

薬の効かない病原菌を、再び薬に弱くする手法を初めて発見 薬剤耐性菌に打ち勝つ新規薬剤開発に期待

千葉大学真菌医学研究センター萩原大祐特任助教、渡邊哲准教授、亀井克彦教授のグループは、重篤な肺感染症を引き起こす病原性の真菌（カビ）において、世界中で急速に拡大しているタイプの薬剤耐性メカニズムを、制御因子の遺伝子変異により無効にできることを実証しました。

研究成果の概要

①新しいタイプの薬剤耐性メカニズム無効化に挑戦

アスペルギルス・フミガタスは肺感染症を引き起こす真菌で、治療が遅れると命に関わる病原性の強い病原真菌です。しかし、治療に用いられる抗真菌薬（アゾール薬）に対して、治療開始前からすでに耐性を示す菌株（注1）が、欧州を発端として多く見つかるようになり問題となっています。日本でも、2013年にこの新しいタイプの薬剤耐性株が初めて見つか（注2）、大きな脅威となっています。本研究では、この新興の薬剤耐性メカニズムを無効にする手法を編み出し、新たな薬剤開発に繋げることを目指しました。

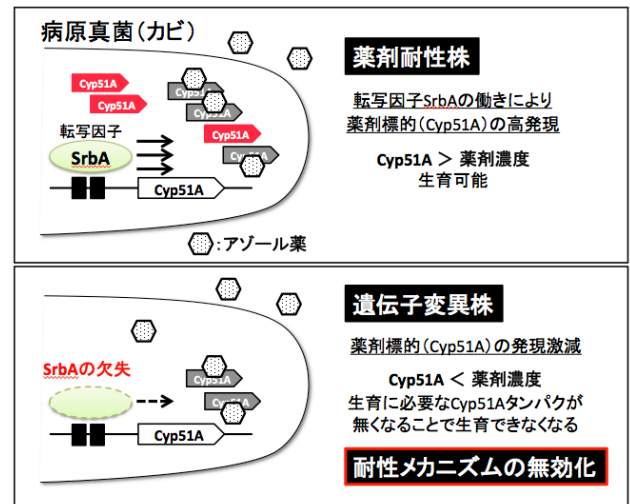
②薬剤耐性株の耐性メカニズムの無効化に成功

この新しいタイプのアゾール薬耐性株では、アゾール薬の標的分子であるタンパク質Cyp51A（注3）の発現が異常に高くなっていることが知られています。そこで、このCyp51Aの発現に関与するSrbAという因子の遺伝子を破壊した変異株を作製しました。得られた遺伝子変異株では、Cyp51Aの発現が顕著に低下し、もともとの薬剤耐性株に比べ、各種医療用アゾール薬に対して、8～64倍以上も感受性が増すことが解りました。これらの薬剤感受性レベルは、本来の投薬で治療効果が期待できる水準を満たすことから、SrbAを機能させなくすることで、耐性メカニズムを無効化できることを世界で初めて実証しました。

薬剤耐性菌に対する新しい治療法の確立に向けて

病原真菌の薬剤耐性株はすでに世界中へと広まっています。しかし、使用できる薬剤が限られており、対策はまだ十分ではありません。SrbAの機能を阻害する薬剤が見つければ、アゾール薬の効果を劇的に高め、耐性株に感染した場合の新しい治療法の確立に繋がることが期待されます。また、ヒトに病気を引き起こす病原真菌のみならず、農作物に甚大な被害を及ぼす植物病原菌においても、同様のメカニズムによってアゾール系の農薬に耐性を示すことが知られています。本研究の成果は、病原菌から農作物を保護する際にも、SrbAが重要な因子となる可能性を示唆しています。これらの成果を基にして、現在は、医療や農業の現場で問題となる薬剤耐性菌を制御するための、新しい薬剤の開発に取り組んでいます。

