

多剤耐性グラム陰性菌感染症克服に向けた新規感染症治療薬の天然資源探索と分子標的候補多剤排出ポンプの評価解析

研究代表者：森田雄二（創薬科学ユニット）

研究分担者：中島健一（創薬科学ユニット）、木村聡子（生命薬学ユニット）、
富田純子（生命薬学ユニット）、山本浩充（創薬科学ユニット）

多剤耐性緑膿菌など多剤耐性グラム陰性桿菌による感染症は、治療に有効な抗菌薬はほとんどなく、新規の治療薬の開拓が社会的に急務といえる（多剤耐性グラム陽性球菌の代表格であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）にはバンコマイシン、アルベカシン、リネゾリド、ダプトマイシンなど有効な治療薬が比較的多くある）。多剤耐性緑膿菌は、我が国の感染症法では、広域β-ラクタム（メロペネムなど）、抗緑膿菌アミノ配糖体（アミカシンなど）、ニューキノロン（シプロフロキサシンなど）の3系統の抗緑膿菌薬に耐性を獲得した緑膿菌と定義されており、その多くは、外来性のメタロβ-ラクタマーゼとアミノ配糖体アセチル化酵素を獲得し、キノロンの標的酵素遺伝子に典型的な変異を持つ。

研究代表者はこれまでグラム陰性桿菌の多剤排出ポンプに関する研究を行い多くの成果を挙げてきた。多剤排出ポンプは、薬剤耐性機構としては補助的な役割にとどまるが、多剤耐性のベースとして重要である。創薬においては外膜と多剤排出ポンプによる透過性バリアが新薬探索の障壁となる（例えば抗MRSA薬リネゾリドは多剤排出ポンプによりグラム陰性桿菌には効かない）。さらに多剤排出ポンプは薬剤耐性だけでなく病原性発現やバイオフィーム形成などに関与する可能性も示唆された。本研究では、我々は我が国の典型的な高度多剤耐性緑膿菌NCGM2.S1株を用いて、抗菌薬耐性における多剤排出ポンプの寄与度を評価した。さらに多剤耐性グラム陰性桿菌に有効な全く新しい系統の感染症治療薬の開発を目指し、多剤耐性緑膿菌の抗菌薬耐性系阻害薬やバイオフィーム形成阻害薬の探索を行った。

1. 多剤排出ポンプの寄与度

我が国の典型的な高度多剤耐性緑膿菌NCGM2.S1株から多剤排出ポンプ遺伝子*mexXY*を欠損した遺伝子改変株は、アミカシン等抗緑膿菌用アミノ配糖体に感受性化した。NCGM2.S1株だけでなく、他の薬剤耐性緑膿菌でも同様の結果が得られた。多剤排出ポンプ*MexXY*系を阻害する化合物は、多剤耐性緑膿菌のアミカシン等アミノ配糖体耐性を克服できるのかもしれない。一方、NCGM2.S1株から多剤排出ポンプ遺伝子*mexAB*を欠損した遺伝

子改変株の薬剤感受性は、NCGM2.S1株とほぼ同程度であった。*MexAB*系の抗菌薬耐性が欠損しても他の耐性因子によりカバーされるようである。さらにNCGM2.S1株から*mexXY*と*mexAB*の2つの排出系遺伝子を欠損した遺伝子改変株は、抗緑膿菌用アミノ配糖体だけでなく、シプロフロキサシン等ニューキノロン薬にも感受性化した。他の薬剤耐性緑膿菌でも*mexXY*と*mexAB*を含む複数の排出ポンプ遺伝子を欠損させると同様の結果が得られた。*MexXY*や*MexAB*等の排出系を同時に阻害する化合物は、多剤耐性緑膿菌のニューキノロン耐性を克服できるのかもしれない。（実施者：森田）

