

大阪医科薬科大学 薬学部
共同研究成果報告書

2021

(2021年4月～2022年3月)

共同研究課題名（研究テーマ）

疾患モデル動物を用いたてんかん病態、薬理研究	- 4 -
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	- 8 -
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	- 11 -
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	- 14 -
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	- 17 -
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	- 19 -
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	- 23 -
特異体質性薬物反応のメカニズムに関する研究	- 27 -
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	- 31 -
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	- 34 -
核内受容体モジュレーターによる脂質代謝調節	- 36 -
<i>VIBRIO VULNIFICUS</i> M2799 株の鉄獲得機構の解明	- 39 -
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	- 42 -
アルツハイマー病治療を目指す基質結合機構の解明	- 46 -
ABC トランスポーターの発現制御および機能解析研	- 49 -
ホウ素センサープローブの開発に関する研究	- 51 -
酸化ストレス疾患の予防と病態改善に関する研究	- 54 -

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 薬品作用解析学研究室
職・氏名 教授・大野 行弘

研究テーマ：

疾患モデル動物を用いたてんかん病態、薬理研究

研究期間：

令和3年4月1日 ～ 令和4年3月31日

研究担当者：

<本学>

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

<共同研究機関>

研究代表者	池田 昭夫	(京都大学・医学部附属病院・教授)
-------	-------	-------------------

研究目的：

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

本年度の研究内容および研究成果：

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、Kir4.1 をコードする *KCNJ10* 遺伝子の変異が強直間代発作を伴う EAST/SeSAME 症候群を誘発することや、Kir4.1 ノックアウト動物において、けいれん発現、運動失調、四肢の伸展などの行動異常が認められること、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。

本研究では、てんかん病態におけるアストロサイト Kir4.1 チャネルの役割をより明らかにする目的で、アストロサイト選択的阻害剤フルオロクエン酸 (FC) 投与によるけいれん行動を評価するとともに、脳内アストロサイトおよび Kir4.1 の発現変化を解析した。

1. FC 投与によるけいれん行動の評価

8 週齢の SD 系雄性ラットの右側脳室 (AP : -0.9 mm、LM : +1.5 mm、DV : +2.3 mm) にガイドカニューレを埋め込み、4-7 日間の回復期間をおいて実験に使用した。実験日には、FC (0.1、1、10 nmol) を注入用カニューレにより直接微量注入 (20 μ L/分、1 分間) し、2 時間のけいれん行動評価を行った。行動評価後、灌流脳摘出を行い、後日、GFAP および Kir4.1 の免疫組織染色に用いた。

行動評価の結果、Vehicle 群と FC 0.1 nmol 群では、けいれんなどの異常行動を示した動物はいなかったが、FC 1 nmol 群において 7 匹中 1 匹でミオクローヌスが認められた。一方、FC 10 nmol を投与された動物では、8 匹中 3 匹で間代性けいれんや強直間代性けいれんが認められ、また、けいれんを起こさなかった 5 匹のうち 3 匹では頭部や顔面のひきつりが認められた (表 1)。

表 1 FC 投与によるけいれん行動評価

	Vehicle	0.1 nmol	1 nmol	10 nmol
変化なし	9/9	7/7	6/7	2/8
頭部や顔面のひきつき	0/9	0/7	0/7	4/8
ミオクローヌス	0/9	0/7	1/7	1/8
間代性けいれん、強直性けいれん	0/9	0/7	0/7	3/8

2. FC 投与による GFAP 発現変化の解析

行動評価後に摘出した脳から厚さ 4 μ m の冠状切片を作成し、ABC-DAB 法により免疫組織化学染色を行った。脳切片をブロッキング処理後、マウス抗 GFAP モノクローナル抗体 (1 : 100) を添加し、4°C で約 36 時間インキュベートした。その後、ビオチン化ヤギ抗マウス IgG 抗体 (1 : 400) を添加して 60 分間インキュベートし、さらにアビジン-ビオチン化ホースラディッシュペルオキシダーゼ複合体と 60 分間反応させた。GFAP 陽性細胞は、ジアミノベンジジン (DAB) により発色させ、可視化した (図 1)。GFAP 陽性細胞数の計測は、運動皮質 (MC)、体性感覚野 (SC)、嗅周一嗅内皮質 (PRh-Ect)、梨状葉皮質 (PirC)、内側扁桃核後腹部 (MePV)、内側扁桃核後背部 (MePD)、外側基底核 (BLP)、内側基底核 (BMP)、内側皮質核 (PMCo)、海馬 CA1、CA2、CA3、海馬歯状回 (DG) 領域の計 13 部位について行った。

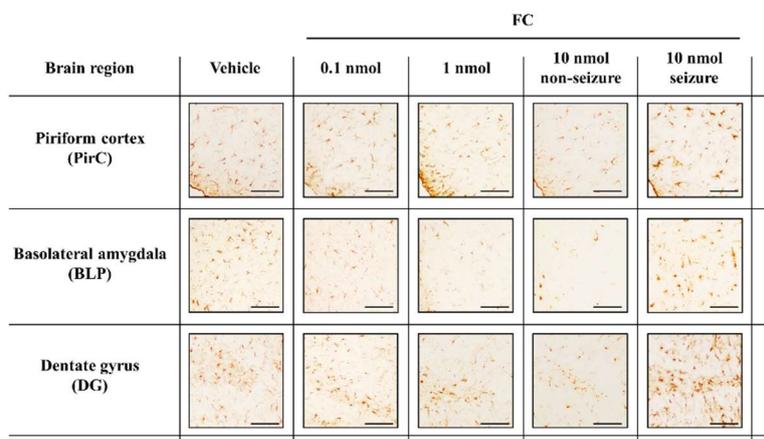


図 1 GFAP の免疫組織染色画像 Scale bar: 100 μ m

GFAP 発現解析の結果、いずれの脳領域においても FC 0.1 nmol 投与による影響は認められなかった。一方、FC 1 nmol 投与では、vehicle 群と比較して、PRh-Ect、PirC、BLP、海馬 CA2、DG 領域における GFAP 陽性細胞数が有意に減少した (図 2)。また、FC 10 nmol 群ではけいれん発現の有無により、GFAP の発現が大きく異なっていた。すなわち、けいれん発現が認められなかった動物では MePD、MePV、BLP、BMP、海馬 CA2 領域運動における GFAP 陽性細胞の減少が見られたが、けいれんを起こした動物の GFAP 発現数は vehicle 群と同程度であり、さらに、反応性アストロサイトの形態学的特徴である GFAP 陽性細胞の細胞体の肥大化も見られた (図 1)。

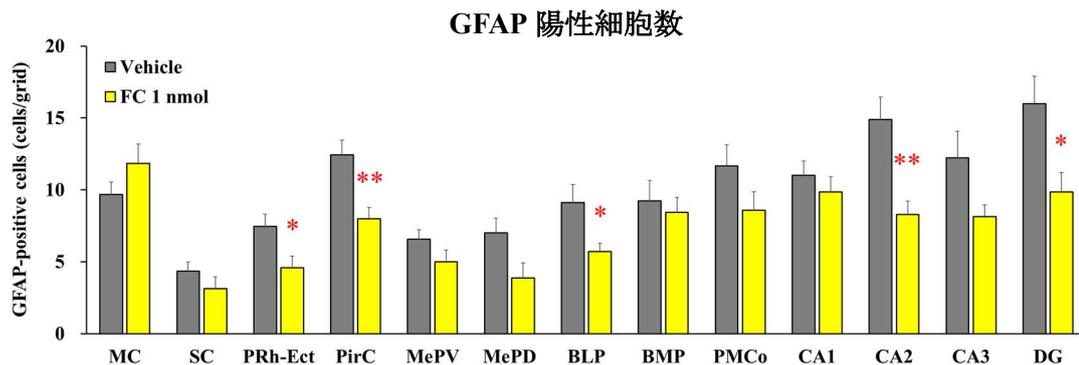
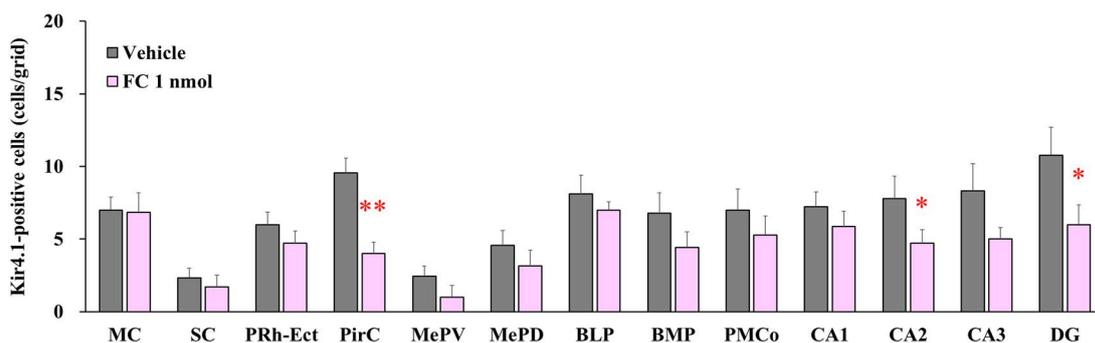


図 2 FC (1 nmol) 投与による GFAP 発現変化

FC 投与による Kir4.1 発現変化の解析

FC 1 nmol 投与による Kir4.1 発現変化を、ウサギ抗 Kir4.1 ポリクローナル抗体 (1 : 100) とビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1 : 400) を用いて、上記 GFAP の免疫組織染色と同様の方法 (ABC-DAB 法) で解析した。その結果、FC 1 nmol 投与群では、vehicle 群と比較して、PirC、CA2、DG 領域における Kir4.1 発現が減少していた (図 3)。



以上、本年度研究結果から、高用量 FC (10 nmol) の脳室内投与によりけいれんが誘発されることが明らかになり、また、FC 1 nmol 投与では、けいれん発作は惹起されないが、側頭葉皮質領域、扁桃核領域、海馬領域における GFAP および Kir4.1 発現が抑制されることが示された。今後は、これら FC 投与モデルを用いて、てんかん病態におけるアストロサイトや Kir4.1 の役割について解析していく予定である。

成果発表：

< 総説 >

- M. E. Frizzo, Y. Ohno: Perisynaptic astrocytes as a potential target for novel antidepressant drugs., *J. Pharmacol. Sci.*, 145, 60-68 (2021)
- Y. Ohno, N. Kunisawa, S. Shimizu: Emerging roles of astrocytic Kir4.1 channels in modulating brain diseases., *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 10236 (2021)

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 臨床薬学教育研究センター
職・氏名 教授・中村 任

研究テーマ：

がん化学療法時の薬物血中濃度に基づく有効性・安全性の評価に関する研究

研究期間：

令和3年4月1日 ～ 令和4年3月31日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 中村 任 （大阪医科薬科大学・薬学部・教授）

<共同研究機関>

研究代表者 矢野 育子 （神戸大学医学部附属病院・薬剤部・教授）

研究分担者 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 生体試料の前処理条件の最適化に関する検討

バイオメタルの測定には ICP-MS を用いており、測定サンプルの前処理として開放型容器を用いて強酸による湿式灰化を行ってきた。開放型容器の使用は完全乾固できるメリットがある一方で、コンタミや作業効率性の点で懸念もあった。本年度は、閉鎖型容器を用いるマイクロ波試料分解装置の利用が可能となったため、同装置の加熱プログラムの最適化を行った。

試料の灰化容器として、耐熱性・耐酸性に優れたポリテトラフルオロエチレン（PTFE）製容器を用いて検討を進めたところ、マイクロ波加熱処理時に容器変形に伴うサンプルの漏出など測定精度に影響を及ぼすことが考えられた。また、試料の種類によっては同装置での加熱プログラムを最適化する必要性も考えられた。一方、測定サンプルは、測定のために試料を消費することとなり、患者血液検体など希少サンプルを用いる場合には再測定などのことを考え、できるだけ少量のサンプルで測定でき且つ精度を落とさずに測定することが求められる。既報も参考にマイクロ波試料分解装置を用いてサンプルの漏出や加熱温度や時間の影響について検討し、標準血清 50 μ L に対して混酸 1 mL（65%硝酸：35%過酸化水素=2：1）を用いて灰化处理するための条件設定を終えた。また、容器内溶液の損失を最小限度に留めて灰化处理可能なことを確認した。

加熱プログラムの最適化を終えたことから、今後は、プラチナならびに鉄、亜鉛、銅などの元素の測定を順次行い、プラチナ系薬物の変動解析を進める予定である。また、引き続き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予定である。

② 服薬指導シートの有用性に関する検討

がん化学療法に関連して比較的高い頻度で重篤な有害事象は発生するため、安全で効果的な化学療法を確保し、患者の不安を和らげるためにも有害事象の発生時期やその重篤度の予測は重要である。これまで、有害事象関連事項を把握するために添付文書等の情報に基づいて血液腫瘍患者に対する服薬指導シートを開発してきたが市販後の臨床データに対する有用性評価は十分に行えていない。本年度は、エトポシド、メチルプレドニゾロン、シスプラチン、シタラビン、リツキシマブ（ESHAP±R）を用いた化学療法あるいはリツキシマブ、シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾロン併用療法（R-CHOP）を受けた非ホジキンリンパ腫（NHL）患者を対象に服薬指導シートの有用性ならびにその改善に関する検討を行った。

ESHAP±R 療法を施行された成人患者 48 例を対象に服薬指導シートを用いて有害事象をモニタリングし、臨床データに基づく同シートの修正前と修正後の予測精度を試算したところ、修正の有無にかかわらず発生した 246 件の有害事象すべてを予測することが可能であった。また、このうち 149 件（61%）は修正前の服薬指導シートで予測された期間と同時期に発生したが、実データを元に発症時期や期間を修正したところ予測精度を 84%に向上させることができた。

