

## 論文の内容の要旨

論文題目 Trypanosome alternative oxidase を標的とした抗アフリカトリパノソーマ症薬の開発

氏名 柘植 千明

(本文)

アフリカトリパノソーマ症はツェツェバエが媒介するトリパノソーマ科原虫の感染によって引き起こされる寄生虫感染症であり、「顧みられない熱帯病 (Neglected Tropical Diseases ; NTDs) のひとつである。20 世紀初頭に初めて確認され、ヒトでは、ヒトアフリカトリパノソーマ症または睡眠病として、家畜ではナガナ病として知られており、そのいずれも治療を施さなければ 100%死に至る。ヒトアフリカトリパノソーマ症は *Trypanosoma brucei rhodesiense*、*T. b. gambiense* の感染により発症し、それぞれ急性、慢性の症状を呈する。サハラ以南の地域において特に深刻な公衆衛生上の問題となっており、確認された新規感染者は 1 年間に 1 万人を超える。既存薬は数種類しかなく副作用や耐性株の出現といった問題を抱えている。またナガナ病は、アフリカにおいてツェツェバエによって媒介される *T. congolense*、*T. vivax*、*T. b. brucei*、*T. simiae*、*T. suis* の感染によって引き起こされ、その宿主動物は、反芻動物、ラクダ、ウマ、ブタ、野生の肉食動物にも及ぶ。ナガナ病による経済損失は年間 4 億 7500 万ドルと試算されており、4000 万頭から 6000 万頭のウシが感染のリスクにさらされている。アフリカでは家畜の中でも特にウシが貴重とされていることから、ウシに感染する *T. congolense*、*T. vivax*、*T. b. brucei* が治療対象とされてきた。現在ナガナ病の治療薬として用いられている化合物はわずか 3 種類しかなく、これらは 50 年以上使用され続けている。耐性原虫の出現や毒性も問題となっており、ヒトアフリカトリパノソーマ症、ナガナ病ともに新規薬剤開発が求められている。

アフリカトリパノソーマ症を引き起こすトリパノソーマはその生活環の中で形態やエネルギー代謝系を大きく変化させ、宿主である哺乳類と媒介昆虫であるツェツェバエの体内環境に適応している。ツェツェバエの体内では、アミノ酸やグルコースを炭素源として、解糖系酵素、TCA 回路を構成する酵素群、そして呼吸鎖電子伝達系を介したエネルギー代謝を行い、酸化的リン酸化により ATP を合成している。一方、宿主体内に移行すると原虫はグリコソームと呼ばれる特殊なオルガネラを発達させ、主に解糖系に依存したエネルギー転換反応となる。宿主体内で病原性を示す bloodstream 型のエネルギー代謝を担う主なオルガネラが、前述したグリコソームとミトコンドリアである。解糖系の過程において、NAD は還元され NADH となるが、この代謝系を進行させるためには NADH の再酸化が不可欠である。この再酸化を行う経路は二つあり、ひとつは、ミトコンドリア内膜に存在するシアン耐性末端酸化酵素 Trypanosome alternative oxidase (TAO) が関わる経路、もうひとつはグリコソーム内の糖代謝系酵素 Glycerol kinase (GK) が関わる経路である。つまり、この二つの経路を同時に止めることができれば、原虫はエネルギー

ギー産生を継続させることができず、速やかに死滅することが予想される。

前出の TAO は原虫の生存に必須であり、かつ宿主哺乳類には存在しないため理想的な薬剤標的である。私の所属する研究グループは、アフリカトリパノソーマ症に対する新規薬剤開発のためこの酵素に対する阻害剤を探索した結果、Ascofuranone (Figure 1) を見出した。Ascofuranone は TAO の組換え酵素活性を nM オーダーという非常に低濃度で阻害し、有望なリード化合物と考えられた。

Ascofuranone は糸状菌由来の天然産生物であることから、実用化を視野に入れた数多くの誘導体が合成されてきた。それら 200 種類以上の誘導体を用いることにより、酵素レベルでの構造活性相関が明らかにされており、誘導体と酵素との共結晶構造解析により、その阻害様式もより明確になっている。薬剤開発において、*in vivo* での投与量や投与期間などの詳細な検討は必要不可欠であるが、Ascofuranone 及びその誘導体の感染動物における治療効果の試験は限定的であった。

さらに、TAO に対する新規阻害剤の探索を行った結果、Ferulenol が新たに見出された。Ferulenol は地中海に生息する多年生草本 *Ferula communis* より単離精製される天然化合物である。Ferulenol は組換え TAO 活性を Ascofuranone 同様に nM オーダーで阻害し、有望な薬剤候補と考えられた。しかしながら、培養原虫に対する増殖阻害効果は  $\mu\text{M}$  オーダーとなり、Ascofuranone と同程度の強力な増殖阻害効果は示さなかった。

