

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 6 年 4 月 22 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

研究代表者及び研究分担者

	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

連携組織

組 織 名	役 割 分 担
株式会社 武蔵野免疫研究所	沖縄産植物由来エキスの資料提供および情報提供

※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：100 %】

5 研究目的

医薬品の開発は、産業と技術の革新などの経済発展と健康・福祉という社会的課題の解決を両立する重要な研究課題である。特に、超高齢化社会を迎えた我が国では、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おり、その実現には難治性疾患の医薬品開発が重要である。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寄与する割合が高くなる。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だけでなく、各病態に適したスクリーニングモデルの構築、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。特に、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評価系の確立は重要なプロセスである。本研究では、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応答機構に着目し、それらを制御することで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。あわせて、申請者らが保有する Seed 化合物・植物エキスの新規活用法やその作用機序を明らかにすることを目的とする。

6 研究概要

本研究は、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る。令和5年度も、(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)を中心に検証をすすめ、順調にライブラリーを拡充することに成功した。特に、そのなかから新たに4つの活性フラクションを見出しただけでなく、ALS モデルマウスでも ALS 治療効果を示す物質を見出すことに成功した。また、iPS 細胞や運動ニューロンモデル細胞を用いた画像解析法についても取り組みその妥当性を評価した。(3) 申請者らが保有する化合物および植物エキスの効果検証と新たな病態モデルマウスの作製を行った(小菅・三枝)。特に、ALS モデルマウスで認められた宮古島産 *Bidens pilosa* 抽出物(MBP)の治療効果に新たな作用機序を見出しただけでなく、新たな産学共同研究をシーアクト社と締結し、特許出願に至る化合物の薬効を明らかにした。一方で、本研究計画主催の「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シンポジウム～生命科学研究を志す高校生・大学生の皆さんへの研究紹介～」を2013年10月28日(土)にハイブリッド形式で開催し、現役高校生を含む78人の参加を得た。

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とそのスクリーニング

小胞体機能の不全により生じる小胞体ストレスは、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ことが報告されている。本研究では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。昨年、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).)。そこで、本年度は、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より細胞傷害性及び細胞保護効果を HT22 細胞でスクリーニングした。HT22 の生存率を MTT 法により評価したところ、大半のフラクションは HT22 細胞の生存率を低下させ、細胞毒性を示したが、4 つのフラクションでは小胞体ストレス誘発細胞死に対して保護効果を示した。現在、このフラクションを大量培養し、有効成分の同定に取り組んでいる。また、新たな真菌株を獲得するために 2022 年と 2023 年に鹿児島県諏訪ノ瀬島および岩手県八幡平・秋田焼山において植物根の採集を行った。根表面を殺菌処理後に培養することで根内に定着する真菌の分離を試みた結果、それぞれ 342 菌株と 95 菌株を獲得することに成功した。これらの菌株に加え廣瀬らの研究室で保有している 51 属 189 種 225 菌株について、① ポテトデキストロース培地 (PD) もしくはジクロラン・グリセロール培地 (DG18)、② ヒートショック処理 (50°C, 20 min.) した PD もしくは DG18、③ 15% NaCl 添加 PD もしくは DG18、④ 10 μg/mL ツニカマイシン添加 PD もしくは DG18 で 1 週間もしくは 2 週間振盪培養、酢酸エチルで抽出後乾固し、アッセイ用試料としてライブラリーに提供した。これらの成果については、本研究プロジェクトが主催した「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シンポジウム～生命科学研究を志す高校生・大学生の皆さんへの研究紹介～」 (@船橋、日本大学薬学部) の中で、「甘い蜜のささやきー菌学者、新種の花園と出会う」とのタイトルで廣瀬教授自ら発表した。

研究分担者の西村・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拡充するとともに、微細藻類の分離と物質変換についても検証した。微細藻類は光のエネルギーを利用して有機物を生合成する独立栄養光合成微生物である。微細藻類を生体触媒とした物質変換は環境負荷が少ない点が利点である。そこで、自然環境から微細藻類を単離し、シンナムアルデヒドをシンナミルアルコールへ変換する株をスクリーニングした。47 地点より採取した水サンプルより微細藻類を分離した結果、72 の単離株が得られた。選抜した単離株 15 株を用いて変換試験を行ったところ、多くの株はシンナムアルデヒド添加により死滅したが、M-41 株はシンナムアルデヒドに対して耐性を持ち、目的生成物であるシンナミルアルコールの収率は 24 時間後に最大 (78%) となることが明らかになかった。上記の結果は、前期の本研究プロジェクトが主催したシンポジウムの中で、日本大学理工学部物質応用化学科環境微生物学研究室 修士課程 2 年 松浦圭佑大学院生が「微細藻類の分離と物質変換」とのタイトルで発表した。

