

研究経過報告書

1. 研究課題名：近赤外発光を利用した生体ライブイメージングで細菌感染症を経時的可視化し治療評価する
2. 研究代表者氏名：鴨志田 剛
3. 研究発表（論文、著書、学会発表等があれば記載してください）

1. Daiki Yamaguchi, **Go Kamoshida***, Syun Kawakubo et al., Near-infrared in vivo imaging system for dynamic visualization of lung-colonizing bacteria in mouse pneumonia. **Microbiology Spectrum**, in press. *Corresponding author
2. **Go Kamoshida***, Daiki Yamaguchi, Yuki Kaya et al., Development of a novel bacterial production system for recombinant bioactive proteins completely free from endotoxin contamination. **PNAS Nexus**, 3(8): pgae328 (2024). *Corresponding author
3. Noriteru Yamada, **Go Kamoshida***, Tsukasa Shiraishi et al., PmrAB, the two-component system of *Acinetobacter baumannii*, controls the phosphoethanolamine modification of lipooligosaccharide in response to metal ions. **Journal of Bacteriology**, 206(5): e0043523 (2024). *Corresponding author

4. 研究実績（必要であれば図を用いても構いません）

細菌感染症において *in vivo* モデルでの病原性評価は、感染症病態の全体像を理解するうえで重要である。感染症病態は、感染初期から死亡まで経時的に変化しており、宿主体内における感染病態の経時的観察は、感染症発症/増悪化機序の解明に繋がると考えられる。しかし、これまでの解析法で多く採用されている方法は、ある決まった 1 時点において、多数の個体を解析することで、その平均を評価する方法である。すなわち、同一個体での経時的変化を直接反映することができない。この問題点を解決する方法として、*in vivo* イメージングが挙げられる。*in vivo* イメージングは 1 個体の病態変化を非侵襲的かつ経時的に評価可能であり、使用する動物数を減らすことも可能である。これまで細菌に対する *in vivo* イメージングは、海洋細菌由来ルシフェリン-ルシフェラーゼ（LuxCDABE）を用いた自家発光系が大半であった。LuxCDABE は基質の添加なしに約 490 nm の発光を放出するシステムである。しかし、600 nm 以下の波長の光は生体組織に含まれるヘモグロビンや酸化ヘモグロビンに吸収、散乱され易く、体内深部透過性が悪い。このため肺など血流量が多い深部組織のイメージングにおいて感度低下の原因となる。我々はこれらの問題点を解決するため、従来法とは異なるシステムを用いて高感度化することが必要であると考えた。発光波長を長波長化することで、体内深部臓器からの透過性を向上できることが報告されている。しかし、近赤外領域の発光を利用し、細菌感染症の経時的な *in vivo* イメージングを実施した例はない。そこで我々は、D-luciferin 誘導体 “TokeOni” に着目した。TokeOni は Luc2（ホタルルシフェラーゼ）との反応により最大発光波長が約 670 nm の近赤外領域の発光を生じる。

Acinetobacter baumannii は薬剤耐性菌として世界的に問題視されており、WHO をはじめ各国の保健機関により新たな抗菌薬の開発が必要な細菌と位置づけられている。また、本菌は易感染性宿主において高頻度に肺炎を引き起こし致死的な病態を呈する典型的な日和見感染菌である。本研究では、高感度な細菌感染症モデルの深部 *in vivo* イメージング法の確立を目指し、*A. baumannii* マウス肺炎モデルに対し、近赤外発光基質を含む最適な発光システムの探索を行った。さらに、臨床分離株や他菌種に適応可能かを検討した。

