

令和 4 年 4 月 11 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22710

研究課題名(和文) 真菌共培養エキスをを用いた革新的エイズ根治薬の開発

研究課題名(英文) Study on anti-AIDS drugs using fungal co-culture extracts

研究代表者

Eldesoky Ahmed (Eldesoky, Ahmed)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・特別研究員

研究者番号：10874521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：HIVはヒトの細胞内に潜伏感染するため、抗HIV薬や免疫細胞によりエイズを根治することができない。そこで、潜伏感染しているHIVに刺激を与えてHIV産生を活性化させ、抗HIV薬あるいは自己免疫によりエイズを根治する戦略が期待されている。しかし、これまでに臨床試験に至った潜伏感染活性化物質(LRA)は報告されていない。そこで、本研究で天然資源からLRAを探索した。そして、植物イモガンピおよびアオガンピから3種類の新規化合物を含む20種類のLRAを単離するとともに誘導体を合成し、既存のLRAより優れた効果を示す化合物を見出すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エイズは、抗HIV薬を服用することにより、感染しても発症を抑えることが可能になった。しかし、HIVはヒトの細胞内に潜伏感染するため、抗HIV薬や免疫細胞により根治することができない。そこで、エイズを根治する戦略として、潜伏感染しているHIVに刺激を与えてHIV産生を活性化させ、抗HIV薬あるいは自己免疫によりエイズを根治する方法が期待されている。しかし、これまでに臨床試験に至った潜伏感染活性化物質(LRA)は報告されていない。本研究では、既存のLRAより優れた効果を示す化合物を見出すことができたので、その学術的および社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The latent HIV reservoirs are activated by latency-reversing agents (LRA), and LRA induce viral production in cells. The activated cells can be eliminated by apoptosis and immune-mediated clearance. Thus far, clinically available LRA has not yet been developed. We searched for LRA from natural sources and succeeded in isolating 20 compounds as LRA including three new compounds from *Stellera chamaejasme* and *Wikstroemia retusa* and in synthesizing their derivatives. Among these, we found better LRA than the known LRAs.

研究分野：天然物化学

キーワード：真菌共培養 エイズ治療薬 探索

1. 研究開始当初の背景

後天性免疫不全症候群 (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS, エイズ) は、ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus, HIV) が CD4 リンパ球に感染することにより免疫力が低下し、日和見感染症を引き起こす状態をいう。国連合同エイズ計画 (UNAIDS) によると、2018 年の世界における HIV 陽性者数は 3790 万人で、そのうち新規感染者数は年間 170 万人と報告されている。

当時、HIV 治療薬として 5 種の標的 (核酸系逆転写酵素、非核酸系逆転写酵素、プロテアーゼ、インテグラーゼ、CCR5) に対する阻害剤が既に開発され、それらの中から 3 剤以上を組み合わせた多剤併用療法が標準治療法として行われていた。そして、抗 HIV 活性が強く、血中半減期が長く、そして薬剤耐性を与えにくいという長所を有する薬剤が既に承認されていた。その結果、治療薬がない時代にはエイズは感染したら死に至る病であったが、抗 HIV 薬を服用することにより感染しても発症を抑えることが可能であった。しかし、HIV はヒトの細胞内に潜伏感染するため (図 1: 潜伏感染細胞)、抗 HIV 薬や免疫細胞により根治することができない。したがって、エイズ患者は生涯にわたって抗 HIV 薬を服用する必要があるが、薬剤耐性獲得や腎毒性による副作用が懸念されるとともに、差別や偏見による精神的抑圧もある。そして、一人当たり年間約 300 万円の医療費がかかるので財政に対する負担も大きい。以上の点から、エイズを根治できる医薬品の開発は、健康と経済的負担の両面で極めて重要な課題とされていた。

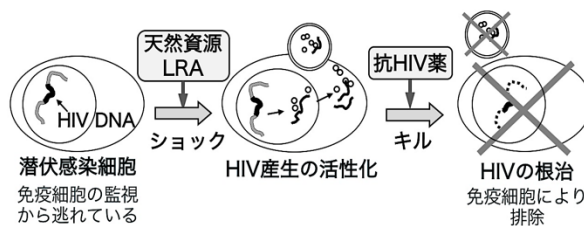


図1. HIVを根治する戦略「ショック&キル法」

2. 研究の目的

エイズを根治する戦略として、HIV が潜伏感染している細胞に刺激 (ショック) を与えて HIV 産生を活性化させ、抗 HIV 薬あるいは自己免疫によりエイズを根治する (キル) 「ショック&キル法」が期待されている (図 1)。ショックを与えることのできる化合物は、潜伏感染活性化物質 (latency-reversing agent: LRA) と呼ばれているが、これまでに臨床試験に至った LRA は報告されていない。そこで本研究では、研究室で独自に構築した天然資源エキストライブラリーを用いて、エイズを根治するために天然資源から LRA を開発することを目指した。

