

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 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590378

研究課題名（和文） クリプトスポリジウム症の効果的な治療に関する研究

研究課題名（英文） Study to explore drug seeds for cryptosporidiosis

研究代表者

所 正治（TOKORO MASAHARU）

金沢大学・医学系・講師

研究者番号：30338024

研究成果の概要（和文）：免疫不全患者における下痢症の原因原虫として深刻な病害をもたらすクリプトスポリジウム症を効果的に治療可能な薬剤シーズを見いだすことを目的に、候補化合物による抗クリプトスポリジウム効果スクリーニング方法を培養細胞感染モデルの利用により確立した。これにより、アデノシンアナログの一部に明らかクリプトスポリジウムの増殖抑制効果を見だし、また、類似化合物である既存抗がん剤の一部に同様の効果を確認した。

研究成果の概要（英文）：Due to the lack of effective chemotherapy, severe cryptosporidiosis especially seen in immune-compromised host is often fatal. To explore drug seeds for the opportunistic infection, a screening method of the drug effect against *Cryptosporidium parvum* in a cell culture model was successfully developed. Using the assessment procedure, anti-cryptosporidial efficacy was confirmed in a part of adenosine analogues, including anti-cancer drugs used in clinical sites.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：寄生虫学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

クリプトスポリジウム症は腸管寄生原虫クリプトスポリジウムを原因とする下痢症を主症状とする疾患であり、免疫不全患者においては、慢性化・劇症化が知られ、死の転帰をとりうる危険な感染症でもある。本原虫に対する薬剤治療については、ヒト第1症例が報告された1976年以来、様々なトライアルが行われてきた。パロモマイシン、アジス

ロマイシン、クラリスロマイシン、ニタゾキサニド等の薬剤は、健常人の症例において下痢症の罹患期間の短縮をもたらさうと報告され使用されているが、免疫不全患者での重症クリプトスポリジウム症を完治しうる薬剤は見出されていない。本原虫に対する薬剤開発の緊急性は、免疫不全における二重盲検法による薬効のエビデンスが存在しないにもかかわらず、2005年6月に、ニタゾキサニド（Alinia®）の米国内での全面的な使

用が FDA により認可されたことに現れており、メキシコで購入された本薬剤の米国内での使用が常習化していることを考慮した例外的措置とみられている。

上記のように治療薬が望まれているにもかかわらず、クリプトスポリジウムは、マラリア、リーシュマニア、トリパノソーマなどの他の原虫と同様に、民間製薬会社での新規薬剤開発計画の存在しない、いわゆる **Neglected diseases** (無視された疾患) のひとつとされている。したがって、臨床において使用可能な薬剤の開発を実現していくためには、多くの既存薬の特許を保有する企業に対する効能の拡大によるアプローチや、WHO/TDR 等の発展途上国向けの薬剤開発イニシアチブ (例えば、**Drugs for Neglected Diseases initiative**) などへの申請を通じて、製薬企業との共同研究を進めていく方法をとっていく必要がある。

ヒトから検出されるクリプトスポリジウムの大部分は、ヒトのみに感染する *Cryptosporidium hominis* と幅広いほ乳類を宿主とする人獣共通感染症である *C. parvum* の 2 種だが、これら 2 種のゲノムプロジェクトが 2004 年に相次いでコンプリートし、これまで未解明であった多くの代謝経路が明らかになった。しかし、個々の代謝経路に関する詳細な解析及び、その結果を利用した創薬は今後の課題である。

ゲノムデータから予想されるクリプトスポリジウムの代謝経路では、アデノシンデアミナーゼや硫黄転移経路が存在せず、またこれまでの研究よりクリプトスポリジウムはアデノシンを環境中からトランスポーターを介して取り込んでいる。したがって、アデノシン関連化合物と、さらに核酸代謝と含硫アミノ酸代謝間の転換酵素として重要な役割を果たしているアデノシルホモシステイン加水分解酵素をターゲットとした各種代謝産物アナログによるトライアルはクリプトスポリジウムには効果的なのではないかと考えたのが、特異代謝経路に関連する薬剤シーズスクリーニングという本研究のスキームの着想のベースである。

