

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2013～2015

課題番号：25305008

研究課題名(和文)西アフリカにまん延する風土病制御に向けた国際共同調査研究

研究課題名(英文)Joint Cooperative Research for Endemic Diseases Control in Ghana

研究代表者

金 惠淑 (KIM, Hye-Sook)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：70314664

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)：ガーナvolta地域のリーシュマニア患者の疫学調査の結果、患者の病変部位の原虫種はL. major 単独で、同地域で媒介するサンショバエはS. Africana が主であった。薬剤耐性マラリアの遺伝子解析では、2010年以降の患者試料のほとんどが既存の抗マラリア薬に感受性型を示し、ガーナ政府がマラリア治療薬を変更したのが原因の一つとして考えられた。HCV患者試料の解析を効率よく行なうため、5'-非翻訳領域で変異しないユニバーサルプライマーを決定した。ガーナ産生薬・Milletia Thonningiiの中からマラリアとリーシュマニア症の両方で阻害能を示す新しい創薬シーズを見いだした。

研究成果の概要(英文)：The epidemiological study of Leishmaniasis was L. major only using lesion of several different parts of patients and major vector was S. Africana in the Volta region. In the genetic analysis of drug-resistant malaria, most of the patient samples collected after 2010 showed a drug-sensitive gene type and one of reason of the result was caused by Ghana government malaria treatment-polish was changed to Artemisinin-based combination therapy than other classical malaria drugs. To effective analysis of HCV patient in Ghana, the universal primer-set was determined in the 5'-untranslated region of HCV genome. We found a new drug discovery seeds showing the ability to inhibit both of malaria and leishmaniasis using in Milletia Thonningii of Ghanaian natural products.

研究分野：医薬品開発、感染症制御

キーワード：マラリア リーシュマニア症 HCV 遺伝子解析 創薬シーズ

## 1. 研究開始当初の背景

マラリア及びリーシュマニア症は寄生原虫感染症であり、現在、世界中でマラリアには約 2 億人、リーシュマニア症には 1200 万人が罹患している。しかし、その流行地がいわゆる先進国ではなく貧困地域に多いため、先進国の企業ベースでの薬剤開発は行われず、WHO 主導によりこれら感染症の抑止を目指した国際プロジェクトが進行している。

マラリアはその罹患者数が非常に多いことや急性期に致死率が高いことより、多額の寄付金が投入され、各国で製薬企業も加えた “Roll Back Malaria project” が進行している。しかし、従来用いられてきたクロロキン・メフロキン耐性の原虫がまん延し、WHO より推奨されている Artemisinin-based combination therapies に対してタイ・カンボジア国境において耐性が報告されている。現在、“Roll Back Malaria” は困難を極めており、本課題の拠点となるガーナでもマラリアは未だ猛威を振るっており、年間 300 万人以上が罹患し、死因の 50%を占めている。

リーシュマニア症に関しては同じく WHO 主導の “Neglected Tropical Diseases project” に取り上げられている。しかし、リーシュマニア症の克服に費やされている人的及び経済的支援はマラリアとは異なり、潤沢とはいえない状況である。リーシュマニア症は皮膚・粘膜皮膚・内臓リーシュマニア症に大別できる。スーダンでは致死率が 90 - 100%に達する内臓リーシュマニア症が流行しているが、ガーナでは皮膚リーシュマニア症が近年爆発的な流行を起こしていると報告されている。皮膚リーシュマニア症は自然治癒することが多いが、皮膚にできた潰瘍が癒痕となって残るため、患者にとっては大きなダメージとなる。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きたが、副作用が非常に強く、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、腎毒性と共に経口投与が困難であるという理由により感染地域での使用はかなり困難である。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薬剤として注目されているが、半減期が 6~8 日と長く使用された期間が短いにも関わらず耐性の出現が危惧されている。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の開発は緊急の課題である。

C 型肝炎は先進国・発展途上国を問わず、世界中で 1 億 7000 万人以上が罹患している重大なウイルス性の肝疾患である。C 型肝炎ウイルス(HCV)は非 A 非 B 型肝炎の原因ウイルスとして 1989 年に発見、同定されたフラビウイルス科に属する RNA ウイルスである。HCV は主に血液を介する非経口感染により肝炎を引き起こし、十数年を経て 80%以上が肝硬変・肝がんへと悪化する。現在、慢性肝炎に対する標準的な治療法として用いられているペグインターフェロンとリバビリンとの併用療法によっても、その治癒率は 50%を少し上回る程度であり、貧血などの副作用も多いこと等から、新たな抗 HCV 剤の開発が囑望されている。

