

氏 名	かま 鎌 井 泰 樹
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2544 号
学位授与の日付	平 成 16 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Studies on Azole Resistance and Virulence of <i>Candida albicans</i> , and Novel Antifungal Agents (<i>Candida albicans</i> のアゾール剤耐性と病原性および新規抗真菌剤に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 植 田 和 光 教 授 加 藤 暢 夫 教 授 植 田 充 美

論 文 内 容 の 要 旨

Candida albicans はヒトの真菌感染症における主要起因菌であり、AIDS 患者の大半が発症するとされる口腔咽頭カンジダ症においては最も分離頻度の高い菌種である。口腔咽頭カンジダ症に対してはアゾール系抗真菌剤である fluconazole が広く用いられているが、長期にわたる治療の結果、アゾール系抗真菌剤に耐性化した *C. albicans* が高頻度で分離されるようになった。このため、アゾール耐性菌に優れた活性を示す新規抗真菌剤が必要とされている。

本論文では、まず本邦の慢性皮膚粘膜カンジダ症より分離されたアゾール耐性 *C. albicans* を用いて耐性機構の解析を行った。次に、新規抗真菌剤のアゾール耐性菌に対する有効性を評価するために、*C. albicans* の病原性に関する基礎的検討に必要なマウス口腔咽頭カンジダ症モデルを確立した。このモデルを用いて新規トリアゾール系抗真菌剤 CS-758 および新規ソルダリン系抗真菌剤 R-135853 のアゾール耐性菌に対する効果を検討し、さらには *C. albicans* の接着因子である *ALS1* の口腔咽頭カンジダ症における病原性への寄与を検討した。本研究の主な内容は以下の通りである。

第一章はアゾール耐性 *C. albicans* の耐性機構の解析について述べている。*C. albicans* のアゾール耐性機構については既に多くのグループによって研究が進み、薬剤排出トランスポーターの発現亢進による細胞内薬剤蓄積量の低下、標的酵素 Erg11p (チトクロム P-450 依存 14 α -sterol demethylase) の薬剤親和性低下が一般的な耐性機構として知られている。しかしながら AIDS 患者の口腔咽頭カンジダ症由来株以外の耐性菌に関する情報は少ないため、本研究では慢性皮膚粘膜カンジダ症由来のアゾール耐性 *C. albicans* の耐性機構について解析を行った。その結果、この株の耐性には ABC タイプのトランスポーターである CDR の発現亢進によると思われる細胞内薬剤蓄積量の低下、および Erg11p のアミノ酸置換 (Y132H, G448V) によると思われる薬剤親和性の低下といった、口腔咽頭カンジダ症由来株で見られるものと同様の機構が関与していることが示された。なお、アゾール耐性との関連は不明であるが、Erg11p の fluconazole 親和性を検討した際に、耐性株由来のチトクロム P-450 が 37°C で不安定であるものの fluconazole 添加により安定化されるといった特徴を見出した。

第二章ではマウス口腔咽頭カンジダ症モデルを確立した結果について述べている。免疫抑制処理を施したマウスの口腔内に *C. albicans* を含んだ綿球を留置するという簡便な手法によって再現性の高い持続性感染が惹起されることを示した。このモデルはヒト口腔咽頭カンジダ症と類似の病理像を現し、fluconazole に対する良好な応答を示した。これらの特徴より、このモデルは新規抗真菌剤の評価および *C. albicans* の病原性研究に有用であると思われる。

第三章では新規トリアゾール抗真菌剤である CS-758 の活性評価について述べている。CS-758 は主要な病原真菌に対して、既存のアゾール系抗真菌剤よりも優れた *in vitro* および *in vivo* 活性を有していた。CS-758 は交差耐性のためにアゾール高度耐性菌に対しては活性が低いものの、耐性度が中程度の菌に対しては優れた活性を保持していることが示された。そこで、種々のアゾール感受性を示す *C. albicans* を用いたマウス口腔咽頭カンジダ症モデルに対する CS-758 の効果を検討したところ、CS-758 は fluconazole が無効である感染症モデルに対しても有効であった。

第四章では新規ソルダリン系抗真菌剤 R-135853 の活性評価について述べている。ソルダリン系抗真菌剤は真菌のタンパ

ク合成に関与する elongation factor 2 を標的とする。R-135853 の *in vitro* 抗真菌活性を検討したところ、特に *C. albicans* に強い活性を示した。アゾール耐性菌に対しても耐性度に関わらず優れた活性を示したことから、本系統の薬剤はアゾール耐性機構の影響を受けにくいと思われた。R-135853 の *in vivo* 活性評価では、fluconazole 耐性 *C. albicans* を用いたマウス食道カンジダ症に対して優れた活性を示した。

