

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15148

研究課題名(和文) PsIGによるカンジダバイオフィーム感染症に対する新規治療法開発

研究課題名(英文) Development of New strategy for Candida biofilm infection by hydrolase PsIG

研究代表者

高園 貴弘 (Takazono, Takahiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：30716569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：C. albicansを始めとしたカンジダ属は、体内に留置したカテーテルなどに付着しバイオフィームを形成することで感染症を引き起こす。本研究では、緑膿菌が保有するPsIGという加水分解酵素が、C. albicansのバイオフィームに対して形成阻害効果を示すことをin vitro, in vivoで確認した。作用機序として、バイオフィーム形成早期に、カンジダの細胞壁に存在するマンナンに結合し、Als-3に関連する凝集を阻害することで効果を発揮していることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、C. albicansによるカテーテル関連感染症の予防に有用なカテーテルコーティング剤の開発に有用である可能性がある。このような技術の報告は限られており、もし、今後臨床応用できれば、カンジダ関連血流感染症でもっとも多いC. albicansによるカテーテル関連感染症を減らすことができる可能性がある。それにより、カンジダ血症による死亡を抑制できる可能性があり、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Candida albicans is the most common species of Candida spp. And It is one of the main pathogens which cause catheter related blood stream infection by making biofilm on medical devises. PsIG is one of the hydrolase which P. aeruginosa possesses. In this study, we evaluated and found the effect of hydrolase PsIG on Candida biofilm in vitro and in vivo. We found that it binds to the mannan of C. albicans and interfere the Als-3 mediated aggregation of hyphae during biofilm formation.

研究分野：感染症学

キーワード：Biofilm

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カンジダによる血流感染症は、様々な診療科領域において血流感染症の原因菌として 4 番目に多く¹、その死亡率は 40%にも上ると報告されている²。カンジダ属は、酵母形で血流に入り、人工デバイスに付着し、そこで菌糸を伸ばしバイオフィームと呼ばれる菌体と細胞外マトリックスによる感染巣を形成し、そこから発芽した酵母形の細胞が血流に乗りさらに感染を拡大すると考えられている。

さらに、形成されたバイオフィームが鎧のような働きをし、浮遊細胞での薬剤感受性検査(いわゆる通常の薬剤感受性検査)と比較し、抗真菌薬への抵抗性を獲得することが知られている³。つまり、抗真菌薬による治療だけではなく、バイオフィーム形成を如何に阻害・予防するかということがカンジダによる血流感染症を治療する上で重要となってくる。

2. 研究の目的

緑膿菌の細胞壁内に存在する PsIG は、グリコシドヒドロラーゼ (glycoside hydrolase) であり、緑膿菌の細胞外マトリックスの主要構成成分である PsI の生合成に関与していると同時に、用量依存性に緑膿菌のバイオフィームを分解する作用が報告されている。カンジダは緑膿菌同様にバイオフィーム感染症をおこす病原体であり、研究代表者は、PsIG がカンジダバイオフィームに対しても合成阻害効果を有すると仮説を立てた。実際にこれまでの研究で PsIG が、*Candida albicans* バイオフィームの形成阻害作用を持つことを in vitro の実験で確認した。本研究計画はその作用機序を解明し、in vivo での効果を確認することを目的としている。

3. 研究の方法

PsIG は、グリコシドヒドロラーゼ (glycoside hydrolase) であり、緑膿菌の細胞外マトリックスの主要構成成分である PsI の生合成に関与しており、緑膿菌のバイオフィーム分解作用が報告されている⁴。申請者は、「PsIG がカンジダバイオフィームに対しても合成阻害効果を有するのではないか」と仮説を立てた。

これまでの研究成果として、*C. albicans* SC5314 を、緑膿菌から精製・抽出された PsIGhydrolase (以下 PsIGh) 希釈液存在下に培養することで、*C. albicans* のバイオフィーム合成を阻害出来ることを確認した。

また、そのバイオフィーム合成阻害作用は用量依存性であり、その IC50 はわずか 10-20nM と、極めて低い濃度で十分なバイオフィーム合成阻害作用を有することを確認し、再現性も得られた。さらに、PsIGh をポリスチレンプレートに固定し、その後 PBS で複数回洗浄した後に、*C. albicans* を培養させたところ、PsIGh 希釈液存在下と同様にバイオフィーム合成を阻害 (予防) できることを確認した。

(1) 作用メカニズムの解明

研究代表者は、PsIG がカンジダの菌体に結合し物理的にバイオフィーム合成阻害作用を發揮している可能性を考えている。それを評価するため、PsIG-Ab を一次抗体として使用し、カンジダ酵母および菌糸への PsIGh 結合の有無や局在について位相差顕微鏡を用いて観察する。また、カンジダ細胞壁の特徴から、PsIGh は細胞壁のマナンへ結合している可能性が高く、マナン欠損株 sextuple gene mutant of Mnn2 (Dr. Gow, University of Aberdeen より譲渡) を用いて Wild type と比較観察を行う予定としている。

