

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6083534号
(P6083534)

(45) 発行日 平成29年2月22日(2017.2.22)

(24) 登録日 平成29年2月3日(2017.2.3)

(51) Int.Cl.		F 1	
A 6 1 K 31/10	(2006.01)	A 6 1 K	31/10
A 6 1 P 33/06	(2006.01)	A 6 1 P	33/06

請求項の数 2 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2013-557467 (P2013-557467)	(73) 特許権者	301021533 国立研究開発法人産業技術総合研究所 東京都千代田区霞が関1-3-1
(86) (22) 出願日	平成25年1月29日(2013.1.29)	(73) 特許権者	504300088 国立大学法人帯広畜産大学 北海道帯広市稲田町西2線11番地
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/051829	(74) 代理人	110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
(87) 国際公開番号	W02013/118606	(72) 発明者	七里 元督 大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 独立 行政法人産業技術総合研究所 関西センタ ー内
(87) 国際公開日	平成25年8月15日(2013.8.15)	(72) 発明者	鈴木 宏志 北海道帯広市稲田町西2線11番地 国立 大学法人帯広畜産大学内
審査請求日	平成28年1月15日(2016.1.15)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	特願2012-25007 (P2012-25007)		
(32) 優先日	平成24年2月8日(2012.2.8)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

(54) 【発明の名称】 マラリアの予防または治療薬及びそのスクリーニング方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

-トコフェロールの血中濃度を低下させる化合物の有効量を含有するマラリアの予防または治療薬であって、前記化合物がプロブコールであるマラリアの予防または治療薬。

【請求項2】

マラリアの予防または治療薬を製造するための、-トコフェロールの血中濃度を低下させる化合物の使用であって、前記化合物がプロブコールである使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、マラリアの予防または治療薬に関する。

【背景技術】

【0002】

マラリアはマラリア原虫が生体内に感染することによって引き起こされる病気であり、ワクチンや治療薬の研究が行なわれている。マラリアの特効薬であるキニーネよりも副作用の弱いクロロキンが開発されたが、クロロキンに耐性を持つ原虫が増えていること、抗原が一定でないためワクチンの製造が困難であるなどの理由によりキニーネもいまだに使用されており、決定的な治療法は確立されていない。キニーネ、クロロキン、クロトリマゾールなどの抗マラリア薬の作用機序は、ヘムに対する錯体形成であることが非特許文献1に記載されている。

【0003】

非特許文献2には、過去の疫学的観察では、微量栄養素、特にビタミンEの欠乏が原虫感染に抵抗性を誘導する可能性を示唆していた。非特許文献3、4では血液中のビタミンE(α-トコフェロール)レベルを調節する蛋白質であるα-トコフェロールトランスフェラーゼ(α-TTP)の欠損したマウスの体内のα-トコフェロール量が減少し、ネズミマラリア原虫感染症に対する耐性を獲得することが記載されている。

【0004】

ビタミンEは多くの食物に比較的多量に含まれることから、ビタミンE欠乏の誘導は困難であり、原虫感染の予防あるいは治療のためにビタミンE欠乏を利用することは非現実的と考えられていた。

10

【0005】

一方、非特許文献5では、高脂血症治療薬であるプロブコールは、肝臓から血漿中へα-トコフェロールを放出するATP-バインディングカセットトランスポーターA1(ABCA1)蛋白質を阻害する活性を有し、マウスへのプロブコール経口投与により血漿中α-トコフェロール濃度を低下できることを記載している。しかしながら、プロブコールを投与して血漿中のα-トコフェロール濃度を低下させても赤血球中のα-トコフェロール量はほとんど変化しない。

【0006】

非特許文献6は、プロブコールを投与した患者が平均14%の血漿中ビタミンE濃度の減少が見られたことを開示しているが、この14%の減少は個人差よりも少なく、プロブコールがビタミンEの血漿中濃度を有意に低下できることは知られていなかった。

20

【0007】

非特許文献7は、クロロキンがα-TTP媒介α-トコフェロール分泌を抑制することが記載されているが、クロロキンの作用機序は上記のように鉄との錯体形成が関与すると考えられていたので、非特許文献7は、クロロキンの新たな抗マラリア作用機序を開示しているとは認識されていなかった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】N. T. Huy et al. J. Biol. Chem., 2002;277:4152

30

【非特許文献2】Shankar AH. J Infect Dis. 2000;182 Suppl 1:S37-53.

【非特許文献3】Herbas MS, Suzuki H. et al. Am J Clin Nutr. 2010;91:200-7

【非特許文献4】Herbas MS, Shichiri M, Suzuki H. et al. Malar J. 2010;9:101

【非特許文献5】Shichiri M. et al. J Nutr Biochem. 2010;21:451-6

【非特許文献6】Elinder LS et al. Arterioscler Thromb Vasc. Biol. 1995;15:1057-63.

