

第84回総会ミニシンポジウム

Ⅲ. 抗結核薬の未来は明るいか？ 新薬開発への期待・現状・問題点

座長¹富岡 治明²多田 敦彦

キーワード：抗結核薬，薬剤ターゲット，バイオインフォマティクス，臨床試験

地球規模で見ると、現在、年間の新患者数は約880万人、死亡者数は約160万人と推定されており、年間1,000万人もの人が結核治療を受けているが、多剤耐性結核（MDR-TBやXDR-TB）の増加とHIV感染者での難治性結核の増加が、結核治療をますます困難なものにしている。また、2006年の調査ではわが国の結核登録患者数は約7万人、年間の新登録患者数は約26,000人、死亡者数は約2,300人であり、結核根絶への道はまだまだ険しいものがある。ところが、治療期間の短縮と多剤耐性結核への対策に欠かせない新しい抗結核薬、特に潜伏感染宿主体内に生存している休眠型や、抗菌薬治療に反応して増殖能を極度に低下させるかあるいは欠如するに至った持続型生残型の結核菌に有効な薬剤の開発が遅々として進まないものである。

WHOの調査では、製薬企業が抗結核薬の開発に消極的な理由は、①開発に要する費用と時間、②開発研究そのものの困難さ、③患者の95%以上は発展途上国で発生しているために開発費に見合うだけの収益が望めないことの3点に尽きるようである。しかしながら、欧米で

はTB AllianceやStop TB Partnershipなどのイニシアチブの下に結核根絶を見据えた取り組みが本格化してきており、こうしたプロジェクト活動の今後の成果が期待される。実際に欧米では、bioinformaticsの研究成果に構造活性相関手法をドッキングさせた三次元定量的構造活性相関分析をベースにした抗結核薬の開発のためのdrug targetの探索・評価と、それを応用してのドラッグデザインの先端的な研究が進められている。こうした状況に鑑み、このミニシンポジウムでは、4名のシンポジストに、「臨床の立場から見て、現在どのようなタイプの抗結核薬が必要なのか？」（多田敦彦）、「TMC-207, PA-824, OPC-67683の臨床的有用性に関する情報」（伊藤邦彦）、「前臨床段階にある新規抗結核薬の開発研究の現状とその問題点」（土井教生）、「新しいタイプの抗結核薬開発のためのdrug targetの探索研究の現状」（富岡治明、多田納豊）というテーマでの講演をお願いし、新しい抗酸菌症治療薬の開発に向けての現状と問題点、ならびに新規薬剤開発のための方策について議論を進めた。

1. 臨床の立場から見て、現在どのようなタイプの抗結核薬が必要なのか？

国立病院機構南岡山医療センター呼吸器内科 多田 敦彦

臨床の立場から見て、なぜ、現在、新規抗結核薬が必要なのか、どのようなタイプの抗結核薬が必要なのか、について考察した。

日本における多剤耐性結核（MDR-TB）の頻度は結核

全体の1.9%（新規症例では0.7%、再治療症例では9.8%）、超多剤耐性結核（XDR-TB）は0.5%と報告されている（2002年）¹⁾。この割合から計算すると日本では年間に約80名のXDR-TB患者が発生していることになる。

¹ 島根大学医学部微生物・免疫学、² 国立病院機構南岡山医療センター呼吸器内科

連絡先：富岡治明，島根大学医学部微生物・免疫学教室，〒693-8501 島根県出雲市塩冶町89-1
(E-mail: tomioka@med.shimane-u.ac.jp)
(Received 29 Oct. 2009)

2007年の新規症例における MDR-TB の頻度は1.2%と報告されており²⁾、今後の MDR-TB の増加が懸念される。また、2008年の WHO 報告書によると世界では結核全体の5.3%が MDR-TB と推定されている（新規症例では2.9%、再治療症例では15.3%）³⁾。MDR-TB なかでも XDR-TB の治療率は低く長期の入院生活を強いられ生命予後も不良である。南岡山医療センターにおける MDR-TB 45例の検討では、キノロン薬感受性 MDR-TB では89% (32/36) に排菌停止が認められたが、キノロン耐性 MDR-TB (ほぼ全例 XDR-TB) では22% (2/9) にしか排菌停止は認められなかった。50%生存期間はいったん排菌停止が得られた34例では122.8カ月であったが、排菌停止が得られなかった11例では68.5カ月と比較的短期間であった⁴⁾。以上のような現状からは、MDR-TB、XDR-TB に有効な新規抗結核薬の開発が求められる。

日本では HIV 感染者数の増加とともに HIV/AIDS 合併結核も増加傾向であり、首都圏での日本国籍塗抹陽性入院患者中 HIV 陽性が判明している割合は0.9% (外国国籍を含めると1%) と報告されている⁵⁾。世界では結核患者のうち70万人 (7.6%) が HIV に感染しており20万人が死亡したと推定されている (2006年)⁶⁾。Rifampicin (RFP) は抗 HIV 薬の血中濃度を低下させることが知られており、新規抗結核薬には RFP と同等の抗結核菌活性を有しながら抗 HIV 薬との相互作用がない薬剤が望まれる。

新登録結核患者中外国籍患者の割合は徐々に増加し2008年には3.8%となっている⁷⁾。MDR-TB も HIV/AIDS 合併結核も海外からの流入という要素が今後さらに重要になると予想される。

HRE (S) Z による標準的治療期間は6カ月であるが、日本での実際の結核治療期間は平均10.2カ月 (2005年) と報告されている⁸⁾。その理由としては、日本では Pyrazinamide (PZA) による副作用のリスクが高い80歳以上の割合が26.6%と高いこと⁷⁾、80歳未満でも PZA を加えた4剤処方割合は77.3%に留まること⁸⁾、6カ月よりも長く治療が必要とされている合併症保有者が多いこと (糖尿病ありは新登録患者の12.9%⁹⁾)、喀痰塗抹陽性初回治療者のうち4.6%が5カ月目以降に少なくとも1回は培養陽性であること⁸⁾などが挙げられる。また、国立病院機構50施設の塗抹陽性結核患者4021名の入院期間は平均72.2日であった (2006年)。日本におけるかつての結核治療期間は平均46カ月 (1970年)、結核での入院期間は平均383日 (1955年)¹⁰⁾であったことから比較すればいずれも大幅に短縮されているとは言え、新規抗結核薬の登場によりさらに短縮されることが望まれる。日本での治療中断・脱落例は1.3%と低い⁸⁾が、海外では20%に達する地域もある¹¹⁾。このような地域では治療期

