

大阪薬科大学 共同研究成果報告書

2016

(2016年4月～2017年3月)

共同研究課題名（研究テーマ）

1. *Vibrio vulnificus* M2799 株の鉄獲得機構の解明・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
(研究代表者：微生物学研究室 教授 辻坊 裕)
2. 多剤耐性菌に有効な新規抗菌薬開発に向けた研究・・・・・・・・・・・・・・・・ 4
(研究代表者：微生物学研究室 教授 辻坊 裕)
3. Prolyl oligopeptidase (POP) substrate selective inhibition kinetics by *in silico*
discovered candidate inhibitors. 7
(研究代表者：生体機能解析学研究室 准教授 坂口 実)
4. 核内受容体モジュレーターによる脂質代謝調節・・・・・・・・・・・・・・・・ 1 1
(研究代表者：病態生化学研究室 教授 藤森 功)
5. 疾患モデル動物を用いたてんかん病態、薬理研究・・・・・・・・・・・・・・・・ 1 3
(研究代表者：薬品作用解析学研究室 教授 大野 行弘)
6. アセトアミノフェン (APAP) 及びそのグルクロン酸代謝物 (AP-glu) の
血中濃度とアセトアミノフェン誘発肝障害との関連性・・ 1 9
(研究代表者：循環病態治療学研究室 教授 林 哲也)
7. 非アルコール性脂肪性肝疾患における血中可溶性
腫瘍壊死因子/受容体 1,2 測定の意義・・・・・・・・ 2 1
(研究代表者：循環病態治療学研究室 教授 林 哲也)
8. シグナル伝達病（がん・糖尿病等）に対する効果的薬物治療法開発
のための基礎研究・・・・・・・・ 2 3
(研究代表者：基礎薬学教育研究センター 教授 尾崎 恵一)

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 微生物学研究室
職・氏名 教授・辻坊 裕

研究テーマ：

Vibrio vulnificus M2799 株の鉄獲得機構の解明

研究期間：

平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 辻坊 裕 (大阪薬科大学・薬学部・教授)
研究分担者 宮本勝城 (大阪薬科大学・薬学部・准教授)
研究分担者 土屋孝弘 (大阪薬科大学・薬学部・講師)

<共同研究機関>

研究代表者 舟橋達也 (松山大学・薬学部・教授)
研究分担者 田邊知孝 (松山大学・薬学部・講師)

研究目的：

Vibrio vulnificus は、汚染された魚介類の摂食や海水の創傷部曝露等を介して、全身性の感染症を引き起こす細菌である。一般に、鉄はほとんどの生物の生存と増殖に不可欠な元素であるが、宿主生体内において病原菌が自由に利用できる遊離鉄は極めて少ない。したがって、宿主生体内で増殖し得る病原菌は、何らかの巧妙な鉄獲得系を保持しているはずである。そこで、我々は臨床分離株 *V. vulnificus* M2799 株の鉄獲得系タンパク質を網羅的に明らかにする目的で、プロテオーム解析を行った。次に、鉄欠乏下で発現量が増大するタンパク質群のうち、本菌株の産生するシデロフォアである *Vulnibactin* を介する鉄取り込み機構に関与するタンパク質の遺伝子欠損株を作製した。すなわち、イソコリスミン酸合成酵素 (ICS)、*Vulnibactin-Fe³⁺* 複合体を基質とする鉄還元酵素 (*VuuB*)、*Vulnibactin-Fe³⁺* 複合体の外膜レセプター (*VuuA*)、および *Vulnibactin-Fe³⁺* 複合体のペリプラズム結合タンパク質 (*FatB*) の欠損株を作製した。これらの欠損株の鉄欠乏下における増殖能について検討したところ、ICS および *VuuA* 遺伝子欠損株では増殖が顕著に抑制されたが、*VuuB* および *FatB* 遺伝子欠損株においては遅いながらも増殖が確認された。以上の結果から、*VuuB* および *FatB* にはそれぞれ代替タンパク質が存在することが示唆され、さらなる解析によって、*Vulnibactin-Fe³⁺* 複合体のペリプラズム結合タンパク質は *FatB* が中心となって機能するが、*VatD* で代替可能であることが推測された。そこで、*FatB* および *VatD* タンパク質の高発現系を構築して、両タンパク質の構造解析を試みた。

本年度の研究内容および研究成果：

本年度は FatB および VatD タンパク質の高発現系を構築した。すなわち、His タグ融合タンパク質として発現する高発現系ベクター pProEX HTa にそれらの遺伝子を導入し、大腸菌 BL21 株を形質転換した。得られた形質転換株から目的タンパク質の発現を試みた結果、HisFatB は封入体を形成したが、HisVatD は、20°C で 18 時間誘導することにより可溶化状態で回収することができた。そこで、HisVatD タンパク質を Ni-Sepharose 6FF および HiLoad Superdex 75pg クロマトグラフィーにより、電気泳動的に均一にまで精製し、AcTEV プロテアーゼで処理することにより His タグを切断後、再度 Ni-Sepharose 6FF カラムクロマトグラフィーを行い、非吸着画分から VatD タンパク質を回収した。VatD 精製標品を、Amicon Ultra-15 遠心式フィルターユニット(10,000 NMWL)により 10 mg/ml まで濃縮し、これを VatD-Apo 体の結晶化サンプルとした。また、Deferoxamine に FeCl₃ 溶液を用いて Deferoxamine-Fe³⁺ を作製し、VatD : Deferoxamine-Fe³⁺ = 1 : 3 になるように混合して、これを VatD-Deferoxamine-Fe³⁺ 複合体の結晶化サンプルとした。蒸気拡散法によりこれらの結晶を作製し、リガク社製 X 線回折装置 (R-Axis VII) および SPring-8 (BL38B1) により X 線回折強度測定を行った。これらのデータから分子置換法により初期位相を決定し、それを基に構造精密化を行い、構造を決定した。その結果、VatD-Apo 体では、分解能 2.6 Å、R factor = 17.4%、VatD-Deferoxamine-Fe³⁺ 複合体では分解能 1.85 Å、R factor = 21.9% で構造を決定した。X 線解析データから構造解析を行ったところ、VatD の全体構造は N-domain と C-domain から構成されており、両ドメインは long α-helix で繋がっていた。VatD-Deferoxamine-Fe³⁺ 複合体の解析により、それらのドメイン間に Deferoxamine-Fe³⁺ が結合していることが明らかとなった。Deferoxamine-Fe³⁺ は VatD の Arg69 および Arg177 と直接および水分子を介した水素結合を形成していることが確認できた。また、本結合領域はトリプトファンやフェニルアラニンなどの疎水性残基が多く確認でき、Trp53、Trp205 および Phe263 の 3 残基で疎水性相互作用を形成していた。さらに、Apo 体と複合体との構造比較により、両構造において N-domain から long α-helix までは、良く一致した構造であったのに対して、Apo 体の C-domain は外側にシフトしていることが明らかとなった (図)。Apo 体において、本結合領域近隣に存在する Gly227、Pro228 の温度因子が高く不安定であることから、Deferoxamine-Fe³⁺ の結合に伴い、VatD の Trp53、Pro228、Arg169、Thr262 の各アミノ酸残基および隣接する水分子と相互作用ネットワークを形成することにより、C-domain が Deferoxamine-Fe³⁺ 側に動き、結合サイトの構造を安定化しているのではないかと推測された。今後、FatB についても同様に精製し、構造解析を行う予定である。

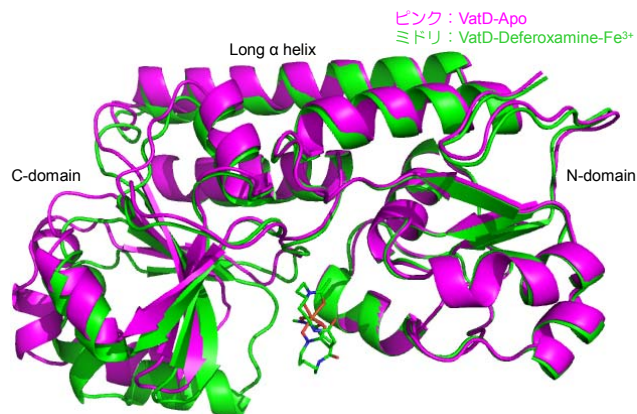


図. VatD-ApoとVatD-Deferoxamine-Fe³⁺との構造比較

成果発表：

<原著論文>

- Hiroaki Kawano, Katsushiro Miyamoto, Miho Negoro, Eriko Zushi, Takahiro Tsuchiya, Tomotaka Tanabe, Tatsuya Funahashi, Hiroshi Tsujibo.
IutB participates in the ferric-vulnibactin utilization system in *Vibrio vulnificus* M2799.
Biomaterials **30**:203-216 (2017).

