

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。なかでもアシネトバクターを含む多剤耐性菌は深刻化しており、新たな治療法の開発が望まれている。本研究では、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微小環境と炎症応答に着目して解析を行った。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、細胞内の炎症性メディエーターを放出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から、新たな治療標的としての可能性が明らかとなった。

The global spread of antimicrobial-resistant bacteria has become a major international concern. Among them, multidrug-resistant bacteria, including *Acinetobacter*, are becoming increasingly problematic, creating an urgent need for new therapeutic strategies. In this study, we focused on the infection microenvironment and inflammatory responses to explore potential new treatments for multidrug-resistant *Acinetobacter*. Our analyses revealed that *Acinetobacter* LPS activates gasdermin D in the cytosol in a caspase-11-dependent manner, leading to the release of intracellular inflammatory mediators. Furthermore, because caspase-11 activation increased bacterial burdens in organs and exacerbated disease severity, our findings suggest that caspase-11 may serve as a promising new therapeutic target.

1. 研究内容

1.1 研究の背景と目的

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「最優先」に位置づけており、抗菌薬の使用制限などの政策を行ってきた。一方で、多剤耐性菌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、ホスト指向性治療法の開発が求められている。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が、我々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た新たな感染治療法の確立を目指した。

1.2 方法

C57BL/6 マウスから骨髓細胞を回収し、マクロファージに分化させたのちに多剤耐性アシネトバクターの感染実験に使用した。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 β 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、多剤耐性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多剤耐性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三次元像を再構築したところ、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や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 β

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 β 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おり、NLRP3 インフラマソームの活性化はカスパーゼ 11 の欠損により消失することから、多剤耐性アシネトバクターはカスパーゼ 11 を介して非典型インフラマソームを活性化し、二次的に NLRP3 インフラマソームの活性化を誘導していることが明らかとなった。一方で、近年 LPS に対する結合分子として報告された NR4a1 は、アシネトバクター感染で誘導される IL-1 β 産生に関与していなかった。

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 欠損マウスに多剤耐性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、ガスダーミン D 阻害効果が報告されている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反応も減弱し、感染病態が改善した。活性化したガスダーミン D は細胞膜を傷害することで細胞内の炎症性メディエーターを細胞外に放出させることから、ガスダーミン D 依存的に上昇する血漿中の炎症性因子を質量分析で解析した。その結果、三種類の炎症性サイトカインが検出された。そのうちの 1 つに対する中和抗体を感染マウスに投与したところ、コントロール抗体投与群と比較して臓器内菌数が減少し、マウスの生存率も回復した。以上の結果から、非典型インフラマソームが活性化することで放出される同炎症因子によって多剤

耐性アシネトバクターの感染病態が悪化していることが判明した。

1.4 考察

これまでアシネトバクターは細胞外で増殖すると考えられていたため、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三次元再構築解析から、感染マクロファージでは食胞膜が破綻し、少なくとも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。これまでに細胞内の LPS 受容体としてカスパーゼ 11 と NR4a1 が報告されているが、多剤耐性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 β 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多剤耐性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 β 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 β 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。カスパーゼ 11 が LPS を認識すると非典型インフラマソームが活性化しプログラム細胞死パイロトーシスが誘導される。そこで、IL-1 β 以外にパイロトーシスで放出される炎症性メディエーターを同定し、その 1 つを中和することで多剤耐性アシネトバクターの感染病態が顕著に緩和したことから、非典型インフラマソームを阻害することで既存抗菌薬が効かない多剤耐性アシネトバクター感染が治療できる可能性が示唆された。このような知見は、薬剤耐性菌の克服に向けたホスト指向性治療介入の有効性

を示しており、今後の基礎研究から社会実装への移行が期待される。

2. 発表（研究成果の発表）

1. ○ Hara H, Matsuda Y, Yamauchi H. Exacerbation mechanisms of bacterial infection through inflammasome-mediated inflammatory responses. 第 99 回日本細菌学会総会（広島、2025 年）
2. Matsuda Y, Yamauchi H, Yoshimura A, Nunez G, ○ Hara H. Activation of Gsdmd by Gram-negative bacterial infection and its impact on the pathogenesis. 第 54 回日本免疫学会学術集会（姫路、2025 年 12 月）
3. ○ Hara H. Inflammasome-mediated exacerbation of Gram-positive bacteria infections. 第 48 回日本分子生物学会年会（横浜、2025 年）
4. ○ Hara H. Exacerbation mechanism of bacterial infection through Gsdmd-mediated membrane rupture. 第 98 回日本生化学会大会（京都、2025 年）
5. ○ Hara H. Activation of caspase-11 by Gram-negative bacterial infection and its impact on the pathogenesis. 第 32 回日本免疫毒性学会学術年会（岐阜、2025 年）
6. ○ Hara H. Exacerbation mechanisms of Gram-positive pathogen infection through inflammasome responses. 第 98 回日本細菌学会総会（金沢、2025 年）