

## 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 5 月 1 日現在

機関番号：15301  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22590099  
 研究課題名（和文） 薬剤耐性マラリアに有効な新規治療薬の創製研究  
 研究課題名（英文） New Antimalarial Drug Development Research

## 研究代表者

金 惠淑 (Hye-Sook KIM)  
 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

## 研究成果の概要（和文）：

地球温暖化と薬剤耐性マラリアの根絶の為に新薬開発研究を行い、下記の研究成果を得た。

1. 過酸化構造を有する有機合成化合物 40 種、及び天然生薬資源由来の 20 種を用いて抗マラリア活性を評価した結果、1  $\mu$  M で抗マラリア活性を示す化合物を見出した。
2. 臨床使用を想定した実験系（感染率が 5%以上）で過酸化構造を有する化合物 (N-89) は高い抗マラリア活性を示した。
3. N-89 の血中滞留時間を延長させるために剤形検討を行った。オイル以外の剤形でも抗マラリア薬効は弱いながら維持されるものの、血中滞留遅延効果は見られなかった。

## 研究成果の概要（英文）：

I found several results for new antimalarial drug development study against multi-drug resistant *Plasmodium falciparum*.

1. A few numbers of compounds indicating the 1 $\mu$ M of antimalarial activity for *P. falciparum* (FCR-3 strain) were acquired using 40 kinds of organic synthetic compounds having peroxide structure in the body and 20 kinds of compounds from the natural product.
2. To evaluate of antimalarial activity for N-89 in clinical model system of malaria patients, N-89 has high and strong antimalarial activity in more than 5% of parasitemia of *P. berghei* infected-mice model on oral route of it.
3. I prepared several kinds of N-89 formula for long lasting effect in blood concentration of mice model. As results, the different formulation of N-89 has weak antimalarial activity compare of oil-N-89 but they did not changed pharmacokinetic parameters in mice compare of oil-N-89.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬科学

キーワード：多剤耐性マラリア、抗マラリア薬効、有意合成化合物、天然生薬資源、投与ルート、体内動態、剤形工夫、医薬品化学

1. 研究開始当初の背景

マラリアは日本本土から駆除されて 40 年

近くになるが、地球上でのマラリアの地位は揺るぎなく、未だに三大感染症の一つに数えられている。マラリアの感染者は世界で2億7千万人以上（年間死亡者数は100万人以上）であり、特に発展途上国ではこの疾患が主な死亡原因の一つとなっている。現在のところ、有効なワクチンはなく、マラリア原虫は各種マラリア治療薬に耐性を獲得し、WHOが推奨する Artemisinin を基本とした併用療法についても耐性を示すマラリア原虫が出現し、新しい抗マラリア薬の開発研究は急務である。

私は今までの研究の中で有機合成品と天然生薬資源由来の化合物より抗マラリア活性を示す化合物を見出した（環状過酸化化合物、常山由来のアルカロイド）。しかし、臨床開発して行くためには体内動態、安全性などの問題点が懸念された。そこで、有機合成品と天然生薬由来化合物を用いて再度スクリーニングし、安全で次の開発ステップに繋がってける化合物を選抜し、作用機序の明瞭な抗マラリア薬をマラリア流行地に提供したい。

## 2. 研究の目的

私は、薬剤耐性マラリアを克服できる新しいマラリア治療薬の開発を行い、マラリア制圧に寄与することを研究目的として本研究を進める。有機合成品である環状過酸化化合物、天然資源由来の常山アルカロイド誘導体、及び他の構造を有する生薬由来化合物を中心に *in vitro*, *in vivo* における薬効解析と臨床試験に向けて最適の抗マラリア候補薬を選抜する。また、今まで得られた優れた抗マラリア活性を示す環状過酸化化合物について剤形検討を行い、安全性評価、及び抗マラリア作用機序の解析も視野に入れて研究を行う。

## 3. 研究の方法

(1) *In vitro*, 及び *in vivo* 評価系を用いた環状過酸化化合物誘導体、及び天然生薬資源由来化合物の抗マラリア活性

- ① 常山誘導体の構造に基づいた誘導体の選別と過酸化構造を有する有機合成品を用い、*in vitro* で抗マラリア活性を評価する。
- ② 培養熱帯熱マラリア原虫 (FCR-3 株) に対して高い抗マラリア活性が得られた化合物についてマウスを用いた抗マラリア薬効評価を実施する。
- ③ 養熱帯熱マラリア原虫株 (クロロキン、メフロキン、並びにアルテミシニン耐性を示

