

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 7 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860295

研究課題名(和文) 緑膿菌の腸管上皮細胞感知メカニズムの解析

研究課題名(英文) Signals of epithelial cells facilitate to translocation of *Pseudomonas aeruginosa* through the epithelial tissues

研究代表者

林 直樹 (Hayashi, Naoki)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：70707463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：高齢化や高度医療化を迎えた先進諸国では、毒力の弱い病原体による日和見感染症を制御することが求められている。このような感染症の発症メカニズムの一つとして、宿主のバリアとして働くムチンで覆われた腸管上皮細胞層を越えて細菌が血液に移行するバクテリアルトランスロケーションの概念が提唱されている。本研究では、日和見感染症起因菌である *Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌) のトランスロケーション機構を調べ、上皮細胞が分泌するタンパク質を感知した緑膿菌は鞭毛運動が亢進し、ムチン層を透過することを明らかとした。本研究の成果は、日和見感染症の新たな予防および治療薬の考案につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The prevention and treatment of opportunistic infections with immunocompromised host are required in the developed countries including Japan. The colonization of *Pseudomonas aeruginosa* in respiratory, urinary, and gastrointestinal tracts in immunocompromised patients can trigger a wide range of severe acute and chronic infectious diseases. In particular, translocation of the colonized *P. aeruginosa* through epithelial tissues, which are covered with mucin, can cause severe bacteremia leading to fatal sepsis. Here, we found that *P. aeruginosa*, which was induced the acceleration of flagellar motility by the smaller protein secreted from epithelial cells, can penetrate the mucin layer. Further studies will be required to clarify the translocation mechanisms in *P. aeruginosa*, our studies could lead to new therapeutic strategies for *P. aeruginosa* gut-derived sepsis.

研究分野：基礎医学 細菌学 病原性

キーワード：感染症 細菌 緑膿菌 上皮細胞 トランスロケーション 鞭毛 ムチン

1. 研究開始当初の背景

Pseudomonas aeruginosa(緑膿菌)は免疫力が低下した宿主において重篤な呼吸器感染症や血液感染症を引き起こす临床上重要なグラム陰性の日和見感染症起因菌である。これまでに多くの抗緑膿菌作用をもつ抗菌薬が開発されてきたが、緑膿菌敗血症による死亡率は依然として高く、新たな予防および治療法の考案が求められている。緑膿菌の呼吸器感染症や血液感染症における侵入門戸の1つが腸管であることが、ヒトでのレトロスペクティブな臨床解析(*Intensive Care Med.* 27:1263, 2001; *J. Trauma.* 60:126, 2006)のみならず白血球減少マウスを用いた感染実験(*PLoS One.* 5:e15131, 2010)によって示されている。すなわち、緑膿菌感染症を理解するためには本菌が腸管から宿主体内に侵入(トランスロケーション)する機構を解明することが重要である。しかし、腸管腔での緑膿菌トランスロケーションメカニズムに関する分子生物学的な知見は少なく、緑膿菌感染症の新たな予防および治療法を考案するためには、緑膿菌トランスロケーションメカニズムの遺伝子レベルで明らかにする必要がある。このような背景のもと、我々の研究グループでは、腸管腔での緑膿菌トランスロケーション過程を、1)上皮細胞の感知、2)上皮細胞への接近、3)上皮細胞表面での付着、4)上皮細胞間隙透過経路の形成、5)上皮細胞層の透過の5つのステップ(図1)に分け、これらメカニズムの解析に取り組んできた。その成果として、緑膿菌が鞭毛運動とムチン分解との少なくとも2つの機能を協力的に作用させることでムチン層を透過する機構(Hayashi N. *J. Infect. Chemother.* 19:305, 2013)、緑膿菌がIII型エフェクターExoSを介して上皮細胞間のタイトジャンクションの開裂を引き起こし、新たに形成された上皮細胞間隙を透過する機構(Okuda J., Hayashi N. *Infect. Immun.* 78:4511, 2010)を明らかにし、緑膿菌トランスロケーションの全体像を解明するための端緒を開いてきた。

