

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16060

研究課題名(和文)併用薬を考慮した抗菌薬の投与設計に向けた抗菌薬とヒト血清アルブミンの構造基盤研究

研究課題名(英文)Structure based study of human serum albumin complex with antibiotics to improve the multidrug antimicrobial therapy.

研究代表者

河合 聡人(Kawai, Akito)

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：20435150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では立体構造の報告が少ない抗菌薬とヒト血清アルブミン(HSA)複合体のX線結晶構造解析を試みた。その結果、7種類の抗菌薬について結晶化に成功し、うち3種類については構造を決定、詳細な相互作用様式を解明することができた。また、薬剤感受性試験により、HSAとの結合部位について競合する薬物が存在すると最小発育阻止濃度が変化し、薬効に影響することを実験的に確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HSAは抗菌薬だけでなく抗がん剤や抗炎症薬など多くの薬と相互作用し、その結合変化によって薬効が左右される。特に救命的な重要性を有する抗菌薬は静脈内に直接投与されるものが多く、血中HSA濃度と同等になることから、併用薬とHSAの結合部位を取り合えば薬効変化が懸念される。本研究で得られた抗菌薬とHSAの詳細な相互作用様式は、併用注意の薬物リスト作成に役に立ち、効果的な薬物療法の設計に応用されることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Plasma protein binding is an essential factor in drug activity. Some antibiotics interact with human serum albumin (HSA), an abundant protein in human plasma. When the binding fraction was reduced, active drug concentrations are reflected in enhanced antimicrobial activity. However, the knowledge of the detail binding scheme of antibiotics with HSA is limited. In this study, we examined the binding scheme of antibiotics containing typical molecular skeletons to HSA using X-ray crystallography. As a result, we succeeded to crystalize seven complexes of HSA and antibiotics and determined four crystal structures. Based on the structure, we selected the competitive drug for binding to HSA and experimentally confirmed that the susceptibility of antibiotics was changed when the competitive drug was present.

研究分野：構造生物学

キーワード：構造生物学 ヒト血清アルブミン 薬剤感受性 抗菌薬

1. 研究開始当初の背景

細菌感染症治療に必須である抗菌薬の薬効を最適化するためには、それぞれの薬物の特性を理解し、血中濃度を適切に設定、維持する投与设计が重要となる。投与设计で考慮すべき項目の中でも、血清タンパク結合率は薬効の発現やその効果時間を左右する重要な因子である。実際、肝疾患、慢性消耗性疾患、重症感染症などにより血清アルブミン値が低下した患者では、血清タンパク質への結合能が高いセフトリアキソン、ダプトマイシン、クリンダマイシンなどは体内からの消失が早くなり、治療効果が低下してしまう。これは血液中でタンパク質に結合した抗菌薬の量が減った結果、クリアランスや分布容積の値が変化したためと考えられている。このような場合、血清アルブミン値の変化に応じた投与设计の変更が必要で、通常1日1回投与が行われるセフトリアキソンでは、投与時間を3~6時間へと延長する、また、1日分の量を3分割して投与するなどの対応例が報告されているが、知見が不足しているため一般臨床ではほとんど行われていない。

ヒト血清中に含まれるタンパク質の約60%はヒト血清アルブミン(HSA)である。このHSAには抗菌薬に限らずNSAIDsや抗がん剤など非常に多くの種類の薬物が結合する。それぞれの薬物のHSAに対する結合能が変化すると、薬効の減弱、または増大による副作用の発現など大きな影響を及ぼす。そのため、HSAと薬物の相互作用に関する知見は薬物の体内動態や薬効の発現を考える上で重要な情報と考えられている。

申請者はこの「血清アルブミン値の変化で抗菌薬のクリアランスや分布容積の値が変動する」こと、「HSAには抗菌薬以外の薬物も結合する」ことから、実際の治療で一般的な多剤併用時には、併用した薬物がHSAとの結合にあたり競合することで、血清アルブミン値が低下した時と同じ状況になるのではと考えた。つまり、「HSAとの結合に競合する併用薬物が存在すると、抗菌薬の消失速度や体内分布などの薬物動態パラメータ、最小発育阻止濃度(MIC)といった薬物動力学パラメータに変動が起きるため、その変化に応じた抗菌薬の投与设计が必要になるのではないかと考えた。これを検証するには、HSAとの相互作用が抗菌薬に類似する薬物のリストが必要である。HSAには代表的な薬物の結合部位が3ヶ所、マイナーな部位が2ヶ所確認されていて、個々の薬物で結合する場所が異なっている(図1)。そこで、HSAと薬物の詳細な相互作用の情報を得るため、タンパク質の立体構造データベースであるProtein Data Bankの情報を精査した。結果、これまでにHSAと化合物複合体の立体構造は約100データが登録されているが、含まれる化合物は脂肪酸やチロキシンなどの内因性物質、NSAIDs、抗がん剤、麻酔薬などの薬物に集中していて、抗菌薬ではわずか1例(フシジン酸ナトリウム)のみであった。

