

**平成 16 年度～平成 20 年度「私立大学学術研究高度化推進事業」
研究成果報告書概要**

研究プロジェクトに参加する主な研究者

プロジェクト①(生物有機化学的アプローチによる天然資源由来ガン治療薬の開発)

研究者名	所属・職名	プロジェクトでの研究課題	プロジェクトでの役割
守安 正恭	生薬化学講座・教授	植物由来生理活性成分の単離、構造決定と in vitro 活性	植物由来ガン治療薬シーズ候補化合物の供給と in vitro 活性の検定
岡野 登志夫	衛生化学講座・教授	生体内イソプレノイドと類縁体の生理作用と発現機構の解明	生体由来ガン治療薬シーズ候補化合物の in vitro 活性の検定と作用機構の解明
棚橋 孝雄	薬化学講座・教授	植物由来生理活性成分の単離、構造決定と in vitro 活性	植物由来ガン治療薬シーズ候補化合物の供給と in vitro 活性の検定
小林 典裕	生命分析化学講座・教授	植物由来生理活性成分の単離、構造決定と物理化学的性質	植物由来ガン治療薬シーズ候補化合物の供給と物理化学的性質の検討
和田 昭盛	生命有機化学講座・教授	生体内イソプレノイド類縁体の合成と構造決定	生体由来ガン治療薬シーズ候補化合物の供給
北河 修治	製剤学講座・教授	植物由来ポリフェノールを利用したガン細胞の多剤耐性の克服	植物由来ポリフェノールによる抗ガン剤排出タンパク質阻害活性の検定

プロジェクト②(神経性疾患の病因、病態の解明および臨床診断法と治療薬の開発)

研究者名	所属・職名	プロジェクトでの研究課題	プロジェクトでの役割
太田 光熙	病態生化学講座・教授	神経性疾患における病態形成関連因子の解明と臨床診断への応用	神経性疾患発症の関連因子の解明と臨床診断に応用可能な検査法の開発
内藤 猛章	薬品化学講座・教授	中枢神経系変性疾患治療薬の創製	治療薬候補化合物の供給と効率的合成法の確立
北川 裕之	生化学講座・教授	神経性疾患の病因解明と治療への糖鎖基盤技術の開発	神経幹細胞の分化、神経回路網形成、神経再生、ウイルス感染における糖鎖機能の解明
斎藤 博幸	薬品物理化学講座・教授	神経性疾患病因タンパク質の構造と機能の解明	アルツハイマー病に代表される神経性痴呆疾患の原因タンパク質の構造と作用機序の解明
杉浦 眞喜子	生命有機化学講座・准教授	中枢神経系変性疾患の病因解明と治療薬の創製	神経性疾患関連糖鎖の構造解析ならびに治療薬候補化合物合成反応の機構解明
小林 吉晴	病態生化学講座・准教授	中枢作用を有する生理活性物質の薬物動態学的研究	神経性疾患治療薬の候補化合物および向精神薬の体内動態解明
宮田 興子	薬品化学講座・教授	中枢神経系変性疾患治療薬の創製	神経性疾患治療薬候補となるアミノ酸類の合成と供給

研究の概要

(1) 研究プロジェクトの目的・意義及び計画の概要

本学が平成 16 年度より取り組んだハイテク・リサーチ・センター整備事業は、平成 11～15 年度に実施した同事業のテーマを発展的に継承し、高齢化社会を迎えた今世紀の最重要課題である「ガン・加齢性疾患の克服」を目標としたもので、ガン、神経性疾患を標的とする 2 つのプロジェクトより構成されている。プロジェクト①（生物有機化学的アプローチによる天然資源由来ガン治療薬の開発）では、バラエティに富む天然由来低分子化合物を供給する化学グループと各種スクリーニングを担当する生物グループによる新薬シーズ探索システムを構築することに力を置いた。プロジェクト②（神経性疾患の病因、病態の解明および臨床診断法と治療薬の開発）では、加齢性疾患のなかでも早急な取り組みが求められる神経性疾患の克服を目標として、有機化学、分子・細胞生物学の先端技術を駆使した多角的なアプローチを行った。

プロジェクト①(生物有機化学的アプローチによる天然資源由来ガン治療薬の開発)

ガン化学療法の研究において、ガン細胞に対する選択毒性に優れる新規抗ガン薬の開発は極めて重要である。天然資源からの抗ガン活性化化合物の抽出・精製、また、これらをシーズとした誘導体の合成は重要なアプローチの一つであり、今日も医療現場で汎用される重要な抗ガン剤が数多く開発されている。ただし、莫大な種類の動植物の検索、さらに天然物にヒントを得て構造を修飾した誘導体など、天然物からの抗ガン剤開発には、できるだけ多くの化合物についてのスクリーニングを行うプロセスが必須である。

