

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2020
課題番号：18K08430
研究課題名(和文)メタロβ-ラクタマーゼを標的とした細菌感染症治療補助剤の開発研究

研究課題名(英文)Development of antibacterial auxiliary agents targeted for metallo-beta-lactamases

研究代表者
和知野 純一 (Wachino, Jun-ichi)
名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：00535651
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では新規メタロβ-ラクタマーゼ阻害剤を開発した。本阻害剤はIMP型、NDM型、VIM型といった世界でも主流のメタロβ-ラクタマーゼの酵素活性を強力に阻害した。また、本阻害剤共存下において、メタロβ-ラクタマーゼ産生菌に対するカルバペネム系薬の薬効が十分に発揮されることがわかった。さらに、動物実験モデルにおいて、カルバペネム系薬と本阻害剤との併用により、マウスの救命率が大幅に高まることがあきらかとなった。本阻害剤は、メタロβ-ラクタマーゼ産生菌感染症の治療に有用な阻害剤となり得る可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
メタロβ-ラクタマーゼ産生菌に対する新たな治療法の開発が喫緊の課題となっている。しかし、現在のところ、メタロβ-ラクタマーゼを標的にした阻害剤が開発・上市された例はない。本研究により開発したメタロβ-ラクタマーゼ阻害剤は強力で、しかも安全性も高いことから、将来、メタロβ-ラクタマーゼ産生菌感染症の治療薬として役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We developed here novel metallo-beta-lactamase inhibitors. Our inhibitors were able to suppress the enzymatic activities of subclass B1 metallo-beta-lactamases such as IMP-type, NDM-type, and VIM-type, which are dominant metallo-beta-lactamases in the world. In addition, our inhibitors could revive the in vitro carbapenem activity against metallo-beta-lactamase producing pathogenic bacteria. Combination therapy with carbapenem and inhibitors successfully cured mice infected with metallo-beta-lactamase producing pathogenic bacteria. Our inhibitors would provide a considerable benefit to patients receiving treatment for lethal infectious diseases caused by metallo-beta-lactamase producing pathogenic bacteria.

研究分野：薬剤耐性菌

キーワード：メタロβ-ラクタマーゼ 阻害剤

1. 研究開始当初の背景

治療に難渋する薬剤耐性菌の世界的蔓延が問題となっている。薬剤耐性菌による感染症を制御するためには、新たな抗菌薬や新規治療法の開発が必要である。本研究では、薬剤耐性菌が産生する薬剤耐性関連酵素を標的に、これらを強力に阻害・不活化する阻害剤（薬剤耐性阻害剤）を開発し、薬剤耐性菌感染症治療に応用することをねらいとしている。このような阻害剤を既知の抗菌薬と併用することで、細菌が産生する薬剤耐性酵素の機能を阻害しつつ、抗菌薬を無傷のまま標的部位に届けることが可能となり、抗菌薬が本来の抗菌活性を維持・発揮できるようになる。

β -ラクタム系薬の中でも、カルバペネム系薬は極めて広い抗菌スペクトルを有し、治療の選択肢として、最後の切り札として位置づけられる β -ラクタム系薬である。しかし、近年では、カルバペネム系薬に耐性を示す各種カルバペネム耐性病原細菌が出現・拡散し始め、全世界で公衆衛生上の大きな脅威となっている。これらカルバペネム耐性菌の主たるカルバペネム耐性機構は、カルバペネム系薬を分解する性質を持つカルバペネマーゼの産生である。カルバペネマーゼには、活性中心に亜鉛イオンをもつメタロ型カルバペネマーゼ（以下、メタロベータラクタマーゼ）と活性中心にセリン基を有するセリン型カルバペネマーゼとがある。これまで、セリン型カルバペネマーゼに対してはアピバクタム、リレバクタムといった有効な阻害剤が開発・上市され、セフトジジムやイミペネムといった β -ラクタム系薬と併用することで、セリン型カルバペネマーゼ産生菌の治療法として用いられるようになった。

一方、メタロベータラクタマーゼ産生菌に関しては、セリン型カルバペネマーゼ産生菌同様、臨床で大きな問題として認識されつつも、メタロベータラクタマーゼに対する阻害剤は未だ開発・上市されていない。そこで本研究では、メタロベータラクタマーゼ阻害剤を開発することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、薬剤耐性機構の中でも、臨床現場で特に問題視されているメタロベータラクタマーゼの阻害剤を開発することである。細菌学、酵素学、構造生物学、有機化学など異分野の技術を導入し、臨床レベルで使用可能なメタロベータラクタマーゼ阻害剤を開発、メタロベータラクタマーゼ産生菌感染症の治療に応用することが本研究の主たるねらいである。

