

第12回 戦略会議「第3回 公開研究進捗状況報告会」

日時

2018年 3月19日(月) 14:00～17:00

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)

【若手研究者・大学院生・学生による研究報告】14:00 ～ 16:20

- 齊藤 まりこ 小型化マイオスタチン阻害ペプチドの発見と高活性化
- 尾嶋千遥 ミオスタチンシグナル阻害はがん悪液質を改善する
- 荳沢 慧 α -ジストログリカン親和性ペプチド搭載polyplexの調製法の最適化と筋細胞内動態特性
- 喜早慧士 脳梗塞後神経新生とGSK-3 β 情報伝達系の変化
- 大村紀子 ネガマイシン誘導体の3位アミノ基部の修飾による高活性リードスルー化合物の創製とその生物活性評価
- 大谷嘉典 末梢神経における生理的リードスルータンパク質 L-MPZの機能解析
- 飯田奏子 ネガマイシン誘導体のリードスルー活性に及ぼすトランスポーターの影響
- 山田 まりこ NMDA誘発性神経細胞障害に対するFurin阻害薬の効果

参加登録方法：直接会場までお越し下さい。

入場無料：どなたもご自由にご参加ください。

【ポスターによる研究報告】 16:20 ～ 17:00

【意見交換会】 17:15 ～ 18:30

レストラン「マグノリア」にて

【代表】野水 基義（東京薬科大学 薬学部）

【問合せ先】井上 勝央（事務局担当） TEL/FAX ☎042-676-3126 E-mail : kinoue@toyaku.ac.jp

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12回 戦略会議

第3回 公開研究進捗状況報告会

講 演 要 旨 集

2018 年 3 月 19 日（月）

東京薬科大学 教育 1 号館

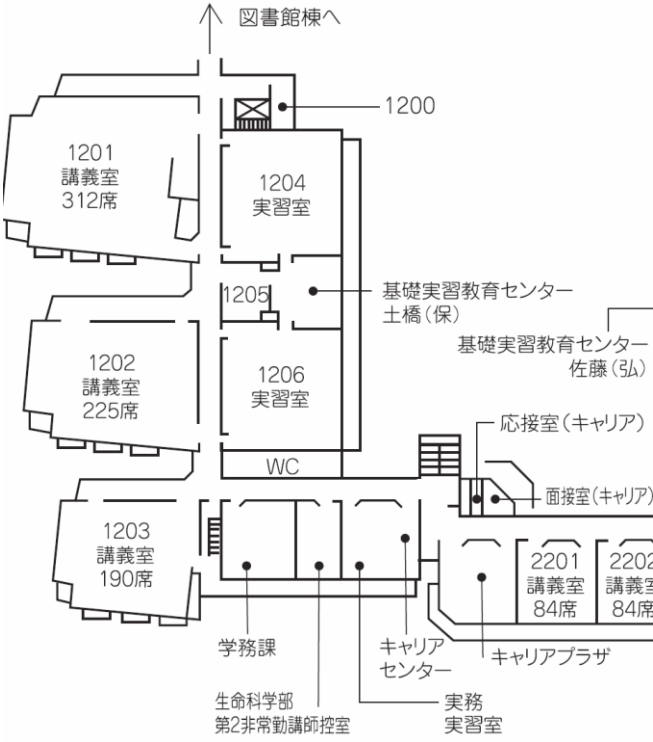
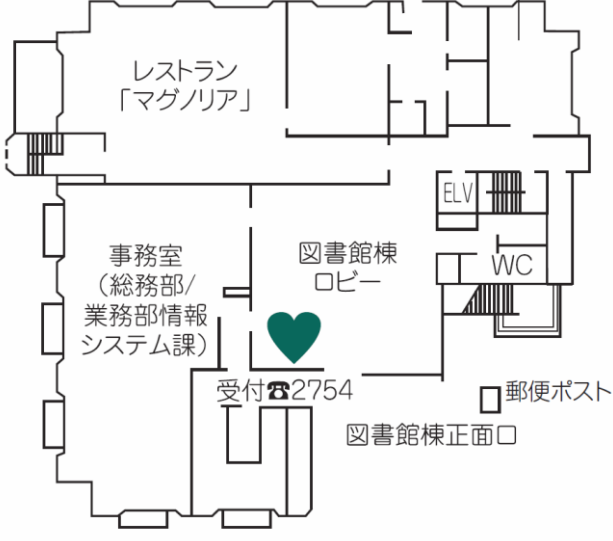
1203 講義室（講演）

2201 講義室（ポスター発表）



東京薬科大学

会場のご案内

報告会・講演会 会場	意見交換会 会場
 ↑ 図書館棟へ 1201 講義室 312席 1202 講義室 225席 1203 講義室 190席 1204 実習室 1205 基礎実習教育センター 土橋(保) 1206 実習室 基礎実習教育センター 佐藤(弘) WC 応接室(キャリア) 面接室(キャリア) 2201 講義室 84席 2202 講義室 84席 学務課 キャリアセンター キャリアプラザ 生命科学部 第2非常勤講師控室 実務実習室	 レストラン「マグノリア」 事務室 (総務部/業務部情報システム課) 図書館棟 ロビー 受付 ☎2754 郵便ポスト 図書館棟正面口 ELV WC 図書館棟 1階
教育1号館 2階 1203 講義室 (講演) 2201 講義室 (ポスター発表)	図書館 1階 レストラン「マグノリア」

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

2018 年 3 月 19 日(月) 13:30 ～ 15:00

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。

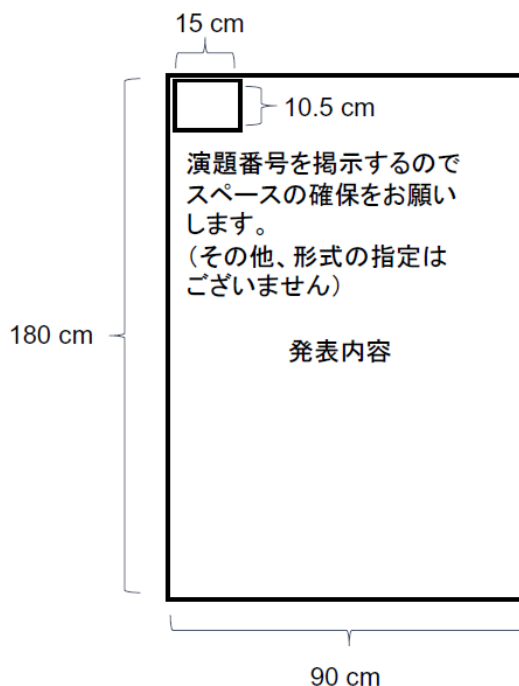
【講演者（特別講演、報告会）へのお知らせ】

- ・ 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、バッテリー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、16 時 20 分から 17 時 00 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 19 日(月)14 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）。



【意見交換会参加者へのお知らせ】

意見交換会は 17 時 15 分からレストラン「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

14:00 ~ 14:10

ご挨拶: プロジェクトリーダー 野水基義

研究報告1

座長: 馬場広子

14:10 ~ 14:25

0-1:

小型化マイオスタチン阻害ペプチドの発見と高活性化

○齊藤 まりこ、高山 健太郎、Cédric 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
(東京薬大・薬)

14:25 ~ 14:40

0-2:

ミオスタチンシグナル阻害はがん悪液質を改善する

○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)

14:40 ~ 14:55

0-3:

α -ジストログリカン親和性ペプチド搭載 polyplex の調製法の最適化と 筋細胞内動態特性

○菰沢 慧、片桐文彦、佐々木 愛理、檜木侑子、高橋葉子、
吉川大和、野水基義、根岸洋一
(東京薬大・薬)

14:55 ~ 15:10

0-4:

脳梗塞後神経新生と GSK-3 β 情報伝達系の変化

○喜早慧士、林 秀樹、折田 真以子、深沢玲美、渡邊純平、袁 博、
高木教夫
(東京薬大・薬)

研究報告2

座長:根岸洋一

15:10 ～ 15:25

0-5:

ネガマイシン誘導体の3位アミノ基部の修飾による高活性リードスルー化合物の創製とその生物活性評価

○大村紀子、濱田圭佑、田口晃弘、小竹優也、小林美咲、新井実咲、高山 健太郎、谷口敦彦、林 良雄
(東京薬大・薬)

15:25 ～ 15:40

0-6:

末梢神経における生理的リードスルータンパク質 L-MPZ の機能解析

○大谷嘉典、山口宜秀、崔 晶晶、馬場広子
(東京薬大・薬)

15:40 ～ 15:55

0-7:

ネガマイシン誘導体のリードスルー活性に及ぼすトランスポーターの影響

○飯田奏子、志村 可奈恵、濱田圭佑、田口晃弘、岸本久直、高山 健太郎、白坂善之、林 良雄、井上勝央
(東京薬大・薬)

15:55 ～ 16:10

0-8:

NMDA 誘発性神経細胞障害に対する Furin 阻害薬の効果

○山田 まりこ、林 秀樹、松嶋 菜穂子、井上大輔、大畑 芽衣子、袁 博、高木教夫
(東京薬大・薬)

(16:10 ～ 16:20: 休憩、会場の移動)

研究報告3 (ポスター発表)

16:20 ～ 17:00

P-1 ～ P-17

(2201 講義室)

閉会の挨拶

17:00 ～ 17:05

高木教夫

意見交換会

(17:15 ～ 18:30、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19日(月)16:20~17:00

ポスター会場 (2201 講義室)

- P-1 ラミニン活性ペプチドを多糖類に固定化したバイオマテリアルの創製**
○熊井 準、保住 建太郎、片桐文彦、吉川大和、野水基義
(東京薬大・薬)
- P-2 Stop codon readthrough により産生される末梢神経系ミエリン構成分子 L-MPZ の機能解析**
○竹原雅之、○中島鉄博、大谷嘉典、檜崎琢朗、山浦大輔、山口宜秀、馬場広子
(東京薬大・薬)
- P-3 ラミニン $\alpha 2$ 鎖由来ペプチドを用いた三元複合体によるジストログリカン指向性遺伝子デリバリーシステムの開発**
○檜木侑子、菰沢 慧、片桐文彦、佐々木 愛理、高橋葉子、吉川大和、野水基義、根岸洋一
(東京薬大・薬)
- P-4 有機触媒を用いた不斉 direct vinylogous aldol 反応**
○坂井崇亮、平島真一、山下祥史、中野 樹、中島康介、古石裕治、三浦 剛
(東京薬大・薬)
- P-5 筋組織選択的な DDS を目的としたペプチド修飾リボソームの調製と筋指向性の評価**
○佐々木 愛理、林 由浩、菰沢 慧、片桐文彦、坂井崇亮、吉田彰宏、平島真一、三浦 剛、高橋葉子、吉川大和、野水基義、根岸洋一
(東京薬大・薬)
- P-6 Conformation Analysis of the A2G80 peptide derived from laminin $\alpha 2$ chain by molecular dynamics simulation**
Jun Kumai¹, ○Yuka Fukasawa¹, Fumihiko Katagiri¹, Yamato Kikkawa¹, Kentaro Hozumi¹, Hironao Yamada², Masaki Fukuda², Takeshi Miyakawa², Ryota Morikawa², Masako Takasu², Motoyoshi Nomizu¹
(¹Sch of Pharm, Tokyo Univ of Pharm and Life Sci, ²Sch of Life Sci, Tokyo Univ of Pharm and Life Sci)
- P-7 Immunohistochemical analysis of the distribution of L-MPZ during sciatic nerve development**
○Jingjing Cui^{1,2}, Yoshinori Otani², Yoshihide Yamaguchi², Hiroko Baba²
(¹China Acad of Chin Med Sci, ²Sch of Pharm, Tokyo Univ of Pharm and Life Sci)

- P-8 脳梗塞後のミクログリアにおける progranulin の病態生理学的変化**
○堀之北 一朗、林 秀樹、水村里沙、山口龍晃、袁 博、高木教夫
(東京薬大・薬)
- P-9 有機触媒を用いた不斉ヒドロホスフィニル化反応**
○藤野佑樹、平島真一、柴沼早希、中島康介、古石裕治、三浦 剛
(東京薬大・薬)
- P-10 低リン食餌が筋肉代謝に与える影響**
○中川瑠美、渡橋弘貴、渡部琢也、斎藤裕紀、稲川俊彦、伊東史子
(東京薬大・生命)
- P-11 Identification of α -dystroglycan binding peptide in the laminin α 2 chain LG4-5 modules**
○Guangrui Zhang, Jun Kumai, Kazuki Ikari, Xiao Yang, Yumika Sugawara, Fumihiko Katagiri, Kentaro Hozumi, Yamato Kikkawa, Motoyoshi Nomizu
(Sch of Pharm, Tokyo Univ of Pharm and Life Sci)
- P-12 マイクロ流体技術を用いたリボソーム作製における基礎的検討**
○林 由浩、佐々木 愛理、濱野展人、高橋葉子、根岸洋一
(東京薬大・薬)
- P-13 筋肉における in vivo 生物発光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**
○志村優太、古屋貴人、白坂善之、岸本久直、井上勝央
(東京薬大・薬)
- P-14 マウス坐骨神経 Lysolecithin 脱髄への IVIg 製剤中の抗ミエリン抗体の効果の検討**
○瀬戸口 潔、河田紋実、寺井義貴、鈴木尚穂、林 明子、馬場広子
(東京薬大・薬)
- P-15 脳梗塞病態における DNMT3a の病態生理学的役割**
○浅田 真由美、喜早慧士、堀之北 一朗、林 秀樹、袁 博、高木教夫
(東京薬大・薬)
- P-16 チオウレア型有機触媒を用いたフラン誘導体の不斉アルキル化反応**
○阿久津 裕士、松本 光、中島康介、平島真一、古石裕治、三浦 剛
(東京薬大・薬)
- P-17 D-luciferin トランスポーターの探索及び機能解析と生物発光イメージングへの応用**
○古屋貴人、志村優太、岸本久直、白坂善之、井上勝央
(東京薬大・薬)

Abstracts

O: 研究報告

P: ポスター発表

小型化マイオスタチン阻害ペプチドの発見と高活性化

○齊藤まりこ、高山健太郎、Cédric 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
東京薬大・薬

【背景・目的】

マイオスタチンは、TGF- β スーパーファミリーに属するタンパク質で、生体内で骨格筋量を負に制御する作用を有する。近年、この作用の阻害に基づいた筋萎縮性疾患治療薬の創製が試みられている。我々は、マイオスタチンを不活化するマウスマイオスタチン前駆体配列(プロドメイン)に注目し、プロドメイン由来のマイオスタチン阻害ペプチド(ペプチド **1**, 23aa, WRQNTRYSRIEAIKIQILSKLRL-amide, $IC_{50} = 3.53 \mu M$)を見いだしている。^[1] ペプチド **1** は、Duchenne 型筋ジストロフィー病態モデル(mdx)マウスへの筋肉内投与により、筋重量を約 20 %増加させた。さらに、ペプチド **1** の構造に基づく網羅的構造活性相関研究の結果、ペプチド **2** (22aa, 2-Naphtyloxy-acetyl-RQNTRYSRIEAIKIQIISKLRL-amide, $IC_{50} = 1.19 \mu M$)^[2]やペプチド **3** (22aa, 2-Naphtyloxy-acetyl-RQNTRYSRIEWIKIQIISKLRL-amide, $IC_{50} = 0.32 \mu M$)^[3]を見だし、 IC_{50} 値の大幅な改善に成功している。そこで本研究では、このペプチド **3** を基にさらなる活性の向上および分子の小型化を指向したマイオスタチン阻害ペプチドの創製を検討した。

【結果・考察】

全てのペプチド誘導体は、Fmoc 固相法にて合成した。合成ペプチド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て解析した。

ペプチド **3** の C 端側に注目した低分子ペプチド誘導体の合成から、アミノ酸 6 残基をダウンサイズした 16 残基からなるマイオスタチン阻害ペプチド **4** の獲得に成功した。本ペプチドは、阻害活性(IC_{50} 値)もペプチド **3** より約 2 倍向上した($IC_{50} = 0.14 \mu M$)。ペプチド **4** は、今後のマイオスタチン阻害剤創製における構造展開での有望な新規プラットフォームであると考えられる。

[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] Takayama, K.; Nakamura, A.; Rentier, C.; Mino, Y.; Asari, T.; Saga, Y.; Taguchi, A.; Yakushiji, F.; Hayashi, Y. *ChemMedChem.* **2016**, 111, 845.

[3] Takayama, K.; Rentier, C.; Asari, T.; Nakamura, A.; Saga, Y.; Shimada, T.; Nirasawa, K.; Sasaki E.; Muguruma, K.; Taguchi, A.; Taniguchi A.; Negishi, Y.; Hayashi Y. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, 8, 751-756

ミオスタチンシグナル阻害はがん悪液質を改善する

○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¹¹東京薬大・生命、²東京薬大・薬

【背景・目的】

がん悪液質は、進行性の骨格筋の減少を特徴とする代謝障害で、末期がん患者の QOL 悪化をもたらすが、従来の療法では改善することが難しい。そこで、骨格筋の減少を抑制し、がん悪液質の治療へつなげることを目標に、ミオスタチン (MSTN) シグナルの抑制を試みた。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。これまでに我々はマウス MSTN 前駆体に由来する MSTN 阻害活性を有する Peptide 2 (*J. Med. Chem.*, 2015) を報告しており、この、ペプチド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 週齢) の背部皮下に、Lewis lung carcinoma (LLC) を 5×10^5 cells/匹移植したがん悪液質モデルマウスを作成し、Peptide-2 を筋肉内投与して治療効果を検証した。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。さらに、大腸がんを自然発症する家族性大腸腺腫症のモデルマウス (APC マウス) に Peptide-2 を投与して治療効果を評価した。

【結果・考察】

がん悪液質モデルマウスに 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 Peptide-2 の効果は局所的であり、大腿筋に投与した場合には腓腹筋には影響は見られなかった。APC マウスに Peptide-2 を投与すると、がん悪液質による体重減少が改善したが、死亡時期を延長することはできなかった。しかし、筋肉のタンパク濃度は維持されており、QOL するが改善する可能性が示唆された。以上、Peptide-2 はがん悪液質を改善させる可能性があることが明らかとなった。

α -ジストログリカン親和性ペプチド搭載 polyplex の調製法の最適化と筋細胞内動態特性

○菰沢慧、片桐文彦、佐々木愛理、檜木侑子、高橋葉子
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・筋萎縮が進行する遺伝性疾患であり、遺伝子治療法の確立が望まれている。最近では筋ジストロフィーの治療のための核酸医薬やゲノム編集ツール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 DDS 開発は依然重要課題である。近年、ラミニン $\alpha 2$ 鎖由来のペプチド (A2G80) が、筋細胞に高発現している α -ジストログリカンに親和性を有することが野水らにより報告されている。そこで本研究は、この A2G80 にオリゴアルギニン (R9) を連結させた A2G80-R9 とプラスミド DNA (pDNA) を複合体 (polyplex) 化し、筋細胞選択的かつ高効率な遺伝子デリバリーシステム (GDS) の確立を目指し、筋芽細胞由来 C2C12 細胞への遺伝子導入能、細胞傷害性、細胞内動態特性について評価した。

【実験方法】

A2G80-R9 と pDNA の混合し polyplex を調製した。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 による ζ 電位測定を行った。また Luciferase assay および MTT assay により、種々の N/P 比で形成した polyplex による C2C12 への遺伝子導入効果と細胞傷害性を評価し N/P 比の最適化を行った。また、対象実験として A2G80-R9 のスクランブル配列による遺伝子導入および NIH3T3 への遺伝子導入効果を評価した。さらに蛍光標識 pDNA を用いた本 polyplex を各細胞への添加後、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) により pDNA の細胞内局在の観察と Flow cytometry により定量した。また本 polyplex の細胞内移行のメカニズムを明らかにするため、各種エンドサイトーシス阻害剤を用い Flow cytometry にて遺伝子導入経路の確認を行った。

【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 ζ 電位を示した。Luciferase assay では C2C12 に対して A2G80-R9 を使用した polyplex (N/P 比 3) を反応させた場合に対照群に比較して 1000 倍程度の高い遺伝子導入効果を示した。さらに CLSM と Flow cytometry により本 polyplex が C2C12 への高い移行性を持つことが示唆された。経路阻害剤の共存により本 polyplex の細胞内移行はマクロピノサイトーシスまたはカベオリン・脂質ラフト介在性のエンドサイトーシスであることが示唆された。

以上のことから、A2G80-R9 を用いた本 polyplex は、A2G80 配列とジストログリカンの親和性に基づき、筋細胞指向性の遺伝子導入を可能にし得ると考えられる。今後は、筋疾患治療に有用な GDS の開発に向け更なる検討を進めていく予定である。

脳梗塞後神経新生と GSK-3 β 情報伝達系の変化

○喜早慧士、林 秀樹、折田 真以子、深沢玲美、渡邊純平、袁 博、高木教夫
東京薬大・薬

【背景・目的】

脳梗塞慢性期の治療薬は再発予防が主な目的であり、組織損傷および症状の改善を期待できるものは存在しない。脳梗塞後神経新生は脳梗塞後に一過性に増強され、損傷組織の再生機序の1つとして注目されている。しかしながら、脳梗塞後神経新生の病態生理学的意義と詳細な機序は未だ不明な点があり、治療への応用には多くの課題が存在する。GSK-3 β 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ため、中枢神経系疾患の病態と密接に関与すると考えられている。本研究では、脳梗塞後神経新生と GSK-3 β 情報伝達系の変化の関与について検討した。

【方法】

Wistar 系雄性ラットの右内頸動脈内に直径 45 μm 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。脳梗塞後神経新生の評価および GSK-3 β 情報伝達系に関わる各種タンパク質の解析は、蛍光免疫染色法およびウエスタンブロット法で行った。GSK-3 β 情報伝達系と脳梗塞後神経新生への関与を調べるため GSK-3 β の上流の PI3K/Akt 経路の阻害薬を大腿静脈から投与した。さらに、胎児ラットより神経幹細胞を単離し、低酸素負荷後の神経幹細胞の増殖および分化過程における GSK-3 β 情報伝達系の変化について検討した。

【結果・考察】

ME 後 7 日目の右海馬歯状回で神経新生を評価したところ増殖性細胞マーカーの Ki67 および神経前駆細胞マーカーの DCX の両陽性新生神経細胞が観察された。さらに、神経細胞への分化に必須である NeuroD の陽性細胞数も増加していた。次に ME 後の GSK-3 β 情報伝達系の経時的変化を観察した結果、ME 後 7 日目で GSK-3 β 情報伝達系は顕著に活性化し、この活性化は PI3-K/Akt 経路依存性であった。次に、この経路と脳梗塞後神経新生の関与を検討するために PI3-K/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。さらに、PI3-K/Akt 経路を活性化し、かつ神経新生に関わる成長因子である IGF-1 および BDNF の発現量を検討したところ、術後 7 日目で著しく減少していた。最後に、単離神経幹細胞を用いて上述のシグナル変化が低酸素負荷後の神経幹細胞の増殖および分化過程で起きているか検討した。その結果、低酸素負荷後に GSK-3 β 情報伝達系が活性化し、細胞増殖能および神経分化能が増強された。さらに、低酸素負荷と同時に PI3-K/Akt 経路の阻害薬を処置した結果、細胞増殖能の増強は抑制されたが、神経分化能の増強には影響を与えなかった。以上の結果から、脳梗塞後神経新生の機序の一端に GSK-3 β 情報伝達系が関与することを明らかにした。

ネガマイシン誘導体の3位アミノ基部の修飾による 高活性リードスルー化合物の創製とその生物活性評価

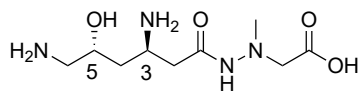
○大村紀子、濱田圭佑、田口晃弘、小竹優也、小林美咲、
新井実咲、高山健太郎、谷口敦彦、林良雄
東京薬大・薬

【背景・目的】

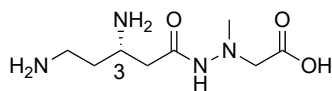
デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) をはじめとする各種遺伝子疾患の約 20% はナンセンス変異に起因することが知られている。近年、ナンセンス変異疾患の治療法として、当該ナンセンス変異により生じる中途終止コドン (PTC) を読み飛ばし (リードスルー)、機能を持ったタンパク質を発現させる試みが注目を集めている。当研究室では、リードスルー活性を有するジペプチド様抗生物質 (+)-Negamycin (**1**) に着目し、構造活性相関研究を展開してきた¹⁾。その結果、比較的高いリードスルー活性を示す誘導体として TCP-112 (**2**) を見出すことに成功している²⁾。今回、**2** の 3 位アミノ基部位に着目し、アミノ酸を含む種々のアシル構造を導入した誘導体の分子設計を行うことで、さらなる高活性誘導体の獲得を図った。

【結果・考察】

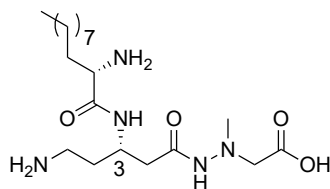
種々の誘導体を合成・評価した結果、直鎖飽和炭化水素を側鎖に有する非天然アミノ酸を導入した誘導体 (**3**, TCP-1109) において **2** の約 4 倍高い活性を有することが明らかとなった。これは、天然由来のリードスルー化合物中で最も高活性であるとされるアミノグリコシド、G418 (**4**) の活性値をも凌駕していた (約 2 倍)。さらに高活性誘導体 **3** について、他のナンセンス変異疾患に対するリードスルー活性を評価するべく、新たな活性評価系を構築し評価を行った。その結果、DMD 以外のナンセンス変異疾患由来配列においても、有意な当該活性の発現を確認でき、本誘導体のナンセンス変異性遺伝性疾患に対する汎用的な応用の可能性が示唆された。



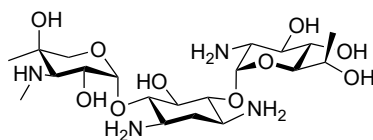
(+)-Negamycin (**1**)□



TCP-112 (**2**)□



TCP-1109 (**3**)□



G418 (**4**)□

[1] Taguchi, A., Hamada, K., Hayashi, Y., *et al.*, *ChemMedChem*, **9**, 2233-2237 (2014).

