

令和元年6月18日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05095

研究課題名(和文) カイコ感染症モデルを基盤とした微生物資源からの新しい抗生物質の開拓

研究課題名(英文) Screening of new antibiotics with therapeutic effect using in vivo-mimic silkworm infection model from natural resources

研究代表者

内田 龍児 (UCHIDA, Ryuji)

東北医科薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：60280632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、簡易的な in vivo 評価系の感染モデルを利用し、治療効果を示す新規抗生物質のシードを天然資源から見出すことを目的とした。結核症に対しては、海洋由来放線菌が生産する ohmyungsamycin 類などの治療効果を示す有効な化合物を見出した。また、真菌症に対しては、温泉由来真菌が生産する新規化合物 tanzawaic acid 類縁化合物が、接合菌の感染モデルにおいて治療効果を示すことを明らかにした。一方、新たな作用機序を有する抗真菌剤のスクリーニングを実施し、臨床薬アムホテリシン B の新規活性増強物質として、shodoamide 類や phialotide 類の発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症は世界で第2位の死因を占めるにも関わらず、抗生物質の開発は後回しになっているのが現状で、将来的な抗生物質の不足が懸念されている。したがって、本研究を含めたアカデミアによる新しい抗生物質の開拓は社会的にも重要であると考えられる。また、本研究の過程で見出された化合物は、新規、既知を問わず実際に治療効果を示すことから、抗生物質のシードとしての可能性がある。さらに、天然資源を利用することから、既存の抗生物質とは構造が異なることもあり、作用機序の解析や全合成・誘導体合成による構造活性相関の解析への展開など、今後、他の研究領域との連携も見込まれる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to find new antibiotic with a therapeutic effect from natural resources using an in vivo-mimic silkworm infection model against pathogenic microorganisms and fungi. For tuberculosis, effective known compounds, ohmyungsamycins, having a therapeutic effect in silkworm infection model with *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare* were isolated from a culture broth of marine derived actinomycete. In addition, novel antifungal compounds, tanzawaic acid related compounds, having a therapeutic effect in silkworm infection model with *Rhizopus oryzae* were discovered from a culture broth of hot spring derived fungus. On the other hand, in screening of antifungal agents with a new mechanism of action, new potentiators of amphotericin B activity, shodoamides and phialotides, were discovered from a culture broth of terrestrial fungus.

研究分野：天然物化学

キーワード：抗生物質 カイコ感染症モデル 天然資源

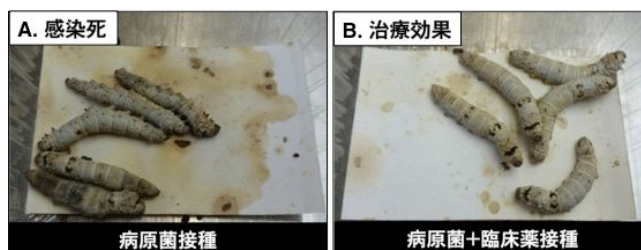
1. 研究開始当初の背景

1928年、A. フレミングらによる人類初の抗生物質ペニシリンの発見以降、人類は様々なタイプの抗生物質を生み出し感染症へ対応してきたが、その脅威は今なお制圧しきれていない。例えば、抗生物質の乱用が原因で生じたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) を代表とする薬剤耐性菌の出現、高度医療成長に伴う深在性真菌症の増加、結核など一度は制圧したと考えられていた再興感染症の復興、さらに新興感染症 (重症急性呼吸器症候群 (SARS) や劇症溶血性連鎖球菌感染症など) の出現により、感染症は未だに克服すべき大きな課題として存在する。しかし、感染症は世界で第2位の死因を占めるにも関わらず、大手製薬企業による創薬研究は慢性疾患や抗がん剤の開発に注力されており、抗生物質の開発は後回しになっているのが現状である。その結果として、現在臨床で使用されている抗生物質に対する耐性菌が出現したときに対応できる抗生物質の不足が懸念されている。したがって、将来の感染症対策を見据えたとき、アカデミアによる新しい抗生物質の開拓は社会的にも重要だと考えられる。

