

平成 30 年 5 月 9 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05017

研究課題名(和文) 機能性糖脂質を利用した細菌性肺炎の制御法探索とその分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of control method of bacterial pneumonia utilizing functional glycolipids and researching its molecular mechanism

研究代表者

小田 真隆 (ODA, MASATAKA)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00412403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、新たに開発した水溶性糖脂質の細菌性肺炎に対する効果、およびそのメカニズムを解析することを目的に実験を進めた。その結果、以下の3つのことが明らかとなった。1)水溶性糖脂質は、マクロファージや好中球に作用すると細胞外に核酸を主成分とする網状構造体を放出していることが判明した。特にマクロファージに於いては、ミトコンドリア由来の核酸を放出し、肺炎球菌や緑膿菌をトラップしていることが分かった。2)阻害剤やノックダウン細胞を用いた解析により、水溶性糖脂質は、mincle受容体に作用していることが示唆された。3)水溶性糖脂質を経鼻投与した結果、肺炎球菌による肺炎、および致死を抑制した。

研究成果の概要(英文)：In this research project, experiments were carried out to analyze the effect of newly developed water-soluble glycolipid (WSG) on bacterial pneumonia and its mechanism. As a result, the following three things were revealed. 1) WSG induced the extracellular release of a net structure containing nucleic acid as a main component in macrophages or neutrophils. Especially in macrophages, it was found that mitochondria-derived nucleic acid was released with little cell death and trapped *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. 2) Analysis using inhibitors and knockdown cells suggested that the WSG act on the mincle receptor other than TLR4 receptor. 3) Pneumonia and mortality caused by *S. pneumoniae* were suppressed by nasal administration of WSG.

研究分野：細菌学、免疫学、薬学、口腔細菌学

キーワード：機能性糖脂質 肺炎 細胞外捕獲網 肺炎球菌 緑膿菌

## 1. 研究開始当初の背景

わが国の肺炎による死亡数は年間 12 万を超えており、特に高齢者肺炎患者の死亡率が高く、かつ増加し続けている。平成 24 年度には日本の三大死因が 53 年ぶりに変化し、ついに肺炎が死因第三位となった。したがって、超高齢社会を迎える今日において、高齢者に好発する呼吸器感染症を予防することは喫緊の課題であるといえる。しかし、口腔、鼻腔、上下気道を介して発症する肺炎は、医学の境界領域の感染症であり、医学基礎領域においてはほとんど研究されていない。また、肺炎起因菌（黄色ブドウ球菌、緑膿菌、肺炎球菌）は、薬剤耐性化が進行し、ペニシリン系、セフェム系、そしてマクロライド系薬剤などに抵抗性を示す多剤耐性菌へと変貌することにより、治療がより困難になっている。一方で、抗生物質に頼らない予防対策に重点を置く施策も推進されている。生体防御機構である免疫系は、体内に侵入した細菌等の表面構造を特異的に認識して作動し、多剤耐性菌に対しても有効な防御システムとなる。そのため、免疫療法薬として、菌体由来成分の医療への応用が試みられてきた。しかしながら、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、組成成分ごとの正確な薬効・薬理が証明されていないため、用途が厳しく制限されている。

申請者らは、単一の化合物として免疫活性化作用を示す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 種に迫る類縁体を合成して構造活性相関研究を行い、構造の単純化と作用の増強に成功した機能性糖脂質を合成した (1)。さらに機能性糖脂質の受容体のひとつが TLR4/MD2 であることも明らかにした (2)。

## 2. 研究の目的

本研究では、肺炎起因菌に感染させた肺炎モデルマウスに対する機能性糖脂質の効果に関する実証研究を行い、不必要な抗菌薬投与を行わない、新たな肺炎の予防法を探索する。また、本機能性糖脂質の免疫賦活効果に