そこで本プロジェクトでは、まず天然物を取り扱う複数の講座が天然資源より種々の化合物を単離・構造決定を行い、候補化合物のライブラリーを作製することとした。対象とした天然物は、主にアルカロイド、フラボノイド、キノン類、イソプレノイドが中心であるが、熱帯植物など、未開拓の資源について積極的に検索するように努めた。また、イソプレノイドであるビタミン A、D、K は脂溶性ビタミンとして著名であるが、抗腫瘍作用があることも知られている。そこで、これらについても種々の新規誘導体を合成した。ついで、各化合物の生物活性を種々の *in vitro* 試験により吟味した。その際、培養細胞を用いる従来の方法に加えて、酸化還元電位の測定やコンピューターを用いたドッキングシミュレーション法など、新しい方法の適用を積極的に検討することとした。シーズ化合物として有用と評価された化合物については、アポトーシス誘導、細胞内情報伝達系への影響など、抗腫瘍作用およびそのメカニズムについても検討を加えた。さらに、担ガン動物を使用した *in vivo* 実験を行い、抗ガン剤としての可能性を評価した。この際、特に既存の抗ガン剤との併用効果や副作用軽減の可能性、そして、近年多く見られる多剤耐性の腫瘍に対する効果についても検討した。

プロジェクト②(神経性疾患の病因、病態の解明および臨床診断法と治療薬の開発)

本プロジェクトでは、(I) 神経系における糖鎖機能の解明、(II) 神経性疾患の病態解明と診断法の開発、(III) 神経性疾患治療薬の創製、そして (IV) 向精神薬の作用機序の解明を柱として、神経性疾患の克服に取り組んだ。

(I) プロテオグリカンの糖鎖部分であるグリコサミノグリカン (GAG) は、細胞の増殖・分化、組織の形態形成、個体発生において重要な機能を果たしていることが近年明らかになってきている。そこで、GAG の多様な機能のうち、特に脳・神経系における機能に着目し、神経細胞の分化や神経回路形成における役割の解明と、その機能発現のメカニズムの理解を目標とした。さらには、神経系における糖鎖機能の解明による創薬の基盤技術の開発を目指し、医薬品開発への応用を視野に入れた研究にも力を注いだ。

(II) 神経変性疾患の増加とその対策が社会の喫緊の問題となっている。そこで、神経軸索の脱髄が主病変の多発性硬化症 (MS) と、黒質・線条体ドーパミン神経の選択的脱落を特徴とするパーキンソン病 (PD)、自己抗体により引き起こされる神経筋接合部の伝達障害が主体である重症筋無力症 (MG) を対象として、病態に密接に関連した因子の解明と診断学への応用を目指した。MS では髄液内ミエリン塩基性蛋白 (MBP) の検出を、神経変性疾患の PD については Parkin 遺伝子産物、 α -Synuclein や神経栄養因子などを中心に、MG に関しては新規に発見された抗 MuSK 抗体を中心にその病態や病像との関連を探求した。

(III) 老人性痴呆症の発現機構の解明ならびにアルツハイマー型痴呆症を代表とする脳疾患治療薬の創製を目的として、神経保護作用やグルタミン酸受容体との関連が明らかになりつつあるアミノ酸類の一般的かつ効率的合成法の開発を行った。特にカイトセファリン類やダーシハーバイン類のような複数のキラルセンターが隣接する環状新規アミノ酸類について、ラジカル反応を駆使した一般的合成法の開発を目指した。また、複数の結合形成を一度に行うドミノ型ラジカル反応を機軸とする生物活性物質創製のための効率的合成法の開発を検討した。

(IV) 神経性疾患には各種の向精神薬が使用されているが、薬物に反応しない難治性の疾患も多い。そこで、新規向精神薬の探索を行うとともに、その作用機序、作用と薬物動態との関連について検討した。また神経性疾患の発症メカニズムの詳細は不明の部分が多く残されていることから、遺伝的背景の異なる種々のマウス系統を用いて研究を行い、神経性疾患発症や向精神薬の作用機序解明の一助とした。

(2) 研究組織

本継続事業にかかわった全研究員とその役割分担を以下に示す。() 内の役職は、本事業に参入した時点のもの。途中参加、離脱、昇進などの異動については末尾の注釈を参照のこと。

プロジェクト①(生物有機化学的アプローチによる天然資源由来ガン治療薬の開発)

プロジェクト・リーダー: 守安 正恭 (生薬学講座・教授)^{a)}

(I) 天然資源よりシーズ候補化合物を単離し化学構造を決定

守安 正恭、市丸 百代 (生薬学講座・講師)^{a, b)}、棚橋 孝雄 (薬化学講座・教授)、竹仲 由希子 (薬化学講座・講師)^{c)}

(II) 天然物の化学修飾と新規誘導体のデザインと合成

和田 昭盛 (生命有機化学講座・助教授)^{d)}、山野 由美子 (生命有機化学講座・講師)、小山 淳子 (生命分析化学講座・講師)

