# (第31回) 公益財団法人篷庵社 研究助成発表会

# 講演要旨集

平成24年7月5日(木)

於 塩野義製薬株式会社 医薬研究センター

# プログラム

日 時 : 平成 24 年 7 月 5 日 (木) 13 時 00 分から 17 時 20 分まで

場 所 : 塩野義製薬株式会社医薬研究センター オーディトリアム

※所属は発表当時のもの

13:00-13:05	ご挨拶 公益財団法人篷庵社 理事長 前田 孝	
	<u>演題および演者(講演 25 分、討論 15分)</u>	<u>座 長</u>
13:05-13:45	<ol> <li>1. 慢性的疼痛による情動障害と食欲抑制のメカニズム</li> <li>南 雅文 先生 (北海道大学大学院薬学研究院 薬理学研究室)</li> </ol>	(篷庵社評議員) 佐藤 公道 先生
13:45-14:25	<ol> <li>乳がん個別化治療実現を目指した遺伝子発現プロファイル 解析および細胞周期プロファイル解析に基づく予後および 化学療法感受性診断法の開発</li> <li>野口 眞三郎 先生 (大阪大学大学院医学系研究科 乳腺内分泌外科)</li> </ol>	(篷庵社元理事) 松本 圭史 先生
14:25-15:05	<ol> <li>新規ペプチドライゲーション法の開発と それを用いる部位特異的修飾蛋白質の合成</li> <li>HLL 御 先生 (大阪大学蛋白質研究所)</li> </ol>	(篷庵社評議員) 村香 從一 先生
15:05-15:20	休 憩	
15:20-16:00	4. 活性カチオン種の生成とその高次利用 <b>藤岡 弘道 先生</b> (大阪大学大学院薬学研究科 分子合成化学分野)	<ul><li>(篷庵社理事)</li><li>北 泰行 先生</li></ul>
16:00-16:40	5. 循環器障害克服のための酸化ストレス研究 <b>玉置 俊晃 先生</b> (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 神経情報医学部門薬理学分野)	(篷庵社元理事) 山本研二郎先生
16:40-17:20	<ul> <li>6.《特別研究助成》</li> <li>心不全の分子病態解明に基づく新規治療標的の同定</li> <li>桑原 宏一郎 先生</li> <li>(京都大学大学院医学研究科 内分泌代謝内科)</li> </ul>	(塩野義製薬(株) 創薬・疾患研究所) 篠崎 俊宏氏

## 目 次

#### 1. 南 雅文

「慢性的疼痛による情動障害と食欲抑制のメカニズム」

1

# 野口 眞三郎 「乳がん個別化治療実現を目指した遺伝子発現プロファイル解析および 細胞周期プロファイル解析に基づく予後および化学療法感受性診断法の開発」

10

川上 徹
 「新規ペプチドライゲーション法の開発とそれを用いる
 部位特異的修飾蛋白質の合成」

19

29

4. 藤岡 弘道

「活性カチオン種の生成とその高次利用」

5. 玉置 俊晃

「循環器障害克服のための酸化ストレス研究」

39

#### 6. 桑原 宏一郎

「心不全の分子病態解明に基づく新規治療標的の同定」

41

#### 慢性的疼痛による情動障害と食欲抑制のメカニズム

#### 北海道大学大学院薬学研究院薬理学研究室

#### 南 雅文

痛みは、侵害刺激が加わった場所とその強さの認知に関わる感覚的側面と、侵害刺激の受容に伴う不安・嫌悪・抑うつなどの負の情動(以下、不快情動と呼ぶ)の生起に関わる情動 的側面からなる複雑な体験である。痛みによる不快情動の生起は、我々を医療機関へと赴か せる原動力であり、疾病や傷害から身を守るための生体警告系としての痛みの生理的役割に とって非常に重要である。しかしながら、痛みが長期間持続する慢性疼痛では、痛みにより 引き起こされる不快情動は、患者の生活の質(QOL)を著しく低下させるばかりか、精神疾 患や情動障害の引き金にもなる。また、慢性的な痛みは、食欲減退の一因にもなる。このよ うな点から、痛みの感覚的側面のみならず、情動的側面や食欲抑制などをも考慮した総合的 な疼痛治療が必要であると考えられる。

我々は痛みによる不快情動生成機構に関して、「extended amygdala」を構成する分界条床核 (BNST)に着目した研究を行い、これまでに痛みによる不快情動生成に BNST が関与してい ることを明らかにした<sup>1)</sup>。さらに、BNST 腹側領域(vBNST)にノルアドレナリン神経が密 に投射していることに着目した研究により、vBNST 内β受容体を介したノルアドレナリン神 経情報伝達が痛みによる不快情動生成に重要な役割を果たしていることを報告した<sup>2,3)</sup>。

BNST の背外側領域(dlBNST)には、コルチコトロピン放出因子(CRF)の密な神経入力 が存在する。CRF はストレス応答おいて、単に内分泌系を調節するだけではなく、神経系に も影響を及ぼして情動や行動においてもノルアドレナリンとともに重要な役割を果たしてい ることが知られている。また、dlBNST 内 CRF 投与により、不安様行動が惹起されることや 摂食量が減少することが報告されている<sup>4)</sup>。

そこで、本研究では、不安様行動や摂食量抑制に関与する dlBNST 内 CRF 神経情報伝達が、 痛みによる不快情動生成に関与するか否か検討を行った。また、痛みによる不快情動生成に 関与する vBNST 内β受容体を介したノルアドレナリン神経情報伝達が、不安様行動や摂食量 抑制に関与するか否かを検討した。

#### I. 痛みによる不快情動生成における背外側分界条床核内 CRF の役割

#### 実験方法

#### 使用動物

雄性 Sprague-Dawley 系ラット (180 - 280 g、日本 SLC)を使用した。実験はすべて北海道大 学動物実験委員会の審査を受け、承認を受けたうえで実施した。

#### 使用薬物

α-helical CRF (非選択的 CRF 受容体アンタゴニスト)、NBI27914 (選択的 CRF1 受容体アン タゴニスト)、antisauvagine-30 (選択的 CRF2 受容体アンタゴニスト)、CRF。

#### ガイドカニューレ埋込手術および dlBNST 内薬物投与

ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) 麻酔下、dlBNST 内薬物投与用 25G ガイドカニ ューレを両側に挿入し、歯科用セメントにて固定した。ガイドカニューレ挿入位置は dlBNST の 1.5 mm 上方 (bregma より AP; -0.3 mm, L; ±1.6 mm, DV; -5.0 mm) とした。ラットは手術 後 5 日目以降に実験に使用した。dlBNST 内薬物投与は、侵害刺激を与える 10 分前に 33G イ ンジェクションカニューレをガイドカニューレに刺入し、マイクロインジェクションポンプ を用いて、頭蓋表面から深さ 6.5 mm の位置に 0.5 µl の容量を流速 0.5 µl/min で投与した。実 験終了後、投与部位の確認を行い、両側 dlBNST 内への薬物投与が確認された個体のみデー 夕解析に用いた。

#### in vivo マイクロダイアリシス法および透析液中 CRF 定量

ペントバルビタールナトリウム(50 mg/kg)麻酔下、マイクロダイアリシス用ガイドカニ ューレをその先端が dlBNST の 1.0 mm 上方に留まるように固定した。術後 1~2 日後、マイ クロダイアリシス用透析プローブを挿入し、0.15%BSA 含有リンゲル液を流速 1.0 µl/min で灌 流した。なお、灌流路にはフリームービングチューブおよび可動式アームに装着したシーベ ルを用い、実験中、ラットが自由にチャンバー内を行動できる状態で行った。透析液は 15 分 毎に回収し、透析液中 CRF 含量を enzyme immunoassay kit (Phoenix Pharmaceuticals Inc.)を用 いて定量した。実験終了後、マイクロダイアリシス用透析プローブ刺入部位を確認し、dlBNST 内への刺入が確認された個体のみデータ解析に用いた。

#### 条件付け場所嫌悪性試験(CPA test)

痛みにより惹起される不快情動は、CPA test により評価した。CPA test には、大きさの等し い 2 つのボックス (一方が白く床面に凹凸のあるボックス、もう一方が黒く床面が滑らかな ボックス) からなるシャトルボックスを使用した。侵害刺激により条件付けを行う CPA test は、4 日間の実験プロトコールで行った (Fig.1A)。1 日目 (habituation session) および 2 日目 (preconditioning session) は、ラットを 15 分間 (900 秒間) 装置内で自由に行動させ、各ボ ックスにおける滞在時間を計測し、2 日目により長く滞在したボックスを pain-paired compartment とした。3 日目 (conditioning session) は、ボックス間の移動が出来ない状態にし、 まず control 刺激として saline 100 μl を左後肢足底内 (i.pl.) 投与し、直ちに pain-paired compartment と反対側のボックスに 60 分間閉じ込めた。約 4 時間後、vehicle あるいは薬物を dlBNST 内投与し、dlBNST 内投与の 10 分後に、侵害刺激として 2% ホルマリン 100 μl を右 後肢足底内投与し、直ちに pain-paired compartment に 60 分間閉じ込めた。4 日目(test session) は再びラットを 15 分間装置内で自由に行動させ、各ボックスにおける滞在時間を計測した。 2 日目の pain-paired compartment 滞在時間から 4 日目の pain-paired compartment 滞在時間を引 いた値を CPA score と定義し、この値が正に大きいほど痛みによる不快情動が強く惹起された ものとして評価した。



Fig.1 条件付け場所嫌悪性試験(CPA test)

A:侵害刺激による条件付け.B:dlBNST 内薬物投与による条件付け.

侵害刺激の代わりに、dlBNST 内薬物投与により条件付けを行う CPA test は、6 日間の実験 プロトコールで行った (Fig. 1B)。1,2 日目は同様であるが、test session を6 日目とし、3 日 目から5 日目を conditioning session とした。2 日目により長く滞在したボックスを drug-paired compartment とした。Conditioning session では、ラットを group 1 と 2 の 2 つのグループに分 けた。午前のセッションでは、group 1 のラットには dlBNST 内薬物投与を行い投与直後から 30 分間 drug-paired compartment に閉じ込めた。一方、group 2 のラットには何も処置を施さず に 30 分間 drug-paired compartment とは反対側のボックスに閉じ込めた。4 時間後、午後のセ ッションでは、group 1 のラットには dlBNST 内薬物投与を行い 30 分間 drug-paired 30 分間閉じ込め、group 2 のラットには dlBNST 内薬物投与を行い 30 分間 drug-paired

#### ホルマリンテスト

アクリル製の透明な観察筒(直径 30 cm、高さ 30 cm)にラットを入れ、30 分以上環境に馴 化させた後、2% ホルマリン 100  $\mu$ l を右後肢足底内に投与し、速やかに観察筒に戻した。ラ ットが lifting、licking、biting、shaking を行った秒数を5分毎(300秒毎)に 60 分間計測し、 以下の式により、Nociceptive score を算出した。

Nociceptive score = {[time (sec) spent with lifting]  $\times$  1 + [time (sec) spent with licking, biting or shaking]  $\times$  2} / 300 (sec)

#### 結果

#### 侵害刺激が dIBNST 内 CRF 遊離に及ぼす影響

ホルマリン後肢足底内投与が dlBNST 内 CRF 遊離に及ぼす影響について in vivo マイクロダ イアリシス法により検討した。その結果、ホルマリン後肢足底内投与により、投与後 15〜30 分をピークとする CRF 遊離量の増加が認められた(Fig.2)。



Fig.2 ホルマリン後肢足底内投与による dlBNST 内 CRF 遊離量の変化 \*\*P < 0.01 vs. pre-formalin injection (Bonferroni's *post hoc* test), n = 7

#### 侵害刺激による不快情動生成に対する dlBNST 内 CRF 受容体アンタゴニスト投与の効果

痛みによる不快情動生成に dlBNST 内 CRF 神経情報伝達の亢進が関与しているか否かを明 らかにするために、ホルマリン後肢足底内投与により惹起される CPA に対する dlBNST 内 α-helical CRF (非選択的 CRF 受容体アンタゴニスト)、NBI27914 (選択的 CRF1 受容体アン タゴニスト)および antisauvagine-30 (選択的 CRF2 受容体アンタゴニスト) 投与の効果につ いて検討した。その結果、ホルマリン後肢足底内投与により惹起される CPA は、dlBNST 内 へのいずれの薬物の投与によっても、用量依存的に抑制された (Fig.3A-C, left panel)。

一方、痛みの感覚的側面に dlBNST 内 CRF 神経情報伝達が関与しているか否かを明らかに するために、ホルマリン後肢足底内投与により惹起される侵害受容行動に対する各アンタゴ ニストの dlBNST 内投与の効果について検討したが、いずれの薬物も侵害受容行動には影響 を及ぼさなかった(Fig.3A-C, right panel)。





\*P < 0.05 vs. vehicle (Newman-Kuels *post hoc* test), n = 5-11

#### dIBNST内 CRF 投与による CPA の惹起に関する検討

侵害刺激により惹起される CPA が、dlBNST 内 CRF 受容体アンタゴニスト投与により抑制 されたことから、侵害刺激の代わりに dlBNST 内 CRF 投与により、直接的に CRF 受容体を活 性化させることで、CPA が惹起されるか否かを検討した。その結果、dlBNST 内 CRF 投与に より用量依存的に CPA が惹起された(Fig.4)。



Fig.4 dlBNST内CRF 投与によるCPAの惹起 \*P < 0.05 vs. vehicle (Newman-Kuels *post hoc* test), n = 10-11

#### 考察

本研究結果から、侵害刺激によりdlBNSTにおいて遊離が亢進されたCRFが、CRF1受容体お よびCRF2受容体を介して痛みによる不快情動生成に重要な役割を果たしていることが示唆 された。一方、dlBNST内CRF神経情報伝達は、痛みの感覚的側面には関与していないことが 示された。dlBNST内CRF神経伝達亢進が、摂食量を抑制することが報告されている<sup>4)</sup>ことか ら、痛みによるdlBNST内CRF神経情報伝達亢進は、痛みによる不快情動生成と食欲低下の両 方に関与していることが考えられる。

