

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07008

研究課題名（和文）深海放線菌由来の新規抗Candida auris物質の特性解析

研究課題名（英文）Characteristic analysis of a novel anti-Candida auris substance derived from deep-sea actinomycetes

研究代表者

金子 幸弘（Kaneko, Yukihiro）

大阪公立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90469958

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）：Candida aurisは薬剤耐性と院内感染が深刻化する新興感染症の原因真菌である。アゾール系とキャンディン系の抗真菌薬に耐性を示すため、新規作用の抗真菌薬の創製が求められている。我々は深海放線菌の培養上清ライブラリーから薬剤耐性C. aurisに増殖抑制効果を示す培養上清を見出した。本研究では、抗菌活性を有する物質を単離・精製し、その構造と作用を明らかにし、安全性・有効性を評価することを目指した。研究成果として、C. aurisの増殖抑制物質とバイオフィーム形成を抑制する凝集抑制物質を発見した（Yamane K, et al. Med Mycol J. 2023;64(1):7-17）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、薬剤耐性Candida aurisに対する新規抗真菌物質を深海放線菌から発見し、その構造と作用を明らかにした点にある。特に、バイオフィーム形成を抑制する物質の発見は、C. aurisの病原性を低減させる可能性を示唆する。

社会的意義としては、既存の抗真菌薬に耐性を持つC. aurisに対する新たな治療法の開発に貢献し、院内感染の予防と治療に大きな影響を与える。これにより、医療現場における感染管理が強化され、患者の健康と安全が向上することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Candida auris is an emerging pathogenic fungus with significant drug resistance and nosocomial infection issues. Due to its resistance to azole and echinocandin antifungal drugs, novel antifungal agents targeting different metabolic pathways are urgently needed. Our research focused on substances from deep-sea actinomycetes, identifying a culture supernatant that inhibits the growth of drug-resistant C. auris. The goal was to isolate and purify active compounds from this supernatant, determine their structure and mechanism, and evaluate their safety and efficacy. We identified two significant compounds: one inhibiting C. auris growth and another preventing its aggregation and biofilm formation, impacting virulence. These findings were partially reported (Yamane K, et al. Med Mycol J. 2023;64(1):7-17).

研究分野：感染症

キーワード：Candida auris 深海放線菌 バイオフィーム形成抑制 凝集抑制

## 1. 研究開始当初の背景

### □ 多剤耐性真菌 *C. auris* は世界的に拡大している新興感染症の病原体である

*C. auris* は、近年、多剤耐性と院内感染が深刻化している新興感染症の原因真菌である (図1)。*C. auris* は、2009年に我が国で最初に報告された新種のカンジダ属真菌で、我が国で分離された株は病原性も低く、薬剤感受性であったが (Sato K et al. Microbiol Immunol 2009) その後、欧米で重篤な感染症を引き起こす多剤耐性傾向の株が分離されて以降、院内感染対策が必要な新興感染症と認識されるようになった。新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の流行に伴う *C. auris* 保有率の上昇が報告され (Zuo T et al. Gastroenterol. 2020) COVID-19 の感染拡大による *C. auris* の院内感染の急増も懸念されている。

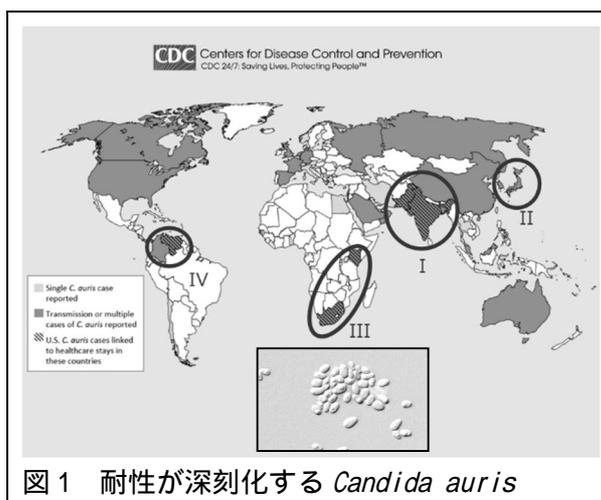


図1 耐性が深刻化する *Candida auris*

ウイルス感染症 (COVID-19) の流行に伴う *C. auris* 保有率の上昇が報告され (Zuo T et al. Gastroenterol. 2020) COVID-19 の感染拡大による *C. auris* の院内感染の急増も懸念されている。