す) に対する抗マラリア薬効と培養細胞株を用いた毒性評価を同時に実施する。マラリア原虫に対する選択毒性が10倍以上の誘導体を選抜し（50%マラリア原虫の増殖阻害濃度は0.1 $\mu$ M以下が望ましい）、再度、これら構造を含む周辺化合物の生理活性評価と構造-活性相関を検討する。天然生薬資源由来の化合物についても活性を有する候補化合物の構造を含む半合成物で再度評価する。さらに、これら既存抗マラリア薬に耐性を示す原虫株での交差耐性有無を検討し、将来生じうる新たな薬剤耐性発現有無を予測する。

- ④ ③で選抜した誘導体を用いて動物レベルでの抗マラリア活性を評価する。この段階で宿主（ヒト）に対して毒性を示さないかあるいは低毒性を示す化合物を中心に、抗マラリア薬効評価を再度実施して抗マラリア作用の高い化合物を選抜する。

(2) 次世代抗マラリア薬としての環状過酸化化合物の臨床開発研究

- ① 1,2,4,5-テトラオキサシクロアルカン類化合物 (N-89) のマウスに対する最適投与スケジュール検討を行う。N-89 は 4-day suppressive test の結果、50mg/kg の経口投与で完治する予備結果をすでに得ている。マラリア患者を治療する事を想定して、血中原虫感染率が5%~30%の時にN-89を経口投与し、その推移を観察する。初期感染率と抗マラリア活性が相関するかどうか検討することで、N-89 の臨床使用時の薬効を最大限に引き出す投与スケジュールを確立する。
- ② 重症マラリア患者の治療を目的とした注射剤（静脈内）の開発を行う。N-89 はアルテミシニンと同様に不溶性の化合物であるため、既存の溶解剤 (olive oil, Cremophor, Tween 等)、あるいは医薬品添加物として承認された懸濁化剤 (HPC, HPMC 等) を用いて注射剤として抗マラリア効果を評価する。薬物血中濃度-時間曲線下面積 (AUC: area under the blood concentration time curve) を高めるためにナノテクを駆使した微粒子化-N-89 の作成、あるいは、上記に示す医薬品添加物を混合した条件での微粒子化剤 (乾式条件) を作成し、これら体内動態解析を行う。
- ③ ②で得られた化合物の体内動態解析を行う。既に過酸化構造を有する化合物の検出法を確立したので、誘導体の体内動態解析も可能である。この研究で選抜化合物の体内動態解析と抗マラリア活性を総合的に評価し、流行地に適した剤形の検討を行う。

- ④ 剤形改善検討の結果、油脂、界面活性剤、及び界面活性補助剤を配合する事で、体内動態解析の改善が見られる予備的結果を得たので、配合比率、用いる溶剤等を改変して半減期の長い剤形を選抜する。
- ⑤ ④までの研究で得られた新規抗マラリア候補化合物の作用機序の解析研究をオミクス手法（プロテオーム解析、トランスクリプトーム解析を含む）を用いて原虫特有の標的分子を同定し、最終的に作用機序の明確な新規抗マラリア治療剤候補を選抜する。

#### 4. 研究成果

(1) 環状過酸化誘導体10種、および天然生薬成分由来の化合物20種の薬効を解析した結果、 $1\mu\text{M}$ 以下で抗マラリア活性を示す化合物を1種見出した。この化合物は環状過酸化構造を有するものの、種々の誘導体を用いたか解析研究で、構造-活性相関を見出せる一連の関連性を見出すことが出来なかった。現在、さらなる置換基を導入した誘導体30種を新たにデザインし、合成した。細胞毒性評価の結果、これら化合物は $1\mu\text{M}$ ~ $20\mu\text{M}$ の濃度で細胞毒性を示した。今後、引き続き抗マラリア活性評価を行う。

(2) 天然生薬資源由来の化合物については抗マラリア活性報告がされているアルカロイドとテルペノイド（一部は半合成）の化合物ライブラリから有望と思われる基本骨格を示す化合物10種をさらに選抜した。現在、*in vitro*薬効と毒性評価を進めている。

(3) 過酸化化合物を含む関連化合物を用い、毒性出現有無をホストのモデル細胞系で調べた結果、細胞培養系での毒性発現は $10\mu\text{M}$ 以上であり、マラリア原虫を選択的に阻害することが判った。