3. 研究の方法

- (1) 酵素の精製：各種メタロベータラクタマーゼを大腸菌に発現させ、菌体を破碎後、超遠心操作により可溶化画分を回収した。回収した可溶化画分を、カラムクロマトグラフィーシステムにかけ、精製作業を行なった。
- (2) X線結晶構造解析：各種メタロベータラクタマーゼの結晶を作製し、その中に阻害剤を浸潤させることで、メタロベータラクタマーゼと阻害剤との共結晶を作製した。共結晶のX線結晶構造解析により、阻害剤の作用様式をあきらかにした。
- (3) 酵素阻害定数の算出：分光光度計を用い、酵素速度論解析を行なった。低濃度のメタロベータラクタマーゼ、各種濃度の阻害剤、各種濃度の基質薬を混和し、基質の分解速度を計測した。ラインウェーバー・バークプロットにより K_i 値を算出した。
- (4) 薬剤感受性試験：微量液体希釈法により、メタロベータラクタマーゼを産生する各種臨床分離株を対象とした薬剤感受性試験を行なった。培養方法や判定基準は、米国臨床検査標準委員会の指針に従った。
- (5) *In vivo*における薬効評価：マウス感染-治療モデルを用い、阻害剤の評価を行なった。メタロベータラクタマーゼを産生する大腸菌や肺炎桿菌を腹腔感染させた後、腹腔や尾静脈経路で治療を行なった。7日間経過を観察し、マウスの生死を指標に、阻害剤の *in vivo*における有効性を評価した。
- (6) 阻害剤の化学合成：阻害剤の合成は *in house*での合成と受託合成を併用した。

4. 研究成果

(初年度)

研究代表者らは先行研究にて、メタロベータラクタマーゼ阻害剤として有用なシード阻害剤(X1)を特定した。初年度は、X1の誘導体を合計8種類準備し、その評価を行なった。はじめに、8個の誘導体に関して、IMP-1、NDM-1、VIM-2メタロベータラクタマーゼに対する阻害定数を算出した。IMP-1に対する K_i 値は0.22-34.1 μM 、NDM-1に対する K_i 値は0.18-34.1 μM 、VIM-2に対する K_i 値は、0.02-20.8 μM となった。さらに、IMP-1、NDM-1、VIM-2を産生するリコンビナント大腸菌に対する阻害効果を薬剤感受性試験により評価したところ、概ね K_i 値と相関する結果となったが、一部乖離も見られた。そこで、乖離の原因を明らかにするため、LC-MS/MSを用い、阻害剤の菌体内流入量を測定した。その結果、阻害剤の種類によって、菌体内に取り込まれる量に差が生じている可能性が示唆された。8種類の阻害剤について、酵素に対する阻害効果、生菌に対する阻害効果の両面から総合的に評価し、最も阻害効果の強かったZ1阻害剤について、次年度以降、評価を継続することとした。

(2年目)

2年目は、Z1阻害剤を中心に評価を行なった。まず、メタロベータラクタマーゼを産生する腸内細菌目細菌、緑膿菌、アシネトバクター属菌を対象に、Z1阻害剤の阻害効果を薬剤感受性試験により検証した。IMP型メタロベータラクタマーゼを産生するメロペネム耐性腸内細菌目細菌19株のうち、17株はZ1阻害剤存在下(16 mg/L)で感性を示した(図1a)。また、IMP型メタロベータラクタマーゼを産生するメロペネム耐性アシネトバクター属菌8株のうち、6株がZ1阻害剤存在下(16 mg/L)で感性を示した(図1b)。さらに、NDM型メタロベータラクタマーゼを産生するメロペネム耐性腸内細菌目細菌14株のうち、7株がZ1阻害剤存在下(16 mg/L)で感性を示した(図1c)。

