

(第 37 回)

公益財団法人 篷庵社

研究助成発表会

講演要旨集

平成 30 年 7 月 25 日 (水)

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30年7月25日(水) 13時00分から17時25分まで

場所：塩野義製薬株式会社医薬研究センター オーデトリウム

\*所属は講演当時のもの

13:00-13:05	ご挨拶 公益財団法人蓬庵社 理事長 武田 禮二	
	<u>演題および演者(講演 25分、討論 10分)</u>	<u>座長</u>
13:05-13:40	1. 抗多剤耐性結核菌活性を有するcaprazamycin類の合成研究 <b>竹本 佳司 先生</b> (京都大学大学院薬学研究科)	(蓬庵社名誉理事) 村橋 俊一 先生
13:40-14:15	2. 血管リモデリング形成における低酸素誘導因子の機能解析 <b>富田 修平 先生</b> (大阪市立大学大学院医学研究科分子病態薬理学分野)	(蓬庵社評議員) 岩尾 洋 先生
14:15-14:50	3. 蛍光プローブの論理的精密設計に基づく、 細胞生命現象・in vivo 微小がんイメージングの実現 <b>浦野 泰照 先生</b> (東京大学大学院薬学系研究科 薬品代謝化学教室)	(蓬庵社名誉理事) 廣部 雅昭 先生
14:50-15:25	4. 有機カチオン膜輸送体の臓器疾患と薬物治療に及ぼす役割 <b>加藤 将夫 先生</b> (金沢大学医薬保健研究域(薬学系))	(故)辻 彰 先生 代理 (蓬庵社評議員) 寺崎 哲也 先生
15:25-15:40	休 憩	
15:40-16:15	5. 希少糖(レアシュガー)の消化管吸収機構と 小腸機能回復に与える影響 <b>鈴木 拓史 先生</b> (山形大学 学術研究院 地域教育文化学部 )	(蓬庵社評議員) 伊勢村 護 先生
16:15-16:50	《特別研究助成》 6. FCMDの中樞神経症状に対する治療法の開発 <b>池田 真理子 先生</b> (藤田保健衛生大学病院 遺伝カウンセリング室)	(塩野義製薬(株) 創薬疾患研究所) 伊藤 久則 氏
16:50-17:25	《特別研究助成》 7. ラミン A/C 遺伝子関連心筋症におけるヒトiPS細胞・ ラットモデルを用いた病態解明・治療法開発 <b>牧山 武 先生</b> (京都大学大学院医学研究科循環器内科学)	(塩野義製薬(株) 創薬疾患研究所) 高橋 浩治 氏

## 目 次

1. **竹本 佳司**  
「抗多剤耐性結核菌活性を有する caprazamycin 類の合成研究」  
1
2. **冨田 修平**  
「血管リモデリング形成における低酸素誘導因子の機能解析」  
11
3. **浦野 泰照**  
「蛍光プローブの論理的精密設計に基づく、  
細胞生命現象・in vivo 微小がんイメージングの実現」  
18
4. **加藤 将夫**  
「有機カチオン膜輸送体の臓器疾患と薬物治療に及ぼす役割」  
27
5. **鈴木 拓史**  
「希少糖(レアシュガー)の消化管吸収機構と  
小腸機能回復に与える影響」  
37
6. **池田 真理子**  
「FCMDの中樞神経症状に対する治療法の開発」  
51
7. **牧山 武**  
「ラミン A/C 遺伝子関連心筋症におけるヒト iPS 細胞・  
ラットモデルを用いた病態解明・治療法開発」  
62

# 抗多剤耐性結核菌活性を有する caprazamycin 類の合成研究

京都大学大学院薬学研究科 竹本佳司

## 1. はじめに

Caprazamycin 類は 2003 年に微生物化学研究所の Igarashi らにより放線菌 *Streptomyces* sp. MK730-62F2 より単離・構造決定された核酸系抗生物質の一種である<sup>1</sup>(Figure 1)。これらは、多剤耐性結核菌 (MDR-TB) を含む結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* に対し強い抗菌活性を持ち、特に化学療法による治療が事実上困難な超多剤耐性結核菌 (XDR-TB) に対しても良好な抗菌活性を示す CPZEN-45 の前駆体であるため、近年注目されている<sup>2</sup>。作用機序は細菌細胞壁の主要構成成分であるペプチドグリカンの生合成酵素 *MraY* を阻害するためと提唱されている<sup>3</sup>。*MraY* は、今日広く用いられているグリコペプチド系抗生物質 (バンコマイシン等) や  $\beta$ -ラクタム系抗生物質が標的とする酵素よりも生合成経路の上流に位置するため、*MraY* を標的とする新規抗菌剤はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) やバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌 (VRSA) などの耐性菌を含む広い抗菌スペクトルを有すると期待されている<sup>4</sup>。さらに、長期薬物投与による多剤耐性菌の出現が報告されており、新たな作用機序を有する新規薬剤の開発が必要とされている。

Caprazamycin 類の構造上の特徴は、3 つの不斉中心を有する七員環ジアゼパノン骨格を中心に、アミノリボース、ウリジン、脂肪酸側鎖が複雑に縮合した興味深い構造である。我々が本研究に参画した当時、Matsuda/Ichikawa<sup>5</sup> と Shibasaki/Watanabe<sup>6</sup> らが caprazol の全合成を報告していたが、caprazamycin 類の全合成は達成されていなかった<sup>7</sup>。そこで、我々は新規抗結核薬シード化合物の創製に応用可能な合成経路の確立を目指し、caprazamycin 類の全合成研究に着手した。

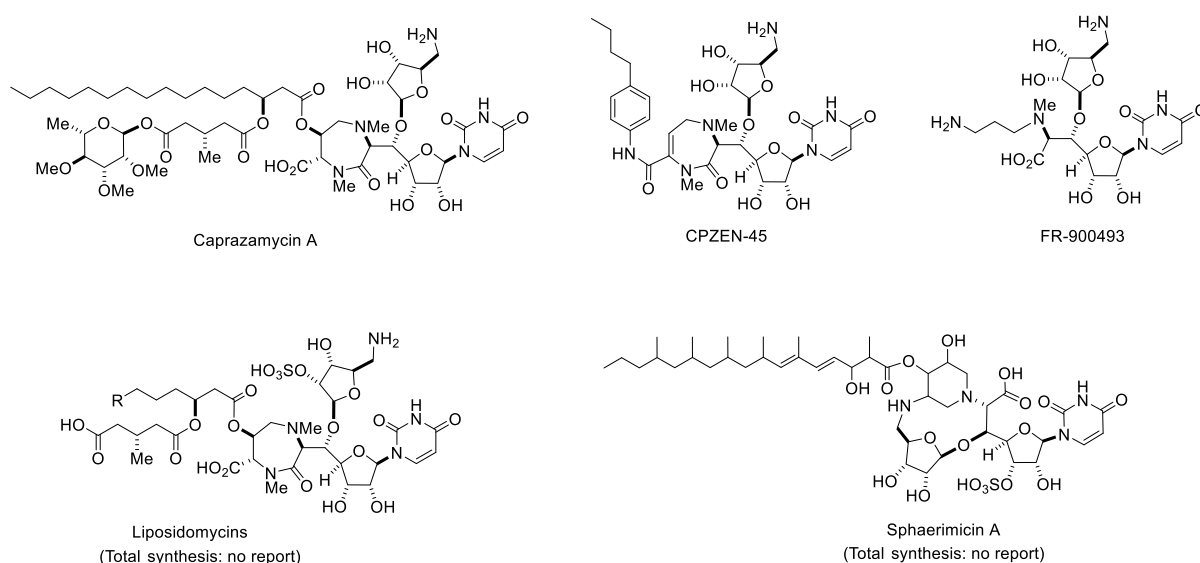
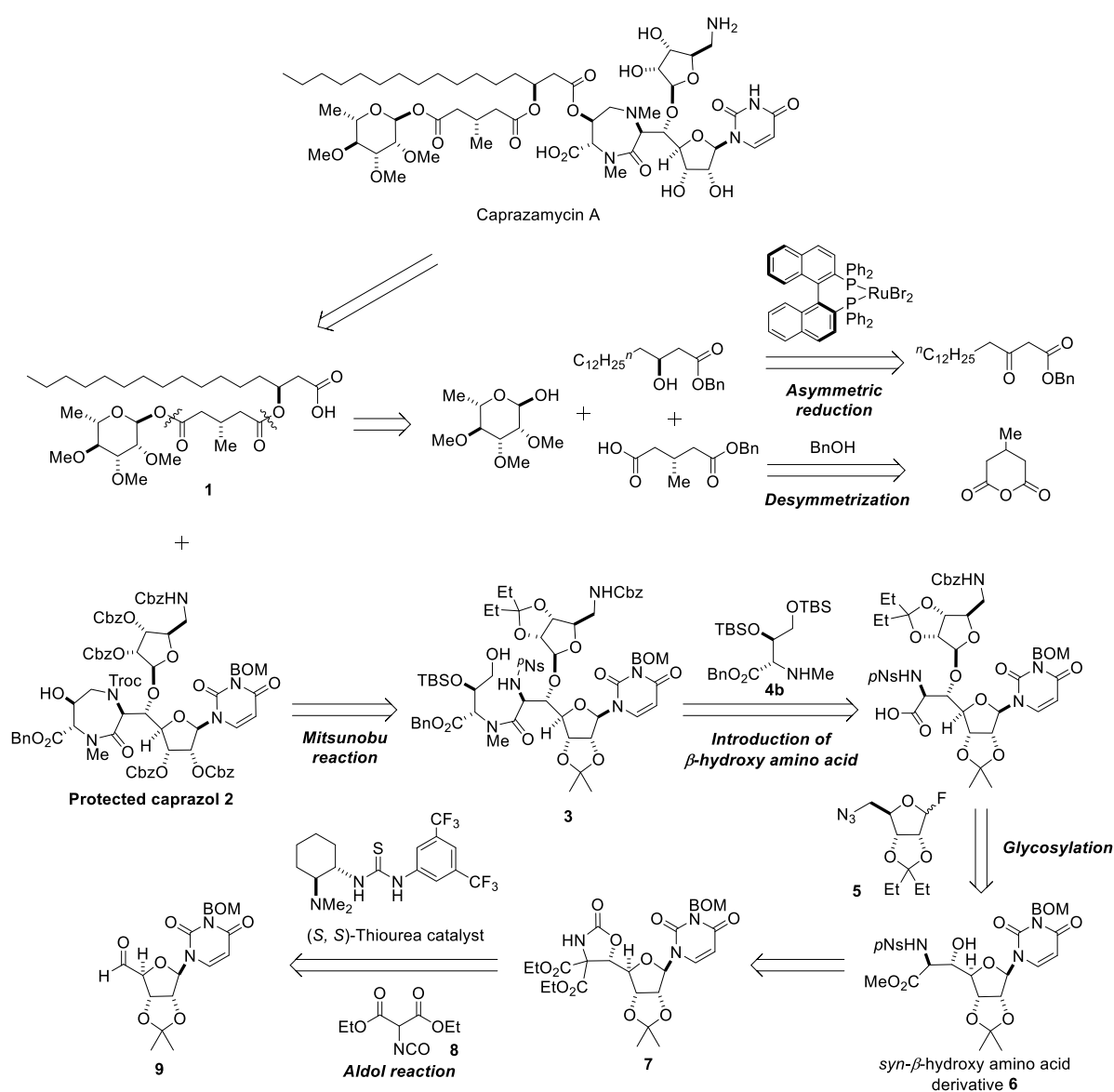


Figure 1. Caprazamycins and other *MraY* inhibitors

## 2. 逆合成解析

Caprazamycin A の合成計画を Scheme 1 に示したが、1)  $\beta$ -アシロキシ脂肪酸側鎖 **1** の導入、2) 七員環ジアゼパノン **2** の構築、3) ウリジン誘導体 **9** のジアステレオ選択的アルドール付加が重要課題となる。不安定と予想される脂肪酸側鎖 **1** は合成終盤で段階的に連結することとし、結合相手のジアゼパノン環 **2** は  $\beta$ -ヒドロキシアミノ酸 **6** に対してアジドリブース **5** と *anti*- $\beta$ -ヒドロキシ- $\alpha$ -アミノ酸 **4b** を順次導入して合成したスルホンアミドアルコール **3** を光延反応に付すことを計画した。*syn*- $\beta$ -ヒドロキシ- $\alpha$ -アミノ酸 **6** は、ウリジンから数段階で得られるアルデヒド **9** と 2-isothiocyanatomalonate **8** とのアルドール付加体 **7** から変換可能と考えた。



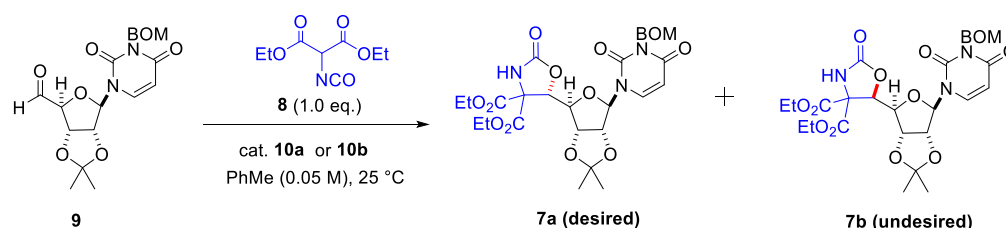
Scheme 1. Retrosynthetic analysis of caprazamycin A

### 3. Caprazamycin A の全合成

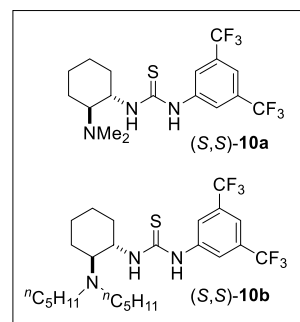
#### (1) ジアステレオ選択的アルドール反応

Uridine を出発原料とし、1,2-ジオールのアセタール化、ウラシルの窒素原子を BOM で保護したアルコール体を IBX 酸化して得たアルデヒド **9** を用いて、ジアステレオ選択的なアルドール反応を試みた (Table 1)。触媒量の Et<sub>3</sub>N、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、DBU を用いた場合には、良好な選択性は得られなかったが (entries 1-3)、(S,S)-チオウレア触媒 **10a**<sup>8</sup> (10 mol%) を用いると、収率 64%、選択性 (**7a/7b**) 3.1:1 で目的のアルドール付加体 **7a** を主生成物として得ることに成功した (entry 4)。さらなる検討の結果、より嵩高い第三級アミノ基をもつチオウレア触媒 **10b** の使用により、収率 (77%) とジアステレオ選択性 (**7a/7b** = 6.5:1) が共に向上することを見出した<sup>9</sup> (entry 5)。残念ながら、触媒量を低減したり、鏡像体の触媒を用いると収率と選択性が共に低下する傾向が観察された (entries 6-8)。

**Table 1.** Aldol reaction of aldehyde **9** and malonate **8** catalyzed by thiourea **10a, b**

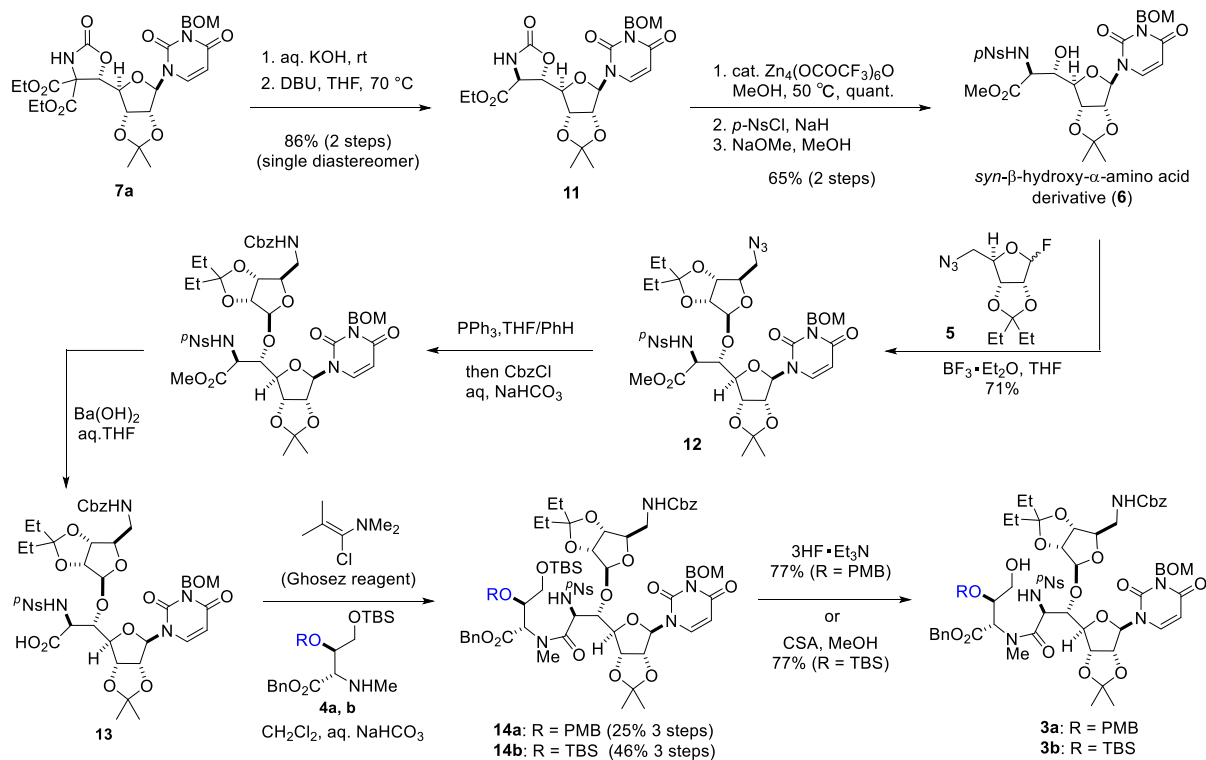


entry	cat.	results ( <b>7a</b> : <b>7b</b> )	other
1	Et <sub>3</sub> N (10 mol%)	50% (dr = 1:1.8)	
2	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (10 mol%)	60% (dr = 1.3:1)	
3	DBU (10 mol%)	42% (dr = 1:1)	
-----			
4	(S, S)- <b>10a</b> (10 mol%)	64% (dr = 3.1:1)	
-----			
5	(S, S)- <b>10b</b> (10 mol%)	77% (dr = 6.5:1)	
6	(S, S)- <b>10b</b> (7 mol%)	81% (dr = 5.0:1)	
7	(S, S)- <b>10b</b> (5 mol%)	68% (dr = 4.2:1)	15% (S.M.)
-----			
8	(R, R)- <b>10b</b> (10 mol%)	80% (dr > 1:20)	



次に、アルドール付加体 **7a** の *syn*- $\beta$ -ヒドロキシ- $\alpha$ -アミノ酸 **6** への誘導を試みた (Scheme 2)。**7a** を水酸化カリウムによって加水分解した後、DBU 存在下加熱することで、熱力学的に安定なトランスオキサズリジノン **11** を得た。**11** はその後の加水分解の容易さから、Zn 四核錯体<sup>10</sup>を用いたエステル交換によってメチルエステルとしたのち、*p*-Ns 基による保護、NaOMe で処理することで **6** を合成した。続いて、**6** を Matsuda, Ichikawa らが報告しているフッ化糖 **5** との  $\beta$  選択的なグリコシド化<sup>5</sup>により **12** とし、アジド基の還元と Cbz 基による保護、続いて加水分解によりカル

