

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10041

研究課題名(和文) クラリスロマイシン耐性肺MAC症に対する新たな治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of new therapeutic agents for clarithromycin-resistant pulmonary MAC disease

研究代表者

中田 登 (Nakata, Noboru)

国立感染症研究所・ハンセン病研究センター 感染制御部・室長

研究者番号：70237296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：クラリスロマイシン耐性肺MAC症に有効な薬剤の開発のため、肺MAC症患者由来クラリスロマイシン高度耐性のMAC株を用いて37種のアベルメクチン誘導体の効果を測定した結果、MAC41株全てに対して抗菌活性を示す誘導体5種を見出した。これら5種は、既存のマクロライドのターゲット部位である50SリボソームのDomein 2057-2059部位ではなく、未知の分子を標的部位としていることが示唆された。これら5種の誘導体は細胞内のMACに対しても抗菌効果を発揮し、抗菌活性は既存のイベルメクチンよりも高いことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺MAC症を含む肺NTM症治療においてもっとも重要な治療薬がクラリスロマイシンであるが、クラリスロマイシンの長期投与により耐性菌が出現することが知られており、クラリスロマイシン耐性肺NTM症に対しては有効な経口投与抗菌薬は存在しないのが現状である。in vitro、及び培養細胞レベルではあるが、アベルメクチン誘導体がクラリスロマイシン耐性MACに有効であることが示され、クラリスロマイシンとは異なる機序で作用していることが示唆されたことは、新たな治療薬開発にとっての前進である。

研究成果の概要(英文)：In order to develop an effective therapeutic agent against clarithromycin-resistant pulmonary MAC disease, we measured the effects of 37 avermectin derivatives using highly clarithromycin-resistant MAC strains derived from patients with pulmonary MAC disease. We found 5 derivatives that show antibacterial activity against the MAC strains. It was suggested that these five species target an unknown molecule, not the Domein V 2057-2059 site of the 50S ribosome, which is the known target site of macrolides. It was clarified that these five derivatives also exerted antibacterial effect against intracellular MAC, and the antibacterial activity was higher than that of ivermectin.

研究分野：細菌学

キーワード：肺MAC症 クラリスロマイシン 薬剤耐性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、日本国内の結核患者数の減少に相反し、非結核性抗酸菌 (NTM) 症の患者数は著しい増加傾向にあり、2014 年の肺 NTM 症新規登録患者数は結核患者とほぼ同数の年 19,000 人であることが報告されている。また、国内の肺 NTM 症罹患率については人口 10 万人あたり 14.7 人 (2014) と結核の罹患率 12.3 人 (2018) を既に大きく上回っており今後も患者数の増加が見込まれる (Namkoong *et al.*, 2016)。これら NTM 症の原因菌として 9 割以上を占めるのが *Mycobacterium avium* complex (MAC) である。肺 MAC 症治療にはマクロライドであるクラリスロマイシン (CAM) をキードラッグとした多剤併用療法が実施されるが、治療期間が一年から長い場合は一生涯に渡るため、治療中にクラリスロマイシン耐性菌が出現することにより根治は極めて困難となり、森本らはクラリスロマイシン耐性肺 MAC 症患者の予後が多剤耐性結核患者と同等に悪いことを報告している (Morimoto *et al.*, 2016)。

現在、肺 MAC 症治療には、クラリスロマイシンへの耐性化を防ぐ目的でリファンピシン、エタンブトールを加えた 3 剤併用療法が標準治療とされているが、日本結核病学会 (2012) はこれらのレジメンが播種性 AIDS-MAC 症患者データへの応用であるため、肺 MAC 症への効果に関してはエビデンスの構築が必要であることに言及している。また近年、リファンピシンがチトクロム P450 (3A4) による代謝活性を誘導することにより、クラリスロマイシンの血中濃度を大幅に低下させることが明らかとなり、3 剤併用療法の有効性について疑問視されている。つまり事実上、肺 MAC 症を含む肺 NTM 症治療のキードラッグはクラリスロマイシンであるにもかかわらず、クラリスロマイシン耐性菌の出現や薬物間相互作用の問題があり、肺 NTM 症に対して有効な経口投与抗菌薬は存在しないのが現状であるが、この危機的状況下にも関わらず NTM をターゲットとした抗菌薬開発は始まっていない。

