

平成25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

研究代表者 富山大学 大学院医学薬学研究部長

まえがき

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	8
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	9
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	11
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	14
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	16
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	20
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	25
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	29
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	32
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	36
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	42
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	46
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25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25年度の研究成果が述べられています。今回で3研究班の受託研究が終了します。

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、① SR 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)、③ SR に対する改変修飾阻害薬の創製 (豊岡尚樹氏)、④ SR-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25年度受託研究課題

班	研究者	研究課題
I セリンラセマゼ(SR)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開発 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の神経変性疾患では、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 (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、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。

最終年度の本年度は、1) *in vitro* で阻害薬候補化合物の活性評価を実施した。また、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* の薬物効果評価を実施した(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 を持つマウス系統の作製を試みた。また、皮膚での SR の機能解析を進めた(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野生型 SR タンパク質の大量発現と結晶化解析を進めた。(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。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、ガランタミン、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の神経変性疾患では、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、皮膚の保湿バリア機能が低下し、相補的にバリア機能に関わる遺伝子発現が上昇している事を見出した (Inoue et al., in press)。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 阻害薬や D-セリンを適切に使用することで、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、皮膚ではバリア機能の調節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 (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，和漢薬からも新たな 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】

昨年までに in vitro スクリーニングで見いだした SR 阻害効果の高い新規化合物（特許申請のため構造は示さない）の濃度-阻害効果を in vitro で評価した（図1）。その結果，化合物 4 が，非常に強い SR 活性阻害作用を示した。

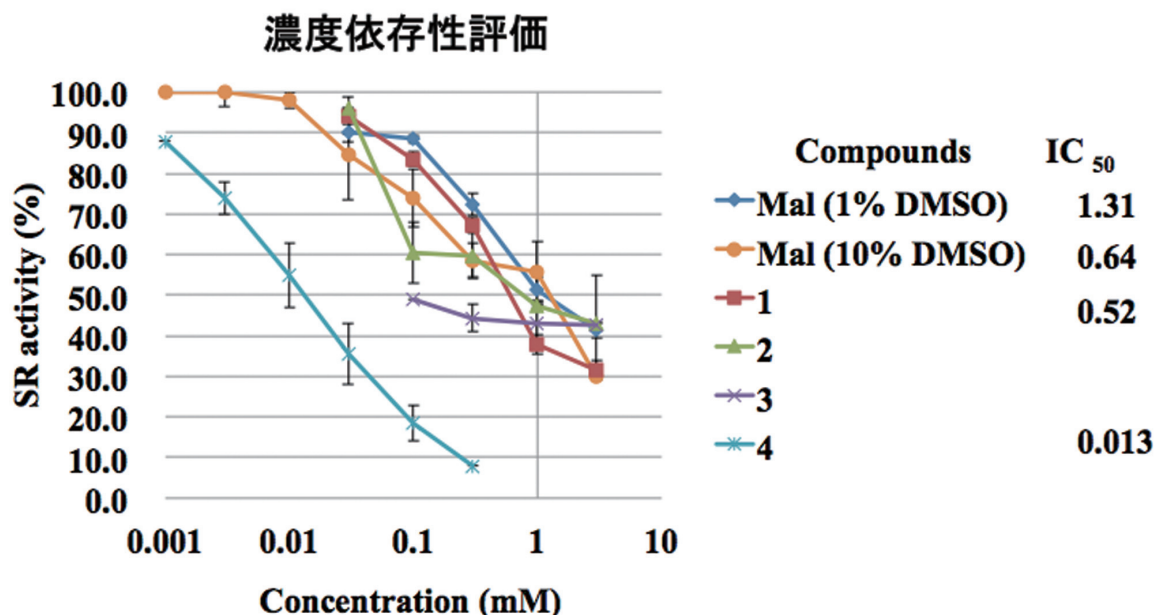


図1 新規合成化合物の濃度-SR 活性曲線

SR 阻害標準化合物のマロン酸 (Mal) と同等か，より強い阻害作用を示した。

次に、Arc-Luc Tg マウス系統 (Izumi et al., 2011, 図 2) を用いて、個体レベルでの化合物評価解析を進めた。なお、個体レベルでの解析は、研究分担者の井上と共に実施した。

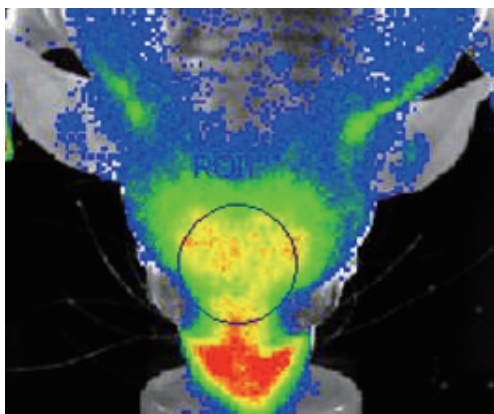


図 2 Arc-Luc Tg マウスで観察される NMDA 受容体活性依存的発光

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。

また、Arc-Luc Tg マウスでの発光計測を容易とするために、成長に伴い自然脱毛するヘアレス (HR; (株) 星野試験動物飼育所) 系統遺伝子を導入した HR-Arc-Luc Tg マウス系統を作製し本研究では用いた。このマウス系統での、発光変化が NMDA 受容体特異的チャンネルブロッカー MK-801 の前投与により抑制されることは、既に確認している。

個体レベルでの薬物作用を評価するために、様々な薬物投与溶媒、投与方法、発光計測プロトコルを検討し、以下の実験方法を確立した (図 3)。まず、溶媒には毒性が低く脂溶性化合物の溶解が容易な PEG400 を用いた。また、薬物投与方法は経口投与とした。薬物ならびに溶媒を実験開始 3 時間前に経口投与し、NMDA 受容体の活性化に伴う発光上昇を引き起こすカイニン酸 (KA) を腹腔内注射投与し、2 時間おきに頭部よりの発光を計測して評価した。

In vivo imaging protocol (Arc-Luc Tg hairless mice)

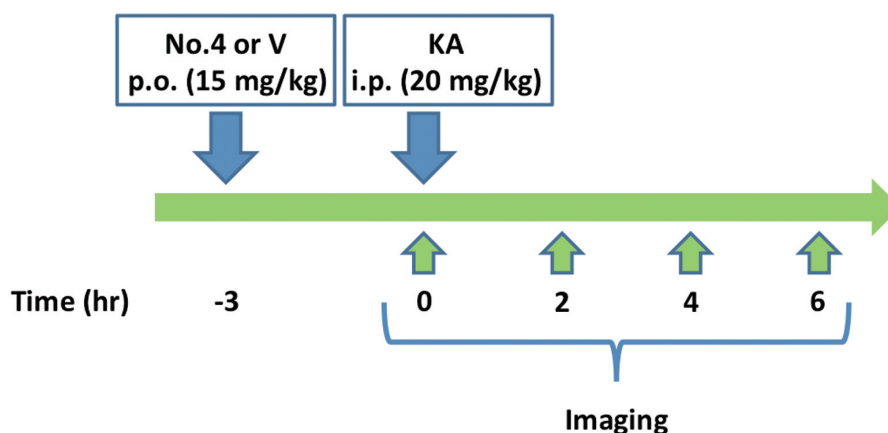


図 3 発光計測プロトコル

カイニン酸 (KA) 投与 3 時間前より、薬物あるいは溶媒を経口投与した。KA 投与直前、投与 2、4、6 時間後にそれぞれ発光計測を実施した。

得られた発光計測結果の一例を、以下に示す (図 4)

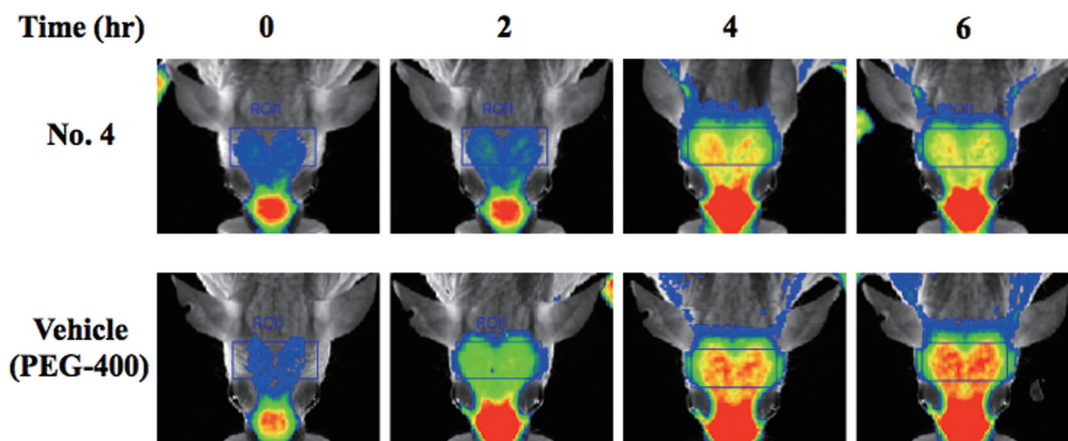


図4 化合物前投与、KA 投与後のマウス発光計測

化合物 No. 4 の投与により、コントロール (Vehicle) 投与に比べ発光上昇が抑制された。

発光計測を解析した結果、No.4 化合物投与群で、発光上昇が有意に抑制された (図 5)。

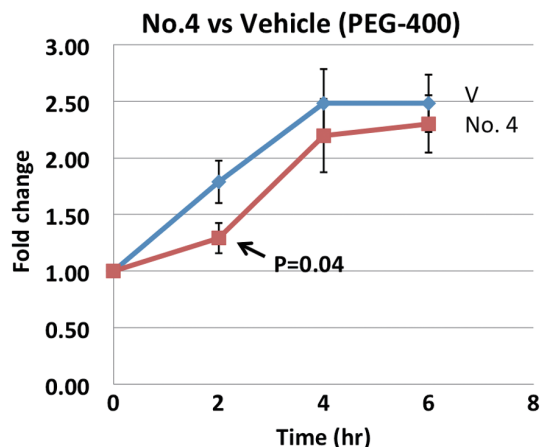


図5 薬物投与による発光の抑制

薬物投与群で発光上昇変化が抑制される傾向が観察され、KA 投与 2 時間後では、発光が有意に抑制された。

【考察と今後の展望】

本研究により、in silico スクリーニングにより見いだしたリード化合物の構造を元に新規合成した SR 阻害化合物が、マウス個体レベルで NMDA 受容体の活性化を抑制することが示唆された。このことは、新規薬物がマウス脳内 SR の活性を阻害して、結果的に D-セリン濃度を低下させ、NMDA 受容体の過剰活性化を抑制したと考えられる。このことは、本研究の酵素結晶構造-in silico スクリーニング-in vitro 評価-in vivo 評価の論理的かつ複合的アプローチが新薬開発に有効なことを示している。Arc-Luc Tg マウスで観察される発光は、脳内神経細胞に由来することから、この化合物は血液脳関門を透過し、中枢神経系に作用したと考えられる。また、経口投与で作用する薬物は、ヒトへの適応を考える場合に重要である。現時点では、マウスの SR に直接作用しているのか明らかではない。従って今後は、この薬物投与が脳内 D-セリン量に与える影響を、マイクロダイアリス法などで評価する必要がある。さらに、アルツハイマー病等の神経変性疾患モデル動物に対する薬物作用を評価することで、ヒト神経変性疾患の新規治療薬開発につながると期待される。

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、神経系の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思われる。また、皮膚ではバリア機能の維持に寄与する可能性がある。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1a.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】

本研究は、マウス SR 遺伝子座にヒト SR cDNA 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。昨年度、遺伝子組換えベクターの構築を行い、ヒト SR cDNA がマウス SR 遺伝子座に挿入された ES 細胞クローンを取得した。本年度は、この ES 細胞を用いてマウス個体作製を試みたが、目的のキメラマウス系統は、まだ得られていない。

【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、マウス系統作製を継続して進める。

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】

最終年度は、最後のヒット化合物の誘導体合成を行い *in vitro* でのセリンラセマーゼ阻害活性評価を実施したところ、これまでに合成した3種類の誘導体と比較してかなり強力な阻害活性を示す化合物を見出した。(Table 1, 誘導体15, 23) これらについては、数種類の *in vivo* 評価を検討している。尚、本誘導体の詳細な構造は、LSIP ファンドとの兼ね合いにより公表を控えさせていただきます。

