

カイコモデルを利用した新規抗菌・抗真菌薬の 同定と開発

浜本 洋

帝京大学医真菌研究センター*

受付日：2018年9月1日 受理日：2018年12月10日

多剤耐性菌の蔓延に対抗するために、新規抗微生物薬の開発が切望されている。また、真菌感染症に対しては、臨床で利用できる抗真菌薬の種類が限られており、医療上のニーズを満たしていない。しかしながら、いずれにおいても新しいメカニズムを有する抗菌・抗真菌薬の開発は非常に限られている。われわれは、治療効果を指標とした探索系が抗菌・抗真菌薬の同定に有用であると考え、カイコを利用した細菌・真菌感染モデルを用いた抗微生物薬における治療効果の評価系を確立した。これまでに、このカイコ感染モデルでの治療効果を指標とした探索により、新規メカニズムを有する抗菌・抗真菌薬の同定に成功している。本総説では、創薬におけるモデル動物としてのカイコモデルの利点について解説するとともに、これまでに得られている新規抗菌・抗真菌薬の開発における成果を紹介する。

Key words: antibiotics, antifungal agent, MRSA, pharmacodynamics

はじめに

多剤耐性菌による感染症は、全世界における保健衛生上の深刻な問題となっている。近年、臨床で利用できるすべての抗菌・抗真菌薬が無効な多剤耐性菌が蔓延し始めており、WHOをはじめとするさまざまな機関からの報告において、感染症による死者の増加や、医療コストの増大などが懸念されている¹⁾。一方で、抗真菌薬においては上市されている抗真菌薬の数がそもそも少ないなど、医療ニーズを満たしていない状況が続いている²⁾。これらの問題を解決するためには、新規メカニズムを有する抗菌・抗真菌薬の開発が必要不可欠である。欧米を中心に新規抗菌・抗真菌薬の開発にあたって迅速審査や独占期間の延長などさまざまなインセンティブが設けられたこともあり、メガファーマも抗菌・抗真菌薬の開発に回帰しつつあるが、依然としてシーズの探索・開発は大学やベンチャー企業を中心に行われている。現在も新規構造を有する化合物の報告は行われてお

り、感染症治療薬を中心とした天然物を収載したデータベースの化合物数も年々増加している。しかしながら、医薬品の開発において最も難しいのは、それらの新規化合物の中から選択毒性が高く治療効果を示すものを見いだすことにある。新しい構造をもつ抗菌・抗真菌薬を示す化合物の発見も次第に難しくなっているなか、新規メカニズムを有し、既存薬と比較しても優れたあるいは同等の治療効果のある抗菌・抗真菌薬の報告はこの数年では片手で数えるほどしかない。したがって、新規抗菌・抗真菌薬の探索における初期段階において、治療効果を指標とした探索法による選別が有効ではないかと考えられる。

治療効果を指標として探索するにあたって、治療効果を示すサンプルの割合が非常に少ないと予想される化合物群を、多数のマウス個体を利用し評価することは、コスト的に大学やベンチャー企業では不可能である。たとえ資金的に可能であったとしても、昨今における動物愛護の高まりのなか、もはや合理

*東京都八王子市大塚 359 番地

Table 1. Comparison of the characteristics of animal models

	Silkworm	Wax moth	Drosophila	Nematode	Zebra fish	Mouse
Body size	2-5 cm	3-4 cm	1-3 mm	1 mm	5 cm	5-10 cm
Movement	Slow (not fly)	Fast (fly)	Slow (fly)	Swim	Swim fast	Fast, bite and jump
Rearing	Easy and many	Easy and many	Easy and many	Easy and many	Easy but not many	Easy but not many
Cost	Cheap	Cheap	Cheap	Cheap	Not cheap	Expensive
Injection of sample	Easy	Easy	Difficult	Very difficult	Easy	Easy
Ethics	Free	Free	Free	Free	Concerned	Concerned
Genetic background	Almost homogenous	Not homogenous	Homogenous	Homogenous	Not homogenous	Homogenous

