

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15516

研究課題名(和文) 既承認医薬品を対象としたカルバペネマーゼ阻害活性を有する薬剤の探索

研究課題名(英文) Screening for carbapenemase inhibitors among approved drug compounds

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) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、カルバペネム分解能を有するβ-ラクタマーゼであるカルバペネマーゼの阻害剤を開発することである。本研究では、1018種の既承認薬についてスクリーニングを行い、カルバペネマーゼ阻害活性を有する既承認薬の特定を行った。スクリーニングにあたり、精製酵素、ニトロセフィン、既承認薬を用いて阻害活性を判別するためのハイスループット(HTS)系を構築した。本HTS系は高い信頼性で簡便、かつ短時間で多数の化合物を評価することを可能にした。結果として、ある種のカルバペネマーゼに対し弱い阻害活性を有するものを13個、中程度の阻害活性を有するものを11個、強い阻害活性を有するものを9個特定するに至った。

研究成果の概要(英文)：Our object is to develop effective inhibitors of carbapenemases, β-lactamases with carbapenem hydrolyzing activity. In this study, we screened for carbapenemase inhibitors among 1018 approved drug compounds. To access this, high-throughput screening technique using purified carbapenemase, nitrocefins, and inhibitor candidate compounds, were developed. This HTS technique made us to evaluate the large number of compounds with ease and reliability in a short time. As a result, we could find 13 weak inhibitors, 11 intermediate inhibitors, and 9 strong inhibitors of one carbapenemase.

研究分野：細菌学

キーワード：カルバペネマーゼ 既承認薬 ハイスループット ニトロセフィン 阻害剤

1. 研究開始当初の背景

近年、細菌の薬剤耐性化が著しく進み、細菌感染症治療に難渋するケースが少なくない。また、多種多様な抗菌薬に耐性を獲得した多剤耐性菌も出現し始めており、今後、さらに薬剤耐性化が進んだ場合、治療困難な症例が増加することは想像に容易い。さらに、薬剤耐性菌の蔓延はヒトのみならず、家畜、愛玩動物、野生動物、養殖魚、河川等自然環境にまで及んでいることが明らかとなっている。このように薬剤耐性菌の蔓延は地球規模で進行しており、極めて深刻な状況となっている。

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は停滞している。このまま抗菌薬開発が停滞した場合、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り、薬剤耐性菌に著効する新たな抗菌薬の開発は人類が直面する喫緊の課題と言える。しかし、収益性や開発費用等の問題点から製薬各社の抗菌薬開発意欲は乏しく、新しい抗菌薬の開発はしばらくの間見込めないのが現状である。そこで本研究では、アカデミアの立場から抗菌薬開発を実践するために、新たな薬剤耐性菌感染症治療法開発に資するための基礎研究を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究は、薬剤耐性菌に有効な新規治療法を確立、提供することを最終目的としたものである。薬剤耐性菌問題を克服するためには、新たな抗菌薬の開発を推し進めるとともに、既存の抗菌薬の効力を再度復帰させることも一案として挙げられる。つまり、細菌が持つ薬剤耐性機構さえ抑制することができれば、既存の抗菌薬もまだまだ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）を同時投与することで、細菌の薬剤耐性機構を抑えつつ、既存の抗菌薬の薬能を人体内で発揮させることは十分可能である。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。 β -ラクタマーゼは細菌が産生する酵素であり、これが β -ラクタム薬を分解、不活化する。何らかの低分子化合物により β -ラクタマーゼの酵素機能を阻害することができれば、 β -ラクタマーゼ産生菌であっても、 β -ラクタム薬の分解を間逃れ、 β -ラクタム薬の抗菌能を発揮させることが可能となる。このような β -ラクタマーゼ阻害剤は数種類既に上市されており、実際に β -ラクタマーゼ産生菌感染症治療にも使用されている。ところが、近年、カルバペネマーゼと呼ばれる特異な β -ラクタマーゼを産生する細菌が増えており、残念ながらこのカルバペネマーゼに対し、既存の β -ラクタマーゼ阻害剤は効果がない。その結果、カルバペネマーゼを標的とした新たな β -ラクタマーゼ阻害剤の開発が強く求められている。

カルバペネマーゼ阻害剤を開発するにあたり、本研究では、既承認薬をベースとした化合物ライブラリーの中から、カルバペネマーゼ阻害候補化合物を探索することとした。既承認薬は、安全性など人体に投与する上で重要な所々の条件を満たしているため、医薬品として転用しやすいというメリットがある。ドラッグリポジショニングによる承認薬の適応拡大はこれまでも例があり、成功した場合には比較的速やかな臨床導入が期待される。

3. 研究の方法

(1)化合物ライブラリー

既承認薬化合物ライブラリーを購入し、実験に供した。延べ約1000種類について検討を試みた。コントロールには既知カルバペネマーゼ阻害剤を使用した。各化合物をジメチルスルホキシドに溶解し、2 mMとした。予備実験の結果から、使用最終濃度を100 μ Mとするとアッセイウェルの一部において沈殿が生じたため、さらに10倍希釈し、使用最終濃度を10 μ Mとして実験に供した。10 μ Mにすると沈殿は生じなくなった。

表 1 既承認薬化合物の内訳

Drugs	No. of compounds
Cancer	118
Cardiovascular disease	162
Digestive system disease	10
Endocrinology	71
Immunology	25
Infection	207
Inflammation	75
Metabolic disease	54
Neurological disease	205
Respiratory disease	23
Vermifuge	15
other	53

