## ペプチド工学と DDS 技術を基盤とした筋疾患に対する 統合創薬の研究拠点形成

平成 27 年度~平成 31 年度 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

## 研究成果報告書

令和2年3月

学校法人名東京薬科大学大学名東京薬科大学研究組織名東京薬科大学

薬学部・生命科学部

研究代表者 野水 基義

(東京薬科大学薬学部教授)

## 目次

はしがき ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
プロジェクトの概要
・学校法人名 ······ 3
·大学名 ······ 3
・研究組織名 ······ 3
<ul><li>・プロジェクト所在地 ・・・・・・・・3</li></ul>
<ul><li>研究プロジェクト名・・・・・・・・・・・・・・・・・・3</li></ul>
・研究観点 · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
・研究代表者 ······ 3
・プロジェクト参加研究者数 ・・・・・・・・・・・・・・・ 3
・該当審査区分 ······ 3
・研究プロジェクトに参加する主な研究者 ・・・・・・・・・3
・研究の概要 ······ 4
・キーワード ・・・・・・・・・・・・・14
・研究発表の状況 ・・・・・・・・・・・ 14
・研究成果の公開状況 ・・・・・・・・・・・・・・ 30
<ul><li>・その他の研究成果等</li><li>・・・・・・・・・・・・・・・31</li></ul>
・「選定時」及び「中間評価時」に付された留意事項及び対応 ・・・・・・・ 31
プロジェクトの成果
<ul><li>開催したシンポジウムおよび要旨集・・・・・・・・32</li></ul>
外部評価者による評価・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 152

#### はしがき

東京薬科大学では、文部科学省「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」の支援を受け、「ペプチド工学と DDS 技術を基盤とした筋疾患に対する統合創薬の研究拠点形成」に関するプロジェクトを平成 27 年度より 5 年間にわたって推進してまいりました。本プロジェクトに参加して頂いた皆様ならびに本プロジェクトの関連業務にご協力して頂きました皆様のご尽力により、本プロジェクトを遂行することができましたことを深く感謝申し上げます。

本プロジェクトでは、筋ジストロフィーをはじめとする多くの難治性筋疾患の克服と超高齢化社会を見据えた国民の筋萎縮医療対策のために、本学を中核とする筋疾患統合創薬研究拠点の構築を目指し、筋疾患に対する創薬シーズ開発や革新的薬物送達システム(DDS)開発を行うとともに、さらなる筋疾患研究および研究拠点の発展に資する次世代の人材育成に取り組んでまいりました。特に、創薬シーズ研究では、筋関連遺伝子の機能制御、筋増殖・分化制御および筋崩壊制御の3領域に、医薬品の送達技術研究では特異的な筋標的化DDSの開発に重点をおき、研究開発を行いました。本活動およびその成果は、筋疾患に対する統合創薬の研究拠点形成を実現し、当初の目標を達成したものと考えております。

本報告書に、これまでの研究成果をまとめ、ご報告申し上げます。忌憚ないご意見を 頂戴できましたら幸甚です。本プロジェクトの成果が、今後の筋疾患研究の発展に貢献 できることを期待しております。

最後に、本プロジェクトに参加して頂いた皆様の今後の益々のご発展をお祈り申し上 げます。

東京薬科大学 薬学部 野水 基義

# プロジェクトの概要

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

教授

## 平成27年度~平成31年度「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」 研究成果報告書概要

1	学校法人名 _	東京薬科大学	2 大学名	東京薬科大学	
3	研究組織名 _	薬学研究科・生命科・	学研究科		
4	プロジェクト所	在地東京都八王子	市堀之内143	2-1	
5	研究プロジェク	小名 <u>ペプチドエ学と</u> 研究拠点形成	<u>: DDS 技術を</u> -	<u> 基盤とした筋疾患に対する</u>	統合創薬の
6	研究観点 _	研究拠点を形成するの	开究		
7	研究代表者				
	研究代表者名	所属部局名	<b>,</b> ]	職名	

8 プロジェクト参加研究者数 8 名

野水 基義

9 該当審査区分 <u>理工・情報</u> 生物・医歯 人文・社会

薬学研究科

#### 10 研究プロジェクトに参加する主な研究者

研究者名	所属·職名	プロジェクトでの研究課題	プロジェクトでの役割	
野水 基義	薬学研究科・ 教授	ジストログリカン結合ペプチドの開発	プロジェクトの総括及び筋組織 への DDS に応用可能なプローブ の開発	
林 良雄	薬学研究科· 教授	ネガマイシン誘導体・マイオスタチン阻 害ペプチドの開発	遺伝子異常による筋疾患に対抗 できる分子創製	
根岸 洋一	薬学研究科· 教授	筋組織特異的 DDS の開発	筋疾患治療に特化した DDS キャリアの開発	
高木 教夫	薬学研究科· 教授	薬物・核酸・ペプチドの薬理学的評価 系の確立	細胞・個体レベルでの医薬品候 補化合物の薬理学的評価	
馬場 広子	薬学研究科· 教授	L-MPZ を用いたリードスルー薬の評価 系の確立	細胞・個体レベルでのリードスル 一薬の効果と安全性評価	
三浦 剛	薬学研究科· 教授	活性化合物の効率的大量合成法の開 発	臨床試験に向けた医薬候補化 合物の安定供給	
井上 勝央	薬学研究科· 教授	医薬品候補化合物の体内動態解析	体内動態特性に優れた医薬品 候補化合物の探索	
伊東 史子	生命科学研究科· 准教授	TGF-βファミリーに属するマイオスタチンの阻害剤の <i>in vivo</i> 、 <i>in vitro</i> 評価	迅速評価系によるマイオスタチ ン阻害薬の探索	
(共同研究機関等)				
該当なし				

<研究者の変更状況(研究代表者を含む)> 該当なし

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

#### 11 研究の概要(※ 項目全体を10枚以内で作成)

(1)研究プロジェクトの目的・意義及び計画の概要

筋ジストロフィー等の筋肉関連疾患は薬物療法の開発が著しく遅れている分野であり、創薬研究の加速が社会から切望されている。本事業では、「筋疾患の統合的創薬」を目指し、筋疾患に対する創薬シーズ開発を行う「分子創製ユニット (A)」、及び筋組織への革新的薬物送達システム (DDS) 開発を行う「創薬高度化ユニット (B)」を編成し、1) 筋関連遺伝子機能制御、2) 筋増殖・分化制御、3) 筋崩壊制御の3領域に特化した創薬研究を行う。これらの研究・組織統合により、難治性筋疾患の克服、高齢者の筋機能強化に繋がる医薬品候補化合物の創出を目指すとともに、本学を中核とする筋疾患統合創薬研究拠点を構築する。

#### A 「分子創製ユニット」は筋疾患に関わる以下の3領域に対する分子創製研究を実施する。

- 1)筋関連遺伝子機能制御:ナンセンス変異の読み飛ばし(リードスルー)活性を有する新規ネガマイシン誘導体を創薬シーズとして、遺伝性疾患であるデュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する治療薬の開発を行う。
- 2) 筋増殖・分化制御:マイオスタチン( $TGF-\beta$ ファミリーに属する筋の増殖抑制因子)とその受容体との結合に対し、特異的阻害活性を有する 23 残基の $\alpha$ ヘリックスペプチドを創薬シーズとして、筋組織増強剤の開発を行う。さらに、本創薬シーズを用いて、多くのがん患者で認められる体重減少の要因である筋組織分解(がん悪液質)の分子機構の解明にも取り組み、高齢者における加齢性筋減少との関連性を探る。
- 3)筋崩壊制御:筋細胞膜の安定化に関わるジストロフィンと複合体を形成するラミニン由来ペプチドを創薬シーズとして、筋細胞の脆弱化を抑制する医薬品の開発を行う。
- <u>B 「創薬高度化ユニット」は、リポソームを利用した筋組織への革新的 DDS の開発を行う。</u> ジストログリカン結合性ペプチドをラミニンペプチドライブラリーから検索し、本ペプチドで修飾した筋指向性リポソームを開発する。さらに本 DDS キャリアに診断用超音波造影ガスを封入したリポソーム(バブルリポソーム)を作製し、超音波照射を併用することで、筋特異的な革新的 DDS へ高度化する。

最終的に「分子創製ユニット」の3領域から創出された創薬パイプラインを「創薬高度化ユニット」で開発した筋組織への革新的DDSを用いて高度化する。筋疾患病態モデルを用いて、医薬品候補化合物を包含するDDS製剤のin vivoでの治療効果、毒性及び体内動態を評価し、その実用化を目指す。

#### (2)研究組織

研究組織は、筋疾患に対する創薬シーズ開発を行う「分子創製ユニット (A)」(野水、林、馬場、伊東、松田[学外協力者:東大]、砂田[学外協力者:川崎医大])、及び筋特異的 DDS 開発を行う「創薬高度化ユニット (B)」(根岸、井上、高木、三浦)から構成される。研究の総括は野水が行い、各研究者は、責任をもってプロジェクトでの役割を果たすとともに、ユニット内・ユニット間の有機的な連携の構築にも取り組んできた。全研究者は3カ月毎に開催される会議(戦略会議)に参加し、研究の進捗状況や解決すべき課題を共有し、相互理解を深めてきた。さらに、これら研究者の指導のもと、実践的創薬研究を通じて若手研究者を育成するために、大学院博士課程 (RA:10=>15名)及びPD (3名)を本事業に参画させている。

#### (3)研究施設・設備等

【主な研究施設】研究1号館(3,109 m²)及び研究4号館(3,109 m²):本研究プロジェクト参加者の研究室及び研究装置・設備を設置する共通機器室等が整備されている。

【本研究プロジェクトで整備した主な設備】

ペプチドシンセサイザー (Protein Technologies 社、Tribute-A、平均稼働時間:10 時間/週、利用者数:延40名/年)、蛍光顕微鏡 (キーエンス、BZ-700、平均稼働時間:30 時間/週、利用者数:延250名/年)

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

#### (4)研究成果の概要 ※下記、13及び14に対応する成果には下線及び\*を付すこと。

各ユニットにおける研究課題の進捗状況と達成度(%)を以下に示す。なお( )内は、13の通し番号を示し、記号は、それぞれ論文(\*)、学会発表(\*\*)、特許(\*\*\*)を示す。

#### **A** 「分子創製ユニット」

A-1) 筋関連遺伝子機能制御:デュシェンヌ型筋ジストロフィーの約 20%はジストロフィン遺伝子上のナンセンス変異が原因である。この変異で生じる中途終止コドンを読み飛ばし、ジストロフィンタンパク質を再生しうるリードスルー薬を創製するため、リードスルー薬の評価系の構築とリードスルー活性を有するネガマイシン誘導体の構造最適化を実施した。

#### ① リードスルー活性を有する新規ネガマイシン誘導体の創製(達成度 98%)

放線菌より単離・同定された活性未知のネガマイシン類縁体である 3-*epi-*deoxynegamycin (1)及びそのロイシン付加体(leucyl-3-*epi-*deoxynegamycin)が、ネガマイシンよりも強い リードスルー活性を有することを発見した(\*30)。さらに(1)の構造を基に、より強力な誘導 体 TCP-112 及び m-クロロベンジルエステル型プロドラッグも創製した(\*30)。 Leucy I-3-ep i-deoxynegamyc in を基本骨格に、3 位アミノ基部及び C 末端カルボン酸部の構造最 適化を検討した結果、C 末端に  $\sigma$ ブロモベンジルアルコールをエステルにて導入した誘導体 (TCP-199)が(1)に対して顕著なリードスルー活性を示した(\*20)。また、本活性は天然由来 の化合物中で最も高いリードスルー活性を有するアミノグリコシド G418 の活性を凌駕するも のであった。また、TCP-112 を基盤とし、<u>さらに高いリードスルー活性を示す誘導体として</u> TCP-1109 を獲得した(\*6)。一方、類縁体1の構造を基に TCP-1109 からの知見を踏まえ新たな 構造活性相関を展開し、TCP-306 の獲得にも成功した。TCP-306 を新たなリードあるいは医薬品 候補化合物とした研究は、AMED 橋渡し研究シーズ A に採択され、現実的な創薬研究として進展 している。一方、TCP-1109 については、筋疾患以外の複数のナンセンス変異疾患に対してもモ デル細胞を用いたリードスルー作用を検討した。殊に、がん抑制遺伝子である p53 のナンセン スでは、HDQ-P1 細胞による評価から、強力なリードスルー活性を確認した。今後、様々なナン センス変異疾患への応用も期待される。これらのことから、本研究の達成度は大変高いもので ある (98%)。

#### ② リードスルー薬の評価系の構築(達成度 95%)

ネガマイシン結合部位及びリードスルー活性発現機構を解明するため、酵母(多剤超感受性酵母株:12gene Δ HSR)を用いた新規リードスルー活性評価系の開発に取り組み、アデニン合成遺伝子(ADE2)中に PTC 変異(TGA、TAG、または TAA)を有する酵母株(ADE2\_PTC 変異酵母株)を用いた定性的なリードスルー活性評価系を構築した(\*\*70)。本評価系では、化合物にリードスルー活性が無い場合、変異株は赤色を呈す一方で、活性が有る場合、変異株は白色を呈する。実際に、本変異株を用いてネガマイシン誘導体を評価した結果、2種の化合物において白色の呈色が認められ、活性発現を定性的に確認できた。

正常組織においてリードスルー機構により産生されることが知られる L-MPZ (内因性リードスルー活性により、末梢神経髄鞘特異的分子である PO mRNA から生成するミエリン構成タンパク質)をプローブとして、生理的なリードスルー機構に対するリードスルー薬の評価系を構築した(\*13、\*\*95、96、100、103、124)。リードスルー薬の  $in\ vitro$  活性は、ヒト PO cDNA を用いた無細胞系やヒト PO cDNA 発現 HeLa 細胞での L-MPZ の発現量を測定することで簡便に評価でき、 $in\ vivo$  活性は、マウス末梢神経へのリードスルー薬の直接投与により評価可能であった。高活性ネガマイシン誘導体(TCP-126 及び-1109)について  $in\ vivo$  評価系における活性を評価したところ、TCP-1109 は有意な活性を示し、かつ毒性は観察されなかった。

in vitro および in vivo において複数のリードスルー薬が PO mRNA からの L-MPZ 産生を促進

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

することが示されたため、末梢神経におけるリードスルーの生理的あるいは病的意義を明らかにすることを目的として、L-MPZ と PO の産生比を変化させたマウスを作成した (\*\*80)。PO mRNA から L-MPZ のみが産生される遺伝子改変マウス(L-MPZ マウス)のホモ接合体では、運動障害と神経伝導速度低下、末梢神経髄鞘の顕著な形態異常と大径軸索の減少が見られた。これらの変化は髄鞘形成期からすでに認められ、加齢とともに進行した。また、L-MPZ マウスでは、PKC リン酸化 L-MPZ の増加が髄鞘形態の異常に関与する可能性が考えられた。L-MPZ と PO がほぼ同量産生されるヘテロ接合体でも、ホモ接合体よりは軽度ではあるが同様の異常が見られた。一方、L-MPZ が産生されない PO マウスのパイロット解析では、L-MPZ マウスに比べて軽度の異常が見られる傾向にあることから、今後解析個体数を増やす予定である。これらの結果から、正常な髄鞘形成と末梢神経機能維持には PO mRNA からの適度なリードスルーが重要であり、新規のリードスルー薬の開発に際して末梢神経組織への移行の程度と PO mRNA 翻訳に対する影響を考慮する必要があることを明らかにした。本成果は nature 姉妹誌である Communications Biology に掲載され (\*2)、本学よりプレスリリースとして配信された。また、林研究室との共同研究であるリードスルー薬による PO mRNA の翻訳への影響、および発達期および加齢に伴う L-MPZ マウスの末梢神経異常など L-MPZ に関する複数の論文を現在準備中である。

以上のように、A-1)プロジェクトは、当初の計画通り、高い活性を有するリードスルー薬の創出に成功し、今後の更なる構造最適化に利用可能な評価系の構築にも成功した。

当該プロジェクトに参画した大学院生及び学部生は、<u>創薬懇話会 2015 in Tokushima において最優秀ポスター賞(\*\*191)及び The 14<sup>th</sup> Chinese International Peptide Symposium & the 5<sup>th</sup> Asia-pacific International Peptide Symposium において Poster Award (\*\*156)、第 62 回日本薬学会関東支部大会において優秀口頭発表賞(\*\*56)、第 56 回ペプチド討論会においてポスター賞(\*\*11)を受賞した。尚、これらの業績から、本研究を大学院生として担当した濵田圭佑博士は、病態性化学教室の助教として採用され(H30 年 7 月より)、田口晃弘助教は本学講師へと昇任が認められた(R2 年 4 月より)。</u>

A-2) 筋増殖・分化制御:筋肉量を負に制御しているマイオスタチンの活性を阻害する最小マイオスタチン部分ペプチド(ペプチド1: H-WRQNTRYSRIEAIKIQILSKLRL-NH₂)をリード化合物として、より強力なマイオスタチン阻害ペプチドの創製を行った。また、マイオスタチンと筋肉量の減少を伴うがん悪液質との関連性について検討した。

#### ① 構造活性相関に基づく新規マイオスタチン阻害ペプチドの創製(達成度 95%)

研究当初は、ペプチド1のN末端 Trp 残基を様々な化合物に置換した 36 種類のペプチド誘導体を合成し、Smad 応答性ルシフェラーゼレポーターアッセイにより、マイオスタチン阻害活性を評価した。その結果、N末端 Trp 部位に 2-naphthyloxyacetic acid を導入した新規アシル化ペプチド2が、ペプチド1より3倍高い阻害活性を示した(\*25)。3,3-diphenylpropionic acidを導入したアシル化ペプチド誘導体においてもペプチド2と同等の阻害活性を示すなど、N末端に導入するアシル基として、カルボニル基から2~3原子のスペーサーを挟んで比較的かさ高い構造を有するものが良いことが明らかとなった。さらに、ペプチド1に含まれる Ile あるいは Leu を置換した 18 種類のペプチド誘導体を合成し、同様に評価した結果、N 末端から 18 残基目の Leu を Ile に置換した誘導体が、ペプチド1よりも有意に高い阻害活性を示した(\*25)。

ペプチド 1 の各構成アミノ酸残基の重要性を精査するため、Ala スキャンを実施した。その結果、配列中に多く存在する I le 及び Leu 残基の重要性が明らかとなった (\*17、\*25)。さらに、Ala 置換により影響を受けなかった C 末端から B 残基目の B の B ではマイオスタチン阻害活性が劇的に低下し、それが B へリックス構造の減少とランダムコイル様構造の増加に起因すること示され、ペプチド B の阻害活性における B へリックス構造形成能の重要が示唆された。本 B Ala スキャンで未検討の B Ala (配列中央部)に対し、11 種類のアミノ

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

酸へ置換したペプチドを合成し、Trp、Val 及び Glu を本部位に導入した誘導体が、ペプチド 1 よりも顕著に高い阻害活性を示した。最終的に、ペプチド 2 と、上述で得られた知見を組み合わせたペプチド誘導体を 4 種合成し、ペプチド 1 より約 11 倍強力かつ、2 よりも約 4 倍強力な阻害活性( $IC_{50}$  値:  $0.32~\mu$ M)を示す新規ペプチド 4 を獲得することに成功した(\*25)。

ペプチド1を短鎖化すると、マイオスタチン阻害活性の減弱( $IC_{50}$  値: $30 \, \mu M$  以上)が見られることがわかっていたが、アミノ酸置換により阻害活性を獲得することを発明し、16 残基からなる小型マイオスタチン阻害ペプチドを創製した。2016 年 8 月に国内特許出願、2017 年 8 月にPCT 出願した(\*\*\*1)。更にリード最適化研究から、最終的な阻害剤として強力な阻害活性とプロテアーゼに強い抵抗性を有する MIPE-1686 の創製に至った(\*7)。本ペプチドも 16 残基からなるが、複数の D 体アミノ酸残基や遺伝子コードされていないアミノ酸残基を含む構造を有している。また、ペプチドの環状化(22 残基)誘導体も獲得できた。一方、新たな阻害剤創製の出発物質として  $TGF-\beta$  スーパーファミリータンパク質と結合するフォリスタチンに着目した研究から、フォリスタチン N 末端の  $\alpha$ -helical 領域及びその周辺にあたる 41 残基目から 54 残基目までのアミノ酸配列を持つ 14 残基のペプチドがマイオスタチン阻害ペプチドのシード化合物として見出され、その構造活性相関研究から高いマイオスタチン選択性も持つ新たなペプチド(ペプチド 26)の獲得にも至った(\*3)。この様に、活性の向上並びに低分子による分子創製において、創薬シーズに近い誘導体が得られていることから、達成率を 95%とした。

#### ② がん悪液質モデルマウスにおけるペプチド1の筋肉量減少抑制効果(達成度 85%)

がん悪液質に対するペプチド 1 の効果を  $in\ vivo$  で評価するためにモデルマウスの作成を行った。C57BL/6 由来のルイス肺腺がん細胞をマウスの背部皮下へ移植し、3 週間にわたって担癌マウスの体重量の変化、腫瘍の大きさ、腫瘍の重さ、さらに移植 3 週間後の腓腹筋量について検討したところ、マウスの体重低下(体重から腫瘍の重さを引いた値)と筋肉量の低下を確認することができた。モデルマウスより腫瘍を摘出して病理切片を作成し、腫瘍形成における  $TGF-\beta$  ファミリーシグナルの影響について検討した結果、がん組織全体ではなく、部分的に  $TGF-\beta$  やマイオスタチンより活性化させる Smad2、Smad3 のリン酸化が亢進していることを見出した。さらに、このリン酸化には  $TGF-\beta$  産生と長期にわたる低酸素曝露が関与していることを明らかにした(\*1、\*28)。

 $TGF-\beta$  ファミリーシグナルに対するペプチド 1 の阻害選択性をレポーターアッセイにより評価した結果、ペプチド 1 はマイオスタチンシグナルを強力に阻害するとともに、BMP によるシグナルも阻害することが示された。そこで、受容体型 Smad のリン酸化に与える影響を検証したところ、Smad 1 時間で誘導される Smad 1/5 のリン酸化も抑制することが明らかとなった(\*28、\*\*110、127)。

以上の研究で確立したがん悪液質モデルマウスを用いて、ペプチド1の治療効果を検討した結果、ペプチド1投与群において、腫瘍重量の減少と、投与部位である腓腹筋重量の有意な改善、及び筋力の指標である Grip Strength の顕著な改善が認められた。これは腓腹筋の一部筋肉の筋線維が肥大したことに依存した。さらにペプチド1投与によりがん悪液質による生存期間が延長した。加えて、消化器がん自然発症モデル(APC \(\textit{\textit{A}}\) 716)マウスを用いて、ペプチド1のがん悪液質の治療効果を検討した結果、ペプチド1投与による延命効果は確認できなかったが、死亡直前の体重はペプチド1投与により維持された。以上の結果より、ペプチド1は、多くの末期がん患者で認められるがん悪液質による筋重量・体重減少を抑制できる可能性が示唆された。ペプチド1の悪液質モデルマウスに対する効果は、全身投与ではなく、腓腹筋への筋肉内投与だけで改善できるため、臨床応用の可能性が高い(in revision)。これまでに、がん悪液質治療のために用いられたマイオスタチンの可溶性受容体は心筋の増強作用が確認されたが、ペプチド1では心筋への影響が認められなかった。これはミオスタチンが心筋に作用しないこと、またペプチド1の作用が投与部位限局的であることを示唆した。また、代謝性疾患である糖尿病に対して、筋肉量を増加させることにより糖尿病の改善効果がみられるか検証した

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

ところ、改善の優位傾向が認められた。

以上のように、A-2)プロジェクトは、当初の計画通り、高いマイオスタチン阻害活性を有する医薬品候補化合物を創出することに成功し、筋肉量の減少を伴うモデルマウスの作成およびそのマウスを用いた医薬品候補化合物の評価にも成功した。

当該プロジェクトに参画した学部生が、日本薬学会第 138 年会において学生優秀賞(\*\*71) および 7th International Peptide Symposium 2015 において Best Poster Award (\*\*174)、高 山健太郎講師が、平成 30 年度に日本薬学会関東支部奨励賞(\*\*55)、日本ペプチド学会奨励賞 (\*\*50)、水島昭二記念研究賞(東京薬科大学)を受賞し、令和元年 1 月より、京都薬科大学准 教授へ栄転した。また、本研究成果は、日経産業新聞、TBS テレビ(未来の起源)、Tarzan 誌に て報道された。

<u>A-3) 筋崩壊制御</u>:筋細胞膜の安定化に寄与するペプチドを開発するため、様々な生物活性を有するラミニンの部分ペプチドを網羅するペプチドライブラリーを用いて、 $\alpha$ -ジストログリカンに特異的に結合するペプチドの探索および初代培養細胞に対する生物活性を検討した。

#### ① $\alpha$ -ジストログリカンに特異的に結合するペプチドの探索 (達成度 90%)

ラミニンα2鎖 LG4-5 モジュールの組換えタンパク質(rec-α2LG4-5)と 41 種類の合成ペプ チドを用いて、LG4-5 モジュールの $\alpha$ -ジストログリカン結合部位を探索したところ、A2G80 (VQLRNGFPYFSY)と A2G78(GLLFYMARINHA)がα-ジストログリカン結合活性を有し、rec-α 2LG4-5 のα-ジストログリカン結合を阻害したことから、LG4-5 モジュールのα-ジストログリ カン結合活性における重要な部位であることがわかった(\*\*73、82、85)。また、リコンビナン トα-ジストログリカンの効率的調製法の確立にも成功し、本タンパク質を用いた結合活性評価 系 ELISA を構築することにも成功した(\*\*86)。本活性評価系を用いた再検討により、さらに、 六種類のペプチドが $\alpha$ -ジストログリカン結合活性を有している可能性を示した。また、A2G80に着目し、α-ジストログリカンに対してより強力に結合する活性ペプチドを獲得することを目 的として構造活性相関研究を展開した。具体的には、各アミノ酸をアラニンへと置換したペプ チドを合成し、合成したアラニン置換ペプチドを、キトサン、ヒアルロン酸からなるポリイコ ンコンプレックス(PIC)マトリックスへと結合させることでペプチド→PIC を構築後、上記にて 得た  $\operatorname{Fc}$  領域を含むマウス lpha – $\operatorname{DG}$  リコンビナントタンパク質を用いる  $\operatorname{ELISA}$  法にて結合活性評価 を行った。その結果、3 種類のアミノ酸残基(Asn, Pro, Ser)が A2G80 の  $\alpha$ -ジストログリカ ン結合活性発現に影響を与えないことを明らかとした(\*\*5、7、8、36、38、73、82、85、86)。 一方、ラミニンα2 鎖 E8 領域を網羅する合成ペプチドから、複数のα-ジストログリカン結合 活性部位を見出した。さらに、ヒト iPS 細胞表面に α-ジストログリカンが高発現しているこ とを世界に先駆けて報告するとともに、α-ジストログリカンが iPS 細胞の未分化能維持に関与 している可能性を示した(\*5、\*\*42)。

本プロジェクトにて得られた $\alpha$ -ジストログリカン結合活性ペプチドは、細胞骨格維持に関与する細胞外マトリックスと $\alpha$ -ジストログリカンとの結合様式の理解に向けて貴重な構造情報を与えるものであると同時に、筋細胞選択的薬物送達法を可能とする分子ツールとしても利用可能であると考えられ、筋疾患治療戦略基盤技術としての応用が期待される。

#### ② 高い生物活性を有するラミニン由来ペプチドの同定(達成度 60%)

673 種のラミニン由来合成ペプチドのうち、生物活性により分類した代表的な 6 種の合成ペプチドを培養プレートに塗布し、培養細胞の継日的な形態変化及び生存活性を検討した結果、AG73 及び C16 に高い細胞結合及び生存維持活性があることを明らかにした(\*11)。また、筋細胞膜に対する保護機能を評価するために、細胞内カルシウム濃度変化のリアルタイム評価系を

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

最適化した。さらに、ヒトラミニン $\alpha$ 5 鎖 G ドメインに着目した細胞接着活性ペプチドの探索研究を展開し、<u>複数の活性ペプチドが受容体特異的に作用し、細胞接着活性を示すことを明ら</u>かとした(\*4)。