関する詳細を明らかにするため、好中球に対する作用、および C 型レクチン受容体との関係について解析する。

## 3. 研究の方法

- 1) 機能性糖脂質の水溶性を向上させるため、構造リファインメント、あるいは溶解剤を工夫した。
- 2) 好中球やマクロファージに水溶性糖脂質を作用させた時の細胞外捕獲網形成について、免疫組織学的染色法や共焦点レーザー顕微鏡を用いたライブイメージング解析法により解析した。細菌の感染拡大に対する ETs の影響を解析するため、トランズウェルを用いて調べた。
- 3) C 型レクチン受容体と水溶性糖脂質の関係について、各種阻害剤や siRNA を用いて解析した。
- 4) 水溶性糖脂質を経鼻投与したマウスにおける肺炎球菌や緑膿菌感染時の肺炎インデックスおよび致死について解析した。

## 4. 研究成果

- 1) 本研究課題開始前までに開発した機能性糖脂質は、水に難溶性であることが課題であった。そこで、既存の機能性糖脂質のトレハロース部位に硫酸基やリン酸基を付加することにより、免疫賦活効果（マクロファージの貪食活性やインターフェロン  $\gamma$  遊離など）は維持した状態であり、かつ蒸留水や 5% ブドウ糖液に溶解できることが明らかとなった。また、本水溶性糖脂質を添加したマクロファージ、あるいは投与したマウスにおける炎症性サイトカイン (TNF, IL-1 $\beta$ ) の遊離量が少なく、糖脂質のひとつであるリポポリサッカライドと比較しても炎症反応が極めて低いことが判明した。水溶性糖脂質の開発により薬剤の調製時間を格段に短縮できた。
- 2) ヒト好中球やマクロファージ (RAW264.7 細胞) に水溶性糖脂質を添加した結果、核酸を主成分とする細胞外捕獲網 (ETs) を形成していることが判明した。特にマクロファージでは、細胞死をほとんど引き起こすことなく、ETs を形成していることが分かり、詳細を調べた結果、ミトコンドリア由来の核酸が

放出されていることが明らかとなった。また、この ETs 形成には、ミトコンドリアにおけるカルシウムイオン濃度の上昇と膜電位の低下が密接に関与していることが示唆された。さらに、ETs は、肺炎球菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌の感染拡大を抑制していることがトランズウェルを用いた解析により明らかになったが、ETs に捕獲された菌は、生存していた。好中球由来の ETs は、抗菌ペプチドを多く含んでいるため、殺菌作用があると報告されているが、マクロファージ由来の ETs は、抗菌ペプチドの量が好中球由来 ETs より少ないのではないかと考えられた。

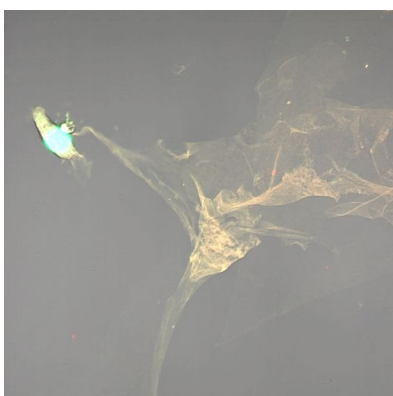


図 1 水溶性糖脂質刺激マクロファージ由来細胞外捕獲網の遊離像

3) 水溶性糖脂質の受容体として TLR4/MD2 を明らかにしてきた。また、ドッキングシミュレーションの結果、水溶性糖脂質の脂肪酸側鎖が MD2 に直接相互作用していた。したがって、水溶性糖脂質のトレハロース部位が異なる受容体に作用しているのではないかと仮説を立て検証した。その結果、約 30 種類の阻害剤を用いた解析により、C 型レクチン受容体であることが分った。さらに各種 C 型レクチンに対する siRNA (6 種) を使用してノックダウン細胞を作製し解析した結果、mincle 受容体に作用していることが判明した。mincle 受容体の下流に存在する Syk のリン酸化も認められ、さらに、Syk 阻害剤である Picetannol 処理により、水溶性糖脂質による TNF 遊離が亢進した。したがって、水溶性糖脂質の糖鎖部位が mincle 受容体に作用することにより、TNF 遊離により引き起こされる炎症反応を抑制していたと考えられた。