<学会発表>

- 宮本勝城、河野広朗、熊田アンリオバディア、土屋孝弘、田邊知孝、舟橋達也、辻坊 裕
Vibrio vulnificus M2799 株の Vulnibactin-Fe³⁺還元酵素の探索
日本薬学会日本薬学会第 137 年会 宮城 (2017 年 3 月).
- 宮本勝城、河野広朗、土屋孝弘、田邊知孝、舟橋達也、辻坊 裕.
Vibrio vulnificus M2799 株の鉄獲得機構の解明.
第 66 回日本薬学会近畿支部総会・大会 大阪 (2016 年 10 月).
- 中村祐太、原田健司、藤澤 巧、大濱宏伸、土屋孝弘、宮本勝城、辻坊 裕.
Vibrio vulnificus M2799 株の鉄獲得機構の解明.
第 66 回日本薬学会近畿支部総会・大会 大阪 (2016 年 10 月).
- 宮本勝城、河野広朗、土屋孝弘、田邊知孝、舟橋達也、辻坊 裕.
Vibrio vulnificus M2799 株の鉄獲得機構の解明.
第 28 回微生物シンポジウム 愛知 (2016 年 9 月).

<その他>

- 宮本勝城
臨床分離株 *Vibrio vulnificus* M2799 株の鉄獲得機構の解明.
医工薬連携の会 関西大学 (2016 年 4 月).

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 微生物学研究室
職・氏名 教授・辻坊 裕

研究テーマ：

多剤耐性菌に有効な新規抗菌薬開発に向けた研究

研究期間：

平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者	辻坊 裕	(大阪薬科大学・薬学部・教授)
研究分担者	宮本 勝城	(大阪薬科大学・薬学部・准教授)
研究分担者	土屋 孝弘	(大阪薬科大学・薬学部・講師)

<共同研究期間>

研究代表者	良原 栄策	(東海大学・工学部・客員准教授)
-------	-------	------------------

研究目的：

Acinetobacter 属細菌は自然界に広く生息するグラム陰性の日和見感染菌である。院内感染では重篤な基礎疾患を有し、人工呼吸器を使用している患者においては肺炎、血管カテーテルを挿入している患者においては菌血症を引き起こすほか、外傷感染、手術部位感染、尿路感染、敗血症、髄膜炎、心内膜炎、腹膜炎などの起因菌となることが知られている。また、室温程度でも適度な栄養源と水分があればゆっくりと生育を続け、バイオフィルムを産生することにより乾燥にも一定期間は耐え得る能力を有していることから、一度医療環境が汚染されてしまうと消滅させにくい傾向が見られる。本菌は緑膿菌と並び特に高頻度で薬剤耐性を獲得することから、院内感染においては非常に問題となっている。

グラム陰性細菌の外膜タンパク質の多くは、 β -バレル構造をもつタンパク質である。外膜タンパク質には薬剤排出ポンプなど様々なトランスポーターが含まれており、それらは薬剤耐性やバイオフィルム形成に必須であるため、創薬のターゲットとして注目されている。これらの外膜タンパク質のフォールディングや外膜への挿入には β -barrel assembly machinery (Bam) 複合体が重要な役割を担っている。Bam 複合体は BamA, B, C, D および E から構成されており、BamA と BamB および BamD が直接結合している。我々はこの結合を阻害する物質を創製することにより、Bam 複合体を標的とした新たな抗菌物質を開発することを目的とする。

本年度の研究内容および研究成果：

Acinetobacter baumannii の基準株 ATCC19606 株，臨床分離株 A112-II-a を用いて，Bam 複合体の結合阻害物質の増殖，殺菌活性，感染モデルマウスへの治療効果を測定した．BamB との結合阻害物質である K5FS3 は 20 μ M で ATCC19606 株の増殖を完全に抑制し，10 μ M で A112-II-a 株の増殖を完全に抑制した．殺菌活性は 10 μ M 以下の濃度では両菌株に対し認められなかった．バイオフィルム形成能に対する影響は，PBS と比較し K5FS3 は菌数には影響を与えない 10 μ M においてバイオフィルム形成は有意に減少した．また，抗 Gr1 抗体を前投与することにより好中球を減少させたマウスに，A112-II-a を経鼻的に投与することで肺炎モデルマウスを作製した．このマウスに各種濃度の K5FS3 を経鼻的に投与すると，濃度依存的にマウスの致死率が低下した．

BamD との結合阻害物質である K5FI2 は 5 μ M で ATCC19606 株の増殖を一部抑制し，10 μ M では完全に抑制した．また A112-II-a 株の増殖は 5 μ M で完全に抑制した．殺菌活性は 10 μ M で両菌株に対し有意に殺菌活性が認められた．肺炎モデルマウスに K5FI2 を経鼻的に投与すると，濃度依存的にマウスの致死率が低下した．

これらの結果より，BamA と BamB との結合または BamA と BamD との結合を阻害することにより本菌の増殖やバイオフィルム形成能およびマウスに対する致死活性を低下させることが可能であることが明らかとなった．つまり Bam 複合体の形成阻害物質は本菌に対する新規抗菌物質として非常に有用であることが明らかとなった．また，BamA と BamB との結合よりも BamA と BamD との結合を阻害する方が，その効果が高いことが明らかとなった．

成果発表：

＜原著論文＞

- ・なし

＜学会発表＞

- ・土屋孝弘，宮本勝城，良原栄策，辻坊 裕.
Bam 複合体を標的としたアシネトバクターに対する新規抗菌物質の開発
第 28 回微生物シンポジウム 名古屋 (2016 年 9 月)
- ・鎌田高天，芦澤穂波，吉田浩子，西村紗也華，千田安香莉，坂東麻悠，岡本茜，土屋孝弘，
宮本勝城，良原栄策，辻坊裕
Bam 複合体を標的としたアシネトバクターに対する新規抗菌物質の開発
第 66 回日本薬学会近畿支部総会・大会 大阪 (2016 年 10 月)
- ・土屋孝弘，宮本勝城，良原栄策，辻坊 裕
Bam 複合体を標的とした新規抗菌物質の開発
第 66 回日本薬学会近畿支部総会・大会 大阪 (2016 年 10 月)

- ・千田安香莉, 芦澤穂波, 鎌田高天, 吉田浩子, 土屋孝弘, 宮本勝城, 良原栄策, 辻坊 裕.
Bam 複合体を標的とした多剤耐性菌に対する新規抗菌物質の開発
第 90 回日本細菌学会総会 仙台 (2017 年 3 月)

<その他>

- ・なし

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 生体機能解析学研究室
職・氏名 准教授 坂口 実

研究テーマ : Prolyl oligopeptidase (POP) substrate selective inhibition kinetics by *in silico* discovered candidate inhibitors.

研究期間 :

平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

研究担当者 :

<本学>

研究代表者 坂口 実 (大阪薬科大学・薬学部・准教授)

<共同研究機関>

研究代表者 Prof. Amiram Goldblum
(Molecular Modeling and Drug Design, Institute for Drug Research,
The Hebrew University of Jerusalem)

研究目的 :

本共同研究は、プロリルオリゴペプチダーゼ (POP) をモデル酵素として、特定の基質に対する分解活性だけを阻害すると推定される化合物を、市販化合物の中から *in Silico* スクリーニングによってピックアップし、*in vitro* で酵素速度論的に解析して、基質選択的な阻害作用を実験的に証明することを目的とする。

モデル酵素として使用する POP は、30 アミノ酸残基以下のオリゴペプチドに作用して、ペプチド鎖内の Pro 残基のカルボキシ側のペプチド結合を加水分解するセリンペプチダーゼであり、生体内で生理活性ペプチドのプロセッシングや不活性化にかかわっていると考えられている。Pro 残基を有するヘプタペプチド Angiotensin III (Ang III) とトリペプチドである thyrotropin-releasing hormone (TRH) はどちらも POP の基質となるペプチドであるが、POP のこれらに対する Km 値はそれぞれ 0.6 μM と 98 μM と報告されており、基質ペプチドの鎖長によって極端に Km 値が異なる。したがって、活性部位において長鎖ペプチドの場合だけ相互作用する領域を部分的にブロックすることができれば、短鎖ペプチドの加水分解には影響を及ぼさない活性阻害薬となる可能性がある。このような基質を選択するという新しいコンセプトに基づく酵素阻害薬の開発は、酵素阻害作用を示す医薬品の副作用の軽減につながる事が期待できる。

Substrate	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	Km (μM)
Angiotensin III	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Phe	0.6
TRH			pGlu	His	Pro	NH ₂	98
Inhibition	Designed Inhibitor						

本年度（H28 年度）の研究内容および研究成果：

昨年度（H27 年度）、Prof. Amiram Goldblum から送られてきた 20 の候補化合物について、POP に対する阻害活性を測定した。その結果、化合物 No. T6816369 と T5450157 (Fig. 1) に POP 阻害活性があることを見出し、Ang III および TRH に対する POP の分解活性に及ぼす阻害活性 (IC₅₀ 値) を測定した (Table 1)。

Table 1. T6816369 と T5450157 の IC₅₀ 値

IC ₅₀ (μM)	Ang III	TRH
T6816369	192.8	33.8
T5450157	> 500	127.7

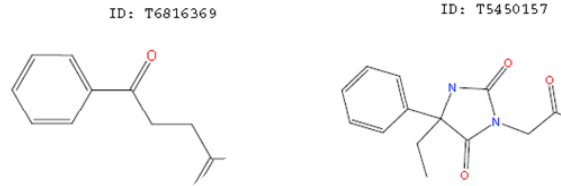


Fig. 1 T6816369 と T5450157 の構造
(部分構造)

本年度は、上記の 2 化合物について、POP 活性阻害作用の反応速度論的解析を行った。酵素反応条件および酵素反応生成物の HPLC による定量は昨年度と同じ方法で行った。

