

# 日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

## I 基本情報

研究開発課題名：従来の抗菌薬開発法にとらわれない、新たな細菌感染症治療薬のスクリーニングに関する研究  
開発

Study on the screening for novel antibacterial drugs not confined to conventional antimicrobial agents  
development

研究開発実施期間：令和元年12月1日～令和4年3月31日

研究開発代表者 氏名：佐藤 豊孝  
Toyotaka Sato

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
国立大学法人北海道大学 大学院獣医学研究院獣医衛生学教室 准教授  
Hokkaido University, Laboratory of Veterinary Hygiene School/Faculty of Veterinary Medicine,  
Associate Professor

## II 研究開発の概要

### 研究開発の概要

本研究開発は、感染部位特異的細菌感染症治療薬の開発に必要な創薬基盤技術を確立することを目的として行った開発研究である。具体的には、各感染部位特異的な細菌生存必須因子(*in vivo* bacterial essential factor = *vivoEF*)阻害剤を検索し、当該阻害剤として臨床応用可能な医薬品(ドラックリポジショニング)や化合物の特性を明らかにするとともに、*vivoEF* 阻害剤のターゲティング因子(*vivoEF*)を網羅的に推定し、多剤耐性菌にも有効な次世代の細菌感染症治療薬の開発につながる知見を蓄積することを目的とし、1) 各生体内物質を用いた *vivoEF* 阻害剤のスクリーニング、2) *vivoEF* 阻害剤の標的となる細菌因子(*vivoEF*)の同定、3) *vivoEF* 阻害剤の生物学的評価を行った。

#### <Our focus>

一般的な培養法では菌の発育に影響を与えないが、  
感染部位などの特定の生体内で菌の発育・生存に  
必須となる細菌因子

※ *vivoEF*は、  
概念的な細菌因子  
であり、菌種や感  
染部位によって異  
なる様々な細菌因  
子が含まれる。

→ *in vivo* bacterial Essential Factor = ***vivoEF***

もし、*vivoEF*を阻害できる化合物があれば…



*vivoEF*  
inhibitors

Grow  
*in vitro*

but

Not  
grow  
*in vivo*

例)  
血液成分(血清など)特異的な  
*vivoEF*阻害剤  
= 血流感染症特異的治療薬

### 研究開発の成果

#### 1) 各生体内物質を用いた *vivoEF* 阻害剤のスクリーニング

各生体内物質(血清、尿、またはサーファクタントプロテイン A)および細菌種の組み合わせでの 1st・2nd スクリーニングおよび高次評価を完了した。ヒト血清添加時では全ての対象菌種においてヒット化合物が得られた。大

腸菌に対する尿を用いたスクリーニングでは2化合物が得られた。一方で、サーファクタントプロテイン A(SPA)を用いた緑膿菌、黄色ブドウ球菌、および非結核性抗酸菌に対する *vivoEF* 阻害剤は得られなかった。

合計 19,327化合物

細菌種	条件	←					ヒット化合物
		北大 既存薬 (約3000)	北大 オリジナル (約2400)	北里 天然物 (約827)	東大 Core (9600)	東大 Validated (約3500)	
大腸菌*	血清	+	+	+	+	+	34*
緑膿菌	血清	+	+	+	+	+	3
黄色ブドウ球菌	血清	+	+	+	+	+	2
大腸菌	尿	+	+	+	+	+	2
緑膿菌	SPA	+	+	+	+	+	0
黄色ブドウ球菌	SPA	+	+	+	+	+	0
非結核性抗酸菌	SPA	+	+	+	+	+	0

SPA: サーファクタントプロテインA +はスクリーニング実施済み

\*大腸菌はFull libraryスクリーニング(約21万化合物)を実施済み

図1. *vivoEF*阻害剤のスクリーニング結果

大腸菌に対する血清特異的 *vivoEF* 阻害剤では、いずれのヒット化合物も濃度依存的な *vivoEF* 阻害効果が得られた。7化合物では強い血清特異的 *vivoEF* 阻害効果(< 6 $\mu$ M)を示した。12化合物において低い細胞毒性を示した。化合物 A では、大腸菌以外にも肺炎桿菌、エンテロバクター、アシネトバクターにも *vivoEF* 阻害効果を示した。緑膿菌に対する血清特異的 *vivoEF* 阻害剤では、3化合物(化合物 B-D)ともに濃度依存的な *vivoEF* 阻害効果が得られた。化合物 B では、緑膿菌以外にもアシネトバクターに対して血清特異的な *vivoEF* 阻害効果が認められた。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌には血清非特異的な抗菌活性が認められた。化合物 C では、緑膿菌以外にも一部のアシネトバクターに対して血清特異的な *vivoEF* 阻害効果が認められた。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌には血清非特異的な抗菌活性が認められた。化合物 D においても、複数の緑膿菌株で血清特異的な *vivoEF* 阻害効果が認められた。黄色ブドウ球菌に対する血清特異的 *vivoEF* 阻害剤では、2化合物ともに濃度依存的な *vivoEF* 阻害効果が得られた。両化合物は、黄色ブドウ球菌のみに血清特異的な *vivoEF* 阻害効果が認められた。