これまでに LuxCDABE を用いた報告はすべてゲノム中に LuxCDABE オペロンを挿入する系であるが、細菌ゲノムの編集は煩雑で汎用性に乏しい。そこでプラスミドを用いたルシフェラーゼ発現により、汎用性の向上を試みた。はじめに細菌感染症モデルで *in vivo* イメージングを行うにあたり、高感度化が可能なシステムを最適化するため、各種発光酵素（LuxCDABE, Luc2（ルシフェラーゼ）および Akaluc（改変型ルシフェラーゼ））を発現するプラスミドを *A. baumannii* ATCC 17978 株へ導入した。まず、Luc2 を発現する ATCC 17978 株（ATCC17978-Luc）と反応することで、様々な波長の光を発する基質の検討を行った。*In vivo* において細菌に最適な発光システムを探索するため、シクロホスファミド投与による免疫抑制マウスに対し各種生物発光する株を肺感染させ、24 時間後の発光を

in vivo イメージングにより検出することを試みた。その結果、LuxCDABE 投与群では 2.8×10^{10} p/sec/cm²/sr の弱い発光を肺で検出できたが、ATCC 17978-Luc 株投与群に D-luciferin や CycLuc1, seMpai (新規近赤外発光基質) を反応させた際の発光はほとんど検出されなかった。次に、ATCC 17978-Luc 株投与群に基質として TokeOni を投与した場合、 4.4×10^{11} p/sec/cm²/sr の強い発光を肺で検出することに成功し、LuxCDABE 発現株と比較して約 10 倍の高感度化を達成した (図 1)。また、Akaluc 発現株投与群に TokeOni を投与した際の発光強度は 3.8×10^{11} p/sec/cm²/sr であった。この値は ATCC 17978-Luc 株投与群に TokeOni を用いた場合の発光強度と同程度である。汎用性の高さから、TokeOni-Luc2 による生物発光が細菌性肺炎に対する *in vivo* イメージングに最も適した生物発光システムであることが示唆された。

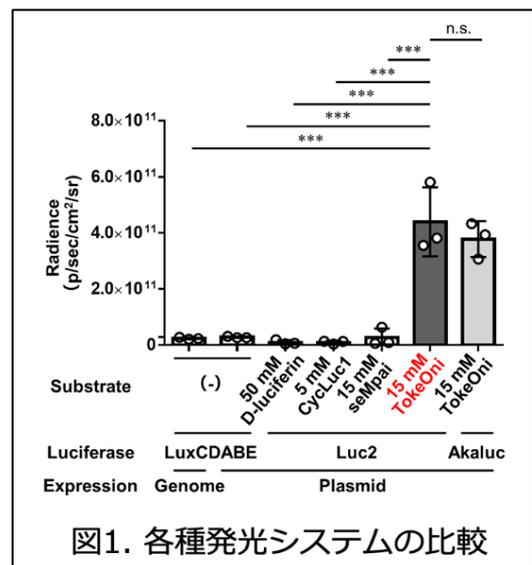


図1. 各種発光システムの比較

In vivo イメージングの利点は、同一個体内の病態変化を非侵襲的かつ経時的に評価できる点である。そこで、免疫抑制マウスに対し ATCC 17978-Luc 株を肺感染させ、感染初期から死亡までの経時的な定着菌数と TokeOni を用いた *in vivo* イメージングで評価した。さらに、感染 4 時間、24 時間、48 時間後における定着菌数と発光強度の相関関係を評価するため、*in vivo* イメージングとそれに続く肺定着菌数測定を行った。その結果、発光強度と肺定着菌数の間には相関関係 ($R^2=0.7366$, $P<0.0001$) が認められた。これらの結果から、TokeOni-Luc2 を用いた近赤外生物発光イメージングは *A. baumannii* の肺感染時の定着菌数の変化を同一個体内で非侵襲的かつ経時的に可視化できることが明らかになった (図 2)。