間の短縮は焦眉の課題である。

早期に症状が改善し排菌が陰性化し退院が可能となるためには Isoniazid (INH)¹²⁾ よりも初期抗菌活性に優れた薬剤が必要であり、治療期間を短縮するためには代謝の遅い分裂のゆるやかな菌を RFP よりも強力に殺菌し、さらに静止菌も殺菌しうる薬剤が必要であると考えられる。

PZA を含む初回標準治療においては、肝機能障害の頻度は25.7%、肝機能障害のための治療中止は8.6%と報告されており¹³⁾、重症肝障害の頻度は0.1~0.5%、肝障害による死亡は0.002~0.01%と推定されている¹⁴⁾。臨床現場では、副作用が少ない新規薬剤、高齢者にも副作用の少ない新規薬剤が待たれている。副作用が減少し、高齢者にも標準治療がより安全に行えるようになれば、治療期間の短縮にもつながると考えられる。

また、新規抗結核薬には、経口薬であること (吸入薬でも可)、服用頻度が少なくすむこと (1日1回、できれば週1~2回)、価格が安いことなども臨床現場では新規薬剤に期待している。

非結核性抗酸菌症、特に *M. avium* 症、*M. intracellulare* 症 (MAC 症) は近年増加しているが治療には難渋することが多い。これらの疾患を治療に導きうる薬剤の開発が切望される。新規薬剤は、これらの菌種に対し低い MIC を有すること、高い血中濃度が得られ、肺への薬剤移行が良好であること、細胞内の菌に有効であることなどが期待される。初期抗菌活性もあればよいが、それ以上に代謝の遅い分裂のゆるやかな菌・静止菌に有効であること、さらに、抗 HIV 薬のみならず clarithromycin と相互作用がないことなどが望まれる。

文 献

- 1) Tuberculosis Research Committee (Ryoken): Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Japan: a nationwide survey, 2002. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007; 11: 1129-1135.
- 2) 結核予防会: 「結核の統計 2008」.
- 3) WHO: Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Fourth global report. 2008.
- 4) 多田敦彦, 河田典子, 柴山卓夫, 他: 多剤耐性結核に対する ofloxacin, levofloxacin の *in vitro* 抗菌活性と臨床効果. *結核.* 2006; 81: 337-344.
- 5) 吉山 崇: 首都圏での結核診療機関での HIV 合併結核患者に関する調査. 厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業「アジア太平洋地域における国際人口移動から見た危機管理としての HIV 感染症対策に関する研究」報告書 (主任研究者: 石川信克). 2006.
- 6) Global tuberculosis control — surveillance, planning, financing. WHO Report 2008.
- 7) 結核予防会: 「結核の統計 2009」.
- 8) 大森正子: 発生動向調査に関する研究 平成18年度報告書.

- 9) 厚生労働省：平成19年結核発生動向調査年報集計結果。
 10) 結核予防会：「結核の統計 2002」。
 11) Connolly C, Davies GR, Wilkinson D: Who fails to complete tuberculosis treatment? Temporal trends and risk factors for treatment interruption in a community-based directly observed therapy programme in a rural district of South Africa. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1999; 3: 1081-7.
 12) Jindani A, Aber VR, Edwards EA, et al.: The early bactericidal activity of drugs in patients with pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*. 1980; 121: 939-949.
 13) 近藤有好 (日本結核病学会治療委員会), 岸不盡彌, 渡辺 彰, 他: 抗結核薬の減感作療法に関する提言. *結核*. 1997; 72: 639-642.
 14) 重藤えり子: 抗結核薬による重症肝障害, アンケート調査結果から. *結核*. 2007; 82: 467-473.

2. TMC-207, PA-824, OPC-67683の臨床的有用性に関する情報

結核研究所臨床疫学部 伊藤 邦彦

1. はじめに

現在いくつかの新規抗結核薬候補が臨床試験中であるが、それらの臨床的有用性に関する情報は比較的少なく、また発表されている情報であってもそれらが臨床医にまで届く機会も少ないのではないかとと思われる。

以下は現在臨床試験中の新薬候補で、ある程度まで臨床試験が進行し、またいくらかの情報が入手可能な3つの薬剤 TMC-207, PA-824, OPC-67683の臨床的有用性に関する情報を整理するものである。

2. TMC-207

最初Johnson & Johnsonで開発研究され2005年にScience誌にR207910ないしdiarylquinoline類という名前で公表された化合物である¹⁾。殺菌力は強く、またATP synthase阻害という作用機序からpersisterへの有効も期待され、結核専門家の間に大きな印象を残した。その後開発はJohnson & Johnsonの子会社であるTibotec社に移り現在ではTMC-207と呼ばれることが多い。

抗菌活性はMycobacteriumにほぼ特異的と考えられている。TB complexのほかMAC, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. chelonae*等に対して低いMIC値を示す²⁾。多剤耐性菌を含む結核菌に対するMIC値は0.002~0.13 µg/mlときわめて低く²⁾、しかも400 mg内服時の血中濃度は5.5 µg/ml程度と報告されている³⁾。しかし血中蛋白結合率は99.9%以上といわれており、このとおりであれば血中のフリーの薬剤濃度はMIC値前後になってしまう計算になる³⁾。RFPとの相互作用により血中濃度が低下すると報告されている⁴⁾。

動物実験ではPZAとの併用で強い抗菌力を発揮することが示されている⁵⁾。ヒトでのEBA活性は7日目で1 log fall (cfu/ml) 以下との報告がありINHやRFP (2 log fall (cfu/ml) 弱程度) よりも明らかに劣る³⁾。現在多剤耐性結核を対象にしたphase II b臨床試験が進行中で、最