HIV 産生の活性化は、HIV DNA の末端の長い反復配列 (long terminal repeat, LTR : LTR の活性化により HIV DNA の転写が促進される) の転写促進作用の活性化を、レポーターアッセイ (luc 遺伝子産物ルシフェラーゼによるルシフェリン発光) で検出する (図 2)。

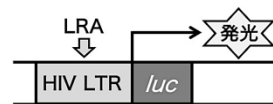


図2. LTR活性化のレポーターアッセイ

天然資源からの医薬シーズ探索には、構造的多様性の高い天然物エキストライブラリーを用いることが重要である。当該研究室のライブラリーは、海綿などの海洋無脊椎動物や真菌などの微生物エキスから構成されている。最近の遺伝子解析により、微生物の生合成遺伝子の多くは休眠状態であることが明らかとなった。そこで当該研究室では、2 種の真菌を同じ培地で培養する「共培養」により高い確率で新規化合物を取得できることを明らかにし (J. Nat. Prod. 2020, 83, 1368-1373; J. Nat. Med. 2020, 74, 545-549)、各種共培養エキスをライブラリー化した。そして、単独培養エキスと共培養エキスとでは評価系により活性に差が認められたが、本研究で行う LRA 活性については、共培養エキスの方が単独培養エキスよりヒット率が高く、細胞毒性 (HeLa 細胞) が低いことがわかった (図 3)。LRA は哺乳類に対する毒性が低いことが望ましいので、LRA 探索には共培養エキスが適していると考えた。

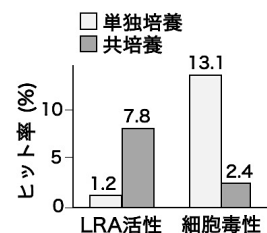


図3. 単独・共培養エキスのLTR活性と細胞毒性

3. 研究の方法

エイズを根治するための「ショック&キル法」において、LRA として作用する天然医薬を開発することを目指し、以下の研究を行った。

- (1) LTR 活性化評価 : LTR の下流に luciferase が組み込まれた TZM bl 細胞をサンプル存在下で 24 時間培養した後、細胞破砕液の luciferase 活性を測定した。
- (2) LRA 活性および細胞毒性スクリーニング : LRA 活性が強く、かつ細胞毒性が弱いエキスをヒットサンプルとした。
- (3) 植物イモガンピ *Stellera chamaejasme* L. エキスに含まれる LRA の単離 : イモガンピの根茎を MeOH 抽出し、エキスを EtOAc と水で分配した。さらに、EtOAc 層を 90% MeOH-H₂O と *n*-hexane で分配した。LRA 活性を示した 90% MeOH 層をカラムクロマトグラフィ

(4) 化合物 13 および誘導体の合成と LTR 活性化評価

化合物 13 の収量は 0.57 mg と少なかったため、市販の phorbol からの合成を試みた。初めに 12 位のベンゾイル化を試みたところ、意外なことに 13 位がベンゾイル化された。これは、12 位はシクロプロパン環と立体障害を有するためであると考えられる。そこで、13 とは 12 位と 13 位のアシル基が入れ替わった 21 も合成した。化合物 21 は、EC₅₀ 値が 13 に比べて 3~4 倍程度減少したため、12 位がベンゾイル基である方が活性は強いことがわかった (表 1)。そして、合成した 13 の EC₅₀ 値は、天然物の値とほぼ同じであった。また、化合物 13 は、13 位のアシル基の二重結合が *Z* 配置であるが、*E* 配置を有する 23 の EC₅₀ 値はほぼ同じ値であった。したがって、二重結合の配置は活性に大きな影響を与えないと考えられる。

また、植物から単離した化合物 1-20 のうち、3、13、14、16、17 は、12 位にベンゾイル基が結合し、13 位のアシル基が異なる化合物である。それらの中で、炭素数が 7、8、10 個のアシル基を有する 3、16、17 の活性にはあまり差が認められなかったため、炭素数がより少ないあるいは多い化合物の活性に興味を持たれた。そこで、炭素数が 3 個および 18 個の化合物を合成したところ、炭素数が 3 個の 22 はわずかであるが活性が減少し、18 個の 24 は活性が大きく減少した。したがって、アシル基の長さは炭素数 7~10 個程度が最適であると考えられる。

化合物 13、14、16 は炭素数が 10 個のアシル基を有し二重結合の数に差が認められたため、二重結合の数や位置の違いにより活性が異なるのか興味を持たれた。そこで、25-28 を合成したが、16 よりも活性の強い化合物は得られなかった。

