

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：31305

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20728

研究課題名（和文）カイコ感染モデルでの治療効果を指標とした天然由来の新しい抗酸菌症治療薬の探索

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

研究代表者

八木 瑛穂 (YAGI, Akiho)

東北医科薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：60856516

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、薬剤候補化合物の生体内での治療（延命）効果を迅速に評価出来る in vivo 評価系「カイコ抗酸菌症（結核および非結核性抗酸菌（NTM）症）モデル」を用いたスクリーニングにより、治療薬の新規リード化合物を天然資源から発見することを目的とした。陸棲および海洋微生物（真菌・放線菌）の培養液約 600 サンプルをスクリーニングした結果、*M. avium* および *M. intracellulare* を感染させたカイコモデルで治療効果を示した *Streptomyces* sp. TMPU-20A065 株の培養液中より、複数の新規成分を含むリポシドマイシン類似化合物を取得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NTM 症は、先進国における罹患率の急激な上昇により、近年注目されている難治性疾患であるにも関わらず、新規薬剤の報告はほとんどない。特に NTM 症の約 9 割を占めている MAC 症は、根治可能な治療法が確立されていないことから、新たな薬剤の開拓を目的とした本研究は、社会的に重要である。本研究により見出された化合物は生体内で治療効果を示すことから、創薬リードとしての可能性が高く、将来的に MAC 症治療薬として、治療の期間短縮化や新たな治療法に繋がる可能性もある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to find novel antimycobacterial agents from natural resources by screening using the silkworm model with *Mycobacterium* spp., which enables rapid evaluation of the therapeutic (life-prolonging) effects of drug candidates in vivo. As a result of screening about 600 samples of culture broths of terrestrial and marine microorganisms (fungi and actinomycetes), several novel liposidomycins were isolated from the culture broth of *Streptomyces* sp. TMPU-20A065, which showed therapeutic effects in a silkworm infection model with *M. avium* and *M. intracellulare*.

研究分野：天然物化学

キーワード：カイコ感染症モデル 抗酸菌症 MAC 抗生物質 天然資源 リポシドマイシン

1. 研究開始当初の背景

結核症は、結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* による世界最大の感染症であり、近い将来克服されると見られていたにも関わらず、HIV/AIDS の流行による重複感染や、複数の臨床薬に対して耐性を示す多剤耐性結核菌の出現により、状況はさらに深刻化している。さらに既存の臨床薬は副作用、長期間の投与、抗 HIV 薬との相互作用などの問題もあることから、異なる化学構造と作用機序を持つ新しい抗結核薬の開発が望まれている。また近年、結核菌群およびらい菌を除いた抗酸菌によって発症する非結核性抗酸菌 (NTM) 症が急速に増加し、日本では結核症の罹患率を上回っている (Namkoong H. *et al. Emerg. Infect. Dis.*, **22**, 1116-1117, 2016)。特に、*M. avium* complex (MAC) が原因菌である MAC 症は、NTM 症の約 9 割を占めているが、現状では根治可能な治療法が存在しない。したがって、結核症と共に新たな薬剤が必要とされている領域である。

2. 研究の目的

抗酸菌症治療薬の課題として、① 薬剤の数が少なく、治療の選択肢が限られているにもかかわらず、新たな作用機序や新規骨格をもつ薬剤の報告がほとんどないことが挙げられる。また、② *in vitro* スクリーニングによって選択された候補化合物が、体内動態や安全性などの問題から生体内 (*in vivo*) で治療効果を示さないことが多い。特に ③ 抗酸菌症の動物実験は 1 ヶ月以上の長期間を要し、迅速な評価が難しいことが、薬剤開発を更に遅らせている。よって「① 新たな作用機序や新規骨格」をもち、かつ「② 抗酸菌に対して生体内で治療効果を示す」候補化合物を、「③ 迅速かつ効率的に」提供する必要がある。そこで本研究では、実験動物としてカイコ幼虫を用いた簡易的な *in vivo* 評価系「カイコ抗酸菌症モデル (Yagi A. *et al., Drug discov. Ther.*, **14**, 287-295, 2021) (図 1)」を、天然資源からのスクリーニングに利用し、カイコを延命させる、すなわち治療効果を示すサンプルを探索の初期段階で判断し、新しい抗酸菌症治療薬のリード化合物を発見することを目的とした。



