(第33回) 公益財団法人 篷庵社 研究助成発表会

講演要旨集

平成 26 年 7 月 15 日 (火)

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26年7月15日(火)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

※所属は講演当時のもの

13:00-13:05	ご挨拶 公益財団法人篷庵社 理事長 武田 禮二	
	演題および演者(講演25分、討論15分)	座 長
13:05-13:45	 新規7員環構築反応の開発とその応用 斎藤 慎一 先生 (東京理科大学理学部 第一部化学科) 	(篷庵社理事) 首藤 紘一 先生
13:45-14:25	 2. 触媒メカニズムに基づいた ヒストン脱メチル化酵素阻害薬の創製 鈴木 孝禎 先生 (京都府立医科大学大学院医学研究科 医薬品化学) 	(篷庵社評議員) 大和田 智彦 先生
14:25-15:05	 3.赤外円二色性スペクトルによる分子キラル分析法の開発 門出 健次 先生 (北海道大学大学院 先端生命科学研究院) 	(篷庵社評議員) 西村 紳一郎 先生
15:05-15:20	休 憩	
15:20-16:00	 4.マスト細胞からのヒスタミン放出機構の解明 平嶋 尚英 先生 (名古屋市立大学大学院薬学研究科 生体超分子システム解析学分野) 	(篷庵社理事) 桐野 豊 先生
16:00-16:40	 5. 人工血管内腔狭窄機序の解明とキマーゼ阻害薬による 狭窄予防 金 徳男 先生 (大阪医科大学 薬理学教室) 	(篷庵社理事) 宮崎 瑞夫 先生
16:40-17:20	 6.《特別研究助成》 慢性骨髄性白血病の病態形成における骨髄微小環境誘導性 分子制御の解明と治療応用 黒田 純也 先生 (京都府立医科大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学) 	(シオノギ製薬㈱ フロンティア医薬研究所) 田中 秀和 氏

目 次

1. 斎藤 慎一

「新規7員環構築反応の開発とその応用」

2. 鈴木 孝禎

「触媒メカニズムに基づいたヒストン脱メチル化酵素阻害薬の創製」

10

1

3. 門出 健次

「赤外円二色性スペクトルによる分子キラル分析法の開発」

20

4. 平嶋 尚英

「マスト細胞からのヒスタミン放出機構の解明」

30

5. 金 徳男

「人工血管内腔狭窄機序の解明とキマーゼ阻害薬による狭窄予防」

40

6. 黒田 純也

「慢性骨髄性白血病の病態形成における

骨髄微小環境誘導性分子制御の解明と治療応用」

49

新規7員環構築反応の開発とその応用

東京理科大学 理学部化学科 斎藤 慎一

1. はじめに

7-9員環骨格をもつ化合物(中員環化合物)は天然物において比較的頻繁にあらわれる骨格 であり、またユニークな生物活性を有するものも数多く知られている。こうした化合物は様々 な手法により合成されているが、短工程でこうした骨格を効率よく合成するのは困難である。

遷移金属触媒を用いる環化付加反応は、環構造を構築する有力な合成法であり、5-6員環 化合物を合成する手法は数多く知られているのに対し、中員環化合物を合成する反応は限ら れている。我々は電子欠乏性不飽和炭化水素のユニークな反応性に着目し、検討を進めた結 果有用なクロスカップリング反応を開発することに成功した。¹すなわち、ニッケル触媒存在 下、メチレンシクロプロパン1 (以下EPCAと略す)とアルキンとの間で[3+2+2] 型反応、すなわち7員環構築反応が進行することを見いだした。この反応は高選択的に進行 し、2 のような位置異性体が高収率にて得られた(式1)。さらに化合物1と異なる2種類 のアルキンの反応についても検討を行ったところ、適切な置換基を導入することにより3成 分間での付加反応が進行し、3 のような7員環化合物が高選択的に得られた(式2)。² 以上のことを踏まえ本研究ではメチレンシクロプロパンやアジリジンをはじめとする小員環 化合物を出発原料として用い、7-9員環化合物の新規合成法を開発すると共にその応用につ いても検討した。



2. ニッケル触媒を用いる [3+2+2] 型反応

2-1. ヘテロ原子が結合したアルキンを用いた7員環構築反応³

7員環構築反応においてヘテロ原子が結合したアルキンを出発原料として用いることにより、 ヘテロ原子で置換された7員環化合物が合成できると考えられる。実際に検討を行ったとこ ろ酸素、あるいは窒素原子で置換された7員環化合物が合成できることを明らかにした(式 3)。また、酸素原子で置換された7員環化合物にはビニルエーテル構造が含まれるため、加 水分解を行うことによりシクロペンタノン誘導体を得ることができた(式4)。



2-2.シクロブタン誘導体を用いた7員環構築反応4

ビフェニレンはひずんだ化合物であり、4員環を構成する炭素-炭素結合に対してニッケルを はじめとする金属が挿入し、5員環メタラサイクルが生成することが知られている。5そこで、 このようなメタラサイクルに対し、ECPAを作用させることにより挿入-転位反応が進行し、 7員環化合物が得られることが期待される。実際に検討を行った結果、ニッケル触媒の存在 下でビフェニレンとECPAが反応し、目的とする7員環化合物が得られることを明らかに した(式5)。また、ビフェニレンのかわりにベンゾシラシクロブテンを用いても同様の反応 が進行し、ケイ素原子が環構造に導入された7員環化合物が得られることがわかった(式6)。 また、この反応においては適切なリン配位子を選択することにより若干の収率向上が見られ た。



3. ニッケル触媒を用いる [4+3+2] 型反応

3-1. ジェンインとECPAとの反応による9員環構築反応⁶

ジェンインは遷移金属に対する反応性が高い基質であり、7員環メタラサイクルが生成した 後にアルキンなどの不飽和炭化水素、あるいは一酸化炭素などと反応し7-8員環化合物を与 えることが知られている。⁷こうした知見を踏まえ、ニッケル触媒の存在下でジェンインとE CPAを反応させたところ9員環化合物が得られることを見いだした(式7、図1)。環化付 加反応による9員環構築反応の例は非常に限られていることから、本研究は9員環化合物を 効率的に得る有用な方法である。



Figure 1. X-ray Structure of a Cyclononadiene Derivative.

3-2. 単環性9員環化合物の合成⁸

3-1.に記した反応を3成分反応へと展開することにより単環性の9員環化合物が得られる と期待し、検討を行ったが9員環化合物を得ることはできなかった。そこでジェンインの構 造に容易に開裂可能な官能基を導入し、9員環構築反応を行った後に環開裂反応を行うこと により単環性の9員環化合物が得られるのではないかと考えた。実際に容易に開裂可能なN-O結合が含まれるジェンインを合成し、9員環を構築した後に環開裂反応を行ったところ、 単環性9員環化合物が得られた(式8)。興味深いことに環開裂反応に用いる還元剤を変更す ることにより、同じ9員環化合物から選択的に2つの単環性化合物を合成することに成功し た。



4. 環拡大反応を利用した含窒素中員環化合物の合成

4-1. 環状ウレアの合成⁹

アジリジンやアゼチジンなどの3-4員環化合物はメチレンシクロプロパンと同様、大きなひ ずみを有する化合物であり含窒素化合物を合成する際の有用な出発原料であることが知られ ている。3. で得られた知見を踏まえ、これらの含窒素化合物も同様の反応性を示すのでは ないかと期待し種々検討を進めた。その結果ビニルアゼチジンやビニルアジリジンがトシル イソシアナートなどの電子欠乏性不飽和炭化水素と反応し、中員環構築反応が進行すること を偶然見いだした。意外なことに本反応は遷移金属触媒を用いることなく進行し、対応する 環状ウレアが高収率にて得られた(式10-11)。



本反応はアゼチジン部位の求核付加反応による双性イオンの生成、それに引き続くアザクラ イゼン型の転位反応により進行するものと考えられる(式12)。



4-2. ベンズアゾシン誘導体の合成¹⁰

4-1.の結果より、ビニルアゼチジンに反応性の高い不飽和化合物を反応させることにより アザクライゼン転位反応を経由する環拡大反応が進行することが期待される。そこでビニル アゼチジンに対してベンザインを反応させたところ、環拡大を伴うアザクライゼン転位が進 行し、ベンズアゾシン誘導体が生成した(式13)。



本反応の中間体は式13に記したようなアンモニウム塩であることが推測される。同様な構造を持ったアンモニウム塩はN-アリールビニルアゼチジンをプロトン化することによっても生成するはずである。そこでN-アリールビニルアゼチジンに酸を作用させたところ予想通

りアザクライゼン転位が進行し、対応するベンズアゾシンが得られた(式14)。意外なこと に得られたベンズアゾシンは不安定であり、再結晶以外の方法では精製することができなか った。このベンズアゾシンは容易にビニルキノリンへと異性化する(式15、図2)。N-上 に置換基の存在するベンズアゾシン、あるいは二重結合が環構造に含まれないベンズアゾシ ンは安定な化合物として存在することから、この異性化反応には二つの官能基の寄与が示唆 された。



Figure 2. X-ray Structures of a Benzazocine and a Vinylquinoline.

この反応について精査した結果、本反応はイミニウムイオンを経由するアザクライゼン転位 により進行しているものと推察した。すなわち、ベンズアゾシンの分解などにより生じたホ ルムアルデヒド等価体がベンズアゾシンと反応し、イミニウムイオンが生ずる。このイミニ ウムイオンを出発原料とする[3,3]転位反応が進行し、対応するビニルキノリンが得ら れる(Scheme 1)。この反応においてはまず他の分子からメチレン(CH₂)を取り込み、その 後メチレンが脱離する、ということになる。メチレンは触媒のように作用し、分子間を移動 してゆく。



本反応におけるホルムアルデヒド等価体の関与は、反応系にホルムアルデヒドを添加するこ とにより反応が劇的に加速することによっても支持される(式16)。また、メチレンが入れ かわることは標識されたホルムアルデヒドを反応に用いることにより確認できた(式17)。 これら一連の反応は温和な条件下で複数の炭素-炭素結合の選択的な開裂、形成を伴う非常に 興味深い反応である。





5. おわりに

高いひずみを持った小員環化合物は比較的容易に合成できる、魅力的な反応剤である。例え ばECPAはニッケル触媒の存在下でさまざまな不飽和炭化水素と反応し、環の開裂を伴う 付加体を与える。一方、ビニルアゼチジンやビニルアジリジンはクライゼン型の転位反応に より、環拡大を伴う付加反応、あるいは異っs6408性化反応が進行する。これらの反応 においては多くの場合、7員環化合物-9員環化合物(中員環化合物)が生成する。現在得ら れた化合物の生物活性に関する検討、あるいはさまざまな生物活性化合物の合成といった応 用を進めている。

謝辞

本研究の一部は公益財団法人蓬庵社の研究助成を受けて行われたものであり、ここに篤く御礼申し上げます。また、共同研究者の方々に深く感謝いたします。

参考文献

- Saito, S.; Masuda, M.; Komagawa, S. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 10540-10541. Saito, S.;
 Komagawa, S.; Azumaya, I.; Masuda, M. J. Org. Chem. 2007, 72, 9114-9120.
- Komagawa, S.; Saito, S. Angew. Chem. Int. Ed. 2006, 45, 2446-2449. Komagawa, S.;
 Takeuchi, K.; Sotome, I.; Azumaya, I.; Masu, H.; Yamasaki, R.; Saito, S. J. Org. Chem. 2009, 74, 3323-3329.
- Yamasaki, R.; Terashima, N.; Sotome, I.; Komagawa, S.; Saito, S. J. Org. Chem. 2010, 75, 480-483.
- 4) Saito, S.; Yoshizawa, T.; Ishigami, S.; Yamasaki, R. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 6028-6030.
- 5) Schaub, T.; Backes, M.; Radius, U. *Organometallics* **2006**, *25*, 4196-4206.
- Saito, S.; Maeda, K.; Yamasaki, R.; Kitamura, T.; Nakagawa, M.; Kato, K.; Azumaya, I.;
 Masu, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, *49*, 1830-1833. Yamasaki, R.; Ohashi, M.; Maeda, K.;
 Kitamura, T.; Nakagawa, M.; Kato, K.; Fujita, T.; Kamura, R.; Kinoshita, K.; Masu, H.;
 Azumaya, I.; Ogoshi, S.; Saito, S. *Chem. Eur. J.* 2013, *19*, 3415-3425.

- Ni, Y.; Montgomery, J. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 11162-11163. Ni, Y.; Montgomery, J. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 2609-2614.
- 8) Yamasaki, R.; Kato, K.; Hanitani, D.; Mutoh, Y.; Saito, S. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 3507-3509.
- 9) Koya, S.; Yamanoi, K.; Yamasaki, R.; Azumaya, I.; Masu, H.; Saito, S. Org. Lett. 2009, 11, 5438-5441. Kanno, E.; Yamanoi, K.; Koya, S.; Azumaya, I.; Masu, H.; Yamasaki, R.; Saito, S. J. Org. Chem. 2012, 77, 2142-2148.
- Aoki, T.; Koya, S.; Yamasaki, R.; Saito, S. *Org. Lett.* 2012, *14*, 4506-4509. Shimizu, T.; Koya,
 S.; Yamasaki, R.; Mutoh, Y.; Azumaya, I.; Katagiri, K.; Saito, S. *J. Org. Chem.* 2014, *79*, 4367-4377.

