

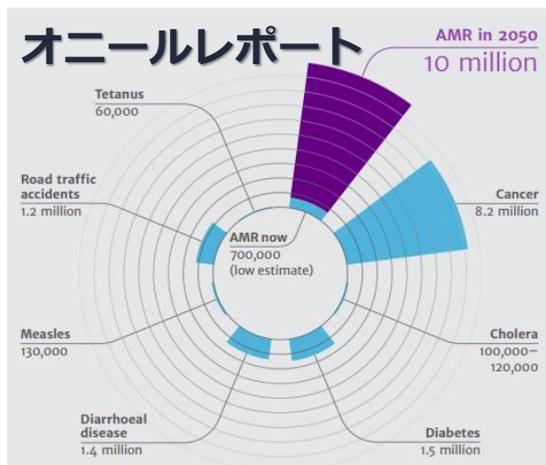
多剤耐性グラム陰性桿菌を含む 緑膿菌に対する人工抗菌酵素の開発

岡山大学 学術研究院医歯薬学域（医）
病原細菌学
准教授 内山 淳平

2023年9月26日



薬剤耐性の問題



2050年に薬剤耐性により
1,000万人が死亡と推定。

WHO薬剤耐性菌リスト



- 緑膿菌
- 腸内細菌目細菌
- アシネトバクター菌

特定のグラム陰性桿菌が
薬剤耐性で問題。

抗菌酵素（Enzybiotics）とは？

- 薬剤耐性に対する新しい治療薬として期待。
- 細菌の細胞壁にあるペプチドグリカンを分解し、殺菌する作用機序。
- ファージのエンドライシンを主に利用。

ペプチドグリカン
結合ドメイン



ペプチドグリカン
分解ドメイン

創薬モダリティ
の1つ。



抗菌酵素の市場

ベンチャー会社による

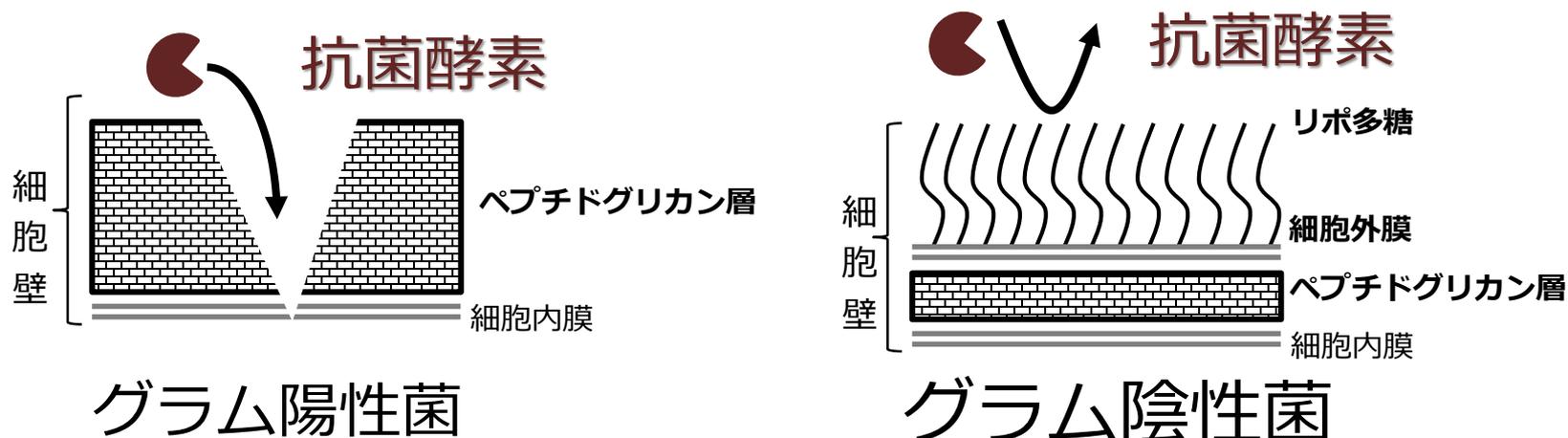
1. 医薬部外品として抗菌酵素を販売。
2. 医薬品にするための臨床試験を実施。



今後、抗菌酵素の市場は
拡大すると期待される。



抗菌酵素の技術的課題



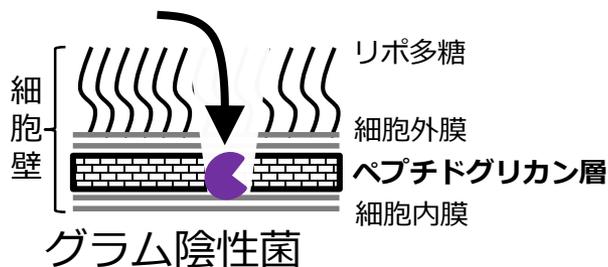
グラム陽性菌は殺菌できるが、
グラム陰性菌は殺菌できない。



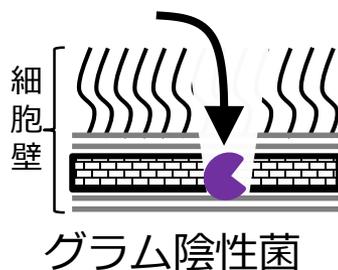
どうやって抗菌酵素で グラム陰性菌を殺菌するのか？

3つの方法が考えられる。

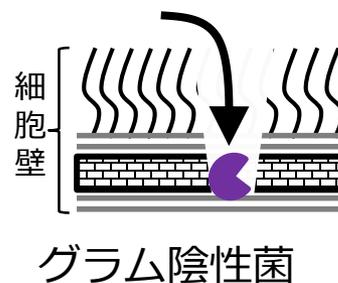
抗菌酵素と
外膜透過剤との併用



一部の
抗菌酵素



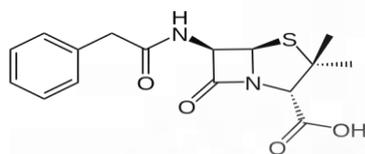
抗菌酵素
の改良



人工抗菌酵素



β-ラクタム系抗菌薬の 開発史の様に、抗菌酵素を改良。

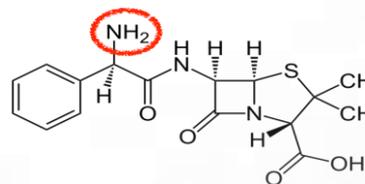


ベンジル
ペニシリン

グラム陰性菌
には効果がない。



半合成



アンピシリン

グラム陰性菌を
殺菌できる！



抗菌酵素



ペプチド技術
構造生物学
データサイエンス
分子生物学



人工抗菌酵素

例：グラム陰性菌に有効
↑ 抗菌効果、↑ 生産

グラム陰性桿菌に対する人工抗菌酵素の
開発により、抗菌酵素の市場を拡大が期待。



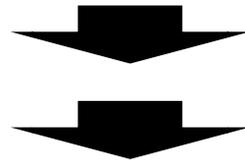
技術開発の目的

多剤耐性グラム陰性桿菌
に対する人工抗菌酵素の開発



本研究の概要

(I) 人工抗菌酵素シーズの作製・探索

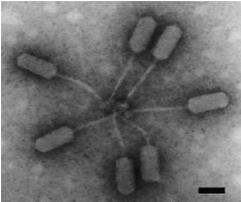


(II) 人工抗菌酵素候補「27DS」の
in vitro・*in vivo*の検討



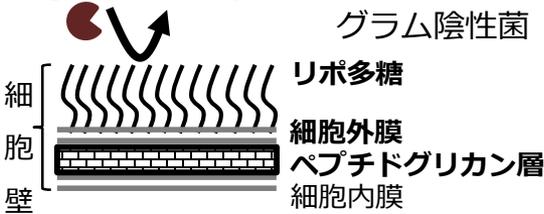
①人工抗菌酵素シースズ の作製・探索

緑膿菌ファージ PAJU2



Virus
Research.
139(1), 131-
134, 2009.

