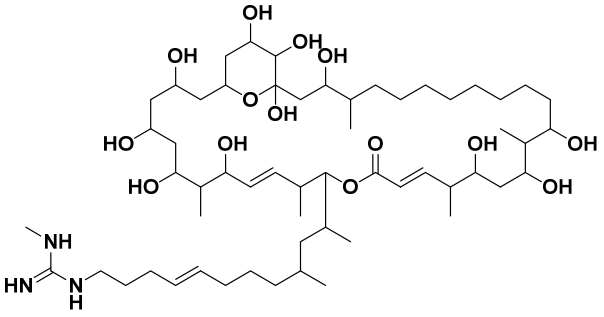
13　微生物資源からの非結核性抗酸菌症剤の開拓	供田　洋

【目的】非結核性抗酸菌（NTM）症は、結核菌以外の抗酸菌により引き起こされる感染症であり、近年世界的にその蔓延が問題となっている。NTM 症のうち、肺に感染した肺 NTM 症がその 80%を占め、重症化しやすく、10 年生存率は 20～50%程度である。現在 NTM 症は、公衆衛生上重要なアンメットメディカルニーズの高い感染症として認識されている。NTM 症治療には、リファンピシン（RFP）、クラリスロマイシン（CAM）、エタンブトール（EB）など既存の抗結核薬による多剤併用療法がとられているが、1 年以上の長期投与の必要性、低い治療効果、また耐性菌出現頻度の増加から、世界レベルで新たな治療薬の開発が求められている。そこで我々は微生物培養液から新規 NTM 症治療薬候補の発見を目的に、スクリーニングの実施及び、以前に発見した創薬シーズである新規 OPMA 物質の各種評価を行った。

【方法】スクリーニングでは NTM の中で最も患者数の多い MAC 症起因菌（*Mycobacterium avium* と *M. intracellulare*、MAC 症はこれらの複合感染で起こる）と最も毒性の強い *M. abscessus* の 3 種を検定菌とした評価系を用い、放線菌及び真菌の微生物培養液より、抗酸菌症原因菌に対して抗菌活性を示すサンプルを探索した。放線菌の生産する新規 OPMA 物質に関しては、全合成及び半合成による OPMA 類縁体を作製した。また、培養開始時に放射標識前駆体である[^{3}H]チミジン、[^{3}H]ウリジン、[^{3}H]ロイシンおよび[^{3}H]*N*-アセチルグルコサミンを与え、それぞれの高分子画分、すなわち、DNA、RNA、タンパク質および細胞壁への取り込みに対する OPMA の影響を調べた。さらに、ビオチン標識化した OPMA を半合成し、NTM より調製した抽出液に混合し、標識体をアビジンビーズで回収することにより、結合するタンパク質を検出し、その中から特異的に結合するタンパク質を LC-MS/MS 解析により特定した。加えて、遺伝学的アプローチとして、OPMA に対する抗酸菌耐性株を取得し、ゲノム上の変異部位を特定した。

【結果】放線菌培養液 2,528 サンプル及び真菌培養液 1,356 サンプル、合計 3,884 サンプルをスクリーニングし、NTM に選択的な抗菌活性を示し、RFP、CAM 及び EB に耐性な *M. avium* に対しても抗菌活性を示したサンプルは 37 サンプルであった。放線菌からは nicrophorusamide A や toyocamycin 等の既知化合物の他、新規物質として kimidinomycin と命名した 38 員環マクロライド系抗生物質を 1 成分取得した（下図）。真菌からは既知化合物 helvolic acid の他、新規性の高い物質を 1 成分取得した。研究分担者の長光らにより OPMA の全合成を達成した。確立した合成法や半合成を利用し OPMA 類縁体を 8 成分取得したが、天然物である OPMA が最も優れた活性を示した。放射標識前駆体の取り込みに対する影響を評価した結果、OPMA は[^{3}H]チミジンおよび[^{3}H]ロイシンの取り込みを強力に阻害したことから、DNA 及びタンパク質合成に影響を与えていることが示された。ビオチン標識化 OPMA を用いたプルダウンアッセイの結果、特異的に結合するタンパク質として 4 種を同定した。遺伝学的アプローチでは、OPMA 耐性菌として 3 株取得することができた。これら耐性菌すべてに共通して変異していた遺伝子を 1 種同定した。以上 2 種の作用点の解析から、複数の作用点が存在することが推定された。この点は DNA とタンパク質の合成を阻害することを説明するものと考えている。