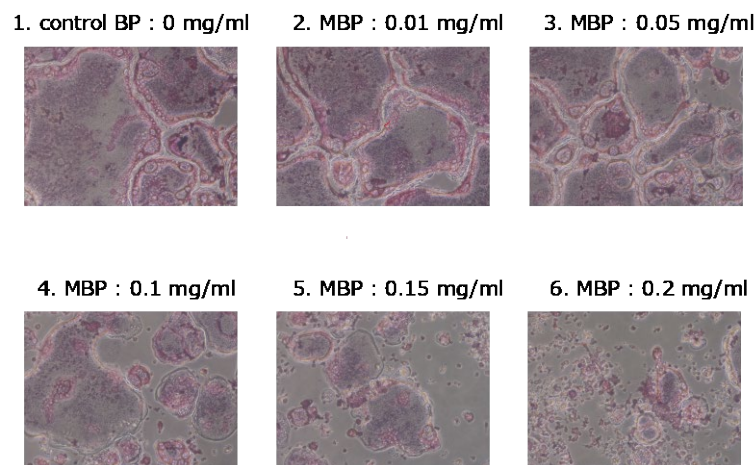
〔7 研究結果 (つづき)〕

(2) 病態モデル細胞を用いた化合物および植物エキスの治療効果の検証

研究分担者の川戸らの研究グループは病的な骨吸収を想定した RANKL 誘導性の破骨細胞分化における宮古島産 *Bidens pilosa* 抽出物 (MBP) の効果を細胞生物学的に検討した。MBP は大型の破骨細胞形成 (図 1) と骨吸収関連酵素 (炭酸脱水酵素 2 型, カテプシン K, ゼラチナーゼ) の産生を抑制した。

図 1 RANKL 誘導性の破骨細胞形成に対する MBP の効果

また, superoxide dismutase の発現増加と活性酸素種の産生抑制を認めたことから, MBP が細胞の抗酸化能を高めて骨吸収を抑制する可能性が示された。さらに, 骨芽細胞への高濃度グルコース負荷による細胞障害関連分子パターンの発現増加と加熱式タバコ煙成分の刺激による骨形成機能低下, ならびにフッ化物による線維芽細胞の成長因子の発現増加を確認し, 今後, これらに対する MBP の効果を検討するための基礎的知見を得たと考えている。



一方, 研究代表者の小菅らのグループでは, 昨年, MBP には ALS のモデルマウスとして汎用されている SOD1^{G93A} トランスジェニックマウス (G93A マウス) で生じる M1 ミクログリアの活性化を選択的に抑制することを報告している (Tsuruta K, Shidara T, Miyagishi H, Nango H, Nakatani Y, Suzuki N, Amano T, Suzuki T, Kosuge Y. Anti-Inflammatory Effects of Miyako *Bidens pilosa* in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Lipopolysaccharide-Stimulated BV-2 Microglia. *Int J Mol Sci.* 2023;24(18):13698.)。そこで, MBP の ALS 治療効果のメカニズム解明のため, MBP がアストロサイト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。G93A マウスの腰髄におけるアストロサイトの表現型の極性変化について精査したところ, A1 型アストロサイトのマーカーである C3 および Gbp2 の発現と A2 型アストロサイトのマーカーである S100a10 の発現が亢進した。同様に, 炎症性サイトカインである TNF- α , IL-1 β , および IL-6 の発現とともに, 抗炎症性サイトカインである TGF- β および IL-10 の発現も増加した。MBP がこれらの増加に及ぼす影響を検討したところ, MBP は C3 の発現を有意に抑制し, Gbp2 の発現を抑制する傾向を示したが, S100a10 の増加には影響を及ぼさなかった。また, MBP は炎症性サイトカインの発現増加は顕著に抑制したが, 抗炎症性サイトカインの発現増加には影響を及ぼさなかった。以上の結果より, MBP の ALS 治療効果には, A1 選択的なアストロサイトの発現制御による神経炎症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浜野裕衣 (学部 6 年生) ら (○浜野裕衣, 鶴田こむぎ, 宮岸寛子, 青野悠里, 三枝禎, 斎藤稔, 小菅康弘) が「宮古ビデン