Table 1

LW	structure	% human SR at 1 mM	LW	structure	% human SR at 1 mM
No. 6	ヒット化合物	27 (64 Mal)	19*	誘導体 19	31 (63 Mal)
1*	誘導体 1	23 (64 Mal)	20*	誘導体 20	52 (63 Mal)
2*	誘導体 2	33 (64 Mal)	21*	誘導体 21	49 (57 Mal)
3*	誘導体 3	35 (64 Mal)	22*	誘導体 22	-----
4*	誘導体 4	24 (64 Mal)		誘導体 23	18 (0.3 mM)
5*	誘導体 5	22 (64 Mal)			41 (0.1 mM)
6*	誘導体 6	27 (64 Mal)			58 (0.03 mM)
7*	誘導体 7	28 (64 Mal)			5 (61 Mal)
8*	誘導体 8	28 (64 Mal)	23*	誘導体 24	31 (57 Mal)
9*	誘導体 9	55 (75 Mal)	24*	誘導体 25	24 (54 Mal)
10*	誘導体 10	48 (75 Mal)	25*	誘導体 26	45 (54 Mal)
11*	誘導体 11	47 (75 Mal)	26*	誘導体 27	31 (54 Mal)
12	誘導体 12	45 (63 Mal)	27	誘導体 28	41 (54 Mal)
13*	誘導体 13	44 (63 Mal)	28*	誘導体 29	74 (77 Mal)
14*	誘導体 14	38 (63 Mal)	29*	誘導体 30	67 (77 Mal)
15*	誘導体 15	20 (63 Mal)	30	誘導体 31	70 (57 Mal)
		28 (0.3 mM)	31*	誘導体 32	40 (57 Mal)
		46 (0.1 mM)			72 (1 mM)
		51 (0.03 mM)			81 (0.3 mM)
	11 (61 Mal)			64 (0.1 mM)	
16	誘導体 16	46 (63 Mal)	32*	誘導体 33	
17*	誘導体 17	32 (63 Mal)	33*	誘導体 34	
18*	誘導体 18	61 (63 Mal)	34*	誘導体 35	

【考察と今後の展望】

in vitro において強力なセリンラセマーゼ阻害活性を示した誘導体15, 23について, Arc-Luc Tg hairless mice を用いた in vivo での評価およびアルツハイマー病モデルマウスを用いた評価を現在進めており, これらの結果を踏まえ, さらなる化合物デザインへと展開する予定である。

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】

1) 野生型ヒトSRの発現と精製

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。昨年度の研究により、Cys2とCys6をAspに置換した変異型ヒトSRの発現・精製方法を改良し、高収率で目的タンパク質を得ることができた。今年度は、改良した発現・精製方法を野生型ヒトSRに適用し、十分量のタンパク質を得ることに成功した。

2) 野生型ヒトSRの結晶化

野生型ヒトSRの結晶化はシッティングドロップ蒸気拡散法で行った。10 mg/mLの野生型ヒトSR溶液1 μ Lと沈澱剤溶液1 μ Lとをプレート上で混合し結晶化ドロップを作成した。結晶化プレートのリザーバーに400 μ Lの沈澱剤溶液を入れ、結晶化プレートをシールで密閉して20°Cで静置し野生型ヒトSRを結晶化した。初期スクリーニングにおける沈澱剤溶液は、Hampton Research社のCrystal Screen 1とIndexを用いた。初期スクリーニングの結果、以下の2条件で野生型ヒトSRの結晶を得た。

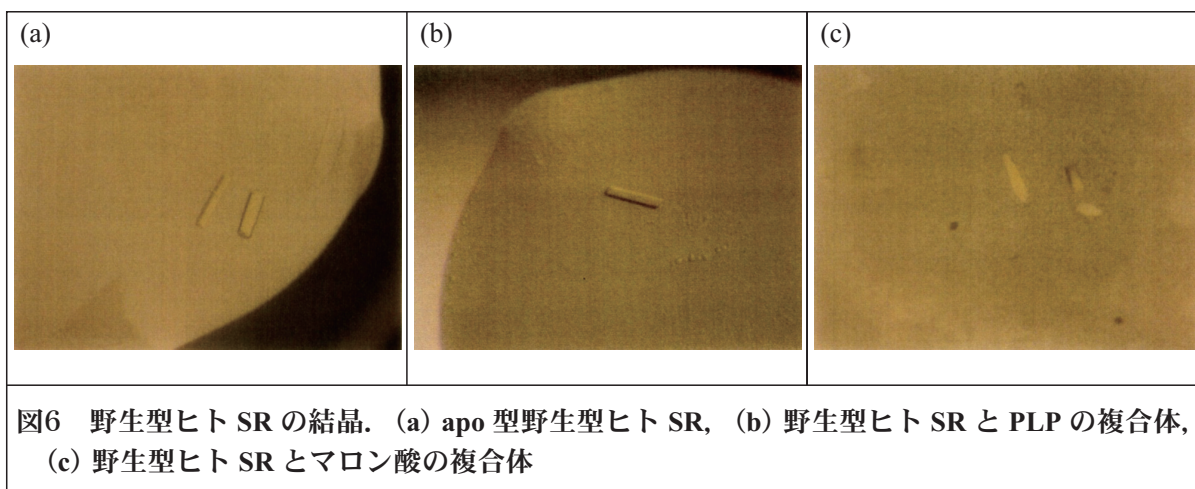
条件1：0.2 M magnesium acetate tetrahydrate, 0.1 M sodium cacodylate trihydrate (pH 6.5), 20% w/v polyethylene glycol (PEG) 8000

条件2：0.2 M sodium acetate trihydrate, 0.1 M tris hydrochloride (pH 8.5), 30% w/v PEG4000

さらに良質な結晶を得るために結晶化条件の最適化を行った。最適化は、上記の条件 1, 2 の pH を変えたり、PEG の種類や濃度を変えて行った。その結果、apo 型の野生型ヒト SR について良質な結晶が得られた (図 6a)。また、野生型ヒト SR と PLP の複合体についても良質な結晶が得られた (図 6b)。

さらに、野生型ヒト SR とマロン酸の複合体についても結晶化条件の探索を行った。マロン酸との複合体を得る際には、野生型ヒト SR はピリドキサルリン酸 (PLP) を加えずにゲルろ過を行い、その後マロン酸が 5 mM, PLP が 50 μ M となるようにそれぞれ加えた。Crystal Screen 1 を用いた初期スクリーニングでは、上記の条件 2 で結晶が見られた。さらに、結晶化条件を最適化することで良質な結晶を得ることに成功した (図 6c)。

野生型ヒト SR と阻害剤 (original 63) の複合体についても結晶化条件を探索した。阻害剤 (original 63) が溶解する条件を調べたところ、10% ジメチルホルムアミド (DMF) 中では 0.6 mM の濃度で阻害剤を溶解することができた。そこで、野生型ヒト SR と阻害剤 (original 63) の複合体を 10% DMF 存在下で調製し結晶化条件を探索したが、複合体の結晶を得ることはできなかった。



3) X線結晶構造解析

Apo 型の野生型ヒト SR, 野生型ヒト SR-PLP 複合体, 野生型ヒト SR-マロン酸複合体の結晶に、終濃度が 30% になるようにグリセロールを加えて凍結保護し、液体窒素中で保存した。回折データの収集は、大型放射光施設 Spring8 の構造生物学ビームライン (BL38B1, BL41XU) において、結晶を 100K に冷却して行った。データ処理は iMosflm と Scala を用いて行い、分子置換法による位相決定とモデルの精密化を試みた。その結果、野生型ヒト SR-PLP 複合体について、図 7 に示す立体構造を得

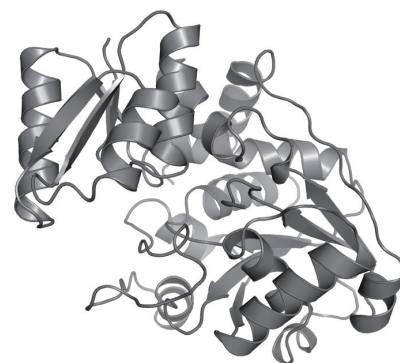


図 7 X線結晶構造解析によって得られた野生型ヒト SR-PLP 複合体の立体構造.

ることができた。しかし、回折データの質が不十分であったため、今回は精密な解析を行うことができなかった。In silico スクリーニングで新規阻害剤の探索を進めるためには、今後も継続して野生型ヒト SR の X 線結晶構造解析に取り組む必要がある。

【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.
- Inoue, R., Yoshihisa, Y., Tojo, Y., Okamura, C., Yoshida, Y., Kishimoto, J., Luan, X., Watanabe, M., Mizuguchi, M., Nabeshima, Y., Hamase, K., Matsunaga, K., Shimizu, T., Mori, H. Localization of serine racemase and its role in the skin. **J. Invest. Dermatol.** In press.
- 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, 2012.
- 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., Oliet, 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.
- 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る。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。昨年度は、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活性を有する生薬として苦参と連翹を特定した。今年度はそれらに関し、脊髄損傷モデルマウスでの活性評価により *in vivo* での有効性を検討し、さらに活性成分の同定にも進んだ。

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。昨年度までの検討により有効性を示した苦参、連翹に関して、本年度は、その活性成分の特定を目指した。生薬エキスの分離・精製を進め、活性成分の定量も実施した。

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 はプロテインキナーゼ 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、それによって 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。つまり慢性期に至った脊髄損傷の機能回復は依然として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 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。しかしグリア瘢痕を形成する astrocyte には、積極的に軸索伸展を促す神経成長因子 (BDNF, NGF, NT 3 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、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、昨年度までの研究で軸索伸展活性が認められた苦参、連翹に着目し、in vivo での運動機能改善作用についての評価を行い活性化合物の同定も目指した。

【実験方法】

1) 脊髄損傷マウスの運動機能障害に対する生薬エキスおよび生薬成分の改善作用

ddY マウス（雌性，8 週齢）の第10胸椎を切除し，露出させた脊髄に6.5 g の錘を 2 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，苦参水エキス，連翹水エキス（500 mg/kg，経口）またはマトリン（10,100 $\mu\text{mol/kg}$ ，経口），オキシマトリン（10,100 $\mu\text{mol/kg}$ ，経口）の投与を31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，加えて我々が考案した TMS スコア（投稿中）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，セロトニン（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。

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 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。

【実験結果】

苦参，連翹の各エキスを，脊髄損傷マウスに経口投与し，31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 (17,544) = 9.069, $P < 0.0001$ ），BSS スコア（薬物 x 経過日数の間の交互作用：F (17,544) = 9.232, $P < 0.0001$ ），TMS スコア（薬物 x 経過日数の間の交互作用：F (17,544) = 10.49, $P < 0.0001$ ）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 (17,510) = 3.317, $P < 0.0001$ ），BSS スコア（薬物 x 経過日数の間の交互作用：F (17,510) = 4.449, $P < 0.0001$ ），TMS スコア（薬物 x 経過日数の間の交互作用：F (17,510) = 3.295, $P < 0.0001$ ）が有意に改善した。苦参エキス投与群の脊髄損傷部位では，5-HT 陽性軸索の密度が有意に増加していた。

苦参，連翹の各水エキスを分画し（共同研究者・紺野の項），CSPG 基質上の軸索形成に対する作

用を検討した。苦参エキスの酢酸エチル画分は無効であり、アルカロイド画分、水画分には軸索伸展活性が認められた。同濃度での活性はアルカロイド画分の方が強い傾向があった。苦参の主要成分としてマトリンとオキシマトリンが知られており、特にアルカロイド画分にはこの2成分がともに多く含有されていることが示された（共同研究者・紺野の項）。

苦参の主成分であるマトリン、オキシマトリンを、脊髄損傷マウスに経口投与し、31日間の後肢運動機能を評価した。溶媒投与群と比較して、マトリン（100 $\mu\text{mol/kg}$ ）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 (15,330) = 6.427, $P < 0.0001$ ）、BSSスコア（薬物 x 経過日数の間の交互作用：F (15,330) = 4.071, $P < 0.0001$ ）、TMSスコア（薬物 x 経過日数の間の交互作用：F (15,330) = 6.132, $P < 0.0001$ ）が有意に改善した。マトリンの低用量（10 $\mu\text{mol/kg}$ ）、およびオキシマトリンは無効だった。

連翹の画分に関しては、酢酸エチル画分、アルカロイド画分、水画分のいずれにも軸索伸展活性が検出された。活性の強さによる画分の絞り込みができなかった。そこで疎水性の差により再分画を実施し、再度、軸索伸展活性を検討している。

