

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17941

研究課題名（和文）カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌（CPE）におけるホスホマイシン耐性機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of resistance mechanism of fosfomicin in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae

研究代表者

伊藤 亮太（Ito, Ryota）

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：50813359

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）：カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌77株（Enterobacter cloacae complex48株、Klebsiella pneumoniae 29株）におけるホスホマイシン耐性機構の解析を行った。全ゲノム解析やリアルタイムPCRを行い、ホスホマイシン耐性株では全株fosA遺伝子を保有しており、蛋白発現量からも、FosAという酵素がホスホマイシン耐性に大きく寄与していることを明らかにした。また、抗菌薬曝露によりホスホマイシン耐性化が進む株が存在し、その要因が微生物内へ抗菌薬を取り込む輸送系の機能低下が関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌（Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, CPE）などの耐性菌の広がりが世界的に問題となっている。ホスホマイシンは1969年に発見された古くから使用されている抗菌薬である。過去に我々は、ホスホマイシンの耐性に関わるfosA遺伝子を阻害することで、これらの耐性菌にもホスホマイシンが有効となる可能性を示した。本研究で主要な耐性菌におけるホスホマイシン耐性機構が明らかとなり、今後fosA阻害剤の開発などの新薬創薬へつなげることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the mechanism of fosfomicin resistance in 77 strains of carbapenemase producing Enterobacteriaceae (48 Enterobacter cloacae complex strains and 29 Klebsiella pneumoniae strains). Whole-genome sequencing and real-time PCR were performed, and all fosfomicin-resistant strains possessed the fosA gene, and it was clarified that the enzyme FosA greatly contributes to fosfomicin resistance from the protein expression level. In addition, it was clarified that there are strains that develop fosfomicin resistance due to antimicrobial exposure, and that the cause is associated with the functional decline of the transporter system utilized by fosfomicin for cell entry.

研究分野：感染症

キーワード：耐性菌 ホスホマイシン カルバペネム耐性腸内細菌目細菌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々は NCBI の GenBank のゲノムデータを用いて、大腸菌を除く多くの腸内細菌科細菌やブドウ糖非発酵菌が内因性にホスホマイシン (FOM) 分解能を持つグルタチオン S-トランスフェラーゼ (FosA) を産生していることを明らかにした<sup>(1)</sup>。また FosA を競争的に阻害することが知られる抗ウイルス薬のホスカルネットにより、主たるグラム陰性桿菌において FOM の殺菌力が有意に賦活化され、FOM がカルバペネマーゼ産生菌等の耐性菌に有効となる可能性を示した<sup>(2)</sup>。しかし、ホスカルネットには腎毒性などの問題があり、そのまま FosA の阻害剤として臨床的に利用することは困難とも考えられる。そのため、既知の FosA 活性部位立体構造に基づき、FosA 阻害薬の候補化合物の探索を行う研究を計画中であり、長期的な CPE に対する新たな治療戦略として FOM と FosA 阻害剤の合剤の開発を行うことを目標としている。

代表的な FOM の耐性機構としては (1) FOM 分解酵素 (FosA 等)、(2) FOM 能動輸送系 (GlpT 系と UhpT 系) の機能低下、(3) FOM の標的部である MurA の変異が挙げられる。我々の研究では、FOM 耐性基質拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (extended spectrum  $\beta$ -lactamase, ESBL) 産生大腸菌において 15 株中 9 株において能動輸送系の機能低下が認められた。しかし、CPE の代表的な菌種である *Klebsiella pneumoniae* や *Enterobacter cloacae* において、FosA の発現や FosA による FOM 耐性への影響、また FosA 以外の FOM の耐性機構は明らかされていない点が大きな課題である。

### 2. 研究の目的

世界的にカルバペネム耐性菌の出現、伝播が問題となっている状況の中、治療薬の一つとなりうる FOM に着目している。しかし、CPE の代表的な菌種における FosA の発現やその他の FOM 耐性機構については明らかにされていない。本研究は、これらの菌種における FOM 耐性機構を包括的に明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では藤田医科大学病院において 2012 年から 2017 年までに 83 例の CPE 症例が収集されている。その内の *K. pneumoniae* 29 株と *E. cloacae complex* 48 株を研究対象とする。本研究では下記の順に実験を進め、対象株における FOM 耐性機構を明らかにする。

#### 感受性試験

##### 全ゲノム解析

##### Inner colony 株解析

##### リアルタイム PCR

##### 糖質利用能解析

#### 感受性試験

ディスク法を用いて、FOM の感受性試験を行い、カルバペネマーゼを産生する *K. pneumoniae* と *E. cloacae complex* における最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration, [MIC]) の分布を確認する。併せてメロペネム、イミペネム、セフメタゾールの感受性試験を行い、カルバペネム耐性菌の確認を行う。感受性試験は Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 基準に準じて施行する。

#### 全ゲノム解析

次世代シーケンサーを用いて全ゲノム解析を行う。Illumina の Miseq を用いる。Fastq ファイルは nullarbor パイプラインによって、アセンブリ、薬剤耐性遺伝子の検索、MLST 解析を行う。代表的な FOM 耐性遺伝子 (*fosA*, *murA*, *glpT*, *uhpT*, *uhpA*, *uhpB*, *uhpC*, *ptsI*, *cyaA*, *cpxA*, *cpXR* 等) のアミノ酸変異の有無を探索する。

#### Inner colony 株解析

FOM ディスクの感受性試験時に、阻止円内部に複数のコロニーを発育する株を認めることがある。親株 (感性株) と娘株 (耐性株) の比較を行うことで、抗菌薬曝露による FOM への耐性化のメカニズムを明らかにする。これらの株でも全ゲノム解析、機能解析を行う。

#### リアルタイム PCR

対象株において、FOM 耐性に関わると予測される目的遺伝子 (*murA*, *glpT*, *uhpT* 等) の蛋白発現量をリアルタイム PCR で定量的に解析する。

#### 糖質利用能解析

対象株における FOM 能動輸送系の機能を解析するために、M9 最小培地を用いた実験を行う。生理食塩水で洗浄された菌液を 0.2% Glucose-6-phosphate (G6P) と 0.2% glycerol-3-phosphate (G3P) 含有の M9 最小培地に接種し、菌の発育を観察する。0.2% G6P 含有の M9 最小培地で発育

が認められれば、UhpT 輸送系の機能は保たれている、また 0.2% G3P 含有の M9 最小培地で発育が認められれば、GlpT 輸送系の機能は保たれていると判断できる。

#### 4. 研究成果

##### (1) 対象株

藤田医科大学病院で検出されたカルバペネマーゼ腸内細菌科細菌 77 株を研究対象とした。菌種は微生物の生化学的性状より確認を行い、菌種内訳は *Enterobacter cloacae complex* 48 株、*Klebsiella pneumoniae* 29 株であった。

##### (2) 感受性検査

CLSI 法に準じて、ディスク法で行った。全株でカルバペネム耐性であった。ホスホマイシンの感受性については *E. cloacae complex* は 48 株中 22 株で感性、*K. pneumoniae* は 29 株中 11 株で感性であった。

##### (3) 全ゲノム解析

またこれらの全 77 株は Illumina の Miseq を用いて全ゲノム解析を行った。得られた Fastq ファイルは nullarbor パイプラインによって、アセンブリ、薬剤耐性遺伝子の検索、MLST 解析を行った。Blast で菌種同定も行い、全株生化学的性状と一致した。*E. cloacae complex* 株は MLST 解析では ST78 が 32 株と最多で、ST133 が 11 株と次いで多かった。*K. pneumoniae* 株では、ST517 が 20 株と最も多く、ST76 が 5 株と 2 番目に多かった。カルバペネム耐性遺伝子としては、全 77 株が *bla<sub>IMP-1</sub>* 遺伝子を保有していた。*E. cloacae complex* 株では 46 株で、*K. pneumoniae* 株では、全 29 株でホスホマイシン耐性に寄与する *fosA* 遺伝子を保有していた。

##### (4) Inner colony 株の検討

*E. cloacae complex* 株の中で、ホスホマイシンディスク試験で阻止円内に発育する株を 2 株認めた。それぞれ感性株である親株とホスホマイシン耐性娘株における主要なホスホマイシン耐性遺伝子の比較を行った。*GlpR*, *ptsI*, *cysA*, *cpxA*, *cpxR*, *fosA*, *murA* の配列は同一だった。ただ、UhpT とその周辺の欠損を認め、M9 最小培地を用いた糖質利用機能解析でも輸送系の機能低下を示唆する所見を認めた。

##### (5) 感性株と耐性株の比較

また、ホスホマイシンの感受性検査では耐性だった *E. cloacae complex* 26 株と *K. pneumoniae* 18 株では、全株で *fosA* 遺伝子を認めた。感性株の 33 株でも *E. cloacae complex* 2 株を除いて、*fosA* 遺伝子を認めた。リアルタイム PCR で FosA の発現量を比較したところ、耐性株で発現量が高い傾向を認めた。しかし、耐性株の中でも FosA の発現量が低い株が存在し、FosA 以外の耐性機序の可能性が示唆された。これらの株に対して、FOM 能動輸送系の機能解析等のさらなる解析を進めていく必要がある。

#### < 引用文献 >

(1) Ito R, Mustapha MM, Tomich AD, 他 6 名, Widespread fosfomycin resistance in Gram-negative bacteria attributable to the chromosomal *fosA* gene. MBio. 2017; 8(4): e00749-17.

(2) Ito R, Tomich AD, McElheny CL, 他 3 名, Inhibition of fosfomycin resistance protein FosA by phosphonoformate (foscarnet) in multidrug-resistant Gram-negative pathogens. Antimicrob Agents Chemother. 2017; 61(12): e01424-17

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------