〔7 研究結果 (つづき)〕

ス・ピローサエキスは筋萎縮性側索硬化症モデルマウスの A1 型アストロサイトの増加を選択的に抑制する」とのタイトルで 2023 年 6 月 17 日の第 148 回日本薬学会関東支部大会 (@Zoom) にてポスター発表するとともに、小菅が「先端的異分野融合で切り拓く新たな薬理学研究を目指して」とのタイトルでその成果の一部を教育講演で発表した。さらに、研究分担者の廣瀬らのグループで保有する二次代謝産物ライブラリーの中から見出した ALS モデルマウスにおいて治療効果を示した新規化合物についても、その詳細を国際科学誌にて発表した (Kusama-Eguchi K, Tokui Y, Minoura A, Yanai Y, **Hirose D**, Furukawa M, **Kosuge Y**, Miura M, Ohkoshi E, Makino M, Minagawa K, Matsuzaki K, Ogawa Y, Watanabe K, Ohsaki A. 2(3H)-Dihydrofranolactone metabolites from Pleosporales sp. NUH322 as anti-amyotrophic lateral sclerosis drugs. *J Nat Med.* 2024;78(1):146-159.)。また、研究代表者と摂南大学薬学部の吉岡教授・山室助教らと共同研究で行った ALS のグリア細胞に関する研究成果が *Journal of Pharmacological Sciences* 誌 (Yamamuro-Tanabe A, **Kosuge Y**, Ishimaru Y, Yoshioka Y. Schwann cell derived-peroxiredoxin protects motor neurons against hydrogen peroxide-induced cell death in mouse motor neuron cell line NSC-34. **2023**;153(2):73-83.) および *Neurochemical Research* 誌 (Yamamuro-Tanabe A, Mukai Y, Kojima W, Zheng S, Matsumoto N, Takada S, Mizuhara M, **Kosuge Y**, Ishimaru Y, Yoshioka Y. In Increase in Peroxiredoxin 6 Expression Induces Neurotoxic A1 Astrocytes in the Lumbar Spinal Cord of Amyotrophic Lateral Sclerosis Mice Model. **2023**;48(12):3571-3584.) に掲載された。

さらに、グラム陰性桿菌のひとつの *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) は、歯周疾患の発症へ関与すると考えられているため、*Pg* 由来の LPS (*Pg*-LPS) は、歯周疾患の進行において重要な役割を果たすことが示唆されている。歯周疾患の全身への影響には、この疾患に関わる微生物または微生物由来の生理活性物質の血流を介した移行が関与することが考えられる。これまでのラットを用いた *in vivo* の研究から、*Pg*-LPS は歯肉組織に局所投与すると同部位の細胞外液中の TNF- α 量を一過性に増大させることが示されている。しかし、歯肉へ局所投与された *Pg*-LPS が血中の TNF- α 量に及ぼす影響については明らかでなかった。そこで、研究分担者の三枝らの研究グループでは、urethane 麻酔下のラットから回収した血液を試料とし *Pg*-LPS の歯肉への投与が試料中の TNF- α 量に及ぼす影響について生化学的に検討した。その結果、代表的なグラム陰性桿菌の *Escherichia coli* (*Ec*) 由来の LPS (*Ec*-LPS) とは異なり *Pg*-LPS のラットの歯肉への投与は血液中の TNF- α 量の増大を誘発したが、歯肉に投与した量の *Ec*-LPS と *Pg*-LPS の静脈投与ではいずれも血液中の TNF- α 量への顕著な影響は認められなかった。以上の生化学的研究から *Pg*-LPS は、全身投与とは異なり歯肉への局所投与により血中の TNF- α 量を増大させることが示された。歯周疾患の全身への影響へ関わりと考えられる血中 TNF- α 量の増加が *Pg*-LPS の静脈投与ではなく歯肉への投与で誘発されることが示唆された。これらの成果は、Koji Saito, **Yuri Aono**, Kazuki Arai, **Yasuhiro Kosuge** and **Tadashi Saigusa** で共同執筆し、「*In vivo* evidence that intra-gingivally administered *Porphyromonas gingivalis*-derived lipopolysaccharide provokes increases in blood TNF- α levels of urethane-anaesthetised rats」とタイトルで *International Journal of Oral-Medical Science* 誌 (2024;22 (4): 178-186) に掲載されている。

