

厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業

新しい抗マラリア戦略を目指した糖鎖関連薬の開発

平成26年度 総括研究報告書

研究代表者 加藤 健太郎

平成27(2015)年 5月

目 次

I . 総括研究報告	
新しい抗マラリア戦略を目指した糖鎖関連薬の開発	----- 3
加藤 健太郎	
II . 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 6
III . 研究成果の刊行物・別刷	----- 7

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）
総括研究報告書

新しい抗マalaria戦略を目指した糖鎖関連薬の開発

研究代表者 加藤 健太郎 帯広畜産大学原虫病研究センター 特任准教授

研究要旨

マalaria感染者は、熱帯、亜熱帯の途上国を中心として年間約3億人、死亡者は年間150～300万人にのぼると報告され、その対策が急務とされている。既存の抗マalaria剤耐性株の出現のため、多くの新しい抗マalaria剤が開発され、また、マalariaワクチン開発の研究が世界規模で試みられているが未開発であり、マalaria撲滅には至っていない。この大きな原因の1つに、先進国の製薬企業では市場性が見込めないことを理由に抗マalaria薬、ワクチンの開発を進めないことが挙げられる。

研究代表者らは独自に開発したマalaria原虫の赤血球感染レセプターの同定系を用いて糖鎖レセプターの同定に成功し、糖鎖がマalaria原虫の赤血球侵入（感染）を著しく阻害することを見出した。本研究では新しい抗マalaria戦略を目指した糖鎖製剤とマalariaワクチンの実用化に向けた開発研究を行うことを目的とする。

研究代表者らはこれまでに感染阻止に効果のあった糖鎖派生体についてどの糖鎖構造体が原虫感染阻止に重要であるか解析を行ってきた。平成26年度はマウスマalaria原虫を用いた動物感染実験により、これまでの*in vitro*での熱帯熱マalariaの感染阻止の解析結果から感染阻止に効果のあった硫酸化多糖類であるカラギーナンや硫酸化ジェランについて、感染阻止能を生体内で解析を行った。また、硫酸化修飾を行って作製した硫酸化ジェランについて元素分析により硫酸基付加を確認した。

研究代表者 加藤 健太郎
帯広畜産大学原虫病研究センター 特任准教授

A. 研究目的

マalariaは*Plasmodium*属原虫の感染によって引き起こされる感染症で、ハマダラカ属の蚊の吸血によってヒトに感染する。マalariaの感染者は、亜熱帯や熱帯地域、特にアフリカ、南アメリカ、東南アジア等の途上国を中心として年間約3億人、死亡者は年間150-300万人にのぼると報告され、その対策が急務とされている。昨今、既存の抗マalaria剤耐性株の出現のため、多くの新しい抗マalaria剤が開発され、また、マalariaワクチン開発の研究が世界規模で試みられているが未開発であり、マalaria撲

滅には至っていない。この大きな原因の1つに、先進国の製薬企業では市場性が見込めないことを理由に抗マalaria薬、ワクチンの開発を進めないことが挙げられる。

研究代表者らは抗マalaria薬開発を目的として、まずウイルスベクターを用いてマalaria原虫の赤血球感染レセプターの同定系の開発に独自に成功した。さらにこの感染レセプター同定系を用いてヘパラン硫酸等の糖鎖レセプターの同定に成功し、糖鎖がマalaria原虫の赤血球侵入（感染）を著しく阻害することを見出した。本研究の目的は、これまでの研究代表者らの研究において抗マalaria作用があることを見出した糖鎖について、新しい抗マalaria戦略を目指した糖鎖製剤とマalariaワクチンの実用化に向けた開発研究を行うことにある。以上の

途上国の現状とマラリア薬開発の遅滞を鑑みると当該研究の必要性が極めて大きい。

B．研究方法

平成26年度はマウスマラリア原虫を用いた動物感染実験により、これまでの*in vitro*での熱帯熱マラリアの感染阻止の解析結果から感染阻止に効果のあった糖鎖構造体の感染阻止能について生体内で解析を行った。以下に平成26年度に実施した研究について記す。