HCV はその遺伝子型によって薬剤に対する抵抗性が異なることが知られており、治療に際してその遺伝子型を先に特定することが重要である。HCV 陽性者の HCV 配列を解析した結果では、一人の患者中に複数のウイルス疑似種が存在し、IFN に対する感受性の高いウイルスの割合によってインターフェロン (IFN) 治療の有効性が左右されるということが示された。HCV は RNA polymerase に proofreading 機能がないため多くの変異種が存在することは知られていたが、一人のヒトの体内で複数種の HCV が増殖している事は特記すべき事象である。また、解析したすべてのヒトに、最近になって新たに治療薬として使用が始まった HCV protease や HCV

polymerase の inhibitor に耐性を持つ HCV clone があり、これらの薬剤に耐性を示す患者が出現する危険性を指摘している。このような事態を回避するためには複数の治療法の開発が必要であり、しかも、それぞれの治療法が、異なる遺伝子型・疑似種に有効であることが必須である。

## 2. 研究の目的

西アフリカにまん延している風土病（リーシュマニア症、C型肝炎、マラリア等）の制御を目的とし、ガーナ大学を拠点に風土病の疫学調査と、これら風土病に用いられる伝承薬（民間薬）のデータベース化を現地の専門家と協力して作成することを目的とする。近年ガーナ・ボルタ州で大流行をしているリーシュマニア症の原因原虫の疫学調査を行う。ガーナではC型肝炎ウイルス(HCV)は2型が多く存在していることが報告されている。しかし、HCVは同じ2型の中でも数多くの亜種が存在するので、本課題ではガーナ・ボルタ地方で蔓延しているHCVの遺伝子型及び亜種を特定し、現在用いられている治療法の有効性を評価する。また、上記の疫学調査と治療法の有効性評価に加え、ガーナでは依然圧倒的に罹患者数及び死亡者数の多いマラリア、特に薬剤耐性マラリアの動向に関する調査を行い、風土病制御のためのシステムを構築する。

## 3. 研究の方法

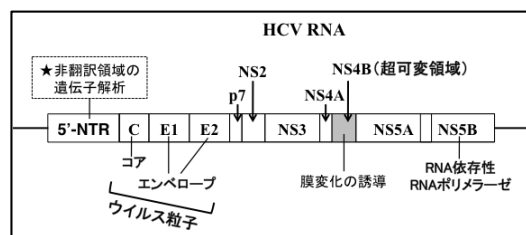
1) ガーナ大学 Boakye 教授のラボを拠点とし、Volta 州 (Ho 群、South Dayi 群)において潰瘍病変を有している患者の病変部からバイオプシーで集めた検体を用い、リーシュマニア原虫共通の遺伝子配列を有する ITS-1 の一部配列を PCR で増幅し、その PCR 産物の産生有無を電気泳動法で評価した。リーシュマニア感染陽性であったサンプルのリーシュマニア原虫種の判定は、内部配列の

異なる塩基配列を認識して切断する制限酵素 HaeIII を処理することで、切断されれば *L. major* と判定した。

リーシュマニア原虫が陽性であったサンプルについては、資料の採取場所、出身地、年齢、既往歴等とリンクさせ、さらに媒介サシチョバエの採集を行い、リーシュマニア原虫感染割合と体内原虫種の同定を行なった。同定方法は患者試料の処理法に従って同様に実施した。

2) マラリアの薬剤耐性遺伝子発現有無について解析した。Boakye 教授のグループが採集したサンプルを用い、既存の薬剤耐性マラリア遺伝子として報告されている *Pfmdr*, *pfprt*, *pfdhp*、及びアルテミシニンの耐性遺伝子と判っている K13 propeller 遺伝子について PCR-RFLP 解析を行なった。K13 遺伝子以外は同グループが既に使っているプライマーを用いた。

3) HCV の全ゲノム構造は 1990 年に解明され、約 9,600 ヌクレオチドからなる 1 本鎖のプラス鎖 RNA から 10 種類の蛋白質が産生されることが明らかになっている。下記に HCV RNA の構造を簡単に示した。