本研究の成果は英国科学雑誌『Scientific Reports』に掲載される予定で、オンライン版では日本時間12月9日（19時）に公開されます。



薬剤耐性メカニズム無効化のモデル

<研究内容に関するお問い合わせ>

千葉大学真菌医学研究センター 特任助教 萩原大祐
TEL: 043-226-2785 メール: dhagi@chiba-u.jp

1. 背景

病原性真菌によって引き起こされる真菌症の治療に使用される抗真菌薬は限られており、アスペルギルス・フミガタスによる感染の治療には、3～4種類の中から選択する必要があります。その中でアゾール薬は、治療効果や副作用の少なさの点から、現在は第一選択薬として主要な役割を果たしています。しかし、長期間にわたりアゾール薬で治療を続けた場合、感染している病原菌が稀に耐性を持つようになります。これは、遺伝子の変異などによって、投与されている薬剤が作用しない方向に感染菌が時間をかけて進化した結果だと考えられます。

第一選択薬であるアゾール薬に対する耐性化は、治療成績を低下させることが報告されています。さらに、全ての治療において感染菌の薬剤耐性について検査を実施しているわけではないことから、薬剤耐性の出現が治療の失敗に繋がったケースが潜在的に存在すると考えられます。使用できる抗真菌薬の選択肢の少ない現状は、薬剤耐性問題から逃れる術が少ないことを意味します。

2007年にオランダの研究グループから、治療過程において耐性化したのではなく、感染当初から耐性を持っていたと推測される複数の耐性株の発見について報告がありました。これらの株にはいずれも特徴的なDNA配列が存在しており、環境中にも一定の割合で存在していることが、その後判明しました。耐性化のメカニズムが調べられた結果、アゾール薬の標的分子であるCyp51A（エルゴステロール合成経路を構成する因子の一つ）の遺伝子のプロモーター領域において、一部の配列が重複して存在し、耐性に寄与していることが解りました。現在までに、この重複する配列（Tandem Repeat (TR)配列）としては、34塩基と46塩基のものがあることが知られています（注4）。そして幾つかの事実から、治療過程ではなく自然環境において、これらの耐性メカニズムがアスペルギルス・フミガタスのゲノムにもたらされたと考えられています。最も可能性の高い原因としては、農業等で使用されている農業用アゾール剤が挙げられています。農業の盛んなオランダなどでは、アゾール剤は農薬として広く使用されており、その土壌中に生息している本菌も農薬アゾールに曝されることが考えられます。そのような環境で、上記の耐性メカニズムを獲得した、“環境型”のアゾール耐性アスペルギルス・フミガタスが出現したと推測されています。

2007年の報告以来、この“環境型”アゾール耐性株は急速に広がりを見せています。当初は欧州を中心とした報告が主でしたが、アフリカ、中東、南アジアへと広がり、2015年から2016年にかけてオーストラリアやアメリカにおいても確認されており、すでに世界的に広がっていると推察されます。

日本における“環境型”アゾール薬耐性株については、千葉大学の同グループが2016年8月発行の論文でその発見を報告しています。見つかった耐性株の遺伝子系統解析から、フランスやドイツで見つかった株と近縁であることが示されており、日本において誕生した“環境型”耐性株ではなく、欧州で出回っている株が何らかのルートで日本に持ち込まれたことが推測されています。

本菌は環境が整うと旺盛に胞子を作る能力があり、作られた胞子は微小であることから容易に大気中へ拡散します。したがって、環境中において、耐性を持った株から大量の胞子がひとたび作られると、気流に乗って遠隔地へ運ばれ、そこでの環境が整えばまたさらに胞子を作り、拡散を繰り返します。耐性を持っていない株と比べても、特に生育等で劣っているわけではありませんので、今後も環境中で広がりを見ることが十分に考えられます。

主要な抗真菌薬であるアゾール薬による治療を困難にしてしまう、これらの“環境型”耐性株の出現と、すでに全世界的に広まっている事実は非常に憂慮すべき現状であり、新たな抗真菌薬の開発が喫緊の課題となります。そこで本研究では、“環境型”耐性メカニズムをもつ耐性株に対しても治療可能な、新規薬剤の開発を指向し、その標的となる候補分子の検証を目的としました。