- (i) これまでの解析によって、硫酸化多糖類であるカラギーナンや硫酸化ジェランが*in vitro*で熱帯熱マラリアの赤血球感染阻止に効果があることがわかった。このため、原料であるジェランガムに硫酸化の修飾を行って独自に作製した硫酸化ジェランについて、その構成元素について元素分析を行った。
- (ii) 硫酸化ジェランの薬剤としての使用について検討するため、細胞毒性試験を行った。抗凝固剤として使用される硫酸化多糖類の1つであるヘパリン等では、薬剤としての使用を考える場合当然ながら抗凝固活性の問題が生じる。そこで、硫酸化ジェランについて抗凝固活性の測定を行った。
- (iii) マウスマラリア原虫を用いたマウスへの感染実験により、 α -カラギーナンの感染阻止効果について解析を行った。

(倫理面への配慮)

平成26年度に実施した研究は、*in vitro*での実験系が主であったため、研究対象者の人権擁護に関わる実験等は行っていないことから、倫理面の問題は無い。動物実験については、実施した帯広畜産大学から認可を受けている。

C．研究結果

- (i) 硫酸化ジェランについては、原料であるジェランガムに硫酸化の修飾を行って作製し、元素分析によって、硫酸基に付加を確認した。
- (ii) 硫酸化ジェランについて細胞毒性試験を行った結果、細胞毒性は見られなかった。次に抗凝固活性の測定を行った結果、抗凝固活性については低い

値を示した。

- (iii) マウスマラリア原虫を用いたマウスへの感染実験により、 α -カラギーナン投与は逆に炎症を助長し、硫酸化ジェランについては特段の感染阻止効果はマウスでは見られなかった。

D．考察

硫酸化多糖類は高分子多糖であるため、実際に薬剤として製造するためには、合成が難しく、かつ均質性の保証が懸念される。研究代表者らはこれらの問題を解消するため、様々な硫酸化多糖類の派生体を用いて、マラリア原虫の増殖阻止効果を解析することで、増殖を抑制するコアとなる構造体の同定を試みていた。これにより、抗マラリア薬として効果のある構造体の低分子化を図ることで、均質性の保証も担保しようと考えている。

E．結論

本研究は硫酸化ジェランの抗マラリア活性についての初めての報告である。硫酸化ジェランは新規の材料から合成された熱帯熱マラリア原虫の増殖阻害薬の候補物質と言える。また、ジェランガムにはドラッグデリバリーシステムの担体としての使用の報告もあることから、この薬剤機序の解明を行うことで、新たなマラリア治療薬の開発につながることを期待される。

F．健康危険情報

無し。

G．研究発表

1. 論文発表

Kato K (corresponding author), Ishiwa A. Roles of carbohydrates in the infection strategies of enteric pathogens. **Trop Med Health**. 43: 41-52. (2015)

Sugi T, Kawazu S, Horimoto T, **Kato K (corresponding author)**. A single mutation in the gatekeeper residue in TgMAPKL-1 restores the effect of bumped kinase inhibitor on cytokinesis arrest. **Int J**

Parasitol Drugs Drug Resist. 5:1-8. (2015)

Recuenco FC, Takano R, Chiba S, Sugi T, Takemae H, Murakoshi F, Ishiwa A, Inomata A, Horimoto T, Kobayashi Y, Horiuchi N, **Kato K (corresponding author)**. Lambda-carrageenan treatment exacerbates the severity of cerebral malaria caused by *Plasmodium berghei* ANKA in BALB/c mice. **Malar J.** 13:487. (2014)

Sugi T, Masatani T, Murakoshi F, Kawazu S, **Kato K (corresponding author)**. Microplate assay for screening *Toxoplasma gondii* bradyzoite differentiation with DUAL luciferase assay. **Anal Biochem.** 464C:9-11. (2014)

2. 学会発表

Terkawi Alaa, 高野 量、**加藤健太郎** 「Differentiated gene profile of macrophage induced by phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes」 第 84 回日本寄生虫学会、東京、2015 年 3 月

高野 量、秦 裕子、竹前 等、尾山 大明、**加藤健太郎** 「熱帯熱マalaria原虫寄生赤血球にみられるマウレル裂を構成する因子の網羅的同定」 第 84 回日本寄生虫学会、東京、2015 年 3 月

