

博士学位論文要旨

(令和3年3月取得分)

ヒストンによる染色体分配制御と共通サブユニット機能解析方法の確立

中林 悠

東北医科薬科大学大学院薬学研究科 生化学教室

【背景】

ヒストン (H2A, H2B, H3, H4) は真核生物に広く高度に保存されたタンパク質であり, DNA を巻きつけヌクレオソーム構造, クロマチン構造を形成する. ヒストンは染色体上の全領域に分布しているため, 転写や DNA 複製など全ての DNA 介在反応に関わると予想される. ヒストン翻訳後修飾に関する研究は 1990 年代後半から広く行われてきたものの, 進化的に保存された非修飾残基が DNA 介在反応にどのような役割を果たすのかは十分に解析されていなかった. これまでに, ヒストンアミノ酸残基を網羅的にアラニンに置換した出芽酵母ヒストン点変異体ライブラリーにより, 転写や DNA 複製に関わると考えられるアミノ酸残基 439 種 (うち 16 種は致死性を示す) が同定され, 多くの非修飾残基が DNA 介在反応制御に関与することが示唆された. しかしながら, これらのヒストン残基が具体的にどのように反応制御に寄与しているのかはいまだに不明であった.

本研究では, 正常な染色体分配に必要とされるヒストンアミノ酸残基の同定およびその詳細な機能解析を通じ, ヒストンによる染色体分配の制御機構の解明に取り組んだ. また, 主要なヌクレオソームおよびバリエーションヌクレオソームの両方に含まれる H2B が, それぞれのヌクレオソームで果たす役割を区別した新たなヒストン機能解析方法を考案した. さらに, この方法を脊椎動物細胞に適用することで, 出芽酵母で明らかにされた H2B 非修飾残基の機能が, 脊椎動物でも進化的に保存されていることを初めて明らかにした.

【ヒストンによる染色体分配制御機構の解析】(主論文 1)

正常な染色体分配に必要なヒストン残基を調べるため, 出芽酵母ヒストン点変異体ライブラリーを用い, 微小管重合阻害剤である thiabendazole および benomyl への薬剤感受性を網羅的にスクリーニングした. これにより, 薬剤感

受性を示す 24 株を同定した. これらの残基はヌクレオソーム構造上の 3 カ所の領域に集中しており, これを thiabendazole/benomyl-sensitive regions (TBS)-I ~ III と分類し, 各領域のヒストン点変異体が示す染色体分配異常の原因を探った.

TBS-I に位置する H2A-I112A, TBS-II に位置する H2A-E57A 点変異体では, 微小管とセントロメアとの異常な結合である mono-polar attachment の割合が増加した. また, これらの点変異体では, 微小管とセントロメアとの正常な結合を促進する shugoshin (Sgo1) のタンパク量およびセントロメア領域への局在が顕著に低下した. このことから, TBS-I, -II 領域は, Sgo1 を介して微小管とセントロメアの正常な結合の形成を維持することで, 染色体分配の正常な進行に寄与していることが明らかとなった. TBS-III に位置する H4-L97A 点変異体では, セントロメア領域のクロマチン構造に関わるヒストンバリエーション Htz1 (出芽酵母 H2A.Z) のクロマチン結合が消失しており, この残基は Htz1/H2B 二量体のクロマチンへの取り込みを介して, 正常な染色体分配に寄与すると考えられた.

【共通サブユニット機能解析方法 (Functional analysis of linker-mediated complex: FALC) の考案】(主論文 2)

ヒストン H2B は H2A およびヒストンバリエーション H2A.Z と二量体を形成し, それぞれヌクレオソームを構成する. H2B の点変異体は様々な表現型を示すが, これがどちらの二量体の機能不全によるものかは区別されていなかった. H2B は 2 つの二量体の共通サブユニットであり, H2B への点変異は両方の二量体の機能に影響を与えるためであり, これは共通サブユニット全般に当てはまる問題であった. そこで, H2B を共通サブユニットの例とし, 共通サブユニットの機能を複合体ごとに区別して解析できる, 新たなタンパク質機能解析方法の考案とその有効性を検証した.