以上のことから、患者数が増え続けている肺 NTM 症のコントロールには「クラリスロマイシンに代わる有効なキードラッグの開発」が急務となっている。

2. 研究の目的

北里研究所の砂塚らは、ペプチドやマクロライド等の新規合成・誘導体合成研究を行っており、幾つかの化合物がメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) やバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) に対して抗菌活性を示すことを見出している (Kobayashi *et al.*, 2010)。

本研究課題は医学的・社会的な重要性が高いにもかかわらず根治治療が難しいクラリスロマイシン耐性肺 MAC 症に対するアベルメクチン誘導体の有効性を検証することにある。

3. 研究の方法

(1) 肺 MAC 症患者由来、クラリスロマイシン高度耐性 (>256 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の MAC 41 株と、アベルメクチン誘導体 37 種を用いて *in vitro* スクリーニングを行った。スクリーニング方法は、CLSI (Clinical and laboratory standards institute) の手法に準拠し、Cation adjusted Muller Hinton broth (5% OADC 添加) を使用した Microdilution 法で MIC を決定した。誘導体の測定濃度範囲は同じマクロライド化合物であるクラリスロマイシンの評価範囲に合わせ、0.25-32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。

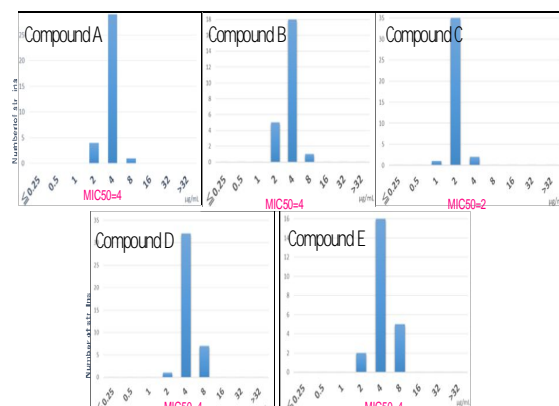
(2) 細胞内寄生細菌である抗酸菌に関してはマクロファージ内の菌に対する抗菌活性評価が重要である。そこで、マクロファージに *M. avium* を感染させ、*ex vivo* における抗菌活性評価を実施した。実際には、ヒト急性単球性白血病由来 THP-1 細胞株を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) でマクロファージへと分化させたのち、MOI 0.1 で 24 時間感染させ、細胞外の菌を除去するため高濃度のアマカシン (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加した RPMI 1640 で 2 時間洗浄したのち、37 に温めたリン酸緩衝液で更に複数洗浄した。その後、それぞれの *in vitro* で効果の認められた誘導体を添加した培地に交換し 37、5% CO₂ 条件下で 72 時間培養したのち、細胞を回収・溶解し、10% OADC を添加した Middlebrook 7H10 (Becton, Dickinson and Company) 寒天培地上に塗布して Colony forming Unit (CFU) を算出した。

4. 研究成果

(1) *In vitro* スクリーニングにより、37 種の誘導体のうち、クラリスロマイシン高度耐性 (>256 $\mu\text{g}/\text{mL}$) MAC41 株全てに対して抗菌活性を示す誘導体 5 種を見出した (MIC₅₀=2-4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (図. 1)。また、これら 5 種は、ある特定の構造特性を持つことが明らかとなった。

MAC におけるクラリスロマイシン耐性メカニズムは、他の一般細菌で知られるのと同様 50S リボソームの Domein 領域内に構成される Peptidyl transferase center (PTC) の 2057-2059 部位における DNA ミューテーション (獲得耐性) である。既存のマクロライド化合物はいずれもリボソームをターゲットとした抗菌活性機序を持つことが知ら

