

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (B)	
研究期間：2008～2009	
課題番号：20790714	
研究課題名 (和文)	難治性のバイオフィルム関連感染症に対する新しい治療法の開発
研究課題名 (英文)	Development of new strategies for intractable infections associated with microbial biofilms.
研究代表者	金子幸弘 (KANEKO YUKIHIRO)
	国立感染症研究所・生物活性物質部・研究員
	研究者番号：90469958

研究成果の概要 (和文)：  
 難治性のバイオフィルム関連感染症に対する新しい治療法の開発のため、緑膿菌およびカンジダを用いて、基礎的および応用的検討を行った。

研究成果の概要 (英文)：  
 In order to invent new strategies for intractable infections associated with microbial biofilms, basic and applicable investigation was performed.  
 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	0	1,700,000
2009 年度	1,600,000	0	1,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

研究分野：感染症

科研費の分科・細目：

キーワード：難治性感染症、バイオフィルム、新規治療、ガリウム、鉄、緑膿菌、真菌、ストレス応答

1. 研究開始当初の背景  
 バイオフィルムに関連した感染症は多様であり、全ての細菌性感染症の 65%以上が、バイオフィルムに関連していると言われていいる。また、カンジダなどの真菌においてもバイオフィルムが重要であることが認識されつつある。さらに、これらの感染症は難治性かつ重篤であり、社会的にも大きな問題である。

のバイオフィルムにおいては、ガリウム (Ga) が鉄の利用阻害を介してバイオフィルムの形成を阻害することが分かってきた。緑膿菌に対する Ga 治療の応用を目的として、抗菌薬との併用効果、および Ga の毒性や作用機序について検討した。  
 また、その他の治療標的の探索と真菌のバイオフィルムに関する基礎的な検討も同時に行った。

2. 研究の目的

研究代表者は、従来、バイオフィルムに対する治療の開発に従事してきた。緑膿菌

3. 研究の方法

- (1) 緑膿菌に対する Ga 治療の応用
- ① 既存抗菌薬との併用効果

菌株 PA01 株を用い、既存抗菌薬（トブラマイシン、シプロフロキサシン、メロペネム、コリスチン）と Ga の併用効果を評価した。

② 安全性の評価

細胞毒性の評価: 培養細胞に Ga を添加後、経上皮電気抵抗値 (TER) の測定により上皮の傷害の程度を評価した。

Ga をマウスに経鼻投与し、肺内 Ga の濃度、肺の炎症の程度、呼吸機能の評価を行った。

③ 耐性機序

トランスポゾンニュータゲネシスを用いて、Ga 耐性を探索した。また、得られた耐性菌の遺伝子を同定し、同定した遺伝子の欠失変異株を作成してその性状を評価した。

(2) バイオフィルムにおけるストレス応答の検討

① 緑膿菌バイオフィームにおけるストレス応答の役割

緑膿菌のトランスポゾンライブラリーの中から、トブラマイシンの感受性に関与する遺伝子を同定したところ、ストレス応答遺伝子であることが判明した。同遺伝子の欠失変異株を作成し、その性状を評価した。

② 真菌バイオフィームにおけるストレス応答と耐性

バイオフィームにおける耐性にはストレス応答が関与していることが示唆されたため、カンジダのストレス応答因子である Hsp90 関連の遺伝子を阻害し、薬剤感受性を評価した。

4. 研究成果

(1) 緑膿菌に対する Ga 治療の応用

① 既存抗菌薬との併用効果

既存抗菌薬（トブラマイシン、シプロフロキサシン、メロペネム、コリスチン）と Ga の併用では、いずれも相加、相乗効果を認めなかった。

② 安全性の評価

Ga は、培養細胞の TER をほとんど変化させなかった (図 1)。このことから Ga の細胞毒性はほとんどないと推測された。

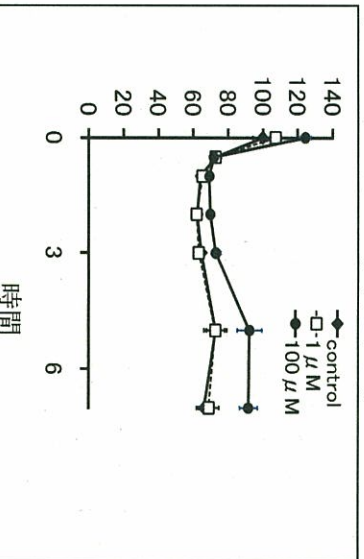


図 1 Ga の TER に及ぼす影響  
Ga は TER にほとんど影響しなかった。

動物での評価でも、Ga は、肺の炎症を惹起せず、呼吸機能にもほとんど影響を与えなかった。

これらの結果から、Ga は比較的安全な治療法となりうることが判明した。これまでに同等の検討は行われておらず、非常に有意義である。

③ 耐性機序

トランスポゾンニュータゲネシスによる Ga 耐性菌の探索で、鉄輸送関連遺伝子である ABC の遺伝子を同定した。これらの遺伝子の欠失変異株を作成し、Ga 感受性を評価した (表 1)。