触媒メカニズムに基づいたヒストン脱メチル化酵素阻害薬の創製

京都府立医科大学院医学研究科 医薬品化学 鈴木 孝禎

1. はじめに

DNA の塩基配列に依存せず遺伝子の発現を制御する機構は、エピジェネティクス と呼ばれている。これまでに、シトシンのメチル化やヒストンリシン残基のアセチル 化、メチル化などが重要なエピジェネティクス機構の一つであることが明らかにされ てきた。また、エピジェネティックな異常は、がんなどの疾病に関与することも報告 されている。したがって、エピジェネティクスをコントロールする化合物は、エピジ ェネティクス研究のためのツールとして利用することも出来るし、抗がん剤などの治 療薬として応用することも期待できる¹⁾。このような背景のもと、我々の研究グルー プでは、エピジェネティクスのケミカルコントロールを行う小分子化合物の創製研究 を行っている。本研究では、エピジェネティクスを制御する重要な酵素の一つである ヒストン脱メチル化酵素をターゲットとし、触媒メカニズムに基づいたリシン特異的 脱メチル化酵素1(LSD1)阻害薬の創製研究を行った。

2. リシン特異的脱メチル化酵素 1(LSD1)阻害薬

リシン特異的脱メチル化酵素1(LSD1)は、FAD 依存的にヒストンH3の4番目の リシン残基(H3K4)のモノメチル体とジメチル体を脱メチル化し、遺伝子の転写活性 を制御することが知られている²⁾。これまでに、LSD1 が前立腺がん細胞や神経芽腫 細胞、白血病細胞の増殖に関与していることが報告されており³⁻⁵⁾、また、LSD1 がα-ヘルペスウイルスの増殖に関与していることが示唆されている⁹⁾。さらに、人工多能 性幹細胞(iPS 細胞)では H3K4 が高度にメチル化されていることが分かっており、 LSD1 阻害薬は iPS 細胞の作製効率の向上に寄与することが期待されている⁷⁾。した がって、LSD1 阻害薬は、LSD1 の機能を調べるためのバイオプローブとして、また、 がんをはじめとする種々の疾患に対する新たな作用機序の治療薬として期待されて いる⁸⁾。しかし、既知の LSD1 阻害薬の多くは、モノアミンオキシダーゼ(MAO)や ポリアミンオキシダーゼ(PAO)も阻害してしまったり、細胞膜を通過しないといっ た問題があり、本研究を開始する以前には、細胞系で利用できる LSD1 選択的阻害薬 は報告されていなかった。そこで本研究では、細胞系や動物実験系でも利用可能な LSD1 選択的阻害薬の創製を目的とした。

3. LSD1 阻害薬 NCL1 の創製研究^{9,10)}

触媒メカニズムに基づいた酵素阻害薬とは、標的酵素による触媒作用を受けてはじ めて活性化され、酵素の活性中心に存在するアミノ酸残基あるいは補因子と共有結合 を形成することで、標的酵素を不活性化させる阻害薬である。標的酵素に対して高い 選択性、高い活性が得られやすいのが、触媒メカニズムに基づいた酵素阻害薬の利点 である。本研究では、触媒メカニズムに基づいたヒストン脱メチル化酵素阻害薬の創 製を目指した。

LSD1の活性中心において、基質のメチル化リシンは、FADにより一電子酸化反応 を受けカチオンラジカルを生じる(図1a)。さらにFADにより、もう一電子が引き抜 かれることにより、イミニウムカチオンを生成する。イミニウムカチオン中間体に対 する水分子の付加、引き続いて起こるホルムアルデヒドの脱離により、脱メチル化が 完結する。MAO阻害薬であるフェニルシクロプロピルアミン(PCPA)は、図1bに 示すようにLSD1を阻害すると考えられる。酵素活性部位に到達したPCPAは、基質 のメチル化リシンの場合と同様に、FADにより一電子酸化反応を受け、カチオンラジ カルを生じる。その後、シクロプロパン環開裂を経て、より安定なベンジルラジカル 化学種へと変換される。そのベンジルラジカルは、FADアニオンラジカルと反応し、 FAD-PCPA結合体が生成する。この付加体がLSD1と強固に結合することでLSD1を 不可逆的に阻害する。

a: LSD1による脱メチル化の推定機構



b: PCPA誘導体の期待されるLSD1阻害機構



図 1. (a) LSD1 によるメチル化ヒストンリシン残基の脱メチル化推定機構と(b) PCPA の推定 LSD1 阻害機構

我々は、PCPAのベンゼン環に適切な置換基(図 1bのR基)を導入することで、 MAOを阻害せず、LSD1だけを阻害する化合物を見出すことができると考えた。そこ で、LSD1のX線結晶構造を基にした分子設計により、NCL1(図 2)を設計した。図 2に示すように、NCL1は、LSD1にだけ結合し、小さい活性ポケットをもつMAOA やMAOBには、結合しないことが予想された。



LSD1-NCL1 complex

MAO-B

図 2. NCL1 の構造と LSD1 と NCL1 の推定結合様式

設計したLSD1阻害薬候補化合物NCL1はスキーム1に示す経路で合成した。まず、 3-ヒドロキシクマル酸のカルボキシ基をメチル基で、フェノール性水酸基を MOM 基 で保護した後、Corey-Chaykovsky 反応にて *trans*-シクロプロパン化合物を得た。続い て、メチルエステルの加水分解、Curtius 転位を利用したカルバメート化、Boc 基およ びMOM 基の脱保護にて得られるアミンを再度 Boc で保護することでフェノール中間 体を得た。つぎに、N-Boc ホモセリンとベンジルアミンを縮合させてアミドを得、続 いて、Boc 基を脱保護した後、安息香酸と縮合させることでアルコール中間体へと導 いた。さらに、フェノール中間体とアルコール中間体を光延反応によりカップリング させた後、Boc 基を脱保護することで、目的化合物である NCL1 を得た。

つぎに、合成した NCL1 および PCPA の LSD1 阻害活性、MAO 阻害活性を調べた
 (表 1)。その結果、期待通り、NCL1 は PCPA よりも強く LSD1 を阻害した。さら
 に、NCL1 の MAO 阻害活性は非常に弱く、NCL1 は、PCPA と比較して優れた LSD1
 選択的阻害薬であることが示された。

さらに、LSD1 阻害機構の解析を行った。様々な濃度の阻害剤の存在下、時間に対して酵素反応生成物をプロットした際に、阻害剤が可逆的阻害剤ならば時間–生成物のグラフは直線系となり、阻害剤が不可逆的阻害剤ならば時間–生成物のグラフは非線形上昇カーブを描いた後に頭打ちとなることが知られている¹¹⁾。NCL1を用いた酵



スキーム 1. NCL1 の合成ルート

表1. PCPA と NCL1 の LSD1, MAO 阻害活性

	IC ₅₀ (μM)		selectivity		
compound	LSD1	MAO-A	MAO-B	MAO-A/LSD1	MAO-B/LSD1
РСРА	32	7.3	4.3	0.23(1)	0.13(1)
NCL1	2.5	230	500	92 (400)	200 (1500)

素速度論解析を行ったところ(図3左)、NCL1によってLSD1活性は時間依存的に低下し、NCL1はLSD1を不可逆的に阻害すると考えられた。また、NCL1とLSD1の混合溶液をMALDI-TOF MSで解析したところ、NCL1とFADが共有結合した複合体の分子量と一致するイオンピーク(m/z1228.1)が検出された(図3右)。これらの結果から、NCL1は図1bに示すように、LSD1の補酵素であるFADに共有結合してNCL1-FAD複合体を形成することでLSD1を不可逆的に阻害することが示唆された。

NCL1を用いたさまざまな生物試験により、NCL1は、細胞周期調節因子であるp21 やアポトーシス制御因子であるPUMAの遺伝子発現を上昇させることで、がん細胞増 殖阻害活性を示すことが分かった¹²⁾。さらに、動物実験においても、NCL1は抗がん 作用を示した。また、NCL1は、HIVの転写抑制作用を有することも明らかとなった¹³⁾。

以上の結果から、LSD1選択的阻害剤の抗がん剤、抗ウイルス剤としての有効性が 示された。



図 3. NCL1 存在下における酵素速度論解析(左)と NCL1-LSD1 混合液の MALDI-TOF MS 解析(右)

4. LSD1 阻害薬 NCD38 の創製研究^{14,15)}

我々は、さらに高活性、高選択的な LSD1 阻害薬を見出すために、別のアイデアに 基づいた LSD1 阻害薬の創製研究を行った。

すでに述べたように、非選択的 LSD1 阻害薬である PCPA は LSD1 活性中心中で FAD と共有結合を形成し、LSD1 を不可逆的に阻害する(図 4A)。その際、PCPA の窒素 原子はアンモニア分子として LSD1 活性中心中から放出される。この機構を基に、我々 は「ドラッグデリバリー型標的酵素不活性化薬」という概念に基づき、リシン部分お よび PCPA 部分を有する LSD1 不活性化薬 1 を設計した (図 4B)。メチル化リシンは LSD1 の基質であるため、1 のリシン部分は MAO には認識されず、LSD1 により選択 的かつ効率的に認識されると考えられる。続いて LSD1 活性中心に運び込まれた 1 の PCPA 部分は FAD と付加体を形成し LSD1 を阻害する。その際、1 のリシン部分はイ ミン中間体となり、続く加水分解を受けることで LSD1 活性中心から放出されると予 想される (図 4B)。すなわち、1 のリシン部分は MAO および LSD1 阻害薬である PCPA を LSD1 活性中心に選択的かつ効率的に運び込む「輸送体」として働くと予想された。 この機構により、1 はドラッグデリバリー型の強力な LSD1 選択的不活性化薬となる ことが期待された。

まず、「ドラッグデリバリー型標的酵素不活性化薬」の概念を検証するために、LSD1 の基質である H3 タンパクの N 末端ペプチドを PCPA 輸送体としたペプチド 1a を設 計、合成した(図 5)。1a の生物活性を評価した結果、期待通り、1a は MAO を阻害 せず(IC₅₀ > 100 μ M)、強力に LSD1 を阻害した(IC₅₀ = 0.16 μ M)(図 5)。しかし、1a



図 4. (A) PCPA による LSD1 阻害、(B) 期待した1による LSD1 不活性化機構

はペプチド化合物であることから、LSD1 を高発現する子宮頸がん HeLa 細胞、神経 芽腫 SH-SY5Y 細胞においても、強い細胞増殖阻害活性を示さなかった。 そこで、つ ぎに 1a の低分子化を試みることにした。



図 5. ペプチド 1a の生物活性評価

低分子型 LSD1 不活性化薬の分子設計は、LSD1 の X 線結晶構造 (PDB code 2UXN) ⁷⁾に基づいて行った。LSD1 の活性ポケット付近には、二つの特徴的な疎水性ポケット が存在する (図 6)。その二つの疎水性ポケットに納まり得る置換基として、リシン構 造の C 側にベンジルアミノ基を、N 側にベンゾイル基を持つ低分子化合物 1b を設計、 合成した (図 6)。



図 6. 低分子化合物 1b と LSD1 のドッキングスタディ

化合物 1b の生物活性評価を行ったところ、1b は IC₅₀ で PCPA の 100 倍以上と非常 に高い LSD1 阻害活性を示した。また、HeLa 細胞および SH-SY5Y 細胞に対して比較 的高い増殖阻害活性を示した(表 2)。化合物 1b が細胞系で活性を示したのは、ペプ チド 1a に比べ細胞膜透過性が改善されたためであると考えられる。これらの結果か ら、予想通り、1b のリシン部分が PCPA の生物活性を向上させたので、PCPA の輸送 体として最適な構造を見出すため、また、より高いがん細胞増殖阻害活性を有する LSD1 阻害薬を見出すために、1b のリシン構造の最適化を行った。

Compound	IC ₅₀ (μΜ)	Gle	₅₀ (μΜ)
Compound	LSD1	HeLa	SH-SY5Y
H ₂ N PCPA	31	>500	500
1a	0.16	27	>160
1b	0.30	35	17

表 2. PCPA、ペプチド 1a、化合物 1b の LSD1 阻害活性およびがん細胞増殖阻害活性

1b と LSD1 のドッキングスタディー(図 6)を基に、**1b** の構造最適化を行ったところ、PCPA や NCL1 と比較して高い LSD1 阻害活性、がん細胞増殖阻害活性を示す化合物 **1g** と **1t** (NCD38)を見出した(図 7)。



1g:R=H 1t:R=CI

Compd		R⁵		IC ₅₀ (μΜ)			GI ₅₀ (μΜ)	
			R	LSD1	MAO A	MAO B	HeLa	SH-SY5Y
F	СРА	_	_	31	2.5	2.4	>500	500
I	NCL1		—	2.5	>100	>100	13	27
	1g	н	н	0.48	87	>100	10	3.3
1t	(NCD38) Н	CI	0.59	>100	>100	4.3	2.3

図 7. PCPA、NCL1、化合物 1g と 1t(NCD38)の生物活性評価

つぎに、LSD1 阻害活性およびがん細胞増殖阻害活性の両方で優れた結果を示した 化合物 1g と 1t (NCD38) に対して、これらの化合物が PCPA のドラッグデリバリー 型機構で LSD1 を不活性化しているかを酵素速度論解析、質量分析により調べた。化 合物 1g と 1t (NCD38) の LSD1 不活性化機構が図 4 に示すように不可逆的であるか どうかを調べるため、反応時間に対する生成物の量をプロットしグラフの形を調べた (図 8)。その結果、反応時間-生成物のグラフは非線形のカーブを描いた。この結果は、 LSD1 活性が時間依存的に低下していることを示しており、化合物 1g と 1t (NCD38) が LSD1 を不可逆的に阻害していることが示唆された。



図8. 化合物1gと1t(NCD38)存在下でのLSD1速度論解析



図 9. 化合物 1g、1t(NCD38)と LSD1 の混合物の MALDI-TOF MS 解析(B)

