

令和元年6月3日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09573

研究課題名（和文）難治性真菌感染症の克服を目指した新規治療戦略の開発

研究課題名（英文）Development of novel therapeutic strategies to overcome refractory fungal infections

研究代表者

宮崎 泰可（MIYAZAKI, Taiga）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・講師

研究者番号：60448496

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：臨床使用が可能な抗真菌薬はきわめて限られているなかで、多剤耐性菌の出現が重大な問題となっている。耐性株の特徴や耐性機序を明らかにし、新たな治療戦略を開発していく必要がある。本研究で我々は、多剤耐性 *Candida glabrata* における耐性機序と *Candida guilliermondii* 感染症の臨床的および微生物学的特徴を明らかにした。また、化合物ライブラリーのハイスループットスクリーニングにより、強力な抗真菌活性を有する新規化合物の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

侵襲性真菌感染症は致死的な経過をとることも少なくない。治療薬が少ないなかで耐性菌の出現が問題となっている。今回、耐性化のメカニズムや耐性菌感染症の臨床的および微生物学的特徴を一部解明した。また、化合物ライブラリーのスクリーニングにより、病原真菌に有効な新規化合物を同定することができた。これらの研究成果は、今後の新薬開発に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In the context of limited availability of antifungal agents, the emergence of multidrug resistant isolates has become a critical issue in clinical settings, underscoring an urgent need for the development of new antifungal strategies.

In this study, we have elucidated the resistant mechanisms of multidrug resistant *Candida glabrata* and the clinical and microbiological characteristics of *Candida guilliermondii* infections. In addition, we performed high-throughput screening of chemical compound libraries and found a novel compound that had potent antifungal activities.

研究分野：感染症内科学

キーワード：抗真菌薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「深在性真菌症診療の現状と課題 ~ 停滞する薬剤開発と多剤耐性病原真菌の脅威 ~」

医療の進歩や HIV/AIDS 患者の増加に伴い、日和見感染症は増加の一途にある。なかでも深在性真菌症は、重篤な経過をとり、治療に難渋することも少なくない。臨床使用が可能な抗真菌薬はわずか 4 系統に限られているなかで、近年、多剤耐性 *Candida glabrata* など耐性カンジダの増加が報告されており、重大な脅威となっている (Pfaller MA et al. J Clin Microb. 50:1199-1203, 2012)。このような厳しい状況にもかかわらず、新規抗真菌薬の開発は滞っている。病原真菌はヒトと同じ真核生物であるため、病原真菌にのみ特異的に作用する薬剤の開発が困難であることが、薬剤開発停滞の一因として挙げられる。

2. 研究の目的

上述のように、深在性真菌症の治療薬はきわめて限られているなかで、近年、耐性カンジダの増加が問題視されているため、研究代表者らは臨床現場での現状やその耐性機序を明らかにし、より有効な治療戦略の開発を目的として、本研究計画を立案した。

具体的には、特に薬剤耐性が問題となっている *Candida glabrata* と *Candida guilliermondii* に焦点をあて、抗真菌薬耐性化に関連する臨床的および真菌学的特徴を解明すること、そして化合物ライブラリーを用いて新たな抗真菌化合物を探索することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

- (1) われわれはこれまでの研究で、*C. glabrata* がキャンディン系薬ミカファンギン (MCFG) に曝露されると容易に低感受性化し、驚くことに、作用機序の異なるアゾール系薬 (フルコナゾール (FLC), イトラコナゾール (ITC), ポリコナゾール (VRC)) に対しても不可逆性の高度耐性を獲得することを明らかにした。この *C. glabrata* 株を用いて、まずはアゾール系薬およびキャンディン系薬に対する既知の耐性機序が関与しているかを検証した。
- (2) 国内の共同研究施設から *C. guilliermondii* の臨床分離株を収集し、その菌種同定の精度、臨床背景の特徴、抗真菌薬感受性パターンと各種ストレスに対する真菌学的特徴、感染マウスを用いた治療実験などを行った。
- (3) 低分子化合物ライブラリーのハイスループットスクリーニングにより、まずは最も臨床で分離頻度の高い *Candida albicans* に対して抗真菌活性を示す化合物を探索した。

