

機関番号：37401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791016

研究課題名(和文) 慢性肉芽腫に対する PEG 化 D-アミノ酸酸化酵素による代替酵素補充療法

研究課題名(英文) Therapeutic application of PEG-DAO in chronic granulomatous disease

研究代表者

中村 秀明 (NAKAMURA HIDEAKI)

崇城大学薬学部・助手

研究者番号：30435151

研究成果の概要(和文)：

H₂O₂ 生成不全好中球を用い、PEG-DAO により好中球の抗菌活性が回復するかを検討した。Diphenyleneiodide(DPI)を用い H₂O₂ 生成不全好中球を作製したところ、コントロール群に比べ顕著な抗菌活性の減弱が認められた。そこに PEG-DAO と D-alanine を処理することにより、好中球による抗菌活性の回復が認められた。PEG-DAO+D-alanine 処理による抗菌活性の回復作用は Myeloperoxidase 阻害剤処理により消失した。さらに PEG-DAO と MPO を共存させることにより HOCl の発生が認められること、PEG-DAO の処理により好中球内活性酸素の増加が確認されたことから、細胞外で生成した H₂O₂ が好中球 phagosome 内に到達し、MPO による HOCl 産生を介した殺菌作用が発揮されるものと推察された。さらに *S. aureus*, MRSA, *P. aeruginosa*, *E. coli* に対する PEG-DAO の抗菌性の検討を行ったところ、グラム陰性菌に対して、効果が弱い傾向が認められたが、いずれの菌に対しても一定の効果が認められた。これらの結果により PEG-DAO は単独または好中球 MPO と強制的に作用し、抗菌作用を発揮するものと推察される。

研究成果の概要(英文)：

We found that DAO shows bactericidal activity through hydrogen peroxide or hypochlorous acid produced by coordinative function with myeloperoxidase in vitro. Furthermore DAO activity deficient mouse showed increased susceptibility of infection against *staphylococcus aureus*. We further investigated the possible application of DAO for chronic granulomatous disease (CGD) which is caused by loss of hydrogen peroxide production. For this purpose, we developed pegylated DAO, which has directionality toward infection site or inflammatory site by enhanced permeability and retention (EPR) effect without loss of enzymatic activity. Treatment of PEG-DAO to CGD neutrophils recovered its bactericidal function, and abolished by inhibition of myeloperoxidase. In conclusion DAO is one of the antibacterial enzyme in our body by producing the hydrogen peroxide. Furthermore its supplementation by PEG-DAO will may recover the bactericidal activity of CGD neutrophils.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009	1,400,000	420,000	1,820,000
2010	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児感染症学

1. 研究開始当初の背景

DAO は D-アミノ酸を代謝し過酸化水素を発生する。本研究室では本酵素を腫瘍特異的に送達するために PEG-DAO を創製した。PEG-DAO は DAO とほぼ同等の酵素活性をもち、*in vitro* において濃度依存的に腫瘍細胞の増殖を抑制した。さらに EPR 効果により腫瘍部に集積し、腫瘍部において活性酸素を発生し抗腫瘍効果を発揮する。このため、EPR 効果が期待される菌感染部位（炎症部位）では PEG-DAO が集積するものと思われる。また慢性肉芽腫は、好中球における活性酸素生成不全が原因であり、感染部位において十分な活性酸素を生成できれば治療が可能となる可能性がある。現状、骨髄移植や遺伝子治療などの治療法が研究されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は細菌に対する DAO の抗菌作用を明らかにすることである。さらに、PEG-DAO を用い慢性肉芽腫症における好中球の機能不全を回復し、感染症治療法の基礎検討するものである。

3. 研究の方法

(1) In vitroにおけるDAOの抗菌作用

(a) (b) SCD 培地中で 1×10^6 cfu/mL の黄色ブドウ球菌に DAO (2 μ g/mL \sim 40 μ g/mL) + D-alanine (0 \sim 10mM) を処理した。96well プレート上に 100 μ L を、37 $^{\circ}$ C、5 時間振とう培養した。マルチウェルプレートリーダーを用い 570nm の吸光度を測定した。