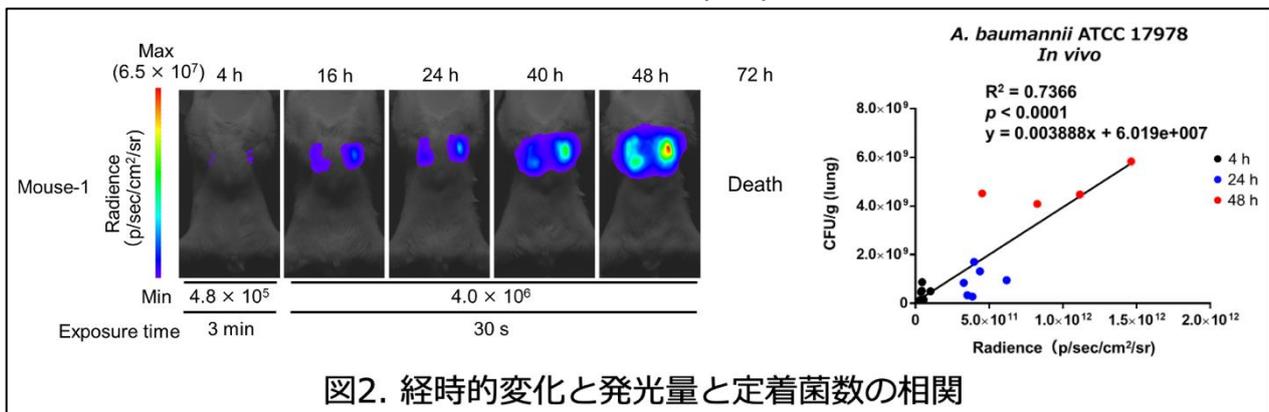
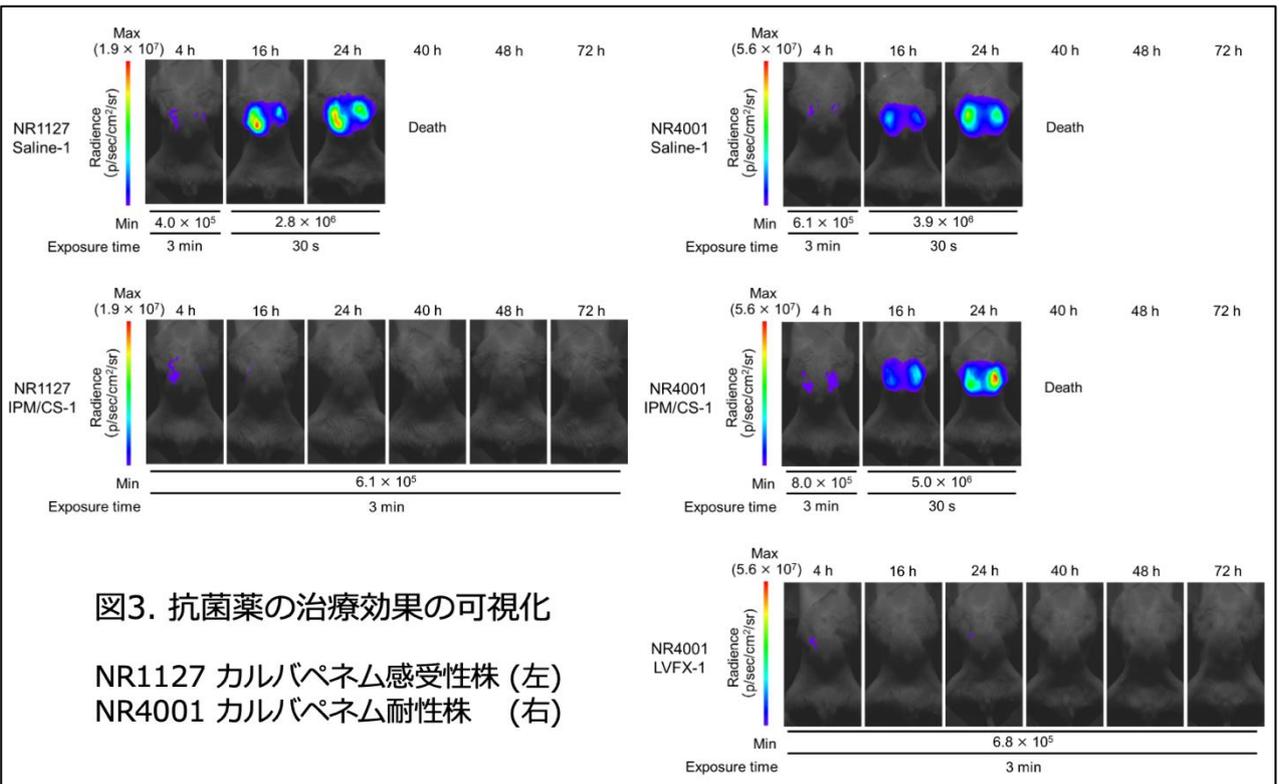


