

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21002

研究課題名(和文) 視床下部ペプチドによる難治性細菌感染症への挑戦：慢性感染 自律神経連関に注目して

研究課題名(英文) Investigation of antimicrobial activity of hypothalamic peptides in chronic bacterial infection

研究代表者

立石 善隆 (TATEISHI, Yoshitaka)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：30433296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：過去の研究および陽性荷電ペプチドに着目して、グレリンの抗菌作用を検討した。2種類の非結核性抗酸菌株(Mycobacterium avium 104(標準株)とM. intracellulare(高病原性臨床株) M.i. 198)に対する直接的作用および貪食細胞内感染菌に対する作用を検討したところ、予想に反して、グレリン濃度依存的に菌数が増加した。そこでグレリンの異化抑制に伴う、間接的な抗菌作用発現の可能性を考え、脂肪細胞および筋肉細胞の培養上清の作用を検討したところ、培養上清は菌の増殖を促進した。今回の結果は、非結核性抗酸菌感染における、グレリンの抗菌作用を否定するものであった。

研究成果の概要(英文)：According to some previous reports and characteristics of cationic charge, we investigated whether ghrelin possesses antibiotic effect on non-tuberculous mycobacteria. We used two strains of non-tuberculous mycobacteria, Mycobacterium avium 104 as a reference strain and M. intracellulare as a hypervirulent clinical strain. Contrary to our expectation, the number of bacteria increased in ghrelin concentration-dependent manner both in direct incubation and in macrophage infection. Furthermore, culture supernatant of adipocytes and myocytes treated with ghrelin also increased the number of bacteria, which contradicts the indirect antibiotic effect by inhibiting catabolism by ghrelin. These data suggests that ghrelin does not possess antibiotic effect on non-tuberculous mycobacteria.

研究分野：細菌学

キーワード：非結核性抗酸菌症 グレリン 抗菌活性

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年虚弱中高齢者で急増している肺非結核性抗酸菌症の主たる原因菌である *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC 菌) は、既存抗菌薬が効きにくく、いまだに根治療法が見出されていない(文献 )。加えてこれらの薬剤抵抗性細菌による感染症の特徴として、細菌側の問題のみならず、生体の殺傷機構を逃れた残存菌による全身的影響(慢性持続性炎症反応-摂食低下-睡眠不足-栄養失調-交感神経機能亢進:悪性サイクル(cachexia cycle))が宿主の予後を左右する。従って、慢性持続性細菌感染症の克服には、抗菌作用・抗炎症作用・恒常性機能回復作用の三作用を兼備した治療薬が要求される。

(2) グレリンは摂食・エネルギー代謝維持に与る視床下部ペプチドであり、摂食促進、脂肪・筋肉等の末梢器官における同化作用、免疫応答調節作用、迷走神経刺激による交感神経活動の抑制作用を持つ。グレリンの恒常性機能調節作用を利用した慢性炎症性疾患 COPD 等への疾患治療へ臨床研究も行われている(文献 )。感染症学領域においては、*in vitro*における抗菌作用を示唆する報告や、敗血症性ショックモデル動物でのグレリン投与効果の報告(文献 )が散見されるものの、視床下部ペプチドと細菌との相互作用の機構、それと併せて抗菌 抗炎症 恒常性回復に着目した検討はなされていない。これらの薬剤抵抗性細菌に対する直接的抗菌効果とそのメカニズムの解明は科学的に大変興味深く、かつ治療薬としても有望性と予想される。

2. 研究の目的

(1) グレリンの抗菌作用の有無とその細菌学的機序を解明する。  
 (2) 感染細胞・組織に対するグレリンの免疫応答調節作用を解明する。  
 (3) 以上の結果より、視床下部ペプチドが臨床応用可能かどうかを考察する。

3. 研究の方法

(1) 供与菌種. 今回、2種類の菌株 *Mycobacterium avium* 104 (標準株) と *M. intracellulare* (高病原性臨床株) M.i.198 を用いた。一部の実験(細胞感染菌の増殖動態の検討)において、結果取得の迅速性を図るため、ルシフェラーゼ発現結核菌株を用いて検討した。なお、非結核性抗酸菌でのルシフェラーゼ発現菌株も作成したが、発現活性が安定しなかったため、今回供試しなかった。  
 (2) 無細胞系における菌の増殖動態の検討. 96穴プレートを用いて、アルブミンを含まない液体培地アルブミンを含有しない液体培地 (Glucose-alanine-salt-Tween80 media: GAST) を使用して、各グレリン濃度存在下での増殖動態を菌数測定により評価した。  
 (3) 感染細胞における菌の増殖動態の検討. ヒト単球系細胞である THP-1 を 100 nM PMA

