

大阪薬科大学
共同研究成果報告書

2020

(2020年4月～2021年3月)

共同研究課題名 (研究テーマ)

ホウ素中性子捕捉療法に用いる新規ホウ素薬剤の開発	- 3 -
疾患モデル動物を用いたてんかん病態、薬理研究.....	- 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.....	- 11 -
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	- 14 -
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.....	- 17 -
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	- 20 -
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	- 23 -
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.....	- 26 -
特異体質性薬物反応のメカニズムに関する研究	- 30 -
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.....	- 33 -
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	- 39 -
核内受容体モジュレーターによる脂質代謝調節	- 42 -
<i>Vibrio vulnificus</i> M2799 株の鉄獲得機構の解明	- 45 -
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.....	- 48 -
医薬品の誘導体に対する分子鋳型ポリマーの調製と応用.....	- 50 -
アルツハイマー病治療を目指す基質結合機構の解明.....	- 53 -
ABC トランスポーター発現制御機構の解析研究.....	- 55 -

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：

ホウ素中性子捕捉療法に用いる新規ホウ素薬剤の開発

研究期間：

令和 2 年 4 月 1 日 ～ 令和 3 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 近藤 直哉 (大阪薬科大学・薬学部・助教)

<共同研究機関>

研究代表者 切畑 光統 (大阪府立大学・研究推進機構・特認教授)

研究分担者 中瀬 生彦 (大阪府立大学・理学系研究科・教授)

研究分担者 服部 能英 (大阪府立大学・研究推進機構・特認講師)

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 ^{10}B -ホウ素原子が熱中性子線と核反応を起こし、発生する飛程の短い α 線および Li 原子核等によって腫瘍細胞のみを殺傷する高効率ながん治療法である。近年、BNCT 用の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、腫瘍細胞内のみに 30 ppm 以上の ^{10}B -ホウ素原子を集積させる必要があり、 ^{10}B -ホウ素原子を送達させるための薬剤 (ホウ素薬剤) の開発は、BNCT の成否を決める最重要な要素技術となっている。しかしながら、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。

以上の背景より、本共同研究では、BNCT のための新規ホウ素薬剤の開発を行う。特に、現状の BNCT において、治療効果が減弱される腫瘍内低酸素への高効率なホウ素送達を目的とした新規ホウ素薬剤の設計・合成を進める。同時に BNCT の殺細胞効果はホウ素の細胞内局在に強く依存することから、有効な BNCT 用薬剤を効率的に開発するには、ホウ素の細胞内局在を定量的に可視化可能な方法の確立が必要となる。したがって、この目的での使用を目指した新規ボロン酸検出用蛍光センサーの開発を併せて行う。

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 腫瘍内低酸素標的新規ホウ素薬剤の設計・合成に関する検討

腫瘍内低酸素領域への集積性を有するイメージング用薬剤 ^{18}F -fluoromisonidazole (^{18}F -FMISO) の構造を参考に、低酸素領域の認識について必須構造であるニトロイミダゾール骨格、及びホウ素導入構造を併せ持つ化合物を腫瘍内低酸素標的ホウ素薬剤の基本構造として設計した。そのうち、ニトロイミダゾール骨格とホウ素導入構造をアミド結合により結合した 2 種の化合物 (ES-1, ES-2) について、アゾマイシンを原料として、数段階の反応により合成した。ES-1, ES-2 について基礎的な評価を行ったところ、両者の水溶性は、低値 ($< 1 \text{ g/L}$) を示した。高用量の薬剤投与が必要となる BNCT においては、ホウ素薬剤の水溶性は重要なパラメータとなるため、より高い水溶性を示すホウ素薬剤設計が肝要であることが示唆された。そこで、ニトロイミダゾール骨格とホウ素導入構造を結合させるリンカー部位に、より水溶性の高いトリアゾール構造を採用したホウ素薬剤誘導体を新たに設計し、複数の誘導体の合成に成功した。現在、この化合物群について、ホウ素薬剤としての有効性評価を進めている。

② 新規ボロン酸検出用蛍光センサーの開発

これまでに、*o*-iminophenol 骨格からなるボロン酸検出用蛍光センサー DAHMI が報告され、BNCT 用薬剤の細胞内局在の評価に利用されている。しかしながら、DAHMI は、ストークスシフトが小さく、量子収率が低い点に問題点を有している。そこで本共同研究では、大きなストークスシフトと細胞膜透過性を示す亜鉛蛍光センサーをリード化合物とした 2-(2-pyridyl)phenol 誘導体 (MB-1) を設計・合成し、ボロン酸検出用蛍光センサーとしての性質について基礎的な評価を実施した。MB-1 は、既報の合成法を参考に、4 段階の反応により総収率 2.5% で合成した。MB-1 について各種溶媒中における吸収・励起・蛍光極大波長を調べた。DMSO-PBS (1:1) 中で MB-1 (終濃度 1 mM) に Phenylboronic acid (Ph-B) (終濃度 0~1 mM) を加え、励起波長 388 nm での 443 nm の蛍光強度を経時的に測定した。また、Ph-B 添加後の絶対量子収率の測定を行った。

その結果、Ph-B 添加後の MB-1 の励起・蛍光極大波長はそれぞれ 388 nm、443 nm となり、DAHMI のストークスシフトと比較して 2 倍以上の拡大を認めた。MB-1 は Ph-B 添加後に 443 nm における蛍光強度に上昇を認め、その上昇率は Ph-B 添加濃度と高い相関を示した。Ph-B 添加後の MB-1 と DAHMI の絶対量子収率は、それぞれ 0.9%、0.8% であった。また、Ph-B 添加後蛍光強度がプラトーに達するのに、DAHMI の場合は 100 分以上を要した一方で、MB-1 の場合は 5 分以内と速やかな蛍光強度上昇を認めた。以上より、本研究により開発した MB-1 は、現在利用される DHAMI と比較して、大きなストークスシフト、高い絶対量子収率を有し、かつ速やかな反応性を示すことから、有効なボロン酸検出用蛍光センサーとなり得る可能性が示された。

成果発表：

<原著論文>

なし

<学会発表>

・ボロン酸検出用蛍光センサーの開発を目的とした 2-(2-pyridyl)phenol 誘導体の合成及び評価、
高田慎也、近藤直哉、萩森政頼、天満 敬、日本薬学会第 141 年会、2021 年 3 月 28 日

<その他>

なし

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 薬品作用解析学研究室
職・氏名 教授・大野 行弘

研究テーマ：

疾患モデル動物を用いたてんかん病態、薬理研究

研究期間：

平成 27 年 10 月 1 日 ～ 令和 3 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：

内向き整流性 K⁺チャネル Kir4.1 は、アストロサイトの空間的 K⁺緩衝機構を仲介しており、細胞外の 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。また、てんかん発作を主徴とする EAST 症候群や SeSAME 症候群の主な原因候補として Kir4.1 をコードする *KCNJ10* 遺伝子の機能欠失変異が知られていることや、抗てんかん薬の反復投与により脳内 Kir4.1 発現が増加することから、てんかんの発症および治療に Kir4.1 が深く関与していることが示唆されている。

常染色体優性外側側頭葉てんかん (ADLTE) は、音刺激により誘発される発作 (聴覚原性発作) を特徴とするてんかんであり、その原因として *Lgi1* の遺伝子変異が知られている。これまでに、*Lgi1* は、AMPA 型グルタミン酸受容体や一部 K⁺チャネルの機能を調節していることが報告されているが、*Lgi1* を介したてんかん原性促進メカニズムについては未だ不明である。

本研究では、*Lgi1* の遺伝子変異によるてんかん原性獲得促進に、Kir4.1 が関与しているのかを明らかにする目的で、聴覚原性発作を示す ADLTE モデル動物 *Lgi1* 変異ラットの脳内 Kir4.1 発現解

析を行った。さらに、バルプロ酸の予防的投与が *Lgi1* 変異ラットのてんかん原性獲得機能に与える影響についても併せて評価した。

1. 音刺激により誘発されるけいれん行動の評価

16 日齢の動物にプライミング刺激 (120 dB、10 kHz、5 min) を行うことにより、8 週齢時のテスト刺激 (120 dB、10 kHz、1 min) で、wild-running や全身性のけいれん発作を誘発することが出来る。

本研究では、*Lgi1* 変異ラットと F344 ラット (野生型) をそれぞれ、音刺激なし群 (A 群)、テスト刺激のみ群 (B 群)、プライミング刺激のみ群 (C 群)、プライミング刺激およびテスト刺激群 (D 群) の 4 群に分けた (Figure 1)。

B 群と D 群について、テスト刺激後のけいれん行動を評価した結果、プライミング刺激を行っていない B 群では、*Lgi1* 変異ラット、F344 ラットともにけいれん行動は認められなかったが、プライミング刺激を行った D 群では、wild-running や全身性の強直間代性けいれん (GTCS) が誘発された。また、D 群の F344 ラットは全例 (8/8 匹) で wild-running を示したのに対し、D 群の *Lgi1* 変異ラットでは、8 匹のうち 7 匹で wild-running に続く GTCS が認められた (Table 1)。

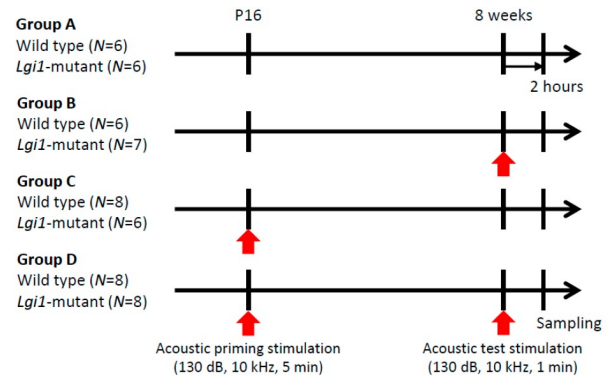


Figure 1. Audiogenic seizure induction.

Genotype	Acoustic Stimulation		Responses to Test Stimulation (No. of Animals)			
	Priming	Test	Total	None	WR	WR+ GTCS
Group B Wild type	-	+	6	6	0	0
Group B <i>Lgi1</i> -mutant	-	+	7	7	0	0
Group D Wild type	+	+	8	0	8	0
Group D <i>Lgi1</i> -mutant	+	+	8	0	1	7 (88%)

Table 1. The responses to acoustic test stimulation at eight weeks in wild-type rats and *Lgi1* mutant rats. WR: wild running; GTCS: generalized tonic-clonic seizure.

2. 音刺激によるてんかん原性獲得過程におけるアストロサイト Kir4.1 の発現解析

免疫組織染色には、テスト刺激の 2 時間後に各動物から摘出した脳を用いた。

はじめに、F344 ラットの冠状切片を用いて Kir4.1 と GFAP (アストロサイトマーカー) の蛍光二重染色を行い、Kir4.1 がアストロサイト特異的に発現していることを確認した (Figure 2A, top)。また、プライミング刺激を与えられた *Lgi1* 変異ラットでは、アストロサイトの Kir4.1 発現が低下していることが見受けられた (Figure 2A, bottom)。

GFAP および Kir4.1 発現数の計測は、ABC-DAB 染色法を用いて、Figure 2B に示す 19 部位について行った (Figure 2B, 2C)。

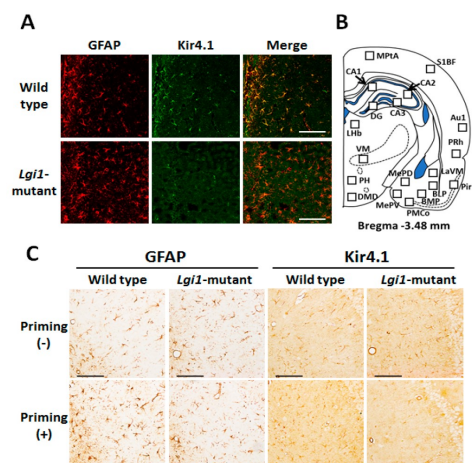
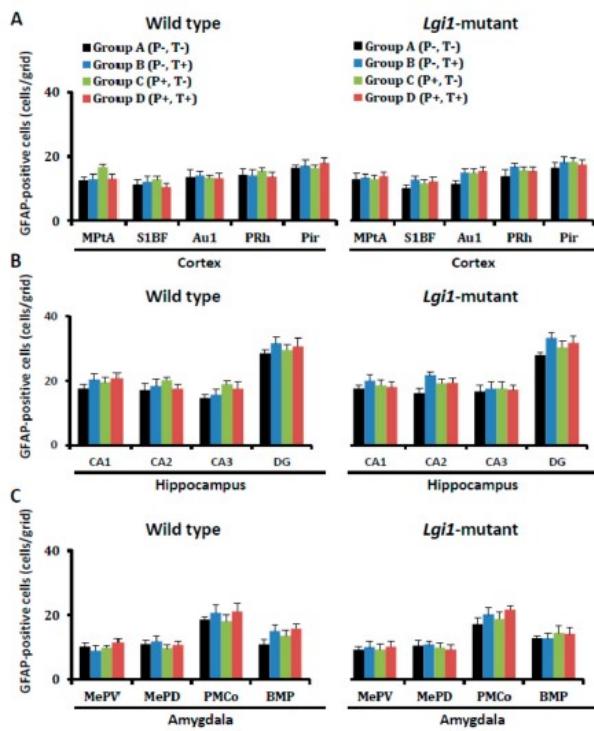


Figure 2. Kir4.1 expression in astrocytes.



その結果、F344 ラットでは、A-D のいずれの群においても、GFAP 発現、Kir4.1 発現、アストロサイトの発現数に対する Kir4.1 の発現数 (Kir4.1/GFAP) に変化はなかった (Figure 3-5, left)。一方、*Lgi1* 変異ラットでは、A-D の 4 群間で GFAP の発現変化は認められなかったが、Kir4.1 の発現数および Kir4.1/GFAP は、プライミング刺激を与えられなかった A 群あるいは B 群と比較して、プライミング刺激を与えられた C 群、D 群の大脳皮質領域、海馬領域、扁桃核領域で有意に低下していた (Figure 3-5, right)。また、*Lgi1* 変異ラットの C 群と D 群間で、Kir4.1 の発現数に差は認められず、テスト刺激は Kir4.1 発現に影響しないことが明らかになった (Figure 4, 5, right)。

Figure 3. Changes in the number of GFAP-immunoreactivity (IR)-positive cells after development of audiogenic epilepsy.

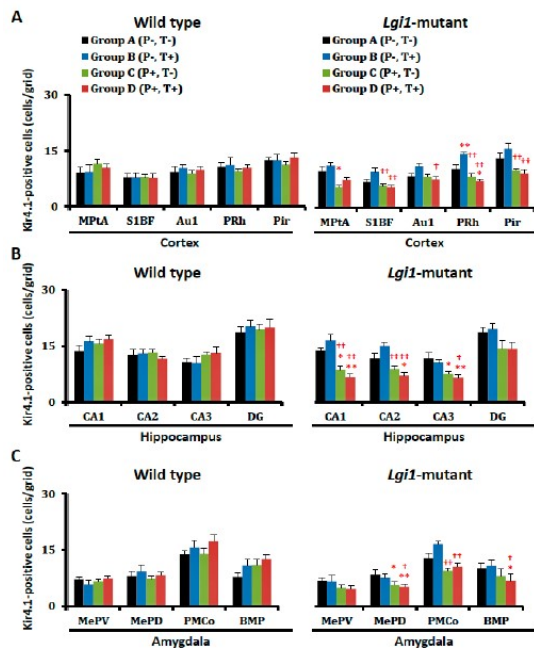


Figure 4. Changes in the number of Kir4.1-IR-positive cells after development of audiogenic epilepsy

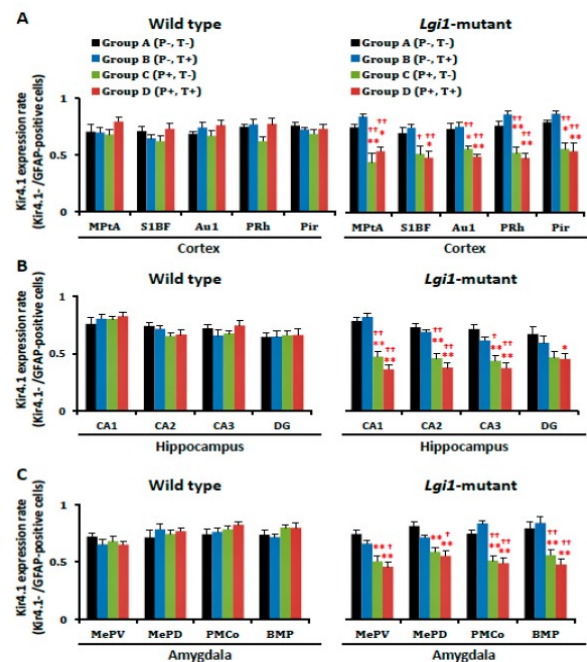


Figure 5. Changes in astrocytic Kir4.1 expression after the development of audiogenic epilepsy. The

3. *Lgi1* 変異ラットのけいれん感受性に対するバルプロ酸の予防的作用評価

バルプロ酸の予防的作用を評価する目的で、プライミング刺激の1日前（15日齢時）から14日間、バルプロ酸（30, 200 mg/kg, i.p.）あるいは生理食塩水の反復投与を行った（Figure 6）。

その結果、*Lgi1* 変異ラットのバルプロ酸投与群では、生理食塩水群と比較して、テスト刺激による GTCS 発現率が低下した（Table 2）。一方、F344 ラットでは、生理食塩水群、バルプロ酸投与群ともに GTCS を呈した動物はいなかった。

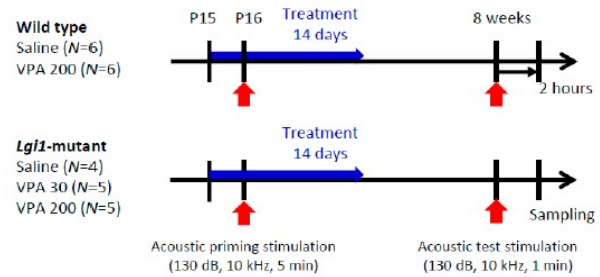


Figure 6. Prophylactic effects of valproic acid (VPA) on audiogenic seizure susceptibility.

Genotype	Drug (mg/kg)	Responses to Test Stimulation (No. of Animals)			
		Total	None	WR	WR + GTCS
Wild type	Saline	6	0	6	0
Wild type	VPA 200	6	0	4	0
<i>Lgi1</i> -mutant	Saline	4	0	1	3 (75%)
<i>Lgi1</i> -mutant	VPA 30	5	0	4	1 (20%)
<i>Lgi1</i> -mutant	VPA 200	5	0	4	1 (20%)

Table 2. The responses to acoustic test stimulation at eight weeks in wild-type rats and *Lgi1* mutant rats treated with VPA. WR: wild running; GTCS: generalized tonic-clonic seizure.

4. アストロサイト Kir4.1 発現に対するのバルプロ酸の作用評価

上述の免疫組織染色の結果と同様に、テスト刺激後の *Lgi1* 変異ラット（生理食塩水群）の大脳皮質、海馬、扁桃核領域においてアストロサイト Kir4.1 発現（Kir4.1/GFAP）の低下が認められ、バルプロ酸の反復投与はそれらアストロサイト Kir4.1 発現低下を有意に改善した（Figure 7A, 7B）。

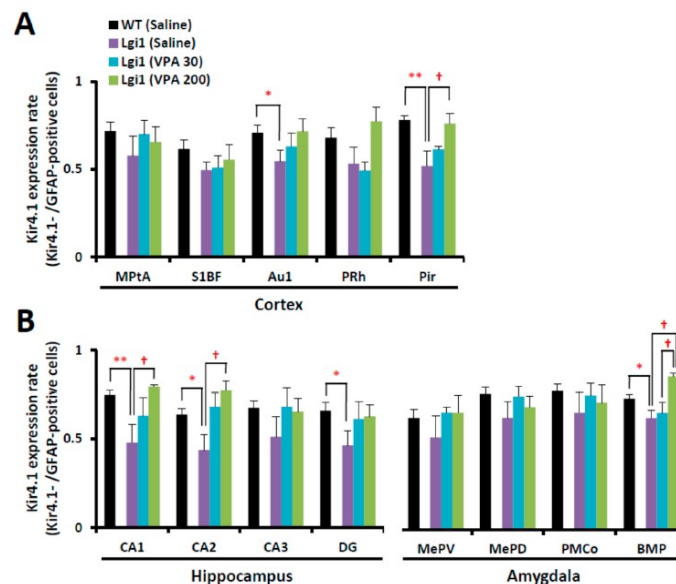


Figure 7. Expression changes in astrocytic Kir4.1 with treatment of valproic acid (VPA).

以上、本年度研究結果から、*Lgi1* 遺伝子変異による聴覚原性けいれんの感受性亢進には、アストロサイト Kir4.1 チャンネルの発現低下が関与していることが示唆された。さらに、バルプロ酸は、*Lgi1* 遺伝子変異によるてんかん原性獲得促進に対して予防効果を示すことが明らかになった。

成果発表：

<原著論文>

- M. Kinboshi, S. Shimizu, T. Mashimo, T. Serikawa, H. Ito, A. Ikeda, R. Takahashi, Y. Ohno: Down-regulation of astrocytic Kir4.1 channels during the audiogenic epileptogenesis in *Leucine-rich glioma-inactivated 1 (Lgi1)* mutant rats., *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 1013 (2019)

<総説>

- M. E. Frizzo, Y. Ohno: Perisynaptic astrocytes as a potential target for novel antidepressant drugs., *J. Pharmacol. Sci.*, 145, 60-68 (2021)
- M. Kinboshi, A. Ikeda, Y. Ohno: Role of astrocytic inwardly rectifying potassium (Kir) 4.1 channels in epileptogenesis., *Front. Neurol.*, 11, 626658 (2020)

<学会発表>

- 清水佐紀、古居薫、加藤綾、澤島愛加梨、池田昭夫、大野行弘：セロトニン神経系を介したアストロサイト内向き整流性Kir4.1チャネルの発現調節機構.，薬学会第140年会 2020/3月25-28日 誌上発表（京都）
- 久積博明、佐藤和明、國澤直史、金星匡人、松橋眞生、池田昭夫、清水佐紀、大野行弘：ピロカルピン誘発てんかんモデルラットにおける広域周波数脳波測定.，薬学会第140年会 2020/3月25-28日 誌上発表（京都）
- 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25-28日 誌上発表（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16-18日（横浜）誌上発表
- Saki Shimizu, Kaoru Furui, Aya Kato, Akari Sawashima, Akio Ikeda, Yukihiro Ohno: Serotonergic regulation of the inwardly rectifying potassium channel (Kir) 4.1 expression in mice astrocytes., 2020/3月16-18日（横浜）誌上発表
- 後藤昌広、梶川駿介、宇佐美清英、下竹昭寛、人見健文、山尾幸広、菊池隆幸、吉田和道、宮本享、松橋眞生、大野行弘、高橋良輔、池田昭夫：臨床てんかん患者で、細胞外K濃度の変動状態が発作発現に関与する可能性.，日本神経学会学術大会（2020）
- 國澤直史、久積博明、加藤将貴、清水佐紀、佐藤和明、金星匡人、松橋眞生、池田昭夫、芹川忠夫、大野行弘：Phf24欠損ラットのけいれん感受性亢進に関する薬理および脳波研究、第16回日本てんかん学会近畿地方会 2021/1/17（オンライン）

<その他>

- なし

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3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、シスプラチンなどの白金製剤に着目し、投与後の体内挙動によって生体内金属元素（バイオメタル）がどのような影響を受けるか検討してきた。その結果、白金製剤の投与によって一部のバイオメタルでは生体内分布が変化していることが推察された。しかしながら、患者の臨床背景による影響については不明な点も多い。ところで、がん化学療法では悪心・嘔吐などの副作用が現れることも多く、使用される薬剤の種類やレジメンによって制吐療法が平行して実施される。制吐療法が推奨される患者背景や評価方法については有効性の指標に関する情報は必ずしも十分でない。また、制吐療法によってはバイオメタルの変動に影響することも考えられる。

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

本年度の研究内容および研究成果：

本年度は、以下の項目について研究実施した。

① 生体内バイオメタル濃度測定のためのサンプル処理に関する検討

研究協力者とともに培養細胞を用い、培養条件の違いによるバイオメタルの変動解析を進めるための基礎的検討を行った。バイオメタルの測定には ICP-MS を用いているが、測定には対象物

質のイオン化が必須である。細胞培養液中にはナトリウムイオンや塩化物イオンを含め多くのイオンが含まれており、マトリックス効果によってバイオメタルのイオン化に影響を与え、測定結果が異なる可能性が考えられる。また、予備検討においてサンプルに含まれる成分組成が影響することを確認している。現在、種々の培養条件においてバイオメタルを測定し、マトリックス効果を定量的に評価しているところである。一方で、ICP-MS 測定サンプルには前処理として強酸による湿式灰化を行い、サンプルを完全に乾固させた上で、硝酸溶液による再溶解の上、測定してきた。当該方法には前処理にかかる時間が長いため、1日で処理できるサンプル数が少なく、効率的にバイオメタルを測定する上で問題となっていた。現在、マイクロ波処理による前処理装置（マイクロ波試料分解装置）を用いて検討を行う準備を進めており、サンプル測定のスループットの向上を目指して同装置を用いた分析方法のバリデーションを行い、効率的に研究を進めることを予定している。

② 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

ドセタキセル（DTX）は、非小細胞性肺癌の治療薬として単剤または分子標的薬との併用で幅広く使用されている。一方で、DTX の副作用として骨髄抑制が知られており、中でも好中球減少に伴う発熱性好中球減少症（FN）は重篤な感染症を引き起こし、患者の生命に関わる可能性があることから用量規定因子となっている。このため、DTX 使用時における FN の予防と対策は極めて重要となるが、その発現リスク因子に関する情報は十分ではない。そこで、進行再発非小細胞肺癌に対する DTX（60 mg/m²）単剤またはベバシズマブとの併用投与を行った患者 81 名を対象として FN の発現状況ならびに臨床検査値等のデータについて後ろ向きに調査したところ、対象患者のうち 18 名（22%）で FN が認められた。また、患者背景のうち、単変量解析の結果が有意であった因子について多変量解析を行ったところ、Performance Status（PS）が 1 または 2 および血小板数が 18.8 万/mm³ 以下であることが FN の有意なリスク因子として抽出された。したがって、治療開始前の PS が不良であったり、血小板数が低値であったりする非小細胞肺癌患者に対しては、DTX 療法を行う際に重篤な好中球減少症に十分に注意しながら、早期発見・早期対処に努める必要があると考えられた。

③ 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

ベンダムスチン（Benda）は悪性リンパ腫の治療薬として使用されるが、代表的な副作用として皮膚障害が知られており、その程度によっては治療の一時中止や薬剤の減量あるいは他剤への変更を余儀なくされる。Benda による皮膚障害の早期発見や早期対処を実施するためには、発現リスク因子に関する情報が不可欠である。そこで、Benda 療法を受けた悪性リンパ腫患者 99 名を対象として後ろ向きに調査したところ、43 名（43%）で皮膚障害を認めた。また、患者背景ならびに生化学検査値、治療歴、診断時の B 症状の有無等について、単変量解析の結果が有意であった因子について多変量解析を行ったところ、化学療法による前治療歴のないことが皮膚障害の有意なリスク因子であった。したがって、化学療法による前治療歴のない悪性リンパ腫患者に対して Benda 療法を行う際には、皮膚障害の発現に十分注意しながら早期発見・早期対処に努める必要があると考えられた。

成果発表 :

<原著論文>

- M. Uchida, Y. Yamaguchi, S. Hosomi, H. Ikesue, Y. Mori, N. Maegawa, A. Takano, Y. Sato, K. Hosohata, N. Muroi, K. Tomii, T. Hashida, T. Nakamura. Risk factors for febrile neutropenia induced by docetaxel chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer. *Biol. Pharm. Bull.*, 43(8):1235-1240 (2020)
- M. Uchida, Y. Mori, K. Akiba, M. Miyasaka, T. Hirano, H. Ikesue, Y. Yamaguchi, A. Takano, N. Maegawa, Y. Shimomura, K. Hosohata, N. Muroi, T. Ishikawa, T. Hashida, T. Nakamura. Risk factors for skin toxicities associated with bendamustine-based chemotherapy in patients with non-hodgkin lymphoma. *Biol. Pharm. Bull.*, 43(10):1577-1582 (2020)

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：

令和 2 年 4 月 1 日 ～ 令和 3 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 浦田 秀仁 (大阪医科薬科大学・薬学部・教授)

研究分担者 和田 俊一 (大阪医科薬科大学・薬学部・准教授)

研究分担者 林 淳祐 (大阪医科薬科大学・薬学部・助教)

<共同研究機関>

研究代表者 小亀 浩市 (国立循環器病研究センター・分子病態部・部長)

研究分担者 斯波 真理子 (国立循環器病研究センター・分子病態部・非常勤研究員)

研究目的：

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 創薬の最大の課題であり、こうした問題を解決する戦略として申請者は、細胞内の環境下で活性化されるプロドラッグ型新規修飾核酸である REDUCT-RNA を分子設計し、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なたため、副作用対治療効果は高くないなど課題が残されている。こうした背景から、本研究は REDUCT-RNA 搭載型 siRNA の FH 治療薬としての有効性を評価・検討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：

REDUCT-RNA 搭載型 siRNA を分子設計するにあたり、文献既知の apoB mRNA に対する siRNA 配列 (apoB siRNA) のアンチセンス鎖を用いて、ヒト血清中で endonuclease による分解が起こりやすい部位を同定し、また既存の汎用化学修飾である 2'-OMe 修飾により siRNA 活性が低下する部位を明らかにしてきた。

REDUCT, 2'-OMe 修飾 apoB siRNA の in vitro 評価

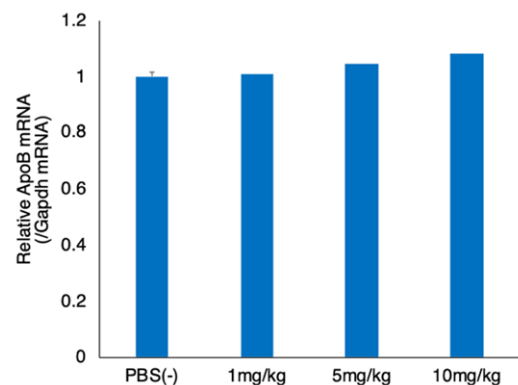
これらの知見を基に、siRNA 活性に影響が出る血清中での分解部位にはプロドラッグ型 REDUCT 修飾、siRNA 活性に影響がない血清中での分解部位には非プロドラッグ型 2'-OMe 修飾を用いて最小限の修飾を行った第一世代 apoB REDUCT-siRNA、及び対照として当該修飾部位を全て非プロドラッグ型 2'-OMe 修飾した apoB 2'-OMe-siRNA を設計・合成し、ヒト肝癌由来細胞 HuH-7 細胞に CEM (Ca²⁺ enrichment of medium) 法によりトランスフェクションし、37°C で 24 時間培養後、SuperPrep Cell Lysis & RT Kit for qPCR を用い cDNA を作成した。次に、Thunderbird SYBR qPCR Mix を用い StepOnePlus でリアルタイム PCR を行い、apoB mRNA 量を定量し、ノックダウン活性を評価した。その結果、全て非プロドラッグ型 2'-OMe 修飾した apoB 2'-OMe-siRNA は、未修飾の天然型 apoB siRNA と比較して大きくノックダウン活性が低下したが、第一世代 apoB REDUCT-siRNA では幾分活性の低下は認められたが、対照の apoB 2'-OMe-siRNA と比較して優れたノックダウン活性を示し、REDUCT 就職の優位性が示された。

GalNAc 修飾 apoB siRNA の in vitro 評価

次に、in vivo 実験への移行を想定して、肝臓への集積性を高め、これによる低用量化を図る目的でセンス鎖への GalNAc 修飾を行った。GalNAc 修飾は、Gren Research 社製の GalNAc アミダイトを用いて行った。GalNAc 修飾した数種の apoB 2'-OMe-siRNA を合成し、in vitro の細胞実験でノックダウン活性を評価した。その結果、GalNAc 修飾を行っても in vitro ではノックダウン活性に有意な影響は現れず、2'-OMe 修飾の影響は GalNAc 修飾を施していない apoB 2'-OMe-siRNA と同様で、2'-OMe 修飾数を増やすと活性が低下する傾向を再確認した。

GalNAc 修飾 apoB 2'-OMe-siRNA の in vivo 試験

次に、in vivo 実験の第一段階として、センス鎖を GalNAc 修飾した apoB 2'-OMe-siRNA を用いて用量設定を目的とした予備的なマウス投与実験を行なった。FH 病態モデルマウスに 1 mg/kg~10 mg/kg で皮下投与し、3 日後肝臓より QuickGene を用いて total RNA の抽出を行なったのち、Highcapacity cDNA reverse transcription kit で cDNA の作成を行なった。この cDNA でリアルタイム qPCR を行い、apoB mRNA 量を測定したところ、apo B mRNA の発現抑制効果は全く認められなかった (右図)。今回は最小限の化学修飾を施した apoB siRNA を用いて検討を行ったが、この結果から、血清中での endonuclease による分解を抑制する REDUCT 修飾や 2'-OMe 修飾の修飾数を可能な限り増やし、かつ 3'-exonuclease からの分解を阻止する 3'-末端領域の修飾を施す戦略で apoB siRNA を分子設計・合成し、in vivo 実験に供していく計画である。



成果発表：

<原著論文>

・

<学会発表>

- ・ 浦田秀仁

細胞内を模倣した還元的環境で活性化するプロドラッグ型核酸創薬

関西大学・大阪医科大学・大阪薬科大学医工薬連関科学研究機構研究発表会、1月

・

<その他>

- ・ 林 淳祐、和田 俊一、浦田 秀仁

REDUCT-siRNA:細胞内還元環境に応答して活性化するプロドラッグ型 RNA 創薬

Medical Science Digest, 2020, 46, 582-585.

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 2 年 4 月 1 日 ～ 令和 3 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)

<共同研究機関>

研究代表者 早川 直樹 (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及び一貫性の検証を行う。併せて、服薬アドヒアランスや経済性に対する評価を行う。

本年度の研究内容および研究成果：

(1) 慢性疾患に対する薬物療法時の配合錠使用に関する薬学的評価

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。

本年度は、配合錠使用と脳心血管イベントの発症率について評価を行い、配合錠が単剤の服用と比較して脳内出血のリスクを減らすことが示唆された [オッズ比 0.16 (95%信頼区間, 0.03-0.66)]。しかしながら症例数が約 400 名と少ないため、引き続き調査を進めていく。

（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。

本年度は、心房細動患者を対象にベプリジル血中濃度と QTc との関連についてレトロスペクティブな研究を行った。ベプリジルは血中濃度依存的に QT を延長させる可能性があるが、その関連性については未だ不明である。本研究の結果、ベプリジル投与開始前後の平均 QTc には有意な差があった ($p < 0.0001$)。また、ベプリジルの投与量および血中濃度と QTc には有意な関連が認められた (それぞれ $p=0.014$, $p < 0.001$)。さらに、ベプリジル血中濃度と ΔQTc にも有意な関連が認められた ($p=0.034$)。ベプリジル投与開始後に 500ms 以上の QTc 延長を発症した患者は 4 名であり、発症例におけるベプリジル血中濃度は QTc 延長非発症例と比較して有意に高かった (973 ± 651 vs. 526 ± 310 ng/mL, $p=0.01$)。結論として、QTc はベプリジル血中濃度と有意に関連することが明らかになった。治療域を超えるベプリジル血中濃度は QTc 延長発症の重要な危険因子であると考えられる。以上の研究成果は論文として発表している。

（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。

本年度は、心臓移植患者を対象にデータマイニングの手法を用いてクロトリマゾールが拒絶反応リスクとタクロリムスの薬物動態に及ぼす影響について検討した。米国食品医薬品局の有害事象報告システム (FAERS) のサブセットデータでは、拒絶反応とクロトリマゾールおよびタクロリムスの併用に有意な関連が認められた [reporting odds ratio 1.92, 95% two-sided confidence interval (95% CI) 1.43-2.58, information component 0.81, 95% CI 0.40-1.23]。タクロリムスのトラフ濃度 (C0) と濃度時間曲線下面積との相関分析において、クロトリマゾールの投与中止後には有意な相関関係が認められたが ($R^2 = 0.60$, $P < 0.05$)、中止前には認められなかった。さらに、クロトリマゾール中止後のタクロリムスのクリアランス (CL/F) の中央値は、中止前と比較して 2.2 倍であった (0.27 vs. 0.59 L/h/kg, $P < 0.05$)。また、C0 の中央値は、クロトリマゾール中止当日 10.7ng/mL、中止 1 日後 6.5ng/mL、中止 2 日後 5.3ng/mL と減少した。結論として、クロトリマゾールを投与および中止した場合は拒絶反応回避のために直ちにタクロリムスの用量調整することが有用であると考えられた。以上の研究成果は論文として発表している。

成果発表：

<原著論文>

- Uno T, Wada K, Hosomi K, Matsuda S, Ikura MM, Takenaka H, Terakawa N, Oita A, Yokoyama S, Kawase A, Takada M. Drug interactions between tacrolimus and clotrimazole troche: a data mining approach followed by a pharmacokinetic study. *Eur J Clin Pharmacol*. 2020 Jan;76(1):117-125.
- Matsui K, Mukai Y, Sakakura K, Wada K, Nakamura T, Kawabata A, Terakawa N, Hayakawa N, Kusano K, Hosomi K, Yokoyama S, Takada M. Relationship between serum bepridil concentration and corrected QT interval. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2021 Jan;59(1):63-70.

<学会発表>

- Hiromi Takenaka, Kenta Minagawa, Kaori Yamanishi, Ayumi Fukuda, Akira Oita, Kyoichi Wada, Keiichiro Iwasaki, Koichi Toda, Kensuke Kuroda, Osamu Seguchi, Masanobu Yanase, Norihide Fukushima; Nutritional management to avoid metabolic decompensation at major surgeries in a patient with propionic acidemia related cardiomyopathy: a case report, TTS2020 (28th International Congress of The Transplantation Society)
- 井倉恵、中村任、宇野貴哉、中北和樹、竹中裕美、松田紗知、小田亮介、和田恭一、服部雄司、瀬口理、築瀬正伸、早川直樹、福嶋教偉. 心移植患者におけるタクロリムス薬物動態に及ぼすアムホテリシン B 併用の影響. 第 56 回移植学会総会 (2020)
- 井倉 恵、中北和樹、宇野貴哉、竹中裕美、松田紗知、小田亮介、和田恭一、中村任、服部雄司、築瀬正伸、早川直樹、福嶋教偉. 補助人工心臓装着時の抗 MRSA 薬とワルファリンの相互作用. 第 30 回医療薬学会年会 (2020)
- 竹中 裕美、皆川 健太、山西 香織、福田 あゆみ、和田 恭一、岩崎 慶一郎、瀬口 理、老田 章、築瀬 正伸、福嶋 教偉. 心臓移植待機中に度重なる侵襲を経験したプロピオン酸血症患者の栄養管理の一例. 第 35 回日本臨床栄養代謝学会学術集会 (2020)

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 感染制御学研究室

職・氏名 教授・駒野 淳

研究テーマ：

多剤耐性菌に有効なペプチド性新規抗菌薬開発に向けた研究

研究期間：

令和 2 年 4 月 1 日 ～ 令和 3 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 駒野 淳 (大阪薬科大学・薬学部・教授)

研究分担者 宮本勝城 (大阪薬科大学・薬学部・准教授)

研究分担者 土屋孝弘 (大阪薬科大学・薬学部・講師)

<共同研究機関>

研究代表者 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ーム形成に必須であるため、創薬のターゲットとして注目されている。これらの外膜タンパク質のフォールディングや外膜への挿入には β -barrel assembly machinery (Bam) 複合体が重要な役割を担っている。Bam 複合体は BamA, B, C, D および E から構成されており、BamA と BamB および BamD が直接結合している。我々はこの結合を阻害するペプチドを創製し、多剤耐性 *Acinetobacter baumannii* に対する新規抗菌物質の開発を目的とする。

本年度の研究内容および研究成果：

BamA と BamD との結合阻害物質のハイスループットスクリーニング系を構築するために *A. baumannii* の BamA および BamD の高発現系の構築を行った。BamA 遺伝子をクローニングし、pProEx HTa を用いてヒスチジンタグ融合 BamA タンパク質発現プラスミドを作製した。BamD 遺伝子をクローニングし、pGEX-6P-1 を用いて GST 融合 BamD タンパク質発現プラスミドを作製した。それぞれのプラスミドを大腸菌 BL21(DE3)*pLysS* に導入しタンパク質の高発現系を構築した。それぞれの大腸菌を 37°C で OD_{600nm} が 0.5 になるまで振とう培養した。IPTG を終濃度 1mM となるように添加し、37°C で 6 時間培養した。集菌後上清を回収し、それぞれ精製した。BamA は HisTrapHP カラムおよび HiTrap Q FF カラムで精製した(図 1)。フラクション 21 をピークにヒスチジンタグ融合 BamA はシングルバンドとして溶出された。

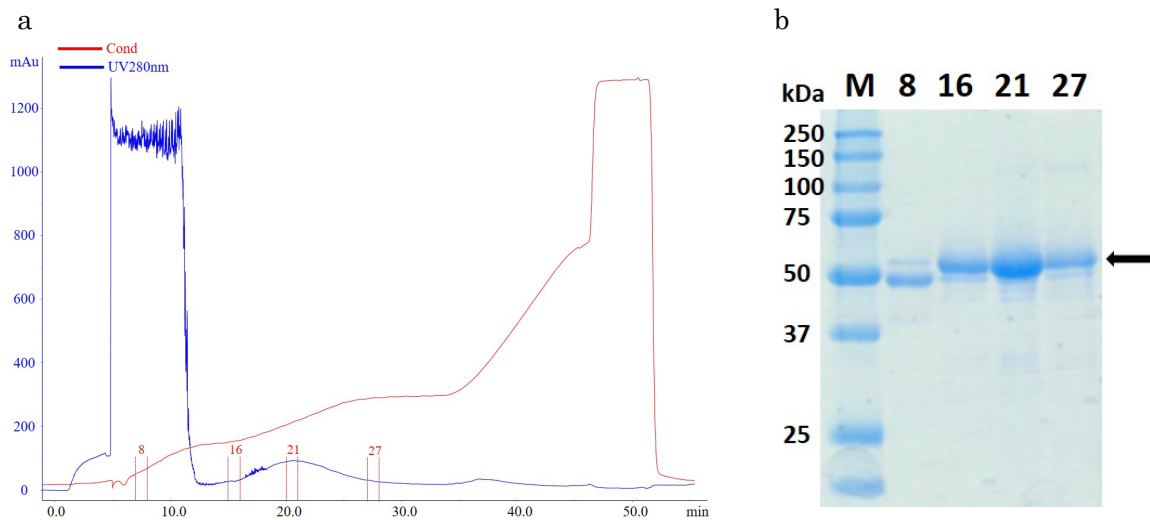


図 1 ヒスチジンタグ融合 BamA の精製. a HisTrap Q FF のクロマトグラム. b 各フラクションの SDS-PAGE. 矢印：ヒスチジンタグ融合 BamA

BamD は GST-Trap HP カラムを用いて精製した(図 2)。フラクション 41–47 までに溶出された。

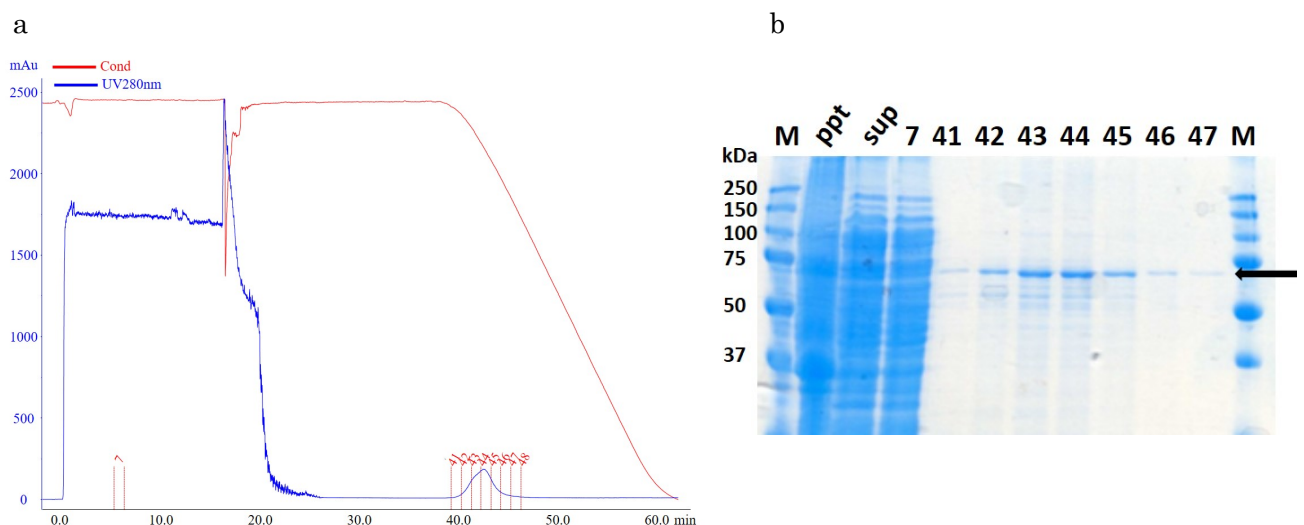


図 2 GST 融合 BamD の精製. a GST Trap HP のクロマトグラム. b 各フラクションの SDS-PAGE. 矢印：GST 融合 BamD

A.baumannii の BamA と BamD の高発現系を構築することができた。今後は得られたタンパク質を用いて BamA と BamD の結合を阻害する低分子化合物をハイスループットでスクリーニングするための系を構築し、スクリーニングを行う予定である。

成果発表：

<原著論文>

- ・なし

<学会発表>

- ・なし

<その他>

- ・なし

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 薬剤学研究室
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3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。申請者はこれまでにアルブミンに結合している脂肪酸が転写因子 HIF-1 を活性化させること、その脂肪酸としてアラキドン酸が有力であること等を見出ししてきた。現在、尿細管管腔中へのアルブミン漏出に伴う腎線維化の発症過程におけるアラキドン酸カスケードと HIF-1 活性化の関連性について明らかにすることを目的とした研究を展開している。その研究の一環として、本研究室では腎障害性薬物であるアドリアマイシン(ADR)投与マウスを用いた実験を行い、ADR 投与がアルブミンの尿中排泄を増加させることを報告してきた。また、ヒト腎近位尿細管上皮細胞由来 HK-2 細胞を用いた実験において、脂肪酸結合型(通常型)ヒト血清アルブミン処理が、濃度依存的に生理活性物質であるプロスタグランジン E₂ (PGE₂) 産生を増加させることも報告してきた。しかし、これらの *in vitro* で得られた知見を *in vivo* で検証していくことが必要である。そこで今年度は、ADR 投与による腎障害マウスを用いて、アルブミン尿中排泄の増加に伴う尿中 PGE₂ 及び代謝物 PGEM 排泄量との相関性を評価することを計画した。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している。

本年度の研究内容および研究成果：

本年度は、ADR 投与による腎障害過程におけるアルブミン尿中排泄量と PGE₂ 量の相関解析を行うため、ADR 投与後 14 日までのマウス尿中 PGE₂ 量の経日変化を評価した。PGE₂ は in vivo において速やかに不活性型の代謝産物 PGEM に変換されることが報告されており、より正確な尿中 PGE₂ 量を評価するため、尿中 PGE₂ と併せて代謝産物の測定を行った。

まず、実験方法について記述する。実験動物として BALB/c 雄性マウス(5 週齢)を使用し、自由飲水、自由摂食下で一週間馴化させた。ADR を 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。ADR 投与前日を day0、ADR 投与日を day1 として、day0、day7 および day14 に代謝ケージを用いて 24 時間尿サンプルを回収し、尿量を測定した。尿サンプルは、尿中排泄後における代謝生成を抑制するため、10 μg/mL のインドメタシン溶液を少量添加した状態で回収した。回収した尿サンプルは、15,000 rpm で遠心分離後上清を回収し、-20 °C で保存した。クレアチニンはクレアチニン測定キットを用いた Jaffe 法により測定した。アルブミンは免疫学的測定法 (ELISA 法) により定量した。PGE₂ の定量には PGE₂ ELISA kit を使用し、PGE₂ の代謝物(PGEM)の定量には Prostaglandin E metabolite ELISA Kit (Cayman CHEMICAL) を使用して測定した。統計処理は、2 群間比較の場合は t 検定、多群間比較の場合は Tukey's HSD 検定により行った(有意水準 5%)。

① 尿中アルブミン量に及ぼす影響

尿中へのアルブミン排出量の変動については、尿中クレアチニン量で補正した尿中アルブミン/クレアチニン比を算出することで評価した。day0 における尿中アルブミン/クレアチニン比については、両群においてほぼ同程度の値であることを確認した。その後 day7 および day14 において、ADR 群は対照群と比較して尿中アルブミン/クレアチニン比は上昇傾向を示し、特に ADR 投与群 day14 においては、day0 と比較して有意な増加を示した。これらの結果から、ADR 投与が糸球体から尿中へのアルブミン漏出を誘発することが示された。

② 尿中 PGE₂/クレアチニン比の経日変化

尿中 PGE₂ 量については、尿中クレアチニン量で補正することで評価を行った。その結果、対照群では、day7 および day14 において、day0 と比較して尿中 PGE₂/クレアチニン比の有意な差は見られなかった。一方、ADR 群においては、day7 および day14 のいずれにおいても、有意ではないものの day0 と比較して尿中 PGE₂/クレアチニン比が増加する傾向が観察された。

③ 尿中 PGEM/クレアチニン比の経日変化

PGE₂ は in vivo において速やかに不活性型の代謝産物 PGEM に変換されることが報告されているため、尿中 PGE₂ 量と同様に尿中 PGEM についても尿中クレアチニン量で補正することで評価を行った。その結果、対照群と ADR 群を比較すると、day7 において有意な差が見られた。また、ADR 群において day0 と比較した場合、day7 で有意な増加が見られた。day14 においても PGE₂ と同様に day0 と比較し増加傾向が見られた。

以上の結果より、ADR 群における尿中 PGE₂ および PGEM 量の増加は、ADR 投与による尿中アルブミン排泄量の増大に伴って起きることが示唆された。一方、今回の結果では、day7 から day14

にかけて尿中 PGE₂/クレアチニン比および尿中 PGEM/クレアチニン比のいずれも経日的にさらなる増加は見られなかった。このことは、尿中アルブミン排泄量の経日的な増加に対して、尿中 PGE₂排泄量の増加が必ずしも一致していないことを示すものであり、今後は PGE₂生成に関与する酵素などの経日的な発現量変化についても解析する必要があると考える。

成果発表：

<原著論文>

・Nakatsuji M, Urakami-Takebayashi Y, Miyadokoro S, Ikeda T, Takehara I, Sun H, Motohashi H, Ohno Y, Nagai J. Fatty acids bound to albumin induce prostaglandin E₂ production in human renal proximal tubular epithelial cell line HK-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 530(1):273-277 (2020).

<学会発表>

- ・中達 穂、池田豊聡、宮所冴衣、竹林裕美子、本橋秀之、永井純也
「アルブミン曝露に伴う腎近位尿細管細胞における PGE₂生成と HIF-1 活性化」
第 70 回日本薬学会関西支部大会（2020 年 10 月 10 日、オンライン開催）
- ・落合春香、大西未企代、西脇 唯、吉川由理佳、竹林裕美子、本橋秀之、永井純也
「アドリアマイシン誘発アルブミン発症マウスにおける尿中 PGE₂排泄量の変動」
日本薬学会第 141 年会（2021 年 3 月 27 日、オンライン開催）

<その他>

- ・なし

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 製剤設計学研究室
職・氏名 教授・戸塚 裕一

研究テーマ：

医薬品および健康食品の機能性粉体の評価に関する検討

研究期間：

令和 2 年 5 月 1 日 ～ 令和 3 年 3 月 31 日

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：

肺は薬物の局所投与だけでなく、広い表面積および肝初回通過効果を回避できるという点から全身投与を目的とした投与経路としても利用できる。一方で肺への薬物送達には粒子制御が必要であり、肺へ効率的に薬物を到達させるには、数 μm 程度に粒子を制御する必要がある。本研究では、バイオサーファクタントであるサーファクチンナトリウム (Sodium surfactin: SF-Na) を添加剤に使用し噴霧乾燥法及び凍結乾燥法によりベタメタゾン吸入粉末剤を調製し、各製剤の粒子物性が吸入特性に及ぼす影響について検討した。

本年度の研究内容および研究成果：

気管支喘息の治療薬として、ステロイドの吸入粉末製剤が重要な役割を果たしている。炎症部位である肺に直接薬物を送達させるだけでなく、薬物を効率的に肺深部へ到達させることができれば、少ない投与量で効果発現が可能となり、全身性の副作用の減少も期待される。そのため、高効率な肺送達性の製剤の調製が可能になると、その有用性はさらに高まる。薬物を効率的に肺に送達するためには、薬物の空気力学的粒子径が $0.5 - 5\mu\text{m}$ 程度であることが求められる。しかし、この程度まで粒子を微細化すると、付着凝集力が増加し、カプセルや吸入デバイス内に薬物が残存する原因となる。そのため、単なる粒子の微細化だけでなく、粒子の流動性を高める必要がある。本研究では、枯草菌より産出されるアミノ酸型バイオサーファクチンであるサーファクチンナトリウムを用い、粒子径や粒子形状などを変化させ、高効率で肺内に送達可能な吸入粉末製剤用粒子の設計を目指した。吸入粉末剤の作製方法としては、粉碎、凍結乾燥法および噴霧乾燥法が用いられる。しかし、粉碎を用いて吸入粉末製剤の設計を行うと、粒子の微細化は可能であるが、不規則な形状の粒子が形成されるため、

凝集性は増大する。そのため、本研究では凍結乾燥法及び噴霧乾燥法にて吸入粉末製剤を作製し、乾燥法の違いが作製したステロイド含有吸入粉末製剤の形態や特性に与える影響について検討を行った。

Table 1 に各製剤に関する薬物含有量、かさ密度、粒子径の結果を示す。

噴霧乾燥法によって得られた粒子において SF-Na 添加により微細で均一性の高い粒子が確認できた。これは、SF-Na 添加により、薬物の分散性が向上したことで、薬物同士の凝集性が低下したことが起因していると考えられる。

一方、凍結乾燥法において得られた粒子は、SF-Na 添加によって粒子径はほとんど変化しなかった。これは凍結乾燥過程で薬物同士が接近し、凝集性の高い粒子が形成されたためであると考えられる。

Table 1 Drug content, bulk density and particle size of spray-dried particles and freeze-dried particles.

	Sample	Drug content (%)	Bulk density (g/cm ³)	Particle size (μm) at 0.4 Mpa		
				<i>D</i> ₁₀	<i>D</i> ₅₀	<i>D</i> ₉₀
SDPs	BM	101.8 ± 1.00	0.157	1.1 ± 0.01	5.53 ± 0.08	18.06 ± 0.41
	BM/SF-Na (2/1)	100.2 ± 0.94	0.097	0.75 ± 0.04	1.45 ± 0.02	2.72 ± 0.06
	BM/SF-Na (4/1)	98.9 ± 2.04	0.103	0.66 ± 0.02	1.31 ± 0.03	2.51 ± 0.00
	BM/SF-Na (8/1)	100.6 ± 0.54	0.095	0.70 ± 0.02	1.36 ± 0.03	2.54 ± 0.08
	BM/SF-Na (16/1)	97.6 ± 3.60	0.114	0.71 ± 0.01	1.40 ± 0.02	2.63 ± 0.03
FDPs	BM	100.3 ± 0.47	0.023	1.55 ± 0.07	9.76 ± 0.72	31.2 ± 2.67
	BM/SF-Na (2/1)	100.7 ± 0.97	0.016	2.01 ± 0.07	11.64 ± 0.57	29.75 ± 1.65
	BM/SF-Na (4/1)	98.8 ± 1.47	0.016	1.94 ± 0.04	14.72 ± 0.35	47.36 ± 3.31
	BM/SF-Na (8/1)	97.7 ± 0.48	0.019	1.46 ± 0.02	9.56 ± 0.27	41.39 ± 0.89
	BM/SF-Na (16/1)	103.3 ± 0.89	0.026	1.31 ± 0.02	6.79 ± 0.21	29.63 ± 1.10

走査型電子顕微鏡による各製剤の粒子形態の結果を Fig. 1 に示す。噴霧乾燥品では球状粒子、凍結乾燥品では針状粒子が観察された。SDPs(16/1)製剤において、他の SDPs 製剤と比較し、粒子が凝集している形状が観察された。これは、SF-Na 添加量が十分量ではなかったため、ベタメタゾンが凝集したと考えられる。

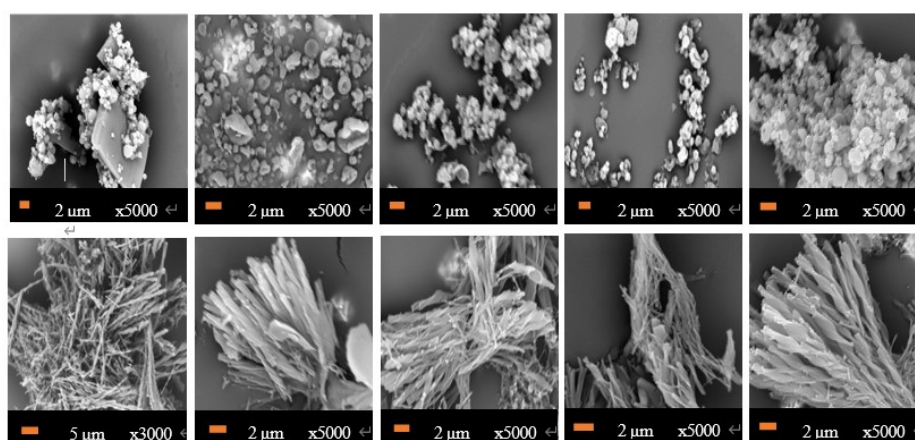


Fig. 1 Scanning Electron Microscope (SEM) images of SDPs and FDPs

Fig. 2 に Twin Impinger により評価した in vitro 吸入特性の結果を示す。SDPs においてはベタメタゾン (Betamethasone:BM) 単体の FPF 値は約 10 %であったのに対し、SF-Na 添加によりいずれの製剤においても肺到達性の向上が見られた。さらに、SF-Na (4/1) 製剤においては、50 %を超える FPF 値を示した。これは、Table 1 で示した通り、SF-Na 添加により、粒子が微細化されることや、粒子の凝集性が低下したことが起因している。FDPs においても SF-Na 添加により、FPF 値の向上が見られた。

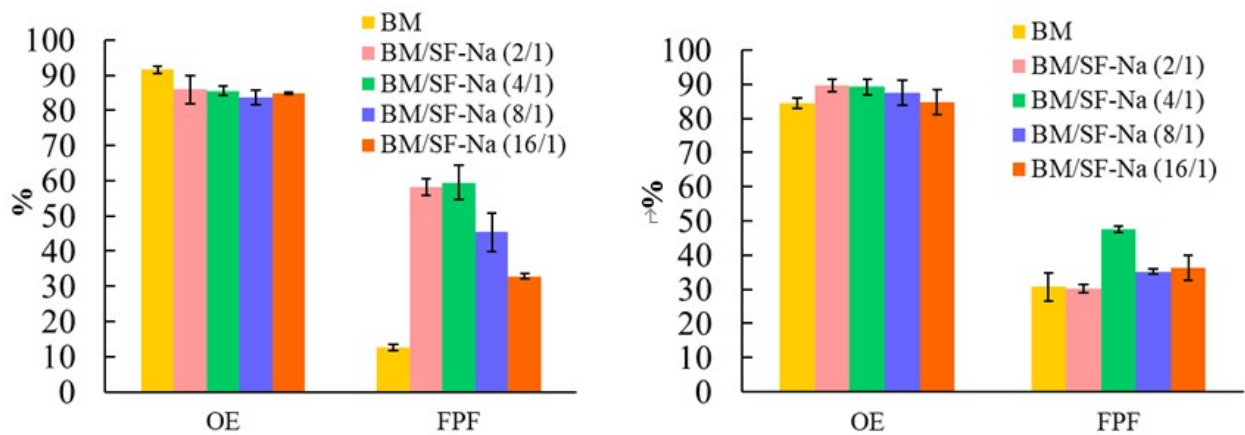


Fig. 2 Aerosol dispersions performance of SDPs and FDPs using a twin impinger at flow rate of 60.0 L/min

Fig. 3 にエネルギー分散型 X 線分光法の結果を示す。SF-Na を添加した製剤においては、Na が検出され、(4/1)製剤と(16/1)製剤を比較すると、(4/1)製剤の方が強い Na のピークが観察された。以上の結果より、SF-Na を添加し調製した粒子表面には SF-Na が存在している可能性が示唆された。これにより、ベタメタゾン表面に SF-Na が吸着することで粒子の幾何学径及び空気力学径が減少するとともに、粒子分散性が向上したと考えられる。

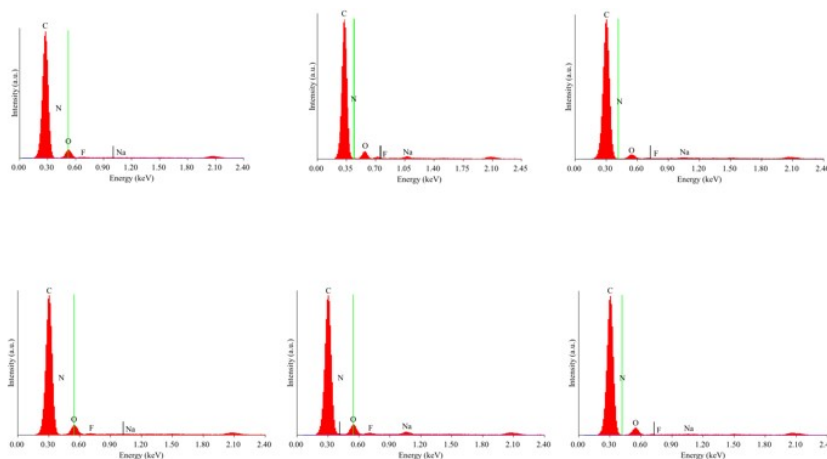


Fig. 3 Energy dispersive X-ray spectrometry results of SDPs and FDPs

成果発表：

<原著論文>

・ Kazunori Kadota, Moe Tanaka, Hikaru Nishiyama, Jun Yee Tse, Hiromasa Uchiyama, Yoshiyuki Shirakawa, Yuichi Tozuka, An effective approach to modify the inhalable betamethasone powders based on morphology and surface control using a biosurfactant, *Powder Technology*, **376** (2020) 517-526

<学会発表>

・ 門田 和紀、斎藤 香菜子、内山 博雅、戸塚裕一：デキストランを基剤とした二成分の医薬品を含む吸入粉末剤の設計、2020年度 春季粉体工学会 (2020) (Web 開催)、5月

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 循環病態治療学研究室
職・氏名 准教授・井尻好雄

研究テーマ：

特異体質性薬物反応のメカニズムに関する研究

研究期間：

令和 2年 4月 1日 ～ 令和 3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)

<共同研究期間>

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

研究目的：

従来から考えられてきた特異体質性薬物反応 (IDRs, idiosyncratic drug reactions) の発症機序として、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 hapten hypotheses がある。しかし、動物実験では hapten hypotheses のみの機序では IDRs が起こらないことが多く、その他の因子が係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 が起こるといふ danger hypotheses が提唱されている。しかし、実際に IDRs 発症機序として danger hypotheses が成立するかは不明である。本研究では、IDRs の中でも特に臨床で問題となっている特異体質性薬物性肝障害に着目し、その発症機序として danger hypotheses が成立するか否かを明らかにする。IDRs 発症機序が明らかになれば、発症予測および有効な治療法の開発に応用できると考えられる。

本年度の研究内容および研究成果：

今年度は、ゲフィチニブ誘発肝障害について検討を行った。ゲフィチニブは肝臓で CYP1A1, CYP3A4, CYP3A5 で代謝され、反応性代謝物である iminoquinone が産生される。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 iminoquinone が原因となる発症機序は報告されていない。そこで、今回 iminoquinone に着目して、ゲフィチニブ誘発肝障害の発症機序の検討を行った。

FLC-4 細胞にゲフィチニブを添加して、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. 1)。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。

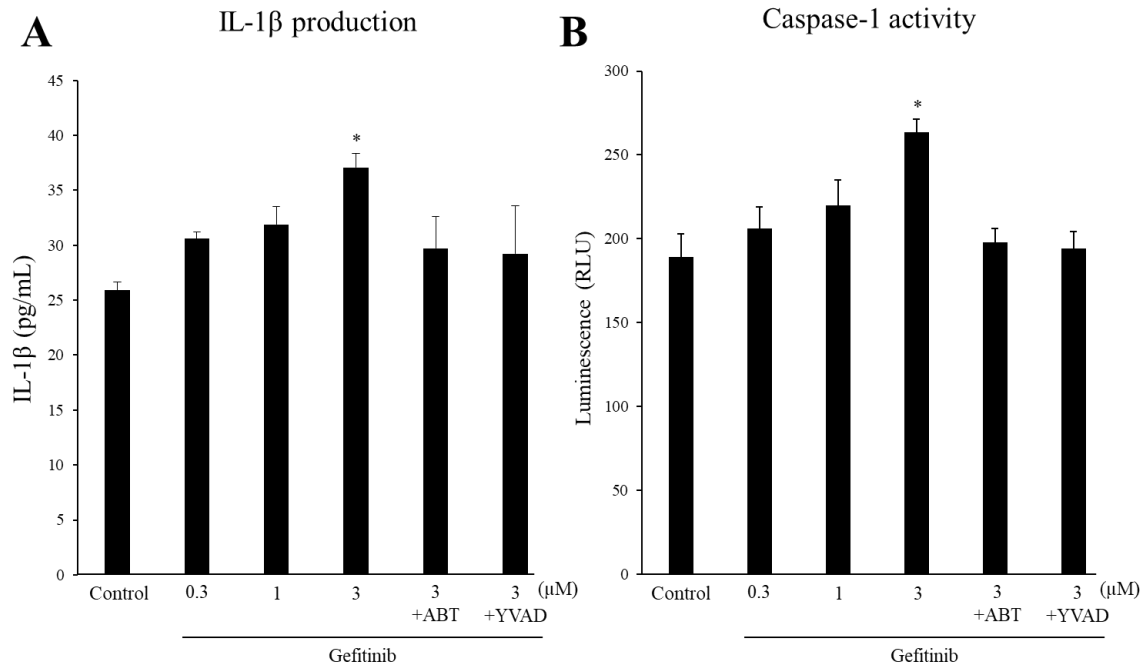


Fig. 1. Incubation of THP-1 cells with the supernatant from hepatocytes incubated with gefitinib lead to release of IL-1 β (A) and an increase in caspase-1 activity. Levels of IL-1 β production and caspase-1 activity of THP-1-derived macrophages in response to incubation for 24 h with the supernatant from incubation of hepatocytes with gefitinib, with or 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 *, $p < 0.05$, $n=3$.

肝細胞の培養液中に放出された DAMPs の探索を行ったところ、heat shock protein (HSP) 40、HSP70、HSP90 の産生量が増加していることが確認された。また、FLC-4 細胞からは DAMPs の一種である high mobility group box 1 (HMGB1) の培地中への放出は認められなかった (Fig. 2)。通常、肝障害を起こす薬物については、肝細胞から DAMPs として HMGB1 が放出され、放出された HMGB1 が抗原提示細胞を活性化すると考えられている。本研究結果では FLC-4 細胞からの HMGB1 分泌は認められなかったが、従来の報告では *in vivo* の検討が多いことから、肝細胞以外から産生されたものを肝細胞で産生されたものとして評価された可能性が考えられる。一方、FLC-4 の培養上清を THP-1 細胞に添加したところ、THP-1 細胞から HMGB1 の分泌が認められた。本結果から、インフラマソーム反応が活性化された抗原提示細胞は、自ら HMGB1 を放出することで他の抗原提示細胞を活性化し、より強い免疫反応を引き起こすことが考えられた。

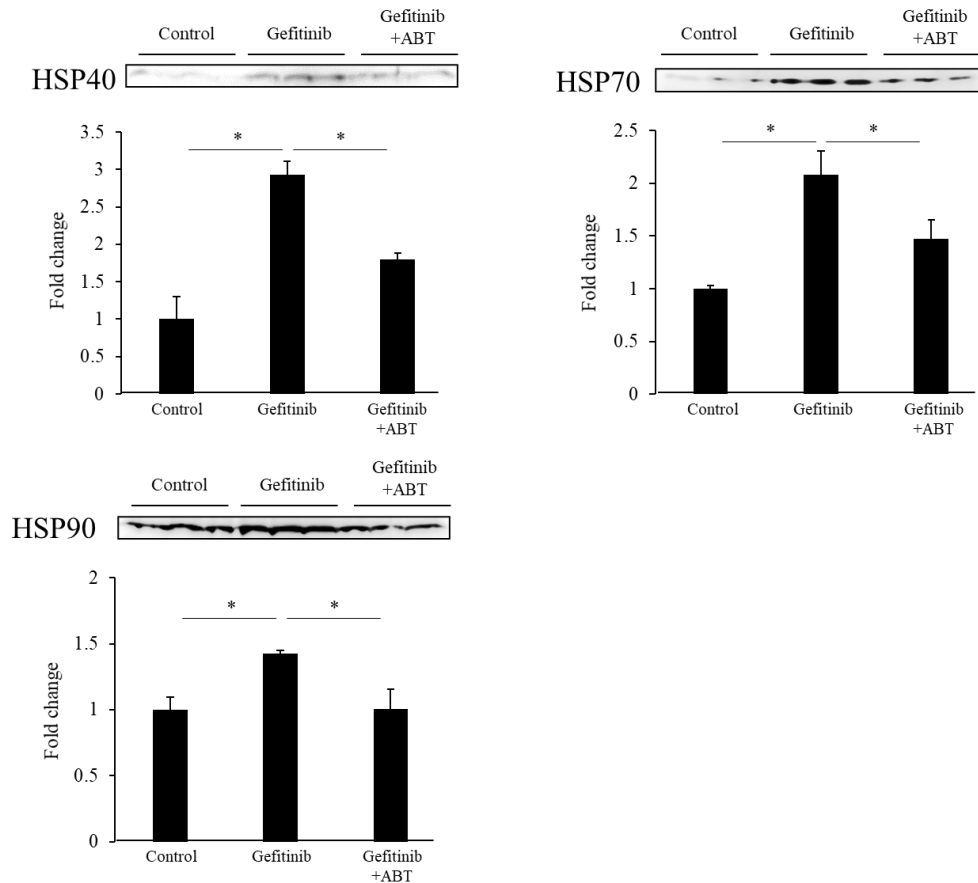


Fig. 2. Heat shock protein (HSP) 40, 70, and 90 were released from hepatocytes as danger associated molecular pattern molecules (DAMPs). Western blot analysis of proteins [high mobility group box 1 (HMGB1), HSP32, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, S100 calcium-binding protein (S100) A8 and S100A9] that were released from hepatocytes incubated for 7 days with gefitinib (3 μ M), with and without, a cytochromes P450 inhibitor (1-aminobenzotriazole, ABT), and their quantitative analysis of HSP40 (B), HSP70 (C), HSP90 (D), S100A8 (E), and S100A9 (F). Statistical significance was determined using the Tukey multiple comparison tests, where **, $p < 0.01$, $n=3$.

以上、ゲフィチニブ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。本発症機序を考慮すると、ゲフィチニブ誘発肝障害の治療法として Kupffer 細胞の活性化を抑制する薬剤（ステロイド等）が有効であると考えられる。

成果発表：

<原著論文>

- Kato R, Ijiri Y, Hayashi T, Utrecht J. Reactive metabolite of gefitinib activates inflammasomes: implications for gefitinib-induced idiosyncratic reaction. *J Toxicol Sci* 45, 673-680 (2020).

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 3 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・精神と身体のみか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 $PPAR\alpha$ を刺激し一酸化窒素 (NO) を介した cGMP の蓄積 (AA/ $PPAR\alpha$ /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。またヒスタミン刺激は cAMP 含量を増加し、ガストリン刺激は細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇した。さらに今後、酸分泌抑制薬 (プロトンポンプ阻害薬、 H_2 受容体拮抗薬およびガストリン拮抗薬) および NSAIDs による粘液開口放出頻度を与える影響についても解明していく。

脂肪の消化吸収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。低脂肪食摂取時に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が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：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の肝臓における glucose-dependent insulinotropic 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。

関連バイオマーカー測定法の開発等：胎児における神経管閉鎖障害の発症リスクを低下させ、アミノ酸やタンパク質の合成に作用し細胞の生成を助けることから胎児の成長に大切な役割を果たす葉酸について SPF 及びパラジウム (II) イオンを用いる葉酸の吸光光度定量法を検討したところ、酸性下、SPF の退色を利用する葉酸の定量法を開発した。本法の感度、再現性は、それぞれ $\epsilon = 6.05 \times 10^5 \text{ (L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{)}$ 、 $\text{RSD}=2.81\%$ ($n=3$)であった。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、キサント色素の 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したところ、 $25 \mu\text{g/mL}$ 以下の Tf 濃度について、モル吸光定数 $\epsilon = 4.5 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、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、酵素反応を介して測定されているほとんどの臨床検査項目には酵素反応の基質最終産物由来の過酸化酸素量が基盤となっているのが現状であるが、この定量法については十分な感度や簡便な操作が担保されていないという問題点が多い。そこで、Fe(II)とオルトカルボキシフェニルフルオロンと最適な界面活性剤との組み合わせにおいて市販色素での 10 倍以上の感度である本法の感度、再現性は、それぞれ $\epsilon = 5.36 \times 10^5 \text{ (L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{)}$ 、 $\text{RSD}=1.85\%$ ($n=5$)であった。実試料への応用を再検討して今後は従来色素の代替え試薬としての機能が発揮できることが期待される。

さらに高感度な試験試薬の開発の一環として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キサント系色素を取り上げた。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ト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、可視化測定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、持続可能な地球環境維持のための検査試薬の開発のための初発実験として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なっている。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 insulinotropic 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
- Y. Kohda. Age-related hepatic glucose-dependent insulinotropic polypeptide expression is modified by ongoing thiamine supplementation in obese diabetic rats. *Fundam. Toxicol. Sci.*, 7: 291-299, 2020

<学会発表>

- 田中美紗希、佐川実唯、藤田芳一、松村人志、山口敬子：o-スルホフェニルフルオロンと金属を用いる葉酸の吸光光度定量法について。第79回日本分析化学討論会 2020
- 鷺見明子、小山麗央、藤田芳一、松村人志、山口敬子：レゾルシノールとカルボニル化合物の縮合反応を用いる発蛍光反応について。第79回日本分析化学討論会 2020
- 湊隆彰、平良滉大、藤田芳一、松村人志、山口敬子：キサントン系色素と金属イオンを用いる吸光光度定量法の過酸化剤への適応。第79回日本分析化学討論会 2020
- 西田勇介、神谷拓、藤田芳一、山口敬子：o-スルホフェニルフルオロンを用いた三元錯体反応によ

る La(III)の吸光光度定量法. 第 79 回日本分析化学討論会 2020

・田邊蘭太、西田勇介、藤田芳一、松村人志、山口敬子：トリフェニルメタン系色素と Hf (IV) を用いたヒト血清アルブミンの吸光光度定量法の開発. 第 79 回日本分析化学討論会 2020

・真名子啓太、竹之下修哉、藤田芳一、松村人志、山口敬子：2,4-ジヒドロキシベンゾイル安息香酸との縮合反応を利用するプリン体の定量法の開発について. 第 79 回日本分析化学討論会 2020

・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：キサントレ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：キサントレ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：キサントレ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 *o*-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：*o*-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：キサントレン系色素-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：o-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 μ M, 10 μ 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 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 3 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)

<共同研究機関>

研究代表者 角山 圭一 (姫路獨協大学・薬学部・准教授)

研究目的：

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

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

本年度の研究内容および研究成果：

昨年度行った、tau 特異的認識抗体の Fab 領域(Fab2r3) 単独、Fab2r3-VQIINK ペプチド複合体の構造解析の結果、Fab2r3 は、大きな構造変化により疎水性ポケットを形成し、VQIINK ペプチド中 4 残基目の Ile 残基と疎水性相互作用を形成することがわかった。この疎水性相互作用が Fab2r3 の VQIINK 配列特異的認識機構に重要な相互作用であることから、本年度は、Fab2r3 の抗原特異性機序解明のため、Ile 残基変異型 VQIINK 類似ペプチドを用いた熱力学的解析、類似ペプチドとの複合体結晶化及びその構造解析に取り組んだ。

① Fab2r3 の疎水性ポケットにおける抗原認識機構

Fab2r3 の疎水性ポケットにおける抗原認識機構を明らかにするため、VQIINK ペプチド中 Ile 残基を他の疎水性アミノ酸に変異させた VQIVNK、VQILNK、VQIFNK ペプチドを用いて、等温滴定型カロリメトリー(ITC)による Fab2r3 との相互作用解析を行った。その結果、全ての変異ペプチドにおいて、Fab2r3 との結合能が大きく低下しており、Fab2r3 の疎水性ポケットは非常に正確に Ile 側鎖構造を認識していることがわかった。

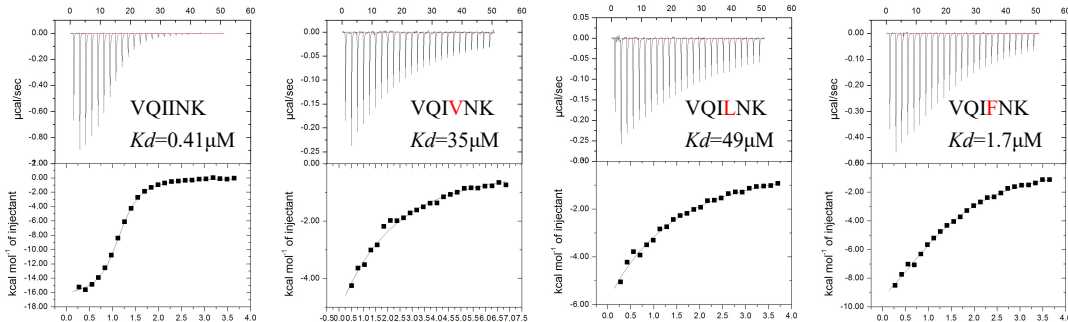


Fig.1 Fab2r3 と各種ペプチドの ITC 測定

② Fab2r3-VQILNK、VQIFNK ペプチド複合体の結晶化

Fab2r3 の疎水性ポケットにおける Ile 側鎖選択的認識機構について原子レベルで明らかにするため、Fab2r3-VQILNK、Fab2r3-VQIFNK 複合体結晶の作製に着手した。Fab2r3-VQIINK 複合体結晶の析出条件を参考に結晶析出条件を検討したところ、右図に示す良質な結晶を得ることに成功した。

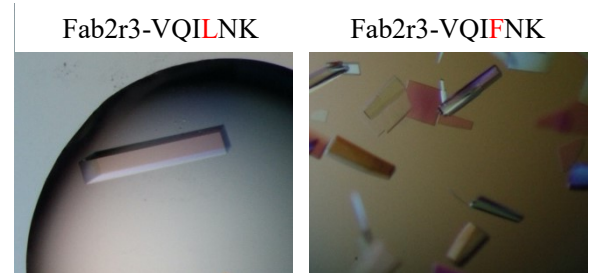


Fig.2 Fab2r3VQILNK、Fab2r3-VQIFNK 結晶

成果発表：

<原著論文>

・Tomohiro Tsuchida, Kouki Susa, Tomohiro Kibiki, Takahiro Tsuchiya, Katsushiro Miyamoto, Yasuko In, Katsuhiko Minoura, Toshimasa Ishida, Taizo Taniguchi, Koji Tomoo, “Crystal structure of the human tau PHF core domain VQIINK complexed with the Fab domain of monoclonal antibody Tau2r3”, *FEBS Letters*, 30 April 2020

<学会発表>

- ・榎田智裕、土屋孝弘、尹 康子、箕浦克彦、谷口泰造、友尾幸司
アルツハイマー病関連蛋白質 Tau 認識抗体による、Tau 自己重合阻害機構の解明
第 70 回 日本薬学会 関西支部総会 (2020 年 10 月)
- ・榎田智裕、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 特異的認識抗体による、Tau 重合阻害機構の解明
“Tau 抗体と VQIINK ペプチドの結合様式解析”
第 141 回 日本薬学会年会 (2021 年 3 月)

<その他>

・ 槌田 智裕

2021年度 日本薬学会 長井記念薬学研究奨励支援 採択

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：

令和2年4月1日 ～ 令和3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 の調節能の評価、さらに FXR の機能および制御機構の解析を行ってきた。本研究では、FXR を介した肥満制御および骨芽細胞の分化制御機構について解析し、肥満や骨分化における FXR の機能と制御機構を解明し、新規 FXR 調節薬の開発を行うことを目的とする。

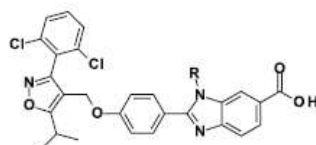
本年度の研究内容および研究成果：

本年度は、以下の項目について研究を実施した。

① 新たな FXR 作動薬の創製

広島国際大学のグループにより、グラクソ・ウェルカム社が合成した FXR 作動薬である GW4064[1] をベースにして、側鎖を様々な置換基に置き換えた化合物[12-33]を創製した。さらに、時間分解一蛍光共鳴エネルギー移動 (TR-FRET) アッセイによる EC₅₀ 値の算出、FXR 結合配列をもつルシフェラーゼレポーターコンストラクトを用いた活性化能 (EC₅₀) を求めた。さらに、特異性の検証としてビタミン D 受容体の活性化能 (EC₅₀) を調べた。その結果、化合物 **19** と **30** が高い FXR EC₅₀/VDR EC₅₀ を示した (表1)。

表 1. 化合物16-33によるFXRおよびVDRの活性化



Cpds.	R	FXR EC ₅₀ (nM) TR-FRET	Relative potency (%)	FXR EC ₅₀ (nM) Luciferase	Relative potency (%)	VDR IC ₅₀ (nM) Luciferase	Relative potency (%)	VDR (IC ₅₀)/FXR (EC ₅₀) Luciferase
12*	CH ₃	43.7 ± 54.2	58.2 ± 26.2	32.0 ± 38.1	101.0 ± 31.1	7151.3 ± 3853.3	55.2 ± 4.5	223
16		19.3 ± 9.8	61.2 ± 14.2	2.31 ± 1.82	76.4 ± 7.8	5760.9 ± 748.3	66.0 ± 8.6	2439
17		96.4 ± 60.4	14.5 ± 12.4	9.3 ± 0.7	50.9 ± 9.2	1401.3 ± 290.2	86.2 ± 1.5	150
18		56.7 ± 63.6	27.6 ± 20.2	3.39 ± 1.61	56.3 ± 3.7	3551.9 ± 459.4	85.8 ± 4.2	1047
19		26.5 ± 10.5	68.7 ± 10.9	0.8 ± 0.2	70.4 ± 2.5	5688.0 ± 1431.8	51.7 ± 0.7	7110
20		30.3 ± 10.8	70.1 ± 10.8	1.8 ± 1.2	68.9 ± 7.4	>10000	20.1 ± 12.5	-
21		116.8 ± 84.4	26.4 ± 13.9	16.5 ± 0.3	59.1 ± 5.2	3197.7 ± 714.1	78.1 ± 2.0	193
22		-	-	14.4 ± 1.5	50.8 ± 3.9	1104.0 ± 179.5	89.3 ± 1.9	76
23		-	-	13.6 ± 0.8	36.8 ± 8.7	928.8 ± 95.7	83.1 ± 1.1	68
24		-	-	4.21 ± 0.54	61.1 ± 9.4	1448.6 ± 201.3	68.9 ± 5.4	344
25		113.4 ± 93.0	31.0 ± 9.1	14.8 ± 2.4	55.6 ± 6.9	921.1 ± 55.3	76.8 ± 2.9	62
26		-	-	1432.0 ± 1672.3	3.9 ± 3.1	>10000	0	-
27		24.7 ± 14.0	23.5 ± 11.2	5.26 ± 4.58	66.6 ± 7.42	1183.4 ± 828.3	82.1 ± 8.6	224
28		24.8 ± 22.7	20.1 ± 11.9	13.0 ± 5.2	55.0 ± 11.7	861.3 ± 21.8	86.0 ± 4.2	66
29		29.1 ± 22.9	26.5 ± 7.5	19.4 ± 13.7	61.4 ± 17.0	2652.5 ± 1520.1	74.9 ± 1.8	136
30		19.9 ± 10.7	51.4 ± 10.5	0.52 ± 0.14	70.9 ± 0.5	346.0 ± 144.9	82.7 ± 4.9	665
31		-	-	1166.1 ± 1144.3	11.1 ± 7.4	>10000	24.3 ± 20.9	-
32		15.1 ± 11.4	9.1 ± 10.0	32.2 ± 18.6	90.2 ± 7.85	2413.8 ± 2160.3	76.1 ± 7.7	74
33		105.3 ± 135.2	30.2 ± 31.6	3.31 ± 0.63	70.9 ± 6.9	1141.6 ± 430.3	76.2 ± 3.4	344

-: Not determined.

② FXR 作動薬による間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化能の評価

マウス間葉系幹細胞 ST-2 細胞を BMP-2 存在下で 6 あるいは 12 日間、骨芽細胞へと分化誘導した。同時に、新規 FXR 作動薬 (**19**, **30**) あるいは FXR 作動薬であるケノデオキシコール酸 (CDCA)、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、酵素活性を調べた。まず、創製した化合物 **19** と **30** の細胞障害性を検討した (図 1 A)。その結果、いずれの化合物も 5 μM までは細胞障害性を示さなかった (図 1 A)。次に、ALP 活性染色を行ったところ、化合物 **19** と **30** および CDCA と GW4064 の添加は、BMP-2 存在下で ALP の酵素活性を上昇させた (図 1B, C)。また、これらの上昇は、いずれも FXR 阻害剤 (ググルステロン: GS) により完全に阻害された (図 1B, C)。

以上の結果から、新規 FXR 作動薬 (**19**, **30**) は FXR 作動薬としてはたらき、FXR を介して骨芽細胞の分化を促進することが示された。

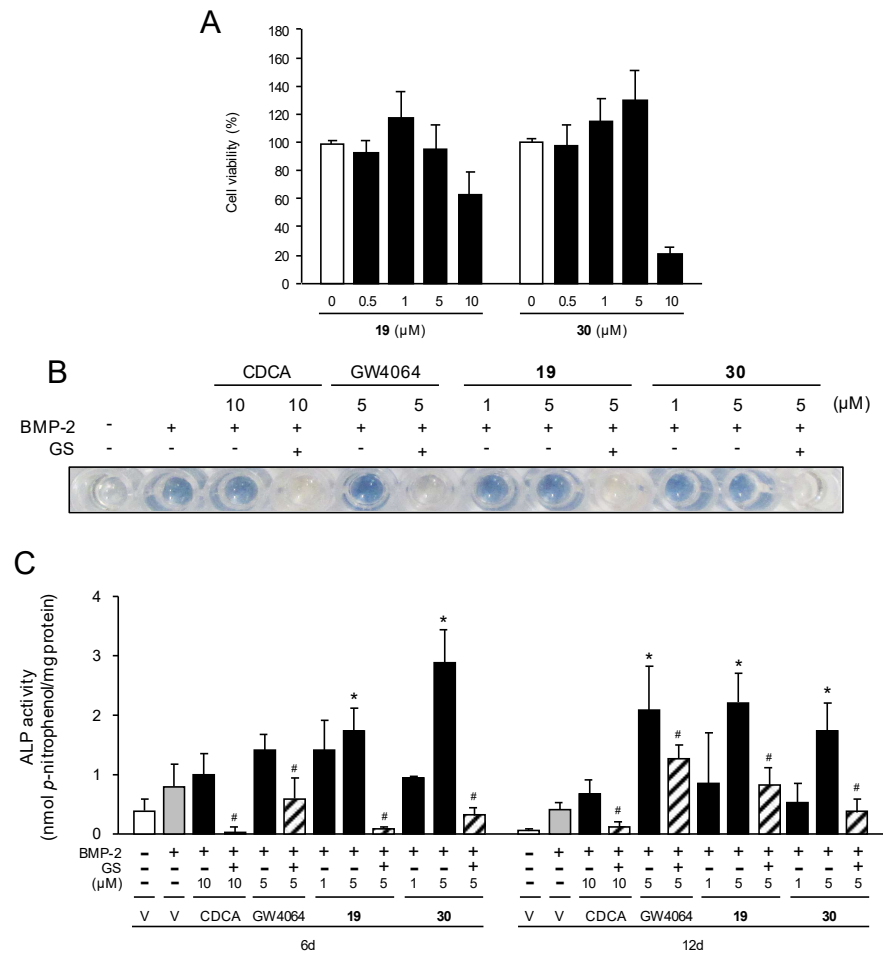


図 1. BMP-2 で活性化したマウス間葉系幹細胞 ST-2 細胞の骨芽細胞への分化における FXR 作動薬 **19** および **30** の効果の検討

A. ST-2 細胞における化合物 **19** および **30** の細胞障害性. ST-2 細胞を 12 日間、化合物 **19** あるいは **30** (0-10 μM) を含む培地で培養し、細胞障害性を WST-8 アッセイにより見積もった。0 μM の値を 100% として、相対値で表した。データは平均値±S.D.(n=5)で表した。B. ALP 活性染色. ST-2 細胞を BMP-2 (50 ng/ml) を含む培地で 12 日間、骨芽細胞へと分化させた。その際、10 μM CDCA, 5 μM GW4064 あるいは 1-5 μM の **19** あるいは **30**。またはグルステロン (GS: 25 μM) を加えた。C. ALP 活性. ST-2 細胞を 6 あるいは 12 日間、BMP-2 (50 ng/ml) 存在下で骨芽細胞へと分化誘導した。その際、10 μM CDCA, 5 μM GW4064 あるいは 1-5 μM の **19** あるいは **30**。またはグルステロン (GS : 25 μM) を加えた。結果は平均値±S.D.(n=3)で表した。*p<0.01, vs.BMP-2 で処理した細胞, #p<0.01, vs.FXR 作動薬で処理した細胞

成果発表 :

<原著論文>

- Masuda, A., Gohda, K., Iguchi, Y., Fujimori, K., Yamashita, Y., Oda, K., Une, M., and Teno, N. N1-Substituted benzimidazole scaffold for farnesoid X receptor (FXR) agonists accompanying prominent selectivity against vitamin D receptor (VDR). *Bioorg. Med. Chem.* 28: 115512 (2020)

<学会発表>

<その他>

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 2 年 4 月 1 日 ～ 令和 3 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、VuuB および IutB の高発現系を構築し、それら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 *vuuB* および *iutB* 遺伝子を pProEX HTa および pET21b(+) に連結して大腸菌 BL21(DE3)pLysS 株に導入し、VuuB を N 末端、IutB を C 末端 His タグ融合タンパク質として高発現させた。得られた VuuB および IutB を用いて酵素活性を測定した。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、Fe³⁺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、VuuB は NADH を電子供与体として、IutB は NADH、NADPH および GSH を電子供与体として FeNTA を還元し、その効果は 10 μM FAD および 20 μM NADH (25.89 ± 0.54 nmol/min/mg protein)、100 μM GSH および 100 μM NADPH (14.24 ± 0.11 nmol/min/mg protein) 存在下において最も高い比活性を示した (図 1)。

次に、カテコール型シデロフォアとして vulnibactin および vibriobactin、ヒドロキサメート型シデロフォアとして aerobactin および deferoxamine を用いて反応特異性について検討した結果、VuuB は Fe³⁺-aerobactin 錯体、Fe³⁺-vibriobactin 錯体および Fe³⁺-vulnibactin 錯体に対して、IutB は Fe³⁺-aerobactin 錯体、Fe³⁺-vulnibactin 錯体 Fe³⁺-deferoxamine 錯体および Fe³⁺-vibriobactin 錯体に対して鉄(III)還元活性を示し、Fe³⁺-vulnibactin 錯体に対する比活性は 1.72 ± 0.01 および 2.32 ± 0.70 nmol/min/mg protein とほぼ同様の比活性を示した (図 2)。

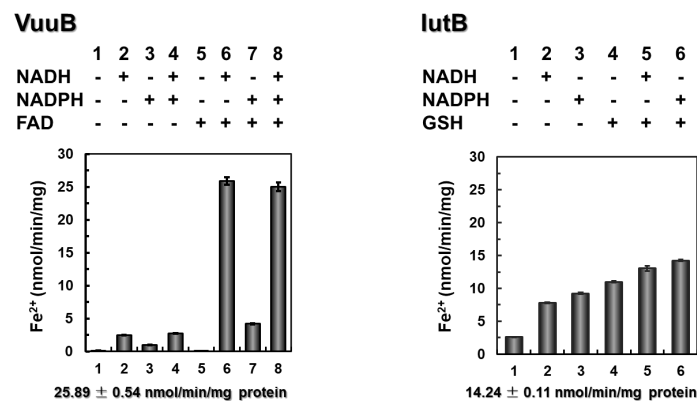


図 1. VuuB および IutB の電子供与体の探索。
The ferric-chelate reductase (FCR) activities of VuuB and IutB were examined using 100 μM Fe³⁺-NTA as an electron acceptor. For the FCR assay of VuuB, 20 μM NADH (sample No. 2, 4, 6, 8) or NADPH (No. 3, 4, 7, 8) was added to 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 1 mM BPT in the presence (No. 5–8) or absence (No. 1–4) of 10 μM FAD. For the FCR assay of IutB, 100 μM NADH (No. 2, 5) or 100 μM NADPH (No. 3, 6) was added to the reaction mixture in the presence (No. 4, 5, 6) or absence (No. 1, 2, 3) of 100 μM GSH. The reactions were carried out at 30°C and 37°C for 1 h, and the OD₅₇₀ was monitored. Data from three independent experiments are shown; vertical lines show standard deviations.

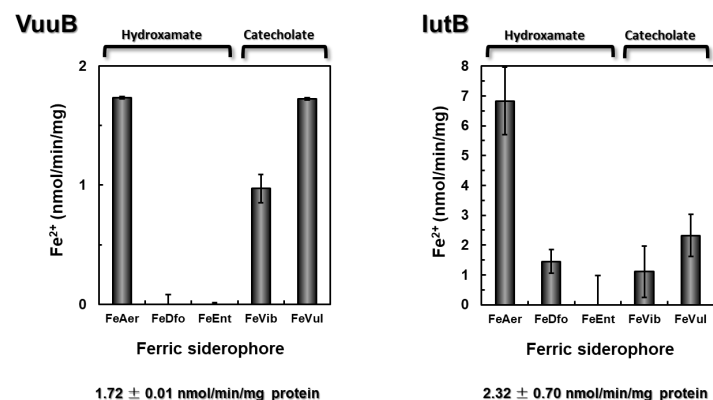


図 2. VuuB および IutB のシデロフォア錯体に対する鉄還元酵素活性。
The FCR activities of VuuB and IutB were examined using 50 μM each of Fe³⁺-aerobactin (FeAer), ferrioxamine B (FeDfo), Fe³⁺-enterobactin (FeEnt), Fe³⁺-vibriobactin (FeVib), or Fe³⁺-vulnibactin (FeVul) as electron acceptors. The reaction mixture contained 10 μM FAD and 50 μM NADH (VuuB) or 50 μM GSH (IutB). The reactions were carried out at 30°C for 1 h. Data from three independent experiments are shown; vertical lines show standard deviations.

成果発表：

<原著論文>

- ・ Naoko Okai, Katsushiro Miyamoto, Koji Tomoo, Takahiro Tsuchiya, Jun Komano, Tomotaka Tanabe, Tatsuya Funahashi, Hiroshi Tsujibo.
VuuB and IutB reduce ferric-vulnibactin in *Vibrio vulnificus* M2799.
Biometals, 33:187-200, 2020.

<学会発表>

- ・ 徳山夏実、宮崎まほろ、森田萌紅、土屋孝弘、宮本勝城、駒野 淳.
Vibrio vulnificus の病原性発現メカニズムの解析.
第 93 回日本細菌学会総会、名古屋 (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 有機薬化学研究室

職・氏名 教授・宇佐美吉英

研究テーマ：

海洋天然物を基盤とする新規 α -グルコシダーゼ阻害剤の開発

研究期間：

平成・令和 2 年 4 月 1 日 ～ 令和 3 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・助教)
研究分担者 葉山登 (大阪医科薬科大学・薬学部・助教)

<共同研究機関>

研究代表者 植沢芳広 (明治薬科大学・薬学部・教授)
研究分担者 永井純子 (明治薬科大学・薬学部・助教)

研究目的：生活習慣病の代表的なもののひとつとして糖尿病が挙げられる。報告によれば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。この病気に対して有機化学者が貢献できるもののひとつとして、新規な α -グルコシダーゼ阻害活性化合物の創製が考えられる。我々は、2014 年に海洋天然物 pericosine E の初の全合成に成功し、さらに、一連の塩素を含む誘導体を合成し、それらの多くが顕著な 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立体配置を有する 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ことが期待される。昨年度までの本課題において、6 位の塩素原子の存在が強力な活性に必須であり、計算化学における酵素とリガンドとの *in silico* ドッキングシミュレーションを行うことで、塩素原子の非共有電子対と酵素のアミノ酸残基との水素結合が重要な役割を果たすことを明らかにした。得られた結果に基づいて、今後、塩素原子を他のハロゲンに変換した新たな pericosine E 誘導体を合成し、より強力な α -グルコシダーゼ阻害活性を示す化合物の創製を目指す。

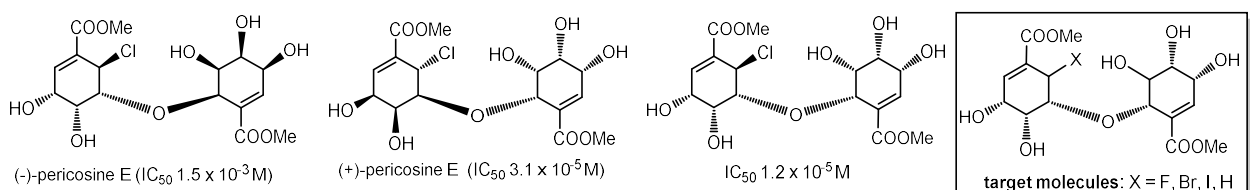
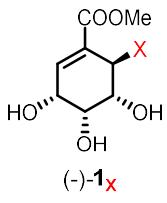
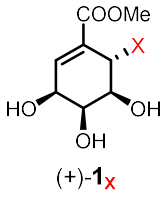
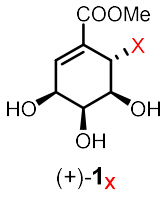


図 1. 塩素原子を含む pericosine E および関連化合物の構造と α -グルコシダーゼ阻害活性

本年度の研究内容および研究成果：本年度は、標的分子の部分構造である pericosine A 部分に他のハロゲンに導入する方法を検討した。既知の合成ルートにおける中間体エポキシドに対してハロゲン陰イオンを用いて S_N2 反応によるハロヒドリンの合成を計画した。HBr や HI は水溶液として市販されており、これらを用いると他の官能基を漬すことが想定されるため、それ以外の反応剤について種々検討した。その結果、臭素化には $BH_2Br \cdot SMe_2$ が、ヨウ素化には AlI_3 が有効であることが明らかとなった。フッ素化は $HF \cdot pyridine$ 錯体を氷浴中、短時間(15分)で処理することで最も良い収率で目的物が得られることが判明した。続いてこれら保護基をもつハロゲン体を脱保護し、各種 pericosine A 誘導体 **1** を両対掌体とも合成した。Pericosine A (**1c**)を含む計 8 種類の化合物について 3 種類の腫瘍細胞 (P388:マウスリンパ球性白血病細胞株、L1210:マウスリンパ球性白血病 B 細胞株、HL-60: ヒト急性前骨髄性白血病細胞株) に対する細胞増殖抑制試験を実施した。表 1 に示す結果のように、全化合物に抗腫瘍活性が認められ、興味深いことに両対掌体間で活性の差がほとんどないこと、フッ素を除くハロゲン種間でも顕著な活性の差は認められず、フッ素体のみ他のものより抗腫瘍活性が劣っていることが判明した。今後、これらの部品を用いて標的化合物を合成する。

表 1. Pericosine A および 6-ハロゲン化体の抗腫瘍活性評価

 (-)- 1 _x	compound		(positive control)				
	cell line		5-FU	(-)- 1 _{Cl}	(-)- 1 _{Br}	(-)- 1 _I	(-)- 1 _F
 (+)- 1 _x	IC ₅₀ (μ M)	P388	3.86	5.00	5.39	6.17	9.91
		L1210	0.63	6.12	5.66	8.18	43.95
		HL-60	0.22	2.03	5.57	6.78	10.77
compound							
cell line		5-FU	(+)- 1 _{Cl}	(+)- 1 _{Br}	(+)- 1 _I	(+)- 1 _F	
 (+)- 1 _x	IC ₅₀ (μ M)	P388	3.86	4.85	5.65	5.91	9.03
		L1210	0.63	3.96	6.30	8.27	38.00
		HL-60	0.22	2.33	6.08	6.55	9.46

成果発表：

<原著論文>

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

<学会発表>

- 神吉真緒、樋口萌、永井純子、植沢芳広、米山弘樹、春沢信哉、宇佐美吉英, 6 位にメトキシ基を持つ pericosine E 誘導体の合成研究: 新規 α -グリコシダーゼ阻害剤の創製, 第 70 回日本薬学会関西支部大会、2020 年 10 月 (立命館大).
- 溝渕慶乃、米山弘樹、春沢信哉、宇佐美吉英, Peicosine A ヨウ素およびフッ素アナログの合成, 日本薬学会第 141 年会、2021 年 3 月 (広島).

<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：

医薬品の誘導体に対する分子鑄型ポリマーの調製と応用

研究期間：

令和 2 年 4 月 1 日 ～ 令和 3 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 葉山 登 (大阪薬科大学・薬学部・助教)
研究分担者 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)

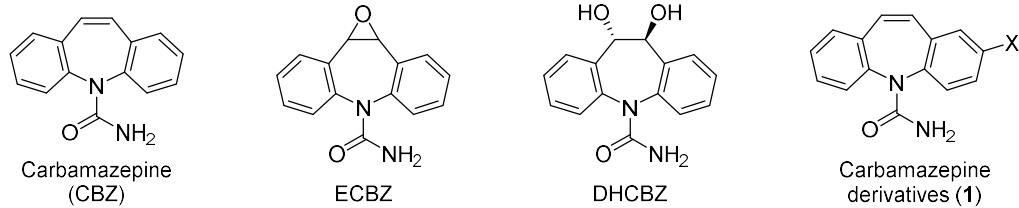
<共同研究機関>

研究代表者 萩中 淳 (武庫川女子大学・バイオサイエンス研究所・所長)
研究分担者 西村 奏咲 (武庫川女子大学・薬学部・講師)

研究目的：

生体試料中の微量の薬物および代謝物の分析には、分離分析法である LC あるいは LC-MS(MS) が汎用されている。また、血清試料の前処理には、除タンパク法、溶媒抽出法、固相抽出法などが用いられているが、いずれも選択性が乏しいという欠点を有している。分子鑄型法は、鑄型分子に対する特異的認識部位あるいは群特異的認識部位を得る方法であり、対象物質の特異的あるいは群特異的認識に利用されているが、微量の薬物の分析においては、分子鑄型ポリマー (MIP) からの鑄型分子の漏出が定量の妨害となる。そこで、擬似鑄型分子 (例えば、**alprenolol** の微量分析においては、擬似鑄型分子としてその構造類似体である **propranolol** (β -blocker) を用いる。) を用いることにより、薬物の高感度・高選択的分析が可能となった。しかし、構造類似体を疑似鑄型として用いる方法では、鑄型分子を用いた MIP に比し分子認識能が低下する。共同研究者らは、**promazine** (PZ) の塩素置換体である **chlorpromazine** を疑似鑄型分子として用いた MIP が、PZ に対して高い分子認識能を与えることを見出し、分子認識能の低下の改善が可能であることを明らかにした。

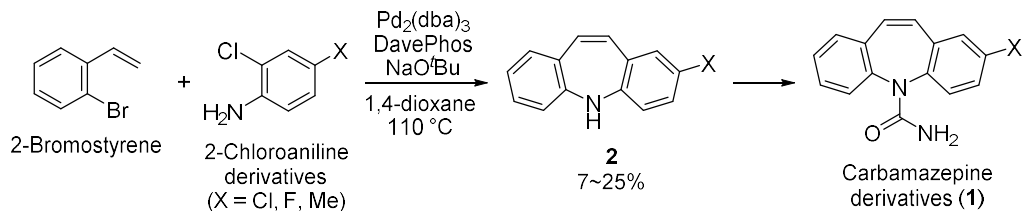
抗てんかん薬であるカルバマゼピン (CBZ) は重篤な副作用を有するため、治療薬物モニタリングが必要な薬物である。そこで、本研究では血清試料中の CBZ およびその代謝物である 10,11-epoxycarbamazepine (ECBZ)、10,11-dihydroxycarbamazepine (DHCBZ) の MIP による選択的抽出法と LC あるいは LC-MS(MS) を組み合わせた分析法を開発することを目的として、CBZ 誘導体 **1** の合成を行うとともに、CBZ 誘導体に対する MIP を調製し、その分子認識能の評価を行った。



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。

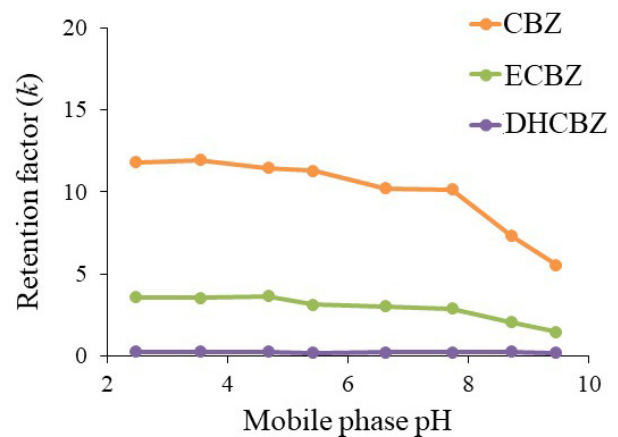
- ① 最初にカルバマゼピンの 2 位を塩素で置換した誘導体 **1a** (X=Cl) の合成を既知の経路 (*J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9773–9784.) で試みたが、芳香環上の塩素化が制御できず、目的物の単離精製が困難であった。そこで、あらかじめ塩素化されている基質を用いた合成経路に変更し、Buchwald によって報告されたジベンザゼピン骨格の合成法 (*J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14048–14051.) を検討した。パラジウム触媒を用いて 2-ブロモスチレンと 4 位に塩素をもつ 2-クロロアニリンのカップリング反応を試みると、複雑な副生成物が生じたが、ジベンザゼピン **2a** (X=Cl) の単離精製は可能であった。このカップリング反応を用いてフッ素原子やメチル基を導入したジベンザゼピン **2** の合成し、**2** から目的となるカルバマゼピン誘導体 **1** を調製した。



- ② MIP の調製には、多段階膨潤重合法を用いた。鋳型分子として、上記①で合成した 2-chlorocarbamazepine (2-CCBZ)、2-fluorocarbamazepine (2-FCBZ)、2-methylcarbamazepine (2-MCBZ)、CBZ (それぞれ 2 mmol) を用い、種粒子にポリスチレン粒子 (粒子径、約 1 μm)、機能性モノマーに メタクリル酸 (MAA) (7 mmol)、架橋剤にエチレンジグリコールジメタクリレート (25 mmol)、重合開始剤に 2,2'-アゾビス (2,4-ジメチルバレロニトリル)、希釈剤にトルエンを用いて、50 °C で 24 時間重合した。また、比較のためにテンプレート分子を用いないで同一条件下で重合したノンインプリントポリマー (NIP) も調製した。MIP の評価には、移動相に 20 mM リン酸塩緩衝液 / アセトニトリル混液を用いて、逆相モードで保持能および分子認識能を HPLC により評価した。なお、MIP の分子認識能の評価には、保持係数 (*k*) の比で定義したインプリント係数 ($IF = k_{MIP}/k_{NIP}$) を用いた。

先ず、¹H NMR および ¹³C NMR により、CBZ およびその誘導体とメタクリル酸との相互作用を検討した。これらの結果は、MAA と CBZ、2-FCBZ および 2-MCBZ では、1:1 で相互作用していることが示唆され、MAA と 2-CCBZ では、2:1 で相互作用していることが示唆された。CBZ、2-FCBZ および 2-MCBZ の O=C-NH₂ と 1 分子の MAA が水素結合を形成し、2-CCBZ では O=C-NH₂ と 1 分子の MAA と水素結合、2 位のハロゲン原子と 1 分子の MAA がハロゲン結合を形成している可能性が示唆された。

多段階膨潤重合法を用いることにより、粒子径約 5 μm の粒子径単分散の MIP あるいは MIP が得られることを、走査電子顕微鏡画像により確認した。次に、逆相モードにおける CBZ、CBZ 誘導体 (2-CCBZ および 2-MCBZ)、CBZ 代謝物 (ECBZ および DHCBBZ) の保持および分子認識を評価した。MIP_{CBZ} において、CBZ およびその代謝物の保持に対する移動相 pH の影響を評価したところ、図に示すように、pH 2 – 8 で保持はほぼ一定であった。pH 8 以上では、MAA の解離により、



MIP の疎水性が低下し、保持の減少が見られたと推測される。移動相 pH 3 において、それぞれの鑄型分子の MIP における鑄型分子の保持は、MIP_{2-CCBZ} > MIP_{2-MCBZ} > MIP_{CBZ} の順であった。一方、分子認識能は、MIP_{CBZ} > MIP_{2-MCBZ} > MIP_{2-CCBZ} の順であった。また、移動相 pH 3 において、ECBZ および DHCBBZ に対する保持能および分子認識能は、MIP_{CBZ} において最も高かった。形状認識に加えて水素結合、ハロゲン結合および疎水性相互作用が重要な役割を果たしていると推測された。

今後、1) 保持能および分子認識能の評価を終わっていない、MIP_{2-FCBZ} を評価する、2) ハロゲン結合の増強を期待して、臭素あるいはヨウ素誘導体の合成、ニ置換体の合成を検討し、それらの MIP の調製と評価を行う、3) 架橋剤として EDMA に変えて、ジビニルベンゼンを用いる、4) 保持能および分子認識能の高い MIP を前処理カラムに用いる CBZ、ECBZ および DHCBBZ の血清中濃度測定への応用を検討する予定である。

また、医薬品の誘導体に対する分子鑄型ポリマーの概念は、CBZ だけでなく他の医薬品の MIP の調製およびその応用に適用可能であり、今後の進展が期待される。

成果発表 :

<学会発表>

・カルバマゼピンおよびその塩素置換体に対する分子インプリントポリマーの調製と評価、神路浩美、久保有沙、葉山 登、本田千恵、萩中 淳、日本薬学会第 141 年会、2021 年 3 月 27 日

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 薬物治療学Ⅱ研究室
職・氏名 教授・福森 亮雄

研究テーマ：

アルツハイマー病治療を目指す基質結合機構の解明

研究期間：

令和 2 年 11 月 1 日 ～ 令和 3 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 福森 亮雄 (大阪薬科大学・薬学部・教授)

<共同研究機関>

研究代表者 工藤 喬 (大阪大学大学院・医学系研究科・精神健康医学)

研究分担者 丸山 理気 (大阪大学大学院・医学系研究科・精神健康医学)

研究目的：

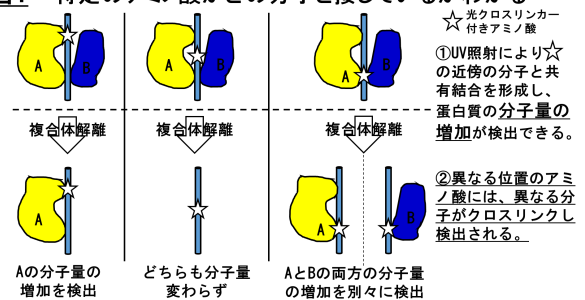
本研究の目的は γ セクレターゼのエクソサイトと呼ばれる基質結合部位への結合機構を解明し、副作用の少ないアルツハイマー病 (AD) 治療薬開発につなげることである。アルツハイマー病の病原物質アミロイド β (A β) 産生において重要な働きをする γ セクレターゼの阻害剤及び調節剤は、薬効は期待されるものの副作用の懸念から開発が難航している。報告者らは従来の γ セクレターゼ阻害剤が潜在的に有する副作用リスクを回避できる新規の作用部位としてエクソサイトを同定してきた。この共同研究では、そのエクソサイトへの多様な基質の結合メカニズムを調べるとともに、その副作用を回避できる阻害法開発へ向けた基盤構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

本年度の研究内容および研究成果：

【方 法】

アミロイド前駆体基質 (APP-C99 および APP-C83) の γ セクレターゼのエクソサイトへの結合の可視化は、ケミカルバイオロジーの技術のひとつである部位特異的光親和性クロスリンク法 (図 1) を用いた。この手法により、分子の相互作用をアミノ酸レベルで検出できる。具体的には非天然アミノ酸 (para benzoyl phenylalanine) の遺伝的取り込み法 (図 2) を用いて、分子中の任意の 1 アミノ酸を

図1 特定のアミノ酸がどの分子と接しているかわかる



クロスリンク可能な側鎖を持つ非天然アミノ酸に置き換えたアミロイド前駆体基質を大腸菌に発現させ C

末端に HIS タグにより精製する。その精製基質を γ セクレターゼを含む細胞溶解液と混合し、インタクトな結合状態で、照射しクロスリンクさせる。その後、変性条件で、複合体を解離し、HIS タグを用いてプルダウンし、ウェスタンブロットする。基質と共有結合した酵素分子は分子量が増加する (黄矢頭が赤矢頭となる。図 3)。このようにして、基質分子中の各アミノ酸に接触する酵素分子を検出した。

【結 果】

今回は γ セクレターゼの代表的な基質 APP-C83 に絞り、APP-C83 のエクソサイト結合の検出系を確立した。APP-C83 は、 $A\beta$ の直接の前駆体である APP-C99 と同じく、アミロイド前駆体蛋白 (APP) 由来の γ セクレターゼの基質であるが、APP-C99 とは異なり、アミノ末端の 16 アミノ酸が欠けている。この欠損 16 アミノ酸残基には、APP-C99 がエクソサイトと相互作用する主要なアミノ酸が含まれており、エクソサイトへの結合メカニズムについてなんらかの洞察が得られると考え、APP-C83 に焦点を当て解析した (図 4)。APP-C83 の部位特異的光クロスリンク法を用いて、単一アミノ酸レベルでの γ セクレターゼとの相互作用を直接調べた。 γ セクレターゼのサブユニット蛋白である PEN-2 は X 番残基が強く相互作用した。それに対して、APP-C99 の PEN-2 との相互作用は X+1 番残基で強かった。このように、相互作用アミノ酸残基が異なっていた。

【考 察】

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

成果発表：

<原著論文>

・

<学会発表>

・

<その他>

・

・

図2 光親和性クロスリンク可能な非天然アミノ酸の遺伝的取り込み法

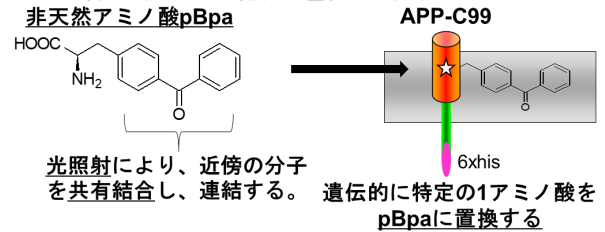
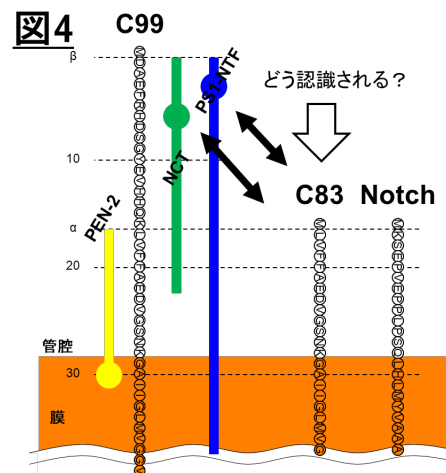
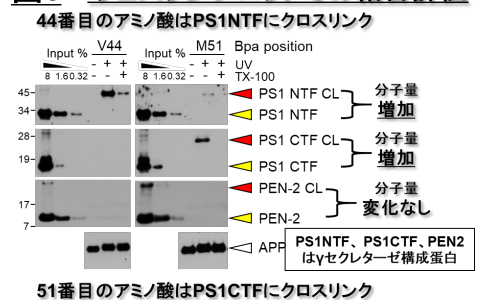


図3 ウェスタンブロットでの結合評価



共同研究成果報告書

研究代表者 所属 大阪薬科大学薬学部
職・氏名 教授・奥平桂一郎

研究テーマ：

ABC トランスporter発現制御機構の解析研究

研究期間：

令和 2 年 4 月 1 日 ～ 令和 3 年 3 月 31 日

研究担当者：

< 本学 >

研究代表者 (大阪薬科大学・薬学部・教授・奥平桂一郎)

< 共同研究機関 >

研究代表者 (同志社女子大学・薬学部・教授・尾崎 恵一)

研究目的：

脂質輸送型 ABC トランスporterの発現および機能を促進する化合物の探索と、新規発現制御機構の解明

本年度の研究内容および研究成果：

ABC トランスporterは、生体膜にあつて ATP 加水分解と共役して、薬剤・イオン・脂質等の輸送を担い、遺伝子変異による機能不全は様々な遺伝病の発症と関連することが報告されている。ABC トランスporterの A サブファミリーは脂質の膜貫通輸送に関わっており、例えば、ABCA1 は細胞表面膜にあつて細胞内の脂質を細胞外に輸送して高密度リポタンパク質 (HDL) を形成し、ABCA1 の機能不全変異により血中の HDL がほぼ消失することが分かっている。ABCA1 と相同性の高い ABCA7 についてはまだ生理的な機能はよくわかっていないが、最近になって複数のゲノムワイド関連解析の結果から、孤発性アルツハイマー病発症の危険因子であることが明らかとなった。しかしこれまで、ABCA7 の機能解析や発現制御メカニズムの研究、また、ABCA7 を標的とした創薬開発という点においては、ほとんど研究が進んでいない。

当該共同研究では、各種化合物ライブラリーから様々な化合物を細胞に添加し、ABCA7 を含めた脂質輸送型 ABC トランスporterの発現および機能を促進する化合物を探索することを目的とする。発見した化合物は、構造活性相関についての検討を行い、化合物を用いた ABC トランスporterの

転写および翻訳後における発現制御メカニズムの解析を行う。さらに、開発した化合物を基盤とした、疾病と関連する ABC トランスポーターの活性化を指向した創薬開発を目指す。

本年度は、ABCA7 の発現を促進する化合物を同定し、その活性及び細胞毒性について検討した。マウスマクロファージ細胞を用いて、スクリーニングより複数の化合物が ABCA7 のタンパク質発現量を増加させることを明らかにした。同定された化合物群の一つであるトリテルペン誘導体の化合物 X について、化合物の濃度および処理時間における ABCA7 の発現量に与える影響を検討した (fig.1)。さらに、それぞれの濃度について細胞生存率を測定し、化合物の細胞に対する毒性を評価した (fig.2)。

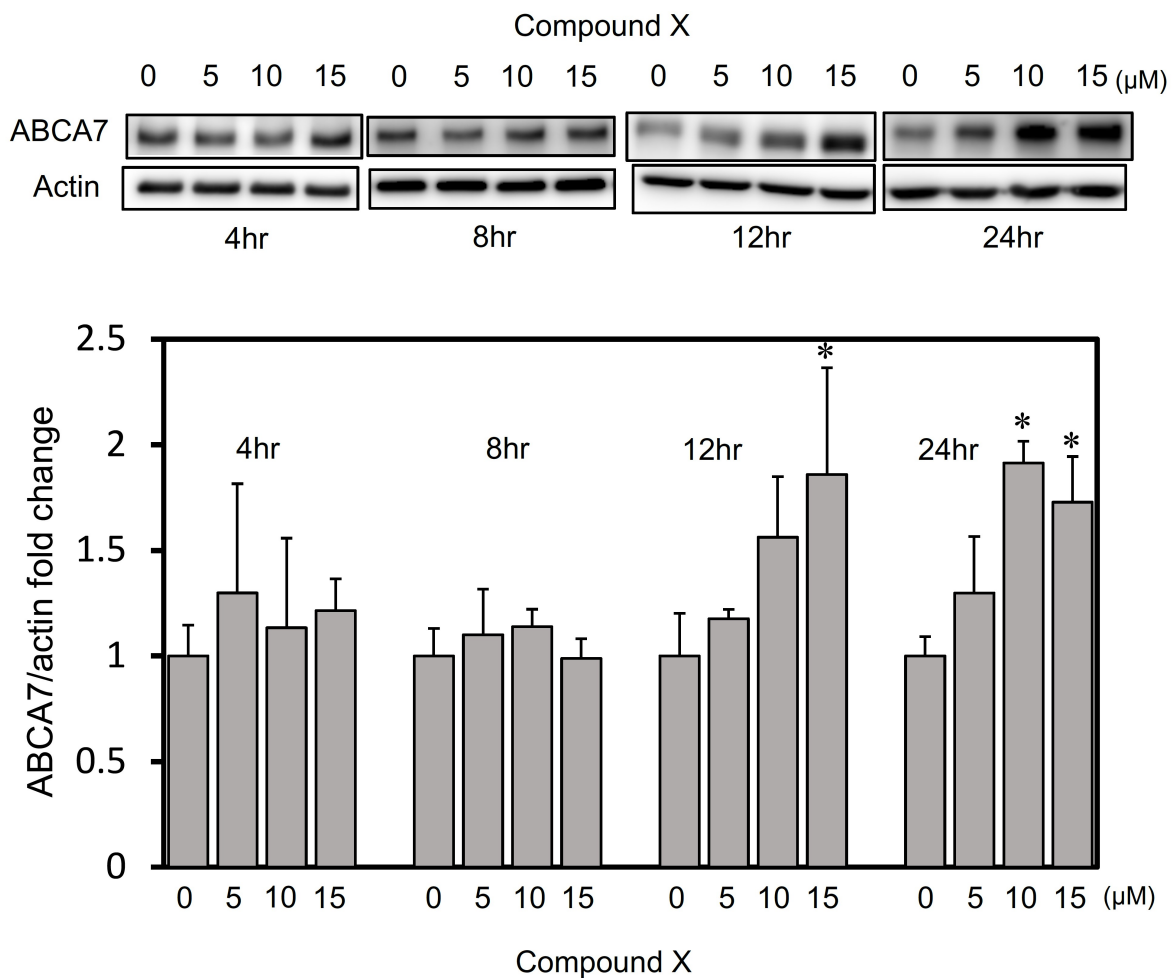


Fig.1 ABCA7 タンパク質発現量に対する化合物 X の作用時間及び濃度の検討

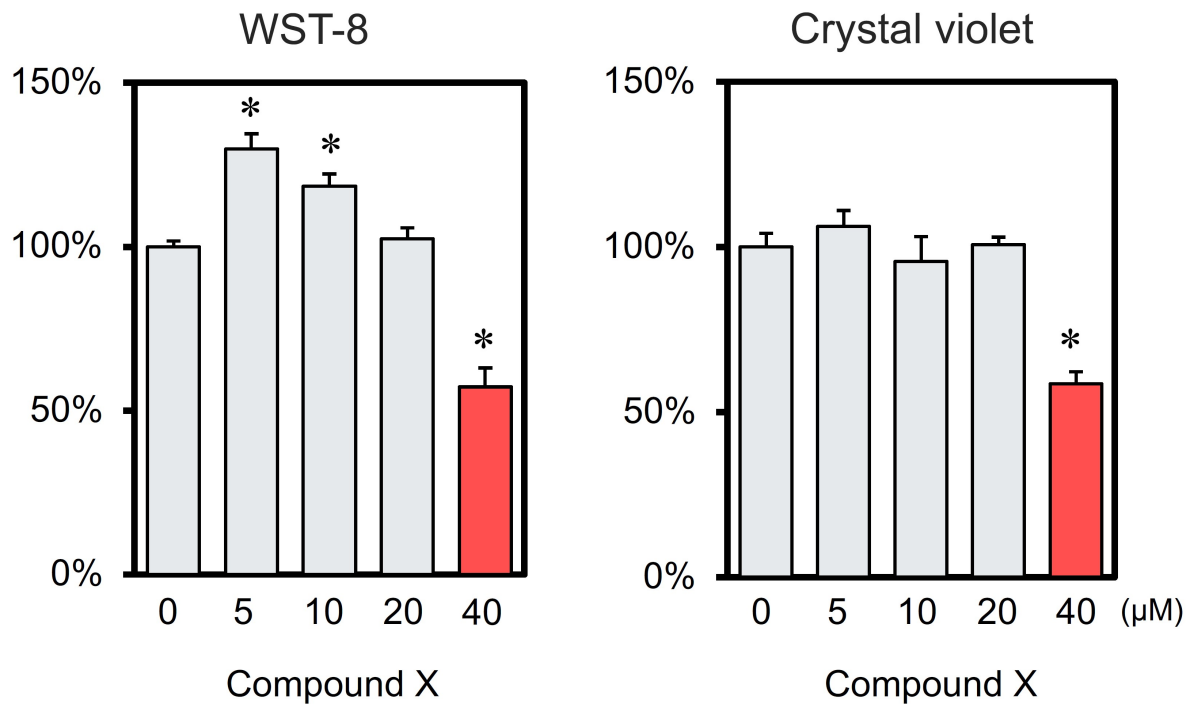


Fig.2 化合物 X の細胞毒性の検討 (24 時間)

マウスのマクロファージ細胞 J774 に対して、化合物 X は 15 μ M で 12 時間、10 μ M, 15 μ M で 24 時間作用させた時に、ABCA7 の発現を有意に増加させた (Fig.1)。また、WST-8 アッセイまたは crystal violet 染色により、化合物 X を作用させた時の細胞の生存率を検討したところ、20 μ M 以下であれば 24 時間で細胞死を引き起こさないことが分かった (Fig.2)。

引き続き、化合物 X 及びその他の同定した化合物群を用いて、ABCA7 発現増強作用及びメカニズムの解析を行う予定である。

成果発表：

<原著論文>

1. Tsujita M, Vaisman B, Chengyu L, Vickers KC, Okuhira K, Braesch-Andersen S, Remaley AT. Apolipoprotein A-I in mouse cerebrospinal fluid derives from the liver and intestine via plasma high-density lipoproteins assembled by ABCA1 and LCAT. FEBS Lett. **595**, 773-788 (2021)
2. Ueda M, Komiya C, Arii S, Kusumoto K, Denda M, Okuhira K, Shigenaga A, Otaka A. Sequence-Independent Traceless Method for Preparation of Peptide/Protein Thioesters Using CPaseY-Mediated Hydrazinolysis. Chem Pharm Bull. **68**, 1226-1232 (2020)
3. Ishima Y, Mimono A, Tuan Giam Chuang V, Fukuda T, Kusumoto K, Okuhira K, Suwa Y, Watanabe H, Ishida T, Morioka H, Maruyama T, Otagiri M. Albumin domain mutants with enhanced A β binding

capacity identified by phage display analysis for application in various peripheral A β elimination approaches of Alzheimer's disease treatment. *IUBMB Life*. **72**, 641-651 (2020)

4. 奥平桂一郎 「抗動脈硬化性タンパク質を利用した創薬への挑戦」 *YAKUGAKU ZASSHI* **140**, 153-157 (2020)

<学会発表>

1. 奥平桂一郎 : 「脂質トランスポーターABCA7 の発現制御機構解明に向けた研究」 第 15 回トランスポーター研究会年会 (Web) (2020.10)
2. 奥平桂一郎 : 「動脈硬化性疾患を標的とした HDL 創薬への挑戦」 徳島大学大学院医歯薬学研究部・BRIGHT 合同公開シンポジウム (2020.12)
3. 佐久間覚、奥平桂一郎、3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化誘導に対するスルフォラファン及びアリルイソチオシアネートの影響、日本薬学会第 141 年会 (web 開催)、2021 年 3 月 28 日
4. 立花洗季、小川真依、石田竜弘、異島優、奥平桂一郎、免疫抑制剤フィンゴリモドがマクロファージへの脂質蓄積に与える影響、日本薬学会第 141 年会 (web 開催)、2021 年 3 月 27 日