

(第 43 回)
公益財団法人 篷庵社
研究助成発表会
講演要旨集

令和 6 年 7 月 9 日 (火)

於 ヒルトン大阪

プログラム

日時：令和6年7月9日（火） 10時00分から16時30分まで
場所：ヒルトン大阪 35階 ウィンドーズ

10:00	ご挨拶 公益財団法人蓬庵社 理事長 武田 禮二	
	演題および演者（講演20分、討論10分）	座長
10:05-	1. 高歪み多環芳香族炭化水素の革新的合成 井川 貴詞 先生 (岐阜薬科大学 創薬化学大講座 薬品化学研究室)	(蓬庵社評議員) 小林 資正 先生
10:40-	2. 医薬資源の自動合成を志向したデータ駆動型精密有機合成反応開発 滝澤 忍 先生 (大阪大学産業科学研究所)	(蓬庵社評議員) 北 泰行 先生
11:15-	3. 中枢神経系グルタミン酸トランスポーター新規調節機構の検討 佐藤 薫 先生 (国立医薬品食品衛生研究所)	(蓬庵社理事) 大和田 智彦 先生
11:45-	昼食休憩	
12:35-	4. ヒト血液脳関門を知る、創る、操る： 物流システムの解明から『血液脳関門操薬』への展開 立川 正憲 先生 (徳島大学大学院医歯薬学研究部 薬学域・DDS研究センター薬動力学部門)	(蓬庵社元評議員) 寺崎 哲也 先生 代理 (蓬庵社評議員) 玉井 郁巳 先生
13:10-	5. 核移行因子KPNA1による軸索輸送制御メカニズムと その生理的意義の解明 山田 雅己 先生 (福井大学学術研究院医学系部門・分子生体情報学分野)	(蓬庵社理事) 米田 悦啓 先生
13:45-	《特別研究助成》 6. 生体内異種細胞間相互作用に着目したパーキンソン症候群 新規治療ストラテジーの創出 糸数 隆秀 先生 (大阪大学大学院医学系研究科 創薬神経科学共同研究講座/分子神経科学講座)	(塩野義製薬株 創薬研究本部) 玉野 竜太 氏
14:15-	休憩	
14:35-	新規助成者ご紹介	
14:45-	《特別研究助成》 7. 小胞輸送障害により生じる新規疾患の病態解明と、 幅広いリソソーム病治療法開発への応用 大友 孝信 先生 (川崎医科大学 医学部 分子遺伝医学教室)	(塩野義製薬株 創薬化学研究所) 横田 慎一 氏
15:20-	《特別研究助成》 8. 細胞外微粒子による炎症応答を抑える高活性化合物の 機能解明と間質性肺炎治療への応用 武村 直紀 先生 (大阪大学大学院薬学研究科)	(塩野義製薬株 創薬疾患研究所) 中野 祥行 氏
15:55-	《特別研究助成》 9. 線維化関連難治性疾患の創薬標的分子の同定とその治療応用 仲矢 道雄 先生 (九州大学大学院薬学研究院疾患制御学分野)	(塩野義製薬株 創薬研究本部) 加藤 秀昭 氏

目 次

1. **井川 貴詞**
「高歪み多環芳香族炭化水素の革新的合成」 1
2. **滝澤 忍**
「医薬資源の自動合成を志向したデータ駆動型
精密有機合成反応開発」 12
3. **佐藤 薫**
「中枢神経系グルタミン酸トランスポーター新規調節機構の検討」 22
4. **立川 正憲**
「ヒト血液脳関門を知る、創る、操る：
物流システムの解明から『血液脳関門操薬』への展開」 32
5. **山田 雅己**
「核移行因子KPNA1による軸索輸送制御メカニズムと
その生理的意義の解明」 42
6. **系数 隆秀**
「生体内異種細胞間相互作用に着目したパーキンソン症候群
新規治療ストラテジーの創出」 52
7. **大友 孝信**
「小胞輸送障害により生じる新規疾患の病態解明と、
幅広いリソソーム病治療法開発への応用」 59
8. **武村 直紀**
「細胞外微粒子による炎症応答を抑える高活性化合物の機能解明と
間質性肺炎治療への応用」 69
9. **仲矢 道雄**
「線維化関連難治性疾患の創薬標的分子の同定とその治療応用」 79

高歪み多環芳香族炭化水素の革新的合成

岐阜薬科大学 薬品化学研究室
井川貴詞

1. はじめに

複数のベンゼン環が縮環したアセン類及びグラフェン類に代表される多環芳香族炭化水素 (PAH) は、大きく広がった π 電子平面を有しており、機能性分子としての応用性が注目されている。しかし、平面的で構造上の多様性に限界があること、 π 電子系を拡張すると溶解性や安定性が大きく低下するため高純度な化合物の合成が困難になることなど多くの課題が残されている。ベンゼン環がそれぞれオルト位で縮環したヘリセンは、両末端の芳香環同士の立体反発のため通常安定な芳香環の平面構造が不安定となり、らせん構造となる (Figure 1)。ヘリセンはひずみの大きな非平面 π 電子構造を有するにも関わらず、熱や光に対して比較的安定な分子であり、特に官能基を有する光学活性ヘリセンは不斉有機触媒、不斉配位子など幅広い応用が期待される。

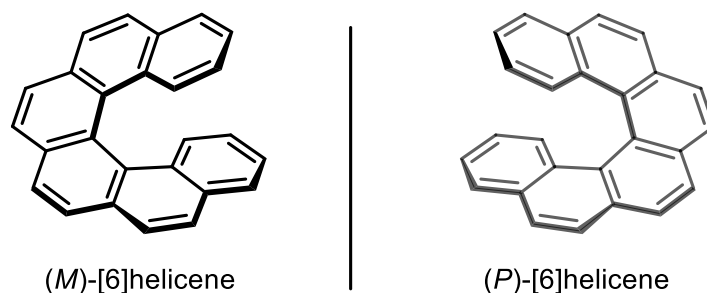


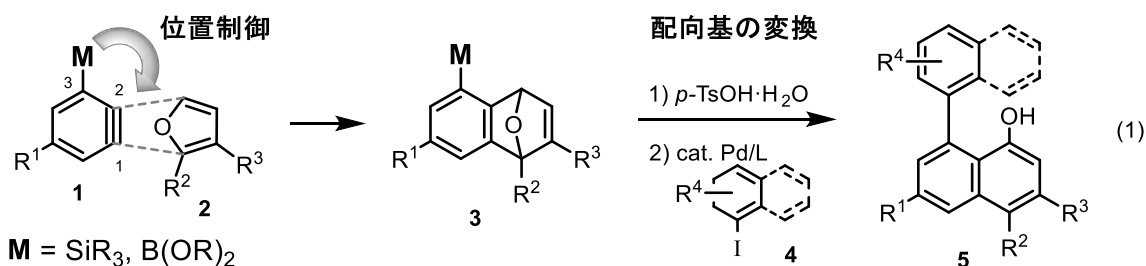
Figure 1. [6]ヘリセンの構造と立体化学

らせん分子は、DNA の二重らせんやタンパク質の α -ヘリックス、多糖のアミロースなど自然界にも多数存在しており、その機能と構造の関係は研究者の興味を掻き立ててきた。ヘリセンに代表されるらせん分子の右巻きと左巻きの構造は、互いに重ね合わせることができない鏡像関係にある。分子の立体化学は、その生物活性に大きな影響を与えるため、らせん分子は医薬品開発の観点からも大変重要である。しかし、歪みの大きならせん状の PAH は通常合成が困難であり、特に官能基化されたらせん状 PAH の立体選択的合成法は殆ど知られていない。

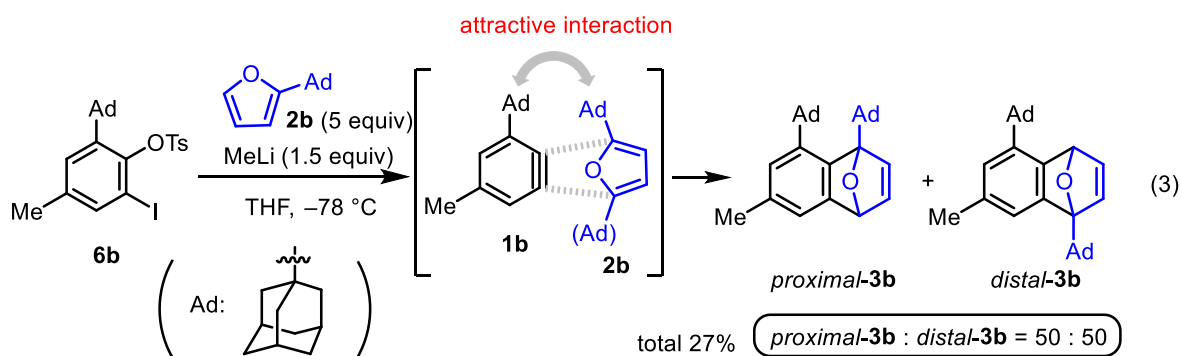
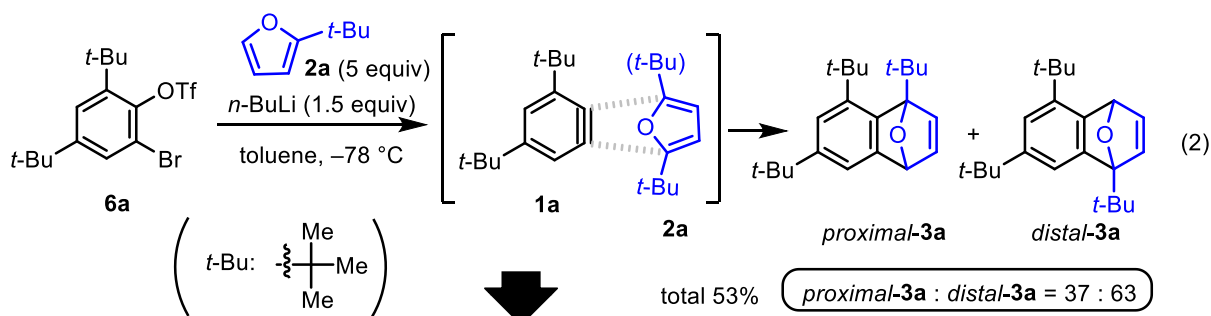
本研究では、歪みの大きな高反応性中間体ベンザインの選択的付加環化反応を基盤として、従来法では合成困難ならせん型高歪 PAH の合成法の開発を目指し研究に着手した。著者は、1) ベンザインの[4+2]付加環化による PAH 構築反応、2) (2+2)付加環化による歪んだビフェニレン骨格の構築、3) 多環式ベンザインの(2+2)付加環化によるらせん型 PAH の合成の順に研究を推進した。以下に本研究の詳細を論述する^[1]。

2. ベンザインの位置選択的[4+2]付加環化反応～発見の端緒～

ベンザインの付加環化反応は、多環式芳香族化合物を合成する手法として、注目を集めてきた。しかし、非対称ベンザインの付加環化反応の多くは、2種類の位置異性体がほぼ1:1の比で生成することが問題である。著者は、変換可能なシリル基やボリル基を配向基(M)として利用することでフラン**2**との[4+2]付加環化反応の位置選択性の問題解決に成功し、その後のカップリング反応と組み合わせて多環芳香族化合物**5**の位置選択的合成法を確立している(式1)^[2]。本反応は、ベンザイン3位に電気陰性度の小さな元素を配置することで反応位置が制御される。



一方、式2や式3に示すように、炭素置換基(*t*-Bu基、Ad基)がベンザインの3位に置換したベンザイン**1a**や**1b**を2位置換フラン**2a**や**2b**と反応させた場合、その位置選択性は低く、得られる付加環化生成物 *proximal-3* と *distal-3* の比はそれぞれ 37:63 と 50:50 となった。この結果は、炭素置換基が置換した場合に選択性が低くなることを実証したものであるが、著者はこの結果に少なからず違和感を覚えた。すなわち、極めて嵩高い置換基同士がぶつかるように反応剤が接近するにもかかわらず低い選択性で、かつ、式3で用いた Ad 基の方が *t*-Bu 基より嵩高いにもかかわらず、式3の選択性(50:50)は式2の選択性(37:63)より低い。その原因として、嵩高い置

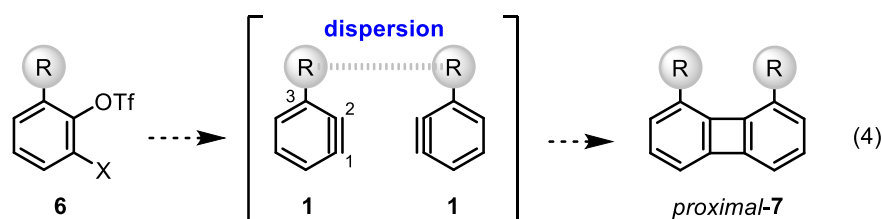


換基の間で引力相互作用が働いているのではないかと考えた。すなわち、ベンザイン付加環化反応の遷移状態では、ベンザインの Ad 基とフランの Ad 基が接近し、置換基の間で引力が働くため distal 選択性が低くなったと考察した。著者は、この嵩高いアルキル基の間に生じるロンドン分散力^[3]を利用すれば、新しい反応制御が可能となると予想した。

3. ベンザインの位置選択的(2+2)付加環化二量化反応

ロンドン分散力は、ヤモリが壁や天井を這う際に利用する引力相互作用として知られており、有機化学の教科書ではアルカン分子間に働く弱い分子間力として取り上げられる^[4]。ロンドン分散力は、静電力などと同様、比較的長距離の分子間で作用する相互作用に分類され、立体反発よりも遠隔位からその効果が表れる。近年、この相互作用は、触媒反応における選択性発現を議論するために利用されることが多くなってきたが、積極的に化学反応の駆動力として利用した反応は、ほとんど知られていない^[5]。

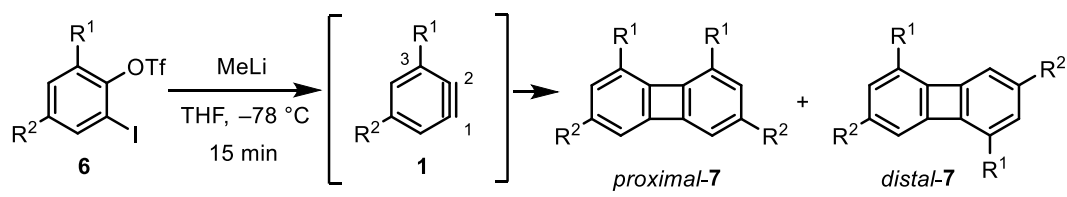
一方、ベンザインの(2+2)付加環化二量化反応は、ビフェニレンを与える反応として古くから認識されているが、不安定なベンザインは反応系中で速やかに分解し、得られるビフェニレンの収率が非常に低いことがほとんどであり、積極的にこの反応を利用することは困難であった。著者は前項の研究中にベンザインの付加環化反応において分散力が比較的大きく作用することを見いだした。そこで、ベンザインの(2+2)付加環化二量化反応において分散力による反応制御が可能と考えた(式4)。すなわち、前駆体 **6** から発生させた3位置換ベンザイン **1** の(2+2)付加環化二量化反応を行うことで、置換基 R の分散力によって基質を効率よく接近させ、更に反応位置を制御することでビフェニレン *proximal-7* が優先的に生成すると予想した。



種々の前駆体 **6** の THF 溶液中に -78°C でメチルリチウムを滴下することで、3位に置換基を有するベンザイン **1** を発生させた (Table 1)。その結果、メトキシ基を配向基とした場合 ($\text{R}^1 = \text{OMe}$, entry 1) を除き、すべての反応においてビフェニレン誘導体 **2** を与えた。配向基 R^1 がメチル基やトリメチルシリル基では、proximal 体と distal 体の比はほぼ 1:1 となるものの ($\text{R}^1 = \text{OMe}$ and SiMe_3 , entries 2 and 3)、シリル基やアルキル基を嵩高くすると予想通り proximal 選択的に反応が進行することがわかった ($\text{R}^1 = \text{Si}(t\text{-Bu})\text{Me}_2$, $t\text{-Bu}$, Ad, entries 4-7)。特に、アルキル基を嵩高くすればするほど選択性が高くなり、Ad 基を配向基とすると *proximal-2* のみを選択的に与えた ($\text{R}^1 = \text{Ad}$, entry 7)。また選択性が向上するとともに収率が改善されており、特に $\text{Si}(t\text{-Bu})\text{Me}_2$ 基を配向基とした時に両位置異性体

を合わせた総収率 80%と一般的なベンザインの (2+2) 付加環化二量化反応と比較して信じられないほど高収率であった ($R^1 = \text{Si}(t\text{-Bu})\text{Me}_2$, entry 4)。完全な選択性にて反応が進行した Ad 基を有するベンザインの場合、収率は 54%であった ($R^1 = \text{Ad}$, entry 7)。

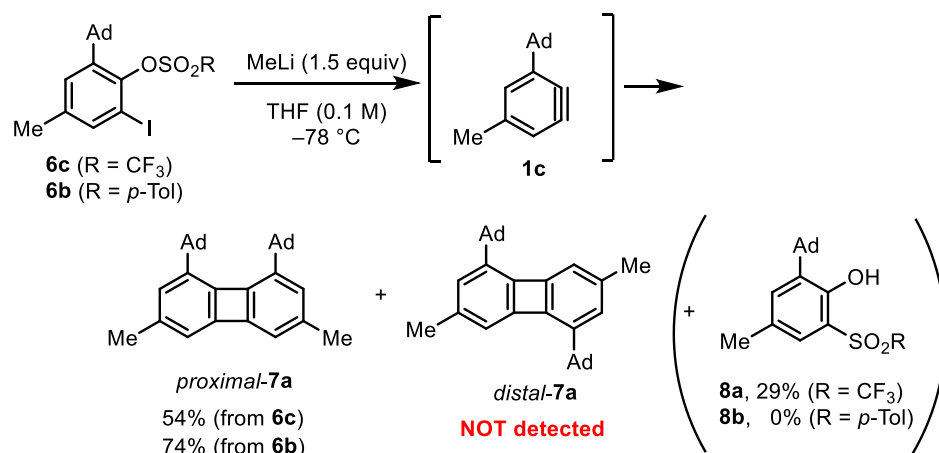
Table 1. ベンザインの(2+2)付加環化二量化反応の位置選択性



entry	R^1	R^2	X	isolated yield (%)		ratio ^a
				proximal-7	distal-7	proximal-7 : distal-7
1	OMe	H	I	complex mixture		–
2	Me	Me	Br	16 ^a	15 ^a	1 : 1
3	SiMe ₃	Me	I	45	40	1.1 : 1
4	Si(<i>t</i> -Bu)Me ₂	Me	I	70	10	7 : 1
5	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	Br	30 ^a	5 ^a	3 : 1
6	<i>t</i> -Bu	Me	I	52	nd ^b	16 : 1
7	Ad ^c	Me	I	54	nd ^b	>20 : 1

^aDetermined by ¹H NMR. ^bnd: not determined. ^cAd: adamantyl.

そこで、Table 1, entry 7 の反応を再度詳細に解析したところ、重大な副生成物の生成が観測された (Scheme 1)。すなわち、脱離基としてトリフルルオキシ基 (TfO 基) を有するアダマンチルベンザイン前駆体 **6c** を原料としたとき、スルホニル基が転位したチアフリース転位体 **8a** が 29%収率で単離された。この副生成物は、**6c** からベンザイン **1c** が発



Scheme 1. 前駆体の選択による副生成物の抑制

生する前に生じており、この転位反応を抑制することで *proximal-7a* の収率は改善可能と考えた。そこで、O-S 結合がより強固な *p*-トルエンスルホニルオキシ基 (TsO 基) へと変更したところ、*distal-7a* はもちろん対応するチアフリース転位生物 **8b** は全く生じることなく、目的とする *proximal-7a* の収率を 74%まで改善することができた。

Figure 2 に *proximal-7a* の X 線結晶構造解析結果を示す。2つのアダマンチル基はビフェニレン環の平面上にはなく、それぞれ立体的に反発して歪んだ構造をしていた (右図)。ラセミ化障壁はおそらく小さいものと予想されるが、この分子もらせん分子といえる。

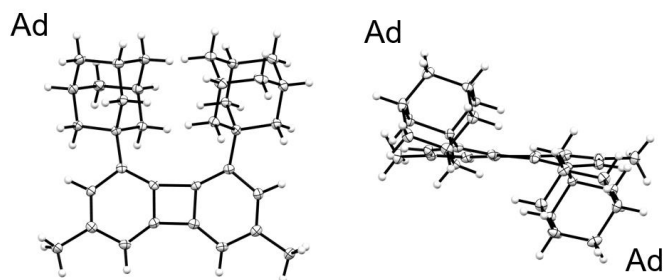
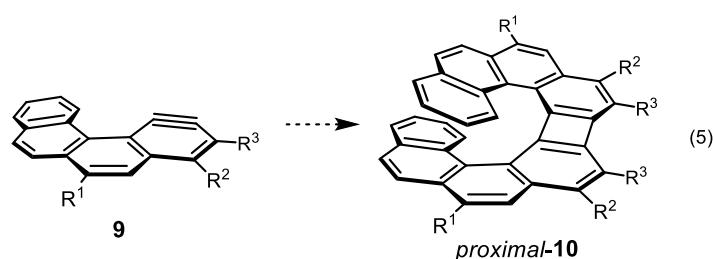


Figure 2. *proximal-7a* の X 線結晶構造解析

4. 計算科学によるらせん分子の安定性比較と反応予測

単環ベンザイン **1** の (2+2) 付加環化二量化反応は、ベンザイン 3 位置換基の分散力によって *proximal* 選択的に進行した。著者はよりラセミ化障壁が大きく魅力的ならせん分子の合成を目指して、多環式ベンザイン **9** の (2+2) 付加環化二量化反応を設計した (式 5)。4 環性ベンザイン **9** はその縮環構造が嵩高い置換基の代用として働き、その π 平面の分散力は更に大きくなることが期待され、(2+2) 付加環化二量化反応によりらせん分子 *proximal-10* が選択的に生成すると考えた。



実際の実験を始める前に、得られる生成物 *proximal-10a* ($R^1, R^2, R^3 = H$) と位置異性体 *distal-syn-10a* (とその配座異性体 *distal-anti-10a*) について DFT 計算を行いエネルギーを比較した (Figure 3a)。その結果、興味深いことに目的のらせん分子 *proximal-10a* が最もエネルギー的に安定であった。次に、それぞれの化合物についてエネルギー分割^[6]を行った (Figure 3b)。最もエネルギー的に不利な *distal-anti-10a* を基準として解析したところ *proximal-10a* の安定性の寄与は、分散力が最も大きいことがわかった。すなわち、*proximal-10a* は π 平面の重なりによる分散相互作用によって安定化していた。

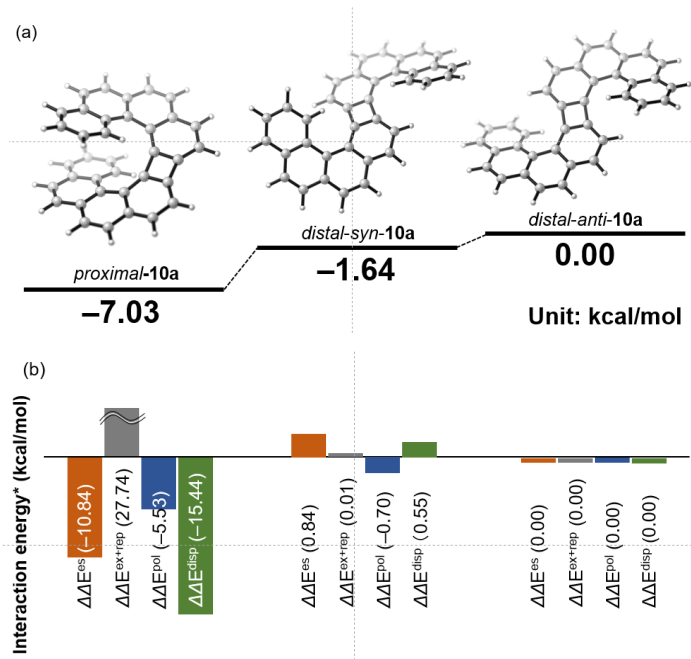


Figure 3. (a) 予想される生成物のエネルギー計算
 (b) エネルギー分割による安定化の要因特定 (E^{es} : 静電エネルギー、 E^{ex+rep} : 交換反発エネルギー、 E^{pol} : 分極エネルギー、 E^{disp} : 分散エネルギー)

各種ビフェニレン誘導体について NCI (noncovalent interaction) プロット^[7]を行った (Figure 4)。その結果、4環性ベンザイン **9** の (2+2) 付加環化二量化反応によって得られるビフェニレン誘導体 *proximal-10a* の場合、弱い引力相互作用が上下の縮合芳香環の広い範囲で働いていることがわかった (右下図)。

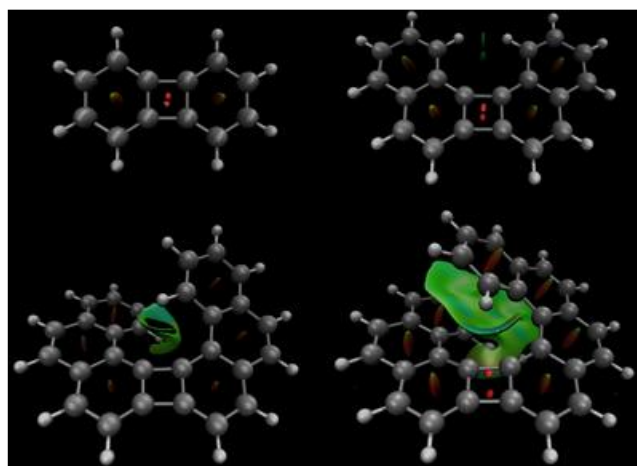


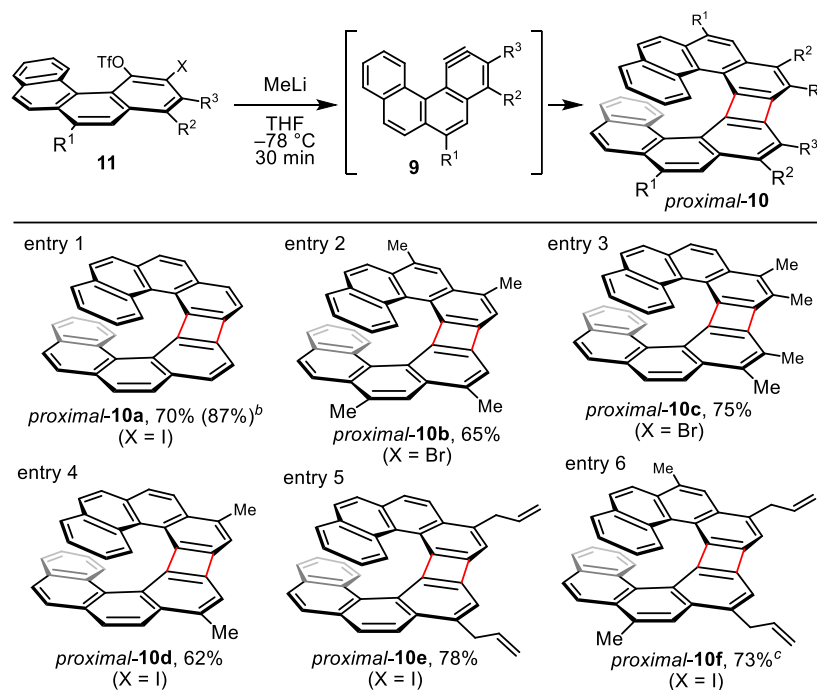
Figure 4. NCI プロットによる生成物の非共有結合性相互作用の可視化
 (赤色: 反発相互作用、緑色: 弱い引力相互作用、青色: 強い引力相互作用)

以上の計算結果より、4環性ベンザイン **9** を発生させることができれば、その (2+2) 付加環化反応により安定ならせん分子 *proximal-10a* が選択的に得られると予想された。

5. ベンザインの位置選択的(2+2)付加環化二量化反応によるらせん分子合成

4環性ベンザイン **9** を発生させるための前駆体 **11** を合成し、THF 溶液としてそこに MeLi をゆっくり加えたところ、完全な位置選択性にて *proximal-10* が得られた (Table 2)。前項の計算に用いた無置換の生成物を与える反応の場合、NMR 収率 87%にて *proximal-10a* を与えた (entry 1)。なお、その単離には再結晶が必要だったため単離収率は 70%と若干低下するものの依然として高収率で付加環化体 *proximal-10a* が得られた。また、芳香環上のメチル基の置換位置によって選択性、収率共に大きな変化はなく、高収率かつ高選択的に *proximal-10b-10d* を与えた (entries 2-4)。置換基としてアリル基を有する場合も同様に反応が進行した (entries 5 and 6)。なお、本反応に使用する脱離基は TfO 基が最も良く、ハロゲンとしてはヨウ素を用いた場合に最も高収率となった。

Table 2. 多環式ベンザインの (2+2) 付加環化二量化反応によるらせん分子合成



^aConditions: 1.0 equiv of **11**, 1.5 equiv of MeLi in THF (0.10 M) at -78 °C for 30 min.

^bDetermined by ¹H NMR. ^c2.8 equiv of MeLi was used.

