

令和 元 年 6 月 17 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08338

研究課題名(和文) β ラクタム剤の抗MRSA活性を復活させるトリプロペプチンCの機序解明研究課題名(英文) the mechanism study of reverse beta-lactam resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* mediated by tripropeptin C

研究代表者

橋爪 秀樹 (HASHIZUME, Hideki)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・主任研究員

研究者番号：10311276

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)：我々が天然より発見した新規化合物トリプロペプチンC(TPPC)は、 β ラクタム剤のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 MRSA に対する抗菌活性を復活させ、相乗的に強い抗菌力を示した。ペニシリンなどの β ラクタム剤は、高い有効性と安全性のある理想的な薬剤であるが耐性菌の出現で有用性が著しく狭められた。本研究では、 β ラクタム剤に耐性を持つMRSAがなぜTPPCにより再度感受性化したのかを明らかにした。すなわちTPPCは、MRSAの薬剤耐性に重要な遺伝子を選択的に発現抑制することで β ラクタム剤が再び殺菌力を示すようになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今や世界的な耐性菌の蔓延により感染症対策は危機的な状況に入りつつある。本研究では、我々の見出したトリプロペプチンが薬剤耐性菌であるMRSAの β ラクタム剤に対する耐性を克服する機構を明らかにした。耐性化並びにそれを解除する方法を知ることが耐性菌を克服する上で大いなる一助になる。さらに驚くべきことにマウスのMRSA全身感染モデルにおいてもトリプロペプチンと β ラクタム併用で優れた相乗的治療効果を示した。これらの結果は今後の耐性菌克服を志向した創薬研究に対して重要な知見と新たな方向性を示したと考えている。

研究成果の概要(英文)：In our previous study, we discovered tripropeptin C (TPPC) from microbial metabolite and we also found that this compound revitalizes and synergistically potentiates the activity of beta-lactams against MRSA. Beta-lactams are essential for our public health because of their potent antibacterial activity and safety. But recently drug resistant bacteria emerged and widespread, the availability of beta-lactams are severely restricted. In this research, we revealed its mode of action, i.e., how TPPC exhibits these activity. As a results, it was revealed that TPPC selectively inhibited the expression of beta-lactam-inducible beta-lactam resistant genes of *blaZ* (beta-lactamase) and *mecA* (foreign penicillin-binding protein). In a mouse/MRSA septicemia model, subcutaneous injection of a combination of TPPC and ceftizoxime demonstrated synergistic therapeutic efficacy compared with each drug alone.

研究分野：微生物学、分子生物学、天然物化学

キーワード：tripropeptin C β ラクタム剤 薬剤耐性菌 MRSA 耐性克服 機序解析 感染症

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

1. 研究開始当初の背景

常在性のグラム陽性細菌であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は、院内感染の主要な起因菌であり、高齢者や術後患者などの易感染性宿主に感染し、皮膚疾患、髄膜炎、心内膜炎、肺炎、敗血症などの重篤な感染症を惹き起こす。MRSA は、 β ラクタム剤を始め多くの薬剤に耐性を獲得しており、有効な薬剤はバンコマイシン等わずかな薬剤に限定されるが、近年ではそれら薬剤に対する低感受性菌の増加により、新薬開発あるいは新規の治療手段による MRSA の克服が世界的に求められるようになった。

トリプロペプチン(TPPC、図 1)は、我々の発見した新規ペプチド系抗生物質で、マウスの MRSA 全身感染モデルにおいて、臨床で最も使用されるバンコマイシンよりも優れた治療効果を示した。さらに TPPC が既存薬と異なる作用機序で細胞壁合成を阻害して抗菌活性を示し、既存薬と交差耐性を示さないことに加え、マウスに 2 週間にわたる静脈内連続投与(100 mg/kg/day)を行なったところ、全く異常が認められず、安全性が高いことが明らかとなり、新規抗 MRSA 薬開発にむけて前臨床研究を進めている。

