

大阪医科薬科大学 薬学部 共同研究成果報告書

2024

(2024 年 4 月～2025 年 3 月)

目次

疾患モデル動物を用いたてんかん病態、薬理研究

ーフルオロクエン酸（FC）投与モデルにおけるけいれん感受性変化および神経興奮変化の評価ー	1
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	3
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	5
特異体質性薬物性肝障害の発症メカニズムに関する研究	7
ストレスに対する脳と身体の防衛機能に関する基礎研究	9
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	11
核内受容体モジュレーターによる脂質代謝調節	13
<i>Vibrio vulnificus</i> M2799 株の鉄獲得機構の解明	15
ABC トランスポーターの発現制御および機能解析研究	17
ホウ素センサープローブの開発に関する研究	19
酸化ストレス疾患の予防と病態改善に関する研究	21
次世代型白金製剤アゾラト架橋白金(II)二核錯体の研究	
ー テトラゾラト架橋白金(II)二核錯体の合成と評価 ー	23
特定の環境下で機能する光分解性保護基の開発と応用	25
カルバシュガー型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	27
質量分析を用いた薬物動態に関わる薬物代謝経路の解析	29
睡眠障害の病態解明とその医療応用	31
創薬応用を目指した Nrf2 制御剤の ADMET 評価（BINDS 事業 BINDS-5975）	33
薬物分子複合体の調製および評価に関する研究	35
膵がんの腫瘍随伴マクロファージにおける ATP-クエン酸リアーゼの生理的役割 (Physiological role of ATP citrate lyase in tumor-associated myeloid cells in pancreatic tumors)	37

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

ーフルオロクエン酸（FC）投与モデルにおけるけいれん感受性変化および神経興奮変化の評価ー

研究期間：

令和6年4月1日 ～ 令和7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約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。

内向き整流性カリウム 4.1（Kir4.1）チャネルは、アストロサイトの空間的 K⁺緩衝機構を仲介しており、シナプス部の K⁺イオン濃度やグルタミン酸濃度の調節において重要な役割を果たしていることから、てんかんの発症および治療に深く関与していることが示唆されている。今回は、てんかん病態におけるアストロサイト Kir4.1 チャネルの役割をより明らかにする目的で、アストロサイト選択的抑制剤フルオロクエン酸（FC）投与モデルにおけるけいれん感受性変化および神経興奮変化について評価した。

本年度の研究内容および研究成果：

これまでに、SD 系雄性ラットの右側脳室に FC（1 nmol）を投与することにより、側頭葉皮質領域と海馬領域におけるアストロサイト Kir4.1 チャネル発現が低下することを見出している。本年度は、FC 投与モデルについて、ペンチレンテトラゾール（PTZ）誘発けいれんに対する感受性を評価するとともに、脳内神経興奮変化を解析した。

1. FC 投与モデルにおける PTZ 誘発けいれん感受性変化

8 週齢の SD 系雄性ラットの右側脳室（AP：-0.9 mm、LM：+1.5 mm、DV：+2.3 mm）にガイドカニューレを埋め込み、約 1 週間の回復期間において実験に使用した。実験日には、FC（1 nmol, i.c.v.）投与から 2 時間後に PTZ（40 mg/kg, i.p.）を投与し、誘発されるけいれん行動を観察した。けいれん行動評価には、6 段階けいれんスコア（スコア 0：変化なし、スコア 1：顔のひきつり、スコア 2：よ

り強い顔、頭部のひきつり、スコア 3：ミオクローヌス発作、スコア 4：前肢の間代性けいれん、スコア 5：全身性の間代性けいれん、強直間代性けいれん）を用いた。また、PTZ 投与から 2 時間後に灌流脳摘出を行い、後日、神経興奮マーカーである c-Fos タンパク質の免疫組織染色に用いた。

けいれん行動評価の結果、FC 投与モデルでは、生理食塩水投与（対照）群と比較して、PTZ により誘発されるけいれん強度（スコア）が有意に増加しており、けいれん持続時間の延長傾向も示された（図 1）。

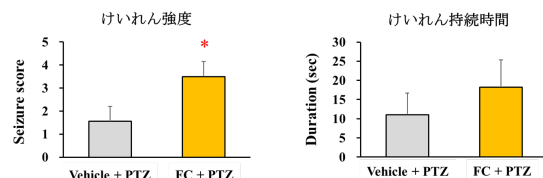


図 1 PTZ誘発けいれんに対するFCの影響

2. FC 投与モデルにおける PTZ 投与後の c-Fos タンパク質の発現変動解析

上記のけいれん評価後に摘出した脳から厚さ 30 μm の冠状切片を作製し、ABC-DAB 法により c-Fos タンパク質の免疫組織染色を行った。まず、2%通常ヤギ血清で 2 時間ブロッキング処理し、ウサギ抗 c-Fos 抗体で 40 時間免疫反応を行った。その後、ビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用いて 2 時間インキュベートし、アビジン-ビオチン標識酵素複合体試薬およびジアミノベンジジン（DAB）により c-Fos タンパク質を可視化した。c-Fos 陽性細胞数は、大脳皮質（MC：運動皮質、SC：感覚皮質、PRh-Ect 嗅周-嗅内皮質、PirC：梨状皮質）、扁桃核（BLP：外側基底核、BMP：内側基底核、MePV：内側核（後腹側部）、MePD：内側核（後背側部）、PMCo：後外側皮質扁桃核）、海馬（CA1-3：海馬アンモン角、DG：歯状回）領域の計 13 部位について計測した。

その結果、FC 投与モデルでは対照群と比較して、扁桃核（BLP）および海馬（DG）において PTZ 投与後の c-Fos 発現が有意に増加していた（図 2）。

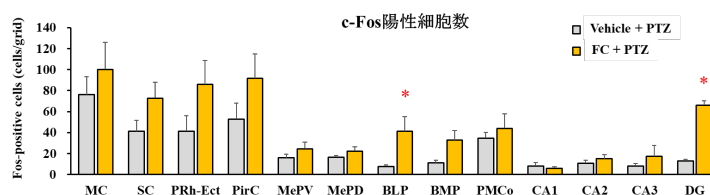


図 2 PTZによるc-Fos発現に対するFCの影響

3. FC 投与モデルにおける海馬細胞外グルタミン酸レベルの変動解析

実験には、8 週齢の SD 系雄性ラットを用いた。予め各ラットの左脳側の海馬（AP：-4.0 mm、LM：-2.6 mm、DV：+2.3 mm）に透析プローブ挿入用のガイドカニューレを留置し、また、右側脳室に FC 注入用のガイドカニューレを留置した。約 1 週間の回復期間の後、ガイドカニューレを介して、透析プローブをサンプル回収部位である左脳側の海馬に挿入し、人工脳脊髄液（aCSF）の灌流を開始した。2 時間の馴化後、10 分ごとにサンプル回収（20 μL ：2 $\mu\text{L}/\text{min}$ ）を行った。まず、定常状態として 1 時間のサンプル回収を行った後、生理食塩水あるいは FC（1 nmol）を右側脳室内に投与し、さらに 2 時間サンプル回収を行った。その後、回収したサンプル中の興奮性神経伝達物質グルタミン酸レベルを HPLC-ECD システムを用いて定量した。

その結果、生理食塩水投与では細胞外グルタミン酸レベルに変化はなかったが、FC 投与による海馬細胞外グルタミン酸レベルの有意な増加が認められた（図 3）。

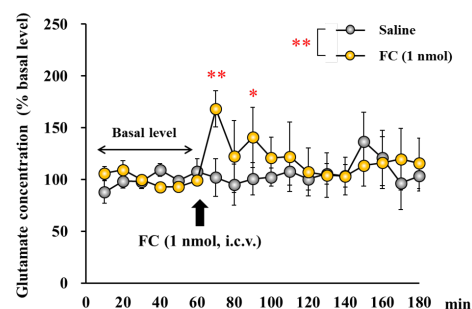


図 3 FCによる海馬細胞外グルタミン酸レベルの変動解析

以上より、FC によるアストロサイト Kir4.1 チャネルの機能障害は、扁桃核および海馬における過剰な神経興奮を惹起し、PTZ 誘発けいれんに対する感受性を亢進させることが示唆された。

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：

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6年4月1日 ～ 令和7年3月31日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 中村 任 （大阪医科薬科大学・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。これまで研究担当者らは、シスプラチンなどのプラチナ製剤に着目し、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、プラチナ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を見出した。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く、検討課題とされてきた。

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と生体内バイオメタルの変動との関連解析を行うことで予測因子の探索を目指す。

本年度の研究内容および研究成果：

肝細胞癌や肺癌をはじめ数種の癌ではバイオメタルの血清中濃度比率が健常者と異なることや、その比率が癌種によって差異があることが報告されている。また、銅など一部のバイオメタルには安定同位体が存在し、安定同位体比率が健常者と癌患者で異なる可能性がある。そこで本年度は、食道癌術前FP療法施行患者における血漿中バイオメタル濃度と同位体比の変動を評価した。

術前がん化学療法として、シスプラチンと5-フルオロウラシル併用（FP）療法を施行した食道癌患者5名について、FP療法を終了し、食道癌摘除術後2～146日目に採血された患者の血漿サンプルを分析した。銅および亜鉛濃度は誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）を用いて ^{63}Cu および ^{66}Zn として測定した。また、銅と亜鉛の安定同位体の比率は、それぞれ ^{63}Cu に対する ^{65}Cu の比

を $\delta^{65}\text{Cu}$ 、 ^{64}Zn に対する ^{66}Zn の比を $\delta^{66}\text{Zn}$ として、各 ICP 分析用元素標準液中の同位体比に対する割合として算出した。

その結果、血漿中銅および銅濃度は、術後上昇傾向にあったが、術後 2 週間以降の回復期には個体間変動が大きくなる傾向にあった。また、血漿中濃度の変動は銅と比較して亜鉛においてより大きかった（図 1、図 2）。一方、標準液を基準にした同位体比は、銅（ $\delta^{65}\text{Cu}$ ）と比較して亜鉛（ $\delta^{66}\text{Zn}$ ）において大きな変動を示しており、それぞれの元素の血中濃度変動の大きかったことが影響した可能性がある（図 3、図 4）。