新規抗 MAC 化合物 kimidinomycin の平面構造



13. 微生物資源からの非結核性抗酸菌症剤の開拓

供田　洋

北里研究所・北里大学 薬学部 低・中分子創薬講座

Key words：非結核性抗酸菌症，天然物，低分子化合物，*Mycobacterium avium* complex，MAC 症

緒　言

非結核性抗酸菌（NTM）症は、結核菌以外の抗酸菌により引き起こされる感染症であり、近年世界的にその蔓延が問題となっている。NTM 症のうち、肺に感染した肺 NTM 症がその 80%を占め、重症化しやすく、10 年生存率は 20～50%程度である［1］。現在 NTM 症は、公衆衛生上重要なアンメットメディカルニーズの高い感染症として認識されている。NTM 症治療には、リファンピシン（RFP）、クラリスロマイシン（CAM）、エタンブトール（EB）など既存の抗結核薬による多剤併用療法がとられているが、1 年以上の長期投与の必要性、低い治療効果、また耐性菌出現頻度の増加から、世界レベルで新たな治療薬の開発が求められている。NTM 症はアジア人に特に多いことが報告されており［2］、年間の新規罹患者数は日本、アメリカ、EU でそれぞれ約 45,000 人、30,000 人、5,000 人であり［3］、日本が最も多いことから、我が国で新たな NTM 症治療薬の開発を行う意義は大きい。そこで我々は微生物培養液から新規 NTM 症治療薬候補の発見を目的に、スクリーニングの実施及び、以前に発見した創薬シーズと期待する新規 OPMA 物質の各種評価を行った。

方法および結果

1. 抗 NTM 活性物質のスクリーニング

微生物資源は日本各地の土壌及び海洋由来サンプルから分離した放線菌及び真菌を用いた。各微生物の培養液を EtOH 抽出し調製した培養抽出液をスクリーニングサンプルとした。抗 NTM 活性の評価には MAC 症起因菌（*Mycobacterium avium* と *M. intracellulare*）と最も毒性の強い *M. abscessus* の 3 種を検定菌とした微量液体希釈法により評価した［4，5］。本研究期間中に新たに放線菌培養液 2,528 サンプル及び真菌培養液 1,356 サンプル、合計 3,884 サンプルをスクリーニングし、NTM に選択的な抗菌活性を示し、RFP、CAM および EB に耐性な *M. avium* に対しても抗菌活性を示したサンプルは 37 サンプルであった（表 1）。これまでにスクリーニングにより選択した放線菌培養液中からは nicrophorusamide A や toyocamycin 等の既知化合物の他、*Streptomyces* sp. KKTA-0263 株の培養液中より新規物質として kimidinomycin と命名した 38 員環マクロライド系抗生物質を 1 成分取得した［6］。真菌からは既知化合物 helvolic acid の他、新規性の高い物質を 1 成分取得した（図 1）。

表 1．スクリーニング結果

微生物	サンプル数	1 次通過サンプル数	2 次通過サンプル数	3 次通過サンプル数
放線菌	2,528	177	71	12
真菌	1,356	211	52	25
合計	3,884	388　(10%)	123　(3.1%)	37　(0.9%)

1 次通過基準は *M. avium* に生育阻害活性を示したサンプル。2 次通過基準は、細胞毒性や枯草菌に対する生育阻害活性を示さなかったサンプル。3 次通過基準は薬剤耐性 *M. avium* に生育阻害活性を示したサンプル。