(III) 物理化学的スクリーニング法の検討

小林 典裕 (生命分析化学講座・教授)、小山 淳子

(IV) 種々の生化学的 *in vitro* スクリーニング

平井 みどり (臨床薬学講座・教授)^{e)}、市丸 百代^{b)}、小山 淳子、須原 義智 (衛生化学講座・講師)、竹仲 由希子

(V) 培養細胞を用いる *in vitro* スクリーニングと抗腫瘍活性メカニズムの解明

岡野 登志夫 (衛生化学講座・教授)、平井 みどり^{e)}、北河 修治 (製剤学講座・教授)^{c)}、寺岡 麗子 (製剤学講座・講師)^{c)}、須原 義智、市丸 百代

(VI) *In vivo* 系での抗腫瘍活性の検討

難波 宏彰 (微生物化学講座・教授)^{f)}、平井 みどり^{e)}、児玉 典子 (微生物化学講座・講師)^{g, h)}、八木 敬子 (臨床薬学講座・講師)^{b)}

(VII) 機器分析による抗腫瘍活性化化合物の *in vitro* および *in vivo* 代謝の検討

小山 淳子、竹内 敦子 (衛生化学講座・講師)

a)平成18年4月より生薬化学講座に改称。b)平成20年7月死亡退職。c)平成18年4月より本事業に参加。d)平成17年4月、生命有機化学講座・教授に昇任。e)平成19年3月退職(神戸大学大学院医学研究科へ異動)。f)平成20年3月退職。これに関連して平成19年3月末をもって本事業から脱離。g)平成16年10月～平成18年9月、米国ハーバード大学医学部ガン研究所にて研修。h)平成20年4月より薬学基礎教育センター・講師に配置替え。

プロジェクト②(神経性疾患の病因、病態の解明および臨床診断法と治療薬の開発)

プロジェクト・リーダー: 菅原 一幸 (生化学講座・教授)^{a)}、太田 光熙 (病態生化学講座・教授)^{b)} <本プロジェクト研究の統括>

グループ (I)

研究代表者: 菅原 一幸 (生化学講座・教授)^{a)}、北川 裕之 (生化学講座・教授)^{c)} <研究の企画立案、神経幹細胞の分化、神経回路網形成、神経再生、ウイルス感染における糖鎖機能の解明に関わる研究>

研究者: 山田 修平 (生化学講座・講師)^{d)} <中枢神経感染性ウイルスと糖鎖の相互作用の解析>、杉浦 眞喜子 (生命有機化学講座・助教授) <NMRを用いた糖鎖の構造解析>、斎藤 博幸 (薬品物理化学講座・教授)^{e)} <神経性疾患病因タンパク質と糖鎖の相互作用の解析>

グループ (II)

研究代表者: 太田光熙 <研究の企画立案、MSに関するMBP蛋白の測定系の開発、 α -Synuclein 検出法の構築、アストログリア細胞を用いた各種神経治療薬による神経栄養因子合成促進作用の解明、抗MuSK抗体測定系の確立、抗MuSK抗体陽性者の臨床的特徴の解析>

グループ (III)

研究代表者: 内藤 猛章 (薬品化学講座・教授) <中枢神経系変性疾患治療薬の創製、研究の企画立案>

研究者: 杉浦 眞喜子 <中枢神経系変性疾患治療薬の創製、合成反応の機構解明>、宮田 興子 (薬品化学講座・助教授)^{f)} <中枢神経系変性疾患治療薬の創製研究、各種アミノ酸類の合成研究>

グループ (IV)

研究代表者: 山田 潤 (薬理学講座・助教授)^{g)}、小林 吉晴 (病態生化学講座・助教授)^{h)} <研究の企画立案、新規向精神薬の探索および神経ステロイドを含めた向精神薬の作用機構解明>

研究者: 小林 吉晴 (病態生化学講座・助教授) <脳内神経ステロイドの意義および動態の解析>、杉本 由美 (薬理学講座・講師)^{g)} <向精神薬の薬理作用および作用機序の解析>、多河 典子 (病態生化学講座・講師)^{c)} <脳内神経ステロイドおよび代謝物の分析と解析>

a)平成18年3月退職(北海道大学大学院生命科学院へ異動)。b)平成18年4月より前任の菅原一幸教授に替わってプロジェクト・リーダーを担当。c)平成18年4月より本事業に参加。d)平成18年9月退職(北海道大学大学院生命科学院へ異動)。e)平成17年4月より本事業に参加。f)平成20年4月、薬品化学講座・教授に昇任。g)平成19年3月退職(横浜薬科大学薬学部へ異動)。h)平成19年4月より前任の山田潤助教授に替わってプロジェクト・リーダーを担当。

(3) 研究施設・設備等

プロジェクト①(生物有機化学的アプローチによる天然資源由来ガン治療薬の開発)

本学ライフサイエンスセンターに設定されている核磁気共鳴装置 (NMR)、質量分析計 (MS)、またこれらを高速液体クロマトグラフ (HPLC) と連結した LC-MS、LC-NMR 等を駆使し、天然資源より単離精製した化合物およびその代謝産物の構造決定を行った。*In vitro* の生物活性試験では各参加講座に設置されている機器 (遺伝子増幅装置やポテンシostatなど) を使用した。また、本学バイオサイエンスセンターなどに設置されている諸機器 (共焦点レーザー顕微鏡、フローサイトメーターなど) も最大限に活用した。担ガンモデル動物の作成やシーズとして選定した化合物の投与実験は、本学動物実験施設を利用して行った。

