

抗マalaria薬創製のための新戦略

－生体膜内環境の特異を目指した分子設計－

高須 清誠

東北大学大学院薬学研究科

1. はじめに

日本や欧米など先進国で需要の高い医薬品は、いかに豊かな生活を送るかを探求するための QOL (Quality of Life) 薬や成人病などの治療 (予防) 薬である。一方、世界人口の 75% を占めている開発途上国が必要とするものは、エイズ、マalaria、結核などの直接的に命を脅かす感染症の治療薬となっている。しかし、彼らの低い所得では治療薬すら満足に入手できず、途上国全体では一日に何万人もの犠牲者がでていく。にもかかわらず、先進国の多くの製薬企業では、市場価値が乏しいという資本主義的観点からそれらの医薬品開発には積極的ではない。その為に、開発途上国の必要とする薬はより一層手に入りづらくなっている。そこで存在価値を発揮すべきものが、公的資金で研究を行うことのできる大学などの研究機関ではないだろうか？

マalariaはマalaria原虫 (*Plasmodium sp.*) が赤血球に寄生することにより発症する感染症で、熱帯亜熱帯を中心に約 3 億人の感染者と一年で約 110 万人の犠牲者がいる (2002 年 WHO データ)。特に、最近ではクロロキンなどの薬剤に強い耐性を示すマalaria原虫の急速な拡散がその制圧を遅らせており、再興感染症として世界的な重要問題となっている。そのような背景の中、薬剤耐性を克服した強力な抗マalaria薬で、なおかつ安価に供給できる化学療法剤の開発が必要となってくる。すなわち、従来薬と化学構造や作用機構が全く異なり、低コストで大量に合成できる医薬品を開発することが理想的であるだろう。そこで我々は原虫オルガネラの生体膜内に形成された固有環境を特異的に認識し蓄積することで活性発現をする小器官標的型の薬剤設計を合成化学と生物有機化学を基盤に企画した¹。

2. DLC 仮説

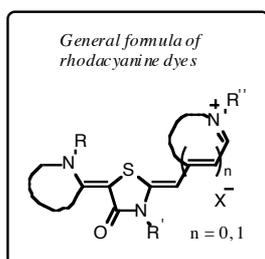
マalaria原虫のゲノム解析から、DNA 配列の一部が藻類の葉緑体の配列と極めて似ていることが発見され、マalaria原虫は動物と植物の両方を祖先としていることが示唆されている。即ち、細胞レベルで見た場合でも、宿主であるヒトとかなり異なる環境をすることが期待される。例えば、マalaria特有の細胞小器官 (オルガネラ) として食胞やアピコプラストという独特のものが存在する。また、細胞のエネルギー供給

の主役であるミトコンドリアにおいても、ミトコンドリア DNA やシトクロム *b* などのタンパクに原虫と宿主では大きな相違があることが知られている。

我々は、Chen らが制癌剤研究で提唱したモデル²をヒントに、共役型カチオン (delocalized lipophilic cations; DLC) は負に帯電した原虫固有のオルガネラに選択的に集積し、それにより抗マラリア活性が発現すると考えた。即ち、DLC は局在化した荷電をもたないカチオンで両親媒性であることから容易に生体膜を透過でき、より負に帯電したオルガネラに選択的かつ自発的に集積することで薬理活性を発現するというものである。原虫ミトコンドリアやアピコプラスト (色素体) は膜内の電位が低いとされており、マラリアに DLC が有効であると期待した。