以上のように、A-3)プロジェクトでは、当初の計画通り、 $\alpha$ -ジストログリカンに特異的かつ強固に結合するペプチドの獲得に成功した。さらに、今後のさらなる構造誘導に必須となる $\alpha$ -ジストログリカン結合活性評価用 ELISA の構築の確立に成功した。

当該プロジェクトに参画した教員が、<u>第 56 回ペプチド討論会にて Chemical communication</u> poster award を受賞した (\*\*8)。

#### B 「創薬高度化ユニット」

#### α-ジストログリカン結合ペプチドを利用した筋組織への革新的 DDS の開発

筋指向性 DDS を開発することを目指し、 $\alpha$ -ジストログリカンの特異的リガンドであるラミニン $\alpha$ 2 鎖由来 A2G80 ペプチドを利用した、筋組織選択的なリポソームならびに本ペプチド遺伝子複合体(ポリプレックス)を開発し、その指向性と核酸・遺伝子導入能について評価した。

#### A2G80-PEG リポソームの開発 (達成度 100%)

A2G80 リポソームを作製するために、A2G80 ペプチドと脂質ユニットのカップリング反応により合成した DSPE-PEG2000-A2G80 を用いて約 100 nm の粒子を調製した。はじめに組織選択性の評価を行うために、リポソームを蛍光プローブ (DiI) 標識し、正常マウスあるいはデュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルマウス (mdx) の各組織切片との相互作用性を検証した。結果、ペプチド未修飾リポソームと比較し、どちらのマウス由来の筋組織でも A2G80 リポソームの高い筋細胞膜への親和性が示された。この結果は、脾臓、腎臓などとの相互作用と比較して極めて顕著なものであるとともに、免疫組織学的解析から、<u>筋細胞膜上に高発現するジストログリカンと相互作用していることが判明した(\*\*65、66)。さらに A2G80 ペプチドに対するスクランブルペプチドを用いた場合では、筋細胞膜への相互作用性は、ほとんど認められなかったことから、A2G80 リポソームのジストログリカンを介した筋細胞選択性が明らかとなった。</u>

A2G80 リポソームを筋組織選択的な全身投与可能な DDS キャリアとするには、デュシャンヌ 型筋ジストロフィー(DMD)モデルマウス(mdx)への静脈内投与後の血中滞留性向上と筋組織 集積性を図ることが重要である。そこで、リポソームに使用する PEG 脂質を異なる鎖長にする 事で、全身循環性に富んだリポソームの最適化を行った。臨床応用可能なマイクロ流体技術を <u>用いてリポソーム型脂質ナノ粒子の調製法を最適化したところ、極めて均一性が高くかつ超微</u> 粒子化(約70 nm)のリポソーム作製に成功した(\*\*44、57)。得られたリポソーム表面に対し、 ポストインサーション法により、DSPE-PEG2000-A2G80 を修飾させた A2G80 リポソームは、約 80 nm の粒子径を示す事が明らかとなった。一方、三浦らにより A2G80 リポソーム作製における機 能性素子となる DSPE - PEG2000-A2G80 の合成反応条件を最適化し、効率的大量合成法の確立に も成功したことで、*in vivo* 検証のための A2G80 リポソームの大量調製が可能となった(\*\*43、 99)。A2G80 リポソームの全身投与後の各種臓器内分布を検証するために、Dil 標識リポソーム を正常および mdx マウスに静脈内投与を行った後、24 時間後の各種臓器を回収し、蛍光顕微鏡 にて組織学的に評価した。その結果、PEG 脂質を組み合わせた A2G80 リポソームは、肝臓への 非特異的な取り込み回避が可能となった。正常マウスの筋組織では、いずれのリポソーム投与 群においても集積を認めず、一方で mdx マウスでは PEG 脂質を組み合わせた A2G80 リポソーム において筋組織への顕著な集積性を認めた。特に筋組織におけるリポソームの分布観察では、 筋細胞膜上に効率的に集積することも明らかとなった。蛍光プローブを抽出し定量解析した結 果からも筋組織選択性が示されたことから、A2G80 リポソームは DMD 筋組織選択的な DDS キャ リアとなりうると期待された(\*\*23、48)。さらに核酸医薬品を内封することを考慮した場合、

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

細胞内まで送達可能なキャリアへと改良することが望ましい。そのため本リポソームに対して、細胞膜透過性ペプチド(R8)を極少量(総脂質量に対して 0.1%)加え、A2G80-R8-リポソームを作製したところ、リポソームの劇的な筋細胞内導入に成功した(\*\*63、99)。また、筋組織への局所投与を投与した際、A2G80-R8 リポソームは A2G80 リポソームと比較して、筋組織内への集積性も向上する事も明らかとした。以上の結果より、A2G80 ペプチドを用いた筋組織指向性リポソームの新規開発に成功した(\*\*23、40)。

#### ② A2G80-R9 を用いた遺伝子導入システムの開発(達成度 100%)

カチオン性ペプチド: R9 を連結させた A2G80 ペプチドと、アニオン性であるプラスミド DNA (蛍光標識プラスミド DNA) とを静電的相互作用により結合させ、A2G80-R9 複合体 (ポリプレックス) を調製したところ、粒子径約 50 nm かつ表面電位が中性付近のポリプレックスが作製可能となった。マウス筋芽由来 C2C12 細胞株を用いて、A2G80-R9 ポリプレックスの細胞内動態特性を共焦点レーザー顕微鏡及びフローサイトメトリーにて評価した。その結果、本ポリプレックスの細胞内移行は、リコンビナントα-ジストログリカンの添加により、細胞内移行が優位に阻害されたことから、筋細胞選択的かつ A2G80 ペプチド配列依存的であることが判明した(\*\*65、69)。顕著な遺伝子導入能を発揮し、その高い細胞内導入には、エネルギー依存的なエンドサイトーシスが関与することも示された。当初の計画通り、高い筋組織選択性を有する遺伝子キャリアの創出に成功した(\*\*41、66)。

さらに遺伝子導入活性のさらなる向上を企図し、A2G80-R9 に細胞質へのプラスミド DNA の拡散 (エンドソーマルエスケープ)を促進するペプチド: H8 を連結させた A2G80-R9-H8 ポリプレックスの調製法について、粒子径と内封遺伝子の安定性の観点から最適化した。C2C12 細胞に対する遺伝子導入効果を検討したところ、粒子径約 50 nm の A2G80-R9-H8 ポリプレックスは A2G80-R9 ポリプレックスに比較して数十倍以上の高い遺伝子導入活性を示した (\*\*31、41)。また蛍光タンパク発現プラスミド DNA を用いて調製した A2G80-R9-H8 ポリプレックスをデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) モデルマウスの脛骨筋内へ局所投与し、5 日後に組織切片を作製、蛍光顕微鏡にて観察したところ、筋繊維における遺伝子発現が認められた (\*\*22、24)。また in vivo イメージング装置における遺伝子発現パターンを評価したところ、投与数日後から 2 週間程度持続した発現パターンが得られ、その活性は単体のプラスミド DNA および A2G80-R9 ポリプレックスに比較して有意に高いことが明らかとなった (\*31、\*\*13、14)。また、超音波応答性ナノバブルと A2G80-R9-H8 ポリプレックスを混合し、マウス筋組織への投与直後に超音波照射することで、さらに持続的かつ高い遺伝子導入活性を示すことも明らかとした。

上記の結果より、筋組織への高い遺伝子導入能を発揮する有用な新規ペプチドキャリアの開発に成功した。

以上のように、B) プロジェクトは、当初の計画通り、ジストログリカンへの高い親和性を有する A2G8O ペプチドを利用した高い筋組織選択性を有する DDS キャリアの創出に成功した。

当該プロジェクトに参画した学部生および大学院生は、遺伝子・デリバリー研究会第 19 回夏期セミナー優秀発表賞 (\*\*15)、第 44 回製剤・創剤セミナー優秀ポスター発表賞 (\*\*22)、日本筋学会第 5 回学術集会 優秀発表賞 (\*\*23)、第 61、63 回日本薬学会関東支部大会 優秀ポスター発表賞 (\*\*14、\*\*94)、日本薬学会第 138、139 年会において優秀ポスター発表賞 (\*\*48、\*\*76)を受賞した。

#### <優れた成果が上がった点>

#### **A 「分子創製ユニット」**

#### A-1)筋関連遺伝子機能制御:

Leucy I-3-epi-deoxynegamycin や TCP-112 を基本骨格に構造活性相関研究を実施し、高活性

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

誘導体として TCP-199、TCP-1109、TCP-306 を獲得することに成功した。TCP-199 は、天然由来で最も高いリードスルー活性を有するアミノグリコシド G418 を凌駕する初めての化合物である。また、TCP-1109 は、マウス末梢神経への直接投与により、顕著な毒性なしに有意な L-MPZ リードスルー活性を示したことから重要な創薬シーズと期待される。TCP-306 は医薬品開発の候補化合物として更なる検討が進められている。

さらに、リードスルー薬を臨床で用いる場合に懸念される生理的リードスルーへの影響に関する新しい知見を得た。哺乳類の正常組織で翻訳リードスルーにより機能分子が産生され機能しているという事実は、近年報告が相次いだがあまり一般的には知られていない。しかし、本研究を通して、リードスルー薬がこれらの生理的リードスルーにも影響しうること、末梢神経ではリードスルー産物が増加しすぎると末梢神経障害を生じうることを明らかにした。したがって、今後薬を開発する上で、従来のリードスルー評価系のみでなく、本研究で確立した評価系を用いてPO mRNAへの影響や血液-神経関門を介した末梢神経への移行性を調べることが重要である点を示すことができた。

#### A-2) 筋増殖・分化制御:

マウスマイオスタチンのプロドメインから世界に先駆けて 23 残基のマイオスタチン阻害ペプチド 1 を発見した。ペプチド 1 を基盤に構造活性相関研究を展開し、高活性誘導体 4 ( $IC_{50}$  値:  $0.32~\mu$ M) および短鎖化誘導体の創製に成功し、知財化を進めている (\*\*\*1, \*\*\*2)。殊に最終的な阻害剤として強力な阻害活性とプロテアーゼに強い抵抗性を有する MIPE-1686 の創製は、医薬候補化合物につながる成果で、筋疾患治療薬開発に貢献が期待される。また、ペプチド 1 は、がん悪液質による筋重量・体重減少を抑制できる可能性が示唆され、本研究で獲得した高活性誘導体に関しても医薬開発が加速してくことが期待される。

#### <u>A-3) 筋崩</u>壊制御:

ラミニン $\alpha$ 2 鎖 LG4-5 モジュールに着目したスクリーニング研究から、 $\alpha$ -ジストログリカン結合活性ペプチド A2G78(GLLFYMARINHA)、A2G80(VQLRNGFPYFSY)との同定に至った。さらに、 $\alpha$ -ジストログリカン結合活性評価用 ELISA の構築にも成功した。本評価系により、さらなる高活性  $\alpha$ -ジストログリカン結合ペプチドの探索研究および構造最適化研究が加速することが期待される。

#### B 「創薬高度化ユニット」

A2G80 リポソームのような静脈内投与によって、DMD モデル筋組織への指向性を示す非ウイルス型の DDS キャリアは世界的に見ても未だ報告例がない。特に本リポソームは、病態特異的な DDS としての機能を有することから、DMD 疾患治療に有用な DDS キャリア開発において、極めて 有益な情報提供となると言える。本研究基盤をもとに DMD 疾患のみならず他の筋疾患治療に向けた DDS 製剤開発へと発展していくものと期待される。

A2G80-R9-H8 ポリプレックスにおいては *in vitro* および *in vivo* において筋細胞における高い遺伝子導入活性を示し、新たに H8 ペプチドを付与することで、*in vivo* においても効率的な遺伝子導入能を発揮できるという優れた成果につなげることができた。この A2G80-R9-H8 の優れている点は、ポリカチオンの R9 ペプチドを有していることから、ポリアニオン性高分子であるプラスミド DNA のみならず、siRNA、miRNA などの低分子核酸のための DDS キャリアとして容易に応用できることである。現在、根本治療のための創薬モダリティとして期待されるゲノム編集ツールのための DDS キャリアとしても多いに期待される。A2G80-R9-H8 は凍結乾燥品ペプチドと導入用遺伝子を室温にて攪拌しつつ混合するのみで、筋組織における高い遺伝子導入を可能とするペプチドキャリアであり、臨床応用を想定した場合には、その管理・調製の容易さが大きな利点となると予想される。

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

#### <課題となった点>

ネガマイシン誘導体を用いたリードスルー薬の創製において、詳細な薬物動態解析が未実施であり、安全性が担保された投与形態・剤形や投与間隔の最適化を進める(必要に応じて構造最適化も実施)。一方で、詳細なリードスルー機構の解明をすることで対象疾患を具体化し、医薬開発の実現に向けた検討を進めていく。

マイオスタチン阻害ペプチドの全身性投与を可能とするため、ペプチドの構造最適化や溶解性の制御、リポソーム・ナノ粒子化を含めた投与剤形の最適化を実施することで、医薬開発を加速させる。がん悪液質や筋ジストロフィーに対する薬効を詳細に検討し、科学的根拠に基づく創薬を推進する。

A2G80-R9 を用いた遺伝子導入において、エンドソームからの効率的な遺伝子放出が律速となっている、エンドソーム破壊能を有するカチオン性ポリマー(polyethyleneimine (PEI))を利用することで、三元複合体を作製する。また、A2G80-PEG リポソームを静脈内投与すると、肝臓に一部トラップされている傾向も認められたことから、リポソーム調製時に全身循環性を可能とする PEG 鎖長の組み合わせを工夫する。

α-ジストログリカン結合活性ペプチドのさらなる構造最適化に向けた足がかりとするべく、 活性ペプチドとα-ジストログリカンとの詳細な結合様式を解明する。

#### <自己評価の実施結果と対応状況>

三ヶ月毎に開催する戦略会議において達成率や費用対効果について議論し、必要に応じて研究計画の見直しを行っている。さらに、最終研究成果報告会(R2年3月)を行うまでの過程において、H28年4月、H29年3月及びH30年3月に本プロジェクトの公開報告会を開催し、有識者との積極的な討論により、プロジェクトの方針や自己評価の妥当性について確認・評価を行ってきた。若手研究者の育成を目的に、H30年3月の研究公開報告会においては、報告者を、学生、大学院生及びPDに限定して行った。

#### <外部(第三者)評価の実施結果と対応状況>

各年度(H27~H30年度)の活動実績について外部評価を実施し、研究計画の妥当性、研究の進捗状況、研究の将来性に関する助言・指摘をいただいている。また、第2回公開研究進捗状況報告会では、外部評価者(同志社大学 石浦章一教授)によるプロジェクト評価も行った。各研究課題が計画通り、順調に進展していること、及び基礎的知見に関して予想を上回る成果が上がっていることなど、おおむね高い評価をいただいている。

#### <研究期間終了後の展望>

本学を筋疾患統合創薬研究拠点とするために、研究期間終了後も、「分子創製ユニット」および「創薬高度化ユニット」のプロジェクトは継続され、本研究で構築されたユニット間の連携により、新規医薬品の創製が可能になると期待される。

「分子創製ユニット」においては、リードスルー活性を有する新規ネガマイシン誘導体及びマイオスタチン阻害ペプチドの両者において、医薬品候補化合物に相当する分子の創製に成功していることから、今後、さらに臨床開発に向けた創薬研究が加速されると思われる。また、マイオスタチン阻害ペプチドは、筋肉量を増加させることにより、代謝性疾患の治療につながる可能性が示唆されたため、さらにサルコペニアに対する治療効果も期待される。さらに、ネガマイシン誘導体の最適化においては、薬効だけでなく、POマウスおよびL-MPZマウスを利用してL-MPZ/PO比と末梢神経機能との関連性を明らかにすることにより、安全性の予測やそれに基づく最適化が可能になると考えられる。

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

「創薬高度化ユニット」においては、α-ジストログリカン結合活性ペプチドの最小活性配列 の探索、および活性発現に重要なアミノ酸残基の同定がなされ、非天然アミノ酸構造への置換 等により生体内酵素分解耐性(血漿中安定性向上)を付与した in vivoで有効な新規高活性ペ プチドの創製が期待される。またリポソーム製剤の開発においては、今後、A2G80 リポソーム の DMD 疾患治療における有用性を評価するために、リポソームへのエクソンスキッピング誘導 用核酸や分子創製ユニットの林らによって開発されたマイオスタチン阻害ペプチドやリードス ル一薬を内封したリポソーム製剤の開発が期待される。なお、A2G80-R9-H8 ペプチドにおいて は、ジストロフィンやゲノム編集ツールなど治療用遺伝子を用いて DMD モデルマウスにおける 治療効果を検証することで DMD ゲノム編集治療のための DDS キャリアとしての応用展開を図る 予定である。遺伝子治療への応用を進める際には高濃度でのポリプレックス調製が重要となる ことが予想され、ポリプレックス溶液中に高分子を共存させる、あるいはポリプレックスを凍 結乾燥状態で保存する手法など、製剤化に向けた検討も進めていきたいと考えている。また、 コンビネーション治療法として、超音波応答性ナノバブルと A2G80-R9-H8 ポリプレックスを組 み合わせた遺伝子送達法の応用研究も展開していく予定である。本プロジェクトで得られた筋 指向性 DDS キャリアの研究成果を基盤として、DMD のみならず筋萎縮症など様々な筋疾患への 応用展開を図っていく予定である。

#### <研究成果の副次的効果>

本研究を行っている過程で、ラミニン由来合成ペプチドをコートした培養プレートでは神経幹細胞の接着および神経幹細胞から分化した神経細胞の突起伸長を顕著に促進する合成ペプチドがあることを見出した。そのうち 1 種は、神経細胞への高い分化誘導能を持っていることが明らかとなった。また、この活性は現在当該研究領域で汎用されているコーティング材料よりも優れており、再生医療分野での応用や幹細胞研究における培養補助薬としての実用化が期待される。また、 $\alpha$ -ジストログリカン結合活性ペプチドは、筋組織指向性を付与する新規機能性分子としての応用が可能であり、本ペプチドを用いた新規 DDS の開発・実用化に繋がることが期待される。

L-MPZ マウスは、髄鞘形成時から始まる進行性の髄鞘障害を生じ、それはヒトの遺伝性運動感覚ニューロパチーに類似する。これまで PO 遺伝子の重複や点変異などが原因とされてきたが、本研究によって翻訳リードスルー調節異常によっても同じ病態を生じうることが明らかになった。今後、L-MPZ マウスは髄鞘異常およびそれに伴って生じる軸索異常の病態機序を明らかにし治療方法を開発する上でのモデルマウスとして有用であることが示された。さらに、本研究を通じて遺伝性だけではなく炎症性脱髄の病態と L-MPZ の関連性も示されたことから、これに関しても今後さらに検討していく予定である。

TCP-112 の細胞膜透過性を検討する過程で、主要なペプチドトランスポーターとして知られる PEPT1 および PEPT2 が TCP-112 を基質として認識し、細胞内へ輸送することを見出した。 TCP-112 のリードスルー活性は細胞内濃度に依存するため、ナンセンス突然変異の治療においては、ペプチドトランスポーターを介した薬物動態制御に繋がることが期待される。

本プロジェクトは、筋関連疾患の克服を目標としているが、本成果は、筋疾患のみならず、 がん、糖尿病、さらに未だ治療薬のない難病治療への応用も期待されるものである。

また、本戦略研究を通じて、当該プロジェクトに参加した院生、学部生等においては、多くの受賞を頂く機会を得た。それらの成果を糧に果敢に研究者の道を歩む学生を複数輩出できたことは、本プロジェクトの大きな功績である。

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

12 キーワード(当該研究内容をよく表していると思われるものを8項目以内で記載してください。)

- (1) ペプチド (2) <u>筋疾患</u> (3) <u>リードスルー</u> (4) マイオスタチン (5) ラミニン (6) DDS
- (7) 筋特異性 (8) リポソーム
- 13 研究発表の状況(研究論文等公表状況。印刷中も含む。) 上記、11(4)に記載した研究成果に対応するものには\*を付すこと。

#### <雑誌論文>

#### 原著論文

- \*Nagata A, <u>Itoh F</u>, Sasho A, Sugita K, Suzuki R, Hinata H, Shimoda Y, Suzuki E, Maemoto Y, Inagawa T, Fujikawa Y, Ikeda E, Fujii C, Inoue H: The evolutionarily conserved deubiquitinase UBH1/UCH-L1 augments DAF7/TGF-β signaling, inhibits dauer larva formation, and enhances lung tumorigenesis. J Biol Chem, *in press* doi: 10.1074/jbc.RA119.011222.
- 2. \*Otani Y, Ohno N, Cui J, Yamaguchi Y, <u>Baba H</u>: Upregulation of large myelin protein zero leads to Charcot-Marie-Tooth disease-like neuropathy in mice. Commun Biol 3, 121 (2020)
- 3. \*Saitoh M, Takayama K, Hitachi K, Taguchi A, Taniguchi A, Tsuchida K, <u>Hayashi Y</u>: Discovery of a follistatin-derived myostatin inhibitory peptide. Bioorg Med Chem Lett, 30, 126892 (2020)
- 4. \* Kumai J, Yamada Y, Hamada K, Katagiri F, Hozumi K, Kikkawa Y, Nomizu M: Identification of active sequences in human laminin α5 G domain. J Pept Sci, 25, e3218 (2019)
- 5. \* Sugawara Y, Hamada K, Yamada Y, Kumai J, Kanagawa M, Kobayashi K, Toda T, Negishi Y, Katagiri F, Hozumi K, Nomizu M, Kikkawa Y: Characterization of dystroglycan binding in adhesion of human induced pluripotent stem cells to laminin-511 E8 fragment. Sci Rep, 9, 13037 (2019)
- 6. \* Hamada K, Omura N, Taguchi A, Baradaran-Heravi A, Kotake M, Arai M, Takayama K, Taniguchi A, Roberge M, <u>Hayashi Y</u>: New negamycin-based potent readthrough derivative effective against TGA-type nonsense mutations. ACS Med Chem Lett, 10, 1450-1456 (2019)
- \* Takayama K, Asari T, Saitoh M, Nirasawa K, Sasaki E, Roppongi Y, Nakamura A, Saga Y, Shimada T, Ikeyama H, Taguchi A, Taniguchi A, Negishi Y, Hayashi Y: Chain-shortened myostatin inhibitory peptides improve grip strength in mice. ACS Med Chem Lett, 10, 985-990 (2019)
- 8. Rentier C, Takayama K, Saitoh M, Nakamura A, Ikeyama H, Taguchi A, Taniguchi A, <u>Hayashi</u> <u>Y</u>: Design and synthesis of potent myostatin inhibitory cyclic peptides. Bioorg Med Chem, 27, 1437-1443 (2019)
- 9. Sakai T, Hirashima S, Matsushima Y, Nakano T, Ishii D, Yamashita Y, Nakashima K, Koseki Y, Miura T: Synthesis of chiral γ,γ-disubstituted γ-butenolides via direct vinylogous aldol reaction of substituted furanone derivatives with aldehydes. Org Lett, 21, 2606-2609 (2019)
- \* Negishi Y, Hamano N, Sato H, Katagiri F, Takatori K, Endo-Takahashi Y, Kikkawa Y, Nomizu
   N. Development of a screening system for targeting carriers using peptide-modified liposomes and tissue sections. Biol Pharm Bull, 41, 1107-1111 (2018)
- 11. \* Hayashi H, Yamada M, Kumai J, <u>Takagi N</u>, <u>Nomizu M</u>: Biological activities of

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

- laminin-111-derived peptide-chitosan matrices in a primary culture of rat cortical neurons. Arch Biochem. Biophys, 648, 53-59 (2018)
- 12. Nakashima K, Noda Y, Hirashima S, Koseki Y, <u>Miura T</u>: Asymmetric conjugate addition of α-cyanoketones to enones using diaminomethylenemalononitrile organocatalyst. J Org Chem, 83, 2402-2408 (2018)
- 13. \* Yamaguchi Y, <u>Baba H</u>: Phylogenetically conserved sequences around myelin P0 stop codon are essential for translational readthrough to produce L-MPZ. Neurochem Res, 43, 227-237 (2018)
- 14. Furuya T, Takehara I, Shimura A, Kishimoto H, Yasujima T, Ohta K, Shirasaka Y, Yuasa H, <u>Inoue</u> <u>K</u>: Organic anion transporter 1 (OAT1/SLC22A6) enhances bioluminescence based on d-luciferin-luciferase reaction in living cells by facilitating the intracellular accumulation of d-luciferin. Biochem Biophys Res Commun, 495, 2152-2157 (2018)
- 15. Arai R, Hirashima S, Kondo J, Nakashima K, Koseki Y, <u>Miura T</u>: Cinchona–Diaminomethylenemalononitrile Organocatalyst for the Highly Enantioselective Hydrophosphonylation of Ketones and Enones. Org Lett, 20, 5569-5572 (2018)
- \* Nakano N, Tsuchiya Y, Kako K, Umezaki K, Sano K, Ikeno S, Otsuka E, Shigeta M, Nakagawa A, Sakata N, <u>Itoh F</u>, Nakano Y, Iemura SI, van Dinther M, Natsume T, ten Dijke P, Itoh S. TMED10 protein interferes with transforming growth factor (TGF)-β signaling by disrupting TGF-β receptor complex formation. J Biol Chem, 292, 4099-4112 (2017)
- 17. \* Asari T, Takayama K, Nakamura A, Shimada T, Taguchi A, <u>Hayashi Y</u>: Structural basis for the effective myostatin inhibition of the mouse myostatin prodomain–derived minimum peptide. ACS Med Chem Lett 8, 113-117 (2017)
- 18. Kikkawa Y, Sugawara Y, Harashima N, Fujii S, Ikari K, Kumai J, Katagiri F, Hozumi K, Nomizu M: Identification of laminin α5 short arm peptides active for endothelial cell attachment and tube formation. J Pept Sci, 23, 666-673 (2017)
- 19. Fujimori C, Kumai J, Nakamura K, Gu Y, Katagiri F, Hozumi K, Kikkawa Y, **Nomizu M**: Biological activity of peptide-conjugated polyion complex matrices consisting of alginate and chitosan. Biopolymers, 108, (2017) doi: 10.1002/bip.22983.
- \* Taguchi A, Hamada K, Shiozuka M, Kobayashi M, Murakami S, Takayama K, Taniguchi A, Usui T, Matsuda R, Hayashi Y: Structure-activity relationship study of leucyl-3-epi-deoxynegamycin for potent premature termination codon readthrough. ACS Med Chem Lett, 8, 1060-1065 (2017)
- 21. Kumai J, Hozumi K, Yamada Y, Katagiri F, Kikkawa Y, Nomizu M: Effect of spacer length and type on the biological activity of peptide-polysaccharide matrices. Biopolymers, 106, 512-520 (2016)
- 22. Kikkawa Y, Harashima N, Ikari K, Fujii S, Katagiri F, Hozumi K, <u>Nomizu M</u>: Down-regulation of cell adhesion via rho-associated protein kinase (ROCK) pathway promotes tumor cell migration on laminin-511. Exp Cell Res, 344, 76-85 (2016)
- 23. Sakai T, Hirashima S, Nakashima K, Maeda C, Yoshida A, Koseki Y, <u>Miura T</u>: Asymmeric chlorination of β-ketoesters using diaminomethylenemalononitrile organocatalyst. Chem Pharm Bull, 64, 1781-1784 (2016)
- 24. Nakashima K, Kawada M, Hirashima S, Kosugi A, Kato M, Yoshida A, Koseki Y, <u>Miura T</u>: Stereoselective conjugate addition of carbonyl compounds to maleimide using