[2] Hamada, K., Taguchi, A., Hayashi, Y., *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.*, **6**, 689-694 (2015).

末梢神経における生理的リードスルータンパク質 L-MPZ の機能解析

○大谷 嘉典、山口 宜秀、崔 晶晶、馬場 広子
東京薬大・薬

【背景・目的】

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、ストップコドンリードスルー薬の開発が行なわれている。一方で、生体内では末梢有髄神経に特異的に存在する Large myelin protein zero (L-MPZ) のように生理的な終止コドン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。そのため安全で効率的なリードスルー薬の開発には、これらのタンパク質の機能を明らかにし、これらへの影響を考慮する必要がある。そこで生理的なリードスルーにより産生される L-MPZ の機能や生理的意義を明らかにするために、正常末梢神経組織における L-MPZ の局在を調べると共に、L-MPZ のみを発現するマウス (L-MPZ マウス) を CRISPR-Cas9 法を用いたゲノム編集により新たに作製し表現型や形態学的特徴の解析を行った。

【実験方法】

正常の成獣及び発達段階のマウス坐骨神経における L-MPZ の局在を免疫染色により調べた。L-MPZ のみを発現する L-MPZ マウスは myelin protein zero (P0) の本来のストップコドン (TAG) をアラニンのコドン (GCG) に変換することで作製し、野生型と比較した。運動機能としての表現型として tail suspension test を行い評価した。また P0 を L-MPZ に置き換えたことによる末梢神経への影響を評価するために坐骨神経を用い Western blot 法及び凍結切片や神経解きほぐし標本による免疫組織染色法で解析した。

【結果・考察】

正常坐骨神経組織を用いた免疫染色では、P0 がコンパクトミエリンに局在するのに対して L-MPZ はそれ以外のミエリンの部位にも存在することが明らかとなった。L-MPZ マウスの tail suspension test では野生型に比べてヘテロ接合体及びホモ接合体において有意に異常が認められた。またその異常の度合はホモ接合体の方が大きかった。坐骨神経の免疫組織学的解析では、ミエリン膜の異常やマクロファージの浸潤など明らかな異常が認められ、Western blot 法ではホモ接合体においてミエリンタンパク質の減少が認められた。L-MPZ の局在が P0 とは異なる点や P0 欠損マウスではこれらの異常が報告されていないことから L-MPZ は P0 とは異なる機能を持つ可能性がある。また運動障害の度合とミエリンの異常の度合が相関する可能性も考えられた。以上のことから、L-MPZ はミエリンの形成あるいは維持に関与し、また P0 と L-MPZ のタンパク質量比の変化が末梢有髄神経の機能に影響する可能性が示唆された。

ネガマイシン誘導体のリードスルー活性に及ぼす トランスポーターの影響

○飯田奏子、志村 可奈恵、濱田圭佑、田口晃弘、岸本久直、高山 健太郎、
白坂善之、林 良雄、井上勝央
東京薬大・薬

【背景・目的】

mRNA がコードするアミノ酸コドンを終止コドンに変換するナンセンス突然変異は、がんや遺伝性疾患の発症・進展における主要な要因であることが指摘されている。これらの治療を行うためには、病態に関わる細胞の遺伝子に含まれる特定のナンセンス突然変異配列を修復する必要があるが、現在までのところ臨床応用可能な遺伝子編集技術は確立されていない。一方、ナンセンス変異に対する治療戦略として、タンパク質合成の段階における終止コドンの読み込み自体を阻害するユニークな方法論が注目を集めている。最近、林らは、終止コドンを読み飛ばす活性を有する低分子化合物（リードスルー薬）として、ネガマイシン誘導体（TCP-112）を創製し、培養細胞において強力な終止コドンリードスルー活性を示すことを報告している。しかし、TCP-112 の化学構造から推定される脂溶性は低く、細胞内移行性は小さいと考えられるため、細胞への添加濃度を基準とした活性評価においては、その活性を低く見積もっている可能性が考えられる。そこで本研究では、ネガマイシン誘導体の細胞内濃度とリードスルー活性との関係を明らかにするために、TCP-112 の細胞膜透過性を亢進するトランスポーターの探索およびその影響について検討した。

【実験方法】

ガラクトシダーゼとホタルルシフェラーゼの融合タンパク質をコードする遺伝子のリンカー領域にナンセンス変異を導入した発現コンストラクトと各種トランスポーター遺伝子を導入した発現コンストラクトを Cos 細胞にトランスフェクションし、TCP-112 存在下で培養した後の細胞内ガラクトシダーゼおよびホタルルシフェラーゼ活性を測定した。

【結果・考察】

ネガマイシンおよび TCP-112 の構造がジペプチドと類似していることからペプチドトランスポーター 1 (PEPT1) の影響について検討したところ、TCP-112 のリードスルー活性は PEPT1 発現細胞において顕著に増大することが示された。その増強効果は、検討した TCP-112 の濃度範囲 (0.1~0.2 mM) において認められた一方、同様なリードスルー活性を有するアミノグリコシド系抗生物質の G418 では認められなかった。また、TCP-112 によるリードスルー活性は、主要なアミノ酸トランスポーターや有機カチオントランスポーターの発現の影響を受けないことが示された。以上の検討より、PEPT1 は TCP-112 を基質として認識し、細胞内へ輸送することにより、リードスルー活性を増強することが示唆された。

NMDA 誘発性神経細胞障害に対する Furin 阻害薬の効果

○山田 まりこ、林 秀樹、松嶋 菜穂子、井上大輔、大畑 芽衣子、袁 博、高木教夫
東京薬大・薬

【背景・目的】

脳梗塞ではグルタミン酸興奮毒性、活性酸素種、栄養因子欠乏など様々な機序が関与して脳組織障害が引き起こされる。虚血による過剰なグルタミン酸の遊離は、*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体を介した細胞内への Ca^{2+} 流入を誘導し、神経細胞死を惹起する。この細胞死の過程で種々のタンパク質分解酵素が活性化され、神経機能を障害することが知られているものの、この過程におけるタンパク質分解酵素の担う役割は明らかでない。そこで本研究は、初代培養大脳皮質神経細胞を用いて NMDA 障害時のタンパク質分解酵素の神経細胞死への関与を検討した。

【方法】

胎生 16 日目のラット大脳皮質を摘出し神経細胞の初代培養を行った。培養後 10 日目に NMDA 型グルタミン酸受容体のリガンドである NMDA を処置し細胞障害を誘発した。NMDA 処置 24 時間前から処置終了までタンパク質分解酵素阻害薬 (Furin inhibitor, γ -secretase inhibitor, Matrix metalloproteinase, Proprotein convertase subtilisin / kexin type 9 inhibitor) を添加した。蛍光カルシウム指示薬を用いて NMDA 処置による細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を測定し、処置 1 時間後に生物発光アッセイ法、4 時間後にイムノブロット法によりカルパイン活性を解析した。また、処置 24 時間後に細胞生存率を XTT 法で測定した。

【結果・考察】

NMDA 誘発性神経障害に対する数種のタンパク質分解酵素阻害薬を検討した結果、Furin 阻害薬が NMDA 誘発障害に対して濃度依存的な保護効果を発揮した。しかし NMDA 処置直後の細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化に対し阻害薬は影響を与えなかった。次にカルパイン活性の変化を解析した結果、NMDA 処置によるカルパイン活性化が Furin 阻害薬により抑制された。このことから NMDA 処置で Furin の活性化が惹起され、それに基づくカルパインの活性化が神経細胞死誘発の一端を担うことが示された。本研究は、NMDA 誘発性神経細胞死における Furin の病態生理学的役割の一端を明らかにし、神経障害に対する新たな治療標的の可能性を示した。

ラミニン活性ペプチドを多糖類に固定化したバイオマテリアルの創製

○熊井 準、保住 建太郎、片桐文彦、吉川大和、野水基義
東京薬大・薬

【背景・目的】

基底膜は、皮膚や血管、神経などの周りに存在する薄い膜状の細胞外マトリックスとして知られている。基底膜は、組織の発生や血管新生、創傷治癒など様々な生物学機能を有しているため組織工学や再生医療分野で注目されている。当研究室では、基底膜に存在する主要な糖タンパク質であるラミニンに着目し、合成ペプチドを用いてラミニンの生物学的機能部位を同定してきた。以前の研究から、ゲル化が容易であるアガロースにシンデカンに結合する AG73 を混合した AG73/アガロースは強い細胞接着活性や神経突起伸長などの多くの生物学的機能を誘導し、細胞移植用基材やインジェクタブルゲルなど医療応用への発展が期待されている。しかし、ペプチド/アガロースはシンデカンに結合する AG73 でのみで生物学的活性を示し、インテグリンに結合する A99 や EF1/アガロースでは生物学的活性を示さなかった。そこで本研究では、インテグリンにも応用可能なペプチド-アガロースの開発を目指した。

【結果・考察】

アガロース末端の糖を過ヨウ素酸ナトリウムにより開裂させ、アルデヒドアガロースを得た。次に、アルデヒドアガロースと N 末端に Cys を付加したペプチドを反応させ、ケミカルライゲーション法を用いてペプチド-アガロースを作製した。A99a/アガロースと A99a-アガロース、アルデヒドアガロースを 2%、1%、0.5% の条件で溶解させ、細胞接着活性を評価した。A99a-アガロースは容量依存的な細胞接着活性を示し、伸展した細胞形態が観察されたが、他のアガロースは細胞接着活性を示さなかった。このことから A99a-アガロースは受容体特異的に細胞と相互作用し、細胞接着を促進することが示された。本研究で開発したペプチド-アガロースは、組織工学や再生医療に応用可能なバイオマテリアルとして期待できる。

Stop codon readthrough により産生される 末梢神経系ミエリン構成分子 L-MPZ の機能解析

○竹原雅之、○中島鉄博、大谷嘉典、檜崎琢朗、山浦大輔、山口宜秀、馬場広子
東京薬大・薬

【背景・目的】

近年、遺伝性筋ジストロフィーなど翻訳領域内の 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の治療のために nonsense 変異を readthrough させ機能タンパク質を産生させる薬 (readthrough 薬) の開発が進められている。一方で、最近、通常の stop codon を readthrough させることにより新たに C 末側に機能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ほ乳類においても明らかとなっている。本研究では、readthrough 薬の生体への影響を考慮するために、正常末梢神経組織中で myelin protein zero (P0) mRNA の stop codon 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ことを目的としている。今回、P0 を欠損し L-MPZ のみを発現するマウス (L-MPZ マウス) を作製し、末梢神経系にどのような影響を及ぼすのか調べた。

【実験方法】

L-MPZ マウスは、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により P0 の stop codon (TAG) を Ala (GCG) に変換して作製した。PCR 法による遺伝子型決定法を確立し、4 匹の F0 マウスと野生型マウスの掛け合わせにより、2 系統を樹立した。10 週齢において、それぞれの系統のヘテロ接合体とホモ接合体を野生型と比較した。運動機能を tail suspension test、P0 と L-MPZ のタンパク質量比を SDS ポリアクリルアミド電気泳動法 (SDS-PAGE)、坐骨神経組織の状態を蛍光免疫染色法、ミエリンタンパク質の量を Western blot 法で評価した。

【結果・考察】

SDS-PAGE 後のゲル染色の結果、野生型と比較してヘテロ接合体では P0 の量が減少し L-MPZ の量が増加していた。ホモ接合体では、P0 がなく L-MPZ のみが認められたが、その量はヘテロ接合体と同程度であった。Tail suspension test ではヘテロ接合体で運動機能に異常が認められ、その異常はホモ接合体でより顕著であった。免疫蛍光染色においても、坐骨神経の有髄軸索で L-MPZ の発現量増加がヘテロ接合体とホモ接合体共に見られたが、野生型と比較してコンパクトミエリン部分やランビエ絞輪周辺部の異常はホモ接合体の方が大きかった。また Western blot では ER stress マーカーや非ミエリン Schwann 細胞マーカーの増加と共にミエリン塩基性タンパク質の減少が明らかとなった。以上の結果から、P0 と L-MPZ の量のバランスが L-MPZ に大きく傾いた場合にミエリンに構造的な異常が生じ運動障害が引き起こされること、また P0 と L-MPZ では役割が異なる可能性があることなどが示唆された。

ラミニン α 2鎖由来ペプチドを用いた三元複合体による ジストログリカン指向性遺伝子デリバリーシステムの開発

○檜木侑子、葦沢慧、片桐文彦、佐々木愛理、高橋葉子
吉川大和、野水基義、根岸洋一
東京薬大・薬

【背景・目的】

現在、様々な遺伝子疾患治療のための核酸医薬とその遺伝子デリバリーシステム（GDS）が開発されつつあるが、筋組織選択的な GDS は未だ確立されていない。しかし、筋ジストロフィーのような筋遺伝子疾患への筋組織選択的 GDS の有用性は高いと考えられる。当研究室ではこれまでにラミニン α 2鎖由来 α ジストログリカン親和性ペプチド（A2G80-R9）を用いた polyplex を用いることで筋芽細胞由来 C2C12 への選択的かつ効率的な遺伝子導入が可能であることを示してきた。しかし血清タンパクの存在下での著しい活性低下が *in vivo* への本 polyplex 適応の課題であった。本研究は、A2G80-R9 とプラスミド DNA（pDNA）、Poly (Ethylene Glycol) Polyethyleneimine (PEG-PEI) とを三元複合体化し、生理的条件下における安定性向上を図ることで筋細胞選択的かつ高効率な遺伝子デリバリーシステム（GDS）の開発を目的とし、調製した三元複合体の物性評価ならびに筋芽細胞由来 C2C12 細胞への遺伝子導入能と細胞傷害性を評価した。

【実験方法】

A2G80-R9/PEG-PEI 混合液と pDNA の混合し、polyplex を調製した。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 による ζ 電位測定を行った。また Luciferase assay および MTT assay により、本三元複合体の血清存在下での C2C12 への遺伝子導入効果と細胞傷害性を評価し最適な形成 N/P 比を決定した。また、対照実験として A2G80-R9 をスクランブル配列に置き換えた際の遺伝子導入効果を評価した。さらに蛍光標識 pDNA を用いた本 polyplex を各細胞への添加後、共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）により pDNA の細胞内局在の観察を行った。

【結果・考察】

A2G80R9 を用いた三元複合体は総 N/P 比 20 以上で 90 nm 程度の粒子径と中性域の ζ 電位を示した。Luciferase assay では C2C12 に対して A2G80-R9 を使用した三元複合体（総 N/P 比 40 付近）を反応させた場合に対照群に比較して 3 倍程度の高い遺伝子導入効果を示した。さらに CLSM により本 polyplex が C2C12 への高い移行性を持つことが示唆された。

以上のことから、A2G80-R9 と PEG-PEI を用いた本三元複合体は、血清に対する抵抗性を獲得するとともに A2G80 配列のジストログリカン親和性と PEG によるステルス化・低毒性化、PEI のプロトンスポンジ効果の特徴を併せ持ち、筋細胞指向的かつ高効率な遺伝子導入を可能にし得ると考えられる。今後は、筋疾患治療に有用な GDS の開発に向け更なる検討を進めていく予定である。

有機触媒を用いた不斉 direct vinylogous aldol 反応

○坂井崇亮、平島真一、山下祥史、中野 樹、中島康介、古石裕治、三浦 剛
東京薬大・薬

【背景・目的】

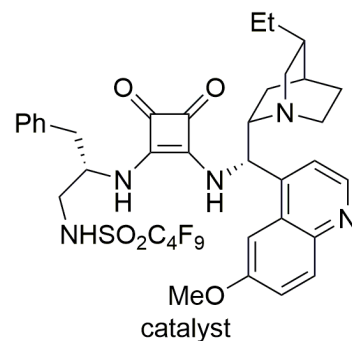
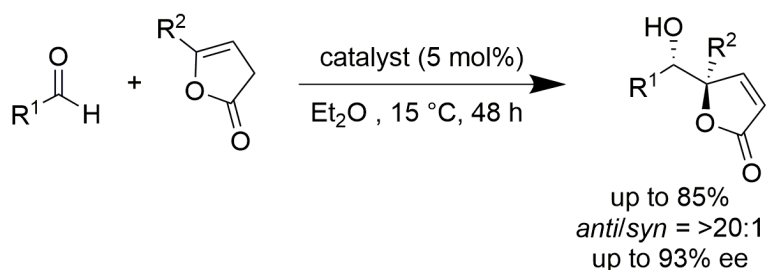
γ -Butenolide 骨格は天然化合物や生理活性物質に含まれる基本構造であり、キラルな γ -butenolide 誘導体を得る合成法開発は薬学分野において重要な研究課題である。当研究室では、環境に優しい有機触媒を用いた立体選択的な反応開発を行っており、新たに設計開発したスクアラミド・スルホンアミド型有機触媒が、無置換の γ -butenolide (γ -crotonolactone) と種々のアルデヒドとの不斉 direct vinylogous aldol 反応を効率よく進行させることをすでに報告している。¹⁾ 今回、 γ 位に四級炭素中心を有するキラルな γ -butenolide 誘導体を合成することを目的に、種々の置換基を有する γ -butenolide 誘導体とアルデヒドとの不斉 direct vinylogous aldol 反応について詳細に検討を行った。

【実験方法】

スクアラミド・スルホンアミド型有機触媒の存在下、 γ 位に置換基を有する α -angelica lactone をはじめとする種々の置換様式の γ -butenolide 誘導体とアルデヒドを反応させて、その立体選択性について詳細に検討した。

【結果・考察】

以下に示すスクアラミド・スルホンアミド型有機触媒を用いて、 α -angelica lactone とアルデヒドを反応させたところ、高収率・高立体選択的に四級不斉炭素を含む γ -butenolide 誘導体を得ることに成功した。種々の置換基を有する γ -butenolide 誘導体を用いた基質一般性についても報告する。



【文献】

- 1) T. Sakai, S. Hirashima, Y. Yamashita, R. Arai, K. Nakashima, A. Yoshida, Y. Koseki, T. Miura., *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 4661.

筋組織選択的な DDS を目的としたペプチド修飾リポソームの調製と筋指向性の評価

○佐々木愛理、林 由浩、菰沢 慧、片桐文彦、坂井崇亮、吉田彰宏、平島真一、三浦 剛、高橋葉子、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、筋肉を支えるジストロフィンタンパクをコードする遺伝子に変異が起ること、ジストロフィンタンパク質が正常に作られない遺伝性疾患である。そのため筋繊維の破壊・壊死が起こり、次第に筋萎縮と筋低下が起き、死に至る。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、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。しかし AON は筋細胞に取り込まれにくく、高い有効血中濃度を要するという問題点があることから、筋ジストロフィー疾患治療に向けた薬物・核酸デリバリーシステムの開発は重要課題と考えられる。そこで本研究は、筋細胞に豊富に発現しているジストログリカンに高い親和性を持つラミニン $\alpha 2$ 鎖由来ペプチド (A2G80) (野水らにより同定) に着目し、このペプチドを用いてリポソームを調製した。また、今回は従来型のリポソームよりも粒子径を小さくし、膜透過性ペプチド (R8) を使用することでより効率的な送達を目的としてペプチド修飾リポソームの調製を試み、筋組織標的指向性の有無について検討を行った。

【方法】

基本脂質として 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3- phosphocholine (DPPC)、cholesterol、distearoyl phosphatidyl ethanol amine-PEG₂₀₀₀-OMe (DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe)、distearoyl phosphatidyl ethanol amine-PEG₂₀₀₀-maleimide (DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal)を用いた。初めに DPPC:Cholesterol:DSPE-PEG₂₀₀₀ = 55:39:3 の脂質に、脂質量に対して 0.2 mol% となるように DiI を加え、マイクロ流体技術を用いた装置として、NanoAssemblr™ (Precision Nanosystems International Inc.)を用いてリポソームの調製を行った。次にポストインセクション法により DSPE-PEG₂₀₀₀Mal-A2G80、DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe、DSPE-PEG₂₀₀₀Mal-R8 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 にて測定した。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蛍光顕微鏡にて行った。また、マウス筋芽細胞由来 C2C12 を用いて、本リポソームの相互作用性の検討を行った。

【結果及び考察】

作製したリポソームの粒子径は、従来型のリポソームの粒子径である 150~200 nm 程度を大きく下回る 60 nm~80 nm 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。C2C12 への導入実験では、膜透過性ペプチドを使用することで、細胞膜との相互作用性が確認できた。ゆえに 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 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。

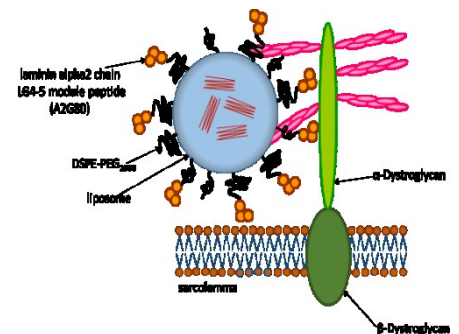


Fig. 1. 筋細胞選択的リポソーム

Conformation Analysis of the A2G80 peptide derived from laminin $\alpha 2$ chain by molecular dynamics simulation

Jun Kumai¹, ○Yuka Fukasawa¹, Fumihiko Katagiri¹, Yamato Kikkawa¹,
Kentaro Hozumi¹, Hironao Yamada², Masaki Fukuda², Takeshi Miyakawa²,
Ryota Morikawa² and Masako Takasu², Motoyoshi Nomizu¹

¹*School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences*

²*School of Life Sciences, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences*

Laminins are glycoproteins composed of α , β , and γ chains. Laminins have diverse biological functions, such as cell adhesion, migration and angiogenesis. Laminin $\alpha 2$ chain is expressed in muscle and nerve tissues, and the interaction between laminin $\alpha 2$ chain and α -dystroglycan (α DG) is essential for proper muscle function [1]. The A2G80 peptide (VQLRNGFPYFSY) derived from laminin $\alpha 2$ chain binds to α DG specifically [2]. We performed molecular dynamics simulation with NPT ensemble and simulated annealing of A2G80 to compare with crystal structure obtained by X-rays as shown in Fig.1. In Fig.2, we show our data of RMSD of A2G80. Furthermore, to identify amino acid residues which determine the structure of A2G80 peptide, alanine-substituted peptides were also simulated, and are compared with the data of circular dichroic spectra. We found TYR⁹ of A2G80 is important for the preservation of peptide conformation. For circular dichroic spectra, PHE⁷ enhances random coil structure.