2. 研究の目的

新しいタイプの抗生物質を開拓する課題として、*in vivo*での治療効果、選択毒性、新たな作用機序、新規基本構造が挙げられる。まず、*In vitro*評価系で選択された化合物の多くが*in vivo*評価系 (動物実験) では効果を示さないことを現実問題として経験する。これは化合物の体内動態 (ADME) や毒性に問題があることが考えられるが、スクリーニングの為に実験動物を用いることは非現実的である。そこで申請者は、課題 および を解決し、且つ倫理的な問題を除外する目的で、昆虫のカイコを宿主とした簡易的な*in vivo*様の感染評価系 (以下、カイコ評価系とする: 図1) を関水ら (Kaito C. *et al*, *Microb Pathog*, 32: 183-90, 2002) の報告を参考に、MRSA 感染モデルおよび真菌 *Candida albicans* 感染モデル、結核症対策を目的とした *Mycobacterium smegmatis* 感染モデルなど構築した。これを、微生物資源 (主に培養液) を用いた

初期スクリーニングに導入することで、実際に治療 (延命) 効果を示すサンプルの早期取得を目指した。また、課題 を解決する手段の一つとして、単独では抗真菌活性を示さず、併用により臨床抗真菌剤の抗真菌活性を増強する低分子化合物のスクリーニングを実施している。これは薬剤の抱える腎毒性等の重篤な副作用の低減を目的としており、抗真菌剤との併用を想定した臨床薬は存在しない。



カイコ評価系

- A. 病原菌を接種したカイコは黒化して死に至る。
- B. 臨床薬を同時に接種したカイコは生存する (治療効果)。

3. 研究の方法

(1) カイコ評価系を用いたスクリーニング

カイコ (5 齢虫) に各種病原細菌・真菌の菌液を摂取後に、微生物等のサンプルを投与し 60~80 時間経過観察する。治療効果を示さないサンプルはカイコが黒化して感染死するのに対し (上図 A)、治療効果を示すサンプルを投与したカイコは生存する (上図 B)。このような治療効果を示すサンプルを選択した。また、結核症対策および真菌症対策の一環として、新たな感染モデルの構築を行った。

(2) 既存抗真菌薬アムホテリシン B (AmB) の活性増強物質のスクリーニング

微量液体希釈法により、各種真菌の生育に影響しない濃度の AmB と微生物等のサンプルを 96 穴プレートの各ウェルに入れ、これに菌数を調整した各種真菌の菌液を加え、1~2 日間培養した。また同時に、AmB を併用しない抗真菌活性測定用のプレートも用意した。各プレートのうち、AmB を添加したプレートでのみで真菌の生育を抑えるものを AmB 増強活性サンプルとして、両プレートで生育阻止が見られるものを、抗真菌活性サンプルとして選択した。

(3) 天然資源からのスクリーニング

スクリーニングのサンプルには、これまで申請者が様々な生物活性物質の探索源として用いて来た微生物の培養液を用いた。土壌、海洋、温泉地などから分離した独自の真菌および放線菌に加え、海洋生物の抽出液をスクリーニングに供した。

(4) 活性物質の生産、単離精製および構造解析

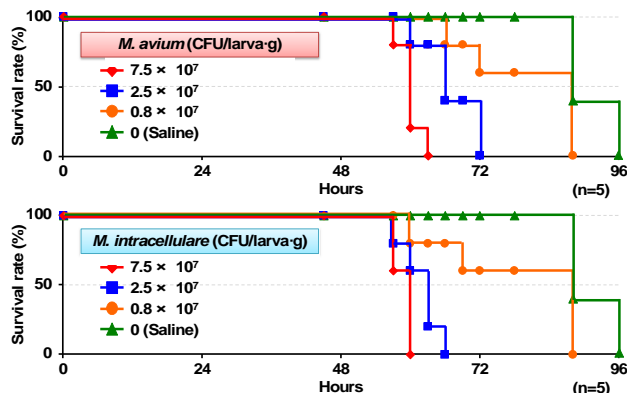
選択された培養液サンプルは大量培養を行い、抽出操作 (溶媒、各種吸着剤)、各種クロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーにより目的とする活性物質の単離を行った。さらに単離した化合物は、各種機器分析 (質量分析、核磁気共鳴スペクトル (NMR) 等) の測定および解析を行ない、立体構造を含めた化学構造を明らかにすると共に、その新規性を化合物検索システムにより調査した。