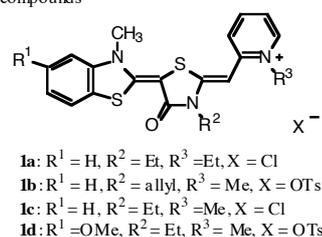
3. 新規抗マラリア活性化合物の探索とロダシアニン色素の合成

DLC に相当するカチオン分子を中心に *in vitro* での抗マラリア活性についてスクリーニングをした³。その結果、化合物 **1a** が強力な抗マラリア作用を持つことが明らかになった。**1a** などの化合物は一般にロダシアニン色素と称され、中心にロダニン環を有し左右にそれぞれメロシアニン、シアニン共役鎖を有する特徴を持っている。これらの化合物の合成法は簡便かつ大量供給が可能であり、医薬品候補としては非常に適している。そこで多種の誘導体を合成し、抗マラリア活性及び宿主への毒性の構造活性相関 (SAR) を調べた。その結果、詳細な SAR 情報に加え、脂溶性の共役型カチオン (DLC) 構造が活性発現に必須であることを見出した。その後の構造最適化研究により *in vitro* の評価系で従来薬に匹敵する効果を示す MKH-57 (**1b**) を開発した^{4,5}。この化合物は薬剤耐性株にも有効であり、ネズミマラリアを用いる *in vivo* 試験でも有効性が確認された。また、ロダシアニン色素は治療薬が限られているリーシュマニア症にも従来薬より高い活性を示すことを最近明らかにした⁶。



Antimalarial efficacies of rhodacyanine compounds

compound	EC ₅₀ (M)		selective toxicity
	<i>P. falciparum</i>	FM3A	
MKT-077 (1a)	7.0 x 10 ⁻⁸	1.5 x 10 ⁻⁵	214
MKH-57 (1b)	1.2 x 10 ⁻⁸	1.2 x 10 ⁻⁵	1,000
HI-16 (1c)	2.6 x 10 ⁻⁸	1.6 x 10 ⁻⁵	615
HT-4 (1d)	1.4 x 10 ⁻⁸	1.2 x 10 ⁻⁵	857
HI-71 (1e)	3.2 x 10 ⁻⁹	4.4 x 10 ⁻⁷	138
quinine	1.1 x 10 ⁻⁷	1.0 x 10 ⁻⁵	910
chloroquine	1.8 x 10 ⁻⁸	3.2 x 10 ⁻⁵	1,800

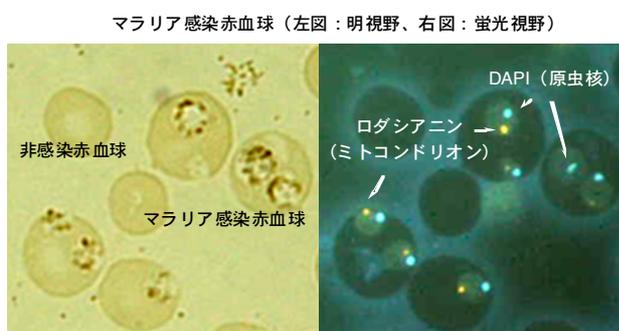


昨年の発表以降、実用化を目指して *in vivo* での評価を指標とした研究を開始した。宿主モデルとしてはマウスを用い、実際に自分達でマウスを飼育し *in vitro* での活性評価を行っている。さらに、その生データを基に薬剤設計を練り直し、極めてタイムラグの少ない環境で新物質の合成にフィードバックを行いつつ創薬研究ができる環境を

整えた。しかし、研究が進むにつれ、*in vivo* と *in vitro* での薬効プロファイルが大きく違うという甘い期待を打ち砕くような問題に遭遇した。現在は、生体内でのバイオアベイラビリティ（この場合は血中濃度が特に重要と考えられる）を向上させるようなアイデアを導入して、*in vivo* でも有効な抗マラリア活性ロダシアニンを見出した。

4. マラリア原虫内でのロダシアニンの挙動

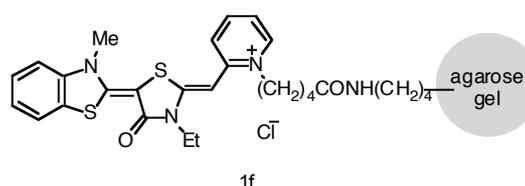
強い抗マラリア活性をもつロダシアニンを赤内型マラリア原虫に添加し適当な条件で培養した後、蛍光顕微鏡で **1a** の挙動を観察した。その結果、**1a** は速やかにマラリア原虫に取込まれ、特定の一部を局所的に染色することが明らかとなった。この現象はヒト熱帯熱マラリア (*P. falciparum*)、マウスマラリア (*P. berghei*) でも観察された⁷。



