

機関番号：33101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580087

研究課題名（和文）呼吸系を標的とした新規抗真菌剤の創製に関する研究

研究課題名（英文）Studies on the development of novel antifungals targeted to fungal respiration

研究代表者

皆川 信子（MINAGAWA NOBUKO）

新潟薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90113026

研究成果の概要（和文）：新規の標的と作用機序を持つ選択性の高い抗真菌剤の開発が久しく待望されている。特異性の高い呼吸阻害剤の併用が、ミトコンドリアを中心とする病原性真菌のエネルギー代謝に致命的影響を与えて強力な増殖阻害を引き起こすことを、*in vitro*で確認した。本研究において、病原性真菌類のエネルギー代謝の中心を成すミトコンドリア内膜の呼吸系を標的とする選択性の高い抗真菌剤の実用化・臨床利用の基盤を確立するために、詳細な検討を加えた。

病原性真菌のシアン耐性呼吸を担うalternative oxidase 核遺伝子破壊株のエネルギー代謝や酸化ストレス抵抗性を調べることにより、alteranative oxidase の生理的役割、さらに抗生物質アスコフラノンの電子伝達阻害や増殖阻害のメカニズムに関して新たな知見が得られた。真菌症の主要な原因菌が属するカンジダ属酵母 *Candida maltosa* のalternative oxidase 核遺伝子破壊株を、野生株と比較検討した。

これまでの研究経過と実績から、シアン感受性呼吸を阻害するアトヴァコンとシアン耐性呼吸を阻害するアスコフラノンの併用によるミトコンドリアの呼吸阻害による増殖阻害は、高い成功確率で *in vivo*系に応用できるものと予想した。*In vitro*の種々の条件下で、病原性真菌の増殖に対するアトヴァコンとアスコフラノンの併用効果を調べた。現在真菌症治療の臨床で繁用されている抗真菌剤、すなわちアゾール系抗真菌剤、アムホテリシンB、ミカファンギンとの効果の比較、同時添加による薬物間相互作用なども検討した。

研究成果の概要（英文）：Presently, there is a pressing need for novel antifungals possessing novel targets and action mechanisms. I already observed the *in vitro* potent growth inhibition of pathogenic fungi by the highly specific respiratory inhibitors which inhibit the fungal mitochondrial electron transport playing a key role in the energy metabolism. In this study, effects of the candidates on the pathogenic yeasts were examined in detail to establish the basis for the clinical application of the antifungals targeted to the mitochondrial respiratory system.

The energy metabolism and oxidative stress damage of the nuclear-encoded alternative oxidase gene disrupted mutants of *Candida maltosa* were used to elucidate the physiological role of alternative oxidase and the inhibitory mechanism of ascofuranone.

From my research background, *in vitro* results obtained by the combined addition of atovaquone, which inhibits cyanide-sensitive respiration, and ascofuranone, which inhibits cyanide-resistant respiration, are thought to be closely related to *in vivo* experiments using whole animals. Accordingly, effects of atovaquone and asucofuranone

on the *in vitro* cell growth of *Candida albicans* have been examined comprehensively in the presence or absence of clinically used antifungals (azoles, amphotericin B, micafungin *etc.*), in order to confirm the clinical efficacy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学 応用微生物学

キーワード：抗生物質生産 創薬

1. 研究開始当初の背景

自然界のいたる所に棲息している真菌類、その一部は、真菌症、アレルギーなどの原因菌として臨床面で重要視されている。中でも深在性真菌症は、別名内臓真菌症と呼ばれ、全身の臓器・組織が真菌で侵される感染症で、免疫能の低下した患者に多発している日和見感染症であり、高度医療の普及と人口高齢化に伴い急激に増加している。カンジダ属及びアスペルギルス属の病原性真菌が臓器に侵襲して発症すると、急速に悪化し重篤となる。現在、病理解剖所見による「病死」の「直接的死因」の大多数は、この深在性真菌症である。ところが、現在使用されている抗真菌剤は数剤程度しかなく、治療の選択肢は非常に狭い。さらに、薬剤耐性、薬剤関連毒性、有害な薬物間相互作用の問題も深刻である。従来の抗真菌剤の標的は、細胞壁、細胞膜、ステロール合成系などであるが、新規の標的と作用機序を持つ選択性の高い抗真菌剤の開発が久しく待望されている。

2. 研究の目的

現在臨床使用されている抗真菌剤の標的とは異なる新規の標的と作用機序を持つ選択性の高い抗真菌剤の開発が火急の課題である。

本研究では、真菌類のエネルギー代謝の中心を成すミトコンドリアの2つの呼吸系、す

なわちシアン感受性呼吸及びシアン耐性呼吸、の両方を同時に標的とする抗真菌剤の実用化のための基盤を確立したい。

3. 研究の方法

エイズ患者の日和見感染症の治療薬として世界的に幅広く臨床使用されているアトヴァコン (atovaquone, GlaxoSmithKline社製) は、ミトコンドリアのシトクロム $bc_1$ 複合体の $Qo$ 部位における電子伝達を特異的に阻害することによって、シアン感受性呼吸を阻害する。シトクロム $bc_1$ 複合体の構造の生物種差により、マラリア原虫や酵母の複合体に対して、哺乳動物の複合体に対するより桁違いに強力な阻害効果を発現する。ヒトにおける副作用は少ないので、医薬品としての臨床使用が確立しているが、我が国では未承認である。一方、世界に先駆けて私たちのグループが研究を進めてきたアスコフラノン<sub>1</sub>は、基質であるユビキノールに類似した構造を有しており、シアン耐性呼吸を担うalternative oxidase に対してきわめて特異性の高い阻害効果を示す。加えて、毒性が低く、化学的に安定で経口投与可能、安価で大量供給可能という優れた特徴を有し、アフリカトリパノソーマ症の化学療法剤としては、感染ヤギを用いた臨床実験のレベルまで全く問題無くクリアしている現状である。

