

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15284

研究課題名(和文) 抗真菌薬アムホテリシンB活性増強剤の標的分子の解析と創薬への展開

研究課題名(英文) Studies on the potentiators of antifungal activities of amphotericin B

研究代表者

小林 啓介(Keisuke, Kobayashi)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：80794734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：抗真菌薬アムホテリシンBの活性を増強する環状テトラペプチド化合物であるネクトリアチド(NCT)に焦点を当てた。NCTのアミノ酸を種々置換した鎖状・環状誘導体の合成から、NCTを凌ぐ高活性体の取得を達成した。ビオチン標識誘導体を用いた解析から、NCTは真菌細胞膜脂質成分、特にエルゴステロールに結合することを明らかとし、この結果は、蛍光誘導体が真菌細胞膜に局在していたことから支持された。カイコ簡易in vivo感染モデルを用いた評価からは、AmB単独と比較し、NCT類とAmBを併用することでカイコ感染死に対する延命効果を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、NCTは、細胞毒性や抗菌活性を全く示さずに、ある種の真菌細胞膜脂質を特異的に認識することを明らかとした。NCTの作用機序を完全に解明することは、生体膜脂質に関する基礎生物学的な新たな知見をもたらすことが学術的に期待されるだけでなく、膜脂質の挙動を長時間モニターできる研究用ツールとしてのNCTの応用も期待できる。臨床面では、薬剤耐性真菌の出現などから真菌感染症に対する対策は重要である。本研究で、NCTはin vivoレベルでも有効性を示す可能性を示した。今後、NCTは、既存の抗真菌薬の効果を最大限に高めるという、新たな「抗真菌感染症薬」のシードとして利用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The cyclic tetrapeptide nectriatide is a potentiator of the antifungal amphotericin B (AmB) activity. To elucidate the mechanism of action, we synthesized several chemical probes of nectriatide. Lipid-binding assay using a biotinyl-probe and membrane-binding liposome assay revealed that nectriatides showed the affinity for ergosterol. Fluorescent microscopy clearly showed that fluorescent-probe was distributed at cell membrane. These results suggested that nectriatides may bind fungal cell membrane and affect the affinity of AmB to ergosterol. To clarify in vivo efficacy of nectriatides, we carried out in vivo-mimic infection assay using the silkworm. All silkworms infected with *C. albicans* died within 60 h. This time was extended by treating with AmB. The combinational treatments of nectriatides and AmB showed further survival-time extension compared to a treatment of AmB only, indicating that nectriatides have a potential to be effective in vivo.

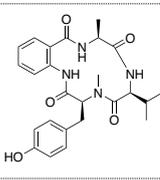
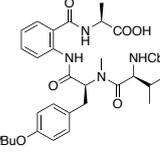
研究分野：天然物化学

キーワード：天然物 真菌感染症 ケミカルバイオロジー 細胞膜 脂質 抗真菌 アムホテリシンB

1. 研究開始当初の背景

病原性真菌による真菌症、特に深在性真菌症は、体内深部の臓器に感染して重篤な症状を引き起こす。その中でも、カンジダ症 (*Candida albicans* (Ca) が主要原因菌) とアスペルギルス症 (*Aspergillus fumigatus* が主要原因菌) が約 70% を占める。最近では、新型コロナウイルス蔓延に伴う合併症としての感染拡大や、多剤耐性真菌の出現も問題視されている。しかし、真菌とヒトは同じ真核生物であることから、新しい抗真菌剤の開発は非常に難しく、臨床で使用されているものはわずか 4 系統のみである。アムホテリシン B (AmB) は幅広い抗真菌スペクトルと殺菌力の高さ、および耐性菌出現頻度の低さから、深在性真菌症に対する切り札的存在として既存抗真菌薬の中で重要な薬剤であるが、腎毒性や低カリウム血症などの副作用が臨床使用時の最大の問題点と指摘されている。我々は、それ自身では抗真菌活性を示さず AmB の効果を増強する化合物は、AmB の投与量を減らし副作用の問題を解決できるのではという発想のもと、Ca を検定菌として微生物資源より AmB 抗真菌活性増強物質の探索を展開してきた。その過程で、真菌の培養抽出液中より、L-アラニン、アンスラニル酸、L-N-メチルチロシンおよび L-バリンからなる新規環状テトラペプチド構造をもつネクトリアチド (NCT) が見出された。NCT は、それ自身では、64 µg/mL を用いても抗 Ca 活性を示さないのに対し、AmB と併用することで、濃度依存的に AmB の MIC 値 (Ca の生育を 90% 阻害する最小濃度) を低下させ、32 µg/mL 併用時には AmB の抗真菌活性を 8 倍増強する (表)。また、NCT の全合成の過程で得られた鎖状構造を有する合成中間体 (L-NCT) が、NCT をしのぐ AmB 増強活性を示すことも見出していた (表)。しかし、NCT 類が示す AmB 活性増強機構や、*in vivo* レベルでもその効果を示すかは不明であった。