【考察】

昨年度の研究においては、110種類の生薬を対象に、細胞でのスクリーニングを行い、CSPG上での軸索伸展阻害を乗り越える活性を、苦参、牛膝、連翹に見出した。さらに昨年は、脊髄損傷マウスに、300 mg/kgの用量で30日間投与する実験により、苦参エキスと連翹エキスによる後肢運動機能改善作用を示した。今年度はその再現性を検討した結果、確かに苦参エキス（500 mg/kg）及び連翹エキス（500 mg/kg）に後肢運動機能改善作用があることを明らかにし、少なくとも苦参エキス投与群では、損傷部位での縫線脊髄路の伸展が認められる結果も得た。苦参エキス500 mg/kg中には、45 $\mu\text{mol/kg}$ のマトリン、10 $\mu\text{mol/kg}$ のオキシマトリンが含有されていることが分かったため（共同研究者・紺野の項）、10 $\mu\text{mol/kg}$ 、100 $\mu\text{mol/kg}$ の用量で、マトリンおよびオキシマトリンの経口投与を実施したところ、マトリンにのみ効果が認められた。

経口投与後のオキシマトリンの大部分はマトリンへ代謝される（Fan et al., 2013）と報告されていることも鑑みると、苦参エキス中の脊髄損傷改善に関わる活性成分はマトリンであることが示唆される。現在、マトリン投与群の損傷脊髄内での組織変化を検討中であるとともに、マトリンの分子作用機序について検討している。

これらの検討により、脊髄損傷の治療につながるターゲットシグナルが明らかにでき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。また一連の研究結果より、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。よってこの実験系は、今後、薬物や活性化合物のスクリーニングへの利用や、薬物の作用機序の解明に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. Methylprednisolone in the treatment of acute spinal cord injury has become more and more questioned. *Lakartidningen*. 2005; 102 (24-25) : 1887-1888,
- 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.
- 8) Fan R, Liu R, Ma R, Bi K, Li Q. Determination of oxymatrine and its active metabolite matrine in human plasma after administration of oxymatrine oral solution by high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Fitoterapia*. 2013; 89 : 271-277.

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⁾。さらに、代謝研究によって、Withanoside IV は投与後代謝され、糖部分がはずれたアグリコン (サポゲニン) sominone となって活性を発揮することも証明した^{4,5)}。そこで、sominone およびその誘導体を化学合成し、より活性が強く合成も比較的容易な denosomin を創成するに至った^{6,7)}。この一連の研究は、伝統薬物成分、特にステロイドサポニンあるいはそのアグリコン (サポゲニン) が、抗認知症薬・脊髄損傷改善薬開発のためのリード化合物になり得ることを示したものと言える。

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。

昨年度までに、110種の和漢生薬エキスについてスクリーニングを行ない、3種 (苦参, 牛膝, 連翹) に強い軸索伸展活性を認め⁸⁾。さらに、うち2種 (苦参, 連翹) は、脊髄損傷マウスの後肢運動機能を有意に回復させた。そこで、活性物質の特定を目指して、これら2種の生薬エキスの分離・精製を進めた。

【結果】

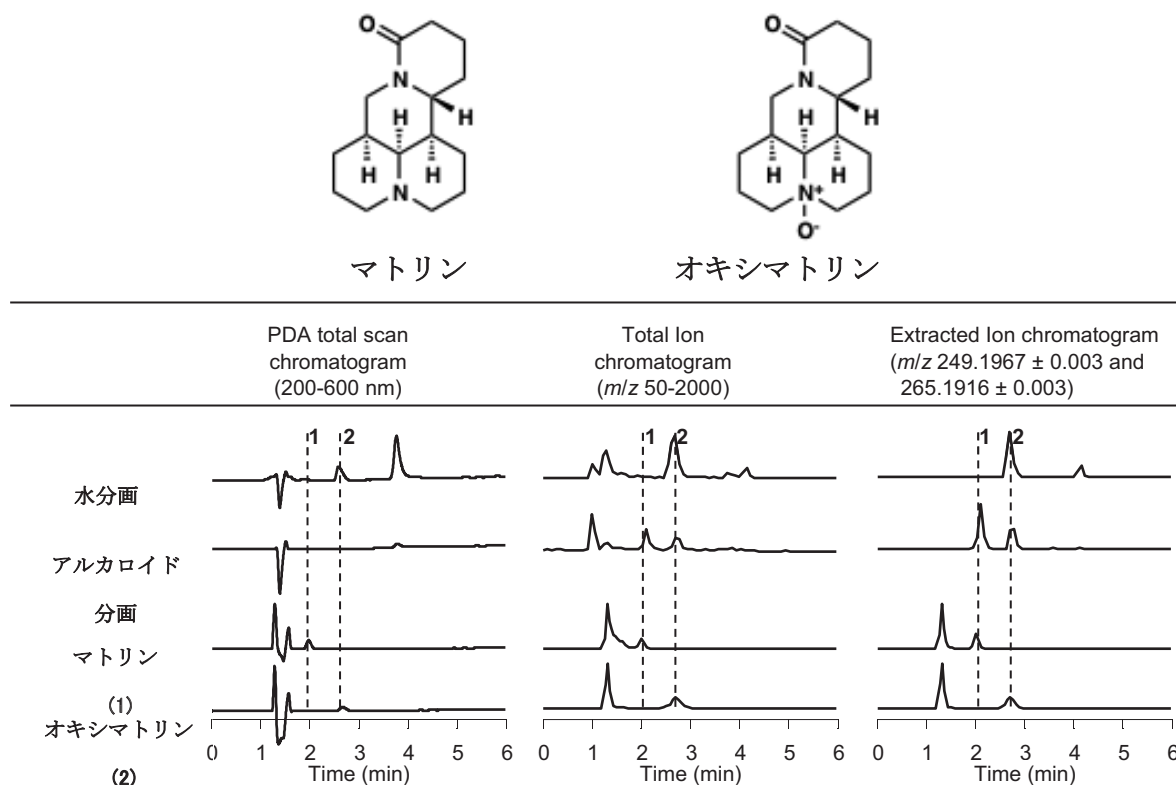
1. 苦参エキス中の活性成分

まず、定法に従って溶媒分画を行った。苦参エキスを酢酸エチルで抽出し、酢酸エチル分画を得た。

水層は、アンモニア水を加えて塩基性とした後、クロロホルムで抽出してアルカロイド分画とした。残った水層を凍結乾燥し、水分画を得た。

こうして得られた三つの分画の軸索伸展活性を調べたところ、アルカロイド分画と水分画が活性を示したが、酢酸エチル分画には活性が認められなかった。この結果から、活性成分はアルカロイド関連物質と考えられた。そこで次に、活性を示した二つの分画に、これらアルカロイドが含まれているかどうかを、LC-MSを用いて検討した。

結果を図1に示す。標品のマトリン、オキシマトリンは、それぞれRT 2 min および2.7 min に溶出される。これと比較しながら分析すると、水分画にはオキシマトリンのみが、アルカロイド分画には、マトリンとオキシマトリンの両方が検出された。精密質量分析においても、それぞれの分子式に一致する値を与えた。



HPLC conditions: CAPCELL PAK C₁₈ UG-120, 1.5 x 120 mm (Shiseido), 5-95% MeCN/H₂O/0.1% HCO₂H for 25 min, 0.2 mL/min at 25 °C, detected by ESI-(+)-Orbitrap MS (ThermoScientific).

図1. マトリン、オキシマトリンのLC-MS分析

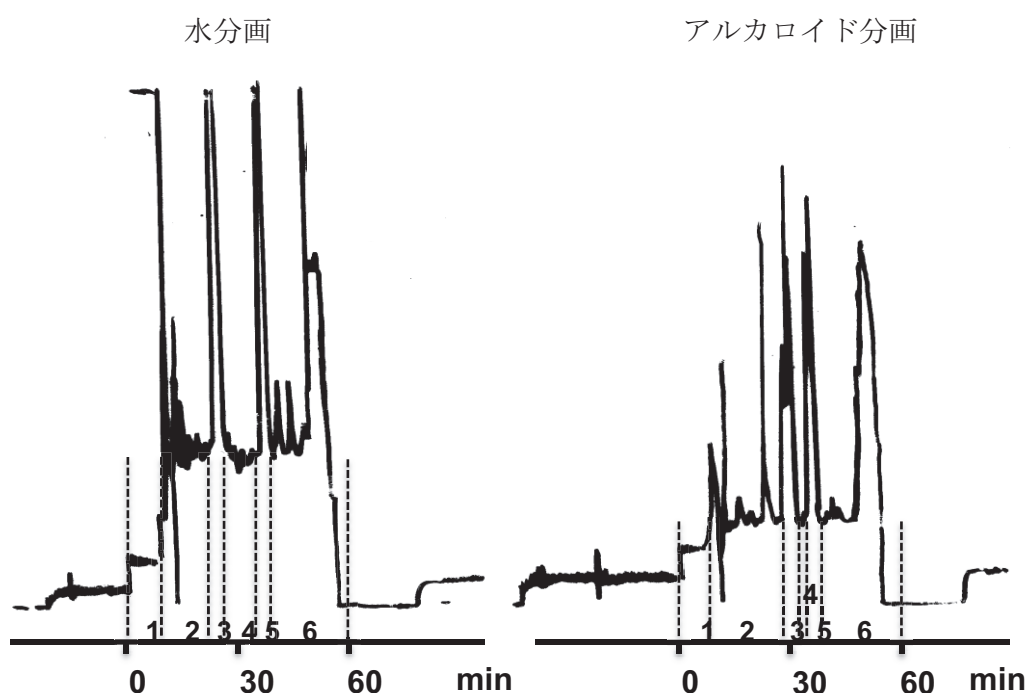
さらに、各分画での含有量を知るために、両化合物の定量を試みた。標品を用い、上記LC-MS法にて検量線を作成し、これに基づいて定量した結果を表1に示す。アルカロイド分画には、エキスに比べてマトリンは約5倍、オキシマトリンは約2倍の濃度で含まれていて、溶媒分画によって効率良く濃縮されていることがわかる。しかし、水分画のオキシマトリン含量は低く、活性のなかった

表1. マトリン, オキシマトリンの定量

	マトリン ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	オキシマトリン ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
苦参エキス	22.4	5.3
水分画	0.1	0.4
アルカロイド分画	140.3	9.5
酢酸エチル分画	0.7	0.2

酢酸エチル分画と同程度であった。このことは、水分画には、オキシマトリン以外の活性成分が存在することを示唆する。

そこで次に、各活性分画を再分画することにより、オキシマトリン以外の活性成分を検索した。逆相 HPLC を用いて再分画した結果を図 2 に示す。水およびアルカロイド分画から、それぞれからさらに 1~6 の分画を得た。LC-MS 分析により、水分画からは画分 5 にオキシマトリンが、アルカロイド分画からは画分 3 にマトリン、画分 5 にオキシマトリンが溶出されていることがわかった。現在、これら再分画成分の軸索伸展活性を検討している。



HPLC conditions: Xtera Prep MS C₁₈ ODB, 19 x 250 mm (Waters), 5-15% (40 min)-95% (60 min) MeCN/H₂O/0.05 M TFA, 5 mL/min at UV 210 nm.

