

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

I 基本情報

研究開発課題名：(日本語) 薬用植物ライブラリーを用いたカルバペネム耐性腸内細菌、多剤耐性アシネト
バクター・緑膿菌および薬剤耐性結核菌に対する新規抗菌薬の探索
(英語) Screening of a plant library for novel antimicrobial drugs against carbapenem-resistant
Enterobacteriaceae, multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas*
aeruginosa, and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*

研究開発実施期間：2016年4月1日～2019年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 切替 照雄
(英語) Teruo KIRIKAE

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 学校法人順天堂 順天堂大学 大学院医学研究科 教授
(英語) Professor, Department of Microbiology, Juntendo University Graduate School of Medicine

II 研究開発の概要

薬剤耐性菌が医療施設を中心に新興し地球規模で拡大し、世界の医療安全を根底から脅かすようになってきた。2015年、WHOはAMR Global Action Planを公表し、新規抗菌薬の開発を最重要課題の1つとしている。我々は日本、ベトナム、ネパール、ミャンマーの医療機関で分離される多剤耐性菌の分子疫学解析を通して、アジア大陸において流行しているカルバペネム耐性因子をはじめとする種々の薬剤耐性因子を同定してきた。本研究ではこの疫学を通して収集した高度耐性臨床分離株（多剤耐性結核菌、多剤耐性緑膿菌・アシネトバクター、カルバペネム耐性腸内細菌）および薬剤耐性因子を用い、植物由来天然物から新規の抗菌物質および新規の薬剤耐性因子（カルバペネマーゼ）阻害剤を同定することを目的に研究を実施した。スクリーニングに用いる植物天然物は医薬基盤・健康・栄養研究所薬用植物資源研究センターが収集し、順天堂大学で *in vitro* のスクリーニングを実施し、栃木県保健環境センターで動物実験を実施した。さらに日本医療研究開発機構 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) の構造展開ユニットとの共同研究を実施した。

医薬基盤健康栄養研究所薬用植物資源研究センターでは、植物由来エキスライブラリーの構築を推進した。期間中、東北、四国を中心に積極的に植物採集を行った。現在までに国内外の植物由来のエキス 12,000 サンプル

ルを超えるライブラリーが構築された。すべての植物エキスライブラリーはアルコール抽出後、DMSO 溶液として保存している。

多剤耐性結核菌および多剤耐性緑膿菌に対して 11742 種、カルバペネマーゼ阻害活性に対しては 11758 種類、多剤耐性アシネトバクター、カルバペネム耐性腸内細菌 (CRE) に対しては 11684 種類のエキスの一次スクリーニングを実施した。スクリーニングでヒットした植物エキスに関しては、原材料植物の入手の容易さ、文献検索、植物成分的な面からの有効性、特許性の判断を行い、分離・精製を行っていく植物の選抜を行った。その結果、多剤耐性結核菌においては、セリ科植物のミツバ、ストロブマツ、チョウセンゴヨウなどを選抜した。多剤耐性緑膿菌に関してはシャクヤク新芽、オールスパイス、イヌマキ枝、葉を選抜した。カルバペネム耐性腸内細菌はシャクヤク新芽、オオイタドリ、シロバナチョウセンアサガオ、アシネトバクターはマルバダイオウ葉、オオイタドリ、カシュウ、カルバペネマーゼ阻害活性についてはオオバスノキ果実、ギンゴウカン花、ソボクをそれぞれ候補植物素材に選定した。

多剤耐性結核菌株を標的とする一次スクリーニングで 563 サンプル (陽性率 4.8%) がヒットした。この中から 4 種類の異なる基本骨格を持った化合物を同定した。このうち 3 種類を、BINDS 構造展開ユニットとの共同研究で、東京大学創薬機構が持っている化合物サンプルを用いたスクリーニングを実施した。東大化合物ライブラリーの類縁体 613 サンプルの多剤耐性結核菌に対する抗結核菌活性を調べた結果、31 化合物が活性を示した (陽性率 5.1%)。これらの中から、最低阻止濃度 (MIC) 0.71 $\mu\text{g/ml}$ (1.56 μM) の化合物 (TKxx) を見出した。TKxx の類縁体 291 サンプルの抗結核菌活性を調べた。その結果 MIC 0.82 $\mu\text{g/ml}$ (3.15 μM) を示した化合物 TKyy など 6 化合物が活性を示した。TKxx は薬剤感受性結核菌及びウシ型結核菌由来 BCG 株に対して MIC はそれぞれ 0.71 $\mu\text{g/ml}$ 及び 1.42 $\mu\text{g/ml}$ を示した。TKxx の細胞毒性をヒト細胞株 HepG2 に対するの細胞毒性 IC₅₀ は 14.9 $\mu\text{g/ml}$ で、抗結核菌作用と比べると 20 倍弱かった。TKxx に関してマウス感染実験を実施予定である。

多剤耐性緑膿菌株で 607 サンプル (陽性率 5.2%)、多剤耐性アシネトバクター株で 489 サンプル (陽性率 4.2%)、カルバペネム耐性腸内細菌 (クレブシエラ) で 16 サンプル (陽性率 0.14%) が陽性であった。これらの内、多剤耐性緑膿菌およびアシネトバクター両方に抗菌活性を示すサンプルの内 10 サンプルの活性分画、アシネトバクター及び CRE に抗菌活性を示す 4 サンプルの活性分画、多剤耐性緑膿菌、アシネトバクター及びカルバペネム耐性腸内細菌 (クレブシエラ) に抗菌活性を持つ 1 サンプルの活性分画を特定した。

