

令和元年5月21日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15688

研究課題名(和文) 多剤耐性菌感染症の克服に向けた、生体内菌発育必須因子の解析とその阻害剤の検索

研究課題名(英文) Screening of in vivo essential factor inhibitors for multi-drug resistant bacteria

研究代表者

佐藤 豊孝 (Sato, Toyotaka)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：30756474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、『試験管内では菌の生育・増殖には影響を与えないが、生体内(組織や血液内などの感染部位)において菌の発育・増殖に大きな影響を与える因子』を標的にし、これまでの新規抗菌性物質の検索手法(=試験管内で菌体の発育・増殖を抑える化合物を検索)とは異なる視点で、今後より問題視される多剤耐性菌の制御に関する研究(本因子を阻害する化合物の検索、その阻害部位の同定、生体内での効果を明らかにする)を行った。その結果、血液内でのみ抗菌活性を示す化合物を複数同定し、その化合物が菌の莢膜の産生を抑えることを明らかとした。以上から、本研究で敗血症といった細菌性血流感染症の新たな治療法に関する科学的知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症といった細菌性血流感染症による死亡率は増加の一途をたどっており、多剤耐性菌はその治療を一層困難にしている。よって本研究で明らかにした、『生体内菌発育必須因子(vivoEF)』とその阻害剤の同定から得た科学的知見は、多剤耐性化や新たな耐性菌を生み出さない新たな感染症治療戦略の確立に寄与する重要な意義を持つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on bacterial factors that are essential for their bacterial growth and survival (vivoEF) in vivo (infected sites such as tissues and blood), but not for in vitro, from a view of emergence and spread of multidrug-resistant bacteria that is considered to be a problem in the future. We screened and identified vivoEF inhibitors. We also identified their targets in bacteria, and evaluated vivoEF effects using infectious models in mouse. As a result, a plurality of compounds showing antibacterial activity only in blood were identified, and it was clarified that the compounds suppress the production of bacterial capsule. From the above, we obtained scientific findings on new treatments for bacterial bloodstream infections such as sepsis in this study.

研究分野：細菌学

キーワード：細菌 薬剤耐性菌 生体内菌発育必須因子 vivoEF 多剤耐性

1. 研究開始当初の背景

各種細菌感染症治療において、多剤耐性菌の問題は日本のみならず世界中で深刻な問題である。しかし、より多剤および高度耐性化する菌への新たな治療戦略の確立が遅れており、今後多剤耐性菌感染症治療において有効な抗菌薬の選択が極めて困難になると予測されている（図1）。

コリスチンやチゲサイクリンは多剤耐性グラム陰性菌への最終選択肢として極めて重要な抗菌薬である。

しかし、我々のこれまでの研究において以下を明らかにしている。

1. これらの抗菌薬に対してもすでに耐性化を示す菌株が臨床現場で出現している。
2. これらの菌株は、世界中の臨床現場で広がり問題となるクローン集団に存在する。
3. これらの耐性化は、プラスミド性等の特別な耐性化機構の付与がなくとも、菌の染色体に保存されている遺伝子の変異により起こる。
4. この耐性化には、臨床現場で一般的に使用されている抗菌薬の使用が関連している。