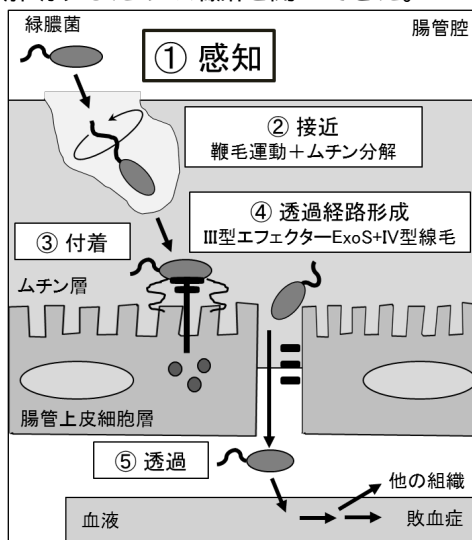


図1. 緑膿菌のトランスロケーションモデル

我々は最近、ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞培養上清の添加によって寒天培地上での緑膿菌の運動性が大きくなることを見出した。緑膿菌の誘引物質の寒天培地中への添加と本菌の運動性が正の相関を示すこと(*Appl. Environ. Microbiol.* 9: 2262, 2007)、緑膿菌は腸管上皮細胞層に接近し、透過することを合わせて考えると、腸管上皮細胞から分泌された物質を感知した緑膿菌が腸管上皮細胞表面へ走化するという着想に至った。

2. 研究の目的

バクテリアルロケーション、特に、日和見感染症の起因菌である緑膿菌の腸管腔からのトランスロケーション機構を解明することで、宿主環境に応じた細菌の感染メカニズムに基づく新たな予防および治療法考案のためのターゲットバリデーションを行なう。本研究では、緑膿菌トランスロケーションの初期段階である「緑膿菌の腸管上皮細胞感知メカニズム」にターゲットを絞り、1)緑膿菌の腸管上皮細胞感知メカニズムとその感染における役割の解明、2)緑膿菌が感知する腸管上皮細胞成分の単離・同定を行なう。

3. 研究の方法

(1) 緑膿菌による人工的ムチン層透過
ウシ顎下腺由来ムチンを用いて人工的ムチン層を作製した(*J. Infect. Chemother.* 19:305, 2013)。人工的ムチン層の下部にCaco-2細胞の培養上清または Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM、コントロール)を添加し、緑膿菌 PA01 株の培養液をムチン層の上層に接種後3時間目における下層の生菌数を測定した。

(2) 緑膿菌の swarming 運動
Caco-2細胞培養上清または DMEM の含有率が50%となるように作成した寒天培地(寒天濃度0.5%)を用いて緑膿菌の swarming 運動を測定した。緑膿菌 PA01 株の一晚培養液を寒天培地の中央に滴下し、37℃、5% CO₂ 条件下で14時間培養後の菌の広がりを観察した。

(3) 緑膿菌によるバイオフィーム産生
O'Tooleらの方法(*Mol. Microbiol.* 28:449, 1998)を参考に、緑膿菌 PA01 株のバイオフィーム産生量を定量した。緑膿菌 PA01 株の一晚培養液にCaco-2細胞培養上清または DMEM を添加して37℃、5% CO₂ 条件下で培養後、形成されたバイオフィームをクリスタルバイオレットで染色し、その吸光度を測定した。

(4) 緑膿菌の鞭毛回転運動
Schniederberend Mらの Tethered cell 法(*J. Bacteriol.* 195:1051, 2013)を参考に、緑膿菌鞭毛フィラメントの回転を測定した。Protein A ならびに緑膿菌 PA01 株の鞭毛フィラメント構成タンパク質(FliC)に対する抗体でスライドガラスを前処理後、緑膿菌 PA01

株の一晚培養液を添加することで緑膿菌の鞭毛フィラメントをスライドガラス上に固定した。その後、Caco-2 細胞培養上清または DMEM を添加し、菌体の動きを観察することで、緑膿菌の鞭毛回転速度を算出した。