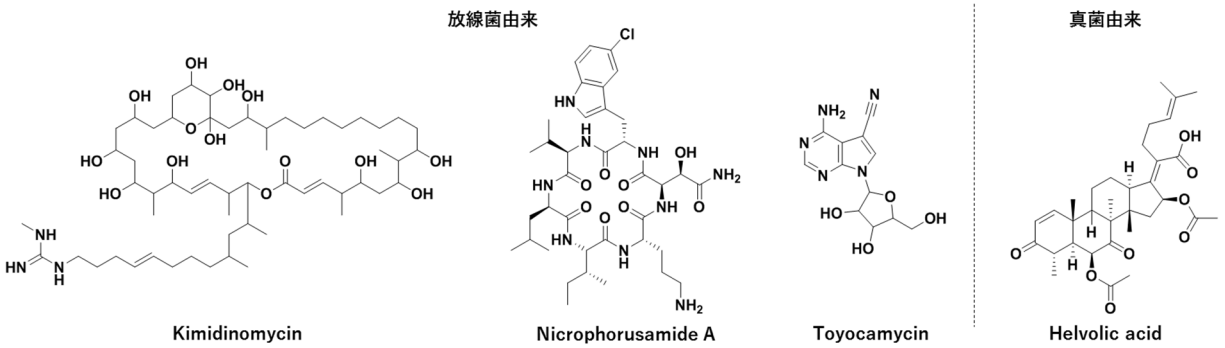


図 1. 取得した微生物由来抗 NTM 活性物質
Kimidinomycin, nicrophorusamide A 及び toyocamycin は放線菌、
helvolic acid は真菌の培養液中より単離した。

2. KKTA-0263 株の培養及び kimidinomycin の単離精製

放線菌 *Streptomyces* sp. KKTA-0263 株は千葉県君津市の土壌より分離された放線菌である。ISP2 寒天培地上に生育した KKTA-0263 株のコロニーを可溶性でんぷんを主成分にした種培地 10 mL に植菌し、27℃で 3 日間浸透培養した。その後、同一の培地組成の生産培地 100 mL に種培地から 1%植菌し、27℃で 7 日間振盪培養を行い、合計 1.0 L の培養液を得た。取得した培養液に等量の EtOH を加え抽出した後、フィルター濾過を行い、菌体を除去して培養抽出液を得た。培養抽出液から EtOH を留去し、HP20 樹脂 50 mL に吸着させ、0%、50%、100%MeOH（各 150 mL）で溶出し、MeOH 100%溶出画分をロータリーエバポレーターで乾固させ、233 mg の粗精製物を得た。分取 HPLC（C18 カラム i.d. 20×250 mm、0.05% TFA 入 40～60% CH_3CN/H_2O、50 分 gradient 条件）により kimidinomycin を分取し、凍結乾燥を行い最終的に 21 mg の kimidinomycin を取得した［6］。

3. 新規 OPMA 物質の創薬を目指した各種評価

当研究室で 2017 年に発見した新規抗 MAC 活性物質である OPMA 物質を用いて各種評価を行った。まず、研究分担者の長光らにより OPMA 物質の全合成が達成され、全合成及び半合成により OPMA 類縁体 8 成分を取得し抗 MAC 活性評価を行った結果、OPMA 物質よりも優れた類縁体は得られなかったため、以降の評価には OPMA 物質を用いた。

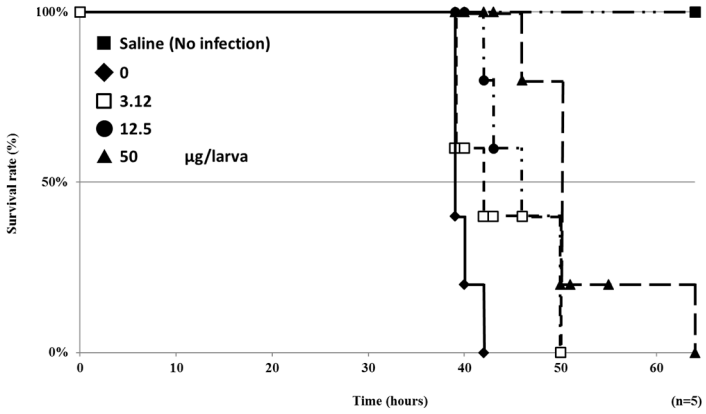


図 2. *M. smegmatis* 感染カイコモデルを用いた OPMA 物質の延命効果
■:生理食塩水のみを注入したカイコ、◆:*M. smegmatis*（2.5×10^7CFU/larva）のみ、□:*M. smegmatis* ＋OPMA 3.12 μg/larva、●：*M. smegmatis*＋OPMA 12.5 μg/larva、▲: *M. smegmatis* ＋OPMA 50 μg/larva。*M. avium* ではカイコが感染死しないため *M. smegmatis* を用いた。