プロジェクト②(神経性疾患の病因、病態の解明および臨床診断法と治療薬の開発)

研究の大部分および糖鎖-タンパク質間相互作用解析、DNA シークエンシング、質量分析、NMR 測定は、本学ライフサイエンスセンター、生化学講座、薬品物理化学講座、病態生化学講座、薬品化学講座、薬理学講座、中央分析室で行った。ラジオアイソトープを用いる研究は本学アイソトープ実験施設で、動物を用いる研究は本学動物実験施設を利用した。

(4) 研究成果の概要

プロジェクト①(生物有機化学的アプローチによる天然資源由来ガン治療薬の開発)

天然物 (高等植物、菌類など) から数多くの化合物を得て、多角的な抗腫瘍活性スクリーニングを行い、多くの化合物群に活性を認めた。ビタミン K および A の化学修飾を行いその活性を検討した。また直接の抗腫瘍活性は示さないものの抗ガン剤の多剤耐性を克服する可能性を有する天然物の検索を行った。マイタケより抽出した MD-Fraction については、現在ヒト臨床試験も行われている。また、より優れたスクリーニング方法の開発についても検討した。その結果、下記のような多数の成果を得ることができた。

<優れた成果があがった点>

(1) アルカロイド類

(a) キョウチクトウ科インドジャボク (*Rauwolfia serpentina*) のインドールアルカロイド類 (新規物質 yohinbinic acid などを含む) に topoisomerase I 阻害活性を認め、reserpine は topoisomerase II に対して強い阻害活性を示した。さらにこれらアルカロイドは HL-60 腫瘍細胞に対して細胞毒性を示した。

(b) ケシ科植物を中心にイソキノリンアルカロイド類 (ベンジルイソキノリン類、テトラヒドロプロトベルベリン類、プロトベルベリン類、シンプルイソキノリン類) を検索し、Epstein-Barr virus-early antigen (EBV-EA) 活性化抑制、マウス皮膚 2 段階発ガン抑制試験を行い、活性を示す化合物を認めた。また、これらアルカロイドのゲラニル化を行ったところ、活性が増大したものを多く認めた。

(2) フラボノイド類

(a) アカネ科 *Adina racemosa* から 5 種の新規フラボノイド配糖体を得たが、これらは真核生物のタンパク質合成阻害活性を有することを明らかにした。

(b) バンレイシ科 *Uvaria accuminata* のフラボノイドの一種である 2-ヒドロキシベンジルカルコン類 (uvaretine, diuvaretine など) に HL-60 腫瘍細胞に対する細胞毒性を認めた。また細胞周期解析によりアポトーシス誘導を認めた。また、正常細胞との比較で腫瘍細胞に対する選択毒性を認めた。2-ヒドロキシベンジル基が欠損すると抗腫瘍活性が減弱し正常細胞に対する毒

性が増すことが判明した。

(3) キノン類

(a) アントラキノン、ナフトキノン、ヘテロキノンなどのキノン類に EBV-EA 活性化抑制効果を示す化合物を多く認め、特に emodine の活性が強かった。また EBV-EA 活性化抑制効果とサイクリックボルタンメトリーにより得られる酸化還元電位との間に良好な相関を認め、簡便なスクリーニング法として有用なことを認めた。この相関は、*Tabebuia impetiginosa* に含有され強い抗ガン活性を有するフラノナフトキノン類についても認められた。

(b) Emodyne の肝代謝産物である 5-hydroxyemodyne は emodyne に遜色のない強い抗発ガンプロモーター、抗発ガンイニシエーター作用を有し、ガン予防薬としての可能性が示唆された。

(4) ポリフェノール類の薬物排出トランスポーター阻害作用による抗ガン剤の多剤耐性克服の可能性

近年、植物中に存在するポリフェノールが P-糖蛋白質等の薬物排出トランスポーターによる抗がん剤の排出を阻害することが明らかにされ、副作用が少ない多剤耐性克服剤の候補として期待される。P-糖蛋白質を過剰発現する KB-C2 細胞を用いて、種々のポリフェノールの作用と構造および物理化学的性質との関係について検討したところ、スチルベン誘導体のピセアタンノールは強い阻害活性を示した。また、最も強い阻害活性が認められたペンタガロイルグルコースについての検討結果より、抗ガン剤排出阻害機構として P-糖蛋白質 ATPase 阻害作用が関与している可能性が示唆された。

(5) ビタミン K および ビタミン A 類縁体

抗ガン活性を有することが報告されているビタミン K および A の構造修飾を系統的に行い、得られた誘導体について各種ガン細胞に対する増殖抑制作用・アポトーシス誘導作用を検討した結果、細胞選択性や作用発現に特異性を示す化合物が得られた。