大腸菌に対する尿特異的 *vivoEF* 阻害剤では、2化合物(化合物 E および F)ともに濃度依存的な *vivoEF* 阻害効果が得られた。化合物 E では、大腸菌以外にもアシネトバクターやメチシリン耐性黄色ブドウ球菌においても尿特異的な *vivoEF* 阻害効果が認められた。化合物 F では、大腸菌以外にもエンテロバクター、肺炎桿菌、アシネトバクター、緑膿菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌においても尿特異的な *vivoEF* 阻害効果が認められた。

## 2) *vivoEF* 阻害剤の標的となる細菌因子(*vivoEF*)の同定

Transposon-directed sequencing (TraDIS)解析およびスクリーニングで得られた *vivoEF* 阻害剤添加時における RNA-Seq 解析を行い、*vivoEF* 阻害剤の標的となる細菌因子(*vivoEF*)の同定をおこなった。

TraDIS 解析の結果、大腸菌では 293 の血清存在下での生存・増殖に重要な細菌因子(*vivoEF*)を推定した(図 2)。RNA-Seq 解析の結果、26/34 の大腸菌に対する血清特異的 *vivoEF* 阻害剤では、共通の細菌因子(細菌因子 X)を標的にしていることが示唆された。本データと TraDIS 解析の結果を集約した(図 2)。

緑膿菌およびメチシリン耐性黄色ブドウ球菌においても同様に RNA-Seq 解析により血清特異的な *vivoEF* 阻害剤によって転写が抑制される遺伝子を網羅的に抽出した。加えて、TraDIS 解析により緑膿菌の血清存在下での生存・生育に必須な細菌因子(*vivoEF*)を網羅的に抽出し、RNA-Seq と TraDIS 解析の結果を統合し、緑膿菌に対する血清特異的 *vivoEF* 阻害剤および *vivoEF* のデータを集積した。

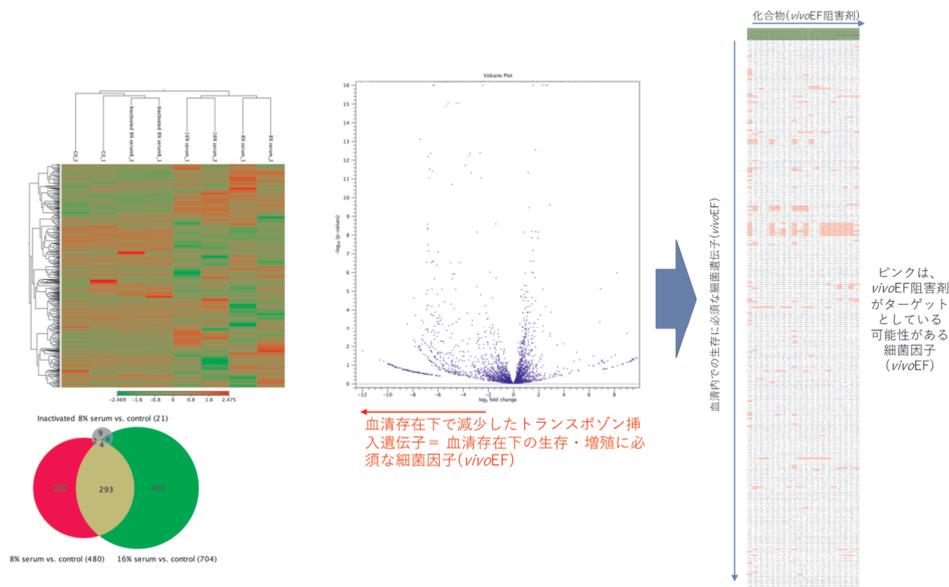


図2. TraDIS解析による大腸菌の血清存在下での *vivoEF* の網羅的推定

### 3) *vivoEF* 阻害剤の生物学的評価

本研究では、2)より細菌因子 X に注目した。X 遺伝子を欠損させた薬剤(シプロフロキサシン耐性)耐性大腸菌株を作製し、マウス感染モデルで評価した。その結果、X 遺伝子を欠損させた大腸菌株は血中で著しく生存能を欠くこと、本遺伝子欠損株を感染させてもマウスは致死にならないことを明らかにした。このことは、本研究課題で認めた細菌因子 X を阻害する 26/34 の大腸菌に対する血清特異的 *vivoEF* 阻害剤は創薬開発に有用であること。また、本解析によって得られた *vivoEF* が確かに耐性菌を含めた新規の細菌感染症治療の確立において有用なターゲットになり得ることを示した。