得られた付加環化体 *proximal-10a* の X 線結晶構造を Figure 5 に示す。最も接近した炭素-炭素原子間の距離は 3.24 Å であり、この値は炭素のファンデルワールス半径の 2 倍よりも小さいことから、上下の芳香環の間には引力相互作用が働いていることが示唆された。

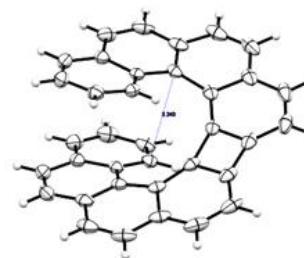


Figure 5. らせん分子の X 線結晶構造

6. 計算科学による反応機構解析

最後に、4環性ベンザイン **9** の (2+2) 付加環化二量化反応の反応機構に関する情報を得るべく計算科学による詳細な解析を実施した (Figure 6-10)。まず最初に、反応の第一段階における軌道の重なりは 1 : 1 の相互作用か、1 : 2 の相互作用かを調べた (Figure 6)。なお、(2+2) 付加環化反応において 2 : 2 の軌道相互作用となる協奏的反応機構は Woodward-Hoffmann 則から除外できる。それぞれの中間体のエネルギーを比較したところ、1 : 2 の軌道相互作用 (Type 2) の場合、52.6 kcal/mol より高エネルギーとなるため、1 : 1 の軌道相互作用 (Type 1) で開始するものと考察した。

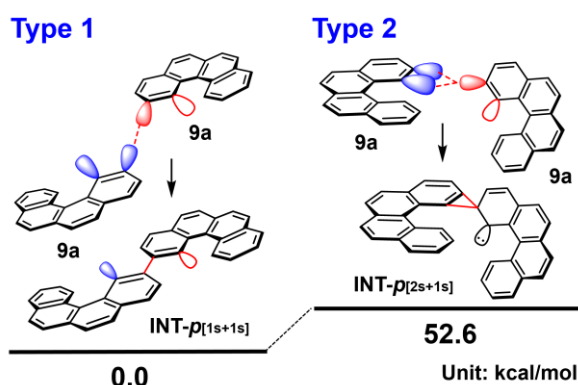


Figure 6. 多環式ベンザイン (2+2) 付加環化反応における二種類の軌道相互作用

次に、2分子の **9a** を 1 : 1 の軌道相互作用となるように接近させていったところ、一段回目の結合形成反応のエネルギー曲線に極大値が存在せず、明確なエネルギー障壁なし (バリアレス) でスムーズに進行し、中間体 $\text{INT-}p[1s+1s]$ が生じることがわかった (Figure 7)。逆にエネルギー障壁がないということは $\text{INT-}p[1s+1s]$ から **9a** に戻る逆反応も容易に進行することを意味する。2つの分子を更に接近させるとエネルギーは急激に上昇する。

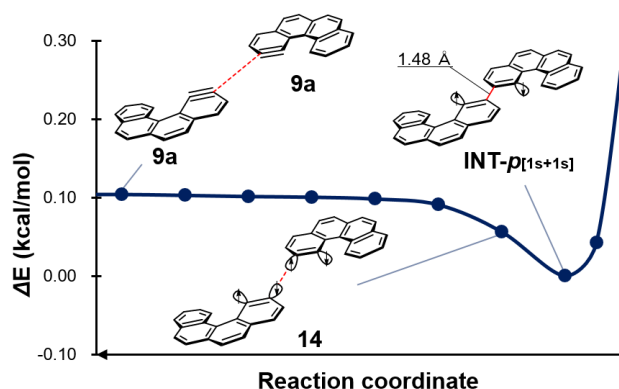


Figure 7. 多環式ベンザイン (2+2) 付加環化反応の第一段階におけるエネルギー変化

次に、 $\text{INT-}p_{(1s+1s)}$ に新たに生じた σ 結合を軸に回転させた結果を Figure 8 に示す。その結果、徐々にエネルギーが上昇し、最もエネルギーの高い極大値（遷移状態周辺）を過ぎるとエネルギーは急激に低下した。このとき、同じ反応について2環性ベンザイン **S1**、3環性ベンザイン **S2**、4環性ベンザイン **9a** の比較を行ったところ、**9a** 場合に最もエネルギー的に低いルートを通った。

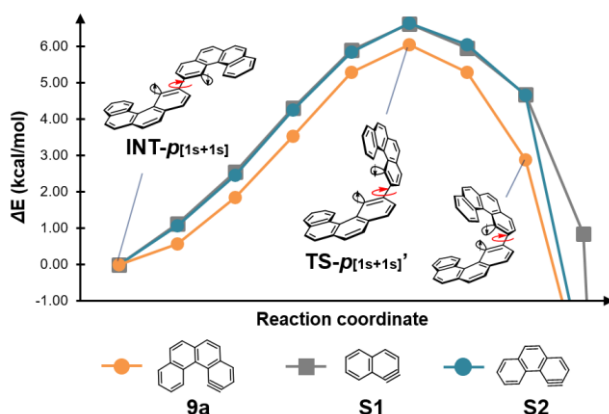


Figure 8. 多環式ベンザイン (2+2) 付加環化反応の第二段階におけるエネルギー変化

2環性ベンザイン **S1**、3環性ベンザイン **S2**、4環性ベンザイン **9a** を原料とした場合の Figure 8 と同様の反応の遷移状態を算出したところ、**9a** を原料とした場合に最もエネルギーが低くなることがわかった (Figure 9)。この結果は、本反応が4環性ベンザインのときに効率よく進行したことを裏付ける結果である。なお、その他の多環式ベンザインでは極めて収率が低くなることが実験的にも証明されている。

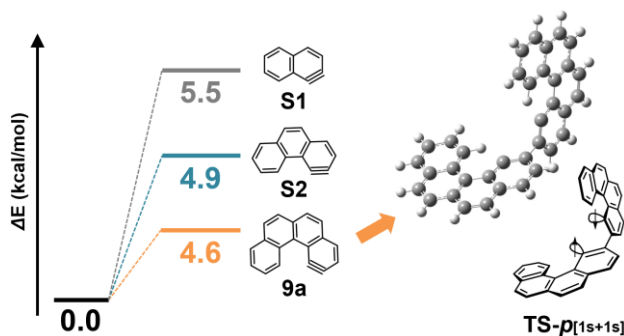


Figure 9. 多環式ベンザインの縮環数による (2+2) 付加環化反応における第二段階の遷移状態エネルギー差

Figure 8 で実施した **9a**、**S1**、**S2** の σ 結合周りで回転させながらエネルギー分割し、分散力に起因するエネルギーをプロットしたところ、Figure 10 に示すように回転のいずれの段階でも **9a** を原料とする反応の中間体エネルギーが最も低くなった。この結果は、分

散力が **9a** の回転運動の駆動力となり、効率的に反応が進行することがわかる。

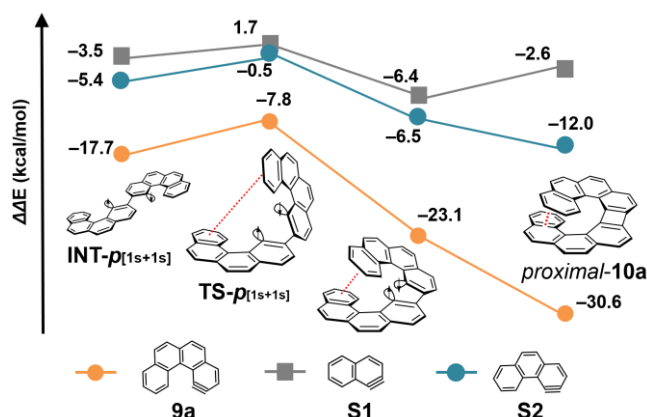


Figure 10. 多環式ベンザインの縮環数による (2+2) 付加環化反応の第二段階における分散力エネルギー変化

ここまでの計算結果から予想される反応機構の全体像を Figure 11 に示した。前駆体 **11** から発生したシングレットジラジカル **9A** はもう一分子の **9A** と 1 : 1 の軌道相互作用によって接近し、 σ 結合を形成することで **INT- $p_{[1s+1s]}$** が生じる。生じた σ 結合を軸に分子内で回転させると遷移状態 **TS- $p_{[1s+1s]}$** を通って更に回転してもう一つの σ 結合を生じ、**proximal-10** となる。**INT- $p_{[1s+1s]}$** を生じる反応は障壁がなく、逆反応が容易に進行するため、次の回転の段階が律速段階となる。回転反応の遷移状態は、分散力によって安定化されるため本反応は proximal 選択的に進行していることが示された。

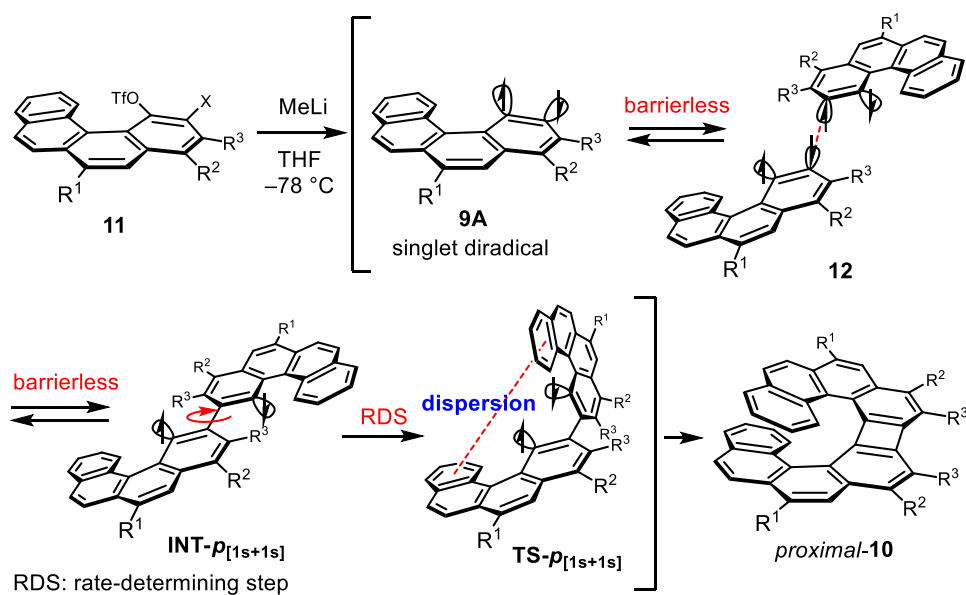


Figure 11. 多環式ベンザインの構造による(2+2)付加環化反応の反応機構

7. 謝辞

本研究の一部は公益財団法人篷庵社の助成金によって実施されたものです。公益財団法人篷庵社 武田禮二理事長はじめ財団関係者の皆様に厚く御礼を申し上げます。また、ご推薦を賜りました大阪大学名誉教授 小林資正先生に心より御礼申し上げます。また、本研究は大阪大学大学院薬学研究科 薬品製造化学研究室、岐阜薬科大学 薬品化学研究室で行われたものであります。本研究を進めるにあたり御指導頂きました大阪大学大学院薬学研究科 赤井周司先生、岐阜薬科大学 佐治木弘尚先生に深謝申し上げます。

8. 参考文献

- [1] Ikawa, T.; Yamamoto, Y.; Heguri, A.; Fukumoto, Y.; Murakami, T.; Takagi, A.; Masuda, Y.; Yahata, K.; Aoyama, H.; Shigeta, Y.; Tokiwa, H.; Akai, S. Could London Dispersion Force Control Regioselective (2+2) Cyclodimerizations of Benzyne? YES: Application to the Synthesis of Helical Biphenylenes. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 10853–10859.
- [2] (a) Ikawa, T.; Masuda, S.; Takagi, A.; Akai, S. 1,3- and 1,4-Benzdiyne Equivalents for Regioselective Synthesis of Polycyclic Heterocycles. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 5206–5211. (b) Ikawa, T.; Nishiyama, T.; Shigeta, T.; Mohri, S.; Morita, S.; Takayanagi, S.; Terauchi, Y.; Morikawa, Y.; Takagi, A.; Ishikawa, Y.; Fujii, S.; Kita, Y.; Akai, S. *ortho*-Selective Nucleophilic Addition of Primary Amines to Silylbenzyne: Synthesis of 2-Silylanilines. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5674–5677. (c) Ikawa, T.; Takagi, A.; Kurita, Y.; Saito, K.; Azechi, K.; Egi, M.; Kakiguchi, K.; Kita, Y.; Akai, S. Preparation of Borylbenzyne and Their Regioselective Diels–Alder Reaction: Synthesis of Functionalized Arylboronates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5563–5566. (d) Akai, S.; Ikawa, T.; Takayanagi, S.; Morikawa, Y.; Mohri, S.; Tsubakiyama, M.; Egi, M.; Wada, Y.; Kita, Y. Synthesis of Biaryl Compounds through Three-Component Assembly: Ambidentate Effect of the *tert*-Butyldimethylsilyl Group for Regioselective Diels–Alder and Hiyama Coupling Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7673–7676.
- [3] (a) London, F. Zur Theorie und Systematik der Molekularkräfte. *Phys.* **1930**, *63*, 245–279. (b) London, F. The general theory of molecular forces. *Trans. Faraday Soc.* **1937**, *33*, 8b–26.
- [4] NHKサイエンス ZERO 最新科学がくつつける！”夢の接着剤”2024年5月19日放送.
- [5] Wagner, J. P.; Schreiner P. R. London Dispersion in Molecular Chemistry—Reconsidering Steric Effects. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 12274–12296.
- [6] Su, P.; Li, H. Energy decomposition analysis of covalent bonds and intermolecular interactions. *J. Chem. Phys.* **2009**, *131*, 014102.
- [7] Contreras-García, J.; Johnson, E. R.; Keinan, S.; Chaudret, R.; Piquema, J.-P.; Beratan, D. N.; Yang, W. NCIPLOT: A Program for Plotting Noncovalent Interaction Regions. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 625–632.

はじめに

精密有機合成は、医薬品、農薬、香料、液晶、及び有機ELなどのファインケミカルズの開発や、その大量安定供給には欠かせない技術の一つである。しかしながら、効率的かつ高収率にて目的化合物を合成するためには反応条件を網羅的に探索し、最適条件を予測・決定する必要がある。しかしながら、探索パラメータ数が多くなると実験試行数は指数関数的に増加し、熟練研究者の経験に基づく逐次網羅的スクリーニングでも多大な時間・労力・資源・エネルギー・経済的コストを要する。持続可能な開発 (**SDGs: Sustainable Development Goals**) が新たなグローバルスタンダードとなる中、従来のようなエネルギー・資源の大量消費や化学廃棄物の大量排出を伴う多段階合成手法とは異なる、真のSDGs志向型合成反応プロセスの開拓が求められている。

様々な次世代型合成反応プロセスが提案される中で、近年、フロー合成・フロー電解合成が注目されている。フロー合成は、微細な流路に原料を流し込み、マイクロミキサーを用いて高効率で混合し、化学反応を流路内にて行う連続合成手法である。フロー反応の特徴は、フラスコ容器等にて反応物を攪拌するバッチ反応と比べ、熱効率・攪拌効率・安全性が高い。複数のフロー反応を集積化することで、入手容易な原料からファインケミカルズを効率的にスケールアップ合成することも可能である。しかしながら、ファインケミカルズ合成に適用する際には、従来の有機化学的パラメータ（試薬の量、反応温度等）に加え、フロー反応装置由来のパラメータ（流速やミキサーの種類等）の条件検討が必要となる。化学酸化剤・還元剤を必要としない電解反応は、電気エネルギーを直接利用して、温和な反応条件下、化学反応を促進する。従来法では困難な反応でも、電解条件を適切に設定することで選択的な酸化・還元反応プロセスを実現できる。フロー反応と電解反応を組み合わせた「フロー電解反応」は、両反応の特徴を利用可能な魅力的手法である。しかしながら、フロー反応と電気化学的パラメータ（電解質の量や電流値等）をそれぞれ最適化するためには、多大な労力を要する。

精密有機合成反応の開発においても迅速なパラメータ最適化が求められ、近年、実験計画法や機械学習法による自動最適化が報告されるようになってきている[1]。このような背景下、我々は最少限の実験試行回数から最適条件を高効率的に探索するベイズ最適化に着目し、ベイズ最適化実装によるフロー・電解精密有機合成反応の開発研究の加速化を試みている。コスト及び法令・規制のため合成法に制約のある化成品合成プロセスの反応条件探索にもベイズ最適化を用いた社会実装研究を行っている。

フロー・電解合成法は、「分子拡散や熱移動を精密に制御でき個々の操作が実験者の技術に依存しにくくデータ精度が高い」、「反応温度・基質当量・溶液の混合速度などのパラメータを容易に変更できる」、「コンピュータ制御による自動化が可能であり信頼性の高いデータを集積化できる」といった特徴を有し、機械学習との親和性が極めて高い。

ベイズ最適化は、少ない実験データ数で回帰モデル構築が可能であり、多次元の反応パラメータの同時探索が行えるため、動的実験計画法の1つとして様々な分野で利用されている。ベイズ最適化の精密有機合成への初めての实装研究は、我々の電解反応の条件探索に関する報告とほぼ同時期に Doyle らがバッチ反応の条件探索[2]に、布施らがフロー反応の条件探索[3]にと、それぞれ独立に報告しており、最近では一般的な最適化ツールになりつつある。ベイズ最適化法を利用する条件探索では、次に示す①-⑥のプロセスによって、最少限の実験試行数にて高収率を与える反応条件を予測する[4]。

- ① 複数の反応パラメータにおいて探索範囲を無作為に実験し学習データを収集する
- ② ①で収集したデータを用いて、ガウス過程回帰を行い、平均と分散を算出する
- ③ 平均と分散から算出される獲得関数を最大化する反応パラメータを予測する

- ④ ③で得られた反応パラメータを、化学反応実験によって評価する
 ⑤ ④で得られた実験結果を学習データに追加してガウス過程回帰を行い、平均と分散を算出する
 ⑥ 収率が最大化するまで③-⑤を繰り返す

ベイズ最適化は、期待値の最大値を与えるパラメータ付近を注目する「活用」と、データ数の少ないパラメータエリアに注目する「探索」を基本戦略とするため、局所解に陥りにくい。獲得関数には、EI (Expected Improvement)、PI (Probability of Improvement)、LCB (Lower Confidence Bound) 等があり、これらを任意に使い分けることで、様々な最適化問題に対応できる。

1. ガウス過程回帰を用いる精密フロー連続反応の収率予測とその可視化

一つの素反応が別の部分に活性基を生成し、それが「ドミノ倒し」のように連鎖的に反応が進行するドミノ反応は、生じた中間体が不安定で分解しやすい場合でも直ちに次の反応に供されるため、従来の多段階合成法では得ることが難しい化合物も合成できる。これまでに我々は、有機分子不斉触媒によるドミノ反応を医薬資源合成に積極的に取り入れることで、様々なキラル多官能性複素環格の高原子効率構築に成功している (図 1) [5]。

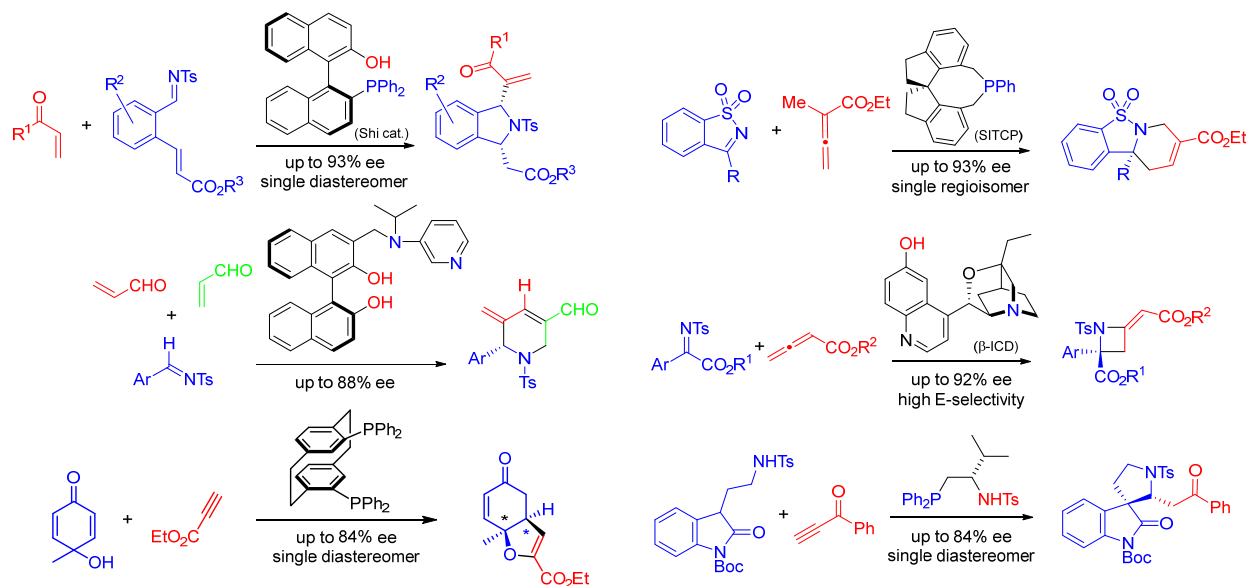


図 1. 有機分子不斉触媒による高原子効率ドミノ反応の開発

光学活性スピロオキシインドールは、医薬品候補の設計・合成に汎用される含窒素複素環化合物であり、これまで数多くの不斉合成法が報告されている。しかしながら、既存法は多工程を要し、さらに低原子効率といった問題があった。そこで今回、アニリン誘導体の酸化によって導かれるジエノン誘導体 **1** の分子内 Rauhut-Currier 反応に続く、アレン酸エステル **2** との分子間[3+2]環化連続反応によるスピロオキシインドール類 **3** の one-pot 合成について検討を行った[6]。結果、アミノ酸のバリンから誘導される酸塩基型有機分子不斉触媒 **4** を用いると高不斉収率 (92% ee) にて目的化合物 **3** が得られることが明らかとなった。しかしながら、アレン酸エステル **2** の自己縮合や、系中で発生した活性中間体の重合といった様々な副反応が発生し、目的のスピロオキシインドール **3** は低収率 (<20%) となった。1,4-ジオキサンの高希釈溶液中にて反応を行うことで収率の改善は見られたものの、未だ化合物 **3** は 44%収率と満足いく結果は得られなかった。そこで本反応における加熱及び攪拌効率の向上を期待し、バッチからフロー反応プロセスへの転換を試みた。さらにガウス過程回帰を適用して、様々なフロー反応条件下での収率予測の可視化を試みた。一般にガウス過程回帰は、以下の特徴を有する回帰手法として知られている。

- (1) 観測データの内挿ができる
- (2) 予測値だけでなく、その誤差も評価できる
- (3) 適切なカーネルを選択することで様々なデータ構造に対応できる

バッチ反応条件の検討から、本反応では『アレン酸エステル **2** の当量・流速・温度』の三つのパラメータが化合物 **3** の収率を左右することが明らかとなっていた。そこで、まずはアレン酸エステル **2** を二当量に固定し、流速と温度の二つのパラメータを同時にスクリーニングしたところ、目的化合物 **3** が 43-72% の収率で得られた。五つの収集した学習データ (図 2. entries 1-5) に基づいてプログラミング言語 Python のライブラリーの 1 つである GPy を利用してガウス過程回帰を行い、流速と温度との収率相関を可視化したところ、流速 1.7 mL min^{-1} 以下、反応温度 $77\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上の際、目的化合物 **3** の収率が最高値を示すことが予想された。

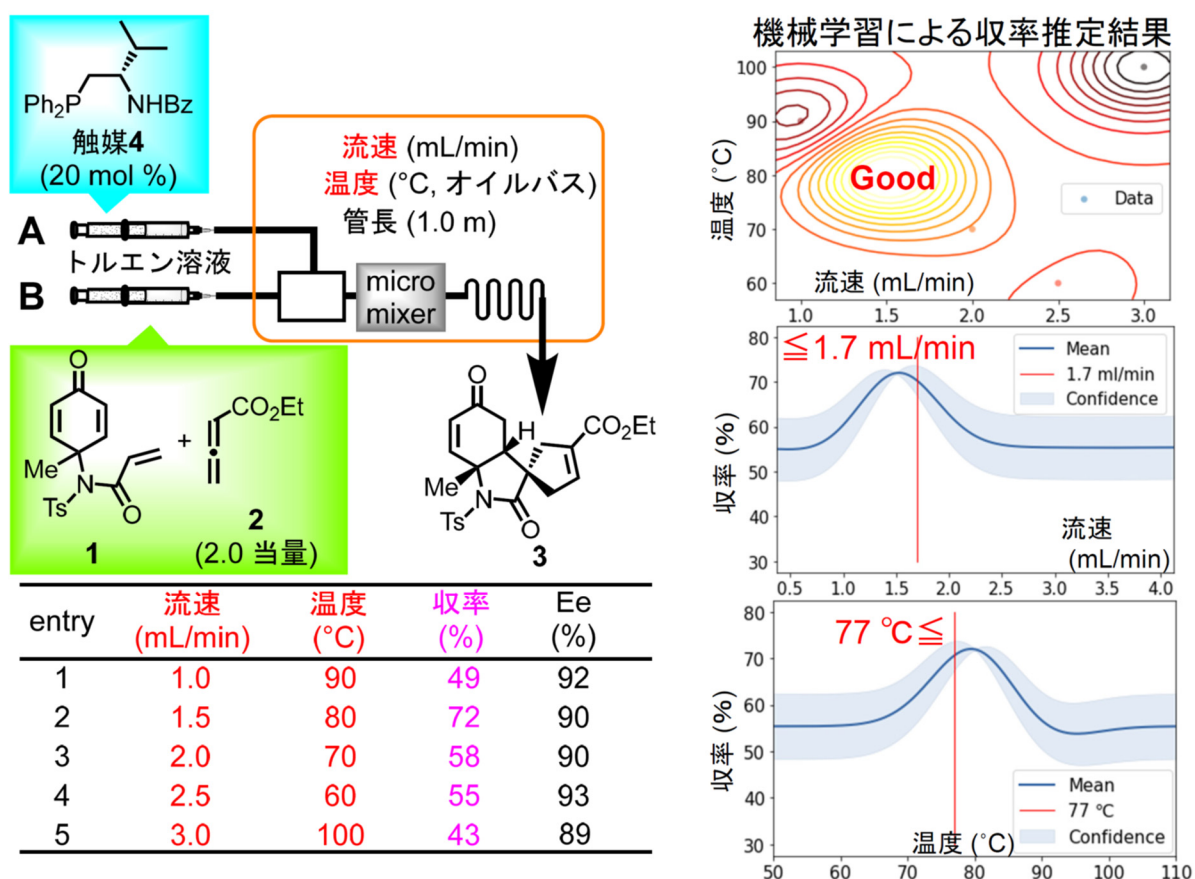


図 2. 最少実験データとガウス過程回帰によるフロー不斉ドミノ反応条件の迅速最適化

次に流速を 1.7 mL min^{-1} に固定し、アレン酸エステル **2** と温度の二つのパラメータを同時にスクリーニングした。結果、最終的には従来の最適化法に比べ大幅に少ない実験回数 (<10) にてフロー反応条件を最適化 (アレン酸エステル **2** : 二当量・反応温度 : $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ・流速 : 1.7 mL min^{-1}) することに成功した。ガウス過程回帰から予想された最適反応条件を用いると、これまで検討した中では最高の単離収率 (76%, 94% ee) でスピロオキシインドール **3** が得られた[6]。ガウス過程回帰を利用する反応条件探索は、アルデヒドのシアノシリル化フロー電解反応[7a]やフェリエ転位フロー電解反応[7b]の反応条件迅速最適化にも有効であり、最近では高活性な有機分子触媒の構造最適化にも適用可能なこ

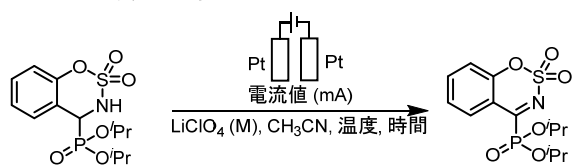
とが明らかとなった[8]。

2. ベイズ最適化を活用する電解合成反応条件のマルチパラメータスクリーニング

電解反応は、不適切な反応条件下では過剰酸化・過剰還元が起こり、その結果、選択性及び収率の低下が見られる。さらに、攪拌速度や電極間距離などの物理学的パラメータも反応結果に影響するため、反応条件探索が複雑化する[9]。近年、電解合成の反応条件探索を効率化するために、実験計画法や機械学習の活用が盛んに検討されている[10]。

表 1. ベイズ最適化を活用する電解合成条件のマルチパラメータスクリーニング

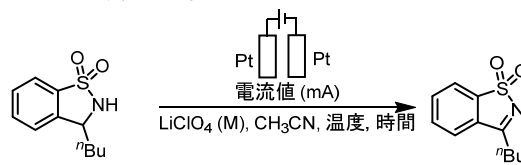
A: 6員環の基質5aの電解酸化条件探索



Entry	電流値 (mA)	[5a] (mM)	[LiClO ₄] (M)	温度 (°C)	時間 (min)	NMR収率 (%)
1	1	10	0.05	60	180	8
2	2	20	0.2	25	60	16
3	3	10	0.1	40	120	65
4	4	15	0.1	40	60	38
5	5	5	0.05	25	120	26
6	4	11	0.22	50	130	60
7	3	11	0.13	45	120	66
8	1	18	0.05	45	120	3
9	3	9.7	0.12	45	120	65
10	5	10	0.21	45	120	41
11	2	10	0.06	45	120	50
12	3	10.4	0.19	45	120	72 (71)

括弧内は単離収率

B: 5員環の基質5bの電解酸化条件探索



Entry	電流値 (mA)	[5b] (mM)	[LiClO ₄] (M)	温度 (°C)	時間 (min)	NMR収率 (%)
1	1	10	0.05	60	180	46
2	2	20	0.2	25	60	22
3	3	10	0.1	40	120	62
4	4	15	0.1	40	60	53
5	5	5	0.05	25	120	14
6	4	10	0.12	60	180	29
7	3	11.7	0.22	40	120	67 (66)

括弧内は単離収率

我々はベイズ最適化が電解合成の反応条件探索の効率化に有効であると考え、 α -ケチミノホスホン酸エステルの電解合成を反応条件探索モデルに、アルゴリズムの開発、及びその実装・評価を行った[11a]。 α -ケチミノホスホン酸エステルは、四置換炭素を有する生物活性化合物 α -アミノリン酸の前駆体として重要な原料であるものの、従来法では過剰な金属酸化剤や高温加熱条件が必要であり、収率も低-中程度である[12]。本最適化実験では、まずは表 1A に示す反応基質アミン **5a** の白金電解酸化において、entries 1-5 に示す無作為な反応条件 [電流値 (mA)・アミン濃度 (mM)・電解質 LiClO₄ 濃度 (M)・反応時間 (min)・反応温度 (°C)] と各条件にて得られる α -ケチミノホスホン酸エステル **6a** の NMR 収率 (8-65%) を学習データとして収集した。得られた学習データに基づいてプログラミング言語 Python のライブラリーの 1 つである GPyOpt を利用してベイズ最適化を行った。表 1A の entries 1-5 を用いてベイズ最適化を行ったところ、entry 6 の反応条件が予測された。本条件を実験評価したところ、60%収率にて目的生成物 **6a** が得られた。この結果を加え、entries 1-6 を学習データに再度ベイズ最適化を行ったところ、entry 7 の条件が提案され、本条件下において **6a** は 66%収率で得られた。ベイズ最適化を繰り返す中で、entry 8 に提示された条件では **6a** の収率は 3%となった。これはデータ数の少ないパラメータエリアに注目する「探索」を行った結果と考えられる。さらにベイズ最適化を繰り返したところ、最終的に entry 12 に示す反応条件において、72%収率

(71%単離収率)で目的物 **6a** を得ることができた。一方、本反応条件 (表 1A, entry 12) を 5員環の基質 **5b** に適用したところ、**6b** の収率は 58%となり、未反応の **5b** も回収された。そこで **5b** の電解酸化反応の初期データを改めて収集し、スクリーニングを行った (表 1B, entries 1-5)。その結果、entry 7に示す反応条件下では、原料の **5b** は完全に消失し、67%NMR 収率 (66%単離収率)にて目的生成物 **6b** を得ることに成功した。ベイズ最適化は様々な基質に対して適切な電解酸化反応条件を迅速に見出すことができ、複雑な構造を有するデヒドロヘリセンの二量体 one-pot 合成にも有効であることが明らかとなった (図 3) [11b]。

