

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：32403

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16029

研究課題名(和文)天然由来化合物を基盤とした菌糸形成阻害による「予防的」抗真菌薬の開発

研究課題名(英文)Development of Antifungal Natural products and their Derivatives with Anti-hyphal Activity against *Candida albicans*

研究代表者

鎌内 等 (Kamauchi, Hitoshi)

城西大学・薬学部・助教

研究者番号：40825402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では深在性カンジダ症の原因菌である *Candida albicans* の酵母形から菌糸形への形態変化を阻害する化合物について天然由来化合物の単離及びその誘導体の化学合成から探索した。海洋由来真菌から単離した dehydrocurvularin は *C. albicans* の菌糸形成阻害活性を示し、さらにヒト細胞上でも同様の効果を示すことが明らかになった。また、クロサイワイタケ科のキノコより単離されたベンゾフェノン化合物 childinin E を合成し、菌糸形成阻害作用を見出した。さらに合成した多環式ピリドン誘導体についても同様に評価し、チオフェンを有する誘導体が有用であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Candida albicans を対象とした酵母形から菌糸形への形態変化を阻害する化合物の探索例は少なく、既存の抗真菌薬を用いて評価されていることが多い。しかし、*C. albicans* における菌糸形成を阻害する化合物は、真菌症治療における予防的な治療を可能にする薬剤の開発に繋がる。今回、天然由来化合物の単離と化学合成によって3タイプの構造式を持つ活性化合物を見出した。このことは予防的な抗真菌薬の創製において新しいアプローチを提案したものと考えている。

研究成果の概要(英文)：This study was isolation and synthesis of compounds with anti-hyphal formation against *Candida albicans* to develop novel type of antifungal agents. As a result, dehydrocurvularin isolated from marine-derived fungus *Curvularia aerea* showed anti-hyphal formation activity. This anti-hyphal formation activity showed on the human cell line. The synthetic pyridone and benzophenone derivatives also showed anti-hyphal formation activity.

研究分野：天然物化学

キーワード： *C. albicans* 菌糸形成 海洋由来真菌 ベンゾフェノン ピリドン

1. 研究開始当初の背景

医療先進国である我が国では高齢者や免疫不全患者を中心に日和見感染症である深在性真菌症の患者数が増加の一途をたどっている。深在性真菌症のうち、カンジダ症は *C. albicans* がその起因菌として 50% を占めており、診断確定に時間を要するにもかかわらず、予後不良であることが多い。そのためカンジダ症の治療には、患者に対して症状がなくても投与する「先制攻撃的治療」など予防的な効果が求められている。

予防的治療を可能にする新たな抗真菌薬のターゲットとして *C. albicans* の菌糸形成機構が注目されている。*C. albicans* は酵母形と菌糸形の 2 つの形態を持つ二形成真菌であり、菌糸形への形態変化は *C. albicans* の生体組織への定着、傷害性を増加させる。さらに、その後のバイオフィーム形成に大きく関与し、薬剤感受性の低下及び耐性獲得の一端となる。よって菌糸形成を阻害する化合物が予防的な効果もつ新たな抗真菌薬として有望であると考えた。

一方で菌糸形成阻害薬を開発する上で課題として挙げられるのは、シード化合物の探索例が十分でないことである。菌糸形成阻害評価を行った化合物の多くは既知の抗真菌薬の構造を基にした誘導体や容易に入手可能な市販品などであり、その構造多様性は限定的である。そこで、構造多様性の豊かな天然由来化合物をターゲットとした菌糸形成阻害化合物の探索を行い、その構造を基盤とした臨床薬候補並びにファーマコフォアモデルの開発研究を展開することにした。

2. 研究の目的

申請者の所属する城西大学生物有機化学講座では真菌類を中心とした天然物抽出エキスライブラリーを所有しており、そのうち複数の抽出エキスに *C. albicans* の増殖を阻害せずに菌糸形成を阻害するものを見出している。本研究ではこれらの抽出エキスから菌糸形成阻害天然物を探索する。また、天然由来化合物の誘導体合成による構造活性相関の検討から菌糸形成阻害におけるファーマコフォアモデルを構築する。

3. 研究の方法

(1) 海洋由来真菌の単離

成分探索を行う天然資源として、多くの抗真菌化合物を輩出している真菌類の二次代謝産物に注目した。真菌は、茨城県沖で採取しペプトン-グルコース-酵母エキス (PGY) 寒天培地にて培養した。単離した真菌は DNA 塩基配列を解析することで同定した。