### □ 真菌に対する新規標的の探索が停滞している

現行の主要な抗真菌薬はポリエン系、アゾール系、カンディン系の3系統で9種に限られる中、アゾール系、カンディン系の抗真菌薬に耐性を示す *C. glabrata* などのカンジダ属真菌が増加しつつある。また、*C. auris* のような多剤耐性真菌も出現している。一方で、新規標的の探索が停滞しているが、その理由として、採算が合わないなどの事情により企業が抗真菌薬開発から撤退していることに加え、真菌はヒトと同じ真核生物であり、選択毒性の観点から治療薬開発が難しいことが挙げられる。したがって、抗真菌薬開発においてアカデミアが担う役割は大きい。

### □ 深海放線菌由来の新規抗 *C. auris* 物質の特性を明らかにする

天然化合物は抗菌薬・抗真菌薬などの資源として使用されてきた歴史があるが、既存の微生物からの分離では新規性が得にくいと判断し、採取や培養が難しい深海細菌叢に着目した。すでに、多種多様な放線菌を分離し、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) やアシネトバクターなどを標的とするスペクトルの異なる物質を複数取得してきた。有用物質のさらなる取得が可能と考え、指示菌を真菌にまで拡大し、耐性傾向の CDC27 株を含む *C. auris* にも有効な候補物質を取得した。

## 2. 研究の目的

取得した抗 *C. auris* 物質を単離・精製し、生物学的・化学的特性を明らかにするとともに、治療薬の標的となる未知の代謝経路の解明を目指し、作用機序を調べ、in vitro での安全性・有効性を評価し、新規抗真菌薬としての可能性を明確にする。

## 3. 研究の方法

以下の要領で、深海放線菌由来の新規抗 *C. auris* 物質の特性を解明した。

#### □ 使用菌株

*Candida auris* のフルコナゾール (FLCZ) 耐性株 LSEM 3673 (南アフリカクレード III) と FLCZ 感受性株 LSEM 0643 (東アジアクレード II) を使用した。これらの株は帝京大学医真菌学研究所のコレクションに保存されており、FLCZ に対する最小発育阻止濃度 (MIC) はそれぞれ  $>64 \mu\text{g/mL}$  と  $16 \mu\text{g/mL}$  である。酵母細胞はポテトデキストロース寒天 (PDA) 培地および pH 7.0 に緩衝された RPMI 培地で培養した。

深海放線菌株は、鹿児島湾の有機物およびメタンが豊富な海底堆積物から分離し、培養上清を得るために培養した。放線菌は 28 で 2 週間培養し、次に  $0.22 \mu\text{m}$  のフィルターで濾過した。95 種類の放線菌株の培養上清を使用して *C. auris* の成長パターンの変化をスクリーニングした。

#### □ 菌液調整

*C. auris* 細胞を RPMI-MOPS に懸濁し、濁度を約  $2-10 \times 10^3 \text{ cells/mL}$  に調整した。50  $\mu\text{L}$  の酵母懸濁液を 96 ウェルプレートに移し、各ウェルに 20% の放線菌培養上清を加えた。最終的な細胞懸濁液と培養上清の濃度はそれぞれ  $1-5 \times 10^3 \text{ cells/mL}$  および 10% である。プレートは 37 で 24 時間インキュベートした。

#### □ 放線菌の同定

放線菌の同定には、NucleoSpin Microbial DNA キットを使用してゲノム DNA を抽出・精製し、16S rRNA 遺伝子を増幅してシーケンス解析を行った。シーケンスデータは BLAST 検索を用いて GenBank データベースと比較した。

#### □ 細胞凝集アッセイ

細胞凝集アッセイでは、*C. auris* 細胞を PDA から削り取り、RPMI-MOPS に懸濁して OD600 を 0.1 に調整した。細胞懸濁液を 37 で 15 時間インキュベートし、その後新鮮な RPMI-MOPS で 1:10 に希釈して顕微鏡で観察した。細胞表面疎水性は、トルエンと混合後の水相の濁度の減少を測定することで評価した。

#### □ バイオフィルムアッセイ

バイオフィルム形成は、RPMI-MOPS 培地に懸濁した *C. auris* 細胞を 96 ウェルプレートに移し、37 で 24 時間インキュベートした後、0.2% クリスタルバイオレット溶液で染色し、エタノールで脱色して吸光度を測定した。

