効成分が様々な多糖や糖脂質の混合物で、正確な有効成分に基づく薬効・薬理が証明されていないため、用途については厳しく制限されている。

そこで申請者らは、単一の化合物として免疫活性化作用を示すジフテリア菌の細胞表面糖脂質トレハロース-6,6-ジコリノミコレート(TDCM)に着目し、これをリード化合物とすることで、効果的な免疫療法薬の開発を目指してきた。そして、これまでに150種の類縁体を合成して構造活性相関研究を行い、最近、構造の単純化と抗癌作用を増強させた糖脂質 Vizantin を創製した。

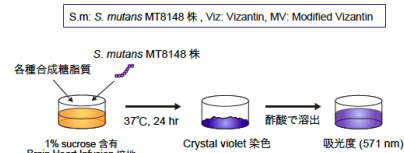
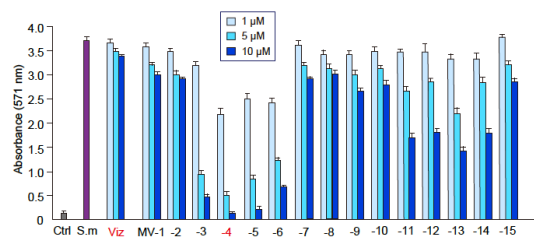
2. 研究の目的

本研究は、二ヶ年の研究機関で申請し、これまで合成した化合物(候補化合物:約50種類)、および新たな Vizantin 誘導体(候補化合物:約20種類)を用いて、ミュータンス菌やメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 MRSA のバイオフィルム形成、および平滑面への付着に対する阻害効果について明らかにする。

3. 研究の方法

二ヶ年計画の研究初年度は、これまで Vizantin の欠点であった溶解性の悪さ故の薬物調製の難しさを克服するため、*in silico* 構造予測スクリーニング法により、溶解性の向上した Vizantin の構造をコンピューター上で網羅的に探索検証し、候補化合物の合成を行う。これまでの検証の結果、Vizantin の脂肪側鎖部位の構造は、活性発現にとっても重要なため、トレハロース部位の水酸基に着目した誘導体の作製を行う。その後、Vizantin、および新たに合成した誘導体をミュータンス菌や MRSA のバイオフィルム形成実験に供し、バイオフィルム形成抑制作用、あるいはバイオフィルムの平滑面付着抑制作用を有する化合物の同定を行う。

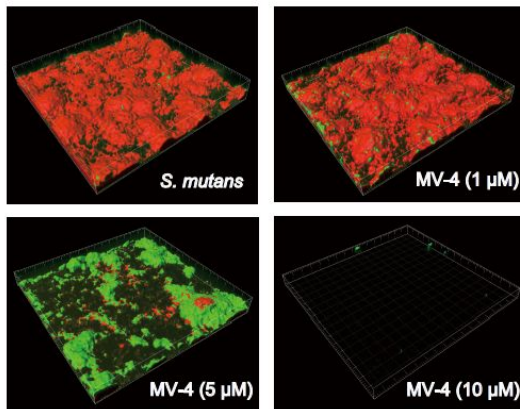
4. 研究成果



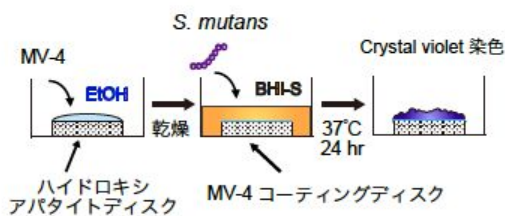
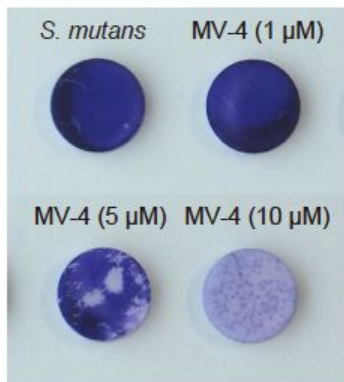
- Vizantin は、*S. mutans* バイオフィルム抑制効果を示さなかった。
- Modified Vizantin (MV)-3, 4, 5, 6 は、濃度依存的に *S. mutans* バイオフィルム形成を抑制し、特に MV-4 が強い抑制効果を示した。