[1] Colognato, H.; and Yurchenco, P. D.; *Dev. Dyn.*, **218**, 213-234 (2000)

[2] Suzuki, N.; Hosumi, K., Urushibata, S.; Yoshimura, T.; Kikkawa, Y.; Gumerson, J. D.; Michele, D. E.; Hoffman, M. P.; Yamada, Y.; and Nomizu M.; *Matrix Biol.*, **29**, 143-151 (2010)

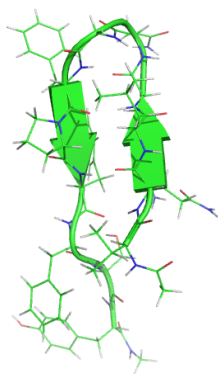
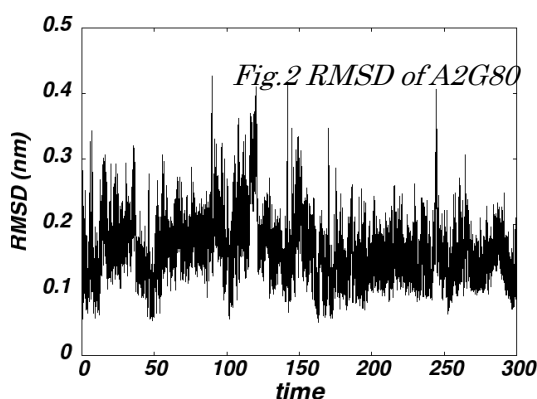


Fig.1 A2G80 (X-ray)



Immunohistochemical analysis of the distribution of L-MPZ during sciatic nerve development

○Jingjing Cui^{1,2}, Yoshinori Otani², Yoshihide Yamaguchi², Hiroko Baba²

¹*China Acad of Chin Med Sci*, ²*Tokyo Univ of Pharm and Life Sci*

【Background and Purpose】

Myelin protein zero (MPZ), as a major myelin protein (~30 kDa) in the peripheral nervous system (PNS), is important for the formation and stabilization of the multilamellar membrane structure of compact myelin. Previous study showed a highly antigenic 36-kDa neuropathy-associated protein (designated L-MPZ) was a novel stop codon readthrough isoform of MPZ that contained an extended 63 amino acids containing an additional predicted PKC phosphorylation site. While L-MPZ may have some unique roles in normal and pathological myelin states, the function and distribution in the PNS myelin are still unknown. Here, we focused on the study of the localization of L-MPZ during sciatic nerve (ScN) development.

【Methods】

ScNs of postnatal day (P) 0-21 and adult ICR mice were fixed by transcardial perfusion with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate-buffered saline. To investigate the localization of L-MPZ during ScN development, immunostaining of longitudinal and cross cryosections was performed using antibodies to L-MPZ, myelin basic protein (MBP), pan-neurofascin and neurofilament (NF). Images were captured with a laser-scanning confocal microscope.

【Results and Discussion】

In developing ScNs, L-MPZ and MBP were detected from P1 and P0 respectively, and their positive signals increased with age. L-MPZ-positive signals were colocalized with MBP in compact myelin, which ensheathed NF-positive axons. The number of axons surrounded by L-MPZ-positive myelin was dramatically increased during P0-7. In contrast to MBP, L-MPZ was detected specifically in Schmidt-Lanterman incisures (SLI) and paranodal region. Thus, L-MPZ was expressed during myelinogenesis and localized in the PNS compact myelin and SLI, suggesting that L-MPZ is probably involved in the formation and maintenance of myelin.

脳梗塞後のミクログリアにおける progranulin の病態生理学的変化

○堀之北 一郎、林 秀樹、水村 里沙、山口 龍晃、袁 博、高木 教夫
東京薬大・薬

【背景】

Progranulin (PGRN) は N 結合型糖タンパク質成長因子であり、組織再分化、創傷治癒あるいは、炎症等に関与している。中枢神経系の PGRN は、脳虚血や脳出血後の神経炎症および血管障害に対して保護的に作用することが報告されている。一方、好中球エラスターゼにより PGRN が切断され生じる granulin (GRN) は、炎症を誘導することが知られている。本研究では、広範な領域に小梗塞を形成し、重篤な症状を模倣するマイクロスフェア脳塞栓 (microsphere embolism: ME) ラットおよび初代培養ミクログリアを用いて PGRN および GRN レベルの経時的変化を検討し、その病態生理学的意義について検討した。

【実験方法】

ヒト多発性梗塞を模倣するラット ME モデルを作製し使用した。ラット新生仔初代培養ミクログリアを単離し、lipopolysaccharide (LPS) で処置することで、活性型ミクログリアを作製し細胞レベルで病態を検討した。PGRN および GRN の変化は western blot 法、qPCR 法および免疫組織染色法を用いて検討した。

【結果・考察】

PGRN のタンパク質および mRNA レベルは、虚血側大脳皮質で ME 後 3 日目に増加した。さらに、LPS 処置後の活性型ミクログリアで PGRN の発現が増加した。また GRN タンパク質レベルは、ME 後 1 日目より増加した。同様に 1 日目から上昇した elastase 活性の結果と考え合わせると、GRN は ME 後早期から発現し、脳梗塞後急性期における炎症性サイトカイン等の誘導を促すと推察された。ME 後および LPS 処置後のミクログリアでの PGRN の増加はミクログリアで惹起される神経保護シグナルの 1 つと推察された。また、虚血後早期の elastase 活性の上昇が、PGRN の切断を惹起し、炎症性サイトカイン等を誘導すると考えられた。以上の結果より PGRN および GRN の発現変化は脳梗塞後の病態に寄与する可能性があり、病態進展と保護シグナルの関係についてさらに検討していく必要がある。

有機触媒を用いた不斉ヒドロホスフィニル化反応

○藤野佑樹、平島真一、柴沼早希、中島康介、古石裕治、三浦 剛
東京薬大・薬

【背景・目的】

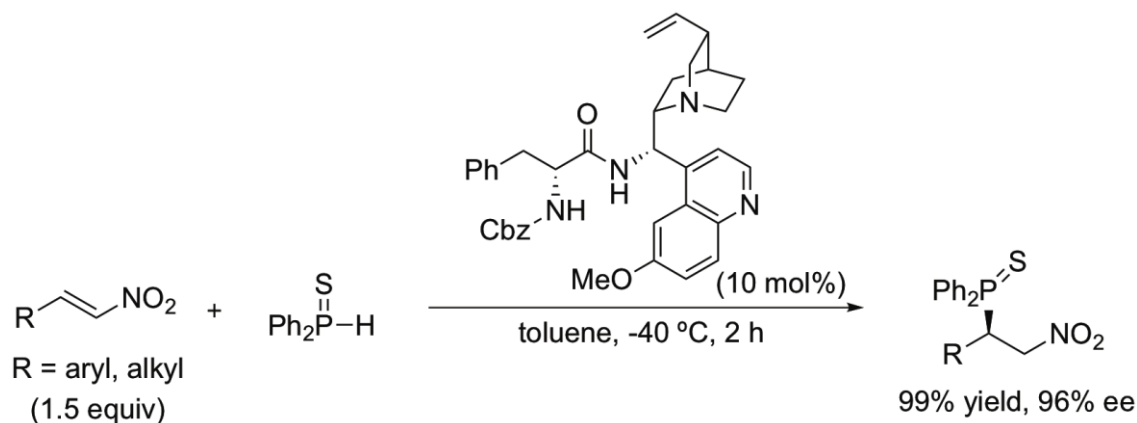
有機触媒を用いた不斉反応は、環境調和型の医薬品合成法として近年目覚ましい発展を遂げている。不斉配位子やルイス塩基触媒などのキラルな有機リン化合物群を合成するために、有機触媒を用いた不斉ヒドロホスフィニル化反応は有効な合成手段である。しかしながら、リン求核剤として用いられる第二級ホスフィンオキシドは試薬の不安定性、低い反応性、生成物の難溶解性などの問題点を有している。これらの問題点を解決できる、より効率的な反応開発を目指して、リン求核剤として第二級ホスフィンスルフィドに着目した。第二級ホスフィンスルフィドの pK_a 値は、第二級ホスフィンオキシドよりも小さいため、高い反応性を期待した。また、硫黄元素の導入によって、生成物の低極性溶媒への溶解性改善も期待できる。このような背景において、第二級ホスフィンスルフィドを用いたニトロアルケンへの不斉ヒドロホスフィニル化反応について検討を行った。

【実験方法】

モデル基質として、以下に示すジフェニルホスフィンスルフィドとニトロアルケンを用いて、有機触媒存在下、トルエン中、室温にて不斉ヒドロホスフィニル化反応条件を詳細に検討した。

【結果・考察】

検討の結果、第二級ホスフィンスルフィドは第二級ホスフィンオキシドよりも有用で取り扱い容易であることが分かった。反応条件を精査することで、高収率・高立体選択的に目的の β -ニトロホスフィンスルフィド化合物を得ることに成功した。種々の置換基を有するニトロアルケン誘導体を用いた基質一般性についても報告する。



低リン食餌が筋肉代謝に与える影響

○中川瑠美、渡橋弘貴、渡部琢也、斎藤裕紀、稲川俊彦、伊東史子
東京薬大・生命

【背景・目的】

無機リン酸(以下、リン)は生体の基本的構成成分であり、骨や軟組織、細胞外液、細胞膜などに分布する。リン代謝は、ホルモン調節のもとに腸管における吸収と腎臓からの排泄によって維持されている。近年、リン代謝異常マウスに高リン食を与えると、動脈硬化や骨粗しょう症が誘発されることが明らかとなり、高リン食と老化現象の関連が報告された。リンは生体を支える様々なシグナルカスケードに必須の分子であり、低リン食は過剰なシグナルを抑制できる可能性がある。そこで、過剰なシグナル異常が顕著となる腫瘍に注目し、低リン食が与える影響について検討した。

【実験方法】

麻酔下の C57BL/6 マウスの背部皮下へ LLC (Lewis Lung Carcinoma) 2.5×10^5 cells/100 μ L を移植した担癌モデルマウスを作製した。当研究室の解析から、この担癌モデルマウスは移植 3 週間程度でがん悪液質が起こる条件を利用した。担癌モデルマウスに普通飼料 (Ca: 0.9%・P: 0.69%) または低リン酸飼料 (Ca: 0.9%・P: 0.027%) および水を自由摂取により与えた。LLC 移植日から 1 週間ごとに体重を計測するとともに、移植 3 週間後にマウスを安楽死させ、腫瘍の増殖、腫瘍の病理切片像、がん悪液質への影響について検討した。

【結果・考察】

継続的な体重変化を比較したところ、普通食餌群よりも低リン食餌群の体重増加は緩慢であり、腫瘍の増殖、重量やサイズ、腓腹筋重量に差は見られなかった。腫瘍組織の病理切片を作成し、アトーシスや細胞増殖について検証したところ、両群には差が見られなかった。しかし、腓腹筋の筋線維の増加が認められ、低リン食餌はがん悪液質による筋肉消耗に対して阻害的に働く可能性が示唆された。また、血管内皮細胞マーカーである PECAM-1 抗体を用いた腫瘍の染色像は、低リン食餌群に形成された血管において、血管径が増大していた。今後は、ミオスタチンシグナル阻害剤 (Peptide-2) を用いて、がん悪液質への効果を検証する予定である。

Identification of α -dystroglycan binding peptide in the laminin α 2 chain LG4-5 modules

○Guangrui Zhang, Jun Kumai, Kazuki Ikari, Xiao Yang, Yumika Sugawara,
Fumihiko Katagiri, Kentaro Hozumi, Yamato Kikkawa, and Motoyoshi Nomizu
School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

Laminins, major components of basement membranes, are consisted of α , β , and γ chains. To date, five α , three β , and three γ chains have been identified. Five α chains express with tissue and developmental stage specific manners, and the laminin α 2 chain specifically expresses in skeletal muscle, peripheral nerves, brain and capillaries. Laminins bind many cell surface receptors and the major receptor of laminin α 2 chain is integrin α 3 β 1, integrin α 7 β 1, syndecan, and α -dystroglycan (α -DG). Specific binding of laminin α 2 chain with α -DG is critical to maintain the structure and function of skeletal muscle, and genetic disruption of laminin α 2 chain causes the muscular dystrophy. Laminin α 2 chain binds α -DG through its C-terminal laminin globular module of LG4-5. Previously, we synthesized 42 peptides that covered the whole sequence of laminin α 2 chain LG4-5 and determined the two α -DG interacting peptides of A2G78 (GLLFYMARINHA) and A2G80 (VQLRNGFPYFSY) [1]. A2G78 and A2G80 significantly inhibited α -DG binding with laminin α 2 chain LG4-5 recombinant protein. In this study, we prepared Fc-tagged recombinant α -DG (Fc-DG) to determine the direct α -DG binding sequence from laminin α 2 chain LG4-5. The direct α -DG binding with peptides was evaluated peptide-chitosan matrix ELIZA method. All peptides derived from laminin α 2 chain LG4-5 were synthesized with CGG residue on their N-terminus and conjugated on the MB-chitosan to construct peptide-chitosan matrix, respectively. Fc-DG was incubated with various peptide-chitosan matrices, and bounded Fc-DG was detected by anti-Fc antibody. As results, A2G77 (CGG-LEVRTEAESGLLF)-chitosan matrix showed strong Fc-DG binding. The A2G77 site may play an important role for α -DG binding in the laminin α 2 chain and the peptide is useful for elucidating the function of the laminin α 2 chain.

[1] Suzuki N, Hozumi K, Urushibata S, Yoshimura T, Kikkawa Y, Gumerson JD, Michele DE, Hoffman MP, Yamada Y, Nomizu M. *Matrix Biol.*, **29**, 143-151, 2010.

マイクロ流体技術を用いたリポソーム作製における基礎的検討

○林 由浩、佐々木愛理、濱野展人、高橋葉子、根岸洋一
東京薬大・薬

【背景・目的】

効率的な薬物治療および遺伝子治療を行なうための、ドラッグデリバリーシステム (DDS)が注目され、薬物や遺伝子の運び屋として、脂質、ポリマー、タンパク質を用いたナノ粒子の開発が盛んとなっている。その中でもリポソームは、生体膜由来であるリン脂質で構成されることから、安全性の面で優れていることが既に知られている。一般的に、リポソームの作製方法として、薄膜法、逆相蒸留法 (REV 法)などが用いられているが、作製の際に多くの工程 (5-10 工程)を必要とすることから、工業化・臨床応用 (抗体やペプチドなどの生理活性物質の搭載、及びそれら製剤のスケールアップ)において課題を残している。これら欠点を克服できる新たな作製法として、マイクロ流体技術を用いたリポソーム作製法が、近年注目を浴びている。マイクロ流体技術を用いたリポソームの作製は、エタノール注入法の原理を用いており、本技術を用いたリポソームの利点として、2 工程という、非常に短い工程で作製できるということ、脂質溶液 (有機溶媒) と緩衝液の混合速度を迅速にできることで、通常作製法と比較し、小さな粒子径のリポソームを得られるという報告もある。

今回、脂質組成や脂質溶液と緩衝液の混合比・混合速度など、マイクロ流体技術に関する各種パラメータが及ぼす基礎検討を行ない、リポソーム作製の最適化を検討したので、報告する。

【方法】

基本脂質として 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC)、Cholesterol (Chol)、distearoyl phosphatidyl ethanol amine-PEG₂₀₀₀-OMe (DSPE-PEG2000-OMe)を用いた。マイクロ流体技術を用いた装置として、NanoAssemblr™ (Precision Nanosystems International Inc.)を用いた。脂質組成を DSPC:Chol:DSPE-PEG2000-OMe = 55:40:44:1-5 (mol%)となるようエタノールに溶解後 (終濃度: 14 mg/ml)、緩衝液と脂質溶液の比率 (Flow Rate Ratio :FRR)、混合速度 (Total Flow Rate : TFR)を変更し、NanoAssemblr により作製した (Fig. 1)。エタノールを除去するため、透析処理を行ない、リポソームを回収後、リポソームの粒子サイズを NICOMP により評価した。

【結果及び考察】

脂質溶液の比率 (FRR)依存的に粒子径の増大が確認された。TFR においては、速度上昇に伴い、わずかに粒子径が減少したものの、FRR と比較し、大きな変化は観察されなかった。また、DSPE-PEG2000-OMe の割合を増やすほど、粒子径が減少することも明らかとなった。これらの結果から、DSPC:Chol:DSPE-PEG2000-OMe = 55:42:3 (mol%)の組成において、70nm 前後のリポソームを得ることが出来た。以上の結果より、マイクロ流体技術を用いたリポソームの作製において、各種基本パラメータの粒子径に及ぼす影響について、重要な情報を得ることができ、最適化することに成功した。今後、本技術を応用し、種々の疾患部位選択性を付与したペプチド・抗体修飾リポソームの開発に焦点をあて、検討していきたいと考えている。

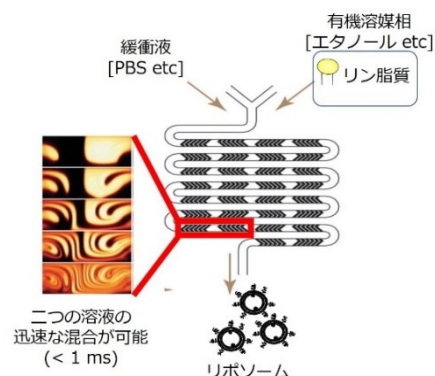


Fig.1 マイクロ流体技術を用いたリポソーム作製における模式図

筋肉における *in vivo* 生物発光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

○志村優太、古屋貴人、白坂善之、岸本久直、井上勝央
東京薬大・薬

【背景・目的】

昆虫由来ルシフェラーゼと D-ルシフェリンとの反応を利用した生物発光イメージングは非侵襲的かつ優れた時空間分解能を有し、マウスなどの小動物における遺伝子発現、多様な細胞内イベントの視覚化および発光性細胞の追跡等に繁用されている。D-ルシフェリンはカルボン酸を有する有機アニオン性化合物であり、生理的環境下における単純拡散による生体膜透過性は極めて低いことが指摘されている。一方、実際の *in vivo* 生物発光イメージングでは、筋肉を含む様々な組織・細胞内での生物発光イメージングが数多く報告されており、膜透過性に関わる大きな問題は見受けられない。このことから、D-ルシフェリンの細胞・組織への移行に、生体膜透過性を促進する内因性トランスポーターが関与する可能性が考えられる。そこで本研究では、D-ルシフェリンの持つカルボン酸基に着目し、D-ルシフェリン/ルシフェラーゼ反応におけるモノカルボン酸トランスポーター (MCTs) の関与の可能性について検討した。

【実験方法】

HEK293 細胞に *Pyrearinus termitillumians* luciferase(eluc) を安定発現させた eluc/HEK293 細胞を作成した。eluc/HEK293 細胞における内在性 MCTs の発現を RT-PCR を用いて検討した。また、eluc/HEK293 細胞に MCT1 及び補助タンパクである CD147 を一過性発現させ、D-ルシフェリン添加時の発光強度をルミノメーターで測定した。加えて、MCT1 及び MCT2 の関与を分離評価するため、選択的阻害剤である AR-C155858 存在下における発光強度を測定した。

【結果・考察】

RT-PCR 解析より、eluc/HEK293 細胞における内在性の MCTs (MCT1-4) は MCT1 のみであることが示された。eluc/HEK293 細胞における D-ルシフェリン添加時の生物発光強度は、MCT1 の選択的阻害剤である AR-C155858 により著しく阻害された。また、eluc/HEK293 細胞に MCT1 または CD147 単独、及び MCT1 と CD147 を一過性発現させ、ルミノメーターで発光強度を測定したところ、MCT1 単独時と比べ MCT1 と CD147 の存在下で有意な発光強度の増大が確認された。以上の結果から、D-ルシフェリンは MCT1 に認識され、細胞内に取り込まれていることが示唆された。MCT1 は筋組織で高発現しているため、筋組織への D-ルシフェリンの移行に寄与すると考えられる。

マウス坐骨神経 Lysolecithin 脱髄への IVIg 製剤中の抗ミエリン抗体の効果の検討

○瀬戸口潔、河田紋実、寺井義貴、鈴木尚穂、林 明子、馬場広子
東京薬大・薬

【背景・目的】

Large-myelin protein zero (L-MPZ)は、protein zero (P0)の C 末端側に 63 アミノ酸が付加した構造を有する 36 kDa の末梢ミエリンタンパク質である。慢性炎症性脱髄性多発神経炎 (chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: CIDP) 患者の血清の解析により、L-MPZ を認識する IgG 抗体価が著しく高い症例があることが知られている。しかし、血中の抗 L-MPZ 抗体と CIDP の病態との関連性は未だ明らかではない。glovenin®は高用量ヒト免疫グロブリン静注 (Intravenous Immunoglobulin: IVIg) 療法に用いられる静注用ヒト IgG 製剤である。IVIg 療法による CIDP 治療時において、投与開始直後から筋力回復が見られる症例があるが、その作用機序は不明である。また、IVIg 製剤はマウスやラットの実験的自己免疫性神経炎にも有効である。IVIg 製剤中には末梢ミエリン中の L-MPZ を認識する抗体が一定量含まれており、CIDP の治療効果の一端を担っている可能性が考えられるものの詳細は明らかではない。

本研究では、抗 L-MPZ 抗体の脱髄病態への関連性を明らかにすることを目的とし、マウス坐骨神経に Lysolecithin を投与し IVIg 製剤の化学的脱髄への効果を調べた。

【実験方法】

9～10 週齢の雄性 ICR マウスの坐骨神経内に Lysolecithin 又は緩衝液を投与した。その後、glovenin®または生理食塩液を 1 日目に尾静脈投与(0.4 ml)、3 日目に腹腔内投与(0.2 ml)した。7 日目または 14 日目に全血採血し坐骨神経を摘出した。神経は 4% Paraformaldehyde で固定後、凍結切片を作製し、脱髄部の面積を計測した。神経組織への glovenin®の沈着を蛍光抗体法で観察した。また ELISA 法で glovenin®のマウス血中濃度を調べた。

【結果・考察】

glovenin®のマウス血中濃度は、7 日目には高濃度(2~2.5 mg/ml)で検出され、十分に持続した効果をもたらしていると考えられた。Lysolecithin 投与後 7 日目と 14 日目の組織標本では、glovenin®投与群において生理食塩液投与群と比較して脱髄状態が明らかに異なっていた。脱髄局所へのヒト IgG 抗体の沈着が見られ、ヒト IgG 抗体が結合したミエリン崩壊物を貪食したマクロファージも観察された。これらの結果から、glovenin®は脱髄時にミエリンに沈着し、脱髄を修飾すると考えられ、glovenin®に含まれる抗 L-MPZ 抗体が関わる可能性が示唆された。

脳梗塞病態における DNMT3a の病態生理学的役割

○浅田 眞由美、喜早 慧士、堀之北 一郎、林 秀樹、袁 博、高木 教夫
東京薬大・薬

【背景・目的】

エピジェネティクスの代表的なものに DNA メチル化がある。DNA プロモーター領域のメチル化は、様々な疾患の病態形成に関与していると考えられている。とりわけ、DNA methyltransferase (DNMT) 3a は、*de novo* メチル化酵素のひとつとして知られており、脳梗塞病態では梗塞領域の増大に寄与している可能性が報告されている。しかしながら、脳梗塞病態での本酵素の病態生理学的役割は詳細に把握されていない。そこで本研究は、DNMT3a に着目し、脳梗塞病態との関わりについて検討した。

【方法】

本研究では、多発性梗塞を模倣するラットマイクロスフェア脳塞栓 (Microsphere Embolism : ME) モデルおよび局所脳虚血モデルとして中大脳動脈閉塞再灌流 (Middle Cerebral Artery Occlusion / Reperfusion : MCAO / R) モデルを用いた。各病態モデルの術後 1、3 および 7 日目の大脳皮質ホモジネートをサンプルとし、ウェスタンブロット法により、DNMT3a タンパク質発現量の変動を観察した。