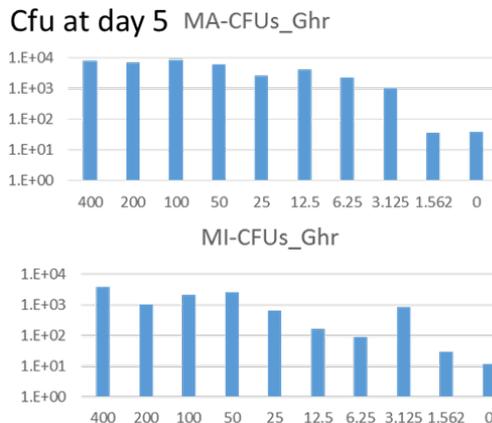
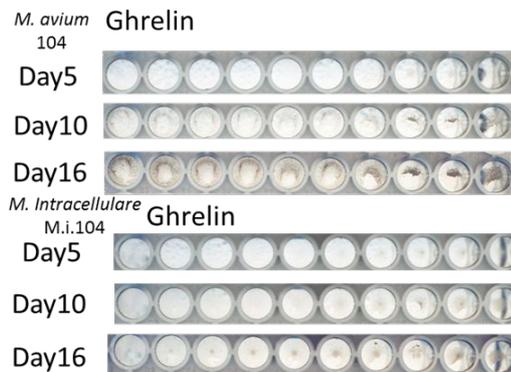
で分化させ、非結核性抗酸菌を感染させた。感染マクロファージ細胞は、5%ウシ血清入り MEM 培地にて各グレリン濃度存在下で培養した。

(4) 共培養系. 定法に従い、24 ウェルプレートにおいて、脂肪細胞 3T3-L1 を 10 µg/mL インスリン、2.5 µM デキサメサゾン、0.5 mM 3-イソブチルキサンチンにより、筋肉細胞 C2C12 を 5%ウマ血清により分化させた。カルチャーインサート内に菌を感染させたマウスマクロファージ細胞 Raw264.7 を培養し、上記 3T3-L1 および C2C12 と共培養を行った。リアルタイム PCR 法により、これらの細胞における遺伝子発現の評価を行った。

4. 研究成果

(1) 過去の他グループによる研究において、グレリンの黄色ブドウ球菌や緑膿菌に対する増殖抑制効果を示唆することが報告されたため、今回、非結核性抗酸菌に対するグレリンの抗菌効果を検討した。2種類の菌株 *Mycobacterium avium* 104 (標準株) と *M. intracellulare* (高病原性臨床株) M.i.198 について、0-400 µg/ml のグレリン存在下での菌の増殖動態を検討したところ、既報とは異なり、菌数がグレリン濃度依存的に増加することが判明した(図1)。

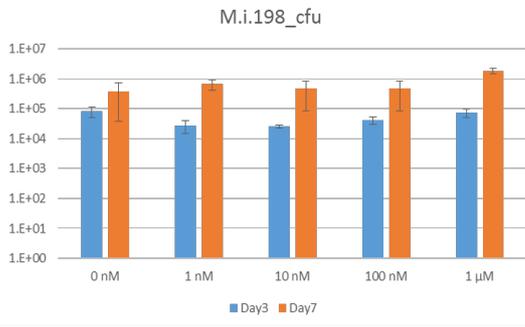
図1. グレリン存在下における非結核性抗酸菌の増殖動態の検討



また、100 nM PMA で分化させた THP-1 マクロファージ細胞に感染させた M.i.198 の菌数変化を検討したところ、グレリン存在下(100 nM から 1 µM)で、細胞内での菌数が増加した

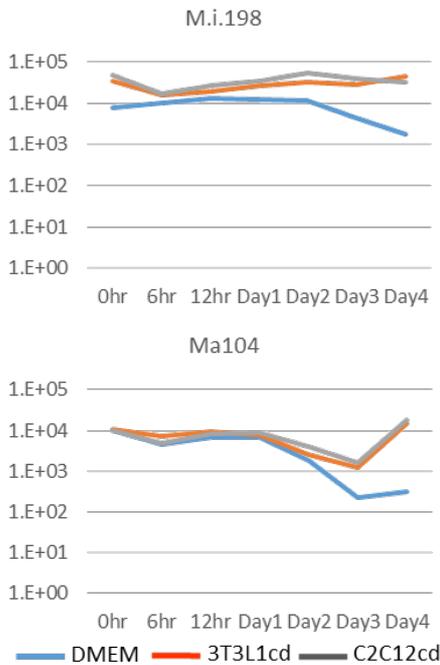
( 図 2 )