#### Ⅱ. 腹側分界条床核内ノルアドレナリン神経伝達による摂食および不安様行動の調節

#### 実験方法

#### 使用動物

雄性 Sprague-Dawley 系ラット (180 - 260 g、日本 SLC)を使用した。実験はすべて北海道大 学動物実験委員会の審査を受け、承認を受けたうえで実施した。

#### 使用薬物

Isoproterenol (β受容体アゴニスト)、timolol (β受容体アンタゴニスト)

#### ガイドカニューレ埋込手術およびvBNST内薬物投与

上述のdlBNST内薬物投与と同様の手技で行った。ただし、ガイドカニューレ挿入位置は vBNSTの1.5 mm上方(bregmaよりAP; -0.3 mm, L; ±1.6 mm, DV; -6.0 mm)とし、薬物は頭蓋 表面から深さ7.5 mmの位置に投与した。

#### 摂食量測定

24時間の平均摂食量を測定した後、20時間絶食させ、vBNST内薬物投与を行い、その5分後 にエサを投入し、エサ投入から30分間の摂食量を測定した。

#### 高架式十字迷路試験(EPM test)

不安様行動は、EPM testにより評価した。評価時の照明強度は、中央のプラットフォームに おいて20 luxの明るさになるように設定した。vBNST内薬物投与を行った5分後に、ラットの 頭をオープンアーム方向に向けてプラットフォーム上に乗せ、各アームへの進入回数および 滞在時間を10分間測定した。測定は画像解析による自動測定装置(LimeLight2, Actimetrics Inc.)を用いて行った。

#### ロータロッド試験

vBNST内β受容体アゴニスト投与が協調運動機能に及ぼす影響について、ロータロッド試験を用いて評価を行った。ロッドの回転速度を等加速度的に上昇(4~40 rpm)させ、ラット がロッドから落ちるまでの時間を計測した。計測は3日間行い、3日目の試験開始5分前に vBNST内薬物投与を行った。

#### 結果

#### 摂食量に対するvBNST内β受容体アゴニスト投与の効果

vBNST内β受容体を介したノルアドレナリン神経情報伝達が摂食量調節に関与しているか 否かを検討するために、vBNST内isoproterenol投与によるvBNST内β受容体刺激が、摂食量に 及ぼす影響について検討した。その結果、vBNST内isoproterenol投与により、用量依存的に摂 食量が低下した(Fig.5A)。また、isoproterenol投与による摂食量の低下は、β受容体拮抗薬timolol 同時投与により有意に抑制された(Fig.5B)。

#### 不安様行動に対するvBNST内β受容体アゴニスト投与の効果

vBNST内isoproterenol投与によるvBNST内β受容体刺激が、不安様行動に及ぼす影響につい てEPM testにより検討した。その結果、vBNST内isoproterenol投与により、用量依存的にオー プンアーム滞在時間が減少した(Fig.6A)。また、isoproterenol投与によるオープンアーム滞在 時間の減少は、timolol同時投与により有意に抑制された(Fig.6B)。



Fig.5 vBNST内 isoproterenol 投与が摂食量に及ぼす影響 A: \*\*\*P < 0.001 vs. vehicle (Newman-Kuels *post hoc* test), n = 5-8. B: \*\*P < 0.01 vs. vehicle; <sup>#</sup>P < 0.05 isoproterenol (Newman-Keuls post hoc test), n = 5-8.



Fig.6 vBNST内 isoproterenol 投与が不安様行動に及ぼす影響 A: \*P < 0.05 vs. vehicle (Newman-Kuels *post hoc* test), n = 9-12. B: \*P < 0.05 vs. vehicle; <sup>#</sup>P < 0.05 isoproterenol (Newman-Keuls post hoc test), n = 10-11.

#### 協調運動機能に対するvBNST内β受容体アゴニスト投与の効果

vBNST内isoproterenol投与によるvBNST内β受容体刺激が、協調運動機能に及ぼす影響についてロータロッド試験により検討した。その結果、vBNST内isoproterenol投与は、協調運動機能には有意な影響を及ぼさなかった。

#### 考察

本研究結果から、vBNST内β受容体を介したノルアドレナリン神経情報伝達の亢進により、 摂食量が低下し、不安が惹起されることが示唆された。我々はこれまでに、侵害刺激により vBNST内でノルアドレナリン遊離量が増加し、そのノルアドレナリンがvBNST内β受容体を介 して痛みに対する嫌悪反応に関与していることを明らかにしている<sup>2,3)</sup>。それらの研究結果 を併せて考えると、痛みによりvBNST内で遊離が亢進されたノルアドレナリンはβ受容体を介 して、痛みによる嫌悪および不安情動の生成に関与するだけでなく、痛みによる食欲抑制に も寄与している可能性が考えられる。

#### 総括

本研究結果およびこれまでに報告されている知見より、痛みによりdlBNSTおよびvBNSTにおいてCRFおよびノルアドレナリン遊離が亢進し、それら神経情報伝達の亢進は、痛みによる不快情動生成に関与するだけでなく、食欲抑制にも関与している可能性が示された。

#### 文献

#### 1. Deyama et al., Behav Brain Res 176:367-371 (2007)

2. Deyama et al., J Neurosci 28:7728-7736 (2008)

3. Deyama et al., Behav Brain Res 197:279-283 (2009)

4. Ciccocioppo, R et al., J Neurosci 23:9445-9451 (2003)

# 乳癌個別化治療実現を目指した遺伝子発現プロファイル解析および 細胞周期プロファイル解析に基づく予後および化学療法感受性診断法の開発

#### 大阪大学大学院医学系研究科乳腺内分泌外科

#### 野口眞三郎

#### はじめに

乳がんは嘗て日本では罹患率の低い癌であったが、生活習慣の欧米化に伴いその罹 患率は急増し現在では女性で最も罹患率の高いがんである。個々の乳がんの生物学的 特徴「個性」に基づいた的確な治療(tailored medicine)を実践するためには、従来 の画像診断や病理診断のみでは不十分であり、より精度の高い「個性」診断法の開発 が不可欠である。手術のみで治癒し得る患者に術後の再発予防のための化学療法(補 助化学療法)は不要であるが、現時点では手術のみで治癒し得るか否か、つまり、患 者が将来再発するか否か(患者の予後)を正確に診断する方法がないので、殆どの乳 がん患者が術後に補助化学療法を受けている。即ち、手術のみで治癒し得る患者に不 必要な化学療法が多数実施され、化学療法に起因する副作用が患者の QOL (quality of line)を著しく低下させていることになる。一方、進行した乳がんで手術のみでの治 癒が期待できない患者では当然術後の補助化学療法は必要であるが、現在、化学療法 の感受性を診断する方法(多数ある化学療法剤の中でどの薬剤が有効であるかを診断 する方法)がないので経験的に薬剤が選択され投与されている。即ち、効果があるか どうか分からずに薬剤投与が実施されているのが実情である。

このように現在の乳がん治療では、予後および化学療法感受性の的確な診断法がな いことのために、無駄で有害な(副作用のある)化学療法が頻繁に実施されている。 この問題を解決し個別化治療を実現するために、我々は、遺伝子発現プロファイル解 析および細胞周期プロファイル解析を応用した新しい乳がんの予後予測法および化学 療法効果予測法を開発しその臨床的有用性を検証すべく研究を行っている。

#### I. 遺伝子発現プロファイル解析

#### (1) 予後予測法の開発

個々の乳癌患者の再発リスクに基づいた適切な補助化学療法を施行するためには 高精度の予後予測法の開発が不可欠である。我々は、乳癌組織におけるヒト全遺伝子 の発現プロファイルを DNA マイクロアレイ (Affymetrix U133plus2.0)を用いて解析 し、その情報に基づいた予後予測法の開発を行った。まず、乳癌組織における遺伝子 発現に関して公開されている 6 つのデータベース(GSE2034, GSE2990, GSE4922, GSE6532, GSE7390, GSE9195)から再発と相関する遺伝子群を抽出し、95 個の遺伝子情 報に基づく予後予測システム(95-gene classifier (95-GC))を作成した(Learning set、 図 1A)。次に、当施設で術後補助療法として内分泌療法のみを受けたリンパ節転移陰 性かつエストロゲンン受容体(ER)陽性の乳癌症例(n=105例)を対象として、上記 の予後予測システムの有用性を検証した(Validation set、図 1B)。Learning set お よび Validation set の何れにおいても、本システム(95-GC)によって乳癌患者を予後 良好群(low risk)と不良群(high risk)に分類することが可能であった(図 1A, B)。 External validation(他施設のデータを用いた解析)においても 95-GC は予後良好 群(low risk)と不良群(high risk)の分類に有用であった(図 1C, D)。



図 1.95-Gene classifier による ER 陽性乳がんの予後予測

我々が開発した 95-GC の特長は、まず、全遺伝子の発現を解析できるマイクロアレ イを用いて、非常に多数例(n=534)の症例のデータに基づいて作成された初めての 予後予測法である点である。既に、小数例(n=105)ではあるが検証試験でも極めて 再現性の高い結果を得おり、既存の予後予測法(Oncotype DX(21 遺伝子)、MammaPrint (70 遺伝子))より高精度であると期待される。また、既存の予後予測法が非常に高 価(40 万円程度)であるのに対して、95-GC は 10 万円程度での臨床応用を目指して いる。高精度の予後予測法を開発することによって多数の補助化学療法を安全に省略 することが可能となり患者への恩恵のみならず医療費削減への貢献も極めて大きい と期待される。

#### (2)化学療法効果予測法

乳がん治療に於いては化学療法が汎用されるが、臨床上の最大の問題点は化学療法 の効果を予測する方法が存在しないことである。そのため、不必要な化学療法が頻繁 に実施されているのが現状である。本研究の目的は、乳がん治療において汎用されて いるパクリタキセル→アンスラサイクリン逐次療法を術前化学療法として実施する症 例を対象とし、かつ、病理学的完全寛解(がん細胞の消失、pathological complete response(pCR))を指標として遺伝子発現プロファイル解析に基づく化学療法効果予測 法を作成することである。

術前化学療法Paclitaxel (80mg/m2 q1w x 12 cycles) →FEC (5-FU 500mg/m2, epi rubicin 75mg/m2, cyclophosphamide 500mg/m2 q3w x 4 cycles) (以下、P→FEC療法) で治療を受けた乳がん症例(n=84例)において、化学療法前に採取した腫瘍サンプルか らRNAを抽出し、マイクロアレイ (Affymetrix U133plus2.0)を用いて遺伝子発現プロ ファイルを解析した。全例において手術標本を用いて化学療法の効果を病理学的に判 定した。病理学的ながん細胞の消失 (pCR)を本研究のエンドポイントとした。

対象:浸潤性乳癌(stage II, III)





図2. 術前化学療法施行症例を対象とした化学療法効果予測法開発のプロトコール

上記の 84 例を Learning set (n=50) と Validation set (n=34) に分け、まず、Learning set を用いて化学療法の効果予測法(70-gene classifier(70-GC))を作成した。次に、

その効果予測システムの有用性を Validation set (n=34) で検証した。70-GC の learning set における陰性的中率は 95.8%、陽性的中率は 53.8%、validation set に おける陰性的中率は 92.8%、陽性的中率は 50.0%と特に効果無効群を高精度に予測する ことができた (図 2)。



図 2.70-gene classifier による化学療法の効果予測

遺伝子発現プロファイル解析による化学療法効果予測法の開発においては、(a)質 の高い腫瘍組織を採取すること、(b)高精度の DNA マイクロアレイ解析を実施するこ と、および、(c)詳細な病理学的効果判定を実施することであるが不可欠であるが、 我々の研究グループはこれらすべての面において高い技術力を有している。特に、針 生検(マンモトーム)サンプルを用いた遺伝子発現プロファイル解析による化学療法 の効果予測法の開発に関しては世界的にも我々のグループが最も進んでいる。化学療 法効果予測法が開発されれば効果が適切な薬剤選択が可能となり、化学療法の治療成 績は格段に向上すると期待される。

エストロゲン受容体(ER)は乳がん診療でルーチンに測定されているがその目的は ホルモン療法に対する効果予測である。ER の陽性的中率は約50%、陰性的中率は約 90%であり、今回我々が作成した化学療法の効果予測法はほぼ同等の精度を有してい ることが明らかとなった。このことは、本法(70-GC)が臨床的に意義のある診断精度 を有していることを示している。従って、今後臨床の場において 70-GC が適切な化学 療法剤選択に貢献することが期待される。

#### Ⅱ. 細胞増殖プロファイル解析

#### (1) 予後予測法

乳がんに限らず増殖速度の早いがんの予後が一般に不良であることは昔から良く知 られている。従来の細胞増殖診断法(BrdUの取り込み、Ki-67免疫染色、DNA flow cytometry 等)の問題点は、手技が煩雑で標準化が困難な点であり、そのことがこれ らの検査法の普及を妨げてきた。我々は、標準化可能でかつ従来法よりもより精度の 高い細胞増殖速度の診断法として細胞周期プロファイル解析法(種々の細胞周期関連 タンパク(CDKs、CDK inhibitors、Cyclins)の発現と活性を同時に測定し得るシステ ム)を確立した(図 3)。



図 3. 細胞周期プロファイル解析で測定する細胞周期関連因子

乳がんの予後因子として、近年、種々の cyclin (B, D1, E等)が注目されている。 Cyclin が細胞周期を制御するには、CDK と複合体を形成しそれを活性化する必要があ る。また、CDK の活性は cyclin 以外にも種々の因子 (CDK inhibitor 等)によって調 節されている。従って、cyclin の発現量よりも CDK の活性の状態を知ることが細胞の 増殖動態を把握するためにはより重要であると考えられる。そこで、我々は微量のサ ンプルから種々の cyclin および CDK inhibitor のタンパク発現のみならず CDK (CDK1, 2, 4, 6)のタンパク発現と活性を同時に測定し得るシステムを開発した。このシステ ムを用いて ER 陽性かつリンパ節転移陰性で、更に、術後補助ホルモン療法のみを施行 した乳がん症例 (以下、ER 陽性・n0 乳がん症例)における予後予測法の開発を行った。

まず、ER 陽性・n0 乳がん症例を対象に細胞周期プロファイル解析(cyclin A, B, D, E, p16, p21, p27 の蛋白発現量、および、CDK1, 2, 4, 6 の特異活性の同時測定)を 実施し再発リスクとの相関を詳細に検討した結果、CDK1 と CDK2 の特異活性が再発リ スクと強く相関すること、また、CDK1 と CDK2 の特異活性値を用いて再発リスクを RS (risk score) として数値化できることを見出した。そこで、次に、新規に集積した ER 陽性・n0 乳がん症例 (n=266) を対象として先行研究で決定した RS に再発リスク分 類 (high risk, intermediate risk, low risk) の妥当性を検証した。その結果、low risk 群は、high risk 群に比して有意に予後が良好であった。また、low risk 群は、 intermediate risk 群 + high risk 群に比しても有意に予後が良好であった。更に、 RS は、既存の病理学的因子とは独立した予後因子であることが判明した。

(2)化学療法効果予測法

細胞増殖の速いがんは一般に化学療法に対する感受性が高いことが知られている。 そこで、細胞周期プロファイル解析で細胞増殖動態を的確に把握することは化学療法 に対する効果予測にも有用ではないかと考え、乳がんに対する術前化学療法の系を用 いてこの問題を検討した。術前化学療法の治療プロトコールはI-(2)と同様である。化 学療法実施前にマンモトームで腫瘍組織を採取してCDK1とCDK2の特異活性を測定しRS を算出し化学療法の効果との相関を検討した。

図4に示す如く、Low-risk 群は、Intermediate-risk 群 + High-risk 群に比して有 意に化学療法の効果が不良であった(pCR 率が有意に低値であった)。以上の結果は、 細胞周期プロファイリングが化学療法の効果予測に有用であることを示唆している。 即ち、High-risk 群は、乳がんの再発リスクは高いが化学療法に対する感受性が高い ので術後に補助化学療法を実施することによって予後の改善が期待されることが示唆 された。



図 4. 細胞周期プロファイル解析による乳がんの化学療法効果予測. Low, low-risk 群; Inter. & High-risk, intermediate-risk plus high-risk 群; PCR, pathological complete response.

