

大阪医科薬科大学 薬学部 共同研究成果報告書

2022

(2022年4月～2023年3月)

共同研究課題名（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.....	- 3 -
がん化学療法時の薬物血中濃度に基づく有効性・安全性の評価に関する研究.....	- 7 -
循環器疾患薬物療法の有効性及び安全性に関する薬学的評価.....	- 9 -
多剤耐性菌に有効なペプチド性新規抗菌薬開発に向けた研究.....	- 12 -
腎疾患モデル動物における尿中脂肪酸関連物質の定量・定性的解析.....	- 15 -
医薬品および健康食品の機能性粉体の評価に関する検討.....	- 18 -
特異体質性薬物反応のメカニズムに関する研究.....	- 21 -
ストレスに対する脳と身体の防衛機能に関する基礎及び臨床研究.....	- 24 -
アルツハイマー型認知症関連タンパク質タウの異常自己重合機構の解明と重合阻害物質の探索.....	- 26 -
核内受容体モジュレーターによる脂質代謝調節.....	- 28 -
<i>Vibrio vulnificus</i> M2799 株の鉄獲得機構の解明.....	- 32 -
海洋天然物を基盤とする新規 α -グルコシダーゼ阻害剤の開発.....	- 34 -
医薬品の誘導体に対する分子鋳型ポリマーの調製と応用.....	- 37 -
アルツハイマー病治療を目指す基質結合機構の解明.....	- 40 -

ABC トランスポーターの発現制御および機能解析研究	- 43 -
ホウ素センサープローブの開発に関する研究	- 45 -
酸化ストレス疾患の予防と病態改善に関する研究	- 48 -
次世代型白金製剤アゾラト架橋白金(II)二核錯体の研究	
— テトラアゾラト架橋白金(II)二核錯体の合成と評価 —	- 50 -
特定の環境下で機能する光分解性保護基の開発と応用	- 54 -

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27年10月1日 ～ 令和5年3月31日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 大野 行弘 (大阪医科薬科大学・薬学部・教授)
研究分担者 清水 佐紀 (大阪医科薬科大学・薬学部・准教授)
研究分担者 國澤 直史 (大阪医科薬科大学・薬学部・助教)

<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：

ニコチンは認知機能改善作用や依存形成作用、抗うつ作用、運動興奮作用など多彩な薬理作用を示すことが知られている。これらニコチンの薬理作用発現は中枢のニコチン性アセチルコリン(nACh)受容体を介することから、様々な中枢神経系疾患の発症および治療にnACh受容体が重要な役割を果たしていると考えられる。特にnACh受容体の遺伝子変異は常染色体優性夜間前頭葉てんかん(ADNFLE)をはじめとするてんかんの発症に関与していることが知られていることから、てんかん治療の新たな標的分子としてnACh受容体が着目されている。しかし、てんかん病態におけるnACh受容体の役割や、ニコチンによる運動興奮症状(けいれん発作、振戦など)の発症メカニズムについては未だ不明な点が多い。

一方、ニューロン-グリア間の相互作用に基づく「三者間シナプス」の概念が定着しており、中枢神経作用薬の薬理作用発現におけるアストロサイトの役割が注目されている。特に、アストロサイトの内向き整流性Kir4.1チャンネルによって仲介される空間的カリウム(K⁺)緩衝機構やシナプス細胞

外のグルタミン酸取り込み機能、アストロサイトにおける脳由来神経栄養因子 BDNF の発現調節は、てんかんやうつ病など中枢神経系疾患の発症に深く関与することが示唆されている。

そこで本研究では、ニコチンによる運動興奮症状（振戦、けいれんなど）の発現におけるアストロサイトの関与について行動薬理的、免疫組織化学的に解析した。

1. ニコチンによる GFAP 発現変化の評価

はじめに、ddY 雄性マウスを用いてニコチン (0.3-3 mg/kg, i.p.) により誘発される運動興奮症状を 15 分間観察した。運動興奮症状の強度は 6 段階スコア (0: 変化なし、1: 頭部、尾部に局限した軽度な振戦、挙尾、2: 全身性の振戦、3: 顕著な振戦、wild running、4: 間代性けいれん、5: 強直けいれん、強直間代性けいれん) を用いて評価し、運動興奮症状の持続時間も計測した。その結果、ニコチンによる用量依存的な運動興奮症状の増強と持続時間の延長が認められた。また、ニコチン 3 mg/kg 投与では一部の動物でけいれん発作が誘発された (図 1)。

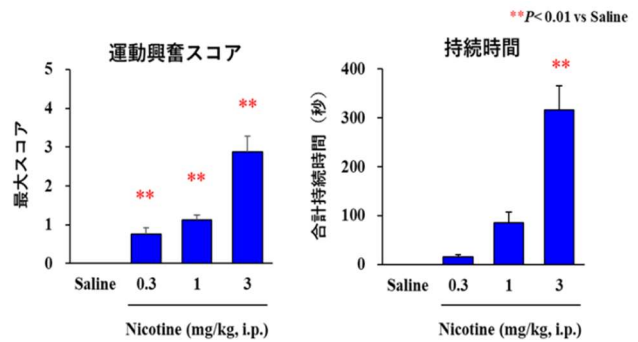


図 1 ニコチンにより誘発される運動興奮症状

次に、ニコチン投与から 24 時間後に摘出した脳を用いて活性化アストロサイトのマーカーである GFAP の免疫組織染色を行った。その結果、梨状葉皮質ではニコチン 1 mg/kg (i.p.) 投与によって、海馬 CA3 および DG ではニコチン 0.3-3 mg/kg (i.p.) 投与によって統計学的に有意な発現増加が認められた (図 2)。また、扁桃体においても上昇傾向が観察された。

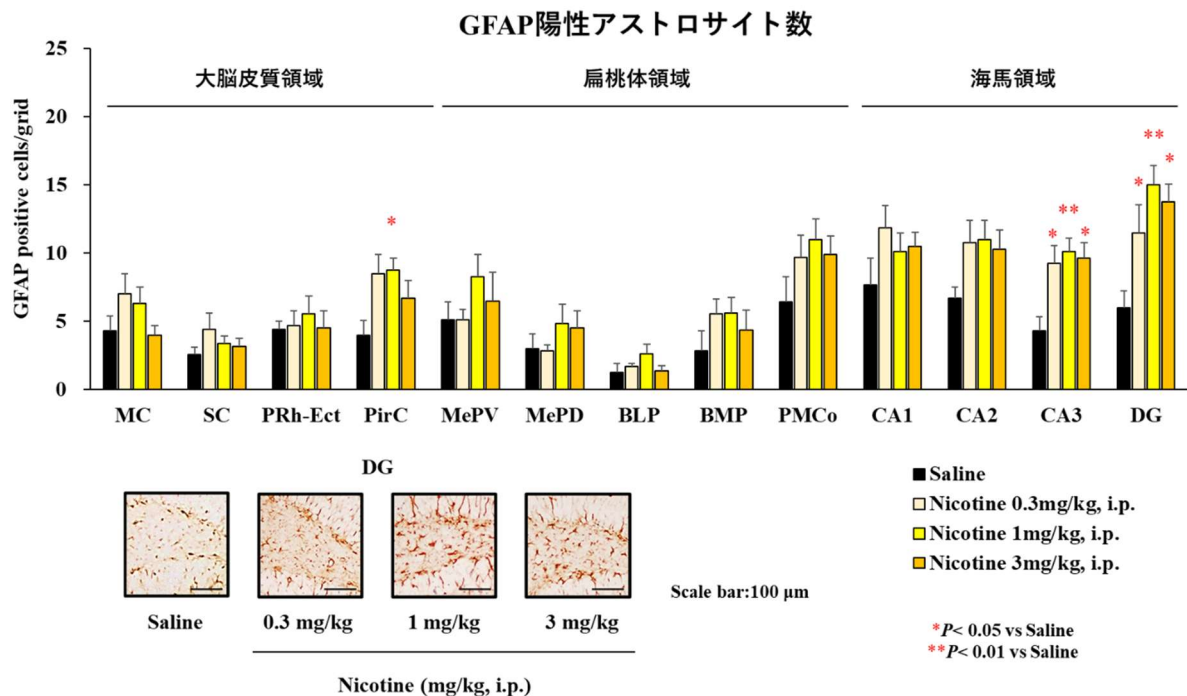


図 2 ニコチンによる GFAP 陽性アストロサイトの発現変化

2. ニコチン誘発けいれんに対するアストロサイト不活性化剤フルオロクエン酸の影響

SD 系雄性ラットを用いてニコチン誘発けいれんに対するアストロサイト不活性化剤フルオロクエン酸 (FC) の影響を評価した。予め留置したガイドカニューレを介してラットの右側脳室に薬物注入カテーテルを刺入し、FC (1 nmol/20 μ L/匹)、または、vehicle を微量注入した。その 2 時間後、ニコチン (3 mg/kg, i.p.) により誘発されるけいれん行動を評価した結果、FC 処置群ではけいれん強度 (スコア) が有意に抑制され、また、けいれん持続時間、けいれん発現率の抑制傾向とけいれん潜時の延長傾向が認められた (図 3)。

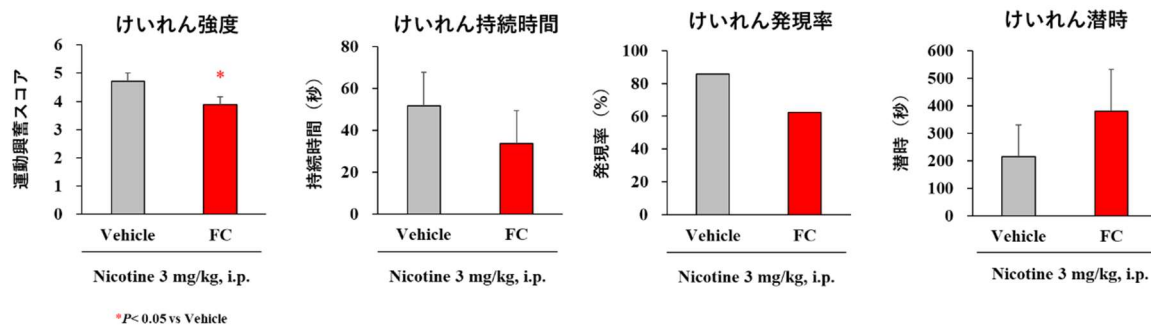


図3 ニコチン誘発けいれんに対するFCの影響

さらに、ニコチン (3 mg/kg, i.p.) 投与から 2 時間後に灌流固定、脳摘出を行い、後日、神経興奮マーカーである Fos タンパク質の免疫組織染色に用いた。海馬領域の Fos 陽性細胞数を FC 群と vehicle 群で比較した結果、FC 群では CA3 および DG 領域の Fos 発現が有意に低下していた。(図 4)

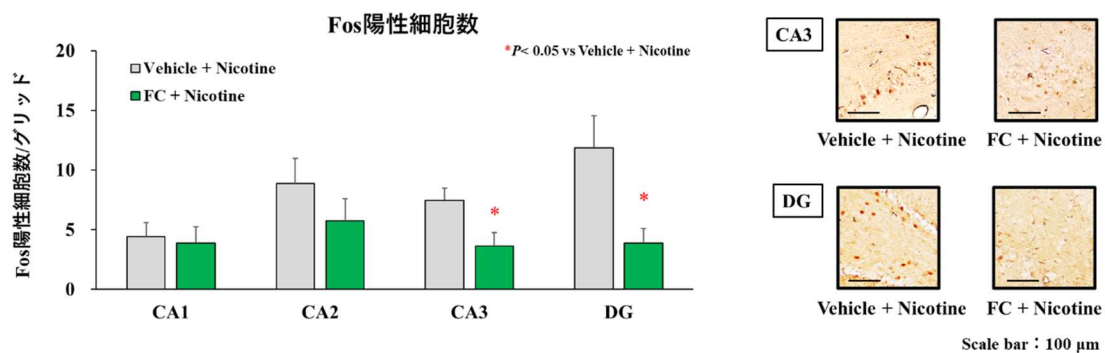


図4 ニコチンによるFos発現に対するFCの影響

本研究結果より、運動興奮症状を惹起する用量のニコチンが脳内アストロサイトの活性化状態に影響を与えること、特に海馬と側頭葉において、GFAP 陽性アストロサイト数を上昇させることが明らかとなった。さらに、FC を脳内投与したアストロサイト不活性化ラットにおいて、ニコチンによるけいれん発作の誘発ならびに海馬神経の過剰興奮の誘発が共に抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、ニコチン誘発けいれんの発現には、海馬などの側頭葉領域におけるアストロサイトの活性化が深く関与していると考えられる。

成果発表：

<原著論文>

・ Mechanisms Underlying Dopaminergic Regulation of Nicotine-Induced Kinetic Tremor. Kato M, Kunisawa N, Shimizu S, Iha HA, Ohno Y. *Front. Pharmacol.* 13, 938175 (2022)

<学会発表>

・ 國澤直史、加藤将貴、小田明奈、白川美波、坂口茉鈴、清水佐紀、大野行弘：Role of astrocytes in nicotine-induced motor excitement symptoms. 第 96 回日本薬理学会年会 (2022 年 11 月、横浜)

・ 國澤直史、加藤将貴、小田明奈、坂口茉鈴、白川美波、清水佐紀、大野行弘：ニコチンによる運動興奮症状に対するアストロサイト選択的抑制剤フルオロクエン酸の影響. 日本薬学会第 143 年会 (2023 年 3 月、札幌)

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 臨床薬学挙育研究センター
職・氏名 教授・中村任

研究テーマ：

がん化学療法時の薬物血中濃度に基づく有効性・安全性の評価に関する研究

研究期間：

令和 4 年 4 月 1 日 ～ 令和 5 年 3 月 3 1 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 中村 任 （大阪薬科大学・薬学部・教授）

<共同研究機関>

研究代表者 矢野 育子 （神戸大学医学部附属病院・薬剤部・教授）

研究分担者 山本 和宏 （神戸大学医学部附属病院・薬剤部・副薬剤部長）

研究目的：

がん化学療法は、がんに対する主要な治療法の一つである。しかし、予期しない副作用の発現も認められるなど、薬効や副作用の発症メカニズムの解明が急がれる。これまで研究代表者らは、シスプラチンなどの白金製剤に着目し、投与後の体内挙動によって生体内金属元素（バイオメタル）がどのような影響を受けるか検討してきた。その結果、白金製剤の投与によって一部のバイオメタルでは生体内分布が変化していることが推察された。しかしながら、患者の臨床背景による影響については不明な点も多い。ところで、がん化学療法では悪心・嘔吐などの副作用が現れることも多く、使用される薬剤の種類やレジメンによって制吐療法が平行して実施される。制吐療法が推奨される患者背景や評価方法については有効性の指標に関する情報は必ずしも十分でない。また、制吐療法によってはバイオメタルの変動に影響することも考えられる。

本研究では、がん化学療法施行患者の臨床情報を用い、がん化学療法の有効性や安全性の予測因子を探索し、個々の患者に対する治療法の至適化を目指す。また、実験動物や培養細胞を用いて、がん化学療法と制吐療法で使用される薬剤の影響を分離して生体内バイオメタルの変動解析を行う。

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プラチナ最終投与日1ヶ月以降の濃度濃度推移と臨床検査値との連関解析

食道癌 5-FU/シスプラチン併用療法を施行された患者におけるシスプラチン最終投与後 29 日～590 日の血漿サンプルを、マイクロ波試料分解装置による灰化处理後、ICP-MS で測定した。その結

果、評価期間においてプラチナはその血漿中濃度に比例して消失する一次速度過程をとり、消失速度定数から算出される血中半減期は 418 時間（17.4 日）から 844 時間（35.2 日）であった。これらの値は、既に報告した同一患者におけるシスプラチン投与後約 1 ヶ月までの半減期と比較して 1.27 倍から 1.95 倍の値であり、半減期が延長する傾向にあった。シスプラチンは主に腎臓から排泄されるが、観察期間中のプラチナの半減期と平均血清クレアチニン値との間に相関関係は認められなかった。一方、シスプラチンは血中でアルブミンと強く結合することが報告されており、観察期間中のプラチナ半減期と平均血清アルブミン値との間に良好な相関関係が認められた。血清アルブミン値が低い患者における相対的に早い血中からのプラチナ消失はシスプラチンが血管外組織に移行しやすいことを反映している可能性があり、低栄養状態で末梢性神経障害の発症リスクが高まる報告とも矛盾しない結果と考えられた。

②プラチナ投与患者における生体内金属の同位体比変動評価

銅には ^{63}Cu と ^{65}Cu の安定同位体が存在することが知られており、銅は相対的に質量の軽い ^{63}Cu が優先して生体反応に利用されると推察される。銅は生体内においては骨や骨格筋に約 50%、肝臓中に約 10%存在し、ホメオスタシスは厳密に調節されているが、肝機能の低下に伴って銅が関連する反応が制限された場合、銅の生体反応が盛んな部位では特に安定同位体比が変動する可能性が考えられる。本年度は、食道癌 5-FU/シスプラチン併用療法を施行された患者 1 名のシスプラチン最終投与 29 日以後 590 日目までの血液検体を用いて、臨床検査値とバイオメタルの変動について同位体比に着目して解析を行った。

当該患者は、観察期間中、ALT や AST によって評価される肝機能に一過性の障害が認められており、血漿中銅濃度はそれに先だつて一過性の上昇を認めた。 $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$ によって表される同位体比を肝障害未発現時と肝障害発現以降とで比較したところ、血漿中の同位体比は前者で 0.51、後者で 0.49～0.52 の値であり著しい変化は認められず、一過性の肝障害発現が血漿中の銅の同位体比に与える影響は小さいと考えられた。引き続き、他の症例も含めて検討を進める予定である。一方、国際純正・応用化学連合（IUPAC）無機化学部門の原子量および同位体存在度委員会（CIAAW）が公表している元素の同位体存在度の値によれば $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$ の値は 0.446（=0.3085/0.6915）であり、今回検討した血漿サンプルの銅の同位体比は標準値よりも高値である。血漿中に存在する ^{65}Cu の割合が相対的に高いことを示す結果ではあり、標準品を用いた $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$ 同位体比分析法のバリデーションを含め検討を進める予定である。

③細胞培養液中のバイオメタル分析法のバリデーション

培養細胞を用いたバイオメタル変動実験を行うための基礎データとして、培養液中のバイオメタル測定法のバリデーションを行った。DMEM 培地に対して抗生物質や FBS(牛胎児血清を添加して調製した Growth 培地)について、鉄、銅、亜鉛の測定を行った。灰化や添加試料の影響についてベースラインの値を確認するとともに、規定の濃度のバイオメタルおよびプラチナを添加した場合の検量線について検証した。その結果、銅やプラチナを測定する目的であれば必ずしも灰化の必要がないことが確認された。硝酸溶液による適度な希釈によって一部のバイオメタルの測定が可能であることが確認できた一方で、FBS を添加して調製するような Growth 培地では鉄や亜鉛の測定のためには灰化処理が必須であり、効率的に対象バイオメタルを同時測定する上で今後は灰化処理を行うプロトコルを作成することとした。細胞内バイオメタルの測定法についても引き続きバリデーションを行う予定である。