化合物 1g と 1t (NCD38) が図 4 に示す機構で LSD1 を不活性化していれば、化合物のリシン構造に関わらず FAD-PCPA 付加体が生成することが予想される。そこで、この FAD-PCPA 付加体の生成を確認するために、MALDI-TOF MS 解析を行い、 FAD-PCPA 付加体の分子量の検出を試みた。その結果、化合物 1g と 1t (NCD38) と LSD1 をインキュベーションした溶液からは FAD-PCPA 付加体 (*m*/*z* 918) および、そ の脱水体 (*m*/*z* 900) に対応するピークが観測された (図 9)。LSD1 の代わりに FAD を 加えた条件下では FAD-PCPA 付加体に対応するピークは観測されなかった。さらに、 NCD38 と LSD1 をインキュベーションした溶液から、化合物 1g と 1t (NCD38) のリ シン構造に相当するピークも観測された。

以上の酵素速度論解析および質量分析の結果から、化合物 1g と 1t(NCD38)が LSD1 の活性中心に PCPA を送り届けるドラッグデリバリー型の機構(図 4) で LSD1 を阻害していることが強く支持された。

5. おわりに

本研究では、触媒メカニズムに基づくヒストン脱メチル化酵素阻害薬の創製研究を 行い、LSD1 阻害薬として NCL1 と NCD38 を見出した。これらの LSD1 阻害薬を用い たケミカルバイオロジー研究により、さらに詳しいエピジェネティクス機構が解明さ れるとともに、エピジェネティクス制御を基盤とする新薬が誕生することを期待して いる。

謝辞

以上の研究成果は、長浜バイオ大学 水上民夫先生、京都大学 河原真大先生をはじ めとする多くの共同研究者の協力により得られたものであります。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。 また、ご推薦を賜りました東京大学 大和田智彦先生に心より感謝致します。

参考文献

- 1) Itoh, Y.; Suzuki, T.; Miyata, N. Mol. Biosyst. 2013, 9, 873-896.
- Shi, Y.; Lan, F.; Matson, C.; Mulligan, P.; Whetstine, J. R.; Cole, P. A.; Casero, R. A.; Shi, Y. *Cell* 2004, *119*, 941–953.
- Metzger, E.; Wissmann, M.; Yin, N.; Müller, J. M.; Schneider, R.; Peters, A. H.; Günther, T.; Buettner, R.; Schüle, R. *Nature* 2005, *437*, 436–439.
- Schulte, J. H.; Lim, S.; Schramm, A.; Friedrichs, N.; Koster, J.; Versteeg, R.; Ora, I.; Pajtler, K.; Klein-Hitpass, L.; Kuhfittig-Kulle, S.; Metzger, E.; Schule, R.; Eggert, A.; Buettner, R.; Kirfel, J. *Cancer Res.* 2009, *69*, 2065–2071.
- Schenk, T.; Chen, W. C.; Gcllner, S.; Howell, L.; Jin, L.; Hebestreit, K.; Klein, H.-U.; Popescu, A. C.; Burnett, A.; Mills, K.; Casero, R. A. Jr.; Marton, L.; Woster, P.; Minden, M. D.; Dugas, M.; Wang, J. C. Y.; Dick, J. E.; Müller-Tidow, C.; Petrie, K.; Zelent, A. *Nat. Med.* 2012, *18*, 605–611.
- Liang, Y.; Vogel, J. L.; Narayanan, A.; Peng, H.; Kristie, T. M. Nat. Med. 2009, 15, 1312– 1317.
- 7) Miyata, N.; Suzuki, T.; Nakagawa, M. PCT Int. Appl. (2012), WO 2012128343.
- 8) Suzuki, T.; Miyata, N. J. Med. Chem. 2011, 54, 8236-8250.
- Ueda, R.; Suzuki, T.; Mino, K.; Tsumoto, H.; Nakagawa, H.; Hasegawa, M.; Sasaki, R.; Mizukami, T.; Miyata, N. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 17536–17537.
- Ogasawara, D.; Suzuki, T.; Mino, K.; Ueda, R.; Khan, M. N. A.; Matsubara, T.; Koseki, K.; Hasegawa, M.; Sasaki, R.; Nakagawa, H.; Mizukami, T.; Miyata, N. *Bioorg. Med. Chem.* 2011, 19, 3702–3708.
- 11) Copeland, R. A. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, 2nd ed., Wiley-VHC, New York, **2000**.
- 12) Cortez, V.; Mann, M.; Tekmal, S.; Suzuki, T.; Miyata, N.; Rodriguez-Aguayo, C.; Lopez-Berestein, G.; Sood, A. K.; Vadlamudi, R. K.. *Breast Cancer Res.* **2012**, *14*, R108.
- 13) 岡本尚、朝光かおり、宮田直樹、<u>鈴木孝禎</u> 特開 2012--036124
- 14) Ogasawara, D.; Itoh, Y.; Tsumoto, H.; Kakizawa, T.; Mino, K.; Fukuhara, K.; Nakagawa, H.; Hasegawa, M.; Sasaki, R.; Mizukami, T.; Miyata, N.; Suzuki. T. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, *52*, 8620–8624.
- 15) Itoh, Y.; Ogasawara, D.; Ota, Y.; Mizukami, T.; Suzuki, T. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2014**, *9*, e201402002.

赤外円二色性スペクトルによる分子キラル分析法の開発

北海道大学大学院先端生命科学研究院

次世代ポストゲノム研究センター

門出 健次

1. はじめに

生命分子はその認識能の発現するため、必然的にキラルな分子が多数を占めるが、その キラリティーを分析する実用的な方法は意外と少ない。最も代表的な分析法が円二色性ス ペクトルである。円偏光二色性(CD: Circular Dichroism)は、左回り円偏光と右回り円偏 光に対する吸光度の差を波長に対してプロットしたものであり、一般に紫外・可視領域の 光を対象としている。これらの吸収は、電子遷移を基本としているため、紫外・可視部に 吸収を有する化合物群がおもな対象となる。これに対して、VCD(Vibrational Circular Dichroism)は、近年普及し始めた赤外版の円二色性スペクトルのことである。振動円二色 性スペクトルとも訳されるが、私達の研究室では、従来の CD スペクトルとの関連性も含め て、赤外円二色性スペクトルと呼んでいる。一般の円二色性スペクトルが電子遷移を基本 としているのに対して、VCD は振動モードのキラリティーを観測している¹⁾⁻³⁾。そのため、 赤外線吸収をもつキラル有機化合物には適用が可能であり、その応用範囲は極めて広い。 赤外円二色性スペクトルは 1970 年代初頭に最初に観測されたものであるが ⁴⁾⁻⁶⁾、1990 年代 になり米国のベンチャー企業より市販装置が販売され始め、その後、複数のメーカーも市 販装置の開発に成功、大学に一台程度の普及が進み、一般の研究者にとっても身近な研究 ツールとなった。VCD は分子中への紫外・可視発色団の導入の必要がなく、赤外吸収を基 盤としているため、ほとんどすべて光学活性な有機分子に適用可能な新たな光学分析手法 であるといえる。VCD の応用範囲としては、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパ ク質、糖鎖、複合糖質、脂質等の一次代謝に関連した生体物質や、生理活性天然有機化合 物などの二次代謝物、薬物などの生体関連物質のみならず、超分子などの高次構造解析に 用いられているなど、低分子から高分子までの多様な分子の立体化学解析に用いられてい る。

波数 (cm ⁻¹) 5×1	04		104	10 ³
電磁波の種類	紫外	可視	赤	外
引き起こされる遷移	電子励起遷移		分子振	動遷移
対応するCD	ECD (UV-CD)	VIS-CD	VCD (IR-CD)
波長 200	nm 40	0	800 1 µm	10
有機化合物	芳香環を持つもの など一部が吸収		全有機化合	ての 合物が吸収

図1.

2. 理論計算との比較による絶対配置決定

2.1 D609 の立体化学研究

VCD の応用例とし最も頻繁にもちいられているのが、絶対配置の決定である。VCD の利 点として信頼にたる理論計算があるが、近年、一般的に用いられるようになった密度反関 数法により得られた理論 VCD スペクトルと実測スペクトルを比較することにより、非経験 的にキラル有機化学物の絶対配置を決定できる。今回、ドラッグ様化合物として D609 の 立体化学解析に VCD を適用してみた。

D609 (Tricyclodecan-9-yl-xanthogenate)は、リン酸基アナログとして知られるキサンテ ート基を有する三環性化合物である。1967年にその他のキサンテート基を有する化合物郡 とともに Möller 等によって合成され⁷⁾、1984年にロ内炎ウイルスに対する有効性が報告さ れた⁸⁾。抗ウイルス作用の他に抗癌作用・抗炎症作用などの生理活性を誘引することが報告 されており、これらの作用は脂質シグナル酵素を阻害することで得られることが知られて いる。また、メタボリックシンドロームに係わるスフィンゴミエリン合成酵素(SMS)⁹⁾の阻 害や抗酸化作用などが知られており、生理活性研究に関する報告は約 30年間で、延べ 700 報以上にも上る。D609には複数の不斉炭素があり、理論的に 8種類の立体異性体が存在す る。しかし、D609には 700報以上の生理活性研究に関する報告が存在するものの、立体化 学に関する言及はほとんどない。このように、D609は、脂質代謝酵素研究において重要な ツールであり、既に 30社以上から市販されているが、驚いたことに、市販品でさえも、そ の立体化学については全く考慮されていない。





図2. D609の構造と可能な立体異性体

8種の全異性体を合成すべく、その前駆体であるアルコール体の合成を行った。まず、ラ セミ体として4種の前駆体アルコールを合成、化合物検出に必要となる紫外領域に吸収を 持つ置換基(発色団)を導入し光学異性体分割カラムを用い、8種の全光学活性体を得た。 D609はその炭化水素のみの骨格と少ない置換基の為に従来法では絶対立体化学決定が困 難である。VCD は全ての有機化合物が吸収可能な赤外光を利用した新規立体構造解析ツー ルであり、D609 のような特徴的な官能基がなく誘導化が困難な化合物にも適応可能である。 D609 の立体化学を VCD と DFT 法に基づく計算化学の組み合わせにより明らかにすること とした。

2. 2 D609 前駆体アルコールの VCD 解析

C-*exo*, O-*endo*体 (3S, 3*R*)の VCD スペクトルの測定には光路長 100 μm の CaF₂ セルを使用し、炭化水素の領域に吸収を持たない CDCl₃ を溶媒として使用した。試料濃度は 0.3 M に調整し、8 cm⁻¹ の分解能で2時間測定した。結果を図3に示す。



図 3. C-exo, O-endo体 (3S, 3R)の VCD スペクトル

1000 - 1100 cm⁻¹に現れる吸収は C-O 伸縮振動、1250 cm⁻¹付近の吸収は O-H 変角振動、 1400 - 1500 cm⁻¹の吸収は C-H 変角振動によるものである。エナンチオマー同士がミラー イメージであり、両者の IR スペクトルが完全に一致していることから、光学分割の成功、 試料濃度の正確さ、VCD 測定の正当性の 3 点が証明された。その他 3 種のジアステレオマ ーについても同様にミラーイメージが得られた。続いて、計算化学の導入により化合物の 絶対立体化学を決定した。

2.3 絶対立体化学の決定

VCD は分子そのものの振動遷移を観測している為、ECD や CD に比べ計算による絶対立 体化学決定の信頼性が高いことが知られている。本研究においても、密度汎用関数法 (DFT 法)に基づく計算化学を導入することとした。計算レベルは比較的単純な B31YP/6-311G (d,p)を使用した。計算の例として (*R*)– C-*exo*, O-*endo* 体を挙げる。 (*R*)–C-*exo*, O-*endo* 体



には図4に示したように、水酸基の O-H 結合の方向が異なる3種の安定構造が存在する。

図 4. (R) C-exo, O-endo 体の配座異性体の構造とその安定性

これら、それぞれについて IR スペクトル、VCD スペクトルを算出し、ボルツマン分布に従って加重平均したものを計算スペクトルとした。以上のような手順で求めた (*R*) – C-exo, O-endo 体の計算スペクトルと(+)–C-exo, O-endo 体の実測スペクトルを比較した(図5)。



図5. C-exo, O-endo 体の実測及び理論計算 VCD、IR スペクトル

図5において、上段は VCD スペクトル、下段は IR スペクトルを示している。また、緑 色の実線は(+) – C-*exo*, O-*endo* 体の実測スペクトル、点線は(*R*) – C-*exo*, O-*endo* 体の計算 スペクトルである。両者は程よく一致しており、ここから(+)–(*R*) – C-*exo*, O-*endo* と決定 出来た。また、対応するエナンチオマーである負の旋光度を持つものは(–)–(S) – C-*exo*, O-*endo* である。計算によって得られた IR スペクトルには 1250 cm⁻¹ 付近に O-H 変角振動 による強い吸収が見られる。計算スペクトルは真空中での VCD スペクトルを示している為、 溶媒中で観測する実測スペクトルと異なり、計算によって得られるスペクトルでは、溶媒 による影響が全く無い。その為、O-H 変角振動が強い吸収として現れる。

他の立体異性体についても同様の手法を用い、全 D609 前駆体アルコールの構造決定に成功

した (図6)。今回用いた計算は比較的単純なものであったが、十分な一致が得られた。 VCD の立体観測能の面からこの結果を考察すると、Fig. 3-4 からわかるように、ジアステ レオマー間で VCD スペクトルに顕著な差が見られ、容易に識別可能である。この結果から、 D609 のような誘導化が困難な化合物に対し VCD による立体構造解析の有用性を示すこと が出来た。