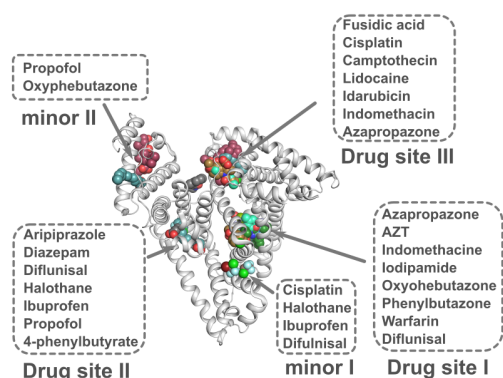


図1 HSAに結合する薬物の位置

表1 対象とする抗菌薬

種類	抗菌薬名
セフェム系	セファゾリン セフトリアキソン
ペネム系	ファロペネム
ポリペプチド系	ダプトマイシン
フルオロキノロン系	シタフロキサシン
マクロライド系	ロキシスロマイシン
リンコマイシン系	クリンダマイシン
グリシルサイクリン系	チゲサイクリン
テトラサイクリン系	ドキシサイクリン
リファンピシン	リファンピシン

2. 研究の目的

詳細な抗菌薬とHSAの相互作用様式を明らかにするため、X線結晶構造解析法を用いてHSAと分子骨格の異なる抗菌薬(表1)について複合体構造を解明する。得られた構造から各抗菌薬と相互作用が競合する薬物を選定する。そして、これら選定した薬物とHSAを添加した培地を用いて抗菌薬のMIC値を測定することで、薬物併用時の抗菌薬の薬物動力学パラメータの変動について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 結晶化とX線結晶構造解析

酵母発現系を用いて調製されたHSAを用いて抗菌薬(表1)との複合体の共結晶化を試みた。結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて、HSAに対してモル比で3-10倍量の抗菌薬を加えた複数条件で行った。また、結晶性の改善を目的にさらにミスチン酸を加えた条件でも結晶化を試みた。得られた結晶は大型放射光実験施設Photon FactoryやSPRING-8のビームラインを共同利用によりX線回折実験を行い、回折データが収集できればプログラムXDSで処理した。構造解析はプログラムMolrepまたはPhaserを用いた分子置換法で行った。構造精密化はプログラムphenix.refineを用いて行い、分子構造の構築はプログラムCootを用いて行った。

(2) 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は国際的な基準である CLSI に準拠した微量液体希釈法で行った。培地は凍結乾燥させたヒト血清由来 HSA (Sigma-Aldrich) をミューラーヒントン培地で溶解した後、フィルター滅菌にて調製した。HSA 添加の影響を調べるため、まずは HSA の有無が異なる培地で薬剤感受性試験を行い、MIC 値が変化することを確認した。次に抗菌薬と競合する薬物のみを加えた条件で薬剤感受性試験を行い、競合薬物に抗菌活性を有していないことを確認した。抗菌薬と競合薬物を用いた薬剤感受性試験は、培地に競合薬物を一定量加え、各抗菌薬の終濃度が 0.12-8 $\mu\text{g/mL}$ となるように調製し、マイクロプレートに 100 μL ずつ分注した。菌株は精度管理株に指定された *E. coli* ATCC 25922 株を使用した。菌株はミューラーヒントン寒天培地上で一晩生育させ、滅菌生理食塩水で McFarland 0.5 となるように懸濁し、さらにミューラーヒントン培地で 20 倍希釈した菌液を調製した。この菌液を抗菌薬の入った培地に 10 μL ずつ加え、37°C で 24 時間培養した後、プレートリーダを用いて OD₆₀₀ の濁度を測定し、培地のみのウェルを対照に濁度が 0.1 以上のウェルを発育したと判定した。