TPPC の生物活性に関して様々な検討を重ねた結果、下記の興味深い薬剤の併用効果を見いだした。すなわち、安全性にすぐれ、最も臨床使用される抗菌剤クラスである β ラクタム剤と TPPC 併用処理によって顕著な抗 MRSA 活性を示したことである。具体的には、臨床分離した MRSA 5 株(市中型、院内型含む)と感受性株(MSSA)3 株に対する 14 種の β ラクタム剤(ペナム、セフェム、カルバペネム等)と TPPC の併用処理での抗菌活性をチェッカーボード法により測定したところ、いずれの MRSA に対しても著しい相乗的な抗菌活性を示した。TPPC とセフォチアムの相乗性を経時殺菌曲線にて検討した結果例を図 2 に示した。

すなわち、単剤では増殖にほとんど影響を及ぼさない最小阻害濃度 MIC の 1/4 濃度の TPPC と 1/16 濃度のセ

図1 トリプロペプチンCの構造

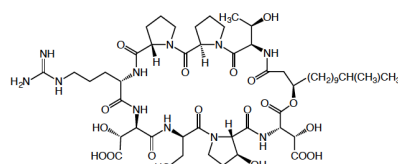
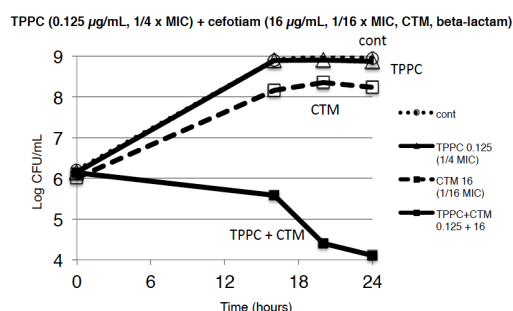


図2 トリプロペプチンとセフォチアム併用による相乗的抗 MRSA 活性(経時殺菌曲線)



併用すると相乗的に生菌数の著しい減少が認められた。一方で MSSA に対して TPPC と β ラクタム剤の併用で相乗的抗菌活性は認められなかった。また、興味深いことにアミノグリコシドやグリコペプチドを含む他の抗菌剤と TPPC を併用しても MRSA に対して相乗性は認められなかった。

TPPC と β ラクタム剤の作用機構は、ともに作用段階は異なるものの、細胞壁合成を阻害することが明らかになっている。一方、我々の予備的な検討において、標的との結合能ならびに抗菌活性が消失した TPPC 誘導体による β ラクタム剤の抗 MRSA 活性の賦活化が認められた。このことは、TPPC の既知の作用機序の他に別の作用点が存在し、それが β ラクタム剤の賦活化ならびに併用時の相乗性に関与することを示唆している。TPPC と β ラクタム剤の相乗性の機構を明らかにすることは、MRSA 感染症の克服に向けた極めて重要な知見を与えるものと期待される。

2．研究の目的

申請者らが見出した TPPC による MRSA の β ラクタム剤への耐性克服の機構を明らかにする。さらに申請段階では動物モデルにおいて、このような魅力的な耐性克服並びに相乗的抗菌活性が発現されるかについては不明であったので、これについても明らかにする。特に耐性克服の機序解明は、今後の耐性菌克服を目指す新薬創製に向けて新たな標的分子や方向性を提供することが強く期待される。

3．研究の方法

(1) マウスの黄色ブドウ球菌全身感染モデル系の構築および感染治療試験

我々の見出した *in vitro* での TPPC による MRSA の β ラクタム耐性克服ならびに併用による相乗性がマウス体内においても観察され、治療効果の改善が見られるかは重要な課題である。そこで動物チームと協力してマウスの MRSA 全身感染モデルを構築し、併用効果を検討した。

(2) TPPC 分子中の活性必須部位の特定

TPPC の構造中、2 つあるカルボン酸は標的であるウンデカプレニルピロリン酸との結合に必須であり、TPPC 単剤での抗菌活性発現に不可欠である。一方で、分子中のアルギニンのグアニジル基は、修飾しても抗菌活性は保持された。そこで、カルボン酸誘導体、並びにグアニジル基誘導体を有機合成グループに合成してもらい、 β ラクタムとの併用効果をチェッカーボード法により検討した。