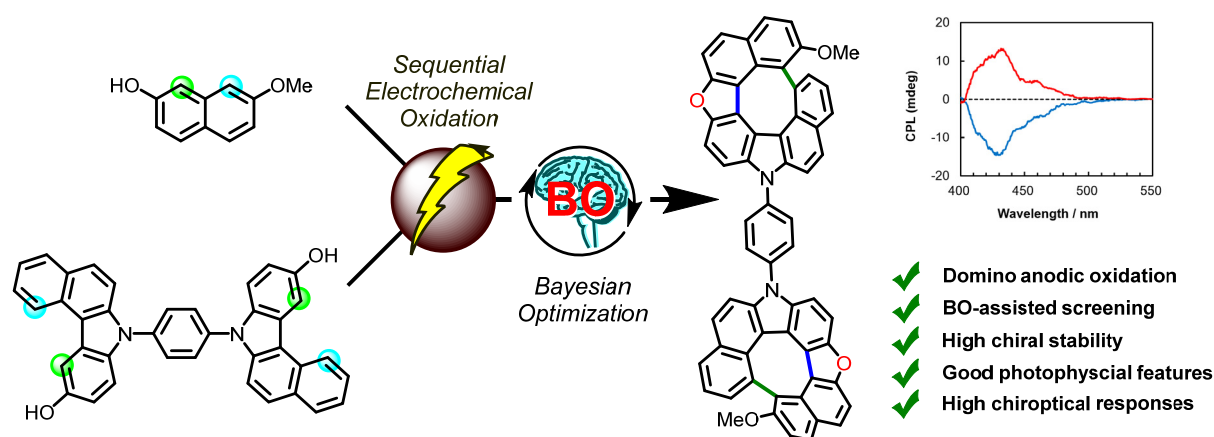


図 3. ベイズ最適化によるヘテロ[7]デヒドロヘリセン二量体の電解 one-pot 合成反応条件の迅速最適化

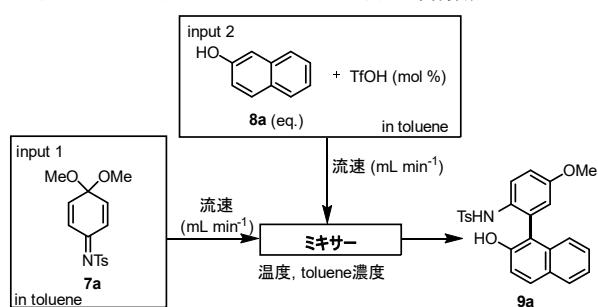
3. ミキサータイプを含むフロー合成条件のデータ駆動型最適化

フロー反応にて高収率で目的化合物を得るためには、フロー反応特有のパラメータの最適化が必要となる。数値パラメータとして流速や流路長があり、カテゴリカルパラメータにはマイクロミキサー (攪拌方式) 等が挙げられる。特にマイクロミキサーの選択は、反応結果を大きく左右するものの、機械工学的なカテゴリカルパラメータであるため、その最適化は困難である。数値化しにくいカテゴリカルパラメータのベイズ最適化の精密有機合成反応への最初の適用は、Doyle らにより報告され、量子化学計算等の様々な記述子を用い反応溶媒や金属配位子を化学的カテゴリカルパラメータとして数値化している[13]。我々は、より簡便にカテゴリカルパラメータを数値化する手法としワンホットエンコーディングに着目した。例えば、ミキサーA、ミキサーB、ミキサーC の 3 種類のミキサーを最適化する場合、ワンホットエンコーディングによってそれぞれ [0 0 1], [0 1 0], [1 0 0] と数値化できる。初期設定状態では、これらミキサータイプは数値化されたに過ぎない。しかしながら、ベイズ最適化は、学習データをアップデートしながら複数の数値パラメータを最適化するため、適切な獲得関数を用いればカテゴリカルパラメータも数値パラメータと同時に最適化できると考えた。本手法を適用するモデル反応として、イミノキノンモノアセタール **7a** と 2-ナフトール (**8a**) からビアリアル化合物 **9a** を合成する有機触媒フロー合成反応を選択した。本反応はバッチ反応が既に報告されているものの、高温条件や特殊で高価なフルオラス反応溶媒、さらに多量の触媒を必要とする等の問題があった[14]。我々は、フロー反応へと展開することで、反応効率が高まる結果、常温、汎用有機溶媒においても反応が進行すると期待した。まずは、5つの数値パラメータ [8a の基質量 (eq.)、酸触媒量 (mol%)、流速 (mL min⁻¹)、反応温度 (°C)、及び基質 **7a** の濃度 (M)] とカテゴリカルパラメータであるミキサーの種類 (Comet X, T-shape, β -type) の 6 次元反応パラメータの最適化を行った。表 2A に示す 6 通りの反応条件とその条件で得られる **9a** の収率 (entries 1-6) を初期データにベイズ最適化を行った。汎用性のある獲得関数 EI による 1 つずつ反応条件を提案するシングルベイズ最適化では、カテゴリカルパラメータ探索ができなかったため、探索重視の獲得関数 LCB による 3 通りの反応条件を同時に提案するパラレルベイズ最適化のアルゴリズムを開発したところ、数値パラメータとカテゴリカルパラメータの同時探索が可能となり、entries 7-9 に示す反応条件が提案された。これらの条件を実際に化学実験により評価したと

ころ、**9a**の収率は81%に向上した(表2A, entry 7)。次に entries 1-9を学習データにベイズ最適化を行うと entries 10-12の条件が示されβタイプのマイクロミキサーは本反応には不適合と判断された結果、これ以降のベイズ最適化では探索対象外となった。さらに entries 1-12の結果を学習データにベイズ最適化を行うと、最終的には entry 15の反応条件にて93%という高い単離収率で目的生成物**9a**が得られた。次に本反応条件(表2A, entry 15)を異なる反応基質であるキノンモノアセタール**7b**と5-ブロモレスルシノール**8b**とのカップリング反応に適用したところ対応するカップリング体**9b**は38%と低収率になった。そこで基質**7b**と**8b**とのカップリング反応(表2B)に対して、改めてベイズ最適化によるマルチパラメータスクリーニングを行うと、66%単離収率で目的生成物**9b**を与える条件(表2B, entry 15)を迅速に見出すことができた。興味深いことに**7a**と**8a**とのカップリング反応で不適合であったβタイプのマイクロミキサーが本反応には最適なミキサーとなった。本手法がフロー反応のミキサー最適化にも有効であることが明らかとなった[15]。尚、パラレルベイズ最適化による反応条件探索法は、光駆動型フルオロアルキル化反応の条件最適化にも有効であることが、最近明らかとなった[16]。

表2. パラレルベイズ最適化を活用するフロー合成条件のマルチパラメータスクリーニング

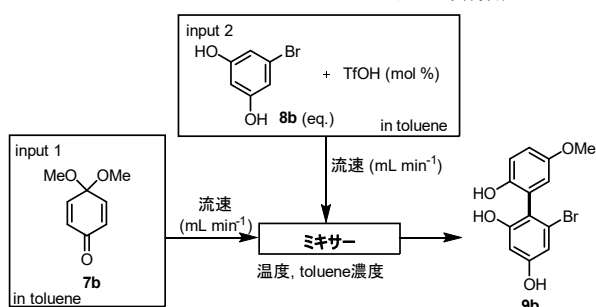
A: イミノキノンモノアセタール**7a**と2-ナフトール**8a**のカップリング条件探索



Entry	ミキサー	8a (eq.)	温度 (°C)	7a (M)	流速 (mL min ⁻¹)	TfOH (mol %)	9a NMR %
1	Comet X	2	60	0.05	0.05	1	68
2	Comet X	3	40	0.01	0.2	0.5	73
3	β-type	1	60	0.01	0.1	2	42
4	β-type	3	20	0.1	0.1	0.5	28
5	T-shaped	1	40	0.05	0.05	2	55
6	T-shaped	2	20	0.1	0.2	1	75
7	T-shaped	2	20	0.1	0.15	1	81
8	Comet X	2.3	55	0.039	0.04	1	77
9	β-type	1.1	85	0.15	0.1	2.4	40
10	T-shaped	1.3	15	0.11	0.15	1.2	78
11	T-shaped	2.1	30	0.061	0.15	1.1	76
12	Comet X	2.8	50	0.014	0.11	1	79
13	Comet X	3.4	55	0.01	0.032	1.3	88
14	Comet X	2.2	15	0.1	0.014	1.7	44
15	Comet X	3.0	25	0.015	0.08	1.5	96 (93)

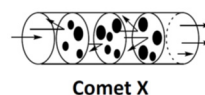
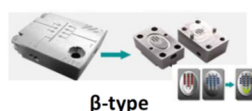
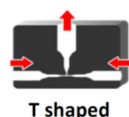
括弧内は単離収率

B: キノンモノアセタール**7b**と3-ブロモレスルシノール**8b**のカップリング条件探索



Entry	ミキサー	8b (eq.)	温度 (°C)	7b (M)	流速 (mL min ⁻¹)	TfOH (mol %)	9b 収率 NMR %
1	Comet X	2	60	0.05	0.05	1	14
2	Comet X	3	40	0.01	0.2	0.5	35
3	β-type	1	60	0.01	0.1	2	11
4	β-type	3	20	0.1	0.1	0.5	52
5	T-shaped	1	40	0.05	0.05	2	4
6	T-shaped	2	20	0.1	0.2	1	29
7	Comet X	3	25	0.14	0.048	0.29	20
8	β-type	3.5	15	0.035	0.087	0.25	58
9	T-shaped	3.5	30	0.15	0.022	0.98	19
10	Comet X	3.4	35	0.056	0.13	0.37	10
11	β-type	2.4	15	0.019	0.041	0.34	40
12	T-shaped	2.4	15	0.011	0.06	0.73	19
13	β-type	3.2	15	0.068	0.062	0.25	20
14	β-type	3.5	15	0.067	0.097	0.53	43
15	β-type	3.2	30	0.044	0.068	0.35	69 (66)

括弧内は単離収率



4. 制約付きベイズ最適化を活用する電解フロー合成反応の条件探索と省エネルギー化

フロー反応と電解反応を組み合わせた「フロー電解反応」は両反応の特徴を利用可能な魅力的手法であるものの、フロー反応と電解反応のパラメータをそれぞれ最適化するためには、多大な労力を要する。そこで、我々はベイズ最適化をフロー電解反応の条件探索へ活用することを計画し、特にエネルギーの効率利用を中心に検討した。エネルギー効率の指標である通電量は、基質濃度や流速等に支配される数式（表3右上、点線四角内）で表される。本発展研究では、この通電量制約をベイズ最適化に実装し、化学収率と電流効率との両方を満足する条件を探索するアルゴリズムを開発した。本手法を適用するモデル反応には、イミン **10** と二酸化炭素から非天然アミノ酸 **11** を合成するフロー電解反応を選択した（表3）。本反応は、理論上は通電量 2 F/mol で進行する。表3の entries 1-5 に、反応基質のイミン **10** と二酸化炭素のフロー電解反応の学習データ [イミン濃度 (M)・電解質濃度 (M)・電流密度 (mA cm²)・流速 (mL h⁻¹)・電極間距離 (μm)、及び各条件でのアミノ酸 **11** の収率 28-88% (電流効率: 24-63%)] を示す。entries 6A-9A にて通電量 (q) を 2.00-3.00 の範囲でベイズ最適化を行った結果、entry 6A の条件で 90%収率、52%電流効率で生成物 **11** が得られた。通電量 (q) を 2.00-2.10 (entries 6B-9B) とさらに制限してベイズ最適化を行うと **11** を 88%収率・87%電流効率 (entry 9B) で合成することができた。ベイズ最適化が電解反応やフロー反応だけでなく、フロー電解反応のマルチパラメータスクリーニングや省エネルギー化にも有効であることが明らかとなった[17]。

表3. 制約付きベイズ最適化を活用する電解フロー合成の省エネルギー条件の探索

$$q [\text{F mol}^{-1}] = F^{-1} A i v^{-1} c^{-1}$$

q: 通電量
F: ファラデー定数
A: 電極面積

i: 電流密度
v: 流速
c: 基質濃度

Entry	[10] (M)	[Bu ₄ NClO ₄] (M)	電流密度 (mA cm ⁻²)	流速 (mL h ⁻¹)	電極間距離 (μm)	通電量 (F mol ⁻¹)	NMR収率 (%)	電流効率 (%)
1	0.08	0.1	25	15	120	2.33	28	24
2	0.08	0.15	40	25	80	2.24	31	28
3	0.04	0.1	10	10	20	2.80	88	28
4	0.04	0.05	25	25	120	2.80	39	33
5	0.12	0.15	15	5	80	2.80	46	63

6A	0.049	0.1	11.1	8.9	30	2.85	90	52
7A	0.062	0.075	12.2	7.4	20	2.98	78	57
8A	0.045	0.12	10.1	9.2	30	2.73	78	58
9A	0.043	0.077	11.9	11.1	30	2.79	81	24

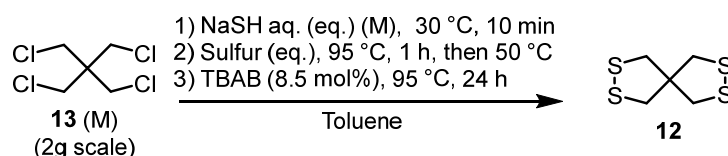
6B	0.04	0.084	10.6	14.6	30	2.03	85	84
7B	0.071	0.053	10.6	8.3	40	2.01	71	71
8B	0.06	0.15	11.7	10.8	20	2.02	77	76
9B	0.042	0.094	12.2	16	20	2.03	88	87

Entries 6A-9A: 通電量(q) 2.00-3.00の範囲に制約しベイズ最適化を実行
 Entries 6B-9B: 通電量(q) 2.00-2.10の範囲に制約しベイズ最適化を実行

5. ベイズ最適化の社会実装研究 —化成品バッチ合成への応用—

ラボスケールの反応開発で得たベイズ最適化の知見を活かすべく、我々は実生産スケール（社会実装）への適用を試みた。生産スケールでの化成品合成ではコストや環境負荷の観点から、使用できる溶媒や試薬、実験試行回数が限られる場合が多く、試行回数を大幅に削減できるベイズ最適化は極めて有効な反応条件探索手法と考えられる。そこで我々はエポキシ硬化剤などに用いられる多価メルカプタン化合物の合成中間体であるスピロジチオラン化合物 **12** の商業スケール合成をモデル反応（協力：旭化学工業株式会社）に検討を行った。本反応は 5 年の歳月をかけて反応条件探索が行われ、68%収率で目的生成物を得る条件を実機合成に適用している[18]。ベイズ最適化を活用するマルチパラメータスクリーニングによる収率の改善を図るべく、まずは 2 グラムスケールにて水硫化ナトリウムや硫黄の量 (eq.)、水硫化ナトリウムや基質 **13** の濃度 (M) の 4 種類の数値パラメータを検討した。実機合成反応条件（表 4 左下、点線四角内）を参考にランダムに設定した 6 つの反応条件と、その際に得られる目的化合物の収率 (39-76%) を entries 1-6 に示す。この結果を学習データに、ベイズ最適化を行ったところ、収率は 78% に到達したものの現行収率 68% を大幅に超える結果は得られなかった（表 4A, entry 7）。ベイズ最適化によるマルチパラメータスクリーニングの効率は初期データの選択方法に左右されることが既に報告されている[3][13]。そこで次に、ラテン超方格サンプリングを用いて初期データを設定し収率の向上を検討した。ラテン超方格サンプリングでは、サンプリング点数で探索空間を分割し、行と列が一致しないように格子を選び、その中でサンプリングをすることで、ランダムかつ均一に初期データを収集できる。ラテン超方格サンプリングによって設定された反応条件とその際の収率(31-68%)を表 4B に entries 1-5 に示す。ベイズ最適化による反応パラメータ予測と実験による評価を 3 度繰り返した結果、収率が徐々に改善され、最終的には 89%収率で目的生成物が得られた（表 4B, entry 7）。見出した反応条件を基にスケールアップ合成を試みた結果、20 グラムスケールでは 87%収率、商業スケールである 100 グラムの原料を用いた場合には、81%収率で目的生成物が得られた。2023 年度より本研究で見出した反応条件にて実機での合成が始まっている[19]。

表 4. ベイズ最適化を活用するスピロジチオラン化合物 **12** の合成条件最適化



A: 研究者の目利きにて作成した初期データを用いるベイズ最適化

Entry	[13] in toluene (M)	NaSH aq. (eq.) (M)	Sulfur (eq.) (M)	GC収率 (%)
1	1.19	6.5	14.8	2.4
2	2.78	4.5	7.4	2.4
3	0.76	5.5	14.8	3.0
4	1.19	5.5	7.4	1.2
5	2.78	6.5	9.8	2.0
6	0.76	4.5	9.8	1.2
7	1.22	5.8	8.1	1.4

実機合成条件	1.71	6.0	11.9	3.0	68
--------	------	-----	------	-----	----

B: ラテン超方格サンプリングで作成した初期データを用いるベイズ最適化

Entry	[13] in toluene (M)	NaSH aq. (eq.) (M)	Sulfur (eq.) (M)	GC収率 (%)
1	4.54	5.5	5.3	2.1
2	2.16	2.7	7.0	3.3
3	1.42	6.9	18.4	2.7
4	0.84	8.3	4.3	0.9
5	1.06	4.1	10.0	1.5
6	1.50	6.7	16.2	2.7
7	4.54	6.5	29.8	1.3

おわりに

以上本章では、ガウス過程回帰、及びベイズ最適化を基盤とするフロー・電解精密有機合成反応の迅速反応条件最適化について我々の最近の研究について紹介した。特にベイズ最適化は初期データの設定が重要であり、今回の作成した初期データは『研究者の目利きに基づくランダムサンプリング』と『研究者の目利き+ラテン超方格サンプリング』によるものである。現在、より効果的な初期データ構築、及びプロセスインフォマティクス・マテリアルズインフォマティクスの精密有機合成分野へのさらなる実装研究を展開している。カーボンニュートラルやSDGsが重要視され、省人化・省エネ化・環境負荷低減を実現する精密有機合成が推進されていく中で、機械学習の社会実装の重要性は、今後ますます増していく。我々の基礎研究が社会のニーズに応え、日本のものづくりの発展に貢献できるよう今後も精進していきたい。

謝辞

本研究は、参考文献に記載した研究者・学生諸氏の共同研究に支えられたものであり、ここに感謝いたします。本研究における有機化合物の機器分析にご尽力いただきました大阪大学産業科学研究所総合解析センター職員の皆様に深謝いたします。本研究成果は、令和2年度公益財団法人篷庵社研究助成金、文部科学省科学研究費助成事業（学術変革領域研究（A）「デジタル有機合成：JP21A204, JP21H05217」, 国際共同研究強化（B）：JP22KK0073）, 「基盤研究（C）：JP 22K06502」により遂行されたものであり、ここに付記して感謝申し上げます。最後に本プロジェクト遂行に当たり、絶えず温かく見守り励まして下さいました大阪大学名誉教授 北 泰行先生、藤岡 弘道先生、笹井 宏明先生に感謝致します。

参考文献

- 1) (a) Taylor, C. J.; Pomberger, A.; Felton, K. C.; Grainger, R.; Barecka, M.; Chamberlain, T. W.; Bourne, R. A.; Johnson, C. N.; Lapkin, A. A. *Chem. Rev.* 123, 3089 (2023); (b) Baró, E. L.; Rodríguez, P. N.; Juárez-Jiménez, J.; Ghashghaei, O.; Lavilla, R. *Adv. Synth. Catal.* 366, 551–573 (2024)
- 2) Shields, B. J.; Stevens, J.; Li, J.; Parasram, M.; Damani, F.; Alvarado, J. I. M.; Janey, J. M.; Adams, R. P.; Doyle, A. G. *Nature* 590, 89 (2021)
- 3) Sugisawa, N.; Sugisawa, H.; Otake, Y.; Krems, R. V.; Nakamura, H.; Fuse, S. *Chem.–Methods*, 1, 484–490 (2021)
- 4) Shahriari, B.; Swersky, K.; Wang, Z.; Adams, R. P.; de Freitas, N. *Proc. IEEE*, 104, 148 (2016); (b) Greenhill, S.; Rana, S.; Gupta, S.; Vellanki, P.; Venkatesh, S. *IEEE Access*, 8, 13937 (2020)
- 5) (a) Takizawa, S. *Chem. Pharm. Bull.* 68, 299–315 (2020); (b) Kishi, K.; Takizawa, S.; Sasai, H. *ACS Catal.*, 8, 5228–5232 (2018); (c) Takizawa, S.; Sako, M.; Abozeid, M. A.; Kishi, K.; Wathsala, H. D. P.; Hirata, S.; Murai, K.; Fujioka, H.; Sasai, H. *Org. Lett.*, 19, 5426–5429 (2017); (d) Takizawa, S.; Kishi, K.; Kusaba, M.; Bai, J.; Suzuki, T.; Sasai, H.; *Heterocycles*, 95, 761–767 (2017); (e) Kishi, K.; Arteaga, F. A.; Takizawa, S.; Sasai, H. *Chem. Commun.*, 53, 7724–7727 (2017); (f) Takizawa, S.; Kishi, K.; Yoshida, Y.; Mader, S.; Arteaga, F. A.; Lee, S.; Hoshino, M.; Rueping, M.; Fujita, M.; Sasai, H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54, 15511–15515 (2015); (g) Takizawa, S.; Arteaga, F. A.; Yoshida, Y.; Suzuki, M.; Sasai, H. *Asian, J. Org. Chem.*, 3, 412–415 (2014); (h) Takizawa, S.; Arteaga, F. A.; Yoshida, Y.; Suzuki, M.; Sasai, H.; *Org. Lett.*, 15, 4142–4145 (2013); (i) Takizawa, S.; Nguyen, T. M.-N.; Grossmann, A.; Suzuki, M.; Enders, D.; Sasai, H. *Tetrahedron*, 69, 1202–1209 (2013); (j) Takizawa, S.; Nguyen, T. M.-N.; Grossmann, A.; Enders, D.; Sasai, H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51, 5423–5426 (2012); (k) Takizawa, S.; Inoue, N.; Sasai, H. *Tetrahedron Lett.*, 52, 377–380 (2011); (l) Takizawa, S.; Inoue, N.; Hirata, S.; Sasai, H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49, 9725–9729 (2010)
- 6) Kondo, M.; Wathsala, H. D. P.; Sako, M.; Hanatani, Y.; Ishikawa, K.; Hara, S.; Takaai, T.; Washio, T.; Takizawa, S.; Sasai, H. *Chem. Commun.* 56, 1259–1262 (2020)
- 7) (a) Sato, E.; Fujii, M.; Tanaka, H.; Mitsudo, K.; Kondo, M.; Takizawa, S.; Sasai, H.; Washio, T.; Ishikawa, K.; Suga, S. *J. Org. Chem.* 86, 16035–16044 (2021); (b) Sato, E.; Tachiwaki, G.; Fujii, M.; Mitsudo, K.; Washio, T.; Takizawa, S.; Suga, S. *Org. Process Res. Dev.* 28, 5, 1422–1429 (2024)

- 8) Hisata, Y.; Washio, T.; Takizawa, S.; Ogoshi, S.; Hoshimoto, Y. *Nat. Commun.* 15, 3708 (2024)
- 9) (a) Dörr, M.; Röckl, J. L.; Rein, J.; Schollmeyer, D.; Waldvogel, S. R. *Chem. Eur. J.*, 26, 10195 (2020); (b) Beil, S. B.; Pollok, D.; Waldvogel, S. R. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 60, 14750 (2021)
- 10) Dörr, M.; Hielscher, M. M.; Proppe, J.; Waldvogel, S. R. *ChemElectroChem*, 8, 2621 (2021)
- 11) (a) Kondo, M.; Sugizaki, A.; Khalid, Md. I.; Wathsala, H. D. P.; Ishikawa, K.; Hara, S.; Takaai, T.; Washio, T.; Takizawa, S.; Sasai, H. *Green Chem.*, 23, 5825 (2021); (b) Salem, M. S. H.; Sharma, R.; Khalid, Md. I.; Sasi, M.; Amasaki, R.; Imai, Y.; Arisawa, M.; Takizawa, S. *Electrochemistry*, 91, 112015 (2023)
- 12) Maestro, A.; de Marigorta, E. M.; Palacios, F.; Vicario, J. *Asian J. Org. Chem.* 9, 538 (2020)
- 13) Torres, J. A. G.; Lau, S. H.; Anchuri, P.; Stevens, J. M.; Doyle, A. G.; Tabora, J. E.; Li, J.; Borovika, A.; Adams, R. P. J. *Am. Chem. Soc.*, 144, 19999 (2022)
- 14) (a) Gao, H.; Xu, Q.-L.; Keene, C.; Yousufuddin, M.; Ess, D. H.; Kürti, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* 55, 566 (2016); (b) Morimoto, K., Sakamoto, K., Ohshika, T., Dohi, T.; Kita, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* 55, 3652 (2016).
- 15) Kondo, M.; Wathsala, H. D. P.; Salem, M. S. H.; Ishikawa, H.; Hara, S.; Takaai, T.; Washio, T.; Sasai, H.; Takizawa, S. *Commun. Chem.* 5, 148 (2022)
- 16) Tagami, K.; Kondo, M.; Takizawa, S.; Mase, N.; Yajima, T. *J. Fluor. Chem.* 276, 110294 (2024)
- 17) Naito, Y.; Kondo, M.; Nakamura, Y.; Shida, N.; Ishikawa, K.; Washio, T.; Takizawa, S.; Atobe, M. *Chem. Commun.* 58, 3893 (2022)
- 18) Kaji, Y.; Ishino, Y. JP 2013-18740 A. 31 January 2013
- 19) Kondo, M.; Wathsala, H. D. P.; Ishikawa, K.; Yamashita, D.; Miyazaki, T.; Ohno, Y.; Sasai, H.; Washio, T.; Takizawa, S. *Molecules*, 28, 5180 (2023)

中枢神経系グルタミン酸トランスポーター新規調節機構の検討

国立医薬品食品衛生研究所薬理部 佐藤 薫

【研究の背景】

中枢神経機能の基盤となる神経回路活動は、神経細胞を伝導する電気信号と神経伝達物質を介した神経細胞間のシナプス伝達で成立している。主たる興奮性神経伝達物質としてグルタミン酸 (L-glutamate: L-Glu) があげられる。種々のイオンチャネル型グルタミン酸受容体や代謝型グルタミン酸受容体への結合を介して中枢神経系の生理機能に関与する一方、神経変性疾患、外傷、虚血といった脳障害においては、細胞外グルタミン酸濃度上昇によって引き起こされる興奮毒性が病態に寄与している。従って、中枢神経機能の恒常性維持のために細胞外グルタミン酸濃度はシナプス周囲のグルタミン酸トランスポーターによって厳密にコントロールされている。翻ってグルタミン酸トランスポーターの機能調節が病態改善の標的としても期待されている。本報告では、前半で L-Glu トランスポーター機能増強物質として DHA をはじめとした PUFA が有望であること、後半でヒト多能性幹細胞 (human induced pluripotent stem cell: hiPSC) 由来神経系細胞 (hiPSC-neural cell) 標本が L-Glu トランスポーター標的化合物のスクリーニング系として有用であることを報告する。

【L-Glu トランスポーター機能調節物質の検討】

L-Glu トランスポーターには 5 つのサブタイプがあり、ヒトでは excitatory amino acid transporter subtype 1 [EAAT1]-5 と呼ばれている (1-3)。成人の中枢神経系においては、神経細胞とアストロサイトに発現している EAAT2 が前脳の 90%以上の L-Glu を取り込んでいる (4)。さらに、アストロサイトに発現している EAAT1 もシナプス間隙の L-Glu を取り込んでいる。EAAT2 (rodent では GLT-1) はアストロサイト培養系においては培養期間に比例して発現量が漸減してしまうことから、EAAT2 の機能調節物質やそのメカニズムを詳細に検討することが困難であった。EAAT1, 2 の L-Glu の取り込みは 3Na^+ 、 1H^+ の流入とそれに引き続く 1K^+ の流出とカップリングしている (Fig. 1A)。すなわち、L-Glu 取り込みと同時に電流が発生するため、L-Glu トランスポーター取り込み活性を電流の大きさに置き換えて定量化することが可能である。そこで、*Xenopus oocytes* に EAAT2、対照分子として EAAT1 を強制発現させ、基質である L-Glu によって惹起される電流を定量することにより、EAAT2 機能調節物質を検討した。我々が最初に注目したのはドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid: DHA) である。青魚に多く含まれる不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid: PUFA) として脳機能への効果をうたった機能性食品が数多く市販されているが、その根拠となるメカニズムを示した論文はほとんどない。Fig. 1B-b1 は EAAT2 を強制発現した *Xenopus oocyte* の L-Glu 誘発電流の典型的な波形である。L-Glu に DHA 100 μM を共存させると EAAT2 の L-Glu 誘発電流が大きくなったが、一方、EAAT1 の L-Glu 誘発電流をわずかに減少させた。DHA と coenzyme A の conjugate (DHA-CoA) が大分子にもかかわらず、DHA と同様の L-Glu 誘発 EAAT2 電流増強

作用を示したことから、DHA は細胞外から EAAT2 に作用していると考えられた。

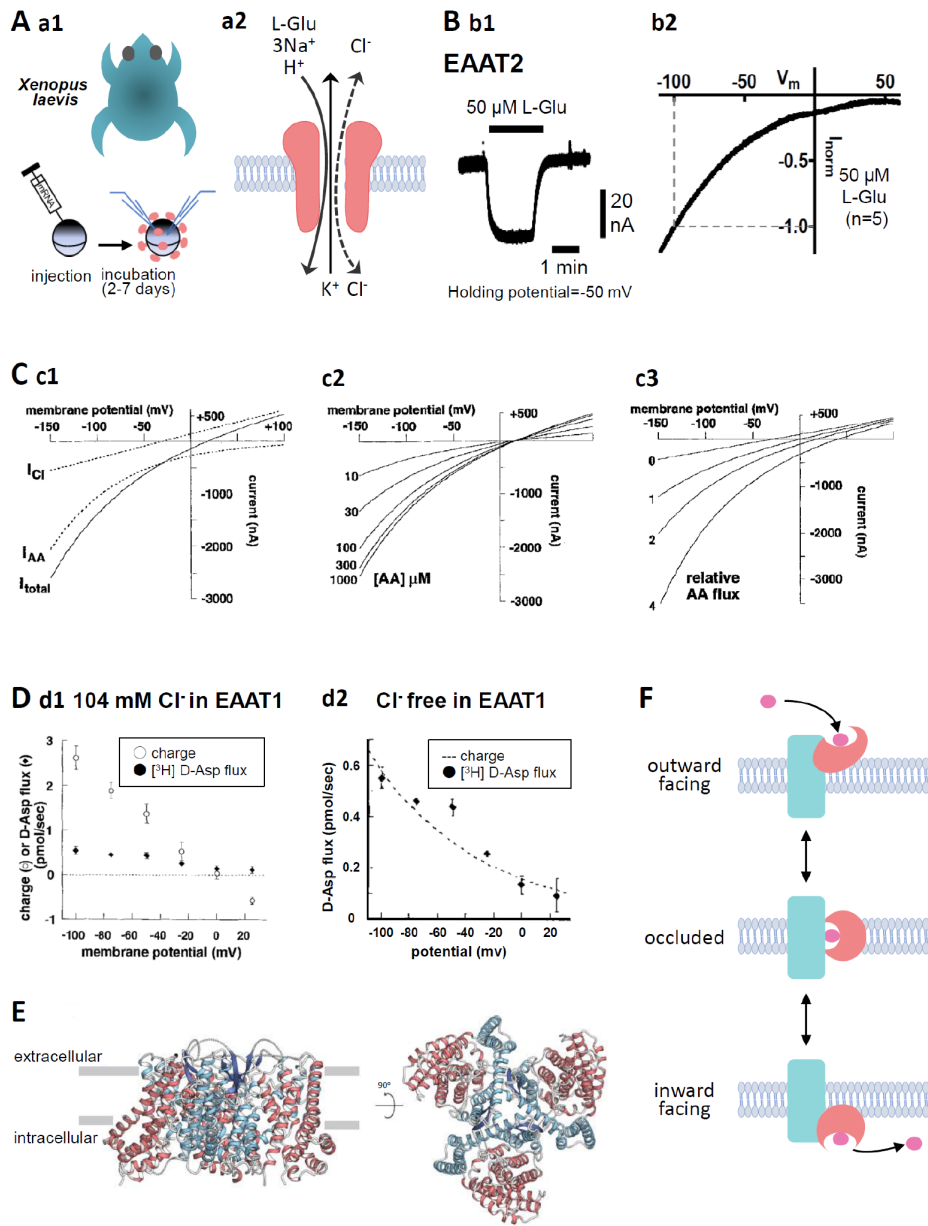


Fig. 1 (A) (a1). Oocytes were collected from anaesthetized *Xenopus laevis*. The isolated oocytes were then treated with collagenase (2 mg mL⁻¹, type 1), and capped mRNA was injected into either defolliculated stage V or VI oocytes. The oocytes were incubated for 2-7 d at 18 °C in ND96 solution containing 96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, and 5 mM HEPES (pH 7.5) supplemented with 0.01% gentamycin. TEVC recordings from the oocytes were performed at room temperature (25 °C) using glass microelectrodes filled with 3 M KCl (resistance = 1-4 MΩ) and an Ag/AgCl pellet electrode. (a2). Substrate- and the coupling ion-transporters by EAATs. Substrate, such as L-Glu, L-Asp, or D-Asp, transport through EAATs is coupled to the co-transport of 3 Na⁺ and 1 H⁺ followed by the counter transport of 1 K⁺. In addition, the binding of substrates and Na⁺ to EAATs activates uncoupled Cl⁻ anion currents. (B) (b1). A representative trace of L-Glu (50 μM for 2 min, black bar)-induced current obtained from *Xenopus* oocytes overexpressing EAAT2 clamped at -50 mV. (b2). IV relationship for L-Glu (50 μM)-induced EAAT2 current. To examine the IV relationship, the L-Glu-induced current was calculated through the subtraction of the steady-state current from the L-Glu-induced current. The curves were obtained with a holding potential of -60 mV applying an 800 ms ramp pulse from -110 to +60 mV. Data are shown as the values normalized to that obtained with 50 μM L-Glu at -100 mV. Means, n = 5. (C) (c1). Model curves of transport-induced currents. The total L-Glu-induced EAAT currents (solid line: I_{total}), electrophysiologically recorded using TEVC methods from EAAT-expressing *Xenopus* oocytes, represent the sum of the coupled L-Glu transport currents (dotted line: I_{AA}) and the uncoupled Cl⁻ anion currents (dotted line: I_{Cl}). (c2). The predicted reversal potential of the net current (I_{total}) is independent of substrate concentration when the concentration dependence of I_{AA} and I_{Cl} is the same. However, the amplitude of I_{total} is dependent on the substrate concentration. (c3). The absolute reversal potential of I_{total} is dependent on I_{AA} relative to I_{Cl} [14] (copyright permission has been obtained). (D) (d1). D-Asp uptake and charge translocation were simultaneously measured during a 100 s application of 100 μM [³H] D-Asp to voltage-clamped oocytes expressing EAAT1 under 104 mM Cl⁻ conditions. (d2). Voltage dependence of RI-labelled D-Asp flux and superimposed exponential (e-fold/75 mV) derived from fit of transport current under nominal Cl⁻-free conditions [14] (copyright permission has been obtained). (E) Overall structure of human EAAT2 as viewed from the membrane plane (left) and the intracellular side (right). The trimerization domain is blue and the transport domain is red. The protomer of EAAT2 is divided into two distinct functional components: one is a rigid scaffold domain that mediates interprotomer interactions and is located in the center of the trimer, and the other is a transport domain containing the substrate-binding site [15]. (F) Schematic representation of the transport cycle of EAATs (elevators). The transport domain (red) moves across the membrane relative to the trimerization domain (blue). The transported L-Glu is pink. When L-Glu binds to the transport domain of the EAAT in outward facing state (top), the conformation changes to occluded state (middle) first, then changes to inward facing state (bottom), thereby releasing L-Glu into the cell.