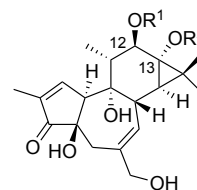


表 1. 合成化合物 13、21-28 による LTR 活性化評価

compd	R ¹	R ²	EC ₅₀ (nM)
21	CO(CH ₂) ₂ (CH=CH) ^Z (CH ₂) ₄ CH ₃	Bz	18
22	Bz	COCH ₂ CH ₃	10
23	Bz	CO(CH ₂) ₂ (CH=CH) ^E (CH ₂) ₄ CH ₃	5.8
24	Bz	CO(CH ₂) ₁₇ CH ₃	—
25	Bz	CO(CH ₂) ₇ (CH=CH) ^Z (CH ₂) ₇ CH ₃	16
26	Bz	CO(CH ₂) ₇ (CH=CH) ^Z CH ₂ (CH=CH) ^Z (CH ₂) ₄ CH ₃	13
27	Bz	CO(CH ₂) ₇ (CH=CH) ^Z CH ₂ (CH=CH) ^Z CH ₂ (CH=CH) ^Z CH ₂ CH ₃	7.6
28	Bz	CO(CH ₂) ₄ (CH=CH) ^Z CH ₂ (CH=CH) ^Z CH ₂ (CH=CH) ^Z (CH ₂) ₄ CH ₃	10
13	Bz	CO(CH ₂) ₂ (CH=CH) ^Z (CH ₂) ₄ CH ₃	5.6

(5) 化合物 1-20 による LTR 活性化の構造活性相関

上記の (3) および (4) の結果から、図 5 に示す構造活性相関が示唆された。本研究で取得した化合物の中には、既存の LRA の活性を上回る有望な化合物が認められたため、PCT 出願するとともに実用化を目指し研究を続けている。

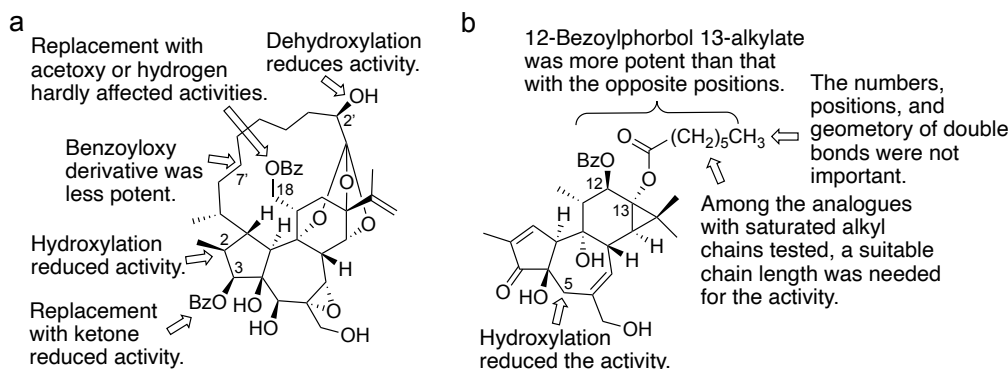


図 5. ダフナン (a) およびチグリアン (b) ジテルペンによる LTR 活性化の構造活性相関

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 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 El-Desoky Ahmed H. H., Eguchi Keisuke, Kishimoto Naoki, Asano Toshifumi, Kato Hikaru, Hitora Yuki, Kotani Shunsuke, Nakamura Teruya, Tsuchiya Soken, Kawahara Teppei, Watanabe Masato, Wada Mikiyo, Nakajima Makoto, Watanabe Takashi, Misumi Shogo, Tsukamoto Sachiko	4. 巻 65
2. 論文標題 Isolation, Synthesis, and Structure-Activity Relationship Study on Daphnane and Tigliane Diterpenes as HIV Latency-Reversing Agents	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 3460 ~ 3472
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jmedchem.1c01973	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

1. 著者名 El-Desoky Ahmed H.H., Eguchi Keisuke, Kato Hikaru, Kishimoto Naoki, Misumi Shogo, Watanabe Takashi, Tsukamoto Sachiko	4. 巻 146
2. 論文標題 Chamaejasmins, cytotoxic guaiane sesquiterpenes from the root of <i>Stellera chamaejasme</i> L.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fitoterapia	6. 最初と最後の頁 104714 ~ 104714
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fitote.2020.104714	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ahmed H. H. El-Desoky, Keisuke Eguchi, Naoki Kishimoto, Toshifumi Asano, Hikaru Kato, Yuki Hitora, Syunsuke Kotani, Teruya Nakamura, Soken Tsuchiya, Teppei Kawahara, Masato Watanabe, Mikiyo Wada, Makoto Nakajima, Takashi Watanabe, Shogo Misumi, Sachiko Tsukamoto
2. 発表標題 Daphnane and Tigliane Diterpenes of <i>Stellera chamaejasme</i> and <i>Wikstroemia retusa</i> as HIV Latency-Reversing Agents: Isolation, Semisynthetic Derivatization and SAR Study
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 HIV感染症治療剤	発明者 三隅将吾;塚本佐知子;岸本直樹;人羅勇氣;前田賢次	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許/PCT/JP2022/009516	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

熊本大学大学院生命科学研究部附属グローバル天然物科学研究センター 天然薬物学分野
<http://kumamoto-natmed.org/>

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		
エジプト	National Research Centre		