2. 研究の目的

クリプトスポリジウム症に対する効果的な治療薬シーズを見いだすため、以下の各課題を達成した。

(1) クリプトスポリジウムの培養細胞感染モデルを用いた薬剤効果の定量的解析システムの構築

(2) アデノシンアナログによる抗クリプトスポリジウム効果の酵素学的作用機序解明

(3) 既存関連薬剤における類似化合物の抗クリプトスポリジウム効果の解明

(4) 定量法の他の抗クリプトスポリジウム効果の探索への応用

3. 研究の方法

(1) クリプトスポリジウムの増殖率の定量法確立：SYBR Green を用いた定量リアルタイム PCR 法により、*Cryptosporidium parvum* HNJ-1 strain の感染培養細胞 (ヒト回盲腺癌細胞) デルにおける感染原虫の増殖を定量する方法を確立した。具体的には、培養系への感染クリプトスポリジウム量とリアルタイム PCR による定量結果の標準曲線を評価した他、このような定量性が、薬剤効果の定量に利用可能かどうかを現在使用されている nitazoxanide (NTZ), paromomycin (PRM), azithromycin (AZT) などのクリプトスポリジウム治療薬と新たに合成したアデノシンアナログ neplanocin A および 2-fluoroadenosine を用いて評価した。

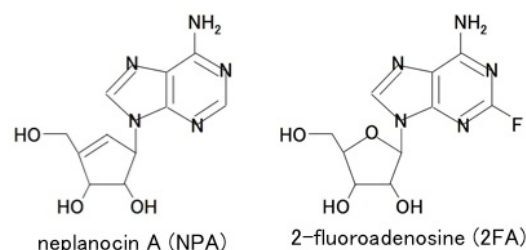


図 1. 増殖抑制評価および酵素学的解析に用いた 2 種のアデノシンアナログの構造

(2) 核酸代謝系における抗クリプトスポリジウム効果発現機序の特定：核酸代謝系において抗クリプトスポリジウム作用に関与する代謝ステップを同定するため、含硫アミノ酸代謝とアデノシン代謝を連結するキーエンザイムである *S*-adenosyl-*l*-homocysteine hydrolase (SAHH) の open reading frame (ORF) をクローニングし、組換えタンパク質を大腸菌で作成、酵素学的な解析を実施した。また、上記 (1) において効果を示したアデノシンアナログを用いて、SAHH 活性阻害効果解析を実施し、その作用機序を評価した。

(3) シーズ化合物の探索：上記スクリーニングによって得られた知見をベースに、抗がん剤等ですでに臨床使用されている薬剤の中から、cladribine、clofarabine、pentostatin、ara G、cytarabine、gemcitabine、enocitabine、zidovudine を選択し、抗クリプトスポリジウム作用解析を実施した。

(4) 本研究によって確立したクリプトスポリジウム定量解析法の感染阻害評価への応用可能性評価：IgY 卵黄抗体 (鶏卵抗体) のクリプトスポリジウム感染阻止効果について

ての評価を実施した。

4. 研究成果

(1) クリプトスポリジウムの培養系における増殖率評価を定量リアルタイムPCR法により評価可能とした。具体的には、図2に示したように感染オーシスト数 $10^1 \sim 10^7$ 個のオーダーにおいて標準曲線が作成可能であり、コントロールとの比較により、細胞進入の阻害、あるいは細胞内での増殖効率の評価が定量的に実施可能である。また、内部標準にDNA精製時に加えた添加DNAを使用し、さらにactin遺伝子をターゲットとした宿主細胞の定量を同時に実施するため、薬剤の抗クリプトスポリジウム効果と細胞毒性の両方を一つの系で評価することが可能となった。また、本法ではSYBR Greenを使用していることから安価に*C. parvum* DNAを定量でき、臨床分離株を含む様々な*C. parvum*の薬剤効果や耐性を評価することが可能である。