(2) 過酸化水素産生を介したDAOの抗菌メカニズム

SCD 培地中で 1×10^6 cfu/mL の黄色ブドウ球菌に DAO (2 μ g/mL \sim 40 μ g/mL)、D-alanine (10mM) およびカタラーゼ (1mg/mL) を単独または混合処理した。96well プレート上に 100 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C、5 時間振とう培養した。マルチウェルプレートリーダーを用い 570nm の吸光度を測定した。

(3) ミエロペルオキシダーゼ (MPO) との協奏作用によるHOClの発生と抗菌活性の増強

DAO (0.2mg/mL) および D-alanine (10mM) を MPO (0U/mL、0.8U/mL または 1.6U/mL)、NaCl (200mM)、ヨウ化カリウム (5mg/mL)、SBT (0.1mg/mL) を含む酢酸緩衝液中 (pH5.0)、25 $^{\circ}$ C 反応させた。経時的に 675nm の吸光度を測定し、次亜塩素酸または次亜ヨウ素酸を検出した。

(4) DAOによる菌由来D-アミノ酸の利用と

HOClの産生

(a) SCD 培地中で 1×10^6 cfu/mL の黄色ブドウ球菌に DAO (10 μ g/mL \sim 200 μ g/mL) を処理した。96well プレート上に 100 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C、5 時間振とう培養した。マルチウェルプレートリーダーを用い 570nm の吸光度を測定した。

(b) 菌加水分解物は黄色ブドウ球菌を 6M HCl 中で 110 $^{\circ}$ C、24 時間処理し、水可溶性画分を凍結乾燥することにより得た。菌破砕物は黄色ブドウ球菌ペレットを超音波破砕

(50W, 5min) し、水可溶性画分を凍結乾燥することにより得た。0.2mg/mL の DAO と上記の菌凍結乾燥物 (1mg/mL) を 37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。DAO 添加前後におけるピルビン酸

(D-alanine の DAO による代謝産物) 量を 2,4 dinitrophenyl hydrazine を用いて測定した。

(c) 超音波破砕菌凍結乾燥物 (1mg/mL) を DAO (0.2mg/mL) および MPO (1.6U/mL) と 25 $^{\circ}$ C でインキュベーションし、方法 (3)-(a) と同方法で HOCl 量を測定した。

(5) ddYマウスにおけるDao遺伝子多型

(b) ddY マウスの耳介を溶解液 (10mM Tris-HCl (pH7.8)、10mM EDTA、0.5% SDS、0.5mg/mL proteinase K) に浸漬し 55 $^{\circ}$ C で 6 時間反応させた。フェノール/クロロホルム法により夾雑タンパク質および脂質を除きゲノム DNA を得た。

5' mDAO (ATGTACGAAGCTGGAGGACAGAGGGG) および 3' mDAO (CAAGCAGACAGGGCAAGCTCTTCATGG) プライマーを用い、PCR によりマウス Dao 遺伝子を増幅した。PCR 産物を PfuI 制限酵素で処理し、1% アガロース電気泳動を行った。

(c) 6 週令のメス ddY マウスの腎臓を、氷冷した懸濁緩衝液 (100mM Tris-HCl pH8.0、1mM PMSF、10 μ g/mL leupeptin、2.5mM EDTA) 中で破砕した。上清に 0.1M D-alanine を加え 37 $^{\circ}$ C で 30 分間静置した。トリクロロ酢酸を加え遠心後、上清に 2,4-dinitrophenyl hydrazine を加え 37 $^{\circ}$ C で 10 分間静置後に 1.5M NaOH を加え 445nm の吸光度を測定し DAO 活性を求めた。

(6) In vivoにおけるDAOの抗菌活性

(a) 6 週令のメス ddY マウスに 1×10^7 cfu/mouse の黄色ブドウ球菌を尾静脈より投与し、72 時間後にマウスを屠殺した。マウス腎臓を 1% CHAPS を含む RPMI 中で破砕し、生理食塩水で希釈後、SCD 寒天培地を用い混釈培養 (37 $^{\circ}$ C、18 時間) 菌コロニー数を計測し、単位重量あたりの腎臓中菌数を産出した。