さらなる研究から、高活性かつ DLC 構造をもつ化合物ほど、集積現象が顕著に現れるという良好な相関が認められた。即ち、DLC 仮説がマラリア創薬の新戦略となることを示唆している。この集積部位は DAPI などを用いた二重染色試験などから原虫の食胞ならびに核以外であることが明らかとなり、原虫ミトコンドリアであることが示唆されている。また、高い抗マラリア活性で DLC 構造をもつ化合物ほど、特異的集積現象が顕著に現れるという興味深い相関があることを明らかとした。

5. アフィニティゲルの作成と標的タンパクの単離

顕微鏡観察の際に、**1a** はマラリアの複雑な生活環のうちシゾン期原虫を強く殺傷することが示唆された。このことから、増殖過程で生合成されるミトコン



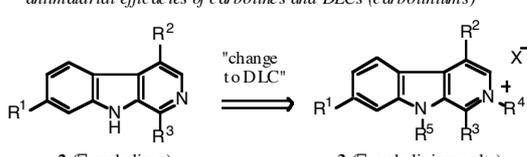
ドリア内の原虫タンパクが真の標的分子として存在するかもしれないと考えた。アフィニティ部位をもつ種々のロダシアニンゲル **1f-i** を設計し、アフィニティクロマトグラフィによるタンパクの単離を検討した。アフィニティクロマト後 SDS-PAGE を行い、ロダシアニンに親和性のある原虫由来タンパクのバンドを再現性よく得ることができた。そのタンパク群からさらに候補を絞り込むために溶出方法に検討を重ねた結果、数種のタンパクに絞り込むまでに至った。そのうちの2種類のタンパクについて MS/MS を用いてアミノ酸配列の一部を決定した。ここで同定されたタンパクが、実際にさき

ほどの集積に関わるタンパクであるかどうかは、今後の研究で解明して行く必要がある。

6. DLC 仮説に基づく新規抗マラリア化合物の設計～アルカロイドをモチーフに

□カルボリン構造をもつアルカロイドは天然に広く存在し、そのうちのいくつかは抗マラリア活性が報告されている。カルボリンのピリジン性窒素をアルキル化しカチオン化合物に誘導すれば DLC に相当する性質を帯びることで抗マラリア活性が向上するものと考え、数種の □カルボリン化合物 **2** とそのカチオン誘導體 **3** を合成し抗マラリア活性を比較した。その結果、後者の共役カチオン化合物のほうが前者に比べ、約 5~80 倍程度の抗マラリア活性の増強が認められた。興味深いことに選択毒性も向上した⁸。本手法は極めて簡便に抗マラリア作用を向上する手法であり、マンザミン類の改良、プロドラッグ化にも広く応用が期待できる。

antimalarial efficacies of carbolines and DLCs (carboliniums)



compd.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	X	EC ₅₀ (M) <i>P. falciparum</i>	selective toxicity
2a	H	OMe	Me	—	H	—	2.2 × 10 ⁻⁵	0.8
3a	H	OMe	Me	Me	H	I	3.7 × 10 ⁻⁷	81
2b	H	OMe	CH=CH ₂	—	H	—	5.0 × 10 ⁻⁶	0.8
3b	H	OMe	CH=CH ₂	Me	H	TsO	1.1 × 10 ⁻⁶	8
3b'	H	OMe	CH=CH ₂	Et	H	TsO	1.3 × 10 ⁻⁷	77
3c	OMe	H	Me	Me	Me	TsO	4.6 × 10 ⁻⁷	48

7. まとめ

本研究では、脂溶性が高いπ共役性非局在型カチオン (DLC) が原虫ミトコンドリアという特定の細胞の特定のオルガネラ (即ち、天然に形成された固有空間) を選択的に認識して細胞毒性を発現するという仮定にたって新規抗マラリア薬の開発を行った。ここで述べた分子設計は抗マラリア薬創製への新手法となりうることを期待される。また、生物有機化学的手法を用いて、マラリア原虫とDLCが分子レベルでどのような相互作用をしているかを若干ながら明らかにすることができた。今後、さらに生物有機化学的な展開を行い、マラリア原虫の増殖阻害機構について基礎的な理解を深めていきたいと考えている。同時に、大学発創薬という非常に楽観的で大甘な妄想を胸に秘めて、実用化を目指した研究を発展させていきたい。