#### まとめ

我々は、DNA マイクロアレイを用いた乳がんの予後予測法(95-GC)、および、化学 療法の効果予測法(70-GC)を作成した。これらの予測法は、既存の診断法では予知し 得ない再発リスク、あるいは、化学療法感受性を診断し得る臨床的には極めて意義の 高い診断法であると期待される。また、細胞周期プロファイル解析も ER 陽性・n0 乳 がん症例の予後予測、更には、化学療法感受性の予測にも有用であることが我々の研 究によって明らかにされた。今後、これらの新しい分子診断法が臨床応用され乳がん の個別化治療が推進されることを切に願う。

#### 業績

- Kim SJ, Nakayama S, Shimazu K et al. Recurrence risk score based on the specific activity of CDK1 and CDK2 predicts response to neoadjuvant paclitaxel followed by 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide in breast cancers. Ann Oncol 23(4):891-7, 2012
- Yamamoto N, Nakayama T, Kajita M et al. Detection of aberrant promoter methylation of GSTP1, RASSF1A, and RARbeta2 in serum DNA of patients with breast cancer by a newly established one-step methylation-specific PCR assay. Breast Cancer Res Treat 132: 165-173, 2012.
- 3. Naoi Y, Tanei T, Kishi K et al. 70-Gene classifier for differentiation between paclitaxel- and docetaxel-sensitive breast cancers. Cancer Lett 314: 206-212, 2012.
- 4. Yasojima H, Shimomura A, Naoi Y et al. Association between c-myc amplification and pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. Eur J Cancer 47: 1779-1788, 2011.
- 5. Tanei T, Shimomura A, Shimazu K et al. Prognostic significance of Ki67 index after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. Eur J Surg Oncol 37: 155-161, 2011.
- Oshima K, Naoi Y, Kishi K et al. Gene expression signature of TP53 but not its mutation status predicts response to sequential paclitaxel and 5-FU/epirubicin/cyclophosphamide in human breast cancer. Cancer Lett 307: 149-157, 2011.
- Naoi Y, Kishi K, Tanei T et al. Prediction of pathologic complete response to sequential paclitaxel and 5-fluorouracil/epirubicin/cyclophosphamide therapy using a 70-gene classifier for breast cancers. Cancer 117: 3682-3690, 2011.
- Naoi Y, Kishi K, Tanei T et al. High genomic grade index associated with poor prognosis for lymph node-negative and estrogen receptor-positive breast cancers and with good response to chemotherapy. Cancer 117: 472-479, 2011.
- Naoi Y, Kishi K, Tanei T et al. Development of 95-gene classifier as a powerful predictor of recurrences in node-negative and ER-positive breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat 128: 633-641, 2011.

- Miyake T, Shimazu K, Ohashi H et al. Indication for sentinel lymph node biopsy for breast cancer when core biopsy shows ductal carcinoma in situ. Am J Surg 202: 59-65, 2011.
- Kurebayashi J, Kanomata N, Kozuka Y et al. The cell cycle profile test is a prognostic indicator for breast cancer patients treated with postoperative 5-fluorouracil-based chemotherapy. Jpn J Clin Oncol 41: 739-746, 2011.
- 12. Miyoshi Y, Kurosumi M, Kurebayashi J et al. Predictive factors for anthracycline-based chemotherapy for human breast cancer. Breast Cancer 17: 103-109, 2010.
- van Nes JG, Smit VT, Putter H et al. Validation study of the prognostic value of cyclin-dependent kinase (CDK)-based risk in Caucasian breast cancer patients. Br J Cancer 100: 494-500, 2009.
- 14. Tanei T, Morimoto K, Shimazu K et al. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. Clin Cancer Res 15: 4234-4241, 2009.
- Nakayama S, Torikoshi Y, Takahashi T et al. Prediction of paclitaxel sensitivity by CDK1 and CDK2 activity in human breast cancer cells. Breast Cancer Res 2009; 11: R12.
- 16. Kim SJ, Taguchi T, Shimazu K et al. Good Response to Paclitaxel Predicts High Rates of Pathologic Complete Response for Breast Cancer Patients Treated Preoperatively with Paclitaxel Followed by 5-Fluorouracil, Epirubicin and Cyclophosphamide. Oncology 77: 134-139, 2009
- Miyoshi Y, Kurosumi M, Kurebayashi J et al. Topoisomerase Ilalpha-positive and BRCA1-negative phenotype: association with favorable response to epirubicin-based regimens for human breast cancers. Cancer Lett 264: 44-53, 2008.
- Kim SJ, Nakayama S, Miyoshi Y et al. Determination of the specific activity of CDK1 and CDK2 as a novel prognostic indicator for early breast cancer. Ann Oncol 19: 68-72, 2008.

# 新規ペプチドライゲーション法の開発と

## それを用いる部位特異的修飾蛋白質の合成

#### 大阪大学蛋白質研究所 川上 徹

#### 1. はじめに

生命現象を解き明かすためには蛋白質の研究は欠かすことができない.遺伝子がコードす る蛋白質の総数,その発現のタイミングや相互作用,また疾患との関連が徐々に明らかにさ れてきている.これにともない,個々の分子あるいはその複合体の機能や構造のより詳細な 解析,特に蛋白質の構造上の修飾による構造変化や機能との相関性の解明は重要な課題とな っている.分子化学的に詳細に解析するためには十分量の部位特異的に修飾された蛋白質を 調製する必要があるが,生化学手的手法ではこの修飾が困難であるため,効率よく高純度に 調製する化学合成が強く望まれている.

ペプチドは固相合成法により迅速に合成できるようになり、50残基程度までのペプチドは ほぼ合成できる.より長鎖のペプチド,蛋白質の化学合成は,30~50 残基程度のペプチドを 合成ブロックとして、ペプチドフラグメント同士の縮合、いわゆるライゲーションを繰り返 すことにより進められる [1]. 代表的なライゲーション法としてチオエステル法と Native Chemical Ligation (NCL) 法がある (図1). チオエステル法は 1991 年に北條, 相本が報告し た(図1A)[2]. ペプチドチオエステル1を合成ブロックとして用い、チオエステルを銀塩 により選択的に活性化し、他方のペプチド合成ブロック2のアミノ基と反応させ、長鎖ペプ チド3を得る.アミノ基とチオール基には保護基を必要とするが、任意のアミノ酸残基で縮 合できる利点がある. 1994 年には Kent らが NCL 法を報告した(図1B) [3]. チオエステル とN末端にCys残基を有するCysペプチド5のチオール基との間で分子間チオエステル交換 が起こり、チオエステル(S-ペプチド)中間体 6 が生成する. チオエステルの近傍にあるア ミノ基への分子内 S-N アシル基転位反応によりアミド(ペプチド)結合が形成され,長鎖ペ プチド7が得られる.このNCL法では必ず Cys 残基が必要であるが,N末端 Cys 残基と選択 的に反応することから、保護基を必要とせず、また、中性水溶液中で反応を行うことができ る.また,ここでは詳細は示さないが,Cys 残基の代わりに N 末端アミノ基に導入したチオ ール補助基を用いる拡張型ケミカルライゲーション法も開発されている[4]. 例えば,我々は 4,5-ジメトキシ-2-メルカプトベンジル (Dmmb) 基などを報告している [4c].

これらのライゲーション法はペプチドチオエステルを合成ブロックとして用いることで飛 躍的に進展した.しかし,最近再びペプチドチオエステルの合成が課題となっている.ペプ チドチオエステルは一般的には,アミノ酸のα-アミノ基の保護基に Boc 基を用いる固相合成 によって合成される [2].近年,糖鎖やリン酸基などによる翻訳後修飾を受けた蛋白質が注目 され,その合成が求められているが,強酸処理を要する Boc 法はその合成に適していない [5]. 一方で,装置や反応操作が簡便であること,また修飾ペプチドの合成に適していることなど から,Fmoc 法によるペプチド合成が主流となっている.しかし,チオエステルは Fmoc 基を 除去する際に,一般的に用いられるピペリジンで分解するため,直接合成することができな かった [6].そのため現在,多くのグループが Fmoc 法によるペプチドチオエステル合成法の 開発に取り組んでいる [7].我々はチオール含有ペプチドにおけるアミドからチオエステルへ の分子内 *N-S* アシル基転位反応に着目し,新規ペプチドチオエステル合成法の開発に取組ん できた [8].ここではその詳細と修飾蛋白質合成への応用について報告する.

(A) Thioester Method



(B) Native Chemical Ligation



図1. ライゲーション法. (A) チオエステル法 [2]. (B) Native chemical ligation 法 [3].

#### 2. N-Sアシル基転位反応を利用する新規ペプチドライゲーション法の開発

#### 2-1. Dmmb 基における N-S アシル基転位反応

当初,4,5-ジメトキシ-2-メルカプトベンジル (Dmmb) 基はライゲーション補助基として開発した [4c]. 主鎖アミドに結合した Dmmb 基はトリフルオロメタンスルホン酸 (TFMSA) のような強酸で処理すると除去することができる (図 2). しかし,トリフルオロ酢酸 (TFA) で処理すると,RP-HPLC 上で9よりも早く溶出され,質量は9と同じペプチドX の生成を観測した [9]. この化合物 X を中性の緩衝液中におくと元のペプチド9 が再生する. この現象は以下のように説明できる [10]. ペプチド9 は TFMSA のような強酸で処理すると Dmmb 基は脱離するが,TFA のようなやや弱い酸の条件ではアミド9 からチオエステル 11 へとライゲーション時とは逆反応の分子内 *N-S* アシル基転位反応が起こる. *S*-ペプチド 11 は化合物 X に相当し,チオール基の代わりにアミノ基が遊離しているために,RP-HPLC ではアミド9よりも早く溶出され,質量は同じである. この *S*-ペプチド 11 を中性緩衝液中におくと,チオエステルからアミドへ分子内 *S-N* アシル基転位反応が進行し,アミド9が再生される.



図2. Dmmb 基を用いるペプチドチオエステル合成

Dmmb 基を有するペプチドの分子内 *N-S* アシル基転位反応を利用するチオエステルの調製 を試みた. 逆反応を防ぐため, 過剰のチオール化合物を反応させれば, ペプチドチオエステ ル 12 を調製できる(図2) [11]. Fmoc-Leu-D,L-[Dmmb(Trt)]Ala-Phe-NHCH<sub>2</sub>-ChemMatrix 樹脂 (8a)から Fmoc 固相合成法によりペプチド鎖を伸長し, BPTI(1-29)の保護ペプチド樹脂とし, TFA 溶液で処理して保護基を除去し,次いで,0.25 M 塩酸 (50% CH<sub>3</sub>CN 水溶液)中,35 ℃, 3 時間反応させて S-ペプチドとし, HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na とリン酸緩衝液 (pH 7.0,50% CH<sub>3</sub>CN)中 で反応させてチオエステルとして,樹脂から切り出した.HPLC で精製して,出発樹脂 8a中 の Fmoc 基を基準として,15% 収率でチオエステル 12a を得た (表 1).チオエステル部位の Leu 残基のラセミ化は検出されなかった.なお,本法でのチオエステル部位アミノ酸残基の ラセミ化は,モデルペプチド,Fmoc-Ile-Arg-*Xaa*-SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H の調製で調べたところ,*Xaa* が Ala, Leu, Phe, Ser では 1%以下程度であり,十分に実用的な方法である.いくつかの特徴を 有するペプチドチオエステルの合成結果を表 1 に示す.

表 1. Dmmb 基を用いるペフチドチオエステル	台瓦	火
---------------------------	----	---

entry	sequen	ce <sup>a)</sup>						yield/% <sup>b)</sup>
1	RPDFC	LEPPY T	GPCKARIIR YFYNAKAGL	SR ( <b>12</b>	a)			15
2	GPTYQ	GPWSS	NSDPA- <i>SR</i> ( <b>12b</b> )					34
3	AGGGG	SSDGS	GRAAGRRASR SSGRAR	RGRH E	PGLGG	PAER (	G-SR ( <b>12</b> 0	;) 12
4	ARTKQ	TARKS(P	O <sub>3</sub> H <sub>2</sub> ) TG- <i>SR</i> ( <b>12d</b> )					31
5	ARTKQ	TARK(Me	$_{3}$ )S TGGKAPRKQL ATKA	ARKSA	P ATG-S	R ( <b>12e</b> )		19
a)	-SR	=	-SCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> H,	b)	出	発	樹	脂,
_							> +	-

Fmoc-Xaa-D,L-[Dmmb(Trt)]Ala-Phe-NHCH<sub>2</sub>-ChemMatrix 樹脂 (8a) からの収率.

