

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791027

研究課題名(和文) 病原真菌における多剤耐性機序の解明と臨床的重要性の評価

研究課題名(英文) Elucidation of multi-antifungal resistance mechanisms in pathogenic fungi and evaluation of clinical significance

研究代表者

宮崎 泰可 (MIYAZAKI, Taiga)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号：60448496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：臨床使用が可能な抗真菌薬は極めて限られている中で、多剤耐性菌の出現は重大な問題である。特に近年、アゾール系薬のみならず、カンディン系薬にも耐性を示す病原真菌 *Candida glabrata* の増加が問題視されている。本研究で我々は、*C. glabrata* の X 遺伝子に起こるわずかな一つのアミノ酸変異が、病原性に影響せずに多剤耐性を誘導することを発見し、この現象の分子生物学的機序を解明した。

研究成果の概要(英文)：Considering the limitations of the currently available antifungals, emergence of multi-antifungal resistance poses a serious concern in clinical settings. Recent surveillance data have revealed an increased number of *Candida glabrata* clinical isolates that display resistance to not only azoles but also echinocandins. In this study, we discovered that a single amino acid substitution in gene X confers multi-antifungal resistance without affecting virulence in *C. glabrata* and revealed molecular mechanisms of this phenomenon.

研究分野：医真菌学

キーワード：薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

—多剤耐性病原真菌の脅威—

医療の進歩や HIV/AIDS 患者の増加に伴い、日和見感染症は増加の一途にある。カンジダ症やアスペルギルス症をはじめとする深在性真菌症は、有効な抗真菌薬が限られており、治療に難渋することも少なくない。そのような中で、多剤耐性病原真菌の出現は、人類において、特に免疫不全患者にとってはきわめて重大な問題である。これまで人類と病原菌の戦いは、新規薬剤開発と耐性菌出現の巧妙な“いたちごっこ”であったが、われわれは常に後手にまわっている。細胞壁合成阻害剤として新しく開発されたキャンディン系抗真菌薬は、副作用が少ないこともあり、臨床現場で頻用されるようになった。しかし近年、特に *Candida glabrata* のキャンディン低感受性株が確実に増加してきている (Pfaller MA et al. Diagn Microbiol Infect Dis. 69:45-50, 2011)。難治性真菌感染症を克服するためには、既存抗真菌薬に対する耐性機序の解明は重要な課題とされている。

2. 研究の目的

前述したとおり、近年、アゾール系薬のみならずキャンディン系薬にも耐性を示す多剤耐性 *Candida glabrata* の増加が問題視されている。アゾール耐性機序はこれまでの研究である程度解明されてきたが、キャンディン耐性に関しては標的酵素である *FKS* 遺伝子の変異以外にはほとんど知られていない。臨床現場では、*FKS* 遺伝子変異を有さないキャンディン低感受性あるいは耐性株も分離されており、そのメカニズムの解明が求められている。本研究は、*C. glabrata* における多剤耐性機序の詳細を解明し、今後の治療戦略や新規薬剤開発へ応用していくことを目的としている。

3. 研究の方法

(1) Micafungin (MCFG) 低感受性株の誘導

C. glabrata の野生株 CBS138 をキャンデ

イン系薬の一つである MCFG を含有した YPD 固形培地に接種した。増殖してきたコロニーを順次 MCFG 濃度を増加させた培地で継代培養したところ、MCFG 低感受性株が選択された。表現型の可逆性を検討するために、これらの株は MCFG を含まない培地で 23 日間継代培養した。

(2) 抗真菌薬感受性試験

抗真菌薬感受性は、標準的に行われている spot dilution assay, E-test, 微量液体希釈法 (ASTY) を用いて評価した (Miyazaki T et al. PLoS Pathog. 9:e1003160, 2013)。

(3) 遺伝子発現解析およびフローサイトメトリ解析

qRT-PCR や rhodamine 6G (R6G) を用いたフローサイトメトリ解析は、これまでに報告されている手法を用いて行った (Miyazaki T et al. PLoS Pathog. 9:e1003160, 2013, Prasad T et al. Antimicrob Agents Chemother. 50:3597, 2006)。

(4) 播種性カンジダ症マウスモデルを用いた病原性の検討

C. glabrata の病原性は、播種性カンジダ症マウスモデルを用いて解析した (Miyazaki T et al. PLoS Pathog. 9:e1003160, 2013)。BALB/c マウス、8 週齢、雌 (Charles River Laboratories Japan Inc.) の尾静脈から 0.2 ml の *C. glabrata* 懸濁液 (4×10^8 cells/ml) を接種した。7 日後、マウスから肝、腎、脾を摘出し、臓器内菌数を解析した。

