

受理年月日	受理番号

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成30年 5月 日

採択番号	29-共同-4		
研究部門	高度診断学研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	五十嵐 郁男
研究課題名	抗生物質など天然由来化合物の抗バベシア活性評価と 新規治療・予防薬への応用		
研究代表者	(ふりがな) 氏名	所属部局等・職名	
	いしやま あき 石山 亜紀	北里大学北里生命科学研究所 熱帯病研究センター・特任助教	
研究分担者	いわつき まさと 岩月 正人	北里大学北里生命科学研究所 熱帯病研究センター・准教授	
	ほかり れい 穂苅 玲	北里大学北里生命科学研究所 熱帯病研究センター・研究員	
	きよはら ひろあき 清原 寛章	北里大学北里生命科学研究所 大学院感染制御科学府 和漢薬物学 研究室・教授	
	おとぐろ かずひこ 乙黒 一彦	北里大学北里生命科学研究所 熱帯病研究センター・研究員	
	いがらし いくお 五十嵐 郁男	帯広畜産大学原虫病研究センター・高度診断学部門・教授	
研究期間	平成29年4月1日 ～ 平成30年3月31日		
目的・趣旨	<p>北里大学 北里生命科学研究所 熱帯病研究センター(以下、北里大)では微生物代謝産物などの天然物を創薬資源として抗マラリアおよび抗トリパノソーマ原虫活性物質を取得し、これらの一部は創薬リード化合物として研究を推進している。抗原虫活性物質ライブラリーはこれらの化合物群から構成されており、随時更新している。</p> <p>動物の neglected disease の一つとしてバベシア症が畜産領域で注目されてきている。バベシアもマラリア原虫やトリパノソーマ原虫と同様に住血原虫であり、既に一部の抗マラリア剤および抗トリパノソーマ剤が抗バベシア効果を示すことが明らかになっている。</p> <p>このような背景のもと、北里大の保有する抗原虫活性物質ライブラリーから効率的にバベシア治療薬のリード化合物が見出されることを期待し、<i>in vitro</i>、<i>in vivo</i> マウス実験系での抗バベシア活性評価を本助成により継続してきた。今年度までに幾つかの化合物が <i>in vitro</i> 抗バベシア活性を示すことを見出し、有望な化合物については <i>in vivo</i> マウス実験系で検証し、特許取得、論文公表してきた。平成29年度は (1)北里大の保有する微生物代謝産物から見出された抗原虫活性物質ライブラリーの拡充(抗原虫スペクトル拡大のため新たに抗リーシュマニア活性物質ライブラリーを追加)、(2)ライブラリーの抗バベシア活性評価の継続(CLF 関連を含む)、(3)見出された有用化合物の <i>in vivo</i> 評価の検討(CLF 関連含む)を実施することとした。</p>		

受理年月日	受理番号

研究経過の
概要

本共同研究はH23年度より北里大で見出された抗原虫活性物質ライブラリーについて、帯広畜産大学(五十嵐教授)の下、以下の原虫種で抗バベシア活性評価を行うことで新たな治療薬シードの発見を目指すために開始した。

- ・ *in vitro* 培養牛バベシア (*Babesia bovis* および *B. bigemina*)
- ・ *in vitro* 培養馬バベシア (*T. equi* および *B. caballi*)
- ・ *in vivo* マウスバベシア (*B. microti*) 感染モデル

(1) 北里大の抗原虫活性物質ライブラリーの拡充

これまでに数種類の先行評価化合物の *in vitro* 抗バベシア活性評価がなされており、H29年度も抗原虫活性物質ライブラリーの抗バベシア活性評価を継続するために微生物培養液から抗マラリア活性物質等のスクリーニングを継続し、活性物質生産菌の大量培養、溶媒抽出、各種クロマトグラフィー、HPLCなどによる精製を行い新規抗マラリア活性物質の取得に至った。その他、抗マラリア活性は無いが新規化合物を3種取得している。抗マラリア活性以外の各種生物活性評価を行う予定。また、抗原虫スペクトル拡大のため新たに抗リーシュマニア活性物質探索系を立ち上げスクリーニングを開始した。

(2) ライブラリーの抗バベシア活性評価の継続(CLF関連を含む)

先行評価化合物のうちCLFが20mg/kg(経口)で標準薬ganazeg(25mg/kg,皮下)と同等の *in vivo* 抗バベシア活性を示すことを見出した(共同出願:国内特許13-138824, PCT出願)。本化合物はバベシアに対して高い原虫特異性を有する可能性が示唆されたが、*in vivo* マウス感染実験においてはバベシアを完全に排除できないことが明らかとなった。このため、本化合物単剤ではなく他の抗バベシア活性物質との組み合わせによる検討が必要であることを明らかとし、論文にて公表*した。