#### 2-2. Cys 残基における N-Sアシル基転位反応とCPE ライゲーション

ー方で、チオール基を含むアミノ酸として Cys がある. ペプチド鎖中の Cys 残基において も分子内 *N-S* アシル基転位反応が進行し、*S-*ペプチドが生成するであろうか? 1966 年に榊 原らは *S-*保護 Cys 含有ペプチドを無水フッ化水素で処理すると保護基が除去され、一部 *S-*ペ プチドが生成しているらしいと述べているが [12]、その詳細な情報はなかった. そこで、<sup>13</sup>C で標識したペプチド、Fmoc-Ile-Ala-Gly(1-<sup>13</sup>C)-Cys-Arg-NH<sub>2</sub> (14) の TFA 溶液中での挙動を <sup>13</sup>C NMR、RP-HPLC、および質量分析で観測した(図3)[10]. <sup>13</sup>C NMR では、TFA 溶液に 溶解直後には 172.5 と 172.7ppm にアミドカルボニル基に相当するシグナルが観測された. そ の後、新しいシグナルが 201.8ppm に現れ、これはチオエステル 15 に相当する. このシグナ ルは時間とともに増大し、およそ 1 月後には一定となり、アミドとチオエステルの比はおよ そ 1:4 であった. 一方、RP-HPLC では、*S-*ペプチド 15 に相当するピークが観測されたが、そ の割合は1月後でも1/5以下であり、<sup>13</sup>C NMR の結果と矛盾している. このことは、S-ペプチドは高濃度のTFA 溶液中では比較的安定で,検討した条件下ではおよそ8割がS-ペプチド15として存在して平衡が保たれているが、0.1% TFA 溶液では元のアミド14 へ速やかに変換されることを示している. では、このS-ペプチドをチオエステルとしてライゲーション反応に用いることは可能であろうか? TFA 濃度の高い条件下ではN-S アシル基転位反応で生じるアミノ基がプロトン化されることで、逆反応のS-N アシル基転位反応が抑制されていると考えられる. すなわち、このアミノ基を何らかの手段で不活性化できればチオエステルとして安定化し、ライゲーション反応へ用いることができると期待できる.



図3. Cys 残基を含むモデルペプチドにおけるアミドとチオエステルの平衡

1985年にZanotti らは Cys-Pro 活性エステル構造を含む化合物が分子内反応によりジケトピ ペラジン (DKP) チオエステルへ変換されることを報告している [13]. この構造をもとに Cys-Pro エステル (CPE) 構造をデザインした (図4) [14]. エステル部分には活性エステル構 造は用いることができないこと,および,固相法での合成を考慮して,グリコールアミドと した.この CPE 構造を C 末端に有するペプチド (CPE ペプチド) 16 は分子内での連続した *N-S* アシル基転位と DKP 形成によって DKP チオエステル 18 へと変換されると期待された.この 反応では *N-S* アシル基転位反応により生成するアミノ基を DKP 形成によりアミドとすること でチオエステルを安定化している.さらに,反応系中に Cys-ペプチド 5 を共存させればワン ポットで NCL 型のライゲーション反応が進行する.

モデルペプチドを用いてライゲーションを行った. CPE ペプチド, Fmoc-His-Pro-Ile-Arg-*Xaa*-Cys-Pro-OCH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub> (16a: *Xaa* = Gly) と Cys ペプチド, H-Cys-Asp-Ile-Leu-Leu-Gly-NH<sub>2</sub> (5a) をリン酸緩衝液中 (pH 7.3, 7.8, 8.3), 37 °C で反応させる と, ライゲーション生成物, Fmoc-His-Pro-Ile-Arg-*Xaa*-Cys-Asp-Ile-Leu-Leu-Gly-NH<sub>2</sub> (7a: *Xaa* = Gly) が 24 時間後にはそれぞれ 50, 63, 90% の収率で生成した. また, CPE ペプチド 16b-d (b: *Xaa* = Ala, c: *Xaa* = Val, d: *Xaa* = Ser) と 5a をそれぞれ pH 8.4 で 24 時間反応させた. いずれ も 70%以上の収率で 7b-d (b: *Xaa* = Ala, 72% (ラセミ化 1%), c: *Xaa* = Val, 74% (ラセミ化 2%), d: *Xaa* = Ser, 75% (ラセミ化 5%)) が生成した.また,縮合部位のアミノ酸残基のラセミ化は セリン残基で若干高かったが,他は 2% 以下であった.なお,ラセミ化はチオエステルへの 変換後に起こっていて,反応溶媒のpHを下げるとチオエステル化に反応時間は要するが,ラ セミ化を抑制することができる.



図4. CPE ライゲーション

#### 2-3. CPC ペプチドからのペプチドチオエステル生成

CPE ペプチドはエステル構造を含むデプシペプチドであり、特殊な発現系を用いることで 遺伝子工学的に調製することができる. 菅らは Flexyzyme と PURE システムを組み合わせた 無細胞系で CPE ペプチドを発現させ、環状ペプチドの調製に成功している [15]. 環状ペプチ ドライブラリー調製に非常に有用な方法である. 一方で、さらに我々は大腸菌などでの一般 的な蛋白質発現系で調製できるような、エステル構造を含まない自己活性化ユニットを探索 した. その結果、1 つの候補として C 末端に Cys-Pro-Cys 配列を有する CPC ペプチド 19 を見 出した [16]. 図5に示す反応機構によってチオエステルへ変換されると考えられる. すなわ ち、Pro 残基の両側の Cys 残基において、N-S アシル基転位反応が起こる. 順序はどちらでも 構わないが、仮に C 末端側でアシル基転位が起こると 20b の構造となり、これは Cys-Pro チ オエステルの構造となる. 次いで他方の残基で転位反応が起こったのち、DKP 形成により、 DKP チオエステル 18 が生成する.

*N-S*アシル基転位反応および DKP 形成は酸により促進されることが知られている. モデル ペプチド, H-Ala-Lys-Leu-Arg-Phe-Gly-Cys-Pro-Cys-NH<sub>2</sub> (**19a**) を 0.1 M 塩酸中, 110 °C で 2 時 間反応させ, RP-HPLC および質量分析により分析した. DKP チオエステル **18a** (peptide A: Ala-Lys-Leu-Arg-Phe-Gly) が生成し, 12% 収率で得られた. また同時に, チオエステルの加 水分解物に相当するペプチドが生成し, 原料 **19a** とその C 末端アミドの加水分解物 **19a'** が 4

24

割程度残っていた. 含水の塩酸中での反応では加水分解が認められたため, ヘプタフルオロ 酪酸 (HFBA) の蒸気中, 110 °C で 4 時間, CPC ペプチド 19a を反応させた. この条件では CPC ペプチドはほぼ消失し, 加水分解も抑えることができた. 目的の DKP チオエステル 18a と同じ質量を示す 18a' が生成し, これは DKP 部分でのエピ化したものであった. この粗生 成物を中性緩衝液中で H-Cys-Tyr-NH<sub>2</sub> (5b) と反応させると, 1 種類のライゲーション生成物 H-Ala-Lys-Leu-Arg-Phe-Gly-Cys-Tyr-NH<sub>2</sub> (7b) が得られた. なお, DKP チオエステル 18a, 18a' の単離収率はそれぞれ 9, 12%, ライゲーション生成物 7b は CPC ペプチド 19 a を基準とし て 17% であった.



図5. CPC ペプチドから DKP チオエステルの生成

以上の条件では、DKP チオエステルは生成するが、酸条件下で加熱しているためにペプチ ド自身の分解やエピ化が進行する.しかし、CPC ペプチドには特殊な非天然型の構造を含ま ず、Cys-Pro-Cys 配列を含む蛋白質は大腸菌などを用いる一般的な蛋白質発現法で調製できる. 天然型アミノ酸のみからなる配列からチオエステルへ変換できることを示すことができたこ とは、組換え蛋白質からのチオエステル調製法の展開に向けての大きな一歩である.

#### 3. 新規ライゲーション法を用いる部位特異的修飾ヒストン蛋白質の全合成

蛋白質の機能調節の1つの重要な手段として、リン酸化やメチル化などによる翻訳後修飾 がある. ヒストン蛋白質は DNA とともにヌクレオソームを構成するコアとなる蛋白質である. そのコアはそれぞれ 100 残基程度からなるヒストン H2A, H2B, H3, H4 の4 種類の蛋白質 がそれぞれ2つずつからなる8量体で形成される.これはメチル化,リン酸化,アセチル化, ユビキチン化など種々の化学修飾を受けることが知られている.この修飾はN末端領域のヒ ストンテールに多く,非常に複雑なパターンを示し,遺伝子の制御機構の一つとして重要な 役割を担っている [17].しかし,修飾の部位および種類とその機能との関連について明確に は理解されていない.これは部位特異的に確実に修飾されたヒストンを生化学的に調製する ことが非常に困難であることに起因する.そこで,確実に修飾を導入することができる化学 合成による修飾ヒストンの全合成を試みた.我々が開発したライゲーション法を駆使してそ の合成法の確立を目指す.部位特異的に様々なパターンで修飾された一連の修飾ヒストンを 調製できれば,詳細な遺伝子制御機構の解明に多大に貢献できる.



図 6. ヒストン H3K9me3 の合成スキーム

トリメチル Lys9 を含む H3 (H3K9me3) の合成スキームを図6に示す. 135 残基の蛋白質 を3つのセグメントに分け,それぞれ CPE ライゲーション,チオエステル法により縮合した

(未発表).現在反応条件を最適するとともに,組換え蛋白質を合成ブロックとして利用する 修飾ヒストンH3,H4の合成条件を検討している.

#### 4. おわりに

蛋白質の化学合成はペプチドチオエステルを合成ブロックとして導入することで爆発的に 発展してきた.しかし,多様な蛋白質の合成が求められるようになり,ペプチドチオエステ ルの簡便かつ効率的な調製法が望まれている.この中で我々は,N-Sアシル基転位反応に着 目してペプチドチオエステルの調製法を開発してきた [8]. N-Sアシル基転位反応は蛋白質の 組継ぎ反応であるプロテインスプライシングにおける鍵反応であり,組換え蛋白質のチオエ ステル調製にも利用されている [18].これは 100 アミノ酸残基数を超えるインテインの酵素 様の作用によって触媒される.我々は化学的にN-Sアシル基転位反応を利用してペプチドチ オエステルを調製することに成功した.この N-Sアシル基転位反応を基盤とするペプチドチ オエステルの調製法が注目を集め,様々な骨格による N-Sアシル基転位反応を経由するペプ チドチオエステル調製法が報告されている [19].今後,より優れた方法の開発を進めていき たい.

#### 4. 謝辞

本研究の一部は、公益財団法人篷庵社からの研究助成によるものであり、ここに厚くお礼 申し上げます.また、ご推薦賜りました村橋俊一先生をはじめ、関係諸先生方に心より感謝 申し上げます.

#### 5. 参考文献

- (a) J. P. Tam, Q. Yu, Z. Miao, *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **51**, 311 (1999); (b) P. E. Dawson, S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 923 (2000); (c) S. Aimoto, *Curr. Org. Chem.*, **5**, 45 (2001); (d) C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 10030 (2008).
- (a) H. Hojo, S. Aimoto, Bull. Chem. Soc. Jpn., 64, 111 (1991); (b) T. Kawakami, S. Kogure, S. Aimoto, Bull. Chem. Soc. Jpn., 69, 3331 (1996); (c) S. Aimoto, Biopolymers (Pept. Sci.), 51, 247 (1999).
- 3. P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, Science, 266, 776 (1994).
- (a) L. E. Canne, S. J. Bark, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 5891 (1996); (b) P. Botti, M. R. Carrasco, S. B. H. Kent, *Tetrahedron Lett.*, **42**, 1831 (2001); (c) T. Kawakami, K. Akaji, S. Aimoto, *Org. Lett.*, **3**, 1403 (2001); (d) J. Offer, C. N. C. Boddy, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 4642 (2002); (e) T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.*, **44**, 6059 (2003).

- 5. T. Kawakami, K. Hasegawa, S. Aimoto, Bull. Chem. Soc. Jpn., 73, 197 (2000).
- (a) X. Li, T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 8669 (1998); (b) K. Hasegawa, Y. L. Sha, J. K. Bang, T. Kawakami, K. Akaji, S. Aimoto, *Lett. Pept. Sci.*, **8**, 277 (2001).
- 7. 重永 章, 佐藤浩平, 大高 章, *有機合成化学協会誌*, **68**, 911 (2010).
- 8. 川上 徹, 相本三郎, *有機合成化学協会誌*, 70, 166 (2012).
- 9. J. Vizzavona, F. Dick, T. Vorherr, Bioorg. Med. Chem. Lett., 12, 1963 (2002).
- 10. K. Nakamura, M. Sumida, T. Kawakami, T. Vorherr, S. Aimoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **79**, 1773 (2006).
- (a) T. Kawakami, M. Sumida, K. Nakamura, T. Vorherr, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.*, 46, 8805 (2005); (b) K. Nakamura, H. Mori, T. Kawakami, H. Hojo, Y. Nakahara, S. Aimoto, *Int. J. Pept. Res. Ther.* 13, 191 (2007); (c) K. Nakamura, T. Kanao, T. Uesugi, T. Hara, T. Sato, T. Kawakami, S. Aimoto, *J. Pept. Sci.*, 15, 731 (2009).
- S. Sakakibara, Y. Shimonishi, M. Okada, Y. Kishida, "Peptides: Proceedings of Eighth European Peptide Symposium" eds. by H. C. Beyerman, A. van de Linde, W. Maassen van den Brink, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1967, p 44.
- 13. G. Zanotti, F. Pinnen, G. Lucente, Tetrahedron Lett., 26, 5481 (1985).
- 14. (a) T. Kawakami, S. Aimoto, *Chem. Lett.* 36, 76 (2007); (b) T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.*, 48, 1903 (2007); (c)T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron*, 65, 3871 (2009).
- 15. T. Kawakami, A. Ohta, M. Ohuchi, H. Ashigai, H. Murakami, H. Suga, *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 888 (2009).
- 16. T. Kawakami, S. Shimizu, S. Aimoto, Bull. Chem. Soc. Jpn., 83, 570 (2010).
- 17. S. Khorasanizadeh, Cell, 116, 259 (2004).
- 18. V. Muralidharan, T. W Muir, Nature Methods, 3, 429 (2006).
- (a) N. Ollivier, J.-B. Behr, O. El-Mahdi, A. Blanpain, O. Melnyk, Org. Lett., 7, 2647 (2005); (b)
   Y. Ohta, S. Itoh, A. Shigenaga, S. Shintaku, N. Fujii, A. Otaka, Org. Lett., 8, 467 (2006); (c) F. Nagaike, Y. Omura, C. Kanazawa, H. Hojo, A. Ueki, Y. Nakahara, Y. Nakahara, Org. Lett., 8, 4465 (2006); (d) H. Hojo, Y. Omura, Y. Akimoto, Y. Nakahara, Y. Nakahara, *Tetrahedron Lett.*, 48, 25 (2007); (e) J. P. Richardson, D. Macmillan, Chem. Commun., 2009, 407; (f) S. Tsuda, A. Shigenaga, K. Bando, A. Otaka, Org. Lett., 11, 823 (2009); (g) J. Kang, N. L. Reynolds, C. Tyrrell, J. R. Dorin D. Macmillan, Org. Biomol. Chem., 7, 4918 (2009); (h) N. Ollivier, J. Dheur, R. Mhidia, A. Blanpain, O. Melnyk, Org. Lett., 12, 5238 (2010); (i) W. Hou, X. Zhang, F. Li, C.-F. Liu, Org. Lett., 13, 386 (2011); (j) J. Dheur, N. Ollivier, O. Melnyk, Org. Lett., 13, 1560 (2011); (k) K. Sato, A. Shigenaga, K. Tsuji, S. Tsuda, Y. Sumikawa, K. Sakamoto, A. Otaka, ChemBioChem, 12, 1840 (2011).

