

# 博士學位論文要旨

(令和元年度取得分)



## 膝関節腔内注射剤架橋ヒアルロン酸製剤 Gel-200 の変形性膝関節症に対する有効性および安全性の解析

高村 絢子

東北医科薬科大学大学院薬学研究科 機能病態分子学教室

変形性膝関節症（膝 OA [osteoarthritis]）は関節軟骨の変性・破壊により起こり、主症状は、関節痛や関節水腫、関節裂隙の狭小化である。膝 OA の治療では、運動療法、物理療法、薬物療法などの保存的治療が主なアプローチとなり、薬物療法では、経口剤や外用剤としてアセトアミノフェン、非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）が、関節腔内注射剤としてヒアルロン酸ナトリウム（HA）製剤や副腎皮質ステロイド製剤が主に用いられる。保存療法で症状の改善が得られない、関節破壊が進展した患者では、手術療法が考慮される。

HA 製剤は、1970 年に競走馬の治療として初めて使用され、膝 OA に対しては 1987 年にアルツ<sup>®</sup>が国内で初めて承認された。その作用メカニズムは十分に解明されていないものの、多くの報告から抗炎症作用、鎮痛作用および関節軟骨の保護作用、滑液の正常化を有することが示唆されている。

Gel-200（Gel-One<sup>®</sup>, 生化学工業株式会社）は無色透明で粘弾性のある架橋 HA 製剤であり、米国で 2011 年より販売されている。架橋構造を有することにより、従来の HA 製剤の毎週 1 回 5 回投与 3 カ月の有効性から 1 回投与 6 カ月の有効性へと投与回数の減少と有効性の延長に成功した。

Gel-200 はこれまでに 3 本の臨床試験（臨床試験

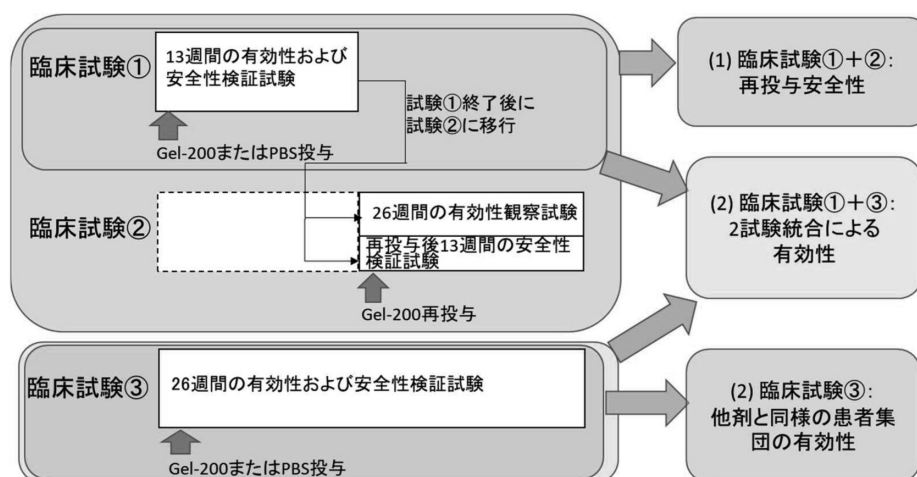
①：膝 OA 患者を対象とした Gel-200 の 1 回投与後 13 週間の有効性および安全性検証試験；臨床試験②：臨床試験①を終了した患者を対象とした Gel-200 の 1 回投与後 26 週間までの有効性観察および再投与後 13 週間までの安全性検証試験；臨床試験③：膝 OA 患者を対象とした Gel-200 の 1 回投与後 26 週間までの有効性および安全性試験）を実施し、膝 OA 患者に対して、1 回膝関節腔内投与後、26 週までの有効性を示し、高い忍容性があることが示されている。

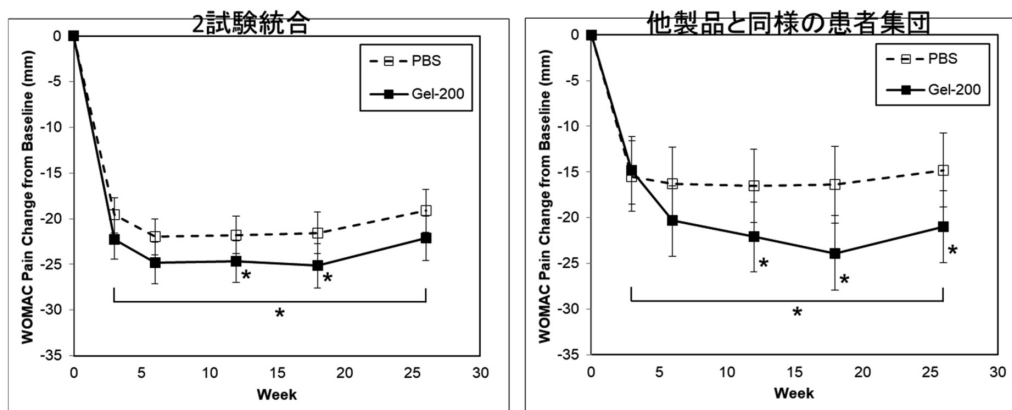
一方、米国では他の HA 製剤も販売されており、それらと Gel-200 を比較すると臨床試験の手法が異なる上、Gel-200 の臨床試験間でも評価方法が異なるため、臨床試験結果の解釈が難しい。さらに一部学会や論文では、HA 製剤の有効性と安全性に対して懐疑的な意見が出ており、治療ガイドラインでの推奨度低下に及んでいる。

本研究では、Gel-200 の臨床試験データを網羅的に再分析し、他 HA 製剤と比較可能な Gel-200 の有効性および安全性データを取得し、評価することを目的として実施した。

### （1）Gel-200 の再投与後の安全性<sup>1)</sup>

臨床試験②の再投与率は他 HA 製剤の試験に比べて低かった。非再投与群は、初回投与の Gel-200





の副作用が原因で再投与を受けなかったのかを確認するため、初回投与後の Gel-200 による副作用および Gel-200 の有効性について、Gel-200 再投与群と Gel-200 非再投与群間で臨床試験①を用いて比較した。

非再投与群は再投与群に対して、Gel-200 初回投与後に統計的に有意に高い疼痛改善を示した。副作用の割合は、患者群間で統計的な差が認められなかった。よって、非再投与群は初回投与後の Gel-200 の有効性が持続し、追加治療が不要であったと示唆され、Gel-200 による副作用が問題でなかったことが分かった。

また、Gel-200 の再投与後の安全性を評価するため、他製品の臨床試験と同じ評価期間である再投与後 4 週までの副作用が報告された患者の割合について、臨床試験②で Gel-200 を再投与した患者群と Gel-200 を 1 回投与した患者群間で比較した。

Gel-200 再投与後 4 週までの副作用の割合は、Gel-200 を 1 回投与後の副作用の割合と統計的な有意差がなかった。よって、Gel-200 は再投与後も安全性に懸念がなかった。

## (2) Gel-200 の有効性<sup>2,3)</sup>

Gel-200 の有効性を総合的に評価するため、臨床試験①と臨床試験②のデータを統合し、有効性を Gel-200 群と PBS 群間で比較したところ、Gel-200 は PBS に比べて、統計的に有意に疼痛を改善した。

また、Gel-200 の臨床試験では、他の HA 製剤の臨床試験と比較すると、幅広い重症度の患者層が含まれていた。他の HA 製剤の臨床試験と有効性を比較することができるよう、臨床試験③の患者群から他 HA 製剤の臨床試験と同じ患者層を抜き出した部分患者集団を用いて、Gel-200 の有効性を解析した。

Gel-200 は PBS に対して、1 回投与後 12 週以降 26 週まで統計的に有意に疼痛を改善した。また、両群間の差は全患者を含めた場合に比べて、さらに大きくなった。

以上の解析結果より、Gel-200 の再投与後安全性と、高い有効性が示され、これらの結果が治療ガイドラインでの正しい評価や医療機関での治療選択に貢献できると考えられる。

## 〈参考文献〉主論文（原著論文）

- 1) Strand V, Lim S, Takamura J. Evidence for safety of retreatment with a single intraarticular injection of Gel-200 for treatment of osteoarthritis of the knee from the double-blind pivotal and open-label retreatment clinical trials. BMC Musculoskelet Disord. 2016;17:240 doi:10.1186/s12891-016-1101-0.
- 2) Takamura J, Takayuki S, Strand V. A pooled analysis of two multicenter, randomized controlled trials of a single intra-articular injection of Gel-200 for treatment of osteoarthritis of the knee. Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord. 2018 May 9;11:1179544118773068. doi:10.1177/1179544118773068. eCollection 2018.
- 3) Takamura J, Takayuki S, Strand V. A single intra-articular injection of Gel-200 for treatment of symptomatic osteoarthritis of the knee is more effective than phosphate buffered saline at 6 months: a subgroup analysis of a multicenter, randomized controlled trial. Cartilage. 2018 Apr 1;1947603518768015. doi:10.1177/1947603518768015.