表. Nectriatide (NCT) および鎖状合成中間体 (L-NCT) の構造と AmB 抗真菌活性増強作用

		Combination with	MIC (µg/mL)	増強率*1	
AmB +	None		1.0	-	
	NCT		2 µg/mL	1.0	1
			4 µg/mL	0.50	2
			8 µg/mL	0.50	2
			16 µg/mL	0.25	4
		32 µg/mL	0.13	8	
	L-NCT		2 µg/mL	0.25	4
			4 µg/mL	0.13	8
			8 µg/mL	0.063	16
			16 µg/mL	0.032	32
		32 µg/mL	0.032	32	

*1 増強率: MIC AmB alone/MIC AmB + potentiator *2 1 と 2 の MIC 値 > 64 µg/mL

2. 研究の目的

本研究では、大きく次の 3 点について、それぞれに示す目的のもと研究を実施した。(1) **優れた NCT 誘導体の探索**—有機合成的手法により、NCT の誘導体を種々合成し、それら化合物の AmB 増強活性や細胞毒性の有無を検証することで、高活性の NCT 誘導体の取得や、続く(2)で扱うケミカルプローブ合成のための構造活性相関に関する知見の獲得、続く(3)で扱う *in vivo* 試験に適した化合物を選定することを目的とした。(2) **作用機序解析**—化学的手法 (機能分子の誘導体化 (プローブ化) による標的分子の探索) や、遺伝学的手法 (変異株のゲノム解析) により、NCT 類が AmB 活性を増強する表現型の標的分子とその作用機序を解明することを目的とした。(3) ***In vivo* 評価**—カイコやマウスを用いて、*in vivo* レベルで、選定した化合物が AmB 活性増強による治療効果をもたらすか検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 優れた NCT 誘導体の探索

液相合成法により、NCT を構成するアミノ酸の種類や立体化学を種々変換した、鎖状および環状の NCT 誘導体を作成した。これらについて、Ca を検定菌とした AmB 増強活性を評価した。また、(2) で使用するビオチン標識体や、蛍光色素 FITC を結合させた蛍光標識体も合成した。

(2) 作用機序解析

AmB は、真菌細胞膜のエルゴステロール (Erg) に特異的に結合することにより細胞膜障害を引き起こして抗真菌活性を発揮する。したがって、NCT 類も細胞膜脂質成分へ相互作用を示し、AmB の活性を増強させているのではないかと考え、以下の検討を行った。

1) 固相脂質結合実験: 疎水性化合物吸着性のプレートに、細胞膜関連脂質としてホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルイノシトール (PI)、Erg およびコレステロール (Cho) (それぞれ EtOH 溶液) を吸着後、ビオチン標識 NCT を添加し一定時間反応させた。プレートを洗浄後、ビオチン検出用試薬でそれぞれ処理し、最終的に吸光度を測定することでビオチン標識 NCT の各脂質への親和性を評価した。

2) リポソーム実験: 蛍光物質を封入した酵母の細胞膜組成を模したリポソーム (PC:PE:PI:Erg = 5:4:1:2 (w/w/w/w)) を作製し、化合物と一定時間反応させた。その後、蛍光物質漏出量を蛍光プレ

