

第85回総会教育講演

Ⅲ. 抗結核薬開発の現況と展望

—新しい drug target の探索—

富岡 治明

要旨：多剤耐性結核と 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おり、治療期間の短縮と多剤耐性結核への対応に欠かせない新規抗結核薬、特に休眠型の結核菌に有効な薬剤の開発が希求されている。本稿では、現在までの新規抗結核薬の開発状況と、bioinformatics 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。

キーワード：結核菌、多剤耐性結核、抗結核薬、薬剤ターゲット、休眠型結核菌

はじめに

1999年のわが国での「結核緊急事態宣言」はまだ記憶に新しいが、2007年の厚生労働省の調査では結核登録患者数は約64,000人、年間の新登録患者数は約25,000人、罹患率は人口10万対19.8、死亡者数は約2,200人であり、わが国での結核根絶への道はまだまだ険しいものがある。他方、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¹⁾。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、抗菌薬治療に应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)の結核菌に有効な抗結核薬の開発は遅々として進んでいない²⁾³⁾。結核治療にrifampicinが導入されてから40年以上がたつが、新リファマイシン系薬剤の開発、あるいは一般細菌感染症の治療薬として開発されたキノロン薬の結核への適用拡大以外には、これといった有望な抗結核薬の登場を見ぬままに時の経過を見ている。近年、結核菌に対する抗菌活性を有する数多くの新規抗菌薬が報告されてきているが、このうちで実際に

臨床試験に供されているのは、diarylquinoline TMC207, nitroimidazopyran PA-824, nitroimidazooxazole OPC-67683, pyrrole LL3858, ethylene diamine SQ-109, oxazolidinone (linezolid, PNU-100480)などと依然として少数にすぎず、その前途は決して明るいものとは言えない²⁾。こうした状況を踏まえ、最近では結核の医療環境を整えるための取り組みが活発になってきており、結核病学会が中心になり「結核医療基準の見直し—2008年」がup-dateされ、2008年にはわが国でもrifabutinが承認された。既に結核菌の全ゲノムが解明され、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、新規抗結核薬開発のための新しいdrug targetに関する研究が近年精力的に進められている⁴⁾。さらに現在は、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になってきており、これらのdrug target蛋白質に対する阻害剤の開発が進行中であるが、三次元構造活性相関(3D-QSAR) analysisとのドッキングにより、今後の新規抗結核薬の開発が加速されるものと期待される^{5)~8)}。本稿では、現在までの新規抗結核薬の開発状況と、新しいタイプの抗酸菌症治療薬の開発に資するようなdrug targetの探索について概説したい。

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代謝の遅い結核菌や再燃の原因となる休眠型の結核菌の殺菌、などが挙げられる⁹⁾¹⁰⁾。既存の抗結核薬の本質的な欠点の1つは、それらが主に増殖性の結核菌を標的としている点にあることは周知のとおりであり、一般に結核の治療には、再発のリスクを減らすため、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の中断を招き、ひいては多剤耐性結核菌の出現と増加の原因となる。さらに世界的には、約20億人が結核菌の曝露を受けており、活動性結核へ進展する潜在的なリスクとなっている。休眠型の結核菌は生体内において数十年もの間生き残るため、休眠型結核菌に対して有効な新薬は二次結核の予防にきわめて有用であると言える。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、休眠型の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である。

