

課題番号	22 独先 11
------	----------

【様式 5 独創的・先駆的研究】

## 学術研究助成金〔独創的・先駆的研究〕 実績報告書

令和 5 年 4 月 15 日

氏 名： 小 菅 康 弘  
 所属・資格： 薬学部・教授  
 実施研究所： 薬学部・薬学研究所

### 1 研究課題

新薬創出を加速化するレジリエントな代謝物ライブラリーの構築と応用

### 2 研究期間

令和 4 年度 ～ 令和 5 年度  
 ※令和 年度 ～ 令和 年度（※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること）

### 3 研究組織

	氏 名	部科校・資格	役割分担
研 究 代 表 者	小 菅 康 弘	薬学部・教授	研究統括, 神経細胞を用いたスクリーニング, 病態モデル動物の作製と評価
研 究 分 担 者	廣 瀬 大	薬学部・教授	真菌ライブラリーの構築、遺伝子解析
	三 枝 禎	松戸歯学部・教授	疼痛モデル動物の作製と評価
	川 戸 貴 行	歯学部・教授	培養歯肉線維芽細胞および破骨細胞を用いたスクリーニング
	西 村 克 史	短期大学部(船橋校舎)・教授	藻類ライブラリーの構築、遺伝子解析
	谷 川 実	理工学部・准教授	藻類ライブラリーの構築、遺伝子解析
	斎 藤 稔	文理学部・教授	神経突起変性の数理解析、神経突起進展の自動認識法の開発

※ホームページ等での公開 (  可・  否 ) いずれかをチェックしてください。  
 否の場合は、理由書を別途添付のこと。

#### 4 現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として、以下の区分より自己評価を行ってください。  
<区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分： ②】・【達成度： 50 %】

#### 5 研究目的

超高齢化社会を迎えた我が国では、人生 100 年時代に向けて、全ての人々が、それぞれのライフステージで、生き生きと、健やかに、安心して生活できる社会の実現が望まれている。そのため、医薬品の開発は、経済発展（産業と技術の革新）と社会的課題（健康・福祉）の解決を両立する重要な研究課題である。しかし、医薬品開発は、途轍もない労力と費用が必要であり、何より「そこまでかけられるだけの実用化の価値」が見出せるかが重要である。なかでも、神経変性疾患などの難治性疾患では、大企業が開発に躊躇するような希少疾患等が多く、アンメット・メディカルニーズも存在するため、これらの領域ではアカデミアが創薬に貢献できるチャンスが必然的に高くなる。創薬研究では、疾患の原因となるタンパク質や遺伝子などの創薬標的の同定をはじめに、各種スクリーニング系の構築、創薬シードの創出、メディシナルケミストリーなどによる最適化を図り、前臨床試験へと進む。その中で、膨大な数の化合物ライブラリーから医薬品候補化合物を効率的に探索する系の確立は重要なプロセスである。そのため、如何に質の高い化合物ライブラリーを創製するかがポイントである。本研究は、酵母から高等動植物に至る真核生物細胞に備わっているストレスの回避機構を利用し、医薬品を開発するうえで鍵となるシーズを創出する新たなアプローチを提示することを目的とする。また、申請者らが保有する Seed 化合物・植物エキスの新規活用法を検証することで、実用化に繋がる学理を創出することを目的とする。

#### 6 研究概要

本研究は、参画する研究者が個別な疾患に関する研究を推進するのではなく、申請者らが独自に保有するストレス抑制薬やデジタルツールの有用性を多面的・多角的に検証することで、疾患の治療や症状の緩和を可能とする製品の研究・開発を加速化する研究基盤を構築する。特に、真菌や藻類の採取、培養法開発、エキスの抽出を担う「試料採取・提供班」、培養細胞による生物活性物質を含むフラクションの検索・評価を行う「in vitro 検索班」、個体レベルでの有用性を検討する「in vivo 評価班」、各チームが収集したデータの数理解析を担う「数理解析班」の 4 つのチームで構成され、研究開発ステージにあわせて連携をとることで、新薬創製に有用なライブラリーの構築に取り組む。令和 4 年度は、(1) 2 次代謝産物含有フラクションの作製および拡充（廣瀬・西村・谷川）と (2) 株化細胞を用いた *in vitro* スクリーニングでの細胞障害性および細胞保護効果の検証（小菅・川戸・斎藤）を中心に、(3) 申請者らが保有する化合物および植物エキスの効果を神経障害性疼痛病態モデルマウスおよび筋萎縮性側索硬化症 (ALS) モデルマウスを用いて評価した（小菅・三枝）。