# 活性カチオン種の生成とその高次利用

#### 大阪大学大学院薬学研究科 藤岡弘道

#### はじめに

カチオン種は非常に有用な化学種として有機合成化学で多用されるが、非常に活性なため、 求核剤の存在下に前駆体を酸処理して発生させ、そのまま系内の求核種と反応させる。例え ば、アセタールを酸条件で処理すれば、カチオン種(オキソニウムイオン)が生成するが、 このものは不安定なため、改めて求核剤を加えて反応させることは困難であり、そのため酸 に不安定な官能基持つ基質や求核剤を用いることはできなかった。そこで、まずカチオン種 (オキソニウムイオン種)を系内に発生させ、改めて求核剤を加える手法が開発できれば、 適応できる基質や求核剤を大きく拡張できる。我々は、アセタールをR<sub>3</sub>SiOTf-ピリジン型塩 基または R<sub>3</sub>SiOTf-ホスフィンで処理するとピリジニウム塩またはホスホニウム塩が生成し (図1)、これらがオキソニウムイオンの合成等価体として働くことを明らかにしてきた。 さらにこれらがオキソニウムイオンとは異なる反応性を示す事も明らかにしてきた。

尚、塩の生成には試薬を加える順番が重要であり、アセタールと塩基(ピリジン型塩基またはホスフィン)の混合物にR<sub>3</sub>SiOTfを加えると塩中間体が生成する。



図1. アセタールからのオキソニウムイオン並びに求電子性塩の生成

#### 1 活性カチオン種としてピリジニウム塩を用いた有機合成反応

アセタールをピリジン型塩基存在下に TMSOTf または TESOTf で処理すると、相当する ピリジニウム型塩中間体が生成する。この塩中間体は、用いるピリジン類を選ぶことにより、 活性なオキソニウムイオン合成等価体として働くことを見出し、水を含む種々の求核種と求 核置換反応を起こすことを見出した。

#### 1.1 アセタールの脱保護<sup>1)</sup>

ピリジン型塩基として 2,6-lutidine または 2,4,6-collidine を用いて,アセタールを TMSOTf または TESOTf で処理すると、相当するルチジニウム塩またはコリジニウム塩中間体が生成 する。ついでこのものを水で処理するとアセタールの脱保護が高収率で進行する事を見出し た(図2)。一般に、アセタールの脱保護は酸性条件下で行われるため、酸に不安定な官能 基を有する基質ではアセタールのみを選択的に脱保護することは困難であったが<sup>2)</sup>、本反応 は R-OTf に対して塩基を過剰量用いているため、弱塩基性条件下に進行する、従来に無い 反応であり、酸性条件下に用いることができない多くの官能基を持つ化合物でも、それらの 官能基に影響することなく、アセタールのみを脱保護できる点で非常に有用である。



図2. 弱塩基性条件下でのアセタールの脱保護

本反応では塩基の種類が非常に重要である(表1)。塩基を添加しない条件では複雑な混 合物を与える(entry 1)。また pyridine や 2-picoline、2,4-lutidine を適用した場合では安定な高 極性化合物が得られ、24 時間水の後処理を行ってもアルデヒドへと変換されなかった (entries 2-4)。一方で、2,6-lutidine を用いた場合では一旦高極性化合物を経由するが、水の後 処理を行うと 0.1 時間でこの高極性化合物は消失してアルデヒドへと変換された (entry 5)。 さらに塩基として 2,4,6-collidine を用いると、水の後処理時間が 2,6-lutidine に比べて長くな るが (0.5 時間) 高収率でアルデヒドを与えた (entry 6)。これらのことから、ピリジン環の 窒素原子周辺の立体的なかさ高さが、本反応における水の後処理の段階で重要な役割を担っ ているものと推測できる。これに対して DMAP で処理すると反応は全く進行しなかった。

	OMe TE bas	SOTf (2.0 equiv) se (3.0 equiv)	$H_2O$
Å.	8 OMe CH	I <sub>2</sub> CI <sub>2,</sub> 0 °C, time A	time B
entry	base	time A / B (h)	yield (%)
1	none	-	complex mix.
2	pyridine	0.5 / 24.0	high polar compound
3	2-picoline	0.5 / 24.0	high polar compound
4	2,4-lutidine	0.5 / 24.0	high polar compound
5	2,6-lutidine	0.5 / 0.1	81
6	2,4,6-collid	ine 0.5 / 0.5	97
7	DMAP	24.0 / -	n.r.

表 1. 様々なピリジン型塩基を用いたアセタールの脱保護実験

本反応を<sup>1</sup>H NMR で追跡した結果を図3に示す。Chart A は 2,6-lutidine、Chart B はアセタール、Chart C はアセタールを TESOTf と 2,6-lutidine で処理した反応混合物、Chart D は水の後処理後の混合物の<sup>1</sup>H NMR チャートである。Chart A, B と Chart C との比較から、反応により 2,6-lutidine の芳香環上のプロトンが低磁場シフトし、アセタール炭素上のプロトンが消失したことが分かる。また Chart C において、 $\delta$  6.0 ppm 付近のプロトンは *N,O*-アセタール

構造を示唆している。さらにこの時点ではアルデヒド由来のプロトンが全く観測されなかった。しかし、反応混合物の水の後処理により $\delta 6.0$  ppm 付近のプロトンは消失し、新たに  $\delta$  9.75 ppm にアルデヒドのプロトンが見られた (Chart D)。。



図 3.<sup>1</sup>H NMR による反応の追跡

これらの実験事実を基に、本反応の反応機構は図4のように考えている。まず TESOT に より活性化されたアセタールの炭素中心に 2,6-lutidine または 2,4,6-collidine が攻撃して pyridinium 型塩を与える。2,6-lutidine や 2,4,6-collidine の場合に、pyridine 環部の 2 位および 6 位のメチル基がアセタール部と立体的に込み合うため、塩中間体の C-N 結合が弱く長く なり、水と反応してヘミアセタールを経てアルデヒド体へ変換されたと考えられる。



図 4. アセタール脱保護の推定反応機構

本法の更なる特徴は、高い官能基選択性である。ケタールはアセタールよりも速く脱保護 される<sup>2,3)</sup>。これは有機化学の常識であり、文献を精査してもケタール存在下にアセタール を選択的に脱保護する条件はなかった.しかしながら、我々の手法ではルイス酸として TESOTf を用いると、ケタールの存在下にアセタールを選択的に脱保護することができる。 本法は、ケタール存在下にアセタールを選択的に脱保護できる、現在でも唯一の手法である。



図 5. ケタール存在下でのアセタール選択的脱保護

#### 1.2 水酸基のアセタール型保護基 (THP-, MOM-, MEM-, BOM-エーテル)の脱保護<sup>4,5)</sup>

上記の反応は、水酸基のアセタール型保護基の脱保護にも応用できる。この場合にも、本 反応の特徴である酸に不安定な官能基を有する化合物にも適用できる(図6)。尚、THP エーテル類は塩基としてコリジンを用いれば反応が進行したが、MOM-エーテルや他の MOM 型エーテルの場合はコリジンでは塩中間体は出来るものの水の付加を経る加水分解が 進行しない。そこで窒素原子の求核性を弱め周辺が嵩高くなっている 2,2'-ビピリリジルを 塩基として用い、その脱保護を達成した。尚、これらアセタール型保護基の 2 個の酸素原子 はいずれも立体的環境が異なるが、いずれの場合にもより立体的に空いている酸素原子が R-OTf を攻撃して高位置選択的に進行する。またこれら官能基の脱保護のされ易さは、通常 の酸条件とは逆の官能基選択性を示す。



図 6. 水酸基のアセタール型保護基の脱保護

また中間体塩を水の代わりにアルコールで処理すると直接的に他の保護基に変換できる。 例えば、MOM-エーテルの塩中間体をベンジルアルコールやトリメチルシリルエタノールで処 理すると高収率で BOM-エーテルや SEM-エーテルへと直接変換できる(図7)。



図 7. MOM - エーテルからの他のアセタール型エーテルへの直接変換

#### 1.3 メチレンアセタールの脱保護<sup>6)</sup>

ジオールのアセタール型保護基としてはアセトナイド、ベンジリデンアセタール等が多用 される。一方、メチレンアセタールはその脱保護に強酸性条件を必要とするため、あまり用 いられなかった。しかしながらメチレンアセタールは塩基性から弱酸性条件下まで、幅広く 耐性を示すため、もし緩和な条件下に脱保護できるならば、保護基として非常に優れている と考えられる。そこで我々は上記の手法を応用し、非常に緩和な条件下での脱保護する事に 成功した。特に脱保護の後処理条件を変えるだけで、4 種の可能なジオール誘導体(ジオー ル、モノシリルエーテル、モノ MOM-エーテル、MOM-シリルエーテル)を作り分けることが 可能である点は、特筆できる(図8)。これらの変換反応は多くの官能基の存在下に行える ため、化合物の合成途中で保護基の変換が可能な有用な手法である。さらに本法を用いると アセトナイド存在下にメチレンアセタールの脱保護も可能である。



図 8. メチレンアセタールから4種のジオール誘導体の作り分け

#### 1.4 ピリジニウム型塩中間体への求核置換反応

次にピリジニウム型塩中間体がカチオン性を持つことに着目し、多くのヘテロ求核種(窒素原子、酸素原子、硫黄原子、リン原子)や炭素求核種の導入に成功した(図9)<sup>7</sup>。また 塩中間体に有機銅試薬を反応させることにより、現在汎用されているアルコキシドとハライ ドまたはその誘導体の縮合反応である Williamson エーテル合成法での合成が困難な込み合 ったエーテル化合物の合成も簡単に出来る(図10)<sup>8</sup>。



図 9. ピリジニウム型塩を経るアセタールの求核置換反応



図 10. ピリジニウム型塩を経るエーテル合成

#### 2 活性カチオン種としてホスホニウム塩を用いた有機合成反応

ピリジン類と同じルイス塩基であるホスフィン存在下にアセタールを TMSOTf または TESOTf で処理すると、相当するα-アルコキシホスホニウム塩中間体が生成する。従来、 ホスホニウム塩は反応種としては Wittig 反応にしか用いられていない。一方、我々は一章で、 塩の構造を変えることにより、反応性を制御できることを示してきた。そこで未知なる反応 性の開拓による新たな合成中間体としての利用を期待して、様々なホスフィン由来のα-ア ルコキシホスホニウム塩と求核種との反応性を検討した。

## 2.1 α-アルコキシホスホニウム塩を用いる有機合成反応

#### 2.1.1 求核置換反応<sup>9)</sup>

TMSOTf存在下アルデヒドと Ph<sub>3</sub>P から調製したホスホニウム塩から、ホスフィンの脱離 を伴う効率的な求核置換反応は報告されていなかった。我々はピリジニウム塩の反応性が用 いるピリジン類の構造により大きく影響されることを見出していたので、ホスホニウム塩に 関しても用いるホスフィンの種類を変えてその反応性を検討した。その結果、かさ高いホス フィンである(*o*-tol)<sub>3</sub>P 由来のホスホニウム塩が高い反応性を示し、水を求核種とした場合、 アルデヒドを高収率で与えた。また、他の求核種であるチオレートやシアニド、Grignard 試 薬とも首尾よく反応し、対応する求核置換体を高収率で与えた(図11)。本反応は、α-アルコキシホスホニウム塩の効率的な求核置換反応の初めての例である。



図 11. ホスホニウム塩を経るアセタールの求核置換反応

#### 2.1.2 Grignard 試薬との新奇な反応<sup>10)</sup>

求核種との反応性が低い Ph<sub>3</sub>P 由来の $\alpha$ -アルコキシホスホニウム塩を Grignard 試薬と反応 させると、アルコール体が主生成物として得られた。副生成物から本反応には酸素の関与が 示唆され、同位体酸素 (<sup>18</sup>O<sub>2</sub>)を用いた実験により、本反応は酸素分子が関与する反応であ ることを見出した。また本反応は、Grignard 試薬と酸素分子から生じるスーパーオキシドラ ジカルアニオン (O<sub>2</sub><sup>--</sup>) が関与する、新規ラジカル機構で進行していることを明らかとした。