第五章では *C. albicans* の接着因子 *ALS1* の病原性に対する寄与をマウス口腔咽頭カンジダ症モデルで検討した結果をまとめている。宿主細胞への接着は *C. albicans* における重要な病原因子と考えられるが、こういった病原因子は有望な新規抗真菌剤の標的となり得るものである。*ALS1* の二重破壊株 (*als1/als1*) を口腔内に接種したマウスでは、接種翌日の口腔組織内生菌数が他の株 (野生株, *ALS1/als1* 株, *als1/als1+ALS1* 株) を接種したマウスに比べて有意に低かった。同様に、マウス舌に対する *ex vivo* 接着試験においても *als1/als1* 株が最も低い接着能を示した。これらの結果より、*ALS1* は口腔咽頭カンジダ症においては感染初期における口腔粘膜への接着に重要な役割を果たすことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

AIDS 患者の口腔咽頭カンジダ症よりアゾール剤に耐性を示す *Candida albicans* が高頻度で分離されている。そのような問題があるにもかかわらず臨床ではその安全性と広い抗真菌スペクトルからアゾール系抗真菌剤が最も広く使用されており、今後もアゾール耐性菌の出現頻度に注意を払う必要がある。現在臨床で使用可能な抗真菌剤は限られており、アゾール耐性菌にも有効な新規抗真菌剤が強く望まれている。本論文ではアゾール耐性の克服を目指し、アゾール耐性機構の解析、抗真菌剤評価や病原性解析のためのマウス口腔咽頭カンジダ症モデルの確立、新規抗真菌剤の活性評価、ならびに *C. albicans* の接着因子 *ALS1* の病原性への寄与について、生化学、分子生物学の手法を使用して検討し、さらに薬理学、病理学的観点からも解析を行ったものである。本論文の評価すべき点は以下のとおりである。

1. 本論文では慢性皮膚粘膜カンジダ症由来のアゾール耐性株を用いてその耐性機構を解析し、CDR トランスポーターの発現亢進によると思われる細胞内薬剤蓄積量の低下と標的酵素 Erg11p の変異による薬剤親和性低下が耐性に関与していることを示した。これらの耐性機構は AIDS 患者の口腔咽頭カンジダ症由来の株で見られるものと同様の機構であったが、非 AIDS 患者由来の耐性株についての情報が得られたことは意義がある。AIDS 患者の口腔咽頭カンジダ症由来株と同様の機構をもつ耐性株が分離されたことで、慢性皮膚粘膜カンジダ症に対する治療薬の使用法に注意を喚起することにもなる。

2. 本論文ではアゾール耐性菌に有効な新規抗真菌剤の開発を目指し、CS-758, R-135853 という新規化合物の評価を行っているが、その評価に先駆けて、まずマウス口腔咽頭カンジダ症モデルを確立した。抗真菌剤の *in vivo* 評価においては、臨床効果が適切に予測可能な真菌症モデル動物を用いることが非常に重要である。アゾール耐性菌に対する有効性を評価するためには、アゾール耐性菌の大半が分離される口腔咽頭カンジダ症のモデルを用いるべきであるとの観点から、本論文において、マウスを用いて高い再現性とヒト病態との類似性を示すモデルが確立された。このモデルでは使用する *C. albicans* の fluconazole 感受性と治療効果とが相関しており、抗真菌剤の臨床での有効性の予測に有用である。このようなモデルを簡便な手法で作成できることを示したことは、新規抗真菌剤の開発において重要な意義をもっている。このモデルを用いて CS-758, R-135853 のアゾール耐性菌に対する活性を評価し、fluconazole 無効のモデルに対してもこれら新規化合物は有効であることを示した。この結果はこれらの新規化合物が臨床においてもアゾール耐性菌に有効であることを強く示唆するものであり、開発が成功した際のアゾール耐性菌に起因する真菌症治療への貢献は非常に大きい。

3. 真菌の病原因子はヒトとの選択性が期待できる有望な新規抗真菌剤標的となり得る。*C. albicans* において、宿主細胞への接着は重要な病原因子である。本論文では *C. albicans* の接着因子のひとつである *ALS1* の病原性への寄与を、*C. albicans* の *ALS1* 遺伝子破壊株およびマウス口腔咽頭カンジダ症モデルを用いて検討した。このモデルを用いた解析、およびマウスの舌を用いた *ex vivo* 接着試験によって *ALS1* は口腔咽頭カンジダ症において、感染初期における口腔粘膜への接着に重要な役割を果たすことが示された。*ALS1* の二重破壊株でも菌接種後の日数が経つにつれて感染の進行が見られ、*ALS1* のみを阻害しても感染の進行を抑制できないことが示唆されたが、本研究は口腔咽頭カンジダ症における *ALS1* の役割を初めて示したものであり、今後の口腔咽頭カンジダ症における *C. albicans* の病原因子の研究に対して大いに参考と

なるものである。

以上のように、本論文は、*C. albicans*におけるアゾール耐性機構を解析し、マウス口腔咽頭カンジダ症モデルの確立することによって、新規抗真菌剤の活性評価がアゾール耐性菌克服のための抗真菌化学療法において重要な意義をもつことを示したものであり、薬理学、医真菌学、病理学の分野に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成16年10月19日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。