もう一つの作用メカニズムとして、PsIG が、バイオフィーム形成に関与する遺伝子発現を抑制している可能性を疑っている。そこで、HWP1 や、agglutinin-like sequence (ALS) family など菌糸の接着やバイオフィーム形成に関与する遺伝子発現を PsIG と共培養下に RNA を抽出しマイクロアレイで網羅的に評価する。

(2) PsIGh コーティングカテーテルの作成と、in vitro でのバイオフィーム合成阻害作用の確認。

(3) in vivo での評価

まず、ラットへ PsIGh を静脈内投与し、その毒性評価を行う。(なお、PsIGh のマウス肺内への投与では毒性を生じないことは確認済みである。)

ラット頸静脈カテーテル留置モデルの作成⁵

PsIGh コーティングカテーテル (vs 非コーティングカテーテル留置) をラット頸静脈に留置し、経静脈的に *C. albicans* を投与し、生存率、末梢血生菌数、臓器生菌数 (肝・脾・腎) カテーテルへのバイオフィーム形成量、生菌数を比較検討する。

4 . 研究成果

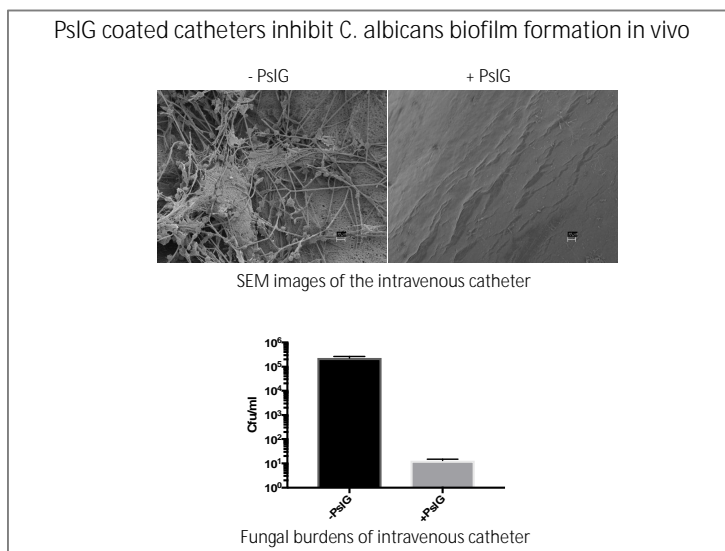
(1) PsIG は、カンジダ属の他の菌種のバイオフィーム阻害作用を示さないことから、*C. albicans* 細胞壁の特有の構成成分に作用していることが考えられた。また、時間差で培養を実施することにより、PsIG はバイオフィーム合成の初期にのみ作用していることが判明した。

電子顕微鏡での観察上は、PsIG 添加後、培養した *C. albicans* とコントロールにおいて形態学的な差は確認できなかった。位相差顕微鏡での観察では、PsIG 抗体で染色した *C. albicans* では、菌糸に沿って、PsIG の沈着が確認できた。しかし、酵母形態には結合していないことが確認できた。また、Flowcytometry を使った検討では、PsIG は、als3 遺伝子というバイオフィームの凝集に関与するタンパク質に関わる遺伝子をノックアウトした *C. albicans* には結合しないこと、O linked mannan の欠損株には結合しないことが確認できた。このことから、PsIG は、Als3 に結合すること、また、O linked mannan に結合することで、バイオフィーム合成を阻害し

ている可能性が考えられた。

(2) PsIG コーティングカテーテルにおいても、*C. albicans* のバイオフィーム形成阻害作用があることを Crystal violet assay で確認した。

(3) その後、ラットの中心静脈カテーテル感染モデルにおいて、PsIG コーティングカテーテルでは、*C. albicans* 感染後にもバイオフィーム形成が阻害できていることが、電子顕微鏡像、生菌数の評価において、下図の様に抑制できていることが確認できた。



本研究により PsIG の医療デバイスへのコーティングにより、*C. albicans* による血流感染症の予防効果が期待出来ると考えられた。

引用文献

1. (Clinical Infectious Diseases 2004; 39:309-17)
2. PLoS One. 2017 Apr 18;12(4):e0175172.
3. Antimicrob Agents Chemother. 2002 Jun;46(6):1773-80.
4. Cell Research (2015) 25:1352-1367
5. Infect Immun. 2004 Oct;72(10):6023-

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takahiro Takazono
2. 発表標題 The bacterial glycoside hydrolase PsIG inhibits Candida albicans biofilm formation in vitro and in vivo
3. 学会等名 Candida and Candidiasis 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高園貴弘
2. 発表標題 カンジダバイオフィーム感染症に対する新規治療法の開発
3. 学会等名 第67回日本化学療法学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高園貴弘
2. 発表標題 カンジダバイオフィームに対する加水分解酵素PsIGの阻害効果
3. 学会等名 第33回日本バイオフィーム学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------