図 12. ホスホニウム塩と Grignard 試薬の新奇な反応

#### 2.1.3 α-アルコキシホスホニウム塩の反応性について<sup>11)</sup>

ホスフィンの立体的パラメーターθ、電子的パラメーターν<sup>11)</sup>を用いて上記α-アルコキシ ホスホニウム塩の反応性の考察を行った。結果、これらホスホニウム塩の反応性はホスフィ ンの立体的因子だけではなく、電子的因子にも強く影響されることが明らかとなった。





steric parameter: θ

electronic parameter: v

図 13. α-アルコキシホスホニウム塩の反応性を支配する因子

#### 2.3 求核付加反応に対するカルボニル基の反応性の逆転<sup>12)</sup>

カルボニル官能基(アルデヒド、ケトン、エステル)の求核付加反応に対する反応性はア ルデヒド>ケトン>エステルの順である。そのため例えばアルデヒドとケトンが共存する化 合物で、アルデヒドのみを選択的に変換する手法は数多く開発されているが、ケトンのみを 選択的に変換するためには、これまで、アルデヒドを選択的に保護した後にケトンを変換し、 脱保護によりアルデヒドを再構築する手法が一般的であり、反応性の低いカルボニル基を反 応性の高いカルボニル基の存在下に反応させる手法は多くない。一方前述したように、ホス フィンの構造がホスホニウム塩の反応性に大きく影響する。例えば、ホスホニウム塩と H<sub>2</sub>O との反応では P(o-tol)<sub>3</sub> 由来の塩中間体は速やかに加水分解が進行するのに対し、PPh<sub>3</sub> 由来のホスホニウム塩は安定で加水分解の進行は非常に遅くなる(図14)。



図 14. α-アルコキシホスホニウム塩の加水分解

そこで、カルボニル基から PPh<sub>3</sub>を用いた *O*,*P*-アセタール型ホスホニウム塩を生成すれば、 このものは求核置換反応に抵抗すると考えられる。そこでアルデヒドとケトンが共存する基 質からアルデヒド選択的に *O*,*P*-アセタール型ホスホニウム塩中間体を形成させることに成 功し、続くボランとの反応ではケトンのみを高収率かつ高選択的に還元できることを見出し た。さらに、本法は様々なケトアルデヒドだけでなく、エステルやカルボン酸、ニトリルの 還元にも適応可能な非常に一般性の高い反応であることを明らかとした(図15)。



図 15. カルボニル官能基の反応性の逆転

#### 2.4 Centrolobine の全合成

Centrolobine は現在ブラジルなどで問題となっているリーシュマニア病の原因寄生虫である Leishmania amazonensis promastigotes に対する活性を有しており、多くの全合成が報告さ

れているが、それらは工程数や、収率面に問題を残すものが多く、また誘導体合成の観点か らもさらなる効率的な合成法の開発が望まれている。

そこで上記手法の応用として、Centrolobineの不斉合成を行った(図16)。即ち、文献 既知のシクロペンテンのオゾン分解により、定量的に鍵反応の前駆体であるケトアルデヒド を得た。このものに PPh<sub>3</sub>-TMSOTf を作用させ、アルデヒド選択的に塩を形成させ、続いて 触媒的な CBS 還元条件に付すことで、良好な収率でラクトールを高エナンチオ選択的に合 成することに成功した。次いで、ホスホネートを用いて Horner- Wadsworth-Emmons 反応を 行い、2,6-ジ置換 THP 化合物を立体選択的に得た。次いでベンジル位ケトンを還元し、還元 的に除去し、最後に Ullmann 反応でブロモ基をメトキシ基に変換して、(+)-Centrolobine の合 成を完成した。総収率は 75%であり、本合成はこれまでに知られている不斉合成のうちで 最も高収率の Centrolobine 不斉合成である。



図 16. (+)-Centrolobine の短工程不斉合成

#### おわりに

以上、アセタール由来の塩中間体の反応性を用いる塩基の種類により制御できることを示 し、緩和な条件下での脱保護や種々の求核置換反応を開発した。特にここで紹介した脱保護 条件は非常に緩和であり、多くの特に酸に不安定な官能基も共存できる。また従来法とは逆 の官能基選択性を示す。事実、最近では多くの天然物合成でその有用性が示されている<sup>13)</sup>。 またホスホニウム塩を経るカルボニル求核付加反応の反応性の逆転は非常に実用性の高い方 法である。今後、さらに塩化学種の反応性を制御したこれまでにない化合物合成法の開発が 期待される。 **謝辞** 本研究の一部は、公益財団法人篷庵社の研究助成によるものであり、ここに厚く御礼 を申し上げます。

#### 参考文献

- (a) Fujioka, H.; Sawama, Y.; Murata, N.; Okitsu, T.; Kubo, O.; Matsuda, S.; Kita, Y. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 11800-11801; (b) Fujioka, H.; Okitsu, T.; Sawama, Y.; Murata, N.; Li, R.; Kita, Y. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 5930-5938.
- (a) Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. In *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd ed.; John Wiley & Sons: New York, 1999; pp 297-329. (b) Hanson, J. R. In *Protecting Groups in Organic Synthesis*, 1st ed.; Blackwell Science, Inc: Malden, MA, 1999; pp 37-43. (c) Kocienski, P. J. *Protecting Groups*; George Thieme Verlag: Stuttgart, 1994; pp 156-170.
- Kreevoy, M. M.; Taft, Jr. R. W. J. Am. Chem. Soc. 1955, 77, 5590-5595. See also: Bunton, C. A.; De Wolfe, R. H. J. Org. Chem. 1965, 30, 1371-1375.
- 4) (a) Fujioka, H.; Okitsu, T.; Ohnaka, T.; Sawama, Y.; Kubo, O.; Okamoto, K.; Kita, Y. Adv. Synth. Catal. 2007, 349, 636-646; (b) Fujioka, H.; Kubo, O.; Okamoto, K.; Senami, K.; Okitsu, T.; Ohnaka, T.; Sawama, Y.; Kita, Y. Heterocycles 2009, 77, 1089-1103.
- (a) Fujioka, H.; Kubo, O.; Senami, K.; Minamitsuji, Y.; Maegawa, T. *Chem. Commun.* 2009, 4429-4431; (b) Fujioka, H.; Minamitsuji, Y.; Kubo, O.; Senami, K.; Maegawa, T. *Tetrahedron*, 2011, 67, 2949-2960.
- (a) Fujioka, H.; Senami, K.; Kubo, O.; Yahata, K.; Minamitsuji, Y.; Maegawa, T. Org. Lett. 2009, 11, 5138-5141;
   (b) Fujioka, H.; Senami, K.; Kubo, O.; Yahata, K.; Minamitsuji, Y.; Maegawa, T. Chem. Pharm. Bull. 58(3), 426-428 (2010).
- (a) Fujioka, H.; Okitsu, T.; Sawama, Y.; Ohnaka, T.; Kita, Y. Synlett 2006, 3077-3080; (b) Fujioka, H.; Okitsu, T.; Ohnaka, T.; Li, R.; Kubo, O.; Okamoto, K.; Sawama, Y.; Kita, Y. J. Org. Chem. 2007, 72, 7898-7902; (c) Fujioka, H.; Ohnaka, T.; Okitsu, T.; Kubo, O.; Okamoto, K.; Sawama, Y.; Kita, Y. Heterocycles 2007, 72, 529-540; (d) Fujioka, H.; Kubo, O.; Senami, K.; Okamoto, K.; Okitsu, K.; Kita, Y. Heterocycles 2009, 79, 1113-1120; (e) Fujioka, H.; Yahata, K.; Hamada, T.; Kubo, O.; Okitsu, T.; Sawama, Y.; Ohnaka, T.; Maegawa, T.; Kita, Y. Chem. Asian J. 2012, 7, 367-373.
- 8) Minamitsuji, M., Kawaguchi, A.; Kubo, O.; Ueyama, Y.; Maegawa, T.; Fujioka, H. *Adv. Synth. Catal.* in press.
- 9) Fujioka, H.; Goto, A.; Ohtake, K.; Kubo, O.; Yahata, K.: Sawama, Y.; Maegawa, T. Chem. Commun. 2010, 46, 3976-3978.
- 10) H. Fujioka, H.; Goto, A.; Ohtake, K.; Kubo, O.; Sawama, Y.; Maegawa, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 9894-9896.
- 11) Goto, A.; Otake, K.; Kubo, O.; Sawama, Y.; Maegawa, T.; Fujioka, H. Chem. Eur. J. in press.
- 12) Fujioka, H.; Yahata, K.; Kubo, O.; Sawama, Y.; Maegawa, T. Angew. Chem., Int. Ed. 2011, 50, 12232-12235.
- 13) For examples, see: (a) Itagaki, N.; Sugahara, T.; Iwabuchi, Y. Org. Lett. 2005, 7, 4181-4183; (b) Ogawa, S.; Urabe, D.; Yokokura, Y.; Arai, H.; Arita, M.; Inoue, M. Org. Lett. 2009, 11, 3602-3605; (c) Goto, T.; Natori, Y.; Takeda, K.; Nambu, H.; Hashimoto, S. Tetrahedron: Asymmetry 2011, 22, 907-915.

#### 循環器障害克服のための酸化ストレス研究

#### -酸化ストレスと生体内鉄-

## 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 薬理学分野 玉置 俊晃

#### 研究概要

生体内の鉄関連疾患としては、世界的に見ると非常に多くの女性の鉄欠乏性貧血患 者が存在するために、臨床医学的・栄養学的には鉄不足に注意が払われてきた。一方、 鉄 過剰と疾患の関連についてはあまり関心をもたれていなかった。鉄は Fenton/Haber-Weiss 反応を介してヒドロキシラジカルを産生するために酸化ストレス の原因となる。鉄過剰症としてヘモクロマトーシス、サラセミアなどの遺伝的鉄過剰 疾患が知られている。近年、生体内の鉄過剰がウイルス性肝炎の病態を悪化させるこ とが明らかになってきており、生体内の鉄過剰が幾つかの疾患の病態に関与している ことが明らかとなりつつある。循環器疾患領域においても例外ではなく、心血管臓器 リモデリング、その危険因子である糖尿病においても鉄が病態に関与していることが 明らかとなりつつある。

今回の研究では、循環器障害に関与する鉄の役割を明らかにするために、in vitro<sup>1)</sup> と in vivo<sup>2)</sup>の検討を行った。ヒト培養糸球体内皮細胞を使用した in vitro の検討では、 アンジオテンシン II(Ang II)刺激時における内皮細胞内における鉄の動体と酸化スト レスの変化を検討した。内皮細胞に 1nM Ang II を 24 時間作用させても細胞内の鉄含 量は変化しなかった。また、正常人の血中トランスフェリン(Tf) 鉄飽和度と考えられ ている 30% iron-saturated human Tf (30% Tf)を内皮に 24 時間作用させても細胞内鉄含 量は変化しなかった。ところが、1nM Ang II と 30% Tf を同時に 24 時間作用させると、 内皮内の鉄含量を有意に増加した。生体内鉄の超過剰時に観察される 90% iron-saturated human Tf(90%Tf)を同様に内皮細胞に作用させた。90%Tf を作用させる と細胞内鉄含量は10倍以上に増加した。1nM Ang IIと90%Tf を同時に24時間作用 させると、内皮内の鉄含量はさらに増加した。1nM Ang II と Tf の同時投与では、90% Tf の同時投与時だけでなく 30% Tf の同時投与時にも、細胞内の反応性が高い2 価鉄は増 加した。1nM Ang II 単独投与や 90% Tf の単独投与では細胞障害性が強いヒドロキシ ラジカルシグナルは観察されないが、1nM Ang II と 90% Tf の同時投与にて反応性の 高い2価鉄イオンが増加した条件では、強いヒドロキシラジカルシグナルが観察され た。以上の結果は、アンジオテンシン II が NADPH oxidase を活性化しスーパーオキ シドを産生するだけでなく内皮細胞内の反応性の高い2価鉄量を増加して酸化スト レスを増強して内皮障害を進展させる可能性を示している。

2型糖尿病モデル動物 (KKAy mice) を用いた in vivo の検討では、鉄キレート剤 Deferoxamine Mesylate (DFO) (100mg/kg/日) を2週間腹腔内投与して、肥満・糖尿病 に対する効果を検討した。DFO 群では血清フェリチン値, 脂肪組織鉄量の有意な低下 がみられたが、ヘモグロビン値とヘマトクリット値は軽度低下を認めたが有意な低下 は観察されなかった。空腹時血糖値については Vehicle(Veh) 群では 118.2±6.1 mg/dl で DFO 群では 110.3±4.2 mg/dl で、DFO 群で低い傾向であったが 2 群間に有意差を 認めなかった。空腹時インスリン値は、Veh 群では 1.93±0.18 ng/ml で DFO 群では 0.57 ±0.03 ng/ml であり、 DFO 群において有意に低下していた。腹腔内グルコース投与 ならびにインスリン投与による耐糖能とインスリン感受性の評価では、Veh 群に比し て DFO 群で改善が認められた。また、鉄除去によって内臓脂肪組織の肥大進展を抑 制できることが明らかとなった。そのメカニズムとして、脂肪の鉄量を減少させるこ とで脂肪組織への浸潤マクロファージ数が減少して、酸化ストレスならびに炎症性サ イトカイン発現が抑制されるためと考えられる。本研究において、浸潤マクロファー ジの局在と p22<sup>phox</sup> もしくはフェリチンの発現部位が一致していたことは、肥大脂肪組 織における過剰な鉄供給と酸化ストレスの産生源としてマクロファージの関与が示 唆された。以上の結果から、酸化ストレス・炎症性サイトカインやマクロファージ浸 潤の亢進によって引き起こされる脂肪組織肥大が鉄除去によって抑制できることが 示唆された。鉄制御は従来とは異なる、新しい作用機序に基づく肥満・糖尿病に対す る治療法となることが期待できる。しかしながら肥満では生体内鉄量は減少している ことも示されており、我々もマウス系統によって、脂肪組織鉄濃度や血清フェリチン 値が異なることを確認している。これが肥満に伴うものか、系統によるものか、詳細 は不明である。肥満における鉄代謝機構の解明にはさらなる知見の集積が望まれる。