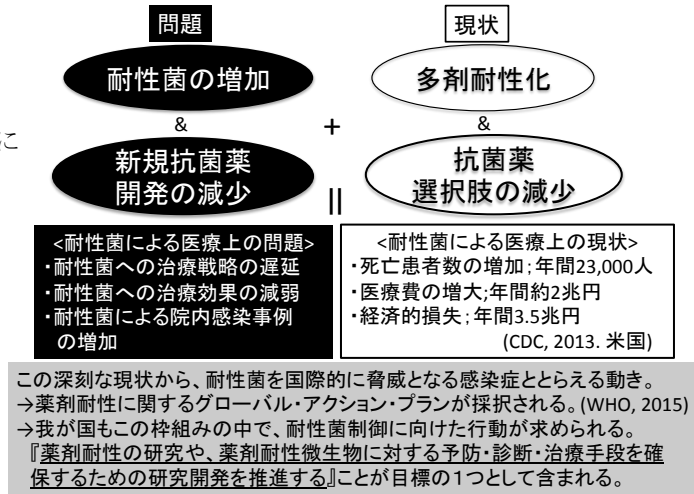


図1. 医療現場および社会全体における耐性菌の問題と現状

これらの所見は、多剤耐性菌への最終手段とされる既存の抗菌薬が一部の菌株にはすでに無効であることを意味している。特に、2と4は我々が初めて明らかにした臨床上極めて重要な所見であり、今後このような菌株が臨床現場でさらに増加していくことが容易に予測できる。以上のことから、今後さらに問題となる多剤耐性菌への対策案の策定は急務であり、その策定には、これまでの既存法にとらわれない新たなアプローチによる多剤耐性菌の出現・増加の制御に関する研究が必要である。

2. 研究の目的

近年の新規抗菌薬開発の停滞といった背景から、多剤耐性菌感染症治療に有効な抗菌薬の選択が今後一層困難となることが危惧される。

本研究では以下のことを目的とする。

『*in vitro* では菌の生育・増殖には影響を与えないが、生体内(組織や血液内などの感染部位)において菌の発育・増殖に大きな影響を与える因子= *in vivo* bacterial essential factor; *vivoEF*』を標的にし、これまでの新規抗菌性物質の検索手法(=*in vitro* で菌体の発育・増殖を抑える化合物を検索)とは異なる視点で、今後より問題視される多剤耐性菌の制御に関する研究(本因子を阻害する化合物の検索、その阻害部位の同定、生体内での効果を明らかにする)を行うこと。

3. 研究の方法

本研究では、1)-4)の順に従い研究を遂行する(次項 図3参照)

- 1) 新たに考案したスクリーニング系を用いて *vivoEF* 阻害物質の検索を行う。
- 2) 候補化合物に対し、*vivoEF* の阻害による多剤耐性菌制御への評価を行う。
- 3) 候補化合物の *vivoEF* 阻害機構の解析を行う。
- 4) 生体内での *vivoEF* 阻害剤としての有用性を評価する。

4. 研究成果

1) vivoEF 阻害物質の検索と多剤耐性菌制御への評価

現存する抗菌薬または新規抗菌薬となる化合物のスクリーニングでは「*in vitro*で抗菌活性を示し、かつ、*in vivo*でも抗菌活性を示す」ものを標的としている。しかし、申請者の着目する *vivoEF* を阻害する物質 (*vivoEF* 阻害剤) は「*in vitro*では抗菌活性を示さないが、特定の *in vivo*では抗菌活性を示す」という独自性を持つ。この独自性に着目することにより、既存の抗菌薬のスクリーニング法では抗菌活性が無いと見逃されてきた化合物を新たな耐性菌治療薬の候補とすることが可能となる(特許出願中)。申請者は多剤耐性大腸菌をモデルとし、約 21 万化合物の中から 21 の血流感染症時における *vivoEF* 阻害剤(培地に血清を添加した時のみ抗菌活性を示す化合物)を同定している(表 1)。

表1. 血流感染症特異的*vivoEF*阻害剤のスクリーニング結果

| 化合物ライブラリー | 化合物数 | ヒット化合物 | | 再現性 assay | 濃度依存性 | 莢膜発現抑制作用 |
|----------------------------|---------|-----------------------|-----------------------|-----------|-------|----------|
| | | 1 st assay | 2 nd assay | | | |
| <東大創薬機構> | | | | | | |
| Core Library | 9,600 | 102 | 2 | 2 | 0 | 0 |
| Validated Compound Library | 4,904 | 99 | 18 | 18 | 3 | 0 |
| Full library | 195,961 | 86 | 60 | 55 | 14 | 7 |
| <北大創薬センター> | | | | | | |
| 既存Library | 1,600 | 88 | 21 | 14 | 3 | 3 |
| 北大Library | 1,600 | 8 | 2 | 1 | 1 | 0 |
| total | 213,665 | 383 | 103 | 90 | 21 | 10 |