(6) マイタケより抽出した MD-Fraction

マイタケ (*Grifola frondosa*) の β -glucan である MD-Fraction は固形担ガンマウスにおいて免疫システムを活性化させることでガン細胞の増殖を抑制する。MD-Fraction の生理活性を検討し、以下の結果を得た。

(a) MD-Fraction は Balb/c マウスにおいて colon-26 carcinoma 細胞の肺転移を抑制した。

(b) シクロフォスファミド投与による汎血球減少症モデルマウスにおいて MD-Fraction は G-CSF を強く誘導することで顆粒球の分化増殖を促進させた。

(c) MD-Fraction は腹腔内投与と経口投与のいずれの投与方法によっても抗腫瘍効果を示し、経口投与では小腸のパイエル板の免疫細胞を活性化し、IL-12 や IFN- γ などのサイトカイン産生の増強を通じて抗腫瘍効果を発現することを認めた。

(d) MD-Fraction と cisplatin の併用は抗腫瘍効果および抗転移効果において併用効果を示した。また、cisplatin による骨髄抑制や腎障害は MD-Fraction の投与によって軽減した。MD-Fraction は経口投与でも効果を発現するため服用が容易で、抗ガン剤による免疫抑制などの副作用を軽減し得る物質として、現在、アメリカ・スロンケタリング癌センターでヒト臨床試験に用いられている。

(7) そのほかの化合物

(a) キク科 *Artemisia annua* の成分のうちクマル酸エステル類に DNA polymerase および topoisomerase 阻害活性が認められたので、類縁体を合成して構造活性相関を検討した。

(b) オトギリソウ科 *Mammea siamensis* に含有する抗腫瘍活性を持つクマリン類を検索し、数

種の新規クマリン類を単離、構造決定した。

(c) バンレイシ科 *U. lucida* から得られた新規 pyrenedione 類 2 種に強い細胞毒性を認めた。また細胞周期解析によりアポトーシス誘導を認めた。

(8) スクリーニング方法の改善

抗ガン剤として使用する場合、より特異的に腫瘍細胞にアポトーシスを誘導することが必要である。そこで、シーズ化合物のスクリーニングの一つとして、アポトーシス関連因子の変動をより効率的に検出できるよう条件設定を行った。また、ガン細胞の浸潤はガンの転移過程において極めて重要である。抗ガン作用に加え、浸潤抑制作用を合わせ持つ場合、より有効な抗ガン剤となり得る。そこで、基底膜再構成基質（マトリジェル）をコートし、基底膜バリアーを模したボーデンチャンバーを用いてガン浸潤阻害作用を検出する系を確立した。

<問題点>

得られた天然物のいくつかは得量が少なく動物実験が困難である。今後、大規模な抽出、あるいは化学合成により十分な量の化合物を供給する必要がある。また誘導体についても収率の面で大量合成が困難となっている場合がある。構造活性相関の検討を行うため、化合物を充分供給できるように、合成経路を検討していく必要がある。活性試験法についてはまだ多くの改善の余地がある。特に *in vivo* で、抗がん作用に加え、ガン浸潤阻害作用を合わせ持つことを検証する場合、より転移を起こしやすい担ガン動物の使用が望ましいと思われる。

<評価体制>

プロジェクト・ミーティングを定期的に関き、研究の進捗状況を報告するとともに、グループ間で協力できる内容に関する討論を行った。本事業の 1、2、及び 5 年度目（予定）に、学外の研究者も参加できるハイテク・リサーチ・シンポジウムを開催し（第 12 項参照）、自己評価、検証を行った。研究の進展に従い新たに共同研究を行う体制を模索してきた。また、国内外の各種学会やシンポジウムでの発表、国際学術雑誌への投稿を積極的に行い、客観的な評価を受けてきた。

<研究期間終了後の展望>

今後も研究は継続するが、天然物については腫瘍細胞に対して特に強い毒性を示すもの、腫瘍細胞と正常細胞に対する選択毒性が顕著なものにターゲットを絞っていく。また有望な化合物の類縁体を合成し、活性を検討する。特にビタミン K およびビタミン A については本プロジェクトで得られた高活性化合物からの構造の情報を基に側鎖部分の修飾をさらに検討し、より高い抗腫瘍活性をもち、かつ細胞選択性の高い誘導体をデザイン・合成していく予定である。

<研究成果の副次的効果>

基本骨格の異なる多くの化合物を得て、抗腫瘍活性を評価することは、ガン以外の疾病に対する治療薬を検索する上でも有効に機能している。例えばスクリーニング法の一つとして抗酸化活性を検討しているが、抗酸化活性を有する化合物はガンの他、加齢に起因する疾患に有効な場合が多い。実際に本プロジェクトで得た種々の化合物についてガン以外の疾病をターゲットとするスクリーニングに付し、有望な化合物を見出すことに成功している。

また、下記の特許を申請し取得した。

(a) 特許 2004059500、「紅豆杉とテコマを含有する医薬組成物及び食品組成物」

平井圭一、小山淳子、信川高寛（2004）。

(b) German (EPC) Patent No 60010425.7, "Anti-drug Resistant Strain Agents and Antichlamydia Agents" 平井圭一、長田久美子、小山淳子、岸本寿男（2005）。