尚、研究内容の詳細は下記参考論文をご覧いただければ幸いです。

#### 参考文献

- 1. Tajima S, Tsuchiya K, Horinouchi Y, Ishizawa K, Ikeda Y, Kihira Y, Shono M, Kawazoe K, Tomita S, and Tamaki T. : *Effect of angiotensin II on iron-transporting protein expression and subsequent intracellular labile iron concentration in human glomerular endothelial cells.* Hypertens Res, **33**(7): 713-21, 2010.
- Tajima S, Ikeda Y, Sawada K, Yamano N, Horinouchi Y, Kihira Y, Ishizawa K, Izawa-Ishizawa Y, Kawazoe K, Tomita S, Minakuchi K, Tsuchiya K, Tamaki T. : Iron reduction by deferoxamine leads to amelioration of adiposity via the regulation of oxidative stress and inflammation in obese and type 2 diabetes KKAy mice. Am J Physiol Endocrinol Metab. 302: E77-86, 2012

# 心不全の分子病態解明に基づく新規治療標的の同定

京都大学大学院 医学研究科 内分泌代謝内科

桑原宏一郎

#### 抄録

本助成研究の目的は、心不全の分子病態解明に基づき、新規治療標的の同定を行う ことである。本研究では、今まで私どもの研究室が見出してきた心不全発症・進展に 関わる転写調節分子経路である、HDAC-NRSF 経路、Rho-MRTF-A-SRF 経路、 TRPC6-calcineurin-NFAT 経路、p300-PGC1 経路を中心にこれら分子経路のさらに詳細 な検討の中から、新規治療標的の探索とそれに基づく新規治療法開発を目指した研究 を行った。今回の発表会ではその成果と、今後の展望について紹介したい。

#### <u>はじめに</u>

さまざまな心血管病の最終病態としての慢性心不全はいまだ予後不良の症候群で あり、その病態解明に基づく新規治療標的同定が望まれる。慢性心不全患者の心臓に おいては心臓ホルモンである心房性および脳性ナトリウム利尿ペプチド(ANP および BNP)遺伝子発現が亢進し、その血中濃度が心不全重症度や予後と非常によく相関する ことが知られている。私どもの研究室は、病的心筋における ANP・BNP 遺伝子発現 調節の分子機構解明からスタートし、長年にわたり不全心において特徴的に認められ る遺伝子発現変化に関わる転写調節経路の解明を通した慢性心不全の分子病態解明 と、それに基づく新規治療標的同定を目指した研究を行ってきた。その結果、現在ま でに、心不全発症に至る病的心筋リモデリングに関与する複数の転写調節経路の存在 を明らかにしている。本助成研究では、私どもの研究室において今まで見出してきた 心不全発症・進展に関わる転写調節分子経路である、HDAC-NRSF 経路、 Rho-MRTF-A-SRF 経路、TRPC6-calcineurin-NFAT 経路、p300-PGC1 経路を中心にこれ ら分子経路のさらに詳細な検討の中から、新規治療標的の探索とそれに基づく新規治 療法開発を行うことを目標に研究を行った。

#### 結果

# 1、転写抑制因子 NRSF による心筋遺伝子発現のエピゲノム制御機構の解明とその下 流標的の同定に基づく新規心不全・突然死治療法の開発

私どもの研究室では、ANP・BNP遺伝子発現調節機構解析の結果、心筋において転 写抑制因子 NRSF(REST)が、複数の心筋胎児型遺伝子の発現制御にヒストン修飾を 介して重要な役割を果たしていることを示してきた。また、心臓における NRSF 機能 の低下が心不全・突然死の発症・進行に関与することを見出し、病的心筋リモデリン グにおける NRSF の役割を世界に先駆けて報告した(Figure1)<sup>1-2</sup>。このことから心不全



の発症・進展における NRSF 転 写抑制複合体の役割とその過程 で働くエピゲノム制御の分子機 序を詳細に解析することが、心 不全発症の新たな分子メカニズ ムの解明、さらには新規心不全 治療法の開発につながるものと 考えている。実際我々は、心不 全を呈し、突然死する心筋特異 的優勢抑制変異型 NRSF 過剰発 現マウス(dnNRSF-Tg)の解析

から T 型カルシウムチャネルが突然死発症に関与する可能性を見出し、新規心不全治療薬としての T 型カルシウムチャネル阻害薬の可能性を最近報告した<sup>3</sup>。そこで本研究では、心臓の機能維持における NRSF 転写抑制複合体の役割とその下流標的についてさらに検討を行った。

#### a. dnNRSF-Tg における HCN チャネルの役割の検討

まず dnNRSF-Tg で認められる心機能低下と致死性不整脈の機序をさらに明らかにす るべく、cDNA microarry を行い、その結果から、胎児期の心室筋には発現するが生後 成熟した心室筋での発現は低下し、病的心において再発現することが知られる hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channel (HCN)2 および4が dnNRSF-Tg の心室筋で発現亢進していることを見出した。実際 HCN2、4 の intron に NRSF の結 合配列が存在し、HCN2、4 は NRSF の標的遺伝子あることが示された。HCN チャネ ルはIfあるいはIhとして知られるイオン電流の発生に関与し、通常の成熟した心臓で は刺激伝導系のみにその発現が限局しており、ペースメーカー活動の生成などに関与 することが知られている。我々はHCN2、4の心室筋における過剰発現がdnNRSF-Tg マウスの表現形に関与するかどうかを明らかにする目的で、dnNRSF-Tg に HCN チ ャネル阻害薬である ivabradine を投与した。まず Ivabradine(3µM)が dnNRSF-Tg から の単離心室筋における Lfを有意に約 50%程度抑制することを確認したのち、野生型マ ウス(WT)では有意に心拍数を低下させるが、心拍数が低下している dnNRSF-Tg の心 拍数には有意な影響を与えない濃度である ivabradine 7mg/kg/day を混餌にて dnNRSF-Tg に投与したところ、血行動態や心機能には影響を与えなかったが、有意に dnNRSF-Tg の突然死による死亡率を低下させた(Figure 2)。実際、ivabradine は dnNRSF-Tg において認められる心室性頻拍を有意に抑制していた。一方で、ivabradine は dnNRSF-Tg において心線維化や、自律神経バランスの異常には影響を及ぼさなか った。HCN 阻害が dnNRSF-Tg の致死性不整脈を抑制した機序に関して、dnNRSF-Tg からの単離心筋を用いて更に詳細に検討したところ、ivabradine 投与はイソプロテレ



ノール刺激により引き起こされる dnNRSF-Tg 心筋の異常自動能亢進を抑制 する傾向が認められた。これらのことから HCN 阻害が心室筋の異常自動能亢進を抑 制することで、dnNRSF-Tg の不整脈発生を 抑制している可能性が示唆された。

そこで次に、HCN チャネルの過剰発現が、 心室筋における異常自動能亢進に十分で

あるかどうかを検討する目的で、HCN2 を心筋特異的に過剰発現するマウス (HCN2-Tg)を作製した。このマウスでは I<sub>f</sub> が心室筋において明らかに認められた。 HCN2-Tg は通常の飼育条件では、心臓の機能や構造に明らかな異常を認めなかった。 そこで、このマウスに対してイソプロテレノールを1週間浸透圧ポンプにて持続皮下 投与を行ったところ、WT に同様に投与した場合に比べ、有意に心室性期外収縮や心 室性頻拍の発生の増加がみられた。HCN2-Tg から心室筋細胞を単離し、イソプロテ レノールで刺激したところ、WT の心室筋ではほとんど認めない、異常自動能の亢進 を認め、それは ivabradine 投与にて抑制された。

以上の結果から dnNRSF-Tg において心室筋で HCN2、4 チャネルの発現が亢進する ことが、異常自動能亢進機序を介して、このマウスの致死性不整脈発症に関与してい ることが示唆された。また HCN2、4 はヒトの不全心でも発現亢進を認めることから <sup>4</sup>、HCN 阻害薬が新しい致死性不整脈予防薬になりうる可能性が示された。

# b. dnNRSF-Tg の致死性不整脈発生における交感神経一副交感神経活性バランスの意義の検討

上記 T 型カルシウムチャネルの dnNRSF-Tg における突然死への関与の検討から、T 型カルシウムチャネル阻害薬の dnNRSF-Tg 突然死抑制効果の機序には、心室筋にお いて発現亢進した T 型カルシウムチャネルを直接抑制する効果に加え、神経細胞など に発現する T 型カルシウムチャネルを抑制することによる、自律神経バランスの改善、 すなわち dnNRSF-Tg において認められる交感神経の活性亢進と副交感神経の活性低 下を正常化する機序、が関与していることを見出した<sup>3</sup>。そこでこの自律神経バラン ス変化がどの程度 dnNRSF-Tg における不整脈・突然死発症に関与しているかを更に 検討するべく、心筋にほとんど発現しておらず、交感神経終末等に発現し、交感神経 活性制御に関与することが知られる N 型カルシウムチャネルを阻害し、dnNRSF-Tg に対する効果を検討した。N および L 型カルシウムチャネル阻害薬であるシルニジピ ンと L 型カルシウムチャネル阻害薬であるニトレンジピンをそれぞれ、血圧に対して は同程度かつ最小の影響しか及ぼさない量で dnNRSF-Tg に混餌投与したところ、シ ルニジピン投与群でのみ不整脈発生が減少し、dnNRSF-Tg の生存率が改善した(Figure 3)。さらに N 型カルシウムチャネルノックアウトマウスと dnNRSF-Tg とを交配し、 dnNRSF-Tg; N型カルシウムチャ ネルヘテロノックアウトマウス を作製したところ、dnNRSF-Tg と比較して、やはり、突然死が減 少した。阻害薬投与、ヘテロノッ クアウトマウス共に、dnNRSF-Tg において認められる活性化した 交感神経の抑制、低下した副交感 神経の回復がみられており、この ような自律神経バランスの改善



が、致死性不整脈の引き金となる交感神経刺激を抑制し、突然死を抑制するものと考 えられ、交感神経系と副交感神経系の活性バランスの突然死発症に対する重要性が示 されたと同時に、それを修飾する N型カルシウムチャネルの治療標的としての意義が 示唆された。

# c. dnNRSF-Tg での心不全、致死性不整脈発症におけるレニンーアンジオテンシン系の関与の検討

上記研究により dnNRSF-Tg の致死性不整脈発症における、胎児型イオンチャネル(T 型カルシウムチャネルおよび HCN チャネル)再誘導の関与と、交感神経活性化の関 与を明らかにしたが、心不全およびそれに伴う突然死に関与することが一般的に知ら れる、レニンーアンジオテンシン系の役割は不明であった。そこで dnNRSF-Tg の心 不全・突然死発症におけるレニンーアンジオテンシンの役割に関して、レニン阻害薬 を用いて検討した。まず dnNRSF-Tg の心室において ACE 遺伝子が発現亢進している ことを確認した。WT マウスでは有意に血圧を低下させるが、血圧が低下している dnNRSF-Tg の血圧には最小限の影響しか示さない量のレニン阻害薬を dnNRSF-Tg に 投与したところ、dnNRSF-Tg で認める心機能低下が抑制され、マウスの死亡率が劇的



Figure 4. レニン阻害薬はdnNRSF-Tgの線維化を抑制し催不整脈源性を抑制する。 A. Masson trichrome染色による組織像。B. 線維化面積。WT:野生型マウス、Tg:dnNRSF-Tg。 に改善した。またレニン阻害薬群では dnNRSF-Tg で認める心拡大、心線維 化も著明に抑制されていた(Figure 4)。 さらに不整脈の発生に関し電極カテ ーテルによる不整脈誘発テストを行 ったところ、不整脈の誘発が有意に抑 制された。以上の結果からレニンーア ンジオテンシン系阻害は、心筋の催不 整脈源性気基質の形成に係る心筋リ モデリング、心線維化を抑制すること で催不整脈性を改善させ、不整脈を現 象させていることが示唆された。dnNRSF-Tgにおいて二次的に活性化するレニンーア ンジオテンシン系がその病態進行に大きな影響を及ぼしていることが示され、心不全 に対するレニンーアンジオテンシン系阻害の作用機序の一端が示された。

#### d. NRSF conditional knockout mice の作製と解析

上記研究はいずれも NRSF の機能を心筋細胞においいて阻害した dnNRSF-Tg を用い て行ってきたが、異常な蛋白質を心筋に過剰発現することによる非特異的反応の関与 を除外することは困難であった。そこで、こうした限界を乗り越えるために、Cre-loxp システムを用いて、心筋細胞において特異的に NRSF を欠失する、NRSF 心筋特異的 ノックアウトマウスを作製した。NRSF 遺伝子の翻訳開始点を含む exon 領域を loxp シークエンスで挟んだ NRSF flox マウスの作製に成功し、心筋細胞特異的に Cre リコ ンビナーゼを発現するαMHC-Cre-Tg と交配した。NRSF<sup>flox/flox</sup>; αMHC-Cre-Tg はメンデ ル比に則り、外見は明らかな異常なく生まれるが、生後徐々に心機能低下を示し、生 後 10 週前後でそのほとんどが死亡した(Figure 5)。埋め込み型心電図モニターにて dnNRSF-Tg と同様、心室性頻拍が頻回にみとめられ、致死性不整脈による突然死が死 因であると考えられた。また dnNRSF-Tg においてみられる T 型カルシウムチャネル や HCN チャネルの発現亢進も同様に認められた。これらのことから、少なくとも生 後の心筋の機能維持には NRSF が必須であることが明らかとなった。さらに、 NRSF<sup>flox/flox</sup>; αMHC-Cre-Tg マウスは胎生期から心筋特異的に NRSF を欠失することか ら、現在 NRSF<sup>flox/flox</sup>; αMHC-MerCreMer-Tg を作製し、タモキシフェン投与により薬 剤誘導性に任意の時期に心筋特異的に NRSF を deletion 可能なマウスを作製し、生後 の様々な時期での心筋細胞機能維持における NRSF の意義を明らかにするべく、その 解析を開始したところである。

また NRSF はヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)1/2 と complex を形成していること が知られており、私どもも心筋細胞において NRSF が HDAC1/2 と複合体を形成する ことを報告した<sup>1</sup>。HDAC1/2 の心筋特異的ダブルノックアウトマウスは NRSF 心筋特 異的ノックアウトマウスと類似の表現形を示す<sup>5</sup>。そこで NRSF-HDAC1/2 complex の 心筋における意義をさらに明らかにす

る た め 、 現 在 NRSF<sup>flox/+</sup>; HDAC1<sup>flox/+</sup>;HDAC2<sup>flox/+</sup>;αMH C-Cre-Tg マウスを作製し、心筋におい て NRSF.HDAC1,HDAC2 をそれぞれ partial に欠失した場合の影響の検討に 着手している。今後これらマウスを用い て心筋におけるエピゲノムマーカー解 析などを行っていく予定である。