これらの *vivoEF* 阻害剤には以下の特徴が認められた。

- 一般的な培地への *vivoEF* 阻害剤の添加だけでは菌の増殖に変化はない。
- 血液成分の血清存在下でのみ抗菌活性を示す。
- 既存抗菌薬とは異なる化学構造を有する。
- 既存抗菌薬とは作用点が異なる。
- 多剤耐性菌にも有効である。
- 一部は大腸菌以外の多菌種にも有効である。

2) 候補化合物の *vivoEF* 阻害機構の解析

血液内での *vivoEF* に莢膜が知れている(莢膜を有する株は血液内成分の補体による菌体膜傷害を回避することで増殖し血流感染症を成立させる)。

約半数(10/21)の *vivoEF* 阻害剤はこの莢膜の発現を抑制することを明らかにした。

しかし、残り 11 の *vivoEF* 阻害剤では莢膜発現の抑制効果は認められず、未知の *vivoEF* に作用していることが示唆された(図 3 化合物 B)。

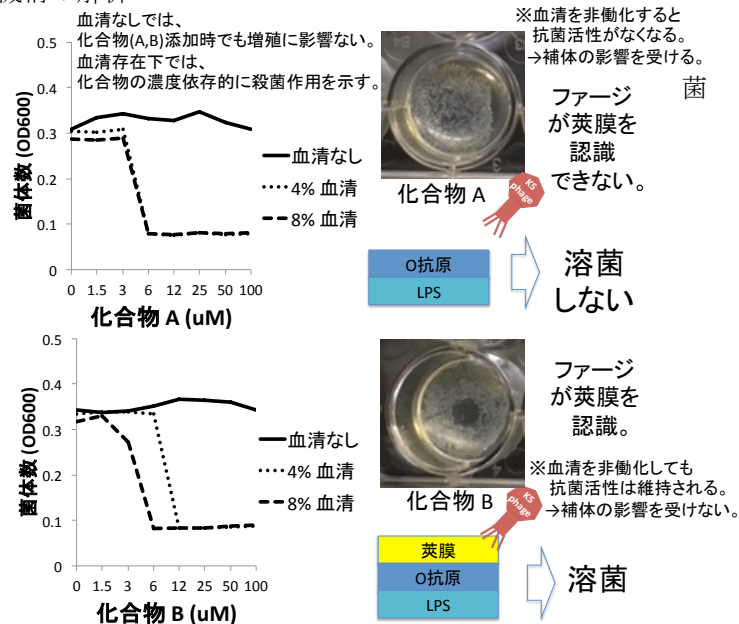


図3-1. 血清存在下での*vivoEF*阻害効果 図3-2. 莢膜を特異的に認識する Bacterial phageによる スポットテスト

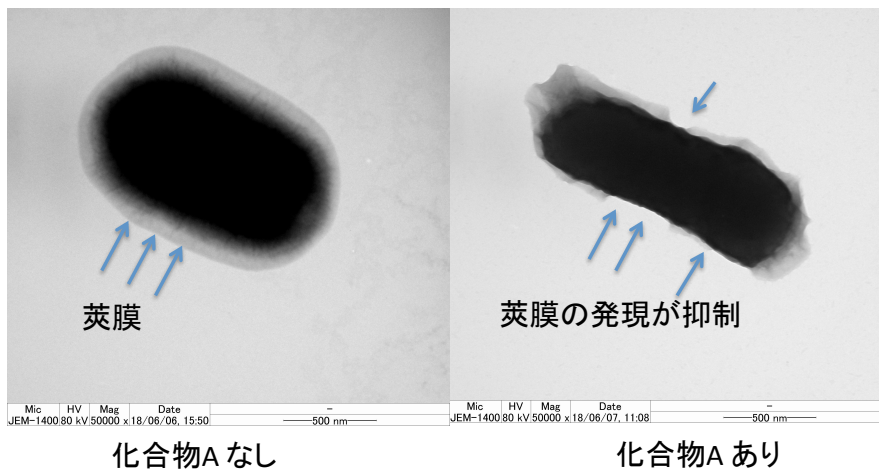


図3-3. 大腸菌の電子顕微鏡画像

いくつかの *vivoEF* 阻害剤については培地添加時に変動のあった遺伝子を RNA-Seq により、網羅的に解析を行った (図 4)。

その結果、一部は莢膜合成に関与する遺伝子群の発現量が低下していることを明らかにした。

これらの候補遺伝子を今後より詳細に解析し、*vivoEF* 阻害の標的部位を同定していく予定である。

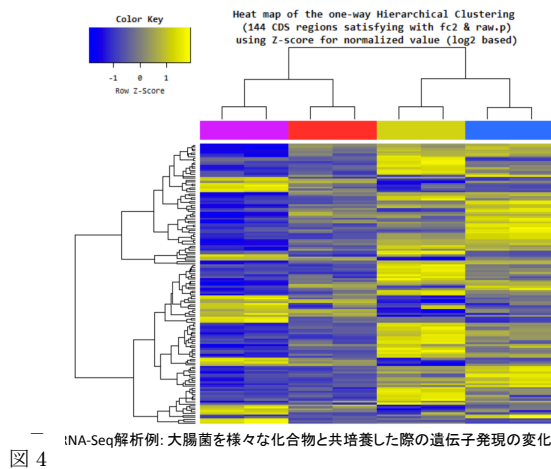


図 4

3) 生体内での *vivoEF* 阻害剤としての有用性を評価

生体内での *vivoEF* 阻害剤の有効性を評価する準備として、血管内皮細胞 (HUVEC) での細胞増殖 (CCK8) および細胞毒性 (LDH) を評価した。