【結果・考察】

ME 後 1、3 および 7 日目いずれの時期においても 大脳皮質ホモジネートにおける DNMT3a タンパク質発現量は sham 群と比較して増加していた。さらに、虚血中心部および虚血周辺部での変化を明らかにするため、MCAO / R モデルでの解析を行ったところ、MCAO / R 後 1 日目の虚血周辺部において DNMT3a タンパク質発現量は虚血中心部の 2 倍以上に増加した。一方、MCAO / R 後 3 および 7 日目では、1 日目のような発現量変動は観察されず、虚血中心部での DNMT3a タンパク質発現量増加が観察された。異なる脳梗塞発症病態において、DNMT3a 発現量は増加していたものの、その増加は時間的・空間的に異なる推移を示した。今後、質的变化等も検討することで脳梗塞病態時における DNMT3a の病態生理学的意義を明らかにしていく必要がある。

チオウレア型有機触媒を用いたフラン誘導体の不斉アルキル化反応

○阿久津裕士、松本 光、中島康介、平島真一、古石裕治、三浦 剛
東京薬大・薬

【背景・目的】

環境に優しい有機触媒を用いた立体選択的な炭素－炭素結合形成反応開発は、有用な医薬品合成法として、近年注目を集めている。有機触媒と 5-ベンジルフルフラール誘導体から得られるトリエナミン中間体を經由した ϵ 位選択的アルキル化は報告例が少なく、立体選択性に改善の余地がある。¹⁾

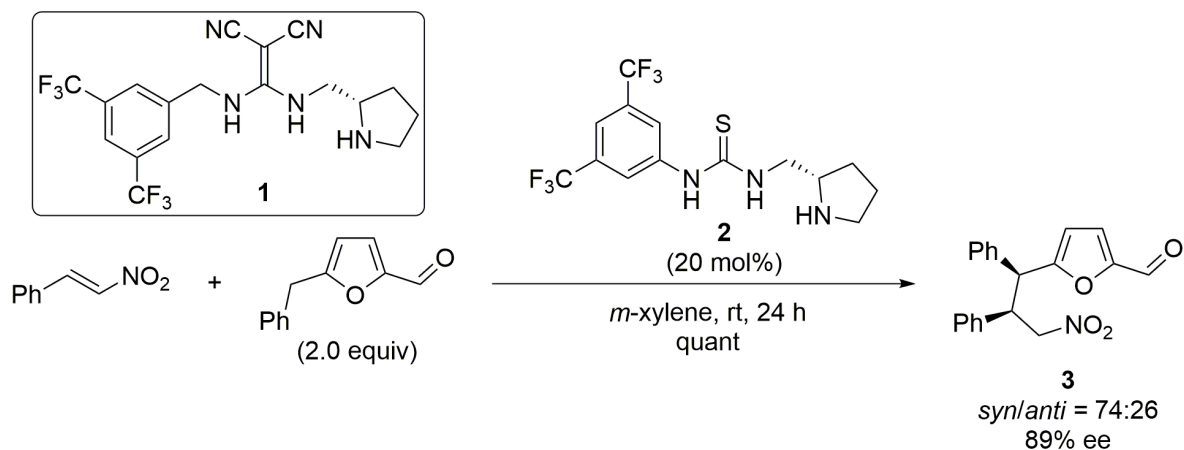
当研究室では、水素結合供与能を有するジアミノメチレンマロノニトリル (DMM)型有機触媒 **1** を開発し、ニトロアルケンと 5-ベンジルフルフラール誘導体との立体選択的 ϵ 位アルキル化反応を報告した。²⁾ 今回、更なる立体選択性の向上を目指して、種々の有機触媒について検討を行った。

【実験方法】

モデル反応として、5-benzylfuran-2-carbaldehyde の *trans*- β -nitrostyrene への不斉共役付加反応について検討を行った。種々の有機触媒を用いて最適な触媒選定を行った後、反応条件の最適化と基質一般性について詳細な検討を行った。

【結果・考察】

チオウレア基を有する有機触媒 **2** を用いたところ、より高い立体選択性で付加生成物 **3** を得ることに成功した。基質一般性についても報告する。



【文献】

- 1) A. Skrzyńska, A. Przydacz, Ł. Albrecht, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 5682.
- 2) H. Akutsu, K. Nakashima, S. Hirashima, M. Kitahara, Y. Koseki, T. Miura, *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 4759.

D-luciferin トランスポーターの探索及び機能解析と 生物発光イメージングへの応用

○古屋貴人、志村優太、岸本久直、白坂善之、井上勝央
東京薬大・薬

【背景・目的】

生物発光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技術である。その発光源は、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、その発光強度は基質や酵素濃度に依存する。しかしながら、一般に酵素含量は一定であるため、細胞外から細胞内への D-luc の移行量が重要となる。一方、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、細胞膜透過性は低く、単純拡散による細胞膜透過はほぼ起こらないと推察される。そこで本研究では、D-luc の細胞膜透過性を亢進が D-luc/luciferase 反応による発光強度の増大化に繋がると仮説を立て、D-luc を基質とするトランスポーターの探索及び機能解析とその生物発光イメージングへの応用について検討した。

【結果・考察】

HEK293 細胞にヒカリコメツキムシ由来のルシフェラーゼである *Pyrearinus termitillumians* luciferase (eLuc) を安定発現させた HEK293 細胞 (HEK/eLuc) に、有機アニオン性トランスポーターを一過性発現させた結果、OAT1 及び OAT3 の一過性発現により、D-luc/eLuc 反応による発光強度は顕著に増大した。OAT1 を HEK293 細胞に一過性発現させ、D-luc の細胞内取り込みを評価した結果、著しい細胞内への D-luc の蓄積が認められた。OAT1 による D-luc の輸送は、Michaelis-Menten 式に従い、 K_m 値は $0.23 \mu\text{M}$ であった。また、この値は、HEK/eLuc/OAT1 細胞における OAT1 を介した 6-carboxyfluorescein 取り込みに対する D-luc の K_i 値と同等であった。よって、D-luc は OAT1 の良好な基質であることが示唆された。また、*in vivo* 生物発光イメージングへの応用の可能性を検討するため、HEK/eLuc/OAT1 細胞および HEK/eLuc 細胞をマウス及びラットの皮下に移植し、D-luc を腹腔内投与したときの生物発光を IVIS により画像化した。HEK/eLuc/OAT1 細胞を移植した群において、発光強度は HEK/eLuc 細胞を移植した群と比較し顕著に増大した。以上の結果より、luciferase 発現細胞に D-luc トランスポーターとして機能する OAT1 を高発現させることにより、高感度な *in vivo* 生物発光イメージングが可能となり、より詳細な luciferase 細胞の追跡や体内動態の解析に利用できると考えられる。

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 30 年 3 月 19 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



Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

第19回 戦略会議「最終研究成果報告会」

日時

2020年 3月11日(水) 14:00～19:00

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)

【研究報告】

14:00 ～ 16:20

ご挨拶：プロジェクトリーダー 野水基義（病態生化学）

○林 良雄（薬品化学）

筋疾患克服を目指したリードスルー薬・マイオスタチン阻害薬の創製

○馬場広子（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

○井上勝央（薬物動態制御学）

ペプチドトランスポーターによるTCP-112のリードスルー活性の増強

○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

○濱田圭佑（病態生化学）

ラミニン α 2鎖由来 α -ジストログリカン結合ペプチドの探索とその構造活性相関研究略

○林 秀樹（応用生化学）

ラット大脳皮質初代培養神経細胞におけるラミニン-111由来ペプチド-
キトサンマトリクスの生物活性

○根岸 洋一（薬物送達学）

デュシェンヌ型筋ジストロフィー疾患治療に向けた筋組織選択的な核酸・
遺伝子デリバリーシステムの開発

【ポスターによる研究報告】

16:40 ～ 17:20

【意見交換会】

17:45 ～ 19:00

レストラン「マグノリア」にて

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。

【代表】 野水 基義（東京薬科大学 薬学部）

【問合せ先】 井上 勝央（事務局担当） TEL/FAX115042-676-3126 E-mail : kinoue@toyaku.ac.jp

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19回 戦略会議
最終研究成果報告会

講演要旨集

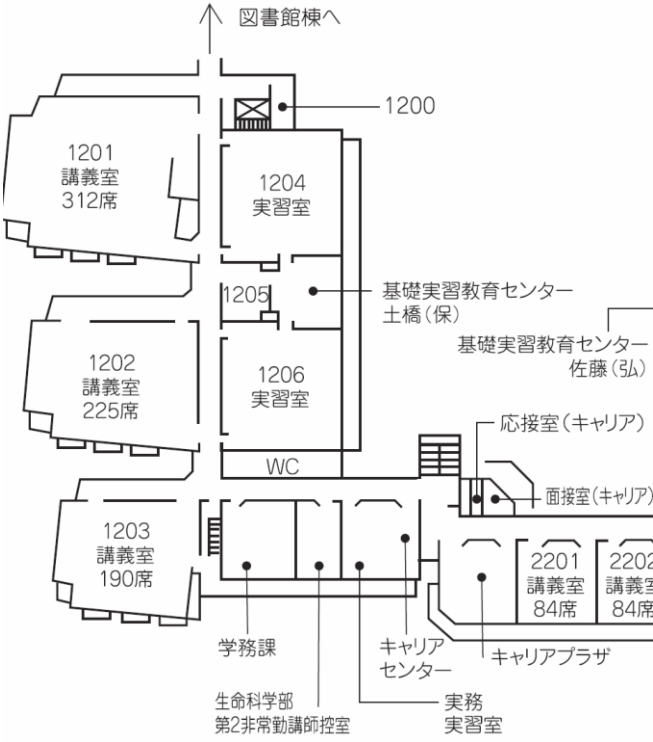
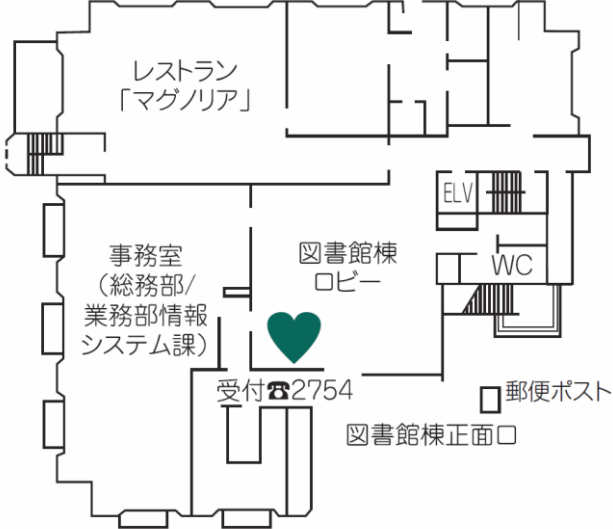
2020 年 3 月 11 日（水）

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）



東京薬科大学

会場のご案内

報告会・講演会 会場	意見交換会 会場
 ↑ 図書館棟へ 1201 講義室 312席 1202 講義室 225席 1203 講義室 190席 1204 実習室 1205 基礎実習教育センター 土橋(保) 1206 実習室 基礎実習教育センター 佐藤(弘) WC 面接室(キャリア) 2201 講義室 84席 2202 講義室 84席 学務課 キャリアセンター キャリアプラザ 生命科学部 第2非常勤講師控室 実務実習室	 レストラン「マグノリア」 事務室 (総務部/業務部情報システム課) 図書館棟 ロビー 受付 ☎2754 郵便ポスト 図書館棟正面口 ELV WC 図書館棟 1階
教育1号館 2階 1203 講義室 (講演) 2201 講義室 (ポスター発表)	図書館 1階 レストラン「マグノリア」

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

2020 年 3 月 11 日(水) 13:30 ～ 15:00

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。

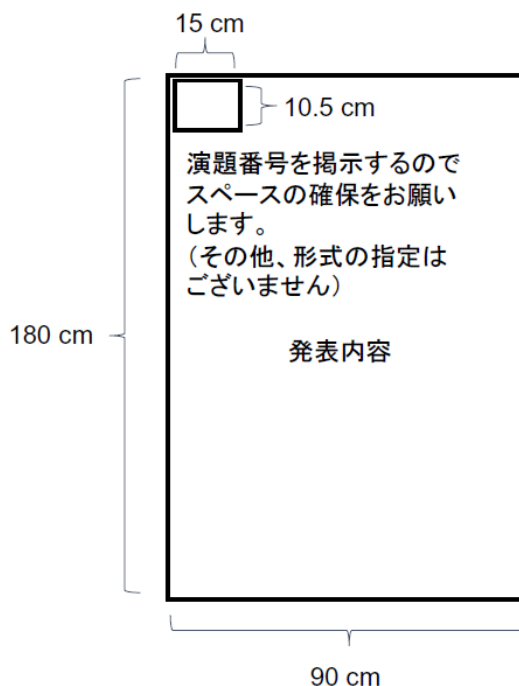
【講演者（特別講演、報告会）へのお知らせ】

- ・ 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、バッテリー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、16 時 40 分から 17 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 11 日 (水) 14 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)。



【意見交換会参加者へのお知らせ】

意見交換会は 17 時 45 分からレストラン「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

14:00 ～ 14:10

ご挨拶: プロジェクトリーダー 野水基義

研究報告1

座長: 高木教夫

14:10 ～ 14:30

S-1:

筋疾患克服を目指したリードスルー薬・マイオスタチン阻害薬の創製

○林 良雄

(東京薬大・薬)

14:30 ～ 14:50

S-2:

**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**

○馬場広子、山口宜秀

(東京薬大・薬)

14:50 ～ 15:10

S-3:

ペプチドトランスポーターによる TCP-112 のリードスルー活性の増強

○井上勝央、志村可奈恵、飯田奏子、濱田圭佑、苔米地隆人、
岸本久直、白坂善之、田口晃弘、野水基義、林 良雄

(東京薬大・薬)

15:10 ～ 15:30

S-4:

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、野口百合¹、高山健太郎²、日向宏樹¹、
林 良雄²、

(¹ 東京薬大・生命、² 東京薬大・薬)

研究報告2

座長:三浦 剛

15:30 ～ 15:50

S-5:

ラミニン α 2 鎖由来 α -ジストログリカン結合ペプチドの探索とその構造 活性相関研究略

○濱田圭佑、張 光端、山田雄二、吉川大和、野水基義
(東京薬大・薬)

15:50 ～ 16:10

S-6:

ラット大脳皮質初代培養神経細胞におけるラミニン-111 由来ペプチド- キトサンマトリックスの生物活性

○林 秀樹、山田まりこ、熊井 準、堀之北一朗、岩谷結衣、高木教夫、
野水基義
(東京薬大・薬)

16:10 ～ 16:30

S-7:

デュシェンヌ型筋ジストロフィー疾患治療に向けた筋組織選択的な核酸・ 遺伝子デリバリーシステムの開発

○根岸洋一、佐々木愛理、菰沢 慧、濱田圭佑、林 由浩、木村優花、
片桐文彦、吉田彰宏、平島真一、三浦 剛、濱野展人、高橋葉子、
吉川大和、野水基義
(東京薬大・薬)

(16:30 ～ 16:40: 休憩、会場の移動)

研究報告 3 (ポスター発表)

16:40 ～ 17:20

P-1 ～ P-17

(2201 講義室)

閉会の挨拶

17:20 ～ 17:30

林 良雄

意見交換会

(17:45 ～ 19:00

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11日(水)16:40~17:20

ポスター会場 (2201 講義室)

- P-1 ラミニンペプチド結合アガロースゲルの創製とその生物活性評価**
○山田雄二、吉田智浩、濱田圭佑、吉川大和、野水基義
(東京薬大・薬)
- P-2 フォリスタチン由来マイオスタチン阻害ペプチドの創製**
齊藤まりこ、高山健太郎、田口晃弘、○谷口敦彦、林 良雄
(東京薬大・薬)
- P-3 ラミニン $\alpha 2$ 鎖由来ペプチドを用いた全身投与可能な筋組織指向性ナノ DDS の開発**
○佐々木愛理、林 由浩、木村優花、菰沢慧、濱野展人、片桐文彦、坂井崇亮、
吉田彰宏、河田雅宏、平島真一、三浦 剛、高橋葉子、吉川大和、野水基義、根岸洋一
(東京薬大・薬)
- P-4 マレイミドへのチオマイケル付加反応を利用した効率的ペプチド-PEG-脂質合成法の開発**
○河田雅宏、坂井崇亮、吉田彰宏、根岸洋一、片桐文彦、阿久津裕士、中島康介、
平島真一、野水基義、三浦 剛
(東京薬大・薬)
- P-5 抗ミエリン抗体を含む IVIg のマウス坐骨神経 lysolecithin 脱髄への効果の検討**
○瀬戸口 潔、林 明子、河田紋実、馬場広子
(東京薬大・薬)
- P-6 リソソームのエキソサイトーシスによる細胞膜透過性の変化**
鷺巣百恵、○苫米地隆人、高橋正樹、岸本久直、白坂善之、井上勝央
(東京薬大・薬)
- P-7 アストロサイトの低酸素・低グルコース誘発炎症反応における progranulin の病態生理学的役割**
○吉澤りほな、堀之北一朗、林 秀樹、岩谷結衣、高木教夫
(東京薬大・薬)
- P-8 有機分子触媒を用いた不斉直截的ピニロガスマイケル付加反応の開発**
○石井大暉¹、平島真一¹、坂井崇亮²、阿久津裕士¹、河田雅宏¹、中島康介¹、三浦 剛¹
(¹東京薬大・薬、²国際医福大・薬)

- P-9 ミオスタチン阻害ペプチドによる糖尿病モデルマウスの症状改善効果**
○日向宏輝¹、尾崎由奈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-10 Identification of α -Dystroglycan Binding Sequences in the Laminin α 2 Chain LG4-5 Modules**
○Guangrui Zhang, Keisuke Hamada, Yuji Yamada, Yamato Kikkawa, Motoyoshi Nomizu
(Sch of Pharm, Tokyo Univ of Pharm and Life Sci)
- P-11 エンドソーム脱出能を付与したラミニン α 2鎖由来ペプチド polyplex による筋組織指向性遺伝子デリバリーシステムの開発**
○菰沢 慧¹、濱田圭佑¹、檜木侑子¹、片桐文彦¹、高橋葉子¹、吉川大和¹、野水基義¹、金川 基²、根岸洋一¹
(¹東京薬大・薬、²神戸大・大学院医)
- P-12 ネガマイシン誘導体 TCP-1109 の創製とリードスルー効率評価系の新規構築**
○田口晃弘、濱田圭佑、大村紀子、嶋野慶樹、澤田直志、高山健太郎、谷口敦彦、林 良雄
(東京薬大・薬)
- P-13 脳梗塞後の GSK-3 β 情報伝達系と神経新生**
○中川 樹、堀之北一朗、林 秀樹、岩谷結衣、高木教夫
(東京薬大・薬)
- P-14 位置選択的ビシナルビスホスフィン誘導体のワンポット合成法**
○廣田瑛紀、平島真一、森田龍輝、高瀬純也、阿久津 裕士、河田雅宏、中島康介、三浦 剛
(東京薬大・薬)
- P-15 骨格筋におけるクレアチニン排出トランスポーターの同定**
○高橋正樹、岸本久直、白坂善之、井上勝央
(東京薬大・薬)
- P-16 第二世代ジアミノメチレンマロノニトリル型有機分子触媒の開発**
○露崎 龍、河田雅宏、阿久津裕士、中島康介、平島真一、三浦 剛
(東京薬大・薬)
- P-17 Immunohistochemical analyses of Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease model, L-MPZ mouse, in development and aging**
○Jingjing Cui, Yoshihide Yamaguchi, Hiroko Baba
(Sch of Pharm, Tokyo Univ of Pharm and Life Sci)

Abstracts

S: 研究報告

P: ポスター発表

筋疾患克服を目指したリードスルー薬・マイオスタチン阻害薬の創製

○林 良雄
東京薬大・薬

筋肉に関する疾患は行動の制限や健康寿命への影響が大きく、特に高齢化の進む我が国においては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創薬基盤研究として、本学「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」の支援のもとリードスルー薬及びマイオスタチン阻害薬の2つの創薬プロジェクトを進めている。本発表ではこれらプロジェクトの今日までの進捗を総括したい。

リードスルー薬の創製は、当該作用を有することが知られている天然ジペプチド様抗生物質 (+)-ネガマイシンを基盤とした研究で、対象疾患はデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) である。我々は、当該疾患の原因の一つであるジストロフィンタンパク質のナンセンス変異を読み飛ばし、機能を有する完全長ジストロフィンの産生を促す薬剤の創製を目指した。即ち、(+)-ネガマイシン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 (ナンセンス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た結果、抗菌作用とリードスルー作用の薬効分離に成功した2種のネガマイシン天然類縁体 (3-エピデオキシネガマイシンおよびそのロイシン付加体) を発見し、更にこれらを新たなリード化合物とする構造誘導から高活性な新規リードスルー化合物の創製に至った。

一方、筋肉量を負に制御する蛋白性因子マイオスタチンの阻害薬研究では、マイオスタチンが受容体に結合することを妨げ、筋肉量を増加させる化合物の創製を目指した。具体的には、マイオスタチンと結合し不活性な複合体を形成することが知られているマイオスタチン前駆体配列 (マウス由来配列) に注目して、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基づく阻害活性評価から、23 残基からなる最小阻害ペプチド配列 (H-WRQNTRYSLRIEAIKIQILSKLRL-NH₂) を同定した。続いてこのペプチドをリード化合物とする構造活性相関研究を実施し、同等な阻害活性を有する小型ペプチド (16 残基) を創製した。更にリード最適化研究から、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。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。

今後、これらの創製した医薬候補化合物が筋疾患治療薬開発に貢献できることを期待する。

【参考文献】

- [1] Hamada, K., *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, 6, 689-694.
- [2] Hamada, K., *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, 10, 1450-1456.
- [3] Takayama, K., *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2015**, 58, 1544.
- [4] Asari, T. *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2017**, 8, 113-117.
- [5] Takayama, K., *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2019**, 10, 985-990.
- [6] Rentier, C., *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2019**, 27, 1437-1443.