図 1 カイコ抗酸菌症モデル

A: 菌液のみを接種したカイコは感染死する。
B: 臨床薬を投与したカイコは延命する。

3. 研究の方法

補助期間中、下記の項目 (1) から (4) を繰り返し実施した (図 2)。

(1) スクリーニングサンプルの作製

土壌や海洋など様々な環境から分離した微生物 (真菌や放線菌) の培養液および海洋生物や植物の抽出液を作製した。

(2) 抗抗酸菌物質のスクリーニング

(1) で作製したサンプルについて、まず 1 次スクリーニングとして、*in vitro* (微量液体希釈法) で抗酸菌に対して生育阻害活性を示すサンプルを選択した。次に 2 次スクリーニングでは、*in vivo* (カイコ抗酸菌症モデル) で治療効果を示すサンプルを選択した。具体的には、カイコの背脈管に菌液を接種して感染させ、30 分以内にサンプルを同様に投与し、2~4 日間経時的に観察した。菌液のみを接種した感染カイコと比較して、延命したサンプルを「治療効果あり」、早く死んだサンプルを「毒性あり」と判断した。検定菌には、結核菌の代替菌として *M. smegmatis* および *M. bovis* BCG、MAC 症の起因菌である *M. avium* および *M. intracellulare* の 4 種抗酸菌を用いた。

(3) 抗抗酸菌物質の単離精製・構造解析

(2) で治療効果の高かったサンプルから優先的に大量培養 (抽出) を行い、分配抽出、各種カラムクロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などの精製手段を駆使して活性物質を単離した。得られた化合物については、核磁気共鳴スペクトル (NMR) や質量分析等の機器測定により立体を含めた構造解析を行い、化合物検索ソフトにより新規性を明らかにした。

(4) 抗抗酸菌物質の生物活性の評価

(3) で得られた化合物について、詳細な抗菌スペクトルおよびカイコ抗酸菌症モデルでの治療効果を確認し、薬剤としての有効性を明らかにした。

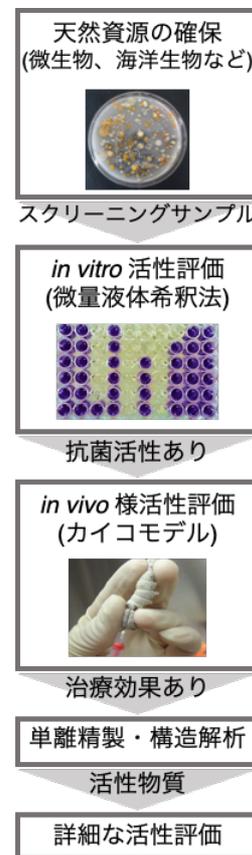


図 2 研究方法の概略

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

① スクリーニング

陸棲および海洋微生物の培養液約 600 サンプルのスクリーニングを実施した結果、カイコ MAC 症モデルに対して毒性を示さずに優れた治療効果を示す放線菌の培養液を 1 サンプル (TMPU-20A065 株) 選択した。

② 活性物質の単離精製・構造解析

山口県山口市下小鯖の土壌から分離した放線菌 *Streptomyces* sp. TMPU-20A065 株の培養液中より、活性物質として核酸系抗生物質である liposidomycin 類 (Isono K. *et al.*, *J. Antibiot.*, **38**, 1617–21, 1985. Ubukata M. *et al.*, *J. Org. Chem.*, **57**, 6392–403, 1992. Kimura K. *et al.*, *J. Antibiot.*, **51**, 647–54, 1998. Kaysser L. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **285**, 12684–94, 2010.) を 17 成分 (1–17) 見出し、3 成分 (1、2 および 4) は新規類縁体であった (図 3)。

③ *in vitro* での活性評価

微量液体希釈法による抗菌活性評価を行なった結果、化合物 1–17 は優れた抗 MAC 活性を示し、*M. avium* および *M. intracellulare* に対して 2.0–64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で MIC 値を示した。

④ *in vivo* (カイコモデル) での活性評価

カイコ MAC 症モデルにおける治療効果を調べた結果、菌液のみを接種したカイコは全て 72 時間後に黒化し感染死したが、菌液を接種して 30 分以内に化合物 1–17 を投与したカイコは投与量依存的に延命した (図 4)。化合物 1–17 は *M. avium* および *M. intracellulare* 感染カイコに対して、0.12–3.7 $\mu\text{g}/\text{larva}\cdot\text{g}$ の範囲で ED₅₀ 値を示した。