(b) 6 週令のメス ddY マウス (Dao 遺伝子野生型および変異型) に 1×10^8 cfu/mouse の黄色ブ

ドウ球菌を尾静脈より投与し、死亡率、体重の推移を測定した。

(7) DAO遺伝子型の違いによる好中球抗菌活性の検討

(a) 10週令のメス ddY マウスに 6%カゼイン溶液 3mL を腹腔内投与し、6 時間後に PBS (-) を用いて腹腔内好中球を回収した。0.2% NaCl および 1.9% NaCl を用いて混入した赤血球を除去した。方法(5)-(c)に記載の方法で好中球内 DAO 活性および腎臓内 DAO 活性を測定した。(b) 10%マウス血清を用いてオプソニン化した黄色ブドウ球菌 (4×10^6 cfu/mL) をマウス好中球と 1:1 の割合で 37°C で 90 分間、振とう培養した。0.2% tween20 で 5 分間インキュベーションし、生理食塩水で段階希釈を行い、SCD 寒天培地上で一夜培養しコロニー数を計測した。

(8) PEG-DAOによる抗菌活性

(a) (b) (c) SCD 培地中で 1×10^6 cfu/mL の黄色ブドウ球菌に PEG-DAO (1mU/mL ~ 200 mU/mL) + D-alanine (0 ~ 30mM) またはカタラーゼ (1mg/mL) を単独または混合処理した。

96well プレート上に 100 μ L を、37°C、5 時間振とう培養した。マルチウェルプレートリーダーを用い 570nm の吸光度を測定した。

(10) MRSAに対するPEG-DAOの抗菌作用

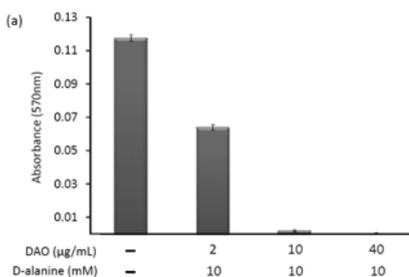
(a) (b) SCD 培地中で 1×10^6 cfu/mL の MRSA に PEG-DAO (1mU/mL ~ 50mU/mL) + D-alanine (0 ~ 30mM) を処理した。96well プレート上に 100 μ L を、37°C、5 時間振とう培養した。マルチウェルプレートリーダーを用い 570nm の吸光度を測定した。

4. 研究成果

(1) In vitro における DAO の抗菌作用

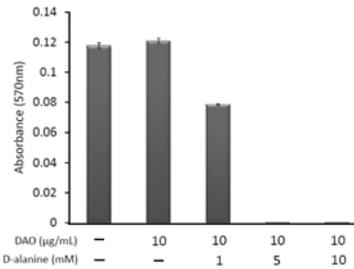
DAO とその基質である D-alanine を共存させることにより黄色ブドウ球菌の増殖が抑制された。(a) 10mM D-alanine 存在下において、DAO は濃度依存的に黄色ブドウ球菌の増殖を抑制した。(b) 10 μ g/mL の DAO 存在下において、D-alanine の濃度依存的に黄色ブドウ球菌の増殖が抑制された。

(a)



(b)

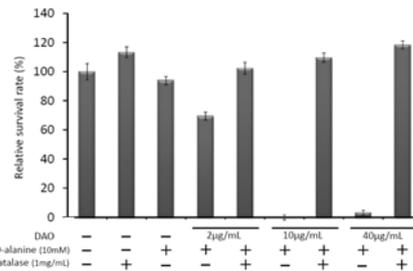
(b)



(2) 過酸化水素産生を介した DAO の抗菌メカニズム

DAO と D-alanine を共存させることにより、黄色ブドウ球菌の増殖は抑制されるが、1mg/mL のカタラーゼを加えることで、DAO による抗菌活性は減弱する。よって、DAO による抗菌活性は過酸化水素産生を介したメカニズムにより発揮されているものと推察された。

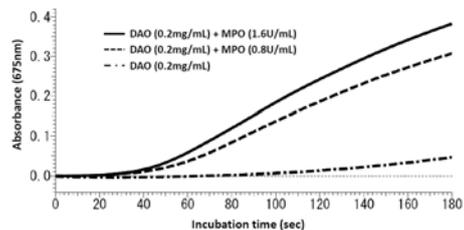
(a)