図6.4種のD609立体異性体のVCDスペクトル

3. 理論計算によらない新規の立体化学解析法

3. 1 VCD 励起子キラリティー法¹⁰⁾

理論計算を用いた VCD(赤外円二色性)スペクトルの計算は近年のトレンドとなりつつある。しかし、VCDの感度が低いこと、ならびに比較的小さな分子しか計算できないという 問題があり、より汎用性の高い立体化学決定法の開発が望まれていた。本研究では、VCD における励起子キラリティー法の可能性に着目した。

励起子キラリティー法は二つの発色団の電気双極子モーメント(矢印、図7)の空間的 相互作用に基づくツインピーク型 CD シグナルの符号から分子の絶対立体化学を決める手 法である。すなわち、二つのモーメントが手前から奥に向かって時計回りに配置されてい る場合(0°< θ< 180°)は正-負の分裂型ピークを示し、反時計回り(-180°< θ< 0°)の場 合は負-正の分裂型ピークを示す¹¹⁾。VCDにおける励起子キラリティー法の可能性を検討す るにあたり、我々はまずカルボニル基を発色団として用いることを考えた。カルボニル基 の C=O 伸縮振動の電気双極子モーメントは C=O 結合にほぼ並行に存在し、また他の官能 基の吸収から独立した場所に強い吸収を示すという利点がある。



図7. 二つのカルボニル基の成す角度 θ 及び分裂型コットン効果の符号と二つのカルボ ニル基の空間的配置の関係

まず、マンノース誘導体1について、0.05M CDCI₃溶液中、100 μm 光路長の CaF₂セル 中にて VCD を測定した(図8a)。IR は 2 分、VCD は 90 分測定した。カルボニル基を一つ だけ持つモノアセチル化体 1a と 1b はカルボニル伸縮振動の領域(1800-1600 cm⁻¹)に強 い IR 吸収を示したが、極めて弱い VCD を示すのみだった。これに対し、カルボニル基を 二つ持つビスアセチル化体 1c は強度が約 20 倍増強された分裂型 VCD を示した。1a-1c の 比較により、この分裂型ピークは各々のカルボニル基由来のシグナルの和ではなく、二つ のカルボニル基の相互作用に基づくものであることが示された。同様の現象は ginkgolide 等の天然物に見られる構造モチーフであるα-置換ラクトン 2 についても観察された。すな わち、カルボニル基を二つ持つ 2c は分裂型 VCD シグナルを示し、その強度はカルボニル 基を一つだけ持つ 2a、2b に比べ 25 倍以上であった(図8b)。さらに、これらの分裂型シ グナルの符号は二つのカルボニル基が成す二面角と一致していた。すなわち、エステル結 合の s-trans 配座、ならびにカルボニル酸素とメチン水素が syn の立体配座を示すことを考 慮すると、1c、2c ともに反時計回りの関係を示し、観察された負-正の分裂型ピークと一致 する結果を与えた。



図8. マンノースおよび γ ラクトン誘導体の VCD スペクトル

1c、2c 以外でも励起子キラリティー法の理論が適用されるかどうかを確認するため、図 9に示す各化合物を合成し、その VCD を測定した。観察されたΔε1、Δε2 の値、ならびに 分裂型ピークの強度 A (Δε1 – Δε2)、理論計算によって求められた最安定コンフォマーにお ける二つのカルボニル基の二面角(θ)を検討した。やはり、正の二面角を示すものは正-負の分裂型ピークを示し、負の二面角を持つものは負-正の分裂型ピークを示した。以上の ことから、絶対立体化学を本手法において決定できることが示された。



3. 2 ECD 励起子キラリティー法と VCD 励起子キラリティー法の比較

これまでのデータは、VCD を用いた本手法が、絶対立体化学をピークの符号から決定で きるだけでなく、ECD 励起子キラリティー法とも類似していることを表している。すなわ ち、発色団の性質が強度 A に及ぼす影響は以下の通りである。

(1) 二つの発色団の吸収極大波数の差が大きいほど A が低下。

(2) 二面角が 0°か 180°に近い場合は A がゼロに近付く。

(3) 発色団間の距離の増大によりAが減少(6-8)。9のように距離が極めて近い場合には∆ε が±1に到達する巨大なピークが観察される。

(4) 発色団が3つ以上ある化合物の場合、観察される分裂型ピークの形状は個々の二つの発 色団間相互作用の和によって近似される。すなわち、1gのピーク形状は1c-1eの分裂型シ グナルの和とよく一致する。

以上の類似点より、我々は本手法を VCD 励起子キラリティー法と呼ぶことを提唱した¹⁰⁾。

3.3 各種(環状)天然物への応用

本手法を用いると、ECD による手法や Mosher 法などが適用できない各種天然物の絶対 立体化学を簡便に決定することができる。例えば、9 のようなスピロ化合物も簡便に解析で きる。さらには、α-アシロキシケトン、α-アミドラクタム、ジラクトンやジェステルなど も解析可能である。図10の各化合物(スピロ化合物を除く)について VCD 励起子キラリ ティー法を適用したところ、全ての化合物において分裂型ピークの符号から絶対立体化学 が決定できることが明らかとなった。図10bに一例として、picrotoxinin(GABAA 受容体 阻害剤)、diltiazem(血管拡張剤)の VCD を示す。また、taxifolin 10 の場合にはアセチル 基を戦略的に導入することにより、C環に元々存在するケトンとの相互作用に基づく分裂型 ピークを観測することができた。



図10. VCD 励起子キラリティー法の適用例

3. 4 グリセロ脂質の絶対立体化学決定法の開発

次に、本手法を用いたグリセロ脂質の絶対立体化学の決定法の開発に着手した。グリセ ロ脂質は細胞膜の主要な構成成分の一つであり、シグナル伝達にも関与する。グリセロ脂 質の絶対立体化学は、細菌は sn-3 型、古細菌は sn-1 型、真核生物は sn-3 型であると考え られている。しかし、哺乳類に見出される bis(monoacylglycero)phosphate が sn-1 型であ ることが判明しており、進化の過程を解明する上でもグリセロ脂質の立体化学を簡便に解 析しうる方法の開発は重要な課題である。また、最近の研究により D-アミノ酸が白内障や アルツハイマー病に関連していることが示唆されていることから、脂質分子に関しても立 体化学と生体機能との関連を究明する必要があると考えられ、本研究によって開発した方 法論がそのような研究の発展に貢献すると期待している。

グリセロ脂質は頭部のアルコール部に、ホスホコリン基や糖の導入などいくつかの修飾 を受ける。また、脂肪鎖の長さや不飽和度も多様である。そこで、各種グリセロ脂質に対 して適用可能な本手法が適用可能かどうかを検討するべく、図11に示すような各種の頭 部と脂肪鎖を有するグリセロ脂質30種以上を調製し、それらのVCDを測定した。その結 果、全ての化合物について sn-3型のときは負-正の分裂型ピークを示し、sn-1型のときは負 -正のピークを示すことを見出した。以上の結果より、VCDを用いることによりグリセロ脂 質の絶対立体化学を簡便に決定しうることが示された。現在、生体内脂質への応用を検討 中である。



図11.VCD 励起子キラリティー法を適用したグリセロ脂質の構造

3.5 VCD の高感度化

本手法は、絶対立体化学の決定のみならず VCD 測定の高感度化にも利用することができ る。例えば、2cの分裂型シグナルは 2.5 mM の濃度でも測定可能であった。すなわち、0.02 mgのサンプル量で絶対立体化学を決定できた。従来 VCD 分光法には 1-10 mg のサンプル 量が必要とされていたが、大幅なサンプル量の低減を達成した。さらに、0.05 M の条件に おいては、このような分裂型シグナルは測定時間 2 分でも観測可能だった。なお、このよ うな測定は未修飾の 2a では不可能だった。近年報告された VCD 装置の改良と相まって¹²⁾、 本手法は今後微量サンプルの解析や経時測定への応用が期待される。

4. おわりに

複雑な化合物を扱う場合キラリティーは必然的に考慮しなくてはならい問題であり、 VCD は、立体化学解析に極めて有効なツールになりつつある。理論計算との組み合わせに よる解析法は、極めて信頼性の高い立体化学の知見が得られる。欧米メガファーマーにお いては、既に、本 VCD 装置が導入されており、ルーチンにより創薬候補化合物の立体化学 が決定されている。今回我々が開発して VCD 励起子キラリティー法は、理論計算を必要と しない最初の非経験的な絶対配置決定法であり、今後の VCD 法の利用を加速させるものと 信じている。

5. 謝辞

本研究は、研究室の谷口 透助教をはじめとして、中橋徳文博士、柴田将孝氏、加藤美佳 子氏、真井大輔氏、本元貴大氏の学生諸子の努力によるものであり、深く感謝いたします。 また理論計算については、三浦信明 北海道大学特任准教授(現:御茶ノ水大学 特任准 教授)の貢献が極めて大きく、ここに感謝いたします。

本研究に助成をいただきました、財団法人篷庵社に深く感謝いたします。また、助成に際 してのご推薦、及び VCD 研究開始時に暖かいご支援をいただきました北海道大学西村紳一 郎先生をはじめ、関係の諸先生方に御礼申し上げます。

6. 参考文献

- Comprehensive Chiroptical Spectroscopy, Berova, N.; Polavarapu, P. L.; Nakanishi, K.; Woody R. W.; eds., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2012.
- 2) Polavarapu, P. L.; He. J.; Anal. Chem., 2004, 76, 61A.
- 3) Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Pan, J.-J.; Chirality, 2008, 20, 643.
- 4) Dudley, R. J.; Mason, S. F.; Peacock, R. D.; J. Chem. Soc., Chem.Commun., 1972, 1084.
- 5) Hsu, E. C.; Holzwarth, G.; Chem. Phys., 1973, 59, 4678.
- 6) Nafie, L. A.; Cheng, J. C.; Stephens, P. J.; J. Am. Chem. Soc., 1975, 97, 3842
- Möller A. & Öttel H. in Ullmanns Enzyklopädien der technischen Chemie, ed. Forest, W. (Urban und Schwarzenberg, Munich, F.R.G.), 1967, 98, 718
- B) Gerhard, S.; Eberhad, A.; Karl, M.; Anita K.; Karin, M.; Klaus, H.; Arthur S.; Proc. Natl. Acad. Sci, 1984, 81, 3263
- Mitsutake, S.; Zama, K.; Yokota, H.; Yoshida, T.; Tanaka, M.; Mitsui, M.; Ikawa, M.; Okabe, M.; Tanaka, Y.; Yamashita, T.; Takemoto, H.; Okazaki, T.; Watanabe, K.; Igarashi, Y.; *J. of Biological Chem.*, 2011, **286**, 28544
- 10) Taniguchi, T.; Monde, K. J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 3695.
- Harada, N.; Nakanishi, K. Circular Dichroic Spectroscopy Exciton Coupling in Organic Stereochemistry; University Science Books: Mill Valley, CA, 1983.
- 12 (a) Rhee, H.; June, Y.-G.; Lee, J.-S.; Lee, K.-K.; Ha, J.-H.; Kim, Z. H.; Jeon, S.-J.; Cho, M. *Nature* 2009, **458**, 310. (b) Lüdeke, S.; Pfeifer, M.; Fischer, P. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, **133**, 5704.

マスト細胞からのヒスタミン放出機構の解明

名古屋市立大学大学院薬学研究科 生体超分子システム解析学分野 平嶋 尚英

はじめに

花粉症や喘息などのアレルギー疾患に悩む人々は近年ますます増加の傾向にあり、 国民の3人に1人はアレルギー症状を持つといわれている。このため優れた抗アレル ギー薬の開発が必要であることは論をまたない。

アレルギーの症状は、マスト細胞(肥満細胞)から分泌される種々の炎症性メディ エーターにより誘発される。なかでもヒスタミンは、末梢神経の刺激や血管透過性の 亢進により、くしゃみ、鼻漏、鼻閉、かゆみ、平滑筋収縮や粘液分泌の亢進等を引き 起こす。ヒスタミンは、マスト細胞内の分泌小胞に蓄えられており、抗原(アレルゲ ン)によって、刺激をうけると分泌小胞が細胞膜と膜融合し、分泌小胞の内容物が細 胞外へ分泌される、いわゆるエクソサイトーシスによる分泌がおこる¹⁾。

これまでの抗アレルギー薬の多くは、ヒスタミン受容体のブロッカーである抗ヒス タミン薬に代表されるような、マスト細胞から分泌された炎症性メディエーターの受 容体のブロッカーであった。一方、クロモグリク酸のようにマスト細胞からの炎症性 メディエーター分泌を抑制する薬物も存在するが、その作用機序やターゲット分子は 明確ではない。エクソサイトーシスによる分泌の分子機構を明らかにすることは、特 定の分子をターゲットとした炎症性メディエーター分泌の抑制薬の開発にも貢献す ると考えられる。

我々はこれまでの研究において、マスト細胞のエクソサイトーシスにおいてSNARE (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)とよばれる一群の蛋 白質とこれらに結合する蛋白質が、ヒスタミンなどの炎症性メディエーターを含む分 泌小胞と細胞膜の融合に関与していることを明らかにしてきた²⁻⁴⁾。

本研究では、これまで行ってきたマスト細胞からの炎症性メディエーター(ヒスタ ミン)の放出機構を分子レベルでの解明をマスト細胞を使って進めるとともに、特定 のタンパク質の機能をより純粋な系で検討できるリポソームベースの人工膜融合系 を用いてさらに詳細な検討を行った。また、DDS のキャリアーとして用いられるナ ノ粒子のマスト細胞の分泌に与える影響についてもあわせて報告する。なお、以下の 実験では、マスト細胞としてはすべて RBL-2H3 細胞を用いた。

1. エクソサイトーシスによる分泌機構の解明

分泌小胞が細胞膜と膜融合するには、分泌小胞の細胞膜へ輸送されなければならな いが、この輸送機構は分子レベルで解明されていない。そこで、マスト細胞における 分泌小胞の微小管依存性の輸送機構について分子レベルで明らかにすることを試み た。

