



〔研究報告書〕

2022年度猪之鼻奨学会研究助成金研究報告

【一般の部】

1. 薬物の死後変化に対する血中タンパク質の寄与に関する研究

[IFCU-2022-01]

千葉大学大学院医学研究院
山岸由和

目 的

死後直後の薬物濃度は、正確な死因鑑定に必要な要因の一つだが、薬物の死後変化（死後代謝）に関する報告は限定的である。最近、我々はベンゾジアゼピン系向精神薬プロマゼパム（BZM）が血中に豊富に存在するタンパク質であるヘモグロビン（Hb）関与による酸化的死後代謝により死体血中で分解されることを報告した。一方、BZMと構造類似のエチゾラム（EZM）は自殺目的で多量服薬されることがあるが、その死体血中よりEZMを検出できないことがあると報告されている。本研究では、EZMがBZMと同様にHbによる酸化的死後代謝が起こる可能性があるかを検討した。

方 法

Hb溶液（100 mg/mL）にEZM（最終濃度0.3 μg/mL）、過酸化水素（最終濃度300 μg/mL）を添加し、37℃で24時間温置後、EZM濃度をLC-Q-Orbitrap-MS（Q-Exactive plus, Thermo Fisher Scientific）で測定した。さらに死後のEZM濃度減少に影響される要因として温度またはグルタチオン（GSH）の影響があるかを検討した。温度は4, 20, 37もしくは45℃に、GSH濃度は赤血球内の濃度である10 mMに設定した。またEZMのHbと過酸化水素による代謝機構を解明するため、EZM代謝物を反応前と反応後で開発中のCI同位体スクリーニング法（CI-IPS）で解析し、網羅的にEZM代謝物を探索した。さらに過酸化水素で生成された未知EZM代謝物UK-EZM-M3はHPLCにより単離精製後、NMR測定で構造を同定した。

結 果

EZMはHb溶液に過酸化水素を加えた反応液中で最も有意に減少し、その減少率は66.5%であった。加えて、環境影響の一因である温度の影響が認められ、温度依存的にEZM濃度は減少した。一方でGSHの影響は有無により有意な変化はあるものの、EZM濃度の減少はほぼ同程度であった。さらにCI-IPSの結果、*m/z* 359.0722（UK-EZM-M1）、357.0576（UK-EZM-M2）及び359.0718（UK-EZM-M3）をもつ複数の未知代謝物が検出された。代謝物標準品との比較により、UK-EZM-M1とUK-EZM-M2はそれぞれα-hydroxyetizolamとその酸化体

であった。さらにNMR測定の結果、UK-EZM-M3は4-(2-chlorophenyl)-2-ethyl-9-methylthieno[3, 2-*f*][1, 2, 4]triazolo[4, 3-*a*][1, 4]diazepine 10(6H)-oxideと同定された。

考 察

Hbによる酸化的死後代謝はBZMと類似の構造を持つEZMでも起こると示唆され、その結果、EZMは複数の死後代謝物に変化すると考えられた。α-hydroxyetizolamは生前にも検出されるが、α-hydroxyetizolamの酸化体ならび4-(2-chlorophenyl)-2-ethyl-9-methylthieno[3, 2-*f*][1, 2, 4]triazolo[4, 3-*a*][1,4]diazepine 10(6H)-oxideは生前血液からの検出が報告されていないため、死後特有の代謝変化を示すバイオマーカーとして使用でき、これらの死後代謝物の生成量から死後の血中EZM濃度減少量を評価できる可能性が示唆された。

2. 共結晶化したCOX-2 選択性NSAIDsの経鼻投与後の鼻粘膜表面における溶出挙動の解析

[IFCU-2022-02]

