

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460130

研究課題名(和文)カイコを簡易 in vivo 評価系に利用した天然由来新規抗真菌剤の創薬研究

研究課題名(英文) Screening for new antifungal antibiotics of microbial origin using silkworm infection model with *Candida albicans*

研究代表者

内田 龍児 (Uchida, Ryuji)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：60280632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：重篤な症状を呈する真菌症の起因菌であるカンジダ・アルビカンスを昆虫のカイコに感染させた in vivo 様の感染モデルを利用し、新規抗真菌剤のリードを微生物の培養液中に求めた結果、治療効果を示す5つの化合物を同定した。また、深在性真菌症の有効な治療薬アムホテリシン B の抗真菌活性増強物質のスクリーニングも並行して行ない、shodoamide と命名した新規化合物の発見にも成功した。

研究成果の概要(英文)：The in vivo-mimic assay system using silkworm larvae was performed as the primary screening tool to discover antifungal antibiotics against *Candida albicans*. 9,500 Microbial cultures were screened in this in vivo-mimic assay system, resulting that five known compounds showing a therapeutic effect were identified. At the same time, in the course of screening for amphotericin B potentiators of microbial origins, four new compounds, designated shodoamides A to D, were isolated from the culture broth of unidentified fungal strain BF-0158. Furthermore, stereochemistries, antifungal activities and mode of action of new antifungal antibiotics, simplifungin and valsafungins A and B, were also elucidated.

研究分野：天然物化学

キーワード：抗真菌剤 感染症 カイコ評価系 微生物資源 天然有機化合物 カンジダ

1. 研究開始当初の背景

近年、高度先端医療などの影響で免疫力が低下した易感染者の増加に伴い、真菌症、特に1年生存率が極めて低い重篤型深在性真菌症の発症率が高くなっている。さらに、適用可能な薬剤が少ないため現行の治療法が奏効しない症例が多発し、多剤耐性真菌症の出現も増加傾向にあることから、問題がさらに深刻化している。しかし、臨床で使用される主な抗真菌剤は、アムホテリシンB (AMPB)、アゾール系抗真菌薬、カンディン系抗真菌剤など数種で、その絶対数・質ともに少ない。さらに世界の抗真菌剤の研究開発に目を向けてみても、アゾール系薬剤の誘導体開発に重点が置かれ、新規骨格あるいは新たな作用機序を持つ薬剤の開発は殆どされていないのが現状であり、5年、10年先の真菌症対策を見据えた新たな抗真菌剤の供給は急務である。

2. 研究の目的

抗真菌剤の開発が抗細菌剤と比較して遅れる理由として、真菌が動物細胞と同じ真核生物であるために、選択毒性を持たせることが極めて困難なことが挙げられる。そこで本研究では、真菌症に対する新規治療薬の開発を目的に、天然資源(微生物の培養液等)を対象に、病原真菌を感染させたカイコを簡易的な *in vivo* 評価系としてスクリーニングの初期段階に導入し、治療効果を指標にサンプルを選別した。

また、既存抗真菌剤の活性を増強する化合物の報告は殆どないことから、これが医薬品へ応用できれば、耐性菌への対応や抗真菌剤の抱える重篤な副作用を低減する手段の一つになると考えられる。そこで増強活性物質の探索も並行して実施した。

3. 研究の方法

補助期間中下記の実験項目(1)~(5)を繰り返し実施し、可能な限り多くの抗真菌活性を有する化合物の取得を行った。

(1) 天然資源の供給

スクリーニングのサンプルには、天然資源の中で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代謝産物を用いる。当研究室および外部共同研究機関より提供される真菌、放線菌および細菌をそれぞれ2~4種類の培地で培養した培養液あるいは、それを分画した濃縮サンプルを主にスクリーニングに供した。

(2) カンジダ感染モデルカイコを用いた抗真菌剤のスクリーニングの実施

まずペーパーディスク法において、他の細菌には効果を示さずカンジダのみに生育阻止を示す培養液を選択した。次に、試験真菌に臨床分離カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans* TIMM1768 株) を用い、