4. 研究成果

- (1) 実験的に作製したアゾール高度耐性 *C. glabrata* 株は、薬剤標的である *ERG11* 遺伝子に変異を認めなかったが、転写因子 Pdr1 の制御下でアゾール排出ポンプ Cdr1 が過剰発現していることを明らかにした。また、この株の *PDR1* 遺伝子あるいは *CDR1* 遺伝子を欠損させるとアゾール感受性になることを確認した。
- (2) *Candida guilliermondii* complex は、*C. guilliermondii* および *Candida fermentati* を含む複数の菌種によって構成されているが、類似の表現型を示すため遺伝子学的手法で識別される。カンジダ血症の原因菌として 1-3% を占め、キャンディン系抗真菌薬に対する感受性が低いという特徴を有するが、疫学的・臨床的な報告はきわめて限定的である。本研究では、国内 7 施設において分離された臨床分離株を収集し、遺伝子学的に *C. guilliermondii* 27 株、*C. fermentati* 12 株を同定した。*C. guilliermondii* は 22 株 (81.5%)

が血液から分離されていたが、*C. fermentati*は血液から分離された株はなく12株すべてが定着例であった。薬剤感受性試験では、アニデュラファンギンに対して中間耐性を示した1株を除いて、すべての株がカンディン系抗真菌薬に感受性であった。カンディン系抗真菌薬耐性に関わる *FKS1* 遺伝子変異を *C. guilliermondii* 4株および *C. fermentati* 8株で調べると全ての株で1st hot spot にアミノ酸変異を有していた。播種性カンジダ症マウスモデルを用いた治療実験で、ミカファンギンは *C. glabrata* に対して著しい治療効果を示した一方で、*C. guilliermondii* に対する治療効果は乏しかった。*C. guilliermondii* と *C. fermentati* の表現型の違いを調べるため、様々なストレスに対する感受性を検討すると *C. fermentati* は *C. guilliermondii* と比較し、過酸化水素に対する感受性が高かった。さらにマクロファージ様細胞は、*C. fermentati* に対してより高い殺真菌作用を示した。

本研究では *C. guilliermondii* と *C. fermentati* が近縁種でありながら、臨床的および微生物学的に異なる特徴を持つ菌であることを新たに発見した。臨床的には *C. guilliermondii* は血流感染との関連性が強かったが、*C. fermentati* は感染症の原因菌となり難い可能性が示唆された。この現象を説明する一因として、両菌種の酸化ストレスおよびマクロファージへの耐性の違いが関連していると考えられた。また、*C. guilliermondii* は *in vitro* ではカンディン系抗真菌薬に対して感受性を示したが、*in vivo* では治療効果に乏しく、臨床的に注意する必要があると考えられた。

(3) 抗真菌活性を示す新規化合物の探索

約1万化合物をスクリーニングし、*C. albicans* に増殖阻害効果を示す43化合物を同定した。その後、他の菌種を用いた広域性試験や濃度活性と化合物構造を評価して、最も優れた化合物の構造展開を行った。周辺化合物を合成後に得られた新規化合物は、最小発育阻止濃度の2倍の濃度で殺真菌作用を示し、抗バイオフィルム効果も有していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1. Shimamura S, Miyazaki T, Tashiro M, Takazono T, Saijo T, Yamamoto K, Imamura Y, Izumikawa K, Yanagihara K, Kohno S, Mukae H. Autophagy-Inducing Factor Atg1 Is Required for Virulence in the Pathogenic Fungus *Candida glabrata*. *Frontiers in microbiology* 10:27, 2019 (査読あり) doi: 10.3389/fmicb.2019.00027.
2. Minematsu A, Miyazaki T, Shimamura S, Nishikawa H, Nakayama H, Takazono T, Saijo T, Yamamoto K, Imamura Y, Yanagihara K, Kohno S, Mukae H, Izumikawa K. Vacuolar proton-translocating ATPase is required for antifungal resistance and virulence of *Candida glabrata*. *PloS one* 14(1) e0210883, 2019 (査読あり) doi: 10.1371/journal.pone.0210883.
3. Hirayama T, Miyazaki T, Yamagishi Y, Mikamo H, Ueda T, Nakajima K, Takesue Y, Higashi Y, Yamamoto Y, Kimura M, Araoka H, Taniguchi S, Fukuda Y, Matsuo Y, Furutani A, Yamashita K, Takazono T, Saijo T, Shimamura S, Yamamoto K, Imamura Y, Izumikawa K, Yanagihara K, Kohno S, Mukae H. Clinical and Microbiological Characteristics of *Candida guilliermondii* and *Candida fermentati*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 62(6), 2018 (査読あり) doi: 10.1128/AAC.02528-17.