【非特許文献7】M. Horiguchi et al. Genes to Cells, 2003;8:789-800

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

40

本発明は、副作用がなく、かつ、マラリアの発症を予防することができ、マラリアに罹患した後で投与しても治療効果を有するマラリアの予防または治療薬及びそのスクリーニング方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

従来、α-TTP欠損マウス及びビタミンE(α-トコフェロール)が欠乏したヒトにおいて、マラリア耐性を獲得できることが示唆されていたが、これらの場合、生体内のビタミンE(α-トコフェロール)の総量が低下しているため、マラリア原虫の標的である赤血球中のビタミンE(α-トコフェロール)量が同様に低下しているため、これによりマラリア耐性を獲得できたものと考えられていた。

50

【0011】

本発明者らは、血漿中の α -トコフェロール濃度を低下できるが、赤血球中のビタミンE(α -トコフェロール)量がほとんど変化しないプロブコールについてマラリア治療効果を調べたところ、意外にも標的の赤血球の状態は変化していないにもかかわらずマラリアによる死亡率を劇的に低下できることを見出し、さらに検討して本発明を完成した。

【0012】

TTP欠損マウスのように、生体内のビタミンE(α -トコフェロール)量を大きく低下させると小脳失調や不妊のような副作用が発現するが、本発明では生体内のビタミンE(α -トコフェロール)の分布を変えて血漿中ビタミンE(α -トコフェロール)濃度を低下させているため、有効成分の投与を停止すると速やかに血漿中ビタミンE(α -トコフェロール)濃度は回復するため、このような不都合は回避できる。

10

【0013】

本発明の第一態様によれば、 α -トコフェロールの血中濃度を低下させる化合物の有効量を含有するマラリアの予防または治療薬が提供される。

【0014】

一実施形態では、化合物が、ABCA1トランスポーター阻害剤、TTP阻害剤、 α -トコフェロール吸収抑制剤、 α -トコフェロール代謝促進剤からなる群から選ばれる。

【0015】

別の実施形態では、化合物がプロブコールである。

【0016】

本発明の第二態様によれば、細胞内に取り込まれる α -トコフェロールエステルを含む培地中で被験化合物の存在下に細胞を培養し、細胞内でエステル加水分解された α -トコフェロールの細胞外への放出を評価する工程を有することを特徴とする、マラリアの予防または治療薬のスクリーニング方法が提供される。

20

【0017】

一実施形態では、 α -トコフェロールエステルが標識された α -トコフェロールエステルである。

【0018】

本発明の第三態様によれば、被験化合物の存在下に α -TTPの細胞膜への移動を評価する工程を有することを特徴とする、マラリアの予防または治療薬のスクリーニング方法が提供される。

30

【0019】

本発明の第四態様によれば、 α -トコフェロールの血中濃度を低下させる化合物の有効量を、マラリアの治療または予防を必要とする患者に投与することを含む、マラリアの治療または予防方法が提供される。

【0020】

本発明の第五態様によれば、マラリアの予防または治療薬を製造するための、 α -トコフェロールの血中濃度を低下させる化合物の使用が提供される。

本発明の第六態様によれば、マラリアの予防または治療薬として使用するための α -トコフェロールの血中濃度を低下させる化合物が提供される。

40

【発明の効果】

【0021】

本発明によれば、副作用が低く、有効性の高いマラリアの予防または治療薬を提供することができる。

【0022】

本発明のマラリアの予防または治療薬は、クロロキン耐性株に対しても高い有効性を有する。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】 α -トコフェロール放出アッセイによるスクリーニング法の概要

50

【図2】 トコフェロール放出アッセイによるスクリーニング法での薄層液体クロマトグラフィーの結果

【図3】 トコフェロール放出アッセイによるスクリーニング法での トコフェロール放出の割合

【図4】 Aは実験動物の給餌スケジュール、Bはプロブコール食から通常食に変更後のマウスの週数に対する血中 - トコフェロール濃度のグラフ。プロブコールが トコフェロール血中濃度を減少できることが示されている。Controlは通常食を与えたC57BL/6Jマウス、KOは通常食を与えた TTP KOマウス。両者とも7週齢で採血。

【図5】 Aは実験動物の給餌スケジュール、Bは感染後経過日数に対する原虫感染率のグラフ、Cは感染後経過日数に対する生存率のグラフ。プロブコールがマラリア感染の死亡率を顕著に減少させることを示す。

10

【図6】 Aは実験動物の給餌スケジュール、Bは感染後経過日数に対する原虫感染率のグラフ、Cは感染後経過日数に対する生存率のグラフ。プロブコールがマラリア感染の死亡率を顕著に減少させることを示す。

【発明を実施するための形態】

【0024】

本発明者らは、マラリア感染症におけるビタミンEの関連性について検討した。ビタミンEは脂溶性抗酸化物質であり、トコフェロール4種類(α、β、γ、δ)およびトコトリエノール4種類(α、β、γ、δ)の総称である。上述8種類のうち、最も活性の高いのは α-トコフェロールであり、ヒトを含め哺乳類の血液中で最も高濃度に存在する。従って、本発明では α-トコフェロールについて着目したが、本発明のマラリアの予防または治療薬はビタミンEの血中濃度を低下させ、トコフェロールの合計量の血中濃度を低下させるものと考えられる。

20

【0025】

本発明の有効成分となる化合物は、α-トコフェロールの血中濃度(血液、血漿又は血清中の濃度)を低下させることができる化合物を広く包含する。当該化合物は、α-トコフェロール(ビタミンE)の血中濃度を低下させるのに必要な量(有効量)をマラリアに感染した患者もしくはマラリア感染の可能性のある被験体に、好ましくは α-トコフェロール(ビタミンE)の血中濃度を有意に低下させるのに必要な量投与されることで、マラリアを予防または治療することができる。

30

【0026】

α-トコフェロールの血中濃度(血液、血漿又は血清中の濃度)を低下させるとは、ヒトにおいて血中濃度の平均値が低下すればよく、有意に低下することが望ましい。α-トコフェロールの血中濃度の低下の程度は、有効成分の投与前の血中濃度を基準として、平均で、例えば15%以上、20%以上、25%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上である。従って、本明細書における「有効量」とは、α-トコフェロールの血中濃度を、有効成分の投与前の血中濃度を基準として、平均で、例えば15%以上、20%以上、25%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上低下させる濃度である。例えば、有効成分がプロブコールの場合には、1日量として下限が1200mg、1400mg、1600mg、1800mg、2000mg、2500mg、3000mg、3500mg、4000mg、5000mgが挙げられ、上限は10000mg、9000mg、8000mg、7000mg、6000mgが挙げられる。これらの上限と下限の任意の組み合わせ(例えば1200mg~10000mg)がプロブコールの有効量として例示される。プロブコール以外の有効成分の有効量は、プロブコールの有効量を参考にして適宜決定できる。

40

【0027】

本発明のマラリアの予防または治療薬の投与により、α-トコフェロールの血中濃度は徐々に低下する。血中濃度低下後の α-トコフェロールの好ましい血漿中濃度(ヒト、成人)は、3.8μM以下、3.6μM以下、3.4μM以下、3.2μM以下、3.0μM

50

以下、2.8 μ M以下、2.6 μ M以下、2.4 μ M以下、2.2 μ M以下、2.0 μ M以下、1.8 μ M以下、1.6 μ M以下、1.4 μ M以下、1.2 μ M以下、1.0 μ M以下、0.8 μ M以下、0.6 μ M以下、0.4 μ M以下または0.2 μ M以下である。

【0028】

本発明の有効成分は、 α -トコフェロールの血中濃度を低下させればよく、 α -トコフェロールが多量に体内にあったとしても、血液中の濃度が低下していればよく、 α -トコフェロールの生体内分布を調節する化合物を有効成分としてもよく、 α -トコフェロールを分解又は排泄して生体内の α -トコフェロールの総量を低下させてもよい。 α -トコフェロールの生体内分布を調節する化合物は、マラリア治療後速やかに α -トコフェロールの血中濃度を回復させることができ、副作用がより低いと推定されるので好ましい。

10

【0029】

本発明において、 α -トコフェロールの血中濃度が「有意に低下」するとは、統計的な有意差をもって α -トコフェロールの血中濃度が低下することを意味し、具体的には $P < 0.05$ 、あるいは $P < 0.01$ の場合が含まれる。

【0030】

本発明のマラリア予防薬は、マラリア感染の3日以上前、好ましくは1週間以上前、より好ましくは2週間以上前に服用することで、マラリア感染に罹患しにくくなり、マラリアに感染した場合でもマラリアの症状は軽度で済み、重症化しにくい。例えば、マラリア感染の可能性のある地域に旅行する場合、旅行者は本発明のマラリア予防または治療薬を旅行前及び旅行中に服用することで、マラリア感染のリスクを大幅に低減することができる。本発明のマラリア予防または治療薬は、副作用が低いので、従来の副作用の強いマラリア治療薬と異なり、予防も含めて長期間服用することが可能である。

20

【0031】

本発明のマラリア治療薬は、マラリア感染後に服用した場合でもマラリアの増殖を抑え、マラリアの治癒を促進し、死亡率を低減することができる。

【0032】

「 α -トコフェロール(ビタミンE)の血中濃度を有意に低下させる化合物」としては、例えば、 α -トコフェロールの細胞から血液中への放出を抑制する化合物、血液中の α -トコフェロールの代謝および/または分解を促進する化合物、 α -トコフェロールの吸収を抑制する化合物などが挙げられ、このような作用を有する化合物をマラリアの予防または治療薬の有効成分として使用することができる。 α -トコフェロールの細胞から血液中への放出を抑制する化合物が速効性を有するために有効成分として好ましい。

30

【0033】

α -トコフェロールの細胞から血液中への放出を抑制する化合物は、たとえばABCA1トランスポーター阻害剤、TTP発現阻害剤、TTPと α -トコフェロールの結合阻害剤、TTPとABCA1の結合阻害剤など、 α -トコフェロールが細胞内から血液中に移行する経路を阻害する化合物を広く包含する。

【0034】

本発明の好ましい有効成分は、プロブコールおよびそれ以外のABCA1トランスポーター阻害剤、TTP阻害剤、 α -トコフェロール吸収抑制剤、 α -トコフェロール代謝促進剤である。

40

【0035】

(1) ABCA1トランスポーター阻害剤

以下のi)~iv)が挙げられる：

i) glyburide

ii) 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) Am J Clin Nutr. 2009;89(1):177-84.

iii) シクロスポリンA (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24:2155-61.)

iv) ABCA1発現阻害剤

【0036】

50

(2) α -トコフェロールトランスファープロテイン (TTP) 阻害剤

TTPの発現を阻害する薬剤が広く包含され、例えばsiRNA、shRNA、アンチセンスRNA、miRNA、もしくはリボザイム、又は細胞内でこれらのRNA分子を放出できる発現ベクターなどが挙げられる。

【0037】

また、TTPに α -トコフェロールと競合的に結合することによってTTPの機能を阻害する薬剤、TTPが細胞膜へ移動することを阻害し、細胞膜から血液中へ α -トコフェロールを放出することを阻害する薬物が挙げられる。

【0038】

(3) α -トコフェロール吸収抑制剤

α -トコフェロールは食物の成分として小腸から吸収されるが、小腸からの取り込みを抑制する薬剤は α -トコフェロール血中濃度を減少する効果がある。

このような薬剤としては、以下のI)~III)が挙げられる。

【0039】

I) コレステロール吸収阻害剤としての陰イオン交換樹脂

医療用医薬品添付文書上に脂溶性ビタミン吸収阻害の記載のあるクエストラン(コレステラミン)、コレバイン(コレステミド)など

【0040】

II) 小腸コレステロールトランスポーター(NPC1L1)阻害剤

エゼチミブ(製品名ゼチーア)

高田龍平ら、「コレステロールトランスポーターNPC1L1によるビタミンEの消化管吸収」、ビタミン84(8), 376-383, 2010-08-25およびNarushima K, et al., Niemann-pick C 1-like 1 mediates alpha-tocopherol transport Mol Pharmacol. 2008;74(1):42-9に記載の化合物。これらの文献および該文献中の化合物は、参考として本明細書に援用される。

【0041】

III) リポ蛋白質リパーゼ(LPL)阻害剤

Triton WR1339など

【0042】

(4) α -トコフェロール代謝促進剤

α -トコフェロールはシトクロームP450(CYP4F2、CYP4F3など)および酸化によってカルボキシエチルヒドロキシクロマン(CEHC)に代謝される。シトクロームP450による代謝や酸化を促進する薬剤は α -トコフェロール血中濃度を減少する可能性がある。シトクロームP450(CYP4F2)は核内レセプターretinoid X receptor(RXR)によって誘導されることが知られており、sterol regulatory element-binding protein(SREBP)によって誘導されることが最近報告されている(Hsu MH, Savas U, Griffin KJ, Johnson EF. Regulation of human cytochrome P450 4F2 expression by sterol regulatory element binding protein and lovastatin. J Biol Chem 2007; 282, 5225-5236)。

【0043】

本発明は、さらにマラリアの予防または治療薬のスクリーニング方法を提供する。

【0044】

好ましいスクリーニング方法について、以下に説明する。

1) α -トコフェロール放出アッセイの概要(図1~3) トリチウムラベル(^3H)した酢酸トコフェロール(^3H -TocAc)を含んだリボソームを作成し、培地に加える。 ^3H -TocAcは速やかに細胞内に取り込まれ、非特異的な加水分解酵素によりアセテートがはずれ、トリチウムでラベルされた α -Toc(^3H - α -Toc)となり、細胞外に放出される。

リボソーム添加24時間後に細胞と培地を別々に回収し脂質の抽出を行い、薄層液体クロマトグラフィー(クロロホルムを使用)にて展開し露光した。酢酸トコフェロール以外にも

α -トコフェロールは同様に使用できるが、酢酸トコフェロールが好ましい。

【0045】

10

20

30

40

50

標識は、 α -トコフェロールまたはそのエステルは細胞内への取り込みと細胞外への放出に実質的に影響しない限りトリチウムラベル ($[^3\text{H}]$) 以外の任意の標識を用いることができる。

【 0 0 4 6 】

この方法では細胞内と培地中の α -TocAc と α -Toc を別々に定量化することが可能である (図 2)。

【 0 0 4 7 】

α -トコフェロールの放出をグラフ化すると (図 3)、TTP を恒常的に発現させた McA-TTP21 細胞では McARH7777 細胞に比べ、細胞外の α -トコフェロールの割合が顕著に増加していることが分かる。

【 0 0 4 8 】

ここで、McA-TTP21 細胞は TTP のある肝細胞を意味し、McA-RH7777 細胞は TTP のない肝細胞を意味する。Arita M, Nomura K, Arai H, Inoue K., *alpha-tocopherol transfer protein stimulates the secretion of alpha-tocopherol from a cultured liver cell line through a brefeldin A-insensitive pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94(23):12437-41. を参照のこと。

【 0 0 4 9 】

さらに α -トコフェロール放出アッセイの詳細 (プロブコール投与時の実験の詳細) を以下 (a)-(i) に示す。

【 0 0 5 0 】

(a) ラット肝癌由来細胞株である McARH7777 細胞と McARH7777 細胞に TTP を恒常的に発現させた McA-TTP21 細胞を コラーゲンコート 6 ウェルディッシュに播種する (1.2×10^5 cells/well)。

【 0 0 5 1 】

(b) 播種後 24 時間後に 0.2% BSA および $10 \mu\text{g/ml}$ の ApoA1 を含有する DMEM に培地交換し、プロブコールを最終濃度 $10 \mu\text{M}$ または $20 \mu\text{M}$ にて添加するプロブコールはエタノールに 40mM の濃度で溶解させる。

【 0 0 5 2 】

(c) プロブコール添加後 2 時間後に $[^3\text{H}]$ α -TocAc をリポソームの形で添加する。

リポソーム組成:

リン脂質 (ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ディセチルホスフェイト混合物) $200 \mu\text{l}$

コレステロール (3mM) $100 \mu\text{l}$

$[^3\text{H}]$ α -TocAc ($11,100,000\text{dpm}$) $300 \mu\text{l}$

非ラベル化 α -TocAc $10 \mu\text{l}$

上記試薬を混合したものの溶媒 (クロロホルム) を窒素ガスを使用して完全乾固する。

0.3M ブドウ糖液 $200 \mu\text{l}$ を添加し、超音波破碎機にて 3 分間処理する。

【 0 0 5 3 】

(d) リポソーム添加 24 時間後に細胞と培地を回収する。

i) 培地をチューブに回収する。

ii) 細胞を $200 \mu\text{l}$ の PBS にて 2 回洗浄し、 0.1% SDS 水溶液 (6% ピロガロール) で細胞を回収する。

【 0 0 5 4 】

(e) 培地および細胞成分に 1.5ml の 65% エタノール溶液と 3ml のヘキサンを加え、5 分間振盪混合する。

【 0 0 5 5 】

(f) 3000rpm で 5 分間遠心分離する。

【 0 0 5 6 】

(g) 上層のヘキサン層をガラスチューブに移し、エバポレーターにて完全に乾固する。

【 0 0 5 7 】

10

20

30

40

50

(h) 完全乾固したサンプルに20 μ lの酢酸エチルを加えて、TLCプレートに一点に滴下、乾燥する。

【0058】

(i) クロロホルムにて展開し乾燥後、RIイメージングアナライザにて検出解析する。

上記のプロトコールは単なる例示であり、当業者は適宜条件を変更して実施することができる。

その他のスクリーニング法について、さらに以下I) - VIII)に説明する

【0059】

I) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と電気化学検出器 (ECD) を用いて α -トコフェロールを測定する手法を用いる方法。

10

【0060】

前述の[3 H] α -TocAcではなく、非ラベルの酢酸トコフェロールを同様の方法で細胞に添加して、24時間後に細胞および培地を回収する。(10cm ディッシュ程度の細胞量が必要) 回収した培地および細胞懸濁液に20 μ M BHT含有クロロホルム/メタノール(2/1)を3倍量添加して1分間振盪混合後、15,000rpm で遠心分離5分間。

【0061】

クロロホルム層を別のチューブに移し、必要に応じて濃縮した後、HPLC-ECDにて測定する。

HPLC条件

- ・ カラム Wakosil-II 5C18 RS 4.6mm \times 250mm (Wako, Tokyo, Japan)
- ・ 還元カラムRC-10 4.0mm \times 15mm (Shiseido, Tokyo, Japan)
- ・ 温度 40
- ・ 検出器 Nanospace SI-2 (Shiseido, Tokyo, Japan)
- ・ 溶離液 50mM NaClO₄含有メタノール
- ・ 流速 0.7ml/min
- ・ 注入量 10 μ l

20

【0062】

II) 質量分析装置による α -トコフェロール測定を用いる方法。

上述I)と同様に非ラベルの酢酸トコフェロールを細胞に添加し、培地中および細胞中の α -トコフェロール含有量を測定する方法として質量分析装置(GC-MSやLC-MS)を用いる方法も本発明のスクリーニング方法において使用することができる。

30

【0063】

III) 抗 α -トコフェロール特異抗体を用いた免疫学的測定法を用いた α -トコフェロール測定を用いる方法 上述I)と同様に非ラベルの酢酸トコフェロールを細胞に添加し、培地中および細胞中の α -トコフェロール含有量を測定する方法として抗 α -トコフェロール特異抗体を用いた免疫学的測定法(ELISA)も本発明のスクリーニング方法において使用することができる。

【0064】

IV) マウスに各種薬剤を投与して α -トコフェロールの血中濃度を測定する方法。

各種薬剤を餌への混餌、給水、経口投与、腹腔内投与、静脈内投与などの方法によって、マウスやラットへ投与し、経時的に血液(EDTA添加)や組織を採取する。

40

採取した血液サンプルは3500rpm \times 5分の遠心処理で血漿分離する。

血漿もしくは組織懸濁液に対し20 μ M BHT含有クロロホルム/メタノール(2/1)を3倍量添加し1分間振盪混合後、15,000rpm で遠心分離5分間する。

クロロホルム層を別のチューブに移し、HPLC-ECDにて測定する。

HPLC-ECDの条件は上述のI)と同様である。

【0065】

V) 細胞内の TTPの局在の蛍光顕微鏡観察

肝細胞内で α -トコフェロールに結合した TTPが細胞膜上に移動してABCA1などの輸送体に受け渡さないと肝細胞内より循環血液中に分配されない。

50

そこで、TTPの細胞内移動を阻害する薬剤をスクリーニングすれば、 α -トコフェロールの血中濃度抑制因子の候補を選択することができる。

具体的には、

(i)McA-TTP細胞などのTTPの発現した細胞を用いる。

(ii)試験薬剤投与後、経時的に反応を停止する。PBSで細胞を洗浄後、パラホルムアルデヒドで固定する。

(iii)PBS洗浄後、0.5%トリトン100 PBS溶液で20分間もしくは冷メタノール溶液で2分間処理する。

(iv)PBS洗浄後、牛血清アルブミンPBS溶液などでブロッキングする。

(v)抗TTP特異抗体を含んだ溶液に置換し1時間から数時間処理する。

(vi)PBS洗浄後、蛍光物質(Alexaなど)付加二次抗体にて処理。

(vii)蛍光顕微鏡を用いてTTPの細胞内局在を観察する。

【0066】

VI)細胞内のTTPの局在を細胞小器官分画処理した分画のウエスタンブロットティングもしくはELISAにて観察する。

【0067】

上述V)の項と同様にTTPの細胞膜への移行を阻害する薬剤のスクリーニングの手法である。

具体的には

(i)細胞内局在するTTPを細胞小器官ごとに分画精製する(ショ糖やフィコールなどの密度勾配を利用した密度勾配遠心分離法や細胞分画精製Kitを用いる)

(ii)細胞小器官ごとのTTPの存在する比率、TTP蛋白量を抗TTP特異抗体を用いたウエスタンブロットティング法、もしくはELISA定量法によって解析する。

【0068】

VII)TTPやABCA1などの α -トコフェロール血中濃度調節に関与するタンパク質の発現調節に関わる薬剤、因子のスクリーニング

TTPやABCA1などの α -トコフェロール血中濃度調節に関わるタンパク質の遺伝子発現もしくは蛋白質の発現を計測する手法で薬剤のスクリーニングを行う。遺伝子発現のスクリーニング法としてはレポーターアッセイ法や定量的リアルタイムPCR法などが有用と考えられる。蛋白質の発現は上述の抗 α -トコフェロール特異抗体を用いたウエスタンブロットティング法、もしくはELISA定量法による評価が可能である。

【0069】

VIII)TTPの α -トコフェロール結合部位に結合する化合物、抗体等の探索

TTPには α -トコフェロールの結合する部位が特定されているが、この部位に結合する可能性のある化合物、抗体等をスクリーニングすることができれば、TTPによる α -トコフェロール運搬を阻害し、血中 α -トコフェロール濃度を減少させる薬剤を探し出すことが可能である。TTPおよび α -トコフェロール結合部位のアミノ酸配列、蛋白構造はすでに既知のものであり、蛋白構造から化合物の推定することでスクリーニングができる。

【0070】

本発明はさらに、 α -トコフェロールの血中濃度を低下させる化合物の有効量を、マラリアの治療または予防を必要とする患者に投与することを含む、マラリアの治療または予防方法、マラリアの予防または治療薬を製造するための、 α -トコフェロールの血中濃度を低下させる化合物の使用、マラリアの予防または治療薬として使用するための α -トコフェロールの血中濃度を低下させる化合物も提供する。 α -トコフェロールの血中濃度を低下させる化合物およびその有効量については上述した通りである。

【0071】

1つの実施形態において、本発明は、 α -トコフェロールの血中濃度を有意に低下させる化合物と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物に関する。これらの医薬組成物は、マラリアの治療または予防のために使用することができる。医薬組成物は、経口、非経口または局所投与のために使用することができる。これらはたとえば、経口的に、例えば錠

10

20

30

40

50

剤、被覆錠剤、硬および軟カプセル、液剤、乳剤もしくは懸濁液の形態で、経鼻的に、例えばスプレーの形態で、直腸に、例えば坐剤の形態で、非経口的に、例えば注射溶液もしくは輸液の形態で、または局所的に、例えば軟膏、クリームもしくはローションなどの形態で投与することができる。

【実施例】

【0072】

以下に本発明を実施例によって説明する。

【0073】

なお、以下の実施例において、プロブコール (WAKO, Japan) および通常食 (CLEA, Japan) を使用した。

【0074】

通常食：餌1kg当たり75mgの α -トコフェロールを含有

プロブコール食：餌1kg当たり75mgの α -トコフェロールと10gのプロブコールを含有 (1% w/w)

【0075】

実施例 1

4週齢のC57BL/6Jマウスの各群6匹 (雄3匹、雌3匹) を使用し、プロブコール食を2週間与えたのち、通常食に変更した。

【0076】

プロブコール食投与2週間後と、通常食に変更した後、1週間後と、2週間後とに採血し (図4A)、採血後、3500rpmで5分間遠心処理し血漿成分を分離した。血漿に対し20 μ M BHT含有クロロホルム/メタノール (2/1) を3倍量添加し1分間振盪混合後、15,000rpmで遠心分離5分間した。

【0077】

クロロホルム層を別のチューブに移し、血漿中の α -トコフェロール濃度をHPLC-ECDにより測定した。

HPLC条件

- ・カラム Wakosil-II 5C18 RS 4.6mm \times 250mm (Wako, Tokyo, Japan)
- ・還元カラムRC-10 4.0mm \times 15mm (Shiseido, Tokyo, Japan)
- ・温度 40
- ・検出器 Nanospace SI-2 (Shiseido, Tokyo, Japan)
- ・溶離液 50mM NaClO₄含有メタノール
- ・流速 0.7ml/min
- ・注入量 10 μ l

結果を図4Bに示す。

【0078】

図4A, B中の0w, 1w, 2wはプロブコール投与終了後の週数を示す。

【0079】

対照 (control) として、通常食を与えているそれぞれ7週齢のC57BL/6Jマウスと TTP KOマウス (Jishage K, Suzuki H. et al.: α -Tocopherol transfer protein is important for the normal development of placental labyrinthine trophoblast in mice. J Biol Chem 2001, 275:1669-1672.) から採血し、同様に血清中の α -トコフェロール濃度をHPLCにより測定した。有意差検定はtwo way ANOVAにて行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

【0080】

結果

通常食を投与しているC57BL/6Jマウスでは α -トコフェロールの血中濃度は雄0.860 μ M、雌1.30 μ Mであったが、通常食を投与している TTP KOでは雄0.027 μ M、雌0.027 μ Mであった。

【0081】

C57BL/6Jマウスにプロブコール食を投与開始し2週間後には、 α -トコフェロールの血中

10

20

30

40

50

濃度は雄0.078 μ M、雌0.132 μ Mと減少していた。通常食に変更した後、1週間後には雄0.34 μ M、雌0.533 μ M、2週間後には雄0.847 μ M、雌0.544 μ Mと血中濃度の再上昇がみられた。

【0082】

以上の結果から、プロブコールは経口投与により血漿中の α -トコフェロール濃度を有意に低下させることができることが明らかになった。プロブコールの投与を中止すると、血漿中の α -トコフェロール濃度は2週間で大きく回復するため、副作用は低いことが推定される。

【0083】

実施例 2

4週齢のC57BL/6Jマウスの各群6匹（雄3匹、雌3匹）を使用しマラリア原虫感染実験を行った。

【0084】

通常食を与えたC57BL/6Jマウスの群、通常食を与えた TTP KOマウスの群にマラリア原虫の感染を行った。

【0085】

感染2週間前よりプロブコール食を投与開始し、感染後も継続してプロブコール食を与え続けたC57BL/6Jマウスの群と、上記の2つの群とを比較した。通常食、プロブコール食は、上述と同じものを使用した（図5 A - C）。

【0086】

感染させたマラリア原虫はネズミマラリア原虫Plasmodium.yoelii 17XLで、マラリア原虫に寄生された赤血球を1ml当たり 1×10^5 細胞含む赤血球溶液を0.2ml（感染赤血球 0.2×10^5 個）腹腔内投与した。

【0087】

マラリア原虫感染後、経時的に採血を行い原虫感染率と生存率を評価した。結果を図5 B, Cに示す。

【0088】

原虫感染率(Parasitemia)の評価法

マウスの尾静脈から採取した静脈血をスライドガラス状にスメアを引き、ギムザ染色する。

【0089】

顕微鏡下で原虫の感染している赤血球数と非感染赤血球数を計測し原虫感染率を測定する。

【0090】

結果：図5 B, Cに示されるように、通常食を与えているC57BL/6Jマウスでは感染後4日目から原虫感染率が増加し、感染8日目から死亡例が出現し、28日後には全例死亡した。それに対して、TTP KOでは寄生虫感染率の増加はごく軽度であり、観察期間中の死亡例はなかった。

【0091】

感染前2週間から感染後も継続してプロブコールを与えた群では、感染後6日目から12日目にかけて一過性に原虫感染率が増加するが、その後減少し、26日目には感染率が0となった。また、プロブコールを与えた群では、顕著に死亡率が減少し、28日目にわずかに死亡例があったのみであった。

【0092】

実施例 3

次に、前述の実施例2と同様にマウスに通常食もしくはプロブコールを与え、マラリア原虫感染をさせたが、プロブコール投与群で感染後30日目に通常食に餌を変更した（図6 A）。

【0093】

マラリア原虫感染の方法および評価項目、評価手法は実施例2の実験と同様である。

10

20

30

40

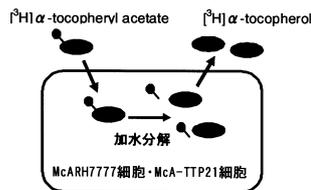
50

【 0 0 9 4 】

結果：図 6 B , C に示されるように、通常食を与えているC57BL/6Jマウスでは感染後4日目から原虫感染率が増加し、感染8日目から死亡例が出現し、18日後には全例死亡した。