現在までに、結核菌に対する抗菌活性を有する多くの新規抗菌剤が報告されてきている。その主なものをTable 1にリストアップした。しかしながら、現時点で臨床試験に供されてきているのは、TMC207, PA-824, OPC-67683, LL3858, SQ-109, linezolidなどのほんの少数にすぎず、その前途は明るいものとは言えない現状にある。新しいタイプの抗結核薬の開発においては、結核菌の増殖能や病原性発現に必要な代謝系や膜透過・膜輸送系に重要な役割を果たす酵素蛋白や制御因子などに加え、結核菌が感染した宿主マクロファージの細胞内シグナル伝達系に cross-talk して宿主細胞の代謝系を攪乱するような機能をもつ protein kinase などにも照準を当て、そうしたもの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。これに関連して、既に結核菌の全ゲノムが解明されて⁴⁾¹¹⁾、結核菌をはじめとする抗酸菌の病原性遺伝子に関する知見も蓄積されてきており、新しい drug target の候補になる遺伝子の検索・同定が進められている。現在は、病原性遺伝子にコードされている蛋白の立体構造を高分解能で解析することが可能となり、とりわけ休眠型の結核菌に有効な抗結核薬の開発を企図しての、これらの蛋白に対する阻害剤の開発が進行中である^{9)5)7)12)~14)}。このような bioinformatics 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。Table 2には、結核菌の病原因子との関連で有望と考えられる drug target をリ

ストアップしたが、特に興味深い drug target について以下に概説したい。

持続生残型・休眠型結核菌に対する drug target

結核菌が宿主内で persister となるメカニズムが解明されれば、持続生残型や休眠型の結核菌をターゲットにした新しいタイプの抗結核薬をデザインすることが可能になり、それにより再発の頻度が抑えられ、抗結核化学療法の治療期間の短縮が達成される。特に、休眠型の結核菌に対して有効な抗結核薬を予防投与することにより、世界の20億人の既感染者、特に HIV 感染者などのハイリスク群での二次結核の発症率を減少させることができる。以下に持続性結核菌感染に対する drug target として有望な酵素蛋白を挙げた。

(1) グリオキシル酸回路酵素

持続感染状態にある結核菌では、グリオキシル酸回路が up-regulate されており、他方、解糖系は抑制されている。これにより結核菌は、脂肪酸の β 酸化によって C2 化合物を炭素源として利用できるようになる。これに連動して、嫌気的環境下やマクロファージ内で結核菌が増殖する際にグリオキシル酸回路の isocitrate lyase (Icl) が up-regulate される。結核菌の Δicl 変異体のマウス生体内での感染後2週間までの増殖動態は、野生型の結核菌と比べて差異は認められないが、宿主の結核菌抗原への細胞性免疫の成立後は、 Δicl 変異体は速やかに排除されていくことが報告されている¹⁵⁾。さらに、icl 遺伝子は非刺激マクロファージではなく活性化マクロファージ内での結核菌の生存に必要なことも明らかにされており、icl 遺伝子は生体内における結核菌の滞留性に重要な役割を果たしていると考えられる¹⁵⁾。ヒトやその他の動物では、グリオキシル酸回路は機能していないため、Icl 蛋白は drug target としてかなり有望であると考えられる。また、aceA 遺伝子や glcB 遺伝子にコードされる isocitrate lyase や malate synthase も結核菌の滞留性に必要であると考えられており¹⁶⁾、これらの酵素も新規抗結核薬開発のための drug target として期待できる。

(2) シクロプロパン合成酵素

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。マクロファージ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バリアーとして、マクロファージ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とができる。最近、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