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

- diaminomethylenedione organocatalyst. Tetrahedron: Asymmetry, 27, 888-895 (2016)
- 25. \* Takayama K, Nakamura A, Rentier C, Mino Y, Asari T, Saga Y, Taguchi A, Yakushiji F, <a href="Hayashi Y"><u>Hayashi Y</u></a>: Effect of N-terminal acylation on the activity of myostatin inhibitory peptides. ChemMedChem, 11, 845-849 (2016)
- 26. Nakashima K, Kawada M, Hirashima S, Kato M, Koseki Y, <u>Miura T</u>: Asymmetric conjugate addition of ketones to maleimide using diaminomethylenedione organocatalyst. Synlett, 26, 1248-1252 (2015)
- 27. Hirashima S, Arai R, Nakashima K, Kawai N, Kondo J, Koseki Y, <u>Miura T</u>: Asymmetric hydrophosphonylation of aldehydes using a cinchona-diaminomethylenemalononitrile organocatalyst. Adv Synth Catal, 357, 3863-3867 (2015)
- 28. \* Furuta C, Miyamoto T, Takagi T, Noguchi Y, Kaneko J, Itoh S, Watanabe T, <u>Itoh F</u>: TGF-β signaling enhancement by long-term exposure to hypoxia in a tumor microenvironment composed of Lewis lung carcinoma cells. Cancer Sci, 11, 1524-1533 (2015) 表紙に選出
- 29. \* Ohsawa Y, Takayama K, Nishimatsu S, Okada T, Fujino M, Fukai Y, Murakami T, Hagiwara H, **Itoh F**, Tsuchida K, **Hayashi Y**, **Sunada Y**: The inhibitory core of the myostatin prodomain: its interaction with both type I and type II membrane receptors and potential to treat muscle atrophy. PLoS One, 10, e0133713 (2015)
- 30. \* Hamada K, Taguchi A, Kotake M, Aita S, Murakami S, Takayama K, Yakushiji F, <u>Hayashi Y</u>: Structure-activity relationship studies of 3-epi-deoxynegamycin derivatives as potent readthrough drug candidates. ACS Med Chem Lett, 6, 689-694 (2015)

#### 総説・著書等

- \* Nirasawa K, Hamada K, Naraki Y, Katagiri F, Endo-Takahashi Y, Kikkawa Y, Nomizu M, Negishi Y: Laminin alpha 2 Chain-Derived Peptide Enables Enhanced Delivery of Plasmid DNA to Skeletal Muscle Cells. The 56th Japanese Peptide Symposium proceeding, in press
- 32. \* Negishi Y, Nomizu M: Laminin-derived peptides: Applications in drug delivery systems for targeting. Pharmocol Ther, 202, 91-97 (2019)
- 33. Takayama K: Medicinal chemistry focused on mid-sized peptides derived from biomolecules. YAKUGAKU ZASSHI, 139, 1377-1384 (2019)
- 34. Taguchi A, Hamada K, <u>Hayashi Y</u>: Chemotherapeutics overcoming nonsense mutation-associated genetic diseases: medicinal chemistry of negamycin. J Antibiot, 71, 205-214 (2018)
- 35. Ito S, <u>Ito F</u>: TMEPAI family: involvement in regulation of multiple signaling pathways. J Biochem, 164, 195-204 (2018)
- 36. 山口宜秀: ミエリンタンパク質 P0(MPZ)とその特殊アイソフォームである L-MPZ の構造と機能. Peripheral Nerve, 28, 8-15 (2017)
- 37. 高山健太郎, <u>林 良雄</u>: ペプチドの構造制御による筋肉増強薬をめざしたマイオスタチン阻害ペプチドの創製. 生命機能に迫る分子化学, 56-61 (2018)
- 38. 高山健太郎, <u>林 良雄</u>: ペプチド化学を利用した生体分子からの中分子創薬. 有機合成化学協会誌, 73, 737-748, (2015)
- 39. 髙山健太郎, <u>林 良雄</u>: マウスマイオスタチンプロドメイン配列に由来するマイオスタチン阻害ペプチドの発見. Jasco Report, 58, 6-11 (2016)

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

#### <図書>

該当なし			

#### <学会発表>

- 1. \* 佐々木愛理, 林 由浩, 木村優花, 韮沢 慧, 濱野展人, 片桐文彦, 三浦 剛, 吉川大和, 髙橋葉子, 野水基義, 根岸洋一: 全身投与可能な筋組織指向性ペプチド修飾ナノ DDS の開発. 日本薬学会第 140 年会 (2020/3, 京都市)
- 2. 小田切美樹, 高山健太郎, 田口晃弘, 谷口敦彦, 林良雄: マイオスタチン阻害ペプチドの酵素安定性評価. 日本薬学会 第 140 年会 (2020/3, 京都市)
- 3. 大谷嘉典, 大野伸彦, 山口宜秀, 崔 晶晶, 藤谷昌司, <u>馬場広子</u>: 末梢神経機能に影響を及ぼす翻訳リードスルータンパク質 Large myelin protein zero の解析. 第 125 回日本解剖学会総会 (2020/3, 宇部市)
- 4. Yamaguchi Y, Otani Y, Ohno N, Cui J, <u>Baba H</u>: Translational Readthrough Regulates Physiological Function in the Nervous System. 第 42 回日本分子生物学会年会 (2019/12, 福岡市)
- 5. \* 濵田圭佑、張 光端、山田雄二、吉川大和、**野水基義**: ラミニンα2 鎖由来α-ジストログリカン結合ペプチドの同定とその構造活性相関研究. 第 37 回メディシナルケミストリーシンポジウム (2019/11, 東京)
- 6. 嶋野慶樹, 濵田圭佑, 大村紀子, 田口晃弘, 澤田直志, 高山健太郎, 谷口敦彦, <u>林 良雄</u>: 高リードスルー活性を有するネガマイシン誘導体 TCP-1109 の創製とその活性評価. 第 37 回メディシナルケミストリーシンポジウム (2019/11, 東京)
- 7. \* Nomizu M: Lecture of Japan Peptide Society Award: Cell adhesion research based on peptide science. 第 56 回ペプチド討論会 (2019/10, 東京)
- 8. \* Hamada K, Zhang G, Yamada Y, Kikkawa Y, Nomizu M: Structure activity relationship study of an α-dystroglycan binding peptide from the laminin α2 chain LG4-5 modules. 第 56 回ペプチド討論会 (2019/10, 東京) \* Chemical communication poster award
- 9. \* Zhang G, Hamada K, Yamada Y, Kikkawa Y, <u>Nomizu M</u>: Identification of α-dystroglycan binding sequences in the laminin α2 chain LG4-5 modules. 第 56 回ペプチド討論会 (2019/10, 東京)
- 10. Yamada Y, Yoshida C, Hamada K, Kikkawa Y, <u>Nomizu M</u>: Three-dimensional cell culture using laminin peptide-conjugated agarose hydrogels. 第 56 回ペプチド討論会 (2019/10, 東京)
- \* Omura N, Hamada K, Taguchi A, Shimano K, Sawada C, Takayama K, Taniguchi A, <u>Hayashi Y</u>: Development of leucyl-3-epi-deoxynegamycin derivative with a potent readthrough activity. 第 56 回ペプチド討論会 (2019/10, 東京) \*ポスター賞
- 12. Odagiri M, Takayama K, Taguchi A, Taniguchi A, <u>Hayashi Y</u>: Enzymatic stability of myostatin inhibitory peptides. 第 56 回ペプチド討論会 (2019/10, 東京)
- \*Nirasawa K, Hamada K, Naraki Y, Katagiri F, Endo-Takahashi Y, Kikkawa Y, Nomizu M, Negishi Y: Laminin-alpha2 chain derived peptide enable enhanced delivery of plasmid DNA to skeletal muscle cells. 第 56 回ペプチド討論会 (2019/10, 東京)
- 14. \* 冨岡花奈, 韮沢 慧, 楢木侑子, 濵田圭佑, 片桐文彦, 髙橋葉子, 吉川大和, 野水基義, 根岸洋 一: エンドソーム脱出能を備えたジストログリカン親和性ペプチドによる筋指向性遺伝子デリバリー システムの開発. 第 63 回日本薬学会関東支部大会(2019/9, 東京) \* 優秀発表賞(ポスター発

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

#### 表の部)

- 15. \* 佐々木愛理, 林 由浩, 木村優花, 韮沢 慧, 濱野展人, 片桐文彦, 坂井崇亮, 吉田彰宏, 平島真一, 三浦剛, 髙橋葉子, 吉川大和, 野水基義, 根岸洋一: 筋組織指向性ペプチドを用いた全身投与型ナノ粒子の開発と臓器移行性評価. 遺伝子・デリバリー研究会第 19 回夏期セミナー(2019/9, 京都市) \* 優秀発表賞
- 16. Takayama K, Saitoh M, Asari T, Roppongi Y, Nakamura A, Ikeyama H, Taguchi A, Taniguchi A, Negishi Y, Havashi Y: Identification and structure-activity relationship of the minimum peptide structure derived from endogenous myostatin inhibitory molecules. Asian Federation for Medicinal Chemistry (AFMC) 12th International Symposium (AIMECS 2019) (2019/9, Istanbul, Turkey)
- 17. 永田麻未, 佐粧彩海, 鈴木理子, 鈴木映里, 下田裕太, 藤川雄太, 伊東史子, 井上英史: 脱ユビキチン化酵素 UCH-L1 は 低酸素条件下で TGF- βングナルを増強する. 第 92 回日本生化学会大会 (2019/9, 横浜市)
- 18. **伊東史子**, 伊東 進: ミオスタチン前駆体由来のミオスタチン阻害最小ペプチドはがん悪液質を改善する. 第 78 回日本癌学会学術総会 (2019/9, 京都市)
- 19. 永田麻未, 佐粧彩海, 鈴木理子, 鈴木映里, 下田裕太, 藤川雄太, 伊東史子, 井上英史: 脱ユビキチン化酵素 UCH-L1 の DUB 活性は TGF- βングナルを増強し、肺がん形成に関与する. 第 78 回日本癌学会学術総会 (2019/9, 京都市)
- 20. 澤田直志,遠藤京弥,田口晃弘,高山健太郎,谷口敦彦, 林 良雄: リードスルー活性向上をめざしたネガマイシン誘導体 3 位アミノ基部の構造活性相関研究.第 51 回若手ペプチド夏の勉強会 (2019/8,北海道)
- 21. 高山健太郎: 中分子創薬における生体由来ペプチド誘導体の創製~ニューロメジンU 受容体選択 的アゴニストとマイオスタチン阻害剤~. 第1回低・中分子創薬研究会 (2019/8, 東京)
- 22. \* 韮沢 慧, 楢木侑子, 濵田圭佑, 冨岡花奈, 片桐文彦, 髙橋葉子, 吉川大和, 野水基義, 根岸洋一: 筋疾患遺伝子治療に向けた新規多機能性ペプチド・遺伝子ナノ粒子の開発. 第 44 回製剤・創剤セミナー(2019/8, 神奈川) \* Best Poster Presentation Award
- 23. \* 佐々木愛理, 林 由浩, 木村優花, 韮沢 慧, 濱野展人, 片桐文彦, 坂井崇亮, 吉田彰宏, 平島真一, 三浦剛, 髙橋葉子, 吉川大和, 野水基義, 根岸洋一: 筋組織へのターゲティング能を有する全身投与型ナノDDSの開発. 日本筋学会第 5 回学術集会 (2019/8, 東京) \* Student's Award 優秀賞
- 24. \* 韮沢 慧, 楢木侑子, 濵田圭佑, 片桐文彦, 髙橋葉子, 吉川大和, 野水基義, 根岸洋一: エンド ソーム脱出能を付与した筋指向性 polyplex による遺伝子デリバリーシステムの開発. 日本筋学会 第5回学術集会(2019/8, 東京)
- 25. Yamaguchi Y, Otani Y, Takehara M, Nakajima T, Narazaki T, Cui J, H. <u>Baba H</u>: Excessive Production of L-MPZ, a Translational Readthrough Isoform of Myelin Protein Zero (P0, MPZ), Causes Charcot–Marie–Tooth Disease (CMT)-like Phenotype. 14th Biennial ISN Satellite Meeting on Myelin Biology (2019/8, Saint-Paulin, Canada)
- 26. Yamaguchi Y, Otani Y, Takehara M, Nakajima T, Narazaki T, Cui J, <u>Baba H</u>: Abnormalities of PeripheralMmyelin Development in Charcot-Marie-Tooth (CMT) Disease model, L-MPZ mouse. 2019 ISN-ASN Meeting (2019/8, Montreal, Canada)
- 27. Setoguchi Y, Hayashi A, Suzuki N, Kaneko S, Tanaka H, Yanaoka D, <u>Baba H</u>: Novel Process of Myelin Debris Clearance by Glovenin Treatment in the Lysolecithin Demyelination of Mmouse Sciatic Nerve. 2019 ISN-ASN Meeting (2019/8, Montreal, Canada)
- 28. Otani Y, Ohno N, Yamaguchi Y, Cui J, Baba H: Increased Ratio of Large Myelin Protein Zero

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

- (L-MPZ) in Myelin Leads to Charcot-Marie-Tooth Disease-like Neuropathy. 2019 ISN-ASN Meeting (2019/8, Montreal, Canada)
- 29. **林 良雄**: 筋肉疾患および遺伝性疾患に対する治療薬創製研究. 第1回ファーマラボ EXPO アカデミックフォーラム (2019/7, 東京)
- 30. \* 佐々木愛理, 林 由浩, 木村優花, 韮沢 慧, 濱野展人, 片桐文彦, 髙橋葉子, 吉川大和, <u>野水</u> <u>基義</u>, <u>根岸洋一</u>: A2G80 リポソームの全身循環を介した筋組織への移行性評価. 日本 DDS 学会 第 35 年会 (2019/7, 神奈川)
- 31. \* 韮沢 慧, 楢木侑子, 濵田圭佑, 片桐文彦, 髙橋葉子, 吉川大和, 野水基義, 根岸洋一: エンド ソーム脱出能を付与した筋指向性遺伝子デリバリーシステムの開発. 日本 DDS 学会第 35 年会 (2019/7, 横浜)
- 32. 大谷嘉典、大野伸彦、山口宜秀、崔 晶晶、<u>馬場広子</u>: 翻訳リードスルーにより制御されるミエリンの形成と機能. NEURO 2019 (第 42 回日本神経科学大会/第 62 回日本神経化学会大会合同大会 (2019/7, 新潟市)
- 33. 林 明子、瀬戸口 潔、金子真之亮、鈴木尚穂、田中大夢、柳岡大悟、<u>馬場広子</u>:グロベニンはミエリン崩壊物への直接結合によりマウス末梢神経リゾレシチン誘導脱髄を修飾する. NEURO 2019 (第 42 回日本神経科学大会/第 62 回日本神経化学会大会合同大会 (2019/7, 新潟市)
- 34. 山口宜秀, 大谷嘉典, 竹原雅之, 中島鉄博, 楢崎琢朗, 崔 晶晶, <u>馬場広子</u>: シャルコー・マリー・トゥース病モデル L-MPZ マウスにおけるミエリン形成過程の解析. NEURO 2019 (第 42 回日本神経科学大会/第 62 回日本神経化学会大会合同大会 (2019/7, 新潟市)
- 35. <u>Itoh F</u>, Nagata A, Furuta C, Hinata H, Sasho A, Itoh S, Inoue H: Hypoxia potentiates TGF-β signaling by induction of deubiquitinase UCH-L1. FASEB Science Research Conferences; TGF-β superfamily conference (2019/7, Florida, USA)
- 36. \* 濵田圭佑, 張 光端, 山田雄二, 吉川大和, 野水基義: ラミニンα2 鎖 LG4-5 モジュールに着目したα-ジストログリカン結合ペプチドの探索. 第 22 回生命化学研究会 (2019/6, 北海道)
- 37. 日向宏輝、尾嶋千遥、渡部琢也、高山健太郎、林良雄、伊東史子. ミオスタチン阻害ペプチ ドの利用と走行運動による筋萎縮阻害. 第 22 回生命化学研究会 (2019/6, 北海道)
- 38. \* 野水基義, 山田雄二, 濱田圭佑, Anh Tan Truong: 人工基底膜を創る. 生命化学研究会ポストコンファレンス (2019/6, 北海道)
- 39. 日向宏輝、伊東史子: ミオスタチン阻害ペプチドによるがん悪液質改善効果. 生命化学研究会ポストコンファレンス (2019/6, 北海道)
- 40. \*林 由浩, 佐々木愛理, 木村優花, 韮沢 慧, 濱野展人, 片桐文彦, 坂井崇亮, 吉田彰宏, 平島真一, 三浦剛, 髙橋葉子, 吉川大和, 野水基義, 根岸洋一: A2G80 ペプチド修飾リポソームの全身投与による筋組織移行性評価. 日本薬剤学会第34年会(2019/5, 富山)
- 41. \* 楢木侑子, 韮沢 慧, 濵田圭佑, 片桐文彦, 髙橋葉子, 吉川大和, 野水基義, 根岸洋一: エンド ソーム脱出能を付与した筋細胞指向性 polyplex による遺伝子デリバリーシステムの開発. 日本薬 剤学会第34回年会(2019/5, 富山)
- 42. \* 吉川大和, 菅原由美香, 濱田圭佑, 山田雄二, 熊井 準, 金川 基, 小林千浩、戸田達史, <u>根岸</u> <u>洋一</u>, 片桐文彦, 保住健太郎, <u>野水基義</u>: ラミニン-511E8 領域由来のジストログリカン (DG) 結合 ペプチドに対するヒト iPS 細胞の接着. 第 51 回日本結合組織学会学術大会 (2019/5, 東京都)
- \* Sasaki E, Hayashi Y, Hamano N, Nirasawa K, Endo-Takahashi Y, Kikkawa Y, Nomizu N, Negishi Y: Development of laminin-a2 chain-derived peptide-modified lipid nanoparticles for muscle targeting delivery system. 19th Symposium for Gene Design and Delivery. (2019/5 Chiba, Japan)
- 44. \* Sasaki E, Hayashi Y, Kimura Y, Hamano N, Nirasawa K, Sakai T, Miura T, Endo-Takahashi Y,

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

- Kikkawa Y, <u>Nomizu M</u>, <u>Negishi Y</u>: Development of muscle targeting liposomes for systemic administration delivery system. The 3rd Workshop for Japan-Korea Young Scientists on Pharmaceutics (2019/5 Chiba, Japan) \* *Best Poster Award*
- \*Nirasawa K, Naraki Y, Hamada K, Katagiri F, Endo-Takahashi Y, Kikkawa Y, Nomizu M, Negishi Y: Development of gene delivery system by enhancing endosomal escape of muscle targeting polyplex. The 3rd Workshop for Japan-Korea Young Scientists on Pharmaceutics (2019/6, Chiba, Japan)
- 46. Rentier C, Takayama K, Saitoh M, Nakamura A, Ikeyama H, Taguchi A, Taniguchi A, Hayashi Y: Design and synthesis of myostatin inhibitory cyclic 22-mer peptides. 11th Joint Meeting on Medicinal Chemistry 2019 (2019/6, Prague, Czech Republic)
- 47. Omura N, Hamada K, Taguchi A, Arai M, Shimano K, Takayama K, Taniguchi A, <u>Hayashi Y</u>: SAR study of negamycin derivative focused on the 3-amino position for potent readthrough activity. 26th American Peptide Symposium and 11th International Peptide Symposium (2019/6, Monterey, USA)
- 48. \* 林 由浩, 佐々木愛理, 木村優花, 韮沢 慧, 濱野展人, 片桐文彦, 坂井崇亮, 吉田彰宏, 平島真一, 三浦剛, 髙橋葉子, 吉川大和, 野水基義, 根岸洋一: A2G80ペプチド修飾リポソームの全身投与による筋組織移行性の評価. 日本薬学会第 139 年会 (2019/3, 千葉) \* 学生優秀発表賞(ポスター発表)
- 49. 大村紀子, 濵田圭佑, 田口晃弘, 新井実咲, 高山健太郎, 谷口敦彦, 林 良雄: リードスルー作用に着目したネガマイシン3位アミノ基部の誘導と生物活性評価. 日本薬学会第 139 年会 (2019/3,千葉)
- \* Takayama K: Medicinal chemistry based on mid-sized peptides derived from biomolecules. 10th International Peptide Symposium/55th Japanese Peptide Symposium, Award Lecture for Young Investigator (2018/12, Kyoto, Japan) \* Young Investigator Award
- 51. 高山健太郎, 淺利知, 齋藤まりこ, 六本木佳美, 中村明里, 嶋田嵩大, 池山弘晃, 田口晃弘, 谷口敦彦, 根岸洋一, 林良雄: 網羅的構造活性相関研究によるマウス由来マイオスタチン阻害ペプチドの高活性化. 第36回メディシナルケミストリーシンポジウム (2018/11, 京都市)
- 52. 大村紀子, 濵田圭佑, 田口晃弘, 新井実咲, 高山健太郎, 谷口敦彦, <u>林 良雄</u>: リードスルー活性 向上をめざしたネガマイシン誘導体 3 位アミノ基部の構造活性相関研究. 第 36 回メディシナルケミストリーシンポジウム (2018/11, 京都市)
- 53. Takayama K, Asari T, Saitoh M, Roppongi Y, Nakamura, A. Shimada T, Taguchi A, Taniguchi A, Negishi Y, Hayashi Y: Structural requirements of mouse myostatin prodomain-derived small peptide for effective myostatin inhibition 8th Peptide Engineering Meeting (2018/11, Berlin, Germany)
- 54. Nagata A, Sasyo A, Suzuki R, Suzuki E, Simoda Y, Fujikawa Y, Watanabe T, <u>Itoh F</u>, Inoue H: Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-L1 positively regulates TGF-β/BMP signaling. 12th International BMP conference (2018/10, Tokyo)
- 55. \* 高山健太郎: 生体由来ペプチドを基盤とした中分子ペプチドの創薬科学基盤研究. 第 62 回日本薬学会関東支部大会 平成 30 年度 日本薬学会 関東支部奨励賞受賞講演(2018/9, 東京) \* 日本薬学会 関東支部奨励賞
- 56. \* 大村紀子, 濵田圭佑, 田口晃弘, 新井実咲, 高山健太郎, 谷口敦彦, 林 良雄: ネガマイシン 3 位アミノ基部に着目した誘導体合成とそのリードスルー活性評価. 第62回日本薬学会関東支部大会(2018/9, 東京)
- 57. \* 木村優花, 佐々木愛理, 林 由浩, 韮沢 慧, 片桐文彦, 濱野展人, 坂井崇亮, 吉田彰宏, 平島 真一, 三浦 剛, 髙橋葉子, 吉川大和, 野水基義, 根岸洋一: 筋細胞を標的としたペプチド修飾リ

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

- ポソームの調製と有用性評価. 第62回日本薬学会関東支部大会(2018/9, 東京)
- 58. \*望月直美, 韮沢 慧, 片桐文彦, 楢木侑子, 濱田圭佑, 髙橋葉子, 濱野展人, 吉川大和, 宮武正太, 青木吉嗣, 武田伸一, 野水基義, 根岸洋一: 筋選択的遺伝子デリバリーを指向したラミニン の 鎖由来ペプチド修飾 polyplex の有用性評価. 第62回日本薬学会関東支部大会(2018/9, 東京)
- 59. 永田麻未, 佐粧彩海, 鈴木理子, 鈴木映里, 下田裕太, 藤川雄太, 渡部琢也, <u>伊東史子</u>, 井上英史. ユビキチン C 末端加水分解酵素 UCH-L1 は Smad2 を介して TGF- βングナルを正に制御する. 第 91 回日本生化学会大会(2018/9, 京都市)
- 60. 高山健太郎, 淺利知, 齋藤まりこ, 六本木佳美, 中村明里, 佐賀裕介, 嶋田嵩大, 池山弘晃, 田口晃弘, 谷口敦彦, <u>根岸洋一</u>, <u>林良雄</u>: マイオスタチン阻害ペプチドの小型化と構造活性相関研究. 日本筋学会第4回学術集会(2018/8, 岡山)
- 61. Takayama K, Asari T, Saitoh M, Roppongi Y, Nakamura A, Taguchi A, Taniguchi A, <u>Hayashi Y</u>: Structural requirements for the effective myostatin inhibition of myostatin prodomain–derived peptide derivatives. 256th American Chemical Society National Meeting & Exposition (2018/8, Boston, USA)
- \* Nirasawa K, Katagiri F, Sasaki E, Hamano N, Naraki Y, Endo-Takahashi Y, Kikkawa Y, Miyatake S, Aoki Y, Takeda S, Nomizu M, Negishi Y: Development of laminin-α2 chain-derived peptide-gene nanoparticles for target delivery to muscle derived cells. 11th Japanese-French Workshop "New insights in personalized medicine for neuromuscular diseases: from basic to applied myology" (2018/6, Tokyo)
- \* Sasaki E, Nobuhito H, Hayashi Y, Nirasawa K, Katagiri F, Sakai T, Yoshida A, Hirashima S, <u>Miura T</u>, Endo-Takahashi Y, Kikkawa Y, <u>Nomizu M</u>, <u>Negishi Y</u>: Evaluation of targeting ability to muscle cell of dual peptide-modified liposomes using microfluidics techniques. 18th Symposium for Gene Design and Delivery. (2018/7 Fukuoka, Japan)
- \* Nirasawa K, Katagiri F, Sasaki E, Hamano N, Naraki Y, Endo-Takahashi Y, Kikkawa Y, Miyatake S, Aoki Y, Takeda S, Nomizu M, Negishi Y: Evaluation of gene transfection efficiency to muscle cell of laminin-α2 chain-derived peptide-gene polyplex. 18th Symposium for Gene Design and Delivery (2018/7, Fukuoka, Japan)
- 65. \* 非沢慧, 片桐文彦, 佐々木愛理, 楢木侑子, 髙橋葉子, 吉川大和, 宮武正太, 青木吉嗣, 武田伸一, 野水基義, 根岸洋一: ラミニン ② 鎖由来ペプチド修飾ポリプレックスによる筋指向性遺伝子デリバリーシステムの開発. 日本核酸医薬学会第 4 回年会(2018/7, 福岡)
- \* Sasaki E, Nobuhito H, Hayashi Y, Nirasawa K, Katagiri F, Sakai T, Yoshida A, Hirashima S, Miura T, Endo-Takahashi Y, Kikkawa Y, Nomizu M, Negishi Y: Development of laminin-α2 chain-derived peptide-modified lipid nanoparticles for target delivery to muscle derived cells. 11th Japanese-French Workshop "New insights in personalized medicine for neuromuscular diseases: from basic to applied myology". (2018/6, Tokyo)
- 67. Takayama K, Asari T, Saitoh M, Roppongi Y, Nakamura A, Taguchi A, Taniguchi A, Negishi Y, Havashi Y: Structural derivatization for the effective myostatin inhibition of myostatin prodomain–derived peptide derivatives. 11th Japanese-French Workshop "New insights in personalized medicine for neuromuscular diseases: From Basic to Applied Myology" (2018/6, Tokyo)
- 68. \* 佐々木愛理, 林 由浩, 韮沢 慧, 片桐文彦, 濱野展人, 坂井崇亮, 吉田彰宏, 平島真一, 三浦剛, 髙橋葉子, 吉川大和, 野水基義, 根岸洋一: 筋細胞選択的 DDS を指向としたペプチド修飾リポソームの調製と細胞相互作用性の検討. 日本薬剤学会第33年会(2018/5, 静岡)