## Importance of core fucosylation in FLT3-mediated cellular signaling

段 程偉

東北医科薬科大学大学院薬学研究科 細胞制御学教室

Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3) is a glycoprotein, that is a member of the class III receptor tyrosine kinase family. Approximately one-third of acute myeloid leukemia (AML) patients have mutations of this gene, and activation of the FLT3 downstream pathway plays an important role in both normal and malignant hematopoiesis. However, the role of N-glycosylation for FLT3 activation remains unclear. In this study, we found that the N-glycan structures on wild type (WT), internal tandem duplication (ITD), and tyrosine kinase domain (TKD) mutants of FLT3 were different. Interestingly, expression of either WT or mutant FLT3 in Ba/F3 cells, an interleukin-3 (IL-3)-dependent hematopoietic progenitor cell, greatly induced core fucosylation. To elucidate the function of core fucosylation in FLT3-mediated signaling, we used a CRISPR/Cas9 system to establish  $\alpha$ 1,6-fucosyltransferase (Fut8) knockout (KO) cells. Surprisingly, the Fut8KO resulted in cell proliferation in an IL-3-independent manner in FLT3-WT cells, which was not observed in the parental cells, and suggested that this proliferation is dependent on FLT3 expression. Fut8KO greatly increased cellular tyrosine phosphorylation levels, together with an activation of STAT5, AKT and ERK signaling, which could be completely neutralized by restoration with Fut8 in the KO

cells. A tyrosine kinase inhibitor consistently and efficiently inhibited cell proliferation induced by Fut8 KO or specific fucosylation inhibitor. Additionally, immunostaining with FLT3 showed that the proteins were mainly expressed on the cell surface in the KO cells, which is similar to FLT3-WT cells, but different from the ITD mutant. Finally, we found that Fut8KO could induce dimer-formation in FLT3 without ligand-stimulation. Taken together, the present study clearly defines the regulatory function of core fucosylation in FLT3, which could provide a valuable direction for the development of drugs that could be effective in the treatment of AML.

### 〈参考文献〉 主論文, 参考論文

- 1) Duan C, Fukuda T, Isaji T, Qi F, Yang J, Wang Y, Takahashi S, Gu J. Deficiency of core fucosylation activates cellular signaling dependent on FLT3 expression in a Ba/F3 cell system. *FASEB J* 2020 Feb;34(2):3239–3252.
- 2) Lu X, Zhang D, Shoji H, Duan C, Zhang G, Isaji T, Wang Y, Fukuda T, Gu J. Deficiency of  $\alpha$ 1,6-fucosyltransferase promotes neuroinflammation by increasing the sensitivity of glial cells to inflammatory mediators. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2019 Mar;1863(3):598–608.



## Analysis of $\alpha$ 2,3-sialyltransferases (ST3GAL3, ST3GAL4, and ST3GAL6) in cell biological functions

祁 峰

東北医科薬科大学大学院薬学研究科 細胞制御学教室

The  $\alpha$ 2,3-Sialylation of N-glycans is considered important but complicated, because the functions of the three  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ 2,3-sialyltransferases, ST3GAL3, ST3GAL4, and ST3GAL6, could be compensating for one another. To distinguish their specific functions, we established each individual knockout (KO) cell line. Loss of either the ST3GAL3 or ST3GAL6 genes decreased cell proliferation and colony formation, as opposed to the effect in the ST3GAL4 KO cells. The phosphorylation levels of ERK and AKT were significantly suppressed in the ST3GAL6- and ST3GAL3-KO cells, respectively. The cell aggregations were clearly observed in the KO cells, particularly the ST3GAL3- and ST3GAL6-KO cells, and the expression levels of E-cadherin and claudin-1 were enhanced in both those cell lines, but were suppressed in the ST3GAL4 KO cells. Those alterations were reversed with an overexpression of each corresponding gene in rescued cells. Of particular interest, the  $\alpha$ 2,3-sialylation levels of  $\beta$ 1 integrin were clearly suppressed in the ST3GAL4 KO cells, but these were increased in the ST3GAL3- and ST3GAL6-KO cells, while the  $\alpha$ 2,3-sialylation levels of EGFR were significantly decreased in the ST3GAL6 KO cells.

The decrease in  $\alpha$ 2,3-sialylation increased the  $\alpha$ 2,6-sialylation on  $\beta$ 1, but not EGFR. Furthermore, a cross-restoration of each of the three genes in ST3GAL6 KO cells, showed that overexpression of ST3GAL6 sufficiently rescued the total  $\alpha$ 2,3-sialylation levels, cell morphology and  $\alpha$ 2,3-sialylation of EGFR, while the  $\alpha$ 2,3-sialylation levels of  $\beta$ 1 were greatly enhanced by an overexpression of ST3GAL4. These results clearly demonstrate that the three  $\alpha$ 2,3-sialyltransferases modify characteristic target proteins and regulate cell biological functions in different ways.

### 〈参考文献〉 主論文, 参考文献

- 1) **Qi, F.**, Isaji, T., Duan, C., Yang, J., Wang, Y., Fukuda, T., Gu, J.. ST3GAL3, ST3GAL4, and ST3GAL6 differ in their regulation of biological functions via the specificities for the  $\alpha$ 2,3-sialylation of target proteins. *FASEB J.* 2020 Jan;34(1):881–897.
- 2) Yang, J., Isaji, T., Zhang, G., **Qi, F.**, Duan, C., Fukuda, T., Gu, J. EpCAM associates with integrin and regulates cell adhesion in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 Dec 2. pii: S0006-291X(19)32280-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.11.152.



## EpCAM regulates cell adhesion and migration in cancer cells

楊 捷

東北医科薬科大学大学院薬学研究科 細胞制御学教室

The epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is one of the most frequently and intensely expressed of tumor-associated antigens, but the role that EpCAM plays in the proliferation, adhesion and migration properties of cancer cells remains unclear. In the present study, we screened several tumor cell lines and found that colorectal cancer CW-2 and epidermoid carcinoma A431 cells expressed relatively higher levels of EpCAM. In order to assess the biological functions of EpCAM expression in cell adhesion and migration, we established a knock out (KO) of EpCAM genes in both of these types of cancer cells via a CRISPR/Cas9 system. The elongated cell morphology was converted to a rounded morphology in the EpCAM-KO cells. These cells showed decreases in cell proliferation and migration into extracellular matrix proteins, as well as decreases in cellular signaling elements such as phosphorylated focal adhesion kinase (FAK), AKT and ERK. Moreover, the cell growth and the colony formation abilities were significantly decreased in EpCAM-KO cells. Importantly, co-immunoprecipitation analysis revealed that EpCAM associated with integrin  $\beta 1$ .