#### □ エルゴステロール定量

エルゴステロールの定量には、25% アルコール性 KOH 溶液で細胞を処理し、n-ヘプタンで抽出したステロールを分光光度計で測定した。ローダミン 6G (R6G) の取り込みと排出アッセイでは、*C. auris* 細胞を RPMI-MOPS に懸濁し、R6G を添加して蛍光を測定した。

#### □ 蛋白質分解酵素活性

BSA 寒天培地上でのコロニーの形成および細胞溶解液を用いた比色法で評価した。放線菌培養上清の生物活性部分を部分的に分離するために、分子量カットオフ 3 kDa のサイズ排除フィルトレーションを実施した。

#### □ 統計解析

Student t 検定および一元配置分散分析を使用して統計的有意性を評価した。

## 4 . 研究成果

IMAs2016D-66 は *C. auris* の表現型を特異的に調節した。初期スクリーニングでは、IMAs2016D-66 を含むウェルで細胞沈降が観察された。顕微鏡分析により、IMAs2016D-66 は

細胞凝集を抑制することが確認された。16S rRNA 遺伝子の部分シーケンスにより、IMAs2016D-66 を産生する放線菌は *Nonomuraea* 属に属することが明らかになった。

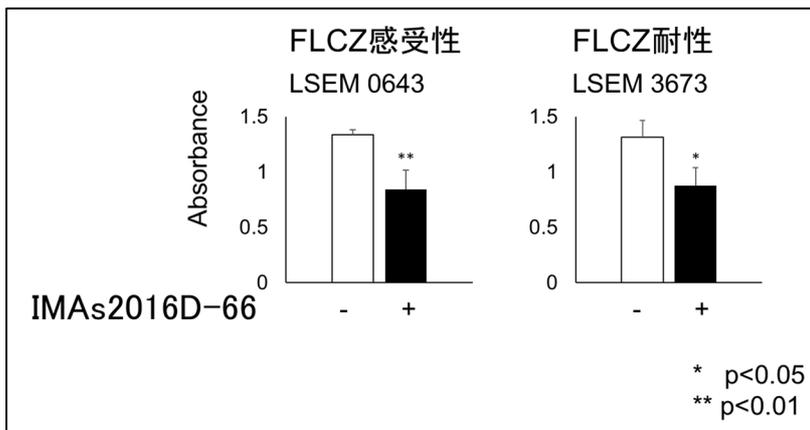
IMAs2016D-66 は細胞表面疎水性を低下させ、バイオフィーム形成を抑制した。細胞表面疎水性の低下が見られ、バイオフィーム形成も有意に減少した。エルゴステロールの分光分析では、IMAs2016D-66 の添加による変化は確認されなかった。

IMAs2016D-66 は特異的に排出ポンプ活性を増加させた。FLCZ 耐性株 LSEM 3673 では、IMAs2016D-66 処理により R6G の排出が増加した。

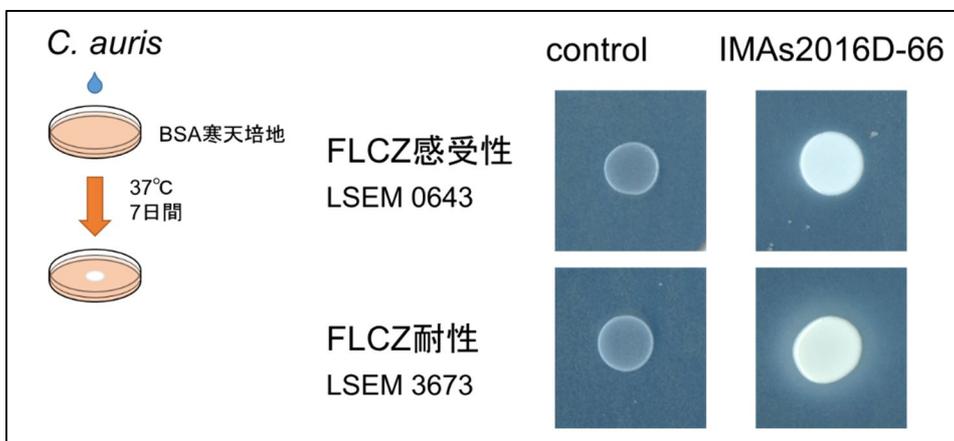
IMAs2016D-66 は蛋白質分解酵素活性を促進した。IMAs2016D-66 を添加すると、両株ともに蛋白質分解酵素活性が有意に上昇した。

IMAs2016D-66 の生物活性部分を部分的に分離すると、バイオフィーム形成、蛋白質分解酵素活性、および排出ポンプ発現に影響を与えた。熱処理により、バイオフィーム形成と蛋白質分解酵素活性に対する効果が失われるが、排出ポンプ活性に対する効果は影響を受けない。分子量が 3 kDa を超える部分が、これらのフェノタイプ変化に関与していることが示唆された。

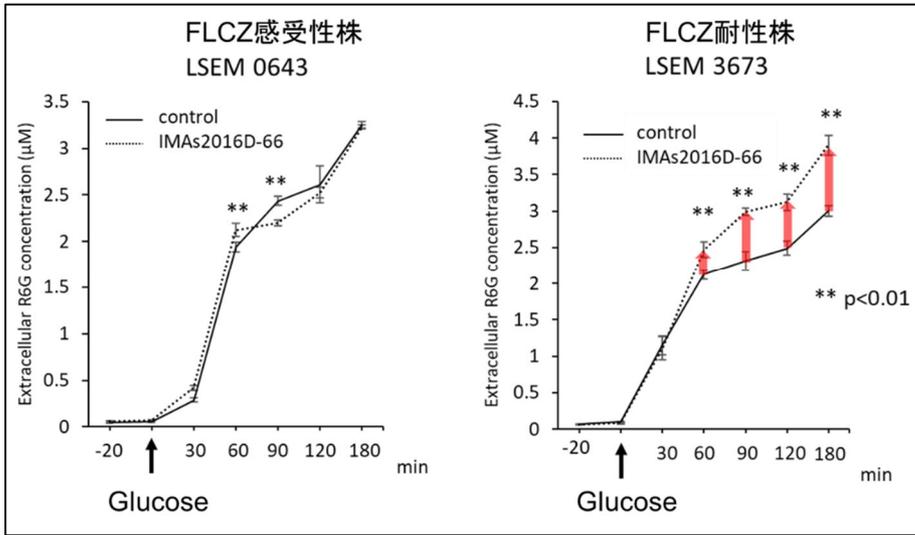
この研究は、*C. auris* の病原性に関する調節機構の解明に寄与し、新たな抗真菌薬の開発に役立つ可能性がある。



IMAs2016D-66 はバイオフィーム形成（定着）を抑制



IMAs2016D-66 はプロテアーゼ活性を活性化



IMAs2016D-66 は FLCZ 耐性株の排出ポンプを活性化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamane Kenshi, Niki Mamiko, Tsubouchi Taishi, Watanabe Tetsuya, Asai Kazuhisa, Oinuma Ken- Ichi, Sakiyama Arata, Saren Chaogetu, Matsumoto Yuki, Makimura Koichi, Kaneko Yukihiro, Kawaguchi Tomoya	4. 巻 64
2. 論文標題 A Culture Supernatant from an Actinomycete sp. Affects Biofilm Formation and Virulence Expression of <i>Candida auris</i>;	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Medical Mycology Journal	6. 最初と最後の頁 7~17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3314/mmj.22-00026	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金子幸弘
2. 発表標題 シンポジウム3. 真菌検査における新しい潮流. 難診断深在性真菌症（ムーコル症）の早期診断法の開発
3. 学会等名 第66回日本医真菌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金子幸弘
2. 発表標題 9. 主催企画：微生物学に興味をもたせる講義の作り方「楽しく教える細菌学」
3. 学会等名 第33回 日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金子幸弘
2. 発表標題 深海放線菌由来化合物による <i>Candida auris</i> のバイオフィルム形成抑制効果
3. 学会等名 第37回日本バイオフィルム学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金子幸弘
2. 発表標題 薬剤耐性菌で我が道を切り拓く ~ 深海埋蔵菌から教育DXまで ~
3. 学会等名 第52回 薬剤耐性菌研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金子幸弘
2. 発表標題 深海微生物が産生する 抗クリプトコックス物質の探索と同定
3. 学会等名 第67回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2023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
研究分担者	坪内 泰志 (Tsubouchi Taishi) (30442990)	大阪公立大学・大学院医学研究科・准教授  (24405)	
研究分担者	榎村 浩一 (Makimura Koichi) (00266347)	帝京大学・公私立大学の部局等・教授  (32643)	
研究分担者	仁木 満美子 (Niki Mamiko) (20438229)	大阪公立大学・大学院医学研究科・准教授  (24405)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	鈴木 仁人  (Suzuki Masato)  (70444073)	国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター・主任研究官    (82603)	

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