

## 細菌

緑膿菌 autoinducer およびその誘導体による IL-8 産生・  
アポトーシス誘導に関する検討

都築 閱<sup>1)</sup> 館田一博<sup>1)</sup> 木村聡一郎<sup>1)</sup> 松本哲哉<sup>1)</sup> 石井良和<sup>1)</sup>  
宮入伸一<sup>2)</sup> 堀川 学<sup>3)</sup> 石黒正路<sup>3)</sup> 山口恵三<sup>1)</sup>

## I. はじめに

菌は環境における自らの濃度を感知し、その濃度に応じて病原因子遺伝子の発現を巧妙に制御している。つまり、菌と菌との情報伝達機構、quorum-sensing と呼ばれる細菌間コミュニケーションシステムである。緑膿菌の quorum-sensing 機構 (las および rhl) はそれぞれ I- 遺伝子 (lasI, rhlI), R- 遺伝子 (lasR, rhlR) 産物である autoinducer および、これと複合体を形成し直接 DNA に結合する転写活性化因子を介した遺伝子発現調節機構により、菌体外毒素、ピオシアニン、菌体外多糖などの病原因子発現を制御している。今回我々は、緑膿菌の quorum-sensing 機構において autoinducer 分子であるホモセリンラクトン分子 (HSL) の生体側細胞への影響に着目した。これまでに Las 系 autoinducer である *N*-3-Oxododecanoyl Homoserine Lactone (3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL) が生体細胞に作用して、好中球遊走因子である IL-8 産生<sup>1,2)</sup> を強く誘導するという結果が報告されている。また我々は、3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL がマクロファージ系細胞および好中球に対して強いアポトーシス誘導作用があることを報告した<sup>3)</sup>。どのようなメカニズムで 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL がアポトーシスを誘導するのか、生体側レセプター分子の特定など多くの疑問が残されている。

現在エリスロマイシン (EM) を代表とするマクロライド剤の慢性緑膿菌気道感染症に対する有効性は確立したものの、その作用機序は未だ解明されるには至っていない。現在宿主側と細菌側への両面から検討されており、本剤の臨床的有効性と関連するデータが多数報告されている。マクロライド剤は sub-MIC であっても緑膿菌が長時間暴露された場合には、細菌の外膜蛋白や LPS などの

菌体表面構造に変化を誘導し血清殺菌に対する感受性を高める<sup>4)</sup> という事実から、マクロライド剤が緑膿菌に対しても殺菌的に作用している可能性を報告してきた<sup>5)</sup>。これらの事実はマクロライド剤が生体内において緑膿菌の病原因子発現を強く抑制していることを示唆しており、これが慢性気道感染症患者における本剤有効性機序の一つとして機能している可能性を示している。今回の発表では、上皮系細胞、マクロファージ系細胞を用い、緑膿菌の 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL およびその誘導体による生体細胞への影響を検討するとともに、マクロライド剤の quorum sensing 機構に対する抑制効果に関して検討を行った。

## II. 材料および方法

1. 使用細胞 ATCC から購入した A549 (上皮細胞系), U937, P388D1 (マクロファージ系) 細胞を使用した。
2. 緑膿菌 autoinducer 分子およびその誘導体 合成は日本大学薬学部・サントリー生物有機科学研究所で行った。
3. 細胞 viability の変化 テトラカラー (生化学工業) にて検討した。細胞に緑膿菌 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL およびその誘導体を 50 μM の濃度で 24 時間作用させ、評価時に reagent を 10 μl ずつ各 well へ加え 2 時間培養後吸光度を測定し、% viability をコントロールとの比で表した。
4. IL-8 測定 市販の ELISA kit (Duo Set, ELISA development system, R & D system) を使用。細胞に緑膿菌 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL およびその誘導体を 50 μM の濃度で 24 時間作用させ上清を用いて測定した。
5. アポトーシスの評価 caspase-1, 3, 8, 9 は col-

1) 東邦大学医学部微生物学教室, 2) 日本大学薬学部, 3) サントリー生物有機科学研究所

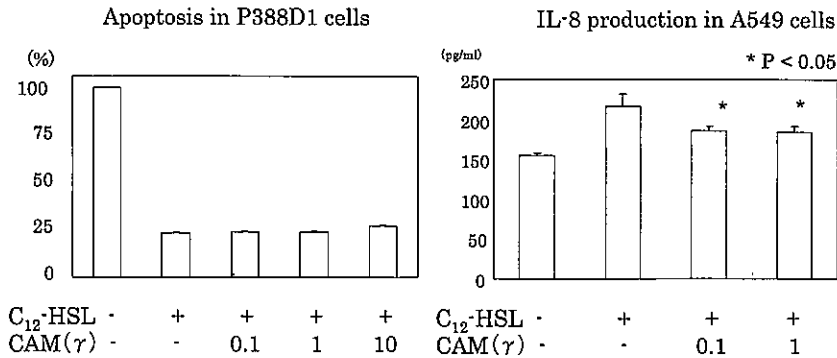
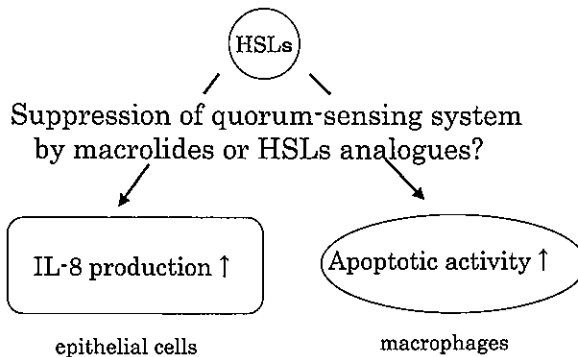
Fig. 1. Effects of Clarithromycin on 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL-induced Host Responses