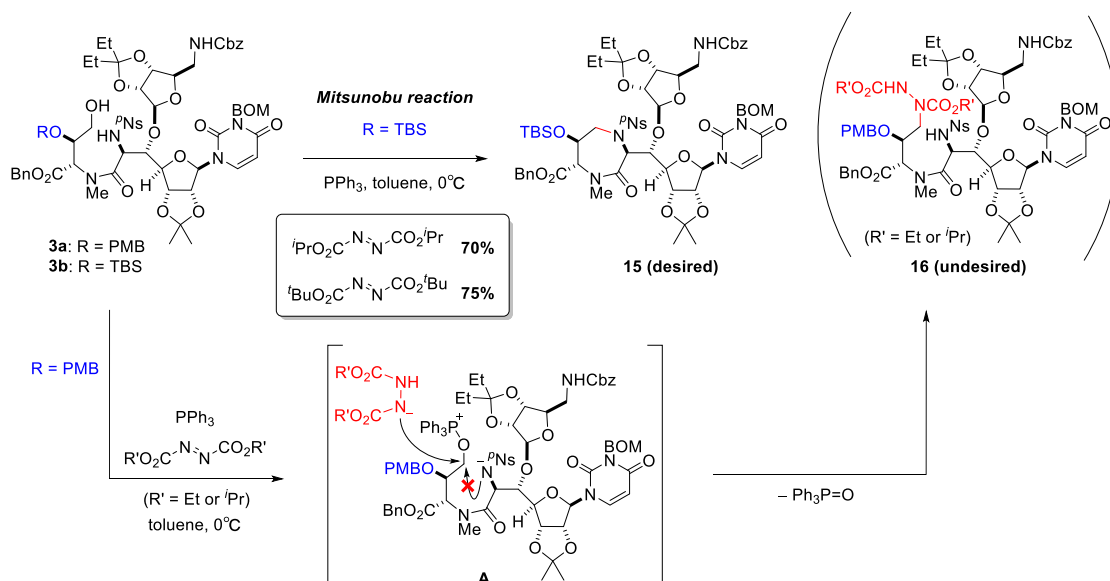
ボン酸 **13** へと変換した。さらに、カルボン酸 **13** と *anti*- $\beta$ -ヒドロキシアミノ酸誘導体 **4a, b** (**a**: R = PMB, **b**: R = TBS) との縮合は、中性条件下で酸塩化物に変換可能な Ghosez 試薬を用いて酸塩化物とすることで  $\beta$ 脱離やエピメリ化等の副反応を抑制し、所望のアミド体 **14a, b** を得た。最後に、第1級アルコールの TBS 基を位置選択的に除去し、光延反応の環化前駆体 **3a, b** を合成した。



**Scheme 2.** Synthesis of precursors for Mitsunobu reaction

## (2) 光延反応によるジアゼパノン骨格の構築

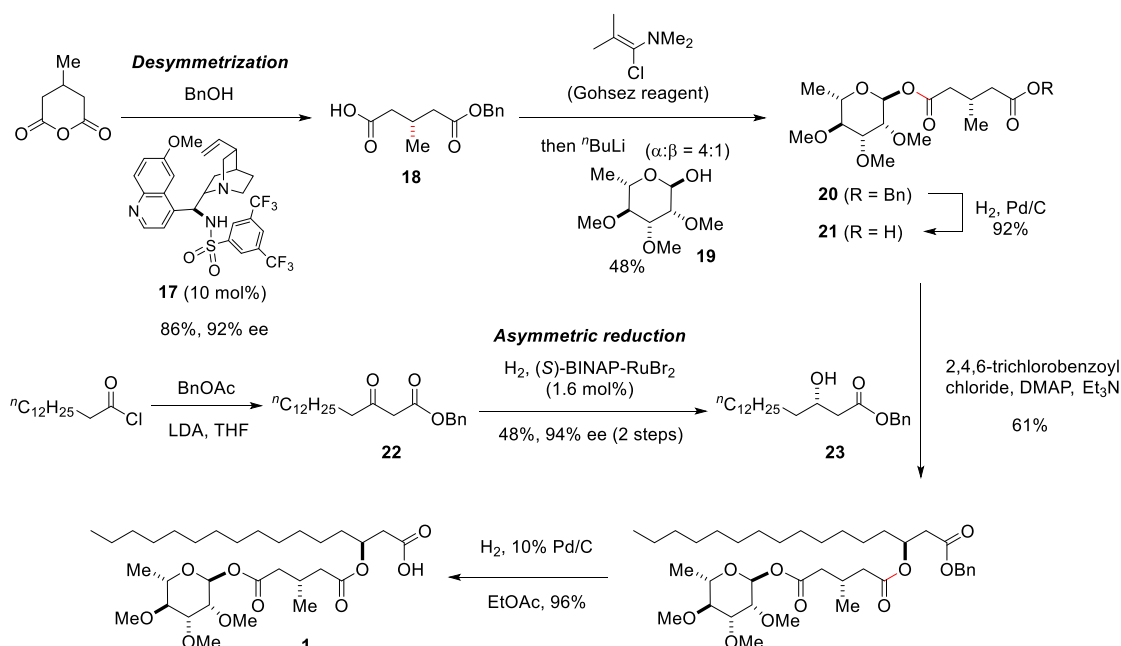
次の7員環形成では、二つの  $\beta$ -ヒドロキシアミノ酸部位の不斉中心を損なうことなくジアゼパノン環を構築する必要がある (Scheme 3)。最初に、第二級アルコールを PMB 基で保護した環化前駆体 **3a** を用いて分子内光延反応を試みた。しかしながら、 $\text{PPh}_3$  存在下、ジエチルアゾジカルボキシレート (DEAD) やジイソプロピルアゾジカルボキシレート (DIAD) を用いても環化体は得られなかった。また、DEAD や DIAD の還元体が分子間  $\text{S}_{\text{N}}2$  反応して生じた副生成物 **16** の存在が、マスペクトルによって確認された。これは、光延条件によって生じた中間体 **A** に対して、所望の分子内  $\text{S}_{\text{N}}2$  反応よりも、分子間  $\text{S}_{\text{N}}2$  反応が優先したためである。そこで、この副生成物 **16** を抑制するため、反応点近傍を立体的に嵩高くできる TBS 基を導入した基質 **3b** を用いて光延反応を試みた。予想通り、DIAD を用いて 70% の収率で環化体 **15** を得、さらに嵩高いジ-*t*-ブチルアゾジカルボキシレート (DBAD) を用いることで収率を 75% まで改善した。



**Scheme 3.** Construction of diazepanone fragment by Mitsunobu reaction

### (3) 脂肪酸側鎖の合成及びジアゼパノンモデルに対する導入

Song 及び Sei らはシンコナルカロイド触媒 **17** を用いた環状無水物の非対称化反応を報告している<sup>11</sup>。本手法を利用して 3-メチルグルタル酸無水物を非対称化し **18** とした後、L-ラムノース誘導体 **19** との縮合を経てエステル **20** を合成した (Scheme 4)。**20** は接触還元して対応するカルボン酸 **21** へと誘導した。一方、 $\beta$ -ヒドロキシカルボン酸誘導体 **23** の合成は、ミリストイルクロリドを出発原料として既知文献に従い  $\beta$ -ケトエステル **22** に変換後、野依法<sup>12</sup>により不斉還元することで  $\beta$ -ヒドロキシベンジルエステル **23** とした。最後に **23** とカルボン酸 **21** を山口法により縮合し、Pd 触媒下接触水素化することで天然型脂肪酸 **1** を合成した。



**Scheme 4.** Synthesis of fatty acid side chain **1**.



これまでにジアゼパノン環に対する天然型の脂肪酸側鎖 **1** の導入については報告例がない。これは、脂肪酸側鎖が不安定な  $\beta$ -アシロキシカルボン酸構造をもつことから、塩基性条件下  $\beta$  脱離、アシル基の転位等が容易に進行するためである。また、ジアゼパノン環においても、エステル部位のエピメリ化、 $\beta$ -脱離、レトロアルドール反応といった副反応が予想される (Figure 2)。

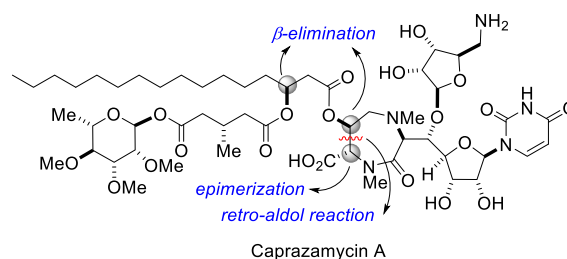
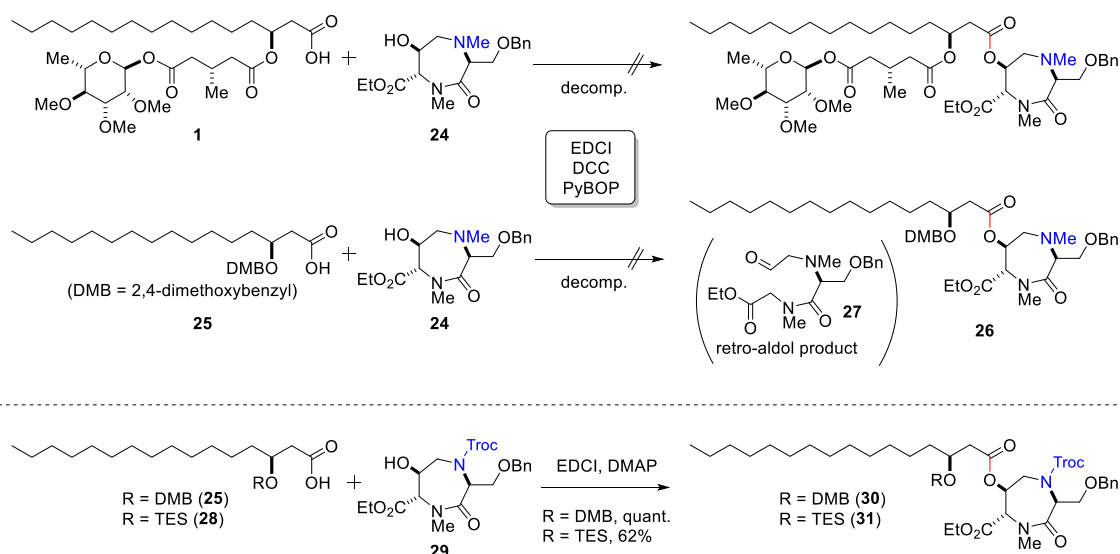


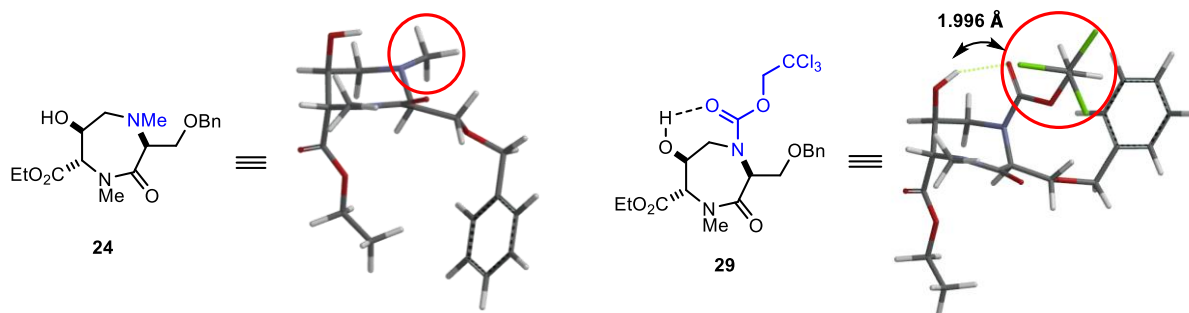
Figure 2. Possible side reaction

そこで、モデルジアゼパノン環を用いて、脂肪酸側鎖 **1** の導入法の確立を目指した (Scheme 5)。モデルジアゼパノン **24** に対し EDCI, DCC, PyBOP といった縮合剤を用いて天然型脂肪酸 **1** との縮合を試みたが、複雑な混合物を与えた。また、脂肪酸側鎖 **1** の  $\beta$ -脱離を抑制する目的で、 $\beta$  位のヒドロキシ基を DMB (2,4-dimethoxybenzyl) 基で保護した脂肪酸 **25** を合成し、EDCI, DCC, PyBOP を用いて縮合を試みたが、目的物 **26** は得られなかった。この際、副生成物として **24** のレトロアルドール反応が進行したアルデヒド **27** の生成が、 $^1\text{H}$  NMR より示唆された。一方で、Troc 基で保護した基質 **29** を用いることで、定量的に縮合体 **30** を得ることに成功した。さらに、本反応は TES 基で保護したカルボン酸 **28** においても有効で、対応するアシル化体 **31** を得ることができた。



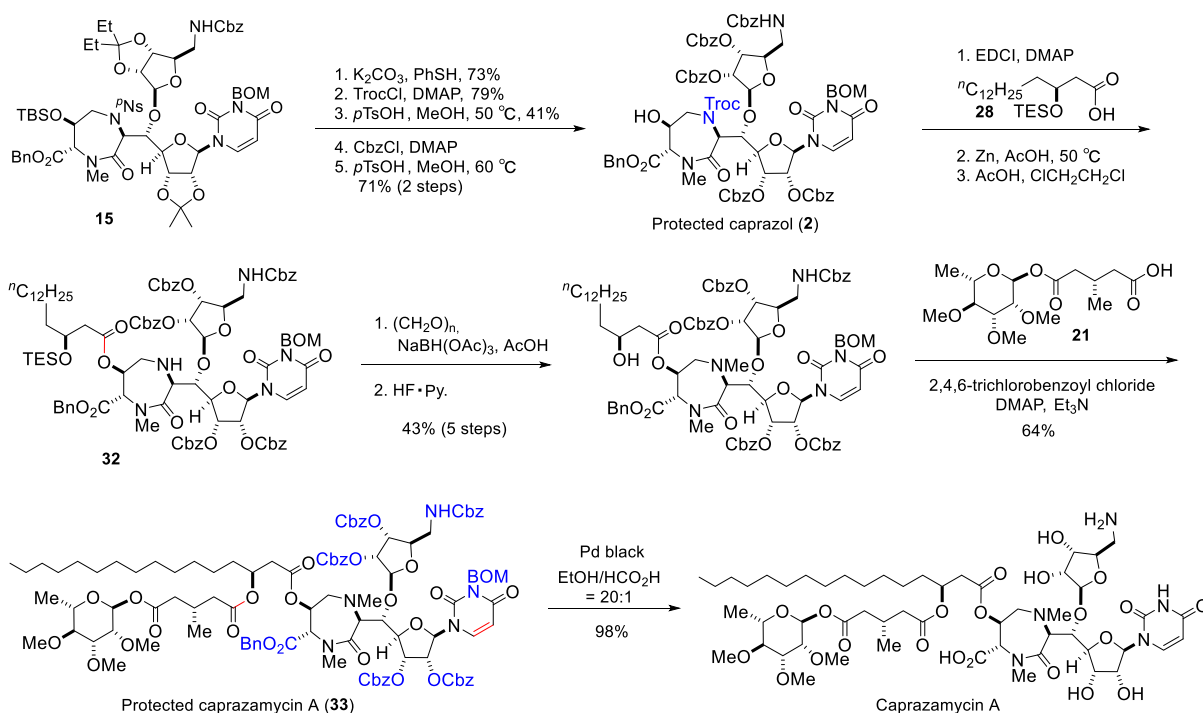
Scheme 5. Assembly of  $\beta$ -acyloxyfatty acid and diazepanone fragment.

*N*-Me 体 **24** と *N*-Troc 体 **29** のジアゼパノンの反応性の違いを、両基質の最安定配座を DFT 計算により求めて考察した (Figure 3)。*N*-Me 体 **24** は第三級アミンの Me 基が擬エクアトリアル位に位置するが、*N*-Troc 体 **29** では Troc 基は近傍のヒドロキシと水素結合するため擬アキシャル位を占有してことが示唆された。これにより、アシル化条件下においても *N*-Troc 体 **29** は水酸基との水素結合によってレトロアルドール反応が抑制されアシル化が優先したと考えられる。



**Figure 3.** The stable conformations of *N*-Me- and *N*-Troc-derivatives **24** and **29** by DFT-calculation

以上の知見を参考にして、光延反応による環化体 **15** から caprazamycin A の全合成を目指した (Scheme 6)。環化体 **15** の *p*-Ns 基を除去し Troc 保護したのち、種々の官能基変換を経て caprazol 保護体 **2** へと誘導した。保護体 **2** と長鎖脂肪酸 **28** の縮合反応は、EDCI を用いることで  $\beta$  脱離、エピメリ化、レトロアルドール反応等の副反応を抑制して進行した。続いて、Zn, AcOH により Troc 基を除去し、還元的アミノ化による *N*-Me 化、TES 基の除去、ラムノースを含む脂肪酸 **21** の導入を試みた。モデル基質で成功した山口法では caprazamycin A 保護体 **33** と共に  $\beta$  脱離体が生じたため、加える  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMAP の量を減らし反応時間を短くすることで、保護体 **33** を収率 64% で得ることに成功した。最後に、保護体 **33** の Cbz 基、BOM 基、Bn エステルの脱保護を検討した。この際の課題は、ウラシルのオレフィン部位を還元することなく保護基を除去する点である。まず、水素雰囲気下、10% Pd/C を用いて脱保護を試みたが保護基の除去には成功したものの、オレフィン



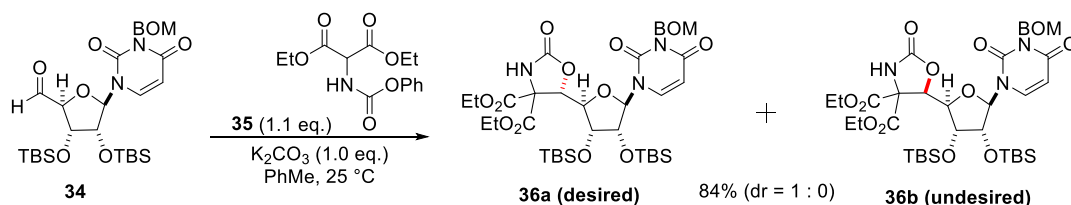
**Scheme 6.** Total synthesis of caprazamycin A

部位の還元体が得られた。また、種々の Pd 触媒及び水素源を検討したが、オレフィン部位の還元体を抑制することはできなかった。詳細な検討を重ねた結果、Pd black 存在下、EtOH/HCO<sub>2</sub>H = 20:1 で処理することで、ほぼ定量的に目的の脱保護体を得ることができ、caprazamycin A の世界初の全合成を達成した<sup>15</sup>。本合成経路は未だに全合成の報告例がない liposidomycin 類、muraminomycin F、A-90289 A といった長鎖脂肪酸側鎖を有する核酸系抗生物質への応用が期待できる。

#### 4. CPZEN-45 の全合成

CPZEN-45 は、caprazamycin B より半合成的に誘導化された核酸系抗菌薬の一種である (Figure 1)。多剤耐性結核菌のみならず、化学療法による治療が事実上困難な 10 剤耐性の超多剤耐性結核菌 に対してても有効であるため注目されているが、我々が本研究に参画した時点では完全化学合成による供給は報告されていなかった。そこで CPZEN-45 の初の完全化学合成に着手した。

