

令和 4 年 4 月 18 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08868

研究課題名(和文)敗血症感染原因菌に対する抗体カクテル療法の確立と治療への応用

研究課題名(英文) Establishment of antibody-cocktail therapy against invading bacteria for sepsis patients

研究代表者

渡邊 伸央 (Watanabe, Nobuo)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：80396928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤耐性菌として知られるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)感染症に対する治療法確立は長年の課題である。MRSAに対して過去に幾つかの抗体が作製されたが、ヒト化抗体として試した臨床試験ではほとんどが無効である。そこで本研究ではi)菌の毒素産生制御系2標的、ならびに細胞壁合成系の中核となる3標的を選定し、計14カ所の配列のペプチドを抗原として、モノクローナル抗体を計25種作製した。しかしいずれの抗体それ自体では目的とした毒素産生抑制活性あるいは菌増殖抑制活性は見られなかった。今後は複数の抗体の組み合わせ、あるいは抗菌剤と併用することによって付加的な抗菌効果が得られるか検討する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において作製した抗MRSA抗体はいずれも単独では当初期待した効果(抗毒素産生作用ならびに抗増殖作用)は見られなかった。しかしこの結果、5種のタンパク質に関しては、今後の標的とすべき配列が絞り込まれたことになる。また、今後は他の抗体ならびに各種の抗菌剤との併用効果を検証することによって付加的な抗菌効果が得られるか検討する予定である。ハイブリドーマは樹立され液体窒素に保管されているため、必要に応じてすぐに抗体の追加産生ならびにヒト化抗体化が可能である。

研究成果の概要(英文)：Establishment of a therapeutic strategy against infectious diseases caused by drug-resistant bacteria including Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) is a long-standing challenge; however, almost no antibody to MRSA has successfully showed effectiveness in the clinical trials. In this study, we targeted 2 master proteins responsible for toxin synthesis and 3 key proteins responsible for cell wall biosynthesis, respectively, and generated a total of 25 monoclonal antibodies in mice. Unfortunately, however, none of them demonstrated expected anti-MRSA activity on its own. However, now it has become possible to assess the anti-MRSA effect of these antibodies in combination with other antibodies and antibiotics etc.

研究分野：感染症

キーワード：モノクローナル抗体 感染症 薬剤耐性 活性抗体

1. 研究開始当初の背景

敗血症などの感染症に対して抗生物質は主要な治療手段である。しかし近年、各種の病原性感染菌は複数の抗生物質に対する多剤耐性を獲得し治療を困難にしている。このような感染症においては、病原感染菌に対する特異的な抗体による治療が有用であると考えられる。

現在多くの病原感染菌の遺伝子配列が明らかとなり、データベースに登録され、遺伝子のどの配列がどのような機能タンパク質に翻訳されるかが明らかになってきている。また実際にこれらの情報に基づいて作製した遺伝子変異体を用いた研究成果が蓄積している。このため、病原菌を培養することなく、予め定めた菌体の標的タンパク質の部位に対応する合成ペプチド等を用いて、抗体を作製することが可能となる。本研究では、抗体カクテル療法確立を目指し、抗菌効果が期待できる標的抗原を選定しモノクローナル抗体を作製しカクテルとし、動物モデルで抗菌活性を検証することを計画した。

2. 研究の目的

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)による肺炎や敗血症などの感染症に対する治療法確立は長年の課題であり、過去に多くの抗MRSA抗体が作製されマウス感染症モデルで有効性が示された。しかし、これらの抗体をヒト化して試した臨床試験ではほとんどが無効となっている。我々はこの現状を、菌体への抗体の単なる結合では除菌は困難であり、抗体の結合により菌の生理機能を阻害できる標的を狙う必要性を考えた(図1)。そこで抗体の結合でMRSAの毒素産生を阻害し得る標的としてquorum sensing系膜タンパク質(AgrBとAgrC)を定めた。MRSAは常時、密度センサー分子(AIP)をAgrBから分泌しており、菌密度上昇によりAIP濃度が閾値を超えると膜上の受容体AgrCが感知し、一群の毒素遺伝子の一斉発現を誘導する。一方、ペプチドグリカンとタイコ酸から成る細胞壁は、菌体内で合成された構成単位が輸送系膜タンパク質(MurJ、LtaA、TarG)を経由して細胞外へ運ばれ重合する。そこで、これらの膜タンパク質の細胞外領域を標的に定め、抗体の結合によって細胞壁合成阻害により増殖抑制能を有する抗体の作製を目指した。