4) 水溶性糖脂質を CBA/JN マウスの鼻腔に投与 (Day 0, 3, 5, 6, 7, 8) 後、肺炎球菌を鼻腔感染 (Day 4) させた。9 日目のマウス肺胞洗浄液および鼻腔洗浄液の肺炎球菌数をカウントした結果、コントロールマウスと比較して著しく少なかった。また、肺炎球菌によるマウスの致死も水溶性糖脂質の経鼻投与により抑制された。

#### 〔引用論文〕

- (1) 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, 2014, 4507-4514.
- (2) Yamamoto, H., Oda, M., Nakano, M., Watanabe, N., Yabiku, K., Shibutani, M., Inoue, M., Imagawa, H., Nagahama, M., Himeno, S., Setsu, K., Sakurai, J., and Nishizawa, M. Development of Vizantin, a safe immunostimulant, based on the structure-activity relationship of Trehalose-6,6'-Dicorynomycolate. **J. Med. Chem.** 56, 2013, 381-385.

#### 5. 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計 23 件)

1. Nakayama, A., Sato, H., Sangita, K., Hayashi, N., Oda, M., and Namba, K.: Asymmetric total syntheses and structure revisions of euroti-umide A and euroti-umide B, and evaluation of their fluorescent properties as natural probes. **European J. Org. Chem.** in press, 2018, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejoc.201800535>
2. Domon, H., Nagai, K., Maekawa, T., Oda, M., Yonezawa, D., Takeda, W., Hiyoshi, T., Tamura, H., Yamaguchi, M., Kawabata, S., and Terao, Y.: Neutrophil elastase subverts the immune response by cleaving toll-like receptors