次に、DHA が EAAT1, 2 分子に直接影響を与えている証左を得るため、EAAT1 と EAAT2

への作用の相違に注目した。EAAT1 と EAAT2 ではトランスポートドメインの TM7b-HP2a 配列が異なり、EC50 の相違をもたらすと報告されている (5)。そこで EAAT2 の TM7b-HP2a を EAAT1 タイプに置換したキメラ分子を作成したが電流が記録できなかった (トランスポーターキメラでは non functional となることが散見される)。そこで、EAAT1 の TM7b-HP2a を

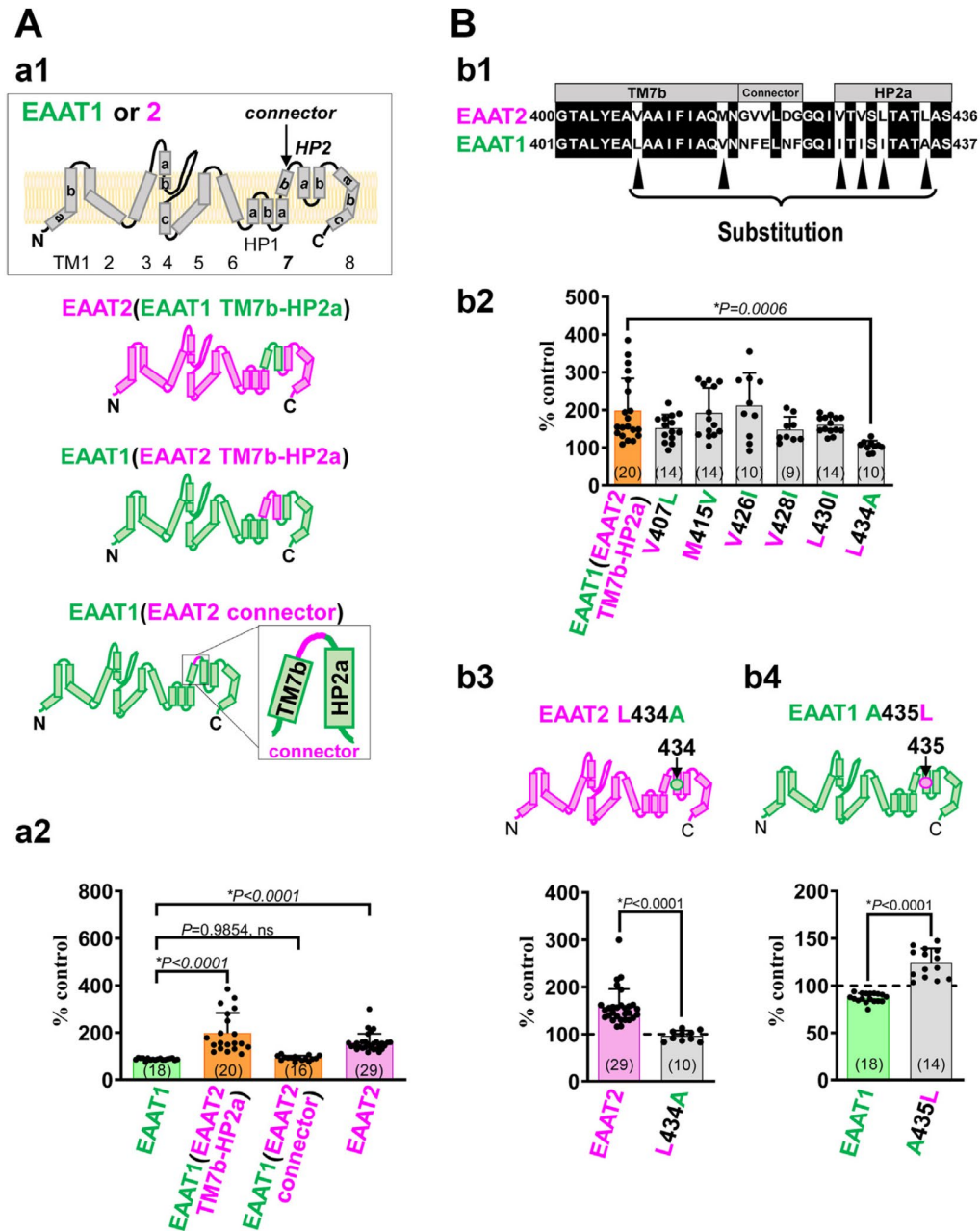


Fig. 2 Leu434 residue in re-entrant hairpin loops HP2a is essential for the augmenting effect of DHA on L-Glu-induced EAAT2 current. **A**, **a1**, topology of EAAT1, EAAT2, and EAAT1-EAAT2 hybrid chimeras: EAAT2(EAAT1 TM7b-HP2a), EAAT1(EAAT2 TM7b-HP2a), and EAAT1(EAAT2 connector). **a2**, the effect of DHA on L-Glu-induced currents of EAAT1, EAAT1(EAAT2 TM7b-HP2a), EAAT1(EAAT2 connector), and EAAT2. Data are shown as rates of increase by DHA. **B**, **b1**, amino acid alignment from TM7b to HP2a of EAAT2 and EAAT1. The common amino acids are shown on a black background. Single amino acid back mutations were performed at the sites indicated by black arrowheads in EAAT1(EAAT2 TM7b-HP2a) chimera. **b2**, comparison of the effects of DHA on EAAT1(EAAT2 TM7b-HP2a) chimera and a series of EAAT1(EAAT2 TM7b-HP2a)s with point back mutations to the original amino acid of EAAT1 for the six amino acids shown in **b1**. Only EAAT1(EAAT2 TM7b-HP2a) L434A shows complete loss of the augmenting effect of DHA. Data are shown as rates of increase by DHA. Exact *p*-values were 0.7809 for V407L, 0.1898 for M415V, 0.1575 for V426I, 0.4775 for V428I, 0.3042 for L430I, and 0.0006 for L434A. versus EAAT1(EAAT2 TM7b-HP2a) group). **b3**, (top) topology of EAAT2 L434A; (bottom) comparison of the effects of DHA on EAAT2 and EAAT2 L434A. Data are shown as rates of increase by DHA. **b4**, (top) topology of EAAT1 A435L; (bottom) comparison of the effects of DHA on EAAT1 and EAAT1 A435L. Data are shown as rates of increase by DHA. Error bars represent mean \pm SD. The numbers written within parentheses in each Figure represent the number of independent experiments. Statistical differences between groups were determined by two-tailed unpaired Student's *t* test (**b3** and **b4**), and Tukey's test following one-way factorial ANOVA (**a2** and **b2**) (denoted by *). *p*-values are indicated in each Figure panel. DHA, docosahexaenoic acid; EAAT1, excitatory amino acid transporter subtype 1; EAAT2, excitatory amino acid transporter subtype 2.

EAAT2 タイプに置換したキメラ (EAAT1(EAAT2 TM7b-HP2a)) を作成したところ、L-Glu 誘発電流への作用が弱い抑制から増強に切り替わった (Fig. 2B-b2)。さらに、EAAT2TM7b-HP2a のどの region が作用に必須なのかについて、各種キメラ、アミノ酸置換等によって検討をすすめ、Leu434 が必須であることを見いだした (Fig. 2B-b2)。検証のため、EAAT2 の Leu434 を Ala 置換したところ、DHA の L-Glu 電流増強作用は消失した (Fig. 2B-b3)。従って、DHA の EAAT2 電流増強作用には、EAAT2 の Leu434 が必須であることが示された。EAAT2 の Leu434 は EAAT1 の Ala435 に相当するが、EAAT1 の Ala435 を Leu に置換すると DHA の作用が減弱から増強に切り替わったことから (Fig. 2B-b4)、この 1 アミノ酸が DHA の作用方向性に大きく関わっていることが示された。

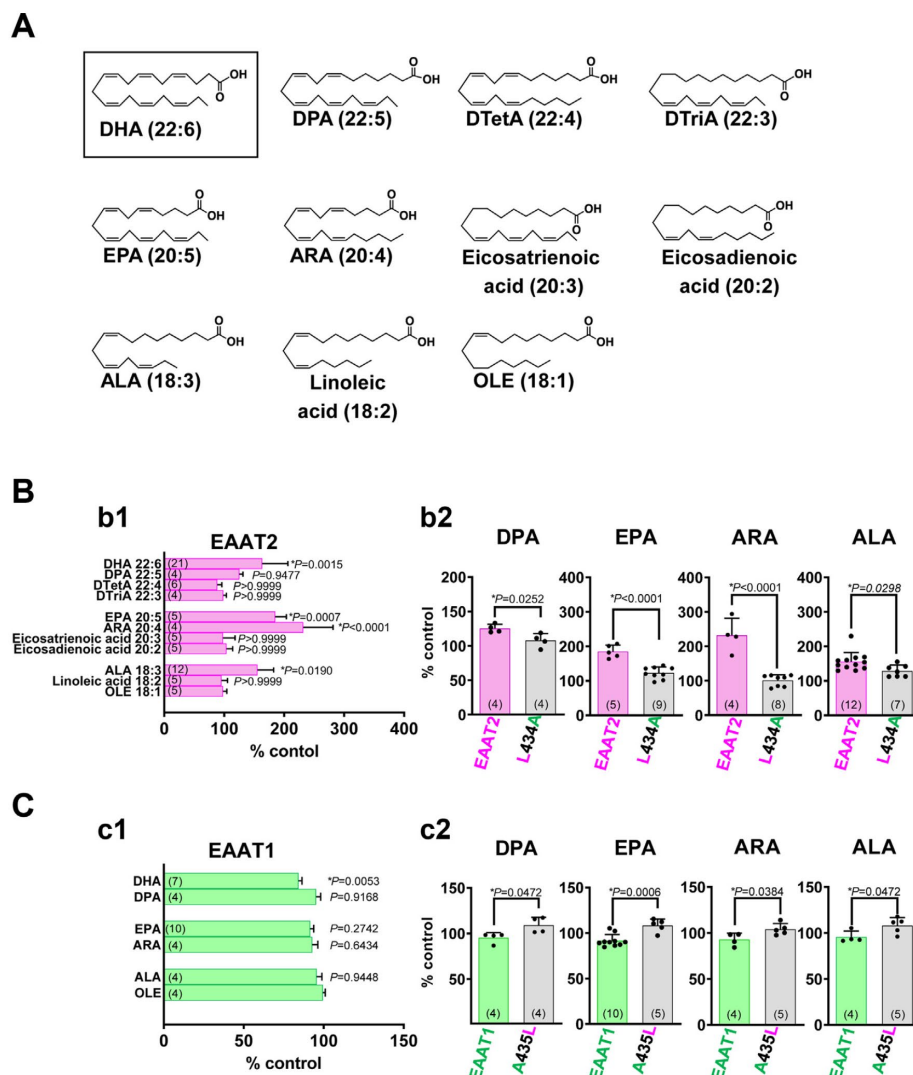


Fig. 3 Identification of other PUFAs that augment L-Glu-induced EAAT2 current. A, structures of fatty acids used in this experiment. ALA, α -linolenic acid; ARA, arachidonic acid; DHA, docosahexaenoic acid; DPA, docosapentaenoic acid, DTetA, docosatetraenoic acid, DTriA, docosatrienoic acid, EPA, eicosapentaenoic acid; OLE, oleic acid. B, b1, effects of fatty acids (100 μ M) shown in A on the L-Glu-induced EAAT2 current. DHA, DPA, EPA, ARA, and ALA significantly increased the current. b2, loss of the augmenting effects of DPA, EPA, ARA and ALA in EAAT2 L434A. C, c1, effects of DHA, DPA, EPA, ARA, and ALA (100 μ M) on the L-Glu-induced EAAT1 current. DHA significantly decreased the current, while DPA, EPA, ARA, and ALA tended to decrease the current. c2, the effects of DPA, EPA, ARA, and ALA on L-Glu-induced EAAT1 A435L current. These PUFAs augmented the L-Glu-induced EAAT1 A435L current. Error bars represent mean \pm SD. The numbers written within parentheses in each figure represent the number of independent experiments. Statistical differences between groups were determined by two-tailed unpaired Student's *t* test (b2 and c2), and Tukey's test following one-way factorial ANOVA (b1 and c1 versus OLE-treated group) (denoted by *). *p*-values are indicated in each figure panel. EAAT2, excitatory amino acid transporter subtype 2; PUFA, polyunsaturated fatty acid.

DHA 以外でも PUFA によるタンパク質機能制御は数多く報告されている。そこで、Fig. 3A

に示した 10 種類の PUFA について、EAAT1, 2 機能への影響について検討した。docosapentaenoic acid (DPA), eicosapentaenoic acid (EPA), arachidonic acid (ARA), and α -linolenic acid (ALA)は DHA と同様、有意に L-Glu 誘発 EAAT2 電流を増強し (Fig. 3B)、EAAT1 電流を減弱した (Fig. 3C)。また、これらの作用にも Leu434 が必須であることが判明した。PUFA による L-Glu トランスポーターの機能制御に Leu434 が必須であることは、L-Glu トランスポーターとの直接的な相互作用を示唆しており、制御メカニズムの解明に重要である。

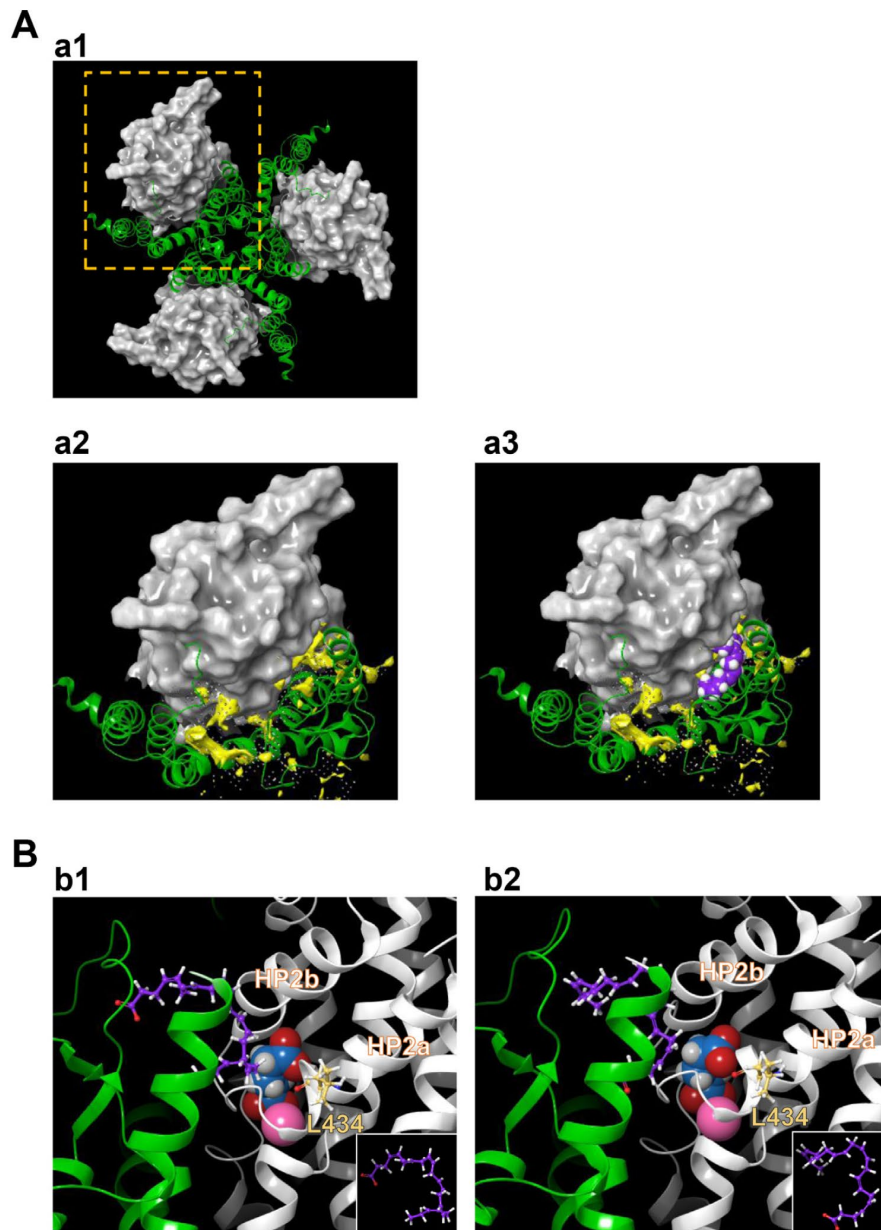


Fig. 4 Proposed binding conformation for DHA in the transport/trimerization domain interface of EAAT2 homology model in the outward facing state OFS. A, a1, extracellular view of trimerized EAAT2 OFS homology model based on EAAT1 crystal structure. Trimerization domain is shown in green ribbon. Transporter domain is shown in gray surface. Structural data were presented using graphical user interface in Maestro Suite. The homology model of EAAT2 was constructed as a monomer based on the crystal structure of OFS EAAT1 (PDBID: 5LLM) with energy-based loop refinement using Homology Modeling unit in Maestro Suite. The quality of homology model was checked by PROCHECK. a2 and a3, magnified monomer in the hatched square in a1 in the absence (a2) or presence (a3) of DHA. The lipid crevice calculated by SiteMap exists at the interface between trimerization domains and transport domains (yellow space) (a2). DHA is docked to the lipid crevice (carbon: purple spheres; hydrogen: white spheres) (a3). B, b1 and b2, docking poses of DHA to the lipid pocket in the vicinity of HP2 according to induced fit docking protocol. The trimerization domain and transport domain are shown in green and gray ribbons, respectively. Carbons in DHA and EAAT2 L434 are represented by purple and yellow sticks, respectively. The atoms in L-Glu are shown as follows: carbon: blue sphere; hydrogen: white sphere, oxygen: red sphere; nitrogen: hiding. Na⁺ is shown as a pink sphere. Two types of the DHA conformations could be visualized according to the position of the carboxylic group, i.e., one is with carboxyl group on upper side (b1) and the other is with carboxyl group on lower side (b2). Both of them have similar U-shaped conformation. Inset is the DHA conformations in each case. Three-dimensional position of DHA is in close proximity to L-Glu binding site and Na⁺ binding site. DHA, docosahexaenoic acid; EAAT2, excitatory amino acid transporter subtype 2; OFS, outward facing state.

DHA が EAAT2 の機能をどのように促進しているのか考察するため、induced fit docking (IFD) simulation を行った。EAAT2 の基質輸送は outward facing state (OFS)→intermediate OFS →unlocked inward facing state (IFS)→IFS で示されるトランスポートドメインのエレベーター仮説が受け入れられている (6, 7) (Fig. 1F)。IFD でスコアが高かった組み合わせは U 型の DHA がトランスポートドメインの疎水性クレバスに入り込んでいる状態であった (Fig. 4B)。その領域はグルタミン酸結合領域、Na⁺結合領域に近く、これらの結合へ影響している可能性もあり興味深い。

【ヒト型 L-Glu トランスポーター評価系としてのヒト iPS 細胞由来神経系細胞】

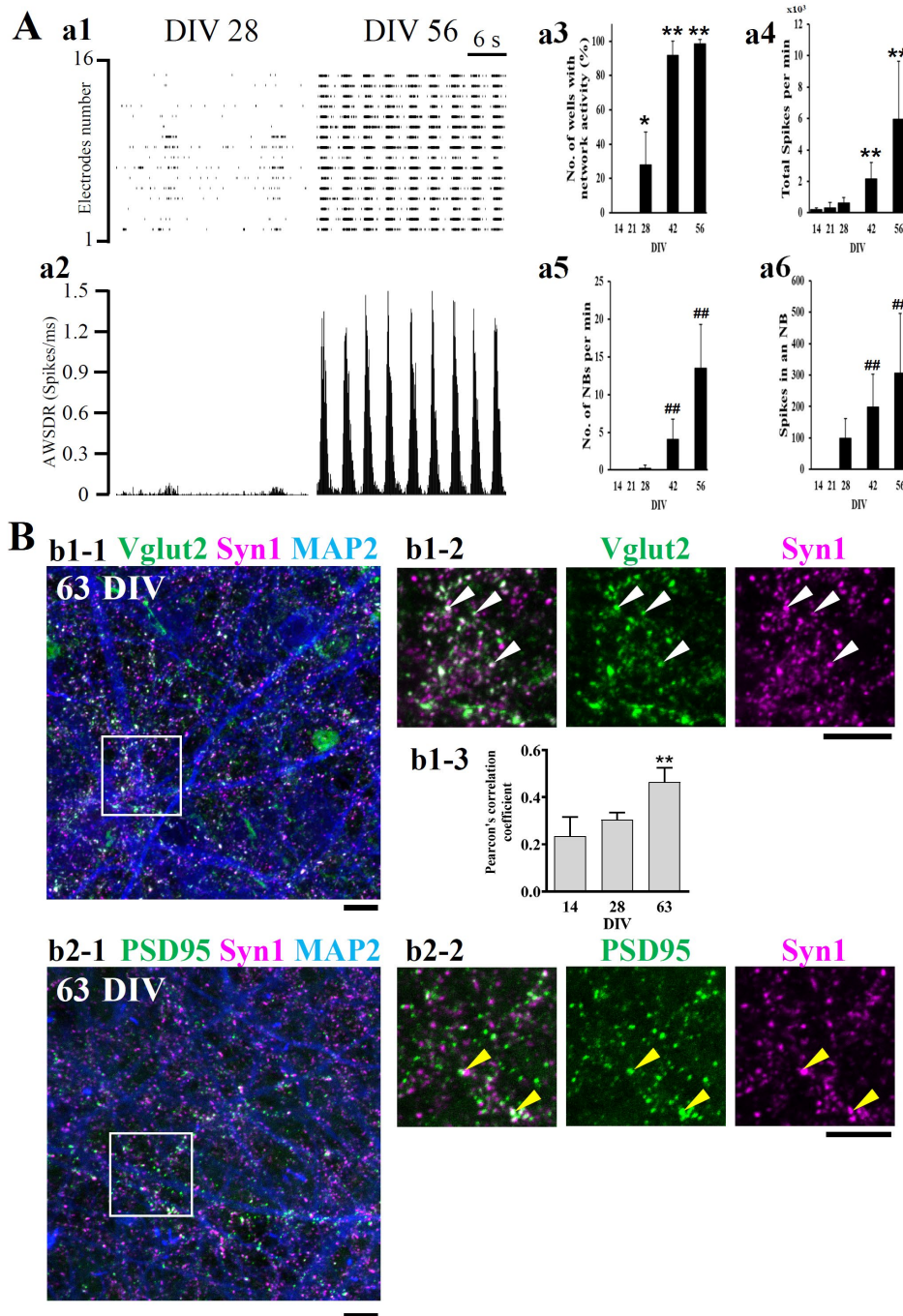
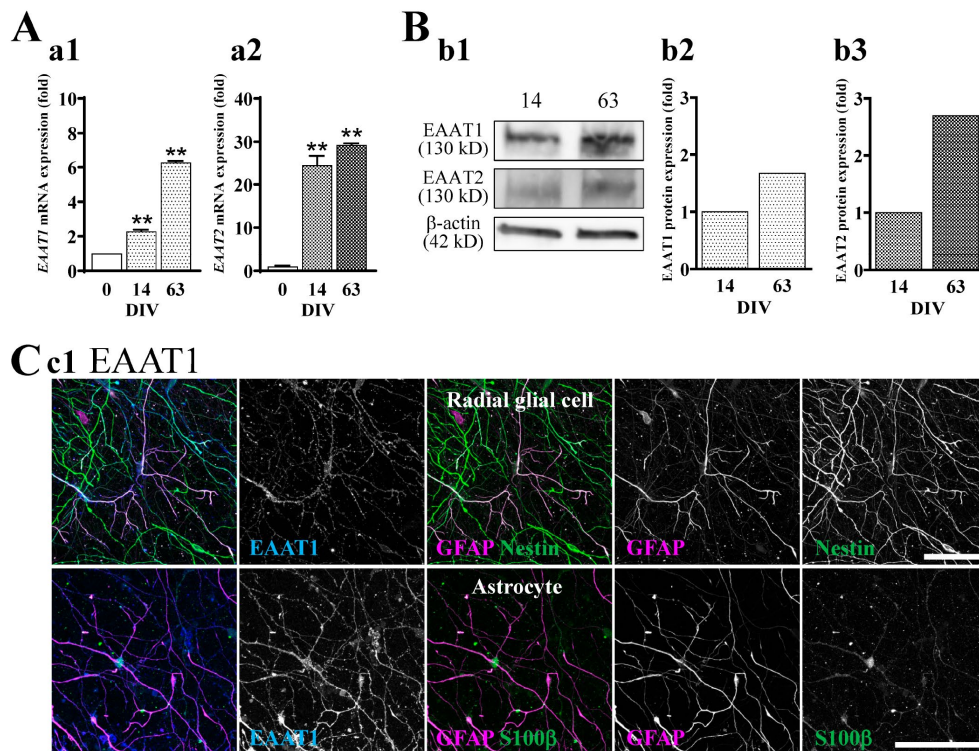


Fig. 5 Expression of EAAT1 and EAAT2 in hiPSC-derived neural cells. (A) The significant increase in the mRNA expression levels of EAAT1 (a1) and EAAT2 (a2) along with culture days was confirmed by qRT-PCR ($n = 3$, ** $p < 0.01$ vs. DIV 0 group, Tukey's test following ANOVA. Data are expressed as the means \pm standard deviations. Similar results were obtained in three independent experiments. (B) Representative immunoblot at 14 and 63 DIV (b1). The expression level of each marker was normalized to 14 DIV. The expression levels of EAAT1 (b2) and EAAT2 (b3) protein

tended to increase with culture days. Similar results were obtained in four independent experiments. (C) Identification of cell types expressed EAAT1 and EAAT2 at 63 DIV. We used the following cell markers: GFAP⁺Nestin⁺ for radial glial cells, GFAP⁺S100 β ⁺ for astrocytes, and HuC/D⁺ or MAP2⁺ for neurons. (c1) EAAT1 was localized in radial glial cells (top) and astrocytes (bottom). (c2) EAAT2 was localized in radial glial cells (top), astrocytes (middle), and neurons (bottom). Scale bar, 100 μ m. Similar results were obtained in three independent experiments.

近年、倫理的な問題を解決したヒト由来幹細胞として、hiPSCの市販が始まり、新薬開発（探索、安全性・毒性、代謝等）における応用が期待されている。我々は、多くのリソース（アカデミア、細胞メーカー等）から取得した hiPSC-neural cells の性状について比較検討を行ってきたが、ほぼすべての場合で、神経細胞が齧歯類初代培養神経細胞よりも興奮毒性に対して耐性があることを見いだしていた。多くの文献でも同様の報告はあるものの（8, 9, 10）、メカニズムについて検討された例はなかった。そこで、hiPSC-neural cells 培養系における L-Glu トランスポーターの機能、興奮毒性への耐性ととの関連について、詳細な検討を行った。市販 hiPSC-neural cells は X 社のものを使用した。この培養系で神経活動を微小電極アレイシステム（microelectrode array system: MEA）で記録したところ、培養 60 日前後で神経回路形成が飽和することが確認された（Fig. 5A）。

また、qRT-PCR において、nestin（幹細胞マーカー）、HuC/D（神経細胞マーカー）、GFAP（ラジアルグリア・アストロサイトマーカー）、S100 β （アストロサイトマーカー）の発現について確認した。培養期間が長くなるにつれ、nestin 発現は減少し、HuC/D 発現は飽和し、GFAP, S100 β 発現は増加した。免疫組織化学的に確認したところ、確かにアストロサイト様の細胞が増加していた。同様に、EAAT1, 2 の発現についても検討した。



c2 EAAT2

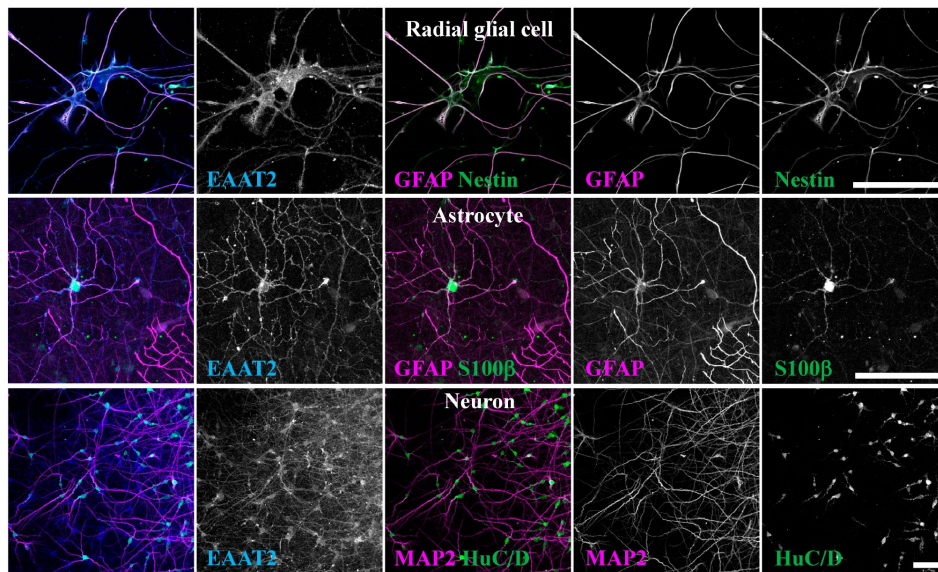


Fig. 6

Functional maturation of hiPSC-derived neural networks. (A) Spontaneous firing of hiPSC-derived neural networks and comparison of 4 parameters at 14, 21, 28, 42, and 56 DIV ($n = 72$). The measurements were performed for 15 min. Raster plots for all 16 electrodes at 28 and 56 DIV (a1). Array wide spike detection rate (AWSDR, number of spikes/ms) at 28 and 56 DIV (a2). Network bursts (NBs) were detected after 28 DIV, and the number of wells with network activity increased with culture days (a3). Total spikes per min increased with culture days (a4). The number of network bursts (NBs) per min increased with culture days (a5). Spikes in an NB increased with culture days (a6). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. DIV 14 group and ## $p < 0.01$ vs. DIV 28 group by the Holm–Bonferroni Method following two-way ANOVA. Data are expressed as the means \pm standard deviations. (B) At 63 DIV,

hiPSC-neurons were immunostained with anti-Vglut2 (green: vesicular glutamate transporter 2), anti-Syn1 (magenta: pre-synapse), and anti-MAP2 (blue: dendrite) antibodies (b1-1). Magnified view in the white square in b1 (b1-2). White arrowheads indicate co-localization of Vglut2 and Syn1 on MAP2-positive fibers. Pearson's Correlation Coefficient between Vglut2 (green) and Syn1 (magenta) increased with culture days (b1-3). At 63 DIV, hiPSC-neurons were immunostained with anti-PSD95 (green: post-synapse), anti-Syn1 (magenta: pre-synapse), and anti-MAP2 (blue: dendrite) antibodies (b2-1). Magnified view in the white square in b2 (b2-2). Yellow arrowheads indicate the PSD95 signal (green) contiguous to the Syn1 signal (Magenta) on MAP2-positive fibers. Scale bar, 10 μ m. Similar results were obtained in three independent experiments.