3. 研究の方法

抗体作製: MRSAのUSA300株を標的とした。上記の5種の膜タンパク質のアミノ酸配列をGenBank経由で入手し、トポロジー予測プログラム(SOSUI等)ならびに文献情報をもとに細胞外ドメインを同定した(表1)。各標的ドメインとも、N末端にシステインを付加した13~31残基の合成ペプチドを作製し、マレイミドスクシニミドエステルを用いて抗原としてKLHまたはポリリジンへ結合させ、またハイブリドーマのスクリーニング用抗原としてBSAに結合させた。マウスに免疫を行い、脾臓細胞とP3Xミエローマと融合させハイブリドーマを樹立し、ヌードマウスに移植して腹水を作製した。続いてProtein A改変体樹脂(KanCapA)を用いてIgGを精製した。これまで毒素発現センサーであるAgr系が5標的10種、細胞壁合成系も5標的10種の抗体作製が完了した。抗原ペプチドの配列は下記に示す。

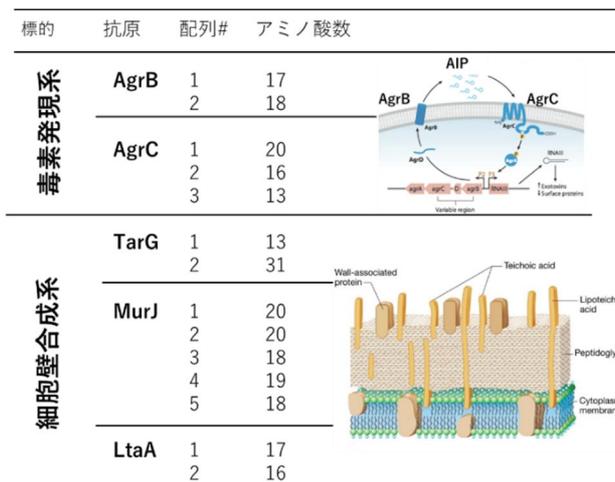


図1 今回作製を試みた抗MRSAモノクローナル抗体

AgrBは菌体からの菌密度センサー分子(AIP)分泌に必要であり、AgrCはAIPの受容体である。菌密度が高まるとAIPの局所濃度が上昇し、AgrCが感知する。この結果、溶血、細胞溶解に関わる毒素遺伝子が一斉に発現する(quorum sensing)。したがってAgrBまたはAgrCへの抗体の結合は、毒素遺伝子の発現を阻害できる可能性がある。

MRSA細胞壁は水平方向へペプチドグリカン層が形成され、垂直方向へタイコイン酸が挿入され構造が強化されている。いずれも細胞内で基本ユニットが合成され、細胞膜の輸送タンパク質を通過して細胞外へ運び出されて重合する。前者の輸送にはMurJが関与し、後者の輸送にはTarGとLtaAが関与する。抗体によるこれらの輸送タンパク質の阻害により、細胞壁合成が阻害されることが期待される。