図2. 経時的变化と発光量と定着菌数の相関

つぎに経時的な定着菌数評価の方法を応用し、抗菌薬の治療効果を経時的に評価できるかを検討した。ATCC 17978-Luc 株はイミペネムに感受性であった。そこで、免疫抑制マウスに対し ATCC 17978-Luc 株を肺感染後、生理食塩水あるいはイミペネム/シラスチン (IPM/CS) を投与したマウスに対して、TokeOni を用いたイメージングを行った。その結果、IPM/CS 治療群では感染初期に肺の発光が検出されたが、その後発光が消失し、マウスは生存傾向を示した。一方で、生理食塩水群では肺の発光が検出され続け、最終的にマウスは死亡した。これらの結果から、近赤外生物発光イメージングは抗菌薬をはじめとした治療薬の治療効果評価に応用可能であることが示唆された。

本研究で開発した近赤外生物発光イメージングシステムは、染色体性でなくプラスミド性であるため、比較的簡単に様々な菌株に適応できる。そこで、本システムの汎用性を評価するため、*A. baumannii* 臨床分離株による肺炎に対し、定着菌数の経時的評価が可能か検討した。カルバペネム耐性 *A. baumannii* は公衆衛生を脅かす存在として世界的に注目されている。そこで、カルバペネム感受性 (NR1127) および耐性 (NR4001) *A. baumannii* 臨床分離株を用いて Luc2 を発現する株 (NR1127-Luc, NR4001-Luc) を樹立した。つぎに、NR1127-Luc あるいは NR4001-Luc 株の肺感染に対し、抗菌薬の治療効果を経時的に可視化できるか検討した。*In vivo* イメ

ーシングの結果、両株共に生理食塩水群では感染後、経時的に肺の発光強度が上昇し最終的にマウスは死亡した。IPM/CS 治療群において、カルバペネム系抗菌薬感受性の NR1127-Luc 株では感染初期に肺の発光を検出したが、その後経時的に発光が消失し、マウスは生存傾向を示した。一方で、カルバペネム系抗菌薬耐性の NR4001-Luc 株では経時的に肺の発光強度が上昇し最終的にマウスは死亡した。NR4001-Luc 株に対し MIC で感受性であったレボフロキサシン (LVFX) を投与したところ、感染初期から大きな発光強度の上昇は見られず、最終的に発光は消失しマウスは生存傾向を示した。これらの結果から、TokeOni を用いた近赤外生物発光イメージングは *A. baumannii* 臨床分離株においても適用可能であり、*in vitro* の抗菌薬の MIC を反映した治療薬の効果を非侵襲的かつ経時的に評価可能であることが明らかになった (図 3)。



本研究では、日和見感染菌であり薬剤耐性菌の出現が世界的に問題となる *A. baumannii* のマウス肺感染モデルに対し、近赤外発光が可能な D-ルシフェリン誘導体 “TokeOni” とプラスミドによるホタルルシフェラーゼ発現系を適用し、従来法よりも高感度な *in vivo* イメージング系の確立に成功した。本システムにより、肺定着菌数の経時的な変化を評価することが可能となった。さらに、薬剤耐性株を含む臨床分離 *A. baumannii* 株に対しても本イメージングシステムは適用可能であり、抗菌薬の有効性評価にも応用できた。本研究は今後、新規治療薬のスクリーニング、病原性評価など、動物感染症モデルを用いた幅広い解析に応用が期待できる。