- and cytokines in pneumococcal pneumonia. **Front. Immunol.** in press, 2018, DOI: 10.3389/fimmu.2018.00732
3. Oda, M., Kurosawa, M., Yamamoto, H., Domon, H., Kimura, T., Isono, T., Maekawa, T., Hayashi, N., Yamada, N., Furue, Y., Kai, D., and Terao, Y.: Sulfated vizantin induces the formation of macrophage extracellular traps. **Microbial. Immunol.** in press, 2018, DOI: 10.1111/1348-0421.12589.
4. Son, T.M., Oda, M., Hayashi, N., Yamaguchi, D., Kawagishi, Y., Takahashi, F., Cuong, M.N., and Fukuyama, Y.: Antimicrobial activity of the constituents of *Dalbergia tonkinensis* Prain and structural-bioactive highlights. **Nat. Prod. Commun.** 13, 2018, 157-161, [https://www.researchgate.net/publication/323388440\\_NPC-2018](https://www.researchgate.net/publication/323388440_NPC-2018)
5. Nagai, K., Domon, H., Maekawa, T., Oda, M., Hiyoshi, T., Tamura, H., Yonezawa, D., Arai, Y., Yokoji, M., Tabeta, K., Habuka, R., Saitoh, A., Yamaguchi, M., Kawabata, S., and Terao, Y.: Pneumococcal DNA-binding proteins released through autolysis induce the production of proinflammatory cytokines via toll-like receptor 4. **Cell. Immunol.** 325, 2018, 14-22, DOI: 10.1016/j.cellimm.2018.01.006.
6. Kurosawa, M., Oda, M., Domon, H., Isono, T., Nakamura, Y., Saitoh, I., Hayasaki H., Yamaguchi, M., Kawabata, S., and Terao, Y.: *Streptococcus pyogenes* CAMP factor promotes bacterial adhesion and invasion in pharyngeal epithelial cells without serum via PI3K/Akt signaling pathway. **Microb. Infect.** 20, 2018, 9-16, DOI: 10.1016/j.micinf.2017.09.007.
7. Oda, M., Domon, H., Kurosawa, M., Isono, T., Maekawa, T., and Terao, Y.: *Streptococcus pyogenes* phospholipase A2 induces the expression of adhesion molecules on human umbilical vein endothelial cells and aorta of mice. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** 7, 2017, 300, DOI: 10.3389/fcimb.2017.00300
8. Murakami, T., Saitoh, I., Sato, M., Inada, E., Soda, M., Oda, M., Domon, H., Iwase, Y., Sawami, T., Suzuki, A., Terao, Y., Ohshima, H., Noguchi, H., and Hayasaki, H.: Isolation and characterization of lymphoid enhancer factor-1-positive deciduous dental pulp stem-like cells after transfection with a piggyBac vector containing LEF1 promoter-driven selection markers. **Arch. Oral Biol.**, 81, 2017, 110-120, DOI: 10.1016/j.archoralbio.2017.04.033.
9. Nagai, K., Domon, H., Oda, M., Shirai, T., Ohsumi, T., Terao, Y., and Arai, Y.: Antimicrobial activity of ethylene-vinyl acetate containing bioactive filler against oral bacteria. **Dent. Mater. J.** 36, 2017, 784-790, DOI: 10.4012/dmj.2016-321.
10. Maekawa, T., Kulwattanaporn, P., Hosur, K., Domon, H., Oda, M., Terao, Y., Maeda, T., and Hajishengallis, G.: Differential expression and roles of secreted frizzled-related protein 5 (Sfrp5) and the wingless homolog Wnt5a in periodontitis. **J. Dent. Res.** 96, 2017, 571-577, DOI: 10.1177/0022034516687248.
11. Takehara, M., Takagishi, T., Seike, S., Oda, M., Sakaguchi, Y., Hisatsune, J., Ochi, S., Kobayashi, K. and Nagahama, M. Cellular entry of *Clostridium perfringens* iota-toxin and *Clostridium botulinum* C2 toxin. **Toxins.** 9, 2017, E247, DOI: 10.3390/toxins9080247.
12. Domon, H., Oda, M., Maekawa, T., Nagai, K., Takeda, W., and Terao, Y.: *Streptococcus pneumoniae* disrupts pulmonary immune defence via elastase release following pneumolysin-dependent neutrophil lysis. **Sci. Rep.** 6, 2016, 38013, DOI: 10.1038/srep38013.
13. Takenaka, S., Oda, M., Domon, H., Ohsumi, T., Suzuki, Y., Ohshima, H., Yamamoto, H., Terao, Y., and Noiri, Y.: Vizantin inhibits bacterial adhesion without affecting bacterial growth and causes *Streptococcus mutans* biofilm to detach by altering its internal architecture. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 480, 2016, 173-179, DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.10.021.
14. Takagishi, T., Oda, M., Takehara, M., Kobayashi, K., and Nagahama, M. Oligomer formation of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin is induced by activation of neutral