① POP の Ang III に対する Km 値に及ぼす T6816369 と T5450157 の影響

【方法】 各濃度 (0.333, 0.4, 0.5, 0.667, 1, 2 μM) の Ang III について POP の反応速度に及ぼす T6816369 (50 μM) と T5450157 (100 μM) の影響を、Lineweaver-Burk plot 法および Michaelis-Menten 式による解析法で検討した。

【結果】

Fig. 2 Lineweaver-Burk plot 法

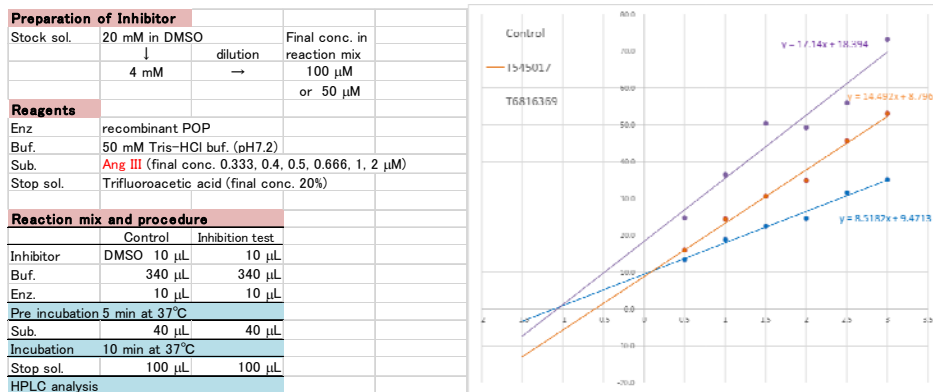


Fig.3 Michaelis-Menten 法

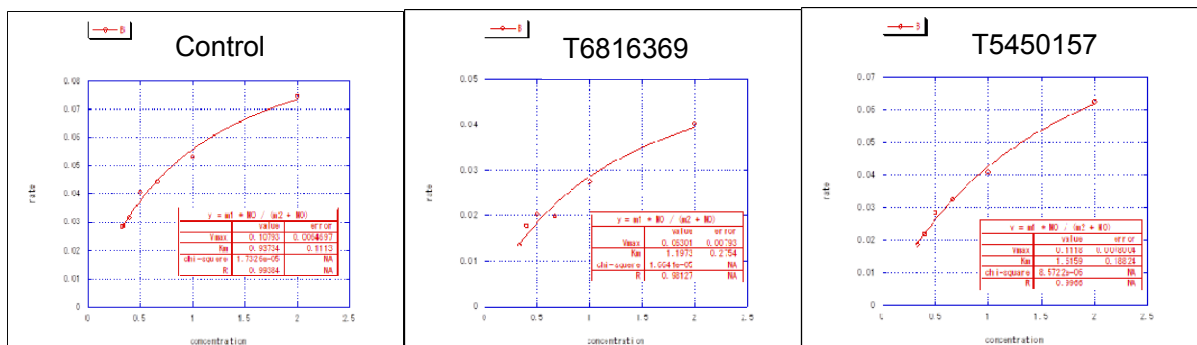


Table 2 それぞれの解析から得られた Ang III に対する Km 値と Vmax 値

	Lineweaver-Burk plot		Michaelis-Menten	
	Km	Vmax	Km	Vmax
Control	0.899	0.106	0.937	0.108
T5450157 (100 μM)	1.647	0.114	1.616	0.112
T6816369 (50 μM)	0.932	0.054	1.197	0.063

② POP の TRH に対する Km 値に及ぼす T6816369 と T5450157 の影響

【方法】 各濃度 (0.1, 0.2, 0.333, 0.4, 0.5, 0.666, 1.0, 2.0 mM) の TRH について POP の反応速度に及ぼす T6816369 (50 μM) と T5450157 (100 μM) の影響を、Lineweaver-Burk plot 法および Michaelis-Menten 式による解析法で検討した。

【結果】

Fig. 4 Lineweaver-Burk plot 法

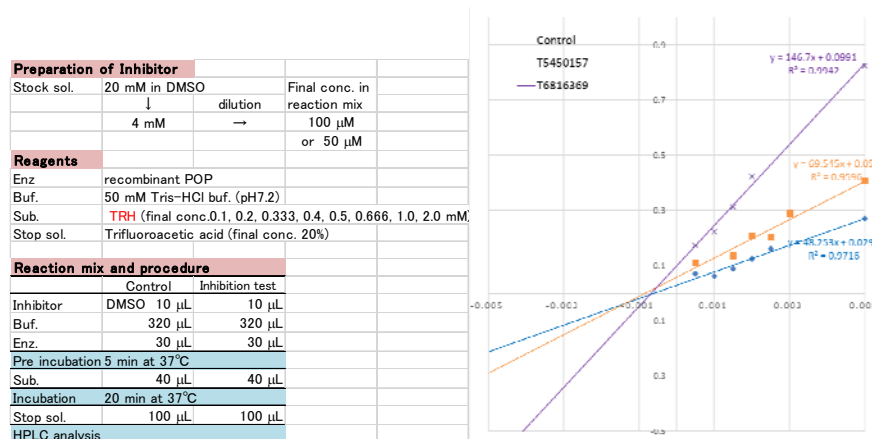


Fig. 5 Michaelis-Menten 法

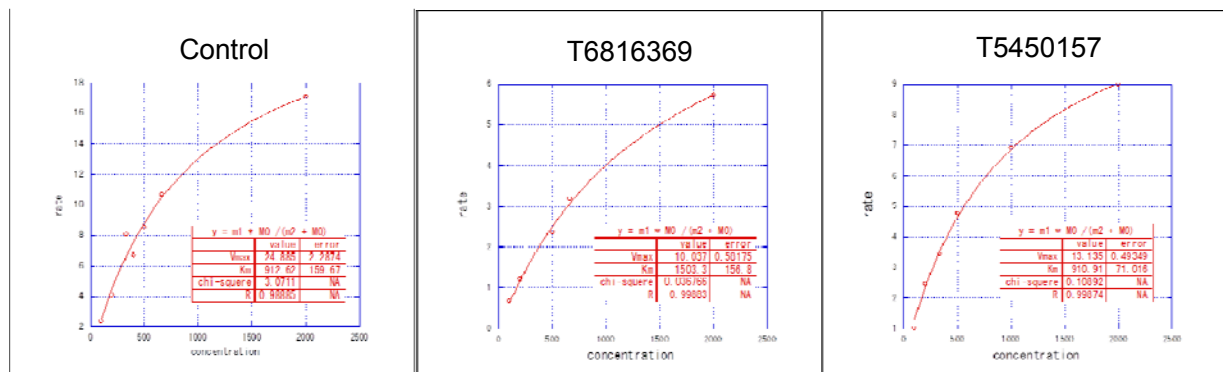


Table 3 それぞれの解析から得られた TRH に対する Km 値と Vmax 値

		Lineweaver-Burk plot		Michaelis-Menten	
		Km	Vmax	Km	Vmax
Control		1611.1	33.39	912.6	24.89
T5450157	(100 μM)	1179.5	16.96	910.9	13.14
T6816369	(50 μM)	1481.0	10.10	1503.3	10.04

③ まとめ

【阻害様式の推測】

Lineweaver-Burk plot から、両化合物の阻害様式を推測した。

Fig. 2 より、POP による Ang III の分解に対して、T5450157 は拮抗阻害 (competitive inhibition) で、T6816369 は非拮抗阻害 (non-competitive inhibition) の様式で阻害すると考えられた。また Fig. 4 より、POP による TRH の分解に対して T5450157 と T6816369 は共に非拮抗阻害の様式で阻害していることが推測された。

【基質選択性の比較】

本研究目的は、Ang III の分解活性に阻害作用を示し、TRH 分解には影響しない基質選択性を示す POP 阻害物質を見出すことである。その基質選択性の指標として、阻害薬なしの control と阻害物質存在下について、Km (Ang III)/Km (TRH) の値を比較した。すなわち、この値が大きいほど Ang III に対する選択性が高いことを示す。なお Km 値は、低基質濃度で誤差が生じやすい Lineweaver-Burk plot より精度が高い Michaelis-Menten 式で求めた値で検討した。その結果、control の $0.937/912.6 = 1.03 \times 10^{-3}$ に対して、T5450157 は $1.616/910.9 = 1.77 \times 10^{-3}$ 、T6816369 は $1.197/1503.3 = 0.80 \times 10^{-3}$ となった。

以上の結果から、POP の Ang III 分解に拮抗阻害を示す T5450157 の方が、T6816369 よりも Ang III に選択性を示す傾向が高いことが示された。今後、T5450157 の構造をもとに、より高い選択性を示す化合物のスクリーニングを行っていきたい。

成果発表：

<原著論文>

- ・未発表

<学会発表>

- ・未発表

<その他>

- ・なし

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 病態生化学研究室
職・氏名 教授・藤森 功

研究テーマ：

核内受容体モジュレーターによる脂質代謝調節

研究期間：

平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 藤森 功（大阪薬科大学・薬学部・教授）

<共同研究機関>

研究代表者 手納 直規（広島国際大学・栄養学部・教授）

研究分担者 井口 裕介（広島国際大学・薬学部・講師）

研究目的：

肥満は多くの生活習慣病の発症原因であり、肥満の予防や解消はこれら疾患の発症を抑えるためにも重要である。しかしながら、肥満の制御機構は複雑であり、それ故、未だ画期的な抗肥満薬の開発に至っていない。核内受容体の一つである farnesoid X receptor (FXR) は脂肪細胞の分化制御に関わっていることが知られているが、その作用機構について未だ解明されていない。本研究では、新規に合成した FXR antagonist による脂肪細胞分化抑制効果を検討するとともに、FXR の機能抑制による脂肪細胞の分化抑制の制御機構について解析した。