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

- 69. \* 非沢慧, 片桐文彦, 佐々木愛理, 楢木侑子, 髙橋葉子, 吉川大和, 野水基義, 根岸洋一: ラミニン ② 鎖由来ペプチド修飾 polyplex を用いた筋組織指向性遺伝子デリバ リーシステムの開発. 日本薬剤学会第33年会(2018/5, 静岡)
- 70. \* 濵田圭佑, 田口晃弘, 塩塚政孝, 小林美咲, 村上沙織, 新井実咲, 大村紀子, 高山健太郎, 谷口敦彦, 臼井健郎, <u>松田良一</u>, <u>林 良雄</u>: leucyl-3-epi-deoxynegamycin を基盤とした新規リードスルー誘導体の探索. 日本薬学会 第 138 年会 (2018/3, 石川県)
- 71. \* 齋藤まりこ, 高山健太郎, Cedric Rentier, 中村明里, 嶋田嵩大, 六本木佳美, 田口晃弘, 谷口敦彦, 根岸洋一, 林良雄: 小型化マイオスタチン阻害ペプチドの発見と高活性化. 日本薬学会第 138 年会 (2018/3, 石川県) \* 学生優秀賞
- 72. 髙橋葉子, 金丸理恵, 片桐文彦, 佐藤加奈子, 大谷嘉典, 鈴木 亮, 丸山一雄, 野水基義, <u>馬場広子, 根岸洋一</u>: 神経細胞選択的ポリプレックス搭載型バブルリポソームによる脳への siRNA デリバリーシステムの構築. 日本薬学会 第 138 年会 (2018/3, 石川県)
- 73. \* 片桐文彦, 深澤由佳, 熊井 準, 保住建太郎, 吉川大和, <u>野水基義</u>: α-ジストログリカン結合ペプチド A2G80 の構造活性相関研究. 日本薬学会 第 138 年会 (2018/3, 石川県)
- 74. 熊井 準, 片桐文彦, 保住建太郎, 吉川大和, <u>野水基義</u>: ラミニンペプチドを用いた新規ペプチド-アガロースマトリックスの開発. 日本薬学会 第 138 年会 (2018/3, 石川県)
- 75. 髙橋葉子, 金丸理恵, 片桐文彦, 佐藤加奈子, 大谷嘉典, 鈴木 亮, 丸山一雄, <u>野水基義, 馬場広子, 根岸洋一</u>: 神経細胞選択的ポリプレックス搭載型バブルリポソームによる脳への siRNA デリバリーシステムの構築. 日本薬学会 第 138 年会 (2018/3, 石川県)
- 76. \* 佐々木愛理, 林 由浩, 韮沢 慧, 片桐文彦, 吉田彰宏, 坂井崇亮, 平島真一, 三浦 剛, 吉川大和, 野水基義, 根岸洋一: ラミニン α2 鎖由来ペプチド修飾脂質ナノ粒子の調製と筋指向性評価. 日本薬学会 第 138 年会 (2018/3, 石川県) \* 学生優秀発表賞(ポスター発表)
- 77. 古屋貴人, 志村優太, 志村明日香, 岸本久直, 白坂善之, <u>井上勝央</u>: D-Luciferin の体内動態に 関与するトランスポーターの同定. 日本薬学会 第 138 年会 (2018/3, 石川県)
- 78. **林 良雄**: ホルモンから抗体薬物複合体までのペプチド中分子創薬の展開. 立命館大学総合科学 技術研究機構 創薬科学研究センター 創剤研究コンソーシアム 2017 年度第 2 回研究会 (2018/2, 滋賀県)
- 79. 林 良雄: ホルモンから抗体薬物複合までのペプチド中分子創展開. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業】生体分子コバレント修飾の革新的解析拠点形成 シンポジウム (2018/2, 東京)
- 80. \* Otani Y, Cui J, Yamaguchi Y, <u>Baba H</u>: Replacement of P0 with L-MPZ in myelin caused peripheral neuropathy-like symptoms. 3rd Young Glia Meeting (2018/1, Shizuoka, Japan)
- 81. <u>Nomizu M</u>: Laminin active peptides conjugated matrices as a biomaterial for tissue engineering. Translational Research on Metabolic and Inflammatory Diseases, and Cancer: Impact of Matrix Biology, 2018/1, Seoul, Korea)
- 82. \* Katagiri F, Fukasawa Y, Kumai J, Hozumi K, Kikkawa Y, <u>Nomizu M</u>: Structure-activity relationship study for α-dystroglycan binding peptide A2G80 derived from mouse laminin α2 chain sequence. ASCB/EMBO 2017 meeting (2017/12, Phiradelphia, USA)
- \*Rentier C, Takayama K, Nakamura A, Saitoh M, Sashida S, <u>Negishi Y</u>, <u>Hayashi Y</u>: Design and synthesis of potent myostatin inhibitory peptides. 第 54 回ペプチド討論会 (2017/11, 大阪府)
- 84. Yang X, Sugawara Y, Harashima N, Fujii S, Ikari K, Katagiri F, Hozumi K, Kikkawa Y, Nomizu M: Identification of laminin α5 short arm peptides active for endothelial cell attachment and tube formation. 第 54 回日本ペプチド討論会 (2017/11, 大阪府)
- 85. \* Katagiri F, Fukasawa Y, Kumai J, Hozumi K, Kikkawa Y, and Nomizu M: Structure-activity

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

- relationship study For α-dystroglycan binding peptide A2G80 derived from mouse laminin α2 chain sequence. 第 54 回日本ペプチド討論会 (2017/11, 大阪府)
- 86. \* Zhang G, Kumai J, Ikari K, Xiao Y, Sugawara Y, Katagiri F, Hozumi K, Kikkawa Y, Nomizu M: Dentification of α-dystroglycan binding sequence in the laminin α2 chain LG4-5 module using peptide-chitosan matirx ELIZA method. 第 54 回日本ペプチド討論会 (2017/11, 大阪府)
- 87. <u>Inoue K</u>, Yuasa H: Impact of interplay between facilitated diffusion and metabolism on intracellular accumulation of purine nucleobases and their analogues. 日本薬物動態学会 第 32 回年会 (2017/11, 東京)
- 88. Hozumi K, Kumai J, Katagiri F, Kikkawa Y, <u>Nomizu M</u>: Development of laminin active peptide-polysaccharide matrices as cell adhesive biomaterials. The 16th International Symposium on Advanced Technology. (2017/11, Tokyo, Japan)
- 89. 高山健太郎: 生体由来ペプチドを基盤とした中分子ペプチド創薬. BioJapan 2017 (2017/10, 横浜市)
- 90. 馬場広子: ミエリンバイオロジーの進歩. 第18回日本脳神経核医学研究会 (2017/10, 横浜市)
- 91. 黒川 亮, 金丸理恵, 片桐文彦, 佐藤加奈子, 大谷嘉典, 髙橋葉子, 鈴木 亮, 丸山一雄, <u>野水基養</u>, <u>馬場広子</u>, <u>根岸洋一</u>: ポリプレックス搭載型バブルリポソームによる脳内 siRNA デリバリーシステムの構築. 遺伝子・デリバリー研究会 第 17 回夏期セミナー (2017/10, 横浜)
- 92. 黒川 亮, 金丸理恵, 片桐文彦, 佐藤加奈子, 大谷嘉典, 髙橋葉子, 鈴木 亮, 丸山一雄, 野水基養, <u>馬場広子</u>, 根岸洋一: 神経細胞選択的ポリプレックス搭載型バブルリポソームによる超音波 応答性 siRNA デリバリーシステムの開発. 第61回 日本薬学会 関東支部会 (2017/9, 東京)
- 93. \* 韮沢 慧, 片桐文彦, 佐々木愛理, 楢木侑子, 三橋祐介, 吉川大和, 野水基義, 根岸洋一: ジストログリカン親和性ペプチドを利用した polyplex による筋細胞選択的遺伝子デリバリーシステム開発. 第61回日本薬学会 関東支部大会 (2017/9, 東京)
- 94. \* 佐々木愛理, 林 由浩, 片桐文彦, 吉田彰宏, 坂井崇亮, 平島真一, 三浦 剛, 吉川大和, 野水 基義, 根岸洋一: ラミニン α2 鎖由来ペプチドを用いた筋選択的リポソームの開発. 第 61 回日本薬 学会 関東支部大会(2017/9, 東京) \* 優秀発表賞(ポスター発表の部)
- 95. \*山口宜秀, 内藤 優, 内野由紀子, 茂木真衣, <u>馬場広子</u>: Phylogenetically conserved sequence around PNS myelin P0 stop codon is essential for the synthesis of the readthrough isoform L-MPZ. 第 60 回日本神経化学会大会 (2017/9, 仙台市)
- 96. \* 大谷嘉典, 山口宜秀, 田口晃弘, 濱田圭佑, <u>林 良雄</u>, <u>馬場広子</u>: Evaluation of novel readthrough agents by using myelin P0-translatinal system in vivo. 第 60 回日本神経化学会大会 (2017/9, 仙台市)
- 97. 保住建太郎, 山田隼人, 片桐文彦, 吉川大和, 野水基義: ラミニン由来活性ペプチド-キトサンゲル を用いた唾液腺細胞分化促進活性の評価. 第 66 回高分子討論会 (2017/9, 愛媛県)
- 98. \* 韮沢 慧, 片桐文彦, 佐々木愛理, 吉川大和, 野水基義, 根岸洋一: ラミニン α2 鎖由来ペプチド を利用した筋細胞選択的遺伝子デリバリーシステムの開発. 遺伝子・デリバリー研究会 第 17 回 夏期セミナー (2017/9, 静岡県)
- 99. \* 佐々木愛理, 林 由浩, 片桐文彦, 吉田彰宏, 坂井崇亮, 平島真一, 三浦 剛, 吉川大和, 野水 基義, 根岸洋一: ラミニン α2 鎖由来ペプチド修飾リポソームの筋組織指向性評価. 遺伝子・デリバ リー研究会 第 17 回夏期セミナー (2017/9, 静岡県)
- 100. \* Otani Y, Yamaguchi Y, Taguchi A, Hamada K, <u>Hayashi Y</u>, <u>Baba H</u>: Influence of negamycin-derived stop codon readthrough agents on physiological readthrough events in vivo. XXIII World Congress of Neurology (2017/9, Kyoto, Japan)

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

- 101. 高山健太郎, Cedric Rentier, 淺利知, 中村明里, 佐賀裕介, 嶋田嵩大, 齋藤まりこ, 六本木佳美, 田口晃弘, 谷口敦彦, 根岸洋一, 林良雄: マイオスタチン阻害ペプチドの活性強化を目指した構造活性相関研究. 日本筋学会第3回学術集会(2017/8, 東京)
- 102. Hayashi A, Nishibe Y, Yamada T, Yanaoka D, Takimoto H, **Baba H**: The anti-large myelin protein zero (L-MPZ) antibody in serum modifies the peripheral nerve demyelination in Lewis rat. ISN-ESN 2017 Meeting (2017/8, Paris, France)
- 103. \* Otani Y, Yamaguchi Y, Taguchi A, Hamada K, <u>Hayashi Y</u>, <u>Baba H</u>: Effect of novel readthrough agents on myelin P0 translation in vivo. ISN-ESN 2017 Meeting (2017/8, Paris, France)
- 104. Hozumi K, Yamada H, Katagiri F, Kikkawa Y, <u>Nomizu M</u>: Development of laminin active-peptide conjugated chitosan hydrogel crosslinked by dicarboxylic acids on Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase. ACS 254th National Meeting. (2017/8, Washington DC, USA)
- 105. 大谷嘉典, 山口宜秀, <u>馬場広子</u>: Negamycin 系新規終止コドンリードスルー薬の末梢神経に対する影響の解析. 第3回日本ミエリン研究会 (2017/7, 東京)
- 106. Kikkawa Y, Sugawara Y, Harashima N, Ikari K, Katagiri F, Hozumi K, <u>Nomizu M</u>.: The role of Lu/B-CAM spectrin binding motif in cell migration on LM-511. Basement membrane workshop. (2017/7, Nashvile, USA)
- 107. 滝澤菜緒, 佐藤加奈子, 大谷嘉典, 髙橋葉子, 鈴木 亮, 丸山一雄, <u>馬場広子</u>, 新槇幸彦, <u>根岸洋</u> 一: 神経細胞選択的ポリプレックスを搭載したバブルリポソームの開発. 第33回日本 DDS 学会学 術集会 (2017/7, 京都市)
- 108. 道鎮えりか, 韮沢 慧, 佐々木愛理, 佐久間哲史, 鈴木 亮, 丸山一雄, 髙橋葉子, 新槇幸彦, 山本 卓, 根岸洋一: デュシェンヌ型筋ジストロフィー疾患治療に向けた超音波応答性ナノバブルによるゲノム編集用遺伝子デリバリー. 第33回日本 DDS 学会学術集会 (2017/7, 京都市)
- 109. 六本木佳美, 高山健太郎, Cedric Rentier, 中村明里, 佐賀裕介, 嶋田嵩大, 齋藤まりこ, 田口晃弘, 谷口敦彦, 根岸洋一, 林良雄: マイオスタチン阻害ペプチドの活性強化を指向した構造活性相関研究. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 12 回年会 (2017/6, 札幌市)
- 110. \* 渡橋弘貴, 尾島千遥, 渡部琢也, 林 良雄, 伊東史子: ミオスタチン阻害ペプチドを利用した筋萎縮改善効果. 平成 29 年度 日本生化学会 関東支部例会 (2017/6, 東京)
- 111. <u>Hayashi Y</u>: Medicinal chemistry of mid-sized molecules on biologically active peptides. KCS Biological Chemistry Division Summer Workshop (2017/6, Jeju, Korea)
- 112. Kobayashi M, Hamada K, Taguchi A, Arai M, Omura N, Takayama K, Taniguchi A, <u>Hayashi Y</u>: Structure-activity relationship study of (+)- negamycin analogues at C3-position for promoting readthrough activity. 21th KPPS Symposium (2017/6, Jeju, Korea)
- 113. Rentier C, Saitoh M, Nakamura A, Shimada T, Sashida S, Takayama K, <u>Negishi Y</u>, <u>Hayashi Y</u>:
  Mouse myostatin prodomain-derived inhibitory peptides for treatment of muscle atrophic disorders.
  25th American Peptide Symposium (2017/6, Whistler, Canada)
- 114. **林 良雄**: ペプチドを基盤とした中分子創薬. 有機合成化学協会 関東支部ミニシンポジウム湘南 2017 (2017/6, 神奈川県)
- 115. 滝澤菜緒, 佐藤加奈子, 大谷嘉典, 髙橋葉子, 鈴木 亮, 丸山一雄, <u>馬場広子</u>, 新槇幸彦, <u>根岸洋</u> 一: 中枢神経系組織への遺伝子導入を指向した Polyplex 搭載型バブルリポソームの開発. 日本 薬剤学会 第 32 年会 (2017/5, さいたま市)
- 116. 道鎮えりか, 韮沢 慧, 佐々木愛理, 佐久間哲史, 鈴木 亮, 丸山一雄, 髙橋葉子, 新槇幸彦, 山本 卓, <u>根岸洋一</u>: 超音波応答性ナノバブルを用いたゲノム編集 DNA の筋組織内デリバリー. 日本薬剤学会 第 32 年会 (2017/5, さいたま市)

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

- 117. 古屋貴人, 竹原一成, 志村明日香, 岸本久直, 湯浅博昭, 白坂善之, <u>井上勝央</u>: D-Luciferin トランスポーターを利用した in vivo 化学発光イメージング. 日本薬剤学会第 32 年会. 日本薬剤学会第 32 年会 (2017/5, さいたま市)
- 118. \* 韮沢 慧, 片桐文彦, 佐々木愛理, 新槇幸彦, 吉川大和, 野水基義, 根岸洋一: ラミニン α2 鎖由 来ペプチドを利用した polyplex による筋細胞選択的遺伝子デリバリーシステムの開発. 遺伝子・デリバリー研究会 第 17 回シンポジウム (2017/5, 大阪市)
- 119. 阿久津裕士, 中島康介, 平島真一, 古石裕治, 三浦 剛: (有機分子触媒を用いた5-アルキルフルフラール誘導体の不斉 ε 位アルキル化反応. 日本薬学会第 137 年会 (2017/3, 仙台市)
- 120. 新井亮雅, 平島真一, 近藤純子, 中島康介, 古石裕治, 三浦 剛: ケトン類に対する有機分子触媒的不斉ヒドロホスホニル化反応. 日本薬学会第 137 年会 (2017/3, 仙台市)
- 121. 野田優太, 中島康介, 平島真一, 古石裕治, <u>三浦 剛</u>: 有機分子触媒を用いた α-シアノケトンのエノンへの不斉共役付加反応の開発. 日本薬学会第 137 年会 (2017/3, 仙台市)
- 122. 坂井崇亮, 平島真一, 前田知恵, 中島康介, 吉田彰宏, 古石裕治, 三浦 剛: ジアミノメチレンマロノニトリル型有機分子触媒を用いる不斉クロロ化反応の開発. 日本薬学会第 137 年会 (2017/3, 仙台市)
- 123. 古屋貴人, 竹原一成, 志村明日香, 岸本久直, 湯浅博昭, 白坂善之, <u>井上勝央</u>: D-Luciferin を基質とするトランスポーターの探索及び bioluminescence イメージングへの応用. 日本薬学会第 137年会 (2017/3, 仙台市)
- \*Otani Y, Yamaguchi Y, Taguchi A, Hamada K, <u>Hayashi Y</u>, <u>Baba H</u>: Enhancement of myelin P0 isoform (L-MPZ) production by negamycin-derived stop codon readthrough agents. The 48th Annual Meeting of the American Society for Neurochemistry (2017/3, Little Rock, USA)
- 125. Negishi Y, Sashida S, Katagiri F, Dochin E, Nirasawa K, Sasaki E, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, Aramaki Y: Nucleic acids delivery into the respiratory muscles of dystrophic mdx by ultrasound-responsive Bubble liposomes. International Symposium on Drug Delivery and Pharmaceutical Sciences: Beyond the History (ISDDPS) (2017/3, Kyoto, Japan)
- 126. Kumai J, Nakamura K, Fujimori C, Katagiri F, Hozumi K, Kikkawa Y, <u>Nomizu M</u>: Prepration of novel biomaterial using polyion complex matrix. The 2017 Japan-NIH Joint Symposium on Advances in Biomedical Research and Disease (2017/2, 仙台市)
- 127. \* 尾嶋千遥, 野口百合, 高山健太郎, 稲川俊彦, 渡部琢也, <u>林 良雄</u>, <u>伊東史子</u>: ミオスタチン阻 害ペプチドを利用したがん悪液質改善効果. 第 39 回 日本分子生物学会年会 (2016/12, 神奈川県)
- 128. Hamada K, Taguchi A, Kobayashi M, Takayama K, Usui T, <u>Hayashi Y</u>: Construction of the multidrug-sensitive yeast strain for elucidating the mechanism of the readthrough activity of (+)-negamycin and its analogues. 2016 ASCB Annual Meeting (2016/12, San Francisco, USA)
- 129. Takayama K, Asari T, Nakamura A, Saga Y, Shimada T, Taguchi A, <u>Negishi Y</u>, <u>Hayashi Y</u>: Structural basis for the effective myostatin inhibitory activity of the minimum peptide originated from mouse myostatin prodomain. 2016 ASCB Annual Meeting (2016/12, San Francisco, USA)
- 130. 高山健太郎, 淺利 知, 中村明里, 佐賀裕介, 嶋田嵩大, 田口晃弘, 林 良雄: マウス由来最小マイオスタチン阻害ペプチドを基盤とする網羅的構造活性相関研究. 第 34 回メディシナルケミストリーシンポジウム (2016/11, つくば市)
- 131. <u>根岸洋一</u>, 指田紗菜恵, 片桐文彦, 道鎮えりか, 韮沢 慧, 佐々木愛理, 髙橋葉子, 鈴木 亮, 丸山一雄, <u>野水基義</u>, 新槇幸彦: 超音波応答性ナノバブルによる筋ジストロフィーモデルマウス呼吸器筋への核酸医薬デリバリー. 日本核酸医薬学会 第2回年会 (2016/11, 東京)

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

- 132. 河田雅宏, 中島康介, 平島真一, 坂上 徹, 鈴木智博, 野田優太, 吉田彰宏, 古石裕治, 三浦 剛: チオウレア-スルホンアミド型有機分子触媒を用いた不斉反応. 第 42 回反応と合成の進歩シンポ ジウム (2016/11, 静岡市)
- 133. Kikkawa Y, Harashima N, Ikari K, Fujii S, Katagiri F, Hozumi K, Nomizu M: Down-regulation of cell adhesion via rho-associated protein kinase (ROCK) pathway promotes tumor cell migration on laminin-511. American Society for Matrix Biology Biennial Meeting. (2016/11, St. Petersburg, USA)
- 134. 阿久津裕士, 中島康介, 平島真一, 吉田彰宏, 古石裕治, 三浦 剛: 新規フルオラス有機分子触媒を用いた不斉 Michael 付加反応. フルオラス科学研究会第9回シンポジウム (2016/10, 名古屋市)
- 135. Rentier C, Nakamura A, Takayama K, Saga Y, Shimada T, Sashida S, Taguchi A, Negishi Y, Hayashi Y: Optimization of myostatin inhibiting peptides incorporating multiple modifications for the improvement of inhibitory activity. 第 53 回ペプチド討論会 (2016/10, 京都市)
- 136. Kumai J, Nakagawa A, Lin Y, Katagiri F, Hozumi K, Kikkawa Y, Nomizu M: Identification of integrin binding site in human laminin alpha5 G domain. 第 53 回ペプチド討論会 (2016/10, 京都市)
- 137. 古屋貴人, 竹原一成, 志村明日香, 岸本久直, 湯浅博昭, 白坂善之, <u>井上勝央</u>: トランスポーター を利用した bioluminescence イメージングの最適化. 第1回黒潮カンファレンス (2016/10, 千葉県)
- 138. 小林美咲, 濵田圭佑, 田口晃弘, 村上沙織, 新井実咲, 塩塚政孝, 高山健太郎, <u>松田良一, 林良雄</u>: 高活性リードスルー誘導体の獲得を目指したネガマイシン天然類縁体の構造活性相関研究. 第 60 回日本薬学会 関東支部大会 (2016/9, 東京)
- 139. 嶋田嵩大, 高山健太郎, 三野友作, 中村明里, 淺利 知, 佐賀裕介, 齊藤まりこ, 六本木佳美, 田口晃弘, 林良雄: マイオスタチン阻害ペプチドの二次構造に着目した構造活性相関研究. 第 60回日本薬学会 関東支部大会 (2016/9, 東京)
- 140. 道鎮えりか, <u>根岸洋一</u>, 指田紗菜恵, 高橋葉子, 鈴木 亮, 丸山一雄, 新槇幸彦: デュシェンヌ型 筋ジストロフィー横隔膜治療に向けた核酸搭載型バブルリポソームの開発とその有用性評価. 第60回日本薬学会 関東支部大会(2016/9, 東京)
- 141. 大谷嘉典, 山口宜秀, 田口晃弘, 濱田圭佑, 林良雄, 馬場広子: Analysis of stop codon readthrough activity of negamycin analogs to produce myelin P0 isoform (L-MPZ). 第 38 日本生物学的精神医学会, 第 59 回日本神経化学会大会 合同年会 (2016/9, 福岡市)
- 142. 林 明子, 山田貴史, 柳岡 大, 西部有香, 滝本博明, <u>馬場広子</u>: Effects of the anti-Large myelin protein zero antibody on the rat lysolecithin-induced peripheral nerve demyelination. 第 38 日本生物学的精神医学会, 第 59 回日本神経化学会大会 合同年会 (2016/9, 福岡市)
- 143. 山口宜秀, 矢野法子, 佐藤 咲, 田部井成也, 中西弘樹, <u>馬場広子</u>: Analysis of PKC-dependent phosphorylation and cell adhesion property of myelin P0 readthrough isoform (L-MPZ). 第 58 回日本神経化学会大会 (2015/9, さいたま市)
- 144. 保住建太郎, 榎本沙也香, 片桐文彦, 吉川大和, <u>野水基義</u>: ペプチド-キトサンマトリックスを用いたインテグリン-インテグリンクロストークの同定. 第 64 回高分子討論会. (2016/9, 横浜市)
- 145. 中村亨太郎, 熊井 準, 藤森 能, 片桐文彦, 保住建太郎, 吉川大和, **野水基義**: ペプチドーポリイ オンコンプレックスマトリックスを用いたバイオマテリアル. 第64回高分子討論会. (2016/9, 横浜市)
- 146. <u>根岸洋一</u>, 指田 紗菜恵, 道鎭えりか, 片桐文彦, 髙橋葉子, 鈴木 亮, <u>野水基義</u>, 丸山一雄, 新槇幸彦: 筋ジストロフィー疾患治療に向けた横隔膜への核酸デリバリーシステムの開発. 遺伝子デリバリー研究会 第 16 回夏期セミナー (2016/9, 長崎)
- 147. Takayama K, Asari T, Rentier C, Nakamura A, Saga Y, Shimada T, Taguchi A, Negishi Y, Hayashi Y:

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

Development of myostatin inhibiting peptides as an attractive therapeutic approach towards muscle atrophic disorders. The 34th European Peptide Symposium and the 8th International Peptide Symposium (2016/9, Leipzig, Germany)

- 148. 濵田圭佑, 田口晃弘, 村上沙織, 小林美咲, 高山健太郎, 林 良雄: ネガマイシン誘導体 C 末端部 の修飾による高活性リードスルー化合物の創製. 第2回日本筋学会学術集会 (2016/8, 東京)
- 149. 高山健太郎, 中村明里, Cedric Rentier, 佐賀裕介, 嶋田嵩大, 田口晃弘, <u>根岸洋一</u>, <u>林 良雄</u>: マウス由来最小マイオスタチン機能阻害ペプチドN末端部の構造活性相関. 第2回日本筋学会学術集会 (2016/8, 東京)
- 150. <u>根岸洋一</u>, 指田紗菜恵, 道鎮えりか, 片桐文彦, 韮沢 慧, 佐々木愛理, 髙橋葉子, 鈴木 亮, 丸山一雄, <u>野水基義</u>, 新槇幸彦: バブルリポソームと超音波照射併用による mdx マウス横隔膜への核酸デリバリーとその有用性評価. 第2回日本筋学会学術集会 (2016/8, 東京)
- 151. <u>Hayashi Y</u>: Medicinal chemistry of mid-sized peptide molecules toward the treatment of cancer, muscle disease and obesity. IUPAC-2015 (2015/8, Busan, South Korea)
- 152. Takayama K, Nakamura A, Mino Y, Asari T, Saga Y, Taguchi A, <u>Hayashi Y</u>: Discovery of mouse-derived human myostatin-inhibitory peptides and its N-terminal acylation. The XXIV EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC-ISMC 2016) (2016/8, Manchester, UK)
- 153. Yamaguchi Y, Yano N, Sato S, Tabei S, Nakanishi H, <u>Baba H</u>: Adhesion propertyes mediated by PKC-dependent phosphorylateion are different between myelin P0 and its readthrough isoform L-MPZ. The 25th ISN-APSN Joint Biennial Meeting in conjunction with the Australasian Society for Neuroscience (ANS) (2015/8, Cairns, Australia)
- 154. Hayashi A, Yamada T, Yanaoka D, Takimoto H, <u>Baba H</u>: Role of anti-large myelin protein zero (L-MPZ) antibody in the lysolecithin induced peripheral nerve demyelination. Satellite to the 25th ISN-APSN Joint Biennial Meeting, Myelin biology (2015/8, Cairns, Australia)
- 155. Yamaguchi Y, Yano N, Sato S, Tabei S, Nakanishi H, <u>Baba H</u>: Adhesion propertyes mediated by PKC-dependent phosphorylateion are different between myelin P0 and its readthrough isoform L-MPZ. Satellite to the 25th ISN-APSN Joint Biennial Meeting, Myelin biology (2015/8, Cairns, Australia)
- \* Hamada K, Taguchi A, Murakami S, Kobayashi M, Takayama K, <u>Hayashi Y</u>: Modification of carboxylic acid part in negamycin analogues and its effect on readthrough activity. The 14th Chinese International Peptide Symposium & the 5th Asia-pacific International Peptide Symposium (2016/7, Nanjing, China) \*Poster Award
- 157. Kumai J, Lin Y, Nakagawa A, Katagiri F, Hozumi K, Kikkawa Y, Nomizu M: Identification of biologically active sequences from human laminin alpha5 G chain domain. The 14th Chinese International Peptide Symposium & the 5th Asia-pacific International Peptide Symposium. (2016/7, Nanjing, China)
- 158. 小林美咲, 濵田圭佑, 田口晃弘, 村上沙織, 塩塚政孝, 高山健太郎, <u>松田良一</u>, <u>林 良雄</u>: Leucyl-3-epi-deoxynegamycin の 3 位アミノ基及びカルボン酸部位に着目した新規高活性リードスルー化合物の創製. 創薬懇話会 2016 in 蓼科 (2016/6, 長野県)
- 159. 中村明里, 高山健太郎, 佐賀裕介, 嶋田嵩大, 田口晃弘, 林良雄: マイオスタチン阻害ペプチドの N 末端 Trp 残基に着目した構造活性相関研究. 創薬懇話会 2016 in 蓼科 (2016/6, 長野県)
- 160. 河田雅宏, 中島康介, 平島真一, 小杉綾子, 加藤真奈, 吉田彰宏, 古石裕治, 三浦 剛: 有機分子触媒を用いたカルボニル化合物のマレイミドへの不斉共役付加反応. 創薬懇話会 2016 in 蓼科 (2016/6, 長野県)