(5) 倫理的配慮

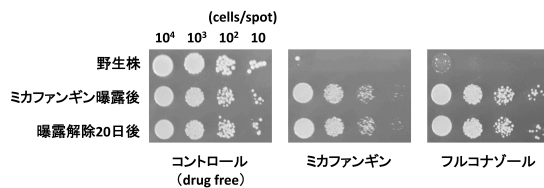
すべての動物実験は、事前に長崎大学の動物実験専門委員会及び、組換え遺伝子実験委員会の承認を得た上で実施した。関連法令を遵守し、動物は可及的に少ない頭数を用いる

とともに、人道的エンドポイントに達した動物は安楽死によって無用の苦痛が生じないように配慮した。

4. 研究成果

(1) *C. glabrata* における MCFG 低感受性化の誘導

低濃度の MCFG に継続的に暴露されることによって、MCFG 低感受性の *C. glabrata* 株が *in vitro* で選択された。これらの株は MCFG を含まない培地で 23 日間継代培養を行ったが、MCFG 低感受性は不可逆的なものであった。



(2) MCFG 低感受性 *C. glabrata* 株の表現型解析

驚くべきことに、今回実験的に選択された MCFG 低感受性 *C. glabrata* 株は、作用機序が異なるアゾール系薬[フルコナゾール (FLC), イトラコナゾール (ITC), ボリコナゾール (VRC)] に対しても同時に高度耐性が誘導されていた。さらに、複数の菌株で同様の表現型を示すことも確認された。

	最小発育阻止濃度 (MIC)		
	FLC	ITC	VRC
野生株	16	2	0.5
ミカファンギン曝露後	>256	>32	>32
曝露解除20日後	>256	>32	>32

(μg/ml)

(3) 全ゲノムシーケンスおよび cDNA ライブラリーを用いた相補的解析による責任遺伝子の同定

MCFG 暴露株の全ゲノムシーケンスを行ったところ、複数の遺伝子変異が検出されたが、cDNA ライブラリーを用いた相補的解析

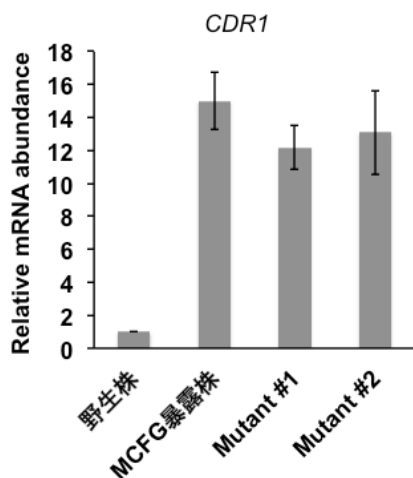
によって、単一の責任遺伝子変異が同定された。更に、この変異を野生株に導入したところ、全ての表現型が再現された。



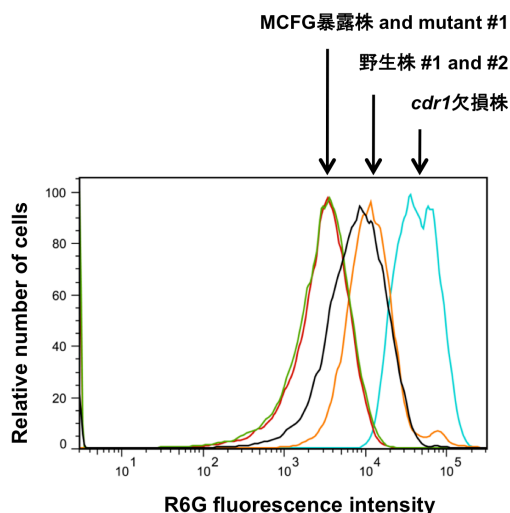
(4) アゾール耐性機序の解明

主要なアゾール耐性機序として、標的分子である 14α -demethylase (Erg11p) の変異や過剰発現、薬剤排出ポンプ (Cdr1, Pdh1) の活性化が知られている (Cowen LE, Nat Rev Microbiol. 6:187-198, 2008)。この変異株では、*ERG11* 遺伝子の変異は認めず、発現量も野生