(1)微小管依存性輸送機構の解明(図1)

分泌小胞は細胞膜近傍までは、微小管の上を輸送されると考えられているが、これ に関与するモータータンパク質であるキネシンは同定されていない。そこで、微小管 依存性の分泌小胞輸送に関与することが期待されるキネシンについて、siRNA を用い たノックダウン実験を行い、どのキネシンが分泌小胞の輸送に関与しているかを検討 した。その結果、キネシンファミリーの kif3A が分泌小胞の輸送に関与していること を見出した。



図1. マスト細胞における分泌小胞の輸送と細胞膜へのターゲッティング

(2)アクティブゾーン様構造の関与

細胞膜近傍に輸送されてきた分泌小胞は、細胞膜と融合してその内容物を細胞外に 放出する。同様のエクソサイトーシスによって分泌を行う神経終末では、シナプス小 胞が細胞膜と融合する部位はアクティブゾーンと呼ばれる特殊化した部位である。 マスト細胞のような非神経系の細胞ではアクティブゾーンのような構造は知られて いない。そこで、マスト細胞アクティブゾーン蛋白質が発現し、分泌に関与している かどうかを検討した。すでに我々はアクティブゾーン蛋白質である ELKS がマスト 細胞に発現し、エクソサイトーシスに関与していることを明らかにした ⁵⁾。さらに、 アクティブゾーン蛋白質の一つである Liprin α がマスト細胞に発現し、エクソサイト ーシスに関与しているかどうかを調べた。

その結果、Liprin α 1 がマスト細胞に発現し、分泌を正に制御していることが明らかとなった(図2)⁶。



図2. siRNAを用いた Liprin-α 1の発現抑制の開口放出への影響 A. Western Blotting による Liprin-α 1の発現抑制の確認 B Liprin-α 1 を発現抑制した細胞における分泌活性 (means± S.E., *, p<0.01, Student's *t* test)

(3)ストア依存性 Ca チャネル Orai の関与

マスト細胞の分泌をはじめ、神経終末からの神経伝達物質の放出などエクソサイト ーシスは一般に、細胞内の Ca イオン濃度の上昇がトリガーとなる。マスト細胞の場 合、この Ca 濃度上昇は、細胞内の Ca ストアから Ca イオンの放出とそれによって 活性化される細胞膜にあるストア依存性 Ca チャネルによって担われていることは知 られていた。しかしながら、ストア依存性 Ca チャネルの分子実体は長いこと不明で あった。近年、その分子実体が Orai とよばれる Ca チャネルであること、STIM と呼 ばれる小胞体の蛋白質がストア内の Ca イオンの枯渇を Orai に伝え、これを活性化 することが明らかとなった(図3)⁷。

Orai には Orai-1、-2、-3 の 3 つのアイソフォームが存在する。そこで、マスト細胞 にどのアイソフォームがどの程度存在し、分泌に関与しているかを明らかにすること を試みた。その結果、Orai-1 が最も多く発現し、次に Orai-2 が多く、Orai-3 の発現 は非常に少ないことが明らかとなった。興味深いことに、Orai-1 と-3 が細胞膜に発 現しているのに対して、Orai-2 は主に分泌小胞に発現していた。また、Orai-2 をノ ックダウンすることで、Orai-2 が抗原刺激による細胞内 Ca 動態と分泌を制御してい ることが明らかとなった。



図3. OraiとSTIM によるマスト細胞における細胞内 Ca 濃度上昇機構 マスト細胞上には IgE の受容体(FcERI)が発現しており、IgE が結合している。アレルゲン である抗原(Ag)が IgE に結合すると、FcERI が活性化され、ホスホリバーゼ C(PLC)が活 性化される。その結果、IP3 が産生され、これが IP3 受容体を介して Ca ストアからの Ca 放出を引き起こす。さらに、ストアの Ca 枯渇を STIM が感知し、それを Orai に伝え、Orai が開き Ca イオンが細外から流入する。

2. 再構成リポソーム系を用いた SNARE 依存性膜融合の評価

我々は、マスト細胞のエクソサイトーシス機構を研究し、SNARE 蛋白質が重要な

役割を果たしていることを明らかにしたが、マスト細胞にはいろいろな SNARE 蛋白 質が発現しており、どの蛋白質がどの程度エクソサイトーシスに寄与しているかが明 らかではなかった。そこで、細胞そのものを用いるのではなく、特定の SNARE 蛋白 質をリポソームに組込んだ単純化した人工膜系で膜融合実験を行った。

(1)SNARE 再構成リポソームによる分泌機構の解析

SNARE 蛋白質を組み込んだリポソームの膜融合実験では、分泌小胞にある SNARE (v-SNARE)を組み込んだリポソーム (v-SNARE リポソーム)と分泌小 胞が融合する相手である細胞膜にある SNARE (t-SNARE)を組み込んだリポソーム

(t-SNARE リポソーム)の融合を測定した。膜融合活性の評価は、リポソームを構成 するリン脂質の一部を NBD とローダミンによって標識し、両蛍光色素の FRET 効率 をモニターすることによって行った。FRET とは、励起波長の短い方の蛍光色素

(donor)を励起しているにもかかわらず、励起波長の長い方の蛍光色素(acceptor) にエネルギーが移動し、励起波長の長い方の蛍光色素の蛍光が観察される現象である。 この FRET の効率は、両蛍光色素間の距離に鋭敏に依存するので、分子間相互作用や 分子間距離を評価するのによく用いられる。v-SNARE リポソーム中では NBD とロ ーダミンの2つの蛍光色素が、FRET が効率よくおこる状況にある。従って、NBD を励起する励起光をあてると NBD は励起されるがそのエネルギーはローダミンに移 動するため、NBD の蛍光は減少する。一方、励起された NBD からのエネルギー移 動によってローダミンは励起されてローダミンの蛍光が観察される。ところが、 v-SNARE リポソームが無標識の t-SNARE リポソームと融合すると、蛍光色素がう すめられ、結果として NBD とローダミンの距離が大きくなり、FRET の効率が低下 し、その結果、NBD からエネルギーが供給されなくなったローダミンの蛍光は減少 し、一方、ローダミンにエネルギーが移動しなくなった NBD の蛍光は増大する(図 4)。

実際の測定では、膜融合に伴う NBD の蛍光強度の増大を経時的に測定した。最後 に界面活性剤を加えて、FRET が全くおこらなくなった状態での NBD の蛍光強度 (Fmax)を測定し、FRET 効率は、この Fmax に対する相対値(%)で評価した。

マスト細胞のエクソサイトーシスに関与する SNARE としては、v-SNARE として VAMP-7、-8 が、t-SNARE としては、SANP23 と syntaxin-3、-4 が関与していると 考えられている。これらの SNARE をリポソームに再構成し、いろいろな組合せの SNARE で膜融合効率を比較した。その結果、v-SNARE として VAMP-8、t-SNARE として syntaxin-3 と SNAP23 の組合せの融合効率が最も高く、v-SNARE として VAMP-7 を組込んだリポソームの膜融合活性は syntaxin の種類によらず低いことを 見出した(図5)⁸。

v-SNARE として **VAMP-8、t-SNARE** として syntaxin-4 と **SNAP23**の組合せでも融 合はおこるので、実際のマスト細胞においては、syntaxin-3 と-4 のどちらも機能し



図4. FRET による膜融合活性の測定 Donor として NBD を、acceptor としてローダミンを用いた。

ていると推測されるが、分泌小胞の種類や内容物の違いによって使い分けられている のかもしれない。今後、分泌小胞の種類の詳細な分類と関与する SNARE の関係を追 究する必要がある。



図5. マスト細胞のエクソサイトーシスに関与する SNARE の組合せとリポソーム膜融合活性 v-SNARE リポソームとt-SNARE リポソームを混合後、120分の膜融合を示す。 t-SNARE として SNAP23 はすべての組み合わせで共通に存在し、syntaxin が syntaxin3 か syntaxin4の場合を検討した。また、v-SNARE としては、VAMP7 か VAMP8 の場合を検討した。

(2)リポソーム膜融合に対する synaptotagmin II の影響

分泌小胞と細胞膜の融合は、Ca イオン依存性であることが知られている。しかし ながら、SNARE 自体に Ca 依存的活性は見出されていない。神経系では、Ca センサ ーに相当する蛋白質として、synaptotagmin I が神経伝達物質の放出に関与している ことが知られている。実際、synaptotagmin I を欠損したショウジョウバエやノック アウトマウスでは、シナプス伝達が阻害される。マスト細胞で最も豊富に発現してい る synaptotagmin II (Syt II) であるが、これまでその機能は、エクソサイトーシス を正に制御するという報告と、負に制御するという報告があり、どちらか明らかにな っていなかった。そこで、リポソームの SNARE 依存性膜融合に対する synaptotagmin II の影響を調べた。その結果、図6に示したように、膜融合への影響 はSyt II の濃度によって異なり、Syt II が高濃度に存在すると膜融合を促進させるが、 Syt II の低濃度では抑制効果をもたらすという結果が得られた⁹。

さらに、この作用の脂質依存性を調べるために、負電荷をもつリン脂質である phosphatidylserine (PS)を、すべて phosphatidylcholine (PC) に置き換えたリポ ソームで実験を行った。その結果、低濃度の Syt II で見られた抑制作用に変化はなか ったが、高濃度で見られた促進作用は見られなくなった。この結果より、Syt II は PS



図6. リポソーム膜融合に対する synaptotagmin の影響

図6. マスト細胞のエクソサイトーシスに関与する SNARE の組合せとリポソーム膜融合活性 v-SNARE リポソームと t-SNARE リポソームを混合後、120 分の膜融合を示す。()内の濃度は加 えた synaptotagmin の濃度を表す。

3. マスト細胞の分泌に対するナノ粒子の影響

ポリ乳酸・グリコール酸(PLGA) 粒子は、生体内分解性・適合性に優れた DDS のキャリアーとしても良く用いられる粒子である。したがって、PLGA 粒子のマスト 細胞への影響を調べることは、このナノ粒子の DDS としての応用を考える上で重要 である。そこで、PLGA 粒子のマスト細胞の分泌に与える影響を調べた。PLGA はエ マルション溶媒拡散法により調製した。このナノ粒子懸濁液を RBL・2H3 細胞へ添加 し、一定時間後(2時間と20時間)、マスト細胞の抗原刺激に対する分泌を測定す ると、ナノ粒子添加後2時間では影響がないが、20時間後には分泌が阻害された(図 7)。

一方、ナノ粒子に暴露された細胞は、一旦ナノ粒子を細胞内に取り込んだ後、細胞 外に放出することが観察されている。従って、ナノ粒子をエクソサイトーシスによっ て細胞外に排出するために SNARE 蛋白質が使われるために、エクソサイトーシスに よる分泌が阻害されたと考えられる。そこで、形質膜上に存在する SNARE(t-SNARE) の一つである SNAP-23 を過剰発現させたマスト細胞を用いて同様の実験を行ったと



図 7. マスト細胞の分泌に対するナノ粒子暴露の影響 ナノ粒子暴露後2時間と20時間でナノ粒子の分泌に対する影響を調べた。Plain-NP は無修飾の PLGA ナノ粒子、CS-NP はキトサン修飾をした PLGA ナノ粒子に暴露した場合。 ころ、ナノ粒子暴露による分泌の阻害が抑制された 10)。

このことは、ナノ粒子暴露による分泌の阻害が、ナノ粒子の排出による競合阻害で あることを示唆する。

次に、*in vivo*において、ナノ粒子が腹腔マスト細胞に及ぼす影響を、全身性アナフィラキシー誘発マウスにより評価した。C57BL/6マウスに IgE とナノ粒子懸濁液を腹腔内投与し、24時間後に抗原を腹腔内投与した。直腸内温度を記録し、血清中のヒスタミン濃度を測定することでアナフィラキシーの重症度の指標とした。マウスにナノ粒子懸濁液を投与し、抗原抗体刺激により全身性アナフィラキシー誘発させたところ、キトサン修飾粒子を投与した群において、直腸温度の減少が抑制され、また、血清中のヒスタミン濃度の減少が観察された。

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、ここに厚く御礼申 し上げます。また、御推薦を賜りました桐野 豊先生に心より感謝いたします。

参考文献

1. Turner, H., Kinet, J.P.

Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI Nature 402 (1999) B24-30.

2. Hibi, T., Hirashima, N., Nakanishi, M.

Rat basophilic leukemia cells express syntaxin-3 and VAMP-7 in granule membranes

Biochem. Biophys. Res. Commun., 271, 36-41 (2000)

3. Tadokoro, S., Nakanishi M., Hirashima, N.

Complexin II facilitates exocytotic release in mast cells by enhancing Ca²⁺ sensitivity of the fusion process

J. Cell Sci., 118 2239-2246 (2005)

4. Tadokoro, S., Kurimoto, T., Nakanishi, M., Hirashima, N.

Munc18-2 regulates exocytotic membrane fusion positively interacting with syntaxin 3 in RBL-2H3 cells

- Mol. Immunol. 44, 3427-3433 (2007)
- 5. Nomura, H., Ohtsuka, T., Tadokro, S., Tanaka, M., Hirashima, N. Involvement of ELKS, an active zone protein, in exocytotic release in RBL-2H3 cells
- Cell. Immunol. 258, 204-211 (2009)
- 6. Nomura, H., Tadokro, S., Hirashima, N.

