

Echinococcus multilocularisのミトコンドリア呼吸鎖の特性とそれを標的にした創薬

著者	遠海 重裕
学位授与年月日	2016-03-24
URL	http://doi.org/10.15083/00073786

論文の内容の要旨

論文題目 *Echinococcus multilocularis* のミトコンドリア
呼吸鎖の特性とそれを標的にした創薬

氏名 遠海重裕

【エキノкокスの生態と現在の治療】

エキノкокス感染症は人獣共通感染症である。ヒトにとって重要な疾患は *Echinococcus granulosus* と *Echinococcus multilocularis* の幼虫ステージが引き起こす単包虫症 (cystic echinococcosis) と多包虫症 (alveolar echinococcosis) である。患者数は世界で 100 万人と言われている。本論文では *E. multilocularis* を対象として研究を進めた。*E. multilocularis* の終宿主はキツネや犬、中間宿主はネズミである。ヒトやブタは非好適中間宿主であるが、虫卵を摂取すると主に肝臓や肺に包虫 (alveolar hydatid cyst) と呼ばれるシストを十数年かけて形成し患者は死に至る。これを多包虫症と呼んでおり、治療法は外科的切除と化学療法があるが早期でなければ完全切除は困難である。化学療法はアルベンダゾールが唯一の適応であるがシストに対する発育抑制作用のみで殺滅する効力は弱く、再発を繰り返せば継続的な内服を行う。治療患者の 65 %が肝障害などの副作用を経験し、3.8 %の患者が内服を中止する事態に陥るが代替薬がないことも大きな問題である。(以下、幼虫ステージをエキノкокス、もしくは原頭節と呼ぶ。)

【フマル酸呼吸とエキノкокスのミトコンドリア呼吸鎖】

ヒトを含めた哺乳類では複合体 I で NADH から得られた還元力とコハク酸-キノン還元酵素 (Succinate-quinone reductase: SQR) として働く複合体 II でコハク酸から得られた還元力をユビキノンに伝達し複合体 III、そして最終的に複合体 IV で最終電子受容体である酸素と反応させて水に還元している (酸素呼吸)。

一方、寄生蠕虫である回虫 (成虫) では酸素濃度が 5 %に低下する小腸内で NADH-フマル酸還元系 (フマル酸呼吸) を利用している。この系は複合体 I で NADH より得られた還元力がロドキノンに伝達され、複合体 II がキノール-フマル酸還元酵素 (Quinol-fumarate reductase : QFR)

として働きフマル酸をコハク酸に還元することで酸素を利用せず ATP を合成できる。2008 年にエキノコックスにおいても NADH-フマル酸還元酵素の比活性が 45 nmol/min/mg であることから嫌氣的呼吸鎖が主に使用されていると報告された。しかし NADH から酸素への NADH-oxidase 活性(4.4 nmol/min/mg)も低いが存在し、2014 年には全ゲノム解析によって複合体 I から IV までのすべての酵素が保存されていることが報告されたため、私はエキノコックスが宿主組織で酸素環境に応じて嫌氣と好氣的呼吸鎖の両方を利用していると考えた。さらに培養系の原頭節では複合体 I のキノン結合部位をキナゾリン誘導体で阻害により殺滅できることから、ミトコンドリア呼吸鎖が薬剤標的となることも報告された。しかし、そのキナゾリン誘導体は哺乳類の複合体 I に対する阻害活性も高いことが問題であった。このためエキノコックスの呼吸鎖を特異的に阻害する新規薬剤を見出すことが課題であった。最初に生物医化学教室のキノン結合部位阻害剤のライブラリーを用いて、キナゾリン誘導体と同様に複合体 I の阻害剤を探索したが低濃度で阻害する化合物を見出すことができなかった。そこで次にこのライブラリーを用いて、NADH-フマル酸還元系の末端酸化酵素である複合体 II および好氣的呼吸鎖を構成する複合体 III の阻害剤のスクリーニングを行った。最終的には見出された化合物の中から *in vivo* 実験でエキノコックスのシストを殺滅できる薬剤を見出すことを目的とした。

【材料と化合物】

材料は北海道立衛生研究所で維持されているエキノコックスの幼虫である原頭節 (Nemuro 株) を使用。化合物は東京大学医学系研究科生物医化学教室のキノン結合部位阻害剤ライブラリーに保管されている 200 種類以上の化合物を使用した。

【エキノコックスの呼吸鎖に対する阻害剤の探索】

エキノコックスの複合体 II (SQR) を低濃度で阻害する化合物が見出された。特にアスコフラノン は 1.1 μM で選択性は 222 倍 (選択性: ブタの SQR に対する IC_{50} との比)、さらにアスコフラノン誘導体の中では化合物 A は IC_{50} 37 nM で選択性 738 倍、化合物 B は IC_{50} 309 nM で選択性 530 倍、化合物 C は IC_{50} 135 nM で選択性 2200 倍と複数の有望な化合物を見出せた。また、化合物 X は IC_{50} 690 nM で阻害し選択性は 145 倍以上であった。