ートリーダーで検出することで、構成脂質分子への化合物の親和性を評価した (界面活性剤でリポソームを処理した時の蛍光物質漏出量を 100% として、以降の漏出率を算出した)。

3) 蛍光顕微鏡観察: *Ca* に蛍光標識 NCT を添加して一定時間培養後、その局在を蛍光顕微鏡で観察した。

4) 真菌細胞膜に結合する AmB の定量: *Ca* に対し AmB および各濃度の L-NCT を併用し一定時間培養後、回収した菌体を有機溶媒で抽出し、その抽出液を LC-MS で解析することで、菌体に結合している AmB 量を定量した。

(3) *In vivo* 評価

薬物動態 (ADME) がヒトと近く、簡便に薬物の治療効果や毒性を評価できることから動物モデルの代替として有用性が示されているカイコを用いた簡易 *in vivo* 感染評価系で NCT 類の効果を検証した。すなわち、*Ca* を感染させたカイコに AmB 単独、または AmB と NCT 類を投与し、感染死するまでの時間を経時的に観察した。

4. 研究成果

(1) 優れた NCT 誘導体の探索

合成した誘導体の AmB 増強活性評価より、アミノ酸の立体化学や、*N*-メチル基やフェノール性水酸基は活性に大きく影響しないことを明らかとした。また、*C* 末や *N* 末がそれぞれ保護された鎖状誘導体は、NCT をしのぐ AmB 増強活性を示すことを明らかとした。ビオチン標識 NCT や、蛍光標識体 NCT が NCT と同等以上の活性を示すことも確認した。

(2) 作用機序解析

1) 固相脂質結合実験: ビオチン標識 NCT は Erg に対し最も強い親和性を示し、PI や PC にも中程度の親和性を示した。一方で、興味深いことに、哺乳類細胞の細胞膜に存在する Cho には親和性を示さなかった。

2) リポソーム実験: AmB 処理では、濃度依存的に蛍光物質の漏出が認められた (AmB が Erg に結合することでリポソーム膜が崩壊したためと考えられる)。また、L-NCT 処理でも、高濃度では約 60% の蛍光物質の漏出を認めた。一方で、脂質組成を変更したリポソームを作製し同様に評価したところ、Erg を除いたリポソームでは、AmB のみならず、L-NCT による蛍光物質の漏出も消失した。この結果より、NCT 類は特に Erg に対して親和性を示す可能性が、人工脂質膜レベルの解析からも示唆された。

3) 蛍光顕微鏡観察: 蛍光 NCT で *Ca* を処理すると、細胞膜にその局在が認められ、その蛍光は酵母型よりも菌糸型の細胞膜で強く認められた (図 a)。*Ca* はこの二形性を示すが、一般的に、酵母型から菌糸型になる出芽部分に豊富に Erg が存在することが知られている。この結果は、NCT 類が真菌細胞膜で確かに Erg に対し親和性を示していることを強く示唆するものであった。また、蛍光 NCT と AmB を併用すると、細胞膜から観測される蛍光強度が蛍光 NCT 単独処理時と比較して増加した (図 b)。この結果は、AmB が存在することで NCT 類の細胞膜への親和性も増強されることを示唆した。

4) 真菌細胞膜に結合する AmB の定量: AmB 単独処理時と比較し、L-NCT の濃度依存的に菌体に結合した AmB 量は増加し、最大で約 2 倍量の AmB が菌体に結合した。

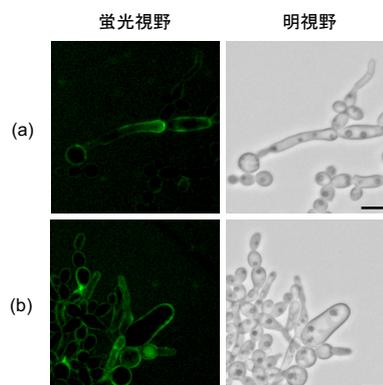


図 4. *Ca* 内における蛍光標識 NCT の局在観察。
(a) *Ca* に対し蛍光標識 NCT を 1 時間反応させた際の局在図。(b) *Ca* に蛍光標識 NCT および AmB を 1 時間反応させた際の局在図。Bars, 10 μ m.