4. 研究成果

緑膿菌による腸管上皮細胞感知メカニズムの解明を目的に、次の結果を得た。

(1) 緑膿菌による人工的ムチン層透過

顎下腺由来ウシムチン標品を充填した人工的ムチン層を用いて、緑膿菌のムチン層透過に対する Caco-2 細胞培養上清の影響を調べた。その結果、Caco-2 細胞培養上清は緑膿菌 PA01 株のムチン層透過菌数をコントロールに用いた DMEM 培地と比べて約 2 倍有意に増加させた。次に、緑膿菌によるムチン層透過を亢進させる Caco-2 細胞培養上清中の成分を同定することを目的に、Caco-2 細胞培養上清中の成分の特徴を調べた。Caco-2 細胞培養上清から限外濾過膜を用いて回収した 10kDa 以下の成分に対する緑膿菌のムチン層透過への影響を調べたところ、10kDa 以下の Caco-2 細胞培養上清は緑膿菌のムチン層透過菌数を有意に増加させた。また、この亢進作用はトリプシン処理により消失した。一方で、3kDa 以下の Caco-2 細胞培養上清には、緑膿菌のムチン層透過亢進作用はみられなかった。

(2) 緑膿菌の swarming 運動

緑膿菌は鞭毛運動とムチン分解との少なくとも 2 つの機能を協力的に作用させることでムチン層を透過する (Hayashi N. *J. Infect. Chemother.* 19:305, 2013)。緑膿菌の鞭毛依存性の菌体運動である swarming 運動に対する Caco-2 細胞培養上清の影響を調べた。その結果、Caco-2 細胞培養上清の添加は、コントロールに用いた DMEM と比べて、swarming 寒天培地上での菌の広がりを約 2.5 倍に増加させた。次に、緑膿菌の培養上清中のプロテアーゼ活性に対する Caco-2 細胞培養上清の添加による影響をアゾカゼインの分解を指標に調べたところ、緑膿菌のアゾカゼイン分解に対する Caco-2 細胞培養上清の影響はみられなかった。

(3) 緑膿菌によるバイオフィーム産生

緑膿菌のバイオフィーム形成と運動性は負の相関を示す (FEMS. *Microbiol.* 33:279, 2008) ことから、Caco-2 細胞培養上清が緑膿菌のバイオフィーム形成を抑制することで、本菌の運動性が亢進したと考えた。Caco-2 細胞培養上清を添加して培養後の緑膿菌 PA01 株のバイオフィーム産生量をクリスタルバイオレット染色により調べたところ、緑膿菌のバイオフィーム産生量に対する Caco-2 細胞培養上清による影響はみられなかった。

(4) 緑膿菌の鞭毛回転運動

Tethered cell 法を参考に、緑膿菌の鞭毛回転速度に対する Caco-2 細胞培養上清の影響を動画解析したところ、10kDa 以下の Caco-2 細胞培養上清は、緑膿菌の鞭毛回転速度を約 1.5 倍増大させた。また、この亢進作用はトリプシン処理により消失した。

本研究によって、緑膿菌は上皮細胞が分泌する 10 kDa 以下のタンパク質を感知することで鞭毛回転に依存した菌体運動が亢進し、ムチン層を透過することが新たに分かった。本研究では、当初計画していた緑膿菌が感知する上皮細胞由来物質を同定することはできなかった。計画通りに進まなかった原因は、緑膿菌の変化する表現型の探索や鞭毛フィラメント回転運動の実験系の構築に時間を要したためである。現在これらの問題点は結果に示したように解決され、緑膿菌の腸管上皮細胞感知メカニズムの解明を目指して解析を進めている。また、本研究における検討実験において我々は、緑膿菌が上皮細胞を感知することで、緑膿菌トランスロケーションに必要な IV 型線毛フィラメントの伸縮モーターをコードする *pilT* と *pilU* 遺伝子の発現量を制御していることを見出した (Shikata, M., *J. Infect. Chemother.* 22: 216, 2016)。

今後は、本研究で得られた成果をもとに緑膿菌トランスロケーションメカニズムの解析を進めていくことで、本菌感染症を含む日和見感染症の新たな予防および治療法の考案につなげていきたい。

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、すべて査読あり)

- (1) Shikata M. #, Hayashi N. #, Fujimoto A., Nakamura T., Matsui N., Ishiyama A., Maekawa Y., and Gotoh N. 2016. The *pilT* gene contributes to type III ExoS effector injection into epithelial cells in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Chemother.* 22:216-220. doi: 10.1016/j.jiac.2015.12.012. #These authors contributed equally to this study.
- (2) Hayashi N., Nishizawa H., Kitao S., Deguchi S., Nakamura T., Fujimoto A., Shikata M., and Gotoh N. 2015 *Pseudomonas aeruginosa* injects type III effector ExoS into epithelial cells through the function of type IV pili. *FEBS Lett.*, 589:890-896. doi: 10.1016/j.febslet.2015.02.031.

