

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	Shrestha Looniva
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 Inhibitory effects of antibiofilm compound 1 against <i>Staphylococcus aureus</i> biofilms (黄色ブドウ球菌のバイオフィームにおける Antibiofilm compound 1 の抑制効果の研究)			
論文審査担当者 <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-start; padding: 10px;"> <div> 主 査 教授 大毛 宏喜 審査委員 教授 坂口 剛正 審査委員 教授 志馬 伸朗 </div> <div style="text-align: right;"> 印 </div> </div>			
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>黄色ブドウ球菌はヒトの常在菌でありながら、しばしば強い病原性を発揮し、皮膚軟組織感染症、敗血症、肺炎、骨髄炎、心内膜炎など様々な感染症を引き起こす。この細菌はまた医療用インプラント器材の表面などに付着し、バイオフィームを形成して、感染の長期化、慢性化に寄与することが知られている。バイオフィームを形成する細菌は一旦感染すると抗菌化学療法に抵抗性を示すため、最終的に埋入したインプラント器材の摘出に至る例も少なくない。現在までにバイオフィーム形成をコントロールすることができる薬剤は開発されておらず、バイオフィーム形成のメカニズム研究、またそれを阻害する薬剤の開発が望まれている。ベンザミダゾール系化合物 5-methoxy-2-[(4-methyl-benzyl)sulfanyl]-1H-benzimidazole は Sambanthamoorthy らによって低分子化合物ライブラリーの中からバイオフィーム形成を阻害するハイスループット・スクリーニングで見出された antibiofilm compound-1 (ABC-1)と名付けられた物質である。Sambanthamoorthy らは ABC-1 が緑膿菌や表皮ブドウ球菌、黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成を阻害するが、阻害濃度で動物細胞などに対して細胞障害作用がないことを示し、ABC-1 が臨床応用可能なバイオフィーム形成阻害の候補であることを示した。しかし ABC-1 の作用メカニズムについては未だ明らかにされていない。申請者は本研究で ABC-1 の黄色ブドウ球菌臨床分離株のバイオフィーム産生に及ぼす影響を検討し、その作用メカニズムについて解析した。</p> <p>まず臨床から分離された 55 株の黄色ブドウ球菌を用いて、そのバイオフィーム産生に及ぼす影響について検討した。ABC-1 は 39 – 156 μM の範囲で1株を除いてほとんどの菌のバイオフィーム産生を抑制した。黄色ブドウ球菌のバイオフィーム産生には三つの主要な菌体表層成分が関与することが知られている。これらは菌体</p>			

表層多糖 PIA (polysaccharide intercellular adhesin)、細胞壁結合タンパク質、そして菌体外 DNA(eDNA)である。多くの黄色ブドウ球菌でこの三種の表層構造が関連しあってバイオフィルムの足場を提供していると考えられている。そこで申請者はまず 55 株のバイオフィルム形成における三種の表層構造の関与について検討した。その結果、菌の産生するバイオフィルムの量と各々の菌における三種の表層構造への依存性の間には関連性は認められなかった。また ABC-1 の効果と三種の表層構造の関与との間にも関連性は認められなかった。

そこで一つ一つの表層構造に対する ABC-1 の影響について検討した。ABC-1 処理した菌体の表層より PIA を抽出し、抗 PIA 血清を用いたドットブロット法によって ABC-1 の PIA に対する影響をみたところ、ABC-1 はいずれの菌株においても菌体表層の PIA 量を明らかに減少させることがわかった。PIA は *ica* オペロンによってその発現が制御されていることが知られている。そこで ABC-1 の *ica* オペロンの発現に及ぼす影響について検討した結果、ABC-1 は *ica* オペロンの発現には影響しなかった。次に ABC-1 の細胞壁結合タンパク質に及ぼす影響について検討した。ABC-1 処理した菌体より細胞壁画分を調整し、細胞壁に共有結合しているタンパク質を抽出して SDS-PAGE により解析したところ、ABC-1 は選択的に Protein A (Spa) の量を減少させたが、他の多くの細胞壁結合タンパク質には影響を及ぼさなかった。そこで ABC-1 に反応して著しく Spa 発現が減弱した株 HP855 を用いて ABC-1 による *spa* を含む主要な細胞壁結合タンパク質遺伝子の発現に及ぼす影響について検討したところ、*spa* の選択的な発現抑制が認められた。そこで HP855 を用いて *spa* 欠失株を作成し、そのバイオフィルム産生性を検討した。その結果、HP855 *spa* 欠失株は著しくバイオフィルム産生が減弱したが、ABC-1 処理 HP855 ではさらにバイオフィルム産生が抑制されていた。このことから ABC-1 の影響は *spa* 発現抑制のみならず、他の因子も関与することが改めて示された。最後に ABC-1 処理した菌の表層成分を用いて eDNA を検出する定量 PCR を行い、マーカーとして *fhuA*、*leuA*、*lysA* について定量した。その結果、ABC-1 はいずれのマーカーを用いても eDNA 量を著しく減弱させることが明らかとなった。

以上のことを総合すると ABC-1 は PIA、eDNA の菌体表面への集積を阻害し、菌体表層タンパク質 Spa の遺伝子発現を選択的に抑制することで黄色ブドウ球菌のバイオフィルム産生を抑制することを明らかにした。今後さらなる詳細なメカニズムの解析が求められるとともにオメプラゾール等臨床で使用されるプロトンポンプ・インヒビターのバイオフィルム抑制活性など、臨床への応用に向けた研究が求められる。

本研究は ABC-1 のバイオフィルム産生抑制のメカニズムを初めて明らかにしたものであり、細菌学、感染症学分野の発展に寄与するところが大きい。よって審査員会委員全員は著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値があることを認めた。