

# 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）北里微生物資源ライブラリーを基盤とした多剤耐性菌を克服する天然物創薬  
（英 語）Drug development research of circumventors against multiple-drug-resistant bacteria  
using the Kitasato Microbial Resources Library

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）砂塚 敏明  
（英 語）Toshiaki Sunazuka

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
（日本語）学校法人北里研究所 北里大学大学院感染制御科学府 生物有機化学研究室 教授  
（英 語）Laboratory of Bioorganic Chemistry, Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato University, Professor

## II 研究開発の概要

### 研究開発の成果およびその意義等

本研究では、当研究グループにおいて抗寄生虫薬エバーメクチンをはじめ 500 種におよぶ新規天然物を発見してきた北里微生物資源ライブラリーを用い、多剤耐性菌に対して効果のある新規抗菌物質（新規母核）探索並びに *in situ click chemistry* を含めた有機合成化学による構造展開を行い、天然物を基盤とした創薬を目指す。

20 世紀、抗菌薬の恩恵により感染症の脅威は減少したが、21 世紀にかけて抗菌薬に対する耐性菌の脅威が現実化してきた。耐性菌には、カルバペネム耐性腸内細菌、MRSA、多剤耐性アシネトバクターおよび多剤耐性緑膿菌などがあり、特に社会的な問題となっている。このような背景のもと、本研究では、当研究グループが長年にかけて構築した北里微生物資源ライブラリーを用いて上記の多剤耐性菌に対して効果のある新規抗菌物質（新規母核）探索並びに *in situ click chemistry* を含めた有機合成化学による構造展開を行い、天然物を基盤とした創薬を目指す。

#### 1) 北里微生物資源ライブラリーの提供、微生物分離

糸状菌：研究例が少ない地域、固有種が多い地域から独自の分離法で分離し、スクリーニングサンプルの供給を目指した。研究例の少ない地域で多様な分離源を採取し、分離対象も不完全菌類、冬虫夏草類、海生菌類、菌寄生菌類、盤菌類など多岐に渡る分類群を分離した。研究課題開始から実施期間満了までに 2,050 株を分離し、8,200

サンプルを作製後にスクリーニンググループに供給した。放線菌：日本各地の土壌に加え、深海を含む海洋サンプルや植物の根など研究例が少ない分離源から、各々に適した培地、培養法で多様な放線菌の分離を目指した。特に植物試料からは、土壌で大多数を占めるストレプトマイセス属放線菌以外の、希少放線菌と呼ばれる分類群の株が多数得られた。研究課題開始か実施期間満了までに、植物分離株 570 株、土壌分離株 1,103 株、海洋由来株 560 株の合計 2,233 株を使用し、液体培養および固体培養、さらに生産量が少ない化合物をピックアップするために培養物を固相抽出により分画したサンプルを作製し、合計 10,432 サンプルをスクリーニンググループに供給した。

## 2) 多剤耐性菌に対して効果のある新規抗菌物質探索並びに単離、構造決定

耐性機構(アルベカシン耐性、セフトジジム耐性、メロペネム耐性等)を標的とした耐性克服薬のスクリーニング系の構築と目的物質の探索を目指した。アルベカシン耐性克服活性物質のスクリーニング系を黄色ブドウ球菌 RN4220 に耐性酵素を組換えた検定菌を作製し、構築した。北里微生物資源ライブラリーより供給された放線菌および糸状菌の培養サンプルをスクリーニングし、目的物質の探索を開始した。精製対象培養サンプルを 94 サンプル選抜した(放線菌 42 サンプル、糸状菌 52 サンプル)。その結果、16 化合物を活性物質として同定した。これら化合物の耐性克服活性は、報告されていない新しい知見であった。PBP2'発現によるメロペネム耐性克服活性物質の探索系を構築し、北里微生物資源ライブラリーより供給された放線菌および糸状菌の培養サンプルをスクリーニングし、目的物質の探索を開始した。精製対象培養サンプルを 41 サンプル選抜した(放線菌 12 サンプル、糸状菌 29 サンプル)。結果としてこれまでに、26 化合物を活性物質として同定した。これら化合物の耐性克服活性は、報告されていない新しい知見であった。セフトジジム耐性克服活性物質のスクリーニング系を臨床分離株 *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 発現株を用いて構築した。加えて、大腸菌 *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 発現株を樹立し、北里微生物資源ライブラリーより供給された放線菌および糸状菌の培養サンプルをスクリーニングし、目的物質の探索を開始した。精製対象培養サンプルを 1 サンプル選抜した。その結果、1 化合物を取得した。IMP-1 型 Metallo- $\beta$ -lactamase 発現によるメロペネム耐性克服活性物質のスクリーニング系を IMP-1 型 MBL 発現する臨床分離大腸菌株、肺炎桿菌および緑膿菌を用いてそれぞれ構築した。北里微生物資源ライブラリーより供給された放線菌および糸状菌の培養サンプルをスクリーニングし、目的物質の探索を開始し、精製対象培養サンプルを 1 サンプル選抜した。