近この臨床試験のStage Iの結果が公表された⁶⁾。多剤耐性結核に対するbackground regime+TMC-207 vs. background regime+placeboのrandomized control studyの比較で(TMC-207群21人/placebo群23人)での2カ月後の培養(液体培地)陰性化率は48% vs. 9%とTMC-207群で有意に高く、2カ月後までの副作用もTMC-207群で軽度の吐き気が有意に多い以外には特に差を認めなかったとされている。またTMC-207の喀痰中菌減少効果は1週間目以降に顕著になる可能性も示されている。少なくとも多剤耐性結核の治療薬としては、今後大いに期待できる結果である。

3. PA-824 (Nitroimidazopyran)

抗菌作用は結核菌群にはほぼ特異的とされる⁷⁾。多剤耐性菌を含む結核菌のMIC値は0.015~0.25 µg/ml程度と低い⁸⁾。ヒトでの最高血中濃度は500 mg単回投与で1.6 µg/ml, 600 mgの7日間投与で3.8 µg/mlと報告されておりMIC値よりも十分に高い⁹⁾。しかし血中での蛋白結合率は94%との情報があり、血中でフリーの薬剤がpersisterの殺菌に有効な濃度にまで達するかどうかは微妙である¹⁰⁾。RFPとの相互作用はないとされている⁷⁾。

動物実験では2RMZ/1RMと比して2RMZPa/1RMPa, 2MZPa/1MPa, 2RZPa/1RPa (M=moxifloxacin, Pa=PA-824) などでは抗菌力は劣るようで¹⁰⁾、他の報告¹¹⁾¹²⁾とあわせても少なくとも動物実験での治療初期の時点ではPZAやRFP, INHを凌ぐような明らかな効果は見出されていないようである。

現在phase II臨床試験が進行中とされているが、現時点ではEBA活性等を含めて一般に公開されていない。

4. OPC-67683 (Nitroimidazo-oxazole)

標準株に対するMICは0.006~0.012 µg/mlと非常に低く、薬剤耐性菌を含む臨床分離株に対するMIC₉₀値は0.012~0.13 µg/mlとされている¹³⁾。抗菌作用は抗酸菌に

特異的で、PA-824と異なり結核菌群以外に *M. kansasii* にも抗菌活性を有するが、MAC等他のNTMには無効とされている¹⁴⁾。現在 phase II 臨床試験に入っているが、蛋白結合率等を含めヒトでの薬物動態に関する情報は一般に公開されていない。実験からはRFPとの間に相互作用はないものとされている¹³⁾。

動物実験等での drug combination に関する情報は乏しい¹³⁾。ヒトでのEBA活性については一般に公開されていないが、2007年10月のIDSA (アメリカ感染症学会) meetingでのTB Allianceの presentationによると、Day 8での log fall (cfu/ml) は概ね0.5前後ないしそれ以下とされ、INHやRFPよりも明らかに劣るようである¹⁴⁾。

現在、TMC-207と同様のMDRを対象とした2つの phase II b 臨床試験が、エストニア/ラトビア/フィリピン/韓国、および日本/中国で進行中である。途中経過等は一切報告されていない。

5. まとめ

現在までのデータからは、本稿で採り上げた3つの新薬候補の臨床的有用性を議論できる時期ではないようである。しかし強いて、動物実験やEBA活性に関する限られた報告から想像すると、多剤耐性結核の治療薬としては大いに期待しうるように思われるものの、一方上記の新薬が「INHやRFPないしPZAに匹敵する有用性をもっていることが非常に確からしい」とは未だ言い難いと推測される。むろん結核化学療法開発の歴史においてはPZAのような薬剤もあるため、実際にはヒトでの臨床試験の結果を待つほかない。現在われわれにできるのは、今後の臨床試験結果を待つとともに、現在のINH, RFP, PZAを耐性化から守る努力を引き続き最大限に行うことであろう。

文 献

- 1) Andries K, Verhasselt P, Guillemont J, et al.: A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 2005 ; 307 : 223-227.
- 2) Huitric E, Verhasselt P, Andries K, et al.: In vitro antimycobacterial spectrum of a diarylquinoline ATP synthase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 ; 51 : 4202-4204.
- 3) Rustomjee R, Diacon AH, Allen J, et al.: Early bactericidal activity and pharmacokinetics of the diarylquinoline TMC 207 in treatment of pulmonary tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 ; 52 : 2831-2835.
- 4) Lounis N, Gevers T, Van Den Berg J, et al.: Impact of the interaction of R207910 with rifampin on the treatment of tuberculosis studied in the mouse model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Jul 21. [Epub ahead of print]
- 5) Ibrahim M, Andries K, Lounis N, et al.: Synergistic activity of R207910 combined with pyrazinamide against murine tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 ; 51 : 1011-1015.
- 6) Andreas H, Alexander P, Martin G, et al.: The Diarylquinoline TMC 207 for multidrug resistant tuberculosis. *New Eng J Med*. 2009 ; 360 : 2397-2404.
- 7) Anonymous: PA-824. *Tuberculosis (Edinb)*. 2008 ; 88 : 134-136.
- 8) Stover CK, Warrenner P, VanDevanter DR, et al.: A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. *Nature*. 2000 ; 405 (6789) : 962-966.
- 9) Ginsberg AM, Laurenzi MW, Rouse DJ, et al.: Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PA-824 in healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 June 15. [Epub ahead of print]
- 10) Hu Y, Coates AR, Mitchison DA: Comparison of the sterilising activities of the nitroimidazopyran PA-824 and moxifloxacin against persisting *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008 ; 12 : 69-73.
- 11) Nuermberger E, Tyagi S, Tasneen R, et al.: Powerful bactericidal and sterilizing activity of a regimen containing PA-824, moxifloxacin, and pyrazinamide in a murine model of tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 ; 52 : 1522-1524.
- 12) Nuermberger E, Rosenthal I, Tyagi S, et al.: Combination chemotherapy with the nitroimidazopyran PA-824 and first-line drugs in a murine model of tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 ; 50 : 2621-2625.
- 13) Matsumoto M, Hashizume H, Tomishige T, et al.: OPC-67683, a nitro-dihydro-imidazooxazole derivative with promising action against tuberculosis in vitro and in mice. *PLoS Med*. 2006 ; 3 : e466.
- 14) Anonymous: OPC-67683. *Tuberculosis (Edinb)*. 2008 ; 88 : 132-133.