本年度の研究内容および研究成果：

広島国際大学において合成された新規 FXR antagonist #123 を 0～10 μM 存在下で、マウス脂肪細胞 3T3-L1 細胞を、6 日間培養した。培養後、WST アッセイにより細胞障害性を調べたところ、今回、検討した 10 μM までは細胞障害性を示さなかった (Fig. 1)。

次に、FXR antagonist #123 (10 μM) 存在下で、3T3-L1 細胞を、6 日間、脂肪細胞へと分化させた。6 日目に、RNA を抽出し、脂肪細胞分化マーカー遺伝子および FXR の標的遺伝子の発現レベルの変化を調べた。FXR antagonist #123 は脂肪細胞における脂肪滴の蓄積を抑制した (Fig. 2)。

また、抽出した RNA を用いて、FXR の標的遺伝子の一つである small heterodimer partner (SHP) の遺伝子発現レベルの変化を

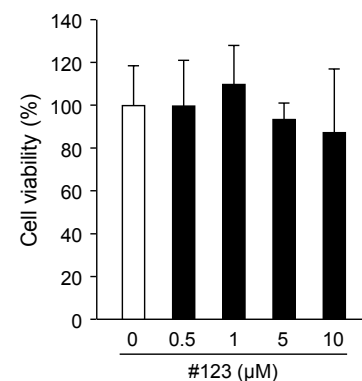


Fig. 1. FXR antagonist #123の脂肪細胞における細胞障害性の検討

リアルタイム PCR により調べた。3T3-L1 細胞を、FXR agonist である GW4064 と FXR antagonist #123 存在下で脂肪細胞へと分化させたところ、SHP 遺伝子の発現は GW4064 による FXR 活性化により上昇した。一方で、GW4064 による SHP 遺伝子の発現レベルの上昇は、FXR antagonist #123 を共存させることにより抑制された (Fig. 3)。

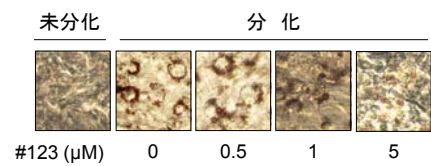


Fig. 2. FXR antagonist #123による脂肪細胞の分化抑制

次に、FXR antagonist #123 存在下で脂肪細胞へと分化させた 3T3-L1 細胞における脂肪細胞分化マーカー遺伝子の発現レベルの変化を調べたところ、PPAR γ 、aP2 および C/EBP α の遺伝子発現レベルは、いずれも脂肪細胞への分化誘導により上昇した。一方、FXR antagonist #123 存在下で分化させた脂肪細胞では、いずれの遺伝子発現も非存在下で分化誘導した場合と比べて低下した (Fig. 4)。

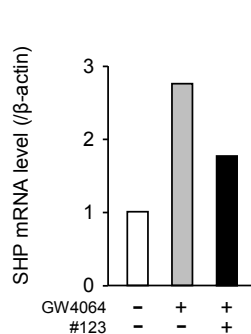


Fig. 3. 分化させた脂肪細胞における FXR antagonist #123によるSHPの発現レベルの変化

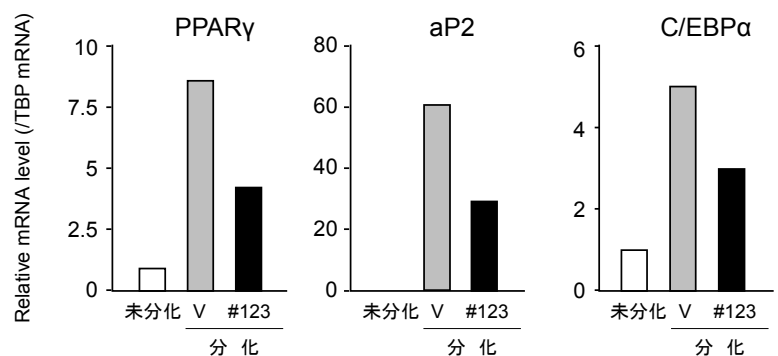


Fig. 4. FXR antagonist #123による脂肪細胞分化マーカー遺伝子の発現レベルの変化

以上の結果より、今回新規に合成した FXR antagonist #123 は脂肪細胞の分化を抑制することが示された。今後、FXR による脂肪細胞分化調節機構について、さらに解析を進めていく予定である。

成果発表：

<原著論文>

- ・なし

<学会発表>

- ・なし

<その他>

- ・なし

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 薬品作用解析学研究室
職・氏名 教授・大野 行弘

研究テーマ：

疾患モデル動物を用いたてんかん病態、薬理研究

研究期間：

平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 大野 行弘 (大阪薬科大学・薬学部・教授)
研究分担者 清水 佐紀 (大阪薬科大学・薬学部・助手)

<共同研究機関>

研究代表者 池田 昭夫 (京都大学・医学部附属病院・教授)

研究目的：

てんかんは人口の約 1%に認められる重篤な神経疾患であり、難治性てんかん患者は 20～30%にのぼる。しかし、てんかんの発症メカニズムや遺伝学的背景については未だ不明な点が多い。本研究では、種々の疾患モデル動物を用い、てんかんの病態メカニズムおよび抗てんかん薬の作用機序を解析し、新たな治療法を探索する。

本年度の研究内容および研究成果：

1. ニコチン性アセチルコリン受容体のけいれん性疾患、運動障害性疾患における病態機序の解明
①ニコチン性アセチルコリン(nACh)受容体を介したけいれん発現機序：nACh 受容体のけいれん発現における機能とメカニズムを明らかにする目的で、ニコチン誘発けいれんに関与する nACh 受容体サブタイプの同定と、神経興奮マーカーである Fos 蛋白の発現解析による脳興奮部位の探索を行った。その結果、ニコチンによるけいれん発現がサブタイプ非選択的 nACh 受容体拮抗薬の mecamylamine、 $\alpha 7$ nACh 受容体拮抗薬の methyllycaconitine により拮抗され、 $\alpha 4$ nACh 受容体拮抗薬の dihydro- β -erythroidine によって影響を受けないことを見出し、ニコチンが $\alpha 7$ nACh 受容体を介してけいれん発作を誘発することを明らかにした (Fig. 1)。また、ニコチン誘発けいれんを呈した動物の脳では、梨状葉皮質、扁桃核内側核、内側手綱核、視床、視床下部、孤束核において Fos 発現が有意に上昇しており、これら部位の神経興奮がけいれん発現に関与していることが示された (Fig. 2)。さらに、これら脳部位を電気破壊した結果、扁桃核の破壊によりニコチン誘発けいれんは特異的

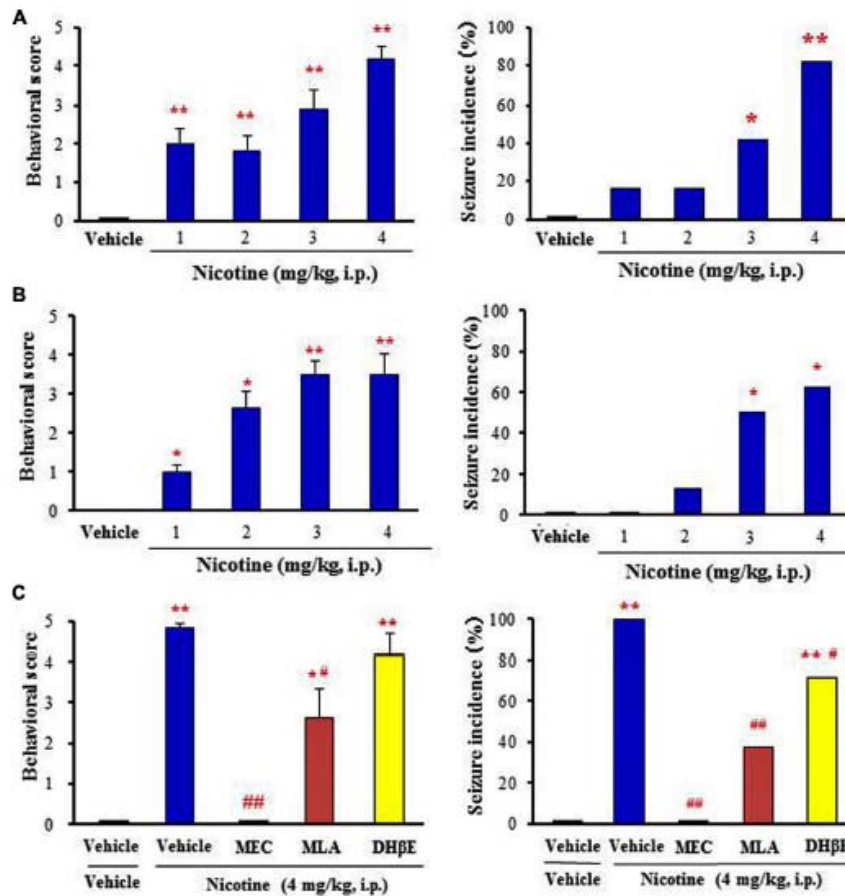


Fig.1. Induction of convulsive seizure by nicotine in mice (A) and rats (B) and its reversal by nACh receptor antagonists (C).
MEC: mecamlamine, MLA: methyllycaconitine, DHβE: dihydro-β-erythroidine.

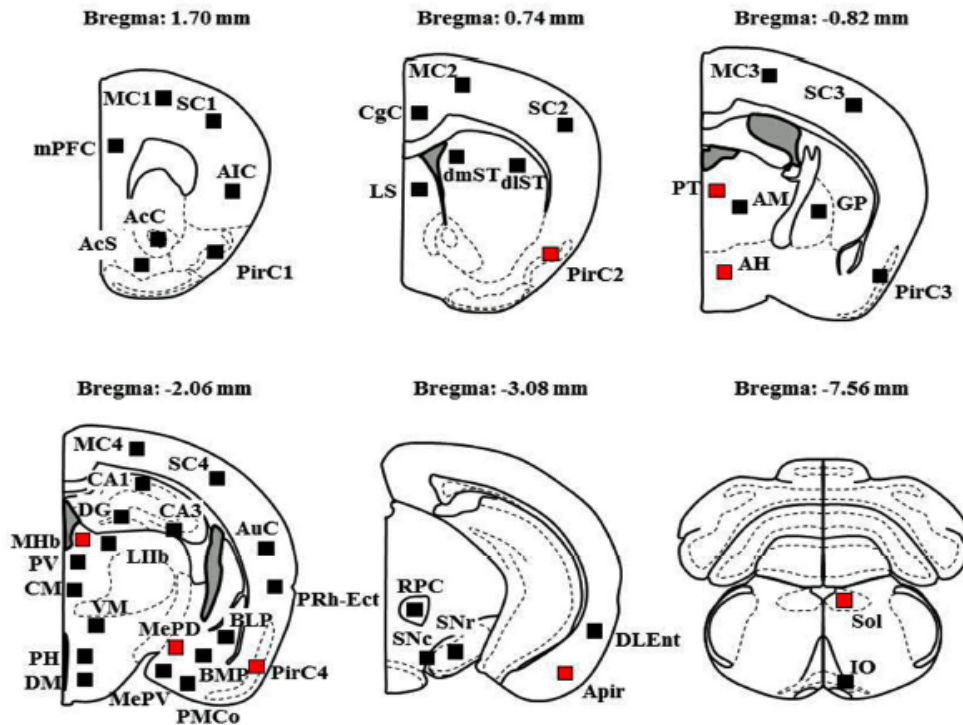


Fig.2. Schematic illustrations of the brain sections selected for quantitative analysis of Fos expression.
Red square express the excitation sites by nicotine 4 mg/kg (i.p.)

に抑制された。また、ニコチンの扁桃核内への微量局所投与によって、けいれん発作が発現した。以上の結果から、脳内アセチルコリン神経系は、 $\alpha 7$ nACh 受容体を介して扁桃核神経を興奮し、全般性けいれん発作を誘発することが明らかとなった。これらの研究成果は、**Frontiers in Pharmacology**, 8:57 (2017)に掲載された。

② ニコチン性アセチルコリン(nACh)受容体を介した振戦発現機序：ニコチンは比較的低用量で動作時振戦を誘発することを見出している。そこで、ニコチン誘発振戦の発現メカニズムを解明する目的で行動薬理学的および免疫組織化学的検討を行った。その結果、ニコチンは 0.5~2 mg/kg の低用量で挙尾および振戦を誘発した (Fig. 3)。このニコチン誘発振戦は methyllycaconitine および $\alpha 7$ nACh

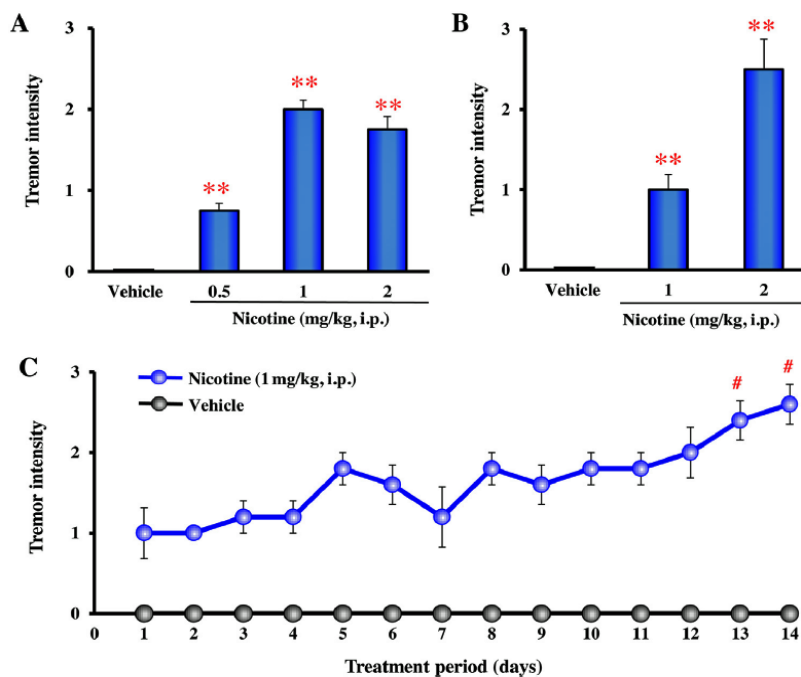


Fig.3 Tremor induction by acute nicotine treatment in mice (A) and rats (B) and by repeated nicotine treatment in rats (C).

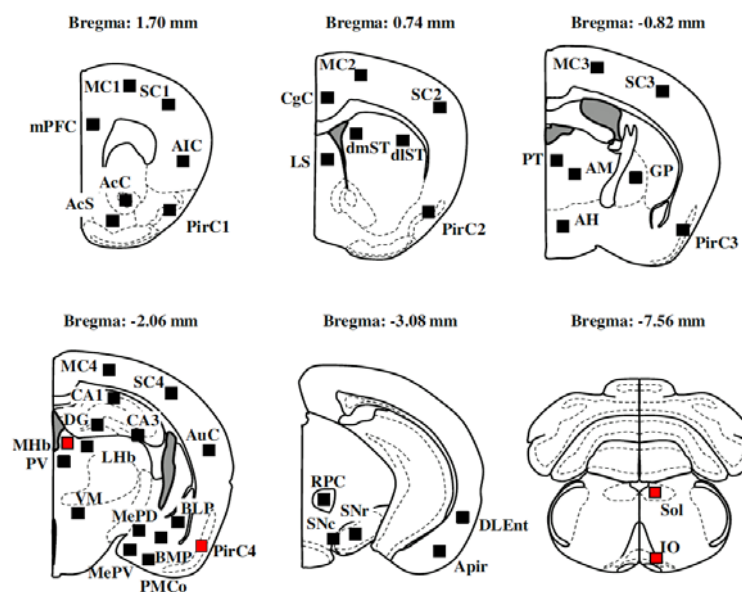


Fig.4 Excitation sites (red square) induced by tremorigenic dose (1 mg/kg, i.p.) of nicotine in mice.

受容体拮抗薬の methyllycaconitine により有意に抑制され、 $\alpha 4$ nACh 受容体拮抗薬の dihydro- β -erythroidine によっては抑制されなかったことから、 $\alpha 7$ nACh 受容体を介する反応であると考えられた。Fos 蛋白発現を指標とした脳興奮部位の探索では、ニコチン 1 mg/kg 投与により、梨状葉皮質(PirC)、内側手綱核、孤束核、下オリーブ核 (IO) において有意な神経興奮が認められた(Fig. 4)。

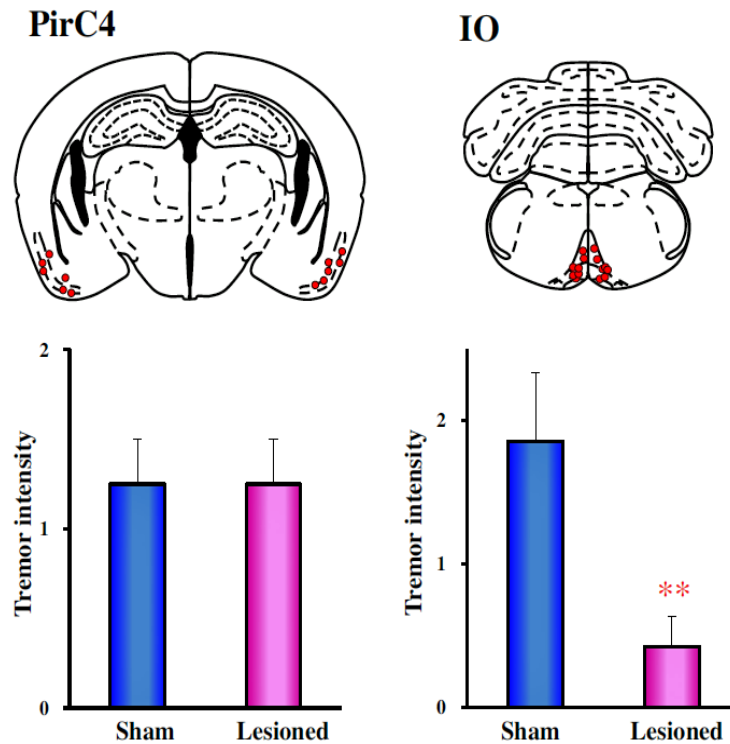


Fig.5 Effects of electric lesioning in the piriform cortex (PirC4) and inferior olive (IO) on nicotine-induced tremor in rats.

これらの脳興奮部位を電氣的に破壊し、原因部位を探索した結果、下オリーブ核の破壊によりニコチン誘発振戦は抑制された(Fig. 5)。以上の結果から、脳内アセチルコリン神経系は、 $\alpha 7$ nACh 受容体を介して下オリーブ核神経を興奮し、動作時振戦を誘発することが明らかとなった。これらの研究成果は、**Behavioral Brain Research**, 314, 173-180 (2016)に掲載された。

2. 脳アストロサイトに着目したてんかん病態研究

グリア細胞は、これら神経細胞を支え、脳内環境の恒常性を維持する支持組織と古くから考えられてきた。しかし、近年では、「神経細胞-グリア間のクロストーク」とも呼ばれる相互作用を介して、より直接的に神経細胞の活動を調節していることが明らかになっている。特に、グリア細胞の主要な構成成分であるアストロサイトは、1)神経系の構造維持、2)神経細胞へのエネルギーの供給、3)血液-脳関門の構築による脳内環境の維持が古くから知られてきたが、最近では、神経伝達物質の取り込みと分泌、イオン環境の恒常性維持、神経栄養因子 (neurotrophic factors) やサイトカインの分泌をはじめとする多彩な機能を示し、神経細胞の興奮性ならびに可塑性の調節に重要な役割を果たしていることが知られている。我々は、アストロサイトの機能のうち、シナプス周囲の細胞外 K^+ 濃度を一定に保つ空間的 K^+ 緩衝機能に着目し、この機能を担う内向き整流性 K^+ チャンネル (Kir4.1 チャンネル) のてんかん発症における役割を探ることとした。現在、ピロカルピン誘発側頭葉てんかんモデル動物、LGI1 変異ヒト外側側頭葉てんかんモデルなどの動物モデルを用いて、てんかん病態におけるアスト

ロサイト Kir4.1 チャンネルの発現変動を検討中である。また、アストロサイトの初代培養系を用いて、アストロサイトの機能低下に伴うアストロサイトの機能変化についても解析中である。

成果発表：

<論文>

1. N. Kunisawa, H. A. Iha, S. Shimizu, K. Tokudome, T. Mukai, M. Kinboshi, T. Serikawa, Y. Ohno: Nicotine evokes kinetic tremor by activating the inferior olive via $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors., **Behavioral Brain Research**, 314, 173-180 (2016)
2. H.A. Iha, N. Kunisawa, S. Shimizu, K. Tokudome, T. Mukai, M. Kinboshi, A. Ikeda, H. Ito, T. Serikawa, Y. Ohno: Nicotine Elicits Convulsive Seizures by Activating Amygdalar Neurons., **Frontiers in Pharmacology**, 8:57 (2017)
3. H.A. Iha, N. Kunisawa, K. Tokudome, T. Mukai, M. Kinboshi, S. Shimizu, Y. Ohno: Immunohistochemical analysis of Fos protein expression for exploring brain regions related to central nervous system disorders and drug actions., In “**In Vivo Neuropharmacology and Neurophysiology**” edited by A. Philippou, Springer, New York, **Neuromethods**, 121, 389-408 (2017)

<学会発表>

1. Naofumi Kunisawa, Higor A. Iha, Saki Shimizu, Misaki Onishi, Yuji Nomura, Nami Matsubara, Chihiro Iwai, Mizuki Ogawa, Mai Hashimura, Yukihiro Ohno: Mechanisms of tremor induction by praoxon, an acetylcholinesterase inhibitor, in mice., 第 90 回日本薬理学会総会 2017/3/15-17 (長崎)
2. Masato Kinboshi, Takahiro Mukai, Kentaro Tokudome, Naofumi Kunisawa, Higor A. Iha, Kazuaki Sato, Saki Shimizu, Tadao Serikawa, Hidefumi Ito, Akio Ikeda, Yukihiro Ohno: Evaluation of astrocytic Kir4.1 channel expression in audiogenic seizure-susceptible *Lgi1* mutant rats., 第 90 回日本薬理学会総会 2017/3/15-17 (長崎)
3. Naofumi Kunisawa, Higor A. Iha, Saki Shimizu, Yuto Mizuguchi, Takanori Nohara, Yudai Atsuta, Keito Yoshikawa, Kentaro Tokudome, Masato Kinboshi, Tadao Serikawa, Yukihiro Ohno: Analysis of causative brain regions for nicotine-induced seizures., 第 46 回日本神経精神薬理学会年会 2016, 7/2-3 韓国 (ソウル)
4. Higor A. Iha, Naofumi Kunisawa, Saki Shimizu, Yudai Atsuta, Takanori Nohara, Kento Yoshikawa, Kentaro Tokudome, Yukihiro Ohno: Pharmacological responses of nicotine-induced tremor to various anti-tremor agents., 第 46 回日本神経精神薬理学会年会 2016, 7/2-3 韓国 (ソウル)
5. Takahiro Mukai, Yuki Nagao, Saki Shimizu, Asuka Ono, Yoshihisa Sakagami, Masato Kinboshi, Akio Ikeda, Hidefumi Ito, Tadao Serikawa, Yukihiro Ohno: Effects of antiepileptic drugs on Kir4.1 channel expression in the rat brain astrocytes., 第 46 回日本神経精神薬理学会年会 2016, 7/2-3 韓国 (ソウル)

6. Higor A. Iha, Naofumi Kunisawa, Saki Shimizu, Yuto Mizuguchi, Takanori Nohara, Yudai Atsuta, Keito Yoshikawa, Kentaro Tokudome, Masato Kinboshi, Tadao Serikawa and Yukihiro Ohno: Nicotine evokes convulsive seizures by activating amygdala neurons partly through $\alpha 7$ nACh receptors., 30th CINP World congress of Neuropsychopharmacology 2016 7/3-5 Korea (Seoul)
7. Naofumi Kunisawa, Higor A. Iha, Saki Shimizu, Yudai Atsuta, Takanori Nohara, Kento Yoshikawa, Kentaro Tokudome, Yukihiro Ohno: Pharmacological analysis of nicotine-induced tremor., 30th CINP World congress of Neuropsychopharmacology 2016 7/3-5 Korea (Seoul)
8. M. Kinboshi, T. Mukai, T. Kentaro, K. Naofumi, H. A. Iha, S. Shimizu, T. Serikawa, H. Ito, A. Ikeda, Y. Ohno: Expressional analysis of astrocytic Kir4.1 channels in audiogenic seizure-susceptible *Lgi1* mutant rats., 第 39 回日本神経科学大会、2016/07/20-22 (横浜)
9. Masato Kinboshi, Takahiro Mukai, Tokudome Kentaro, Kunisawa Naofumi, Higor A. Iha, Saki Shimizu, Tadao Serikawa, Hidefumi Ito, Akio Ikeda, Yukihiro Ohno: Expressional analysis of astrocytic Kir4.1 channels in audiogenic seizure-susceptible *Lgi1* mutant rats., 第 50 回日本てんかん学会 2016/10/7-8 静岡
10. 大野行弘: シナプス分泌機構に着目したてんかん病態解析: シナプス小胞蛋白 SV2A とてんかん原性., シンポジウム (てんかん原性についての基礎研究: 臨床に役立つ知見) 第 50 回日本てんかん学会 2016/10/7-8 (静岡) (招待講演)
11. 向井崇浩、長尾侑紀、清水佐紀、小野朝香、阪上嘉久、大野行弘: 内向き整流性カリウムチャネル Kir4.1 の脳内発現に対する抗てんかん薬の作用., 第 66 回日本薬学会近畿支部総会、2016/10/15 (大阪)
12. 國澤直史、Higor A. Iha、清水佐紀、尾西美咲、野村有治、松原菜美、徳留健太郎、河合悦子、大野行弘: ニコチンによる運動興奮症状の発現メカニズム解析., 第 66 回日本薬学会近畿支部総会、2016/10/15 (大阪)
13. 松葉勇亮、金星匡人、向井崇浩、石橋佳美、森岡由季子、田中志保、辻佳美、今浦春奈、中村貴之、清水佐紀、芹川忠夫、大野行弘: *Lgi1* 変異ラットの音刺激誘発けいれんにおけるアストロサイト Kir4.1 チャネルの発現解析., 第 66 回日本薬学会近畿支部総会、2016/10/15 (大阪)
14. 野村有治、尾西美咲、松原菜美、國澤直史、Higor A. Iha、清水佐紀、河合悦子、大野行弘: ニコチン誘発振戦におけるセロトニン受容体の関与., 第 66 回日本薬学会近畿支部総会、2016/10/15 (大阪)
15. Higor A. Iha、國澤直史、清水佐紀、熱田侑大、野原孝紀、吉川健斗、徳留健太郎、大野行弘: Acute nicotine causes convulsive seizures by activating amygdala neurons, primarily through $\alpha 7$ nACh receptors., 第 130 回日本薬理学会近畿部会、2016/11/19 (京都)

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 循環病態治療学研究室
職・氏名 教授・林 哲也

研究テーマ：アセトアミノフェン (APAP) 及びそのグルクロン酸代謝物 (AP-glu) の血中濃度とアセトアミノフェン誘発肝障害との関連性

研究期間：

平成 28 年 4 月 20 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者	林 哲也	(大阪薬科大学・薬学部・教授)
研究分担者	井尻 好雄	(大阪薬科大学・薬学部・准教授)
研究分担者	加藤 隆児	(大阪薬科大学・薬学部・講師)

<共同研究機関>

研究代表者	大里 恭章	(八尾徳洲会総合病院 薬剤部長)
研究分担者	原田 博雅	(八尾徳洲会総合病院 内科・院長)

研究目的：

アセトアミノフェン錠又は細粒を服用している患者を対象に、主要評価項目として APAP 及びその代謝物である AP-glu の血中濃度同時測定を行い、AILI 発症と AP-glu/APAP 濃度比率 (%) との関連性を検討する。副次的評価項目として、APAP の有効血中濃度の再構築、UGT1A1 遺伝子多型患者における投与量の検討、血清中 sTNF、sTNFR1、sTNFR2 の検討、アルコール常用者、慢性肝疾患患者 (ASH、NAFLD; SS & NASH、HCV、etc.) に対する投与量を再検討する。

本研究の意義は、AILI 発症を事前に予測する「予測予防の医療」の実践である。

本年度の研究内容および研究成果：

本年度は、以下の項目について研究実施した。

50 歳女性で大腸がん (T1aN1M1、Stage IV)、多発肝転移と診断され疼痛管理のため APAP 1.5g/day の服用を開始した患者の血清中 AP-glu/APAP 濃度、sTNF、sTNFR1、sTNFR2 濃度の測定を行った。2016 年 10 月 21 日、11 月 11 日、1 月 6 日の 3 回、本患者血清の APAP-glu/APAP 濃度、sTNF、sTNFR1、sTNFR2 濃度を測定した。さらに血液生化学検査として CRP、AST、ALT、血中アルブミン (Alb) の項目を測定した。その結果を表 1 に示す。AST、ALT、Alb 濃度が正常範囲内であること、AP-glu/APAP 濃度比は低下していないことから、APAP 誘発肝障害を起こしている可能性は低いと考えられた。1 月の AP-glu/APAP の濃度比 (551%) が高値を示した理由は、最終服薬時間と採血時間の間隔が長かったものと考えられる。また、本患者において sTNF はほとん

ど検出されず、CRP も正常であるため炎症反応は否定される。sTNFR1 及び sTNFR2 濃度の上昇は肝障害によるものではなく、がん起因するものと考えられた。以上、血中 AST、ALT、Alb、sTNF、sTNFR1、sTNFR2 濃度及び血中 AP-glu/APAP 濃度比を相互的に観察することにより、AILI 発症を事前に予測できる可能性があると考えられた。

表 1 各種測定パラメータ

測定項目 (単位)	マーカー						血液生化学的検査				
	APAP ($\mu\text{g/mL}$)	AP-glu ($\mu\text{g/mL}$)	AP-glu/APAP (%)	sTNF (pg/mL)	sTNFR1 (pg/mL)	sTNFR2 (pg/mL)	CRP (mg/dL)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	γ GTP (IU/L)	Alb (g/dL)
10月21日	11.5	8.5	74.1	0	2590 (↑)	3781 (↑)	0.24(→)	56 (→)	27 (→)	83 (↑)	4.9 (→)
11月11日	2.6	1.2	46.8	0	1673 (↑)	3055 (↑)	0.12(→)	61 (→)	41 (→)	119 (↑)	4.9 (→)
1月6日	3.2	17.8	551	0	2238 (↑)	3152 (↑)	0.60(↗)	72 (→)	34 (→)	122 (↑)	4.9 (→)

成果発表：

<原著論文>

- ・なし

<学会発表>

- ・第 38 回日本循環制御医学会・学術集会 一般演題ポスター発表「アセトアミノフェン服用がん患者における各種マーカーの変動」

<その他>

- ・なし

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 循環病態治療学研究室
職・氏名 教授・林 哲也

研究テーマ：

非アルコール性脂肪性肝疾患における血中可溶性腫瘍壊死因子/受容体 1,2 測定の意義

研究期間：

平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者	林 哲也	(大阪薬科大学・薬学部・教授)
研究分担者	井尻 好雄	(大阪薬科大学・薬学部・准教授)
研究分担者	加藤 隆児	(大阪薬科大学・薬学部・講師)

<共同研究機関>

研究代表者	金 守良	(神戸朝日病院 院長)
研究分担者	金 啓二	(神戸朝日病院 薬剤部長)

研究目的：

肝細胞癌のリスク因子の一つとして非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の存在が注目されている。NASH の確定診断を行うには肝生検による組織学的診断が不可欠であるが、入院が必要など患者の侵襲は大きい。単純脂肪(SS)からNASHへ進行する一つの要因であるエンドトキシン上昇による炎症性サイトカイン(TNF α)及びその受容体である可溶性TNF受容体1, 2(sTNF-R1,-R2)が血液(血漿)中においてNASHで上昇している可能性がある(circulating sTNF)。そこで今回sTNFとsTNF-R1,-R2を測定し健常人、SS、NASHの間に差があるかを比較し、NASHに有用なバイオマーカーか検討する。

本年度の研究内容および研究成果：

本年度は、以下の項目について研究実施した。

- ① 本研究では、sTNF、sTNF-R1及びR2がNAFLDのバイオマーカーとなり得るかを検討するために、NAFLD患者の血清中sTNF、sTNFR1/R2の測定を行った。2015年6月から2016年1月の期間に、神戸朝日病院にてNAFLDと診断された患者26名(56検体)の血清をELISA法によりsTNF、TNFR1/R2の測定を行った。sTNFは、ほとんど検出されなかった。sTNFR1濃度は0.67-3.28(1.3 \pm 0.4) ng/mLで、sTNFR2濃度は1.37-7.77(2.8 \pm 1.1) ng/mLであった。sTNFR1/R2の結果を分散分析すると、 $y = 2.40x - 0.35$ で高い相関性を示した($r = 0.946$)。sTNF R1

<R2 は、免疫担当細胞（クッパー細胞）の関与が示唆された。さらに、C 型肝炎患者の sTNF [0-60pg/mL] / sTNFR1 [1-6ng/mL] / R2[5-10ng/mL]との報告と比較して、NAFLD のそれら血清中濃度は低値を示した。sTNF、sTNFR1 及び R2 は、NAFLD のバイオマーカーになる可能性が示唆された。

- ② NAFLD ならびに NASH 診断患者に対して、生化学検査により得られた各種検査値データと血中 sTNF-Rs 値の解析を行い、sTNF-Rs を用いて NASH の診断予測が可能であるかを検討した。対象者は、2002 年 1 月～ 2006 年 11 月、2015 年 1 月～ 2017 年 3 月の期間中に神戸朝日病院に受診し、エコー検査により脂肪肝が確認された患者のうち、非アルコール性の脂肪肝患者とした。肝生検による組織学的診断、採血時の血液から生化学検査ならびに sTNF- α 、-R1、-R2 の ELISA 測定を行い、解析を行った。NAFLD と診断された患者の血中 sTNF-R1、-R2 値は、健常人よりも高い数値を示し、血中の sTNF-R1、-R2 値は高い相関性を示した。また、肝生検により NASH と診断された患者においては、線維化が進むことにより sTNF-R1 値が高くなることが示された。さらに、SS 患者群と比較して、NASH 患者群では、Alb、AST、ALT 値が有意に高値を示したが、血小板数は低値を示した。一方で、AST/ALT 比には群間に差は認められなかった。NASH への進行に伴い、血中 sTNF-Rs 値が上昇する可能性が示された。また、Alb、AST、ALT、血小板値の変動が確認され、これらの数値とともに NASH を疑い、肝生検を勧める上で参考になる可能性が示された。

成果発表：

<原著論文>

- ・なし

<学会発表>

- ・第 37 回日本循環制御医学会・学術集会 一般演題（口頭発表）「NAFLD 症例における sTNF、sTNF-R1 及び-R2 の血清中濃度」
- ・第 38 回日本循環制御医学会・学術集会 一般演題（口頭発表）「非アルコール性脂肪性肝疾患患者における soluble TNF receptor 値の解析と臨床的予測」

