

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23790925

研究課題名(和文) 環状ジグアニル酸を介する病原性制御機構をターゲットとした新規感染症治療法の探索

研究課題名(英文) Target of alternative antimicrobial approach: bacterial pathogenesis regulated by cyclic di-GMP signaling system

研究代表者

木村 聡一郎 (KIMURA, Soichiro)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：60408870

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)：近年、病原細菌の薬剤耐性化が深刻な問題となっており、治療の難渋化や医療経済の悪化を招いている。よって既存の抗菌薬療法とは異なるコンセプトを基に、治療・予防戦略を執ることが急務となっている。そこで本研究では、抗菌薬の“殺菌性”に着目するのではなく、宿主の病態に大きく関わる細菌の“病原性”を抑制することによる新たな治療法を提案することを目的とし種々の検討を加えた。その結果、既存の抗菌薬であるアジスロマイシンは緑膿菌の生育を抑制する抗菌薬であるが、低濃度で使用することにより病原性制御機構(cyclic di-GMPシグナル伝達機構)を抑制することがわかった。

研究成果の概要(英文)：Macrolides have been reported to exert a variety of effects on both host immunomodulation as well as repression of bacterial pathogenicity. In this study, we report that the 3',5'-cyclic diguanylic acid (c-di-GMP) signaling system, which regulates virulence to the host, was affected by the macrolide azithromycin (AZM). Using DNA microarray analysis, we selected two *Pseudomonas aeruginosa* genes related to c-di-GMP metabolism that were significantly affected by AZM treatment. The expression of these genes was significantly repressed by AZM in a time- and dose-dependent manner, whereas no difference in *pde* gene expression was observed in the absence of AZM. In-frame deletion of the *pde* gene affected both virulence factors and the quorum-sensing system and significantly decreased total bacteria in a mouse pneumonia model compared to the wild-type strain. These results suggest that macrolides affect virulence factor production via the c-di-GMP regulatory system.

研究分野：微生物・感染症学

キーワード：感染症 緑膿菌 肺炎 マウス Quorum sensing cyclic di-GMP

1. 研究開始当初の背景

(1) これまでに多数の抗菌薬が開発されてきたが、開発とともに薬剤耐性菌が出現し、2004年の時点では約70%の病原細菌が少なくとも1つの抗菌薬に対して耐性を獲得していると推定されている。このことから、従来の“抗菌薬の殺菌性”を基に新規治療薬を開発することは非常に厳しい状況にあり、かつ既存の抗菌薬を使用した感染症治療においても新たな治療戦略を模索することが急務となっている。

(2) マクロライド系抗菌薬は、細菌リボソームをターゲットとする静菌的抗菌薬であるが、これとは異なる新たなターゲット分子もいくつか報告されている。申請者の所属する研究グループでは、本来抗菌活性を示さない緑膿菌に対して低濃度のアジスロマイシンを作用させることによって、後述の Quorum-sensing (QS) 機構を介した病原因子の抑制効果を報告している

(3) 多くの細菌は、QS 機構と呼ばれる菌と菌との細菌間コミュニケーションシステムを介して自身のおかれた環境を認識(主に細菌密度)し、応答(病原性因子の発現)することが知られている。一方、細胞内情報伝達分子として環状ビス(3'-5')ジグアニル酸(3,5-cyclic diguanylic acid: c-di-GMP)を介した病原性の制御機構は、近年注目されている新たな病原因子制御機構であり、細胞内のc-di-GMPの濃度により病原性等が制御されている。

2. 研究の目的

(1) これまでの抗菌薬の開発が“細菌に対する殺菌性の向上”を目的としていたが、薬剤耐性菌などの問題により開発が滞っているのが現状である。一方、“細菌の病原性”に着目しそれを抑制することができれば、宿主の免疫機構とともに細菌を排除することが可能である。よって、上記 QS 機構や c-di-GMP シグナリング伝達機構は病原性制御機構であるため、新たな化学療法のターゲット分子として機能する可能性が高い。

