

カンジダ属の抗真菌薬耐性について —アゾール耐性を中心に

掛 屋 弘 宮 崎 泰 可 宮 崎 義 継
河 野 茂

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
新興感染症病態制御学系専攻
感染分子病態学講座
病態生理制御学分野

Key words: アゾール系抗真菌薬 (azole antifungal agents), アゾール耐性機序 (mechanism of azole resistance),
14 α -demethylase, 薬剤排出ポンプ (efflux pump), Δ 5,6 desaturase

はじめに

アゾール系抗真菌薬は、1958年欧米で上市されて以来、その高い抗真菌活性と優れた安全性を有する抗真菌薬である。1980年代以降、欧米で AIDS が蔓延したことや医療技術の進歩により免疫抑制患者が増加したことに起因する日和見感染症の治療や予防に頻用されるようになっていく。その結果、1980年代後半からアゾール耐性のカンジダ属を誘導することとなった。アゾール耐性カンジダ属における現在のもう一つの問題点は、アゾール系抗真菌薬に自然耐性のカンジダ属、すなわち *Candida glabrata* や *C. krusei* などの分離頻度が高くなっていることである。これらの問題により、臨床において初期治療が不成功に終わり、抗真菌薬の大量投与や変更を余儀なくされる場合がある。近年は、AIDS に対しては HAART 療法が導入されたことにより、耐性カンジダの分離頻度は低下していると報告されている^{1,2)} が、その機序の解明や対策はまだ十分とはいえない。

アゾール耐性機序

カンジダの耐性機序の研究は1990年代に入り、盛んに行われるようになり、現在まで主に4つの耐性機序が明らかになっている。

1) *ERG11* 遺伝子の過剰発現による相対的な標的酵素の増加

アゾール系抗真菌薬の標的酵素である14 α -demethylase をコードする *ERG11* 遺伝子の過剰発現の結果として、標的酵素の量が増加して起こる耐性機序である。

別刷請求先: 掛屋 弘

〒852-8501 長崎市坂本1丁目7-1
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

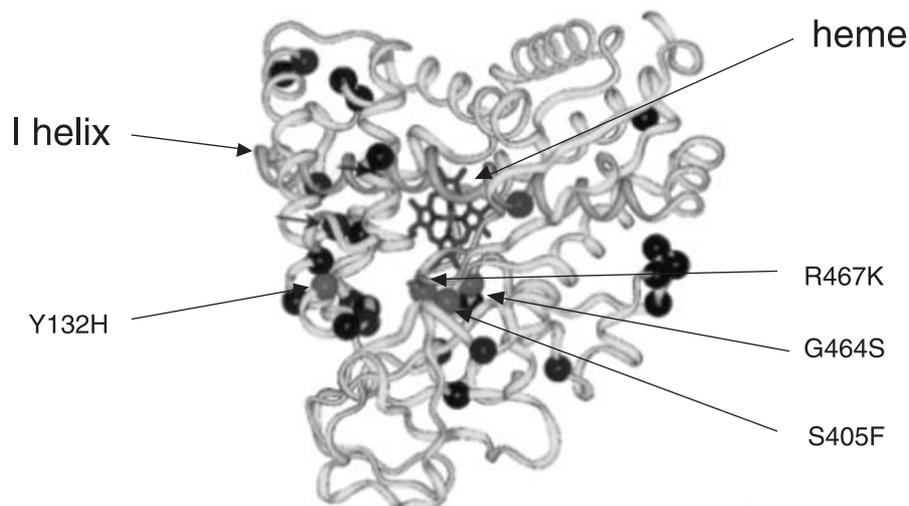
mRNA の発現レベルでみると *ERG11* 遺伝子の過剰発現は、2時間以内の FLCZ の暴露によっても引き起こされることが分かっている。しかし、その過剰発現は薬剤感受性を3から5倍程度低下させるが、高度耐性を引き起こす原因とはならないと報告されている³⁾。