抗菌酵素ORF27



グラム陰性菌

細胞壁

リポ多糖

細胞外膜

ペプチドグリカン層

細胞内膜

+

外膜透過性ドメイン

グラム陰性菌に有効な
抗菌酵素の一部



FEBS Letter. 500(1-2), 56-59, 2001.

OR

抗菌ペプチドの一部



人工抗菌酵素シーズの作製

外膜親和性 ドメイン

1. Type A
2. Type B
3. Type C
4. Type S
5. Type D

ドメインの組み合わせ

Version 1 N  Protein domain  C

Version 2 N  ORF27  C

Version 3 N  ORF27  C

Version 4 N  Protein domain  C

Control 1 N  ORF27 C

Control 2 N   C

20個の内12個の
人工抗菌酵素シーズが作出



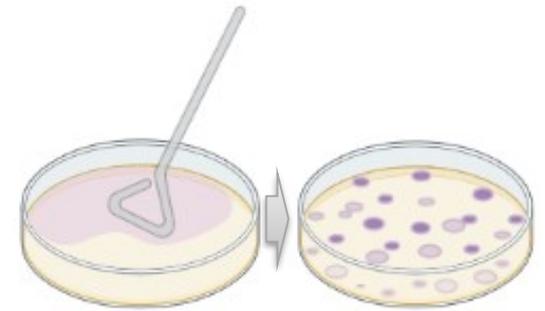
抗菌活性の測定

緑膿菌PAO1株
(10^7 CFU/mL)

+

人工抗菌酵素シース
(0.05 mg/mL)