- (1) Vizantin を含む免疫賦活効果を示す化合物(約50種類)は、水に不溶性であるため、エマルジョン溶液(5.0%大豆油、1.0%ポリソルベート80、5.0%グルコース)、あるいはアルブミン溶液に溶解した。
- (2) Vizantin の溶解性を向上させるため、トレハロース部位の構造を変化させ、溶解性が高いと考えられる約20種類の化合物を有機合成した。
- (3) ミュータンス菌やメチシリン耐性黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成に対する各種化合物の効果について、クスタル

バイオレット, Syto9, ローダミン D などの染色剤を用いて解析した。歯面を模倣するため, カチオンチャージした 96 ウェルプレート, および人工唾液でペリクルを形成したハイドロキシapatite樹脂を用いて候補化合物を探索した。バイオフィルムの画像は, Keyence 社製 BIOREVO を用いて解析した。

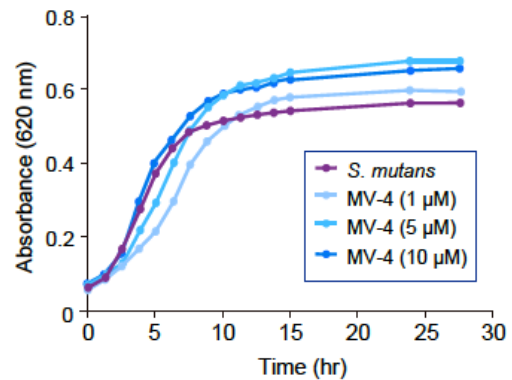


Green: Calcein AM (*S. mutans*), Red: Rhodamine B (マトリックス成分)

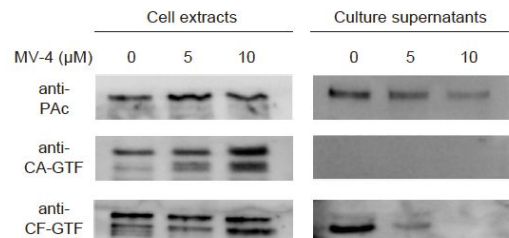


- (4) 好中球やマクロファージ由来細胞株に各種化合物を添加後, 産生される各種サイトカインを ELISA キットにて定量した。複数デザインした Vizantin 誘導体から, 免疫誘導能の高い構造体を選択した。
- (5) ミュータンス菌の増殖に対する各種化合

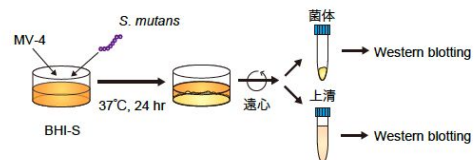
物の直接的な影響について濁度法を用いて解析した。



- (6) ミュータンス菌やメチシリン耐性黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成に密接に関与するグルコシルトランスフェラーゼやクオラムセンシングに関するオートインデューサーペプチドの遊離に対する候補化合物の影響について解析した。



PAc: タンパク質抗原, CA-GTF: 菌体結合型 GTF, CF-GTF: 遊離型 GTF



得られた結果は, 研究代表者自身が学会および学術誌で専門家を対象に報告する。そして, 申請者が作成する研究室のホームページ(年間の延べアクセス数は約 45,000 / 更新頻度は年間 200 回以上)から, リアルタイムで広く国民に発信した。

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 14 件)