図 2. HPLC による再分画

2. 連翹エキスの分離・精製

連翹エキスについても、苦参エキスと同様な方法で溶媒分画したが、軸索伸展活性はどの分画にも有意に見られ、苦参エキスのように特定の分画に集中することはなかった。すなわち、連翹エキスの場合、溶媒分画は活性成分の分離・精製には適切な方法ではないことがわかったので、別の方法で分

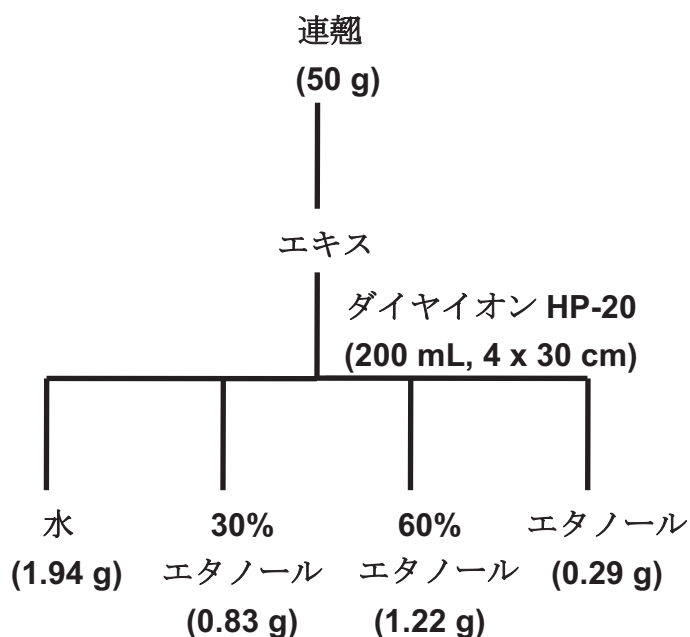


図3. 連翹エキスのだイヤイオン HP-20 による分画

【考察】

110種の和漢生薬エキスの軸索伸展活性スクリーニングから、2種（苦参，連翹）の活性の強いエキスを選び、活性成分の検索を行った。苦参エキスからは、溶媒分画によって活性成分が効率良くアルカロイド分画に分配・濃縮され、活性物質としてマトリンを同定した。マトリンは、苦参の主アルカロイド成分としてよく知られ、これまでに神経保護作用，抗がん作用，抗炎症作用が報告されているが、軸索伸展活性は、本研究によって初めて見出された。水分画も、アルカロイド分画と同様の活性を示したが、オキシマトリンの含量は非常に低く、他の活性成分の存在が示唆された。そこで、逆相HPLCで再分画し、他の活性成分の分離・精製を検討している。連翹エキスは、苦参エキスとは異なり、同様の溶媒分画では効率良く活性成分を濃縮できないことがわかった。すなわち、苦参とは活性物質の化学的性質が異なることが窺える。そこで現在、ダイヤイオン HP-20を用いた疎水性吸着クロマトグラフィーによる分画を検討している。

ここで得られた結果は、和漢生薬が脊髄損傷改善に有効な薬物素材であることを、現実に示したものであると言える。これらの情報をもとに、今後さらに活性成分の分離・精製，活性物質の同定ができれば、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.

画することにした。ダイヤイオンHP-20は、疎水性相互作用に基づいた吸着クロマトグラフィーで、生薬エキスのような多成分混合物を疎水性，親水性の成分に分離するため繁用される方法である。連翹エキスにこの方法を試みることにした。分離スキームを図3に示す。全体の約半量は吸着されずに素通りし，残り半分がエタノール濃度の段階溶出によって，少しずつ溶出されてきていることがわかる。現在，これら分画の軸索伸展活性を検討中である。

- 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.
- 4) Kuboyama T., Tohda C., Komatsu K. Withanoside IV and its active metabolite, sominone, attenuate A (25-35)-induced neurodegeneration, *Eur. J. Neurosci.*, (2006) **23**, 1417-1426.
- 5) Tohda C., Joyashiki E. Sominone enhances neurite outgrowth and spatial memory mediated by the neurotrophic factor receptor. *Br. J. Pharmacol.* (2009) **157**, 1427-1440.
- 6) Matsuya Y., Yamakawa Y., Tohda C., Teshigawara K., Yamada M. and Nemoto H. Synthesis of sominone and its derivatives based on RCM strategy: discovery of a novel anti-Alzheimer's disease medicine candidate "denosomin". *Org. Lett.* (2009) **11**, 3970-3973.
- 7) Teshigawara K., Kuboyama T., Shigyo M., Nagata A., Sugimoto K., Matsuya Y. and Tohda C. A novel compound, denosomin, ameliorates spinal cord injury via axonal growth associated with astrocyte-secreted vimentin. *Br. J. Pharmacol.* (2013) **168**, 903-919.
- 8) Kuboyama T., Luo X., Park K., Blackmore M. G., Tojima T., Tohda C., Bixby J. L., Lemmon V. P., Kamiguchi H. Paxillin phosphorylation counteracts proteoglycan-mediated inhibition of axon regeneration. *Exp. Neurol.* (2013) **248**, 157-169.

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

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 博士らは、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。

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に至るまでの機序を解明して鍵となる分子を同定することが重要となる。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)。また, dystrophic endball では PKA が活性化していることを明らかにしている。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と考えられた。そこで本年度は, dystrophic endball における PKA の活性化制御機構について検討した。

【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

実験 1 では培養 4 時間後に薬物を処置し, その 2 日後, 戸島らの方法 (Tojima et al, 2007) に準じて細胞を固定し, 神経マーカーのウサギ抗 β -tubulin III ポリクローナル抗体 (Sigma) 及びマウス抗 CSPG モノクローナル抗体 (CS-56, Sigma) を用いて免疫染色を行った。倒立蛍光顕微鏡 (BZ-8000, KEYENCE) を用いて蛍光画像を取得した。CSPG 濃度勾配の外側の端から内側へ 120 μ m の距離の間に伸長した軸索の長さを定量した。

実験 2 では, 培養 2 日後, 薬物を 5 分間処置した後に上述した手法で細胞を固定した。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 Axio Vision software (Carl Zeiss) を用いて定量した。

【実験結果】

1. cAMP 阻害による軸索再生作用

PKA 阻害剤によって CSPG 濃度勾配を横切る軸索再生が促進されることは既に明らかにしている。PKA は cAMP 増加によって活性化される。そこで cAMP 阻害剤処置による CSPG 濃度勾配上の軸索

再生に対する作用を検討した。CSPG 濃度勾配下で培養した神経細胞に対して、cAMP のアンタゴニスト Rp-cAMPS (20, 10, 200 μ M), 膜貫通型アデニル酸シクラーゼ阻害薬 2',5'-dideoxyadenosine (0.1, 1, 10, 50 μ M), 細胞質型アデニル酸シクラーゼ阻害薬 2-hydroxyestradiol (1, 5, 10 μ M) を処置したが、いずれも濃度勾配を横切る軸索の長さは増加しなかった。

2. Dystrophic endball における cAMP 阻害時の PKA の活性

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 および PKARII に対する抗体を用い、神経軸索終末部における pS⁹⁶ PKARII と PKARII の蛍光強度の比をとり、PKA の活性を評価する実験を行った。PKA の catalytic domain に作用して直接 PKA の活性を阻害する KT5720 (1 μ M) および mPKI (1 μ M) を dystrophic endball に処置した時、pS⁹⁶ PKARII に対する PKARII の比 (PKA の活性) は減少した。一方、Rp-cAMPS (200 μ M), 2',5'-dideoxyadenosine (50 μ M), 2-hydroxyestradiol (10 μ M) を処置しても PKA の活性は減少しなかった。

【考察】

以上の研究結果から、CSPG 濃度勾配上の dystrophic endball では PKA の活性が増加しているが、これは dystrophic endball で cAMP の濃度が増加しているためではなく、何らかの機構で PKA が直接活性化されていることが推測された。Proline-directed protein kinase や RSK1 など、PKA の regulatory domain と catalytic domain の間の相互作用を調整して PKA を活性化させるプロテインキナーゼがいくつか報告されており (Braun et al., 1991; Chaturvedi et al., 2006; Houslay et al., 2006), CSPG 濃度勾配はこのようなキナーゼの活性を制御するなどして PKA を直接活性化しているかもしれない。これまでの研究成果より、CSPG 濃度勾配下で再生不全に陥った軸索を再生させる機序として、PKA 阻害による PAK, paxillin を介した再生機序を明らかにした。本成果は、脊髄損傷治療薬の新たな分子ターゲットを提唱するものである。以上の久保山の研究成果の一部は、Experimental Neurology に発表した (Kuboyama et al., 2013)。

【参考文献】

- Braun RK, Vulliet PR, Carbonaro-Hall DA, Hall FL. Phosphorylation of RII subunit and attenuation of cAMP-dependent protein kinase activity by proline-directed protein kinase. *Arch Biochem Biophys*, 289:187-191, 1991.
- Chaturvedi D, Poppleton HM, Stringfield T, Barbier A, Patel TB. Subcellular localization and biological actions of activated RSK1 are determined by its interactions with subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol*, 26:4586-4600, 2006.
- 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.
- Houslay MD. A RSK(y) relationship with promiscuous PKA. *Sci STKE*, 2006:pe32, 2006.
- 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.
- Kuboyama T, Luo X, Park K, Blackmore MG, Tojima T, Tohda C, Bixby JL, Lemmon VP, Kamiguchi H. Paxillin phosphorylation counteracts proteoglycan-mediated inhibition of axon regeneration. *Exp Neurol*, 248:157-169, 2013.
- 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

加齢や生活習慣が危険因子である眼疾患として、糖尿病網膜症、加齢黄斑変性症、緑内障、及び網膜色素変性症が挙げられる。急速な高齢化が進んでいる現代において、これら疾患の治療法開発は急務である。*In vitro* 薬理試験によって、これら眼疾患に対する薬理標的が徐々に提案されている。その一方で、現在加齢黄斑変性症に適応されている pegaptanib などは硝子体内に投与される薬物であり、末梢投与にて効果を示す薬物の開発は進んでいない。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最も解決すべき課題は「循環血液から網膜への物質移行を制限する血液網膜関門 (BRB) を突破するための戦略構築」である。この戦略構築によって、経口もしくは静脈内薬物投与によって眼疾患を内科的に治療することが可能となる。

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を解明し、さらに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。BRB には循環血液中に存在する物質を選択的に認識し、網膜へ促進的に輸送させる分子機構の存在が示されてきている¹⁾。我々は脳と網膜への物質移行性と化合物の脂溶性との相関を *in vivo* ラット総頸動脈単回投与方法 (retinal uptake index (RUI)/brain uptake index (BUI) 法) にて検討した結果、有機カチオン性薬物である verapamil は、その脂溶性から予想される移行性の指標値と比較し、高い値を示す一方で、低い脳移行性を示した²⁾。本解析結果から、「**BRB は verapamil を選択的に認識する輸送機構**」を備えており、本機構に認識されるような薬物を網膜へ効率的に薬物を送達させることが可能と考えられた。この verapamil 認識型の血液網膜関門 novel カチオン輸送担体の薬物認識・輸送機構を明らかにするとともに、本機構を網膜疾患治療薬送達へと展開させる基盤を築くことが本課題における研究目的である。

研究成果の概要及び結論

本課題 3 年目において、本薬物輸送機構について網膜疾患治療への展開を視野に、カチオン性薬

物で網膜神経保護作用を有する薬物の透過性評価とそれを担う分子実体特定に着手した。また、一部の化合物について、BRBを介し網膜から循環血液中へ排出輸送されることが明らかにされていることから、BRBにおける有機カチオン性化合物排出輸送機構の有無を評価した。さらに、BRB積極的透過パスポート構造候補となる官能基導入の足掛かりとなるハロゲン置換基導入について、位置選択的ヨード化反応の条件検討を実施し、最適な反応条件の設定を完了させると共に、反応の官能基導入にあたる有用性を検証した。

細谷班は有機カチオン性 α_2 -agonistであるclonidineの循環血液中から網膜へのBRBを介した輸送機構を*in vivo*及び*in vitro*実験手法にて評価した。これまでの検討から、BRBを介した網膜へのカチオン性薬物移行について、verapamilとpropranololはそれぞれ異なるinner BRB輸送機構に認識され、輸送されていることが明らかとなった。Clonidineは高血圧薬であるが、網膜視神経障害を抑制することが報告されている。緑内障の進行には神経障害が関わることから、clonidineのBRB透過メカニズム解明は、効率的なclonidineの網膜への送達、そして緑内障治療法確立へ繋がると期待される。循環血液から網膜へのBRB透過を*in vivo*及び*in vitro*実験系を用いて評価したところ、(i)循環血液から網膜へのclonidine輸送はBRB輸送機構介在型であること、(ii)Inner BRBにおけるclonidine輸送は、これまで見出されたverapamil及びpropranolol輸送機構と類似性を有している、の2点が明らかとなった。現在、clonidineの緑内障治療に向けての投与方法・ドラッグデザインを視野に、BRBにおけるclonidine輸送を制御するため、分子実体特定とその制御機構解明に取り組んでいる。