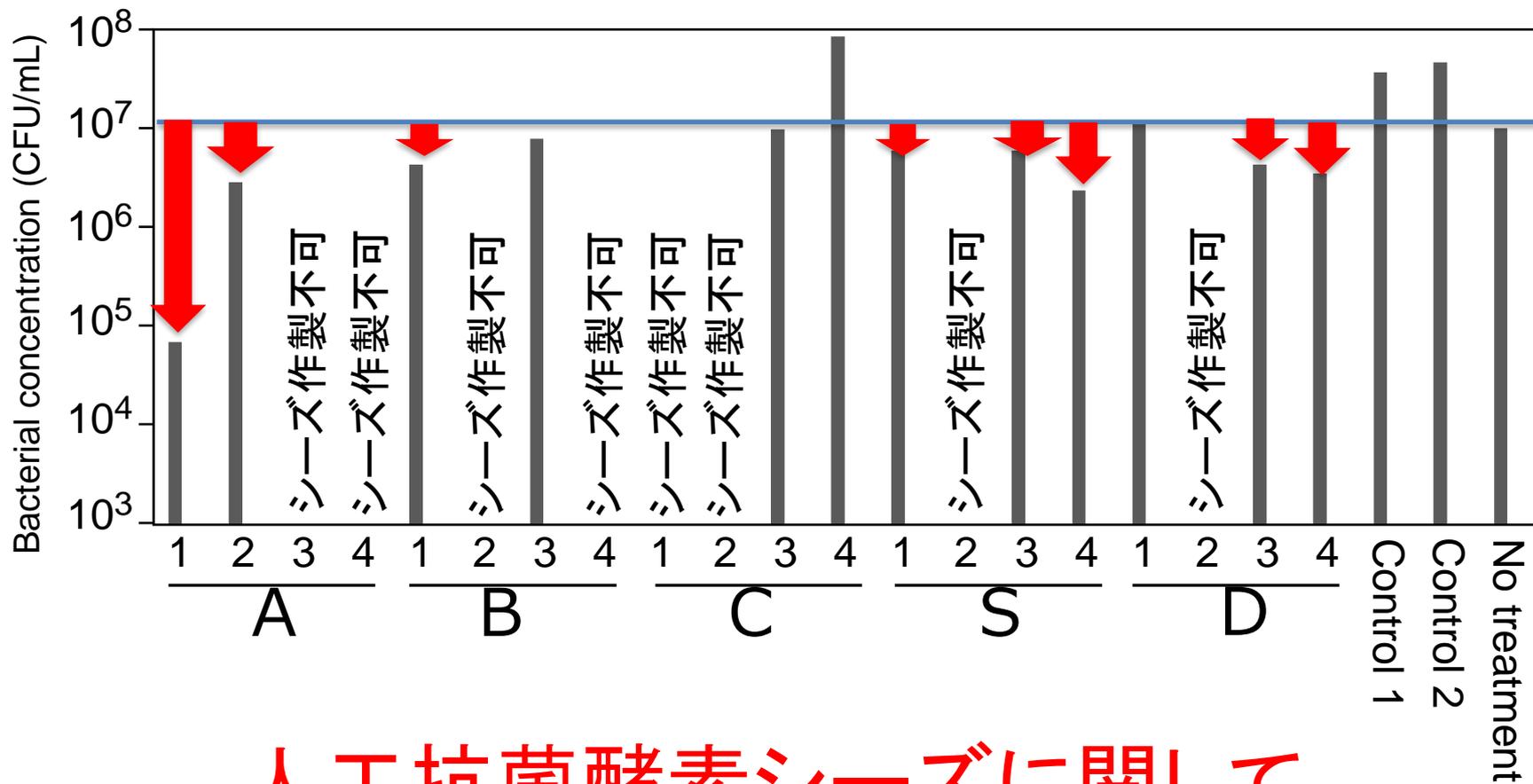
30分
培養



生菌数
を測定



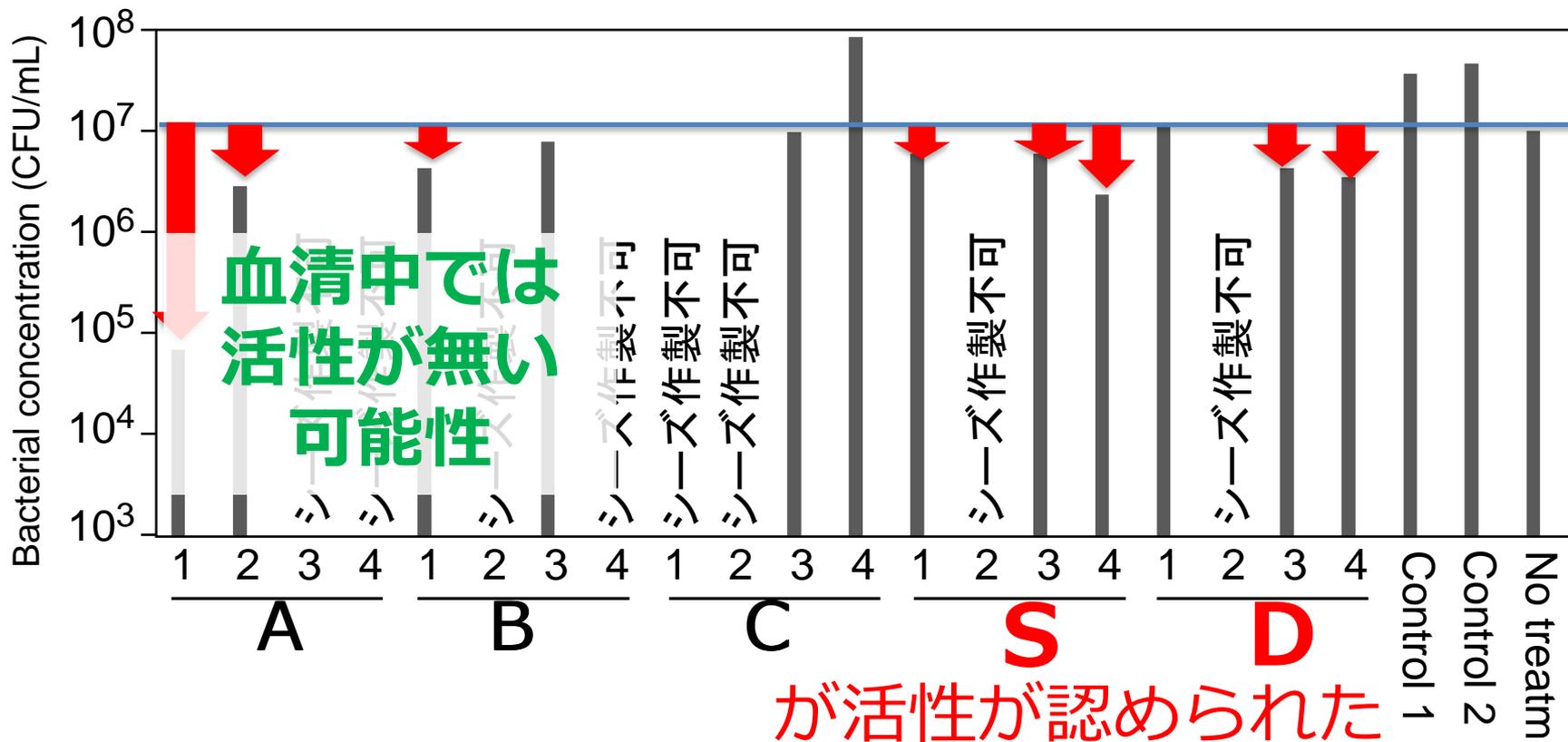
人工抗菌酵素シーズの 抗菌活性の測定結果



人工抗菌酵素シーズに関して、
抗菌活性が認められた。



人工抗菌酵素シーズの 抗菌活性の測定結果



SとDの融合による 抗菌活性の検討①

DS×27



27×DS



SD×27



27×SD



緑膿菌PAO1株
(10^7 CFU/mL)

+

人工抗菌酵素
シーズ
(0.05 mg/mL)

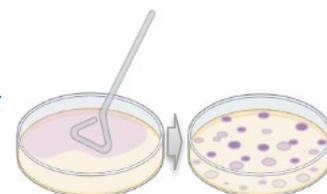
OR

人工抗菌酵素
シーズ
(0.05 mg/mL)

