

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780308

研究課題名（和文） 細菌間情報伝達阻害による新規感染症予防法の開発

研究課題名（英文） Development of a novel treatment to prevent bacterial infection by the inhibition of inter-bacterial signal transduction.

研究代表者

峰松 健夫 (MINEMATSU TAKEO)

東京大学・大学院医学系研究科・特任講師

研究者番号：00398752

研究成果の概要（和文）：

病原細菌の一部では、周囲の細菌密度を感知するために、AHL という物質を使ってコミュニケーションを取っており、周囲の細菌密度が高まると病原性を発揮する。そこで AHL を細菌外で捕捉することが、病原性の発揮を抑制する新たな創傷感染予防法になると考え検討した。その結果、細菌の培養液中では期待通り病原因子の発現を抑制することに成功したが、動物実験では創傷感染を防ぐことができなかった。今後はその原因を探索し改善することで、創傷感染予防技術の開発を目指す。

研究成果の概要（英文）：

A part of bacteria communicate mutually using AHL to detect the bacterial density in surrounding. The bacteria which recognized the higher density express the virulent genes. Therefore, we tried to develop a new prevention method of wound infection by capturing AHL outside bacteria. Although our method successfully inhibit the virulent gene expressions in vitro, it could not prevent the wound infection in the animal experiment. Further studies to identify its reason are required.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：疾病予防・制御

1. 研究開始当初の背景

多剤耐性菌の脅威が連日のように報じられる中、耐性菌の出現に繋がらない感染症対策、つまり細菌を攻撃し排除するという考え方以外の戦略に基づく、あらたな感染症対策の確立が求められている。

近年、感染症対策の新たなターゲットとして注目されているのが Quorum Sensing (QS) である。QS とは acylated homoserine lactone (AHL) などの小分子をシグナル物質として用いる細菌間コミュニケーション機

構であり、病原因子などの発現を制御している。細菌は常に一定量の AHL を合成・放出しているため、環境における細菌密度が高まると AHL 濃度も高まる。さらに AHL は細胞膜透過性であるため、放出された AHL は再び細菌内に取り込まれる。細菌内の AHL 濃度は、環境の AHL 濃度つまり細菌密度に依存する。細菌内 AHL 濃度がある一定量 (Quorum) を超えると AHL 受容体である R 蛋白質が活性化し、病原因子の遺伝子発現を促進する。従って、AHL の伝達を細胞外

で阻害することで病原因子の発現を抑制することができると考えられる。

本研究では、皮膚常在細菌であり、また皮膚感染症の主要な起因菌である緑膿菌をモデルとし、緑膿菌内で機能する本来の AHL レセプターである R 蛋白質を、細胞外での AHL の捕捉に利用することを考案し、その効果を検証した。

2. 研究の目的

本研究は、リコンビナント R 蛋白質を用いた緑膿菌における細菌間情報伝達阻害による病原因子の発現抑制法の確立をめざし、以下の 2 項目の検証を行う。

- (1) R 蛋白質の病原因子発現阻害効果の検証 (in vitro)
- (2) R 蛋白質による創傷感染防止効果の検証 (in vivo)

3. 研究の方法

(1) リコンビナント R 蛋白質の合成

大腸菌を用いてリコンビナント R 蛋白質を合成する試みは、これまでもいくつか報告されているが、その可溶性に問題があるとされてきた。本研究では、無細胞系システムを用いることで合成できるのではないかと考え、以下の 2 種類のリコンビナント R 蛋白質の合成を試みた。

- ・全長 R 蛋白質
- ・R 蛋白質の AHL 結合ドメインのみ

(2) R 蛋白質の病原因子発現阻害効果の検証 (in vitro)

緑膿菌培養液に上記 2 種類の R 蛋白質を添加し、QS で制御される遺伝子群 (lasB、toxA など) の発現を、対照群と比較した。

(3) R 蛋白質による創傷感染防止効果の検証 (in vivo)

