

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22390024

研究課題名（和文） 広範囲抗寄生虫薬の開発とその分子基盤の構築

研究課題名（英文） Study of new broad spectrum of anti-parasitic agent and basis of molecular base of it

研究代表者

綿矢 有佑 (WATAYA YUSUKE)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・名誉教授

研究者番号：90127598

研究成果の概要（和文）：

N-89 の住血吸虫に対する作用機構を解析した。

(1) 産卵能抑制に関連するタンパク質因子を網羅的に探索した結果、11 種のタンパク質が変動していた。そのうち、paramyosin は N-89 作用で処理 24 時間後に 30% まで減少した。マラリア原虫の標的分子群と異なることから、両感染症における N-89 の相違をさらに検証して行く必要がある。

(2) N-89 投与により中体が短く、且つ、ヘモゾインの産生量も減少した。

(3) Rhodamine-N-89 付加体を作成して住血吸虫への局在を調べたところ、N-89 は中体へ取り込まれて作用することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

The mechanism of action of N-89 for malaria and schistosomiasis;

(1) Total 11 of proteins were changed by N-89 in *Schistosoma mansoni* using comprehensive proteomics. Among them, paramyosin was reduced to 30% of control after 24hr treatment with N-89. Malaria parasite and *S. mansoni* were not similar target molecules in proteomics with N-89 in the study and it will be necessary to validate further the differences in both 2 pathogens.

(2) Body length of *S. mansoni* was shorted by N-89 administration and production of hemozoin also decreased *in vivo* experiment.

(3) Rhodamine-N-89 adducts will may act incorporated into the parasite body clearly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2011 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2012 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：住血吸虫、マラリア、分子生物学、抗寄生虫薬、ゲノミクス、プロテオミクス

## 1. 研究開始当初の背景

マラリアは年間3～5億人が感染し、150万～200万人が死亡する世界最大の寄生原虫感染症である。特効薬クロロキンと殺虫剤 DDT により、一時撲滅できたかに見えたマラリアは、薬剤耐性マラリア原虫と殺虫剤耐性ハマダラ蚊の出現により、その対策は極めて困難な状況に置かれている。一方、住血吸虫症は世界で2億人以上が罹患し、死者は年間20万人とも言われている重篤な寄生原虫感染症である。マラリア及住血吸虫症の流行地は大規模灌漑事業等により年々拡大している。このようなマラリア及び住血吸虫症の撲滅に薬物療法が不可欠であることは言うまでもない。本研究は発展途上国から強い要請のある「マラリアと住血吸虫症を克服する新しい抗寄生虫薬の開発」と「寄生現象のパラダイムの分子基盤を確立」し、国際貢献するものである。

住血吸虫症に対する特効薬として現在はプラジカンテルが用いられているが、プラジカンテルは副作用の少ない優れた薬物であるが、幼生には効果がないため、予防及び感染初期の投与には適していない。また、感染後プラジカンテルで住血吸虫を駆除しても、肝臓の障害が治療できないまま蓄積してしまう。さらに、プラジカンテルに耐性を持つ吸虫も報告され始めている現在、新たな特効薬の開発が急務であり望まれている。

マラリアと住血吸虫症の病原体には共に宿主の赤血球を栄養源とする共通性があるため、共通する分解・代謝機構が有ると想定した。最近、抗マラリア薬であるアルテミシニン系の薬物及びメフロキンが住血吸虫の幼生に有効であるという報告がなされた。しかし、アルテミシニン系の薬物は未だ化学合成が困難で、発展途上国の人々に大量に供給することは不可能である。また、メフロキンは耐性マラリア原虫が世界中に蔓延しており、住血吸虫症と同時にマラリアの治療を行う目的での使用は耐性病原体の出現の容易さの点で実用化は難しくその有効性に問題が有る。そこで、我々は、アルテミシニンと同様に分子内に環状過酸化構造を持つ新規化合物 N-89 を新たな抗住血吸虫薬候補として研究を始めた。この化合物は我々のグループが合成、選別した化合物であり、強力な抗マラリア作用を有することはすでに明らかにしている。また、N-89 がマンソン住血吸虫に対して優れた阻害効果を示すことは既に明らかにし特許を出願している（綿矢有佑、