2) *ERG11* 遺伝子の point mutation

ERG11 遺伝子に point mutation が起こり、その産物である14 α -demethylase のアミノ酸の極性が変化し、さらに立体構造の変化をもたらすことでアゾール系抗真菌薬との親和性(結合性)が低下することによる耐性機序である。すでに *C. albicans* において多くのアミノ酸変異が報告されているが、アミノ酸変異の中でも132番目のチロシン(Y)がヒスチジン(H)に変異した Y132H および heme binding domain とよばれる470番目のシスチン(C470)周囲のアミノ酸変異が、アゾール耐性株に報告されている⁴⁾。14 α -demethylase の推定されている立体構造をみると (Fig. 1)、Y132H 周辺はアゾール系抗真菌薬との結合部を形成するアミノ酸の一つと考えられている。また、C470 周辺はヘム鉄と結合する活性中心の部位にあたり、その周囲のアミノ酸変異 (S405F, G464S, R467K) も、アゾールとの親和性(結合性)を低下させると考えられている⁵⁾。

私達は1993年長期 ketoconazole (KCZ) が投与された患者より分離された高度アゾール耐性 Darlington 株 (MIC 256 μ g/ml) の耐性機構についての検討を行った。その耐性機序としてポンプ遺伝子やエルゴステロール合成経路における変化は、耐性機序に関連しないと報告されている^{6,7)}、未だ明らかでない点も多い⁴⁾。

私達は *ERG11* 遺伝子の変異に注目した。Darlington 株の *ERG11* 遺伝子には感受性株の遺伝子配列⁸⁾ と比較すると、両対立遺伝子ともに Y132H と I471T (471番目



● : Mutations which are important for azole resistance

Fig. 1. Three - dimensional model of *C. albicans* 14 α -demethylase structure⁴⁾.

The mutations are marked by spheres. The substitutions found in both azole-sensitive and -resistant strains are represented by black spheres, and the substitutions demonstrated to be important for azole affinity are shown in gray.

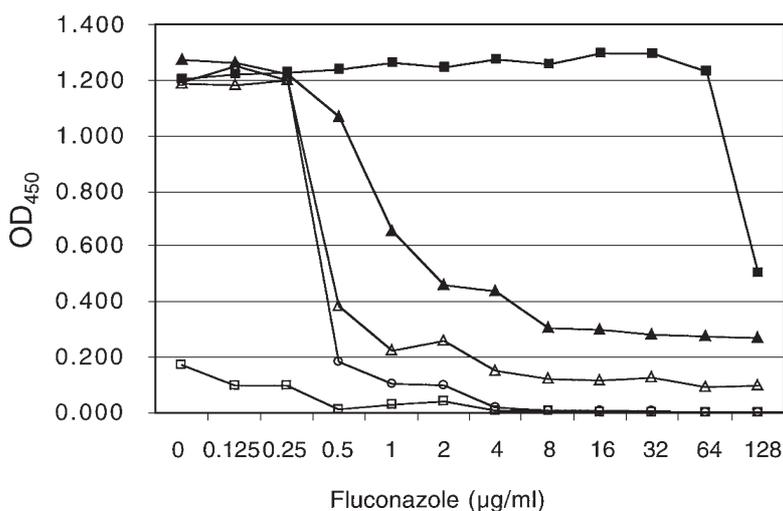


Fig. 2. Fluconazole growth inhibition in *C. albicans* at day 4.

Data are for *C. albicans* isolates CAI4 (open squares), CAF2-1 (open circles), SC5314 (open triangles), Darlington (filled squares), and transformant 12 (filled triangles). OD₄₅₀, optical density at 450nm⁹⁾.

のイソロイシン (I) からスレオニンへ (T) の変異) の二つのアミノ酸変異をもたらす遺伝子変異があり, その変異に関してホモ接合体であることが明らかとなった. 一方, 感受性株 (CAI4 株) の *ERG11* 対立遺伝子の一つは, 野生株と同様で, もう一方には二つのアミノ酸変異 (D116E, K128T) があつたが, 両アミノ酸変異とも感受性株に報告されている変異であつた⁴⁾. そこで, 私達はこの感受性株の一つの *ERG11* 遺伝子 (*C-ERG11*) を Darlington 株由来の *ERG11* (*D-ERG11*) と置換した形質転換株 (ヘテロ接合体: transformant 12) を作成し, それらの fluconazole (FLCZ) に対する薬剤感受性を検討した. その結果 (Fig. 2), 各 well の検濁度を比較する

と, Darlington 株は FLCZ に高度耐性であり, CAI4 株やその親株である SC5314 および CAF2-1 株 (MIC 0.5 μ g/ml) は感受性であることを示していた. 一つの Darlington 株由来の *ERG11* 遺伝子を有する形質転換株の薬剤感受性は, Darlington 株には及ばないものの感受性株より耐性に変化した. この変化は遺伝子置換による 14 α -demethylase における 2 つのアミノ酸変異が関与していることを示唆していた.