プロジェクト② (神経性疾患の病因、病態の解明および臨床診断法と治療薬の開発)

本プロジェクトを構成する (I) - (IV) の各課題について、得られた成果を要約する。

(I) 神経系における糖鎖機能の解明

神経機能における硫酸化 GAG の構造や機能などに関して、下記のように予想をはるかに上回る多くの成果を挙げることができ、創薬に向けた強固な基盤を築くことができた。

- (1) ブタ胎仔脳と成体の脳からコンドロイチン硫酸 (CS) 画分を調製し、マウスの海馬神経に対する神経突起伸長促進活性を調べたところ、胎仔脳由来の CS 鎖のみが活性を有することを明らかにした。また、胎仔脳の CS 画分にのみイズロン酸が含まれ、胎仔脳の CS 鎖は CS /デルマタン硫酸 (DS) ハイブリッド鎖であることが判明した。
- (2) メクラウナギの脊索から精製した高硫酸化 CS /DS が神経突起伸長促進活性をもつことを明らかにした。また、各種細胞増殖・分化因子との相互作用には、CS ドメインと DS ドメインからなるハイブリッド構造が必要であることを証明した。
- (3) SH-SY5Y ニューロblast-マ細胞に強制発現させたアピカンの CS 鎖には神経栄養因子との結合能がなく、CS 鎖の組成も異なることを明らかにした。
- (4) 神経突起伸長促進活性をもつブタ胎仔脳由来 CS /DS ハイブリッド鎖と相互作用する脳内タンパク質を精製し、神経栄養因子のプライオトロフィン (PTN) であることを証明した。
- (5) マウス脳に由来する CS /DS プロテオグリカンの DSD-1-PG に特異的な単クローン抗体 473HD のエピトープ構造を、ELISA 法及び糖鎖マイクロアレイを用いて解明した。
- (6) アルツハイマー病発症危険因子であるアポEアイソフォームのヘパリン結合過程を表面プラズモン共鳴 (SPR) 法によって追跡し、結合が二段階反応であることを初めて見出した。また細胞表面でのアポEとグリコサミノグリカンの相互作用モデルの提示に成功した
- (7) 脳内で生じる C 末端欠損アポEフラグメントの神経細胞毒性に注目して C 末端を段階的に欠損したアポE4変異体の物理化学的評価を行い、切断によってモノマー化したアポEフラグメント C 末端ヘリックスの疎水性部位露出がその作用に重要であることを見出した。
- (8) 脳での CS /DS の重要性を調べるため、その生合成に関与する CS /DS GalNAc 4-スルホトランスフェラーゼ群について、発生に伴うマウス脳内での発現を精査した。C4ST-1 と C4ST-2 は脳全体に幅広く分布していたが、D4ST-1 と UST は特に小脳で限定された発現をしており、その発現時期も一過性であった。
- (9) イカ軟骨 CS-E が神経突起伸長促進活性を発現するうえで必要な最小オリゴ糖構造を同定する目的で、CS-E 多糖由来の八糖および十糖のオリゴ糖ライブラリーを作製し、主要なオリゴ糖の構造を決定した。
- (10) CS-E に特異的なファージディスプレイ抗体のスクリーニングに成功した。本抗体を用いた解析から、CS-E 様構造をもつ CS 鎖が、実際にマウスの脳における神経活動の活発な領域に分布していることを見出した。
- (11) 神経幹細胞において CS の硫酸化を阻害した実験から、神経幹細胞の維持には、CS の硫酸化が必要であることを見出した。
- (12) 種々のグリア細胞や損傷脳に発現するヘパラン硫酸 (HS) プロテオグリカンの構造および発現解析を行い、損傷脳では、ウロン酸 2 位の硫酸化の割合が増加した HS 鎖やシンデカン-1 コアタンパク質の発現が上昇することを見出した。
- (13) CS の 4-O-硫酸化を触媒する硫酸基転移酵素遺伝子のゼブラフィッシュ胚におけるノックダウン実験から、CS の硫酸化が運動神経の軸索ガイダンスに重要な役割を果たしているこ

とを明らかにした。(論文投稿中)

- (14) CS-E による神経突起伸長促進作用は、CS-E が神経細胞上の細胞接着分子であるコンタクチン-1 に結合し、下流のシグナル伝達を活性化させることによって発現されることを見出し、CS 多糖が細胞外シグナル分子として機能しうること、さらに CS を認識する受容体が存在することを、初めて証明した。(論文投稿中)
- (15) 野生型アポ E3 に比べてアポ E4 はコレステロール搬出機能が著しく低く、二量体化がアポ E アイソフォーム間でのコレステロール搬出能の違いに重要であることが示唆された。
- (16) 新規に作製した C 末端欠損アポ E、二量体化アポ E3 などを用いた検討から、二量体化などの会合体形成による細胞膜脂質や細胞表面糖鎖などとの協同的な相互作用が、アポ E の脳内コレステロール輸送機能に重要であることが示唆された。