これを5齢幼虫にまで飼育したカイコの背脈管(ヒトの血管に相当)に注射することでカンジダ感染モデルカイコを作製し、これに試験サンプル単独、あるいはAMPB活性増強物質を取得するために試験サンプル+AMPB(カンジダの生育に影響しない濃度を投与)をして接種し、3、4日後に生存数を確認した。判定基準は無投与群と比較して延命効果が認められるものとし、効果の確認されたサンプルは項目3の培養および精製過程へ進めた。

(3) 活性物質の生産および単離精製

(2)で有効と判断されたサンプルは、三角フラスコあるいはジャーファーマンター等を用いた大量培養を行い、この培養液から抽出操作(溶媒、各種吸着剤)、各種クロマトグラフィー(液々分配、カラム:吸着、イオン交換、順相、逆相、分配、HPLC)等の精製手法を組み合わせることで目的とする抗真菌活性物質の単離を行った。

(4) 抗真菌活性物質の構造解析

単離した化合物は各種機器分析(質量分析、赤外吸収スペクトル、紫外外部吸収スペクトル、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。

(5) 活性物質の評価

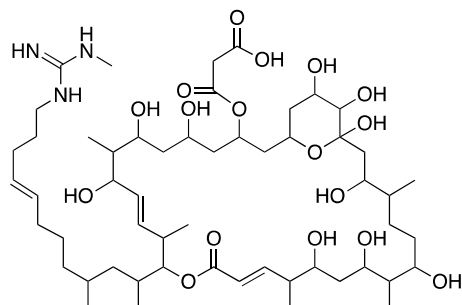
発見した新規化合物は、カイコ簡易 *in vivo* 評価系にて耐性菌を含む病原真菌に対する評価を行い、毒性試験および薬物代謝実験などを行う。また、微量液体希釈法において各種細菌および真菌に対する抗菌スペクトルを測定し、薬剤としての有効性を判断し、リードと成り得る候補化合物を選別した。

4. 研究成果

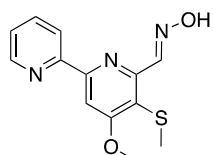
微生物培養液約9,500サンプルを評価した結果、細胞毒性を示さずカイコ評価系で治療効果を示す培養液を12サンプル、AMPB増強活性を示す培養液を3サンプル選択し、現在活性成分の単離精製を進めた。そのうち、活性物質の構造を明らかにしたものを以下に示す(図1)。

まず、カイコ評価系で治療効果を示す化合物として、放線菌の培養液中からは、K10-0569株が生産する copiamycin (Arai T. *et al. J. Antibiot.* **18**, 63-67, 1965)、OPMA1341株およびOPMA2412株が生産する collismycin (Shindo K. *et al. J. Antibiot.* **47**, 1072-1074, 1994)、OPMA00312株が生産する 5-(13-methyltetradecyl)-1,3-benzenediol (Tsuge N. *et al. J. Antibiot.* **45**, 886-891, 1994) を活性物質として単離同定した。また、真菌の培養液中からは、BF-0169株が生産する xanthoepocin (Igarashi Y. *et al. J. Antibiot.* **53**,

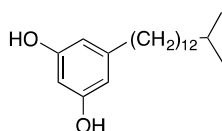
928-1074, 2000)、BF-0117 株 が生産する fusarielin A を単離同定した。これらのうち、5-(13-methyltetradecyl)-1,3-benzenediol は、抗真菌活性の報告はこれまでになく、詳細な抗真菌スペクトルに興味をもたれる。