In vivo での治療効果をアカデミア研究室でも簡易的に評価できる方法として、カイコを用いた NTM 感染モデル［4, 7］を開発してきた。すなわち、2.0 g まで飼育した 5 齢虫のカイコの背脈管に滅菌シリンジを用いて *M. smegmatis*（2.5×10^7 CFU/larva、n＝5）を注入後、37℃で飼育することによりカイコは 43 時間後に全て感染死した。この条件下、*M. smegmatis* 感染直後に OPMA 物質を背脈管より投与し、経時的にカイコ生存数をカウントした（図 2）。その結果、OPMA 物質を投与したカイコは、用量依存的に延命され、50 μg/larva 投与群では最大 12 時間以上の延命効果を示した。このように OPMA 物質はより高次の動物実験でも治療効果を示すことが期待される。

次に OPMA 物質の作用機序を明らかとするために、放射標識前駆体の取り込みに対する影響を評価した。すなわち、OPMA 物質の存在下、培養開始時に放射標識前駆体である[^{3}H]チミジン、[^{3}H]ウリジン、[^{3}H] L-ロイシンおよび[^{3}H]*N*-アセチルグルコサミンを与え、これらの高分子画分を経時的に回収し液体シンチレーションカウンタで測定することにより、DNA、RNA、タンパク質、細胞壁生合成に対する OPMA 物質の影響を調べた。その結果、OPMA 物質は[^{3}H]チミジンおよび[^{3}H] L-ロイシンの取り込みを強力に阻害した（図 3）。

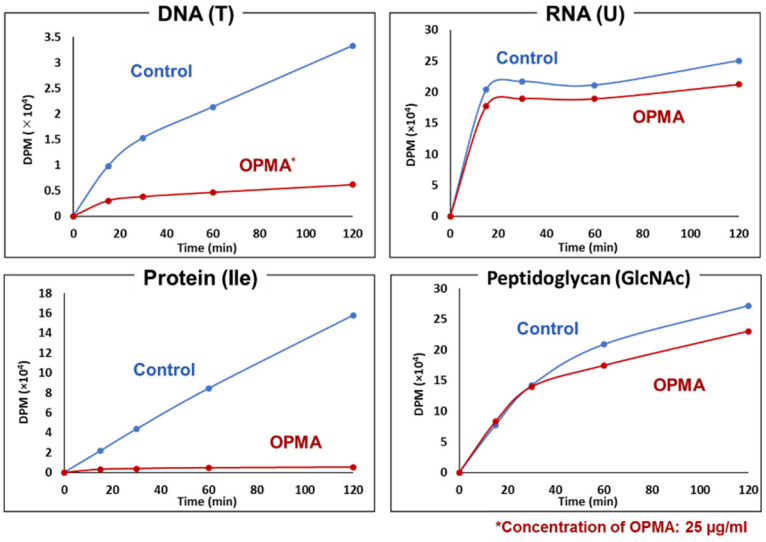


図 3. OPMA 物質の放射標識前駆体の取り込みに対する影響
M. avium が最小培地では生育しなかったため、*M. smegmatis* を用いた。T : [^{3}H]チミジン、U : [^{3}H]ウリジン、Ile : [^{3}H]L-ロイシン、GlcNAc : [^{3}H]*N*-アセチルグルコサミン

加えて、半合成により取得したビオチン標識化 OPMA 物質を用いてプルダウンアッセイを行った。すなわち、*M. avium* 又は *M. smegmatis* を液体培養後、遠心分離により菌体を回収し、超音波破砕によりライセートを調製した。ビオチン標識化 OPMA 物質とストレプトアビジンビーズを反応させ、ライセートとインキュベートした。その後ビーズを回収し、結合タンパク質を OPMA 物質で競合させ溶出した。溶出液を電気泳動し結合タンパク質を分離した。その結果 OPMA 物質に特異的に結合するタンパク質として 4 種を同定した。

さらに、OPMA 物質に耐性な *M. avium* を作製し、遺伝子変異部位を調べることで薬剤標的を明らかにしようと試みた。しかし、MIC の 2 倍量の OPMA 物質を含んだ寒天培地に *M. avium* を塗布してもコロニーを得ることが出来なかった。そこで MIC の 1／16 倍量の OPMA 物質を含んだ液体培地で培養し、徐々に OPMA 物質の濃度を上げていくことで耐性菌の取得を試みた。最終的に 8 倍耐性菌を 3 株取得し、得られた耐性菌のゲノム解析を行うことで 3 株に共通して見られた変異箇所を 1 箇所同定した。