4. Nagayoshi Y, Miyazaki T, Shimamura S, Nakayama H, Minematsu A, Yamauchi S, Takazono T, Nakamura S, Yanagihara K, Kohno S, Mukae H, Izumikawa K. Unexpected effects of azole transporter inhibitors on antifungal susceptibility in *Candida glabrata* and other pathogenic *Candida* species. *PloS one* 12(7) e0180990, 2017 (査読あり) doi: 10.1371/journal.pone.0180990.
5. Nishikawa H, Miyazaki T, Nakayama H, Minematsu A, Yamauchi S, Yamashita K, Takazono T, Shimamura S, Nakamura S, Izumikawa K, Yanagihara K, Kohno S, Mukae H. Roles of vacuolar H⁺-ATPase in the oxidative stress response of *Candida glabrata*. *FEMS yeast research* 16(5), 2016 (査読あり) doi: 10.1093/femsyr/fow054.

〔学会発表〕(計 22 件)

1. 伊藤裕也、宮崎泰可、中山浩伸、田中 大、田代将人、高園貴弘、西條知見、島村真太郎、山本和子、今村圭文、泉川公一、柳原克紀、河野 茂、迎 寛. 病原真菌 *Candida glabrata* におけるカルシニューリン関連分子 Elm1 の機能解析. 真菌症フォーラム 2019 学術集会, 2019
2. 宮崎泰可. 深在性真菌症の治療～基礎研究からのトランスレーション. 真菌症フォーラム 2019 学術集会, 2019
3. 中田奈々、宮崎泰可、高園貴弘、島村真太郎、西條知見、山本和子、今村圭文、泉川公一、柳原克紀、榎村浩一、河野 茂、迎 寛. 化合物ライブラリーを用いた抗真菌薬のハイスクリーンング. 第 67 回日本化学療法学会総会, 2019
4. 宮崎泰可. エルゴステロール合成酵素阻害薬. 第 67 回日本化学療法学会総会, 2019
5. 宮崎泰可. 臨床に役立つ深在性真菌症研究の最前線. 第 6 回日本医真菌学会関西支部「深在性真菌症研究会」, 2019
6. Taiga Miyazaki. Translational research on invasive candidiasis. 7th Global Network Forum on Infection and Immunity, 2018
7. 島村真太郎、宮崎泰可、田代将人、高園貴弘、西條知見、山本和子、今村圭文、泉川公一、柳原克紀、河野 茂、迎 寛. 病原真菌 *Candida glabrata* におけるオートファジー誘導因子 Atg1 と病原性の関連. 第 41 回日本分子生物学会年会, 2018
8. 宮崎泰可. 病原酵母カンジダにおけるストレス応答機序解明の魅力. 第 22 回酵母合同シンポジウム, 2018
9. 島村真太郎、宮崎泰可、永吉洋介、中山浩伸、田代将人、高園貴弘、西條知見、山本和子、今村圭文、泉川公一、柳原克紀、河野 茂、迎 寛. *Candida glabrata* における新規多剤耐性機序の解明. 第 62 回日本医真菌学会総会・学術集会, 2018
10. 芦澤信之、宮崎泰可、賀来敬仁、田代将人、高園貴弘、小佐井康介、西條知見、島村真太郎、森永芳智、山本和子、今村圭文、泉川公一、柳原克紀、河野 茂、迎 寛. カンジダ腹膜炎に腹膜線維症が及ぼす影響とミカファンギンの治療効果についてのマウスモデルを用いた検討. 第 62 回日本医真菌学会総会, 2018
11. Tatsuro Hirayama, Taiga Miyazaki, Takahiro Takazono, Tomomi Saijo, Shintaro Shimamura, Kazuko Yamamoto, Yoshifumi Imamura, Koichi Izumikawa, Katsunori Yanagihara, Shigeru Kohno, Hiroshi Mukae. Clinical and Microbiological Characteristics of *Candida guilliermondii* and *Candida fermentati*. 20th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, 2018