日本大学 薬学部
鈴木直人

目 的

経鼻投与は、鼻腔局所や全身循環のみならず、鼻腔から脳へ直接薬物を送達できる投与方法として、注目を集めている。特に、本投与方法では、これまでに血液-脳関門（BBB）非透過性と報告される薬物を脳へ送達することが可能となる。非ステロイド性抗炎症薬のメロキシカム（MLX）は、高いシクロオキシゲナーゼ-2（COX-2）選択性から脳内における炎症反応を抑制するため、様々な中枢性疾患を治療することが期待される。しかしながら、MLXは水に対する溶解性が乏しいため、粘液量の少ない鼻粘膜表面ではMLXが溶解することができず、治療に十分な量のMLXが脳に送達できないことが懸念される。従って、MLXの脳送達を目的とした経鼻製剤の設計には、MLXの鼻粘液に対する溶解性を改善する技術が必須である。共結晶は、薬物と室温で固体の医薬品添加剤（コフォーマー）が同一結晶構造を構築する複合体であり、本来薬物がもつ溶解性などの物理化学的特性を改善することが可能である。そこで、本研究では共結晶を基盤とした経鼻製剤の設計を目的として、MLX含有共結晶の鼻粘膜表面における溶出挙動について評価した。

方 法

MLX含有共結晶のコフォーマーとして報告される1-ヒドロキシ2-ナフトエ酸（HNA）、安息香酸（BZA）お

よびp-ヒドロキシ安息香酸 (PHB) とMLXをそれぞれモル比1:1で混合し、溶媒として酢酸エチルあるいはテトラヒドロフランを用いて、溶媒蒸発法 (EVA) あるいは溶媒アシスト粉碎法 (LAG) により共結晶の調製を試みた。得られた混合物について、粉末X線回折 (PXRD)、示差走査熱量測定 (DSC) により評価した。また、各共結晶を34℃に加温した疑似鼻粘液に添加した後に溶解したMLX量を高速液体クロマトグラフィーにより定量することで、各共結晶の鼻粘膜表面における溶解性を評価した。また、MLX単体ならびに各MLX含有共結晶の疑似鼻粘液への溶出特性を評価した。

結 果

EVAで調製したMLXとHNAの混合物ならびにLAGで調製したMLXとBZAの混合物のPXRDパターンは、ケンブリッジ結晶構造データベースに登録される結晶構造情報と一致したため、各混合物において共結晶が形成したことが明らかとなった。また、LAGより得られたMLXとPHBの混合物のPXRDパターンにおいて、MLXおよびPHBとは異なる新たな結晶相に由来する回折ピークが認められた。また、DSC曲線では物理的混合物 (PM) における210℃付近の吸熱ピークと異なるピークが認められたことから、共結晶の形成が示唆された。

得られた3種類の共結晶について、疑似鼻粘液に対する溶解性を評価したところ、MLX-HNAでは、試験開始直後からMLX溶解量が徐々に増加し、試験2時間後にMLX単体 (5 μM) の約10倍の溶解性 (50 μM) を示した。また、MLX-BZAでは、試験開始直後には、MLX単体より僅かに高い溶解性 (6 μM) を示したものの、その後、MLX単体と同程度に推移したため、MLX単体に結晶化したと考えられた。さらに、MLX-PHBでは、MLX単体よりも低い溶解性を示し、MLX単体に速やかに変化したと考えられた。

最後に、MLX-HNAの溶出試験を実施した結果、MLX単体の累積放出率は2時間後に約34.1%であったのに対し、MLX-HNAでは96.1%となり溶解性の改善に伴う溶出性の向上が認められた。

考 察

MLXを含有する共結晶の調製を試みたところ、既報のMLX含有共結晶の形成が認められた。また、これら共結晶の疑似鼻粘液における溶解性試験の結果、MLX-HNA共結晶で最も高い溶解性を示し、鼻粘膜表面に投与してからクリアランスにより除去される2時間後まで過飽和を形成することが明らかとなった。さらに、溶出試験においても、MLX単体より高い累積溶出率を示した。以上より、HNAからなるMLX共結晶が経鼻投与された場合、鼻粘膜表面にはMLXの過飽和層が形成し、鼻から脳へのMLX送達量の増加が期待される。今後は、より鼻腔表面に近い僅かな鼻粘液存在下における溶出挙動を評価して、共結晶技術を基盤とした脳標的MLX含有経鼻製剤の確立を目指す。

3. オルガノイドのがん化過程における p53/c-myc 経路の重要性の検討

[IFCU-2022-03]