両者とも培養期間が長くなるにつれ発現が増加しており、EAAT1 はアストロサイト、EAAT2 はアストロサイトと神経細胞に発現していた (Fig. 6C)

hiPSC-neural cells の興奮毒性に対する耐性と EAAT1, 2 との関連について薬理的に検討した (Fig. 7)。神経回路が完成された培養 60 日目以降でも、100 μ M L-Glu によって神経細胞への障害は引き起こされなかった (Fig. 7A)。しかし、EAAT1, 2 の両者を阻害する TFB-TBOA が共存していると、培養 63 日後の標本で L-Glu は有意に神経細胞の生存率を低下させた (Fig. 7B-b2)。さらに、EAAT1 選択的阻害剤 UCPH-101, EAAT2 競合的阻害剤 dihydrokinic acid (DHK)、強力な EAAT2 阻害剤 WAY213613 を用いて、細胞外 L-Glu が EAAT1, EAAT2 の両者によって取り込まれること、EAAT1 より EAAT2 のほうが取り込みに大きく貢献していることを明らかとした (Fig. 7C, D)。

hiPSC-neural cell 培養系では、アストロサイトが分化、増殖し、アストロサイトに発現している EAAT1, アストロサイトと神経細胞に発現している EAAT2 が細胞外 L-Glu を強力に取り込み、神経細胞を興奮毒性から防御していることが明らかとなった。したがって、hiPSC neural cells はこれまで齧歯類初代培養では難しかった EAAT2 を標的とした新薬探索やメカニズム解明に有用であることが示唆された。

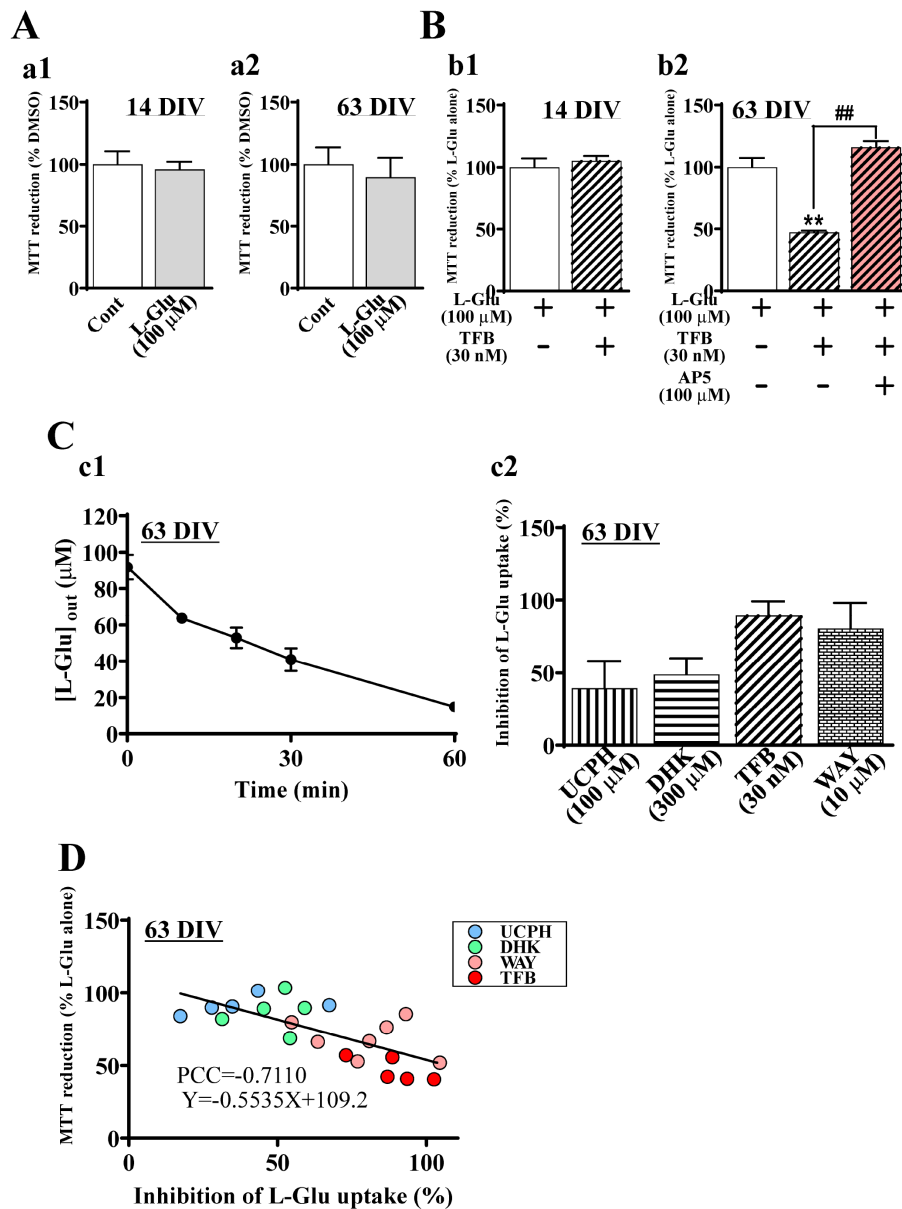


Fig. 7 Inhibition of EAATs increases the extracellular L-Glu concentration and leads to excitotoxicity at 63 DIV. (A) The effect of L-Glu alone on cell viability at 14 and 63 DIV ($n = 6$). Cell viability was assessed using the MTT reduction assay. At 14 (a1) and 63 (a2) DIV, the application of L-Glu at 100 μ M for 24 h did not change MTT reductions compared with the application of DMSO at 0.4% (Cont), which was used as a vehicle. Unpaired *t*-test. Data are expressed as the means \pm standard deviations. Similar results were obtained in three independent experiments. (B) The effects of TFB-TBOA (TFB, nonspecific EAAT inhibitor, 30 nM) when coapplied with L-Glu on cell viability at 14 and 63 DIV ($n = 4-6$). At 14 DIV, TFB caused no effect on MTT reductions (b1). On the other hand, at 63 DIV, TFB significantly decreased MTT reductions, and AP5 (NMDAR antagonist, 100 μ M) blocked the decrease in MTT reductions by TFB (b2). Similar results were obtained in three

independent experiments. ** $p < 0.01$ vs. L-Glu(+)/TFB(-)/AP5(-) group by Tukey's test following ANOVA. # $p < 0.01$ vs. L-Glu(+)/TFB(+)/AP5(-) group by Tukey's test following ANOVA. Data are expressed as the means \pm standard deviations. Similar results were obtained in three independent experiments. (C) Identification of the contribution of specific EAATs to the decrease in exogenously applied L-Glu. (c1) Change in the concentration of L-Glu in the medium ([L-Glu]_{out}) after L-Glu (100 μ M) was applied at 63 DIV ($n = 3$). [L-Glu]_{out} was nearly zero at 60 min. Data are expressed as the means \pm standard deviations. Similar results were obtained in three independent experiments. (c2) The effects of EAAT inhibitors on L-Glu uptake at 63 DIV ($n = 5-7$). The effects of EAAT inhibitors on the decrease in [L-Glu]_{out} were assessed at 30 min, which was the time for the 50% decrease in [L-Glu]_{out} from Figure 4C(c1). The percentage inhibition of EAAT inhibitors on L-Glu uptake activity was calculated as 100% of the decrease in extracellular L-Glu concentration in the absence of EAAT

【References】

1. Arriza JL, Fairman WA, Wadiche JI, Murdoch GH, Kavanaugh MP, Amara SG. (1994) Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J. Neurosci.* 14, 5559–5569.
2. Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG. (1997) Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4155–4160.

3. Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG. (1995) An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375, 599–603.
4. Tanaka K, Watase, K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T. et al. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 1997, 276, 1699–1702.
5. Mitrovic AD, Amara SG, Johnston GA, Vandenberg RJ. (1998) Identification of functional domains of the human glutamate transporters EAAT1 and EAAT2. *J. Biol. Chem.* 273, 14698–14706.
6. Reyes N, Ginter C, Boudker O. (2009) Transport mechanism of a bacterial homologue of glutamate transporters. *Nature* 462, 880–885.
7. Kanner BI, Bendahan A. (1982) Binding order of substrates to the sodium and potassium ion coupled L-glutamic acid transporter from rat brain. *Biochemistry* 21, 6327–6330.
8. Sato K, Takahashi K, Shigemoto-Mogami Y, Chujo K, Sekino Y. Glypican 6 Enhances N-Methyl-D-Aspartate Receptor Function in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons. *Front. Cell. Neurosci.* 2016, 10, 259.
9. Bauersachs HG, Bengtson CP, Weiss U, Hellwig A, García-Vilela C, Zaremba B, Kaessmann H, Pruunsild P, Bading H. N-methyl-d-aspartate Receptor-mediated Preconditioning Mitigates Excitotoxicity in Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Brain Organoids. *Neuroscience* 2022, 484, 83–97.
10. Daneshgar N, Leidinger MR, Le S, Hefti M, Prigione A, Dai DF. Activated microglia and neuroinflammation as a pathogenic mechanism in Leigh syndrome. *Front. Neurosci.* 2022, 16, 1068498.

【謝辞】

本研究成果は以下の論文としてまとめることができました。

1. Takahashi K, Chen L, Sayama M, Wu M, Hayashi MK, Irie T, Ohwada T, Sato K*. Leucine 434 is essential for docosahexaenoic acid-induced augmentation of L-glutamate transporter current. *J Biol Chem.* 2023 Jan;299(1):102793. doi: 10.1016/j.jbc.2022.102793. Epub 2022 Dec 9. PMID: 36509140
2. Takahashi K, Ishibashi Y, Chujo K, Suzuki I, Sato K*. Neuroprotective Potential of L-Glutamate Transporters in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Cells against Excitotoxicity. *Int J Mol Sci.* 2023 Aug 9;24(16):12605. doi: 10.3390/ijms241612605. PMID: 37628787
3. Takahashi K, Sato K*. The Conventional and Breakthrough Tool for the Study of L-Glutamate Transporters. *Membranes (Basel).* 2024 Mar 27;14(4):77. doi: 10.3390/membranes14040077. PMID: 38668105

お力添えいただきました公益財団法人 蓬庵社様に心より御礼申し上げます。

ヒト血液脳関門を知る、創る、操る： 物流システムの解明から『血液脳関門操薬』への展開

徳島大学大学院医歯薬学研究部
薬学域・DDS 研究センター薬動力学部門
立川 正憲

1. はじめに

人々が、健やかに成長し、はたらき、老いることのできる健康長寿社会を実現するためには、疾患に対する予防医療の確立や治療体制を一層強化することが必要である。その中でも脳神経疾患は、人生のあらゆるステージにおいて罹患者の生活の質を低下させるだけでなく、介護者の負担増を余儀なくさせる。厚生労働省の研究班が発表した将来推計¹によると、高齢化が進む我が国では、2040年には認知症患者が584万人、認知症予備軍とされる軽度認知障害患者が613万人に上り、65歳以上の高齢者の7人に1人が認知症に罹患すると予想されている。そこで脳神経疾患を制圧する治療薬や、症状悪化を遅らせる疾患修飾薬の開発が強く求められている。これだけでなく、若年者を中心に増加傾向にあるうつ病や統合失調症などの精神疾患、そして発達早期の治療介入によって治癒が見込まれる小児神経疾患に対する薬剤開発も、喫緊の課題である。このような現状をふまえ、各国の製薬企業やベンチャー企業が、従来の低分子薬物だけでなく、核酸やペプチド、抗体タンパク質などの中高分子を新たなモダリティとした脳神経疾患治療薬や疾患修飾薬の開発にしのぎを削っているが、未だアンメットメディカルニーズの域を脱していない。

脳神経疾患に対する治療薬や疾患修飾薬が効果を発揮するためには、薬物が脳内の標的部位に到達することが大前提となる。薬物を循環血液中から脳内に届けようとすると、そこには脳血管の壁、いわゆる「血液脳関門 (Blood-Brain Barrier, BBB)」²(図1)が立ちはだかる。治療薬開発の成否は、脳血管の壁をいかに攻略するかにかかっているといえるが、現状では、薬物に血液脳関門を突破する機能を付与方法論の開発は未だ発展途上にあり。末梢臓器と同じように、脳にも縦横無尽に微小血管網が張り巡らされており、循環血液中に入った薬物は脳内でもこの微小血管内を循環することができる。脳毛細血管は、平均40 μm の間隔で走行しており²、その間の

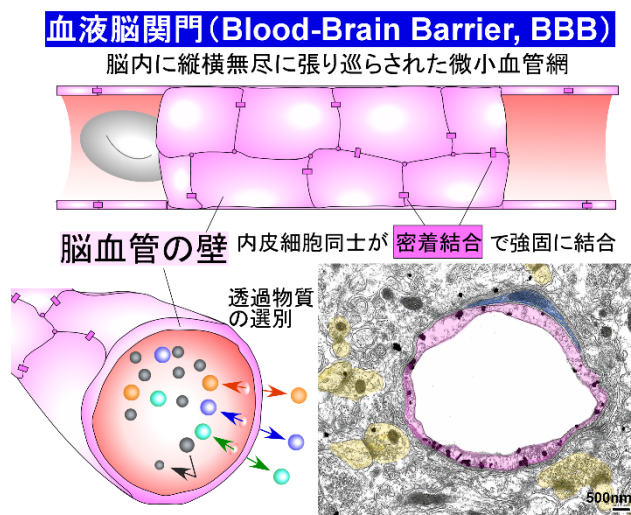


図1 血液脳関門(Blood-Brain Barrier, BBB)の機能形態学的特徴

右下図は、トランスポーターの免疫電子顕微鏡写真(マウス脳)、脳毛細血管内皮細胞をピンク色、ペリサイトを青色、シナプス構造を黄色で着色

血液脳関門を突破する機能を付与方法論の開発は未だ発展途上にあり。末梢臓器と同じように、脳にも縦横無尽に微小血管網が張り巡らされており、循環血液中に入った薬物は脳内でもこの微小血管内を循環することができる。脳毛細血管は、平均40 μm の間隔で走行しており²、その間の

空間に神経グリア細胞の細胞体や突起、神経シナプスなどの神経活動の機能単位が配置されている(図1右下の電子顕微鏡写真)。形態学的には循環血流から薬物の標的部位まで数十 μm しか離れておらず、脳血管の壁を通過することができた薬物は速やかに標的部位に到達可能である。しかし脳血管の壁は、肺や肝臓などの末梢臓器の血管とは異なって特殊化されており、内皮細胞どうしが密着結合(tight junction)で強く結合して、細胞間のすきまを介した物質透過(paracellular transport)を著しく制限している。一方で脳血管の壁には、血液中を循環する物質の中から特定の物質を選別して透過させる仕組みが存在し、この仕組みを私たちは「物流システム」とよんでいる。そこで特殊化された脳血管の壁の物質透過性、つまり「血液脳関門の物流システム(BBB Logistics)」の作動原理を、ヒトレベルで分子機構論的に理解することが、脳神経疾患に対する治療薬や疾患修飾薬の脳内病的部位への効率的な送達を実現するうえで必須である。

2. 『血液脳関門操薬』のストラテジー

薬物送達システム(DDS)の研究開発は、低分子薬物に対してだけでなく、修飾リポソームや高分子ミセル、人工エクソソームなどのナノ医療工学の発展とともに、高分子薬物へ対しても大きな広がりを見せている。今こそ、ヒト血液脳関門の物流システムを利用して、あらゆるモダリティの血液脳関門透

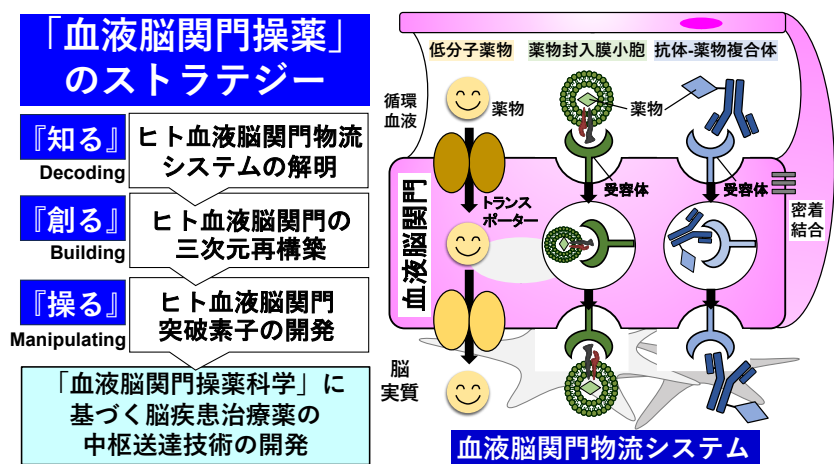


図2 『血液脳関門操薬』のアウトライン

過性をマニピュレーション(操作)し、血液脳関門を突破した薬物を脳内の標的部位へ時空間を制御してナビゲートするための方法論の確立が、脳神経疾患創薬に変革をもたらす好機となると期待される。そこで私たちは、血液脳関門の物流システムを利用して、あらゆるモダリティの血液脳関門透過性をマニピュレーションする方法論の開発を、『血液脳関門操薬』(図2)と名付け、異分野融合のもとにプロジェクトを進めてきた。本プロジェクトは、定量プロテオミクスを基盤として、ヒト血液脳関門の物流システム(BBB Logistics)の作動原理を「知る(Decoding)」、次にマイクロ流体工学との融合によって、BBB Logisticsを再現したヒトBBB on-a-Chipを「創る(Building)」、最終的にBBB chipを評価系として用い、BBB Logisticsを利用して薬物の血液脳関門の透過性を「操る(Manipulating)」方法論を確立する、という三本の柱からなっている。本プロジェクトでは、「ヒト血液脳関門操薬科学」を構築し、物流システムに認識される血液脳関門突破素子の開発と脳疾患治療薬の中枢送達技術への実装を最終目標とした。

参考文献

1. 認知症施策推進関係者会議(第2回)資料
2. 立川正憲ら 血液脳関門 脳科学辞典 <https://bsd.neuroinf.jp/wiki/血液脳関門> (2020).

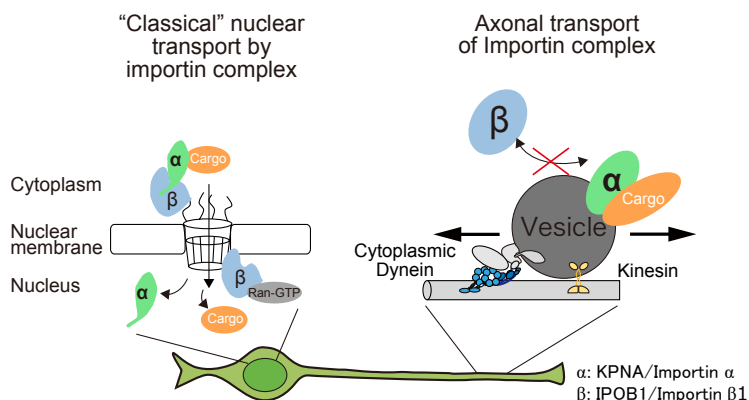
核移行因子 KPNA1 による軸索輸送制御メカニズムとその生理的意義の解明

福井大学学術研究院医学系部門・分子生体情報学分野

山田 雅己

1. はじめに

主要な核移行因子の一つである KPNA/Karyopherin α /Importin α は、核局在化シグナル (NLS: nuclear localization signal) を有する Cargo や Importin β 1 (IPOB1) と三者複合体を形成し、核-細胞質間の物質輸送を担っている (図 1 左)^[1]。一方で KPNA は、核

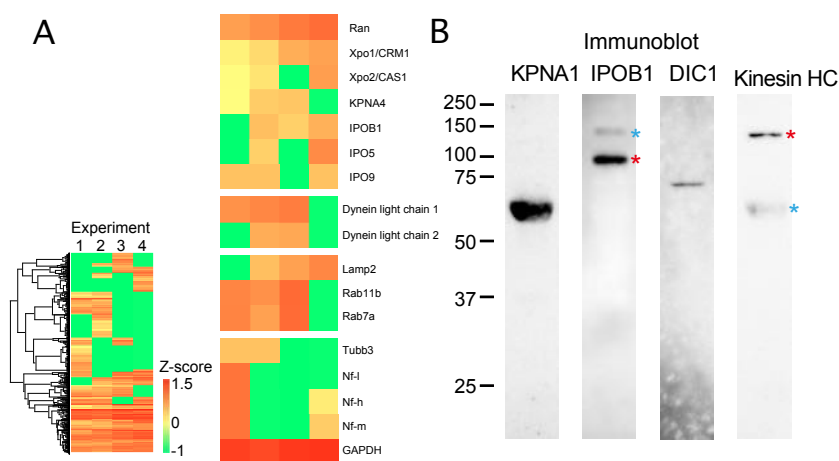


(図 1) KPNA1による細胞内物質輸送制御の模式図

移行のみならず生体内での様々な役割を担う多機能分子としての側面を持つことがわかってきた^[2]。中でも KPNA1 は、脳組織や神経細胞において強く発現することが知られ、*Kpna1* 遺伝子の精神疾患発症への関与が報告されている^[3]。最近私たちは、*Kpna1* ノックアウト (KO) マウスを用いて、この遺伝子欠損による遺伝的要因 (G)に孤立や薬物ストレスの環境的要因 (E)が加わった G x E 相互作用が特定の脳部位での神経細胞の機能調節に影響を及ぼし精神疾患様の行動異常が生じることを報告した^[4-6]。これまでも神経細胞内のシナプスや軸索末端などの特定部位において、インポーチンが末梢から細胞核への情報伝達に関わることは示唆されていたが、その詳細な分子機構は明らかではなかった。今回私たちは、KPNA1 に関連する神経細胞内での物質輸送を明らかにするため、特に神経軸索における KPNA1 の分子動態に着目して解析を行なった。ラット大腿神経を用いた軸索成分に対する生化学的解析から、KPNA1 および IPOB1 やその他の核移行関連因子が軸索中に豊富に存在していることが示された。後根神経節細胞を用いたライブセルイメージングでは、KPNA1 および IPOB1 が順行性および逆行性の双方向に軸索内を移動し、特徴的な分子動態を示した。また KPNA1 は、微小管分子モーター、微小管関連因子、および小胞関連因子とも軸索内で挙動を共にすることもわかった。しかしながら、軸索輸送における KPNA1 と IPOB1 は、ほとんど挙動を共にしていなかった(図 1 右)。また本研究において、統合失調症患者型の KPNA1 変異体の神経細胞での機能解析を行い、その局在が核内に限定していること、特定の核外輸送シグナル (NES, nuclear export signal) 配列を付加することで、軸索への局在が回復すると共に分子動態の顕著な改善が見られた (Mizuno et al., under revision in *Neurobiol Dis*)。これらより、KPNA1 は、分子モーターを介した軸索内での情報伝達に不可欠な役割を担っており、精神疾患の発症にも関与する重要な因子であることが示唆された。

2.1. 軸索性インポートンについて

まず、私たちは神経細胞の軸索部分でのインポートンに関連するタンパク質の発現を包括的に調べるため、ラット大腿神経を摘出した後に細胞抽出液を調製し、液体クロマトグラフィ-タンデム質量分析 (LC-MS/MS) を行った。この解析により、IPOB1、IPO5、IPO9、KPNA4、CRM1/Exportin1、CAS/Exportin2、small GTPase Ran などのインポートン関連タンパク質の存在が明らかになった。これらの因子は核-細胞質間の物質輸送を制御する因子としてよく知られているが、今回の解析結果より、軸索にもインポートンに関連する様々なタンパク質が存在していたことは興味深い (図 2A)。この抽出液を用いて、KPNA 抗体および IPOB1 抗体での免疫ブロット解析を行ったところ、KPNA1 については~60 kDa に IPOB1 については~100 kDa に各々バンドを確認することができた (図 2B)。質量分析の結果では、KPNA1 は安定して検出されなかったが、これはペプチドの強度が低いのか、あるいは他のペプチドからの干渉による可能性が考えられた。これらの所見は、軸索内に多様なインポートン関連タンパク質が存在すること、特に KPNA1 は豊富に存在していることを示すものである。



(図 2) 大腿神経内のインポートン関連因子の発現
(A) LC-MS/MS質量分析、(B) 免疫ブロット

2.2. 神経細胞内での KPNA と IPOB1

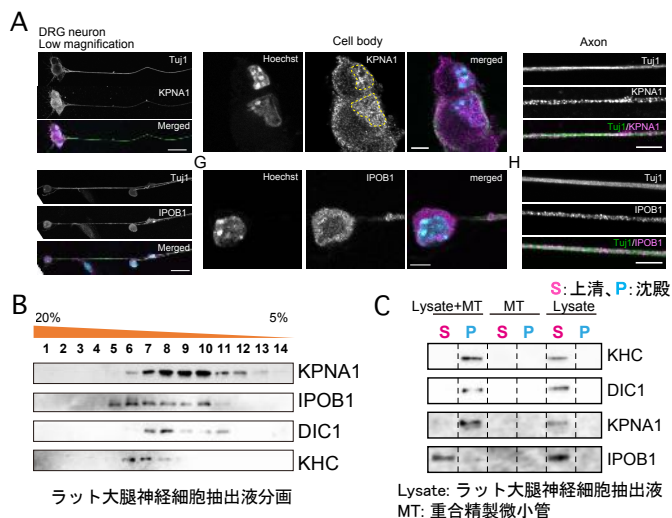
神経細胞内における KPNA1 と IPOB1 の局在を解析するため、神経細胞マーカーとして抗βIII チューブリン抗体/Tuj1 を用いて、初代培養のマウス後根神経節細胞 (DRG: dorsal root ganglion) の免疫細胞染色を行った。KPNA1 と IPOB1 両方のシグナルが Tuj1 陽性 DRG ニューロン内に検出された (図 3A)。KPNA1 は DRG ニューロンの軸索および細胞体に局在していた。細胞体では KPNA1 はニューロンの核内に局在が見られ、軸索領域では KPNA1 は特徴的な点状の染色パターンを示した (図 3A, 上段)。IPOB1 は、細胞体ではとりわけ核膜に顕著なシグナルが見られ、細胞質でも高いシグナルが検出された。軸索領域における IPOB1 は、KPNA1 同様の点状の染色パターンを示した (図 3A, 下段)。ま

た、KPNA1 では Tuj1 陽性ニューロンの方が Tuj1 陰性細胞よりも高い発現が見られたが、IPOB1 では Tuj1 陽性ニューロンと Tuj1 陰性細胞の間での発現量の差はほとんど見られず、IPOB1 はより偏在的に発現していることが示唆された（データ省略）。

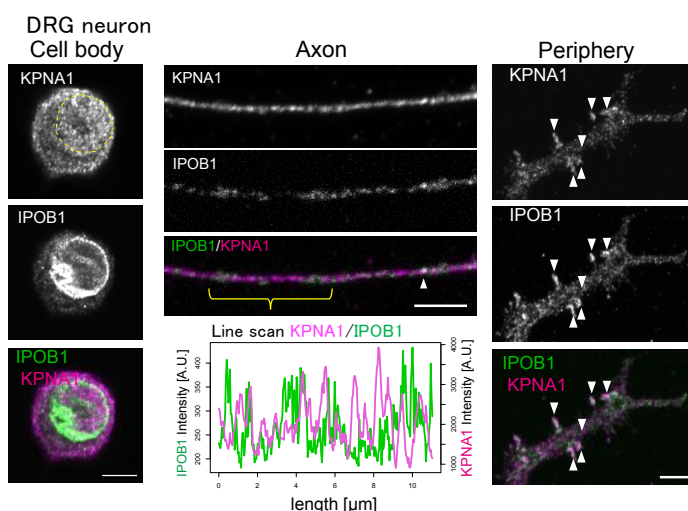
次に、軸索性 KPNA1 と IPOB1 を含む複合体の特徴を明らかにするために、シヨ糖密度勾配遠心法にてラット大腿神経

抽出液を分画し免疫ブロッティングを行った（図 3B）。分画の結果、KPNA1 は細胞質ダイニン中間鎖 1（DIC1）と一部で溶出画分の位置が重複していたが、キネシン重鎖（KHC）とはほとんど一致しなかった。興味深いことには、IPOB1 は KPNA1 とは異なる位置に溶出画分を示した。さらに、精製したチューブリンを重合させて行なった微小管プルダウンアッセイにおいて、ATP 存在下での KPNA1 は細胞質ダイニンやキネシンと同様に微小管との共沈が見られたが、IPOB1 は微小管との共沈は見られなかった（図 3C）。KPNA1 または IPOB1 に対する抗体でラット大腿神経抽出液を用いたそれぞれの免疫沈降は可能であったが、KPNA1 抗体では IPOB1 の共沈は見られず、IPOB1 抗体でも KPNA1 の共沈は見られなかった（データ省略）。これらの結果は、少なくとも非創傷状態の末梢神経細胞では、軸索内での KPNA1 と IPOB1 の安定した複合体の形成を支持するものではなく、別々の複合体を形成している可能性が考えられた。

KPNA1 と IPOB1 のそれぞれに対する抗体を用いて DRG ニューロンを免疫二重染色したところ、前述同様、細胞体での KPNA1 は特に核内に、IPOB1 は核膜にはっきりと局在が見られた（図 4 左列）。また、両者の軸索領域における染色パターン（ラインスキャン）はほとんど一致していなかったことから、KPNA1 と IPOB1 が DRG ニューロンの軸索領域では共局在し