3. 前臨床段階にある新規抗結核薬の開発研究の現状とその問題点

結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部 土井 教生

Global Alliance for TB Drug Development (TB Alliance)

TB Allianceが主導しサポートしているプロジェクトを“mode of action”別により下記に示す。MoxifloxacinとPA-824を除き、他はいずれも前臨床試験段階にある。

1. **DNA GYRASE**: Moxifloxacin, Quinolone TBK-613, Mycobacterial Gyrase Inhibitors.
2. **CELL WALL SYNTHESIS**: InhA Inhibitors.
3. **RIBOSOMES (50S)**: Pleuromutilins.
4. **PROTEASE**: Protease Inhibitors.
5. **ENERGY METABOLISM**: Malate Synthase Inhibitors, Riminophenazines, Energy Metabolism Inhibitors.
6. **MULTIPLE TARGETS**: PA-824, Nitroimidazoles, Multi-functional Molecules.
7. **UNKNOWN TARGETS**: Phenotypic Screening.
8. **OTHER**: GSK Focused Screening.

Working Group on New TB Drugs (WGND)/ Stop TB Partnership/WHO

WGNDの調査による上記以外の新規抗結核薬プロジェクト（2008年進行中）を下記に示す。

1. **Discovery—high throughput screening**: Actinomycete Metabolite Screening & Fungal Metabolite Screening (Univ. Illinois), Persistence Target Discovery/Target Discovery: Phenotypic Screening (Vertex Pharm.), Screen for Synthetic Lethality in *M. tuberculosis* (Johns Hopkins Univ.).
2. **Discovery—hit to lead**: Summit plc. Compounds (The Lilly TB Drug Discovery Initiative), Tuberculosis Protein Kinase Inhibitors (Vertex Pharm.).
3. **Discovery—lead optimization**: Dipiperidines/Homopiperazines and Piperazines (Sequella, Inc.), TL1 Inhibitors (Sequella, Inc.).
4. **Preclinical—candidate selected, animal efficacy studies**: CPZEN-45 (The Lilly TB Drug Discovery Initiative), DC-159a—Quinolone (RIT-JATA), Nano-drug Delivery System for Anti-TB Drugs (CSIR, South Africa), SQ641—Nucleoside-based Capuramycins/SQ73—Ethylenediamine/SQ609—Dipiperidine (Sequella, Inc.).
5. **Advanced preclinical—GLP pharmacology/toxicology in animals**: TB Oxazolidinone PNU-100480 (Pfizer).

6. **Clinical Phase I**: Diamine SQ-109 (Sequella, Inc.), Linezolid (TBTC Study 30: CDC TBTC, Pfizer, various universities), Pyrrole LL-3858 (Lupin Pharm. Inc.).
7. **Clinical Phase II**: Diarylquinoline TMC207 (Tibotec), Rifapentine (TBTC Study 29: CDC TBTC, Sanofi-Aventis), OPC-67683 (Otsuka Pharm. Co.).
8. **Clinical Phase III**: Gatifloxacin-OFLTUB (Lupin, NIAID TB RU, TRC, WHO TDR), Latent TB Infection (TBTC Study 26: CDC TBTC, Department of Veterans Affairs).

まとめ：現状と問題点そして新たな展望

(1) 2008年10月現在、世界では Drug Discovery 20, Preclinical 9, Clinical Testing 10, 合計39のプロジェクトが進行中である。しかし現状はキノロン (MFLX, TBK-613, GFLX, DC-159a) 4プロジェクト, Nitroimidazole (PA-824, OPC-67683, 新Nitroimidazole誘導体) 3プロジェクトが競合しており、科学的判断よりも欧米製薬企業の特許権益を巡る拮抗と緊張関係の許で開発過程が進展している：BMGF基金を背景に米国主導型 (TB Alliance/

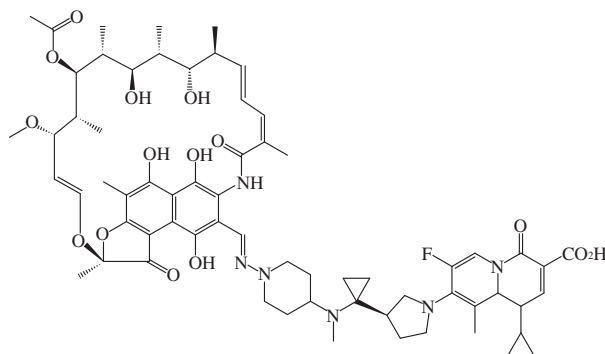


Fig. 1 Multifunctional molecule hybrid antibiotic

CBR-2092: “Rifampicin + Fluoroquinolone”

Poster Presentation No. F1-2101~2108; 47th ICAAC Meeting Chicago, Illinois, Sept. 17–20, 2007 Cumbre Pharmaceuticals Ins. (TB Alliance, University of Auckland & Colorado State University; 2008)

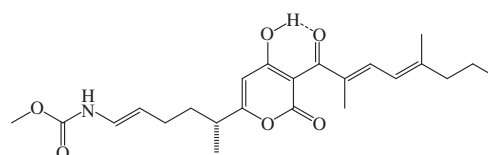


Fig. 2 RNA polymerase (RNAP) “switch region” inhibitors

Myxopyronin (Myx): Polyketide-derived α -Pyrone Antibiotic Mukhopadhyay J, et al. Cell. 2008; 135: 295–307.