<その他>

- ・なし

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 基礎薬学教育研究センター

職・氏名 教授・尾崎 恵一

研究テーマ：シグナル伝達病（がん・糖尿病等）に対する効果的薬物治療法開発のための基礎研究

研究期間：

平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 尾崎 恵一 （大阪薬科大学・薬学部・教授）

<共同研究期間>

研究代表者 服部 喜之（星薬科大学・薬学部・准教授）

研究目的：

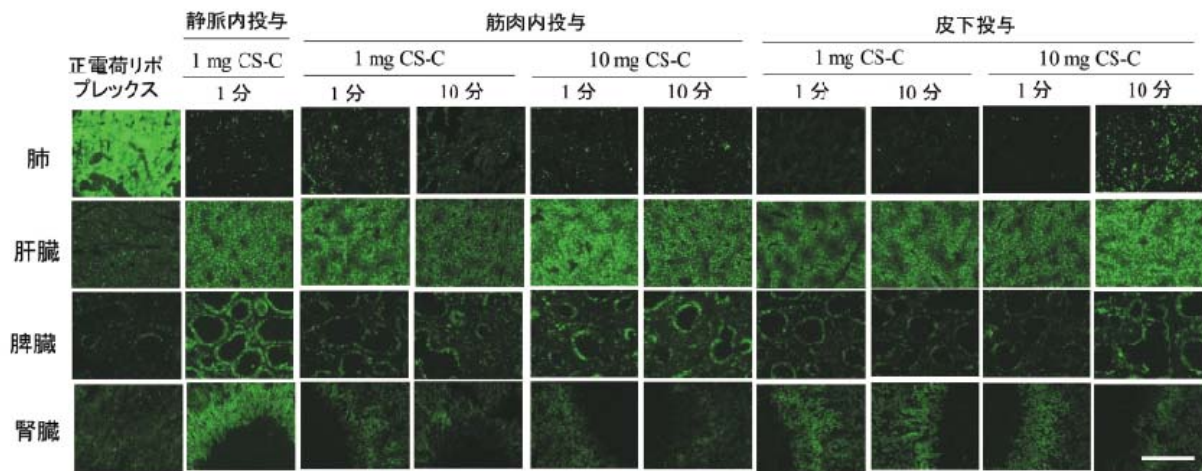
本共同研究における到達目標は、より効率の良いシグナル伝達病（がん・糖尿病）に対する薬物治療実現のために薬剤感受性遺伝子や薬物ターゲット遺伝子の同定および独自の薬物送達法（DDS）開発を行うことである。

そこで目下の研究目的は、肝臓への転移がんを標的とした薬物治療法の開発であり、共同研究者である星薬科大学の服部らが見出した「負電荷ポリマーと正電荷リポプレックスの連続投与による肝臓へのsiRNA 送達システム」を利用して肝転移がん治療のためのsiRNA標的分子を同定することである。

本年度の研究内容および研究成果：

負電荷を有するsiRNA と正電荷を有するリポソーム製剤（**正電荷リポソーム**）を混合することで静電的に結合した複合体（**正電荷リポプレックス**）を形成させる。この正電荷リポプレックスを培養細胞に添加すると、siRNA は効率よく細胞内に導入される。しかしながら、生体に正電荷リポプレックスを静脈内投与すると、血液中ですぐやかに赤血球などの血液成分と凝集体を形成し、肺の毛細血管に捕捉され、投与後数分以内に肺に集積した。また、正電荷リポプレックスを筋肉内または腹腔内投与した場合、ほとんど全身循環に移行せず、siRNA は投与部位周辺の組織に導入されてしまうため、これらの投与方法では主要な組織へsiRNA を送達させることは困難であった。その改良法として**負電荷ポリマーと正電荷リポプレックスを連続投与**することで肝臓にsiRNAを効率よく送達できることが分かった（図1）。

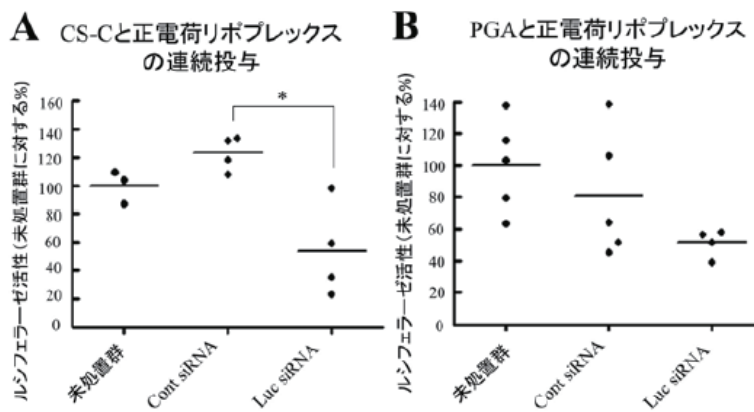
図1



コンドロイチン硫酸と正電荷リポプレックス連続投与におけるコンドロイチン硫酸の投与方法が及ぼす siRNA のマウス生体内分布への影響

そこで、これらのシステムを利用して実際の肝転移がんに対して連続投与方法により siRNA をがん細胞内に送達し、標的遺伝子の発現を抑制できるか検討を行った。ヒト乳がん MCF-7 細胞のルシフェラーゼ発現安定株をマウス脾臓内に移植し、脾臓から門脈を介して肝臓に転移する肝転移がんモデルマウスに対し、CS-C または PGA とルシフェラーゼ遺伝子に対する siRNA (Luc siRNA) を用いて調製した正電荷リポプレックスを連続投与したところ、コントロール siRNA (ContsiRNA) 投与群と比較して高いルシフェラーゼ活性の抑制効果が見出された。すなわち、連続投与により肝転移がんへ送達された siRNA は、がん細胞内で発現している標的遺伝子を特異的に抑制できた (図2)。

図2



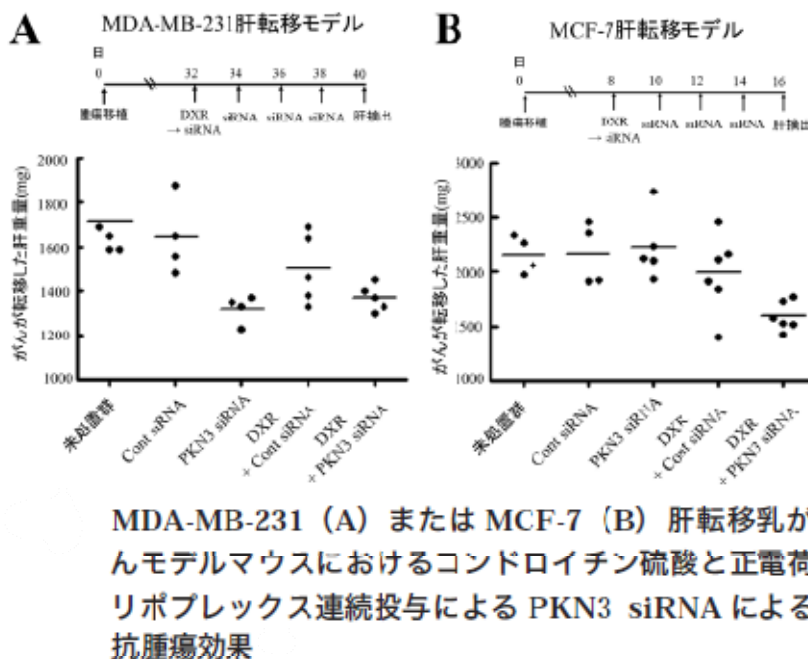
MCF-7 肝転移乳がんモデルマウスにおけるコンドロイチン硫酸 (CS-C) またはポリグルタミン酸 (PGA) と正電荷リポプレックス連続投与におけるがん細胞における遺伝子発現抑制効果

最後に、がん増殖を抑制するがん治療用の siRNA を連続投与方法により肝転移がんへ送達し、転移がんの増殖を抑制できるかどうか検討した。これまでの報告において、protein kinase N3 (PKN3) に対する siRNA のリポソーム製剤が、肺転移がんなどの転移モデルマウスに対して尾静脈内投与によりが

んの転移を抑制できることが明らかにされていた。そこで、PKN3siRNA を転移がん治療用siRNA として合成し、PKN3siRNA を用いて調製した正電荷リポプレックスとCS-Cを連続投与することで、肝転移がんの増殖を抑制できるか検討した。肝転移モデルマウスの作製には、PKN3発現陽性株であるヒト乳がんMDA-MB-231 細胞とPKN3 発現陰性株であるMCF-7 細胞を用いた。また、肝転移がんの治療は、PKN3 siRNA と抗がん薬のドキソルビシン(DXR)との併用で行った。その結果、MDAMB-231 転移がんにおいては、PKN3 siRNA 単独投与で高い抗腫瘍効果が観察されたが、DXR の併用による相加・相乗効果は見られなかった。一方、MCF-7 転移がんにおいては、PKN3 siRNA 単独投与では抗腫瘍効果は観察されなかったものの、DXR とPKN3 siRNA の併用群においては、高い抗腫瘍効果が確認できた (図3)。

以上より、肝転移がんに対するPKN3を標的としたsiRNA投与には、ある一定の制がん効果を見出すことができた。今後は、この分子メカニズムの解明も含めて、CS-C と正電荷リポプレックスの連続投与によるsiRNA の肝転移がんへの導入システムを肝転移がん治療へと応用していくためのさらなる検討を行っていく予定である。

図 3



成果発表：

<原著論文>

・ Y. Hattori, Y. Yoshiike, T. Kikuchi, N. Yamamoto, K. Ozaki, H. Onishi, Evaluation of injection route of anionic polymer for siRNA delivery into the liver by sequential injection of anionic polymer and cationic lipoplex of siRNA, *J Drug Deliv Sci Tec*, 35, 40-49 (2016).

・ Y. Hattori, S. Arai, T. Kikuchi, K. Ozaki, K. Kawano, E. Yonemochi, Therapeutic effect for liver-metastasized tumor by sequential intravenous injection of anionic polymer and cationic lipoplex of siRNA, *J Drug Target*, 24, 309-317 (2016).