

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08343

研究課題名(和文) 北里微生物資源ライブラリーからの熱帯病治療薬シードの探索

研究課題名(英文) Search for seeds of drugs for tropical diseases from Kitasato microbial library

研究代表者

岩月 正人 (Iwatsuki, Masato)

北里大学・感染制御科学府・准教授

研究者番号：70353464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：抗マラリア原虫活性指標に微生物培養液のスクリーニングを行い選択した糸状菌3株(以下、FKI-7019株、A株およびB株)について検討を行った。その結果、新規の抗マラリア活性物質としてFKI-7019株から直鎖状リポペプチド2種(kozupeptinと命名)、A株から環状テトラペプチド系化合物2種、B株からヘテロ複素環系化合物2種を発見した。また抗リーシュマニア原虫活性評価系についても単品化合物ライブラリーを用いたスクリーニングを行い、既知3化合物が皮膚リーシュマニア原虫に対して活性を示すことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

得られた創薬シード化合物は熱帯病治療薬の開発に特化した非営利団体の支援および製薬企業との共同研究によって国際的な開発研究へと展開していくことで各原虫症治療薬の開発に繋がることが期待される。開発された治療薬はマラリアおよびリーシュマニア症による人的被害を軽減することで開発途上国の保健衛生の向上に繋がります、人類の福祉として国際貢献をするものである。

研究成果の概要(英文)：In this project, we successfully discovered six new antimalarial compounds from 3 different fungal cultured broths. From the cultured broth of FKI-7019 strain, we isolated two new linear lipopeptides named kozupeptins A and B, having potent in vitro and in vivo antimalarial activity. From the cultured broth of strain A, we found two new cyclic tetrapeptides showing moderate in vitro antimalarial activity. From the cultured broth of strain B, we found two new heterocyclic compounds displaying moderate in vitro antimalarial activity. We also picked up three known compounds as antileishmanial agents active against *Leishmania major* in vitro.

研究分野：天然物化学

キーワード：マラリア リーシュマニア 微生物代謝産物 天然物化学 微生物創薬 新規化合物

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マラリアはマラリア原虫の感染によって引き起される原虫症であり全世界で年間 42 万人以上の死亡者が発生している。特にアフリカでは経口投与可能な治療薬の供給不足によって 5 歳以下の幼児が熱帯熱マラリア原虫感染により死亡している。現在は主に植物成分由来のアルテミシニン類を中心とした薬物治療が行われているが薬剤耐性原虫の出現が問題視されている。

リーシュマニア症はトリパノソーマ科の鞭毛を持つリーシュマニア原虫の感染によって引き起される原虫症であり、原虫種により多様な症状(皮膚型、内蔵型など)が現れ薬剤感受性も大きく異なる。このため現在使用されている治療薬は効果が一定ではなく、薬剤耐性原虫の出現や副作用、非経口薬であるなどの問題点がある。

これら原虫症について「薬剤耐性原虫にも有効」で「安全域が広く」「安価で安定な供給可能」かつ「経口投与が可能」な治療薬の開発が望まれている。しかし国内外の製薬会社はこれらの原虫症治療薬開発の経済的見返りが少ないことから積極的な研究開発を進めていない。そのため日本国内でも治療薬の開発研究は限られた研究機関のみで行われているのが現状である。

研究代表者の所属機関は天然物資源および各種化合物ライブラリーをスクリーニングすることで抗マラリア原虫活性物質(1999年よりWHO/TDRの研究協力機関として)および抗トリパノソーマ原虫活性物質(2005年よりDNDiの研究協力機関として)の探索を行ってきた。

その過程で研究代表者らは天然物資源より抗マラリア原虫活性および抗トリパノソーマ原虫活性を示す新規化合物 8 群 19 成分を発見すると共に、抗原虫活性を示す既知化合物を多数見出してきた。中でも微生物培養液より研究代表者らが発見した 2 種のシード化合物は既存の薬剤とは異なるユニークな骨格を有し、かつ強力な抗原虫活性を示すことが大きな特徴である。

これらシード化合物について有機合成法による最適化研究を共同研究として進行中であり、より高活性で安全域の広い誘導体の創製にも成功しつつある。一方、創薬研究においては「先行シード化合物の最適化」と並行した「バックアップのためのシード化合物の探索」が非常に重要である。そこでバックアップのためのシード化合物の探索も継続して実施しており、*in vitro* 抗マラリア原虫活性および抗リーシュマニア原虫活性の評価系を用いたスクリーニングにより有望な活性物質を生産する糸状菌 1 株(*Paracamarosporium* 属 FKI-7019 株)を見出しており活性物質の発酵生産、精製および構造決定を開始していた。