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

○馬場広子、山口宜秀
東京薬大・薬

ナンセンス変異による遺伝性筋ジストロフィー症の治療薬の一つとして、stop codon readthrough (readthrough) 薬の開発が行われている。一方、ヒトを含む高等動物の正常組織において、ある種のタンパク質の翻訳時に readthrough が生じ、C 末端の異なる機能分子が産生されることが報告されている。このため、readthrough 薬を開発し臨床応用していく上で、これらの生理的 readthrough に対する薬剤の影響を考慮することは重要である。本研究では、末梢神経組織中で myelin protein zero (P0 or MPZ) mRNA の readthrough によって産生される large myelin protein zero (L-MPZ)に着目し、正常組織における readthrough 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 薬評価系を確立することを目的として研究してきた。これまでに報告したように、複数の readthrough 薬によって、in vitro および in vivo で L-MPZ/P0 量比が増加し、P0 mRNA に対する readthrough 活性が認められた。そこで、L-MPZ/P0 比の増加が髄鞘の形成や維持に及ぼす影響を明らかにするために、P0 遺伝子の stop codon を変異させ、L-MPZ のみを産生する L-MPZ マウスを作製し、末梢神経機能および形態解析を行った。

L-MPZ ホモマウスの成体では、tail suspension test や rotarod test で明らかな運動機能障害を示し、神経伝導速度などの電気生理学的検査でも異常が認められた。末梢神経組織では、有髄神経線維の減少や大径軸索の減少が見られ、重層した髄鞘膜の各層間の解離やランビエ絞輪周辺部の構造異常、髄鞘の長さの短縮など様々な形態異常が認められた。また、活性化マクロファージの浸潤や ER ストレスマーカーの増加から、2 次的な脱髄が推測された。これらの異常は発達段階からすでに見られ始め、加齢とともに進行することがわかった。P0 減少と L-MPZ の増加が見られるヘテロマウスの末梢神経では、ホモマウスよりは軽度ではあるが同様の異常が観察された。さらに、L-MPZ を欠損させた P0 マウスの予備研究において、P0 のみ産生される場合にも軽度ではあるが異常が認められた。

これらの結果から、末梢神経において適切な L-MPZ/P0 量比が正常な髄鞘の形成・維持に必要なことから、今後新たな readthrough 薬の開発に際して P0 mRNA に対する影響を解析することが重要と考えられる。

ペプチドトランスポーターによる TCP-112 のリードスルー活性の増強

○井上勝央、志村可奈恵、飯田奏子、濱田圭佑、苫米地隆人、岸本久直、
白坂善之、田口晃弘、野水基義、林 良雄
東京薬大・薬

デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、ジストロフィン遺伝子の異常により発症する遺伝性筋疾患である。その遺伝子の変異には様々なタイプが報告されているが、その 1 つに mRNA がコードするアミノ酸コドンが終始コドンに変換されるナンセンス突然変異が挙げられる。一般に、ナンセンス突然変異による疾患を治療するためには、病態に関わる細胞の遺伝子に含まれる特定のナンセンス突然変異配列を修復する必要があるが、現在までのところ臨床応用可能な遺伝子編集技術は確立されていない。最近、ナンセンス突然変異に対する治療戦略として、タンパク質合成の段階における終始コドンの読み込み自体を阻害するユニークな方法論が注目を集めており、その活性を有する低分子化合物 (リードスルー薬) としてネガマイシン誘導体 (TCP-112) が創製された。TCP-112 は培養細胞において強力なリードスルー活性を有しているが、その化学構造から推定される生体膜透過性は小さいため、細胞への添加濃度を基準とした活性評価においては、そのリードスルー活性を低く見積もっている可能性が考えられる。

これまでに我々は、トランスポーターを利用した薬物送達の可能性を探るとともに、TCP-112 の細胞膜透過性を亢進するトランスポーターの同定について検討し、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。PEPT1 あるいは PEPT2 と終始コドンをもつルシフェラーゼをコードするレポータープラスミドを COS-7 細胞に一過性発現させ、TCP-112 添加時のリードスルー活性を化学発光により測定した結果、PEPT1 および PEPT2 発現細胞において TCP-112 の効果が顕著に増強することが示された。一方、強力なリードスルー活性を有するアミノグリコシド系抗生物質である G418 では、その影響は認められなかった。PEPT1 および PEPT2 発現細胞における TCP-112 の取り込みを LC-MS/MS により定量した結果、TCP-112 の取り込み活性は、時間依存的に上昇し、細胞外溶液が中性条件下で顕著に高いことが示された。このことから、PEPT1 および PEPT2 は、TCP-112 を基質として認識し、細胞内へ輸送することにより TCP-112 の細胞内濃度の上昇及びリードスルー活性の増強を引き起こすことが示唆された。したがって、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、TCP-112 のプロドラッグ化やトランスポーターを用いた動態制御が望まれる。

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、野口百合¹、高山健太郎²、日向宏樹¹、林 良雄²¹東京薬大・生命、²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、がん患者の死亡と密接に関連する。現在までに、がん悪液質に対する有効な治療は存在しないが、治療戦略の候補として筋肉量の維持療法が期待されている。そこで本研究では、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。ミの 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を *in vivo* で検証した。

【実験方法】

C57BL/6 雄マウス（7 週齢）の背部皮下に、Lewis lung carcinoma (LLC) を 5×10^5 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。

【結果・考察】

HepG2 細胞を用いたレポーターアッセイにより Peptide-2 は MSTN を選択的に阻害できることがわかった。Activin には作用せず、GDF-11 をわずかに抑制したが、GDF-11 も筋肉の分化を負に制御するため、マウスの筋肉消耗抑制には効果的であると考えられた。

マウスの背部皮下に LLC を移植したがん悪液質モデルマウスの腓腹筋に 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がん悪液質の症状が減弱した。具体的には、腓腹筋萎縮と四肢の Grip Strength が改善し、生存期間が延長した。しかしながら、脂肪重量、心筋重量には影響を与えなかった。これらの結果は、Peptide-2 ががん悪液質の筋肉消耗を抑制する新規治療候補である可能性を示唆した。

ラミニン α 2 鎖由来 α -ジストログリカン結合ペプチドの探索と その構造活性相関研究

○濱田圭佑、張 光端、山田雄二、吉川大和、野水基義
東京薬大・薬

ラミニンは、基底膜の主要な構成成分で、 α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖の3種類のサブユニットからなる糖タンパク質である。これらサブユニットの組み合わせにより、19種のアイソフォームを形成することで多種多様な生物学的機能を発現する。中でも、ラミニン α 2 鎖は筋肉に高発現し、そのC末端に存在する球状 (LG) モジュールを介して α -ジストログリカン (α -DG) と結合することが知られている。 α -DG は、骨格筋細胞においてラミニンと結合するとともにジストロフィンとも結合し、細胞外マトリックスと細胞内骨格タンパク質とを繋ぎとめる重要な役割を担っており、筋細胞膜の安定化、筋機能の維持に寄与している。

これまでに我々は、全ラミニンアイソフォームの一次配列を網羅した 3000 種類以上の合成ペプチドを用いた、網羅的スクリーニング法を確立し、各細胞膜受容体に作用する活性ペプチド配列を複数同定してきた。さらに、ラミニン α 2 鎖由来のペプチドライブラリーを用いたスクリーニングから、 α -DG と特異的に相互作用する 4 種類のペプチド (A2G77: LEVRTEAESGLLF、A2G78: GLLFYMARINHA、A2G80 :VQLRNGFPYFSY、A2G95: KAVGGFKVGLDL) を同定してきた。本研究では、それらの中で細胞接着を示さずに α -DG 結合活性のみを示した A2G80 に着目し、 α -DG 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。まず、活性発現に重要なアミノ酸残基を同定するため、各アミノ酸をアラニンへと置換したペプチドを合成した。合成したアラニン置換ペプチドをキトサンマトリックスに結合させてペプチド-キトサンマトリックスとした後、Fc 領域を含むマウス α -DG 組換えタンパク質を用いる ELISA 法にて α -DG 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 α -DG 結合活性発現に影響を与えないことが示された。次に、活性に影響を与えない2種類のアミノ酸 (Asn, Pro) に着目し、さらに 36 種類のペプチドを合成し、その α -DG 結合活性を評価した。その結果、Pro 残基を Gly 残基へと置換したペプチドが、A2G80 の約 1.6 倍の α -DG 結合活性を示した。本高活性ペプチドは、筋組織・筋細胞への高選択的かつ高効率な薬物送達用ツールとして、筋ジストロフィーをはじめとする各種難治性筋疾患治療薬の創製研究へと応用できるものである。さらに本結果は、細胞骨格維持に関与する細胞外マトリックスと α -DG との詳細な結合様式の理解にむけた貴重な構造情報を示すものであり、 α -DG の詳細な生物活性発現メカニズムの解明にも繋がる有用な知見を与えるものである。

ラット大脳皮質初代培養神経細胞におけるラミニン-111 由来 ペプチド-キトサンマトリクスの生物活性

○林 秀樹、山田まりこ、熊井 準、堀之北一朗、岩谷結衣、高木教夫、野水基義
東京薬大・薬

【背景】

細胞接着性の生体材料は、様々な細胞、特に神経細胞の初代培養に使用されている。以前、我々はいくつかのラミニン-111 由来ペプチドを混合し、それらをキトサンマトリクスに結合させることで、ラミニン-111 の機能を模倣できることを報告してきた。この混合ペプチド-キトサンマトリクスは、混合ペプチドが相乗的に働き、強い細胞接着活性などの多くの生物学的機能を発揮した。しかし、中枢神経系神経細胞の生存と神経突起伸長に及ぼすペプチド-キトサンマトリクスの効果は検討されていない。そこで、本研究はラット大脳皮質初代培養神経細胞を用いて、細胞接着活性、神経突起伸長、細胞生存率について検討した。

【結果・考察】

6つのラミニン-111 由来ペプチドの生物学的活性をペプチド-キトサンコンストラクトを用い検討した。シンデカン結合ペプチドである AG73 (RKRLQVQLSIRT, mouse laminin α 1 chain 2719-2730)と C16 (KAFDITYVRLKF, laminin γ 1 chain 139-150) をキトサンに結合させた AG73-ChtM と C16-ChtM は、顕著な神経細胞接着活性を示し、かつラット大脳皮質初代培養神経細胞の突起伸長を増強した。一方、インテグリン結合ペプチドをキトサンに結合させた場合、初代培養神経細胞では生物学的活性を示さなかった。さらに、AG73-ChtM と C16-ChtM は、グリア細胞のフィーダー層が無い無血清培地条件で、少なくとも 4 週間初代培養神経細胞の生存を維持した。これらの結果は、AG73-ChtM および C16-ChtM が、中枢神経系神経細胞の初代培養に有用であり、また中枢神経系における組織工学に応用できる機能的なバイオマテリアルとして期待できることを示した。

デデュシェンヌ型筋ジストロフィー疾患治療に向けた 筋組織選択的な核酸・遺伝子デリバリーシステムの開発

○根岸洋一、佐々木愛理、葦沢 慧、濱田圭佑、林 由浩、木村優花、片桐文彦、
吉田彰宏、平島真一、三浦 剛、濱野展人、高橋葉子、吉川大和、野水基義
東京薬大・薬

多様な創薬モダリティ開発の対象となっている、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は、筋細胞内に存在するジストロフィンと呼ばれるタンパク質の遺伝子異常・変異により、筋力が低下する遺伝性の難病であり、全世界で出生男児 1/3,500 人の割合で発症する遺伝性疾患である。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。2016 年に本疾患を対象に米国承認された世界初の DMD 治療薬、エテプリルセンは、エクソンスキッピング誘導法を利用したアンチセンス核酸である。しかしながら、骨格筋におけるジストロフィンの発現回復が一時的であることや筋組織移行性が低いこと、さらに標的指向性の欠如などのために持続的な投与が必要とされている。そのため核酸・遺伝子医薬の治療効率の向上には、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させるドラッグデリバリーシステム (DDS)の開発が重要である。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、筋疾患選択的 DDS 開発は、ほとんど報告されていない。そのような背景を踏まえ、これまでに我々は筋疾患治療に向けた DDS 研究開発を進めてきた。本シンポジウムでは、現在、開発を進めているジストログリカン選択的ペプチドを利用した筋組織選択的な核酸・遺伝子デリバリーシステム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。

ラミニンペプチド結合アガロースゲルの創製とその生物活性評価

○山田雄二、吉田智浩、濱田圭佑、吉川大和、野水基義
東京薬大・薬

我々はラミニンの全配列を網羅する 3000 種類以上のペプチドのスクリーニングから、多くの細胞接着ペプチドを同定してきた。これらのペプチドは多様な生物活性を示し、3次元培養基材に細胞接着性を付与する分子として有望である。我々の目的はこれらのペプチドと多糖材料の融合により、細胞に理想的な細胞外環境を提供する3次元培養基材を開発することである。これまでの研究において、シンデカンに結合するラミニン由来ペプチドの AG73 (RKRLQVQLSIRT) をアガロースゲルに混合すると、細胞接着性が付与されることをゲル表面での2次元培養で確認した。しかし、インテグリンに結合するラミニン由来ペプチドの A99 (AGTFALRGDNPQG) の活性を付与するにはアガロースゲルとの共有結合が必要であることが示唆された。また、3次元培養も試されていなかった。

そこで本研究では、アガロースにペプチドを共有結合させたペプチド結合アガロースゲルを作製し、長期的な3次元培養を行うことにした。まず、第一級アルコールをアルデヒドに酸化する試薬である TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl) を用いてアルデヒド化アガロースを合成し、ペプチドの N 末端に導入したシステインとチアゾリジン環を形成させることで共有結合させた。次に、ヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) を用いたゲル上への細胞接着評価により、AG73 と A99 を共有結合させたアガロースゲルが細胞接着活性を示すことを確認した。最後に、HDF を用いてゲル内部での3次元培養を行った結果、A99 修飾アガロースゲル内の細胞は強く伸展し増殖するが、AG73 修飾アガロースゲル内の細胞はほとんど増殖しないことが示された。以上の結果から、ペプチドのアガロースゲルへの共有結合が細胞接着に有益であること、3次元培養での細胞増殖にはインテグリンシグナルが重要であること、ペプチド修飾アガロースゲルが3次元培養基材として有用であることが示された。

フォリスタチン由来マイオスタチン阻害ペプチドの創製

齊藤まりこ、高山健太郎、田口晃弘、○谷口敦彦、林 良雄
東京薬大・薬

マイオスタチンは、1997年に McPherron らによって発見された TGF- β スーパーファミリーに属する局所因子で、主に骨格筋に発現し、アクチビン受容体を介して骨格筋量を負に制御する[1]。従って、何らかの機構でマイオスタチン活性を阻害する薬剤は、難治性筋萎縮性疾患をはじめとした筋萎縮に対する治療薬となり得る。しかし、他の TGF- β スーパーファミリータンパク質と受容体を共用することから、受容体を標的とした薬剤においては副作用発現が懸念されてきた。我々は、リガンドであるマイオスタチンに作用するシーズとして、既にマウスマイオスタチンプロドメイン配列に由来する阻害ペプチドの創製及び構造活性相関研究を実施し、有力な創薬リード化合物を獲得しているが[2]、マイオスタチン選択性に関する問題を完全には克服できていない。そこで、新たな阻害剤創製の出発物質としてフォリスタチンに着目した。フォリスタチンは、生体内に恒常的に発現するタンパク質の一種で、2009年の Cash らの報告によれば、N末端に存在する α -helical 領域を介して TGF- β スーパーファミリータンパク質と結合するが、マイオスタチンとは特に相互作用点を多く持つ。

【実験方法】

フォリスタチンの上記領域に由来する種々のペプチドを合成し、HEK293細胞を用いた 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より、マイオスタチン阻害活性を評価した。

【結果・考察】

フォリスタチン N 末端の α -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 peptide 4 ($IC_{50} = 9.73 \mu M$) がマイオスタチン阻害ペプチドのリード化合物として見出され、加えて野生型マウスを用いた *in vivo* 試験により、生体内でも効果を発揮することが確認された。更に、マイオスタチン阻害活性向上やペプチドの物性改善を目指し、構造活性相関研究を展開した結果、peptide 4 と比べて阻害活性が約 2.5 倍向上し、高いマイオスタチン選択性も持つ peptide 26 ($IC_{50} = 3.92 \mu M$) の獲得にも至った。本研究結果は、筋萎縮性疾患治療薬創製の新たなリードを提供するものである。

【参考文献】

- [1] McPherron, AC., Lee, SJ., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1997**, 94, 12457.
- [2] a) 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; b) Asari, T.; Takayama, K.; Nakamura, A.; Shimada, T.; Taguchi, A.; Hayashi, Y. *ACS Med. Chem. Lett.*, **2017**, 8, 113-117.
- [3] Saito, M., Takayama, K., Hitachi, K., Taguchi, A., Taniguchi, A., Tsuchida, K., Hayashi Y. *Bioorg. Med. Chem. Letts.*, **2020**, 30, 126892.

ラミニン α 2鎖由来ペプチドを用いた全身投与可能な 筋組織指向性ナノ DDS の開発

○佐々木愛理、林 由浩、木村優花、菰沢 慧、濱野展人、片桐文彦、坂井崇亮、
吉田彰宏、河田雅宏、平島真一、三浦 剛、高橋葉子、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、筋組織を支えるジストロフィンタンパクをコードする遺伝子に変異が起こることで、ジストロフィンタンパク質が正常に産生されない遺伝性疾患である。そのため筋繊維の破壊・壊死が起こり、次第に筋萎縮と筋力低下が起き、死に至る。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、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。しかし AON は筋細胞に取り込まれにくく、高い有効血中濃度を要するという問題点があることから、筋ジストロフィー疾患治療に向けた薬物・核酸デリバリーシステムの開発は重要課題と考えられる。

この課題を解決すべく本研究では、筋細胞に豊富に発現しているジストログリカンに高い親和性を持つラミニン α 2鎖由来ペプチド (A2G80) (野水らにより同定) に着目し、このペプチドを用いて A2G80 ペプチド修飾リポソーム (A2G80 リポソーム) の作製を行った。更に異なる鎖長を持つ PEG 脂質をリポソームに修飾し、血中滞留性の向上を図り、全身投与型筋組織指向性ナノ DDS の開発を試みた。

【方法】

DPPC:Cholesterol:DSPE-PEG₂₀₀₀=55:39:3 又は、DPPC:Cholesterol:DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₇₅₀=55:39:1:2 の脂質組成でリポソームの作製を試みた。リポソームの検出が可能となるように、脂質量に対して 0.2 mol% となるように DiI を加えた。リポソームの作製には、マイクロ流体技術を用いた装置である NanoAssembler™ (Precision Nanosystems International Inc.) を使用した。これにより得られた 2 種類のリポソームに対し、ポストインサクション法により DSPE-PEG₂₀₀₀Mal-A2G80 を総脂質量に対して 1 mol% 相当量を一定時間反応させ、A2G80 ペプチド修飾リポソーム (A2G80 リポソーム) を作製した。本リポソームの指向性についてマウス筋組織切片を用いて評価した。また、DMD モデルマウス (*mdx*) へ尾静脈内投与を行い、24 時間後に各臓器を回収しリポソームの体内分布を評価した。

【結果及び考察】

作製したリポソームの粒子径は約 70 nm~80 nm を示した。筋組織切片との相互作用性の検討においては、未修飾リポソームと比較し、A2G80 リポソームは筋細胞膜への強い相互作用性が観察された。また、iv 投与を行った結果、A2G80 リポソームは筋組織に集積することが明らかとなった。さらに、鎖長の異なる PEG 脂質を組み合わせることで、肝臓への移行性が低下し、筋組織への集積性が向上することが示された。

以上より、PEG 脂質を組み合わせた A2G80 リポソームは、筋組織選択的な全身投与型のナノ DDS となることが期待される。今後は、薬物を用いたリポソームの調製、および治療効果等の検討を行う予定である。

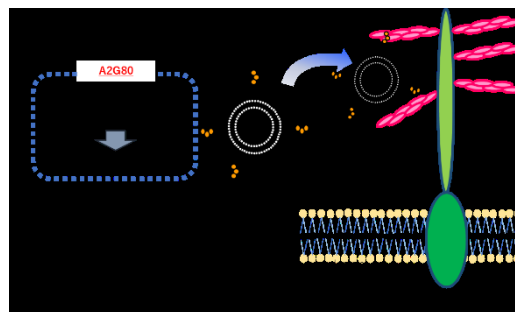


Fig 1. Development of A2G80 peptide modified liposomes

マレイミドへのチオマイケル付加反応を利用した 効率的ペプチド-PEG-脂質合成法の開発

○河田雅宏、坂井崇亮、吉田彰宏、根岸洋一、片桐文彦、阿久津裕士、中島康介、
平島真一、野水基義、三浦 剛
東京薬大・薬

【背景・目的】

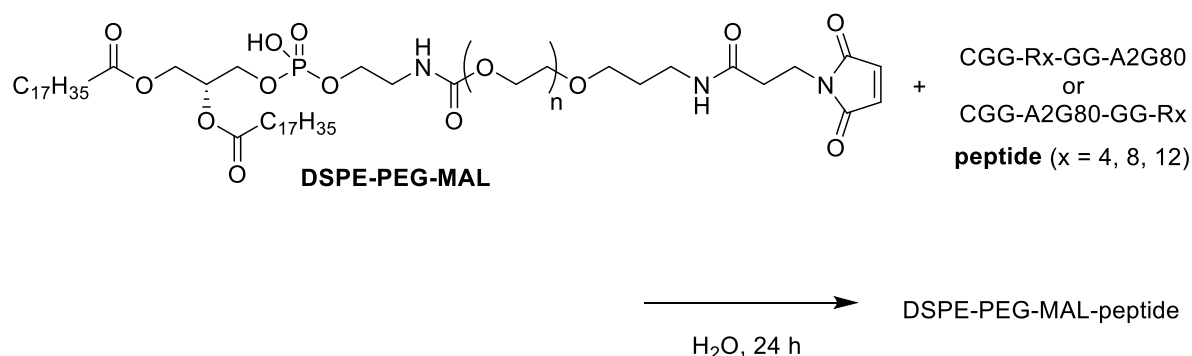
ペプチド-PEG-脂質はドラッグデリバリーシステムキャリアとしてのリポソームに、標的指向性を付与する機能素子として使用されている。以前に我々はデュシェンヌ型筋ジストロフィー治療薬を志向して、ラミニン $\alpha 2$ 鎖由来ペプチド(A2G80: VQLRNGFPYFSY)を有するペプチド-PEG-脂質の合成・精製法を開発した。また、A2G80-PEG-脂質を用いたリポソームは筋細胞膜への高い選択性を有することが明らかになっている¹⁾。

今回我々は、A2G80-PEG-脂質を用いたリポソームのさらなる高活性化を目的として、膜透過性ペプチドであるポリアルギニン鎖を有する新たなペプチド-PEG 脂質を合成することとした。

【実験方法・結果・考察】

ポリアルギニン鎖として R4、R8、R12 をそれぞれペプチド鎖の N 末端側(実際の末端は CGG)と C 末端に有する 6 種類のペプチドを用いて膜透過性ペプチド-PEG-脂質を合成した。

PEG-脂質としては、マイケル受容体としてマレイミドを有する SUNBRIGHT® DSPE-PEG-MAL を用いて、ペプチド N 末端のシステイン残基からのチオマイケル付加反応を利用して結合形成を行った。反応溶媒としては水を用い、室温で反応を行った。反応終了後、COSMOSIL®5C4 を用いた逆相 HPLC で精製した。本精製法は今回合成したすべてのペプチド-PEG-脂質に対して用いることができた。今後本手法を用いることで様々なペプチド-PEG-脂質を合成・精製することが可能であると考えられる。



【文献】

1) 佐々木愛理、林 由浩、菰沢 慧、片桐文彦、坂井崇亮、吉田彰宏、平島真一、三浦 剛、高橋葉子、吉川大和、野水基義、根岸洋一、第 12 回戦略会議 第 3 回公開研究進捗状況報告会講演要旨集 P-5

抗ミエリン抗体を含む IVIg の マウス坐骨神経 lysolecithin 脱髄への効果の検討

○瀬戸口 潔、林 明子、河田紋実、馬場広子
東京薬大・薬

【背景・目的】

Large-myelin protein zero (L-MPZ)は、末梢ミエリンタンパク質 myelin protein zero (P0)のアイソフォームである。一部の慢性炎症性脱髄性多発神経炎 (chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: CIDP)患者の血清中 IgG の抗原分子として見出された。CIDP 治療に用いられる静注用ヒト IgG 製剤 (intravenous human immunoglobulin: IVIg)の glovenin[®]や Venilon[®]はミエリンタンパク質を認識する抗体を一定量含んでいる。しかし、この抗体の脱髄に対する作用は明らかではない。IVIg 中に含まれる抗ミエリン抗体の脱髄病巣への関与を明らかにするために、本研究ではミエリン抗原を同定し、マウス坐骨神経 lysolecithin 誘導化学的脱髄に対する IVIg の効果を調べた。

【実験方法】

① L-MPZ 特異的ペプチドで免疫吸収した IVIg を用いて、ラット坐骨神経ホモジネートのウェスタンブロッティングを行った。② 8～10 週齢の雄性 ICR マウスの坐骨神経内に lysolecithin 又は緩衝液を投与し、0 日目とした。その後、glovenin[®]又は生理食塩液を 1 日目に尾静脈内投与、3 日目に腹腔内投与を行い、7、14 日目に全血採血し、坐骨神経を摘出した。神経は 4% paraformaldehyde で後固定後、凍結切片を作製し、免疫染色により IVIg の分布及び脱髄巣に集積した CD68⁺マクロファージの形態変化を調べた。