CDC)の特許世界戦略の思惑が新薬開発の分野にも色濃く投影されている。

(2) 近年注目を集めているのはMultifunctional Molecules (別名 Hybrid Antibiotic Project) で、異なる複数の抗結核薬剤 (例: RFPと Quinolone) を安定な ligandで結合し1分子1薬剤に合成する新薬開発の試みである; Hybrid Antibioticは構成薬剤を個別に同時投与した場合に比べ *in vivo*で長期持続的かつより強力な抗菌活性を発現することが判明している。2008年現在, TB Alliance, Univ. of

Aucklandと Colorado State Univ. が共同で開発を進めている (Fig. 1); 標的分子は Nitroimidazole 誘導体+Compound-X。

(3) 他方, 既存の Rifamycin系抗菌薬と交差耐性を示さない新規 RNA Polymerase (RNAP) “Switch Region” 阻害剤 Myxopyronin (Myx): Polyketide-derived α -Pyrone Antibioticが見出されている (Mukhopadhyay J, et al. Cell. 2008; 135: 295-307); Myxは Post Rifampicinとして今後の開発の可能性に期待がもたれている (Fig. 2)。

4. 新しいタイプの抗結核薬開発のための drug targetの探索研究の現況

島根大学医学部微生物・免疫学教室 富岡 治明, 多田納 豊

はじめに

現在, 世界の年間の新患者数は約880万人, 死亡者数は約160万人と推定されており, 年間1,000万人もの人が結核治療を受けているが, 多剤耐性結核 (MDR-TBや XDR-TB)の増加と HIV感染者での難治性結核の増加が, 結核治療をますます困難なものにしている。ところが, 治療期間の短縮と多剤耐性結核への対策に欠かせない新しい抗結核薬, 特に潜伏感染宿主体内に生存している dormant type (休眠型) や, 抗菌薬治療に応答して増殖能を極度に低下させるかあるいは欠如するに至った persistent type (持続型生残型)の結核菌に有効な薬剤の開発が遅々として進まないの¹⁾²⁾。しかしながら, 欧米では TB Allianceや Stop TB Partnershipなどのイニシャチブの下に結核根絶を見据えた取り組みが本格化してきており, bioinformaticsや genomicsさらにはこれらの研究成果に構造活性相関 structure-activity relationship (SAR) 手法をドッキングさせた三次元定量的構造活性相関three-dimensional quantitative SAR (3D-QSAR) analysisをベースにしての抗結核薬の開発, 特に dormant typeや persistent typeの結核菌を標的としての drug targetの探索・評価とそれを応用してのドラッグデザインの先端的な研究が進められている。本稿では, bioinformatics, genomics, proteomicsをベースにしての drug targetの探索とそれを応用しての新規結核薬の開発の現状について概説する。

新しい drug targetを基盤とした抗結核薬の開発

結核治療レジメンにおける主要な課題としては, ①DOTSと患者の服薬遵守を促進するための投薬間隔を長くすることのできる薬剤の開発, ②投薬初期に高い殺菌活性を示す薬剤の使用による耐性結核菌の出現阻止, ③

新しいタイプの抗結核薬を用いての休眠型や持続生残型の結核菌の殺菌, などが挙げられる。既存の抗結核薬のほとんどは増殖性の結核菌にしか作用しないため, 持続生残型の結核菌に対する殺菌力が弱く, 現行の薬剤による結核治療には基本的には6カ月以上の長期化学療法が必要である。このことは, しばしば患者の服薬遵守に問題を生じ, ひいては多剤耐性結核菌増加の原因となる。さらに世界的には, 約17億人が結核菌の曝露を受けており, こうした既感染者の体内に生存している休眠型結核菌は, 活動性結核発症の潜在的なリスクとなっている。この休眠型結核菌は生体内において数十年もの間生き残るため, このタイプの結核菌に対して有効な新薬は二次結核予防にきわめて有用である。

特に発展途上国における既感染者からの二次結核の発症を防ぐことの重要性を考えた場合, 休眠型結核菌に対して殺菌作用を示す新しいタイプの薬剤の開発が急務と思われる。こうした新規薬剤のデザインに当っては, 結核菌の増殖能や病原性発現に必要な代謝系や膜透過・膜輸送系といった細胞機能の発現に重要な役割を果たす酵素や制御因子などに照準を当て, そうしたものの中に新しいタイプの drug targetを設定していくのが合理的な戦略と言える。実際に, 既に結核菌の全ゲノムが解明されており³⁾, 結核菌をはじめとする抗酸菌の増殖能や病原性に関わる遺伝子に関する多くの知見も蓄積されてきており, 新しい drug targetに関する研究が近年精力的に進められている⁴⁾⁵⁾。Tableには, 今後の新規抗結核薬開発に有望と考えられる drug targetをリストアップした。