1. Yamamoto, H., Oda, M., Kanno, M., Tamashiro,

- S., Tamura, I., Yoneda, T., Yamasaki, N., Domon, H., Nakano M., Takahashi, H., Terao, Y., Kasai, Y., and Imagawa, H.: Chemical hybridization of Vizantin and Lipid A to generate a novel LPS antagonist. Chem. Pharm. Bull., 64: 246-257., 2016. (査読有り)
2. Sakaue, Y., Domon, H., Oda, M., Takenaka, S., Kubo, M., Fukuyama, Y., Okiji, T., and Terao, Y.: Anti-biofilm and bactericidal effects of Magnolia bark-derived magnolol and honokiol on *Streptococcus mutans*. Microbiol. Immunol., 60:10-16, 2016. (査読有り)
3. Kurosawa, M., Oda, M., Domon, H., Saitoh, I., Hayasaki, H., and Terao, Y.: *Streptococcus pyogenes* CAMP factor attenuates phagocytic activity of RAW 264.7 cells. Microb. Infect., 18: 118-127, 2016. (査読有り)
4. Domon, H., Uehara, Y., Oda, M., Seo, H., Kubota, N., and Terao, Y.: Poor survival of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on inanimate objects in the public spaces. MicrobiologyOpen, 5: 39-346, 2016. (査読有り)
5. Namba, K., Takeuchi, K., Kaihara Y., Oda, M., Nakayama, A., Nakayama, A., Yoshida, M., Tanino, K.: Total synthesis of palau'amine. Nat. Commun., 6: 8731, 2015. (査読有り)
6. Miyamoto, K., Seike, S., Takagishi, T., Okui, K., Oda, M., Takehara, M., and Nagahama, M.: Identification of the replication region in pBCNF5603, a bacteriocin-encoding plasmid, in the enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strain F5603. BMC Microbiol., 15: 118, 2015. (査読有り)
7. Kubo, M., Nishikawa, Y., Harada, K., Oda, M., Huang, JM., Domon, H., Terao, Y., and Fukuyama, Y.: Tetranorsesquiterpenoids and santalane-type sesquiterpenoids from *Illicium lanceolatum* and their antimicrobial activity against the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis*. J. Nat. Prod., 78: 1466-1469, 2015. (査読有り)
8. Takagishi, T., Oda, M., Kabura, M., Kurosawa, M., Tominaga, K., Urano, S., Ueda, Y., Kobayashi, K., Kobayashi, T., Sakurai, J., Terao, Y., and Nagahama, M.: *Clostridium perfringens* alpha-toxin induces GM1a clustering and TrkA phosphorylation in the host cell membrane. PLoS one, 10; e0120497, 2015. (査読有り)
9. Ohsumi, T., Takenaka, S., Wakamatsu, R., Sakaue, Y., Narisawa, N., Senpuku, H., Ohshima, H., Terao, Y., and Okiji, T.: Residual structure of *Streptococcus mutans* biofilm following complete disinfection favors secondary bacterial adhesion and biofilm re-development. PLoS one, 10: e0116647, 2015. (査読有り)
10. Oda, M., Yamamoto, H., Shibutani, M., Nakano, M., Yabiku, K., Tarui, T., Kameyama, N., Shirakawa, D., Obayashi, S., Watanabe, N., Nakase, H., Suenaga, M., Matsunaga, Y., Nagahama, M., Takahashi, H., Imagawa, H., Kurosawa, M., Terao, Y., Nishizawa, M., and Sakurai, J.: Vizantin inhibits endotoxin-mediated immune responses via the Toll-like receptor 4/MD-2 complex. J. Immunol., 193: 4507-4514, 2014. (査読有り)
11. Domon, H., Nakajima, T., Tabeta, K., and Yamazaki, K.: Age-related alterations in gene expression of gingival fibroblasts stimulated with *Porphyromonas gingivalis*. J. Periodontal Res., 49: 536-543, 2014. (査読有り)
12. Oda, M., Imagawa, H., Kato, R., Yabiku, K., Yoshikawa, T., Takemoto, T., Takahashi, H., Yamamoto, H., Nishizawa, M., Sakurai, J., Nagahama, M.: Novel inhibitor of bacterial sphingomyelinase, SMY-540, developed based on three-dimensional structure analysis. J. Enz. Inhib. Med. Chem., 29: 303-310, 2014. (査読有り)