R-CHOP 療法を施行した成人患者 75 名を対象に行った検討においても発生した有害事象はいずれも服薬指導シートによって予測されたものであった。そのうち、254 件（71%）は同シートに記載された副作用項目と同じ期間に発生しており、また、重篤度を問わず、輸液反応や末梢神経障害の発現時期も同シートに記載されていた内容を完全に一致していた。一方で、血小板減少症の患者（42%）では予測精度が低下しており、今後の検討課題である。

成果発表：

<原著論文>

- Mayako Uchida, Rika Kawai, Rie Hisamitsu, Sayaka Mai, Shigeru Ishida, Hiroyuki Watanabe, Takehiro Kawashiri, Koji Kato, Keiko Hosohata, Toshihiro Miyamoto, Nobuaki Egashira, Tsutomu Nakamura, Koichi Akashi, Ichiro Ieiri. Evaluation of medication instruction sheets for patients undergoing R-CHOP therapy in non-Hodgkin's lymphoma. *In vivo*, 36(3):1461-1467 (2022)
- Mayako Uchida, Saeko Murata, Hanae Morikawa, Hiroko Yonemitsu, Shigeru Ishida, Kimitaka Suetsugu, Toshikazu Tsuji, Hiroyuki Watanabe, Takehiro Kawashiri, Koji Kato, Keiko Hosohata, Toshihiro Miyamoto, Nobuaki Egashira, Tsutomu Nakamura, Koichi Akashi, Ichiro Ieiri. Usefulness of medication guidance sheets for patients with non-Hodgkin's lymphoma receiving ESHAPA±R therapy. *Anticancer Res*, 42(4):2053-2060 (2022)

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3年4月1日 ～ 令和4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)

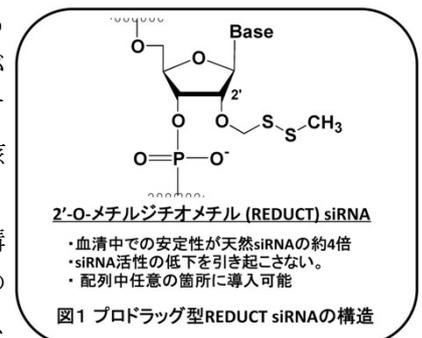
<共同研究機関>

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 (図1)。

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した。



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

を明らかにした。これらの知見を基に、化学修飾が siRNA 活性に影響を及ぼさず、血清中での分解好発部位にはプロドラッグ型 REDUCT 修飾、化学修飾が siRNA 活性に影響を及ぼさない血清中での分解好発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 REDUCT, 2'-OMe-ApoB siRNA は、in vitro では 2'-OMe 修飾に対する優位性を確認できたものの、センス鎖に GalNac 修飾を行った第一世代 2'-OMe-ApoB siRNA は、in vivo では apo B mRNA の発現抑制効果は全く示さなかったことを前年度までに明らかにしている。

第二世代 REDUCT, 2'-OMe 修飾 ApoB siRNA の in vitro 評価

本年度は、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 の分子設計の見直しを行った。まず、センス鎖についても 2'-OMe 修飾により siRNA 活性が低下する部位を明らかにし、センス鎖にも 12 残基の 2'-OMe 修飾を行い、3'-末端は GalNac 修飾を行うことで 3'-exonuclease からの保護と肝臓細胞へのターゲティングを図った。アンチセンス鎖に関しては、様々な核酸分解酵素に耐性を有することが明らかにされている L 型チミジンで 3'-末端 2 塩基オーバーハングを構成し、安定化を図った上で、in vitro での評価を繰り返しながら最終的に 8 残基の 2'-OMe 修飾を導入し、2 残基の REDUCT 修飾導入した siRNA を設計した。

新たな分子設計に基づき、未修飾の Native ApoB siRNA に加えて、2'-OMe 修飾部位のみ修飾を施した 2'-OMe-ApoB siRNA、REDUCT 修飾を行うべき箇所をも 2'-OMe 修飾した 2'-OMe, 2'-OMe-ApoB siRNA、REDUCT 修飾と 2'-OMe 修飾を適切に施した REDUCT, 2'-OMe-ApoB siRNA の 3 種の第二世代 siRNA を合成し、in vitro における apoB mRNA の発現抑制効果を評価した (図 2)。その結果、未修飾の Native ApoB siRNA と比較して、2'-OMe-ApoB siRNA においては 2'-OMe 修飾の多さから若干の活性の低下が認められたが、REDUCT 修飾を行うべき箇所をも 2'-OMe 修飾した 2'-OMe, 2'-OMe-ApoB siRNA では siRNA 活性はほぼ消失した。この結果は、これまでに同定した siRNA の血清中での安定性向上に化学修飾が必要である領域のうち、従来の 2'-OMe 修飾では siRNA 活性が低下する箇所を的確に捉えることに成功したものと考えている。一方、2'-OMe 修飾と REDUCT 修飾を適切に施した 2'-OMe, REDUCT-ApoB siRNA では、2'-OMe-ApoB siRNA と比較し、若干活性が低下するもののほぼ同程度の活性を維持しており、REDUCT 修飾がプロドラッグとして有効に機能していることが示唆された。これは 2'-OMe, 2'-OMe-ApoB siRNA と比較して、2'-OMe 修飾に対する REDUCT 修飾の優位性を示すことができた結果と考えている。

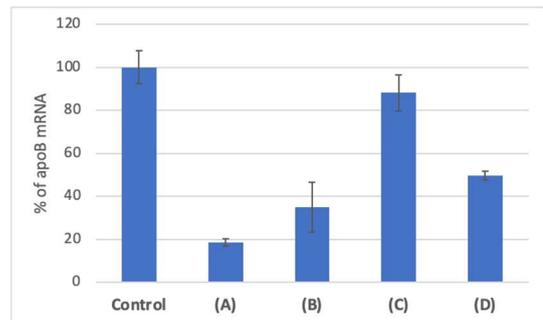


図2 HuH-7 cells were transfected with 10 nM siRNAs in 10 %FBS/ 9 mM CaCl₂/DMEM (CEM method) at 37 °C for 24 h. Cells were lysed and apoB mRNA was quantitated by RT-qPCR. (A) Native ApoB siRNA, (B) 2'-OMe-ApoB siRNA, (C) 2'-OMe, 2'-OMe-ApoB siRNA and (D) 2'-OMe, 2'-OMDTM-ApoB siRNA.

次に in vivo モデル実験として、病態モデルマウス (C57BL/6J) を用いて 2'-OMe-ApoB siRNA 及び 2'-OMe, 2'-OMe-ApoB-siRNA を 5 mg/kg~20 mg/kg で皮下投与し、3 日後の肝臓細胞の apoB mRNA の発現量を RT-qPCR で定量したところ、いずれの siRNA もコントロールと有意差なく、in vivo で naked siRNA としての投与で siRNA 活性を発現するのに十分な安定性を有していないことが示唆された。

以上のように、プロドラッグ型修飾が有効な領域を同定し、これらの情報を基に一連の修飾 ApoB siRNA を設計・合成し、その siRNA 活性の評価を行なった。In vitro では 2'-OMe 修飾、REDUCT 修飾が有効に機能している結果が得られたが、in vivo での予備検討では、以上のようにして設計した部分的 2'-OMe 修飾では十分な安定化は得られないことが判明したことから、今後 LNP (lipid

nanoparticle) などの併用による保護・安定化の向上を図る方策や、REDUCT 修飾を全残基に施すことのできる合成技術の開発を検討していく必要があると考えている。

成果発表：

<学会発表>

・杉本紀人、林淳祐、船木涼平、保積慧美、和田郁人、斯波真理子、和田俊一、浦田秀仁
プロドラッグ型ホスホトリエステル修飾ギャップマー型核酸の合成とその遺伝子発現抑制効果の評価 日本薬学会 第143年会 (名古屋)

・杉本紀人、林淳祐、船木涼平、保積恵美、和田郁人、斯波真理子、和田俊一、浦田秀仁
プロドラッグ型ホスホトリエステル修飾を導入した Gapmer 核酸の合成とその評価 日本核酸医薬学会 第6回年会 (徳島)

<その他>

・林淳祐、和田俊一、浦田秀仁

「医薬品における DDS 技術開発と製剤への応用」情報機構、2021 年
第4章 3節 核酸医薬における化学修飾核酸の概要と研究開発

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3年4月1日 ～ 令和4年3月31日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 中村 任 (大阪医科薬科大学・薬学部・教授)
研究分担者 中村 敏明 (大阪医科薬科大学・薬学部・教授)
岩永 一範 (大阪医科薬科大学・薬学部・教授)
和田 恭一 (大阪医科薬科大学・薬学部・特任教授)
音窪 麻衣 (大阪医科薬科大学・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)

研究目的：

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

本年度の研究内容および研究成果：

(1) 慢性疾患に対する薬物療法時の配合錠使用に関する薬学的評価

降圧作用を有する配合錠は服薬アドヒアランス向上により脳心血管イベント(MACE)発症率を低下させる効果が期待されるが、関連性を示す報告は限定的である。本年度は、国立循環器病研究センターでイルベサルタン/アムロジピン配合錠を処方された患者(配合錠群)と各単剤で処方された患者(単剤群)を対象とし、ICD-10コードの後方視的調査により各群の初回処方後5年間のMACE発症歴を比較検討した。

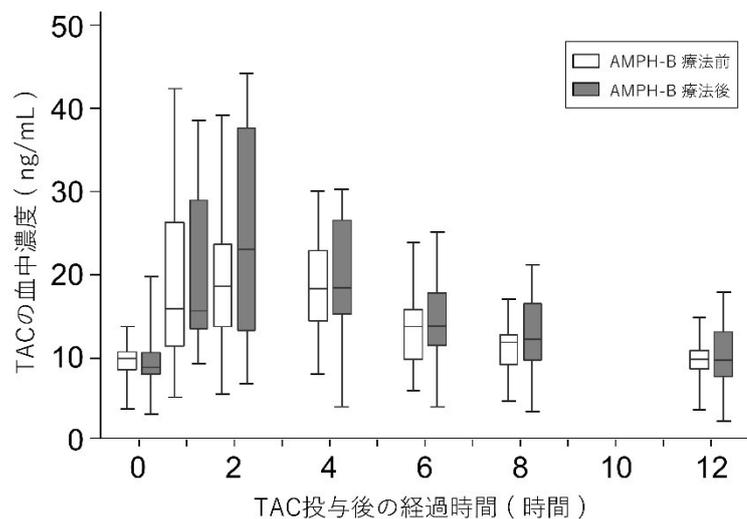
死亡および追跡不能症例を除いた配合錠群 209名と単剤群 108名において、MACE発症延べ件数(実人数)はそれぞれ212件(103名)および104件(55名)であり、配合錠群の単剤群に対するMACEのオッズ比(OR)は0.94であった(有意差なし)。MACEのうち、脳内出血のORは0.16(95%CI, 0.03-

0.66)であり、配合錠群で有意に低かった一方で、Kaplan-Meier 解析の結果、MACE 発現までの期間に有意差は認められなかった。降圧薬の配合錠による服薬管理は脳内出血の発症を抑制する可能性が示唆された。単一施設での検討や少ないサンプル数が研究の限界として挙げられるが、現在、対象配合錠を4種類として検討を進めており、今後は、服薬アドヒアランスとの関連についても評価する予定である。

(2) 心臓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

心臓移植 (HTx) 後の免疫抑制療法に伴う日和見感染予防として抗真菌薬が投与される。アゾール系抗真菌薬はカルシニューリン阻害薬との相互作用が報告されており、これまで国立循環器病研究センターではクロトリマゾールトローチを使用し、同薬の使用中止後にタクロリムス (TAC) 薬物動態が有意に変動することから TAC 血中濃度管理を入院下で慎重に行う必要があった。本年度は、クロトリマゾールに代えてアムホテリシン B (AMPH-B) 含嗽を使用している現状を踏まえて、AMPH-B の併用前後で TAC の体内動態を評価した。

HTx 後、TAC と AMPH-B 含嗽を併用した患者 14 名 (男性 10 名、女性 4 名) を対象として検討を行った。AMPH-B 含嗽併用時 (HTx 術後 6 か月) と非併用時 (同 9 か月) に TAC 内服前および内服後 12 時間までの採血を行い、TAC 血中濃度推移を比較したところ、AMPH-B 含嗽併用下と非併用下における TAC の投与量とトラフ値に有意な差はなかった。また、TAC 血中濃度下面積 (AUC₀₋₁₂) はそれぞれ 170.1±57.4 と 187.5±73.4 (ng・h/mL) であり、有意差を認めなかった。以上の結果、抗真菌薬を AMPH-B 含嗽に変更し、その併用前後の TAC 薬物動態が安定していたことから、HTx 後 6 か月目の心生検時に同薬を中止する際に入院による TAC 血中濃度管理が不要となることが明らかとなった。



心臓移植患者に対するアムホテリシン B (AMPH-B) 療法前後におけるタクロリムス (TAC) の時間-血中濃度推移。
すべての患者は心臓移植後約 1 週間後から 6 ヶ月間 AMPH-B 経口懸濁液による感染予防治療を受けており、箱ひげ図には中央値と第一-第三四分位範囲ならびに最大値と最小値を示した。

(3) 心臓移植後のバルガンシクロビル予防投与患者における好中球減少のリスク評価

臓器移植において、サイトメガロウイルス (CMV) 抗体がドナー陽性かつレシピエント陰性の CMV 感染症に対する高リスク患者では移植後早期よりバルガンシクロビル (VGCV) の予防投与が開始され、

それ以外の中等度/低リスク患者と比較して投与期間が長くなることから、VGCV で警告される重篤な好中球減少発現リスクが高まると考えられるが情報は十分でない。本年度は、心臓移植後の VGCV 投与患者における好中球減少発現リスクに関する因子について検討を行った。

対象は、2012 年 1 月～2017 年 7 月に国立循環器病研究センターで心臓移植を受けた患者のうち、CMV 感染予防または治療を目的に VGCV を投与された患者を対象とした。患者背景、臨床検査値および処方歴は電子カルテより収集し、後方視的観察研究を行った。患者を高リスク群と中等度/低リスク群に分け、移植後 1 年以内の好中球減少発現(好中球数 1,500/ μ L 未満)の有無、VGCV 投与期間と累積投与量、ならびに VGCV 投与開始時の患者背景等について比較検討した。その結果、高リスク群では、移植後早期に VGCV 投与が開始されていた。両群の好中球減少発現率に有意差はなく、また、VGCV 投与後の好中球減少発現までの VGCV 投与期間と累積投与量のいずれにも有意差はなかった。一方、好中球減少発現までのミコフェノール酸モフェチル (MMF) の累積投与量は高リスク群で中等度/低リスク群と比較して有意に多かった。

VGCV 予防投与量 (1 日 1 回 450 mg) は CMV 感染症治療時の半分の用量に設定されている。今回、高リスク群と中等度/低リスク群における好中球減少発現までの VGCV 投与期間や累積投与量に有意差は認められず、VGCV の予防投与は好中球減少発現率に影響しなかったことから、設定した予防投与量が安全性の面から問題とならないことが示唆された。

成果発表：

<原著論文>

・Megumi Ikura, Tsutomu Nakamura, Takaya Uno, Kazuki Nakagita, Hiromi Takenaka, Sachi Matsuda, Ryosuke Oda, Kyoichi Wada, Yuji Hattori, Osamu Seguchi, Masanobu Yanase, Naoki Hayakawa, Norihide Fukushima. Discontinuation of oral amphotericin B therapy dose not influence the pharmacokinetics of tacrolimus in heart transplant patients. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 59(8):566-571 (2021).

<学会発表>

・大嶋健太、音窪麻衣、寺川伸江、岩永一範、角山香織、中村敏明、早川直樹、中村任：イルベサルタン/アムロジピン配合錠処方歴と脳心血管イベント発症との関連解析、日本医療薬学会第 4 回フレッシュアップカンファランス (2021)

・早瀬琴香、音窪麻衣、和田恭一、井倉恵、宇野貴哉、中北和樹、瀬口理、早川直樹、福嶋教偉、中村任：心臓移植後のバルガンシクロビル予防投与患者における好中球減少のリスク評価、第 23 回日本医薬品情報学会総会・学術大会 (2021)

・音窪麻衣、和田恭一、井倉恵、宇野貴哉、中北和樹、早川直樹、渡邊琢也、瀬口理、福嶋教偉、中村任：心臓移植後の外来患者における好中球減少の発現予測因子の探索、日本薬学会第 142 年会 (2022)

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 感染制御学研究室

職・氏名 教授・駒野 淳

研究テーマ：

多剤耐性菌に有効なペプチド性新規抗菌薬開発に向けた研究

研究期間：

令和3年4月1日 ～ 令和4年3月31日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 駒野 淳 (大阪医科薬科大学・薬学部・教授)

研究分担者 宮本勝城 (大阪医科薬科大学・薬学部・准教授)

研究分担者 土屋孝弘 (大阪医科薬科大学・薬学部・講師)

<共同研究機関>

研究代表者 宮地勇人 (東海大学・医学部・教授)

研究分担者 良原栄策 (東海大学・医学部・客員准教授)

研究分担者 浅井さとみ (東海大学・医学部・准教授)

研究目的：

Acinetobacter baumannii は自然界に広く生息するグラム陰性桿菌で、近年では市中感染や院内感染が増加している日和見感染菌である。院内感染では重篤な基礎疾患を有し、人工呼吸器を使用している患者においては肺炎、血管カテーテルを挿入している患者においては菌血症を引き起こすほか、外傷感染、手術部位感染、尿路感染、敗血症、髄膜炎、心内膜炎、腹膜炎などの起因菌となることが知られている。本菌は緑膿菌と並び特に高頻度で薬剤耐性を獲得することから、院内感染においては非常に問題となっている。

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

本年度の研究内容および研究成果：

Acinetobacter baumannii の基準株 ATCC19606 株, 臨床分離株 A112-II-a および多剤耐性菌 Ab10659 株を用いて, Bam 複合体の結合阻害物質の増殖抑制効果, 殺菌活性, 抗生物質との併用効果を測定した. BamD との結合阻害物質である K7FI2 は 5 μ M で A112-II-a 株の増殖を完全に抑制した. ATCC19606 株の増殖は 5 μ M で一部抑制し, 10 μ M では完全に抑制した. また 10 μ M で Ab10659 株の増殖を完全に抑制した(図 1).

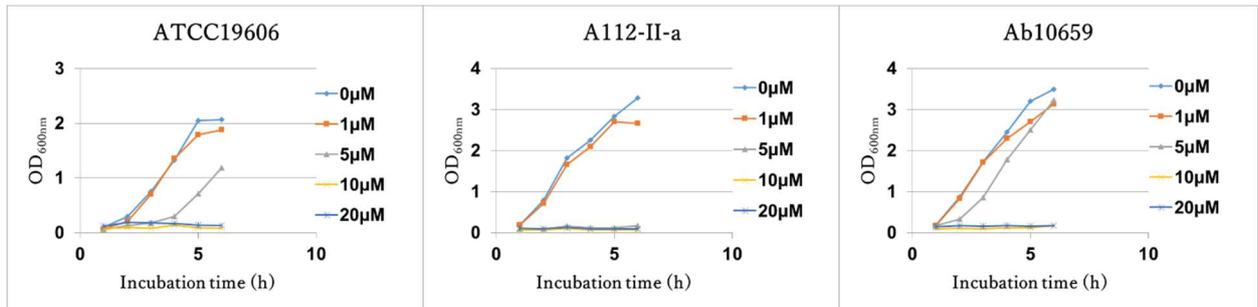


図 1. K7FI2 の各種菌株に対する増殖抑制効果

いずれの阻害物質においてもすべての菌株に対し殺菌活性は認められなかった(図 2).

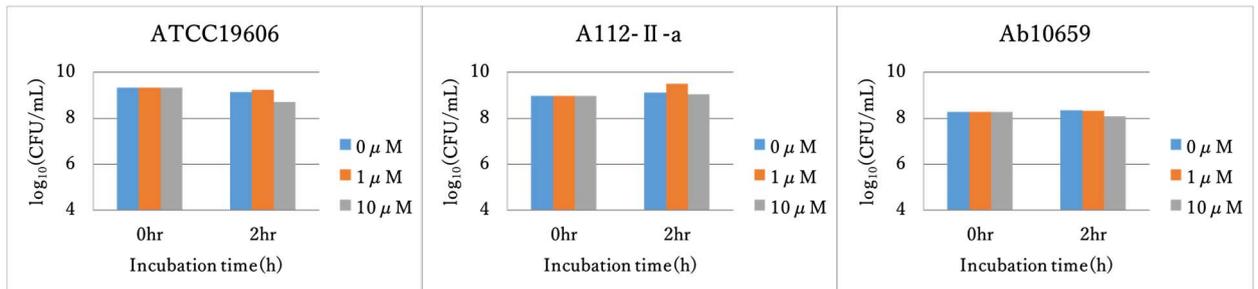


図 1. K7FI2 の各種菌株に対する殺菌効果

Ab10659 株の増殖に影響を与えない濃度の K7FI2 とイミペネムを併用すると, Ab10569 株の増殖は完全に抑制された(図 3).

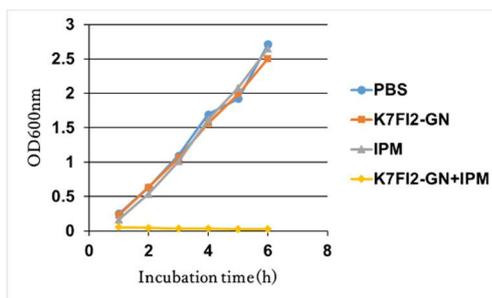


図 3. Ab10569 株の増殖に対する K7FI2 とイミペネムの併用効果

これらの結果より, K7FI2 は本菌の臨床分離株や多剤耐性株の増殖を抑制することが明らかとなった. また, K7FI2 はいずれの菌株に対しても殺菌効果は認められなかったが, Ab10659 株のバイオフィルム形成を抑制し, ATCC19606 株に対しても抑制傾向が認められた. さらに, K7FI2 はイミペネムと併用することにより増殖を完全に抑制したことから, K7FI2 は薬剤耐性菌に対して抗生物質の感受性を亢進することが明らかとなったことから, 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.

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 大阪医科薬科大学薬学部

職・氏名 教授・永井 純也

研究テーマ：

腎疾患モデル動物における尿中脂肪酸関連物質の定量・定性的解析

研究期間：

令和元年10月1日 ～ 令和4年3月31日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 永井 純也 (大阪医科薬科大学・薬学部・教授)

研究分担者 本橋 秀之 (大阪医科薬科大学・薬学部・准教授)

研究分担者 竹林 裕美子 (大阪医科薬科大学・薬学部・助教)

<共同研究機関>

研究代表者 大野 芳正 (東京医科大学・医学部・主任教授)

研究目的：

慢性腎臓病(CKD)や薬剤投与による糸球体ろ過バリア機能の低下は、通常では糸球体ろ過が制限されているアルブミンが尿細管管腔中へと漏出するようになる。こうしたアルブミンの漏出自体が腎線維化、ひいては腎不全につながる要因となることが示唆されているが、その分子機構は不明である。また、漏出したタンパク質による尿細管上皮細胞の障害は、薬物の尿細管分泌や再吸収を担う薬物トランスポーターの機能や発現に影響し、薬物の腎挙動に影響する可能性も考えられる。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い出してきた。現在、尿細管管腔中へのアルブミン漏出に伴う腎線維化の発症過程におけるアラキドン酸カスケードと HIF-1 活性化の関連性について明らかにすることを目的とした研究を展開している。その研究の一環として、本研究室では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：

本研究室では、以前よりヒト腎近位尿細管由来の HK-2 細胞株を用いた実験に加え、ADR 投与マウスを用いた実験において、アルブミンによる HIF-1 活性化とそれに続くトランスポーター発現・機能の変化について解析を進めてきた。本研究では、アルブミンに結合している脂肪酸が HIF-1 を活性化する経路の一つとして、アルブミンに結合しているアラキドン酸からシクロオキシゲナーゼによって生成されるプロスタグランジンを介した経路が関与している可能性を想定していることから、既に示してきた尿中 PGE₂に加え、尿中 PGF₂ α の排泄変動についても検討を行った。加えて、ADR 投与後 14 日のマウスを用いて、尿中 PGE₂ 量と HIF-1 関連遺伝子の発現変動について影響を評価した。

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(6 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。代謝ケージを用いて Day0、7、14 の 24 時間尿サンプルを回収した。Day14 の尿サンプル回収後、心採血及び腎摘出を行った。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以下で保存した。心採血により得られた血液サンプルは 10,000 rpm で 10 分間遠心分離後、上清を回収し、-20°C以下で保存した。摘出した腎のうち、1/4 を RNAlater に浸漬しリアルタイム PCR 用サンプルとした。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。PGF₂ α は PGF₂ α 測定キットを用いた ELISA 法により測定した。摘出した腎臓の mRNA 発現解析にはリアルタイム PCR 法を行った。統計処理は、2 群間の平均値の比較には Student's t-test (有意水準 5%)を用い、3 群以上の平均値の比較には Tukey's HSD test (有意水準 5%)を用いて行った。

以下、本年度に得られた研究成果について記述する。

① 血漿および尿中クレアチニンおよびアルブミンに及ぼす影響

血漿中のクレアチニンおよびアルブミンに及ぼす ADR の影響について検討した。その結果、両検査値において両群間に有意な差は確認できなかった。血清クレアチニンの変動が起こらなかった要因としては、本実験の条件である ADR 投与後 14 日では糸球体障害の程度が限定的であるものと考え

られる。クレアチニンクリアランスについても、同様に両群間に有意な差は認められなかった。

次に、ADR 投与前日の Day0 における尿中アルブミン/クレアチニン比については、両群において同程度の値であることを確認した。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傾向が観察され、Day14 では ADR 群において有意な増加が確認された。

これらの結果から、ADR 投与による糸球体からのアルブミン漏出の増大及び腎障害の惹起が認められた。また、本実験で惹起させたマウスの病態は、クレアチニンクリアランスと尿中アルブミンの結果より、比較的腎障害の初期を反映しているものと推察された。従って、ADR 投与によって、尿中にアルブミンが漏出するマウスが作成できていることを認めるとともに、本病態マウスが本解析を進めていくうえで妥当な実験モデルであることが示された。

② 尿中 PGE2 および PGF2 α 排泄量に及ぼす影響

尿中 PGE2 量について、尿中クレアチニン量で補正した値を用いて ADR 投与後の変動を評価した。

まず、Day0 における尿中 PGE2/クレアチニン比については、両群において同程度の値であることを確認した。その後 Day7 では、ADR 群は対照群と比較して有意ではなかったものの尿中 PGE2/クレアチニン比の増加が認められた ($P=0.0584$)。また、Day14 においても ADR 群において増加傾向は観察された。

次に、PGF2 α 排泄量についてもクレアチニン量で補正を行い評価した。その結果、ADR 群において、尿中アルブミン排泄量の増大に伴って、尿中 PGF2 α 排泄量が増加する傾向が見られた。また、この尿中 PGF2 α 排泄量の変動は尿中 PGE2 排泄量の変動と同様の挙動を示すことが示唆された。

これらの結果より、ADR 誘発アルブミン尿発症時においてアルブミンに結合しているアラキドン酸からシクロオキシゲナーゼによって種々のプロスタグランジンが生成され、尿中に排泄される可能性が示唆された。

③ 腎における各種 mRNA 発現に及ぼす影響

Day14 で得た腎サンプルを用いて、両群における GLUT1 および GLUT2 の mRNA 発現について、リアルタイム PCR 法を用いて比較解析した。その結果、Day14 のマウスの腎において GLUT1 および GLUT2 の mRNA 発現に有意な変化は見られなかった。また、GLUT2 は GLUT のサブファミリーの一つであるが、Day14 において GLUT1 と同様、GLUT2 の mRNA 発現に変動が見られなかった。

次に、対照群と ADR 群における腎線維化関連遺伝子 VEGF、CTGF、LOX の mRNA 発現を解析した。その結果、VEGF の mRNA 発現は ADR 群において有意に低下した。また CTGF および LOX の mRNA 発現についても ADR 群において低下する傾向が見られた。これらの腎線維化関連遺伝子は HIF-1 標的遺伝子でもあるため、HIF-1 活性化に伴いこれらの遺伝子も発現上昇が見られるものと想定していた。しかし、今回の実験では予想に反して、いずれの腎線維化関連遺伝子においても発現は低下していたことから、検討した Day14 においては一時的なネガティブフィードバック機構が働いた可能性など、その詳細についてはタンパクレベルでの検討も加えて進めて行く必要があるものと考えてい

る。

以上、ADR 誘発アルブミン尿発症マウスにおいて、PGE₂に加え PGF₂αの尿中排泄量の増加が認められ、アルブミンに結合しているアラキドン酸からシクロオキシゲナーゼによって生成されるプロスタグランジを介した経路が HIF-1 活性化に関与している可能性が示された。その一方で、ADR 投与後 14 日のマウス腎において、mRNA レベルでの線維化を示す変化は観察されなかった。今後は、本 ADR 誘発アルブミン尿発症モデルマウスを用いて、遺伝子レベルのみならず、タンパクレベルでの変化についても調べるとともに、ADR 投与後におけるより長期的な変動について解析していく必要があると考えている。

成果発表：

<学会発表>

- ・大西未企代、落合春香、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尿発症マウスにおける腎 HIF-1 発現と尿中 PGE₂ 排泄量の変動」
日本薬学会第 36 年会（2021 年 5 月 13～5 月 15 日、オンライン開催）

- ・足立瑠衣、山口大輝、中達 穂、竹林裕美子、本橋秀之、永井純也

「腎近位尿細管上皮細胞株 HK-2 におけるアルブミン誘発 HIF-1 活性化と PGE₂ 受容体の関与」
第 71 回日本薬学会関西支部大会（2021 年 10 月 9 日、オンライン開催）

腸溶性ポリマーを混合したゼリー剤 (Gelatin/HPMCP, Gelatin/HPMCAS, Gelatin/Eud-L)は、pH 6.8 で Acetaminophen を速やかに放出したのに対し、pH 1.2 での薬物放出は遅延した。

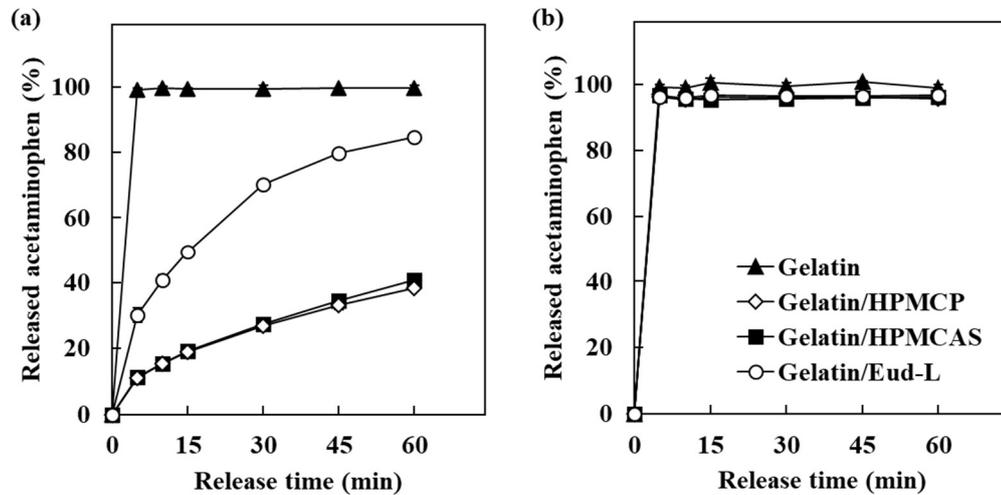


Figure 1 Release profiles of acetaminophen from various gel formulations (a) pH 1.2 and (b) pH 6.8. ▲, Gelatin (5%); ◇, Gelatin/HPMCP (5%/4%); ■, Gelatin/HPMCAS (5%/4%); ○, Gelatin/Eud-L (5%/4%).

そこで、pH 1.2 での薬物放出試験における各試料 (Gelatin/HPMCP, Gelatin/HPMCAS, Gelatin/Eud-L ゼリー剤)の外観および断面図を **Figure 2** に示す。各試料は放出試験中に、白濁していることが確認できる。これは、HPMCP, HPMCAS, Eud-L の pKa は、それぞれ 4.83 ± 0.04 , 5.09 ± 0.05 , 6.45 ± 0.03 であり、pH1.2 で Acetaminophen が遅延した原因として、腸溶性ポリマーが凝集し基剤内部まで白濁したことが考えられる。

pH 1.2 での 60 分後の Acetaminophen 放出率は、Gelatin/Eud-L ゼリー剤と比べ Gelatin/HPMCP および Gelatin/HPMCAS ゼリー剤のほうが抑制された。そこで、Gelatin 濃度を固定し HPMCP と HPMCAS の濃度を変化した際の薬物放出挙動を比較した。その結果、低濃度 (1.0%, 2.5%) では HPMCP 添加した Gelatin ゼリー剤のほうが、HPMCAS に比べ薬物放出を抑制した。この理由として、HPMCP が有するフタル酸基間の π - π スタッキング相互作用が推察された。以上の結果より、Gelatin に対し HPMCP が酸性条件下における薬物放出を最も抑制させることが期待された。

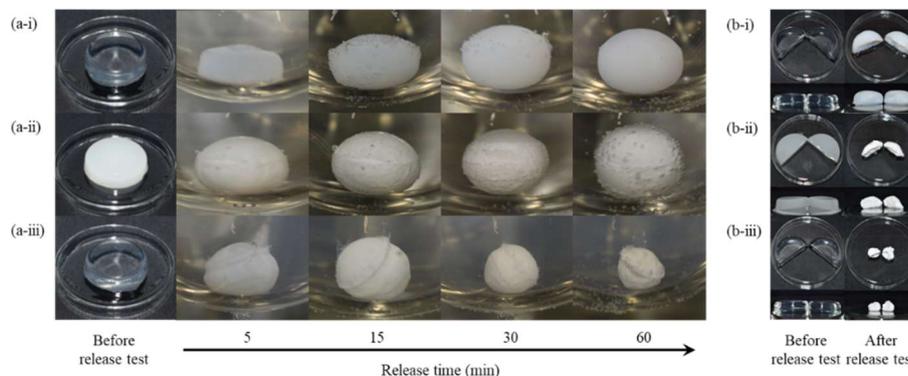


Figure 2 (a) Temporal change in appearances of various formulations and (b) Cross-section of various formulations before and after release tests. (i) Gelatin/HPMCP gel formulation, (ii) Gelatin/HPMCAS gel formulation, and (iii) Gelatin/Eud-L gel formulation.

続いて、ゼリー剤の Gelatin および HPMCP 添加濃度変化が、薬物放出挙動に及ぼす影響について検討した。Figure 3 に、異なる Gelatin 濃度 (5.0%, 4.0%, 3.0%) および HPMCP 濃度 (4.0%, 2.5%, 1.0%) で調製したゼリー剤からの薬物放出試験結果を示す。Gelatin/HPMCP (5.0%/1.0%, 4.0%/1.0%, 3.0%/2.5%, 3.0%/1.0%) 処方では、製剤が崩壊し、薬物放出速度が増大した。これは崩壊により製剤の表面積が増加したことが要因として考えられた。一方、Gelatin/HPMCP (5.0%/4.0%, 5.0%/2.5%, 4.0%/4.0%, 4.0%/2.5%, 3.0%/4.0%) 処方の製剤は試験終了まで崩壊せず、検討した処方の中で最も薬物放出を抑制

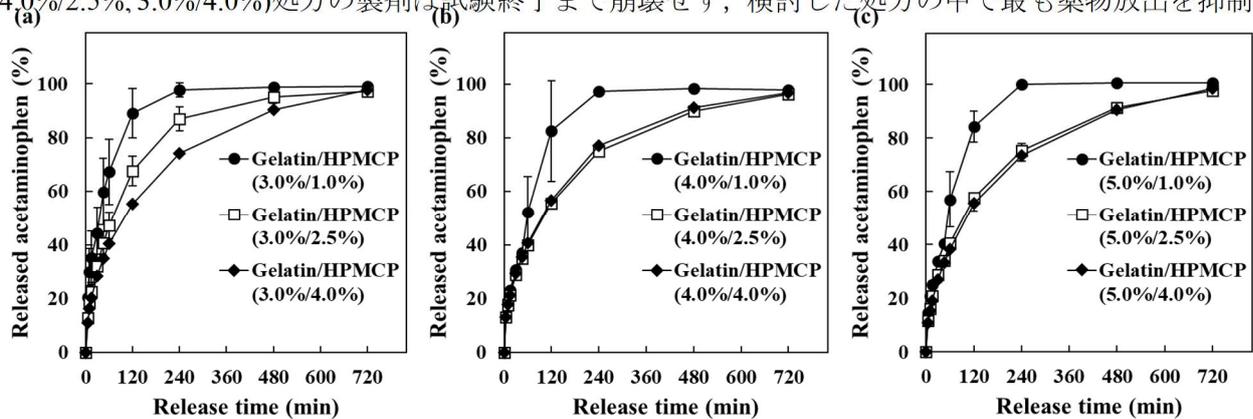


Figure 3 Acetaminophen release profiles from Gelatin gel formulations (5.0%, 4.0%, and 3.0%) blended with different contents (4.0%, 2.5%, and 1.0%) of HPMCP in pH 1.2.

最終的に、Gelatin/HPMCP 混合ゼリー剤の濃度がテクスチャに及ぼす影響について評価した。Gelatin (3.0%, 4.0%, 5.0%) および Gelatin/HPMCP (3.0%/4.0%, 4.0%/4.0%, 5.0%/4.0%) のテクスチャ特性 (硬度, 付着性, 凝集性) を解析した結果を Figure 4 に示す。ゼリーの硬度は、Gelatin の添加量が増加するに伴い増大した。これは Gelatin が構造中の NH と CO が水素結合し、三重螺旋構造の形成を介して水分子を保持しゲル化するため、Gelatin 濃度が高まることで強固なネットワーク構造を構築したと考えられた。それに対し、HPMCP 濃度に伴いゼリー硬度は低下した。HPMCP 添加により pH が Gelatin の等電点に近付いたことが要因として推察される。付着性は、HPMCP 添加に伴い増大した。これはイオン化した HPMCP がゲル構造中の水分子と水和し、表面水を減少したことが要因だと考えられる。凝集性は Gelatin 濃度、HPMCP 濃度に関わらず一定の値を示した。

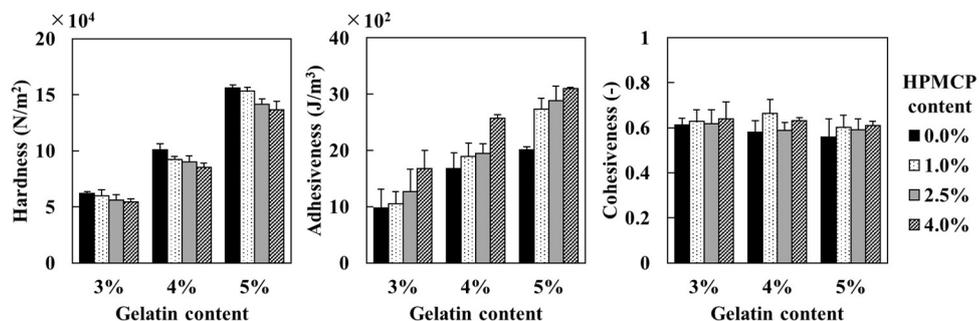


Figure 4 Texture properties of (a) hardness, (b) adhesiveness, and (c) cohesiveness of Gelatin gel formulations (3.0%, 4.0%, and 5.0%) blended with HPMCP (0.0%, 1.0%, 2.5% and 4.0%).

成果発表：

<原著論文>

・ Satoshi Nogami , Hiromasa Uchiyama , Kazunori Kadota , Yuichi Tozuka, Design of a pH-responsive oral gel formulation based on the matrix systems of gelatin/hydroxypropyl methylcellulose phthalate for controlled drug release, *International Journal of Pharmaceutics*, 592 (2021) 120047

<学会発表>

・ 野上聡、内山博雅、門田和紀、有馬寛、岩瀬裕希、富永大輝、山田武、高田慎一、柴山充弘、戸塚裕一: Gelatin/腸溶性ポリマー混合系による pH 応答薬物放出能を有する経口ゲル製剤の設計、日本薬剤学会第36年会, (2021) (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3年4月1日 ～ 令和4年3月31日

研究担当者：

<本学>

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

<共同研究期間>

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

研究目的：

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、特異体質性薬物反応（IDRs, idiosyncratic drug reactions）が起こるといふ danger hypotheses が提唱されている。従来から IDRs の発症機序として hapten hypotheses が考えられてきたが、hapten hypotheses のみの機序では IDRs が起こらないことが多く、danger signal が関与していると考えられている。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、アミオダロン誘発肝障害について検討を行った。アミオダロンは Vaughan-Williams 分類 III 群の抗不整脈薬で、心室性不整脈および心不全（低心機能）又は肥大型心筋症に伴う心房細動に用いられている。肝臓で主に CYP3A4 で代謝され、反応性代謝物である quinone が産生される。この反応性代謝物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、現在までに本発症機序は報告されていない。一方、ドロネダロンはアミオダロンの安全性を高める目的で開発され、薬理作用の特徴は類似しているが構造式中にヨウ素を含まない化合物である。日本では未発売であるが海外で臨床使用されており、アミオダロンのように反応性代謝物を産生するという報告はなされていない。本研究では、反応性代謝物に着目して、アミオダロン誘発肝障害の発症機序の検討を行った。また、ドロネダロンについても同じく検討を行った。

FLC-4 細胞にアミオダロンおよびドロネダロンを添加して、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、アミオダロン添加群においては caspase-1 活性および培養液中 IL-1 β 濃度の上昇が認められた (Fig. 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。

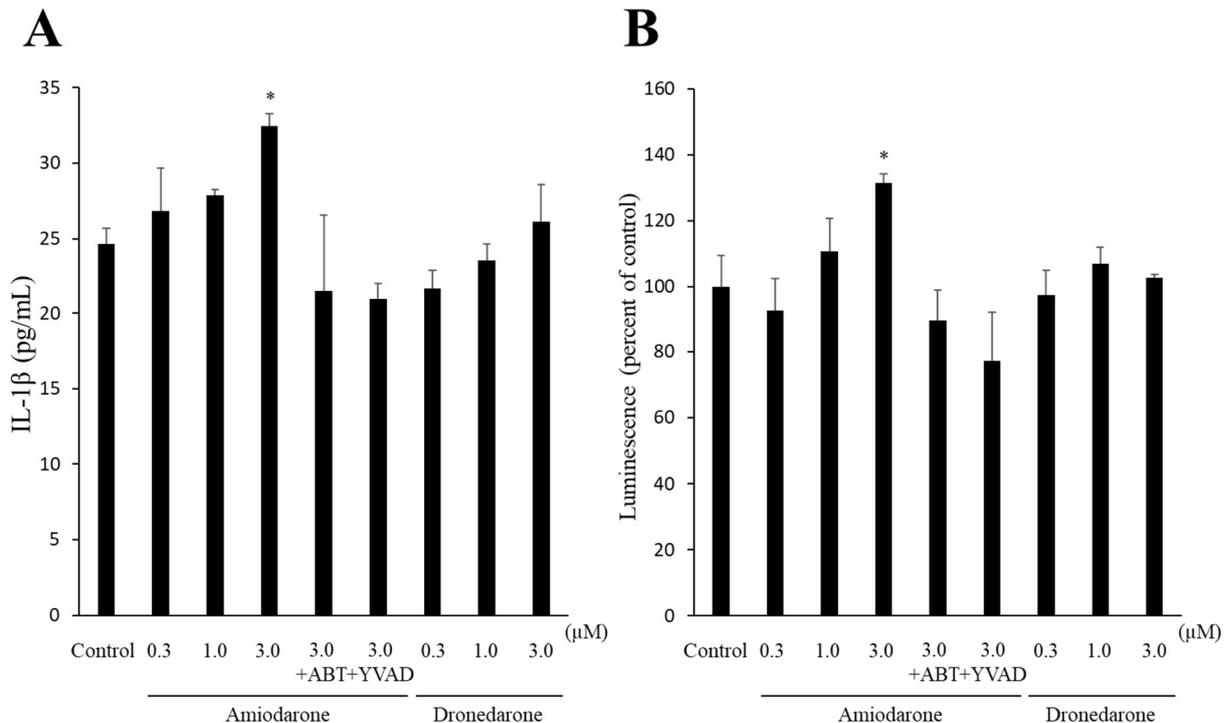


Figure 1. Incubation of THP-1 cells with the supernatant from hepatocytes incubated with amiodarone lead to release of IL-1 β (A). An increase in caspase-1 activity correlates with the release of IL-1 β (B). Levels of IL-1 β secreted by THP-1-derived macrophages and caspase-1 activity of THP-1-derived macrophages incubated for 24 h with the supernatant from an incubation of hepatocytes with amiodarone and dronedarone for 7 days, with and without, a cytochromes P450 inhibitor (1-aminobenzotriazole, ABT) or a caspase-1 inhibitor (Ac-YVAD-cmk, YVAD). Statistical significance was determined using the Tukey multiple comparison tests, where *, $p < 0.05$, $n=3-4$.

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 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 (data not shown)。本結果から、インフラマソーム反応が活性化された抗原提示細胞は、自ら HMGB1 を放出することで他の抗原提示細胞を活性化し、より強い免疫反応を引き起こすことが考えられた。

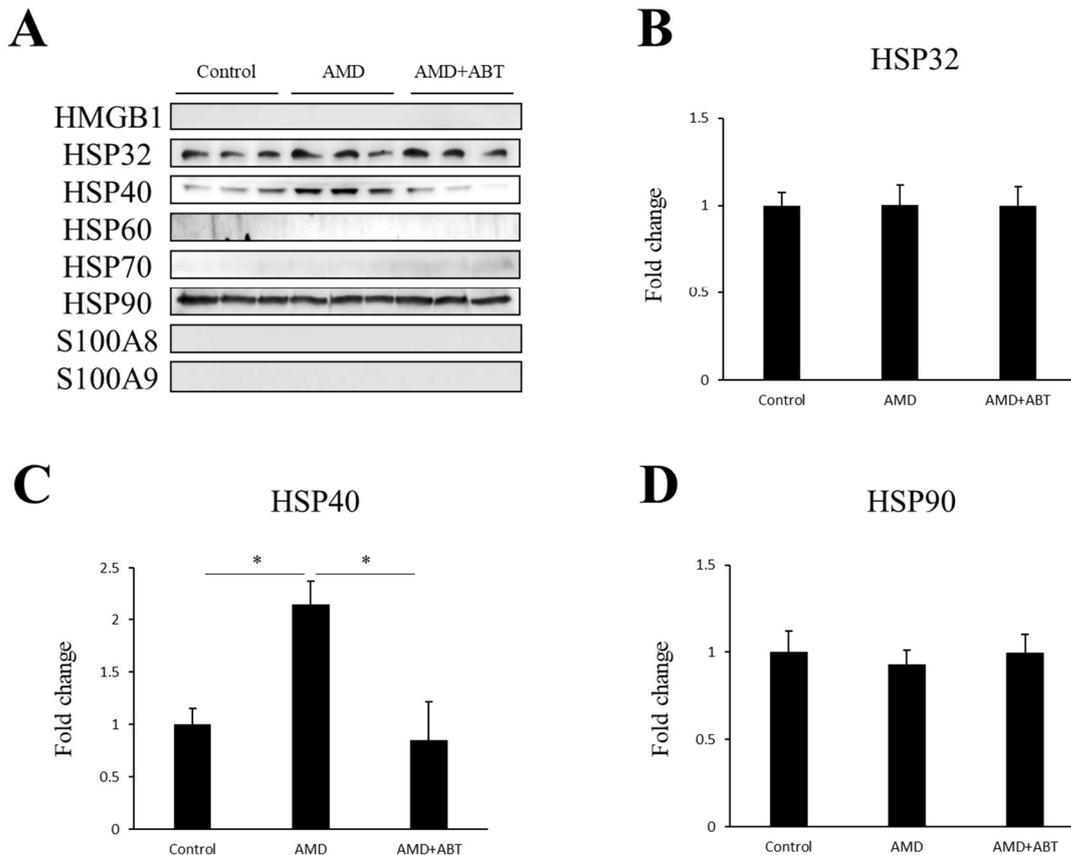


Figure 3. Heat shock protein (HSP) 40 was released from hepatocytes as danger associated molecular pattern molecules (DAMPs). (A) Western blot analysis of proteins [high mobility group box 1 (HMGB1), HSP32, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, S100 calcium-binding protein (S100) A8 and S100A9] that were released from hepatocytes incubated for 7 days with amiodarone (3 μ M), with and without, a cytochromes P450 inhibitor (1-aminobenzotriazole, ABT), and their quantitative analysis of HSP32 (B), HSP40 (C) and HSP90 (D). The volume of culture medium that was loaded was 20 μ L per lane for all blots; the primary antibodies (HMGB1, HSP32, HSP40, HSP90, S100A8 and S100A9 antibody) were diluted 1: 1000, and the anti-HSP60 and anti-HSP70 antibodies were diluted 1: 3000 and were detected by goat anti-rabbit IgG-peroxidase. Bound peroxidase was visualized by using Luminata™ Classico Western HRP Substrates. Secondary antibody was diluted 1:1000. Statistical significance was determined using the Tukey multiple comparison tests, where *, $p < 0.05$, $n=3$.

以上、アミオダロ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。また、ドロネダロンではインフラマソームの活性化が認められず、アミオダロンと比較して安全性が高いことが示唆された。本発症機序を考慮すると、アミオダロ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. Amiodarone, Unlike Dronedarone, Activates Inflammasomes via Its Reactive Metabolites: Implications for Amiodarone Adverse Reactions. *Chem Res Toxicol* 34, 1860-1865 (2021).

<学会発表>

- ・中村仁, 加藤隆児, 井尻好雄, 林哲也. アミオダロンとドロネダロンのヒトマクロファージ様細胞に対する反応性. 第42回日本循環制御医学会総会・学術集会 7月（大阪）

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 名誉教授 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：

令和2年 4月 1日 ～ 令和4年 3月 31日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 松村 人志 （大阪医科薬科大学・薬学部・名誉教授）

研究分担者 幸田 祐佳 （大阪医科薬科大学・薬学部・准教授）

研究分担者 田中 早織 （大阪医科薬科大学・薬学部・助教）

<共同研究機関>

研究代表者 黒田 健治 （医療法人 杏和会 阪南病院・院長）

研究目的：

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

本年度の研究内容および研究成果：

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

夢を見る睡眠として知られているレム睡眠に関する実験を、ノックアウトマウス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としている。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。ところが、ノックアウトマウスの中には麻酔及び手術という実験条件に耐えられないものがあり、実験は難渋している。

精神科疾患における脳機能の保護に及ぼす治療薬の役割に関する臨床研究

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。

臨床症状や認知機能と、血液試料の測定結果との種々相関を検討し、クロザピンの効果を低減せしめている要因、及びクロザピン奏効の要因を見つけ出そうとしている。効果や副作用と、血漿中濃度との関係も否定できないが、条件によっては、血球中濃度との間に連関が見られることがあり、興味を持たれる。コロナウイルス蔓延の影響で病棟への出入りが制限されるなど、研究が思うように進展していないが、クロザピンの効果には、他の抗精神病薬には見られない特別なものがあり、クロザピン研究の重要性を痛感しているところである。

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。この細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇により活性化された Ca^{2+} 濃度依存性 PLA_2 を介してアラキドン酸が産生される。産生されたアラキドン酸（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。すなわち、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ることを明らかにした。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に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、トリグリセリドの再合成に関与する酵素である小腸上皮細胞 monoacylglycerol acyltransferase (MGAT) 2、diacylglycerol acyltransferase (DGAT) 1 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リド値およびMGAT2・DGAT1 タンパク質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リ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 タンパク質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 タンパク質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リド値と総コレステロール値を有意に減少させたが、MGAT2・DGAT1 タンパク質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、トリグリセリ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飼料中の脂質だけでなく、炭水化物の含有量も減少させた食事療法および食事療法期間の延長も考慮して検討していく。

成果発表：

<原著論文>

S Tanaka, S Ito, C Shimamoto, H Matsumura, T Inui, Y Marunaka, T Nakahari. Nitric oxide synthesis stimulated by arachidonic acid accumulation via PPAR α in acetylcholine-stimulated gastric mucous cells. *Exp. Physiol.*, 106(9):1939-1949, 2021

<学会発表>

- ・田中早織、島本史夫、松村人志：高脂肪食および低脂肪食による食事療法が2型糖尿病合併脂質異常症ラットの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71回日本薬学会関西支部総会・大会、2021
- ・藤塚万椰、田中早織、島本史夫、松村人志：胃酸分泌刺激物質が及ぼす胃粘液分泌機構への影響。第71回日本薬学会関西支部総会・大会、2021
- ・田中早織、近澤有里奈、山副祥太郎、松村人志：2型糖尿病発症早期段階のモデルラットに対する低脂肪食摂取による治療効果。日本薬学会第142年会、2022

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 4 年 3 月 31 日

研究担当者：

< 本学 >

研究代表者 友尾 幸司 (大阪医科薬科大学・薬学部・准教授)

研究分担者 尹 康子 (大阪医科薬科大学・薬学部・准教授)

< 共同研究機関 >

研究代表者 角山 圭一 (姫路獨協大学・薬学部・准教授)

研究目的：

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

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

本年度の研究内容および研究成果：

昨年度までに、tau 特異的認識抗体の Fab 領域(Fab2r3) が、tau の自己重合反応を阻害し、その作用は、tau 分子中の VQIINK 領域への結合に因ることを、Fab2r3-VQIINK ペプチド複合体の立体構造解析および熱力学的解析により明らかにしてきた。更に、Fab2r3 の VQIINK 配列特異的認識機構には、VQIINK ペプチド中 4 残基目の Ile 残基と疎水性相互作用が重要であることも推測された。本年度は、Fab2r3 の tau 特異的認識機構解明のため、Fab2r3 の apo 体の構造解析を行った。

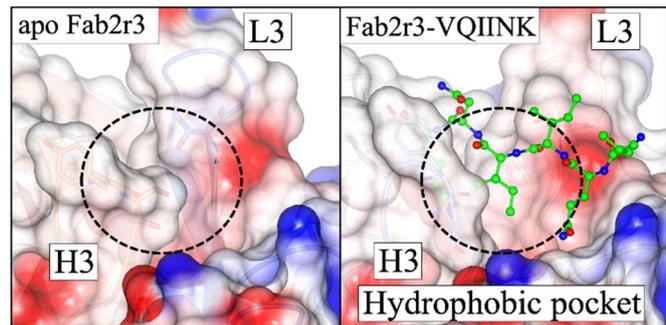
Fab2r3-VQIINK ペプチド複合体結晶析出条件を基に、apo Fab2r3 結晶析出条件を探索した。その結果、結晶化母液の pH が結晶の質に影響することが分かり、様々な pH で結晶析出条件を探索したところ、pH7.6 の条件下で沈殿剤として 20% (w/v) PEG3350、15% (w/v) Glycerol、0.1M NH₄I を用いた条件で質の良い結晶を得ることに成功した。



Fab2r3 の apo 体結晶

得られた結晶を用いて、Fab2r3 の apo 体の構造解析に着手し、2.3 Å の分解能での構造決定に成功した。得られた apo 体構造と、Fab2r3-VQIINK 複合体構造を比較した結果、複合体構造において 3 番目の重鎖ループ (H3) と軽鎖ループ (L3) により形成されていた VQIINK との結合における疎水ポケットは、apo 体構造中では H3 ループ領域が大きく構造変化を起こし、疎水ポケットが消失していることが明らかとなった。

これらの結果から、Fab2r3 による VQIINK 配列特異的認識は、先ず Fab2r3 の疎水ポケット形成を伴う Ile 残基側鎖の選択から始まり、次に Q 及び K の極性アミノ酸残基との水素結合対が形成されるという作用機序を推測するに至った。



成果発表：

<原著論文>

・ Tomohiro Tsuchida, Kouki Susa, Tomohiro Kibiki, Takahiro Tsuchiya, Katsushiro Miyamoto, Yasuko In, Katsuhiko Minoura, Taizo Taniguchi, Toshimasa Ishida, and Koji Tomoo, “Structural study of the recognition mechanism of tau antibody Tau2r3 with the key sequence (VQIINK) in tau aggregation”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 585:36-41, 2021

<学会発表>

・ Tomohiro Tsuchida, Takahiro Tsuchiya, Katsushiro Miyamoto, Shinji Takai, Teruo Ueno, Yoshihiko Fujioka, Yasuko In, Katsuhiko Minoura, Taizo Taniguchi, and Koji Tomoo
Structural study of the inhibitory mechanism of tau recognition antibody to tau aggregation”,

25th Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, Praha, 2021 年 8 月

・ 槌田智裕、土屋孝弘、宮本勝城、尹 康子、箕浦 克彦、高井真司、上野照生、藤岡良彦、谷口泰造、友尾幸司

アルツハイマー型認知症関連蛋白質 Tau 認識抗体による Tau 重合阻害機構の解明

—Tau 抗体の VQIINK 配列特異的認識機構の解明—

第 71 回 日本薬学会関西支部総会・大会、2021 年 10 月 (オンライン@近畿大学)

・ 槌田 智裕、小橋川 栞愛、土屋 孝弘、宮本 勝城、箕浦 克彦、尹 康子、高井 真司、上野 照生、藤岡 良彦、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 自己重合阻害機構の解明 —Tau 抗体の Tau 特異的認識機構—

日本薬学会第 142 年会 (2022 年 3 月)

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 3 年 4 月 1 日 ～ 令和 4 年 3 月 3 1 日

研究担当者：

< 本学 >

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

< 共同研究機関 >

研究代表者 手納直規 (広島国際大学・栄養学部・教授)
研究分担者 井口裕介 (広島国際大学・薬学部・講師)
研究分担者 小田啓祐 (広島国際大学・薬学部・講師)
研究分担者 山下ユキコ (広島国際大学・薬学部・助教)

研究目的：

核内受容体の一つである farnesoid X receptor (FXR) は多くの種類の細胞の分化制御にも関わっており、これまでに既存および本研究グループで合成した FXR 作働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。

新たな FXR 作働薬の創製と解析

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 作働薬である GW4064[1] をベースにして、昨年度からさらに、側鎖を様々な置換基に置き換えた化合物[2-16]を創製した (図 1)。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 9、14 と 15 が高い FXR EC₅₀/VDR EC₅₀ を示した (表 1)。

さらに、化合物 **9**、**14** と **15** をマウスに経口投与し、体内動態（臓器への滞留、蓄積）を調べた。そのうち、**15** (FXR 拮抗薬) は回腸に分布する傾向があり、回腸において FXR 標的遺伝子の発現レベルを有意に抑制した。

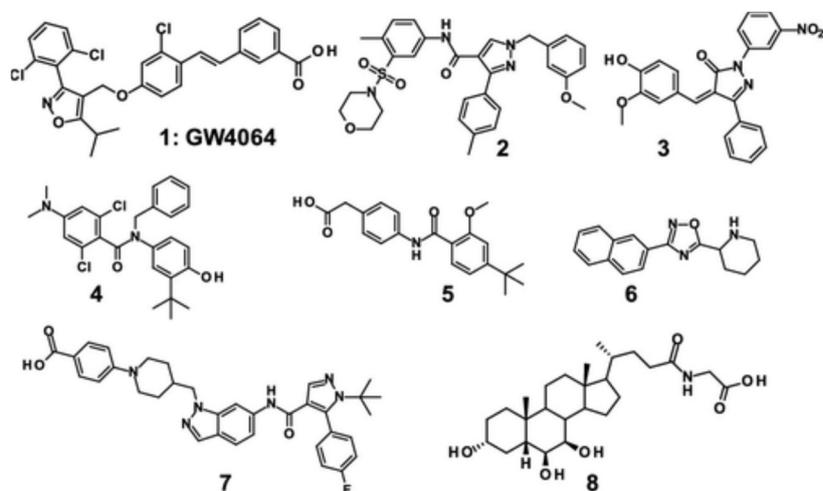


図 1. 創製した FXR 拮抗薬[2~8]の化学構造

表 1. FXR 拮抗薬 [9~16]の FXR アンタゴニスト活性と細胞障害性

Cpds.	R ₁	R ₂	R ₃	TR-FRET IC ₅₀ (nM)	Luciferase IC ₅₀ (nM)	Cytotoxicity IC ₅₀ (μM)
9	CH ₃	CH ₃	-OCH ₃	7 ± 2*	<0.001*	>100*
10	CH ₃	CH ₃	F	35 ± 20*	0.05 ± 0.06*	>100*
11	CH ₃		-OCH ₃	62.6 ± 45.9	0.11 ± 0.04	>100
12	F	CH ₃	-OCH ₃	7.8 ± 1.6	<0.001	>100
13	F	CH ₃	F	64.5 ± 11.8	0.09 ± 0.04	>100
14	CH ₃		F	183.1 ± 94.4	0.06 ± 0.03	>100
15	F		F	32.9 ± 11.7	0.05 ± 0.06	>100
16	H		F	140.0 ± 103.3	1.8 ± 0.9	>100

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

前年度に引き続き、合成された FXR 作動薬の骨分化誘導能を調べた。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、新たに創製した 4 種類の FXR 作動薬および FXR 作動薬であるケノデオキシコール酸 (CDCA)、GW4064 を加えた。まず、1 あるいは 3 日間培養後における細胞障害性を調べたが、いずれも細胞障害性は認められなかった。

さらに、ST-2 細胞を BMP-2 存在下で、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、FXR 標的遺伝子の発現を調べ、2 つの化合物で有意な ALP 活性の上昇が認められた。

成果発表：

<原著論文>

- Gohda, K., Iguchi, Y., Masuda, A., Fujimori, K., Yamashita, Y., Teno, N. Design and identification of a new farnesoid X receptor (FXR) partial agonist by computational structure-activity relationship analysis: Ligand-induced H8 helix fluctuation in the ligand-binding domain of FXR may lead to partial agonism. ***Bioorg. Med. Chem. Lett.*** 41: 128026 (2021)
- Teno, N., Iguchi, Y., Oda, K., Yamashita, Y., Masuda, A., Fujimori, K., Une, M., Gohda, K. Discovery of orally active and nonsteroidal farnesoid X Receptor (FXR) antagonist with propensity for accumulation and responsiveness in ileum. ***ACS Med. Chem. Lett.*** 12: 420–425 (2021)

<学会発表>

- 増田有沙、井口裕介、小田啓祐、山下ユキコ、藤森 功、合田圭吾、手納直規
「腸管への分布傾向を有する farnesoid X receptor (FXR) アンタゴニストの創出」
第 60 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 2021.10.23-24

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3年4月1日 ～ 令和4年3月31日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 宮本勝城 (大阪医科薬科大学・薬学部・准教授)
研究分担者 土屋孝弘 (大阪医科薬科大学・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。その結果、VuuB は NADH を電子供与体として、IutB は NADH、NADPH および GSH を電子供与体として FeNTA を還元し、その効果はそれぞれ 10 μ M FAD および 20 μ M NADH、100 μ M GSH および 100 μ M NADPH 存在下において最も高い比活性を示した。次に、カテコール型シデロフォアとして vulnibactin および vibriobactin、ハイドロキサメート型シデロフォアとして aerobactin および deferoxamine を用いて反応特異性について検討した結果、VuuB は Fe³⁺-aerobactin 錯体、Fe³⁺-vibriobactin 錯体および Fe³⁺-vulnibactin 錯体に対して、IutB は Fe³⁺-aerobactin 錯体、Fe³⁺-vulnibactin 錯体 Fe³⁺-deferoxamine 錯体および Fe³⁺-vibriobactin 錯体に対して鉄(III)還元活性を示し、Fe³⁺-vulnibactin 錯体に対する比活性は 1.72 ± 0.01 および 2.32 ± 0.70 nmol/min/mg protein とほぼ同様の比活性を示した (図 1)。

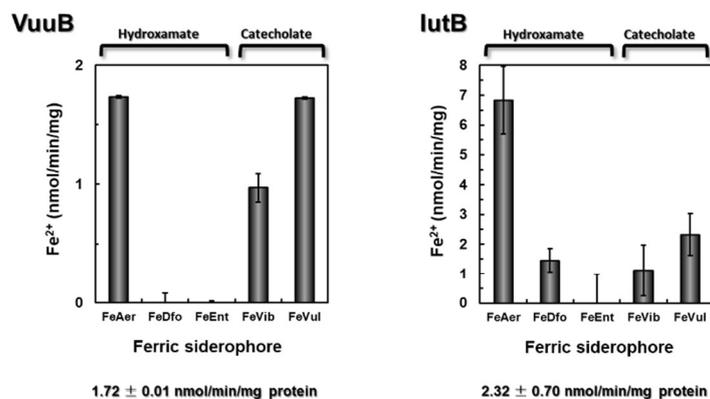


図 1. VuuB および IutB のシデロフォア鉄錯体に対する鉄還元酵素活性。
The FCR activities of VuuB and IutB were examined using 50 μ M each of Fe³⁺-aerobactin (FeAer), ferrioxamine B (FeDfo), Fe³⁺-enterobactin (FeEnt), Fe³⁺-vibriobactin (FeVib), or Fe³⁺-vulnibactin (FeVul) as electron acceptors. The reaction mixture contained 10 μ M FAD and 50 μ M NADH (VuuB) or 50 μ M 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：

<学会発表>

・ Katsushiro Miyamoto, Hiroaki Kawano, Naoko Okai, Takeshi Hiromoto, Nao Miyano, Koji Tomoo, Takahiro Tsuchiya, Jun Komano, Tomotaka Tanabe, Tatsuya Funahashi, Hiroshi Tsujibo.

Ferric utilization system in *Vibrio vulnificus* M2799.

World Microbe Forum, July 20, 2021.

・ 宮本勝城、岡井直子、友尾幸司、土屋孝弘、駒野 淳、田邊知孝、舟橋達也、辻坊 裕

Vibrio vulnificus M2799 株の Fe³⁺-vulnibactin 還元酵素に関する研究.

第 94 回日本細菌学会総会、オンライン (2021 年 3 月).

<その他>

・ Katsushiro Miyamoto, Hiroaki Kawano, Naoko Okai, Takeshi Hiromoto, Nao Miyano, Koji Tomoo, Takahiro Tsuchiya, Jun Komano, Tomotaka Tanabe, Tatsuya Funahashi, Hiroshi Tsujibo. Iron-utilization system in *Vibrio vulnificus* M2799. *Mar. Drugs*, 19:170, 2021.

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3年4月1日 ～ 令和4年3月31日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 葉山 登 (大阪医科薬科大学・薬学部・助教)

研究分担者 宇佐美 吉英 (大阪医科薬科大学・薬学部・教授)

研究分担者 米山 弘樹 (大阪医科薬科大学・薬学部・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)

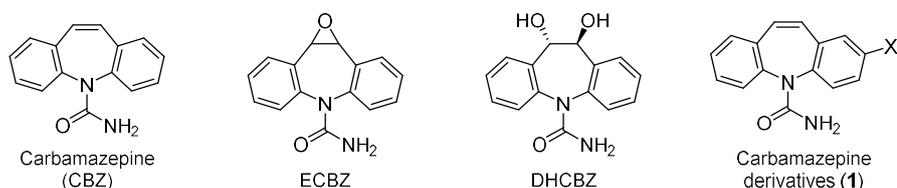
研究分担者 西村 奏咲 (武庫川女子大学・薬学部・講師)

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* (β -blocker) 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* 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 (TDM) 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 置換体 **1** (下図、参照) の合成を行った。また、CBZ および CBZ 置換体に対する MIP を調製し、その調製法の最適化を行うとともに、調製した MIP における CBZ および CBZ 置換体の分子認識機構の解明、保持能およ

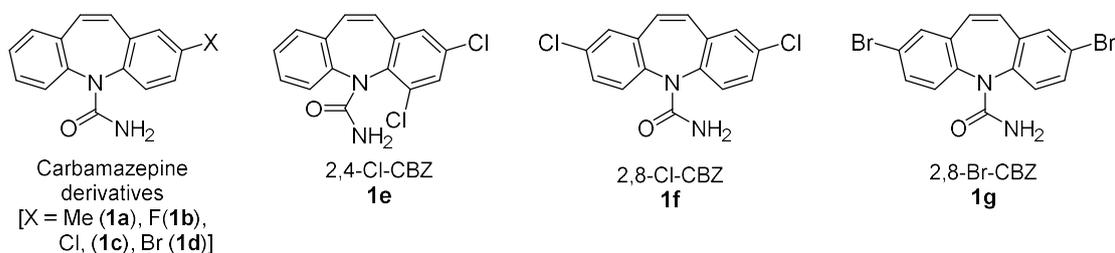
び分子認識能の評価を行った。



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を実施した。

- ① 昨年度の一置換カルバマゼピン[2-methylcarbamazepine (2-MCBZ)、2-fluorocarbamazepine (2-FCBZ)、2-chlorocarbamazepine (2-CCBZ)、2-bromocarbamazepine (2-BCBZ) (それぞれ、**1a-d**)]に続き、二置換カルバマゼピン[2,4-dichlorocarbamazepine (2,4-DCCBZ)、2,8-dichlorocarbamazepine (2,8-DCCBZ)、2,8-dibromocarbamazepine (2,8-DBCZ) (それぞれ、**1e-g**)]の合成を試みた。これまでに開発した一置換カルバマゼピンの合成法を用いて、2位と4位を塩素で置換したカルバマゼピン(**1e**)の合成に成功した。一方、2位と8位の二置換カルバマゼピン(**1f, 1g**)は、既知の合成法(*J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9773–9784.)による調製を改めて検討した。ハロゲン化直後の前駆体が分離できなかったため、混合物の状態に変換を続けたところ、最終生成物の単離精製は比較的容易であることを明らかにした。この知見を基に、MIPの調製するための必要量のカルバマゼピン誘導体(**1a-g**)を合成し、供給した。



- 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、CBZ、上記①で合成した一置換および二置換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)、架橋剤にエチレングリコールジメタクリレート(EDMA) (25 mmol)あるいはジビニルベンゼン(DVB)、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)、希釈剤にトルエンあるいはクロロホルムを用いて、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/アセトニトリル混液(pH 3)を用いて、逆相モードで保持能および分子認識能をLC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。

まず、¹H NMR および ¹³C NMR により、CBZ および一置換および二置換CBZとMAAとの相互作用を検討した。これらの結果は、MAAとCBZ、2-MCBZ、2-FCBZでは1:1で相互作用していることが示唆され、MAAと2-CCBZおよび2-BCBZでは2:1で相互作用し、MAAと2,8-DCCBZ

および 2,8-DBCZ では 3:1 で相互作用していることが示唆された。さらに、CBZ、2-MCBZ、2-FCBZ の O=C-NH₂ と 1 分子の MAA が水素結合を形成し、2-CCBZ および 2-BCBZ 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。また、2,8-DCCBZ および 2,8-DBCZ では O=C-NH₂ と 1 分子の MAA と水素結合、2,8 位のハロゲン原子と 2 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。一方、DFT 法を用いる計算化学的手法による、MAA と 2-CCBT の相互作用は、2 分子の MAA が 2-CCBT の O=C-NH₂ と水素結合を形成し、1 分子の MAA が塩素原子と水素結合を形成している可能性が示唆された。しかし、詳細に関しては現在検討中である。

次に、逆相モードで移動相 pH 3 において、CBZ および CBZ 置換体に対する MIP における、CBZ および CBZ 置換体の保持および分子認識を評価した。EDMA を架橋剤に、希釈剤にトルエンを用いて調製した MIP 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_{2,8-DCCBZ} > MIP_{2-CCBZ} > MIP_{2-MCBZ} > MIP_{CBZ} > MIP_{2-FCBZ} の順であった。一方、分子認識能は、MIP_{2,8-DCCBZ} > MIP_{CBZ} > MIP_{2-MCBZ} > MIP_{2-CCBZ} > MIP_{2-FCBZ} の順であった。また、DVB を架橋剤に、希釈剤にトルエンを用いて調製した MIP 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、移動相 pH 3 において、MIP_{2,8-DCCBZ} > MIP_{2-MCBZ} > MIP_{2-CCBZ} > MIP_{2-FCBZ} > MIP_{CBZ} の順であった。一方、分子認識能は、MIP_{2,8-DCCBZ} > MIP_{2-MCBZ} > MIP_{2-FCBZ} > MIP_{2-CCBZ} > MIP_{CBZ} の順であった。さらに、DVB を架橋剤に、希釈剤にクロロホルムを用いて調製した MIP 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、移動相 pH 3 において、MIP_{2,8-DBCZ} > MIP_{2-BCBZ} > MIP_{2,4-DBCZ} であったが、分子認識能は、MIP_{2-BCBZ} > MIP_{2,8-DBCZ} > MIP_{2,4-DBCZ} であった。

EDMA を架橋剤に用いて調製した MIP に比べ、DVB を架橋剤に用いて調製した MIP のほうが、大きな保持を示した。これは、DVB と CBZ および CBZ 置換体との π - π 相互作用および疎水性相互作用によると思われる。これらの結果は、形状認識に加えて水素結合、ハロゲン結合、 π - π 相互作用、疎水性相互作用が、CBZ および CBZ 置換体の保持および分子認識に重要な役割を果たしていると考えられる。

今後、1) 計算化学的手法を用いて、MAA と CBZ および CBZ 置換体の相互作用を明らかにする、2) 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 DHCZ の血清中濃度測定への応用を検討する予定である。

また、医薬品の置換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、今後さらに検討する予定である。

成果発表：

<学会発表>

- ・ Preparation of monodisperse molecularly-imprinted polymers and their application to pharmaceutical and biomedical analysis : Jun Haginaka, 31st International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA 2021)、8 月 (京都) (招待講演)
- ・ カルバマゼピンおよびその置換体に対する分子インプリントポリマーの調製と応用 : 神路浩美、葉山登、本田千恵、米山弘樹、宇佐美吉英、萩中淳、第 33 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、9 月 (京都)
- ・ 液体クロマトグラフィー用高機能充填剤の開発と応用 : 萩中 淳、第 33 回バイオメディカル分析化学シンポジウム、9 月 (京都) (招待講演)

- ・カルバマゼピン誘導体の合成研究と分子インプリントポリマーの調製への応用：葉山登、神路浩美、矢田麻奈衣、米山弘樹、本田千恵、萩中淳、宇佐美吉英、第50回複素環化学討論会、10月（オンライン）
- ・分子鑄型ポリマーのバイオアナリシスへの応用：萩中 淳、第13回JBFシンポジウム、2月（オンライン）（招待講演）

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4年3月31日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 福森 亮雄 (大阪医科薬科大学・薬学部・教授)

<共同研究機関>

研究代表者 工藤 喬 (大阪大学大学院・医学系研究科・精神健康医学)

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)

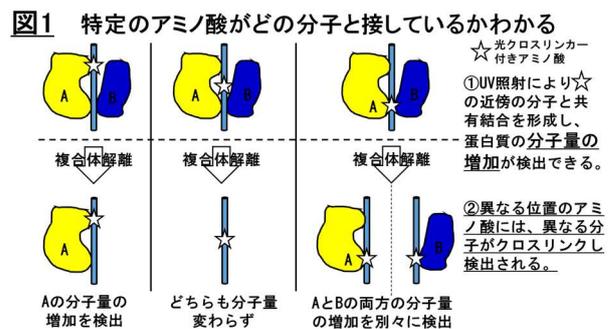
研究目的：

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：

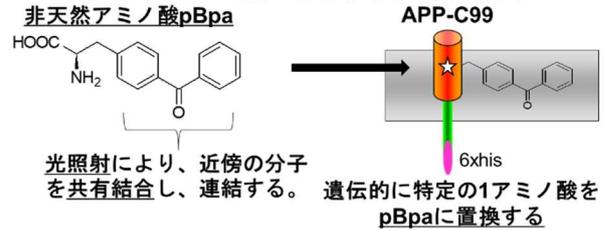
【方 法】

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



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

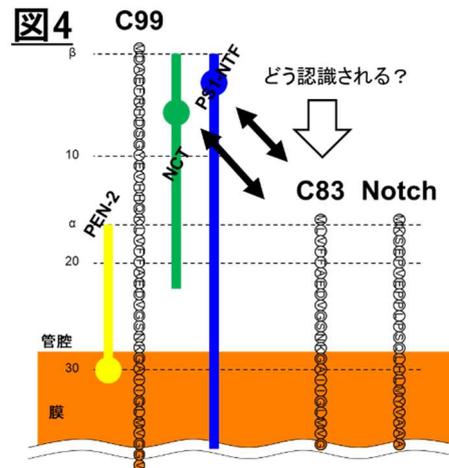
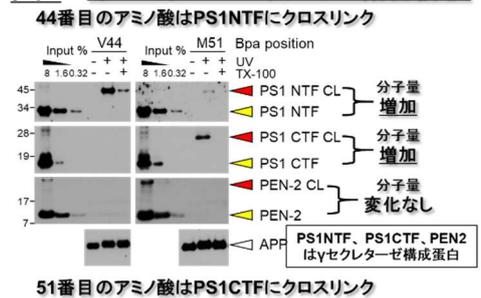
図2 光親和性クロスリンク可能な非天然アミノ酸の遺伝的取り込み法



【結 果】

本年度は特にクロスリンクシステムのバックグラウンドを低下させることに注力し、より正確に定量した。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。

図3 ウェスタンブロットでの結合評価



【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>

• ELISA Evaluation of Tau Accumulation in the Brains of Patients with Alzheimer Disease., Shinohara M, Hirokawa J, Shimodaira A, Tashiro Y, Suzuki K, Ghani G, Fukumori A, Matsubara T, Morishima M, Saito Y, Murayama S, Sato N., *J Neuropathol Exp Neurol.* 80(7):652-662. 2021

• Upregulated expression of a subset of genes in APP;ob/ob mice: Evidence of an interaction between diabetes-linked obesity and Alzheimer's disease., Shinohara M, Kikuchi M, Onishi-Takeya M, Tashiro Y, Suzuki K, Noda

Y, Takeda S, Mukouazono M, Nagano S, Fukumori A, Morishita R, Nakaya A, Sato N., *FASEB Bioadv.* 3(5):323-333. 2021

• Deletion of B-cell translocation gene 2 (BTG2) alters the responses of glial cells in white matter to chronic cerebral hypoperfusion., Suzuki K, Shinohara M, Uno Y, Tashiro Y, Ghani G, Yamamoto M, Fukumori A, Shindo A, Mashimo T, Tomimoto H, Sato N., *J Neuroinflammation.* 18(1):86. 2021

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 大阪医科薬科大学薬学部
職・氏名 教授・奥平 桂一郎

研究テーマ：

ABC トランスポーターの発現制御および機能解析研

研究期間：

令和 3 年 4 月 1 日 ～ 令和 4 年 3 月 3 1 日

研究担当者：

< 本学 >

研究代表者 (大阪医科薬科大学・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：

ABC トランスポーターは、生体膜にあって ATP 加水分解と共役して、薬剤・イオン・脂質等の輸送を担い、遺伝子変異による機能不全は様々な遺伝病の発症と関連することが報告されている。さらに、抗がん剤に対してがん細胞が抵抗性を示す多剤耐性に ABC トランスポーターが関与していることもよく知られており、がん化学療法における大きな問題となっている。本研究では、多剤耐性がん細胞株で多く見られる ABC トランスポーター (ABCB1) である P-糖タンパク質 (P-gp、MDR1) の発現上昇をとまなう慢性骨髄性白血病 K562 細胞 (K562Nin および K562/Adm) に対して、近年エピゲノム薬として注目されるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤で構造の異なる各種薬剤の感受性を調べた。さらに、低感受性、耐性を示す HDAC 阻害剤に対しては、アメリカで臨床試験が進む P-gp 阻害剤を併用することで、低感受性のメカニズム、耐性克服の可能性についても検討した。まず、K562、K562Nin および K562/Adm 細胞に対して、Vincristine (VCR, Vin) と Doxorubicin (DXR, Adm) に対する感受性を WST-8 assay によって調べた。P-gp を高レベルに発現した K562Nin、K562/Adm 細胞は、いずれも K562 親細胞と比較して VCR と DXR の両薬剤に対して強度に耐性を示した。加えて、P-gp の基質として報告されていた第 2 世代 Ah1 キナーゼ阻害剤 Nilotinib を含む、第 1 世代薬 Imatinib、第 3 世代薬 Ponatinib についても検討したが、予想外に K562Nin、K562/Adm 細胞は、K562 親細胞と同様にすべての薬剤に高感受性を示した。次に VCR と DXR の耐性克服のために、各種 P-gp 阻害剤 (Tariquidar (XR9576)、Zosuquidar (LY335979)、Elacridar (GF120918)) の併用を試みたところ、いずれの薬剤も VCR と DXR の耐性を克服した。

これらの知見をもとに、構造別に 4 グループの HDAC 阻害剤についても検討した。K562Nin、K562/Adm 細胞は、Cyclic tetrapeptides 型 HDAC 阻害剤に対して強い耐性を示し、各種 P-gp 阻害剤併用によって感受性が回復した。一方、短鎖脂肪酸型、Panobinostat を除く Hydroxamic acids 型については感受性に大きな変化はなかった。また、Panobinostat、Benzamides 型の Entinostat について認め

られた感受性低下は、各種 P-gp 阻害剤併用によって Panobinostat では回復したが、Entinostat では完全には回復しなかった。以上のように、本研究では P-gp を介した HDAC 阻害剤耐性化と、P-gp 阻害剤による耐性克服の可能性を明らかにした。

成果発表：

<原著論文>

- ・ Sakuma S, Yasuda K, Kitahara R, Tsujimoto K, Yamashita K, Hoshino N, Fujimoto Y, Okuhira K. Comparative effects of sulforaphane and allyl isothiocyanate on 3T3-L1 adipogenesis. *J. Nutr. Metab.*, 2022: 1-8, 2022
- ・ Sakuma S, Yabuuchi M, Yoshizumi A, Okajima Y, Fujimoto Y, Okuhira K. Comparative effects of luteolin and quercetin on adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J. Pharm. Nutr. Sci.*, 11: 65-72, 2021
- ・ Hirakawa N, Ishima Y, Kinoshita R, Nakano R, Chuang VTG, Ando H, Shimizu T, Okuhira K, Maruyama T, Otagiri M, Ishida T. Reduction-Responsive and Multidrug Deliverable Albumin Nanoparticles: An Antitumor Drug to Abraxane against Human Pancreatic Tumor-Bearing Mice. *ACS Appl Bio Mater.* 2021 May 17;4(5):4302-4309.
- ・ Kinoshita R, Ishima Y, Chuang VTG, Watanabe H, Shimizu T, Ando H, Okuhira K, Otagiri M, Ishida T, Maruyama T. The Therapeutic Effect of Human Serum Albumin Dimer-Doxorubicin Complex against Human Pancreatic Tumors. *Pharmaceutics.* 2021 Aug 5;13(8):1209.

<学会発表>

- ・ 立花洸季、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による ABC トランスポーターの増加を介した泡沫化マクロファージへの脂質蓄積への影響」日本薬剤学会第 36 年会
- ・ 有井紗由季、上田将弘、重永章、大高章、猪熊翼、山田健一、石田竜弘、奥平桂一郎：「新規タンパク分解誘導剤によるチミジル酸合成酵素阻害メカニズムの解明」日本薬剤学会第 36 年会
- ・ 小川真依、立花洸季、石田竜弘、奥平桂一郎：「多発性硬化症治療薬 FTY720 による ABC トランスポーターA1 発現に対する影響とそのメカニズム」日本薬剤学会第 36 年会
- ・ 水野優、鈴木悠菜、佐久間覚、奥平桂一郎：「ヒト脳血管内皮細胞 hCMEC/D3 における密着結合関連タンパク質 Claudin-5 発現に対するメチルグリオキサールおよび L- テアニンの影響」フォーラム 2021 衛生薬学・環境トキシコロジー
- ・ 奥平桂一郎：「細胞内タンパク質の特異的分解誘導剤の創製」関西大学・大阪医科薬科大学 医工薬連環科学教育研究機構 第 2 回研究セミナー
- ・ 辻田麻紀、高瀬博嗣、奥平桂一郎、鏑木基成：「磁場照射による ABCA1 トランスポーター機能とマウス成体脳細胞新生への影響」第 1 回トランスポーター研究会関西部会
- ・ 東南百花、佐久間覚、奥平桂一郎：「3T3-L1 細胞を用いた白色脂肪細胞のベージュ化関連遺伝子発現に対するスルフォラファンの影響」日本薬学会第 141 年会
- ・ 外村奈夕、奥平桂一郎、尾崎恵一：「多剤耐性慢性骨髄性白血病細胞の HDAC 阻害剤耐性化とその耐性克服法」第 71 回日本薬学会関西支部総会・大会
- ・ 佐々木澄美、吉田徳幸、奥平桂一郎、小比賀聡、井上貴雄：「アンチセンス医薬品の細胞内取り込みに関与する分子の探索」日本薬学会第 141 年会

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 生体分析学研究室

職・氏名 教授・天満 敬

研究テーマ：

ホウ素センサープローブの開発に関する研究

研究期間：

令和3年4月1日 ～ 令和4年3月31日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 天満 敬（大阪医科薬科大学・薬学部・教授）

研究分担者 近藤 直哉（大阪医科薬科大学・薬学部・助教）

研究分担者 高田 慎也（大阪医科薬科大学・薬学部・博士課程学生）

<共同研究機関>

研究代表者 萩森 政頼（武庫川女子大学・薬学部・教授）

研究目的：

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

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

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

本年度の研究内容および研究成果：

本年度は以下の項目について研究を実施した。

① ホウ素センサーPPN-1 の開発に関する検討

近年、多くのホウ素薬剤が共通構造として有するボロン酸部位を検出対象とする蛍光センサーとして *o*-iminophenol 骨格からなる DAHMI が報告された。DAHMI は所期の目的に使用され得る一方で、ストークスシフトが小さいことに問題を有している。そこで我々は、ストークスシフトの拡大を目的に、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Byp-NH₂ の構造に着目した。すなわち、Byp-NH₂ の 2,2'-bipyridine 部位を 2-(2-pyridyl)phenol とすることでボロン酸の検出が可能となると考え、新規ボロン酸検出用蛍光センサーとして PPN-1 を設計した。本研究では PPN-1 を合成後、その有効性についての基礎的評価を行った。

既報の合成法を参考に、4 段階の反応により PPN-1 を合成した。PPN-1 の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 PPN-1 (終濃度 1 mM) に BPA (終濃度 0~1 mM) を加え、蛍光強度の BPA 濃度との相関性を調べた。DMSO-Tris HCl (1:1) 中で PPN-1 (終濃度 0.1 mM) に BPA 溶液又は各種金属カチオン溶液 (終濃度 1 mM) を加え、蛍光強度を測定した。DMSO-PBS (1:1) 中で PPN-1 (終濃度 1 mM) に BPA (終濃度 1 mM) を加え、蛍光強度を経時的に測定した。実験は全て励起波長 387 nm、蛍光波長 442 nm で測定し、励起波長 411 nm、蛍光波長 431 nm において同様の条件で測定した DAHMI の結果と比較した。

PPN-1 を総収率 2.5% で得た。BPA 添加後の PPN-1 の励起・蛍光極大波長はそれぞれ 387 nm、442 nm となった。DAHMI の場合、それぞれ 411 nm、431 nm となり、PPN-1 のストークスシフトは DAHMI と比較して 2 倍以上の拡大を認めた。PPN-1 は BPA 添加後に 442 nm における蛍光強度上昇を認め、その上昇率は BPA 添加濃度と高い相関を示した。PPN-1 は、BPA 溶液との混合後に 3 倍以上の蛍光強度上昇を認めた一方、金属溶液ではいずれも 1.2 倍以下となり、BPA に対する高い特異性を示唆した。PPN-1 は BPA と混合後、蛍光強度がプラトーに達するまで 5 分以内と速やかな蛍光強度上昇を認めた一方、DAHMI の場合は 100 分以上を要し、PPN-1 の DAHMI と比較した速やかな反応性が示唆された。

以上より、PPN-1 は DAHMI と比較して大きなストークスシフトと速やかな反応性を有し、ボロン酸含有薬剤 BPA に特異性を示すことから、新たなボロン酸検出用蛍光センサーとなる可能性が示された。

② ホウ素センサーPPN-1 の改良に関する検討

我々はこれまでに 2-(2-pyridyl)phenol 骨格を有する PPN-1 を設計・合成し、基質特異性と速やかな反応性を兼ね備えたボロン酸蛍光センサーとしての基礎的な有効性を示してきた。本研究では、PPN-1 の蛍光特性改善を目的として、PPN-1 のピリジン部分を電子供与性基 (EDG) あるいは電子吸引性基 (EWG) を有する一置換ベンゼンに変更した PPN 誘導体 (PPN-1~5) を合成し、2-(2-pyridyl)phenol 骨格が有する電子密度の蛍光特性に与える影響を、PPN-1 の場合と比較検討した。

4 段階の反応を経て PPN-1~5 を合成した。DMSO/PBS (1:1) 中における PPN-1~5 の吸収、励起、及び蛍光極大波長を調べた。DMSO/PBS (1:1) 中で PPN-1~5 (終濃度 10 μM) に phenylboronic acid (PBA、終濃度 1 mM) を加え、蛍光強度変化を調べた。

PPN-1~5 の合成を $^1\text{H-NMR}$ 及び質量分析法で確認した。PPN-1 の PBA 添加時の蛍光強度は PPN-1 の場合の 1.4 倍となり、PPN-1 の蛍光特性改善に母体骨格へのベンゼン環導入の有効性が示唆された。また、ベンゼン環に EWG を導入した PPN-2, 3 では PPN-1 の 1.1~1.3 倍、EDG を導入した PPN-4, 5 では 1.6~1.8 倍に PBA 添加時蛍光強度の増強を認めたことから、2-(2-pyridyl)phenol 骨格が有する電子密度の上昇がボロン酸蛍光センサーの蛍光特性改善に有効である可能性が示された。

成果発表：

<学会発表>

- ・ホウ素中性子捕捉療法用薬剤の有効性評価のためのボロン酸検出用蛍光センサーの開発、高田慎也、近藤直哉、萩森政頼、天満 敬、日本分析化学会第 70 年会、2021 年 9 月 22 日（オンライン）
- ・2-(2-Pyridyl)phenol 骨格を有するボロン酸蛍光センサーMB-1 の蛍光特性改善に関する検討、高田慎也、近藤直哉、萩森政頼、天満 敬、日本薬学会第 142 年会、2022 年 3 月 26 日（オンライン）

共同研究成果報告書

研究代表者 所属 薬物治療学研究室
職・氏名 准教授 幸田 祐佳

研究テーマ：

酸化ストレス疾患の予防と病態改善に関する研究

研究期間：

令和3年3月1日 ～ 令和4年3月31日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 幸田 祐佳 （大阪医科薬科大学・薬学部・准教授）

研究分担者 松村 人志 （大阪医科薬科大学・薬学部・名誉教授）

<共同研究機関>

研究代表者 福石 信之 （金城学院大学・薬学部・教授）

研究目的：

肥満を伴う糖尿病や睡眠障害の予防は、新型コロナウイルス感染症のパンデミックの現代においてより一層、重要であると考えられる。肥満を伴う糖尿病患者は、新型コロナ感染において、重症化リスクが高いとされている。酸化ストレス[フリーラジカルの産生と消去系のバランスが崩れている状態]は、様々な疾患の成因として考えられており、肥満、糖尿病そして睡眠障害は酸化ストレス疾患である。酸化ストレス疾患には、脳老化や脳疾患も含まれる。コロナ禍の中、不安やストレスによりコロナうつを発症するケースも増えていると思われる。うつや不眠といった体調の変化は、インスリン抵抗性を増大させ、肥満や糖尿病を誘発することが報告されている。睡眠を調節することにより、うつを防ぐことが可能であるとの知見もある。

培養細胞ならびに肥満糖尿病モデルラットにおいて、血圧調節、血糖コントロールと睡眠や覚醒に関連する種々の遺伝子発現解析にて評価し、肥満症、アレルギー疾患、睡眠障害、糖尿病合併症を含む酸化ストレス疾患の予防、病態改善と治療法について検討する。本共同研究において、酸化ストレス抑制による疾患の予防法のみならず病態を改善する新たな治療薬に繋がる知見を探究する。

本年度の研究内容および研究成果：

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

酸化ストレス疾患である肥満や糖尿病は、睡眠障害の合併率が高いとされている。我々は、肥満糖尿病ラットではオレキシンの血漿中濃度が上昇することを報告している。オレキシンは睡眠覚醒調

節のみならず糖代謝恒常性に関わると考えられている。肥満糖尿病ラット OLETF はコレシストキニン A 受容体が欠損しているため、満腹を感じられず、オレキシンによる糖代謝恒常性と睡眠調節が有効活用されていないと考え、本研究にて検証を進めている。本共同研究において、オレキシンによる睡眠調節と糖代謝恒常性の維持メカニズムの関連性について解明する。

肝臓は、糖代謝と脂質代謝過程において酸化ストレス状態になりやすいと考えられる。肥満や糖尿病患者では、非アルコール性脂肪性肝疾患(Nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD)の合併症が高く、NAFLD は脂肪肝から肝炎、肝硬変に至る病態である。NAFLD 合併の肥満と糖尿病治療では、血糖コントロールとともに肝臓の酸化ストレスを抑制することが重要であると考え。肥満を伴う糖尿病ラットにおいて、肥満の改善状態と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、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・糖尿病ラットの肝臓におけるインクレチン glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) 発現に焦点を当て、肥満と糖尿病状態へ与える影響に関する検討により、ラット肝臓における GIP 発現変動は、肥満・糖尿病ラットの酸化ストレス状態に影響する可能性が示唆された。肥満・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 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。

成果発表：

<原著論文>

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

<学会発表>

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