## 7 研究結果 (4,000 字以上記入のこと)

## (1) 糸状菌由来および藻類由来二次代謝産物ライブラリーの構築の小胞体ストレス誘発細胞死に対する保護効果の検証

小胞体ストレスは、小胞体機能の不全により生じ、脳梗塞、パーキンソン病やアルツハイマー病などで認められる神経細胞死に関与するだけでなく、炎症や癌などにも関与することが報告されている。これまでに、小菅及び廣瀬らの研究グループでは、糸状菌を標的とした二次代謝産物の新規化合物探索研究とその生物活性の同定を行っている。そこで、本研究でも神経細胞保護物質の探索を目的として、マウス海馬由来神経様細胞の HT22 を用いて、糸状菌由来二次代謝産物が小胞体ストレス誘発細胞死に及ぼす影響について検討を行った。

HT22 の生存率は、MTT 法により評価した。試料は、菌株をポテトデキストロース培地もしくはジクロラン・グリセロール培地で 1 週間もしくは 2 週間振盪培養した培養液を酢酸エチル抽出し、乾固したものを dimethyl sulfoxide に溶解して用いた。小胞体ストレスの誘導薬のひとつであるツニカマイシンが誘発する細胞死に及ぼす影響を検討した結果、Hirose & Watanabe によって新種記載された *Mariannaea imbricata* NUH319 の代謝産物において、細胞死毒性はあるものの、細胞死抑制効果が認められた。そこで、その成分探索と構造解析を行ったところ、少なくとも 4 種類の化合物が単離された。さらに、その新規化合物のひとつは細胞死毒性を示さずに細胞保護作用を有すことを見出した。以上より、本研究グループで作製・保有する二次代謝産物ライブラリーは、新規化合物を含むフラクションを有するだけでなく、有用な生物活性を持つ化合物も含有することから、小胞体ストレスが関与する神経変性疾患の新たな治療薬開発ツールとなることが示唆された。現在、これらの化合物の化学構造の解明と化学的合成法についても検討しているが、これらの成果の一部は、研究代表者の研究室所属の高橋愛 大学院生ら (○高橋愛、岩崎里矩、草間-江口國子、宮岸寛子、石内勘一郎、廣瀬大、松崎桂一、大崎愛弓、小菅康弘) が「糸状菌由来二次代謝産物の小胞体ストレス誘発細胞死に対する保護効果」とのタイトルで 2023 年 3 月に開催された日本薬学会第 143 年会 (札幌) にて発表した。現在、その内容の一部を含んだ論文を執筆中である。

研究分担者の廣瀬らの研究グループでは、日本産のハチミツやハウスダストのなかから新種の糸状菌を発見し、報告した (Ryo Hagiuda, Tadashi Itagaki, Dai Hirose. *Aspergillus verrucosus* sp. nov., a xerophilic species isolated from house dust and honey in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2023 73(2). doi: 10.1099/ijsem.0.005727.)。現在、これらの新種の真菌が産生する代謝産物のライブラリーを作製するとともに、細胞傷害性及び細胞保護効果を HT22 細胞等で検証している。同様に、西村・谷川らも様々な培養条件で単離培養した藻類を用いた代謝産物ライブラリーを作製し、拡充しつつある。次年度以降では、HT22 細胞にツニカマイシンを曝露することで小胞体ストレスを誘発するストレス抑制薬スクリーニング法に加えて、Salk 研究所の Pamela Maher Research Professor および Antonio Currais Staff Scientist と開発したミトコンドリア機能抑制薬を用いた *in vitro* 虚血モデル、ミクログリアのモデル細胞である BV2 細胞に Lipopolysaccharide (LPS) を用いて神経炎症を模したモデルを活用し、その応用性・機能性についても詳細に検討していく予定である。

