

奨励金No.1594

# 先端的3Dイメージング技術による薬剤耐性菌感染の微小病態解析

原 英樹

国立大学法人旭川医科大学 教授

## Micro-pathological analysis of drug-resistant bacterial infections using advanced 3D imaging technology

Hideki Hara

Asahikawa Medical University, Professor



国際的に薬剤耐性菌の蔓延が問題視されている。本研究では、世界的に多剤耐性アシネトバクターに対する新たな治療法を模索するために感染炎症応答を解析した。その結果、アシネトバクターのLPSは細胞質においてカスパーゼ11依存的にガスダーミンDを活性化し、細胞膜を傷害していることが判明した。また、カスパーゼ11の活性化がアシネトバクターの臓器内菌数を増加させ感染病態を悪化させていることが明らかとなった。

The global spread of drug-resistant bacteria is an increasing concern. In this study, we investigated the infection-induced inflammatory response to explore novel therapeutic strategies against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Our findings revealed that *Acinetobacter* LPS is recognized by caspase-11 and activates gasdermin D in the cytosol, leading to cell membrane rupture. Furthermore, it was found that activation of caspase-11 increases bacterial loads in the organs and exacerbates the pathogenicity of *Acinetobacter* infection.

### 1. 研究内容

#### 1.1 研究の背景と目的

現代社会は人流の活発化により感染症が拡大しやすい環境にある。なかでも薬剤耐性菌のサイレント・パンデミックが深刻化しており、2050年には薬剤耐性菌による死者数が悪性腫瘍の死者数を追い越すと試算されている。世界保健機構は多剤耐性を示すアシネトバクターなどを緊急性「Critical」と発表しているがこれまでに大きな進展はなく、臨床現場での対策としては抗菌薬の使用制限が主であることから感染症に対する新薬開発が世界的に停滞している。また、既存の抗生物質やファージ療法、抗菌ペプチドなどは直接細菌を標的とすることから、新たな耐性菌の出現を誘発することが懸念されている。この医療問題を打

破するために、既存の治療法から脱却し新たな感染治療戦略を確立させることが危急の課題となっている。病原体は様々な微生物リガンドを発現していることから多岐にわたる炎症応答を惹起する。われわれはそのなかで多くの感染重症患者で報告されているインフラマソーム応答に着目し新たな感染治療法を模索した。

#### 1.2 方法

アシネトバクターをマウスの骨髄細胞から分化したマクロファージに感染させた。感染マクロファージにおける細菌の動態や感染微小環境を詳細に調べるために、グルタルアルデヒドで固定した感染細胞を走査型電子顕微鏡で観察した。インフラマソーム応答の指標として、培養上清中の

IL-1 $\beta$ 濃度をELISAで測定し、細胞膜の傷害を評価するために培養上清中のLDHを測定した。また、カスパーゼの活性化はウエスタンブロット法で活性型タンパク質を検出することで評価した。さらに、個体レベルでの感染病態を調べるために、アシネトバクターを経静脈感染したマウスの臓器内菌数をカウントし、血清中のサイトカイン濃度を測定した。病態の評価における血液凝固の指標として血漿中のTAT（トロンビン・アンチトロンビン複合体）を測定した。

### 1.3 結果

走査型電子顕微鏡を用いてアシネトバクターに感染したマクロファージを観察したところ、細菌を含んだ食胞が多数見られた。そこで、連続断面像を重ねることで3次元像を構築したところ、食胞膜が崩壊している部分が認められた。この結果から、マクロファージの食胞内で殺菌・分解を受けた細菌リガンドが細胞質に曝露されインフラマソームが活性化している可能性が考えられた。

インフラマソームは細胞内で微生物成分を検知する異物認識システムであり、細胞内受容体、アダプター分子ASCおよびシステインプロテアーゼであるカスパーゼ1で構成される。これまでにインフラマソームを活性化する細胞内受容体として8種類の分子が同定されており、これらが微生物リガンドを感知することでインフラマソーム複合体を形成しカスパーゼ1を活性化する。活性型カスパーゼ1は、炎症性サイトカインであるIL-1 $\beta$ やIL-18前駆体をプロセッシングすることで細胞外へ分泌させ、またガスダーミンDを介した炎症誘導型細胞死パイロトーシスを引き起こす。様々なインフラマソーム関連分子を欠損したマクロファージにアシネトバクターを感染させると、NLRP3およびカスパーゼ11を欠損した細胞においてIL-1 $\beta$ の産生が低下した。また、細胞内LPSセンサーとして報告されているカスパーゼ11依存的に細胞死が誘導されていた。近年、新たなLPSセンサーと

してNR4a1が報告されたことからアシネトバクター感染で検討したが、野生型マクロファージとの間で有意な差は認められなかった。

次に、インフラマソーム応答の影響を個体レベルで検討したところ、興味深いことに、カスパーゼ11欠損マウスにアシネトバクターを感染させると野生型マウスと比較して臓器内菌数が減少し、マウスの生存率が改善した。カスパーゼ11はガスダーミンDを活性化することで細胞膜に孔を形成することから、近年ガスダーミンD阻害効果が報告されたジスルフィラムをマウスに前投与したところ、アシネトバクターの臓器内菌数が低下した。また、感染で誘導される血液凝固も減弱し、感染病態が改善した。

### 1.4 考察

これまでアシネトバクターは細胞外で増殖し、細胞内へのアクセスは考慮されていなかった。しかしながら、今回の感染微小環境における3次元構築解析から、少なくとも食胞膜が破綻し、菌体もしくは細菌リガンドが細胞質に曝露される状況にあることが判明した。細胞表面に細菌リガンドを認識するセンサー分子が発現しているように、細胞質内にも同様の分子が存在する。現在までに、細胞内のLPS受容体としてカスパーゼ11とNR4a1が報告されているが、アシネトバクター感染においてはカスパーゼ11依存的にガスダーミンDを活性化し、細胞膜を傷害していることが判明した。これによって二次的にNLRP3を介してインフラマソームが活性化し、IL-1 $\beta$ がマクロファージから分泌されることがわかった。この一連の炎症応答がアシネトバクターの感染病態に与える影響を検討したところ、カスパーゼ11の活性化がアシネトバクターの臓器内菌数を増加させ、感染病態を悪化させていることが明らかとなった。一方で、IL-1 $\beta$ を欠損してもアシネトバクターの臓器内菌数は低下しなかったことから、IL-1 $\beta$ 非依存的な炎症応答が感染病態を形成していると考えられる。

IL-1 $\beta$ とは異なる炎症誘導因子を特定し阻害剤を開発することで、薬剤耐性化が懸念されているアシネトバクターに対する革新的な治療法が確立できると期待される。

## 2. 発表（研究成果の発表）

1. Matsuda Y, Yamauchi H, Kamoshida G, Shiraishi T, Yokota S, Hara H. Activation of caspase-11 exacerbates Acinetobacter infection through gasdermin D-driven membrane rupture. 第53回日本免疫学会総会（長崎、2024年）
2. Hara H. Mechanisms and applications of inflammation-mediated severity of bacterial infections. 第97回日本生化学会大会（横浜、2024年）
3. Hara H. Accelerating infectious disease research from Asahikawa. 第97回日本細菌学会総会（札幌、2024年）
4. Matsuda Y, Yamauchi H, Kamoshida G, Shiraishi T, Yokota S, Hara H. Exacerbation mechanism of Acinetobacter infection through Gsdmd-mediated membrane rupture. 第97回日本細菌学会総会（札幌、2024年）