13. Aoki-Nonaka, Y., Nakajima, T., Miyauchi, S., Miyazawa, H., Yamada, H., Domon, H., Tabeta, K., Yamazaki, K.: Natural killer T cells mediate alveolar bone resorption and a systemic inflammatory response in response to oral infection of mice with Porphyromonas gingivalis. J. Periodontal Res., 49: 69-76, 2014. (査読有り)
14. Wakamatsu, R., Takenaka, S., Ohsumi, T., Terao, Y., Ohshima, H., and Okiji, T.: Penetration kinetics of four mouthrinses into Streptococcus mutans biofilms analyzed by direct time-lapse visualization. Clin. Oral Invest., 8: 625-634, 2014. (査読有り)

[学会発表] (計 18 件)

1. 黒澤美絵, 土門久哲, 寺尾 豊: 多機能性糖脂質によるマクロファージ細胞外捕獲網形成機構の解明. 第 89 回日本細菌学会総会, 大阪国際交流センター (大阪府・大阪市), 2016 年 3 月 23-25 日, 第 89 回日本細菌学会総会プログラム集 78 頁, 2016.
2. 土門久哲, 坂上雄樹, 小田真隆, 山口雅也, 川端重忠, 寺尾 豊: 肺炎球菌による肺組織傷害誘導メカニズムの解析. 第 89 回日本細菌学会総会, 大阪国際交流センター (大阪府・大阪市), 2016 年 3 月 23-25 日, 第 89 回日本細菌学会総会プログラム集 72 頁, 2016.
3. 黒澤美絵, 小田真隆, 土門久哲, 寺尾 豊: Streptococcus pyogenes の咽頭上皮細胞株への付着・侵入における CAMP factor の役割. 第 89 回日本細菌学会総会, 大阪国際交流センター (大阪府・大阪市), 2016 年 3 月 23-25 日, 第 89 回日本細菌学会総会プログラム集 78 頁, 2016.
4. 小田真隆, 黒澤美絵, 土門久哲, 寺尾 豊: 多機能性糖脂質によるマクロファージ METs 形成メカニズムの解析. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市), 2015 年 9 月 11-13 日.
5. 土門久哲, 坂上雄樹, 小田真隆, 山口雅也, 川端重忠, 寺尾 豊: 肺炎球菌による宿主細胞の細胞死誘導能の解析. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市), 2015 年 9 月 11-13 日.
6. 黒澤美絵, 小田真隆, 土門久哲, 斎藤一誠, 早崎治明, 寺尾 豊: Streptococcus pyogenes CAMP factor の RAW264.7 細胞に対する空胞形成メカニズムの検討. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市), 2015 年 9 月 11-13 日.
7. 毛利泰士, 住友倫子, 山口雅也, 中田匡宣, 寺尾 豊, 川端重忠: Streptococcus pyogenes に起因する皮膚感染症の発症における SpeB の関与. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市), 2015 年 9 月 11-13 日.
8. 黒澤美絵, 小田真隆, 土門久哲, 寺尾 豊: Streptococcus pyogenes CAMP factor の RAW264.7 細胞に対する病原性解析, 第 88 回日本細菌学会総会, 長良川国際会議場 (岐阜県・岐阜市), 2015 年 3 月 28 日.
9. 坂上雄樹, 土門久哲, 小田真隆, 興地隆史, 寺尾 豊: Streptococcus mutans バイオフィルムに対する植物由来抽出物の検索, 第 51 回日本細菌学会中部支部総会, 北陸大学薬学部 (石川県・金沢市), 2014 年 10 月 17 日.
10. 黒澤美絵, 小田真隆, 土門久哲, 寺尾 豊: Streptococcus pyogenes CAMP factor の免疫担当細胞に対する病原性解析, 第 51 回日本細菌学会中部支部総会, 北陸大学薬学部 (石川県・金沢市), 2014 年 10 月 17 日.
11. 小田真隆, 山本博文, 黒澤美絵, 土門久哲, 寺尾 豊: 多機能性糖脂質の自然免疫活性化メカニズムの解明, 第 51 回日本細菌学会中部支部総会, 北陸大学薬学部 (石川県・