2. 研究の目的

本研究では微生物培養液を用いて新たな骨格・より優れた活性プロファイルを有する「マラリア」および「リーシュマニア症」治療薬のシード化合物(バックアップ)を探索する。具体的には申請期間内に少なくとも各 5 種の *in vitro* で有効な活性物質の発見を目指す。更に有望な化合物については原虫感染マウスモデルを用いた *in vivo* 抗原虫活性評価を行いシード化合物を探索する。目標とするシード化合物は「*in vivo* において 30 mg/kg x 4 回で治療効果を示す」物質とし、申請期間内に少なくとも各 1 種のシード化合物の発見を目指す。

3. 研究の方法

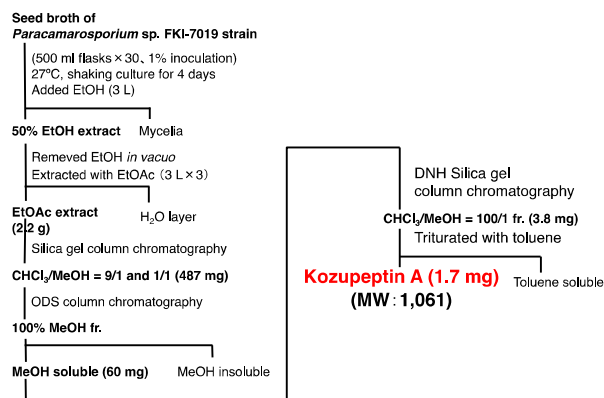
本研究では抗マラリア原虫活性および抗リーシュマニア原虫活性を指標に微生物培養液のスクリーニングを行い、「薬剤耐性原虫にも有効」で「安全域が広く」「安価に供給可能」かつ「経口投与が可能」なマラリアおよびリーシュマニア症治療薬開発のためのシード化合物(バックアップ)を発見することを目的に、(1) *in vitro* 抗原虫活性評価系での微生物培養液のスクリーニング、(2) 活性物質の発酵生産および単離、(3) 活性物質の構造解析、(4) 有望な化合物の大量取得、(5) 原虫感染マウスモデルを用いた *in vivo* 抗原虫活性評価を行った。初年度は(1)-(3)を中心に、次年度以降は(1)-(4)を継続しつつ(5)も実施した。

4. 研究成果

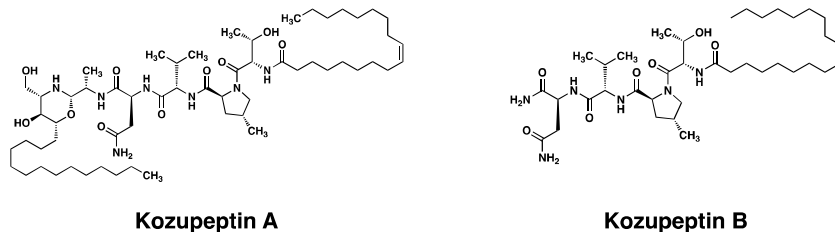
4-1. 微生物培養液からの抗マラリア活性物質の探索

4-1-1. 糸状菌 FKI-7019 株

初年度は開始前のスクリーニングで選択していた *Paracamarosporium* 属糸状菌 FKI-7019 株について抗マラリア活性を指標に発酵・精製を実施した。その結果、発酵 Lot. 1 (3 L) から分子量 1,061 の新規リポペプチド化合物(kozupeptin A と命名)を単離した(右図)。同様に発酵 Lot. 2 (3 L) についても精製を行い、kozupeptin A の再取得を試みた。残念ながら kozupeptin A は生産していなかったが、分子量 706 の新規 Kozupepton 類縁体(kozupeptin B と命名)を単離した。



各種機器分析（NMR、質量分析）およびESI-MS/MSフラグメント解析の結果、両物質が異常アミノ酸を含む5つのアミノ酸ユニット（Asn、Val、The、4-MePro、Alanial）およびオレイン酸（Kozupeptin Aでは更にスフィンゴシン）を含む直鎖状リポペプチドであることを明らかにした。更に完全酸加水分解物のFDLA修飾体を用いた改良Marfey法およびLC/CDスペクトル解析により、アミノ酸残基の絶対立体配置を決定した（下図）。



Kozuoetin A および B はサブマイクロオーダーで多剤耐性マラリア原虫の増殖を阻害し、ヒト正常線維芽細胞に対する毒性は抗マラリア活性と比べて約30-150倍低いことが明らかとなった（下表）。

Compound	IC ₅₀ (μM)		
	<i>In vitro</i> antimalarial activity		Cytotoxicity (MRC-5 cells)
	K1 strain ^[a]	FCR3 strain ^[b]	
Kozupeptin A	0.15	0.29	>23
Kozupeptin B	1.03	1.46	>35
Chloroquine	0.17	0.038	58 ^[c]
Artemisinin	0.019	0.023	160 ^[c]

[a] Chloroquine-resistant strain, [b] Chloroquine-sensitive strain, [c] *J. Antibiot.* 2011, 64, 183.