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 臨床薬学教育研究センター
職・氏名 教授・中村任

研究テーマ：

循環器疾患薬物療法の有効性及び安全性に関する薬学的評価

研究期間：

令和 4 年 4 月 1 日 ～ 令和 5 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 中村 任 (大阪薬科大学・薬学部・教授)
研究分担者 中村 敏明 (大阪薬科大学・薬学部・教授)
岩永 一範 (大阪薬科大学・薬学部・教授)
矢野 良一 (大阪薬科大学・薬学部・教授)
角山 香織 (大阪薬科大学・薬学部・教授)
和田 恭一 (大阪薬科大学・薬学部・特任教授)

<共同研究機関>

研究代表者 川端 一功 (国立循環器病研究センター・薬剤部・部長)

研究目的：

医薬品には、承認申請時の有効性及び安全性に関するデータは存在するものの対象患者が限定されており、市販後に臨床で活用するための情報や費用対効果に関する情報は必ずしも十分でない。本研究では、国立循環器病研究センターの診療情報ならびに医薬品情報データベース等を活用し、医薬品の有効性及び安全性について臨床における再現性や一貫性の検証を行う。併せて、服薬アドヒアランスや経済性に対する評価を行う。

本年度の研究内容および研究成果：

(1) 慢性疾患に対する薬物療法時の配合錠使用に関する薬学的評価

降圧作用を有する配合錠は服薬アドヒアランス向上により脳心血管イベント(MACE)発症率を低下させる効果が期待されるが、関連性を示す報告は限定的である。本年度は、国立循環器病研究センターでアンギオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) /アムロジピン配合錠 (アイミクス[®]配合錠、エックスフォージ配合錠、ユニシア配合錠、ザクラス配合錠) を処方された患者 (配合錠群) と各主薬の単剤を同時期に処方された患者 (単剤群) を対象とし、ICD-10 コードの後方視的調査により各群の初回処方後 1 年間の MACE 発症率を比較検討した。また、観察期間に対する処方日数の割合 (PDC) を評価した。

死亡および追跡不能症例を除いた配合錠群は 341 名、単剤群は 270 名であった。配合錠群の

PDC は 1 名 (89.3%) を除き 90%以上であり、アドヒアランスは良好と考えられた。一方、単剤群では PDC が 80%未満の患者が 19.1%~31.1%存在した。配合錠群と単剤群における MACE 発症率は、それぞれアイミクス 20.0%と 46.2%、ユニシア 14.1%と 21.1%、ザクラス 22.5%と 19.5%、エックスフォージ 0.0%と 4.8%であった。なお、単剤群に対する配合錠群のオッズ比はアイミクスで 0.29 であり有意差を認めたが、他 3 剤のオッズ比に有意差は認められなかった。

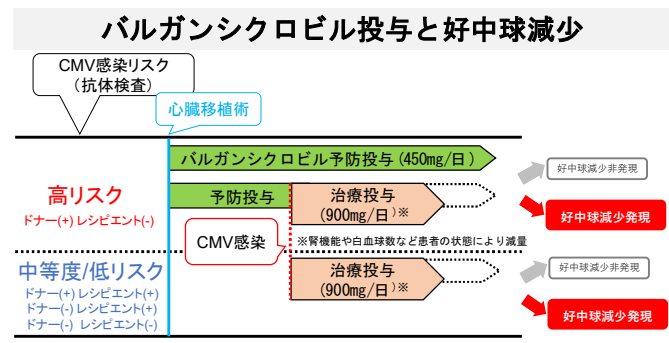
単剤群と比較して配合錠群で低い MACE 発症率にはアドヒアランスの向上が影響すると考えられており、引き続き、併存疾患、既往歴、併用薬などの因子について解析を進める予定である。

(2) 心臓移植後の外来患者における好中球減少の発現予測因子の探索

好中球減少は心移植後の免疫抑制療法に伴い発現することがある。特に、外来治療移行後は、患者の自己管理が中心となるため注意が必要である。外来治療移行前に好中球減少の発現を予測することができれば、より安全な薬物治療の提供が可能となる。好中球減少発現に影響をおよぼす因子として、サイトメガロウイルス (CMV) 感染症、ミコフェノール酸モフェチル (MMF) の暴露量、バルガンシクロビル (VGCV) 投与の有無、血球数などが報告されている。本年度は、心移植患者を CMV 感染症リスクでわけ、外来治療移行後の好中球減少の発現予測因子を外来治療移行時の患者情報から探索した。

対象は 2012 年 1 月~2019 年 3 月に国立循環器病研究センターで心移植を受けた患者 80 名のうち倫理委員会承認時に 18 歳以上の患者 43 名とした。対象期間を移植後 1 年間とし、患者基本情報、処方薬情報 (免疫抑制剤の投与量、AUC など) を電子カルテから後方視的に調査した。患者を VGCV 予防投与あり群 22 名と同等し群 21 名群に分け、CMV 感染や感染症の状況ならびに外来治療移行後の好中球減少発現 (好中球数 1,500/ μ L 未満) の有無について連関解析を行った。

VGCV 予防投与群では心臓移植患者の 77.3% (17/22) が好中球減少症を経験しましたが、これは予防投与なし群 (42.9% [9/21]、 p 0.031) よりも有意に高い結果であった。VGCV 投与期間および最初の好中球減少症エピソードまでの累積投与量には両群間で有意差は観察されなかった。一方、ミコフェノール酸モフェチルの累積用量は、予防投与なし群と比較して、予防投与あり群の方が有意に高かった (p 0.018)。ミコフェノール酸モフェチルの毎日の維持用量と定期的に測定されるミコフェノール酸の血中濃度時間曲線下面積 (AUC) は、両群間で有意な差を認めていない。



結果として、好中球減少症を発症するリスクは、低用量の VGCV 予防投与を受けている心臓移植患者の方が予防投与を受けていない患者よりも高かったが、これはおそらく好中球減少症の発症までの VGCV の投与期間や累積用量に起因するものではないと考えられた。本検討では、外来治療移行後、好中球減少による緊急入院はなかった。心臓移植後、外来治療移行まで及び移行後も定期的に専門職が連携することによって CMV 感染症状況や血球数に基づく VGCV や MMF の投与量を調節することが好中球減少による緊急入院を防ぐことに寄与していると考えられた。

成果発表：

<原著論文>

- Mai Otokubo, Kyoichi Wada, Megumi Ikura, Kotoka Hayase, Takaya Uno, Kazuki Nakagita, Naoki Hayakawa, Takuya Watanabe, Osamu Seguchi, Norihide Fukushima, Tsutomu Nakamura. Risk Assessment of Neutropenia during Low-Dose Valganciclovir Prophylaxis for Heart Transplant Recipients. *Biol. Pharm. Bull.* 45:452-459 (2022).

<学会発表>

- 川出紗瑛、岩永一範、角山香織、中村敏明、中蔵伊知郎、上野智子、中野一也、川端一功、中村任：ARB/Ca 拮抗薬配合錠処方歴と脳心血管イベント発症との関連解析、医療薬学フォーラム 2022／第 30 回クリニカルファーマシーシンポジウム（2022）

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 感染制御学研究室

職・氏名 教授・駒野 淳

研究テーマ：

多剤耐性菌に有効なペプチド性新規抗菌薬開発に向けた研究

研究期間：

平成・令和 4 年 4 月 1 日 ～ 令和 5 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 駒野 淳 (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 宮地勇人 (東海大学・医学部・教授)

研究分担者 良原栄策 (東海大学・医学部・客員准教授)

研究分担者 浅井さとみ (東海大学・医学部・准教授)

研究目的：

Acinetobacter baumannii は自然界に広く生息するグラム陰性桿菌で、近年では市中感染や院内感染が増加している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。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ー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ペプチドを創製し、多剤耐性 *Acinetobacter baumannii* に対する新規抗菌物質の開発を目的とする。

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 および多剤耐性菌 Ab10659 株を用いて, Bam 複合体の結合阻害物質の増殖抑制効果とバイオフィーム形成能の抑制効果を測定した. BamD との結合阻害物質は BamA と結合する BamD のアミノ酸配列(4 アミノ酸)を1つ2つ3つとタンデムにつないだペプチド(K7FI, K7FI2, K7FI3)を用いて, その効果の違いを比較した. いずれの菌株に対しても, K7FI3, K7FI2, K7FI の順に増殖抑制効果は強く認められた(図 1,2,3).

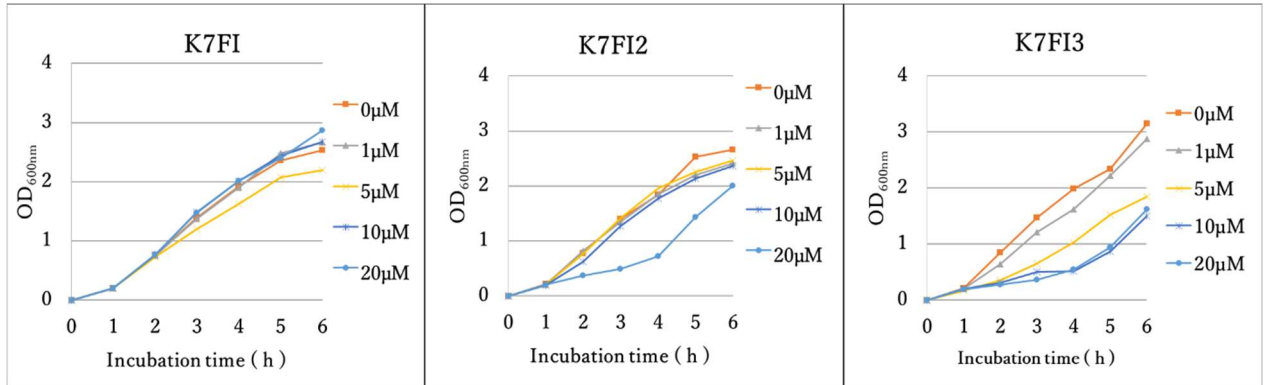


図 1. ATCC19606 株に対する増殖抑制効果

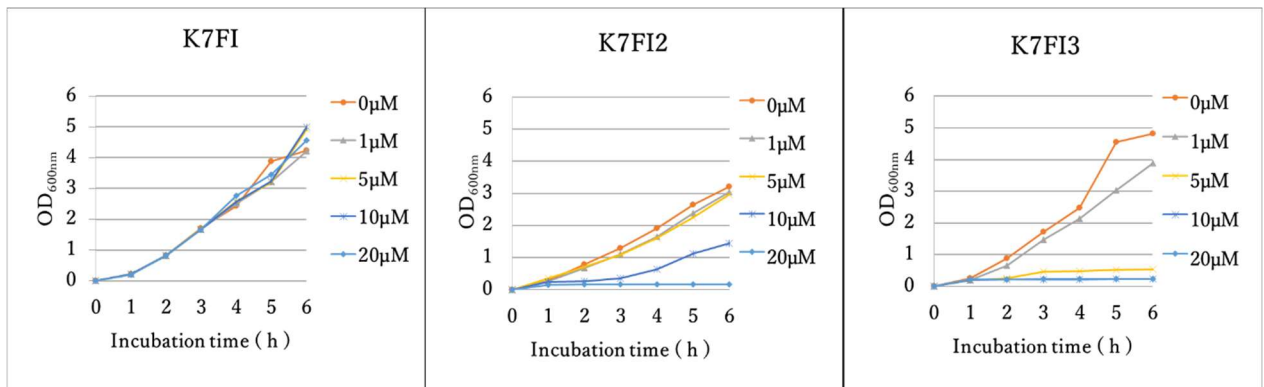


図 2. A112-II-a 株に対する増殖抑制効果

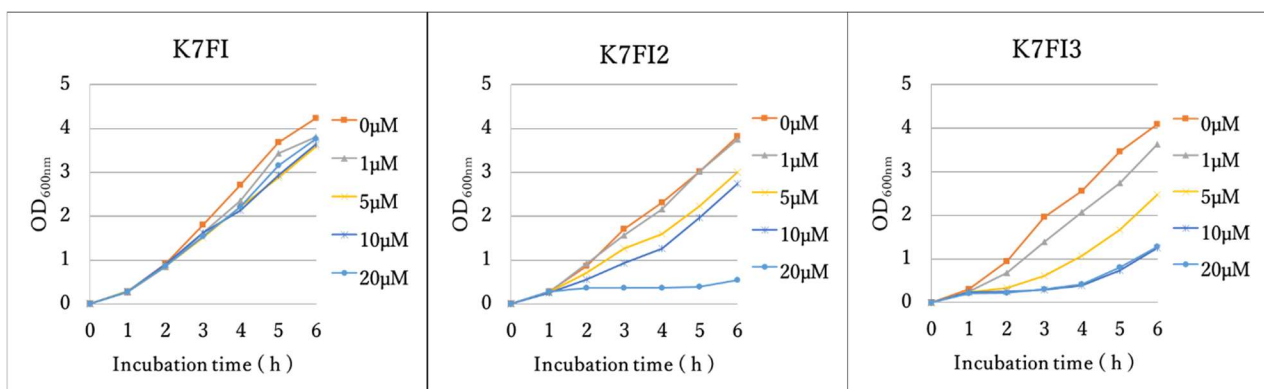


図 3. Ab10659 株に対する増殖抑制効果

バイオフィーム形成阻害効果を測定したところ, 1 μM ではいずれの菌株に対しても, すべてのペプチドで, バイオフィーム形成抑制効果は認められなかった(図 4).

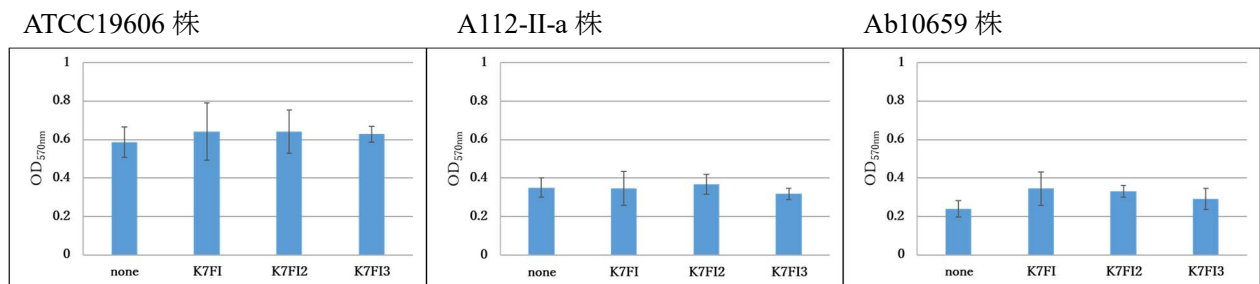


図 4. 各菌株に対するバイオフィーム形成阻害効果

これらの結果より、ペプチドはよりタンデムに繋げた方が、増殖抑制効果は高く、K7F12 と比べて K7F13 の活性は 1.5 倍以上であった。これは、4 アミノ酸配列の分子数の増加分以上の活性の上昇であり、タンデムに繋ぐことにより、BamA と BamD との結合をより阻害できることが示唆された。今後はそのメカニズムを解析するとともに、新たな阻害物質の創製を行う予定である。

成果発表：

<学会発表>

- ・Bam 複合体を標的とした多剤耐性アシネトバクターに対する新規抗菌物質の開発. 稲田裕明, 谷口菜優, 土屋孝弘, 宮本勝城, 駒野淳, 良原栄策, 辻坊 裕. 第 96 回日本細菌学会総会. 2013 年 3 月 16 日

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 大阪医科薬科大学薬学部
職・氏名 教授・永井純也

研究テーマ：

腎疾患モデル動物における尿中脂肪酸関連物質の定量・定性的解析

研究期間：

令和元年10月1日 ～ 令和5年3月31日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 永井 純也 (大阪医科薬科大学・薬学部・教授)

研究分担者 本橋 秀之 (大阪医科薬科大学・薬学部・准教授)

研究分担者 竹林裕美子 (大阪医科薬科大学・薬学部・助教)

<共同研究機関>

研究代表者 大野 芳正 (東京医科大学・医学部・主任教授)

研究目的：

慢性腎臓病(CKD)や薬剤投与による糸球体ろ過バリア機能の低下は、通常では糸球体ろ過が制限されているアルブミンが尿細管管腔中へと漏出するようになる。こうしたアルブミンの漏出自体が腎線維化、ひいては腎不全につながる要因となることが示唆されているが、その分子機構は不明である。また、漏出したタンパク質による尿細管上皮細胞の障害は、薬物の尿細管分泌や再吸収を担う薬物トランスポーターの機能や発現に影響し、薬物の腎挙動に影響する可能性も考えられる。我々はこれまでにアルブミンに結合している脂肪酸が転写因子 HIF-1 を活性化させること、その脂肪酸としてアラキドン酸が有力であること等を見い出してきた。現在、尿細管管腔中へのアルブミン漏出に伴う腎線維化の発症過程におけるアラキドン酸カスケードと HIF-1 活性化の関連性について明らかにすることを目的とした研究を展開している。その研究の一環として、本研究室ではアルブミンの尿中排泄を増加させるアドリアマイシン(ADR)投与マウスを用いた *in vivo* 解析を進めている。また、ヒト腎近位尿細管上皮細胞由来 HK-2 細胞を用いた実験において、脂肪酸結合型(通常型)ヒト血清アルブミン処理が、濃度依存的に生理活性物質であるプロスタグランジン E₂ (PGE₂) 産生を増加させることも明らかにしてきた。

昨年度は、ADR 投与による腎障害マウスを用いて、アルブミン尿中排泄の増加に伴う尿中 PGE₂ および代謝物 PGEM 排泄量との相関性を評価し、ADR 誘発アルブミン尿発症マウスにおいて、PGE₂ に加え PGF_{2a} の尿中排泄量の増加が認められ、アルブミンに結合しているアラキドン酸からシクロオキシゲナーゼによって生成されるプロスタグランジを介した経路が HIF-1 活性化に関与している可能性を示した。

今年度の本研究では、HK-2 細胞において PG の細胞膜輸送に関わるプロスタグランジントランスポーター(PGT)が HIF-1 誘導に関与している可能性を想定し、HIF-1 活性化によって上昇が認められる GLUT 活性、HIF-1 関連遺伝子発現および PGE₂ 産生に及ぼす PGT 阻害剤の影響について検討した。なお、本共同研究では、本実験によって得られる測定データ分析と臨床的知見に基づく知識や情報の提供を受けるため、東京医科大学泌尿器科学分野主任教授大野芳正博士との共同で研究を展開している。

本年度の研究内容および研究成果：

まず、実験方法について記述する。培養細胞はヒト腎近位尿細管細胞株 HK-2 を用い、37°C、5% CO₂/95% air 条件下、10%FBS と 1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含む DMEM/F-12 培地を用いて培養した。無血清培地に交換して 24 時間後、アルブミン/PGT 阻害剤で 48 時間処理後、取り込み実験、mRNA 発現解析および細胞外 PGE₂ 定量実験を行った。D-[³H]Glucose 取り込み量は液体シンチレーションカウンター法を用い、細胞タンパク質の定量に Lowry 法を用いた。また、mRNA 発現解析はリアルタイム PCR 解析によって行った。細胞外 PGE₂ の定量に ELISA 法を用いた。統計学的解析は、Student の t 検定あるいは多重比較検定によって行い、p 値が 0.05 未満である場合に統計学的に有意差ありと判断した。