謝辞

終始、温かくご指導、激励していただき、行く先わからない研究に対して太っ腹にご支援をいただいた井原正隆教授 (東北大・薬) に心より感謝しています。また、綿矢有佑教授、金恵淑助教授 (以上、岡山大・薬)、永沼章教授、久下周佐助教授 (以上、東北大・薬)、中条茂男助教授 (昭和大・薬) の各先生には、専門的知識と技術の提供をいただき篤くお礼申し上げます。また、合成、マウスの取扱い、電気泳動、顕微鏡観察などのテクニックを有する研究員および学生諸氏 Pudhom Khanitha 博士 (J

S T)、伊上博史修士、寺内広毅修士、盛崎大貴修士、下釜翼学士、葛西一希学士（以上、東北大・薬）の日夜にわたる努力に心よりありがたく思っています。また、研究費は文部科学省科学研究費、科学技術振興機構（J S T）権利化試験、東京生化学研究会、武田科学振興財団に援助いただきました。ここに謝意を記します。

引用文献

1. 井原正隆、高須清誠、寺内広毅 「抗マラリア薬 大学での創薬研究」 投稿中.
2. Chen, L. B. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **1988**, *4*, 155–181.
3. Takasu, K.; Katagiri, R.; Tanaka, Y.; Toyota, M.; Kim H.-S.; Wataya, Y.; Ihara, M. *Heterocycles* **2001**, *54*, 607–610. (特許) 特開 2001-247575、PCT/JP01/01568.
4. Takasu, K.; Inoue, H.; Kim, H.-S.; Suzuki, M.; Shishido, T.; Wataya, Y.; Ihara, M. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 995–998. (特許) 特開 2003-034640~034642.
5. Takasu, K.; Terauchi, H.; Inoue, H.; Kim, H.-S.; Wataya, Y.; Ihara, M. *J. Combi. Chem.* **2003**, *5*, 211-214. (特許) 特願 2003-334553.
6. In preparation. (特許) 特願 2003-128454.
7. In preparation. (特許) 特願 2002-307611.
8. Takasu, K.; Shimogama, T.; Saiin, C.; Kim, H.-S.; Wataya, Y.; Ihara, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1689–1692.

たかす きよせい

高須 清 誠 (TAKASU, Kiyosei)

1970年12月 京都府生まれ

勤務先 東北大学大学院薬学研究科

医薬製造化学分野

〒980-8578

宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉

Phone 022-217-6879 Fax 022-217-6877

E-mail kay-t@mail.pharm.tohoku.ac.jp

URL <http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seizou>

経歴

1993年 京都大学薬学部卒業 (富士薫教授)

1996年 米国カンザス州立大学化学科研究員 (Duy H. Hua,教授)

1997年 日本学術振興会特別研究員

1998年 京都大学大学院薬学研究科博士課程修了 (富士薫教授)

1998年 東北大学大学院薬学研究科助手 (井原正隆教授) 現在に至る

趣味

笑うこと、格闘技 (プロレス) 観戦

特技

フェンシング、ウクレレ (今は定かでない)

受賞

日本薬学会東北支部奨励賞 (H.12)

有機合成化学協会研究企画賞 (H.13)

第3回天然物談話会奨励賞 (H.15)

研究対象

他に、連続反応プロセスの開発や多環状生理活性天然物の合成研究も行っています。

ひとこと

今ある研究テーマを一所懸命することは大変だけれど、やれば意外とできるものです。しかし自分が一所懸命できるテーマを一から発掘することは、なかなか難しいものですね。

私は、学生の頃から超分子化学、不斉触媒開発、素反応開発、天然物合成、医薬品化学、生物有機化学といろいろ首をつっこんでいますが、自分の芯となる研究は何であるのか迷ってばかりです (どれも面白い・・・)。学生の皆さん、一緒に悩みましょう。そして最後には笑いましょう。