東邦大学 薬学部 公衆衛生学教室

山口 陽子

目 的

がん抑制遺伝子p53は、がん遺伝子c-mycの発現制御領域に結合しc-mycの転写抑制を介して細胞周期を適切に制御し細胞のがん化を防いでいる。これについて申請者は、老化マウスにおいてはc-mycがp53による制御から逸脱することを見出した (BBRC, 2018)。つまり、老化細胞はがん遺伝子であるc-mycが過剰に発現できる状態にあり、細胞周期の停止が解除されればがん化しやすい状態にあると言える。そこで本申請課題では、オルガノイド (ミニ臓器) を用いた発がんモデルにおけるp53/c-myc経路の発現を調べ、p53によるc-mycの発現抑制の解除が組織のがん化においてどのように機能するかを検証した。

方 法

C57BL/6JとバッククロスしたLox-STOP-Lox (LSL)-KrasG12D/+; Trp53^{fl/fl} マウス、APC^{fl/fl}; Trp53^{fl/fl} マウスから小腸オルガノイド、胆管オルガノイドを調製した。調製した正常オルガノイドにレンチウイルスベクターpHR-Creを導入することで、KrasG12D発現; p53欠損オルガノイド、APC欠損; p53欠損オルガノイドを作製した。調製したオルガノイドをBALB/cA^{tm/m}の皮下に移植し、腫瘍形成したものを再度オルガノイド培養することによってがん化オルガノイドを得た。

得られたオルガノイド、あるいはp53活性化剤Nutlin-3a、p53抑制剤Pifithrin-alphaまたはc-Myc抑制剤10058-F4にて処理したオルガノイドからRNAを抽出し、RT-qPCRを用いてc-mycならびにp53の標的遺伝子であるp21、Mdm2の発現を測定した。また、薬剤によるオルガノイドの生存への影響を細胞増殖法によって調べた。

結 果

正常オルガノイドをp53活性化剤Nutlin-3aの存在下で培養すると、p53の活性化に伴いc-mycの発現が抑制され、オルガノイド培養系においてもp53によるc-mycの抑制機構が機能することが確認できた。

次に正常オルガノイドをc-myc抑制剤10058-F4によって処理したところ、生存率が低下し、オルガノイドの生存がc-myc依存的であることが確かめられた。

以上をもとに、オルガノイドにおけるp53の欠損と他家移植はc-mycを発現上昇させストレス耐性に寄与すると推察されたが、検証の結果、大腸オルガノイド、胆管オルガノイドにおけるc-mycの発現量は、p53の欠損や腫瘍形成により上昇することがなかった。つまり、オルガノイド培養条件下においては、p53遺伝子の有無によらず、c-mycの発現が高いレベルで維持されることが明らかになった。

なお、p53の欠損はオルガノイドの樹立や他家移植の成功率を上昇させるが (Aging, 2021)、オルガノイ

ドをp53抑制剤pifithrin-alpha存在下で培養した場合でもp21, Mdm2の発現は低下せず、オルガノイド培養条件下においてはp53の活性がごく低いレベルに抑えられていることがわかった。これもp53遺伝子の欠損が培養中オルガノイドのc-mycの発現レベルに影響しない原因であると考えられた。

考 察

当初、オルガノイドにおけるp53の欠損、またはp53阻害剤の処理でc-mycの発現が上昇し、発がんを促進すると考えられたが、オルガノイドの培養条件下においてはc-mycの発現が高く維持されており、p53の欠損によるc-mycの発現上昇が観察されないことがわかった。一方、筆宝らは、p53の欠損はオルガノイドの樹立や他家移植の成功率を上昇させると報告している(Aging, 2021)。このことから、がん化過程へのp53/c-myc経路の影響は、作製中であるp53/c-myc経路を解除したマウスを用い、オルガノイド樹立の効率や腫瘍の生着度で検証すべきであると考えられた。

4. iPS細胞由来巨核球・血小板製剤による骨癒合促進効果の作用機序の解明と骨折治療用血小板製剤の開発

[IFCU-2022-04]