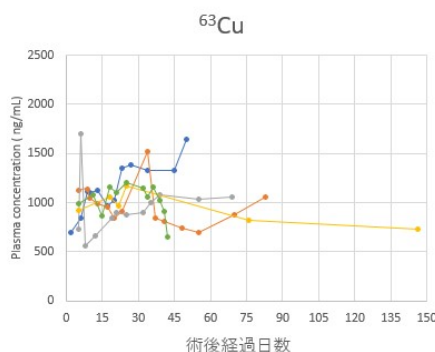


図1:術前FP療法施行患者における
血漿中銅濃度の時間推移

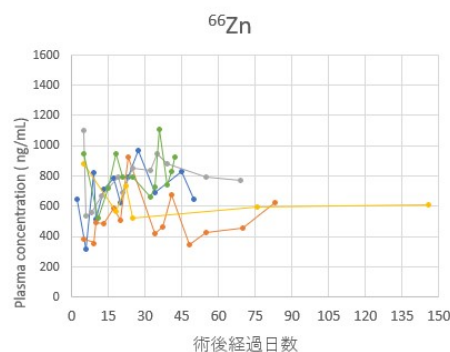


図2:術前FP療法施行患者における
血漿中亜鉛濃度の時間推移

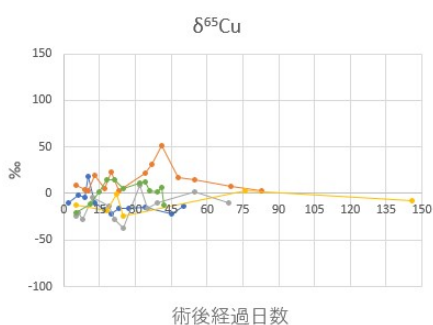


図3:術前FP療法施行患者における
血漿中 $\delta^{65}\text{Cu}$ 値の時間推移

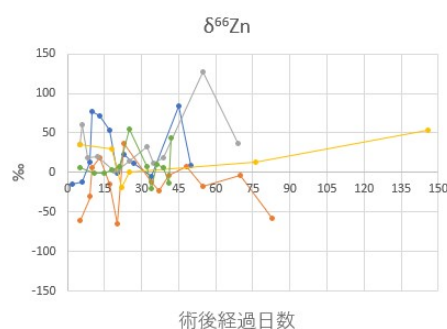


図4:術前FP療法施行患者における
血漿中 $\delta^{66}\text{Zn}$ 値の時間推移

食道癌術前 FP 療法後の患者において、術後の同位体比変動は銅と比較して亜鉛で大きく、各元素の血中濃度変動の大きさが少なくとも一部影響したものと推察されたが、症例数が限られており、バイオメタルの濃度と同位体比の変動の相関性については引き続き検討予定である

成果発表：

<学会発表>

- ・食道癌 FP 療法後の血漿バイオメタル濃度と同位体比の変動評価 ～術後回復期以降の検討～、西田智史、山下和彦、吉岡佐恵、岩永一範、山本和宏、矢野育子、中村任、第 74 回日本薬学会関西支部総会・大会、2024 年 10 月 5 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 7 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・講師）

＜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 hypoxia-inducible factor-1(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などを見い出してきた。

低酸素条件下で応答する転写因子である hypoxia-inducible factor (HIF)は、100 以上の遺伝子の発現調節に関与するとされている。低酸素条件下において、生体内代謝や組織細胞が正常に機能するために HIF による遺伝子調節が行われており、erythropoietin (EPO)の産生促進や解糖系の活性化などが知られている。一方で CTGF や lox などの線維化関連遺伝子の発現や血管新生の促進に関与していると示唆されていることから、HIF 活性化による生体への影響は二面性を持つと考えられる。さらに HIF はトランスポーターに対する発現や機能を変動させ、転写因子として働く可能性も考えられる。

また、HIF-PH(低酸素誘導因子プロリン水酸化酵素)阻害薬は、HIF- α の分解抑制に伴う HIF 活性化を引き起こすことによって EPO の産生増加を導き、赤血球形成を促進すると考えられている。こうした薬理作用を踏まえ、臨床において HIF-PH 阻害薬は腎性貧血の治療薬として用いられている。そこで、実際にヒトに医薬品として使用されている HIF-PH 阻害薬ロキサデュスタット (RXD) が投与された際に、腎や肝における HIF 活性化が各種遺伝子発現やタンパク機能活性に及ぼす影響を調べる計画を設定した。すなわち、RXD を投与したマウスの腎および肝における HIF 標的遺伝子発現に

及ぼす影響について解析を行った。本共同研究では、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：

実験動物として BALB/c 雄性マウス(5 週齢)を用いた。自由摂餌、自由飲水で 1 週間馴化させ、1 回目の RXD 投与を 0 時間とし、その 48 時間後に 2 回目の RXD 投与を行った。そして 52 時間後に心採血による血液サンプルの回収と腎および肝摘出を行った。体重測定は RXD 投与 0 時間後、24 時間後、48 時間後に行った。摘出した組織のうち、リアルタイム PCR 用サンプルは、RNAlater に浸漬し-20℃で保存した。また Western blotting 用サンプルは、Lowry 法にてタンパク定量を行った後に-80℃で保存した。なお、RXD 投与に際しては、DMSO に溶解させた後、滅菌済み PBS を用いて 1.0 % DMSO 溶液かつ 2.0 mg/mL RXD 溶液を調製し、30 mg/kg の用量で腹腔内投与した。一方で対照群(Control 群)として、滅菌済み PBS を用いて 1.0 % DMSO 溶液を調製し、等容量で投与した。回収した血清サンプルの EPO 濃度解析は、免疫学的測定法によって行った。また、摘出した組織における mRNA 発現解析はリアルタイム PCR 法によって行い、タンパク質発現解析は Western blotting によって行った。

心採血で回収した血清サンプルを用いて、マウス血清 EPO 濃度の測定とその比較を行った。Control 群と比較して RXD 投与群では、マウス血清 EPO 濃度が増加傾向を示した。この結果から、本研究での RXD 投与により EPO 産生が誘導され、RXD の薬効発現を確認した。

次に、摘出した腎および肝のホモジネートを用いて、Western blotting により HIF-1 α タンパク質発現解析を行った。その結果、今回の条件下では RXD 投与は腎において有意な HIF-1 α 発現変化を示さなかったが、肝では HIF-1 α のタンパク質発現の有意な上昇を認めた。

さらに、腎および肝から抽出した mRNA をリアルタイム PCR 法により HIF 標的遺伝子 Glut1 の mRNA 発現を比較解析した。その結果、Control 群と比較して RXD 投与群の Glut1 mRNA 発現については、腎では明確な変化は認められなかったが、肝では増加傾向が認められた。

次に、HIF-1 活性化による mRNA 発現変化の報告がある薬物トランスポーター Bcrp mRNA 発現について解析した。その結果、Control 群と比較して RXD 投与群では、腎および肝のいずれにおいても Bcrp の mRNA 発現に有意な変化は見られなかった。

今後、腎障害モデルを用いて同様の検討を行い、腎ならびに肝における HIF 活性化と薬物トランスポーターなどの発現・機能変動の関係性について解析することを予定している。

成果発表：

<学会発表>

・神谷瑞貴、松田早也香、竹林裕美子、本橋秀之、永井純也、マウス肝における薬物トランスポーターの mRNA 発現に及ぼす HIF-PH 阻害薬ロキサデュスタットの影響、第 74 回日本薬学会関西支部大会（2024 年 10 月、武庫川女子大学、西宮）

・Junya Nagai, Makiko Yamazaki, Ai Takahashi, Yumiko Urakami-Takebayashi, Yoshio Ohno, Hideyuki Motohashi. Effect of the hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor roxadustat on expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human kidney epithelial cell line HK-2, 2024 ISSX/JSSX Meeting（Sep. 2024, Honolulu, Hawaii, USA）

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 薬物治療学Ⅰ研究室

職・氏名 教授・加藤隆児

研究テーマ：

特異体質性薬物性肝障害の発症メカニズムに関する研究

研究期間：

令和6年4月1日 ～ 令和7年3月31日

研究担当者：

＜本学＞

研究代表者 加藤 隆児 （大阪医科薬科大学・薬学部・教授）

研究分担者 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・講師）

＜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、抗原提示細胞を活性化することで IDRs が起こるという 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、重篤な肝障害が問題となり市場撤退したキノロン系抗菌薬であるトロバフロキサシンの発症機序について検討を行った。トロバフロキサシン誘発肝障害の発症機序は未だ解明されておらず、不明な点が多い。本研究では、シプロフロキサシン、レボフロキサシン、ガチフロキサシン、グレパフロキサシン、トロバフロキサシンを対象に、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。

シプロフロキサシン、レボフロキサシン、ガチフロキサシン、グレパフロキサシン、トロバフロキサシン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、どの薬物においても caspase-1 活性および培養液中 IL-1 β 濃度の上昇は認められなかった。

一方、FLC-4 細胞にシプロフロキサシン、レボフロキサシン、ガチフロキサシン、グレパフロキサシン、トロバフロキサシンを添加して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、トロバフロキサシン添加群において 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）。トロバフロキサシン添加群において 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 によるトロバフロキサシンの代謝物が原因となり、DAMPs が肝細胞から放出され THP-1 内のインフラマソーム活性化が起こったものと考えられた。

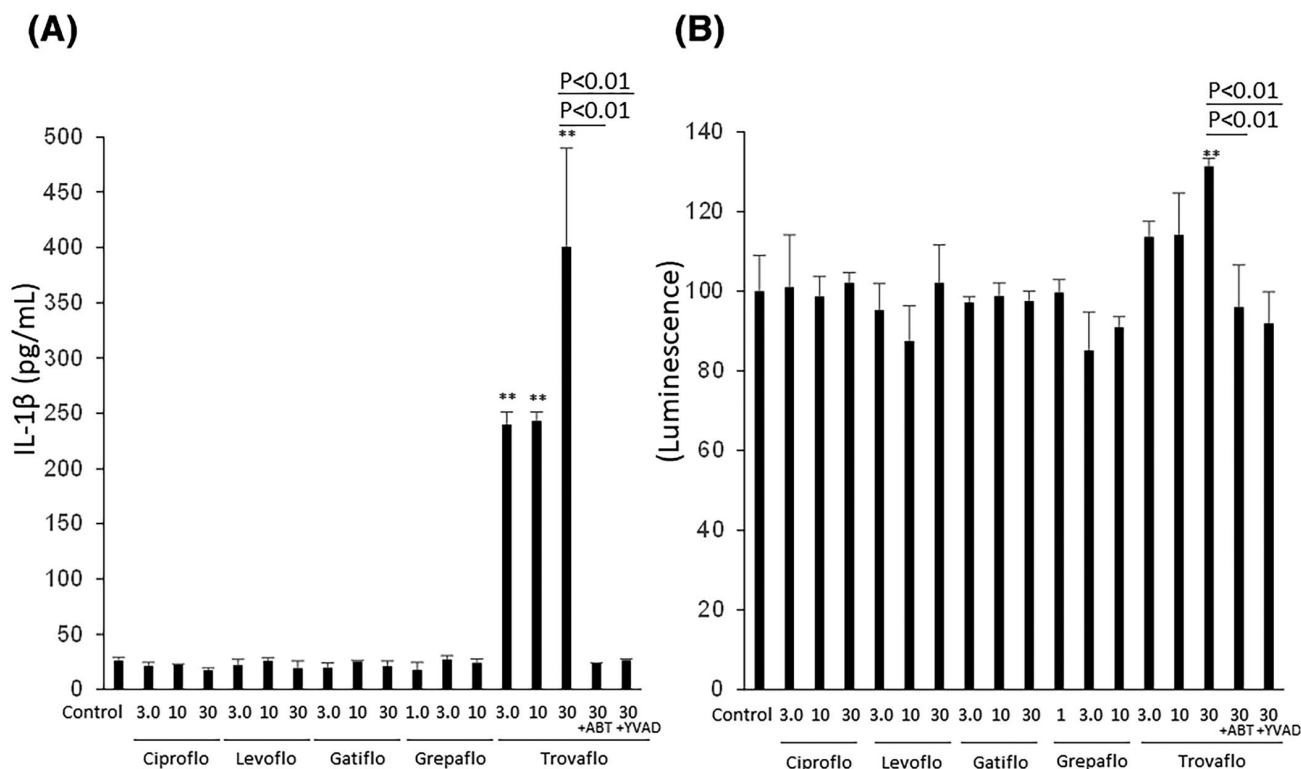


Fig. 1. Incubation of THP-1 cells with the supernatant from hepatocytes incubated with trovafloxacin leads to release of IL-1 β (A) or caspase-1 activity (B). Levels of IL-1 β secreted by THP-1-derived macrophages and caspase-1 activity of THP-1-derived macrophages incubated for 24 h with the supernatant from an incubation of hepatocytes with ciprofloxacin, levofloxacin, gatifloxacin, grepafloxacin, or trovafloxacin for 7 days, with and without a cytochromes P450 inhibitor (1-aminobenzotriazole, ABT) or a caspase-1 inhibitor (Ac-YVAD-cmk, YVAD). Statistical significance was determined using the Tukey multiple comparison tests, where *p < 0.05, n = 3.

以上の結果から、トロバフロキサシン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起こることが示唆された。

成果発表：

<原著論文>

- Tanaka S, Noda T, Urashima K, Kohda Y, Ijiri Y, Kato R. Reactive metabolite of trovafloxacin activates inflammasomes: implications for trovafloxacin-induced liver injury. J Appl Toxicol. 44, 846-852 (2024). <https://doi.org/10.1002/jat.4585>

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 薬物治療学Ⅰ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研究

研究期間：
令和6年4月1日 ～ 令和7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・講師）
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）

研究目的：

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。Rapid eye movement(REM)睡眠は、脳をリフレッシュさせる可能性が考えられる。一酸化窒素合成酵素(nitric oxidase synthase: NOS)阻害剤がラットのREM睡眠を増加させるとの報告を基に、どのNOSs サブタイプがREM睡眠に影響を及ぼすかについて明らかにし、REM睡眠を増加させる医薬品の開発を目指す。睡眠障害の発症・進展メカニズムに関連する遺伝子発現解析を試みる。肥満・糖尿病を伴う睡眠障害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を行い、新たな治療薬の開発に繋がる知見を求める。

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

既に一部のNO合成酵素（NOS）阻害剤が、特にレム睡眠に強く影響することを示している。

本研究では、関与するNO合成酵素のタイプを明らかにすると共に、レム睡眠を始めとする睡眠・覚醒の制御機構について、多角的に検討する。さらに、肥満・糖尿病・睡眠障害を一連の病態と捉え、発症メカニズムと予防法を探究する。

トリプル、シングル、ダブル NOS(s)ノックアウト (KO) マウスを使用して、NOS 阻害剤に対する反応性を精査することで、3 種類の NOS のうち、いずれの NOS が関与して、NOS 阻害剤による睡眠構築の変化が生じるのかを解明する。以前に各タイプの NOS に特異的な阻害剤を用いて検討したが、明確な結論に至ることができなかったため、今回は KO マウスを使用することとした。

本研究での睡眠・覚醒データを解析しながら、NOSs KO マウスにおいて、肥満、糖尿病、睡眠障害に関わる脳内物質の変動、血液生化学マーカー、遺伝子、タンパク質の発現解析を行い、肥満・糖尿病を伴う睡眠・覚醒の制御機構を検討する。

酸化ストレス関連疾患における脳と身体の防衛機能に関する基礎研究

チアミン摂取は、2 型糖尿病の自然発症モデルである BKS.Cg-m+/+Lepr^{db}/J の摂餌量と摂水量を減少させることが明らかとなった。さらに、チアミンの継続的な飲水により、レプチン受容体欠損マウスにおける血糖値の上昇が抑制される可能性が示唆された。さらに、2 型糖尿病モデルマウスでは、脂肪肝の形成、インスリン過剰産生による膵臓の肥大、褐色脂肪の萎縮減少（白色脂肪細胞への変化）が亢進し、チアミン投与群では、それらが抑制傾向にある可能性が考えられるが、病理組織学的検査結果を踏まえた上での考察が必須である。これらの結果は、遺伝子型が homo の動物に限定してみられる現象であり、遺伝子型が hetero の動物では、摂餌量と飲水量を含めた全項目においてチアミン投与群において有意な差はみられなかった。これらの結果がレプチン受容体変異による過食を抑制した結果によるものか、今後さらに探究を進める。

<学会発表>

チアミン摂取によるレプチン受容体欠損マウスの糖尿病状態への影響

幸田祐佳, 松村人志, 黒田健治, 田中早織, 加藤隆児

第 51 回日本毒性学会学術年会, 2024 年 7 月（福岡）

<原著論文>

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, 2023

<その他>

6 年次特別演習・実習発表会演題

「NOSs ダブルノックアウトマウスの NOSs 遺伝子発現解析に関する研究」

「iNOS シングルノックアウトマウスにおける脳内レプチン受容体発現に関する研究」

「NOSs ノックアウトマウスにおける脳内オレキシン受容体発現に関する研究」

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7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：

前年度までに、抗 tau 抗体の Fab ドメイン（Fab2r3）が、tau 分子中の VQIINK 配列を特異的に認識結合することにより、tau の自己重合を阻害する働きを有しており、Fab2r3-VQIINK 複合体の立体構造解析の結果から、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。また、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、VQIINK ペプチドの4残基目の Ile を Leu に置換した VQILNK ペプ

チドを用いて Fab2r3-VQILNK 複合体の構造解析を行った。以前に構造解析を行った、Fab2r3-VQIINK 複合体との構造比較から、リガンド結合部の構造において、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）。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。

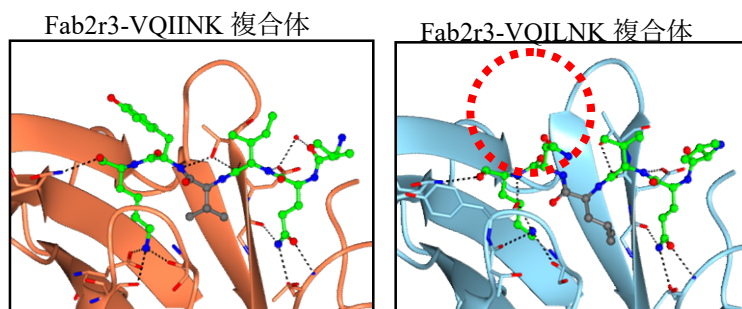


図 Fab2r3 と VQIINK および VQILNK 両複合体の

リガンド結合部の比較

成果発表：

<原著論文>

無し

<学会発表>

無し

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 6 年 4 月 1 日 ～ 令和 7 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)
研究分担者	中辻 匡俊	(大阪医科薬科大学・薬学部・助教)

< 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：

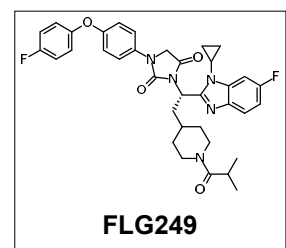
核内受容体の一つである farnesoid X receptor (FXR) は、さまざまな種類の細胞の分化制御に関わっており、これまでに FXR モジュレーターを用いて、脂肪細胞や骨芽細胞の分化への影響や FXR の機能および制御機構の解析を行ってきた。本研究では、FXR による細胞分化について解析し、細胞分化における FXR の機能と制御機構を解明し、新規 FXR 調節薬の開発を行うことを目的とする。

本年度の研究内容および研究成果：

本年度は FXR モジュレーターの機能評価について、以下の項目について研究を実施した。

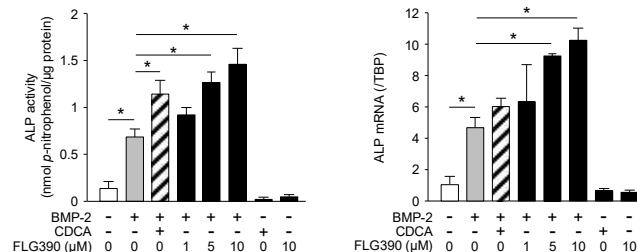
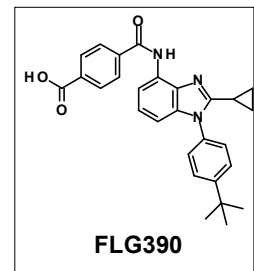
1) FXR アンタゴニスト

マウスを高脂肪食で 4 週間飼育し、同時に FXR アンタゴニストである FLG249 を経口投与したところ、胆汁酸代謝、セラミド合成や脂肪酸の β 酸化に関連する遺伝子の発現が変化し、肝臓と回腸の脂質代謝が改善された。

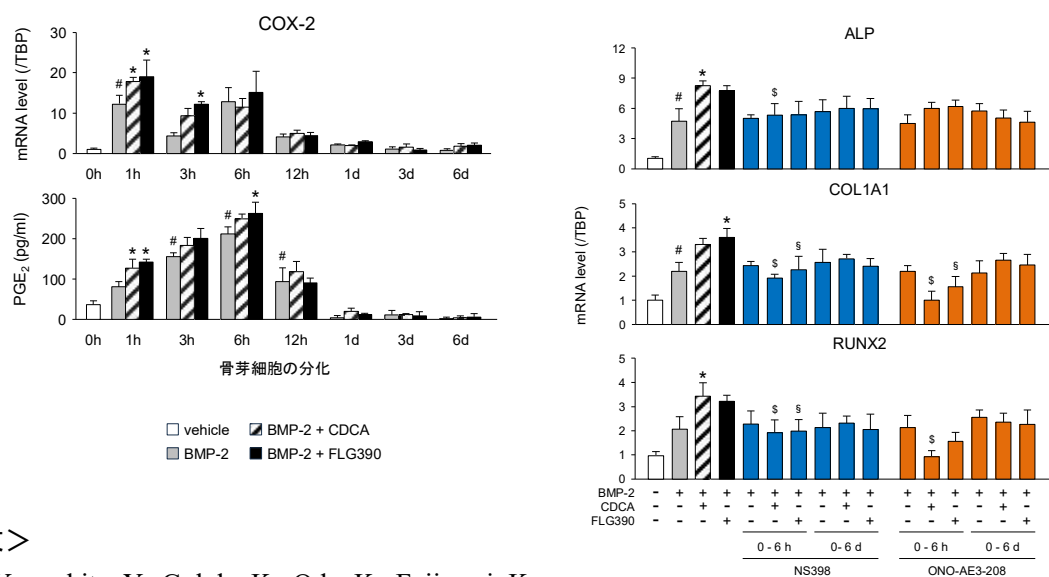


2) FXR アゴニスト

FXR アゴニストである FLG390 および FXR アゴニストとして知られているケノデオキシコール酸 (CDCA) を BMP-2 によって誘導したマウス間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化の影響とその制御機構を解析した。FLG390 は CDCA と同程度に骨芽細胞の分化を促進した。



FXR の活性化は、骨芽細胞の分化初期段階でシクロオキシゲナーゼ (COX) -2 の発現とプロスタグランジン (PG) E₂ の産生を増加させた。COX-2 選択的阻害剤 (NS398) および PGE₂ 受容体の一つである EP4 受容体アンタゴニスト (ONO-AE3-208) を骨芽細胞分化開始後 6 時間のみ処理すると、骨芽細胞の分化関連遺伝子 (ALP, COL1A1, RUNX2) の発現は、6 日間処理した場合と同程度に抑制された。これらの結果から、FXR の活性化は、COX-2-PGE₂-EP4 を介して骨芽細胞分化の初期段階を促進することが分かった。