(II) 神経系疾患の病態解明と診断法の開発

MS, PD, MG の病態解明とそれらの臨床診断法に関する応用研究を行い、実用的な臨床診断法を 2 種類開発できた。以下に得られた成果を列挙した。

- (1) 憎悪期に一致して脳脊髄液中にミエリン塩基性蛋白 (MBP) が出現することから、臨床的に有用な MBP 検出法を新規に開発した。現在臨床治験を目指している。
- (2) MS の亜型として脳グリア細胞に局在する水チャンネル蛋白 Aq uapo l in4 に対する自己抗体陽性 MS を簡便な検査法で検出できる測定法をサブグループ I と共同で作成中である。
- (3) PD に関しては、Lewy 小体中に特異的に蓄積する α -Synuclein と家族性 PD の原因遺伝子である Park 蛋白について、ラット脳組織中の部位別局在や加齢変化を明らかにした。
- (4) PD と健常者血中の α -Synuclein レベルを今回開発した ELISA 法を用いて解析し、統計学的に有意差はなかったものの、PD で増加傾向を示すことを明らかにした。
- (5) アストロサイト培養系を用いて、PD 治療薬の cabergoline、ropinirol、脳代謝賦活薬の ifenprodil、prostaglandin 類、その他の類似化合物の示す神経栄養因子生成亢進作用を検討し、作用を示す薬物を見出した (サブグループ III との共同研究)。
- (6) MG に関して、新しい診断マーカーである抗 MuSK 抗体の測定系を日本で初めて開発した。さらに、抗 MuSK 抗体のサブクラス分析やエピトープ解析を行い、日本人抗 MuSK 抗体陽性患者の臨床的特徴を明らかにした。

(III) 神経性疾患治療薬の創製

各種アミノ酸類の効率的合成法を開発するために、下記の新規ラジカル反応を開発した。

- (1) 末端にオキシムエーテルを有するヒドロキサメート類のラジカル付加閉環反応を開発し、鎖状の β -アミノ酸類の一般的合成法を確立した。
- (2) グリオキシル酸のオキシムエーテル類と種々の炭素ラジカルの反応を検討し、これらの反応が効率的に進行することを明らかにした。
- (3) 水中で亜鉛もラジカル開始剤として働くことを明らかにし、環境にやさしい新たなラジカル反応を開発した。
- (4) 分子軌道計算や各種 NMR 手法を用いて、トリエチルボランをラジカル開始剤として用いたラジカル反応の反応機構を明らかにした。
- (5) 環状ニトロンをラジカル受容体とする光学活性アミノ酸類合成の新手法を開発した。
- (6) ペンマクリン酸の不斉全合成を世界で初めて達成するとともに、類縁立体異性体の一般合成法を開発した。

(IV) 向精神薬の作用機序の解明

向精神薬の作用機序、作用と薬物動態との関連について以下の成果を得た。

- (1) ドーパミン再取り込み阻害薬の作用機序について、強制水泳試験における不動状態を指標として検討した結果、ドーパミン D1 および D2 受容体が関与することを明らかにした。
- (2) 行動モデルを用いて、欧米でうつ病の治療に使用されているセントジョーンズワートが新規の強迫性障害治療薬として有用であることを示唆する結果を得た。
- (3) 抗うつ薬として使用されている各種選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) が強迫性障害に有効であることを明らかにした。
- (4) 出産前後の神経ステロイドレベルについて検討したところ、血中 dehydroepiandrosterone、androstenediol が出産後に低下することを明らかにし、うつ病との関連性が推測された。
- (5) 各種系統のマウスについてうつ病モデル行動を精査したところ、系統間で顕著な相違があり、抗うつ薬 SSRI に対する感受性にも相違があることが判明した。さらに、脳内 pregnenolone sulfate と dehydroepiandrosterone sulfate 濃度も系統間で異なることを明らかにした。
- (6) セロトニン-ノルアドレナリン再取り込み阻害薬である milnacipran について、強迫性障害治療薬としての可能性を明らかにした。
- (7) 細胞内で不活性型グルココルチコイドを活性型に変換する 11 位水酸化ステロイド脱水素酵素 (11 β HSD1) を抑制することができれば、脳機能の低下を予防できると期待される。Benzofuranyl phenol 誘導体についてスクリーニングを行った結果、マウス大脳皮質、小脳および海馬の 11 β HSD1 活性は、4-(2-benzofuranyl)phenol と stemofuran A に、15~18%抑制されることが認められた。

<優れた成果があがった点>

(a) 神経突起伸長促進活性を持つ CS/DS 多糖から、多数のオリゴ糖を単離し、構造を決定した。得られた構造既知オリゴ糖ライブラリーは、殆ど市販されておらず、他の研究グループが調製することは非常に困難であるため、神経突起伸長促進活性発現に必要な最小オリゴ糖構造を同定し、創薬へ繋げるためには必要不可欠である。また、CS に対するレセプター分子の発見は、CS 自身が細胞外シグナル分子 (リガンド) として機能することを世界で初めて証明したことになり、CS レセプター分子の下流シグナル伝達系を含め、CS が、創薬のターゲットとして有望であることを強く示唆するものである。