〔7 研究結果 (つづき)〕

加えて、研究代表者の小菅らは、微細藻類 *Aurantiochytrium* が産生する脂質から抽出精製され、ペンタデカン酸を中心とした奇数鎖の飽和脂肪酸により構成されるトリグリセライドであるペンタデシルに着目した研究も行った。ペンタデシルは、これまでに、正常ヒト線維芽細胞に対する小胞体ストレス緩和作用、視神経細胞の保護、肌細胞の改善作用などが報告されている。しかし、Lipopolysaccharide (LPS) が誘発する炎症に及ぼす影響については検証された例がなく、不明なままである。本研究では、マウスミクログリア細胞株 BV-2 細胞を用いて、LPS 誘発性の炎症反応に及ぼす影響について検討した。シーアクト社から供与されたペンタデシルの曝露は、BV-2 細胞の増殖能に影響を及ぼさなかった。ペンタデシルは LPS 誘発性の炎症性サイトカイン IL-1 β および IL-6 の発現増加を抑制したものの、TNF- α の増加には影響を及ぼさなかった。ペンタデシルは、抗炎症性サイトカイン TGF- β や IL-10 の発現レベルには影響を及ぼさなかった。以上より、BV-2 細胞においてペンタデシルは炎症性サイトカイン選択的な産生抑制作用を介した抗炎症効果を示すことが示唆された。これらの成果は、研究代表者の研究室所属の鶴田こむぎ 大学院生ら（鶴田こむぎ、佐藤優成、宮岸寛子、阪田泰子、石川英明、坪井誠、小菅康弘）が 2024 年 3 月開催の日本薬学会第 144 年会（横浜）にて、「Lipopolysaccharide 刺激 BV-2 ミクログリア細胞におけるペンタデシルの抗炎症作用」とのタイトルで発表するとともに、シーアクト社と共同で特許出願した（特願 2024-010296）。なお、現在、その内容の一部を含んだ論文を執筆中である。

〔3〕運動ニューロンモデル細胞および iPS 細胞を用いた数理解析

研究代表者は、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 (PGE2) や prostaglandin D2 (PGD2) 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報告している。本年度の研究では、研究分担者である文理学部の齊藤教授らの保有する細胞撮影装置を利用し、NSC34 細胞における PGE2 の神経突起進展作用の時間変化を検証し、詳細に解析した。NSC-34 細胞では、これまで、PGE2 受容体である EP2 および EP3 受容体、PGD2 受容体である DP1 および DP2 受容体が発現することが明らかとなっていたが、PGI2 受容体である IP 受容体が発現していることを発見した。PGE2 曝露や Gs タンパク質共役型の EP2 受容体刺激は、細胞増殖を抑制し、神経突起を伸長させたものの、EP2 受容体と同じ Gs タンパク質共役型受容体である IP 受容体や DP1 受容体刺激は、細胞増殖や神経突起の伸長に影響を及ぼさなかった。一般的に、分裂が終了したニューロンは先導突起の伸長と細胞体の牽引という 2 つの段階を繰り返すことで目的地に移動し、標的細胞と回路を形成する。そこで、タイムラプス撮影により経時的な形態変化を観察したところ、PGE2 を曝露した NSC-34 細胞では、神経突起の伸縮を繰り返すと同時に細胞体の牽引が生じ、細胞形態が激しく変化することが明らかになった。一方、PGI2 曝露では NSC-34 細胞の神経突起や細胞形態に変化はなかった。以上より、PGE2 刺激による NSC-34 細胞の運動ニューロンへの変換は、生体内でのニューロンの成熟過程と同様のプロセスを介して分化・成熟していくことが示唆された。これらの成果

〔7 研究結果（つづき）〕

は、研究代表者の研究室所属の永山恋梅 大学院生ら（永山恋梅，岡部悠衣，日根梨緒，北山雄大，安井景子，宮岸寛子，斎藤稔，小菅康弘）が 2023 年 10 月 28 日開催の令和 5 年度（第 3 4 回）日本大学薬学部学術講演会にて、「運動ニューロン様株化細胞 NSC-34 の神経突起伸長に Prostaglandin 類が及ぼす影響」とのタイトルで発表し，優秀発表賞を受賞した。

一方で、研究分担者の齊藤らの研究グループでは、健常者およびアルツハイマー型認知症患者（AD）から作製した iPS 細胞由来の神経細胞の神経突起形態に対して数理解析を行った。iPS 細胞由来の神経前駆細胞に対して、播種後 3 日目から 1 4 日目に顕微鏡撮影を行い，それぞれの神経突起に対して駆動力を計算した。そして，得られた駆動力に対してトレンド除去揺らぎ解析（Detrended Fluctuation Analysis; DFA）を行うことで、スケーリング指数や自己相関性の変化を求めた。その結果、駆動力の自己相関性は，AD 由来の神経突起では健常者由来のものより有意に小さく，駆動力はよりランダムに近いことが分かった。また，神経突起の伸長過程において，神経突起変性に関わっているタウやアミロイド β といったタンパク質の異常凝集体の発現を免疫蛍光染色によって調べた。その結果，これらの凝集体の発現が健常者由来と AD 由来の神経突起では異なることを見出すとともに，このような違いが見られる前に既に駆動力の自己相関性には違いが見られることを見出した。これらの成果は，「アルツハイマー病に特徴的なタウアイソフォーム蓄積を再現する病態モデルの作製」および「患者脳由来タウ凝集体の立体構造に基づいた新規変異型タウの解析」とのタイトルで，2023 年 7 月に開催された第 66 回日本神経化学会大会合同大会（@神戸）にて発表した。