なお、本研究では、GLUT 阻害剤として phloretin(100 μM)を用い HK-2 細胞における D-[³H]Glucose 取り込み量を測定し、phloretin 非存在下と存在下での D-[³H]Glucose 取り込み量の差分を取ることで、GLUT 輸送活性を評価した。GLUT 活性は、HIF-1 活性化の指標として用いたが、その根拠としては GLUT1 mRNA が転写因子 HIF-1 の典型的な標的遺伝子であり、HIF-1 活性化に伴う GLUT1 mRNA 発現の上昇、それに伴う GLUT 活性の亢進に基づくものである。PGT 阻害剤には、ブロモクレゾールグリーン (BCG) およびスルホブロモフタレイン (BSP) を用いた。

次に、実験結果について述べる。まず、PGT 阻害剤である BCG を共存させることにより、アルブミン誘発 GLUT 活性上昇を増強する傾向が観察された。また、BCG と同様に PGT 阻害剤である BSP 共存においても、アルブミン誘発 GLUT 活性の上昇の亢進が認められ、その亢進作用には BSP 濃度依存的な効果が認められた。

次に、HIF-1 関連遺伝子 GLUT1 や HIF-1 α の mRNA 発現に及ぼす PGT 阻害剤の影響を検討した。その結果、BCG および BSP のアルブミンとの共存処理は、GLUT1 および HIF-1 α mRNA 発現のいずれにおいても、アルブミン単独処理に比べ、明確な変化は認められなかった。

また、HK-2 細胞における PGT の mRNA 発現変動に及ぼす BCG および BSP の影響について検討した。その結果、アルブミン単独処理によって PGT mRNA は発現上昇が観察されることが見いだされたものの、その上昇に対して PGT 阻害剤共存は明確な影響を与えなかった。また、アルブミン処理によって誘発される PGE₂ 産生上昇に及ぼす PGT 阻害剤の影響について検討した。その結果、BCG および BSP のいずれにおいても、アルブミン処理によって誘発される培地中 PGE₂ 量増加に明確な変化は認められなかった。今回の mRNA 発現や PGE₂ 産生量の解析結果は、PGT 阻害剤の共存による明確な影響が認められない結果であったが、本実験では処理後 48 時間の時点での解析という限定したものであったことから、今後は処理時間をいくつか変化させた実験条件での検討も必要であるものと考えている。

以上、ヒト腎近位尿細管上皮細胞 HK-2 を用いた本実験において、PGT 阻害剤である BCG および BSP 処理により、アルブミン誘発 GLUT 活性上昇は増加する傾向が見られた。その一方で、本実験

条件下の BCG および BSP 処理は、アルブミンによって誘発される HIF-1 関連遺伝子発現上昇に対して明確な影響を与えなかった。加えて、アルブミン誘発 PGE₂ 産生上昇に対しても、本実験条件下の BCG および BSP 処理では明確な変化は観察されなかった。これらの結果を踏まえると、アルブミン曝露による HIF-1 活性化には、一部、PGT が関与する可能性が示唆されるものの、その詳細な分子機構やその寄与の程度などは、さらなる解析を踏まえて考察していく必要があるものと考えている。

成果発表：

<学会発表>

・濱口真歩、津田裕里、足立瑠衣、山口大輝、竹林裕美子、本橋秀之、永井純也

「腎近位尿細管上皮細胞株 HK-2 におけるアルブミン曝露による HIF-1 活性化に及ぼすプロスタグランジントランスポーター阻害剤の影響」

日本薬学会第 37 年会（2022 年 5 月 26～5 月 28 日、オンライン開催）

・永井純也、濱口真歩、津田裕里、足立瑠衣、山口大輝、竹林裕美子、本橋秀之、大野芳正

「アルブミン曝露による腎近位尿細管上皮細胞 HIF-1 活性化における PGE₂ の役割」

日本薬物動態学会第 37 回年会（2022 年 11 月 7～10 日、横浜）

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 製剤設計学研究室

職・氏名 教授・戸塚 裕一

研究テーマ：

医薬品および健康食品の機能性粉体の評価に関する検討

研究期間：

令和 4 年 4 月 1 日 ～ 令和 5 年 3 月 3 1 日

研究担当者：

研究代表者 戸塚 裕一 (大阪医科薬科大学・薬学部)

研究分担者 門田 和紀 (大阪医科薬科大学・薬学部)

研究分担者 内山 博雅 (大阪医科薬科大学・薬学部)

<共同研究機関>

研究代表者 白川 善幸 (同志社大学・理工学部)

研究目的：

製薬会社が開発する経口製剤の投与剤形として、そのほとんどが錠剤やカプセル剤等の剤形であるため、特に高齢者や小児患者に対する服薬アドヒアランスを向上させることができる剤形の開発が求められている。実際、高齢者の罹患率が最も高いと言われている生活習慣病は死因の約 6 割を占め、その薬物療法として簡便な経口投与医薬品が頻用されており、その剤形のほとんどは未だ錠剤が占めている。また、小児患者に対しても、その市場規模が小さい上に、各国において求められる剤形が異なることからこれまで開発が停滞しているのが現状である。小児患者への医薬品投与としては、医療現場において錠剤を服用することが困難である場合や年齢換算で投与量を調節する場合、錠剤を粉砕して服用させる事例も多くみられる。その際、錠剤に施されたコーティングが剥離し、薬物由来の苦味等が生じる。その結果、小児患者の拒薬および服薬アドヒアランスの低下を招き、薬物治療の遅延を引き起こす。そこで、これらの問題を解決するために、口腔内崩壊錠、フィルム剤、経口ゼリー剤といった易服用性製剤の開発が盛んに行われている。なかでも経口ゼリー剤は、苦味マスキングやテクスチャ制御といった特性を併せ持ち、既に医療用医薬品として流通している。しかし、経口ゼリー剤において、嵩高さや保存剤使用の問題等が挙げられるため、それほど高齢者製剤および小児製剤として利用が普及していないのが現状である。近年、スプリングル製剤や用事分散型ゲル剤が注目されている。これらは、小児だけでなくあらゆる年齢にも対応することが期待できるとされている。

本研究では、モデル薬物として強い苦味を有するジフェンヒドラミン塩酸塩に対し、苦味マスキングを目的として高分子化合物を添加した溶液について噴霧乾燥粒子 (SDPs) を作製した。作製した SDPs の薬物溶出性および苦味評価について溶出試験および味覚センサーによる評価を行った。さらに、従来のゼリー剤は成人投与量で個包装されているため、小児の各年齢に合わせた多様な投与量調

ができる，簡易ゼリー剤についても作製し，溶出試験および味覚センサーによる評価を行った。

本年度の研究内容および研究成果：

モデル薬物として使用したジフェンヒドรามミン塩酸塩 (Diphenhydramine Hydrochloride : DPH) 溶液の濃度に対する苦味の後味を示す CPA (Change of membrane Potential by Adsorption) 値の変化を Fig.1 に示す。その結果，0.02-10 mM の DPH 濃度域において，CPA 値は DPH 濃度の対数と比例関係にあることがわかった。本研究の味覚センサーによる測定については，この濃度域にて実施した。

Fig.2 に，1mM の DPH 溶液に対して，DPH と高分子を質量比が 1/10 となるように高分子 Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC)，水溶性多糖類の Gelatin 及び Carrageenan を添加し，30 分間攪拌した溶液の苦味を測定した結果を示す。DPH 原末と比較して，高分子を添加した溶液では CPA 値が抑制されていることが確認できる。中でも，Carrageenan は高い苦味マスキング効果が期待できる。

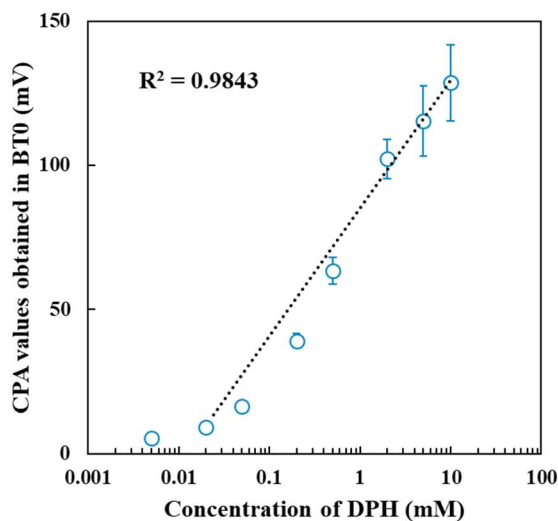


Fig. 1 CPA values for 0.005-10 mM DPH

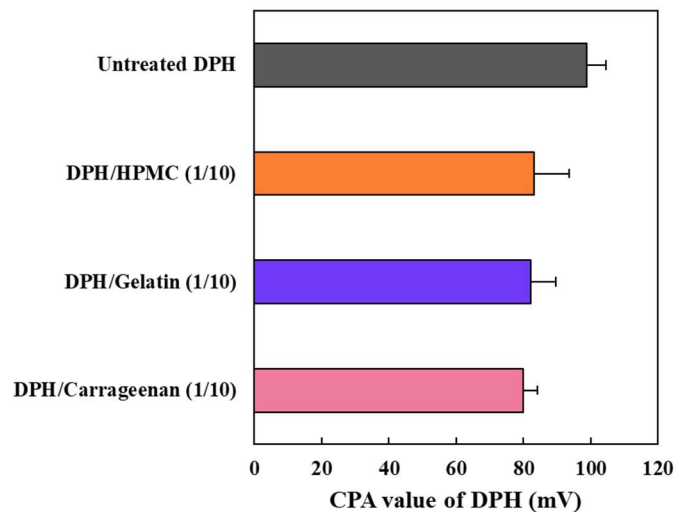


Fig. 2 CPA values for DPH solution added polymer.

続いて，DPH と各高分子を質量比が 1/10 となるように精製水に溶解させ，噴霧乾燥機を用いて噴霧乾燥粒子 (spray-dried particles : SDPs) を作製した。Fig.3 に各種高分子を用いて調製した SDPs の溶出試験結果を示す。なお，溶出試験液として口腔内を模擬した pH 6.8 緩衝液にて実施した。DPH 原薬は試験開始直後に溶出率が 100%に達するのに対し，各種高分子により作製した SDPs については初期の溶出速度を抑えることに成功した。そこで，DPH 原末および SDPs (DPH/Polymer) を pH 6.8 緩衝液に加え，30 秒間振盪した溶液の溶出量および苦味を測定した。Fig.4 の左側に溶出量を，右側に苦味を示す。その結果，溶出試験結果と同様，DPH 原末と比較して SDPs は，溶出量・苦味を示す CPA 値ともに抑制されていた。中でも，DPH/Carrageenan 製剤において最も溶出量・CPA 値が抑制されており，苦味マスキング効果が最も高いと推測された。

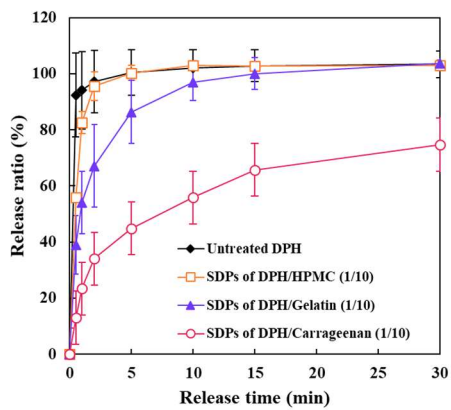


Fig. 3 Dissolution profiles for SDPs.

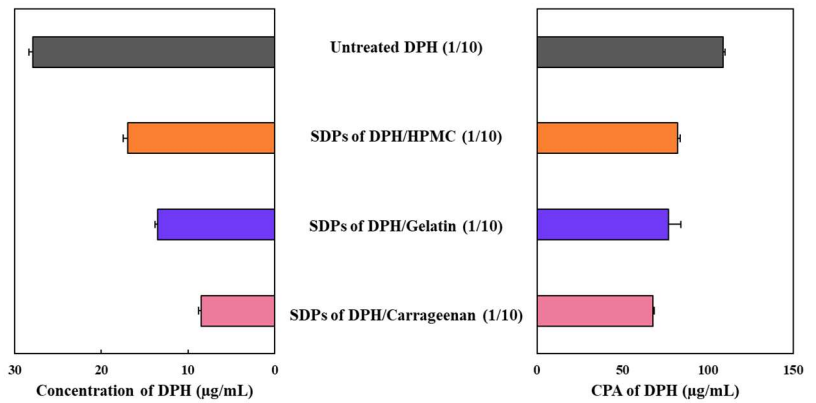


Fig. 4 CPA values for SDPs.

以上より、最も苦味が抑制されることが期待できる製剤として、DPH/Carrageenan 噴霧乾燥粒子を用いて、簡易ゼリー剤を調製し、その溶出速度及び30秒後の溶出量・苦味についても評価を行った。なお、簡易ゼリー剤は、得られたSDPsをCarrageenan 3 w/v%となるように、あらかじめ55°Cに加熱した湯浴にて3分間湯煎し、Carrageenanの溶解後25°Cで1時間静置し調製した。

Fig.5 に、DPH 原末、SDPs、物理的混合 (PM : Physical mixture) を用いて調製したゼリー製剤からのDPHの溶出試験結果を示す。ゼリー製剤とすることでDPH原末及びSDPsと比較しても、初期の溶出速度を抑えることに成功した。さらに**Fig.6**に30秒後の溶出量・CPA値の結果を示す。溶出試験結果と同様に、ゼリー製剤についてSDPsと比較しても高い、溶出量と苦味に抑制がみられた。

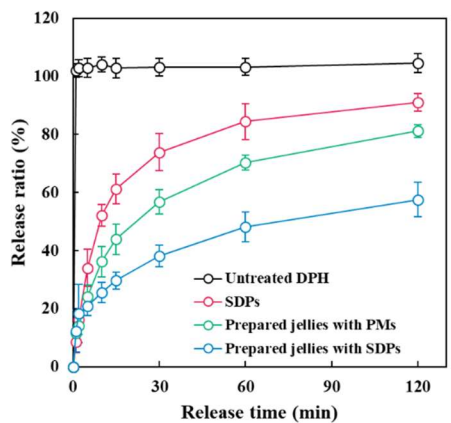


Fig. 5 Dissolution profiles for prepared jellies with DPH/Carrageenan (1/10)

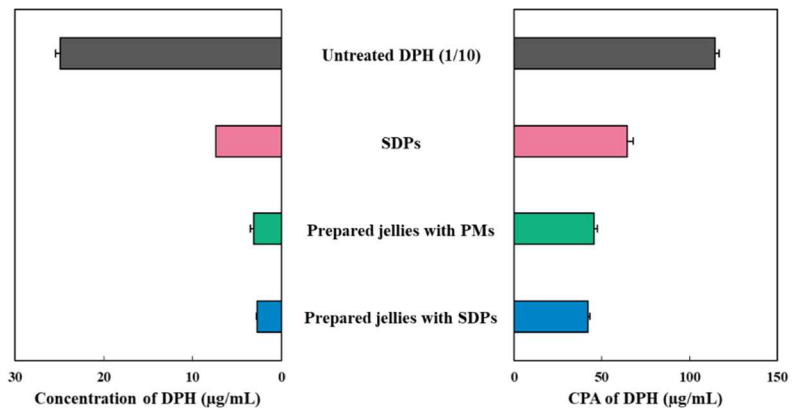


Fig. 6 CPA values for prepared jellies with DPH/Carrageenan (1/10)

成果発表：

<原著論文>

- Satoshi Nogami , Kazunori Kadota , Hiromasa Uchiyama, Hiroshi Arima-Osonoi, Mitsuhiro Shibayama, Yuichi Tozuka, Evaluation of the rheological and rupture properties of gelatin-based hydrogels blended with polymers to determine their drug diffusion behavior, *Polymer Journal*, **54** (2022) 1477-1487

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 准教授・井尻好雄

研究テーマ：
特異体質性薬物反応のメカニズムに関する研究

研究期間：
令和 4 年 4 月 1 日 ～ 令和 5 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者	井尻好雄	（大阪医科薬科大学・薬学部・准教授）
研究分担者	加藤隆児	（大阪医科薬科大学・薬学部・准教授）
研究分担者	林哲也	（大阪医科薬科大学・薬学部・客員研究員）

<共同研究機関>

研究代表者	Jack Uetrecht	（トロント大学・薬学部・教授）
-------	---------------	-----------------

研究目的：

特異体質性薬物反応（IDRs, idiosyncratic drug reactions）の発症機序は様々報告されているが、その中でも免疫を介した反応は重篤副作用を引き起こすとされており、注目されている。近年、薬物の反応性代謝物が細胞ストレスとなり danger signal が放出され、放出された danger signal が抗原提示細胞を活性化することで、IDRs が起こるといふ danger hypotheses が提唱されている。しかし、実際に IDRs 発症機序として danger hypotheses が成立するかは不明である。本研究では、IDRs の中でも特に臨床で問題となっている特異体質性薬物性肝障害に着目し、その発症機序として danger hypotheses が成立するか否かを明らかにする。IDRs 発症機序が明らかになれば、発症予測および有効な治療法の開発に応用できると考えられる。

本年度の研究内容および研究成果：

今年度は、がん分子標的薬について検討を行った。がん分子標的薬の中でも特に Multi-targeted tyrosine kinase inhibitors（MTKIs）は特異体質性副反応が多く報告されているが、発症機序については不明な点が多い。本研究では、スニチニブ、レゴラフェニブ、レンバチニブ、カボザンチニブを対象に、薬物自身あるいはその反応性代謝物に着目して、それら薬物の特異体質性薬物性肝障害の発症機序の検討を行った。

スニチニブ、レゴラフェニブ、レンバチニブ、カボザンチニブをマクロファージに分化させた THP-1 細胞に直接添加したところ、レゴラフェニブにおいて caspase-1 活性および培養液中 IL-1 β 濃度の上昇が認められた（Fig. 1）。レゴラフェニブは THP-1 細胞内でイソチオシアネート様の反応性代謝

物が産生される可能性があり、それによりインフラマソーム活性化が起こったと考えられた。

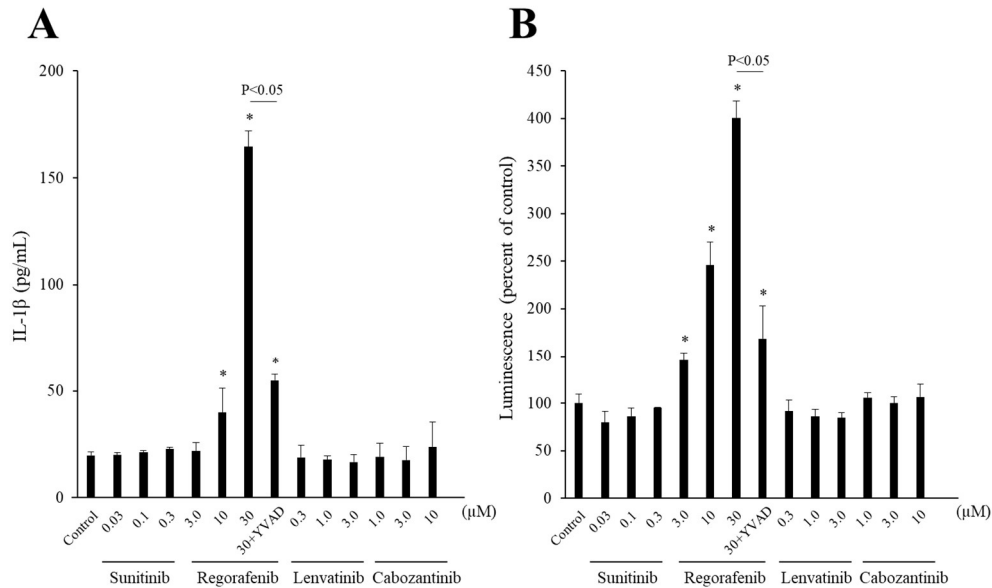


Fig. 1. Levels of IL-1 β and caspase-1 activity in THP-1-derived macrophages in response to 24 h of treatment with sunitinib, regorafenib, lenvatinib and cabozantinib with or without a caspase-1 inhibitor, Ac-YVAD-CHO (YVAD). (A) Incubation of THP-1 cells with regorafenib led to release of IL-1 β . (B) Incubation of THP-1 cells with regorafenib also increased caspase-1 activity. Statistical significance was determined using the Tukey multiple comparison tests, where *, $p < 0.05$, vs. control ($n=3$).