千葉大学大学院医学研究院 イノベーション再生医学
向井 務 晃

目 的

日本は2007年に超高齢社会に入り、骨折や変性疾患が増加し、迅速な骨癒合を促進する治療法の確立が求められているが、欧米で認可されているBone morphogenetic protein 2 (BMP2) 製剤は造腫瘍性、投与局所での高炎症の惹起などにより、本邦では未承認である。我々は、患者の自己血液を遠心して得られる、多血小板血漿 (PRP) に着目し、骨癒合促進効果を動物実験、臨床研究で報告してきた。一方PRPは、患者毎の製剤の不均一性、また作用機序の科学的根拠が不明瞭なことが課題であった。そこで共同研究者が開発したiPS細胞由来のユニバーサルタイプの人工血小板を用いた、骨再生用人工血小板製剤の開発を考案し、ラット腰椎癒合モデルを用いて骨形成促進効果を証明した (Spine Surg Relat Res. 2021, 特許取得)。興味深いことに、ELISAでの定量的結果、同製剤にはBMP familyがほぼ含有されていないことから、本研究では同製剤の骨再生機序の解明を目的とした。

方 法

不死化巨核球 (cell stem cell. 2014) 5×10^6 個をプラスチックで5日間振盪培養し、成熟巨核球 5×10^6 個と血小板 15×10^6 個を回収した。遠心後に上清を除去、1 ml のPBSで溶いた後、 -30°C で保存した製剤をiPM (iPS-derived platelets and megakaryocyte) 製剤とし、使用時には解凍後遠心し、その上清を用いた。

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) から成熟骨芽細胞への誘導を定量できるin vitroの系を最適化し、以下の検証を行った。

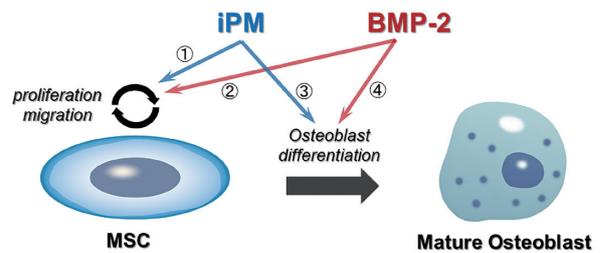


図1 研究概念図

- 1) iPM, BMP2のMSC増殖能・遊走能への効果検証 (図1①②): コントロール群, iPM投与群 (2.5%, 5%, 10%), BMP (100, 200, 300ng/ml) 投与群の7群を作成し、増殖条件でMSC細胞数をFACSにて定量、またtranswell assayにて遊走細胞面積を定量した。
- 2) iPM, BMP2のMSC分化能への検証 (図1③④): 上記7群に対し、MSCの分化条件下にqPCRにて成熟骨芽細胞マーカーの定量 (ALPL, SPP-1) と Alizarin red染色を施行した。
- 3) RNAシーケンシス: MSC増殖条件でのコントロール群 (1. Growth Medium; GM) 群, 2. GM+iPM群, 3. GM+BMP2群, 4. MSCの分化条件でのコントロール群 (Differentiation Medium; DM) 群, 5. DM+iPM群, 6. DM+BMP2群の6条件で検証した。

結 果

- 1) iPM投与群のみ、MSCの細胞増殖能が、コントロール群に比べ4-6倍、遊走能が約2倍に有意に亢進した。
- 2) BMP2 200ng/ml, 300ng/ml投与群のみ、qPCR, Alizarin red染色で有意に骨分化が促進された。
- 3) RNAシーケンシスの結果、GM+iPM群ではGM群とGM+BMP2群に比べ、cell cycleやproliferationに関わるシグナルが上昇し、DM+BMP2群ではDM群とDM+iPMs群に比べ、骨形成に寄与するBMP2関連のシグナルやproteoglycansに関わるシグナルが上昇した。

考 察

1) 2) の結果よりiPM製剤とBMP2製剤では骨形成促進効果の機序が異なることが示された。すなわち、iPM製剤はMSCの増殖能と遊走能の促進により、またBMP2製剤はMSCからの骨芽細胞への分化促進により、in vivoでの骨再生効果に寄与している可能性が示された。また3)の網羅的な解析からも、両製剤のMSCに対する反応経路が異なることが示された。以上より、iPM製剤の骨形成促進効果を向上させる方法として、不死化巨核球段階でBMP2遺伝子を強制発現させ、iPM製剤にBMP2タンパクを補完することが有効である可能性が示唆された。