金 惠淑，平本晃子，佐藤 聡，太田伸生，熊谷 貴，下河原理江子，谷口斎恵. 新規抗住血吸虫. 特願 2008-172663, PCT/JP2009/61698)。

国外の他のグループからも新規抗住血吸虫候補薬の報告がなされているが、いずれも *in vitro* の結果が主である。Oxadiazole 化合物は感染マウスに投与してはいるが、哺乳動物に対しての毒性試験・体内動態の結果は報告されておらず、住血吸虫への選択性に問題がある。加えて、当然のことながら、これらの化合物では抗マラリア作用は検討されていない。マラリアと住血吸虫症の両方に対して有効である N-89 は寄生虫症の蔓延地域でしばしば見られる混合感染に対して特に有用性が高い。そのため、我々はマラリアと住血吸虫症の両方に有望な新規治療薬の創製とその基盤を構築して感染症治療の土台を提供したい。

## 2. 研究の目的

本研究はマラリアと住血吸虫症の2大寄生虫病に有効な広範囲治療薬を開発することを目的としている。現在用いられている抗寄生虫薬はその適用範囲が狭く、一剤で治療できる寄生虫症は限られている。マラリアと住血吸虫症は罹患者数が圧倒的に多く、蔓延地域が重複しているため混合感染も多い。本研究はこれらの寄生虫病病原体に共通する弱点を見出し、単一の薬剤でマラリアと住血吸虫症という複数の寄生虫病の治療を可能とする治療薬の開発を行い、寄生虫病の制圧に寄与するものである。

## 3. 研究の方法

(1) 肺移行期、肝臓寄生期・雌雄接合開始期、産卵期の各生活環におけるマンソン住血吸虫に *in vivo* 及び *in vitro* で N-89 を投与し、雌雄別々に回収して、得られた可溶性タンパク質画分を二次元電気泳動で分離し、非投与群と比較解析して変動のあるタンパク質スポットを選別する。各スポットをトリプシン消化後 MS 解析で住血吸虫タンパク質を同定する。

(2) 各生活環におけるマンソン住血吸虫から雌雄別々に lysate を調製し、N-89 をリガンドとして affinity chromatography を行い、N-89 と親和性のあるタンパク質を分離する。分離したタンパク質は MS 解析を行ってタンパク質を同定する。

(3) (1)、(2) で得られた結果から N-89 の標的候補タンパク質を特定する。

(4) 標的候補タンパク質の遺伝子配列より アンチセンス・RNAi を設計・作成し、*in vitro* において標的タンパク質をノックダウンして機能解析を行う。この結果より、N-89 の虫体を形態変化・死滅させる効果と産卵能を抑制する効果に関連した標的タンパク質を特定する。

(5) マンソン住血吸虫感染後 5 週目のマウスに N-89 を投与し、12 時間後及び 2 週間後に行ったプロテオーム解析により、いずれの時期にも変動していたタンパク質（オス：増加 6 種類、減少 5 種類　メス：増加 6 種類、減少 6 種類）について発現量を解析する。住血吸虫タンパク質に対する抗体は市販されているものがほとんどないので、他の生物種と比較し、アミノ酸配列の相同性が高いタンパク質に対する抗体、あるいは目的とするタンパク質の一部に相同な部位に対する抗体を購入し、感染後 5 週目のマウスに N-89 を投与し、経時的にタンパク質画分を調製して Western blot を行う。

(6) マンソン住血吸虫感染後 5 週目のマウスに N-89 を投与し、12 時間後に mRNA から調製した cDNA を用い、リアルタイム PCR による発現変動パターンを比較解析する。

