

(様式10)

【16fk0108120j0001】

平成 29年 5月 31日

平成 28年度医療研究開発推進事業費補助金

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業) 成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

補助事業課題名 : (日本語) 超多剤耐性グラム陰性菌に有効な新規抗菌化合物の探索と創製
(英語) Discovery and development of novel antimicrobials against extensively drug-resistant gram-negative bacteria

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所薬剤耐性研究センター・主任研究官・鈴木仁人
所属 役職 氏名 : (英語) Masato Suzuki, Antimicrobial Resistance Research Center, National Institute of Infectious Diseases

実施期間 : 平成28年4月1日 ~ 平成29年3月31日

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究代表者”鈴木 仁人”（国立感染症研究所）は、国内外から収集した耐性菌株のゲノムを解析し、薬剤耐性遺伝子の周辺を含む遺伝的構造を詳細に把握した。また、临床上問題となる薬剤耐性遺伝子を国内外の分離株または人工合成 DNA から個別にクローニングし、各種抗菌薬に対する薬剤耐性遺伝子ライブラリーを作製した。本年度は、獲得性アミノ配糖体耐性因子として、アミノ配糖体 N-アセチル化転移酵素遺伝子 *aac(3)-Ia*, *aac(6')-Ia*, *aac(6')-Ib-cr* および *aac(2')-Ia*、アミノ配糖体アデニル化転移酵素遺伝子 *ant(2'')-Ia*, *ant(3'')-Ia*, *ant(4')-Ia* および *ant(6)-Ia*、アミノ配糖体リン酸化転移酵素遺伝子 *aph(2'')-Ia*, *aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib* および *aph(6)-Id*、16S rRNA メチル化転移酵素遺伝子 *armA*, *rmtA* および *npmA*、獲得性コリスチン耐性因子として、リポド A ホスホエタノールアミン転移酵素遺伝子 *mcr-1* および *mcr-2*、獲得性β-ラクタム剤耐性因子として、β-ラクタマーゼ遺伝子 *bla_{GES-1}*, *bla_{GES-5}* および *bla_{GES-24}* を対象とした。各種薬剤耐性遺伝子は pUC57 ベクターに組み込み、発現にはクラス I インテグロンの Pc-P2 ハイブリッドプロモーターを用い、各種発現ベクターは挿入配列が存在せず、相同組換えを起こしにくい大腸菌 MDS42 Δ*recA* 株に導入した。

研究分担者”五十嵐 雅之”（微生物化学研究所）は、天然物ライブラリーから大腸菌と肺炎桿菌に対する抗菌活性や哺乳細胞に対する低毒性を指標に多剤耐性グラム陰性菌に有効な抗菌化合物を探索し、7 種類の化合物を見出した。そのうち 5 種類はアミノ配糖体で、他の 2 種類は既存の抗菌薬とは異なる作用点を有していると考えられた。研究分担者”高橋 良昭”（微生物化学研究所）は、天然物ライブラリーから見出したアミノ配糖体を基に、水酸化、フッ素化、デオキシ化、アミノ酸側鎖の変更など合成的探索を行い、抗菌活性を増強させた新たな誘導体の開発を試みた。その結果、アミノ配糖体修飾酵素や 16S rRNA メチル化転移酵素を産生する腸内細菌科細菌、MCR-1 産生コリスチン耐性大腸菌、緑膿菌、アシネトバクター属菌にも良好な抗菌活性を示すリード化合物候補を得た。

研究分担者”成瀬 秀則”（JSR 株式会社）は、大腸菌と黄色ブドウ球菌への抗菌活性を指標に高分子ポリマーの合成的探索を行い、分子量や構造の最適化を行い、ESKAPE 耐性菌株に有効な抗菌ポリマーの開発を試みた。また、緑膿菌などバイオフィーム産生菌への抗菌活性の増強を目的にポリマー側鎖の修飾法も検討した。その結果、緑膿菌、MCR-1 産生コリスチン耐性大腸菌、ダプトマイシン非感性 MRSA にも良好な抗菌活性を示し、工業的に大量生産可能で耐久性のあるポリマーを得た。

Masato Suzuki (National Institute of Infectious Diseases) and colleagues sequenced genomes of antimicrobial resistant (AMR) bacterial isolates collected from Asian countries including Japan, and analyzed the detailed genetic structures around important AMR genes. The clinically relevant AMR genes, such as genes for aminoglycoside N-acetyltransferases [*aac(3)-Ia*, *aac(6')-Ia*, *aac(6')-Ib-cr* and *aac(2')-Ia*], aminoglycoside O-adenyltransferases (*ant(2'')-Ia*, *ant(3'')-Ia*, *ant(4')-Ia* and *ant(6)-Ia*), aminoglycoside O-phosphotransferases [*aph(2'')-Ia*, *aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib* and *aph(6)-Id*], 16S ribosomal RNA methylases (*armA*, *rmtA* and *rmtA*), lipid A phosphoethanolamine transferases (*mcr-1* and *mcr-2*), and β-lactamases (*bla_{GES-1}*, *bla_{GES-5}* and *bla_{GES-24}*), were cloned from AMR isolates or synthesized DNAs into pUC57 vectors and expressed under the class I integron Pc-P2 hybrid promoter in the insertion sequence-less and homologous recombination-defective strain (MDS42 Δ*recA* strain) of *Escherichia coli*.