（図 3）KPNA1/IPOB の DRG ニューロン内局在と軸索領域での相互作用
 (A)免疫細胞染色、(B)シヨ糖密度勾配遠心、(C)微小管プルダウン

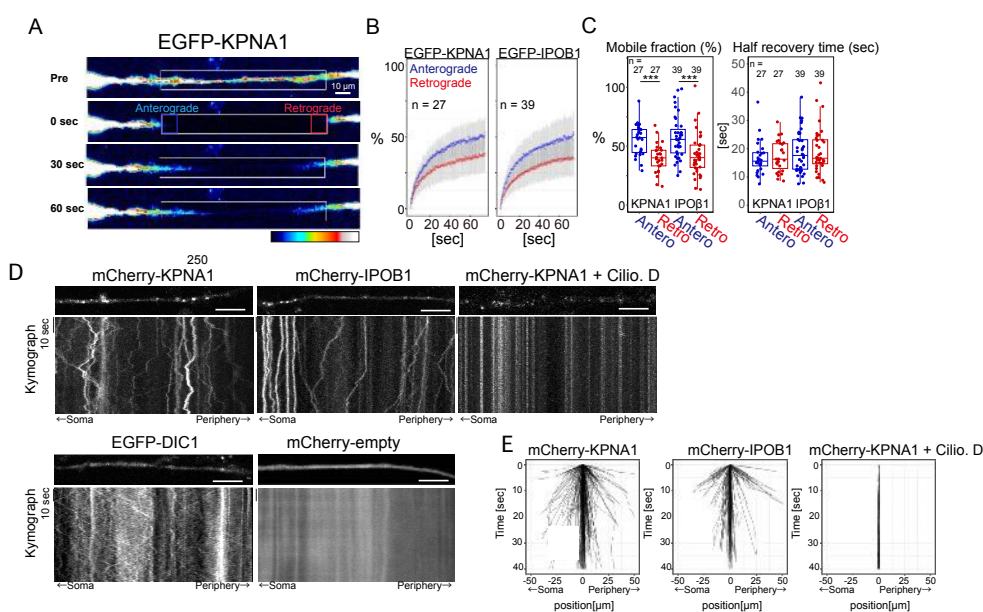


（図 4）KPNA1 と IPOB の免疫二重染色

ていなことが示唆され、前述の生化学的データを支持するものであった (図4中央列)。興味深いことに、DRGニューロンの軸索終末領域では、KPNA1とIPOB1の明確な共局在が観察され、限られた領域においては、KPNA1とIPOB1が相互作用している可能性が示唆された (図4右列)。

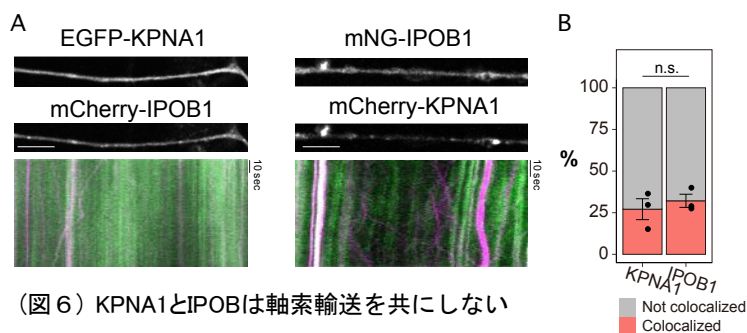
2.3. KPNA1およびIPOB1の軸索輸送とその関連性

KPNA1とIPOB1の軸索内での移動性を調べるため、EGFPまたはmCherryの蛍光融合タンパク質としてDRGニューロン内に過剰発現させてライブセルイメージングを行った。まず、KPNA1とIPOB1が軸索内での移動性を示すかどうかを評価するために、光褪色後蛍光回復 (FRAP: fluorescence recovery after photobleaching) を行った (図5A-C) [7]。具体的には、軸索に沿った長い矩形領域を光褪色させて後の蛍光回復を経時的に観察して、タンパク質の順行性または逆行性の動きを解析した。KPNA1およびIPOB1は、両方向からの蛍光回復が見られたことから、逆行性および順行性の双方向への輸送が示された (図5A&B)。このとき、回復の半減時間 ($t_{1/2}$) は、順行性と逆行性で有意な差は見られなかった (図5C)。mCherryで標識したKPNAとIPOB1軌跡のカイモグラフィ解析によると、両者ともに多くのスポットは比較的安定した移動性を維持し双方向へと輸送されていたが、いくつかの蛍光スポットにおいては移動方向の切り替わりが頻繁に見られた (図5D)。さらに、ダイニン阻害剤のシリオブレビンD (Cilio. D)により、軸索内でのKPNA1の輸送は完全に停止した (図5D&E, 右)、これらの知見から、軸索のKPNA1の可動性が細胞質ダイニンやキネシンのような分子モーターの活性に依存していることを示唆された。



(図5) KPNA1とIPOBのDRGニューロン軸索領域における移動性

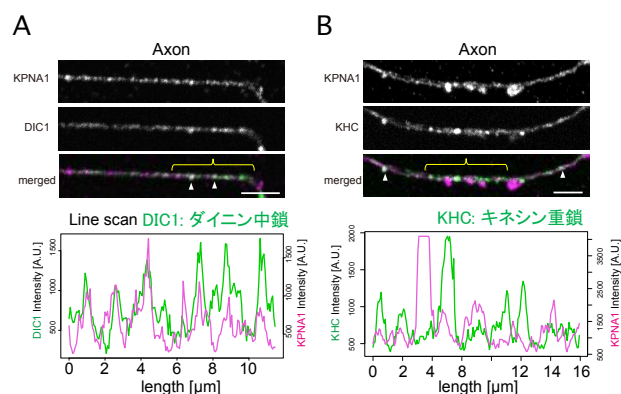
これらの過剰発現させた KPNA1 あるいは IPOB1 の蛍光タンパク質は、内因性のものと同様の局在パターンを示した (図 6A、一部省略)。軸索における KPNA と IPOB1 の関係を調べるために、mNG-IPOB1/mCherry-KPNA1 または EGFP-KPNA1/mCherry-IPOB1 の組み合わせで発現させた DRG ニューロンで二重ライブイメージングを行った。



(図 6) KPNA1とIPOB1は軸索輸送を共にしない

または EGFP-KPNA1/mCherry-IPOB1 の組み合わせで発現させた DRG ニューロンで二重ライブイメージングを行った。定量的解析の結果、KPNA1 と IPOB1 の共挙動の割合は、mCherry-KPNA1 と EGFP-IPOB1、および mCherry-IPOB1 と EGFP-KPNA1 の両方で約 25%であった (図 6B)。この結果から、軸索の KPNA1 と IPOB1 は、それらが豊富に存在するにもかかわらず、主に同じ輸送複合体を形成しているわけではないことが示唆された。

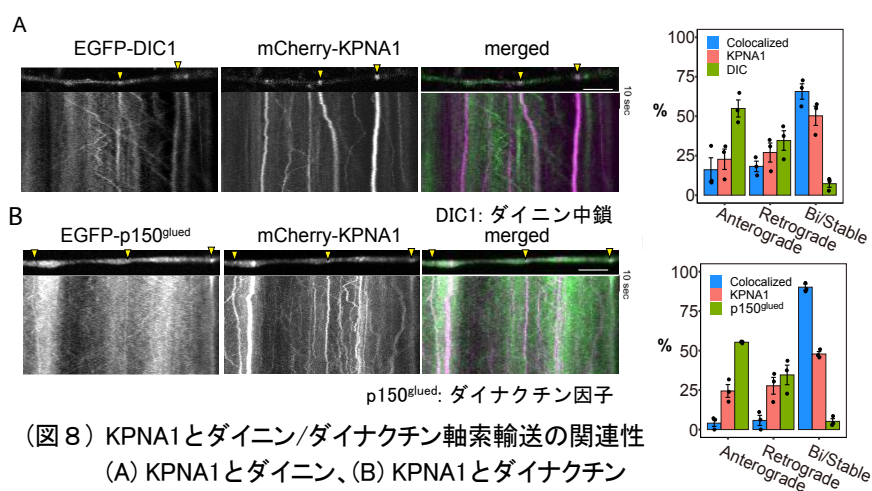
次に、KPNA1 と微小管モーター複合体の関連性を調べるために、KPNA1 抗体と DIC1 抗体および KHC 抗体との二重免疫染色を行った (図 7)。これらの結果は、DRG ニューロン軸索領域での KPNA1 と細胞質ダイニンとの間において、限られた数ではあるが相互作用の可能性を示唆するのであった (図 7A)。一方、KHC の染色では、DRG ニューロン軸索における KPNA1 との明確な共局在は見られなかった (図 7B)。



(図 7) KPNA1と分子モーターの免疫二重染色

(A) KPNA1と細胞質ダイニン (C) KPNA1とキネシン

さらに、KPNA1 の軸索内での運動性と分子モーター複合体との関係を解析するために、ダイニンまたはそのアクセサリタンパク質のダイナクチン p150^{glued} との蛍光融合タンパク質、EGFP-DIC1 や EGFP-p150^{glued} を DRG ニューロンに過剰発現させて二重ライブイメージング実験を行

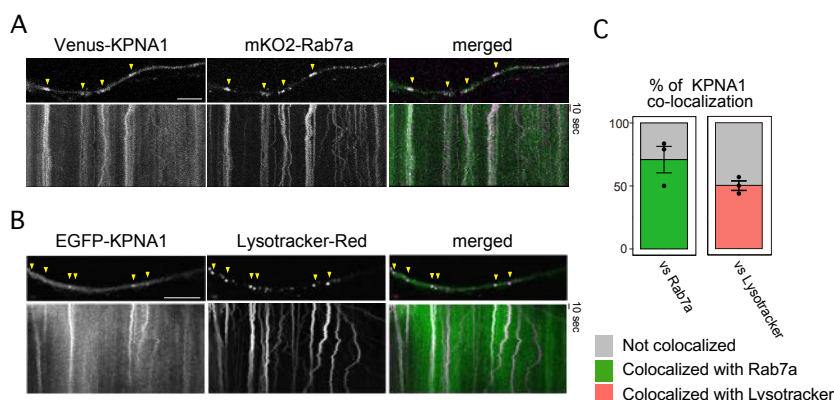


(図 8) KPNA1とダイニン/ダイナクチン軸索輸送の関連性 (A) KPNA1とダイニン、(B) KPNA1とダイナクチン

った。その結果、EGFP-DIC1 および EGFP-p150^{glued} と軸索領域における共挙動する mCherry-KPNA1 は、均一な速度での比較的遅い移動性を示した (図 8A & B)。これらの所見は、KPNA1 がダイニンおよびダイナクチン複合体と直接的および間接的なメカニズムで挙動を共にし、分子モーターによる遅い輸送を受けることを示唆している。

2. 4. 軸索 KPNA1 と軸索エンドソーム/リソソーム小胞の共挙動

軸索性インポーチンの輸送は、非小胞系逆行性輸送と関連している^[8]。しかしながら、軸索性 KPNA1 の運動パターンは不均一であり、かなりの割合が双方向への運動を示し、その移動は逆行性輸送に限定され



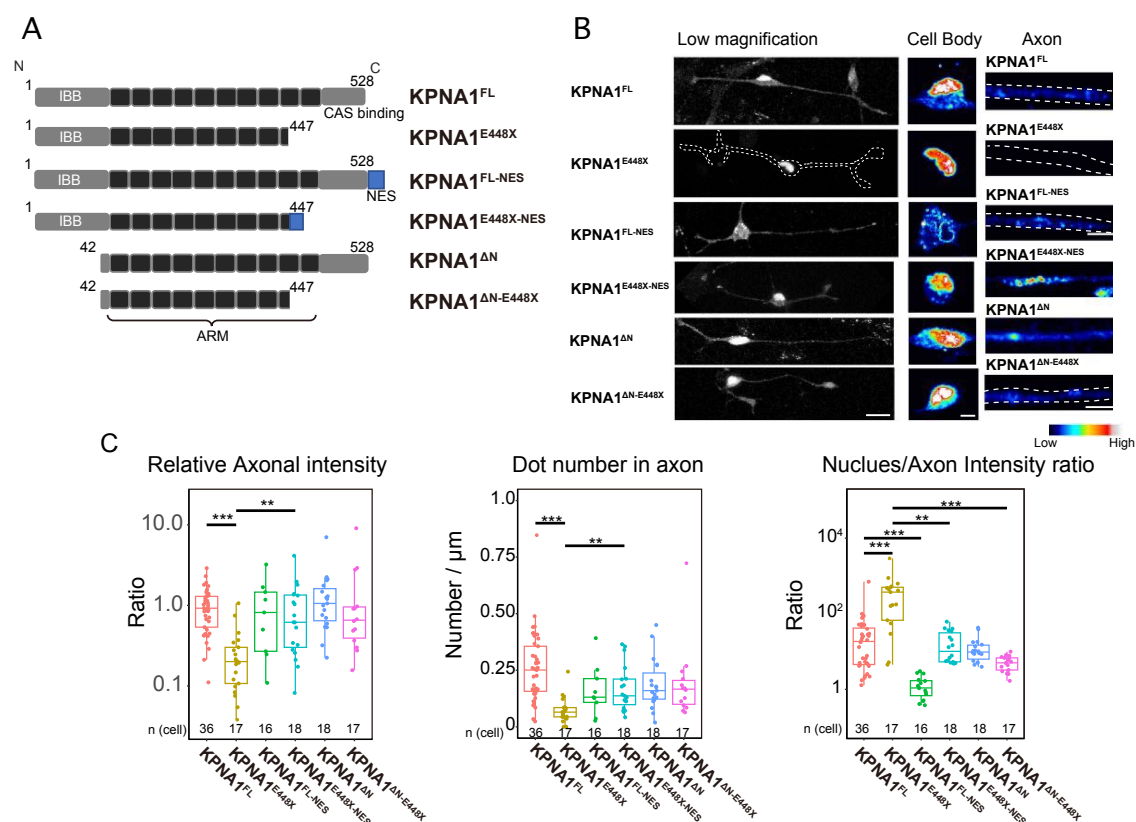
(図 9) 軸索性KPNA1と小胞輸送複合体の解析
(A) KPNA1とRab7a、(B) KPNA1とリソソーム、(C) 定量化データ

ないことが明らかになった。そこで私たちは、軸索性 KPNA1 と他の軸索輸送複合体との関連性を調べるため、一般的に双方向への輸送が見られる小胞カーゴに注目した。KPNA1 が小胞と結合しているかどうかを評価するために、後期エンドソームのマーカである mKO2-Rab7a、またはリソソームを標識する LysoTracker-red を用いて、Venus/EGFP-KPNA1 のライブセルイメージングを行った。カイモグラフ解析より、Rab7a およびリソソームは KPNA1 と比較的類似した運動パターンと共挙動を示した (図 9A&B)。定量分析の結果、Rab7a とリソソームの両方の蛍光スポットの 50%以上が KPNA1 との共挙動を示す高値であった (図 9C)。これらより、KPNA1 の一部は小胞を Cargo として一緒に輸送されること、軸索性インポーチンが小胞と非小胞の両方の複合体に包含している可能性が示唆された。

2. 5. 統合失調症患者型 KPNA1 変異体のその機能解析

統合失調症患者のエクソソームスクリーニングにより、KPNA1 に *de novo* ナンセンス変異・KPNA1E448X が同定された^[9]。そこで私たちは、DRG ニューロンに mCherry-KPNA1E448X などの各種 KPNA1 変異を過剰発現させて、軸索内での局在と運動性について調べた (図 10A&B)。KPNA の相対的な蛍光強度を比較すると、KPNA1E448X では核/軸索の蛍光強度比が 100 を超え、KPNA1FL (FL: full length)の約 10.0 よりも有意に高値を示し、KPNA1 の著しい核への蓄積と軸索領域での KPNA1 の消失が確認された (図 10C)。KPNA の C 末端は、その核外輸送因子 CAS/exportin2 との結合領域であることから^[10]、こ

の核内での異常なタンパク質の蓄積は、KPNA1の核外輸送の消失によるものと考えられる。そこで、*Kpna1* 遺伝子に別の核外輸送因子 CRM1/exportin1 によって認識されるプロテインキナーゼ阻害剤 (PKI: protein kinase inhibitor) の核外輸送配列 (NES) を連結させたキメラ遺伝子を作製し、この付加によって KPNA1E448X の軸索部分への局在が回復するかどうかを調べた^[11]。KPNA1FL の C 末端に NES を結合させた KPNA1 (KPNA1FL-NES) と E448X (KPNA1E448X-NES) は共に軸索領域に局在し、それらの相対強度およびスポット数は、KPNA1FL との間で有意な差は見られなかった (図 10B&C)。KPNA1FL-NES では核からタンパク質が消失しており、KPNA1 に対する CAS あるいは CRM1 による核外輸送の活性により、蛍光融合タンパク質は核外へと輸送されたことが示唆された。さらに、IPOB1 との結合領域である N 末端 41 アミノ酸が欠失した KPNA1DeltaN および KPNA1DeltaN-E448X を作製し同様に解析したところ、両者ともに相対的な軸索での KPNA1 の強度やスポット数は全長タンパク質と有意差は見られなかった (図 10C)。しかしながら、核と軸索の比率は、KPNA1E448X よりも KPNA1DeltaN-E448X の方が有意に低かったことから、KPNA1E448X の異常蓄積には、KPNA1 の IBB ドメイン (Importin β 結合領域) への IPOB1 の結合が必要であることが示唆された。

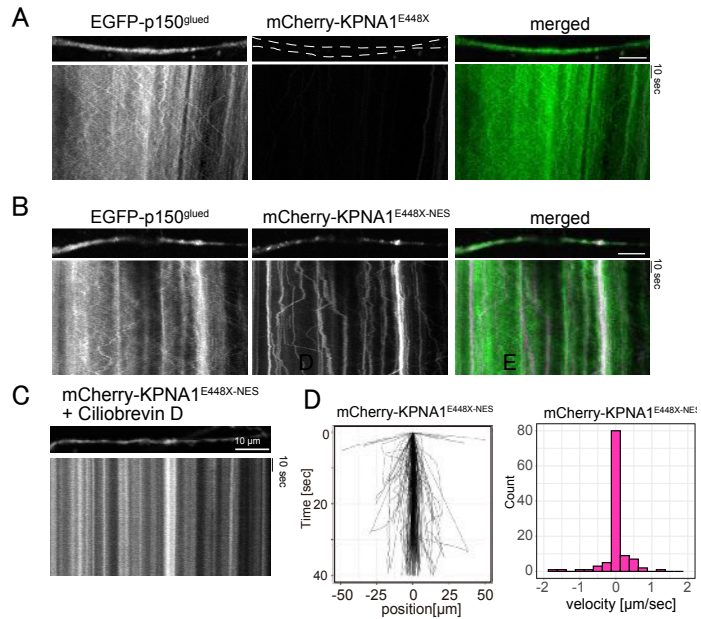


(図10) KPNA1変異体の機能解析

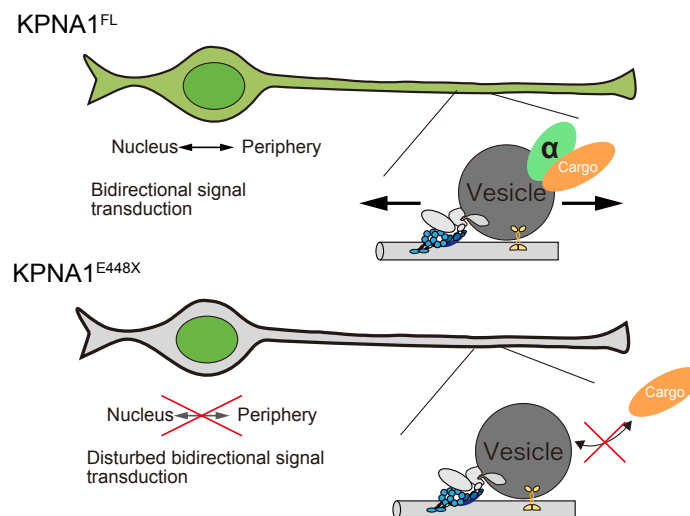
(A) 各種KPNA1変異体、(B) KPNA1変異体の局在、(C) 定量化データ

2.6. NES 配列付加による変異型 KPNA1E448X の軸索輸送の回復

軸索領域における KPNA1E448X-NES の運動性を解析するために、mCherry-KPNA1E448X-NES ライブイメージングを行った。軸索の KPNA1 がほとんど失われた KPNA1E448X とは対照的に、mCherry-KPNA1E448X-NES を発現している DRG ニューロンでは、軸索の運動スポットが観察された (図 11A&B)。カイモグラフを用いて解析した KPNA1E448X-NES の軌跡と速度ヒストグラムは



(図11) PKI-NES配列付加によるKPNA1^{E448X}変異体の機能回復 KPNA1FL と類似しており、軸索に沿って比較的安定したスポット移動性を示した (図 11D)。さらに、シリオブレビン D を添加すると、KPNA1FL で観察されたのと同様に、KPNA1E448X-NES の運動性は停止した。この結果は、KPNA1E448X-NES の運動性が、KPNA1FL タンパク質で観察されたような分子モーター活性に依存していることを示している。一方で、KPNA1E448X への NES 配列の付加は、KPNA1 の異常局在を改善し軸索領域におけるダイニン/ダイナクチン複合体および Rab7a との会合を確認できたことから、統合失調症患者型 KPNA1 変異体 (KPNA1E448X) に核外輸送配列を付加することでのその機能回復が期待される (図 12)。



(図12) 統合失調症患者型のKPNA1変異(E448X) の模式図

3. おわりに

今回の研究では、軸索性インポーチンの KPNA1 の分子動態と、統合失調症に関連する変異による局在の変化について新たな知見が得られた。また、軸索性の KPNA1 と IPOB1 は、核一細胞質間の物質輸送を担う場合とは異なる輸送複合体を形成していることが示唆された。さらに、KPNA1 の軸索輸送には、細胞質ダイニンやキネシンといった微小管分子モーターが深く関わっていることが明らかとなった。さらに、KPNA1 は、小胞系/非小胞系を含む予想外のパートナーとも結合しており、独自の軸索内輸送が示されたことは興味深く、軸索性インポーチンの役割についての理解が深まった。今回の研究は主に末梢神経系に焦点を当てて行われたが、中枢神経系の発達や精神疾患の理解にもつながる重要な知見と考えられる。さらなる解析は必要であるが、短い DNA 配列の追加によって局在異常およびその分子機能の改善が見込めることから、精神疾患や神経変性疾患の発症に共通する分子メカニズムについて、より深い理解が求められると共に新しい治療法の開発に期待が寄せられる。

4. 謝辞

本研究成果は、公益財団法人蓬庵社からの4年間に渡る研究助成により成し得たものです。武田禮二理事長をはじめ、財団関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。また、本研究助成にご推薦いただきました一般財団法人阪大微生物病研究会理事長の米田悦啓先生に心より感謝申し上げます。本研究は、福井大学学術研究院医学系部門分子生体情報学分野の水野克俊助教と大学院生の菅原将樹君をはじめスタッフ・大学院生・事務補佐員の皆様、ならびに国内外の共同研究者のご支援により得られたものであり、ここに深く感謝の意を表します。

5. 参考文献

- [1] Hosokawa K., Nishi M., Sakamoto H., Tanaka Y., Kawata M.
Regional distribution of importin subtype mRNA expression in the nervous system: Study of early postnatal and adult mouse.
Neuroscience (2008)157, 864–877. doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.09.045
- [2] Oka M., Yoneda Y. Importin α : Functions as a nuclear transport factor and beyond.
Proc Japan Acad Ser B Phys Biol Sci (2018) 94, 259–274. doi.org/10.2183/pjab.94.018
- [3] Panayotis N., Sheinin A., Dagan S.Y., Tsoory M.M., Rother F., Vadhvani M., Meshcheriakova A., Koley S., Marvaldi L., Song D.A., Reuveny E., Eickholt B.J., Hartmann E., Bader M., Michaelevski I., Fainzilber M.
Importin $\alpha 5$ regulates anxiety through MeCP2 and sphingosine kinase 1.
Cell Reports (2018) 25, 3169–3179.e7. doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.066
- [4] Nomiya H, Sakurai K., Miyamoto Y., Oka M., Yoneda Y., Hikida T., **Yamada M.**
A Kpna1-deficient psychotropic drug-induced schizophrenia model mouse for studying

gene-environment interactions.

Sci Rep (2024) Feb 9;14(1):3376. doi: 10.1038/s41598-024-53237-3

- [5] Nomiya H, **Yamada M.**
Interactions between genetic and environmental factors and schizophrenia: Insights from *KPNA1-deficient* mice.
J Neurol Neuromed (in press)
- [6] Sakurai K., Itou, T., Morita M., Kasahara E., Moriyama T., MacPherson T., Ozawa T., Miyamoto Y., Yoneda Y., Sekiyama A., Oka M., Hikida T.
Effects of Importin α 1/KPNA1 deletion and adolescent social isolation stress on psychiatric disorder-associated behaviors in mice.
PLoS One (2021) 16, 1–23. doi.org/10.1371/journal.pone.0258364
- [7] **Yamada M.**, Toba S, Yoshida Y, Haratani K, Mori D, Yano Y, Kiyosue YM, Nakamura T, Itoh K, Fushiki S, Setou M, Wynshaw-Boris A, Torisawa T, Toyoshima YY & Hirotsune S
LIS1 and NDEL1 coordinate the plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein.
EMBO J (2008) Vol.27(19), pp2471-2483
- [8] Terenzio M., Koley S., Samra N., Rishal I., Zhao Q., Sahoo P.K., Urisman A., Marvaldi L., Oses-Prieto J.A., Forester C., Gomes C., Kalinski A.L., Di Pizio A., Doron-Mandel E., Perry R.B., Koppel I., Twiss J.L., Burlingame A.L., Fainzilber M.
Locally translated mTOR controls axonal local translation in nerve injury.
Science (2018) 359, 1416–1421. doi.org/10.1126/science.aan1053
- [9] Girard S.L., Gauthier J., Noreau A., Xiong L., Zhou S., Jouan L., Dionne-Laporte A., Spiegelman D., Henrion E., Diallo O., Thibodeau P., Bachand I., Bao J.Y.J., Tong A.H.Y., Lin C.H., Millet B., Jaafari N., Joober R., Dion P.A., Lok S., Krebs M.O., Rouleau G.A.
Increased exonic de novo mutation rate in individuals with schizophrenia.
Nat Genet (2011) 43, 860–863. doi.org/10.1038/ng.886
- [10] Herold A., Truant R., Wiegand H., Cullen B.R.
Determination of the functional domain organization of the importin α nuclear import factor.
J Cell Biol (1998) 143, 309–318. doi.org/10.1083/jcb.143.2.309
- [11] Wen W., Meinkoth J.L., Tsien R.Y., Taylor S.S.
Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus.
Cell (1995) 82, 463–473. doi.org/10.1016/0092-8674(95)90435-2

: 尚、以下の原著論文(1報)を現在投稿中である。

Mizuno K., Sugahara M., Kato R., Itoh T., Fujita S., **Yamada M.**
Analysis of axonal importin KPNA1 motility and the effects of mutations associated with the onset of psychiatric disorder.
Neurobiol Dis (under revision)

生体内異種細胞間相互作用に着目したパーキンソン症候群新規治療ストラテジーの創出

大阪大学大学院医学系研究科 創薬神経科学共同研究講座/分子神経科学講座

糸数 隆秀

小胞輸送障害により生じる新規疾患の病態解明と、 幅広いリソソーム病治療法開発への応用

川崎医科大学 医学部 分子遺伝医学教室
大友 孝信

1. はじめに

リソソームは酸性の細胞小器官(オルガネラ)で、細胞内外からオートファジーやエンドサイトーシスで運ばれてくる物質の分解を担っている。リソソーム酵素の遺伝子変異により分解活性が低下すると、主に小児期に発症するリソソーム病となる。リソソーム病には欠損酵素の種類によって 40 以上の疾患が含まれる¹が、多くには未だ治療法が存在せず、希少難病である(指定難病 19、小児慢性特定疾病 75~102)。

我々は近年、リソソーム病と臨床像が酷似するが診断がつかない患者に対して網羅的遺伝子解析を行ったところ、*VPS33A* 遺伝子に変異を同定した²。*VPS33A* はオートファジーやエンドサイトーシスの小胞をリソソームへ輸送するために必要な小胞輸送複合体を構成する分子であった。また、この患者ではリソソーム酵素自体の遺伝子には異常はなかった。我々の発見から「リソソームへの基質の輸送」と「リソソームでの基質の分解」という一連の代謝経路(の障害)と臨床症状とのリンクが示唆されたのである。この新規疾患はリソソーム病のひとつであるムコ多糖症と症状が類似し、プラスアルファの症状も認めるため、ムコ多糖症プラス症候群(Mucopolysaccharidosis Plus Syndrome, MPSPS, OMIM #617303)と命名された³。

本研究助成において我々は MPSPS に関する以下の 3 つのプロジェクトを提案し、遂行した。

- ① *VPS33A* がムコ多糖の代謝に寄与するメカニズムの解明
- ② 変異 *VPS33A* をターゲットとした MPSPS の創薬
- ③ *VPS33A* を含む小胞輸送複合体によるエンドサイトーシスの新しい制御機構の解明

このうち①、②についての進捗をそれぞれ第 3 項、第 4 項で示すが、未発表・特許関連データが含まれるため、一部マスクし概説にとどめることをご了承いただきたい。③については、第 5 項、第 6 項にて詳細に説明する。

2. Mucopolysaccharidosis Plus Syndrome (MPSPS)

MPSPS の症例は、リソソーム病のムコ多糖症やムコリピドーシスと類似する症状を有するが診断がつかなかった家系に対して全エクソーム解析を実施し、原因遺伝子 *VPS33A* を同定したものである²。本疾患は常染色体潜性(劣性)遺伝性で、患者は全員 c.1492C>T(p.R498W)変異を両アレル(ホモ接合体)で有していた。古典的なムコ多糖症と類似した特徴的な顔貌、骨変形や関節拘縮、肝臓・

脾臓の腫大などの症状に加え、腎不全、造血不全を呈し、生命予後は重篤である【図 1】。血中のムコ多糖は上昇しており、ムコ多糖の代謝経路に障害があることが古典的なムコ多糖症同様の症状を引き起こす原因であると考えられるが、その他のプラス症状（腎不全、造血不全）のメカニズムは不明である。我々は本疾患について継続的に症例を集積し、臨床像を報告している^{4,5,6}。特に腎の組織所見では脂質代謝



【図 1】 MPSPS の所見

特徴的顔貌、骨の変形腎不全、造血障害などを呈す。

特徴的顔貌、骨の変形腎不全、造血障害などを呈す。特徴的顔貌、骨の変形腎不全、造血障害などを呈す。特徴的顔貌、骨の変形腎不全、造血障害などを呈す。

我々は MPSPS の病態に関する細胞生物学的な解析も進めている。VPS33A は小胞輸送に重要な分子であるため、本分子の異常はオートファジーやエンドサイトーシスの広範な破綻を引き起こし、その結果、リソソームで代謝されるべき物質が代謝されずに蓄積する（疾患となる）ことが予想される。しかし、驚くべきことに MPSPS 患者皮膚線維芽細胞におけるオートファジーやエンドサイトーシス機能は正常であった。つまり、本疾患では、(i) 細胞内小胞輸送に関わる分子の遺伝子異常があるにも関わらず、細胞の小胞輸送機能は保たれており、(ii) ムコ多糖を代謝するリソソーム酵素は欠損しておらず、ムコ多糖をリソソームへ小胞輸送する機能も保たれているようであるが、実際に患者ではムコ多糖が蓄積している。この一見矛盾するような表現型に本疾患を理解するためのクエスチョンが残されている。この課題の解決は、MPSPS の病態理解のみならず、他のリソソーム病との関連を明らかにし、治療法開発への足掛かりとなることが期待される。

3. VPS33A の変異によって相互作用が変化する分子の同定

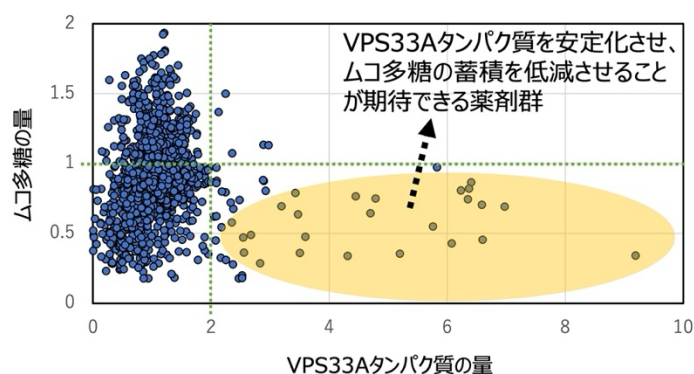
本研究項目の詳細については、研究の新奇性保護の観点から公表を控えさせていただきます。

4. MPSPS 治療薬候補のスクリーニング

我々の先行研究から変異 VPS33A 分子は不安定であることが明らかになっている（未発表）。また患者変異はオートファジーやエンドサイトーシスの機能に大きな影響を与えないことが示唆されている。そこで我々は変異型 VPS33A タンパク質を安定化させることが MPSPS の治療法につながるのではないかと考えた。一方で、単純に細胞内の VPS33A 量を増加させるのみで細胞機能を低下させる

可能性がある(例えば分解を止める、凝集体を形成するなどの)薬剤は治療薬候補とはならない。今回我々は、(i)変異 VPS33A 量を増加させる、(ii)ムコ多糖を減少させる、の2つのパラメーターを用いてFDA承認薬1970種類から効果のある薬剤をスクリーニングした。

結果を【図4】に示す。各点は個々の薬剤を示す。縦軸は、ムコ多糖の一種であるヘパラン硫酸のコアタンパク質にタグをつけて発現させ蛍光染色を可能とし、薬剤処理前後のヘパラン硫酸量の変化をfold値で示したものである。横軸は、変異VPS33AにLuciferaseを結合させて発現させ、薬剤処理前後の変異VPS33A量の変化をfold値で示したものである。右下の領域にプロットされる薬剤がMPSPSの候補薬剤となる。現在これら選択された薬剤の効果をセルラインや患者細胞にて確認中である。



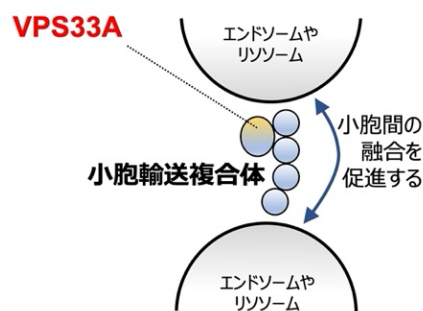
【図4】 FDA承認薬(1970種類)のスクリーニング結果
(薬剤名は示していません)

我々はMPSPSモデルマウスの作出にも挑戦している。CRISPR/Cas9を用いて、ヒトVPS33A遺伝子p.R498W変異に相当するマウスVps33a遺伝子p.R500W変異をマウス受精卵へ導入し、p.R500W変異を持つヘテロ個体までが得られている。しかし、このヘテロ個体のいくつかにはMPSPSとは無関係と考えられる症状を示す個体がランダムに出現し、ヘテロ同士の交配の妊孕性も低いという問題が生じている。CRISPR/Cas9で行なったノックインの過程でのオフターゲット変異の可能性を考え、現在、純系のC57BL/6マウスへバッククロスをしているところである。安定して妊娠が確認される状態になれば、ヘテロ変異個体同士を掛け合わせてMPSPSモデルマウスを得て、全身組織の解析および治療実験を行う。前述の通り、FDA承認薬からのスクリーニングであるため、治療効果が明確であった際にはドラッグリポジショニングのスキームで臨床応用へも展開しやすい。

5. VPS33Aを含む新規小胞輸送複合体(Hybrid型)の同定

MPSPSの原因遺伝子でもあるVPS33AはVPS33Aタンパク質をコードし、他のVPSタンパク質(16、18、11、41、39、8、3)と複合体を形成して小胞輸送複合体を構成する⁹【図5】。

HOPS(homotypic fusion and vacuole protein sorting)はオートファゴソームとリソソームの小胞間をテザリングする(稽留する、繋ぎ止める)ことでそれら小胞間の融合を促進する。CORVET(class C core endosomal vacuole tethering)は初期エンドソーム間のテザリングを促進し、エンドソームの成熟に

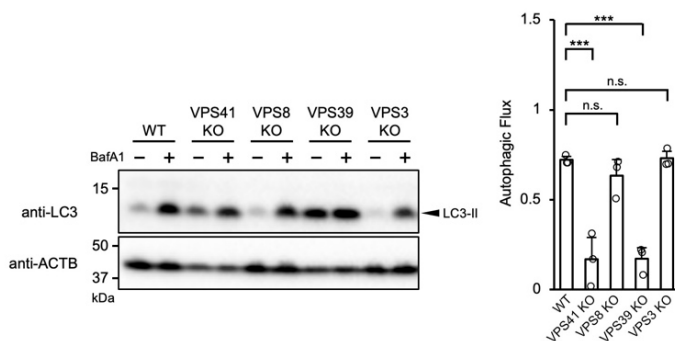


【図5】 小胞輸送複合体

寄与する【次ページ 図 6】。しかしこれら小胞輸送複合体の機能が完全に解明されたわけではなく、近年もリサイクル小胞系への関与などの発見が続いている¹⁰。

我々はこれら VPS 分子に注目し、HeLa 細胞において CRISPR/Cas9 を用いて VPS 遺伝子群をノックアウト(KO)し、オートファジーに与える影響を検討した。HOPS と CORVET は VPS33A、16、18、11 から構成されるコアとなる部分(class C core)を共通に有し、端側にそれぞれ異なる VPS 分子が結合している【次ページ 図 6】。

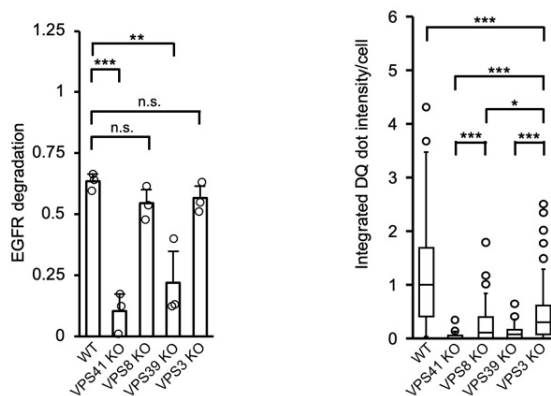
VPS41 KO や VPS39 KO では HOPS が形成されずオートファジーの機能が障害されると予想され、その通りの結果であった【図 7】。一方で、既報においても CORVET のオートファジーへの寄与は明らかではなく、我々の解析においても VPS8 KO や VPS3 KO でオートファジーの機能は保たれていた【図 7】。



【図 7】 VPS KO 細胞におけるオートファジー

続いて我々は同様にエンドサイトーシスの機能を解析した。EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) に注目した解析では、HOPS が構成されない VPS41 KO や VPS39 KO でエンドサイトーシスが停止し、CORVET が構成されない VPS8 KO や VPS3 KO ではエンドサイトーシスは正常であった。従って、受容体介在性エンドサイトーシスはオートファジー同様 HOPS 依存性に制御され、CORVET の寄与は明らかではなかった【図 8・左】。

しかし、別のエンドサイトーシス様式であるマクロピノサイトーシスに注目し、蛍光標識を付加した BSA (Bovine serum albumin) を追跡すると、VPS41 KO や VPS39 KO でエンドサイトーシスは停止するが、VPS3 KO や VPS8 KO においてもエンドサイトーシスは低下し、さらに VPS3 KO と VPS8 KO 間においても差が認められた【図 8・右】。この結果は、マクロピノサイトーシスは HOPS に依存するものの、HOPS のみではなく別の輸送複合体によっても制御されていることを示唆する。「別の輸送複合体」が CORVET であると仮定した場合、VPS3 KO と VPS8 KO とでは同程度に機能が障害されると予想されるが、今回マクロピノサイトーシスは VPS8 KO では VPS3 KO よりも有意に低下していたことから、「別の輸送複合体」が CORVET であるとは断定できな



【図 8】 VPS KO 細胞におけるエンドサイトーシス

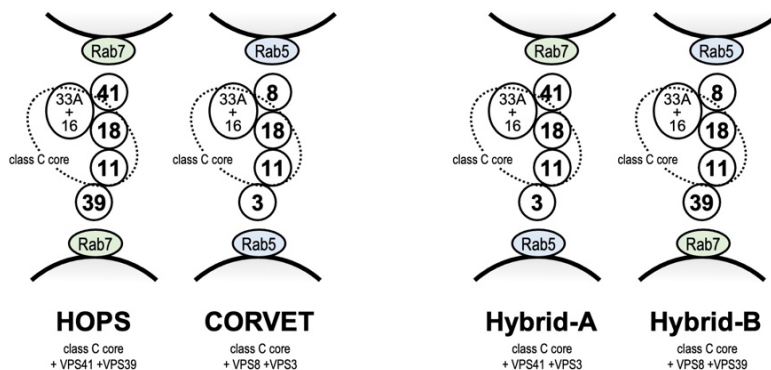
左: レセプター介在性エンドサイトーシス

右: マクロピノサイトーシス

蛍光物質 DQ は、バックボーン(この場合は BSA) がリソソームなどで分解を受けると蛍光を発するようになる。

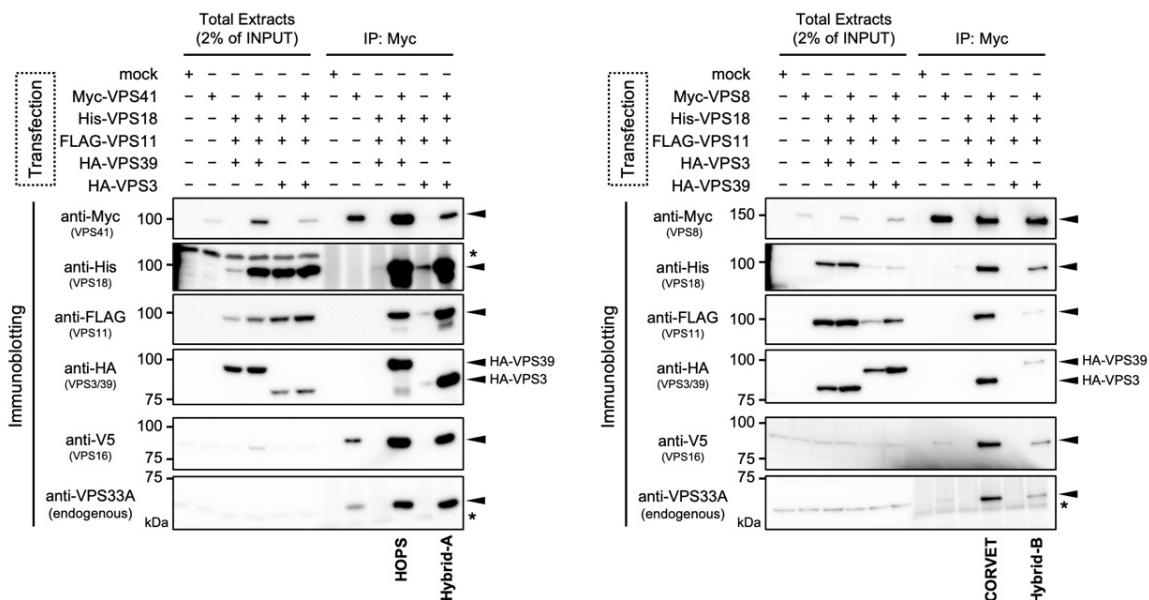
い。そこで我々は HOPS と CORVET の一部の VPS 分子が入れ替わった Hybrid 型の小胞輸送複合体の存在を想定した【図 6】。

我々が想定した Hybrid 型の小胞輸送複合体の構造は class C core に加えて、VPS41 + VPS3 を持つもの (Hybrid-A) と、VPS8 + VPS39 を持つもの (Hybrid-B) である。我々はこれらの存在を、3 つの方法、(i) 小胞間をブリッジする部分の 4 つの VPS 分子を同時に強発現し、一側から免疫沈降しもう一側を検出する方法、(ii) 小胞輸送複合体の一侧の



【図 6】 小胞輸送複合体 (丸の中の数字は VPS 分子番号を示す)
 左 2 つ: 既知の小胞輸送複合体 HOPS と CORVET
 右 2 つ: 我々が想定し同定した Hybrid 型の小胞輸送複合体 A と B

VPS を強発現して免疫沈降し、結合してくる内因性の分子を質量分析計で検出する方法、(iii) 完全に内因性の小胞輸送複合体を免疫沈降で検出する方法で検証した。その結果、Hybrid 型の 2 種類の小胞輸送複合体が確かに形成されていることが確認された【図 9】。Hybrid 型の小胞輸送複合体は酵母において形成される可能性が示されている¹¹が、哺乳類細胞で実際 intrinsic に形成されていることを示したのは初めてである。

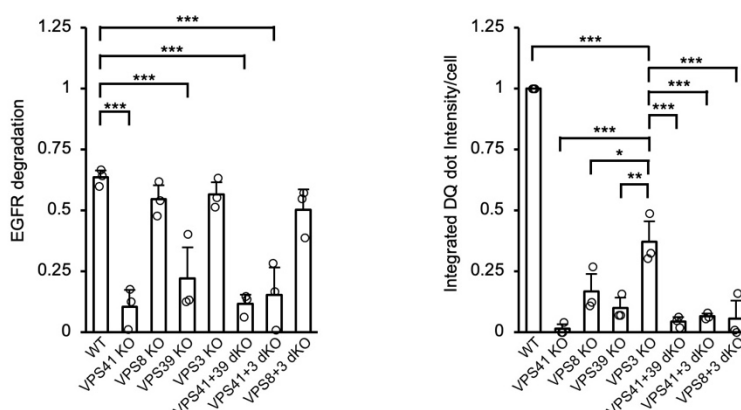


【図 9】 免疫沈降による、4 つの小胞輸送複合体の存在の確認

6. Hybrid 型の小胞輸送複合体が制御するエンドサイトーシスの様式

前述した、受容体介在性エンドサイトーシスとマクロピノサイトーシスが異なる制御を受けている事実に対し、Hybrid 型の小胞輸送複合体の寄与を調べた。我々は CRISPR/Cas9 を使い、VPS 分子を 2 つ同時に欠損するダブルノックアウト (dKO) 細胞を作製し、実際に VPS41+39 dKO、VPS41+3 dKO、VPS8+3 dKO 細胞を得ることができた。端側の 4 種類の VPS 分子のうち 2 種類を同時に欠損させると、4 つの小胞輸送複合体のうち 3 つを欠損させることが可能となり、残る 1 つの複合体のみを残存させた状態を観察することができる。具体的には VPS41+39 dKO 細胞では CORVET のみが残存、VPS41+3 dKO 細胞では Hybrid-B のみが残存、VPS8+3 dKO 細胞では HOPS のみが残存していると推測される。

オートファジーと受容体介在性エンドサイトーシスは VPS8+3 dKO 細胞で保たれており、やはり HOPS 依存性のプロセスであることが確認できた【**図 10・左**】。マクロピノサイトーシスは、HOPS のみの存在下 (VPS8+3 dKO 細胞) や Hybrid-B のみの存在下 (VPS41+3 dKO 細胞) では停止しており、HOPS と Hybrid-B 両方の存在下 (VPS3 KO 細胞) で駆動されていた【**図 10・右**】。ただし、HOPS と Hybrid-B 両方が存在する状況においても完全野生型に比べるとマクロピノサイトーシスによる分解能力は低下しており、そこに CORVET や Hybrid-A の寄与が示唆される。HOPS と Hybrid-A 両方の存在下 (VPS8 KO 細胞) でも駆動されるが、Hybrid-B に比べて Hybrid-A の寄与は小さいと考えられる。

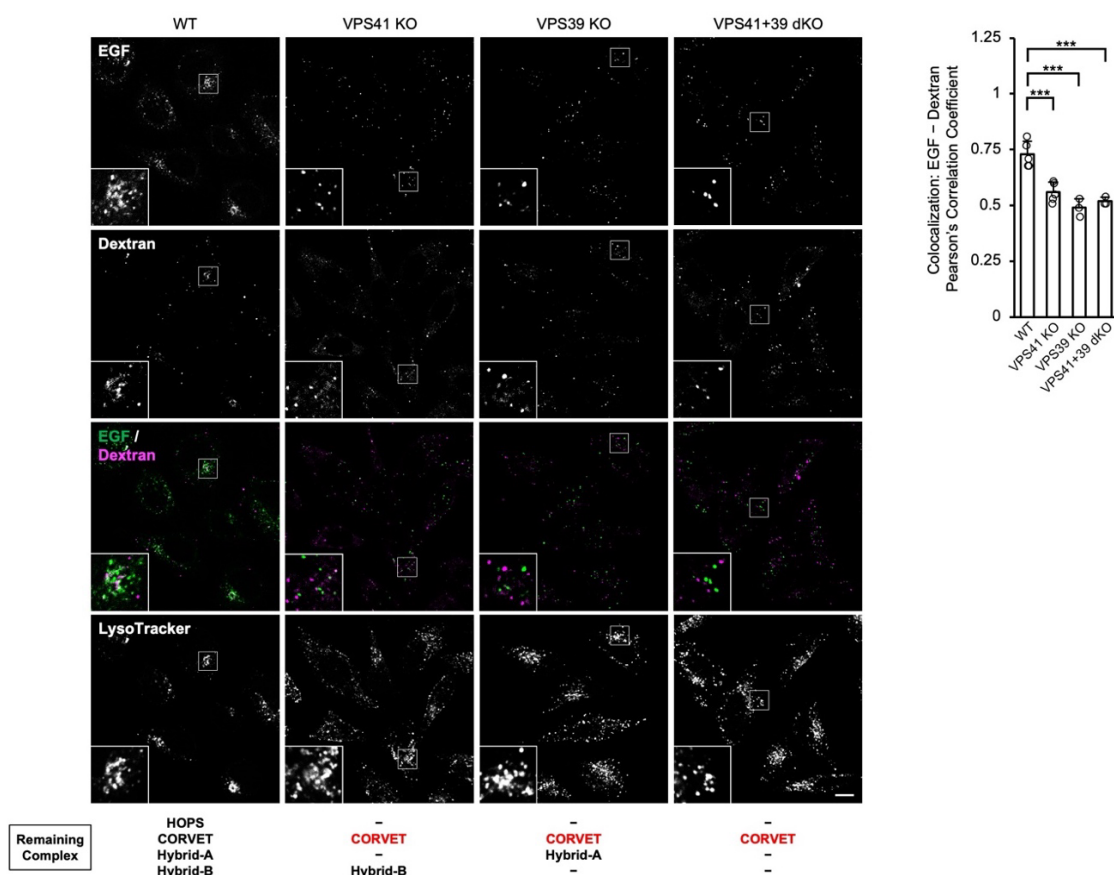


【**図 10**】 VPS KO (dKO 含む) 細胞におけるエンドサイトーシス

左: EGFR を指標としたレセプター介在性エンドサイトーシス
右: 蛍光標識した BSA を指標としたマクロピノサイトーシス

このように受容体介在性エンドサイトーシスとマクロピノサイトーシスは異なった小胞輸送複合体で制御されることが明らかになった。しかし、教科書的なエンドサイトーシス経路によると、様々な様式で積荷が細胞内へ取り込まれた後一旦合流し、その後リソソームや形質膜などの目的地へ向けてソートされるため、我々のモデルは説明がつかない。そこで、受容体介在性エンドサイトーシスで取り込まれた積荷とマクロピノサイトーシスで取り込まれた積荷が一体合流するのかどうかを確認するため、蛍光ラベルした EGF (受容体介在性エンドサイトーシスの積荷) と、異なる蛍光色素でラベルしたデキストラン (マクロピノサイトーシスの積荷) を同時に細胞へ取り込ませ追跡した。この実験においては、リソソームへ到達する途中の経路の合流を観察するため、HOPS を欠損した細胞 (VPS41 KO、VPS39 KO、VPS41+39 dKO) を使用した。

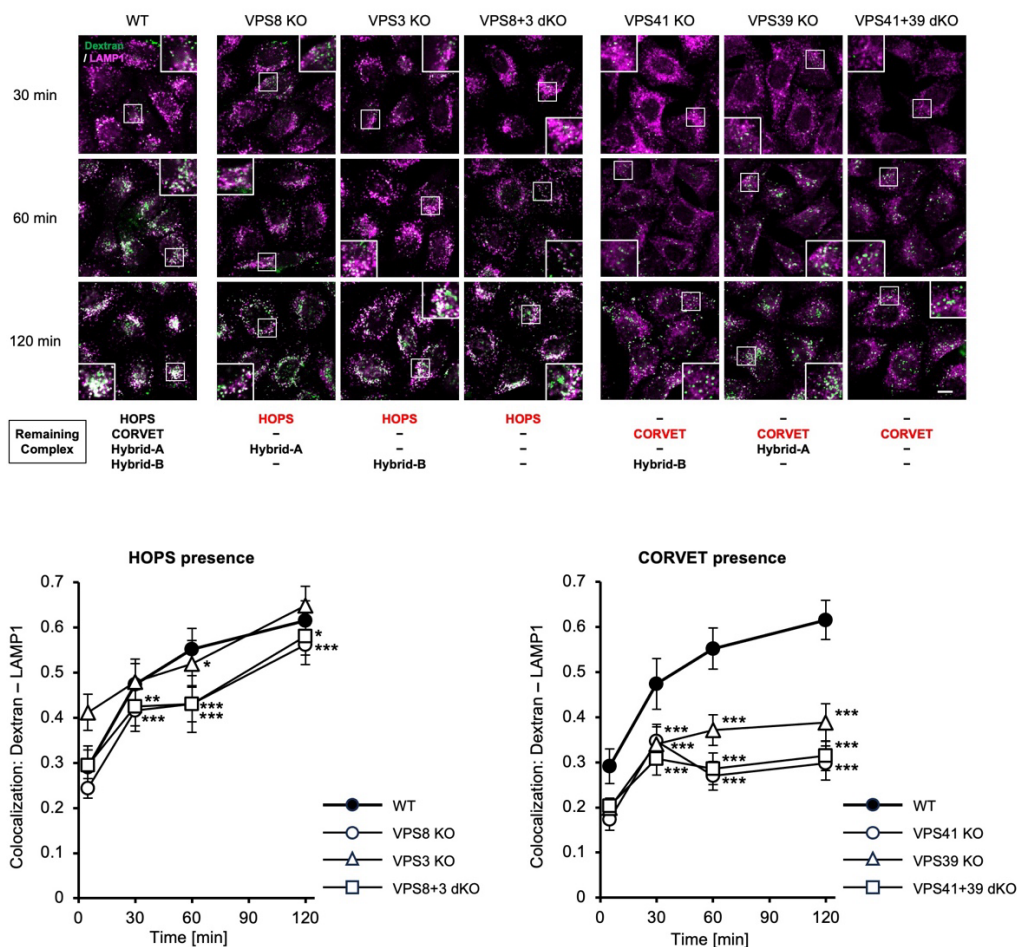
野生型細胞では 1 時間後に EGF とデキストランが同じ場所に存在し、リソソームのマーカースとも一致した。つまり、双方の積荷共に細胞内に取り込まれリソソームまでエンドサイトーシスされたと考えられる。HOPSを欠損する細胞ではいずれも、EGFとデキストランの共局在率は野生型に比べて低く、またリソソームとのマーカースとも一致していなかった【**図 11**】。このことから、後期エンドソームとリソソームの融合を止めた細胞において、通常であればリソソームまで到達するべき十分な時間を観察しても、受容体介在性エンドサイトーシスとマクロピノサイトーシスの積荷は合流しないことが示され、細胞内に取り込まれると早期に合流する教科書的なモデルとは異なることが示唆された。



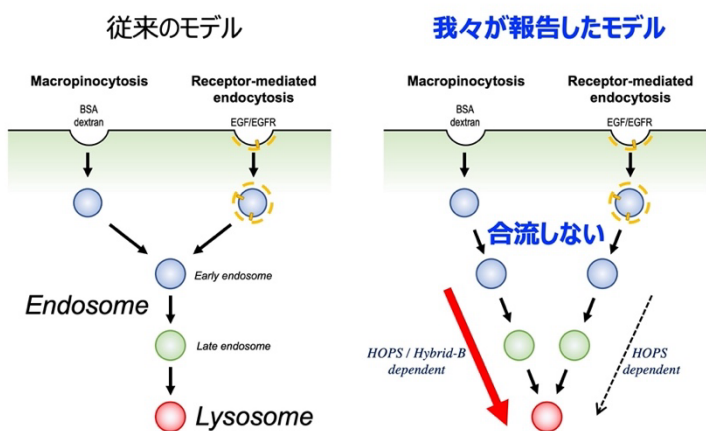
【**図 11**】 レセプター介在性エンドサイトーシスとマクロピノサイトーシスの積荷の合流

マクロピノサイトーシス経路の制御における HOPS と Hybrid-B の寄与を明確にするため、dKO 細胞を用いタイムコースで積荷のリソソームへの到達を追跡した。HOPS のみ存在 (VPS8+3 dKO)、HOPS と Hybrid-A が存在する場合 (VPS8 KO) においても、時間経過と共に積荷はリソソームへ到達するが、野生型に比べてリソソームへの到達は遅延する。一方で、HOPS と Hybrid-B が存在すれば (VPS3 KO)、野生型と同等に積荷がリソソームへ輸送されることが判った【**次ページ 図 12・左**】。HOPS が存在しない系においては、積荷はリソソームへ到達することができない【**次ページ 図 12・右**】。これによりマクロピノサイトーシス経路における Hybrid-B の働きが明確となった。酵母における Hybrid 型の小胞輸送複合体は単なる HOPS と CORVET の中間体という位置づけである¹¹が、今回

哺乳類細胞において明確に Hybrid の機能を示したことは重要な発見である【図 13】。



【図 12】 小胞輸送複合体の有無と、ピノサイトーシスの積荷のリソソームへの輸送(タイムコース)



【マクロピノサイトーシス経路(左矢印)は Hybrid-Bにより制御される】

【図 13】 まとめの図

新規に同定した Hybrid 型の小胞輸送複合体が、レセプター介在性エンドサイトーシスとは独立してピノサイトーシス経路を制御する。

7. おわりに

今回、MPSPS や VPS33A 分子に関連した基礎研究、臨床研究、トランスレーショナル研究を幅広く展開した。エンドサイトーシスの様式とその制御に関する新しい知見は生物の普遍的なメカニズムである小胞輸送において重要な意義を有する。また現在進行中の研究においても有望な結果が得られており、今後重要な成果が当該領域にもたらされることが期待される。

8. 謝辞

本研究は、川崎医科大学分子遺伝医学教室のスタッフである寺脇正剛博士、森脇隆仁博士、日本学術振興会外国人特別研究員 Filipp Vasilev 博士、ならびに技術補佐員の多大なるサポートを受け行われたものです。研究に携わった研究者の皆様に深謝いたします。第5項、第6項の研究成果は原著論文¹²にて発表しました。本研究は公益財団法人篷庵社の特別研究助成により支援を受けました。関係者各位に厚く御礼を申し上げます。

参考文献 (本研究助成を受けて発表した論文(◎)／我々のグループが発表した論文(●))

1. Platt FM, d'Azzo A, Davidson BL, *et al.* Lysosomal storage diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 Oct 1;4(1):27.
2. ● Kondo H, Maksimova N, Otomo T, *et al.* Mutation in VPS33A affects metabolism of glycosaminoglycans: a new type of mucopolysaccharidosis with severe systemic symptoms. *Hum Mol Genet*. 2017 Jan 1;26(1):173-183.
3. #617303 MUCOPOLYSACCHARIDOSIS-PLUS SYNDROME; MPSPS, Online Mendelian Inheritance in Man (<https://omim.org/entry/617303>)
4. ● Vasilev F, Sukhomyasova A, Otomo T. Mucopolysaccharidosis-Plus Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2020 Jan 9;21(2):421.
5. ● Sofronova V, Iwata R, Moriya T, *et al.* Hematopoietic Disorders, Renal Impairment and Growth in Mucopolysaccharidosis-Plus Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2022 May 23;23(10):5851.
6. ● Sofronova V, Gotovtseva L, Danilova A, *et al.* Prenatal Diagnosis of Mucopolysaccharidosis-Plus Syndrome (MPSPS). *Genes (Basel)*. 2023 Aug 3;14(8):1581.
7. Xie M, Li JP. Heparan sulfate proteoglycan - A common receptor for diverse cytokines. *Cell Signal*. 2019 Feb;54:115-121.
8. Clausen TM, Sandoval DR, Spleid CB, *et al.* SARS-CoV-2 Infection Depends on Cellular Heparan Sulfate and ACE2. *Cell*. 2020 Nov 12;183(4):1043-1057.
9. van der Beek J, Jonker C, van der Welle R, *et al.* CORVET, CHEVI and HOPS - multisubunit tethers of the endo-lysosomal system in health and disease. *J Cell Sci*. 2019 May 15;132(10):jcs189134.
10. van der Beek J, de Heus C, Sanza P, *et al.* Loss of the HOPS complex disrupts early-to-late endosome transition, impairs endosomal recycling and induces accumulation of amphisomes. *Mol Biol Cell*. 2024 Mar 1;35(3):ar40.
11. Peplowska K, Markgraf DF, Ostrowicz CW, *et al.* The CORVET tethering complex interacts with the yeast Rab5 homolog Vps21 and is involved in endo-lysosomal biogenesis. *Dev Cell*. 2007 May;12(5):739-50.
12. ◎ Terawaki S, Vasilev F, Moriwaki T, *et al.* HOPS, CORVET and newly-identified Hybrid tethering complexes contribute differentially towards multiple modes of endocytosis. *Sci Rep*. 2023 Oct 31;13(1):18734.