12. Ito Y, Miyazaki T, et al. Role of Elml in cell wall integrity and virulence of *Candida glabrata*. 20th congress of the international society for human and animal mycology, 2018
13. N. Motokawa, T. Miyazaki, T. Ueda, Y. Takesue, Y. Yamagishi, H. Mikamo, K. Yamada, H. Kakeya, H. Kawamura, K. Izumikawa, K. Yanagihara, S. Kohno, H. Mukae. Proposal of a new scoring system to predict prognosis of candidemia patients. 14th ASM Conference on *Candida* and Candidiasis, 2018
14. 宮崎泰可, カンジダ属における抗真菌薬耐性の現状と今後の展望. 第 91 回 日本細菌学会総会, 2018
15. 宮崎泰可. 侵襲性カンジダ症に関する最新の話. 第 29 回 日本臨床微生物学会, 2018
16. 宮崎泰可. 抗真菌薬の適正使用を考える. 第 61 回日本医真菌学会総会・学術集会, 2017
17. 平山達朗, 宮崎泰可, 賀来敬仁, 田代将人, 小佐井康介, 西條知見, 島村真太郎, 山本和子, 今村圭文, 泉川公一, 柳原克紀, 河野 茂, 迎 寛. 国内 7 施設で臨床分離された *Candida guilliermondii* complex 株の検討. 第 61 回日本医真菌学会総会・学術集会, 2017
18. 芦澤信之, 宮崎泰可, 田代将人, 高園貴弘, 西條知見, 島村真太郎, 山本和子, 今村圭文, 泉川公一, 柳原克紀, 河野 茂, 迎 寛. 腹膜線維症マウスモデルを用いたカンジダ腹膜炎に対するミカファンギンの治療効果. 第 61 回日本医真菌学会総会・学術集会, 2017
19. 本川奈々, 宮崎泰可, 竹末芳生, 植田貴史, 三鴨廣繁, 山岸由佳, 掛屋 弘, 川村英樹, 泉川公一, 柳原克紀, 河野 茂, 迎 寛. カンジダ血症の血液培養複数回陽性に関連する因子の検討-多施設共同後ろ向き観察研究-. 第 61 回日本医真菌学会総会・学術集会, 2017
20. Tatsuro Hirayama, Taiga Miyazaki, Tomomi Saijo, Shintaro Shimamura, Kazuko Yamamoto, Yoshifumi Imamura, Koichi Izumikawa, Katsunori Yanagihara, Shigeru Kohno, Hiroshi Mukae. Development of a mouse model of invasive candidiasis caused by fungal translocation from the gut: virulence assessment of six major pathogenic *Candida* species. ASM MICROBE 2017
21. Nana Motokawa, Taiga Miyazaki, Koichi Izumikawa, Katsunori Yanagihara, Shigeru Kohno, Hiroshi Mukae. Association between Pitt bacteremia score and mortality in patients with candidemia: proposal of a new scoring system to predict prognosis of candidemia. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2017
22. 宮崎泰可. カンジダの抗真菌薬耐性. 第 91 回日本感染症学会総会・学術講演会, 2017

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。