2. シード化合物の探索

多剤耐性緑膿菌の抗菌薬耐性やバイオフィーム形成を阻害するシード化合物を探索したところ、候補シード生薬エキスがいくつか得られた。詳細に解析した結果、多剤排出系*MexXY*に依存してアミノ配糖体耐性を阻害するシード化合物が得られた。既存の緑膿菌多剤排出ポンプ阻害剤は、多剤耐性緑膿菌に対してキノロン等の耐性を阻害するが、アミノ配糖体の耐性を阻害しない。しかしながら阻害に必要な濃度は非常に高く、今後阻害剤の作用機序を分子レベルで解明し、特許出願した阻害剤を最適化し、創薬を目指した基礎研究を展開したい。アミノ配糖体は腎毒性など副作用が問題となるため、その点について検討するためラットを用いて予備試験を行った。（実施者：森田（抗菌薬耐性阻害剤の探索）、山本（バイオフィーム形成阻害剤の探索）、中島（生薬エキスの調製、シード化合物の構造決定など）、木村（アミノ配糖体の腎毒性について））

3. その他

我々は臨床的に重要かつ同定困難な新興感染症の原因菌であるシネディ菌（*Helicobacter cinaedi*）について、薬剤感受性測定を開発し、ニューキノロンやマクロライドなどに耐性を示すことを見出した。興味深いことに、上記アミノ配糖体耐性阻害剤がこの菌に単独で作用することを見出した。この菌のゲノム配列を解析したところ、緑膿菌の多剤排出ポンプに類似性を示す機能未知タンパ

ク質が見出された。今後さらに抗菌薬耐性機構などシネディ菌について解析する必要がある。(実施者：富田（抗菌アッセイ）、森田（ゲノム解析））

本研究成果は、多剤耐性グラム陰性菌感染症を克服する上で、基礎的知見になると考えられる。最後になりましたが、愛知学院大学薬学部医療薬学生命研究所に深く感謝申し上げます。

研究成果

特許出願

森田雄二、中島健一、富田純子、田邊宏樹、井上 誠、河村好章
『抗菌薬耐性阻害剤』、出願番号：特願2013-160441、出願日：2013/8/1

論文発表

1. **Morita Y**, Tomida J, Kawamura Y
MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*.
Front Microbiol, **3**: e408, 2012.
2. **Morita Y**, Tomida J, Kawamura Y
Multidrug efflux systems in *Helicobacter cinaedi*.
Antibiotics, **1**: 29-43, 2012
3. **Morita Y**, Tomida J, Kawamura Y
Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials.
Front Microbiol, **4**: e422 (1-8), 2014.

学会発表

1. **森田雄二**、富田純子、河村好章
薬剤耐性緑膿菌PA7のキノロン耐性機構に関する分子遺伝学的解析
第58回日本薬学会東海支部総会・大会、静岡、平成24年7月
2. **森田雄二**、富田純子、河村好章
緑膿菌PA7のRND型多剤排出ポンプに関する逆遺伝学的解析
第49回日本細菌学会中部支部総会、金沢、平成24年11月
3. **森田雄二**、富田純子、河村好章
薬剤耐性緑膿菌PA7の多剤排出オペロン*mexEF-oprN*過発現に関与する遺伝子変異部位の同定
第86回日本細菌学会総会、千葉、平成25年3月
4. **森田雄二**、富田純子、河村好章
薬剤耐性緑膿菌PA7の推定酸化還元酵素遺伝子*mexS*変異によるRND型多剤排出オペロン*mexEF-*

*oprN*の発現

日本薬学会 第133年会、
横浜、平成25年3月

5. **森田雄二**、富田純子、後藤隆次、赤池孝章、河村好章
新興・院内感染菌*Helicobacter cinaedi*のゲノム解析：多剤排出ポンプについて
第59回日本薬学会東海支部 総会・大会、名古屋、平成25年7月
6. **森田雄二**、富田純子、後藤隆次、赤池孝章、河村好章
*Helicobacter cinaedi*のゲノムにコードする推定多剤排出ポンプについて
第50回日本細菌学会中部支部総会、蒲郡、平成25年10月
7. **森田雄二**、小嶋悠希、中島健一、富田純子、田邊宏樹、井上 誠、河村好章
多剤耐性緑膿菌の抗菌薬耐性系阻害物質の探索とその解析
日本薬学会 第134年会、熊本、平成26年3月
8. 小嶋悠希、**森田雄二**、中島健一、富田純子、田邊宏樹、井上 誠、河村好章
生薬由来成分による緑膿菌のマクロライド・リンコマイシン系薬耐性阻害とそのメカニズムについて
日本薬学会 第134年会、熊本、平成26年3月