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

- 161. 濵田圭佑, 田口晃弘, 村上沙織, 小林美咲, 高山健太郎, 臼井健郎, 林 良雄: ナンセンス変異読み飛ばし活性を有する(+)ーネガマイシンの作用機構解析を目的とした多剤超感受性酵母株の構築. 第5回医薬エ3大学包括連携推進シンポジウム (2016/6, 東京)
- 162. 濵田圭佑, 田口晃弘, 高山健太郎, 薬師寺文華, 臼井健郎, 林 良雄: リードスルー活性を有する (+)-ネガマイシンの作用機構解析を目的とした多剤超感受性酵母株の構築. 日本ケミカルバイオロジー学会第11回年会 (2016/6, 京都市)
- 163. 熊井 準, 中川生彩, 林 怡辰, 片桐文彦, 保住建太郎, 吉川大和, 野水基義: 高分子多糖マトリックスを用いたラミニン α5 鎖 G ドメイン生物活性部位の同定. 第 48 回日本結合組織学会学術大会 (2016/6, 長崎市)
- 164. 指田紗菜恵, <u>根岸洋一</u>, 道鎮えりか, 片桐文彦, 鈴木 亮, 丸山一雄, <u>野水基義</u>, 新槇幸彦: バブルリポソームと超音波照射併用による筋ジストロフィーモデルマウス横隔膜治療法の開発. 第 32 回日本 DDS 学会学術集会 (2016/6, 静岡市)
- 165. <u>三浦 剛</u>: 有機分子触媒を用いた不斉反応の開発. 有機合成化学協会 関東支部ミニシンポジウム (2016/6, 神奈川)
- 166. **三浦 剛**, 新井亮雅, 平島真一, 中島康介, 古石裕治: 新規有機分子触媒を用いた不斉 Pudovik 反応の開発. BIO tech 2016 第 15 回アカデミックフォーラム (2016/5, 東京)
- 167. 佐賀裕介, 高山健太郎, 三野友作, 中村明里, 淺利知, 田口晃弘, 薬師寺文華, 林良雄: マイオスタチン阻害ペプチドのN末端トリプトファン残基に着目した構造活性相関研究. 日本薬学会第136年会(2016/3, 横浜市)
- 168. 片桐文彦, 山田里実, 保住建太郎, 吉川大和, <u>野水基義</u>: ラミニン γ1 鎖配列由来生物活性ペプチド C16 の構造活性相関. 日本薬学会第 136 年会 (2016/3, 横浜市)
- 169. 熊井 準, 中川生彩, 片桐文彦, 保住建太郎, 吉川大和, 野水基義: ペプチド-アルギン酸マトリックスを用いたヒトラミニン  $\alpha$ 5Gドメイン活性配列の同定. 日本薬学会第 136 年会 (2016/3, 横浜市)
- 170. 指田紗菜恵, <u>根岸洋一</u>, 櫻井あかね, 道鎮えりか, 髙橋葉子, 鈴木 亮, 丸山一雄, 新槇幸彦: バブルリポソームと超音波照射併用による横隔膜への遺伝子デリバリーシステムの確立. 日本薬学会第 136 年会 (2016/3, 横浜市)
- 171. 阿久津裕士, 山本智之, 中島康介, 矢内 光, 髙橋流太, 小谷 明, 平島真一, 古石裕治, 袴田秀樹, 松本隆司, 三浦 剛: 新規水素結合供与型有機分子触媒の設計と不斉アルドール反応への適用. 日本薬学会第 136 年会 (2016/3, 横浜市)
- 172. 河田雅宏, 坂上 徹, 中島康介, 平島真一, 古石裕治, 三浦 剛: 新規有機分子触媒を用いたアルキリデンマロン酸エステルへの不斉共役付加反応の開発. 日本薬学会第 136 年会 (2016/3, 横浜市)
- 173. **野水基義**: ラミニンの活性ペプチドを用いた人工基底膜の創製. 第 22 回ペプチドフォーラム (2016/3, 石川県)
- \*Nakamura A, Takayama K, Mino Y, Asari T, Saga Y, Taguchi A, Yakushiji F, <u>Hayashi Y</u>: Structure-activity relationship study of N-terminal Trp residue in prodomain-derived myostatin inhibitory peptide. The 7th International Peptide Sympodium (2015/12, Matrix Biopolis, Singapore) \*Best Poster Award
- 175. Kumai J, Nakagawa S, Yichen L, Katagiri F, Hozumi K, Kikkawa Y, Nomizu M: Identification of active sequences from human laminin alpha5 chain G domain. 2015 cell biology ascb annual meeting (2015/12, San Diego, USA)
- 176. Gu Y, Kumai J, Katagiri F, Hozumi K, Kikkawa Y, <u>Nomizu M</u>: Laminin beta chain derived peptide conjugated chitosan matrices promote cell attachment and spreading. 2015 cell biology ascb annual

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

- meeting (2015/12, San Diego, USA)
- 177. Katagiri F, Yamada S, Hozumi K, Kikkawa Y, <u>Nomizu M</u>: Structure-activity relationship study for biologically active peptides C16 (KAFDITYVRLKF) derived from mouse laminin gamma1 chain sequence. 2015 cell biology ascb annual meeting (2015/12, San Diego, USA)
- 178. <u>Nomizu M</u>: Peptide-conjugated polysaccharide matrix as a functional biomaterial for tissue engineering. Peptide Engineering Meeting-7. (2015/12, Pune, India)
- 179. 濵田圭佑, 田口晃弘, 小竹優也, 会田俊, 村上沙織, 高山健太郎, 薬師寺文華, <u>林良雄</u>: 高活性リードスルー薬の獲得を目指したネガマイシン C 末端誘導体の開発. 第 52 回ペプチド討論会 (2015/11, 神奈川県)
- 180. Kumai J, Nakagawa A, Yichen L, Katagiri F, Hozumi K, Kikkawa Y, Nomizu M: Screening of biological active peptides from human laminin alpha5 chain G domain. 第 52 回ペプチド討論会 (2015/11, 神奈川県)
- 181. Gu Y, Kumai J, Katagiri F, Hozumi K, Kikkawa Y, <u>Nomizu M</u>: The cell attachment and spreading activities of laminin beta chains derived biologically active peptides conjugated chitosan matrices. 第 52 回ペプチド討論会 (2015/11, 神奈川県)
- 182. Fujii S, Nakagawa A, Harashima N, Ikari K, Katagiri F, Hozumi K, Kikkawa Y, Nomizu M: Identification of amino acids sequences in short arm region of laminin alpha5 involving endothelial cell attachment. 第52回ペプチド討論会 (2015/11, 神奈川県)
- 183. 中村明里, 高山健太郎, 三野友作, 淺利 知, 佐賀裕介, 田口晃弘, 薬師寺文華, **林 良雄**: マイオスタチン阻害ペプチドの N 末端アシル化と構造活性相関. 第 33 回メディシナルケミストリーシンポジウム (2015/11, 千葉市)
- 184. 成島岳史, 平島真一, 中島康介, 古石裕治, 三浦 剛: 新規フルオラス有機分子触媒を用いた不 斉 Michael 付加反応. フルオラス科学研究会第8回シンポジウム (2015/10, 静岡市)
- 185. 平島真一, 新井亮雅, 河合宣明, 近藤純子, 中島康介, 古石裕治, 三浦 剛: 有機分子触媒を用いたアルデヒドの不斉ヒドロホスホニル化反応. 第 41 回反応と合成の進歩シンポジウム (2015/10, 大阪府)
- 186. <u>Nomizu M</u>: Peptide-conjugated natural polysaccharide gel as a functional biomaterial for tissue engineering. China-Korea-Japan Symposium on Prevention and Treatment of Chronic Diseases by Traditional Medicine. (2015/10, Beijin, China)
- 187. Taguchi A, Hamada K, Kotake M, Aita S, Murakami S, Takayama K, Yakushiji F, <u>Hayashi Y</u>: Structure–activity relationship studies focused on 3-amino moiety of negamycin derivatives for potent readthrough activity. Frontiers in Medicinal Chemistry 2015 (2015/9, Antwerp, Belgium)
- 188. <u>根岸洋一</u>, 櫻井あかね, 指田紗菜恵, 片桐文彦, 髙橋葉子, 鈴木 亮, 丸山一雄, <u>野水基義</u>, 新槇幸彦: バブルリポソームと超音波照射併用による筋ジストロフィーモデルマウス筋組織への核酸デリバリー. 第1回日本筋学会学術集会 (2015/8, 東京)
- 189. Itoh F: The minimum peptide from mouse myostatin precursor improves muscle wasting and cancer associated cachexia. TGFß meeting in Uppsala (2015/8, Uppsala, Sweden)
- 190. Kikkawa Y, Harashima N, Ikari K, Fujii S, Katagiri F, Hozumi K, Nomizu M: Tumor cell migration on laminin-511 is promoted through the receptor binding reduced with PMA. 9th International Conference on Proteoglycans and 10th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium (2015/8, Seoul, Korea)
- 191. \* 濵田圭佑, 田口晃弘, 小竹優也, 生澤俊太郎, 会田 俊, 村上沙織, 高山健太郎, 薬師寺文華, 臼井健郎, 林 良雄: 3 位アミノ基部に着目した新規ネガマイシン誘導体の合成とそのリードスル

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

- 一活性評価. 創薬懇話会 2015 in 徳島 (2015/7, 徳島県) \* 最優秀ポスター賞
- 192. 濵田圭佑, 高山健太郎, 田口晃弘, 会田 俊, 生澤俊太郎, 村上沙織, 薬師寺文華, 臼井健郎, 林 **良雄**: 高リードスルー活性を有する新規ネガマイシン誘導体の合成と癌細胞増殖抑制への応用. 第 17 回日本 RNA 学会 (2015/7, 札幌市)
- 新井亮雅, 平島真一, 河合宣明, 近藤純子, 中島康介, 古石裕治, 三浦 剛: ジアミノメチレンマロ 193. ノニトリル型有機触媒を用いた不斉 Pudovik 反応. 第 4 回医薬工 3 大学包括連携推進シンポジウ ム (2015/6, 東京)
- 194. Takayama K, Taguchi A, Hamada K, Yakushiji F, Hayashi Y: Medicinal chemistry of peptidic compounds for the treatment of muscular diseases. 24th American Peptide Symposium (2015/6, Orlando, USA)
- 195. 碇 和樹, 藤井翔吾, 片桐文彦, 保住建太郎, 吉川大和, 野水基義: MDCK 細胞の cyst 形成にお けるラミニン-511 の役割. 第47回日本結合組織学会学術大会 (2015/5, 東京)
- 196. 藤井翔吾, 碇 和樹, 片桐文彦, 保住建太郎, 吉川大和, 野水基義: ラミニン-511 に対する細胞接 着の抑制と細胞運動の促進. 第47回日本結合組織学会学術大会 (2015/5, 東京)
- 櫻井あかね, 根岸洋一, 間山彩, 指田紗菜恵, 片桐文彦, 髙橋葉子, 鈴木 亮, 丸山一雄, 野水基 197. 義, 新槇幸彦: 筋ジストロフィー心筋治療に向けた核酸搭載型バブルリポソームと超音波併用シス テムの有用性評価. 日本薬剤学会第30年会(2015/5. 長崎市)

#### 知的財産等

- 1. \*林 良雄, 高山健太郎, 根岸洋一: ペプチドもしくはその薬学的に許容される塩, またはそれらの プロドラッグ.特願 2016-158123(2016 年 8 月 10 日 ), "Peptide or pharmaceutically acceptable salts or prodrugs thereof", PCT/JP2017/028834 (2017 年 8 月 8 日), (JST 大学等知財基盤強化支援 (権利化支援)制度採択)
- \*林 良雄, 伊東史子, 薬師寺文華, 高山健太郎, 青木 進, 野口百合, 砂田芳秀, 大澤 裕, 西松 2. 伸一郎: マイオスタチン阻害ペプチド. 特許第 6143270 号 (2017 年 5 月 19 日)

#### <研究成果の公開状況>(上記以外)

シンポジウム・学会等の実施状況、インターネットでの公開状況等

<既に実施しているもの>

シンポジウム・学会等の実施状況、インターネットでの公開状況等

ホームページで公開している場合には、URLを記載してください。

#### <既に実施しているもの>

- 1) 平成 28 年 4 月 1 日 第 4 回戦略会議「第 1 回公開研究進捗状況報告会」 東京薬科大学 教育 1号館 1203 講義室, 2201 講義室
- 2) 平成 29 年 3 月 17 日 第 8 回戦略会議「第 2 回公開研究進捗状況報告会」 東京薬科大学 教育 1号館 1203 講義室, 2201 講義室
- 3) 平成 30 年 3 月 19 日 第 12 回戦略会議「第 3 回公開研究進捗状況報告会」 東京薬科大学 教育 1号館 1203 講義室, 2201 講義室
- 4) 令和 2 年 3 月 19 日 第 19 回戦略会議「最終研究成果報告会」 東京薬科大学 教育 1号館 1203 講義室, 2201 講義室 (新型コロナウイルスの感染防御対策に伴う対応として紙上開催)

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1511013

大学専用ホームページ https://www.toyaku.ac.jp/research/results/results01 プロジェクト専用ホームページ http://toyaku27research.sakura.ne.jp/yaku/

<これから実施する予定のもの> 特になし。

#### 14 その他の研究成果等

プレスリリース 「シャルコー・マリー・トゥース病の新たなマウスモデルの作製に成功 ~神経系指定 難病の病態解明に期待~」 2020 年 3 月 13 日

#### 15 「選定時」及び「中間評価時」に付された留意事項及び対応

<「選定時」に付された留意事項> 該当なし。

<「選定時」に付された留意事項への対応> 該当なし。

<「中間評価時」に付された留意事項> 該当なし。

<「中間評価時」に付された留意事項への対応> 該当なし。 主催: 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

「ペプチド工学と DDS 技術を基盤とした筋疾患に対する統合創業の研究拠点形成」

## 第4回 戦略会議「第1回 公開研究進捗状況報告会」

日時: 平成28年4月1日(金) 14:00 ~ 17:50 会場: 東京薬科大学 研究5号館 5204 講義室

### プログラム

開会の挨拶 14:00 ~ 14:05	プロジェクトリーダー 野水 基義 (薬学部 病態生化学)
研究報告·話題提供	
14:05 ~ 14:30	野水 基義 (薬学部 病態生化学) 「ジストログリカン結合ペプチドの開発」
14:30 ~ 14:55	平島 真一 (薬学部 薬化学) 「活性化合物の効率的大量合成法の開発」
14:55 ~ 15:20	林 秀樹 (薬学部 応用生化学) 「薬物・核酸・ペプチドの薬理学的評価系の確立」
15:20 ~ 15:45	根岸 洋一(薬学部 薬物送達学) 「筋組織特異的 DDS の開発」
15:45 ~ 16:00	休憩
16:00 ~ 16:25	伊東 史子(生命科学部 心血管医科学) 「マイオスタチン阻害剤の in vivo/in vitro 評価」
16:25 ~ 16:50	井上 勝央 (薬学部 薬物動態制御学) 「医薬品候補化合物の体内動態解析」
16:50 ~ 17:15	山□ 宜秀(薬学部 機能形態学) 「L-MPZ を用いたリードスルー薬の評価」
17:15 ~ 17:40	林 良雄(薬学部 薬品化学) 「ネガマイシン誘導体・マイオスタチン阻害ペプチドの開発」
総括と閉会の挨拶	
17:40 ~ 17:50	林 良雄(薬学部 薬品化学)

主催: 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

「ペプチド工学と DDS 技術を基盤とした筋疾患に対する統合創薬の研究拠点形成」

## 第8回 戦略会議「第2回 公開研究進捗状況報告会」

日時: 平成29年3月17日(金) 10:30 ~ 16:35

会場: 東京薬科大学 教育 1号館 1203 講義室(講演)、

2201 講義室(ポスター発表)

参加登録方法: 直接会場までお越し下さい(入場無料)。

学部生・大学院生・教職員どなたでもご自由に参加ください。

#### 開会の挨拶・プロジェクトの概要説明、研究報告

10:30 ~ 11:00 プロジェクトリーダー 野水 基義 (病態生化学)

ラミニン由来活性ペプチドの探索と医薬分野への応用戦略

11:00 ~ 11:20 根岸 洋一 (薬物送達学)

筋ジストロフィー疾患治療に向けたドラッグデリバリーシステムの開発

11:20 ~ 12:20 ポスター発表

(12:20 ~ 13:20: 昼食休憩)

13:20 ~ 13:40 林 良雄 (薬品化学)

ネガマイシン誘導体・マイオスタチン阻害ペプチドの開発

13:40 ~ 14:00 山口 宜秀 (機能形態学)

末梢神経系ミエリン構成分子 L-MPZ による stop codon readthrough

評価系の検討

14:00 ~ 14:20 伊東 史子 (心血管医科学)

ミオスタチン阻害ペプチドを用いたがん悪液質改善効果

(14:20 ~ 14:30: 休憩)

特別講演1

14:30 ~ 15:20 松田 良一 先生(東京大学 大学院総合文化研究科·教授)

Duchenne type Muscular Dystrophy の治療戦略~リードスルー療法、

抗炎症療法、さらに疾患修飾因子を逆用した補完療法に挑む~

特別講演2

15:20 ~ 16:10 砂田 芳秀 先生 (川崎医科大学 医学部·教授)

TGF- β 阻害戦略による抗加齢・健康寿命延伸医薬の創出

総合討論·総括

16:10 ~ 16:30 プロジェクト評価者:石浦 章一 先生(同志社大学 生命医科学部·教授)

閉会の挨拶

16:30 ~ 16:35 林 良雄 (薬品化学)

意見交換会 (16:40 ~17:50、マグノリアにて)

連絡先:

〒192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1 東京薬科大学 薬学部 薬物動態制御学教室

宋尔条科人子 条子部 条初勤思利御子多 井上 勝央(事務局担当)

TEL: 042-676-3126

E-mail: kinoue@toyaku.ac.jp



Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

## 文部科学省 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

## ペプチド工学と DDS 技術を基盤とした 筋疾患に対する統合創薬の研究拠点形成

# 第8回 戦略会議第2回 公開研究進捗状況報告会

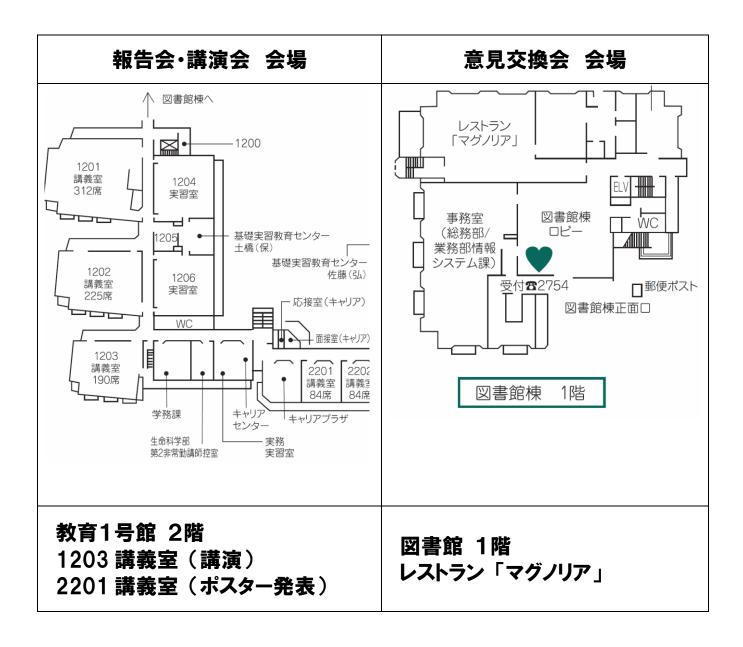
## 講演要旨集

2017年3月17日(金)

東京薬科大学 教育 1 号館 1203 講義室(講演) 2201 講義室(ポスター発表)



# 会場のご案内



# お知らせとお願い

# 【参加者へのお知らせ】

### 総合受付場所

教育1号館 1203 講義室 入口

#### 参加受付時間

2017年3月17日(金) 10:00 ~ 14:20

### 参加登録手続き

参加費は無料です。総合受付にて、当日参加のご登録をお願いいたします(ご所属・ご 氏名の記帳をお願いいたします)。

# 【参加者へのお願い】

#### 一般的注意事項

- 会場内での写真撮影およびビデオ撮影は、固くお断りします。
- 会場(1203 講義室及び 2201 講義室)は飲食禁止となっています。ご協力をお願いいたします。
- 講演中は会場内での携帯電話のご利用はご遠慮ください。
- キャンパス内は全面禁煙です。ご協力をお願い致します。

# 【講演者(特別講演、報告会)へのお知らせ】

・ ご自身の PC の持ち込みをお願い致します (USB・CD-R 等のファイルで持ち込む場合は、事前に事務局までご連絡をお願い致します)。係がプロジェクターへの接続をお手伝いいたします。発表中にスクリーンセーバーや省電力モードにならないよう設定して下さい。

- ・ 外部モニタ出力端子は通常の D-Sub-15 ピンのみの対応となります。形状が特殊なモニタ出力端子の場合は変換アダプタをご持参ください。また、バッテリ切れに備えて発表会場に AC アダプタをご持参ください。
- ・ ご発表のシンポジウム開始前の休憩時間に、演台まで各自の PC をお持ちくださり、接続をご確認下さい。

# 【ポスター発表者へのお知らせ】

- ・ ポスター発表は 2201 講義室で行います。ポスター発表演者は、各自のポスター前で発表をお願いします。
- ・ 掲示時間は、11 時 20 分から 12 時 20 分です。
- ・ 演題番号をご確認の上、所定の場所に ポスターを掲示して下さい。
- 3月17日(金)10時までに掲示をお願いいたします(プッシュピンは会場に用意してあります)。
- ポスターのサイズは右図を参考にして作成してください。
- ・ ポスターの撤去は閉会後に行ってください。不要なポスターは掲示しておかれても結構 です(事務局で廃棄の処理を行います)。

# 演題番号を掲示するので スペースの確保をお願い します。 (その他、形式の指定は ございません) 発表内容

15 cm

10.5 cm

# 【意見交換会参加者へのお知らせ】

意見交換会は16時40からレストラン「マグノリア」で行います。参加費は無料です。

# プログラム

講演会会場 (1203 講義室)

司会: 井上勝央

### 開会の挨拶・プロジェクトの概要説明

10:30 ~ 10:40 ご挨拶:プロジェクトリーダー 野水基義

研究報告 座長:馬場広子

 $10:40 \sim 11:00$  **0-1**:

ラミニン由来活性ペプチドの探索と医薬分野への応用戦略

○野水基義、熊井準、中村享太郎、片桐文彦、保住建太郎、

吉川大和

(東京薬大・薬)

 $11:00 \sim 11:20$  **0-2**:

筋ジストロフィー疾患治療に向けたドラッグデリバリーシステムの開発

〇根岸洋一、指田紗菜恵、佐々木愛理、韮沢 慧、片桐文彦、 吉田彰宏、平島真一、三浦 剛、髙橋葉子、新槙幸彦、吉川大和、

野水基義

(東京薬大・薬)

#### 研究発表

11:20 ~ 12:20 ポスター発表

(12:20 ~ 13:20: 昼食休憩)

**研究報告** 座長:根岸洋一

 $13:20 \sim 13:40$  **0-3**:

#### ネガマイシン誘導体・マイオスタチン阻害ペプチドの開発

○林 良雄¹、高山健太郎¹、田口晃弘¹、濱田圭佑¹、中村明里¹、 佐賀裕介¹、嶋田嵩大¹、小林美咲¹、新井実咲¹、齋藤まりこ¹、 六本木佳美¹、谷口敦彦¹、根岸洋一¹、伊東史子²、松田良一³、 大澤 裕⁴、西松伸一郎⁴、砂田芳秀⁴、臼井健郎⁵、大久保佑美⁶、 宇谷厚志⁶

(1東京薬大·薬、2東京薬大·生命、3東大·総合文化、4川崎医大、5筑波大·生命環境、6長崎大·医)

 $13:40 \sim 14:00$  **0-4**:

末梢神経系ミエリン構成分子 L-MPZ による stop codon readthrough 評価系の検討

○山口宜秀、大谷嘉典、林 明子、石橋智子、田口晃弘、濱田圭佑、 林 良雄、馬場広子 (東京薬大・薬)

 $14:00 \sim 14:20$  **0-5**:

#### ミオスタチン阻害ペプチドを用いたがん悪液質改善効果

○伊東史子¹、尾嶋千遥¹、宮本 樹¹、渡部琢也¹、高山健太郎²、 林 良雄²、

(1東京薬大・生命、2東京薬大・薬)

(14:20 ~ 14:30: 休憩)

特別講演 1 座長:林 良雄

 $14:30 \sim 15:20$  L-1:

Duchenne type Muscular Dystrophy の治療戦略〜リードスルー 療法、抗炎症療法、さらに疾患修飾因子を逆用した補完療法に挑む〜

松田 良一 先生 (東大·総合文化 教授)

特別講演 2 座長:野水基義

 $15:20 \sim 16:10$  L-2:

TGF-β 阻害戦略による抗加齢・健康寿命延伸医薬の創出

砂田 芳秀 先生 (川崎医大 教授)

**総合討論・総括** 司会:野水基義

16:10 ~ 16:30 プロジェクト評価者:石浦 章一 先生

(同志社大学・生命医 教授)

閉会の挨拶

16:30 ~ 16:35 林 良雄(東京薬大·薬)

意見交換会

 $(16:40 \sim 17:50, レストラン「マグノリア」にて)$ 

# ポスター発表

掲示・説明討論時間 3月17日(金)11:20~12:20

# ポスター会場 (2201 講義室)

#### P-1 ヒトラミニンα5鎖 Gドメインの細胞接着部位の同定

○熊井 準、片桐文彦、保住建太郎、吉川大和、野水基義 (東京薬大・薬)

# P-2 **血管内皮細胞の接着および管腔形成における**ラミニン α 5 鎖 short arm 領域活性 ペプチドの同定

○菅原由美香、原島望、藤井翔悟、碇和樹、熊井準、片桐文彦、保住建太郎、 吉川大和、野水基義 (東京薬大・薬)

#### P-3 ラミニン-511 に対する細胞接着の抑制による細胞運動の促進

〇田中悠介、原島望、菅原由美香、碇和樹、片桐文彦、保住建太郎、野水基義、 吉川大和

(東京薬大・薬)

#### P-4 ラミニン α 2 鎖由来ペプチドを用いた筋細胞選択的リポソームの開発

○佐々木愛理、指田紗菜恵、片桐文彦、吉田彰宏、平島真一、三浦 剛、新槙幸彦、吉川大和、野水基義、根岸洋一 (東京薬大・薬)

# P-5 バブルリポソームと超音波照射併用による mdx マウス横隔膜への核酸デリバリーと その有用性評価

○指田紗菜恵¹、道鎮えりか¹、片桐文彦¹、韮沢 慧¹、佐々木愛理¹、髙橋葉子¹、 丸山一雄²、新槇幸彦¹、野水基義¹、根岸 洋一¹ (¹東京薬大・薬、²帝京大・薬)

### P-6 バブルリポソームと超音波照射を併用したゲノム編集用プラスミド DNA 導入による デュシェンヌ型筋ジストロフィー遺伝子治療法の開発

○道鎮えりか、髙橋葉子、新槇幸彦、根岸洋一 (東京薬大・薬)

# P-7 ラミニン α 2 鎖由来ペプチドを利用した polyplex による筋細胞選択的遺伝子デリバリーシステムの開発

○ 韮沢 慧、片桐文彦、佐々木愛理、新槇幸彦、吉川大和、野水基義、根岸洋一 (東京薬大・薬)

#### P-8 マレイミドへの付加反応に基づくペプチド-PEG-脂質の効率的合成法の開発

〇吉田彰宏、根岸洋一、片桐文彦、佐々木愛理、指田紗菜恵、平島真一、野水基義、 三浦 剛

(東京薬大・薬)

#### P-9 マレイミドへの有機触媒的不斉共役付加反応の開発

○中島康介、河田雅宏、平島真一、古石裕治、三浦 剛 (東京薬大·薬)

#### P-10 有機触媒を用いたケトンの不斉ヒドロホスホニル化反応の開発

○新井亮雅、平島真一、中島康介、古石裕治、三浦 剛 (東京薬大・薬)

#### P-11 マウス由来マイオスタチン阻害ペプチドの網羅的構造活性相関研究1

〇高山健太郎、淺利 知、中村明里、佐賀裕介、嶋田嵩大、田口晃弘、谷口敦彦、 林 良雄

(東京薬大・薬)

#### P-12 マウス由来マイオスタチン阻害ペプチドの網羅的構造活性相関研究2

○Cédric Rentier、高山健太郎、中村明里、佐賀裕介、嶋田嵩大、齋藤まりこ、 六本木佳美、田口晃弘、谷口敦彦、根岸洋一、林 良雄 (東京薬大・薬)

# P-13 (+) -ネガマイシンを基盤とした高活性リードスルー化合物の創製とその作用機構解析を 目的とした多剤超感受性酵母株の構築

〇濵田圭佑¹、田口晃弘¹、村上沙織¹、鈴木奈々¹、小林美咲¹、新井実咲¹、 高山健太郎¹、谷口敦彦¹、臼井健郎²、林 良雄¹ (¹東京薬大•薬、²筑波大•生命環境系)

#### P-14 脳虚血誘発神経新生における GSK-3 βリン酸化の役割

○喜早慧士、林 秀樹、伊藤剛志、浅田眞由美、新井美穂、袁 博、高木教夫 (東京薬大・薬)

#### P-15 虚血性神経障害時のリポプロテイン受容体 LRP1 の変化と薬物治療に関する研究

○山田まりこ、佐藤祥子、結城もえ、袁 博、林 秀樹、高木教夫 (東京薬大・薬)

## P-16 視神経保護におけるアポリポタンパク質 E 含有リポタンパク質と α 2-マクログロブリンの 役割

○林 秀樹、森 みすず、袁 博、高木教夫 (東京薬大・薬)

#### P-17 ミオスタチン阻害ペプチドを利用したがん悪液質改善効果

○尾嶋千遥¹、宮本 樹¹、渡部琢也¹、高山健太郎²、林 良雄²、伊東史子¹(¹東京薬大・生命、²東京薬大・薬)

#### P-18 Negamycin 系新規終止コドンリードスルー薬の末梢神経に対する影響の解析

○大谷嘉典、山口 宜秀、田口晃弘、濱田圭佑、林 良雄、馬場広子 (¹東京薬大・薬)

# P-19 連続ブロック表面走査型電子顕微鏡(SBF-SEM)を用いた GlcNAc6ST-1 欠損マウス 坐骨神経の解析

○林 明子¹、大野伸彦²、池中一裕²、馬場広子¹ (¹東京薬大・薬、²自然科学研究機構・生理研)

#### P-20 オリゴデンドロサイトにおける非定型 Myosin VI の発現解析

○山崎礼二、山口宜秀、石橋智子、馬場広子 (東京薬大·薬)

#### P-21 マイオスタチン阻害ペプチドの血中安定性の評価

○飯田奏子、岸本久直、白坂善之、高山健太郎、林良雄、井上勝央 (東京薬大•薬)

# P-22 有機アニオントランスポーターを利用した D-luciferin による bioluminescence イメージングの最適化

〇志村明日香  $^1$ 、古屋貴人  $^1$ 、岸本久直  $^1$ 、竹原一成  $^2$ 、湯浅博昭  $^2$ 、白坂善之  $^1$ 、井上 勝央  $^1$ 

(1東京薬大・薬、2名古屋市立大・薬)

# P-23 筋肉におけるルシフェラーゼ発現の in vivo イメージングを指向した D-ルシフェリントランスポーターの探索

○古屋貴人、志村明日香、岸本久直、白坂善之、井上勝央 (東京薬大·薬)

# **Abstracts**

L:招待講演

0: 研究報告

P: ポスター発表

# Duchenne type Muscular Dystrophy(DMD)の治療戦略

ーリードスルー療法、抗炎症療法、さらに疾患修飾因子を逆用した 補完療法に挑む—

# 松田良一

# 東京大学 大学院総合文化研究科 教授

Duchenne type Muscular Dystrophy (DMD) はジストロフィン遺伝子の異常により起きる伴性の致死性筋疾患であり、その治療法は未だ確立していない。現在、CRISPR/Cas9 によるジストロフィン遺伝子の導入やエキソンスキップ、そしてナンセンス突然変異の克服に有効なリードスルーによる治療方法、さらに筋ジス症状の緩和につながる抗炎症剤等に関する研究が進められている。私たちはジストロフィン遺伝子にナンセンス突然変異を有する mdx マウスを用いて、1) 経口投与可能なリードスルー薬物による治療や2) ロスタグランディン D 合成酵素阻害剤等による抗炎症治療法、さらに3)飲食物に含まれるリン、あるいは経口投与された甲状腺ホルモン(T3)が DMD 症状を悪化させる強力な疾患修飾因子であることを見出し、それらを逆用して新たな DMD の補完療法を提案している。

#### 【略歴】

東京都立大学大学院中退、カリフォルニア大学バークレー校博士研究員、東京都立大学理学部助手、W. Alton Jones Cell Science center, Senior Scientist、東京大学教養学部助教授を経て現職。

精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィー関連疾患の基盤的診断・治療開発研究」班 幹事。理学博士。

# TGF-β阻害戦略による抗加齢・健康寿命延伸医薬の創出

# 砂田芳秀

#### 川崎医科大学 神経内科学 教授·副学長

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は、ジストロフィン遺伝子変異により筋力低下をきたす希少難病である。ジストロフィン mRNA 修復療法の対象は特定 exon の欠失や点変異の患者に限定されるという限界がある。われわれは、骨格筋量を負に制御する TGF- $\beta$ 分子であるマイオスタチンの活性亢進による筋ジストロフィー病態を世界に先駆け報告した(J Clin Invest 116, 2006)。マイオスタチンは DMD の原因ではないものの、disease modifier として注目されている。マイオスタチン N-末端の生理的な阻害領域であるプロドメインから、その活性阻害中心配列を同定し、東京薬科大学との協同研究によりペプチド医薬の開発に取り組んでいる。その過程で既に知られていた血中リガンド阻害ばかりでなく、細胞表面のリガンド・受容体結合の阻害という新たな阻害機構を発見した(PLOS ONE e0133713, 2015)。マイオスタチン阻害は筋ジストロフィーだけではなく、ステロイドミオパチーやサルコペニアに対する治療効果も期待される。

また、骨格筋はインスリンの標的臓器でもあり、肥満や糖尿病の病態生理にも重要や役割を果たしている。マイオスタチン阻害により骨格筋量が増加するとともに体脂肪量と内臓脂肪量は減少し、インスリン抵抗性が改善する。さらに骨格筋量の維持は骨粗鬆症や変形性関節症の予防にもつながる。このようにマイオスタチンに代表される TGF-β分子の活性抑制により、生活習慣病の基盤であるメタボリック症候群、ロコモーティブシンドロームやサルコペニアの予防と健康寿命の延伸が期待される。

現時点でマイオスタチン阻害ペプチドの筋肉への局所投与で筋量と筋張力の増加を達成できたが、全身投与での治療効果は明らかではない。現在、全身投与可能な安定化したペプチド医薬の開発に取り組んでいる。

### 履歴:

昭和58年	3月	岡山大学医学部医学科卒業
昭和58年	5月	国立病院医療センター内科研修医
昭和60年	6月	国立病院医療センター神経内科レジデント
昭和63年	4月	東京大学医学部脳研神経内科医員
平成 4年	4月	東京大学医学部脳研神経内科文部技官
平成 5年	5月	米国アイオワ大学医学部留学
平成 8年	4月	帝京大学医学部神経内科学講師
平成11年	6月	川崎医科大学神経内科学教授
平成21年	4月	川崎医科大学副学長
		現在に至る。

専門分野; 臨床神経学

主要研究領域:筋ジストロフィーなどの筋疾患の病態解明と治療法の開発。 平成20~22年度の厚生労働省筋ジストロフィー研究班主任研究者を務める。

專門医:日本內科学会認定內科医、日本神経学会神経內科專門医、日本頭痛学会專門医、日本認知症学会專門医

学会活動:日本内科学会評議員、日本神経学会代議員、日本神経治療学会評議員、日本神経 感染症学会評議員、日本筋学会副理事長など

#### 受賞

第7回基底膜国際シンポジウム若手研究者賞 (1995年)

フランス科学アカデミー最優秀論文賞 (1995年)

第9回国際神経筋疾患コングレス最優秀ポスター賞 (1998年)

第21回国際神経学コングレスポスター賞(2013年)

第34回日本神経治療学会会長賞(2016年)

# ラミニン由来活性ペプチドの探索と医薬分野への応用戦略

○野水基義、熊井準、中村享太郎、片桐文彦、保住建太郎、吉川大和 東京薬大・薬

基底膜は、うすい膜状の細胞外マトリックスで、上皮や内皮組織の直下、筋細胞や脂肪細胞あ るいは血管内皮細胞の周囲などほとんどの組織に存在し、個体の発生や再生、特に器官形成、血 管新生、創傷治癒などに深く関与している。基底膜は、インテグリンやシンデカンなど 20 種類 以上の細胞表面レセプターを介して細胞と対話しており、様々な生命現象を制御している。基底 膜の主役的存在であるラミニンは、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ の3つのサブユニットが3本鎖コイルドコイル構 造部分で会合し、全体が十字架構造をした巨大分子で、細胞接着、器官形成、神経網再生、血管 新生、創傷治癒やがんの増殖転移などに深く関わっている。現在までに、5 種類のα鎖、3 種類 のβ鎖、3種類のγ鎖が発見されており、それらの会合体として16種類のラミニンアイソフォ ームが報告されている。我々は、全ラミニンアイソフォームのアミノ酸配列を網羅した約3,000 種類のペプチドを合成し、種々の細胞を用いて細胞接着活性を測定することにより、約 100 種類 の活性ペプチドを同定した。活性のあったペプチドのなかには細胞特異的に接着活性や細胞遊走 を促進するもの、インテグリン、シンデカン、α-ジストログリカン、CD44 に特異的に結合する ものが見つかってきている。例えば、ラミニン α 2 鎖 LG4-5 モジュールの組換えタンパク質 (rec-α2LG4-5) と 41 種類の合成ペプチドを用いて、LG4-5 モジュールのα-ジストログリカン 結合部位を探索したところ、A2G78(GLLFYMARINHA)と A2G80(VQLRNGFPYFSY)がα-ジストログ リカン結合活性を有し、rec- $\alpha$  2LG4-5 の $\alpha$ -ジストログリカン結合を阻害したことから、LG4-5 モジュールのα-ジストログリカン結合活性における重要な部位であることがわかった。これら α-ジストログリカンに結合するペプチドは、生物学的機能や筋ジストロフィーの病態メカニズ ムの解明、及びそれらに基づく組織工学や医薬分野への応用が期待される。また、近年、マウス 肉腫基底膜の可溶化ゲルであるマトリゲルが、細胞工学的研究において数多く用いられその有用 性が証明されてきているが、マウス肉腫由来であるため臨床応用は不可能である。そこでマトリ ゲルに匹敵する合成バイオマテリアル、すなわち「人工基底膜」の開発が待ち望まれている。ま た、同定された活性ペプチドをキトサンなどの多糖を用いたマトリックスに固定化することによ り、作用が増強することがわかった。さらに、受容体の異なるラミニン活性ペプチドを多糖マト リックスに複数種類再構築することにより、ペプチドの活性が相乗的に増加され、ラミニン様の 活性を示すことがわかってきた。これらペプチド-マトリックスは「人工基底膜」ともいえる合 成バイオマテリアルとして用いることが可能で、組織工学や再生医療の分野への応用が期待され る。以上のように、基底膜のラミニン由来活性ペプチドは受容体特異的に結合し、様々な生物活 性を示すことから、医薬分野への応用に向けたペプチド工学のツールとしての応用戦略が展開し ていくことが期待される。

筋ジストロフィー疾患治療に向けたドラッグデリバリーシステムの開発

○根岸洋一、指田紗菜恵、佐々木愛理、韮沢 慧、片桐文彦、吉田彰宏、 平島真一、三浦 剛、髙橋葉子、新槙幸彦、吉川大和、野水基義 東京薬大・薬

骨格筋は、全身で最大の臓器であり、運動機能のために高度に分化した特殊な組織である。 また、神経と同じように電気信号がその生理機能に重要な役割を果たしていることも特徴的 である。骨格筋におこる疾患としては、多発筋炎・重症筋無力症といった免疫性疾患、筋ジ ストロフィーを代表とする遺伝性疾患、先天代謝異常、全身疾患に伴う疾患など、数多くの ものがある。中でも進行性の筋委縮と筋力低下をおこすデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、骨格筋自体が発症部位であるとともに遺伝子治療の標的部位であり、エクソン スキッピング(エクソン上の変異によって生じたナンセンス変異の読み飛ばし)をはじめ、数々の新 規治療が試行されている。しかしながら、骨格筋への核酸・遺伝子導入は、導入効率と発現 の持続性が低いことが問題であり、繰り返し投与が必要となる。そのため核酸・遺伝子医薬 による治療を奏功させるためには、骨格筋内での核酸・遺伝子の滞留性を上げ、持続的な発 現を実現する必要がある。現在、遺伝子治療の実用化に向けて、生体内での安定性や安全性 を改善するような非ウイルスベクターの開発が活発に行われているものの、筋疾患治療に特 化したドラッグデリバリーシステム (DDS)の開発は、ほとんど成されていない。そのような 背景から、これまでに我々は筋疾患治療に向けた DDS 研究開発を進めている。 本シンポジウ ムでは、現在、開発を進めている核酸・遺伝子デリバリーを可能とする超音波応答性ナノバ ブルや筋組織選択的な DDS キャリアについて紹介するとともに、これらを利用する筋疾患治 療戦略について議論する予定である。

## ネガマイシン誘導体・マイオスタチン阻害ペプチドの開発

○林 良雄<sup>1</sup>、高山健太郎<sup>1</sup>、田口晃弘<sup>1</sup>、濱田圭佑<sup>1</sup>、中村明里<sup>1</sup>、佐賀裕介<sup>1</sup>、 嶋田嵩大<sup>1</sup>、小林美咲<sup>1</sup>、新井実咲<sup>1</sup>、齋藤まりこ<sup>1</sup>、六本木佳美<sup>1</sup>、谷口敦彦<sup>1</sup>、 根岸洋一<sup>1</sup>、伊東史子<sup>2</sup>、松田良一<sup>3</sup>、大澤 裕<sup>4</sup>、西松伸一郎<sup>4</sup>、砂田芳秀<sup>4</sup>、 臼井健郎<sup>5</sup>、大久保佑美<sup>6</sup>、宇谷厚志<sup>6</sup>

<sup>1</sup>東京薬大・薬、<sup>2</sup>東京薬大・生命、<sup>3</sup>東大・総合文化、<sup>4</sup>川崎医大、 <sup>5</sup>筑波大・生命環境、<sup>6</sup>長崎大・医

#### 【背景・目的】

筋肉に関わる疾患は、行動の制限や健康寿命への影響が大きく、高寿命化の進む我が国において克服すべき喫緊の課題である。我々は、ナンセンス変異に起因する筋ジストロフィーや世代縦断的筋萎縮性疾患の治療に繋がる基礎的な創薬研究として、2つのプロジェクトを展開している。即ち、1970年に放線菌から単離同定されたジペプチド様抗生物質(+)-ネガマイシンを基盤とするリードスルー薬創製研究および筋肉量を負に制御する蛋白性因子マイオスタチンの受容体への結合を妨げるマイオスタチン阻害ペプチド創製研究である。

#### 【リードスルー薬創製プロジェクト】

(+)-ネガマイシン 1 をリード化合物とし、細胞レベルでのリードスルー評価系 (PTC 配列を含むデュアルレポーターシステム)を用いた構造活性相関を展開し、抗菌活性がない (原核細胞に作用しない)ネガマイシン天然アナログ 2 種 (3-エピデオキシネガマイシン 2 およびそのロイシン付加体 3)を含めて、1 より強力なリードスルー活性を示す複数の化合物の創製に至った。一方、遺伝学的解析が可能な多剤超感受性酵母 12geneΔHSR のアデニン合成遺伝子 ADE2へ3種の PTC 変異を導入した変異株の構築に成功し、ネガマイシン誘導体の作用機構解析およびリードスルー化合物スクリーニングに有用な評価系を確立した。

#### 【マイオスタチン阻害ペプチド創製プロジェクト】

マウスマイオスタチン前駆体配列から、砂田らにより発見された 29 残基のマイオスタチン阻害ペプチドを基盤とし、構造活性相関を展開することで、23 残基からなる最小阻害ペプチド配列 (H-WRQNTRYSRIEAIKIQILSKLRL-NH<sub>2</sub>) を見いだした。相当する合成ペプチド 4 は、 $\alpha$  ヘリックス性を有し、約 30 nM の  $K_D$  値でマイオスタチンへ親和性を示し、マウスへの筋肉内投与では約 20%の筋重量増加を認めた。さらに、N 末端 Trp 残基が効果的な阻害に重要であった。当該 Trp 残基に関する構造活性相関では、ペプチド 4 よりも約 3 倍強い活性を示す阻害ペプチド 5 の創製に至った。一方、Ala スキャンや Pro スキャンによるペプチド 4 の網羅的構造活性相関により、阻害活性に重要なアミノ酸残基の同定や二次構造と阻害活性の相関を解析した。Smad 応答性デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイにて阻害活性を測定し、N 末端から 7 番目の Tyr 残基および C 末端領域に複数存在する Leu や Ile 残基、さらに  $\alpha$  ヘリックス形成能の維持が阻害活性に重要性であることを新たに導いた。これらの知見は、治療に適用可能な高活性マイオスタチン阻害ペプチドの創製に有用であると考えている。

# 末梢神経系ミエリン構成分子 L-MPZ による stop codon readthrough 評価系の検討

○山口宜秀、大谷嘉典、林明子、石橋智子、田口晃弘、濱田圭佑、 林良雄、馬場広子 東京薬大・薬

Duchenne 型筋ジストロフィーを始め、遺伝子翻訳領域内に生じた nonsense 変異により機能 タンパク質が産生されず発症する重篤な疾患が多く存在する。これらの治療薬として、 nonsense 変異により生じた stop codon を翻訳時に readthrough させ機能性タンパク質を産生させる薬 (readtrhough 薬) が期待され、開発が進められている。一方、生体では翻訳時の stop codon の readthrough により C 末部に新たなドメインを付加しタンパク質の多様性を生み出すシステムの存在がウィルスからショウジョウバエで知られており、最近はヒトを含む高等動物においてもその存在が注目されている。このため、これから readthrough 薬を開発し、臨床応用していく上で、正常な遺伝子発現時に生じる生理的な readthrough に対する薬の影響を考慮することは重要である。本研究では、正常末梢神経組織中で myelin protein zero (P0) mRNAの readthrough によって産生される Large myelin protein zero (L-MPZ) を用いて、正常組織でreadthrough が生じる機序およびその生理的意義を明らかにするとともに in vitro および in vivo における readthrough 薬の評価系を確立することを目標とし研究を行っている。

L-MPZ は、P0 翻訳時の stop codon readthrough により C 末端側に 63 アミノ酸が付加された分子であり、P0 と共に正常な末梢神経髄鞘 (ミエリン) の構成成分として存在する。これまでの *in vitro* 転写/翻訳系を用いた解析では、P0 遺伝子の生来の stop codon 前後の DNA 配列が L-MPZ 産生のための readthrough 効率に影響することを明らかにしている。また確立した *in vitro* 転写/翻訳系を用い、本学薬品化学教室(林良雄教授)で開発された negamycin 系候補薬 7種の readthrough 効率を調べ、TCP112 が他と比べ高い活性を示すことを明らかにした。 さらに培養細胞系および末梢神経に対する readthrough 薬の影響を調べた。培養細胞による強制発現系では、TCP112 を含む 3種の薬で P0 mRNA に対する高い readthrough 活性が認められた。その中で細胞膜透過率が高いと考えられた TCP1109 の坐骨神経内への直接投与により L-MPZ/P0 比が約 30%増加し、*in vivo* における readthrough 活性が示された。また aminoglycoside系 readthrough薬 G418を投与した群では、組織障害、伝導速度低下および歩行障害が見られたのに対して、TCP1109 投与群では明らかな神経系への影響は見られなかった。今後、L-MPZ など正常組織内に存在する readthrough 産物の機能を明らかにし、これらへの影響を解析することで、安全な readthrough薬の開発が期待される。

#### O - 5

ミオスタチン阻害ペプチドを用いたがん悪液質改善効果

○伊東史子<sup>1</sup>、尾嶋千遥<sup>1</sup>、宮本樹<sup>1</sup>、渡部琢也<sup>1</sup>、高山健太郎<sup>2</sup>、林良雄<sup>2</sup>
<sup>1</sup>東京薬大・生命、<sup>2</sup>東京薬大・薬

#### 【背景・目的】

がん悪液質は、末期がん患者でみられる継続的筋肉量の低下を特徴とする進行性の栄養不良症候群であり、筋肉量の維持によりがん悪液質を改善できると期待されている。そこで、筋肉分化を負に制御するミオスタチン(MSTN)シグナルに注目した。ミ MSTN は TGF-βファミリーに属するサイトカインであり、骨格筋から産生されて骨格筋細胞の分化・増殖作用を負に制御している。我々が報告した、マウス MSTN 前駆体由来の MSTN 阻害活性を有する Peptide 2 (J. Med. Chem., 2015) を利用して、がん悪液質の改善効果について検討した。

#### 【実験方法】

C57BL/6 雄マウス(7 週齡)の背部皮下に、Lewis lung carcinoma (LLC) を 5×10<sup>5</sup> cells/匹移植してがん悪液質モデルマウスを作成した。筋肉量の減少と体重変化を指標にエンドポイントを設定した。担がんモデルマウスに Peptide-2 を筋肉内投与し、治療効果は、腫瘍の重量、体重変化、筋肉量の変化、腓腹筋重量、心筋重量、Grip strength、脂肪重量、筋肉細胞内タンパク質濃度の変化を測定して評価した。さらに、Apc 遺伝子の変異による家族性大腸腺腫症のモデルマウス (APC マウス)を利用して、Peptide-2 の治療効果を評価した。

#### 【結果・考察】

LLC を移植すると、3 週間で筋肉の消耗が確認でき、がん悪液質モデルマウスとなることがわかった。このモデルマウスに Peptide 2 を投与したところ、生理食塩水を投与したコントロールマウスと比較して筋肉の萎縮が改善され、腫瘍重量が減少し、生存期間が延長した。 さらに、がん悪液質モデルマウスでは Grip strength が低下したのに対し、Peptide 2 投与により Grip strength の増強も確認された。しかしながら、脂肪重量、筋肉細胞のタンパク質濃度には影響を与えなかった。APC マウスに Peptide-2 を投与すると、体重の減少が改善することがわかった。これらの結果より、がん悪液質モデルマウスにおいて Peptide-2 を投与すると、がん悪液質が維改善できることが明らかとなった。

## ヒトラミニン α 5 鎖 G ドメインの細胞接着部位の同定

○熊井準、片桐文彦、保住建太郎、吉川大和、野水基義 東京薬大・薬

#### 【背景・目的】

ラミニンは基底膜に存在する  $\alpha$  鎖、  $\beta$  鎖、  $\gamma$  鎖のヘテロ三量体から成る巨大タンパク質として知られ、細胞接着や細胞遊走など多くの生物学的機能を有している。  $\alpha$  鎖の C 末端側には 5 つの LG モジュールから成る G ドメイン部位が存在しラミニンの生物学的機能の中心的役割を担っていると考えられている。近年、ヒト ES/iPS 細胞においてヒトラミニン 511 およびヒトラミニン 511E8 フラグメントは、インテグリン  $\alpha$  6  $\beta$  1 を介した強い細胞接着能を示し、ヒト ES/iPS 細胞培養基質として有用であることが見出されてきた。しかし、ラミニン 511 の精製は高コストでありさらなるヒト ES/iPS 細胞を用いた臨床研究の発展には安価で簡便なバイオマテリアルの開発が求められている。本研究は、新たなヒト ES/iPS 細胞培養基材の開発を目指し、ヒトラミニン  $\alpha$  5 鎖 G ドメインの細胞接着部位の同定を行うこととした。

#### 【実験方法】

ヒト ES/iPS 細胞の培養基質として利用されているヒトラミニン-511 の中で重要な役割を担っている G ドメインに注目し、ヒトラミニン $\alpha$ 5 鎖 G ドメインを網羅する 115 種類の合成ペプチドを用いて、細胞接着部位の同定を行った。方法としてペプチドをプレートにコートする方法とペプチドをキトサンマトリックスに固定化したペプチド-キトサンマトリックスを用いる方法で網羅的な解析を行った。

#### 【結果・考察】

ヒト皮膚繊維芽細胞を用い、細胞接着活性について検討したところ 115 種類のペプチドのうち、18 種類の生物活性配列が同定され、2 種類のペプチド及び 2 種類のペプチド-キトサンマトリックスが EDTA のみで阻害されたことから、これらのペプチド活性配列はインテグリンを介した細胞接着であることが示唆された。さらに、hA5G66d(NLGSVNVS)-キトサンマトリックスは、インテグリン  $\alpha$  3  $\beta$  1 およびインテグリン  $\alpha$  6  $\beta$  1 と相互作用することがわかった.この結果からこれらのペプチドは多様な機能を有するラミニンの分子メカニズムを解明する上で、有用なツールとなることが期待される。また、hA5G66d-キトサンマトリックスは、インテグリン  $\alpha$  3  $\beta$  1 およびインテグリン  $\alpha$  6  $\beta$  1 を介して細胞と相互作用していることから、ヒト ES/iPS 細胞の培養基材としての応用が期待できる。

# 血管内皮細胞の接着および管腔形成における ラミニン α5 鎖 short arm 領域活性ペプチドの同定

○菅原由美香、原島望、藤井翔悟、碇和樹、熊井準、片桐文彦、保住建太郎、 吉川大和、野水基義 東京薬大・薬

#### 【背景・目的】

血管において、基底膜が血管内皮細胞と平滑筋細胞の間に介在しており、血管内皮細胞の挙動は、基底膜構成成分の相互作用に大きく影響される。ラミニンは、基底膜の主要な構成成分の1つで、 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖、 $\gamma$ 鎖から成る糖タンパク質である。これらは、5 種類の $\alpha$ 鎖、3 種類の $\beta$ 3 種類の $\beta$ 4 は、 $\beta$ 4 は、 $\beta$ 5 には、 $\beta$ 6 をいる。血管の基底膜では、 $\beta$ 7 をいる。 $\beta$ 7 は、 $\beta$ 8 には、 $\beta$ 8 には、 $\beta$ 9 には、 $\beta$ 9 をいる。 $\beta$ 9 には  $\beta$ 9 に  $\beta$ 9 に

#### 【結果・考察】

本研究では、組換えタンパク質および合成ペプチドを用いて、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs)に対する活性アミノ酸配列を同定した。α5 鎖の short arm 領域は、3 つの球状ドメイン(LN, L4a, L4b)ドメインおよび3 つの棒状ドメイン(LEa, LEb, LEc)が LN-LEa-L4a-LEb-L4b-LEc で構成されている。この領域の組換タンパクを作製し HUVECs の細胞接着アッセイを調べたところ、α5 LN-LEa 領域で RGD 非依存的な細胞接着活性が示された。そこでα5LN-LEaのアミノ酸配列を網羅する 70 種類のペプチドを合成したところ、A5-16(LN 領域内:LENGIVVSLVNGR)が HUVECs の強力な細胞接着を示した。さらに N 末端および C 末端を欠損させたペプチドを合成し、A5-16 の細胞接着活性中心配列を調べた。その結果、アミノ酸配列(IVVSLVNGR)が、A5-16 の血管内皮細胞に対する接着活性の中心配列であることが示された。このペプチドへの細胞接着は、二価イオンとへパラン硫酸に依存していた。HUVECsはマトリゲル上で、毛細管様の管腔形成を起こすことが知られている。A5-16 存在下で血管内皮細胞の管腔形成は阻害され、短く管腔を伴った小さな細胞集塊を形成した。また、A5-16の管腔形成へ影響を及ぼす活性中心配列は、アミノ酸配列(EIVVSLVNGR)であった。以上の結果より、このアミノ酸配列は人工血管などにおいて内皮細胞を接着させるバイオマテリアルのデザインに利用されることが期待される。