カルバペネマーゼ IMP-1、NDM-1 及び VIM-2 を用いた阻害剤スクリーニングを実施した。147 サンプル (陽性率 1.3%) が IMP-1 阻害活性を、236 サンプル (陽性率 2.0%) が NDM-1 阻害活性を、24 サンプル (陽性率 0.20%) が VIM-2 阻害活性を示した。

抗結核薬リード化合物 : MIC が 1 $\mu\text{g/ml}$ 以下で細胞毒性の低い低分子化合物が同定された。今後は、本化合物の推定構造を持つ化合物を合成し、構造確認、活性評価、物性評価、薬物動態試験 (PK 試験)、作用機序解明を経て感染マウス実験を実施する。同時に合成的な手法を用いた最適化を実施する。

薬用植物ライブラリー : 一連の植物エキスライブラリー作製、抗菌薬スクリーニング、構造決定および in vivo 評価ができる体制を今後も継続する必要がある。カルバペネム耐性腸内細菌、多剤耐性アシネトバクター・緑膿菌に対して抗菌活性のある 20 化合物の構造を決定したが、活性の強い低分子を検出する新たなシステムの構築が必要である。植物エキスの作製法の変更、標的分子をさらに絞った抗菌薬スクリーニング法の開発、ス

クリーニングの早い段階での BINDS 支援の申請などの研究体制の構築を行う。

創薬の基盤として汎用性および継続・発展性：薬用植物ライブラリーを用いた抗菌薬探索はライブラリー作製促進のためにも必要である。本研究によって新たなリード化合物が同定され、これらの化合物に関する創薬研究を発展させる必要がある。

Drug-resistant pathogens has been globally spreading in medical settings and become one of the most serious health threats throughout the world. The WHO alerts in “GLOBAL ACTION PLAN ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE in 2015” that development of novel antimicrobial agents is one of the most urgent matters in the world health. We have identified several drug-resistant factors spreading in Asian countries, including Japan, Myanmar, Nepal and Vietnam, thorough our molecular epidemiological studies of multidrug-resistant pathogens isolated from medical settings in these countries. In this study, we used four isolates, which are collected thorough these epidemiological studies, including carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*, and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, for screening of library of plant extracts. We also set up a screening method of carbapenem inhibitors using recombinant proteins of drug-resistant determinants from carbapenem-resistant pathogens. Plant extracts for screening were collected by Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIHN). *In vitro* screening was conducted at Department of Microbiology, Juntendo University Graduate School of Medicine. *In vivo* infection experiment in mice was conducted at Department of Microbiology, Tochigi Prefecture Institute of Public Health and Environmental Science.

To expand the library of plant extracts, we newly collected plants in Tohoku and Shikoku regions during this study periods at Research Center for Medicinal Plant Resources, NIBIHN. As the results, the library has more than 12,000 samples of extracts derived from plants in Japan and other countries.

In the first screening, 11,742 samples were screened against drug-resistant *M. tuberculosis* and multidrug-resistant *P. aeruginosa*. 11,758 samples were screened against carbapenemase inhibitors. 11,684 samples were screened against multidrug-resistant *A. baumannii* and carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. Of them, hit samples were further screened by availability, publications and patents. As the results, we selected *Cryptotaenia japonica*, *Pinus strobus* and *Pinus koraiensis* as candidate plants containing antimicrobial activities against drug-resistant *M. tuberculosis*; *Paeonia lactiflora*, All Spice and *Podocarpus macrophyllus* against multidrug-resistant *P. aeruginosa*; *Paeonia lactiflora*, *Reynoutria sachalinensis* and *Datura stramonium* against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*; *Rheum rhabarbarum*, *Reynoutria sachalinensis* and *Anacardium occidentale* against multidrug-resistant *A. baumannii*; *Vaccinium smallii*, *Leucaena leucocephala* and *Caesalpinia sappan* as candidates of carbapenemase inhibitors.

In the first screening for drug-resistant *M. tuberculosis*, 563 samples (positive rates: 4.8%) were selected. Of them, 4 kinds of chemical compounds with different basial structures were identified. Based on the chemical structures of 3 of these 4 samples, further screening were conducted using another chemical library at Drug Discovery Initiative, The University of Tokyo, in collaboration with Structural Analysis Unit, Basis for Supporting Innovative Drug Discovery and Life Science Research (BINDS). Of 613 screened samples, 31 were positive (positive rate: 5.1%). Compound TKxx showed strong activities

against drug-resistant *M. tuberculosis* with MIC of 0.71 ug/ml. Of 291 related compounds, 6 compounds including TKyy (MIC of 0.82 ug/ml) also showed strong activities. TKxx had antimicrobial activities against drug-sensitive *M. tuberculosis* (MIC of 0.71 ug/ml) and *M. bovis* BCG (MIC of 1.42 ug/ml). TKxx had weak toxicity against a human cell-line (HepG2) (IC50 of 14.9 ug/ml). We have a plan to assess the compound in mice infection experiments.

In the first screening, 607 samples were positive (positive rate: 5.2%) for multidrug-resistant *P. aeruginosa*; 489 samples were positive (positive rate: 4.2%) for multidrug-resistant *A. baumannii*; 16 samples were positive (positive rate: 0.14%) for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. Of them, we identified positive fractions from 10 samples which had antimicrobial activities against both multidrug-resistant *A. baumannii* and *P. aeruginosa*; 4 samples against both multidrug-resistant *A. baumannii* and carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*; and a sample against multidrug-resistant *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*.

Screening for carbapenemase inhibitors were conducted using IMP-1, NDM-1 and VIM-2. 147 samples showed inhibitory activities against IMP-1 (positive rate: 1.3%); 236 samples showed inhibitory activities against NDM-1 (positive rate: 2.0%); and 24 samples showed inhibitory activities against VIM-2 (positive rate: 0.2%).