4. 研究成果

(1) 新たなカイク感染症モデルの構築

結核症対策として、これまでに *M. smegmatis* を感染させたカイク評価系を利用したスクリーニングを行ってきたが、一般に *M. smegmatis* は病原性がないとされている。そこで、結核菌 *M. tuberculosis* と同じ結核菌群菌に属し、ハウスキーピング遺伝子のほとんどが非常によく保存されている *M. bovis* BCG の感染症モデルの構築を行った。その結果、菌数依存的な感染が確認され、カナマイシン等の既存薬が効果を示すことを確認した。したがって、これら 2 つのカイク評価系をスクリーニング初期に導入し、より早い段階で治療効果を示すサンプルか否かを判断できるようになった。

また、日本では結核症の罹患率を上回り問題視されている非結核性抗酸菌 (NTM) 症の一つ肺 MAC (*M. avium* complex) 症の起原菌 *M. avium* および *M. intracellulare* に対するカイク感染モデルも同様に構築し、肺 MAC 症治療薬のスクリーニングにも着手した。

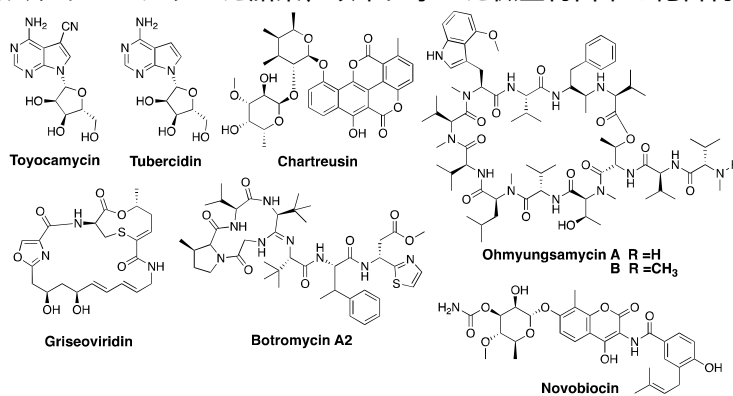


M. avium および *M. intracellulare* の感染実験

(2) 抗結核症および抗肺 MAC 症治療薬のスクリーニング

陸棲および海洋微生物の培養液や海洋生物および植物の抽出液約 2,000 サンプル、当研究室で保有する化合物ライブラリをスクリーニングした結果、以下に示した微生物由来の化合物を

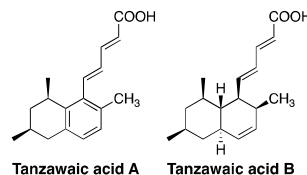
活性物質として見出した。また、微量液体希釈法により測定した各種抗酸菌に対する生育阻害活性およびカイク評価系における治療効果を右表にまとめた。このうち、カイク評価系で治療効果を示した ohmyungsamycin、chartreucin、griseoviridin、は既知化合物ではあるが、マウスレベルでも治療効果が認められる可能性がある。



Compound	MIC ₉₀ (μg/ml)			ED ₅₀ (μg/larvae-g)	
	<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. bovis</i> BCB	<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>
Toyocamycin	NT	0.39	NT	—	—
Tubercidin	NT	3.13	NT	—	—
Chartreucin	3.13	3.13	25	25	> 50
Ohmyungsamycin A	0.39	0.20	0.78	13	50
Griseoviridin	> 40	1.56	NT	50	> 50
Botromycin A2	0.0031	0.025	NT	—	—
Novobiocin	6.25	3.13	50	—	—