ラミニン-511 に対する細胞接着の抑制による細胞運動の促進

○田中悠介、原島望、菅原由美香、碇和樹、片桐文彦、 保住建太郎、野水基義、吉川大和 東京薬大・薬

#### 【背景・目的】

基底膜は、特殊化した薄い膜上の構造体で、全身に広く存在している。正常な上皮組織における基底膜は、細胞を秩序良く接着させ組織の安定化を担っている。しかしながら、悪性化を起こした癌細胞は、細胞と基底膜の接着メカニズムを破綻させ、癌の浸潤や転移に特徴的な細胞運動を促進するようになる。基底膜の構成成分は、主にIV型コラーゲン、ラミニン、ニドゲン、パールカンからなっており、これらの成分のなかでもラミニンが癌細胞の接着や運動に関与すると示されてきた。  $\alpha$ 5、 $\beta$ 1、 $\gamma$ 1 鎖で構成されるラミニン-511(LM-511)は、成体の基底膜において主要な構成成分であり、癌細胞と相互作用する可能性が高い。LM-511 に結合する受容体には、インテグリン  $\alpha$ 3 $\beta$ 1、 $\alpha$ 6 $\beta$ 1、 $\alpha$ 6 $\beta$ 4、Lutheran (Lu)、B-CAM があり、特に Luと B-CAM は特異的な受容体として知られている。また、Luと B-CAM に共通な細胞内ドメイン領域には、細胞骨格タンパク質のひとつであるスペクトリンが結合する。しかしながら、これらの受容体や細胞内のタンパク質がどのようなメカニズムを介して、LM-511 に接着する細胞が動きに変化を起こすか明らかになっていない。

#### 【結果・考察】

Lu と B-CAM の共通する細胞内ドメインには、細胞骨格スペクトリンが結合するモチーフ (Arg<sup>573</sup>Lys<sup>574</sup>)が知られている。本研究では、ラミニン-511 によって促進される細胞運動における Lu/B-CAM とスペクトリンの相互作用の役割を明らかにするため、 Arg<sup>573</sup>Lys<sup>574</sup> を Ala で置換した Mutant Lu 遺伝子を作製し、Lu/B-CAM を発現していないヒト線維肉腫細胞 HT1080 に導入した。その結果、Mutant Lu を発現する細胞は、wild type Lu を発現する細胞よりもラミニン-511 に対する細胞接着が弱くなった。一方、ラミニン-511 上での細胞運動は wild type Lu を発現する細胞よりも促進された。これらのことから、Lu/B-CAM とスペクトリンの相互作用が、ラミニン-511 に対する細胞接着および運動を制御していることが明らかとなった。また、これらの wild type Lu と Mutant Lu のスペクトリン結合能を確認したところ、抗スペクトリン抗体による免疫沈降では、wild type Lu とスペクトリンの結合が検出され、Mutant Lu では結合が減少すると確認された。しかしながら、抗 Lu 抗体による免疫沈降では、wild type Lu でさえスペクトリンとの結合が検出されなかったことから、Lu が過剰に存在するとスペクトリンと相互作用できない Lu が存在することを示した。癌組織などでは、Lu/B-CAM の過剰な発現またはスペクトリンの発現減少などにより、Lu/B-CAM とスペクトリン相互作用が破綻することで、ラミニン-511 を含む基底膜へ浸潤していくことが示唆された。

ラミニンα2鎖由来ペプチドを用いた筋細胞選択的リポソームの開発

○佐々木愛理、指田紗菜恵、片桐文彦、吉田彰宏、平島真一、三浦 剛、 新槙幸彦、吉川大和、野水基義、根岸洋一 東京薬大・薬

#### 【背景・目的】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は、筋繊維の破壊・壊死(筋壊死)が起こり、次第に筋萎縮と筋低下が進行していく遺伝性筋疾患である。DMDの遺伝子治療法として、遺伝子配列特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド(AON)を細胞内に導入し、mRNAのスプライシング時イントロンとともに変異のあるエクソンをスキップさせることで、ジストロフィンタンパク質の発現を回復させるエクソン・スキッピング療法が検討されている。昨年、AONの一つである化学修飾によって生体内での安定性を向上させた phosphorodiamidate morpholino oligomer (PMO)の臨床応用がスタートしているが、PMO は筋細胞に取り込まれにくく、高い有効濃度を要するという問題点があることから、低投与量化を可能とするDDS 開発は、重要課題と考えられる。

当研究室では遺伝子導入法の開発のため、DMD モデルマウス (*mdx*) に対してバブルリポソームと超音波照射併用による PMO 導入による治療効果について検討してきた。より効率的な遺伝子治療法の確立をするため、本研究では、筋細胞に豊富に発現しているジストログリカンに親和性を持つ A2G80 ペプチド (野水らにより同定)を使用し、リポソームに筋細胞への標的指向性を持たせることができるか否かについて検討した。

## 【方法】

基本脂質として 1.2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC)、distearoyl phospatidyl ethanol amine-PEG<sub>2000</sub>-OMe (DSPE-PEG<sub>2000</sub>-OMe)、distearoyl phospatidyl ethanol amine-PEG<sub>2000</sub>-maleimide (DSPE-PEG<sub>2000</sub>-Mal)を用いた。初めに DSPC:DSPE-PEG<sub>2000</sub>=94:4 の脂質に、脂質量に対して 0.2 mol%となるように DiI を加え、REV 法にてリポソームの調製を行った。次にポストインサーション法により DSPE-PEG<sub>2000</sub>Mal-A2G80 を加えて、一定時間反応させ、A2G80-修飾リポソームを作製した。それぞれの粒子径を NICOMP で測定した。

この A2G80-修飾リポソームをマウス組織切片に添加し、標的指向性の評価を行った。 C57BL/6 マウス、*mdx* マウスの脛骨筋、肝臓の凍結切片を作製し、そこに A2G80-リポソームを添加した。このサンプルを蛍光顕微鏡にて観察した。

#### 【結果及び考察】

作製したリポソームの粒子径は、全て 150~200 nm 程度であった。組織切片へのリポソーム添加実験では、C57BL/6、mdx マウス脛骨筋組織切片のどちらも未修飾リポソームと比較し、細胞膜への強い相互作用性が確認された。他の臓器では、細胞膜への相互作用は、ほとんど認められなかった。以上より、A2G80-修飾リポソームは筋細胞膜への高い選択性を有することが示唆された。今後は in vitro における細胞内導入の検討、in vivo におけるリポソームの体内挙動についての検討を行う予定である。

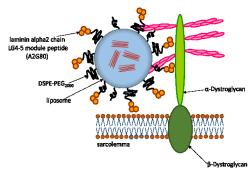


Fig. 1. 筋細胞選択的リポソーム

# バブルリポソームと超音波照射併用による mdx マウス横隔膜への核酸デリバリーとその有用性評価

○指田紗菜恵<sup>1</sup>、道鎮えりか<sup>1</sup>、片桐文彦<sup>1</sup>、韮沢 慧<sup>1</sup>、佐々木愛理<sup>1</sup>、 髙橋葉子<sup>1</sup>、丸山一雄<sup>2</sup>、新槇幸彦<sup>1</sup>、野水基義<sup>1</sup>、根岸 洋一<sup>1</sup> 「東京薬科大学・薬、<sup>2</sup>帝京大学・薬

#### 【背景・目的】

デュシャンヌ型筋ジストロフィー(DMD)の治療法として、近年、エクソン・スキッピング療法が検討されている。しかしながら、その治療にはアンチセンスオリゴヌクレオチド (AON)の高用量・高頻度の投与が必要とされる。これまでに我々はバブルリポソーム(BL)と超音波(US)照射を併用することで、心筋や骨格筋でのジストロフィンの効率的なタンパク質発現が可能となることを示してきた。本研究では横隔膜でのジストロフィンの発現回復を目指し、DMDモデルマウス(mdx)に対し、ジストロフィン遺伝子のエクソンスキッピングを誘導可能な AON (phosphorodiamidate morpholino oligonucleotides: PMO)をバブルリポソームと超音波照射併用により、横隔膜骨格筋組織への核酸デリバリーを試み、本デリバリーシステムの有用性を評価した。

#### 【方法】

構成脂質である DPPC および DSPE-PEG2000 にアニオン性脂質を含有させたリポソームに 超音波造影ガスを封入し PMO 搭載用のバブリポソームを調製した。次に PMO にカチオン 性ペプチドを連結させたものをアニオン性脂質含有バブリポソームへと搭載し、相互作用性 をフローサイトメトリー (FACS) にて評価した。DMD モデルマウスとして、mdx マウス ( $\mathcal{S}$ , 5 週齢) を使用した。mdx に対し、PMO と BL の混合溶液を尾静脈あるいは、腹腔内投与し、直ちに体外から横隔膜へと超音波照射した。2 週間後の横隔膜を回収し、ジストロフィンタンパク質発現を組織学的に調べた。

#### 【結果・考察】

バブルリポソームへの効率的な PMO 搭載が認められた。横隔膜骨格筋組織では、PMO 単独投与群では、ジストロフィンの発現が認められなかったのに対し、バブルリポソームと超音波照射群では、ジストロフィンタンパク質の陽性筋線維数の増加が認められた。以上のことから、バブルリポソームと超音波照射の併用システムは、横隔膜骨格筋組織における有用な AON デリバリーシステムとなりうると期待された。

バブルリポソームと超音波照射を併用したゲノム編集用プラスミド DNA 導入によるデュシェンヌ型筋ジストロフィー遺伝子治療法の開発

# ○道鎮えりか、髙橋葉子、新槇幸彦、根岸洋一 東京薬大・薬

#### 【背景・目的】

筋ジストロフィーは、筋線維の変性・壊死によって筋力低下・筋委縮が進行する遺伝性疾患であり、その中で最も発症頻度が高く重症のものが、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD)である。その原因は、筋細胞の機械的安定に寄与するタンパク質であるジストロフィンの遺伝子変異である。 近年では、DMD の遺伝子治療法として、ゲノム編集を用いて特定の塩基配列を除去したり、修復したりすることでジストロフィンタンパク質を発現させる治療法も注目されつつある。これまでに当研究室ではバブルリポソームが、有用な遺伝子導入キャリアとなることを示してきた。

本研究では、より効率的な DMD 遺伝子治療システムを開発するため、DMD モデルマウス (mdx)に対し、バブルリポソームと超音波照射併用によるゲノム編集用プラスミド DNA の導入を試み、治療効果の有無について検討した。今回は、ゲノム編集により、ジストロフィン遺伝子 Exon23 (ストップコドンを有する) の除去を行い、バブルリポソームと超音波照射併用による導入効率の向上と治療効果の有無について検討した。

#### 【実験方法】

mdx (♂、5-6 週齢)の脛骨筋へゲノム編集用プラスミド DNA とバブルリポソームの混合溶液を投与し、2 週間後に筋組織を回収した。その後、免疫染色法にてジストロフィンタンパク質の発現回復を確認した。さらに PCR 法にてゲノム DNA をテンプレートとし、Exon23 領域を増幅させたのち、電気泳動にて欠損バンドの確認を行った。

#### 【結果・考察】

免疫染色法にてジストロフィンタンパク質の 発現回復を確認した結果、プラスミド DNA 単独 投与群と比較して、バブルリポソームと超音波 併用群でジストロフィンタンパク質の向上が示 された。また、PCR の結果より、欠損バンドを 観察することができ、ゲノムレベルで遺伝子変 異が修復されている可能性が示された。以上の 結果から、バブルリポソームと超音波照射の併 用法は、DMD 治療を目的とするゲノム編集ツー ルの有用なデリバリーシステムとなりうると期 待される。

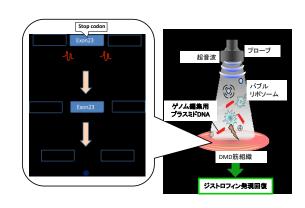


Fig. 1. パブルリポソームと超音波併用によるゲノム編集技術を用いた DMD 治療戦闘

# ラミニンα2鎖由来ペプチドを利用した polyplex による 筋細胞選択的遺伝子デリバリーシステムの開発

○ 韮沢 慧、片桐文彦、佐々木愛理、新槇幸彦、吉川大和、野水基義、根岸洋一 東京薬大・薬

#### 【背景・目的】

筋ジストロフィーは、筋線維の変性・壊死によって筋力低下・筋委縮が進行する遺伝性疾患であり、その中で最も発症頻度が高く重症のものが、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD)である。その原因は、筋細胞骨格形成タンパクであるジストロフィンが遺伝子変異により産生されなくなることである。近年、筋ジストロフィー治療のための核酸医薬などが開発されつつあるが、その細胞内移行性向上のための送達システムの開発が求められている。最近、筋細胞に高発現しているジストログリカンに対して親和性のあるラミニン  $\alpha 2$  鎖モジュール由来のペプチド (A2G80) が野水らにより報告された。そこで本研究では、この A2G80にカチオン性ペプチド (R9) を連結させた A2G80-R9 とプラスミド DNA (pDNA) を複合化 (polyplex) し、筋細胞選択的な遺伝子デリバリーシステムの確立を目指す。今回は、作製した polyplex の物性評価とマウス筋芽細胞由来の C2C12 およびマウス胎児皮膚細胞由来の NIH3T3 を用いた遺伝子導入能を評価した。

#### 【実験方法】

A2G80-R9 と pDNA の混合後、室温で 10min の incubation を行い polyplex とした。物性評価として、アガロースゲル電気泳動による polyplex 形成の確認、DLS による粒子径測定と NICOMP を用いた  $\zeta$  電位測定を行った。また Luciferase assay および MTT assay により、A2G80-R9 で形成した polyplex の N/P 比依存的な C2C12 への遺伝子導入効率と細胞傷害性の変化を比較検討した。また、対象実験として NIH3T3 への遺伝子導入、A2G80R9 の scramble を用いた polyplex による C2C12 への遺伝子導入、更には単体の A2G80 添加による競合実験を行い A2G80 の配列依存的な遺伝子導入効果について検討した。

#### 【結果・考察】

A2G80R9 を用いた polyplex は N/P 比 3 以上で 50 nm 程度の粒子径と中性域の  $\zeta$  電位を示し、C2C12 への遺伝子導入においては、scramble を用いた polyplex に比べて N/P 比依存的な、高い導入効率を示した。N/P 比 10 以上では顕著な細胞傷害性を示した。また NIH3T3 への遺伝子導入においては、A2G80R9 を用いた polyplex においても高い活性は確認されなかった。競合実験においては配列依存的な遺伝子導入が起きていることが示唆された。

以上のことから、A2G80R9を用いた polyplex は、A2G80 とジストログリカンと相互作用することで、筋細胞選択的な遺伝子導入を可能にしていると考えられる。今後は、筋疾患治療に有用な遺伝子デリバリーシステムの開発に向け更なる検討を進めていく予定である。

# マレイミドへの付加反応に基づくペプチド-PEG-脂質の 効率的合成法の開発

○吉田彰宏、根岸洋一、片桐文彦、佐々木愛理、指田紗菜恵、平島真一、 野水基義、三浦 剛 東京薬大・薬

#### 【背景・目的】

細胞選択的なペプチド、ポリエチレングリコール(PEG)、および脂質ユニットを含む "ペプチド-PEG-脂質"は、ドラッグデリバリーシステム (DDS) キャリアとしてのリポソームに、標的指向性を付与する機能素子として使用されている。しかしながら、個々のペプチドに適した反応条件を用いなければ、高純度のペプチド-PEG-脂質を合成することはできない。今回、高純度のペプチド-PEG-脂質を効率的に入手できる方法論を確立するために、マレイミド構造を有する PEG-脂質へのペプチドの付加反応について検討した。 具体的には市販の脂質-PEGマレイミド構造を有する SUNBRIGHT® DSPE-PEG-MAL に対して、システインを N 端残基とするペプチドのスルファニル基 (-SH) を共役付加させて合成する反応条件および得られた付加生成物の精製法について詳細に検討した。

### 【実験方法】

システインを N 端残基とするペプチドの水溶液へ SUNBRIGHT® DSPE-PEG-MAL の水溶液 を加え,室温で反応させた。反応終了後,逆相 HPLC にて精製した。

$$C_{17}H_{35} \longrightarrow C_{17}H_{35} \longrightarrow C_{1$$

#### 【結果・考察】

反応条件(基質の当量、pH、濃度、時間)を種々検討したところ、用いるペプチドによって異なる点はあるものの、ペプチドを DSPE-PEG-MAL に対して小過剰とし、反応溶媒に各種緩衝液ではなく水を用い、 $1 \, mg/mL$  のペプチド水溶液として室温 6-24 時間反応させる条件で目的の付加体が効率よく得られ、HPLC 分取も容易であることを見出した。

今後,システインを N 端残基とする種々のペプチドを用いることで,様々なペプチド-PEG-脂質を合成できると考えられる。

# マレイミドへの有機触媒的不斉共役付加反応の開発

# ○中島康介、河田雅宏、平島真一、古石裕治、三浦 剛 東京薬大・薬

#### 【背景・目的】

キラルなスクシンイミド骨格は天然物や医薬品候補化合物の中心骨格としてその構造中に散見される。このような構造はマレイミドを出発物質として遷移金属や有機分子触媒を用いた環化付加反応、共役付加反応により誘導することができる。しかし、有機分子触媒を用いたマレイミドに対する共役付加反応において、マイケルドナーとして単純な構造のケトンを用いた反応例は少ない。発表者らはより高効率な有機分子触媒の開発を目的として、水素結合供与による反応基質の活性化能に着目し、これまでにジアミノメチレンマロノニトリル(DMM)触媒を既に報告している。<sup>1)</sup> 今回、さらに強力な水素結合供与能を有することを予測して開発したジアミノメチレンインデンジオン(DMI)触媒を用いて、マレイミドと単純なケトンとの不斉共役付加反応について検討した。<sup>2)</sup>

#### 【実験方法】

モデル反応として、acetone の N-phenylmaleimide に対する不斉共役付加反応について検討を行った。種々の有機分子触媒を用いて最適な有機触媒を選定した後、反応条件の最適化を詳細に行った。また、acetone 以外のケトン類、アルデヒド類についても検討を行った。

#### 【結果・考察】

種々の有機分子触媒を用いて検討した結果、DMI型有機触媒 1 を用いて、p-xylene 中、40℃ で 48 時間反応させることで、良好な収率、立体選択性で付加体 2 を得ることに成功した。今後、本方法論を用いて機能性ペプチド-脂質複合体の合成に応用展開することを目指す。

$$F_3C$$
 $N-Ph$ 
 $N-Ph$ 

#### 【文献】

- 1) T. Miura et al. Tetrahedron Lett. 2013, 54, 4896.
- 2) K. Nakashima et al. Tetrahedron: Asymmetry 2016, 27, 888.

# 有機触媒を用いたケトンの不斉ヒドロホスホニル化反応の開発

# ○新井亮雅、平島真一、中島康介、古石裕治、三浦 剛 東京薬大・薬

#### 【背景・目的】

 $\alpha$ -Hydroxy phosphonate は炭素-リン結合の安定性から生体内で安定であり、生体内リン酸エステルの安定なミックとしてリン酸部分の構造修飾に利用され、生物活性化合物の機能性素子として期待されている。不斉炭素中心を有する  $\alpha$ -hydroxy phosphonate はカルボニル化合物と phosphite の不斉ヒドロホスホニル化反応により合成されるが、アルデヒドやイミンなど反応性の高い基質において数多く報告されている。しかしながら、ケトン類に対する不斉ヒドロホスホニル化はケトンの反応性の低さと立体制御の難しさから報告例は非常に少ない。当研究室では、ジアミノメチレンマロノニトリル(DMM)型有機分子触媒の開発に成功しており、アルデヒドに対する不斉ヒドロホスホニル化反応が高収率、高立体選択的に進行することを報告している。 $^{1}$  今回、DMM 型有機分子触媒を用いたケトンに対する不斉ヒドロホスホニル化の検討を行ったので報告させて頂く。

DMM 型有機分子触媒 1 の存在下、acetophenone 2 と diphenyl phosphite 3 をトルエン中、- 60 °C で 74 時間反応させることによって、高いエナンチオ選択性で四置換不斉炭素を有する  $\alpha$ -hydroxy phosphonate 4 を得ることに成功した。興味深いことに、代表的な水素結合供与ユニットであるチオウレア型やスクアラミド型有機分子触媒よりも、当研究室で開発した DMM 型有機分子触媒の方がより高い立体選択性を与えることが分かった。

本シンポジウムでは、ケトンの不斉ヒドロホスホニル化反応における触媒構造検討、最適 条件検討、および反応基質一般性について報告する予定である。

#### 【文献】

1) S. Hirashima, R. Arai, K. Nakashima, N, Kawai, J. Kondo, Y. Koseki, T. Miura *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 3863.

マウス由来マイオスタチン阻害ペプチドの網羅的構造活性相関研究1

○高山健太郎、淺利 知、中村明里、佐賀裕介、嶋田嵩大、 田口晃弘、谷口敦彦、林 良雄 東京薬大・薬

#### 【背景・目的】

TGF- $\beta$ スーパーファミリー分子の一つであるマイオスタチンは、骨格筋量を負に制御するタンパク質である。近年、このマイオスタチンの機能を阻害することで、筋萎縮性疾患の治療薬を創製する試みが注目されている。我々は、マイオスタチン前駆体タンパク質のプロドメイン部分が成熟マイオスタチンを不活性化することに着目した。すなわち、マウス由来プロドメインの探索から、最小阻害ペプチド 1 (23aa, WRQNTRYSRIEAIKIQILSKLRL-amide) の獲得に成功した [1]。そして、ペプチド 1 が、(1) CD スペクトル測定により $\alpha$  ヘリックス構造を形成すること、(2) SPR 解析により約 30 nM の  $K_D$  値をもってマイオスタチンに親和性を示すこと、(3)筋肉内投与により約 20%の筋重量増加をもたらすことを報告した[1]。また、(4) 効果的なマイオスタチン阻害活性の発現には、N 末端 Trp 残基が重要性であることを見出した[1]。筆者らは、より強力な阻害ペプチドの開発をめざし、ペプチド 1 の網羅的な構造活性相関研究に着手した。本発表では、Ala スキャンを基盤とした阻害活性に重要なアミノ酸残基を同定及び Pro 置換に基づく二次構造と阻害活性の相関について述べる。

#### 【実験方法】

本研究に用いた、すべてのペプチド誘導体は Fmoc 固相合成法により合成し、そのマイオスタチン 阻害活性は、Smad 応答性デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイにより解析した。また二次構造解析は、CD スペクトルを測定することにより実施した。

#### 【結果・考察】

阻害活性に基づく網羅的な構造活性相関を実施した結果、ペプチド 1 に於ける効果的なマイオスタチン阻害の発現には、1)マウス配列に由来する N 末端から 7 番目に位置する Tyr 残基、2) C 末端領域に存在する複数の Leu 及び IIe 残基が重要であること、さらに、3)ペプチドの $\alpha$  ヘリックス構造形成能が重要であることが明らかとなった[2]。これらの結果は、今後の高活性マイオスタチン阻害剤の創製に有用な知見を与えるものと考えられる。

#### 【参考文献】

- [1] Takayama, K.; Noguchi, Y.; Aoki, S.; Takayama, S.; Yoshida, M.; Asari, T.; Yakushiji, F.; Nishimatsu, S.; Ohsawa, Y.; Itoh, F.; Negishi, Y.; Sunada, Y.; Hayashi, Y. J. Med. Chem. 2015, 58, 1544.
- [2] Asari, T.; Takayama, K.; Nakamura, A.; Shimada, T.; Taguchi, A.; Hayashi, Y. ACS Med. Chem. Lett. **2017**, *8*, 113-117.

マウス由来マイオスタチン阻害ペプチドの網羅的構造活性相関研究2

○Cédric Rentier、高山健太郎、中村明里、佐賀裕介、嶋田嵩大、齋藤まりこ、 六本木佳美、田口晃弘、谷口敦彦、根岸洋一、林 良雄 東京薬大・薬

#### 【背景・目的】

マイオスタチンは骨格筋量を負に制御する機能を有することから、近年、筋萎縮性疾患治療薬創製の標的として注目されている。我々は、マウスマイオスタチン前駆体プロドメインから、阻害ペプチド  $\mathbf{1}$  (23aa, WRQNTRYSRIEAIKIQILSKLRL-amide) の獲得に成功しており、筋肉内投与により約 20%の筋重量増加をもたらすことを報告した[1]。また、ペプチド  $\mathbf{1}$  に関して既に、(1) Ala スキャンにより活性発現に重要なアミノ酸残基、(2) CD スペクトル測定により  $\alpha$  ヘリックス構造形成能の重要性、(3) SPR 解析により約 30 nM の  $K_D$  値をもってマイオスタチンに親和性を示すことを明らかとしている[1,2]。更に、阻害活性の強化において、N 末端 Trp 残基の構造活性相関研究から、ペプチド  $\mathbf{1}$  よりも約 3 倍強力な阻害能(IC50値:1.19  $\mu$ M)を示すペプチド  $\mathbf{2}$  (22aa, 2-naphtyloxy-RQNTRYSRIEAIKIQILSKLRL-amide)の創製に成功した[3]。本発表では、より強力な阻害ペプチドの開発をめざし、ペプチド  $\mathbf{1}$  の活性に重要な疎水性分岐鎖アミノ酸、及び Ala スキャンで未検討の Ala に着目した各種誘導体を合成し、構造と阻害活性の相関について検討した。

#### 【実験方法】

本研究に用いた、すべてのペプチド誘導体は Fmoc 固相合成法により合成し、そのマイオスタチン 阻害活性は、Smad 応答性デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイにより解析した。また二次構造解析は、CD スペクトルを測定することにより実施した。

#### 【結果・考察】

マイオスタチン阻害活性に基づく網羅的な構造活性相関を実施した結果、ペプチド 2 において、1) C 末端から 6 番目に位置する Leu 残基を Ile 残基に、2) Ala 残基を Trp 残基に置換した新規ペプチド誘導体が  $0.32~\mu M$  の  $IC_{50}$  値を示した。これらの結果は、今後の高活性マイオスタチン阻害剤の創製に有用な知見を与えるものと考えられる。

#### 【参考文献】

- [1] Takayama, K.; Noguchi, Y.; Aoki, S.; Takayama, S.; Yoshida, M.; Asari, T.; Yakushiji, F.; Nishimatsu, S.; Ohsawa, Y.; Itoh, F.; Negishi, Y.; Sunada, Y.; Hayashi, Y. J. Med. Chem. 2015, 58, 1544.
- [2] Asari, T.; Takayama, K.; Nakamura, A.; Shimada, T.; Taguchi, A.; Hayashi, Y. ACS Med. Chem. Lett. **2017**, 8, 113-117.
- [3] Takayama, K.; Nakamura, A.; Rentier, C.; Mino, Y.; Asari, T.; Saga, Y.; Taguchi, A.; Yakushiji, F.; Hayashi, Y. *ChemMedChem.* **2016**, 111, 845.

