

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07155

研究課題名(和文) リーシュマニア症の新たな治療薬「熱帯紫雲膏」開発にむけた基礎的研究

研究課題名(英文) The fundamental research for development of new leishmanicidal medicine;
Tropical Shiun-Ko

研究代表者

安元 加奈未 (Mori-Yasumoto, Kanami)

東京理科大学・薬学部薬学科・講師

研究者番号：70412393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、現地の植物資源を用いて安価な熱帯紫雲膏を開発し、途上国の生活向上に資する基礎研究として、新たなシズ探索と、活性キノン化合物等のリーシュマニア原虫アポトーシス誘導能についての検討を行うものである。原虫ミトコンドリア膜電位をJC-1により検討し、化合物のアポトーシス誘導能を評価した。さらに、予備試験にて活性を示した植物エキスから、イソマツ科、マメ科植物より23種の活性化合物の単離構造決定を行い、抗リーシュマニア活性を検討した。単離化合物および既知活性キノン化合物についてJC-1での膜電位変化を検討した。また、熱帯紫雲膏作成の足がかりとして、既知活性キノン化合物の成分定量を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、未だに明確な治療薬がなく顧みられない熱帯病であるリーシュマニア症に焦点を当て、現地の植物資源を用いて安価な「熱帯紫雲膏」を開発し、途上国の生活向上という社会実装を見据えた研究展開を行うための基礎研究である。発症国の植物資源から新たな治療薬の種を探し、有望な植物由来化合物を見いだした。また、原虫のアポトーシス誘導能を検討する試験法を検討した。

研究成果の概要(英文)：In this research project, basic research was conducted to develop inexpensive tropical shiunkou using local plant resources. We investigated the leishmanicidal constituents from tropical plants and the ability of active known quinone compounds to induce Leishmania protozoan apoptosis. The protozoan mitochondrial membrane potential was investigated by JC-1 to evaluate the ability of the compound to induce apoptosis. Furthermore, from the plant extracts that showed activity in the preliminary test, the isolated structures of 23 active compounds from Plumbaginaceae and Legumes were determined, and their leishmanicidal activity was examined. The changes in membrane potential at JC-1 were investigated for isolated compounds and known active quinone compounds. In addition, in preparation for tropical shiunkou, the components of known active quinone compounds were quantified.

研究分野：天然物化学 薬用植物学

キーワード：リーシュマニア症 薬用植物 天然活性物質 熱帯感染症 抗リーシュマニア

1. 研究開始当初の背景

リーシュマニア症は、WHO が世界六大熱帯病に指定する、重篤な昆虫媒介性原虫症である。病態は皮膚型・粘膜皮膚型・内臓型に分類され、原虫種や媒介昆虫種によって多様な病態を呈することが知られている。世界 80 カ国以上、1200 万人以上の患者の存在が推定され、感染者数はマラリア・トリパノソーマに並ぶほどである。現在の第一選択薬はアンチモン製剤であるが副作用が強く、治療は高価で近年耐性原虫も報告されている。内臓型治療薬ミルテホシンも妊娠中の患者には適応できないなどの問題がある。特に皮膚型・粘膜皮膚型は明確な特効薬が未だになく、感染地域のほとんどの患者が治療を受けられず、放置されている。すなわち、明確な特効薬が未だになく、莫大な患者数が明らかであるにも関わらず、新薬・ワクチン開発が進まないことから『顧みられない』感染症 (Neglected Tropical Disease: NTDs) と言われている。日本には現存しない病気とされているが、輸入感染症として、また昨今流行の見られたデング熱ウィルスのように気候変動による流行拡大も懸念されている。

申請者は現在まで主に熱帯植物から皮膚型昆虫寄生体原虫を用いて、抗リーシュマニア活性物質の探索に取り組んできた。その研究過程において、申請者の研究グループは生薬である紫根の成分 shikonin 類縁体に強力な抗リーシュマニア原虫活性を見出した。(PCT 国際出願 PCT/JP2005/13268 国際公開番号 WO2006/011394 A1) この研究成果から、漢方薬「紫雲膏」を用いてペルーでパイロット臨床試験を行い、高い皮膚型リーシュマニア症に対する有効性が認められた(淵野, 安元ら, 日本薬学会第 129 回年会, 2009)。現在の第一選択薬であるアンチモン製剤は非常に高価で、その毒性から安全面でも問題がある。一方、紫雲膏の構成生薬は日本、中国など温帯地域で生産されるため供給量に限界がある。熱帯・亜熱帯域の患者に安価で有効な治療薬を提供するには、罹患者の多い熱帯地方の植物から有効な植物を見出すことが重要である。

これまで申請者は、ミャンマー産植物より顕著な抗リーシュマニア活性物質を単離構造決定し、報告してきた。これらはナフトキノン骨格を有しており、原虫および宿主細胞に対する選択性 (IC₅₀ 比) が非常に高く、リード化合物として十分に期待できる。キノン系化合物群には、他の原虫において、主な ATP 産生源である嫌氣的ミトコンドリア呼吸鎖 (PEPCK-コハク酸回路) を阻害し、酸化ストレスを与えることで、アポトーシスを誘導するとの報告がある (Ribeiro, G.A. et al, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2013)。リーシュマニア原虫に対するキノン系化合物群の特異的な阻害活性も、嫌氣的ミトコンドリア呼吸鎖阻害によるアポトーシス誘導という作用機序を有している可能性は高い。

このような背景から、抗リーシュマニア活性を有する熱帯産植物を用いて、紫雲膏のような軟膏剤の創薬を目指すための基礎研究として、ミトコンドリア呼吸鎖に着目した本研究を行うこととした。

2. 研究の目的

熱帯地域にて流行の見られるリーシュマニア症は、寄生虫の一種であるリーシュマニア原虫が引き起こす病気で世界 88 カ国以上、1200 万人以上の感染者が存在すると推定され、WHO により制圧すべき病気の 1 つとされている。特に皮膚型リーシュマニア症には特効薬は未だ存在しない。地球温暖化やグローバル化により、熱帯病の拡大も懸念されており、治療薬開発が望まれている。これまで我々は、患者の多い地域の植物資源から医薬品シーズの探索研究を行い、リーシュマニア原虫を選択的に阻害する化合物を得ている。本研究では、新たに熱帯域で入手した有望な薬用植物からさらなる抗リーシュマニア活性物質を探索するとともに、これまでに得られている化合物の薬理活性機構の解明を目的として以下の 3 つの項目について研究を行う。

- ① 嫌氣的ミトコンドリア呼吸鎖 (PEPCK-コハク酸回路) 阻害の検討: JC-1 によるリーシュマニア原虫ミトコンドリア膜電位の検討 (既知活性キノン化合物, 単離化合物)
- ② 熱帯産薬用植物エキスからの抗リーシュマニア活性化合物の探索
- ③ ミャンマー産植物に含まれる活性キノン化合物の成分定量

3. 研究の方法

①既知活性化合物 (キノン系化合物) の原虫アポトーシス誘導活性の検討:

JC-1 蛍光プローブによるミトコンドリア膜電位の変化の検討

キノン系化合物群の嫌氣的ミトコンドリア呼吸鎖阻害によるアポトーシス誘導の有無を検討した。アポトーシスは、ミトコンドリア膜電位の低下により開始したと見なされ、指標とすることが可能である。脂溶性カチオン蛍光プローブ JC-1 (JC-1 MitoMP Detection Kit, 同仁化学) により、アポトーシスを起こした細胞を調べた。供試化合物と 48 時間共培養した昆虫寄生型原虫は、

JC-1 と反応後、蛍光プレートリーダーにて測定した。ポジティブコントロールは、株化細胞にもアポトーシスを誘導する oligomycin を用いた。

②熱帯・亜熱帯産植物エキスから新規抗リーシュマニア活性化化合物の単離・構造決定

予備試験にて活性の見られた植物エキス 2 種 (MIC 12.5, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) から、抗リーシュマニア活性を指標に活性成分の単離精製を行った。活性物質は、IR, UV, CD, ^1H および ^{13}C NMR, LC-MS 等の機器分析により化合物構造を明らかにした。抗リーシュマニア活性試験法は、皮膚型リーシュマニア原虫 *Leishmania major* に、検定するサンプルを添加し、48 時間後 WST-1 試薬を加えて反応させ、ELISA リーダーにて吸光度を測定し、原虫の生存率を算定した (Mori-Yasumoto et al, Natural Product Research, 2020)。

③熱帯紫雲膏作成のための成分定量：既知活性キノン系物質の含有量を検討

ミャンマー産植物を原料に紫雲膏を調整する足がかりとして、活性化化合物がメタノールエキス中にどのくらい存在するのかを明らかにした。HPLC 分析により、各種条件 (波長, 抽出量, 抽出時間, 移動相等) を検討することで成分定量を行った。

4. 研究成果

本研究課題では、現地の植物資源を用いて安価な「熱帯紫雲膏」を開発し、途上国の生活向上という社会実装を見据えた研究展開を行うための基礎研究として、新たなシーズ探索とともに、活性キノン系化合物群のリーシュマニア原虫に対する薬理作用を嫌氣的ミトコンドリア呼吸鎖阻害によるアポトーシス誘導の有無の検討によって明らかにしていくものである。

まず、既知活性化化合物(キノン系化合物)の原虫アポトーシス誘導活性の検討を行うべく、キノン系化合物群の嫌氣的ミトコンドリア呼吸鎖阻害によるアポトーシス誘導の有無を検討した。アポトーシスは、ミトコンドリア膜電位の低下により開始したと見なされ、指標とすることができる。脂溶性カチオン蛍光プローブ JC-1 は、構造内に持つカチオンを持ち、ミトコンドリア内膜の電位と親和性があるため、ミトコンドリア膜電位に応じて色素がミトコンドリアへ蓄積する。ミトコンドリアが正常で、膜電位が維持されると、JC-1 が凝集し赤色の蛍光を発する。膜電位が低下すると、JC-1 が単量体として存在し緑色の蛍光を発する。これらの赤色と緑色の蛍光強度の変化を測定することでミトコンドリアの状態を評価することができる。JC-1 を用いた試験についてリーシュマニア原虫に適した試薬条件等を検討するため、ナフトキノン誘導体でマラリア治療薬でもある atovaquone, およびミトコンドリア電子伝達系複合体 III の阻害剤である抗生物質 ascochlorin について検討を行った。その結果、これらの化合物にはコントロールと比較して顕著な膜電位差は観測されなかった。

また、熱帯領域であるミャンマーに生育する植物から、さらなる抗リーシュマニア活性を有する化学成分を探索することを目的として一次スクリーニングで活性の見られた植物メタノールエキスから、イソマツ科植物およびマメ科植物エキスについて各種クロマトグラフィー等の化学的分離手法を用いて抗リーシュマニア活性成分の探索を行った。その結果、計 23 種の化合物を単離し、それぞれの化学構造を各種機器分析法により決定した。現在、本結果について論文投稿の準備中であるため、詳細な構造の報告は差し控えるが、これらは芳香族化合物およびフラボノイド誘導体であった。得られた化合物について、詳細な抗リーシュマニア活性 (promastigote 体) を検討した結果、活性を示した化合物の IC_{50} 値は 4.6 ~ 14.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった [陽性対照: amphotericin B ($\text{IC}_{50} > 0.1 \mu\text{M}$)]。

得られたマメ科植物の単離化合物について、化学構造と抗リーシュマニア活性との相関について検討を行った。

今回の研究において、単離した化合物の中から主要な 2 種 (#1, #2), および研究代表者が保有する既知活性キノン系化合物 (#3) について JC-1 による膜電位の変化を検討した [濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)]。陽性対照は oligomycin (P) を用いた [濃度 (μM)]。その結果、コントロールと比較して #2 および #3 については顕著な膜電位変化が観測されたため、アポトーシスを誘導していることが示唆された。

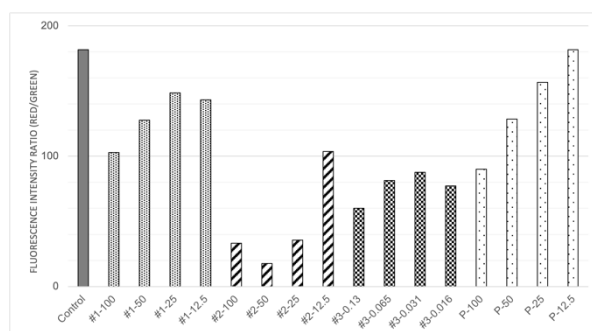


図 1 化合物添加後の原虫ミトコンドリア膜電位検出

この結果から、#2, #3 を含有する植物エキスは熱帯紫雲膏に使用する候補として期待できる。そこで、「熱帯紫雲膏」への足がかりとして、顕著な抗リーシュマニア活性を有するナフトキノン誘導体 (#3) について、植物体への成分定量を行い、メタノール抽出エキスの含有量を検討した。その結果、0.0052%含有されていることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mori-Yasumoto Kanami, Hashimoto Yukihiko, Agatsuma Yutaka, Fuchino Hiroyuki, Yasumoto Ko, Shirota Osamu, Satake Motoyoshi, Sekita Setsuko	4. 巻 -
2. 論文標題 Leishmanicidal phenolic compounds derived from <i>Dalbergia cultrata</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Natural Product Research	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14786419.2020.1744140	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 -

1. 著者名 R?dis-Baptista Gandhi, Dodou Hilania V., Prieto-da-Silva ?Ivaro R. B., Zaharenko Andr? J., Kazuma Kohei, Nihei Ken-ichi, Inagaki Hidetoshi, Mori-Yasumoto Kanami, Konno Katsuhiko	4. 巻 0
2. 論文標題 Comprehensive analysis of peptides and low molecular weight components of the giant ant <i>Dinoponera quadriceps</i> venom	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1515/hsz-2019-397ja-01	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊絢女, 安元加奈未, 安元剛, 淵野裕之, 佐竹元吉, 代田修
2. 発表標題 抗リーシュマニア活性を有する薬用植物の探索(その31)ミャンマー産植物 PYINER LANKAR <i>Sophora exigua</i> の成分について
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2020年~2021年

1. 発表者名 代田修, 三好達也, 安元(森)加奈未
2. 発表標題 ズイナ (<i>Itea japonica</i>)のポリフェノール成分について
3. 学会等名 第58回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------