(7) (5)、(6) で得られた結果から N-89 の標的候補タンパク質を特定する。

(8) N-89 蛍光ラベル帯を用いた局在解析、及び標的分子解析を網羅的に行う。(5)、(6)、

(7) で得られた結果から N-89 の標的候補タンパク質を同定する。

(9) 新規抗寄生虫薬の臨床試験に向けた流行地の医療行政情報を収集し、本研究の進展に応用する。

#### 4. 研究成果

(1) 産卵能抑制の作用機序の解明のため、マンソン住血吸虫感染後 5 週目のマウスに N-89 を投与し、12 時間後、及び 2 週間後の虫体を回収、雌雄別々にタンパク質可溶性画分を調製し、N-89 投与時に変動したタンパク質をプロテオーム解析より同定した。N-89 を投与したマウスの住血吸虫産卵能抑制は、投与後 4 週間以上持続している事を考え合わせると、両条件で共通して変動していたタンパク質が N-89 の産卵能抑制効果に関与している可能性が高い。プロテオーム解析の結果、雄では構造タンパク質、chaperon 等 6 種類のタンパク質が増加し、5 種類のタンパク質が減少していた。雌では構造タンパク質、

regulatory protein, chaperon 等それぞれ 3 種類のタンパク質が増加、及び減少していた。このうち、雌で減少していた paramyosine を用いて western blot 解析を行った結果、N-89 投与後 24 時間でコントロールの 1/3 に減少していた。

(2) N-89 の住血吸虫に対する直接的な影響を調べるため *in vitro* で実験を行った。まず、マウスにマンソン住血吸虫を感染させ、5 週目に虫体を回収し、*in vitro* で N-89 を加えたところ、強い阻害効果を示した (EC<sub>50</sub> 値：16nM)。形態観察の結果、N-89 投与住血吸虫は有意に虫体が短くなり、ヘモグロビンの消化で生成するヘモゾインの含有量も減少していた。これら N-89 投与によって住血吸虫にもたらされた変化は N-89 の住血吸虫の産卵能抑制に関与していると思われる。

(3) 住血吸虫タンパク質に対する抗体は市販されているものがないので、他の生物種と比較し、アミノ酸配列の相同性が高いタンパク質に対する抗体、あるいは目的とするタンパク質の一部に相同な部位に対する抗体を購入し、感染後 5 週目のマウスに N-89 を投与し、12 時間後にタンパク質画分を調製してウエスタンブロッティングを行ったが、抗体が反応せずタンパク質レベルでの解析が出来なかった。

(4) N-89 のマンソン住血吸虫における薬剤標的タンパク質を同定するため、N-89 ビオチン付加体を作製した。現在、この N-89 ビオチン付加体を用いて、N-89 と親和性のあるマンソン住血吸虫タンパク質の同定を試みている。

4 マンソン住血吸虫内における N-89 の局在を観察するために N-89 に蛍光物質ローダミンを標識したローダミン標識 N-89 を作製した。マンソン住血吸虫の凍結切片に Rhodamine 付加体 N-89 を作用させ、局在の観察を行なった。Rhodamine 付加体 N-89 は住血吸虫体内の核 (DAPI) 及びミトコンドリア

(MitoTracker Red) とは共局在しないが、特異的に局在する部位があることを明らかにした。また、薬剤作用時間に依存して Rhodamine 付加体 N-89 が濃縮される結果を得た。現在、局在部位を明らかにするため、解析を行っている。

(5) ビオチン付加体 N-89 を用いて、N-89 の標的タンパク質を同定するためのプロテオミクスの研究基盤を検討した。現在までに住血吸虫における N-89 の標的タンパク質は同定出来ていないが、今後明らかにしたい。

