

2021 年度 福山大学特別研究 報告書

核内受容体を標的とした血管疾患の新規治療法の確立

研究代表者

薬学部薬学科 病態生理・ゲノム機能学研究室 松岡浩史

研究分担者

薬学部薬学科 生化学研究室	志摩亜季保
薬学部薬学科 薬品分析化学研究室	小川祥二郎
薬学部薬学科 医薬品化学研究室	西山卓志
薬学部薬学科 病態生理・ゲノム機能学研究室	道原明宏
薬学部薬学科 分子免疫学研究室	本田真知子
薬学部薬学科 薬理学研究室	渡邊正知
薬学部薬学科 薬物治療学研究室	大西正俊

研究期間

2021 年 4 月 1 日～2022 年 3 月 31 日

研究背景

動脈硬化は、脂質異常症や糖尿病、高血圧、喫煙、運動不足などの危険因子により生じると考えられ、最終的に動脈の血流が遮断されて、脳梗塞や心筋梗塞などの血管疾患を引き起こす原因となる。本邦における死亡者総数の約25%は血管疾患に起因しているが、一度進行した動脈硬化を退縮させる治療法は未だに開発されていない。

本プロジェクトでは、動脈硬化に対して抑制作用がある核内受容体の発現制御ネットワークの全容を明らかにするとともに、その制御系の活性化に対する作動薬の効果について評価することで、動脈硬化治療を目指した標的分子の同定および動脈硬化に対する効果的な治療薬の開発を目的とする。それにより、動脈硬化の原因となる組織中の蓄積コレステロールを除去する新たな治療戦略の基盤構築が期待される。

本プロジェクトは、以下の4つのグループで研究分担している。

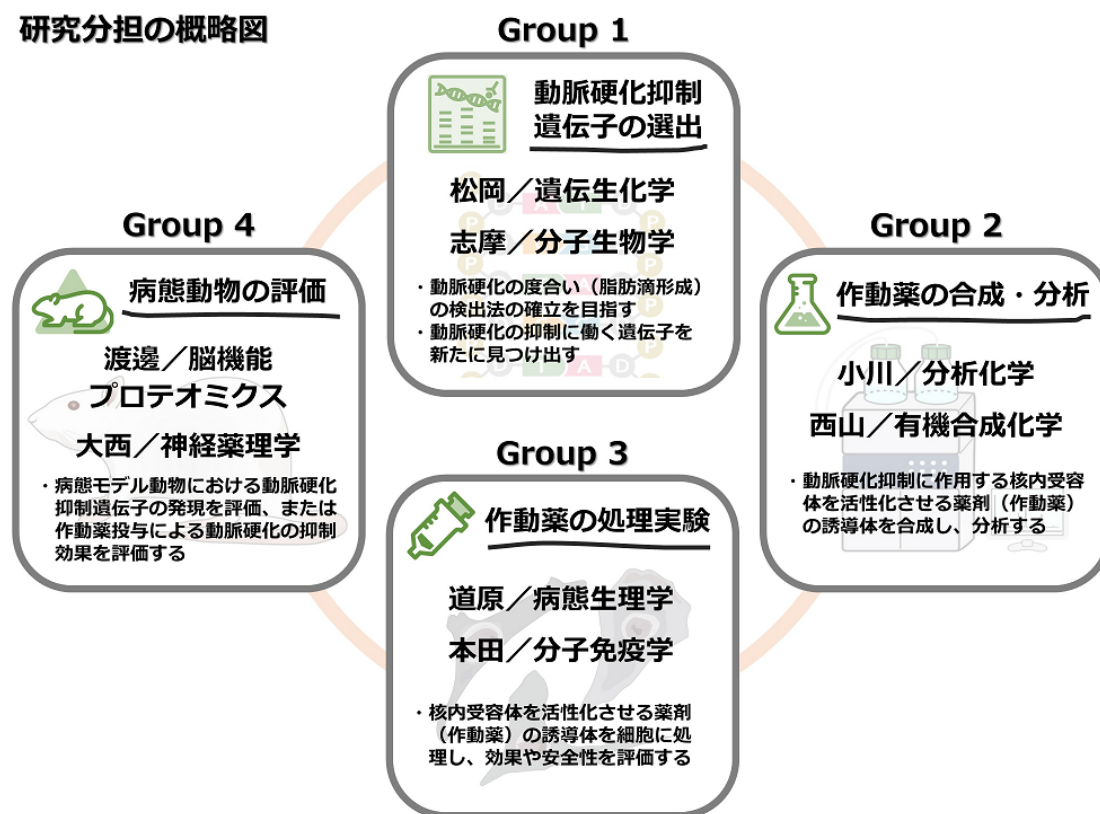
グループ1（動脈硬化抑制遺伝子の選出／松岡・志摩）

グループ2（作動薬の合成・分析／小川・西山）

グループ3（作動薬の処理実験／道原・本田）

グループ4（病態動物の評価／渡邊・大西）

研究分担の概略図



2021年度研究報告書

1. 研究課題 「核内受容体を標的とした血管疾患の新規治療法の確立」 グループ1

2. 研究者名 薬学部薬学科 病態生理・ゲノム機能学研究室 松岡浩史

3. 研究協力者 濱島崇寛 (福山大学薬学部薬学科・学部6年)

大石亜美 (福山大学薬学部薬学科・学部6年)

山岡愛主 (福山大学薬学部薬学科・学部5年)

重藤真佑 (福山大学薬学部薬学科・学部5年)

4. 研究目的

心疾患と脳血管疾患は本邦の死因上位であり、これらの多くは動脈硬化により惹き起こされる。動脈硬化は脂質異常症や糖尿病、高血圧などの危険因子により血管に負担がかかると、血中の LDL コレステロールが血管内皮下に取り込まれ、酸化型となる。それをマクロファージが取込むことで、脂肪滴が生じて泡沫化する。その後、泡沫細胞の蓄積はプラークを発生させ、動脈硬化へと進展する。

動脈硬化治療において、血中の脂質である LDL コレステロールや中性脂肪を低下させる薬剤が使用されており、それら薬剤は予防には効果的であるが、すでに蓄積された脂質を除去する治療としての効果は十分でなく、新たな治療薬の開発が必要である。

国際ゲノムプロジェクトの成果で得られた 48 種の核内受容体遺伝子について、それらのノックアウト解析により病態に関連する因子が同定され、その一部はすでに国内外で臨床応用されている。例えば、PPAR α を標的とする脂質異常症薬（フィブラート系）、PPAR γ を標的とする糖尿病薬（チアゾリジン系）、GR α を標的とする抗炎症薬（ステロイド系）、性ホルモン受容体を標的とする内分泌療法など、多くの核内受容体を標的分子とした薬剤・治療法が広く利用されている。一方、本プロジェクトで着目する ROR α は、動脈硬化の抑制に寄与することは明らかにされているが、その標的遺伝子と作動薬については多くの部分が不明である。

本研究では、動脈硬化に対して抑制的に作用する核内受容体について、その標的遺伝子群の選出とともに、それら標的遺伝子の効果的な活性化法の確立を目的とする。

5. 研究成果

動脈硬化抑制に関わる ROR α 核内受容体の作動薬候補について、それらの活性化能を評価するために、*in cellulo*による評価系の構築に取り組んだ。

HepG2（ヒト肝癌由来細胞）を用いて、ROR α 作動薬である SR1078 を処理後、標的遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で評価した。同様に、HepG2 に ROR α 逆作動薬である SR1001 を処理し、標的遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により評価した。また、HepG2 を用いて、ROR α 応答性ルシフェラーゼレポーターおよび ROR α 発現ベクターの共トランスフェクション下により、作動薬に対する活性化能を評価した。

ROR α のリガンド処理による発現解析の結果、SR1078 処理において標的遺伝子の mRNA 量の発現亢進が観察された。一方、SR1001 処理においては標的遺伝子の mRNA 量の発現減少が観察された（図1）。

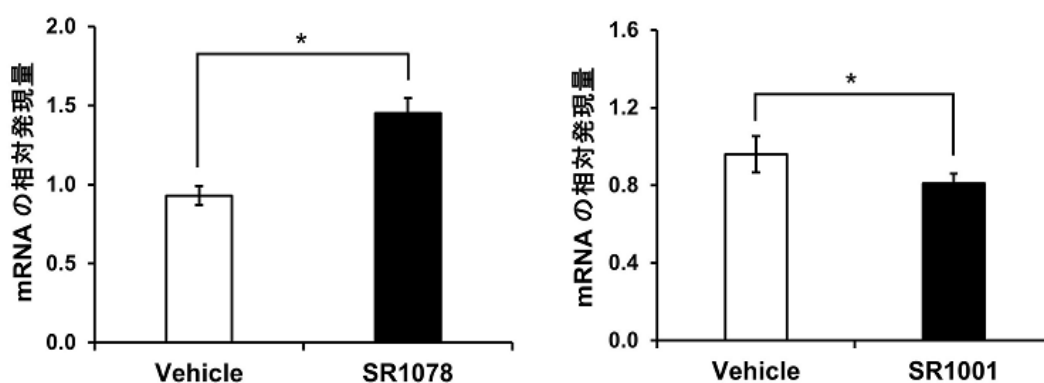


図1. SR1078作動薬およびSR1001逆作動薬によるROR α 標的遺伝子の発現量評価

リガンド活性化能をレポーター解析により評価した結果、ROR α 過剰発現系により発現応答性が観察され、その応答性は SR1001 処理により減少を示した。これらの結果、ROR α 作動薬である SR1078 は ROR α 標的遺伝子を発現亢進させ、逆作動薬である SR1001 は ROR α 標的遺伝子を発現抑制させることが示された（図2）。

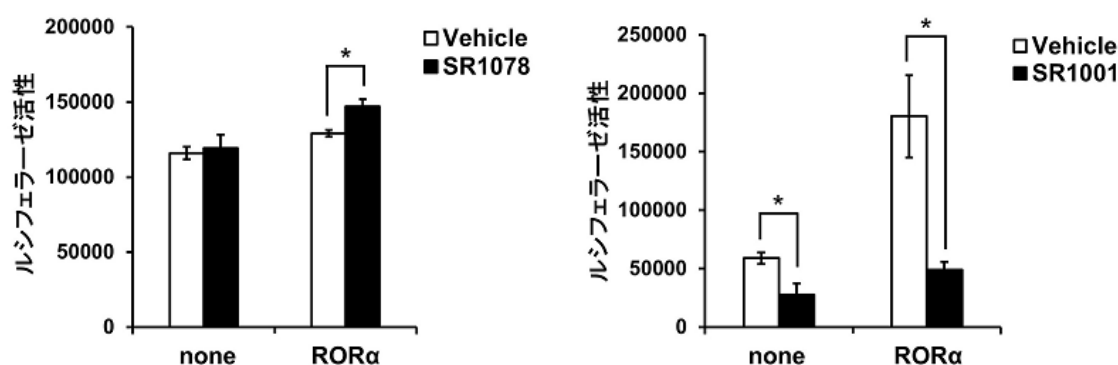


図2. SR1078作動薬およびSR1001逆作動薬によるROR α 活性化能の評価

従来のルシフェラーゼレポーター系では活性測定に細胞溶解の手順を要しており、多くの時間と労力を有する。そこで、作動薬候補シリーズに対する ROR α 活性化能評価の高速化・簡略化を目的として、細胞溶解を不要とし、尚且つ 96 ウェルプレートの小スケールでの測定が可能となる分泌ルシフェラーゼアッセイへの応用を試みた。その結果、*Metridia longa* 由来の分泌ルシフェラーゼ遺伝子上流に ROR α 応答配列を含むプロモーターを連結させた pMet-Luc レポーターシステムを用いることで、細胞培養上清中にルシフェラーゼを分泌させることに成功し、作動薬候補シリーズに対する ROR α 活性化能の迅速な評価系を確立することができた。

これら研究成果の一部は、2021 年度日本薬学会中国四国支部学術大会において、「動脈硬化抑制に關与するレチノイド關連オーファン受容体の標的遺伝子群の探索」および「LXR α 核内受容体を介した 24S-ヒドロキシコレステロールの代謝誘導系の解析」という題目で発表した。また、ROR α 標的遺伝子である細胞接着分子 CLDND1 の活性化機構を明らかにし、「ヒト血管内皮細胞における細胞接着分子 CLDND1 の発現調節機構の解析」という題目で発表した。さらに、これまでに行ってきた ROR α の標的遺伝子群の探索研究について、招待総説の依頼を受け、英文誌 *Biol. Pharm. Bull.* へ「Identification of the ROR α transcriptional network contributes to the search for therapeutic targets in atherosclerosis」という表題で報告した。

6. 来年度の研究計画

本研究の最終目的は、核内受容体の標的遺伝子群を選出すること、それとともに作動薬およびその誘導体により標的遺伝子群を誘導させて、脂肪滴形成への影響を評価していくことである。今回の分担研究により、作動薬候補シリーズに対する核内受容体の活性化能評価系を確立できたことになる。本実験系を用いることで、今後は核内受容体の標的遺伝子群の選出に用いるとともに、作動薬やその誘導体に対する影響についても検討する。

7. 研究経費内訳

グリーンサイエンス特別研究費	450 千円
科学研究費助成事業 基盤研究 (C)	[課題番号 21K06791]

8. 研究成果発表

原著論文、著書等

- 1) Identification of the ROR α transcriptional network contributes to the search for therapeutic targets in atherosclerosis. Hiroshi Matsuoka, and Akihiro Michihara. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 44(11) 1607-1616 (2021)

口頭発表

1) 動脈硬化抑制に關与するレチノイド關連オーファン受容体の標的遺伝子群の探索【奨励賞受賞講演】

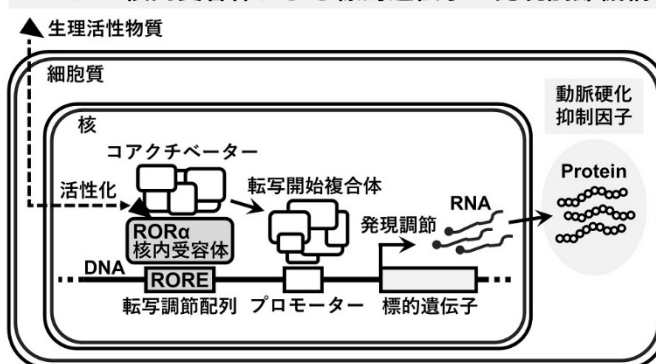
松岡浩史

第 60 回日本薬学会 中国四国支部学術大会 (2021 年 10 月・愛媛オンライン)、演題番号 AL-1

【目的】心疾患と脳血管疾患は本邦の死因上位を占めており、これらの根本原因である動脈硬化の治療・予防法の開発は重要である。核内受容体の機能欠失マウスの解析によって、レチノイド關連オーファン受容体 α (Retinoid-related Orphan Receptor α ; ROR α) 遺伝子欠失が、高密度リポ蛋白質の減少や炎症性サイトカインの増大を通じて動脈硬化を発症させると報告されている。すなわち、ROR α を含めた発現制御ネットワークの働きの、抗動脈硬化作用があると推測される。そこで、ROR α の標的遺伝子群の同定を通じて、動脈硬化の抑制機構の解明に取り組んだ。

【方法】ヒトゲノム上に存在する各種 ROR α 応答配列 (RORE) の結合性および応答性の解析によって、ROR α と強い親和性を示す RORE を特定した。その配列を各遺伝子プロモーター近傍で検索し、RORE を有する標的遺伝子候補を抽出した。次に、ROR α

■ ROR α 核内受容体による標的遺伝子の発現調節機構



の過剰発現およびノックダウン培養細胞系により、ROR α 発現に連動する標的遺伝子群を選出した。また、それら標的遺伝子群の RORE に対する結合性および応答性を、ゲル移動度シフト解析およびルシフェラーゼレポーター解析により評価した。さらに、ROR α 作動薬を用いて、標的遺伝子の誘導能を評価した。

【結果・考察】ゲノムワイド検索および逆遺伝学的アプローチを足掛かりとして、ROR α の結合性と応答性を合わせ持つ RORE を有する標的遺伝子の同定に成功した。これら標的遺伝子として、血中糖濃度の調節酵素 PCK1、細胞接着分子 CLDN1、蓄積コレステロールの除去酵素 NCEH1、酸化ステロールの代謝酵素 CYP39A1 を得た [1-6]。また、それら遺伝子発現は ROR α 作動薬により誘導された。今後、ROR α の標的遺伝子群の探索を進め、動脈硬化の抑制因子の新規同定により、動脈硬化治療を目指した創薬研究への進展が期待される。

[1] Matsuoka et al., *PLoS One* **10** (2015), [2] Matsuoka et al., *J. Biochem.* **161** (2017), [3] Matsuoka et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **498** (2018), [4] Shima et al., *BPB rep.* **3** (2020), [5] Matsuoka et al., *BMC Mol. Cell Biol.* **21** (2020), [6] Matsuoka et al., *Int. J. Mol. Sci.* **21** (2020)

2) ヒト血管内皮細胞における細胞接着分子 CLDND1 の発現調節機構の解析

山岡愛主, 志摩亜季保, 松岡浩史, 濱島崇寛, 小迫舞鈴, 田原佑馬, 道原明宏
第 60 回日本薬学会 中国四国支部学術大会 (2021 年 10 月・愛媛オンライン)、演題番号 0-065

【目的】脳卒中を引き起こす要因の一つに血管内皮細胞間の密着結合の脆弱化による物質透過性亢進が報告されている。クローディングファミリーは、物質透過性を制御するタイトジャンクションの主要な構成分子であり、そのうちの Claudin domain containing 1 (CLDND1) は小脳や肝臓において多く発現している。我々は、脳出血モデル動物実験により脳出血時に CLDND1 が減少すること、CLDND1 ノックダウン培養細胞実験により物質透過性が亢進することを明らかにしてきた。これにより、CLDND1 の発現量の変化が脳卒中の発症要因である物質透過性亢進に影響を与えることが考えられる。これらことから、レポーター解析によりヒト CLDND1 プロモーター領域で転写制御配列を探索したところ、エンハンサー領域を数塩基の領域として特定した。本研究では、そのヒト CLDND1 のエンハンサー領域に対する転写因子の同定を試みた。

【方法】ヒト CLDND1 プロモーター領域のエンハンサー領域に結合する転写因子を *in silico* 解析により推測し、制御配列に対する応答性および結合性をレポーター解析および ChIP 解析により評価した。さらに、転写因子の一過性発現に対する CLDND1 発現量を qRT-PCR 法およびウエスタンブロット法により評価した。

【結果と考察】エンハンサー領域に結合する転写因子を TFBIND で検索した結果、ETS-like protein-1 (ELK1) 結合配列と高い相同性が示された。レポーター解析の結果、ELK1 はエンハンサー領域にアクチベーターとして作用することが観察された。一方、ChIP 解析の結果、ELK1 の結合性は観察されなかった。また、ELK1 の一過性発現解析の結果、ELK1 の発現増加に伴って CLDND1 発現量の有意な増加が観察された。以上の結果、CLDND1 のエンハンサー領域に ELK1 がアクチベーターとして作用し、CLDND1 の発現を活性化していることが示唆された。現在、ELK1 の MAP キナーゼ経路によるリン酸化や、血清応答因子 (SRF) との三量体形成が標的遺伝子の発現を活性化させることが報告されているため、これらの条件により CLDND1 の発現が活性化されるか解析中である。

3) LXR α 核内受容体を介した 24S-ヒドロキシコレステロールの代謝誘導系の解析

重藤真佑, 松岡浩史, 大石亜美, 深坂日向子, 田原佑馬, 道原明宏
第 60 回日本薬学会 中国四国支部学術大会 (2021 年 10 月・愛媛オンライン)、演題番号 0-062

【目的】脳内コレステロールは P450 酵素により 24S-ヒドロキシコレステロール (24S-OHC) へ変換後、血液脳関門を通過して循環系へ排出され、肝臓において CYP39A1 により選択的に代謝される。CYP39A1 の発現異常は、神経細胞毒性を示す 24S-OHC の過剰な蓄積を通じて、アルツハイマー病などの神経変性疾患の進行に関与

すると考えられている。24S-OHC を内因性リガンドとする肝臓 X 受容体 α (LXR α) は、レチノイド X 受容体 α (RXR α) とヘテロダイマーを形成する核内受容体であり、CYP7A1 や CYP3A4 をはじめとした代謝酵素の発現を制御する。一方、CYP39A1 代謝酵素の発現制御メカニズムについては不明である。そこで本研究では CYP39A1 の発現制御に対し、LXR α /RXR α および、それらのリガンドによる影響を評価した。

【方法】 ヒト肝癌由来細胞 HepG2 を用いて、CYP39A1 プロモーター領域 (-1187~+118) における LXR α /RXR α の応答性をルシフェラーゼレポーター解析により評価した。また、HepG2 を用いて LXR α /RXR α 一過性発現時の CYP39A1 発現量をリアルタイム PCR 法で評価した。同様に LXR α /RXR α を一過性発現させた後、それらのアゴニストである T0901317/9-cisRA を処理し、CYP39A1 発現量をリアルタイム PCR 法で評価した。

【結果と考察】 CYP39A1 プロモーター領域における LXR α /RXR α の応答性を評価した結果、LXR α /RXR α の一過性発現により有意な応答性の減少が観察された。また、LXR α /RXR α 一過性発現による mRNA 量を評価した結果、CYP39A1 の mRNA 量の発現減少が観察された。一方、アゴニスト処理により mRNA 量を評価した結果、CYP39A1 の mRNA 量の発現増加が観察された。これらの結果より、核内受容体 LXR α /RXR α は CYP39A1 プロモーター領域に結合し、リプレッサーとして働くことが示唆された。また、アゴニスト存在下において LXR α /RXR α を介した転写開始複合体の形成により、CYP39A1 転写を促進することが示された。現在、CYP39A1 プロモーター領域の欠失レポーターを作成し、LXR α 応答配列について詳細な解析をすすめている。

4) 動脈硬化抑制に関わる ROR α 核内受容体の標的遺伝子の探索

松岡浩史, 道原明宏

第 60 回日本薬学会 中国四国支部学術大会 (2021 年 10 月・愛媛オンライン)、演題番号 P-007

【目的】 動脈硬化の薬物治療において、スタチン、フィブラートなどの薬剤が臨床現場で応用されている。しかし、これら薬剤は脂質降下薬としての作用により予防には効果的であるが、すでに蓄積された脂質を除去する効果は十分でなく、新たな治療薬の開発が必要である。遺伝子欠失マウスの解析により、レチノイン酸関連オーファン受容体 α (ROR α) が動脈硬化抑制に働くことが報告されている。そこで、我々は ROR α 核内受容体が制御する標的遺伝子群の同定を通じて、動脈硬化の抑制メカニズムの解明とその活性化法の開発に取り組んできた。

【方法】 各種 ROR α 応答配列の結合性および応答性の解析によって、ROR α と強い親和性を示す ROR α 応答配列 (RORE) を特定した。その配列をヒトゲノム上の各遺伝子プロモーター近傍で検索し、RORE を有する標的遺伝子候補を抽出した。次に、ROR α の過剰発現およびノックダウン培養細胞系により、ROR α 発現に連動する標的遺伝子群を選出した。また、それら標的遺伝子群の RORE に対する結合性および応答性を、ゲル移動度シフト解析およびルシフェラーゼレポーター解析により評価した。

さらに、ROR α 作動薬を用いて、標的遺伝子の誘導能を評価した。

【結果・考察】RORE のヒトゲノムワイド探索および ROR α 核内受容体の逆遺伝学的アプローチによって、ROR α の結合性と応答性を合わせ持つ RORE を有する標的遺伝子の同定に成功した。これら標的遺伝子として、血中糖濃度の調節酵素 PEPCK、細胞接着分子 CLDN1、蓄積コレステロールの除去酵素 NCEH1、オキシステロールの代謝酵素 CYP39A1 を得た。さらに、ROR α 作動薬による標的遺伝子の誘導性を評価した結果、それら遺伝子発現の亢進が示された。現在、ROR α 発現制御ネットワークの全容解明を目指し、オミクス解析への展開を検討中である。

- 5) 動脈硬化抑制に関わる ROR α 核内受容体の標的遺伝子の探索
松岡浩史，道原明宏
第 12 回川崎医科大学学術集会（2021 年 7 月・岡山）、演題番号 P6
- 6) 動脈硬化抑制に関わる核内受容体の標的遺伝子の探索と創薬応用
松岡浩史
2021 年度 福山大学研究成果発表会（2021 年 9 月・福山大学オンライン）
- 7) 動脈硬化抑制に関わる ROR α 核内受容体の標的遺伝子の探索
松岡浩史，道原明宏
第 6 回 KMS メディカル・アーク 2022（2022 年 2 月・岡山オンライン）

9. その他

研究代表者のこれまでの研究成果（2015～2021 年）が認められ、2021 年度日本薬学会中国四国支部奨励賞を受賞した。また、研究協力者である山岡愛主が第 60 回日本薬学会中国四国支部学術大会で発表した研究成果が認められ、学生発表奨励賞を受賞した。

2021年度研究報告書

1. 研究課題 「核内受容体を標的とした血管疾患の新規治療法の確立」 グループ1

2. 研究者名 薬学部薬学科 生化学研究室 志摩亜季保

3. 研究協力者 上敷領 淳 (福山大学薬学部薬学科・准教授)

4. 研究目的

動脈硬化は、脂質異常症や糖尿病、高血圧などの疾患や、喫煙、運動不足などの生活習慣により生じると考えられる。最終的には、動脈の血流が遮断され、脳卒中や心疾患などの脳・血管疾患を引き起こす原因となる。本邦における死亡者総数の約25%は動脈硬化に起因しているが、一度進行した病状を退縮させる治療法は開発されていない。本研究では、動脈硬化抑制に働く核内受容体の新たな標的遺伝子を選出するために、ゲノム編集システムにより核内受容体遺伝子のノックアウト細胞を作成する。

5. 研究成果

特定遺伝子のノックアウトによる逆遺伝学的解析は、その特定遺伝子の機能解析に有用である。そこで、アテローム性動脈硬化の抑制的転写因子である核内受容体 ROR α (Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor α) のノックアウト細胞を作成し、転写ネットワークへの影響を評価するために、CRISPR-Cas9 システムを用いた ROR α ゲノム編集用ベクターを作成した。ROR α ゲノム編集用ベクターは、ROR α の第3エクソン (あるいは第4エクソン) 上を特異的に切断し、その領域にピューロマイシン耐性および緑色蛍光タンパク質を発現する配列「EGFP-Puro^r」が逆向きに挿入されるノックアウト細胞を作成するように、PITCh-KIKO 法に準じて設計した (広島大学分子遺伝学研究室の山本卓教授と佐久間哲史准教授の協力により作成)。作成した ROR α ゲノム編集用ベクターを用いて HEK293T

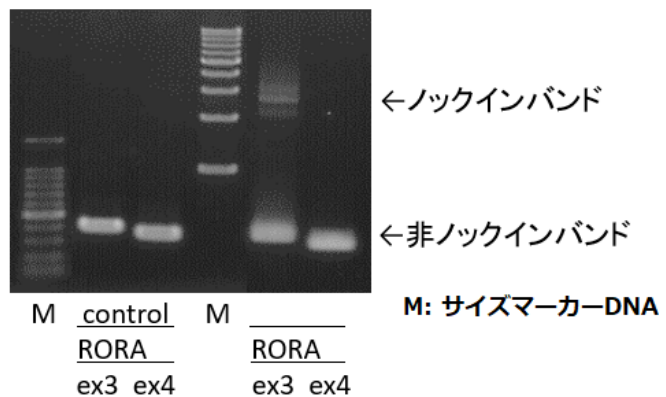


図1 : PCR 法による挿入効率の評価

細胞にトランスフェクションし、48 時間後にゲノム DNA を抽出して、PCR

法により ROR α のエクソン上への EGFP-Puro^r カセットの挿入効率を評価した。その結果、第3エクソンへのカセット挿入によるノックインバンドが確認された (図1)。

次に、肝細胞における ROR α 遺伝子の機能を調べるために、肝培養細胞 HepG2 を用いて Lipofectamine 2000 によりトランスフェクションし、48 時間後にピューロマイシン (濃度: 0、0.5、1、1.5、2.0 μ M) を添加して培養することで、ピューロマイシン耐性および緑色蛍光タンパク質の発現を指標として ROR α ノックアウト細胞を選択した。その結果、薬剤耐性により生存する細胞を選出でき、尚且つ緑色蛍光を発する細胞を選出することに成功した (図2)。

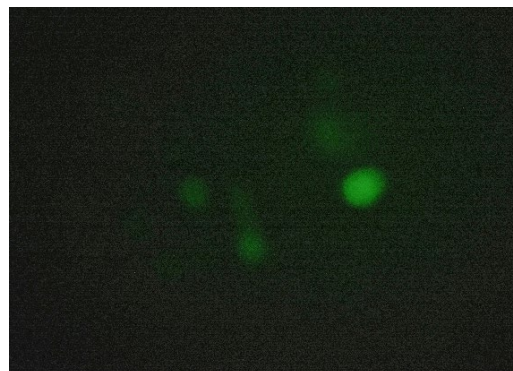


図2 : 緑色蛍光を発する肝培養細胞

さらに、選出した肝培養細胞からゲノム DNA を抽出後、PCR 法により ROR α 第3エクソン上の目的部位への EGFP-Puro^r カセットの挿入を評価した (以下のプライマーを使用した)。

RORA_ex3_FW: TCTGGGGATCAATTTTACTCAAGGAAAAAGAAG

RORA_ex3_RV: TGAGTCCAGGTTTCAGAAGGCACTTTCAC

その結果、EGFP-Puro^r カセットのインサート DNA (約 2500 bp) を含む DNA 断片のサイズ (約 3000 bp) は検出されず、非ノックインバンドのみが検出された。今後、引き続き、薬剤選択方法の検討を続けていく予定である。

6. 来年度の研究計画

今後、いくつかの細胞種を用いて安定的なノックアウト細胞の樹立を目指すとともに、ノックアウト細胞の樹立後は ROR α の制御下にある標的遺伝子の発現量を評価する。また、ノックアウト細胞を用いて、DNA マイクロアレイ解析あるいは RNA-seq 解析により網羅的に遺伝子発現変動を評価する。

7. 研究経費内訳

グリーンサイエンス特別研究費	150 千円
科学研究費助成事業 研究活動スタート支援	「21K20748」

8. 研究成果発表

原著論文 (1 報)

1) 脳卒中に関与する細胞接着分子である CLDN1 の発現調節法の開発を目指し

て、志摩亜季保，松岡浩史，道原明宏，福山大学薬学部研究年報，(39)，
17-32 (2021)

学会発表 (4 件)

1) アバント™中の HMB による肝臓のリポタンパク質代謝に及ぼす効果

田場典仁，田邊静香，高路和明，藤井朋保，志摩亜季保，上敷領淳，森田哲生

第 13 回日本臨床栄養代謝学会 中国四国支部学術集会 (2021 年 8 月・岡山)

アバント™は HMB、アルギニン及びグルタミン含有飲料であり、褥瘡等の創傷改善における栄養管理上、極めて有用である。中でも HMB は体タンパク質の分解抑制と合成促進、過剰な炎症反応の抑制等の効果が報告されている。そこで本研究では HMB の肝における脂質代謝に及ぼす効果を調べるため、肝性リパーゼ (HTGL) の挙動について検討した。HMB によって肝組織からの HTGL の分泌が促進され、この促進効果はホスホリパーゼ A2 阻害剤によって大きく抑制された。さらにこの HMB の効果はシクロオキシゲナーゼ阻害剤によっても抑制されたことから、HMB のプロスタグランジン産生系への関与が考えられた。一方、この HTGL 分泌促進作用はロイコトリエン合成系阻害剤によっても、抑制されたことから、HMB の作用にロイコトリエン B4 準位の関与も示唆された。すなわち HMB はアラキドン酸カスケードを含むシグナル伝達系を介して、肝の脂質代謝系を亢進していることが示唆された。

2) 医療用サプリメントアバント™に含まれる HMB の乳癌細胞に対する効果

岡田彩香，田邊静香，紺田真希，菅香理，藤井朋保，志摩亜季保，上敷領淳，森田哲生

第 60 回日本薬学会 中国四国支部学術大会 (2021 年 10 月・愛媛)

【目的】医療用サプリメントのアバントは、褥瘡等の創傷改善に極めて有用である。その主成分はロイシン (Leu) の代謝産物である HMB (β -ヒドロキシ- β -メチル酪酸) とアルギニン (Arg) 及びグルタミン (Gln) である。中でも HMB の体タンパク質の合成促進や分解抑制等の生理作用が注目されている。本研究室においても、HMB の肝タンパク質合成作用が見出されている。しかし、HMB の癌細胞に対する作用の詳細は不明な点が多い。そこで今回、マウス乳癌 FM3A 細胞を用い、その増殖に対する HMB の効果について検討した。

【方法】マウス乳癌 FM3A 細胞を RPMI1640 培地中、各種薬剤存在下 37°C、5%CO₂ 下で 3 日間培養後、細胞数を測定した。

【結果・考察】本乳癌細胞は HMB 存在下、その濃度の増加に伴って、細胞増殖の促進が認められた。しかし HMB 生成の出発原料である Leu の添加では、細胞増殖はむしろ抑制された。また、HMB と Leu を共存させると、HMB の細胞増殖促進作用は減退した。一方、他の分岐鎖アミノ酸のイソロイシン (Ile) やバリン (Val) では、各々細胞増殖の促進作用を有し、HMB との共存によってほぼ相加的に作用の増強が認められた。また、アバントに含まれる Arg や Gln も各々癌細胞の増殖を促進したが、HMB と Gln との共存によってその作用は亢進されたが、Arg との共存ではむしろ抑制された。さらに、HMB による細胞増殖促進作用は、5-フルオロウラシル (5-FU) によって抑制され、5-FU の作用は減弱しなかった。すなわち、アバント等のアミノ酸含有栄養剤の適用は、十分慎重に投与する必要性が示唆された。

【謝辞】本研究の施行に当たり、多大な御協力頂いた教育医学研究所 (広島市) 並びに安浦病院 (呉市) 理事長 西本 慶次 先生に深謝致します。

- 3) ヒト血管内皮細胞における細胞接着分子 CLDN1 の発現調節機構の解析
山岡愛主, 志摩亜季保, 松岡浩史, 濱島崇寛, 小迫舞鈴, 田原佑馬, 道原明宏
第 60 回日本薬学会 中国四国支部学術大会 (2021 年 10 月・愛媛)

- 4) マウス乳癌 FM3A 細胞におけるパルボシクリブによる脂質代謝の変化
藤井朋保, 中桐大翔, 志摩亜季保, 上敷領淳, 森田哲生
第 94 回日本生化学会大会 (2021 年 11 月・横浜)

【目的】パルボシクリブは、細胞周期を制御するサイクリン依存性キナーゼ (CDK) 4/6 を選択的に阻害することによって、癌細胞の増殖抑制を目的として開発された分子標的薬であり、現在、本邦ではホルモン受容体陽性及び HER2 陰性乳癌治療薬として用いられている。しかしパルボシクリブの癌細胞に対する作用として細胞周期の停止以外の作用詳細は不詳であり、特に細胞の構成成分やエネルギーの獲得上重要な脂質代謝との関連は不明である。そこで本研究では、トリアシルグリセロール (TG) やリポタンパク質の供給過程に大きく寄与するリポタンパク質リパーゼ (LPL) の挙動に対するパルボシクリブの作用に着目し解析を進めている。そこで今回、マウス乳癌 FM3A 細胞を用い、パルボシクリブによる LPL の分泌機構に対する効果について解析した。【方法】マウス乳癌 FM3A 細胞を HBSS 培地中、各種試薬存在下 37°C、5%CO₂ で温置後、細胞と反応液を分離し、その反応液を遊離された LPL の粗酵素標品とし、その活性等はラジオアイソトープ法及びウエスタンブロットティングにより測定した。また、Nile red を用いて細胞内の脂質を染色し、フローサイトメトリー (FACS) を用いて解析した。【結果・考察】FM3A 細胞をパルボシクリブと温置すると、濃度依存的に細胞増殖が抑制され、5 μM ではほぼ完全に増殖が抑制された。また、その際に細胞の膨化と脂質の貯留が認められた。さらに LPL の分泌が、パルボシクリブの濃度の増加に伴って促進した。このパルボシクリブによる LPL 分泌促進作用は、カルシウムキレーターである BAPTA-AM によって阻害された。またこの LPL 分泌促進効果は、Protein kinase C (PKC) の阻害剤である Go6983 によって著しく阻害された。すなわちパルボシクリブは、CDK4/6 を抑制するとともに、癌細胞内のカルシウム準位の増加を伴う PKC の活性化を惹起し、これによって LPL の分泌を促進する作用をも併有することが示唆された。なお、この LPL に対する作用が癌細胞内の TG の貯留に一役を果たしている可能性も考えられた。

9. その他

なし

2021年度研究報告書

1. 研究課題 「核内受容体を標的とした血管疾患の新規治療法の確立」 グループ2

2. 研究者名 薬学部薬学科 薬品分析化学研究室 小川 祥二郎

3. 研究協力者 平田 結衣 (福山大学薬学部薬学科・学部5年)

4. 研究目的

先天性コレステロール生合成不全症である Smith-Lemli-Opitz 症候群 (SLOS) は 7-dehydrocholesterol reductase の欠損あるいは本酵素の著しい機能低下によりコレステロールの産生が不足することに伴い発症する。SLOS ではコレステロールのみならずそこから派生して生成される副腎皮質ホルモンや性ホルモンの合成障害も伴うことから、種々の臓器や身体の奇形、精神発達遅延も伴う重篤な疾患である。根治法はいまだなく、新生児に対してコレステロールやステロイドホルモンの補充療法が対症療法として行われているが、予後が極めて不良であるため迅速な診断法の開発は急務である。日本においては質量分析計を方法論とした新生児マススクリーニングによりアミノ酸などの代謝に関わる先天性疾患のスクリーニングが行われているが、SLOS は該当項目には含まれていない。しかしながら、高い特異性と選択性を有する質量分析法は本疾患の迅速な診断法となりうる。一方、本疾患患者の血中にはコレステロール前駆体の 7-dehydrocholesterol 並びにその酸化成績体が優位に存在していることが示唆されているが、一般的にコレステロールなどの中性ステロイドは質量分析計の感度が不十分であるため、高感度化には誘導体化が好適である。これまでの誘導体化試薬はピリジンや 3 級アミン等を導入したプロトン親和性原子団の導入を目的とされたデザインの報告があるが、これらは装置内部の ESI 部分で正イオンへの変換が行われる。我々は常時正に荷電した誘導体化試薬を合成することで誘導体化の時点で正イオンに変換でき、質量分析計でのイオン化の際のロスを軽減できると考えた。以上を踏まえ、SLOS 診断法への寄与を見据えた、荷電した新規 Cookson 型誘導体化試薬をデザイン合成することにした。

5. 研究成果

荷電型の Cookson 型試薬のデザインをするにあたり、4 級アンモニウム型とピリジニウム型の 2 種が主に考えられた。アンモニウム型の試薬では我々の事前検討から① 誘導体の MS/MS 挙動では分子カチオンをプリカーサーイオンと

したMS/MSで試薬の開裂に伴うプロダクトイオンが得られることが多く、種々のSLOS由来の7-dehydrocholesterol酸化生成体の水酸基異性体を区別すること、②誘導体の極性がピリジニウム型のものよりも高くなりやすいことから適度な疎水性を担保できるものの方が好適であることを考慮して置換ピリジンを荷電の基盤とした試薬をデザインすることにした。そこで初めに2,6-difluoroisonicotinic acidから5段階で4-(2,6-difluoropyridyl)-1,2,4-troazolidine-3,5-dioneを合成した。これを荷電のためにヨードメタンによるピリジンの窒素部位のメチル化 (*N*-メチルピリジニウム化) を試みたところ、当初の計画通りには反応が進行しなかった。そこで、文献等を再度検討し2,6-位のフッ素をメチル基にした2,6-dimethylisonicotinic acidに変更し、上記と同様の経路で反応したところ、ヨードメタンによる*N*-メチルピリジニウム化が進行した。本化合物をdiacetoxybenzoic acidによる脱水素酸化に付して4-(2,6-dimethylpyridyl)-1,2,4-troazoline-3,5-dioneの新規荷電型Cookson型試薬が合成できた。これを7-dehydrocholesterolと反応させたところ、狙い通り反応が進行し、NMRにて構造も確認できた。一方で4-(2,6-difluoropyridyl)-1,2,4-troazolidine-3,5-dioneについては*N*-メチルピリジニウム化の反応方法を変更し、トリフルオロメタンスルホン酸無水物/メタノール系で*N*-メチルピリジニウム化が進行し、続くdiacetyiodobenzoic acidによる脱水素酸化と7-dehydrocholesterolと反応も確認できたことから、こちらも荷電型のCookson型試薬を得ることに成功した。以上、2つの新規の荷電型Cookson型試薬の合成が達成された。

6. 来年度の研究計画

現在、我々は得られた試薬と反応させる SLOS の新規バイオマーカーとして示唆される側鎖に水酸基を有する 7-dehydrocholesterol 誘導体を合成している。標品合成が出来次第、合成した新規試薬による誘導体の LC/MS/MS 挙動を精査し、SLOS モデルラット血漿中のバイオマーカー探索へと繋げる予定である。また、新規荷電型 Cookson 型試薬によるビタミン D 代謝物の MS/MS 挙動も精査し、これまでごく僅かに報告されているアンモニウム型荷電の誘導体化試薬の挙動と異なれば、従来分析が困難である活性型ビタミン D 分析に本試薬が高い有効性を示す可能性があるため、こちらも並行して進めていく。

7. 研究経費内訳

グリーンサイエンス特別研究費	150 千円
----------------	--------

8. 研究成果発表

原著論文、著書等

- 1) Derivatization-based quadruplex LC/ESI-MS/MS method for high throughput quantification of serum dehydroepiandrosterone sulfate. S. Aso, **S. Ogawa**, S. Nishimoto-Kusunose, M. Satoh, T. Ishige, F. Nomura, T. Higashi., *Biomed. Chromatogr.*, **35**, e5027 (2021).

【目的】生体試料中のステロイド定量において、LC/ESI-MS/MSは特異性の点でイムノアッセイを凌駕する。しかしその一方で、分析スループットには改善の余地があり、その向上策として検体多重化 (sample-multiplexing) が有望視される。そこで本研究では、デヒドロエピアンドロステロンサルフェート (DHEAS) に対し、Girard試薬T及びP (GT及びGP) とそれらのアイソトポログ (2H3-GT及び2H5-GP) による誘導体化を基盤とする、血清4検体一括LC/ESI-MS/MS定量法の開発を試みた。

【方法・結果】GT及びGPは市販品を使用し、 $^2\text{H}_3$ -GT及び $^2\text{H}_5$ -GPは既報に準じて合成した。血清4検体 (各5 μL) を $^2\text{H}_4$ -DHEAS (IS) を含む10% 酢酸含有メタノールで除タンパク後、それぞれの上清を、各Girard試薬 (20 μg) により誘導体化 (80°C, 15分) した。得られた4試料を混合後、LC/ESI-MS/MSで分析した [移動相: メタノール-10 mM ギ酸アンモニウム-ギ酸 (35:40:0.1, v/v/v), カラム: YMC-Triart C18 (5 μm , 150 \times 2.0 mm i.d.)]。いずれのGirard試薬を用いた場合も、DHEASの17位ケト基を経由して荷電部位が導入され、正イオン検出ESI-MSで高強度の $[\text{M}]^+$ が観察された。これらをMS/MSに付すと特徴的なプロダクトイオン (m/z 325.2) が得られ、その結果、誘導体化によりDHEASの検出感度は10倍向上し、 $\text{S/N} = 5$ を与える注入量は1.4 fmolに達した。4種の誘導体間の保持時間の差は最大でも0.3分と十分に小さく、1回 (4検体) あたりのLC/MS運転時間は6分であった。いずれの試薬を用いた場合でも検量線は0.1–10 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で $r^2 \geq 0.999$ の直線性を示した。日内・日間変動試験でのRSDは $\leq 3.6\%$ 、添加回収率は94.4–108.1%と良好な結果が得られ、本法は精度、正確度ともに優れていた。また、4検体分の血清マトリックスによるイオン化抑制も無視し得る程度であった。最後に、血清36検体を用いて従来法 (誘導体化なしで1検体ずつ分析) と本法とを比較した結果、同等の定量値 [y (本法) = $0.943x$ (従来法) + 0.079, $r^2 = 0.977$] が得られ、除タンパク後の合計の分析時間を約220分から約90分 (誘導体化操作の約35分を含む) へと40%程度に短縮できた。このように4種のGirard試薬アナログ及びアイソトポログを利用した4検体一括化は、DHEASのLC/ESI-MS/MSアッセイのスループット向上に有効であった。

学会発表

- 1) 6種のGirard試薬を用いた副腎静脈血清中アルドステロンの6検体一括 LC/ESI-MS/MS 定量法の開発

太田 有紗, 帆保 航, 水元 優花, 楠瀬 翔一, **小川 祥二郎**, 杉浦 悠毅, 西本 紘嗣郎, 東 達也

第46回日本医用マスメクトル学会年会 (2021年9月・宮城), 演題番号01-06

【目的】原発性アルドステロン症 (PA) の治療方針の決定には副腎腫瘍 (APA) 部位の特

定が重要であり、これには左右副腎のそれぞれ3か所の静脈支脈から採血するssAVS (super-selective adrenal venous sampling) とLC/ESI-MS/MSによるそのアルドステロン (ALD) 濃度測定が有用である。本研究では、分析スループットの向上及びssAVS検体相互の直接比較に基づく確実なAPA部位特定を目指し、6種のGirard型試薬を用いる6検体一括LC/ESI-MS/MS定量法の開発を試みた。

【実験・結果】 Girard型試薬にはトリメチルアンモニウム、ピリジニウム、3-メチルピリジニウム部位を有するGT、GP及びG3MPとそれらのアイソトポログ (2H3-GT、2H5-GP及び2H7-G3MP) を購入あるいは合成して用いた。左右副腎のssAVS試料 (血清、各25 µL) をそれぞれ³H8-ALD (IS) を含むMeCNで除タンパク後、固相抽出に付して精製した。これらを上記の6種のGirard型試薬 (20 µg) で誘導体化 [MeOH-AcOH (9:1, v/v) 中超音波処理, 15 min] し、得られた6試料を混合後、LC/ESI-MS/MSに付した。その結果、いずれの試薬を用いてもALD及びISに由来するピークがssAVS試料中の共存物質の影響を受けることなく明瞭に観察された。検量線は1.0–40 ng/mLの範囲で $r^2 \geq 0.999$ の直線性を示し、さらに日内・日間変動試験 (RSD $\leq 8.2\%$) 及び添加回収試験 (98.0–103.2%) の結果も良好であった。次に4人の片側性PA患者からACTHを投与後に採取した計24のssAVS試料について、患者ごとの6検体を同時定量した。その結果、本法により14 ng/mL以上のALD濃度を示した試料の採取部位は、摘除後の病理検査によってAPAと確認された部位と符合した。このように、本法のAPAの有無、部位の特定における有用性が示された。また、この24検体の測定について、前処理以降にかかる分析時間を比較したところ、従来法 (誘導体化なしで1検体ずつ測定) では約250 min (10.5 min \times 24運転) であったのに対し、本法では約70 min (誘導体化: 30 min + 9 min \times 4運転) と、大幅に短縮すること、すなわち分析スループットの向上にも成功した。

2) 内因性ビタミンD₃代謝物合成への遠隔含酸素官能基化の応用

小川 祥二郎, 末次 薫桃, 立野 李奈, 伊達 有子, 小嶋 英二郎

日本薬学会142回年会 (2022年3月・愛知), 演題番号27PO1-am2-41

【目的】 内因性のステロイド、ビタミンD (セコステロイド) 代謝物は種々の酸化成績体が存在し、これらの疾患との関連が注目される。その生理活性の評価や精密定量を行うにあたり化学合成された標品は必須である。先に我々はCookson型試薬による誘導体化とLC/ESI-MS/MSを駆使して血中活性型ビタミンD₃測定を試みたところ、セコステロイドA環に水酸基を有する内因性夾雑物質の存在を見出した。今回、我々は夾雑物質として強く示唆される4 α ,25-及び4 β ,25-ジヒドロキシビタミンD₃に着目し、市販コレステロールを原料にその合成を試みることにした。

【実験・結果】 先ず、コレステロールを二酸化セレンを用いた直接4 β -水酸化を活用し、5段階で3 β ,4 α -ジアセトキ-コレスタ-5,7-ジエンを合成した。一方、コレステロールを4酸化ルテニウムによる酸化を用いる7段階の経路で4位水酸基の異性体の3 β ,4 β -ジアセトキ-コレスタ-5,7-ジエンを合成した。次いでこれらの5,7-ジエンを保護し、in

situ発生させたDMDOによる直接遠隔酸化を行う事で、狙い通り鍵中間体である25-ヒドロキシ体を得られた。今後は脱保基の脱保護の後、光反応による5,7-ジエンの開裂条件の検討を行い、最終目的である4 α ,25-及び4 β ,25-ジヒドロキシビタミンD₃を得る予定である。

9. その他

なし

2021年度研究報告書

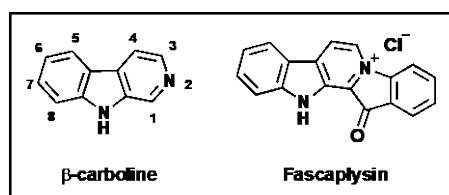
1. 研究課題 「核内受容体を標的とした血管疾患の新規治療法の確立」 グループ2
—動脈硬化抑制に働く核内受容体作動薬のリード化合物の探索研究

2. 研究者名 薬学部薬学科 医薬品化学研究室 西山卓志

3. 研究協力者 町支臣成 (福山大学薬学部薬学科・教授)
横山千展 (福山大学薬学部薬学科・学部5年)

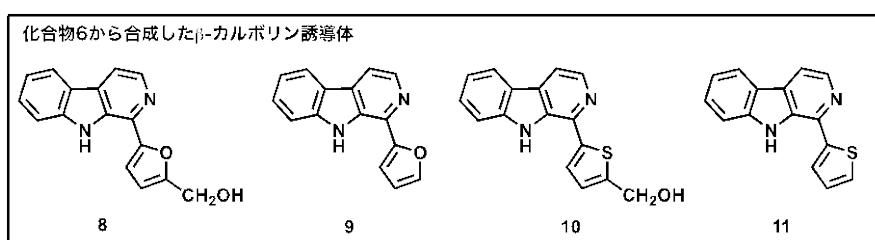
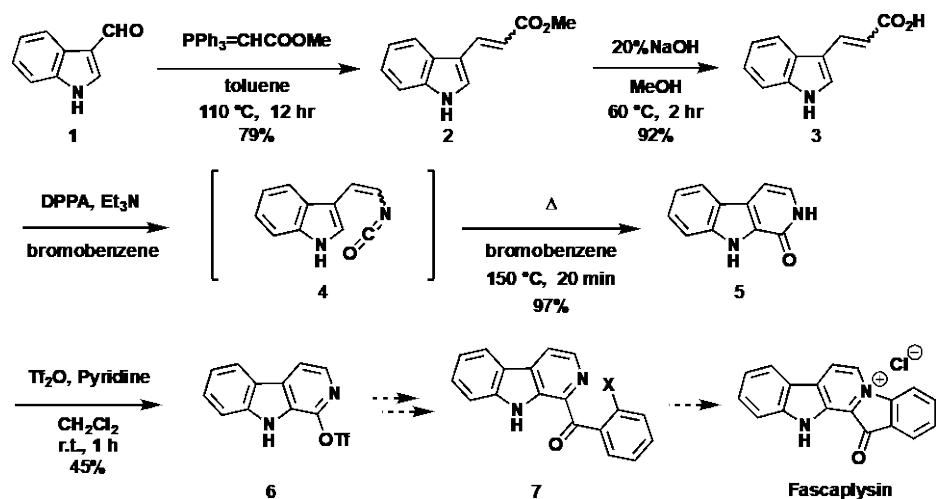
4. 研究目的

動脈硬化は脂質異常症や糖尿病などにより生じると考えられ、最終的に動脈血流が遮断されて脳梗塞や心疾患などの血管疾患の原因となる。本邦における死亡者総数の約 25%は動脈硬化に起因しているが、一度進行した病状を退縮させる治療法は開発されていない。本課題では、動脈硬化抑制に関わる核内受容体について、核内受容体を活性化させる作動薬候補化合物を合成する。その中で、これまでに報告されている動脈硬化抑制に働く核内受容体を活性化するβ-カルボリンアルカロイド Fascaplysin を標的化合物として設定し、全合成および誘導体合成を目指す。



5. 研究成果

Fascaplysin に含まれるβ-カルボリン骨格を当研究室で推進する熱電子環状反応による構築を検討した。3-ホルミルインドール **1** を出発原料とし、ホルミル基に対してウィッティヒ反応を行い、3-エテニルインドール **2** とし、エステル部を水酸化ナトリウム水溶液で加水分解することでカルボン酸 **3** を得た。次にカルボン酸 **3** をブロモベンゼン中、トリエチルアミン存在下、DPPAを用いることで、イソシアナートを組み込んだ 2-アザヘキサトリエンが生成後、熱電子環状反応に付すと高収率でピリドン体 **5** を得ることができた。得られたピリドン部をトリフレート化し、トリフレート体 **6** に対し鈴木-宮浦クロスカップリング反応により種々の官能基の導入を行い、β-カルボリン誘導体 **8-11** を合成することができた。現在、Fascaplysin の合成前駆体である化合物 **7** の合成を検討中である (下図)。本研究内容は、「β-カルボリンアルカロイド perlolyrine とその誘導体合成」というタイトルで日本薬学会第 142 年会において成果を発表した。



6. 来年度の研究計画

来年度は、Fascaplysin の全合成を達成するために化合物 7 の合成を進めていく予定である。合成経路が確立でき次第、新規の誘導体合成へと展開していく予定である。また今年度、合成した β-カルボリン誘導体 8-11 について、核内受容体に対する生物活性評価試験を実施していく予定である。

7. 研究経費内訳

グリーンサイエンス特別研究費

150 千円

8. 研究成果発表

原著論文、著書等

- 1) Synthesis of Pyrrolo[2,3-*c*]quinoline Alkaloid Marinoquinolines. Takashi Nishiyama, Mari Murakami, Kimiko Taninaka, Erina Hamada, Mai Endo, Daiki Kinou, Noriyuki Hatae, and Tominari Choshi. *Heterocycles*. DOI: 10.3987/COM-20-S(K)14. (2020)
- 2) 創薬を志向したカルバゾール系化合物の新規合成法開発と医薬素材の探索研究. 西山 卓志. DOI: <https://doi.org/10.1248/yakushi.21-00141>. (2021)

口頭発表

- 1) 熱電子環状反応を活用した trigonoine B の全合成研究

第 47 回反応と合成進歩シンポジウム（オンライン）、演題番号 1P-61

【目的】 Trigonoinine B は、2011 年に Hao らによって *Ttigonostemon lii* の葉から単離・構造決定された新規のアルカロイドである。Trigonoinine B は、pyrrolo[2,3-*c*]quinoline と 2,3-dihydroquinolin-4-one を基本骨格とし、生物活性として、抗 HIV 活性を有することが報告されている。多様な生物活性と構造的興味から pyrrolo[2,3-*c*]quinoline 骨格の効率的な合成法の開発は、多くの研究グループから注目を集めている。しかしながら、trigonoinine B の全合成は未だ報告されていない。そこで、著者は trigonoinine B を標的化合物とした新規合成法の開発研究を実施した。

【方法・結果】 当研究室では、共役ヘキサトリエン系および共役アザヘキサトリエン系に対する熱電子環状反応を活用し、天然物を含む生物活性含窒素複素環化合物の合成研究を推進している。そこで、今回、trigonoinine B を標的化合物として設定した新たな合成法を開発することとした。

2-Iodo-5-methoxyaniline と pyrrole-3-boronic acid pinacol ester を鈴木-宮浦カップリング反応後、CH₂Cl₂ 中で 3-(2-iodophenyl)propylisocyanate を加え、ウレア構造を形成した。次に、ウレアに対して Et₃N 存在下、CBr₄、PPh₃ を室温中で反応させ、カルボジイミドを合成した。得られたカルボジイミドを TBAF 存在下 1,2-dichlorobenzene 中加熱することで、脱シリル化が進行後、熱電子環状反応が進行し、4-aminopyrroloquinoline を収率 82% で合成した。続いて、4-aminopyrroloquinoline のアミノ部を利用して、Pd(OAc)₂, Cu(OAc)₂ 存在下、Buchwald-Hartwig 反応を利用したシクロアミノ化反応を行い、テトラヒドロキノリンを収率 73% で合成できた。最後に、テトラヒドロキノリンを KMnO₄ で酸化し、trigonoinine B を総収率 9.2% で最初の全合成を達成することができた。

2) Dictyodendrin 類を標的とした新規 pyrrolo[2,3-*c*]carbazole 骨格構築法の開発研究 第 50 回複素環化学討論会（オンライン）、演題番号 P-25

【目的】 Dictyodendrin 類は、2003 年 伏谷らによって *Dictyodendrilla verongiformis* から単離・構造決定された海洋アルカロイドであり、生物活性として、テロメラーゼ阻害活性を示すことが報告されている。また、他に例を見ない電子豊富な pyrrolo[2,3-*c*]carbazole 骨格を有することから、合成標的として広く注目されており、現在までに 15 例の全合成が報告されている。しかし、dictyodendrin 類は、2 つの窒素原子を含む電子豊富な多環性芳香環を有すため誘導体合成は困難であることから、いまだ生物活性評価試験に関する報告は少ない。そのため、多段階合成を効率化する合成戦略の開発が強く求められている。今回著者は、これまでに報告された合成戦略とは異なった新規 pyrrolo[2,3-*c*]carbazole 骨格構築法の開発目的とし、その全合成研究を実施した。

【方法・結果】 3-Iodoindole-2-carbaldehyde から 2 工程で鍵前駆体である 3-iodo-2-(prop-2-enyl)indole を得た。次いで、当研究室で見出した一酸化炭素気流中、Pd 触媒存在下、スズ試薬とともに反応を行うとサイクロカルボニレーションが進行し、4-hydroxycarbazole を得た。次いで、得られた水酸基を 4 工程でアルデヒドへと変換し、

methyl azidoacetate の縮合反応、続く熱閉環反応に付すことで、dictyodendrin の基本骨格である pyrrolo[2,3-*c*]carbazole を合成できた。現在は、dictyodendrin 類の全合成を目指し、種々の官能基の導入を検討中である。

3) 新規 indolizine-5-one 骨格構築法の開発と応用

第 60 回中国四国支部学術大会（オンライン）、演題番号 O-004

【目的】 Rosettacin や camptothecin (CPT) は、構造的特徴として、いずれも indolizine-5-one 構造を基本骨格とする天然物です。本骨格は、これらの天然物が有するトポイソメラーゼ I 阻害活性の発現に重要な骨格であることから、新たな合成法の開発は依然として大きな関心を集めている。今回著者は、indolizine-5-one 構造の新規合成法の開発を目的とし、rosettacin を標的化合物とした全合成を検討した。

【方法・結果】 合成計画として rosettacin の骨格中に含まれるイソキノロン環を *o*-アルキニルオキシムに対する熱環化反応を応用することで構築できると考え、合成を行った。出発原料として 2-ヨードキノリンとアセチレン誘導体を設定し、2 工程で鍵前駆体であるアルドオキシムへと誘導した。これに対し、熱環化反応を行うことで、イソキノリン-*N*-オキシドを合成後、無水酢酸中で加熱することでイソキノロンを一挙に得ることができた。最後に C 環部を分子内環化反応に付すことで rosettacin の全合成を達成した。

4) Rosettacin の全合成研究

日本薬学会第 142 年会（オンライン）演題番号 27PO7-pm2-09S

【目的】 Camptothecin (CPT) は、1966 年に Wani と Wall によって単離・構造決定された天然由来のアルカロイドである。生物活性として、トポイソメラーゼ I と結合することにより腫瘍細胞の成長を強力に阻害し、細胞アポトーシスを起こす結果、抗腫瘍活性を示すことが報告されている。これまでの研究で、CPT の構造中に含まれる indolizine-5-one 構造がトポイソメラーゼ I 阻害活性の発現に重要な骨格であることが明らかとなっており、新たな合成法の開発は依然として大きな関心を集めている。今回、著者は、新たな抗悪性腫瘍薬のリード化合物として、rosettacin を標的化合物に設定し、indolizine-5-one 構造の効率的な合成法の開発を目的とした rosettacin の全合成研究を行った。

【方法・結果】 2000 年、坂本らは、2-ethynyl benzaldehyde oxime から熱環化反応を用いた isoquinoline 誘導体の合成法を報告している。近年、当研究室では、本方法論を生理活性天然物の合成へと応用展開している。今回筆者は、熱環化反応を用いた rosettacin の全合成を計画した。出発原料として、2-ヨードキノリンとアセチレン誘導体を設定し、2 工程で鍵前駆体であるアルドオキシムへと誘導した。これに対し、熱環化反応を行うことで、イソキノリン-*N*-オキシドを合成後、無水酢酸中で加熱することでイソキノロンを一挙に得ることができた。最後に C 環部を分子内環化反応に付す

ことで rosettacin の全合成を達成した。

5) Pyrrolo[2,3-*c*]carbazole alkaloid, dictyodendrin B の全合成研究

日本薬学会第 142 年会（オンライン）演題番号 27PO7-pm2-08S

【目的】 Dictyodendrin 類は、2003 年 Fusetani らによって海綿の *Dictyodendrilla verongiformis* から単離・構造決定された海産性の天然有機化合物である。これらの天然物は生物活性として、テロメラーゼ阻害活性を有することが報告されており、新規抗悪性腫瘍薬として期待されている。Dictyodendrin 類は世界中の研究グループから合成ターゲットとして広く注目されており、これまでに複数の全合成例が報告されている。しかし、dictyodendrin 類は、2 つの窒素原子を含む電子豊富な多環性芳香環を有することから、合成は困難で非効率的であり、いまだ構造活性相関に関する報告例は少ない。そのため、多段階合成を効率化する新たな合成戦略の開発が強く求められている。今回筆者は、dictyodendrin B を合成ターゲットに設定し、そのコア構造である pyrrolo[2,3-*c*]carbazole 骨格の効率的な合成法の開発を目的とし、その全合成研究を実施した。

【方法】 7-methoxyindole を出発原料とし、Grignard 反応、続く 2 級水酸基の保護により、鍵前駆体である 2-propenylindole を 2 工程で効率よく合成できた。cyclocarbonylation 反応を用いることで 4-hydroxycarbazole を得た。次いで、4 工程で誘導したホルミル体に対し、Hemetsberger インドール合成によるピロール環部の構築を行うことで pyrrolo[2,3-*c*]carbazole を合成することができた。

6) β -カルボリンアルカロイド dichotomine 類の合成と生物活性評価

日本薬学会第 142 年会（オンライン）演題番号 27PO7-pm 2-10S

【目的】 Dichotomine 類は、2004 年、吉川らにより *Stellaria dichotoma* から単離・構造決定された β -カルボリンアルカロイドである。構造的特徴として、 β -カルボリン骨格の 1 位に不斉中心を含むアルコール部あるいはアシル部を、3 位にカルボキシル基やその誘導体であるエステルやアミドを有していることが挙げられる。また、これらの化合物群は、ヒト好塩基球細胞から遊離される化学伝達物質の 1 つであるヘキサミンナーゼの遊離抑制により抗アレルギー作用を示すことが報告されている。今回筆者は、dichotomine 類の合成と生物活性評価を実施し、医薬素材としてのリード化合物の探索研究を行なった。

【方法・結果】 当研究室では、これまでに共役 1-アザヘキサトリエン系化合物に対し、熱電子環状反応を行うことで縮合ピリジン環を構築する方法により、様々な生物活性天然物の合成研究を展開してきた。筆者は、dichotomine 類の基本骨格である β -カルボリン骨格構築にこの本反応を活用することを考えた。その結果、6 種類の天然物合成に成功した。そして、その化合物を使った細胞増殖抑制活性および抗炎症作用に関する生物活性評価試験を実施した。

7) β -カルボリンアルカロイド *perlolyrine* とその誘導体合成

日本薬学会第 142 年会（オンライン）演題番号 27PO7-pm2-11S

【目的】 β -カルボリン骨格を有する天然物群は、抗腫瘍作用、抗不安作用など様々な生物活性を示し、医薬品にも活用されている。これらの多くは、 β -カルボリン骨格の 1 位に様々な官能基を持ち、それが様々な生理活性を示す要因の一つだと考えられる。その中で、*perlolyrine* は、1988 年に単離・構造決定された β -カルボリンアルカロイドであり、生物活性として、MAO 阻害作用を有することが報告されている。今回、筆者は、*perlolyrine* を標的化合物とした全合成を検討するとともに β -カルボリン骨格の 1 位に様々な官能基を導入した誘導体の合成およびヒトがん細胞に対する増殖抑制試験を実施した。

【方法・結果】 当研究室では、これまでにカルボン酸に対し、塩基存在下、diphenylphosphoryl azide (DPPA)を用い、系内でイソシアナートを生成後、熱を加えることで電子環状反応が進行し、含窒素縮合複素環の構築法を確立し、様々な天然物の全合成へと応用展開している。そこで、*perlolyrine* の基本骨格である β -カルボリン骨格を熱電子環状反応により構築できると考えた。3-ホルミルインドールに対し、Witting 反応と加水分解により 2 工程でカルボン酸 3 へと誘導した。カルボン酸をブロモベンゼン中、DPPA、トリエチルアミン存在下、150℃で加熱すると系内でイソシアナートを生成後、環化反応が進行し、ピリドン体を高収率で得ることができた。得られたピリドン部をトリフレート化し、 β -カルボリン骨格 1 位への鈴木-宮浦クロスカップリング反応によりカップリング体を合成した。最後にアルデヒドを還元することで *perlolyrine* の全合成を達成することができた。現在、トリフレート体に対し種々の官能基の導入を行い、 β -カルボリン誘導体の合成とヒトがん細胞に対する増殖抑制試験を実施している。

8) 熱エネルギーを利用した *calothrixin* 誘導体の合成研究

日本薬学会第 142 年会（オンライン）演題番号 27PO7-pm2-07

【目的】 *Calothrixin* 類は、1999 年 Rickards らにより *Calothrix cyanobacteria* から単離・構造決定されたインドール[3,2-*j*]フェナンスリジンアルカロイドである。生物活性として、様々なヒトがん細胞株に対する抗腫瘍活性および抗マラリア活性を示すことが報告されている。これまでに、数多くの全合成が報告されているが、*calothrixin* 類の化学構造と抗腫瘍作用との関係を明らかにする報告例は、少なく限られていた。そこで、本研究では、*calothrixin* 類の化学構造と抗腫瘍活性との関係を解明することを目的とし、その化学構造を変換可能な新たな合成法の開発を検討した。

【方法・結果】 *Calothrixin* 類に含まれるピリジン(D 環)部は、本研究の鍵反応である熱電子環状反応により構築することを計画した。その結果、*calothrixin B* の形式全合成を達成することができた。現在、*calothrixin B* の D 環部、E 環部の化学構造を変換した誘

導体の合成を検討している。

9. その他

なし

2021年度研究報告書

1. 研究課題 「核内受容体を標的とした血管疾患の新規治療法の確立」 グループ3

2. 研究者名 薬学部薬学科 病態生理・ゲノム機能学研究室 道原明宏

3. 研究協力者 渡部美波 (福山大学薬学部薬学科・学部6年)
末田有土 (福山大学薬学部薬学科・学部6年)

4. 研究目的

動脈硬化は、脂質異常症や糖尿病、高血圧、喫煙、運動不足などの危険因子により生じると考えられ、最終的に動脈の血流が遮断されて、脳梗塞や心筋梗塞などの血管疾患を引き起こす原因となる。本研究では、動脈硬化に対して抑制的に作用する ROR α 核内受容体について、そのノックダウン実験系を確立するとともに、それによる抑制効果と細胞毒性を評価することを目的とする。

5. 研究成果

ヒト肝癌由来細胞 HepG2 を用いて、ROR α 遺伝子の siRNA ノックダウン系による標的遺伝子の発現抑制効果および細胞毒性を評価した。

本実験に用いた siRNA は、ROR α 遺伝子に対応するオリゴヌクレオチドをアニーリング後、T7 RNA ポリメラーゼによる *in vitro* 転写反応、DNaseI および RNaseT1 処理により合成した (*in vitro* Transcription T7 Kit, Takara-bio)。同様の方法で、ネガティブコントロールとして緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子に対応する siRNA も合成した。

HepG2 (ヒト肝がん由来細胞) の培養は 10%FBS を含む D-MEM 培養液を用いてインキュベートした。1.0 \times 10⁵ cells/well になるように HepG2 を 24 穴プレートに撒き 9 時間後に、Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) および siROR α (または siGFP) を含む 100 μ L の Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) 内で形成させた DNA-リポソーム複合体を細胞に導入した。72 時間培養後に ISOGEN (Nippon Gene) を用いてトータル RNA を調製した。その RNA を用いて逆転写反応により cDNA を合成し、LightCycler 480 Instrument II (Roche) 用いたリアルタイム PCR 法により各遺伝子の発現量を測定した。補正用には 18S rRNA 遺伝子を用いた。

細胞毒性検出キット PLUS (Merck) を用いて、細胞損傷によって細胞質内から培養液に遊離した lactate dehydrogenase (LDH) 活性を測定した。

培養液の遠心上清 100 μ L を 96well プレートに入れ、基質液と反応液を混合した溶液 100 μ L を各 well に入れた。5 分後に反応停止液 50 μ L を入れ、反応を停止させた。その後、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) で 490nm の吸光度を測定した。

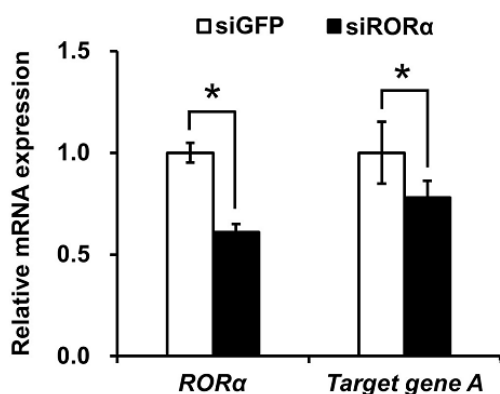


図1. siRNAノックダウンによる発現評価

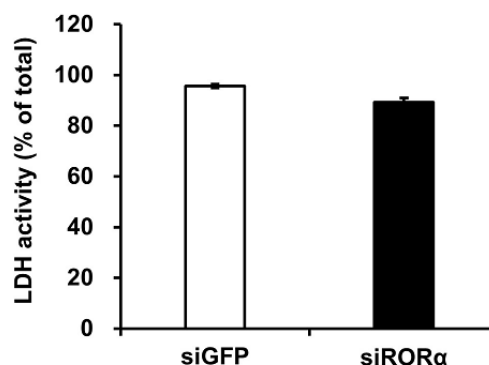


図2. siRNAノックダウンによる細胞毒性評価

結果、HepG2 肝細胞培養系に siROR α を導入することによって、ROR α 遺伝子の発現抑制が示されるとともに、ROR α の制御下にある標的遺伝子の発現抑制も示された (図 1)。また、siROR α 導入による細胞毒性は、コントロールとして用いた siGFP と同程度であることが示された (図 2)。これらの結果により、HepG2 肝細胞培養系による siRNA ノックダウン系を確立できたと考える。

6. 来年度の研究計画

本研究の目的としては、核内受容体の標的遺伝子群を選出すること、それとともに作動薬およびその誘導体により標的遺伝子群を誘導させて、脂肪滴形成への影響を評価していくことである。今回の分担研究にて、核内受容体の抑制による標的遺伝子の発現評価系を確立できたことになる。本実験系を用いることで、今後は核内受容体の標的遺伝子群の選出に用いるとともに、作動薬やその誘導体に対する影響についても検討する。

7. 研究経費内訳

グリーンサイエンス特別研究費

150 千円

8. 研究成果発表

原著論文、著書等

- 1) Identification of the ROR α transcriptional network contributes to the search for therapeutic targets in atherosclerosis. Hiroshi Matsuoka, and Akihiro Michihara.

Biological and Pharmaceutical Bulletin. 44(11) 1607-1616 (2021)

- 2) Sacran, a sulfated polysaccharide, suppresses the absorption of lipids and modulates the intestinal flora in non-alcoholic steatohepatitis model rats. Goto M, Azuma K, Arima H, Kaneko S, Higashi T, Motoyama K, Michihara A, Shimizu T, Kadowaki D, Maruyama T, Otagiri M, Iohara D, Hirayama F, Anraku M. *Life Sciences*. (2021), in press
- 3) The effects of sacran, a sulfated polysaccharide, on gut microbiota using chronic kidney disease model rats. Goto M, Kobira Y, Kaneko S, Arima H, Michihara A, Azuma K, Higashi T, Motoyama K, Watanabe H, Maruyama T, Kadowaki D, Otagiri M, Iohara D, Hirayama F, Anraku M. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. (2022), in press
- 4) Effect of Genetic Analysis on Preventive Consciousness of Lifestyle-Related Symptoms or Diseases, Michihara A, Horioka Y, Sadamitsu T, Sueda A, *Jpn. Health Med. Associ.*, 30 : 142-150 (2021)
- 5) Effect of Background Factors on Preventive Consciousness aimed at Lifestyle-Related Symptoms or Diseases, and Changing Awareness of Genetic Analysis, Michihara A, Yoshioka R, Horioka Y, *Jpn. Health Med. Associ.*, 30 : 493-499 (2022)
- 6) Effect of genetic analysis on obesity prevention awareness in pharmacy staff, Matsuoka H, Koga Y, Kishimoto D, Michihara A, *Jpn. Health Med. Associ.*, in press

口頭発表

- 1) 理事長企画シンポジウム (未病栄養シンポジウム)
道原明宏
第 57 回高血圧関連疾患モデル学会、第 25 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、第 38 回国際心臓研究学会日本部会、第 43 回心筋生検研究会、第 29 回日本血管生物医学会 5 学会合同大会 (2021 年 9 月・久留米オンライン)
- 2) ヒト血管内皮細胞における細胞接着分子 CLDN1 の発現調節機構の解析
山岡愛主, 志摩亜季保, 松岡浩史, 濱島崇寛, 小迫舞鈴, 田原佑馬, 道原明宏
第 60 回日本薬学会 中国四国支部学術大会 (2021 年 10 月・愛媛オンライン)、演題番号 0-065
- 3) LXR α 核内受容体を介した 24S-ヒドロキシコレステロールの代謝誘導系の解析
重藤真佑, 松岡浩史, 大石亜美, 深坂日向子, 田原佑馬, 道原明宏
第 60 回日本薬学会 中国四国支部学術大会 (2021 年 10 月・愛媛オンライン)、演題番号 0-062

- 4) 一般市民を対象にした肥満関連遺伝子検査による予防意識向上に対する有効性の評価
岸本大樹、松岡浩史、吉岡利紗、古賀雄太郎、末延道尚、道原明宏
第 60 回日本薬学会 中国四国支部学術大会 (2021 年 10 月・愛媛オンライン)、演題番号 0-018
- 5) 小学生を対象にしたゲノム教育に関するテスト連動型イラスト動画講義の有効性
吉岡利紗、小迫舞鈴、深坂日向子、西江智美、山岡愛主、松岡浩史、道原明宏
第 142 回日本薬学会年会 (2022 年 3 月・名古屋オンライン)、26P01-71S
- 6) 動脈硬化抑制に関わる ROR α 核内受容体の標的遺伝子の探索
松岡浩史，道原明宏
第 60 回日本薬学会 中国四国支部学術大会 (2021 年 10 月・愛媛オンライン)、演題番号 P-007
- 7) 動脈硬化抑制に関わる ROR α 核内受容体の標的遺伝子の探索
松岡浩史，道原明宏
第 12 回川崎医科大学学術集会 (2021 年 7 月・岡山)、演題番号 P6
- 8) 動脈硬化抑制に関わる ROR α 核内受容体の標的遺伝子の探索
松岡浩史，道原明宏
第 6 回 KMS メディカル・アーク 2022 (2022 年 2 月・岡山オンライン)
- 9) 表面脱アセチル化キチンナノファイバーによる非アルコール性脂肪性肝炎抑制効果について
安楽誠，伊福伸介，東和生，道原明宏，小田切優樹，庵原大輔，平山文俊
第 35 回日本キチンキトサン学会 (2021 年 8 月・鹿児島)

9. その他

【新聞掲載】 高度な内容に興味津々 尾道の西藤小児科 DNA の働き学ぶ 近くの福山大学生が授業，中国新聞社朝刊，2021 年 7 月 27 日 (火)，地域 22 面

2021年度研究報告書

1. 研究課題 「核内受容体を標的とした血管疾患の新規治療法の確立」 グループ3

2. 研究者名 薬学部薬学科 分子免疫学研究室 本田真知子

3. 研究協力者 今 重之 (福山大学薬学部薬学科・教授)

4. 研究目的

脂肪滴は、中性脂肪などの中性脂質の貯蔵庫として重要な細胞内オルガネラであるが、過剰な脂肪蓄積は動脈硬化病態と密接に関連している。そこで本研究では、核内受容体の作動薬およびその誘導体の脂肪滴形成における関与を明らかにするために、脂肪滴形成の手法を確立し、さらに脂肪滴中の色素を有機溶媒で抽出する半定量系の検討を行うことを目的とした。

5. 研究成果

脂肪の多くは肝臓で作られることから、本分担研究では肝がん細胞株である HepG2 細胞を用いた脂肪滴形成の実験系の検討を行った。脂肪滴形成は、オレイン酸とパルミチン酸混合物を遊離脂肪酸として HepG2 細胞に添加し素無血清培地で 24 時間培養し、PBS で洗浄後にリポタンパク質の染色に使用されるオイルレッド O で染色した。パラホルムアルデヒドで固定後に顕微鏡で脂肪滴形成を確認した。

脂肪滴形成の定量化に関しては、オイルレッド O 染色させた HepG2 細胞を 100%イソプロパノールを加えて 5 分間放置することで染色細胞からオイルレッド O を溶出させ、溶出液を 96 穴プレートに移し、マイクロプレートリーダーにて吸光度 (492nm) を測定した。

HepG2 細胞を遊離脂肪酸で刺激することで、HepG2 細胞からの脂肪滴をオイルレッド O 染色により検出することができた (図 1)。

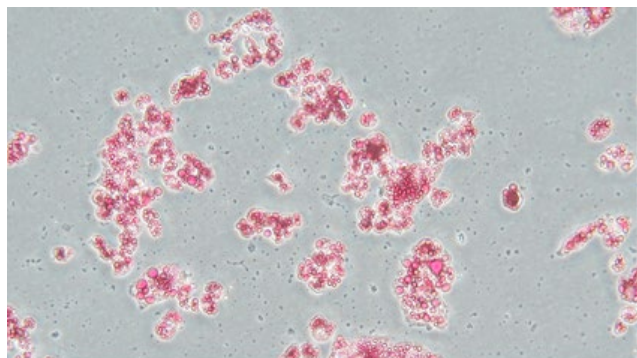


図1: HepG2細胞の脂肪滴形成

その後、脂肪滴形成の半定量測定系の確立を進めた結果、遊離脂肪酸添加無と比較して遊離脂肪酸添加により明らかに高い吸光度が得られた。また、脂肪滴形成に影響を与えると予想される二つの阻害剤により、遊離脂肪酸添加の吸光度と比較して抑制できることが分かった (図 2)。

これらの結果から、本研究目的である脂肪滴形成とその半定量系の確立に成功したと考える。

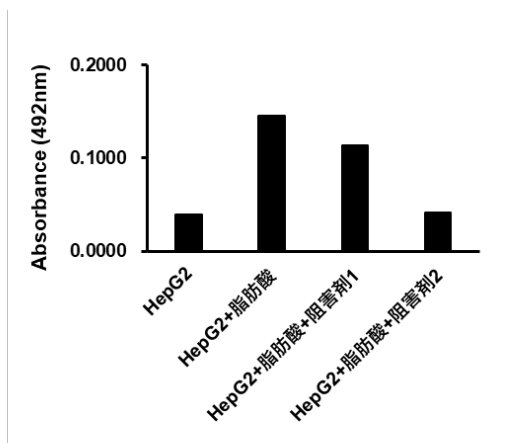


図2: プレートリーダーを利用した脂肪滴の半定量系
阻害剤1と2は脂肪滴形成阻害能の可能性のある物質

6. 来年度の研究計画

本研究の最終目的は、核内受容体の作動薬およびその誘導体による脂肪滴形成への影響である。今回の分担研究にてプレートリーダーを用いた脂肪滴形成の半定量系を確立することができた。プレートリーダーを用いることで96サンプルを同時に測定できることから、ハイスループットな実験系を確立できたこととなる。本実験系を用いることで、今後は動脈硬化抑制に関わる核内受容体の作動薬やその誘導体の脂肪滴形成への影響を検討する。

7. 研究経費内訳

グリーンサイエンス特別研究費

150千円

8. 研究成果発表

原著論文、著書等

Nephronectin influences EAE development by regulating Th17/Treg balance via reactive oxygen species. Machiko Honda, Tatsuya Segawa, Kiyoshi Ishikawa, Masahiro Maeda, Yoshiro Saito, Shigeyuki Kon. *Am J Physiol Cell Physiol.* in press.

学会発表

1) トロンビン切断型ネフロネクチンは新たなインテグリン結合能を獲得する
本田真知子、今重之、福山大学薬学部分子免疫
第42回日本分子生物学会年会 (福岡)

【背景】当研究室では、細胞外基質ネフロネクチン(Npnt)に対する中和抗体を作製し、関節リウマチや実験的自己免疫脳脊髄炎モデル(EAE)等の自己免疫疾患増悪化にNpntが関与することを見出している。さらに、Npntによるセレン含有タンパク質セ

レノプロテイン P (SeP) の発現増強、活性酸素種 ROS の代謝亢進を介した Th17 分化誘導が EAE 増悪化に関与するという結果も得ている。しかしながら、自己免疫疾患に関わる Npnt の受容体は不明であることから、本研究では、自己免疫疾患に関わる Npnt の受容体を明らかにすることを目的に実験を進めた。

【方法】 アミノ酸解析により Npnt のトロンビン切断配列を推察できたことから、予想した切断部位前後のペプチドを 4 種類合成し、細胞接着試験によりそれぞれのペプチドの接着活性を検討した。

【結果と考察】 リコンビナント Npnt がトロンビンで切断されることを明らかにした。合成した 4 種類のペプチドのうち 2 種類は、B16 メラノーマ細胞や RD 細胞と接着することが確認できた。これらの接着活性は、GRGDS ペプチドでは阻害することができず、 $\beta 1$ や $\alpha 4$ 、 $\alpha 9$ インテグリンに対する中和抗体によって阻害できた。興味深いことに、 $\alpha 4$ や $\alpha 9$ インテグリンを遺伝子導入した CHO 細胞では、これらのペプチドは接着活性を示さないことから、さらに何らかの分子が結合に関与している可能性を得た。

Npnt は腎臓形成に重要な分子として同定され、その生理的な受容体は RGD 配列を認識する $\alpha 8 \beta 1$ インテグリンであると報告されている。我々の実験結果では、GRGDS ペプチドは細胞接着に影響を与えなかったことから、トロンビンにより切断された Npnt は新たなインテグリン結合活性を獲得すると考えられる。現在、トロンビン切断型 Npnt の細胞接着活性に影響を与える分子の同定を進めている。

2) トロンビン切断型ネフロネクチンは $\alpha 4$ 、 $\alpha 9$ 、 $\beta 7$ 発現細胞と接着する

本田真知子、今 重之、福山大学薬学部分子免疫

日本薬学会第 142 年会 (名古屋、オンライン)

【背景】 当研究室ではこれまでに、細胞外基質ネフロネクチン (Npnt) に対する中和抗体を作製し、関節リウマチや実験的自己免疫性脳脊髄炎モデル (EAE) 等の自己免疫疾患増悪化に Npnt が関与することを明らかにしている。その後、Npnt のアミノ酸解析により Npnt 内にトロンビン切断配列を有することを発見し、実際に Npnt はトロンビンで切断できることを見出した。そこで本研究では、トロンビン切断型 Npnt の受容体を明らかにすることを目的として実験を進めた。

【方法】 アミノ酸解析から得られた Npnt のトロンビン切断部位前後のペプチドを 4 種類合成し、細胞接着試験により受容体の同定を進めた。

【結果と考察】 B16 メラノーマ細胞や RD 細胞を用いて 4 種類の合成ペプチドの接着活性を検討した結果、2 種類で接着活性を有することが明らかとなった。これらの接着活性は、GRGDS ペプチドでは阻害することができず、 $\beta 1$ や $\alpha 4$ 、さらに $\alpha 9$ インテグリンに対する中和抗体を用いることで阻害できることが分かった。一方で、 $\alpha 4$ や $\alpha 9$ インテグリン、さらにそれらを共発現させた CHO 細胞では、接着活性を示さなかったことから、さらに別の分子の必要性を予想した。そこで、 $\alpha 4$ と $\alpha 9$ 共発現細胞に $\beta 7$ インテグリンを導入した結果、B16 メラノーマ細胞や RD 細胞と同等の接着活性を示すことを見出した。以上の結果から、トロンビン切断によって露出される Npnt 配列は $\alpha 4$ 、 $\alpha 9$ 、 $\beta 7$ インテグリンを受容体とすることが分かった。現在、接着活性を示した配列を抗原とした抗体を作製することで、トロンビン切断型 Npnt の病態との関わりを解明することを目指している。

3) 細胞外基質ネフロネクチンに対する中和抗体は DSS 誘導大腸炎を増悪化させる

高原千穂、柴田紗知、本田真知子、高山健人、今 重之

日本薬学会第 142 年会 (名古屋、オンライン)

【背景】ネフロネクチン (Npnt) は、 $\alpha 8 \beta 1$ インテグリンを受容体として腎臓形成に関与する細胞外基質である。当研究室では、Npnt に対する中和抗体を作製することで、関節リウマチモデルである抗コラーゲン II 誘導関節炎 (CAIA) や多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の増悪化に Npnt が関わることを見出している。これらの結果から Npnt は多くの自己免疫疾患増悪化に関与すると予想されたことから、本研究ではデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導大腸炎モデル増悪化における Npnt の役割を明らかにすることを目的に研究を行った。

【方法】DSS 誘導大腸炎は、8 週齢の C57BL/6 マウスに 2% DSS を 10 日間自由飲水させることで発症させた。Npnt 中和抗体は、DSS 投与開始の 1 日前と 2 日後に腹腔内投与を行った。体重や摂餌量、Disease Activity Index (DAI) を毎日測定し、DSS 投与 10 日目に腸組織を回収した。

【結果と考察】Npnt 中和抗体投与により、体重減少および下痢の有意な悪化を認めた。腸組織の HE 染色では、control 群と比較し Npnt 中和抗体投与群で陰窩の消失や粘膜下層の肥厚を認めた。また、Npnt 中和抗体投与により腸内の IL-1 β mRNA 発現が増強していることが分かった。以上の結果から、予想に反して Npnt は DSS 誘導大腸炎を抑制する機能を有することを示唆する結果を得た。現在、腸内細菌叢について次世代シーケンサーを用いたメタ 16S 解析を行っており、本結果も報告する予定である。今後、リコンビナント Npnt 投与や受容体の阻害、大腸組織の RNA シーケンスなどを行うことで Npnt による DSS 誘導大腸炎軽減の作用機序を明らかにすることを予定している。

9. その他

なし

2021年度研究報告書

1. 研究課題 「核内受容体を標的とした血管疾患の新規治療法の確立」 グループ4

2. 研究者名 薬学部薬学科 薬理学研究室 渡邊正知

3. 研究協力者 門田麻由子 (福山大学薬学部薬学科・助手)

4. 研究目的

動脈硬化は脂質異常症や糖尿病などにより生じると考えられ、最終的に動脈血流が遮断されて脳梗塞や心疾患などの血管疾患の原因となる。本研究では、脳梗塞急性期モデルにおける動脈硬化制御遺伝子の発現変化を評価し、疾患重篤度との相関を解析するとともに、標的遺伝子の機能を制御することによる治療効果を評価する。

5. 研究成果

脳梗塞急性期として虚血再灌流障害モデルを用い、動脈硬化抑制に関わるレチノイン酸受容体関連オーファン受容体(ROR) α の遺伝子発現レベルをqPCRにて解析した。虚血誘導性の *RoraX4* は、再灌流3時間後および4日後の二相性に有意な上昇を示した。一方、虚血耐性モデルでは *RoraX1* の増加が認められた。これらの結果からアイソフォームの発現パターンの違いが病態を反映していることが示唆された。

6. 来年度の研究計画

虚血再灌流障害モデルに対する ROR α を介した神経保護作用を明らかにするために、ROR α のアゴニストやインバースアゴニストを用い、血液脳関門の脆弱化と海馬神経細胞死を指標に解析する。

7. 研究経費内訳

グリーンサイエンス特別研究費 150千円

8. 研究成果発表

学会発表 (口頭発表: 1件)

- 1) シリアンハムスターの冬眠時の体温制御における SUMO 化修飾の役割
渡邊正知、門田麻由子、田村豊
冬眠休眠研究会 第4回 (2022年2月オンライン)

【目的】 ジュウサンセンジリスの深冬眠期に small ubiquitin-related modifier (SUMO) 化修飾が増加することが報告され、SUMO 化修飾が深冬眠時の低血流量（低酸素/低グルコース）に対し保護作用を有することが示唆された。しかし、深冬眠期の SUMO 化修飾亢進と体温制御との関連性は未だ明らかになっていない。そこで本研究では冬眠時の体温制御における SUMO 化修飾の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】 冬眠動物には、10 週令以上（体重 100g 以上）のシリアンハムスター (*Mesocricetus auratus*: ハムスター) を用いた。冬眠は、寒冷環境 (Ta=5°C)、短日条件（明期 8 時間、暗期 16 時間）で飼育することにより誘導した。寒冷環境・短日条件で 1 か月以上飼育し冬眠していない個体を「寒冷曝露群」、深冬眠を 5 回以上繰り返した群を「深冬眠群」、深冬眠と深冬眠の間の覚醒個体を「中途覚醒群」とした。コントロール群には、環境温度 22±1°C、長日条件（明期 14 時間、暗期 10 時間）で飼育したハムスターを用いた。また、擬似冬眠モデルには、非冬眠ハムスターを冬眠誘発環境で 3 時間馴化させた後、N⁶-cyclohexyladenosine (CHA) を側脳室内に投与し低体温を誘導した個体を用いた。

【結果/考察】 冬眠サイクルにおける視床下部組織の SUMO 化修飾レベルを解析したところ、SUMO1 化修飾レベルは深冬眠群でコントロール群の 1.47 倍、SUMO2/3 化修飾レベルは深冬眠群でコントロール群の 2.92 倍も有意に増加した。一方、寒冷曝露群、中途覚醒群では有意な変化は認められず、SUMO 化修飾は体温低下に依存することが示唆された。そこで、擬似冬眠モデルを用い、環境温度を変化させ、SUMO 化修飾レベルと体温低下レベルとの関連性を解析した。その結果、SUMO 化修飾レベルは体温と高い負の相関関係を示すことが明らかとなった。次に、体温低下に対する SUMO 化修飾の影響を擬似冬眠モデルを用いて薬理的に解析した。SUMO 化修飾酵素阻害薬は、CHA 誘導体温低下作用を増強した。一方、脱 SUMO 化修飾酵素阻害薬は、CHA 誘導体温低下作用を抑制した。以上の結果から、SUMO 化修飾は冬眠時の体温低下により誘導され、その体温低下を抑制的に制御していることが示唆された。

9. その他

なし

2021年度研究報告書

1. 研究課題 「核内受容体を標的とした血管疾患の新規治療法の確立」グループ4
—脳血管疾患の神経病変におけるキヌレニン経路の役割に関する研究

2. 研究者名 薬学部薬学科 薬物治療学研究室 大西正俊

3. 研究協力者 井上敦子 (福山大学薬学部薬学科・教授)

4. 研究目的

脳出血などを含む脳血管疾患は、発症頻度こそ減少傾向にあるものの、一旦発症してしまうと要介護になる率は極めて高い。しかしながら、脳出血による神経障害の発症機序は未だ不明のままである。一方で我々は、脳出血後にキヌレニン経路の入口に位置する律速酵素の1つ indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO)が上昇することを見出した。そこで本研究では、脳出血後のキヌレニン経路の変動によるその中間産物の増減が、神経細胞を中心とする中枢神経系へ及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

5. 研究成果

本研究計画により、脳出血後には慢性的に IDO が上昇することが初めて明らかになった。この知見は、脳出血後にキヌレニン経路が変動する可能性を示している。IDO は、キヌレニン経路の入口でトリプトファンをキヌレニンに変換する酵素であり、その上昇は、すなわち、トリプトファン代謝の亢進を意味する。トリプトファンは、精神活動に寄与するセロトニンの原料として知られており、実際、脳出血後にはセロトニンレベルが減少し、それは IDO の阻害薬でリバースされた。免疫組織化学染色の結果、IDO はセロトニン作動性神経に発現しており、脳出血後遺症に伴う意欲低下に関与する可能性が示された。そこで、*in vivo* マウス脳出血モデルのうつ様行動の検定を行った結果、脳出血後のストレス耐性の低下に IDO が寄与していることが明らかになった (論文投稿中)。

IDO の下流には kynurenine 3-monooxygenase (KMO)が存在する。第2の律速酵素である。KMO は、キヌレニンが神経毒性を示すキノリン酸になるか逆に神経保護を示すキヌレン酸になるかの分かれ道に位置しており、IDO の上昇に伴ってこれも同様に上昇してくる可能性があった。そこで、初代培養ミクログリアに血液凝固因子トロンビンを曝露した結果、p38MAPK 経路を介して KMO が上昇してきた。それに伴い、キノリン酸/キヌレン酸比

が上昇し、それは KMO 阻害薬でリバースされた。つまり、KMO 阻害薬は神経保護性に働く可能性がある（第 94 回日本薬理学会年会）。したがって本研究では、*in vivo* 脳出血モデルにおける KMO の動態および役割について検討した。脳出血後には KMO が上昇しており、少なくとも神経、ミクログリア、および、アストロサイトにおいて発現が認められた。この *in vivo* モデルにおいてもキノリン酸/キヌレン酸比は上昇し、これはミクログリアの KMO を阻害することでほぼ完全に抑制された。KMO 阻害薬は、キノリン酸/キヌレン酸比の抑制に関連する抗脳浮腫作用を示し、神経保護効果も発揮した（第 95 回日本薬理学会年会、日本薬学会第 142 年会）。

6. 来年度の研究計画

キノリン酸/キヌレン酸比の低下による神経保護には興奮性アミノ酸である NMDA の受容体が関与していることが示唆される。近年、麻薬であるケタミンが NMDA 受容体阻害に基づく抗うつ作用を示すことが報告されており、キヌレニン経路の変動が脳出血後遺症に伴う意欲低下に関わる可能性がある。来年度以降は、この可能性について検討する。

7. 研究経費内訳

グリーンサイエンス特別研究費	150 千円
----------------	--------

8. 研究成果発表

口頭発表

- 1) Contribution of kynurenine 3-monooxygenase to hemorrhagic neuron injury
Mana Furutaguchi, Masatoshi Ohnishi, Takuya Shigemasa, Shunpei Tasaka, Atsuko Inoue

第 95 回日本薬理学会年会（2022 年 3 月・福岡）、演題番号 1-0-013

Kynurenine 3-monooxygenase (KMO) is a kind of rate-limiting enzyme in the kynurenine pathway. We investigated the change in KMO expression and intermediary metabolite levels after intracerebral hemorrhage (ICH) in neuronal injury. Treatment with thrombin to primary-cultured microglia increased the KMO expression through the p38 MAPK pathway. In the cultured medium, the ratio of quinolinic acid (QUIN), an N-methyl-D-aspartate receptor agonist, to kynurenic acid (KYNA), its antagonist, was increased, whereas the level of 3-hydroxykynurenine, a redox-active compound, showed no significant change. The increased QUIN/KYNA ratio was blocked by Ro61-8048, a KMO inhibitor. In the mouse ICH model, immunohistochemical staining showed that

KMO was co-localized with neurons, microglia, and astrocytes. The QUIN/KYNA ratio was increased after ICH, but blocked by the intracerebroventricular injection of Ro61-8048 or liposomal clodronate, a microglia toxin. Ro61-8048 ameliorated the loss of neurons, as indicated by NeuN-immunopositive cells, at the perihematomal region and repaired their abnormal behaviors without affecting the hematoma size. In conclusion, Thrombin-induced alterations of microglial KMO and intermediary metabolites of the kynurenine pathway were suggested to play important roles in neuronal injury after ICH.

2) 脳出血後の神経障害におけるキヌレニン経路の変動の役割

重政拓哉, 大西正俊, 古田口愛, 町田葵, 田坂俊平, 井上敦子

日本薬学会第142年会(2022年3月・名古屋)、演題番号 28P09-am2-19S

目的: キヌレニン経路の中間産物であるキノリン酸(QUIN)は、NMDA 受容体アゴニストとして働くことが知られている。そこで本研究では、脳出血時の神経障害におけるキヌレニン経路の役割を明らかにすることを目的とする。

方法: マウスの線条体にコラゲナーゼを投与し、in vivo 脳出血モデルを作成した。キヌレニン-3-モノオキシゲナーゼ(KMO)阻害薬である Ro61-8048 は側脳室内に投与した。KMO mRNA レベルはリアルタイム PCR で定量した。免疫組織化学染色は常法により行った。QUIN/キヌレン酸(KYNA)比は HPLC にて測定した。脳水分含量は、(湿重量-乾燥量)/湿重量×100(%)により求めた。行動試験では、corner turn、beam walking、及び、pole tests を行った。

結果・考察: 脳出血 24 時間後において KMO mRNA レベルが上昇した。KMO のタンパク質は、神経、ミクログリア、及び、アストロサイトにおいて発現していた。脳出血によって QUIN/KYNA 比は増加したが、Ro、及び、ミクログリア枯渇薬であるクロドロン酸を投与することによって、この比は低下した。したがって、QUIN/KYNA 比の上昇にはミクログリアにおける KMO が主たる役割を果たしていることが示唆された。Ro は脳出血による NeuN 陽性細胞数の減少、及び、異常行動を改善したことから、脳出血により誘発される神経障害に KMO が寄与していることが示唆された。

結論: 脳出血により KMO が上昇し、キヌレニン経路の変動が起こっていることが明らかになった。その中で、ミクログリアにおける KMO が QUIN/KYNA 比の上昇に関与しており、脳出血による神経毒性の原因となっていることが明らかになった。

9. その他

なし