その結果、細胞増殖性に影響を与えない *vivoEF* 阻害剤 (化合物 50 μ M で活性値が >65% のもの) は 15、細胞毒性 (LDH) に影響を与えない *vivoEF* 阻害剤 (化合物 50 μ M で活性値が <20% のもの) は 14 認められた (例、図 5)。

今後細胞毒性に影響が認められな *vivoEF* 阻害剤において生体内での

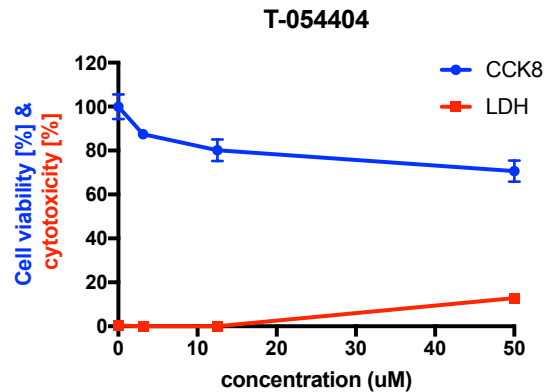


図 5. 血管内皮細胞における *vivoEF* 阻害剤の細胞増殖性および細胞毒性試験

効果および、その標的部位の同定を行う予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Hiyama Y, Takahashi S, Sato T, Shinagawa M, Fukushima Y, Nakajima C, Suzuki Y, Masumori N, Yokota SI. Evaluation of Susceptibilities to Carbapenems and Faropenem Against Cephalosporin-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* Clinical Isolates with *penA* Mosaic Alleles. *Microb Drug Resist.* 2019 Apr;25(3):427-433. doi: 10.1089/mdr.2018.0263. Epub 2019 Jan 24. PMID: 30676251
- ② Honda H, Sato T, Shinagawa M, Fukushima Y, Nakajima C, Suzuki Y, Shiraishi T, Kuronuma K, Takahashi S, Takahashi H, Yokota SI. Multiclonal Expansion and High Prevalence of β -Lactamase-Negative *Haemophilus influenzae* with High-Level Ampicillin Resistance in Japan and Susceptibility to Quinolones. *Antimicrob Agents*