共通サブユニットを区別した機能解析戦略,

Functional analysis of linker-mediated complex (FALC) 法の手順は以下である。(1) 共通サブユニットと各複合体に特有なサブユニットのタンパク質をそれぞれ連結した連結タンパク質を作製する。(2) それぞれの連結タンパク質の共通サブユニット部分に変異を導入する。(3) 適した遺伝子破壊酵母株に連結タンパク質変異体を発現させる。この FALC 法を、共通サブユニット H2B, 特有サブユニット H2A および Htz1 に適用し、連結ヒストン (H2B-H2A, H2B-Htz1) 発現酵母株を作製することで、H2B-D71, -L109, -K123 の機能解析を行った。

FALC 法による解析から、H2B-D71 は主に Htz1/H2B 二量体において機能し、そのクロマチン結合能に必須であることが分かった。H2B-L109 は、H2A/H2B および Htz1/H2B 二量体の両方で働き、細胞の生存に必要であった。H2B-K123 は主に H2A/H2B 二量体において、DNA 複製、DNA 修復、転写反応制御に重要な働きを持つことが分かった。このように、共通サブユニットの機能がどの複合体中で発揮されるのかを区別する上で、FALC 法は有効であることが示された。

【ニワトリ H2B および H2A.Z への iFALC 法の適用】(主論文 3)

FALC 法による H2B の機能解析に成功したが、FALC 法には (1) 連結部位が複合体中で近接していること、(2) 対象とする共通サブユニットおよび特有サブユニットの全遺伝子を欠損した細胞が必要であること、(3) 出芽酵母以外に適用できるのか不明であるといった制限があった。そこで、FALC 法が広く適用できるよう、(1) ~ (3) の克服に取り組む。(1') サブユニット間の連結に 300 アミノ酸のリンカー配列を挿入できること、(2') 特有サブユニットのみ遺伝子破壊すればよいこと、(3') 脊椎動物細胞にも適用可能であることの 3 点を示した。この戦略を、improved FALC (iFALC) 法と新たに名付けた。

iFALC 法をニワトリの H2B と H2A.Z に適用した連結ヒストン発現細胞を樹立し、脊椎動物細胞における H2B の機能解析を試みた。その結果、H2B-D68A (出芽酵母 H2B-D71A に相当する) を導入した、H2B(D68A)-H2A.Z 連結ヒストンのクロマチン結合能が、出芽酵母と同様に消失することが明らかとなった。この結果は、進化的に保存さ

れたヒストン非修飾残基の機能が、出芽酵母から脊椎動物に至るまで高度に保存されていることを示すものであり、出芽酵母のヒストン解析の有用性を支持するものである。また、iFALC 法により、細胞内に存在する様々な共通サブユニットについて、複合体中での機能を区別した解析が広く可能になると考えられた。

【総括】

本研究では、ヒストンがどのように染色体分配反応制御に関与しているのか、その具体的なメカニズムの一つを明らかにした。出芽酵母ヒストン点変異体ライブラリーの解析から、転写反応や DNA 複製、DNA 修復反応に関わると考えられる残基が多数同定されているが、それらの具体的な関与はいまだ明らかではない。本研究で示したように、ヒストン点変異体の包括的な解析は、ヒストンと DNA 介在反応制御因子との間に形成されている制御関係の解明に極めて有効であると考えられる。また、共通サブユニット解析方法である FALC 法および iFALC 法によって、ヒストンの機能がヒトなどの高等生物でも保存されているのかを解析することが可能になった。本研究で解析したヒストンに限らず、網羅的な突然点変異体ライブラリーおよび共通サブユニット機能解析方法を組み合わせることで、タンパク質機能解析が新たな局面に進むことが期待される。

〈参考文献〉主論文 (原著論文)

- 1) Kawashima, S., Nakabayashi, Y., Matsubara, K., Sano, N., Enomoto, T., Tanaka, K., Seki, M., Horikoshi, M. Global analysis of core histones reveals nucleosomal surfaces required for chromosome bi-orientation. *EMBO J* (2011) **30**, 3353–3367.
- 2) Nakabayashi, Y., Kawashima, S., Enomoto, T., Seki, M., Horikoshi, M. Roles of common subunits within distinct multisubunit complexes. *Proc. Acad. Natl. Sci. USA* (2014) **111**, 699–704.
- 3) Nakabayashi, Y., Harata, M., Seki, M. An Improved Functional Analysis of Linker-mediated Complex (iFALC) Strategy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2020) in press.