(+)-ネガマイシンを基盤とした高活性リードスルー化合物の創製と その作用機構解析を目的とした多剤超感受性酵母株の構築

○濵田圭佑<sup>1</sup>、田口晃弘<sup>1</sup>、村上沙織<sup>1</sup>、鈴木奈々<sup>1</sup>、小林美咲<sup>1</sup>、新井実咲<sup>1</sup>、 高山健太郎<sup>1</sup>、谷口敦彦<sup>1</sup>、臼井健郎<sup>2</sup>、林 良雄<sup>1</sup> <sup>1</sup>東京薬大・薬、<sup>2</sup> 筑波大・生命環境系

#### 【背景・目的】

ヒト遺伝性疾患の約 10~20%はエクソン内のナンセンス突然変異(未熟終止コドン、premature termination codon; PTC)に起因する。近年その治療法として、mRNA 上の PTC をリボソームでのタンパク質合成の段階で読み飛ばし(リードスルー)することで、機能を持つ完全長タンパク質を発現させる方法が提唱されており、ナンセンス変異疾患克服の一手段として注目を集めている。1970 年に放線菌(Streptomyces purpeofuscus)から単離同定されたジペプチド様抗生物質 (+)-ネガマイシン (1) も、当該活性を有すると報告された化合物の一つである。我々は 1 をリード化合物とし、高活性誘導体の獲得を目指して構造活性相関研究を展開してきた。その結果、1 より強力なリードスルー活性を示す複数の化合物の創製に成功している <sup>1),2)</sup>。しかしながら、高活性誘導体の獲得に必要不可欠な、ネガマイシン類の標的分子や結合部位は未だ明らかとなっていない。さらに、細胞内で通常抑制されているリードスルーが発現するメカニズムも十分に解明されていないのが現状である。

#### 【実験方法】

知念らにより構築された酵母株 12geneΔHSR は、薬剤排出系に関わる 12 遺伝子を破壊するとともに胞子形成能を向上させることにより、遺伝学的解析に必要な形質転換能、接合能、胞子形成能を維持したまま多くの薬剤に対し高い薬剤感受性を示す多剤超感受性酵母である³)。そこで今回 12geneΔHSR を用い、ネガマイシン誘導体の作用機構解析、及びリードスルー活性評価に有効な酵母株の構築を行った。

#### 【結果・考察】

本誘導体のナンセンス変異標的指向性の検討、及び出芽酵母でのリードスルー活性評価系の確立を目的として、12 $gene\Delta HSR$ のアデニン合成遺伝子  $ADE2 \sim PTC$  変異(ochre、amber、または opal)を導入するとともに、PTC 含有 LacZ 遺伝子プラスミド導入を行った。これらの株はアデニンが不足した培地では赤色を呈するがリードスルーが起こると白くなり、さらに LacZの  $\beta$ -galactosidase 活性により当該活性の定量が可能である。発表ではこれらの株を用いたリードスルー活性検討について報告したい。

#### 【参考文献】

- [1] Taguchi, A., Hamada, K., Hayashi, Y., et al., ChemMedChem 2014, 9, 2233-2237.
- [2] Hamada, K., Taguchi, A., Hayashi, Y., et al., ACS Med. Chem. Lett. 2015, 6, 689-694.
- [3] Chinen, T., Ota, Y., Usui, T., et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 2011, 75, 1588-1593.

# 脳虚血誘発神経新生における GSK-3β リン酸化の役割

○喜早慧士、林秀樹、伊藤剛志、浅田眞由美、新井美穂、袁博、高木教夫 東京薬大・薬

#### 【背景・目的】

脳梗塞は直接的な死を免れたとしても重篤な副作用を残す予後不良の疾患である。現在、脳梗塞慢性期に用いられている薬物は再発予防を第一義的な目的としており、治療を目的としたものはほとんど存在しない。脳梗塞慢性期の治療として、内因性の再生機構の一つである神経新生が注目されている。神経新生は、脳梗塞後に一過性に増強されることが知られているが、詳細なメカニズムはいまだ不明である。 $GSK-3\beta$ は中枢神経系に豊富に存在し、様々な細胞機能を制御している。そこで、本研究は、脳梗塞後神経新生の初期段階である神経幹・前駆細胞の増殖・分化過程における $GSK-3\beta$ 情報伝達系の関与を解明するために企画された。

#### 【方法】

Wistar 系雄性ラットの右内頸動脈内に直径  $45\,\mu$  m のマイクロスフェアを 700 個注入しマイクロスフェア脳塞栓(ME)モデルを作製した。術後 1,3,7 および 14 日目の右大脳半球を採取し、ウエスタンブロット法を用いて  $GSK-3\,\beta$  情報伝達系に関わる各種タンパク質の解析を行った。細胞の増殖・分化過程の評価は、蛍光免疫染色法を用いて、術後 7 日目の右海馬歯状回で行った。さらに、 $GSK-3\,\beta$  の上流の PI3K/Akt 経路の阻害剤である Wortmannin (30  $\mu g/kg$ ) を大腿静脈から投与し、 $GSK-3\,\beta$  情報伝達系の脳梗塞後神経新生への関与を検討した。

#### 【結果・考察】

ME 後の PI3K/Akt/GSK-3  $\beta$  情報伝達系の経時的変化を観察した結果、ME 後 7 日目で顕著な活性化を示した。また、ME 後 7 日目の右海馬歯状回では、増殖性細胞のマーカーである Ki67 および神経前駆細胞のマーカーである DCX の両陽性細胞が観察された。さらに、神経細胞への分化に必須の因子である NeuroD 陽性細胞数も増加していた。次に、GSK-3  $\beta$  の上流の PI3K/Akt 経路を阻害した結果、ME 後 7 日目で観察された NeuroD 陽性細胞数の増加が抑制された。最後に、この経路を活性化する因子について検討した。BDNF や IGF-1 は、受容体を介して PI3K/Akt 経路を活性化し、かつ神経新生と密接に関わる成長因子であるが、IGF-1 および BDNF の発現量は術後 7 日目で著しく減少していた。 以上の結果から、ME 後神経新生の細胞増殖および分化過程には、上流因子の解析は今後の課題であるが、PI3K/Akt 経路依存的な GSK-3  $\beta$  のリン酸化を介した NeuroD 発現の増強が関与することが示唆された。

虚血性神経障害時のリポプロテイン受容体 LRP1 の変化と薬物治療に関する研究

○山田まりこ、佐藤祥子、結城もえ、袁博、林秀樹、高木教夫 東京薬大・薬

#### 【背景・目的】

脳血管疾患は我が国の主要な死因の一つであり、要介護認定を受ける疾患の第1位である。 また本疾患の後遺症による QOL 低下が社会的問題となっており、治療薬の開発は急務であ る。脳が虚血状態に陥ると酸化ストレスや興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の大量放出 等が誘導され、細胞死が惹起される。

これまで当研究室は、low density lipoprotein (LDL)受容体ファミリーの受容体の1つである LDL receptor-related protein 1 (LRP1)の活性化が視神経保護効果を発揮することを報告している。そこで本研究では、脳梗塞治療薬開発を最終目標として、LRP1 のリガンドであるリポプロテイン(LP)の神経障害に対する保護効果を初代培養大脳皮質神経細胞を用いて検討した。

#### 【実験方法】

胎生 16 日目の Sprague-Dawley 系ラットの大脳皮質を摘出し初代培養を行った。培養後 10 日目に、グルタミン酸障害として N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)型グルタミン酸受容体のリガンドである NMDA ( $10\sim30~\mu$ M、15~分) 処置、または酸化ストレスとして  $H_2O_2$  ( $10\sim100~\mu$ M、1 時間) 処置を行った。処置 24 時間後にミトコンドリア活性を指標とした XTT 法により細胞生存率を評価した。LP は初代培養大脳皮質グリア細胞の培養上清から、ショ糖密度勾配超遠心法により単離した。LP は神経障害誘導 30 分前から障害処置終了時まで培養液中に添加した。

#### 【結果・考察】

グルタミン酸障害および酸化ストレスに対する LP の生存率への影響を XTT 法により解析 した結果、どの濃度の LP 投与においても神経保護効果は観察されなかった。また、イムノブロット解析により TrkB、Akt、GSK-3β および CREB 量を検討した結果、LP による顕著な変化は見られなかったものの、神経保護的に働くシグナル経路が変化する傾向であった。

視神経を構成する網膜神経節細胞に対しては LP が細胞膜上に存在する LRP1 を介して神経 保護効果を発揮することが明らかとなっている。このことから、LRP1 のイムノブロット解析 を行ったところ、興味深いことに大脳皮質神経細胞では、グルタミン酸障害および酸化ストレスにより LRP1 細胞外ドメインの切断が誘導されていた。すなわちこの切断により LRP1 を介する神経保護シグナルが伝達されない可能性が考えられた。

以上より、本研究では大脳皮質神経細胞へのグルタミン酸障害および酸化ストレスに対する LPの保護効果は観察されなかったものの、LRP1の切断を阻害することで神経保護効果を発揮 できる可能性を示した。

視神経保護におけるアポリポタンパク質 E 含有リポタンパク質と α 2-マクログロブリンの役割

○林秀樹、森みすず、袁博、高木教夫 東京薬大・薬

#### 【背景・目的】

中枢神経系の神経細胞が障害を受けると周辺のグリア細胞はアポリポタンパク質 E 含有リポタンパク質(E-LP)を大量に放出するが、その役割は不明である。これまでの研究で我々は、 E-LP が初代培養網膜神経節細胞の LRP1(低比重リポタンパク質受容体ファミリーの受容体の一つ)を介して、グルタミン酸誘導性神経細胞死に対する保護効果を発揮することを明らかにした。また E-LP と同様にグリア細胞から放出され LRP1 のリガンドである  $\alpha$  2-マクログロブリンが、E-LP の神経保護効果を妨害することを示した。そこで本研究は、E-LP の in vivoでの神経保護効果と E-LP の保護効果に影響を及ぼすグリア細胞由来因子  $\alpha$  2-マクログロブリンの解析を目的とした。

#### 【実験方法】

SD 系雄性ラット(7 週齢)の硝子体内に N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)型グルタミン酸受容体アゴニストである NMDA(20 nmol/eye)を注射し、NMDA 誘導性視神経障害ラット(緑内障モデル)を作製した。また同時に E-LP(5 ng/eye)を硝子体内投与し、3 日後の網膜の変化を生化学的および組織学的に解析した。さらに C57BL/6 マウス(3 から4 日齢)から網膜グリア細胞を初代培養し、E-LP(100 ng/mL)が網膜グリア細胞の $\alpha$ 2-マクログロブリン発現に与える影響を観察した。

#### 【結果・考察】

NMDA 硝子体内投与による視神経障害をイムノブロット法および網膜組織切片を用い解析した結果、NMDA 投与により網膜神経節細胞のマーカータンパク質である Brn-3a 発現量が減少し、E-LP の同時投与は、この減少を抑制した。また E-LP の投与はアポトーシスの指標である cleaved caspase 3 の増加も抑制した。さらに NMDA 硝子体内投与による網膜組織障害も軽減した。初代培養網膜グリア細胞を用いた解析では、培養液中に E-LP を添加したところ、 $\alpha$  2-マクログロブリンのタンパク質発現量が減少した。これらの結果から、E-LP は NMDA 硝子体内投与による視神経障害を軽減し、その一因として  $\alpha$  2-マクログロブリンの発現抑制機構が関与する可能性が示された。

# ミオスタチン阻害ペプチドを利用したがん悪液質改善効果

○尾嶋千遥<sup>1</sup>、宮本樹<sup>1</sup>、渡部琢也<sup>1</sup>、高山健太郎<sup>2</sup>、林良雄<sup>2</sup>、伊東史子<sup>1</sup> <sup>1</sup>東京薬大・生命、<sup>2</sup>東京薬大・薬

#### 【背景・目的】

ミオスタチン(Myostatin、別名:GDF-8、以後 MSTN)は TGF- $\beta$  ファミリーに属するサイトカインであり、骨格筋から産生されて骨格筋細胞の分化・増殖作用を負に制御する。それゆえ MSTN シグナルを阻害できれば、加齢性筋障害や筋ジストロフィーなどの様々な筋萎縮性状態を改善する薬になる可能性が高いと注目されている。我々はマウス MSTN 前駆体領域から、24 アミノ酸からなる MSTN 阻害活性を有する最小ペプチド領域を同定し、ミオスタチン阻害ペプチド(Peptide 2)とした(*J. Med. Chem., 2015*)。本研究では、この Peptide 2 を利用して、継続的筋肉消耗を特徴とするがん悪液質の改善効果について検討を行った。

#### 【実験方法】

C57BL/6 雄マウス(7 週齡)の背部皮下に、Lewis lung carcinoma (LLC) を 5×10<sup>5</sup> cells/匹移植し、3 週間後にがん悪液質モデルマウスとして利用可能か検証した。がん悪液質モデルマウスに Peptide-2 を筋肉内投与し、がん悪液質の治療効果について検討した。治療効果は、腫瘍の重量、体重変化、筋肉量の変化、腓腹筋重量、心筋重量、Grip strength、脂肪重量、筋肉細胞内タンパク質濃度の変化を測定して評価した。

#### 【結果・考察】

がん悪液質モデルマウスでは、LLC 移植 3 週間で筋肉の消耗が確認できた。このモデルマウスに Peptide 2 を投与したところ、腫瘍サイズは Peptide 2 投与により小さくなり、生存率が改善した。さらに、がん悪液質モデルマウスでは筋肉量と Grip strength が低下したのに対し、Peptide 2 投与により、腓腹筋重量の有意な増加、Grip strength の増強も確認された。しかしながら、脂肪重量、筋肉細胞のタンパク質濃度には影響を与えなかった。以上の結果より、がん悪液質モデルマウスにおいて Peptide-2 を投与すると、筋肉消耗が阻害されて筋肉の質が維持されることが明らかとなった。

# Negamycin 系新規終止コドンリードスルー薬の 末梢神経に対する影響の解析

○大谷嘉典、山口 宜秀、田口晃弘、濱田圭佑、林 良雄、馬場広子 東京薬大・薬

#### 【背景・目的】

Large myelin protein zero (L-MPZ) は、myelin protein zero (P0)の C 末端側に 63 アミノ酸が付加された終止コドンリードスルー産物で、P0 と共に正常な末梢神経髄鞘の構成成分として存在する(Yamaguchi et al., 2012)。また、免疫性神経障害患者の血清中に高率に抗 L-MPZ 抗体が認められることから、疾患との関連性も示唆されている。しかし、L-MPZ の生理的および病的役割に関しては未だ不明な点が多い。近年、Duchenne 型筋ジストロフィーなどに見られるナンセンス突然変異に対する治療薬として、終止コドンリードスルー薬の開発が行なわれている。しかし、生体内では L-MPZ のようにリードスルー機序によって産生されるタンパク質が存在するため、安全で効率的なリードスルー薬の開発にはそれらへの影響を明らかにすることが重要と考えられる。そこで我々は、新たに開発した Negamycin 系リードスルー薬による L-MPZ 産生量の変化を解析し、末梢神経への影響を検討した。

#### 【実験方法】

P0 cDNA を導入した HeLa 細胞にリードスルー薬を添加し、P0 陽性細胞に対する L-MPZ 陽性細胞数の比を指標として解析した。また、末梢神経への影響を評価するため、マウス坐骨神経内にリードスルー薬を直接投与し、L-MPZ の産生変化を Western blot 法や免疫組織染色法で解析した。さらに、リードスルー活性を持つ G418 をコントロールとして伝導速度の測定および歩行試験(Beam Walking Test)を行い、末梢神経に対する毒性を評価した。

#### 【結果・考察】

培養細胞において、TCP1109 を含む 3種の薬剤で P0 mRNA に対する高いリードスルー活性が認められた。活性の高い TCP1109 の坐骨神経内への投与により L-MPZ/P0 比が約 30%増加し、in vivo におけるリードスルー活性が示された。また、G418 投与群では組織障害や伝導速度低下、歩行障害がみられたのに対して、TCP1109 投与では明らかな神経系への影響は見られなかった。今後、L-MPZ など正常組織内に存在するリードスルー産物の機能を明らかにし、これらへの影響を解析することで、安全なリードスルー薬の開発が期待される。

# 連続ブロック表面走査型電子顕微鏡(SBF-SEM)を用いた GlcNAc6ST-1 欠損マウス坐骨神経の解析

○林 明子<sup>1</sup>、大野伸彦<sup>2</sup>、池中一裕<sup>2</sup>、馬場広子<sup>1</sup> <sup>1</sup>東京薬大・薬、<sup>2</sup>自然科学研究機構・生理研

#### 【背景・目的】

N-アセチルグルコサミン-6-硫酸転移酵素-1 (GlcNAc6ST-1) は糖鎖内部の GlcNAc に硫酸基を転移する酵素である。P0 タンパク質は糖鎖の付加された末梢神経髄鞘の主要な糖タンパク質であり、1 回膜貫通型で髄鞘細胞膜同士の接着に重要である。この P0 タンパク質に硫酸化糖鎖が付加しているものが数%あることがわかっている。 しかし、この硫酸化糖鎖を有する P0 タンパク質の髄鞘における局在や機能はほとんど分かっていない。連続ブロック表面走査型電子顕微鏡(Serial block-face scanning electron microscopy: SBF-SEM)は、組み込み式のウルトラミクロトームによる試料の表層切削と SEM による試料断面の撮像とを交互に繰り返し、透過型電子顕微鏡による連続切片観察のようなデジタル画像を取得できる。通常の透過型電子顕微鏡では見る事の出来ない立体的な超微細構造が観察可能である。本研究では、末梢神経において、硫酸化糖鎖付加 P0 タンパク質の髄鞘形態への関与を調べるために、SBF-SEM を用いて GlcNAc6ST-1 欠損マウス坐骨神経の立体構造を正常マウスと比較し髄鞘の軸索機能維持における硫酸化糖鎖の関与を検討した。

#### 【実験方法】

GlcNAc6ST-1 欠損マウス及び野生型マウスの坐骨神経について、免疫染色用および電子顕微鏡用標本を作成した。SBF-SEM による撮像は、自然科学研究機構生理学研究所、脳形態解析部門の MERLIN あるいは SIGMA VP 3View (Carl Zeiss. Germany, Gatan Inc., Nippon Gatan)の設備を使用した。

#### 【結果・考察】

連続切片の自動撮像の結果、立体構築可能な 400~1200 枚程度のスタック画像が得られた。 GlcNAc6ST-1 欠損マウス坐骨神経では、ランビエ絞輪付近の立体構造が乱れて軸索にも影響が及んでいるものが観察された。SBF-SEM は応用範囲が広く、末梢神経組織の微細構造観察において優れていた。従来観察できなかったごくわずかな生検材料・小動物の微小器官の観察などにも威力を発揮出来るものと考えられた。

末梢神経系において硫酸化糖鎖付加型 PO タンパク質は特にランビエ絞輪付近の髄鞘構造の形成・維持に重要であると考えられた。

# オリゴデンドロサイトにおける非定型 Myosin VI の発現解析

# ○山崎礼二、山口宜秀、石橋智子、馬場広子 東京薬大・薬

#### 【背景・目的】

中枢神経系の髄鞘はオリゴデンドロサイト (OL) によって形成される膜様構造物で、絶縁体として軸索の跳躍伝導に関わるほか様々な神経機能に関与する。脳の発達過程で OL は短期間に大量の脂質やタンパク質を産生し、軸索周囲に輸送して複数の髄鞘を形成する。しかし、これらの輸送機序に関しては不明な点が多い。我々はこれまでに非定型ミオシン Myosin ID (Myold)が OL 内で髄鞘タンパク質の輸送に関与し、髄鞘形成や脱髄後の再生に不可欠であることを明らかにした(Yamazaki et al., 2014; 2016)。本研究では、同じく非定型ミオシンに属する Myosin VI (Myo6) に着目し、OL における発現時期や細胞内局在および他のミオシン分子との関連性について解析した。

#### 【実験方法】

成熟マウスの小脳およびクプリゾンによって脱髄を誘導したマウスの脳梁を蛍光免疫染色法により解析し、Myo6の脳内局在および発現細胞を調べた。次にラット初代培養 OLの分化過程におけるミオシンファミリー(Myo6, Myo5a, Myo1d)の発現および局在を RT-PCR 法や蛍光二重染色法により解析し比較した。また、他細胞を用いた報告(Buss et al., 2004)をもとに、OL における Myo6 と endocytosis との関連性を各小胞マーカーとの蛍光染色で検討した

#### 【結果・考察】

中枢神経系では Myo6 は成熟 OL に存在し、脱髄時には OL 前駆細胞にも発現していることを明らかにした。また、培養系では Myo1d が成熟 OL のみに発現しているのに対し、Myo5aと Myo6 は前駆細胞から成熟 OL まで持続的に発現していた。どれも成熟 OL の細胞体と突起に分布するが、Myo1d はさらに突起最先端の膜周囲にも集積していた。Myo6 の細胞内局在はクラスリン結合タンパク質(AP2)と高い相関を認めた。

以上の結果から、Myo6 は OL においてクラスリンを介した endocytosis に関与する可能性が示唆された。Myo6 と発現時期や分布が類似している Myo5a は exocytosis に関わることから、OL の分化や髄鞘形成・維持には、時間的、空間的あるいは機能的に異なる複数のミオシンが関わっていると考えられた。

## マイオスタチン阻害ペプチドの血中安定性の評価

○飯田奏子、岸本久直、白坂善之、高山健太郎、林 良雄、井上勝央 東京薬大・薬

#### 【背景・目的】

TGF-β ファミリーに属するマイオスタチンは骨格筋量を負に制御する因子であり、その機能の抑制は骨格筋量を増大させることが知られている。したがってマイオスタチンの機能を抑制する化合物の創製は、筋萎縮性疾患である筋ジストロフィー等の治療薬の開発に繋がることが期待されている。最近、マイオスタチンの部分ペプチドである mMPS が in vitro 試験でマイオスタチンシグナルの阻害活性を示し、マウス in vivo 試験で骨格筋量を増大させることが示されている。しかし、マイオスタチン阻害ペプチドの生体内での安定性や in vivo での体内動態特性については不明である。そこで本研究ではマイオスタチン阻害ペプチドの in vivo での体内動態を評価することを目的に、その定量法を確立し血清及び血漿における安定性について検討した。

#### 【実験方法】

マイオスタチン阻害ペプチド (mMPS: AWRQNTRYSRIEAIKIQILSKLRL-NH<sub>2</sub> 分子量 2956) の定量は LC-MS/MS を使いて行った。分析条件は、分析カラムとして L-column2 C8 (2.0×100 mm) を用い、カラム温度は 40 度、流速は 0.25 (mL/min) とし、移動相には A: 0.1% ギ酸水溶液、B: アセトニトリルを使用し、以下のグラジエントプログラムにより分析した。(gradient B (%): 5-60-90-90-5-5 (1-7-8-10-13-18 分))

mMPS の分解物の同定は LC-MS/IT/TOF により行った。また血液からペプチド成分を回収するための除たんぱく条件についても検討した。

#### 【結果・考察】

mMPS の定量を上記の方法で行なった結果、 $0.01\,\mu\text{M}$  から  $2\,\mu\text{M}$  の濃度範囲において良好な直線性が得られた。mMPS は疎水性及び塩基性アミノ酸を多く含有することからプラスチック容器への吸着が疑われたが、吸着試験の結果よりその吸着性は低いことが示された。マウス血漿中における mMPS の安定性について検討した結果、時間依存的な分解はほとんど認められなかった。一方、マウス血清を用いた検討では、部分的な mMPS の分解が認められ、その分解産物として m/z が 1637 の IEAIKIQILSKLRL-NH2 が同定された。したがって mMPS は血中では比較的安定に存在し、血液凝固系が活性化した条件下において、 $10\,\text{番目のアルギニン残基を認識するプロテアーゼにより分解される可能性が示された。}$ 

# 有機アニオントランスポーターを利用した D-luciferin による bioluminescence イメージングの最適化

○志村明日香<sup>1</sup>、古屋貴人<sup>1</sup>、岸本久直<sup>1</sup>、竹原一成<sup>2</sup>、湯浅博昭<sup>2</sup>、 白坂善之<sup>1</sup>、井上勝央<sup>1</sup> 「東京薬大・薬、<sup>2</sup>名古屋市立大・薬

#### 【背景・目的】

Bioluminescence イメージングは生体内における細胞や分子の挙動、機能を非侵襲的に高感度かつ簡便に画像化することができる技術である。発光源は、一般に外因性の基質である D-luciferin (D-Luc)と細胞や組織に発現させた luciferase による化学発光反応が用いられるため、この bioluminescence イメージングにおいては細胞外から細胞内への D-Luc の移行が必須となる。しかし、D-Luc はフェノール性水酸基とカルボキシル基を有する水溶性有機アニオン化合物であるため、細胞膜透過性は低いことが推測される。そこで本研究では、D-Luc の細胞膜透過性を亢進させることで効率的な D-Luc/luciferase 反応が可能になると仮説を立て、D-Luc を基質とするトランスポーター分子の探索とその bioluminescence イメージングへの応用について検討した。

#### 【結果・考察】

細胞膜を介した D-Luc/Pyrearinus termitillumians luciferase (eluc) 反応は、eluc/HEK293 細胞ではほとんど認められなかったが、有機アニオントランスポーターである OAT1 及び OAT3 の一過性発現により、顕著に増大した。その輸送活性は OATs の阻害剤である probenecid の共存により強く阻害された。これらの結果から、D-Luc の細胞膜透過性は著しく低く、OAT1 及び OAT3 を細胞膜に発現させることで、D-Luc/eLuc 反応を増強できることが明らかとなった。

OAT1 及び OAT3 を共発現させた eluc-HEK293 細胞における D-Luc/eluc 反応は、D-Luc 添加後、約30分で定常状態に到達し、OAT1 及び OAT3 の D-Luc に対するみかけの  $K_m$  値はそれぞれ  $0.36~\mu M$ 、 $0.31~\mu M$  であった。また、OAT1 の蛍光性基質である 6-carboxyfluorescein の取り込みに対する D-Luc の  $IC_{50}$  値は  $1~\mu M$  であり、阻害様式は競合阻害であることが示された。したがって、OAT1 及び OAT3 は D-Luc を良好な基質として認識することが示唆された。

OAT1/eluc/HEK293 細胞と eluc/HEK293 細胞をマウス皮下に移植し、D-Luc を腹腔内投与したときの bioluminescence イメージングは、OAT1/eluc/HEK293 細胞を移植した群において発光強度は顕著に増大した。以上の結果より、OAT1 及び OAT3 を利用することで D-Luc/eluc 反応を用いた bioluminescence イメージングの感度と精度を向上できる可能性が示された。

筋肉におけるルシフェラーゼ発現の *in vivo* イメージングを指向した **D**-ルシフェリントランスポーターの探索

○古屋貴人、志村明日香、岸本久直、白坂善之、井上勝央 東京薬大·薬

#### 【背景・目的】

D-luciferin (D-Luc)/luciferase 反応により生じる化学発光を利用した bioluminescence イメージングは、その高い時空間分解能や非侵襲性を利用して、小動物個体における発光性細胞・組織等の in vivo における遺伝子発現や多様な細胞内イベントの視覚化に応用されている。これまでに我々は、D-Luc の生体膜透過性が著しく低く、腎臓特異的有機アニオントランスポーターである OAT1 及び OAT3 の利用により、その膜透過性を亢進させ、D-Luc/luciferase 反応による発光強度の増強が可能であることを明らかとしてきた。しかし、実際の D-Luc/luciferase 反応の in vivo イメージングにおいては、外因性のトランスポーターを発現させることなく全身でのイメージングが可能であることから、他のトランスポーターの関与が考えられる。そこで本研究では、D-Luc の化学構造に着目し、モノカルボン酸トランスポーターファミリーである SLC16A について D-Luc/luciferase 反応に与える影響を検討した。

#### 【実験方法】

HEK293 細胞及び MDCKII細胞に *Pyrearinus termitillumians* luciferase (eluc) を安定発現させた eluc/HEK293 細胞、eluc/MDCKII細胞を作製した。eluc/HEK293 細胞に MCT1 を一過性発現させ、D-Luc 添加時の発光強度をルミノメーターで測定した。また、MCT1 及び MCT2 の関与を分離評価するため、それらの特異的阻害剤である AR-C155858 存在下における発光強度を測定した。さらに eluc/MDCKII細胞を Transwell®で一週間培養し、D-Luc の apical (頂端膜)及び basal (基底膜)添加時の膜透過性の違いを発光強度を指標に IVIS で測定した。

#### 【結果・考察】

Transwell®に培養した eluc/MDCKII細胞での D-Luc の細胞内への取り込みは、頂端膜からよりも基底膜側からの方が顕著に高いことが示され、D-Luc の取り込みに働く輸送系がMDCKII細胞の基底膜側に局在することが示唆された。さらに、この膜透過は AR-C155858により著しく減少したため、D-Luc の基底膜側から細胞内への取り込みに MCT1 が関与する可能性が推察された。そこで各種 MCTs (SLC16As)を eluc/HEK293 細胞に一過性発現させ、D-Luc/ eluc 反応による発光強度を測定した結果、MCT1 発現系において有意な発光強度の増大が観察され、その増加は AR-C155858の共存下において著しく低下した。以上の結果より、MCT1 は D-Luc を基質として認識するトランスポーターであることが明らかとなった。MCT1 は主に筋組織に高発現しているため、筋組織での D-Luc/luciferase 反応を利用した in vivo イメージングにおいて MCT1 が重要である可能性が示唆された。

文部科学省 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

「ペプチド工学と DDS 技術を基盤とした筋疾患に対する統合創薬の研究拠点形成」講演要旨集

平成 29 年 3 月 17 日発行

発行 東京薬科大学

〒192-0392

東京都八王子市堀之内 1432-1

TEL/FAX: 042-676-3126

無断転載・複製を禁ず。

Copyright 2017© All rights reserved, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

