

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08514

研究課題名（和文）再発性C. difficile感染症に対する新規創薬シード化合物の探索

研究課題名（英文）Screening of drug discovery seed compounds for recurrent C. difficile infection

研究代表者

松井 秀仁（Matsui, Hidehito）

北里大学・感染制御科学府・講師

研究者番号：80503797

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：C. difficile感染症は再発することが多く問題となっている。そこで本研究では、CDIに対する新たな創薬シード化合物の探索として、抗菌活性のみならず、毒素産生阻害活性、芽胞形成阻害活性を有する天然化合物の探索を行った。毒素の定量系を確立し、新たなスクリーニング系を用いて、天然化合物ライブラリーの評価を行った。その結果、抗菌活性、芽胞形成阻害活性、毒素産生阻害活性を示した化合物を、それぞれ19、10、7化合物見出すことが出来た。これら化合物は、既存抗菌薬よりも優れた抗菌活性を有するものや、芽胞形成を特異的に抑制するものがあり、今後のさらなる評価が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

C. difficile感染症(CDI)は、従来の抗菌薬治療において、10～30%の症例において再発が起こり、再発例ではさらなる再発を繰り返すリスクが高まり難治化することが報告されている。本研究で見出した天然化合物は新たなCDI治療薬の創製に向けたシード化合物になる可能性があることや、その作用機構の解析は、新たな薬剤開発の標的の同定に繋がることから学術的および社会的意義は大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：Recurrence of C. difficile infection is a serious problem in clinical settings. In this study, we aimed to identify the seed compound of drug development for CDI. ELISA system for Toxin B and binary toxin were established, and a library of natural compounds was evaluated using the screening method for inhibitory activity to bacterial growth, spore formation, or toxin production. From the screening results, the compounds with inhibitory activity for bacterial growth, spore formation, and toxin production were shown in 19, 10, and 7 compounds, respectively. These hit compounds indicated the antibacterial activity superior to existing antimicrobial agents or specific inhibitory activity for toxin production or spore formation, therefore these compounds are expected for further evaluation in the future.

研究分野：化学療法学

キーワード：Clostridioides difficile CDI Binary toxin 毒素 芽胞

1. 研究開始当初の背景

Clostridioides difficile は、ヒトなどの腸管内に生息する偏性嫌気性菌であるが、様々な化学的・物理的因子に抵抗性をしめず芽胞を形成する特徴を有している。近年、この *C. difficile* による腸管感染症(*C. difficile* infection: CDI)が世界的にも問題となっており、下痢や発熱、腹痛などの症状を伴い、さらに偽膜性大腸炎や腸管穿孔、中毒性巨大結腸症、麻痺性イレウスへと進展し、死亡に至る症例もある。2000年頃より欧米で Binary toxin を産生し、さらに Toxin A や Toxin B の過剰な毒素産生能を有した強毒株によるアウトブレイクが発生し、CDI による死亡例の増加につながっていった。CDI の治療薬としては、メトロニダゾールやバンコマイシン、フィダキソマイシンが用いられているが、症状の改善が認められた患者の内、約 25% で CDI の再発が起こり、さらにその再発例に対しては、45 ~ 65% でさらに再発を繰り返し、重症化することが臨床問題となっている。その大きな原因としては、*C. difficile* が芽胞を形成することに起因する。抗菌薬の作用により栄養細胞の状態の *C. difficile* は死滅するが、芽胞は残存する。その後、抗菌薬のプレッシャーが無くなると芽胞より発芽し、栄養細胞として再増殖を開始し毒素が産生されて CDI が再発する。その為、既存薬とは異なる標的および作用機序で CDI の再発を抑制する新たな治療薬の開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、CDI の再発の抑制に繋げることができるような新たな作用を有した天然化合物を見出すために、これまでの栄養細胞に対する抗菌作用のみならず、芽胞形成阻害作用や毒素産生阻害作用などを有する天然化合物を新規創薬シード化合物として見いだすことを目的とする。

3. 研究の方法

(1). ELISA 法による毒素定量系の構築

Binary toxin の定量系を構築するため、構成タンパク遺伝子である *cdtA* および *cdtB* を PCR で増幅し、大腸菌あるいは *Brevibacillus* によるタンパク発現系のプラスミドにクローニングした。タンパク発現を誘導後、菌体あるいは培養上清を回収し、コバルトイオンカラムを用いて CDTa と CDTb のアフィニティ 精製を行った。精製した CDTa と CDTb は、アジュバントと混合後、ラット腹腔内に免疫した。抗血清を回収し、作製した抗原カラムを用いて、抗 CDTa ポリクローナル抗体と抗 CDTb ポリクローナル抗体を精製した。抗体価は ELISA 法で測定し、特異性の評価は western blot で行った。ビオチン標識抗体を作製し、アビジン-HRP を用いて、sandwich-ELISA による CDTa と CDTb の定量系の測定条件の検討を行った。

(2). スクリーニング方法の構築

試験菌株の Binary toxin 産生 *C. difficile* を嫌気条件下で培養後、BHIS 培地に懸濁した。96 well プレートに調製した既存抗菌薬のメトロニダゾール(MNZ)、バンコマイシン(VCM)、フィダキソマイシン(FDX)の希釈系列に、*C. difficile* 菌液を加えて、嫌気条件下 36 で 72 時間培養を行った。MIC の判定後、培養上清を回収し、毒素定量用のサンプルとした。また、培養後の菌液とエタノールを等量混合することで栄養細胞を殺菌した後、BHIS 寒天培地に接種して残存した芽胞の計測を行った。

(3). 天然化合物ライブラリーからの活性物質のスクリーニングと評価

天然化合物ライブラリーの 726 化合物をサンプルとし、終濃度 20 µg/mL で構築したスクリーニング系を用いて、1 次評価を実施した。抗菌活性や芽胞形成阻害活性、毒素産生阻害活性を示した化合物については、さらに低濃度で評価を実施した。

4. 研究成果

(1). ELISA 法による毒素定量系の構築

cdtA および *cdtB* 遺伝子の PCR 産物を大腸菌用プラスミドに挿入し、タンパク発現用プラスミドを構築した。アラビノースでタンパク発現誘導を行った結果、CDTa は可溶性画分に約 50 kDa のタンパク発現が確認されたが、CDTb は不溶化してしまい回収することが出来なかった。そこで、CDTb については *Brevibacillus* による分泌タンパク発現系を用いて、組み換えタンパクの作製を実施した。その結果、培養上清中に目的タンパクである CDTb の約 75 kDa のバンドが確認された(図 1)。各発現系を用いて、CDTa および CDTb を得た後、ラットに免疫することで抗体の作製を行った。いずれも十分な抗体価の上昇が確認され、抗原カラムを用いて精製することで、抗 CDTa ポリクローナル抗体と抗 CDTb ポリクローナル抗体を得ることが出来た。各 4 ロットのポリクローナル抗体を作製し、sandwich-ELISA に適した抗体の組み合わせを検

討することで、定量系の構築を行った。その結果、CDTa および CDTb の最小検出感度はいずれも 0.3 ng/mL であった(図 2)。各法は、培養上清中毒素量を定量することが可能な感度を有していた。また、Toxin B についても、市販抗体を用いて定量系を構築した。