表 1 野生株 (PA01) および鉄輸送関連遺伝子 AB 欠損株 (PA01  $\Delta$ AB) の Ga 感受性

	IC90	Ga [ $\mu$ M]
PA01	10	
PA01 $\Delta$ AB	160	

また、バイオフィームにおける耐性を評価したところ、バイオフィームではほとんど耐性に関連していないことが判明した (図 2)。

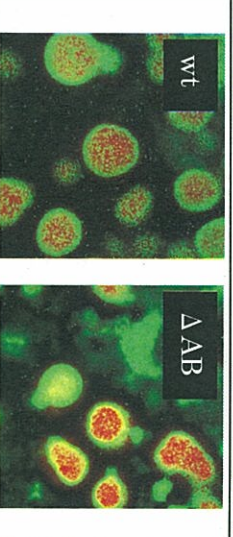


図 2 野生株 (wt) および欠損株 ( $\Delta$ AB) のバイオフィームの Ga 感受性 Ga を 100  $\mu$ M 加えたのち、死菌を赤に染色したところ、ともに中心部の菌が感受性を示した。

本成果は、緑膿菌では、Ga 耐性に関する初めての発見である。これまで Ga の作用機序の詳細は知られていないため、Ga の作用機序を知る糸口となる可能性が高く、新たな治療薬を探索する手掛かりともなることが期待される。

(2) バイオフィームにおけるストレス応答の検討

① 緑膿菌バイオフィームにおけるストレス応答の役割

緑膿菌のトランスポゾンライブラリーの中から、トブラマイシンの感受性に関与する遺伝子を同定したところ、*angR5* という一連のストレス応答遺伝子であることが判明した。同遺伝子の欠失変異株は、正常にバイオフィームを形成するが、トブラマイシンに対しては野生株よりも感受性であることが判明した (図 3)。

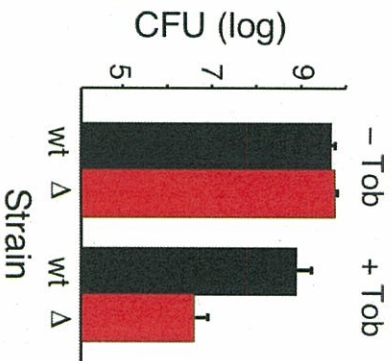


図3 *amgR* 欠損株 ( $\Delta$ ) は、野生株 (wt) と比較してトブラマイシン (Tob) 感受性である。

② 真菌バイオフィームにおけるストレス応答と耐性

カンジダのストレス応答因子である Hsp90 関連の遺伝子を阻害したところ、ポリコナーールの作用を増強させ、ミカフアンギンの paradoxical effect も減弱させることが明らかとなった (図4)。

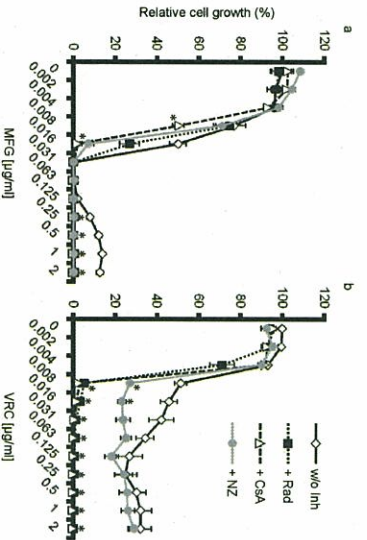


図4 Hsp90 阻害剤 (Rad) はミカフアンギン (MFG) およびポリコナーール (VRC) の作用を増強させた。他のストレス応答阻害剤 (CSA、NZ) も同様の効果を示した。

また、カンジダのバイオフィームにおいて Hsp90 阻害剤はミカフアンギンの効果を増強させることが判明した。他のストレス応答阻害剤 (CSA、Cer、NZ) も同様の効果を示した (図5)。