(2) 海洋由来真菌の培養・化合物の単離

選定した海洋由来真菌は麦培地 (3.2 kg) を用いて 27°C、28 日間培養し、クロロホルム、酢酸エチルにて抽出した。得られたエキスについてシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて化合物の単離を行った。単離した化合物は質量分析、各種 NMR 等の機器を用いてその構造を解析した。

(3) 天然由来化合物の合成

C. albicans の菌糸形成を阻害する化合物を探索するにあたり、多様な生物活性を示した天然由来化合物を中心に合成した。キノコより単離され、高度に酸素化されたベンゾフェノン誘導体である childinin E と、含窒素化合物として *C. albicans* の増殖阻害を示した trichodin A の構造を基調とした 2-ピリドン誘導体を合成ターゲットとした。

(4) 抗真菌活性試験

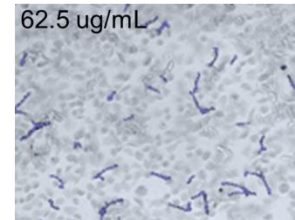
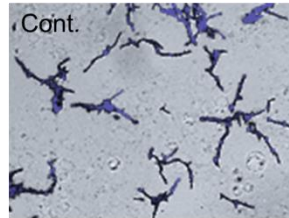
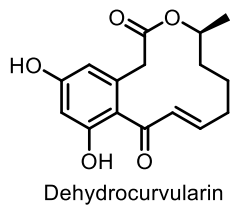
C. albicans (SC5314) は American Type Culture Collection (ATCC) より購入し、PGY 寒天培地にて 27°C、2 日間培養したものを用いた。The Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) の指針に基づき、各化合物の *C. albicans* に対する感受性を評価した。評価は微量希釈法によって行い、最小発育阻止濃度 (MIC) を確認した。菌糸形成阻害試験は、菌糸成長を促進する N-アセチルグルコサミン含有培地及び spider 培地を用いて行った。*C. albicans* と各化合物を菌糸形成を促進する各種培地で 37°C、24 時間培養し、顕微鏡で観察した。菌糸形成の様子を写真に撮影し、画像解析ソフト image J を用いて菌糸長を定量した。

4. 研究成果

(1) 海洋由来真菌 *Curvularia aeria* の成分探索

茨城県鹿嶋港のフジツボから分離された真菌 *Curvularia aeria* クロロホルムエキスについて成分探索を行い、curvularin (1) および dehydrocurvularin (2) の 2 種の芳香族ポリケタイドを単離した。この 2 種の化合物に対し、*C. albicans* の増殖阻害活性を評価した結果、dehydrocurvularin (2) にのみ活性が見られた。Dehydrocurvularin の菌糸形成阻害活性は 24 well プラスチックプレート上では微弱であったが、ヒト肺がん細胞 (A549 細胞) 上ではより低濃度で阻害活性が見られた。このことから、dehydrocurvularin はヒト細胞上で強力な抗真菌活性を示すことが分かった。また、dehydrocurvularin は A549 細胞上において *C. albicans* の細胞接着作用を阻害することが明らかになったため、細胞接着に関する遺伝子発現量を RT-PCR 法にて解析した。その結果、*C. albicans* の細胞接着に関与する遺伝子 (*HWPI*, *EFG1*, *ECE1*) の発現を抑制することが分かった。

