

平成 31 年 4 月 8 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19129

研究課題名(和文)腸管上皮細胞への指向性を誘起する緑膿菌の感知機構の解析

研究課題名(英文)Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* through intestinal epithelial cells layer

研究代表者

林 直樹 (Naoki, Hayashi)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：70707463

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)：临床上重要な日和見感染菌である緑膿菌は、ムチンで覆われた上皮細胞層からなる粘膜上皮を越え(トランスロケーション)、重篤な血液感染症を引き起こすことがある。本研究では、腸管上皮細胞から分泌される複数のタンパク質(10 kDa以下)が緑膿菌によるムチン層透過を亢進し、その分泌因子の一つがケモカインのGrowth-related Oncogene alpha (GRO-)であることを見出した。また、多機能性糖脂質が緑膿菌の増殖速度に影響を与えることなくケモタキシスシグナルを攪乱し、本菌によるべん毛依存性のムチン層透過を抑制することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では緑膿菌トランスロケーションにおいて、緑膿菌が上皮細胞を感知して接近する機構と多機能性糖脂質による緑膿菌トランスロケーション制御機構について明らかにした。近年、薬剤耐性菌が世界的に増加しているが、この30年間、新たなタイプの抗菌薬開発は進んでおらず、薬剤耐性菌に対する新たな治療戦略が国際的に求められている。また、緑膿菌のべん毛は、ワクチンや抗感染症薬のターゲットとして注目されており、ヒトでの臨床研究を含めて多くの研究が進行している。本研究成果は、緑膿菌トランスロケーションメカニズムを明らかにすることに加え、多機能性糖脂質が新たな感染症予防および治療に応用をできる可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen that causes severe sepsis. The gastrointestinal tract is considered one of the reservoirs in infection for P. aeruginosa. We consider the penetration of P. aeruginosa through the epithelial tissue to be at least 5 steps. We previously demonstrated that P. aeruginosa penetrates the mucin layer by flagellar motility and a mucin degrading protease. In this project, we found that penetration of the mucin layer by P. aeruginosa is facilitated by small proteins secreted by epithelial cells, both by inducing acceleration of a flagellar motility and increasing chemotaxis. Additionally, we found that multi-functional glycolipid is an effective inhibitor of flagellar motility in P. aeruginosa. The multi-functional glycolipid might be of potential use in the prevention and treatment of P. aeruginosa sepsis.

研究分野：細菌学

キーワード：緑膿菌 べん毛 上皮細胞 トランスロケーション 多機能性糖脂質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本を含む先進諸国では、高齢化や高度医療化にともない毒力の弱い病原体による日和見感染症を制御することが求められている。*Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌) は、免疫力が低下した宿主において呼吸器感染症や血液感染症を引き起こす临床上重要なグラム陰性の日和見感染症起因菌である。これまでに多くの抗緑膿菌作用をもつ抗菌薬が開発されてきたが、緑膿菌敗血症による死亡率は依然として高く、新たな予防および治療法の考案が必要である。ヒトの呼吸器、泌尿器、消化管内腔は、細胞間を密に結合した上皮細胞層と高い粘性をもつムチン層が存在し、細菌を含む微生物の血液中への移行(トランスロケーション)に対して障壁を形成している。しかし、緑膿菌は免疫力が低下した宿主においてこれら障壁を越え、重篤な血液感染症を引き起こすことがある。これまでに、ヒトでのレトロスペクティブな解析や白血球減少マウスを用いた感染実験により、緑膿菌の血液感染症における侵入門戸の1つが腸管であると示されているが、腸管腔での緑膿菌トランスロケーションに関する分子生物学的なメカニズムは未解明なことが多い。そこで我々の研究グループでは、緑膿菌を含む日和見感染症に対する新たな予防および治療法を考案するための基礎的な知見を得ることを目的に、腸管腔での緑膿菌トランスロケーション過程を、緑膿菌による1) 上皮細胞の感知、2) 接近、3) 付着、4) 上皮細胞層透過経路の形成、5) 透過の5つのステップに分け、分子生物学的なメカニズムの解析を進めてきた(Fig. 1)。その成果として、緑膿菌のトランスロケーションの5つのステップのうち、緑膿菌がべん毛運動とプロテアーゼによるムチン分解によりムチン層を透過する機構、緑膿菌がIV型線毛とIII型分泌エフェクターにより上皮細胞相関接着を破綻して上皮細胞間隙を透過する機構を明らかにし、緑膿菌トランスロケーションの全体像を解明するための端緒を開いてきた。申請者は、ヒト結腸癌由来Caco-2細胞培養上清中の10 kDa以下の成分が緑膿菌のムチン層透過を亢進し、この亢進作用はプロテアーゼ処理により減少することを見出しており、腸管上皮細胞から分泌された低分子量タンパク質を感知した緑膿菌が、上皮細胞表面を覆うムチン層の透過が亢進されることで、トランスロケーションを成立させているという着想に至った。