更に Kozupeptin A はネズミマラリア感染マウスモデルにおいて30 mg/kg、i.p.投与でマラリア原虫の増殖を52.4%抑制した。治療実験において毒性症状も確認されなかった。

In vivo antimalarial activity (i.p. administration on *P. berghei* N strain-infected mice)

Compound	Dosage	Route	Inhibition
Kozupeptin A	30 mg/kg/day x 4 days (n = 5)	i.p.	52.4%
Artesunate	30 mg/kg/day x 4 days (n = 5)	i.p.	89.9%

4-1-2. 糸状菌 A および B 株

実施期間中のスクリーニングで選択した糸状菌2株(以下、A および B 株)についても抗マラリア活性物質の発酵・精製を行った。まず糸状菌 A 株の培養液から精製を行い、新規の抗マラリア活性物質として環状テトラペプチド2化合物を単離した。これらも完全酸加水分解物のFDLA修飾体を用いた改良Marfey法によりアミノ酸残基の絶対立体配置を決定した。

一方、糸状菌 B 株の培養液から精製を行い、新規の抗マラリア活性物質としてヘテロ複素環を含む2化合物およびその既知類縁3化合物を単離した。

これら化合物はいずれも *in vitro* で多剤耐性マラリア原虫の増殖を強力に阻害した。

4-2. 化合物ライブラリーからの抗リーシュマニア活性物質の探索

抗リーシュマニア原虫活性評価系についても大村天然化合物ライブラリーを用いたスクリーニングを行い、異なる骨格を有する既知3化合物が皮膚リーシュマニア原虫(*Leishmania major*)に対して活性を示すことを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hayashi Yumi, Fukasawa Wataru, Hirose Tomoyasu, Iwatsuki Masato, Hokari Rei, Ishiyama Aki, Kanaida Masahiro, Nonaka Kenichi, Take Akira, Otoguro Kazuhiko, Omura Satoshi, Shiomi Kazuro, Sunazuka Toshiaki	4. 巻 21
2. 論文標題 Kozupeptins, Antimalarial Agents Produced by Paracamarosporium Species: Isolation, Structural Elucidation, Total Synthesis, and Bioactivity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 2180 ~ 2184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.9b00483	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 林 裕美, 廣瀬 友靖, 深澤 航, 岩月 正人, 野中 健一, 穂苅 玲, 石山 亜紀, 塩見 和朗, 大村 智, 砂塚 敏明
2. 発表標題 新規抗マラリア活性リポペプチド Kozupeptin A の実用的全合成および絶対立体構造の決定
3. 学会等名 日本薬学会 第139回年会
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 Yumi Hayashi, Tomoyasu Hirose, Wataru Fukasawa, Masato Iwatsuki, Kenichi Nonaka, Rei Hokari, Aki Ishiyama, Kazuro Shiomi, Satoshi Omura, Toshiaki Sunazuka
2. 発表標題 New Antimalarial Lipopeptides Produced by Paracamarosporium Species: Isolation, Structural Elucidation, Efficient Total Synthesis, and Biological Activity
3. 学会等名 The 14th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC-14) (国際学会)
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 深澤航、森菜月、岩月正人、野中健一、廣瀬友靖、石山亜紀、穂苅玲、乙黒一彦、大村智、塩見和朗
2. 発表標題 糸状菌が生産する新規抗マラリア活性物質
3. 学会等名 第10回 北里化学シンポジウム
4. 発表年 2017年 ~ 2018年

1. 発表者名 林裕美, 渡邊善洋, 廣瀬 友靖, 深澤航, 岩月正人, 石山亜紀, 穂苺玲, 野中健一, 大村智, 砂塚敏明
2. 発表標題 微生物培養液からの抗マalaria活性害物質の探索 (1)
3. 学会等名 日本熱帯医学会(第60回)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 大内孝仁, 渡邊善洋, 荒川 絵美, 岩月正人, 石山亜紀, 穂苺玲, 松本厚子, 野中健一, 大村智
2. 発表標題 微生物培養液からの抗マalaria活性害物質の探索 (2)
3. 学会等名 日本熱帯医学会(第60回)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Masato Iwatsuki, Yumi Hayashi, Wataru Fukasawa, Tomoyasu Hirose, Rei Hokari, Aki Ishiyama, Ken Nonaka, Kazuro Shiomi, Toshiaki Sunazuka, and Satoshi Omura
2. 発表標題 New antimalarial compounds from Kitasato microbial cultured broth libraries
3. 学会等名 The Joint Symposium of "10th Korea-Japan Chemical Biology Symposium" & "30th Meeting for New Drug Discovery"
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 林裕美、廣瀬友靖、深澤航、岩月正人、穂苺玲、石山亜紀、野中健一、塩見和朗、大村智、砂塚敏明
2. 発表標題 抗マalaria活性を有するkozupeptin類の単離、構造決定、全合成および活性評価
3. 学会等名 第61回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 新規FKI-7019物質およびその製造方法	発明者 大村智 乙黒一彦 岩 月正人 石山亜紀 穂 苅玲 砂塚敏明 他5名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、JP2018-211679	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----