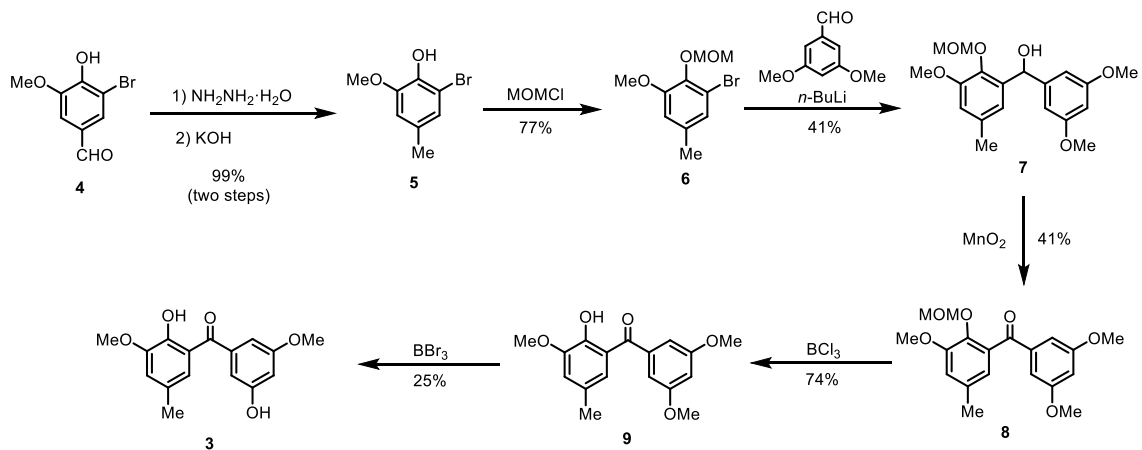
Cell adhesion of *C. albicans*



(2) キノコ由来ベンゾフェノン childinin E の合成

クロサイワイタケ科のキノコより単離されているベンゾフェノン化合物の中で、容易にアクセスが可能と考えられた childinin E (**3**) について合成を行った。まず、ベンゾフェノンの左半部に該当するプロモベンゾフェノンについて合成を行った。市販の 5-ブロモバニリン (**4**) のホルミル基をメチル基へと変換し、さらに水酸基を保護した中間体 **6** を合成した。次に **6** と 3,5-ジメトキシベンズアルデヒドを *n*-BuLi を用いてカップリング反応を行い、ベンズヒドロール **7** を得た。さらに二酸化マンガンを α 位を酸化することでベンゾフェノン **8** を合成した。次に **8** について三塩化ホウ素を用いて MOM 基の脱保護を行い **9** とし、最後に三臭化ホウ素を使った脱メチル化によって目的である childinin E (**3**) の合成を達成した。

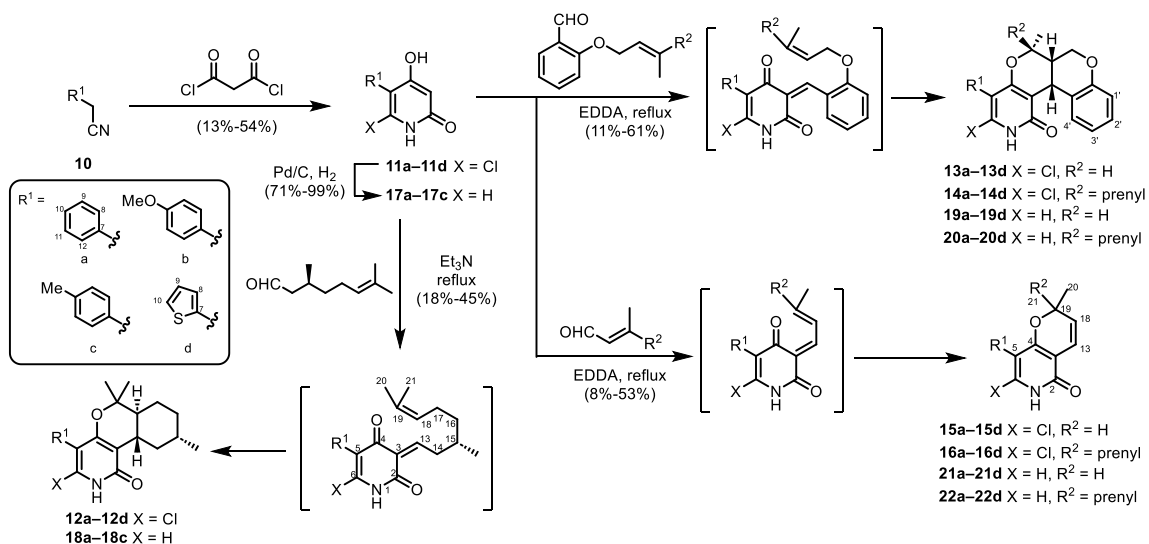
合成した化合物について *C. albicans* における菌糸形成阻害試験を行ったところ、childinin E とその合成中間体である **9** は濃度 25 $\mu\text{g/mL}$ で菌糸形成阻害作用を示した。さらに両化合物は濃度依存的に菌糸形成を阻害することを明らかにした。



(3) ピリドン誘導体の合成

C. albicans の増殖阻害を示した天然由来のピリドン化合物である trichodin A の構造を基に 3,4 位に結合する環状構造の導入と、5 位置換基の多様化をターゲットとした誘導体合成を行った。各種アセトニトリル誘導体 (**10a-10d**) を出発物質とし、マロニルクロリドと反応させピリドン中間体 (**11a-11d**) を合成した。次に、ピリドン中間体を各種アルデヒドをクネーフェナーゲル縮合とディールスアルダー反応のドミノ型反応により環状構造を持つ目的の誘導体 (**12-16**) へと変換した。また、中間体 **11a-11c** の 6 位塩素を水素化した中間体 (**17a-17c**) について、同様の方法でピリドン誘導体 (**18-22**) を合成し計 35 種を得た。

合成した化合物について *C. albicans* における菌糸形成阻害試験を行ったところ、4 種の化合物 (**13c**, **15d**, **21a**, **21c**) が濃度 25 $\mu\text{g/mL}$ で菌糸形成阻害作用を示した。さらに **15d** は *C. albicans* における組織接着、耐性獲得の原因となるバイオフィーム形成阻害を示すことが明らかになった。そのため、化合物 **15d** は菌糸、バイオフィーム形成の 2 つの作用を阻害する抗真菌薬のリード化合物となり得る。また、菌糸阻害活性試験において、5 位の置換基にチオフェンを有するピリドン誘導体はヒット率が高く、この構造が菌糸形成阻害活性におけるファーマコフォアの一部と考えられた。



今回の研究の結果、単離した天然由来化合物、及び合成した天然由来化合物の誘導体から複数種の *C. albicans* 菌糸形成阻害化合物を見出した。これらの化合物は日本で上市されている抗真菌薬の4つのクラス（ポリエン、ピリミジン、アゾール、キャンディン系）の構造式とは類似しておらず、それぞれに特徴的な構造式を有する。このことから、既存薬にない構造式に菌糸形成阻害をターゲットとした抗真菌薬のファーマコフォアが存在することが分かった。さらに、本研究では副作用の指標となる *C. albicans* の増殖阻害を示す化合物は少なかったことから、これら天然由来化合物をリードとすることでより安全性の高い抗真菌薬の開発が可能と考えられる。一方で、今回の結果が菌糸形成阻害に関するファーマコフォアの多様性の高さを示唆していることから、より最適な創薬リードを開発するために更なる探索研究の必要があると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kamauchi Hitoshi, Hirata Momoka, Takao Koichi, Sugita Yoshiaki	4. 巻 61
2. 論文標題 Synthesis and pharmacological evaluation of childinin E and several derivatives as anti-hyphal formation inhibitors against <i>Candida albicans</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 152588 ~ 152588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2020.152588	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kamauchi Hitoshi, Kimura Yu, Ushiwatari Mikoto, Suzuki Mitsuaki, Seki Taishi, Takao Koichi, Sugita Yoshiaki	4. 巻 37
2. 論文標題 Synthesis and antifungal activity of polycyclic pyridone derivatives with anti-hyphal and biofilm formation activity against <i>Candida albicans</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 127845 ~ 127845
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2021.127845	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kamauchi Hitoshi, Furukawa Miho, Kiba Yuka, Kitamura Masashi, Usui Kanako, Katakura Masanori, Takao Koichi, Sugita Yoshiaki	4. 巻 75
2. 論文標題 Antifungal activity of dehydrocurvularin for <i>Candida</i> spp. through the inhibition of adhesion to human adenocarcinoma cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 530 ~ 533
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-022-00543-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鎌内等、木村由、牛渡美琴、關大志、鈴木光明、平田桃香、高尾 浩一、杉田 義昭
2. 発表標題 菌糸-バイオフィルム形成阻害をターゲットとした真菌由来天然物の誘導体合成
3. 学会等名 第63回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鎌内 等、古川 未歩、騎馬 由佳、北村 雅史、片倉 賢紀、高尾 浩一、杉田 義昭
2. 発表標題 真菌由来化合物dehydrocurvularinが示すカンジダ属真菌への接着阻害活性
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村 由、鎌内 等、牛渡 美琴、關 大志、高尾 浩一、杉田 義昭
2. 発表標題 チオフェン含有多環式ピリドン誘導体の合成とCandida albicansの菌糸・バイオフィルム形成阻害活性の評価
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鎌内 等、平田 桃香、高尾 浩一、杉田 義昭
2. 発表標題 キノコ由来ベンゾフェノンChildinin E の合成とCandida albicans菌糸形成阻害活性
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------