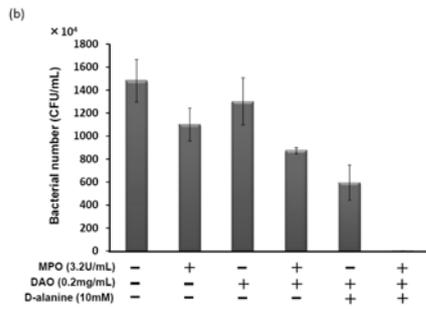


(3) ミエロペルオキシダーゼ (MPO) との協奏作用による HOCl の発生と抗菌活性の増強

(a) DAO + D-alanine と MPO を pH5.0 において共存させることにより HOCl の発生が認められた。(b) DAO 単独では抗菌活性はほとんど観察されなかった。しかし DAO と D-alanine を共存させることにより抗菌活性の増強がみとめられ、DAO、D-alanine および MPO を加えることで、顕著な抗菌活性が認められ、本条件では黄色ブドウ球菌のコロニーが観察されなかった。さらに、DAO と MPO の処理においても一定の抗菌作用が認められた。

(a)

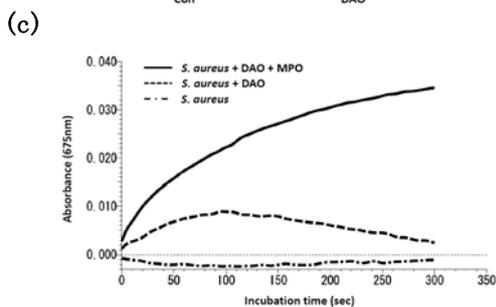
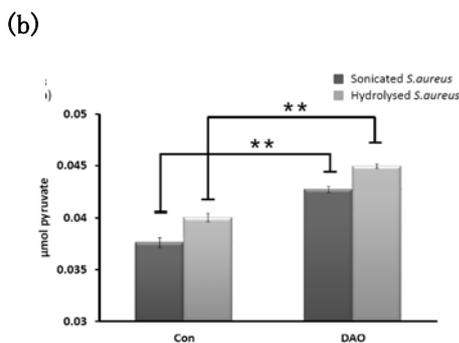
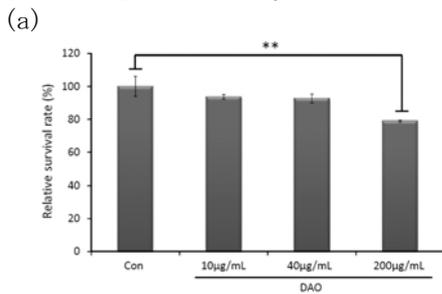




(4) DAO による菌由来 D-アミノ酸の利用と HOC1 の産生

(a) DAO 単独処理によりわずかではあるが、黄色ブドウ球菌の増殖の抑制が認められた。
 (b) 黄色ブドウ球菌の菌破砕物に DAO を処理することにより、D-alanine の代謝物であるピルビン酸の増加が認められた。黄色ブドウ球菌中に DAO が利用可能な D-alanine が含まれることを示しており、菌由来の D-alanine を利用し、過酸化水素が発生しているものと思われる。

(c) 菌破砕物に DAO および MPO を処理することにより HOC1 の発生が認められる。また菌破砕物に DAO を処理することで一過性の OD の増加が認められるが、過酸化水素の発生によるものと推察される。



(5) ddY マウスにおける Dao 遺伝子多型

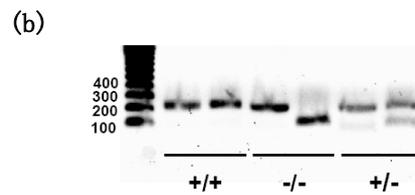
(a) 野生型 *Dao* と変異型 *Dao* の遺伝子配列
 (b) ddY マウスの耳介から得たゲノム DNA を用い、RFLP 法により *Dao* 遺伝子多型に基づいてグループ分けを行った。メス ddY マウスでは変異型：ヘテロ型：野生型=8：12：3 の比率で得られた。(n=46)

(c) 異なる *Dao* 遺伝子型の腎臓中 DAO 活性を測定したところ、遺伝子解析の結果と一致した結果を得た。変異型において 0.04mU/g wet tissue、ヘテロ型において 21.7mU/g wet tissue、野生型において 56.9mU/g wet tissue の活性が得られた。

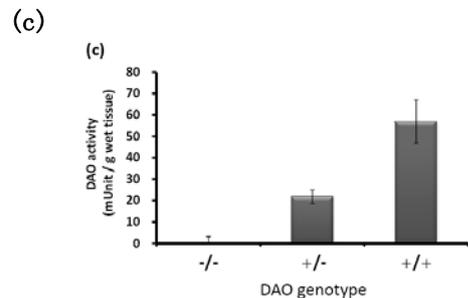
(a)

```

521                                     550
wild type  atgtgattat caactgcacc ggggtgtggg cggggccct
           .....
mutant type atgtgattat caactgcacc aggggtgtggg cggggccct
  
```

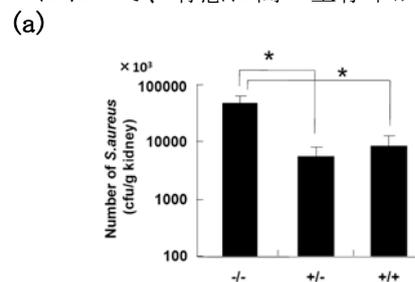


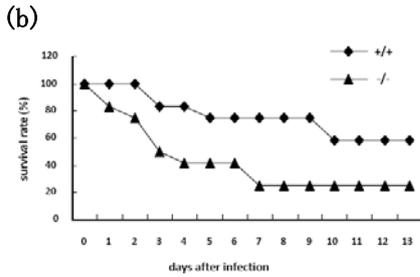
DAO gene type	-/-	-/+	+/+
Number of mice	16	24	6



(6) In vivo における DAO の抗菌効果

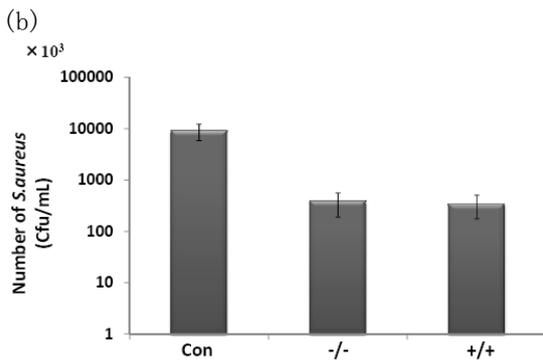
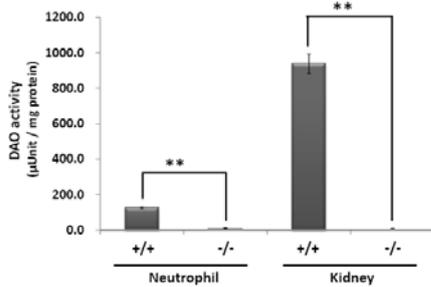
(a) 黄色ブドウ球菌 1×10^7 cfu/mouse をマウス尾静脈より接種し、72 時間後に腎臓内の黄色ブドウ球菌数を計測した。ヘテロ型のマウスおよび野生型のマウスにおいて、DAO 変異型のマウスに比べ有意に生菌数が減少していた。
 (b) DAO 遺伝子変異型マウスと野生型マウスの黄色ブドウ球菌感染に対する生存率を検討したところ、DAO 遺伝子野生型のマウスにおいて、有意に高い生存率が見られた。