(3) カイク評価系を用いた治療効果を示す抗真菌薬のスクリーニング

これまで、*C. albicans* 感染モデルのみによるスクリーニングを行ってきたが、本研究期間中に、重篤な症状を呈する深在性真菌症の 4 種の起原菌 *C. albicans*、*Cryptococcus neoformans*、*Aspergillus fumigatus*、*Rhizopus oryzae*、すべての感染モデルを構築することができた。これらカイク評価系を利用し、陸棲由来の微生物の培養液約 8,200 サンプルを評価した結果、温泉由来真菌 *Penicillium* sp. BF-0005 株から接合菌 *R. oryzae* に対し抗真菌活性を示す新規 tanzawaic acid 類縁化合物を単離し、既知化合物ではあったが tanzawaic acid A および B が *R. oryzae* を感染させたカイク評価系で治療効果を示すことを明らかにした。現在、*R. oryzae* が原因となるの接合菌症の治療薬として使われる臨床薬は AmB のみであることを考慮すると、今後、マウスレベルでの治療効果を確認する必要がある。

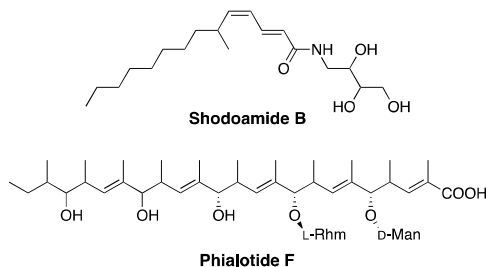


Compound	MIC ₉₀ (μg/ml)	ED ₅₀ (μg/larvae-g)
Tanzawaic acid A	1.0	7.0
B	0.5	7.0

(4) 抗真菌薬 AmB の活性増強物質のスクリーニング

上記 4 種の病原真菌に対する AmB 活性増強物質のスクリーニングを実施した結果、近年発見された新属の真菌 *Pseudophialophora* 属に属する BF-0158 株より、2 つのタイプの新規活性

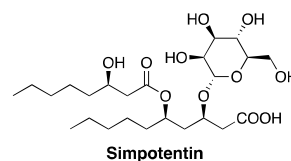
物質 shodoamide 類および phialotide 類を見出した (下図)。Shodoamide 類は A~D の 4 成分を単離し、天然では稀な *N*-(2,3,4-trihydroxybutyl)formamide 構造を有する化合物群であることを明らかにした。一方、phialotide 類は A~H の 8 成分を単離し、ポリケチドから生合成される繰り返し構造をアグリコンとし、これに 1~3 個のマンノースあるいはラムノースが結合したポリケチド配糖体であることを明らかにした。



Conc (μg/ml)	MIC (μg/ml)	
	Shodoamide B	Phialotide F
16	0.0156	NT
8	0.0313	< 0.0156
4	0.125	< 0.0156
2	0.125	< 0.0156
1	NT	< 0.0156
0.5	NT	0.0625
0.25	NT	0.25
0	0.5	0.5

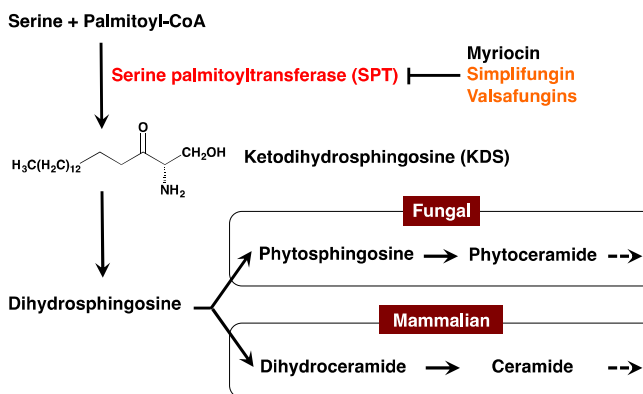
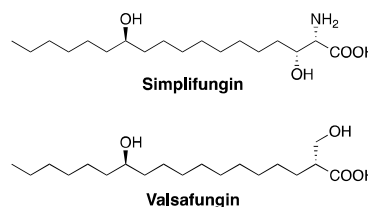
各化合物群の中では、shodoamide B および phialotide F (上右表) が最も高い併用効果を示した。前者は 16 μg/ml の濃度で AmB の MIC 値を 0.5 μg/ml から 0.01560 μg/ml へと低下させ、32 倍の増強活性を示し、後者はさらに低濃度の 1.0 μg/ml で、32 倍もの増強活性を示した。Phialotide F はこれまでに単離した化合物の中で、最も高い増強効果を示す化合物であるが、残念ながらカイコ評価系では治療効果が認められなかったことから、*in vivo* でも有効且つ強力な増強物質を取得する目的で、今後、誘導体合成を展開する予定である。