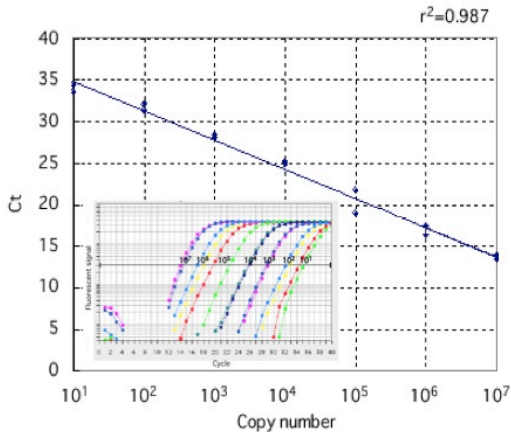


図2. リアルタイムPCRによるスタンダードカーブ
培養細胞中へ感染させたオーシスト量 $10^1 \sim 10^7$ 個において、
定量性を確認した($r^2=0.987$)

(2) neplanocin A (NPA) および 2-fluoroadenosine (2FA) の各アデノシンアナログの抗クリプト作用解析結果は、以下の通り。

①NPAは濃度依存的に培養クリプトスポリジウム増殖を抑制(50%有効濃度 $EC_{50} = 139 \mu\text{M}$)したが、その効果は、マラリア原虫($EC_{50} = 0.20 \mu\text{M}$)やHIV($EC_{50} = 0.001-0.1 \mu\text{M}$)に対する効果よりも低く、クリプトスポリジウムの薬剤抵抗性を確認することとなった。

②2FAは、クリプトスポリジウムの細胞培養系では効果を示したが、詳細解析により、宿主細胞への毒性がこの効果をもたらしている可能性が示唆され、 EC_{50} を決定することができなかった。細胞毒性を評価しないスクリーニング系では、このような候補基質が高い効果を示す基質としてピックアップされる危険性が示され、また、本法の有用性が明らかになった。

かになった。

(3) アデノシルホモシステイン加水分解酵素 S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase (SAHH) に関する酵素学的阻害反応解析では、NPAは組換えクリプトスポリジウムSAHHの活性を競合的に阻害($K_i = 0.395 \mu\text{M}$)することが明らかになった。一方、2FAはSAHHに対する阻害効果は示さなかった。

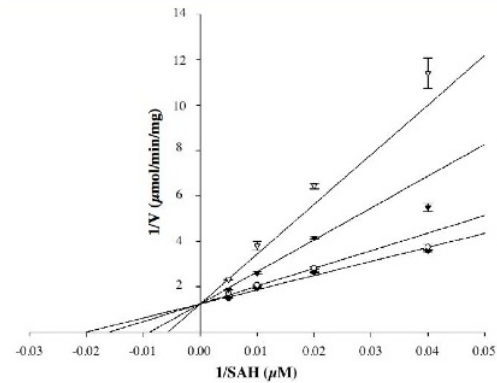


図3. NPAによるSAHHの競合阻害反応。Lineweaver-Burk plotにより、0, 0.1, 0.5, 1 μM のNPA存在下の反応を示す。

(4) 既に使用されている抗がん剤の中で、特にアデノシン類似化合物に注目し、抗クリプトスポリジウム効果を評価した。cladribine, clofarabine, cytarabine, gemcitabineのクリプトスポリジウムの増殖に対する EC_{50} は、それぞれ $5.44 \mu\text{M}$, $0.585 \mu\text{M}$, $3.17 \mu\text{M}$, and $1.07 \mu\text{M}$ と、唯一の承認薬であるニタゾキサニド $EC_{50} = 50.2 \mu\text{M}$ を超える効果を示した。一方、pentostatinおよびara-Gでは有意な効果を認めなかった。

以上の結果は、既存関連薬剤を用いたクリプトスポリジウム症治療のためのトライアルが効果を上げる可能性があることを示唆しており、特に、上記の薬剤と、ニタゾキサニドやパロモマイシンなどの従来使用されてきた抗クリプトスポリジウム薬によるコンビネーションには、効果をあげる可能性があると考えられた。

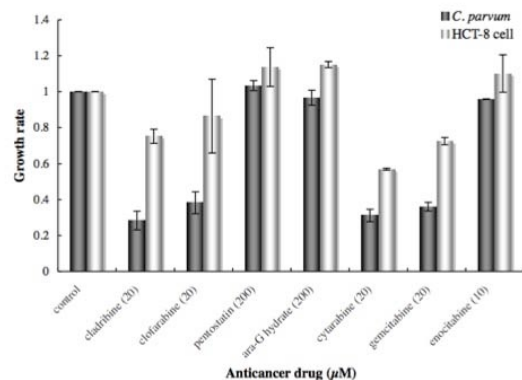


図4. 各種抗がん剤の*C. parvum*およびヒト細胞(HCT-8)への増殖阻害作用評価

(4) 卵黄抗体 (鶏卵抗体) のクリプトスポリジウム感染阻止効果について本法を用いたスクリーニング結果は以下の通り。

①クリプトスポリジウム P15 組換えタンパク質により作成した抗 P15 IgY 抗体を 10mg/ml 濃度で使用した場合、培養系において約 38% のスポロゾイトの侵入阻止を見た。