細胞外微粒子による炎症応答を抑える高活性化合物の機能解明と間質性肺炎治療への応用

大阪大学 大学院薬学研究科

生体応答制御学分野

武村直紀

1. はじめに

間質性肺炎は様々な環境的要因や遺伝的要因によって肺に炎症が起こり、肺胞壁の損傷が繰り返されると、肺胞壁の線維化が進んで固く厚くなり、ガス交換がうまくできなくなる病気である。中でも、原因を特定できない場合の間質性肺炎（特発性間質性肺炎）は国から難病指定されており、多くの場合に高度の肺線維症や肺癌、ときにその併発状態へと進行する。間質性肺炎を引き起こす環境的要因の1つとして、空気中を漂う数 μm 以下の微粒子が知られており、例としてPM2.5や黄砂などの大気汚染物質、またシリカ、アスベスト、酸化チタンなどの工業用材料が挙げられる。これらは肉眼でほとんど捉えられない大きさであるため、意図しても避けることが難しく、さらに肺に吸入されるとなかなか除去されずに沈着するという、非常に危険な性質を持つ。近代化を背景にこれら吸入性微粒子への暴露は確実に増えており、見えない原因として微粒子が特発性間質性肺炎の発症や増悪に加担している可能性がある。

上記のような微粒子は、細胞を外から刺激して免疫機構を活性化し、炎症応答を誘発するという共通の性質を持っている。免疫は異物を認識して排除する重要な防御機構であり、自然免疫と獲得免疫に大別される。そのうち、自然免疫の役割は、病原体の侵入を感知してサイトカイン、インターフェロン、ケモカインなどの炎症誘発物質の産生を誘導し、速やかに病原体を攻撃・排除することである。一方で、自然免疫は非感染性の刺激に対して過度の炎症応答を惹起し、我々の体を傷つける場合があり、このような現象を「自然炎症」という¹⁾。微粒子を原因とする諸疾患の予防・治療のためには、微粒子が誘導する自然炎症の全体像を把握し、害をなす応答を適切に制御することが重要である。

微粒子は炎症誘発物質の放出を伴う細胞死であるパイロトーシスを誘導することで、自然炎症を引き起こすことが知られている²⁾。体内に侵入した微粒子をマクロファージなどの免疫細胞が貪食し、ファゴリソソーム内で消化しようとするが、その際に微粒子の持つ鋭利な結晶構造や特殊な表面性状によってファゴリソソーム膜が損傷し、機能不全を起こしてしまう（図1左）。すると、その異常を捉えた自然免疫受容体NLRP3が活性化し、アダプター分子であるASC、プロテアーゼであるCaspase-1と共にインフラマソームと呼ばれるタンパク質複合体を形成する。インフラマソームの形成に伴い活性化したCaspase-1は、細胞内に前駆体として存在する炎症性サイトカインIL-1 β やIL-18を切断して活性化型への成熟化を促

す。さらに、Caspase-1 は Gasdermin D を切断して活性化し、細胞膜に小孔を形成させる。これにより細胞膜の透過性が高まり、IL-1 β や IL-18 の放出が促される一方で、小孔から細胞外液が流入して細胞が膨潤し、ひいては細胞膜が破裂して死に至る。間質性肺炎を

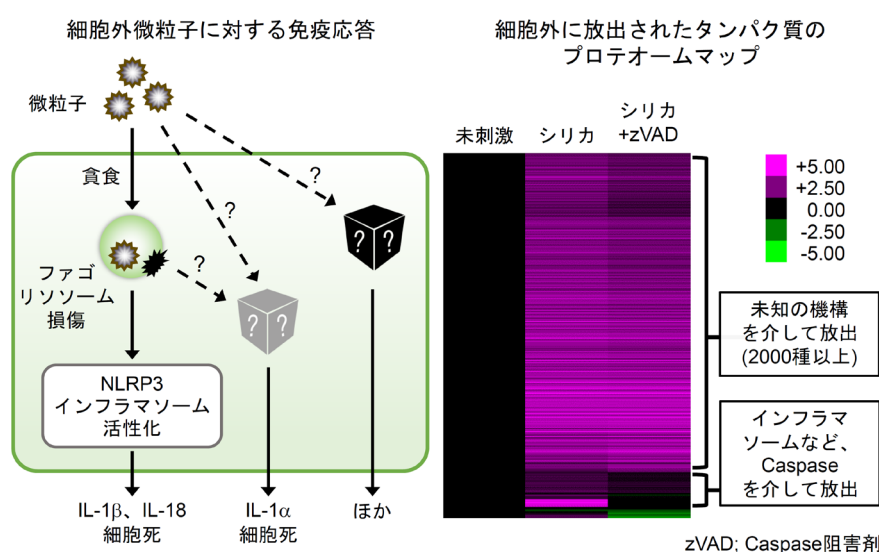


図1. NLRP3インフラマソームの活性化は微粒子が誘導する応答の一部に過ぎない

含め、微粒子を起因とする諸疾患に当該機構が関与することが明らかとなっており、関連分子を標的とする薬剤の開発が進められてきた。しかし近年では、微粒子は NLRP3 インフラマソーム非依存的な分子機構も同時に刺激して細胞死シグナルを刺激し、IL-1 β と同じ受容体に作用する IL-1 α をはじめとする様々な分子の放出を誘導していることが明らかとなってきた。実際に我々がマウスのマクロファージを黄砂や PM2.5 の主成分であるシリカの微粒子で刺激し、細胞外に放出されたタンパク質を質量分析によって網羅的に解析したところ、刺激に応じて変動する 2000 種類以上ものタンパク質のうち、NLRP3 インフラマソームに依存して放出されているのは僅か 1 割程度でしかないことが分かっている (図 1 右)。すなわち、NLRP3 インフラマソームを標的とするだけでは、微粒子が誘導するパイロトーシスを起因とする炎症応答を十分に抑えられないことが予想される。

我々は、NLRP3 インフラマソーム依存的・非依存的な炎症応答の双方を阻害する薬剤こそ、微粒子を要因とする炎症性疾患の予防・治療に真に役立てられると考え、研究を推進している。そのような目的に適う化合物を探索したところ、天然化合物である Oridonin と既存の医薬品である Dasatinib がヒットした^{2,3)}。そこで本研究では、それぞれの作用機序の解明、さらに間質性肺炎に対する抑制効果の評価を試みた。

2-1. 候補化合物としての Oridonin の同定

マウスのマクロファージを微粒子で刺激すると、細胞死するとともに、NLRP3 インフラマソーム依存的に IL-1 β を、さらに NLRP3 インフラマソーム非依存的に IL-1 α を放出する。これらの反応をすべからく抑える化合物を得ることを目的として、我々は市販の天然化合物ライブラリー中の各化合物でマウスの腹腔マクロファージを処理したのちに、シリカ粒子で刺激し、培養上清中に放出された IL-1 α と IL-1 β 、ならびに生存率を測定した (図 2)。探索の結果、IL-1 α 、IL-1 β の放出や、生存率の低下を強く抑える化合物として Oridonin を得た。

Oridonin は、わが国で古来より民間薬として消化不良や食欲不振、腹痛などに使用されてきた延命草という植物の有効成分として知られている⁴⁾。**Oridonin** はマウス骨髄由来マクロファージおよびヒト単球系細胞株 THP-1 細胞をシリカ粒子で刺激した場合でも、同様の抑制効果を示した。さらに黄砂や、痛風や動脈硬化の要因となっていることが知られている尿酸塩結晶やコレステロール結晶でマウス腹腔マクロファージを刺激した場合においても、**Oridonin** は同様の抑制効果を示した。一方で、**NLRP3** と同様にインフラソームを形成する自然免疫受容体である **NLRC4** や **AIM2** のリガンドであるフラジェリン（細菌の鞭毛を構成するタンパク質）や 2 本鎖 DNA で刺激した場合に誘導される細胞死や **IL-1 α** と **IL-1 β** の放出に対しては、**Oridonin** は影響しなかった。以上の結果から、**Oridonin** は細胞の由来となる生物種や、微粒子の成分・形状を問わず、インフラマソームを介さない作用で、微粒子により誘導される細胞死とそれに伴う **IL-1 α** と **IL-1 β** の放出を抑えることが分かった。

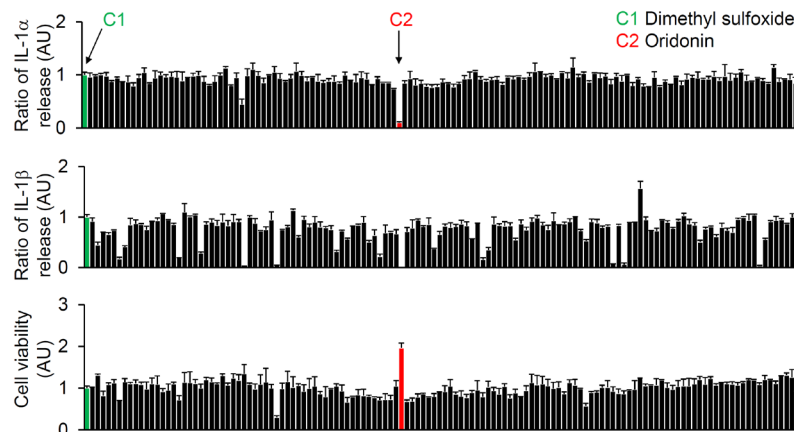


図2. シリカ粒子により誘導されるマクロファージの細胞死とそれに伴うIL-1 α およびIL-1 β の放出を阻害する天然物化合物の探索

2-2. Oridonin の作用機序の解析

Oridonin が **NLRP3** に直接作用して活性化を阻害することについて既に報告はあったものの⁵⁾、当該作用機序だけでは **IL-1 α** の放出や細胞死の誘導を抑えることは説明できない。そこで、**Oridonin** は微粒子に接触した細胞において特有に起きるイベントのうちで、**NLRP3** の活性化よりも上流に作用すると予想し、はじめに貪食作用を抑えている可能性を検討した。蛍光標識したシリカ粒子をマウス骨髄由来マクロファージに貪食させ、細胞内に取り込まれた粒子の数を蛍光顕微鏡観察により計数した。**Oridonin** で処理した細胞では、未処理の場合と変わらない数のシリカ粒子の取り込みが観察されたため、**Oridonin** は貪食作用には影響しないことが分かった。

次に、微粒子によるファゴリソソームの損傷に対する影響を評価するために、損傷したリソソーム膜のマーカーと

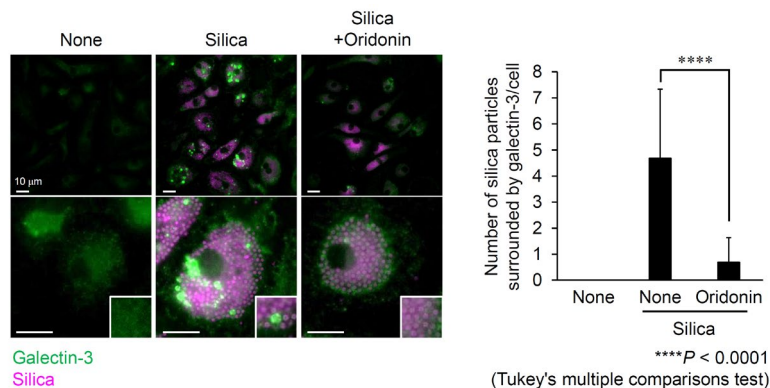


図3. Oridoninはシリカ粒子によるファゴリソソーム膜の損傷を抑制する

して知られている Galectin-3 を免疫染色して顕微鏡観察した (図 3)。結果として、貪食したシリカ粒子の周囲には Galectin-3 が集積する一方で、Oridonin 処理でその集積が抑えられることが分かった。リソソーム膜の損傷を評価する別の手段として、蛍光色素 LysoTracker Deep Red でマウス腹腔マク

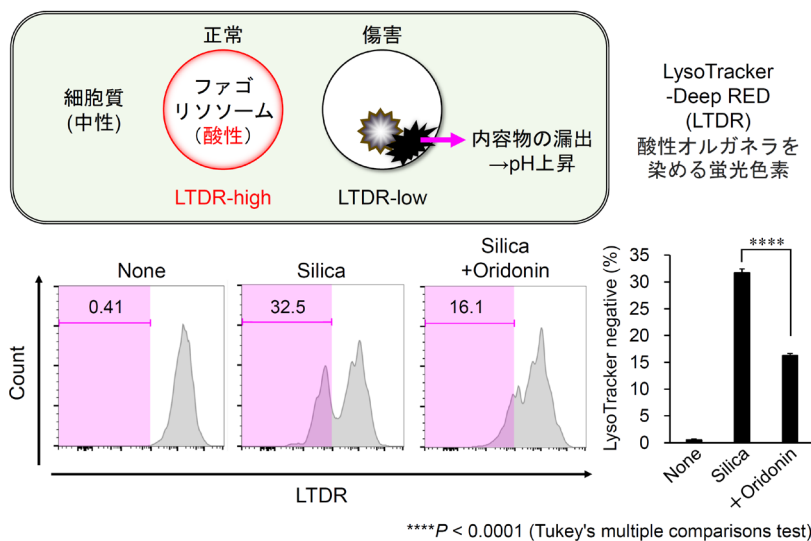


図4. Oridoninはシリカ粒子によるファゴリソソームの機能不全を阻害する

ロファージを染色し、リソソーム膜の損傷に伴うリソソーム内 pH の上昇 (= 蛍光強度が下がる) をフローサイトメトリーで検出した (図 4)。その結果、Oridonin で処理した場合には、シリカ粒子による LysoTracker Deep Red の蛍光強度の低下が抑えられたことから、シリカ粒子による刺激で機能不全を起こしているファゴリソソームを内包する細胞の数が著減していることが分かった。以上の結果から、Oridonin は微粒子を取り込んだファゴリソソームで起きる膜損傷を抑え、下流で起きる応答を包括的に防いでいると考えられた。

過去の報告により、Oridonin は C16-C17 位の二重結合を介して特定の分子に結合することが知られている⁵⁾。そこで同箇所を還元した Oridonin 誘導体 (R-Oridonin) を合成した (図 5)。R-Oridonin は Oridonin と比較して、シリカ粒子で刺激したマウス腹腔マクロファージにおいて、IL-1 α と IL-1 β の放出および LysoTracker Deep Red の蛍光強度の低下を抑える活性が著減した。以上の結果から、微粒子によるファゴリソソーム膜の損傷を抑える Oridonin の作用にも C16-C17 位の二重結合が関与していることが分かった。

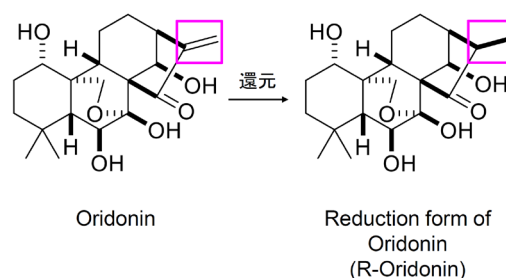


図5. Oridoninの還元体 (R-Oridonin)

Oridonin とその類似体を用いて構造活性相関を調べたところ、上記のような Oridonin の作用について、C1 位の水酸基は関与しないことが分かった。同箇所をビオチン化した Oridonin と R-Oridonin を作製し、これらを用いたプルダウンアッセイによって回収したマウス腹腔マクロファージ由来のタンパク質を質量分析した。現在は、これによって得られた結果をもとに、Oridonin に結合し、一方で R-Oridonin には結合しない分子のうちで、Oridonin の作用に関わる分子の同定を進めている。

2-3. 間質性肺炎に対する Oridonin の効果の評価

シリカ粒子をマウスに経気管投与することで誘発される急性肺傷害に対する Oridonin の効果を調べた (図 6)。当該モデルでは、シリカ粒子が肺のマクロファージを刺激して NLRP3 依存的な IL-1 β の放出と NLRP3 非依存的な IL-1 α の放出を誘導し、後者の働きで肺に浸潤した好中球が組織を傷害する²⁾。シリカ粒子のみを投与したマウスと比較して、

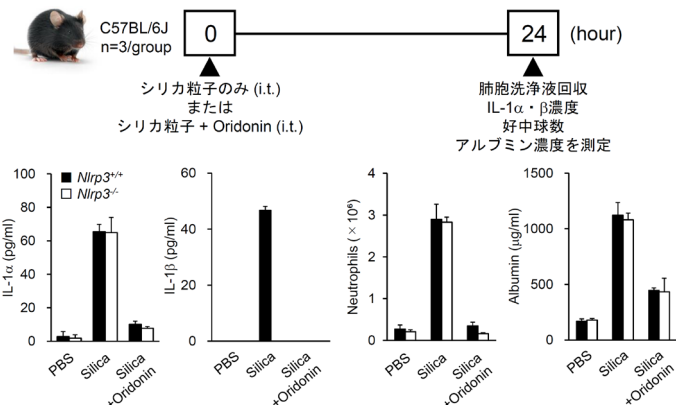


図6. OridoninはNLRP3非依存的に起こるシリカ粒子誘導性の肺傷害を顕著に抑制する

シリカ粒子とともに Oridonin を経気管投与したマウスでは、肺胞洗浄液中の IL-1 α と IL-1 β の濃度、好中球の数、さらに組織傷害のマーカーであるアルブミンの濃度がいずれも有意に抑制された。以上の結果から、Oridonin は微粒子に起因する間質性肺炎の急性期に起きる組織傷害を抑えるために有効であることが分かった。

3-1. 候補化合物としての Dasatinib の同定

延命草は古くから用いられている生薬であり、また Oridonin 自体も数々の研究で試験されてきたことから、Oridonin の安全性は高いと考えられているものの、薬剤としてはまだ承認されていない。そこで我々はドラッグリポジショニングを目的として、微粒子による炎症応答を効果的に抑制する新たな化合物を探索した。この探索においては、インフラマソームの構成分子である ASC の機能を欠いているマウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞を用いた。FDA 承認薬を含めた薬剤化合物ライブラリーを大阪大学 大学院薬学研究科 創薬サイエンス研究支援拠点から提供を受け、各化合物でマウスの RAW264.7 細胞を処理したのちに、シリカ粒子で刺激した。培養上清中に放出された IL-1 α を測定するとともに、蛍光色素 DRAQ7 で染まる死細胞の割合を大阪大学 大学院薬学研究科 創薬サイエンス研究支援拠点が保有する CellVoyager® CV8000 (横河電機) を用いたハイスループットイメージングで解析した。シリカ粒子により誘導される IL-1 α の放出と細胞死を 50%以上抑えることを水準として候補化合物を定めたところ、興味深いことに Dasatinib や Bosutinib をはじめとする Src family kinases (SFKs) 阻害剤が複数ヒットした (図 7)。SFKs は生存、分化、代謝などの多様な生理機能の制御に関わることがよく知られている。ヒットした化合物はいずれについても、シリカ粒子でマウス骨髄由来マクロファージを刺激した場合に誘導される細胞死と、それに伴う IL-1 α や IL-1 β の放出を強く抑えた。臨床で最もよく研究されているという理由から⁶⁾、我々は Dasatinib を対象に絞って以降の解析を進めた。Dasatinib は THP-1 をシリカ粒子で刺激した場合でも、同様の抑制効果を示した。さらに黄砂や尿酸塩結晶でマウ

ス骨髄由来マクロファージを刺激した場合においても、Dasatinib は同様の抑制効果を示した。一方で、微粒子と同様に NLRP3 インフラソームの形成を誘導するアデノシン三リン酸でマウス骨髄由来マクロファージを刺激した場合に誘導される細胞死と、それに伴う IL-1 α や IL-1 β の放出に対しては、Dasatinib は影響しなかった。以上の結果から、Dasatinib もまた、細胞の由来となる生物種や、微粒子の成分・形状を問わず、インフラマソームを介さない作用で、微粒子によって誘導される細胞死とそれに伴う IL-1 α と IL-1 β の放出と抑えることが分かった。

Stimulation	Candidate drugs	Cell death (%)	IL-1 α (pg/ml)	Target
None	-	4 \pm 0.2	201.5 \pm 0.7	-
Silica	-	54.1 \pm 3	3192.7 \pm 36.2	-
	Bosutinib	3.3 \pm 0.9	125.7 \pm 35.4	Src family kinases, Bcr-Abl kinase
	Dasatinib	26.6 \pm 4	1262.7 \pm 766.7	Src family kinases, Bcr-Abl
	PD-161570	7.9 \pm 3.5	229.8 \pm 0.1	Src family kinases, FGF, PDGFR, EGFR
	PD-166285	4.5 \pm 1.4	143 \pm 4.2	Src family kinases, FGFR
	PD-173952	2.7 \pm 1.3	718.4 \pm 44.1	Src family kinases
	PD-407824	4.4 \pm 0.6	1524.5 \pm 261.7	Src family kinases, Wee1/Chk1

図7.シリカ粒子により誘導されるマクロファージの細胞死とそれに伴うIL-1 α の放出を阻害する薬剤を探索して得た候補

3-2. Dasatinib の作用機序の解析

Oridonin と同様に、Dasatinib についても微粒子による刺激で特有に起きるイベントに作用していると予想した。SFKs は Fc γ 受容体を介した抗原抗体複合体の貪食を制御するという報告もある。そこで Dasatinib が微粒子の貪食に影響するかを評価したところ、Dasatinib で処理したマウス骨髄由来マクロファージによる蛍光シリカ粒子の取り込みは未処理の場合と比べて遜色ないことが分かった。

次に、LysoTracker Deep Red でマウス骨髄由来マクロファージを染色し、リソソーム膜損傷に伴うリソソーム内 pH の上昇をフローサイトメトリーで検出した(図8)。その結果、Dasatinib で処理した細胞では、シリカ粒子による LysoTracker Deep Red の蛍光強度の低下が抑えられた。以上の結果から、Dasatinib もまた微粒子を取り込んだファゴリソソームで起きる機能不全を抑え、下流で起きる応答を包括的に防いでいると考えられた。

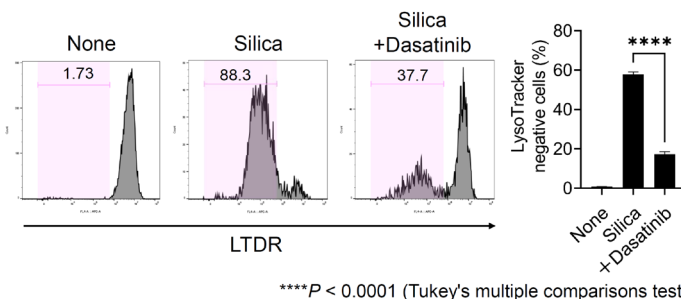


図8. Dasatinibはシリカ粒子によるファゴリソソームの機能不全を阻害する

子による LysoTracker Deep Red の蛍光強度の低下が抑えられた。以上の結果から、Dasatinib もまた微粒子を取り込んだファゴリソソームで起きる機能不全を抑え、下流で起きる応答を包括的に防いでいると考えられた。

これまでに、SFKs の一つである c-Src の恒常的活性型 (c-Src^{Y527F}) を形質導入したマウス胎児線維芽細胞では、リソソーム膜の透過性が増すことが報告されている⁷⁾。また、c-Src を阻害すると *Mycobacterium tuberculosis* が誘導するリソソームの不安定化が抑えられるという報告もある⁸⁾。したがって、Dasatinib が標的とする SFKs もまた、微粒子が誘導するファゴリソソーム膜の不安定化を促進している可能性がある。我々は、微粒子を貪食した直後

に形成される貪食膜の周囲にリン酸化された（活性化型）SFKsが集積し、初期ファゴソームになった後も維持されていることを観察している³⁾。SFKsは初期ファゴソームに存在する、リソソーム由来のセラミド産生酵素である酸性スフィンゴミエリナーゼを活性化することが報告されている⁹⁾。活性化した酸性スフィンゴミエリナーゼはスフィンゴミエリンをセラミドに変換し、その後にセラミダーゼがセラミドをスフィンゴシンに変換する。スフィンゴシンの蓄積は膜の透過性を高める。興味深いことに、酸性スフィンゴミエリナーゼの阻害剤もシリカ粒子が誘導する細胞死を阻害することが報告されている^{10,11)}。今後、Dasatinibが標的とするSFKsの下流において、酸性スフィンゴミエリナーゼが微粒子を内包したファゴリソソームの膜不安定化を誘導している可能性について検討する必要がある。

3-3. 間質性肺炎に対する Dasatinib の効果の評価

シリカ粒子で誘導する急性肺傷害に対する Dasatinib の効果を調べた。シリカ粒子のみを

投与したマウスと比較して、シリカ粒子とともに Dasatinib を経口投与したマウスでは、肺胞洗浄液中の IL-1 α の濃度、好中球の数、アルブミンの濃度がいずれも有意に抑制された（図9）。以上の結果から、微粒子に起因する間質性肺炎の急性期における組織傷害を抑えるために Dasatinib が有効であることが分かった。

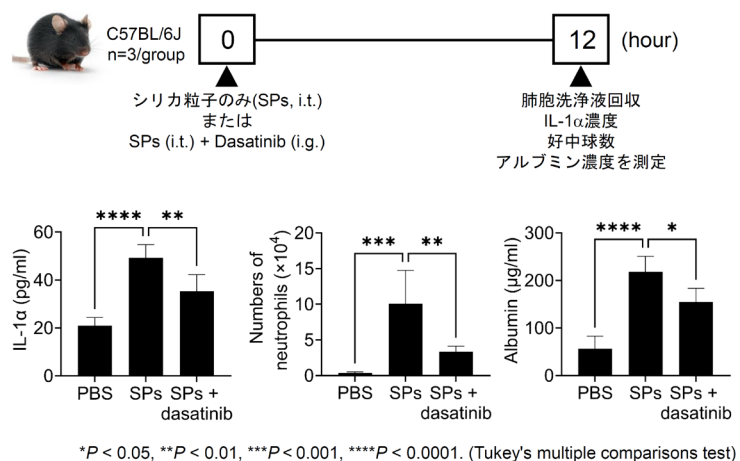


図9. DasatinibはNLRP3非依存的に起こるシリカ粒子誘導性の肺傷害を顕著に抑制する

4. おわりに

本研究を通じて、微粒子により誘導されるファゴリソソームの機能不全を抑える Oridonin や Dasatinib のような化合物は、微粒子を要因とする炎症性疾患に対する薬物療法の開発において有用であると考えられた（図10）。間質性肺炎に対する Oridonin と Dasatinib の利用手段として、とりわけ微粒子を吸入して急性に起きる肺傷害に対する応急処置に有用であろうと考えられる。また、前述のように、間質性肺炎は病態が慢性化して肺線維症や肺癌に発展する場合がある。微粒子に起因する肺線維症に対して、惜しむらくも我々以外のグループからの研究ではあるが、Oridonin や Dasatinib が有効であることが報告されている^{12,13)}。一方で、微粒子に起因する肺癌に対する両者の効果に関する報告はまだ無い。IL-1 α は肺癌の病態形成に関与する可能性があると考えられている。また、好中球については、シリカ粒子により誘導される肺癌の進行を促すことが報告されている¹⁴⁾。Dasatinib は現在のところ慢

性骨髄性白血病の治療に使用されているが、Dasatinib の適応拡大を図る上で、微粒子を要因とする間質性肺炎に伴う肺癌は対象疾患の候補になるだろう。また、微粒子を起因とする炎症性疾患は、間質性肺炎以外にも痛風、動脈硬化、アルツハイマー病などの様々なものが挙げられ、Oridonin や Dasatinib のような化合物はこれらの予防・治療にも有効であろうと期待される。

現在、我々は微粒子により誘導されるパイロトーシスによって放出される分子のうち、IL-1 α 以外のある分子の解析を進めており、当該分子は好中球ではなく好酸球を肺に遊走させることが分かっている。すなわち、微粒子によって誘導されるパイロトーシスを介して肺で起きる炎症応答は、実は分子や細胞によって細分化できるという新たな知見が得られつつある。今後も微粒子が誘導する炎症誘導機構について理解を深め、有効な薬剤療法の開発に貢献していきたい。

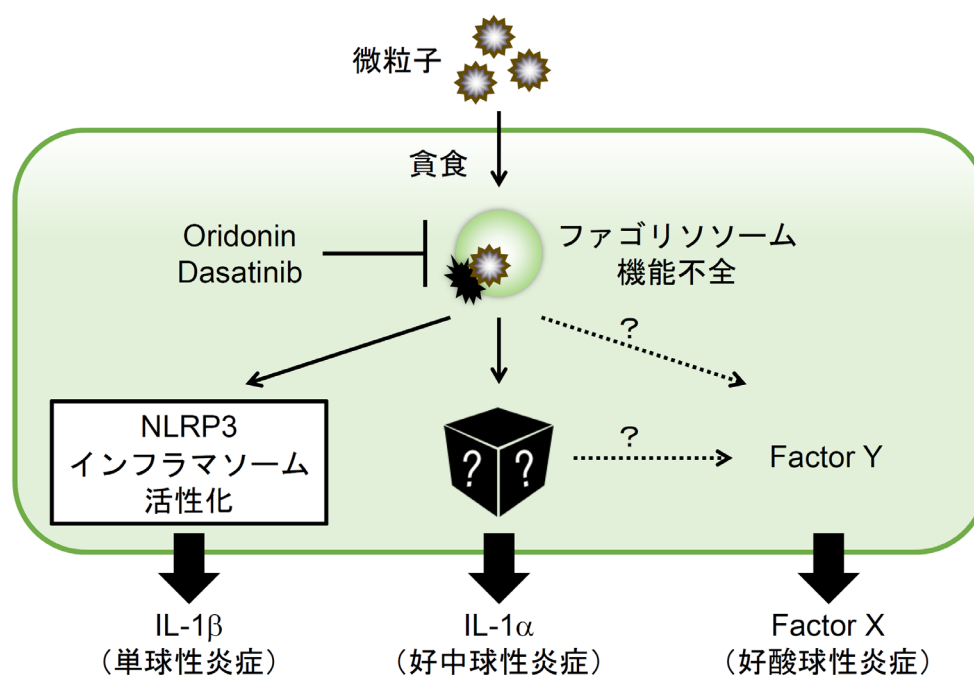


図10. 新たに見えてきた、微粒子による炎症応答の理解

5. 謝辞

本研究は、大阪大学 大学院薬学研究科 生体応答制御学分野の大学院生である潘逸義氏、生駒健太氏を筆頭に、同研究室の教員、大学院生、学部生、ならびに研究室外の多くの共同研究者のご協力のもとに実施したものです。研究に携わった全ての方々に厚くお礼を申し上げます。本研究を推進するにあたり、多大なる援助を賜りました公益財団法人 篷庵社および財団関係者の皆様に心から感謝申し上げます。

参考文献

1. Takemura N. Development of Anti-inflammatory Drugs with Novel Mechanisms of Action Targeting Pyroptosis. *Yakugaku Zasshi*. 2023;143(12):997-1003.
2. Ikoma K, Takahama M, Kimishima A, Pan Y, Taura M, Nakayama A, Arai M, Takemura N*, Saitoh T*. Oridonin suppresses particulate-induced NLRP3-independent IL-1 α release to prevent crystallopathy in the lung. *Int Immunol*. 2022;34(10):493-504. (*equal corresponding)
3. Pan Y, Ikoma K, Matsui R, Nakayama A, Takemura N*, Saitoh T*. Dasatinib suppresses particulate-induced pyroptosis and acute lung inflammation. *Front Pharmacol*. 2023;14:1250383. (*equal corresponding)
4. Fujita E, Fujita T, Katayama H, M Shibuya, T Shingu. Terpenoids. Part XV. Structure and absolute configuration oridonin isolated from *Isodon japonicus* and *Isodon trichocarpus*. *J Chem Soc C*. 1970;12:1674-1681.
5. He H, Jiang H, Chen Y, Ye J, Wang A, Wang C, Liu Q, Liang G, Deng X, Jiang W, Zhou R. Oridonin is a covalent NLRP3 inhibitor with strong anti-inflammasome activity. *Nat Commun*. 2018;9(1):2550.
6. Araujo J, Logothetis C. Dasatinib: a potent SRC inhibitor in clinical development for the treatment of solid tumors. *Cancer Treat Rev*. 2010;36(6):492-500.
7. Fehrenbacher N, Bastholm L, Kirkegaard-Sørensen T, Rafn B, Bøttzauw T, Nielsen C, Weber E, Shirasawa S, Kallunki T, Jäättelä M. Sensitization to the lysosomal cell death pathway by oncogene-induced down-regulation of lysosome-associated membrane proteins 1 and 2. *Cancer Res*. 2008;68(16):6623-33.
8. Amaral EP, Riteau N, Moayeri M, Maier N, Mayer-Barber KD, Pereira RM, Lage SL, Kubler A, Bishai WR, D'Império-Lima MR, Sher A, Andrade BB. Lysosomal Cathepsin Release Is Required for NLRP3-Inflammasome Activation by *Mycobacterium tuberculosis* in Infected Macrophages. *Front Immunol*. 2018;9:1427.
9. Kumazoe M, Kadomatsu M, Bae J, Otsuka Y, Fujimura Y, Tachibana H. Src Mediates Epigallocatechin-3-O-Gallate-Elicited Acid Sphingomyelinase Activation. *Molecules*. 2020;25(22):5481.
10. Thibodeau MS, Giardina C, Knecht DA, Helble J, Hubbard AK. Silica-induced apoptosis in mouse alveolar macrophages is initiated by lysosomal enzyme activity. *Toxicol Sci*. 2004;80(1):34-48.
11. Biswas R, Trout KL, Jessop F, Harkema JR, Holian A. Imipramine blocks acute silicosis in a mouse model. *Part Fibre Toxicol*. 2017;14(1):36.
12. Gao J, Li C, Wang X, Sun X, Zhang R, Chen C, Yu M, Liu Y, Zhu Y, Chen J. Oridonin

- attenuates lung inflammation and fibrosis in silicosis via covalent targeting iNOS. *Biomed Pharmacother.* 2022;153:113532.
13. Cruz FF, Horta LF, Maia Lde A, Lopes-Pacheco M, da Silva AB, Morales MM, Gonçalves-de-Albuquerque CF, Takiya CM, de Castro-Faria-Neto HC, Rocco PR. Dasatinib Reduces Lung Inflammation and Fibrosis in Acute Experimental Silicosis. *PLoS One.* 2016;11(1):e0147005.
 14. Satpathy SR, Jala VR, Bodduluri SR, Krishnan E, Hegde B, Hoyle GW, Fraig M, Luster AD, Haribabu B. Crystalline silica-induced leukotriene B4-dependent inflammation promotes lung tumour growth. *Nat Commun.* 2015;6:7064.

線維化関連難治性疾患の創薬標的分子の同定とその治療応用

九州大学薬学研究院疾患制御学
仲矢道雄

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