(6) 物理的破壊によるマンソン住血吸虫のシストミューラ培養液に N-89、あるいは N-251 を直接処理したところ、濃度依存的に

セルカリアの成長阻害と運動性の低下が見られた。両化合物のうち、N-251の方がN-89より阻害能が強く、特に、シストソミューラの運動性に与える影響が大きいことが判った。現在、マンソン住血吸虫の運動性に関わる因子の網羅的な比較解析を行っている。

#### 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9件)

以下、全て査読あり

1. Kamata, M., Hagiwara, J., Hokari, T., Suzuki, C., Fujino, R., Kobayashi, S., Kim, H.-S. and Wataya, Y. Applications of triphenylpyrylium salt-sensitized electron transfer photo-oxygenation reactions to the synthesis of benzo-fused 1,4-diaryl-2,3-dioxabicyclo[2.2.2]octanes as new antimalarial cyclic peroxides. *Research on Chemical Intermediate*, 39, 127-137, 2013 (<http://link.springer.com/article/10.1007/s11164-012-0637-3>)
2. Morita, M., Sanai, H., Hiramoto, A., Sato, A., Hiraoka, O., Sakura, T., Kaneko, O., Masuyama, A., Nojima, M., Wataya, Y. and Kim, H.-S. *Plasmodium falciparum* endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein is a possible target of synthetic antimalarial endoperoxides, N-89 and N-251. *J Proteome Res.*, 11, 5704-5711, 2012 (<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/pr3005315>)
3. Tanaka, Y., Sakamoto, A., Inoue, T., Yamada, T., Kikuchi, T., Kajimoto, T., Muraoka, O., Sato, A., Wataya, Y., Kim, H.-S., and Tanaka, R. Andiroliides HeP from the flower of andiroba (*Carapa guianensis*, Meliaceae). *Tetrahedron*, 68, 3669-3677, 2012 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040402011019727>)
4. Sato, A., Kawai, S., Hiramoto, A., Morita, M., Tanigawa, N., Nakase, Y., Komichi, Y., Matsumoto, M., Hiraoka, O., Hiramoto, K., Tokuhara, H., Masuyama, A., Nojima, M., Higaki, K., Hayatsu, H., Wataya, Y., Kim, H.-S. Antimalarial activity of 6-(1,2,6,7-tetraoxaspiro[7.11]nonadec-4-yl)hexan-1-ol (N-251) and its carboxylic acid derivatives. *Parasitol. Int.*, 60 (4), 488-492, 2011 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138357691100136X>)
5. Sato, A., Hiramoto, A., Morita, M., Matsumoto, M., Komichi, Y., Nakase, Y., Tanigawa, N., Hiraoka, O., Hiramoto, K., Hayatsu, H., Higaki, K., Kawai, S., Masuyama, A., Nojima, M., Wataya, Y., Kim, H.-S. Antimalarial Activity of Endoperoxide Compound 6-(1,2,6,7-Tetraoxaspiro[7.11]nonadec-4-yl)hexan-1-ol. *Parasitol. Int.*, 60, 270-273, 2011 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383576911000444>)
6. Taniguchi, T., Kumagai, T., Shimogawara, R., Ichinose, S., Hiramoto, A., Sato, A., Morita, M., Nojima, M., Kim, H.-S., Wataya, Y., Ohta, N. Schistosomicidal and antifecundity effects of oral treatment of synthetic endoperoxide N-89. *Parasitology International*, 60, 231-236, 2011 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383576911000225>)
7. Nishiyama, Y., Iwasa, K., Okada, S., Takeuchi, S., Moriyasu, M., Kamigauchi, M., Koyama, J., Takeuchi, A., Tokuda, H., Kim, H.-S., Wataya, Y., Takeda, K., Liu, Y., Wu, P., Bastow, K., Akiyama, T. and Lee, K. Geranyl derivatives of isoquinoline alkaloids show increased biological activities. *Heterocycles*, 81, 1193-1229, 2010 (<http://www.heterocycles.jp/newlibrary/downloads/PDF/21203/81/5>)
8. Sato, A., Hiramoto, A., Wataya, Y. and Kim, H.-S. Protein expression profiles of necrosis and apoptosis induced by 5-Fluoro-2'-deoxyuridine in mouse cancer cells. *Journal of Proteome Research*, 9, 2329-2338, 2010 (<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr9010537>)
9. Morisaki, D., Kim, H.-S., Inoue, H., Terauchi, H., Kuge, S., Naganuma, A., Wataya, Y., Tokuyama, H., Ihara, M. and Takasu, K. Selective accumulation of rhodocyanine in plasmodial mitochondria is related to the growth inhibition of malaria parasites. *Chemical Science*, 1, 206-209, 2010 (<http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2010/sc/c0sc00125b>)