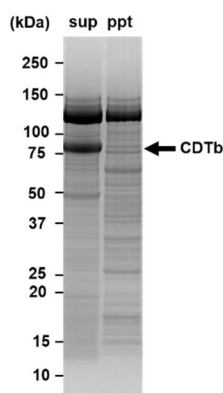


図 1. CDTb 遺伝子組み換えタンパクの発現

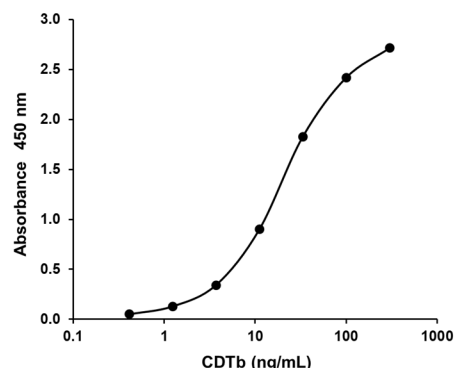


図 2. CDTb 検出 sandwich-ELISA

(2). スクリーニング方法の構築

試験菌株には *C. difficile* NCTC13366 株を用いて、スクリーニング系を確立するために培地や培養時間などを条件の最適化を行った。構築したスクリーニング系の精度を評価するため、既存抗菌薬を用いて試験を行った結果、MNZ, VCM, FDX の MIC はそれぞれ 8, 1, 0.5 $\mu\text{g/mL}$ であった。また、培養上清中毒素量を定量した結果、FDX は 1/4MIC の条件下において毒素産生量が低下することが確認された。芽胞形成については、1/2MIC の FDX において、1/100 以下に減少することが確認された。これらの結果から、本スクリーニング系は、抗菌活性、毒素産生阻害活性、芽胞形成阻害活性を評価可能な方法であることが確認された。

(3). 天然化合物ライブラリーからの活性物質のスクリーニングと評価

天然化合物ライブラリーの 726 化合物をサンプルとし、終濃度 20 $\mu\text{g/mL}$ で構築したスクリーニング系を用いて、1 次評価を実施した。活性の認められた化合物については、さらに低濃度での評価を実施した。その結果、抗菌活性評価において、MIC 0.1 $\mu\text{g/mL}$ を示した化合物を 16 個、0.01 $\mu\text{g/mL}$ 以下であった化合物を 3 個見出した。これらは、既存 CDI 治療薬よりも低い MIC を示した。毒素産生阻害活性を示した化合物は 7 個見出し、10 $\mu\text{g/mL}$ の条件下において、Toxin B, CDTa, CDTb のいずれかの毒素産生を 70%以上阻害した(図 3)。芽胞形成阻害活性は 10 化合物で認められ、特に化合物 H は濃度依存的に芽胞形成が阻害され、72 時間時点でコントロールと比較して 1/1000 以下に抑制された。これら活性を示した化合物については、詳細な評価を進めている。

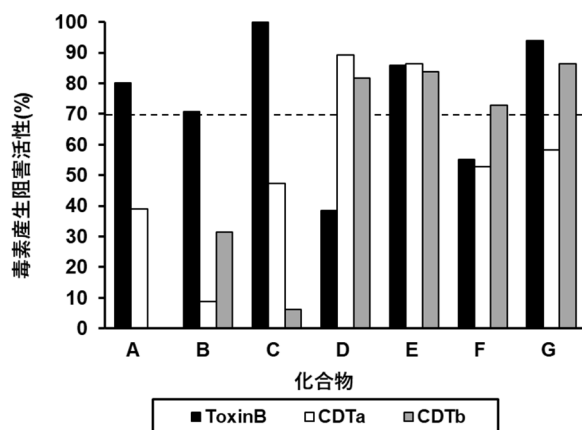


図 3. 毒素産生阻害活性の評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 荒木陸, 松井秀仁, 鈴木由美子, 遠藤晴美, 菅又美穂, 花木秀明
2. 発表標題 Clostridioides difficile Binary toxin 定量系を用いた毒素産生に対する治療薬の評価
3. 学会等名 第97回日本感染症学会総会・学術講演会第71回日本化学療法学会学術集会合同学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 荒木陸, 松井秀仁, 鈴木由美子, 菅又美穂, 花木秀明
2. 発表標題 Clostridioides difficileの毒素産生に対するCDI治療薬の評価
3. 学会等名 第72回日本感染症学会東日本地方学術集会 第70回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会
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	内山 淳平 (Uchiyama Jumpei) (20574619)	岡山大学・医歯薬学域・准教授 (15301)	

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
---------	---------