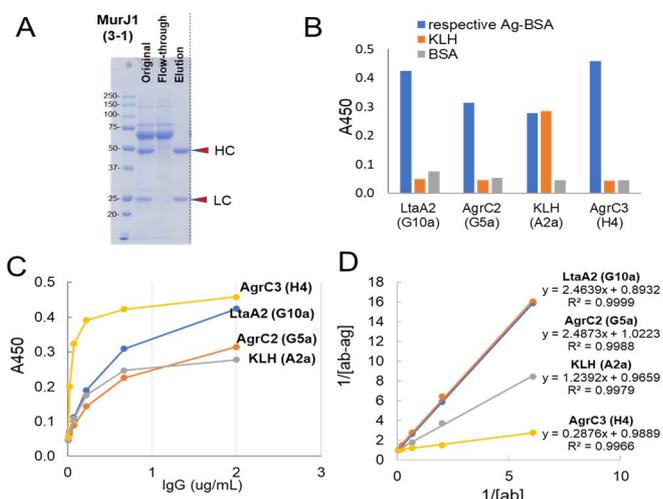


図2 抗MRSAモノクローナル抗体の精製ならびに特異性・反応性の検証(A) KanCapAを用いた腹水からのIgGの精製1例としてMurJ1(3-1)を示す。最終生成物はIgG重鎖(HC)と軽鎖(LC)のみであることが確認された。(B) ELISAによる特異性の確認。精製後のIgGは、ELISAによって抗原ペプチド-BSA結合物、KLH(免疫時のキャリアタンパク質)またはBSAと反応させた。KLHとは反応しないことが確認された。(C) ELISAによる抗体力価の測定。(D) 解離定数の測定(C)で求めた値をDouble ReciprocalプロットによってKdを算出した。

AgrB [EWU33556.1]
 AgrB1 (80-99) CTNLTFYLI RRHAHGAHAPSS
 AgrB2 (139-158) CSVYAPAATKKKPIPVRLIKR

AgrC [YP_500745.1]
 AgrC1 (12-31) CSGIKYSKLDYFFIIVISTLS
 AgrC2 (152-167) CYSQINSDEAKVIRQYS
 AgrC3 (83-95) CIYAYITKISDSIF

MurJ [WP_064131809.1]
 MurJ1: (79-98) CAYKVSQKFYKSSFIVMSITG
 MurJ2: (283-302) CGIPSQLQDIFNMLNMSTNK
 MurJ3: (114-131) CELTLARNIHDKNGWSVDD
 MurJ4: (268-287) CNLVDQFTHNGALSLVGIPS
 MurJ5: (365-385) CYGYDPIVLGHDPNHDGSR

LtaA [WP_001154222.1]
 LtaA1 (231-247) CLPTYATKVINVSTIEYT
 LtaA2 (359-374) CITQFTNNLNNTFYFSA

TarG [WP_094321475.1]
 TarG1 (56-68) CGLGIRSNAPIHGV
 TarG2 (217-237) CYFIAESYRAAILYHEWYFMDH
 TarG3 (211-240) CMKYNPVYFIAESYRAAILYHEWYFMDHWKL

4. 研究成果

抗体作製：14種のペプチドを用いて作製を試みた結果、11種の抗原に対して、特異性ならびに親和性において十分な抗体が得られた(図2、表1)。すなわち、抗体はELISAにおいて抗原ペプチドを結合させたBSAと反応するが、免疫時のキャリアタンパク質に用いたKLHやBSAそのものとは反応しないことを確認した。また、抗原ペプチド-BSAに対する抗体の力価(Kd値)は0.1~1 nMの範囲であり、使用上ほぼ問題ないものと考えられた。

抗菌活性評価：培養密度上昇が引き金となりAgr系によって発現が制御される毒素遺伝子のレベルをqPCRで測定した。対象は、溶血に関わる α -toxin、白血球崩壊毒素であるPanton-Valentine leukocidin (PVL)、RNAIII等とした。しかし試した7種の抗体にはいずれの毒素遺伝子発現に対しても抑制作用が全く見られなかった(図3A、溶血毒素である α -毒素遺伝子hlaのみ掲載)。次に、細胞壁合成系に対する抗体の効果を調べた。培養時に抗体を添加し増殖阻害作用の有無を評価した。しかし試した11種の抗体にはいずれも抑制効果が無いことが判明した(図2B、LtaA2抗体に抑制が見られたが再現性が無いことを確認した)。さらに抗生物質感受性試験で用いられる阻止円形成試験での評価を行った。増殖抑制作用があれば、陽性対照に用いたMRSAにも有効な抗生物質Vancomycinのように、ろ紙の周りに円形の増殖抑制領域が現れることが期待されるが、いずれの抗体にも抑制効果が全く無いことが再確認された(図3C-E、表1)。ペプチド抗原による抗体それ自体に抗菌活性が見られなかったため、MRSAの細胞壁をリゾスタフィンで消化し、膜タンパク質を抽出し、これを抗原として同様にモノクローナル抗体を作製した。これらの抗体の増殖阻害活性を阻止円形成試験で調べたが、抑制効果は見られなかった(図3C-E、表1)。