抗マラリア活性物質(NP-023)が新たに抗原虫活性物質ライブラリーに追加され、NP-023について抗バベシア活性の評価を行ったところ、*in vitro*で抗バベシア活性は認められなかった(> 50 μM)が、NP-023の抗マラリア創薬過程においては新たな知見が得られた。

(3) 見出された有用化合物の *in vivo* 評価の検討(CLF関連含む)

CLF単剤ではなく他の抗バベシア活性物質との組み合わせによる検討が必要であることを明らかにしたことを受け、CLFと標準薬ganazegの併用による検討を行い、CLF単剤よりも低濃度で *in vitro*における相乗あるいは相加効果が確認された。また、*in vivo*においても同様に2剤併用により原虫の完全排除(再燃無し、PCR(-))に至る結果が得られた。作用機序解析としてmRNA、DNAに対する影響を検討したところ、CLFとganazegがDNAに結合することで、上記の活性を発現したと推定された。本成果について論文発表に至った(成果欄に記載)。

* AAC 60:2739-2746(2016).

受理年月日	受理番号

研究成果の概要	<p>プロジェクト毎にH29年度の成果と今後の予定を以下に示す。</p> <p>(1) 北里大の抗原虫活性物質ライブラリーの拡充 次候補化合物を選択するために抗原虫活性物質ライブラリーの拡充をすべく抗マラリア活性を中心に北里大の天然物ライブラリーについてスクリーニングを行ない、新規抗マラリア活性物質を2化合物(IC₅₀ 150-910nM)取得した。これらの物質は培養の再現や十分な量的取得が困難であったため、<i>in vivo</i>評価を目指すための全合成を進めている。その他、抗マラリア活性は見出せなかったものの2つの新規化合物を培養液より取得した。また新たな培養液も見出されており、活性物質取得を継続している。</p> <p>抗原虫スペクトルを拡大するために新たに抗リーシュマニア活性物質のスクリーニング系を立ち上げた。皮膚リーシュマニア原虫種の <i>L. major</i>、<i>L. mexican</i>、<i>L. tropica</i>を用いマクロファージ内寄生型の原虫を標的とした系を構築した。比較的安定して原虫の維持が可能な <i>L. major</i>を用いて北里大の化合物ライブラリーから順次評価を行っている。ヒット化合物が見出せた後に他2種の原虫にて活性スペクトルを確認することとした。</p> <p>内臓リーシュマニア原虫種である <i>L. donovani</i>についても評価系を立ち上げている。</p> <p>(2) ライブラリーの抗バベシア活性評価の継続(CLF関連を含む) 上記で見出された新規化合物類は抗マラリア活性での特許取得を想定しており、先ず量的供給の達成を進めている。抗バベシア活性評価はその後に行う予定とした。</p> <p>(3) 見出された有用化合物の <i>in vivo</i>評価の検討(CLF関連含む) CLFに良好な抗バベシア活性が認められたことから同様のphenazine 骨格を有する化合物類についても順次 <i>in vivo</i>抗バベシア活性を評価する予定であったが、<i>B. caballi</i>、<i>B. bigemina</i>、<i>B. gibsoni</i>、<i>B. bovis</i>、<i>T. equi</i>に対し <i>in vitro</i>活性スペクトルが狭いためペンディングとした。</p> <p>CLFと他剤の併用効果について標準薬ganazegで検討し、単剤よりも低濃度で <i>in vitro</i>における相乗あるいは相加効果が確認された。<i>In vivo</i>においても2剤併用により原虫の完全排除(再燃無し、PCR(-))に至る結果が得られた。作用機序解析としてmRNA、DNAに対する影響を検討したところ、CLFとganazegがDNAに結合することで、上記の活性を発現したと推定された。本成果について論文を投稿し受理された。</p>
研究成果の発表	<p>CLF と Ganazeg の併用効果について論文発表 Chemotherapeutic efficacies of a clofazimine and diminazene aceturate combination against piroplasm parasites and their AT-rich DNA-binding activity on Babesia bovis. Scientific Reports 7: 13888 DOI:10.1038/ s41598-017-14304-0 Bumduuren Tuvshintulga, Mahmoud AbouLaila, Thillaiampalam Sivakumar, Dickson Stuart Tayebwa, Sambuu Gantuya, Khandsuren Naranbaatar, Aki Ishiyama, Masato Iwatsuki, Kazuhiko Otoguro, Satoshi Ōmura, Mohamad Alaa Terkawi, Azirwan Guswanto, Mohamed Abdo Rizk, Naoaki Yokoyama, Ikuo Igarashi</p>