赤沼班は抗炎症薬の網膜への送達を目標に計画していたが、カチオン性官能基を有する抗炎症薬はBRBに存在するnovelカチオン輸送担体の輸送基質となる可能性が低いと考えられた。有機カチオン性炎症関連物質としてhistamineなどが知られており、histamineは糖尿病モデルにて網膜内合成酵素活性上昇が報告されている。そこで、「カチオン性炎症関連物質のBRBカチオン輸送担体を介し、網膜から促進的に排出させることで網膜内炎症応答を低下させる」というBRBカチオン輸送担体を利用した間接的抗炎症作用が望めるかを検証した。初めにhistamineを基質とする輸送担体の機能評価プローブ化合物である1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)のBRB透過を解析したところ、MPP⁺はBRBを介し排出輸送されることが示され、その過程への有機カチオン輸送担体OCT3・PMATの関与が示唆された。Histamineはこれら輸送担体の基質と報告されている。そこで、histamineのBRB排出輸送を評価したところ、BRB非透過性化合物と比較し1.3倍消失速度定数が高値であったものの、有意ではなかった。従って、BRBには有機カチオン化合物の排出輸送機構を備えているものの、内因性炎症関連化合物の網膜からのクリアランスには大きく寄与しないことが示唆された。ただし、本研究にて初めて「BRBはカチオン性化合物排出機構を備えている」ことが実証され、この排出機構に認識させないような網膜疾患適用薬が最適なシーズであると考えられる。

久保班は昨年度から引き続き、網膜選択的薬物送達に繋がるnovelカチオン輸送担体の分子実体特

定に向けた機能解析を実施すると共に、inner BRB において発現が示された novel カチオン輸送担体候補分子に対する特異的ポリクローナル作成に着手した。SLC family について、inner BRB 及び outer BRB において発現する分子の発現細胞を構築し、各種プローブ薬物の輸送解析を実施したところ、2種類の分子について、非発現細胞と比較しカチオン性薬物である clonidine の輸送変化が示され、これら分子が BRB において有機カチオン性薬物輸送に寄与する可能性が示唆された。また、inner BRB において発現が示された SLC ファミリーでカチオン性化合物を輸送する SLC16A に属する分子2種類について、詳細な網膜における発現局在パターンの解明と選択的な網膜への薬物送達ツールへの展開を視野に、ポリクローナル抗体作成を試みた。経過として、エピトープタンパク質発現系を構築し、モルモット能動免疫を実施するにあたり、十分量のものが得られた。現在、本タンパク質を用い、モルモットに対し、免疫を行っている。

松谷班は、「イミダゾ [2,1-b] チアゾール」を有効なパスポート構造として設定し、本骨格の効率的導入を念頭に、導入反応の足掛かりとなるイミダゾ [2,1-b] チアゾール骨格に対する位置選択的ヨウ素化反応について精査し、本法を確立した (3 種類, ヨード体の最大収率89%)。また本ヨード体 3種類を用いた Suzuki-Miyaura クロスカップリング反応について、単純有機ホウ素化合物 (Ar-B (OH)₂) をモデル化合物として検討を行ったところ、カップリング体を40-70%の収率で得ることに成功した。今後、本反応を応用することで網膜疾患治療薬の送達向上に繋がるかを、機能的解析にて検証していく予定である。

【参考文献】

- 1) Hosoya K, Tomi M, Tachikawa M. Strategies for therapy of retinal diseases using systemic drug delivery: relevance of transporters at the blood-retinal barrier. *Expert Opin Drug Deliv.* 8, 1571-87 (2011)
- 2) Hosoya K, Yamamoto A, Akanuma S, Tachikawa M. Lipophilicity and transporter influence on blood-retinal barrier permeability: a comparison with blood-brain barrier permeability. *Pharm. Res.* 27, 2715-24 (2010)

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、緑内障などの網膜疾患に対する治療薬を送達することである。これまでの研究成果から、有機カチオン性薬物である verapamil と propranolol に関して、血液網膜関門（BRB）を介した循環血液中から網膜への移行には inner BRB に存在する分子実体未知（novel）カチオン輸送担体の関与が示唆された^{1,2)}。加えて、ラット inner BRB モデルである TR-iBRB2 細胞を用い、verapamil や propranolol 輸送阻害を指標に各種化合物の認識性を評価したところ、神経保護作用を有する有機カチオン性薬物が本トランスポーターに認識される可能性が示唆された。緑内障時には網膜神経細胞死が認められるため、神経保護作用の網膜への効率的送達法を確立することは、本疾患に対する薬物療法を実施するにあたり、極めて重要である。

これら神経保護薬の中で、inner BRB 輸送機構解明候補として、高血圧治療薬である clonidine に着目した。Clonidine は、腹腔内投与によって光障害に対し保護作用を示すことや、網膜視神経障害を抑制することが報告されており、網膜神経保護の上で有望な薬と考えられる。一方、上述のように循環器系疾患に clonidine は現在適応されている。そのため、網膜疾患に clonidine を適用させるにあたって、「網膜へ選択的に移行させる」方法の確立が必須となる。この網膜への選択的移行を実現する上で、inner BRB に存在する novel カチオン輸送担体は網膜移行過程における重要なツールであると考えられる。

本研究では、BRB の clonidine 透過特性を詳細に解明することを目的とした。*In vivo* BRB 透過は総頸動脈単回投与法（retinal uptake index 法）にて評価し、加えて inner BRB における clonidine 輸送特性、特に novel カチオン輸送担体の clonidine 輸送への関与は、TR-iBRB2 細胞を用いて評価した。

【実験手法】

(A) 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]clonidine and 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{injectate}$ [¹⁴C]*n*-butanol in Ringer-HEPES buffer (pH

7.4)) を総頸動脈へ瞬時に200 μ L 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, %) は Eq. 1 から算出した。

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

(B) 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。

(C) TR-iBRB2 細胞における ^3H clonidine 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 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 clonidine (PerkinElmer Life & Analytical Sciences) を0.5 μ Ci/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、培養用 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 μ L 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 μ L 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 μ L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. 2)。

$$\text{Cell/medium ratio (\mu L/mg protein)} = \frac{[^3\text{H}]\text{Compound concentration in the cell (dpm/mg protein)}}{[^3\text{H}]\text{Compound concentration in the medium (dpm/\mu L)}} \quad \dots [\text{Eq. 2}]$$

^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} , nmol/(min•mg protein)) 及び Michaelis-Menten 定数 (K_m , μ M) は、基質濃度 ($[S]$, μ M) 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。

【結果・考察】

A. *In vivo* BRB を介した³H]clonidine 網膜移行特性

In vivo 環境下における³H]clonidine の BRB 透過様式を解析した。³H]Clonidine の RUI 値は非標識 clonidine や pyrilamine, propranolol にて、40 mM 共存下、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) や nicotine (40 mM) の共存にて、³H]clonidine の RUI 値はコントロールと比較し約30%低下した。一方、既知有機カチオン輸送担体の基質である tetraethylammonium (TEA, 40 mM) や有機アニオン輸送担体基質である *p*-aminohippurate (PAH, 40 mM) や probenecid (40 mM) にて、³H]clonidine の RUI 値は変化しなかった。以上の点から、clonidine は *in vivo* BRB を介し循環血液中から網膜へ輸送されること、そしてその過程には既知有機カチオン輸送担体ではなく、verapamil や pyrilamine, propranolol 感受性の輸送機構が関与することが示唆された。

B. *In vitro* inner BRB モデル細胞における³H]clonidine 輸送特性

TR-iBRB2 細胞への clonidine 輸送は、時間依存性、温度依存性および濃度依存性 ($K_m = 286 \mu\text{M}$) を示した。また、その輸送活性は細胞外 pH と正の相関、及び細胞内 pH と負の相関を示したことから、inner BRB における clonidine 輸送機構は H^+ との対向輸送型であることが示唆された。さらに、その輸送は取り込み実験 buffer 中 Na^+ の choline 置換や K^+ 置換条件下にて変化しなかったことから、本輸送機構は「 Na^+ 非依存性」および「膜電位非依存性」であることが示唆された。以上の解析結果を総合すると、inner BRB における clonidine 輸送は担体介在型であり、その機構は Na^+ 及び膜電位非依存性の H^+ /organic cation antiporter であることが示唆された。

これまでに、 H^+ /organic cation antiporter の特性を示す輸送担体は BRB に存在する novel カチオン輸送機構以外に、一部の既報有機カチオン輸送担体もまた同様の性質を示すことが知られている。そこで、inner BRB における clonidine 輸送に寄与する分子を特定するため、各種化合物による阻害効果を検証した。その結果、propranolol や pyrilamine, verapamil などの有機カチオン性薬物群で阻害される一方、既報有機カチオン輸送担体基質である、TEA や 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP^+), choline, L-carnitine, cimetidine, serotonin, putrescine にて阻害されなかった。さらに、有機アニオン輸送担体基質である PAH や diclofenac, acetylsalicylic acid にて阻害されなかった。これらの特性は、TR-iBRB2 細胞への verapamil, pyrilamine, 及び propranolol 輸送実験時にて得られた結果と類似しており、TR-iBRB2 細胞への clonidine 輸送機構について、verapamil や pyrilamine, propranolol の輸送機構との同一性が考えられた。この同一性を、TR-iBRB2 細胞への clonidine 輸送に対する verapamil, pyrilamine, 及び propranolol による阻害様式の解析にて検証を試みたところ、verapamil は、TR-iBRB2細胞における clonidine 輸送に対し、競合阻害の様式 ($K_i = 90 \mu\text{M}$) を示した。一方、この clonidine 輸送に対し、

pyrilamine と propranolol は競合阻害しなかった。以上の結果から、clonidine と verapamil の inner BRB における輸送機構は同一である可能性が示された。

【結論および展望】

本研究結果から、網膜神経保護が期待される clonidine について、inner BRB に存在する verapamil 認識型有機カチオン輸送担体に認識され、網膜へ促進的に輸送されることが示唆された。ただし、網膜以外の組織に対しても移行性を示すことを予備的検証結果から明らかにしている。さらなる網膜への移行性向上に取り組み、循環器薬理作用を示さず、かつ網膜に対し神経保護効果を示すような、安全な薬物の開発の上での本輸送機構の重要性を実証する予定である。

【参考文献】

- 1) Kubo Y, Shimizu Y, Kusagawa Y, Akanuma S, Hosoya K. Propranolol transport across the inner blood-retinal barrier: potential involvement of a novel organic cation transporter. *J. Pharm. Sci.*, **102**, 3332-42 (2013)
- 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.* **30**, 847-56 (2013)

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している。第2年目の解析にて、「novel カチオン輸送担体は一般的な抗炎症薬を認識しない」ことが明らかとなった。そこで、今年度は「網膜内にて、神経毒性・炎症を示すような内因性化合物の効率的なクリアランスを達成するため、BRB を応用する」基礎的検証を実施した。

蓄積することで神経障害など、網膜障害を誘発する有機カチオン化合物として、外因性化合物 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) や内因性化合物 histamine が挙げられる。これらは既報の有機カチオン輸送担体 (OCT や OCTN, MATE, PMAT) の基質であることが報告されている。近年、BRB は網膜からの化合物クリアランスに寄与すること¹⁾、そして inner BRB には少なくとも OCTN2 の発現・機能が報告されていることから²⁾、BRB は MPP⁺ や histamine の網膜内動態に関与する可能性が高い。そこで、第3年目は BRB における MPP⁺ 及び histamine の輸送特性を解明することを目的とし、特に既知有機カチオン輸送担体群の寄与について詳細に評価した。

【実験手法】

(A) 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 μCi/injectate [³H]MPP⁺ and 0.5 μCi/injectate [¹⁴C]*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 (LSC-5200; Aloka) にて放射活性を測定した。Retinal uptake index (RUI, %) は Eq. 1 から算出した。