4. 研究成果

(1) HSA-抗菌薬複合体の結晶化と X 線回折実験

HSA と抗菌薬の結晶化を行ったところ、ダプトマイシンを除く抗菌薬で結晶が得られる条件を見出すことはできた。しかし、全ての結晶において図 2 に示すようなクラスター状であった。単結晶が得るためシーディング法を繰り返すなど検討を行ったが、安定して単結晶が得られる条件を見出すことはできなかった。そこで、結晶化ドロップの数を増やし、これらの中から単結晶のようなもの、また、局所的に X 線を照射すれば単結晶部分で回折実験が行えそうな結晶を選び、液体窒素中で急速凍結した。この結晶を、Photon Factory や SPring-8 へと輸送し、X 線回折実験を行った。その結果、セフェム系 (セファゾリンとセフトリアキソン) 及び、クリンダマイシンの結晶構造をそれぞれ、2.7 Å、2.2 Å、2.9 Å 分解能で決定することができた。それ以外の抗菌薬については、回折点は観察されるが分解能が低い、異方性が強い、複数の結晶由来の回折点が観察されるなど (図 3)、構造解析が可能な回折データを収集することはできなかった。

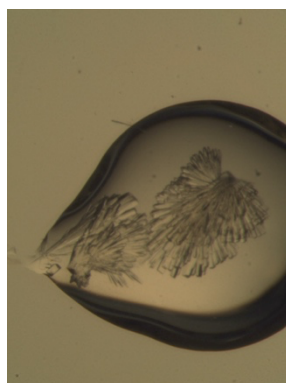
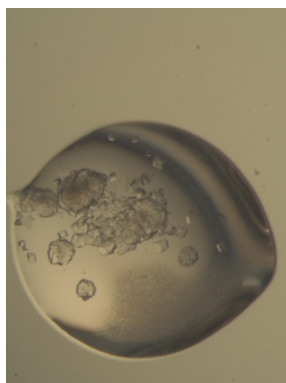


図 2 HSA-抗菌薬複合体の結晶

(左) 抗菌薬のみ (右) ミリスチン酸添加

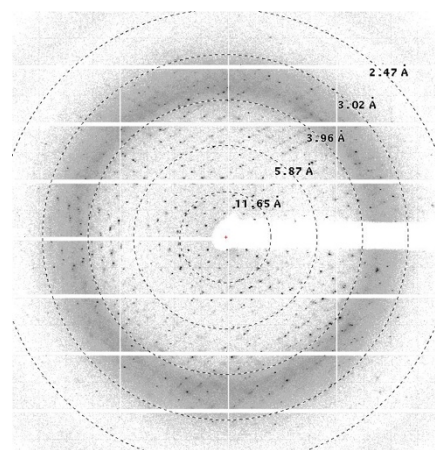


図 3 HSA-抗菌薬複合体の結晶の回折像

(3) X 線結晶構造

構造解析に成功したセファゾリン、セフトリアキソンおよびクリンダマイシンはそれぞれ 1 分子が HSA に結合していることが明らかになった (図 4)。特にセファゾリンとセフトリアキシンの相互作用には共通性が観察され、アルギニン残基でセファロsporin 環を水素結合で認識していることが明らかになった。このことから各種セファロsporin の HSA に対する結合親和性を計算化学的に予測できるのではないかと考え、現在ドッキングシミュレーションを用いた検討を進めている。また、クリンダマイシンも糖の水酸基とカルボキシアミドのカルボニル酸素も水素結合を介したアルギニン残基で認識していることが明らかになった。

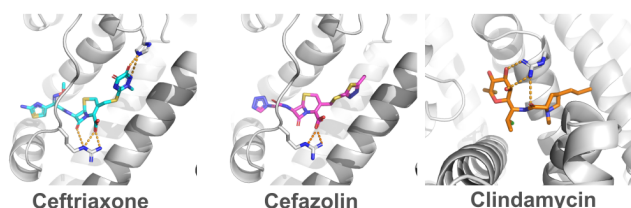


図 4 HSA と抗菌薬の複合体構造

(3) 薬剤感受性試験

結晶構造から結合位置が明らかになったセファゾリン、セフトリアキソンについて、薬剤感受性試験を行った。培地中への HSA 添加でセフトリアキシソンの MIC 値は 8 倍、4 倍上昇することを確認した。この結果は既報論文の結果と一致していた (*Antimicrob. Agents Chemother.*, 52, 3994–4000, 2008)。そこで、抗菌薬に他の薬物を混ぜ、MIC 値を測定したところ、結合部位の競合が予想される薬物でその量異存的な MIC 値の低下を観察した。また、その量はアルブミン濃度と等量から影響が観察されることも確認できた。実臨床を想定すると、抗菌薬と競合薬物の血中濃度は逆転していることが想定されるため、平衡透析法を用いてセファゾリンおよびセフトリアキソンを HSA を結合させた状態から競合薬物を添加していくことで、抗菌薬が HSA から解離することも確認している。