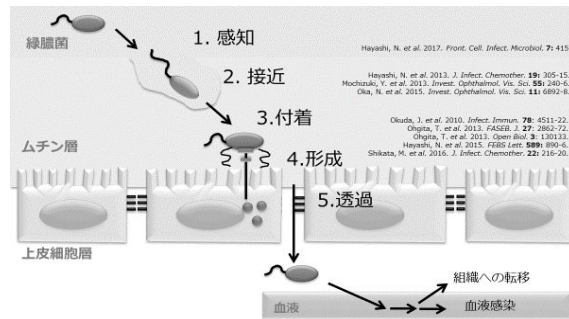


Fig. 1. 緑膿菌トランスロケーションモデル

2. 研究の目的

临床上重要な日和見感染症起因菌である緑膿菌の腸管腔からのトランスロケーション機構を解明することで、宿主環境に応じた細菌の感染メカニズムに基づく新たな予防および治療法考案のためのターゲットバリデーションを行なう。本研究では、緑膿菌トランスロケーションの初期段階である「緑膿菌による腸管上皮細胞の感知」にターゲットを絞り、(1)緑膿菌が感知する腸管上皮細胞分泌タンパク質の同定、(2)腸管上皮細胞を感知する緑膿菌センサーの同定、(3)腸管上皮細胞が緑膿菌のムチン層透過を亢進する機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 人工的ムチン層を用いた緑膿菌によるムチン層透過実験

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) を用いて調製した2%顎下腺由来ウシムチンを Transwell® の上層に充填した。次に、Transwell® の下層に上皮細胞培養上清もしくは上皮細胞の培養に用いた DMEM をコントロールとして充填後、ムチン層上部に緑膿菌の培養液を添加した。37℃、5% CO₂ 条件下で3時間培養後、Transwell® 下層の溶液を LB agar に塗布し、37℃で一晩培養後に出現したコロニーの数を計測した。

(2) 緑膿菌によるプロテアーゼ活性の測定

緑膿菌培養上清によるアゾカゼイン分解を測定した。Caco-2 細胞培養上清もしくは DMEM 中で一晩培養した緑膿菌の菌液を遠心分離した。得られた上清に 0.2% アゾカゼイン溶液 [0.2% azocasein、100 mM CaCl₂、500 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)] を加え、30分間、37℃、5% CO₂ 条件下で静置培養した。培養後の溶液に、10% trichloroacetic acid を添加し、溶液中のアゾカゼイン分解反応を停止後、吸光度 (Abs=440 nm) を測定した。

(3) 緑膿菌による swarming motility の観察

Caco-2 細胞培養上清を添加した swarming agar (0.5% bacto-agar、50% Caco-2 細胞培養上清) 上の中央に緑膿菌液を滴下した。37℃、5% CO₂ 条件下で14時間培養後、swarming 培地上における緑膿菌の広がりを観察した。

(4) テザードセル法による緑膿菌のべん毛フィラメント回転速度の解析

テザードセル法を用いて緑膿菌体の回転運動を観察した。protein A および抗 FliC 抗体で表

面処理したスライドガラスに、緑膿菌の培養液を滴下した。緑膿菌のべん毛をスライドガラスに固定後、Caco-2 細胞培養上清もしくは DMEM をスライドガラスに滴下し、EVOS® FL Cell Imaging System を用いて、緑膿菌体の回転運動を動画で観察した。

(5) キャピラリーアッセイによる緑膿菌の化学走化性の観察

GFP を発現する緑膿菌を用いたキャピラリーアッセイを行った。L-arginine (誘引物質)、chloroform (忌避物質)、Caco-2 細胞培養上清および DMEM をそれぞれ充填したキャピラリー (Drummond) の先端を、chemotaxis buffer [10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)、0.1 mM disodium EDTA] で懸濁した緑膿菌 GFP 発現株の培養液に浸した。37 °C で反応後、倒立型蛍光顕微鏡 (IX71; OLYMPUS) を用いてキャピラリー内の蛍光を経時的に観察した。

(6) 多機能性糖脂質による処理

LB 液体培地で培養した緑膿菌に多機能性糖脂質 (100 μM) を添加後、37 °C で 3 時間培養した。多機能性糖脂質処理後のべん毛構造は、べん毛フィラメント FliC タンパク質に特異的な抗体を用いた western blot および ELISA により解析し、電子顕微鏡を用いてべん毛構造を観察した。また、半定量的 RT-PCR 法により、べん毛関連遺伝子の発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) 緑膿菌による上皮細胞感知メカニズムの解析

緑膿菌によるムチン層透過に与える上皮細胞培養上清の影響を調べたところ、Caco-2 細胞培養上清は、緑膿菌によるムチン層透過をコントロール DMEM に比べて 2 倍亢進させた。限外濾過膜を用いて回収した 10 kDa 以下の Caco-2 細胞培養上清は、緑膿菌 PAO1 株によるムチン層透過を 2 倍亢進させ、この亢進はトリプシン処理で消失した。これらの結果から、Caco-2 細胞が分泌する 10 kDa 以下のタンパク質が緑膿菌によるムチン層透過を亢進させることが示唆された。次に、べん毛フィラメント回転速度に対する Caco-2 細胞培養上清の影響を調べたところ、Caco-2 細胞培養上清は緑膿菌のべん毛依存性の swarming 運動ならびにべん毛フィラメントの回転速度を増大させた。また、本菌は Caco-2 細胞培養上清に走化性を示した。これら Caco-2 細胞培養上清による人工的ムチン層透過、べん毛回転速度、および化学走化性の亢進はトリプシン処理で消失し、さらに限外濾過膜を用いて回収した 10 kDa 以下の画分に亢進作用があることが分かった。本研究により、緑膿菌は上皮細胞が分泌する 10 kDa 以下のタンパク質を感知し、べん毛回転に依存した化学走化性が亢進し、ムチン層を透過することが示唆された。次に、Caco-2 細胞培養上清に含まれる 10 kDa 以下のサイトカインを測定したところ、Interleukin-8 (IL-8)、Macrophage-derived Chemokine (MDC)、Macrophage Inflammatory Proteins-1 (MIP-1)、Regulated on activation normal T cell expressed and secreted (RANTES)、Growth-related Oncogene alpha (GRO-α) の 5 種類が検出された。これら 5 種のサイトカインのうち、GRO-α のみが緑膿菌 PAO1 株によるムチン層透過を 1.7 倍亢進させた。GRO-α が緑膿菌によるムチン層透過を亢進させるメカニズムを明らかにすることを目的に、緑膿菌のべん毛運動と化学走化性に対する Caco-2 細胞培養上清と GRO-α の影響を調べた。その結果、緑膿菌のべん毛フィラメント回転速度は、Caco-2 細胞培養上清により 1.3 倍、GRO-α により 1.2 倍、それぞれ増大させた。また、緑膿菌は Caco-2 細胞培養上清に走化性を示したが、GRO-α に対しては走化性を示さなかった。これらの結果から、Caco-2 細胞が分泌する GRO-α を感知した緑膿菌は、べん毛運動を増大し、ムチン層を透過することが示唆された。また、GRO-α による緑膿菌ムチン層透過の亢進作用は Caco-2 細胞培養上清の 75% であり、さらに緑膿菌は GRO-α に対して化学走化性を示さなかった。本研究の結果より Caco-2 細胞培養上清に含まれる複数の 10 kDa 以下のタンパク質が、緑膿菌によるムチン層透過を亢進させることが新たに分かった。

(2) 緑膿菌トランスロケーション制御法の探索

緑膿菌によるムチン層透過に対する多機能性糖脂質の影響を調べたところ、多機能性糖脂質は緑膿菌の増殖速度に有意な影響を与えることなく、本菌によるムチン層透過菌数を 65% 減少させた。次に、緑膿菌のべん毛運動とプロテアーゼ産生に対する多機能性糖脂質の影響を調べたところ、多機能性糖脂質は緑膿菌のプロテアーゼ活性に有意な影響を与えることなく、べん毛依存性の swimming 運動を 62% 減少させた。また、多機能性糖脂質処理により緑膿菌の菌体運動の消失がトラッキング解析により観察された。次に、緑膿菌のべん毛フィラメント形成に対する多機能性糖脂質の影響を調べたところ、多機能性糖脂質添加時の FliC タンパク質発現量への有意な影響は認められず、べん毛フィラメント構造体への多機能性糖脂質による影響も観察されなかった。べん毛関連遺伝子群 (フィラメント; *fliC*、モーター; *motA* および *motC*、ケモタキシスシグナル伝達; *cheA*、*cheB*、*cheR1*、*cheW*、*cheY*、および *cheZ*) に対する多機能性糖脂質の影響を調べたところ、多機能性糖脂質は *cheR1*、*cheW*、および *cheZ* 遺伝子の発現量をそれぞれ 48%、42%、および 46% 減少させた。本研究の結果より、多機能性糖脂質は緑膿菌の増殖速度に影響を与えることなく、本菌によるべん毛運動依存性のムチン層透過を抑制することが新たに分かった。