Also, the expression levels of integrin  $\alpha 5$  were decreased in EpCAM-KO cells, compared with that in the wild-type cells. Taken together, these data clearly demonstrate that EpCAM associates with integrin  $\beta 1$  to regulate FAK/ERK signaling pathways in controlling cell adhesion, migration and proliferation via extracellular matrix adhesion, which provides novel mechanisms for EpCAM-mediated biological functions and cancer phenotypes.

### 〈参考文献〉 主論文, 参考文献

- 1) **Yang, J.**, Isaji, T., Zhang, G., Qi, F., Duan, C., Fukuda, T., Gu, J. EpCAM associates with integrin and regulates cell adhesion in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 Dec 2. pii: S0006-291X (19)32280-6. doi:10.1016/j.bbrc.2019.11.152.
- 2) Qi, F., Isaji, T., Duan, C., **Yang, J.**, Wang, Y., Fukuda, T., Gu, J.. ST3GAL3, ST3GAL4, and ST3GAL6 differ in their regulation of biological functions via the specificities for the  $\alpha 2,3$ -sialylation of target proteins. *FASEB J.* 2020 Jan;34(1):881 – 897.



## 海馬 AMPK 活性化による抗うつ作用とそのメカニズム解明に関する研究

小平 貴代

東北医科薬科大学大学院薬学研究科 薬理学教室

うつ病は意欲減退、体重減少、睡眠障害などの精神および身体的症状を呈する疾患である。厚生労働省の調査によると、平成 30 年度の健康理由による自殺者の大部分をうつ病が占めていたとされる。現在のうつ病治療では多くの抗うつ薬が汎用されているが、医療費圧迫および長期服用によるコンプライアンス低下の面から、うつ病の予防療法および新規治療法の開発が求められている。

うつ病モデル動物として当研究室では、嗅球摘出 (Olfactory bulbectomy: OBX) マウスを用いてうつ病の病態および抗うつ薬の作用メカニズムの解明を行ってきた。このマウスでは、尾懸垂試験 (Tail-suspension test: TST) および強制水泳試験 (Forced swimming test: FST) で無動時間の延長として評価されるうつ様行動に加え、脳内のモノアミン神経伝達系を中心とした障害が確認されている。さらに、これらの障害は既存の抗うつ薬を慢性投与することで改善が認められている。これらのことから、OBX 動物は臨床的妥当性のあるうつ病モデル動物として注目されている。

継続的な運動にはうつ病の予防効果があることが近年の研究で示唆されている。運動による抑うつ気分の改善には、Adenosine monophosphate (AMP) 活性化プロテインキナーゼ (AMP-activated protein kinase: AMPK) の関与が示唆されている。さらに、AMPK の活性化作用を有する Metformin, 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside (AICAR) および Resveratrol がうつ病患者やうつ病モデル動物のうつ様症状を改善することが報告されている。しかしながら、脳内の AMPK 活性化がどのようなメカニズムで抗うつ作用を示すかは十分に明らかにされていない。

以上の背景より、本研究では OBX マウスに AICAR を投与し、AMPK 活性化による抗うつ作用およびその作用メカニズムの解明を目的として行動薬理的、神経化学的および分子生物学的に検討した。

OBX 法から 21 日目における OBX マウスでは、

TST における無動時間の延長、すなわちうつ様行動が認められた。この無動時間の延長は AICAR の急性投与ではなく 14 日間の慢性投与により有意に短縮され、抗うつ作用を示した。また、AICAR による抗うつ作用は FST においても認められた。これらのことから、持続的な AMPK 活性化が抗うつ作用に関与することが示唆された。

これまでに、AMPK の活性化はプロテインキナーゼ (Protein kinase: PK) C $\zeta$  の活性化を促すこと、その PKC $\zeta$  は核内因子  $\kappa$ B (Nuclear factor-kappa B: NF- $\kappa$ B) を介して神経の細胞増殖、成長因子として知られている脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor: BDNF) の分泌を促し、Tyrosine kinase receptor type 2 (TrkB) 受容体を介してサイクリック AMP 応答配列結合タンパク (Cyclic AMP response element-binding protein: CREB) をリン酸化することが報告されていることから、これらのタンパクのリン酸化および発現レベルを Western blotting 法により評価した。その結果、AICAR を慢性投与することで海馬 AMPK および NF- $\kappa$ B のリン酸化が認められた。さらに、OBX 群で認められる海馬 PKC $\zeta$  と CREB のリン酸化レベルおよび BDNF 発現レベルの減少は、AICAR の慢性投与によって有意に改善された。

抗うつ薬の作用機序として、これまで脳内モノアミンの上昇に起因するモノアミン仮説で理解されていたが、臨床で認められる抗うつ作用の発現時期と抗うつ薬のモノアミン濃度が上昇する時期が乖離しているなどの矛盾があった。2000 年代になり、抗うつ薬は BDNFなどを介して海馬で認められる神経細胞の産生を促進させることから、神経細胞新生仮説が提唱されるに至っている。このことから、海馬歯状回における神経新生が AICAR の投与により促進されているか否かを免疫組織化学的染色法にて評価した。その結果、OBX マウスの海馬歯状回では新生細胞マーカーである 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) および未熟神経細胞マーカーである Doublecortin (DCX) を共発現している神経新生細胞

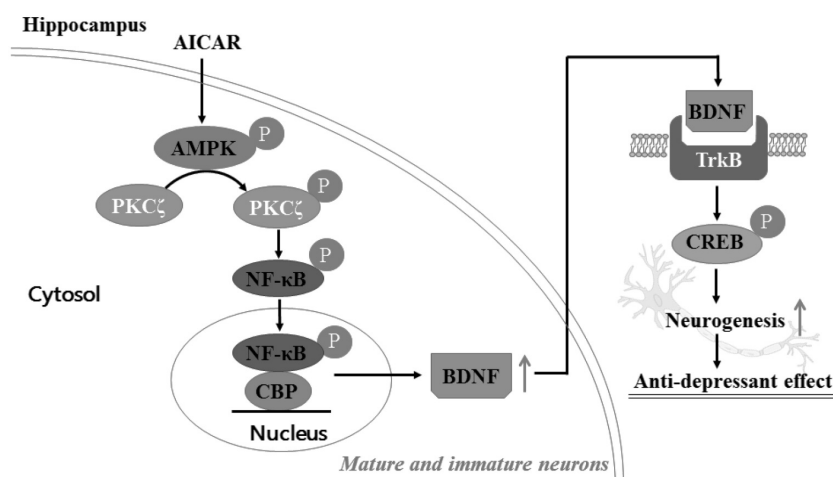


Fig. 1. Hypothesis of AICAR antidepressant mechanism.

胞数は減少傾向を示した。一方、AICAR を慢性投与することにより BrdU/DCX 陽性細胞数は有意に改善した。したがって、海馬 AMPK の活性化が神経新生を促進させることを明らかにした。

AICAR による抗うつ作用に PKCζ の活性化が関与しているか否かを明らかにするため PKCζ 阻害薬である Myristoylated PKC pseudosubstrate (Zeta-inhibitory peptide: ZIP) を併用し、AICAR の抗うつ作用を評価した。その結果、OBX マウスへの AICAR 慢性投与により認められていた TST での無動時間の短縮は ZIP を併用することで消失した。また、AICAR 慢性投与により認められていた BDNF 発現量の上昇と海馬歯状回における神経新生促進作用も、ZIP の併用により有意に抑制された。神経新生には BDNF およびその受容体である TrkB 受容体の活性化が関与していることから、AICAR の抗うつ作用に TrkB 受容体の活性化が関与しているか否かを検討するため TrkB 受容体アンタゴニストである ANA-12 の効果を検討した。その結果、AICAR の慢性投与による抗うつ作用は ANA-12 の併用によって消失した。また、海馬神経新生への影響を検討したところ、AICAR 投与により認められていた神経新生促進作用は ANA-12 を併用することで有意に抑制された。これらの結果より、AICAR は海馬 AMPK/PKCζ/NF-κB 経路により BDNF の発現上昇を促し TrkB 受容体を介して海馬歯状回における神経細胞の増殖を促していることが示唆された。