+

0.5 mM EDTA

30 分培養

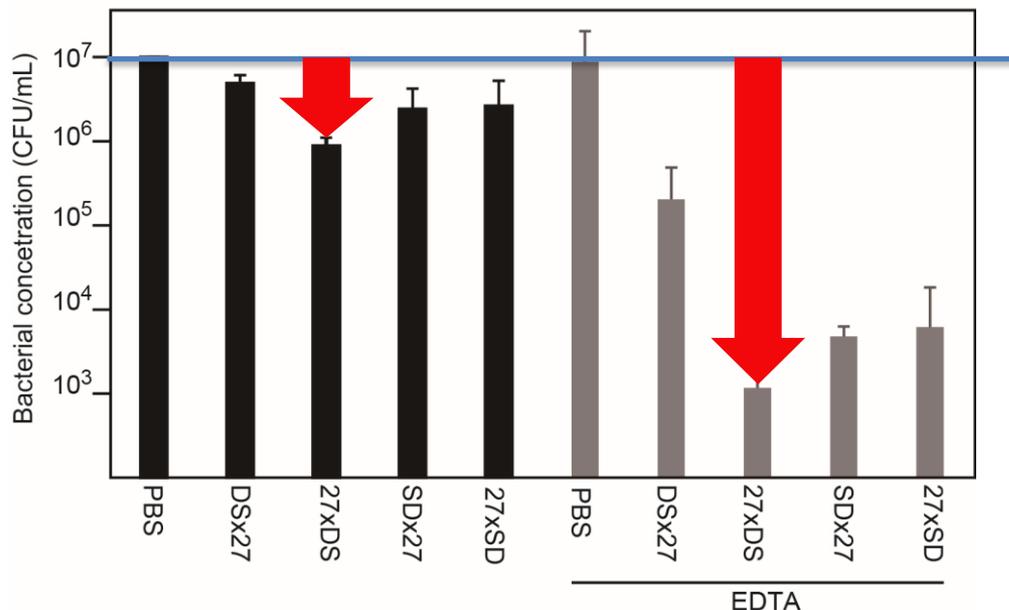


生菌数
を測定

外膜透過剤



SとDの融合による 抗菌活性の検討②

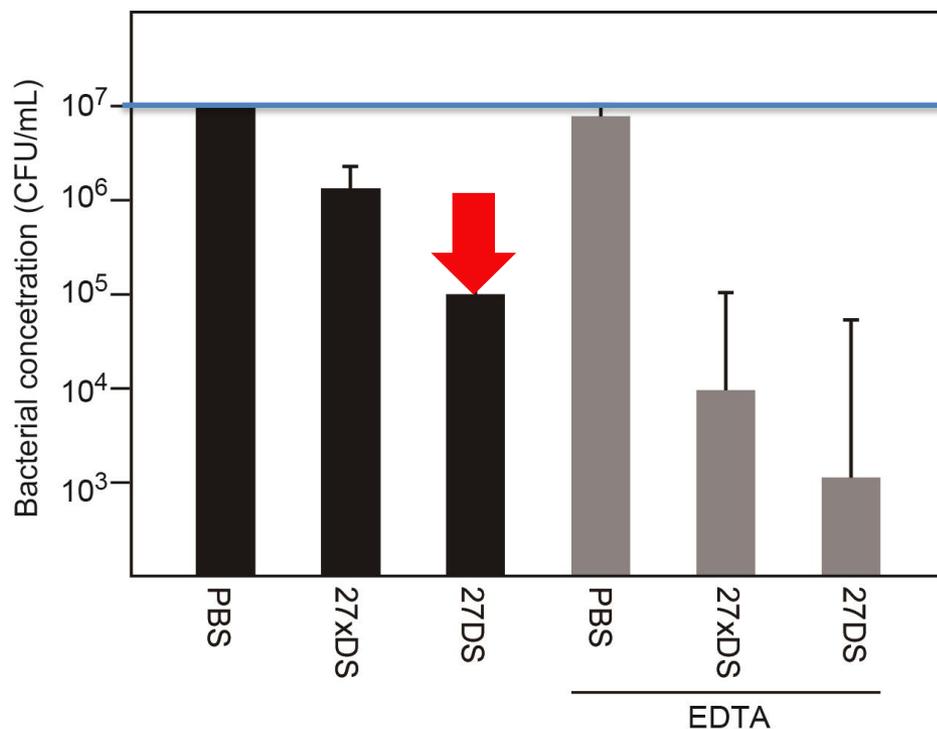


SやD単体の結合よりも、DSにした方が
高い活性が得られた。
27xDSが活性が最も高かった。



SとDの融合による 抗菌活性の検討③

リンカー削除による殺菌効果の改善



27DSを候補分子として選抜。



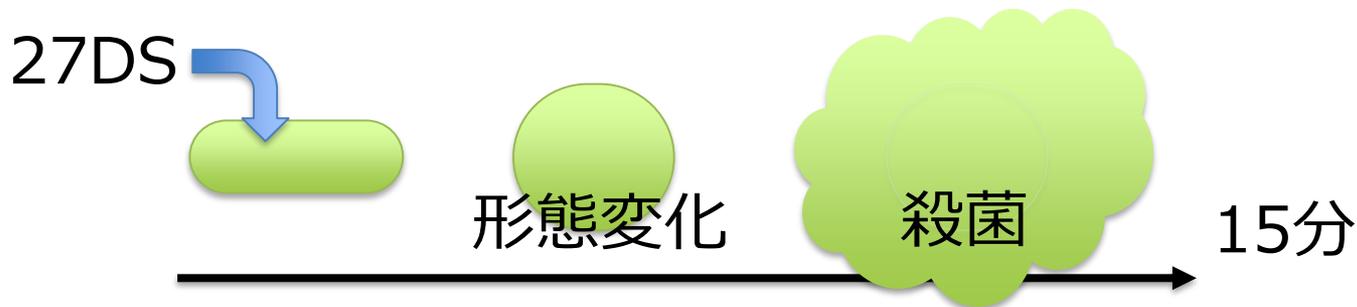
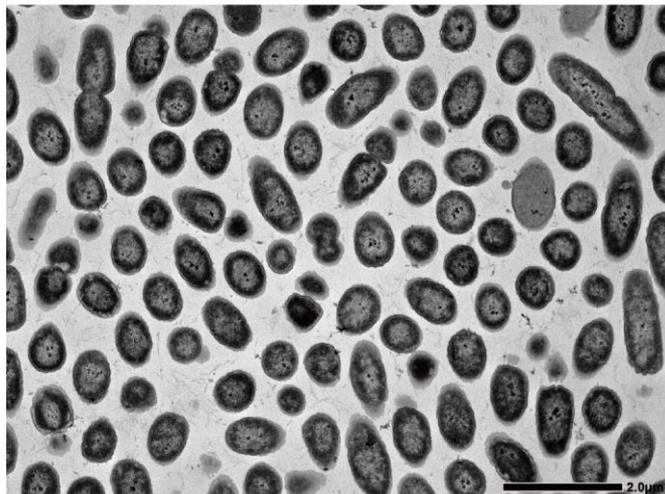
②人工抗菌酵素候補「27DS」 *Din vitro*・*in vivo*の検討

1. 作用機序の確認
2. 抗菌スペクトルの測定
3. マウスを使用した予防効果・
治療効果の検証

27DSの作用機序



×5,000



菌の形状維持が困難となり死滅。



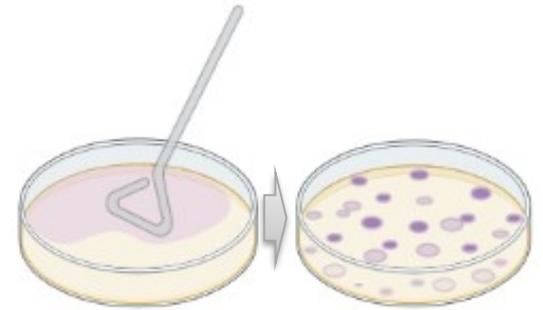
27DSの 抗菌スペクトル①

臨床分離株
(10^7 CFU/mL)

+

27DS (0.05 mg/mL)

