

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15158

研究課題名（和文）コリスチン耐性菌の新規抗菌治療

研究課題名（英文）Novel antimicrobial treatment of colistin-resistant bacteria

研究代表者

平林 亜希（Hirabayashi, Aki）

国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター・主任研究官

研究者番号：00801911

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：コリスチンは多剤耐性グラム陰性菌に対して用いられる抗菌薬であるが、近年、伝達性プラスミドを介したコリスチン耐性遺伝子mcrが検出されており、コリスチン耐性菌による感染症の新たな治療法の確立が急務である。本研究ではコリスチン耐性大腸菌に対し低用量コリスチンと併用効果のある薬剤をFDA既承認薬を含む780種類のライブラリーからスクリーニングにて20種類選出し、その標的候補の一つとしてグラム陰性菌の細胞外膜構成タンパクXを同定した。承認薬が細胞外膜構成タンパクXと結合し、外膜の機能に作用することによりコリスチンの作用が増強されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コリスチンは強力な殺菌作用をもつが、一方で量依存とされる腎毒性などの副作用の多い薬剤として知られている。コリスチン耐性菌による感染症の治療薬としてコリスチンのもつ殺菌作用を生かしつつ副作用の面からコリスチンの使用量を低減できる併用療法の開発は臨床現場において強く求められている。本研究はすでに他の目的で使用されている既承認薬の新しい作用点を見いだすことで既存薬の新規適用拡大や、より迅速な新たな治療法の開発につながり、臨床現場の課題の解決の一つとなりうる。

研究成果の概要（英文）：Colistin is an antimicrobial drug used against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. Recently, the colistin-resistant gene mcr has been detected via a transmissible plasmid, and it is urgent to establish a new treatment for infections caused by colistin-resistant bacteria. In this study, we screened a library of 780 drugs, including FDA-approved drugs, for 20 drugs that are effective in combination with low-dose colistin against colistin-resistant E. coli, and identified the extracellular membrane component protein X of Gram-negative bacteria as one of the candidate targets. It was suggested that the approved drugs bind to X and enhance the action of colistin by acting on the function of the outer membrane.

研究分野：薬剤耐性菌

キーワード：コリスチン mcr 外膜タンパク

1. 研究開始当初の背景

コリスチンはグラム陰性菌に対して濃度依存的かつ強力な短時間殺菌作用を持つ。かつては国内でも臨床使用されてきたが、他の抗菌薬の開発やコリスチンのもつ腎毒性や神経毒性などの副作用の問題から日本では使用量が激減し発売中止となった。しかし、近年の多剤耐性グラム陰性菌の増加を踏まえ、コリスチンは2015年より本邦でも薬事承認され、多剤耐性グラム陰性菌の治療薬として再注目されるようになった。コリスチンの耐性機序は、コリスチンの作用点であるLPSの変異であり、これは染色体性の変異が原因であると考えられていた。しかし2015年に中国でプラスミド上に存在する獲得性のコリスチン耐性遺伝子 *mcr* が初めて発見された。MCRはコリスチンの標的であるLPSのリピドAにホスホエタノールアミンを修飾し、外膜の陰性荷電を減少させ、耐性に寄与する。現在、世界各国で伝達性プラスミドを介したコリスチン耐性遺伝子 *mcr* の拡散が懸念されており、早急な対策が必要である。

2. 研究の目的

本研究ではコリスチン耐性菌への新たな治療法を開発することを目的に、低用量コリスチンと併用効果のある薬剤の探索と機序の解明を行う。

3. 研究の方法

780種類のFDA承認薬を含む化合物ライブラリーを用いてスクリーニングを行い、*mcr* 陽性コリスチン耐性大腸菌実験室株に対し低用量コリスチンと併用効果のある薬剤を同定し、そのうち抗がん剤など感染症の治療に不適な薬剤を除き20種類の承認薬を選出した。これらの承認薬の併用療法について臨床や家畜からの分離株を用いた検討を行った。

コリスチンとの併用効果を認めた20種類の薬剤のうち11薬剤の承認薬処理後のLPSについてMS(質量分析法)による解析を行った。また、承認薬処理後の細胞外膜の陰性荷電の変化を調べるため、Z電位を測定した。

