

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和 3 年 5 月 25 日

採択番号	2020-共同-14		
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	2020 年 4 月 1 日 ~ 2021 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 1/3 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種の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。さらに世界三大感染症の一つマラリアもアピコンプレクサ類原虫の感染により発症し、年間 3~5 億人が罹患し、その内、約 200 万人もの命を奪う医療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ケトピペラジン(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て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。したがって大手製薬企業がその開発に着手しないのが現状である。利潤に左右されない大学とわれわれ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。</p> <p>これまでに、われわれ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。さらに、MCF が抗ネオスポラ、抗マラリア活性を示すことも確認した。今後の MCF の実用化に向けて種々の動物実験による解析を行う必要があり、化合物量を担保することが必要不可欠である。現状の糸状菌によって産生される抗原虫剤 MCF は、生産効率が低く、化合物の生産性の向上化させる必要がある。MCF の生産性向上化、実用化に向けて、育種方法の開発、生合成経路解明に向けた解析、MCF の抗原虫作用機構の解析を実施した。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>DKP 誘導体の MCF 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し、MCF がマラリアの既存薬クロロキンと同レベルの抗原虫活性を持つ。MCF は、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次世代のマラリア薬として、もしくは、新規アピコンプレクサ類原虫薬剤にない化学構造を持つ MCF が新規の抗原虫活性を示す薬剤として発展することが期待できる。既存の 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、種々の実験動物による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った。この現状を打開するために、われわれは、低コストで且つ効率的な MCF の生産方法の開発における基盤構築を行っている。</p> <p>従来の方法では、MCF 生産菌 (<i>Metarhizium</i> sp.) をリッター培養当たり MCF 収量が数 mg 程度の生産効率であったが、前年までの研究成果において、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、リッター培養当たり 80mg オーダーの収量を得る条件を構築した。目標値のリッター培養当たり 100mg オーダー以上に向けて順調に推移している。昨年度より継続し、培養における酸素供給効率の制御が可能なジャーフェンターを用いた MCF の生産方法の条件検討を行っている。フラスコ培養とフェンター培養との間で、MCF 生産菌の培養生産物のパターンが異なるなど、その原因について解析を進めている。各々に対応した高収率の精製方法を構築し、MCF の生産の効率化は上昇している。</p> <p>MCF の生合成経路解明とその遺伝子情報を基にした MCF 生産方法開発を行うことを考慮し、その予備実験、解析を開始した。MCF は、Leu と Phe とのジペプチドを環状化した基盤骨格を持つジケトピペラジンであるものの、その生物学的な証拠は得ていなかった。今回、われわれは、生合成経路の中間体としてジケトピペラジン各々 L 体の cyclo[Leu-Phe]を経由して MCF が合成されていることを改変フィッシャー法にて確認し、その生合成経路において、ジケトピペラジンの形成が律速段階でない可能性について突きとめた。さらに、培養条件において、エピジェネティックに変化を与えて、MCF 生産上昇に働く化合物を探索した。その結果、ニコチン類などの添加物が MCF 生産量の向上化に働くことが明らかとなった。一方、MCF の抗原虫作用において、これまでにトランスクリプトーム解析から原虫の小胞体および核に作用している可能性を予想されていたものの、その証拠が得られていなかった。MCF が原虫のストレス応答機構を経て殺原虫効果を示すことが明らかになってきた。原虫のストレス応答、とりわけ小胞体ストレス応答機構は、哺乳類や酵母で解っている従来の機構と大きく異なる分子機構と考えられている。したがって、その解明に向けた基礎研究が今後の本プロジェクトの発展に必要となる。</p> <p>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り、本研究成果は、DKP 誘導体の MCF がアピコンプレクサ類原虫症に対する新たな治療薬または予防薬としての開発に繋がる。</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> <p>○ Lessombun A, Iijima M, Iijima M, Pagmadulam B, Orkhon B, Doi H, Issiki K, Sawa R, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Metacytofilin has potent anti-malarial activity. <i>Parasitol Int.</i> 2021 Apr;81:102267. doi: 10.1016/j.parint.2020.102267.</p> <p>○ <u>Nihei C</u>, Nakanishi M. Cargo selection in the early secretory pathway of African trypanosomes. <i>Parasitol Int.</i> 2021 May 14;84:102379. doi:10.1016/j.parint.2021.102379.</p>
----------------------	---