そこで, どちらのアミノ酸変異が主要な耐性化機序に関わっているかを明らかにするために, それぞれの変異を有する *ERG11* 遺伝子を過剰発現させ, 薬剤感受性を検討した. 感受性株由来の *ERG11* 遺伝子や Darlington

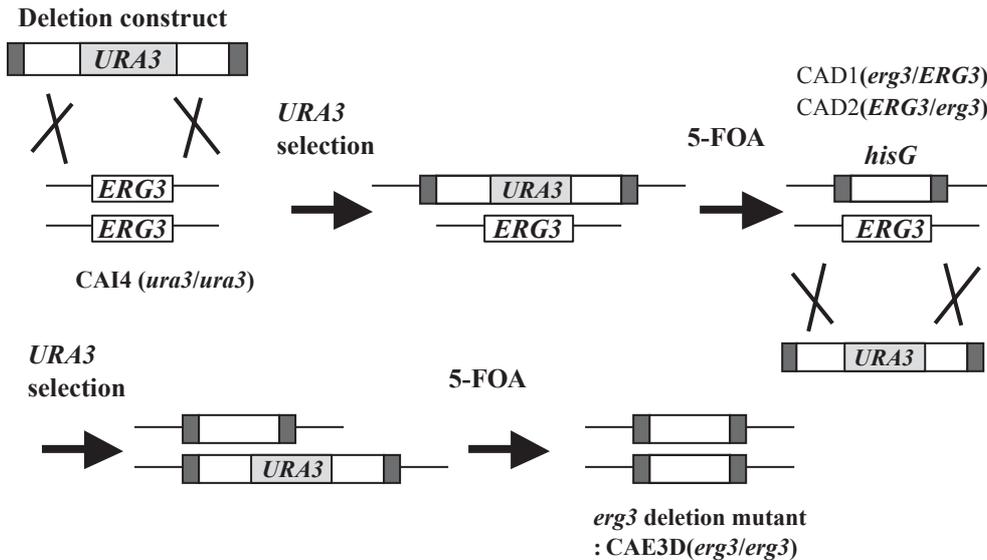


Fig. 3. The methods for gene disruption¹⁴⁾.

The *erg3* single deletion mutant (CAD1: *erg3/ERG3*, CAD2: *ERG3/erg3*) and double deletion mutant (CAE3D, *erg3/erg3*) are made from CAI4 strain using URA3-*hisG* cassette.

株由来の *ERG11* 遺伝子, Y132H, I471T それぞれのアミノ酸変異を誘導する point mutation を有する *ERG11* 遺伝子をプラスミド (YEP351G) に結合し, *Saccharomyces cerevisiae* に導入し, *ERG11* 遺伝子上流のプロモータを活性化することにより過剰発現を誘導した. 薬剤感受性の検討には E-test を使用した. その結果, 感受性株由来の *ERG11* 遺伝子を導入した株の MIC が $1.5 \mu\text{g/ml}$ であったのに対して, Y132H 変異を有する場合は $16 \mu\text{g/ml}$, I471T 変異を有する場合は $6 \mu\text{g/ml}$, 両方の変異を有する場合は $256 \mu\text{g/ml}$ 以上であり, それぞれのアミノ酸変異が耐性に関わり, さらに二つのアミノ酸変異が加わることで相乗的な効果を示すことが明らかとなった⁹⁾.