## 〔7 研究結果 (つづき)〕

## (2) 病態モデルマウスを用いた化合物および植物エキスの治療効果の検証

ビデンス・ピローサ (*Bidens pilosa* L. var. *radiata* Scherff : BP) は、民間薬や機能性食品として世界的に利用されているキク科センダングサ属の植物である。これまでに、研究代表者らの研究グループは、沖縄県宮古島で栽培され、加工された植物製剤である宮古ビデンス・ピローサエキス末 (MBP) には、ALS のモデルマウスとして汎用されている SOD1<sup>G93A</sup> トランスジェニックマウス (G93A マウス) で生じるミクログリアやアストロサイトの活性化を抑制し、生存期間を延長させることを報告している (Kosuge Y., et al. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:1020673)。そこで、MBP の ALS 治療効果のメカニズム解明のため、MBP がグリア細胞活性化に及ぼす影響を検討した。

運動機能障害発症直後の 15 週齢の雄性 G93A マウスに、精製水で溶解した MBP を 7 日間経口投与 (2 g/kg/day) し、腰髄内の mRNA 発現量を real-time PCR 法により測定した。はじめに、G93A マウスの腰髄におけるミクログリア表現型の極性変化について精査したところ、細胞傷害性の M1 ミクログリアのマーカである IFN- $\gamma$  R の mRNA 発現レベルと細胞保護性の M2 ミクログリアマーカである IL-13R および Ym1 の mRNA 発現レベルが亢進しており、G93A マウスの腰髄では M1 ミクログリアおよび M2 ミクログリアのいずれもが増加していることが明らかとなった。そこで、MBP がこれらの増加に及ぼす影響を検討した。その結果、IFN- $\gamma$  R の mRNA 発現レベルは MBP の投与により顕著に抑制されたものの、MBP は IL-13R および Ym1 の mRNA 発現増加には影響を及ぼさなかった。同様に、各種のサイトカインの mRNA 発現レベルの変化についても検討した。G93A マウスでは、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、および IL-6 の発現が増加するだけでなく、抗炎症性サイトカインである TGF- $\beta$  および IL-10 の産生が増加した。MBP は TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、および IL-6 の増加は顕著に抑制したが、TGF- $\beta$  および IL-10 の増加には影響を及ぼさなかった。以上より、MBP の ALS 治療効果には、細胞傷害性の M1 型ミクログリア選択的な制御による神経炎症の抑制が関与することが示唆された。これらの成果は、研究代表者の研究室所属の鶴田こむぎ 大学院生が (○鶴田こむぎ、宮岸寛子、設楽尊人、廣瀬大、小菅康弘) が、「宮古ビデンス・ピローサは筋萎縮性側索硬化症モデルマウスの M1 型ミクログリアの増加を選択的に抑制する」とのタイトルで 2022 年 9 月に第 66 回日本薬学会関東支部大会 (横浜) にて口頭発表するとともに、同大学院生が (○鶴田こむぎ、宮岸寛子、中谷善彦、高橋愛、廣瀬大、天野託、小菅康弘) が、「宮古ビデンス・ピローサはミクログリア細胞株 BV-2 細胞の細胞増殖と Lipopolysaccharide 誘発性の炎症性応答を抑制する」とのタイトルで 2023 年 3 月の日本薬学会第 143 年会 (札幌) で発表した。現在、これらの成果をまとめ、"Miyako *Bidens pilosa* extract regulates inflammatory response in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis and lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglia" (著者 Komugi Tsuruta, Takato Shidara, Hiroko Miyagishi, Hiroshi Nango, Yoshihiko Nakatani, Naoto Suzuki, Taku Amano, Toyofumi Suzuki and Yasuhiro Kosuge) とのタイトルで国際学術誌に投稿中である。

## 〔7 研究結果 (つづき)〕

研究代表者らは、また、MBP には神経障害性疼痛治療薬のシーズとなることを見出している (小菅康弘、宮岸寛子、高橋愛、特願 2022-10060)。そこで、疼痛緩和作用のメカニズム解明を、神経障害性疼痛モデルマウスとして雄性 ICR マウスの右後肢の坐骨神経を半結紮した partial sciatic nerve ligation マウス (PSL マウス) を用いて行った。MBP は 2 g/kg を 1 日 1 回経口投与し、対照群には精製水を経口投与した。病態責任部位である腰髄におけるミクログリアおよびアストロサイトの変化を検討したところ、アストロサイトマーカーである GFAP の発現レベルは、いずれの群においても顕著な変化は認められなかった。一方、ミクログリアのマーカーである CD11b の発現レベルは、術後 3 日の水を投与した PSL マウスにおいて有意に上昇した。これに対して、MBP を投与した PSL マウス群の CD11b の発現レベルは、水を投与した PSL マウスと比較して、有意に抑制された。以上果より、MBP は、術後早期に生じるミクログリアの活性化が関与することが示唆された。次年度は、免疫組織化学的手法により活性化変化が生じるミクログリアの種類や位置などを解析するとともに、炎症性サイトカインやプロスタグランジンなどの他の病態修飾因子の発現に及ぼす影響についても検証する予定である。