(3) 成果のまとめ

本申請では、緑膿菌のトランスロケーションの5つのステップのうち、緑膿菌が上皮細胞を感知して接近する機構と多機能性糖脂質による緑膿菌トランスロケーション制御機構について明らかにすることができた。近年、薬剤耐性菌が世界的に増加しているが、この30年間、新たなタイプの抗菌薬開発は進んでおらず、薬剤耐性菌に対する新たな治療戦略が国際的に求められている。また、緑膿菌のべん毛は、ワクチンや抗感染薬のターゲットとして注目されており、ヒトでの臨床研究を含めて多くの研究が進行している。本研究成果は多機能性糖脂質が新たな感染症予防および治療に応用をできることを示すものであり、今後、新たな薬の開発につながることを期待できる。

5. 主な発表論等

〔雑誌論文〕(計2件、すべて査読あり)

Hayashi, N., Furue, Y., Kai, D., Yamada, N., Yamamoto, H., Nakano, T., and Oda, M. 2015. Sulfated vizantin suppresses mucin layer penetration dependent on flagella motility of *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *PLoS ONE.*, **13**: e0206696. doi: 10.1371/journal.pone.0206696.

Hayashi, N., Yokotani, A., Yamamoto, M., Kososhi, M., Morita, M., Fukunishi, C., Nishizawa, N., and Gotoh, N. 2017. Extracellular Signals of a Human Epithelial Colorectal Adenocarcinoma (Caco-2) Cell Line Facilitate the Penetration of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 Strain through the Mucin Layer. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**: 415. doi: 10.3389/fcimb.2017.00415.

〔学会発表〕(計13件)

古江由依、甲斐大智、山田倫暉、林直樹、山本博文、小田真隆：緑膿菌の鞭毛運動に対する多機能性糖脂質の影響。日本薬学会第139年会。2019。

林直樹、小田真隆：緑膿菌トランスロケーション機構の解析と制御法の探索。第53回緑膿菌感染症研究会。2019。

林直樹、古江由依、甲斐大智、山田倫暉、小田真隆：多機能性糖脂質 sulfated vizantin による緑膿菌ムチン層透過抑制メカニズムの解析。第71回日本細菌学会関西支部総会・学術講演会。2018。

林直樹、古江由依、甲斐大智、山田倫暉、小田真隆：機能性糖脂質による緑膿菌のムチン層透過抑制メカニズムの解析。第30回微生物シンポジウム。2018。

林直樹：敗血症の視点から緑膿菌の指向性を考える：緑膿菌による宿主上皮トランスロケーション機構の解析。第29回日本臨床微生物学会。2018。

林直樹：緑膿菌 PA01 株が培養上皮細胞を感知するメカニズムの解析。第52回緑膿菌感染症研究会。2018。

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。2017。

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。2017。

林直樹：緑膿菌トランスロケーションの解析。第90回日本細菌学会総会(仙台)。2017。

林直樹、後藤直正：緑膿菌 PA01 株が培養上皮細胞を感知するメカニズムの解析。第51回緑膿菌感染症研究会。2017。

林直樹、後藤直正：上皮細胞を感知した緑膿菌がムチン層を透過する機構の解析。第64回日本化学療法学会西日本支部総会 第59回日本感染症学会中日本地方会学術集会 第86回日本感染症西日本地方会学術集会 合同学会。2016。

Hayashi, N., and Gotoh N.: Translocation of *Pseudomonas aeruginosa* through the epithelial cell layer. The 13th Korea - Japan International Symposium on Microbiology. 2016.

林直樹、後藤直正：*Pseudomonas aeruginosa* が上皮細胞を感知する機構の解析。第90回日本感染症学会学術講演会。2016。

〔図書〕(計0件)

〔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

京都薬科大学微生物・感染制御学分野

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

6 . 研究組織

(1) 研究協力者

後藤 直正(Gotoh, Naomasa)
京都薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：3 0 1 2 1 5 6 0

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。