次に、AMPK による一連のシグナル経路の活性化が海馬のどの細胞種で起きているかを特定するため Neuronal nuclei (NeuN: 成熟神経細胞マーカー)、DCX、Ionized calcium binding adaptor

molecule 1 (Iba-1: ミクログリアマーカー) および Glial fibrillary acidic protein (GFAP: アストロサイトマーカー) を使用し、リン酸化 AMPK との共局在を免疫組織化学的手法で染色し観察した。その結果、リン酸化 AMPK は NeuN、DCX および Iba-1 陽性細胞で共局在が認められたが、GFAP 陽性細胞においてはリン酸化 AMPK との共局在は認められなかった。この結果を踏まえ、AMPK の下流に存在する NF-κB が NeuN、DCX および Iba-1 のいずれの陽性細胞で活性化しているかを検討した。その結果、リン酸化 NF-κB は NeuN および DCX 陽性細胞で共局在を示し、Iba-1 陽性細胞とは共局在は認められなかった。これらの結果より、AMPK による一連のシグナル活性化は未熟および成熟神経細胞内で起きていることが示唆された。

以上の本研究での結果を総括すると、AICAR は海馬成熟神経細胞および未熟神経細胞内の AMPK/PKCζ/NF-κB 経路を活性化し、BDNF 発現量の上昇を生じる。次いで、BDNF が TrkB 受容体に作用して CREB のリン酸化を介し、神経新生を促進して抗うつ作用を示すことを明らかにした (Fig. 1)。また、海馬 AMPK を活性化する薬物が新規抗うつ薬に成り得る可能性を示唆した。

## 主論文 (原著論文)

Odaira T, Nakagawasai O, Takahashi K, Nemoto W, Sakuma W, Lin JR, Tan-No K, Mechanisms underpinning AMP-activated protein kinase-related effects on behavior and hippocampal neurogenesis in an animal model of depression, *Neuropharmacology*. 2019;150:121–133.

## 潰瘍性大腸炎モデルラットにおける吸収制御因子の変動および体内動態への影響

熊谷 菜歩

東北医科薬科大学大学院薬学研究科 薬物動態学教室

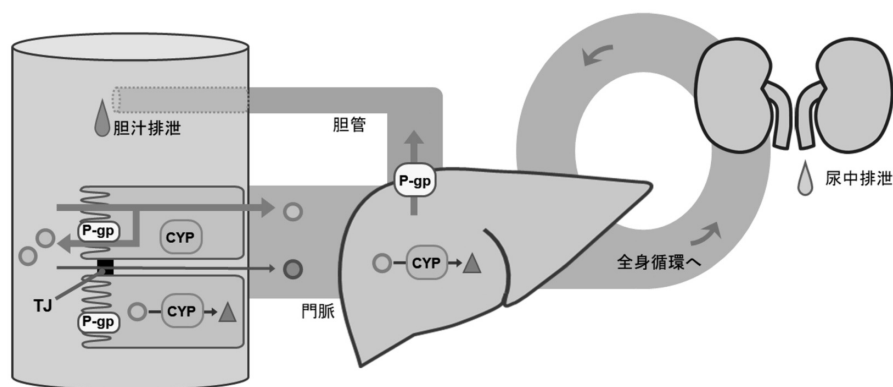
潰瘍性大腸炎 (Ulcerative Colitis: UC) は寛解と再燃を繰り返す原因不明の難治性疾患であり、長期的な治療が必要である。UC 患者では炎症部位の大腸において、粘液層の変化や腸内細菌叢の変化、細胞間隙の開口による透過性亢進が起こり、腸上皮バリア機能が破綻していることが知られている。さらに、UC 患者の空腸において病理組織学的変化が認められた報告、あるいは大腸の粘膜が治癒しているにもかかわらず、下痢や腹痛などの症状がある患者において回腸で粘膜透過性亢進が認められた報告など、炎症部位である大腸に加えて小腸での機能異常が示唆された。経口投与された薬物の主な吸収部位は小腸であり、小腸における薬物の透過性亢進は薬物の血中濃度上昇をもたらし、副作用発現を生じる可能性がある。そのため、適切な投与量設計のためにも病態時の薬物体内動態を把握することは重要である。そこで、本研究ではヒト UC と類似した病態を呈するデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発性 UC モデルラットを用い、病態時の小腸における薬物の吸収変動およびその後の体内動態への影響を検討した。

薬物の吸収ルートを生理解剖学的に大別すると、経細胞輸送 (transcellular transport) と細胞間隙輸送 (paracellular transport) に分類できる。

経細胞輸送ルートは、腸管粘膜上皮細胞膜の脂質二重層を単純拡散によって透過することから、一般に脂溶性薬物の透過性に優れている。腸管粘膜上皮細胞の刷子縁膜側に存在する排泄トランスポーターである P-糖タンパク質 (Pglycoprotein; P-gp) や小腸上皮細胞内における代謝酵素 Cytochrome P450 の中で最も多く発現している CYP 3A は、いずれも基質特異性が低く、多くの薬物の経口バイオアベイラビリティの低下に関わっていることが知られている。そこで本研究では、まずこの点に注目し、UC 時の小腸における P-gp および CYP3A 発現および肝初回通過効果の変動について検討を行った。DSS ラットの空腸、回腸 (小腸) および結腸 (大腸) を用いて P-gp の

mRNA 相対発現量および diffusion chamber 法による機能解析を行ったところ、空腸および結腸において、DSS 群で P-gp の mRNA 発現量および機能の低下が生じ、これに対応した P-gp 基質の腸管粘膜上皮細胞からの透過性亢進が認められた。一方、回腸では P-gp mRNA 発現および機能の低下は認められず、UC 時の P-gp 発現および機能低下には部位差が明らかとなった。さらに、DSS 群の空腸および回腸において CYP3A9 mRNA 発現の上昇が認められ、小腸粘膜上皮細胞内での代謝が亢進する可能性が考えられた。一方で、体内で最も代謝酵素が多く存在する肝臓においては、CYP3A1, 2, 9, 18 mRNA の有意な発現低下 (12%, 23%, 5%, 17%まで低下) が認められたことから、経口投与後に全身循環血へ至る前の小腸および肝臓による初回通過効果は低下すると推察された。さらに、DSS 群において肝細胞の胆管側膜の P-gp mRNA 発現低下が観察されたことから、胆汁排泄の遅延も認められた。次に、P-gp の機能低下が *in vivo* へ反映するかについて P-gp の基質である Rhodamine123 (Rho123) を用いて薬物速度論解析を行った。Rho123 は静脈内投与後の血中濃度推移をみると、DSS ラット群では  $\beta$  相 (消失相) の低下、半減期の延長を示し、それに伴い AUC の増大と全身クリアランスの低下を生じさせた。この現象は胆管側膜に存在する P-gp の発現低下が認められていることから、胆汁排泄の低下による消失の遅延が考えられた。また、Rho123 経口投与後の血中濃度推移をみると、吸収速度定数ならびに最高血中濃度の上昇が示された。したがって、空腸の P-gp 機能が低下している UC 患者が P-gp 基質となる薬物を経口摂取した場合、薬物の透過性が亢進し血中濃度上昇に伴う副作用の恐れがあるため、投与量の減量が必要になると考えられる。

一方、細胞間隙輸送ルートは主に水溶性薬物が単純拡散によって透過する。細胞と細胞の間は Tight junction (TJ) によって強固に結合しており、バリア機能として重要な働きをしている。TJ