ラットの背部に作製した全層欠損創に緑膿菌を接種し、創傷感染モデルを作製した。直後に、各 R 蛋白質溶液を投与し、創傷治癒過程を観察した。対照群には Vehicle 溶液を投与した。

4. 研究成果

(1) リコンビナント R 蛋白質の合成

まず大腸菌を用いて合成し、そのホモジネートをウェスタンブロッティングで解析した。その結果、R 蛋白質は予想よりも低分子分画に染色され、問題は可溶性と言うよりもむしろ細菌内での分解にあると考えられた。

そこで、無細胞系システムを用いて合成したところ、予想された分子量の R 蛋白質が、極めて効率的に合成されていることが証明された (図 1)。

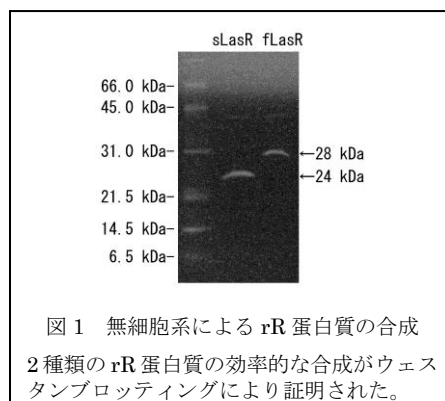


図 1 無細胞系による rR 蛋白質の合成
2 種類の rR 蛋白質の効率的な合成がウェスタンブロッティングにより証明された。

(2) R 蛋白質の病原因子発現阻害効果の検証 (in vitro)

緑膿菌の液体培養に 2 種類のリコンビナント R 蛋白質を添加し、Total RNA を抽出した。QS で制御される遺伝子群 (lasB、lasR、lasI、toxA、algR、内部標準 rpoD) の mRNA 発現を RT-PCR 法で解析した。対照群と比べ、全長 R 蛋白質および R 蛋白質 AHL 結合ドメインいずれもこれらの発現を有意に抑制することが示された (図 2)。

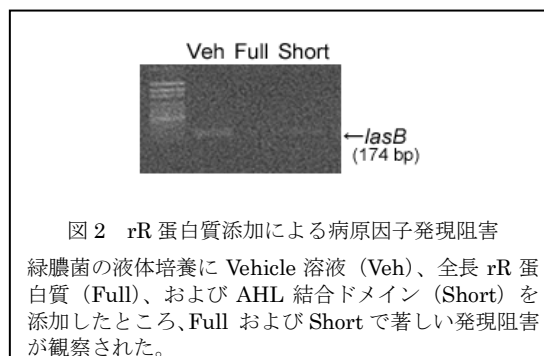


図 2 rR 蛋白質添加による病原因子発現阻害

緑膿菌の液体培養に Vehicle 溶液 (Veh)、全長 rR 蛋白質 (Full)、および AHL 結合ドメイン (Short) を添加したところ、Full および Short で著しい発現阻害が観察された。

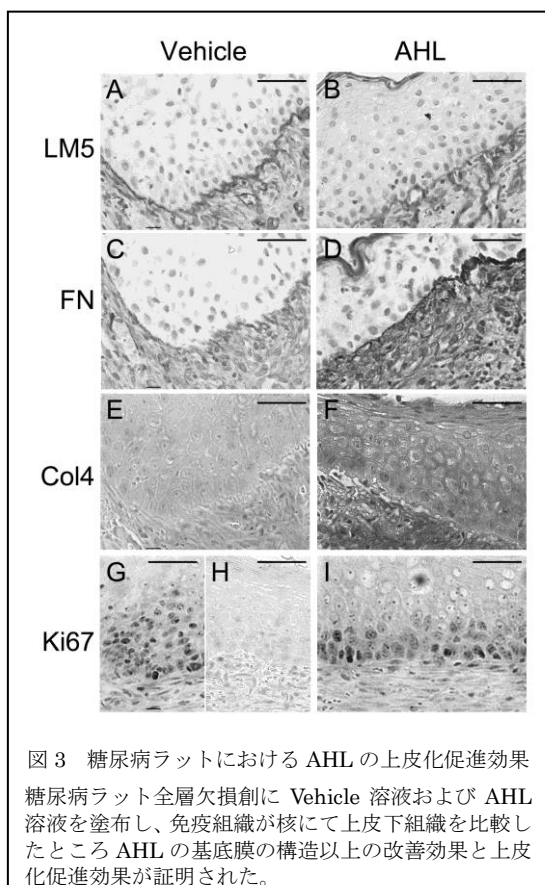
(3) R 蛋白質による創傷感染防止効果の検証 (in vivo)