- sphingomyelinase. **Biochim Biophys Acta.** 1858, 2016, 2681-2688, DOI: 10.1016/j.bbmem.2016.07.009.
15. 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, 2016, 246-257, DOI: 10.1248/cpb.c15-00828.
16. 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, 2016, 10-16, DOI: 10.1111/1348-0421.12343.
17. 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, 2016, 118-127, DOI: 10.1016/j.micinf.2015.10.003.
18. 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, 2016, 39-46, DOI: 10.1002/mbo3.308.
19. Namba, K., Takeuchi, K., Kaihara Y., Oda, M., Nakayama, A., Nakayama, A., Yoshida, M., and Tanino, K. Total synthesis of palau'amine. **Nat. Commun.** 6, 2015, 8731, DOI: 10.1038/ncomms9731.
20. 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, 2015, 118, DOI: 10.1186/s12866-015-0443-3.
21. 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, 2015, 1466-1469, DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00237.
22. 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, 2015, e0120497, DOI: 10.1371/journal.pone.0120497.
23. Oda, M., Terao, Y., Sakurai, J., and Nagahama, M. Membrane-binding mechanism of *Clostridium perfringens* alpha-toxin. **Toxins.** 7, 2015, 5268-5275, DOI: 10.3390/toxins7124880.
- 〔学会発表〕(計16件)
- 1) 林直樹, 後藤直正, 小田真隆: 腸管上皮細胞が緑膿菌によるムチン層透過を亢進するメカニズムの解析. 平成29年度近畿腸管微生物研究会総会・研究発表会(大阪), 2017.6.
- 2) 西澤渚, 林直樹, 小田真隆: 多剤耐性緑膿菌感染マウスに対する機能性糖脂質の効果. 第29回微生物シンポジウム(広島), 2017.8.
- 3) 横谷篤, 林直樹, 後藤直正, 小田真隆: 緑膿菌によるムチン層透過に与えるサイトカインの影響. 第29回微生物シンポジウム(広島), 2017.8.
- 4) 小田真隆: 機能性糖脂質によるマクロファージ細胞外捕獲網の発現誘導. 第11回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム(京都), 2017.10.
- 5) 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), 2016.3.
- 6) 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), 2016.3.
- 7) 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), 2016.3.

8) 坂上雄樹, 土門久哲, 小田真隆, 竹中彰治, 大墨竜也, 寺尾豊, 野杵由一郎: *Streptococcus mutans* バイオフィルムに対する厚朴由来抽出物の殺菌効果. 第 30 回日本バイオフィルム学会学術集会(東京), 2016.7

9) 土門久哲, 小田真隆, 寺尾豊: 肺炎球菌の自己融解に起点を発する肺障害のカスケード機構. 第 55 回新潟化学療法研究会(新潟), 2016.7

10) 永井康介, 土門久哲, 小田真隆, 寺尾豊: 自己溶菌に漏出する *Streptococcus pneumoniae* 染色体 DNA の病原性解析. 第 4 回四大学・口腔微生物研究会(札幌), 2016.8.

11) 黒澤美絵, 小田真隆, 土門久哲, 齊藤一誠, 早崎治明, 寺尾豊: A 群レンサ球菌の PI3K/Akt 活性化因子を介した咽頭上皮細胞株への付着・侵入メカニズムの解析. 第 58 回歯科基礎医学会(札幌), 2016.8.

12) 土門久哲, 小田真隆, 川端重忠, 寺尾豊: 肺炎球菌性肺炎の重症化メカニズムの分子解析. 第 65 回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第 63 回日本化学療法学会東日本支部総会・合同学会(新潟), 2016.10

13) 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,(新潟), 2016.9

14) 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,(新潟), 2016.9

15) 黒澤美絵, 小田真隆, 土門久哲, 齋藤一誠, 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,新潟(新潟), 2016.9

16) Masataka Oda, Masahiro Nagahama, Jun Sakurai, Yutaka Terao: Clostridium perfringens alpha-toxin induces phospholipid metabolism and clusterization of GM1a/TrkA complex, ETOX17, (Portugal), 2015.6

〔図書〕(計 1 件)

1. Takenaka, S., Oda, M., Domon, H., Wakamatsu, R., Ohsumi, T., Terao, Y., and Noiri, Y. Adverse influences of antimicrobial strategy against mature oral biofilm. Microbial Biofilms-Importance and applications (Chapter 18), InTech. (2016).

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: リン酸基を有するトレハロース化合物及びその用途

発明者: 小田真隆, 山本博文

権利者: 大塚化学

種類: 特許

番号: 特願 2016-039815

出願年: 2016 年

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ

<http://labo.kyoto-phu.ac.jp/bisei/>

6. 研究組織

1) 研究代表者

小田真隆 (ODA Masataka)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 00412403

2) 研究分担者

寺尾豊 (TERAO Yutaka)

新潟大学・歯学部・教授

研究者番号: 50397717

3) 研究分担者

土門久哲 (DOMON Hisanori)

新潟大学・歯学部・教授

研究者番号: 00594350