持続性結核菌感染に対する drug target

結核菌の細胞壁は, ミコール酸に富んだきわめて堅牢な構造をしており, そういった構造的特徴は, 結核菌のビルレンスと滞留性の発現に重要である。マクロファー

Table Promising drug targets in *Mycobacterium tuberculosis*

Metabolic pathway	Gene products (gene)	Indispensability for <i>in vitro</i> bacterial growth	Inhibitors	Author (year)
1. Biosynthesis of nucleic acids				
DNA	Ribonucleotide reductase (<i>ndrE, ndrF2, ndrZ</i>)	+		Dawes (2003)
	Thymidylate kinase (<i>dtymk</i>)	+	Bicyclic thymidine analogues	Munier-Lehmann (2001) Vanheusden (2004)
	NAD ⁺ -dependent DNA ligase (<i>ligA</i>)	+	N-substituted tetracyclic indole	Gong (2004) Srivastava (2005, 2007) Korycka-Machala (2007)
	DNA gyrase/type II topoisomerase (<i>gyrA, gyrB</i>)	+	Fluoro-quinolones	Takiff (1994) Aubry (2004)
AMP	Adenosine kinase		2-Methyl-adenosine 3-Deaza-adenosines	Wang (2005) Long (2003, 2006, 2007)
ATP	ATP synthase (<i>atpE</i>)	+	Diaryl-quinolines	Andries (2005) Petrella (2006) Koul (2007) Huitric (2007)
2. Biosynthesis of mycothiol				
	L-cystein: 1-d-myo-inosityl 1-amino-2-deoxy- α -D-glucopyranoside ligase (<i>mshC</i>)	+	NFT1836	Sareen (2003) Sasseti (2003) Newton (2006) Buchmeier (2006)
	Glycosyltransferase (<i>mshA</i>)	+	Oligosaccharide	Buchmeier (2006)
	N-acetyl-1-D-myo-inosityl-2-amino-2-deoxy- α -D-glucopyranoside deacetylase (<i>mshB</i>)	+		Newton (2000, 2006) Maynes (2003)
	Mycothiol synthase (<i>mshD</i>)			Vetting (2003) Buchmeier (2006)
3. Biosynthesis of cell wall components				
Arabinogalactan	Arabinosyl transferase (<i>embA-C</i>)	+	Ethambutol	Belanger (1996) Escuyer (2001) Seidel (2007)
	Arabinofuranosyl transferase (<i>afI</i>)	+	Ethambutol	Cociorva (2005) Alderwick (2006) Seidel (2007)
	UDP-galactopyranose mutase (<i>glf</i>)	+	Uridine analogs	Pan (2001) Sanders (2001) Scherman (2003)
	Phosphoribosyl transferase (<i>Rv3806c</i>)	+		Huang (2005)
	dTDP-glucose dehydratase (<i>rmlB</i>)	+	Rhodanine analogs	Ma (2001) Li (2006)
	dTDP-keto-deoxyglucose epimerase (<i>rmlC</i>)	+	Rhodanine analogs	Ma (2001) Kantardjieff (2004) Li (2006)
	dTDP-deoxyhexulose reductase (<i>rmlD</i>)	+	Rhodanine analogs	Ma (2001)
Mycolic acids	Enoyl-acyl carrier protein (ACP) reductase (<i>inhA</i>)	+	Isoniazid Diazaborine	Banerjee (1994) de Boer (1999) Slayden (2000)
	β -Ketoacyl-ACP synthase (<i>kasAB, fabH</i>)	+	Thiolactomycin	Schaeffer (2001) Musayev (2005) Bhatt (2007)

Table Promising drug targets in *Mycobacterium tuberculosis* (Continued)

Metabolic pathway	Gene products (gene)	Indispensability for <i>in vitro</i> bacterial growth	Inhibitors	Author (year)
	β -Ketoacyl-ACP reductase (<i>mabA</i>)	+	Isoniazid	Cohen-Gonsaud (2002) Ducasse-Cabonat (2004)
	S-adenosylmethionine methyltransferase (<i>mmaA4</i>)	+		Yuan (1995) Glickman (2000) Boissier (2006)
	Cyclopropane synthase (<i>pcaA</i> , <i>cmaA2</i> , <i>mmaA2</i>)	+	Sinefungin	Glickman (2000, 2001, 2003) Guinavarch (2006)
	Polyketide synthase (<i>pks13</i>)	+	Cerulenin	Child (1998) Portevin (2004)
	Acyl-AMP ligase (<i>fadD32</i>)	+		Portevin (2005)
	Acyl-coenzyme A carboxylase (<i>acc</i>)	+	Naphtalene sulpho- nate compound (NCI-65828)	Portevin (2005) Lin (2006) Gago (2006)
Lipoarabinomannan	Polyprenyl monophospho- mannose synthase (<i>ppm1</i>)	+		Gurcha (2002) Guy (2004)
	Mannosyltransferase (<i>pimB</i> , <i>pimF</i>)	+		Schaeffer (1999) Alexander (2004)
Phosphatidyl- inositol- mannoside	Phosphatidylinositol mannosyltransferase (<i>pimA</i>)	+	Galactose-derived phosphonate analogs	Guerin (2005) Dinev (2007)
Phthiocerol dimycocerosate esters	Phthiocerol dimycocerosyl transferase (<i>papA5</i>)	+		Cox (1999) Buglino (2004)
	Mycocerosic acid synthase (<i>mas</i>)	+		Sirakova (2002)
	Acyl coenzyme A synthase (<i>fadD28</i>)	+		Sirakova (2002)
Peptideglycan	Alanine racemase (<i>alr</i>)	+	D-cycloserine	LeMagueres (2005)
	D-Ala-D-Ala ligase (<i>ddl</i>)	+	D-cycloserine	Feng (2003)
4. Enzymes in the glyoxylate shunt pathway				
	Isocitrate lyase (<i>icl1</i> , <i>icl2</i> , <i>aceA</i>)	+	Nitropropionate Itaconate	Honer (1999) Sharma (2000) Munoz-Elias (2005) Gould (2006)
	Malate synthase (<i>glcB</i>)	+		Smith (2003) Kinhikar (2006)
5. Regulatory proteins and stringent response enzymes				
	Adenylyl transferase (<i>glnE</i>)	+		Parish (2000)
	Uridyl transferase (<i>glnD</i>)	+		Read (2007)
	MtrA response regulator (<i>mtrA</i>)	+		Zahrt (2000) Fol (2006)
	Iron-response regulator (<i>ideR</i>)	+		Rodriguez (2002) Chou (2004) Ranjan (2006) Wisedchaisri (2007)
	DosR regulator protein (<i>dosR</i>)	+		Boon (2002) Roupie (2007)
	Rel protein (<i>rel</i>)	+		Dahl (2005) Jain (2006)

Modied from Ref.16. MΦ: Macrophage.

ジ (MΦ) のファゴソーム内に局在する結核菌は、こうした強固な細胞壁を防御壁として、MΦの殺菌エフェクター分子による攻撃に対して強い抵抗性を発揮する。これに関連して、superfine cord形成能を欠いたコロニー形態を示す変異体をスクリーニングすることにより、*pcaA* 遺伝子にコードされる methyl transferase (PcaA) が結核菌のビルレンス因子の一つとして同定されている。PcaAはミコール酸にシクロプロパン基を1つ付加するが、このようなミコール酸の修飾は結核菌の活発な増殖期から静止期へと移行する際に起こることが明らかになった。特にシクロプロパン化されたミコール酸は、病原性抗酸菌の細胞壁の主要な構成成分となっており、これにより、結核菌の活性酸素分子種 (ROI) への抵抗性が増強することが報告されている⁶⁾。結核菌の *pcaA* 変異体はマウスにおいて正常な増殖能を示すものの滞留性が低下するので、PcaAは新規抗結核薬の target として有望である。

