

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590532

研究課題名(和文) 選択的液胞破壊作用に基づく新たな抗真菌化学療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel antifungal chemotherapy based on vacuole-disruptive activity.

研究代表者

荻田 亮(Ogita, Akira)

大阪市立大学・都市健康・スポーツ研究センター・准教授

研究者番号：00244624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：アンホテリシン B による真菌液胞膜の選択的破壊作用による新たな抗真菌化学療法の実現に向け、新規因子の探索とそれらの作用機序の解明を試みた。アリシン以外の新たなアクセラレーター因子として抗生物質 niphimycin の側鎖である N-methyl-N''-dodecylguanidine を見いだすとともに、これらによる作用メカニズムの一端を明らかにした。

液胞破壊作用の誘引条件として、膜構成要素であるエルゴステロール分子の存在と、細胞のオートファジーが深く関与していることを明らかにし、選択的液胞破壊作用に基づく新たな抗真菌化学療法を実現するためのシステムについての提案を行った。

研究成果の概要(英文)：To attempt realization of a novel antifungal chemotherapy based on selective fungal vacuole-disruptive activities using amphotericin B, exploring novel amplifier factors and elucidating their action mechanism were performed. These studies showed that N-methyl-N''-dodecylguanidine, a synthetic analogue of the alkyl side chain of niphimycin, would be a candidate as an enhancer of activities of vacuole targeting antifungal antibiotics, in addition to allicin, an allyl sulfur compound from garlic, and partly revealed its mode of action.

Our results obtained with analyses of the mode of action suggested that the presence of ergosterol as a component in membranes and progression of autophagy induced execution of vacuole-disruption. We additionally proposed a practical approach to realize an antifungal chemotherapy via selective vacuole-disruptive activities.

研究分野：生体分子機能学

キーワード：液胞破壊作用

## 1. 研究開始当初の背景

あらゆる抗真菌薬が効かず、発病すると治療の手だてがない薬剤耐性真菌が世界に広がり始めている。健康人においては大きな問題とはならないが、高齢者や免疫抑制剤の投与を受けている臓器移植患者などの免疫力が低下した人は命にかかわる。日本では薬剤耐性真菌による症例の報告はまだ少ないが、とりわけ、深在性真菌症は難治性疾患であり、治療期間が長期化することから薬剤耐性化する可能性が強く潜在し、その拡大は時間の問題と懸念されている。日本における真菌症治療では「細胞膜エルゴステロール」あるいは「細胞壁グルカン」をターゲットとする数種類の抗真菌剤が承認、使用されているものの、薬剤耐性菌の出現の問題に対処しきれておらず、臨床現場からは新たな抗真菌剤の開発が熱望されている。しかしながら、真菌は宿主と同様の真核生物であり、その機能や構造から、真菌だけをターゲットとする選択毒性の高い抗真菌剤の開発は困難であることに加え、新規物質の開発研究には莫大なコストが必要とされることから、抗真菌剤の新規開発研究は行き詰まりの様相を呈している。臨床では異種抗生物質の複合使用もなされているが、耐性化の助長、副作用の増幅もあって、必ずしも有効な手段とはいえない。このような背景のなか、新たな抗真菌機序に基づいた抗生物質の開発および使用方法に向けての臨床医学的要望は高まるばかりである。

高コストを要する新規物質のスクリーニングや、副作用が危惧される抗真菌剤の複合使用といったこれまでの手法ではなく、安全が担保されている天然由来成分と既承認の抗生物質を組み合わせる新たな手法を用いて、既存抗生物質に潜在する未知なる活性を検索した結果、天然由来のニンニク薬効成分であるアリシンがアクセラレーター因子となり、臨床で繁用される既存抗生物質アンホテリシン B (AmB) に潜在する「真菌液胞膜障害作用」を増幅する事実が見いだされた。ヒトには存在しない細胞小器官である「液胞」をターゲットとするこれまでにない全く新しいアプローチは、副作用を著しく低減させることや、抗真菌剤への耐性化抑制が可能となることに加えて、臨床における既存抗生物質活用の選択肢を拡大し得る画期的なものであると考えられる。

抗真菌剤は細菌用抗生物質に比べて開発が困難であることや、加速する高齢者人口の増加に伴って真菌感染症が拡大の一途をたどっていること等を勘案すると、本研究が及ぼす社会的インパクトは計り知れない。このような背景から、本研究で提案する抗真菌化学療法の実現に向けた基礎的、応用的検討が急務と考えた。