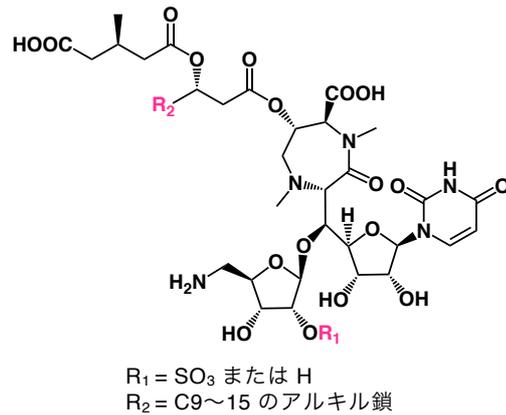


図 3 liposidomycin 類の構造

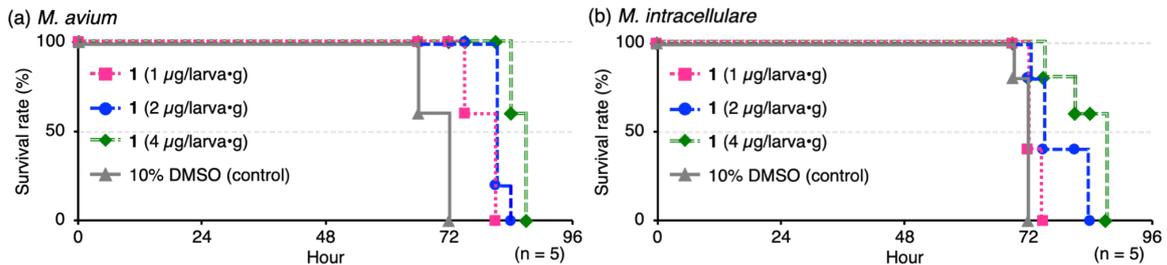


図 4 カイコ *M. avium* (a) および *M. intracellulare* (b) 感染モデルにおける化合物 1 の治療効果

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

近年世界的に注目されている肺 MAC 症だが、国内外において新規薬剤の報告はほとんどない。したがって、カイコモデルを用いたスクリーニングにより新規成分を含む liposidomycin 類を発見し、生体内で治療効果を示すリード化合物として提唱した本研究成果は非常に意義がある。今回得られた化合物 1–17 は全て *M. avium* および *M. intracellulare* に対して、微量液体希釈法での抗菌活性およびカイコモデルでの延命効果を示し、各化合物の ED₅₀ 値はそれぞれの MIC 値よりも低い値であった。カイコ MAC 症モデルではマウスモデルと同様に臨床薬も効きにくいいため、このような活性を示す化合物はこれまでになく、liposidomycin 類がカイコ MAC 症モデルにおいて体内動態の非常に優れた化合物群であることが示唆された。さらに、MAC 症治療薬クラリスロマイシンの *M. avium* および *M. intracellulare* 感染カイコに対する ED₅₀ 値はそれぞれ 23 および 42 $\mu\text{g}/\text{larva}\cdot\text{g}$ であり、化合物 1–17 はより低用量で効果を示した。これらの成果は、liposidomycin 類に既存薬以上の効果が期待できるという点で非常に大きなインパクトがある。

(3) 今後の展望

TMPU-20A065 株については、微量ながら他の新規成分の生産も確認されており、現在構造および詳細な活性について検討を進めている。今後、論文投稿および学会での成果発表を予定している。また、本研究において liposidomycin 類のような優れた候補化合物が取得できていることから、カイコ評価系を用いたスクリーニングの有用性が再確認された。今後も更なるリード化合物の取得が見込めることから、精力的にスクリーニングを継続していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 八木 瑛穂, 富士原 万柚, 内田 龍児
2. 発表標題 Streptomyces sp. TMPU-20A065 株が生産する新規 liposidomycin 類の抗 Mycobacterium avium complex 活性
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 Rotinsulu Sarah H. C., 八木 瑛穂, 山崎 寛之, Rotinsulu Henki, Wewengkang Defny, Sumilat Deiske, 内田 龍児
2. 発表標題 インドネシアの海洋生物資源を利用した抗感染症薬の探索
3. 学会等名 日本薬学会第 142 年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北医科薬科大学 薬学部 天然物化学教室 https://www.tohoku-mpu.ac.jp/laboratory/tennen/index.html

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

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
---------	---------