- Chemother. 2018 Aug 27;62(9). pii: e00851-18. doi: 10.1128/AAC.00851-18. Print 2018 Sep. PMID: 29987153
- ③ Sato T, Shiraishi T, Hiyama Y, Honda H, Shinagawa M, Usui M, Kuronuma K, Masumori N, Takahashi S, Tamura Y, Yokota SI. Contribution of Novel Amino Acid Alterations in PmrA or PmrB to Colistin Resistance in mcr-Negative Escherichia coli Clinical Isolates, Including Major Multidrug-Resistant Lineages O25b:H4-ST131-H30Rx and Non-x. Antimicrob Agents Chemother. 2018 Aug 27;62(9). pii: e00864-18. doi: 10.1128/AAC.00864-18. Print 2018 Sep. PMID: 29914952
 - ④ Ohkoshi Y, Sato T, Wada T, Fukushima Y, Murabayashi H, Takakuwa Y, Nishiyama K, Honda H, Shiraishi T, Kuronuma K, Takahashi H, Nakajima C, Suzuki Y, Yokota SI. Whole genome analysis of a multidrug-resistant Streptococcus pneumoniae isolate from a patient with invasive pneumococcal infection developing disseminated intravascular coagulation. J Infect Chemother. 2018 Aug;24(8):674-681. doi: 10.1016/j.jiac.2018.01.012. Epub 2018 Feb 26. PMID: 29496334
 - ⑤ Sato T, Fukuda A, Usui M, Shinagawa M, Shiraishi T, Tamura Y, Takahashi S, Yokota SI. Isolation of a mcr-1-harboring Escherichia coli isolate from a human clinical setting in Sapporo, Japan. J Glob Antimicrob Resist. 2018 Jun;13:20-21. doi: 10.1016/j.jgar.2018.02.010. Epub 2018 Feb 21. No abstract available. PMID: 29476984
 - ⑥ Yokota SI, Hakamada H, Yamamoto S, Sato T, Shiraishi T, Shinagawa M, Takahashi S. Release of large amounts of lipopolysaccharides from Pseudomonas aeruginosa cells reduces their susceptibility to colistin. Int J Antimicrob Agents. 2018 Jun;51(6):888-896. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.02.004. Epub 2018 Feb 9. PMID: 29432867
 - ⑦ Yamamoto K, Ogasawara N, Yamamoto S, Takano K, Shiraishi T, Sato T, Tsutsumi H, Himi T, Yokota SI. Evaluation of consistency in quantification of gene copy number by real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction and virus titer by plaque-forming assay for human respiratory syncytial virus. Microbiol Immunol. 2018 Feb;62(2):90-98. doi: 10.1111/1348-0421.12563. PMID: 29266482
 - ⑧ Sato T, Harada K, Usui M, Tsuyuki Y, Shiraishi T, Tamura Y, Yokota SI. Tigecycline Susceptibility of Klebsiella pneumoniae Complex and Escherichia coli Isolates from Companion Animals: The Prevalence of Tigecycline-Nonsusceptible K. pneumoniae Complex, Including Internationally Expanding Human Pathogenic Lineages. Microb Drug Resist. 2018 Jul/Aug;24(6):860-867. doi: 10.1089/mdr.2017.0184. Epub 2017 Dec 12. PMID: 29232167
 - ⑨ Fukuda A, Sato T, Shinagawa M, Takahashi S, Asai T, Yokota SI, Usui M, Tamura Y. High prevalence of mcr-1, mcr-3 and mcr-5 in Escherichia coli derived from diseased pigs in Japan. Int J Antimicrob Agents. 2018 Jan;51(1):163-164. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.11.010. Epub 2017 Nov 26. PMID: 29180277
 - ⑩ Sato T, Ohkoshi Y, Wada T, Fukushima Y, Murabayashi H, Takakuwa Y, Nishiyama K, Shiraishi T, Nakajima C, Suzuki Y, Yokota SI. Complete Genome Sequence of Multidrug-Resistant Streptococcus pneumoniae Serotype 19F Isolated from an Invasive Infection in Sapporo, Japan. Genome Announc. 2017 Nov 2;5(44). pii: e01239-17. doi: 10.1128/genomeA.01239-17. PMID: 29097473