30 分培養

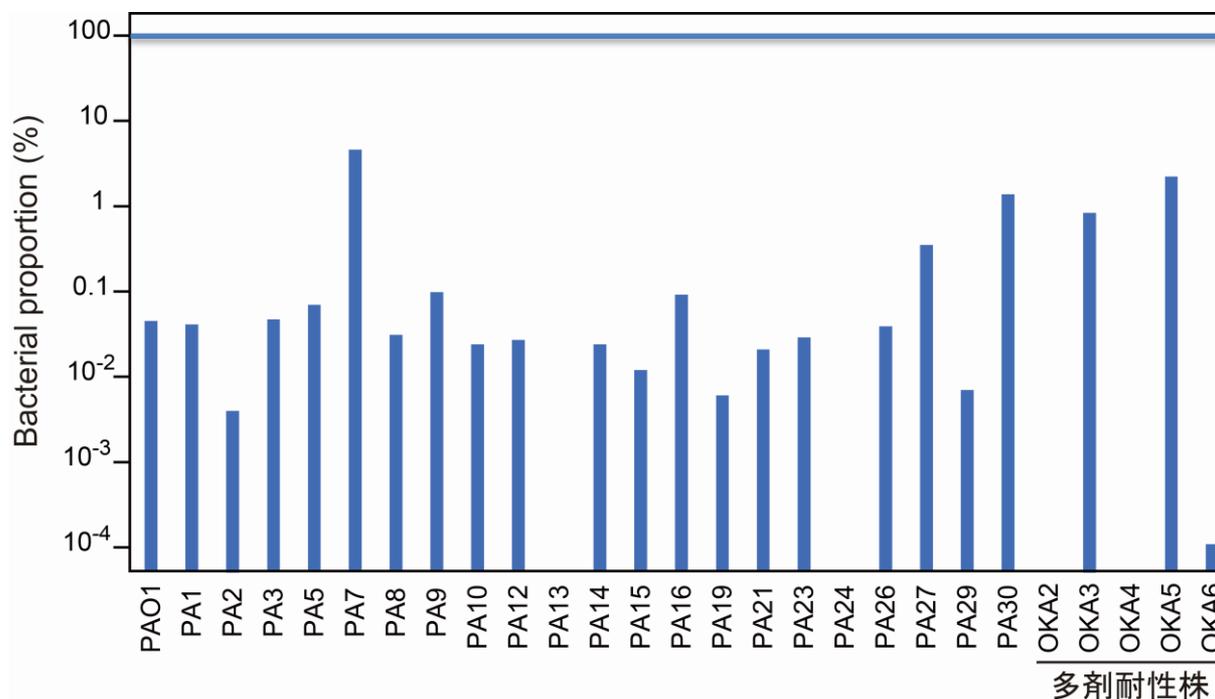


生菌数
を測定



27DSの 抗菌スペクトル②

緑膿菌に対する抗菌活性



多剤耐性株を含む
緑膿菌臨床分離株を殺菌可能。

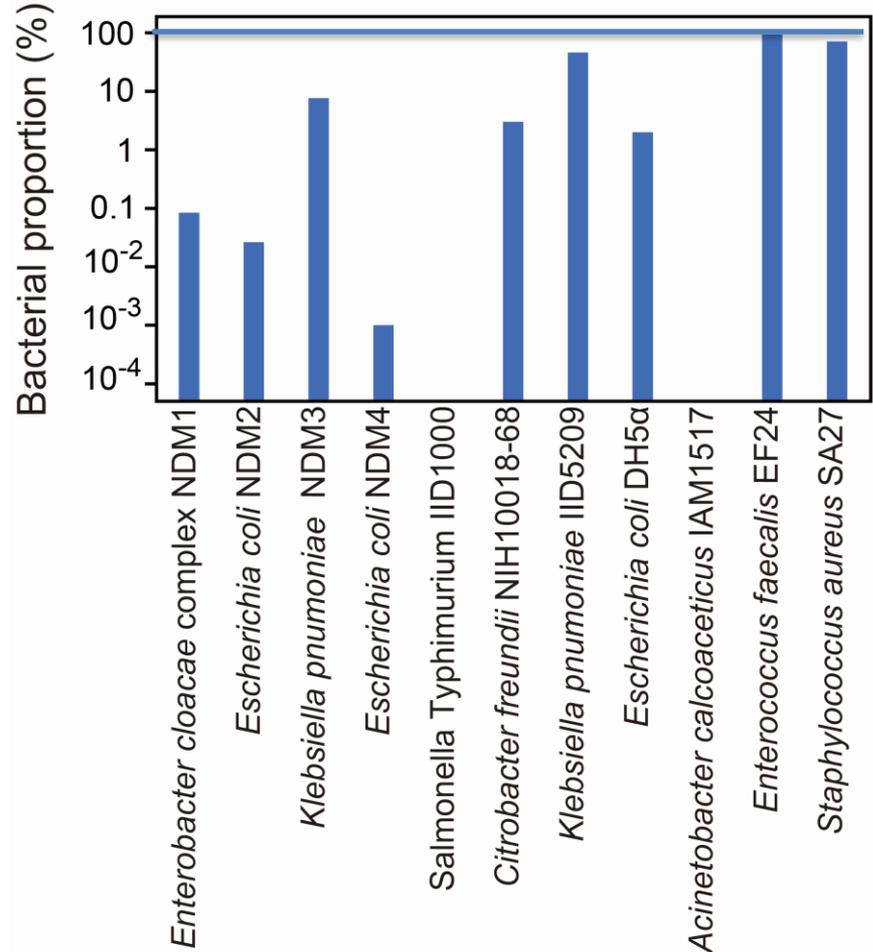


27DSの 抗菌スペクトル③

他の細菌種に
対する抗菌活性



他の薬剤耐性
グラム陰性桿菌
にも有効。



カルバペネム耐性
腸内細菌目細菌



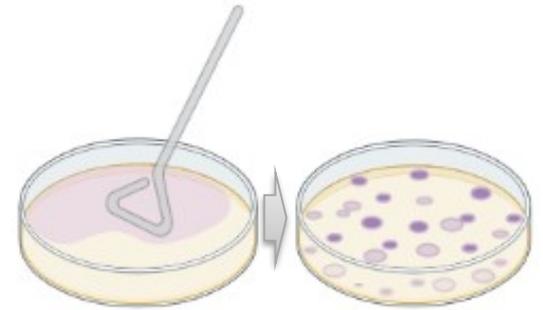
27DS + EDTAの 抗菌スペクトル①

臨床分離株
(10^7 CFU/mL)