*vivoEF* 阻害効果は、従来の抗菌薬が持たない独創的な特性である。本特性は、*vivoEF* 阻害剤は感染部位の特定の病原菌には良好な抗菌活性を示すが、腸内フローラのような常在性細菌叢には影響を与えない利点を持つと考えられる。本評価をマウスへの化合物 G(大腸菌に対する血清特異的 *vivoEF* 阻害剤)投与により確認した。従来の抗菌薬(シプロフロキサシンおよびメロペネム)では投与後の腸管内細菌叢の多様性が失われたが、化合物 G では、低用量および高用量でも腸管内細菌叢の多様性に変化を与えなかった。

上記の効果の蓋然性を示すためにカニクイザルを用いた化合物 G 投与実験を行った。その結果、被験菌にシプロフロキサシン耐性大腸菌を用いた為、シプロフロキサシン投与後の血清では、当該菌株に殺菌効果を示さなかったが、化合物 G 投与後の血清ではシプロフロキサシン耐性大腸菌においても明らかな抗菌活性を示した。また、化合物 G 投与後の腸管内細菌叢に変化は認められなかった。

以上から本研究課題の実施によち、*vivoEF* の存在と本細菌因子を阻害する阻害剤(*vivoEF* 阻害剤)の網羅的検索・同定に関する基礎基盤技術を確立し、本技術が感染部位特異的治療薬の確立と本創薬シーズの創出に有用であることを証明した。今後、確立した本技術基盤を用いて創薬開発に向けた研究開発を一層推進させていきたい。

Research Summary of  
**Study on the screening for novel antibacterial drugs  
not confined to conventional antimicrobial agents' development**

The purpose of this R&D was to establish the basic drug discovery technologies necessary for the development of drugs for the treatment of bacterial infections that are specific to the infection sites. Specifically, we focused on *in vivo* bacterial essential factor (*vivoEF*) inhibitors specific to each infection site, and characterize drugs (drug repositioning) and compounds that can be applied clinically as such inhibitors. In addition, we aimed to comprehensively estimate the targeting factors of *vivoEF* inhibitors (*vivoEF*s) and accumulate knowledge that will lead to the development of next-generation drugs for bacterial infections that are effective against multidrug-resistant bacteria. We performed 1) Screening of *vivoEF* inhibitors using each *in vivo* substance, 2) identification of bacterial factors (*vivoEF*) targeted by *vivoEF* inhibitors, and 3) biological evaluation of *vivoEF* inhibitors, and got following observations.

1) Screening of *vivoEF* inhibitors using each *in vivo* substance

1st and 2nd screening and further evaluation were completed for each biological substance (serum, urine, or surfactant protein A) bacterial species combination. Hit compounds were obtained in all target bacterial species when human serum was added. Screening with urine against *E. coli* yielded 2 compounds. On the other hand, no *vivoEF* inhibitors were obtained against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Mycobacterium intracellulare* using surfactant protein A (SPA).

2) Identification of bacterial factors (*vivoEF*) as targets of *vivoEF* inhibitors

To identify bacterial factors targeted by *vivoEF* inhibitors (*vivoEF*s), transposon-directed sequencing (TraDIS) analysis and RNA-Seq were performed. As a result, 293 *vivoEF*s in the presence of serum was estimated in *E. coli*. RNA-Seq analysis suggested that 26 of 34 serum-specific *vivoEF* inhibitors against *E. coli* target a common bacterial factor (bacterial factor X). A database was constructed to consolidate the results of this data and the TraDIS analysis. Similarly, in *P. aeruginosa* and methicillin-resistant *S. aureus*, TraDIS and RNA-Seq analysis were performed. The results identified a comprehensive list of *vivoEF*s and *vivoEF* inhibitors.

3) Biological evaluation of *vivoEF* inhibitors

In this study, an integrated RNA-Seq and TraDIS analysis method was used to analyze the serum-specific *vivoEF* inhibitor (compound G). By the method, we revealed a serum-specific antimicrobial activity mediated by bacterial factor X. In this study, we further demonstrated that the influence of *vivoEF* X in mouse infectious model. As a result, we found that X gene-deficient *E. coli* strains were significantly defective in blood viability, and the infection was not lethal to mice. The results of this study showed that This is consistent with the findings in this research project that 26/34 *vivoEF* inhibitors inhibits bacterial factor X, which was found to be serum-specific *vivoEF* inhibitors against *E. coli* are useful for drug discovery and development. In addition, the *vivoEF* obtained by this analysis is useful for drug discovery and development, certainly be a useful target in the establishment of novel therapies for bacterial infections, including resistant strains.