Fig. 2



orimetric assay (R&D system) を使用した。緑膿菌3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL 50  $\mu$ M を作用させ4時間後に測定し、コントロールとの比で表した。

6. アポトーシス阻害剤の評価 Caspase-Family Inhibitor Set III (BioVision Research Products) を使用。細胞に緑膿菌3-oxo-C<sub>12</sub>-HSLおよびその誘導体50  $\mu$ M を作用させる1時間前にCaspase-1, 3, 8, 9, Family Inhibitor 4  $\mu$ M を作用させ、細胞viabilityの変化をテトラカラーで評価した。

7. クラリスロマイシン (CAM) による quorum sensing抑制作用の評価 CAMは100%メタノールで溶解し、RPMI1640 (Gibco, Grand Island, N.Y.) にて0.1, 1, 10  $\gamma$  に希釈した。緑膿菌3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL 50  $\mu$ M を作用させる24時間前にCAMを作用させ、細胞viability, IL-8誘導作用を評価した。

### III. 成績

(1) 緑膿菌autoinducer分子およびその誘導体がIL-8産生誘導、細胞viabilityに与える影響

今回は緑膿菌3-oxo-C<sub>12</sub>-HSLとその誘導体23種類を用いて検討した。A549, U937, P388D1細胞に緑膿菌autoinducer分子およびその誘導体を作用させ、IL-8産生誘導、細胞viabilityを指標とし、構造の違いによる活性を評価した。まず、細胞によって緑膿菌autoinducer分子による反応が異なることがわかった。上皮細胞系A549細胞では、IL-8を産生誘導するが細胞viabilityは変化せず、マクロファージ系U937, P388D1細胞ではviabilityに変化を認めたがIL-8の産生は誘導しなかった。構造的には非常に特異性が高く、L体がD体になるだけでも活性は消失した。特に側鎖の長さが重要であり12炭素以下で活性は消失した。しかしphenyl基やcyclopropyl基などの構造物が側鎖末端にあると側鎖

の長さが12炭素以下でも活性を認めた。一方、2炭素長くした3-oxo-C<sub>14</sub>-HSLでは逆に活性の増強が観察された。細胞viabilityの低下はIL-8産生誘導作用よりも特異性が高く、細胞viabilityを低下させた誘導体は全てIL-8産生誘導作用を持つ誘導体に含まれた。

#### (2) アポトーシスの分子機構の解明

細胞viability低下にアポトーシスの関与を考え、アポトーシス実行過程に働くcaspase3, 8, 9とcaspase活性化に関与するcaspase1に着目した。3-oxo-C<sub>12</sub>-HSLをP388D1細胞に作用させるとcaspase 1, 3, 8, 9のいずれも発現を認めた。Caspase-1, 3, 8, 9, Family inhibitorを3-oxo-C<sub>12</sub>-HSLを作用させる1時間前にP388D1細胞に加えると、完全な抑制効果は認めなかったがコントロールの半分程度までアポトーシスは抑制された。以上より3-oxo-C<sub>12</sub>-HSLによりP388D1細胞のアポトーシスが誘導され、アポトーシス誘導機構にはcaspaseの系が一部関与していることが推測された。A549細胞ではcaspaseの発現を認めず、またcaspase inhibitorによる抑制効果も認めなかったことより、caspaseの系以外の経路が関与していることが推測された。

#### (3) HSL阻害剤の効果

いくつかの誘導体が3-oxo-C<sub>12</sub>-HSLによるIL-8産生・アポトーシス誘導に対して阻害活性を有していることが確認されたが、活性としては非常に弱く、阻害剤として使用可能な誘導体を見つけることはできなかった。

#### (4) マクロライド剤の宿主に対する作用

CAMをsub-MICの濃度で上皮系細胞、マクロファージ系細胞に作用させ、3-oxo-C<sub>12</sub>-HSLによるIL-8産生、アポトーシス誘導作用が抑制されるか検討した。アポトーシス抑制効果は認めなかったが、IL-8産生誘導を抑制した (Fig. 1)。反応濃度、作用時間により反応性に違いが認められ、今後さらに検討が必要と思われる。