Scheme of Gastrointestinal Absorption and Drug Disposition

の開口は水溶性薬物やイオンの透過性亢進に関与することから、細胞間隙輸送ルートにおいては、TJ が水溶性薬物の吸収制御因子として機能している。本研究では、TJ 機能の評価を行うために、水溶性薬物のモデルとして細胞間隙マーカーである 6-Carboxyfluorescein (6-CF) を用いた。diffusion chamber 法にて評価を行ったところ、空腸および結腸からの 6-CF の透過性亢進は DSS 群において顕著に認められたが、回腸においては有意な差は認められなかった。同時に TJ 機能指標である膜抵抗値を測定したところ、空腸および結腸において膜抵抗値の低下が認められたが、回腸においては有意な変動は認められなかった。また、膜抵抗値低下と 6-CF の透過性亢進には相関が認められ、P-gp の機能低下と同様の部位差が明らかとなった。次に、whole body においても同様の部位差が認められるかを検討するために、Loop 法を用いて空腸、回腸および結腸の各部位から 6-CF を投与し、血中濃度推移を検討したところ、*in vitro* の実験結果と同様の部位差が認められた。この部位差の原因を明らかにするために、TJ を構成しているタンパクの中でも腸管全域に発現し、透過性亢進と発現低下との相関が認められている claudin-4 の免疫染色を行ったところ、claudin-4 の発現は空腸で減弱が認められ、回腸および結腸では認められなかった。このことから小腸間における透過性亢進の部位差は、claudin-4 の発現低下の有無が関与していると考えられた。さらに、TJ 機能低下による水溶性薬物の吸収およびその後の体内動態を検討するために、6-CF 投与後の血中濃度を測定し、薬物速度論解析を行った。その結果、経口投与後の血中濃度推移をみると、吸収速度定数ならびに最高血中濃度の上昇が示された。これは、空

腸における claudin-4 発現量の低下に伴う TJ 開口に基づくものであると考えられた。また、6-CF 静脈内投与後の血中濃度推移をみると、DSS ラット群では有意な  $\beta$  相（消失相）の低下ならびに半減期の延長が示され、このことが顕著な AUC の増大と全身クリアランスの低下を導いたと考えられた。したがって、クリアランス臓器が腎臓である水溶性薬物は、UC 患者において投与量の減量も視野に入れて薬物療法をする必要があると考えられた。

本研究では、UC モデルラットを用いて大腸に加えて薬物吸収部位である空腸からの P-gp 基質および水溶性薬物の吸収増大、さらにクリアランス臓器である肝臓および腎臓の機能低下を引き起こしていることを明らかにした。同様なことはヒトにおいても起こっていることが予測されるため、したがって、UC 患者には吸収制御因子およびクリアランス臓器の機能低下を考慮した薬物療法が重要であり、本研究の結果は、今後の疾患を考慮した薬物療法において非常に有用な知見を与えていると考えられる。

#### 〈参考文献〉主論文（原著論文）

- 1) Kumagai M, Ishii M, Morimoto K, Tomita M., Increased membrane permeation and blood concentration of 6-carboxyfluorescein associated with dysfunction of paracellular route barrier in the small intestine of ulcerative colitis model rats. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, in press.
- 2) 熊谷 茉歩, 石井 敬, 森本 かおり, 富田 幹雄, デキストラン硫酸ナトリウム誘発性潰瘍性大腸炎ラットにおける肝および腸バリア機能の変動. 東北医科薬科大学研究誌, 印刷中.

# タデ藍 *Persicaria tinctoria* 含有機能性成分の PPAR $\gamma$ 活性化を介したインスリン抵抗性の改善及び TNF- $\alpha$ 誘導炎症モデルにおける抗炎症作用の研究

金野 太亮

東北医科薬科大学大学院薬学研究科 生薬学教室

タデ藍 *Persicaria tinctoria* は、タデ科イヌタデ属の一年生植物であり、古来より藍染めの染料や食用、および生薬として、その美的要素と多くの機能性に由来する様々な用途が知られている。当研究室では Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ) リガンド活性を示す化合物のスクリーニングを行っているが、タデ藍 *Persicaria tinctoria* に含まれる Indirubin、および Tryptanthrin が PPAR  $\gamma$  リガンド活性を有することに着目し、タデ藍の機能性の解明と新たな治療薬としての可能性について、第1章ではマウス脂肪細胞 3T3-L1 細胞株を用いた Indirubin のインスリン抵抗性改善作用について、第2章ではヒト結腸上皮細胞 HT-29 細胞株における TNF- $\alpha$  誘導性炎症モデルを用いた潰瘍性大腸炎 (Ulcerative Colitis; UC) における Tryptanthrin の抗炎症メカニズムを検討した。

## 【第1章】タデ藍 *Persicaria tinctoria* 含有成分 Indirubin による PPAR $\gamma$ 活性化と脂肪細胞におけるインスリン抵抗性改善作用の検討

【背景】インスリン感受性の亢進に寄与する Adipokine は、正常に成熟した成熟脂肪細胞により産生されるが、脂肪細胞の分化障害や過度に肥大

化した脂肪細胞により産生される炎症惹起物質はインスリン抵抗性を引き起こす (Fig. 1)。PPAR  $\gamma$  は脂肪細胞分化のマスターレギュレーターであり、インスリン感受性に関与する重要な因子である。PPAR  $\gamma$  を活性化することは、脂肪前駆細胞を成熟脂肪細胞へと細胞分化を促進させるとともに、成熟脂肪細胞における糖脂質代謝能を亢進させることで脂肪細胞の正常な機能を増強し、インスリン抵抗性の改善に寄与できる可能性がある。このことから、Indirubin の PPAR  $\gamma$  リガンド活性を介したインスリン抵抗性改善作用について検討した。

【方法】Indirubin の PPAR  $\gamma$  リガンド活性は、ELISA 法で評価した。また、マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 細胞株を用いて脂肪前駆細胞から成熟脂肪細胞への細胞分化促進作用に対する影響と、成熟脂肪細胞における Glucose 消費量、GLUT4、Adiponectin、および Estrogen の定量を行い、Indirubin のインスリン抵抗性改善作用を評価した。

【結果】50 nM Indirubin は、同濃度の Pioglitazone と比較し 1.35 倍強い PPAR  $\gamma$  リガンド活性を示した。この結合活性は、PPAR  $\gamma$  アンタゴニスト GW9662 (100 nM–1 nM) により濃度依存的に有意に抑制された。脂肪前駆細胞に対する Indirubin (1  $\mu$ M–1 nM) の影響を検討したところ、脂肪前

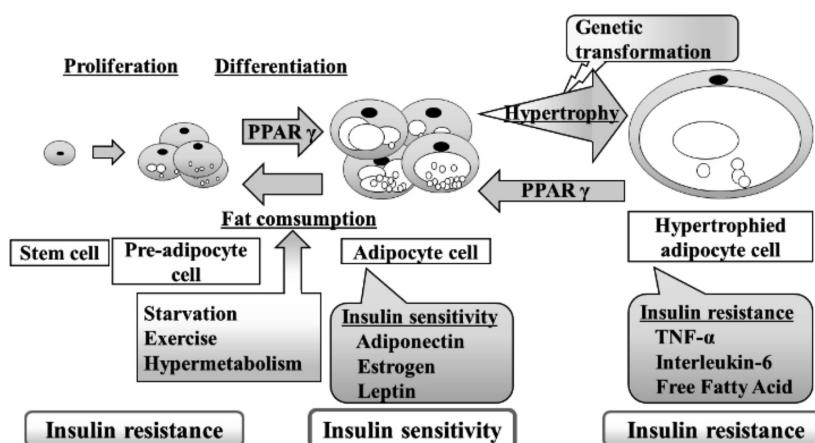


Fig. 1. Differentiation process of adipocytes and insulin sensitivity.