Liprin-α regulates exocytosis by affecting cell spread and adhesion Immunol. Lett. **139**, 110-116 (2011)

- Prakriya M, Feske S, Gwack Y, Srikanth S, Rao A, Hogan PG.
 Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel Nature 443, 230-233 (2006)
- 8. Sakiyama, H., Tadokoro, S., Nakanishi, M., Hirashima, N.
- Membrane fusion between liposomes containing SNARE proteins involved in mast cell exocytosis

Inflamm. Res. 58, 139-142 (2009)

- Nagai, Y., Tadokoro, S., Hirashima, N.
 Effects of synaptotagmin II on membrane fusion of liposomes containing SNARE proteins involved in exocytosis in mast cells
 BBA Biomembranes 1808, 2435-2439 (2011)
- 10. Tahara, K., Tadokoro, S., Yamamoto, H., Kawashima, Y., Hirashima, N.
 The suppression of IgE-mediated histamine release from mast cells following exocytic exclusion of biodegradable polymeric nanoparticles
 Biomaterials 33, 343-351 (2012)

人工血管内腔狭窄機序の解明とキマーゼ阻害薬による狭窄予防

大阪医科大学 薬理学教室

金 徳男

1、はじめに

腎不全患者において2日に1回の透析による血液浄化はその生命維持に不可欠である。人 工透析技術の向上は日進月歩であり、近年、例え左右の腎臓が共に機能不全に陥ったとして も、数十年間も血液透析に頼りながら通常の生活を送ることももはや夢ではなくなった。こ のような患者において欠かせないのがスムースな血管アクセスルートの確保である。しかし、 近年、このアクセスルートの機能不全が臨床上大きな問題となってきている。

全身血中の老廃物を効率よく除去するには一定の時間内に充分な血液量を透析装置に通過 させ、浄化後の血液を再び血管へ戻さなければならない。つまり、大量の血流量を確保する には動脈の血流が理想的であるが、動脈の解剖学的な局在は深く、穿刺やその後の止血など も容易ではない。そこで、透析を必要とする患者は外科的に血管アクセスルートを作製しけ ればならない。その作製術として、①自己動脈と静脈の吻合よるシャント術(内シャント); ② ePTFE (expanded polytetrafluoroethylene) 人工血管の動脈と静脈間におけるループ状の移 植術(外シャント)が挙げられる(図1)。外シャントに比べて、内シャントの開存率が良 いと言われているが、

腎不全患者の血管
 状態が非常に悪く、
 内シャントの作製
 に適しない場合に
 は人工血管移植術
 が施される。しか
 し、この外シャン



図1 血管アクセスルート

トの使用可能な期間は短く、移植後の1年間開存率は50%以下であり、2年間開存率は2 5%以下となる[1]。そこで、多くの患者は新たな血管アクセスルートの作製を余儀なく強い られ、患者に与える苦痛が甚大であるだけではなく、医療保険コストの面でも社会的に非常 に大きな問題となっている。勿論、内シャントも外シャントと同様に時間の経過とともに血 管内膜肥厚による管腔狭窄が進んでゆき、最終的には血液浄化に必要な血液量を提供できず、 血管アクセスの不全に陥ってしまう。内シャントの狭窄好発部位は動脈の血液流出部位に当 たる静脈管腔内と動静脈吻合部であり、外シャントの場合はePTFE人工血管と静脈との吻合 部と人工血管管腔内である[2]。このような血管内膜肥厚の原因については未だ不明な点が多 いが、血行力学的変化、アンジオテンシンΙΙやTGF-β1などの活性化がその一部に関与する と報告されている[3, 4]。

これまでに、我々は肥満細胞顆粒中に貯蔵されているキマーゼが従来のアンジオテンシン 変換酵素(ACE)に加え、アンジオテンシンIからアンジオテンシンIIへの変換において 非常に重要な役割を果たしていることを報告してきた[5]。また、本酵素がTGF-β1やマトリ ックスメタロプロテアーゼ(Matrix metalloproteinase、MMPs)の活性化などにも関与することが 明らかになりつつある[6,7]。そこで、本研究では、人工透析時の血管アクセスルートの代用 モデルとして、イヌ動静脈シャントモデルと人工血管移植モデルを作製し、その後のキマー ゼの動態やキマーゼ特異的な阻害薬の薬効などについて検討した。

2、イヌ動静脈シャントモデルの血管内膜肥厚とキマーゼ[8]

図2に示すように、麻酔下のイヌ上腕動脈と静脈を剥離し、それぞれの血管を縦方向に1.2 cmを切開し、側一側吻合を行った。その一ヶ月後、サンプルを採集し、血管内膜肥厚の特徴 とキマーゼ、ACE、 TGF-β1およびアンジオテンシンII などの変化について組織学的な検 討を行った。また、本病態におけるレニンーアンジオテンシン系の役割を解明するため、キ マーゼ阻害薬 (NK3201) [9,10]とACE阻害薬 (Lisinopril)の薬効についても検討を加えた。



図2 モデル作製法

図3 内シャントの血管内膜肥厚特徴

内膜肥厚やキマーゼなどの発現に対する解析部位は主に3ヵ所が含まれ(図2)、部位Aは上 腕部の求心側であり、この部位の静脈はモデル作製後、動脈の血液流入口に相当し、従って、 シェアストレスや動脈圧の影響を最も受けやすくなる。部位Bは動静脈の吻合部であり、図 2と図3に示しているように、左側の半分くらいは動脈、そして、その右側が静脈になる。 部位Cは上腕部の遠心側であり、この部位の静脈へは動脈の血液が殆ど流れず、シェアスト レスや動脈圧の影響をそれほど受けない。結果、イヌ動静脈シャント作製1ヶ月後の血管内 膜肥厚は部位Aの静脈側で最も顕著であり、内腔面積も非常に小さく(図3、部位A)、透 析患者の内シャント狭窄特徴と類似していた。動静脈吻合部(部位B)の動脈壁では著明な 内膜肥厚が見られなかったが、その静脈壁においては非常に顕著な偏心性内膜肥厚が見られ た。一方、シェアストレスなどの影響をあまり受けない部位Cの静脈においては内膜肥厚が 殆ど見られなかった(data not shown)。部位Aと部位Bの血管内膜肥厚及び血管内腔狭窄は キマーゼ特異的な阻害薬であるNK3201の経口投与により有意に改善された(図4)。また、 ACE阻害薬であるLisinoprilの投与によっても内膜肥厚がある程度抑制され、血管内狭窄も有 意に改善されたことから、本病態におけるレニンーアンジオテンシン系の関与が示唆された。 以上の結果を踏まえ、本研究では、動静脈シャント作製後の肥厚部位におけるキマーゼや従 来のレニンーアンジオテンシン系の構成諸要素の分布や変化などについても免疫染色を用い て調べることにした。結果、キマーゼ陽性細胞は正常の静脈や動脈では非常に少なかったが、 動静脈シャント作製1ヶ月後の静脈の肥厚部位とその中膜においては多数認められた(図5)。



図4 血管内膜肥厚の定量

図5 免疫染色

また、正常動静脈のACEの陽性染色像は内皮細胞に限局して見られたのに対し、肥厚内膜中の微小血管内では多数のリング状の陽性染色像が認められた。TGF- β 1に関しても、正常血管では陽性染色が非常に少なかったが、肥厚内膜では多数見られた。また、内膜肥厚部位において、アンジオテンシンIIの広範囲な陽性染色像が見られ、同部位におけるAT₁受容体の陽性染色像も確認できた。以上より、イヌ動静脈シャント作製後の血管内膜肥厚の病態生理の一部にはキマーゼやACEの活性化によるアンジオテンシンIIの産生過剰やTGF- β 1の活性化が関与することが示された。

3、イヌePTFE人工血管移植モデルの内膜肥厚とキマーゼ[11]

前述したように、近年、血管アクセスルートにePTFE人工血管を用いる機会が大いに増え、

その後の機能不全も臨床上大きな問題となってきており、その対策が急がれている。そこで、 我々はイヌのePTFE人工血管移植モデルの作製を試み、本モデルにおけるキマーゼの役割に ついて検討することにした。

麻酔下に、イヌの大腿動脈と静脈を剥離し、血流遮断後にePTFE人工血管(長さ:10 cm、 直径:4 mm)を動静脈間にループ状に移植した(図6A)。その2週、4週と8週間後に自 己動脈、人工血管と自己静脈を含んだサンプル全体を摘出し、三等分に切断後、カルノア固 定し、パラフィンブロックを作製した。動静脈吻合部と人工血管内腔の血管内膜肥厚の全体 像を把握するため、三等分したサンプルを輪切りではなく、図6Bに示すような縦軸方向へ の組織切片作製を試み

た。つまり、動脈側に は吻合された自己動脈 壁(A)と人工血管の 一部、中間部は上下の 人工血管壁によって囲 まれており、そして、 静脈側には人工血管の 一部と自己静脈壁(V) が含まれる(図6C)。



図6 人工血管移植法と内膜肥厚の経時的変化

図6Cに示すように、人工血管移植2週間後、内膜肥厚は静脈吻合部の人工血管起始部よ り認められ、時間の経過とともにそのボリュームを増やしていった。そして、移植8週後で は静脈吻合部だけではなく、吻合部から遠く離れた人工血管の中間部でも局所的な著明な内 膜肥厚が見られるようになった。面白い

ことに、組織切片上の人工血管壁をよ く観察すると、管腔内外を貫く多数の 隙間が存在していた。そして、その隙 間には外膜側から内腔へ向かって遊走 している細胞が数多く見られた(図7)。 このような隙間はPTFEをある条件下で 急激に引き延ばした結果であり、従っ て、expanded PTFE(ePTFE)と呼ばれ てきた。ePTFE人工血管移植4週間後、 外膜側からの細胞遊走は半分程度まで



図7 人工血管壁の細胞遊走像

しか進んでおらず、この時期の人工血管内腔では、吻合部付近を除き、内膜肥厚が殆ど見当 たらなかった(図7、上)。しかし、その8週間後では動静脈吻合部以外の所でも内膜肥厚 が局所的に見られるようになった。この時期の人工血管壁には、外膜側からの細胞遊走が人 工血管素材全壁に及んでいた(図7、下)。人工血管移植後、内膜肥厚が吻合部から人工血 管管腔方向への進達は2 cmを超えないと言われており、人工血管中間部の内膜肥厚における 外膜側遊走細胞の関与が示唆された。ePTFE人工血管移植 2 ヶ月後の血管内膜肥厚はキマー ゼ阻害薬であるNK3201の経口投与によって大きく抑制された(図8)。本モデルにおけるキ



図8 人工血管移植後の内膜肥厚に対する NK3201 の効果

マーゼやアンジオテンシン I I の分布なども免疫染色を用いて検討したが、人工血管移植後、 特に人工血管周囲組織において広範囲な陽性染色像が見られた(data not shown)。

人工血管移植後に現れる内膜肥 厚の細胞成分を特定するために、

細胞マーカーであるvimentin、

α-SMA,、desmin とsmoothelinの免疫染色も行った。Vimentinは線維
 芽細胞や筋線維芽細胞などの間葉
 系細胞に特異的に発現する細胞骨

表1	細胞マーカーによる細胞分類				
STATE OF STATE	Vimentin	αSMA	Desmin	Smoothelin	
線維芽細胞	+	1	2	122-12	
筋線維芽細胞	* +	+	1-+	C. Start	
血管平滑筋細胞	1- K	+	1	+	

格成分であり[12]、α-SMAは血管平滑筋だけではなく、線維芽細胞が形質転換されて筋線維芽 細胞になった場合でも発現する[13]。Desminは心筋、骨格筋、平滑筋に発現し[14]、Smoothelin は平滑筋にしか発現しない[15]。従って、このような細胞マーカーの発現を調べることにより 細胞成分をある程度特定可能とする(表1)。図9は人工血管移植2ヶ月後の静脈吻合部の 連続切片である。この図に示している ように、内膜肥厚部位の細胞成分の9 割くらいはVimentin陽性であり、そし て、その殆どがα-SMAも陽性であった。 一方、DesminやSmoothelinを発現して いる細胞は極めて少なく、人工血管移 植後の肥厚部位の大部分は筋線維芽細 胞であることが示された。その他の細 胞成分については、線維芽細胞や形質 転換途中の細胞であると考えられた。 人工血管壁への遊走細胞についても同



図9 細胞マーカーの免疫染色

様な検討を行ってみたが、遊走して侵入した細胞の殆どはVimentin陽性細胞であったが(図 7)、α-SMA、DesminおよびSmoothelinの発現は認められず、線維芽細胞であった。

以上より、ePTFE人工血管移植後の吻合部以外の内膜肥厚の形成機序には、人工血管周囲 組織に存在する線維芽細胞の管腔内への遊走と浸潤が密接に関与する可能性が示唆された。 っまり、線維芽細胞が外膜側から遊走して内腔側に到達すると、そこで足場を提供したり、 その細胞自体が増殖し、または、形質転換されて筋線維芽細胞となったりして内膜肥厚のボ リュームを増やしているのではないかと考えられた。また、近年、アンジオテンシンIIや TGF-*β*1などの活性化が血管再構築に伴う細胞遊走や形質転換に関与することもよく知られ ている。本研究でもグラフト周囲組織におけるキマーゼ、アンジオテンシンIIやTGF-*β*1 の著明な活性化が認められており、キマーゼ特異的な阻害薬の投与は各部位の血管内膜肥厚 を有意に抑制したことから、キマーゼを介したアンジオテンシンII産生過剰やTGF-*β*1の活 性化がePTFE人工血管移植後の内膜肥厚と密接に関連する線維芽細胞の遊走、形質転換と増 殖などに寄与することが示唆された。

4、ePTFE人工血管と中層無孔体からなるグラシル人工血管との比較検討 [16]