Figure 5. 心筋特異的NRSFノックアウトマウスは生後突然死する。

2、Rho 依存性転写活性化因子 MRTF-A の病的心筋リモデリングにおける役割の解析とその治療標的としての意義の検討

近年平滑筋、骨格筋、心筋など種々の筋肉細胞において、転写因子 Serum response factor (SRF)がその標的遺伝子である細胞骨格関連蛋白質や immediate early gene、さら には micro RNA などの発現制御を介して、心筋を含むこれら細胞の発生、分化、増殖 および病的リモデリングに重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。また SRF の活性を制御する転写共役因子が複数発見され、SRF 活性制御機構の一端が明らかと なってきている。中でも myocardin family に属する myocardin や myocardin-related transcriptional factor (MRTF)-A,-B は直接的に SRF と結合し転写活性を強力に亢進させる SRF のパートナー分子である。申請者はアクチン重合の促進が Rho 依存性に MRTF-A の核内移行を促進し SRF を活性化させることを報告し<sup>6</sup>、さらにこの分子機構が心筋の病的リモデリングにも関与している可能性を見出した。以上より本助成研究では病的心筋リモデリングにおける Rho-MRTF-A 経路の役割の詳細を検討した。

MRTF-A は非刺激下では free のアクチンと結合しているが、Rho 活性化とそれに伴 うアクチン重合化が起こるとアクチンから外れて核内に移行して SRF を活性化する。 心筋肥大に関与し、心筋細胞において Rho を活性化することが知られる機械的進展刺 激や、エンドセリンー1、アンジオテンシンIIによる液性因子刺激は MRTF-A の核内 移行を促進し、SRF 依存性転写活性を亢進させた(Figure 6)。アンジオテンシンII 慢性 投与や圧負荷による心筋肥大および ANP、BNP 遺伝子発現亢進が MRTF-A ノックア ウト(KO)マウスでは有意に減弱しており、心筋肥大における MRTF-A-SRF 経路の重 要性が示された<sup>7</sup>。



Figure 6. 培養心筋細胞において機械的伸展刺激、エンドセリンー1(ET-1)刺激、 アンジオテンシンII(AngII)刺激はMRTF-Aの核内移行を促進する。 A,伸展刺激によるRho活性化。B,FLAG-MRTF-Aをアデノウイルスを用いて心筋細胞に 過剰発現したFLAG-MRTF-Aの進展刺激による核内移行。C,ET-1,AngIIによる FLAG-MRTF-Aの核内移行。文献7より改変引用。 ANP は SRF 結合部位を 2 か所 その遺伝子の 5'隣接領域に有す るが、BNP には SRF の結合サイ トが同定されていなかった。そこ で、MRTF-A による BNP 遺伝子 発現制御が直接的なものである か、間接的なものであるかを検討 したところ、BNP 遺伝子の 5'隣 接領域に MRTF-A-SRF 経路によ り直接活性化される標的部位を 同定し、そこに SRF が結合しう ることを確認した。これらのこと から、BNP もまた ANP と同様 明こかとなった<sup>7</sup>

MRTF-A-SRF 経路の直接的な下流標的であることが明らかとなった<sup>7</sup>。

今後、最近見出された MRTF-A 依存性転写の特異的阻害剤を用いて、心肥大および 心不全各マウスモデルに対するその治療的効果を検討する予定である。 3、病的心筋リモデリングにおける TRPC6/3 イオンチャネルを介したシグナルクロ ストークとその新規治療標的としての意義の解明

私どもの研究室では、受容体活性化型カルシウムチャネルである TRPC6 および 3 イオンチャンネルの活性化が、受容体刺激に引き続く Calcineurin-NFAT 経路の活性化 に関与し、病的心肥大や心不全発症に係る心筋リモデリングに重要な役割を果たすこ とを示した<sup>8</sup>。さらに、この経路を ANP/BNP-Ganylyl Cyclase-A(GC-A)-cGMP-Protein kinase G (PKG) 経路が直接的な TRPC6 のリン酸化を介して抑制的に制御することも 見出している<sup>9</sup>。

これらのことから TRPC が新規心肥大、心不全の治療標的となる可能性が示唆される。そこで本助成研究において我々は TRPC 阻害薬の心肥大や心不全モデルに対する効果を検討した。

a. 心 肥 大 抑 制 に 対 す る TRPC3/6 チャネル阻害の意義 の検討

TRPC3,6 共に ANP, BNP の共通 の受容体である GC-A のノック アウトマウスの心室において 発現が有意に亢進していた。そ こで、pan-TRPC 阻害薬である BTP2 を混餌にて心肥大モデル マウスである GC-A ノックアウ トマウスに投与したところ、

BTP2 は血圧や心拍数には影響を与えなかったが、GC-A ノッ



Figure 7. TRPC阻害薬BTP2はGC-Aノックアウトマウスにおける心肥大、線維化を抑制する。 A, GC-Aノックアウトマウス心室におけるTRPC6の発現亢進。B, 心体重比。 C, 組織像。Masson trichrome染色。WT:野生型マウス、KO:GC-Aノックアウトマウス。 \*p<0.05 vs WT、#p<0.05 vs. KO without BTP2。文献9より改変引用。

クアウトマウスにおける心肥大および心線維化を抑制し(Figure 7)、心肥大マーカーで ある ANP, BNP 遺伝子の発現亢進を有意に抑制した。また BTP2 はアンジオテンシン II 慢性投与によるマウス心肥大も血圧に影響せずに有意に抑制した。これらのことか らより TRPC6/3 に対する選択的阻害が心肥大に対し有効である可能性が示唆された <sup>9</sup>。そこで最近見出され、TRPC3 に特異的な阻害薬で、TRPC6/3 複合体の活性も抑制 しうる、Pyr3 をアンジオテンシン II 慢性投与マウスに投与したところ、BTP2 よりも より低用量で強力に心肥大を血圧非依存性に抑制した。以上のことから TRPC6/3 選択 的阻害薬が新規心臓病治療法となりうる可能性が示唆された。

#### b. 肺高血圧による右心肥大における TRPC3/6 チャネルの役割の検討

TRPC6 は最近肺高血圧の発症に大きな果たすことが示唆されている。そこで、我々は モノクロタリンピロール投与によるマウス肺高血圧モデルを作製し、TRPC の発現を 見たところ、肺高血圧モデルマウスの肺組織において TRPC6 の発現が有意に亢進し ており、また TRPC3 の発現も認められた。そこで上記 TRPC3 特異的阻害薬 Pyr3 を この肺高血圧モデルマウスに投与したところ、右室圧の有意な低下を認めた。またモ ノクロタリン投与による肺高血圧モデルラットにも同様に Pyr3 を投与したところ、 やはり右室圧の低下と右室肥大の軽減を認めた。現在ヒト肺高血圧患者由来肺動脈血 管平滑筋の増殖に対する Pyr3 の効果を検討中である。本結果は TRPC6/3 阻害薬が新 たな肺高血圧症治療薬となりうる可能性を示唆している。

# c. 心不全・突然死発症に対する新規治療法としての TRPC3/6 チャネル阻害の意義の検討

TRPC6/3 阻害が、心肥大のみならず、心不全発症あるいはその進展を抑制する効果が あるかどうかをさらに検討する目的にて、現在、拡張型心筋症・突然死モデルマウス である dnNRSF-Tg に Pyr3 を投与中である。Preliminary な結果では Pyr3 が dnNRSF-Tg の心機能障害を改善し、死亡率を改善する結果を得ている。今後更に解析を継続して いく予定である。

# 4、心筋老化、拡張不全における p300-PGC-1 ミトコンドリア遺伝子発現調節経路の 治療標的としての意義の解明

最近我々は転写活性化に関与するヒストンアセチル化酵素(HAT)p300の機能を心筋 細胞特異的に阻害したマウス(dnp300 Tg)を作成したが、このマウスはうっ血性心不全 により死に至る表現形質を示した<sup>10</sup>。このマウスでは心筋収縮能低下も認めたがそれ 以上に著明な拡張能の低下を認め、一部のマウスでは心房細動を発症していた。この マウスにおいて心筋ミトコンドリアの形態異常および機能低下を認め、ミトコンドリ ア遺伝子のマスターレギュレーターである PGC-1αをはじめ複数のミトコンドリア遺 伝子の発現低下を認めた。p300 は PGC-1αの co-activator であることから、我々は p300 阻害による PGC-1α発現、および機能低下が最終的にミトコンドリア機能低下を引き 起こし、心筋拡張機能低下、心不全発症の原因となるものと考えた。これらのことか ら、ヒト老化に伴う心筋拡張不全進行の分子機序のひとつにこのミトコンドリア関連 遺伝子発現調節経路(核-ミトコンドリア連関)の機能変化を介したミトコンドリア機 能異常が関与している可能性を考えている。実際、高齢マウスでは若年齢のマウスに 比べ PGC-1α遺伝子発現が低下していることを見出している(未発表データ)。

また、ミトコンドリア機能異常が心機能異常を引き起こす一つの機序として、ROS 産生増加を介して、酸化ストレス応答性のカルシウムチャネルである TRPM2 が活性 化し、下流の病的シグナル伝達経路を活性化する機序を想定しており、現在 TRPM2 ノックアウトマウスを用いてその仮説を検証中である。

さらに最近、ミトコンドリアにおけるエネルギー、脂肪酸代謝経路に係る酵素がア セチル化されていることが明らかとなり、リジン残基のアセチル化を介したこれら酵 素の活性制御機構の役割が注目されている<sup>11</sup>。これら酵素の脱アセチル化には Sirt family 分子が関与していることが示されているが、アセチル化に関与する分子はまだ 明らかでない。私どもの研究室ではミトコンドリア代謝調節酵素のリジンアセチル化 に関与する分子として p300 もその候補ととらえており、dnp300 マウスを用いたメタ ボローム解析やミトコンドリア代謝調節酵素のアセチル化解析を今後行っていく予 定である。

#### <u> 結語</u>

HDAC-NRSF経路、Rho-MRTF-A-SRF経路、TRPC6-calcineurin-NFAT経路、p300-PGC1 経路を中心とした検討の中から、新規治療標的の探索を行い、新規心不全治療薬開発 の基盤形成を目指した研究を行った。今後、さらに研究を推進する中で、新規心不全 治療法の開発を目指したい。

#### 

- Kuwahara K, Saito Y, Ogawa E, Takahashi N, Nakagawa Y, Naruse Y, Harada M, Hamanaka I, Izumi T, Miyamoto Y, Kishimoto I, Kawakami R, Nakanishi M, Mori N, Nakao K. The neuron-restrictive silencer element-neuron-restrictive silencer factor system regulates basal and endothelin 1-inducible atrial natriuretic peptide gene expression in ventricular myocytes. *Mol Cell Biol.* 2001;21:2085-2097
- Kuwahara K, Saito Y, Takano M, Arai Y, Yasuno S, Nakagawa Y, Takahashi N, Adachi Y, Takemura G, Horie M, Miyamoto Y, Morisaki T, Kuratomi S, Noma A, Fujiwara H, Yoshimasa Y, Kinoshita H, Kawakami R, Kishimoto I, Nakanishi M, Usami S, Harada M, Nakao K. Nrsf regulates the fetal cardiac gene program and maintains normal cardiac structure and function. *EMBO J.* 2003;22:6310-6321
- 3. Kinoshita H, Kuwahara K, Takano M, Arai Y, Kuwabara Y, Yasuno S, Nakagawa Y, Nakanishi M, Harada M, Fujiwara M, Murakami M, Ueshima K, Nakao K. T-type ca2+ channel blockade prevents sudden death in mice with heart failure. *Circulation*. 2009;120:743-752
- 4. Stillitano F, Lonardo G, Zicha S, Varro A, Cerbai E, Mugelli A, Nattel S. Molecular basis of funny current (if) in normal and failing human heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;45:289-299
- Montgomery RL, Davis CA, Potthoff MJ, Haberland M, Fielitz J, Qi X, Hill JA, Richardson JA, Olson EN. Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility. *Genes Dev.* 2007;21:1790-1802
- 6. Kuwahara K, Barrientos T, Pipes GC, Li S, Olson EN. Muscle-specific signaling

mechanism that links actin dynamics to serum response factor. *Mol Cell Biol*. 2005;25:3173-3181

- 7. Kuwahara K, Kinoshita H, Kuwabara Y, Nakagawa Y, Usami S, Minami T, Yamada Y, Fujiwara M, Nakao K. Myocardin-related transcription factor a is a common mediator of mechanical stress- and neurohumoral stimulation-induced cardiac hypertrophic signaling leading to activation of brain natriuretic peptide gene expression. *Mol Cell Biol.* 2010;30:4134-4148
- Kuwahara K, Wang Y, McAnally J, Richardson JA, Bassel-Duby R, Hill JA, Olson EN. Trpc6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. J Clin Invest. 2006;116:3114-3126
- 9. Kinoshita H, Kuwahara K, Nishida M, Jian Z, Rong X, Kiyonaka S, Kuwabara Y, Kurose H, Inoue R, Mori Y, Li Y, Nakagawa Y, Usami S, Fujiwara M, Yamada Y, Minami T, Ueshima K, Nakao K. Inhibition of trpc6 channel activity contributes to the antihypertrophic effects of natriuretic peptides-guanylyl cyclase-a signaling in the heart. *Circ Res.* 2010;106:1849-1860
- Nakagawa Y, Kuwahara K, Takemura G, Akao M, Kato M, Arai Y, Takano M, Harada M, Murakami M, Nakanishi M, Usami S, Yasuno S, Kinoshita H, Fujiwara M, Ueshima K, Nakao K. P300 plays a critical role in maintaining cardiac mitochondrial function and cell survival in postnatal hearts. *Circ Res.* 2009;105:746-754
- Hirschey MD, Shimazu T, Goetzman E, Jing E, Schwer B, Lombard DB, Grueter CA, Harris C, Biddinger S, Ilkayeva OR, Stevens RD, Li Y, Saha AK, Ruderman NB, Bain JR, Newgard CB, Farese RV, Jr., Alt FW, Kahn CR, Verdin E. Sirt3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature*. 2010;464:121-125