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

(B) *In vivo* microdialysis 法³⁾

Microdialysis probe (TEP-50; Eicom) の入り口側に Ringer-HEPES buffer で満たしたディスポーザブ

ルシリンジ (Terumo, Kyoto) を polyethylene tube (SP19; ID, 0.35 mm; OD, 1.05 mm; Natsume) を介して接続し, probe の出口側は20 cm の polyethylene tube (SP10; ID, 0.28 mm; OD, 0.61 mm; Natsume) を装着した。シリンジを Infusion pump model 11 (Harvard apparatus, Holyston) にセットし, 流速 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ であらかじめ灌流をスタートさせ, probe 及び polyethylene tube 内部を buffer で満たした。被験化合物 ($[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ 及び $[^3\text{H}]\text{histamine}$) と BRB 非透過性 bulk flow マーカー ($[^{14}\text{C}]\text{D-mannitol}$) を $[^3\text{H}]:[^{14}\text{C}] = 10 (2 \mu\text{Ci}):1 (0.2 \mu\text{Ci})$ となるように溶解した。8 週齢ラットを pentobarbital sodium 腹腔内投与 (50 mg/kg) にて麻酔し, ラット脳定位固定装置 (SR-5R; Narishige, Tokyo, Japan) に固定した。眼瞼閉鎖反射を消失させるため xylocaine を眼部周囲に点滴することで局部麻酔を施し, 上瞼を開かせた状態で固定した。角膜と強膜の境目から約 1 mm 強膜側に22Gの針で穴を開け, 眼球から流出する眼房水を十分に拭き取った。先ほど開けた穴から, 被験薬物溶液をマイクロシリンジ (Hamilton, Nevada) を用い, 強膜から約 3 mm 深い位置に 1 μL 投与した。投与30秒後にマイクロシリンジをゆっくりと抜き取り, 素早く microdialysis probe の先端を強膜から約 3 mm の深さまで挿入し, 外科用アロンアルファ (Daiichi-sankyo) にて接着させた。Probe 挿入時を 0 分とし, 指定時間間隔にて180分間, 透析液のサンプリングを実施した。サンプリング終了後, 投与液及び重量を測定した透析液に monofluor を加え, よく攪拌した後, 液体シンチレーションカウンター (LSC-5200; ALOKA, Tokyo, Japan) にて ^3H 及び ^{14}C の放射活性を測定した。得られた放射活性と透析液重量の商から, 透析液中化合物濃度 (Cd; dpm/mL) を算出し, 投与量 (Dose; dpm) にて規格化した透析液中濃度 (Cp; % of dose/mL) は以下の [Eq. 2] から算出した。

$$C_p (\% \text{ of dose/mL}) = \frac{\text{Cd (dpm/mL)}}{\text{Dose (dpm)}} \times 100 \quad [\text{Eq. 2}]$$

一般に C_p の経時的変化は線形 2-コンパートメントモデルで表現され, その消失 (端末) 相における消失速度定数が硝子体/網膜からの消失を評価にあたり適していることが報告されている。そこで, 各タイムポイントにおける C_p のデータについて, それぞれの経過時間 (t ; min) に対し C_p をプロットすると共に, 以下の Eq. (4) にフィットさせた。

$$C_p = C_1 \times \exp(\lambda_1 \times t) + C_2 \times \exp(\lambda_2 \times t) \quad [\text{Eq. 3}]$$

ここで, C_1 と C_2 はそれぞれ分布相と消失相における初期濃度 (% of dose/mL) を, λ_1 と λ_2 はそれぞれ分布相と消失相における消失速度定数 (min^{-1}) を表している。

(C) TR-iBRB2 細胞及び初代培養ラット RPE 細胞を用いたMPP⁺取り込み解析

TR-iBRB2 細胞及び初代培養網膜色素上皮 (RPE) 細胞を24-well plate に播種し⁴⁾, well 内にて confluent に達した段階で取り込み実験に供した。トレーサー溶液は, $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ (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、培養用 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. 4)。

$$\text{Cell/medium ratio } (\mu\text{L/mg protein}) = \frac{[^3\text{H}]\text{Compound concentration in the cell (dpm/mg protein)}}{[^3\text{H}]\text{Compound concentration in the medium (dpm}/\mu\text{L})} \quad \dots[\text{Eq. 4}]$$

^3H 化合物の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。

【結果・考察】

A. *In vivo* BRB を介した MPP^+ 及び histamine 輸送特性

既報の有機カチオン輸送担体が BRB において発現し、循環血液から網膜への化合物移行に関与するかを検証するため、retinal uptake index (RUI) 法を実施した。 ^3H] MPP^+ 単独投与時の RUI 値は11.9 \pm 2.4%であった。非標識50 mM MPP^+ 共存下における ^3H] MPP^+ の RUI 値は16.5 \pm 2.8%であり、 ^3H] MPP^+ 単独投与時の RUI 値と比較し有意な差は無かった。本結果から、循環血液からBRBを介した網膜への輸送に輸送担体は寄与しないことが示唆された。

網膜から循環血液中への排出過程に BRB が関与するかを検証するため、microdialysis 法を実施した。初めに MPP^+ の硝子体/網膜からの消失への BRB の関与をmicrodialysis 法にて評価したところ、 ^3H] MPP^+ 、及び BRB 難透過であり bulk flow による消失マーカーの ^{14}C] D-mannitol の透析液中濃度推移は、見かけ上二相性を示し、その末端相における各化合物の傾きに異なる傾向が示された。末端相での傾き、即ち消失速度定数 (λ_2) を算出した結果、 ^3H] MPP^+ の λ_2 値は $16.3 \times 10^{-3} \pm 0.2 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ であり、 ^{14}C] D-mannitol の λ_2 値 ($10.5 \times 10^{-3} \pm 0.8 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) と比較し1.6倍有意に高値であった。 MPP^+ と D-mannitol の λ_2 値についての差は、BRB を介した消失機構の存在を示唆する。一方、 ^3H] histamine の λ_2 値は $12.5 \times 10^{-3} \pm 4.6 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ であり、 ^{14}C] D-mannitol の λ_2 値 ($9.84 \times 10^{-3} \pm 2.90 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) と比較し、1.3倍高値ではあったものの、有意ではなかった。従って、 MPP^+ の方が histamine と比較し

BRB を介した排出輸送の活性が高いと判断された。言い換えれば、histamine の網膜内からのクリアランスについて、BRB を介した排出過程の寄与は小さいと判断される。

B. *In vitro* BRB モデル細胞における MPP⁺ 輸送特性

炎症物質 histamine の BRB を介した促進的排出輸送は観察されなかった。しかし、網膜への有機カチオン性薬物送達を実現する上で、「BRB を介し排出輸送される化合物の特徴」を明らかにすることは高い重要性を有すると判断された。そこで、MPP⁺ をプローブ化合物として、inner BRB 及び outer BRB の *in vitro* モデル細胞を用い、両関門において MPP⁺ 輸送に寄与する分子実体解明に着手した。

Inner BRB モデルとして用いた TR-iBRB2 細胞への [³H]MPP⁺ 取り込みは時間依存性や濃度依存性 ($K_m = 59 \mu\text{M}$) を示したことから、inner BRB における担体介在型 MPP⁺ 輸送機構の存在が示唆された。この MPP⁺ 輸送は、既報有機カチオン輸送担体を広く認識する阻害剤である amantadine 及び quinidine によってそれぞれ65%及び35%有意に阻害された。また、その取り込みは、OCT と PMAT を共に阻害する dopamine 及び decynium-22によってそれぞれ50%及び44%阻害され、OCT 及び PMAT の基質と報告されている nicotine 共存にて42%有意に阻害された。さらに、OCT と PMAT に加え MATE1 を阻害する serotonin は、初代培養ラット RPE 細胞への [³H]MPP⁺ 取り込みを40%有意に阻害した。しかし、その [³H]MPP⁺ 取り込みを TEA は、OCT1-2 と OCTN1-2, MATE1 を強力に阻害する0.1 mM, 1 mM 及び 2 mM 共存条件下にて、15-30%阻害したものの、その阻害は統計学的有意ではなかった。また、histamine, corticosterone 及び estradiol は、OCT1-3 を阻害する条件下にて、その [³H]MPP⁺ 取り込みを阻害しなかった。さらに、OCT1-2 を阻害する choline や、OCTN1-2 を阻害する L-carnitine, MATE1 を阻害する cimetidine は、 [³H]MPP⁺ 取り込みを阻害しなかった。有機アニオン輸送担体典型的基質である PAH 共存によっても、その取り込みは変化しなかった。OCT と OCTN の基質・阻害剤については、TR-iBRB2 細胞への MPP⁺ 輸送に対する阻害・非阻害のプロファイルが混在しており、MATE 阻害剤では阻害されていないことから、OCT と OCTN, MATE が本 MPP⁺ 輸送に関与する可能性は低いと判断される。この消去法的考えに基づくと、TR-iBRB2 細胞における MPP⁺ 取り込みに PMAT が関与すると考えられた。

Outer BRB モデルとして用いた初代培養ラット RPE 細胞への [³H]MPP⁺ 取り込みは時間依存性や濃度依存性 ($K_m = 64 \mu\text{M}$) を示したことから、outer BRB における担体介在型 MPP⁺ 輸送機構の存在が示唆された。初代培養ラット RPE 細胞への MPP⁺ 輸送を担う分子の特定を目的に、各種有機カチオン輸送担体の基質・阻害剤共存による輸送阻害効果を検証した。本細胞への [³H]MPP⁺ 取り込みは非標識 MPP⁺ の共存にて78%阻害され、既報有機カチオン輸送担体を広く認識する阻害剤である amantadine 及び quinidine によってそれぞれ65%及び35%有意に阻害された。また、その取り込みは、OCT と PMAT を共に阻害する dopamine 及び decynium-22によってそれぞれ50%及び44%阻害され、

OCT 及び PMAT の基質と報告されている nicotine 共存にて42%有意に阻害された。さらに、OCT と PMAT に加え MATE1 を阻害する serotonin は、初代培養ラット RPE 細胞への $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ 取り込みを40%有意に阻害した。しかし、その $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ 取り込みを TEA は、OCT1-2 と OCTN1-2, MATE1 を強力に阻害する0.1 mM, 1 mM 及び 2 mM 共存条件下にて、15-30%阻害したものの、その阻害は統計学的有意ではなかった。また、histamine, corticosterone 及び estradiol は、OCT1-3 を阻害する条件下にて、その $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ 取り込みを阻害しなかった。さらに、OCT1-2を阻害する choline や、OCTN1-2 を阻害する L-carnitine, MATE1 を阻害する cimetidine は、 $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ 取り込みを阻害しなかった。有機アニオン輸送担体典型的基質である PAH 共存によっても、その取り込みは変化しなかった。本阻害実験の結果は以下の3点にまとめられる。

- (i) 複数種の有機カチオン輸送機構を阻害するが、特にOCTとPMAT両方を協力を阻害する化合物 (Amantadine や dopamine, decynium-22, nicotine, serotonin, quinidine) は、初代培養 RPE 細胞における MPP^+ 取り込みの阻害が観察される。
- (ii) OCT1-2 と MATE を阻害する条件下 (TEA による阻害) では有意な MPP^+ 輸送阻害が観察されない。
- (iii) OCT のみ、OCTN のみ、そして MATE のみを阻害する条件下 (Histamine, cimetidine, estradiol, corticosterone, choline, 及び L-carnitine) では有意な MPP^+ 輸送阻害が観察されない。

これらの点を総合すると、OCT3 と PMAT を共に認識する化合物で阻害が示されている。従って、本結果から outer BRB における MPP^+ 輸送には OCT3 と PMAT が共に寄与していることが示唆された。

【結論および展望】

本研究結果から、炎症関連物質 histamine の網膜からのクリアランスにBRBは大きく寄与しないことから、BRB を網膜からの histamine クリアランスに応用することは困難であることが明らかとなった。一方、BRB は MPP^+ 排出機能を備えていることが実験的に示され、*in vitro* 解析から、inner BRB では PMAT が、そして outer BRB では OCT3 及び PMAT がその排出輸送に関与することが示唆された。これまで細谷班にて、カチオン性薬物の循環血液中から網膜へ促進的に移行させるためのクライテリアを作成されている。本クライテリアに、「今回見出された BRB 排出輸送寄与分子である OCT3 及び PMAT に認識させない」という点を加えることによって、さらなる効率的な網膜へのカチオン性薬物送達実現が可能になると期待される。

【参考文献】

- 1) Akanuma S, Soutome T, Hisada E, Tachikawa M, Kubo Y, Hosoya K. Na^+ -independent nucleoside transporters regulate adenosine and hypoxanthine levels in Müller cells and the inner blood-retinal barrier.