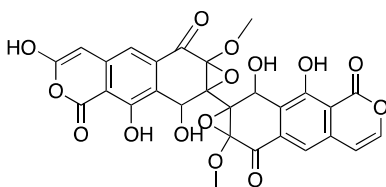
Copiamycin



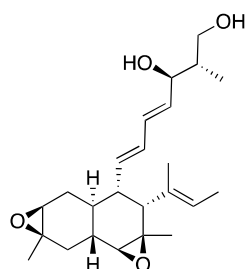
Collismycin



5-(13-methyltetradecyl)-1,3-benzenediol



Xanthoepocin



Fusarielin A

図1 微生物由来の抗真菌活性物質

次に AMPB 増強活性を示す化合物として、未同定真菌 BF-0158 の培養液中から shodoamide と命名した新規化合物 4 成分の発見に成功した (特許取得予定: 構造未掲載)。現在、さらに精製を進め新規成分の取得を試みており、今後、立体化学の解析、詳細な併用による抗真菌スペクトルの測定およびカイコあるいはマウス評価系での治療効果等を調査し、創薬シードを目指した誘導体合成へと展開する予定である。

先行研究において発見した真菌 *Simplicillium minatense* FKI-4981 (図2) が生産する新規抗真菌物質 simplifungin および真菌 *Valsaceae* sp. KFH-53 が生産する新規類縁化合物 valsafungin A および B (図2) については、その絶対立体化学の解明、詳細な抗菌活性および作用機序の解析を試みた。

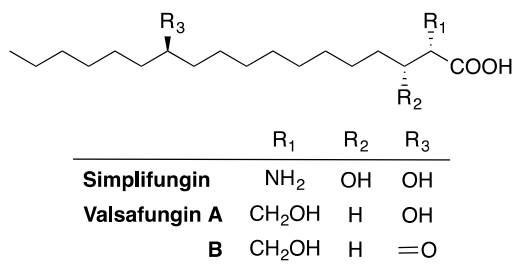


図2 Simplifungin および valsafungin 類の絶対立体構造

まず、絶対立体化学の解明については、様々なモッシャー試薬を用い誘導体化し NMR で解析することで全ての立体化学を明らかにした (図2)。

次に、抗真菌活性については、simplifungin は酵母様真菌 (MIC; 4.0~32 μg/mL) に、valsafungin 類は酵母様真菌 (MIC; 0.125~16 μg/mL) および接合菌 (MIC; 0.5~1.0 μg/mL) に対する生育阻害を示し、カンジダに対しては、誘導体化の過程で得られた simplifungin のカルボン酸メチル誘導体が最も強い抗真菌活性 (MIC; 0.25 μg/mL) を示した。

また、simplifungin および valsafungin A の作用点については、独自に構築した LCMS を用いた検出方法により明らかにした。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* から調製した粗酵素を用いて解析した結果、スフィンゴリン脂質合成過程の初期段階の酵素セリン-パルミトイル転移酵素 (SPT) を阻害することを明らかにした (図3)。これまでに天然由来の SPT 阻害剤として myriocin (Kluepfel D *et al.* *J Antibiot.* **25**, 109-15, 1972) が知られている。

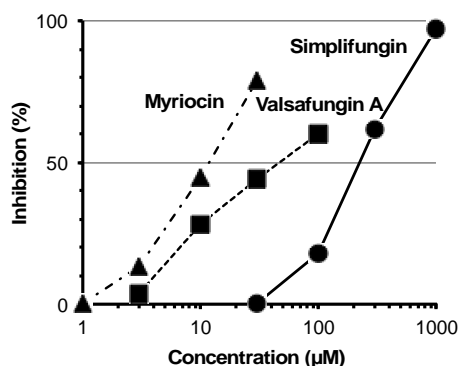


図3 Simplifungin および valsafungin A の SPT 阻害活性

本化合物については、今後カイコ評価系での治療効果を再確認し、結果が良好であればマウスを用いた感染実験を実施し、抗真菌薬のシードとしての可能性を見極めたいと考えている。

スクリーニングで選択された残りのサンプルは引き続き検討を行い、補助期間終了後も新規抗真菌剤のシードを目指した探索研究を継続する予定である。

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2件)

Uchida R, Namiguchi S, Ishijima H, Tomoda H: Therapeutic effects of three trichothecenes in the silkworm infection assay with *Candida albicans*. *Drug Discov Ther* **10**: 44-48, 2016. DOI: 10.5582/ddt.2016.01013