(3) 人工 MRSA の作製

MRSA は薬剤感受性菌 MSSA が外来の耐性遺伝子 *mecA* を獲得したものである。今後の解析のために MSSA ATCC29213 株に pHY300PLK-dBla(β ラクタマーゼ遺伝子欠損)シヤトルベクター上にクローニングした *mecA* 遺伝子を導入(29213-*mecA*)し、以降の実験に利用した。

(4) β ラクタマーゼ活性阻害試験ならびに β ラクタマーゼ発現誘導阻害試験

相乗性を示す機序として TPPC が MRSA の β ラクタム分解酵素である β ラクタマーゼを阻害する可能性が考えられた。あるいは、TPPC が β ラクタム剤による β ラクタマーゼの発現誘導に影響を及ぼすことが考えられた。そこで、ニトロセフィンを用いて TPPC の β ラクタマーゼ阻害活性ならびに発現誘導に対する影響を評価した。

(5) 遺伝子発現解析

TPPC による MRSA の影響を解明すべく、遺伝子発現解析を行った。すなわち TPPC, β ラクタムあるいは併用の様々な濃度を MRSA に 10 分間処理し、ビーズ破碎後に mRNA を抽出し、逆転写後に real time PCR にて細胞壁合成関連、耐性遺伝子、二成分制御系の遺伝子に注目して遺伝子の発現量の変化を観察した。

(6) 相乗性非表現型株の取得ならびに全ゲノム解析

チェッカーボード法で相乗効果の低い株を連続的に取得・培養を繰り返し、相乗性非表現型株を取得した。また、相乗性を示す濃度の TPPC と β ラクタムを含んだ観点平板上で

生育してくるコロニーを拾い、相乗性非表現型であることを確認したのちに以降の実験に用いた。またこれら 2 方法で得られた株の全ゲノムをイルミナ社の MiSeq を用いて解読し、親株との比較を行った。

4 . 研究成果

(1) マウスの黄色ブドウ球菌全身感染モデル系の構築および感染治療試験

MRSA ATCC33591 株の全身感染モデルが構築できたので、TPPC ならびに β ラクタム剤の治療効果を検討した。なお、本モデルは薬剤投与なしでは、翌日にマウスが全て致死する。 β ラクタム剤は多数上市されているが、検討の結果 *in vitro* でセフトゾキシム(ZOX) が最も併用効果が高かったので、これを使用した。また、投与経路は皮下投与とした。単剤での ED_{50} 値は、TPPC; 50mg/kg および ZOX; >50 mg/kg であった。一方併用投与では、濃度依存的に治療効果が改善し、TPPC; 12.5 および ZOX; 25mg/kg の併用投与で感染 10 日目の生存率は 100% であった。以上のように TPPC による MRSA の β ラクタム耐性克服ならびに併用による相乗性がマウス体内においても観察されることが明らかとなった。

(2) TPPC 分子中の活性必須部位の特定

有機合成グループが合成したカルボン酸誘導体、並びにグアニジル基誘導体を、チェッカーボード法により β ラクタムとの併用効果を検討した。その結果、いずれの誘導体ともに相乗効果が認められた。一方で、TPPC のエステル開裂体についても同様の検討を行ったところ、抗菌活性および相乗性のいずれもが消失していた。このことから、TPPC のカルボン酸やグアニジル基は相乗性に必須ではないこと、ならびに環状構造が相乗性発現に重要であることが強く示唆された。

(3) 人工 MRSA の作製

親株に使用した MSSA ATCC29213 株は β ラクタム誘導型の耐性機構 *bla* system (*blaZ*/I/R) を保有おり、実験的にも β ラクタム処理で β ラクタマーゼが誘導されることを確認した。本株に *mecA* 遺伝子を導入したところ、この人工 MRSA 株(29213-*mecA*)は各種 β ラクタム剤に対し 32–512 倍の耐性を獲得した。また遺伝子発現解析により β ラクタム剤処理により *mecA* の発現上昇が確認できた。