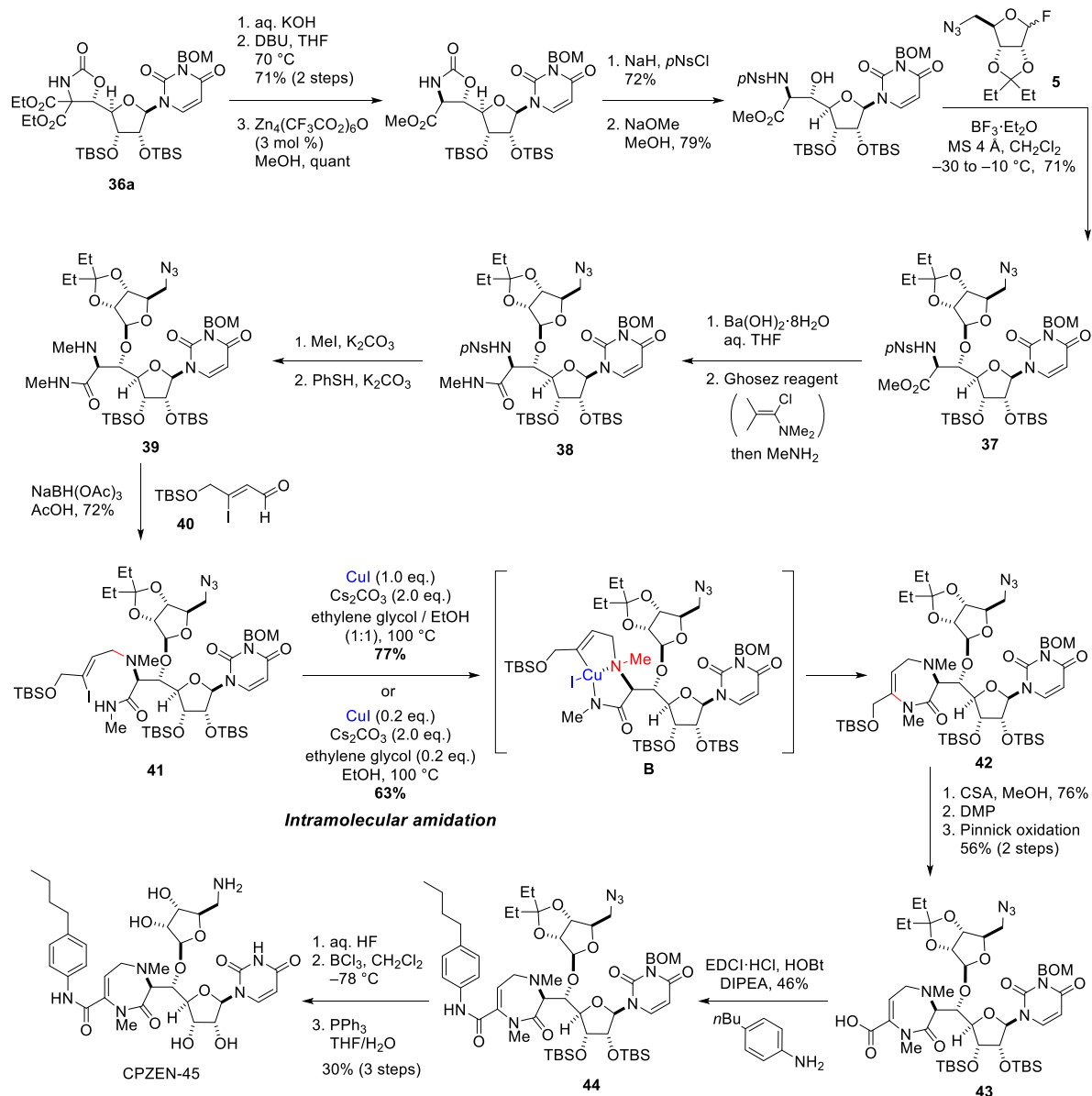
Caprazamycin A の全合成で開発したジアステレオ選択的アルドール反応は大量合成には課題を残していた。そこで Shibasaki, Watanabe らの報告<sup>6</sup>を参考に、ウリジンの 2, 3 位水酸基を TBS 基で保護したアルデヒド **34** を調製し、フェニルカルバメートを有するマロン酸ジエステル **35** とトルエン中、1 当量の炭酸カリウムと室温で反応させることで、目的のアルドール成績体 **36a** を収率 84%、単一化合物として得ることに成功した。



**Scheme 7.** Diastereoselective aldol reaction

さらにアルドール体 **36a** は、その後の官能基変換とアジドリボース **5** の導入を含む 6 工程を経て化合物 **37** とし、加水分解と続くアミド化によりアミド **38**、Me 化と *p*-Ns 基の除去を経てアミン **39** へと誘導した。得られたアミン **39** は、アルデヒド **40** との還元的アミノ化により良好な収率で環化前駆体 **41** に変換した。次のジアゼパノン骨格の構築については、種々検討した結果、環化前駆体 **41** を ethylene glycol / EtOH = 1:1 の混合溶媒中、CuI (1.0 eq.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.0 eq.) を用いて 100 ° C に加熱することで<sup>16</sup>、77%の収率で目的の環化体 **42** が得られることを見出した。さらに、本反応は CuI を 20 mol%にまで低減しても進行し、63%の収率で環化体を得ることができた。

合成したジアゼパノン体 **42** は、TBS 基の除去と続く 2 回の酸化反応を経てカルボン酸 **43** とした。その後、カルボン酸 **43** をアニリン誘導体との縮合により CPZEN-45 保護体 **44** とし、最後に TBS 基とペンチリデンアセタールの除去に続く、BCl<sub>3</sub> による BOM 基の除去、さらにアジドの還元により、CPZEN-45 の初の全合成を達成した<sup>17</sup>。



**Scheme 8.** Total synthesis of CPZEN-45

## 5. 結語

研究開始当初に想定された幾つかの課題を解決するために、チオ尿素触媒を用いた $\beta$ -ヒドロキシ- $\alpha$ -アミノ酸の立体選択的アルドール付加反応、光延反応を利用した1,4-ジアゼピン-2-オン環の構築、光学活性な $\beta$ -アシロキシ脂肪酸の不斉合成と段階的導入、隣接基関与を利用した銅触媒分子内アミド化による1,4-ジアゼピン-2-オン環の形成など独自で新たな鍵反応を開発することでCaprazamycin類 (caprazamycin A, CPZEN-45) の全合成を達成することができた。いずれの反応もスケールアップにも十分に耐えうる堅牢的な反応であり、誘導体合成も含め未だに全合成の報告例がない核酸系抗生物質への応用が期待できる。

## 6. 謝辞

本研究の一部は、公益財団法人篷庵社から4年間にわたりいただいた研究助成によるものであり、ここに厚く御礼申し上げます。またご推薦を賜りました村橋俊一先生に心より感謝申し上げます。Caprazamycin AとCPZEN-45の天然品の<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMRスペクトルデータをご供与いただいた微生物化学研究所の五十嵐雅之博士、高橋良昭博士に深謝申し上げます。最後に、これらの研究成果は、京都大学薬学研究科薬品分子化学分野の塚野千尋講師、中村斐有博士、吉田拓馬氏の献身的な努力により達成されたものであり、この機会をお借りして深謝いたします。

## 7. 引用文献

1. a) M. Igarashi, N. Nakagawa, S. Doi, N. Hattori, H. Naganawa, M. Hamada, *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 580; b) T. Takeuchi, M. Igarashi, H. Naganawa, JP P2003-12687A, **2003**; c) M. Igarashi, Y. Takahashi, T. Shitara, H. Nakamura, H. Naganawa, T. Miyake, Y. Akamatsu, *J. Antibiot.* **2005**, *58*, 327; d) C. Dini, *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, *5*, 1221; e) T. D. H. Bugg, A. J. Lloyd, D. I. Roper, *Infect. Disord.: Drug Targets* **2006**, *6*, 85.
2. a) Y. Ishizaki, C. Hayashi, K. Inoue, M. Igarashi, Y. Takahashi, V. Pujari, D. C. Crick, P. J. Brennan, A. Nomoto, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 30309; b) Y. Takahashi, M. Igarashi, T. Miyake, H. Soutome, K. Ishikawa, Y. Komatsuki, Y. Koyama, N. Nakagawa, S. Hattori, K. Inoue, N. Doi, Y. Akamatsu, *J. Antibiot.* **2013**, *66*, 171; c) S. N. M. Hanif, A. J. Hickey, L. Garcia-Contreras, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *88*, 370; d) T. Miyake, Y. Takahashi, M. Igarashi, *235th Am. Chem. Soc. National Meet.: CARB*, **2008**, 104.
3. a) C. Dini, P. Collette, N. Drochon, J. C. Guillot, G. Lemoine, P. Mauvais, J. Aszodi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1839; b) Y. Ishizaki, C. Hayashi, K. Inoue, M. Igarashi, Y. Takahashi, V. Pujari, D. C. Crick, P. J. Brennan, A. Nomoto, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 30309.
4. K. Kimura, T. D. H. Bugg, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 252.
5. a) S. Hirano, S. Ichikawa, A. Matsuda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1854; b) S. Hirano, S. Ichikawa, A. Matsuda, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 9936; c) S. Hirano, S. Ichikawa, A. Matsuda, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 569.
6. a) P. Gopinath, L. Wang, H. Abe, G. Ravi, T. Masuda, T. Watanabe, M. Shibasaki, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 3364; b) P. Gopinath, T. Watanabe, M. Shibasaki, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 9260.
7. Recently, Shibasaki and co-workers have developed a total synthesis of caprazamycin B; H. Abe, P. Gopinath, G. Ravi, L. Wang, T. Watanabe, M. Shibasaki, *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 3782.
8. T. Okino, Y. Hoashi, Y. Takemoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12672.
9. S. Sakamoto, N. Kazumi, Y. Kobayashi, C. Tsukano, Y. Takemoto, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 4758.
10. T. Ohshima, T. Iwasaki, Y. Maegawa, A. Yoshiyama, K. Mashima, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2944.
11. a) S. H. Oh, H. S. Rho, J. W. Lee, J. E. Lee, S. H. Youk, J. Chin, C. E. Song, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7872; b) T. Honjo, T. Tsumura, S. Sano, Y. Nagao, K. Yamaguchi, Y. Sei, *Synlett* **2009**, 3279.
12. a) M. S. Arias-Pérez, M. S. López, M. J. Santos, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2002**, 1549; b) D. A. Evans, W. C. Black, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4497.
13. D. F. Taber, P. B. Decker, H. M. Fales, T. H. Jones, H. A. Lloyd, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2968.
14. a) R. Noyori, H. Takaya, *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 345; b) V. Ratovelomanana-Vidal, C. Girard, R. Touati, J. P. Tranchier, B. Ben Hassine, J. P. Genêt, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 261.
15. H. Nakamura, C. Tsukano, M. Yasui, S. Yokouchi, M. Igarashi, Y. Takemoto, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 3136.
16. J. L. Kenwright, W. R. J. D. Galloway, D. T. Blackwell, A. Isidro-Llobet, J. Hodgkinson, L. Wortmann, S. D. Bowden, M. Welch, D. R. Spring, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 2981.
17. H. Nakamura, T. Yoshida, C. Tsukano, Y. Takemoto, *Org. Lett.*, **2016**, *18*, 2300.

# 血管リモデリング形成における低酸素誘導因子の機能解析

大阪市立大学大学院医学研究科分子病態薬理学  
富田修平

## 1. はじめに

心疾患や脳血管疾患などの心血管病 (cardiovascular diseases; CVD)は、長年日本人の死亡原因の上位を占めている。CVD 発症には動脈硬化の進展が重大な危険因子として考えられている。動脈硬化病変において、マクロファージ、T 細胞、樹状細胞、肥満細胞など炎症性細胞の浸潤が認められ、炎症性サイトカインの発現が増加していることが知られており、近年では動脈硬化は炎症性疾患のうちのひとつであるという概念が定着しつつある。この概念は 1976 年に Russell Ross らによって提唱された「傷害反応説」がもととなっており、彼らは種々のサイトカインや増殖因子を介した血管平滑筋細胞とマクロファージや T 細胞との相互作用に伴う炎症反応が動脈硬化の進展に関与しているという仮説を提唱した<sup>1</sup>。このようなアテローム性動脈硬化の形成過程だけでなく、新生内膜の形成が認められる動脈硬化やステント留置術後の血管再狭窄などの血管リモデリングにおいても血管構成細胞とマクロファージや T 細胞との相互作用が病態形成に寄与していることが知られている。

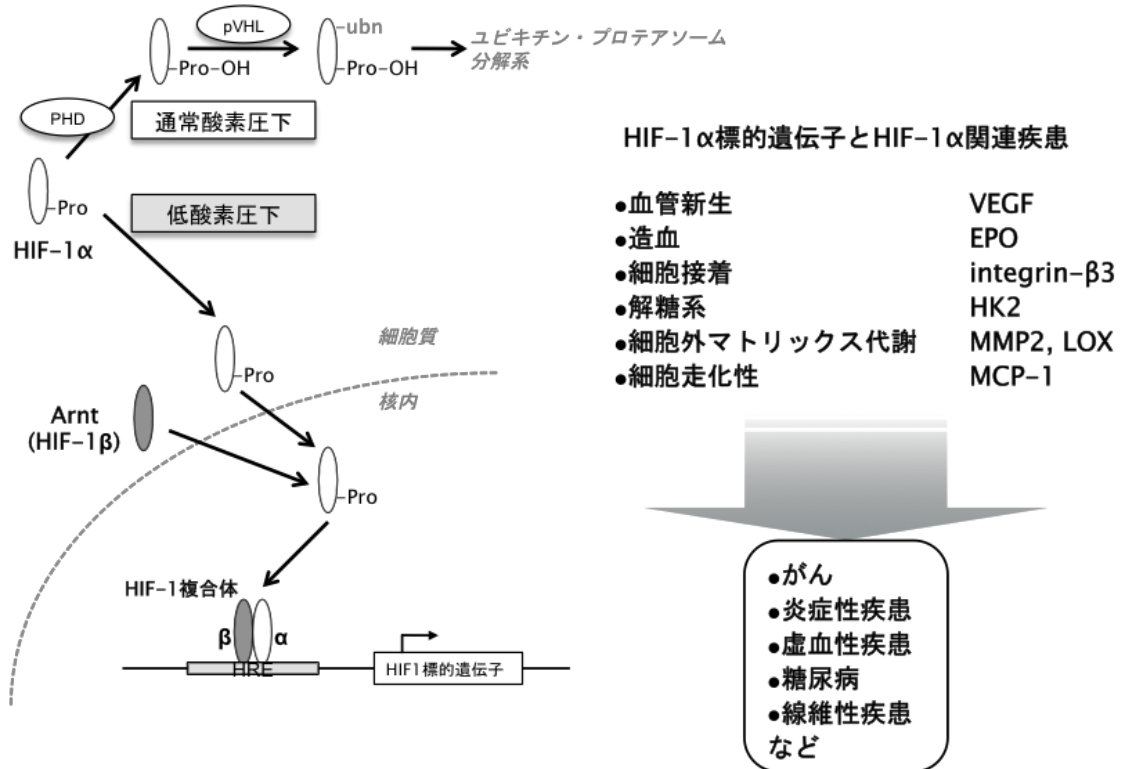


図1 HIF-1 $\alpha$ による標的遺伝子の転写活性化機序とHIF-1 $\alpha$ 関連疾患

血管リモデリングの病態は多様であるが、こうした慢性炎症の状態にある組織では微小低酸素環境が存在することが知られている。低酸素応答において中心的な役割を果たす転写制御因子として低酸素誘導因子 hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )が存在する。HIF-1 $\alpha$ は低酸素環境下で安定化され HIF-1 $\beta$  とヘテロダイマ

一の HIF-1 複合体を形成し核内移行して、標的遺伝子の転写を制御する。HIF-1 $\alpha$  の標的分子である炎症性サイトカインや細胞外マトリックス制御関連分子<sup>2</sup>は、慢性炎症やがんの悪性化、細胞増殖などの分野で注目されてきた (図1)。さらに最近では低酸素環境だけではなく angiotensin II (Ang II) や platelet-derived growth factor (PDGF)、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) などの成長因子やサイトカインなどでも誘導されることが明らかとなり、HIF-1 $\alpha$  は慢性炎症疾患としても捉えられる血管リモデリングの分野でもその機能が注目されている。

本研究では、血管リモデリングの病態形成において中心的な役割を果たす細胞群のうち、血管平滑筋細胞由来の HIF-1 $\alpha$  の役割を中心にこれまでにならぬ報告してきた研究成果を中心に報告する。

## 2. 血管リモデリングにおける血管平滑筋細胞由来 HIF-1 $\alpha$ の役割

ステント留置術後に形成される新生内膜や動脈硬化に観察される血管壁中膜肥厚の病態において、血管平滑筋細胞の遊走、増殖や細胞肥大は、血管リモデリングの形成に重要な役割を果たしている。また、血管リモデリングの形成過程において血管平滑筋細胞は MCP-1 や IL-1、IL-6 などといったサイトカインを分泌することで単球の遊走や浸潤、炎症を引き起こす<sup>3</sup>。従って、血管平滑筋細胞は血管リモデリングにおいて中心的な役割を果たしていることが考えられる。血管平滑筋細胞には比較的恒常的に HIF-1 $\alpha$  が発現しており、低酸素刺激や Ang II、PDGF、TNF- $\alpha$  などの成長因子やサイトカインなどで誘導される<sup>4</sup>。アテローム性動脈硬化病巣部において、脂質コアの周囲では低酸素環境と HIF-1 $\alpha$  発現、VEGF 発現やマクロファージマーカーが共局在していることが報告されており<sup>5</sup>、血管リモデリングにおける HIF-1 $\alpha$  の役割が注目されてきている。

