

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和 2 年 5 月 26 日

採択番号	2019-共同-13		
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	西川 義文
研究課題名	新規抗アピコンプレクサ類原虫薬 DKP 誘導体の実用化		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	にへい こういち 二瓶 浩一	(公財)微生物化学研究会微生物化学研究所・定年制研究員・ 研究総括と実験の実施	
研究分担者	いじま まさとみ 飯島 正富	(公財)微生物化学研究会微生物化学研究所・定年制研究員・ 抗原虫剤の生産方法の開発	
	どい ひろやす 土井 宏育	(公財)微生物化学研究会微生物化学研究所・定年制研究員・ 抗原虫剤の生産方法の開発	
	にしかわ よしふみ 西川 義文	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授・(役割分担)抗原虫活 性を持つ化合物の判定および検出系の開発	
研究期間	2019 年 4 月 1 日 ~ 2020 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<p>アピコンプレクサ類原虫トキソプラズマは、世界人口の約 30%以上が感染していることが推定されており、その感染により、流産や新生児の先天性トキソプラズマ症を引き起こし、少子化が進む現代社会において大きな問題の一つとなっている。さらに、家畜の生産性の低下が問題視されるトキソプラズマと近縁、ネオスポラ感染による牛の流産例が全国的に見つかっており、被害の拡大が懸念される。一方、世界三大感染症の一つマalariaもアピコンプレクサ類原虫であるプラスモディウム感染により発症し、年間 3~5 億人が罹患し、その内、約 200 万人もの命を奪う医学分野で重要な疾患である。我々はトキソプラズマをはじめとするアピコンプレクサ類原虫症に対して極めて有効と考えられるジクトピペラジン(DKP)誘導体のメタサイトフィリン(MCF)を発見した(特願 2017-243872)。アピコンプレクサ類原虫に対して <i>in vivo</i> および <i>in vitro</i> 系において優れた抗原虫活性を示す MCF は現存の方法では生産性が低いため実用化に向けた生産方法の改善をする必要がある。本研究課題は、微生物を利用する育種法による MCF の生産方法の効率化および DKP 誘導体調製方法の開発を行い、新たな原虫剤の創成を行うことを目的とした。</p>		

<p>研究経過の概要</p>	<p>原虫病薬は、市場規模が新規薬剤の開発費を下回るため、大手製薬企業がその開発になかなか着手しないのが現状である。従って、利潤に左右されない大学と我々のような化合物を提供する公的研究機関で抗原虫薬の探索および創薬に向けた開発を実施することが重要である。我々の研究グループの目的は感染者数の多いトキソプラズマによる繁殖障害問題を解決するための創薬に繋がる新規技術・有用化合物を提供することにある。これまでに我々は原虫薬開発に適した天然化合物ライブラリーの構築を行い、トキソプラズマ感染マウスに対する優れた治癒効果を示す MCF を発見した。しかしながら糸状菌によって産生される MCF は、生産効率が悪く、化合物の生産性の向上化させる必要がある。MCF の実用化に向けて種々の動物実験をする必要があり、化合物量を担保することが必須である。MCF の生産性向上化および育種による構造活性相関解析に加え、他の原虫に対する抗原虫作用のパネル評価を行い、独自の新規抗原虫薬の実用化に向けた開発を実施した。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>ジケトピペラジン(DKP)誘導体メタサイトフィリンは、トキソプラズマ、ネオスポラおよびマラリア原虫に対する抗原虫活性を示す。さらに、MCF が既存薬クロロキンと同レベルの抗原虫活性値を示し、MCF はクロロキン耐性マラリア原虫に対し、高い抗原虫活性を示すことも示してきた。世の中でマラリア既存薬に対する耐性株が出現している現状を踏まえると MCF の様なこれまでのマラリア薬もしくはアピコンプレクサ類原虫薬剤にない化学構造を持つ新規の抗原虫活性を示す薬剤が次世代原虫薬として発展することが大に期待できる。</p> <p>メタサイトフィリン(MCF)が新たな原虫創薬における重要な意義を持つ化合物であることが明らかであるにも関わらず、現存の MCF 生産菌の育種による生産方法では、MCF の原虫に対する作用機序解析、小型および大型動物(マウス、ネコ、ヤギ、ニワトリ等)を用いた感染モデルを用いた解析を進めるのに必要な量を担保するのが困難な状況である。この現状を打開するために、低コストで且つ効率的な MCF の生産方法の開発が急務である。</p> <p>これまでの方法では、MCF 生産菌(<i>Metarhizium sp.</i>)をリッター培養当たり MCF 収量が数 mg 程度(最大でも10mg 以下)の生産効率であった。我々の目標は精製工程を含めてリッター培養当たり100mg オーダー以上の MCF の収量を得る安定的な生産方法の開発である。</p> <p>前年までの研究成果において、MCF 生産菌(<i>Metarhizium sp.</i> 糸状菌)をリッター培養当たり最大~60mg 程度の収量だった生産効率から、MCF 生産糸状菌への紫外線照射による突然変異導入条件の改良および無機塩、アミノ酸等の添加物組成に加え、酸素の供給効率等の培養条件の改良により、本年度は、リッター培養当たり最大で約80 mg オーダーの収量への向上化に成功した。本結果は、MCF の抗原虫薬として実用化の可能性が見えてきた大きな進展的成果である。今後は、本プロジェクトの目標収率である精製工程を含めてリッター培養当たり100mg オーダー以上の安定的な生産効率および収量に向けてさらに生産方法を改良し、研究を進める予定である。現在、将来的な工場レベルでの MCF 大量生産を見据え、酸素供給効率の制御が可能なジャーフェーマターを用いた MCF の生産方法の条件検討を行っており、最適条件の検討を進めている。</p> <p>化学合成と比較し、低予算での誘導体展開を行える微生物育種法により、MCF 誘導体の生産方法の開発を行った。その結果、生産培地にハロゲン化されたフェニル基を持つフェニルアラニンを添加することでハロゲンが導入された MCF 誘導体が得られる方法が明らかになりつつある。現在、MCF 生産菌の培養方法を栄養培地から最小培地による生育条件を検討しており、種々のアミノ酸誘導体や MCF 前駆体と予想される化合物の</p>

	<p>添加により新規の MCF または DKP 誘導体の調製方法の開発を進めている。</p> <p>優れた抗原虫作用を示す MCF の将来的な実用化を踏まえ、本申請内容の研究課題の遂行が不可欠であると考えられる。本研究成果を通じて MCF および DKP 誘導体がトキソプラズマ、ネオスポラの妊娠期感染による繁殖障害問題、既存薬耐性マラリアの出現問題、その他のアピコンプレクサ類原虫症の解決に期待が持てる。</p>
<p>研究成果の 発表</p>	<p>○ Lessombun A, Iijima M, Umeda K, Kondoh D, Pagmadulam B, Abdou AM, Suzuki Y, Ohba SI, Isshiki K, Kimura T, Kubota Y, Sawa R, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Metacytofilin is a potent therapeutic drug candidate for toxoplasmosis. <i>J Infect Dis.</i> 2020 Feb 18;221(5):766-774. doi: 10.1093/infdis/jiz501.</p> <p>○ Pagmadulam B, Tserendulam D, Rentsenkhand T, Igarashi M, Sawa R, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Isolation and characterization of antiprotozoal compound-producing <i>Streptomyces</i> species from Mongolian soils. <i>Parasitol Int.</i> 2020 doi: 10.1016/j.parint.2019.101961.</p>