一方、FLC-4 細胞にスニチニブ、レゴラフェニブ、レンバチニブ、カボザンチニブを添加して 1 週間培養を行った後、培養液上清をマクロファージ化 THP-1 細胞に加えたところ、スニチニブおよびレゴラフェニブ添加群においては caspase-1 活性および培養液中 IL-1 β 濃度の上昇が認められた (Fig. 2)。スニチニブ添加群において CYP の非特異的阻害剤である ABT を肝細胞の培養液中にあらかじめ添加するとインフラマソーム反応の活性化が認められなかったことから、CYP によるスニチニブの代謝物が原因となり、DAMPs が肝細胞から放出され THP-1 の活性化が起こったものと考えられた。

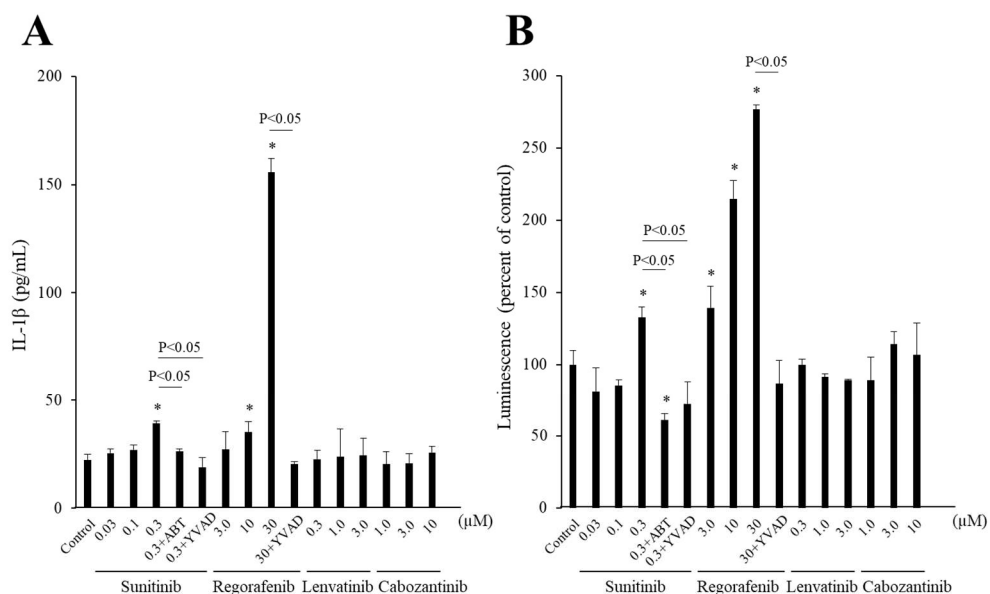


Fig. 2. IL-1 β and caspase-1 activity of THP-1-derived macrophages in response to the supernatant from FLC-4 cells incubated with sunitinib, regorafenib, lenvatinib or cabozantinib with or without YVAD. (A) Incubation of THP-1 cells with the supernatant from FLC-4 cells incubated with sunitinib and regorafenib led to an increase in IL-1 β . In the case of sunitinib, this was significantly inhibited by ABT added to the FLC-4 incubation. (B) Incubation of THP-1 cells with sunitinib and regorafenib led to an increase in caspase-1 activity. Again, this was significantly inhibited by ABT added to the FLC-4 incubation. Statistical significance was determined using the Tukey multiple comparison tests, where *, $p < 0.05$, vs. control ($n=3$).

肝細胞の培養液中に放出された DAMPs の探索を行ったところ、heat shock protein (HSP) 90 の産生量が増加していることが確認された。また、FLC-4 細胞からは DAMPs の一種である high mobility group box 1 (HMGB1) の培地中への放出は認められなかった (Fig. 3)。一方、FLC-4 の培養上清を THP-1 細胞に添加したところ、THP-1 細胞から HMGB1 の分泌が認められた (data not shown)。本結果から、インフラマソーム反応が活性化された抗原提示細胞は、自ら HMGB1 を放出することで他の抗原提示細胞を活性化し、より強い免疫反応を引き起こすことが考えられた。

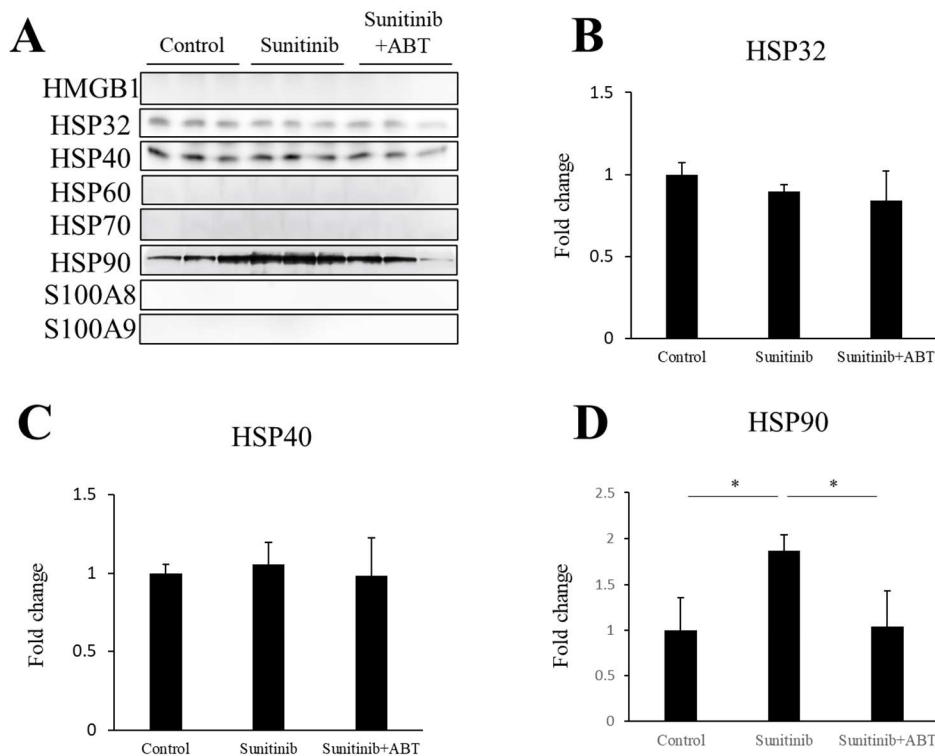


Fig. 3. Heat shock protein (HSP) 90 was released from hepatocytes as a danger associated molecular pattern molecule (DAMP). (A) Western blot analysis of proteins [high mobility group box 1 (HMGB1), HSP32, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, S100 calcium-binding protein (S100) A8 and S100A9] that were released from hepatocytes incubated for 7 days with sunitinib (3 μ M), with or without, a cytochromes P450 inhibitor (1-aminobenzotriazole, ABT), and their quantitative analysis of HSP32 (B), HSP40 (C) and HSP90 (D). Statistical significance was determined using the Tukey multiple comparison tests, where *, $p < 0.05$, $n=3$.

以上の結果から、レゴラフェニブにおいては薬物そのものが抗原提示細胞を活性化することで特異体質性肝障害が発症することが考えられた。また、スニチニブ誘発肝障害の発症機序に CYP による代謝物が原因となり、抗原提示細胞の活性化が示唆された。本発症機序を考慮すると、スニチニブおよびレゴラフェニブ誘発肝障害の治療法として Kupffer 細胞の活性化を抑制する薬剤 (ステロイド等) が有効であると考えられる。

成果発表:

<原著論文>

- Kato R, Ijiri Y. Regorafenib and reactive metabolite of sunitinib activate inflammasomes: Implications for multi tyrosine kinase inhibitor-Induced immune related adverse events. *Pharmazie* 77, 54-58 (2022).

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 薬物治療学研究室
職・氏名 准教授 幸田 祐佳

研究テーマ：

ストレスに対する脳と身体の防衛機能に関する基礎及び臨床研究

研究期間：

令和 4 年 4 月 1 日 ～ 令和 5 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 幸田 祐佳 (大阪医科薬科大学・薬学部・准教授)

研究分担者 田中 早織 (大阪医科薬科大学・薬学部・助教)

研究分担者 松村 人志 (大阪医科薬科大学・薬学部・名誉教授)

<共同研究機関>

研究代表者 黒田 健治 (医療法人 杏和会 阪南病院・院長)

さまざまなストレスの中で生き抜くために備わっている脳・精神と身体のメカニズムを多角的に追究し、新しい治療薬の開発に繋げる。

本年度の研究内容および研究成果：

睡眠の制御機序の解明と、身体及び脳を保護するための機能としての睡眠の役割に関する基礎研究

夢を見る睡眠として知られているレム睡眠に関する実験を、ノックアウトマウスにより実施している。レム睡眠は中脳から橋を中心とした脳幹領域で制御されているとの仮説が広く受け入れられているが、我々は一酸化窒素合成酵素が関与する制御機構を、間脳領域において明らかにしている。レム睡眠は、出生直後には徐波睡眠や覚醒の量とほぼ同等程度に多量に出現し、1日の約1/3がレム睡眠であることになり、成長と共に全睡眠量の1/4程度にまで減少し、老化とともにさらに出現が少なくなる傾向である。脳機能の活力を維持する為に、レム睡眠が何らかの重要な役割を担っているのではないかと考え、将来、レム睡眠を増加させる薬剤を開発することには、価値あることと考えている。

本研究成果は必要な実験結果が揃った段階で、特許取得が可能かどうかを検討することになっている。現在は、一酸化窒素の合成に関わる種々酵素のさまざまなノックアウトマウスを用いて、検討を重ねている。

精神科疾患における脳機能の保護に及ぼす治療薬の役割に関する臨床研究

阪南病院との共同研究において、同意が得られた患者を対象として遂行している。治療抵抗性統合失調症に対して、クロザピンが使用可能となっているが、クロザピンの効果については、以前から、また各国から、血中濃度との相関があまり良くないことが報告されており、実地臨床の場面において、非常に有効な場合がある一方で、全く効果の得られない場合もあることで、患者にとっても、医師のいっても、悩ましい問題となっている。しかし、他の治療薬で全く効果がなかった重度の統合失調症が、クロザピンの投与で退院可能なまでに改善をみる等の劇的な現象が見られることがあることから、クロザピンがどのような場合に奏効するのか、何故効果が得られない場合があるのか、詳細を明らかにすることは、今後の治療法の展開の為に、また、脳機能の健全性を維持する為の知見を得る上で、有用な情報となることを考えている。

我々は、クロザピンとその2つの主要な代謝物の濃度を測定し、その際、血漿中濃度のみならず血球中濃度も並行して測定を試みている。クロザピン及びクロザピンの代謝物が血球中に移行し、血球との接触で分解したりする事が明らかになってきたためである。臨床症状ならびに認知機能と、血液サンプルの測定結果との種々相関を検討し、クロザピンの効果を低減せしめている要因、及びクロザピン奏効の要因を研究している。効果や副作用と、血漿中濃度との関係も否定できないが、条件によっては、血球中濃度との間に連関が見られることがある。クロザピンの効果には、他の抗精神病薬には見られない特徴的な現象があり、クロザピン研究の重要性を今後明らかにする。

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 薬品物理化学研究室
職・氏名 准教授・友尾幸司

研究テーマ：

アルツハイマー型認知症関連タンパク質タウの異常自己重合機構の解明と重合阻害物質の探索

研究期間：

平成 29 年 4 月 1 日 ～ 令和 5 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 友尾 幸司 (大阪医科薬科大学・薬学部・准教授)

研究分担者 尹 康子 (大阪医科薬科大学・薬学部・准教授)

<共同研究機関>

研究代表者 角山 圭一 (姫路獨協大学・薬学部・准教授)

研究目的：

微小管結合タンパク質 tau は、神経細胞の形状支持や細胞内の物質輸送を担う微小管の重合促進と安定化に働いている。アルツハイマー型認知症(AD ; Alzheimer's disease)患者の脳内では、異常なリン酸化により微小管から解離した tau が異常自己重合を起こし、PHF(paired helical filament)と呼ばれる不溶性線維を形成して神経細胞内に蓄積している。これは神経原線維変化と呼ばれ、認知症の重症度と強い相関を示すアルツハイマー型認知症の病理学的特徴の一つとされている。tau 分子中の微小管結合部位 (MBD ; Microtubule-Binding Domain) は、tau の微小管結合に重要である一方で、異常自己重合にも大きく関与していると考えられている。

本研究は、tau 分子中の MBD 領域に着目して様々な tau 変異体を作成し、tau の自己重合に関与するアミノ酸残基およびペプチド領域を断定して自己重合機構の解明に繋げると共に、MBD 領域に特異的に結合する抗体の tau 凝集阻害能に着目して、認知症治療薬のリード物質となり得る tau 重合阻害物質の探索を目的としている。

本年度の研究内容および研究成果：

昨年度は、Fab2r3 の tau 特異的認識機構解明のため、Fab2r3 の apo 体の構造解析を行い、得られた apo 体構造と、Fab2r3-VQIINK 複合体構造を比較した結果、複合体構造において 3 番目の重鎖ループ (H3) と軽鎖ループ (L3) により形成されていた VQIINK との結合における疎水ポケットは、apo 体構造中では H3 ループ領域が大きく構造変化を起こし、疎水ポケットが消失していることが明らかとなった。これらの結果から、Fab2r3 による VQIINK 配列特異的認識は、先ず Fab2r3 の疎水ポケット形成を伴う Ile 残基側鎖の選択から始まり、次に Q 及び K の極性アミ

ノ酸残基との水素結合対が形成されるという作用機序を推測するに至った。

これらの作用機序を構造化学的に解明することを目的とし、本年度は、VQIINK ペプチドの 4 残基目の Ile を Leu に置換した VQILNK ペプチドと Fab2R3 の相互作用解析を行った。等温滴定型熱量測定 (ITC) 法による解析により、Leu への置換により Fab2r3 への結合親和性が 1/40 に低下することが分かった。(図 1) この結果を構造化学的に解析するために、Fab2r3-VQILNK 複合体の構造解析に着手した。

Fab2r3-VQIINK 複合体の結晶化条件を基に VQILNK 複合体結晶を得ることに成功した。得られた結晶を用いて、2.1 Å 分解能の X 線回折強度データを取得した。VQIINK および VQILNK 両複合体におけるリガンド結合部の構造比較から、Fab2r3 と水素結合を形成するペプチド中の Lys 残基の側鎖構造が、両複合体構造間で異なる事がわかった。(図 3) この構造変化は、リガンドペプチドの Ile 残基から Leu 残基への変異に起因するものと考えられ、VQILNK リガンドの結合親和性の低下と相関するものと推測した。

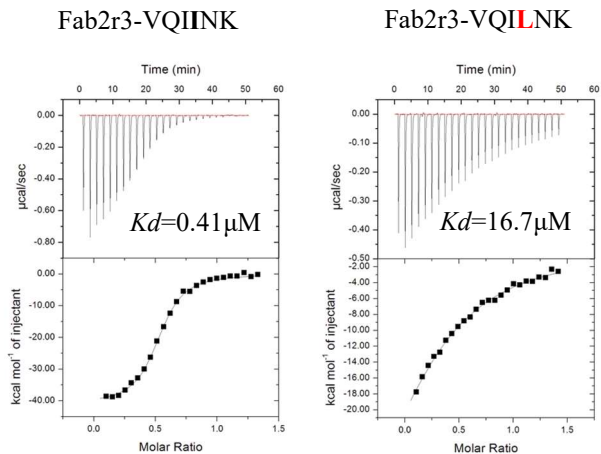


図 1. ITC 測定による Fab2r3 とリガンドペプチドとの相互作用解析

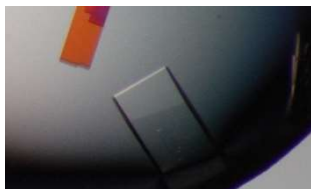


図 2 Fab2r3-VQILNK 複合体結晶

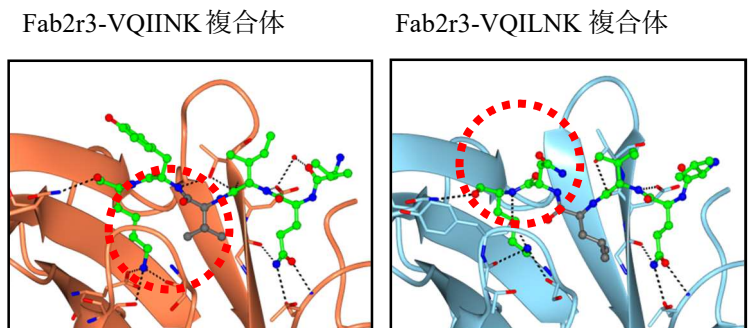


図 3 Fab2r3 と VQIINK および VQILNK 両複合体

のリガンド結合部の比較

成果発表：

<学会発表>

- ・ 槌田智裕、小橋川栞愛、土屋孝弘、宮本勝城、箕浦克彦、尹 康子、角山圭一、谷口泰造、友尾幸司

抗 Tau 抗体 Tau2r3 が有する Tau 分子中 VQIINK 配列 特異的認識機構に関する研究
日本薬学会第 143 年会 (2023 年 3 月)

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 薬学部・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：
令和4年4月1日 ～ 令和5年3月31日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 藤森 功 (大阪医科薬科大学・薬学部・教授)
研究分担者 小池 敦資 (大阪医科薬科大学・薬学部・講師)

<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)
研究分担者 小田啓祐 (広島国際大学・薬学部・講師)
研究分担者 山下ユキコ (広島国際大学・薬学部・助教)

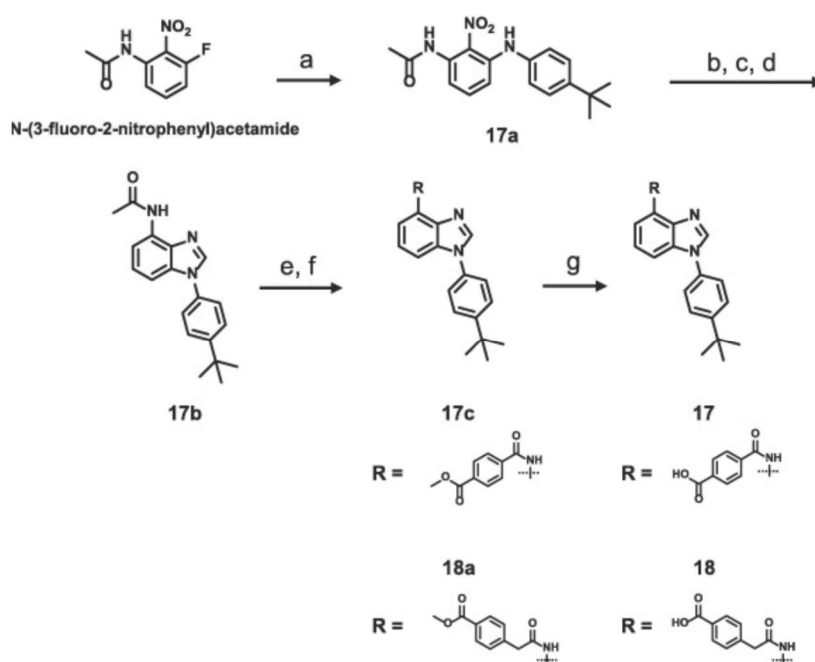
研究目的：

核内受容体の一つである farnesoid X receptor (FXR) は多くの種類の細胞の分化制御にも関わっており、これまでに既存および本研究グループで合成した FXR 調節薬を用いて、脂肪細胞や骨芽細胞における FXR の調節能の評価、さらに FXR の機能および制御機構の解析を行ってきた。本研究では、FXR を介した肥満制御および骨芽細胞の分化制御機構について解析し、肥満や骨分化における FXR の機能と制御機構を解明し、新規 FXR 調節薬の開発を行うことを目的とする。

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を実施した。

広島国際大学のグループが新たに合成したベンズイミダゾール骨格を有する化合物 (FXR 調節薬) (図1) について、時間分解一蛍光共鳴エネルギー移動 (TR-FRET) アッセイによる EC₅₀ 値の算出、核内受容体結合配列をもつルシフェラーゼレポーターコンストラクトを用いた核内受容体の活性化能 (EC₅₀) を評価した (表1, 図2)。化合物 18 は FXR 活性化能に加え、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ の活性化能も有していることが分かった (図2)。さらに、化合物 18 は PPAR γ の Ser273 のサイクリン依存性キナーゼ (cyclin-dependent kinase: CDK) 5 を介したリン酸化を抑制し、



PPAR γ を活性化することが分かった (図 3)。

図 1. 新規 FXR 調節薬の創製

表 1. ベンズイミダゾール骨格の R1 と R3 を置換した化合物の FRET 解析と FXR 活性化能の評価

Cpds.	R1	R3	FRET FXR EC ₅₀ (μ M)	Relatively agonistic activity (%) ¹
11			0.14 \pm 0.07	19.4 \pm 15.4
17			0.49 \pm 0.16	26.6 \pm 4.9
18			0.25 \pm 0.12	13.5 \pm 11.2
19			0.41 \pm 0.34	15.6 \pm 10.8
12			ia ²	nc ³
20			0.63 \pm 0.38	9.3 \pm 7.8
21			0.64 \pm 0.46	21.9 \pm 10.2
22			ia ²	nc ³
23			0.76 \pm 0.50	10.2 \pm 9.0
24			0.51 \pm 0.39	19.6 \pm 12.0
25			0.14 \pm 0.02	23.9 \pm 11.9
26			ia ²	nc ³

1: Relatively agonistic activity with 2 μ M of GW4064 (%), 2: Inactive. 3: Not calculated

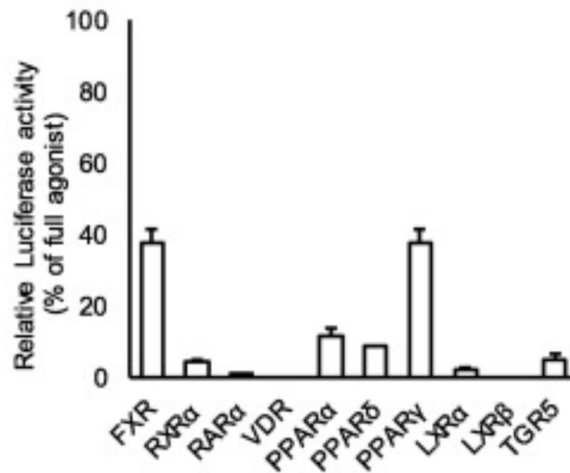


図 2. 化合物 18 の各種核内受容体に対する活性化能の検討

各種核内受容体および TGR5 の結合配列にルシフェラーゼレポーターを連結したコンストラクトをヒト肝がん由来 Huh-7 細胞に導入し、それぞれのアゴニスト (10 μ M) を用いて活性化能を評価した(mean \pm S.D.; n = 3)。

次に、化合物 18 の PPAR γ 活性化のメカニズムを解析した。マウス脂肪細胞株 3T3-L1 を、化合物 18 またはロシグリタゾン (PPAR γ アゴニスト) で前処理しておく、TNF α 刺激による PPAR γ の Ser273 のリン酸化が化合物 18 の用量依存的に抑制されることが分かった(図 3 A, B) この結果は、化合物 18 は CDK5 を介した PPAR γ の Ser273 のリン酸化を抑制し、PPAR γ を活性化することを示している。CDK5 による PPAR γ の Ser273 のリン酸化は PPAR γ の活性を抑制することが知られている。

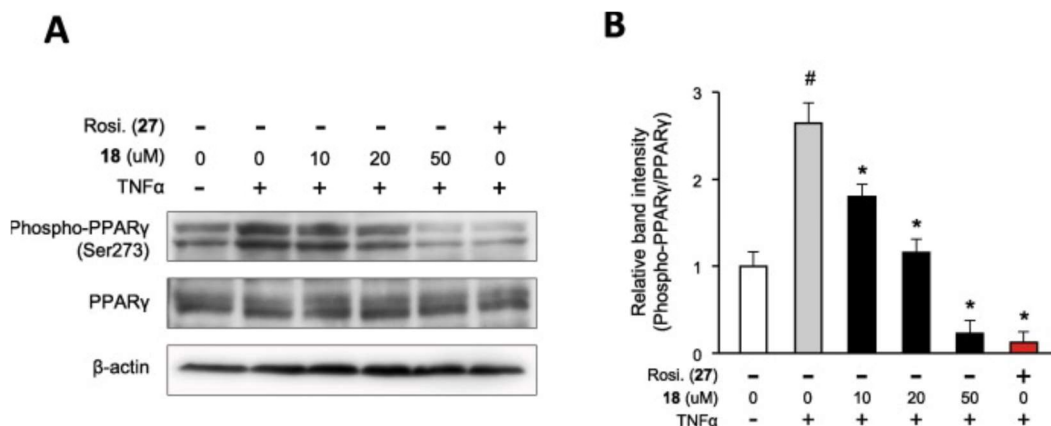


図 3. 脂肪細胞における化合物 18 による PPAR γ のリン酸化の抑制

(A) 3T3-L1 細胞を化合物 18 (0–50 μ M) あるいはロシグリタゾン(Rosi.: 5 μ M) で 1 時間前処理した後、TNF α (50 ng/mL) と化合物 18 (0–50 μ M) あるいはロシグリタゾン(Rosi.: 5 μ M)で 90 分間処理した。リン酸化 PPAR γ (Ser273)、total PPAR γ および β -actin (内部標準) の発現を Western blotting により解析した。(B) (A)の結果のバンド強度を測定した (mean \pm S.D.; n=3, #p < 0.01, vs. non-treated cells, *p < 0.01, vs. TNF α)

alone-treated cells)。

臨床試験において、FXR および PPAR γ アゴニストはそれぞれ個別に評価、検討されている。FXR アゴニストであるオベチコール酸と PPAR γ アゴニストであるピオグリタゾン、非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) における抗糖尿病薬としての臨床試験で良好な結果を示している。NAFLD は肥満と密接に関連しており、インスリン抵抗性糖尿病 (2 型糖尿病) にも密接に関連している。よって、化合物 18 は NAFLD と 2 型糖尿病の両方を標的とすることから、代謝性疾患の治療のための包括的なアプローチに有効であると考えられる。

成果発表：

<原著論文>

Yamashita, Y., Gohda, K., Iguchi, Y., Fujimori, K., Oda, K., Masuda, A., Une, M., Teno, N. Discovery of FXR/PPAR γ dual partial agonist. *Bioorg. Med. Chem.* 85: 117238 (2023)

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 感染制御学研究室
職・氏名 准教授・宮本 勝城

研究テーマ：

Vibrio vulnificus M2799 株の鉄獲得機構の解明

研究期間：

令和 4 年 4 月 1 日 ～ 令和 5 年 3 月 3 1 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 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・准教授)

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失株を作製した。すなわち、イソコリスミン酸合成酵素(ICS)、 Fe^{3+} -*vulnibactin* 錯体を基質とする鉄還元酵素(VuuB)、 Fe^{3+} -*vulnibactin* 錯体の外膜レセプター(VuuA)、および Fe^{3+} -*vulnibactin* 錯体のペリプラズム結合タンパク質(FatB)の欠失株を作製した。これらの欠失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 遺伝子欠失株では増殖が顕著に抑制されたが、VuuB および FatB 遺伝子欠失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、FatB の代替タンパク質として、ハイドロキサメート型シデロフォア鉄錯体のペリプラズム結合タンパク質 VatD が機能すること、VuuB の代替タンパク質として、ハイドロキサメート型シデロフォア鉄錯体の還元酵素である IutB が機能することを明らかにした。今回、FatB および VatD、VuuB および IutB の高発現系を構築し、前者については結晶化、後者については諸性質について検討した。

本年度の研究内容および研究成果：

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。VatD アポ体およびシデロフォア鉄錯体との複合体について結晶化スクリーニングを行っている。

次に *V. vulnificus* M2799 株の *vuuB* および *iutB* 遺伝子を pProEX HTa および pET21b(+) に連結して大腸菌 BL21(DE3)pLysS 株に導入し、VuuB を N 末端、IutB を C 末端 His タグ融合タンパク質として高発現させた。得られた VuuB および IutB を用いて酵素活性を測定した。その結果、VuuB は NADH を電子供与体として、IutB は NADH、NADPH および GSH を電子供与体として FeNTA を還元し、その効果はそれぞれ 10 μM FAD および 20 μM NADH、100 μM GSH および 100 μM NADPH 存在下において最も高い比活性を示した。次に、カテコール型シデロフォアとして *vulnibactin* および *vibriobactin*、ハイドロキサメート型シデロフォアとして *aerobactin* および *deferoxamine* を用いて反応特異性について検討した結果、VuuB は Fe³⁺-*aerobactin* 錯体、Fe³⁺-*vibriobactin* 錯体および Fe³⁺-*vulnibactin* 錯体に対して、IutB は Fe³⁺-*aerobactin* 錯体、Fe³⁺-*vulnibactin* 錯体 Fe³⁺-*deferoxamine* 錯体および Fe³⁺-*vibriobactin* 錯体に対して鉄(III)還元活性を示し、Fe³⁺-*vulnibactin* 錯体に対する比活性は 1.72 ± 0.01 および 2.32 ± 0.70 nmol/min/mg protein とほぼ同様の比活性を示した。

成果発表：

<学会発表>

- ・ 宮本勝城
鉄を標的とした新規感染症治療薬の開発。
日本薬学会第 143 年会、札幌 (2023 年 3 月)。

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 有機薬化学研究室
職・氏名 教授・宇佐美吉英

研究テーマ：

海洋天然物を基盤とする新規 α -グルコシダーゼ阻害剤の開発

研究期間：

平成・令和 2 年 4 月 1 日 ～ 令和 5 年 3 月 3 1 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 宇佐美吉英 (大阪医科薬科大学・薬学部・教授)

研究分担者 米山弘樹 (大阪医科薬科大学・薬学部・講師)

研究分担者 葉山登 (大阪医科薬科大学・薬学部・助教)

<共同研究機関>

研究代表者 植沢芳広 (明治薬科大学・薬学部・教授)

研究分担者 永井純子 (明治薬科大学・薬学部・助教)

研究目的：新規な α -グルコシダーゼ阻害活性化合物の創製は、全世界で絶え間なく増え続ける糖尿病有病者を前に、我々薬学研究者、とりわけ有機合成化学に携わる者が貢献できる非常に重要な研究テーマの一つである。我々は、この 20 年あまりの間、カルバシュガー構造を有する海洋天然物 pericosine 類の合成研究を行ってきた。その中で、pericosine E (**1**) の初の全合成を達成し、その後、塩素を含む誘導体が顕著な α -グルコシダーゼ阻害活性を示すことを明らかにした。また、その後の塩素原子を含まない類縁体合成研究を経て、顕著な活性に塩素原子の存在が必須であることを示した。そこで、次に図 1 下段に示す他のハロゲンをもつ pericosine E 誘導体 **3**~**8** の合成を計画した。

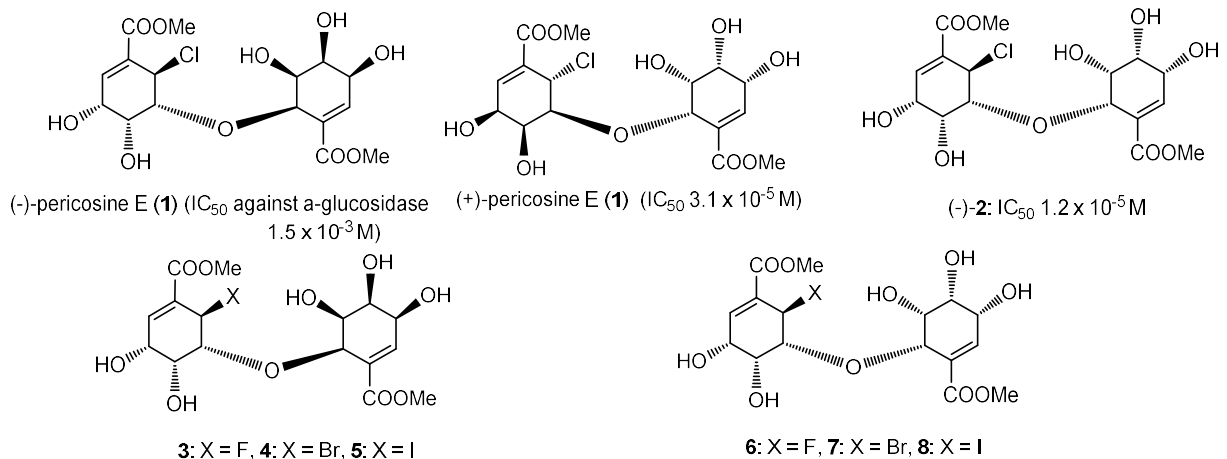


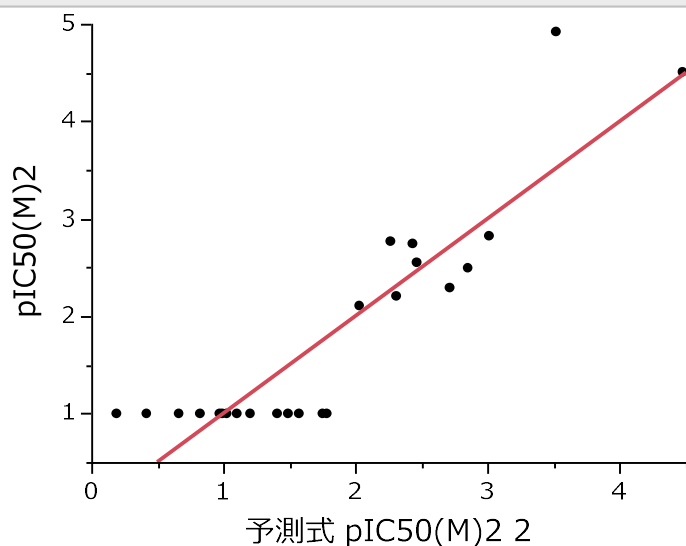
図 1. Pericosine E (**1**) および本研究における合成標的化合物 **3**~**8** の構造

本年度の研究内容および研究成果：

1. 新規単環性 pericosine E 誘導体の活性の予測

modeling には PLS 回帰分析法を使用し、これまでに合成した pericosine E 誘導体の構造と実験で得られた α -グルコシダーゼに対する IC_{50} 値を入力し、測定値が得られない化合物の $pIC_{50}(M)$ は 1 と仮定して、図に示すようにグラフ化し、新規合成標的の活性予測を行った。

予測式 $pIC_{50}(M)2$ と $pIC_{50}(M)2$ の二変量の関係



— 直線のあてはめ

直線のあてはめ

$$pIC_{50}(M)2 = -2.22e-16 + 1 * \text{予測式 } pIC_{50}(M)2$$

あてはめの要約

R2乗	0.81015
自由度調整R2乗	0.801521
誤差の標準偏差(RMSE)	0.512763
Yの平均	1.809303
オブザベーション(または重みの合計)	24

分散分析

要因	自由度	平方和	平均平方	F値
モデル	1	24.683740	24.6837	93.8810
誤差	22	5.784367	0.2629	p値(Prob>F)
全体(修正済み)	23	30.468107		<.0001*

パラメータ推定値

項	推定値	標準誤差	t値	p値(Prob> t)
切片	-2.22e-16	0.214067	-0.00	1.0000
予測式 $pIC_{50}(M)2$	1	0.103207	9.69	<.0001*

図 2. 令和 4 年度合成標的化合物の構造と α -グリコシダーゼ阻害活性予測

その結果、 $pIC_{50}(M)$ の予測値は、化合物 **3** : 1.6011845116、**4** : 3.9137942433、**5** : 3.4150664176、**6** : 2.8577571014、**7** : 2.5891289783、**8** : 3.8802629261 となり、mM レベルの IC_{50} 値での活性が期待できるといふ計算結果が得られた。この結果を受けて合成について検討した。

2. 標的化合物の合成.

既に報告した pericosine E の合成スキームに従って、Lewis 酸触媒として BF₃ 存在下、各種ハロヒドリン **9** と *trans*-エポキシド **10** とのカップリング反応を行ったところ、ハロゲンがフッ素、臭素の場合には低収率 (10-20%程度) ながら目的のカップリング体 **11_F**, **11_{Br}** を与えたが、ヨウ素の場合には目的物 **11_I** を与えず、4%程度の収率で構造未定の生成物 **12** を与えた。目的のカップリング体の収率が満足できるものではなかったため、先の合成には進めなかった。

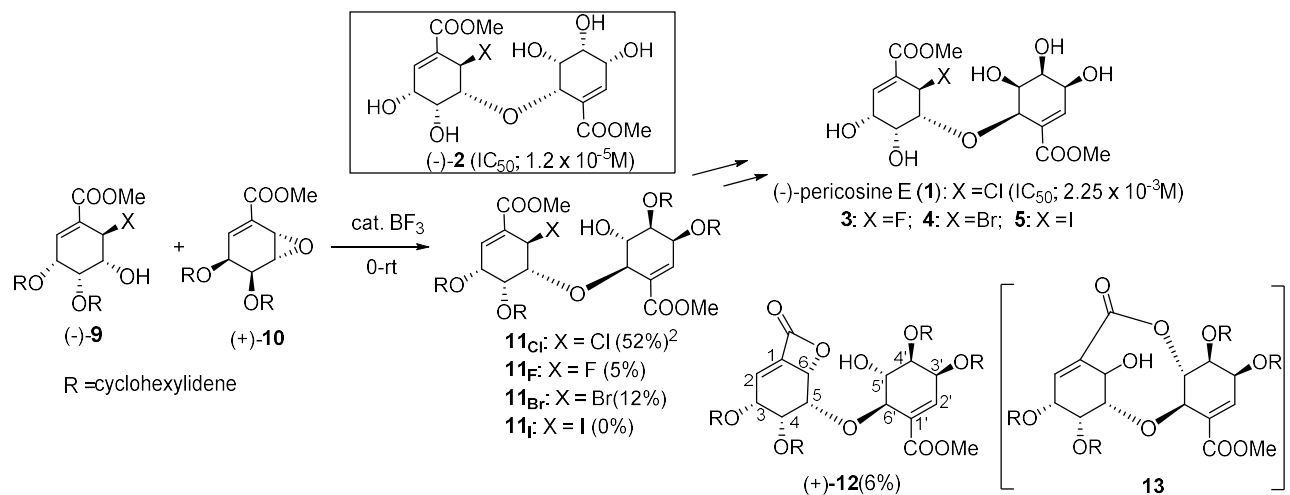


図 3 標的化合物の合成の検討

ヨードヒドリンとの反応における生成物 **12** の構造決定については、各種スペクトル解析より、メトキシ基を 1 つもち、ヨウ素原子を欠いていることが判明したことから、当初、分子内ラクトン **13** の構造が考えられたが、その後の NOESY 解析において H6/H6' にクロスピークが観測されたため、**13** の可能性は排除され、別の分子内ラクトン **12** の構造が示唆された。

成果発表 :

<原著論文>

- [Yoshihide Usami](#), Yoshino Mizobuchi, Mai Ijuin, Takeshi Yamada, Mizuki Morita, Koji Mizuki, [Hiroyuki Yoneyama](#), and Shinya Harusawa. Synthesis of 6-Halo-substituted Pericosine A and Their Evaluations for Antitumor and Antiglycosidase Activities. *Marine Drugs*, **20** (7), 43, 2022.
- [Yoshihide Usami](#), Kimika Nakamura, Yoshino Mizobuchi, Koji Mizuki, Shinya Harusawa, [Hiroyuki Yoneyama](#), and Takeshi Yamada. Enantiomeric composition of natural pericosine A derived from *Periconia byssoides* and α -glycosidase inhibitory activity of (-)-enantiomer. *Chirality*, **34**, 1320-1327, 2022.

<学会発表>

- 宮本京香、新子沙矢、野村有佐、葉山登、米山弘樹、植沢芳広、宇佐美吉英
塩素以外のハロゲンを含むペリコシン E 類縁体の合成への試み。
日本薬学会第 143 年会、2023 年 3 月(札幌.)

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 有機薬化学研究室

職・氏名 助教・葉山 登

研究テーマ：

医薬品の誘導体に対する分子鑄型ポリマーの調製と応用

研究期間：

令和 4 年 4 月 1 日 ～ 令和 5 年 3 月 3 1 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 葉山 登 (大阪医科薬科大学・薬学部・助教)

研究分担者 宇佐美 吉英 (大阪医科薬科大学・薬学部・教授)

研究分担者 米山 弘樹 (大阪医科薬科大学・薬学部・講師)

<共同研究機関>

研究代表者 萩中 淳 (武庫川女子大学・バイオサイエンス研究所・所長)

研究分担者 本田 千恵 (武庫川女子大学・バイオサイエンス研究所・助教)

研究分担者 西村 奏咲 (武庫川女子大学・薬学部・講師)

研究分担者 堀山 志朱代 (武庫川女子大学・薬学部・講師)

研究目的：

去勢抵抗性前立腺がんの治療に用いられている **Abiraterone (Abi)** は、生体内で 3β -Hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD) により、**Abi** よりも活性の高い Δ^4 -**Abi (D4A)** に代謝される。**D4A** は 5α -Reductase および 5β -Reductase により、それぞれ **3-Keto-5 α -Abi** および **3-Keto-5 β -Abi** に代謝され、 3β -HSD および 3α -HSD により、**3-Keto-5 α -Abi** は **3 α -OH-5 α -Abi** および **3 β -OH-5 α -Abi** に、**3-Keto-5 β -Abi** は **3 α -OH-5 β -Abi** および **3 β -OH-5 β -Abi** に代謝される。**Abi** の併用治療効果を評価する目的で、高分解能 LC/MS 装置により、**Abi** およびその代謝物のヒト血清中濃度を測定したところ、いくつかの未知ピークの出現を確認した。今回、**D4A** および Δ^5 -**Abi (D5A)** と同じ精密質量値 m/z 348.2322 の抽出マスキロマトグラム上に出現した未知ピークの構造を明らかにすることを目的とする。

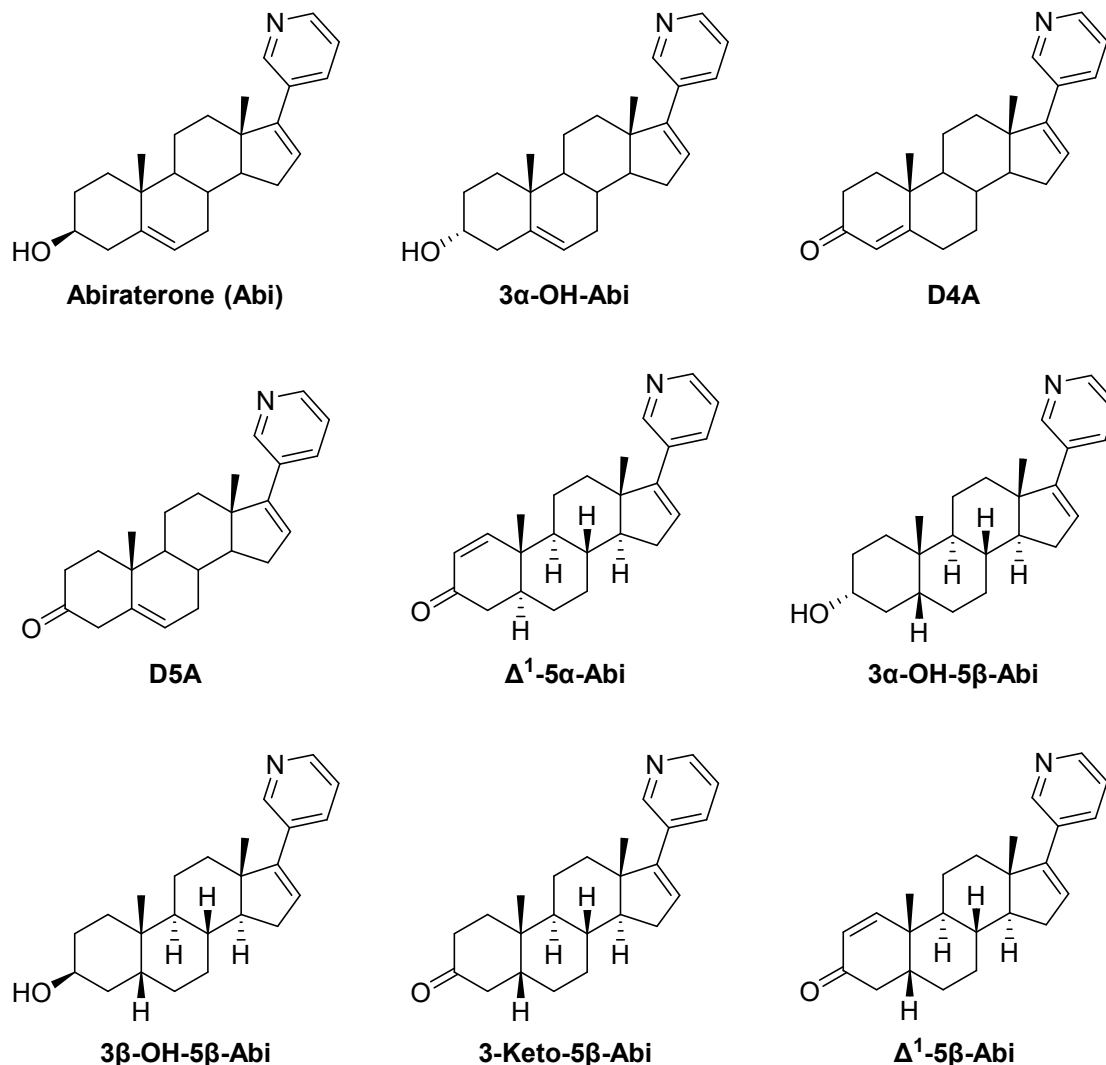
本年度の研究内容および研究成果：

本年度は、以下の項目について研究を実施した。

① 代謝物の合成

3 α -OH-Abi, **D4A**, **D5A** は **Abi** から数工程を経てそれぞれ合成できることを明らかにした。また、 **Δ^1 -5 α -Abi** は **3-Keto-5 α -Abi** から、ステロイド骨格の 2 位を臭素化した後に、塩基で処理することで選択的に合成できることを見出した。一方、**3 α -OH-5 β -Abi** は文献 (*Nature*, **533**, 547–551 (2016)) を

参考に *3 α -Hydroxy-5 β -androstan-17-one* から合成できることを確認した。得られた **3 α -OH-5 β -Abi** を原料として **3 β -OH-5 β -Abi**, **3-Keto-5 β -Abi**, **Δ^1 -5 β -Abi** の調製をそれぞれ検証し、合成経路を確立した。また、いずれの化合物も NMR, LC/MS 分析に必要な量を合成し、供給した。



② 代謝物の分析

LC/MS 装置には、LC として Nexera (Shimadzu)、MS として impact II Q-TOF (Bruker) を用い、ESI 法の正イオンモードで分析した。分析カラムは ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1 \times 150 mm, 3.5 μ m) を用い、移動相は CH₃OH/CH₃CN (60/40, v/v) および H₂O のグラジエント溶離を用い、流速は 0.2 mL/min とした。

Abi 投与後のヒト血清試料の [M+H]⁺ *m/z* 348.2322 \pm 0.005 の抽出イオンクロマトグラムの保持時間 14.7 min の未知ピークが **D5A** であることを既に報告した。そこで、保持時間 12.72 min に出現した未知ピークは二重結合の位置が異なる、 **Δ^1 -5 α -Abi** あるいは **Δ^1 -5 β -Abi** と推測し合成した。ヒト血清試料に合成した二種の化合物を添加して分析用試料とし、LC/MS を測定した。 **Δ^1 -5 α -Abi** は保持時間 13.09 min、 **Δ^1 -5 β -Abi** は保持時間 12.79 min にピークが出現し、 **Δ^1 -5 β -Abi** が未知代謝物であることが明らかとなった (Figure)。Abi の代謝物として **D5A** を新たに報告したが、本研究は、**D5A** に加え

て、 Δ^1 -5 β -Abi が生成する可能性を示唆している。

今後、 Δ^1 -5 β -Abi の代謝経路について検討する予定である。

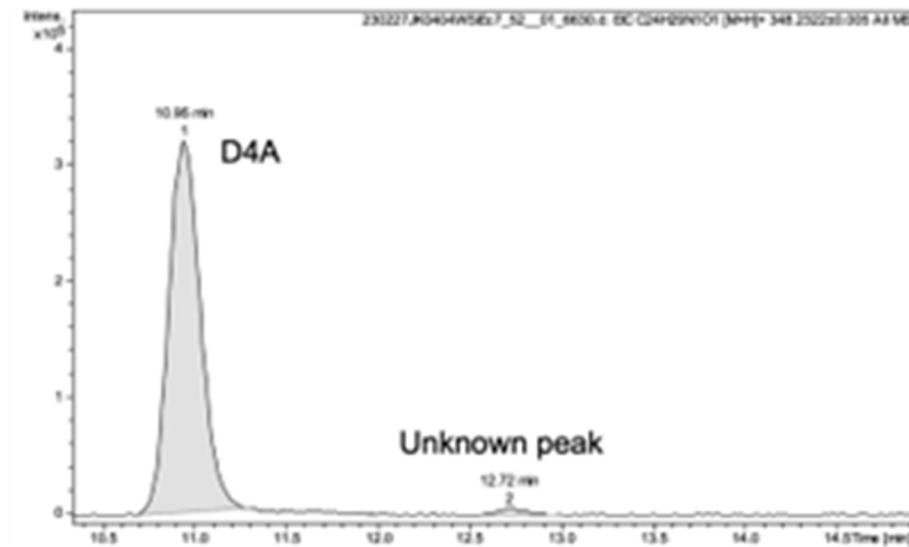


Figure. Extracted ion chromatogram of m/z 348.2322 \pm 0.005 after administration of Abi acetate.

成果発表：

<学会発表>

- ・ヒト血清中のアビラテロンおよびその代謝物の分析における未知代謝物の解析：堀山志朱代、葉山登、米山弘樹、宇佐美吉英、萩中淳、第 34 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、9 月（千葉）
- ・アビラテロンの未知代謝物の同定解析：葉山登、堀山志朱代、西由紀菜、矢田麻奈衣、米山弘樹、萩中淳、宇佐美吉英、日本薬学会第 143 年会、3 月（札幌）

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 薬物治療学Ⅱ研究室

職・氏名 教授・福森 亮雄

研究テーマ：

アルツハイマー病治療を目指す基質結合機構の解明

研究期間：

令和2年11月1日～令和5年3月31日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 福森 亮雄（大阪医科薬科大学・薬学部・教授）

<共同研究機関>

研究代表者 工藤 喬（大阪大学大学院医学系研究科・精神健康医学・教授）

研究分担者 丸山 理気（大阪大学大学院医学系研究科・医学系研究科・大学院生）

研究目的：

本研究の目的は γ セクレターゼのエクソサイトと呼ばれる基質結合部位への結合機構を解明し、副作用の少ないアルツハイマー病（AD）治療薬開発につなげることである。アルツハイマー病の病原物質アミロイド β ($A\beta$)産生において重要な働きをする γ セクレターゼの阻害剤及び調節剤は、薬効は期待されるものの副作用の懸念から開発が難航している。報告者らは従来の γ セクレターゼ阻害剤が潜在的に有する副作用リスクを回避できる新規の作用部位としてエクソサイトを同定してきた。この共同研究では、そのエクソサイトへの多様な基質の結合メカニズムを調べるとともに、その副作用を回避できる阻害法開発へ向けた基盤構築を行う。

本年度の研究内容および研究成果：

【方 法】

アミロイド前駆体基質 (APP-C99 および APP-C83) の γ セクレターゼのエクソサイトへの結合の可視化は、ケミカルバイオロジーの技術のひとつである部位特異的光親和性クロスリンク法 (図 1) を用いた。この手法により、分子の相互作用をアミノ酸レベルで検出できる。具体的には非天然アミノ酸 (para benzoyl phenylalanine) の遺伝的取り込み法

(図 2) を用いて、分子中の任意の 1 アミノ酸をクロスリンク可能な側鎖を持つ非天然アミノ酸に置き換えたアミロイド前駆体基質を大腸菌に発現させ C 末端に HIS タグにより精製する。その精製基質を γ セクレターゼを含む細胞溶解液と混合し、インタクトな結合状態で、光照射しクロスリンクさせる。その後、変性条件で、複合体を解離し、HIS タグを用いてプルダウンし、ウェスタンブロットする。基質と共有結合した酵素分子は分子量が増加する (黄矢頭が赤矢頭となる。図 3)。このようにして、基質分子中の各アミノ酸に接触する酵素分子を検出した。

図1 特定のアミノ酸がどの分子と接しているかわかる

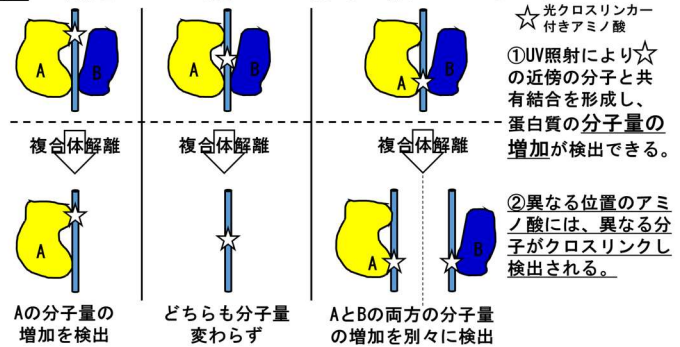


図2 光親和性クロスリンク可能な非天然アミノ酸の遺伝的取り込み法

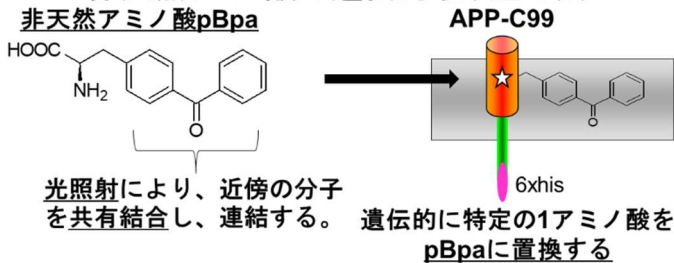
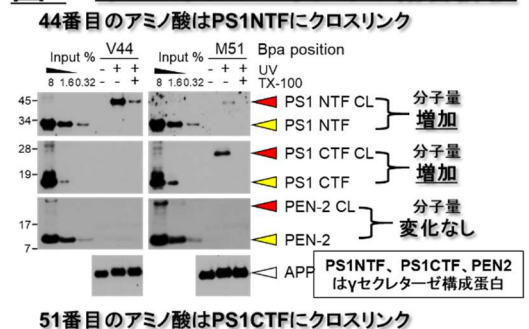


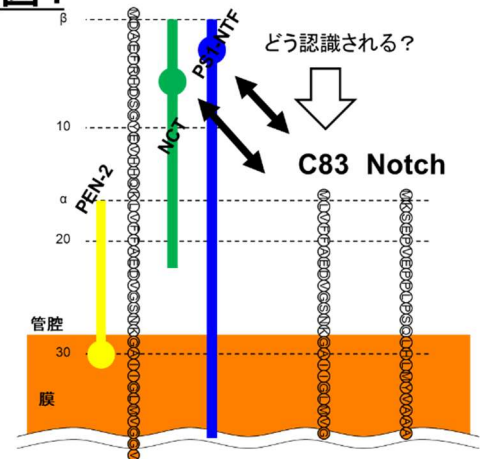
図3 ウェスタンブロットでの結合評価



【結 果】

本年度は定量を完了させて、まとめを行った。 γ セクレターゼの代表的な基質 APP-C83 に絞り、APP-C83 のエクソサイト結合の検出系を用いて正確に結合量を定量した。APP-C83 は、 $A\beta$ の直接の前駆体である APP-C99 と同じく、アミロイド前駆体蛋白 (APP) 由来の γ セクレターゼの基質であるが、APP-C99 とは異なり、アミノ末端の 16 アミノ酸が欠けている。この欠損 16 アミノ酸残基には、APP-C99 がエクソサイトと相互作用する主要なアミノ酸が含まれており、エクソサイトへの結合メカニズムについてなんらかの洞察が得られると考え、APP-C83 に焦点を当て解析した (図 4)。APP-C83 の部位特異的光クロスリンク法を用いて、単一アミノ酸レベルでの γ セクレターゼとの相互作用を直接調べた。 γ セクレターゼのサブユニット蛋白

図4 C99



である PEN-2 は X 番残基が強く相互作用した。それに対して、APP-C99 の PEN-2 との相互作用は X+1 番残基で強かった。このように、相互作用アミノ酸残基が異なっていた。また、論文の投稿を行った。

【考 察】

今回、APP-C83 もエクソサイト構成蛋白と相互作用することを示した。また、その相互作用するアミノ酸は、APP-C99 とは異なることを明らかにした。これらのことから、エクソサイトの結合にはアミノ酸配列の異なる基質を認識する柔軟性がある事がわかった。今後この柔軟性を回避できるようなエクソサイト阻害剤を探す必要がある。また、論文の改訂を行いチャレンジする。

成果発表：

<原著論文>

- APLP2 is predominantly cleaved by β -secretase and γ -secretase in the human brain.

Yanagida K, Maruyama R, Tagami S, Kudo T, Okochi M, Fukumori A.
Psychogeriatrics. 23(2):311-318. (2023)

- Active site geometry stabilization of a presenilin homolog by the lipid bilayer promotes intramembrane proteolysis.

Feilen LP, Chen SY, Fukumori A, Feederle R, Zacharias M, Steiner H.
Elife. 11:e76090. (2022)

<学会発表>

- アルツハイマー病における凝集した A β に対する生体反応に関連する分子である IL3R α の代謝

高野 結月、柳田 寛太、新宮 愛、山口 敬子、岡田 健、福森 亮雄
日本薬学会 第 143 年会、2023 年 3 月 27 日

- アルツハイマー病の A β 産生酵素 γ セクレターゼの切断スピードはなぜ遅いのか？

大島 真穂、柳田 寛太、岡田 健、新宮 愛、山口 敬子、浅野 晶子、土井 光暢、福森 亮雄
日本薬学会 第 143 年会、2023 年 3 月 27 日

- アルツハイマー病の病原物質である凝集 A β を認識する受容体である Tyro3 の代謝

高嶋 結衣、柳田 寛太、新宮 愛、山口 敬子、岡田 健、福森 亮雄
日本薬学会 第 143 年会、2023 年 3 月 27 日

- APP ファミリータンパク APLP1 の γ セクレターゼによる連続切断の解析

大西 由梨恵、柳田 寛太、新宮 愛、山口 敬子、岡田 健、福森 亮雄
日本薬学会 第 143 年会、2023 年 3 月 27 日

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 大阪医科薬科大学薬学部
職・氏名 教授・奥平桂一郎

研究テーマ：

ABC トランスポーターの発現制御および機能解析研究

研究期間：

令和 4 年 4 月 1 日 ～ 令和 5 年 3 月 3 1 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 奥平桂一郎 (大阪薬科大学・薬学部・教授)

<共同研究機関>

研究代表者 尾崎 恵一 (同志社女子大学・薬学部・教授)

研究目的：

ABC トランスポーターは、生体膜にあって ATP 加水分解と共役して、薬剤・イオン・脂質等の輸送を担い、遺伝子変異による機能不全は様々な遺伝病の発症と関連することが報告されている。さらに、抗がん剤に対してがん細胞が抵抗性を示す多剤耐性に ABC トランスポーターが関与していることがよく知られており、がん化学療法における大きな問題となっている。本研究ではまず、ABC トランスポーターの一つである P-糖タンパク質(ABCB1,P-gp)の発現亢進が認められる多剤耐性慢性骨髄性白血病 K562 細胞 (K562/Vin および K562/Adm) を用いて、これらの細胞に対する各種ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤の効果について検討した。さらに、ABC トランスポーターの一つである ABCA1 が、免疫抑制剤 Fingolimod で発現が制御される分子メカニズムについて検討した。

本年度の研究内容および研究成果：

まず、本邦で承認されている HDAC 阻害剤 4 剤のうちの 3 剤 (Romidepsin, Panobinostat, Tucidinostat) に対して上記細胞が耐性を獲得していることが明らかとなった。また、米国で臨床試験が進む P-gp 阻害剤 (Tariquidar 他) を併用することで、その耐性が P-gp によるものであることが確認された。次に、多剤耐性を示さない通常の K562 細胞の 3 次元スフェロイド培養系を構築して、従来の浮遊培養系と比較したところ、Vincristine および Doxorubicin の効果は顕著に減弱していたが、HDAC 阻害剤感受性はなお高かった。一方、K562/Vin、K562/Adm 細胞スフェロイド培養系では、やはり HDAC 阻害剤耐性を示したが、P-gp 阻害剤である Tariquidar 併用で感受性を回復することが分かった。さらに、浮遊培養系で各種 P-gp 阻害剤候補化合物の併用を試みたところ、経口妊娠中絶薬 mifepristone についても P-gp 阻害効果を示し、HDAC 阻害剤感受性を回復させた。また、抗老化薬としても知られる Resveratrol 及び類縁体については、P-gp 阻害効果は認められなかったが、P-gp 発現量に関係なく単独で各種 K562 細胞の増殖を抑制した。しかし、その cis 異性体の効果は弱かった。以上、本研究

では P-gp を介した HDAC 阻害剤耐性化と、P-gp 阻害剤による多剤耐性克服の可能性を明らかにした。

動脈硬化の進展に伴って血管壁に動脈硬化巣（プラーク）が形成されるが、これは酸化した脂質等を貪食したマクロファージが泡沫化して蓄積したものである。フィンゴリモド（FTY720）は、多発性硬化症の治療薬として臨床現場で使用されている免疫抑制剤であり、これまでに動脈硬化性プラークの形成を抑制することが報告されている。しかし、マクロファージの泡沫化に対する FTY720 の効果については、ほとんど知られていなかった。そこで、マウスマクロファージ細胞を用いて調べたところ、FTY720 は ABCA1 の発現を増加させることによって、細胞内の脂質滴形成を抑制することが分かった。また、FTY720 は、FASN、APOE、ABCG1 といった肝臓 X 受容体（LXR）標的遺伝子の発現を増強することが明らかになった。また、FTY720 による ABCA1 の発現上昇は、スフィンゴシンキナーゼ 2（SphK2）の発現をノックダウンすることで抑制された。さらに、FTY720 投与によりヒストン H3 リジン 9（H3K9）のアセチル化が誘導されたが、これは SphK2 ノックダウンした細胞で消失することがわかった。以上のことから、FTY720 は SphK2 を介した H3K9 のアセチル化を通じて ABCA1 の発現を誘導し、マクロファージにおける脂質の蓄積を抑制することが明らかとなった。以上、本研究では FTY720 の ABCA1 に対する新しい分子制御機構を明らかにし、動脈硬化治療に対する FTY720 の可能性を示した。

成果発表：

<原著論文>

1. Tachibana K, Kusumoto K, Ogawa M, Ando H, Shimizu T, Ishima Y, Ishida T, Okuhira K. FTY720 Reduces Lipid Accumulation by Upregulating ABCA1 through Liver X Receptor and Sphingosine Kinase 2 Signaling in Macrophages. *Int J Mol Sci*, 23(23):14617, 2022
2. Ohoka N, Yokoo H, Okuhira K, Demizu Y, Naito M. Molecular Design, Synthesis, and Evaluation of SNIPER (ER) that Induces Targeted Protein Degradation of Era. *Methods Mol Biol*, 2418:363-382, 2022

<学会発表>

1. 立花洗季, 楠本嵩志, 前橋梨花, 樹山友絵, 永尾綾菜, 辻田麻紀, 異島優, 石田竜弘, 奥平桂一郎 : 「ApoA-1 binding protein の加齢に伴う血清中濃度の変化およびその抗炎症作用」フォーラム 2022 衛生薬学・環境トキシコロジー
2. 立花洗季, 楠本嵩志, 前橋梨花, 樹山友絵, 永尾綾菜, 辻田麻紀, 異島優, 石田竜弘, 奥平桂一郎 : 「抗炎症タンパク質 ApoA-1 binding protein の加齢に伴う血清中濃度の変化」第 95 回日本生化学会大会
3. 外村奈夕, 奥平桂一郎, 尾崎恵一 : 「多剤耐性慢性骨髄性白血病細胞の各種 HDAC 阻害剤に対する感受性とその耐性克服」第 26 回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 楠本嵩志, 佐々木澄美, 立花洗季, 橋本蒼太, 山口絢香, 小川真奈加, 石原理沙, 吉田徳幸, 井上貴雄, 奥平桂一郎 : 「線虫における核酸トランスポーター SID-1 のヒト相同分子の解析」日本薬学会第 143 年会
5. 服部菜々美, 佐久間覚, 奥平桂一郎 : 「Sulforaphane は PRDM16 経路を介して白色脂肪細胞のベージュ化を誘導する」日本薬学会第 143 年会
6. 奥平桂一郎 : 「動脈硬化抑制因子の機能研究」神戸薬科大学 特別研究セミナー

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 生体分析学研究室
職・氏名 教授・天満 敬

研究テーマ：
ホウ素センサープローブの開発に関する研究

研究期間：
令和 3 年 4 月 1 日 ～ 令和 5 年 3 月 3 1 日

研究担当者：
<本学>
研究代表者 天満 敬 (大阪医科薬科大学・薬学部・教授)
研究分担者 近藤 直哉 (大阪医科薬科大学・薬学部・助教)
研究分担者 高田 慎也 (大阪医科薬科大学・薬学部・博士課程学生)
<共同研究機関>
研究代表者 萩森 政頼 (武庫川女子大学・薬学部・教授)

研究目的：
ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) は、腫瘍細胞に集積した質量数 10 のホウ素原子 (^{10}B) が熱中性子線照射により核変換反応を起こし、発生する飛程の短い α 線および Li 反跳原子核によって腫瘍細胞のみを殺傷する高効率ながん治療法である。近年、BNCT 用の加速器中性子源が実現されたことに伴って、難治性のがんに対する新たな可能性を秘めた治療法として大きな注目を集めており、BNCT 用加速器中性子源が大阪医科薬科大学関西 BNCT 共同医療センターをはじめ日本各地に設置され始めている。

BNCT によるがんの治療を成功に導くためには、腫瘍細胞内のみならず 20 ppm 以上の ^{10}B を集積させる必要があり、 ^{10}B を送達させるための薬剤 (ホウ素薬剤) の開発は、BNCT の成否を決める最重要課題となっている。しかしながら、現在 BNCT に臨床利用されているホウ素薬剤は、腫瘍選択性・集積性において十分なものではなく、より有効な新規ホウ素薬剤の開発が急務となっている。さらに、新たなホウ素薬剤開発において基礎的な有効性評価のためにはホウ素の細胞内局在評価を可能とするホウ素センサープローブが必須であるが、現状インビトロ評価に優れた特性を示すものがなく、ホウ素薬剤開発のボトルネックとなっている。

このような背景から本共同研究では、ホウ素の細胞内局在評価に優れた特性を示す新しいホウ素センサープローブの開発を行う。本共同研究の成果は、新たなホウ素薬剤の効率的創出と、医学・薬学・工学・物理学など多くの学問分野の結集たる BNCT 領域のさらなる発展に貢献すると期待される。

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を実施した。

① ホウ素センサーBS631 の開発に関する検討

上述のとおり、BNCT は ^{10}B と中性子の核反応により生じる短飛程の粒子線を用いる治療法であり、その治療効果は ^{10}B の細胞内濃度や局在に依存する。これまでに、BNCT 用薬剤構造中に汎用されるボロン酸を標的とした蛍光センサーが開発され、薬剤の局在評価に利用されてきた。しかしながら、既存センサーは青色蛍光を発し、一般的な核染色試薬との共染色が困難であった。本研究では、蛍光色素への導入により長波長化が報告されるテトラヒドロキノキサリンをボロン酸捕捉構造に組み込んだセンサーBS-631 を設計・合成後、現在臨床で用いられる BNCT 用薬剤 BPA を用いて、その有効性を評価した。

BS-631 を 6 段階反応により合成した。BS-631 と BPA を 0.5%DMSO/H₂O 中で混合後、吸収・蛍光波長を調べた。BS-631 と各種金属カチオンについて、混合後の蛍光強度を BPA の場合と比較した。予め BPA を取り込ませた細胞について固定化後、BS-631 を添加した。30 分後、Hoechst 33342 による核染色、蛍光顕微鏡観察を行った。

BS-631 を総収率 3.2%で合成した。BPA と混合後の BS-631 の極大励起波長は 425 nm、極大蛍光波長は 631 nm と赤色領域まで蛍光の長波長化を認めた。BS-631 の蛍光強度は BPA 濃度と高い直線性を示した。BS-631 は金属カチオンとの共存下で蛍光を発さず、ボロン酸への高い特異性を示した。BPA を取り込ませた細胞について、ボロン酸の局在を明瞭に可視化できた。以上、BS-631 は青色核染色試薬との共染色を可能とするボロン酸センサーとして有効である可能性が示された。

② ホウ素センサーBITQ の開発に関する検討

我々はこれまでに、ボロン酸化合物と反応して蛍光を生じるボロン酸検出用蛍光センサーPPN-1 を開発し、既存の蛍光センサーDAHMI と比べ、蛍光強度は同等であるが、ボロン酸との反応の高速化とストークスシフトの拡大が達成されることを明らかとしてきた。本研究ではさらに、細胞の蛍光顕微鏡観察を可能とするため、蛍光強度の上昇を目指して 2-(2'-hydroxyphenyl)-1H-benzimidazole を母体骨格とした BITQ を新たに設計・合成し、ボロン酸検出用蛍光センサーとしての特性を PPN-1 と比較した。

0.5%DMSO-H₂O 中で、センサーに 100 当量の BPA を加え、励起・蛍光スペクトルを測定した。EtOH 中でフェニルボロン酸を添加し、センサーの蛍光量子収率を相対法で測定した。BPA 添加後のセンサー蛍光強度から検出限界を調べた。BITQ を添加した BPA-Fructose 処置・未処置ヒト膵癌 T3M4 細胞を蛍光顕微鏡を用いて観察した。結果は PPN-1 の場合と比較した。

BITQ の BPA 添加後の励起極大波長、蛍光極大波長は、それぞれ 390 nm、480 nm となり、PPN-1 の 387 nm、442 nm と比較してストークスシフトの拡大を認めた。BITQ は PPN-1 と同様に BPA 添加後速やかな蛍光強度上昇を示した。BITQ は、PPN-1 と比べ著しく高い相対量子収率を示し、その検出限界は PPN-1 の 7 分の 1 の BPA 濃度となった。BITQ は、PPN-1 と異なり、BPA 処置細胞の明瞭な蛍光顕微鏡画像の取得を可能とした。以上より、BITQ は PPN-1 と比較して顕著な蛍光性の増強を達成し、ボロン酸化合物の細胞内局在評価に用いる蛍光センサーとしての高い可能性を示した。

成果発表：

<原著論文>

1. Takada S, Kondo N, Hagimori M, Temma T. Development of a switching-type fluorescence sensor for the detection of boronic acid-containing agents. *Anal Sci.* 2022;**38**(10):1289-96.
2. Kondo N, Aoki E, Takada S, Temma T. A red-emitting fluorescence sensor for detecting boronic acid-containing agents in cells. *Sensors.* 2022;**22**(19):7671.
3. Kondo N, Takada S, Hagimori M, Temma T. Development of a 2-(2-hydroxyphenyl)-1H- benzimidazole-based fluorescence sensor targeting boronic acids for versatile application in boron neutron capture therapy. *Cancers.* 2023;**15**(6):1862.

<学会発表>

1. Development of an off/on-type fluorescence sensor to visualize the intracellular distribution of boronoagents, Shinya Takada, Naoya Kondo, Takashi Temma, 13th Congress of the World Federation of Nuclear Medicine and Biology, Sep 8th to 11th, 2022 (Kyoto, Japan)
2. ボロン酸の高感度蛍光分析のための蛍光オフオンセンサーの開発：TQ-HPBI の合成と培養細胞を用いた有効性評価、高田慎也、近藤直哉、萩森政頼、天満 敬、日本分析化学会第 71 年会、2022 年 9 月 16 日（岡山）
3. ボロン酸の細胞内局在評価を目的とした蛍光センサーの開発に関する研究、高田慎也、近藤直哉、萩森政頼、天満 敬、第 72 回日本薬学会関西支部総会・大会、2022 年 10 月 8 日（大阪）
4. 細胞内ホウ素局在解析と血中ホウ素濃度定量のためのボロン酸検出用蛍光センサーの開発、高田慎也、近藤直哉、萩森政頼、天満 敬、第 18 回日本中性子捕捉療法学会学術大会、2022 年 10 月 30 日（つくば）
5. ボロン酸含有薬剤の細胞内局在評価を目的とした赤色蛍光センサーの開発、青木映里香、近藤直哉、高田慎也、天満 敬、日本薬学会第 143 年会、2023 年 3 月 26 日（札幌）

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 薬物治療学研究室
職・氏名 准教授 幸田 祐佳

研究テーマ：

酸化ストレス疾患の予防と病態改善に関する研究

研究期間：

令和3年3月1日 ～ 令和5年3月31日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 幸田 祐佳 (大阪医科薬科大学・薬学部・准教授)

研究分担者 松村 人志 (大阪医科薬科大学・薬学部・名誉教授)

<共同研究機関>

研究代表者 福石 信之 (金城学院大学・薬学部・教授)

研究目的：

酸化ストレス[フリーラジカルの産生と消去系のバランスが崩れている状態]は、様々な疾患の成因として考えられており、肥満、糖尿病そして睡眠障害は酸化ストレス疾患である。

酸化ストレス疾患には、脳老化や脳疾患も含まれる。うつや不眠といった体調の変化は、インスリン抵抗性を増大させ、肥満や糖尿病を誘発することが報告されている。睡眠を調節することにより、うつを防ぐことが可能であるとの知見もある。

培養細胞ならびに肥満糖尿病モデルラットにおいて、血圧調節、血糖コントロールと睡眠や覚醒に関連する種々の遺伝子発現解析にて評価し、肥満症、アレルギー疾患、睡眠障害、糖尿病合併症を含む酸化ストレス疾患の予防、病態改善と治療法について検討する。

本共同研究において、酸化ストレス抑制による疾患の予防法のみならず病態を改善する新たな治療薬に繋がる知見を探究する。

本年度の研究内容および研究成果：

我々は、肥満・糖尿病モデルラットにおいて、チアミンを継続的に摂取することにより、酸化ストレス疾患である肥満と糖尿病合併症の予防に繋がることを報告している。肥満を伴う糖尿病、アレルギー疾患、睡眠障害における糖脂質代謝異常、酸化ストレス状態を多角的に捉え、予防と病態改善メカニズムの解明に向けて探究している。

肥満・糖尿病ラットの肝臓におけるインクレチン発現に焦点を当て、肥満と糖尿病状態へ与える影響に関する検討により、ラット肝臓における GIP 発現変動は、肥満・糖尿病ラットの酸化ストレス状態に影響する可能性を示唆する結果を得ている。肥満・糖尿病ラットにチアミン水を継続的に摂取させると、高血糖、肥満と肝臓病変の改善効果が得られた。チアミンの継続的な摂取は、血糖コントロ

ール、糖代謝調節に関連するインクレチン発現を変動させることが判明した。チアミンの継続的な摂取は、肥満ならびに糖尿病合併症を改善し、肝臓における酸化ストレスを抑制する可能性が考えられることから、酸化ストレス疾患の予防と治療法の確立に貢献できることが示唆された。

我々は、肥満ならびに糖尿病ラットではオレキシンの血漿中濃度が上昇することを報告している。オレキシンは睡眠覚醒調節および糖代謝恒常性に関わると考えられている。肥満と糖尿病ラットである OLETF はコレシストキニン A 受容体が欠損しているため、満腹を感じられず、オレキシンによる糖代謝恒常性と睡眠調節が有効活用されていないと考え、本研究にて検証を進めている。

本共同研究において、オレキシンによる睡眠調節と糖代謝恒常性の維持メカニズムの関連性について解明する。肝臓は、糖代謝と脂質代謝過程において酸化ストレス状態になりやすいと考えられる。肥満や糖尿病患者では、非アルコール性脂肪性肝疾患の合併症が高く、本疾患は脂肪肝から肝炎、肝硬変に至る病態である。我々は、非アルコール性脂肪性肝疾患合併の肥満と糖尿病治療では、血糖値調節とともに肝臓の酸化ストレスを抑制することが重要であると考え。

肥満を伴う糖尿病ラットにおいて、酸化ストレス状態を評価し、酸化ストレス疾患の予防と治療法について検討し、チアミンの継続的な摂取による酸化ストレス防御と予防ならびに酸化ストレス疾患治療法の確立について探究を進めている。

成果発表：

<原著論文>

Focus on orexin-A in obese diabetes rats: upregulation of orexin-A receptor in the diabetic brain. Y. Kohda, Fundam. Toxicol. Sci., 8: 235-241, 2021

Effects of continuous thiamine intake on onset and progression of type 2 diabetes in leptin-receptor deficient mice. Y. Kohda, Fundam. Toxicol. Sci., 10: 83-90, 2022

<学会発表>

Hepatic glucose-dependent insulinotropic polypeptide expression is modified by ongoing thiamine supplementation in obese diabetic rats. Y. Kohda, N. Fukuishi, H. Matsumura The 48th Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicology, July (Kobe), 2021

Focus on the diabetic brain: Upregulation of orexin receptor and plasma orexin level in obese diabetic rats. Y. Kohda, N. Fukuishi, H. Matsumura The 96th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society, December (Yokohama), 2022

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 有機薬化学研究室
職・氏名 講師・米山 弘樹

研究テーマ：

次世代型白金製剤アゾラト架橋白金(II)二核錯体の研究
— テトラゾラト架橋白金(II)二核錯体の合成と評価 —

研究期間：

令和4年4月1日 ～ 令和5年3月31日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 米山 弘樹 (大阪医科薬科大学・薬学部・講師)

研究分担者 宇佐美 吉英 (大阪医科薬科大学・薬学部・教授)

研究分担者 葉山 登 (大阪医科薬科大学・薬学部・助教)

<共同研究機関>

研究代表者 米田 誠治 (鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授)

研究分担者 植村 雅子 (鈴鹿医療科学大学・薬学部・助教)

研究目的：白金製剤に分類される次世代型抗悪性腫瘍剤の開発

cisplatin や oxaliplatin の様な白金製剤は、DNA 鎖内の 2 つの構成塩基 (グアニン、アデニン) の間で架橋を形成することで作用を示す。しかしこの時に DNA 鎖が大きく屈折するため歪が生じ、DNA 修復補助等の作用により効果が薄れる要因になっていると考えられる。そこで、二核の白金製剤とすれば DNA 鎖を歪ませることなく架橋させることが出来ると考え、アゾールに白金(II)単核錯体のダイマーを配位させ、アゾラト架橋白金(II)二核錯体とした次世代型の抗悪性腫瘍白金製剤の開発を目的とした研究を行っている。先行研究ではピラゾール、トリアゾール、テトラゾールを架体としたアゾラト架橋白金(II)二核錯体に高い抗腫瘍効果があり、特に白金製剤耐性がんに対して大きな効果を示すという特徴を持っている事を見出した。中でも、テトラゾラト架橋白金(II)二核錯体 ($[{cis-Pt(NH_3)_2}_2(\mu-OH)(\mu-5-R-tetrazolato-N2,N3)]^{2+}$) が、*in vivo* で非常に高い抗腫瘍効果を発揮したことから、先ずテトラゾール体を基盤とした創薬研究を行っている。

本報告期間においてはテトラゾール体を中心とした次の二つの研究を主に行った。

①フッ素の導入

一般に、医薬品候補化合物にフッ素を導入することによって、物理化学的性質や体内動態が変化することが知られている。そのことから、テトラゾラト架橋錯体 5-Me (R=CH₃) のメチル基にフッ素を導入した誘導体 5-MF₁₋₃ (R=CH₂F, CHF₂, CF₃) を合成し、5-Me および 5-MF₁₋₃ の脂溶性、細胞内蓄積量、*in vitro* 細胞毒性および *in vivo* 抗腫瘍効果を評価及び、5-Me へのフッ素導入効果の検討を目的とする。

②アルキニル基の導入

創薬研究において、がん細胞への取り込み量や取り込み様式を観察することは重要である。そこで、テトラゾラト架橋錯体に末端アルキンを導入した化合物を合成し、*in vitro* 細胞毒性および *in vivo* 抗腫瘍効果を評価し、有用性が確認された場合、ラマン散乱顕微鏡を用いたイメージング研究を行う事でテトラゾラト架橋錯体の体内動態を調べることを目的とする。

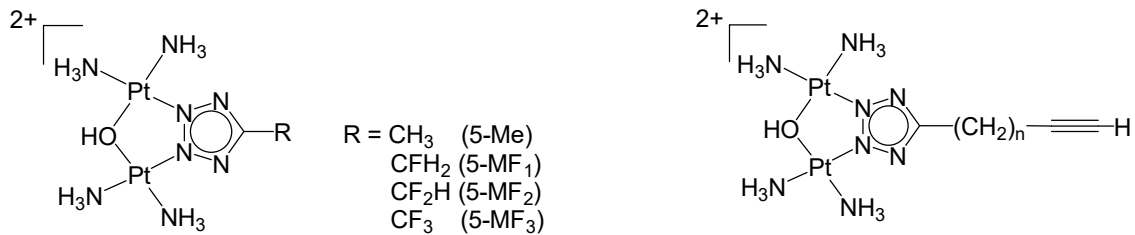


図. フッ素導入テトラゾラト架橋白金(II)二核錯体(5-MF₁₋₃)及びアルキニル基導入テトラゾラト架橋白金(II)二核錯体

本年度の研究内容および研究成果：テトラゾール体合成と白金錯体化及びその評価

令和4年度は以下の項目についての研究成果を報告する。

①フッ素の導入

フッ素を導入したテトラゾール体の合成は、原料となるフッ素化ニトリルが低沸点化合物であるため、当研究室で開発した低温でのテトラゾール合成法 (*Tetrahedron Lett.*, **2020**, *61*, 151517) を用いて効率的に合成した。続いて、白金(II)単核錯体 *cis*-Pt(NH₃)₂(NO₃)₂ の飽和水溶液に、NaOH 水溶液を滴下して得た、[*cis*-Pt(NH₃)₂(μ-OH)]₂(NO₃)₂ (OH ダイマー) を結晶化したものとフッ素を導入したテトラゾール体を水中で 40°C、24 時間反応させてフッ素を導入したテトラゾラト架橋白金(II)二核錯体 (5-MF₁₋₃) を合成した。

最初に、5-MF₁₋₃ の脂溶性をフラスコ振盪法 (*n*-octanol/H₂O) に基づいて求めた分配係数 *logP* を指標として評価したところ、5-MF₂ < 5-MF₁ ≈ 5-MF₃ < 5-Me の順に高くなり、5-Me へフッ素を導入することによって低下した。

続いて、*in vitro* 細胞内蓄積量および細胞毒性の決定には、colon26 マウス大腸がん細胞を用いた。1 μM の大腸がん治療薬 oxaliplatin、5-Me および 5-MF₁₋₃ を細胞に暴露させ、ICP-MS を用いて白金を定量し、10⁷ 細胞あたりの白金錯体の蓄積量を算出した (*n* = 3)。細胞毒性は、WST Assay を用いて 50%阻害濃度 (IC₅₀) を指標として評価した (*n* = 6)。5-MF₁₋₃ の細胞内蓄積量は、oxaliplatin と比べて遥かに多く (57~117 倍)、細胞毒性も非常に高かった (oxaliplatin の 5~21 倍) ことから、テトラゾラト架橋錯体の細胞毒性は、非常に高効率な細胞内蓄積が寄与していると考えられる。一方で、テトラゾラト架橋錯体同士の細胞内蓄積量や細胞毒性を比較したところ、互いに大きな差はなく、フッ素導入数や脂溶性との明確な相関は認められなかった。

最後に、*in vivo* 抗腫瘍効果を、colon26 細胞を同種移植した BALB/c マウスに、oxaliplatin、5-Me および 5-MF₁₋₃ を単回静脈内投与 (10 mg/kg) し、腫瘍体積変化を基準に評価した (*n* = 6) ところ、5-MF₁ と 5-MF₂ が oxaliplatin よりも高い効果を示し、最も脂溶性の低い 5-MF₂ で高い抗腫瘍効果が確認された。一方で、5-MF₃ は効果をほとんど発揮しなかった。

以上の結果から、フッ素導入テトラゾラト架橋錯体 5-MF_{1,3} の脂溶性の違いは、*in vitro* 細胞内蓄積や細胞毒性において大きな影響を及ぼさないことが分かった。一方で、*in vivo* 実験では *in vitro* 試験と矛盾する様な結果が示された。これは、5-MF₃ の生体内で錯体としての安定性の低さが影響していると考えられる。トリフルオロメチル基により、テトラゾレート環の電子密度が大きく低下したため、白金錯体が不安定化し、テトラゾラト架橋錯体が生体内に投与されてから腫瘍組織に至るまでの間で他の生体分子と反応した、または、がん細胞内で DNA 以外の生体分子と相互作用した可能性を推定している。これら成果の一部については、*Inorg. Chem.*誌(*Inorg. Chem.* **2022**, *61*, 12155–12164.)と国際学会(10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference)にて報告した。

②アルキニル基の導入

最初に、分子内にアルキニル基を有するテトラゾール体の合成を行った。当研究室で開発した低温でのテトラゾール合成法 (*Tetrahedron Lett.*, **2020**, *61*, 151517) には官能基選択性があり、反応性が高く従来のテトラゾール合成法では反応してしまうアルキニル基と反応しないという長所があった。その為、本合成法を用いることで原料となるニトリル体のアルキニル基を保持したままテトラゾール体を合成することが可能であったため、市販のアルキニル基含有ニトリル体より効率的に合成を行う事が出来た。

続いて、アルキニル基を導入したテトラゾール体を用い、含フッ素テトラゾラト架橋白金(II)二核錯体の合成法と同様にして架橋錯体の合成を行った。¹H-, ¹³C-, 及び ¹⁹⁵Pt-NMR の測定結果から、目的のアルキニル基導入テトラゾラト架橋白金(II)二核錯体が得られたことを確認した。アルキニル基導入テトラゾラト架橋白金(II)二核錯体の HCT116 細胞に対する *in vitro* 細胞毒性は oxaliplatin よりも低かったが、有効な毒性を示した。これら成果については、第 31 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、第 68 回日本薬学会東海支部総会・大会、日本薬学会 143 年会にて報告した。

アルキニル基導入テトラゾラト架橋錯体については、その合成に成功し、*in vitro* 細胞毒性において有効な毒性を確認した。今後、*in vivo* 実験での有効性の検討を行い、テトラゾラト架橋錯体が生体内に投与されてから腫瘍組織に至るまでの体内動態を調べるために、ラマン散乱顕微鏡を用いたイメージング研究が可能かどうかの調査を行っていく。

成果発表：

<原著論文>

・ Introduction of Fluorine into Antitumor-Active Dinuclear Platinum(II) Complexes Leads to Modulation of In Vivo Antitumor Activity in Mice; M. Uemura, K. Hiramoto, H. Yoneyama, S. Harusawa, S. Komeda, *Inorg. Chem.* **2022**, *61*, 12155–12164.

<学会発表>

・ Antitumor and immunostimulatory activities of the tetrazolato-bridged dinuclear Pt(II) complexes: S. Komeda, K. Hiramoto, M. Uemura, H. Yoneyama, Y. Usami, S. Harusawa, 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, Kobe Japan, 2022 年 11 月 28 日～12 月 3 日 (招待講演)

・ 末端アルキンを導入した制がんアゾラト架橋白金(II)二核錯体の合成：若山実希、米山弘樹、植村雅子、宇佐美吉英、米田誠治、第 31 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2022 年 6 月 18 日～19 日

- ・末端アルキンを導入したアゾラト架橋白金(II)二核錯体の合成：若山実希、米山弘樹、植村雅子、宇佐美吉英、米田誠治、第 68 回日本薬学会東海支部総会・大会、2022 年 7 月 9 日
- ・末端アルキンを導入したテトラゾラト架橋白金(II)二核錯体の合成と細胞毒性：若山 実希、米山弘樹、植村 雅子、宇佐美 吉英、米田 誠治、日本薬学会 143 年会、2023 年 3 月 26-28 日.

<その他>

- ・ Data on synthesis and structure–activity relationships of tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes; S. Komeda, H. Yoneyama, M. Uemura, T. Tsuchiya, M. Hoshiyama, T. Sakazaki, K. Hiramoto, S. Harusawa, *Data in Brief*, **2022**, 40, 107697.

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 医薬分子化学研究室
職・氏名 教授・平野智也

研究テーマ：

特定の環境下で機能する光分解性保護基の開発と応用

研究期間：

令和 4 年 4 月 1 日 ～ 令和 5 年 3 月 3 1 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 平野 智也 (大阪医科薬科大学・薬学部・教授)

<共同研究機関>

研究代表者 影近 弘之 (東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授)

研究目的：

光照射を利用する手法は時間と空間を限局した制御、解析が可能となるため、生物学などの研究基礎だけでなく疾患の治療にも応用されている。こうした手法においては、光によってさまざまな機能を発揮する光機能分子が用いられる。光によって共有結合の切断反応が起こる光分解性保護基もこうした光機能分子の一つである。生理活性分子の活性に必須な官能基に光分解性保護基を導入した分子は **Caged** 化合物と呼ばれ、特定の波長の光を照射することで時間と空間を限局した生理活性分子を放出が可能となる。その一方で光照射のみによる制御では、照射する光を限局したとしても目的の細胞や病態組織選択的な生理活性分子の放出は困難であるという問題がある。そこで、本研究では、光分解性保護基に外部環境変化を認識する部位を導入することで、特定の環境下でのみ機能する光分解性保護基の開発を目指す。さらに、開発した光分解性保護基を疾患治療薬と結合させ、疾患部位選択的に医薬品を光放出する分子システムを構築する。本システムは副作用を軽減した、新たな光治療法となりえる。

本年度の研究内容および研究成果：

本年度は、pH 変化に応じて光分解反応の進行が OFF-ON-OFF と変化することにより、特定の pH 領域で機能する光分解性保護基を基に、機能する pH 領域の調整とさらなる高機能化を目指した研究を行った。開発した光分解性保護基が機能する pH 領域は二つの水酸基の脱プロトン化により制御され、モノアニオン型となる pH において光反応が進行する。こうした機能が水酸基の置換位置を変化させた際にどうなるのかを比較、解析した。その結果、同じフェニル基上の水酸基の位置がそれぞれオルト位とパラ位となる化合物間において、機能が大きく異なることが示された。電子的効果などに大きな差がない、これらの化合物間で機能が大きく異なることは興味深く、光誘起電子移動だけではない

機構が関与していると考えられる。こうした知見は、低酸素環境、金属イオン濃度変化など、他の環境選択的に機能する光分解性保護基の開発にも有用となる。さらに、特定の pH 領域で機能する光分解性保護基に、抗がん剤として機能するゲムシタピンを導入した分子の開発を行った。ゲムシタピンの水酸基の保護、光分解性保護基との結合反応の条件を種々検討した結果、目的となる分子の合成に成功した。同様の手法により、がんなどの疾患組織近傍においてみられる pH 6 付近の環境選択的に機能する光分解性保護基にもゲムシタピンを導入することが可能になると考えられる。こうした分子は、がん組織に高い選択性を持つ治療を可能とし、副作用を低減した分子システムとなりえる。

また光分解性保護基だけでなく、他の光機能分子である蛍光センサーの開発研究も行った。DNA、RNA 上の核酸塩基、ヒストンタンパク質へのメチル化などの化学的な修飾反応は、遺伝子の一次配列に依存しない生理機能であるエピジェネティクス、エピトランスクリプトームの分子的な基盤である。これらを簡便かつ安価で、網羅的に解析することは、ポストゲノム時代の重要な研究課題となる。その一方で、化学的な安定性の低さなどから質量分析などの従来の手法では解析が困難となるケースもある。こうした問題を解決した手法として、修飾核酸塩基、修飾アミノ酸と選択的に結合を形成する有機化学反応を見出し、反応前後で蛍光特性が変化する蛍光センサーの開発を行った。核酸塩基に対する修飾反応としてはシトシンに対するメチル化が最も古くから研究されているが、DNA、RNA 上のアデニンに対してもメチル化が起こり、様々な生理機能に関与していることが示唆されている。例えば、RNA 上の N⁶位のメチル化は、体内時計に関わることなどが報告されている。一方、N¹位に対するメチル化に関しては不明な点が多い。そこで生理的条件下で N¹-メチルアデニンと選択的に結合を形成する有機化学反応を見出し、それらを基にした蛍光センサーの開発を行った。N¹-メチルアデニンは、N¹位のメチル化により C2 位の求電子性が向上している。そのため、アルカリ性水溶液中では、水酸化物イオンが C2 位を攻撃し、N⁶-メチルアデノシンが生成するジムロート転位反応が起こることが報告されている。私は本反応から着想を得て、求核性の官能基を持つ化合物群を用いた検討から、ベンジルアミン誘導体が結合を形成することを見出した。さらに、フェニル基を蛍光物質であるクマリンに変換できることも見出し、N¹-メチルアデニンの高感度かつリアルタイムに検出する蛍光センサーの候補となる分子を得ることに成功した。

これらの研究成果の一部は各学会において発表した。また、研究データを取りまとめた原著論文を現在作成中である。

成果発表：

<学会発表>

- ・ 岡優希, 北川星来, 竹信慶乃, 高絢一果, 安田大輔, 上川拓也, 影近弘之, 大江知之, 平野智也、N¹-メチルアデノシンを検出する蛍光センサーの構造最適化に関する研究、日本薬学会第 143 年会、2023 年 3 月
- ・ 坂野翼、星野匡彦、柴崎紀子、安原徳子、平野智也、影近弘之、大崎愛弓、*Tetradium ruticarpum* および *Quassia amara* 由来の蛍光を有するアルカロイドの探索、第 66 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、2022 年 11 月
- ・ 安田大輔、中嶋祐介、笹井美花、東田岳都、峰晴満帆、加藤大輝、影近 弘之、平野 智也、クマリン骨格を有する pH 応答型ケージド化合物の合成と光分解特性、第 72 回日本薬学会関西支部総会・大会、2022 年 10 月
- ・ 北川星来、岡優希、安田大輔、上川 拓也、影近弘之、平野智也、有機化学反応に基づく N¹-メチルアデノシンの蛍光検出法の開発、第 44 回日本光医学・光生物学学会、2022 年 6 月

- ・ 北川星来、岡優希、安田大輔、上川 拓也、影近弘之、平野智也、 N^1 -メチルアデノシンを検出する蛍光センサーの開発、日本ケミカルバイオロジー学会第 16 回年会、2022 年 5 月
- ・ 安田大輔、磯野真理子、加藤大輝、影近弘之、平野智也、過酸化水素存在下で生理活性物質を放出するケージド化合物の創成、第 75 回日本酸化ストレス学会学術集会、2022 年 5 月

<その他>

- ・ 平野智也、横尾英知、影近弘之、蛍光性天然物を基にした新規蛍光物質の創製、有機合成化学協会誌、80、922-929 (2022)