

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04868

研究課題名(和文) 病原細菌の主要なカルバペネム耐性機構、IMP-1に着目した研究

研究課題名(英文) Characterization of IMP-1, a major carbapenem resistance factor in bacteria

研究代表者

荒川 宜親 (Arakawa, Yoshichika)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10212622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤耐性菌の拡散が医療の現場で問題となっている。したがって、薬剤耐性菌問題を克服するために新しい抗菌薬や化合物の開発が必要とされている。本研究では、メタロ-β-ラクタマーゼ(以下 MBL)の阻害剤の開発を目的とした。MBL阻害剤はMBL産生菌に対するカルバペネム系薬の効果を復帰させるものと考えられる。我々は臨床的に問題となっているMBLの1つであるIMP-1を標的に阻害剤探索を行った。2107化合物を評価した結果、8化合物を阻害剤候補として特定した。この8つの化合物はIMP型MBL産生によるカルバペネム耐性の問題を克服するのに役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Emerging of drug-resistant bacteria is a major clinical concern. Thus, it is essential to develop new antibiotics and agents to overcome the problem of drug-resistant bacteria. To respond to the aforementioned urgent and unmet needs, we have screened for metallo-beta-lactamase (MBL) inhibitor. MBL inhibitor can revive the efficacy of carbapenem antibiotics. We have screened 2107 small molecule compounds to identify IMP-1 inhibitor. IMP-1 is the dominant MBL in clinically isolated Enterobacteriaceae. Enzymatic and biological analyses revealed that 8 compounds would be candidates of IMP-1 inhibitor. These 8 compounds would be a great help to overcome carbapenem resistance caused by production of IMP-type MBL.

研究分野：細菌学

キーワード：薬剤耐性菌

1. 研究開始当初の背景

近年、病原細菌の薬剤耐性化が著しく進行し、薬剤耐性菌の治療に難渋するケースが見受けられる。また、多様な抗菌薬に広範な耐性を獲得したいわゆる多剤耐性菌も出現・拡散し始めており、医療や畜産の現場において、極めて深刻な問題となっている。

上述のように薬剤耐性菌の増加と蔓延が進行する中、薬剤耐性菌に著効する新たな抗菌薬開発など、薬剤耐性菌への対策は遅れている。国際機関による推計では、2050年には薬剤耐性菌感染症により1千万人が死亡するとの試算もある。したがって、薬剤耐性菌に著効する新たな抗菌薬の開発や新たな治療法の提供など、薬剤耐性菌への対策が全世界で喫緊の課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では、アカデミアの視点から、薬剤耐性菌感染症の治療に利用できる新たな化合物を創製することを最終目的としている。薬剤耐性菌感染症克服のためには、これらに著効する新たな抗菌薬を開発することが1つの手立てとして挙げられる。しかし、実際の開発となると、基礎研究から臨床研究を辿り、実用化までの期間は長く、また、開発できたとしても、これまで同様、新たな耐性菌が生じる可能性もあり、新たな抗菌薬の開発にも幾つかのデメリットがあることは周知の事実である。

そこで本研究では、病原細菌が薬剤耐性機構を獲得したことにより一度は効力が失われた既存の抗菌薬の効果を、再度復帰させる新たな化合物を探索・創製することを目的とした。細菌が持つ薬剤耐性機構さえ抑制することができれば、既存の抗菌薬も十分に活用できる余地がある。既存の抗菌薬と薬剤耐性機構を抑制する化合物（薬剤耐性阻害剤）を同時投与し、細菌の薬剤耐性機構を抑えることができれば、薬剤耐性機構の存在によって失われるはずだった抗菌薬の効果を人体内で十分維持できると考え

られる。本研究では、薬剤耐性菌に有効な治療法開発の一助として、薬剤耐性機構阻害剤の開発を行うこととした。

我々の研究グループでは、細菌の主要なβ-ラクタム薬耐性機構であるβ-ラクタマーゼについてこれまで研究を行ってきた。特に、メタロ-β-ラクタマーゼについて重点的に基礎研究を行ってきた。メタロ-β-ラクタマーゼは腸内細菌科細菌を始めとしたグラム陰性菌による感染症の治療に重用されるカルバペネム系薬をも分解する性質を持つ。したがって、メタロ-β-ラクタマーゼは細菌が産生するβ-ラクタマーゼの中でも、特に問題視されている。しかし、このメタロ-β-ラクタマーゼに対し、既知のβ-ラクタマーゼ阻害剤は効果がなく、これまでに上市された阻害剤も存在しない。そこで本研究では、メタロ-β-ラクタマーゼに対する阻害剤の開発を目指すこととした。メタロ-β-ラクタマーゼの中でも、研究代表者が世界に先駆けて発見し、我が国の医療現場においては特に問題視されているIMP型メタロ-β-ラクタマーゼを標的とし、その阻害剤の開発研究を行う。