また、先行研究で発見した simpotentin (右図) については、協力研究者により全合成が達成され、絶対立体構造を含めた構造を決定でき、現在、誘導体合成が進められている。



(5) 新規抗真菌剤 simplifungin および valsafungin の作用機序の解析

先行研究で発見した simplifungin および valsafungin (右図) は *C. albicans* や *C. neoformans* などの酵母様真菌に対して生育阻害活性を示す新規化合物である。これらの構造は、スフィンゴ脂質生合成経路の律速酵素セリンパルミトイル転移酵素 (SPT) を阻害する myriocin と類似することから、SPT が標的と仮定した。まず、セリンとパルミトイル CoA から SPT により生成される生合成中間体 ketodihydrosphingosine (KDS) を評価系に加えると抗真菌活性が減弱したことから、SPT の可能性が示唆された。次に、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* から SPT を含む粗酵素液を調製し、基質であるセリンとパルミトイル CoA、濃度調整をした simplifungin あるいは valsafungin と一定時間反応させ、生成する KDS を LCMS で定量した。その結果、各化合物の濃度依存的に KDS の生成量が減少したことから、作用点が SPT であることを明らかにした。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① [Uchida R](#), Kondo A, Yagi A, Nonaka K, Masuma R, Kobayashi K, Tomoda H, Simpotentin, a new potentiator of amphotericin B activity against *Candida albicans*, produced by *Simplicillium minatense* FKI-4981, *J Antibiot*, 査読有, 72 巻, 2019, 134-140
DOI: 10.1038/s41429-018-0128-x.
- ② Yamazaki H, Yagi A, Akaishi M, Kirikoshi R, Takahashi O, Abe T, Chiba S, Takahashi K, Iwakura N, Namikoshi M, [Uchida R](#), Halogenated cladosporens produced by the sodium halide-supplemented fermentation of the plant-associated fungus *Cladosporium* sp. TMPU1621, *Tetrahedron Lett*, 査読有, 2018, 59 巻, 1913-1915
DOI: 10.1016/j.tetlet.2018.03.082
- ③ Tominaga T, [Uchida R](#), Koyama N, Tomoda H, Anti-*Rhizopus* activity of tanzawaic acids produced by the hot spring-derived fungus *Penicillium* sp. BF-0005, *J Antibiot*, 査読有, 2018, 71 巻, 626-

DOI: 10.1038/s41429-018-0049-8.

- ④ Abdjul DB, Yagi A, Yamazaki H, Kirikoshi R, Takahashi O, Namikoshi M, Uchida R, Anti-mycobacterial haliclodoniamine alkaloids from the Okinawan marine sponge *Haliclona* sp. collected at Iriomote Island, *Phytochem Lett*, 査読有, 2018, 26 巻, 130-133.
DOI: 10.1016/j.phytol.2018.01.013
- ⑤ Yagi A, Uchida R, Hamamoto H, Sekimizu K, Kimura K, Tomoda H, Anti-Mycobacterium activity of microbial peptides in a silkworm infection model with *Mycobacterium smegmatis*, *J Antibiot*, 査読有, 2017, 70 巻, 685-690
DOI: 10.1038/ja.2017.23
- ⑥ Ishijima H, Uchida R, Ohtawa M, Kondo A, Nagai K, Shima K, Nonaka K, Masuma R, Iwamoto S, Onodera H, Nagamitsu T, Tomoda H, Simplifungin and valsafungins, antifungal antibiotics of fungal origin, *J Org Chem*, 査読有, 2016, 81 巻, 7373-7383
DOI: 10.1021/acs.joc.6b00952