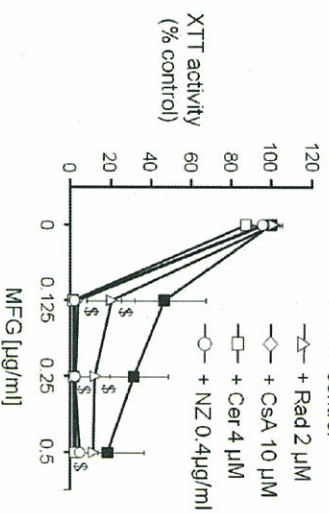


図5 Hsp90 阻害剤 (Rad) は、バイオフィームに対するミカフアンギン (MFG) の効果を増強した。他のストレス応答阻害剤 (CSA、Cer、NZ) も同様の効果を示した。

①および②の結果から、緑膿菌および真菌の双方において、ストレス応答因子が耐性に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。このようなストレス応答が、既存の抗菌薬の効果を増強するための治療標的となりうる可能性が示唆された。

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 2 件)

- ① Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. The effects of an hsp90 inhibitor on the paradoxical effect. *Jpn J Infect Dis.* 2009 Sep;62(5):392-3.
- ② Lee S, Hinz A, Bauerle E, Angermeyer A, Juhaszova K, Kaneko Y, Singh PK, Manoil C. Targeting a bacterial stress response to enhance antibiotic action. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 25;106(34):14570-5.

【学会発表】 (計 13 件)

- ① 金子幸弘、大野秀明、今村圭文、河野茂、宮崎義継 ストレス応答阻害による *Candida albicans* の抗真菌薬耐性の制御 真菌症フォーラム第 11 回学術集会 2010 年 3 月 東京
- ② 金子幸弘、大野秀明、宮崎義継、河野茂 緑膿菌のガリウム耐性機序とガリウム耐性の影響についての検討 第 44 回緑膿菌感染症研究会 2010 年 2 月 東京
- ③ Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Effects of antifungal combinations against *Candida* biofilms and stress responses. *Interscience*

- Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2009年9月 米国 サンプラソンスコ
- ④ 金子幸弘、大野秀明、宮崎義継、Pradeep Singh 難治性緑膿菌呼吸器感染症に対するガリウム治療の呼吸機能等に対する影響 第49回日本呼吸器学会学術講演会 2009年6月 東京
- ⑤ 金子幸弘、大野秀明、宮崎義継、河野茂 難治性緑膿菌感染症に対するガリウム治療の効果および耐性機序に関する検討 第57回日本化学療法学会総会 2009年6月 東京
- ⑥ Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Combination therapy of micafungin with voriconazole and amphotericin B against *Candida* biofilms. International Society for Human and Animal Mycology. 2009年5月 東京
- ⑦ Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Hsp90 inhibitor preferentially attenuates postnadir resistance to micafungin and tolerance to voriconazole of *Candida albicans*. International Society for Human and Animal Mycology. 2009年5月 東京
- ⑧ Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Hsp90 inhibitor preferentially attenuates postnadir resistance to micafungin and tolerance to voriconazole of *Candida albicans*. General meeting of American Society for Microbiology. 2009年5月 米国 フライデルフアイア
- ⑨ Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Voriconazole attenuates the effect of micafungin against *Candida* biofilms in vitro possibly via stress responses. General meeting of American Society for Microbiology. 2009年5月 米国 フライデルフアイア
- ⑩ 金子幸弘、大野秀明、今村圭文、河野茂、宮崎義継 *Candida albicans* の biofilm に対する micafungin と voriconazole、amphotericin B との併用効果 第83回日本感染症学会総会・学術講演会 東京 2009年4月
- ⑪ 金子幸弘、緑膿菌バイオフィームに対するガリウム (Ga) の作用についての検討、第43回緑膿菌感染症研究会、2009年2月 京都
- ⑫ 金子幸弘、*Candida albicans* の biofilm に対するミカファンジンとボリコナゾール、アムホテリジン B との併用効果、第52回日本医真菌

学会・第7回国際クリプトコックス  
会議 2008年9月 長崎  
金子幸弘、難治性緑膿菌呼吸器感染  
症に対するガリウム治療の試み、第  
48回日本呼吸器学会、2008年6月  
神戸

【図書】(計0件)

【産業財産権】

○出願状況(計0件)

【その他】

ホームページ等 該当せず

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子幸弘 (KANEKO YUKIHIRO)

国立感染症研究所生物活性物質部

研究者番号: 90469958