### IV. 考察

最近になって、緑膿菌の病原因子の多くが特異的な遺伝子制御メカニズムであるquorum-sensing機構により制御されていることが明らかとなって

いる。過去に我々はアジスロマイシン (AZM) 2 μg/mlによる作用を検討し、本剤が3-oxo-C<sub>12</sub>-HSLの産生を強く抑制することを観察した<sup>6)</sup>。また、この作用はautoinducer産生酵素および転写活性化因子の転写に対する抑制効果と良く一致するものであった。これらの知見は、マクロライド剤が緑膿菌quorum-sensing機構を介して本菌の病原因子の発現を制御している可能性を示すものである。今回の検討では3-oxo-C<sub>12</sub>-HSLによるIL-8産生誘導作用をCAMがsub-MICで抑制したことから、マクロライド剤が本菌のquorum-sensing機構を抑制することにより、菌側と生体側の両面から感染症の発症病態をmodulateしている可能性が考えられた。

また、多くのグラム陰性菌がquorum-sensing機構を持ち、各グラム陰性菌がautoinducerの構造的な違いを認識し感知することが知られている。緑膿菌の場合2つのサーキットを持つため、自己シグナルの認識は非常に厳密になることが予測される。緑膿菌がautoinducerの構造の違いをどの程度、どの部位を厳格に認識しているのか知ることができれば、阻害剤の開発も可能と思われる。

今回の検討ではautoinducer誘導体を用いてIL-8産生、細胞viabilityを指標とし、antagonist, agonist作用を持つ誘導体を検索した。その結果、3-oxo-C<sub>12</sub>-HSLが結合する生体側レセプター分子はIL-8産生誘導、アポトーシス誘導では異なりそれぞれに特徴的な分子構造があることが推測された。IL-8誘導作用にはL体のHSL ringとacyl-side chainの長さが重要であり、アポトーシス誘導作用には加えてacyl-side chainの3-oxo groupが重要であった。さらに、3-oxo-C<sub>12</sub>-HSLのacyl-side chainを親水基にすると活性は失われたが、phenyl基やcyclopropyl基の様な疎水基にすると活性は保たれた。また、autoinducer誘導体の検証で活性の認められなかった3-oxo-C<sub>12</sub>-HSLのacyl-side chainを親水基にした誘導体に着目した。このようなわずかな構造的違いだけで完全に結合活性を失ってしまうとは考えにくく、むしろLasRに結合することはできるが、何らかの理由でLasRの活性化ができなかったのではないかと考えた。もし、そうであるならばantagonistとしての活性を持つのではないかと考えられた

が、残念ながらantagonist活性は弱く認められたものの、阻害剤として使用できる程の活性は認められなかった。

次にその分子機構を解明するために、今回はcaspase1, 3, 8, 9に着目し、アポトーシス誘導作用のメカニズムに関与することを確認した。caspase阻害剤により完全な阻害効果は認められなかったため、他のシグナルも関与していることが推測された。これまでに気道上皮細胞からmitogen-activated protein kinase (MAP kinase) を含む系を介してIL-8が産生されること<sup>7)</sup>や、breast carcinoma細胞のアポトーシスにsignal transducer and activator of transcription (STAT) 3が関連すること<sup>8)</sup>が報告され、これらとquorum-sensing機構との関連に関し現在検討を行っている。

Quorum sensing機構は緑膿菌感染症の病態形成において重要な要因であることに疑いはない。quorum sensing機構を抑制することにより感染病態がどのように変化するのか、quorum sensing機構抑制剤の感染症治療薬としての可能性など、今後さらに検討していく予定である。

## 文 献

- 1) DI MANGO E., ZAR H. J., BRYAN R., *et al.* : Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *J Clin Invest.* 96 : 2204~2210, 1995
- 2) SMITH R. S., FEDYK E. R., SPRINGER T. A., *et al.* : IL-8 production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the *Pseudomonas* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by NF-kappa B and activator protein-2. *J. Immunol.* 167 : 366~374, 2001
- 3) TATEDA K., ISHII Y., HORIKAWA M., *et al.* : The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infect. Immun.* 71 : 5785~5793, 2003
- 4) TATEDA K., ISHII Y., HIRAKATA Y., *et al.* : Profiles of outer membrane proteins and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* grown in the presence of sub-MICs of macrolide antibiotics and their relation to enhanced serum sensitivity. *J. Antimicrob. Chemother.* 34 : 931~942, 1994
- 5) TATEDA K., ISHII Y., MATSUMOTO T., *et al.* : Direct evidence for antipseudomonal activity of macrolides : exposure-dependent bactericidal activity and inhibition of protein synthesis by erythromycin, clarithromycin, and azithromycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 : 2271~2275, 1996
- 6) TATEDA K., COMTE R., PECHERE J. C., *et al.* : Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 : 1930~1933, 2001
- 7) DENNING G. M., WOLLENWEBER L. A., RAILSBACK M. A., *et al.* : *Pseudomonas pyocyanin* increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. *Infect. Immun.* 66 : 5777~5784, 1998
- 8) LI L., HOOI D., CHHABRA S. R., *et al.* : Bacterial N-acylhomoserine lactone-induced apoptosis in breast carcinoma cells correlated with down-modulation of STAT3. *Oncogene.* 23 : 4894~4902, 2004