②P23 IgY 抗体を同濃度で使用した場合には、約 76% の侵入阻止効果を認めた。

③同濃度の P15 および P23 IgY 抗体をコンビネーション出使用すると約 87% の侵入阻止効果を認めた。

④比較に使用したクリプトスポリジウムのスポロゾイト粗抽出抗原により免役した抗スポロゾイト IgY 抗体では、阻止効果ははっきりしない。

局所での卵黄抗体のこれほどの高濃度を生体内で維持するという点に問題はあるが、スポロゾイトの侵入前に抗スポロゾイト抗体が実際に感染を阻止しうる可能性が確認された。また、本研究で確立したスクリーニング手法は、抗体薬によるクリプトスポリジウムの侵入阻止効果についても評価可能であることが明らかとなった。

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 吉川尚男、橘 裕司、所 正治、阿部 仁一郎. 腸管寄生原虫の遺伝子検査法. 検査と技術 vol. 40 (No. 6) 2012 (医学書院):478-492, 査読無
- ② Arai T, Kimata I, Kitade Y, Nakamoto K and Tokoro M. In vitro assessment of anticryptosporidial efficacy and cytotoxicity of adenosine analogues using a SYBR Green real-time PCR method. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2011 Mar;66(3):560-3. 査読有, DOI:10. 1093/jac/dkq522

[学会発表] (計 4 件)

- ① 所 正治. 免疫不全患者において考慮すべき日和見原虫症のリスク. 第 20 回食細胞機能異常症研究会、2012. 12. 15, 東京慈恵会医科大学南講堂 (東京)
- ② 所 正治. 症例にみる寄生虫感染症. 第 19 回中部圏支部微生物検査研究班宿泊研修会. 2012. 11. 10, 加賀片山津温泉佳水郷 (石川県)
- ③ 所 正治. 腸管寄生原虫: 網羅的検出により見えてくるもの. 第 153 回日本獣医学会学術集会 獣医寄生虫学会シンポジウム「臨床医学から見た人獣共通寄

生虫症」2012. 3. 28, 大宮ソニックシティ (埼玉県)

- ④ 荒井朋子, 木俣 勲, 北出幸夫, 所 正治. アデノシンアナログによる SAHH 酵素阻害作用の抗クリプトスポリジウム効果の検討. 第 67 回日本寄生虫学会西日本支部大会、2011. 10. 8, 金沢 (石川県)

[図書] (計 5 件)

- ① 所 正治, 医学書院, 今日の治療と看護 (改訂第 3 版), クリプトスポリジウム症, 2013. 3. 30, 965 頁
- ② 所 正治, 西村書店, カラー版内科学, クリプトスポリジウム症, イソスポーラ症, サイクロスポーラ症, 2012. 7. 24, 1890-1891 頁
- ③ 荒井朋子, 所 正治, 文光堂, Medical Technology 別冊 新 染色法のすべて, クリプトスポリジウムのオーシストの染色, 2011. 3. 25, 372-373 頁
- ④ 所 正治, 日本臨牀社, 別冊 日本臨牀新領域別症候群シリーズ No. 13 肝・胆道症候群 (第 2 版) —その他の肝・胆道系疾患を含めて—, 肝クリプトスポリジウム症, 2010. 9, 131-134 頁
- ⑤ 所 正治, 井関基弘, 日本臨牀社, 日本臨床増刊号: 広範囲血液・尿化学検査・免疫学的検査—その数値をどう読むか— [第 7 版], クリプトスポリジウムとジアルジア, 2010. 6;68(6), 263-266 頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

所 正治 (TOKORO MASAHARU)

金沢大学・医学系・講師

研究者番号: 30338024

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし