

2021年度 北陸大学特別研究助成【 奨励研究 】 報告書

代表者	所属	薬学	職位	准教授	氏名	佐藤 友紀
-----	----	----	----	-----	----	-------

研究課題名	選択的抗緑膿菌活性を有する新規ポリミキシンB誘導体の開発研究
-------	--------------------------------

交付額	1,000,000 円
-----	-------------

研究成果の概要

本研究では、ポリミキシンBの構造を基に、構造中アミノ酸残基を置換した誘導体を合成し、その抗菌活性、LPS結合活性、細胞毒性の検討を行った。今回合成した誘導体の抗菌活性は、抗菌活性に重要とされるDab残基を置換していることから、抗菌活性の低下が予測されたが、緑膿菌に対してPMB sulfateと同等の抗菌活性を保持する誘導体を得ることができた。またLPS結合活性においての脂肪酸の有無、菌による結合活性の違いを明らかにした。細胞毒性への影響についても調査し毒性の低減が認められた。これらの知見を活かし、さらに新規誘導体を合成し、開発を進めている。

研究目的

感染症治療において、抗菌薬に耐性を示す耐性菌の出現は、治療を困難にするため問題となっている。薬剤耐性菌の多くは、健康者に感染しても問題となることは少ないが、入院患者など免疫機能が低下した患者では重症化につながる危険性が高くなるため問題である。

現在、薬剤耐性が問題となっている病原体の中で、緑膿菌は、薬剤の外膜透過性の低下、細胞外への薬剤排出能の亢進及びβ-ラクタマーゼなどの薬剤分解酵素の産生増加など、様々な耐性機構を有するため、多くの薬剤に対して耐性を獲得しやすい菌種であることが知られている。また、緑膿菌感染症の治療に有効なフルオロキノロン系、カルバペネム系、アミノグリコシド系の3系統の抗生物質に耐性を獲得した緑膿菌は、多剤耐性緑膿菌と呼ばれ、現在、国内で感染症の治療薬として承認されているほぼすべての抗生物質の効果が期待できず、治療が著しく困難となるため、有効な治療薬の開発が急がれている。

ポリミキシンBは、細菌外膜の構成成分であるリポ多糖 (LPS)のlipid Aに結合し、膜の安定性を低下させ、細菌外膜に局所的な障害を起こし、細胞内容物を流出させ殺菌的に作用する。細菌の外膜に直接作用して膜を破壊することから、抗菌作用の発現に、細菌の膜を透過する必要がない。そのため、細菌の細胞膜を通過して作用を示す薬物に比べ、緑膿菌の多様な薬剤耐性による影響を受けにくいという特徴がある。また、ポリミキシンB誘導体は、グラム陰性菌に特徴的な内毒素の本体であるLPSと結合し、その毒素を中和する働きを持っているため、敗血症にも有効であると考えられる。しかしながら、細胞膜機能障害薬であるため、ヒトへの影響が問題となっている。

本研究では、ポリミキシンBの利点を生かしつつ、その毒性に大きな影響を及ぼす、脂溶性部位と塩基性部位について検討を行うことで、緑膿菌選択的、毒性低減ポリミキシンB誘導体の合成を目指した。

研究の方法

誘導体の合成は、自動ペプチド合成機を用いたFmoc固相合成法により行った。合成した直鎖保護ペプチドにTFA処理をし、保護基の選択的除去および樹脂からのペプチド鎖の切断を行い、DPPAを用いて環化を行った。最終脱保護の後、生成物をToyopearl HW-40カラムで溶出、HPLCにより精製を行った。目的物は、質量分析により確認を行った。本研究では、ポリミキシンBの脂溶性部位と塩基性部位に着目した誘導体を合成した。

合成PMB誘導体の抗菌活性は、大腸菌、ネズミチフス菌及び緑膿菌を用い、日本化学療法学会標準法に規定されている微量液体希釈法により、最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration; MIC) を測定した。緑膿菌に対して高活性を示した誘導体については、多剤耐性緑膿菌を用いた抗菌活性についても測定を行い、効果の判定を行った。

LPS結合活性の測定法は、displacement assay法により行う(Moore RA et al, Antimicrob Agents Chemother, 29, 496-500, 1986)。本研究では、ポリミキシンBの1位Dab残基の側鎖Nγ-アミノ基に5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonyl-Gly (DNS-Gly) を導入した [Dab(DNS-Gly)¹]-PMB₃を蛍光標識体として用い、誘導体のLPSに対する結合活性を評価する。

合成PMB誘導体の細胞毒性の測定は、MTT assay法により評価を行った。

研究成果

①ポリミキシンB誘導体のデザインおよび合成

ポリミキシンB誘導体の合成は、自動ペプチド合成機を用いたFmoc固相合成法により行う。トリフルオロ酢酸により、保護基の選択的除去および樹脂からのペプチド鎖の切断を行い、DPPAを用いて環化を行う。その後最終脱保護の後、生成物をToyopearl HW-40カラムで溶出、HPLCにより精製を行う。目的物の確認は、質量分析により行った。

誘導体のデザインは、これまでのポリミキシンBの構造活性相関の知見に基づき行った^{1,2,3)}。

・脂肪酸を有し、高抗菌活性を有しながら毒性軽減を目指した誘導体の合成

ポリミキシン類のうち、オクタン酸によりアシル化されているポリミキシンB₃をリード化合物とし、ペプチド中のDab残基を置換し、毒性発現の一つの要因である、ペプチドのトータル塩基性を低下させ、毒性軽減を目指したシリーズを合成した。

・緑膿菌選択的、毒性低減誘導体の合成

毒性の発現のもう一つの要因とされるN末端脂肪酸を除去した誘導体において、申請者はDes-FA-[Ser²-Dap³]-PMB(2-10)が、ポリミキシンBに比べ毒性が低く、緑膿菌に対し選択的な抗菌活性を示すことを報告している²⁾。本研究では、この誘導体応用し、環状構造部分のDab残基の側鎖アミノ基までの距離を制御し、外膜LPSとの相互作用を変化させた誘導体を合成した。

②合成PMB誘導体の抗菌活性

今回合成した誘導体の抗菌活性は、抗菌活性に重要とされるDab残基を置換していることから、抗菌活性の低下が予測される。しかしながら、いくつかの誘導体はPMB sulfateと同等の抗菌活性を保持する結果を得た。また5位に関しては、これまでの研究でも抗菌活性への重要性が示唆されていたが、本研究においても同様の結果を得た。側鎖アミノ基までの距離を検討した誘導体においては、脂肪酸の有無により、抗菌活性発現に有用な部位に差があることを明らかにした。

③合成PMB誘導体のLPS結合活性測定

LPS結合活性の測定では、脂溶性部位の有無には関係なく、アミノ酸残基側鎖の塩基性の重要性が示唆された。

④合成PMB誘導体の細胞毒性の測定

合成したPMB誘導体の細胞毒性については、合成した誘導体はいずれもPMB sulfateに比較し細胞毒性は低下していることが明らかとなった。

本研究では、PMB₃の構造をベースとした誘導体を合成し、抗菌活性、LPS結合活性、細胞毒性について検討を行った。その結果、3種の菌に対する抗菌活性に必要な部位を明らかにした。また、緑膿菌に抗菌活性を示すために必要な部位について明らかにした。これらの知見は、今後のPMBの構造活性相関研究で有効性・安全性の高いPMB誘導体の開発をする上で有用であると考ええる。

〈引用文献〉

1. Sakura, N., Itoh, T., Uchida, Y., Ohki, K., Okimura, K., Chiba, K., Sato, Y., and Sawanishi, H. (2004) Bull. Chem. Soc. Jpn., 77, 1915-1924.
2. Sato, Y., Shindo, M., Sakura, N., Uchida, Y., and Kato, I. (2011) Chem. Pharm. Bull., 59, 597-602.
3. Yuki Sato, Naoki Sakura, Tatsuo Takahashi, Keiko Okimura, Masakazu Miura, Keiichi Hatakeyama, Keiichi Ohshima, Tohru Mochizuki Peptide Science 2018: Proceedings of the 10th International Peptide Symposium / The 55th Japanese Peptide Symposium Shiroh Futaki and Katsumi Matsuzaki (Editors) The Japanese Peptide Society, 2019.

主な発表論文等

日本薬学会第143年会（札幌）2023年3月にて発表予定