Table 1 Promising new anti-TB drugs in clinical studies

Agents	Remarks	References (Authors)
Nitroimidazoles		
Nitroimidazopyran (PA-824, PA-1343)	Excellent <i>in vitro</i> activity against MDR-MTB (MIC=0.03 to 0.25 $\mu\text{g/ml}$) Active against non-replicating MTB by intracellular nitric oxide release Good <i>in vivo</i> activity against MTB infection in mice Conversion to the active form by mycobacterial redox systems (?) Inhibitory action against mycolic acid biosynthesis RNI-mediated bactericidal activity PA-1343 has oral bioavailability. PA-824 is in a phase 2 study.	Stover (2000) Tyagi (2005) Lanaerts (2005) Nuermberger (2008) Tasneen (2008) Singh (2008) Ginsberg (2009)
Nitroimidazooxazoles (OPC-67683)	Excellent <i>in vitro</i> activity against INH or RIF resistant MTB (MIC=0.006 $\mu\text{g/ml}$) Inhibitory action against mycolic acid biosynthesis Bactericidal action against drug-tolerant MTB Good <i>in vivo</i> activity against MTB infection in mice OPC-67683 is in a phase 2 study.	Matsumoto (2006) Sasaki (2006) Saliu (2007)
Diarylquinoline TMC207 (R207910)		
Diarylquinoline TMC207 (R207910)	Excellent <i>in vitro</i> activity against drug-resistant MTB (MIC=0.01 to 0.09 $\mu\text{g/ml}$) Good <i>in vivo</i> activity against MTB infection induced in mice and guinea pigs Inhibitory action against ATP biosynthesis Exhibits bactericidal action against dormant MTB by inhibiting residual ATP synthase in non-replicating MTB organisms Good <i>in vivo</i> bactericidal activity against non-replicating dormant MTB Good therapeutic activity in treating MDR-TB patients in combination with 2nd-line drugs The addition of TMC207 to the standard therapy of MDR-TB patients reduced the time to negative sputum culture. TMC207 is in a phase 3 study.	Andries (2005) Rubin (2005) Petrella (2006) Koul (2007, 2008) Ibrahim (2007, 2009) Lenaerts (2007) Rustomjee (2008) Lounis (2008, 2009) Veziris (2009) Nuermberger (2009) Diacon (2009)
Pyrrole derivatives (LL3858)		
Pyrrole derivatives (LL3858)	Good <i>in vitro</i> activity against MTB and MAC Efficacious against MTB infection in mice (more active than INH) LL3858 is in a phase 1 study.	Deidda (1998) Biava (2002, 2003, 2004, 2005, 2006)
Oxazolidinones		
Linezolid Eprezolid PNU-100480	Good <i>in vitro</i> activity against MDR-MTB (MIC=0.5 to 2.0 $\mu\text{g/ml}$) Good <i>in vivo</i> sterilizing activity against MTB infection induced in mice Efficacious in treating MDR-TB patients Linezolid is in a phase 2 study. PNU-100480 is in a phase 1 study.	Zurenko (1996) Cynamon (1999) Rodriguez (2002, 2003) Alcala (2003) Garcia-Tapia (2004) Fortun (2005) Park (2006) Condos (2008) Williams (2009) Nam (2009) Schechter (2010)
DA-7157 RBx 8700	Good <i>in vitro</i> activity against MDR-MTB (MIC=0.25 to 1.0 $\mu\text{g/ml}$)	Sood (2005, 2006) Vera-Cabrera (2006)
Ethylene diamine SQ-109		
Ethylene diamine SQ-109	Good <i>in vitro</i> activity against MDR-MTB (MIC=0.16 to 0.64 $\mu\text{g/ml}$) Drug target is in cell wall synthesis. Good <i>in vivo</i> activity against MTB infection induced in mice SQ-109 is in a phase 1 study.	Chen (2006) Nikonenko (2007)

れた。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が活発に増殖している phase から stationary phase へと移行する際に起こる。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) への抵抗性が增强することが報告されている¹⁷⁾。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

Table 2 Promising drug targets in MTB related to mycobacterial cell wall components

Protein (Gene)	Function	Inhibitors	References
Fatty acid synthetase-I (<i>fas</i>)*	Mycolic acid synthesis		Schwelzer (2004)
ACP (<i>acpM</i>)*, **	Mycolic acid synthesis		Kremer (2001)
Malonyl-CoA : ACP transacylase (<i>fabD</i>)	Mycolic acid synthesis		Kremer (2001)
β -Ketoacyl-ACP synthase III (<i>fabH</i>)*	Mycolic acid synthesis	Thiolactomycin	Choi (2000)
β -Ketoacyl-ACP synthase (<i>kasAB</i>)*	Mycolic acid synthesis	Thiolactomycin	Schaeffer (2001)
β -Ketoacyl-ACP reductase (<i>fabG1</i>)	Mycolic acid synthesis		Marrakchi (2002)
β -Ketoacyl-ACP reductase (<i>mabA</i>)*	Mycolic acid synthesis	Isoniazid	Cohen-Gonsaud (2002)
Enoyl ACP reductase (<i>fabI/inhA</i>)	Mycolic acid synthesis	Isoniazid Triclosan Diazaborines	Rozwarski (1999)
Enoyl ACP isomerase (<i>echA10?</i>)	Mycolic acid synthesis		
S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferase (<i>mmaA1-A4</i>)	Mycolic acid synthesis	S-adenocyl-N-decyl-aminoethyl	Yuan (1997) Glickman (2003) Boissier (2006) Vaubourgr (2009)
Cyclopropane synthase (<i>pcaA</i>)*	Mycolic acid synthesis	Sinefungin Thiacetazone	Glickman (2000) Alahari (2007)
Cyclopropane mycolic acid synthase (<i>cmaA1, A2</i>)*	Mycolic acid synthesis	Thiacetazone	Yuan (1995) Glickman (2001) Alahari (2007)
Acyl-CoA carboxylase (<i>accD4, D5</i>)*	Mycolic acid synthesis	Naphtalene sulphonate	Portevin (2005) Lin (2006)
Fatty acyl-AMP ligase (<i>fadD32</i>)*	Mycolic acid synthesis		Portevin (2005)
Polyketide synthase (<i>pks13</i>)*	Mycolic acid synthesis	Cerulenin	Gavalda (2009)
Phosphatidylinositol mannosyltransferase (<i>pimA</i>)	mAGP complex synthesis	Phosphonate analogues	Guerin (2005) Dinev (2007)
Glucose-1-phosphate thymidyltransferase (<i>rmlA</i>)	mAGP complex synthesis		Blankenfeldt (2000) Qu (2007)
dTDP-glucose dehydratase (<i>rmlB</i>)	mAGP complex synthesis	Rhodanines	Li (2006)
dTDP-keto-deoxyglucose epimerase (<i>rmlC</i>)	mAGP complex synthesis	Rhodanines	Li (2006)
dTDP-deoxyhexulose reductase (<i>rmlD</i>)	mAGP complex synthesis	Rhodanines	Ma (2001)
Polyprenol monophosphomannose synthase (<i>ppm1</i>)*	LAM synthesis		Gurcha (2002) Alexander (2004)
Mannosyltransferase (<i>pimB,F</i>)*	LAM synthesis		Schaeffer (1999)
Phthiocerol dimycocerosyl transferase (<i>papA5</i>)*	PDIM (Wax) synthesis		Buglino (2004)
Phthiocerol synthase (<i>ppsA-E</i>)	PDIM (Wax) synthesis		Azad (1997)
Mycocerosic acid synthase (<i>mas, fad26, fadD28</i>)	PDIM (Wax) synthesis		Mathur (1992) Sirakova (2002)
Mycobacterial membrane protein large family of proteins (<i>mmpL7</i>)*	PDIM (Wax) synthesis		Domenech (2005)
Filamentation temperature-sensitive protein Z (<i>ftsZ</i>)	Septum formation	Taxanes	Rajagopalan (2005)
Mycolytransferase I (<i>Rv3802c</i>)*	TDM synthesis		Brand (2003) Matsunaga (2008)
Mycolytransferase II (<i>Rv1288, Rv518c, Rv0774c</i>)	TDM synthesis		Brand (2003)
Mycolytransferases (Ag85 complex) (<i>fbpA,B,C</i>)	TDM synthesis	Phosphonates Trehalose analogs	Belisle (1997)

* Indispensable for bacterial survival and growth in macrophages and in animals.

** ACP: acyl carrier protein

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。

(3) その他の有望なtarget蛋白

最近, nitroimidazopyran PA-824が持続生残型結核菌に殺菌作用を示すメカニズムとして, 結核菌のDdnと呼ば

れる nitroreductaseの酵素作用より PA-824が還元されて生じる活性酸化窒素の関与が考えられている¹⁸⁾。実際に, 各種の nitroimidazole 化合物からの活性酸化窒素の生成率と低酸素条件下で増殖を休止した持続生残型結核菌に対する殺菌能はよく相関するし, また, nitric oxide (NO)

scavengerであるCarboxy-PTIOはPA-824からのDdn依存のNO産生をブロックすることにより、実際に持続生残型結核菌に対するPA-824の殺菌活性を阻害することが報告されている¹⁸⁾。このことに関連して、持続生残型結核菌を対象とした場合、菌の活性化窒素抵抗性発現に関わるDlaTと呼ばれるacyltransferaseもまたdrug targetとして有望と考えられる。DlaT欠損型の結核菌はモルモットの肺内での増殖能が著しく低下しており、事実、DlaT蛋白の阻害剤であるrhodanine D157070は、isoniazidとは異なり、低酸素条件下で増殖を休止した持続生残型結核菌に対してもNO依存性の殺菌能を示すことが報告されている¹⁹⁾。さらに、こうした持続生残型結核菌に特徴的なdrug target探索との関連で、環境適応、特に低酸素、飢餓、マクロファージ内でのストレスへの曝露などに適応して、休眠型や持続生残型に転換した結核菌での遺伝子発現の変化が網羅的に調べられている。Murphyらの報告によれば、総じて蛋白やATPの生合成系の遺伝子では発現抑制などが起こるが、他方、DevR蛋白で制御されているDevR regulonに属す53の遺伝子の発現、特に炭水化物・脂肪酸代謝系に関わる11個の遺伝子や、電子伝達系に関わる8個の遺伝子は逆にup-regulateされることが明らかになっている²⁰⁾。従って、Ddn, DlaT, DevRも有望なdrug targetと言える。このような観点からのdrug target探索もまた期待がもてそうである。

細胞壁生合成系に関連した drug target

結核菌の病原性の発現には、脂質に富む細胞壁の構造が重要である。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 (TDM) などであるが、特にManLAMには、IFN- γ によるマクロファージ活性化に対する抑制作用や、マクロファージから産生された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²¹⁾、LAMやPDIMの生合成酵素〔LAM合成系：*ppm1* 遺伝子産物 (polyprenol monophosphomannose synthase) *pimB*, *pimF* 遺伝子産物 (mannosyltransferase)；PDIM合成系：*ppsA-E*, *mas*, *fad26*, *fadD28* 遺伝子産物〕やPDIMを菌体表面に輸送するための膜輸送体蛋白 (*mmpL7* 遺伝子産物)が、新規抗結核薬のdrug targetとして有望である。

ところで、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バリアーとなることから、菌体内でdTDPと

glucose-1-phosphateからdTDPラムノースを合成する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。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コファクター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²²⁾。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 $\mu\text{g/ml}$ とある程度の抗菌活性を示すことが報告されている²³⁾。

結核菌および宿主細胞のシグナル伝達に関連した drug target

結核菌やBCG菌は、種々のprotein kinaseやprotein phosphataseを発現しており、これらは、菌の増殖の関係した代謝反応のregulatorとして重要である。特に、Ser/Thr protein kinase (STPK) についての研究が進んでおり、その機能や菌の代謝やビルレンスとの関連から考えて、抗結核薬開発のためのdrug targetとして有用なものが含まれている。結核菌はPknAからPknLまでの11種のSTPKを発現するが、PknA, B, Iが細胞増殖に、PknD, E, Fが膜の輸送系の調節に関わっていることが知られている (Table 3)²⁴⁾²⁵⁾。ところで、結核菌のSTPKのうちではPknGとPknKの2つが膜貫通ドメインをもたず、分泌蛋白と考えられており、特にPknGについては、マクロファージのファゴソーム内で結核菌から分泌され、そのPknGがマクロファージの細胞内シグナル伝達系に直接cross-talkしてマクロファージのシグナル伝達系を攪乱することが報告されている²⁵⁾。実際にWalburgerらの報告によると、BCG生菌がマクロファージに感染した場合には、菌を取り込んだphagosomeは、BCG菌が産生するLAMなどの成分の作用により、その成熟過程が阻害されphagolysosomeの形成には至らないが、PknGを欠損したBCG菌を感染させたマクロファージでは、そうしたブロッキングを受けることなく、正常な形のphagosomal maturationのプロセスが進行し、死菌を貪食した場合と同様にphagosome-lysosome (P-L)融合が効率よく起こるようになることが、共焦点レーザーキャンやOrganelle電気泳動法を用いた実験で明らかになっている²⁶⁾。また、これに関連して、PknG欠損BCGではマクロファージ内での増殖能が失われることが確かめられている。従って、病原性抗酸菌は、PknG蛋白による宿主マクロファージのシグナル伝達系への介入によってマクロファージ内でのP-L融合を阻害し、ひいてはマクロファージ内での生き延びを図っているものと考えられ

Table 3 Properties of MTB STPKs^{a)}

PK ^{b)}	ORF	Adjacent genes	Transmembrane domain	MW (kDa)	Substrate	Functions
PknA	<i>Rv0015c</i>	<i>oriC/ebp</i>	+	45.6	EmbR, FabH KasA, KasB GlmU, MurD GroEL1 FadE?	Cell elongation/ division
PknB*	<i>Rv0014c</i>	<i>oriC/ebp</i>	+	66.5	EmbR, FadD KasA, KasB GarA, GlmU PbpA, RshA GroEL1 Rv1747 Rv0020c FadE? ^{c)}	Cell elongation/ division
PknL*	<i>Rv2176</i>	Transcriptional regulator (<i>Rv2175c</i>)	+	42.8	<i>Rv2175c</i> GroEL1 FadE? FtsE?, FtsH?	Transcription ?
PknF*	<i>Rv1746</i>	ABC transporter	+	50.7	KasA GroEL1 Rv1747 Rv0020c	Membrane transport
PknI	<i>Rv2914c</i>	<i>ffh</i>	+	61.8		Cell division
PknJ*	<i>Rv2088</i>	Transposon	+	61.6	FadE?	Unknown
PknD*	<i>Rv0931c</i>	Phosphate-uptake operon	+	69.5	FabD, FabH KasA, KasB MmpL7, GarA GroEL1	Phosphate transport
PknE	<i>Rv1743</i>	ABC transporter	+	60.5	KasA GroEL1 Rv1747	Membrane transport
PknH*	<i>Rv1266c</i>	<i>embR</i>	+	66.8	EmbR KasA GroEL1 Rv1747 Rv0020c	Arabinan metabolism
PknG*	<i>Rv0140c</i>	<i>glnH</i>	—	81.6	GarA	Amino acid uptake
PknK	<i>Rv3080c</i>	<i>luxA, virS</i>	—**	119	VirS FtsE?, FtsH?	Transcription

^{a)} Modified from the review articles of Av-Gay and Everett (2000) and Chao et al., (2009) by supplementing additional informations.

^{b)} PK: protein kinase; ORF: open reading frame; MW: molecular weight; EmbR: transcription factor involved in arabinogalactan synthesis; GarA: Forkhead-associated domain-containing protein; GlmU: *N*-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase; MurD: UDP-*N*-acetylmuramoylalanine-D-glutamate ligase; FadE: acyl-CoA dehydrogenase; PbpA: penicillin-binding protein; RshA: anti-sigma factor; Rv1747: ABC transporter; Rv2175c: DNA-binding transcriptional regulator; FtsE, FtsH: cell division proteins; ABC: ATP-binding cassette; VirS: transcriptional regulator.

^{c)} FadE?, FtsE?, FtsH?: These proteins are reported to interact with PknA, PknB, PknJ, and PknL (FadE) and PknK and PknL (FtsE, FtsH) in a protein-protein network (Cui et al., 2009).

*Autophosphorylation

** PknK has recently been reported to be located to the cell wall fraction.

る。Székelyらは、PknG阻害活性のある化合物 AX20017 (tetrahydrobenzothiofene) とその誘導体 AX33510 と AX14585が、感染マクロファージ内で BCG 菌から分泌される PknG の作用による P-L 融合阻害という現象をブロックすることにより、ひいては BCG 菌に対するマクロファージ殺菌活性が有効に発揮されるようになることを確かめている²⁷⁾。また、結核菌の protein tyrosine phos-

phatase PtpA にも P-L 融合に対するブロッキング作用が報告されている²⁸⁾。以上のごとく、PknG や PtpA のような宿主細胞のシグナル伝達系に影響を及ぼすようなタイプの病原因子もまた優れた drug target となるものと期待される。

おわりに

以上、現在までの新規抗結核薬の開発状況と、bioinformatics, genomics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てきた。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すぎたばかりであり、今後の開発研究の進展が大いに期待される場所である。しかしながら、このような新しい方法論でスクリーニングあるいはデザインされた抗結核薬候補化合物のうちの果たしていくつが、実際に一連の基礎研究を経て臨床試験に供され、新薬としての申請に漕ぎ着けることができるのかは、現時点では全く不明である。現在、精力的に研究が進められつつある新しいタイプのdrug targetはあくまでも病原菌の側のそれであり、そうした知見をベースとして開発された新規抗結核薬が、生体の側のどのような標的分子とのinteractionを介して副反応を惹起してくるのかといった問題についての研究には、さらに多くの労力と資金の投入が必要になるであろう。従って現時点では、開発中の結核薬のヒトへの副反応を詳しく知るには、結局のところは臨床試験を待つほかはないということになる。基礎研究の段階では、きわめて優れた*in vitro*および*in vivo*抗菌活性を示した候補薬剤が、臨床試験での副反応をクリアできずに、それ以上の開発が断念された事例については枚挙にいとまがない。そういう意味合いでは、「結核治療の今後は明るいのか?」という質問には、確かにTMC-207, PA-824, OPC-68673などの優れた薬効をもつ新規薬剤の臨床試験が進行中であり、数年以内には認可に漕ぎ着けるであろうという期待感はあるのだが、しかしながら、本当にユニークなdrug targetに照準を当てての新規薬剤の開発という視点では、「やっと夜明けを迎えたばかりである」と答えるしかない。新規抗結核薬の場合、開発費に見合うだけの収益が望めないことがネックとなって、多くの製薬企業は本格的な開発には二の足を踏んでいる。しかしながら、特に休眠型の結核菌に対して強い滅菌作用を示すような新規抗結核薬は、副作用の問題をクリアすれば、世界中で結核の治療と発症予防に盛んに処方されることになり、十分に高い収益が見込まれるものと考えられる。今後の開発研究の進展が大いに期待される場所である。

文 献

1) World Health Organization. A Ministerial Meeting of High M/XDR-TB Burden Countries : The Key Bottlenecks Hampering the Prevention and Scale-up of M/XDR-TB Control and Patient Care. 2009 (<http://www.who.int/tb/challenges/>)

mdr/bottlenecks/bottlenecks_full_version.pdf)

2) 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.

3) Janin YL : Antituberculosis drugs: ten years of research. *Bioorg Med Chem.* 2006 ; 15 : 2479-2513.

4) Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. : Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 1998 ; 393 : 537-544.

5) Glickman MS, Jacobs WR : Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* : Dawn of a discipline. *Cell.* 2001 ; 104 : 477-485.

6) Mdluli K, Spigelman M : Novel targets for tuberculosis drug discovery. *Curr Opin Pharmacol.* 2006 ; 6 : 459-467.

7) Tomioka H : Development of new antituberculous agents based on new drug targets and structure-activity relationship. *Exp Opin Drug Discov.* 2008 ; 3 : 1-29.

8) Tomioka H, Tatano Y, Shimizu T, et al. : Recent advances in anti-tuberculous drug development and novel drug targets. *Expert Rev Resp Med.* 2008 ; 2 : 455-471.

9) Smith CV, Dharma V, Sacchettini JC : TB drug discovery: addressing issues of persistence and resistance. *Tuberculosis (Edinb.).* 2004 ; 84 : 45-55.

10) Tomioka H : Development of new antituberculous drugs: strategies for new drug targets and drug delivery. *Drug Design Rev.* 2005 ; 2 : 427-434.

11) Fleischmann RD, Alland D, Eisen JA, et al. : Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol.* 2002 ; 184 : 5479-5490.

12) Smith I : *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev.* 2003 ; 16 : 463-496.

13) Zhang Y, Amzel LM : Tuberculosis drug targets. *Curr Drug Targets.* 2002 ; 3 : 131-154.

14) Kumari S, Ram VJ : Advances in molecular targets and chemotherapy of tuberculosis. *Drugs Today (Barc).* 2004 ; 40 : 487-500.

15) McKinney JD, Höner zu Bentrup K, Muñoz-Eliás EJ : Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature.* 2000 ; 406 : 735-738.

16) Smith CV, Huang CC, Miczak A, et al. : Biochemical and structural studies of malate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.* 2003 ; 278 : 1735-1743.

17) 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.

18) Singh R, Manjunatha U, Boshoff HI, et al. : PA-824 kills nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* by intracellular NO release. *Science.* 2008 ; 322 : 1392-1395.

19) Bryk R, Gold B, Venugopal A, et al. : Selective killing of nonreplicating mycobacteria. *Cell Host Microbe.* 2008 ; 3 :

- 137–145.
- 20) Murphy DJ, Brown JR : Identification of gene targets against dormant phase *Mycobacterium tuberculosis* infections. *BMC Infect Dis.* 2007 ; 7 : 84.
 - 21) Cox JS, Chen B, McNeil M, et al. : Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature.* 1999 ; 402 : 79–83.
 - 22) 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.
 - 23) 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.
 - 24) Av-Gay Y, Everett M : The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* 2000 ; 8 : 238–244.
 - 25) Chao J, Wong D, Zheng X, et al. : Protein kinase and phosphatase signaling in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and pathogenesis. *Biochim Biophys Acta-Proteins & Proteomics.* 2009. (doi:10.1016/j.bbapap.2009.09.008)
 - 26) Walburger A, Koul A, Ferrari G, et al. : Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science.* 2004 ; 304 : 1800–1804.
 - 27) Székely R, Wączek 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.
 - 28) Philips JA : Mycobacterial manipulation of vacuolar sorting. *Cell Microbiol.* 2008 ; 10 : 2408–2415.

————— The 85th Annual Meeting Educational Lecture —————

PROSPECTS FOR THE DEVELOPMENT OF NEW ANTITUBERCULOUS DRUGS
PUTTING OUR HOPES ON NEW DRUG TARGETS

Haruaki TOMIOKA

Abstract Worldwide, tuberculosis remains the most frequent and important infectious disease to cause morbidity and death. However, the development of new drugs for the treatment and prophylaxis of TB has been slow. Therefore, novel types of antituberculous drugs, which act on the unique drug targets in *Mycobacterium tuberculosis*, particularly the drug targets related to the establishment of mycobacterial dormancy in host's macrophages, are urgently needed. In this context, it should be noted that current antituberculous drugs mostly target the metabolic reactions and proteins which are essential for the growth of *M. tuberculosis* in extracellular milieu. It may also be promising to develop another type of drug that exerts an inhibitory action against bacterial virulence factors which cross talk and interfere with signaling pathways of *M. tuberculosis*-infected host immunocompetent cells such as lymphocytes, macrophages and NK cells, thereby changing the intracellular milieu favorable to intramacrophage survival

and growth of infected bacilli. In this review article, I will describe recent approaches to identify and establish novel potential drug targets in *M. tuberculosis*, especially those related to mycobacterial virulence, dormancy, and cross-talk with cellular signaling pathways.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, Multidrug-resistant tuberculosis, Antituberculous drugs, Drug targets, Dormant-type tubercle bacilli

Department of Microbiology and Immunology, Shimane University School of Medicine

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