猪又 敦子、村越 ふみ、石和 玲子、堀本 泰介、**加藤健太郎** 「*Cryptosporidium parvum* の elongation factor 1alpha は宿主細胞表面のヘパリン硫酸と相互作用する」 第 84 回日本寄生虫学会、東京、2015 年 3 月

加藤健太郎 「原虫病感染症の制御と克服に向けて - マラリアとクリプトスポリジウム」 原虫病研究会、北海道、2014 年 11 月

猪又敦子、村越ふみ、石和玲子、堀本泰介、**加藤健太郎** 「クリプトスポリジウム原虫のヘパリン結合性感染抑制因子の解析」 第 157 回日本獣医学会、北海

道、2014 年 9 月

猪又 敦子、村越 ふみ、堀本 泰介、**加藤健太郎** 「*Cryptosporidium parvum* EF1- のヘパリン結合性とその機能解析」 第 22 回分子寄生虫ワークショップ、第 12 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 合同大会、北海道、2014 年 9 月

高野 量、尾山大明、秦 裕子、**加藤健太郎** 「熱帯熱マalaria原虫分泌タンパク質の探索」 第 22 回分子寄生虫ワークショップ、第 12 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 合同大会、北海道、2014 年 9 月

Mohamad Alaa Terkawi, Ryo Takano, **Kentaro Kato** 「Analyses of macrophage responses to *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes」 第22回分子寄生虫ワークショップ、第12回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 合同大会、北海道、2014年9月

土生川佳世、小林郷介、**加藤健太郎** 「マラリア原虫とヘパリンと私」 第22回分子寄生虫ワークショップ、第12回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 合同大会、北海道、2014年9月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

加藤健太郎、杉達紀、正谷達膳（以上発明者）「抗原虫薬のスクリーニング方法及び組換えトキソプラズマ株」 特願2014-109262、国立大学法人帯広畜産大学、国立大学法人鹿児島大学(以上出願人) 2014年5月27日

2. 実用新案登録

無し。

3. その他

無し。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
テルカウィ アラール、高 野量、加藤 健太郎	ヒト末梢血由来マク ロファージと熱帯熱 マラリア原虫寄生赤 血球の共培養法	高宮信三郎	寄生虫研究 材 料と方法 2014 年版	三恵社	名古屋市	2014年	9-10
加藤健太郎	トキソプラズマ原虫 のブタを用いた感染 実験	高宮信三郎	寄生虫研究 材 料と方法 2014 年版	三恵社	名古屋市	2014年	27-28
村越ふみ、 加藤健太郎	クリプトスポリジウム 原虫における培養細 胞を用いた感染・増 殖阻害アッセイ	高宮信三郎	寄生虫研究 材 料と方法 2014 年版	三恵社	名古屋市	2014年	105-106
高野量、テ ルカウィ ア ラール、加藤 健太郎	熱帯熱マラリア原虫 寄生赤血球貪食時 におけるマクロファ ージ内遺伝子発現 解析	高宮信三郎	寄生虫研究 材 料と方法 2014 年版	三恵社	名古屋市	2014年	111-116

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kato K (corresponding author) , Ishiwa A.	The roles of carbohydrates in the infection strategies of enteric pathogens	Trop Med Health.	43	41-52	2015年
Sugi T, Kawazu S, Horimoto T, Kato K (corresponding author) .	A single mutation in the gatekeeper residue in TgMAPKL-1 restores the inhibitory effect of a bumped kinase inhibitor on cell cycle	Int J Parasitol Drugs Drug Resist.	5	1-8	2015年
Recuenco FC, Takano R, Chiba S, Sugi T, Takemae H, Murakoshi F, Ishiwa A, Inomata A, Horimoto T, Kobayashi Y, Horiuchi N, Kato K (corresponding author) .	Lambda-carrageenan treatment exacerbates the severity of cerebral malaria caused by <i>Plasmodium berghei</i> ANKA in BALB/c mice	Malar J.	13	487	2014年
Sugi T, Masatani T, Murakoshi F, Kawazu S, Kato K (corresponding author) .	Microplate assay for screening <i>Toxoplasma gondii</i> bradyzoite differentiation with DUAL luciferase assay	Anal Biochem.	464C	9-11	2014年