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 54, 1469-77 (2013)

- 2) Tachikawa M, Takeda Y, Tomi M, Hosoya K. Involvement of OCTN2 in the transport of acetyl-L-carnitine across the inner blood-retinal barrier. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 430-6 (2010)
- 3) Katayama K, Ohshima Y, Tomi M, Hosoya K. Application of microdialysis to evaluate the efflux transport of estradiol 17-beta glucuronide across the rat blood-retinal barrier. *J. Neurosci. Method*, 156, 249-56 (2006)
- 4) Usui T, Kubo Y, Akanuma S, Hosoya K. B-alanine and l-histidine transport across the inner blood-retinal barrier: potential involvement in L-carnosine supply. *Exp. Eye Res.*, 113, 135-42 (2013)

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 准教授 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。

BRB は内側血液網膜関門（inner BRB; 網膜毛細血管内皮細胞を実体とする）及び外側血液網膜関門（outer BRB; 網膜色素上皮 (RPE) 細胞を実体とする）にて構成されている。昨年度までの研究にて、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、輸送基質やその認識性がこれまでに明確にされていない、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、inner BRB 及び outer BRB における発現の検証を実施した。さらに、発現が示された分子について、過剰発現細胞を構築し、その分子の化合物認識性を検証してきた。今年度は、novel カチオン輸送担体分子実体同定を目的に、その基質輸送機能をさらに検証した。そして、将来的には抗体標識リポソーム（イムノリポソーム）を用いた網膜への遺伝子デリバリー法へ展開させることを視野に、inner BRB 発現型 novel カチオン輸送担体に対するポリクローナル抗体作成に着手した。

【実験手法】

(A) 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 50 ng/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、20°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 (20°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。

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。

(B) Novel カチオン輸送担体候補分子に対するポリクローナル抗体作出

TR-iBRB2 細胞 total RNA をソースとし complementary DNA (cDNA) を合成し、本 cDNA を鋳型とした polymerase chain reaction (PCR) にて、標的分子に対し特異的な塩基配列 (約 100 bp) を増幅した。本増幅配列を pGEM-Teasy plasmid (Promega) へ組み込んだ後、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて、増幅産物の配列を確認した。増幅産物に問題がないことが確認された後、本 vector からリコンビナントタンパク質発現用 plasmid である pGEX-4T2 (GE healthcare) へ、増幅配列を制限酵素処理、次いで ligation 反応することで移し換えた。pGEX-4T2 に目的産物が問題なく組み込まれているか、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) によって確認の後、本 plasmid を導入した大腸菌 (BL21) を培養、そして isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) にて目的リコンビナントタンパク質発現を誘導した。導入した大腸菌を破碎、次いで Glutathione Sepharose 4B (GE healthcare) を用いた精製にて、目的タンパク質を回収した。

【結果・考察】

A. 目的タンパク質発現細胞を用いた化合物輸送評価

昨年までの解析にて見出した分子について詳細な解析を実施するため (Table 1)、現在ほ乳類細胞発現系の構築を行っている。新たな novel カチオン輸送担体候補分子として、inner BRB において発

Table 1 昨年度までに見出した血液網膜関門 novel カチオン輸送担体候補分子

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)

現する SLC family の molecule E, F, G の open reading frame (ORF) を単離し、アフリカツメガエル卵母細胞発現系構築を試みた。Molecule E について、カチオン性化合物である clonidine や nicotine 認識性が示され、この分子が新たな novel カチオン輸送担体候補分子として見出された。また、molecule F および G についてもカチオン性薬物認識性が可能性として示された。現在、上述の分子について詳細な輸送特性解明のため、アフリカツメガエル卵母細胞発現系における分子発現条件の至適化と、ほ乳類細胞発現系構築に取り組んでいる。

B. 抗体作出に向けたリコンビナントタンパク質作成

Inner BRB における発現が示唆された分子について、分子の発現・局在の精査と将来的な網膜への遺伝子デリバリー適応型イムノリポソーム構築を目的とし、現在、特異的抗体作出に着手している。Inner BRB 発現分子の中で、2種類について、リコンビナントタンパク質の作成に成功した。具体的には、1つ目の分子は抗原部位としてN末端側で3種類、C末端側で1種類のエピトープタンパク質作製に成功し、C末端側のタンパク質はモルモットとウサギを免疫動物として、N末端側のタンパク質はモルモットのみを免疫動物として、能動免疫を実施している。2つ目の分子はN末端側で2種類、C末端側で2種類のエピトープタンパク質作製に成功し、これらタンパク質はモルモットのみを免疫

動物として能動免疫を開始している。

【結論および展望】

今年度の研究成果として新たな血液網膜関門 novel カチオン輸送担体候補分子を見出した。現在、ほ乳類発現細胞を用いた詳細な輸送特性解明に取り組んでおり、inner BRB におけるカチオン性薬物輸送への寄与を詳細に評価する予定である。また、novel カチオン輸送担体候補分子について抗体作出に取り組んでおり、今年の春には抗体精製・評価が完了する予定である。今後、本抗体を用いたイムノリポソームが網膜への遺伝子デリバリーについて有用であるか検証を進める予定である。

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

【研究の目的と背景】

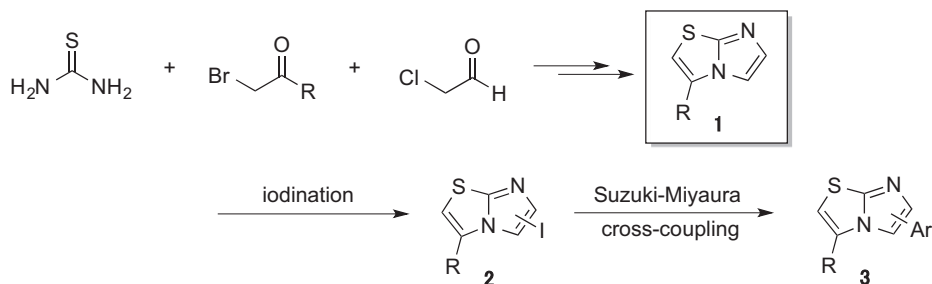
血液網膜関門を介したベラパミル輸送を阻害する薬物の特徴として，アミン含有薬物は阻害を示すものの，四級アンモニウム含有薬物では阻害されないことが挙げられる。本研究では「網膜への薬物送達を目的とした薬物・化合物の誘導体化」を最終目標として研究を遂行しており，それを可能とするパスポート構造を明らかにするためには，プローブとなる薬物に対し各種アミン含有構造を付加させ，その輸送活性を比較するのが最良の方法である。平成23年度は，「ジヒドロフラン融合型縮環系化合物」をモデル薬物として，アミン型官能基を薬物に効率良く導入するための方法論を確立し，また平成24年度は，シクロブテノンに対するジアゾメチレンアニオンの求核付加-連続的電子環状反応というドミノ型プロセスを用い，パスポート構造の候補となる1,2-ジアゼピン骨格の新規構築法を開拓してきた。本年度は，アミン構造を内蔵した含窒素複素環骨格である「イミダゾ [2,1-*b*] チアゾール」を有効なパスポート構造として設定し，本骨格の効率的な化学合成法の確立を目指すこととした。その上で，本骨格をプローブ薬物に導入することを念頭に，「クロスカップリング法」に基づいた戦略について検討を行った。すなわち，クロスカップリングの足がかりとなるハロゲン置換基を導入するため，イミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格に対する位置選択的なヨウ素化反応について精査し，さらにモデル基質を用いたクロスカップリング反応を実施して，有効性のデモンストレーションを行った。

【実験方法】

イミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格 (1) は，既存のチアゾール環合成法等を参考として，チオ尿素と2種類の α -ハロケトン化合物との縮合反応により構築できるものと考えられる。本法に基づいて効率的合成を達成した後，本化合物に対し，ヨード化の条件検討を行う。本骨格には3カ所の反応点が存在するため，その位置選択性をコントロールできる手法の開拓を目指すものとする。また，合成されたヨード体 (2) をプローブ薬物に付加させるため，単純なモデル化合物を用いてクロスカップリングの検討を行う。カップリングパートナーとしては，毒性の観点から重金属を含まないホウ素化合物を選択して Suzuki-Miyaura カップリングの検討を行い，パスポート構造導入にあたってのヨード体

(2) の有用性を検証する (Scheme 1)。

Scheme 1



(イミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格合成の実施例)

2-Amino-thiazole-4-carboxylic acid ethyl ester hydrobromide (4)

Thiourea (9.75 g, 128 mmol) の MeCN (300 mL) 溶液に 0°C で Ethyl bromopyruvate (25.0 g, 128 mmol) を加え、室温にて18時間攪拌した。反応終了後、 Et_2O を加えて室温にて2日間攪拌した。その後、析出した結晶を吸引ろ過にて集めた。白色の固体 (28.3 g, 112 mmol, 87%) として(4)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.08 (1H, s), 5.13 (2H, brs), 3.46 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 1.38 (3H, t, $J = 7.1$ Hz).

Imidazo[2,1-*b*]thiazole-3-carboxylic acid ethyl ester (5)

チアゾール体 (4) (5 g, 20 mmol) の DMF (10 mL) 溶液に Ar 雰囲気下、炭酸カルシウム (4 g, 40 mmol) を加え、室温で1.5時間攪拌した。その後、臭化ナトリウム (2.7 g, 26 mmol), Chloroacetaldehyde (5 mL, 30 mmol) を順次加え、 50°C にて22時間攪拌した。反応終了後、反応溶液を留去し、 CH_2Cl_2 で希釈し、水、飽和食塩水で順次洗浄した。得られた有機層を MgSO_4 で乾燥、ろ過後溶媒を減圧下留去した。この残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : AcOEt = 1 : 1) で分離し、褐色の油状物質 (1.25 g, 6.37 mmol, 32%) として (5) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.00 (1H, s), 7.74 (1H, s), 7.34 (1H, s), 4.40 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 1.37 (3H, t, $J = 7.1$ Hz).

Imidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl-methanol (9)

エステル体 (5) (1.242 g, 6.34 mmol) の CH_2Cl_2 (1.5 mL) 溶液に Ar 雰囲気下、 0°C にて DIBAL (15.3 mL, 15.9 mmol) を加え、 0°C にて30分攪拌した。反応終了後、 0°C にて Et_2O (50 mL), MeOH (50 mL) を順次加え、室温で1時間攪拌した。その後、反応溶液をセライト濾過し、有機層を MgSO_4 で乾燥、ろ過後溶媒を減圧下留去した。この残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl_3 : MeOH = 10 : 1) で分離し、薄黄色の固体 (892 mg, 5.78 mmol, 91%) として(9)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.70 (1H, s), 7.25 (1H, s), 6.99 (1H, s), 4.77 (2H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, Methanol- d_4): δ 151.02, 134.51, 133.67, 113.49, 110.67, 57.53; IR (KBr): 3185 cm^{-1} (OH); MS (EI) m/z 154

(M⁺); HRMS (EI) Calcd for C₆H₆N₂OS: 154.0189 (M⁺), found: 154.0201; m.p. 123-124°C (CHCl₃-Methanol).

3-(*tert*-Butyl-dimethyl-silyloxymethyl)-imidazo[2,1-*b*]thiazole (10)

アルコール体 (9) (1.05 g, 6.81 mmol) の DMF (20 mL) 溶液に Ar 雰囲気下, 0°Cにて NEt₃ (1.9 mL, 13.62 mmol), *tert*-butyldimethethylsilyl chloride (2.05 g, 13.62 mmol) を順次加え, Ar 下, 室温にて15分 攪拌した。反応終了後, 反応溶液に飽和重曹水を加え, CH₂Cl₂ で抽出し, 得られた有機層を MgSO₄ で乾燥, ろ過後溶媒を減圧下留去した。この残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane: Acetone = 3 : 1) で分離し, 淡黄色の固体 (1.67 g, 6.23 mmol, 92%) として (10) を得た。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ7.49 (1H, s), 7.35 (1H, s), 6.64 (1H, s), 4.75 (2H, s), 0.91 (9H, s), 0.10 (6H, s); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ149.65, 134.63, 134.36, 131.09, 108.25, 58.45, 25.66, 18.15, -5.47; IR (KBr): 1471 cm⁻¹ (C=C); MS (EI) *m/z* 268 (M⁺); HRMS (EI) Calcd for C₁₂H₂₀N₂OSSi: 268.1053 (M⁺), found: 268.1066; m.p. 55-56°C (hexane : Acetone = 3 : 1).

(イミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格のヨード化の実施例)

3-(*tert*-Butyl-dimethyl-silyloxymethyl)-5-iodo-imidazo[2,1-*b*]thiazol (11)

TBS エーテル体 (10) (800 mg, 2.98 mmol) の CH₂Cl₂ (4.8 mL) 溶液に Ar 雰囲気下, 5°Cにて炭酸水素ナトリウム (650 mg, 7.74 mmol) の水溶液 (23 mL) を加え, ヨウ素 (1.06 g, 4.2 mmol) の CH₂Cl₂ (25 mL) 溶液をゆっくり添加したのち, 5°Cにて 3 時間攪拌後, 室温に戻し, さらに15時間攪拌した。反応終了後, 反応溶液が無色になるまで10% Na₂S₂O₃ 水溶液を加え, CH₂Cl₂で抽出した。得られた有機層を水で洗浄後, MgSO₄ で乾燥, ろ過後溶媒を減圧下留去した。この残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : Acetone = 3 : 1) で分離し, 淡黄色の固体 (1.05 g, 2.66 mmol, 89%) として (11)を得た。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ7.27 (1H, s), 6.76 (1H, s), 5.07 (2H, s), 0.95 (9H, s), 0.14 (6H, s); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ152.97, 142.64, 142.36, 133.08, 109.25, 59.11, 25.77, 18.28, -5.38; IR (KBr): 1474 cm⁻¹ (C=C), 1429 cm⁻¹ (C=C); MS (EI) *m/z* 394 (M⁺); HRMS (EI) Calcd for C₁₂H₁₉IN₂OSSi: 394.0013 (M⁺), found: 394.0032; m.p. 121-122°C (hexane : Acetone = 3 : 1).

(Suzuki-Miyaura クロスカップリング反応の実施例)

3-(*tert*-Butyl-dimethyl-silyloxymethyl)-5-(3-nitro-phenyl)-imidazo[2,1-*b*]thiazole (14)

ヨード体 (11) (50 mg, 0.13 mmol) の benzene (450 μL) 溶液に Ar 雰囲気下, Tetrakis (triphenylphosphine) palladium (15 mg, 0.013 mmol), 炭酸ナトリウム (27 mg, 0.25 mmol) の水溶液 (128 μL), 3-Nitrophenyl boronic acid (23 mg, 0.14 mmol), EtOH (170 μL) を順次加え, 80°Cにて17時間攪拌後, 室温に戻し, 3-Nitrophenyl boronicacid (23 mg, 0.14 mmol), Tetrakis (triphenylphosphine) palladium (4 mg, 0.003 mmol)

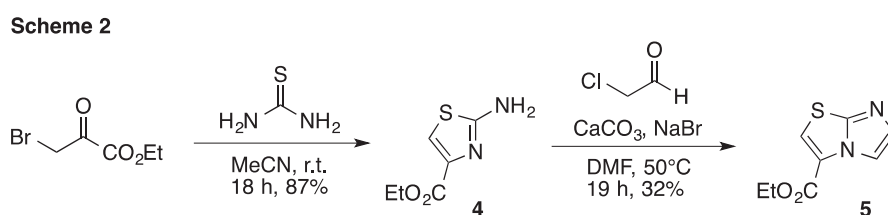
をさらに添加し、再度80°Cにて5時間攪拌した。反応終了後、反応溶液に水を加え、CH₂Cl₂で抽出した。得られた有機層をMgSO₄で乾燥、ろ過後溶媒を減圧下留去した。この残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（CHCl₃:Ether=4:1）で分離し、黄色の固体（25 mg, 0.064 mmol, 50%）として(14)を得た。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ8.29 (1H, s), 8.27 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.81 (1H, d, *J* = 7.7 Hz), 7.61 (1H, dd, *J* = 7.7 Hz, 8.0 Hz), 7.32 (1H, s), 6.78 (1H, s), 4.47 (2H, s), 0.74 (9H, s), -0.10 (6H, s); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ147.86, 135.30, 134.58, 132.68, 131.70, 129.11, 125.88, 124.21, 124.03, 123.00, 110.26, 58.60, 25.24, 18.08, -5.64; IR (KBr): 1522 cm⁻¹ (NO₂); MS (EI) *m/z* 394 (M⁺); HRMS (EI) Calcd for C₁₈H₂₃N₃O₃SSi: 389.1221 (M⁺), found: 389.1229; m.p. 107-110°C (hexane : Acetone = 3 : 1).

【結果・考察】

<イミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格合成法の検討>

まずは、本研究でパスポート構造と設定したイミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格の構築法について検討を行った。その概略を Scheme 2 に示す。



チオ尿素とブロモピルビン酸エチルを、MeCN 溶媒中にて室温で攪拌したところ、縮合環化反応が円滑に進行し、良好な収率にてチアゾール誘導体(4)を得ることに成功した。次に、化合物4とクロロアセトアルデヒドから、イミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格(5)への変換を試みた。種々条件検討の結果、DMF 溶媒中にて炭酸カルシウムと臭化ナトリウム存在下、50°Cに加熱することでイミダゾ [2,1-*b*] チアゾール誘導体(5)を合成することができた。収率には未だ改善の余地が残されるものの、目的としたイミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格を構築することに成功した。

<イミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格のヨウ素化の検討>

イミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格(5)に対して、クロスカップリングの足がかりとなるハロゲン導入の検討を行った。ハロゲンとしては、最も反応性が高いとされるヨウ素を選択した。芳香環をヨウ素化する場合、代表的な方法の1つとして、リチオ化を経由する方法が挙げられる。そこでまず、リチオ化補助機能のある官能基(directed-metallating group: DMG)を有する基質として、アミド体(6)の調製を行った。本化合物は、エステル5をアルカリ加水分解して得られるカルボン酸を、ジエチル

アミンとの脱水縮合に付すことにより、容易に合成することができた (Scheme 3)。

次いで、アミド体 **6** に対するリチオ化とヨウ素化の条件検討を行った。それらの結果を、Table 1 にまとめる。THF 溶媒中 DMPU 存在下、基質に -78°C で *s*-BuLi を作用させ、その後 I_2 と反応させた (entry 1-6)。試薬の当量関係や添加の順番を変えると、ヨウ素化される位置の選択性が逆転するという、興味深い現象が見られた (entry 1 vs 3)。ヨウ素化剤として NIS を用いたり、溶媒として DME を用いた場合、異性体 **8** の生成が顕著に軽減した (entry 7-10)。最も良好な結果を与えたのは entry 8 の条件で、この場合、異性体 **7** のみを 41% (BRSM: 45%) の収率で位置選択的に生成することが明らかとなった。

Scheme 3

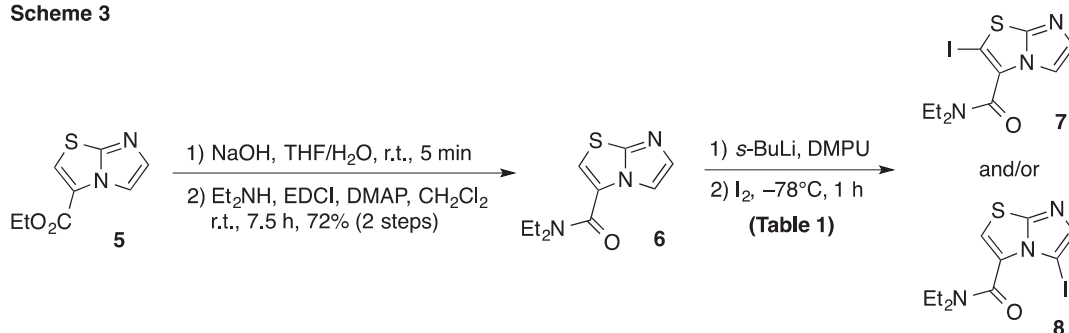


Table 1

entry	procedure	solvent	E^+	equiv.		time 1)	yield (%)		
				<i>s</i> -BuLi	DMPU		7	8	recovery
1	A	THF	I_2	1	6	1 h	41	4	-
2	A	THF	I_2	1	6	0.5 h	15	30	19
3	B	THF	I_2	1.2	6	1 h	-	41	45
4	A※	THF	I_2	1.2	6	1 h	25	15	37
5	A※	THF	I_2	1.2	6	1 h	18	18	21
6	A	THF	I_2	1.2	2.8	1 h	26	20	23
7	A	THF	NIS	1.2	2.8	1 h	28	7	40
8	C	THF	I_2	2.5	6	1 h	41	-	36
9	C	DME	I_2	1.2	-	1 h	16	-	49
10	C	DME	I_2	2.5	-	1 h	35	-	25

A: **6**, DMPUのTHF溶液に *s*-BuLiを添加。

B: DMPU/THFに *s*-BuLi, **6**のTHF溶液を順次添加。

C: Aに従い操作し、クエンチを 10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 水溶液で行った。

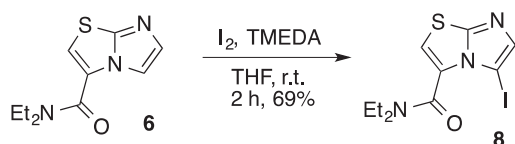
*: entry4では *s*-BuLiをゆっくり添加、 entry5では *s*-BuLiをすばやく添加

一方、異性体 **8** を選択的に得るためには、entry 3 の条件にて反応を行うことで、ほぼ同等の結果を得られることになるが、リチオ化を経ない単純な芳香族求電子置換反応 (SNAr) によるヨウ素化により、更に有効な結果が得られることも種々の文献情報から推察された。そこで、基質 **6** に対して THF 溶媒中 TMEDA 存在下にヨウ素と反応させたところ、予想通り 69% という良好な収率で位置選択的にヨード体 **8** を生成することを見出した (Scheme 4)。

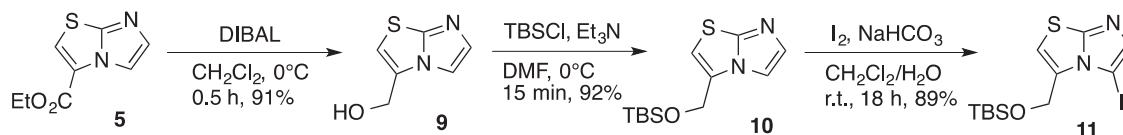
このように、リチオ化を経由しない SNAr ヨード化が効率よく進行することが分かったので、基質

となるイミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格には、アミドやエステルといった DMG は必ずしも必要ではないと考えることができる。そこで、エステル体 **5** を DIBAL で還元してアルコール体 **9** とし、ついで TBS 保護した基質 **10** を合成した。本化合物の SNAr ヨード化を試みたところ、塩基として炭酸水素ナトリウムを用いる条件下で 89% という高収率で反応が進行し、位置選択的なヨード体 **11** を得ることに成功した (Scheme 5)。

Scheme 4



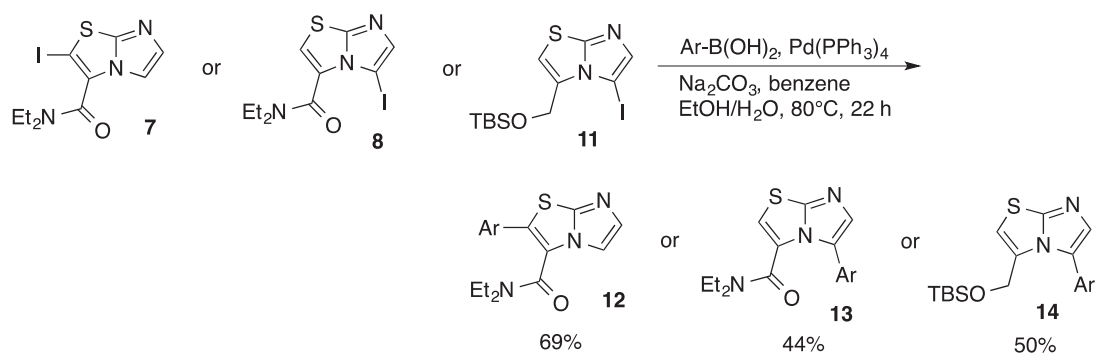
Scheme 5



<ヨード体に対する Suzuki-Miyaura クロスカップリング反応の検討>

上述の通り、3種のヨード体を位置選択的に合成することに成功したので、これらの化合物が、プローブ薬物にパスポート構造 (イミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格) を付加するための有用なツールとなるかを検証することにした。単純な有機ホウ素化合物 (Ar-B(OH)₂) をプローブ薬物のモデルとして用い、3種のヨード体 (**7**, **8**, **11**) それぞれに対して、標準的な Suzuki-Miyaura カップリング条件にて検討を行った。すなわち、ヨード体とホウ素化合物を有機溶媒-水系にて Pd 触媒と炭酸ナトリウム存在下、80°C で 1 晩反応させたところ、カップリング反応が進行して、それぞれ対応するカップリング体を 40-70% 程度の収率で生成することが明らかとなった (Scheme 6)。

Scheme 6



【今後の予定・次年度への展開】

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イミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格を想定し、本骨格の効率的構築法を確立した。また、プローブ薬物へと本骨格を付加する方法として、位置選択的ヨード化反応の条件設定を完了させ、さらにこれらのヨード体を用いて、クロスカップリング法により実際にイミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格を導入できることを証明した。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。