HCV の疫学調査は現地の協力体制の構築を行なっているため、ラボレベルでの解析を中心に行なった。加藤教授グループでは 2003 年に HCV レプリコン (1b 遺伝子型の HCV-0 株) が自律的に複製増幅する細胞株を樹立し、さらに RNA 複製の効率を亢進させる適応変異を組み込んだ全長 HCV RNA (約 11000 ヌクレオチド) が複製増幅する株を樹立した。また、HCV の複製が効率よく再現される新しいヒト肝がん細胞株 (Li23) を見だし、遺伝子

型 2a 属する HCV 粒子を持続的に産生されることにも成功し、Li23 細胞システムを基盤として遺伝子型 1b の感染性 HCV 粒子を産生させることを目指し、これら細胞株を用いて HCV の持続的 RNA 複製により生じる遺伝的変異性や多様生について解析している。上記の図に示すように HCV ゲノム構造で最も保存された領域は 5' -非翻訳領域である。しかしながら、同じ遺伝子型でも持続感染期間が長くなると変異が蓄積し、RT-PCR による HCV ゲノムの検出増幅の妨げになる。そこで、ラボで樹立した細胞株を用いて HCV ゲノムを確実に検出増幅することを目的とし、上記の 5' -非翻訳領域の遺伝子解析を行なった。そうすることで、ガーナ由来の貴重な HCV サンプルを無駄にすることなく解析することが出来る。

4) ガーナ産薬用植物資源を用いた創薬シーズ探索研究を行なった。ガーナ大学が有する生薬由来の粗抽出物を用い、今まで研究代表者グループが実施している抗マalaria薬効評価法に準拠して抗マalaria薬効を評価した。ヒト熱帯熱マalaria原虫培養液に評価する化合物、あるいはエキス成分を添加し、培養した後、検鏡下で薬剤非添加群を 100% にした時の薬剤添加時のマalaria原虫の感染率から薬剤のマalaria原虫阻害能を算出した。同様の生薬サンプルを使い、リーシュマニア原虫 (*L. tropica*, *L. donovani*) における阻害能についても評価した。培養したリーシュマニア原虫に薬物を添加し、3 日間培養後のリーシュマニア原虫数をコールターカウンターで計測して、薬剤阻害能を評価した。

#### 4 . 研究成果

1) 2013 年~2014 年にかけて volta 地域の Ho 群、South Dayi 群の数カ所のコミュニティーを調査した所、病変を示す患者 17 名を新規に見いだした。病変部から検出した原虫

を用いて PCR を行なった結果、全て *L. major* であった。採取した地域は既存のコミュニティーを含め、新たな場所からも検出された。また、同時期に媒介するサシチョバエの試料についても媒介昆虫の分布と感染有無について調べた。サシチョバエの 65% は *S. Africana* であり、これら地域の主な媒介種であった。原虫感染有無についても *S. Africana* から 1 検体の中から *L. major* 陽性が確認された。これら結果と地理的な関連については今後精査が必要であり、詳細な解析データは論文として報告する予定である。

2) マラリアの薬剤耐性研究は Boakye グループで長年行なわれており、収集した試料は現在プロジェクトが進行中であるため、2010 年以降の試料でコード化されたものを用いた。2010 年までの試料については 2013 年の同グループの論文報告がされており、Duah らと同じプライマーで解析した (Duah et al., *Malaria Journal*, 2013, 12:377)。ガーナ政府のマalaria治療薬のガイドラインは、2005 年度より artesunate-amodiaquine (AS-AQ) と artemether-lumefantrine (AL)-dihydroartemisin-piperaquine (DHAP) に変わったため、最近の artemisinin 耐性に関わると報告されている K13 propeller 遺伝子は野生型を示した。他の Pfmdr, pfcrt, pfdhp については、用いた試料のほとんどが野生型を示した。一部の遺伝子産物では PCR-RFLP により僅かながら切断される結果が得られたが、再現が得られなかった。これら試料については、当グループが保有する試料情報を精査して再解析する予定である。Duah らは、上記の論文で 2003 年~2010 年までの 756 サンプルについて解析し、ガーナにおけるこれら遺伝子の薬剤耐性頻度は 2007 年を堺に減少し、野生型の頻度が増加していると報告している。その理由としてマalaria治療薬の指針が変わったことを理由の一つとしてあげており、これら結果を踏まえて本研究で行っ