(4) β ラクタマーゼ活性阻害試験ならびに β ラクタマーゼ発現誘導阻害試験

ニトロセフィンを用いた β ラクタマーゼ活性阻害試験については、陽性対象のクラブラン酸およびスルバクタムがそれぞれ 0.37, 5.7 μ g/ml の IC_{50} 値を示したのに対し、TPPC は MIC 値の 100 倍濃度である 100 μ g/mL でも阻害を示さなかった。

次に MRSA ATCC33591 株に β ラクタム剤のセフォチアム(MIC; 512 μ g/mL) を 1 μ g/mL 処理し、同時に TPPC あるいはバンコマイシン、アルベカシンを処理し、培養 1 時間後の培養液中の β ラクタマーゼ活性をニトロセフィン法にて検討した。その結果、対象であるバンコマイシンおよびアルベカシンは MIC 値でも阻害が見られなかったのに対し、TPPC は強い阻害を示し、その IC_{50} 値は $1/16 \times$ MIC という低濃度であった。

(5) 遺伝子発現解析

MRSA は β ラクタム剤を感知して外来の β ラクタム耐性遺伝子である β ラクタマーゼ

(BlaZ)およびβラクタムに低親和性の細胞壁重合酵素である mecA (Pbp2A)の発現が誘導され、βラクタム剤に耐性を示す。この2種の耐性遺伝子 BlaZ, Pbp2A は、構造類似性の非常に高い感知機・シグナル伝達酵素によって相互に制御され、一方の経路が活性化することで双方の耐性遺伝子の発現が誘導される。(4)の結果から、TPPC がβラクタムによる耐性遺伝子の発現誘導を阻害する可能性が示唆されたため、BlaZ, Pbp2A シグナル伝達経路およびその他の薬剤耐性に関わる因子の発現量を検討した。その結果、TPPC はβラクタムによる耐性遺伝子発現を選択的に非誘導時のレベルにまで低下させた。このほか、先に作成した人工 MRSA (29213-mecA)についても同様の実験を行なった。ベクターコントロールである 29213-vector は、TPPC とβラクタム剤併用で相乗性を示さなかったことから、相乗性発現には mecA の存在が必須であることが示唆された。また人工 MRSA (29213-mecA)株について遺伝子発現解析を行ったところ、野生株 ATCC33591 の時と同様に TPPC がβラクタムによる耐性遺伝子発現を選択的に非誘導時のレベルにまで低下させた。

BlaZ, Pbp2A の発現がないとβラクタム耐性を示さないことはすでに知られていることから、TPPC による上記2つの耐性遺伝子発現抑制がβラクタム剤の MRSA に対する抗菌力を復活させた要因であることが明らかになった。

(6) 相乗性非表現型株の取得ならびに全ゲノム解析

上記(5)のように耐性克服する機構は明らかとなったが、TPPC がどの分子と作用してそのような生物活性を示すかについては明らかとなっていない。そこで、MRSA 野生株を親株として人工的に相乗性を示さない株を作成し、全ゲノム解析で親株との変異点を調べることで、作用分子の解明を試みた。その結果、細胞壁合成を調節する2成分制御系の vicK, RNA polymerase subunit rpoB, rpoC, 環境ストレス応答シグマ因子の sigB、排出タンパクの vraDE に共通して変異が見られた。現在これらの候補遺伝子群の発現解析ならびに変異導入を行い、βラクタム耐性克服に関する知見を収集している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Hideki Hashizume, Yoshiaki Takahashi, Tohru Masuda, Shun-ichi Ohba, Tomokazu Ohishi, Manabu Kawada & Masayuki Igarashi. (2018) In vivo efficacy of β-lactam/tripropeptin C in a mouse septicemia model and the mechanism of reverse β-lactam resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* mediated by tripropeptin C. **J Antibiot.**(71) 79-85.
DOI: 10.1038/ja.2017.88

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

公益財団法人 微生物科学研究会 附属微生物化学研究所

<https://www.bikaken.or.jp/research/publications/index.php>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8 桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：原田 滋子
ローマ字氏名：HARADA, Shigeko

※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。