- 金沢市), 2014 年 10 月 17 日.
12. 土門久哲, 坂上雄樹, 小田真隆, 寺尾 豊: 慢性炎症性疾患における TLR シグナル抑制因子の解析, 第 51 回日本細菌学会中部支部総会, 北陸大学薬学部(石川県・金沢市), 2014 年 10 月 17 日.
 13. 小田真隆, 黒澤美絵, 土門久哲, 寺尾 豊: A 群レンサ球菌 CAMP ファクターのマクロファージに対する病原性解析, 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市), 2014 年 9 月 27 日.
 14. 土門久哲, 小田真隆, 寺尾 豊: 歯周炎における TLR シグナル抑制因子の解析, 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市), 2014 年 9 月 27 日.
 15. 黒澤美絵, 小田真隆, 土門久哲, 寺尾 豊: 合成糖脂質の Streptococcus mutans バイオフィルムに対する作用, 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市), 2014 年 9 月 26 日.
 16. 坂上雄樹, 土門久哲, 小田真隆, 興地隆史, 寺尾 豊: Streptococcus mutans に対する植物由来抽出物の殺菌ならびに抗バイオフィルム効果の検討, 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市), 2014 年 9 月 26 日.
 17. 高松輝美, 高岸照久, 小田真隆, 小林敬子, 竹原正也, 永浜政博: ウエルシュ菌 毒素のオリゴマー形成におけるセラミドの役割, 第 88 回日本細菌学会総会, 長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市), 2015 年 3 月 28 日.
 18. 高岸照久, 小田真隆, 竹原正也, 小林敬子, 永浜政博: ウエルシュ菌 毒素の脂質クラスター形成に対する内因性 PLC- 1 の役割, 第 88 回日本細菌学会総会, 長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市), 2015 年 3 月 28 日.

{図書}(計 4 件)

1. 寺尾 豊, 小田真隆: 口腔微生物学・免疫学 第 4 版(川端重忠, 小松澤均, 大原直也, 寺尾 豊, 浜田茂幸編), p111-114, p175-196 (総頁数 303), 医歯薬出版, 2015.
2. Nagahama M., Ochi S., Oda M., Miyamoto K., Takehara M., and Kobayashi K.: Recent insights into *Clostridium perfringens* beta-toxin. *Toxins*, 7:396-406, 2015(総頁数 188).
3. 寺尾 豊. ナノスケールの研究を歯科医学に, 日本歯科評論, ヒョーロン・パブリッシャーズ社, 74: 9-11, 2014(総頁数 181).
4. Nagahama M, Oda M., Tsuge H., Kobayashi K.: Enteric toxins of *Clostridium perfringens*: Beta Toxin, TpeL, Epsilon Toxin and Iota Toxin. *Molecular Medical Microbiology-Second edition*, Vol. 2, 997-1013, 2014 (総頁数 2216).

{産業財産権}

出願状況(計 0 件) 取得状況(計 0 件)

{その他}ホームページ等

<http://www.dent.niigata-u.ac.jp/microbio/microbio.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺尾 豊 (TERAO Yutaka)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 50397717

(2)研究分担者

小田 真隆 (ODA Masataka)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号: 00412403

(3)研究分担者

土門 久哲 (DOMON Hisanori)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号: 00594350