Vehicle 溶液を投与した対照群では、創面積が拡大し、また深達度も悪化した。2 種類いずれかの R 蛋白質を投与した動物でも創は悪化し、治癒傾向を認めなかった。組織学的解析でも同様に著しい炎症反応が観察された。これらの結果は、In vivo では R 蛋白質の QS 阻害効果が失われたことを示している。その原因として、創部の分泌蛋白質等が R 蛋白質と結合した可能性、R 蛋白質が創部の蛋白質分解酵素などの影響で変性もしくは不活化した可能性などが考えられる。あるいはリコンビナント R 蛋白質自体が異物として認識され炎症を促進した可能性についても考慮しなければならない。

(3) その他の結果

In vivo 実験において当初期待した結果は得られなかったものの、副次的に AHL の創傷治癒促進効果が同定された。正常ラットの全層

欠損創に AHL を塗布した場合には肉芽形成および収縮の促進が観察された。また In vitro 実験において AHL が表皮ケラチノサイトの遊走を促進することが証明され、上皮化促進効果が示唆された。更に糖尿病モデルラットの全層欠損創に AHL を塗布したところ、治癒期間の短縮を認めた。組織学的解析により、AHL は上皮化における基底膜の形成異常を改善することで上皮化を促進していることが明らかとなった (図 3)。今後はこの点にも着目し、新たな創傷治癒促進剤としての応用を目指したい。



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 4 件)

- (1) Paes C, Nakagami G, Minematsu T, Nagase T, Huang L, Sari Y, Sanada H. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone enhances keratinocyte migration and induces Mmp13 gene expression in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有. 427, 2012, 273-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.09.037.

- (2) Asada M, Nakagami G, Minematsu T, Nagase T, Akase T, Huang L, Yoshimura K, Sanada H. Novel models for bacterial colonization and infection of full-thickness wounds in rats. *Wound Repair Regen.* 査読有. 20, 2012, 601-10. doi: 10.1111/j.1524-475X.2012.00800.x.
- (3) Asada M, Nakagami G, Minematsu T, Nagase T, Akase T, Huang L, Yoshimura K, Sanada H. Novel biomarkers for the detection of wound infection by wound fluid RT-PCR in rats. *Exp Dermatol.* 査読有. 21, 2012, 118-22. doi: 10.1111/j.1600-0625.2011.01404.x.
- (4) Nakagami G, Minematsu T, Asada M, Nagase T, Akase T, Huang L, Morohoshi T, Ikeda T, Ohta Y, Sanada H. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone can accelerate cutaneous wound healing through myofibroblast differentiation in rats. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 査読有. 62, 2011, 157-63. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00796.x.