3. 研究の方法

(1)化合物ライブラリー

延べ2107種類の化合物について検討を行った。各化合物をジメチルスルホキシドまたはバッファーに溶解し、実験に供した。

(2)Cell-based Screening

96穴プレートに、1/8から1/4MIC値に相当するメロペネムを含有するミューラーヒントン液体培地を分注し、さらに、終濃度100μg/mLとなるように、化合物を添加した。IMP-1、NDM-1、VIM-2メタロ-β-ラクタマーゼを産生する臨床分離大腸菌や肺炎桿菌をそれぞれ接種、35°Cで一晩培養した。

(3)メタロ-β-ラクタマーゼの発現・精製

IMP-1メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子を

pET ベクターに連結し、*Escherichia coli* BL21 (DE3) にて IMP-1 を発現させた。IMP-1 の精製には陽イオン交換カラム、疎水相互作用カラム、ゲルろ過カラムを用いた。NDM-1 および VIM-2 メタロ-β-ラクタマーゼについても同様に行った。

(4) IC50 の測定

各化合物の濃度を振り、化合物存在下において、メタロ-β-ラクタマーゼ (10 nM) によるイミペネム分解活性 (298nm) を測定した。イミペネムの初期濃度は 150 μM、測定温度は 30℃とした。

(5) X 線結晶構造解析

IMP-1 の結晶を作製し、ソーキングにより阻害剤を IMP-1 結晶中に導入した。阻害剤の濃度は、結晶ドロップ中で最終濃度が 1-10 mM となるように調整した。本作業により、IMP-1-阻害剤複合体結晶を作製した。回折データの回収は愛知シンクロトロン光センサーおよび PF で行った。NDM-1 の結晶についても同様に作製し、解析を行った。

(6) 構造活性相関解析

ヒット化合物の各種誘導体を用意し、酵素活性阻害効果を指標に構造活性相関解析を行った。

4. 研究成果

IMP-1 および NDM-1 メタロ-β-ラクタマーゼについては最終純度 95%以上で精製でき、実験に必要な十分量を確保することができた。

まず、IMP-1 産生大腸菌を用いた Cell-based Screening を行った。化合物 100 μg/mL のみ含む培地、または、化合物 100 μg/mL およびメロペネム 1/8-1/4MIC 値濃度を含む培地で、それぞれ菌の発育を観察した。前者で発育が確認され、後者で発育が確認されなかった化合物を 1 次ヒット化合物として抽出した。その結果、当該化合物は

2107 化合物中 21 個であった (0.1%)。

さらに、NDM-1 産生大腸菌を用いた Cell-based screening も同様に行った。その結果、当該化合物は 2107 化合物中 11 個であった (0.5%)。

これらヒット化合物の詳細を見てみると、これまでにメタロ-β-ラクタマーゼ阻害剤として報告のあるもの、またはそれらの誘導体がいくつか含まれることがわかった。これらの化合物は新規性および発展性に乏しいため、その後の検討からは外すこととした。最終的に、8 化合物 (シード化合物) についてさらに検討を行うこととし、2 つのシード化合物 (化合物 X および化合物 Y) について初期検討を終えた。

化合物 X の IMP-1 に対する IC50 は 100 μM 程度であった。酵素学的視点からはそれほど強い化合物とはいえないものであった。しかし、IMP-1 産生株に対する生物学的阻害効果を調べたところ、100 μg/mL 存在下で、IMP-1 産生大腸菌のメロペネムの MIC が 1 μg/mL から 0.03125 μg/mL まで低下した。上記の結果から、酵素学的な阻害効果と生物学的な阻害効果に一部乖離が見られた。化合物 X は IMP-1 以外の他のメタロ-β-ラクタマーゼにも阻害効果を示し、さらに、それらを産生する細菌に対しても阻害効果を示した。また、IMP-1 と化合物 X の複合体結晶を作製し、データ回収を終えた。

化合物 Y の IMP-1、NDM-1、VIM-2 に対する IC50 は 30-70 μM 程度であった。IMP-1 産生株に対する化合物 Y の生物学的阻害効果を調べたところ、100 μg/mL 存在下で、IMP-1 産生大腸菌のメロペネムの MIC は 1 管しか低下しなかった。一方、NDM-1 産生株に対する化合物 Y の阻害効果を調べたところ、100 μg/mL 存在下で、NDM-1 産生大腸菌のメロペネムの MIC が 64 μg/mL から 2 μg/mL まで低下した。VIM-2 産生株に対しても同程度の阻害効果が確認された。

化合物 Y の誘導体を 7 種類用意し、構造活性相関解析を行った。その結果、酵素活性

阻害に必要な官能基、原子位置等を特定することができた。また、NDM-1 と化合物 Y の複合体結晶を作製し、データ回収を終えた。

本研究により IMP-1 および NDM-1 に対し、酵素および細菌レベルで阻害効果を示すシード化合物を特定することができた。特に、化合物 X および Y は有望なシード阻害化合物として発展性が期待されるものであった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

(1) Chihiro Norizuki, Kumiko Kawamura, Jun-ichi Wachino, Masahiro Suzuki, Noriyuki Nagano, Takaaki Kondo, Yoshichika Arakawa.