Masayuki Igarashi (Institute of Microbial Chemistry) and colleagues screened for novel antibacterial agents effective against extensively drug-resistant Gram-negative bacteria from natural compound libraries on the basis of antibacterial activities against bacterial cells, including *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae*, and low toxicities against mammalian cells, and discovered 7 potential compounds. 5 compounds among them belonged to aminoglycosides and other 2 compounds seemed to have antibacterial mechanisms distinct from those of the existing drugs.

Yoshiaki Takahashi (Institute of Microbial Chemistry) and colleagues made chemical modification, such as hydroxylation, fluorination and deoxygenation, or change of the amino acid side chain on the aminoglycosides discovered from natural compound libraries. The developed derivatives as potential lead compounds exhibited greater potency against AMR isolates and strains, including aminoglycoside modifying enzymes and 16S ribosomal RNA methylase-producing Enterobacteriaceae, MCR-1-producing colistin-resistant *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp.

Hidenori Naruse (JSR Corporation) and colleagues synthesized antibacterial polymers effective against the ESKAPE pathogens on the basis of antibacterial activities against both Gram-negative and Gram-positive bacteria, including *E. coli* and *Staphylococcus aureus*, improved chemical composition and molecular weight, and developed the optimized antibacterial polymers. The developed polymers were durable and mass producible, and showed substantial antibacterial activities against AMR clinical isolates, including biofilm-forming *P. aeruginosa*, MCR-1-producing colistin-resistant *E. coli* and daptomycin-nonsusceptible MRSA.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 6 件)

1. Segawa T, Matsui M, Suzuki M, Tsutsui A, Kuroda M, Shibayama K, Suzuki S. Utilizing the Carba NP test as an indicator of expression level of carbapenemase genes in Enterobacteriaceae. **J Microbiol Methods**. 2017 133:35-39.
2. Hayashi M, Kawamura K, Matsui M, Suzuki M, Suzuki S, Shibayama K, Arakawa Y. Reduction in chlorhexidine efficacy against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* international clone II. **J Hosp Infect**. 2017 95(3):318-323.
3. Suzuki M, Shibayama K, Yahara K. A genome-wide association study identifies a horizontally-transferred bacterial surface adhesin gene associated with antimicrobial resistant strains. **Sci Rep**. 2016 6:37811.
4. Oinuma KI, Suzuki M, Sato K, Nakaie K, Niki M, Takizawa E, Niki M, Shibayama K, Yamada K, Kakeya H, Kaneko Y. Genome Sequence of an *Acinetobacter baumannii* Strain Carrying Three Acquired Carbapenemase Genes. **Genome Announc**. 2016 4(6): e01290-16.
5. Teramoto M, Zhai Z, Komatsu A, Shibayama K, Suzuki M. Genome Sequence of the Psychrophilic Bacterium *Tenacibaculum ovolyticum* Strain da5A-8 Isolated from Deep Seawater. **Genome Announc**. 2016 4(3):e00644-16.
6. Uchiyama J, Suzuki M, Nishifuji K, Kato S, Miyata R, Nasukawa T, Yamaguchi K, Takemura-Uchiyama I, Ujihara T, Shimakura H, Murakami H, Okamoto N, Sakaguchi Y, Shibayama K, Sakaguchi M, Matsuzaki S. Analyses of Short-Term Antagonistic Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PA01 and Phage KPP22 (Myoviridae Family, PB1-Like Virus Genus). **Appl Environ Microbiol**. 2016 82(15):4482-91.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 薬剤耐性プラスミドの接合伝達における細菌間競合の影響
吉田 真歩、平林 亜希、荒川 宜親、柴山 恵吾、鈴木 仁人
第90回日本細菌学会総会
仙台国際医療センター展示棟 (宮城県仙台市)
2017年3月19-21日、国内、ポスター発表