[学会発表] (計 11 件)

- (1) 仲上豪二郎, 峰松健夫, 長瀬敬, 山根拓実, 金澤寿樹, 真田弘美. ラット繊維芽細胞における緑膿菌クオラムセンシングシグナルによる遺伝子発現調整に関する検討. 第 42 回日本創傷治癒学会, 2012 年 12 月 2-4 日, 北海道(かでの 2. 7).
- (2) Huang L, Minematsu T, Nakagami G, Asada M, Nagase T, Oe M, Noguchi H, Mori T, Sugama J, Sanada H. Acylhomoserine lactone improves the impaired basement membrane formation in the epithelializing tissue during cutaneous wound healing in hyperglycemic rats. 4th Congress of the World Union of Wound Healing Societies. 2012 年 9 月 2-6 日, 横浜 (パシフィコ横浜).
- (3) Nakagami G, Minematsu T, Nagase T, Morohoshi T, Ikeda T, Asada M, Paes C, Sanada H. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal molecule, N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone, induces matrix metalloproteinase expression via MAPK/AP-1 pathway in rat fibroblast. 4th Congress of the World Union of Wound Healing Societies. 2012 年 9 月 2-6 日, 横浜 (パシフィコ横浜).
- (4) Paes QC, Nakagami G, Minematsu T,

Nagase T, Juang L, Asada M, Yamamoto Y, Kanazawa T, Kishi C, Sanada H. Investigation of the influence of Pseudomonas aeruginosa quorum sensing signal molecule N-(3-Oxododecanoyl) homoserine lactone on keratinocyte migration. 4th Congress of the World Union of Wound Healing Societies. 2012年9月2-6日, 横浜 (パシフィコ横浜).

- (5) 仲上豪二郎, 峰松健夫, 長瀬敬, 山根拓実, 真田弘美. ラット線維芽細胞における緑膿菌クオラムセンシングシグナルによる遺伝子発現調節機構の解明. 第14回日本褥瘡学会学術集会, 2012年9月1-2日, 神奈川 (パシフィコ横浜).
- (6) 浅田真弓, 仲上豪二郎, 峰松健夫, 長瀬敬, 真田弘美. ラットを用いた表層感染創動物モデルの開発. 第14回日本褥瘡学会学術集会, 2012年9月1-2日, 神奈川 (パシフィコ横浜).
- (7) 黄麗娟, 峰松健夫, 仲上豪二郎, 長瀬敬, 大江真琴, 森武俊, 野口博史, 須釜淳子, 真田弘美. 高血糖ラット皮膚創傷治癒過程における Acylhomoserine lactone の上皮化促進メカニズム. 第41回日本創傷治癒学会学術集会, 2011年12月5-6日, 名古屋 (ウインクあいち).
- (8) 浅田真弓, 仲上豪二郎, 峰松健夫, 黄麗娟, 長瀬敬, 真田弘美. 滲出液 RT-PCR法による感染診断の臨床応用可能性の検討. 第41回日本創傷治癒学会学術集会, 2011年12月5-6日, 名古屋 (ウインクあいち).
- (9) 仲上豪二郎, 峰松健夫, 黄麗娟, 浅田真弓, 長瀬敬, 真田弘美. 緑膿菌クオラムセンシングシグナルによる MMP9 発現制御機構の解明. 第41回日本創傷治癒学会学術集会, 2011年12月5-6日, 名古屋 (ウインクあいち).
- (10) Paes C, Nakagami G, Minematsu T, Nagase T, Morohoshi T, Ikeda T, Sanada H. In vitro effect of the Pseudomonas aeruginosa quorum sensing signal molecule, N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone, on keratinocyte migration. European Wound Management Association (EWMA). 2011年5月25-27日, Brussels (SQUARE-BRUSSELS MEETING CENTRE), Belgium.
- (11) Nakagami G, Minematsu T, Nagase T, Morohoshi T, Ikeda T, Asada M, Paes C, Sanada H. The Pseudomonas aeruginosa quorum sensing signal molecule, N-(3-oxododecanoyl) homoserine

lactone, induces matrix metalloproteinase expression via MAPK/AP-1 pathway in rat fibroblast. European Wound Management Association (EWMA). 2011年5月25-27日, Brussels (SQUARE-BRUSSELS MEETING CENTRE), Belgium.

[その他]

ホームページ等

<http://www.rounenkango.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

峰松 健夫 (MINEMATSU TAKEO)

東京大学・大学院医学系研究科・特任講師
研究者番号：00398752

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：