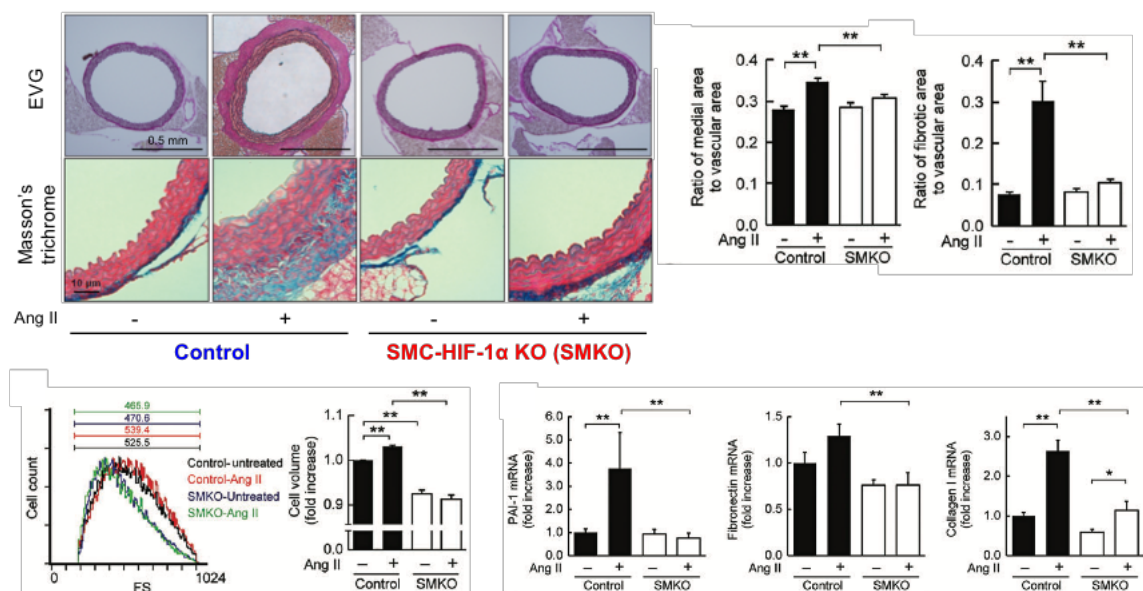


図2 平滑筋細胞由来HIF-1 $\alpha$ は細胞肥大や細胞外マトリックス構成成分であるcollagenを産生を促進し、血管リモデリング促進因子として働く

最近われわれは、Ang II 慢性持続投与血管リモデリングマウスモデルを用いて、Ang II によって誘発される大動脈中膜肥厚や血管周囲の線維化、マクロファージ

の浸潤が平滑筋特異的 HIF-1 $\alpha$  欠損マウスでは抑制されることを見出した<sup>6</sup>。この Ang II 慢性持続投与血管リモデリングマウスモデルでは、大動脈中膜の HIF-1 $\alpha$  が誘導されており、mRNA レベルおよびタンパクレベルで HIF-1 $\alpha$  発現の上昇を確認されている。また、生体内において血管平滑筋細胞由来 HIF-1 $\alpha$  は Ang II による、PAI-1 や collagen I などの細胞外マトリックス代謝関連遺伝子発現亢進、MCP-1 や IL-1 $\beta$  などの炎症関連遺伝子発現亢進に寄与していることが示唆され、さらに Ang II による血管平滑筋細胞肥大にも寄与していることが見出された (図 2)。以上の結果より、血管平滑筋細胞由来 HIF-1 $\alpha$  は血管リモデリング促進因子として捉えられる。

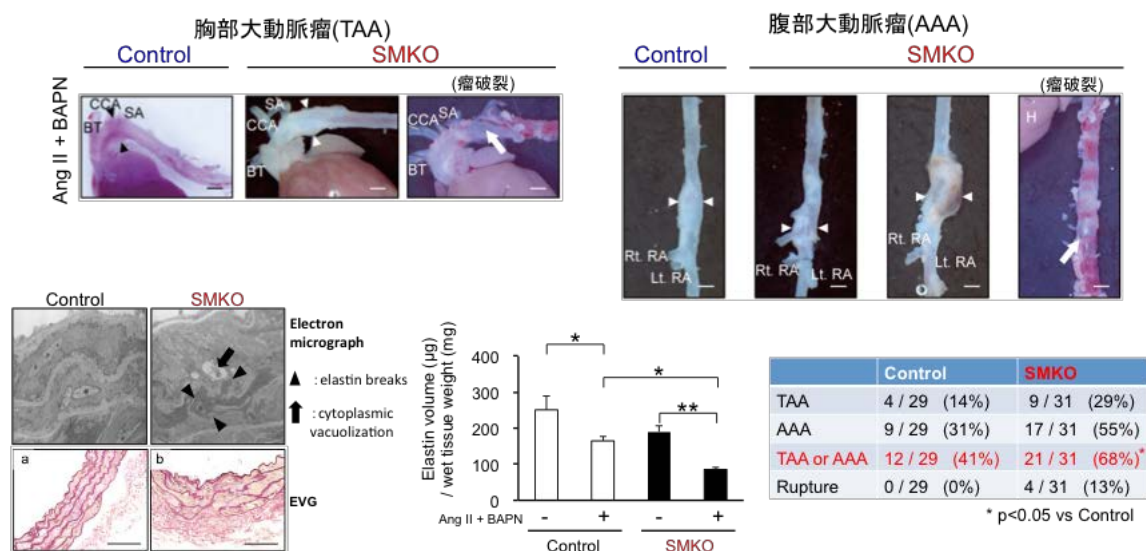


図 3 平滑筋細胞特異的 HIF-1 $\alpha$  欠損により大動脈瘤形成は促進され、エラスチン線維の断裂は促進される

血管リモデリングは外的刺激に対する生体の慢性的な代償反応として起こるものであり、過剰な (病的な) リモデリングは組織の機能を低下させてしまうことがあるため抑制されるほうが好ましいという認識が根付いているように思われる。では、血管平滑筋細胞由来 HIF-1 $\alpha$  は常に抑制され、血管リモデリングが抑制された方がより血管機能を維持することができるのか。その疑問を解決するために、次に血管脆弱性をもたらすマウス大動脈瘤モデルを用いて血管平滑筋細胞由来 HIF-1 $\alpha$  の役割の検討を行った。臨床において、ヒト動脈瘤組織の平滑筋細胞や外膜にて HIF-1 $\alpha$  発現亢進が認められることが報告されている<sup>7</sup>。また、エラストラーゼ誘発性大動脈瘤マウスモデルを用いた検討でも大動脈組織中にて HIF-1 $\alpha$  発現亢進が認められることが報告されている。われわれが用いた薬剤誘導性大動脈瘤モデルにおいても HIF-1 $\alpha$  mRNA 発現亢進が認められ、平滑筋特異的 HIF-1 $\alpha$  欠損により大動脈瘤の形成が促進された<sup>8</sup>。大動脈瘤の病変部では、elastin を主成分とする弾性線維 (elastin 線維) の断裂や菲薄化が認められる。弾性線維は血管の弾性維持において大きな役割を果たしているため、この弾性線維の断裂や菲薄化が大動脈瘤形成の原因として考えられている。薬剤誘導性大動脈瘤モデルにおいて認められる弾性線維の破壊や elastin 量の減少は平滑筋特異的 HIF-1 $\alpha$  欠損により促進された (図 3)。

Elastin 線維の破壊や分解には炎症性細胞や血管構成細胞由来の MMP-2 や



MMP-9 が寄与すると考えられているが、本モデルにおいて平滑筋特異的 HIF-1 $\alpha$  欠損は MMP-2 活性に影響を与えなかった。これまでの大動脈瘤の形成に関する報告では、elastin 線維の分解に着目したものが多かった。つまり、MMP-2 や MMP-9 の活性や発現を検討した論文が大多数であった。その理由として、大血管中膜の弾性板 (elastin 線維) は発生の段階で成熟血管として形成された以後は分解と合成のターンオーバーがほとんど起こらないと考えられていたことが背景として存在する。しかし最近、elastin 線維の架橋を担う酵素である lysyl oxidase (LOX) の阻害剤、 $\beta$ -aminopropionitrile を実験動物に投与することによって大動脈瘤が形成されることが報告されていることから<sup>9</sup>、elastin 線維は分解と合成のターンオーバーにより恒常性が保たれており合成不全によっても elastin 線維の脆弱性を呈する可能性が示唆される。われわれの大動脈瘤モデルにおける平滑筋特異的 HIF-1 $\alpha$  欠損の影響の検討において平滑筋由来 HIF-1 $\alpha$  は elastin 線維の分解に影響を与えないことが示唆されたため、次にわれわれは elastin 線維の合成過程に着目した。Elastin 線維の主要な構成成分である可溶性の tropoelastin は細胞内で合成され elastin binding protein にて安定化・保持された後、microfibril という繊維状タンパクの周囲に集合し LOX によって分子間で架橋され elastin 線維が形成される<sup>10</sup>。平滑筋特異的 HIF-1 $\alpha$  欠損により LOX 活性は低下し、薬剤投与による大動脈瘤誘導条件下において大動脈 LOX mRNA 発現および tropoelastin mRNA 発現は平滑筋特異的 HIF-1 $\alpha$  欠損により低下した。われわれはコントロールマウスおよび平滑筋特異的 HIF-1 $\alpha$  欠損マウスのそれぞれの大動脈より平滑筋細胞を単離し、細胞培養系においても HIF-1 $\alpha$  欠損により tropoelastin mRNA 発現が低下することを確認した。以上の結果より、血管平滑筋細胞由来 HIF-1 $\alpha$  は elastin 線維分解には影響せず、elastin 線維合成過程において tropoelastin 発現や elastin 架橋を促進させることで大動脈瘤形成に対して保護的に働くことが示唆された。

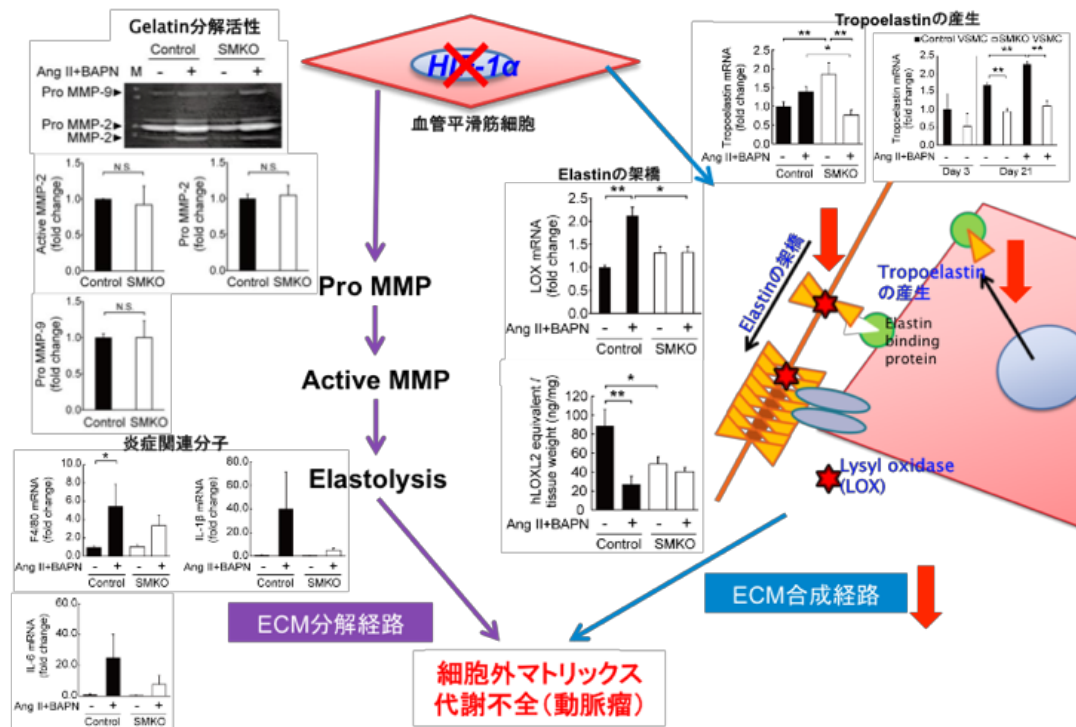


図4 平滑筋特異的HIF-1 $\alpha$ 欠損がelastinの分解および合成に及ぼす影響

一方で、elastin 線維を分解する MMP-2 は HIF-1 $\alpha$  により制御されていることが知られており、マウスモデルにおいても deferoxamine 投与や sh RNA 処置による HIF-1 $\alpha$  発現抑制が MMP-2 や MMP-9 の発現および活性を抑制し大動脈瘤形成を抑制させるという報告がある<sup>11</sup>。われわれの検討においても薬剤誘導性大動脈瘤モデルにおいて認められる MMP-2 および MMP-9 の発現上昇は平滑筋特異的 HIF-1 $\alpha$  欠損により抑制されたが、前述のように平滑筋由来 HIF-1 $\alpha$  発現は MMP-2 活性には影響しなかった (図 4)。われわれの報告により直接的に大動脈瘤形成における血管平滑筋細胞由来 HIF-1 $\alpha$  の役割が明らかにされ、血管平滑筋細胞由来 HIF-1 $\alpha$  発現は elastin 線維の恒常性維持において分解よりもむしろ合成に寄与するという新たな概念が提唱された (図 5)。

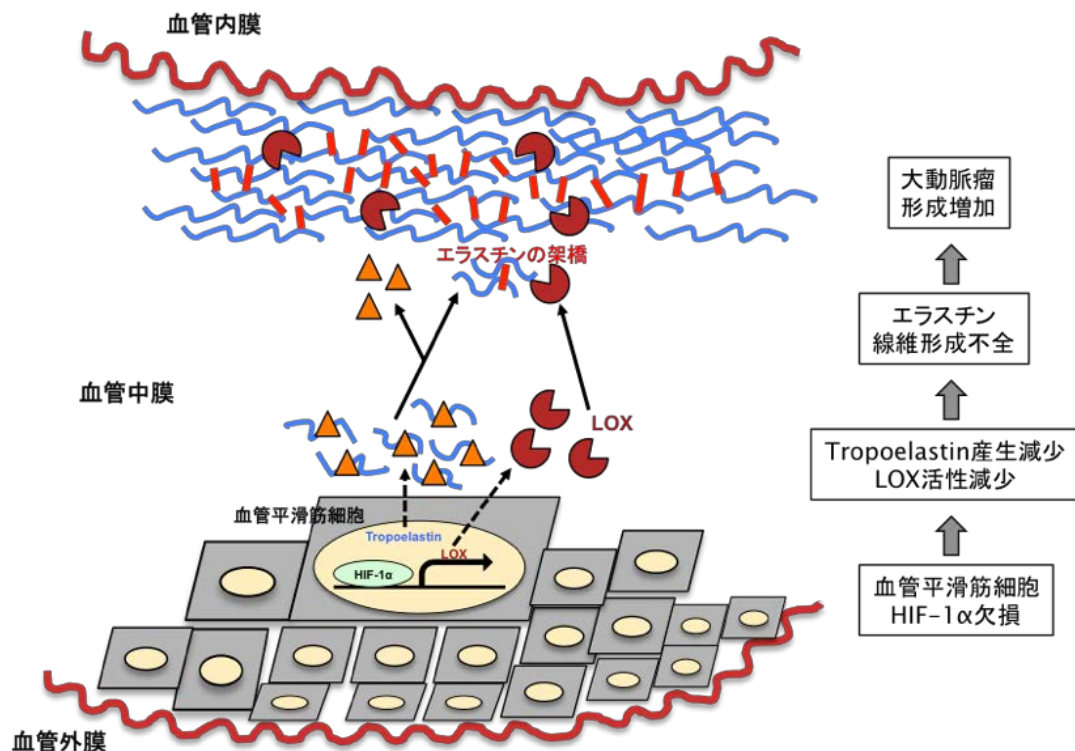


図 5 平滑筋由来 HIF-1 $\alpha$  は、elastin 線維の形成過程における elastin 産生および elastin 架橋を増強させることにより大動脈瘤形成に対して保護的に作用する

したがって、血管平滑筋細胞由来 HIF-1 $\alpha$  は平滑筋細胞増殖や collagen 産生、MMP 発現亢進などの細胞外マトリクス代謝亢進に寄与するため血管リモデリング促進因子として捉えることができる一方で、細胞外マトリクス成分の恒常性維持にも寄与しており、欠乏により血管脆弱性をもたらす可能性がある。したがって、血管リモデリングにおいて血管平滑筋細胞由来 HIF-1 $\alpha$  は生体適応にはたらくており、過剰な発現亢進や発現抑制は適応破綻をもたらす可能性があると考えられる。

### 3. おわりに

これまでにわれわれは、①マウス大腿動脈カフ傷害モデルを用いて T 細胞由来 HIF-1 $\alpha$  の欠損は血管組織局所のサイトカイン産生を増加させ血管リモデリングを増悪させること<sup>12</sup>、②ガイドワイヤーによるマウス大腿動脈血管障害モデルに

においてマクロファージ由来 HIF-1 $\alpha$  は病巣部へのマクロファージの動員や炎症性サイトカインの発現、マクロファージ分化における極性制御を介して新生内膜形成に寄与していること<sup>13</sup>、③Ang II 誘発性血管リモデリングにおける血管線維化や血管平滑筋細胞肥大による中膜肥厚は血管平滑筋細胞由来 HIF-1 $\alpha$  を介していること<sup>6</sup>、④大動脈瘤モデルにおいて血管平滑筋細胞由来 HIF-1 $\alpha$  は tropoelastin 発現および LOX の発現、活性を制御して elastin 線維の形成に寄与することで大動脈瘤形成に対して保護的に作用すること<sup>8</sup>を示した。これらの結果より、生体内における HIF-1 $\alpha$  の過剰活性化や欠乏は過剰な代償反応や血管機能不全を引き起こす（適応破綻）ことが考えられ、生体制御可能範囲内の HIF-1 $\alpha$  発現は血管恒常性維持（生体適応）に働いていると考えられる（図6）。即ち、HIF-1 $\alpha$  を標的とした治療戦略を立案する場合には、その病態の見極めが重要であると考えられる。

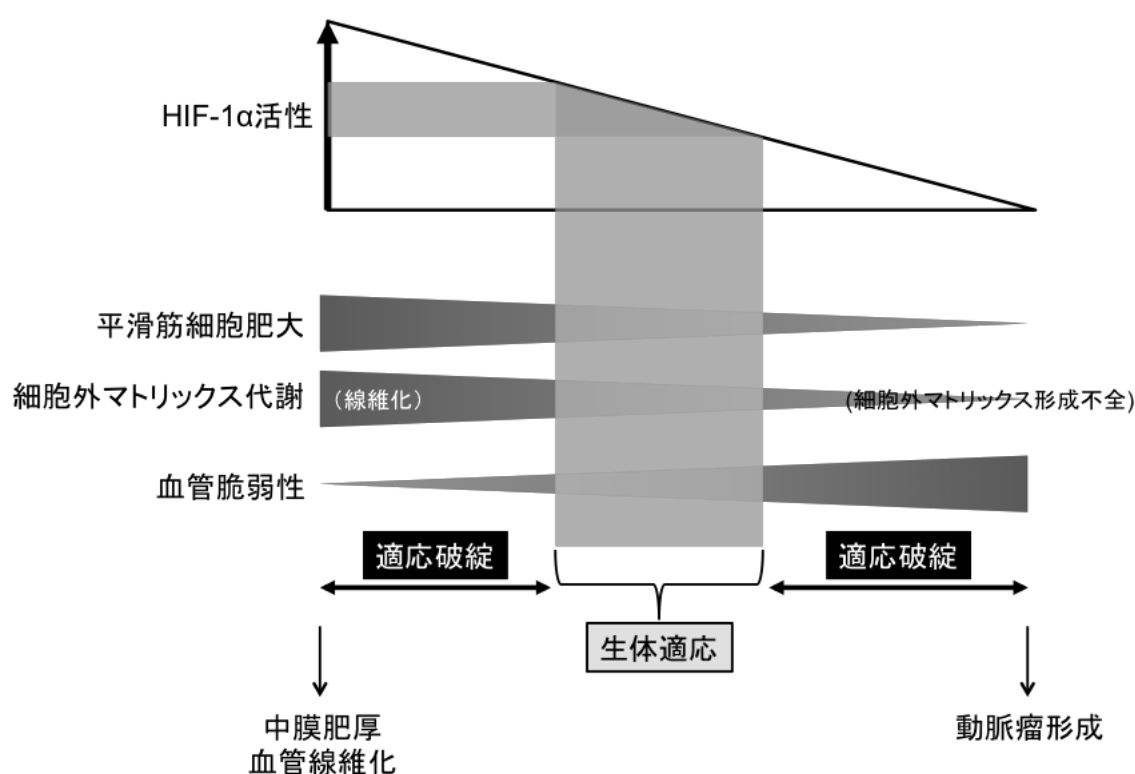


図6 平滑筋由来HIF-1 $\alpha$ 活性の血管恒常性維持に対する役割の概念図

近年、腎性貧血の治療薬としてプロリン水酸化酵素 (PHD)阻害剤の治験が進行中である。PHD は非低酸素下にて HIF-1 $\alpha$  のプロリン残基を水酸化しユビキチン-プロテアソーム分解系による HIF-1 $\alpha$  の分解を引き起こすため、PHD 阻害剤は HIF-1 $\alpha$  の特異的な活性化薬として使用される。PHD 阻害剤による HIF-1 $\alpha$  発現制御が血管リモデリングの治療戦略として有効になる可能性が考えられるが、前述のようにその病態を見極めたうえで病態ごとの適応が期待される。

#### 4. 謝辞

本研究成果は、当時研究室に所属していた今西正樹先生（現徳島大学大学病院薬剤部助教）の貢献が極めて大きく、ここに感謝致します。そして、本研究に助成いただきました財団法人蓬庵社に深く感謝申し上げます。また、助成に際して

のご推薦を賜りました四天王寺大学学長 岩尾洋先生に心より感謝申し上げます。

## 5. 参考文献

1. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-126
2. Semenza GL. Targeting hif-1 for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer.* 2003;3:721-732
3. Clarke MC, Talib S, Figg NL, Bennett MR. Vascular smooth muscle cell apoptosis induces interleukin-1-directed inflammation: Effects of hyperlipidemia-mediated inhibition of phagocytosis. *Circ Res.* 2010;106:363-372
4. Dery MA, Michaud MD, Richard DE. Hypoxia-inducible factor 1: Regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37:535-540
5. Sluimer JC, Gasc JM, van Wanroij JL, Kisters N, Groeneweg M, Sollewijn Gelpke MD, Cleutjens JP, van den Akker LH, Corvol P, Wouters BG, Daemen MJ, Bijnens AP. Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51:1258-1265
6. Imanishi M, Tomita S, Ishizawa K, Kihira Y, Ueno M, Izawa-Ishizawa Y, Ikeda Y, Yamano N, Tsuchiya K, Tamaki T. Smooth muscle cell-specific hif-1alpha deficiency suppresses angiotensin ii-induced vascular remodelling in mice. *Cardiovasc Res.* 2014
7. Erdozain OJ, Pegrum S, Winrow VR, Horrocks M, Stevens CR. Hypoxia in abdominal aortic aneurysm supports a role for hif-1alpha and ets-1 as drivers of matrix metalloproteinase upregulation in human aortic smooth muscle cells. *J Vasc Res.* 2011;48:163-170
8. Imanishi M, Chiba Y, Tomita N, Matsunaga S, Nakagawa T, Ueno M, Yamamoto K, Tamaki T, Tomita S. Hypoxia-inducible factor-1alpha in smooth muscle cells protects against aortic aneurysms-brief report. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2016;36:2158-2162
9. Kanematsu Y, Kanematsu M, Kurihara C, Tsou TL, Nuki Y, Liang EI, Makino H, Hashimoto T. Pharmacologically induced thoracic and abdominal aortic aneurysms in mice. *Hypertension.* 2010;55:1267-1274
10. Patel D, Menon R, Taite LJ. Self-assembly of elastin-based peptides into the ecm: The importance of integrins and the elastin binding protein in elastic fiber assembly. *Biomacromolecules.* 2011;12:432-440
11. Yang L, Shen L, Li G, Yuan H, Jin X, Wu X. Silencing of hypoxia inducible factor-1alpha gene attenuated angiotensin -induced abdominal aortic aneurysm in apolipoprotein e-deficient mice. *Atherosclerosis.* 2016;252:40-49
12. Kurobe H, Urata M, Ueno M, Ueki M, Ono S, Izawa-Ishizawa Y, Fukuhara Y, Lei Y, Ripen AM, Kanbara T, Aihara K, Ishizawa K, Akaike M, Gonzalez FJ, Tamaki T, Takahama Y, Yoshizumi M, Kitagawa T, Tomita S. Role of hypoxia-inducible factor 1alpha in t cells as a negative regulator in development of vascular remodeling. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2010;30:210-217
13. Nakayama T, Kurobe H, Sugasawa N, Kinoshita H, Higashida M, Matsuoka Y, Yoshida Y, Hirata Y, Sakata M, Maxfield MW, Shimabukuro M, Takahama Y, Sata M, Tamaki T, Kitagawa T, Tomita S. Role of macrophage-derived hypoxia-inducible factor (hif)-1alpha as a mediator of vascular remodelling. *Cardiovasc Res.* 2013;99:705-715

# 蛍光プローブの論理的精密設計に基づく、 細胞生命現象・in vivo 微小がんイメージングの実現

東京大学大学院薬学系研究科 薬品代謝化学教室  
東京大学大学院医学系研究科 生体情報学分野  
浦野泰照

## 1. はじめに

蛍光プローブとは、検出対象分子と特異的に反応・結合してその蛍光特性が大きく変化する分子ツールであり、近年、「生きている状態の生物試料」における種々の生理活性物質の動態をリアルタイムに観測するために汎用されている。蛍光プローブは、GFP などの蛍光タンパク質をベースとするものと有機合成小分子をベースとするものに大別されるが、本稿では後者の有機小分子をベースとするプローブの開発について、筆者らのこれまでの研究について紹介する。

有機小分子蛍光プローブとは、それ自身は無蛍光であるが、観測対象分子と反応、結合することで強い蛍光を発するようになる分子である。本プローブ類は、細胞外液に添加するだけですべての細胞に、速やかにかつ濃度を制御して導入可能であるなどの特長も持つ。このように生体応答観測や疾患イメージングツールとして優れた性質を有する有機小分子蛍光プローブであるが、これまでその開発はほとんど trial and error 方式でなされてきていた。これは、現代の最新の量子化学計算を駆使しても、新たな有機化合物の蛍光特性、中でもその明るさ(蛍光量子収率)を正確に予測することはほぼ不可能であるからである。

筆者らはこのような状況を打破し、目的の機能を有する蛍光プローブを論理的に精密に設計することを目標とした研究を行ってきた結果、光誘起電子移動(Photoinduced Electron Transfer; PeT)を設計原理とする蛍光プローブの論理的なデザイン法を確立することに成功した。すなわち、例えば代表的な蛍光分子であるフルオレセインは、分子をベンゼン環部位と蛍光団であるキサンテン環部位の2部位に分けて考えることが可能であり、分子内 PeT によりその蛍光特性を精密に制御可能であることを見出した(図 1a)。具体的には、ベンゼン環部位の最高占有電子軌道(HOMO)エネルギーレベルがある値よりも高いフルオレセイン誘導体に青色光を照射して、蛍光を発する部位であるキサンテン環部位を励起させると、蛍光を発して基底状態に戻るよりも速く電子移動が起こる(これを PeT と呼ぶ)ため蛍光はほぼ観察されないが、ベンゼン環部位の電子密度が低い誘導体では PeT 速度は遅いため、通常通りの強い蛍光が観察されることが明らかとなった(図 1b)<sup>1,2</sup>。すなわち、フルオレセイン類のベンゼン環部位の電子密度を精密に変化させることで、その蛍光特性を自在に制御することが可能となった。さらにこの分子内 PeT に基づく蛍光制御法は、ローダミンや BODIPY、シアニンといった他の蛍光団にも適用可能であることも明らかとなった。

以上の知見を発展させることで筆者らは、図 1c に示した蛍光プローブの論理的設計法の確立に成功した。すなわち、ある観測対象分子に対する蛍光プローブの開発を考える際、その観測対象分子と特異的に結合・反応し、かつその反応前後で基質の HOMO エネルギーレベルが大きく低下する化学反応(分光学的な変化は一切必要ない)さえ知っていれば、これを活用して反応前は PeT によりほぼ無蛍光であり、反応後に PeT が起こらなくなることで強い蛍光を発するプローブを論理的に開発することが可能となった。

上述の蛍光プローブデザイン法を活用することで、筆者らは様々な蛍光プローブの開発に成功してきた。一例を挙げるならば、ある特定の活性酸素種のみを検出可能な蛍光プローブ<sup>25</sup>や、生細胞中の様々な酵素活性(ex.  $\beta$ -ガラクトシダーゼ<sup>6,7</sup>、アルカリホスファターゼ<sup>8</sup>、グルタチオンS-トランスフェラーゼ<sup>9</sup>など)を検出可能な蛍光プローブなどの開発にも成功してきた。

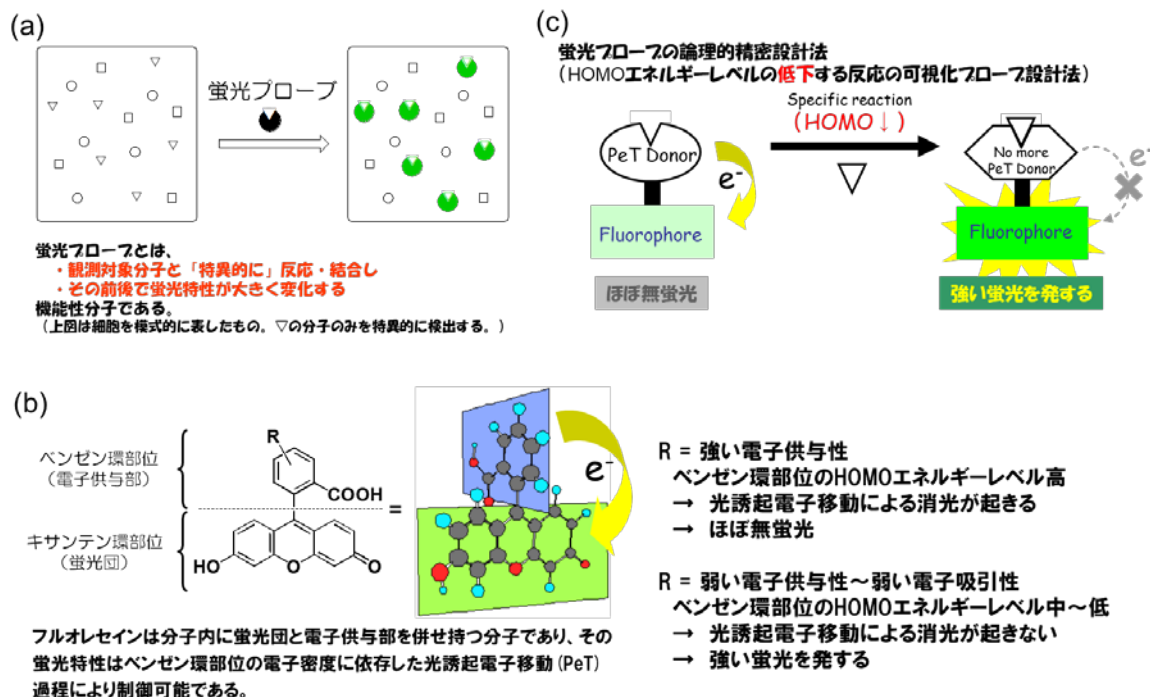


図1 (a) 代表的な長波長励起蛍光分子であるフルオレセインは2つの部位に分割して考えることができる (b) フルオレセイン誘導体の蛍光量子収率は、ベンゼン環部位の電子密度 (正確には HOMO エネルギーレベル) に依存した光誘起電子移動の概念によって、精密に予測することが可能である (c) これまでに確立した、光誘起電子移動に基づく蛍光プローブの論理的精密設計法の一例

## 2. Activatable probes と Always-on probes

これまで有機小分子蛍光プローブは、主に細胞生物学実験において、生きている状態の細胞内で起こる様々な変化を可視化する目的に使用されてきた。しかしこれらのプローブによる可視化技法は、遺伝子技術を用いていないため、最終的にはヒト体内への適用も十分に可能な安全性の高いイメージング技術であるという特長も有している。そこで筆者らは、日本人の死因の第一位を占め続けている疾患である「がん」をターゲットとする、全く新たな医療蛍光イメージングプローブの開発を目指した研究を開始した。

臨床的な観点からがんは、発見時の進行度により患者の予後が大きく左右されることが一般的に知られており、実際胃がん、肺がん、結腸がん、乳がんなど主要部位のがんにおいて、がんの早期発見の重要性が示されている。従来の代表的ながん診断手法として、がん集積性の高いプローブを活用してがんの画像化を実現する PET、SPECT、MRI 技法などが挙げられ、これらの技法は全身スキャンによる断層撮影が可能であるという特長を有している。例えば PET イメージングでは、がん細胞が異常に高い代謝活性を持ち、活動のエネルギー源である糖を多く取り込む性質を有することを利用し、FDG(Fluorodeoxyglucose)などの糖誘導体プローブを活用してがんイメージングを実現している。

しかしながら、上述した画像化手法には共通の問題点が存在する。それはこれらの手法で用いるコントラストプローブは、それが体内のどの部位に分布しているかに関係なく、常にほぼ一定のシグナルを発し続ける点(Always-on probe)であり、この性質が微小がん部位の早期発見を困難にさせている(図 2a)。すなわち、投与したコントラストプローブのうちがん部位に取り込まれるプローブの量は、がん部位の大きさやプローブの体内動態を考えれば極めてわずかであり、がん選択性が十分に高いプローブであっても、バックグラウンドに拡散していく量の方が圧倒的に多い。よってこれらの技法でがん部位を選択的に検出するためには、がん部位以外に分散している余剰のプローブが十分に排出されるのを待つ必要があるが、実際の体内では細胞間、組織間にプローブが分布してしまい、現実的にバックグラウンドをゼロにまで減らすことは困難である。このような理由から、上記技法によるがんの早期発見は難しく、例えば PET-CT で検出できるがんのサイズは 1cm が限界であると言われている。

一方、光を検出原理とする技法は、光の組織透過性の問題から第一選択の診断技法としては敬遠されてきた。しかしながら、最近の内視鏡技術のめざましい進展により、体内臓器のほとんどは内視鏡を使って観測することが十分可能となり、さらには通常のがん摘出手術の現場では、術者は光の届く眼前に患部を見ながら手術を行っていることから、光イメージング技法は実用的な臨床画像診断手法として今後大きく発展するものと期待されている。そればかりではなく、光、特に蛍光を原理とする分子イメージング技法は、疾患部位と正常部位の質的な差異を明確に見分けてこれを画像化することが可能であるという、従来の技法にはない優れた特長を有している。すなわち例えば、がん細胞の持つ特徴を手がかりに複雑な生体組織の中のがん部位にだけ、明確かつ高い選択性を持って蛍光色を付与する蛍光コントラストプローブ分子(Activatable probe)を開発し、これを内視鏡検査・手術や外科手術と組み合わせれば、がん医療に画期的な進展がもたらされるはずである(図 2b)。そこで筆者らは、1 mm 以下の微小がんであっても、これを高精細にイメージング可能な蛍光プローブの開発に着手した。

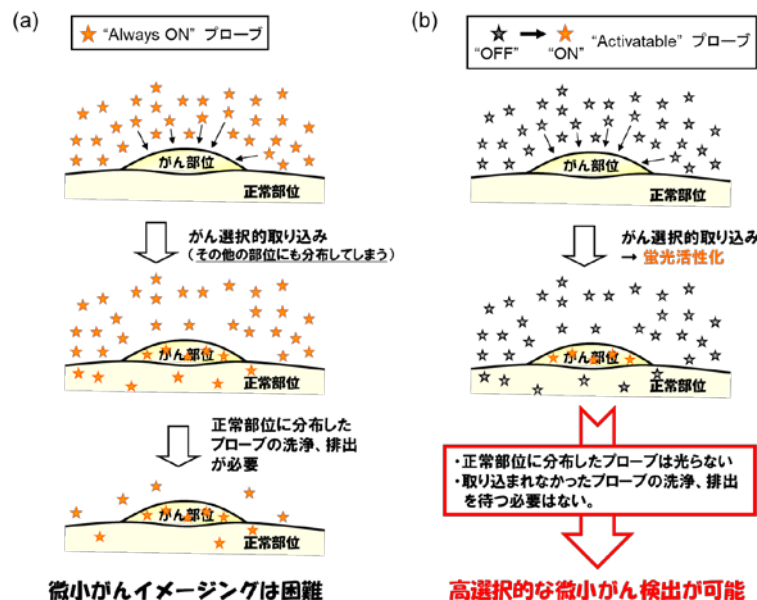


図2 従来のがん診断技法と、我々が今回開発することに成功した蛍光を活用した高選択的ながんイメージング手法 (a) PET, MRI などの“Always ON”プローブによるがんイメージング法。 (b) 今回確立した“Activatable”蛍光プローブの精密設計による微小がんイメージング手法。

### 3. アミノペプチダーゼ蛍光プローブの開発に基づく in vivo 迅速がん蛍光イメージングの実現

筆者らはこれまでに、有機小分子ベースの酸性環境検出蛍光プローブを、代表的ながん特異的抗体である Herceptin へと共有結合を介して結合させたプローブによるがんイメージングに成功してきた。これは、がん細胞に取り込まれるまでは pH 7.4 の細胞外にプローブが存在するため無蛍光であるが、抗体がエンドサイトーシス経路によってがん細胞に選択的に取り込まれると、最終的にはリソソーム内へと運搬されるため酸性環境となり、蛍光を発するという原理に基づく。本プローブのがんマウスモデルへの投与により、1 mm 以下の微小がんであってもこれを高感度、高選択的にイメージング可能であることが明らかとなった<sup>10</sup>。一方で本がんイメージング法は、エンドサイトーシスによってゆっくりとがん細胞にプローブが蓄積&蛍光活性化するため、プローブ投与からがんが十分な蛍光を持つまでに数時間から 1 日程度の時間が必要であった。このため、本技法がヒト患者で真に有効な医療技術であることを証明するためには、安全性試験をクリアした後に、全身性投与による臨床試験を行う必要があるが、この試験を進めるためには大きなファンドと研究体制が必要であり、現実性は極めて低い。そこで筆者らは、全身性投与の必要の無い実用的な外科手術サポート術として、局所散布による迅速がん蛍光イメージングの実現を目指した研究を開始した。具体的には、がん細胞で亢進しているとの報告がある  $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ (以下 GGT) 活性を検出する蛍光プローブ gGlu-HMRG を開発した (図 4a)<sup>11,12</sup>。本プローブの設計原理は、筆者らが確立してきたもう一つの分子デザイン法である分子内スピロ環化を動作原理とするものである。以下簡単に紹介する。

通常のローダミングリーンは pH 非依存的に常に強い蛍光を発する分子であるが (図 3 上段)、このカルボキシ基をヒドロキシメチル基へと置換したヒドロキシメチルローダミングリーン (HMRG) は、分子内スピロ環化により pH 9 よりも強いアルカリ性環境では無色無蛍光となる (図 3 中段)。さらに、HMRG の一つのアミノ基を酢酸によってアミド化した AcHMRG は、より酸性の環境でもスピロ環化体が優先するようになり、pH6 以下の酸性環境でしか色と蛍光を発しなくなり、pH 7.4 の中性 pH 環境では無色無蛍光となる (図 3 下段)。もしこの無色無蛍光性の AcHMRG のアミド基が加水分解酵素によって切断されると、中性 pH 環境下では図中のオレンジの枠で囲った変化が起き、強い蛍光を発する HMRG を生成する。よって、AcHMRG のアセチル基を各種アミノ酸へと置き換えることで、各種アミノペプチダーゼ活性を検出する蛍光プローブの網羅的な設計・開発が可能となり (図 3 最下段)<sup>12</sup>、図 4a に示した GGT 活性検出蛍光プローブ gGlu-HMRG の開発を達成した。

中性 pH 環境ではほぼ無蛍光である gGlu-HMRG は、正常細胞環境ではその GGT 活性が低いためほぼ無蛍光のまま存在し、よってバックグラウンド蛍光は極めて低く抑えられるが、がん細胞が存在する環境では、がん細胞表面に高発現している GGT によって効率的に加水分解されて高蛍光性の HMRG に変換され、生成した HMRG は高い疎水性のため即座にがん細胞内に取り込まれ、よってがん部位が強い蛍光を発するようになる。実際開発した gGlu-HMRG を、各種培養がん細胞と正常細胞 (正常ヒト臍帯静脈内皮細胞; HUVEC) に適用し、その酵素活性の比較を行ったところ、GGT 活性は卵巣、肺、肝臓、胆管がん細胞で高く、HUVEC では低いことが明らかとなった (図 4b)。一方で、GGT 活性がそれほど高くないがん細胞も存在し、GGT 活性が有意に亢進していたがん細胞は全体の約 6 割程度であった。このように gGlu-HMRG で全てのがん細胞を検出できるわけではないものの、従来は手術中に微小がんを検出することは不可能であったため、6 割程度であってもがん細胞を明確に検出できるようになれば、がん外科手術を補助する技術として極めて大きな意味を持つと考え、次にがんモデルマウスを用いた in vivo 蛍光イメージングを行った。



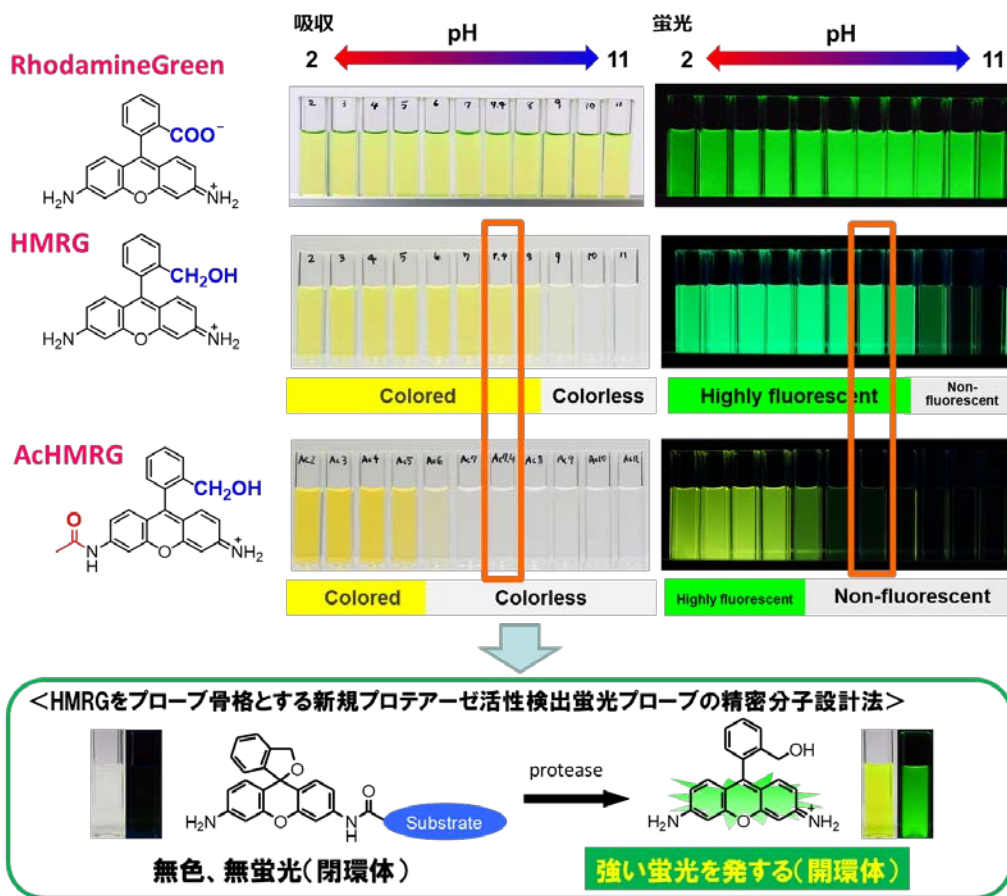


図3 HMRG をプローブ骨格とする新規プロテアーゼ活性検出蛍光プローブの精密分子設計法の確立

各種卵巣がん細胞を腹腔内に播種させたがんモデルマウスを作成し、これに gGlu-HMRG の PBS 溶液を腹腔内投与し、5 分後に開腹して蛍光イメージングを行った。その結果、プローブ投与 5 分後であっても、がん部位が極めて強い蛍光を発生し、1 mm 以下の微小がんであっても、明確にこれを検出可能であることが明らかとなった(図 4c,d.)<sup>11</sup>。なお図 4d の写真は特別な装置で撮像したものではなく、筆者が個人所有している市販のデジタルカメラで、515 nm のロングパスフィルター越しに撮ったものである。すなわち本プローブの散布により、裸眼でも十分に検出できるだけの強い蛍光ががん部位から発せられており、これは次々とプローブを高蛍光性生成物へと変換する酵素のターンオーバーによるものであり、他の可視化技術では全く達成できなかったものである。

次に内視鏡下でのがん部位検出、手術のモデル実験として、麻酔したがんモデルマウスの腹膜に小さな穴をあけ、ここから蛍光内視鏡(オリンパス(株)と共同開発)を挿入し、鉗子孔からスプレーヤーでプローブを局所的に散布し、微小がん部位検出が可能かどうか検討した。その結果、プローブスプレー直後から徐々にがん部位が光り始め、プローブ散布後わずか数十秒~数分程度で、通常の白色光内視鏡では識別不可能な微小がん部位でも、これを明確に蛍光可視化できることが明らかとなった(図 4e)<sup>11</sup>。

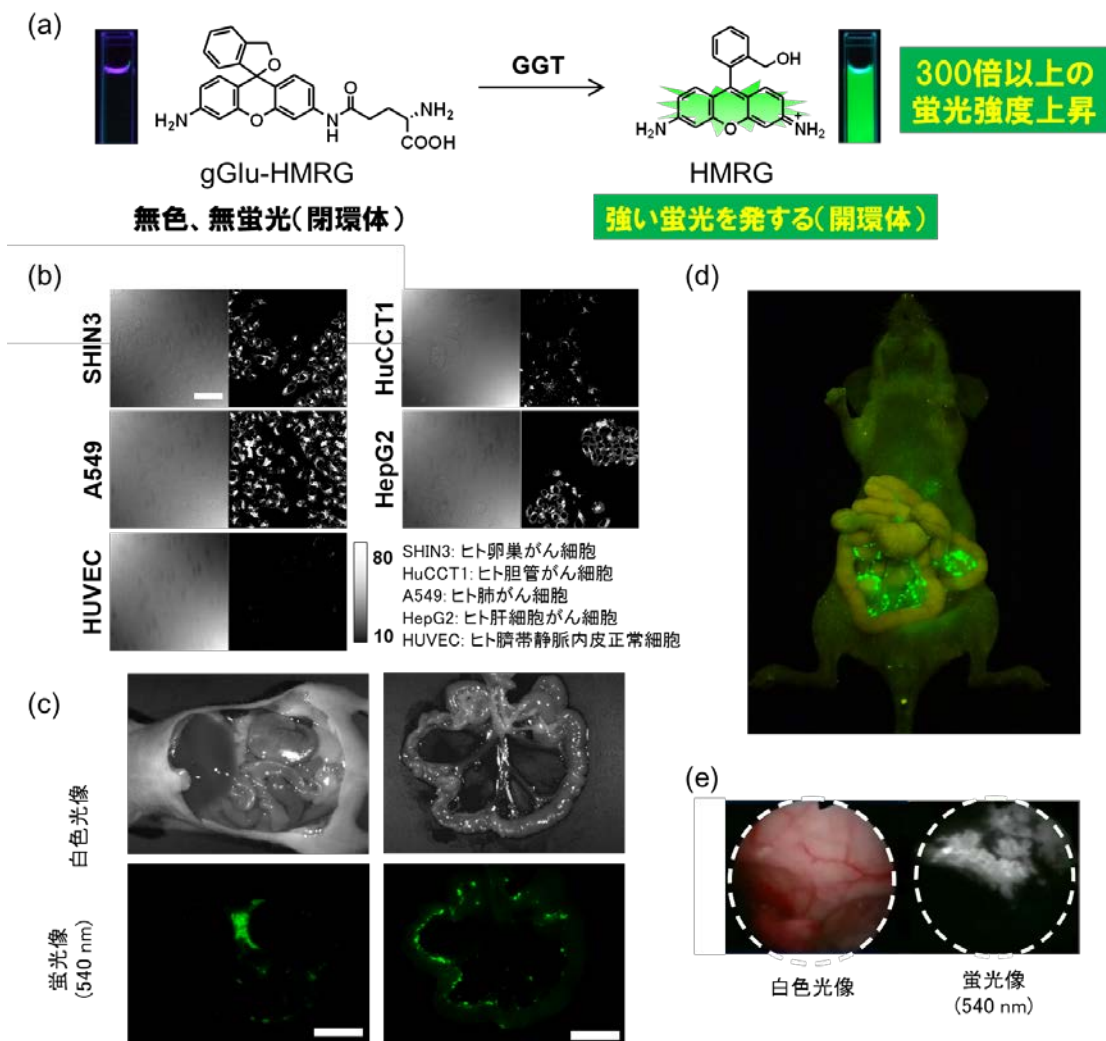


図4 (a) 新規 GGT 活性検出蛍光プローブ gGlu-HMRG の開発 (b) gGlu-HMRG による各種がん細胞、正常細胞の GGT 活性比較 (c) gGlu-HMRG の腹腔内投与による腸間膜上微小播種がんイメージング (プローブ投与 10 分後) (d) gGlu-HMRG による腹腔内微小播種がんイメージング (市販のデジタルカメラによる撮像) (e) 蛍光内視鏡下での gGlu-HMRG の局所散布による微小がん検出 (左: 通常白色光像、右: 蛍光像(プローブ散布 5 分後))

#### 4. GGT 活性検出蛍光プローブによるヒト新鮮臨床検体を用いたがん部位迅速可視化

前項で達成した短時間でのがん部位可視化技術は、がんの外科手術、内視鏡下切除術のタイムフレームに挿入可能な実用性の高い技術であるため、実臨床への応用が強く期待される技術である。一方で、がんは非常にヘテロ性の高い疾患であり、gGlu-HMRG によって実際の患者さんのがんの検出が可能かどうかを検証しなければ、新たながん医療技術として有効であるとは言えない。

前節の最初に述べたように、通常のがん診断薬の有効性は患者さん体内に注射などによって導入して検証する必要があり、その実現は容易ではないが、1 分から数十分程度でのがんイメージングが可能な gGlu-HMRG によるがん迅速イメージング手法は、ヒト臨床検体を用いて ex vivo でその機能を検証すること

が可能な初めての方法である(図 5a)。よって本技法は多くの臨床外科医の興味を引き、実際に外科手術で体外に取り出したばかりのヒト摘出新鮮臨床がん検体を用いたプローブ機能の検証実験が、国内外で数多く進行中である。以下、乳がんでの検証例を紹介する。

筆者らは九州大学病院別府病院の三森功士教授らと共同して、実際のヒト患者さんから摘出された乳がん臨床検体でのイメージングを行った。乳がんに対する手術の約半数を占める乳房部分切除術では、がん細胞を取り切れたかどうか確認するために、切除標本の断端にがん細胞が含まれているかどうかを手術中に診断する検査が必須である。しかし、切除面全体の病理検査をすることは不可能であり、ごく一部の代表的な部分のみの検査しか出来ないため、がんを見逃してしまう可能性が指摘されており、実際のがんの局所再発が起きてしまう患者さんも少なく無いのが現状である。そこで、乳がん手術で摘出された実際の新鮮臨床検体に gGlu-HMRG を散布し、その有用性を検証した。その結果、非浸潤性乳管癌(図 5b 上)、浸潤性乳管癌(図 5b 下)など様々な乳腺腫瘍を数分程度の迅速性で検出できることが明らかとなった。100 例以上の臨床検体での検証の結果、1 mm 以下の微小がんであっても、プローブ適用後 5 分以内に高い感度を持って検出可能であること、またヘテロ性の高い疾患であるがんとしては異例に高い感度、特異度(90%以上)での検出が可能であることが明らかとなった<sup>13</sup>。本手法は切除断端全体をイメージング対象にできることから、目視では検出不可能な微小がんが断端に遺残している場合でもこれを明確に検出することが可能となり、局所再発の頻度を劇的に低下させるものと大いに期待している。さらにごく最近、本手法は乳がんのリンパ節転移検出にも有効であり、乳腺外科手術中にリンパ節転移の有無を、摘出リンパ節を用いた迅速蛍光イメージングによって判断できる可能性が示された<sup>14</sup>。

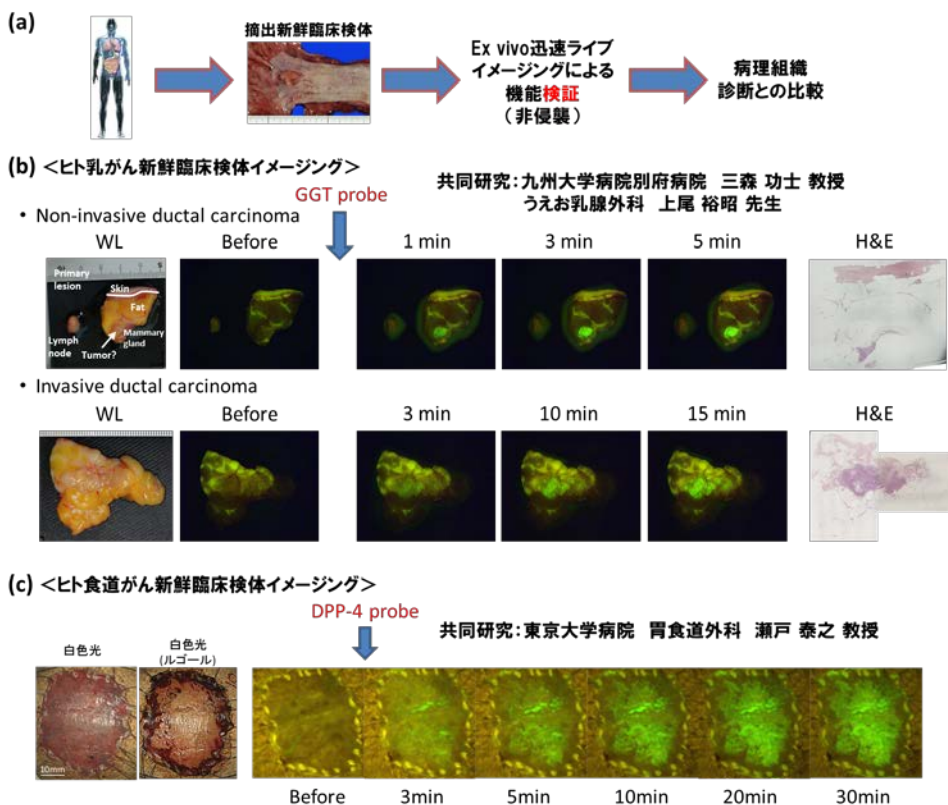


図5 (a) 蛍光プローブのヒト新鮮がん臨床検体への適用による ex vivo でのイメージング機能検証

(b) ヒト乳がん部分切除サンプルへの gGlu-HMRG 散布による切除断端微小がんの可視化。プローブ投与後 1 分でも微小がん部位が可視化され、数分後には術者の目でも十分視認可能な強い蛍光を発する様になった。蛍光を発する部位と術後の病理組織染色像 (H&E) は良い一致を示した。 上段：非浸潤性乳管がん、下段：浸潤性乳管がん (c) ヒト食道がん ESD 検体への DPP-4 プローブ散布によるがん部位可視化。プローブ投与後数分で、がん部位と正常部位の境界が明瞭に可視化された。

## 5. 蛍光プローブライブラリーの作製とこの臨床検体への適用による食道がん迅速イメージングプローブの開発

上述したように、gGlu-HMRG は臨床的価値の高いがんイメージングツールとなりえると考えられた。しかし、すべてのがん種に反応するわけではなく、組織型や臓器によっては反応が認められないがん組織も確かめられた。食道がんはその一例で、この可視化を実現するためには食道がんに対する新たなバイオマーカー酵素の探索が必要となる。そこで HMRG を蛍光プローブ骨格とし、ここに 1 または 2 アミノ酸を導入することで、アミノペプチダーゼ、ジペプチジルペプチダーゼ酵素活性を検出するプローブライブラリーを新たに作製し、これを食道がん新鮮臨床検体へと適用することで、食道がん特異性の高い蛍光プローブの探索を開始した。その結果、GP-HMRG, AcGlyPro-HMRG, Arg-HMRG, Ile-HMRG, Tyr-HMRG など腫瘍部のほうが非腫瘍部よりも蛍光強度が上昇することが明らかとなり、このうち腫瘍部と非腫瘍部の蛍光強度の差が最大となったのは GP-HMRG であった。

GP-HMRG を基質としうる酵素の探索を行ったところ、末端から 2 残基目に Pro があるオリゴペプチドを基質とするジペプチジルペプチダーゼとして DPP-4 が候補として挙げられた。そこで、DPP-4 阻害剤による蛍光上昇抑制の検討、siRNA 導入による食道がん培養細胞株でのイメージング挙動の変化、qRT-PCR による食道がん培養細胞での DPP-4 発現量の評価、臨床検体での DPP-4 免疫組織染色を行い、GP-HMRG のターゲット酵素が DPP-4 であることを確認した<sup>15</sup>。

DPP-4 プローブを食道がんの内視鏡下切除 ESD 新鮮検体へと適用した迅速蛍光イメージング例を図 5c に示した。プローブ散布後数分で、腫瘍部と非腫瘍部の境界が明確に可視化されることが明らかとなった。新鮮臨床検体 70 例以上に適用し、腫瘍部・非腫瘍部の蛍光挙動を解析した結果、感度、特異度、正診率はそれぞれ 96.9%、85.7%、90.5% であり、術中迅速イメージング手法として十分な性能を有することが明らかとなった。

## 6. おわりに

筆者らが最近確立することに成功した有機小分子蛍光プローブの論理的な設計法により、開発可能な蛍光プローブの種類は飛躍的に増大した。その結果、in vivo で微小がん部位を選択的に検出可能な蛍光イメージング技術を複数開発することに成功した。特に、gGlu-HMRG を活用した迅速乳がんイメージング手法は、動物実験レベルを越えて、実際の患者さんの自然発症がんにも十分有効であることが明らかとなった。また蛍光プローブライブラリーの新鮮臨床検体への適用により、新たな診断プローブの探索とバイオマーカー酵素の発見を狙うアプローチにより、DPP-4 活性検出蛍光プローブの局所散布により食道がんの迅速蛍光イメージングが可能であることが明らかとなった。今後これらの蛍光プローブの術中局所散布によって、術者が治療すべきがん部位を明確に判断でき、的確な蛍光内視鏡下手術、あるいは開腹外科手術が可能とな

る日も近いものと大いに期待している。

## 6. 謝辞

本研究の一部は公益財団法人蓬庵社の研究助成によるものであり、深謝いたします。また、ご推薦を賜りました廣部雅昭先生に厚く御礼申し上げます。

本稿で紹介した蛍光プローブ類の開発研究は、東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室、同医学系研究科生体情報学分野で主に行われたものです。エンドサイトーシスの可視化によるがん蛍光イメージング技法の開発に関しては、米国 NIH の小林久隆主任研究員との、gGlu-HMRG によるヒト摘出乳がんサンプルでのがんイメージング研究は、九州大学別府病院の三森功士教授、うえお乳腺外科院長の上尾裕昭先生との、DPP-4 プローブによる食道がんイメージング研究は東京大学病院胃食道外科の瀬戸泰之教授との共同研究です。この場を借りて、以上の皆様に深く感謝いたします。

## 文献

1. Miura T, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**: 8666-8671, 2003.
2. Tanaka K, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**: 2530-2536, 2001.
3. Setsukinai K, et al., *J. Biol. Chem.*, **278**: 3170-3175, 2003.
4. Ueno T, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**: 10640-10641, 2006.
5. Abo M, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **133**: 10629-10637, 2011.
6. Urano Y, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**: 4888-4894, 2005.
7. Kamiya M, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **133**: 12960-12963, 2011.
8. Kamiya M, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**: 5439-5441, 2005.
9. Fujikawa Y, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **130**: 14533-14543, 2008.
10. Urano Y, et al., *Nat. Med.*, **15**: 104-109, 2009.
11. Urano Y, et al., *Sci. Transl. Med.*, **3**: 110ra119, 2011.
12. Sakabe M, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **135**: 409-414, 2013.
13. Ueo H, Shinden Y, et al., *Sci. Rep.*, **5**: 12080, 2015.
14. Shinden Y, Ueo H, et al., *Sci. Rep.*, **6**: 27626, 2016.
15. Onoyama H, et al., *Sci. Rep.*, **6**: 26399, 2016.