2. 研究手法と成果

本研究では、同グループが報告済みの、日本で分離された“環境型”アゾール薬耐性のアスペルギルス・フミガタス株を実験材料としています。遺伝子機能の検証には、SrbAという転写制御因子を対象としました。このSrbAは、アゾール薬の標的分子であるCyp51Aの遺伝子発現をコントロールすることが知られており、他にも真菌の細胞膜の構成に重要な脂質であるエルゴステロールの合成に関わる因子群の発現制御も行っています。

“環境型”アゾール薬耐性株のSrbA遺伝子を破壊して得られた変異体を対象に、アゾール薬を含む各種抗真菌薬に対する感受性試験を行い、アゾール薬にのみ、感受性が低下することが解りました。また、農薬として使用されているアゾール剤に対しても、感受性が極度に低下することが示されました。一方、アゾール系以外の農薬に対する感受性は、SrbA遺伝子の破壊による影響は見られませんでした。

Cyp51Aやエルゴステロール合成に関係する遺伝子の発現レベルをリアルタイムPCR法によって調べると、SrbA遺伝子を破壊した株では、元の株に比べて約4～30倍低下していることが解りました。これらの遺伝子の発現低下が複合的にアゾール薬への感受性化に繋がっていると考えられます。

また、アスペルギルス・フミガタスが感染する際、肺組織への侵入部位では酸素濃度が低下することが知られており、菌が低酸素環境というストレス状態に適応できない場合、感染を進行させることはできません。SrbA遺伝子を破壊することで、酸素濃度の低い(O₂ level = 1~2%)環境下では生育できなくなることが知られています。本研究において“環境型”耐性株から作製した変異体も、低酸素環境下での生育が非常に悪くなっていました。したがって、SrbAの機能を阻害することで、感染の進行も抑えられると考えられます。

本研究の結果から、SrbAの機能を阻害することによって、“環境型”の耐性メカニズムを持った株でも、1) アゾール薬によって治療可能となり、2) 感染時の菌の生育を抑えて、病原性を減弱させる効果が期待されます。今後の薬剤開発における、新規な標的としての可能性が示されました。

3. 論文情報

<タイトル>

Sensitisation of an azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strain containing the Cyp51A-related mutation by deleting the SrbA gene

<著者名>

Daisuke Hagiwara (萩原大祐), Akira Watanabe (渡邊哲), Katsuhiko Kamei (亀井克彦)

<雑誌>

Scientific Reports, 6, 38833 (2016)

<DOI>

10.1038/srep38833

4. 捕捉説明

注1：真菌感染治療においてアゾール薬は主要な薬剤ですが、類似した構造のアゾール系化合物が農薬として認可され使用されています。幾つかの証拠から、環境中での農業用アゾール剤に曝されることで、アゾール薬に対する耐性を獲得してきたと考えられています。これらの耐性菌株は、医療用のアゾールにも交差耐性を持つことが示されており、患者さんからも多く分離されています。最近のオランダからの統計では、感染していた菌株の20%以上がこの“環境型”薬剤耐性株であったとされています。

注2：Journal of Infection and Chemotherapy誌、2016年8月号: p577-9, [DOI:

10.1016/j.jiac.2016.01.015]

注3：Cyp51Aというタンパク質がアゾール薬の標的分子であり、このタンパク質はエルゴステロール合成に関わる因子の一つです。アゾール薬が結合することでタンパク質の機能が阻害され、エルゴステロールの合成が不全になり、結果として菌の生育を阻害します。

注4：TR配列にSrbAタンパク質が結合して、Cyp51A遺伝子の発現を制御していることが示唆されています。詳細な機構は未解明ですが、重複した配列が存在することで、Cyp51Aの発現量が増加するというデータが報告されています。