[学会発表] (計6件)

1. 中村由香、片本 茜、佐藤 聡、檜垣和孝、綿矢有佑、金 惠淑。経皮吸収型抗マラリア薬の開発研究。日本薬学会第133年会、2013年03月27日～2013年03月30日、横浜、神奈川
2. 片本 茜、脇本達也、渡部裕紀、森田将之、林 孝輔、佐藤 聡、綿矢有佑、高橋拓真、今田智加子、檜垣和孝、金 惠淑。環状過酸化化合物N-251の生物学的利用能向上を目的とする開発研究。第72回日本寄生虫学会東日本支部会、第10回分子寄生

- 虫・マalariaフォーラム、2012年10月12日～2012年10月13日、前橋、群馬
3. 金 惠淑。薬剤耐性マalariaを如何に制御できるか？－日本から発信する新しい抗マalaria薬－。Bio Japan 2012 (World Business Forum)、2012年10月10日～10月12日、横浜
  4. Kim, H.-S. New antimalarial endoperoxides -Bench to bed for malaria control- The 5th ASEAN congress of tropical medicine and parasitology. 2012年5月15日～5月17日, Manila, Philippine
  5. 森田 将之、平本 晃子、佐藤 聡、岡田 和朗、鎌井 一気、脇本 達也、林 孝輔、片本 茜、渡部 裕紀、高橋 拓真、今田 智加子、平岡 修、野島 正朋、檜垣 和孝、綿矢有佑、金 惠淑。新規抗マalaria薬・環状過酸化化合物の開発研究。日本薬学会第132年会、平成24年3月28日～3月31日、札幌
  6. 金 惠淑、平本晃子、佐藤 聡、森田将之、熊谷 貴、下河原理江子、谷口斎恵、奈良 武司、太田伸生、綿矢有佑。新規抗住血吸虫薬の開発研究、第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会 合同大会、2010年12月8日、神戸

〔図書〕 (計4件)

1. 金 惠淑、佐藤 聡、森田将之、綿矢有佑。薬剤耐性マalariaに対する新規治療薬開発の現況。最新医学、67 (11) , 74-79, 2012
2. 牧 純、玉井栄治、関谷洋志、廣瀬恭子、秋山伸二、難波弘行、金 惠淑、坂上 宏。旅行医学・旅行薬学の視点より論考する釜山 (韓国) -心身の健康対策と旅による薬学的知見-。松山大学論集23 (6)、257-28、2012.
3. 牧 純、難波弘行、秋山伸二、玉井栄治、関谷洋志、金 惠淑、廣瀬恭子、坂上宏、柴田和彦、八重徹司、山口功、相良英憲、出石文男。薬学の領域としての「旅行医学」の提唱。愛媛県病薬会誌通巻109号、9-20、2011.
4. 佐藤聡、金 惠淑、綿矢有佑。核膜の裏打ちタンパク質Lamin-B1。生体の科学、Vol.62 (5), 406-407, 2011.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

綿矢 有佑 (WATAYA YUSUKE)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・

名誉教授

研究者番号：90127598

### (2) 研究分担者

佐藤 聡 (SATO AKIRA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40530663

金 惠淑 (KIM HYE-SOOK)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：70314664

土居 弘幸 (DOI HIROYUKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：20452568