ところで、結核菌細胞壁中の主要な脂質成分は lipoarabinomannan (LAM), phthiocerol dimycoserolate (PDIM) ファミリーに属する糖脂質、6,6'-trehalose dimycolate などであるが、特に mannosylated LAMには、IFN- γ による MΦ活性化に対する抑制作用や、MΦから産生された ROIを消去する作用などが知られている。他方、宿主の肺内での結核菌の増殖には、PDIMの合成と輸送が必要であるところから⁷⁾、LAMやPDIMの生合成酵素やPDIMを菌体表面に輸送するための膜輸送体蛋白が、新規抗結核薬の drug target として有望である。

また、L-ラムノース基は、ミコール酸がエステル結合したアラビノガラクトタンとペプチドグリカンから成る mAGP複合体形成に必須の役割を果たしている。mAGP複合体は、化学的障害や殺菌性の物質に対しての強い防壁となることから、菌体内で dTDP と glucose-1-phosphate から dTDP-rhamnose を合成する4種の Rml酵素 (RmlA~RmlD) は新規抗結核薬の drug target として期待できる⁸⁾。最近、Kantardjieffらは、RmlC (Rv3465) が構造的にユニークで基質特異性も高く補因子も必要としないところから、dTDP-rhamnose経路中で最も有望な drug target であると報告している⁹⁾。また Maらは、RmlB-Dの酵素活性を10 mM濃度で阻害できるような活性を示す11種の薬剤を8,000種類の化合物の中からスクリーニングしているが、これら Rml阻害剤の1つ (化合物 No.5372) は、結核菌に対して MIC=16 μ g/mlと、ある程度の抗菌活性を示すことが報告されている⁸⁾。

結核菌および宿主細胞のシグナル伝達に関する drug target

病原性抗酸菌は、ファゴソームの成熟化、アポトーシ

スや免疫反応を阻害するなど、宿主 MΦのシグナル伝達経路を修飾することにより、宿主細胞内での生存・増殖を可能にしている。最近、Walburgerらにより、宿主細胞のシグナル伝達系に作用を及ぼす病原因子として serine/threonine protein kinase G (PknG) が同定された¹⁰⁾。病原性のある抗酸菌は、PknGタンパクを感染した MΦのファゴソーム内に分泌し、宿主 MΦのシグナル伝達系への介入によって、MΦ内でのファゴソーム-リソソーム融合を阻害し、ひいては MΦ内での生き延びを図っているものと考えられる。また、Székelyらは、Nasted Chemical LibraryTM (NCL) kinase inhibitory libraryのなかの1000の化合物についてスクリーニングを行い、PknG阻害活性のある化合物 AX20017 (tetrahydrobenzothiothiophene) およびその誘導体 AX33510と AX14585を見出しており¹¹⁾、今後の開発研究の進展が大いに期待される。

おわりに

以上、bioinformatics, genomics, ならびに proteomics をベースにした新しいタイプの drug targetの探索と、それを応用しての新規結核薬の開発の現状について概説した。現在は、drug targetとして有望な蛋白質の立体構造を高分解能で解析することが可能であり、とりわけ休眠型や持続生残型の結核菌に有効な抗結核薬の開発を企図しての、これらの drug target に対する阻害剤の開発が進行中であるが^{12)~15)}、3D-QSAR analysisとのドッキングにより優れた抗結核薬の開発が加速されるものと思われる。このような bioinformatics と有機化学・量子化学的手法をベースにした3D-QSAR analysisを駆使した手法によるアプローチは、新規抗結核薬の開発にきわめて有用であると考えられるが¹⁶⁾、現時点では、こうした取り組みは世界的に見てもその端緒についたばかりであり、今後の開発研究の進展が大いに期待される。

文 献

- 1) Tomioka H: Current status of some antituberculosis drugs and the development of new antituberculous agents with special reference to their *in vitro* and *in vivo* antimicrobial activities. *Curr Pharm Des.* 2006; 12: 4047-4070.
- 2) Janin YL: Antituberculosis drugs: ten years of research. *Bioorg Med Chem.* 2006; 15: 2479-2513.
- 3) Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al.: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 1998; 393: 537-544.
- 4) Glickman MS, Jacobs WR: Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: Dawn of a discipline. *Cell.* 2001; 104: 477-485.
- 5) Mdluli K, Spigelman M: Novel targets for tuberculosis drug discovery. *Curr Opin Pharmacol.* 2006; 6: 459-467.
- 6) Yuan Y, Lee RE, Besra GS, et al.: Identification of a gene

- involved in the biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci USA. 1995 ; 92 : 6630–6634.
- 7) Cox JS, Chen B, McNeil M, et al.: Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. Nature. 1999 ; 402 : 79–83.
 - 8) Ma Y, Stern RJ, Scherman MS, et al.: Drug targeting *Mycobacterium tuberculosis* cell wall synthesis: genetics of dTDP-rhamnose synthetic enzymes and development of a microtiter plate-based screen for inhibitors of conversion of dTDP-glucose to dTDP-rhamnose. Antimicrob Agents Chemother. 2001 ; 45 : 1407–1416.
 - 9) Kantardjieff KA, Kim CY, Naranjo C, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* RmlC epimerase (*Rv3465*): a promising drug-target structure in the rhamnose pathway. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2004 ; 60 : 895–902.
 - 10) Walburger A, Koul A, Ferrari G, et al.: Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. Science. 2004 ; 304 : 1800–1804.
 - 11) Székely R, Wácsek F, Szabadkai I, et al.: A novel drug discovery concept for tuberculosis: inhibition of bacterial and host cell signalling. Immunol Lett. 2008 ; 116 : 225–231.
 - 12) Kantardjieff K, Rupp B: Structural bioinformatic approaches to the discovery of new antimycobacterial drugs. Curr Pharm Des. 2004 ; 10 : 3195–3211.
 - 13) Smith CV, Dharma V, Sacchettini JC: TB drug discovery: addressing issues of persistence and resistance. Tuberculosis (Edinb). 2004 ; 84 : 45–55.
 - 14) Tomioka H: Development of new antituberculous drugs: strategies for new drug targets and drug delivery. Drug Design Rev. 2005 ; 2 : 427–434.
 - 15) Tomioka H, Tatano Y, Yasumoto K, et al.: Recent advances in anti-tuberculous drug development and novel drug targets. Expert Rev Resp Med. 2008 ; 2 : 455–471.
 - 16) Tomioka H: Development of new antituberculous agents based on new drug targets and structure-activity relationship. Exp Opin Drug Discov. 2008 ; 3 : 1–29.