考　察

スクリーニングで、*M. avium* の薬剤耐性菌にも有効なサンプルは真菌由来のものが多かった理由として、CAM や RFP は放線菌由来の抗生物質を最適化したものであり、放線菌の生産する活性物質の多くは、CAM や RFP と関連する化合物であり、その標的も同じである可能性が高く、従って耐性菌には効果を示さなかったと推定される。

カイコを宿主とした NTM 感染モデルを用いた OPMA 物質の評価の結果、カイコの NTM 感染死を延命させた。このことは OPMA 物質はさらに高次のマウスを宿主とした *in vivo* での NTM 感染系でも、治療効果を示すことを期待させる。また、毒性という観点からも、OPMA 物質投与により、カイコが早期に死亡することはなく、少なくとも 60 時間まではカイコに対して毒性を示さない。これらの結果から OPMA 物質は安全性の高い化合物であることが考えられた。現在、臨床分離された複数の薬剤に耐性の *M. avium* 株に対する OPMA 物質の効果や、細胞内への *M. avium* の持続感染の評価系での OPMA 物質の有効性を研究中である。

OPMA 物質の放射標識前駆体の取り込みに対する影響を評価した結果、チミジンと L-ロイシンの取り込みを強力に阻害したことから、OPMA 物質は DNA 合成とタンパク質合成に影響を与えていることが推定され、複数の標的を持つことが考えられた。そのため、耐性菌の取得実験において、耐性菌がほとんど出現しなかったのではないかと考えられる。今後、プルダウンアッセイの結果や、耐性菌の変異箇所の結果で得られた標的候補を精査することで、OPMA 物質の作用機序を明らかとしていきたい。

共同研究者

本研究の共同研究者は、北里大学大学院薬学研究科微生物薬品化学の大城太一教授、同院薬品製造化学教室の長光亨教授である。

文　献

1) Namkoong H, Kurashima A, Morimoto K, Hoshino Y, Hasegawa N, Ato M, Mitarai S. Epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease, Japan. Emerg Infect Dis. 2016 Jun;22(6):1116-7. doi: 10.3201/eid2206.151086. PMID: 27191735; PMCID: PMC4880076.

2) Adjemian J, Olivier KN, Seitz AE, Holland SM, Prevots DR. Prevalence of nontuberculous mycobacterial lung disease in U.S. Medicare beneficiaries. Am J Respir Crit Care Med. 2012 Apr 15;185(8):881-6. doi: 10.1164/rccm.201111-2016OC. Epub 2012 Feb 3. PMID: 22312016; PMCID: PMC3360574.

3) Timmins GS. What are the challenges in commercial non-tuberculous mycobacteria (NTM) drug discovery and how should we move forward? Expert Opin Drug Discov. 2020 Jan;15(1):7-9. doi: 10.1080/17460441.2020.1673362. Epub 2019 Sep 30. PMID: 31566439.

4) Hosoda K, Koyama N, Kanamoto A, Tomoda H. Discovery of nosiheptide, griseoviridin, and etamycin as potent anti-mycobacterial agents against *Mycobacterium avium* complex. Molecules. 2019 Apr 16;24(8):1495. doi: 10.3390/molecules24081495. PMID: 30995807; PMCID: PMC6514863.

5) Hosoda K, Koyama N, Hamamoto H, Yagi A, Uchida R, Kanamoto A, Tomoda H. Evaluation of anti-mycobacterial compounds in a silkworm infection model with *Mycobacteroides abscessus*. Molecules. 2020 Oct 27;25(21):4971. doi: 10.3390/molecules25214971. PMID: 33121091; PMCID: PMC7663337.

6) Hikima A, Asamizu S, Onaka H, Zhang H, Tomoda H, Koyama N. Kimidinomycin, a new antibiotic against *Mycobacterium avium* complex, produced by *Streptomyces* sp. KKTA-0263. J Antibiot (Tokyo). 2022 Feb;75(2):72-76. doi: 10.1038/s41429-021-00494-3. Epub 2021 Dec 23. PMID: 34949834.

7） Yagi A, Uchida R, Hamamoto H, Sekimizu K, Kimura KI, Tomoda H. Anti-mycobacterium activity of microbial peptides in a silkworm infection model with *Mycobacterium smegmatis*. J Antibiot (Tokyo). 2017 May;70(5):685-690. doi: 10.1038/ja.2017.23. PMID: 28446822.