+

27DS (0.05 mg/mL)
+ EDTA 0.5 mM

30分培養

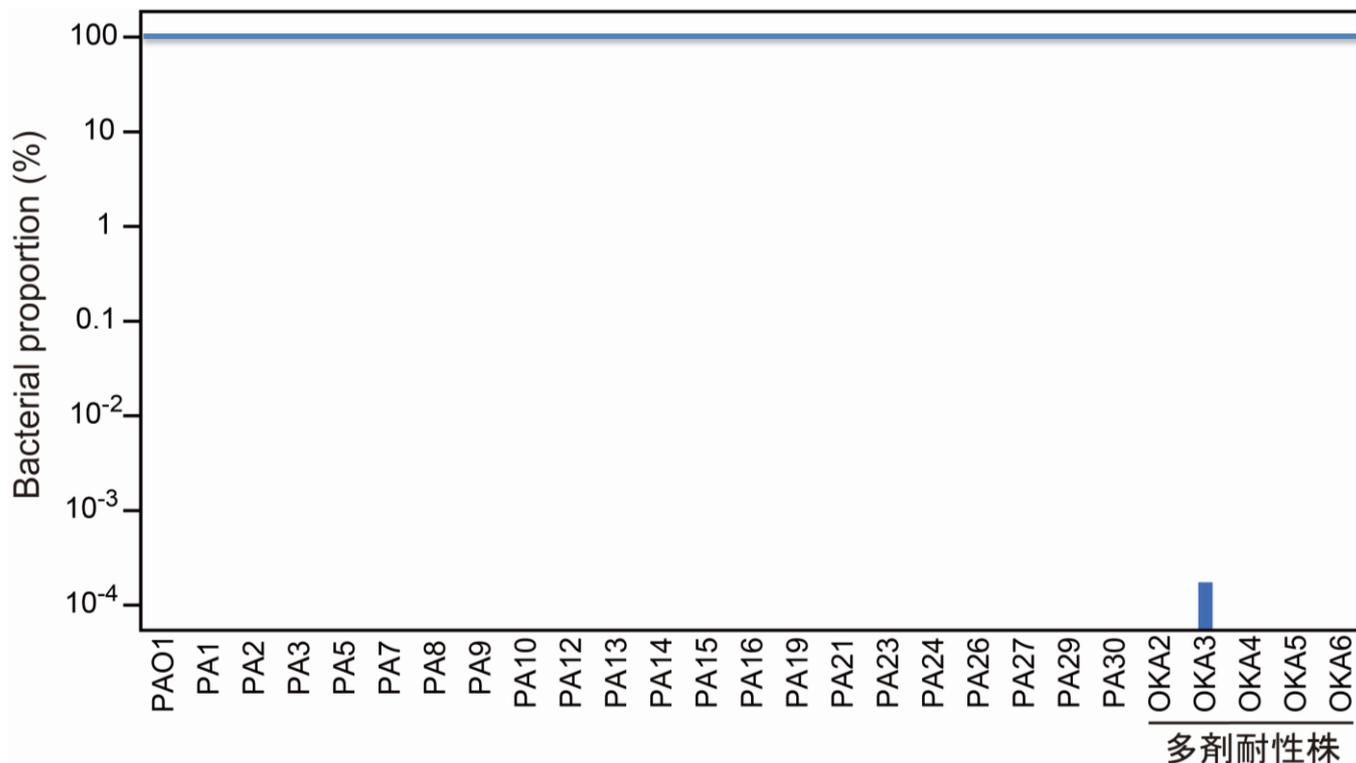


生菌数
を測定



27DS + EDTAの 抗菌スペクトル②

緑膿菌に対する抗菌活性



多剤耐性株を含む緑膿菌臨床分離株
に対して極めて強い殺菌作用を示した。

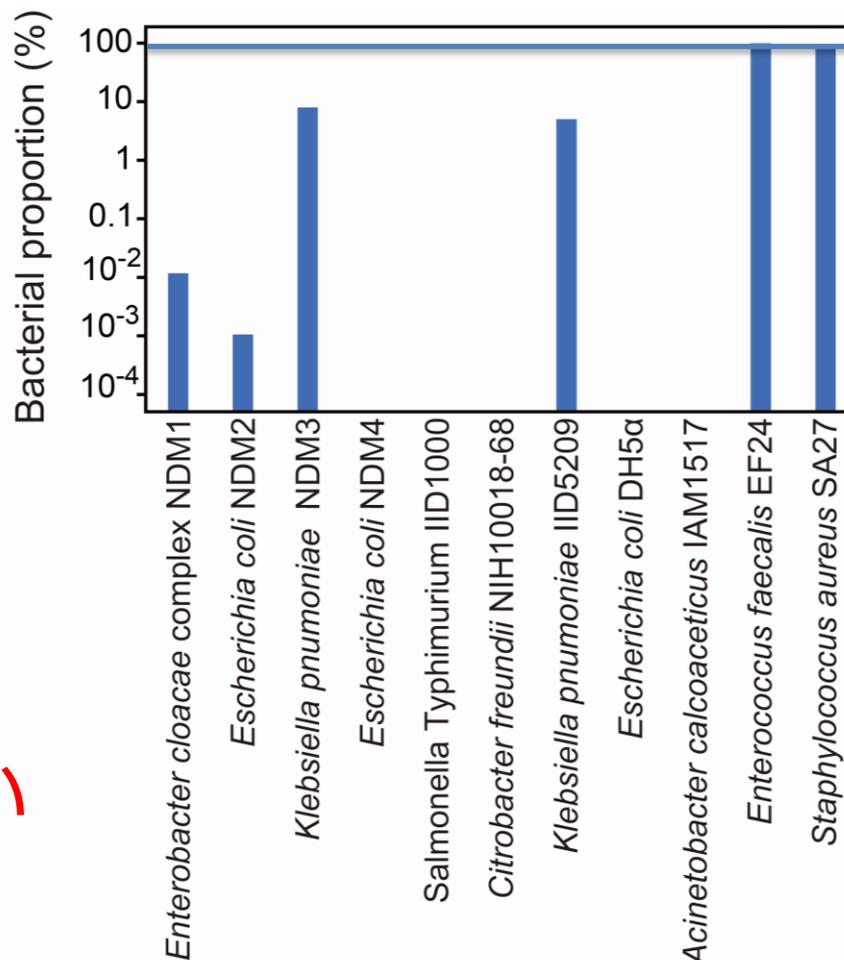


27DS+EDTAの 抗菌スペクトル③

他の細菌種に
対する抗菌活性



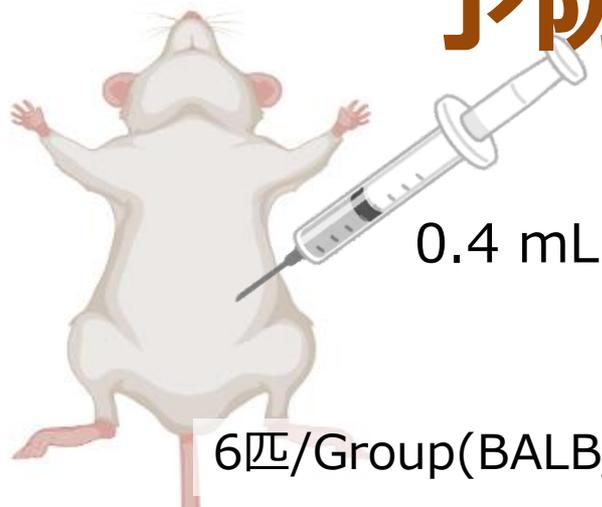
薬剤耐性
グラム陰性桿菌
に対して極めて強い
殺菌作用を示した。



カルバペネム耐性
腸内細菌目細菌



27DSおよび 27DS+EDTAの 予防効果の検討

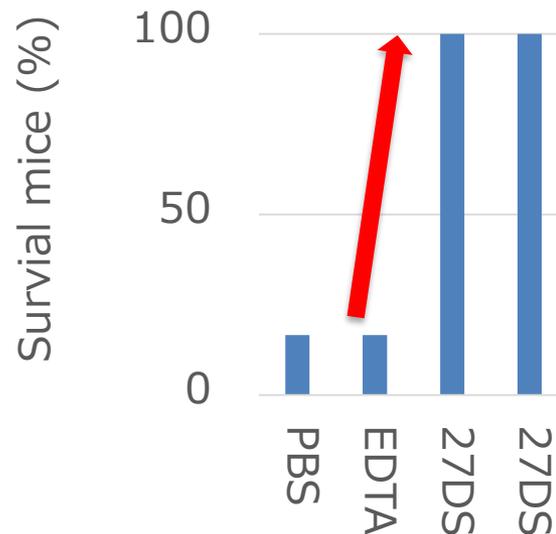


マウスの生存を1週間観察

6匹/Group(BALB/C, ♀, 8 wk)