〔学会発表〕(計 13 件)

- (1) 横谷篤、古曾志まり子、福西千晶、山本昌美、林直樹、後藤直正: 腸管上皮細胞が緑膿菌によるムチン層透過を亢進す

- る機構の解析. 日本薬学会第 136 年会 (横浜), 2016.3.28.
- (2) 福西千晶、山本昌美、古曾志まり子、森田眞由、横谷篤、林直樹、後藤直正: 腸管上皮細胞の分泌物は緑膿菌によるムチン層透過を亢進する. 第 89 回日本細菌学会総会 (大阪), 2016.3.24.
- (3) 林直樹、後藤直正: 緑膿菌による宿主上皮トランスロケーションメカニズムの解析. 第 50 回緑膿菌感染症研究会 (東京), 2016.2.6.
- (4) 山本昌美、古曾志まり子、森田眞由、福西千晶、横谷篤、林直樹、後藤直正: 緑膿菌が上皮細胞を感知するメカニズムの解析. 第 68 回日本細菌学会関西支部総会 (京都), 2015.11.28.
- (5) 横谷篤、古曾志まり子、森田眞由、福西千晶、山本昌美、林直樹、後藤直正: 緑膿菌が上皮細胞を感知する機構の解析. 第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (大阪), 2015.10.17.
- (6) 古曾志まり子、林直樹、後藤直正: 緑膿菌による上皮細胞感知機構の解析. 第 63 回日本化学療法学会西日本支部総会 第 58 回日本感染症学会中日本地方会学術集会 第 85 回日本感染症西日本地方会学術集会 合同学会 (奈良), 2015.10.16.
- (7) 林直樹、後藤直正: 緑膿菌が III 型エフェクター ExoS を上皮細胞内に注入するために必要な IV 型線毛のメカニズム解析. 第 63 回日本化学療法学会西日本支部総会 第 58 回日本感染症学会中日本地方会学術集会 第 85 回日本感染症西日本地方会学術集会 合同学会 (奈良), 2015.10.16.
- (8) Hayashi N., Nishizawa H., Kitao S., Deguchi S., Nakamura T., Fujimoto A., Shikata M., and Gotoh N.: *Pseudomonas aeruginosa* PA01 strain injects type III effector ExoS into epithelial cells through the function of type IV pili. ASM Conference on *Pseudomonas* 2015. (Washington D.C.), 2015.9.10.
- (9) 林直樹、後藤直正: 緑膿菌の上皮細胞層透過戦略. 日本薬学会第 135 年会 (神戸), 2015.3.28.
- (10) 林直樹、中村貴乃、藤本祥代、藤澤彰宏、古曾志まり子、森田眞由、後藤直正: 緑膿菌による上皮細胞層透過機構の解析. 第 4 回 4 大学連携研究フォーラム (京都), 2014.12.2.
- (11) 林直樹、後藤直正: 緑膿菌による III 型エフェクター ExoS の注入における IV 型線毛モータータンパク質をコードする *pilT* 遺伝子の必要性. 第 62 回日本化学療法学会西日本支部総会 第 57 回日本感染症学会中日本地方会学術集会 第 84 回日本感染症西日本地方会学術集会 3 学会合同学会 (岡山), 2014.10.24.
- (12) 福西千晶、山本昌美、古曾志まり子、森

田眞由、林直樹、後藤直正: 緑膿菌の上皮細胞への走化シグナルの解析. 第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (京都), 2014.10.11.

- (13) 林直樹、後藤直正: *Pseudomonas aeruginosa* による上皮細胞タイトジャンクション破綻における IV 型線毛の必要性. 第 88 回日本感染症学会学術講演会 第 62 回日本化学療法学会総会 合同学会 (福岡), 2014.6.18.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

京都薬科大学微生物・感染制御学分野
(<http://www.kyoto-phu.ac.jp/labo/bisei/index.html>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 直樹(HAYASHI, Naoki)
京都薬科大学・薬学部・助教
研究者番号: 7 0 7 0 7 4 6 3

(2) 研究協力者

後藤 直正(GOTOH, Naomasa)
京都薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 3 0 1 2 1 5 6 0