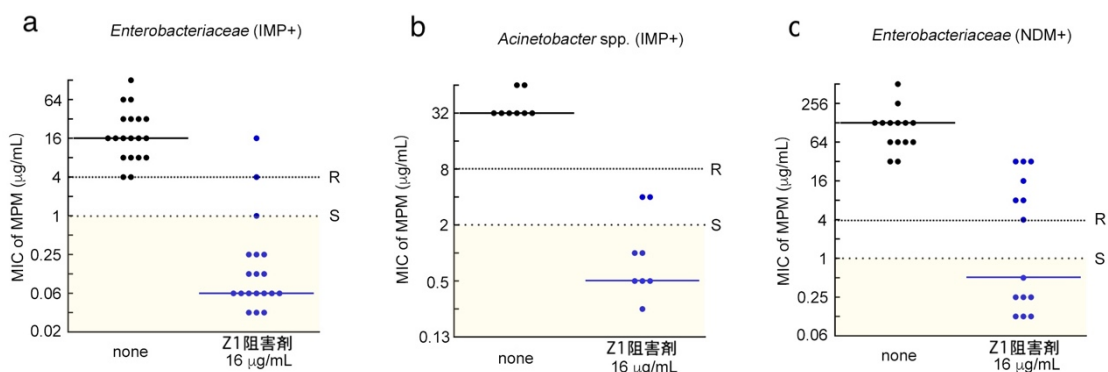


図1. 薬剤感受性試験結果

しかし、IMP型メタロベータラクタマーゼを産生する緑膿菌に対して、Z1阻害剤は明確な阻害効果を示さなかった。したがって、Z1阻害剤は腸内細菌目細菌、アシネトバクター属菌には阻害効果を示すものの、緑膿菌に対する阻害効果はやや弱い傾向にあることがわかった。

さらに、Z1阻害剤の*in vivo*における阻害効果を検証するため、マウス感染-治療モデルを用いた評価を行なった。IMP-1産生大腸菌、NDM-1+VIM-1産生肺炎桿菌をマウスに感染させ、メロペネム単剤治療群、メロペネムとZ1阻害剤との併用群において、それぞれ7日間生存率を算出した。その結果、単剤治療群に比べ、併用群における生存率が有意に高

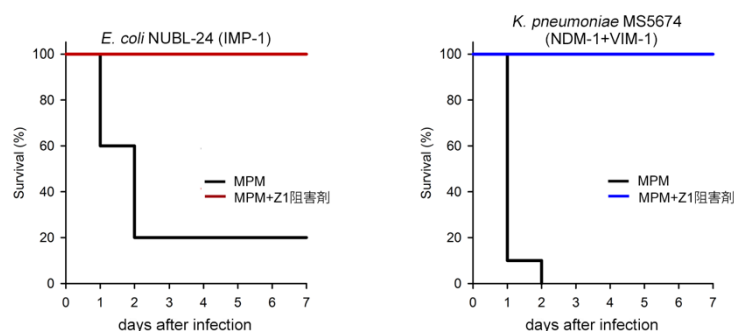


図2. *in vivo*におけるZ1阻害剤の評価結果

いことが明らかとなった。(図2)

Z1 阻害剤とメタロベータラクタマーゼとの結合様式をあきらかにするために、NDM-1、VIM-2 と Z1 阻害剤との複合体モデルを X 線結晶構造解析により決定した。いずれのメタロベータラクタマーゼにおいても、活性中心の亜鉛に、Z1 化合物のカルボキシル基とスルファモイル基が結合していることがわかった。側鎖のエチルおよびメチル基は、メタロベータラクタマーゼのループ構造にある疎水性アミノ酸と相互作用していることがあきらかとなった。(図3)

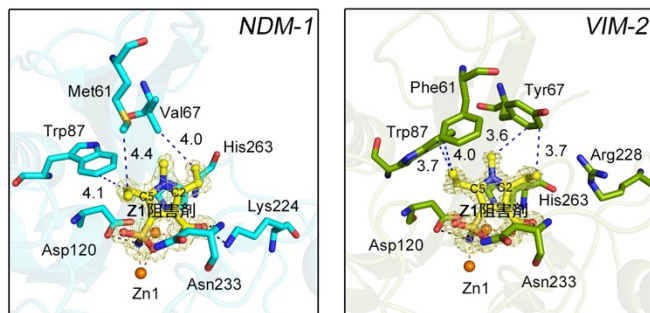


図3. メタロベータラクタマーゼとZ1阻害剤との結合様式

(3年目)

3年目は、2年目に合成した Z1 阻害剤の化学構造改変を行い、新たに Z2 および Z3 阻害剤を創出し、これらの評価を行った。プロトタイプとなる Z1 阻害剤は IMP 型、NDM 型、VIM2 型など各種メタロ-β-ラクタマーゼを強く阻害し、メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌にも阻害効果を示したが、低溶解性という問題点が残されていた。そこで、Z1 阻害剤を化学構造改変し、低溶解性の問題を克服することを試みた。新たに創出した Z2 阻害剤は、フリー体では低溶解性のままであったが、ナトリウム塩もしくはカリウム塩とすることで、生理食塩水のへの溶解性が大幅に向上した。また、Z3 阻害剤はフリー体の状態で高い溶解性を示した。Z2 阻害剤は、酵素および生菌に対して、Z1 阻害剤と同程度の阻害効果を示したものの、Z3 阻害剤の効果は、Z1 阻害剤よりも劣る結果となった。

