

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659212

研究課題名（和文） 新規抗リーシュマニア薬の開発研究

研究課題名（英文） Study of novel anti-leishmanial drug

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）：

Leishmania major の promastigotes に対する新規創薬シーズ探索研究を行った。68種の化合物の中から、EC₅₀値が27 nM、42 nMと低い化合物2種類を見出した。一方、コントロールとして用いた Amphotericin Bでは、リーシュマニア原虫でEC₅₀値が63 nMと46倍の選択毒性を示すことから、構造-活性相関に基づいた評価をさらに行う。

作用機序解析のツールとしてHSP90と反応する抗体を見出し、リーシュマニア原虫のHsp90複合体の構成因子を解析できる基盤を構築した。また、新規阻害剤としてGeldanamycinとその誘導体、及び低分子のHsp90阻害剤が30～40 nM でリーシュマニア原虫阻害能を示すことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

I performed to new drug discovery research for 68 compounds from organic compounds and natural product using promastigotes of *Leishmania major*. The EC₅₀ values among 2 of them for *L. major* were 42 nM and 27 nM. In contrast, Amphotericin B as a positive control was show 63 nM of EC₅₀ value for *L. major* and selective toxicity of 46-fold compare to mammalian cells of it. The structure-activity relationship study will be need more.

I established the mechanism analysis of HSP90 and complex relationship in *L. major* and also we found the high anti-leishmanial effect for HSP90 inhibitor and it's analogs include small molecules (EC₅₀ values; 30-40 nM) against *L. major* promastigotes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

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：リーシュマニア原虫、アンチモン製剤、抗リーシュマニア活性評価、Geldanamycin、Hsp90、*Leishmania major*、*Leishmania donovani*

1. 研究開始当初の背景

リーシュマニア属の寄生原虫が感染して発症するリーシュマニア症は、皮膚・粘膜、

皮膚・内蔵リーシュマニア症に大別できる。特に内蔵リーシュマニア症は皮膚が黒ずみ、肝臓・脾臓が腫脹して処置しなければ致死率

が90-100%に達する非常に重篤な疾病である。現在、世界88カ国3億5千万人が感染の機器に曝され、毎年新たに200万人が罹患している。従来アンチモン製剤が第一選択薬として治療に用いられて来たが、副作用が非常に強く、さらに最近では耐性原虫も報告されている。アンフォテリシンBも治療に用いられるが、高価である・腎毒性がある・経口投与が困難であると言う理由によりやはり感染地域での使用は困難である。最近になってミルテフォシンが開発され、経口投与できる副作用の少ない画期的な薬剤として注目された。しかし、半減期が長いこと、動物で催奇形性が報告されていることなどの問題を抱えている。また、再発する患者が報告され、早い時期に耐性が出現することが危惧されている。これらの諸問題を考え合わせると新たな抗リーシュマニア薬は緊急の改題である。そこで、本研究は当研究室で保有している化合物ライブラリーを活用して、安全で安価な抗リーシュマニア薬の開発を目指す。

2. 研究の目的

重篤な寄生原虫感染症であるリーシュマニア症に現在用いられている薬剤は、毒性が高い・高価である・耐性原虫が出現している等の理由により、感染地域におけるコンプライアンスは低い。これらの問題を解決すべく新たな抗リーシュマニア薬を開発することは緊急の課題である。そこで、本研究では当研究室が所有している化合物ライブラリーを活用して、*in vitro*において、リーシュマニア原虫への阻害能が高く、哺乳動物細胞への毒性が低く、かつ *in vivo* においても抗リーシュマニア活性を有する化合物を抗リーシュマニア薬として開発することを目的とする。また、以前の研究で *in vitro* で特に活性の高かったイノシンアナログとの組み合わせによりさらに有効な治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 当ラボ保有のライブラリーの化合物を培養リーシュマニア原虫に三段階の濃度で投与し、効果のある化合物を一次スクリーニングする。リーシュマニア原虫は宿主のマクロファージ内に寄生した形態 (Amastigotes) と媒介動物であるサシチョウバエの体内の形態 (Promastigotes) の二通りの形態をとる。これら二通りの形態で

化合物に対する感受性も異なっているが、一次スクリーニングでは培養が容易な Promastigotes に対する阻害活性を指標として化合物の選別を行う。すなわち、24穴プレートで培養したリーシュマニア原虫の Promastigotes に 1 μ M, 100nM, 10nM の3段階に希釈したラボ保有の化合物ライブラリーから既存論文等で報告されている構造を示す化合物を中心に38種選抜して、本実験に用いた。

(2) 副作用の軽減を目指した天然生薬資源由来の化合物を30種選抜して抗リーシュマニア作用を評価する。

(3) 上記の(1)(2)で選抜した化合物と溶媒のみをそれぞれ2穴ずつに添加し、72時間後の原虫の増殖を溶媒のみ添加したコントロールの原虫の増殖を100%として換算し、100nMでの増殖阻害能が50%以上で、1 μ M作用時に増殖を強く阻害した化合物を有効とみなす。10nMで50%以上の増殖阻害を示した化合物は新薬の有望な化合物であるといえる。