(7) DAO 遺伝子型の違いによる好中球抗菌活性の検討

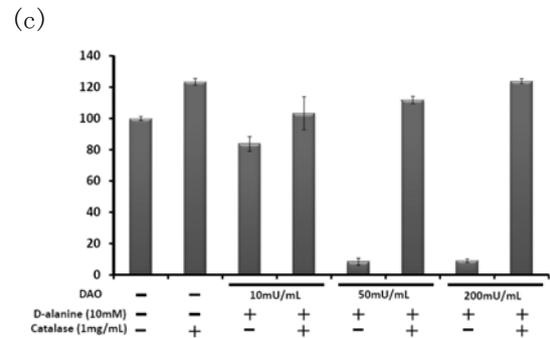
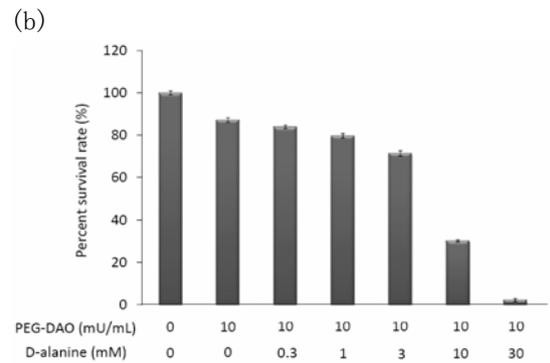
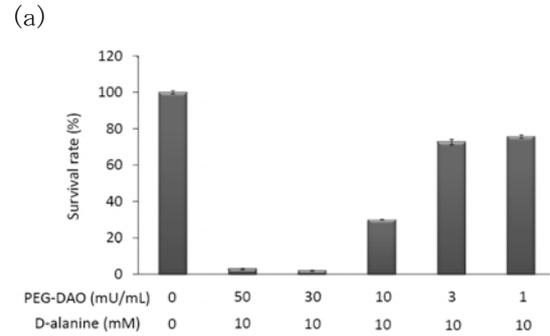
(a) DAO 遺伝子変異型および野生型 ddY マウスの腹腔内好中球の DAO 活性を検討した。腎臓内 DAO 活性と同様に好中球内 DAO も変異型マウスにおいて DAO 活性の欠失が認められた。また好中球内 DAO の活性 ($\mu\text{U}/\text{mg}$ protein) は腎臓内に比べ 1/8 程度の DAO 活性しか認められなかった。(b) DAO 変異型および野生型 ddY マウス由来の腹腔内好中球抗菌活性を検討したところ、DAO 活性の違いによる抗菌活性に差は認められなかった。好中球内では NADPH 酸化酵素が主要な過酸化水素産生源であり、DAO 活性は好中球内の過酸化水素生成量に大きな影響を及ぼさないと考えられる。



(8) PEG-DAO による抗菌活性

(a) 黄色ブドウ球菌に対する PEG-DAO の抗菌活性を検討したところ、10mM D-alanine 存在下において、PEG-DAO は黄色ブドウ球菌の増殖を濃度依存的に抑制した。(b) 10mU/mL PEG-DAO 存在下において、黄色ブドウ球菌の増殖が D-alanine の濃度依存的に抑制された。

(c) PEG-DAO による黄色ブドウ球菌の増殖抑制作用はカタラーゼの添加により消失した。PEG-DAO による抗菌活性は過酸化水素を介しているものと考えられる。



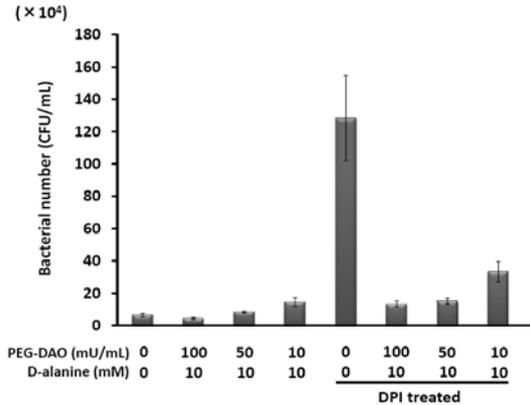
(9) PEG-DAO による機能不全好中球の抗菌活性の回復

(a) Diphenylene iodonium (DPI) 10 μM 処理により好中球の抗菌活性が減弱し、好中球内生菌数の増大が認められた。PEG-DAO および D-alanine の処理により好中球内生菌数が顕著に減少した。(b) DPI 処理好中球に対し PEG-DAO と D-alanine を処理することで、好中球内生菌数の減少が認められる。さらに MPO 阻害剤である Benzoic acid hydrazide analog (4-ABH) 10 μM 処理により、PEG-DAO+D-alanine による好中球抗菌活性の回復が認められなくなった。PEG-DAO+D-alanine 処理により産生した過酸化水素は直接的に抗菌作用を示す経路と MPO を介した HOCl 産生による抗菌作用を

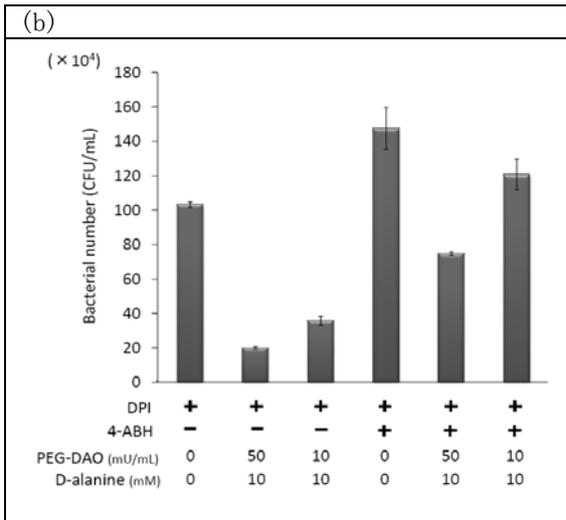
示すことが推察された。

(c) 5mM の D-alanine 存在下において PEG-DAO の濃度依存的に好中球内活性酸素の増加が認められた。これらの結果より PEG-DAO+D-alanine の添加により好中球内過酸化水素が上昇し、好中球内 MPO により HOCl が産生され、好中球機能が回復するものと推察された。

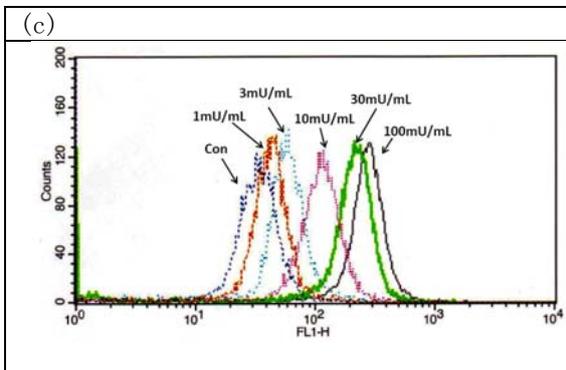
(a)



(b)



(c)

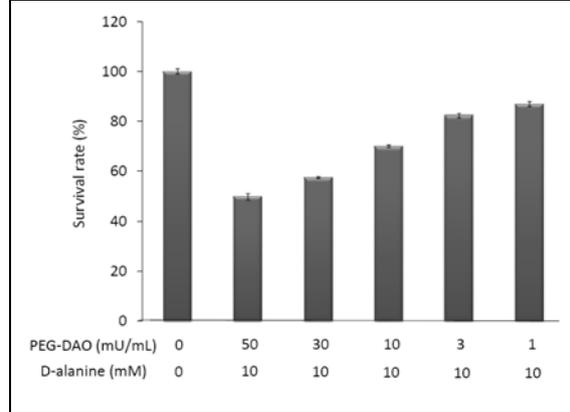


(10) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対する PEG-DAO の抗菌作用

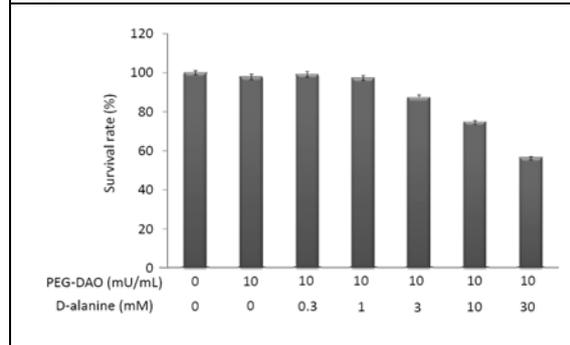
(a) PEG-DAO+D-alanine(10mM) 処理により、PEG-DAO 濃度依存的に MRSA の増殖抑制作用が認められた。

(b) PEG-DAO(10mU/mL)+D-alanine 処理により、D-alanine 濃度依存的に MRSA の増殖抑制作用が認められた。

(a)



(b)



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)

[学会発表] (計 1 件)

Intracellular uptake of water soluble ZnPP micells (SMA-ZnPP and PEG-ZnPP) and the unique release mechanism of the drug from the micelles. Controlled release society. 2010, 7/10-14

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 秀明 (NAKAMURA HIDEAKI)

崇城大学薬学部・助手

研究者番号：30435151