(2) 新たに候補分子を選抜するのではなく、既に市販され安全性が確保されており、かつ本来の抗菌力とは異なる新規な作用が発見されつつあるマクロライド系抗菌薬を候補化合物として用いることにより、迅速に治療法の評価を行うことができる。

(3) 上記(1)と(2)の背景から、既存のマクロライド系抗菌薬を中心に、緑膿菌の病原性制御機構(QS 機構および c-di-GMP シグナル伝達機構)に対する作用を検討する。

3. 研究の方法

(1) 候補遺伝子の選抜および遺伝子欠損株

の作出：予備的検討により選抜された2つの候補遺伝子について、それらの機能およびマクロライド剤への反応性を考慮し、遺伝子欠損株を作製する。

(2) 遺伝子欠損株の評価：候補遺伝子は、病原性制御機構に関わる主要な遺伝子であるため、遺伝子欠損により病原性に強く影響を及ぼすと予測される。そこで、緑膿菌の主要な病原因子に対して及ぼす影響を定量的 realtime-PCR 法により測定する。

(3) マウス感染モデルを用いた候補遺伝子の評価：マウス肺炎感染モデルを使用して、遺伝子欠損株の評価を行う。具体的には、遺伝子欠損株もしくはその野生株をマウスに経気道的に感染させ、感染細菌数、各種サイトカインの変動、病理所見などから総合的に遺伝子欠損の影響を評価する。

4. 研究成果

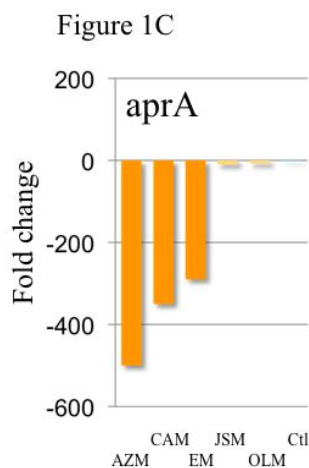
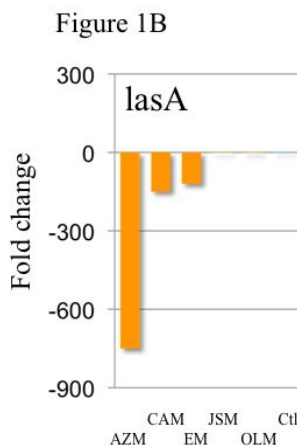
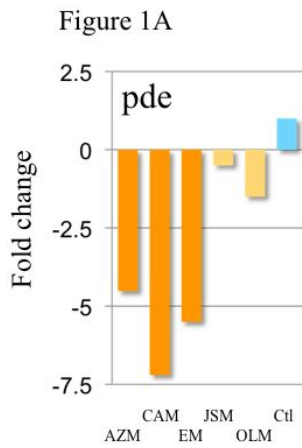
(1) これまでに我々は、低濃度のアジスロマイシンが緑膿菌の QS 機構に影響を及ぼすことを、DNA マイクロアレイを用いて検討し報告してきた。一方、緑膿菌のゲノムデータベース上では、40種の c-di-GMP 関連遺伝子が公開されている。そこで既に実施済みの上記 DNA マイクロアレイのデータおよび定量的リアルタイム PCR 法を用いて、アジスロマイシンが c-di-GMP 関連遺伝子に対して影響を及ぼすかどうかを調べたところ、緑膿菌の全 5500 遺伝子の中から1つの c-di-GMP 合成酵素遺伝子と1つの c-di-GMP 分解酵素遺伝子の発現に大きく影響を及ぼすことが分かった。またアジスロマイシンに対して濃度依存的に発現量が変化(分解酵素遺伝子は発現量が増加し、合成酵素遺伝子の発現量は低下)することも分かった (Table 1)。2つの候補遺伝子について酵素活性機能ドメイン構造について調べたところ、c-di-GMP 分解酵素遺伝子は分解活性ドメインのみを保有していたが、c-di-GMP 合成酵素遺伝子は合成活性ドメインのみではなく分解活性ドメインも保有していた。そこで、2つの候補遺伝子の中から c-di-GMP 分解酵素遺伝子のみに着目して以下検討することとした。