以上、本研究では特に実臨床で頻用されるセフェム系抗菌薬の HSA への結合、薬剤感受性の変化について解明することに成功した。これらの基礎知見をもとに抗がん剤治療中などの感染症治療時に投与設計の最適化が必要な薬物の選定につながることを期待できる。また、多くの抗菌薬で結晶化には成功している。近年、多数の結晶を用いた X 線回折実験法が確立されていて実績を上げている。今後、今回得られた結晶もこの方法を試し構造解析可能なデータを収集したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hirata Kenshiro, Kawai Akito, Chuang Victor Tuan Giam, Sakurama Keiki, Nishi Koji, Yamasaki Keishi, Otagiri Masaki	4. 巻 7
2. 論文標題 Effects of Myristate on the Induced Circular Dichroism Spectra of Aripiprazole Bound to Human Serum Albumin: A Structural/Chemical Investigation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 4413 ~ 4419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.1c06220	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamasaki Keishi, Kawai Akito, Sakurama Keiki, Udo Nagiko, Yoshino Yuta, Saito Yuki, Tsukigawa Kenji, Nishi Koji, Otagiri Masaki	4. 巻 18
2. 論文標題 Interaction of Benzbromarone with Subdomains IIIA and IB/IIA on Human Serum Albumin as the Primary and Secondary Binding Regions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1061 ~ 1070
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.molpharmaceut.0c01004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawai Akito, Kobashigawa Yoshihiro, Hirata Kenshiro, Morioka Hiroshi, Imoto Shuhei, Nishi Koji, Chuang Victor Tuan Giam, Yamasaki Keishi, Otagiri Masaki	4. 巻 7
2. 論文標題 Chlorine Atoms of an Aripiprazole Molecule Control the Geometry and Motion of Aripiprazole and Deschloro-aripiprazole in Subdomain IIIA of Human Serum Albumin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 29944 ~ 29951
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.2c02929	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamasaki Keishi, Teshima Honoka, Yukizawa Reina, Kuyama Koki, Tsukigawa Kenji, Nishi Koji, Otagiri Masaki, Kawai Akito	4. 巻 66
2. 論文標題 Structural Basis of the Change in the Interaction Between Mycophenolic Acid and Subdomain IIIA of Human Serum Albumin During Renal Failure	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 951 ~ 961
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.2c01790	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河合 聡人 , 小橋川 敬博 , 平田 憲史郎 , 森岡 弘志 , 井本 修平 , 西 弘二 , 山崎 啓之 , 小田切 優樹
2. 発表標題 ヒト血清アルブミンとアリピプラゾール誘導体の誘起CDスペクトル変化に関する構造生物化学的考察
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Keishi Yamasaki, Honoka Teshima, Reina Yukizawa, Koki Kuyama, Kenji Tsukigawa, Koji Nishi, Masaki Otagiri, Akito Kawai
2. 発表標題 Structural basis of the change in the interaction between mycophenolic acid and subdomain IIA of human serum albumin during renal failure
3. 学会等名 日本薬物動態学会第37回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎 啓之, 河合 聡人, 雪澤 玲奈, 齋藤 友紀, 月川 健士, 西 弘二, 小田切 優樹
2. 発表標題 ベンズプロマロンのヒト血清アルブミンへの結合に及ぼす尿酸および遊離脂肪酸の影響
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎 啓之, 河合 聡人, 月川 健士, 西 弘二, 小田切 優樹
2. 発表標題 ヒト血清アルブミン分子上のベンズプロマロンのタンパク結合サイトの同定と結合へと影響因子の解析
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎 啓之, 河合 聡人, 櫻間 啓基, 有働 なぎ子, 吉野 悠大, 齋藤 友紀, 月川 健士, 西 弘二, 小田切 優樹
2. 発表標題 ベンスプロマロンのタンパク結合特性に関する基礎的検討
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	山崎 啓之 (Yamasaki Keishi) (30435143)	崇城大学・薬学部・教授 (37401)	
連携研究者	小田切 優樹 (Otagiri Masaki) (80120145)	崇城大学・薬学部・教授 (37401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------