## 3) 動物を用いた感染防御モデルの解析や薬理学的検証、物性、体内動態、吸収排泄等の検討

Metallo- $\beta$ -lactamase 発現によるメロペネム耐性克服活性物質 A 変換体および活性化合物(PBP2'発現によるメロペネム耐性を克服する活性物質 B)について、抗菌スペクトルの解析およびラット血清中での活性について耐性克服活性を検討した。その結果、活性物質 A 変換体には、Metallo- $\beta$ -lactamase 発現によるメロペネム耐性克服活性が確認された。しかしながら、活性物質 B はラット血清下で PBP2'発現によるメロペネム耐性を克服する活性が失われた。本結果から、活性物質 A 変換体創製に注力することが妥当だと判断した。活性物質 A 高活性化体を評価するために IMP-1 型 MBL が発現している臨床分離 *Klebsiella pneumoniae* 株でマウス感染モデル系を構築した。高活性化体として創製された活性物質 A-22 に関して静脈投与によるマウス薬理試験の結果から、200 mg/kg/day での体重減少や異常な所見は見られなかった。活性物質 A-22 より高活性な類縁体を創製するために 23 化合物の新たな類縁体合成を実施した。その結果、活性物質 A のファーマコフォアを決定した。

## 4) *In situ click chemistry* を駆使した高活性化合物の創製

高活性な化合物取得のために、天然物の誘導化を目指した。メロペネム耐性克服活性を示す活性物質 A の変換体を合成した。その結果、tertiary butyl エステル化に高活性化が見られた。また、特徴的な化学構造を有している部分を変換すると活性が消失することを明らかにした。メロペネム耐性克服活性物質として見出された活性物質 A をリードとして、活性物質 A の全合成を達成し、その誘導体を 35 化合物合成した。そのなかで、高活性化合物として活

性物質 A-5 を創製した。活性物質 A-5 は活性物質 A より 100 倍強い耐性克服活性を示した。さらに、高活性物質 A-5 のナトリウム塩体 A-22 を創製し *in vivo* での有効性を確認するためサンプル合成をおこない 200 mg 以上を供給した。さらに、緑膿菌への薬剤の取り込みを促進する置換基を導入することでこれまでにないタイプの活性物質 A-19 と活性物質 A-26 の創製にも成功した。活性物質 A-22 より高活性な類縁体を創製するために 23 化合物の新たな類縁体合成を実施した。その結果、活性物質 A のファーマコフォアを決定し、緑膿菌の薬剤耐性を克服する新規活性物質を 5 化合物創製した。また、IMP-1 型 MBL が発現している臨床分離大腸菌株に耐性克服活性を示した活性物質 C を同定し、誘導体を 11 化合物合成した。高活性物質 A 誘導体創製に注力するために活性物質 C の誘導体合成は中止した。*In situ click chemistry* を駆使した高活性化合物の創製に関しては、 $\beta$ -ラクタム薬耐性を克服する活性物質創製のために、活性物質 D および活性物質 D の誘導化により、*in situ click chemistry* の利用のために必要な官能基の最適導入位置を決めた。抗菌活性を指標に本事業終了時まで高活性体を可能な限り合成する予定である。結果としてこれまでに 70 化合物以上の誘導体を創製し、その耐性克服活性を検証した。