Uchida R, Hanaki H, Matsui H, Hamamoto H, Sekimizu K, Iwatsuki M, Kim YP, Tomoda H: *In vitro* and *in vivo* anti-MRSA activities of nosokomyceins. *Drug Discov Ther* **8**: 249-254, 2014. DOI: 10.5582/ddt.2014.01050

[学会発表](計11件)

荒井美紀、内田龍児、石島広之、宮崎秀俊、野中健一、増間碌郎、供田 洋: 真菌 *Pochonia chlamidosoria* var. *ellipsospora* FKI-6088 が生産する pochopolone 類の立体化学の解析および抗真菌活性. 日本薬学会第 136 年会 (横浜) 2016. 3. 26~29.

富永剛広、内田龍児、石島広之、供田 洋: 真菌 BF-0126 株が生産する pyridoxathin の抗真菌活性に関する研究. 日本薬学会第 136 年会 (横浜) 2016. 3. 26~29.

Uchida R, Miyazaki H, Ishijima H, Nonaka K, Masuma R, Tomoda H: Pochopolones, new antifungal antibiotics, produced by *Pochonia chlamidosoria* var. *ellipsospora* FKI-6088. The 8th Japan-Korea Chemical Biology Symposium (Okinawa, Japan) 2016. 1. 18~19.

Ishijima H, Uchida R, Ohtawa M, Kondo A, Nagai K, Nonaka K, Masuma R, Iwanoto S, Onodera H, Nagamitsu T, Tomoda H; Fungal simplifungin and valsafungin, new antifungal antibiotics targeting serine palmitoyltransferase. The 8th Japan-Korea Chemical Biology Symposium (Okinawa, Japan) 2016. 1. 18~19.

Uchida R, Ishijima H, Kondo A, Ohtawa M, Nagai K, Nonaka K, Masuma R, Iwanoto S, Onodera H, Nagamitsu T, Tomoda H; Fungal simplifungin and valsafungin, new antifungal antibiotics targeting serine palmitoyltransferase.

PACIFICHEM 2015 (Honolulu, USA) 2015. 12. 15~20.

石島広之、内田龍児、近藤あり子、野中健一、増間碌郎、岩本晋、小野寺秀幸、供田 洋: 真菌が生産する新規抗真菌活性物質 valsafungin に関する研究. 日本薬学会第 135 年会 (神戸) 2015. 3. 26~28.

加島政博、内田龍児、石島広之、供田 洋: 真菌 BF-0158 株が生産する新規抗真菌剤に関する研究. 日本薬学会第 135 年会 (神戸) 2015. 3. 26~28.

荒井美紀、内田龍児、石島広之、供田 洋: カイコ真菌症モデルにおける真菌由来 simplifungin の amphotericin B 活性増強作用. 日本薬学会第 135 年会 (神戸) 2015. 3. 26~28.

Uchida R, Ishijima H, Ohtawa M, Kondo A, Nagai K, Nonaka K, Masuma R, Nagamitsu T, Tomoda H; Simplifungin, a new antifungal antibiotic produced by *Simplicillium minatense* FKI-4981. Natural Product Discovery & Development in the Post Genomic Era (San Diego, USA) 2015. 1. 10~13.

内田龍児、供田 洋: カイコ細菌感染モデルを利用した感染症治療薬の探索. 日本薬学会第 134 年会 (熊本) 2014. 3. 28~30.

石島広之、内田龍児、近藤あり子、野中健一、増間碌郎、供田 洋: 真菌 *Simplicillium minatense* FKI-4981 株が生産する新規抗真菌剤に関する研究. 日本薬学会第 134 年会 (熊本) 2014. 3. 28~30.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ

[http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/microbchem/w
ei_sheng_wu_yao_pin_zhi_zao_xue/Welcome.ht
ml](http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/microbchem/w
ei_sheng_wu_yao_pin_zhi_zao_xue/Welcome.html)

6．研究組織

(1)研究代表者

内田 龍児 (UCHIDA RYUJI)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：60280632

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし