

令和元年6月7日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16233

研究課題名(和文) 薬剤耐性菌感染症に対する光線治療法の確立

研究課題名(英文) Antibody-selective elimination of drug-resistant pathogens with near-infrared light

研究代表者

伊藤 公博 (ITO, KIMIHIRO)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：60794336

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)：我々が開発してきたphotoimmunotherapy (PIT) は、がん細胞膜に特異的に結合する抗体に光感受性物質を結合させ、近赤外光の照射によりがん細胞膜のみを破壊する治療法である。本研究課題では、通常の抗菌薬が無効の薬剤耐性病原体に対する治療にPITを応用させることを目的とした。黄色ブドウ球菌の細胞壁構成成分と特異的に結合する抗体を光感受性物質と結合させた化合物を細菌に結合させたのち近赤外光を照射することで、抗体選択的に強い殺菌効果が誘導されることをin vitroおよびin vivoモデルを用いて確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペニシリンが実用化されてから、細菌感染症に対する治療は抗菌薬の進歩と耐性菌の出現を繰り返している。近年になり、複数の耐性メカニズムを持つ細菌も検出されるようになり、薬剤耐性菌に対する感染症治療は全世界的な問題である。今回開発した病原体に対するPITは、細菌の主たる構成成分である細胞壁を物理的に破壊することで殺菌効果を誘導し、薬剤耐性の有無にかかわらず抗体選択的に殺菌効果が得られる方法である。抗菌薬と異なる作用機序であり、薬剤耐性を誘導しにくいと考えられ、今後の耐性菌治療法開発に役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：We have recently developed photoimmunotherapy (PIT) as a new class of molecular targeted cancer therapy based on the conjugation of a monoclonal antibody (mAb) with a near-infrared (NIR) light-activated photosensitizer (PS). The mAb-PS conjugate binds immunospecifically to the target molecules on the cancer cell surface and rapidly ruptures the membrane after NIR light exposure. Here, we conducted a proof of concept study of PIT against pathogens utilizing mAb-PS conjugates by targeting the cell wall component of *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* targeting mAb-PS conjugate selectively binds and kills *S. aureus* upon NIR light exposure irrespective of the antibiotic resistance both in in vitro and in vivo models.

研究分野：消化器内科、感染症内科

キーワード：薬剤耐性菌 分子標的薬 近赤外光

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

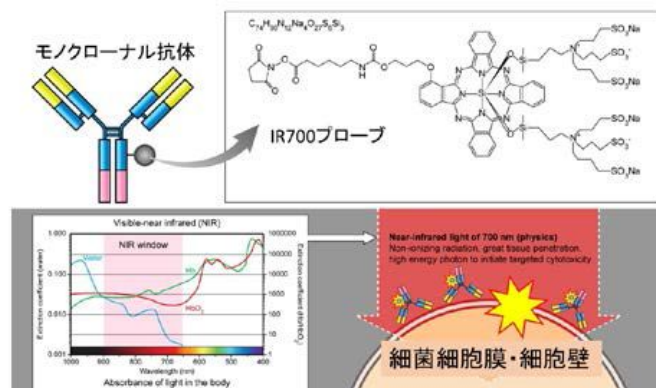
1. 研究開始当初の背景

1940年代にペニシリンが実用化されてから、細菌感染症に対する治療は抗菌薬の進歩と耐性菌の出現を繰り返している。薬剤耐性のメカニズムとして薬剤の酵素分解や修飾、細胞膜透過性の低下、薬剤排出機構、作用点変異などが広く知られているが、近年になり、複数の耐性メカニズムを発現する細菌(多剤耐性緑膿菌など)も検出されるようになった。耐性菌に対する感染症治療は現在も全世界的な問題となっており、新規抗菌薬の開発とならび、新たな治療法の出現が望まれている。

2011年にMitsunagaらは、がん分子標的モノクローナル抗体に近赤外光を吸収し蛍光や熱などを産生する蛍光プローブ IR700 を結合させた化合物と近赤外光を用いて、正常細胞に障害を与えず、がん細胞のみを分子標的的特異的に生体に無害な近赤外光で破壊する方法を開発し、photoimmunotherapy(PIT: 光線免疫療法)と名付けられて報告した(Mitsunaga M et al. Nat Med 2011)。研究代表者とMitsunagaは、PITのがんに対する有用性について研究を行い、その成果を報告してきた(Ito K, et al. BMC Cancer 2016. Ito K, et al. Oncotarget 2016, Ito K, et al. Bioconjugate Chem. 2017)。

2. 研究の目的

本研究では、がんに対するPITの方法論を感染症治療へ応用することを目的とした(右図参照)。細菌の細胞膜や細胞壁に存在する標的分子を特異的に認識するモノクローナル抗体を探索し、モノクローナル抗体と蛍光プローブIR700を結合させた化合物を合成した。次に、細菌と抗体化合物を反応させた後に近赤外光を照射し、細胞膜(壁)破壊から治療効果が得られるかを検討した。更に、治療効果の高いモノクローナル抗体を選択し、菌体を投与した*in vivo*モデルに対して抗体化合物を投与した後に近赤外光を照射し、その治療効果を検証した。



3. 研究の方法

(1) *in vitro*における黄色ブドウ球菌に対するSAIR700による光線治療効果

(1-1) 細菌株

メチシリン感受性黄色ブドウ球菌 MSSA (JKmsSA1 and JCM2874)

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 MRSA (JKmrSA1 and JKmrSA2)

バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌 VISA (MU3 and MU50)

(1-2) モノクローナル抗体-IR700 結合化合物の合成

黄色ブドウ球菌の細胞壁主要構成成分であるペプチドグリカンに対するモノクローナル抗体(clone Staph12-569.3, murine IgG3)と近赤外光感受性物質 IR700DX NHS ester を混和し、ゲルろ過にて化合物(SAIR700)を抽出した。ゲルろ過したSAIR700は、分光光度計を用いて吸光度測定を行い、1分子の抗体に対して約3分子のIR700が結合するように調整した。

(1-3) 黄色ブドウ球菌細菌株に対するSAIR700の結合性評価と近赤外光照射による殺菌効果

黄色ブドウ球菌細菌株懸濁液 OD 0.5 = 10^8 CFU/mL から、 10^6 CFU/mL のサンプルを調整し、

10 µg の SAIR700 を添加し、4 遮光下で振盪しながら 1 時間反応させた。反応後のサンプルを洗浄し、フローサイトメーターを用いた結合性評価や近赤外光照射による殺菌効果を評価した。

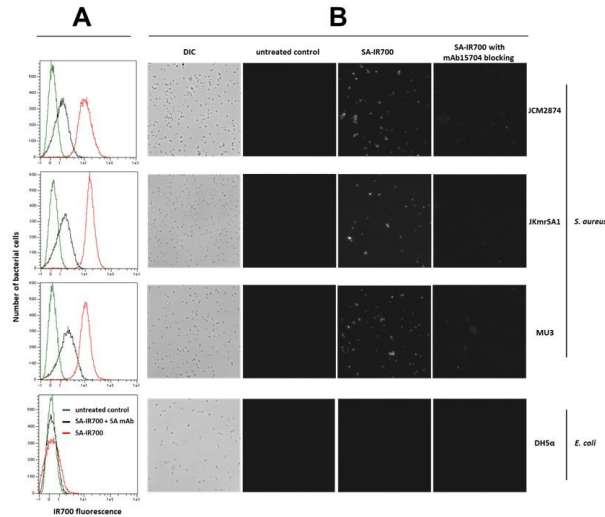
(2) in vivo における黄色ブドウ球菌に対する光線治療効果

コットンラット (*Sigmodon hispidus*) の鼻腔に MRSA 細菌株 JKmrSA1 を麻酔下にて投与し、1 週間経過観察すると全例に MRSA が保菌された。MRSA 鼻腔保菌ラットに対して、SAIR700 を鼻腔投与し、その後近赤外光を鼻腔内に照射した。処置後にラット鼻腔を切除し培養し殺菌効果を評価した。また、組織障害の有無について病理組織学的に評価した。

4. 研究成果

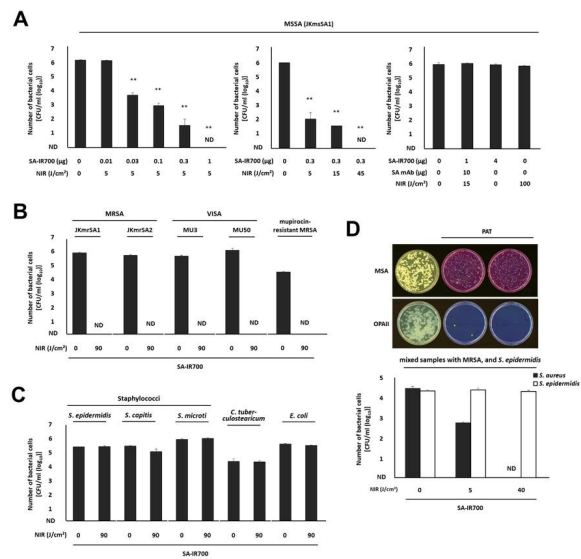
(1) in vitro における黄色ブドウ球菌に対する SAIR700 による光線治療効果

ペプチドグリカンを認識する抗体化合物 SAIR700 は、ペプチドグリカン細胞壁主要構成成分とする黄色ブドウ球菌 (右図上 3 段) に抗体選択的に結合し、陰性コントロールである大腸菌には結合しなかった (右図 A: フローサイトメーターの代表的結果、B: 蛍光顕微鏡観察の代表的結果)。



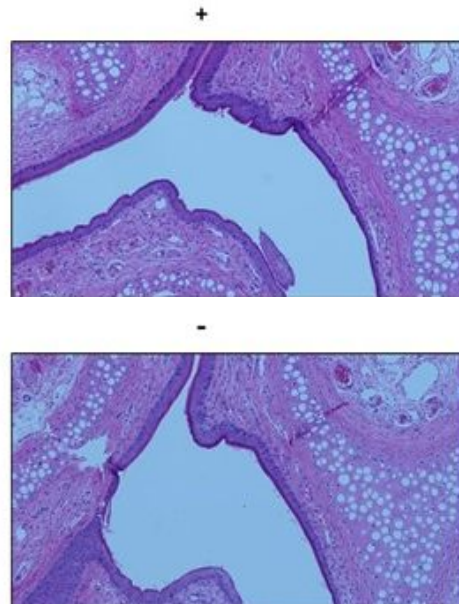
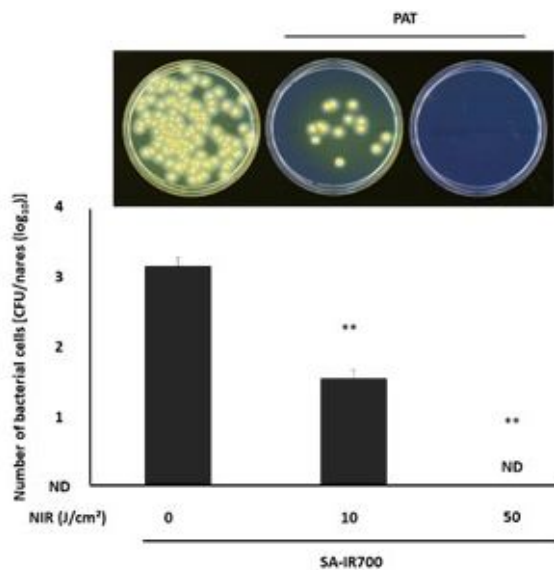
次に、SAIR700 を MSSA (JKmsSA1) に添加し、近赤外光を照射した。右図 A に示す通り、抗体化合物の投与濃度および近赤外光照射エネルギーに依存した殺菌効果を認めた。一方で、抗体化合物のみ、または、近赤外光照射のみの処置では殺菌効果は全く得られなかった。同様の検討を SAIR700 が選択的に結合した MRSA 株、

VISA 株、ムピロシン耐性 MRSA 株に行ったところ、抗体選択的な近赤外光による殺菌効果が誘導された (右図 B)。一方で、抗体選択的な SAIR700 の結合が得られなかった表皮ブドウ球菌、大腸菌などでは殺菌効果を誘導できなかった (右図 C)。また、SAIR700 が選択的に結合にする MRSA 株と結合しない表皮ブドウ球菌株を混在させたサンプルに対して近赤外光を照射すると、MRSA 株のみを抗体選択的に除去することが可能であった (右図 D)。



(2) in vivo における黄色ブドウ球菌に対する光線治療効果

In vitro の検討で SAIR700 を用いた近赤外光照射によって殺菌効果が誘導された MRSA 株 (JKmrSA1) を両鼻腔内に投与したコットンラットに対して、1 週間後に SAIR700 を投与、その後近赤外光を鼻腔内に全身麻酔下で照射した。処置後のコットンラット鼻腔を切除し、組織培養を行った。SAIR700 投与のみのラットでは MRSA の増殖が認められたのに対して、SAIR700 投与後に近赤外光を照射した群では、近赤外光のエネルギー量に依存して殺菌効果が誘導された (下図左)。また、近赤外光照射に伴う鼻腔組織へのダメージは組織学的に明らかでなかった (下図右)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

6. 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：光永 真人

ローマ字氏名：MITSUNAGA, Makoto

研究者番号：40433990

研究協力者氏名：岩瀬 忠行

ローマ字氏名：IWASE, Tadayuki

研究者番号：80385294

研究協力者氏名：西村 尚

ローマ字氏名：NISHIMURA, Takashi

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。