2. コリスチン耐性菌に対するコリスチンと承認薬の併用効果
平林 亜希、柴山 恵吾、鈴木 仁人
第 90 回日本細菌学会総会
仙台国際医療センター展示棟（宮城県仙台市）
2017 年 3 月 19-21 日、国内、ポスター発表
3. アジア地域での薬剤耐性サーベイランス体制構築と薬剤耐性菌研究について
柴山 恵吾、鈴木 仁人
新興・再興感染症制御プロジェクト 新興再興事業・J-GRID 合同シンポジウム「感染症研究連携のフロンティア」
国立感染症研究所（東京都新宿区）
2017 年 3 月 16 日、国内、口頭発表
4. POT 法および MLST 法によるアシネトバクター属臨床分離株の遺伝子型解析
老沼 研一、鈴木 仁人、佐藤 佳奈子、中家 清隆、滝沢 恵津子、仁木 誠、仁木 満美子、山田 康一、柴山 恵吾、掛屋 弘、金子 幸弘
第 51 回緑膿菌感染症研究会
レンブラントホテル大分（大分県大分市）
2017 年 2 月 10-11 日、国内、口頭発表
5. アシネトバクター属菌に拡散している TMB 型メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子の解析
鈴木 仁人、松井 真理、鈴木 里和、瀬川 孝耶、矢原 耕史、鹿山 鎮男、菅井 基行、柴山 恵吾
第 51 回緑膿菌感染症研究会
レンブラントホテル大分（大分県大分市）
2017 年 2 月 10-11 日、国内、口頭発表
6. Genomic analysis of epidemic multidrug-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii*
Masato Suzuki
The 10th China-Japan-Korea Forum for Communicable Disease Control and Prevention
Chinese Center for Disease Control and Prevention (Beijing, China)
2016 年 12 月 19 日、国外、口頭発表
7. アシネトバクター属臨床分離株の薬剤感受性試験と分子疫学解析
老沼 研一、佐藤 佳奈子、鈴木 仁人、柴山 恵吾、滝沢 恵津子、仁木 誠、中家 清隆、仁木 満美子、山田 康一、掛屋 弘、金子 幸弘
第 86 回日本感染症学会西日本地方会学術集会
沖縄コンベンションセンター（沖縄県沖縄市）
2016 年 11 月 24-26 日、国内、口頭発表
8. 病原細菌流行株の分泌タンパク質の解析
鈴木 仁人
第 69 回日本細菌学会関西支部総会
大阪市立大学杉本キャンパス田中記念館（大阪府大阪市）
2016 年 11 月 19 日、国内、口頭発表
9. アシネトバクター属菌に拡散している巨大な薬剤耐性プラスミドの解析
鈴木 仁人、松井 真理、鈴木 里和、瀬川 孝耶、矢原 耕史、鹿山 鎮男、菅井 基行、柴山 恵吾
第 45 回薬剤耐性菌研究会
安芸グランドホテル（広島県広島市）

2016年10月21-22日、国内、口頭発表

10. *Acinetobacter baumannii* の種内多数ゲノム比較による水平伝達に由来しカルバペネム耐性に関連する細胞表面接着因子の遺伝子の発見

矢原 耕史、鈴木 仁人、柴山 恵吾

第45回薬剤耐性菌研究会

安芸グランドホテル（広島県広島市）

2016年10月21-22日、国内、口頭発表

11. 新規PB1様ファージKPP22と緑膿菌PA01株を利用した前適応ファージKPP22M作製過程の遺伝的解析

那須川 忠弥、内山 淳平、鈴木 仁人、西藤 公司、加藤 伸一郎、内山 伊代、氏原 隆子、島倉 秀勝、村上 裕信、岡本 憲明、阪口 義彦、柴山 恵吾、阪口 雅弘、松崎 茂展

日本微生物生態学会ファージ・環境ウイルス研究合同シンポジウム

JAMSTEC 横浜本部（神奈川県横須賀市）

2016年10月21-22日、国内、ポスター発表

- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当無し。

- (4) 特許出願
該当無し。

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

研究開発課題名：(日本語) 超多剤耐性グラム陰性菌に有効な新規抗菌化合物の天然物の修飾を中心とした合成的探索
(英語) Synthetic search of novel antimicrobials against extensively drug-resistant gram-negative bacteria focusing on modifications of natural products.

研究開発担当者 (日本語) 創薬化学研究部 部長 高橋 良昭
所属 役職 氏名：(英語) Laboratory of Medicinal Chemistry, Laboratory Head, Yoshiaki Takahashi

実施期間：平成 28年 4月 1日 ~ 平成 29年 3月 31日

分担研究 (日本語) 超多剤耐性グラム陰性菌に有効な抗菌化合物の天然物ライブラリーからの探索
開発課題名：(英語) Discovery of novel antimicrobials against extensively drug-resistant gram-negative bacteria from natural product library.

研究開発分担者 (日本語) 第2生物活性研究部 部長 五十嵐 雅之
所属 役職 氏名：(英語) Laboratory of Microbiology, Laboratory Head, Masayuki Igarashi

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：国立感染症研究所・細菌第二部・鈴木仁人 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0件、国際誌 0件)
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
- (4) 特許出願

平成 29年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 新興・再構感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Disease

研究開発課題名： (日本語) 超多剤耐性グラム陰性菌に有効な新規抗菌化合物の精密重合による創製
(英語) Discovery and development of novel antimicrobials against extensively drug-resistant gram-negative bacteria

研究開発担当者 (日本語) JSR株式会社ディスプレイソリューション研究所 主事 成瀬 秀則

所属 役職 氏名： (英語) JSR Corporation Display Solution Research Laboratories Hidenori Naruse

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語)

開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語)

所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者： 国立感染症研究所 薬剤耐性センター 鈴木仁人 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 0 件)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし