

平成24年度富山県受託研究

和漢薬・バイオテクノロジー研究

研究成果報告書

国立大学法人

富 山 大 学

研究代表者 村 口 篤

目 次

和漢薬・バイオテクノロジー受託研究報告書

まえがき
研究代表者 富山大学 大学院医学薬学研究部長
村 口 篤

I. セリンラセマーゼ(SR)を標的とした 神経変性疾患治療薬の開発	1
I-1 SRの酵素活性測定と阻害薬のスクリーニング	5
富山大学・大学院医学薬学研究部 分子神経科学講座 森 寿	
I-2 ヒト型 SR 発現マウスの開発と個体レベルでの阻害薬効果の解析	10
富山大学・大学院医学薬学研究部 分子神経科学講座 井 上 蘭	
I-3 SR に対する改変修飾阻害薬の創製	12
富山大学・大学院理工学研究部 生体機能性分子工学研究室 豊 岡 尚 樹	
I-4 SR-阻害薬複合体の立体構造解析	16
富山大学・大学院医学薬学研究部 構造生物学研究室 水 口 峰 之	
II. 富山県産和漢薬から開発する脊髄損傷改善薬に 関する研究	19
II-1 脊髄損傷モデルマウスにおける和漢薬の有効性の検討	21
富山大学・和漢医薬学総合研究所 神経機能学分野 東 田 千 尋	
II-2 脊髄損傷に有効な和漢薬の活性成分の同定	25
富山大学・和漢医薬学総合研究所 和漢薬製剤開発分野 紺 野 勝 弘	
II-3 細胞接着斑形成制御を機序とする脊髄損傷治療薬の開発	29
富山大学・和漢医薬学総合研究所 神経機能学分野 久保山 友 晴	

Ⅲ. 「飲む目薬」の開発：血液網膜関門 novel カチオン輸送担体の 薬物認識機構を応用したドラッグデリバリーシステム	33
Ⅲ-1 血液網膜関門 novel カチオン輸送担体特性に基づいた 投与法の確立とドラッグデザイン	36
富山大学・大学院医学薬学研究部 薬剤学研究室 細 谷 健 一	
Ⅲ-2 抗炎症薬の循環血液から網膜への novel カチオン輸送担体を利用した 効率的な送達法	42
富山大学・大学院医学薬学研究部 薬剤学研究室 赤 沼 伸 乙	
Ⅲ-3 Novel カチオン輸送担体分子実体の解明と遺伝子デリバリー法確立.....	45
富山大学・大学院医学薬学研究部 薬剤学研究室 久 保 義 行	
Ⅲ-4 Novel カチオン輸送担体に対するパスポート構造を元にした、 有機化学的薬物誘導体化	50
富山大学・大学院医学薬学研究部 薬品製造学研究室 松 谷 裕 二	

平成24年度

和漢薬・バイオテクノロジー受託研究報告書

研究代表者 富山大学 大学院医学薬学研究部長 村口 篤

まえがき

富山県からの受託研究「和漢薬・バイオテクノロジー」において、本年度は3つの研究課題に取り組みました。本報告書には、これら3つの研究課題に取り組んだ3研究班（森研究班，東田研究班，細谷研究班）の平成24年度の研究成果が述べられています。

以下、その研究内容と研究者を紹介します。

森研究班の研究テーマは、「セリンラセマーゼ（SR）を標的とした神経変性疾患治療薬の開発」であり、本年度は、①SRの酵素活性測定と阻害薬のスクリーニング（森 寿氏）、②ヒト型SR発現マウスの開発と個体レベルでの阻害薬効果の解析（井上蘭氏）、③SRに対する改変修飾阻害薬の創製（豊岡尚樹氏）、④SR-阻害薬複合体の立体構造解析（水口峰之氏）について、各氏の研究成果を報告しています。

東田研究班の研究テーマは、「富山県産和漢薬から開発する脊髄損傷改善薬に関する研究」であり、本年度は、①脊髄損傷モデルマウスにおける和漢薬の有効性の検討（東田千尋氏）、②脊髄損傷に有効な和漢薬の活性成分の同定（紺野勝弘氏）、③細胞接着斑形成制御を機序とする脊髄損傷治療薬の開発（久保山友晴氏）について、各氏の研究成果を報告しています。

細谷研究班の研究テーマは、「『飲む目薬』の開発: 血液網膜関門 novel カチオン輸送担体の薬物認識機構を応用したドラッグデリバリーシステム」であり、本年度は、①血液網膜関門 novel カチオン輸送担体特性に基づいた投与法の確立とドラッグデザイン（細谷健一氏）、②抗炎症薬の循環血液から網膜への novel カチオン輸送担体を利用した効率的な送達法（赤沼伸乙氏）、③ Novel カチオン輸送担体分子実体の解明と遺伝子デリバリー法確立（久保義行氏）、④ Novel カチオン輸送担体に対するパスポート構造を元にした、有機化学的薬物誘導体化（松谷裕二氏）について、各氏の研究成果を紹介しています。

これらの成果が、現場において活かされるまでには時間が必要と考えられますが、これらの基礎的研究における大学の知の創造と蓄積の成果が、現場の方々に学問的立場からの示唆を与え、やがて応用されていくことを、長い目で見守りたいと思います。そして、このような幅広い和漢薬やバイオテクノロジーの研究成果が、広く県薬業界にも還元され、その活性化につながることを期待します。

最後になりましたが、本研究の実施にあたり、絶大なご支援を頂いた富山県関係機関に深く感謝申し上げます。

平成24年度受託研究課題

班	研究者	研究課題
I セリンラセマゼ(SRM)を標的とした 神経変性疾患治療薬の開発	I-1 森 寿	SRの酵素活性測定と阻害薬のスクリーニング
	I-2 井上 蘭	ヒト型SR発現マウスの開発と個体レベルでの阻害薬効果の解析
	I-3 豊岡 尚樹	SRに対する改変修飾阻害薬の創製
	I-4 水口 峰之	SR-阻害薬複合体の立体構造解析
II 富山県産和漢薬から開発する 脊髄損傷改善薬に関する研究	II-1 東田 千尋	脊髄損傷モデルマウスにおける和漢薬の有効性の検討
	II-2 紺野 勝弘	脊髄損傷に有効な和漢薬の活性成分の同定
	II-3 久保山 友晴	細胞接着斑形成制御を機序とする脊髄損傷治療薬の開発
III 「飲む目薬」の開発…血液網膜関門 novelカチオン輸送担体の薬物認識機構を応用 したドラッグデリバリーシステム	III-1 細谷 健一	血液網膜関門 novel カチオン輸送担体特性に基づいた投与法の確立とドラッグデザイン
	III-2 赤沼 伸乙	抗炎症薬の循環血液から網膜への novel カチオン輸送担体を利用した効率的な送達法
	III-3 久保 義行	Novel カチオン輸送担体分子実体の解明と遺伝子デリバリー法確立
	III-4 松谷 裕二	Novel カチオン輸送担体に対するパスポート構造を元にした、有機化学的薬物誘導体化

I. セリンラセマーゼ (SR) を標的とした 神経変性疾患治療薬の開発

富山大学・大学院医学薬学研究部 分子神経科学講座 教授 森 寿

【各班のまとめ】

高齢化を迎えている現代社会では、痴呆、記憶障害、情動障害などの原因となる神経変性疾患に対する治療薬を開発する事が、社会保健の観点や高齢者の生活の質を保持する観点から、医学的、社会的に解決すべき重要な課題である。現在いくつかの神経変性疾患に対する治療薬が開発されつつあるが、いまだ十分とは言えない。新たな神経変性疾患治療薬の開発は、高齢化を迎える社会において非常に大きな市場ニーズがある。

脳梗塞、アルツハイマー病、パーキンソン病などでは、神経細胞死に伴う過剰なグルタミン酸の放出と、それに伴う NMDA 型グルタミン酸受容体 (GluR) の過剰活性化が、神経変性疾患の進展に関わる共通機構と考えられている。研究代表者の森らは、NMDA 型 GluR の作動を制御する内在性コアゴニストとしての D-セリンの役割に注目し、D-セリンの産生に関わるセリンラセマーゼ (SR) の遺伝子ノックアウト (KO) マウスを作製し、その機能解析を進めて来た。その結果、SR-KO マウスは、神経細胞死を引き起こす NMDA、あるいはアルツハイマー病の原因のひとつと考えられている A β ペプチドの脳内投与による興奮毒性に対して、抵抗性を示す事を明らかにした (Inoue et al., 2008)。また、他の研究グループの SR-KO マウスを用いた研究により、実験的脳梗塞による神経細胞死に対しても抵抗性を示す事も明らかにされている (Mustafa et al., 2010; Wolosker and Mori, 2012)。さらに、井上、森らは、抑制性神経伝達を阻害するペンチレンテトラゾール (PTZ) 投与で誘発される全般性てんかん発作が、SR-KO マウスで軽減すること、PTZ 投与後の神経細胞の活性化状態を示す分子マーカーのひとつである c-Fos タンパク質の発現誘導が大脳皮質や海馬等で減少していること、海馬歯状回で PTZ 誘発性の細胞外グルタミン酸濃度の上昇が生じないこと等を見出し報告した (Harai et al, 2012)。従って SR は、ヒトで生涯発症率が 0.5-1 % と報告されているてんかん発作軽減のあらたな薬物標的となる可能性も示唆された。このように、SR により生産される D-セリンは、NMDA 受容体の過剰活性化状況において大きく関与している可能性が示唆され、SR の阻害薬は、神経変性疾患やてんかん発作の新たな治療薬となりうると考えられる。

本研究では、班員のそれぞれ専門分野での研究手法を活かし、1) ヒト SR に対する新たな阻害薬候補の詳細な活性測定を *in vitro* の系で行い、SR 阻害薬のリード化合物を決定する。また、本学の和

漢医薬学総合研究所から共同研究として提供される和漢薬資源の中から SR に作用する薬物候補のスクリーニングを進める (森)。2) マウス SR をヒト SR に入れ替えたヒト型 SR を持つマウス系統を複製し、ヒト SR に対する阻害薬の効果を *in vivo* で検証する (井上)。3) 阻害薬候補に化学的修飾を行い、特異性が高く、脳透過性を高めた新たな化合物をデザインし合成する (豊岡)。4) 阻害薬-SR 複合体の立体構造を明らかにして、作用機構の分子機構を明らかにする (水口)、のそれぞれの役割分担と達成目標のもとに研究班を組織した。

本年度は、1) ヒト SR の *in vitro* の酵素活性測定系を用いて、SR 阻害薬候補のスクリーニングを進め、新規 SR 阻害薬候補をさらに見出した。また、化合物の阻害活性を定量的に解析するために、野生型 SR を用いた *in vitro* の酵素活性測定系を確立した。さらに NMDA 受容体の活性依存的な遺伝子発現をモニターできる Arc-Luc Tg マウス (Izumi et al., 2011) を用いた *in vivo* の薬物効果評価に着手した (森)。2) マウス SR の遺伝子座にヒト SR cDNA を導入したヒト型 SR を持つマウス系統を複製するための標的遺伝子組換えベクターを完成し、マウス胚性幹 (ES) 細胞に導入することにより、目的の相同組換え ES 細胞を取得した (井上)。3) SR 阻害薬リード化合物から合成を進め、新規 SR 阻害薬の合成と活性評価を行った (豊岡)。4) 立体構造解析のための SR タンパク質の大量発現と解析を進めた (水口)。

本研究班の薬剤開発の手法は、様々な酵素阻害薬の論理的デザインと検証のモデルケースとなると期待される。また、和漢薬から新たな SR 阻害作用のある物質を見出す事も期待される。これら、一連の研究を連携推進し、新規薬物創製を進める手法を確立する事は、研究開発型の富山県の薬業振興に資する可能性も非常に大きいと考えられる。

【研究全体の背景と目的】

高齢化を迎えている現代社会では、痴呆、記憶障害、情動障害などの原因となる神経変性疾患に対する治療薬を開発する事が、社会保健の観点や高齢者の生活の質を保持する観点から、医学的、社会的に解決すべき重要な課題である。現在いくつかの神経変性疾患に対する治療薬が開発されつつあるが、いまだ十分とは言えない。例えば、現在、アルツハイマー病に対して日本の臨床現場で使われている薬物は、脳内アセチルコリンの濃度を高めるために、アセチルコリンの分解酵素であるエステラーゼを標的としたドネペジル、ガラントミン、リバスチグミンの3種類と、NMDA 受容体を標的としたメマンチンの合計4種類であり、新たな分子標的に対する治療薬の開発は、神経変性疾患治療薬の新規開発の観点から、高齢化を迎える社会において非常に大きな市場ニーズがある。

脳梗塞、アルツハイマー病、パーキンソン病などでは、神経細胞死に伴う過剰なグルタミン酸の放出と、それに伴う NMDA 受容体の過剰活性化、カルシウム流入、カルシウム依存的酵素群の恒常的活性化、ミトコンドリア膜電位の異常上昇などの一連の反応に伴う興奮毒性が、ネクローシスやアポ

トーシスによる神経変性疾患の進展に関わる共通機構と考えられている。

我々は、NMDA 受容体の作動を制御する内在性コアゴニストとしての D-セリンの役割に注目し、D-セリンの産生に関わるセリンラセマーゼ (SR) の遺伝子ノックアウト (KO) マウスを作製し、その機能解析を進めて来た。その結果、SR が高次脳機能を担う前脳神経細胞に主に発現し、産生された D-セリンが NMDA 受容体の機能制御に関わる事を個体レベルで世界に先駆けて明らかにした (Inoue et al., 2008)。さらに、SR-KO マウスが、神経細胞死を引き起こす NMDA、あるいはアルツハイマー病の原因のひとつと考えられている A β ペプチドの脳内投与による興奮毒性に対して、抵抗性を示す事を明らかにした (Inoue et al., 2008)。また、他の研究グループの SR-KO マウスを用いた研究により、実験的脳梗塞による神経細胞死に対しても抵抗性を示す事も明らかにされている (Mustafa et al., 2010; Wolosker and Mori, 2012)。さらに、我々は、抑制性神経伝達を阻害するペンチレンテトラゾール (PTZ) 投与で誘発される全般性てんかん発作が、SR-KO マウスで軽減すること、PTZ 投与後の神経細胞の活性化状態を示す分子マーカーのひとつである c-Fos タンパク質の発現誘導が大脳皮質や海馬で減少していること、海馬歯状回で PTZ 誘発性の細胞外グルタミン酸濃度の上昇が生じないこと等を見出した (Harai et al., 2012)。従って、SR は、ヒトで生涯発症率が 0.5-1% と報告されているてんかん発作軽減のあらたな薬物標的となる可能性を示唆した。一方で、NMDA 受容体の機能を直接阻害する事は、記憶・学習などの高次脳機能の障害や、精神症状の発症に関わる可能性が示唆されているが、SR-KO マウスでは通常の記憶・学習行動に異常は見られず、精神症状様の異常行動も示さない (Mori and Inoue, 2011)。さらに最近 D-セリンは神経伝達物質が情報伝達を行うシナプスでの NMDA 受容体を選択的に活性化することで、神経細胞死を引き起こす事も脳スライス標本を用いた実験で報告されている (Papouin et al., 2012)。これらの事から、NMDA 受容体の機能修飾に関わっている SR から産生される D-セリンは、NMDA 受容体の過剰活性化状況においてより大きく関与している可能性が示唆される。

また我々は、SR が皮膚の角質細胞の最終分化過程で発現していることと、SR-KO マウスでは、皮膚のバリア機能に関わる遺伝子の発現が上昇している事を見出した (Inoue et al., 論文投稿中)。皮膚においても NMDA 受容体が発現している事が報告されていたが、本研究は、皮膚の NMDA 受容体の機能に SR 由来の D-セリンが重要である事を示唆するのみならず、本研究で開発される SR 阻害薬には、皮膚バリア機能の向上作用が期待される可能性を示唆している。

以上の背景から、SR の阻害薬は、神経系では神経変性疾患やてんかん発作の新たな治療薬となり、皮膚ではバリア機能の維持向上を促す薬物となりうると考えられる。

既に、申請代表者らは大腸菌に発現させたヒトの SR を用いて *in vitro* 酵素活性測定系を確立した。また、北里大学薬学部の広野修一教授のグループと共同し、ヒト SR の結晶立体構造情報 (Smith et al., 2010) を元に、*in silico* スクリーニングにより、400万種の化合物の中から阻害薬候補を 19種にま

で絞り込んだ。さらに、in vitro での酵素活性測定系により、この19種の化合物の中から従来報告されている阻害薬より活性の高い化合物を1種類、同程度の活性の化合物を3種類見出した。

従って、本研究では班員のそれぞれ専門分野での研究手法を活かし、1) ヒト SR に対する新たな阻害薬候補の詳細な活性測定を in vitro の系で行い、SR 阻害薬のリード化合物を決定する。また、本学の和漢医薬学総合研究所から共同研究として提供される和漢薬資源の中から SR に作用する薬物候補のスクリーニングを進める(森)。2) マウス SR をヒト SR に入れ替えたヒト型 SR を持つマウス系統を作製し、阻害薬の効果を in vivo で検証する(井上)。3) 阻害薬候補に化学的修飾を行い、特異性が高く、脳透過性を高めた新たな化合物をデザイン合成して評価する(豊岡)。4) 阻害薬-SR 複合体の立体構造を明らかにして、作用機構の分子機構を明らかにする(水口)、のそれぞれの役割分担をもつ研究班を組織した。

本研究の手法は、様々な酵素阻害薬の論理的デザインと検証のモデルケースとなると期待される。また、和漢薬から新たな SR 阻害作用のある物質を見出す事が期待される。これら、一連の研究を連携推進し、新規薬物創製を進める手法を確立する事は、研究開発型の富山県の薬業の振興に資する可能性も非常に大きいと考えられる。

I - 1 SR の酵素活性測定と阻害薬のスクリーニング

富山大学・大学院医学薬学研究部 分子神経科学講座 教授 森 寿

【研究目的】

本研究では、SR 阻害薬リード化合物を同定し、新規 SR 阻害薬候補をスクリーニングするために、大腸菌でのリコンビナント SR の発現ならびに精製を行い *in vitro* および培養細胞系での、SR 活性測定系の確立と SR 阻害薬候補のスクリーニングを実施することを目的とする。また、個体レベルでの阻害薬の効果を検証するために、NMDA 受容体活性化に依存して発現する遺伝子を発光計測できる Arc-Luc Tg マウス系統 (Izumi et al., 2011) を用いた評価を行う。

【研究方法ならびに結果】

1) 変異型リコンビナントヒト SR (SR-C/D) の発現精製

マウス SR cDNA は、マウス脳由来 cDNA ライブラリーから PCR により増幅しクローン化して遺伝子配列を確認した後、リコンビナントタンパク精製のためのヒスチジンタグ (His x 6) 配列をカルボキシル末端に挿入した。また、ヒト SR cDNA は、理研バイオリソースより入手し、Smith らの報告 (Smith et al., 2010) に従い、可溶性を高めるためにアミノ酸配列の 2 番目ならびに 6 番目の Cys をそれぞれ Asp に置換し、さらに精製のためにカルボキシル末端にヒスチジンタグ配列を導入する修飾 (SR-C/D-His) を行った。これらの SR 遺伝子断片を、IPTG 添加により大腸菌でリコンビナントタンパク質を高発現するベクター pET21a に組み込んだ。出来上がった発現ベクターを、リコンビナントタンパク質発現用の大腸菌 (BL21-DE 3 株) に導入した。

大腸菌を 37°C で液体培養し、OD_{600 nm} の吸光度が 0.6 になった対数増殖期で最終濃度 0.5 mM の IPTG を加え発現誘導を行い、25°C で 16 時間以上培養した。遠心による集菌後、大腸菌ペレットを -80°C に凍結保存した。

以下のリコンビナント SR の精製は、研究分担者の水口教授の研究室で実施した。まず、凍結大腸菌ペレットを溶解液 (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 20 mM Imidazole) に懸濁した後、超音波破碎を行い、遠心 (35,000 rpm, 20 min, 4°C) 後、上清を His-Tag 精製カラムに通しリコンビナント SR を結合させた。次いでイミダゾール濃度を上昇させることで His-Tag 精製カラムからの溶出を行った。溶出液の蛋白濃度を測定し、SR が含まれると考えられる分画を、電気泳動 (SDS-PAGE) と CBB による蛋白質染色により確認し、Sephadex-75 カラムと溶出液 (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM

NaCl, 10% glycerol, 10 μ M PLP, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT) を用いてゲル濾過精製を行った。得られた分画を再度 SDS-PAGE と CBB により確認し, SR の含まれる分画をプールした後, 分注し液体窒素中で急速凍結し, 活性測定まで $-80^{\circ}C$ で保存した。この一連の発現精製過程で得られたリコンビナントSRの精製純度は70-80%であった。

2) 野生型リコンビナントヒトSRの発現精製

上記変異型のSR-C/Dを用いて, 活性測定を実施していたが, 阻害薬の K_i 値を求め定量的に評価するための実験を行うには, 活性が低い事がわかった。また, SRは十分な機能を発揮するために, 二量体化することが必要であり, また二量体形成には, 緩衝液の条件が影響を与える事が報告された(Wang and Barger, 2011)。そこで, 野生型(アミノ酸配列の2番目ならびに6番目がCys)のヒトSR遺伝子配列に精製のためにカルボキシル末端にヒスチジンタグ配列を導入した発現ベクターを構築し, 変異体SR-C/Dと同様の方法で精製を行い評価した。

3) in vitro SR 活性測定系の構築

SRの活性に対する化合物の阻害効果は, L-セリンのラセミ化反応と, 生産されるD-セリンの定量により計測した。

L-セリンのラセミ化反応は, Strisovskýら(2005)の方法に従い, リコンビナントSRを, 100 mM HEPES (pH 8.0), 1 mM $MgCl_2$, 10 μ M PLP, 1 mM ATP, 20 mM L-セリン, 5 mM DTT, ならびに DMSO に溶解した化合物(1~0.01 mM)を含む反応液125 μ L 中で, $37^{\circ}C$ で8時間以上反応させた。また, 反応初速度の解析のために, 経時的に反応を停止した。

D-セリンの定量は, Itoら(2007)の方法に従って行った。上記ラセミ化の反応液25 μ L に25 μ L の100 mM HEPES (pH 8.0), 20 μ M PLP, 2 μ g リコンビナントD-セリンデヒドラターゼ1(Dsd1)を含む溶液を加え, $30^{\circ}C$ で30分間反応させた。Dsd1は, D-セリンに対する特異性が非常に高く, D-セリンからピルビン酸とアンモニアを生成する。従って, Dsd1によってD-セリンから生産されるピルビン酸を比色反応によって計測した。そのために, 反応溶液50 μ L に50 μ L の0.05% DNP/2M HClを加え, $30^{\circ}C$ で5分間反応させた後, 100 μ L エタノールを加え, 次いで125 μ L の10M NaOHを加え, よく混和して室温で10分間反応させ, 515 nmの波長の吸光度計測を分光光度計で測定した。

4) 新規化合物のSR阻害活性の測定

ヒトSRの結晶立体構造情報をもとに, 北里大学薬学部の広野修一教授, 合田浩准教授との共同研究により見出したSR阻害薬候補19種類から, 上記in vitro SR活性測定系により, 4化合物がSR活性阻害効果を示した。この4化合物の構造情報をもとに, 研究分担者の豊岡教授が新規有機化合物

を合成した。新規化合物は、LW, MM, DR, ED の 4 種類に大別され、現時点で LW から34種、MM から37種、DR から29種、ED から37種の計137種の化合物の SR 活性阻害評価を、SR-C/D を用いて実施した。その結果、4 リード化合物から合成展開された新規化合物の中に、従来 SR 阻害薬として標準的に用いられているマロン酸と同程度、あるいは、より強力な阻害効果を示すものを見出した。MM については、IC₅₀値を求め、従来報告されているマロン酸より、阻害活性が有意に強い事が明らかになった (図 1)。

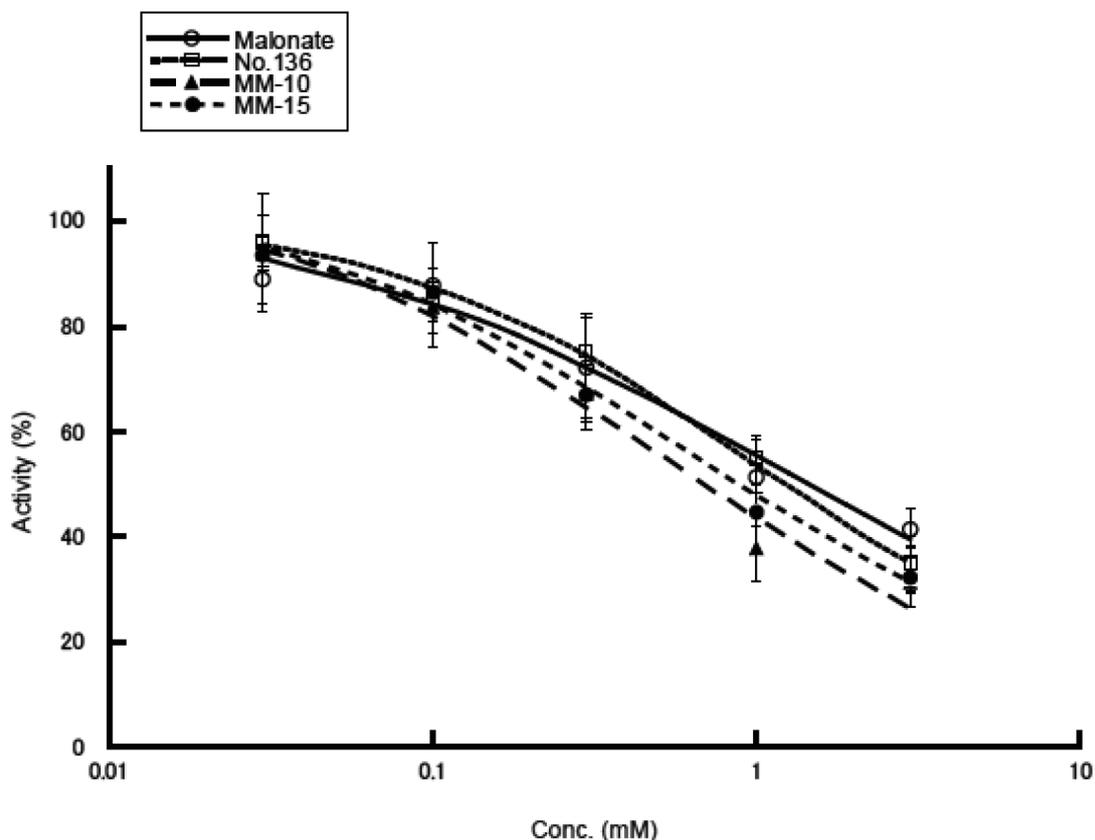


図 1 MM 化合物の SR 活性に対する阻害作用

リコンビナント SR-C/D を用いた試験管内活性評価により、MM10と MM15は、オリジナルリード化合物 (No. 136) や標準阻害薬のマロン酸 (Malonate) より強い阻害活性を示した。

5) 野生型 SR の発現と SR 活性測定

変異型 SR-C/D は、薬物の作用機構の解析過程で活性が弱い事が明らかとなったため、野生型ヒト SR を発現精製し、酵素の基本的性質の解析を実施した。その結果、野生型 SR の酵素活性は、最初に報告された文献 (Strisovský et al., 2005) にほぼ一致して高く、反応初速度の解析や阻害薬の作用解析が十分に行える事がわかった (図 2)

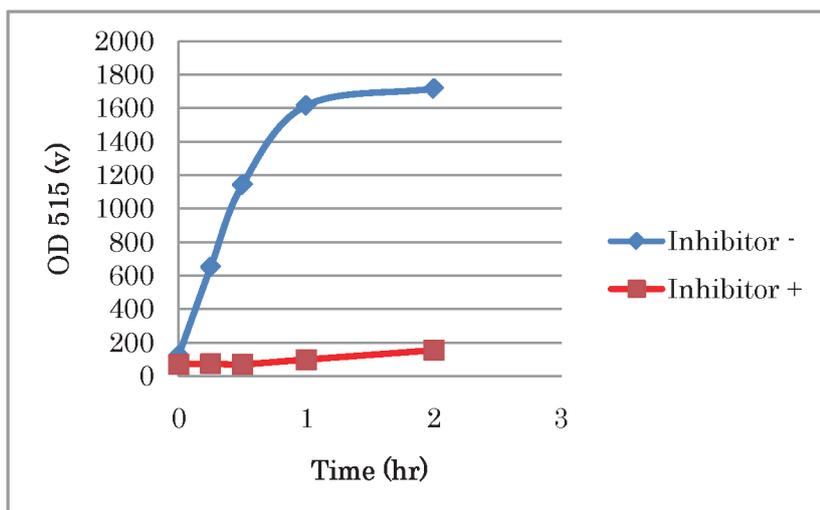


図2 野生型 SR の反応速度曲線。
反応時間30分までの初速度は、
1次関数的に上昇した。また、
阻害薬の効果も確認できた。

さらに、阻害薬の作用機構を解析するために、基質であるL-セリン濃度に対する阻害薬の効果を解析したところ、基質に対する競合阻害である事が示唆された(図3)。

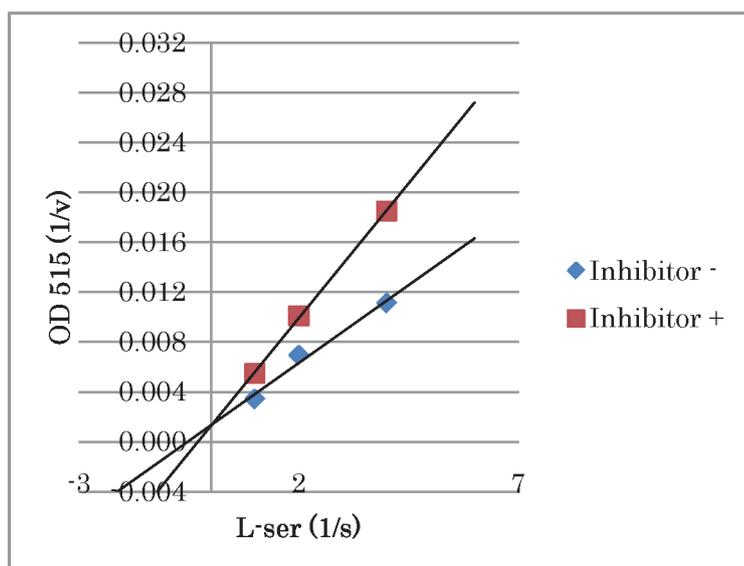


図3 基質濃度に対する阻害薬の作用。
Lineweaver-Burk プロットにおいて、
阻害薬の有無で同じX軸上の交点を示
し、競合阻害である事が示唆された。

また、阻害効果が高い薬物については、NMDA 受容体活性依存的な遺伝子発現を発光として定量評価できる Arc-Luc Tg マウス系統 (Izumi et al., 2011, 図4) を用いた解析に着手した。

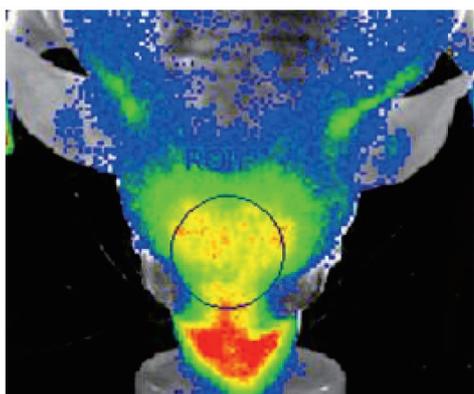


図4 Arc-Luc Tg マウスで観察される NMDA 受容体活性依存的発光

Arc-Luc Tg マウスでは、NMDA 受容体活性依存的に発現するArc遺伝子にホタル由来発光タンパク質 (ルシフェラーゼ Luc) 遺伝子を連結したトランスジーンが組み込まれている。図は背側より頭部を発光観察したものであり、通常飼育状態でも NMDA 受容体は機能しているため、脳からの発光 (円内) が観察できる。

【考察と今後の展望】

本研究により、リコンビナント SR の発現と *in vitro* での SR 活性測定系は確立されたと考えられる。既に *in silico* スクリーニングにより SR 阻害薬のリード化合物を同定し、それらのリード化合物から有機合成展開した新規化合物の中から、*in vitro* スクリーニングにより複数の新規 SR 阻害薬候補を同定した。今後は、見出された新規化合物の効果を定量的に解析するとともに、構造活性相関を明らかにし、さらに、新規阻害薬と SR との結晶を作製し、立体構造解析を実施することで阻害機構の解明を行う。また、マウス個体レベルでの活性測定を Arc-Luc Tg マウスで行う事で、体内動態や個体レベルでの作用機構解析を経て、新規薬物候補の同定につなげる。

I - 2 ヒト型 SR 発現マウスの開発と個体レベルでの 阻害薬効果の解析

富山大学・大学院医学薬学研究部 分子神経科学講座 助教 井上 蘭

【研究目的】

SR の阻害薬は、神経系疾患に対しては変性疾患やてんかん発作の新たな治療薬となりうると考えられる。また、皮膚ではバリア機能の維持や向上に寄与することが期待される。in silico スクリーニングにより見出したヒト SR に対する阻害薬候補19種を用いて、SR に対する阻害効果を in vitro で測定する過程で、ヒトSRに対する阻害効果を示す化合物とは異なる化合物がマウス SR に対して阻害効果を示すことが明らかとなった。また、ヒト SR (NCBI Accession: CAG33581.1) とマウス SR (NCBI Accession: CAI24252.1) のアミノ酸配列を比較すると、ヒト SR が340アミノ酸 (a.a.) から構成されるのに対し、マウス SR は、339 a.a.と1 a.a. 少なく、また、全体のアミノ酸配列の比較で、ヒトSR とマウス SR のアミノ酸同一性は、89%である。これらのことから、本研究で開発するヒト SR に対する阻害薬は、個体レベルでの活性検討の際に用いるマウス SR に対する効果が、ヒト SR とは異なる可能性がある。従って、本研究では、SR 阻害薬の効果を in vivo で検証するために、マウス SR をヒト SR に入れ替えたヒト型 SR を持つマウス系統を作製することを目的とする。

【研究方法と結果】

本研究では、マウス SR 遺伝子座にヒト SR (変異型 SR-C/D) 遺伝子を挿入した標的遺伝子組換えベクターを構築し、マウス胚性幹 (ES) 細胞に導入し、目的の遺伝子組換えが行われたES細胞からキメラマウスの作製により、ヒト型 SR 発現マウス系統を作製するものである。本年度は、遺伝子組換えベクターの構築を以下の方法で進めた。

1) 標的遺伝子組換えベクターの構築

マウス SR 遺伝子をヒト SR に置き換えるために、理研バイオリソースより、マウス SR ゲノム遺伝子配列をバクテリア人工染色体 (BAC) に含む大腸菌株 (B6Ng01-238C10) を入手した。大腸菌内での相同組み換え法を用い、マウス SR 遺伝子の翻訳開始 Met に、in vitro 酵素活性評価に用いているヒト SR cDNA (SR-C/D-His) を挿入するための研究を進めた。

BAC を含む大腸菌に、薬剤耐性マーカーとして、ゼオシン耐性かつストレプトマイシン感受性となる遺伝子断片を相同組み換えにより、マウス SR 遺伝子の翻訳開始 Met の位置に導入した。薬剤耐

性ならびに BAC に対する PCR 法で、正しく遺伝子が挿入されたクローンを選択した。ヒト SR とネオマイシン耐性遺伝子断片を構築し、目的の標的遺伝子組換えベクターが完成した (図 5)。また、C57BL/6 系統由来 ES 細胞 に導入し、標的遺伝子組換え細胞をサザンブロット解析によりスクリーニングし同定した (図 6)。

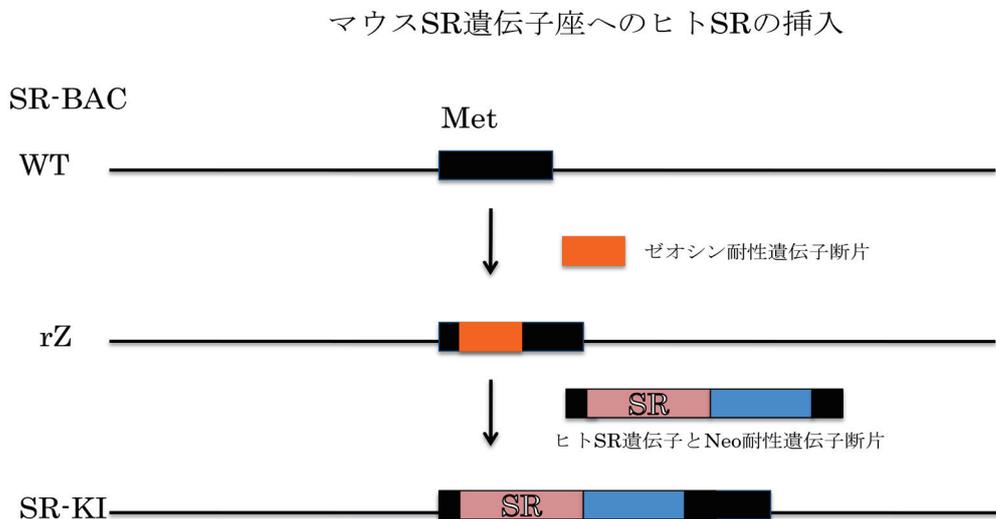


図 5 マウス SR 遺伝子座へのヒト SR 遺伝子の挿入方法の概略

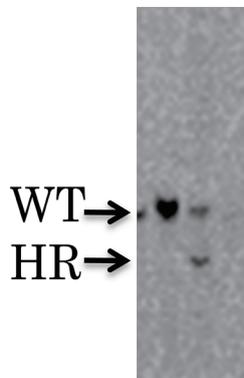


図 6 ES 細胞のサザンブロット解析の結果

標的遺伝子組換え細胞を選択するために、サザンブロット解析を実施した。WT が野生型遺伝子由来のバンド、HR が相同組換え由来のバンドを示し、HR バンドを有する細胞にはヒト SR-C/D が挿入されている。

【考察と今後の展望】

ヒト型 SR 発現マウス系統作製のための、標的遺伝子組換えベクターの構築を終え、遺伝子組換えベクターは完成した。また、ES 細胞に導入して、目的の遺伝子組換えが起きたクローンを得たので、マウス系統作製を進める。

I - 3 SR に対する改変修飾阻害薬の創製

富山大学・大学院理工学研究部 生体機能性分子工学研究室 教授 豊岡尚樹

【研究の目的, 方法, 結果】

昨年度, 既存の SR 阻害剤の化学構造および SR の結晶構造を利用した in-silico スクリーニングを実施し, 4 種類のリード化合物を同定した。さらに, 4 種類のリード化合物のうち, ビスアミド (1) をリード化合物とした誘導体合成および活性評価を行い, 2 種類のより強力な SR 阻害剤を見出した。(Figure 1)

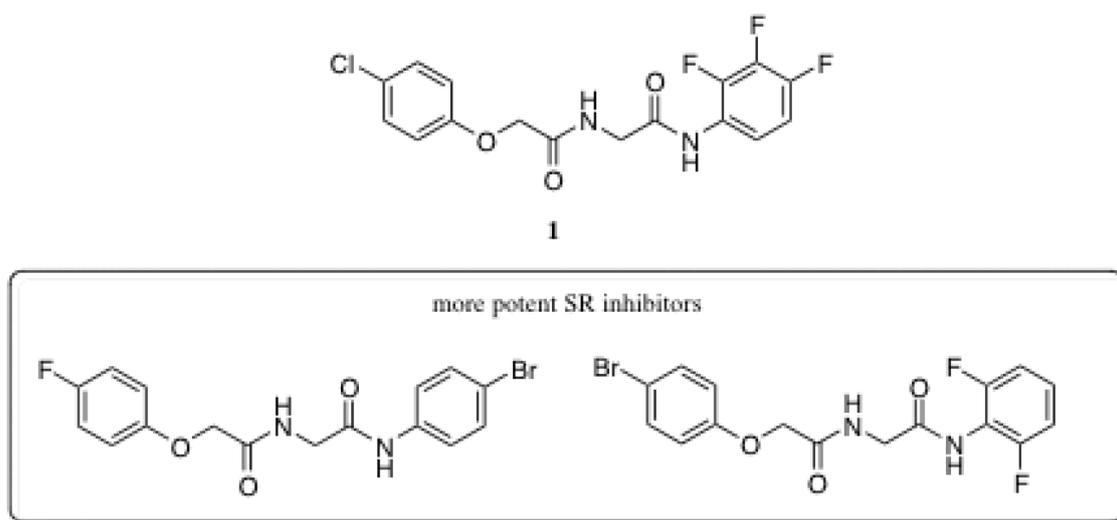


Figure 1

今年度は, 残る 3 種類の化合物のうち, 2 種類について同様に誘導体合成, SR に対する阻害活性評価を行い, 以下の Table 1, 2 に示す結果を得た。尚, リード化合物の構造, 誘導体合成のスキームおよび誘導体の構造は, 現在 LSIP ファンドの支援を受け, 国際特許出願 (PCT) の準備に入っており, 本報告書での公表を控えます。

Table 1

DR *New	structure	% human 0.3 mM	Dose Response (%human 1,0.3,0.1 mM)
No. 84	リード化合物	90 (Mal 54)	
1*	誘導体 1	93 (58)	
2*	誘導体 2	95	
3*	誘導体 3	95	
4	誘導体 4	95	
5*	誘導体 5	90	
6	誘導体 6	84	
7*	誘導体 7	81	
8*	誘導体 8	89	
9*	誘導体 9	78	
10*	誘導体 10	91	
11	誘導体 11	1) 75 2) 69 (Mal 54)	64, 72, 88 (Mal 56, 73, 94)
12*	誘導体 12	92	
13	誘導体 13	83	
14*	誘導体 14	86	
15	誘導体 15	81	
16	誘導体 16	88	
17*	誘導体 17	97	
18*	誘導体 18	1) 86 2) 84 (Mal 54)	
19*	誘導体 19	98	
20*	誘導体 20	90	
21*	誘導体 21	85	
22	誘導体 22	89	
23	誘導体 23	93	
24*	誘導体 24	96	
25	誘導体 25	97	
26*	誘導体 26	89	
27*	誘導体 27	80	
28	誘導体 28	79	
29	誘導体 29	80	
30	誘導体 30	80	
31	誘導体 31	77	
32	誘導体 32	85	
33	誘導体 33	1) 70 2) 66 (Mal 54)	1st. 47, 46, 53 (Mal 56, 73, 94) 2nd. 71, 68, 96 (Mal 77, 74, 85) 3rd. 69, 76, 86 (Mal 74, 77, 84)

2nd. : DMSO 10% Dose response 0.3, 0.1, 0.03 mM

3rd. : DMSO 20 % Dose response 0.3, 0.1, 0.03 mM

Table 2

DR *New	structure	% human 0.3 mM	Dose Response (%human 1,0.3,0.1 mM)
No. 126	リード化合物	97 (Mal 73)	86, 97, 99 (Mal 56, 73, 94)
1*	誘導体 1	88 (Mal 63)	
2*	誘導体 2	97	
3*	誘導体 3	93	
4*	誘導体 4	63	
5*	誘導体 5	99	
6*	誘導体 6	95	
7*	誘導体 7	99	
8*	誘導体 8	99	
9*	誘導体 9	99	
10 com. Av.	誘導体 10	72	
11*	誘導体 11	99	
12*	誘導体 12	99 (Mal 65)	
13*	誘導体 13	99	
14*	誘導体 14	99	
15*	誘導体 15	99	
16*	誘導体 16	72	
17*	誘導体 17	47	46, 51, 71 (Mal 49, 64, 83)
18*	誘導体 18	50	
19*	誘導体 19	52	
20*	誘導体 20	53	
21*	誘導体 21	49	
22*	誘導体 22	46	44, 49, 75 (Mal 49, 64, 83)
23*	誘導体 23	50	
24*	誘導体 24	57	
25*	誘導体 25	42	38, 41, 49 (Mal 49, 64, 83)
26*	誘導体 26	94	
27	誘導体 27	48 (Mal 51)	
28	誘導体 28	48	
29	誘導体 29	54	
30	誘導体 30	75	
31	誘導体 31	58	
32	誘導体 33	81	
33	誘導体 34	73	
34	誘導体 35	49	
35	誘導体 36	62	
36	誘導体 37	46	
37	誘導体 38	48	

Table 1 に示すように、リード化合物 No. 84 誘導体では誘導体 11, 33 にマロン酸よりも強い阻害活性が認められ、リード化合物 No. 126 誘導体では誘導体 17, 22, 25 に同じくマロン酸よりも強い活性が認められた。

【考察と今後の展望】

リード化合物を基にした新規 SR 阻害薬候補のデザインと有機合成を実施し、SR 阻害活性を示す新規化合物を見出した。これらの新規化合物は、今後さらなる構造-活性相関を検討すると共に、最後の化合物についても誘導体合成および SR に対する活性評価を進めていく予定である。有機化合物合成と In vitro, in vivo での活性評価を繰り返すことで、論理的かつ根拠のある薬剤開発につながると期待される。

I - 4 SR-阻害薬複合体の立体構造解析

富山大学・大学院医学薬学研究部 構造生物学研究室 教授 水口 峰之

【研究目的】

SRの阻害薬は、神経変性疾患の新たな治療薬になりうると期待されている。SRを標的とした新たな神経変性疾患治療薬を開発するには、ヒトSRの阻害剤の作用機構を三次元立体構造から解明する必要がある。得られる立体構造は、新たな薬物デザインの根拠となる重要な情報になると期待される。従って、本研究は、ヒトSRとその阻害薬の立体構造をX線結晶構造解析によって明らかにし、阻害剤の作用機構を解明することを目的として実施した。

【研究結果】

タンパク質のX線結晶構造解析を成功させるには、高純度のタンパク質試料が数十ミリグラム必要である。また、タンパク質が不安定な場合には結晶化が困難であるため、安定なタンパク質試料を得ることも重要である。ヒトSRは340アミノ酸残基からなるタンパク質であり、Cysを7つ有する。Smithらは、Cys2とCys6をAspに変異させたヒトSRは安定で立体構造解析に適していると報告している(Smith et al., 2010)。Smithらの方法にしたがって、我々はヒトSRのC2D/C6D変異体の発現・精製を行った。

ヒトSRのC2D/C6D変異体のDNAを挿入したpET21aベクターを使って大腸菌BL21(DE3)RIPLを形質転換し、目的タンパク質を発現させた。この方法は昨年度と同様であるが、さらに発現量を向上させるために発現プロトコルを改良した。その結果、以下の発現プロトコルが、目的タンパク質の発現量を大幅に改善させることがわかった。まず、培養プレートの大腸菌コロニーをスクレイパーですべてとり、100 mLのLB培地に加えて、2～3時間程度37°Cで前培養を行った(LB培地にはアンピシリンとピリドキシンをそれぞれ50 µg/mLと0.01%になるように加えた)。わずかに白く懸濁したら、1 LのLB培地に加え、600 nmのODが0.5になるまで37°Cで培養した。その後、IPTGを0.3 mMになるように加え、37°Cで約18時間培養した。回収した大腸菌を超音波で破碎し、上清画分に含まれる目的タンパク質を精製した。

ヒトSRのC末端にHisタグを付加しているため、HisタグとNi²⁺イオンのアフィニティークロマトグラフィーで精製を行った。精製したヒトSRの純度はSDS-PAGEを用いて確認した。LB培地2 Lを用いて大腸菌を培養した場合、最大で9.6 mgのヒトSRを得ることができた。昨年度までのプ

ロトコールでは0.14~0.39 mgであったので大幅に改善されたといえる。

【考察と今後の展望】

研究代表者の研究によって、野生型 SR は C2D/C6D 変異体よりも活性が高いことが判明した。今後は、改良されたプロトコールを野生型 SR に適用し、結晶化に十分な量のタンパク質を得る。また、理化学研究所 NMR 施設の立体構造解析パイプラインによる無細胞タンパク合成の利用も検討する。さらに、創薬等支援技術基盤プラットフォームの利用も検討し、立体構造解析が成功するよう多方面から研究を進める。

【全体の今後の展望】

神経変性疾患ならびにてんかん発作等の神経細胞の過剰興奮が引き起こす病態に関わる SR を標的として、分子生物学、分子遺伝学、有機合成化学、構造生物学が共同する本研究は、様々な酵素阻害薬の論理的デザインと検証のモデルケースとなり、さらに和漢薬資源等からも新たなSR阻害作用物質を見出す事が期待される。これら、一連の研究を連携推進し、新規薬物創製を進める一連の手法を実施する事は、富山県の薬業の振興にも資すると考えられる。

【文献】

- Inoue, R., Hashimoto, K., Harai, T., Mori, H. NMDA- and β -amyloid₁₋₄₂-induced neurotoxicity is attenuated in serine racemase knock-out mice. **J. Neurosci.** 28 : 14486-14491, 2008.
- Izumi, H., Ishimoto, T., Yamamoto, H., Nishijo, H., Mori, H. Bioluminescence imaging of Arc expression enables detection of activity-dependent and plastic changes in the visual cortex of adult mice. **Brain Struct. Funct.**, 216 : 91-104, 2011.
- Harai, T., Inoue, R., Fujita, Y., Tanaka, A., Horio, M., Hashimoto, K., Hongou, K., Miyawaki, T., Mori, H. Decreased susceptibility to seizures induced by pentylentetrazole in serine racemase knockout mice. **Epilepsy Research** 102 : 180-187.
- Ito T, Takahashi K, Naka T, Hemmi H, Yoshimura T. Enzymatic assay of D-serine using D-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Anal. Biochem.** 371 : 167-172, 2007.
- Mori, H., Inoue, R. Serine racemase knockout mice. **Chemistry & Biodiversity** 7 : 1573-1578, 2010.
- Mustafa AK, Ahmad AS, Zeynalov E, Gazi SK, Sikka G, Ehmsen JT, Barrow RK, Coyle JT, Snyder SH, Doré S. Serine racemase deletion protects against ischemia and excitotoxicity. **J. Neurosci.** 30 : 1413-1416, 2010.
- Papouin, T., Ladépêche, L., Ruel, J., Sacchi, S., Labasque, M., Hanini, M., Groc, L., Pollegioni, L., Mothet,

J-P., Olier, S.H.R. Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor are gated by different endogenous coagonists. **Cell** 150 : 633-646, 2012.

Smith MA, Mack V, Ebner A, Moraes I, Felicetti B, Wood M, Schonfeld D, Mather O, Cesura A, Barker J. The structure of mammalian serine racemase: evidence for conformational changes upon inhibitor binding. **J. Biol. Chem.** 285 : 12873-12881, 2010.

Stríšovský K, Jirásková J, Mikulová A, Rulíšek L, Konvalinka J. Dual substrate and reaction specificity in mouse serine racemase: identification of high-affinity decarboxylate substrate and inhibitors and analysis of the beta-eliminase activity. **Biochemistry** 44 : 13091-13100, 2005.

Wang, W. and Barger, S.W. Roles of quaternary structure and cysteine residues in the activity of human serine racemase. **BMC Biochemistry**, 12 : 63, 2011.

Wolosker, H. and Mori, H. Serine racemase: an unconventional enzyme for an unconventional transmitter. **Amino Acids** 43 : 1895-1904, 2012.

II. 富山県産和漢薬から開発する脊髄損傷改善薬に関する研究

富山大学・和漢医薬学総合研究所

神経機能学分野 東田千尋

和漢薬製剤開発分野 紺野勝弘

神経機能学分野 久保山友晴

脊髄損傷では、外傷性に脊椎が損壊し、挫滅あるいは離断した脊髄内で神経細胞やミエリン細胞が破壊され脳と末梢を繋ぐ信号が断裂され、損傷脊髄部位およびその下位脊髄が支配する体幹・上下肢の運動と感覚が機能不全に陥る。現在、全世界で約250万人の脊髄損傷者がおり、さらに年間13万人があらたに脊髄損傷を負っている。脊髄損傷の治療に関して、多方面からの研究が進められているが、慢性期に至った脊髄損傷の機能回復は極めて困難である。

本研究では、脊髄損傷を効果的に回復させ得る新しい治療薬の創出を目指している。そのために、①初代培養神経細胞を用いたスクリーニング、および動物モデルでの検討による、軸索伸展作用を有する和漢薬成分の同定、②軸索再生不全に陥った軸索を再伸展させる分子メカニズムの解析、③脊髄損傷慢性期で運動機能の改善を阻む因子の同定、を進めている。また②および③の結果を逐次①のスクリーニング系に反映させ、軸索再生を達成するいくつかの機序ごとに、和漢薬から活性化化合物を探索することで、軸索伸展を導く複数のメカニズムにもとづき、創薬シーズとなる活性成分の多面的な同定を進める。

【各班の概要】

脊髄損傷モデルマウスにおける和漢薬の有効性の検討

東田 千尋

脊髄損傷後、慢性期に移行するにしたがって損傷中心を囲うように形成されるグリア性瘢痕は、軸索が再伸展したり分枝することを物理的障壁となり阻害するだけでなく、軸索伸展を阻害する細胞外基質を分泌する。主たる軸索阻害因子はコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) である。よって、CSPG 存在下でも軸索伸展が可能になることは、慢性期脊髄損傷の運動機能を改善する上で鍵となる重要な活性である。本年度は、CSPG コーティング上でも軸索を伸展させる活性の検出を目的として、110種類の生薬水エキスを検討した。活性ありと認められた生薬に関しては、さらに脊髄損傷モデルマウスでの活性評価を実施し、2つの生薬の有効性を見出した。

和漢生薬を脊髄損傷改善に有効な薬物素材と考え、各種和漢生薬エキスを対象にして脊髄損傷改善作用の薬理活性を検討し、活性成分の同定と作用機序の分子的解明を目指した。本年度は、110種類の生薬水エキスを検討し、3種（苦参、牛膝、連翹）に強い軸索再生活性が認められた。さらに、うち2種（苦参、連翹）は、脊髄損傷マウスの運動機能を有意に回復させた。これら3種の生薬エキスの活性成分同定を目指し、溶媒による分画を行ない、各分画の成分プロファイルをLC-MSにより検討した。

細胞接着斑形成制御を機序とする脊髄損傷治療薬の開発

久保山 友晴

グリア性瘢痕内では活性化アストロサイトから阻害因子のコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) が分泌され、これが濃度勾配を形成して沈着し、軸索再生を阻害する主たる原因の一つとなっている。CSPG による軸索再生阻害の機序は未だ解明されておらず、これを紐解くことは、軸索再生の機序を知ることに繋がる。昨年度までに久保山は、p21-activated kinase (PAK) がpaxillin をリン酸化して CSPG 濃度勾配上の軸索再生を促進することを明らかにした。PAK は Protein kinase A (PKA) によってリン酸化されることによって不活性化されることが報告されていることから、CSPG 濃度勾配上の dystrophic endball では PKA が活性化しているため PAK が不活性化し、paxillin のリン酸化が抑制されているのではないかと考えた。そこで本年度は、dystrophic endball における PKA の活性を検討した。

Ⅱ－１ 脊髄損傷モデルマウスにおける和漢薬の有効性の検討

富山大学・和漢医薬学総合研究所・神経機能学分野

准教授 東 田 千 尋

【研究目的と背景】

脊髄損傷に対する臨床的対処の現状としては、受傷直後の大量ステロイド剤投与による障害の減弱化が試みられているものの、その効果は疑問視されており (Kronvall et al., 2005)、動物実験での改善効果も明確でない (Pereira et al., 2009)。こういった現状の中、胚性幹細胞 (ES細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を応用した再生医療が次世代の脊髄損傷の治療戦略として有望視され、近年、精力的に基礎研究が進められている (Kumagai et al., (2009); Tsuji et al., 2010)。しかしこれらの戦略で、モデル動物での脊髄損傷改善作用が認められるのは、対照群でもある程度の自然回復が認められる損傷条件下で、急性期 (1-2 日以内) から亜急性期 (10日程度以内) に細胞を移植した場合が主であり、慢性期での有効性は不明である。つまり依然として慢性期に至った脊髄損傷の機能回復は極めて困難であると考えられている。

グリア瘢痕は、慢性期脊髄損傷で神経軸索が伸展を阻害する物理的バリアであると同時に、CSPG などの軸索抑制因子を放出するため、その負の側面がクローズアップされてきた。しかし astrocyte には、積極的に軸索伸展を促す神経成長因子 (BDNF, NGF, NT3 等) の分泌 (Rolls et al., 2009)、シナプス間隙のグルタミン酸クリアランスによる神経細胞死の保護 (Rothstein et al., 1996) といった正の作用も備わっていることが、次々と示されている。つまり、慢性期脊髄損傷を治療する鍵は、①神経軸索の伸展と、②グリア細胞の正の作用を高めるような制御の両方に働きかけることである (Tohda and Kuboyama, 2011; Teshigawara, Kuboyama et al., 2013)。

そこで本研究では、和漢薬を対象にして、脊髄損傷改善作用の薬理活性を、いくつかの細胞モデルと脊髄損傷動物モデルにおいて多面的に検討し、活性成分の同定と、作用機序の分子的解明を目指す。In vivo モデルでの解析 (東田)、in vitro モデルでのアッセイとメカニズム解析 (東田, 久保山)、化学的分析研究 (紺野) と役割分担し、相互に連携しながら実施する。

本年度は、主として、CSPG による軸索伸展阻害を乗り越えて軸索を伸展させる活性に着目し、in vitro における和漢薬のスクリーニングと、in vivo での運動機能改善作用についての評価を行った。

【実験方法】

1) スクリーニングに用いた生薬エキス

和漢医薬学総合研究所内に保有されている、生薬（枋本天海堂より）水エキス110種類を用いた。

2) CSPG 基質上における軸索伸展阻害に対する生薬エキスの改善作用

マウス胎児（胎生14日齢）の脳より大脳皮質神経細胞を初代培養した。培養には、poly-D-lysine コーティングののち、CSPG としての aggrecan を $2\mu\text{g/ml}$ にてさらにコーティングした 8-well カルチャースライドを用いた。細胞は 5×10^4 cells/well の密度で播種した。培養2日目に、溶媒のみあるいは生薬エキスを 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ になるように培地中に加え、その6日後に細胞を固定し免疫蛍光染色を行った。軸索マーカーとしてリン酸化型ニューロフィラメント H (pNF-H) と、神経細胞マーカーとして MAP2 を 2重染色した。蛍光顕微鏡 (BX61/DP70システム, オリンパス) にて画像を取得し、軸索の長さを Neurocyte 画像解析ソフトで測定するとともに、Image J 画像解析ソフト上で神経細胞の数を測定し、神経細胞あたりの軸索の長さを算出した。

3) 脊髄損傷マウスの運動機能障害に対する生薬エキスの改善作用

ddY マウス（雌性, 8 週齢）の第11胸椎を切除し、露出させた脊髄に6.5 g の錘を 3 cm の高さから 1 回落下させ圧挫損傷モデルを作製した。損傷 1 時間後に初回, その翌日から 1 日 1 回, 生薬水エキス (300 mg/kg, 経口) の投与を30日間行った。マウスの後肢運動機能の評価は10段階の BMS スコアと, 5 段階の BSS スコアにより行った。その後, マウスを麻酔下に還流固定し脊髄を摘出した。連続矢状断切片を作製し, 免疫組織染色を行った。縫線脊髄路の可視化には, serotonin (5-HT) 抗体を用い, 同時に astrocyte マーカーの GFAP 抗体, コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) マーカーの CS56抗体を用いた三重染色を行った

【実験結果】

マウス大脳皮質神経細胞を用いて, CSPG 基質上の軸索形成に対する生薬水エキスの効果を検討した。実験は 3 回実施し, その平均値によって評価した。通常の poly-D-lysine コーティング上の培養時と比較して, CSPG 基質上で培養した場合, 軸索長は有意に短くなった。6 日間, 110 種類の生薬水エキスを, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ になるように処置し軸索が有意に伸展するかどうかを検討した結果, 苦参 (10 $\mu\text{g/ml}$), 牛膝 (10 $\mu\text{g/ml}$), 連翹 (1 $\mu\text{g/ml}$) に軸索長促進作用が認められた。

そこで次に, 苦参, 牛膝, 連翹の各エキスを, 脊髄損傷マウスに経口投与し, 30 日間の後肢運動機能の評価した。溶媒投与群と比較して, 苦参エキス投与によって BMS スコア (薬物 x 経過日数の間の交互作用: $F(18, 576) = 3.143, P < 0.0001$) と BSS スコア (薬物 x 経過日数の間の交互作用:

F (18, 576) = 4.455, P < 0.0001) が有意に改善した。また、連翹エキス投与によっても、BMS スコア (薬物 x 経過日数の間の交互作用 : F (18, 504) = 2.618, P = 0.0003) と BSS スコア (薬物 x 経過日数の間の交互作用 : F (18, 504) = 2.212, P = 0.0029) が有意に改善した。一方、牛膝エキス投与では、BMS スコア (薬物 x 経過日数の間の交互作用 : F (18, 612) = 1.004, P = 0.4533) と BSS スコア (薬物 x 経過日数の間の交互作用 : F (18, 612) = 1.427, P = 0.1122) とともに、溶媒投与群との差が見られなかった。現在、それぞれのマウスから脊髄組織を摘出し、免疫組織染色により軸索形成の程度を検討している。

これらの検討と並行させて、苦参、牛膝、連翹の各水エキスから、分画を作製し (共同研究者・紺野の項)、CSPG 基質上の軸索形成に対する作用を検討中である。

【考察】

昨年度の研究においては、人参 (栃本天海堂)、黄耆 (栃本天海堂)、刺五加 (栃本天海堂)、桂枝朮 (中国江西省) について、初代培養大脳皮質神経細胞での CSPG 濃度勾配上における軸索伸展作用を検討し、桂枝朮水エキスに活性を見出した。しかし、その伸展活性はあまり強くなく、脊髄損傷モデルマウスでの効果を期待することが難しいと考え、あらためて110種類の生薬を対象に、細胞でのスクリーニングを行った。結果として、CSPG 上での軸索伸展阻害を乗り越える活性が、苦参、牛膝、連翹に見出された。さらに苦参と連翹エキスは、脊髄損傷マウスの後肢運動麻痺を改善させる作用を示した。現在、苦参および連翹中の活性成分の特定と、それらの作用機序について検討している。これらの検討により、脊髄損傷治療薬の新たなシーズの提案が可能になるものと考えている。同時に、苦参と連翹を構成生薬とした新たな漢方方剤を作製し、脊髄損傷マウスに投与する実験を実施し、単独の生薬エキスでの作用と比較して、相加・相乗作用が期待できないかも検討する予定である。また今回の研究結果より、CSPG 上での軸索形成の活性が、脊髄損傷後の運動機能改善活性をある程度予測できることも示された。よって、この実験系を、薬物や活性化合物のスクリーニングに有効に利用するとともに、薬物の作用機序の解明にも積極的に利用できると考えている。

【参考文献】

- 1) Kronvall E, Sayer FT, Nilsson OG. Iprednisolone in the treatment of acute spinal cord injury has become more and more questioned. *Lakartidningen*. 2005 ; 102 (24-25) : 18871888,
- 2) Pereira JE, Costa LM, Cabrita AM, Couto PA, Filipe VM, Magalhães LG, Fornaro M, Di Scipio F, Geuna S, Mauricio AC, Varejão AS. Methylprednisolone fails to improve functional and histological outcome following spinal cord injury in rats. *Exp Neurol*. 2009 ; 220 (1) : 71-81.
- 3) Kumagai G, Okada Y, Yamane J, Nagoshi N, Kitamura K, Mukaino M, Tsuji O, Fujiyoshi K, Katoh H,

- Okada S, Shibata S, Matsuzaki Y, Toh S, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. Roles of ES cell-derived gliogenic neural stem/progenitor cells in functional recovery after spinal cord injury. *PLoS One*. 2009 ; 4 (11) : e7706.
- 4) Tsuji O, Miura K, Okada Y, Fujiyoshi K, Mukaino M, Nagoshi N, Kitamura K, Kumagai G, Nishino M, Tomisato S, Higashi H, Nagai T, Katoh H, Kohda K, Matsuzaki Y, Yuzaki M, Ikeda E, Toyama Y, Nakamura M, Yamanaka S, Okano H. Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 ; 107 (28) : 12704-12709.
- 5) Rolls A, Shechter R, Schwartz M. The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat Rev Neurosci*. 2009; 10 (3) : 235-241.
- 6) Tohda C, Kuboyama T. Current and future therapeutic strategies for functional repair of spinal cord injury. *Pharmacol Ther*. 2011 ; 132 (1) : 57-71.
- 7) Teshigawara K, Kuboyama T, Shigyo M, Nagata A, Sugimoto K, Matsuya Y, Tohda C. A novel compound, denosomin ameliorates spinal cord injury via axonal growth associated with astrocyte-secreted vimentin. *Br J Pharmacol*. 2013 ; 168 (4), 903-919.

Ⅱ－２ 脊髄損傷に有効な和漢薬の活性成分の同定

富山大学・和漢医薬学総合研究所・和漢薬製剤開発分野

客員教授 紺野勝弘

【研究の目的とその背景】

脊髄損傷に対する薬物療法について、多くの研究が行われているが、未だ有効な治療法は確立されていない¹⁾。たとえば、臨床的対処としてステロイド剤の大量投与が試みられているが、その有効性は疑問視されている。また、胚性幹細胞 (ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を応用した再生医療が有望視され、基礎研究が進められているが、実用化には更なる研究の進展を待たなければならない。このような現状の中、本研究代表者の東田らは、伝統薬物成分が脊髄損傷改善の有効な薬剤になり得る可能性を示している。東田らは、和漢生薬をはじめとした伝統薬物の神経変性疾患改善作用に関する基礎研究を積み重ねてきているが²⁾、その一環として、アユルベーダ薬物である Ashwagandha (インド人参, *Withania somnifera* の根) に含まれるステロイドサポニン Withanoside IV が、記憶障害改善作用と共に脊髄損傷マウスの運動機能を回復させる効果があることも明らかにした³⁾。

これらの結果から、和漢生薬は脊髄損傷改善に有効な薬物素材と考えられるが、これまでその観点からの研究は行われていない。そこで、本研究では、各種和漢生薬エキスを対象にして脊髄損傷改善作用の薬理活性を検討し、活性成分の同定と作用機序の分子的解明を目指す。

昨年度、4種の和漢生薬エキス(人参, 黄耆, 刺五加, 桂枝朮)について薬理活性試験(大脳皮質神経細胞における神経突起伸展作用, プロテオグリカン濃度勾配を持つ軸索終末部における軸索再生活性)を行い、有意の活性を示すことがわかった。そこで今年度、対象を広げて110種の和漢生薬エキスについてスクリーニングを行なったところ、3種(苦参, 牛膝, 連翹)に強い軸索再生活性が認められた。さらに、うち2種(苦参, 連翹)は、脊髄損傷マウスの運動機能を有意に回復させた(東田, 久保山の報告参照)。これら3種の生薬エキスの活性成分同定を目指し、溶媒による分画を行ない、各分画の成分プロファイルをLC-MSにより検討した。

【実験方法】

1. 和漢生薬エキスの溶媒分画

生薬約45 gを秤量した後、水900 mLを加え、煎じ器(ウチダ和漢薬製)を用いて抽出した。溶媒が沸騰するまで強火で加熱し(10~15分)、その後とろ火で計1時間になるように加熱した。茶こしでろ過した後、熱時綿栓ろ過し、ろ液を室温まで放冷後、凍結乾燥。得られた粗抽出物を300 mLの

水に溶かし、酢酸エチル (100 mL x 2) で抽出。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧で留去して、酢酸エチル分画を得た。水層にアンモニア水を加えて塩基性とし (pH~10)、クロロホルム (100 mL x 2) で抽出。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧で留去して、アルカロイド分画を得た。残った水層を凍結乾燥し、水分画を得た。

2. LC-MS 分析

PDA 検出器付 Accela HPLC システム (Thermo Scientific) と ESI プローブ付 LTQ Orbitrap XL ETD (Thermo Scientific) をタンデムにつないだ LC-MS システムを用いた。検出はフォトダイオードアレイと MS の同時検出。

i) サンプル調製

凍結乾燥した水分画を純水に溶解し、フィルターでろ過し、LC-MS 用サンプルとした。乾燥した酢酸エチルおよびアルカロイド分画は、50%メタノール水に溶解し、同様にフィルターでろ過し、LC-MS 用サンプルとした。すべてのサンプルは 5 mg/mL の濃度になるよう調製し、その 10 μ L を LC に注入した。

ii) LC 条件

カラム：CAPCELL PAK C18 MGIII (資生堂), 5 μ m, 1.5 mm x 150mm

カラム温度：25 $^{\circ}$ C

移動相：A 液 (0.1%ギ酸/水), B 液 (0.1%ギ酸/アセトニトリル)

溶離条件：直線濃度勾配によるグラジエント (10 \rightarrow 70%B/30分)

検出：全UV (200-600 nm)

流速：200 μ L/分

iii) MS 条件

ネブライザーガス：窒素 (30 psi, 10 L/分, 350 $^{\circ}$)

測定範囲：50-2000 amu

検出：正イオンモード

【結果】

1. 和漢生薬エキスの溶媒分画

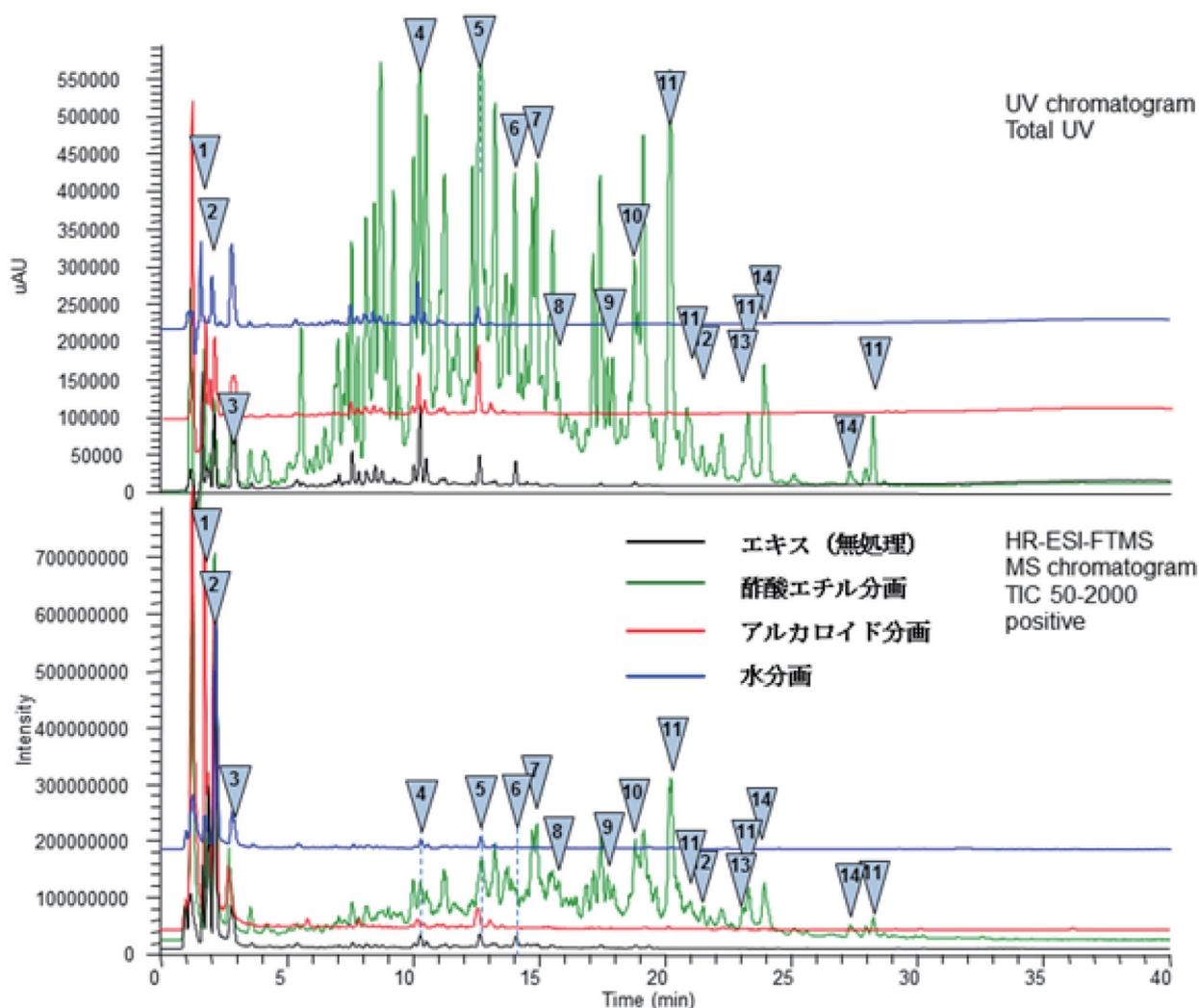
結果を以下の表に示す。牛膝が最も収量が高く、他 2 種の 5 倍近い。アルカロイド分画の収量も高い。しかし、いずれも水分画が最も多く、80-90%を占める。酢酸エチル分画の収量は非常に低いが、連翹だけアルカロイド分画より多いのが特徴的である。現在、各分画の活性を試験中。

各生薬エキスからの溶媒分画による収量

	苦参		牛膝		連翹	
	収量 mg	比率 %	収量 mg	比率 %	収量 mg	比率 %
酢酸エチル分画	57	2	189	1	319	10
アルカロイド分画	425	15	3040	20	88	3
水分画	2411	83	12016	79	2667	87
計	2893		15245		3074	

2. LC-MS 分析

例として、苦参の L-MS プロファイルを示す。



酢酸エチル分画に多くの成分が移行し、MS および MSMS 解析によって、以下に示す14種の化合物が同定できた。

No.	化合物名	計算値 [M+H] ⁺	実測値 [M+H] ⁺
1	Matrine/Isomatrine	249.1969	249.1960
2	Oxymatrine	265.1918	265.1909
3	9 α -Hydroxymatrine/Sophoranol	265.1918	265.1910
4	Kushenol O	563.1764	563.1755
5	Trifolirhizin	447.1291	447.1284
6	Trifolirhizin malonate	533.1295	533.1287
7	Kuraridinol/Kurarinol	457.2227	457.2217
8	Sophoraisoflavanone A	371.1495	371.1488
9	Norkurarinol /Kosamol O	443.2070	443.2064
10	Kushenol I/Kushenol N	455.2070	455.2062
11	Kurarinone/Kushenol C/Isokurarinone/Kuraridine	439.2121	439.2113
12	Sophoraflavanone B	341.1389	341.1380
13	Methoxykurarinone	453.2278	453.2262
14	Sophoraflavone G/ Sophoraflavanone C	425.1965	425.1955

現在、これらの情報をもとに、HPLC をはじめとした種々のクロマトグラフィーを用いて、活性成分の分離・精製を進めている。

【考察】

今回、110種の和漢生薬エキスのスクリーニングから、3種（苦参，牛膝，連翹）の活性の強いエキスを選び、溶媒分画および得られた分画のLC-MSによる成分プロファイル分析を行った。ここで得られた情報をもとに、活性成分を分離・精製し、活性物質を同定できれば、新しい和漢薬の展開、あるいは創薬への発展が期待できる。

【参考文献】

- 1) Tohda C. and Kuboyama T. Current and future therapeutic strategies for functional repair of spinal cord injury. *Pharmacol. Ther.* (2011) **132**, 57-71.
- 2) 東田千尋：伝統薬物による神経変性疾患の克服-治療薬開発と病態機序の解明に向けて-, 薬学雑誌 (2008) 128, 1159-1167.
- 3) Nakayama N. and Tohda C. Withanoside IV improves hindlimb function by facilitating axonal regrowth and increase in peripheral nervous system myelin level after spinal cord injury. *Neurosci. Res.* (2007) **58**, 176-182.

Ⅱ－３ 細胞接着班形成制御を機序とする脊髄損傷治療薬の開発

富山大学・和漢医薬学総合研究所・神経機能学分野

助教 久保山 友晴

【研究目的と背景】

脊髄損傷などで中枢神経組織が損傷を受けると、損傷部位周辺で活性化アストロサイトが凝集し、グリア性癍痕が形成される。断裂した神経軸索はグリア性癍痕を越えて再生することができない。そのため、脊髄損傷では下肢麻痺などの機能障害が永続する。1928年 Cajal は、脊髄損傷部位（グリア性癍痕形成部）近傍で軸索終末部が膨腫した球状体を呈して伸長が停止することを発見し、これを dystrophic endball と名づけた。Dystrophic endball の形成が軸索再生不全の原因だと考えられているが、未だにその分子的基盤は明らかになっていない。一方、グリア性癍痕内では活性化アストロサイトから阻害因子のコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) が分泌され、これが濃度勾配を形成して沈着し、軸索再生を阻害する主たる原因の一つとなっている (Davies et al, 1999)。Case Western Reserve 大学 Silver 博士の研究室では、CSPG 濃度勾配を形成した培養皿上で後根神経節神経細胞を培養することにより、dystrophic endball を再現した (Tom et al, 2004)。これにより、CSPG による軸索再生不全を dystrophic endball 形成の視点から解析する妥当性が示唆された。本培養系を用いることにより、dystrophic endball の分子的基盤の解析が容易になり、これまで未解決であった“CSPG による軸索再生阻害の機序”の解明を大きく進めることができる。

私はこれまでに、前述した dystrophic endball の形成を再現する培養系を用いて大規模な薬物スクリーニングを行なった結果、プロテインキナーゼ A (PKA) 阻害剤を処置することにより、dystrophic endball が前方への移動を再開することを初めて明らかにした。次に、細胞運動能に重要な役割を果たす細胞接着斑（細胞-基質間の結合形成部）の構成分子である paxillin が PKA 阻害によってリン酸化され、これにより細胞接着斑のダイナミクスが亢進し、結果として dystrophic endball が CSPG 濃度勾配上で前方移動を再開することを明らかにした（投稿中）。

そこで私は、脊髄損傷下で再生不全に陥った軸索終末部の細胞接着斑の形成を制御することができれば、軸索再生が誘発され、脊髄損傷を治療することができるのではないかと考えた。そこで、細胞接着斑の形成制御作用を有する生薬及びその成分を同定し、その薬理作用を解析することにより、新たな脊髄損傷治療薬を開発することを目指している。本目標を達成するためには、CSPG 濃度勾配を検知し、細胞接着斑の形成を制御する鍵となる paxillin リン酸化の制御機構を解明することも重要となる。昨年度までに久保山は、p21-activated kinase (PAK) が paxillin をリン酸化して CSPG 濃度勾配

上の軸索再生を促進することを明らかにした。PAK は PKA によってリン酸化されることによって不活性化されることが報告されている (Howe and Juliano, 2000)。以上のことから、CSPG 濃度勾配上の dystrophic endball では PKA が活性化しているため PAK が不活性化し、paxillin のリン酸化が抑制されているのではないかと考えた。そこで本年度は、dystrophic endball における PKA の活性を検討した。

【実験方法】

1. 細胞培養

Tom らの方法 (Tom et al, 2004) に準じて、培養皿上に CSPG の濃度勾配を作製した。次に成体ラットより後根神経節神経細胞を単離し、CSPG 濃度勾配を形成させた培養皿あるいは 10 μ g/ml laminin をコートした培養皿上に播種し、2% B-27 (Invitrogen) を含む Neurobasal A 培地 (Invitrogen) を用いて 37°C, 5% CO₂ 条件下で培養した。

2. 免疫染色

培養 2 日後、戸島らの方法 (Tojima et al, 2007) に準じて細胞を固定した。実験1では、固定 5 分前に 20 μ M forskolin (Sigma) あるいは溶媒を処置した。続いて PKA regulatory domain II (PKA RII) を認識するマウスモノクローナル抗体 (1:400, BD Biosciences) 及び PKA RII の 96 番目のセリン残基のリン酸化 (pS⁹⁶ PKA RII) を特異的に認識するウサギモノクローナル抗体 (1:200, Epitomics) を 1 次抗体として用い、Alexa Fluor 488 結合型抗マウス IgG 抗体 (1:400, Invitrogen) 及び Alexa Fluor 594 結合型抗ウサギ IgG 抗体 (1:400, Invitrogen) を 2 次抗体として用い、免疫染色を行った。倒立蛍光顕微鏡 (Axio Observer Z1, Carl Zeiss) を用いて蛍光画像を取得した。軸索終末部における蛍光強度は AxioVision software (Carl Zeiss) を用いて定量した。

【実験結果】

1. 軸索終末部における PKA 活性の可視化

PKA は 2 つの catalytic subunit と 2 つの regulatory subunit (RI・RII) から構成される。RI と RII は catalytic subunit のキナーゼ活性を阻害する (Taylor et al, 1990)。cAMP が RI・RII に結合すると、RI・RII が catalytic subunit と解離し、catalytic subunit のキナーゼ活性が賦活化する。RII の 96 番目のセリン残基は自己リン酸化すると、cAMP 依存性の catalytic subunit と RII の解離が促進され、catalytic subunit のキナーゼ活性が賦活化する (Granot et al, 1980; Erlichman et al, 1983)。そのため、RII の 96 番目のセリン残基のリン酸化 (pS⁹⁶ PKARII) を認識する抗体を用いて PKA の活性化を検出する手法が既に報告されている (Mizuno et al, 2002)。そこで私は、pS⁹⁶ PKARII に対する抗体を用い、神経

軸索終末部における PKA の活性を蛍光免疫染色法により可視化する実験を行った。均一な laminin 基質上で後根神経節神経細胞を 2 日間培養した後、アデニル酸シクラーゼ賦活薬 forskolin (cAMP の産生を増加させることによって PKA を活性化する) あるいは溶媒を処置した。その後、pS⁹⁶ PKA RII に対する抗体及び PKA RII に対する抗体を用いて免疫染色を行った。軸索終末部における蛍光強度を定量した結果、forskolin 処置群では pS⁹⁶ PKA RII の発現量が溶媒処置群に比べて有意に増加していた。一方、PKA RII の発現量は forskolin 処置群と溶媒処置群の間で有意な差はなかった。また各軸索終末部において、pS⁹⁶ PKA RII の発現量に対する PKA RII の発現量の比を算出した結果、forskolin 処置群では溶媒処置群に比べて有意に増加していた。以上のことから、軸索終末部においても PKA が活性化する時に PKA RII の96番目のセリン残基のリン酸化が増加することが明らかになった。

2. Dystrophic endball における PKA の活性

CSPG 濃度勾配基質あるいは laminin 基質上で培養した神経細胞の軸索終末部における PKA の活性を評価した。CSPG 濃度勾配上で培養した神経細胞の軸索終末部 (dystrophic endball) では、pS⁹⁶ PKA RII の発現量及び pS⁹⁶ PKA RII の発現量に対する PKA RII の発現量の比が、laminin 基質上の軸索終末部に比べて有意に増加した。一方 PKA RII の発現量は、いずれの基質上の軸索終末部でも有意な差が見られなかった。

【考察】

これまでの研究結果から、CSPG 濃度勾配上の dystrophic endball では PKA の活性が増加していることが示された。以前の久保山の研究で、PKA 阻害剤処置により CSPG 濃度勾配上の dystrophic endball が前方への移動を再開することを明らかにしており、PKA の活性化が軸索再生不全の要因となっている可能性が高い。CSPG 濃度勾配の下流シグナルを解析した研究はこれまでにほとんどなく、PKA の活性化が含まれることを示したのは本研究が初めてである。今後は CSPG 濃度勾配を検知する受容体を含めた PKA 活性化の機序を明らかにしていく予定である。そして CSPG 濃度勾配上で細胞接着班の形成を制御して軸索再生不全となる一連の分子機序を解明し、軸索再生誘発に重要となる分子を決定する。さらにその分子の活性を制御する薬物を本研究班の紺野博士と協力して生薬及びその成分中から見出し、本研究班の東田博士と協力して脊髄損傷モデル動物を用いた活性薬物の解析を行う予定である。

【参考文献】

Davies SJ, Goucher DR, Doller C, Silver J. Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *J Neurosci*, 19 : 5810-5822, 1999.

- Erlichman J, Rangel-Aldao R, Rosen OM. Reversible autophosphorylation of type II cAMP-dependent protein kinase: distinction between intramolecular and intermolecular reactions. *Methods Enzymol*, 99 : 176-186, 1983.
- Granot J, Mildvan AS, Kaiser ET. Studies of the mechanism of action and regulation of cAMP-dependent protein kinase. *Arch Biochem Biophys*, 205 : 1-17, 1980.
- Howe AK, Juliano RL. Regulation of anchorage-dependent signal transduction by protein kinase A and p21-activated kinase. *Nat Cell Biol*, 2 : 593-600, 2000.
- Mizuno M, Yamada K, Maekawa N, Saito K, Seishima M, Nabeshima T. CREB phosphorylation as a molecular marker of memory processing in the hippocampus for spatial learning. *Behav Brain Res*, 133 : 135-41, 2002.
- Tojima T, Akiyama H, Itofusa R, Li Y, Katayama H, Miyawaki A, Kamiguchi H. Attractive axon guidance involves asymmetric membrane transport and exocytosis in the growth cone. *Nat Neurosci*, 10 : 58-66, 2007.
- Tom VJ, Steinmetz MP, Miller JH, Doller CM, Silver J. Studies on the development and behavior of the dystrophic growth cone, the hallmark of regeneration failure, in an in vitro model of the glial scar and after spinal cord injury. *J Neurosci*, 24 : 6531-6539, 2004.
- Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W. cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem*, 59 : 971-1005, 1990.

Ⅲ. 「飲む目薬」の開発：血液網膜関門 novel カチオン輸送担体の薬物認識機構を応用したドラッグデリバリーシステム

富山大学・大学院医学薬学研究部 薬剤学研究室 教授 細谷 健一

【各班のまとめ】

背景・目的

糖尿病網膜症や加齢黄斑変性症，緑内障などの眼疾患は加齢が危険因子である。高齢化が進んでいる現代において，これら疾患の治療法確立は急務である。*In vitro* 薬理試験によって，これら眼疾患に対する創薬シーズは見いだされてきているものの，末梢投与にて効果を示す薬物の開発はほとんど進んでおらず，眼球内投与などが適応されている。眼球内への薬物投与は患者への負担が大きいことから，眼疾患の効果的な治療と罹患者のquality of lifeを共に満たすためには末梢投与による投与戦略構築が必須である。末梢投与された薬物の網膜への移行は，両コンパートメントを隔てる血液網膜関門（BRB）によって制限されていることから，BRBを介した循環血液から網膜への突破法確立は，末梢投与による眼疾患治療戦略構築に繋がる。

本課題は，課題申請当初に見いだされた「BRBに存在する verapamil を選択的に認識する輸送機構」について，輸送分子の特徴と実体，そして本分子の薬物認識特性解明を目的としている。そして，薬物認識プロファイルに基づく薬物誘導体化を実施による網膜移行性の向上，すなわち本機構を応用した網膜へのドラッグデリバリー法確立を達成目標としている。本課題二年目においては本カチオン輸送機構の特性を精査すると共に薬物認識特性を評価した。さらに，本輸送機構の候補分子となりうるオーファントランスポーターのBRBにおける発現を解析すると共に，open reading frame（翻訳領域）をクローニングし，薬物等の輸送機能を評価した。また，効率的な薬物誘導体化を実施するため，塩基性官能基修飾法について検討した。

初年度の研究成果および結論

細谷班は内側血液網膜関門（inner BRB）において verapamil 輸送に関与する「分子実体が明らかにされていない輸送担体」について，初年度に得られた成果を元として，機能的評価を実施した。循環血液と脳を隔てる関門である血液脳関門（BBB）において，古典的 H₁ アンタゴニストである pyrilamine のインフラックス輸送に関与する機構の存在が報告されている（参考文献#1）。そこで，本輸送機構との同一性を inner BRB モデル細胞株である条件的不死化ラット網膜毛細血管内皮細胞株（TR-iBRB2

細胞)を用いて評価した。また, verapamil 輸送に対し強力な阻害効果が示された propranolol についても TR-iBRB2 細胞における輸送を解析し, verapamil 輸送との同一性を検証した。輸送解析の結果, verapamil の輸送特性は pyrilamine や propranolol とは異なることが示され, 内側血液網膜関門 novel カチオン性薬物輸送機構は血液脳関門に存在する pyrilamine 輸送機構とは異なる, 全く新しい機構であることが示唆された。なお, 本成果の一部は Pharmaceutical Research に投稿し, 2013年に掲載の予定である(参考文献#2)。

赤沼班は verapamil 及び propranolol をプローブ薬物とし, 抗炎症薬などの血液網膜関門 novel 輸送機構認識性を評価した。その結果, 内側血液網膜関門 novel カチオン性薬物輸送機構はカチオン性官能基を有する抗炎症薬は認識しないことが示唆された。一方, その他薬物の認識傾向を評価したところ, 非イオン帯電性官能基(1-3級アミン)を有する化合物について, 水-オクタノール分配係数(Log D)値と認識性の指標(阻害率)との相関が示され, 薬物誘導体化に向けての指標が得られた。

久保班は初年度から継続して血液網膜関門 verapamil 認識型輸送担体の分子実体解明を実施している。BRBは網膜毛細血管内皮細胞を実体とする inner BRB と網膜色素上皮(RPE)細胞を実体とする外側血液網膜関門(outer BRB)の2つで構成されている。Outer BRBにおいても verapamil 認識性輸送担体の存在が示唆されていることから, ラット初代培養 RPE 細胞における mRNA 発現解析を実施し, 候補分子の幅を広げた。その結果, 候補分子として inner BRB と outer BRB 両方に, または片方に発現する solute carrier (SLC) トランスポーターとして6分子を, 細菌類ホモログ分子として8分子を新たに候補分子として選定した。初年度に決定した分子を含め, 計14分子について ORF を単離し, 候補分子 Xenopus Laevis 卵母細胞発現系を構築した。本卵母細胞発現系における verapamil 輸送機能を評価した結果, verapamil 輸送機能を有したのは7分子であった。これらの分子は BRB において verapamil インフラックス輸送に関与する可能性があり, その寄与を今後明らかにする予定である。

松谷班はパスポート構造として 1,2-ジアゼピン誘導体について, 一般性の高い新合成法の確立を実施した。ヨードベンゼン誘導体を出発物質とし, 原料化合物となる, 各種置換シクロブテノン誘導体の合成を行い, 良好な収率で得ることに成功した。本化合物のなかで 3-(4-tolyl)cyclobutenone を原料として 1,2-ジアゼピン環形成反応について条件検討を行った結果, 収率として最大85%を達成したが, エノール型ジアゼピンとイミン型ジアゼピンの生成比は82:18であった。なお, エノール型ジアゼピンとイミン型ジアゼピンの生成比が 1:1 となる反応について最大収率は73%であった。上記検討にて見出された最適条件にて, 各種置換シクロブテノンを原料として反応の一般性を検証した結果, エノール型ジアゼピンの生成比が高い割合であるものの, 様々な置換誘導体の収率は59-84%と概ね良好であった。以上の検討を基に, エノール型ジアゼピンのみを高収率で得る方法, そしてエノール型ジアゼピンをイミン型ジアゼピンへ異性化させる条件についても検証した。その結果, 反応条件の最適化に成功し, それぞれを単一生成物として得ることが可能となった。

以上のように、血液網膜関門 novel カチオン性薬物輸送担体について、その化合物認識特性が明らかとなり、分子実体の探索および機能評価の戦略に一定の目処が立った。さらに、環状アミン化合物として中枢神経系への移行性が高い、1,2-ジアゼピン誘導体合成について、生成比等の調節が可能な方法を確認した。抗血管新生薬や抗炎症薬など網膜への移行性が熱望される薬物について、novel カチオン性薬物輸送担体認識性が非常に低いことも明らかになったことから、今後は網膜移行性を向上させるための誘導体化戦略を構築すると共に、分子実体の同定とその重要性の解明に着手する予定である。

【参考文献】

1. Okura T, Hattori A, Takano Y, Sato T, Hammarlund-Udenaes M, Terasaki T, Deguchi Y; Involvement of the pyrilamine transporter, a putative organic cation transporter, in blood-brain barrier transport of oxycodone., *Drug Metab. Dispos.*, 36, 2005-13 (2008)
2. Kubo Y, Kusagawa Y, Tachikawa M, Akanuma S, Hosoya K; Involvement of a Novel Organic Cation Transporter in Verapamil Transport Across the Inner Blood-Retinal Barrier., *Pharm. Res.*, *in press*.

Ⅲ－1 血液網膜関門 novel カチオン輸送担体特性に基づいた 投与法の確立とドラッグデザイン

富山大学・大学院医学薬学研究部 薬剤学研究室 教授 細谷 健一

【研究の背景と目的】

本研究計画の最終到達目標は verapamil を認識する novel カチオン輸送機構の特徴を応用し、加齢性黄斑変性症などの治療薬を送達することである。申請者は初年度までの研究成果から、血液網膜関門 (BRB) を介した循環血液中から網膜への verapamil 移行性は脳と比較し非常に高く、その過程には既報の有機カチオントランスポーターである OCT や OCTN, MATE, PMAT とは異なる輸送機構が関与する可能性を見いだしている。一方、この輸送は古典的 H₁ アンタゴニストである pyrilamine や β-ブロッカーである propranolol によって阻害されていた。Pyrilamine について、血液脳関門 (BBB) における pyrilamine を基質とする分子実体不明の未知トランスポーターの存在が示されている (参考文献 #1)。Propranolol は脳への移行性が高い薬物であり、既報のトランスポーターでは説明の付かない pyrilamine の他に鎮痛剤 naloxone の脳移行を阻害することが報告されている (参考文献 #2)。従って、BRB に存在する verapamil トランスポーターの特性を明らかにする上で、pyrilamine と propranolol 輸送機構との比較することは重要である。本年度は、BRB を介した pyrilamine と propranolol の輸送特性を詳細に解析し、verapamil 輸送特性との同一性と相違性を評価した。

【実験手法】

(A) TR-iBRB2 細胞の培養

In vitro inner BRB モデル細胞として、条件的不死化ラット網膜毛細血管内皮細胞株 (TR-iBRB2) 細胞を用いた。TR-iBRB2 細胞は立ち上げてから少なくとも 2 回継代し、細胞形態および増殖速度に大きな変化がないことを確認後、実験に用いた。

(B) TR-iBRB2 細胞における [³H]pyrilamine および [³H]propranolol 輸送解析

Collagen I-coated 24-well plate に TR-iBRB2 細胞を 1.0×10^5 cells/well となるように播種し、33°C の加湿された 5% CO₂/95% air インキュベーターにて 48 時間培養した。細胞が confluent の状態になっていることを確認し、取り込み解析に用いた。

トレーサー溶液は、[³H]pyrilamine もしくは [³H]propranolol (PerkinElmer Life & Analytical Sciences)

を0.5 $\mu\text{Ci/mL}$ となるように extracellular fluid (ECF) buffer (122 mM NaCl, 25 mM NaHCO_3 , 3 mM KCl, 1.2 mM MgSO_4 , 0.4 mM K_2HPO_4 , 10 mM D-glucose, 1.4 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES, pH 7.4) に溶解させたものを用いた。細胞を培養させた24-well plateを37°Cに維持し、培養 medium を除去した。ECF buffer (37°C) にて細胞を3回洗浄し、トレーサー溶液を200 μL 加えた。指定時間経過後、トレーサー溶液を除き、氷冷 ECF buffer で3回細胞を洗浄した。NaOH 水溶液 (1 N) を400 μL 加え、室温で12時間処理することで細胞を可溶化させ、1 N HCl を400 μL 加え中和させた。この中和液の一部を Monofluor (National Diagnostics Inc.) へ移し、液体シンチレーションカウンター (LSC-5200; Aloka) にて放射活性を測定した。また、bovine serum albumin を標準とし、DC Protein assay kit (BIO-RAD) を用い、可溶化液中のタンパク質量を測定した。

細胞内への ^3H 薬物取り込み輸送は cell/medium ratio で表した (Eq. 1)。

$$\text{Cell/medium ratio } (\mu\text{L}/\text{mg protein}) = \frac{[^3\text{H}]\text{Compound concentration in the cell (dpm/mg protein)}}{[^3\text{H}]\text{Compound concentration in the medium (dpm}/\mu\text{L})} \quad \dots[\text{Eq. 1}]$$

^3H 薬物の TR-iBRB2 細胞への輸送に対する最大取り込み速度 (V_{max} , $\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg protein})$) 及び Michaelis-Menten 定数 (K_m , μM) は、基質濃度 ($[\text{S}]$, μM) に対する薬物輸送速度 (v) のプロットから、非線形最小二乗法プログラム (MULTI) を用いて解析した。

(C) Retinal uptake index 法

ラット (雄性, Wistar 系統, 6 週齢) にペントバルビタールを腹腔内投与した (50 mg/kg)。トレーサー溶液 (1-5 $\mu\text{Ci}/\text{injectate}$ ^3H propranolol and 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{injectate}$ ^{14}C n-butanol in Ringer-HEPES buffer (pH 7.4)) を総頸動脈へ瞬時に200 μL 投与し、15秒後断頭し、速やかに網膜及び脳を採取した。採取した組織は2 N NaOH にて可溶化後、液体シンチレーションカクテル (Hionic-Fluor) を加え、液体シンチレーションカウンター (AccuFLEX LSC-7400, Aloka) にて放射活性を測定した。Retinal uptake index (RUI, %) および brain uptake index (BUI, %) は Eq. 1 から算出した。

$$\text{RUI, BUI } (\%) = \frac{[^3\text{H}]/[^{14}\text{C}] \text{ radioactivity ratio in the retina or brain}}{[^3\text{H}]/[^{14}\text{C}] \text{ radioactivity ratio in injectate}} \times 100 \quad \dots [\text{Eq. 1}]$$

(D) データ解析

実験データは平均値 \pm 標準誤差 (Mean \pm S.E.M.) で表した。比較検定には2群間の比較の場合には、unpaired Student's t-test を用いて有意差を検定した。3群間以上の場合には one-way analysis of variance (ANOVA) で分散分析を行い、Dunnett's Test もしくは Tukey's Multiple Comparisons Test によって多重比較を行った。

【結果・考察】

A. TR-iBRB2 細胞における $[^3\text{H}]$ pyrilamine 輸送と本細胞への $[^3\text{H}]$ verapamil 輸送との比較

TR-iBRB2 細胞における $[^3\text{H}]$ pyrilamine 取り込み輸送は少なくとも1分まで直線性を示した。その取り込み輸送は 4°C において約50%，非標識 pyrilamine 共存下 ($500\ \mu\text{M}$) において58%それぞれ低下した。TR-iBRB2 細胞への pyrilamine 輸送の濃度依存性を検証した結果，高親和性 ($K_{m,1} = 20.2 \pm 4.4\ \text{M}$; $J_{\max,1} = 0.837 \pm 0.179\ \text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{mg protein})$) と低親和性 ($K_{m,2} = 252 \pm 6\ \mu\text{M}$; $J_{\max,2} = 22.3 \pm 0.8\ \text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{mg protein})$) の2相を示した。以上の結果から，inner BRB における pyrilamine 輸送は担体介在型であり，その機構は高親和性と低親和性の2種類であることが示唆された。BBB における pyrilamine 輸送について，BBB モデル細胞である条件的不死化ラット脳毛細血管内皮細胞株 (TR-BBB13 細胞) への pyrilamine 輸送の K_m 値は $28\ \mu\text{M}$ と報告されており (参考文献 #1)，TR-iBRB2 細胞における高親和性 pyrilamine 輸送の K_m 値と近似している。TR-iBRB2 細胞には BBB に存在する pyrilamine 輸送機構の他にもう一つの低親和性輸送機構が存在することが示唆された。

TR-iBRB2 細胞への pyrilamine と verapamil の輸送特性について比較した。細胞外 pH 依存性を評価した結果，pH 7.4条件下における取り込みと比較し，pH 6.4条件下では両薬物共に変動しなかったものの，pH 8.4条件下において $[^3\text{H}]$ pyrilamine の輸送は有意に上昇した (Fig. 1)。各種薬物・化合物共存下 ($500\ \mu\text{M}$) において TR-iBRB2 細胞への $[^3\text{H}]$ pyrilamine 取り込み輸送を評価した結果，OCTN2 の基質である L-carnitine は $[^3\text{H}]$ verapamil 輸送を阻害したものの， $[^3\text{H}]$ pyrilamine 輸送は阻害しなかった (Fig. 2)。一方，その他の薬物・化合物について阻害スペクトルは類似していた。Pyrilamine と verapamil

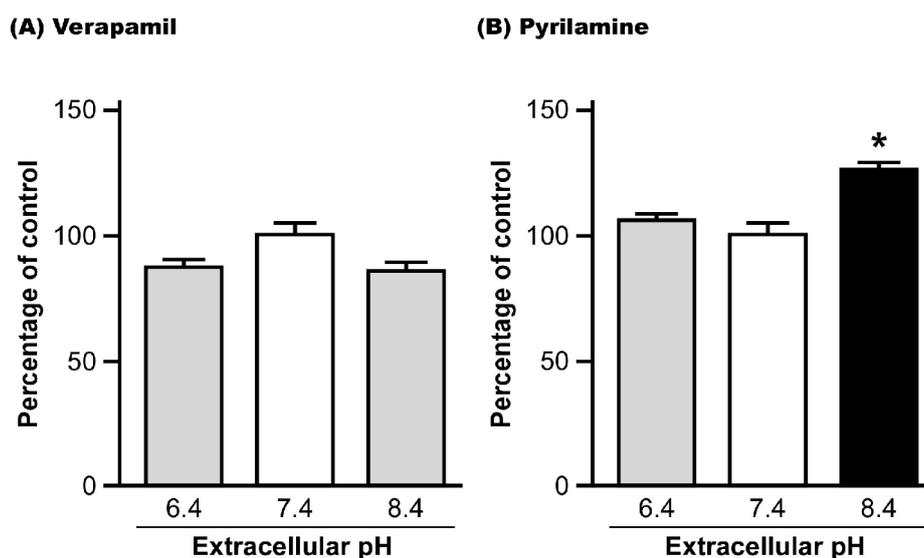


Figure 1 Effect of extracellular pH on uptake of $[^3\text{H}]$ verapamil (A) and $[^3\text{H}]$ pyrilamine (B) by TR-iBRB2 cells.

Extracellular pH-dependence of drugs' uptake was examined at 37°C for 3 min. Each column represents the mean \pm S.E.M. ($n=3-6$). * $p<0.01$, significantly different from the uptake at extracellular pH 7.4.

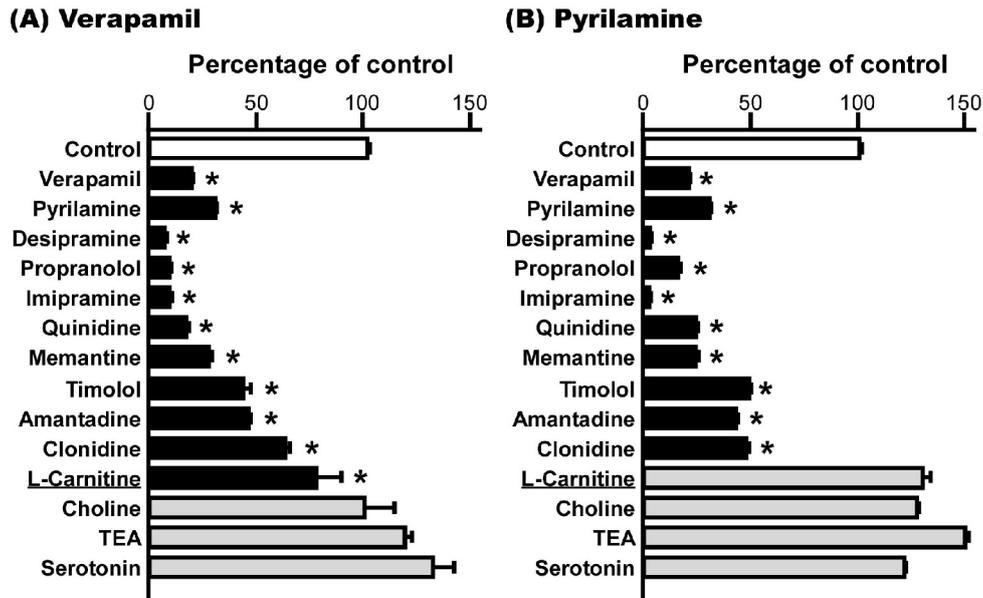


Figure 2 Effect of inhibitors on uptake of [³H]verapamil (A) and [³H]pyrilamine (B) by TR-iBRB2 cells. Uptake of these drugs was performed at 37°C for 3 min in the absence (control) or presence of inhibitors. Each bar represents the mean ± S.E.M. (n=3-6). **p*<0.01, significantly different from the control.

との輸送機構の同一性をさらに検証するため、verapamil 共存下における pyrilamine 輸送の濃度依存性解析と pyrilamine 共存下における verapamil 輸送の濃度依存性解析にて評価した。本結果から、TR-iBRB2 細胞への verapamil 輸送を pyrilamine は競合的に阻害するものの、TR-iBRB2 細胞への pyrilamine 輸送を verapamil は競合的に阻害しないことが示された。以上の結果から、inner BRB における pyrilamine 輸送機構は verapamil の輸送機構とは異なることが示唆された。

TR-iBRB2 細胞への [³H]propranolol 輸送についても比較検討を実施した。[³H]Propranolol の外部 pH 変動の影響を解析した結果、pH 7.4条件下と比較し、pH 6.4条件下において変動せず、pH 8.4条件下において有意に上昇した。また、500 μM L-carnitine 共存による阻害効果は示されず、それ以外の薬物について効果は verapamil および pyrilamine と同様であった。これらの結果は TR-iBRB2 細胞における [³H]propranolol 輸送が本細胞への pyrilamine 輸送と類似していることを示唆している。TR-iBRB2 細胞への propranolol 輸送について、verapamil と pyrilamine 輸送との同一性を検証した。Verapamil (200 μM) 共存下における濃度依存的な propranolol 輸送を Lineweaver-Burk plot した結果、非共存下における結果と y 軸上で交差せず、verapamil は propranolol 輸送を競合的には阻害しないことが示唆された。一方で、pyrilamine (200 μM) 共存下における濃度依存的な propranolol 輸送を Lineweaver-Burk plot した結果、非共存下における結果と y 軸上で交差し、その *K_i* 値は356 μM と算出された。本 *K_i* 値は TR-iBRB2 細胞における pyrilamine 輸送の低親和性輸送の *K_m* 値 (252 μM) と近似した。以上の結果を総合すると、inner BRB における propranolol 輸送は pyrilamine 輸送の低親和性輸送機構と同一ではあるものの、verapamil の輸送機構とは異なると考えられた。

B. *In vivo* BRB を介した [³H]propranolol 網膜移行特性と [³H]verapamil の移行性との比較

In vivo 環境下における [³H]propranolol の BRB 透過様式を解析し、 [³H]verapamil の BRB 透過様式と比較した。 [³H]Propranolol の RUI 値は非標識 propranolol (40 mM) および pyrilamine (40 mM) 共存下にて薬物非共存条件下 (コントロール) と比較し50%以上低下した。また、 verapamil (3 mM) 共存にて、 [³H]propranolol の RUI 値はコントロールと比較し27%低下した。一方、 choline (40 mM) 共存下とコントロールとの間に有意な変化は示されなかった。この阻害プロファイルは [³H]verapamil の RUI 法による実験結果と、 verapamil (3 mM) の効果を除き、類似していた。従って、 *in vivo* BRB を介した [³H]propranolol 輸送について、薬物感受性は BRB における verapamil 輸送と類似していることが示唆された。

[³H]Propranolol のBRB インフラックス輸送について、典型的な有機カチオン/アニオントランスポーター阻害剤の効果を検証した。OCT および OCTN の基質である tetraethylammonium (TEA) 共存 (40 mM) にて [³H]propranolol の RUI 値は、 コントロールと比較し35%低下し、 OAT 基質である p-aminohippurate 共存 (40 mM) にて阻害効果は示されなかった。Inner BRB モデルである TR-iBRB2 細胞への [³H]propranolol 輸送は TEA では阻害されなかったものの、 outer BRB には TEA 感受性の輸送機構である OCT3 (SLC22A3) の発現が報告されている (参考文献 #3)。従って、 BRB を介した propranolol 輸送には inner BRB の分子だけではなく、 outer BRB に存在する OCT3 が関与する可能性が考えられた。

以上の結果を総合すると、 *in vivo* BRB を介した propranolol 輸送への inner BRB に存在する pyrilamine 感受性輸送機構、そして outer BRB に存在する OCT3 の関与が示唆された。

【結論および展望】

本研究結果から、 inner BRB において存在するカチオン性薬物輸送機構として、以下の3種類の存在が導き出された。

1. Verapamil を基質とし、pyrilamine を阻害剤とする (基質ではない) 輸送担体。
2. Pyrilamine と propranolol を基質とし、verapamil を基質としない輸送担体。
3. Pyrilamine を基質とするものの、verapamil と propranolol を基質としない。

この3種類の分子機構について、それぞれの認識特性に基づく網膜 (と脳) への移行性については課題として残されたものの、少なくともこれらの機構に認識される薬物は BRB 透過性が非常に高いと考えられる。また、輸送基質のパスポート構造決定には至っていないものの、後述の赤沼班の研究成果からも脂溶性の高いアミン系薬物が基質である可能性が高く、今後はそのモデル薬物・化合物について BRB 透過性を詳細に評価する予定である。

【参考文献】

1. Okura T, Hattori A, Takano Y, Sato T, Hammarlund-Udenaes M, Terasaki T, Deguchi Y; Involvement of the pyrilamine transporter, a putative organic cation transporter, in blood-brain barrier transport of oxycodone. *Drug. Metab. Dispos.* 36, 2005-13 (2008)
2. Suzuki T, Ohmuro A, Miyata M, Furuishi T, Hidaka S, Kugawa F, Fukami T, Tomono K; Involvement of an influx transporter in the blood-brain barrier transport of naloxone. *Biopharm. Drug Dispos.*, 31, 243-52 (2010)
3. Rajan PD, Kekuda R, Chancy CD, Huang W, Ganapathy V, Smith SB; Expression of the extraneuronal monoamine transporter in RPE and neural retina. *Curr. Eye Res.*, 20, 195-204 (2000)

Ⅲ－２ 抗炎症薬の循環血液から網膜への novel カチオン輸送担体を利用した効率的な送達法

富山大学・大学院医学薬学研究部 薬剤学研究室 助教 赤 沼 伸 乙

【研究の背景と目的】

本研究では、失明を伴う眼疾患の悪化に関係する炎症応答を抑制するための薬物を網膜へ送達する方法論構築を目的とする。抗炎症薬の網膜へのデリバリーを考える上で、血液網膜関門 verapamil 認識性 novel カチオン性薬物輸送担体の認識性及びその特徴を明らかにすることは重要である。炎症メディエーターであるプロスタグランジン合成を阻害する抗炎症薬として非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) が挙げられ、一部の NSAIDs にはカチオン性構造が組み込まれている。これまでの研究から、血液網膜関門 (BRB) に存在する新規カチオン性薬物輸送担体はアミン構造を有する薬物を認識する可能性が示唆されたことから、本輸送担体は網膜への NSAIDs のデリバリー戦略構築において重要と考えられる。そこで、*in vivo* BRB の特性を良好に保持する TR-iBRB2 細胞をソース、カチオン性薬物輸送スクリーニングプローブとして [³H]verapamil と [³H]propranolol を用い、抗炎症薬の認識性を評価した。それに加え、昨年度から遂行している新規カチオン性薬物輸送担体の薬物認識について化合物構造を基とした特徴付けを [³H]propranolol をプローブ薬物として実施した。

【実験手法】

(A) BRB モデル細胞の培養

In vitro inner BRB モデル細胞として、条件的不死化ラット網膜毛細血管内皮細胞株 (TR-iBRB2) 細胞を用いた。TR-iBRB2 細胞は立ち上げてから少なくとも2回継代し、細胞形態および増殖速度に大きな変化がないことを確認後、実験に用いた。

(B) TR-iBRB2 細胞における [³H]verapamil および [³H]propranolol 輸送解析

Collagen I-coated 24-well plate に TR-iBRB2 細胞を 1.0×10^5 cells/well となるように播種し、33°C の加湿された 5% CO₂/95% air インキュベーターにて48時間培養した。細胞が confluent の状態になっていることを確認し、取り込み解析に用いた。

トレーサー溶液は、 [³H]pyrilamine もしくは [³H]propranolol (PerkinElmer Life & Analytical Sciences) を 0.5 μCi/mL となるように extracellular fluid (ECF) buffer (122 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 3 mM KCl,

1.2 mM MgSO₄, 0.4 mM K₂HPO₄, 10 mM D-glucose, 1.4 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.4) に溶解させたものを用いた。細胞を培養させた24-well plateを37°Cに維持し、培養 medium を除去した。ECF buffer (37°C) にて細胞を3回洗浄し、トレーサー溶液を200 μL 加えた。指定時間経過後、トレーサー溶液を除き、氷冷 ECF buffer で3回細胞を洗浄した。NaOH 水溶液 (1 N) を400 μL 加え、室温で12時間処理することで細胞を可溶化させ、1 N HCl を400 μL 加え中和させた。この中和液の一部を Monofluor (National Diagnostics Inc.) へ移し、液体シンチレーションカウンター (LSC-5200; Aloka) にて放射活性を測定した。また、bovine serum albumin を標準とし、DC Protein assay kit (BIO-RAD) を用い、可溶化液中のタンパク質量を測定した。

細胞内への [³H] 薬物取り込み輸送は cell/medium ratio で表した (Eq. 1)。

$$\text{Cell/medium ratio } (\mu\text{L}/\text{mg protein}) = \frac{[\text{H}^3]\text{Compound concentration in the cell (dpm/mg protein)}}{[\text{H}^3]\text{Compound concentration in the medium (dpm}/\mu\text{L})} \quad \dots[\text{Eq. 1}]$$

化合物共存に伴う cell/medium ratio の変動は Eq. 2 の percentage of control にて表した (Eq. 2)。

$$\text{Percentage of control} = \frac{\text{Cell/medium ratio in the presence of inhibitor}}{\text{Cell/medium ratio in the absence of inhibitor}} \quad \dots[\text{Eq. 2}]$$

(C) データ解析

実験データは平均値±標準誤差 (Mean ± S.E.M.) で表した。比較検定には2群間の比較の場合には、unpaired Student's *t*-test を用いて有意差を検定した。3群間以上の場合には one-way analysis of variance (ANOVA) で分散分析を行い、Dunnett's Test もしくは Tukey's Multiple Comparisons Test によって多重比較を行った。

【結果・考察】

A. TR-iBRB2 細胞における [³H]verapamil および [³H]propranolol 輸送への NSAIDs の効果

アミン構造を有する NSAIDs である diclofenac や celecoxib, meloxicam, mefenamic acid を用い、 [³H]verapamil や [³H]propranolol の TR-iBRB2 における輸送への効果を検証した。なお、アミン構造を有さない NSAIDs として acetylsalicylic acid を、NSAIDs ではないものの構造としてアミンを有し、NSAIDs と構造類似性を有する血管新生阻害薬として sorafenib と pazopanib を、用いた。TR-iBRB2 細胞への [³H]verapamil 輸送は acetylsalicylic acid や meloxicam, mefenamic acid, celecoxib, sorafenib, pazopanib 共存によって阻害されなかった (**Fig. 1A**)。また、その [³H]propranolol 輸送は diclofenac や acetylsalicylic acid, celecoxib, sorafenib, pazopanib によって有意に変動しなかった (**Fig. 1B**)。以上の結果から、inner BRB に存在する novel カチオン性薬物輸送担体はこれらの薬物を認識しないことが示唆された。

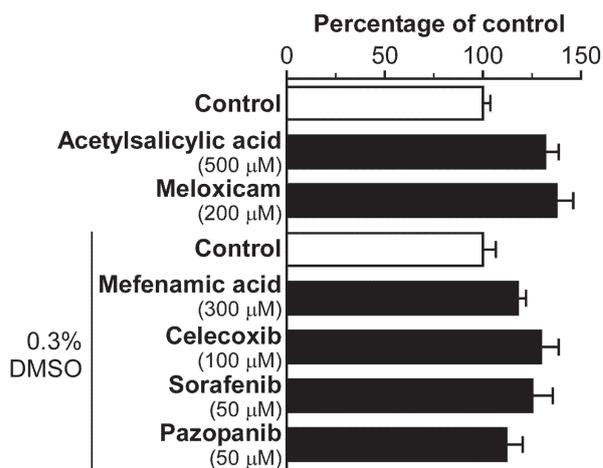
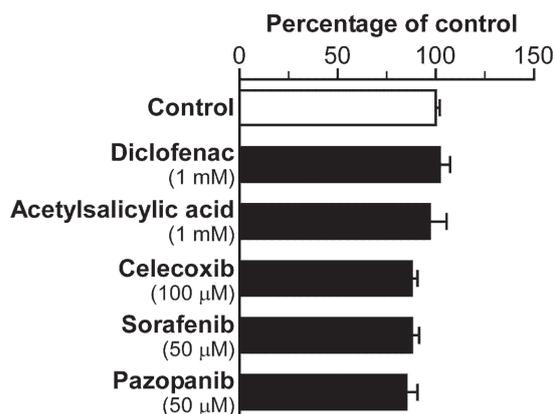
(A) [³H]Verapamil**(B) [³H]Propranolol**

Figure 1 Effect of several drugs on [³H]verapamil and [³H]propranolol uptake by TR-iBRB2 cells.

Uptake of [³H]verapamil (A) and [³H]propranolol (B) by TR-iBRB2 cells was performed in the absence (control) or presence of drugs at 37°C for 3 min. Each bar represents the mean ± S.E.M. (n=3-16).

B. [³H]Propranolol をプローブとした、TR-iBRB2 におけるアミン系薬物認識特性評価

上述のように、既報の抗炎症薬は inner BRB に存在する novel カチオン性薬物輸送担体に対する認識性が低いことから、網膜への抗炎症薬デリバリーを実現するためには、薬物の誘導体化戦略を執る必要がある。そこで、薬物誘導体化を行う上での最終化合物の物性について特徴を決定することを目的とし、Inner BRB に存在する novel カチオン性薬物認識性薬物輸送担体について、アミン系薬物認識特性を評価した。カチオン性薬物や内因性カチオン性化合物を20種類選択し、TR-iBRB2 細胞への [³H]propranolol 輸送解析時に共存させ、阻害効果を検証した。4級アンモニウムを有する薬物や一部の3級アミン+2級アミンを共に有した薬物の8つを除き、12種類の薬物について阻害率と Ringer (pH 7.4)-オクタノール分配係数 (DC) の対数值との正の相関が示された ($p < 0.01$)。一方で、分子量や分子体積、水素結合数、分子極性表面積と DC との相関性は示されなかった。以上の結果から、inner BRB に存在する novel カチオン性薬物輸送担体は、カチオン帯電性構造を有するのみで化合物 (基質) を認識するような単純な機構ではないことが示唆された。

【結論および展望】

本研究結果から、市販の抗炎症薬は BRB に存在する novel カチオン性薬物輸送機構に認識されないことが示唆された。さらに、この市販の抗炎症薬を novel カチオン性薬物輸送機構へ認識させるための戦略として、4級アンモニウムを含まない脂溶性アミン化合物誘導体化が方策の一つと考えられた。ただし、阻害率は必ずしも輸送基質としての親和性を反映していないことから、上述の構造的特徴を有する薬物が輸送基質となるか評価を行うと共に、誘導体化した薬物の輸送活性を *in vivo*・*in vitro* 両面から評価する予定である。

Ⅲ－3 Novel カチオン輸送担体分子実体の解明と 遺伝子デリバリー法確立

富山大学・大学院医学薬学研究部 薬剤学研究室 講師 久保義行

【研究の背景と目的】

血液網膜関門 (BRB) に発現する verapamil 認識性 novel カチオン性薬物輸送機構の分子実体の解明は、新規薬物送達技術を開発する上で極めて重要である。有機カチオン性薬物の組織関門透過は、主に solute carrier (SLC) ファミリーに属するインフラックストランスポーターによって担われると考えられている。しかし、これまでの当研究室における発現解析と輸送解析の結果から、BRB の有機カチオン性薬物透過機構に、未知の BRB 透過輸送担体分子が関与することが強く示唆される。

初年度の研究にて、カチオン性輸送担体に共通するモチーフ配列を有するものの基質認識性が明確ではない、SLC ファミリーと細菌類カチオントランスポーターホモログ、マラリア原虫カチオントランスポーターホモログについて BRB の一つである内側血液網膜関門 (inner BRB; 網膜毛細血管内皮細胞を実体とする) における発現解析と、発現分子の輸送解析を一部実施した。BRB は inner BRB だけではなく、網膜色素上皮 (RPE) 細胞を実体とする外側血液網膜関門 (outer BRB) によっても構成されており、網膜への物質供給に役割を果たすことが明らかにされている。従って、inner BRB と (もしくは) outer BRB において発現する novel カチオン輸送担体は、網膜への物質供給を担う輸送担体の候補となりうる。そこで、本研究では、novel カチオン性薬物輸送担体候補分子群の探索を inner BRB と outer BRB 両面について実施することで、BRB の有機カチオン性薬物透過機構を分子の観点から解明することを目的とした。

【実験手法】

(A) BRB モデル細胞の培養

In vitro inner BRB モデル細胞として、条件的不死化ラット網膜毛細血管内皮細胞株 (TR-iBRB2) 細胞を用いた。TR-iBRB2 細胞は立ち上げてから少なくとも 2 回継代し、細胞形態および増殖速度に大きな変化がないことを確認後、実験に用いた。

In vitro outer BRB モデル細胞として、ラット初代培養 RPE 細胞を用いた。ラットから眼球を摘出し、5% ポビドンヨード液にて消毒し、Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; 138 mM NaCl, 5.6 mM

D-glucose, 0.44 mM KH₂PO₄, 4.2 mM NaHCO₃, 0.34 mM Na₂HPO₄, 0.22 mM Phenol red) で洗浄後, 40 U/mL testicular hyaluronidase と20 U/mL collagenase, 0.1 % trypsin を含有した HBSS にてインキュベート (37°C, 50分) した。RPE 細胞を眼球から採取し, 遠心すること (1,200 × g, 4°C, 10分) で回収した。ペレットを20 % ウシ胎児血清と抗生物質を含有したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM): F12で再懸濁後, 37°Cインキュベーター (5 % CO₂/air) にて培養後, 実験に用いた。

(B) 細胞及び網膜からの total RNA の回収および RT-PCR 法による mRNA 発現解析

培養した細胞が dish 中にて90-100 % コンフルエントに達していることを確認し, RNeasy Mini kit (QIAGEN) を用い, 各細胞の total RNA を調製した。ラット網膜 total RNA は, 6 週齢雄性 Wistar ラット眼球から網膜を単離し, TRIzol reagent (Invitrogen) を用いて total RNA を調製した。

それぞれの total RNA をサンプルとし, oligo dT primer と ReverTra Ace (TOYOBO) を用いて逆転写反応を行い, cDNA を合成した。なお, ReverTra Ace 非含有サンプルも作成した (RT (-) サンプル)。それぞれの cDNA を用い, ExTaq[®] polymerase (Takara shuzo) を polymerase として PCR を行った。各標的分子特異的な primer を設計し, 反応条件は94°Cで2分 denature 処理後, 94°Cで30秒, 55°Cで30秒, 72°Cで1分のインキュベートを30-40サイクル行い, 増幅産物を得た。PCR 増幅産物に対して 1/10量の10×DNA loading buffer (0.25 % BPB, 0.25 % xylene cyanol FF 及び50 % glycerol) を加え, ethidium bromide を含んだ 2 % agarose gel [2 % agarose, 0.6 µg/mL ethidium bromide を含む TAE buffer (40 mM Tris base, 40 mM acetic acid, 1 mM EDTA)] に loading し, TAE buffer を泳動バッファーとして Mupid 21 ミニゲル泳動槽 (Cosmo Bio) を用い100 V で45分泳動を行った。バンドの検出は Bio Printer (Bio Craft) を用いて行った。増幅産物は pGEM-Teasy vector (Promega) に組み込んだ後に ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて, 増幅産物の配列を確認した。

(C) アフリカツメガエル卵母細胞発現系による標的分子の基質輸送機能解析

標的遺伝子 open reading frame を complementary RNA (cRNA) 合成に最適化された pGEM-HE plasmid のマルチクローニングサイトへ組み込んだ。cRNA は RiboMAX[™] Large Scale RNA Production System-T7 (Promega) を用いて合成した。雌性アフリカツメガエル (Kato-S-Science) から卵巣を摘出し, collagenase A (Roche) 処理後, 濾胞細胞を除去することで oocyte を得た。Oocyte は SOS buffer (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.5) を用いて培養した。培養1日後に標的分子 cRNA をマイクロインジェクター (Narishige) にて23 nL 注入し, 4日間さらに培養することで, oocyte へ標的分子タンパク質を発現させた。

ND96 (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.4) に [³H]verapamil (American Radiolabeled Inc.) などの各種放射性標識薬物・化合物を0.1-0.2 µCi/200 µL となるように溶解させ, tracer buffer とした。ND96へ oocyte を移し, 37°Cで20分プレインキュベーションし,

tracer buffer 中でインキュベーションすることで (37°C) 取り込み実験を行った。指定時間経過後、oocyte を 4°C ND96 で 4 回洗浄し、5% sodium dodecyl sulfate にて可溶化させた。可溶化液に 3 mL Monofluor (National Diagnostics Inc.) を加え攪拌した後、液体シンチレーションカウンター (LSC6101, Aloka) にて放射活性を測定した。

(D) データ解析

塩基配列は GENETYX®-SV/RC version 10 (GENETYX Co.) にて解析した。Oocyte への薬物輸送活性は、oocyte/medium ratio で表した (Eq. 1)。

$$\text{Oocyte/medium ratio } (\mu\text{L/oocyte}) = \frac{\text{Radioactivity per oocyte (dpm/oocyte)}}{\text{Radioactivity in the medium (dpm/\mu\text{L})}} \quad \dots[\text{Eq. 1}]$$

実験データは平均値 ± 標準誤差 (Mean ± S.E.M.) で表した。比較検定には 2 群間の比較の場合には、unpaired Student's *t*-test を用いて有意差を検定した。3 群間以上の場合には one-way analysis of variance (ANOVA) で分散分析を行い、Dunnett's Test もしくは Tukey's Multiple Comparisons Test によって多重比較を行った。

【結果・考察】

A. BRB モデルにおける novel カチオン性薬物輸送担体候補分子の発現

Inner BRB および outer BRB モデルにおける novel カチオン性薬物輸送担体候補分子 mRNA 発現を RT-PCR 法にて解析した。SLC ファミリーとして 10 分子、大腸菌トランスポーターホモログ (EstT) として 12 分子について解析した結果、① Inner BRB と outer BRB 共に発現する分子、② Inner BRB にのみ発現する分子、そして③ Outer BRB にのみ発現する分子、の 3 つに分類される mRNA 発現プロフィールが得られた (Table 1)。

Table 1 mRNA expression profile of novel organic cation drug transporter candidates at the inner and outer BRB.

Molecules	① Expressed at the inner and outer BRB	② Expressed at the inner BRB	③ Expressed at the outer BRB
SLC family	6 molecules	1 molecule	0
EstT	7 molecules	2 molecules	2 molecules

B. Novel カチオン性薬物輸送担体候補分子の open reading frame 単離と発現系構築

発現が示された分子について、発現系構築を目的とし、open reading frame (ORF) 単離を試みた。Inner BRB および outer BRB それぞれを total RNA ソースとして PCR 法にて検討した結果、計 14 分子 (SLC ファミリーについて 5 分子、EstT について 9 分子) の ORF 単離に成功した。また、これら

ORF は現在アフリカツメガエル卵母細胞発現系構築用プラスミドである pGEM-HE のマルチクローニングサイトに組み込み、cRNA 合成に成功している。

C. 輸送対象化合物の選定

カチオン性薬物トランスポーターの多くは含窒素官能基を認識し化合物を輸送すると考えられている。Verapamil は「Tertiary amine」と「Nitrile」を含有する。今回単離したクローンについて、verapamil を含めたカチオン性薬物・化合物の認識性を解明することは、分子実体決定後の網膜への薬物デリバリー応用への重要な知見に繋がる。そこで、verapamil とは異なる構造化合物として「Primary amine」と「Secondary amine」を含む spermine を始めとして、構造的特徴が異なる7化合物を選定し (Table 2), アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた輸送実験に供した。

Table 2 Test compound for transport study

Compound	Functional group
Verapamil	<ul style="list-style-type: none"> • Tertiary amine • Nitrile
Spermine	<ul style="list-style-type: none"> • Primary amine • Secondary amine • No aromatic ring
Compound A	<ul style="list-style-type: none"> • Tertiary amine • Pyridine
Compound B	<ul style="list-style-type: none"> • Pyridinium
Compound C	<ul style="list-style-type: none"> • Ammonium • No aromatic ring
Compound D	<ul style="list-style-type: none"> • Primary amine • Organic amido • Carboxyl group
Compound E	<ul style="list-style-type: none"> • Amine (-) • No aromatic ring • Sulfate

D. 候補分子発現アフリカツメガエル卵母細胞を用いた化合物輸送解析

アフリカツメガエル卵母細胞へ候補分子 cRNA を microinjection することで、候補分子を卵母細胞に発現させ、C. に記載した薬物・化合物の輸送評価した。過去にヒトホモログにおいて spermine などのポリアミン指向性を有する分子である SLC ファミリー分子 (Slc12a8) について [³H]spermine 輸送活性が示された (Fig. 1)。それ以外の分子について、各種化合物の輸送機構について評価した結果、各分子の特徴として Table 3 に示すような特徴が示された。また、この特徴から導き出される、「Verapamil 輸送候補分子」は SLC ファミリーに属する分子として 1 分子、EstT として 6 分子見出された。

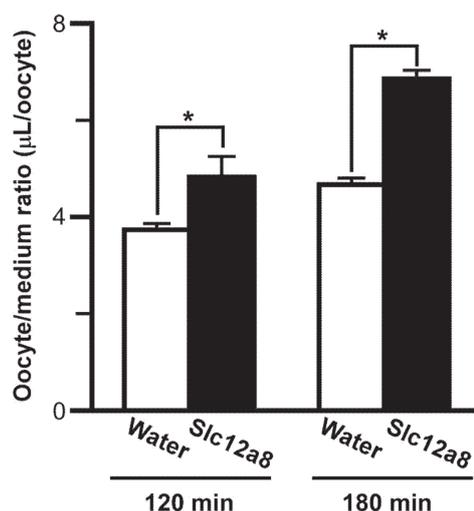


Figure 1 [³H]Spermine uptake by Slc12a8-expressing oocytes.

Uptake experiment was performed at 20 °C for 120 min and 180 min. Each column represents the mean ± S.E.M. (n=7-10). **p*<0.01, significant difference.

Table 3 Summary of transport study using candidate-expressing oocytes

Family	Molecule	Character
SLC family	Slc12a8	● 2級アミン指向性。
	Molecule A	● 2級アミンと脂肪族4級アンモニウム指向性。
	Molecule B	● 1-2級アミンと4級アンモニウム指向性。
	Molecule C	● 2-3級アミン指向性。
	Molecule D	● 芳香族4級アンモニウム指向性。
EstT	Molecule a	● 2級アミンと芳香族4級アンモニウム指向性。 ● 3級アミン認識性は低い。
	Molecule b	● 芳香族4級アンモニウム指向性。
	Molecule c	● アニオン性化合物指向性。 ● アミン認識性は低い。
	Molecule d	● 1-2級アミンと4級アンモニウム指向性。 ● アニオン性化合物指向性。
	Molecule e	● 4級アンモニウム指向性。
	Molecule f	● 3級アミン指向性。 ● 芳香族4級アンモニウム指向性。
	Molecule g	● 1-2級アミンと芳香族4級アンモニウム指向性を有する。 ● 3級アミン指向性は低い。
	Molecule h	● アニオン性化合物指向性。 ● アミン認識性は低い。
	Molecule i	● 1級アミン指向性。 ● 3級アミン認識性は低い。 (3級アミンが複数あると認識するという可能性はある)

【結論および展望】

本年度の解析から、BRBに存在する verapamil 認識型 novel 有機カチオン性輸送担体候補として、7分子見出された。アフリカツメガエル卵母細胞は両生類の細胞であることから、その分子を介した薬物輸送について、ほ乳類においてどのような様式であるか解析することで、「循環血液中に存在する薬物の網膜への移行に関与する」ことが明らかになると期待される。現在、cRNA合成用プラスミドに組み込んでいる候補分子 ORF について、ほ乳類細胞への発現系構築用のプラスミドである pcDNA4 プラスミドへの組み換えを行っており、次年度は本プラスミドを用いた発現系構築を試みる。Verapamil 輸送について、BRBを介し循環血液中から網膜への移行に関与すると考えられた分子について、RNA干渉法によってその寄与を評価する。その分子の寄与が示された場合は、本課題最終目標である「標的分子に対する抗体を用いたターゲティング法」を確立するため、候補分子を標的とした抗体作成に着手する予定である。

Ⅲ－４ Novel カチオン輸送担体に対するパスポート構造を元にした，有機化学的薬物誘導体化

富山大学・大学院医学薬学研究部 薬品製造学研究室 教授 松谷裕二

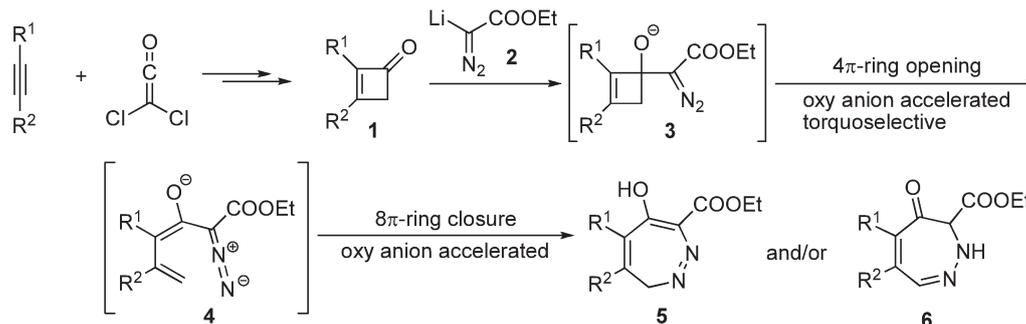
【研究の背景と目的】

血液網膜関門を介したベラパミル輸送を阻害する薬物の特徴として，アミン含有薬物は阻害を示すものの，四級アンモニウム含有薬物では阻害されないことが挙げられる。本研究では「網膜への薬物送達を目的とした薬物・化合物の誘導体化」を最終目標として研究を遂行しており，それを可能とするパスポート構造を明らかにするためには，プローブとなる薬物に対し各種アミン含有構造を付加させ，その輸送活性を比較するのが最良の方法である。本年度は，パスポート構造の候補として含窒素複素環構造を想定し，特に7員環を有する1,2-ジアゼピン誘導体を構築するための，一般性の高い新手法の開発を行うこととした。ジアゼピン骨格は窒素原子の求核性により四級アンモニウム化などの化学修飾が可能であり，化合物の物性チューニングが容易であること，また，構造物性に影響を与えず互変異性構造がジアゼピン骨格上では可能であることが，その理由である。筆者らは，これまでに独自の手法によるベンゾジアゼピン骨格構築法を開発しており，本法が本目的の達成に直線的に応用可能と見込まれる。すなわち，シクロブテノンに対するジアゾメチレンアニオンの求核付加_連続的電子環状反応というドミノ型プロセスを用い，1,2-ジアゼピン骨格の新規構築法として検討を行うことにした。また，本骨格に存在する互変異性体の存在についても精査し，異性体を効果的に合成し分けるための反応条件についても検討を行うものとした。更に，今後実際に研究を進める予定であるプローブ薬物へのパスポート構造付加も念頭におき，合成可能な1,2-ジアゼピン誘導体の置換基一般性や，反応性や安定性についての情報を得ることも，本研究の目的である。

【実験手法】

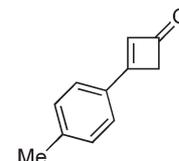
1,2-ジアゼピン形成反応の基質となるシクロブテノン誘導体(1)は，置換アセチレン類とジクロロケテンとの[2+2]環化付加反応を利用して合成を行う。本化合物に対し，ジアゾメチレンアニオン(2)を低温下にて求核付加させ，生じたオキシアニオンにより加速される $4\pi-8\pi$ タンデム型電子環状反応により，中間体3および4を経て，目的とする1,2-ジアゼピン誘導体(5または6)を合成するよう計画した(Scheme 1)。

Scheme 1



([2+2] 環化付加反応によるシクロブテノン誘導体 **1** の合成の実施例)

To a solution of 4-tolylacetylene (4.76 g, 41.0 mmol) and zinc-copper couple (10.0 g, 153 mmol) in Et₂O (82 mL) was added the solution of trichloroacetyl chloride (1.70 g, 103 mmol) in dimethoxyethane (31 mL) via cannula at 0 °C. After stirring for 15 min, the cooling bath was removed to allow the reaction to warm up to room temperature. After stirring for 1.5 h, the resulting mixture was filtered through Celite (solvent; hexane). The combined organic extracts were washed with each of ice-cold 0.5 M hydrochloric acid, ice-cold 5% sodium hydroxide solution, and brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude mixture containing 4,4-dichlorocyclobutenone was directly subjected to the next reaction without further purification.

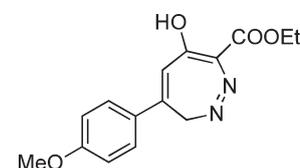


To a solution of zinc dust (7.89 g, 121 mmol) and tetramethylethylenediamine (18.1 mL, 121 mmol) in EtOH (42 mL) were dropwised acetic acid (6.9 mL, 121 mmol) and then the solution of 4,4-dichlorocyclobutenone (4.75 g, 20.9 mmol) in EtOH (42 mL) via cannula at 0 °C. After stirring for 15 min at the same temperature, the cooling bath was removed to allow the reaction to warm up to room temperature. After stirring for 1 h, The resulting mixture was filtered through Celite (solvent; hexane:Et₂O = 1:1). The combined organic extracts were washed with each of 10% hydrochloric acid, saturated aqueous NaHCO₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (hexane) to afford the cyclobutenone (2.00 g, 12.7 mmol, 31%) as a yellow solid.

Mp 97-100 °C; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.52 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.31 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 6.32 (1H, s), 3.51 (2H, s), 2.44 (3H, s); ¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 187.2, 170.6, 142.5, 129.3, 128.6, 128.45, 128.38, 48.2, 21.5; IR (KBr): 1699 cm⁻¹; MS (EI) *m/z* 158 (M⁺); HRMS (EI) calcd for C₁₁H₁₀O: 158.0732, found: 158.0758.

(1,2-ジアゼピン誘導体 **5** の合成の実施例)

To a solution of ethyl diazoacetate (44.5 mg, 0.39 mmol) in dry THF (1.3 mL) was added n-BuLi in hexane (1.6 M, 0.33 mL, 0.52 mmol) at -78 °C, and the

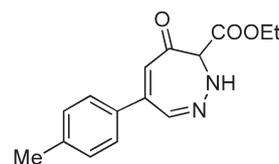


mixture was stirred at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min. To the above mixture was added a solution of the 3-(4-methoxyphenyl)cyclobutenone (45.0 mg, 0.26 mmol) in dry THF (1.3 mL). After stirring for 15 min at the same temperature, the cooling bath was removed to allow the reaction to warm up to room temperature for 1 h. The reaction mixture was diluted with sat. NH_4Cl aq., extracted with CH_2Cl_2 , and dried over MgSO_4 . The solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (hexane:MeOH = 200:1) to afford **5** (62.9 mg, 84%) as a yellow solid.

Mp $100\text{--}105\text{ }^{\circ}\text{C}$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Acetone- d_6): δ 9.13 (1H, brs), 7.67 (2H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.02 (2H, d, $J = 8.7$ Hz), 6.51 (1H, s), 4.56 (2H, s), 4.20 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 2.83 (3H, s), 1.27 (3H, t, $J = 7.1$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, Acetone- d_6): δ 182.8, 167.5, 162.1, 146.3, 136.6, 135.2, 130.5, 129.4, 115.1, 61.1, 55.7, 52.1, 14.4; IR (KBr): 3220, 1738 cm^{-1} ; MS (EI) m/z 288 (M^+); HRMS (EI) calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$: 288.1110, found: 288.1133.

(1,2-ジアゼピン誘導体 **6** の合成の実施例)

To a solution of LDA (1.50 mmol, prepared from diisopropylamine and $n\text{-BuLi}$) in dry THF (2.2 mL) was added ethyl diazoacetate (152.9 mg, 1.30 mmol) in dry THF (2.2 mL) at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, and the mixture was stirred at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 0.5 h. To the above mixture



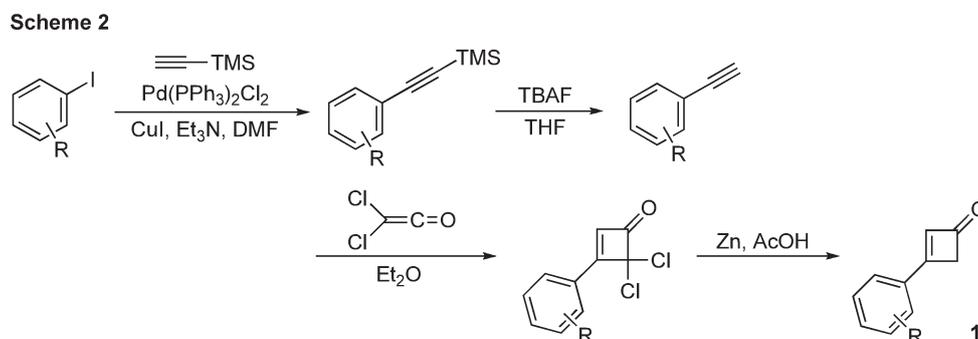
was added a solution of the 3-(4-tolyl)cyclobutenone (105.9 mg, 0.67 mmol) in dry THF (2.3 mL). After stirring for 15 min at the same temperature, the cooling bath was removed to allow the reaction to warm up to room temperature for 1 h. The reaction mixture was diluted with sat. NH_4Cl aq., extracted with CH_2Cl_2 , and dried over MgSO_4 . The solvent was removed under reduced pressure. To this residue were added benzene (9.1 mL) and pyridine (0.37 mL, 4.6 mmol) at room temperature. After stirring for further 7 h, pyridine (74 μL , 0.92 mmol) was added to the mixture. After stirring for further 5 h, pyridine (74 μL , 0.92 mmol) was added to the mixture. After stirring for further 5 h, pyridine (74 μL , 0.92 mmol) was added to the mixture. After stirring for 7 h, the reaction was quenched with 10% hydrochloric acid, and the reaction mixture was extracted with Et_2O . The combined organic extracts were concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (hexane:AcOEt = 4:1) to afford **6** (103 mg, 0.378 mmol, 81%) as a colorless oil.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.59 (1H, brs), 7.43-7.35 (3H, m), 7.26-7.24 (2H, m), 6.77 (1H, s), 4.49-4.36 (2H, m), 4.07 (1H, s), 2.41 (3H, s), 1.34 (3H, t, $J = 7.1$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, Benzene- d_6): 178.5, 166.6, 144.9, 139.1, 138.2, 135.6, 132.2, 129.6, 127.9, 68.6, 62.3, 21.0, 14.1; IR (KBr): 3371, 1742 cm^{-1} ; MS (EI) m/z 158 (M^+); HRMS (EI) calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$: 272.1161, found: 272.1144.

【結果・考察】

＜各種置換シクロブテノン誘導体 **1** の合成＞

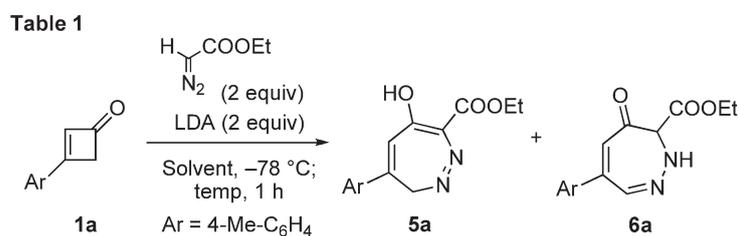
まずは、1,2-ジアゼピン合成のための原料化合物となる、各種置換シクロブテノン誘導体**1**の合成を行った。その概略を Scheme 2 に示す。



容易に入手可能なヨードベンゼン誘導体に対して、DMF 溶媒中にて TMS-アセチレンとの園頭カップリングを CuI, Et₃N, およびパラジウム触媒存在下にて行い、良好な収率にて TMS-アセチレン体とし、引き続き TBAF を用いた脱シリル化を行って、アルキン体を合成した。次に、Et₂O 溶媒中にて、トリクロロアセチルクロリドから調製したジクロロケテンとの [2+2] 環化付加反応に付き、シクロブテノン骨格を構築、その後、クロロ基を酢酸中で亜鉛還元により除去し、目的とする各種置換シクロブテノン誘導体 (**1**) を得ることに成功した。

＜1,2-ジアゼピン環形成反応の条件検討＞

3-(4-tolyl)cyclobutenone (**1a**) をモデル基質として、1,2-ジアゼピン環形成反応の条件検討を行った。その詳細を Table 1 に示す。ここでは、溶媒と反応温度について精査した。塩基として LDA を用いていることからエーテル系溶媒に固定し、まずは THF を溶媒として低温下リチオジアゾアセテート



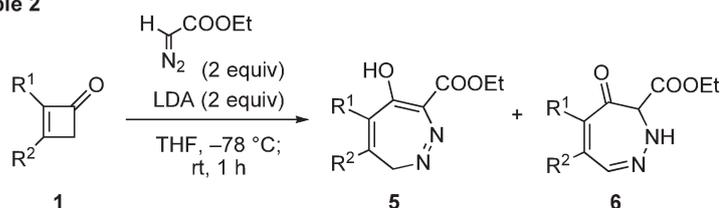
entry	solvent	temp	yield (%)	5a:6a
1	THF	rt	73	51:49
2	CPME	rt	47	40:60
3	Et ₂ O	rt	65	45:55
4	THF	0 °C	51	37:63
5	THF	45 °C	47	34:66
6	THF	rt	85	82:18

を調製して **1a** と反応させ、次いで反応温度を室温まで昇温させたところ、73% という良好な収率にて目的とする 1,2-ジアゼピン誘導体を与えることが判った。ここで得られた 1,2-ジアゼピン誘導体は 2 種類であり、それぞれを単離して構造解析を行ったところ、エノール型ジアゼピン (**5a**) とイミン型ジアゼピン (**6a**) であることが判り、その生成比はほぼ 1:1 であった (entry 1)。その他のエーテル系溶媒 (CPME, Et₂O) を用いた場合、収率が若干低下した (entry 2, 3)。また、THF 溶媒中でも、昇温温度を 0°C や 45°C とした場合も、収率の低下が見られた (entry 4, 5)。なお、entry 1 と同条件でも、微量の酸性不純物を排除した溶媒を用いた時、収率が 85% まで向上し、また **5a** と **6a** の異性体比も 82:18 と大きく変化することが明らかとなった (entry 5)。この結果は、微妙な反応条件の違いが、異性体比に大きな影響を与えることを示すものである。

<1,2-ジアゼピン環形成反応の一般性の検討>

ここまでの検討で見出された最適条件にて、種々の置換基を有するシクロブテノン体を基質として、1,2-ジアゼピン環形成反応の一般性を検証した。その結果を Table 2 に示す。R² として芳香族置換基を有する誘導体について、概ね良好な収率にて 1,2-ジアゼピン誘導体を与えることが明らかとなった (entry 1-5)。やや立体障害がある誘導体 (R² = Mes) についても、若干収率は落ちるものの、対応するジアゼピン体を生成した (entry 6)。また、R¹ にも置換基を有する基質や、脂肪族置換基を有する基質においても、反応は進行することが明らかとなった (entry 7, 8)。なお、いずれの場合においても、2 種類の互変異性体 (**5** および **6**) を生成しており、エノール型異性体 **5** が主生成物であった。これらの異性体は、いずれもカラムクロマトグラフィーにて単離精製が可能である。

Table 2



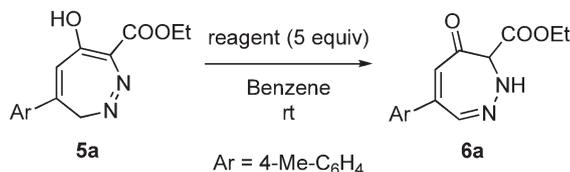
entry	1	R ¹	R ²	yield (%)	5:6
1	1b	H	Ph	84	86:14
2	1c	H	4-MeO-C ₆ H ₄	77	77:23
3	1d	H	4-F-C ₆ H ₄	71	90:10
4	1e	H	1-Naph	78	72:28
5	1f	H	2-Me-C ₆ H ₄	77	73:27
6	1g	H	Mes	59	58:42
7	1h	Ph	Ph	69	81:19
8	1i	H	<i>n</i> -Bu	64	88:12

以上のように、本 1,2-ジアゼピン環形成反応は、一般性が高く広い応用性を有することが明らかとなった。

<互変異性体の相互変換と選択的合成>

上述の通り、本反応では2種類のジアゼピン互変異生体が生成した。これらは、いわゆるタートメリズムにより相互変換できるものと考えられ、一方で、それぞれが分離可能な安定性と物性を独立して有している。そこで、これら異性体の相互変換の要因となる条件について、精査することにした。エノール型ジアゼピン **5a** を用いて、酸および塩基の影響を調査した結果を Table 3 に示す。酸性条件では徐々に分解反応が進行するのみであったが (entry 1)、アミン塩基の存在下ではイミン型ジアゼピン **6a** への異性化が観察された (entry 2-7)。特にピリジン共存下で効率良く異性化が進行した (entry 5)。なお、**6a** は安定な異性体であり、**5a** への逆異性化は全く観察されなかった。

Table 3



entry	reagent	time (h)	yield (%)
1	10% HCl aq	21	—
2	<i>i</i> -Pr ₂ NH	0.75	59
3	BnNH ₂	0.75	41
4	Et ₃ N	1.5	70
5	Pyridine	7	81
6	DMAP	0.5	61
7	2,6-lutidine	4	67

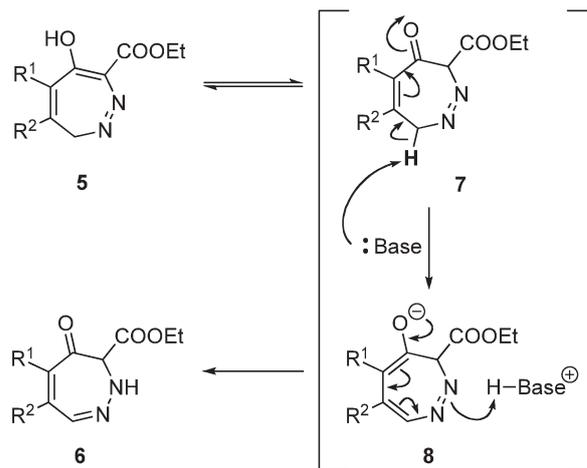
塩基性条件下での異性化のメカニズムは、

Scheme 3 に示すようなものと推定される。すなわち、**5** のケト型である **7** に対する塩基の作用で脱プロトン化が進行してエノラート **8** が生じ、その再プロトン化が窒素原子上で起こることで異性体 **6** が生じるものである。

これらの検討から、互変異性体の生成比には、反応系内のアミン塩基が大きく作用していることが示唆される。そこで、これらの互変異性体を選択的に得るような反応条件について検討を

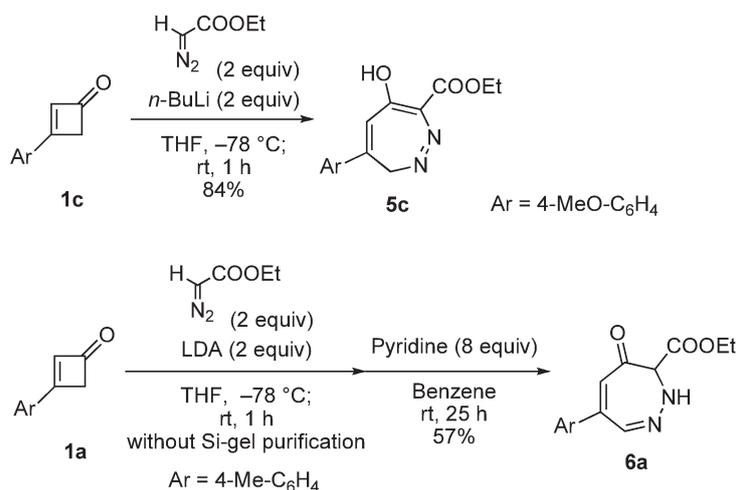
行った。その結果について、Scheme 4 にまとめる。リチオジアゾアセテートの調製に LDA を用いると、アミン塩基であるジイソプロピルアミンが反応系中に遊離する。これは、異性体 **5** から **6** への異性化を促進するものと考えられる。そこで、LDA の代わりに *n*-BuLi を塩基として利用する反応条件

Scheme 3



を試みたところ、エノール型異性体 **5** が 84 % という高収率で生成し、イミン型異性体 **6** は全く生成しなかった。また逆に、従来の条件で得たジアゼピン生成物（異性体混合物）を、精製せずにそのままピリジン処理を施すことで、57 % 収率にてイミン型異性体 **6** を単一生成物として得ることに成功した。このように、反応条件を適切に設定することで、1,2-ジアゼピンの 2 種類の互変異性体を効率的に合成する一般法を確立することに成功した。

Scheme 4



【結論および今後の展開】

上述の通り、本年度はパスポート構造として含窒素複素環である 1,2-ジアゼピン誘導体を想定し、シクロブテノンの連続的電子環状反応を活用することで、2 種類の互変異性体を選択的に合成するための一般法を確立できた。今後は、網膜への薬物送達を可能とするパスポート構造を特定し、網膜輸送性に優れた薬物を創出するため、硝子体内投与でのみしか現在成功していない VEGF を標的とし、本受容体阻害剤などにパスポート構造を付加した誘導体合成を行い、輸送活性を比較検討していく予定である。