駆細胞の成熟脂肪細胞への細胞分化を促進し、その作用はインスリン依存的に増強された。次に、成熟脂肪細胞に対する Indirubin の影響を検討した。Indirubin ( $1\mu\text{M}$ – $1\text{nM}$ ) で処理した細胞はコントロール群と比較して、Rosiglitazone 処理群 ( $1\mu\text{M}$ – $1\text{nM}$ ) と同様に脂肪滴サイズの縮小と多数の微細な脂肪滴の分散を認める細胞分化の適正化による過剰な脂肪蓄積を有意に抑制した。また、Indirubin 処理により培地中 Glucose 濃度の有意な低下を示し、最も低下した  $1\mu\text{M}$  Indirubin 処理群ではコントロール群と比較し 13.7% の低下が見られた。このとき、GLUT4 発現量は Indirubin 処理群でコントロール群と比較して、最大で 1.48 倍の有意な増加を示し、その影響は用量依存的であった。この影響は、 $1\mu\text{M}$  Indirubin は同濃度の Rosiglitazone と比較して約 1.2 倍強いものであった。さらに、Indirubin 処理した細胞における Adiponectin、および Estrogen 分泌量は、コントロール群と比較して各々最大 1.85 倍、および 1.64 倍の有意な分泌量亢進を示し、その影響には明確な濃度依存性を認めた。

**【考察】** PPAR $\gamma$  は細胞の核内受容体として機能性維持を司る重要な調節因子であり、その生理機能発現はリガンド結合部位へのリガンド結合により活性化された PPAR $\gamma$  が、PI3K/Akt 系、Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) 系、および AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) 系等の複数のシグナル伝達系に対する多彩な調節、およびクロストークを介して制御されることに起因する。特に、PI3K/Akt シグナル系は細胞分化、Glucose 輸送、および脂質代謝等の多彩な生理機能

発現に関与することが示されていることから、GLUT4 発現量増加に伴う糖消費量の亢進、および Adipokine 分泌量増加は Indirubin が PPAR $\gamma$  を介し本経路に作用した可能性が推察される。また、Indirubin 処理した細胞には特徴的な形態学的変化が観察されたが、これは脂肪前駆細胞から成熟脂肪細胞への分化に伴い脂質代謝能を獲得する過程において、PPAR $\gamma$  活性化を介した脂質合成関連遺伝子発現やその活性調節、さらに脂質代謝関連タンパク質等に対し影響を与えたものと推察できる。今後、より詳細な検討が必要ではあるが、以上のことから Indirubin はインスリン抵抗性を改善する可能性があることが示唆されたものと考える。

## 【第2章】ヒト結腸上皮細胞 HT-29 細胞株における TNF- $\alpha$ 誘導炎症モデルを用いたタデ藍 *Persicaria tinctoria* 含有成分 Tryptanthrin の抗炎症メカニズムの検討

**【背景】** TNF- $\alpha$  は、UC の炎症誘導において最も重要なメディエーターの1つであり、大腸上皮の炎症に反応し COX-2 をはじめとした炎症誘発性シグナルを刺激する。この COX-2 発現を起点としたプロスタノイドシグナル伝達は、粘膜治癒だけではなく、炎症を誘導し相乗的に TNF- $\alpha$  誘導性炎症反応を増幅させるとともに、PG 類により惹起された炎症を増悪する正のフィードバック機構を介し最終的に UC の重篤化を引き起こす。さらに、これらの刺激で誘導された Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) は、炎症亢進、および粘膜損傷を引き起こすことで病態形成に関与する。PPAR $\gamma$  発現量低下は UC 発症の一因であり、UC

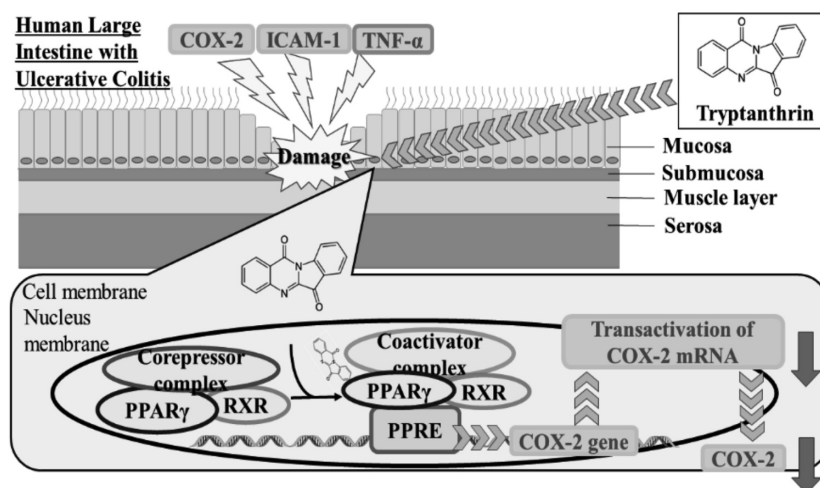


Fig. 2. Tryptanthrin may suppress cyclooxygenase 2 expression via PPAR $\gamma$  activation.

治療における Key Drug 5-aminosalicylic acid (5-ASA) は PPAR $\gamma$  を介した抗炎症作用を示すこと、またタデ藍は臨床試験により難治性症例に著効を示す「青黛」の起原植物であることに着目し、PPAR $\gamma$  を標的とした Tryptanthrin の抗炎症作用を検討した (Fig. 2).

**【方法】** Tryptanthrin の PPAR $\gamma$  リガンド活性は、ELISA 法で評価した。ヒト結腸上皮細胞 HT-29 細胞株における TNF- $\alpha$  誘導炎症モデルを用いて COX-2, および ICAM-1 を発現させ、その発現量を定量し Tryptanthrin による抗炎症効果を評価した。

**【結果】** 5 nM Tryptanthrin は、5 nM 5-ASA と同様の PPAR $\gamma$  リガンド活性を示し、PPAR $\gamma$  アンタゴニスト GW9662 (100 nM–1 nM) 併用により、その結合活性は濃度依存的に有意に抑制された。また、Tryptanthrin 処理した細胞の COX-2 発現量は濃度依存的に有意な低下を示したが、ICAM-1 発現量には影響を与えなかった。

**【考察】** Tryptanthrin は、ICAM-1 発現に影響を与えずに COX-2 発現量を抑制したが、これは COX-2 プロモーターが PPAR $\gamma$  シグナル伝達系の下流領域に位置する PPRE の一部に含まれていることにより制御されたためと考えられる。PPAR $\gamma$  により制御を受けたものと考えられる。PPAR $\gamma$  リガンドによる COX-2 のダウンレギュレーションは、COX-2 プロモーターに対する転写因子 Activator Protein-1 (AP-1) 活性化の抑制により発揮される。このことから、COX-2-PGE2 シグナルは粘膜治癒、

および粘膜損傷 2 つの相反する作用を有しているため、炎症条件下における本シグナル伝達系の適正化は大腸上皮細胞の恒常性維持において重要である。炎症時には、TNF- $\alpha$  は大腸上皮細胞において過剰に p21 Activated Kinase (PAK1) を発現させ、NF- $\kappa$ B の活性化を誘導することで炎症反応を増強する。このとき PPAR $\gamma$  アゴニストは、過剰発現した PAK1 を阻害し PPAR $\gamma$  発現量を回復させることで、NF- $\kappa$ B のダウンレギュレーションを誘導し炎症反応を抑制する。したがって、Tryptanthrin は 5-ASA と同様の機序を持つことに加え、I $\kappa$ B $\alpha$  分解抑制作用による p65 の核内移行量も制限することで、複合的な抗炎症効果を発揮することが推察される。

**【総括】** PPAR $\gamma$  活性化を介し Indirubin はインスリン抵抗性改善作用、Tryptanthrin は抗炎症作用を示すこと示唆されたことから、タデ藍 *Persicaria tinctoria* 含有機能性成分は新たな治療薬開発の一助になるものと考ええる。

#### 〈参考文献〉主論文 (原著論文)

Indirubin Promotes Adipocyte Differentiation and Reduce Lipid Accumulation in 3T3-L1 cell via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Activation. Taisuke Konno, Kenroh Sasaki, Kyoko Kobayashi, Toshihiro Murata, *Molecular Medicine Reports*, **21** (3), 1552–1560 (2020).