次に複合体 III の NADH-シトクロム *c* 還元酵素に対する IC_{50} を測定し、阻害活性が高い複数の化合物が見出された。アスコフラノン誘導体の化合物 B は IC_{50} が 8.2 nM、化合物 D は 16 nM、化合物 X は IC_{50} 0.15 nM と低濃度で阻害した。次に見出した化合物について好氣条件の培養系で原頭節の殺滅効果を確認した。アスコフラノン誘導体の中には化合物 B が 3 日目、化合物 E や化合物 F が 4 日目、化合物 D は 5 日目に原頭節を殺滅した。また、化合物 X も 7 日目で原頭節の殺滅が可能であった。好氣条件下で 7 日以内に殺滅できなかった化合物は複合体 III に対す

る IC₅₀ は高い傾向が認められた。アスコフラノンと化合物 X が複合体 II を阻害することは新しい知見であり、複合体 II、もしくは III は複合体 I と同様に薬剤標的となることが初めて明らかになった。

【*E. multilocularis* の呼吸鎖の特性】

好氣的条件の培養系で複合体 III を低濃度で阻害する化合物が高い原頭節殺滅能力を持っていた。しかし、低酸素・好氣的条件での複合体 II と III の薬剤標的として重要性、そして異なった酸素環境に対する呼吸鎖の機能については判っていない。そこで好気および低酸素条件の原頭節の培地に各複合体を特異的に阻害する化合物を添加し、その生存率の変化を観察することでエキノкокスの呼吸鎖の特性を調べた。好気条件培養ではアンチマイシン A（複合体 III 阻害剤）は単剤でも原頭節に対する強い殺滅効果を認めたが、アトペニン A5（複合体 II 阻害剤）単剤では殺滅効果は全くなかった。アンチマイシン A とアトペニン A5 を併用した場合はアンチマイシン A 単剤よりもさらに強い殺滅効果が得られた。一方、好気条件でアンチマイシン A にフマル酸（フマル酸呼吸の基質）を加えて原頭節の殺滅を観察したがアンチマイシン A 単剤と同じ殺滅効果スピードであった。この結果より好気条件下ではエキノкокスはフマル酸呼吸を積極的に利用せず酸素呼吸を行っていると考えられた。

一方、低酸素条件ではアンチマイシン A の原頭節に対する殺滅効果は消失した。これは低酸素嫌気条件では酸素呼吸からフマル酸呼吸にシフトしたことを示唆していた。しかし、アトペニン A5 単独での殺滅効果は弱く、アンチマイシン A と併用して強い殺滅効果が得られることから電子が複合体 III を経由して微量な酸素と反応していると考えられた。原頭節は酸素存在下では酸素呼吸を行い、低酸素下ではフマル酸呼吸に切り替えるため複合体 II と III の両方を薬剤標的することがより効率的であることが判った。

【化合物 X を中心とした *E. multilocularis* 感染マウスの治療実験】

本研究では *in vitro* 実験で複数の有望な化合物が見出された。特に化合物 X はその特徴からすぐに臨床応用可能な化合物と考えられた。化合物 X は好氣的条件で 7 日目に原頭節を全て殺滅するが、低酸素条件では 7 日目でも生存率が 83%であった。化合物 X は複合体 II に対して IC₅₀ が 550 nM と相対的に高いためにフマル酸呼吸を阻害する力が弱く、この結果もエキノкокスが低酸素下では呼吸鎖をフマル酸呼吸に切り換えていることを示唆していた。 *in vivo* 実験では見出された化合物の中で複合体 III を最も低濃度で阻害した化合物 X を利用し、BALB/c マウスで治療実験を行った。虫卵 200 個を経口投与し 4 週間後に肝臓のシスト定着を確認した後から各薬剤を経口で 12 週間投与した。その結果、化合物 X (200 mg/kg/day)単剤、化合物 X (200 mg/kg/day)とプラジカンテル(100 mg/kg/day)併用、化合物 X とアスコフラノン (700 mg/kg/day)

併用群がコントロール(無投薬)群に対して有意なシスト形成の阻害を示した。治療薬候補として化合物 X の有効性が示され、かつ *in vivo* 実験でもエキノкокスの複合体 II と III が薬剤標的となることが示された。

【まとめ】

本研究では複数のアスコフラノン誘導体と化合物Xが複合体IIとIIIに対して強い阻害活性を持ち培養系の原頭節を殺滅することが初めて明らかになった。さらにエキノкокスが酸素呼吸とフマル酸呼吸を酸素濃度環境に応じて切り換えており、定着した組織での酸素血流量に対応して生存していると考えられた。そのため強い殺滅作用を得るために複合体IIとIIIの両方を阻害することが効率的であることが分かった。実際に*in vivo*実験では化合物Xにより感染マウスのシスト形成が無治療のコントロールと比較して有意に低下した。化合物Xの臨床応用の可能性と同時に呼吸鎖を構成する複合体IIとIIIは薬剤標的となることが*in vivo*実験でも示され、これを標的とした化合物の開発がさらに可能になったと考えられる。有効な薬剤のないエキノкокス症に対して、基礎研究を基盤とした創薬が成功をおさめる可能性とその意義は高いと考えられる。