## 有機カチオン膜輸送体の臓器疾患と薬物治療に及ぼす役割

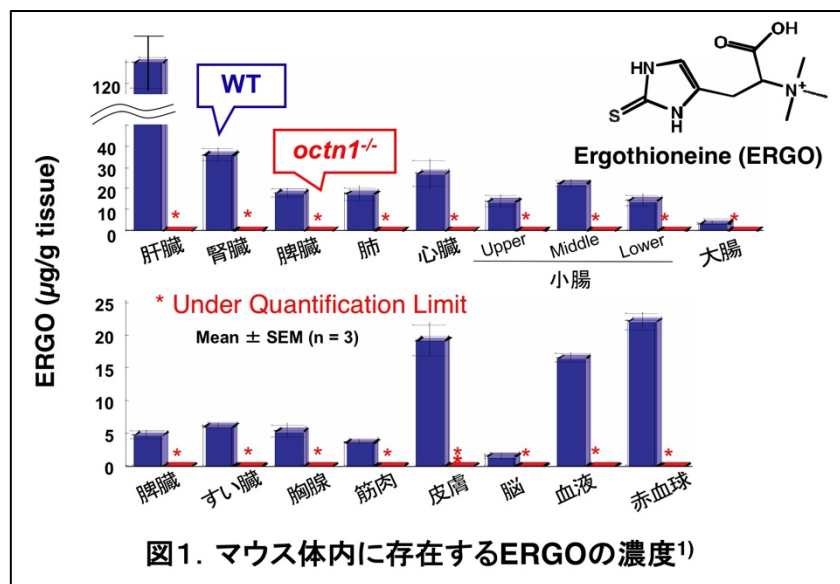
加藤 将夫

金沢大学医薬保健研究域（薬学系）

トランスポーター（膜輸送体）は、細胞膜に埋め込まれた膜タンパク質であり、内因性あるいは外因性物質を基質として認識し、それらの細胞膜を介した取り込みや排出を司る。したがって膜輸送体は、それら物質の細胞内外での非結合形濃度比を規定する。そのため、薬物や栄養物などの体内動態に深く関与するばかりでなく、疾患部位に発現する膜輸送体やその基質を利用すれば、当該部位を標的とした疾患治療や、病態の変化を追跡するバイオマーカーなどに応用できる可能性がある。我々は、solute carrier (SLC) superfamily に属する膜輸送体の一つ carnitine/organic cation transporter 1 (OCTN1/SLC22A4) に着目し、その生体内での役割を解明するとともに、当該膜輸送体が種々の病態ないし健康の維持に関与することを示唆するデータを得た。本稿においては、その成果とともに、今後の応用の可能性について言及する。

### 1. OCTN1 欠損マウスの作製とメタボローム解析

OCTN1 遺伝子を培養細胞に導入すると、幅広い有機カチオン性化合物を細胞内に取り込む。したがって、OCTN1 は有機カチオン膜輸送体の一種として位置付けられてきた。OCTN1 は生体内のほとんどの臓器に発現する一方、生体内で何を基質として輸送するかは不明であった。そこで、OCTN1 の生体内での役割の解明を目指し、遺伝子欠損マウス(*octn1*<sup>-/-</sup>)を作製した。しかし、野生型マウス(WT)と比べ *octn1*<sup>-/-</sup> には明確な phenotype の違いが見つけられず、成長、繁殖、生化学マーカー等も WT と同等であった。そこで、膜輸送体が細胞内外の基質の濃度比を規定することを考慮し、血漿と血球や臓器中に含まれる生体内物質の一斉定量（メタボローム解析）を行った。結果、食物由来の抗酸化物質である ergothioneine (ERGO) が、WT に存在し *octn1*<sup>-/-</sup> には



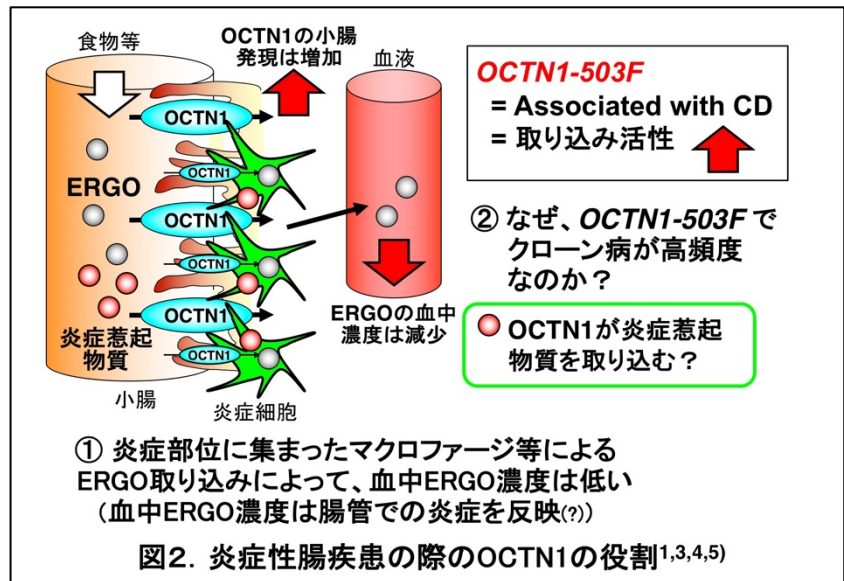
存在しないことを見出した<sup>1)</sup>。さらに、HPLCを用いてマウス体内の ERGO 濃度を詳細に検討したところ、ERGO は WT においては、調べたあらゆる臓器に数  $\mu\text{M}$  から数百  $\mu\text{M}$  存在する一方、*octn1*<sup>-/-</sup>ではいずれの臓器にも検出されなかった (図 1)。このことは、OCTN1 がほとんどすべての臓器に発現することと対応し、OCTN1 が ERGO の臓器分布に働く主たる膜輸送体であることが示唆された。ERGO は 100 年以上以前からその存在が知られている物質であり、OCTN1 の良好な基質であることも *in vitro* では報告されている<sup>2)</sup>。ERGO は哺乳類の体内では生合成されず、マウスやヒトにおいては食物から摂取される。その後の解析から、*octn1*<sup>-/-</sup>で ERGO がほとんど検出されない (図 1) 主たる原因は、近位尿細管刷子縁膜に存在する OCTN1 が ERGO の再吸収に関わっており、*octn1*<sup>-/-</sup>ではその再吸収が起こらない結果、ERGO を摂取しても短時間で尿中へ排泄されるためであった。

## 2. 腸肝腎炎症時の OCTN1 の役割

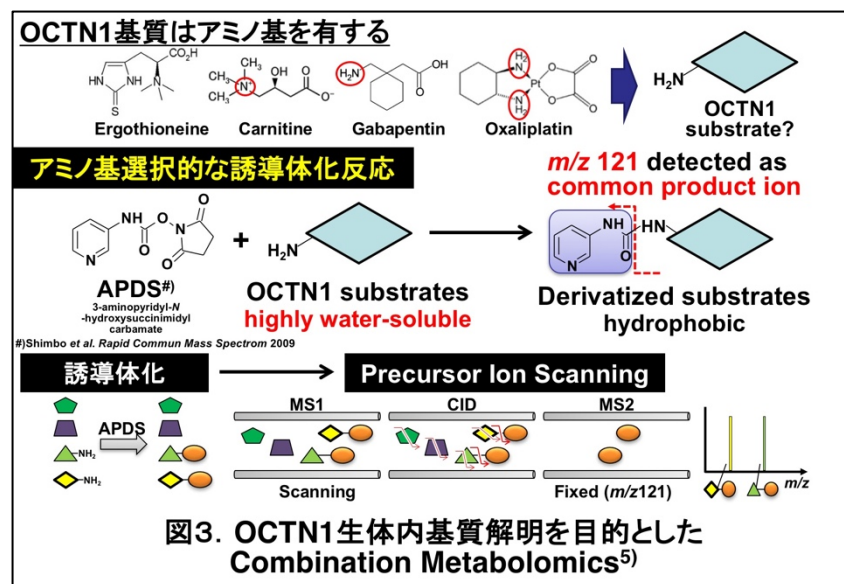
OCTN1 やそのホモログである OCTN2/SLC22A5 遺伝子の多型が炎症性腸疾患の一種であるクローン病の罹患率に関連することが以前に報告されており<sup>3)</sup>、このうち OCTN1 遺伝子についてはその後のさまざまな報告から少なくとも Caucasian における関連性が肯定されている。OCTN1 遺伝子は魚類、両生類、鳥類、哺乳類など ERGO を生合成せず、食物から摂取する動物種でよく保存されている。また OCTN1 は、ヒトやマウス小腸の吸収上皮細胞刷子縁膜に局在する。従って OCTN1 は消化管において食物由来の ERGO を体内に取り込む膜輸送体でもあり、消化管においては他の臓器に比べ高い濃度が暴露されると考えられる。そこで、ERGO が抗酸化物質であることに着目し酸化ストレスと関連する種々の病態との関連について検討した。

マウスで小腸虚血再灌流モデルを作製したところ、WT に比べ *octn1*<sup>-/-</sup>では、小腸組織の破壊が顕著かつ生存率も有意に低かった<sup>1)</sup>。さらに、デキストラン硫酸誘発腸炎モデルを作製したところ、*octn1*<sup>-/-</sup>の方が、WT に比べ体重減少や小腸組織損傷が顕著であった<sup>4)</sup>。したがって、OCTN1 がこれら組織損傷に対して防御的役割を果たすことが示唆される。このデキストラン硫酸誘発腸炎マウス小腸刷子縁膜では OCTN1 タンパク質の発現や ERGO 濃度が非炎症群に比べ顕著に増加していた<sup>4)</sup>。また、クローン病患者小腸下部においても、対照群に比した同様な OCTN1 発現や ERGO 濃度の増加が報告されている。一方、我々の検討から、デキストラン硫酸誘発腸炎マウスやクローン病患者血液中の ERGO 濃度は、対照群に比べむしろ低下している<sup>1,4)</sup>。腸炎の際、ERGO の吸収臓器である小腸で高い OCTN1 の発現が見られる一方、ERGO の血中濃度が低いことは、一見矛盾しているようである。さらに詳細に検討したところ、

その原因の一つに、腸炎時に小腸細胞間液に集積する炎症細胞に ERGO が効率的に取り込まれることが示された(図2)<sup>4)</sup>。すなわち、高い発現量を示す OCTN1 によって小腸で吸収された ERGO は、吸収後、その一部が、小腸に集まっている炎症細胞によってトラップされてしまい、結果として血中濃度は健常人に比べて低いという仮説が成り立つ(図2)。



クローン病の罹患率の高い OCTN1 遺伝子多型は OCTN1 のアミノ酸変異 L503F を伴う。L503F 変異は Caucasian では 30% 程度の割合で見られる一方、日本人にはほとんど見られないことがわかっている。L503F 変異は ERGO をはじめとする多くの基質の取り込み活性が野生型 OCTN1 に比べて高い gain-of-function の性質がある。クローン病の病態には炎症が深く関与しており、このような高い活性を持つ OCTN1 が腸管内の何らかの物質を取り込むことがその一因である可能性もある(図2)が、原因物質の特定には至っていない<sup>3)</sup>。我々は、DSS 腸炎モデルマウス組織抽出物を基質源として用い、そこに含まれる OCTN1 基質の解明を目指すことで、そのような原因物質の存在が示唆できないか検討を行った。前述のメタボローム解析よりも、OCTN1 への特異性を高めた方策として、combination metabolomics を開発した(図3)。すなわち、OCTN1 遺伝子発現細胞である HEK293/OCTN1 細胞(対照として、vectorのみを導入した HEK293/mock 細胞)に、基質源である DSS 腸炎モデルマウス組織抽出





物を添加し、一定時間取り込ませることで、OCTN1 基質を細胞内に濃縮的に取り込ませたのち、誘導体化試薬である APDS (3-aminopyridyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate) を用い、OCTN1 の多くの基質が保有するアミノ基を特異的に修飾した (図 3)。その後、質量分析装置 LC-MS/MS を用い、APDS 部分を選択的に認識する precursor ion scanning を行うことで、HEK293/OCTN1 細胞に選択的に取り込まれ、かつ、アミノ基を有する化合物のみを選択的に検出することを試みた (図 3)。その結果、炎症組織に存在する OCTN1 基質として spermine を見出した<sup>5)</sup>。実際、マウス腹腔マクロファージを lipopolysaccharide (LPS) で処理することで活性化させた時の炎症性サイトカイン放出は *octn1*<sup>-/-</sup> で WT に比べ低下し、マクロファージ内の spermine 濃度も *octn1*<sup>-/-</sup> で WT に比べ低い傾向にあった<sup>5)</sup>。このように、OCTN1 には抗酸化物質 ERGO を取り込むことで組織を保護しつつも、いったん炎症が起こった場合にはむしろ炎症を悪化させる二面性を持つことが考えられる。同様な、OCTN1 の役割についての二面性は、脳内の免疫を司る細胞であるミクログリアにおいても見出されている。ミクログリアを LPS で処理すると活性化が起こり、炎症性サイトカインが放出される。*octn1* 遺伝子のノックダウンや *octn1*<sup>-/-</sup> より調製したミクログリアでは、このような炎症性サイトカイン放出が促進され、OCTN1 が抑制的に働くことが示唆される一方、その後のミクログリアの肥大化は、*octn1*<sup>-/-</sup> では起こりづらい<sup>6)</sup>。OCTN1 が異なる複数のメカニズムに関与している可能性がある。

本研究においては、クローン病に用いられる 5-aminosalicylate の消化管膜透過にも OCTN1 が一部関与することを示唆している<sup>7)</sup>。

一方、ジメチルニトロサミンやコンカナバリン A 誘発肝線維化モデルを作製した場合にも、WT に比べ *octn1*<sup>-/-</sup> では肝臓での線維化や酸化ストレスが顕著であった (図 4)<sup>8)</sup>。

したがって、OCTN1 がこれら病態モデルにおいても防御的役割を果たすことが示唆される。さらに、WT においてこれら病態モデル肝臓中 ERGO 濃度や OCTN1 発現量は正常時よりも増加していた<sup>8)</sup>。すなわち、病態時に OCTN1 の発現が増加することが示唆

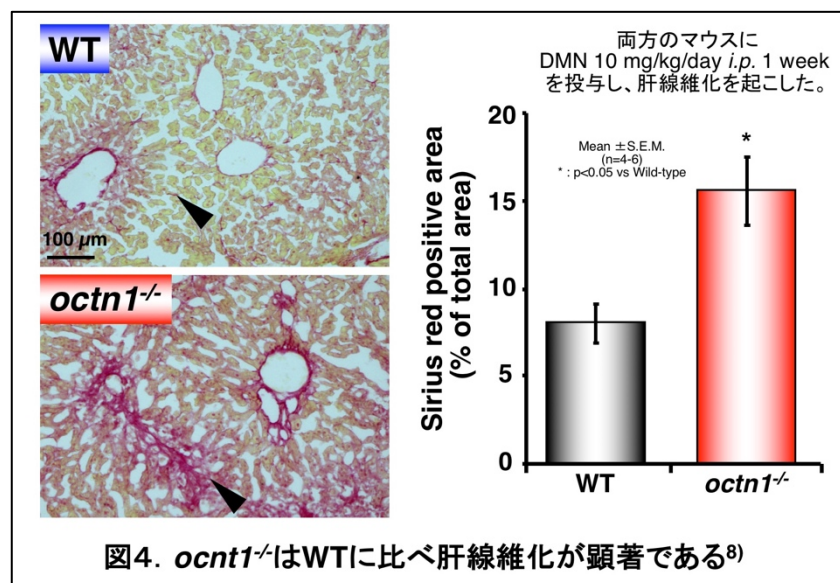
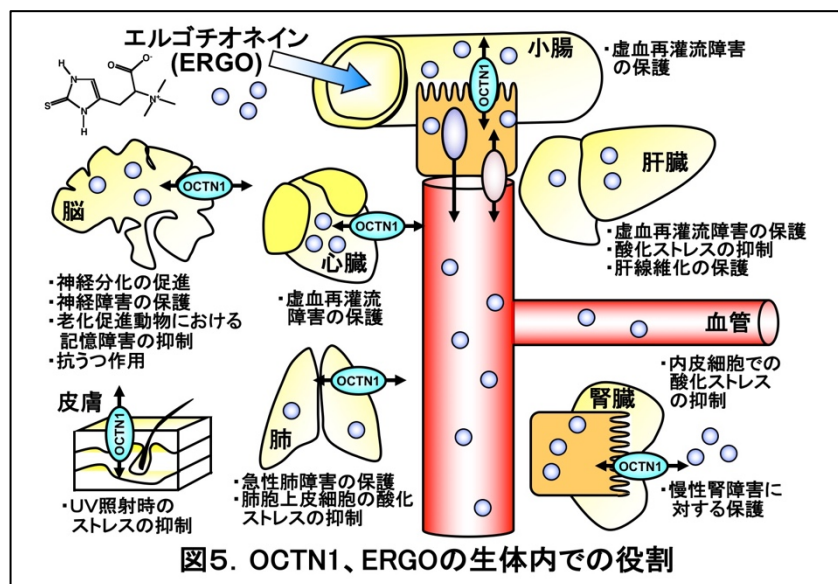


図4. *octn1*<sup>-/-</sup>はWTに比べ肝線維化が顕著である<sup>8)</sup>

される。肝臓における OCTN1 の発現は、正常時には血管内皮細胞に、肝線維化時には星細胞に見られる<sup>8)</sup>。NASH 患者肝臓より採取した切片においても、肝線維化の度合いに依存して OCTN1 の強い発現が見られた。一方で、ERGO を含む餌を摂取させると、ジメチルニトロサミン誘発肝線維化は抑制される傾向にあった<sup>8)</sup>。以上より、OCTN1 は肝線維化時においても、自らの発現が増加し、おそらく ERGO を細胞内に取り込むことで、臓器炎症に対する防御に働くものと考えられる。