また、Z2 阻害剤の *in vivo* における阻害効果を検証するためにマウス感染モデルを用いた動物実験を行った。腹腔感染-腹腔投与モデル、腹腔感染-静脈投与モデル、いずれにおいても、Z2 阻害剤の効果により、マウスの救命率が有意に改善することが確認された。さらに、肺感染-腹腔投与モデルにおいては、Z2 阻害剤の効果により肺内の菌数が有意に減少することが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wachino Jun-ichi, Jin Wanchun, Kimura Kouji, Kurosaki Hiromasa, Sato Ayato, Arakawa Yoshichika	4. 巻 11
2. 論文標題 Sulfamoyl Heteroarylcarboxylic Acids as Promising Metallo-β-Lactamase Inhibitors for Controlling Bacterial Carbapenem Resistance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mBio.03144-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Matsuo Nao, Nonogaki Rina, Hayashi Michiko, Wachino Jun-ichi, Suzuki Masahiro, Arakawa Yoshichika, Kawamura Kumiko	4. 巻 64
2. 論文標題 Characterization of blaCTX-M-27/F1:A2:B20 Plasmids Harbored by Escherichia coli ST131 Sublineage C1/H30R Isolates Spreading among Elderly Japanese in Non-acute Care Settings	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AAC.00202-20	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 -
1. 著者名 Wachino Jun-ichi, Kanechi Reo, Nishino Erina, Mochizuki Marie, Jin Wanchun, Kimura Kouji, Kurosaki Hiromasa, Arakawa Yoshichika	4. 巻 63
2. 論文標題 4-Amino-2-Sulfanylbenzoic Acid as a Potent Subclass B3 Metallo-β-Lactamase-Specific Inhibitor Applicable for Distinguishing Metallo-β-Lactamase Subclasses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AAC.01197-19	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 -
1. 著者名 Moroi Hiroaki, Kimura Kouji, Ido Ayaka, Banno Hirotsugu, Jin Wanchun, Wachino Jun-ichi, Yamada Keiko, Kikkawa Fumitaka, Park Yeon-Joon, Arakawa Yoshichika	4. 巻 72
2. 論文標題 Erythromycin-Susceptible but Clindamycin-Resistant Phenotype of Clinical <i>ermB</i> -PCR-Positive Group B Streptococci Isolates with IS-Inserted ermB	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 420-422
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7883/yoken.JJID.2019.015	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 -

1. 著者名 Wachino Jun-ichi, Jin Wanchun, Kimura Kouji, Arakawa Yoshichika	4. 巻 63
2. 論文標題 Intercellular Transfer of Chromosomal Antimicrobial Resistance Genes between <i>Acinetobacter baumannii</i> Strains Mediated by Prophages	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.00334-19	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 -

1. 著者名 Jun-ichi Wachino, Yohei Doi, Yoshichika Arakawa	4. 巻 34(4)
2. 論文標題 Aminoglycoside Resistance: Updates with a Focus on Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Infectious disease clinics of North America	6. 最初と最後の頁 887-902
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.idc.2020.06.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takumi Ushino, Wanchun Jin, Jun-Ichi Wachino, Yoshichika Arakawa, Kouji Kimura	4. 巻 74(3)
2. 論文標題 Daptomycin Susceptibility of Group B Streptococcus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 233-235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7883/yoken.JJID.2020.371	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5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 和知野純一、荒川宜親
2. 発表標題 薬剤耐性機構とその制御に資する 創薬研究
3. 学会等名 日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 和知野純一、金万春、木村幸司、荒川宜親
2. 発表標題 メタロ-β-ラクタマーゼ阻害剤開発の試み（第一報）
3. 学会等名 日本感染症学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和知野純一、金万春、木村幸司、荒川宜親
2. 発表標題 メタロ-β-ラクタマーゼ阻害剤開発の試み
3. 学会等名 日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jun-ichi Wachino
2. 発表標題 Emergence of New Metallo-beta-lactamase and Spread of ESBL-producers in Japan
3. 学会等名 The 30th annual meeting of Japanese society for clinical microbiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun-ichi Wachino, Wanchun Jin, Kouji Kimura, Hiromasa Kurosaki, Ayato Sato, Yoshichika Arakawa
2. 発表標題 Sulfamoyl heterarylcarboxylic acids as promising metallo-beta-lactamase inhibitors for controlling bacterial carbapenem resistance
3. 学会等名 ASM Microbe (国際学会)
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------