(3) *In vivo* 評価

Ca を感染させたカイコ ($n = 5$) は感染後 60 時間で全頭が死亡したが、AmB 投与により、その投与量依存的に生存時間が延長し、2.5 μ g/頭の投与では 90 時間まで全頭死亡時間が延長した。この条件において、AmB (2.5 μ g/頭) に L-NCT を併用したところ、感染 96 時間でも 3 頭が生存した。このことから、NCT 類は、より高次の動物を用いた *in vivo* でも AmB 増強活性を示すことが期待され、その投与量を減少 (投与間隔の延長) させる可能性が示唆された。

(4) おわりに

細胞膜は様々なシグナル伝達や細胞骨格調節などに関与しており、近年、その膜脂質 (リン脂質やステロール) による生命現象制御の重要性が明らかとなってきた。しかし、脂質成分は遺伝子にコードされていないことから、その機能解明はなかなか進んでおらず、膜脂質を標的とする化合物はその解析ツールとなりうる。しかし、細胞膜に作用する化合物は、AmB を含めた一部化合物を除いて標的非特異的であり、いずれの化合物も激しい膜損傷を起こすことで細胞毒性や抗真菌・細菌活性を示す。本研究で、NCT はある種のステロールとリン脂質を特異的に認識するものの、細胞毒性などを全く示さず、これまでの化合物とは一線を画していることを

明らかとした。NCT の作用機序を完全に解明することは、生体膜脂質に関する基礎生物学的な新たな知見をもたらすことが学術的に期待されるだけでなく、膜脂質の挙動を長時間モニターできる研究用ツールとしての NCT の応用も期待できる。臨床面に目を向けると、薬剤耐性真菌の出現や、新型コロナウイルス感染の蔓延に併発する発症例の増加、地球の気候変動にともなう新興真菌症の発生などから真菌感染症に対する対策は重要である。AmB は、脂質を標的とすることから遺伝子変異にともなう耐性菌出現頻度は低く、幅広い抗真菌スペクトルを有している点から、これからも抗真菌感染症の切り札となりうる。本研究で、NCT は動物を用いた *in vivo* レベルでも有効性を示す可能性を示した。今後、NCT は既存の抗真菌薬の効果を最大限に高めるといふ、新たな「抗真菌感染症薬」のシードとして利用されることも期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nagai Kenichiro, Kobayashi Keisuke, Miyake Ryosuke, Sato Yukino, Seki Reiko, Fukuda Takashi, Yagi Akiho, Uchida Ryuji, Ohshiro Taichi, Tomoda Hiroshi	4. 巻 77
2. 論文標題 Synthesis and biological evaluation of nectriatide derivatives, potentiators of amphotericin B activity	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 214 ~ 220
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41429-023-00700-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三宅良介、小林啓介、長井賢一郎、大城太一、供田洋
2. 発表標題 カイコを用いた抗真菌剤amphotericin B活性増強化合物nectriatideの簡易in vivo評価
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三宅良介、小林啓介、長井賢一郎、西村慎一、供田洋、大城太一
2. 発表標題 抗真菌剤amphotericin B活性増強化合物nectriatide誘導体に関する研究
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三宅良介、小林啓介、長井賢一郎、西村慎一、供田洋、大城太一
2. 発表標題 なぜnectriatideは抗真菌剤amphotericin Bの活性を増強するのか？
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林啓介、長井賢一郎、三宅良介、西村慎一、福田隆志、内田龍児、供田洋、大城太一
2. 発表標題 抗真菌薬amphotericin B活性増強剤necatriotide類の機能解析
3. 学会等名 第65回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 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 大城太一、供田洋、 小林啓介、長井賢一郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2023-141938	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	長井 賢一郎 (Nagai Kenichiro)	北里大学	
研究協力者	西村 慎一 (Nishimura Shinichi)	広島大学	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------