図.1 アベルメクチン誘導体のCAM高度耐性 (>256 $\mu\text{g}/\text{mL}$) MAC に対する抗菌作用

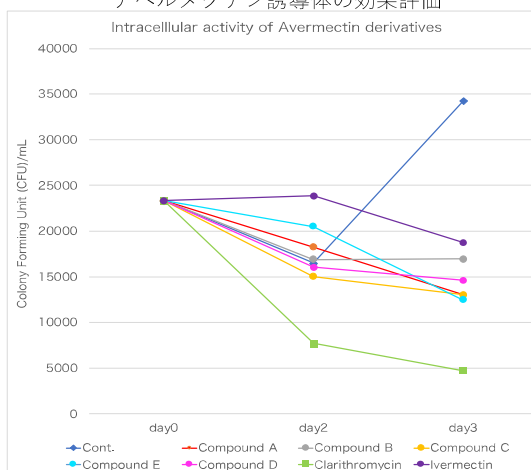


れているが、本研究で用いたアベルメクチンは 16 員環マクロライド化合物にも関わらず、クラリスロマイシ耐性 MAC に抗菌活性を示した。このことから、新規合成されたアベルメクチン誘導体は既存のマクロライドのターゲット部位(2057-2059)ではない未知の分子を標的部位としている可能性が高いと考えられた。

(2) マクロファージ分化 THP-1 細胞を使用した *ex vivo* による抗菌活性試験では、これら 5 種の誘導体が THP-1 細胞内の MAC に対しても抗菌効果を発揮することが明らかとなった。さらに、これらの抗菌活性は既存のイベルメクチンよりも高いことが明らかとなった(図. 2)。

以上のことから、新規合成アベルメクチン誘導体は難治性肺 MAC 症に対する新戦略として非常に有望な化合物であることが示された。

図. 2 THP-1マクロファージ内におけるアベルメクチン誘導体の効果評価



< 引用文献 >

Kobayashi Y, Ichioka M, Hirose T, *et al.* (2010) Botromycin derivatives: efficient chemical modifications of the ester moiety and evaluation of anti-MRSA and anti-VRE activities. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **20**: 6116-6120.

Morimoto K, Namkoong H, Hasegawa N, *et al.* (2016) Macrolide-Resistant Mycobacterium avium Complex Lung Disease: Analysis of 102 Consecutive Cases. *Annals of the American Thoracic Society* **13**: 1904-1911.

Namkoong H, Kurashima A, Morimoto K, Hoshino Y, Hasegawa N, Ato M & Mitarai S (2016) Epidemiology of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease, Japan. *Emerging infectious diseases* **22**: 1116-1117.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件(うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件)

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| 1. 著者名 Yoshida Mitsunori, Nakata Noboru, Miyamoto Yuji, Fukano Hanako, Ato Manabu, Hoshino Yoshihiko | 4. 巻 365 |
| 2. 論文標題 A rapid and non-pathogenic assay for association of Mycobacterium tuberculosis gyrBA mutations and fluoroquinolone resistance using recombinant Mycobacterium smegmatis | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters | 6. 最初と最後の頁 1-8 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femsle/fny266 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

| |
|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 星野仁彦、深野華子、野口吉彦、吉田光範、朝倉崇徳、森野英里子、中川拓、長谷衣佐乃、高崎仁、小川賢二、長谷川直樹、阿戸学、中田登、砂塚敏明 |
| 2. 発表標題 CAM耐性MACに対する新規合成マクロライドの効果 |
| 3. 学会等名 第49回結核・非定形抗酸菌症治療研究会 |
| 4. 発表年 2018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 | 星野 仁彦 (Hoshino Yoshihiko) (20569694) | 国立感染症研究所・ハンセン病研究センター 感染制御部・室長 (82603) | |
| 連携研究者 | 砂塚 敏明 (Sunazuka Toshiaki) (30226592) | 北里大学・その他の研究科・教授 (32607) | |
| 連携研究者 | 廣瀬 友靖 (Hirose Tomoharu) (00370156) | 北里大学・その他の研究科・准教授 (32607) | |