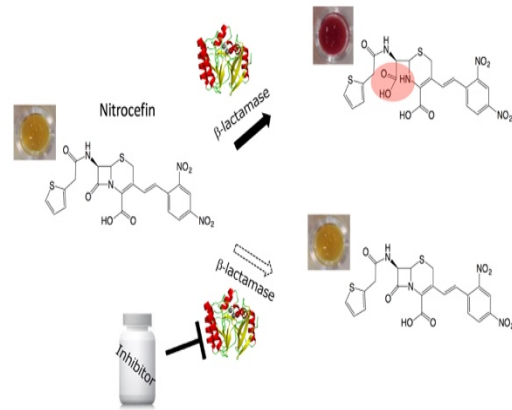
(2)カルバペネマーゼの精製

6種類のカルバペネマーゼについて精製作業を行った。6種類いずれのカルバペネマーゼについても大腸菌を用いた蛋白発現系を構築した。5種類のカルバペネマーゼについては可溶性タグ等を付加せずに、オリジナルのN末端を用いて発現させ、各種バッファー、カラムを用いて精製作業を行った。また、1つのカルバペネマーゼについてはオリジナルのN末端を用いて発現させた場合には可溶化が確認できなかったため、ヒスチジンタグを付加し、さらに低温下で発現させることで可溶化することができた。使用するバッファーおよびカラムは既報に従った。最後に、限外ろ過によるバッファー交換と濃縮作業を行い、いずれのカルバペネマーゼも10 mg/mL以上とし、-80°Cで保管した。

(3)ハイスループット(HTS)系の構築

多数の化合物について短時間での評価を可能とするために、96ウェルプレートを使用したHTS系を構築した。精製したカルバペネマーゼ、発色β-ラクタム薬であるニトロセフィン、および既承認薬化合物の3者をプレートマスターを用いて混和し、波長482nmの値を経時的に観察することで、阻害候補化合物の選別を行った(図1)。

図 1 スクリーニング方法の原理



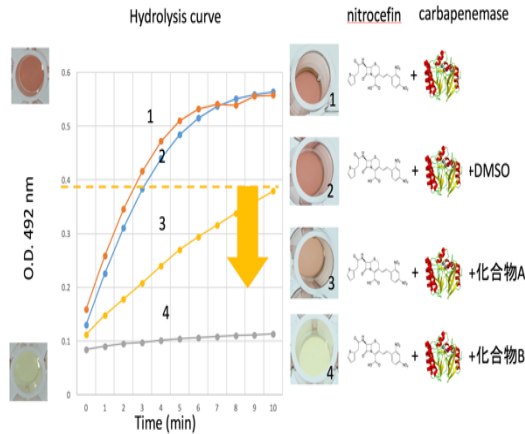
(4)X線結晶構造解析

カルバペネマーゼの結晶を作製し、ソーキングにより既承認薬をカルバペネマーゼの結晶中に導入した。既承認薬の濃度は、結晶ドロップ中で最終濃度が10 mMとなるように調整した。本作業により、カルバペネマーゼ-既承認薬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ン光センターで行った。

4. 研究成果

6種類のカルバペネマーゼについてはいずれも最終純度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。そのうちの1種類を用い、阻害剤を探索するためのHTS系を立ち上げた。最終的に、カルバペネマーゼ濃度をnMオーダーに、発色基質であるニトロセフィンを100 μMに、既承認薬を10 μMに固定し、吸光度482 nmの値を30°C、10分間経時的に観察する系とした。既承認薬にカルバペネマーゼ阻害活性がある場合には、ニトロセフィンの分解が抑制され、吸光度482 nmの時間変化量が、コントロールウエルのものに比べて小さくなる(図2)。コントロールウエルにおける0-5分までのΔabsを100%とした場合に、既承認薬含有ウエルのΔabsがどのような値を示すかで、便宜的に阻害効果を分類した。50%以下の場合を弱阻害、30%以下の場合を中程度阻害、10%以下の場合を強阻害とした。

図2 HTS 法によるスクリーニング



上述の HTS 系と判定基準を利用し、現在までに 4 種類のカルバペネマーゼについてスクリーニングを終えた。そのうち 1 種類のカルバペネマーゼ A の結果について述べる。1018 種類の既承認薬化合物のうち、弱い阻害活性を示したものが 13 個、中程度の阻害活性を示したものが 11 個、強い阻害活性を示したものが 9 個という内訳となった。今回対象とした既承認薬化合物には、表 1 のように、抗がん剤、抗微生物薬、抗炎症薬など様々な種類の既承認薬が含まれているが、特定の疾患に対する治療薬がカルバペネマーゼ阻害活性を有するというわけではなく、対象疾患の枠に依存せず、様々な既承認薬にカルバペネマーゼ阻害活性があることがわかった。

阻害活性が認められた既承認薬とカルバペネマーゼの複合体結晶の回折データを解析したところ、カルバペネマーゼ側の電子密度については問題なく確認できたが、阻害剤として導入した既承認薬に相当する電子密度についてははっきりと確認することができなかった。

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 1 件)

Jun-ichi Wachino, Yoshihiro Yamaguchi, Shigetaro Mori, Wanchun Jin, Kouji

Kimura, Hiromasa Kurosaki, Yoshichika Arakawa.

Structural insights into recognition of hydrolyzed carbapenems and inhibitors by subclass B3 metallo- β -lactamase SMB-1.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2016 Jun 60(7)4274-4282. 査読有

[学会発表] (計 0 件)

[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/

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

黒崎 博雅 (KUROSAKI, Hiromasa)
金城学院大学・薬学部・教授
研究者番号：70234599

(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

Anupuriya Kumar

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教

横山 覚 (YOKOYAMA, Satoru)

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