Table 1

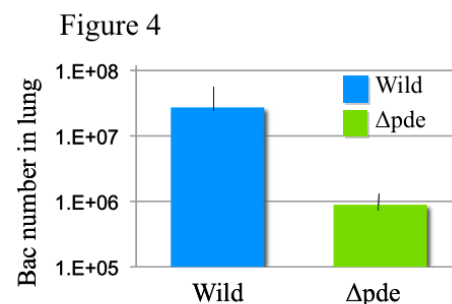
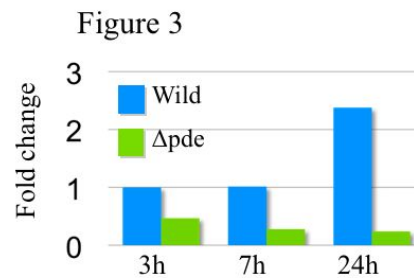
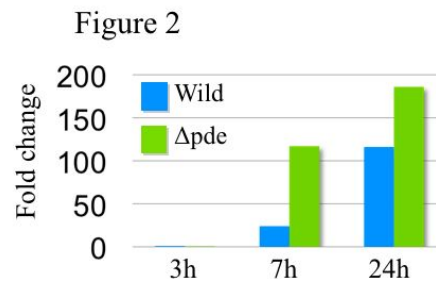
Gene	Conserved motif	Enzyme activity		Azithromycin (µg/mL)		
		DGC	PDEA	0.1	0.5	2.0
<i>pde</i>	EAL	-	+	-1.4	-2.8	-8.5
<i>dgc</i>	GGDEF, (EAL)	+	-	2.5	8.5	13.2

(2) 各種マクロライド系抗菌薬の c-di-GMP 分解酵素遺伝子への作用を調べたところ、アジスロマイシンと同様に臨床で治療効果の高いクラリスロマイシン、エリスロマイシンは発現量の有意な低下が見られたが、臨床での使用頻度の低いジョサマイシン、オレアンド

マイシンでは発現量の低下が見られなかった (Figure 1A)。緑膿菌の主な病原性因子としてエラスターゼ (*lasA*) やアルカリプロテアーゼ (*aprA*) が知られているため、これらに対しても各種マクロライドの作用を調べた。その結果、c-di-GMP 分解酵素遺伝子の発現量の低下と相関して、*lasA* (Figure 1B) や *aprA* (Figure 1C) の発現量の低下が観察された。以上のことから、マクロライド系抗菌薬が直接もしくは間接的に c-di-GMP シグナル伝達機構を介した病原性の低下を招いていることが予測された。



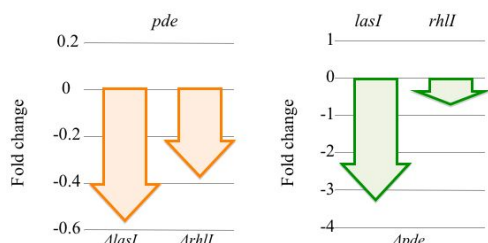
(3) c-di-GMP 分解酵素遺伝子の機能を調べるため、本遺伝子欠損株 (*pde*) を作製した。緑膿菌野生株と *pde* 株とを用いて生育に及ぼす影響を調べたところ、両者に差は見られなかった。一方、バイオフィーム (細胞外多糖: EPS) 産生を確認したところ、野生株と比較して *pde* 株では EPS の産生が有意に増加していた (Figure 2)。また QS 機構におよぼす作用を調べたところ、野生株と比較して *pde* 株では QS 機構を制御している *LasI* という分子の発現量が低下していた (Figure 3)。一方、*RhlI* については同様に *pde* 株で発現量の低下傾向が見られたが有意差はなかった。さらにマウス肺炎モデルを用いて野生株と *pde* 株との肺内での増殖性の違いを比較したところ、*pde* 株では肺内菌数の低下が見られた (Figure 4)。以上のことから、アジスロマイシンなどのターゲットとなる c-di-GMP 分解酵素遺伝子 (*pde*) は病原性の低下に関わることが予測された。