〔学会発表〕（計 11 件）

- ① T. Sato. Molecular epidemiological analysis of antimicrobial drug-resistant Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae isolated in Sapporo, in Japan. U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP), 21st Acute Respiratory Infections (ARI) Panel Meeting – Bacterial Diseases (招待講演). 2019.
- ② T. Sato. Molecular epidemiological analysis of antimicrobial resistant bacteria isolated from animals and human. The 7th bacteriology Special Seminar. (招待講演). 2018 年
- ③ 佐藤 豊孝. 医療で重要なペット由来薬剤耐性大腸菌. 第 8 回 日本医師会・日本獣医師会による連携シンポジウム (招待講演). 2018 年
- ④ 佐藤 豊孝、品川 雅明、高橋 聡、横田 伸一. 入院治療中にアミカシン耐性を獲得した多剤耐性 Klebsiella pneumoniae の全ゲノム解析. 第 92 回日本感染症学会総会・学術講演会 第 66 回日本化学療法学会学術講演会合同学会. 2018 年
- ⑤ 本田 宏幸, 佐藤 豊孝, 高橋 弘毅, 横田 伸一. β -lactamase-negative ampicillin-resistant Haemophilus influenzae 臨床分離株の遺伝学的特徴. 第 91 回日本細菌学会総会. 2018 年
- ⑥ T. Sato, M. Usui, M. Shinagawa, A. Fukuda, H. Honda, T. Shiraishi, H. Takahashi, Y. Tamura, S. Takahashi, SI. Yokota. 大腸菌臨床分離株における epidemic clone, ST131, のコリスチン及びチゲサイクリン耐性. 第 91 回日本細菌学会総会. 2018 年

- ⑦ Honda H, Sato T, Shinagawa M, Fukushima Y, Nakajima C, Suzuki Y, Shiraishi T, Kuronuma K, Takahashi S, Takahashi H, Yokota SI. Genetic analysis of high-level β -lactamase-negative ampicillin-resistant strains and in vitro-selected fluoroquinolone-resistant mutants of Haemophilus influenza. ASM Microbe 2018 (国際学会)
- ⑧ T. Sato, M. Shinagawa, S. Nishijima, Y. Fukushima, C. Nakajima, H. Honda, T. Shiraishi, K. Kuronuma, H. Takahashi, Y. Suzuki, S. Takahashi, Y. SI. Yokota. In vivo generation of extensively drug-resistant Klebsiella pneumoniae via a disrupting mutation in the DNA repair enzyme MutS. ASM Microbe 2018 (国際学会)
- ⑨ 佐藤 豊孝. 基礎から見た臨床現場の耐性菌. 第2回北海道微生物検査研究会(招待講演). 2017年
- ⑩ T. Sato, Y. Suzuki, T. Shiraishi, H. Honda, M. Shinagawa, S. Yamamoto, N. Ogasawara, S. Takahashi, Y. Tamura, SI. Yokota. Tigecycline non-susceptibility occurs exclusively in fluoroquinolone-resistant Escherichia coli clinical isolates, including the major multidrug-resistant lineages O25b:H4-ST131-H30R and O1-ST648. ASM Microbe 2017 (国際学会)
- ⑪ 佐藤 豊孝、福田 昭、白石 宗、品川 雅明、山本 聡、小笠原 徳子、臼井 優、高橋 聡、田村 豊、横田 伸一. コリスチン耐性大腸菌臨床分離株の耐性機構の解析. 第11回細菌学若手コロッセウム. 2017年

〔図書〕(計 1 件)

- ① 横田 伸一、佐藤 豊孝. 抗菌薬多剤耐性における efflux pump の役割を見直す
化学療法の領域 2017年(担当:共著)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 抗菌薬のスクリーニング法

発明者: 佐藤 豊孝、横田 伸一

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許 2017-201889

出願年: 2017

国内外の別: 国内

○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

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:

ローマ字氏名:

※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。