成果発表：

<原著論文>

- 1) Iguchi, Y., Yamashita, Y., Gohda, K., Oda, K., Fujimori, K., Sera, Y., Imanaka, T., Yamaguchi, M., Une, M., Teno, N. FXR antagonist FLG249 lowers hepatic triacylglycerol and serum cholesterol level in high-fat diet-induced obese mice. *Biol. Pharm. Bull.* 47: 1429-1436 (2024)
- 2) Fujimori, K., Iguchi, Y., Yamashita, Y., Gohda, K., Teno, N. FXR activation accelerates early phase of osteoblast differentiation through COX-2-PGE₂-EP4 axis in BMP-2-induced mouse mesenchymal stem cells. *Molecules* 30: 58 (2025)

<学会発表>

- ・井口裕介、山下ユキ子、合田圭吾、小田啓祐、藤森 功、世良行寛、今中常雄、山口雅史、宇根瑞穂、手納直規「高脂肪食誘発肥満マウスに対する新規 farnesoid X receptor アンタゴニスト FLG249 の影響」日本薬学会第 145 年会

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6年4月1日 ～ 令和7年3月31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・准教授）

＜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。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：

FatB と VatD の構造解析を目的として、両タンパク質の高発現系を構築した。FatB および VatD は His タグ融合タンパク質として可溶化で発現し、Ni キレートアフィニティーおよびゲル濾過クロマトグラフィーにより、両タンパク質を高純度に精製した。次に、いくつかの市販のスクリーニングキットを用いて FatB および VatD の結晶化条件の検索を行い、VatD アポ体および VatD-ferrioxamine B 複合体の構造解析に使用可能な良質の結晶を得ることに成功した[Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun. 9:1078-1082 (2015)]。VatD-ferrioxamine B 複合体の初期構造は、MOLREP プログラムを用いた分子置換法により決定し、構造精密化の初期段階で VatD に結合した ferrioxamine B の明瞭な電子密度を確認することができた。さらに、VatD アポ体と VatD-ferrioxamine B 複合体との構造比較により、ferrioxamine B の結合に伴って VatD の C 末端ドメインが顕著に移動して誘導適合型の結合様式を示すことが分かった。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。

成果発表：

<原著論文>

- ・なし

<学会発表>

- ・倉田 寧々，竹内 祥子，土屋 孝弘，宮本 勝城，駒野 淳，辻坊 裕
Vibrio vulnificus の致死性毒素 MARTX 毒素の C 末端側ドメインの機能解析
第 97 回日本細菌学会総会、2024 年 8 月（札幌）
- ・佐々木 舞，竹内 祥子，土屋 孝弘，宮本 勝城，駒野 淳，辻坊 裕
Vibrio vulnificus の致死性毒素 MARTX 毒素の N 末端側ドメインの機能解析
第 97 回日本細菌学会総会、2024 年 8 月（札幌）
- ・能祖 由梨奈，杉村 陽菜，土屋 孝弘，宮本 勝城，駒野 淳，辻坊 裕
Vibrio vulnificus の致死性毒素 MARTX 毒素の機能的ドメインの解析
第 97 回日本細菌学会総会、2024 年 8 月（札幌）
- ・梶谷 優羽，能祖 由梨奈，佐々木 舞，土屋 孝弘，宮本 勝城，駒野 淳，辻坊 裕
Vibrio vulnificus が産生する致死性毒素 RtxA1 毒素のドメイン解析
日本薬学会第 145 年会、2025 年 3 月（福岡）

<その他>

- ・宮本 勝城
鉄を標的とした新規感染症治療薬の開発
Yakugaku Zasshi., 144:633-641, 2024（総説）

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6年4月1日 ～ 令和7年3月31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、生体膜あって ATP の加水分解と共役して、薬物、イオン、脂質など多様な基質の輸送を担う。がん化学療法においては、ABC トランスポーターが多剤耐性の獲得に関与しており、治療を妨げる大きな要因となっている。また、ABC トランスポーターの遺伝的多型や変異はさまざまな疾患との関連が指摘されており、その一例として、ABCA7 はゲノムワイド関連解析（GWAS）によりアルツハイマー病のリスク因子の一つとして同定されている。しかしながら、中枢神経系における ABCA7 の発現制御機構については、未だ十分に解明されていない。本研究では、ミクログリア細胞における ABCA7 の発現がどのように制御されているのか、その分子メカニズムの解明を目的として解析を行った。

本年度の研究内容および研究成果：

これまでの研究において、マウスミクログリア細胞 BV-2 では、グルコース濃度に依存して ABCA7 タンパク質の発現が増加することを明らかにした。また、ABCA7 の発現を増加させることが知られているスタチンの効果を BV-2 細胞で検討したところ、スタチンによる ABCA7 発現への影響はごくわずかであった。一方、末梢性マクロファージであるマウス J774 細胞では、グルコースおよびスタチンのいずれによっても ABCA7 発現が増加した。これらの結果は、グルコースによる ABCA7 発現の調節機構が中枢および末梢の両系統に共通して存在する可能性を示唆した。

そこで当概年度においては、グルコースの主要代謝経路である解糖系に着目し、解糖系の各種阻害剤を用いて ABCA7 の発現に対する影響を調べた。まず、グルコースと同じ単糖であるフルクトースおよびガラクトースによる刺激では、ABCA7 の発現にほとんど影響しなかったことから、ABCA7 の発現増加作用は単糖の中ではグルコース特異的であることが示された。また、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ（G6PD）阻害剤である G6PDi の添加では ABCA7 発現に影響は認められなかつ

たが、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）阻害剤であるヘプテリジン酸の添加により、グルコースによる ABCA7 発現増加作用は有意に低下した。また、ミトコンドリアピルビン酸輸送体阻害剤 UK5099 の添加によって、ABCA7 の発現に影響はなかった。これらの結果をまとめると、解糖系で生成されるサイトゾル中のピルビン酸が、ABCA7 の発現制御に関与している可能性が示唆された。過去の研究により、サイトゾル中ピルビン酸はヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）と相互作用することが報告されている（KD Gupta et al., Cell Reports, 30(8):2712-2728.e8, 2020）。この知見を踏まえ、HDAC 阻害剤 Trichostatin A を添加したところ、グルコース依存的な ABCA7 の発現増強作用は有意に低下した。このことは、ヒストンアセチル化がグルコースによる ABCA7 の発現制御に関与している可能性を示唆している。

成果発表：

<原著論文>

- ・ L-Theanine protects against methylglyoxal-induced oxidative stress and tight junction disruption in human cerebral microvascular endothelial cells, Kusumoto K, Habuchi K, Sakuma S, Okuhira K, *Food Nutr Sci*, 15:1218-1229, 2024
- ・ Multispanning membrane protein SIDT2 increases knockdown activity of gapmer antisense oligonucleotides, Kusumoto K, Sasaki K, Uchida Y, Utsumi A, Yoshida T, Obika S, Inoue T, Okuhira K, *Sci Rep*, 15(1):586, 2025

<学会発表>

- ・「アルツハイマー病関連タンパク質 ABC トランスポーターA7 の発現制御機構の解明」
羽渕 康容、楠本 嵩志、中井 麻由美、小島 日和、佐久間 覚、奥平 桂一郎
第 74 回 日本薬学会関西支部総会・大会（兵庫）
2024 年 10 月 5 日（土）
- ・「解糖系を介した ABC トランスポーターA7 発現制御機構の解明」
羽渕 康容、楠本 嵩志、中井 麻由美、小島 日和、佐久間 覚、奥平 桂一郎
第 45 回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム（徳島）
2024 年 10 月 10 日（木）～ 10 月 11 日（金）
- ・「ATP-Binding Cassette トランスポーターA7 の解糖系を介した発現制御機構の解明」
羽渕 康容、楠本 嵩志、中井 麻由美、小島 日和、佐久間 覚、奥平 桂一郎
第 97 回 日本生化学会大会（横浜）
2024 年 11 月 6 日（水）～ 11 月 8 日（金）
- ・「ミクログリア細胞におけるレスベラトロールの ABCA7 発現量に対する影響」
小島 日和、羽渕 康容、楠本 嵩志、佐久間 覚、奥平 桂一郎
日本薬学会 第 145 年会（福岡）
2025 年 3 月 26 日（水）～ 3 月 29 日（土）
- ・「フィンゴリモド（FTY720）による ABCA1 を介した脂質蓄積抑制機構」
奥平 桂一郎
第 56 回 日本動脈硬化学会総会・学術総会（神戸）
2024 年 7 月 6 日（土）～ 7 月 7 日（日）

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7年3月31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 宮崎 杏奈（大阪医科薬科大学・薬学部・助教）

＜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）

研究分担者 高田 慎也（武庫川女子大学・薬学部・助手）

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的ながん治療法である。近年、BNCT 用の中性子加速器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 用中性子加速器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 $\mu\text{g/g}$ 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 の成否を決める最も重要な要素技術となっている。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：

① 新規レシオ型ホウ素検出用蛍光プローブの開発に関する検討

これまでに開発してきたホウ素検出用蛍光プローブの蛍光特性はいずれも ON/OFF 型であり、蛍光のアウトプットがプローブの局在や細胞内環境の影響を受けやすいことが課題となっている。本年度は、真に有用なホウ素検出用蛍光プローブの開発を目的として、局在や細胞内環境の影響を受けにくいレシオ変化型の蛍光プローブの開発に着手した。具体的には、ホウ素キレート部位を有しかつレシオ変化型蛍光プローブとしての優れた蛍光特性を有する化合物を母核とした DHNBI を開発し、その有用性について評価した。

5%DMSO-H₂O 中、DHNBI（終濃度 1 μ M）にフェニルボロン酸（PBA）またはホウ酸（終濃度 0-1 mM）を添加し、蛍光特性の変化を調べた。また、DHNBI（終濃度 1 μ M）に各種金属カチオン（終濃度 10 μ M）を添加し選択性を調べた。A549 細胞に *p*-Boronophenylalanine（BPA）、DHNBI を順次添加し、蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。

DHNBI は PBA・ホウ酸添加後に、それぞれ 474 nm、476 nm における蛍光強度上昇と 534 nm における蛍光強度減少を示し、レシオ変化型としての性質を示した。DHNBI の蛍光強度比は PBA・ホウ酸添加濃度（0-50 等量）との間で高い直線性（ $r=0.99$ ）を示した。DHNBI は金属カチオン添加による蛍光強度の上昇を示さず、ホウ素への高選択性を示した。DHNBI は BPA 添加細胞で明瞭な蛍光を示した。以上より、DHNBI は BNCT 領域の発展に貢献する新たなホウ素検出用蛍光プローブであることを明らかとした。

成果発表：

<原著論文>

1. Hara F, Mizuyama N, Fujino T, Takada S, Temma T, Saji H, Mukai T, and Hagimori M. Development of a Pyrone-Fused Tricyclic Scaffold-based Ratiometric Fluorescent Probe for Al³⁺ Detection. *J Fluoresc* (2024). <https://doi.org/10.1007/s10895-024-03864-w>

<学会発表>

1. BNCT 領域の発展のためのインビトロ・インビボ用創薬研究、天満 敬、第 20 回日本中性子補足療法学会学術大会、2024 年 7 月 26 日（高槻）
2. ボロン酸含有薬剤の細胞内局在解析を目的とした 2-(2-Hydroxyphenyl)benzothiazole 誘導体の開発、杜 洪欽、高田慎也、近藤直哉、宮崎杏奈、萩森政頼、天満 敬、第 36 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2024 年 8 月 28 日（静岡）
3. BNCT 用薬剤の有効性評価を目的としたレシオ変化型ボロン酸蛍光プローブの開発、松本芽依、高田慎也、原 史子、堀山志朱代、天満 敬、萩森政頼、第 74 回日本薬学会関西支部総会・大会、2024 年 10 月 5 日（西宮）
4. 生物中ホウ素の検出を目的とした蛍光プローブの開発、高田慎也、藤野 毅、見島伊織, Dehini Kankanamge Ganegoda、原 史子、堀山志朱代、天満 敬、萩森政頼、日本薬学会第 145 年会、2025 年 3 月 27 日（福岡）

<その他>

なし

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 薬物治療学Ⅰ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4月1日 ～ 令和7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、様々な疾患の成因而として考えられている。肥満、糖尿病そして睡眠障害は、酸化ストレスが関連する疾患である。

酸化ストレス関連疾患には、脳老化や脳疾患も含まれることが考えられる。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を伴う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法により評価し、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：

本年度の研究成果は、国際学会、オーストラリア（メルボルン）にて開催された ASCEPT, APFP&APSA Joint Congress にて発表した。発表演題は「Effect of thiamine supplementation on hepatic GIP modification in obese diabetic rats」である。

肝臓は、糖脂質代謝過程においてフリーラジカルを産生し、酸化ストレス状態になりやすいと考えられる。肥満を伴う2型糖尿病患者では、非アルコール性肝疾患(NAFLD)の合併症が高く、NAFLD合併の肥満ならびに糖尿病治療では、血糖コントロールとともに肝臓における酸化ストレスを抑制す

ることが重要である。肥満を伴う糖尿病ラットにおいて、肥満の改善、血糖値および酸化ストレス状態を評価し、糖尿病合併症を含む酸化ストレス疾患の予防と治療法、さらにチアミン誘導体の継続的な摂取による酸化ストレス防御の可能性について探究している。

肥満を伴う糖尿病ラットの肝臓における glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) 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、肥満を伴う糖尿病ラットの酸化ストレス状態に関連する可能性が示唆された。肥満を伴う糖尿病ラットにチアミン含有飲料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である GIP 発現を変動させることが判明した。継続的なチアミン摂取は、肥満と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。

共同研究機関である金城学院大学 福石信之教授の研究室では、kamebakaurin が、肥満細胞からのヒスタミンやロイコトリエンなどのアレルギー惹起物質の遊離を著明に抑制することを証明した。本年度の福石信之教授の研究成果として、kamebakaurin が抗アレルギー薬の候補物質として有力である事を示しただけでなく、kamebakaurin が阻害する分子が抗アレルギー薬の新たなターゲット分子になることを示している。

今後は、kamebakaurin の抗アレルギー作用のみならず酸化ストレスを抑制するメカニズムを介して、肝障害を軽減する可能性を見出し、酸化ストレス関連疾患の予防と病態改善に繋がる知見を探究する。

<学会発表>

Effect of thiamine supplementation on hepatic GIP modification in obese diabetic rats

Kohda Y, Matsumura H, Fukuishi N, Tanaka S, Kato R

ASCEPT, APFP&APSA Joint Congress, 2024 年 12 月(Melbourne, Australia)

<原著論文>

Kamebakaurin suppresses antigen-induced mast cell activation by inhibition of FcεRI signaling pathway

Asai H, Kato K, Miyasaka M, Hatsukawa K, Murakami N, Takeda N, Abe J, Aoyagi Y, Kohda Y, Gui MY, Jin YR, Li XW, Hitotsuyanagi Y, Takeya K, Andoh T, Kurosaki H, Fukuishi N Int Arch Allergy Immunol,185(9): 836-847, 2024

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, 2023

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

<その他>

なし

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 6 年 4 月 1 日 ～ 令和 7 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 に代表される抗がん性白金錯体化合物は、一般に 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と考えられている。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る可能性がある。そこで、我々は、二核の白金製剤とすることで DNA 鎖を歪めることなく架橋することが出来るのではないかと考え、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きた。

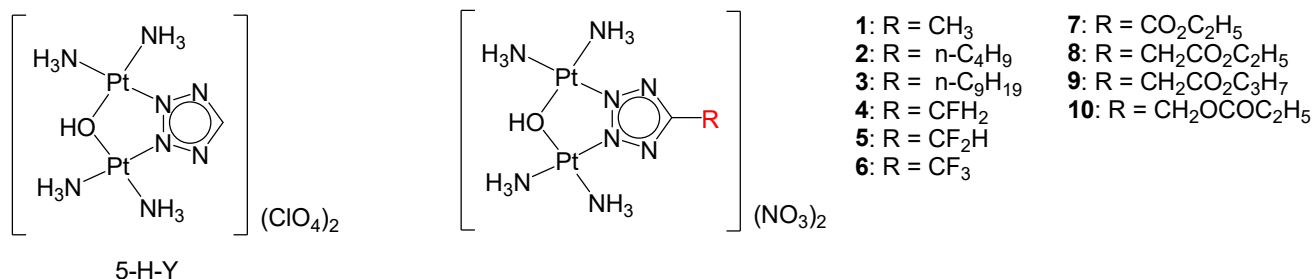


図. 5-H-Y および関連テトラゾラト架橋白金二核錯体の化学構造

先行研究においてピラゾール、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 **5-H-Y** ($[\{cis-Pt(NH_3)_2\}_2(\mu-OH)(\mu-5-R-tetrazolato-N2,N3)]^{2+}$) は、*in vivo* で非常に高い抗腫瘍効果を発揮することが明らかになったことから、テトラゾール白金錯体を中心に創薬研究を行っている。

本年度の研究内容および研究成果： 先に述べたようにこれまでは一般に白金二核錯体の抗腫瘍性は DNA に架橋することによって複製を阻害することが発現機構であると考えられてきた。しかし、最近、ある種の白金錯体が前立腺がん細胞のアンドロゲン受容体(AR)に結合してシグナリングを阻害することがわかってきた。そこで、**5-H-Y** およびこれまでに合成に成功した **5-H-Y** 誘導体 10 種 **1-10** (前項図) を合成して補充し、ヒト前立腺がん細胞 LNCaP を用いる増殖抑制活性試験に付した。その結果、**5-H-Y** が IC₅₀ 値：3.9 μM と最も強い活性を示し、化合物 **1** も少し活性は落ちるが同等の活性を示した(IC₅₀ 値：5.0 μM)。アルキル基の長さが長い **2** は活性を示さなかった。化合物 **7-9** も不活性であったが、その他は弱いながらも活性を示した。

最も活性の強かった **5-H-Y** を用いてさらに詳しい実験を行い、低濃度でも LNCaP 細胞の AR シグナリングに直接影響を与えることと、従来通り DNA に結合してアポトーシスを誘発することが判明し、この薬剤の抗がん作用の作用機序が 2 通りあることを明らかにした。

成果発表：

<原著論文>

・ Tasuku Arai, Masashi Oshima, Masako Uemura, Takeshi Matsunaga, Taiki Ashizawa, Yoshitomo Suhara, Hiroki Yoneyama, Yoshihide Usami, Shinya Harusawa, Seiji Komeda, Yoshihisa Hirota.

Azolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes exhibit androgen receptor-mediated anti-prostate cancer activity. *Inorganic Chem.* **63**, 20951-20963, 2024.

<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 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6年4月1日 ～ 令和7年3月31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（東京科学大学・総合研究院・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：

これまで開発してきた特定の pH 領域を検出する蛍光センサーの構造が、エストロゲン受容体に対するリガンド分子の構造と類似していることに着目し、蛍光センサーとしての機能を併せ持つリガンド分子の開発を行った。エストロゲンが結合する受容体には、細胞質中から核内に存在し、リガンド依存的に特定の遺伝子の転写を活性化するという、genomic な生理機能を担うエストロゲン受容体（ER）がある。一方、ER は細胞膜上にも存在し、別の受容体タンパク質である GPER とともに、遺伝子の転写制御を介さないエストロゲンの non-genomic な生理機能を担っていることが報告されている。これらの生理機能の解析および関連する疾患治療薬の開発を行うためには、各々の受容体の局在変化および分解を検出できる分子が有用となる。我々はこうした解析に用いることができる分子として、特定の pH 領域、特にリソソームでの受容体の分解を検出できる弱酸性環境を検出するという蛍

光センサーとしての機能を併せ持つエストロゲン受容体リガンドの開発に成功した。これらの研究成果をとりまとめ、原著論文として発表した。

また本年度は、これまで開発した過酸化水素に応答して機能する光分解性保護基の機能の改良も行った。過酸化水素は活性酸素種の一つであるが、病的な組織においてその産生が亢進することが知られている。例えば、パーキンソン病病変部においてはその濃度が増大することから、過酸化水素の濃度が高い環境選択的にパーキンソン病の症状を改善するドーパミンなどの生理活性分子を放出できる分子システムは有用となる。しかし我々がこれまで開発してきた過酸化水素存在下で機能する光分解性保護基は、化学的な不安定性などの要因により、ドーパミンなどのアミノ基を持つ分子との複合体の形成が困難であった。そこで、こうした問題を解決した分子を新たにデザインした。合成に成功した光分解性保護基は期待どおりにドーパミンとの複合体の合成に用いることができた。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：

<原著論文>

- ・Tomoya Hirano, Daisuke Yasuda, Takeshi Yamada, Hiroyuki Kagechika, Development of fluorescent estrogen receptor ligands with pH sensor functionality, *Chem. Pharm. Bull.*, **73**, 412-418 (2025)

<学会発表>

- ・浅田萌香、小橋彬徳、板垣奈々、安田大輔、影近弘之、平野智也、特定の pH 領域で機能する光機能分子の構造と機能に関する開発研究、日本薬学会第 145 年会、2025 年 3 月、福岡
- ・大崎愛弓、星野匡彦、坂野翼、安原徳子、平野智也、影近弘之、ブラジル産薬用植物 *Quassia amara* に含まれる蛍光成分の蛍光特性と生細胞導入、日本薬学会第 145 年会、2025 年 3 月、福岡
- ・平野智也、龍神央明、浅田萌香、板垣奈々、安田大輔、影近弘之、特定の pH 領域で機能する光機能分子の開発研究、第 50 回反応と合成の進歩シンポジウム、2024 年 10 月、神戸
- ・井原ななみ、安田大輔、谷梨理子、宮治紗羅、岡優希、北川星来、竹信慶乃、高絢一果、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研究、第 74 回 日本薬学会関西支部総会・大会、2024 年 10 月、西宮
- ・古賀勇希、安田大輔、楠木萌、藤本達喜、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機能するケージド化合物の開発、第 74 回 日本薬学会関西支部総会・大会、2024 年 10 月、西宮
- ・平野智也、安田大輔、影近弘之、生体分子応答型光分解性保護基の開発、第 46 回日本光医学・光生物学会、2024 年 7 月、静岡

<その他>

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：

カルバシュガー型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：

令和6年4月1日 ～ 令和7年3月31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 朝田 瑞穂（明治薬科大学・薬学部・助教）

研究目的：大学発の糖尿病薬の創薬を目指し、 α -グルコシダーゼ阻害活性の期待されるカルバシュガー構造を有する天然物ならびに類縁体のキラル合成を行い、それらの活性を調べる。具体的には放線菌 *Streptomyces lincolnensis* 由来の lincitol 類ならびにこれまで合成例の無い rancinamycin 類の合成に取り組む。活性試験によって得られた結果について計算化学を用いて活性発現に関する理解を深め、そこから得られた知見をもとにさらに活性の強い化合物の構造を予測し、新しい標的化合物をデザイン、合成に役立てる。

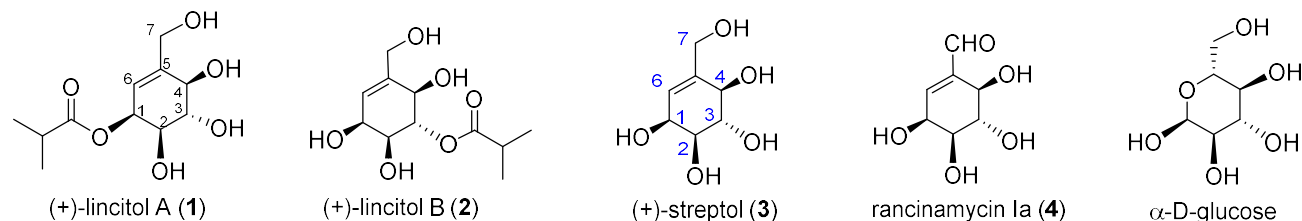
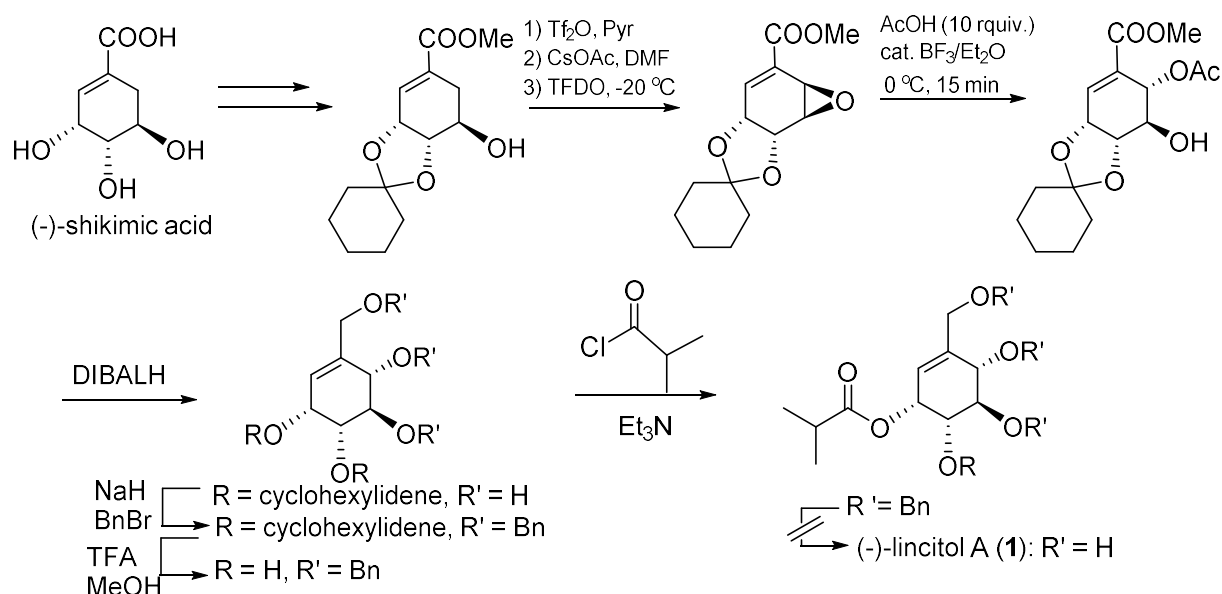


図 1. Lincitol 類および rancinamycin Ia の化学構造

本年度の研究内容および研究成果：引き続き lincitol 類、rancinamycin 類の合成研究を並行して実施している。これまで合成した (+)-, (-)-**2** および (+)-, (-)-**3**、合計 4 種の化合物について、Protein Data Bank に登録されている酵母由来の α -グルコシダーゼの構造データをもとにドッキングシミュレーションを行ったところ、酵素との親和性が (+)-**2** > (-)-**2**、(+)-**3** > (-)-**3** の順となること示す計算結果が得られており、実際に測定した活性の強度とパラレルな結果であった。今回、(+)-**1** および (-)-**1** につい

て同様の計算を行ったところ、特に(+)-**1** において強い親和性が期待できる計算値が得られた。そこで未だ合成経路の確立されていない**1**の合成に焦点を当て(-)-エナンチオマーについて検討した。スキームに示す合成を行い、最終中間体を得たが、最終段階の脱ベンジル化は成功に至っていない。そこで、スキームに登場するモデル化合物を用いて、種々の条件下で脱ベンジル化を検討した。その結果、DDQを用いた場合、3つのベンジルエーテルのうち2つが外れ、残った1つがベンジリデンアセタールを形成することを見出した。



スキーム 1. (-)-シキミ酸からの(-)-lincitol A の合成の検討

今後、最終中間体に対して DDQ を作用させ、同様のベンジリデンアセタール中間体とした後、 TFA-MeOH で脱アセタール化して目的物を合成する予定である。成功すれば、天然物であるエナンチオマー(+)-**1** も合成し、活性試験を実施する。また、昨年の報告で活性試験のための資料の量が充分ではないとしていた(+)-**2** の合成は既に完了している。

成果発表：

<原著論文>

- ・なし

<学会発表>

- ・ Rancinamycin Ia の合成、馬場輝、葉山登、米山弘樹、宇佐美吉英、
日本薬学会第 145 年会、2025 年 3 月 26-29 日（福岡）

<その他>

- ・なし

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：

質量分析を用いた薬物動態に関わる薬物代謝経路の解析

研究期間：

令和 6 年 4 月 1 日 ～ 令和 7 年 3 月 31 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)

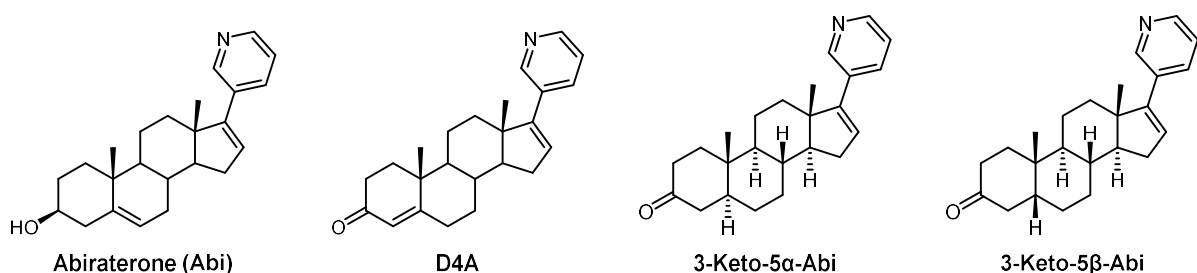
研究分担者 米山 弘樹 (大阪医科薬科大学・薬学部・講師)

＜共同研究機関＞

研究代表者 堀山 志朱代 (武庫川女子大学・薬学部・講師)

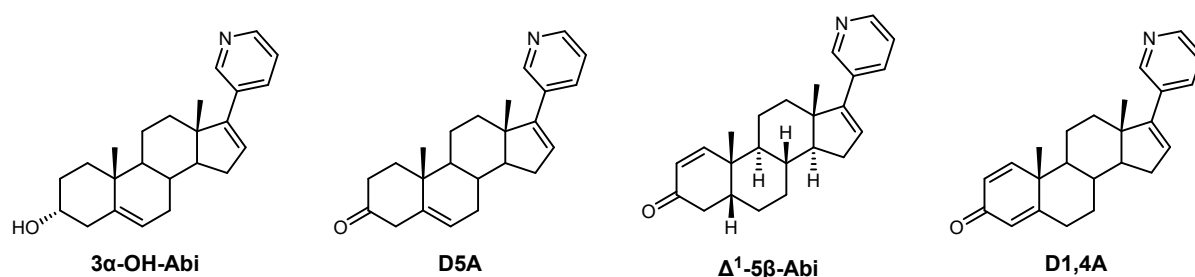
研究目的：

Abiraterone (Abi) は去勢抵抗性前立腺がんの治療に用いられているが、生体内で 3β -Hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD) により、**Abi** よりもアンドロゲン受容体への活性が高い **Δ^4 -Abi (D4A)** に代謝される。一方、**D4A** は 5α -reductase および 5β -reductase により、それぞれ **3-keto- 5α -Abi** および **3-keto- 5β -Abi** に代謝される。



これまでに **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。そこで、未知代謝物の推定化合物として **3 α -OH-Abi**, **D5A**, **Δ^1 - 5β -Abi** を合成したところ、LC 上での保持時間が一致し、同定することに成功した。また、酵素 3α -HSD および S9 を用いた実験により **3 α -OH-Abi**, **D5A** がどのような変換を経て生じるのかを明らかとした。一方、 **Δ^1 - 5β -Abi** についてどのような代謝経路で生じるのかを明らかにできていない。そこで我々はマウスに **Δ^1 - 5β -Abi** および **3-keto- 5β -Abi** を尾

静脈から投与し、顎骨後ろに位置する静脈から採血を行い、除タンパクした試料を高分解能 LC/MS 装置により測定した。 Δ^1 -5 β -Abi を投与したところ、代謝物として 3-keto-5 β -Abi および 3-keto-5 α -Abi が出現した。この結果は、4 位が不飽和になった後、5 α -reductase および 5 β -reductase により 5 位の水素の立体が異なる代謝物が生成したと考えられた。また、抽出イオンクロマトグラム上に D4A より 2u 質量値が低いピークが確認された。我々はその化合物を D1,4A と推察し、 Δ^1 -5 β -Abi の代謝経路の中間体である可能性があることから、D1,4A の合成を試みた。一方、3-keto-5 β -Abi を投与したところ、代謝物として D4A および D5A の生成が確認されたが、 Δ^1 -5 β -Abi を直接検出できていない。今後、採血時間等を検討するとともに、S9 の実験も併用する実験も検討が必要である。



本年度の研究内容および研究成果：

D1,4A は、市販の Δ^4 -Androstene-3,17-dione から DDQ によりステロイド骨格を酸化し、その後、Abi と同様の方法でピリジン骨格を導入する合成経路を計画した。 Δ^4 -Androstene-3,17-dione から DDQ 酸化によるステロイド 1,2 位のオレフィン化の進行を確認したが、不純物の除去が困難であった。そこで不純物が混入したままステロイド 17 位のトリフラート化と続く鈴木-宮浦カップリングによるピリジン環の導入を試みたところ、反応は進行し、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにより D1,4A が合成できることを確認したが、今のところ単離・精製には至っていない。現在、この経路を精査し、D1,4A の単離方法を探索中である。

成果発表：

<原著論文>

・なし

<学会発表>

・アビラテロン誘導体に対する分子鋳型ポリマーの調製と応用：神路浩美、本田千恵、堀山志朱代、葉山 登、萩中 淳、第 36 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2024 年 8 月（静岡）（誌上開催）

・アビラテロン新規代謝物の構造および代謝経路の解析：城戸崎 彩乃、高澤 帆夏、原 史子、高田 慎也、萩森 政頼、葉山 登、萩中 淳、堀山 志朱代、第 74 回日本薬学会関西支部総会・大会、2024 年 10 月（西宮）

<その他>

・なし

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：

睡眠障害の病態解明とその医療応用

研究期間：

令和6年5月1日 ～ 令和7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・薬物治療学Ⅱ研究室・教授）

<共同研究機関>

研究代表者 足立 浩祥（大阪大学・キャンパスライフ健康支援・相談センター・教授）

研究目的：

本研究の目的は、オレキシンを含む睡眠障害関連分子や神経関連ペプチドを、ヒト検体などから測定することなどを通じて、睡眠障害の病態解明とその医療応用につなげることである。

本年度の研究内容および研究成果：

本共同研究は、睡眠・覚醒調節に深く関与する分子機構の解明を目的として、大阪大学における臨床睡眠研究と大阪医科薬科大学における分子生化学的アプローチとを融合させる形で進めている。特に、オレキシンおよびその受容体系に注目し、それらの機能異常が睡眠障害においてどのように関与しているかを明らかにすることを目指している。

研究の初期段階として、現在は関連文献のレビューおよび研究対象とする分子群の選定、ならびに使用する検体の性質や条件のすり合わせを進めているところである。また、実際にヒト由来検体を用いた測定系の検討も段階的に開始しており、いくつかの候補分子に対して基礎的な測定を試みている段階である。

特に、ヒト検体からのオレキシン関連分子の安定的な検出法や、他の神経ペプチドとの相関解析については、検出感度や特異性の確保が課題であり、引き続き条件検討を行っている。現在までのところ、一定の方向性は見えてきているが、定量的な評価や臨床データとの関連づけについては今後の検討が必要である。

一方で、これらの測定データの蓄積は、将来的に睡眠障害の分子診断マーカーの同定や、新規治療戦略の構築にもつながる可能性があると考えられる。そのため、今後はより症例数を増やした検体収集と、測定法の最適化を並行して進め、臨床応用に向けた足がかりとなる基盤データの蓄積を目指す。

全体として、現時点では準備的な段階が中心ではあるが、分子病態の解明に向けた枠組みづくりと研究基盤の整備は着実に進みつつある。引き続き、臨床現場との連携を深めながら、着実に研究を進展させていく予定である。

成果発表：

<原著論文>

- ・特記なし

<学会発表>

- ・CLIPPERS CSF サンプルのマウス脳組織ベースアッセイ、金宗 潤、清水 幹人、岡田 健、柳田 寛太、山口 敬子、松永 秀典、坂口 学、福森 亮雄：28P-pm504、日本薬学会第 145 年会（福岡）、2025 年 3 月
- ・自己免疫性脳炎の新規抗原同定における Caspr1 を用いた CBA の検証と課題、平井 要、岡田 健、金宗 潤、柳田 寛太、山口 敬子、松永 秀典、加藤 隆児、清水 幹人、坂口 学、福森 亮雄：29PA-430S、日本薬学会第 145 年会（福岡）、2025 年 3 月

<その他>

- ・特記なし

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：

創薬応用を目指した Nrf2 制御剤の ADMET 評価（BINDS 事業 BINDS-5975）

研究期間：

令和6年2月24日 ～ 令和7年3月31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）

研究分担者 安田 大輔（大阪医科薬科大学・薬学部・助教）

<共同研究機関>

研究代表者 金光 佳代子（東京大学・大学院薬学系研究科附属創薬機構・特任准教授）

研究分担者 小島 宏建（京都大学・大学院薬学系研究科附属創薬機構・特任教授）

研究目的：

本研究では、多彩なアンメットメディカルニーズを克服するための創薬リード化合物の創出を目的とする。

生体防御因子 Nrf2 は種々の難治疾患に対する治療標的として期待されている。Nrf2 の活性は Keap1 とのタンパク質間相互作用 (PPI) によって厳密に調節されており、この PPI を制御する分子は Nrf2 の活性化または抑制を担うモジュレーターとして有用である、申請者らは、Keap1-Nrf2 間の PPI を制御する低分子化合物をデザイン・合成しその化学構造 (置換基) の種類によって Nrf2 活性化剤または抑制剤のいずれかとして機能することを見出している。それらの Nrf2 制御剤は、パーキンソン病や慢性腎臓病、間質性肺疾患、治療抵抗性がんなどに対する治療薬候補として有望である。特に直近では、治療抵抗性がん細胞において Nrf2 を抑制することにより薬剤耐性の解除を実現しつつ、周囲の正常細胞においては Nrf2 を活性化して副作用の軽減を同時に行う、dual-active な Nrf2 制御剤の開発に注力している。しかしながら、研究代表者らが開発した一連の Nrf2 制御剤の多くは、細胞系や *in vivo* での薬効発現に重要な薬物動態・毒性 (ADMET) パラメータに問題があり、構造改変によりパラメータの改善を行う余地が残されている。

共同研究先である東京大学薬学部附属創薬機構では、創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) 事業の一環として非臨床 POC の取得や特許取得・企業導出等、本格的・革新的創薬に向けた ADMET パラメータの評価や薬効スクリーニングの支援を行っている。本研究では Nrf2 制御剤に関する ADMET パラメータのうち、特に問題点の多いシトクロム P450 による代謝に対する安定性・水溶性・細胞膜透過性・血漿タンパク質結合能の4点について詳細な評価を依頼し、また動物における ADMET 評価も併せて行うことで、非臨床 POC の取得に向けた研究を行う。

本年度の研究内容および研究成果：

Nrf2 制御剤のうち、強い細胞内 Nrf2 活性化作用を有する KMN003 について、全身性強皮症 (SSc) 間質性肺疾患 (ILD) モデルマウスに対する *in vivo* での治療効果を、本学医学部内科学 IV 教室 リウマチ膠原病内科と共同で評価した。KMN003 を 30 mg/kg/day の容量で 28 間連日投与し、その SSC および ILD に対する治療効果を評価したが、コントロール群と比べて優位な効果は得られなかった。その原因が KMN003 の体内動態に起因すると考え、東京大学大学院薬学系研究科創薬機構（以下、創薬機構）に *in vivo* PK 評価を依頼した。その結果、KMN003 は腹腔内投与後の血中濃度が低く推移し、また標的臓器に対する対流性も低いことが治療効果を発現しなかった原因であることが示唆された。今後、より薬物動態に優れた KMN003 誘導体を創成する必要がある。

また研究代表者等は、新規 Nrf2 活性化剤であるナフタレン-2-アセトアミド構造を有する誘導体群をデザイン・合成し、その細胞内 Nrf2 活性化剤を評価したところ、ピロリジン・ピペリジン・モルホリン構造を有する誘導体群が特に強力な細胞内 Nrf2 活性化効果を示すことを明らかにした。そこで、それらの Keap1-Nrf2 間 PPI 阻害作用の評価を創薬機構に依頼した。蛍光偏光アッセイにより得られたアセトアミド型誘導体の PPI 阻害活性は、ナフタレン環 2 位が無置換の誘導体と同等であり、側鎖の物性などが細胞内での機能発揮（膜透過性や細胞質滞留性の向上）に影響していることが示唆された。さらに、最も細胞内 Nrf2 活性化効果に優れたピロリジン-アセトアミド型誘導体について *in vitro* ADME 試験の実施を依頼し、膜透過性・水溶性・代謝安定性・血漿タンパク結合率をそれぞれ評価した。それらの結果について、原著論文を執筆中である。

成果発表：

<学会発表>

- ・タンパク質間相互作用阻害型 Nrf2 モジュレーターの開発、
○安田大輔, 井上大輔, 海東和麻, 多胡めぐみ, 大江知之, 平野智也
日本ケミカルバイオロジー学会 第 18 回年会、2024 年 5 月 27 日(口頭)
- ・ビススルホンアミド型 Keap1-Nrf2 PPI 阻害剤の創製研究
○秋山敏毅, 安田大輔, Kuai Zhen, 平野智也, 山下泰信, 高田悠里, 伊藤幸裕, 鈴木孝禎
第 50 回 反応と合成の進歩シンポジウム、2024 年 10 月 28 日 (ポスター)
- ・新規 Nrf2 活性化剤 KMN003 が示す抗炎症作用の解析
○豊島海, 米田慶二郎, 安田大輔, 中澤洋介, 多胡憲治, 多胡めぐみ
第 97 回 日本生化学会大会、2024 年 11 月 8 日 (ポスター)
- ・ナフタレン-2-アセトアミド型 Keap1-Nrf2 PPI 阻害剤の創成
○安田大輔, 豊島海, 多胡めぐみ, 大江知之, 金光佳世子, 今村理世, 小島宏建, 海東和麻, 平野智也
第 41 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2024 年 11 月 21 日 (ポスター)
- ・アジド基を持つ Nrf2 活性化薬の創製研究
○植田 祐一郎, 秋山 敏毅, 安田 大輔, Kuai Zhen, 平野 智也, 山下 泰信, 高田 悠里, 伊藤 幸裕, 鈴木 孝禎
日本薬学会 第 145 年会、2025 年 3 月 29 日 (口頭)
- ・アゼチジン骨格を有するナフタレン-2-アセトアミド誘導体の細胞内 Nrf2 活性化効果
○井上 小有里, 山内 紗季, 井上 大輔, 安田 大輔, 大江 知之, 平野 智也
日本薬学会 第 145 年会、2025 年 3 月 28 日 (口頭)

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：

薬物分子複合体の調製および評価に関する研究

研究期間：

令和6年4月1日 ～ 令和7年3月31日

研究担当者：

＜本学＞

研究代表者 戸塚 裕一（大阪医科薬科大学・薬学部・教授）

研究分担者 内山 博雅（大阪医科薬科大学・薬学部・講師）

研究代表者 田仲 涼真（大阪医科薬科大学・薬学部・助教）

＜共同研究機関＞

研究代表者 門田 和紀（和歌山県立医科大学・薬学部・教授）

研究目的：

難溶性や難吸収性を示す医薬品が増大する中、溶解性改善技術はその重要性を増している。中でも医薬品原薬の形を共結晶や塩結晶、非晶質状態へと変化させる技術は多くの医薬品に応用されている。共結晶はイオン結合以外の分子間相互作用によって二成分以上の構成分子で形成される単一の結晶と定義される。一方で塩結晶は、イオン結合によって二成分以上の構成分子で形成される単一の結晶と定義される。非晶質の中でも、非晶質複合体やコアマルフラスは、カウンター化合物との間の相互作用により、両成分を非晶質状態とした状態になる。これらは、**薬物分子複合体とも**総称され、医薬品開発において無くてはならない製剤手法の一つである。

本研究では、経口製剤に用いられている薬物分子複合体を経肺投与へと応用することを目指した。経肺投与を行う医薬品として、抗結核薬に着目した。結核は結核菌の空気感染が引き起こす慢性感染症であり、世界人口の1/3である約20億人が罹患していると報告されている。特に環境の整っていない発展途上国では未だ感染が深刻であり、その治療は必要不可欠である。結核菌が感染する部位は主に肺深部になるが、治療法は経口投与による化学療法であり、経口投与により薬物が消化管から吸収された後、全身循環する過程で肺への分布を期待して治療が行われる。そのため、高容量の薬物量を服用する必要があること、また系統の異なる抗菌薬を数種類併用する必要があるポリファーマシーが問題となる。より効果的な結核治療を目指すために、複数の結核薬を直接肺へと送達する目的で薬物分子複合体を設計し評価を行った。モデル薬物には、4-aminosalicylic acid (PAS)とisoniazid (INH)を用い、これらを噴霧乾燥にて分子複合化し、経肺投与製剤としての肺到達性を*in vitro*の評価法であるAndersen Cascade Impactor (ACI)にて評価した。

本年度の研究内容および研究成果：

冷却晶析法により PAS と INH 間で形成された結晶を単結晶 X 線回折測定により評価したところ、PAS のアミノ基と INH のヒドラジド基の間、さらに INH のピリジル窒素原子と PAS の水酸基の間で水素結合を形成し、モル比 1:1 で共結晶を形成していることが明らかとなった。

そこで、これらの組み合わせを経肺投与製剤化する目的で噴霧乾燥法により粒子の調製を行った。調製した粒子の結晶性を粉末 X 線回折測定により評価しところ、噴霧乾燥物においても共結晶に由来する回折ピークを確認することができた。また、モル比 1:1 で調製した場合にのみ他方の結晶に由来する回折ピークを認めなかったことから、噴霧乾燥法においても冷却晶析法と同様に PAS と INH は 1:1 で共結晶を形成していると考えられた。

下図に示すようにモル比 1:1 で調製した噴霧乾燥粉末を ACI にて評価したところ、両化合物は各ステージ区分に同程度の堆積を示し、肺への到達性が 20%以上で良好な肺内送達性であった。溶解度試験及び ACI と Transwell Insert の組み合わせによる in vitro 肺内溶出試験を行った結果、PAS の溶解性は共結晶形成により向上され、さらに両化合物の同時放出を確認した。以上のことから、分子複合体の形成により、肺への同時送達性に優れた製剤の調製が可能であった。

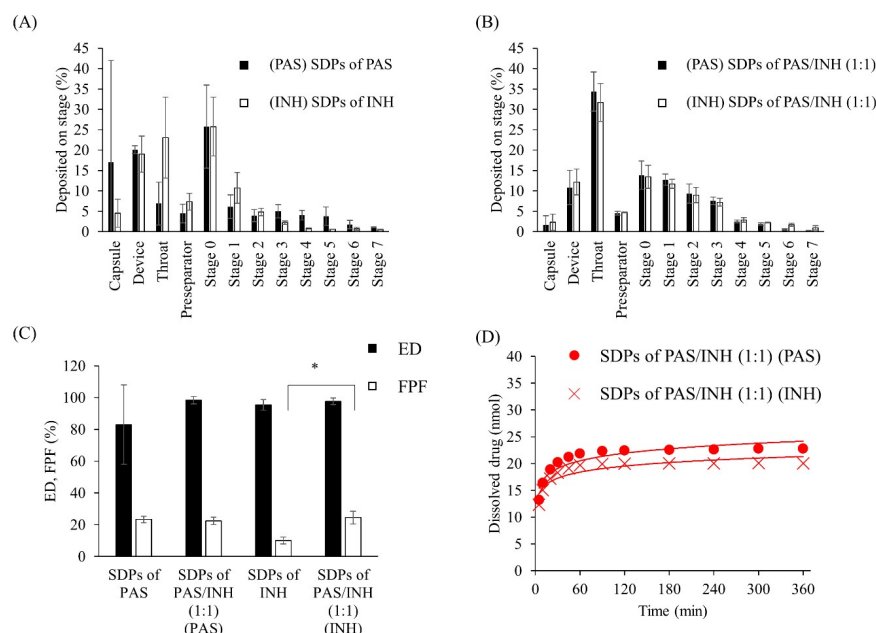


Figure 10. Deposited percentages of (A) PAS from the s SDPs of PAS and INH from SDPs of INH, and (B) PAS and INH from the SDPs of PAS/INH. (C) Emitted doses (EDs) and fine particle fractions (FPFs) obtained using the ACI featuring the SDPs of PAS, INH, and PAS/INH. (D) Dissolution profiles of PAS and INH from the SDPs of PAS/INH.

成果発表：

<原著論文>

・ Mo P., Hatanaka Y., Furukawa S., Takase M., Yamanaka S., Doi M., Kamarainen T., Uchiyama H., Kadota K.*, Tozuka Y.*,
Cocrystal formulation design of 4-Aminosalicylic acid and isoniazid via spray-drying based on a ternary phase diagram toward simultaneous pulmonary delivery, Powder Technology., (2024) 445

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 生化学研究室
職・氏名 教授・福永 理己郎

研究テーマ：

膵がんの腫瘍随伴マクロファージにおける ATP-クエン酸リアーゼの生理的役割

(Physiological role of ATP citrate lyase in tumor-associated myeloid cells in pancreatic tumors)

研究期間：

令和6年8月1日 ～ 令和7年3月31日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 福永 理己郎 （大阪医科薬科大学・薬学部・教授）

研究分担者 伊藤 千紘 （大阪医科薬科大学・薬学部・助教）

<共同研究機関>

研究代表者 Tony Hunter （Professor, MCBL, Salk Institute for Biological Studies）

研究分担者 Aubrey N. Michi （Research Associate, MCBL, Salk Institute for Biological Studies）

研究目的：

この共同研究は、膵がんの腫瘍随伴骨髄球細胞（TAM: tumor-associated myeloid cells）におけるクエン酸 ATP リアーゼ（ACLY: ATP citrate lyase）の生理的役割の解明を目的とする。TAM は、腫瘍随伴炎症を誘導することにより、膵がんの進行に重要な役割を果たしており、炎症性サイトカインを産生するだけでなく、腫瘍細胞の生体膜の形成に重要な細胞外脂質やアセチル CoA を供給している可能性が提唱されている。Hunter らは、マウスの初代骨髄系細胞およびヒト単球系 THP1 細胞由来の ACLY ノックアウト細胞を用いて、TAM の機能における ACLY および脂質合成に必須な関連酵素の生理的役割の解析を進めている。一方、福永らは、CRISPR/Cas9 技術を用いて THP1 細胞や他の細胞系列における高効率遺伝子ノックアウト法を開発した。本研究では、この手法を用いて初代マクロファージや THP1 細胞から ACLY 遺伝子および細胞質アセチル CoA 合成酵素（ACSS2: acetyl-CoA synthetase）遺伝子のノックアウト細胞を共同で作製し、TAM の脂質代謝や炎症性サイトカイン産生における ACLY 関連遺伝子の生理的機能を解明し、膵がん治療における標的代謝経路を提示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 まず、ACLY および ACSS2 遺伝子を効率よくノックアウト（KO）するための sgRNA 標的配列を探索するために、ヒト由来 HeLa 細胞を用いて遺伝子 KO を試みた。ヒト ACLY 遺伝子と ACSS2 遺伝子について、GeCKOver.2 の標的ライブラリーを参考にそれぞれ 4～5 カ所ずつ 20 塩基の標的配列を選定し、これらの配列を pX330 ベクターに挿入して sgRNA/Cas9 発現ベクターを構築した。標的配列 TG1～TG4 はエクソン内のフレームシフト変異を狙う単一 DSB(double-strand break) 方略であり、TG5 はスプライシング部位の破壊を狙う二重 DSB 方略を試みた。これらのプラス

ミドをピューロマイシン耐性遺伝子プラスミド（pUREF-EX）と共にヒト HeLa 細胞にトランスフェクションして、一過性高濃度ピューロマイシン選択法によって、それぞれのポリクローナル細胞集団を樹立した。また、両遺伝子の sgRNA/Ca9 プラスミドを共導入することによって、ACLY/ACSS2 ダブルノックアウト（DKO）細胞の樹立も試みた。その結果、ACSS2 については TG1～TG5 の全ての標的で高い効率で遺伝子 KO が成功したのに対し、ACLY ではいずれの標的でも KO 効率が低く、ACLY 欠損細胞は増殖能が低下する可能性が示唆された（図1）。

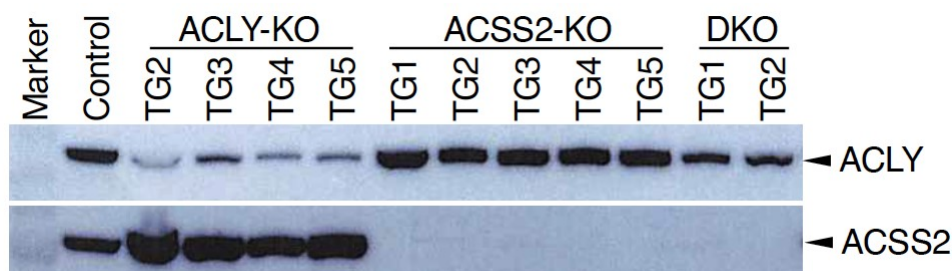


図1. HeLa細胞におけるACLY およびACSS2 遺伝子ノックアウトの検証

- ② 次に、ヒト単球様白血病細胞由来の細胞株である THP1 細胞を用いて ACLY 遺伝子と ACSS2 遺伝子の単独 KO を試みた。この場合も ACLY と ACSS2 遺伝子について4～5カ所の標的部位を試みた結果、ACSS2 では全ての標的において高効率で KO できること、ACLY でも TG2 と TG5 では比較的良好な効率で KO できることが判明した。また、ACLY と ACSS2 のダブルノックアウト（DKO）を試みた細胞においては、ACSS2 のバンドは消失していたが、ACLY の KO 効率は低かった（図2）。

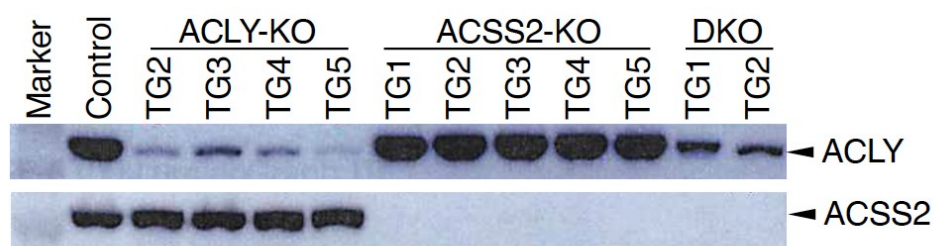


図2. THP1細胞におけるACLY およびACSS2 遺伝子ノックアウトの検証

- ③ 以上の結果より、ACSS2 遺伝子が欠損しても HeLa 細胞や THP1 細胞の生存や増殖に大きな支障はないが、ACLY 遺伝子が欠損すると細胞の生存率あるいは増殖能が低下することが示唆された。ACLY はアセチル CoA の供給ひいては脂肪酸合成に重要な役割を担う酵素であることから、現在、培地に酢酸イオンや脂肪酸を添加するなど、培養条件の至適化を行うと共に、各ノックアウト細胞のクローンを単離する試みを進めている。今後は、THP1 細胞由来のノックアウトクローン細胞を用いて、マクロファージへの細胞分化、サイトカイン産生、食食作用などにおける ACLY/ACSS2 遺伝子の機能を解析する予定である。

成果発表：

- ＜原著論文＞ なし
＜学会発表＞ なし
＜その他＞ なし