図2. THP-1マクロファージ内感染菌の増殖動態に対するグレリン投与効果の検討



( 2 ) 生体において、グレリンが脂肪や筋肉などの末梢器官において、同化作用をもたらすことが知られている。そこでグレリンの異化抑制に伴う、間接的な抗菌作用発現の可能性を考え、脂肪細胞 3T3-L1 および筋肉細胞 C2C12 の培養上清を用いて、2 種類の菌株 *Mycobacterium avium* 104 と *M. intracellulare* M.i.198 に対する抗菌作用を検討した。上記の培養上清は菌の増殖を促進したことから、異化抑制の伴う抗菌作用発現の仮説は否定された ( 図 3 )。

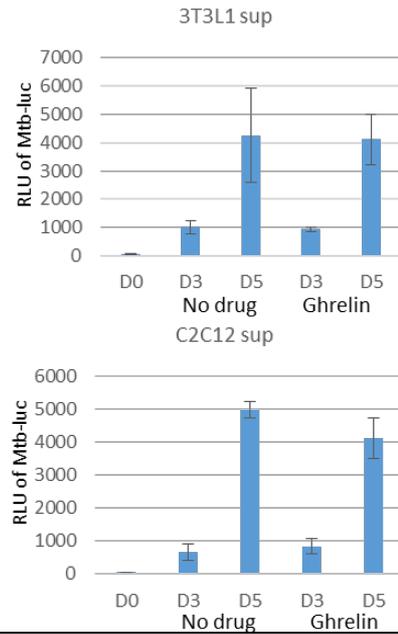
図3. 脂肪および筋肉細胞の培養上清による、非結核性抗酸菌に対する抗菌効果の検討



( 3 ) グレリンは免疫調節作用をもち、慢性炎症病態に対する炎症寛解作用を持つことが知られるが、感染病態における細胞内感染菌に対する詳細な効果は分かっていない。そこで、非結核性抗酸菌を Raw264.7 細胞に感染させ、感染マクロファージを脂肪細胞ならびに筋肉細胞と共培養したところ、脂肪細胞における tlr2, il6 の発現抑制 ( 各 0.056, 0.26 倍 ) ならびに筋肉細胞における il6、および代表的な筋萎縮関連遺伝子である atrogen-1 の発現抑制 ( 各 0.32, 0.11 倍 ) を認めた。

しかし、菌の増殖を抑止する効果はみられなかった ( 図 4 )

図4. 脂肪細胞および筋肉細胞との共培養下における、マクロファージ内感染菌の菌増殖動態に対するグレリンの効果



( 4 ) 菌の病原性を探究するには、特定の遺伝子を発現ないしは欠損させる実験系が必要となる。非結核性抗酸菌の場合、結核菌と異なり、遺伝子組換え実験はほとんどなされていない。そこで、抗酸菌の発現ベクターを用いて、緑色蛍光タンパクあるいはルシフェラーゼを発現させるプラスミドを構築し、*M. avium* subsp *hominissuis* MAH104 ( レファレンス株 )、*M. intracellulare* M.i.198 ( 淋総分離株 )、*M. avium* subsp *avium* ATCC25291 ( ATCC 株 )、*M. avium* subsp *avium* ATCC35767 ( ATCC 株 )、*M. avium* subsp *hominissuis* MAH OCU806 ( 環境分離株 )、*M. avium* subsp *hominissuis* MAH OCU817 ( MAH OCU806 の glycopeptidolipid 欠損株 )、*M. avium* subsp *hominissuis* MAH 104R ( MAH 104 の glycopeptidolipid 欠損株 ) の 7 種類の非結核性抗酸菌株に形質導入を試みた。300ng-1 μg のプラスミドを 20 μL のコンピテントセルに電気穿孔法 ( 1700 V, 50 μF, 150 , 1 mm gap ) で形質導入したところ、M.i.198 のみで 0.05-0.28 × 10<sup>-8</sup> の形質転換効率で成功したが、*M. avium* では全く形質転換が起こらなかった ( 図 5 )。従来から MAH の形質転換が結核菌よりも困難であることが知られていたが、これを裏付ける結果となった。また、M.i.198 では形質転換が成功したことから、本菌株が遺伝子組換え実験に有用であることが示唆された。