Alternative oxidase 核遺伝子破壊株のエネルギー代謝や酸化ストレス抵抗性を調べることにより、alteranative oxidase の生理的役割、そしてアスコフラノンの増殖阻害機序が明らかになると考えた。クリプトコッカス属酵母では、alternative oxidase 遺伝子破壊による顕著な病原性・感染性の低下が報告されている。既に作成してある *Candida albicans* 及び *Candida maltosa* の alternative oxidase 核遺伝子破壊株を用いて、野生株との詳細な比較検討を行った。

アスコフラノンを化学療法剤として実用化するための研究の一環として、国内共同研究者の鳥取大学齋本博之教授が一連のアスコフラノン誘導体を合成した。これら誘導体やアスコフラノン関連化合物を用いて、alternative oxidase 活性の阻害と病原性真菌の *in vitro* 増殖阻害に関する構造活性相関を検討し、臨床利用・実用化を目指してより優れた抗真菌剤たりうる化合物の候補を探索した。

これまでの研究経過と実績から、アトヴァコンとアスコフラノンの併用によるミトコンドリアの呼吸阻害による増殖阻害は、高い成功確率で *in vivo* 系に応用できるものと期待できる。種々の生育条件下で、病原性真菌の増殖に対するアトヴァコンとアスコフラノンの併用効果を詳しく検討した。現在臨床的に繁用されている抗真菌剤、すなわちアゾール系抗真菌剤、アムホテリシンB、ミカファンギンとの効果の比較、同時投与による薬物間相互作用なども詳細に検討した。

#### 4. 研究成果

病原性真菌のシアン耐性呼吸を担う alternative oxidase 核遺伝子破壊株のエネルギー代謝や酸化ストレス抵抗性を調べることにより、alteranative oxidase の生理的役割、さらに抗生物質アスコフラノンの電子伝達阻害や増殖阻害のメカニズムに関して検討を加えた。真菌症の主要な原因菌が属するカンジダ属の酵母 *Candida albicans*

及び *Candida maltosa* の alternative oxidase 核遺伝子破壊株を、野生株と比較し、新たな知見が得られた。

これまでの研究経過と実績から、シアン感受性呼吸を阻害するアトヴァコンとシアン耐性呼吸を阻害するアスコフラノンの併用によるミトコンドリアの呼吸阻害による増殖阻害は、高い成功確率で *in vivo* 系に応用できるものと期待できる。 *In vitro* の種々の生育条件下で、病原性真菌の増殖に対するアトヴァコンとアスコフラノンの併用効果を中心に調べた。現在真菌症治療の臨床で繁用されている抗真菌剤、すなわちアゾール系抗真菌剤、アムホテリシンB、ミカファンギンとの効果の比較、同時添加による薬物間相互作用なども検討し、今後の研究の進展につながると思われる興味深い知見を得た。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Nobuko Minagawa, Mariko Uehara, Shiori Seki, Ayumi Nitta, and Kento Kogawara: Effects of Combined Addition of Atovaquone and Lithium on the *in vitro* Cell Growth of Pathogenic Yeast *Candida albicans*, *Yakugaku Zasshi*, 130 247-51 (2010)
- ② Edward Berry, Li-shar Huang, Dong-Woo Lee, Fevzi Daldal, Kazuo Nagai, and Nobuko Minagawa: Ascochlorin is a Novel, Specific Inhibitor of the Mitochondrial Cytochrome *bc*<sub>1</sub> Complex, *Biochim. Biophys. Acta*, 1797 360-370 (2010)

[学会発表] (計9件)

- ① 皆川信子: *Candida albicans* に対する atovaquone と併用薬剤の効果、日本農芸化学会 2008年度大会 (2008)
- ② Nobuko Minagawa: Effects of Atovaquone on the *in vitro* Cell Growth of *Candida albicans*, Bari International Symposium on "Mitochondrial Physiology and Pathology", Bari, Italy (2008)
- ③ Nobuko Minagawa: Physiological Role of

Alternative Oxidase in the Yeast *Candida maltosa*, First International AOX Symposium, Évora, Portugal (2008)

④ Nobuko Minagawa : Effects of Atovaquone on the Respiration and Cell Growth of *Candida albicans*, BMB2008, Kobe, Japan (2008)

⑤ 皆川信子 : 抗生物質アスコクロリンの作用機序、日本農芸化学会 2009 年度大会、福岡 (2009)

⑥ Nobuko Minagawa : Ascochlorin, a specific inhibitor of the mitochondrial cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex, 日本生化学会、神戸 (2009)

⑦ 皆川信子 : 抗生物質 Ascochlorin はシトクロム *bc*<sub>1</sub> 複合体のユニークな阻害剤である、平成 22 年度日本生化学会関東支部例会、長岡 (2010)

⑧ Nobuko Minagawa: Ascochlorin is an unusual inhibitor of the cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex, 9<sup>th</sup> International Mycological Congress, Edinburgh, UK (2010)

⑨ 皆川信子 : 植物病原性真菌 *Ascochyta viciae* が産生する抗生物質 ascochlorin、衛生環境トキシコロジーフォーラム 2010、東京 (2010)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
皆川 信子 (MINAGAWA NOBUKO)

研究者番号 : 90113026

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号 :