【結果・考察】

① IVIg 中に含まれるミエリンタンパク質を認識する抗体は抗 L-MPZ 抗体であることが明らかとなった。② Lysolecithin 脱髄巣のミエリンやミエリン崩壊物に IVIg の沈着が見られた。ミエリン崩壊物に関して myelin basic protein (MBP)と IVIg を観察すると、崩壊物の直径と数のヒストグラムは異なり、7、14 日目共に IVIg⁺崩壊物は MBP⁺/IVIg⁻崩壊物よりも大きいものが見られた。また脱髄巣における CD68⁺マクロファージに関して、食胞に IVIg⁺崩壊物が見られる CD68⁺像の面積は 7 日目で 14 日目よりも有意に大きく、CD68 と IVIg の二重陽性像の面積は 14 日目で 7 日目よりも大きい傾向があった。これらの結果から IVIg 中の抗 L-MPZ 抗体が末梢神経脱髄巣において L-MPZ と反応し、オプソニン作用によってマクロファージによる貪食作用を促進していることが推測された。今後、*in vitro* においてミエリン崩壊物中の L-MPZ と抗 L-MPZ 抗体を介するマクロファージの貪食能の評価を行うと共に、L-MPZ 欠損マウスにおける lysolecithin 脱髄への IVIg の作用を調べ、抗 L-MPZ 抗体の役割を明らかにすることが重要と考えられる。

リソソームのエキソサイトーシスによる細胞膜透過性の変化

鷲巢百恵、○苫米地隆人、高橋正樹、岸本久直、白坂善之、井上勝央
東京薬大・薬

【背景・目的】

皮膚がんの一種であるメラノーマ（悪性黒色腫）の悪性度は、高い転移能と関係するため、転移性がん細胞を標的とした化学療法や最適な治療ストラテジーの開発が望まれている。最近、悪性度の高いがん組織において、リソソームマーカータンパク質（LAMP1）の細胞膜への局在化が示されており、リソソーム機能と転移性との関連性が示唆されている。そこで本研究では、メラノーマ特異的な薬物送達の可能性を探るため、メラノーマにおけるエキソサイトーシスによるリソソームタンパク質の細胞膜局在化と細胞膜透過性について検討した。

【方法】

A-2058 細胞にリソソーム局在性蛍光 pH センサータンパク質（lyso-pHluorin）を一過性発現させ、細胞膜への発現を蛍光顕微鏡により観察した。リソソームのエキソサイトーシス活性は ionomycin 処理による細胞外リソソーム酵素活性により評価した。細胞膜透過性の変化はトランスポーターとヒカリコメツキムシルシフェラーゼ（eLuc）を共発現させた細胞における D-luciferin（D-Luc）の細胞内移行に基づく化学発光強度の変化により評価した。

【結果・考察】

カルシウムイオノフォアである ionomycin の添加により、A-2058 細胞における細胞外リソソーム酵素活性は顕著に増加した。lyso-pHluorin を一過性発現させた A-2058 細胞において、pHluorin による緑色蛍光が ionomycin 未処理条件下で認められ、この蛍光は細胞外 pH を酸性（pH 5.5）にすることで消光した。リソソーム局在性 OAT1（LAMP1-OAT1）を A-2058 細胞に一過性発現させ、D-Luc を細胞外に添加し、eLuc/D-Luc 反応による発光強度を測定したところ、その発光強度は ionomycin 処理により顕著に低下した。以上の結果より、メラノーマはリソソームタンパク質を恒常的に細胞膜に発現し、リソソームのエキソサイトーシスが惹起された条件において、有機アニオン化合物に対する細胞膜透過を制限する可能性が示唆された。

アストロサイトの低酸素・低グルコース誘発炎症反応における progranulin の病態生理学的役割

○吉澤りほな、堀之北一朗、林 秀樹、岩谷結衣、高木教夫
東京薬大・薬

【背景】

アストロサイトは、神経細胞や脳血管機能を制御するグリア細胞の一種であり、グリア細胞の中では最も多い割合で存在している。このアストロサイトは、脳虚血に陥ると活性化し、急性期には炎症性サイトカインを分泌し炎症反応を惹起すると考えられている。本研究で着目した progranulin (PGRN) は 糖タンパク質成長因子の一種であり、創傷治癒や炎症抑制等に関与すると考えられている。一方、PGRN は好中球エラスターゼにより分解され、炎症発生に係わる granulin を生じる。中枢神経系での PGRN は、脳虚血や脳出血後の神経炎症および血管障害に対して保護的に作用すると示唆されているが、アストロサイトでの役割は解明されていない。そこで本研究では、脳虚血状態を模倣した低酸素・低グルコース条件下で惹起される炎症反応時のアストロサイトにおける PGRN の病態生理学的役割について検討した。

【実験方法】

常法に従い、生後 3 日目のラット脳から大脳皮質アストロサイトを単離培養し継代後、4-6 日後に FBS を除去した。その 24 時間後に低酸素・低グルコース条件下で 4 時間培養した細胞を実験に使用した。GFAP、p38 および STAT の変化は western blot 法を用いて検討した。

【結果・考察】

OGD 処置後の GFAP タンパク質量は OGD 未処置群のそれと比較し増加し、この増加した GFAP 量は、PGRN 分解酵素阻害薬シベレスタットで変化せず、リコンビナント PGRN (rPGRN) の処置によって減少した。次にアストロサイトの OGD 誘発炎症反応に及ぼす rPGRN の効果を検討するため、リン酸化 p38 および STAT 量を測定したところ、OGD 処置によりアストロサイトのリン酸化 p38 量は顕著に増加し、rPGRN はこの増加を抑制した。一方、リン酸化 STAT 量は OGD 後に減少し、この減少は rPGRN によって抑制された。

以上の結果は、OGD 処置後のアストロサイトで惹起される炎症反応は rPGRN によって p38 のリン酸化増大抑制作用とリン酸化 STAT の減少抑制作用を介して、減弱されることが示唆され、アストロサイトにおける PGRN の病態生理学的役割の一端を示した。今後、病態進展と保護シグナルについてさらに検討していく必要がある。

有機分子触媒を用いた不斉直截的ビニロガスマイケル付加反応の開発

○石井大暉¹、平島真一¹、坂井崇亮²、阿久津裕士¹、河田雅宏¹、中島康介¹、
三浦 剛¹

¹東京薬大・薬、²国際医福大・薬

【背景・目的】

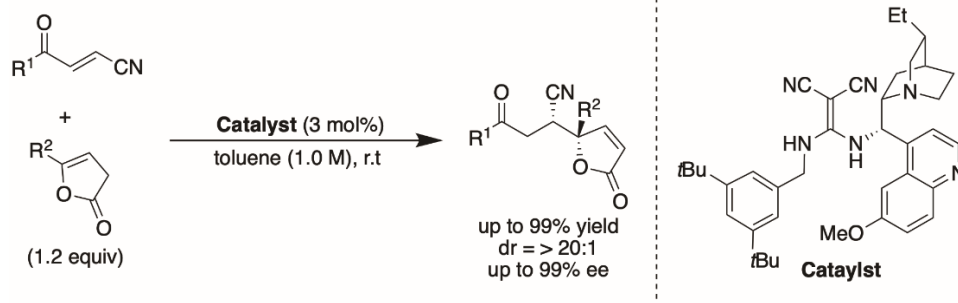
γ -ブテノリド骨格は天然物や生理活性物質に広く含まれている構造である。中でも、 γ 位に不斉中心を有する γ -ブテノリド誘導体は天然物や医薬品の合成中間体として有用であり、立体選択的な合成法の開発は現在も盛んに行われている。当研究室では、スクアラミド・スルホンアミド有機分子触媒を設計・開発し、 γ -クロトノラクトンとアルデヒドとの不斉直截的ビニロガスアルドール反応に適応できることを報告している。¹⁾ さらに、求核剤を α -アングリカラクトンなどの置換フラノン誘導体に展開し、 γ,γ -二置換 γ -ブテノリド誘導体の合成にも成功している。²⁾ 今回、四級不斉中心を有する γ -ブテノリド誘導体の効率合成・新規展開を目的として、エステルやアミンなどの多様な官能基変換が行えるシアノ基を導入した β -シアノエノン求電子剤として用い、 β,γ -不飽和ブテノリドとの不斉直截的ビニロガスマイケル付加反応について検討を行った。

【実験方法】

β -シアノエノンに対して β,γ -不飽和ブテノリドを 1.2 当量、触媒量の有機分子触媒存在下、トルエン中、不斉直截的ビニロガスマイケル付加反応について詳細に検討を行った。

【結果・考察】

ジアミノメチレンマロノニトリル (DMM) 型有機分子触媒を用いて、 α -アングリカラクトンと β -シアノエノンとを反応させたところ、高収率・高立体選択的に目的とする δ -シアノ γ -ブテノリド誘導体を得ることに成功した。種々の置換基を有する β -シアノエノンや置換フラノン誘導体の基質一般性についても報告する。



【文献】 1) T. Sakai, S. Hirashima, Y. Yamashita, R. Arai, K. Nakashima, A. Yoshida, Y. Koseki, T. Miura, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 4661.

2) T. Sakai, S. Hirashima, Y. Matsushima, T. Nakano, D. Ishii, Y. Yamashita, K. Nakashima, T. Miura, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 2606.

ミオスタチン阻害ペプチドによる糖尿病モデルマウスの症状改善効果

○日向宏輝¹、尾崎由奈¹、高山健太郎²、林 良雄²、伊東史子¹¹東京薬大・生命、²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- 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骨格筋細胞の増殖を負に制御する。それゆえ MSTN シグナルの阻害は、加齢性筋障害や筋ジストロフィーなどの筋萎縮性疾患の治療薬につながると期待されている。我々は、マウス MSTN 前駆体領域に存在する 24 アミノ酸の MSTN 阻害活性中心を同定し、MSTN 阻害ペプチド (Peptide-2) と報告した (*J. Med. Chem.*, 2015)。これまでの研究結果により Peptide-2 をマウス下肢筋肉に投与すると筋肉量が増加すること、がん悪液質モデルマウスに筋肉内投与するとがん悪液質症状を低減させること (in revision) を明らかにしてきた。本研究では、糖尿病モデルマウスを作成し、筋肉の増強が血糖値に与える影響について検証した。

【実験方法】

生後 6 週齢の雄 ICR マウスにストレプトゾトシンを 150 mg/kg 腹腔内投与し、糖尿病モデルマウスを作成した。ストレプトゾトシン投与 4 週間後からマウス下肢筋肉に Peptide-2 (0.6 mM, 50 μ l) を週 1 回、4 週間にわたって筋肉内投与した。トレッドミルを利用して、1 週間のうち連続する 3 日間を走行 (傾斜 5 度、32 cm/s, 30 min) させ、残りの 4 日間を休息させる実験スケジュールを 4 週間行った。Peptide-2 投与群と非投与群における血糖値などの糖尿病症状の変化を検討した。

【結果・考察】

糖尿病モデルマウスにおいて、Peptide-2 投与とトレッドミルによる運動負荷を併用することにより筋肉量と Grip strength が増強した。しかし Peptide-2 非投与群と比較して血糖値、尿糖の値に有意な差はみられなかった。この原因として、ストレプトゾトシン投与により糖尿病が劇的に進行しすぎてしまった可能性がある。今後は、Peptide-2 投与とトレッドミルによる運動負荷を併用して筋肉代謝を亢進させたのちストレプトゾトシンを投与して糖尿病を発症させ病態への影響を詳細に検討する必要がある。

Identification of α -Dystroglycan Binding Sequences in the Laminin α 2 Chain LG4-5 Modules

○Guangrui Zhang, Keisuke Hamada, Yuji Yamada, Yamato Kikkawa, Motoyoshi Nomizu

Department of Clinical Biochemistry, School of Pharmacy,

Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

Laminins, major components of basement membranes, are consisted of α , β , and γ chains. To date, five α , three β , and three γ chains have been identified. The laminin α 2 chain specifically expresses in skeletal muscle, peripheral nerves, brain and capillaries. Major receptors of the laminin α 2 chain are integrin α 3 β 1, integrin α 7 β 1, syndecan, and α -dystroglycan (α -DG). Specific binding of the laminin α 2 chain with α -DG is critical to maintain the structure and function of skeletal muscle, and genetic disruption of the laminin α 2 chain causes the muscular dystrophy. The laminin α 2 chain binds α -DG through its C-terminal laminin globular module of LG4-5. In this study, we prepared Fc tagged α -DG to determine the direct α -DG binding sequence from the laminin α 2 chain LG4-5. The direct α -DG binding with peptides was evaluated using 42 peptides derived from laminin α 2 chain LG4-5 were synthesized with CGG residue on their N-terminus and conjugated on the maleimidebenzoyloxy-chitosan to construct a peptide-chitosan matrix, respectively. Fc-DG was incubated with the peptide-chitosan matrices, and bounded Fc-DG was detected by anti-Fc antibody. As a result of screening, we found that four peptides-chitosan matrices (A2G77-, A2G78-, A2G80-, and A2G95-chitosan matrices) showed strong Fc-DG binding. Following truncated peptide synthesis revealed that their minimum active sequences are RTEAES, GLLFYMAR, RNGFPY, and KAVGGFK, respectively. These four sites may play an important role for α -DG binding in the laminin α 2 chain. Finally, we evaluated cell attachment activity of these peptides using C2C12 mouse myoblast cells and determined that these peptides were bind to the muscle cells effectively. These results suggested that these peptides are useful for useful for understanding α -DG binding mechanism and for development of biomaterials.

エンドソーム脱出能を付与したラミニン $\alpha 2$ 鎖由来ペプチド polyplex による筋組織指向性遺伝子デリバリーシステムの開発

○ 菰沢慧¹、濱田圭佑¹、檜木侑子¹、片桐文彦¹、高橋葉子¹、
吉川大和¹、野水基義¹、金川基²、根岸洋一¹
¹東京薬大・薬、²神戸大・大学院医

【背景・目的】

遺伝性筋疾患である筋ジストロフィー治療のための核酸医薬や治療用遺伝子の研究開発が盛んに行われているが、これらポリアニオンの組織選択性・細胞内移行性向上・細胞内拡散促進のための遺伝子デリバリーシステム(GDS)の開発は依然として課題である。近年、筋細胞に高発現しているジストログリカン(α -DG)に対して親和性のあるラミニン $\alpha 2$ 鎖由来のペプチド (A2G80) が野水らにより報告された。そこで我々はこの A2G80 に膜透過性ペプチドであるオリゴアルギニン(R9)と細胞内にてエンドソーム脱出を促進するオリゴヒスチジン(H8)を結合させた多機能性ペプチド(A2G80-R9-H8)とプラスミド DNA (pDNA)を複合化(polyplex)し、筋細胞指向性 GDS の確立を目指す。今回は、調製した polyplex の物性評価および α -DG 指向性、遺伝子導入活性を *in vitro* において明らかにするとともに、DMD モデルマウスにおける経時的な遺伝子発現パターンについて評価を行った。

【実験方法】

アガロースゲル電気泳動による polyplex 形成の確認、ゼータサイザーによる粒子径・ ζ 電位測定を行った。また YOYO-1 にて蛍光標識した pDNA の筋芽細胞株 C2C12 細胞内への取り込みをリコンビナント α -DG の共存・非共存化の条件にて flow cytometry を用いて評価することで polyplex の α -DG 指向性を評価した。C2C12 細胞への遺伝子導入活性は Luciferase assay にて評価した。また DMD モデルマウスの脛骨筋に対し polyplex を局注し、Luciferase 遺伝子または蛍光タンパクをコードした遺伝子の発現をそれぞれ *in vivo* imaging system(IVIS)、蛍光顕微鏡にて評価した。

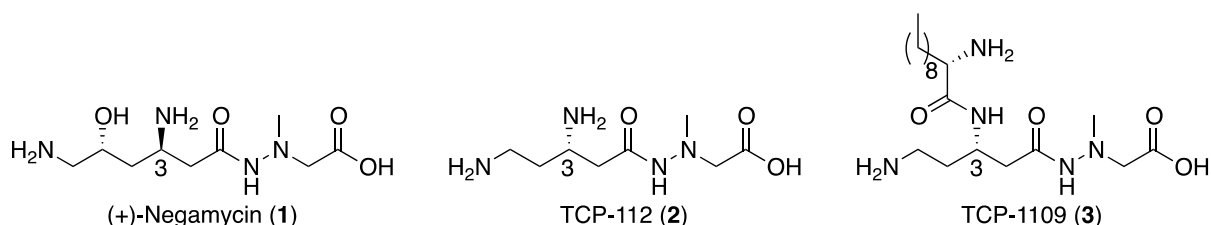
【結果・考察】

A2G80-R9-H8 を用いた polyplex は N/P 比 1 以上で 40 nm 程度の粒子径と N/P 比依存的な ζ 電位の増大を示した。 α -DG を用いた阻害実験においては A2G80-R9-H8 の α -DG 指向性が示唆された。C2C12 への遺伝子導入においては、pDNA 単体に比較して有意に高い導入活性を示した。また、IVIS にて Luciferase 遺伝子発現パターンを評価したところ 2 週間程度の持続的な遺伝子発現を示し、その活性は単体の pDNA に比較して有意に高かった。さらに蛍光タンパクの発現を凍結切片にて観察した結果、筋繊維における遺伝子発現が認められた。以上のことから、A2G80-R9-H8 を用いた polyplex は、 α -DG との相互作用を介し筋組織への効率的な遺伝子導入を可能にすることが明らかとなった。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。

ネガマイシン誘導体 TCP-1109 の創製と リードスルー効率評価系の新規構築

○田口晃弘、濱田圭佑、大村紀子、嶋野慶樹、澤田直志、
高山健太郎、谷口敦彦、林 良雄
東京薬大・薬

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy ; DMD) をはじめとする各種遺伝性疾患の約 20% はナンセンス変異 (中途終止コドン、premature termination codons ; PTCs) によって発症することが知られている。近年、その治療法として mRNA 上の PTC を読み飛ばし (リードスルー)、機能を持つタンパク質を発現させる方法が注目を集めている。我々は、リードスルー作用を有する (+)-Negamycin (**1**) を基にした構造活性相関研究を展開し、高活性な誘導体 TCP-112 (**2**) の創製に成功している[1]。



今回、更に **3** の左翼 3 位アミノ基部位に種々のアシル構造の導入を試みたところ、PTC として TGA 配列を含む DMD 由来配列を有するレポーター遺伝子による細胞評価系において、(S)-2-aminoundecanoic acid を導入した誘導体 (**4**, TCP-1109) が **1** の約 10 倍高いリードスルー活性を有することが明らかとなった[2]。

一方で、誘導体のリードスルー活性は、誘導体未添加群 (陰性対照群) に対する比活性として算出したが、リードスルー効率 (%) を算出するために、12 種類のデュアルレポータープラスミドを新たに構築した。PTC として TGA または TAG を用い、PTC の上流にウミシイタケルシフェラーゼ、下流にホタルルシフェラーゼ発現配列を挿入した。また、PTC とその前後 12 塩基配列にそれぞれ、メロシン欠損型先天性筋ジストロフィー (MDC1A)、がん抑制遺伝子、嚢胞性線維症の疾患由来配列を導入した。構築したプラスミドを COS-7 細胞に導入し、活性評価を行った結果、TCP-1109 (**3**) は、DMD、MDC1A を含む 3 種の TGA 配列を含む疾患由来配列にて、2.25–7.30% のリードスルー効率を示した[2]。したがって、誘導体 **3** は PTC として TGA 配列を含む筋ジストロフィーや他のナンセンス変異疾患への応用が期待される。

【参考文献】

- [1] Hamada, K., Taguchi, A., Hayashi, Y. *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, 6, 689-694.
[2] Hamada, K., Omura, N., Hayashi, Y. *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, 10, 1450-1456.

脳梗塞後の GSK-3 β 情報伝達系と神経新生

○中川 樹、堀之北一朗、林 秀樹、岩谷結衣、高木教夫
東京薬大・薬

【背景・目的】

脳梗塞後の神経新生は一過性に増強され、損傷組織の再生機序の1つとして考えられている。しかしながら、脳梗塞後神経新生の病態生理学的意義と詳細な機序は未だ不明な点があり、脳梗塞慢性期における治療へ応用するには多くの課題が存在する。GSK-3 β 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ため、中枢神経系疾患の病態と密接に関与すると考えられている。本研究では、脳梗塞後の病態把握の一つとして、中枢神経系に豊富に存在し種々の細胞機能を制御している GSK-3 β に着目し、その情報伝達系の変化と神経新生について検討した。

【方法】

本研究では、Wistar 系雄性ラットの右内頸動脈内に直径 45 μm のマイクロスフェアを 700 個注入し、ヒト多発性梗塞を模倣するマイクロスフェア脳塞栓 (ME) モデルを使用した。脳梗塞後神経新生の評価および GSK-3 β 情報伝達系に関わる各種タンパク質の解析は、蛍光免疫染色法およびウエスタンブロット法で行った。さらに、胎児ラットより神経幹細胞を単離し、低酸素負荷後の神経幹細胞における GSK-3 β 情報伝達系の変化について検討した。

【結果・考察】

ME 後 7 日目の右海馬歯状回で増殖性細胞マーカーの Ki67 および神経前駆細胞マーカーの DCX を用い神経新生を評価したところ、両陽性新生神経細胞が観察された。また、神経細胞への分化過程に関与する NeuroD の陽性細胞数も海馬歯状回で増加していた。さらに GSK-3 β 情報伝達系の経時的変化を観察した結果、ME 後 7 日目でリン酸化 Akt およびリン酸化 GSK-3 β 量が増加していた。すなわち、ME後の神経新生は PI3-K/Akt 経路依存的に惹起される可能性が示された。最後に、単離神経幹細胞を用いて上述のシグナル変化が低酸素負荷後の神経幹細胞の増殖および分化過程で起きているか検討した。その結果、低酸素負荷後の神経幹細胞では GSK-3 β 情報伝達系が活性化し、細胞増殖能および神経分化能が増強された。以上の結果から、脳梗塞後神経新生の機序の一端に GSK-3 β 情報伝達系が関与する可能性を示した。

位置選択的ビスナルビスホスフィン誘導体のワンポット合成法

○廣田瑛紀、平島真一、森田龍輝、高瀬純也、阿久津裕士、河田雅宏、
中島康介、三浦 剛
東京薬大・薬

【背景・目的】

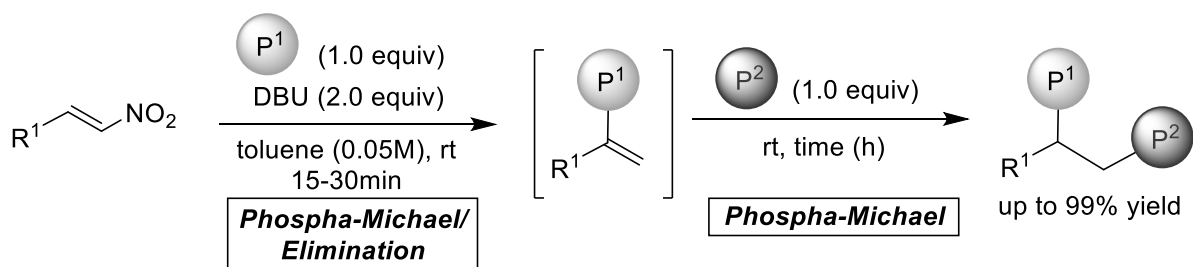
有機リン化合物は生理活性物質、金属配位子、ルイス塩基など幅広い範囲の性質を有する有用な化合物群である。中でも、ビスナルビスホスフィン誘導体は遷移金属の有用な二座配位子として利用されているが、その合成例は僅かである。したがって、効率的なビスナルビスホスフィン誘導体の合成法開発が望まれている。そのような背景において、我々はニトロアルケンを出発原料としたビスナルビスホスフィン誘導体の一段階合成法を見出した。本反応機構はホスファーマイケル付加/脱離/ホスファーマイケル付加のタンデム反応であると考えている。今回、本反応の更なる適用拡大を目的に、位置選択的に異なるリン求核剤を付加させたビスナルビスホスフィン誘導体のワンポット合成について検討を行った。

【実験方法】

β -ニトロスチレンに対し、トルエン溶媒中、塩基存在下、1 当量のリン求核剤①をホスファーマイケル付加し、続いてニトロ基を脱離させた後、もう 1 当量のリン求核剤②を反応させることで、位置選択的ビスナルビスホスフィン誘導体の合成を行った。

【結果】

塩基として DBU を用いて、位置選択的ビスナルビスホスフィン誘導体のワンポット合成を行ったところ、目的物を良好な収率で得ることに成功した。種々のニトロアルケンやリン求核剤を用いた基質一般性についても報告する。