## 2. 研究の目的

本研究においては、まず AmB が真菌に及

ぼす液胞膜破壊作用に基づいて、細胞膜をはじめとした細胞小器官への影響、液胞膜障害に関与するタンパク質の解析、薬剤および液胞膜の保護作用に関与する因子の探索、ヒト培養細胞における特異性の検証など一連のインビトロ試験を通して、基礎的データを総括し、新規ターゲットに基づいた抗真菌剤の開発と、その臨床使用への具現化に向けた検討を進める。一方で、真菌液胞膜に選択的な破壊作用を現出させる新規因子のスクリーニングシステムに基づく、新規抗生物質の開発研究における新たなデザインとしての確立を目指す。

## 3. 研究の方法

AmB の殺真菌作用を増幅するアリシン以外のアクセラレーター因子を見いだすため、主として出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* W303 をモデル細胞として使用し、スクリーニング実験を行った。ペーパーディスク法および液体培地希釈法を用いて AmB とアクセラレーター因子の組合せによる相乗的抗真菌作用を観察した。ペーパーディスク法では、AmB を含まない YPD 寒天培地と AmB を含む寒天培地それぞれに、YPD 培地にて前培養した *S. cerevisiae* を  $1 \times 10^6$  cells/ml となるように懸濁したシャーレプレートを作成した。寒天培地上に種々薬剤を含んだペーパーディスクを貼付し、30°C で 48 時間静置培養した後、生育阻止円の有無を観察した。液体培地希釈法においては、YPD 培地にて前培養した *S. cerevisiae* を  $1 \times 10^6$  cells/ml に希釈した細胞懸濁液に、倍々希釈により調整した AmB と種々薬剤を添加し、各々の組合せによる相乗的効果をチェッカーボード法により判定した。AmB との組合せによって相乗効果が認められた新規因子については病原性酵母 *Candida albicans* および病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* に対する効果についても確認を行い、系統的データを取得した。また、ヒト培養細胞 HL60 を使用し、RPMI 培地中における各種薬剤の有効性および細胞毒性についても検証を行った。

真菌の細胞小器官である液胞膜に対する破壊作用については液胞を特異的に染色する蛍光プローブ (FM4-64) を使用した。YPD 培地にて前培養した試験菌を PBS バッファーで洗浄した後、5  $\mu$ M FM4-64 を含む YPD 培地中において 30 分間の染色処理を施した。染色処理後の細胞を再度 PBS バッファーで洗浄した後、YPD 培地中あるいは蒸留水中において各種薬剤処理を行い、蛍光顕微鏡にて液胞の形状を観察した。

AmB の液胞膜障害作用は、貧栄養下、とりわけ蒸留水中で著しく増幅される。これらの状況においてはオートファジーが促進されることから、AmB とオートファジーとの関連について検討した。本実験系には、主として *S. cerevisiae* BY4741 株および本株に由来する  $\Delta$ atg 株ならびに  $\Delta$ vma 株を用いた。これら

の株を YPD 培地中で前培養したのち、蒸留水に懸濁することでオートファジーを促進させた。1×10<sup>7</sup> cells/ml の細胞を懸濁した蒸留水を、AmB を始めとする種々薬剤の有無の条件でインキュベートしたのち、生菌数をコロニーカウント法で測定した。また、細胞内 K<sup>+</sup> の細胞外への漏出を細胞膜障害の指標として測定した。AmB の細胞内動態については AmB に蛍光標識を施した AmB-誘導体 (dAmB) を用いて蛍光顕微鏡で観察した。

#### 4. 研究成果

*S. cerevisiae* 標準株および病原性酵母 *C. albicans* をモデルとして、アリシンおよび AmB 以外に液胞膜断片化を介して殺真菌活性を引き起こす新規因子の探索を行った結果、既存抗生物質ニフィマイシンの側鎖である *N*-methyl-*N'*-dodecylguanidine (MC12) がこれらの真菌に対する AmB の液胞膜障害作用を増幅する事実を見いだした。また、抗グラム陰性細菌剤ポリミキシン B (PMB) においては、アリシンとの併用によってこれらの真菌に対して液胞膜障害作用に起因する殺真菌作用を引き起こすことを見いだした。

