

大阪薬科大学 共同研究成果報告書

2019

(2019 年 4 月～2020 年 3 月)

共同研究課題名（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	3
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	6
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	9
循環器疾患薬物療法の有効性および安全性に関する薬学的評価	13
シグナル伝達病（がん・糖尿病等）に対する効果的薬物治療法開発のための基礎研究	17
疾患モデル動物を用いたてんかん病態、薬理研究	21
核内受容体モジュレーターによる脂質代謝調節	26
プロドラッグ型 siRNA を用いた家族性高コレステロール血症治療薬の開発	30
Fatty Acid Binding Protein 4 (FABP4) 標的イメージングプローブ開発に関する研究	33
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	36
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	39
心不全に対する新規治療標的の探索	45
Soluble Tumor necrosis factor (sTNF)、sTNF-Receptor1 (R1) 及び sTNF-R2 とがんの進行度との関連性を明らかにするパイロットスタディ	48
低酸素を基盤とした心筋リモデリング、肺高血圧症、Onco-cardiology に関する病態の遺伝子解析及びこれらアンメットメディカルニーズに対する治療戦略のリサーチ研究	51
特異体質性薬物反応のメカニズムに関する研究	55
<i>Vibrio vulnificus</i> M2799 株の鉄獲得機構の解明	59
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	62
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 ..	65

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：

平成 31 年 4 月 1 日 ～ 令和 2 年 3 月 31

研究担当者：

研究代表者	(大阪薬科大学・薬学部・戸塚 裕一)
研究分担者	(大阪薬科大学・薬学部・門田 和紀)
研究分担者	(大阪薬科大学・薬学部・内山 博雅)

<共同研究期間>

研究代表者 (同志社大学・理工学部・白川 善幸)

研究目的：

マリアアザミに含まれる Silybin は、フラボノイドの一種であり、抗酸化作用を有するだけでなく肝細胞の保護などを有しているため機能性食品として利用されている。しかし、Silybin は難溶性を示し (<5 µg/mL)、それに伴い吸収性が低いため、溶解性の改善が求められている。これまで我々は、酵素処理により糖を転移した α -Glucosyl hesperidin (Hsp-G) や α -Glucosyl rutin (Rutin-G) などの糖転移化合物を用いて、難溶性フラボノイド類の溶解性および吸収性改善に成功してきた。その際、難溶性フラボノイド類をエタノールに溶解し、水に溶解した糖転移化合物と混合した液を噴霧乾燥法により粉体を作製していた。一方、有機溶媒を使用せず水中に難溶性化合物を分散させ湿式粉碎して微粒化する方法は環境的に易しく、難溶性化合物の溶解性改善方法として注目されている。本研究では、Silybin を糖転移化合物と共に湿式粉碎し、微粒化および非晶質化することで溶解性の改善を試み、噴霧乾燥法により調製した粉体と比較した。

本年度の研究内容および研究成果：

Fig. 1 に湿式粉碎による Silybin 粒子径の経時的変化を示す。Silybin 単独および Sucrose を添加し湿式粉碎すると、150 分後において Silybin の平均粒子径は約 2 µm まで減少したが、粉碎時間の経過とともに粒子径が増大し、凝集傾向が認められた。それに対し、Hsp-G を添加すると、粒子径は減少し、凝集は認められなかった。特に Silybin と Hsp-G を重量比率 1:5 処方では、平均粒子径が約 140 nm にまで達した。

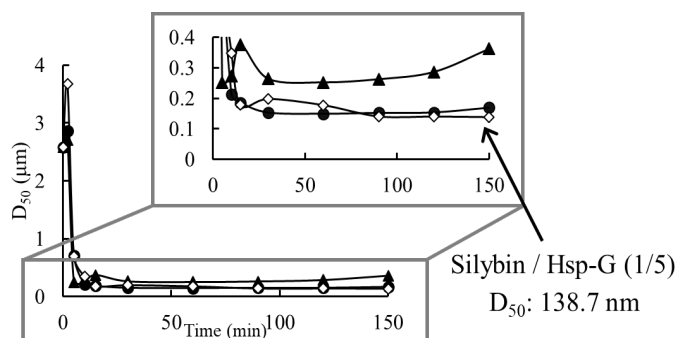


Fig. 1 Change in mean diameter of silybin particles (▲) silybin/Hsp-G (1/1), (●) silybin/Hsp-G (1/2), (○) silybin/Hsp-G (1/5).

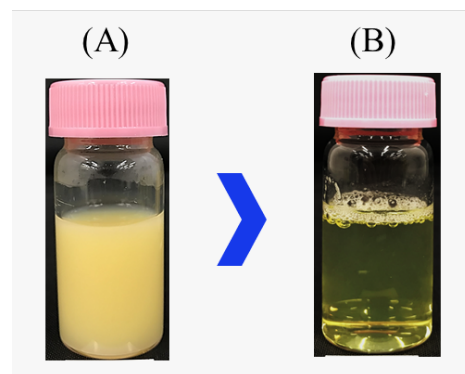


Fig. 2 Photographs of slurry (A) before milling and (B) after milling.

Fig. 2 に Silybin/Hsp-G (1/5) の処方での粉碎前後のスラリーの外観を示す。150 分粉碎後の Silybin/Hsp-G (1/5) は澄明となっていることが確認された。Fig. 3 に噴霧乾燥および凍結乾燥した製剤の粉末 X 線回折結果を示す。Silybin と Hsp-G との物理的混合物で確認された Silybin 原薬由来の結晶ピークは噴霧乾燥製剤、凍結乾燥製剤ともに確認されなかった。

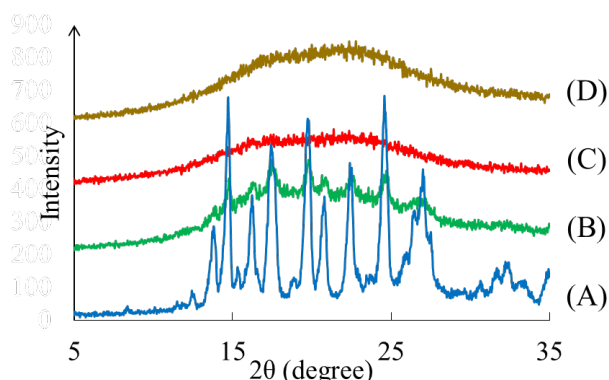


Fig. 3 Powder X-ray diffraction patterns of (A) untreated silybin, (B) physical mixture, (C) spray-dried particles and (D) Freeze-dried particles.

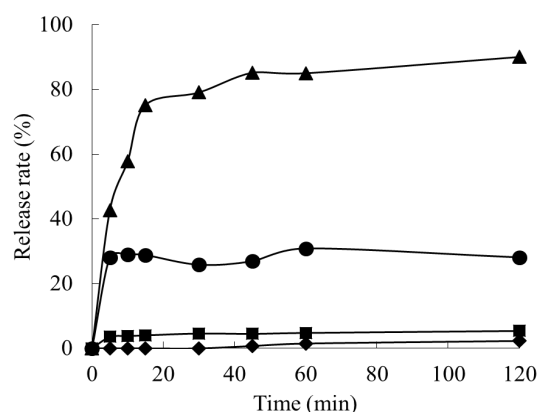


Fig. 4 Dissolution profile of silybin in distilled water at 37 °C (◆) untreated silybin, (■) PM of silybin/Hsp-G (1/5), (●) SD of silybin/Hsp-G (1/5), (▲)FD of silybin/Hsp-G (1/5).

Fig. 4 にパドル法により各製剤について実施した溶出試験結果を示す。Silybin 原末は 120 分後においてもほとんど溶出していないのに対し、凍結乾燥及び噴霧乾燥製剤は溶出量の向上が確認された。特に、湿式粉碎し凍結乾燥させた製剤は添加した薬物量のほぼ全量を溶出する結果となった。これらの結果から噴霧乾燥製剤の溶出速度の増加は Silybin が非晶質化したことに大きく起因していると考えられた。さらに、凍結乾燥製剤では粒子径が減少する微粒化の他に、粉碎時のエネルギーにより、Silybin が溶解していることが示唆され、噴霧乾燥製剤よりも溶解性改善効果が大きいことが明らかになった。

成果発表：
＜学会発表＞

・藤森 美季、内山 博雅、門田 和紀、戸塚裕一：湿式粉碎による Silybin の機能性粉体作製、2019 年度 粉体工学会春期研究発表会。（2020）（東京）、5 月

・藤森 美季、内山 博雅、門田 和紀、戸塚裕一：機能性食品開発を指向した湿式粉碎による Silybin ナノ粒子の調製、2019 年度 製剤機械技術学会 第 29 回大会（2020）（岐阜）、10 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 30 年 4 月 1 日 ～ 令和 2 年 3 月 31 日

研究担当者：

＜本学＞

研究代表者 宇佐美 吉英（大阪薬科大学・薬学部・教授）

研究分担者 米山 弘樹（大阪薬科大学・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：

世界保健機関(WHO)によって 2016 年に報告されたグローバルレポートによると、世界の成人の糖尿病有病者数は 2014 年までに 4 億 2,200 万人に達し、2025 年には 7 億人を突破するまで増加すると試算されている。この生活習慣病克服するために我々有機化学者が貢献できることの 1 つとして、新規な α -グルコシダーゼ阻害活性化合物の創製が挙げられる。我々は、2014 年に世界で初めて海洋動物アメフラシ由来真菌の代謝産物 pericosine E (1)の全合成に成功し、その後、一連の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。 α -グルコースとは異なる相対配置を有する pericosine 類の構造に基づく活性化合物の創製は、新しいタイプの糖尿病薬、抗肥満薬の開発に繋がると期待される。本研究では塩素原子が活性に必須か、また、その場合、何故、強力な活性に繋がるかを明らかにするため、塩素原子をメトキシ基に変換した様々な類縁体を合成し、活性評価を行うことで、構造活性相関に関する知見を得ることを目的とした。本課題では明治薬科大学の植沢教授グループとの共同研究における QSAR 解析およびドッキングシミュレーションにより合理的な解釈を得ようと試みた。

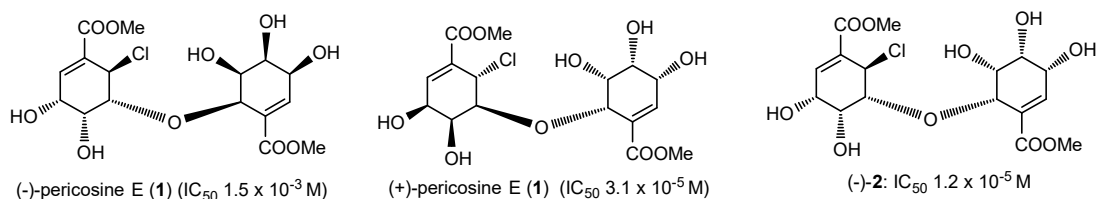


図 1. 塩素原子を含む pericosine E および関連化合物の構造と α -グリコシダーゼ阻害活性

本年度の研究内容および研究成果：

1. 新規誘導体の合成と活性評価

塩素原子をメトキシ基に置き換えた pericosine E 類縁体全 16 種のうち、本年度は以下に示した残り 4 種のすべての異性体 **4**～**6** の合成に成功し、各種グリコシダーゼ阻害活性試験に供した。すべての異性体に酵母由来の α -グルコシダーゼに対する阻害活性が見られたが、 IC_{50} を決定できる程度の活性を示したのは **4,5** の 2 種であり、(-)-**5** は、塩素原子を含む天然物 (-)-**1** と同程度の活性を示し、さらに β -ガラクトシダーゼに対しても顕著な阻害活性 (IC_{50} 7.9×10^{-4} M) を示した。

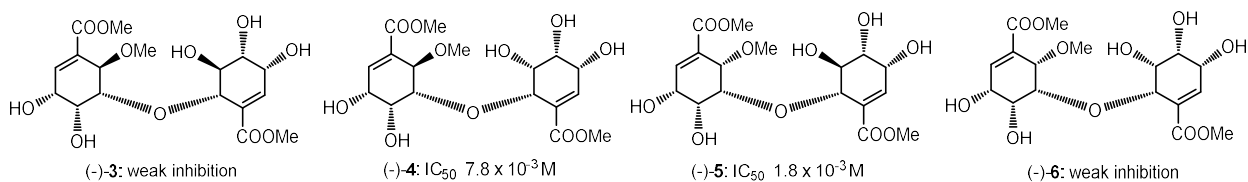


図 2. 令和元年度合成標的化合物の化学構造と α -グリコシダーゼ阻害活性

2. QSAR 解析

本課題において合成された全 16 種の化合物に対する活性試験結果を加えて、QSAR 解析に付した。この計算においては、活性試験で弱い活性を示すものの IC_{50} を決定でなかったもの ($IC_{50} > 7.8 \times 10^{-3}$ M) をすべて不活性として計算を行ったところ、結果として昨年度の報告書に記載したものに比べて、様々な記述子において 0.6 以上あった r^2 値の低下がみられ、上位のものでも 0.40～0.45 であり、弱い相関となった。しかしながら、化合物の右側部分が図 2 に示されたような絶対配置であるとき、高い確率で活性を示すことを裏付けた。

3. ドッキングシミュレーション解析

QSAR 解析において相関に関する明確な情報が得られなかったため、Protein Data Bank (PDB) より引用した α -グルコシダーゼ code 3A4A と活性化合物 (-)-**3**, (-)-**5** とのドッキングシミュレーションを Molecular Operating Environment (MOE)-Dock を用いて実施した。結果の要約を図 3 および図 4 に示した。

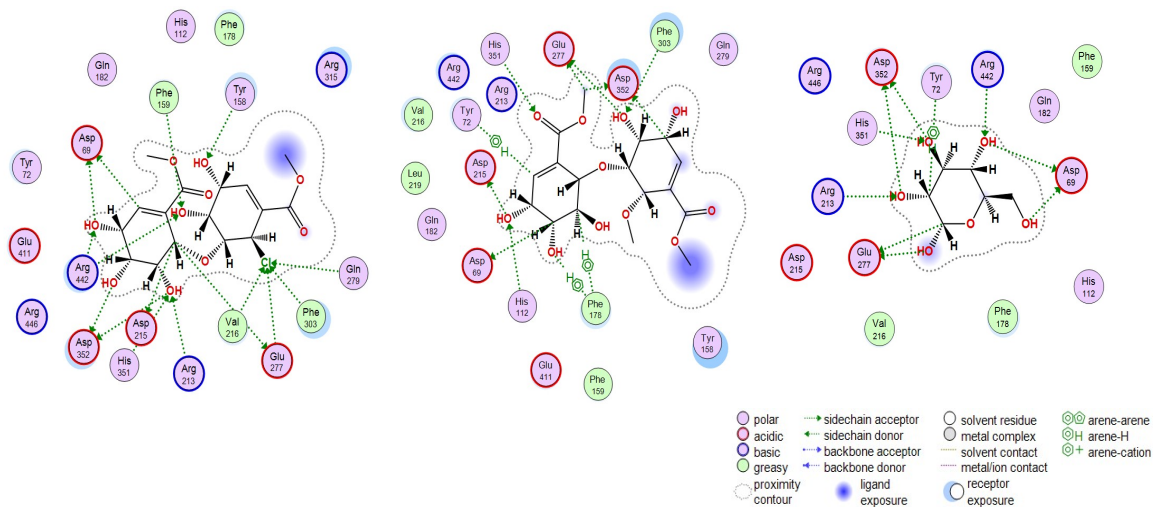


図 3. 化合物(-)-**3**, (-)-**5** とよびグルコースと α -グルコシダーゼの活性ポケットによるドッキングシミュレーションから得られた二次元的相互作用図。

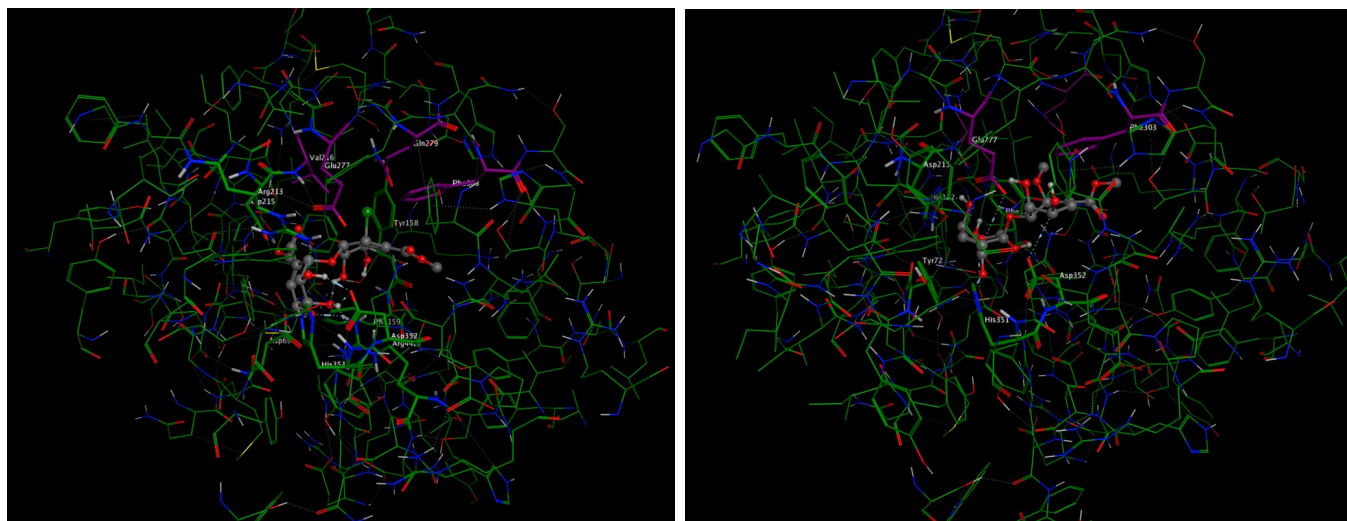


図4. α -グルコシダーゼの活性ポケットと化合物とのタンパク質-リガンド 相互作用図；
（左図）：(-)-3；（右図）(-)-5. 化合物 (-)-3 の塩素原子は緑、それと相互作用する周辺アミノ酸残基 Val216, Glu277, Gln279, Phe303 は紫で表示した.

図3を見ると化合物 (-)-3 および (-)-5 の α -グルコシダーゼの活性サイトにおけるアミノ酸残基との相互作用の様子が随分異なることが明らかであり、これらはグルコースとの相互作用とも大きく異なっている。(-)-3 および (-)-5 の α -グルコシダーゼの活性サイトにおける相互作用の大きな違いはとして、(-)-3 では塩素原子と周辺アミノ酸との水素結合が見られるのに対し、塩素原子をメトキシ基に変えた化合物 (-)-5 ではそのような相互作用が見当たらない。立体的に示された図4で左図に示す(-)-3 は酵素の活性ポケットがより小さくなっている、言い換えればより強く相互作用しているのが伺える。本検討によって、ハロゲンの非共有電子対が α -グルコシダーゼの活性サイトにおけるアミノ酸残基との相互作用をより強力にしていることが示唆された。本研究で得られた知見を今後のドラッグデザインに活かしていきたいと考えている。

成果発表：

<原著論文>

- Syntheses and Glycosidase Inhibitory Activities, and in Silico Docking Studies of Pericosine E Analogs Methoxy-Substituted at C6.
Yoshihide Usami, Megumi Higuchi, Koji Mizuki, Mizuki Yamamoto, Mao Kanki, Chika Nakasone, Yuya Sugimoto, Makio Shibano, Yoshihiro Uesawa, Junko Nagai, Hiroki Yoneyama, Shinya Harusawa.
marine drugs, **18**, 221 (2020).

<学会発表>

- 塩素原子欠損型 pericosine E 類縁体の合成
樋口 萌、神吉真緒、山本瑞季、米山弘樹、春沢信哉、植沢芳広、永井純子、宇佐美吉英
創薬懇話会 2019 in 秋保、2019年6月20日。
- 塩素欠損型 pericosine E 誘導体の合成とグリコシダーゼ活性評価
樋口 萌、神吉真緒、山本瑞季、溝渕慶乃、芝野眞喜雄、植沢芳広、永井純子、米山弘樹、春沢信哉、宇佐美吉英
第69回日本薬学会関西支部大会、神戸薬科大学、2019年10月12日。

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：

平成29年 2月 1日 ～ 令和2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）

<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 久米 学 （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（CDDP）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、CDDP 治療開始後に血中鉄濃度の一過性上昇を認めるなど、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る。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、CDDP 治療開始後に認められたバイオメタルの変動は制吐療法の影響を受けてい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 マウスにおけるオキサリプラチン腹腔投与後の血中プラチナおよびバイオメタル濃度変動の検討

これまで、プラチナ系抗癌剤としてシスプラチン処置の影響を検討してきたが、本年度はオキサリプラチンを用いて検討を行った。実験には正常マウスを用い、オキサリプラチンを1週間に2回、腹腔内に繰り返し投与を行い、投与1時間後と次回投与直前（1回目の投与48時間後）に採血を行った。対照群としては、5%ブドウ糖溶液を投与したマウスを用いた。得られた血液サンプルについて湿式灰化を行い、誘導結合プラズマ質量分析計（ICP-MS）を用いて元素分析を行った。これまでのシスプラチンでの検討結果と同様に、オキサリプラチン投与開始48時間以内に著しい体重減少は認めなかった。また、オキサリプラチンの初回投与1時間後には血中にプラチナが検出され、腹腔から血中にオキサリプラチンが移行したものと推察された。その後、血中プラチナ濃度は速やかに低下し、血中からの消失が確認されたが、投与48時間後においても血中でのプラチナの残存を確認した。投与3週間目のオキサリプラチン投与群でも1週目と同様の傾向は認められたものの、シスプラチン投与群の場合と異なり、1週目と比較して3週目の平均値は低値を示した。シスプラチンとオキサリプラチンの血中あるいは体内での分布の違いを反映していると考えられた。一方で、バイオメタルに関しては、オキサリプラチン投与1時間後の鉄、銅、亜鉛の血中濃度は対照群と比較して有意な差は認めなかった。投与48時間後では、銅の血中濃度が投与1時間後の値と比較して高値を示したものの、鉄や亜鉛ではこのような傾向は認められなかった。今後は、シスプラチンとオキサリプラチンの体内動態の差異について、腎臓や肝臓における蓄積性の観点から検討する予定である。

② マウスにおけるデキサメタゾン腹腔投与後の血中デキサメタゾンおよびバイオメタル濃度変動の検討

これまで、シスプラチンを含む化学療法施行時にはデキサメタゾン等の制吐剤が併用されることから、デキサメタゾンが血中バイオメタルに与える影響について検討を行った。実験には正常マウスを用い、デキサメタゾンを腹腔内に単回投与し、投与1時間後と24時間後に採血を行った。対照群としては、生理食塩水を投与したマウスを用いた。血中デキサメタゾン濃度の測定は、血清分離後、既報に従い、液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS/MS）を用いて測定した。また、血中のバイオメタルについては既述の通り、湿式灰化を行い、ICP-MSを用いて元素分析を行った。デキサメタゾン腹腔内投与1時間後の血清中デキサメタゾン濃度の中間値は4.49 µg/mL（四分位範囲 2.53～5.83）であったが、24時間後には検出限界以下であり、デキサメタゾンの速やかな血中からの消失を反映していると考えられた。一方、デキサメタゾン投与1時間後の鉄、銅、亜鉛の血清中濃度は、対照群と比較して有意な差を認めなかったものの、同24時間後では溶媒対照群と比較して有意に高く、それぞれ1.56倍、1.43倍、1.14倍の値を示した。デキサメタゾン投与を行ったマウスについて肝臓中ならびに腎臓中のバイオメタル濃度を測定したところ、鉄、亜鉛、銅の肝臓中濃度は低下する傾向にあった。また、血清中では検出限界以下のマンガンについては、デキサメタゾン投与24時間後の肝臓中濃度は対照群と比較して有意に低値を示した。腎臓中のバイオメタル濃度についてはデキサメタゾン投与による有意な影響を認めなかった。いずれのバイオメタルも生体内では2価の金属イオンとして存在し、一部は共通のトランスポーターを介して生体膜を通過することから、デキサメタゾン処置によるこれら肝臓のトランスポーターの発現変動がバイオメタル濃度に影響していると推察された。

③ がん化学療法誘発性の悪心・嘔吐の予防に向けたガイドライン遵守状況の評価

シスプラチンに限らず催吐作用を持つ薬剤を使用するがん化学療法施行時には、化学療法に伴う副作用発現を予防する目的でデキサメタゾンをはじめとする薬剤の投与が行われる。一方で、血液がんでは免疫担当細胞ががん化していることに伴う免疫不全状況に加え、制吐剤の投与によって過剰な免疫抑制効果が引き起こされ感染症リスクが高まることを危惧し、ガイドラインで推奨される制吐剤の使用を制限することも少なくない。血液がん患者 40 名を対象として検討したところ、ガイドライン遵守率は 45%であった。ガイドライン遵守群では嘔吐した患者がいなかったのに対し、非遵守群では 22.7%の患者が嘔吐を経験していた。また、40 名のうち 8 名の患者においてレスキュー薬の投与が必要であった。22 名の患者は観察期間中、全く悪心嘔吐を経験せずにコントロール可能であった。化学療法で使用される薬剤の催吐性の強さや支持療法で 사용되는制吐剤の違いなどの患者背景とガイドライン遵守率とがどの程度関連するかは明らかにできていないが、固形がんに対する化学療法と比較して血液がんに対する化学療法ではガイドライン遵守率が低い傾向にあることが明らかになった。

成果発表：

<原著論文>

- K. Yamashita, T. Ogihara, M. Hayashi, T. Nakagawa, Y. Ishizaki, M. Kume, I. Yano, R. Niigata, J. Hiraoka, H. Yasui, T. Nakamura. Association between dexamethasone treatment and alterations in serum concentrations of trace metals. *Pharmazie*. 75:217-221 (2020).
- Y. Nagatani, Y. Imamura, T. Nakamura, K. Yamashita, M. Okuno, H. Yasui, J. Hiraoka, R. Niigata, K. Kono, Y. Hyogo, H. Suto, K. Takenaka, Y. Funakoshi, M. Toyoda, N. Kiyota, H. Minami. Pharmacokinetics of oxaliplatin in a hemodialysis patient with metastatic colon cancer. *Int J Oncol Res*. 2(2):017 (2019).
- M. Uchida, T. Nakamura, H. Watanabe, T. Miyamoto, K. Akashi, S. Masuda. Usefulness of medication instruction sheets for sharing information on cancer chemotherapy within the health care team. *Pharmazie*, 74(9):566-569 (2019).
- M. Uchida, T. Nakamura, T. Shima, G. Yoshimoto, K. Kato, M. Shimokawa, K. Hosohata, T. Miyamoto, K. Akashi. Evaluation of compliance with antiemetic guidelines for prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting in patients with hematologic malignancy. *Pharmazie*, 74(4):250-254 (2019)

<学会発表>

- M. Uchida, T. Nakamura, K. Kato, T. Miyamoto, K. Akashi. Comparison between antiemetic effects of palonosetron and granisetron on chemotherapy-induced nausea and vomiting in Japanese patients treated with R-CHOP, 79th FIP World Congress of Pharmacy, 2019.9, Abu Dhabi, United Arab Emirates.

- ・山口裕規、内田まやこ、細見周平、池末裕明、細畑圭子、室井延之、佐藤悠城、藤本大智、富井啓介、橋田亨、中村任：非小細胞肺癌を対象としたドセタキセル療法における発熱性好中球減少症のリスク因子、第69回日本薬学会近畿支部総会・大会、2019年10月12日、神戸
- ・森康裕、内田まやこ、秋葉健太、池末裕明、細畑圭子、室井延之、下村良充、石川隆之、橋田亨、中村任：悪性リンパ腫を対象としたベンダムスチン療法による皮膚障害出現のリスク因子、第69回日本薬学会近畿支部総会・大会、2019年10月12日、神戸
- ・石崎裕馬、荻原孝史、林真穂、中川貴之、山下和彦、久米学、矢野育子、平岡純、安井裕之、中村任：マウス血清中バイオメタル濃度に及ぼすシスプラチン、オキサリプラチンおよびデキサメタゾンの影響、日本薬学会第140年会、2020年3月25-28日、京都

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 1 年 7 月 1 日 ～ 令和 2 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）
和田 恭一（大阪薬科大学・薬学部・特任教授）
音窪 麻衣（大阪薬科大学・薬学部・助手）

<共同研究期間>

研究代表者 老田 章（国立循環器病研究センター・薬剤部・部長）
研究分担者 寺川 伸江（国立循環器病研究センター・薬剤部・副部長）

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、実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実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。

研究の内容

（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

慢性疾患あるいは冠動脈疾患又は術後管理の薬物治療として配合剤が処方された患者を対象に、症状の安定性、服薬アドヒアランス率ならびに配合錠使用の経済性について診療録に基づく後ろ向き観察研究により、既存情報を用いて検討を行う。

（2）循環器疾患薬物療法時の副作用発現予測と重篤化回避のための手法確立

国内外で既存の公開医薬品情報データベースについて、統計学的手法を活用し、薬効や有害事象の発現と投薬との関連性の強弱を定量的に評価し、国立循環器病研究センターの診療情報との整合性について検証を行う。

（3）循環器疾患治療薬の母集団薬物動態解析と患者個別化投与設計法の確立

循環器疾患治療薬の血中濃度と有効性や副作用の関連性に関して後ろ向きに調査し、各薬剤の薬物動態パラメータを算出することによって薬物動態学的特性を把握し、個々の患者に適した投与量の調節方法の確立を行う。

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を実施した。

①補助人工心臓装着患者におけるワルファリン投与量に及ぼす抗生剤多剤併用の影響

ワルファリン(WF)は多種類の薬物と相互作用を有することが知られているが、薬物代謝酵素の阻害剤と誘導剤を同時に併用した場合のWFの投与量を調査した報告はほとんどない。今回、補助人工心臓(LVAD)装着患者において、WF服用中に代謝酵素 CYP3A4 の阻害剤であるクラリスロマイシン(CAM)と CYP の誘導剤であるリファンピシン(RFP)の両者を併用した症例を経験した。

患者は、非結核性抗酸菌症(原因菌: *Mycobacterium avium*)と診断され、CAM600mg/day、RFP300mg/day 及びレボフロキサシン 375mg/day が開始された。CAM+RFP 併用薬投与前のWFの投与量は約 2.00mg/day、PT-INR は 1.80~2.10、PT-INR 値を WF 投与量で補正した Warfarin Sensitivity Index (WSI)は約 0.90 を推移していた。併用薬投与開始 1 日目に PT-INR は 4.00、WSI は 1.77 となり、WF の投与のみを一旦中止し、新鮮凍結血漿投与でリバースを行った。同 2 日目に WF を 1.00 mg/day で再開し、WF の投与量と PT-INR はそれぞれ、3 日目 1.75mg/day、1.88、4 日目 2.00mg/day、1.58 であり、78 日目には 5.50mg/day、1.79 となった時点で目標 PT-INR 治療域に到達、WSI は 0.34 であった。これらの結果は、CYP3A4 阻害作用のある CAM と CYP の誘導作用のある RFP を併用した患者において、WF 投与量を併用前の約 2.5 倍に増量することで、目標 PT-INR を維持することが可能であることを示していると考えられ、引き続き同様の症例について検討を進める予定である。

②抗不整脈薬ベプリジルの血中濃度と QTc 延長の相関解析

抗不整脈であるベプリジル(BEP)は、QT 延長作用を有することが知られている。一方で、血中濃度と QT 延長作用との関連性については、未だ不明な点が残されている。本研究では、BEP 血中濃度と QT 延長作用について検討を行った。

対象は、BEP 血中濃度測定を行った患者 94 例とした。診療録に基づき、患者背景、BEP 服用量、定常状態到達後の BEP 血中濃度 (BEP 投与開始 21 日以降)、心電図所見についてレトロスペクティブに調査した。対象患者における BEP 血中濃度を次の 6 群に分類した: $BEP \leq 200$ 、 $200 < BEP \leq 400$ 、 $400 < BEP \leq 600$ 、 $600 < BEP \leq 800$ 、 $800 < BEP \leq 1000$ 、 $1000 \text{ ng/mL} < BEP$ 。分類した BEP 血中濃度域別に ΔQTc を算出したところ、それぞれ 11.0 ± 6.2 、 17.9 ± 4.2 、 31.3 ± 4.5 、 29.5 ± 4.5 、 37.1 ± 6.7 、 $45.9 \pm 6.7 \text{ msec}$ であり、BEP 血中濃度が高くなるにつれて ΔQTc が増加する傾向が認められた ($P < 0.001$)。次に、QTc 延長のリスク因子を評価する目的で多変量ロジスティック解析を行ったところ、心筋症 (調整オッズ比=9.60、95%信頼区間=1.16-97.44) ならびに BEP 血中濃度 (範囲オッズ比=86.54、95%信頼区間=2.75-4626.83) について QTc 延長との有意な相関が得られた。さらに、BEP 血中濃度と薬剤性 QT 延長の指標である「 $\Delta QTc > 60 \text{ msec}$ 」について、BEP 血中濃度のカットオフ値を算出したところ 756 ng/ml であった ($P < 0.01$)。これらの結果から、BEP による QTc 延長作用が血中濃度依存的であることが確認さ

れた。QTc 延長作用は torsade de pointes や突然死を起こす恐れがあり、心電図と共に定期的に BEP 血中濃度をモニタリングすることが重要と考えられた。

③心臓移植後患者におけるミコフェノール酸 AUC_{0-12h} 推定法の検討

ミコフェノール酸モフェチル（MMF）は、その活性代謝物であるミコフェノール酸（MPA）の血中濃度が、骨髄機能障害や拒絶反応に関連すると報告されており、血中濃度時間曲線下面積（AUC）の算出による投与量設計が推奨されている。しかしながら、AUC の算出には頻回の採血が必要であり患者の負担が大きいことから、少数の採血ポイントから AUC を推定する方法が望まれている。これまでに、母集団解析に基づいて、服用後 12 時間の AUC（ AUC_{0-12h} ）の推定法を報告してきた。具体的には、MMF 服用 2 時間後の血中濃度（ C_2 ）を用いてベイズ推定を行って静注投与を仮定したトラフ濃度（ pC_0 ）および全身クリアランスと分布容積を算出し、続いて静注モデルにおける AUC_{0-12h} （ $AUC_{0-12h} iv$ ）を算出した。その後、 $AUC_{0-12h} iv$ から経口 AUC_{0-12h} （ $AUC_{0-12h} po$ ）を推定する方法である。本研究では、MMF を服用した際のトラフ濃度（ aC_0 ）および C_2 を用いることで、 $AUC_{0-12h} po$ の推定精度が改善されるか否かについて検討を行った。

国立循環器病研究センターで心臓移植を行った患者および海外渡航移植後に同センターで治療を継続した患者のうち、MMF の服用歴がある 40 名を対象とした。MMF の AUC_{0-12h} の実測値（実測 AUC_{0-12h} ）は、MMF 服用前および服用後 1、2、4、6、8、12 時間後の 7 点において採取された血液について測定された MPA 濃度を用いて線形台形法により算出した。算出された実測 AUC_{0-12h} を基に平均誤差（ME）、平均絶対誤差（MAE）、平均平方二乗誤差（RMSE）を算出し、既報と比較することで推定精度の評価を行った。 aC_0 を用いて推定した $AUC_{0-12h} po$ の ME、MAE、RMSE は、それぞれ -2.32、8.84、12.11 であった。既報ではベイズ推定された $AUC_{0-12h} po$ の ME、MAE、RMSE は、それぞれ -2.55、9.40、12.83 であり、我々が得た結果と比較して、ME は高値を示し、MAE、RMSE はそれぞれ低値を示した。 pC_0 を用いて $AUC_{0-12h} po$ を推定する以前の方法と比較して、 aC_0 を用いる今回の方法の方が実測 $AUC_{0-12h} po$ をより正確に推定できると考えられた。引き続き測定精度の検証を行う予定である。

④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

慢性疾患を有する患者では服用すべき薬剤数が多く、服薬の負担が大きい。近年、2 種類以上の有効成分を 1 錠にした配合錠が上市されており、単剤で服用する場合と比較して服用剤数を減らすことができ、服薬負担の軽減に繋がっている。配合錠に関しては承認申請時の有効性や安全性に関する情報はあがるが、服薬アドヒアランスに関する実臨床データでの検証は十分に行われていない。また、単剤から配合錠、配合錠から単剤への切り替えに至る患者背景等の臨床情報や配合錠使用による経済性に関する情報に乏しく、実臨床で活用するための情報を充実させる必要がある。

本研究では、国立循環器病研究センターで配合錠が処方された患者を対象に、症状の安定性、服薬アドヒアランス率（飲み忘れ等で処方日数調整を必要とした患者割合）、心・脳血管イベント発生率ならびに配合錠使用の経済性について診療録に基づく後ろ向き観察研究により、既存情報を用いて検討を行う。予定登録者数としては 10,000 名程度を見込んでおり、現在、登録を進めているところである。

成果発表：

<学会発表>

- ・ 水上想莉、中北和樹、和田恭一、井倉恵、松田紗知、竹中裕美、宇野貴哉、中村任、瀬口理、築瀬正伸、福嶋教偉、福嶋五月、藤田知之、小林順二郎、寺川伸江、老田章：補助人工心臓装着患者における抗生剤の多剤併用が、ワルファリンの投与量に影響を与えた1症例の報告、医療薬学フォーラム 2019／第27回クリニカルファーマシーシンポジウム、2019年7月13-14日、広島
- ・ 松井和樹、向井優太郎、坂倉広大、和田恭一、中村任、高田充隆、寺川伸江、草野研吾、老田章：ベプリジル血中濃度とQTc延長作用に関する検討、第29回日本医療薬学会年会、2019年11月2-4日、福岡
- ・ 水上想莉、井倉恵、宮崎誠、中北和樹、竹中裕美、松田紗知、宇野貴哉、和田恭一、中村任、老田章：心臓移植後患者におけるミコフェノール酸AUC_{0-12h}推定法の検討、第29回日本医療薬学会年会、2019年11月2-4日、福岡

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 薬学教育研究センター

職・氏名 教授・尾崎 恵一

研究テーマ：

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

研究期間：

平成 31 年 4 月 1 日 ～ 令和 2 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 尾崎 恵一（大阪薬科大学・薬学部・教授）

<共同研究期間>

研究代表者 服部 喜之（星薬科大学・薬学部・教授）

研究目的：

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

2019年度の研究目的は、葉酸-PEG-修飾-カチオン性 リポソームを用いたsiRNAデリバリーの効果を、葉酸レセプターを高発現しているがん細胞株に対して*in vitro* および*in vivo* レベルで解析し、葉酸レセプター選択的遺伝子サイレンシングの有効性について明らかにすることである。

In this study, we examined the effects of cationic lipid type in folate (FA)-polyethylene glycol (PEG)-modified cationic liposomes on gene-silencing effects in tumor cells using cationic liposomes/siRNA complexes (siRNA lipoplexes). We used three types of cationic cholesterol derivatives, cholesteryl 3-((2-hydroxyethyl)amino)propylcarbamate hydroiodide (HAPC-Chol), N-(2-(2-hydroxyethylamino)ethyl)cholesteryl-3-carboxamide (OH-Chol), and cholesteryl 2-((2-hydroxyethyl)amino)ethylcarbamate (OH-C-Chol), and we prepared three types of FA-PEG-modified siRNA lipoplexes. The modification of cationic liposomes with 1–2 mol % PEG-lipid abolished the gene-silencing effects in human nasopharyngeal tumor KB cells, which overexpress the FA-receptor (FR). In contrast, FA-PEG-modification of cationic liposomes restored gene-silencing activity regardless of the cationic lipid type in cationic liposomes. However, the optimal amount of PEG-lipid and FA-PEG-lipid in cationic liposomes for selective gene silencing and cellular uptake were different among the three types of cationic liposomes. Furthermore, *in vitro* transfection of polo-like kinase 1 (PLK1) siRNA by FA-PEG-modified liposomes

exhibited strong cytotoxicity in KB cells, compared with PEG-modified liposomes; however, in in vivo therapy, intra-tumoral injection of PEG-modified PLK1 siRNA lipoplexes inhibited tumor growth of KB xenografts, as well as that of FA-PEG-modified PLK1 siRNA lipoplexes. From these results, the optimal formulation of PEG- and FA-PEG-modified liposomes for FR-selective gene silencing might be different between in vitro and in vivo transfection.

本年度の研究内容および研究成果：

まず、今回用いたカチオン性コレステロール誘導体、および中性ヘルパー脂質、葉酸-PEG-DSPE の構造を図 1 に示す。

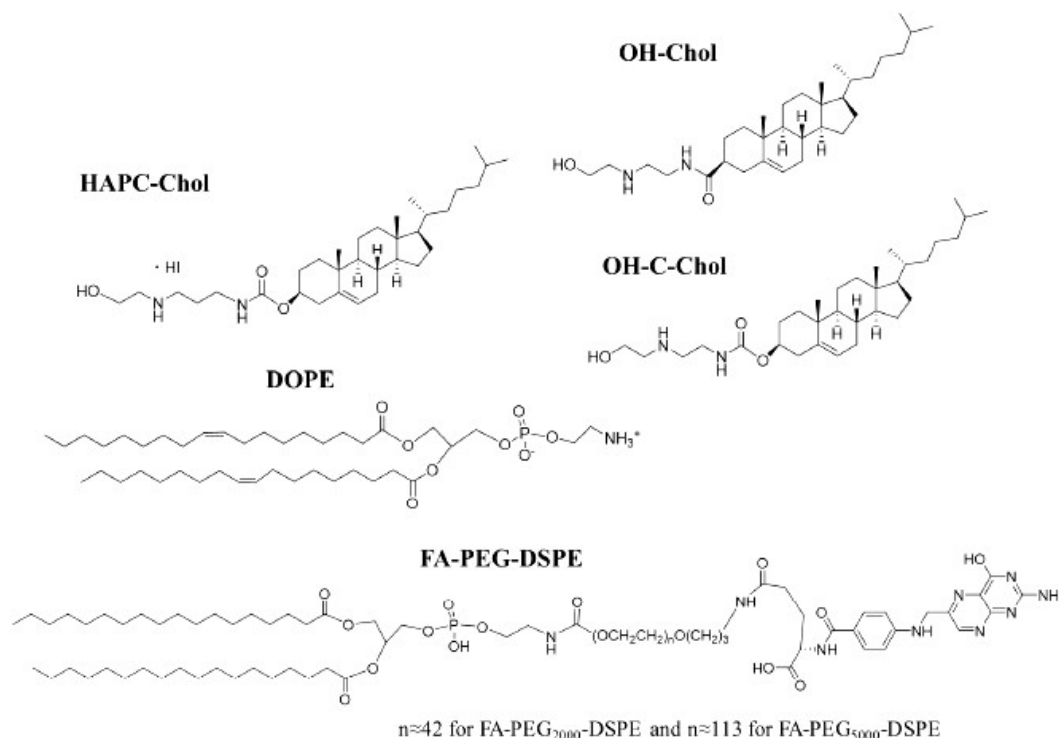


図 1. Structure of cationic cholesterol derivatives, neutral helper lipid, and FA-PEG-DSPE

次に、LP-HAPC、LP-OH、LP-OH-C にそれぞれ葉酸-PEG を導入した葉酸-PEG-修飾-カチオン性 リポソームと葉酸のないものとの siRNA デリバリー効果の差を *in vitro* レベルで比較した。

用いた葉酸高発現がん細胞は、ヒト鼻咽頭がん細胞株 KB 細胞、および gene silencing ターゲットとしては、細胞分裂に関与し多数のがん細胞で発現上昇がみられる polo-like kinase(PLK1)を選択した。

その結果が次頁図 2 となる。

Lipofectamine RNAiMAX をポジティブコントロールとして、LP-HAPC、LP-OH、LP-OH-C のどのタイプにおいても、FA=葉酸を導入した葉酸-PEG-修飾-カチオン性 リポソームが葉酸のないものと比較して、PLK1 mRNA の発現抑制効果が大きかった。

また、図示していないが、KB 細胞の増殖抑制効果も葉酸-PEG-修飾-カチオン性 リポソーム PLK1 silencing 方に、より強く見られた。

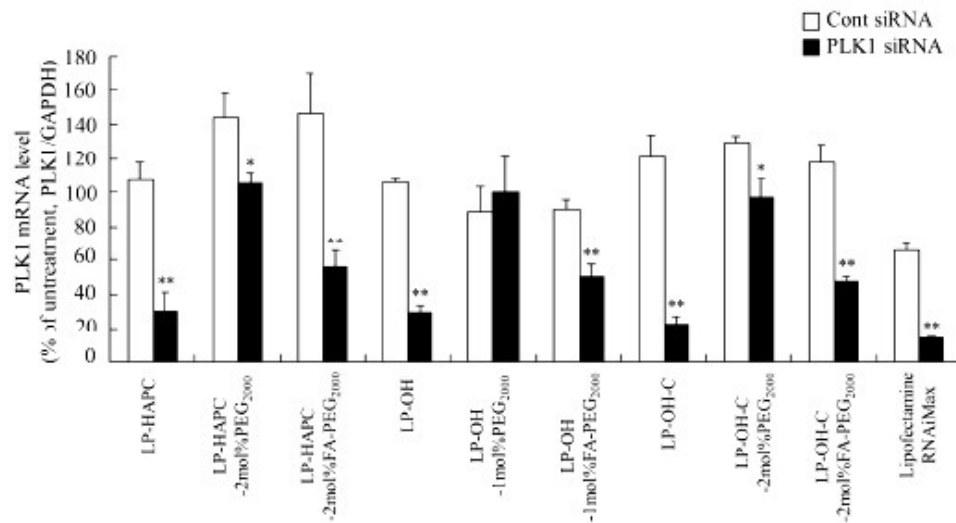


図2 Effect of FA-PEG-modification of cationic liposomes on suppression of PLK1 mRNA expression by transfection with FA-PEG-modified PLK1 siRNA lipoplexes into KB cells.

そこで、これらの *in vitro* の結果を踏まえて、KB 細胞をヌードマウスに担癌させた *Xenograft* モデルにおける薬酸-PEG-修飾-カチオン性 リポソームの効果を調べる *in vivo* 実験に進んだ。

その結果が次の図3となる。

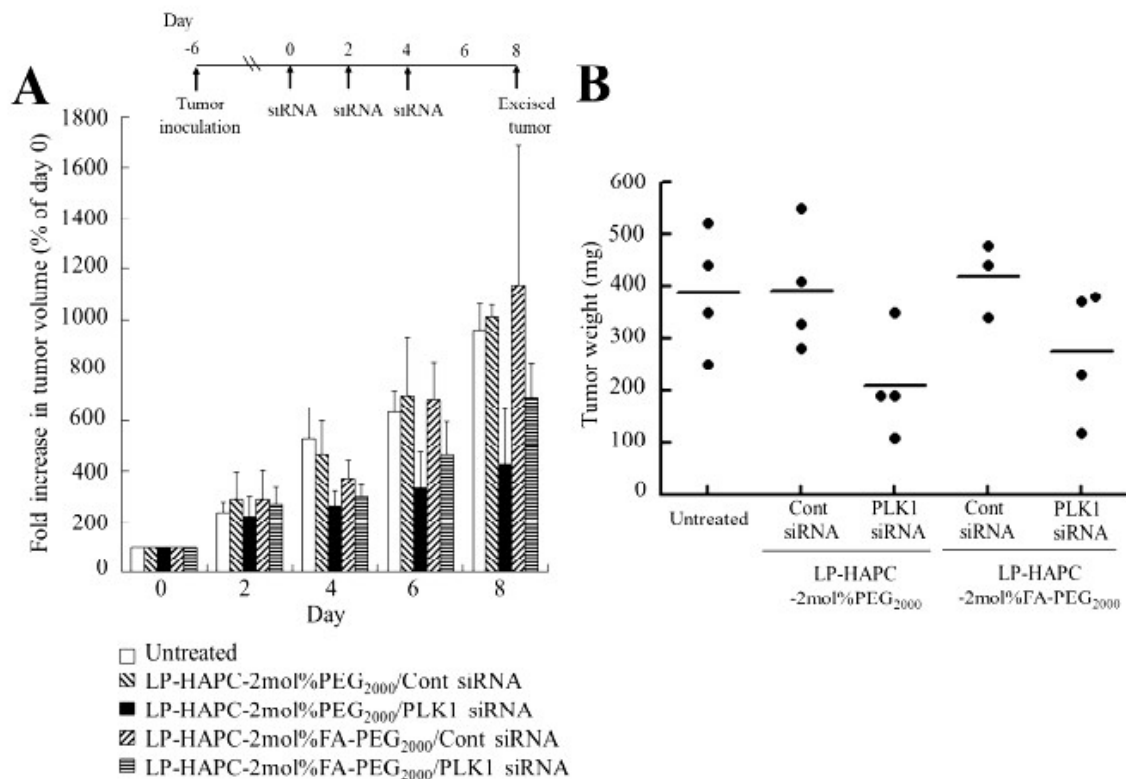


図3 *In vivo* siRNA therapy of KB tumor xenografts with FA-PEG-modified PLK1 siRNA lipoplexes in mice. (A) 腫瘍の容積 (B) 腫瘍の重量

制がん効果としては、*in vivo*レベルでは葉酸-PEG-修飾-カチオン性 リポソームの有効性を示せなかった。（図示していないが、PLK1 遺伝子発現抑制効果は *in vivo*レベルでも認められた。）

（考察）葉酸レセプター選択的遺伝子サイレンシングの有効性について、*in vitro* および *in vivo* レベルで gene silencing 効果は認められたが、抗腫瘍効果に関しては *in vivo* レベルでは確認できなかった。今後は、silencing gene の選択を中心に、再検討していく必要がある。

成果発表：

<原著論文>

- 1, “Effect of cationic lipid in cationic liposomes on siRNA delivery into the lung by intravenous injection of cationic lipoplex”, Hattori Y, Nakamura M, Takeuchi N, Tamaki K, Shimizu S, Yoshiike, Y, Taguchi M, Ohno H, Ozaki K, Onishi H.
***J. Drug Target.* 27, 217-227 (2019)**
- 2, “Effect of cationic lipid type in PEGylated liposomes on siRNA delivery after intravenous injection of siRNA lipoplexes”, Hattori Y, Nakamura M, Takeuchi N, Tamaki K, Ozaki K, Onishi H.
***Wrld. Acad. Sci.* 1, 74-85 (2019)**
- 3, “Effect of cationic lipid type in folate-PEG-modified cationic liposomes on folate receptor-mediated siRNA transfection in tumor cells” Hattori Y, Shimizu N, Ozaki K, Onishi H.
***Pharmaceutics* 11(4), 181 (22 pages) (2019)**
- 4, “Optimized combination of cationic lipids and neutral helper lipids in cationic liposomes for siRNA delivery into the lung by intravenous injection of siRNA lipoplexes”, Hattori Y, Tamaki K, Ozaki K, Kawano K, Onishi H. ***J. Drug Deliv. Sci. Tec.* 52, 1042-1050 (2019)**

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：

令和 元年 4 月 1 日 ～ 令和 2 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 大野 行弘 (大阪薬科大学・薬学部・教授)

研究分担者 清水 佐紀 (大阪薬科大学・薬学部・助教)

研究分担者 國澤 直史 (大阪薬科大学・薬学部・助教)

<共同研究期間>

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：

我々は、強直間代けいれん発作を自然発症する Noda Epileptic Rat (NER) を用いて新規てんかん原性調節因子の探索を行い、 G_{ai} -interacting protein (GINIP、別名 PHF24) が NER のけいれん発作を発現制御している可能性を見出した (Kuramoto et al., Behav. Genet., 47, 609-619, 2017)。

GINIP は、PHD finger protein 24 (Phf24) ともよばれ、G protein-coupled receptor (GPCR) と共役する 3 量体 G_i タンパク質の α サブユニット (G_{ai}) と特異的に相互作用する機能タンパク質であり、GPCR と G_{ai} サブユニットとの共役反応を調節する。過去の報告 (Gaillard et al., Neuron, 84, 123-136, 2014) から、GINIP が $GABA_B$ 受容体を介する鎮痛作用の発現を調節することが示されているが、痛覚制御以外の GINIP の機能については不明である。

本研究では、けいれん発症制御を含む GINIP の中枢機能を探るため、TALEN 法により新たに作出した GINIP-ノックアウト (KO) ラットを用い、てんかん原性感受性、不安様行動 (衝動性)、認知機能、情動機能などの中枢神経系機能に及ぼす GINIP 欠損の影響を検討した。

1. けいれん感受性評価

11 週齢の GINIP-KO ラットおよび F344 ラット（対照）に、ピロカルピン（300 mg/kg, i.p.）を投与した結果、GINIP-KO ラットにおけるけいれん発現率の有意な上昇、けいれん強度（スコア）およびけいれん持続時間の増加傾向が認められた（Fig. 1A）。また、ペンチレンテトラゾール（PTZ: 30, 35, 40 mg/kg, i.p.）を投与した結果、GINIP-KO ラットは F344 ラットに比べ高いけいれん発現感受性を示し、40 mg/kg の PTZ 投与において、けいれん強度およびけいれん発現率に統計学的な有意差が認められた（Fig. 1B）。

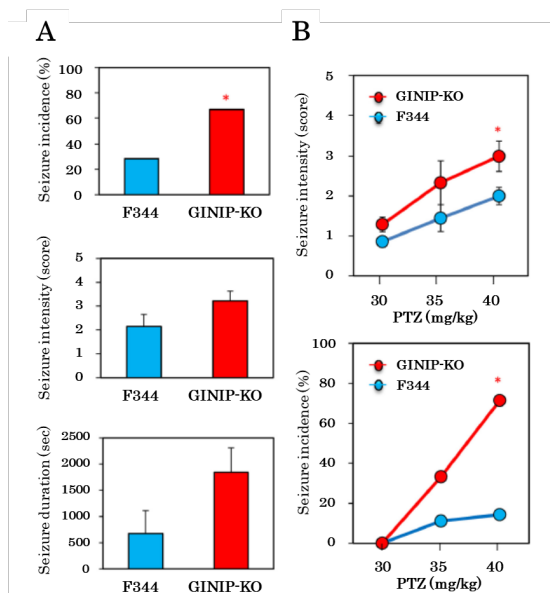


Fig.1. Susceptibility of GINIP-KO rats to drug-induced seizures. A: Pilocarpine-induced seizure test. Eleven-week GINIP-KO and F344 rats were treated with 300 mg/kg (i.p.) pilocarpine, and the seizure incidence rate, maximum score and total duration of pilocarpine-induced seizures were measured. B: Pentylentetrazole (PTZ)-induced seizure test. Eleven-week-old GINIP-KO and F344 rats were treated with 30, 35 or 40 mg/kg (i.p.), and the seizure incidence rate and the maximum score of PTZ-induced seizures were measured. Data show the mean \pm SEM of 7-9 animals. * P <0.05; Significantly different from F344 rats.

2. てんかん原性感受性評価

11 週齢の GINIP-KO ラットと F344 ラットに、単回投与ではけいれん発作を誘発しない低用量(30 mg/kg) の PTZ を 10 日間連続で腹腔内投与することにより、PTZ キンドリングに対する感受性を評価した。その結果、投与 5 日目から GINIP-KO ラットでは、高いけいれんスコアが維持され、投与 9 日目と 10 日目において F344 ラットと比較して有意な差が認められた（Fig. 2A）。また、GINIP-KO ラットのけいれん発現率は、PTZ 投与 7 日目には 50%に達し、9 日目と 10 日目には 80～90%を示した。一方、F344 ラットでは、けいれん発現率が 50%に達したのは PTZ 投与 10 日目のみであった（Fig. 2B）。以上の結果より、GINIP-KO ラットでは、キンドリング形成の感受性が亢進していることが明らかになった。

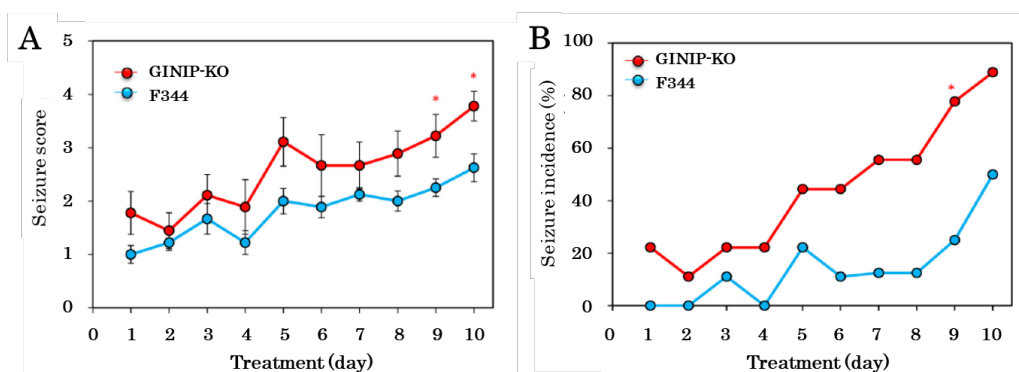


Fig. 2. Susceptibility of GINIP-KO rats to PTZ kindling. A: Eleven-week-old GINIP-KO and F344 rats were treated daily with a low dose (30 mg/kg, i.p.) of PTZ for 10 successive days. B: Seizure incidence rate and the maximum score of PTZ-induced seizures were measured for 20 min after daily PTZ injection. Data show the mean \pm SEM of 9 animals. * P <0.05; Significantly different from F344 rats.

3. 不安様行動（衝動性）評価

20 週齢の GINIP-KO ラットと F344 ラットの不安様行動を高架式十字迷路試験により評価した。両群間で総アーム侵入回数（オープンアームへの侵入回数+クローズアームへの侵入回数）に差は認められなかったが（Fig. 3A）、GINIP-KO ラットは F344 ラットに比べ、クローズアームへの侵入回数が有意に少なかった（Fig. 3B）。また、オープンアームへの侵入は、GINIP-KO ラットにおいてのみ認められた（Fig. 3C,D）。以上より、GINIP-KO ラットでは、不安が減弱（衝動性が亢進）していることが示唆された。

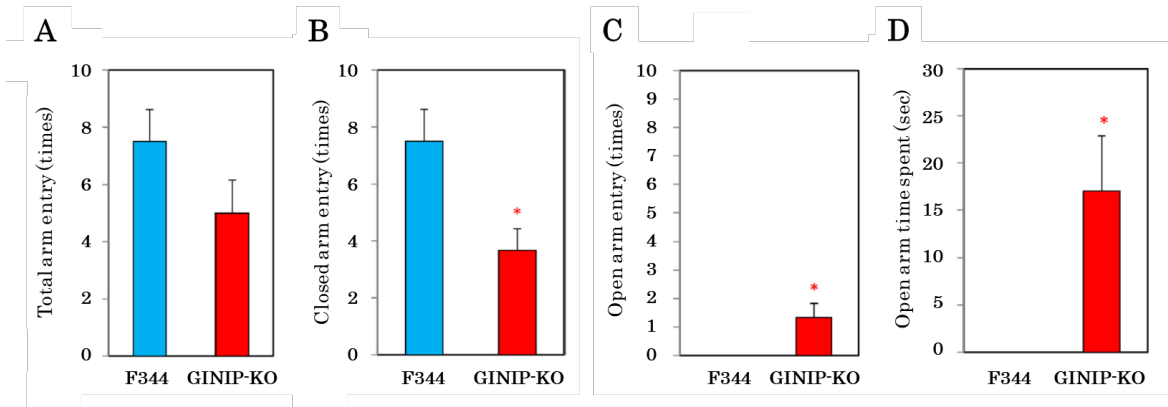


Fig. 3. Elevated plus maze (EPM) test in GINIP-KO rats. Twenty-week-old GINIP and F344 rats were placed on a EPM stage and the number of times they entered all arms (A), closed arms (B) and open arms (C), as well as the time spent in open arms (D), were measured. Data show the mean \pm SEM of 6 animals. * $P < 0.05$; Significantly different from F344 rats.

4. 認知機能評価

モリス水迷路装置を用いて、20 週齢の GINIP-KO ラットと F344 ラットの認知機能を評価した。まず、水面下 3 cm の位置に設置したプラットフォームへの到達時間を 4 日間測定した。その結果、試行 1 日目では GINIP-KO ラットと F344 ラットの両群間でプラットフォームへの到達時間に差はなかったが、試行 2 日目以降では、GINIP-KO ラットのプラットフォームへの到達時間は F344 ラットと比べて有意に長かった（Fig. 4A）。さらに、4 日目の試験後、装置からプラットフォームを取り除き、動物を自由に泳がせた結果、GINIP-KO ラットでは、F344 ラットと比較し、プラットフォームがあった場所を通過した回数が有意に少なかった（Fig. 4B）。以上の結果より、GINIP-KO ラットでは、空間記憶の獲得機能および保持機能が低下していることが示唆された。

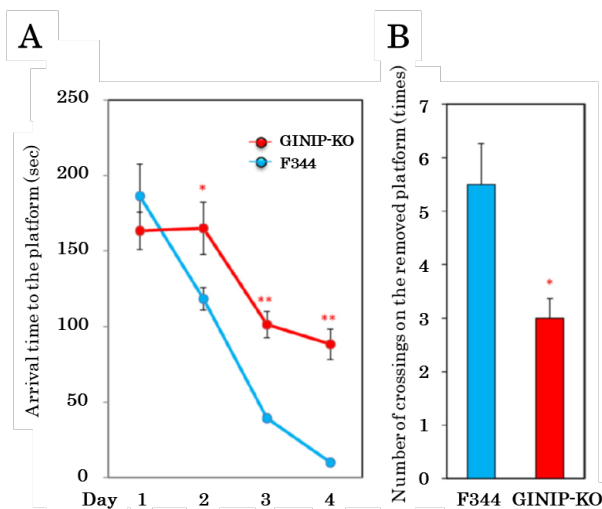


Fig. 4. Morris water maze (MWM) test in GINIP-KO rats. Twenty-week-old GINIP-KO and F344 rats were subjected to the MWM test, consisting of 4 trials/day on 4 consecutive days, and the arrival time (sec) to the platform was measured (A). A probe test without the platform was performed on the 4th day after the training, and crossing numbers (times) on the removed platform were measured (B). Data show the mean \pm SEM of 6 animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Significantly different from F344 rats.

5. 情動反応試験

20 週齢の GINIP-KO ラットおよび F344 ラットの棒刺激、エアー刺激、触刺激あるいは尾クリップ刺激に対する情動反応を評価した結果、いずれの刺激に対しても、GINIP-KO ラットは、F344 ラットと比較して有意に高い情動反応性（過敏性）を示した（Fig. 5）。

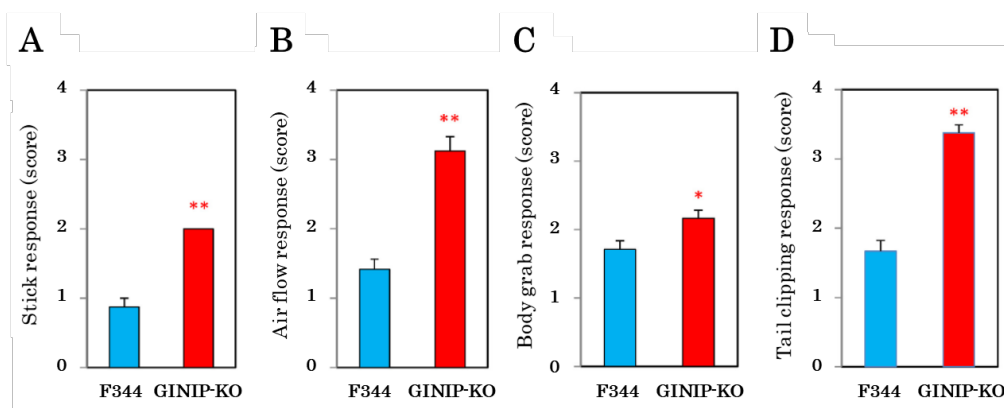


Fig. 5. Emotional response test in GINIP-KO rats. Twenty-week-old GINIP-KO and F344 rats were evaluated for emotional responses to a stick near the face (A), air flowing to the face (B), body grabbing (C), and tail clipping (D). Data show the mean \pm SEM of 6 animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Significantly different from F344 rats.

以上、本年度の研究結果から、GINIP が新たなてんかん原性調節因子として機能することが明らかとなり、GINIP 機能を促進する薬物が新たなてんかん治療薬になりうると考えられた。さらに、GINIP は情動調節や認知機能の制御にも重要な働きを有すると考えられた。てんかん患者において、情動障害や認知障害がみられることも多い。これら症状の発現には、けいれん発作の後遺症や治療薬の副作用など二次的な要因が関与する場合もあるが、今回の検討から、GINIP が直接関与している可能性が考えられた。

成果発表：

<原著論文>

- T. Serikawa, N. Kunisawa, S. Shimizu, M. Kato, H. A. Iha, M. Kinboshi, H. Nishikawa, Y. Shirakawa, B. Voigt, S. Nakanishi, T. Kuramoto, T. Kaneko, T. Yamamoto, T. Mashimo, M. Sasa, Y. Ohno: Increased seizure sensitivity, emotional defects and cognitive impairment in PHD finger protein 24 (Phf24)-null rats., *Behav. Brain Res.*, 369, 111922 (2019)

<学会発表>

- 國澤 直史、加藤 将貴、清水 佐紀、伊波 イーゴル、中西 聡、庫本 高志、金子 武人、山本 卓、真下 知士、芹川 忠夫、大野 行弘： Phf24 欠損ラットのけいれん発現評価., 薬学会第 140 年会 2020/3 月（京都）
- Naofumi Kunisawa, Tadao Serikawa, Masaki Kato, Saki Shimizu, Higor Alves Iha, Hisao Nishikawa, Yu Shirakawa, Masashi Sasa, Yukihiro Ohno: Deletion of PHD finger protein 24 (Phf24) in rats causes elevated seizure sensitivity, emotional defects and cognitive impairment., 第 93 回日本薬理学会 2020/3 月（横浜）
- 芹川忠夫、清水佐紀、國澤直史、大野行弘、吉見一人、真下知士、笹 征史： Phf24 蛋白質の DNA 相互作用を調べる, 第 144 回関西実験動物研究会, 2019/11 月（京都）

- Naofumi Kunisawa, Tadao Serikawa, Saki Shimizu, Masaki Kato, Higor A. Iha, Masato Kinboshi, Kazuaki Sato, Hisao Nishikawa, Yu Shirakawa, Masashi Sasa, Yukihiro Ohno: Behavioral analysis of PHD finger protein 24 (Phf24)-null rats., 第 53 回日本てんかん学会学術集会, 2019/10 月（神戸）
- Naofumi Kunisawa, Tadao Serikawa, Saki Shimizu, Masaki Kato, Higor Alves Iha, Masato Kinboshi, Hisao Nishikawa, Yu Shirakawa, Masashi Sasa, Yukihiro Ohno: PHD finger protein 24 (Phf24)-null rats exhibit increased seizure sensitivity, emotional defects and cognitive impairment., The 6th Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, 2019/10 月（福岡）
- Masaki Kato, Naofumi Kunisawa, Saki Shimizu, Kazuma Kawakita, Shohei Kawaji, Higor A. Iha, Takashi Kuramoto, Tomoji Mashimo, Tadao Serikawa, Yukihiro Ohno: Increased seizure sensitivity in *PHD finger protein 24 (Phf24)*-knockout rats., The 2019 International society of neurochemistry (ISN)-American society of neurochemistry (ASN) Meeting, 2019/8 月（Montreal, Canada）
- Masaki Kato, Naofumi Kunisawa, Saki Shimizu, Kazuma Kawakita, Shohei Kawaji, Higor A. Iha, Satoshi Nakanishi, Takashi Kuramoto, Takehito Kaneko, Takashi Yamamoto, Tomoji Mashimo, Tadao Serikawa, Yukihiro Ohno: Elevated seizure susceptibility in *Phf24*-knock out rats., 第 42 回日本神経科学学会, 2019/7 月（新潟）
- 芹川忠夫、清水佐紀、庫本高志、真下知士、桑村 充、笹 征史、大野行弘：NER と Phf24-null ラットにおける前シナプスアクティブゾーンの遺伝子発現変化, 第 66 回日本実験動物学会総会, 2019/5 月（福岡）
- 加藤将貴、國澤直史、清水佐紀、河北和馬、川路翔平、Iha A.Higor、中西聡、庫本高志、金子武人、山本卓、真下知士、芹川忠夫、大野行弘：Phf24 遺伝子欠損によるけいれん感受性の亢進, 第 139 回日本薬学会年会, 2019/3 月（千葉）
- 加藤将貴、國澤直史、清水佐紀、河北和馬、川路翔平、伊波イーゴル、中西 聡、庫本高志、金子武人、山本 卓、真下知士、芹川忠夫、大野行弘：Phf24 欠損ラットにおけるけいれん発現感受性の評価, 第 92 回日本薬理学会年会, 2019/3 月（大阪）

<その他>

.

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 病態生化学
職・氏名 教授・藤森 功

研究テーマ：

核内受容体モジュレーターによる脂質代謝調節

研究期間：

平成31年4月1日 ～ 令和2年3月31日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 藤森 功（大阪薬科大学・薬学部・教授）
研究分担者 小池 敦資（大阪薬科大学・薬学部・助教）
研究分担者 前原 都有子（大阪薬科大学・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・助教）
研究分担者 山下ユキコ（広島国際大学・薬学部・助手）

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 作動薬と阻害薬を用いて、脂肪細胞や骨芽細胞における 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。

① 広島国際大学のグループにより新たな 4 種類 FXR の作動薬（1～4）が合成され（図1）、細胞を用いてそれぞれの FXR 作動薬の FXR に対する特異性を評価した（図2）。具体的には、ヒト 293 細胞に各種核内受容体（LXR α/β , VDR, PPAR $\alpha/\gamma/\delta$, RAR α , RXR α , VDR5 および FXR）の結合部位をもつプロモーター・ルシフェラーゼを導入し、合成した新規 FXR 作動薬の存在下でルシフェラーゼ活性を測定することにより評価した。4 種類の新規 FXR 作動薬（1～4）のうち、FXR 作動薬3, 4 は FXR に特異的であり、1, 2 は FXR に加え、LXR α も活性化することが分かった（図2）。

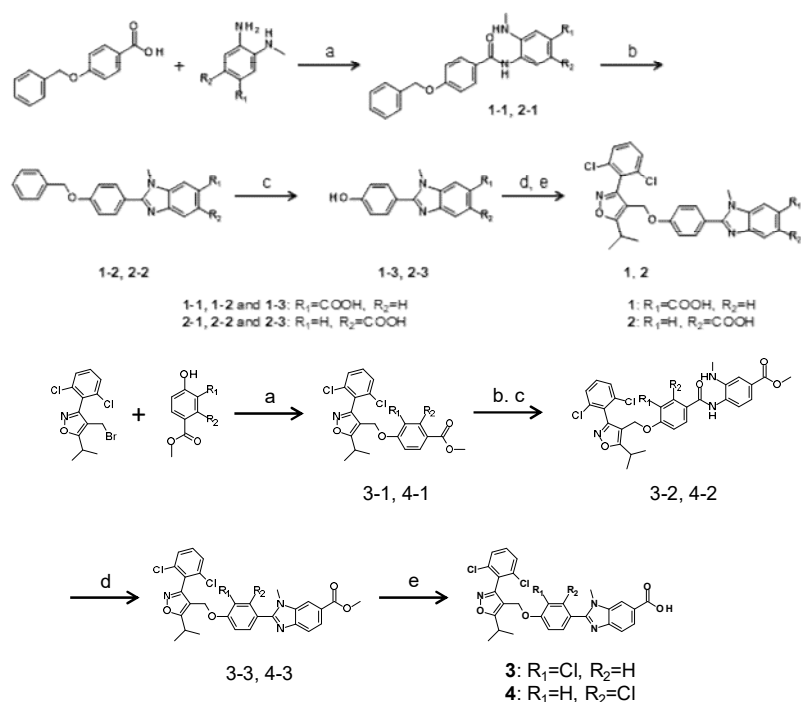


図 1. 新規 FXR 作動薬の合成スキーム

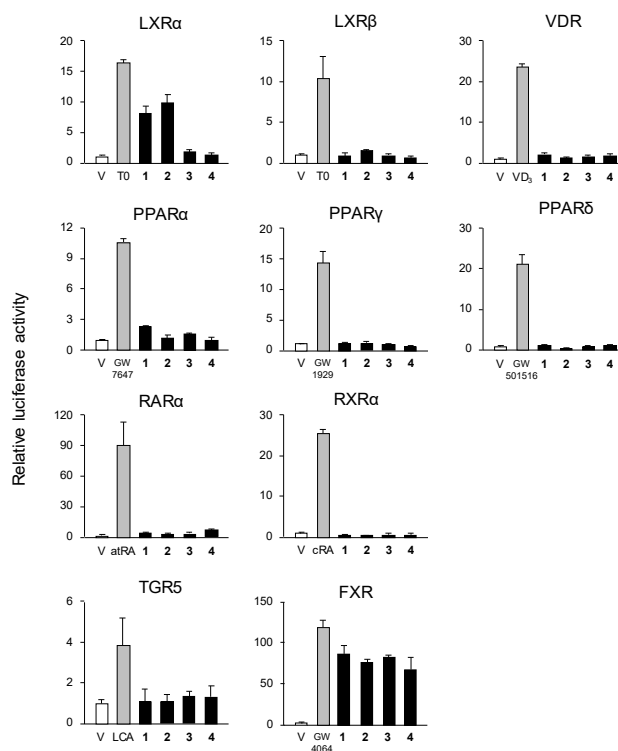


図2. プロモーター・ルシフェラーゼアッセイによる、新規 FXR 作動薬の FXR 特異性の検討

T0901317 (T0 ; LXRα/β 作動薬), vitamin D₃ (VD₃ ; VDR 作動薬), GW7647 (PPARα 作動薬), GW1929 (PPARγ 作動薬), GW501516 (PPARδ 作動薬), all-*trans*-retinoic acid (atRA ; RARα 作動薬), 9-*cis*-retinoic acid (cRA ; RXRα 作動薬), lithocholic acid (LCA ; TGR5 作動薬), GW4064 (FXR 作動薬)

② FXR 作動薬を用いた間葉系幹細胞の骨芽細胞の分化への影響を評価した。

間葉系幹細胞 ST-2 を BMP-2 存在下で 12 日間骨芽細胞へと分化誘導した。同時に、新規 FXR 作動薬

（3，4）あるいは既知の FXR 作動薬である CDCA および GW4064 を加えた。6 あるいは 12 日間分化誘導後、アルカリホスファターゼ（ALP）の活性染色、酵素活性および mRNA 発現を調べた。既知および新規の FXR 作動薬はいずれも、BMP-2 存在下で ALP 活性および酵素活性を上昇させた（図3左 a, b）。これらの上昇は、いずれも FXR 阻害剤（GS）により完全に阻害された（図3左 a, b）。また、ALP 遺伝子の発現は、FXR 作動薬により上昇し、6 日目より 12 日目のほうが高かった（図3左 c）。また、これらの遺伝子発現上昇は FXR 阻害剤（GS）により抑制された（図3左 c）。

次に、骨芽細胞の分化時に発現上昇する遺伝子である RUNX2（Runt-related transcription factor 2）、COL1A1（collagen A1）および OCN（osteocalcin）の発現は BMP-2 依存の骨芽細胞分化の進展とともに上昇し、いずれの FXR 作動薬によっても、さらに発現レベルが上昇した（図3右）。また、これらの遺伝子の発現上昇は FXR 阻害剤（GS）で抑制された（図3右）。

以上の結果から、新規 FXR 作動薬（3，4）は FXR を介して骨芽細胞の分化を促進することが示された。

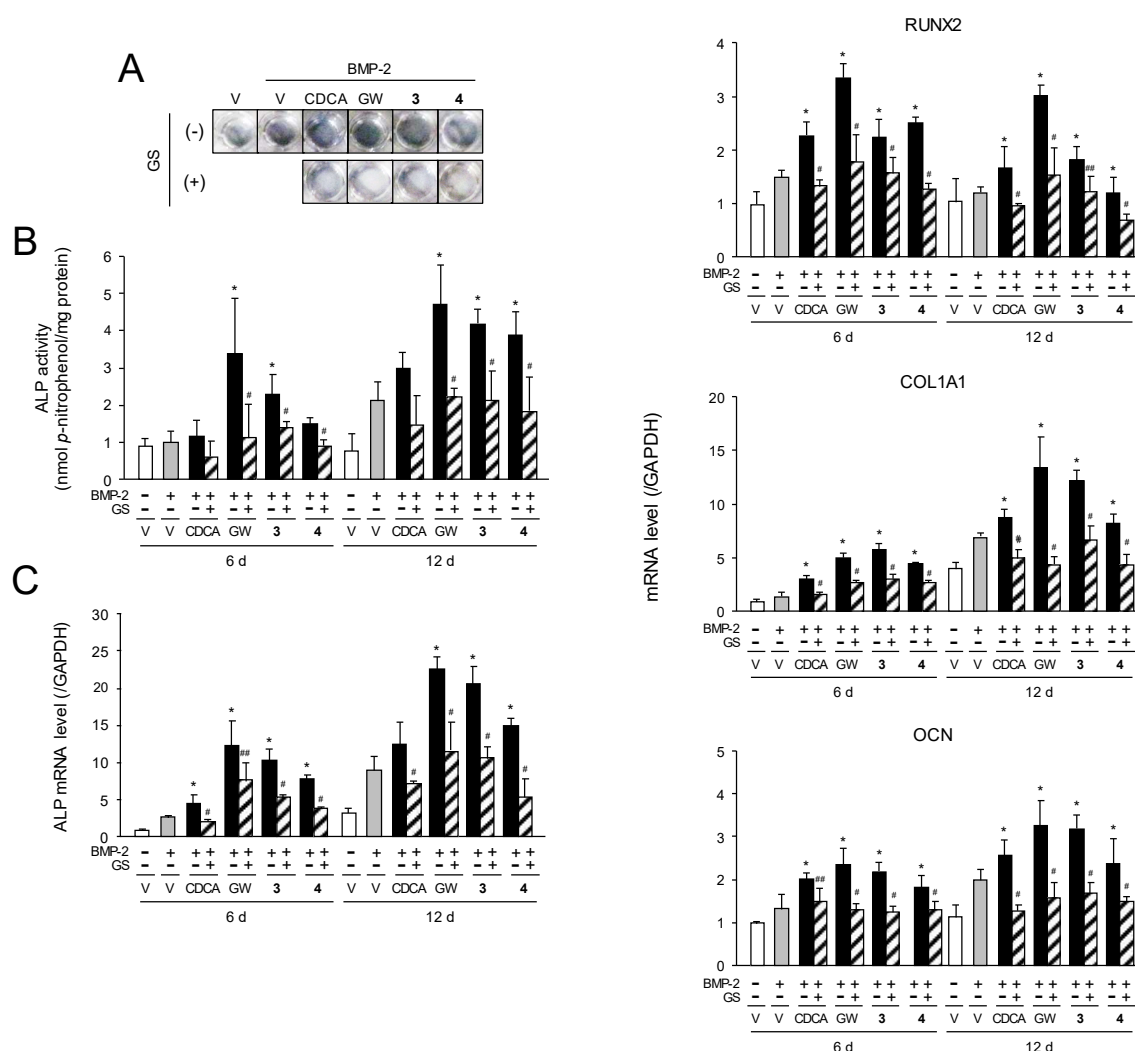


図3. 新規 FXR 作動薬（3，4）による骨芽細胞の分化制御

chenodeoxycholic acid (CDCA; FXR 作動薬), GW4064 (GW; FXR 作動薬), guggulsterone (GS; FXR 阻害薬)
vehicle (V)

③ 昨年度に引き続き、FXR の脂肪細胞の分化制御機構を解析した。その結果、FXR は直接、PPAR γ のプロモーターに結合することに加え、脂肪酸合成系酵素である stearoyl-CoA desaturase (SCD) のプロモーターにも結合することが分かった（図4）。つまり、脂肪細胞において FXR は PPAR γ により活性化され、さらに SCD のプロモーターに結合し、脂肪細胞において脂肪酸合成を促進することが示された。

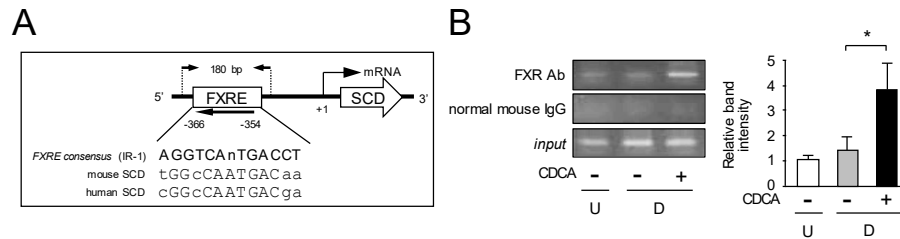


図4. クロマチン免疫沈降法による FXR の SCD プロモーターの FXRE への結合解析

A. *In silico* 解析により見出した SCD プロモーターの FXRE。ヒトとマウスの SCD 遺伝子プロモーターの FXRE のヌクレオチド配列を比較した。B. 3T3-L1 細胞を、6 日間、FXR 作働薬（CDCA）存在下で脂肪細胞へと分化誘導した。抗 FXR 抗体を用いてクロマチン免疫沈降法による解析を行い、PCR による増幅産物をアガロースゲル電気泳動し、バンド強度を数値化した。値は平均値±S.D. (n=3) で表している。U：未分化、D：分化した脂肪細胞。*p < 0.01。

成果発表：

<原著論文>

- Shinohara, S., Fujimori, K. Promotion of lipogenesis by PPAR γ -activated FXR expression in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 527: 49-55 (2020)
- Fujimori, K., Iguchi, Y., Yamashita, Y., Gohda, K., Teno, N. Synthesis of novel farnesoid X receptor agonists and validation of their efficacy in activating differentiation of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells into osteoblasts. *Molecules* 24: 4155 (2019)

<学会発表>

- 篠原早貴、井口裕介、小田啓祐、山下ユキコ、合田圭吾、手納直規、藤森 功
「脂肪細胞分化制御における核内受容体 FXR の機能解析」
第 66 回日本生化学会近畿支部例会（京都大学，京都）2019.5.25
- 篠原早貴、井口裕介、小田啓祐、山下ユキコ、合田圭吾、手納直規、藤森 功
「脂肪細胞分化制御における核内受容体 FXR の機能と調節機構の解析」
第 92 回日本生化学会大会（パシフィコ横浜，横浜）2019.9.18-20
- 増田有沙、山下ユキコ、井口裕介、小田啓祐、藤森 功、合田圭吾、手納直規
「Farnesoid X receptor (FXR) アンタゴニストの構造活性相関研究：薬物動態と標的組織分布の評価」
日本薬学会第 140 年会（京都国際会館ほか，京都）2020.3.25-28

<その他>

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 機能分子創製化学研究室
職・氏名 教授・浦田 秀仁

研究テーマ：

プロドラッグ型 siRNA を用いた家族性高コレステロール血症治療薬の開発

研究期間：

平成 31 年 2 月 13 日 ～ 令和 2 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 浦田 秀仁（大阪薬科大学・薬学部・教授）
研究分担者 和田 俊一（大阪薬科大学・薬学部・准教授）
研究分担者 林 淳祐（大阪薬科大学・薬学部・助教）

<共同研究期間>

研究代表者 斯波 真理子（国立循環器病研究センター・病態代謝部・部長）
研究分担者 和田 郁人（国立循環器病研究センター・病態代謝部・流動研究員）

研究目的：

申請者が開発したプロドラッグ型 RNA は、細胞内の環境下で活性化される新規修飾核酸である (REDUCT-RNA)。核酸医薬は、生体内での安定性向上を目的に化学修飾が施されるが、siRNA 分子中の修飾位置によって siRNA 活性が低下することが siRNA 創薬の最大の課題となっている。こうした問題を解決する戦略として REDUCT-RNA を設計し、開発を進めてきた。

アポリポ蛋白 B (ApoB) は動脈硬化惹起性リポ蛋白である LDL の構成成分であり、ホモ接合体家族性高コレステロール血症(FH)治療薬の標的分子になりうる。最近、ApoB mRNA を標的とするアンチセンス核酸 (AON)である Mipomersen がホモ接合体 FH 治療薬として上市されたが、体内で分解されやすく高用量の投与が必要のため、副作用対治療効果は低いなどの問題がある。こうした背景から、REDUCT-RNA 搭載型 siRNA の FH 治療薬としての in vivo 応用を目指し検討を行うことを目的としている。

本年度の研究内容および研究成果：

1. ApoB siRNA の合成と in vitro 評価系の確立
文献既知の ApoB mRNA 標的配列 (S. Jurgen et al., Nature, 2004, 432, 173.) に対する 3'末端に TT オーバーハングを有する天然型 21mer siRNA を

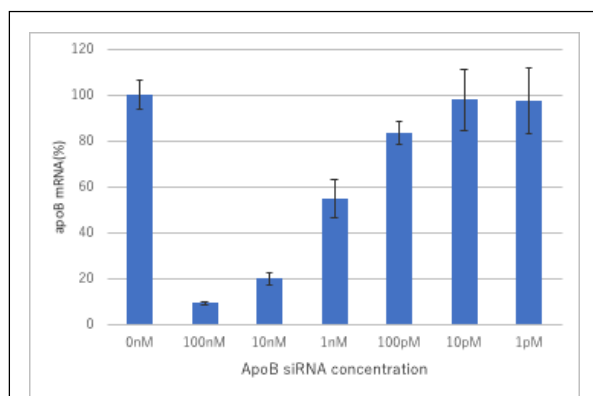


図1 天然型 siRNA による ApoB mRNA 発現抑制

合成し、ヒト肝癌由来細胞株 HuH-7 を用い RT-PCR 法による ApoB mRNA 発現量を評価する評価系を確立した（図1）。

2. REDUCT 修飾 ApoB siRNA の設計、合成と in vivo 評価

siRNA が機能発現するには生体内安定性の向上が不可欠であり、体内では exonuclease と endonuclease がオリゴヌクレオチドの分解に関与している。酵素活性としては exonuclease が大部分を占めるとされており、exonuclease による分解はオリゴヌクレオチドの末端に化学修飾を施すことで比較的容易に保護することが可能である。一方、endonuclease によるオリゴヌクレオチドの内部の分解は、分解好発部位が塩基配列により異なるため、化学修飾すべき部位が問題となる。REDUCT 修飾の弱点は、現時点での合成技術では 21mer の RNA 鎖中に 4～5 残基程度の導入が限界であり、この弱点を補う方法論として最適修飾位置の同定を行うこととし、以下の検討を行った。

既存の化学修飾で影響されない部位の同定

化学修飾により endonuclease への耐性の付与は必要であるが、既存の非プロドラッグ型の化学修飾を施しても siRNA 活性に影響のない部位を同定することで、REDUCT 修飾が必ずしも必要のない領域の同定を試みた。そこで、ApoB siRNA のアンチセンス鎖に既存の修飾 (2'-OMe) を施した 16 種類の siRNA を網羅的に合成し（図2）、各々の ApoB mRNA ノックダウン活性を上述の in vitro の評価系を用いて評価し、化学修飾により大きく影響を受ける部位を同定した。

Sense strand 5' -GUCAUCACACUGAAUACCAAUTT-3'
Antisense strand 3' -TTCAGUAGUGUGACUUAUGGUUA-5'

図2 ApoB siRNA の塩基配列と 2'-OMe 修飾部位
配列下の青線は合成したアンチセンス鎖の 2'-OMe 修飾部位を示す。

血清中で分解を受けやすい部位の同定

化学修飾部位を最小限にするために血清中で分解されやすい部位の同定を検討した。5'- または 3'-末端を蛍光標識した ApoB siRNA を合成し、ヒト及びマウス血清で処理し、経時的に siRNA の分解挙動を分析することで分解を受けやすい部位の同定を検討した。分解反応条件や後処理条件の検討を種々行い、およその分解傾向を確認しており、今後詳細な分解位置の同定を PAGE による標品との比較や MALDI TOF-MS による分子量測定により行っていく。

今後、これらの結果に基づき、化学修飾によって siRNA 活性に影響のない部位には既存の修飾を、影響が大きい部位には REDUCT 修飾を相補的に使用して REDUCT ApoB siRNA を設計、合成し、in vitro 評価で優れたものについて in vivo 評価を行う予定である。

成果発表：

<原著論文>

.

<学会発表>

- 1) J. Hayashi, R. Funaki, N. Sugimoto, Y. Ochi, S. Wada, H. Urata

Properties of reducing-environment-responsive prodrug-type phosphate-modified oligonucleotides for development of oligonucleotide therapeutics.

The 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry. 2019 年 10 月 (Tokyo)

- 2) J. Hayashi, R. Funaki, N. Sugimoto, Y. Ochi, S. Wada, H. Urata

Syntheses and properties of reducing environment responsive prodrug-type

oligonucleotides bearing cyclic and linear disulfide moieties.

Commemorative International Symposium of the Japan Society of Nucleic Acids Chemistry、7月（神戸）

- 3) 杉本紀人、船木涼平、林淳祐、越智洋輔、和田俊一、浦田秀仁

細胞内還元環境に応答するプロドラッグ型リン酸部修飾 DNA の変換効率の比較

日本核酸医薬学会 第5回年会、7月（大阪）

- 4) 越智洋輔、林淳祐、森田康之、西垣美沙、和田俊一、浦田秀仁

還元環境に応答するプロドラッグ型 RNA の配列拡張を指向した合成研究

日本薬学会第139年会、3月（千葉）

- 5) 林淳祐、船木涼平、越智洋輔、和田俊一、浦田秀仁

細胞内還元環境に応答する直鎖ジスルフィド修飾を施したプロドラッグ型リン酸トリエステル(PTE) 核酸の合成

日本薬学会第139年会、3月（千葉）

<その他>

- ・
- ・

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：

Fatty Acid Binding Protein 4（FABP4）標的イメージングプローブ開発に関する研究

研究期間：

平成29年 4月 1日 ～ 令和 2年 3月31日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 天満 敬（大阪薬科大学・薬学部・教授）

研究分担者 平田 雅彦（大阪薬科大学・薬学部・講師）

<共同研究期間>

研究代表者 秋澤 宏行（昭和薬科大学・薬学部・教授）

研究分担者 尾江 悟（昭和薬科大学・薬学部・助教）

研究目的：

脂肪酸結合タンパク質（FABP）は細胞内の脂質輸送に携わる細胞内タンパク質であり、脂質蓄積、シグナル伝達、膜合成等に関与している。中でも脂肪細胞型脂肪酸結合タンパク質（FABP4）は脂肪細胞、マクロファージ、がん間質細胞、がん関連脂肪細胞等に発現し、PI3K/Akt シグナルの抑制を介して脂肪細胞のインスリン感受性を低下させ脂質異常症やインスリン抵抗性に関与する一方で、JNK1の活性化を介してTNF α 、interleukin 1 β 、MCP-1等炎症性サイトカインの産生を亢進する。また、FABP4欠損マウスでは移植がんの成長速度や転移能が低下するなど、FABP4は動脈硬化プラークの不安定性やがんの悪性度と密接に関連することが知られている。したがって、FABP4の発現量を非侵襲的に体外から検出することができれば、動脈硬化プラークの不安定性評価や、がん組織環境の病態評価、さらには動脈硬化やがんを対象とした治療薬開発に有用であると考えられる。

以上を背景として我々は、FABP4を核医学分子イメージング法（PET/SPECT）を用いて定量的かつ非侵襲的にイメージングすることを目的とした放射性分子イメージングプローブ開発に取り組んできた。これまでに種々のFABP4阻害剤の分子構造をもとに放射性ハロゲン標識の検討を行い、放射性ヨウ素標識プローブ $^{123/125}\text{I}$ -TAP1、放射性フッ素標識プローブ ^{18}F -FTAP1を開発し、その有効性を報告してきた（PLoS One 2014;9(4):e94668, Nucl Med Biol 2015;42:184-191, 特許第6099045号（2017年3月3日、トリアゾロピリミジン誘導体化合物））。

本共同研究では ^{18}F -FTAP1をリード化合物として臨床展開を見据えた改良検討を行う。具体的には、 ^{18}F -FTAP1の問題点であった標的認識特性および体内動態特性の改善を目的として、新たなFABP4イメージングプローブの設計・合成と、それに引き続く標品タンパク質や培養細胞系を用いたインビトロ評価、病態モデル動物を用いたインビボ評価を行う。これらの検討を通じて、 ^{18}F -FTAP1

の標的認識特性と体内動態特性を上回る改良型 FABP4 標的核医学イメージングプローブを開発する。

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 ^{18}F -FTAP1 誘導体の設計・合成に関する検討

昨年度までに、 ^{18}F -FTAP1 の体内動態特性の改善に向けて、 ^{18}F -FTAP1 のフルオロエトキシ基をフッ素に置換した化合物や、フッ素を導入するアニリン環のオルト位にメチル基を導入した化合物を設計・合成し、FABP4 に対する結合阻害活性を調べてきた。そこで本年度は新たな誘導体を設計し、それに対応する非放射性化合物の合成および阻害活性評価を行った。

^{18}F -FTAP1 のトリアゾロピリミジン骨格は FABP4 阻害活性に必須の構造部分であることから、放射性フッ素を導入するアニリン環への置換基の導入、放射性フッ素の導入位置の改変、トリアゾロピリミジン骨格とアニリン環とのリンカー構造の改変、構造中フェニル基のピリジル基への変更、の分子設計の可能性を検討し、複数の誘導体の合成に成功した。また、そのうちのいくつかの誘導体は FTAP1 と同等の FABP4 結合阻害活性を有することを見出した。

② 新しい ^{18}F 標識法の導入に関する検討

昨年度までの検討を踏まえて、 ^{18}F -FTAP1 のイメージングプローブとしての性能改善のためには、 ^{18}F -FTAP1 の場合のように構造中アニリン環に ^{18}F -フルオロエトキシ基を導入するのではなく、構造中アニリン環に直接 ^{18}F -フッ素を導入することが有効であると考えた。しかしながら、比放射能を損なわずに放射性フッ素を直接ベンゼン環に導入する標識合成方法はあまり報告されていない。そこで本年度は、非放射性化合物の合成に成功した各種誘導体の中でも最も単純な ^{18}F -FTAP1 の ^{18}F -フルオロエトキシ基を ^{18}F -フッ素に置換した化合物（ ^{18}F -dFTAP1）の標識検討を行った。

^{18}F -dFTAP1 の標識検討にあたっては、ピナコールボレート前駆体を別途合成し、Cu 触媒を用いた標識検討を行った。薄層クロマトグラフィー法を用いて反応溶液の放射能の Rf 値を非放射性化合物の UV 吸収の Rf 値と比較したところ、両者に一致を認めず ^{18}F -dFTAP1 の合成には至らなかった。

ベンゼン環への直接 ^{18}F -フッ素化のためには反応条件の最適化が必要と考えられたことから、研究室で別途開発している dFTAP1 と同程度の分子量をもつモデル化合物を用いて、非放射性フッ素化反応を検討し、Cu 触媒の添加量等の諸条件の検討を行った。その結果、ピナコールボレート前駆体から Cu 触媒を用いたフッ素化反応を効率的に進行させる反応条件の取得に成功し、次年度以降の ^{18}F -dFTAP1 合成の成功可能性を強く示唆した。

成果発表：

<原著論文>

なし

<学会発表>

・分子イメージングに基づく非侵襲的インビボ機能分析、天満 敬、日本分析化学会近畿支部第 3 回支部講演会、2019 年 12 月 6 日

・p38 α イメージングプローブ[$^{123/125}\text{I}$]FIC のテレピン油誘発炎症モデルマウスを用いた有効性評価、橋本知行、平田雅彦、竹口温子、花蘭 楓、柿坂隆志、吉田直史、渡邊裕之、飯國慎平、小野正博、大桃善朗、近藤直哉、天満 敬、日本薬学会第 140 年会、2020 年 3 月

＜その他＞

なし

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 薬剤学研究室

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2年3月31日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 永井 純也（大阪薬科大学・薬学部・教授）

研究分担者 本橋 秀之（大阪薬科大学・薬学部・准教授）

研究分担者 竹林 裕美子（大阪薬科大学・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血清アルブミンが尿細管管腔中へと漏出ようになる。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な点も多い。我々はこれまでにヒト腎近位尿細管由来上皮細胞株を用いた検討によって、アルブミンに結合している脂肪酸が低酸素誘導因子 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、アルブミン処理は PGE₂ 生成を高め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。一方、本研究では培養細胞株を用いた *in vitro* レベルでの研究を中心に進めてきたが、*in vitro* レベルで得られた結果が *in vivo* レベルで実際に認められるかについての検証が必要である。そこで、*in vivo* におけるアルブミン漏出による尿細管 PGE₂ 及び代謝物 PGE-M の生成促進について調べるためアルブミン尿を誘発する実験動物を用い、HIF-1 活性化と尿中 PGE₂ 量の相関について調べることを計画した。具体的には、アドリアマイシン（ADR）誘発腎障害マウスや2型糖尿病モデルラットから回収された尿をサンプルとして尿中 PGE₂ および PGE-M 排泄量を測定する。その測定と並行して各種腎機能マーカー（血清クレアチニン、尿中アルブミン等）を測定する。また、腎線維化の進行との関係を調べるため、HIF-1 標的線維化関連遺伝子等の発現解析を行う。これら一連の研究において、腎疾患モデル動物の尿に含まれる脂肪酸関連物質の組成分析と量的評価を行うとともに各種バイオマーカー等との相関性について解析を行う。また、こうした解析において臨床医からの視点による考察や研究展開に

についての提案等を得ることは非常に重要である。そこで、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することとした。

本年度の研究内容および研究成果：

本年度は、上記の目的を踏まえた、ADR 誘発アルブミン尿発症モデルマウスを用いた検討を進めるに際しての基礎的データを収集することを中心に進め、その結果を以下に述べる。

① ADR 誘発アルブミン尿発症モデルマウスの作製

実験動物として BALB/c 雄性マウス(5 週齢)を使用し、明期：暗期＝12：12 の明暗サイクル、自由飲水、自由摂食下で 1 週間馴化させた。ADR 投与前日を Day0、ADR 投与日を Day1、ADR 投与 14 日後を Day14 とした。Day0 と Day14 の 24 時間尿サンプルを代謝ケージを用いて回収した。なお、実験動物は、ADR 投与後も継続して、明期：暗期＝12：12 の明暗サイクル、自由飲水・自由摂食下で飼育した。ADR 投与に際して、生理食塩水を用いて 2.0 mg/mL の濃度の ADR 溶液を調製し、10 mg/kg の用量で尾静脈投与を行った。対照群として、等容量の生理食塩水を投与した。尿・血液サンプルにおいて、クレアチニンはクレアチニン測定キットを用いた Jaffe 法により測定し、アルブミンは免疫学的測定法（ELISA 法）により定量した。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。

まず、血清クレアチニン値に及ぼす ADR の影響について検討した。その結果、各群間で変化は認められなかった[対照群 0.50 ± 0.08 mg/dL (*n*=5)、ADR 群 0.50 ± 0.04 mg/dL (*n*=6)、*p*=0.94]。また、血清アルブミン値についても、ADR 群では対照群と比較して有意な変化は認められなかった[対照群 4.69 ± 0.35 g/dL (*n*=5)、ADR 群 4.31 ± 0.22 g/dL (*n*=5)、*p*=0.38]。

尿中アルブミン量については、尿中クレアチニン量で補正した尿中アルブミン/尿中クレアチニン比で評価した。Day0 における尿中アルブミン/クレアチニン比については、両群間でほぼ同程度の値であることを確認した[対照群 0.20 ± 0.06 (*n*=6)、ADR 群 0.14 ± 0.02 (*n*=5)、*p*=0.47]。その後 Day7 では、ADR 群は対照群と比較して尿中アルブミン/クレアチニン比の増加が観察された[対照群 0.12 ± 0.02 (*n*=6)、ADR 群 0.37 ± 0.04 (*n*=5)、*p*=0.0003]。さらに、Day14 では ADR 群においてより明確な上昇が認められた [対照群 0.13 ± 0.005 (*n*=5)、ADR 群 3.00 ± 0.72 (*n*=6)、*p*=0.006]。これらの結果から、ADR 投与により、糸球体からのアルブミン漏出が生じるアルブミン尿発症モデルマウスの作製が確認された。

② ADR 誘発アルブミン尿発症モデルマウスにおける HIF-1 関連遺伝子の発現変動

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、自由飲水下で 1 週間馴化させ、ADR 投与前日を Day0、ADR 投与日を Day1、ADR 投与 14 日後を Day14 とし、Day14 の尿サンプル回収後に腎摘出を行った。摘出した腎を RNeasy 小管に浸漬しリアルタイム PCR 用サンプルとして-20℃で保存した。残りの 2/3 腎はホモジナイズ、遠心分離後、上清を回収し、Western blotting 用サンプルとして-80℃で保存した。なお、ADR 投与に際して、生理食塩水を用いて 2.0 mg/mL の濃度の ADR 溶液を調製し、10 mg/kg の用量で投与を行った。対照群として、等容量の生理食塩水を投与した。摘出した腎臓の mRNA 発現解析にはリアルタイム PCR、タンパク質発現解析には Western blotting により行った。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。

Day14 における腎サンプルを用いて、HIF-1 α 、GLUT1、ABCG2/BCRP および PPAR γ の mRNA 発現について、リアルタイム PCR 法を用いて対照群と ADR 群で比較解析した。なお、これら 4 種類の mRNA 遺伝子は、いずれも HK-2 細胞を用いた in vitro 実験系において、アルブミン負荷により発現上昇が観察されたものである。PCR 解析の結果、HIF-1 α 、GLUT1、ABCG2/BCRP および PPAR γ の mRNA は、対照群(n=3)を 100%とした場合に、ADR 群(n=4)ではそれぞれ $163 \pm 5.1\%$ 、 $129 \pm 5.7\%$ 、 $78.3 \pm 1.4\%$ および $212 \pm 5.9\%$ の発現変動があることが見いだされた。なお、上昇が観察された HIF-1 α 、GLUT1 および PPAR γ mRNA は、いずれも有意な変動として検出された。一方、ABCG2 mRNA については、in vitro 実験とは異なり、低下傾向が認められたが、有意差は検出されなかった($p=0.30$)。

また、Western blotting の結果から、HIF-1 α のタンパクレベルでの発現は、対照群に比べ、ADR 群において上昇していることが観察された。各サンプルにおける HIF-1 α と β -actin のバンドの数値化を行い、HIF-1 α / β -actin 発現比で対照群(n=3)と ADR 群(n=4)で比較したところ、対照群に比べ ADR 群では、HIF-1 α / β -actin 発現比が 1.82 ± 0.08 倍と上昇しており、またこの上昇は有意な変化として検出された($p=0.02$)。

以上、今年度において、ADR 投与によるアルブミン尿が誘発したモデルマウスの作製が確認され、さらに ADR 群の腎における HIF-1 活性化も観察されたことから、我々がこれまで進めてきた in vitro の結果を検証する上で本モデルマウスが有用であることが確認できた。今後は、本モデルマウスを用いて尿中脂肪酸関連物質の定量ならびに腎における線維化関連遺伝子の発現変動について解析を進めていく予定である。

成果発表：

<原著論文>

- ・なし

<学会発表>

- ・ 永井純也、松谷春花、孫 紅昕、堀 晴菜、久保朱里、竹林裕美子、本橋秀之
「腎近位尿細管上皮細胞における HIF-1 活性化と OCTN2 介在性輸送」
第 41 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2019 年 10 月 18～19 日（千葉）
- ・ 中達 穂、宮所 冴衣、池田 豊聡、金久 奨、竹林 裕美子、本橋 秀之、永井 純也
「腎近位尿細管上皮細胞へのアルブミン曝露による HIF-1 活性化とプロスタグラン生成」
日本薬学会第 140 年会、(コロナ感染症による年会中止に伴い誌上発表)、2020 年 3 月 25 日～28 日（京都）

<その他>

- ・なし

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 薬物治療学研究室
職・氏名 教授・松村人志

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：

平成 29 年 4 月 1 日 ～ 令和 2 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者	松村 人志	(大阪薬科大学・薬学部・教授)
研究分担者	島本 史夫	(大阪薬科大学・薬学部・教授)
研究分担者	幸田 祐佳	(大阪薬科大学・薬学部・准教授)
研究分担者	山口 敬子	(大阪薬科大学・薬学部・講師)
研究分担者	田中 早織	(大阪薬科大学・薬学部・助教)

<共同研究期間>

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：

本研究は大きく分けて、次の3つの領域で、並行して推進することとしている。すなわち、(i) ストレスに対する防衛としての胃粘膜保護・消化吸収機能、血糖値維持・代謝安定等に関する機序の解明、関連バイオマーカー測定法の開発等を目指す基礎研究、(ii) 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、(iii) 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、を行い、新たな治療薬の開発に繋がる知見を求める。

(i) から順番に研究内容と成果について記述する。

胃粘膜保護に関する研究テーマ：モルモット胃幽門腺粘液細胞を単離し、細胞内粘液顆粒の開口放出現象と細胞内情報伝達因子に関する研究を継続している。胃粘液細胞からの粘液分泌（開口放出）はアセチルコリン (ACh) 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇により活性化される。この開口放出はアラキドン酸 (AA) からプロスタグランジン (PGE_2) を介した cAMP の蓄積 (AA/ PGE_2 /EP4 機構) およびアラキドン酸が $\text{PPAR}\alpha$ を刺激し一酸化窒素 (NO) を介した cGMP の蓄積 (AA/ $\text{PPAR}\alpha$ /NO/cGMP 機構) の2つの機構により調節される。この2つの調節機構を活性化するためにはアラキドン酸の産

生が必須であり、ACh 刺激が細胞内 Ca^{2+} 濃度依存性 PLA_2 を介してアラキドン酸を産生することが明らかとなった。同様の手法により、インドメタシン (IDM) は $10 \mu\text{M}$ ACh 刺激性開口放出を減少させたが、 $1 \mu\text{M}$ ACh 刺激性開口放出を逆に増強させた。この相反する現象は、IDM が $\text{PGE}_2/\text{EP4}$ 機構を抑制することによりアラキドン酸が蓄積し、その結果として $\text{PPAR}\alpha/\text{NO}$ 機構が活性化されることにより引き起こされたと考えられ、 PGE_2 放出量とアラキドン酸産生量が関与していると推察された。並行して胃酸分泌刺激物質であるヒスタミンおよびガストリンによる粘液分泌に対する影響について検討した。両胃酸分泌刺激物質は粘液開口放出を増加した。今後、これらの胃酸分泌刺激物質による粘液開口放出に関与する細胞内情報伝達因子を解明していく。

脂肪の消化吸收機能に関する研究テーマ：脂質異常症合併 2 型糖尿病 (OLETF) ラットを用いて食事療法の効果を検討した。飼料中の脂質含有量の差異による、トリグリセライドの再合成に関与する酵素である小腸上皮細胞 monoacylglycerol acyltransferase-2 (MGAT2)、diacylglycerol acyltransferase-1 (DGAT1) タンパク発現量の変化を検討した。高脂肪食摂取時にトリグリセライド値および MGAT2・DGAT1 タンパク発現量が有意に増加した。脂質異常症を合併する糖尿病病態下での高脂肪食摂取時にトリグリセライド値が増加する要因として、従来から報告されている代謝機能の低下および小腸絨毛過形成に加え、MGAT2・DGAT1 タンパク発現量増加が一因である可能性が考えられた。低脂肪食摂取時では脂肪吸収能の減少は見られたが MGAT2・DGAT1 タンパク発現量の変化は見られなかったため、肝臓などの他の組織での脂質再合成酵素の発現に関与している可能性が考えられた。同様に、インスリン療法の効果を検討した。4 週間のインスリン療法はトリグリセライド値と総コレステロール値を有意に減少させたが、MGAT2・DGAT1 タンパク発現量に変化はなかった。インスリン療法は脂質異常症改善に効果的であるが、トリグリセライド再合成過程には作用していないと推察された。今後、糖尿病合併脂質異常症改善対策としての食事療法、インスリン療法の効果を解明していく。並行して 2 型糖尿病モデルマウス (db マウス) を用いて小腸の脂肪吸収に関する形態的・機能的変化を解析した。脂肪吸収能に変化がないにもかかわらず高脂血症を認めた。脂質異常症発症機序解明と予防のため db マウスを用いて脂質含量の異なる食事療法を行い血中脂質濃度改善効果と小腸形態的・機能的変化との連関を明らかにする予定である。

血糖値維持・代謝安定等に関する機序の解明：肥満を伴う糖尿病患者では、高血圧の合併症が高く、高血圧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血圧コントロールが重要である。酸化ストレスは、肥満、高血圧、糖尿病の病態に関与している。肥満を伴う糖尿病ラットにおいて、肥満の改善、血糖および血圧コントロール等を評価し、肥満症、高血圧症、糖尿病合併症を含む酸化ストレス疾患の予防と治療法について検討している。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にチアミン含有飲料水を継続的に摂取させると、空腹時高血糖、肥満と高血圧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 Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) 発現と血漿中オレキシン濃度を変動させることが判明した。チアミン含有飲料水を長期間摂取することにより、肥満を伴う糖尿病ラットの合併症発症臓器である肝臓と脳組織におけるポリ[adenosine diphosphate (ADP)-リボース]ポリメラーゼの過剰活性化によるタンパク質の ADP-リボシル化が抑制されることが明らかとなった。

継続的なチアミン摂取は、高血圧合併の肥満と糖尿病合併症を改善し、脳における酸化ストレスを抑制したことから、酸化ストレス疾患の予防と治療法の確立に貢献できる可能性が示唆された。

関連バイオマーカー測定法の開発等：必須微量元素のひとつであるセレンは自然界に広く分布している。生体ではグルタチオンペルオキシダーゼやヨードチロニン脱ヨード酵素、チオレドキシン還元酵素などセレノプロテインとして抗酸化反応において重要な役割を果たしている。臨床においては原

子吸光分光光度法により血中濃度を測定しているが、迅速な測定法とはいえず、簡便性、経済性、感度などにおいて難点を有している場合があり、セレンの簡便で高感度な吸光光度定量法の開発を試みた。今回キサンテン系色素のうち *o*-カルボキシフェニルフルオロン（OCPF）と Fe (III)イオン及び界面活性剤などを併用した三元錯体生成反応を利用する簡便で高感度な Se (IV)分析法の可能性について検討したところ、金属イオンとして Fe (III)添加の条件下、溶媒抽出などの煩雑な操作をすることなく、0.4 ～1.2 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲において良好な直線である検量線が得られ、モル吸光係数 $\varepsilon = 3.93 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を得る事ができた。ヒトとウシの乳より精製され、ヒトの母乳中や、唾液、涙、十二指腸などの多くの分泌液中に含まれているトランスファミリタンパク質に属するラクトフェリンはノロウイルスに抵抗を示すという報告もなされている。今回、OCPF と金属イオンに Mo(IV)を用いるラクトフェリンの吸光光度測定法について検討したところ 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 以下の LF 濃度について、モル吸光定数は $\varepsilon = 4.5 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ となり、0.5 mg/ml における 5 回の繰り返し測定における平均値 \pm 標準偏差は、 0.332 ± 0.018 、変動係数 $\text{CV} = 5.3\%$ で、良好な検量線を作成することが出来た。今後、実試料中の LF 測定への適応などについて検討する予定である。一方、炎症時に減少する急性期タンパク、栄養状態の指標として重要な臨床検査項目の 1 つであるトランスフェリン（以下 Tf と略す）は、キサンテン色素の OCPF と金属イオン Mo(VI)を用いる Tf の吸光光度定量法について基礎的定量条件の検討をたところ、25 $\mu\text{g/mL}$ 以下の Tf 濃度について、モル吸光定数 $\varepsilon = 4.5 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 、5 回の繰り返し適定における平均値 \pm 標準偏差は 0.344 ± 0.010 、変動係数 $\text{CV} = 0.029\%$ で、良好な検量線を作成することが出来た。Lf と Tf の両者において界面活性剤、液性や緩衝液の違いにより同等の感度を得ることができたので、これらを分別定量することが可能であることが示唆された。

また、キサンテン系色素は、比較的古くから利用されており種々の優れた特性を有するため、その応用範囲は分析試薬としてだけではなく情報用色素、増感剤や医療診断用色素など多岐にわたっている。今回はジプロモカルボキシフェニルフルオロンというキサンテン系色素に電子吸引基の臭素 2 つの導入を試みたところ、銅 (II) 添加の有無における吸収スペクトル測定をしたところ、可視化利用における重要因子として極大吸収波長のシフト幅に変化が著明に観察され、今後の適用は期待される結果となった。また、ホップやベリー類に含まれ、抗酸化作用を有するポリフェノール類の一種であるエラグ酸の平面構造が金属イオンと容易に結合することを利用して吸収スペクトル特性を検討した。Al (III)とエラグ酸の組成比はモル比法により、弱酸性条件下で 1 : 2 という結果となった。今後、生理活性の詳細な検討も含め、エラグ酸と金属または、他の生理活性物質との相互作用について検討を重ねる予定である。

(ii) については、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を用いて行っている。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、われわれ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つつある。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ているようであり、従って 1 日の約 1/3 がレム睡眠であることになるのだが、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にある。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、われわれは予想しており、将来、レム睡眠を増加させる薬剤を開発することには、一定の価値があると考えている。本研究成果については、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、検討を重ねているところである。

(iii) については、研究倫理審査委員会の承認を得た上で、阪南病院との共同で、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（商品名：クロザリル）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、実地臨床の場面に於いても、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、臨床家にとっても、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、等について、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が予想される。

現在進行中の研究に於いて、われわれ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ているが、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することにしている。これは、クロザピン及びクロザピンの代謝物が血球中に移行したり、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。クロザピンとその2つの代謝物の血漿中及び血球中濃度を測定する測定系を、本学薬学教育研究センターの佐藤卓史准教授のご指導により確立した。他方、病院での診察結果による症状評価のみでは情報が不十分であると考え、患者の認知領域の諸種機能評価も行うこととし、これは本学の学生達が担当している。

これら臨床症状や認知機能と、血液試料を基に得られた測定結果との種々相関を検討し、どのような要因が、クロザピンの効果を低減せしめているのか、どのような要件が、クロザピン奏効の条件となっているのか等を解析しているところであり、研究の途中ではあるが、血球中濃度と認知機能評価値との間に連関が見られる等の興味深い結果が散見されるようになってきている。現在は、症例を積み重ねている途中であるが、コロナウイルス蔓延の影響で進展が停滞していることも相俟って、まだ症例数が不十分なため、何らかの結論には至っていないが、治療抵抗性統合失調症におけるクロザピンの薬効に関する解析を通して、精神疾患からの回復や脳機能の維持のための要因を探っていきたい。

成果発表：

<原著論文>

・ Y. Kohda, A. Maekita, T. Tanaka, H. Matsumura. Hepatic glucose-dependent insulintropic polypeptide expression is modified by supplementing high-dose thiamine in obese diabetic rats. *Fundam. Toxicol. Sci.*, 4: 279-284, 2017

・ Y. Kohda, J. Ueda, R. Azuma, Y. Nakatani, H. Murase, K. Matsui, Y. Takezoe, E. Nagata, R. Matsui, T. Tanaka, H. Matsumura. Thiamine supplementation modulates oxidative stress by inhibiting hepatic adenosine diphosphate (ADP)-ribosylation in obese diabetic rats. *Fundam. Toxicol. Sci.*, 6: 1-8, 2019

・ Y. Kohda and H. Matsumura. Obesity-related hypertension and enhanced plasma orexin-A level are attenuated by the consumption of thiamine water in diabetic rats under cerebral oxidative stress conditions. *Fundam. Toxicol. Sci.*, 6: 383-390, 2019

<学会発表>

・ 田中 早織、松村 人志、島本 史夫：2 型糖尿病モデルマウスによる脂肪吸収機能に関する小腸の形態的・機能的変化の検討。日本薬学会第 140 年会 2019

・ 田中早織、松村人志、島本史夫：2 型糖尿病合併脂質異常症ラットに対する食事療法が小腸の脂肪吸収機能・脂質再合成酵素発現と血中脂質濃度改善に与える影響。第 34 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 2019

- ・別所蓉子, 藤田 芳一, 山口 敬子. キサンテン系色素と金属を用いる Se(IV)吸光光度分析法の開発について Se(IV)吸光光度分析法の開発について日本分析化学会 第 79 回分析化学討論会, 2019
- ・久保田 望海, 真名子 啓太, 松村 人志, 藤田 芳一, 山口 敬子. キサンテン系色素誘導体に関する基礎的研究について日本分析化学会 第 68 年会, 2019
- ・佐藤 翔一, 西田 勇介, 鷺見 明子, 松村 人志, 藤田 芳一, 山口 敬子. 三元錯体生成法を利用した、ラクトフェリンの吸光光度定量法の開発について. 日本分析化学会 第 68 年会, 2019
- ・鳥居 諒平, 湊 隆彰, 田中 美紗希, 藤田 芳一, 松村 人志, 山口 敬子 エラグ酸と金属の錯体生成反応について. 日本分析化学会 第 68 年会, 2019
- ・浜田 まどか, 藤田 芳一, 田邊 蘭太, 松村 人志, 山口 敬子. キサンテン系色素と金属を用いるトランスフェリンの分析法に関する研究日本分析化学会 第 68 年会, 2019
- ・Y. Kohda, A. Maekita, T. Tanaka, H. Matsumura. Hepatic GIP protein expression is modified by supplementing high-dose thiamine in obese diabetic rats. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, 2018
- ・山口茉菜、田中早織、瀧本智代、山路友里奈、島本史夫：2 型糖尿病合併脂質異常症における低脂肪食摂取と脂肪吸収・再合成機能に関する検討. 第 68 回日本薬学会近畿支部総会・大会および大阪薬科大学卒業研究発表 2018
- ・瀧本智代、田中早織、山口茉菜、日下知映里、島本史夫：2 型糖尿病合併脂質異常症における高脂肪食摂取と脂肪吸収・再合成機能に関する検討. 第 68 回日本薬学会近畿支部総会・大会および大阪薬科大学卒業研究発表 2018
- ・福谷匡紘、田中早織、瀧本智代、山口茉菜、島本史夫：2 型糖尿病合併脂質異常症に対するインスリン療法と脂肪吸収・再合成機能に関する検討. 第 68 回日本薬学会近畿支部総会・大会および大阪薬科大学卒業研究発表 2018
- ・田中早織、松村人志、幸田祐佳、島本史夫：2 型糖尿病合併脂質異常症における高脂肪食・低脂肪食による小腸での脂肪吸収・脂質再合成酵素が脂質濃度改善に与える影響. 日本薬学会 139 年会 2018
- ・木原 愛美, 山口 敬子, 藤田 芳一, 松村 人志, 島本 史夫. パラジウム(II)と σ -スルホフェニルフルオロンを用いる生体活性化合物の測定法について. 日本分析化学会 第 67 年会, 2018
- ・浅田 翔太, 佐藤 翔一, 山口 敬子, 藤田 芳一, 松村 人志, 島本 史夫. σ -カルボキシフェニルフルオロンと鉄(II)を用いる過酸化脂質と過酸化水素の吸光光度定量法について. 日本分析化学会 第 67 年会, 2018
- ・斎藤 瑞希, 山口 敬子, 藤田 芳一, 松村 人志, 島本 史夫. キサンテン系色素-金属錯体とカテコールアミン誘導体の吸光光度定量法について. 日本分析化学会 第 67 年会, 2018
- ・池澤 和弥, 山口 敬子, 藤田 芳一, 松村 人志, 島本 史夫. トリフェニルメタン系化合物と Hf(IV)を用いる HSA の吸光光度法の開発. 日本分析化学会 第 67 年会, 2018
- ・幸田祐佳, 山本晶子, 小中千明, 中村彩音, 前北章衣, 松村人志. 肥満ラットのチアミン摂取による肝インクレチン発現および糖尿病合併症の改善. 第 38 回日本肥満学会, 2017
- ・岡島 龍斗, 柏木 翔和, 久保田 望海, 浅田 翔太, 山口 敬子, 松村 人志, 中原 良介, 藤田 芳一. σ -カルボキシフェニルフルオロンと鉄(II)を用いる過酸化脂質の吸光度定量法の開発について. 日本分析化学会第 66 年会, 2017
- ・米島美保、田中早織、篠田あゆみ、幸田祐佳、松村人志、島本史夫：胃幽門腺粘液細胞における細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を介して PPAR α を活性化するアラキドン酸の効果. 日本薬学会第 137 年会および大阪薬科大学卒業研究発表 2017

・篠田あゆみ、田中早織、米島美保、幸田祐佳、松村人志、島本史夫：胃幽門腺粘液細胞におけるインドメタシンによるアセチルコリン($1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$)刺激性開口放出の相反する現象. 日本薬学会第137年会および大阪薬科大学卒業研究発表 2017

・奥鈴花、高野美菜、小林早紀子、深野木悠希、鎌野安紀子、堀口まり奈、渡邊直美、島本史夫：2型糖尿病合併脂質異常症に対する高脂肪食・低脂肪食摂取と小腸 MGAT2・DGAT1 発現量に関する検討. 日本薬学会第137年会および大阪薬科大学卒業研究発表 2017

・深野木悠希、高野美菜、奥鈴花、小林早紀子、鎌野安紀子、堀口まり奈、渡邊直美、宮崎誠、島本史夫：2型糖尿病合併脂質異常症に対するインスリン療法と小腸 MGAT2 および DGAT1 発現量に関する検討. 日本薬学会第137年会および大阪薬科大学卒業研究発表 2017

<その他>

なし。

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 病態分子薬理学研究室
職・氏名 教授・大喜多 守

研究テーマ：

心不全に対する新規治療標的の探索

研究期間：

平成31年4月1日 ～ 令和2年3月31日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 大喜多 守（大阪薬科大学・薬学部・教授）

研究分担者 中川 恵輔（大阪薬科大学・薬学部・助手）

<共同研究期間>

研究代表者 今村 武史（鳥取大学・医学部・教授）

研究分担者 澤野 達哉（鳥取大学・医学部・助教）

研究目的：

世界中で高齢化が進み、今後、高齢の心不全患者が爆発的に増加することが予想されている。この心不全には左室駆出率分画（ejection fraction: EF）が保持された心不全（HFpEF）と EF が低下した心不全（HFrEF）に分けられ、HFpEF が心不全患者を占める割合は増加を続けている。しかしながら、HFpEF に対する特異的な薬物療法はなく、HFrEF に用いられる治療法が流用されているのが現状である。HFpEF に対する新規の治療標的や治療薬の開発は喫緊の課題である。本研究では、種々の心不全疾患モデル動物を用い、HFpEF および HFrEF などの心不全病態制御の解明および新規治療標的を探索する。

本年度の研究内容および研究成果：

本年度は、HFpEF にみられる拡張機能障害を呈する Deoxycorticosterone acetate (DOCA) -食塩高血圧ラットを用い、高血圧発症後4週目以降にエストロゲン受容体作動薬を用いた治療的な介入を検討した。テールカフ法による血圧測定および心エコー検査による心機能検査により薬効評価を行った。

収縮期血圧 (SBP) が定常状態になる DOCA-食塩処置4週間後から低用量 (LTx) および高用量 (HTx) のエストロゲン受容体作動薬による治療を2週間行った。偽処置を行った Sham 群と比較して、DOCA 食塩処置4週間で有意な血圧上昇が確認された。しかしながら、エストロゲン受容体作動薬による治療を行った DOCA+LTx 群および DOCA+HTx 群では SBP および DBP は低下しなかった (Fig.1 A, B)。また心エコー検査による心機能測定では、いずれの群間においても、左室拡張末期径 (LVIDd)、左室収縮末期径 (LVIDs) および収縮能の指標である左室駆出率 (EF) に有意な差は

認められなかった（Fig. 2A-C）。拡張機能の指標となる E/A 比は、Sham 群と比較して、DOCA+Vehicle 群において有意な低下が確認されたが、DOCA+LTx 群および DOCA+HTx 群では E/A 比の改善は認められなかった（Fig. 2 D）。

現在、雌性動物における検討や予防的な介入の検討などを進めている。

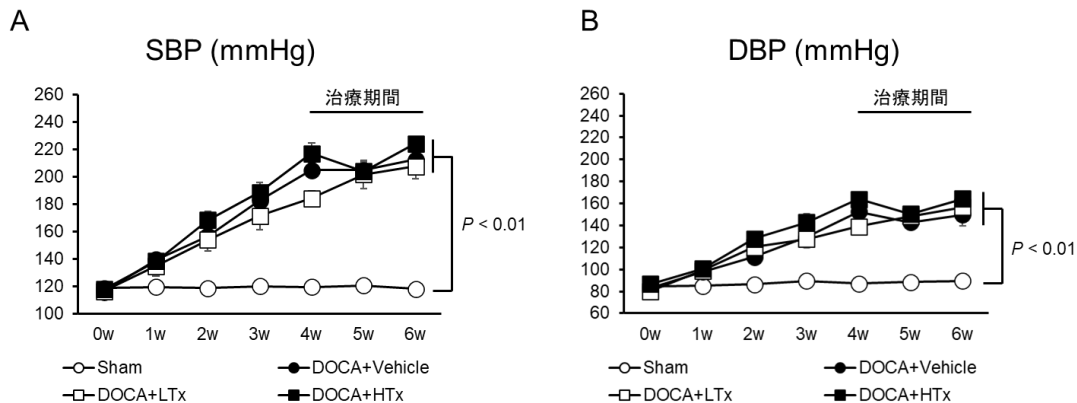


Fig. 1. 収縮期血圧および拡張期血圧に対するエストロゲン受容体作動薬の影響

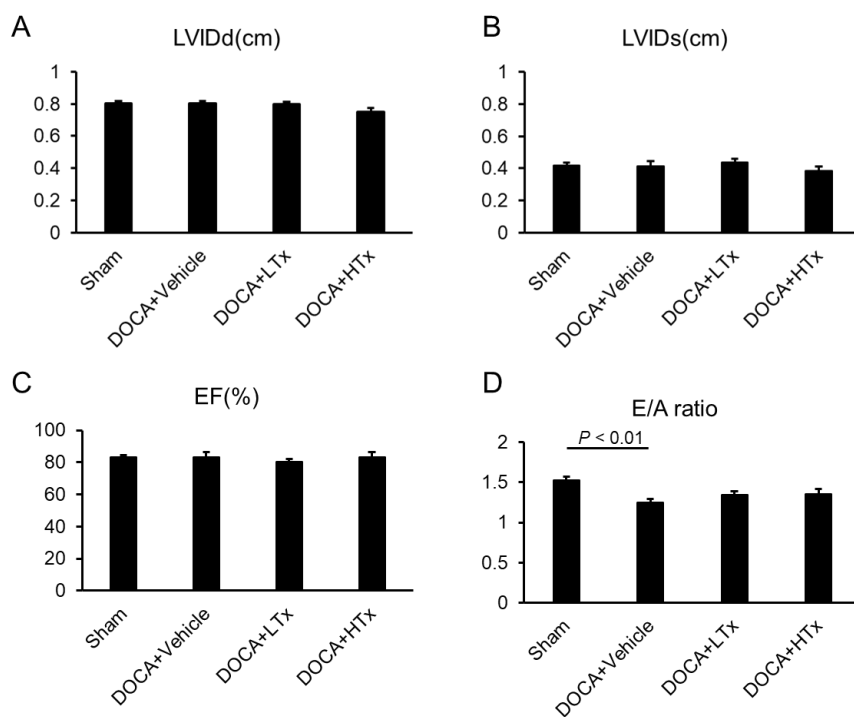


Fig. 2. 心臓の収縮機能および拡張機能に対するエストロゲン受容体作動薬の影響

成果発表：

<原著論文>

なし

＜学会発表＞

なし

＜その他＞

なし

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 循環病態治療学研究室
職・氏名 教授・林哲也

研究テーマ：

Soluble Tumor necrosis factor (sTNF)、sTNF-Receptor1 (R1) 及び sTNF-R2 とがんの進行度との関連性を明らかにするパイロットスタディ

研究期間：

平成 31 年 4 月 1 日 ～ 令和 2 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

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

<共同研究機関>

研究代表者	三吉範克	(大阪国際がんセンター・医長)
-------	------	-----------------

研究目的：

Soluble Tumor Necrosis Factor-alpha (sTNF) と TNF receptor 1 および 2 (sTNFR1、sTNFR2) は、敗血症、C 型肝炎、がん、心不全、自己免疫疾患、薬剤性肝障害など様々な病態で早期に出現する指標として知られている。しかし、実際に患者での血漿中 sTNF、sTNFR1、sTNFR2 について詳細な検討はほとんどされていない。本研究では、血漿中 sTNF、sTNFR1、sTNFR2 が、がんの再発や予後を予測する指標となり得るかどうかを調べるために、がん患者の血漿中 sTNF、sTNFR1、sTNFR2 と、がんのステージとの関連性について検討を行う。

本年度の研究内容および研究成果：

書面によりインフォームドコンセントが得られた健常人 5 名（採血ポイント 5 点）とがん患者 3 名（大腸がん 1 例、小細胞肺癌 2 例、採血ポイント 9 点）から血液 2 mL を採取し、血漿中 sTNFR1 および sTNFR2 濃度の測定を行った。測定には R&D Systems 社の ELISA キット（Quantikine®Immunoassay human sTNFR1）を用いた。sTNFR1 および sTNFR2 濃度の測定限界はいずれも 5.0 pg/mL であった。

健常人の健常人の血漿中 sTNFR1 濃度は $1,005 \pm 256$ pg/mL、sTNFR2 濃度は $1,968 \pm 633$ pg/mL であった。一方、がん患者の血漿中 sTNFR1 濃度は $2,457 \pm 2,631$ pg/mL、sTNFR2 濃度は $2,249 \pm 956$ pg/mL

であった。両濃度ともに健常者と比較して、有意な差は認められなかった（Fig. 1B, 1C）。

大腸がんステージIV患者の血漿中 sTNFR1 および sTNFR2 濃度の経時変化を Fig. 1A に示した。sTNFR2 の濃度は 1,000-4,400 pg/mL の間で変動が認められた。また、sTNFR1 濃度（9,179 pg/mL）が高値を示した患者は採血後 2 週間後に死亡した。

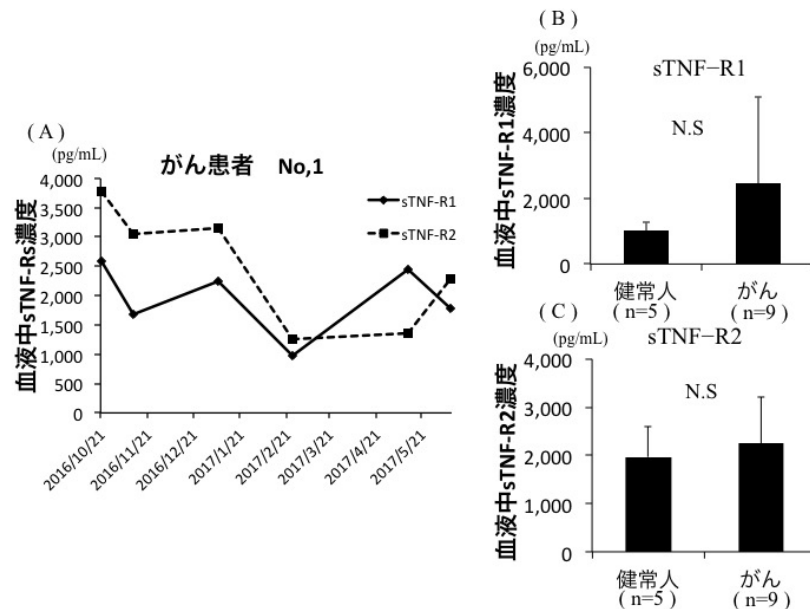


Fig. 1 健常人およびがん患者の血漿中 sTNFR1 および sTNFR2 濃度

- (A) ステージIV患者における血漿中 sTNFR1 および sTNFR2 濃度推移
(B) 健常人とがん患者の平均 sTNFR1 および sTNFR2 濃度の比較

本研究で対象としている TNF- α は主にマクロファージや樹状細胞といわれる抗原提示細胞 (antigen presenting cell; APC) により産生される炎症性サイトカインであり、APC の細胞膜には主に TNF- α の受容体である TNFR2 が存在し、APC 以外の細胞膜には主に TNFR1 が存在することが報告されている。様々な刺激に切断酵素の一種である TNF- α converting enzyme (TACE) が反応すると、TNFR1 および TNFR2 は細胞膜から切断・可溶化され、sTNFR1 および sTNFR2 として血中を循環する。今回の検討では、症例数が少なくばらつきが大きかったことから、健常人とがん患者の間で血漿中 sTNFR1 および sTNFR2 濃度の有意な差は認められなかった。

しかし、sTNFR1 濃度（9,179 pg/mL）が高値を示した患者が、その 2 週間後に死亡が認められた。本患者はステージIVの患者であることから、サルコペニアのような筋線維の崩壊による sTNF- R1 の上昇が見られたと考えられた。したがって、sTNFR1 濃度が患者予後を予測する可能性が考えられた。

成果発表：

<原著論文>

・なし

<学会発表>

- ・中代里美、加藤隆児、井尻好雄、林哲也. 低酸素下におけるヒト膀胱がん細胞 253J-BV のシスプラチンの反応性. 日本薬学会第 139 年会、3 月（千葉）

<その他>

- ・なし

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 循環病態治療学研究室
職・氏名 教授・林哲也

研究テーマ：

低酸素を基盤とした心筋リモデリング、肺高血圧症、Onco-cardiology に関する病態の遺伝子解析及びこれらアンメットメディカルニーズに対する治療戦略のリーサーチ研究

研究期間：

平成 31 年 4 月 1 日 ～ 令和 2 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

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

<共同研究機関>

研究代表者	橋本 武志	(医療法人 医進会 高石加茂病院・理事長)
研究分担者	泉 康雄	(医療法人 医進会 高石加茂病院・院長)

研究目的：①慢性心不全の1次予防に対する治療戦略を開発すること

②急性心不全の2次予防、3次予防に対する治療戦略を開発すること

③Onco-cardiology すなわち抗がん薬投与における①②に対する治療戦略を開発すること

④肺高血圧症の治療戦略を開発すること

本年度の研究内容および研究成果：

①②心不全患者および肺高血圧症患者では、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の活性化および血漿中 aldosterone (Ald) 濃度の上昇が報告されている。本研究では Ald に着目し、Sugen-Hypoxia 肺高血圧モデルラットを用いて、心筋リモデリングと Ald との関連性について検討を行った。本年度は特に、心筋でのミネラルコルチコイド受容体 (MR) およびミトコンドリアで Ald 生成の際に必要なコレステロール輸送体である steroidogenic acute regulatory protein (StAR) 発現量について検討を行った。また、心筋リモデリングに対する MR 阻害剤 spironolactone (SPL) の影響についても検討を行った。その結果、SU-Hypoxia 群において心筋リモデリングが惹起され、StAR および MR の発現が有意に増加した (Figs. 1 and 2)。これらの変化は、SPL 投与より有意な減少が認められた (Figs. 1 and 2)。これら結果から、心筋リモデリングの進展には、MR および StAR を介した経路が関与していることが考えられる。

SPL 投与より心筋におけるアルドステロン誘発 ERK1/2 および c-Jun N-terminal kinase（JNK）が減少し、心不全の進行が抑制されることが報告されている。また、ラット心筋でのタンパクおよび mRNA 発現量の測定結果から、SU-Hypoxia 群において ERK1/2 および JNK の活性化が認められ、SPL 投与によりそれら発現量の減少が認められたことから、心筋リモデリングが MR-ERK/JNK を介しており、SPL がそれらシグナルを抑制したと考えられる。

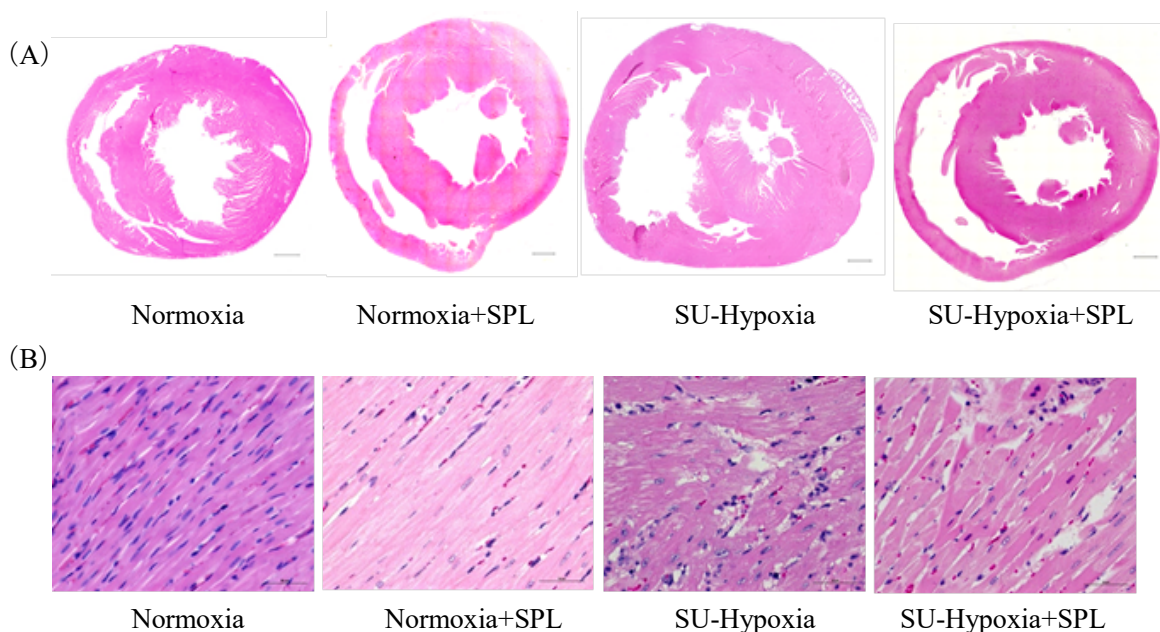


Fig. 1 心臓断面および光学顕微鏡所見
SPL, spironolactone; SU, sugen5416.

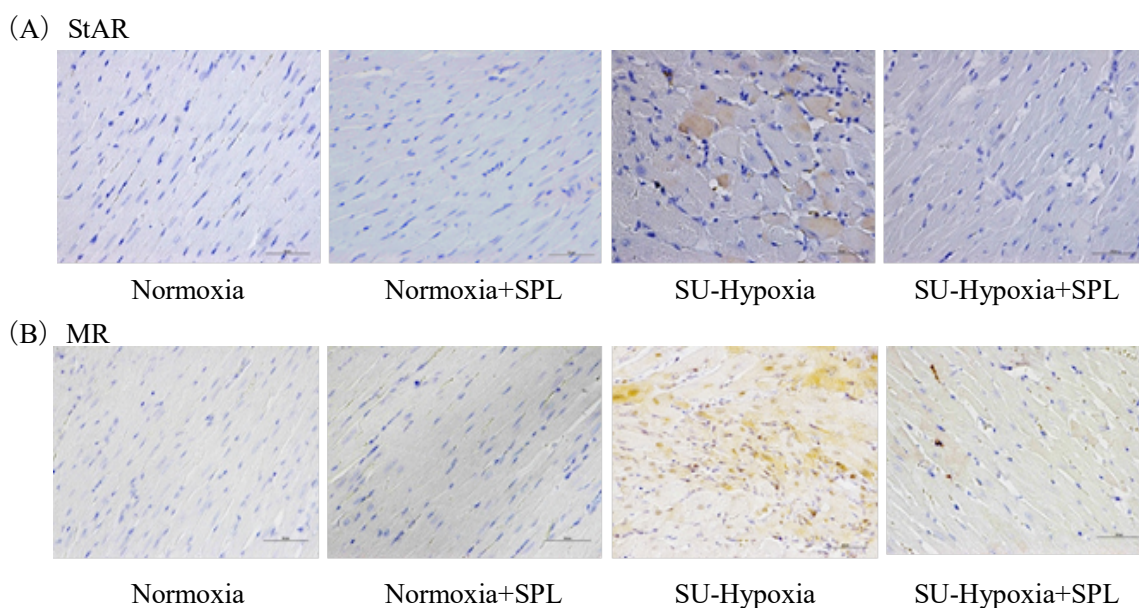


Fig. 2 心筋における StAR および MR 発現
SPL, spironolactone; SU, sugen5416.

③④Sugen-Hypoxia 肺高血圧モデルラット作成に用いている sugen5416 は VEGFR2 拮抗薬（分子標的薬）である。近年、VEGFR 拮抗薬などの分子標的薬の登場により、心不全、肺高血圧症（PAH）、血栓塞栓症などの心血管障害が新たな問題として浮上し、腫瘍循環器学（onco-cardiology）が注目されている。本モデルにおいても心血管障害が認められているが、肺動脈叢状病変および右室機能の低下に対する SPL の改善作用が確認された。今後、抗がん剤による心血管障害に対する新たな治療戦略となる可能性が示唆された。

成果発表：

<原著論文>

- ・Nakagawa T, Furukawa Y, Hayashi Tetsuya, Nomura A, Yokoe S, Moriwaki K, Kato R, Ijiri Y, Yamaguchi T, Izumi Y, Yoshiyama M, Asahi M. Augmented O-GlcNAcylation attenuates intermittent hypoxia-induced cardiac remodeling through the suppression of NFAT and NF- κ B activities in mice. *Hypertens Res* 42, 1858-1871, 2019.

<学会発表>

- ・Hayashi T, Kato R, Imano H, Ijiri Y, Nomura A, Asahi M, Wu H, Nakano T, Yamaguchi T, Izumi Y, Yoshiyama M, Ohta-Ogo K, Ishibashi-Ueda H. Mineralocorticoid-receptor antagonists regulate mitochondrial dynamics and local aldosterone production attenuating right ventricular remodeling in pulmonary arterial hypertension. *American Heart Association Scientific Sessions 2019*, 2019 年 11 月（Philadelphia, USA）
- ・Yamamoto Y, Kanesaki K, Ogata T, Matsumoto S, Hosokawa A, Yamamoto K, Nomura A, Woo E, Imano H, Kato R, Ijiri Y, Yamaguchi T, Izumi Y, Yoshiyama M, Okada Y, Asahi M, Hayashi T. Role of cardiac steroidogenic acute regulatory protein in pulmonary arterial hypertension: a novel treatment with antagonists of mineralocorticoid receptors and anticoagulants. 第 83 回 日本循環器学会学術集会、3 月（横浜）
- ・佐々木咲輝、兼崎絢汰、向井正幸、入谷純奈、玉田愛美、丸山明莉、橋本朱里、鎌江春華、甲田和男、末澤勇人、加藤隆児、井尻好雄、葭山稔、林哲也. VEGF 受容体阻害薬 semaxanib が持続低酸素負荷時に誘発する cardiac remodeling と spironolactone の心保護効果. 第 40 回日本循環制御医学会総会、6 月（長野）
- ・末澤勇人、兼崎絢汰、入谷純奈、甲田和男、田村麻起、榎田倫子、岡田悠佑、泉春菜、岩田のぞ実、矢澤風香、藤本愛、加藤隆児、井尻好雄、林哲也. Semaxanib 投与低酸素負荷ラットにおける VEGF 発現量の変動と心筋リモデリング. 第 40 回日本循環制御医学会総会、6 月（長野）
- ・Kanesaki K, Nomura A, Imano H, Kato R, Ijiri Y, Woo E, Yamaguchi T, Izumi Y, Ogo K, Ueda H, Katsumata T, Yoshiyama M, Asahi M, Hayashi T. Mineralocorticoid-receptor antagonists attenuates right ventricular remodeling in pulmonary arterial hypertension through regulating mitochondrial dynamics and local aldosterone production. 第 42 回日本高血圧学会総会、10 月（東京）

- ・ Yamaguchi Y, Kanasaki K, Kato R, Imano H, Ijiri Y, Nomura A, Asahi M, Wu H, Nakano T, Yamaguchi T, Izumi Y, Yoshiyama M, Ohta-Ogo K, Ishibashi-Ueda H, Hayashi T. Effects of mineralocorticoid-receptor antagonists on right ventricular remodeling in pulmonary arterial hypertension. 第23回日本心不全学会学術集会、10月（広島）

<その他>

- ・ なし

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 循環病態治療学研究室
職・氏名 教授・林哲也

研究テーマ：

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：

平成31年 4月 1日 ～ 令和 2年 3月 31日

研究担当者：

＜本学＞

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

＜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：

従来、特異体質性薬物反応（IDRs, idiosyncratic drug reactions）の機序として、薬物あるいはその反応性代謝物がタンパク質などに結合し、hapten となることで発症すると考えられて来た（hapten hypotheses）。しかし、動物実験レベルでは hapten が確認されても IDRs は起こらないことが多く、その他の因子が関わっていると考えられていた。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、アセトアミノフェンおよびカルバマゼピン誘発肝障害について検討を行った。アセトアミノフェンは、約10%程度が薬物代謝酵素 cytochrome P450（CYP）2E1 で代謝され、反応性代謝物である N-acetyl-p-benzoquinone imine（NAPQI）が産生される。従来、この NAPQI がミトコンドリア障害を起こすことで中毒性肝障害を発症することが知られているが、近年、NAPQI が原因で danger signal が放出され、特異体質性肝障害を発症する可能性が示唆されている。本発症機序については不明な点が多く、明らかになっていないため検討を行った。

本研究では、ヒト肝細胞として FLC-4 細胞、抗原提示細胞として分化誘導を行った THP-1 細胞を用いた。また、抗原提示細胞が活性化されるとインフラマソーム反応が活性化されることが報告されている。インフラマソーム反応活性化により caspase-1 が活性化され、IL-1 β が細胞外に放出されることから、抗原提示細胞の活性化の評価として caspase-1 活性および培養液中 IL-1 β 濃度とした。アセトアミノフェンを FLC-4 細胞に添加し 1 週間培養を行った後、その培養液上清を THP-1 細胞に添加すると、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)。CYP 阻害剤である 1-aminobenzotriazole (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、NAPQI が原因となり、danger signal である danger associated molecular patterns (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。また、肝細胞の培養液中に放出された DAMPs の探索を行った。DAMPs として報告されている物質には様々なものがあるが、代表的なものとして heat shock protein (HSP) や high mobility group box 1 (HMGB1)、核酸などがある。今回は培養上清中 DNA および RNA 量の増加が認められたことから、これら核酸が原因と考えられた。以上の結果から、アセトアミノフェン誘発肝障害時には、特異体質性の反応が起こっていることが明らかとなった。アセトアミノフェン誘発肝障害発症時には NAPQI 補足の目的で N-acetylcysteine の投与が行われているが、そのほかに immune related adverse event (irAE) のガイドラインにあるステロイド投与が有効であると考えられた。

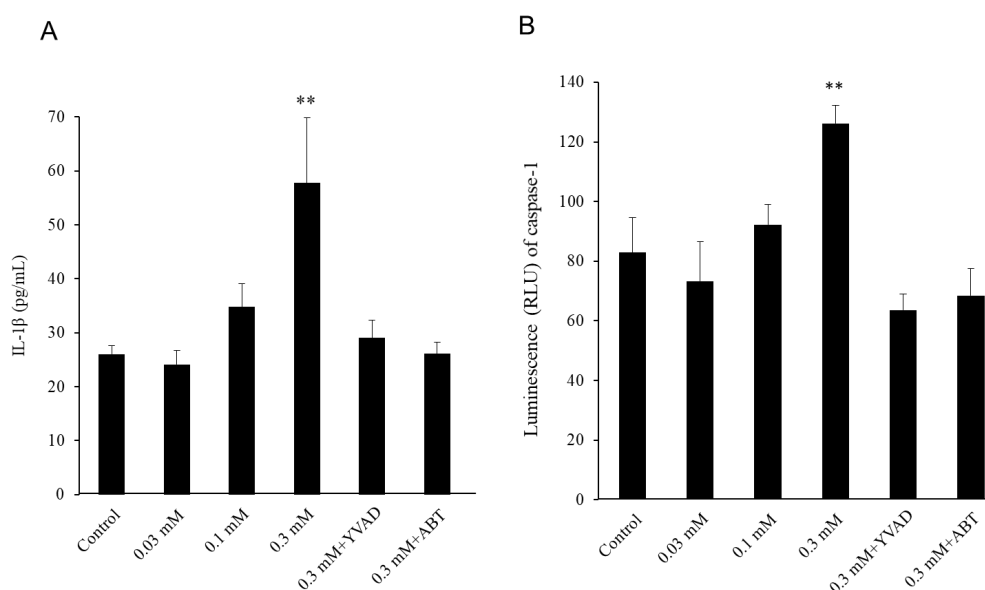


Fig. 1 Incubation of THP-1 cells with the supernatant from hepatocytes incubated with acetaminophen (APAP) lead to release of IL-1 β and increase in caspase-1 activity. (A) Levels of IL-1 β secreted by THP-1-derived macrophages incubated for 24 h with the supernatant from an incubation of hepatocytes with APAP for 7 days, with and without, a cytochromes P450 inhibitor (1-aminobenzotriazole, ABT) or a caspase-1 inhibitor (Ac-YVAD-cmk, YVAD). (B) Caspase-1 activity of THP-1-derived macrophages in response to incubation for 24 h with the supernatant from incubation of hepatocytes with APAP, with or without ABT or YVAD. Statistical significance was determined using the one-way ANOVA, where **, $p < 0.01$ vs Control ($n=3-5$).

一方、カルバマゼピン誘発肝障害は特異体質性機序で発症することが報告されているが、その詳細は不明である。カルバマゼピンは肝臓で薬物代謝酵素 CYP3A により代謝され、主代謝物である 10,11-epoxide の他、2-hydroxyiminostilbene が産生される。2-hydroxyiminostilbene は酸化還元反応により反応性に富んだ iminoquinone に変換されることが報告されている。この iminoquinone が細胞ストレスとなり、肝細胞から danger signal を放出させることが考えられるが、現在までに

2-hydroxyiminostilbene が原因となる発症機序は報告されていない。そこで、今回 2-hydroxyiminostilbene に着目して、カルバマゼピン誘発肝障害の発症機序の検討を行った。

FLC-4 細胞にカルバマゼピンを添加して、1 週間培養を行った後、培養液上清を抗原提示細胞に加えたところ、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）。CYP 阻害剤 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、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。

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、HSP60 の産生量が増加していることが確認された。肝細胞の培養上清に HSP60 の抗体をあらかじめ添加したものを THP-1 細胞に添加したところ、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、HSP60 が DAMPs として放出され THP-1 の活性化を引き起こしたと考えられた。また、THP-1 細胞に直接 2-hydroxyiminostilbene を添加したところ、インフラマソーム反応の活性化が認められたことから、代謝物が直接 THP-1 細胞を活性化することも示唆された（Fig. 2）。

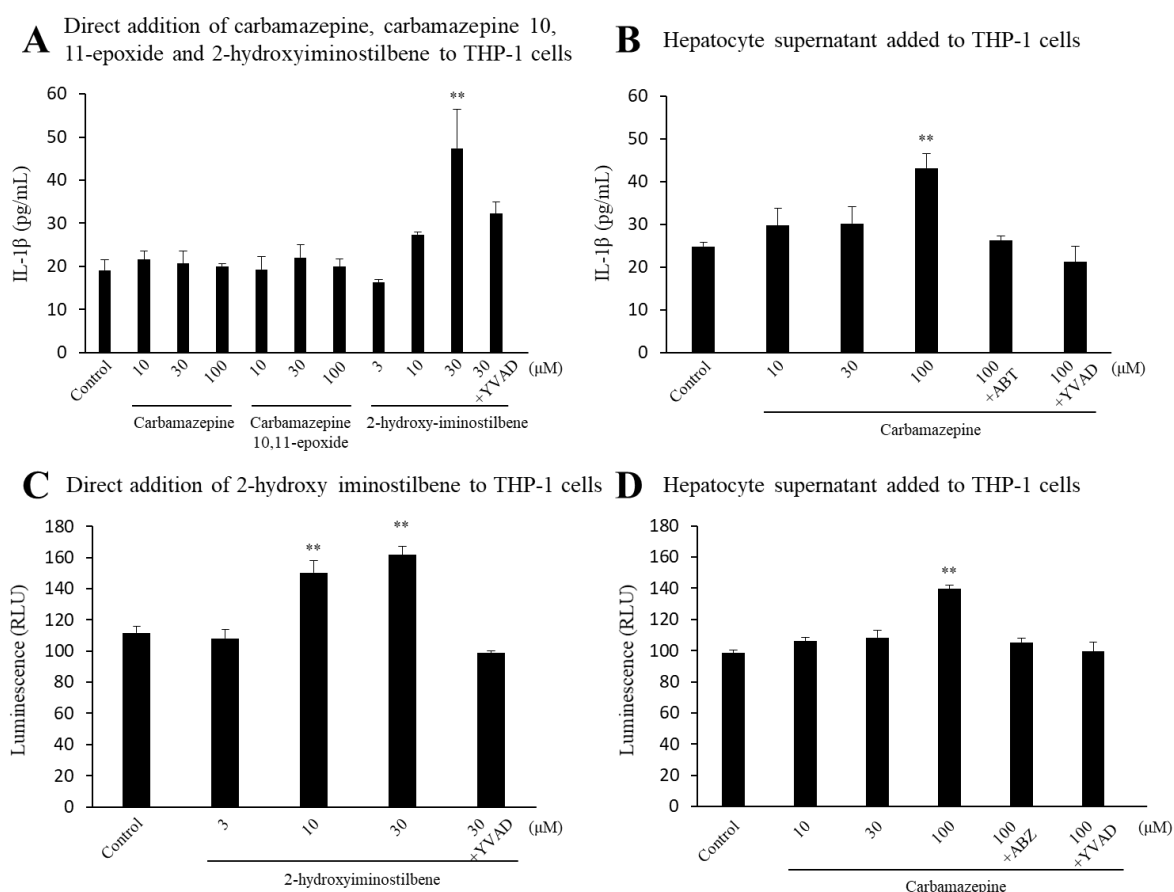


Fig. 2 Incubation of THP-1 cells with 2-hydroxyiminostilbene or the supernatant from the incubation of hepatocytes with carbamazepine led to release of IL-1 β and an increase in caspase-1 activity. (A) Levels of IL-1 β secreted by THP-1-derived macrophages in response to 24 h of treatment with carbamazepine, carbamazepine 10,11-epoxide and 2-hydroxyiminostilbene itself, or (B) IL-1 β produced by incubation of THP-1-derived macrophages in response to the supernatant from an incubation of hepatocytes with carbamazepine for 7 days, with or without a cytochrome P450 inhibitor, 1-aminobenzotriazole (ABT) or a caspase-1 inhibitor, Ac-YVAD-CHO (YVAD). (C) Caspase-1 activity of THP-1-derived macrophages in response to incubation for 24 h with 2-hydroxyiminostilbene itself or (D) the supernatant from incubation of hepatocytes with carbamazepine, with or without YVAD. Statistical significance was determined using the one-way ANOVA. $P < 0.05$ was considered significant (** $P < 0.01$, $n=3-5$).

以上、アセトアミノフェンおよびカルバマゼピン誘発肝障害の発症機序に代謝物が原因となり、抗原提示細胞の活性化、肝障害では特に **Kupffer** 細胞が活性化することで発症することが示唆された。アセトアミノフェンおよびカルバマゼピン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, Hayashi T, Uetrecht J. The 2-Hydroxyiminostilbene Metabolite of Carbamazepine or the Supernatant from Incubation of Hepatocytes with Carbamazepine Activates Inflammasomes: Implications for Carbamazepine-Induced Hypersensitivity Reactions. *Drug Metab Dispos* 47, 1093-1096, 2019.

<学会発表>

- ・西澤峻，山本栞，小林岳広，小柳津亨，林実花，加藤隆児，山本浩二郎，大里恭章，井尻好雄，瓜生恭章，原田博雅，林哲也．血中 Acetaminophen（APAP）-グルクロン酸体濃度/APAP 比率モニタリングに関する臨床研究報告．第 36 回日本 TDM 学会・学術大会、5 月（東京）
- ・加藤隆児，井尻好雄，林哲也，Jack Uetrecht. Acetaminophen 誘発肝障害における免疫担当細胞のシグナル応答．第 46 回 日本毒性学会学術年会、6 月（徳島）
- ・加藤隆児，井尻好雄，Jack Uetrecht，林哲也．中毒性アセトアミノフェン誘発肝障害は臨床上免疫性に進行し増悪する．第 40 回日本臨床薬理学会学術総会、12 月（東京）

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：

平成 31 年 4 月 1 日 ～ 令和 2 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・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、IutB に着目し、その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：

V. vulnificus M2799 株の *iutB* 遺伝子を pET21b(+) に連結して大腸菌 BL21(DE3)pLysS 株に導入し、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 IutB を用いて酵素活性を測定した。鉄(III)還元酵素は NADH、NADPH または還元型グルタチオン(GSH)を電子供与体とし、 Fe^{3+} を電子受容体とする還元反応を触媒する。そこで、鉄キレート化合物として鉄(III)ニトリロ三酢酸(FeNTA)を用いて補酵素要求性について検討した。その結果、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 100 μM GSH および 100 μM NADPH 存在下において最も高い比活性(14.24 ± 0.11 nmol/min/mg protein)を示した (図 1)。

次に、鉄キレート化合物群に対する鉄還元活性を測定した結果、IutB は鉄キレート化合物の FeNTA をはじめとし、Fe-citrate および FeEDTA に対して、さらには FeCl_3 にも鉄(III)還元活性を示した (図 2)。また、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、IutB は Fe^{3+} -aerobactin 錯体、 Fe^{3+} -vulnibactin 錯体 Fe^{3+} -deferoxamine 錯体および Fe^{3+} -vibriobactin 錯体に対して鉄(III)還元活性を示した (図 3)。

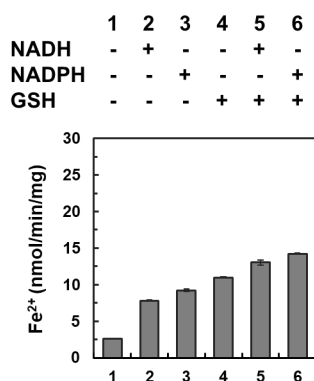


図1. IutBの補酵素依存性

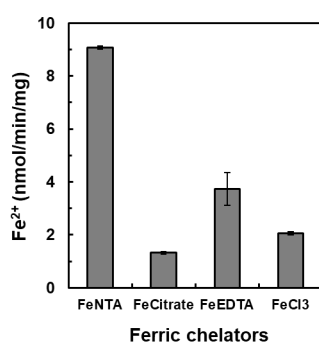


図2. IutBの鉄(III)キレート化合物に対する反応

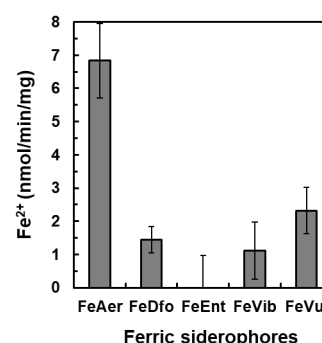


図3. IutBのシデロフォア-鉄(III)錯体に対する反応

成果発表：

<原著論文>

- なし

<学会発表>

- 岡井直子、宮本勝城、土屋孝弘、田邊知孝、舟橋達也、辻坊 裕.
Vibrio vulnificus M2799 株の鉄還元酵素 VuuB の諸性質.
日本薬学会第 139 年会 千葉 (2019 年 3 月).
- 桑原寿奈、西脇広裕、森垣柁哉、佐伯龍斗、土屋孝弘、宮本勝城、辻坊 裕.
Vibrio vulnificus の致死性毒素 RtxA1 毒素の解析.
第 92 回日本細菌学会総会、札幌 (2019 年 4 月).
- 谷口菜優、中村光希、蓮井良美、丸山奈緒子、土屋孝弘、宮本勝城、良原栄策、辻坊 裕.
Bam 複合体を標的とした多剤耐性アシネトバクターに対する新規抗菌物質の開発.
第 92 回日本細菌学会総会、札幌 (2019 年 4 月).
- 土屋孝弘、谷口菜優、中村光希、蓮井良美、丸山奈緒子、宮本勝城、良原栄策、駒野 淳.

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.
第31回微生物シンポジウム 京都 (2019年8月).

<その他>

- ・ なし

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：

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 31 年 4 月 1 日 ～ 令和 2 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・講師 ）

＜共同研究期間＞

研究代表者 小島直也 （東海大学・工学部・教授 ）

研究分担者 良原栄策 （東海大学・工学部・客員准教授 ）

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ルム形成に必須であるため、創薬のターゲットとして注目されている。これらの外膜タンパク質のフォールディングや外膜への挿入には β -barrel assembly machinery (Bam) 複合体が重要な役割を担っている。Bam 複合体は BamA, B, C, D および E から構成されており、BamA と BamB および BamD が直接結合している。我々はこの結合を阻害するペプチドを創製し、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バイオフィーム形成能と感染モデルマウスの治療効果を測定した。BamA と BamD の結合阻害物質である K7FI2 は 5 μ M で ATCC19606 株のバイオフィーム形成の減少傾向が認められ、Ab10659 株に対してはバイオフィーム形成を有意に抑制した（図 1）。

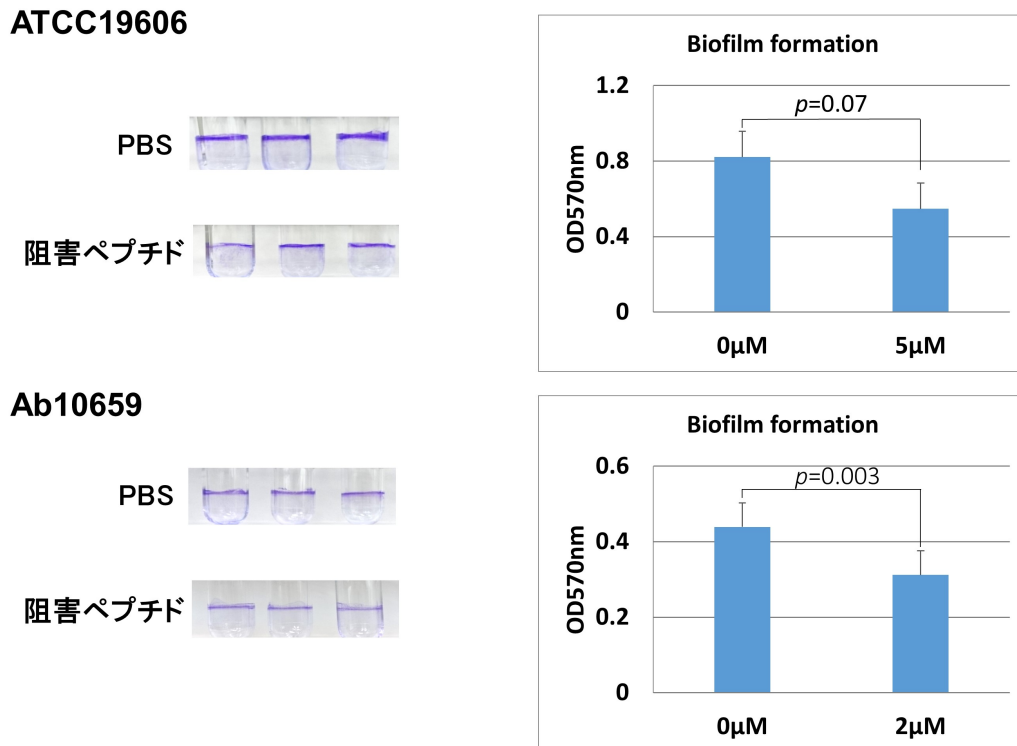


図 1. バイオフィーム形成抑制能の評価

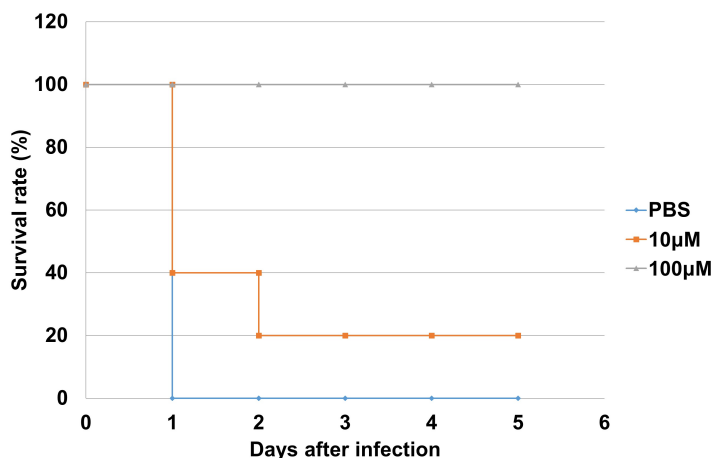


図 2. 感染モデルマウスへの治療効果

これらの結果より、K7FI2 は多剤耐性株のバイオフィーム形成能を抑制し、さらには感染モデル

次に 250 μ g の抗 Gr-1 抗体を C57BL/6 マウスの腹腔内に投与することにより好中球減少マウスを作製し、24 時間後に Ab10659 株 (2×10^9 CFU) を腹腔内感染させた後、K7FI2 を腹腔内に投与し経口的に生存率を測定した（図 2）。

その結果、10 μ M 投与群では生存率が 20%であり、100 μ M 投与群ではすべてのマウスが生存した。

マウスへの治療効果が認められたことから、Bam 複合体の形成阻害物質は本菌に対する新規抗菌物質として非常に有用であることが明らかとなった。

成果発表：

<原著論文>

- ・なし

<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。

谷口菜優，中村光希，蓮井良美，丸山奈緒子，土屋孝弘，宮本勝城，良原栄策，辻坊 裕
2019 年 4 月

- ・ 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。

土屋孝弘，谷口菜優，中村光希，蓮井良美，丸山奈緒子，宮本勝城，良原栄策，駒野 淳
2019 年 8 月

<その他>

- ・なし

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30年4月1日 ～ 令和2年3月31日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 友尾 幸司（大阪薬科大学・薬学部・准教授）

研究分担者 尹 康子（大阪薬科大学・薬学部・准教授）

<共同研究期間>

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、神経細胞の骨組みを作り細胞内の物質輸送を担う微小管に結合し、そ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、異常にリン酸化された tau が微小管への結合を抑制され、それに伴って異常自己重合を起こし、PHF(paired helical filament)と呼ばれる特異な不溶性線維の束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し、アルツハイマー型認知症の病理学的変化を特徴づける病理構造物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、Tau 特異的認識抗体の Fab 領域と VQIINK ペプチドとの複合体の構造解析を行い、Fab 抗体のペプチド認識能について幾つかの構造化学的知見を得た。本年度は、より詳細な認識機構を明らかにするために、幾つかの VQIINK 類似ペプチドと Fab 抗体の相互作用解析、および Fab 単独の結晶化及びその構造解析に取り組んだ。

①Tau 特異的認識 Fab 抗体の抗原認識機構の解明

Tau 特異的認識 Fab 抗体 (Fab2r3) と VQIINK ペプチドとの複合体構造から、Fab2r3 と多くの水素結合を形成していた VQIINK 配列中の Gln、Lys 残基の複合体形成における役割を明らかにするため、両アミノ酸残基を Ala に変換した VAIINK および VQIINA ペプチドを用いて、等温滴定カロリーメトリー法 (ITC) による Fab2r3 との相互作用解析を行った。その結果、両変異ペプチドは大きく結合能を失うことが明らかとなり、Gln と Lys の両残基の影響に差が無い事分かった。

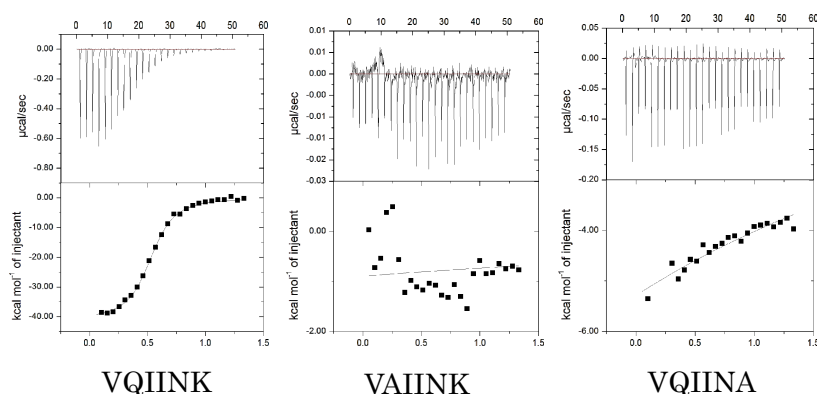


Fig.1 Fab2r3 と VQIINK ペプチドとの ITC 測定

②Fab2r3 単独の結晶化とその構造解析

Fab2r3 の単独結晶の作成は、Fab2r3-VQIINK ペプチドとの複合体結晶の結晶化条件を参考に条件検索を行った。その結果、Fab 濃度、buffer の pH およびグリセロール濃度を变化させた条件で右図に示す結晶を得る事に成功した。

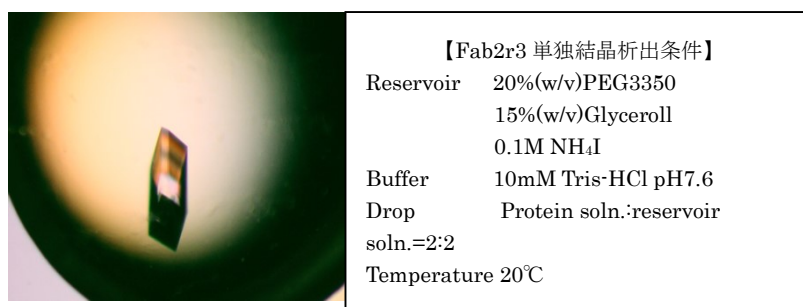


Fig.2 Fab2r3 単独結晶と結晶化条件

成果発表：

<原著論文>

- ・なし

<学会発表>

- ・ 槌田智裕、土屋孝弘、尹 康子、箕浦克彦、谷口泰造、友尾幸司
アルツハイマー型認知症関連タンパク質 Tau の特異的認識抗体による、Tau 自己重合阻害機構の解明
第 69 回 日本薬学会 関西支部総会（2019 年 10 月）
- ・ 槌田智裕、土屋孝弘、尹 康子、箕浦克彦、谷口泰造、友尾幸司
Tau 認識抗体による Tau 重合阻害機構解析
第 38 回 日本認知症学会（2019 年 11 月）
- ・ 槌田智裕、土屋孝弘、尹 康子、箕浦克彦、谷口泰造、友尾幸司
アルツハイマー型認知症関連 Tau タンパク質の特異的認識抗体による、Tau 重合阻害機構の解明
第 140 回 日本薬学会年会（2020 年 3 月）

<その他>

- ・なし