図5. 緑色蛍光タンパク、あるいはルシフェラーゼ発現ベクターを形質転換した際に、寒天培地上で得られたコロニー数

菌株名	Kanamycin concentration (μg/ml)	pMV261-gfp	pSO-sigApr-luc	蒸留水
Mi.198	100	4	20	1
MAH 104	400	0	0	0
MAA 25291	100	0	0	0
MAA 35767	50	10	0	5
MAH OCU806	50	50	0	300
MAH OCU817	50	1	0	0
MAH 104R	100	0	0	0

(5) 今回の結果は、非結核性抗酸菌感染における、グレリンの直接的抗菌作用を否定するものであった。グレリンの作用は上記のほか、迷走神経抑制、食欲増進等、生体内では非常に多面的な作用をもつため、慢性持続性感染におけるグレリンの作用解明には生体レベルでの検討が必要である。一方、臨床的には非結核性抗酸菌症の最多起因菌は *M. avium-intracellulare* complex であるとして一括に捉えられている。しかし、今回の研究結果では、*M. intracellulare* のみにおいて形質導入が可能であったことから、*M. avium* と *M. intracellulare* の細菌学的性質に関連した、生体内での病態形成機構の差異が示唆された。

<引用文献>

Tateishi Y. Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi. 2010  
 Griffith DE. Am J Respir Crit Care Med. 2007.  
 Miki K, Tateishi Y. BMC Pulm Med. 2013.  
 Miki K, Tateishi Y. PLoS One. 2012.  
 Chorny A. J Immunol. 2008.

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 3 件)

Totani T, Nishiuchi Y, Tateishi Y, Yoshida Y, Kitanaka H, Niki M, Kaneko Y, Matsumoto S. Effects of nutritional and ambient oxygen condition on biofilm formation in *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* via altered glycolipid expression. Scientific Reports. 2017;7.41775. DOI: 10.1038/srep41775.  
立石善隆、松本壮吉. 結核菌の病原因子. 呼吸器内科. 2016;29.65-70.  
 Ozeki Y, Igarashi M, Doe M, Tamaru A, Kinoshita N, Ogura Y, Iwamoto T, Sawa R, Umekita M, Enany S, Nishiuchi Y, Osakda-Oka M, Hayashi T, Niki M, Tateishi Y, Hamano M, Matsumoto S. A new

screen for tuberculosis drug candidates utilizing a luciferase-expressing recombinant *Mycobacterium bovis* Bacille de Calmette et Guérin. PLoS One. 2015;10.e0141658. DOI: 10.1371/journal.pone.0141658. Collecticon2015.

[学会発表](計 5 件)

大西宏明, 米谷正太, 大塚弘毅, 荒木光二, 松本壮吉, 立石善隆, 河合伸, 渡邊卓. *Mycobacterium kyorinense* および近縁種 *Mycobacterium celatum* の薬剤耐性関連遺伝子の解析. 第 65 回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 2016年10月26日-28日. 新潟県新潟市.  
Tateishi Y, Matsumoto S, Nishiuchi Y. Role of nutritional richness, hypoxia, bioactive cell-wall glycopeptidolipid on biofilm formation in *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. ASM microbe 2016. June 16-20. Boston (USA).  
Tateishi Y. Biofilm formation in *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. 第 56 回日本呼吸器学会総会. 2016年04月8日-10日. 京都府京都市.  
 尾関百合子, 山口雄大, Enany Shymaa, 五十嵐雅之, 西内由紀子, 岡真優子, 岩本朋忠, 小椋義俊, 林哲也, 立石善隆, 西山晃史, 松本壮吉. 結核・抗酸菌症に関する最近の provocative な研究 ルシフェラーゼ発現リコンビナント BCG による新規結核薬の迅速スクリーニング系の確立と実践. 第 89 回日本細菌学会総会. 2016年3月23日-25日. 大阪府大阪市.  
立石善隆, 尾関百合子, 西山晃史, 松本壮吉. 結核菌におけるポリフェノールの抗菌作用の検討. 第 89 回日本細菌学会総会. 2016年.3月23日-25日. 大阪府大阪市.

[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  
<https://www.med-niigatauniv-bacteriol.org>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

立石 善隆 (TATEISHI, Yoshitaka)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：30433296

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )