

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

若手研究者奨励研究報告書

目 次

課題番号

第1分野

20000	13001	アドレノメデュリン投与による重症心不全治療の臨床評価	永谷 憲歳	……	1
1009A	13002	子宮体癌に対するヒト型モノクローナル抗体の作製	福地 剛	……	5
1008A	13003	新しい変異導入法の開発による神経疾患モデルマウスの樹立	笹岡 俊邦	……	10
1010A	13004	病原細菌のコミュニケーションシステムを標的とした医薬品の開発	阿部 章夫	……	15
1006A	13005	糖部立体配座を固定した人工核酸によるアンチセンス医薬品の開発	小比賀 聡	……	20
1007A					

第2分野

1011A	23001	慢性C型肝炎に対するインターフェロン治療効果に関与する宿主因子の解析と医療への応用	土方美奈子	……	29
1012A	23002	ゲノム情報に基づいた移植免疫機構の解明と免疫抑制療法	梨井 康	……	35
1016A	23003	ヒトヘルペスウイルス8による悪性腫瘍発症機構の解明と医療への応用	片野 晴隆	……	42
1013A	23004	血管内造血機構の解明と臍腸間膜動脈より新規造血幹細胞因子の単離	高倉 伸幸	……	47
1014A	23005	BRS-3安定発現細胞系を用いた新規摂食調節ペプチドの同定と病態生理学的意義の解明	宮里 幹也	……	52
1015A	23006	ATP受容体を介した痛み情報伝達機序の解明と医療への応用	小泉 修一	……	57
1018A	23007	トリプトファンによる細胞性免疫の制御	五條 理志	……	61
1019A	23008	気管支喘息における気道リモデリングの制御についての検討	中尾 篤人	……	66
1017A	23009	顔面神経再生に際して発現制御を受ける遺伝子データベースの構築	赤澤 智宏	……	69

第3分野

1020A	33001	循環器病治療薬開発に不可欠な小動物における循環動態テレメトリシステムの開発	佐藤 隆幸	……	73
1022A	33002	有機アニオントランスポーターを介した小腸および腎臓における排出・分泌機構	崔 吉道	……	77
1021A	33003	組換えヒトP450酵素の代謝反応を利用した医薬品等の評価方法の開発	山崎 浩史	……	81

第4分野

1025A	43001	腹膜透析の重篤な合併症である硬化性被嚢性腹膜炎 (Sclerosing Encapsulating Peritonitis) の診断と治療に関する研究	平原 一郎	……	89
1023A	43002	多発性硬化症における病原性T細胞特異的抑制方法の検討	三宅 幸子	……	98
1024A	43003	熱帯病に対する新たな治療薬の開発に関する研究	小出 達夫	……	103

20000	第5分野		
1026A	53001	カルボシラン dendリマーを基本骨格としたペロ毒素中和剤の開発	西川喜代孝 …… 109
1027A	53002	新規抗酸化酵素ペルオキシレドキシンを標的とする抗マラリア薬の開発に関する研究	河津信一郎 …… 113
1028A	53003	Non-typable Haemophilus influenzae 由来リポオリゴ糖抗原に対するペプチドミミックのワクチン応用についての研究	橋本 雅仁 …… 119
1029A	53004	RNAヘリカーゼを標的とする抗ウイルス剤の開発	清水 博之 …… 124
1030A	53005	薬用植物の分子エンジニアリングによる抗酸化物質生産の改良	山崎 真巳 …… 132
	第6分野		
1031A	63001	分子間相互作用制御による高度安定型タンパク質製剤の設計	伊豆津健一 …… 137
1032A	63002	生分解性を有する新規な化学合成ハイドロゲルの開発と組織再建スキャホールドへの応用	山岡 哲二 …… 140
1033A	第7分野		
	73001	ヒト破骨細胞と骨芽細胞培養系を用いた薬物の有効性と安全性に関する検討	和田 誠基 …… 151

熱帯病に対する新たな治療薬の開発に関する研究

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 薬品試験部

研究者 小出 達夫

要旨

南米産薬用植物3種から抗リーシュマニア活性をもつ化合物10種が単離、同定された。そのうち最も活性の強いゲルマクラン骨格をもつセスキテルペンの作用機序は α -メチレン γ -ラク톤の反応性二重結合によるものであることが示唆された。

1. 研究目的

リーシュマニア症は媒介昆虫サシチョウバエを介して感染する寄生虫病で熱帯地域を主に97カ国に存在し、患者数は1200-1400万といわれている。国内における患者は稀ではあるが、国外からの輸入症例としてときにみられる。病原体であるリーシュマニア原虫はマクロファージに寄生し内臓型や皮膚型の病型を呈して、ときには死亡という重篤な経過をたどることもある。現在治療には、主に5価のアンチモン製剤が使われているが副作用が強く高価であり、また薬剤耐性を獲得した原虫も存在するため、副作用の少ない安価な特効薬の開発が望まれている。また、リーシュマニア症流行地はそのほとんどが交通が不便で医療体制が整っていないため、容易に入手でき、長期保存、経口投与が可能な治療薬が求められている。そこで本研究では、これらの条件を満たす新たな治療薬の開発を目的として、伝統的に南米で用いられている薬用植物を基とした抗リーシュマニア活性のスクリーニングを行った。また、スクリーニングにより活性が認められた化合物については、その作用機序の検討を行った。

2. 研究方法

材料 (Leishmania)

本研究には *Leishmania major* (MHOM/SU/73/5ASKH), *Leishmania panamensis* (MHOM/PA/71/LS94), *Leishmania guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) の3種の原虫を用いた。

方法

1) 抗リーシュマニア活性の測定

96 well プレートに DMSO で溶解した薬用植物の MeOH, CH₂Cl₂ 抽出物を培地で希釈して2倍希釈系列をつくり、Leishmania を終濃度 5x10⁵/ml になるように加え、培養液の全量を 100 μ l として5% CO₂ 存在下 27 $^{\circ}$ C でインキュベートし、24 時間後に原虫数の測定を行った。各濃度に対する生原虫数をグラフにプロットし用量作用曲線から IC₅₀ を算出した。

2) 活性成分の単離及び構造決定

スクリーニングにおいて活性が高かった薬用植物エキスより、抗リーシュマニア活性を指標にして各種クロマトグラフィーを用い活性成分の分離を行い、活性本体を単離して NMR, GC-MS 等により構造決定を行った。また、それぞれの化合物と従来使われている抗リーシュマニア剤との活性の比較を1)と同様の方法を用いて行った。

3) 作用機序の検討

スクリーニングにおいて最も活性が高かったペルー産 *Elephantopus mollis* より分離した抗リーシュマニア活性を有するゲルマクラン骨格をもつセスキテルペン Molephantin と Elephantopin の作用機序の解明を行うため、*Elephantopus mollis* より分離した他の類似構造化合物5種 (Fig.1) および Molephantin より合成を行った誘導体12種 (Fig.4) の活性と比較検討した。

また、ゲルマクラン骨格をもつ他の化合物に関して細胞内チオール系反応への関与が報告されているため、システインの Molephantin と Elephantopin の抗原虫作用への影響について検討を行った。

さらに、リーシュマニア原虫を超音波破碎して得た粗酵素画分を用いて、各酵素系への Molephantin , Elephantopin の阻害活性を測定し、酵素系への阻害活性の原虫致死活性との関係を検討した。

3. 研究成果

1) スクリーニング

以下の南米産薬用植物 29 種について、そのエキスの抗リーシュマニア活性 (*Leishmania major*) についてスクリーニングを行った。

Vouacapoua americana, *Schinus molle*, *Ruta graveolens*, *Operculina altissima*, *Polygala spectabilis*, *Echinodorus grandiflorus*, *Heisteria acuminata*, *Cissus sicyoides*, *Symphytum officinale*, *Cheilanthes nyriophilla*, *Palicourea rigida*, *Anona Muricata*, *Jatropha cillata*, *Calophyllum Brasiliensis*, *Elephantopus mollis*, *Phyllanthus niruri*, *Quassia amara*, *Himatanthus sucuuba*, *Copaifera reticulata*, *Pilocarpus microphyllus*, *Hymenaea courbaril*, *Cleome hassleriana*, *Myrcia sphaerocarpa*, *Croton cajucara*, *Hyptis crenata*, *Bowdichen major*, *Himatanthus sucuuba*, *Fleurya aestuans*, *Veronica officinalis*

その結果、ペルー産 *Elephantopus mollis* (現地名 Lengua de vaca, 最小致死濃度 <12.5µg/ml) に強い活性が、ペルー産 *Operculina altissima* (現地名 Batata de purga, 最小致死濃度 25µg/ml) 及びブラジル産 *Hyptis crenata* (現地名 Salva do marajo, 最小致死濃度 100µg/ml) にも活性が認められた。

2) 活性成分の単離及び構造決定

スクリーニングにおいて最も活性が高かった *Elephantopus mollis* の活性画分より抗リーシュマニア活性を有するゲルマクラン骨格をもつセスキテルペン化合物 Molephantin ($IC_{50}=0.2\mu\text{g/ml}$) と Elephantopin ($IC_{50}<0.1\mu\text{g/ml}$) (Fig.1) を分離した。その他微量成分として 5 種 (Fig.1) を単離した。これらの化合物については現在、リーシュマニア症に第 2 選択薬として使用されているアンホテリシン B ($IC_{50}=0.1\mu\text{g/ml}$) やペンタミジン ($IC_{50}=4.1\mu\text{g/ml}$) と同等もしくはそれ以上の活性が認められた。

また、*Operculina altissima* の活性画分を加水分解することにより抗リーシュマニア活性を有する樹脂配糖体 (Fig.2) が分離され、活性本体はこの構造を基本単位とするポリマーであることが推測された。

Hyptis crenata の活性画分からは活性成分としてウルソール酸 ($IC_{50}=21.0\mu\text{g/ml}$) とクマリン ($IC_{50}=12.5\mu\text{g/ml}$) (Fig.3) が単離された。この 2 種の化合物の活性はアンホテリシン B やペンタミジンより弱かった。また、これら全化合物の活性にはリーシュマニアの種差は見られなかった。

3) 作用機序の検討

Molephantin と Elephantopin 及びその誘導体の構造活性相関を検討したところ、 α -メチレン γ -ラク톤 環構造をもつ Molephantin , Elephantopin , 及び他の類似構造化合物 5 種と誘導体 6 種 (化合物 1-13) はいずれも高い活性を示したが、メチレン基が還元された誘導体 6 種 (化合物 14-19) には活性の低下が認められた。(Table 1)

チオール化合物の関与について検討したところ、Molephantin 及び Elephantopin の抗リーシュマニア活性はシステイン 1mM 共存下では完全に阻害された。また、解糖系酵素への影響を調べたが、乳酸デヒドロゲナーゼ及びピルビン酸キナーゼに対する阻害活性は認められなかった。グリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼなどの SH 酵素やプロテインキナーゼ C などのシグナル伝達系のリン酸化酵素については現在検討中である。

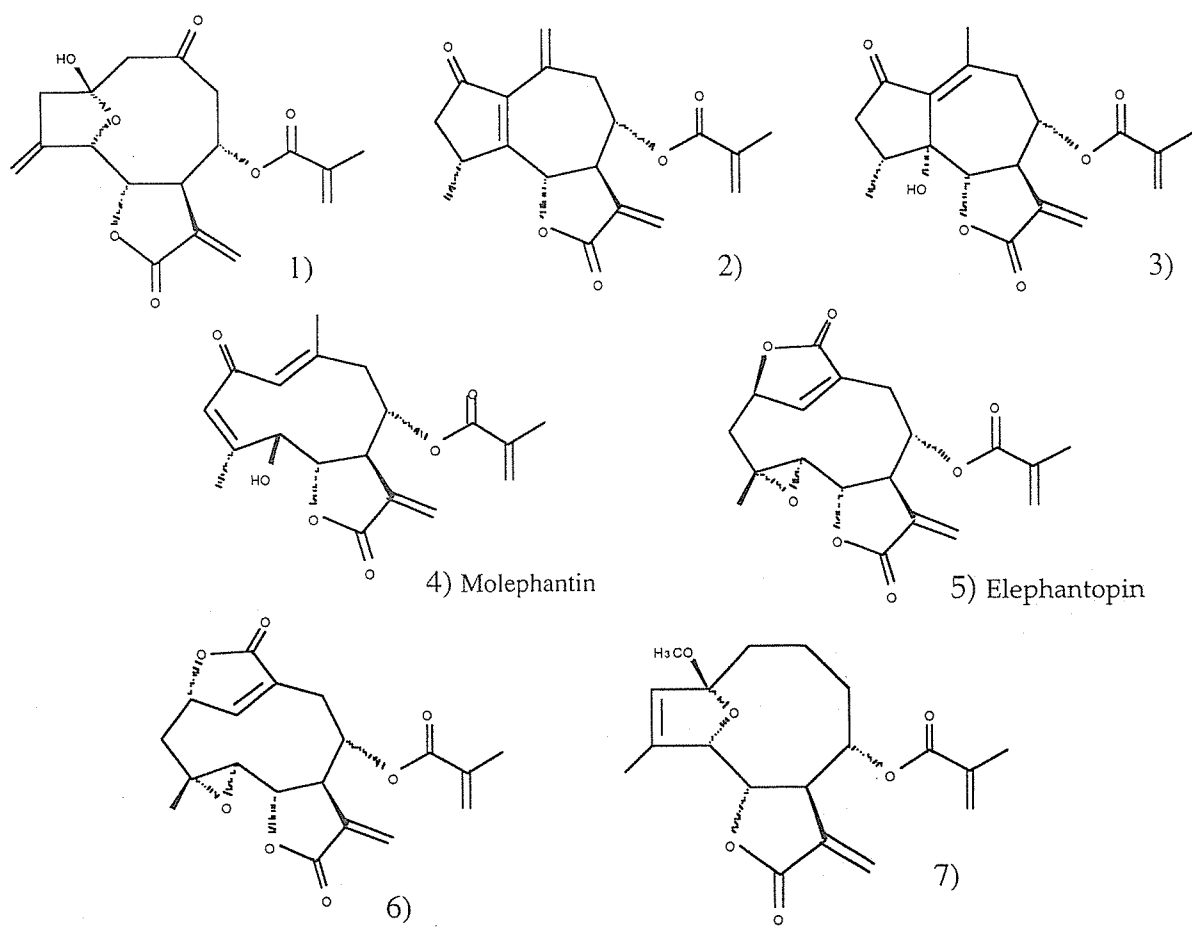


Fig.1 Structures of germacranolides from *Elephantopus mollis*

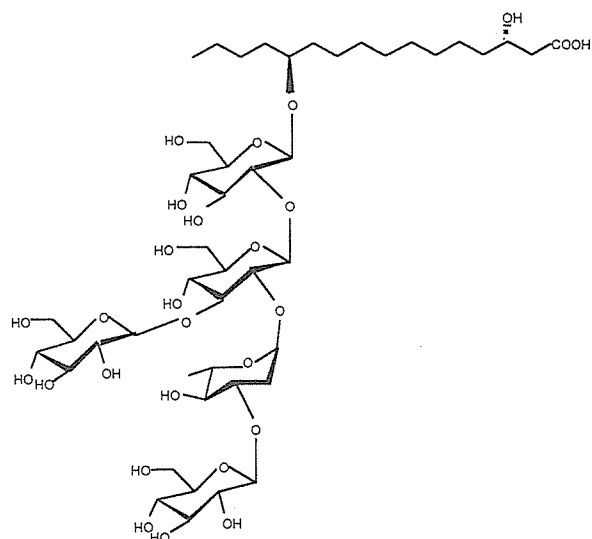
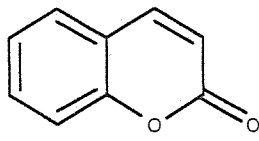
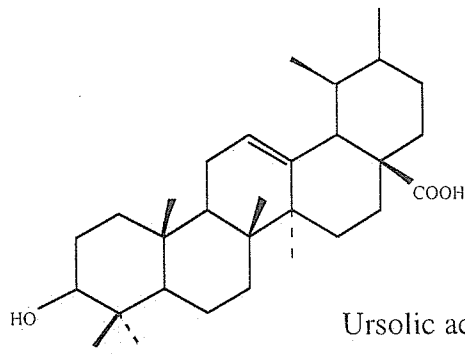


Fig. 2 Structure of glycoside from *Operculina altissima*



cumarine



Ursolic acid

Fig.3 Structures of active compounds from *Hyptis crenata*

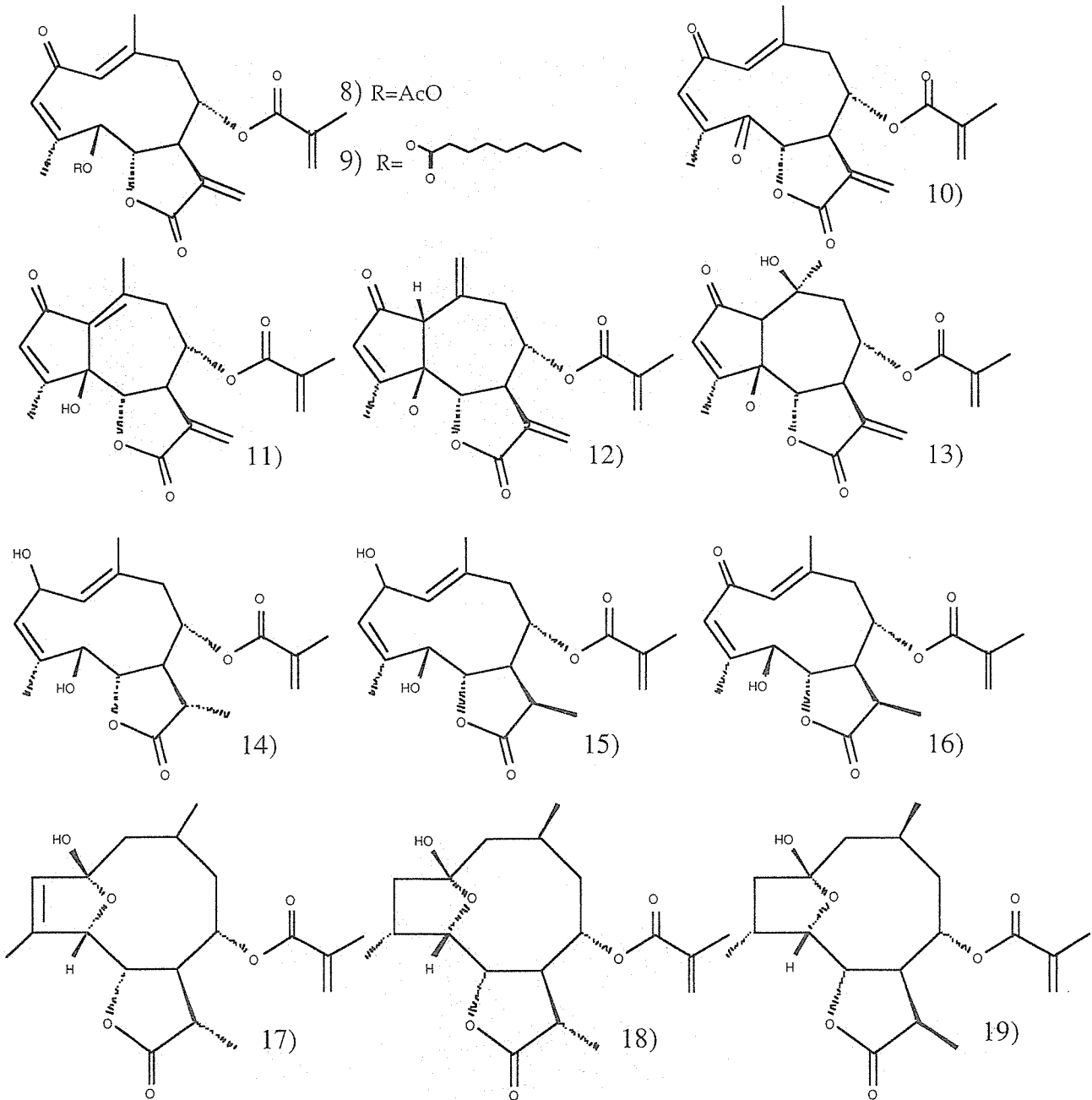


Fig.4 Structures of derivatives from Molephantin

Comp.No.	IC ₅₀	Comp.No.	IC ₅₀
1)	0.4	11)	<0.1
2)	1.0	12)	<0.1
3)	0.4	13)	0.1
4)	0.2	14)	26.0
5)	<0.1	15)	7.4
6)	0.6	16)	12.0
7)	0.1	17)	35.0
8)	<0.1	18)	71.0
9)	0.8	19)	79.5
10)	<0.1		

Table I IC₅₀ of the relative compounds and derivatives from Molephantin (μg/ml)

4. 考察

近年、世界的に代替医療が注目されており伝統的植物療法もそのひとつである。世界で伝統的に用いられている薬用植物資源は膨大であり、さらにその薬効、安全性などが伝統的に確立しているものが多く、抗マラリア薬であるアルテミシニンなど優れた薬が生まれる土壌となっている。しかしこれらの薬用植物においてはその薬効発現の科学的根拠が明らかとなっていないものがほとんどである。現在、抗リーシュマニア薬として主に臨床的に用いられているのはアンチモン剤だけであり、それに代わる有力な新薬は未だ開発されていないのが現状である。そのため、新たなリード化合物を薬用資源の宝庫とされる南米産薬用植物からスクリーニングし、その作用機序、原虫生体内標的部位の解明を行うことによって薬効発現の科学的根拠を明らかにすることは重要である。

本研究で活性のみとめられた *Elephantopus mollis* は解熱や抗炎症作用があるといわれており、皮膚病などの治療に使われている。この *Elephantopus mollis* の主成分である Molephantin, Elephantopin はゲルマクラン骨格をもつセスキテルペンラクトンでこの種の化合物は一般に抗炎症、抗腫瘍作用を持つものが多い。これらのゲルマクラン骨格をもつ化合物は分子レベルにおいては NF-kappaB の発現阻害に伴う IL-6 誘導阻害、各種 protease, kinase, phosphatase などの活性化阻害作用があり、この NF-kappaB の発現阻害作用はシステインによって阻害されることが報告されている。しかし、これらの報告はすべて哺乳類の細胞における結果であり、リーシュマニアに対する報告例はない。

今回の実験においてシステイン存在下では Molephantin, Elephantopin の抗リーシュマニア活性は阻害された。これに伴い Molephantin 及び Elephantopin とシステインが反応し、縮合体を形成したことによると考えられる 305nm における吸光度の増加が認められた。この現象はメチレン基をもたない誘導体では認められなかった。これらの結果からシステインの SH 基とメチレン基が反応し、Molephantin 及び Elephantopin の活性部位が修飾されることにより、抗リーシュマニア活性が低下したと推測された。また、これらゲルマクラン化合物添加時に顕微鏡で形態学的変化を観察すると核の変性が観察されることと、構造活性相関の結果から α-メチレンγ-ラクトンが活性の発現に必須なことを考え併せると、この反応性の高いメチレン基をもつことによりアルキル化剤として作用し、酵素や DNA を修飾することにより抗リーシュマニア活性を示すことが考えられる。

また、この抗リーシュマニア作用の他に Elephantopin などのゲルマクラン化合物がもつ抗炎症作用はリーシュマニア感染患部の炎症軽減にも有効であると考えられ、今後、リーシュマニア治療薬の有力な候補となりうると思われる。

他に、活性が認められた樹脂配糖体はその構造から両親媒性が強いことが予想される。顕微鏡で形態学的変化を観察すると膜傷害のような状態がみられ、さらに脂肪酸部位を加水分解して除去すると、活性が消失することから、界面活性作用により抗リーシュマニア活性が発現すると考えられる。またウルソール酸やクマリンには多様な活性が報告されており、その作用機序の解明及びさらに有効な誘導体の探索が今後必要となるだろう。

5. まとめ

リーシュマニア治療薬の開発を目的として、伝統的に南米で用いられている薬用植物を基とした抗リーシュマニア活性のスクリーニングを行ったところ、*Elephantopus mollis* よりゲルマクラン骨格をもつセスキテルペン7種、*Operculina altissima* より樹脂配糖体、*Hyptis crenata* よりがウルソール酸、クマリンが単離、同定された。そのうち最も活性の強いゲルマクラン骨格をもつセスキテルペンの作用機序は α -メチレン γ -ラク톤の反応性二重結合によるものであることが示唆された。

6. 研究発表

該当なし

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
若手研究者奨励研究報告書

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社