(b) MS の臨床診断に応用できる簡易検査法を開発できたことは、治療法を選択でき、症状の経過を見極める指標を提供できることになり、患者にとって大変な朗報である。しかも学会を通じた呼びかけにより本検査は厚生労働省より保険収載項目となり、患者は自己負担を免れる好結果となった。一方、MG に関する新規の自己抗体の検査法も、他施設や民間検査会社が実施できない測定法であるため、共同研究先病院を通じて現在まで無料検査を行ってきている。本抗体陽性が判明すれば、治療法の選択が容易となる。このように2つの検査項目ともに現場の医療に貢献できたことは大きな成果である。

(c) ペンマクリン酸の不斉全合成を世界で初めて達成するとともに、特異な構造を有する医薬品のリード化合物として注目されているマルチネリン酸の不斉全合成に日本で2番目に成功し、今後の神経疾患治療薬の開発に繋がる合成ルートを確立した。

(d) 各種 SSRI や SNRI が強迫性障害治療薬評価モデルである marble burying behavior を抑制すること、さらに、SSRI の抗うつ作用とセロトニンおよびドーパミン作動性神経との関連に

ついて検討を行い、SSRI の抗うつ作用にドーパミン受容体が関連することを明らかにできた。また、脳内神経ステロイドである DHEA の活性を評価するために有用な、海馬、大脳皮質の 11 β HSD1 活性測定法を確立できた。さらに、benzofuranyl phenol 誘導体が 11 β HSD1 抑制作用を示すことを明らかにできた。

<問題点>

(a) 今回得られた新たな知見の多くは、GAG の構造解析、単離した GAG を用いた結合実験など、無細胞系の実験が多かった。プロジェクト 3 年目より、*in vivo* での実験も始めたが、GAG の医薬品への応用を見据えると、モデル生物や培養細胞などを使用した実験を研究の中心課題とするような方向へさらに積極的に転換する必要がある。

(b) PD に関する研究から新規な成果が得られなかった点は問題であった。今後は別の視点から病態へのアプローチを考える必要がある。

(c) ペンマクリン酸およびマルチネリン酸の両不斉全合成に関して、1 段階のみ立体選択性の向上または収率の改善が望まれた。

(d) 既存の向精神薬の効果や神経ステロイドレベルにマウス系統差が認められたことより、今後は遺伝的背景を検討し、精神神経疾患との関連を臨床的に明らかにして、病態の解明や治療法に寄与するよう努力する。

<評価体制>

プロジェクト①と同じ評価体制に基づいて自己評価および客観的評価を行ってきた。

<研究終了後の展望>

(a) 今後は医療への応用に主眼を置き、培養細胞や GAG の生合成に関与する酵素の遺伝子改変マウスを用いた解析、ならびにこれら生合成酵素の変異による遺伝病の同定など、糖鎖を利用した創薬に集約した研究を展開する。現在いくつかの GAG 生合成酵素の遺伝子改変マウスの神経系におけるフェノタイプ解析を展開しており、*in vivo* における GAG の神経系へ与える役割が明確になるであろう。また、神経細胞上の CS レセプターを介した神経突起伸長作用のより詳細なメカニズムを解析することにより、GAG 糖鎖の創薬への応用を目指す。

(b) 今後、確立した MS 診断法の臨床治験を行い、広く活用できる検査にしたい。また、抗 MuSK 抗体測定法に関しては保険収載項目の認定を獲得し、MG 患者の診断確定率の向上を目指す。

(c) 神経伝達に関わる生物活性アミノ酸類の合成研究は永遠のテーマであることから、今後も外部資金に支援される研究を続行する予定である。

<研究成果の副次的効果>

下記の特許（出願番号／申請年／発明の名称／発明人）を出願し、取得した。

(a) 特願 2004-308584／2004 年／「サメ皮由来のコンドロイチン硫酸／デルマトン硫酸ハイブリッド糖鎖」／菅原一幸他。(b) PH-2152US-PROV（米国仮出願）／2004 年／"CHONDROITIN SULFATE/DERMATAN SULFATE HYBRID CHAINS AS THERAPEUTIC AGENTS FOR NEUROLOGICAL DISEASES"／菅原一幸他。(c) GBP290245（英国出願）／2004 年／"Antibody"／菅原一幸他。(d) 登録番号 3522775／2004 年／「ヘパラン不飽和 4 糖およびその製造法」／菅原一幸、杉浦眞喜子、山田修平他。(e) 特願 2005-80724／2005 年／「抗デルマトン硫酸抗体と機能性硫酸化オリゴ糖」／菅原一幸、バオ・シンフォン。(f) 特願 2005-165699／2005 年／「サメ軟骨のコンドロイチン硫酸由来の硫酸化八糖」／菅原一幸。(g) 特願 2005-197587／2005 年／「プレイオトロフィン結合性および非結合性のコンドロイチン硫酸／デルマトン硫酸」／菅原一幸、バオ・シンフォン。