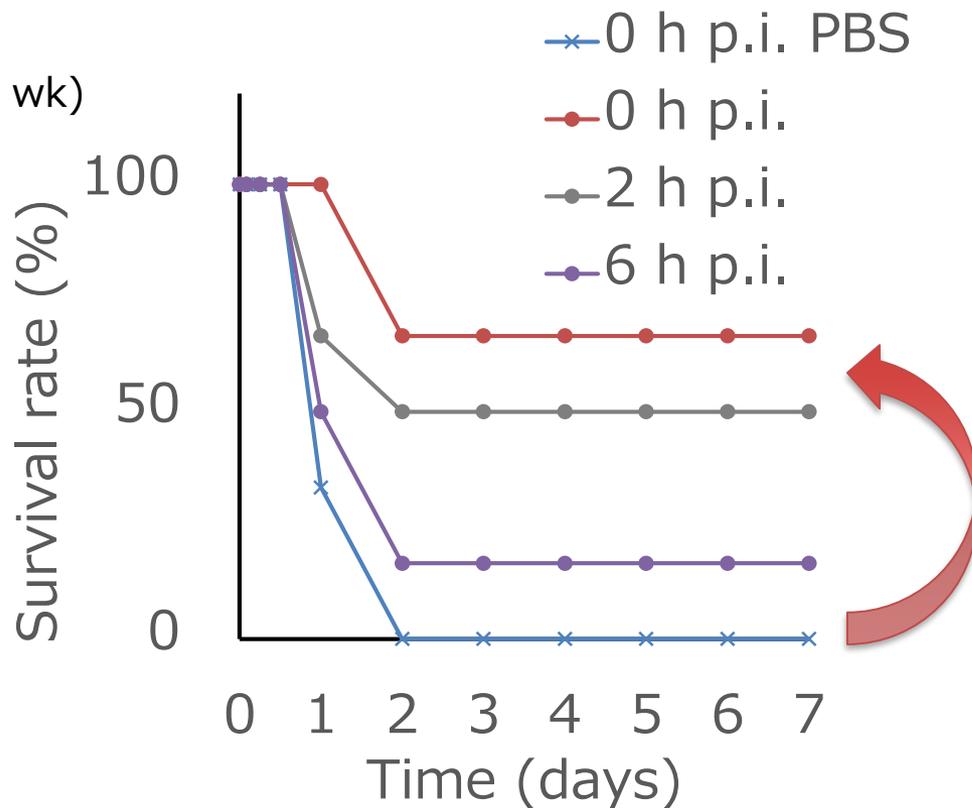
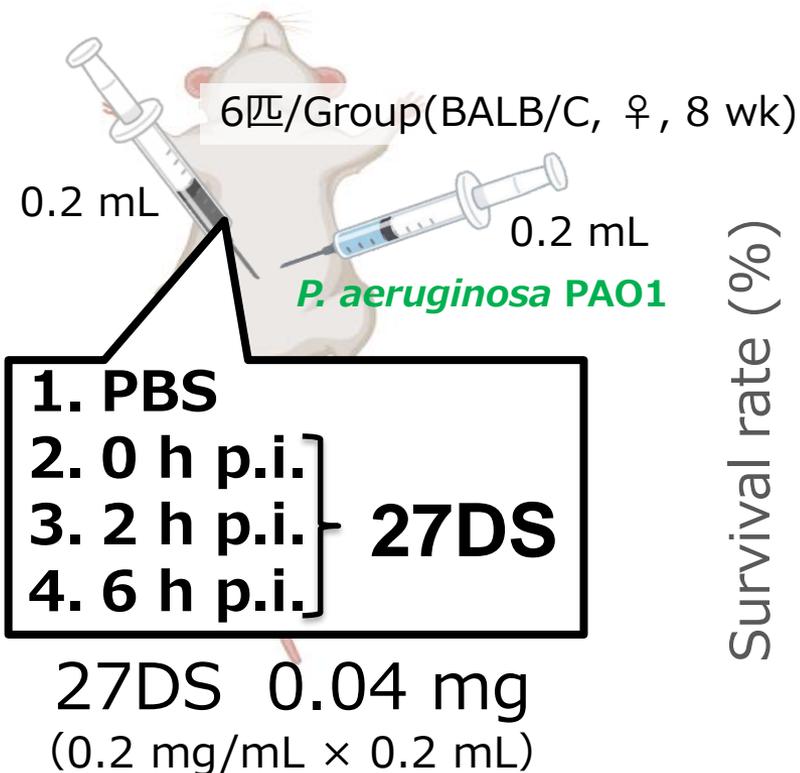
1. *P. aeruginosa* PAO1 + PBS
2. *P. aeruginosa* PAO1 + EDTA
3. *P. aeruginosa* PAO1 + 27DS
4. *P. aeruginosa* PAO1 + 27DS+EDTA