〔学会発表〕(計 12 件)

- ① 八木 瑛穂、山崎 寛之、内田 龍児、カイク *Mycobacterium avium* complex 症モデルの構築と天然化合物ライブラリーの評価、日本薬学会第 140 年会、幕張メッセ (千葉)、2019 年 3 月
- ② 長井 賢一郎、福田 隆志、安原 義、八木 瑛穂、内田 龍児、供田 洋、アムホテリシン B 活性増強物質 nectriatide に関する研究、日本薬学会第 140 年会、幕張メッセ (千葉)、2019 年 3 月
- ③ 大多和 正樹、清水 恵理、齋藤 淳、李 大葵、近藤 あり子、八木 瑛穂、小林 啓介、内田 龍児、供田 洋、長光 亨、Amphotericin B 活性増強作用を有する simpotentin の全合成と絶対立体配置の決定、第 44 回反応と合成の進歩シンポジウム、熊本、2018 年 11 月
- ④ 渡辺 菜、三浦 夢咲、内田 龍児、藤村 務、カイクを用いた創薬研究、第 57 回日本薬学会東北支部大会、仙台、2018 年 10 月
- ⑤ 八木 瑛穂、内田 龍児、カイクを宿主とした *Mycobacterium avium* complex 症モデルの構築、第 57 回日本薬学会東北支部大会、仙台、2018 年 10 月
- ⑥ 内田 龍児、大多和 正樹、近藤 あり子、清水 恵理、八木 瑛穂、齋藤 淳、李 大葵、小林 啓介、野中 健一、増間 碌郎、長光 亨、供田 洋、真菌が生産するアムホテリシン B 活性増強物質 simpotentin に関する研究、第 60 回天然有機化合物討論会、久留米 (福岡)、2018 年 9 月
- ⑦ Uchida R, Kobayashi K, Nonaka K, Masuma R, Nagamitsu T, Tomoda H, A new potentiator of antifungal activity of amphotericin B against *Candida albicans*, produced by *Simplicillium minatense* FKI-4981, *ASM Microbe* 2018, Atlanta (USA), 2018 年 6 月
- ⑧ 山崎 寛之、Delfly B, Abdjul, 桐越 亮太、八木 瑛穂、高橋 央宜、内田 龍児、浪越 通夫、西表島産海綿 *Haliclona* sp. より得られた新規 halichondriamine 類の構造と生物活性、日本生薬学会第 64 回年会、千葉、2017 年 9 月
- 八木瑛穂、内田龍児、供田 洋、真菌 BF-0158 株が生産する新規 amphotericin B 増強活性物質に関する研究、日本薬学会第 137 年会、仙台、2017 年 3 月
- 富永剛広、内田龍児、供田 洋、カイク感染モデルを用いた微生物由来の接合菌症治療薬の探索研究、日本薬学会第 137 年会 (仙台) 2017 年 3 月
- 石島広之、内田龍児、大多和正樹、近藤あり子、長井賢一郎、島圭介、野中健一、増間碌郎、岩本晋、小野寺秀幸、長光 亨、供田 洋、真菌が生産する新規抗真菌活性物質 Simplifungin および Valsafungin 類に関する研究、第 58 回天然有機化合物討論会、仙台、2016 年 9 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

- ① 名称：抗真菌薬に対する活性増強作用を有する新規環状ペプチド化合物及びその製造方法
発明者：供田洋、内田龍児、福田隆志、長井賢一郎
権利者：学校法人北里研究所
種類：特許
番号：特願 2017-009691
出願年：2017 年
国内外の別：国内
- ② 名称：抗真菌薬に対する活性増強作用を有する新規化合物及びその製造方法
発明者：供田洋、内田龍児
権利者：学校法人北里研究所
種類：特許
番号：特願 2017-004266
出願年：2017 年

国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tohoku-mpu.ac.jp/laboratory/tennen/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。