

No.	24-3110	
Project Title	新規モダリティ分子による侵襲性感染症に対する治療薬開発	
Principal Investigator	Ichiro Nakagawa (Kyoto University Graduate School of Medicine・Professor)	
Project Member(s)	IMSUT Host Researcher	kouhei Tsumoto (The Institute of Medical Science, The University of Tokyo・Professor)
	Project Member (s)	野沢孝志 (京都大学大学院医学研究科・准教授)
	Project Member (s)	村瀬一典 (京都大学大学院医学研究科・助教)
	Project Member (s)	山田尚子 (京都大学大学院医学研究科・技術補佐員)

東京大学医科学研究所国際共同利用・共同研究拠点事業
共同研究報告書（年次終了・研究完了）【国内】

共同研究報告（年次終了）

近年、病原体における薬剤耐性化や宿主免疫系への抵抗性、高病原化株の出現が問題となっている。高病原化株が出現する過程では、①変異や水平伝搬による病原性変化株の出現、②選択圧による変異株の優占化、が繰り返される。細菌感染症への予防・治療法として、新規の抗菌剤やワクチンの開発が期待されているが、不適切な抗菌剤の使用は細菌叢の攪乱や耐性菌の蔓延を促す。そのため、既存の薬剤とは異なる作用機序で、耐性株が出現しにくい新規創薬のシーズ開発が望まれている。しかし、単一の因子に対する阻害剤では複雑な病態に対応出来ず、かつ過度な選択圧のため耐性菌の出現を増長させてしまう。また、低分子創薬においては、数十万にも及ぶ化合物のスクリーニングは莫大な時間と予算が必要となる上に必ずしも目的とする活性を持つ化合物が取得できない場合もある。また得られた化合物が実際に薬剤シーズに至るまでには様々なハードルが多い。そこで本共同研究においては、人工細胞外小胞(EVs)の実装を目標として、その増殖阻害効果についての機能解析を行った。

本研究では、細菌が産生する細胞外小胞 (extracellular vesicles; EVs) が、異種細菌間の相互作用においてどのような役割を果たすのかを明らかにすることを目的として、大腸菌由来EVがA群レンサ球菌 (Group A *Streptococcus*; GAS, *Streptococcus pyogenes*) に及ぼす影響を解析した。細菌EVは、タンパク質、核酸、シグナル分子、病原因子などを含む脂質二重膜小胞であり、宿主-細菌間相互作用だけでなく、細菌同士の情報伝達や競合にも関与すると考えられている。しかし、異なる菌種間でEVが標的細菌の増殖や病原性をどのように変化させるのかについては、十分に理解されていなかった。

本研究ではまず、大腸菌EVが複数の細菌種の増殖に与える影響を検討した。その結果、大腸菌EVは調べたグラム陽性菌の増殖を抑制し、とくにGASに対して顕著な増殖抑制効果を示した。一方で、大腸菌自身の増殖には明らかな影響を示さなかった。GASに対する効果はEV濃度依存的であり、EV処理により対数増殖期の増殖速度が低下し、倍加時間が延長した。ただし、Live/Dead染色ではEV処理後も死細胞の割合は増加せず、EVはGASを直接殺菌するのではなく、静菌的に増殖効率を低下させることが示唆された。また、蛍光標識EVを用いた観察により、大腸菌EVがGASの細胞表面に付着することが確認された。

次に、EV処理によるGASの細胞形態変化を、走査型電子顕微鏡および透過型電子顕微鏡で解析した。未処理のGASは均一な球状細胞が連なった通常の連鎖構造を示したのに対し、EV処理細胞では細胞の膨化や不均一な形態が認められ、1つの細胞内に複数の隔壁が形成されていた。さらに、細胞分裂の中心的因子であるFtsZを可視化した解析では、通常は細胞中央に形成されるZ-ringが、EV処理細胞では近接した複数箇所に形成されることが明らかとなった。タイムラプス観察からも、EV処理細胞では細胞の伸長や分離が十分に進行しないまま次の隔壁形成が開始され、結果として複数の隔壁をもつ異常な細胞形態が生じることが示された。

この細胞分裂異常の原因を調べるため、蛍光D-アミノ酸プローブHADAを用いて新規ペプチドグリカン合成を可視化した。通常のGASでは、隔壁部位でペプチドグリカン合成が開始された後、周辺部へと広がり、細胞伸長と娘細胞の形成が進行する。一方、EV処理細胞では、HADAシグナルが隔壁部位に強く蓄積し、周辺部への拡がりが増加していた。さらに、アンピシリン誘導性溶菌試験およびペプチドグリカン加水分解酵素活性の解析から、EV処理によりGASのペプチドグリカン加水分解活性が低下していることが示された。これらの結果から、大腸菌EVはGASのペプチドグリカン合成そのものを完全に止めるのではなく、ペプチドグリカンのリモデリング、とくに分解過程を阻害することで、細胞伸長と細胞分離の異常を引き起こすと考えられた。

さらに、本研究ではRNA-seq解析により、EV処理がGASの遺伝子発現に与える影響を網羅的に調べた。その結果、EV処理4時間後にはGASゲノム上の約10%に相当する遺伝子の発現が変動し、その多くは発現低下を示した。発現変動遺伝子には、代謝、輸送、酵素活性、細胞分裂、毒素活性に関わる遺伝子が含まれており、EV処理は細胞分裂だけでなく、GASの広範な生物学的機能に影響を及ぼすことが示された。とくに、GASの代表的な病原因子であるストレプトリジンOをコードする *slo*、NADグリコヒドロラーゼをコードする *nga*、ヒアルロン酸莢膜合成に関わる *hasABC*、ストレプトリジンS関連遺伝子 *sagA* などの発現が顕著に低下していた。

これらの遺伝子発現変化が実際の病原因子活性に反映されるかを検討したところ、EV処理GASではNADase活性、溶血活性、ヒアルロン酸莢膜産生がいずれも有意に低下していた。さらに、強毒GAS株SSI-1を用いたマウス皮下感染モデルでは、EV処理GASを感染させた群において皮膚病変の形成と進展が著しく抑制された。未処理GAS感染群では全例で明瞭な膿瘍形成を伴う病変が認められたのに対し、EV処理GAS感染群では病変面積が有意に小さく、一部のマウスでは症状が認められなかった。これにより、大腸菌EVはGASの増殖を抑制するだけでなく、その病原性を大きく低下させることが示された。