EDTA 1 mM, 27DS 0.1 mg/mL



感染予防に有効。

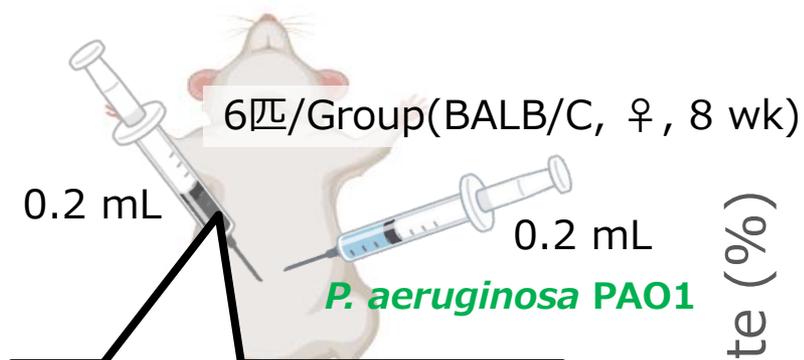
27DSの治療効果



全身感染の治療に有効。

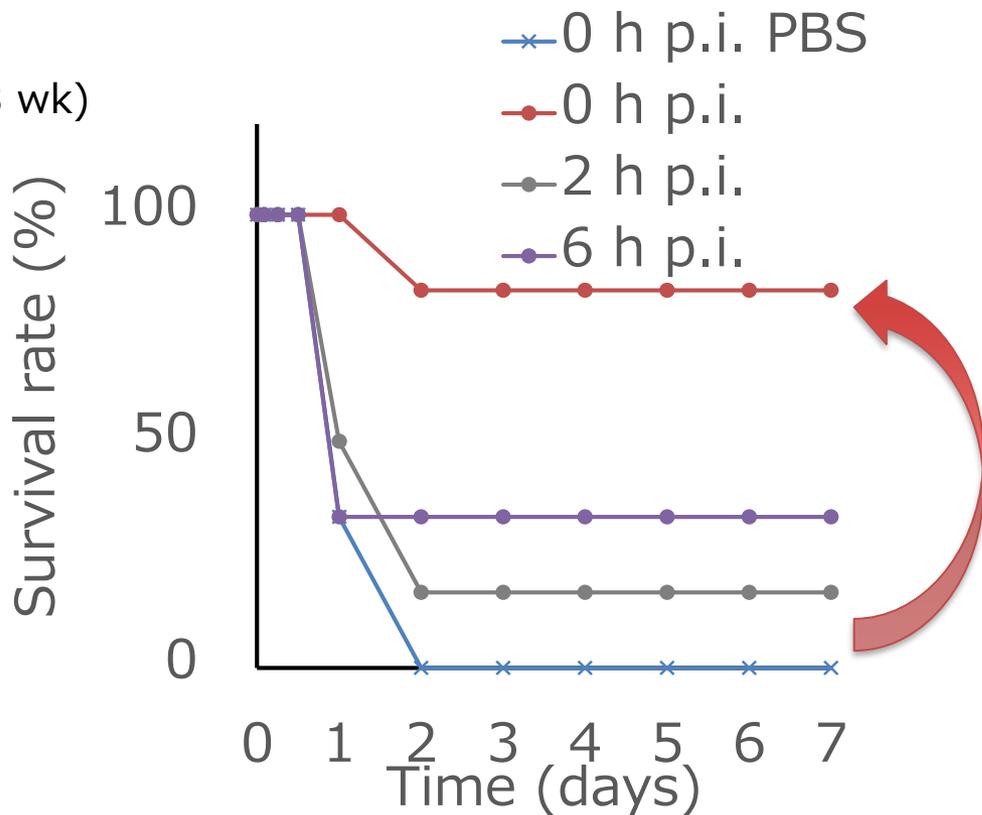


27DS + EDTA の治療効果①



- 1. PBS
- 2. 0 h p.i. } 27DS
- 3. 2 h p.i. } +
- 4. 6 h p.i. } EDTA

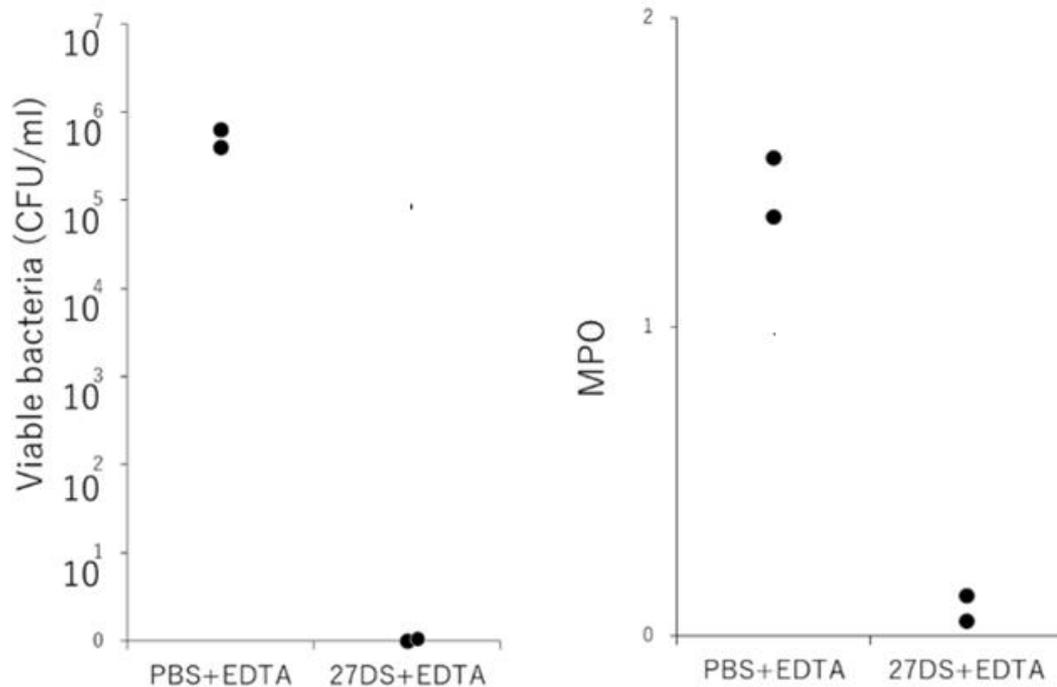
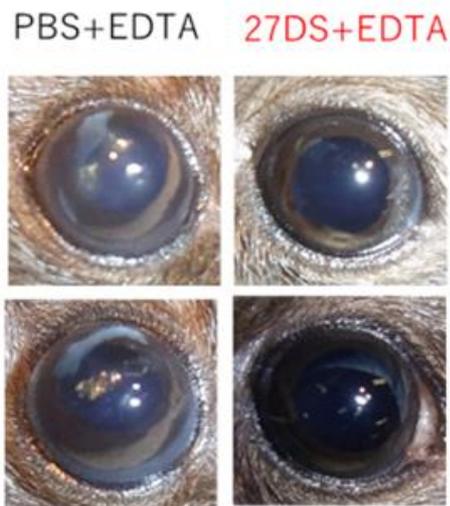
27DS 0.04 mg
EDTA 2 mM



全身感染の治療に有効。



27DS + EDTA の治療効果②



27DS + EDTAは、
局所感染に有効。



まとめ

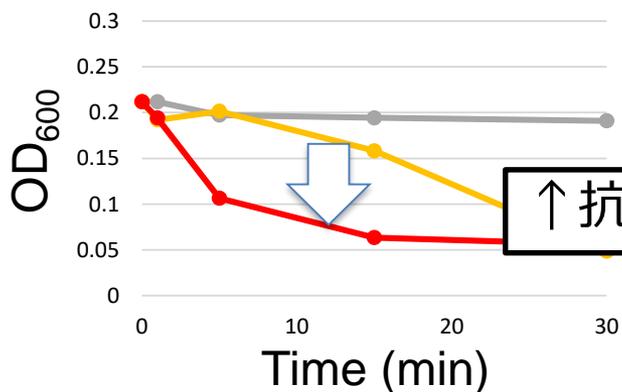
27DSは、

1. 新規人工抗菌酵素である。
2. EDTAと併用で、高い抗菌活性を示す。
3. 薬剤耐性グラム陰性桿菌を殺菌できる。
4. 予防薬として使用できる。
5. 全身・局所感染に治療効果を有する。



今回は、薬剤耐性グラム陰性菌に対する人工抗菌酵素のお話ですが、

薬剤耐性グラム陽性菌に対する人工抗菌酵素も作製しています。



e.g., ↑ 安定性、
↑ 生産性、
↑ 抗菌活性 など



従来技術との比較

	抗菌酵素		人工 抗菌酵素
資源	限定的	➡	これから開拓
抗菌活性	中	➡	高
抗菌 スペクトル	狭～中	➡	狭～広
耐性菌出現率	低		低
安全性	高		高
生産コスト	低～中		低～中
生産ライン	有り		有り



新技術の特徴・ 他の技術との比較

	微生物の2次代謝物など	抗菌ペプチド	人工抗菌酵素	ファージ療法	
				ファージカクテル	GMファージ
	低～中分子	中分子	中～高分子	高分子	
抗菌活性	高	高	中～高	高	高
抗菌スペクトル	中～広	広	狭～中	狭	狭
耐性菌出現率	高	高	低	中	中
安全性	高	低～高	高	中	中
生産コスト	低～中	低～中	低～中	高	高
生産ライン	既に整備されている	既に整備されている	既存を転用可能	ない	ない

想定される用途

- 薬剤耐性を標的とした医薬品（動物・ヒト）
- 医薬部外品（化粧品、コンタクトレンズ保存液 等）
- 選択培地では、雑菌の混入により検査精度の低下を招くことがある。雑菌の増殖抑制に使用できる。（*Microbiology Spectrum*. 9(1), e0007721, 2021.）
- 研究試薬



実用化に向けた課題

- 医薬品として
現在、基礎的薬理試験や開発、対象疾患の探索、薬事戦略相談、人工抗菌酵素の製造（CMC）、非臨床試験（安全性試験）、臨床試験に関して、計画・実施していく必要がある。
- 本技術と企業ニーズのマッチング（ライセンスアウトできる企業を見つける）。



企業への期待

- 27DSの利用に興味を有する企業を希望。
- 新しい標的細菌に対する抗菌酵素や人工抗菌酵素の共同開発を希望する企業を希望。
- マイクロバイオーム編集を考えている企業には、本技術の導入が有用。



27DSに関する知的財産権

- 発明の名称：グラム陰性菌の外膜透過性ポリペプチド、該ポリペプチドを含む抗菌性タンパク質、抗菌剤又は消毒剤、医薬組成物並びに抗菌剤組成物又は消毒剤組成物
- 出願番号：特願2023-108915
- 出願人：岡山大学、高知大学
- 発明者：内山淳平、内山伊代、福田憲、山城健児



お問い合わせ先

岡山大学

研究推進機構 知的財産本部

T E L : 086-251-8417

e-mail : chizai@okayama-u.ac.jp

URL : <https://www.orzd.okayama-u.ac.jp/>