上述したように、ePTFE人工血管移植後、外膜側から遊走する線維芽細胞が人工血管管腔 内の内膜肥厚形成に関与する可能性を示唆してきた。考え方が非常にシンプルではあるが、 このような細胞遊走を物理的に遮断すれば、その内膜肥厚が大きく抑制されるのではないか と考え、次の検討を行ってみた。麻酔下に、イヌの頚動脈と頚静脈を剥離し、右側にはePTFE 人工血管(長さ:7cm、直径:6mm)を、そして、左側にはグラシル(Grasil,長さ:7cm、 直径:5.6mm, Terumo Medical Corporation)をそれぞれ移植した。グラシルは日本で開発され た唯一の臨床応用可能な 人工血管であり[17,18]、 図10に示すように、 中間無孔体からなる三 層構造をなしている。 この中間無孔体は伸縮 性に富んでおり、穿刺 後の針孔からの出血を 防ぐ。ePTFEと全く同 じ素材ではないが、人 工血管移植後の外膜側 からの線維芽細胞の内



図10 ePTFE とグラジルの相違 (グラシル商品パンフレットより引用)

腔への遊走がこのバリアによって遮断されるかもしれない。両人工血管移植8週間後と16 週間後にサインプルを採集し、人工血管の動脈側、中間部、静脈側の3ヵ所における内膜肥 厚形成の特徴について比較検討を行った。



図11 ePTFE とグラジルグラフトの内膜肥厚パターンの差異

図11のバーグラフに示すように、ePTFEグラフトに比べて、グラシルグラフトの人工血 管内腔内の総内膜肥厚面積は8週後と16週後のいずれの時点おいても有意に少なかった。 そして、部位別の内膜肥厚を解析した結果、グラシルグラフトの動脈側と静脈側の血管内膜 肥厚面積はePTFEグラフトそのものとはあまり変わらなかったが、グラシルグラフトの中間 部の内膜肥厚だけが有意に少なかった。このようなことより、ePTFE人工血管移植後の中間 部血管内膜肥厚の発生機序において、移植後に見られる外膜側線維芽細胞の管腔内遊走が非 常に重要な役割を果たしていることが示唆された。

5、終わりに

内シャントや外シャントの血管内膜肥厚にはキマーゼによるアンジオテンシンΙΙ産生過 剰やTGF-β1の活性化が非常に重要な役割を果たしていることが示された。また、ePTFE人工 血管移植後の血管内膜肥厚には外膜から遊走してくる線維芽細胞が密接関与する可能性も高 く、血管アクセス不全に対する改善策として、薬物療法に加え、人工血管素材の改良なども 不可欠ではないかと考えられた。

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、深く感謝いたしま す。また、ご推薦賜りました宮崎瑞夫先生に厚くお礼申し上げます。そして、グラシルをご 提供して頂いた株式会社テルモに深く御礼申し上げます。

参考文献

- Schwab SJ, Harrington JT, Singh A, Roher R, Shohaib SA, Perrone RD, Meyer K, Beasley D.: Vascular access for hemodialysis. Kidney Int. 55 (5), 2078 • 2090 (1999).
- Swedberg, S.H., Brown, B.G., Sigley, R., Wight, T.N., Gordon, D., Nicholls, S.C.: Intimal fibromuscular hyperplasia at the venous anastomosis of PTFE grafts in hemodialysis patients. Clinical, immunocytochemical, light and electron microscopic assessment. Circulation 80 (6), 1726 • 1736. (1989).
- Liu, S.Q.: Focal expression of angiotensin II type 1 receptor and smooth muscle cell proliferation in the neointima of experimental vein grafts: relation to eddy blood flow. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 19 (11), 2630.2639 (1999).
- Um, J.W., Kim, J.M., Min, B.W., Kim, Y.S., Son, G.S., Lee, J.B., Jung, S.I., Kim, S.J., Choi, S.Y., Koo, B.H., Ishibashi, N., Shirouzu, K., Whang, C.W.: Transforming growth factor-beta1 expression and the role of angiotensin-converting enzyme inhibitor on perianastomotic intimal hyperplasia in polytetrafluoroethylene graft implanted in rabbit carotid artery. Kurume Med J. 51 (3.4), 235.243 (2004).
- Takai, S., Jin, D., Sakaguchi, M., Miyazaki, M.: Chymase-dependent angiotensin II formation in human vascular tissue. Circulation 100 (6), 654.658 (1999).
- Lindstedt,K.A.,Wang,Y., Shiota, N., Saarinen, J., Hyytiainen,M., Kokkonen, J.O., Keski-Oja, J., Kovanen, P.T.: Activation of paracrine TGF-beta1 signaling upon stimulation and degranulation

of rat serosal mast cells: a novel function for chymase. FASEB J. 15 (8), 1377 · 1388 (2001).

- Tchougounova E, Lundequist A, Fajardo I, Winberg JO, Abrink M, Pejler G.: A key role for mast cell chymase in the activation of pro-matrix metalloprotease-9 and pro-matrix metalloprotease-2. J Biol Chem. 280:9291-6929 (2005).
- Jin, D., Ueda, H., Takai, S., Okamoto, Y., Muramatsu, M., Sakaguchi, M., Shibahara, N., Katsuoka, Y., Miyazaki, M.: Effect of chymase inhibition on the arteriovenous fistula stenosis in dogs. J Am Soc Nephrol. 16 (4), 1024–1034 (2005).
- Takai S, Jin D, Nishimoto M, Yuda A, Sakaguchi M, Kamoshita K, Ishida K, Sukenaga Y, Sasaki S, Miyazaki M.: Oral administration of a specific chymase inhibitor, NK3201, inhibits vascular proliferation in grafted vein. Life Sci. 69: 1725–1732 (2001).
- Jin D, Takai S, Yamada M, Sakaguchi M, Kamoshita K, Ishida K, Sukenaga Y, Miyazaki M.: Impact of chymase inhibitor on cardiac function and survival after myocardial infarction. Cardiovasc Res. 60: 413–420 (2003).
- Jin D, Ueda H, Takai S, Muramatsu M, Furubayashi K, Ibaraki T, Kishi K, Katsuoka Y, Miyazaki M.: Roles of chymase in stenosis occurring after polytetrafluoroethylene graft implantations. Life Sci. 81(16):1291-1300 (2007).
- Wang N, Stamenovic D.: Mechanics of vimentin intermediate filaments. J Muscle Res Cell Motil.;23(5-6):535-540 (2002).
- Tomasek JJ, McRae J, Owens GK, Haaksma CJ.: Regulation of alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts is dependent on the intronic CArG element and the transforming growth factor-beta1 control element. Am J Pathol. 166(5):1343-1351 (2005).
- 14. Paulin D, Li Z.: Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. Exp Cell Res. 301(1):1-7 (2004).
- 15. van der Loop FT, Schaart G, Timmer ED, Ramaekers FC, van Eys GJ.: Smoothelin, a novel cytoskeletal protein specific for smooth muscle cells. J Cell Biol. 134(2):401-411 (1996).
- Jin D, Takai S, Li Z, Sakonjo H, Otsuki Y, Shibayama Y, Miyazaki M.: Outside fibroblasts play a key role in the development of inner neointima after the implantation of polytetrafluoroethylene grafts. J Pharmacol Sci. 119(2):139-149 (2012).
- Ota K, Tsuji Y, Kukita K, Sasaki S, Sakai S, Fuchinoue S, et al.: Feature and clinical use report of Terumo graft for hemodialysis (TRE-687). J Jpn Soc Dial Ther.36:1693–1699.(2003).
- 18. Ota K, Tsuji Y, Kukita K, Sasaki S, Sakai S, Fuchinoue S, et al.: Long-term outcome of Terumo vascular graft (GRASILR) for hemodialysis. J Jpn Soc Dial Ther. 39:1395–1401 (2006).

慢性骨髄性白血病の病態形成における骨髄微小環境誘導性分子制御の解明と治療応用

京都府立医科大学大学院医学研究科 血液 • 腫瘍内科学

黒田純也

はじめに ~研究の背景とねらい~

近年、分子標的治療薬の開発と臨床導入により、多くの造血器悪性腫瘍の治療予後は劇的に改善した。な かでも、分子標的治療戦略におけるパラダイムシフトの先駆けとなったのは慢性骨髄性白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)に対するチロシンキナーゼ阻害剤(Tyrosine kinase inhibitors, TKIs) である。CML は、相互染色体転座 t(9;22)(q34;q22)、すなわちフィラデルフィア染色体異常により生じる BCR-ABL 融合タンパクの恒常的なチロシンキナーゼ(TK)活性化により、細胞増殖やアポトーシス抵抗性を促 進する下流細胞内シグナルが活性化することが病態形成の主因である。CML の通常化学療法剤による制御 は困難であり、TKI 導入以前は同種造血幹細胞移植が完治、ならびに長期生存をもたらしうる唯一の治療戦 略であったが、BCR-ABL TK に対する分子標的薬である imatinib や、より強力な nilotinib や dasatinib などの第 2 世代 TKI (second generation TKIs, SGIs)は効率的に CML 細胞の増殖を阻害、アポトーシ スによる細胞死を誘導することで体内の CML 細胞を大幅に低減しうることから、TKIs 治療継続により高率に長 期安定的状態をもたらし、近年では慢性期 CMLの5 年生存率は 90%以上に改善した。しかしながら、これら 多くの症例は半永久的なTKI治療を必要とする¹⁾。CML細胞の根絶による疾患克服を目指した新規分子標的治療戦略開発を推進するうえで、CML細胞の細胞死抵抗性獲得、TKIを含む薬剤抵抗性の分子メカニズムの解明は必須の研究課題である。

積年の研究により、CML細胞ではTKI結合部位であるABLキナーゼドメイン(KD)の点突然変異に によるBCR-ABL 依存的TKI 抵抗性獲得メカニズムと、BCR-ABL に依存しない細胞死抵抗性獲得メカニズ ムが存在し、これらが重複することで治療抵抗性を獲得し、疾患維持をもたらすことが明らかになってきた²⁾。多く のABL KD 変異がSGIs、あるいは第3世代TKIであるponatinibなどによって克服された今、克服すべきは BCR-ABL 非依存的TKI 抵抗性獲得メカニズムである。あらゆる細胞は組織内環境因子による支持のもとホ メオスターシスが保たれているが、CML 細胞も病変の主座である骨髄において骨髄間質細胞(Bone marrow stromal cell, BMSC)や細胞外マトリクス(Extracellular matrix, ECM)、造血成長因子などの各種の骨 髄環境構成因子により庇護されることで生存、増殖しており、TKI による細胞死刺激からも回避している可能 性が推測される。本研究では腫瘍環境構成因子である BMSC、ECM との相互作用によって造血器腫瘍の治 療抵抗性を特異的に促進する分子メカニズムを同定することで標的分子を同定し、その制御法開発による新 規分子標的治療法を探索することとした。

CML 細胞における骨髄環境特異的 Gelectin-3 (Gal-3)発現誘導

まず初めに、in vitro 骨髄微小環境 擬似モデルとして培養プレート底面を 擬似 ECM であるフィブロネクチンでコー ティング、擬似 BMSC として不死化ヒト BMSC 由来細胞株 HS-5 でシートし、 これらの条件での培養によって CML 由



来細胞株(K562、MYL)に生じる分子制御の変化を遺伝子発現マイクロアレイにより網羅的に検討した。前者 では接着因子介在性の分子制御効果を、後者ではそれにくわえて HS-5とCML 細胞間のクロストーク、HS-5 由来の液性因子の CML 細胞へのパラクライン効果の総和を観察できると期待されるが、両条件に共通の変化 として 284 遺伝子における2 倍以上の発現上昇、215 遺伝子における 0.5 倍以下への発現低下が誘導さ れた。さらにシグナルパスウェイ解析によってこれらの分子間の連関について検討したところ、RAS/MAPK 経路や AKT 経路の活性化を導く Gal-3 が、擬似骨髄微小環境モデルにおいて特異的に CML 細胞に発現誘導され CML-CP#1 CML-CP#2 CML-CP#3 CML-CP#4 ることが判明した(図1)³⁾。Gal-3はβ-ガ ラクトシド結合性レクチンであるガレクチンファ x 10 ミリー分子の一つであり、細胞増殖、細胞 x 40 CML-MBC#14 CML-MBC#15 CML-LBC#12 Ph⁺AML#21 遊走、細胞浸潤の促進、細胞死抵抗性の

x10 亢進、mRNA スプライシング制御など多彩 x40 な細胞機能に関与するほか、固形ガンや悪



性リンパ腫では遠隔転移の促進に関与することが報告されている⁴⁾。重要なことに患者骨髄由来CML細胞を 検討したところ、いずれの CML 細胞も骨髄内において実際に Gal-3 を発現していることも明らかになった。興味 深いことに患者 CML 細胞においては、より病初期の慢性期 CML 細胞においては Gal-3 発現が普遍的である のに対し、病状進行期、すわなち、フィラデルフィア染色体異常にくわえ、種々の付加的遺伝子異常が加わりク ローン性進展をおこし、分子病態・臨床病態ともにより激烈化した後の移行期、急性転化期においては、CML 細胞における Gal-3 発現は減弱している(図 2)³⁾。骨髄微小環境特異的 Gal-3 発現による BCR-ABL 非依存的な細胞増殖・細胞死抵抗性獲得シグナルの CML における初期病態形成、治療抵抗性への寄与が 示唆される。

Gal-3 高発現による CML 細胞の形質変化、薬剤抵抗性獲得と分子効果

CML 細胞における Gal-3 の機能を明らかに すべく、CML 細胞株への遺伝子導入による Gal-3 強制発現を行い、その効果を検討す ることとした。In vitro において、Gal-3 を安 定的に過剰発現した CML 細胞株亜株は 親株に比して細胞増殖能やコロニー形成能



 ⁽図3) CML由来細胞株 MYLにおけるGal-3過剰発現によるTKI抵抗性獲得.
 Gal-3剰発現 MYL/Gal-3細胞ではTKIによるアポトーシス誘導効果(M1: subG1=アポトーシス細胞) が減少。