(4) (3) の評価系で用いた過酸化化合物群を *in vivo* 動物評価系で抗マラリア薬効評価を行った。その結果、抗マラリア活性が見られたものの活性は弱く、結果としてマウスは完治しなかった。マラリア流行地の状況を考慮すると、これら化合物は数時間以上の血中半減期が要求される。既に見出した N-89 同様、これら化合物は血中半減期が短く、そのため、完治出来なかったと考えられる。現在、置換基の導入、及び既存の剤形改善法を駆使した製剤改善研究を計画している。

(5) マラリア流行地に適した 1, 2, 4, 5-テトラオキサシクロアルカン類化合物 (N-89) の投与スケジュールを検討した。マラリア患者を治療する事を想定して、血中原虫感染率が5%の時に N-89 を経口投与し ( $68\text{mg}/\text{kg} \times 3$  回

／日×3日)、その推移を観察した。その結果、N-89 投与3回目から感染率の低下が見られ、その後は感染率が上昇する事無く薬剤投与完了時に血中原虫は検出されなかった。また、血中感染率を10%にあげた実験系でも、血中原虫は検出されないことから、N-89 は高マラリア原虫感染マウスにおいてもマラリア原虫を死滅する能力を有する事が示唆された。

(6) 作用機序の解析研究の結果、N-89 を処理したマラリア原虫培養液より、血球由来のタンパク質が2種同定され、現在、これらタンパク質と N-89 の関連について検討を開始した。

(7) 過酸化構造を有する化合物の体内動態解析を行った。医薬品として開発するためには代謝産物の同定とその代謝産物の薬効発現有無が重要である。そのため、代謝産物の同定方法について検討を行った。動物の肝ミクロソームを用いた *in vitro* での代謝産物の同定の結果、反応条件時に用いる NADPH が過酸化構造の分解に関わり、検出の妨げになることが判った。現在、NADPH の代わりに代謝産物を測定出来る方法を検討している

(8) 重症マラリア患者の治療を目的とした注射剤（静脈内）開発研究で、懸濁化剤として HPMC、Cremophore、及び EtOH を種々の配合比で混ぜ、N-89 懸濁液を作成した。この N-89 溶液を用いて抗マラリア活性評価と体内動態解析の結果、従来の olive oil に溶解した N-89 より薬効が低下し、血中半減期も短くなっていた。その他の剤形検討の結果、抗マラリア薬効は示すものの、一部の N-89 剤形は濃縮して血中濃度を測定することができた。

本研究成果は多剤耐性マラリアに有望な治療薬（治療法）を見出すための基礎研究であり、マラリアの根絶に向けて、新しい医薬品のシーズ発掘に貢献することができると考えている。また、マラリアの現況に適した医薬品開発を展開しているので、世界のマラリア研究者からも支持を得ている。研究成果を論文、学会等で発表することで共同研究など、組織的に研究展開して行きたい。また、不溶性製剤の可溶化に向けた最新の研究成果を私たちの N-89 の研究も応用し、臨床開発に拍車をかけたい。

#### 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 10 件)

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 HS. 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., Komich 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. 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>)
  7. 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>)
  8. Kumura, N., Furukawaa, H., Onyangob, A., Izumia, M., Nakajimaa, S., Ito, H., Hatano, T., Kim, H.-S., Wataya, Y. and Baba. Different Behavior of Artemisinin and Tetraoxane in the Oxidative Degradation of Phospholipid. *Chemistry and Physics of Lipids*, 160(2), 114-120, 2009 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009308409000796>)
  9. Kumura, N., Furukawa, H., Kobayashi, M., Onyango, A. N., Izumi, M., Nakajima, S., Kim, H.-S., Wataya, Y. and Baba, N. Synthesis of novel conjugates of tetraoxane endoperoxide with bis (quaternary ammonium salts). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73 (1), 217-220, 2009 ([https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/73/1/73\\_80571/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/73/1/73_80571/_pdf))
- [学会発表] (計 7 件)
1. 金 惠淑。薬剤耐性マラリアを如何に制御できるか?—日本から発信する新しい抗マラリア薬—。Bio Japan 2012 (World Business Forum)、2012年10月10日～10月12日、横浜
  2. 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
  3. 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。新規抗マラリア薬・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
  4. 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。薬剤耐性マラリアに対する新規治療薬開発の現況。最新医学、67 (11) , 74-79, 2012

6. 研究組織

(1)研究代表者

金 惠淑 (Hye-Sook KIM)

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

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：