#### 5) 合成による化合物最適化特許出願、企業導出

特許出願および企業導出にむけて、活性物質 A 高活性化体の探索合成研究から活性物質 A-19, 活性物質 A-22, 活性物質 A-26, 活性物質 A-45 などの特許候補化合物を創製した。導出先企業との協議により特許戦略的に妥当である時期に特許出願予定である。

#### 今後の課題と方向性

今後の課題は、創薬候補化合物を含めたさらなる高活性化体を求めた探索合成研究および構造毒性相関を実施し、創薬候補化合物の安全性を検証することが課題である。GLP 試験をクリアーできるレベルの候補化合物を創製することが次の目標となる。

One object of our projects for 2016 -2019 was the constructions of the Kitasato Microbial Resources Library and isolation of microorganisms. We built the library of filamentous fungi and actinomycetes with highly unique characteristics and submitted them to the screening group. We also classified the fungi at the genus level by morphological characteristics.

Filamentous fungi: Fungi were isolated from regions where little research has been conducted and regions with numerous endemic strains using methods we had developed, and screening samples were submitted. In 2016-2019, we isolated 2,050 strains (land , marine , deep sea strains and so on). In total, 8,200 samples were prepared and submitted to the screening group. Actinomycetes: Actinomycetes were isolated from soil samples from across Japan as well as from soil, plant and marine sources; 2,233 strains were submitted for screening. Because metabolites produced by microorganisms are greatly influenced by culture conditions, the following measures were observed during preparation of screening samples.

1. Four types of medium with original compositions were used for production of metabolites by production culture.
2. Fractionated samples and fractionated and enriched sample components were prepared and subjected to tests with different columns, eluents, and elution volumes. We separated the samples into 5 fractions and obtained 5-fold enriched samples. Next, we tested culture methods and sample preparation methods as described above, and submitted 10,432 samples for screening.

Another object of our projects for 2016-2019 was the discovery, isolation, and structural analysis of new antibiotic substances effective against multidrug-resistant bacteria. We designed and built screening

systems for drugs that can overcome bacterial resistance by targeting resistance mechanisms (arbekacin resistance, ceftazidime resistance, meropenem resistance, amikacin resistance, and beta-lactam resistance) and used these to discover target substances.

Our screening system for active substances for overcoming arbekacin resistance identified active compounds (Total 16 compounds). This is a completely new finding. On the other hand, our screening program for microbial metabolites in the search for compounds that circumvent MEPM-resistance of MRSA strains, led us to discover active compounds (Total 26 compounds). Also, our screening system for active substances for overcoming ceftazidime resistance analyzed a lot of culture samples of filamentous fungi and actinomycetes provided by microbial metabolites and identified a known compound as having potent antibiotic activity. We also built screening systems for active substances for overcoming meropenem resistance using clinically isolated *Escherichia coli* KB366, *Klebsiella pneumoniae* KB365, and *Pseudomonas aeruginosa* KB370. Compound A, and tertiary butyl-compound A as well as compounds A-5, 19, 22, 26 and 45 were all synthesized as active substances for overcoming resistance. This is also a completely new finding. Our screening systems for active substances for overcoming amikacin resistance and beta-lactam resistance also screened culture samples of filamentous fungi and actinomycetes provided by the library and began discovery of target substances.

Yet another object of our projects for 2016-2019 was the creation of highly potent compounds through organic chemistry and in situ click chemistry. We determined the optimal positioning for introducing functional groups required for medicinal chemistry to natural product skeletons by derivation of natural products.

Our goal was to derive natural products in order to obtain highly potent compounds. Especially, we synthesized the analogs of compound A that can overcome meropenem resistance in *P. aeruginosa* (compounds A-19, -22, -26 and -45). Some analogs show around 100 times more potent activity comparing to compound A. We also uncovered a part of their specific mechanism of action.

In addition, we synthesized samples for assessing the in vivo efficacy of the highly potent compound A-19, -22, and -26, -45 with about 300 mg of substrate, respectively. We will synthesize more active compounds as derivatives of compound A and hope that it can overcome GLP (Good Laboratory Practice).