

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670487

研究課題名(和文) 薬剤耐性菌感染症を克服する光線免疫殺菌療法の開発

研究課題名(英文) Development of bacteria-targeted photoimmunotherapy

研究代表者

光永 真人 (Mitsunaga, Makoto)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：40433990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：黄色ブドウ球菌の主要細胞壁構成成分であるペプチドグリカンの特異的に認識するモノクローナル抗体と光感受性物質を結合させた化合物および近赤外光の照射によって、モノクローナル抗体が標的的特異的に結合する細菌(黄色ブドウ球菌)のみを選択的に殺菌することが可能であった。MRSAやVISAのような薬剤耐性黄色ブドウ球菌に対しても、抗ペプチドグリカンモノクローナル抗体の特異的な結合によって殺菌効果が誘導可能であった。標的的特異的な感染症治療として今後臨床応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have developed a method for treating *Staphylococcus aureus* bacteria by photosensitizer-antibody conjugates against peptidoglycan, the major component of the cell wall of the Gram-positive bacteria, and near-infrared light. Specific binding of photosensitizer-antibody conjugates to the cell wall led to kill the cells specifically upon near-infrared light irradiation in methicillin-susceptible, methicillin-resistant and vancomycin intermediate-susceptible *Staphylococcus aureus* in vitro. Further studies are warranted for future clinical translation.

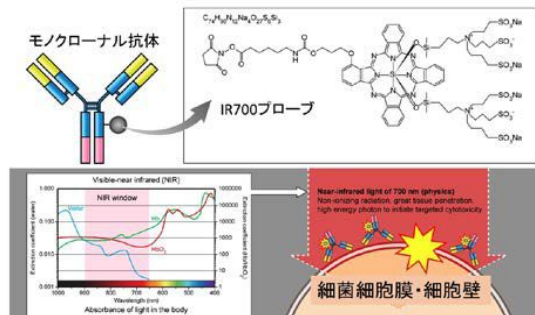
研究分野：消化器内科学

キーワード：抗体療法 近赤外光 感染症 黄色ブドウ球菌 薬剤耐性菌

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暫くして薬剤耐性菌が確認されて以来、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り、耐性菌に対する感染症治療は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。

研究代表者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である IR700 を結合させ、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)と名付けて発表し(下図:引用文献)、その有用性につき引き続き報告してきた(引用文献、)。。



2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らが開発したがんに対する PIT の方法論を感染症治療へ応用することを目的とする。つまり、細菌の細胞膜や細胞壁に存在する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、細菌と反応後に近赤外光を照射して、細胞膜(壁)破壊から治療効果が得られるか検討し

た。

現在広く用いられている抗菌薬の作用機序と全く異なり、本方法では、モノクローナル抗体の認識する分子を発現する菌に対して選択的に、蛍光プローブ IR700 の産生するエネルギーによる機械的な殺菌効果を期待できることから、周囲の組織に対する近赤外光による細胞障害性は少なくなり、また、対応するモノクローナル抗体の選択で抗生剤無効の多剤耐性菌に対しても有効な方法となることが期待された。

3. 研究の方法

(1) 細菌株

グラム陽性球菌：黄色ブドウ球菌

JCM2874

MR14 (MRSA;Methicillin-resistant Staphylococcus aureus)

MU3 (VISA; Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus)

グラム陽性球菌：表皮ブドウ球菌

JCM2419

Epi28

グラム陰性桿菌：大腸菌

DH5

(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 15704(QED bioscience)と IR700DX NHS ester(LI-COR)を混和し、ゲルろ過にて化合物(mAb15704-IR700)を抽出した。ゲルろ過した mAb15704-IR700 は、分光光度計を用いて吸光度測定を行い、1分子の mAb15704 に対して約3分子の IR700 が結合するように調整した。

(3) 各細菌株に対する抗ペプチドグリカン抗体 mAb15704-IR700 の結合性評価

Overnight culture の細菌懸濁液 OD 0.5 = 10^8 CFU/mL から、 10^6 CFU/mL のサンプルを用意した。サンプルに 10 μ g の抗ペプチドグリカン抗体 mAb15704-IR700 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、以下の検討を行った。

蛍光顕微鏡

オリンパス社製倒立顕微鏡 IX73 を用いて蛍光顕微鏡観察下にて IR700 プローブの細菌に対する結合性を評価した。

フローサイトメーター

Miltenyi Biotec 社製 MACSQuant analyzer を用いて、IR700 プローブの細菌に対する結合性を定量的に評価した。

電子顕微鏡

抗体の特異的結合部位を確認するために、電界放出形走査電子顕微鏡 FE-SEM (日立社製) を用いて、mAb15704 と反応後のサンプルに対して金コロイド結合 anti-mouse IgG2 次抗体を添加し、サンプル洗浄後にイメージングを行った。

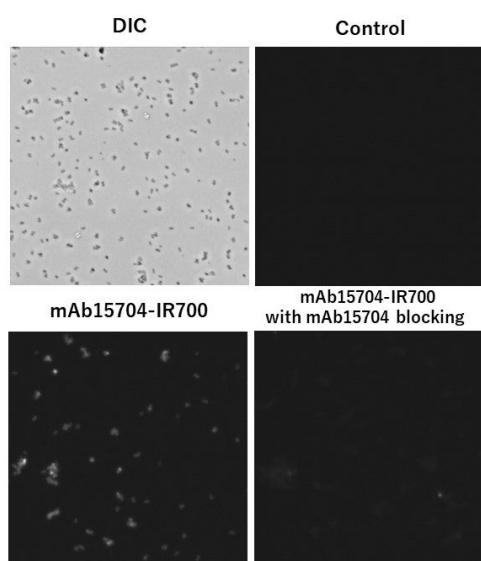
(4) 光線照射処置と殺菌効果の評価

細菌懸濁液と抗ペプチドグリカン抗体 mAb15704-IR700 を反応後に近赤外光(LED ライト、波長ピーク 690 nm) を照射した。照射後にサンプルは vortex し、平板培地に段階希釈法にて滴下した。37 で 24 時間培養を行い、コロニー形成の評価から抗体と光線治療による殺菌効果を評価した。

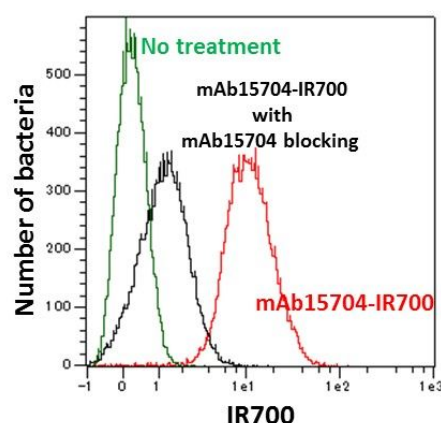
4. 研究成果

(1) 各種細菌株に対する抗ペプチドグリカン抗体 mAb15704-IR700 の結合性

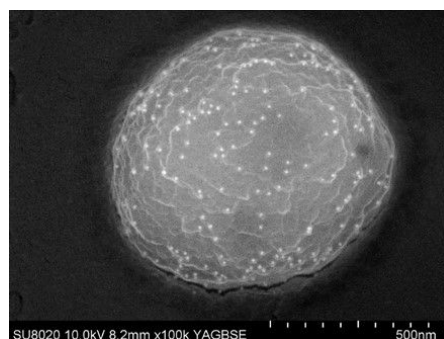
黄色ブドウ球菌株に対して mAb15704-IR700 を添加し、洗浄後の蛍光顕微鏡写真およびフローサイトメトリーの結果、さらに、金コロイド結合抗マウス IgG 二次抗体を用いた電界放出形走査電子顕微鏡の結果以下に示す。



JCM2874 DIC: 通常光顕微鏡像、Control: 抗体未反応の細菌に対する蛍光顕微鏡像、mAb15704-IR700: 細菌に結合・局在した IR700 の蛍光像、mAb15704-IR700 with mAb15704 blocking: cold antibody (mAb15704) 添加によるブロッキング後の蛍光顕微鏡像



JCM2874 と mAb15704-IR700 の反応によるシグナル(mean fluorescence intensity; MFI) 比はコントロールと比べて 57.72 倍であった。

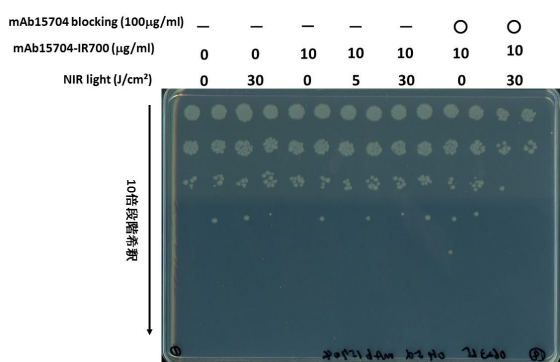
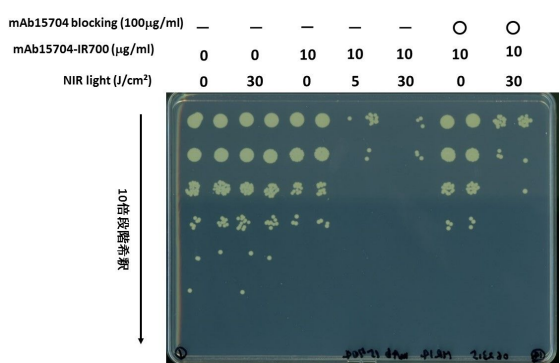
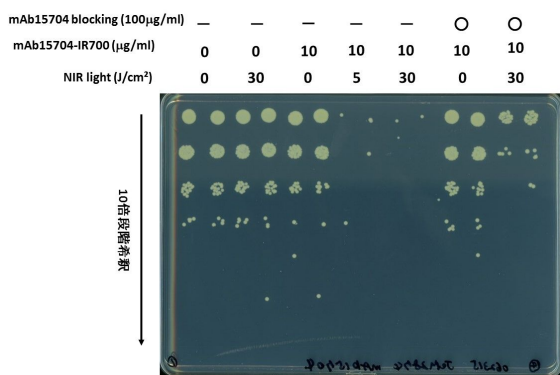


MR14 の細胞壁に結合した mAb15704 と反応した金コロイド 2 次抗体の局在を認めた。

mAb15704-IR700 の各種細菌株細胞壁に対する結合性は菌株によって異なり、フローサイトメトリーのコントロールと比較した MFI 比は以下の通りであった。

細菌株	MFI 比
JCM2874	57.72
MR14	62.00
MU3	61.89
JCM2419	35.16
Epi28	76.1
DH5	2.57

(2) 光線照射処置と殺菌効果の評価



各種細菌株と mAb15704-IR700 を反応後に近赤外光を照射し、処置後のサンプルを限界希釈法にて平板培地へ添加し培養した結果

を示した。上段 JCM2874、中段 MR14、下段 DH5。図に示した通り、mAb15704-IR700 と近赤外光照射により、JCM2374 および MR14 では、光線殺菌効果が誘導され、その効果は cold の抗体である mAb15704 によるブロッキングで減弱した。一方で、mAb15704-IR700 との結合性をほとんど認めなかった DH5 においては光線殺菌効果が誘導されなかった。以上のことから、抗ペプチドグリカン抗体化合物 mAb15704-IR700 はブドウ球菌の細胞壁に標的的特異的に結合し、近赤外光の照射を受けた mAb15704-IR700 による細胞障害性が誘導されることが分かった。

(3) 考察と今後の展望

研究代表者が開発してきた、がんに対する分子標的的特異的な蛍光イメージングとイメージングをガイドとして、近赤外光照射によって細胞破壊を誘導する治療法である PIT は、黄色ブドウ球菌の主要細胞壁構成成分であるペプチドグリカンの特異的に認識する抗体によって標的的特異的な感染症治療として応用できる可能性が *in vitro* の条件において示唆された。治療効果は抗ペプチドグリカン抗体の特異的結合性に依存していることから、副作用の少ない特異的な治療となり得る一方で、多彩な菌種に有効な治療法とはいえない。光のアクセスが良い部位（臓器）における、多剤耐性菌感染症が良いターゲットになると考える。今後は、感染動物モデルを利用して実際の治療法としての実現可能性を評価していく予定である。

< 引用文献 >

Mitsunaga M, Ogawa M, Kosaka N, Rosenblum LT, Choyke PL, Kobayashi H. Cancer cell-selective *in vivo* near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules. *at Med.* 2011;17(12):1685-1691.

Mitsunaga M, Nakajima T, Kramer-Marek G, Choyke PL, Kobayashi H. Immediate in vivo target-specific cancer cell death after near infrared photoimmunotherapy. *MC Cancer* 2012;12(1):345.

Mitsunaga M, Nakajima T, Sano K, Choyke PL, Kobayashi H. Near-infrared theranostic photoimmunotherapy (PIT): repeated exposure of light enhances the effect of immunoconjugate. *ioconjug Chem.* 2012;23:604-9.

Ito K, Mitsunaga M*, Nishimura T, Kobayashi H, Tajiri H. Combination photoimmunotherapy with monoclonal antibodies recognizing different epitopes of human epidermal growth factor receptor 2: An assessment of phototherapeutic effect based on fluorescence molecular imaging. *Oncotarget* 2016;7:14143-52.

Ito K, Mitsunaga M*, Arihiro S, Saruta M, Matsuoka M, Kobayashi H, Tajiri H. Molecular targeted photoimmunotherapy for HER2-positive human gastric cancer in combination with chemotherapy results in improved treatment outcomes through different cytotoxic mechanisms. *BMC Cancer* 2016;16:37.

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 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

光永 真人 (MITSUNAGA, Makoto)

東京慈恵会医科大学・内科学講座・消化器・肝臓内科・講師

研究者番号 : 4 0 4 3 3 9 9 0

(2)連携研究者

岩瀬 忠行 (IWASE, Tadayuki)

東京慈恵会医科大学・細菌学講座・講師

研究者番号 : 8 0 3 8 5 2 9 4

(3)研究協力者

伊藤 公博 (ITO, Kimihiro)