## *Staphylococcus aureus* の Sulfamethoxazole-trimethoprim 耐性 small colony variants に関する研究

佐藤 匠

東北医科薬科大学大学院薬学研究科 臨床感染症学教室

抗菌薬の有効性が期待できない薬剤耐性菌が世界的に増加の一途をたどっている。そのため、行政・医療分野・畜産分野が一丸となった薬剤耐性菌への対策が実施されており、特に医療分野において不必要な抗菌薬の使用を避けるといった抗菌薬の適正使用が重要とされている。しかしながら、日本では抗菌薬が適応外の感染症に使用されることが見受けられる。その一例として、*Staphylococcus aureus* 感染症の治療に Sulfamethoxazole-trimethoprim (ST) 合剤が選択されることがある。この理由は、米国および欧州における ST 合剤の感受性率が 98–99% であり耐性株がほとんど分離されていないため、海外の治療ガイドライン等で推奨されていることが挙げられる。しかしながら、ST 合剤を用いた治療は奏功せず投与期間が長期化する症例が散見される。

近年、ST 合剤の長期投与を受けた *S. aureus* 感染症患者の喀痰を血液寒天培地で培養したところ、直径 1 mm 以下の小さなコロニー (small colony variants : SCVs) が分離されることが報告された。この SCVs が薬剤耐性を示すのか、先行研究では明らかにされていないことから、本研究では ST 合剤を用いた治療の長期化の原因として SCVs が関与している可能性について基礎的検討を行った。

第一章では、*S. aureus* に対する *in vitro* ST 合剤負荷により、ST 合剤耐性 SCVs の出現に関する検討を行った。*S. aureus* 臨床分離株 40 株 (MRSA 20 株含む) に対し、ST 合剤の最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration : MIC) および耐性変異株出現阻止濃度 (mutant prevention concentration : MPC) を測定し、生体内で耐性株が増殖しやすいとされる濃度域である耐性変異株選択濃度域 (mutant selection window : MSW) を決定した。被験菌株は全て ST 合剤感受性を示したが、40 株中 32 株 (80%) において、MSW に SCVs が検出された。すなわち、MSW 濃度の ST 合剤負荷により SCVs が出現したことから、これらの株

は SCVs コロニーの形態を形成しやすい *S. aureus* を含むヘテロ耐性株であることが明らかになった。次にヘテロ耐性株のスクリーニング法を検討し、その感度および特異度を決定した。最適なスクリーニングの条件は、ST 合剤 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  および thymidine 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を含有する Mueller-Hinton (MH) 寒天培地を用いた 48 時間の培養であり、その感度および特異度はそれぞれ 100%、88.9% であった。今回、同培地を用いた薬剤感受性試験 (Etest 法) により、SCVs の形態を保持したまま ST 合剤感受性を測定できる条件を見いだした。この方法を用いることにより SCVs が全て ST 合剤耐性 (MIC :  $>32 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 株であることが明らかになった。さらに、これら SCVs の ST 合剤耐性機序を検討するため、菌体内への thymidine 取り込みに関与する nucleoside permease C (NupC) をコードしている *nupC* の mRNA 発現量を定量した。SCVs における *nupC* の mRNA 発現量は、臨床分離株 (wild type : WT) に比し約 4 倍高く、thymidine の取り込みが亢進していた。すなわち、SCVs は菌体外から thymidine を取り込むことにより菌体内の thymidine の枯渇を回避し、ST 合剤に耐性を獲得したと考えられた。しかしながら、通常の検査で用いられる MH 寒天培地は核酸類の分解処理が行われていることから、thymidine が全く含まれておらず SCVs は発育できない。そのため、臨床検査で汎用される MH 寒天培地を用いた細菌検査では、耐性株を検出できなかったことが示唆された。今回の ST 合剤耐性 SCVs のスクリーニング法は、*S. aureus* 感染症に対し ST 合剤投与前の検査で耐性株を検出できることから、不適切な使用を抑制できると考えられた。

他方、台湾、パキスタンおよびアフリカなどの国々では ST 合剤耐性 *S. aureus* の分離頻度が 35–59% と高い。また、これまで極めて低い耐性率を示していた米国においても、ST 合剤の処方頻度の増加により耐性率が 6–13% まで上昇してきてい

る。これらの耐性機序は、trimethoprim の標的酵素である dihydrofolate reductase をコードする *dfrB* 遺伝子の変異に起因することが報告されているが、その耐性獲得条件については明らかではなかった。第二章では、*S. aureus* に対し ST 合剤の 1/2 MIC による経時的負荷を行うことにより、*dfrB* の変異による ST 合剤耐性株の出現条件について検討した。*S. aureus* 臨床分離株に対し ST 合剤を 14 日間負荷したところ、40 株中 18 株 (45%) が ST 合剤耐性を獲得した。これら 18 株の *dfrB* の塩基配列を解析したところ、全てに F98Y 変異などが確認された。また、これら 18 株を抗菌薬フリーの培地で 14 日間培養したところ、7 株は ST 合剤感受性が回復したが、残り 11 株は耐性を保持した。さらに、前述の 7 株に対し ST 合剤を再負荷したところ、7 日以内に全て耐性を示すことが明らかになった。

生体内において ST 合剤耐性株が選択されることは、治療失敗ならびに長期投与の原因となるが、その他の要因として細菌の biofilm 形成が挙げられる。しかしながら、SCVs の biofilm 形成に関する検討はほとんどない。第三章では ST 合剤耐性 SCVs の biofilm 形成量の測定および biofilm 形成 SCVs に対する各種抗菌薬の殺菌効果についての検討を行った。第一章で用いた *S. aureus* の WT 32 株と、その SCVs 32 株の計 64 株を被験菌株とし、biofilm 形成モデルを作製した。Biofilm 量を crystal violet 染色法で測定し、biofilm 形成促進遺伝子である *sigB* の mRNA 発現量も測定した。SCVs の biofilm 形成量は WT に比し約 2 倍高く ( $P < 0.05$ )、*sigB* の mRNA 発現量が有意に上昇していた ( $P <$

0.05)。SCVs は *sigB* の発現上昇を介して様々な物質代謝を調節していることが知られている。ST 合剤によって *sigB* の mRNA 発現量が高い SCVs が選択されたことから、SCVs の biofilm 形成量が高かったと考えられた。

次に、biofilm 形成 *S. aureus* に対する vancomycin, daptomycin, rifampicin および minocycline の殺菌効果を検討した。Vancomycin および daptomycin は曝露後 24 時間で biofilm 形成 WT の生菌数を  $1/10^4$  に減少させたのに対し、SCVs はほとんど減少しなかった。一方、rifampicin および minocycline は WT, SCVs とともに生菌数を  $1/10^4$  に減少させたが、72 時間後には各々の菌数が baseline 付近まで回復した。また、これらの株のほとんどが各薬剤に耐性を獲得した。

結論として本研究において、従来の細菌検査で困難であった *S. aureus* の ST 合剤耐性 SCVs の検出を可能にした。*S. aureus* 感染症に対する ST 合剤の使用により ST 合剤耐性 SCVs が選択され、biofilm 形成を助長させるばかりか他の抗菌薬の効果も減弱させる可能性がある。したがって、*S. aureus* 感染症に ST 合剤を使用しない適正使用の遵守が求められる。

#### 〈参考論文〉主論文（原著論文）

Takumi Sato, Masato Kawamura, Emiko Furukawa, Shigeru Fujimura, Screening method for trimethoprim/sulfamethoxazole-resistant small colony variants of *Staphylococcus aureus*, *J Glob Antimicrob Resist*. **15**: 1–5 (2018).