プロブコールを与えた群では、感染後6日目から16日目にかけて一過性に原虫感染率が増加するが、その後減少し、22日目には感染率が0となった。プロブコールを与えた群では、顕著に死亡率が減少し、20日目にわずかに死亡例があったのみであった。感染後30日目から通常食に変更しているが、原虫感染率の再増加および死亡率の増加は認められなかった。

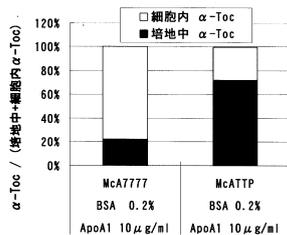
【 図 1 】



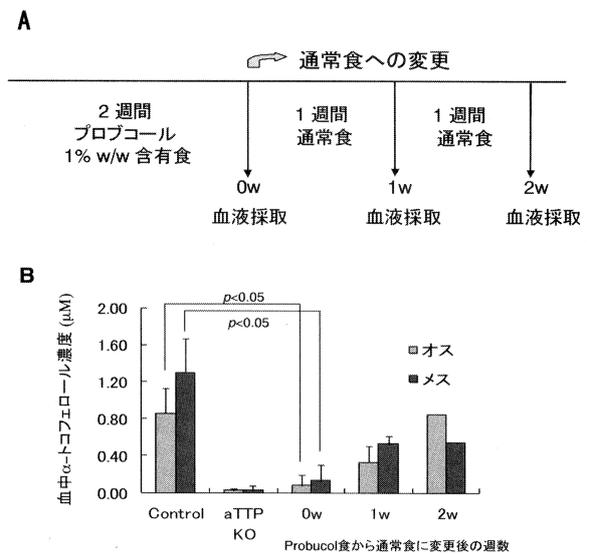
【 図 2 】



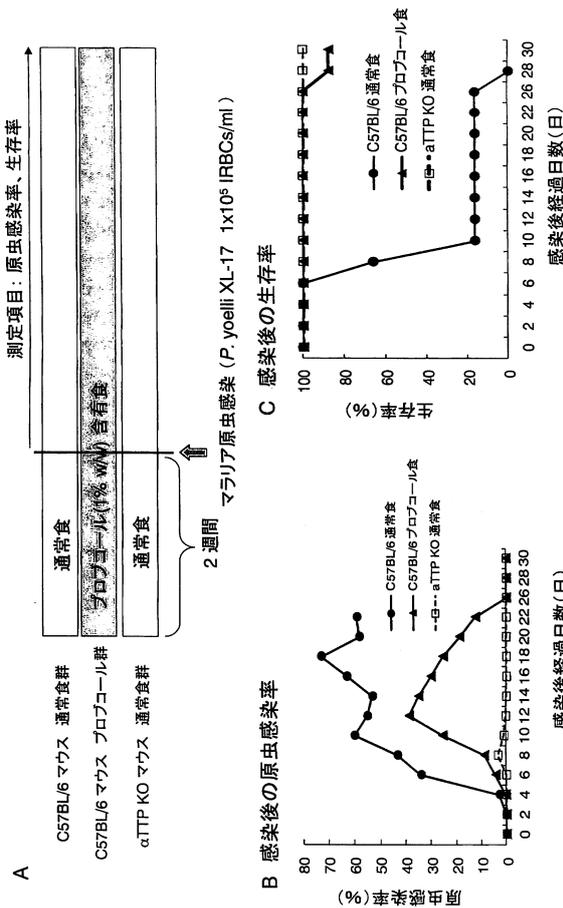
【 図 3 】



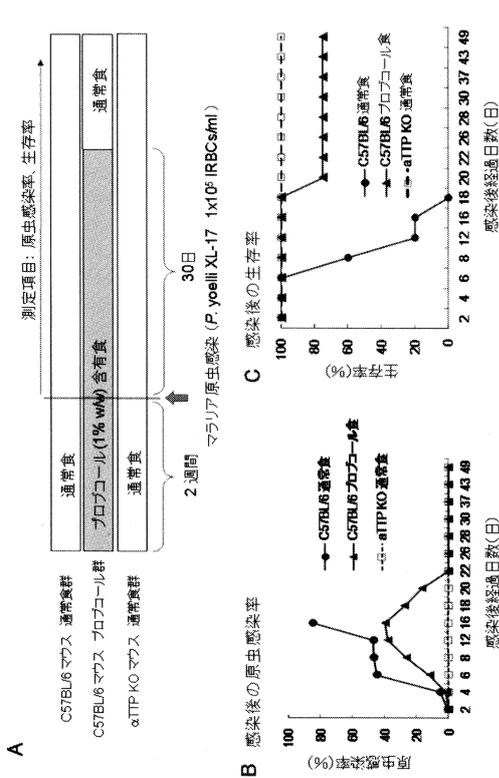
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



フロントページの続き

(72)発明者 ヘルバス コスタス マリア シェルリー
北海道帯広市稲田町西2線11番地 国立大学法人帯広畜産大学内

審査官 安藤 公祐

(56)参考文献 特開平02-015026(JP,A)
国際公開第2007/101710(WO,A1)
J. Nutr. Biochem., 2010年, 21, 451-6
Malaria J., 2010年, 9:101, 1-12

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A61K 31/10
A61P 33/06
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)