MC12 においては単独では液胞膜障害作用を引き起こさないが、AmB との併用によってのみ真菌液胞膜の断片化を引き起こすことが判った。すなわち、MC12 は AmB が有する液胞膜障害作用を増幅していることが明らかになった。さらに、高濃度のエルゴステロールで処理した真菌細胞は MC12 と AmB による本活性に対して耐性を示すことから、アリシンと同様にエルゴステロールの細胞内輸送に関与して液胞膜障害作用を発揮しているものと推察された。一方、PMB が細胞小器官を破壊する作用を有するかどうかについて検討した結果、高濃度で処理した場合において、単離液胞の断片化を引き起こすことが明らかになった。アリシンは液胞膜障害作用を有していないことが明らかにされていることから、PMB とアリシンの組合せによる真菌液胞膜障害作用に関しては、アリシンが、PMB の細胞内への取り込みを促進することで液胞膜に対する直接的な作用を助長していることが明らかとなった。

ヒト培養細胞 HL60 に対する AmB とアリシンの組合せ効果について検証したところ、HL60 の生育に対する AmB の作用は極めて僅少であり、少なくとも *S. cerevisiae* や *C. albicans* に対して致死作用を示す濃度までの範囲においては HL60 に対して、何ら細胞毒性を示さないことがわかった。また、HL60 に対しては AmB とアリシンの組合せによる相乗的作用が発現しないことが判った。

dAmB を用いて AmB を可視化し、その致死作用と細胞内動態との関係を検討した結果、致死濃度以下の dAmB 処理細胞では、液胞膜に dAmB の蛍光が観察されたが、液胞膜障害作用は観察されなかった。一方、MC12 の共存下においては dAmB 処理細胞において

液胞膜障害が観察されたことから、MC12 は細胞内に取り込まれた AmB が液胞膜に作用する過程に対して促進作用を及ぼしていることが判った。さらに、種々のエルゴステロール合成タンパク質の欠損株を用いて AmB とエルゴステロールの関係について検討を行った。AmB に耐性を示す  $\Delta$ erg3 株はエルゴステロールの代替としてエビステロールを細胞内に蓄積する。本変異株においては、細胞内に dAmB の蛍光が観察されなかったことから、真菌においてエルゴステロール合成が機能していることが、細胞内への AmB の取り込み、および AmB の液胞膜破壊作用の増幅における重要な要因であることが明らかとなった。

AmB による真菌液胞膜破壊作用が効果的に発現する条件を検討したところ、貧栄養、低浸透圧下において顕著にその作用が増幅することが判った。すなわち、液胞膜融合が促進される低浸透圧環境下において AmB の液胞膜障害作用が顕著に発現することを明らかにした。また、同様の条件下においては MC12 による更なる致死作用の促進は認められなかった。一方、YPD 培地中で非致死濃度の AmB により処理した細胞を蒸留水中に懸濁したところ、液胞膜障害を伴う致死作用が確認された。以上の結果から、AmB の液胞膜破壊作用は真菌における液胞膜融合の過程で発現し、MC12 は液胞膜融合を誘導することで AmB の液胞膜障害作用を増幅している可能性が示された。

AmB による液胞膜障害作用と、貧栄養および低浸透圧下において発現するオートファジーとの関連を検証するため、オートファジー関連遺伝子の欠損変異株に対する AmB の致死作用と液胞膜障害作用、ならびにその細胞内動態を親株のそれと比較した。本実験系においては、主として *S. cerevisiae* BY4741 株および本株に由来する  $\Delta$ atg 株ならびに  $\Delta$ vma 株を用いた。

本実験系に供試したすべての  $\Delta$ atg 株および  $\Delta$ vma 株において AmB 耐性が生じていることが判った。液胞観察が容易な  $\Delta$ atg18 株、 $\Delta$ vma1 株、 $\Delta$ vma2 株、 $\Delta$ vma3 株に対して dAmB を作用させたところ、 $\Delta$ atg18 株では細胞質中に拡散し、 $\Delta$ vma1 株、 $\Delta$ vma2 株、および  $\Delta$ vma3 株では dAmB が液胞内部へと取り込まれていることが判った。すなわち、 $\Delta$ atg 18 株では AmB を液胞膜に輸送する機構が機能しないことで AmB 耐性が生じていると推察された。一方、 $\Delta$ vma 株では AmB を取り込んだ小胞が液胞と融合しないために、AmB 耐性が生じていると推察された。これらの結果から AmB による液胞膜障害作用の発現は細胞のオートファジー機能と深く関連していることが明らかになった。

以上の研究成果は、液胞をターゲットとする新たな抗真菌作用における発現メカニズムの一端を明らかにした基礎的データであるのみならず、ヒト培養細胞に対しての安全

性についても検証されていることから、今後の新規抗真菌剤の開発および新たな抗真菌化学療法への展開に繋がる有用な知見と成り得る。さらに、本研究における新規増幅因子のスクリーニングシステムによって AmB およびアリシン以外の有効なアクセラレーター因子が見いだされていることなどから、本スクリーニングシステムは新規抗真菌剤開発研究における新たなシステムへと展開する可能性が示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Fujita K, Tatsumi M, Ogita A, Kubo I, Tanaka T. Anethole induces apoptotic cell death accompanied with reactive oxygen species production and DNA fragmentation in *Aspergillus fumigatus* and *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Journal, 査読有, Vol 2, 2014, pp. 1304-1311.