たガーナにおける薬剤耐性マラリア結果も踏まえて慎重に考察する必要がある。

3) ガーナ由来の貴重な HCV サンプルを無駄にすることなく解析するため、HCV ゲノム構造で最も保存された領域である 5' -非翻訳領域の遺伝子解析を試みた。1b 型 HCV ゲノムが長期間 (最長 9 年) 複製したことにより HCV 遺伝子の多様性が生じている HCV 複製モデル系を使用して遺伝子解析を行ない、変異のない領域の同定を試みた。その結果、HCV の複製が長期間繰り返されなくても全く変異しない領域を同定することができ、ほぼ 100% の検出効率が予想されるプライマーセットを構築し、反応条件を最適化することができた。そのため、今後のガーナの HCV 試料を用いて遺伝子型解析を行なう際のユニバーサルプライマーとして活用する予定である。

4) ガーナ産天然薬用植物を用いた創薬シーズの探索を行なった。ヘミンを添加しない 2 種のリーシュマニア原虫・*L. major* と *L. donovani* 両方で 1mg/ml 以下で阻害活性を示す *Millettia Thonningii* 由来の抽出液、及び 3 種の化合物を見いだすことが出来た。現在、抽出エキスについてはさらに再分画して活性物質の同定を急いでいる。他の 3 種の化合物については構造-活性相関を行なうための誘導体の合成を行っており、完了次第再評価する予定である。これら阻害活性を示す化合物は熱帯熱マラリア原虫に対しても同程度の阻害活性を示すことから、両原虫における同様の阻害機序が考えられる。メカニズム解析については構造-活性相関評価後に行なう計画である。抗 HCV 活性についても加藤グループでアッセイ系を運用しているので、これら化合物の阻害能も評価する計画である。

#### 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 7 件)

1. Imada, C., Takahashi, T., Kuramoto, M., Masuda, K., Ogawara, K., Sato, A., Wataya, Y., Kim, H.-S. and Higaki, K. Improvement of oral bioavailability of N-251, a novel antimalarial drug, by long-chain fatty acid-based self-microemulsifying drug delivery system. *Pharm. Res.*, 32 (8), 2595-2608, 2015.
2. Morita, M., Koyama, T., Sanai, H., Sato, K., Hiramoto, A., Masuyama, A., Nojima, M., Wataya, Y. and Kim, H.-S. Stage specific activity of synthetic antimalarial endo- peroxides, N-89 and N-251, against *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Int.*, 64, 113-117, 2015.
3. 金 惠淑, 片本 茜, 佐藤 聡, 綿矢有佑, 土居弘幸. 薬剤耐性マラリアに有望な新規抗マラリア薬開発の現況. *岡山医学会雑誌*, 127(12), 231-235, 2015.
4. Sato, A., Nakama, K., Satake, A., Yamamoto, A., Hiramoto, A., Masutani, M., Wataya, Y. and Kim, H.-S. Role of activating transcription factor 3 protein ATF3 in necrosis and apoptosis of cell death induced by 5-Fluoro-2-deoxyuridine. *FEBS J.*, 281 (7), 1892-1900, 2014.
5. Kandeel, M., Noguchia, Y., Oh-Hashi, K., Kim, H.-S. and Kitade, Y. Molecular dynamics and energetic perceptions of substrate recognition by thymidylate kinase *J. Thermal Analysis and Calorimetry*. 115, 2089-2097, 2014.
6. Ueda, Y., Takeda, M., Mori, K., Dansako, H., Wakita, T., Kim, H.-S., Sato, A., Wataya, Y., Ikeda, M. and Kato, N. New preclinical anti-malarial drugs potently inhibit hepatitis C virus genotype 1b RNA replication. *PLoS One*, 8 (8), e72519 (1-11), 2013.
7. Kamata, M., Hagiwara, J., Hokari, T., Suzuki, C., Fujino, R., Kobayashi, S., Kim, H.-S. and Wataya, Y. Applications of triphenylpyrylium salt-sensitized electron transfer photo-oxygenation reactions to the synthesis of benzo-fused 1,4-diaryl-2,3-dioxabicyclo[2.2.2]octanes as new anti-malarial cyclic peroxides. *Res. Chem. Intermed.*, 39, 127-137, 2013.