(4) 宿主のモデルとしてマウス乳がん由来 FM3A 細胞を用いて *in vitro* で阻害活性を解析する。(3)、(4)の結果より、リーシュマニア原虫に対する阻害活性が高く、FM3A 細胞に対する阻害活性が低い化合物が優れた薬物候補化合物となる。

(5) 作用機序解析のツールとしてリーシュマニア原虫の HSP90 の機能解析を行う。ヒト由来、あるいは他の生物種の HSP90 間のタンパク質の配列から相同性のある部分を決定し、交差反応の有無を検討する。既存の販売の HSP90 の抗体とリーシュマニア原虫のタンパク質が反応することを確認する。そのためにリーシュマニア原虫培養液からタンパク質の単離、精製を行い、本実験に用いる。

4. 研究成果

(1) 皮膚型リーシュマニア原虫である *Leishmania major* の培養が比較的容易な前鞭毛型 (Promastigotes) リーシュマニア原虫を用いて抗リーシュマニア活性を測定し、哺乳動物細胞を用いて細胞障害性を評価した。一次スクリーニングは化合物を 1 μ M, 100nM, 10nM の3段階に希釈し、抗リーシュマニア活性を評価した。一次スクリーニングの結果、当研究室で有している化合物ライブラリーから38種類の化合物を選抜した。これら化合物に関しては、二次スクリーニングとして化

化合物を6段階に希釈し、抗リーシュマニア活性を評価するとともに、哺乳動物細胞を用いた細胞毒性の評価も行った。38種類の化合物の中から、リーシュマニア原虫に対する50%増殖阻害濃度が27 nM、42 nMと低い化合物2種類(化合物WA及び化合物WB)を見出した。しかし、哺乳動物細胞を指標とした選択毒性が数倍程度しか無く、高い選択毒性は得られなかった。我々のin vitroスクリーニングにおいて、化合物の選抜指標として用いている抗リーシュマニア薬 Amphotericin B の50%増殖阻害濃度は、リーシュマニア原虫では63 nM、哺乳動物細胞では2.9 μM(選択毒性4.6倍)であった。

(2) 従来の治療剤であるアンチモン製剤を含めリーシュマニア症治療薬は副作用が強いことが問題となっている。そのため、民間療法で使われる天然生薬資源30種を用いて抗リーシュマニア効果を評価した。評価したいずれの化合物もEC50値は1000 nM程度であり、一桁以上の選択性を示す化合物は見出せなかった。現在、(1) (2)の構造類縁体を用い、構造-活性相関解析を行っている。

(3) Hsp90阻害剤である Geldanamycinとその誘導体、及びGeldanamycin系とは異なる低分子Hsp90阻害剤を用いて抗リーシュマニア活性評価を行ない、リーシュマニア原虫に対する50%増殖阻害濃度(EC50)が30~40 nMの化合物を見出した。これら化合物の細胞障害性評価を行ったところ、原虫阻害能と同程度の細胞障害性を有することが判った。また、リーシュマニア原虫の分子シャペロンHsp90と反応する抗Hsp90抗体を見出し、プロテオミクス的手法を用いたリーシュマニア原虫のHsp90複合体の構成因子を解析できる基盤を構築した。今後、宿主であるヒトとリーシュマニア原虫のHsp90、及びHsp90複合体の構成因子の違いを明らかにし、リーシュマニア原虫のHsp90を選択的に阻害する化合物の探索を行ないたい。

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5件)

以下、全て査読あり

1. 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>)

2. Tanaka Y, Sakamoto A, Inoue T, Yamada T, Kikuchi T, Kajimoto T, Muraoka O, Sato A, Wataya Y, Kim H.-S, and Tanaka R. Andriolides HeP from the flower of andiroba (*Carapa guianensis*, Meliaceae). *Tetrahedron*, 68, 3669-3677, 2012
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040402011019727>)
3. 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. *Parasitology International*, 60, 270-273, 2011
(<http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2011.04.001>)
4. 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 endo-peroxide N-89. *Parasitology International*, 60, 231-236, 2011
(<http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2011.02.007>)
5. 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>)

[学会発表] (計5件)

1. 金 惠淑, 佐藤 聡, 森田将之, 綿矢有佑, 熊谷貴, 下河原理江子, 太田伸生. 難治性感染症治療薬の開発研究. 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. 大里泰規, 片本 茜, 中村由香, 佐藤 聡, 金 惠淑. In vivoにおける抗マラリア活性評価システムの開発. 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
3. Wen Jiang, Akira Sato, Masaki Kamata, Hye-Sook Kim. The antimalarial

activity of cyclic peroxides. Forum
Cheju 15; The 15th Japan-Korea
Parasitologists, Seminar. 2012年05月23
日～2012年05月25日, Miyazaki, Japan

4. 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
5. 谷口斎恵、熊谷 貴、下河原理江子、平本
晃子、佐藤 聡、金 惠淑、綿矢有佑、太
田伸生。合成環状過酸化化合物N-89投与
による Manson 住血吸虫体内のヘモゾイ
ン蓄積量に与える影響。第80回日本寄生
虫学会大会、2011年7月18日、東京

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

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

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

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書