骨格筋におけるクレアチニン排出トランスポーターの同定

○高橋正樹、岸本久直、白坂善之、井上勝央
東京薬大・薬

【背景・目的】

クレアチニンは、クレアチンの最終代謝産物であり、主として骨格筋で非酵素的に産生され、血中に排出される。クレアチニンは、親水性が極めて高く、血漿タンパクとの結合はほぼ無視できるため、腎糸球体濾過により尿中排泄され、分泌および再吸収をほとんど受けないと考えられている。しかし最近では、クレアチニンを輸送するトランスポーターが同定され、それらは腎臓に発現することから、クレアチニンの腎排泄において、糸球体濾過だけでなく、尿細管分泌の関与も指摘されている。したがって、クレアチニンの体内動態はトランスポーターにより制御されている可能性が考えられる。一方、骨格筋で産生されたクレアチニンの血液への排出においてもトランスポーターの関与が想定されるが、筋細胞や骨格筋組織におけるクレアチニンの輸送現象自体が検出されていないため、骨格筋におけるクレアチニン排出の分子機構は不明である。そこで本研究では、クレアチニンの促進拡散に関与するトランスポーターの探索を行った。

【方法】

HEK293 細胞にクレアチニン輸送能を有する OAT2 と各種トランスポーターを一過性に共発現させ、定常状態における $[^{14}\text{C}]$ creatinine 及び $[^3\text{H}]\text{cGMP}$ の細胞内への取り込みを液体シンチレーションカウンターにより測定し、その放射活性比を評価した。

【結果・考察】

HEK293/OAT2 細胞における $[^{14}\text{C}]$ creatinine 取り込みは、20 分以降に定常状態になり、その時の細胞内 $[^{14}\text{C}]$ creatinine は、mock 細胞に比較し、約 30 倍であった。HEK293/OAT2 細胞に各種トランスポーターを一過性発現させ、定常状態における細胞内 $[^3\text{H}]\text{cGMP}$ に対する $[^{14}\text{C}]$ creatinine の比をスクリーニングした結果、 $[^{14}\text{C}]$ creatinine/ $[^3\text{H}]\text{cGMP}$ を顕著に低下する遺伝子を同定した。その低下はクレアチニンと類似の構造を有するジピリダモールにより阻害された。しかし、本遺伝子単独発現系において $[^{14}\text{C}]$ creatinine の有意な細胞内取り込みは認められなかった。さらに、本遺伝子は骨格筋において高発現することが示された。以上の結果より、本遺伝子はクレアチニンの促進拡散型トランスポーターをコードし、そのトランスポーターは骨格筋において生成されたクレアチニンをその濃度勾配を駆動力として細胞内から血液中へ排出することが示唆された。クレアチニークリアランスは臨床において腎機能マーカーとして汎用されているため、今後、本トランスポーターの活性変化に関わる因子を精査する必要があると考えられる。

第二世代ジアミノメチレンマロノニトリル型有機分子触媒の開発

○露崎 龍、河田雅宏、阿久津裕士、中島康介、平島真一、三浦 剛
東京薬大・薬

【背景・目的】

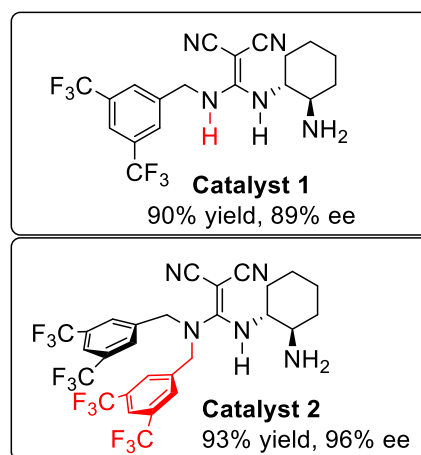
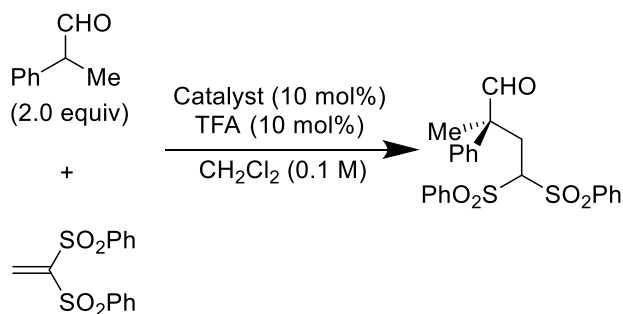
我々はジアミノメチレンマロノニトリル (DMM) 型に代表される push-pull ethylene 骨格を有する有機分子触媒を開発してきた。DMM 型の有機分子触媒は見かけ上、チオウレアやスクアラムイドと類似した構造を有する。最近、我々はこれらの触媒に関して計算科学的・分光学的な解析を行い、DMM 型分子はチオウレアとは異なる配座特性を示すことを報告した¹⁾。すなわち、DMM 型有機分子触媒の有する二つの N-H 基のうち、一方は基質固定化に関与せず、単一の N-H 基とベンジル位 C-H 基からなる水素結合によって基質が固定化され、触媒能を発現する。今回、我々は上述の知見を基に第二世代 DMM 型有機分子触媒を開発したため、報告する。

【実験方法】

モデル基質として、2-phenylpropionaldehyde と 1,1-bis(phenylsulfonyl)ethylene を用いて、DMM 型有機分子触媒の活性評価を行った。

【結果・考察】

検討の結果、基質固定に関与しないと考えられる水素をアリールメチル基に置換した触媒は既存の DMM 型有機分子触媒よりも優れた立体選択性を示すことが明らかになった。また、アリール基上の置換基を種々検討した結果、電子求引基を有するものがより良好な結果を与えることから、芳香環が電子不足になることにより、C-H 水素結合がより基質固定に関与しやすくなったと考えられる。



【文献】

河田雅宏, 矢内 光, 平島真一, 小坂井皓啓, 中島康介, 松本隆司, 三浦 剛, 第 45 回反応と合成の進歩シンポジウム講演要旨集 2019, p.114.

Immunohistochemical analyses of Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease model, L-MPZ mouse, in development and aging

○Jingjing Cui, Yoshihide Yamaguchi, Hiroko Baba

*Department of Molecular Neurobiology, School of Pharmacy,
Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences*

【Background and Purpose】

Large myelin protein zero (L-MPZ) is a novel translational readthrough isoform of peripheral myelin protein zero (P0, MPZ). In previous study, L-MPZ mouse which expressed L-MPZ instead of P0 demonstrated abnormalities in myelin and axons at 8-10 weeks of age. Since some changes were found in sciatic nerve (ScN) semi-thin sections from L-MPZ mice at postnatal day 21 (P21) and 1 year old (1Y), in this study, we focused on the influence of L-MPZ over-production in development and aging.

【Methods】

ScN of P21 and 1Y mice were rapidly dissected and immediately fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate-buffer (PB) for 30 min. After fixation, nerves were cryoprotected with 10% sucrose in 0.1 M PB, and then later with 30% sucrose overnight at 4°C. To investigate the influence of increase of L-MPZ in ScN, immunostaining was performed using antibodies to L-MPZ, E-cadherin, DRP2, Caspr, pan-neurofascin, KV1.2, Sodium channel, moesin, GRP78, glial fibrillary acidic protein (GFAP), CD68 and CD206 in longitudinal cryosections and teased fibers. Images were captured with a laser-scanning confocal microscope.

【Results and Discussion】

Abnormal morphologies were detected in peripheral myelin and axons of P21 and 1Y L-MPZ heterozygous and homozygous mice, including disruption of PNS myelin structure, loss of Schmidt-Lanterman incisures, disorganization of Cajal bands and molecular structure around the nodal area, increase of ER stress and non-myelinated Schwann cell and extensive macrophage infiltration. Compared to 10-week-old (10W) L-MPZ mice, P21 L-MPZ mice showed milder but significant morphological changes. In contrast to 10W L-MPZ mice, 1Y L-MPZ mice showed more severe phenotypes. Thus, the morphological changes of myelin and axons caused by increased L-MPZ levels have already occurred in myelination and progressed in aging.

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

2020 年 3 月 11 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



Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

外部評価者による評価

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業実施経過報告外部評価

研究プロジェクト名	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	
研究代表者名	野水 基義	薬学研究科
研究期間	平成 27 年度～平成 31 年度	5 年間で 1 年目
1 研究成果について - 本研究は、筋疾患に対する分子創製ならびに筋組織への革新的薬物送達システム（DDS）の技術開発を行い、筋疾患特異的な新規治療薬を開発することを目的とした意欲的な研究である。研究成果の実現のために、創薬シーズの実用化レベルへの分子創製を行う「分子創製ユニット」と筋疾患治療の共通基盤技術となる筋組織への革新的薬物送達システム（DDS）の開発を行う「創薬高度化ユニット」を組織編成し研究を行っている。今年度は 2 年目であり以下の点で成果をあげた。 ① リードスルー活性評価系の構築と構造活性相関に基づくネガマイシン誘導体の構造最適化を実施した。具体的には、末梢神経系ミエリン構成分子 L-MPZ による stop codon readthrough 評価系を作製した。また、stop codon readthrough 活性に基づくネガマイシン誘導体の構造最適化を行った。 ② 生理活性や体内動態特性に基づくマイオスタチン阻害ペプチドの構造最適化と薬理評価を実施した。具体的には、マイオスタチンを強力に阻害するペプチドを同定した。また、動物モデルを作製し、マイオスタチン阻害ペプチドの in vivo 評価を行った。マイオスタチン阻害ペプチドの血中安定性に関する評価検討を行った。 ③ 筋特異的 DDS の技術開発：ジストログリカン結合性ペプチド修飾リポソームの作製とその機能評価、及び効率的なペプチド導入方法の開発と薬理的な評価系の構築を実施した。具体的には、筋指向性リポソームの調整（A2G80 ペプチド修飾リポソーム）、A2G80 ペプチド修飾リポソームの組織選択性評価を行った。また、一部のペプチドの薬理的評価系の確立に成功した。 上記の検討は、構想調書、テーマ調書の研究計画に沿った成果で順調に計画が進行していると考えられる。今後は、機能性ペプチドの効率的な大量合成法の開発など実際の医薬品開発に重要な項目のさらなる検討を期待する。また、「分子創製ユニット」と「創薬高度化ユニット」の研究成果の統合が、本プロジェクトの成功の鍵と考える。多くの難治性筋疾患の克服と超高齢化社会を見据えた治療に向けた研究成果が大いに期待される。 - 初年度であるので、シーズ探索、最適化を中心に研究を展開しているが、現時点では評価できる業績はほとんどない。年度ごとに明確な数値目標を掲げて、研究の見直し、軌道修正などが必要と思われるので、二年目以後に期待したい。 2 つのユニットの連携は現時点でははっきりせず、個別研究の成果が列挙されているが、学内での研究拠点を目的とする本事業では、いかに私学の学術的基盤を高度化するかという課題があるので、それに対する取り組みが必要であろう。 若手育成や産学連携等取り組むべき課題に対しての方策をたてることが望ましい。 - 本戦略研究は、筋疾患に対してペプチド工学と DDS を基盤とした統合創薬の研究拠点形成を目指すものであり、標的の先端性、社会要請の高さ、拠点構成員の優れた研究レベル等を鑑み、その成果への期待が大変大きいものである。実際、実施初年度より、優れた研究成果を挙げており、高く評価できる。遺伝子機能制御については、リードスルー活性評価系が構築でき、SAR によるネガマイシン誘導体の構造最適化に成功している。筋増殖・分化制御については、マイオスタチン阻害ペプチドの創製と機能評価、血中安定性に関して順調に成果を挙げている。また、創薬高度化ユニットにおいては、ペプチド大量合成、リポソームの開発に加え、薬理的評価系についても、期待通りの成果を挙げている。		

学会発表などの研究成果報告はもとより、優れた学術雑誌に複数の原著論文を報告しており、そのアクティビティーの高さが強く感じられる。

以上のように、当初想定された計画について、十分な研究成果を挙げており、次年度以降の研究成果にも大きな期待が寄せられる。

- ・本研究は、筋肉疾患、特にデュシェンヌ型筋ジストロフィー症をターゲットとして、主として3つの方向からこの問題を攻略しようとしている。即ち、「分子創製ユニット」の（１）ネガマイシン誘導体のリードスルー活性を利用する治療法の確立と、（２）筋肉量を負に制御しているマイオスタチン阻害剤の開発、および「創薬高度化ユニット」の（３）リポソームをDDSとして利用するための、ジストログリカン結合性ペプチド修飾リポソームの作成に基づく治療法の確立である。（１）に関しては、ネオマイシン誘導体の3位アミノ基に着目してより高いリードスルー活性を有する誘導体を開発し、*in vitro*の発現系を用いてリードスルー活性を測定することに成功している。（２）に関しては、サイトカインの1種であるマイオスタチンのプロドメインに結合する阻害ペプチド1の単離に成功している。このペプチド1についてAlaスキャンを行って活性に重要なアミノ酸を特定した。このペプチドのアルファヘリックスを破壊するような変位は活性を保持しないことから、アルファヘリックス領域がマイオスタチンへの結合に重要と考えられた。また、活性測定のためのモデルマウスの作成にも成功している。課題は多いが、1年目の成果として期待が持てる成果が得られていると評価できる。（３）に関しては、筋特異的ターゲットとして α -ジストログリカン結合性ペプチドA2G80をマレイミドを持つ脂質に共有結合させて、凝集性のない安定したリポソームを作成することに成功した。

以上の結果は、1年目の成果として期待されたものであって、本プロジェクトが順調に始動していることを示していると考えられる。発表論文も申し分なく、成果を裏付けている。

2 その他

- ・研究成果報告会の開催の日時内容（各ユニット毎に行っているかなど）の記載が必要です。
- ・年次評価に際しては、本来は構想調書に記した数値目標をあげ、達成率、問題点、研究の方針変更の必要性の有無、問題点の解決方法などを記載した報告書であるべきである。すなわち、中間報告書の準じた形での客観性を持った報告書でないと、外部評価としての意義が乏しい。今後は、個々の研究を様々なフォーマットで記載したものではなく、発表論文とそのインパクトファクターを列記し、特許出願状況等が評価できる形が望ましい。
- ・筋崩壊制御についても、特に、当初計画にあるような、ペプチドライブラリーからの同定と結合特性の評価などについて、その内容への期待が大きいことから、研究成果の蓄積が期待される。
モデルマウスなど、準備に時間を要する内容を含んでいることもあり、特に生物・薬理系研究については、リスクマネジを考慮することも要請されるであろう。
- ・リードスルー活性を持つ化合物の応用に関しては、他のUGAコドンをも有する蛋白質の発現の影響、UGAコドンに挿入されるアミノ酸の影響など、考慮しなければならないいくつかの点が懸念されるが、申請者らはそのような点も考慮して研究を進めようとしており、成果が期待される。

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業実施経過報告外部評価票

研究プロジェクト名	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	
研究代表者名	野水 基義	薬学研究科
研究期間	平成 27 年度～平成 31 年度	5 年間で 2 年目

【年次評価】

1 研究成果について

- 本研究は、難治性筋疾患に対する分子創製ならびに筋組織への革新的薬物送達システム（DDS）の技術開発を行い、筋疾患特異的な新規治療薬を開発することを目的とした意欲的な研究である。研究成果の実現のために、創薬シーズの実用化レベルへの分子創製を行うⅠ「分子創製ユニット」と筋疾患治療の共通基盤技術となる筋組織への革新的薬物送達システム（DDS）の開発を行うⅡ「創薬高度化ユニット」を組織編成し研究を行っている。今年度は 2 年目であり以下の点で成果をあげた。

Ⅰ「分子創製ユニット」

- ① リードスルー活性評価系の構築と構造活性相関に基づくネガマイシン誘導体の構造最適化を実施した。具体的には、末梢神経系ミエリン構成分子 L-MPZ による stop codon readthrough 評価系を作製した。また、stop codon readthrough 活性に基づくネガマイシン誘導体の構造最適化を行った。
- ② 生理活性や体内動態特性に基づくマイオスタチン阻害ペプチドの構造最適化と薬理評価を実施した。具体的には、マイオスタチンを強力に阻害するペプチドを同定した。また、動物モデルを作製し、マイオスタチン阻害ペプチドの in vivo 評価を行った。マイオスタチン阻害ペプチドの血中安定性に関する評価検討を行った。

Ⅱ「創薬高度化ユニット」

- ① 筋特異的 DDS の技術開発：ジストログリカン結合性ペプチド修飾リポソームの作製とその機能評価、及び効率的なペプチド導入方法の開発と薬理的な評価系の構築を実施した。具体的には、筋指向性リポソームの最適化（A2G8-PEG リポソーム）、リポソームの組織選択性評価、リポソームを利用した筋組織選択的核酸・遺伝子導入システムの構築を行った。また、機能性ペプチドの大量合成法の開発と薬物・核酸・ペプチドの薬理的評価系の確立に成功した。

上記の検討は、構想調書、テーマ調書の研究計画に沿った成果で順調に計画が進行していると考ええる。今後は、難治性筋疾患に対する医薬品開発にむけて、「分子創製ユニット」と「創薬高度化ユニット」の研究成果の統合を期待したい。筋ジストロフィーを始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筋萎縮医療対策に向けた研究成果が大いに期待される。

- 研究計画の妥当性と進捗状況：綿密に計画された調書に基づき、研究は研究計画の通りに概ね順調に進捗していると考えられる。平成 29 年 3 月 17 日に第 2 回の公開研究進捗状況報告会を開催し、活発な研究状況が推察される。各個研究ではマイオスタチン関連の論文が注目されるが、総じて論文数が少ない。しかしながら、現在投稿中の論文もあり、学会発表は活発にされていることより、3 年目の中間報告時には論文としての成果が期待される。

本事業は筋疾患という難病に着目して展開しており、研究としての意義は大きい。しかしながら、現時点では分子創製ユニットと創薬高度化ユニットの連携が明確ではない。ともすれば、各個研究が優先されるが、学内の研究拠点形成という本事業の主旨を鑑みると、ユニット間の連携が今後の課題と言える。ポスドクの雇用など若手研究者の育成に取り組んでいる点は評価される。

- ・筋関連遺伝子機能制御については、P0cDNA 安定発現 HeLa 細胞株を用いた in vitro 評価系、病態マウスを用いた readthrough 評価系を予定通り構築でき順調である。Readthrough 候補薬の解析だけでなく、生理的役割など議論の展開が期待される。構造最適化も順調であるほか、機能形態学と薬品化学の連携により、その研究が加速できていることも高く評価できる。

筋増殖・分化制御に関しては、最小マイオスタチン阻害ペプチドの発見、SAR 研究による高機能化、in vivo/in vitro 評価が順調に進展しており、評価できる。抑制機序に関する知見の蓄積が強く期待される。動態解析についても評価系の構築に成功したほか、次年度以降の展開の礎になる知見を得ており、その進展を期待したい。

筋指向性ペプチドに関しては、A2G78 と A2G80 に関する研究成果が特に興味深い。構造活性相関研究から高機能ペプチドの獲得が可能であると考えられる。また、ペプチドマトリクスが人工基底膜といえるようなバイオマテリアルとしての可能性があることが示されており、特筆すべき成果である。

筋指向性リポソームに関しては、上記 A2G80-PEG リポソーム調製法の最適化から、筋細胞膜との相互作用性に優れたリポソームの調製に成功しているほか、カチオン性 R9 ペプチドの導入から遺伝子複合体の調製が容易になっており、A2G80 を用いた遺伝子導入システムの構築に目標通り成功したことは高く評価できる。動態解析、薬理的解析に関しても順調であると評価できる。

以上のように、当該プロジェクトは、当初予定の通り順調に進展しているほか、基礎的知見に関しても予想を上回る成果が上がっており、高く評価できる。

- ・研究は3つの課題（1. 筋関連遺伝子機能制御、2. 筋増殖・分化制御、3. 筋特異的 DDS キャリアの開発）に分かれ、いずれの課題も今年度の目標をほぼ達成している。

1-1. 「筋関連遺伝子機能制御」においては DMD の 20% がジストロフィン遺伝子のナンセンス変異が原因となっていることから、ナンセンス変異の効率のよいリードスルー系の開発を試みている。この課題については in vitro 評価系を構築できたことが大きく、また、TCP199 などのリードスルー促進試薬の開発にも進展が見られた。さらに、本来のストップコドンにおけるリードスルーの影響の調査が進むことが期待される。

1-2. 「筋増殖・分化制御」では、筋肉量を負に制御しているマイオスタチンの強力な阻害剤の創製を目指している。この領域では既に昨年得られた阻害ペプチドの阻害効果を向上させることに成功しており、小型化は効果の減少をもたらしたが、小型化したペプチドにアミノ酸置換を施すことによって阻害活性が再現される結果は興味深い。また、peptide2 の阻害効果についてはリン酸化との関連が示唆されており、興味深い。なお、がん悪液質は重要な問題であるが、悪疫性をより定量的に評価するための指標の開発が望まれる。また、治療効果と生存率が必ずしも相関しないように見える理由を明らかにすることも重要と思われた。

1-3. 「筋特異的 DDS キャリア」は大変興味深く、治療の局面においても重要である。

この課題については、DDS のための組織特異的指向性を担保するためのペプチドの開発とそれを結合したリポソームを作成し、キャリアとして機能することが確かめられている。さらに、この系を用いて細胞への導入から組織への導入の評価へと進んでいくことが期待される。リアルタイムの測定系が構築されていることは高く評価されるが、これを用いた定量的な測定（ペプチドの違いによる速度定数の違い、吸着とデリバリーの効率など）が期待される。

2 その他

- ・平成 29 年 3 月 17 日には第 8 回戦略会議「第 2 回公開研究進捗状況報告会」を開催している。本報告会では、外部評価者（同志社大学 石浦章一氏）によるプロジェクトの評価も同時に行っている。

- ・平成 28 年度の報告書は詳細に渡って記載されているが、評価する側としては、できれば中間報告に準じる形での報告書が望ましい。

- (1) 成果の記載：中間報告書では研究成果を記載するスペースは限られているので、主な研究成果を簡潔に記載し、研究成果に下線、論文あるいは報告の番号を 1 対 1 で対応するように明確にする努力が必要であろう。

- (2) 学内（学外）の研究体制：研究体制を図示し、その相互関係を明確にする。
 - (3) 業績の数値化：最終的には論文の数または質で評価するので、ユニットごとの総インパクトファクター数、数値目標を達成できたかどうか、達成できてないときの要因の解明、克服するための対策などの記載が望ましい。数値目標より大きく下回る場合はB評価以下になる可能性もある。
 - (4) 本事業で補助を受けて購入した機器の活用状況：稼働時間とのべ使用人数等を明記
 - (5) PD、RA などの人数
-
- ・各種学会における発表状況は良好で、高く評価できる。JBC など優れた学術雑誌に論文が複数掲載されたこと、特許申請等の成果が上がっていることも、特筆すべきである。
 - ・リードスルーのメカニズムの解明が望まれるが、そのためにはこれらの試薬とターゲット蛋白質との定量的な相互作用の測定や相互作用の分子レベルでの構造解析が必要（NMR、MD など）ではないかと思われた。全体として、今後報告においてさらに定量的な結果の報告が望まれる。

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業実施経過報告外部評価票

研究プロジェクト名	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	
研究代表者名	野水 基義	薬学研究科
研究期間	平成 27 年度～平成 31 年度	5 年間で 3 年目