株と同等であった。一方、*CDR1*は約12倍、*PDH1*は約2倍の発現量増加が変異株において認められた。

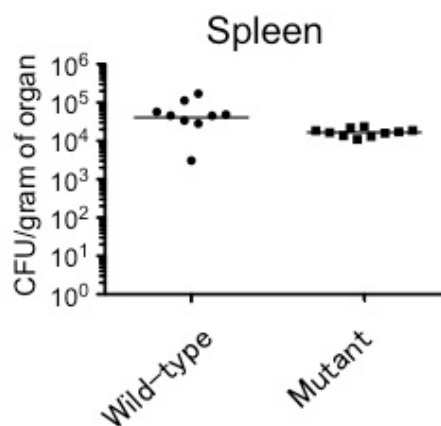
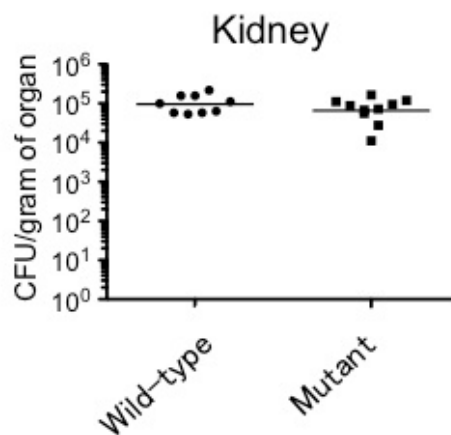


更に、フローサイトメトリーを用いて、*Cdr1*の基質の一つである rhodamine 6G (R6G) の細胞内濃度を解析した。薬剤排出ポンプを不活化した状態で受動的に細胞内に取り込まれるR6G濃度は野生株と変異株で同等であった。一方、通常の増殖環境で検討したところ、変異株では野生株よりも明らかにR6Gの細胞内濃度が低下しており、主に*Cdr1*の過剰発現による薬剤排出の促進が示唆された。コントロールとして使用した*cdr1*欠損株では、予想通り細胞内R6G濃度の上昇が確認された。



(5) 播種性カンジダ症マウスモデルを用いた病原性の検討

今回同定された遺伝子変異が *C. glabrata* の病原性に与える影響を検討した。経静脈感染7日後の腎および脾内菌数は、野生株と変異株で有意差はなく、播種性カンジダ症マウスモデルにおいては、この変異が *C. glabrata* の病原性を低下させないことが証明された。



考察

近年、世界的にカンディン系薬の使用頻度が増えており、アゾール系薬のみならずカンディン系薬にも耐性を示す *C. glabrata* 臨床分離株の増加が報告されている。*FKS* 遺伝子と *ERG11* 遺伝子の産物が、それぞれカンディン系薬とアゾール系薬の薬剤標的として知られている。薬剤標的の変異は薬剤親和性の低下をもたらすため、重要な耐性機序の一つであるが、今回我々が作製した耐性誘導株においては、いずれの標的遺伝子にも変異を認めなかった。ところが、ある遺伝子

のわずか一つのアミノ酸変異が、病原性を低下させることなく、異なる系統の抗真菌薬耐性を誘導することが本研究により示された。この実験的に誘導された多剤耐性 *C. glabrata* 株では、アゾールの主要な排出ポンプである Cdr1 が、アゾール不在でも著明に活性化されていた。Cdr1 は、キャンディン系抗薬を基質として認識しないため、二次的に誘導された現象であると推察される。これらは今まで報告のない新規の現象であり、今後、より詳細な分子生物学的機序の解明と臨床との関連性を検証する必要がある。

結論

本研究により、新規の抗真菌薬耐性機序が明らかになった。これは、病原性を低下させることなく、多剤耐性をもたらすものであり、臨床現場で実際に起こりうる可能性がある。既存の抗真菌薬に対する耐性機序の解明は、今後新たな薬剤や治療戦略の開発に重要な情報をもたらすものと考えられる。分子生物学的手法を用いた更なる解析に加え、この耐性機序が他の菌種でも同様に存在するのか、また、実際に多剤耐性臨床分離株においてどの程度関与しているのかを今後検証していく予定である。

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 5 件)

1. Miyazaki T, Kohno S. ER stress response mechanisms in the pathogenic yeast *Candida glabrata* and their roles in virulence. *Virulence*. 5(2):365-70, 2014. 査読有り.
2. Miyazaki T. Elucidation of multiantifungal resistance mechanisms in pathogenic fungi and their clinical impacts. *Jpn J Antibiot*. 67(4):263-71, 2014. 査読有り.
3. Nagayoshi Y, Miyazaki T, Minematsu A, Yamauchi S, Takazono T, Nakamura S,

Imamura Y, Izumikawa K, Kakeya H, Yanagihara K, Kohno S. Contribution of the Slt2-regulated transcription factors to echinocandin tolerance in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res*. 14(7):1128-31, 2014. 査読有り.

4. Hosogaya N, Miyazaki T, Nagi M, Tanabe K, Minematsu A, Nagayoshi Y, Yamauchi S, Nakamura S, Imamura Y, Izumikawa K, Kakeya H, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kugiyama K, Kohno S. The heme-binding protein Dap1 links iron homeostasis to azole resistance via the P450 protein Erg11 in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res*. 13(4):411-21, 2013. 査読有り.
5. Miyazaki T, Nakayama H, Nagayoshi Y, Kakeya H, Kohno S. Dissection of Ire1 functions reveals stress response mechanisms uniquely evolved in *Candida glabrata*. *PLoS Pathog*. 9(1):e1003160, 2013. 査読有り.