さらに、MBP については、研究分担者である歯学部川戸教授の研究グループの研究成果により新たに「破骨細胞の分化抑制剤または破骨細胞の骨吸収機能抑制剤」としての可能性を見出したため、NUBIC を介して製品開発者の武蔵野免疫研究所とともに、特許を出願した (川戸貴行、小菅康弘、田中秀樹、破骨細胞分化抑制剤、特願 2022-207058)。なお、これらの一連の成果は、2023 年 5 月に開催の第 72 回日本口腔衛生学会学術大会 (大阪) で、川戸教授の研究室の中井久美子助教が「宮古島産 *Bidens pilosa* 抽出物の骨吸収性疾患の予防への応用に向けた基礎研究」というタイトルでシンポジウムを、同研究室の福澤京子 大学院生が「宮古島産 *Bidens pilosa* 抽出物が破骨細胞の分化に及ぼす影響」とのタイトルで研究発表を行う予定である。

加えて、これまでに、研究代表者と研究分担者の松戸歯学部三枝教授らとが共同研究を行ってきたプロスタグランジン類の運動ニューロン分化促進作用や、ALS の運動ニューロンの脆弱性に関する研究成果を Hiroshi Nango; Komugi Tsuruta; Hiroko Miyagishi; Yuri Aono; Tadashi Saigusa; Yasuhiro Kosuge で共同執筆した総説「Update on the pathological roles of prostaglandin E2 in neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis」をまとめ、国際科学誌に投稿中である。

**(3) 運動ニューロンモデル細胞および iPS 細胞を用いた軸索進展促進因子の解明と数理解析**

中枢神経系 (CNS) に細胞体が存在する運動ニューロンは骨格筋の収縮弛緩の制御を司っており、これらは上位運動ニューロンと下位運動ニューロンに分類される。特に、下位運動ニューロンは脊髄前角に存在しており、CNS から末梢骨格筋に直接的にニューロン信号を伝達している細胞である。ALS はこれらの運動ニューロンが選択的に変性する疾患であるため、運動ニューロンの変性を抑制する、あるいは機能的な運動ニューロンを新たに作製するといった根本的治療法の開発は渴望されている。しかし、ALS では神経変性のメカニズムだけでなく、運動ニューロン分化や神経突起伸長のメカニズムについても不明な点が多い。研究代表者は、これまでに、

## 〔7 研究結果（つづき）〕

神経芽腫と脊髄運動ニューロンのハイブリッド細胞であり、運動ニューロンのモデルとして汎用されている NSC-34 細胞を用いて、prostaglandin E2 や prostaglandin D2 が運動ニューロンの分化や神経突起の進展を促進するとともに、機能的な運動ニューロンへ成熟させることを薬理学的手法や分子細胞学的手法を用いて明らかにしてきた（総説; Hiroshi Nango and Yasuhiro Kosuge, *Cell Mol Neurobiol* 2022 42(7):2097-2108）。そこで、本研究では、研究分担者である文理学部の齋藤教授が開発した数理計画法を用いて、PGE2 や PGD2 の有する神経突起進展作用と既存の神経栄養因子の作用を比較する。本年度は、NSC-34 細胞を用いて長時間（3～7 日程度）タイムラプス撮影方法を検討した。これらの成果は、研究代表者の研究室所属の永山恋梅 大学院生が 2023 年 8 月開催予定の「生体機能と創薬シンポジウム 2023」（@徳島）または「次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム 2023」（@徳島）で発表予定である。また、研究代表者も、2023 年 6 月 17 日（土）（オンライン開催）の教育講演で発表予定である。次年度は、prostaglandin 類が iPS 細胞の神経分化に及ぼす影響を評価するとともに、ALS モデルマウス脊髄内の神経幹細胞に及ぼす影響についても評価することを新たに計画している。