が亢進し、TKIs や doxorubicin、etoposide、cytarabine、vincristine など各種の抗がん剤によるアポト ーシス誘導に対して部分的ながら抵抗性を示した(図 3)。また、HS-5 の培養上清には G-CSF、GM-CSF、

¥ 4VL+HS-WL+HS-Α. MYL/G3 G M-CSF、Kit ligand、MIP-1 α 、IL-6、IL-8、 562+ 562 MYL МУL Actin Actin Gal-3 Gal-3 pAkt Mcl-1 IL-11 など各種の造血サイトカインが含まれるが、 Akt Bcl-2 pErk Bcl-X₁ Bim Erk Bim Gal-3 過剰発現 CML 細胞株は親株に比して、 В DEAB DEAB DEAB HS-5 培養上清に対する走化性が亢進しているこ MYI MYL/Gal3 とが明らかになった。同時に Gal-3 過剰発現によっ (図4) Gal-3発現による分子制御の変化. A. AKT, ERKの活性化とMCL-1の誘導. B. ALDH1発現の亢進(DEABにより阻害される)

て CML 細胞における AKT、ERK のより高度の活性化が認められ、細胞増殖能亢進の原因と考えられたほか、 ALDH1 の発現誘導は薬剤抵抗性のほか、幹細胞性獲得を促進するものと考えられ^{5,6)}、これによりコロニー 形成能、すなわちクローン性増殖能亢進が獲得されたものと考えられる。また、アポトーシス抵抗性 BCL-2 ファミ リー分子である MCL-1 の発現誘導が認められ、アポトーシス抵抗性亢進の一因と考えられた(図 4)。一方、 CML 細胞を TKI に暴露しても Gal-3 の発現に変化はなく、Gal-3 と BCR-ABL は独立、かつ、補完的に AKT、 ERK など共通の下流シグナルを活性化し、CML 細胞の生存、増殖を促進することが示された³⁾。

CML 細胞の Gal-3 高発現によるオートクライン、パラクライン細胞増殖促進効果とメカニズム

白血病細胞は細胞間クロストークや自身の 分泌する液性因子によって、自身のみならず 隣接する白血病細胞、BMSC の増殖を刺 激・亢進し、骨髄微小環境内にいわゆる malignant nicheを形成し、生存・増殖に





より有利な環境形成を促進していると考えられている⁷⁾。Gal-3誘導が骨髄環境特異的な現象であることから、 我々は Gal-3 が骨髄環境におけるオートクライン、パラクライン細胞増殖促進に関与する可能性を検討した。そ の結果、Gal-3 過剰発現 CML 細胞の培養上清は親株の培養上清に比べ、CML 細胞、ならびに BMSC の 増殖を促進した。この現象のメカニズムを明らかにするため、Gal-3過剰発現 CML 細胞由来培養上清、ならび に親株由来培養上清をそれぞれ液体クロマトグラフィーによって分離し、上清成分の相違を検討したところ、 Gal-3 過剰発現 CML 細胞由来培養上清では親株由来培養上清に存在する 110KDa 分子が減少・消失 しており、これを含む画分において細胞増殖能が有意に低減していることが明らかになった(図 5)。さらにアミノ 酸配列解析によって、同分子は元来、培養液中に含まれる SERPINA1 (アンチトリプシン A) とアルブミンの 複合体であることが判明した⁸⁾。SERPINA1 は炎症性蛋白のひとつであり、各種のがん細胞の増殖を抑制す ること、また、Gal-3 は SERPINA1 との結合能を有することが知られている⁹⁾。一方、サイトカインアレイを用い た検討により、Gal-3 過剰発現 CML 細胞由来培養上清では親株由来培養上清に比し細胞増殖を促進す る TGF-Bが 2 倍以上に増加し、細胞増殖を抑制する CXCL-10 や IL-10 が半分以下に減少していることも 明らかになった⁸⁾。これらの協調的効果により、Gal-3はCML細胞、ならびに周辺BMSCの増殖をオートクラ イン、パラクラインに促進しているものと想定される。

Gal-3 過剰発現による CML 細胞の骨髄棲息の促進

In vivo 骨髄環境における Gal-3 の機能を検討するため、Gal-3 過剰発現 CML 細胞、親株 CML 細胞をそれぞれ免疫不全(NOD/SCID)マウスに移植し、生着、ならびに生体内の進展様式について検討した。いずれ

の細胞を移植したマウスにおいても、移植後 数日より末梢血中に CML 細胞の出現を認 めたが、移植後 20 日前後を境に親株細胞 移植マウスでは末梢血より白血病細胞が消 失し、30 日後ごろより腹腔内など骨髄外臓 器における CML 細胞の多発腫瘤形成を認 め、50 日目までに多臓器浸潤により移植マ ウスは全て死亡した。この際、親株移植マウ スでは CML 細胞を骨髄に認めなかった。一 方、Gal-3 過剰発現 CML 細胞移植マウス



(図6) MYL細胞、Gal-3過剰発現MYL細胞(MYL/G3)の NOD/SCIDマウスへの移植モデル。末梢血中のCML細胞率(A)と生存 曲線(B). 実線; MYL細胞、点線; MYL/G3細胞. MYL細胞移植マウ ス(C)ではCML細胞の骨髄外臓器浸潤が顕著であるのに対し、MYL/G3 細胞移植マウスではCML細胞は骨髄内に留まる。

では、移植後 20 日後も末梢血に CML 細胞は出現を続け、殆どのマウスが観察期間(80 日)を通じて生存し 続けた。これらのマウスでは Gal-3 過剰発現 CML 細胞は骨髄内、ならびに骨髄から連続性に周辺臓器に直 接浸潤してはいるものの、骨髄外臓器への遠隔転移を認めなかった³⁾。CML 細胞における Gal-3 の発現は CML 細胞の骨髄生着のみならず、骨髄での棲息維持を促進すると考えられる(図 6)。

CML 細胞の Gal-3 高発現による TKI 抵抗性の克服戦略

これらの結果から、骨髄微小環境内では BCR-ABL 非依存性に CML 細胞の生存、増殖、アポトーシス抵抗 性を促進する Gal-3 による代替的な多彩な分子効果、ならびに細胞生物学的効果が機能しているため、 CML 細胞に対して TKI によって BCR-ABL シグナルを阻害しても、CML 細胞を完全に駆逐することは困難と なるストーリーが成立する。そこで、Gal-3 誘導性 TKI 抵抗性を克服しうる戦略を探索することとした。まずは Gal-3 の直接阻害による効果を検討すべくフランクション化シトラスペクチン (Fractionated citrus pectin (FCP))の効果を検討した。FCPはシトラスペクチンの構造変化体であり、Gal-3と結合し、その作用を阻害する 作用を有することが知られている。実際、TKI と FCP の併用は期待通り Gal-3 導性 TKI 抵抗性を克服した ³⁾。しかしながら、FCP を *in vivo* で用いることは困難であるうえ、現有の薬剤には Gal-3 阻害効果を有するも のは存在しない。そこで、次に Gal-3 誘導性 TKI 抵抗性を克服しうる現有の薬剤を探索することとした。従前、 われわれは TKI の BCR-ABL 阻害による CML 細胞のアポトーシス誘導においては、8 種存在するアポトーシス 誘導性 BH3-only protein (BIM、BAD、BID、PUMA、BIK、HRK、NOXA、BMF)のうち¹⁰⁾、BIM の誘 導が必須であり、くわえて BAD、BMF の補助的・協調的効果が必要であることを明らかにしてきた^{11, 12)}。 Gal-3 により発現亢進する MCL-1 は、TKI により発現誘導された BIM や BMF に結合し、これらによるアポト

ーシス誘導作用を中和、相殺してしまうため、細 胞死誘導効果が減弱すると想定される。そこで、 BCR-ABL阻害によるCML細胞の細胞死誘導 に必須のBIMをBCR-ABL非依存的に誘導し つつ、くわえてBIM以外のBH-3 only protein を誘導・活性化しうる薬剤を探索することとした。 多種の薬剤のスクリーニングを行うなか、protein



(図7) BH3-only proteinの制御によるGal-3誘導性TKI抵抗性の 克服

phosphatase 2A (PP2A)活性化剤である FTY720 が BCR-ABL 非依存的に BIM ならびに BID を誘導・ 活性化することで CML 細胞にアポトーシスを誘導しうること、ABL KD 変異による TKI 抵抗性を克服しうること、 ならびに TKI との併用により Gal-3 による TKI 感受性低下を克服しうることを見出した (図 7)¹³⁾。 FTY720 は多発性硬化症に対する免疫抑制剤として、現在、すでに日常診療に活用されている薬剤である¹⁴⁾。 既存 薬の新たな活用法が見出されたものと期待できる。

まとめ

CML における骨髄微小環境誘導性分子とし てのGal-3の病態形成における意義、エフェク ター分子と細胞生物学的効果、その克服によ る治療開発の可能性について、現時点までの 研究結果を記した(図8)。いまだ未知の分 子メカニズムの関与の存在も推測され、現在 も研究を継続中である。



(図8) CMLにおける骨髄微小環境誘導性Gal-3発現による多彩な病態形成促進作用.

謝辞

本研究に助成いただきました財団法人篷庵社に深謝申し上げます。

参考文献

- Mahon FX, Réa D, Guilhot J, Guilhot F, Huguet F, Nicolini F, Legros L, Charbonnier A, Guerci A, Varet B, Etienne G, Reiffers J, Rousselot P; Intergroupe Français des Leucémies Myéloïdes Chroniques. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. Lancet Oncol. 2010;11:1029-1035.
- 2. Kuroda J, Shimura Y, Yamamoto-Sugitani M, Sasaki N, Taniwaki M. Multifaceted mechanisms for cell survival and drug targeting in chronic myelogenous leukemia. Curr Cancer Drug Targets. 2013;13:69-79.
- Yamamoto-Sugitani M, Kuroda J, Ashihara E, Nagoshi H, Kobayashi T, Matsumoto Y, Sasaki N, Shimura Y, Kiyota M, Nakayama R, Akaji K, Taki T, Uoshima N, Kobayashi Y, Horiike S, Maekawa T, Taniwaki M. Galectin-3 (Gal-3) induced by leukemia microenvironment promotes drug resistance and bone marrow lodgment in chronic myelogenous leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108:17468-17473.
- 4. Song L, Tang JW, Owusu L, Sun MZ, Wu J, Zhang J. Galectin-3 in cancer. Clin Chim Acta. 2014;431C:185-191.
- 5. Lohberger B, Rinner B, Stuendl N, Absenger M, Liegl-Atzwanger B, Walzer SM, Windhager R, Leithner A. Aldehyde dehydrogenase 1, a potential marker for cancer stem cells in human sarcoma. PLoS One. 2012;7:e43664.
- Kawasoe M, Yamamoto Y, Okawa K, Funato T, Takeda M, Hara T, Tsurumi H, Moriwaki H, Arioka Y, Takemura M, Matsunami H, Markey SP, Saito K. Acquired resistance of leukemic cells to AraC is associated with the upregulation of aldehyde dehydrogenase 1 family member A2. Exp Hematol. 2013;41:597-603.
- 7. Colmone A, Amorim M, Pontier AL, Wang S, Jablonski E, Sipkins DA. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. Science. 2008;322:1861-1865.
- Nakayama R, Kuroda J, Taniyama N, Yamamoto-Sugitani M, Wada S, Kiyota M, Mizutani S, Chinen Y, Matsumoto Y, Nagoshi H, Shimura Y, Kobayashi T, Horiike S, Sato K, Taniwaki M. Suppression of SERPINA1-albumin complex formation by galectin-3 overexpression leads to paracrine growth promotion of chronic myelogenous leukemia cells. Leuk Res. 2014;38:103-108.
- Cederfur C, Salomonsson E, Nilsson J, Halim A, Oberg CT, Larson G, Nilsson UJ, Leffler H. Different affinity of galectins for human serum glycoproteins: galectin-3 binds many protease inhibitors and acute phase proteins. Glycobiology. 2008;18:384-394.
- 10. Kuroda J, Taniwaki M. Involvement of BH3-only proteins in hematologic malignancies. Crit Rev Oncol Hematol. 2009;71:89-101.

- 11. Kuroda J, Puthalakath H, Cragg MS, Kelly PN, Bouillet P, Huang DC, Kimura S, Ottmann OG, Druker BJ, Villunger A, Roberts AW, Strasser A. Bim and Bad mediate imatinib-induced killing of Bcr/Abl+ leukemic cells, and resistance due to their loss is overcome by a BH3 mimetic. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:14907-14912.
- 12. Kuroda J, Kimura S, Strasser A, Andreeff M, O'Reilly LA, Ashihara E, Kamitsuji Y, Yokota A, Kawata E, Takeuchi M, Tanaka R, Tabe Y, Taniwaki M, Maekawa T. Apoptosis-based dual molecular targeting by INNO-406, a second-generation Bcr-Abl inhibitor, and ABT-737, an inhibitor of antiapoptotic Bcl-2 proteins, against Bcr-Abl-positive leukemia. Cell Death Differ. 2007;14:1667-1677.
- 13. Kiyota M, Kuroda J, Yamamoto-Sugitani M, Shimura Y, Nakayama R, Nagoshi H, Mizutani S, Chinen Y, Sasaki N, Sakamoto N, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Taniwaki M. FTY720 induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells via dual activation of BIM and BID and overcomes various types of resistance to tyrosine kinase inhibitors. Apoptosis. 2013;18:1437-1446.
- 14. Willis MA, Cohen JA. Fingolimod therapy for multiple sclerosis. Semin Neurol. 2013;33:37-44.