Shinozaki ら<sup>9)</sup>は、慢性腎臓病モデルを作製し、WT に比べ *octn1*<sup>-/-</sup> で顕著な腎機能の悪化、炎症の亢進、線維化が見られることを示すとともに、慢性腎臓病患者においても腎機能低下と血中 ERGO 濃度が相関すること、腎移植後には腎機能とともに ERGO の血中濃度も回復することを示し、腎臓の病態と OCTN1 や ERGO との関係を明らかにした。また、Ben Said ら<sup>10)</sup>は、OCTN1 が蝸牛線条内皮に発現し、その遺伝子変異が劣性非症候性難聴の一種である DFNB60 を引き起こすことを示した。現在までに、OCTN1 ないし基質である ERGO が種々の臓器疾患に対して防御的に働くことが示唆されており (図 5)、このことは、OCTN1 と ERGO がほとんどの臓器に存在することと対応する。また、OCTN1 と ERGO が正常な状態よりもむしろ病態時に重要な役割を果たすと考えれば、快適な環境下で飼育された正常な *octn1*<sup>-/-</sup> と WT との比較では、phenotype の違いが見られなかったことも説明できるかもしれない。



### 3. 中枢神経系における OCTN1 の役割

脳は血液脳関門によって異物の侵入を防いでいる臓器であるが、ERGO はマウス脳組織にも検出される (図 1)。ERGO は体内で合成されないことから、脳に存在する ERGO も食物由来と考えられる。ERGO は水溶性の高いアミノ酸の一種であり、OCTN1 を発現しない細胞にはほとんど取り込まれないことから、膜透過性は極めて低い。*octn1*<sup>-/-</sup> の脳組織に ERGO が検出されないことから (図 1)、ERGO が膜輸送体 OCTN1 によって脳に取り込まれていることが示唆される。生体にとって異物である

ERGO を膜輸送体によって脳に取り込んでいることから、ERGO が脳において何らかの役割を果たす可能性があると考え、さらに研究を行った。

OCTN1 はヒトおよびマウス神経細胞に発現し、マウス培養神経細胞では ERGO の細胞内への取り込みが確認され、*octn1* 遺伝子をノックダウンすると取り込みは顕著に低下した<sup>11)</sup>。一方で、グリア細胞には明確な OCTN1 の発現は認められなかった。したがって、OCTN1 は神経細胞に機能的に発現すると考えられる。さらに、OCTN1 の機能的発現は自己増殖能と多分化能を有する神経幹細胞(neural stem cell, NSC)にも観察され、その遺伝子発現量を見る限り、SLC22 family に属する他の有機カチオン膜輸送体よりもはるかに高かった<sup>12)</sup>。マウス大脳皮質由来 NSC に ERGO を添加した後に培養すると、神経細胞マーカー ( $\beta$  III tubulin) 陽性細胞の割合を増加させる一方、アストロサイトマーカー (GFAP) 陽性細胞の割合を減少させた<sup>12)</sup>。すなわち、NSC は神経細胞とグリア細胞の両方へ分化する能力を有するが、ERGO はそのうちの神経細胞への分化 (神経新生) を促進することが示唆された。ERGO 以外の他の抗酸化物質を NSC に添加したところ、ERGO と同様に、抗酸化作用を発揮した一方で、神経細胞への分化促進は見られなかったことから、ERGO の作用は抗酸化作用とは異なるメカニズムによると考えられる<sup>12)</sup>。NSC に ERGO を添加すると、細胞内情報伝達経路の一種である mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) シグナルのタンパク質である mTOR 及びその下流の S6K1 (p70 ribosomal protein S6 kinase) のリン酸化と、神経栄養因子 neurotrophins (NT) の一種である NT-5 の発現が増加する<sup>13)</sup>。ERGO の作用には、これら細胞内情報伝達の活性化と、神経栄養因子 NT-5 の発現増加を介したその受容体 TrkB (tropomyosin receptor kinase B) の活性化が少なくとも一部関与することが示唆される<sup>13)</sup>。

神経幹細胞は脳の海馬に多く存在し、アルツハイマー型認知症やうつ病患者では海馬の萎縮が起こる。また抗うつ薬の中には神経新生を促進するものが知られる。このように神経新生は疾患と密接に関係することから、ERGO による脳機能に及ぼす作用を次に、*in vivo* で検討した。マウスに ERGO を多く含む餌を摂取させたところ、海馬歯状回において未熟な神経細胞のマーカーである doublecortin 陽性細胞の数が増えていた一方、血漿中や脳中 ERGO 濃度が ERGO を含まない対照餌摂取群に比べ高かった<sup>13)</sup>。したがって、経口摂取された ERGO が脳内に到達し神経新生を促すことが示唆された。この ERGO 摂取マウスでは、対照餌摂取群に比べ、自発運動量に変化がない一方、強制水泳試験や尾懸垂試験における無動時間が対照群と比較し有意に短縮されたことから、ERGO による抗うつ作用が示唆された<sup>14)</sup>。

神経新生は神経の再生を意味することから、病態時だけでなく、正常な状態での脳機能にも影響を与える可能性がある。そこで、ERGO 経口投与による記憶・学習能力に及ぼす影響を、通常飼育下の正常マウスに対して行った。1日3回の経口投与を2週間行ったのち、Novel object

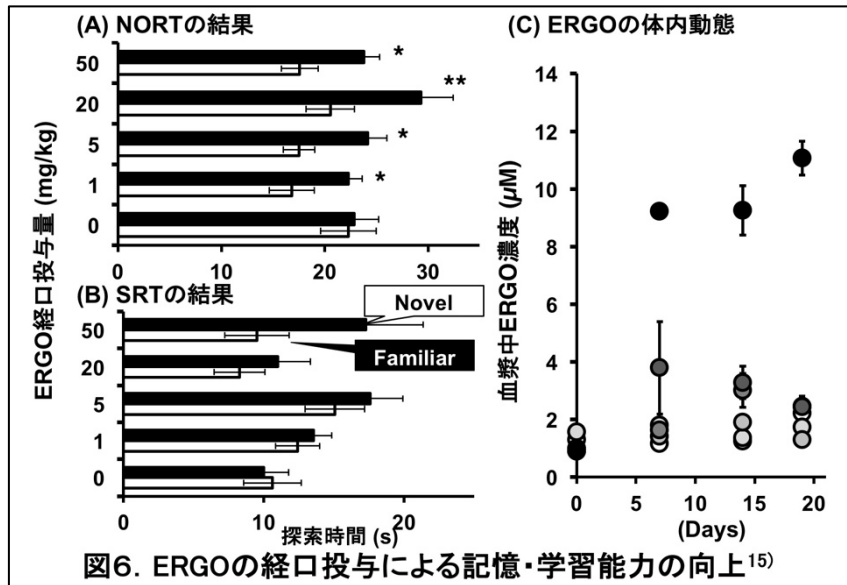


図6. ERGOの経口投与による記憶・学習能力の向上<sup>15)</sup>

recognition test (NORT)と Spatial recognition test (SRT)を行い、それぞれ新規物体認識能と空間認識能への ERGO の影響を調べた。NORT および SRT では、あらかじめ両隅に同じ物体を配置した立方体チャンバーにマウスを入れ、数分間のトレーニングを行い、マウスにこれら物体とその配置を認識させたのち、一定時間飼育ケージに戻すことで記憶をほぼ消失させる。その後、NORT においては片方の物体を別の物体に入れ替える一方、SRT においては片方をそのまま配置だけ変更させる (いずれも、novel な物体と定義)。いずれにおいても、もう片方の物体は配置も含めてそのままである (familiar な物体と定義)。改めてマウスをチャンバーに入れて数分間の試験を行い、その間、novel な物体と familiar な物体を探索した時間を測定する。マウスがトレーニング時の物体や配置を

記憶していれば novel な物体に対する探索時間が延長し、覚えていなければ両方の物体に同程度の探索時間を示すことを利用した試験である。1 mg/kg 以上の ERGO を経口投与後、NORT において、novel な物体に対する探索時間は、familiar な物体への探索

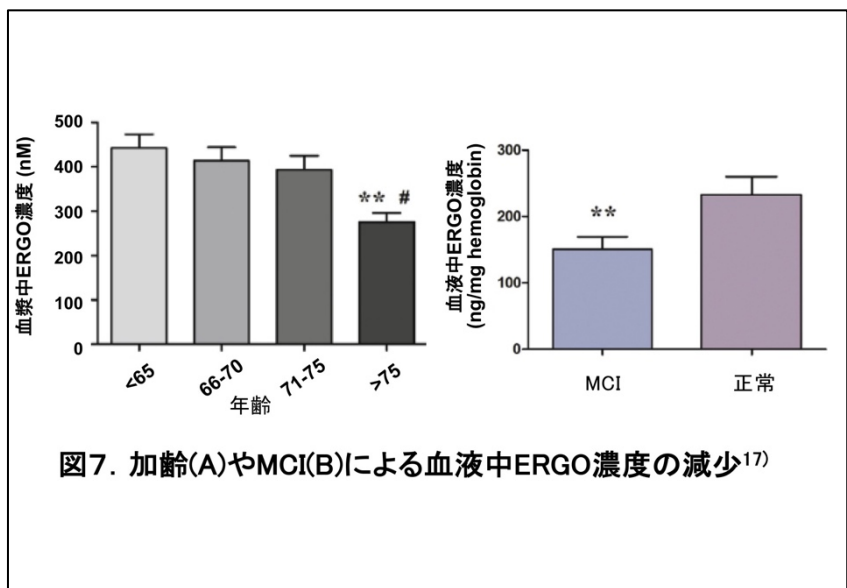


図7. 加齢(A)やMCI(B)による血液中ERGO濃度の減少<sup>17)</sup>

時間に比べて有意に高かった (図 6)<sup>15)</sup>。また、discrimination index (novel に対する探索時間と familiar に対する探索時間の差の全体に対する割合) を計算すると、両方の試験で ERGO 経口投与による有意な増加が検出された<sup>15)</sup>。さらに、この時の ERGO の血漿中濃度 (図 6) や脳海馬中濃度は投与量依存的に増加し、ERGO による効果が裏付けられた<sup>15)</sup>。脳機能促進効果が見られた血漿中 ERGO 濃度は、マウスやヒトの正常レベル (1  $\mu$ M 程度) の数倍であり、最近海外で実施されたヒトへの ERGO 経口投与 (1 日当たり 5 ないし 25 mg) 後に見られる血漿中濃度とほぼ同じであり、ヒトでも到達しうるレベルである<sup>16)</sup>。すなわち、ERGO の脳機能に及ぼす効果は clinically relevant である。最近、ヒトにおける ERGO の血中濃度が、加齢、MCI (軽度認知障害、mild cognitive impairment)、パーキンソン病等で減少することが相次いで報告されている (図 7)<sup>17,18)</sup>。これらの結果は、クローン病のみならず、脳機能、神経変性疾患においても OCTN1 ないし ERGO が重要な働きを果たす可能性を示す。実際、ヒト血漿中レベルに近いところで記憶・学習能力が増加したこと (図 6) と、アルツハイマー型認知症の一步手前の段階で ERGO 濃度が低下していること (図 7) は、少なくとも、MCI 等で低下している ERGO を外から補充することが臨床的にも意味がある可能性を示す。現在我々は、ヒトで摂取可能な食物由来 ERGO を含む錠剤を開発し、ヒトで ERGO の摂取が記憶・学習に効果を発揮するかどうかを検討中である。この結果によっては、脳機能の維持の面から高齢社会における諸問題の一部を改善し、生活の質の向上につながる可能性がある。

#### 4. 今後の展望

仮に、膜輸送体 OCTN1 が食物由来の抗酸化物質 ERGO を体内に取り込むため生体に備わっていると仮定すると、そこには何らかの生理的意義があると考えられる。しかし、抗酸化物質は体内に多種類存在しており、抗酸化物質としての役割だけでは限定的とも考えられる。しかし、少なくとも脳における ERGO の働きには、抗酸化作用では説明できない特徴があり、我々がまだ理解できていない役割が存在する可能性もある。一方で、他の研究グループと本研究によって、炎症性腸疾患時の OCTN1 と ERGO の動きや、ERGO による神経新生とさまざまな脳機能改善効果が示されたことは、これら知見に基づき、病気の診断法や治療法、予防法の開発も期待される。OCTN1 が病気と関連する disease transporter であるか否かについて、さらなる検討が必要である。

## 【謝辞】

本研究の遂行にあたり、ご援助を賜りました公益財団法人篷庵社ならびに塩野義製薬株式会社の関係者の皆様に、心から御礼申し上げます。とくに、4年間にわたり、継続的にご支援いただきましたことは、研究遂行の大きな原動力になりました。また、研究助成対象者としてご推薦いただきました、故辻彰先生に深謝申し上げますとともに、先生のご冥福を心よりお祈りいたします。

## 【引用】 ○は篷庵社助成金での研究成果を示す（今後、投稿予定のものも含む）】

- 1) Kato Y, Kubo Y, Iwata D, Kato S, Sudo T, Sugiura T, Kagaya T, Wakayama T, Hirayama A, Sugimoto M, Sugihara K, Kaneko S, Soga T, Asano M, Tomita M, Matsui T, Wada M, Tsuji A. Gene knockout and metabolome analysis of carnitine/organic cation transporter OCTN1. *Pharm Res* 27: 832-840, 2010.
- 2) Gründemann D, Harlfinger S, Golz S, Geerts A, Lazar A, Berkels R, et al. Discovery of the ergothioneine transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 5256-5261, 2005.
- 3) Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, Newman B, Van Oene M, Cescon D, Greenberg G, Griffiths AM, St George-Hyslop PH, Siminovitch KA. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* 36: 471-475, 2004.
- 4) Shimizu T, Masuo Y, Takahashi S, Nakamichi N, Kato Y. Organic cation transporter Octn1-mediated uptake of food-derived antioxidant ergothioneine into infiltrating macrophages during intestinal inflammation in mice. *Drug Metab Pharmacokinet* 30(3): 231-239, 2015.
- 5) Masuo Y, Ohba Y, Yamada K, Nakamichi N, Ogihara T, Kunishima M, Kato Y. Combination metabolomics approach for identifying endogenous substrates of carnitine/organic cation transporter OCTN1, submitted.
- 6) Ishimoto T, Nakamichi N, Nishijima H, Masuo Y, Kato Y. Carnitine/organic cation transporter OCTN1 negatively regulates activation in murine cultured microglial cells. *Neurochem Res* 43(1): 107-119, 2018.
- 7) Shimizu T, Kijima A, Masuo Y, Ishimoto T, Sugiura T, Takahashi S, Nakamichi N, Kato Y. Gene ablation of carnitine/organic cation transporter 1 reduces gastrointestinal absorption of 5-aminosalicylate in mice. *Chem Pharm Bull* 38: 774-780, 2015.
- 8) Tang Y, Masuo Y, Sakai Y, Wakayama T, Sugiura T, Harada R, Futatsugi A, Komura T, Nakamichi N, Sekiguchi H, Sutoh K, Usumi K, Iseki S, Kaneko S, Kato Y. Localization of xenobiotic transporter OCTN1/SLC22A4 in hepatic stellate cells and its protective role in liver fibrosis. *J Pharm Sci* 105: 1779-1789, 2016.
- 9) Shinozaki Y, Furuichi K, Toyama T, Kitajima S, Hara A, Iwata Y, Sakai N, Shimizu M, Kaneko S, Isozumi N, Nagamori S, Kanai Y, Sugiura T, Kato Y, Wada T. Impairment of the carnitine/organic cation transporter 1-ergothioneine axis is mediated by intestinal transporter dysfunction in chronic kidney disease. *Kid Int* 92: 1356-1369, 2017.
- 10) Ben Said M, Grati M, Ishimoto T, Zou B, Chakchouk I, Ma Q, Yao Q, Hammami B, Yan D, Mittal R, Nakamichi N, Ghorbel A, Neng L, Tekin M, Shi XR, Kato Y, Masmoudi S, Lu Z, Hmani M, Liu X. A mutation in SLC22A4 encoding an organic cation transporter expressed in the cochlea stria endothelium causes human recessive non-syndromic hearing loss DFNB60. *Human Genetics* 135: 513-524, 2016.

- 11) Nakamichi N, Taguchi T, Hosotani H, Wakayama T, Shimizu T, Sugiura T, Iseki S, Kato Y. Functional expression of carnitine/organic cation transporter OCTN1 in mouse brain neurons: Possible involvement in neuronal differentiation. *Neurochem Int* 61: 1121-1132, 2012.
- 12) Ishimoto T, Nakamichi N, Hosotani H, Masuo Y, Sugiura T, Kato Y. Organic cation transporter-mediated ergothioneine uptake in mouse neural progenitor cells suppresses proliferation and promotes differentiation into neurons. *PLoS One* 9: e89434, 2014.
- 13) Ishimoto T, Masuo Y, Kato Y, Nakamichi N. Ergothioneine-induced neuronal differentiation is mediated by activation of S6K1 (Thr389) and neurotrophin 5/TrkB signaling in neural stem cells, to be submitted.
- 14) Nakamichi N, Nakayama K, Ishimoto T, Masuo Y, Wakayama T, Sekiguchi H, Sutoh K, Usumi K, Iseki S, Kato Y. Food-derived hydrophilic antioxidant ergothioneine is distributed to the brain and exerts antidepressant effect in mice. *Brain Behav* 6: e00477, 2016.
- 15) Nakamichi N, Nishiyama M, Nakao S, Takeda Y, Ishimoto T, Masuo Y, Matsumoto S, Suzuki M, Kato Y. Oral administration of the food-derived hydrophilic antioxidant ergothioneine enhances object recognition memory and promotes neuronal maturation in the murine hippocampus, to be submitted.
- 16) Cheah IK, Tang RM, Yew TS, Lim KH, Halliwell B. Administration of Pure Ergothioneine to Healthy Human Subjects: Uptake, Metabolism, and Effects on Biomarkers of Oxidative Damage and Inflammation. *Antioxid Redox Signal* 26: 193-206, 2017.
- 17) Cheah IK, Feng L, Tang RMY, Lim KHC and Halliwell B. Ergothioneine levels in an elderly population decrease with age and incidence of cognitive decline; a risk factor for neurodegeneration? *Biochem Biophys Res Commun* 478: 162-167, 2016.
- 18) Hatano T, Saiki S, Okuzumi A, Mohny RP and Hattori N. Identification of novel biomarkers for Parkinson's disease by metabolomic technologies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 87: 295-301, 2016.

希少糖（レアシュガー）の消化管吸収機構と  
小腸機能回復に与える影響

山形大学

鈴木拓史



## 「FCMD の中枢神経症状に対する治療法の開発」

藤田保健衛生大学病院 遺伝カウンセリング室

池田真理子

ラミン A/C 遺伝子関連心筋症におけるヒト iPS 細胞・ラットモデルを用いた病態解明・治療法開発

京都大学大学院医学研究科循環器内科 牧山 武

公益財団法人 篷庵社

Hoansha Foundation

大阪市中央区道修町3丁目1番8号

電話：06-6231-9180

<http://www.shionogi.co.jp/ho/>