的な理由がない動物の使用は社会的にも許されるものではない。われわれの研究室では、それらの問題を克服できるモデル動物としてカイコに着目した研究を行っている。2002年にわれわれの研究室の垣内力准教授らによってカイコの細菌感染モデルが確立された³⁾。続いて、われわれはこのカイコの細菌・真菌モデルを用いて、臨床で用いられる抗菌・抗真菌薬の治療効果を定量的に評価できることを見いだした⁴⁾。さらに、本モデルを用いることによって治療効果を指標に新しい抗微生物薬を探索できるのではないかと考え、実際に黄色ブドウ球菌感染カイコを用いてスクリーニングを行ったところ、新規作用機序をもつライソシン E の発見にいたった⁵⁾。また、われわれや本モデルに興味をもった研究者らにより、カイコを用いて複数の新規抗菌・抗真菌薬の同定に成功している。本総説では、抗菌・抗真菌薬の探索研究におけるカイコの有用性と、これまでの成果について報告する。

I. カイコのモデル動物としての有用性

モデル動物としてのカイコには、他の哺乳類、昆虫モデルと比較してさまざまな利点がある (Table 1)。抗菌・抗真菌薬の治療効果を評価する標準的なモデルは現在もマウスモデルであるが、マウスに比べカイコはコストが 1/100 以下と安く、倫理的な規制がない。また、カイコの性質として群飼育が可能であることから多数の個体を小さなスペースで扱うことができる⁶⁾。加えて、日本などのアジア圏とイタリアの一部では養蚕業が残されているため、カイコを卵として安価に購入することが可能で、交配によって繁殖させる手間もかからない。欧州などではハチノスツツリガ (Wax moth) が動物実験代替モデルとして感染実験に用いられることがあるが、それに比べて体長が大きく、動きが緩慢なカイコは注

射実験が実施しやすい。さらに、4000年にわたる養蚕業の歴史に基づく近代蚕糸学の成果により、遺伝的背景がある程度明らかになっており性質もほぼ均一で個体差も少ないという、モデル動物には欠かせない特長をカイコは有している。すなわち、カイコを用いることで少数の個体でも実験の再現性が高く、信頼性の高い結果を得ることも可能である。このようにカイコは、治療効果を指標とした探索法による選別に用いるモデル動物として優れた特長を有している。

II. カイコにおける抗菌・抗真菌薬の治療効果の評価

カイコの細菌・真菌感染モデルにおいて、臨床で使用されている抗菌・抗真菌薬を投与したところ、定量的かつ再現よく治療効果を評価することができた。その半数の生存に必要な薬剤投与量 (ED₅₀) を、哺乳動物モデルでの論文報告と比較したところ、ほぼ一致した結果が得られた^{4,17)} (Table 2)。このことから、カイコは抗菌・抗真菌薬の治療効果を定量的に評価できるモデル動物であると考えられる。また、よく質問される点ではあるが、カイコは試験管と同じ結果を示すわけではない。Fig. 1 に示す化合物 05 と 07 は、化合物ライブラリーから得られたヒット化合物を有機合成展開し、得られた抗菌活性がほぼ同等な化合物であるが、カイコでの治療効果がまったく異なっていた。この 2 つの化合物の構造における違いは、ベンゼン環に対して塩素が付加されているかないかであるが、カイコでの体液 (hemolymph) 中での安定性が異なっていることから、治療効果が高い 05 のほうが、治療効果が低い 07 よりも半減期が長かった。このように、カイコを用いたアッセイ系は、単に試験管内での抗菌活性を反映するのではなく、哺乳動物と同様に、化合物の吸収、

Table 2. Therapeutic effectiveness of antibiotics in the silkworm model

Antibiotics	Tested strain	ED ₅₀ (mg/kg · animal)	
		Silkworm	Mouse
Teicoplanin	<i>Staphylococcus aureus</i> MSSA1	0.3	0.1
Vancomycin		0.3	1
Minocycline		4	1
Flomoxef		0.2	0.3
Linezolid		9	4
Amphotericin B	<i>Aspergillus fumigatus</i> TIMM2920	1	0.05
Micafungin		2	0.5
Itraconazole		10	29

Silkworms were infected with *S. aureus* (3.0×10^7 cfu/larva) and *A. fumigatus* (1.0×10^5 cells/larva), and then injected with each antimicrobial agent. The ED₅₀ values in the silkworm model were determined from the survival curves and compared with those in mice cited in references 4 and 17.