5. 高度悪性化がんで高発現する転写バリエーション分子のがん転移における機能解析

[IFCU-2022-05]

千葉県がんセンター

盛永 敬郎

目 的

がんの病態にスプライシング制御異常が深く関わることが知られている。これまでに私たちは、乳癌臨床検体に対するロングリードシーケンス解析により、固有のエクソンを有するTNS3遺伝子の新規バリエーション(TNS3-S)がトリプルネガティブ乳癌(TNBC)においてサブタイプ特異的に発現することを報告しており、本研究では当該遺伝子発現の有無が乳癌病態に与える影響の解明を目的とした。

方 法

- [1] TNS3-Sの転写開始点の同定: TNS3-Sの5'領域全長配列を5'RACE法で調べ、当該配列から転写開始点を検索した。転写開始点の上流配列を用いたレポーターアッセイにより転写制御領域を検索した。転写制御領域のDNAメチル化をBisulfite法及びqMSP(定量的メチル化特異的PCR)法で調べた。また、TNS3-Sに相当する遺伝子がヒトだけでなくマウスでも存在しているか否かをリアルタイムPCR法並びにcDNA全長のクローニングにより調べた。
- [2] TNS3-Sノックアウト細胞株(KO株)を用いた転移能の解析: Luciferaseを発現する高肺転移性TNBC細胞株を用いて、方法[1]で同定した転写開始点を含むTNS3-S固有領域をゲノム編集技術で取り除いたKO株を作成した。さらにKO株にTNS3-Sを過剰発現させたRescue株を樹立した。KO株、Rescue株についてin vitro培養して観察したほか、ヌードマウスの尾静脈から注入し、肺生着レベルへの影響をbioluminescence法で解析した。

結 果

- [1] TNS3-Sの転写開始点及び転写制御領域を同定した: 方法[1]により、TNS3-Sに固有のエクソンを生じる転写開始点を同定した。さらに、レポーターアッセイにより、転写開始点の-340から+1までの領域に転写制御領域が含まれることを明らかにした。この転写制御領域にはCpG islandが含まれ、この領域がメチル化されているTNBC細胞株と脱メチル化しているTNBC細胞株が存在し、メチル化がTNS3-Sの発現制御に関わることが示唆された。
- [2] TNS3-S発現は種を超えて保存されている: マウスのゲノム上にも結果[1]で見いだした転写制御領域と相同性の高い(70%程度)領域が含まれていた。そこで同転写開始点からなるマウスのTNS3-S配列を予測して、マウスのTNBC細胞株を用いてリアルタイムPCRで調べたところ、当該mRNAが発現していた。さらに、このmRNA全

長をクローニングしてシーケンス解析することで、マウスでもTNS3-Sが発現していることを見いだした。

- [3] TNS3-SはTNBCの肺転移を促進する: 樹立したKO株については、リアルタイムPCR法並びに免疫沈降法でTNS3-Sの欠失を確認した。KO株は浮遊培養時にアポトーシスを誘導しやすく、Rescue株ではこの性質が抑制されることがわかった。さらに、ヌードマウスを用いた肺転移モデルでは、KO株では肺転移が有意に減少し、Rescue株では回復した(p=0.0012)。

考 察

本研究により、TNS3-Sは発現制御領域のDNA脱メチル化されたTNBC細胞で発現しており、乳癌の肺転移に関わることが示唆された。また、マウスでも同バリエーションが発現することを明らかにした。今後は、臨床検体とマウスモデルを用いて、実際の乳癌組織内での発現制御機構や免疫を含めた転移制御機構を明らかにしていく。

【若手の部】

6. 放線菌*Nocardia*の産生する感染宿主との相互作用に寄与する天然物の探索とその機能解明

[IFCU-2022-06]

千葉大学大学院薬学研究院 創薬科学講座

活性構造化学研究室

原 康 雅

目 的

微生物は、医薬品開発につながる多様な骨格構造や生物活性を有する天然有機化合物(天然物)を産生する有望な天然物探索資源である。近年、新規の天然物の報告が減少していることから、放線菌の多くを占める*Streptomyces*以外の放線菌(希少放線菌)が新たな天然物探索資源として注目されている。その希少放線菌の1つである*Nocardia*は、同じ放線菌で実際の臨床でも使用される化合物群を産生する放線菌*Streptomyces*に比べ、天然物の単離報告例は少ない。しかし、近年のゲノム解析により、*Nocardia*が*Streptomyces*と同程度の天然物生合成遺伝子を有することが明らかにされた。そのため、*Nocardia*の持つ未だ天然物の報告されていない生合成遺伝子を活性化することができれば、新たな天然物を獲得することが可能となる。また、近年、*Barkholderia*などの病原菌から感染に寄与する天然物が報告されるなど、病原菌の感染に対して有機化学的な観点からの研究が進められている。そのため、*Nocardia*の産生する天然物を明らかにすれば、他の病原菌の産生する天然物との構造や生物活性の差異が明らかになる可能性がある。

そこで、本研究では、生物活性を指標に*Nocardia*が産生する天然物を探索し、その天然物の機能解明を行うこととした。

方 法

千葉大学真菌医学研究センターより入手した *Nocardia* を培養し、得られた培養抽出物について、マウスマクロファージ様細胞株J774.1に対する細胞毒性評価やマウスマクロファージ様細胞株RAW264を用いた抗炎症活性評価を実施した。抗炎症活性評価では、RAW264に Lipopolysaccharide を添加して炎症反応を誘導し、炎症亢進に伴い産生される炎症メディエーターであるNO量を Griess法により測定した。細胞死に伴うNO産生減少による偽陽性を除くため、細胞生存率を同時に評価した。生物活性が見られた抽出物は、シリカゲルやODS等の担体を用いたカラムクロマトグラフィーやHPLCにて分離、精製を行い、化合物を単離した。単離化合物はNMRやMSなどのスペクトルデータをもとに構造決定を試みた。

結 果

*Nocardia*の単培養抽出物がJ774.1に対して細胞毒性を示さなかった菌株のうち9種を選別し、4種類の培養条件にて動物細胞J774.1存在下での培養（共培養）を実施した。得られた36種の共培養抽出物についてJ774.1に対する細胞毒性試験とLCMSでの解析を実施した結果、共培養にのみ細胞毒性を示した抽出物12種、共培養優先的に産生される化合物を有する抽出物20種を見出した。このうち、共培養にて細胞毒性を示し、かつ、共培養優先的に産生される化合物を有していた、J774.1存在下での *N. pseudobrasiliensis* IFM 0624^Tの

培養抽出物の分画を実施した。その結果、分子量1000を超えるペプチドと推定される3種の天然物を単離した。

また、*Nocardia*基準株13種を用いて4種類の培地による単培養を実施し、52種の培養抽出物を作成した。これら抽出物の抗炎症活性によるスクリーニングの結果、19種の抽出物でNO産生が顕著に低下した。なかでも高い細胞生存率を有したままNO産生を抑制した *N. vinacea* IFM 10175^TのYeast-Malt-Glucose培地での培養抽出物について生物活性を指標に分画を行い、ペプチドと推定される複数の天然物を単離した。

考 察

*N. pseudobrasiliensis*や *N. vinacea*より単離した天然物について、未だその構造決定に至っていない。そのため、今後、単離天然物の構造決定を行った後、マウスマクロファージ様細胞株に対する細胞毒性評価や抗炎症活性評価を実施し、その機能を明らかにしたいと考える。

謝 辞

本研究の実施に当たり、ご指導、ご助言いただきました千葉大学大学院薬学研究院 石橋正己博士、高屋明子博士、慶應義塾大学理工学部 荒井 緑博士、千葉大学真菌医学研究センター 矢口貴志博士に厚く御礼申し上げます。また、本実験の遂行に当たりご協力いただきました海老原 樹氏、渡邊圭一郎氏、瀬戸陽介氏、三宅真未氏に厚く御礼申し上げます。