以上のことから、本研究では Ascofuranone と Ferulenol をリード化合物とし、酵素、培養系そしてマウスの系を用いて TAO を薬剤標的としたアフリカトリパノソーマ症に対する新規薬剤の実用化を目指して研究を進めた。Ascofuranone においてはその誘導体も含め、*T. brucei* 感染マウスにおける治療効果を検討しその有効性を示すこと、Ferulenol に関しては、まず阻害様式や構造活性相関を明らかにし、その結果をもとに Ferulenol よりもより強力に阻害効果を示す誘導体を見出すことを目的とした。

Ascofuranone 誘導体を用いた培養系における実験では、酵素レベルの構造活性相関では分からなかった、原虫に対する増殖阻害効果がある構造により増強されることが明らかとなった。この結果は以降の誘導体のデザインの基盤となり、以前より高い確率で阻害効果の強い化合物の合成が可能となった。また *in vivo* 感染治療実験では、Ascofuranone 誘導体の中で 3 つの化合物がマウスを完治させ、さらにその中のひとつの誘導体が Ascofuranone よりも必要容量や投与条件において高い治療効果を示した。ここ数十年、感染マウスを延命させることができて完治させることができる化合物は見出されておらず、アフリカトリパノソーマ症の薬剤開発においては大きな進歩である。しかも、24 時間おきに 3~5 日間の投与で完治し、今現在治療に用いられている薬と比較してもその投与頻度及び投与期間は短い。

Ferulenol は、TAO 酵素活性を nM オーダーの低濃度で阻害した。TAO に対して競合阻害を示

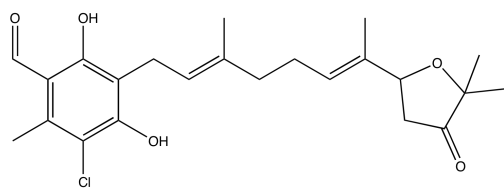
す阻害剤は Ferulenol が初めてであり、Ferulenol の発見により TAO の酵素としての反応機構がより明確になることが期待できる。Ferulenol については、培養原虫に対しても効果的に阻害する化合物を見出すため、誘導体の合成を依頼し構造活性相関を調べた。誘導体は構造活性相関を明らかにするためそれぞれの官能基やリンカーの長さを変えるだけでなく、Ascofuranone 誘導体を用いた実験から得られた情報をもとに合成した。その結果、構造活性相関だけでなく Ascofuranone 誘導体において培養原虫に対する増殖阻害を増強する構造は Ferulenol 誘導体においても同様の効果を示すことが明らかとなった。その構造を持った誘導体は、培養原虫に対する IC<sub>50</sub> 値が Ferulenol の 3.1 μM から 0.093 μM まで低下し、およそ 30 倍程度強力な阻害効果を示した。この構造は Ascofuranone 誘導体にも Ferulenol 誘導体にも適応できたことから、様々な阻害剤に応用できる可能性がある。

ここまでの *in vivo* 感染治療実験では、*T. b. brucei* を用いたが、*T. congolense* が主たる病原体であるナガナ病に対する治療薬としての可能性を調べるため、*T. congolense* に対する阻害効果を検討した。その結果、Ascofuranone とその誘導体、さらに Ferulenol 誘導体の中に *T. congolense* の増殖を低濃度で阻害する化合物が見つかった。

以上本研究により Ascofuranone と Ferulenol、及びその誘導体はヒトの睡眠病だけでなく家畜のナガナ病に対しても有望な新規薬剤候補化合物であることが示された。

本研究において、Ascofuranone、Ferulenol とともにリード化合物よりもより強力な阻害効果や治療効果のある誘導体を見出すことができた。Ascofuranone 誘導体に関しては感染マウスを完治できる段階まで来ており、今後はアフリカ現地で実際に感染宿主となっているウシなどの大型動物の感染治療実験を行うといった流行地のニーズに沿った開発を進めて行く必要があると考える。Ferulenol はまだ感染マウスの治癒には至っていないが、低コストでの合成が可能であり培養原虫に対する阻害効果が Ferulenol よりも強力な誘導体も見つかっており、それらの投与によりマウスの完治、もしくは完治しなくとも血液内原虫の増殖阻害効果を示す可能性は十分にあると考える。

本研究により、Ascofuranone と Ferulenol、及びその誘導体がアフリカトリパノソーマ症に対する新規薬剤となる可能性が十分に示され、これら新規薬剤が数十年の新薬の不在の後に投入されることで、アフリカトリパノソーマ症が NTDs ではなくなると確信している。



(Figure 1) Ascofuranone