Detection of Escherichia coli producing CTX-M-1-Group extended-spectrum beta-lactamases from pigs in Aichi Prefecture, Japan, between 2015 and 2016

Jpn J Infect Dis. 2018 71(1)33-38. 査読有

(2) Mitsuru Oodate, Kouji Kimura, Hirotugu Banno, Satoru Yokoyama, Wanchun Jin, Jun-ichi Wachino, Yoshinori Hasegawa, Yoshichika Arakawa.

Predominance of serogroup 19 CC320/271 among penicillin-nonsusceptible Streptococcus pneumoniae isolates after introduction of the PCV7 vaccine in several regions of Japan.

Jpn J Infect Dis. 2018 71(1)14-20. 査読有

(3) Kentaro Kato, Hiroshi Mizumoto, Kousaku Matsubara, Atsuko Hara, Jun-ichi Wachino, Yoshichika Arakawa, and Daisuke Hata.

Recurrence of Escherichia coli meningitis in a preterm infant and co-infection of echovirus 18.

IDcases. 2017 10.135-137. 査読有

(4) Hirotugu Banno, Kouji Kimura, Yosuke Tanaka, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda, Wanchun Jin, Jun-ichi Wachino, Keiko Yamada, Keigo Shibayama, Yoshichika Arakawa.

Analysis of multidrug resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility forming small, less hemolytic colonies.

PLOS one 2017 12(8)e0183453. 査読有

(5) Wanchun Jin, Jun-ichi Wachino, Yoshihiro Yamaguchi, Kouji Kimura, Anupriya Kumar, Mototsugu Yamada, Akihiro Morinaka, Yoshiaki Sakamaki, Minoru Yonezawa, Hiromasa Kurosaki, Yoshichika Arakawa.

Structural insights into the TLA-3 extended-spectrum beta-lactamase and its inhibition by avibactam and OP0595. Antimicrob Agents Chemother 2017 61(10) e00501-17. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

(1) Wanchun Jin, 和知野純一、木村幸司、荒川宜親

Avibactam-, OP0595-TLA-3 ベータラクタマーゼ複合体の X 線結晶構造解析
2018. 第 91 回日本細菌学会総会 (福岡)

(2) Kazuki Kitaoka, Kouji Kimura, Hirotugu Banno, Wanchun Jin, Jun-ichi Wachino, and Yoshichika Arakawa

Carbapenem Resistance due to Amino Acid Insertion in Penicillin-Binding Protein of 3 of beta-Lactamase-

Negative Ampicillin-Resistant
Haemophilus Influenzae
2017. 第 54 回日本細菌学会中部支部総会
(名古屋)

(3)坂野弘嗣、木村幸司、田中洋輔、関塚剛史、
黒田誠、和知野純一、山田景子、柴山恵吾、
荒川宜親

Characterization of Group B
Streptococci with Reduced Penicillin
Susceptibility Forming Small Less-
beta-Hemolytic Colonies
on Sheep Blood Agar
2017. 第 54 回日本細菌学会中部支部総会
(名古屋)

(4)仲崇天、和知野純一、木村幸司、荒川宜親
メタロ-β-ラクタマーゼ VIM-2 の精製と阻
害剤探索
2017. 第 54 回日本細菌学会中部支部総会
(名古屋)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

[https://www.med.nagoya-
u.ac.jp/medical_J/laboratory/basic-
med/micro-immunology/bacteriology/](https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/laboratory/basic-med/micro-immunology/bacteriology/)

6. 研究組織

(1)研究代表者

荒川 宜親 (ARAKAWA, Yoshichika)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10212622

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

木村 幸司 (KIMURA, Kouji)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：50425675

和知野 純一 (WACHINO, Jun-ichi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：00535651

(4)研究協力者

金 万春 (JIN, Wanchun)
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助
教

ANUPRIYA Kumar

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助
教

坂野 弘嗣 (BANNO, Hirotsugu)
名古屋大学・大学院医学系研究科・博士課
程後期4年

北岡 一樹 (KITAOKA, Kazuki)
名古屋大学・大学院医学系研究科・博士課
程後期4年

金地 玲生 (KANECHI, Leo)
名古屋大学・大学院医学系研究科・博士課
程前期2年

金山 暁人 (KANAYAMA, Takato)
名古屋大学・大学院医学系研究科・博士課
程前期2年