(4) 今回作製した c-di-GMP シグナル伝達機構の欠損株 (*pde*) と既に我々が保有している QS 機構欠損株 (*lasI*, *rhlI*) とを用いて、両病原性制御機構の関連性を調べた (Figure 5)。野生株と比較して *lasI*, *rhlI* では c-di-GMP 分解酵素 (*pde*) の発現量の低下が観察された。一方、野生株と比較して

pde 株では, *rhlI* および *lasI* の発現量が低下し、特に *rhlI* での発現量の低下が著しかった。以上のことから、c-di-GMP シグナル伝達機構と QS 機構とは相互に作用し、病原性を制御している可能性が示された。

Figure 5



< 引用文献 >

Katz et al: Nat Biotechnol, 24:1529, 2006

Shinkai et al: Pharmacol Ther, 117:393, 2008

Tateda et al: AAC, 45:1930, 2001

Wozniak et al: Chest, 125:62S, 2004

Miller and Bassler: Annu Rev Microbiol, 55:165, 2001

Hengge R: Nat Rev Microbiol, 7: 263, 2009

Kai et al. Plum Phamacor Ther 22:483, 2009

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 1 件)

木村聡一郎、舘田一博：緑膿菌の病原性制御機構と治療標的としての可能性。感染・炎症・免疫 査読なし 43(2) 98-105 2013

[学会発表](計 9 件)

木村聡一郎、舘田一博
緑膿菌の細菌内・細菌間情報伝達分子と病原性との関与。第7回若手研究者育成のためのワークショップ(シンポジウム：若手研究者によるバイオフィーム研究ワークショップ)国立感染症研究所(東京都新宿区)2013年6月2日

木村聡一郎、舘田一博
緑膿菌のバイオフィーム形成とその制御機構 第86回日本細菌学会総会(シンポジウム：バイオフィーム制御に向けての挑戦的アプローチ)幕張メッセ(千葉県千葉市)2013年

3月19日

木村聡一郎、嵯峨知生、石井良和、舘田一博

細菌の病原性に基づいた新規感染症治療薬およびそのターゲット分子の探索。第66回東邦医学会総会 東邦大学(東京都大田区)2012年11月9日

木村聡一郎、舘田一博

緑膿菌のバイオフィーム形成とその制御機構 第61回日本感染症学会東日本地方会学術集会(シンポジウム：バイオフィーム研究をめぐる最近の潮流)ホテル日航東京(東京都港区)2012年10月11日

木村聡一郎、舘田一博

細菌間・細胞内情報伝達分子をターゲットとした感染症治療法への応用の可能性。第85回日本細菌学会総会(シンポジウム：細菌センサーと環境応答)長崎新聞文化ホール(長崎県長崎市)2012年3月29日

木村聡一郎

緑膿菌におけるバイオフィーム研究の最前線 第46回緑膿菌感染症研究会(教育講演)慶應義塾大学(東京都新宿区)2012年2月17日

Kimura S, Mori N, Tateda K, Kai T, Ishii Y, Yamaguchi K.

Azithromycin modulates virulence factors via 3',5'-cyclic diguanylic acid signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sapporo Convention Center, Sapporo Hokkaido), 2011.9.7

Kimura S, Nomura N, TATEDA K.

Intercellular and Intracellular signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. (Symposium) Eurobiofilm (Copenhagen, Denmark), 2011.7.5

木村聡一郎、森 伸晃、舘田一博、石井良和、山口恵三

マクロライド剤の緑膿菌 Quorum sensing と cyclic di-GMP シグナル伝達機構への作用機序。第59回日本化学療法学会総会 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)2011年6月24日

[その他]

ホームページ等

<http://www.lab.toho-u.ac.jp/med/micro/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村 聡一郎 (KIMURA, Soichiro)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：60408870