【年次評価】

1 研究成果について

- 本研究は、難治性筋疾患に対する分子創製ならびに筋組織への革新的薬物送達システム（DDS）の技術開発を行い、筋疾患特異的な新規治療薬を開発することを目的とした意欲的な研究事業である。研究成果の実現のために、創薬シーズの実用化レベルへの分子創製を行うⅠ「分子創製ユニット」と筋疾患治療の共通基盤技術となる筋組織への革新的薬物送達システム（DDS）の開発を行うⅡ「創薬高度化ユニット」を組織編成し研究を行っている。今年度は3年目であり以下の点で成果をあげた。
- Ⅰ「分子創製ユニット」以下の3つの領域で成果を上げた。
 - 筋関連遺伝子機能制御：リードスルー活性評価系の構築と構造活性相関に基づくネガマイシン誘導体の構造最適化を実施した。その結果、TCP-1109の獲得に成功した。また、これらのリードスルー薬の評価系の構築に成功した。
 - 筋増殖・分化制御：生理活性や体内動態特性に基づくマイオスタチン阻害ペプチドの構造最適化と薬理評価を実施した。具体的には、マイオスタチンを強力に阻害するペプチドを4種類同定して、その薬効を検討した。また、がん悪液質モデルマウスにおけるペプチドの筋肉量減少抑制効果を検討した。
 - 筋崩壊制御：α-ジストログリカンに特異的に結合するペプチドの探索と生物活性を有するラミニン由来ペプチドの同定を行った。
- Ⅱ「創薬高度化ユニット」
 - 筋特異的 DDS の技術開発：ジストログリカン結合性ペプチド修飾リポソームの作製とその機能評価、及び効率的なペプチド導入方法の開発と薬理的な評価系の構築を実施した。具体的には、筋指向性リポソームの最適化（A2G8-PEG リポソーム）、また、A2G80-R9 を用いた遺伝子導入システムの構築を行った。また、機能性ペプチドの大量合成法の開発と薬物・核酸・ペプチドの薬理的評価系の確立を行った。

3 年目となった本事業であるが、この3年間で、構想調書、テーマ調書の研究計画に沿った成果で順調に計画が進行していると考ええる。難治性筋疾患に対する医薬品開発は、大変な困難を伴うが、「分子創製ユニット」と「創薬高度化ユニット」の研究成果の統合によって、新規医薬品の創製の可能性が高いと考える。残りの2年間の研究期間から、筋ジストロフィーを始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筋萎縮医療対策に向けた研究成果が大いに期待される。

- 3 年目の折返し点であることより、原著論文の量と質、知的財産、を中心に数字で評価した。2016 年～2018 年の原著論文では、TMED10 に関する J Biol Chem の論文が特筆に値する。しかしながら、研究グループ間の格差がある印象を受けたので、各研究ユニット間の連携などを含めて、共同研究体制のあり方を考え直す必要があるかもしれない。学会発表は活発になされているが、論文化はなされていないものが大半であり、実績としての評価が困難である。以下、それぞれの項目について、A(良い)、B(概ねよい)、C(普通)、D: 大幅に改善すべき)で示した。
- (1) 目的達成度：B
- (2) 費用対効果バランス：A

- (3) 研究推進体制：A
- (4) 技術革新への対応：C
- (5) 実用化等の発展性：C

- ・筋関連遺伝子機能制御については、Leucyl-3-epi-deoxynegamycin や TCP-112 を基本骨格として SAR 研究を実施して、TCP-199、TCP-1109 を得ている。前者は天然由来化合物の活性を凌駕しているほか、後者は、Readthrough 薬開発の重要なシーズとなりえる。これらは、研究拠点形成の中核となる大きな成果であると高く評価できる。参画学生のポスター賞受賞も評価できる。薬物動態解析が鍵となるが、拠点における協働体制により加速されるものと期待したい。筋増殖・分化制御に関しては、最小マイオスタチン阻害ペプチドの発見に基づき、高活性誘導体 4 と短鎖化誘導体の創製に成功し、知財化を進めたことは、今後の創薬研究開発に直結する成果であり、特筆すべき成果と評価できる。副作用が低減されていることも付記したい。製剤研究が鍵を握るが、最適化研究の加速化も、拠点における協働体制により実現するものと期待される。参画学生の受賞も高く評価したい。

筋崩壊制御に関しては、 α ジストログリカン特異的ペプチドの探索、ラミニン由来ペプチドから高活性ペプチドの同定に成功している。A2G80 に関する研究成果が特に興味深い。

筋指向性リポソームに関しては、A2G80-R8-PEG を用いて調製した A2G80-R8 リポソームの細胞取り込みの顕著な亢進がきわめて興味深い。大量合成法も確立したことから、次年度以降の解析と応用研究に期待がかかる。A2G80-R9 に関する結果は、遺伝子導入への応用が現実のものとなる内容を包含しており、高く評価できる。全身循環性を高める分子設計の成功を強く期待したい。

以上のように、当該プロジェクトは、当初予定の通り順調に進展しているほか、基礎的知見に関しても予想を上回る成果が蓄積されてきており、高く評価できる。分子創製ユニットにおいて創出される分子種が、創薬高度化ユニットにおいて製剤最適化される拠点体制が整ってきており、当初の目標を上回る、研究の更なる加速と成果の蓄積を大きく期待させる。

- ・研究は組織された 2 つの研究ユニット、即ち「分子創製ユニット」と「創薬高度化ユニット」によって進められた。課題は、昨年から引き継いで、3 つの課題（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）に分かれる。いずれの課題も目標をほぼ達成していると言える。

A-1. 「筋関連遺伝子機能制御」においては①高リードスルー活性を有する TCP-199 および TCP1109 の取得、②酵母（多剤超感受性酵母株）を用いた新規リードスルー活性評価系と、内因性リードスルー活性を持つ L-MPZ をプローブとして生理的なリードスルー機構に対する評価系を構築し、例えば、TCP-1109 の活性を測定し、同時に毒性が観察されないことを示すことができた。評価系の構築は今後の研究に極めて有効と考えられる。

A-2. 「筋増殖・分化制御」では、筋肉量を負に制御しているマイオスタチンの強力な阻害剤の創製を目指し、すでに取得していたペプチド 1 を元に合成した 36 種類のペプチド誘導体から、ペプチド 1 の 3 倍の活性を持つ新規アシル化ペプチド、ペプチド 2 が取得された。この研究から、 α ヘリックス構造形成が阻害活性に重要であることが示唆された。さらに、Ala スキャンなどを用いて検討した結果、ペプチド 1 の約 11 倍の阻害活性を持つペプチド 4 を獲得することに成功している。ペプチドを短くすると阻害活性が減少するが、アミノ酸置換により活性が回復されることが発見されたことは重要な成果である。がん悪液質モデルマウスを用いてペプチド 1 の治療効果を確認することができたが、昨年同様、治療効果と生存率が必ずしも相関しないという問題は未解決である。

A-3. 「筋崩壊制御」では、ラミニン由来の 41 種のペプチドから筋細胞膜を安定化させるものを選択する過程で、 α -ジストログリカンに特異的に結合するペプチドが結合に必要なペプチドのモチーフを同定している。また、673 種の合成ペプチドから 6 種の生物活性の高いペプチドを見出している。まだ、完成度は高くないが、実際の治療への応用に重要な研究成果が得られている。

B. 「創薬高度化ユニット」においては、DDS 開発のために筋指向性のリポソームの開発を目指し、ラミニン由来の α -ジストログリカンを標的としたペプチドの取得を目指し、また、このリポソームを用いて遺伝子導入を目指しており、成果を上げつつある。

以上をまとめると、本研究で取得された高活性誘導体ペプチド TCP-199 や TCP-1109 はリードスルー活性の極めて高い化合物で、今後の応用が期待される。また、A2G80・遺伝子複合体の筋細胞選択的な導入がペプチド配列依存的にエンドサイトーシスを介して達成できることが明らかになり、次年度以降の研究成果が大いに期待される。後継者の育成においても学生やポストドクター、若手研究者の発表が多く、努力の跡が認められる。

2 その他

- ・平成 30 年 3 月 19 日には第 12 回戦略会議「第 3 回公開研究進捗状況報告会」を開催している。
- ・当初の予定通りいかなかった部分についての対策など、プロジェクト自体の軌道修正は必要なかったのかどうか、あまり記載されていない。すなわち、調書作成当時と国内外の研究進捗状況も異なると思うので、若干の軌道修正や、重点領域の設定等が行われることが多いが、この点を明記しないとテーマが散逸している印象に繋がる。事業の実現に際しては予算の規模に対応した研究のスリム化が必要ではないかと考える。
- ・各種学会における発表状況は良好で、高く評価できる。優れた学術雑誌に論文が複数掲載されたこと、特許申請等の成果が上がっていることも、特筆すべきである。

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業実施経過報告外部評価票

研究プロジェクト名	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	
研究代表者名	野水 基義	薬学研究科
研究期間	平成 27 年度～平成 31 年度	5 年間で 4 年目

【年次評価】

1 研究成果について

- 本研究は、難治性筋疾患に対する分子創製ならびに筋組織への革新的薬物送達システム (DDS) の技術開発を行い、筋疾患特異的な新規治療薬を開発することを目的とした意欲的な研究事業である。研究成果の実現のために、創薬シーズの実用化レベルへの分子創製を行う I「分子創製ユニット」と筋疾患治療の共通基盤技術となる筋組織への革新的薬物送達システム (DDS) の開発を行う II「創薬高度化ユニット」を組織編成し研究を行っている。今年度は 4 年目であり以下の点で成果をあげた。

I「分子創製ユニット」

筋関連遺伝子機能制御：リードスルー活性評価系の構築と構造活性相関に基づくネガマイシン誘導体の構造最適化を実施した。

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

stop codon read through 活性に基づくネガマイシン誘導体の構造最適化

ネガマイシン誘導体の体内動態

筋増殖・分化制御：生理活性や体内動態特性に基づくマイオスタチン阻害ペプチドの構造最適化と薬理評価を実施した。

マイオスタチンを強力に阻害するペプチドの創製

マイオスタチン阻害ペプチドの in vivo/in vitro 評価

II「創薬高度化ユニット」

筋特異的 DDS の技術開発：ジストログリカン結合性ペプチド修飾リポソームの作製と機能評価、および効率的なペプチド導入方法の開発と薬理学的な評価系の構築を実施した。

筋組織特異的 DDS の開発

機能性ペプチドの効率的な大量合成法の開発

薬物・核酸・ペプチドの薬理学的評価系の確立
- 4 年目となった本事業であるが、この 4 年間で、構想調書、テーマ調書の研究計画に沿った成果で順調に計画が進行していると考え。難治性筋疾患に対する医薬品開発は、大変な困難を伴うが、「分子創製ユニット」と「創薬高度化ユニット」の研究成果の統合によって、新規医薬品の創製の可能性が高いと考える。残り 1 年の研究期間で、筋ジストロフィーを始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筋萎縮医療対策に向けた研究成果が大いに期待される。

3 年目の中間報告以後、プロジェクト自体の輪郭が明確になり、予算規模に応じた研究が各テーマとも順調に展開されている印象である。最終年度の前年ということもあり、原著論文は決して多くはないが、研究発表は活発になされている。また、投稿準備中の研究成果も散見され、最終年度までに成果が公表されることが期待される。

当初の研究計画によると各ユニットが並列的に研究を進め、最終的に統合していく方針のようであるが、報告書を見る限りでは学内での協力体制が見えてこない。若手研究者育成など学内の研究基盤強化などの側面からのアプローチも一つの方法ではないかと思う。

もう一つの問題は実用化という出口に向けてのロードマップが今ひとつ明確に提示されていないことである。知財という視点からは分子創製ユニットからの 2 件が中間報告書に記載されている

が他のユニットについては記載がない。したがって最終報告書には特許申請を含めた実用化に向けてのロードマップの作成が必須であり、それによって研究の将来性が正当に評価されるのではないかと考える。

- 筋関連遺伝子機能制御について、1-1 では stop-codon readthrough 薬アッセイ系の確立に成功しており、今年度は L-MPZ のミエリン局在に関する成果を始め、ミエリン形成・維持と readthrough との関連に関する興味深い結果を得つつあり、進捗は良好である。1-2 ではネガマイシン誘導体合成について、SAR 研究がさらに進み、新たな分子設計指針がでていること、1-3 では、動態研究に確実な進展が見られること、など臨床研究への進捗が評価できる。担当学生を受賞と、学位期間短縮取得は、本研究グループの活性の高さを表すものである。国内外の学会発表も順調である。原著論文等に関しては、着実な推移は見られるが、さらなる進展を期待したい。

筋増殖・分化制御について、前年度までの高い実績を踏まえ、さらに優れた成果につながる実績を挙げつつある。小型化ペプチドによる阻害活性の強化、in vivo における活性の確認等、研究進捗が高く評価でき、構造最適化と有用性に関する検討に更なる期待がもてる。他グループとの連携もよい。2-2 の Peptide-2 の活性評価に関しても有益な知見を得つつあり、分子レベルでの記述の加速を強く期待したい。学会発表等も確実である。

筋組織特異的 DDS 開発については、DSPE-PEG2000 と DSPE-PEG750 の組み合わせによる A2G80-PEG リポソームによる、全身投与型リポソーム開発の成功、A2G80-R9 遺伝子導入システムが顕著な成果を収めていること、の 2 点を特に高く評価したい。核酸の薬物送達という意味でも大きな技術基盤になる可能性を秘めており、評価者として、この内容のさらなる展開を強く期待している。3-2 機能性ペプチドの大量合成、3-3 の薬理的評価系の確立に関しても、十分な進展が見られる。研究成果発表は、原著論文報告あるいは国内学会発表を中心に、順調であり、評価の高い有機合成専門誌への掲載は特に評価できる。

以上のように、当該プロジェクトは、当初予定の通り順調に進展しているほか、基礎的知見に関しても予想を上回る成果がさらに蓄積されており、将来性も含め、高く評価できる。分子創製ユニットにおいて創出される分子種が、創薬高度化ユニットにおいて製剤最適化される拠点体制が整うなど、体制構築にも成功しており、領域構成としても申し分ない。当初の目標を上回る、研究の更なる加速と成果の蓄積を大きく期待させる。

- 昨年同様、2 つの研究ユニット、即ち「分子創製ユニット」と「創薬高度化ユニット」によって進められ、前者においては、昨年同様、1. 筋関連遺伝子機能制御、2. 筋増殖・分化制御を課題とし、後者においては 3. 筋特異的 DDS の技術開発 を課題として研究を行い、いずれの課題もほぼ目標を達成している。

1-1. 「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」では L-MPZ の産生量が及ぼす影響を、昨年作成した L-MPZ ホモおよび同ヘテロマウスへの影響を調べることによって検討した結果、特にホモにおいて脱髄などが見いだされ、ヘテロにおいても無視できない影響が見いだされた。ミエリン形態の異常には L-MPZ の過剰なリン酸化が関与すると述べられているが、最終目的を考えれば、リン酸化の抑制や readthrough 自体の制御の可能性についても記述が欲しいと思われた。

1-2. 「Stop codon readthrough 活性に基づくネガマイシンの構造最適化」においては TCP-112 を元にしてロイシン導入部位に長鎖アルキル機を導入することによってより強力な readthrough 活性があること、また、ジペプチジルトランスフェラーゼを破壊することによって活性が低下することを明らかにした。しかし、1-1 の結果から readthrough は活性が高すぎる場合には毒性が懸念されるので、ここで得られた結果をもとにして、適度な readthrough 活性を調節する手段に使えないかに興味をもたれたが、それに関するコメントは見つけることができなかった。

2-1. 分子創生ユニットのもう一つの課題である、筋増殖・分化制御では、昨年開発したマイオスタチンを強力に阻害するペプチド 2 よりさらに 6 残基短くて、さらに強力なペプチドの取得に成功し、ペプチド 2 の環状化にも成功している。環状化はペプチドの寿命の延長を目指したものかと思われたが、それについて述べられていない。

2-2. マイオスタチン阻害ペプチドの in vivo/in vitro 評価においては、既に本研究で取得されているペプチド 2 の MSTN 阻害効果を検証し、Smad2 のリン酸化抑制効果を検証してい

るが、運動療法との併用の効果、および糖尿病モデルマウスを用いた血糖値改善についての結果は最終年度に持ち越された。

2 その他

- ・ 原著論文、国際学会等で研究成果を発表している。
- ・ 中間報告書は非常に完成度が高く、これに上述のロードマップを加えると最終成果報告書は充実したものになると考えられる。なお、貴学の他のプロジェクトで実施されていたように国際学会あるいは国際シンポジウムの開催、研究成果のインターネットでの公表、プレスリリースなど多角的な研究成果の発信が望ましい。
- ・ 国内外から高く評価されている研究代表者のリーダーシップ，並びに領域内の研究成果の蓄積は，特筆に値し，改めて高く評価したい。今年度，当初目標を上回る研究成果を期待している。
- ・ 各ユニットのそれぞれの課題に関しては満足できる成果が得られたことが発表論文にも示されている。しかし、リードスルーが負の効果を与えることに今後どう対処するのかの展望が十分議論されているとは思えなかった。3つの研究ユニットが情報交換を促進し、最終的に、分子創生ユニットで開発された分子を創薬高度化ユニットで開発される DDS を利用して疾患の治療に応用できるかについて考察することが必要である。なお、人事・表彰を通して、若手研究者の育成に効果が表れていることが注目される。

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業実施経過報告外部評価票

研究プロジェクト名	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	
研究代表者名	野水 基義	薬学研究科
研究期間	平成 26 年度～令和元年度	5 年間で 5 年目

【最終評価】

1 研究成果について

- ・本研究は、難治性筋疾患に対する分子創製ならびに筋組織への革新的薬物送達システム（DDS）の技術研究を行い、筋疾患特異的な新規治療薬を開発することを目的とした意欲的な研究事業である。研究成果の実現のために、創薬シーズの実用化レベルへの分子創製を行うⅠ「分子創製ユニット」と筋疾患治療の共通基盤技術となる筋組織への革新的薬物送達システム（DDS）の開発を行うⅡ「創薬高度化ユニット」を組織編成して、幅広く意欲的な研究を行った。最終的に以下の成果を上げた。
- ・Ⅰ「分子創製ユニット」

1. Leucyl-3-epi-deoxynegamycin や TCP-112 を基本骨格に構造活性相関研究を実施し、高活性誘導体として TCP-199, TCP-1109, TCP306 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、毒性を認めず有意な L-MPZ リードスルー活性を示したことから、大変有望な創薬候補物質と考える。
2. 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。
3. 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、 α -ジストログリカン結合活性ペプチド A2G78 (GLLFYMARINHA)、A2G80 (VQLRNGFPYFSY) を同定した。

- ・Ⅱ「創薬高度化ユニット」

DMD モデル筋組織への指向性を有する A2G80 リポソームの開発を行った。特に A2G80-R9-H8 ポリプレックスは、in vitro 及び 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活性を得た。また、本コンプレックスは、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 としての応用が期待される。

- ・本プロジェクトは緻密な研究計画に基づき分子創薬ユニット（2 グループ）と創薬高度化ユニット（1 グループ）から構成されている。プロジェクトのテーマは縦割りで、相互の連携については明確ではないが、概ね研究進捗状況は順調と考えられる。なかでもリポソームに関する研究は創薬シーズとして注目される。ただし、期間内に達成できなかった部分、例えば臨床家との連携による出口研究などについては課題として、今後の取り組み方などについて言及することが望ましい。

総合評価：B

(1) 研究計画の妥当性：A'

(2) 研究の進捗状況：B

(3) 研究の将来性：B

(4) 研究体制：B'

(5) プロジェクトの活動状況と領域構成：B

・創製ユニットと創薬高度化ユニットを編成、遺伝子機能制御、筋増殖・分化制御、筋崩壊制御の3領域における創薬研究を進める計画であり、妥当な課題設定と研究計画であった。

分子創製ユニットにおける達成度は極めて高いものと評価できる。例えば、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（TCP-306, TC-1109）はAMED 橋渡し研究シーズAに発展しているほか、活性評価系も著名な雑誌に原著論文が複数掲載されている。筋増殖・分化制御に関しては、マイオスタチン活性阻害する部分ペプチドを基に、創薬シーズに近い誘導体が得られているほか、その活性阻害に関する作用機序を明確に示している。この内容は特に社会要請の高いものであり、各種報道、担当者の複数の受賞などにその影響力の大きさが現れている。筋崩壊制御に関しては、ラミニンの部分ペプチドライブラリー等を基に、計画通り、 α -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、並びにその評価系の確立に成功しており、高く評価できる。

創薬高度化ユニットにおける達成度も同様に極めて高いものと評価できる。例えば、上記 α -ジストログリカン特異的リガンドに関して、極めて均一性が高くかつ超微粒子化したPEGリポソームの開発とその大量合成法の確立に成功している。このリポソームはin vivoにおける筋組織選択性が示されている。さらに、カチオン性ペプチドR9を連結させた上記ペプチドとプラスミドDNAの複合体が効率よい細胞内移行を示し、かつ高い筋組織選択性を有していたことは特筆に値する。これらの研究成果の高い評価は、各種学会講演賞、ポスター賞を多数受賞していることに裏打ちされている。

以上の結果は、社会要請のきわめて強い筋疾患の統合的創薬を大きく加速させるものであり、その展望は明るく、将来性を強く感じさせる。研究成果の波及効果も相当に及ぶことが期待できる。また、堅牢な運営体制、評価システムも、研究代表者の特筆すべきリーダーシップによるものであると極めて高く評価できる。研究報告数も、期待をはるかに上回るものである。

以上のように、当初の研究計画を上回る研究成果を挙げており、その内容は期待を越える優れたものであった、と言える。今後、学内での本研究拠点のセンター化等、当該研究領域のさらなる充実を強く期待したい。

・研究は2つの研究ユニット、即ち「A 分子創製ユニット」と「B 創薬高度化ユニット」によって進められ、前者Aにおいては、1. 筋関連遺伝子機能制御、2. 筋増殖・分化制御、3. 筋崩壊制御を課題とし、後者Bにおいては「 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」が行われた。いずれの課題もほぼ目標を達成している。

A-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」では放線菌より単離された化合物で、ネガマイシンより活性の高いものを得ると共に、より高活性の誘導体の合成にも成功している。また、「リードスルー薬の評価系の構築」にも成功している。今後開発されるリードスルー活性化化合物については活性の測定と、副作用の有無の解析が重要で、今後さらに適度なリードスルー活性を持つ誘導体の開発が望まれる。また、開発された高活性ネガマイシン誘導体TCP-1109には毒性が認められなかったのは朗報である。

A-2) 「筋増殖・分化制御」においては、アミノ酸残基置換の結果に基づいて構造活性相関に基づく新規マイオスタチン部分ペプチド成功している。明らかになったアミノ酸残基置換の位置効果に基づいて、元のペプチド1よりも11倍強力な2よりも約4倍強力な新規ペプチド4の合成に成功した。また、短鎖化ペプチドの再検討により、16残基からなる小型でプロテアーゼ抵抗性の阻害ペプチドとしてMIPE-1686、また、フォリスタチン由来のマイオスタチン選択性のペプチドの取得にも成功している。また、ペプチド1の悪液質マウスに対する効果を検討した結果、腓腹筋内への投与で効果が得られることが明らかになり臨床応用への可能性が示された。

A-3) 筋崩壊制御においては、ラミニン α 2鎖LG4-5モジュールに着目したスクリーニング研究によって、 α -ジストログリカン結合ペプチドを取得し、さらに同結合性評価用のELISAの構築にも成功した。

B「創薬高度化ユニット」に関しては、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A2G80-R9-H8リポソームの作製に成功した。このDDSは導入用遺伝

子と室温で攪拌して混合するだけで導入が可能である。

2 今後の展望と期待

「分子創製ユニット」は、すでに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創薬候補化合物を同定している。また、「創薬高度化ユニット」は、A2G80 リポソームの開発に成功していることから、今後はこの二つのユニットの連携により、DMD モデルマウスを用いての前臨床研究と、これまでにない新規の医薬品の創薬が期待される。また、超音波応答性ナノバブルと A2G80-R9-H8 ポリプレックスを組み合わせた遺伝子送達法の応用研究も楽しみである。

3 その他

- ・最終年度の報告書は記入スペースが限られているので、ポイントとなる研究成果を明示し、それに対応する研究成果（論文の番号、発表の番号、特許の番号）を記載することが望ましい。

- ・課題として詳細なリードスルー活性機構の解明を挙げているが、より具体的に、何をどう研究すれば解決に至ると考えられるかを提示してもらえるとさらにわかりやすいと思われた。また、指向性の評価に結合定数のような定量的なパラメータを用いるとわかりやすい。いずれにしても、最終年度の成果により、新規医薬品創製の可能性の期待が高められたと考えられる。特許出願と共に、発表論文も雑誌の表紙に採用されるなど、質・量ともに評価できるものである。また、学生のポスター賞など教育的効果だけでなく、発表が昇進に貢献するなど、若手の教育・育成への効果も顕著で評価できる。以上、本戦略研究は、当初の目的を十分達成できたと考えられる。