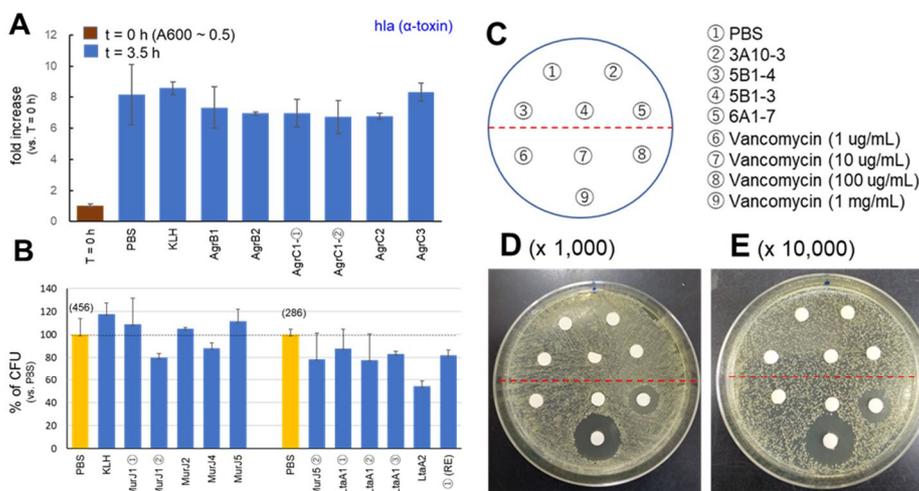


図3 抗MRSAモノクローナル抗体の抗菌活性評価

(A)毒素遺伝子発現誘導に対する効果：対数増殖期(OD600 = 0.5)のMRSAのLB液体培地に各抗体を0.2 mg/mLで添加し(t = 0 h)、さらに3.5時間培養し毒素遺伝子の発現をリアルタイムPCRで調べた。発現量は3.5時間培養前の値の倍数とした。 α -トキシンの結果を表示。(B)増殖阻害活性：対数増殖期手前のMRSAのLB液体培地に各抗体を0.2 mg/mLで添加し、3.5時間液体培地で培養した後、プレートに塗布して一晚培養しコロニー数(CFU)を計測した。(C)阻止円法によるモノクローナル抗体のMRSAの増殖抑制能の測定：LB液体培地で一晚培養したMRSAを1,000倍または10,000倍に希釈し、この1 mLを10 cmのLB寒天培地へ播種した。ろ紙(直径5 mm)をのせ、抗体溶液(2 mg/mL)を10 μ L滴下し、一晚培養した(スポット ~)。陽性対照として1~1000 ug/mLのVancomycinを同様に滴下した(スポット ~)。 (C)-(E)はMRSAの細胞膜タンパク質に対する抗体4種の結果を表示した。

今回の研究で作製した抗体の結果を表1にまとめた。

表1 本研究で作製した抗MRSA抗体の特異性ならびに抗菌活性のまとめ

	Target (position)	clone	Isotype	Specificity	Kd (nM)		Effects on QS gene expression	Effect on growth	
					DR	SP		colony formation	inhibitory circle
control	KLH	F6-1	G2a,	OK	23.6	12.4	No	No	No
		A2a	G2a,	OK	0.38	0.38	No	-	-
Quorum sensing	AgrB1	E3	G1,	OK	1.23	2.58	No	-	-
		G10	G1,	OK	1.27	2.78	No	-	-
	AgrB2	1F	G1,	OK	1.07	1.05	No	-	-
	AgrC1	F5-3	G1,	OK	1.01	1.11	No	-	-
		F4	G1,	unsuccessful			-	-	-
	AgrC2	G5a	G1,	OK	0.82	0.97	No	-	-
		E10	G2a,	OK	0.16	0.18	No	-	-
AgrC3	H4	G1,	OK	0.15	0.16	No	-	-	
cell wall synthesis	LtaA1	A3-4	G1,	OK	0.56	0.63	-	No	No
		G3-4	G1,	OK	0.53	0.57	-	No	No
		2	G2a, (?)	OK	209	37	-	-	-
	LtaA2	A2	G1,	OK	0.57	0.65	-	No	No
		G10a	G1,	OK	0.89	0.98	-	No	No
	MurJ1	3-1	G1, (?)	OK	0.16	1.11	-	No	No
		4-1	G1,	OK	0.38	0.42	-	No	No
	MurJ2	A2	G2a,	OK	0.37	0.41	-	No	No
	MurJ3			unsuccessful			-	-	-
	MurJ4	3-1	G1,	OK	0.54	0.62	-	No	No
	MurJ5	2	G2a, (?)	OK	1.07	1.14	-	No	No
		4	G1,	OK			-	No	No
TarG1	H7	G1,	OK	0.26	0.29	-	No	No	
TarG2	B9F7	-	unsuccessful			-	-	-	
Cell wall proteins		3A10-3	-	OK	0.21	0.21	-	-	No
		5B1-4	-	OK	0.41	0.47	-	-	No
		5B1-3	-	OK	0.48	0.49	-	-	No
		6A1-7	-	OK	0.17	0.17	-	-	No