[学会発表] (計 16 件)

1. Taiga Miyazaki. A single amino acid substitution in Ipi1 confers multiantifungal resistance without affecting virulence in *Candida glabrata*. 12th ASM Conference on *Candida* and Candidiasis. 2014年3月29日, The Hyatt Regency New Orleans (米国ニューオーリンズ).
2. 峰松明日香、宮崎泰可、他. *Candida glabrata*のV-ATPase活性と薬剤耐性との関連. 真菌症フォーラム第15回学術集会. 2014年2月8日, 第一ホテル東京(東京都港区).
3. 宮崎泰可. *Candida glabrata*で特有の進化を遂げた小胞体ストレス応答機序. 第62回日本化学療法学会・第84回日本感染症学会西日本地方会学術集会 合同学会. 2014年

- 10月25日, 岡山コンベンションセンター (岡山市北区) .
4. 西川博、宮崎泰可、他. 病原真菌 *Candida glabrata* の vacuolar H⁺-ATPase が酸化ストレス応答に及ぼす影響. 第62回日本化学療法学会・第84回日本感染症学会西日本地方会学術集会 合同学会. 2014年10月25日, 岡山コンベンションセンター (岡山市北区) .
 5. 宮崎泰可. 病原真菌におけるストレス応答機序の解明と新規治療戦略への応用. 第73回日本呼吸器学会九州地方会学術集会. 2014年10月10日, 鹿児島県医師会館 (鹿児島島中央町) .
 6. 宮崎泰可. 最新のガイドラインから読み取れる深在性真菌症診療の現状と課題. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会. 2014年11月2日, ワークピア横浜 (横浜市中区) .
 7. 宮崎泰可. カンジダの病原性とストレス応答. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会. 2014年11月1日, ワークピア横浜 (横浜市中区) .
 8. 西川博、宮崎泰可、他. 病原真菌 *Candida glabrata* の vacuolar H⁺-ATPase が酸化ストレス応答に及ぼす影響. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会. 2014年11月1日, ワークピア横浜 (横浜市中区) .
 9. 宮崎泰可. 深在性真菌症の今後の治療戦略. 第87回日本感染症学会学術講演会・第61回日本化学療法学会総会 合同学会. 2013年6月5日, パシフィコ横浜 (横浜市西区) .
 10. 峰松明日香、宮崎泰可、他. Vacuolar H⁺-ATPase の阻害が *Candida glabrata* の抗真菌薬耐性と病原性に与える影響. 第87回日本感染症学会学術講演会・第61回日本化学療法学会総会 合同学会. 2013年6月5日, パシフィコ横浜 (横浜市西区) .
 11. Yohsuke Nagayoshi, Taiga Miyazaki, et al. Unexpected effects of the monoamine oxidase A inhibitor clorgyline on antifungal susceptibility of *Candida glabrata*. 28th International Congress of Chemotherapy and Infection. 2013年6月7日, パシフィコ横浜 (横浜市西区) .
 12. 宮崎泰可. カンジダの小胞体ストレス応答と病原性. 第57回日本医真菌学会総会・学術総会. 2013年9月27日, 京王プラザホテル (東京都新宿区) .
 13. 宮崎泰可. 「カンジダ vs. 抗真菌薬」. 第57回日本医真菌学会総会・学術総会. 2013年9月27日, 京王プラザホテル (東京都新宿区) .
 14. 宮崎泰可. カンジダ血症. 第57回日本医真菌学会総会・学術総会. 2013年9月28日, 京王プラザホテル (東京都新宿区) .
 15. 宮崎泰可. 深在性真菌症の今後の治療戦略. 第57回日本医真菌学会総会・学術総会. 2013年9月28日, 京王プラザホテル (東京都新宿区) .
 16. 宮崎泰可. 深在性真菌症治療における各種抗真菌薬の位置づけを考える～日頃の疑問に答える～内科臨床医の立場より. 第62回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第60回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会. 2013年10月31日, 東京ドームホテル (東京都文京区) .
- [図書] (計1件)
1. 日本医真菌学会 侵襲性カンジダ症の診断・治療ガイドライン作成委員会「侵襲性カンジダ症の診断・治療ガイドライン2013」春恒社, 2013年, pp.1-134.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
- 宮崎 泰可 (MIYAZAKI, Taiga)
- 長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系) ・
講師
- 研究者番号: 60448496