————— The 84th Annual Meeting Mini-Symposium —————

CAN WE HAVE ADEQUATE CHEMOTHERAPY REGIMENS
FOR TUBERCULOSIS IN THE FUTURE ?

— Current Status and Future Prospects for Development of New Antituberculous Drugs —

Chairpersons: ¹Haruaki TOMIOKA and ²Atsuhiko TADA

Abstract Worldwide, tuberculosis (TB) remains the most frequent and important infectious disease causing morbidity and death. One-third of the world's population is infected with *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), the etiologic agent of TB. The World Health Organization estimates that about eight to ten million new TB cases occur annually worldwide and the incidence of TB is currently increasing. In this context, TB is in the top three, with malaria and HIV being the two other leading causes of death from a single infectious agent. Approximately 1.6 million deaths are attributable to TB annually. In Japan, there were 70,000 TB patients including 26,000 new TB cases and 2,300 deaths in 2006. In order to combat TB, it is urgently desired to develop new antituberculous drugs which are active against multidrug-resistant MTB and moreover efficacious in decreasing the periods of chemotherapy. In particular, we urgently need new drugs that display strong sterilizing activity *in vivo* against slowly metabolizing and, if possible, dormant and/or persistent populations of MTB organisms that cause relapse. Unfortunately, no such new and useful drugs other than rifabutin and rifapentine have been marketed for TB in the US and other countries during the 40 years since the release of rifampicin.

There are a number of constraints that have deterred companies from investing in new anti-TB drugs. Research is

expensive, slow and difficult, and requires specialized facilities for handling MTB. There are few animal models that closely mimic the human TB disease. A long development time will be required for any new anti-TB drug. In fact, clinical trials will require a minimum of six-months of therapy, with a follow-up period of one year or more. In addition, it is hard to demonstrate an obvious benefit of a new anti-TB agent over pre-existing drugs, since clinical trials involve multidrug combination therapy using highly effective ordinary anti-TB drugs. Finally, there is a perceived lack of commercial return to companies engaged in the development of new anti-TB drugs, because over 95% of TB cases worldwide are in developing countries. At present, several new promising antituberculous agents are being developed on the initiative of the TB Alliance and Stop TB Partnership with a view of eradicating TB worldwide in the near future. Indeed, in the US and some European countries, research and clinical trials for the bioinformatics-based development of novel antituberculous are currently proceeding. In particular, attempts for drug design using a three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D-QSAR) analysis based on genomics and proteomics on the novel drug targets of MTB pathogens are very promising. A great advance in the fundamental and practical studies is needed to promote the development of such kinds of

new anti-TB drugs in the near future.

In this symposium, we reviewed the following areas.

1. Dr. Atsuhiko TADA (Department of Internal Medicine, National Hospital Organization Minami-Okayama Medical Center) reviewed antituberculous drugs that can fully meet the requirement of physicians engaging in the clinical control of tuberculosis. Increase in incidence of MDR-TB and XDR-TB is the major problem. It is expected that new effective antituberculous drugs improve the treatment of MDR-TB and XDR-TB. Because the rate of co-infection with HIV is increasing, new antituberculous drugs that do not interact with anti-HIV drugs are needed. Clinicians require new antituberculous drugs with early bactericidal activity superior to that of INH and more efficacious against slow-growing or dormant MTB organisms than RFP. New drugs are also expected to be less toxic and less expensive.

2. Dr. Kunihiko ITO (Research Institute of Tuberculosis, JATA) reviewed the clinical usefulness of TMC-207, PA-824, and OPC-67683. Information about the clinical usefulness of these new agents has been relatively limited to date. The available information was summarized in this session. Generally those three drug-candidates seem to be very promising in the treatment of multi-drug resistant tuberculosis. However, it is not certain whether these agents have the same degree of anti-tuberculosis effects as the first-line drugs, isoniazid, rifampicin, and pyrazinamide.

3. Dr. Norio DOI (Department of Mycobacteria References and Research, Research Institute of Tuberculosis, JATA) reviewed the present status and issues of a few antituberculous drug candidates other than the agents currently being

clinically tested. According to the Working Group on New Anti-TB Drugs/StopTB Partnership/WHO, preclinical 9 and new drug discovery 20 projects are in progress. Among these, quinolones, nitrofuranylamides, hybrid antibiotics and post rifampicin RNA-polymerase-inhibitor myxopyronin appear to be promising. In preclinical stage compounds, new respiratory quinolone DC-159a, CPZEN-45 and capuramycin were synthesized in Japan. Aerosol drug (PA-824, Capreomycin, etc.) projects for inhalation therapy might develop a new route of administration in the future.

4. Dr. Haruaki TOMIOKA and Dr. Yutaka TATANO (Department of Microbiology and Immunology, Shimane University School of Medicine) reviewed recent advances in antituberculous drug development with special reference to novel drug targets. Newly elucidated, critical information on the entire genome of MTB and advances in knowledge regarding various mycobacterial virulence genes are promoting the identification of genes that code for new drug targets. Against this background, the future development of new antituberculous drugs is discussed in relation to potential pharmacological targets of MTB in the present article.

Key words: Antituberculous drugs, Drug targets, Bioinformatics, Clinical studies

¹Department of Microbiology and Immunology, Shimane University School of Medicine, ²National Hospital Organization Minami-Okayama Medical Center

Correspondence to: Haruaki Tomioka, Department of Microbiology and Immunology, Shimane University School of Medicine, 89-1, Enya-cho, Izumo-shi, Shimane 693-8501 Japan. (E-mail: tomioka@med.shimane-u.ac.jp)