② Kang CK, Yamada K, Usuki Y, Ogita A, Fujita K, Tanaka T. Visualization analysis of the vacuole-targeting fungicidal activity of amphotericin B against the parent strain and an ergosterol-less mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology, 査読有, Vol. 159, 2013, pp. 939-947.

③ Yutani M, Ogita A, Fujita K, Tanaka T. Generation of novel fungicidal activity by the combined actions of hygromycin B and polymyxin B. International Journal of Life Science and Medical Research, 査読有, Vol. 3, 2013, pp. 193-199.

[学会発表] (計 8 件)

①吉岡美知留、松岡研、山田圭一、荻田亮、藤田憲一、田中俊雄。アンホテリシン B の真菌液胞膜障害作用におけるオートファジーの関与。日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 28 日、岡山大学 (岡山県岡山市)。

②近藤拓也、荻田亮、藤田憲一、田中俊雄。ヤナギタデ由来成分の真菌液胞膜破壊作用。日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 28 日、岡山大学 (岡山県岡山市)。

③Tomiyama T, Inoi T, Nishiyama T, Horibe H, Takahashi R, Kitamura S, Umena Y, Ogita A, Tanaka T, Fujita K. Effect of pgsE on microbial production of poly  $\gamma$ -glutamic acid –Estimation of molecular weight based on intrinsic viscosity and SEC-MALS analyses–, The 2014 OCARINA Annual International Meeting, 4 Mar 2015, Osaka, Japan.

④姜昌慶、山田圭一、荻田亮、藤田憲一、田中俊雄。N-methyl-N"-dodecylguanidine によって増幅する Amphotericin B の真菌液胞膜破壊作用。第 66 回日本生物工学会大会、2014 年 9 月 10 日、札幌コンベンションセンター (北

海道札幌市)。

⑤村田和加恵、金原聡子、北原望、荻田亮、藤田憲一、田中俊雄。出芽酵母の偽菌糸形成に際しておこる微小管の配向異常への Bim1 および Kar9 タンパク質の関与の可能性。日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 28 日、明治大学 (神奈川県川崎市)。

⑥村田和加恵、金原聡子、北原望、荻田亮、藤田憲一、田中俊雄。出芽酵母の偽菌糸形成における微小管の配向およびアクチンの凝集異常の関与。第 65 回日本生物工学会大会、2013 年 9 月 19 日、広島国際会議場 (広島県広島市)。

⑦姜昌慶、山田圭一、荻田亮、藤田憲一、田中俊雄。amphotericin B の真菌液胞膜破壊作用を促進する N-methyl-N"-dodecylguanidine の作用機序。日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 26 日、東北大学 (宮城県仙台市)。

⑧村田和加恵、北原望、金原聡子、荻田亮、藤田憲一、田中俊雄。出芽酵母の偽菌糸形成におけるアクチンパッチ形成不全の関与。日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 26 日、東北大学 (宮城県仙台市)。

[図書] (計 1 件)

①荻田亮、藤田憲一、田中俊雄。技術情報協会、食品・化粧品・医薬品への保存料・防腐剤の最適な配合法、2014、pp. 92-96。

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：防腐剤又は抗菌剤の効果増強剤

発明者：荻田亮、田中俊雄、藤田憲一。

権利者：公立大学法人 大阪市立大学

種類：特許

番号：特願 2012-234161

出願年月日：平成 24 年 10 月 23 日

国内外の別：国内

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

荻田 亮 (OGITA, Akira)

大阪市立大学・都市健康・スポーツ研究センター・准教授

研究者番号：00244624

(2)連携研究者

藤田 憲一 (FUJITA, Ken-ichi)

大阪市立大学大学院・理学研究科・准教授  
研究者番号：10285281

田中 俊雄 (TANAKA, Toshio)

大阪市立大学大学院・理学研究科・教授  
研究者番号：10137185

清水 隆 (SHIMIZU, Takashi)

山口大学・農学部・准教授

研究者番号：40320155