抗体のSpecificity：抗原のキャリアタンパク質に用いたKLHならびに遊離BSAとは反応せず、BSAに結合させた抗原ペプチドと特異的に反応

親和性： 解離定数(Kd)はdouble reciprocal plot (DR) ならびにScatchard plot (SP)にて算出した。

クオラム センシング(QS)によって制御を受ける毒素遺伝子の発現はリアルタイムPCRにて測定した。

菌増殖(growth)はコロニー数と阻止円法(inhibitory circle)で測定した。

【謝辞】

本研究においてご指導、ご協力くださった東海大学医学部救命救急医学・中川儀英教授ならびに梅澤和夫准教授、分子生命科学・亀谷美恵准教授ならびに大島志乃氏、基盤診療学系臨床検査学・良原栄策教授、生体防御学・大谷郁准教授、生命科学統合支援センター・田中正之博士に感謝いたします。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Watanabe N, Kidokoro M, Tanaka M, Inoue S, Tsuji T, Akatuska H, Okada C, Iida Y, Okada Y, Suzuki Y, Sato T, Yahata T, Hirayama N, Nakagawa Y, Inokuchi S.	4. 巻 20
2. 論文標題 Podoplanin is indispensable for cell motility and platelet-induced epithelial-to-mesenchymal transition-related gene expression in esophagus squamous carcinoma TE11A cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Cell International	6. 最初と最後の頁 263
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12935-020-01328-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe N, Kidokoro M, Suzuki Y, Tanaka M, Inoue S, Tsukamoto H, Hirayama N, Hsieh PW, Tseng CP, Nakagawa Y, Inokuchi S	4. 巻 14
2. 論文標題 A pull-down and slot blot-based screening system for inhibitor compounds of the podoplanin-CLEC-2 interaction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0222331
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0222331	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Ishihara T, Watanabe N, Inoue S, Aoki H, Tsuji T, Yamamoto B, Yanagi H, Oki M1, Kryukov K, Nakagawa S, Inokuchi S, Ozawa H, Imanishi T	4. 巻 14
2. 論文標題 Usefulness of next-generation DNA sequencing for the diagnosis of urinary tract infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Discov Ther.	6. 最初と最後の頁 42-49
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5582/ddt.2020.01000	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Watanabe N, Kryukov K, Nakagawa S, Takeuchi JS, Takeshita M, Kirimura Y, Mitsuhashi S, Ishihara T, Aoki H, Inokuchi S, Imanishi T, Inoue S	4. 巻 13
2. 論文標題 Detection of pathogenic bacteria in the blood from sepsis patients using 16S rRNA gene amplicon sequencing analysis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0202049
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0202049. eCollection 2018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tamada K, Nakajima S, Ogawa N, Inada M, Shibasaki H, Sato A, Takasawa R, Yoshimori A, Suzuki Y, Watanabe N, Oyama T, Abe H, Inoue S, Abe T, Yokomizo T, Tanuma S.	4. 巻 511
2. 論文標題 Papaverine identified as an inhibitor of high mobility group box 1/receptor for advanced glycation end-products interaction suppresses high mobility group box 1-mediated inflammatory responses.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 665-670
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.01.136.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	井上 茂亮 (Inoue Shigeaki) (30582209)	東海大学・医学部・准教授 (32644)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------