## ガングリオシド GM3 合成酵素及び GM2 合成酵素における 細胞内輸送機構の解析

宍戸 史

東北医科薬科大学分子生体膜研究所 機能病態分子学教室

糖転移酵素は、糖供与体である糖ヌクレオチドから基質となる受容体にその糖部分を転移する反応を触媒する酵素であり、糖脂質、N 結合型糖鎖、O 結合型糖鎖、プロテオグリカンなど多様な糖鎖を生合成する過程において欠かせない役割を担っている。本研究では、シアル酸を含むスフィンゴ糖脂質であるガングリオシドの生合成に関わる糖転移酵素に着目し、遺伝子制御による組織特異的な糖脂質発現制御の可能性、および糖転移酵素の細胞内局在の調節機構について解析を行った。

ガングリオシドは一つの分子内に親水性部分と疎水性部分の両方を持つ両親媒性の分子であり、その分子種は親水性の糖鎖部分と疎水性のセラミド脂質部分両方の構造多様性により特徴付けられている。生体内での生合成は精密に制御されており、小胞体 (ER) で合成されたセラミドが小胞体膜、およびゴルジ体 cis 槽でグルコシルセラミド (GlcCer) に変換され、cis 槽、medial 槽、trans 槽、トランスゴルジネットワーク (TGN) を経る過程でゴルジ体に局在する糖転移酵素によって単糖が順次転移され GM3、GM2、GD3 などのガングリオシドが合成される。合成されたガングリオシドは主に細胞膜外層に存在し、コレステロールと共に脂質マイクロドメインと呼ばれる膜タンパク質の動きを制限する微小領域を作り出す。脂質マイクロドメインには増殖因子受容体などの細胞膜タンパク質の多くが集まり、シグナル伝達の中継地点となる。ガングリオシドはこの脂質マイクロドメインで多様な糖鎖構造を駆使してタンパク質の機能を正または負に制御する調節因子としての機能が想定されている。

ガングリオシドはゴルジ体槽板を経由する中でガングリオシド合成酵素群による段階的な糖鎖修飾を次々に受けると前述したが、ゴルジ体はゴルジ槽板の生成と消失を繰り返す非常にダイナミックに動く細胞小器官であり、安定したガングリオシド供給のためにはガングリオシド合成酵素が小胞体からゴル

ジ体に運ばれた後、その機能を発揮する場であるゴルジ体に一定時間繫留される必要がある。しかしながら、このゴルジ体内での段階的な糖鎖修飾がどのように行われているか、さらに糖転移酵素がどのようにしてそれぞれが局在する槽板にとどまっているか、詳細なメカニズムはほとんどわかっていない。本研究ではガングリオシド生合成機構解明の観点から、ガングリオシド GM3 合成酵素 ( $\alpha$ -2,3-sialyltransferase : ST3GAL5) および GM2 合成酵素 ( $\beta$ -1,4 *N*-acetylgalactosaminyltransferase : B4GalNAcT1, B4GALNT1) の種々の変異体を作製し、ガングリオシド合成酵素の転写制御機構や細胞内輸送機構について解析を行った。その結果、ST3GAL5、B4GALNT1 の新規 mRNA バリエーションを同定した。さらに、細胞質領域 N 末端側に配置された塩基性アミノ酸を基盤としたアミノ酸配列、ST3GAL5 ではアルギニン (R)/リジン (K)-based motif が、B4GALNT1 ではアルギニン (R)-based motif がそれぞれ酵素のゴルジ体繫留に寄与しているという新知見を得た。

第 1 章では、GM3 合成酵素の新規 mRNA バリエーション (c-type) が肝臓特異的に発現していることを示した。ST3GAL5 の mRNA バリエーションは a-type、b-type が報告されており、ST3GAL5 のノックアウトマウスを用いて GM3 の生理学的重要性やその機能が精査されてきた。その過程で、肝臓組織で高い GM3 合成活性が認められるにもかかわらず mRNA バリエーション (a-type、b-type) の発現量が低いということ、ノックアウトマウスの肝臓でわずかながら GM2 が検出されることなどの矛盾が生じていた。マウス肝臓組織の cDNA を用いた 5'-RACE などの詳細な解析を行った結果、ノックアウトマウスの肝臓での GM3 合成活性の由来が肝臓特異的に発現する新規 mRNA バリエーション (c-type) であることを明らかにした。<sup>1)</sup>

第 2 章では、B4GALNT1 が新規 mRNA バリエーション (variant 2) を持ち、この新規 mRNA から

M1-B4GALNT1 が翻訳されることを示した。M1-B4GALNT1 は 2 型の膜タンパク質で、既知の M2-B4GALNT1 よりも長い細胞質領域 N 末端を持つ。この N 末端にはゴルジ体から小胞体への逆行輸送シグナル配列である R-based motif が存在し、COPI 被覆小胞の酸性ポケットと結合して逆行輸送されることを見いだした。さらに、R-based motif をもたない既知のアイソフォームである M2-B4GALNT1 が M1-B4GALNT1 とヘテロダイマーを形成することで、M2-B4GALNT1 ホモダイマーよりも高い細胞内での酵素安定性を持つことが示された。興味深いことに、このヘテロダイマーの安定性の向上は小胞体への逆行輸送が要因ではなくゴルジ体繫留に依存するものであり、B4GALNT1 において R-based motif がゴルジ体繫留シグナルとして機能することが示唆された。<sup>2)</sup>

第 3 章では、ST3GAL5 および B4GALNT1 の小胞体からゴルジ体への搬出機構の解析を行った。細胞質領域の膜貫通領域近傍には、小胞体からゴルジ体への搬出に必要な [R/K] (X) [R/K] 配列が存在すると報告されている。この配列が全長 M3-ST3GAL5、および全長 M2-B4GALNT1 に及ぼす影響を精査した結果、[R/K](X)[R/K] 配列だけでなく、[R/K](X)[R/K] 配列周辺の塩基性アミノ酸を含む配列 (R/K-based motif) が ST3GAL5 と B4GALNT1 の小胞体搬出に関与することを明らかにした。さらに、ST3GAL5 の R/K-based motif の部分変異体では、細胞内局在の変化、ST3GAL5 の内腔側領域に付加する N 結合型糖鎖の成熟度の変化、および細胞内での酵素タンパク質安定性の低下が生じることを見いだした。これらの結果から、細胞質領域の R/K-based motif は小胞体搬出のみならず、ST3GAL5 の安定したゴルジ体繫留機構にも

重要な役割を持つことが示唆された。<sup>3)</sup>

以上のことから、B4GALNT1 では逆行輸送シグナルとして機能する R-based motif が、ST3GAL5 では小胞体搬出シグナルとして機能する R/K-based motif が、それぞれゴルジ体繫留機構にも寄与しているという新知見が得られた。ゴルジ体内の輸送に関わる因子は出芽酵母から哺乳類まで広く保存されていることから、本研究で得られた知見をもとに糖転移酵素の輸送に関わる分子の同定を進めていくことで、多くの生物種の糖転移酵素の小胞体搬出機構やゴルジ体繫留機構の解明につながることを期待される。

### 〈参考文献〉主論文 (原著論文)

- 1) Identification of a new liver-specific c-type mRNA transcriptional variant for mouse ST3GAL5 (GM3/GM4 synthase). Shishido, F., Uemura, S., Nitta, T., Inokuchi, J.I. Glycoconjugate journal (2017) 34, 651–659.
- 2) Identification of a new B4GalNAcT1 (GM2/GD2/GA2 synthase) isoform, and regulation of enzyme stability and intracellular transport by arginine-based motif. Shishido, F., Uemura, S., Kashimura, M., Inokuchi, J.I. Biochimica et biophysica acta (2017) 1859(10), 2001–2011.
- 3) The regulation of ER export and Golgi retention of ST3Gal5 (GM3/GM4 synthase) and B4GalNAcT1 (GM2/GD2/GA2 synthase) by arginine/lysine-based motif adjacent to the transmembrane domain. Uemura, S., Shishido, F., Kashimura, M., Inokuchi, J.I. Glycobiology (2015) 25(12), 1410–1422.