#### [学会発表](計 15 件)

1. 榎田真千子, 河本理沙, 金 惠淑. 経皮吸収型抗マラリア薬の開発研究. 日本薬

- 学会第 136 年会、2016 年 3 月 26 日～3 月 28 日（横浜市）
2. 金 惠淑、河本理沙、真北町尾、綿矢有佑。経皮吸収型抗マラリア薬の開発研究。第 85 回日本寄生虫学会大会、2016 年 3 月 18 日～3 月 21 日（宮崎市）
  3. 金 惠淑、綿矢有佑、河本理沙、横田真千子、土居弘幸。日本から発信する抗マラリア薬。医療展示会中央西日本メディカルイノベーション 2016、2016 年 2 月 16 日～2 月 17 日（岡山市）
  4. Hye-Sook Kim. Current situation of antimalarial endoperoxides in Japan. Forum Cheju 17, 2015 年 11 月 13 日～11 月 14 日（吹田市）
  5. Hye-Sook Kim, Risa Komoto, Machiko Makita, Yusuke Watayam Yuji Kurosaki and Kazutaka Higaki. Pharmacokinetic study of antimalarial-endoperoxides. Forum Cheju 17, 2015 年 11 月 13 日～11 月 14 日（吹田市）
  6. 金 惠淑。日本から発信する新しい抗マラリア薬。ライフサイエンスワールド 2015（アカデミックフォーラム）、2015 年 5 月 12 日～5 月 13 日（東京都）
  7. 金 惠淑。抗マラリア候補・環状過酸化物の開発現況。第 84 回日本寄生虫学会大会、2015 年 3 月 21 日～3 月 22 日（三鷹市）
  8. Hye-Sook Kim, Yuka Nakamura, Risa Komoto, Kaoru Kanai, Akira Sato, Yuji Kurosaki, Kazutaka Higaki and Yusuke Wataya. Antimalarial drug development of synthetic endoperoxides as new drug. 大韓寄生虫学・熱帯医学会第 56 回総会及び学術大会、2014 年 10 月 30 日～10 月 31 日（釜山、韓国）
  9. 金 惠淑、中村由香、河本理沙、金井 薫、佐藤 聡、綿矢有佑、黒崎勇二、檜垣和孝。難治性感染症制御に向けてー薬剤耐性マラリアに有望な新薬開発の現況ー。第 70 回日本寄生虫学会西日本支部大会、2014 年 10 月 18 日～10 月 19 日（神戸市）
  10. Hye-Sook Kim, Chikako Imada, Makoto Kuramoto, Ken-Ichi Ogawara, Akira Sato, Yusuke Wataya and Kazutaka Higaki. Improvement of oral absorption behavior of antimalarial candidate of N-251 by self micro-emulsifying drug delivery system. BA/BE 2014 conference, 2014 年 10 月 6 日～10 月 7 日（ソウル、韓国）
  11. Hye-Sook Kim, Yuka Nakamura, Risa Komoto, Akira Sato, Yusuke Wataya and Daniel Adjei Boakye. Antimalarial drug development of synthetic N-251 compound as new drug. 13<sup>th</sup> International congress of parasitology 2014, 2014 年 8 月 10 日～

- 8 月 15 日（メキシコシティ、メキシコ）
12. 金 惠淑、中村由香、河本理沙、片本 茜、佐藤 聡、檜垣和孝、黒崎勇二、綿矢有佑。非経口型抗マラリア薬の開発研究。日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 28 日～3 月 30 日（熊本市）
  13. 金 惠淑、中村由香、河本理沙、片本 茜、佐藤 聡、綿矢有佑、檜垣和孝、黒崎勇二。非経口型抗マラリア薬の開発研究。第 83 回日本寄生虫学会、2014 年 3 月 27 日～3 月 28 日（松山市）
  14. 中村由香、河本理沙、片本 茜、佐藤 聡、綿矢有佑、檜垣和孝、金 惠淑。経皮吸収型抗マラリア薬の開発研究。第 69 回日本寄生虫学会西日本支部大会、2013 年 10 月 19 日～10 月 20 日（香川）
  15. Hye-Sook Kim, Masayuki Morita, Akane Katamoto, Hiroki Watanabe, Akira Sato, Kazutaka Higaki and Yusuke wataya. New candidates as anti-malarial drugs. Forum Cheju 16, 2013 年 8 月 30 日～9 月 1 日（ソウル、韓国）

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：抗マラリア剤

発明者：金 惠淑、綿矢有佑、佐藤 聡、土居弘幸

権利者：国立大学法人岡山大学

種類：特許

番号：PCT/JP2015/79511

出願年月日：2015 年 10 月 20 日

国内外の別：外国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

土居弘幸（DOI, Hiroyuki）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：20452568

加藤宣之（KATO, Nobuyuki）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40150883