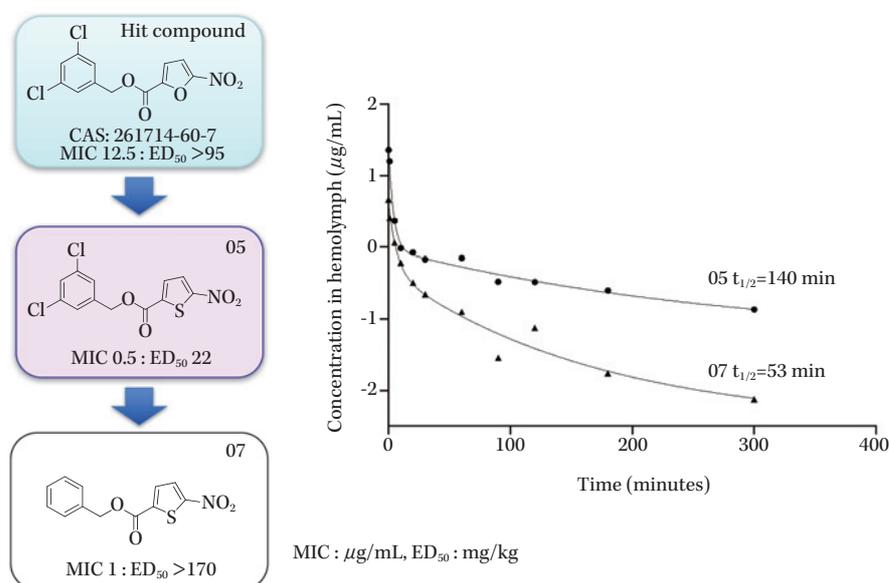


Fig. 1. Pharmacokinetic parameters that affect the therapeutic effectiveness of antimicrobial compounds even in a silkworm model

分布、代謝、排泄、毒性という、いわゆる ADMET が治療効果を左右する⁷⁾。実際、カイコにもヒトと似た物質透過性を示す腸管⁸⁾、および、シトクロム P450 や抱合反応を担う肝臓に相当する臓器⁹⁾、腎臓に相当する排泄にかかわる臓器など、一通り薬物動態に関与する臓器や機能が備わっている。また、全ゲノム解析の結果から、カイコにおいてもシトクロム P450 が多数存在していることがわかっている¹⁰⁾。カイコにヒトシトクロム P450 によって代謝される化合物を注射すると、ほとんどの化合物が代謝されてしまう。さらに、カイコモデルにおける化合物の毒性は、ラットモデルとよく相関していた。得られ

た相関係数は 0.72 であり、動物実験代替モデルとしては十分であると考えられる¹¹⁾。したがって、カイコモデルは単なる試験管ではなく、マウスやヒトと同様に化合物の薬物動態や毒性が治療効果に反映されたモデル動物になっている。

III. カイコ探索モデルを用いたライソシン E の同定

われわれはカイコを用いて治療効果を指標とした抗菌・抗真菌薬の探索を実施した。独自に調製した約 1 万 5 千の土壌細菌の培養上清から、抗菌活性を示した 2,800 サンプルについて、カイコ黄色ブドウ球菌感染モデルにおける治療効果を検討した。その結果、23 サンプルがカイコモデルにおいて治療効

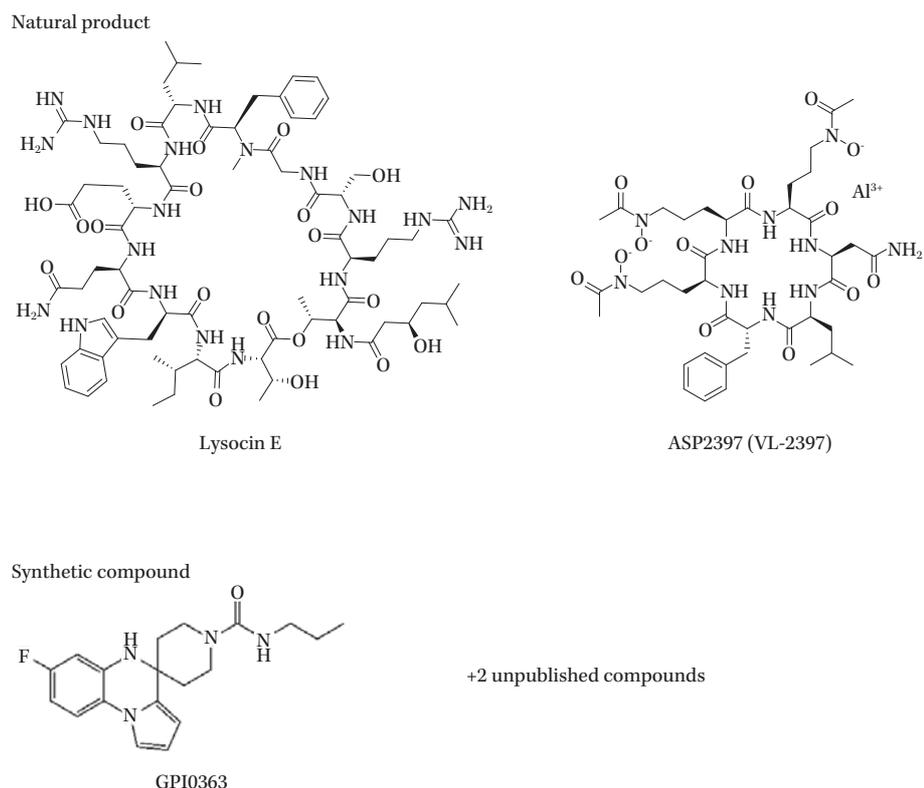


Fig. 2. Structures of antimicrobial agents identified using the silkworm model

果を示した。それらの培養上清から治療効果を指標に精製を行ったところ、沖縄の土壌より分離した *Lysobacter* 属の菌が生産する新規抗菌薬ライソシン E を見いだすことに成功した (Fig. 2)⁵⁾。ライソシン E は分子量が 1,617 の新規環状ペプチドであり、12 個のアミノ酸から構成される。その構造解析は、ライソシン E を構成するアミノ酸として D-グルタミン酸と L-グルタミンが混在していたため、きわめて困難が伴った。なぜならば、アミノ酸を同定するために酸加水分解してしまうとグルタミンがグルタミン酸になり、D 体もしくは L 体のグルタミン酸がどちらのアミノ酸に由来するか区別できなくなるためである。当時、当研究室の博士研究員であった現 東京農業大学の浦井誠先生、および、九州大学大学院薬学研究科の浜瀬健児先生による選択的なグルタミンの分解法と組み合わせ、二次元 HPLC によるアミノ酸の D 体、L 体の決定技術なくしては不可能であった。またライソシン E の全合成経路が東京大学の井上将行教授らのグループとの共同研究により確立され、本構造解析の結果が正しいことが検証されている¹²⁾。

ライソシン E の作用標的は、これまでの抗菌薬とは異なり細胞膜上のメナキノンであった⁵⁾。メナキノンは細菌特異的に電子伝達系で利用される補酵素であり、哺乳類のユビキノンは構造が異なっている。したがって、ライソシン E はその抗菌活性の発揮メカニズムが新しいことから黄色ブドウ球菌の多剤耐性菌、および、実験室株で作成したバンコマイシン耐性株に対しても抗菌活性を示す¹³⁾。さらにライソシン E の特長として、迅速で強力な殺菌活性を示す点は注目に値する。実に 99.99% 以上の黄色ブドウ球菌が 1 分以内に殺傷されるという、他の抗菌薬には類例のない強い殺菌力を有する。この殺菌力のためであるかは不明であるが、ライソシン E はマウスモデルにおいても比較として用いたバンコマイシンに比べても少ない用量で優れた治療効果を示す。しかもこれまでのところ目立った毒性は認められていない。したがって、ライソシン E は臨床応用が期待されており、現在 AMED の創薬支援ネットワークのプロジェクトにおいて臨床試験に向けた各種試験を実施している。

IV. カイコを用いた新規抗真菌薬 ASP2397 (VL-2397) の同定

2003年に日本化学療法学会総会においてカイコモデルを用いた治療効果の評価系を発表した際、いくつかの製薬会社が本モデルに興味をもっていた。その中でも、最も熱心で実際にわれわれから実験系を導入しカイコを用いたスクリーニングを実施したのが当時の藤沢薬品工業(現アステラス製薬)であった。アステラス製薬の研究陣がさらに改良したカイコを用いたアスペルギルス感染モデルを用いて探索を行った結果、310サンプルの抗真菌活性を示す培養上清の中からASP2397が同定された(Fig. 2)¹⁴⁾。ASP2397はカイコアスペルギルス感染モデルにおいてアルミニウム体に治療活性があり、鉄体には治療活性がない。これは、鉄体は血清添加によって抗真菌活性が低下するが、アルミニウム体はその活性が変化しないためであると考えられる。ASP2397は真菌に特異的に存在するSiderophore Iron Transporter依存に取り込まれて作用することが明らかにされているが、その作用標的はまだ明らかではない。

V. 化合物ライブラリーを用いた探索

これまでは天然物における成果を述べたが、われわれは化合物ライブラリーを用いた探索も実施している。約10万の化合物を東京大学の創薬機構から分譲していただき、黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性を示した3,400化合物についてカイコでの治療効果を検討した結果、3化合物が得られた(Fig. 2)。そのうち1つの化合物GPI0363は*Staphylococcus*属にのみ抗菌活性を示すという、非常に狭い抗菌スペクトルを示した¹⁵⁾。多剤耐性菌が蔓延している状況において、非常に狭いスペクトルの抗菌薬は他の菌が耐性菌にならないという観点からきわめて有用である。そこで、そのメカニズムを明らかにするため、本化合物の耐性菌を人為的に取得し、その変異部位について次世代シーケンサーを用いて解析したところ、RNAポリメラーゼの転写 σ_A 因子をコードする遺伝子に変異が生じていることがわかった。生化学的な解析から、GPI0363は σ_A 因子依存的なRNAポリメラーゼの合成を阻害したことから、本化合物の標的は σ_A 因子であると推察された¹⁵⁾。通常、化合物ライブラリーから得られたヒット化合物は、標的に対する結合能や薬物動態が最適ではない

ため、抗菌活性および治療効果は高くない。本化合物も、天然物からカイコにおける治療効果を指標とした探索により得られた化合物と比較しても、抗菌活性および治療効果が10~100倍程度低く、マウスモデルにおける治療効果もきわめて弱かった。そこで有機合成を専門としている先生にご協力いただき、有機合成展開により活性が改善された化合物の創出を試みたが、ヒット化合物の合成展開可能部位が少なかったこともあり、抗菌活性および治療効果の両方が高くなった化合物を得ることができなかった。一方で、本研究の過程からカイコは治療効果を指標とした合成抗菌薬の合成展開による最適化の評価にも利用できることを明らかにした⁷⁾。これらの結果は、カイコモデルは化合物ライブラリーからの新規作用メカニズムをもつ化合物の同定、および、有機合成展開された化合物の評価に利用することが可能であることを示している。

おわりに

本総説では、カイコを用いて実際に複数の新規構造かつメカニズムが新しい抗菌・抗真菌薬を同定できたことを示した。このように、カイコを用いた新規感染症治療薬の創出が可能であるという知見が蓄積されてきていると思われる。われわれも、まだ構造が未決定の新規と推定される抗菌・抗真菌薬を複数有しており、今後さらにカイコモデルの有用性が明らかになってくるのは間違いない。カイコは日本だけでなく、中国やインドでも医薬品における治療効果の評価に使われ始めている¹⁶⁾。しかし、日本における蚕糸学および養蚕業が蓄積してきた知見は非常に大きく、まだまだ日本におけるカイコのアドバンテージは他の国に比べても大きい。このような強みを活かしたカイコを用いて探索された日本発の新しい感染症治療薬が実用化され、現在直面している抗菌・抗真菌薬の危機が解決されることを期待している。

謝辞

本総説のとりまとめにあたって、的確なアドバイスをいただきました帝京大学医真菌研究センターの関水と久センター長に感謝いたします。また、本研究を支援していただきました多くの共同研究者にこの場を借りて御礼申し上げます。

なお本研究は、AMED、医薬基盤研究所、日本学術振興会科学研究費基盤研究 (S) JP15H05783 等の研究費を受けて得られた成果である。

利益相反自己申告：申告すべきものなし。

文献

- 1) WHO: Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014
- 2) 浜本 洋：新規抗真菌薬開発の現状と課題。治療の領域 2018; 34(S-1): 53-61
- 3) Kaito C, Akimitsu N, Watanabe H, Sekimizu K: Silkworm larvae as an animal model of bacterial infection pathogenic to humans. *Microb Pathog* 2002; 32: 183-90
- 4) Hamamoto H, Kurokawa K, Kaito C, Kamura K, Manitra Razanajatovo I, Kusuhara H, et al: Quantitative evaluation of the therapeutic effects of antibiotics using silkworms infected with human pathogenic microorganisms. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 774-9
- 5) Hamamoto H, Urai M, Ishii K, Yasukawa J, Paudel A, Murai M, et al: Lysocin E is a new antibiotic that targets menaquinone in the bacterial membrane. *Nat Chem Biol* 2015; 11: 127-33
- 6) Panthee S, Paudel A, Hamamoto H, Sekimizu K: Advantages of the Silkworm As an Animal Model for Developing Novel Antimicrobial Agents. *Front Microbiol* 2017; 8: 373
- 7) Paudel A, Panthee S, Urai M, Hamamoto H, Ohwada T, Sekimizu K: Pharmacokinetic parameters explain the therapeutic activity of antimicrobial agents in a silkworm infection model. *Sci Rep* 2018; 8: 1578
- 8) Hamamoto H, Kamura K, Razanajatovo I M, Murakami K, Santa T, Sekimizu K: Effects of molecular mass and hydrophobicity on transport rates through non-specific pathways of the silkworm larva midgut. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 26: 38-42
- 9) Hamamoto H, Tonoike A, Narushima K, Horie R, Sekimizu K: Silkworm as a model animal to evaluate drug candidate toxicity and metabolism. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2009; 149: 334-9
- 10) Li B, Zhang H, Ni M, Wang B B, Li F C, Xu K Z, et al: Identification and characterization of six cytochrome P450 genes belonging to CYP4 and CYP6 gene families in the silkworm, *Bombyx mori*. *Mol Biol Rep* 2014; 41: 5135-46
- 11) Usui K, Nishida S, Sugita T, Ueki T, Matsu moto Y, Okumura H, et al: Acute oral toxicity test of chemical compounds in silkworms. *Drug Discov Ther* 2016; 10: 57-61
- 12) Murai M, Kaji T, Kuranaga T, Hamamoto H, Sekimizu K, Inoue M: Total synthesis and biological evaluation of the antibiotic lysocin E and its enantiomeric, epimeric, and N-demethylated analogues. *Angew Chem Int Ed Engl* 2015; 54: 1556-60
- 13) Ishii K, Tabuchi F, Matsuo M, Tatsuno K, Sato T, Okazaki M, et al: Phenotypic and genomic comparisons of highly vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains developed from multiple clinical MRSA strains by *in vitro* mutagenesis. *Sci Rep* 2015; 5: 17092
- 14) Nakamura I, Kanasaki R, Yoshikawa K, Furukawa S, Fujie A, Hamamoto H, et al: Discovery of a new antifungal agent ASP2397 using a silkworm model of *Aspergillus fumigatus* infection. *J Antibiot* 2017; 70: 41-4
- 15) Paudel A, Hamamoto H, Panthee S, Kaneko K, Matsunaga S, Kanai M, et al: A Novel Spiro-Heterocyclic Compound Identified by the Silkworm Infection Model Inhibits Transcription in *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol* 2017; 8: 712
- 16) Zhang X, Xue R, Cao G, Pan Z, Zheng X, Gong C: Silkworms can be used as an animal model to screen and evaluate gouty therapeutic drugs. *J Insect Sci* 2012; 12: 4
- 17) 浜本 洋, 関水 和久: カイコ細菌・真菌感染モデルを用いた新規抗生物質の開発。薬学雑誌 2018; 138: 895-9

Identification of novel antibiotics using a silkworm model

Hiroshi Hamamoto

Teikyo University Institute of Medical Mycology, 359 Otsuka, Hachio-ji, Tokyo, Japan

Development of novel antibiotics is desirable to combat antimicrobial resistance. Due to the availability of only a limited number of antifungal agents for clinical use, the clinical demand of antifungal agents has not yet been met. However, very few novel antimicrobials with novel mechanisms of action are in the development pipeline. Therefore, a new screening system to evaluate the therapeutic effectiveness of candidate samples is desirable to identify novel therapeutic antibiotics. For this purpose, we established a system for evaluation of the therapeutic effectiveness of antibiotics using silkworm infected with bacteria or fungi. We have now successfully identified a few antibiotics with novel structures and new mechanisms of action using a silkworm model for screening candidate compounds. In this review, I shall introduce the merits of the silkworm model and our achievements in the area of development of antibiotics.