近年, *C. glabrata* が高率に耐性を獲得することが報告されているが, その一つのメカニズムとして, *C. albicans* は, diploid cell であり, 両方の対立遺伝子上に変異が起こることが耐性獲得のために重要であるが, *C. glabrata* は haploid cell であり, 一つの遺伝子上の変異が, 直接表現系として現れることが考えられている¹⁰⁾. 私達の *C. albicans* における *ERG11* 遺伝子の置換実験は, それらの仮説を支持していると考えられる.

3) 薬剤排出ポンプの過剰発現による細胞内薬剤の減少

薬剤排出ポンプにより細胞外へ薬剤がくみ出され, 細胞内薬剤濃度が低下することによっておこる耐性機序である. 排出ポンプには, ABC transporter と Major facilitator といわれる 2 種類のポンプがあるが, ABC transporter は, ATP を加水分解し, エネルギーとして薬剤を排出するポンプで, *C. albicans* では Cdr1p, Cdr2p, *C. glabrata* では CgCdr1p, Pdh1p, *C. dubliniensis* では CdCdr1p が報告されている. 一方, Major facilitator (MF) transporter は, プロトンの流入と共役して薬剤を排出するポンプであり, *C. albicans* では FLCZ に基質特異的な

CaMdrp やアゾール系抗真菌薬の排出には関係がないとされる Flu1p が報告されている.

新見らは, *C. albicans* の *CDR1* 遺伝子を 7 つの主な ABC transporter 遺伝子が欠損する *S. cerevisiae* にて発現させ, その役割を検討した. その結果, *CDR1* 遺伝子発現株は, その親株と比較し FLCZ や KCZ, itraconazole (ITCZ) に対する感受性を 48 倍, 31 倍以上, 250 倍以上に低下させた. さらに *CDR1* 遺伝子は, 他の薬剤や基質の細胞外排出にも関わっていることが報告されている¹¹⁾.

4) 細胞膜の構成成分であるエルゴステロールの合成経路における変化

ERG3 遺伝子にコードされる $\Delta 5, 6$ desaturase の活性が低下し, 細胞膜の構成成分が変化することによる耐性化機序である.

ERG3 の変異による耐性機序に関して, *S. cerevisiae* では, 肯定的な報告がされているが¹²⁾, *C. glabrata* では否定的な報告もみられる¹³⁾.

私達は分子生物学的手法を用い *C. albicans* の *ERG3* 遺伝子欠損株を作成し, その薬剤感受性およびステロール成分を分析した. 方法として, はじめに diploid cell である *C. albicans* の *ERG3* 対立遺伝子の一つを URA3-*hisG* cassette で置換し, その後 5-FOA プレート上で, URA3 遺伝子を取りのぞいた後に, もう一方の対立遺伝子を再び同じ cassette で置換して *ERG3* 遺伝子欠損株を作成した (Fig. 3). そのアゾール感受性を検討した結果, 親株 (CAI4) や一つの対立遺伝子だけを欠損した株 (ヘテロ接合体: CAD1; *erg3/ERG3*, CAD2; *ERG3/erg3*) の FLCZ に対する MIC がそれぞれ $0.5 \mu\text{g/ml}$ であったが, 二つの対立遺伝子を欠損した株 (ホモ接合体: CAE3D; *erg3/erg3*) の MIC は $1024 \mu\text{g/ml}$ であり, アゾール高度耐性へと変化していた. それらの細胞膜のステロール成分を

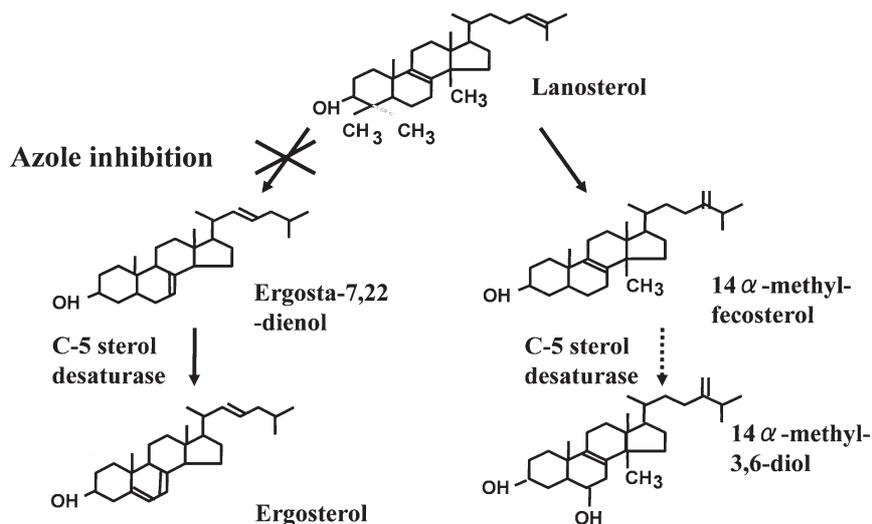


Fig. 4. The toxic effects of the diol in *S. cerevisiae* are eliminated by a mutation in *ERG3*.

Structures included are lanosterol, the substrate of sterol 14 α -demethylase in the yeast; ergosta-7,22-dienol, a substrate for sterol, delta 5,6 desaturase; ergosterol, the end-product of the pathway and from azole treated cells, 14 α -methylfecosterol and 14 α -methylergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diol¹²⁾.

Table 1. Combination of resistance mechanism and stepwise increase of azole resistance¹⁵⁾.

Patient No.	isolates	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			Resistance mechanism linked to MIC increase
		FLCZ	KCZ	ITCZ	
I	C23	1	1	1	S405F mutation on one <i>ERG11</i> allele
	C39	32	8	2	S405F mutation on both <i>ERG11</i> alleles Increase of mRNA for <i>CDR1</i> and <i>CDR2</i>
II	C33	1	1	1	
	C34	8	1	2	S405F mutation on both <i>ERG11</i> alleles
	C82	128	32	32	Increase of mRNA for <i>CDR1</i> and <i>CDR2</i>
	C26	512	256	64	Y132H mutation on both <i>ERG11</i> alleles
IV	C27	1	1	1	
	C37	8	2	2	G464S and R467K mutations on both <i>ERG11</i> alleles
	C40	128	128	32	Y132H mutation on both <i>ERG11</i> alleles Increase of mRNA for <i>MDR1</i> and <i>CDR2</i>
V	C43	1	1	1	G129A mutation on one <i>ERG11</i> allele
	C56	512	256	64	G129A and G464S mutation on both <i>ERG11</i> alleles Increase of mRNA for <i>CDR1</i> and <i>CDR2</i>

分析した結果, *ERG3*欠損株 (CAE3D) はエルゴステロールを欠損し, 代わりに, Ergosta-7, 22-dien-3 β -ol が生成されていた. さらに, 各株を FLCZ とともに培養すると感受性株には 14-methyl-ergosta-8,24(28)-dien-3,6-diol が蓄積していたが, *ERG3* 遺伝子欠損株 (CAE3D) では diol の蓄積はみられなかった¹⁴⁾.

ERG3 遺伝子欠損株ではエルゴステロールが生成される課程において, アゾールの添加により, Fig. 4 の右の経路に進むために, その最終産物として diol が生成される. この diol の蓄積は細胞の発育を障害し, *S. cerevisiae* における抗真菌活性の機序と考えられている. Δ 5,6-desaturase をコードする *ERG3* 遺伝子の欠損により, その diol が蓄積しないことがその耐性のメカニズムと考えられている¹²⁾.

5) 複数の耐性機序の関与

さらに高度耐性にはこれらの複数の耐性機序が関与することが報告されている.

Sanglard らは, 同一患者より分離され, 段階的にアゾール耐性を獲得した *C. albicans* の耐性機序を検討している. その結果, 患者 I では, 元々存在していた *ERG11* の S405F mutation が両対立遺伝子上におこり, さらに *CDR* ポンプの活性が加わり耐性を獲得していた. 患者 II では, *ERG11* 遺伝子の S405F mutation にポンプ遺伝子の活性化が加わり, さらに *ERG11* 遺伝子上で Y132H 変異がおこっていた. (Table.1)¹⁵⁾. Perea らの検討では, HIV 患者の口腔由来の FLCZ 耐性 *C. albicans* の耐性機序として, ポンプ遺伝子の過剰発現が関与しているものが 85%, *ERG11* 遺伝子の mutation が 65%, *ERG11* 遺伝子の過剰発現が 35% であり, 複数の機序が関与して高度耐性を獲

得するものが75%であったと報告されている¹⁶⁾。

6) 耐性真菌に対する対策

今後の耐性真菌に対する対策としては、新しい作用機序を有する1, 3- β -D-glucan 阻害薬や新規トリアゾール系抗真菌薬 (voriconazole, posaconazole, CS758) などの抗真菌薬, アムホテリシン B の脂質製剤, さらにそれらと従来の抗真菌薬との併用療法, または顆粒球刺激因子 (G-CSF) やマクロファージ刺激因子 (M-CSF), インターフェロンなどの免疫賦活療法の併用などが期待される¹⁷⁾。

おわりに

近年は、さらなる新たな耐性機序の探索が盛んに行われているが、その研究の方法として DNA マイクロアレイを使用した関連遺伝子の検出は有用な研究法と考えられる^{18, 19)}。また病原真菌のゲノム解析により新しい薬剤耐性遺伝子やその治療法が発見される可能性があり、期待されている。これらの情報を基にしたゲノム創薬はまだ始まったばかりの状況であるが、さらなるデータの蓄積によりその実現が大いに期待される。

将来的な展望としては、新しい抗真菌薬の開発や耐性機序の研究はもとより、臨床効果を反映するような薬剤感受性検査の開発、さらに現在 MRSA や VRE などの一般細菌の耐性菌蔓延から学ぶべき抗真菌薬の適正使用も重要な課題になってくるものと考えられる。

Reference

- 1) Revanker SG, Sanche SE, Dib OP, Cacers M, Patterson FT: Effect of highly active antiretroviral therapy on recurrent oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients. *AIDS* **12**: 2511-2513, 1998.
- 2) Martins MD, Lozano-Chiu M, Rex JH: Declining rates of oropharyngeal candidiasis and carriage of *Candida albicans* associated with trends toward reduced rate of carriage of fluconazole-resistant *C. albicans* in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis* **27**: 1291-1294, 1998.
- 3) Sanglard D, Odds FC: Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* **2**: 73-85, 2002.
- 4) Marichal P, Koymans L, Willemsens S, Bellens D, Verhasselt P, Luyten W, Borgers M, Ramaekers FCS, Odds FC, Bossche HV: Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 α -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology* **145**: 2701-2713, 1999.
- 5) Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE: Y132H substitution in *Candida albicans* sterol 14 alpha-demethylase confers fluconazole resistance by preventing binding to haem. *FEMS Microbiol Lett* **180**: 171-175, 1999.
- 6) Albertson GD, Niimi M, Cannon RD, Jenkinson HF: Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 2835-2841, 1996.
- 7) Miyazaki Y, Geber A, Miyazaki H, Falconer D, Parkinson T, Hitchcock C, Grimberg B, Nyswaner K, Bennett JE: Cloning, sequencing, expression and allelic sequence diversity of *ERG3* (C-5 sterol desaturase gene) in *Candida albicans*. *Gene* **236**: 43-51, 1999.
- 8) Lai MH, Kirsh DR: Nucleotide sequence of cytochrome P450 L1A1 (lanosterol 14 alphasdemethylase) from *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res* **17**: 804, 1989.
- 9) Kakeya H, Miyazaki Y, Miyazaki H, Nyswaner K, Grimberg B, Bennett JE: Genetic analysis of azole resistance in the Darlington strain of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 2985-2990, 2000.
- 10) Lupetti A, Danesi R, Campa M, Tacca MD, Kelley S: Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Molecul Med* **8**: 76-81, 2002.
- 11) Nakamura K, Niimi M, Niimi K, et al.: Functional expression of *Candida albicans* drug efflux pump Cdr1p in *Saccharomyces cerevisiae* strain deficient in membrane transporters. *Antimicrob agents Chemother* **45**: 3366-3374, 2002
- 12) Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, Manning NJ, Loeffler J, Herbart H, Schumacher U, Einsele H: Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol $\Delta^{5,6}$ -desaturation. *FEBS Letters* **400**: 80-82, 1997.
- 13) Geber A, Hichcock CA, Awartz JE, Pullen FS, Marsden KE, Kwon-Chung KJ, Bennett JE: Deletion of *Candida glabrata* *ERG3* and *ERG11* genes: Effect on cell viability, cell growth, sterol composition, antifungal susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 2708-2717, 1995.
- 14) Miyazaki T, Miyazaki Y, Kakeya H, Yanagihara K, Hirakata Y, Tomono K, Tashiro T, Kohno S: Abstracts to the 42st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Abstract M-197 Sandiego, CA, 2002.
- 15) Sanglard D, Ischer F, Koymans L, Bille J: Amino acid substitutions in cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* **32**: 241-253, 1998.
- 16) Perea S, López-Ribot JL, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Santillán RA, Martínez M, Calabrese D, Sanglard D, Patterson TF: Prevalence of Molecular Mechanisms of Resistance to Azole Antifungal Agents in *Candida albicans* Strains Displaying High-Level Fluconazole Resistance Isolated from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 2676-2682, 2001.
- 17) Canuto MM, Rodero FG: Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *Lancet Infect Dis* **2**: 550-563, 2002.
- 18) Marianne D. De Backer, Tatiana Ilyina, Xiao-Jun Ma, Sandy Vandoninck, Walter H.M.L. Luyten, and Hugo Vanden Bossche: Genomic Profiling of the Response of *Candida albicans* to Itraconazole Treatment Using a DNA Microarray. *Antimicrob. Agents Chemother* **45**: 1660-1670, 2001.
- 19) Marton MJ, Derisi JD, Bennett HA, Iyer VR, Meyer MR, Roberts CJ, Stoughton R, Buchard J, Slade D, Dai H, Bassett Jr. DE, Hartwell LH, Brown PO, Friend SH: Drug target validation and identification of secondary target effects using DNA microarrays. *Nat Med* **4**: 1293-1301, 1998

Azole Resistance in *Candida* Spp.

Hiroshi Kakeya, Taiga Miyazaki, Yoshitsugu Miyazaki, Shigeru Kohno
Division of Molecular and Clinical Microbiology, Department of Molecular Microbiology
and Immunology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences
1-7-1 Sakamoto, Nagasaki 852-8501, Japan

The emergence of azole-resistant *Candida* spp. is a significant problem after long-term treatment of recurrent oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients. Several mechanisms can cause this resistance.

An important mechanism of azole resistance is reduced intracellular accumulation of the drug. Among the multidrug efflux transporters, ABC transporters and the major facilitator superfamily are reported to cause the resistance.

Erg11p, sterol C14 α -demethylase, is a target of azole derivatives. It was reported that *ERG11* overexpression had only a modest effect on the development of azole resistance. However, mutations in the *ERG11* gene can cause the resistance, probably by reducing binding of azole to the target enzyme. We sequenced the *ERG11* gene in a high-level azole resistant *C. albicans* strain, Darlington, and found that two amino acid substitutions, Y132H and I471T, had been encoded in the Darlington *ERG11* gene. To assess the significance of these substitutions, we replaced one of the two copies of *ERG11* gene in an azole-susceptible strain of *C. albicans* with a copy of the Darlington *ERG11* and this resulted in a modest increase in azole resistance. Furthermore, to estimate the effect of Y132H and I471T individually, *ERG11* genes with either or both mutations were expressed in *S. cerevisiae*. The I471T substitution, not previously described, conferred azole resistance when overexpressed alone and increased this resistance when added to the Y132H substitution.

Alterations in the sterol biosynthetic pathway are another resistance mechanism. Inhibition of 14 α -demethylase by azole results not only in ergosterol depletion but also in accumulation of methylated sterol 14 α -methylergosta-8, 22(28)-dien-3 β , 6 α -diol. We deleted the *ERG3* gene, which encodes a sterol 5, 6-desaturase, in *C. albicans*, and the deletion resulted in reduced susceptibility of the mutant to azoles. Sterol analysis revealed that *erg3* mutant lost both ergosterol and diol when cultured with fluconazole.

この論文は、第46回日本医真菌学会総会の“シンポジウムⅢ：カンジダ属の Molecular Mycology: 臨床医にも必要な最近のトピックス”において発表されたものです。