低用量コリスチンと20種類の承認薬の併用下でそれぞれの自然耐性株を選択し、次世代シーケンサーでDNA変異部位を解析した。変異株の解析にて標的部位の候補を選択し、それらの変異を含んだ標的タンパクのDNAをクローニングした大腸菌株を作成した。これらの株を用いて併用効果の再構築実験を行った。標的タンパクの一つであるタンパクXを精製する系を確立し、NMRを用いた承認薬と標的タンパクXとの結合についての解析を行った。

4. 研究成果

低用量コリスチンと20種類の承認薬との併用療法のうち、いくつかの承認薬は臨床・家畜分離株にも実験室株と同様の効果を認め、これらの承認薬と低用量コリスチンの併用の臨床的な応用の可能性が示唆された。

MSによるLPSの解析では、コントロールと比較し変化を認めなかった。またZ電位の測定ではコントロールと比較し変化を認めなかった。20薬剤のうち6薬剤は同系統に属しており、これらの承認薬曝露により得られた変異株では、同系統の薬剤に選択的に併用効果がキャンセルされた。薬剤の系統ごとに併用効果の機序が異なることが示唆された。

低用量コリスチンと20種類の承認薬との併用療法に対する耐性株の多くは、グラム陰性菌のLPSなどの外膜構成因子の輸送系に関わる遺伝子に変異があることが分かった。変異株の解析にて標的部位の候補を選択し、それらの変異を含んだ標的タンパクのDNAをクローニングした大腸菌株を用いて併用効果の再構築実験を行ったところ、候補となる細胞外

膜構成タンパクが承認薬の標的であることを示唆する所見が得られた。NMR を用いた解析では承認薬と標的タンパク X の結合が見られた。これらの結果から作用機序としては、承認薬が細胞外膜を構成する標的タンパク X と結合することで外膜の機能に作用することにより、コリスチンの作用が増強されることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hirabayashi Aki, Yanagisawa Hideji, Takahashi Hiromizu, Yahara Koji, Boeing Philipp, Wolfenden Bethan, Nov Vandarith, Lorn Vichet, Veng Mom, Ann Vuth, Darapheak Chau, Shibayama Keigo, Suzuki Masato	4. 巻 12
2. 論文標題 On-Site Genomic Epidemiological Analysis of Antimicrobial-Resistant Bacteria in Cambodia With Portable Laboratory Equipment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 675463
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.675463	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 該当する
1. 著者名 Hirabayashi Aki, Yahara Koji, Mitsuhashi Satomi, Nakagawa So, Imanishi Tadashi, Ha Van Thi Thu, Nguyen An Van, Nguyen Son Thai, Shibayama Keigo, Suzuki Masato	4. 巻 16
2. 論文標題 Plasmid analysis of NDM metallo-β-lactamase-producing Enterobacterales isolated in Vietnam	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0231119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0231119	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 該当する
1. 著者名 Hirabayashi Aki, Ha Van Thi Thu, Nguyen An Van, Nguyen Son Thai, Shibayama Keigo, Suzuki Masato	4. 巻 70
2. 論文標題 Emergence of a plasmid-borne tigecycline resistance in <i>Klebsiella pneumoniae</i> in Vietnam	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medical Microbiology	6. 最初と最後の頁 1320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/jmm.0.001320	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 該当する
1. 著者名 Hirabayashi Aki, Dao Trung Duc, Takemura Taichiro, Hasebe Futoshi, Trang Le Thi, Thanh Nguyen Ha, Tran Hoang Huy, Shibayama Keigo, Kasuga Ikuro, Suzuki Masato	4. 巻 6
2. 論文標題 A Transferable IncC-IncX3 Hybrid Plasmid Cocarrying <i>bla</i> _{NDM-4} , <i>tet</i> (X), and <i>tmexCD3-toprJ3</i> Confers Resistance to Carbapenem and Tigecycline	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 00592-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mSphere.00592-21	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 該当する

〔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 平林亜希、柴山恵吾、鈴木仁人
2. 発表標題 コリスチン耐性菌に対する新規併用療法の開発
3. 学会等名 日本細菌学会総会
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
---------	---------