微生物由来の新しい感染症治療薬の探索研究

八木 瑛穂

東北医科薬科大学大学院薬学研究科 天然物化学教室

感染症は、人類が今なお克服すべき課題であるが、感染症治療薬の開発は世界規模で大きく縮小されている。そこで本研究では、新しい感染症治療薬につながる低分子化合物を微生物資源に求め、①根治可能な治療方法が存在しない *Mycobacterium avium* complex (MAC) 症治療薬、および②抗真菌薬アムホテリシン B (AmB) の抗真菌活性を増強する併用薬について探索研究を行った。

第1章 カイコ感染モデルを用いた MAC 症治療薬の探索

【背景・目的】

非結核性抗酸菌 (NTM) 症は、結核菌群およびらい菌を除いた抗酸菌によって発症する疾患で、日本では結核症より罹患率が高く、急速な増加がみられる感染症である。特に、*M. avium* および *M. intracellulare* が起原因菌となる MAC 症は、NTM 症の約 9 割を占めており、根治可能な治療法が確立されていないことから、新たな薬剤が必要とされ

ている。また、新しい薬剤探索の問題点の一つとして、*in vitro* で選択された候補化合物の多くが、生体内では治療効果を示さないことが挙げられる。この差を埋めるための手段の一つとして、実験動物としてカイコを用いた簡易的な感染 *in vivo* 評価系 (カイコ感染モデル) が関水らによって提案され、治療 (延命) 効果を指標とした抗菌薬のスクリーニングに利用されている。そこで本研究では、カイコ MAC 症モデルへ応用し、微生物由来の抗 MAC 活性物質の探索を行った。

【方法・結果】

カイコ MAC 症モデルの構築

カイコ 5 齢幼虫 (1.9–2.0 g) の背脈管から、*M. avium* JCM15340 株および *M. intracellulare* JCM6384 株の菌液 ($0.75\text{--}7.5 \times 10^7$ CFU/カイコ・g) を接種 (50 μ L/カイコ) し、37°C で飼育したときの生死を経時的に観察した。その結果、生理食塩水を投与したカイコは 80 時間まで全て生存したのに対し、両抗酸菌を接種したカイコは菌数依存

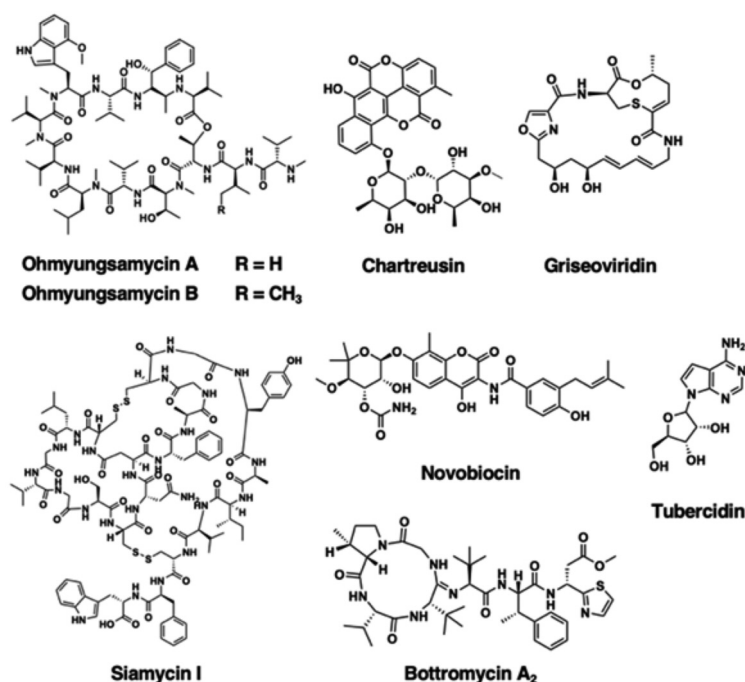


図1 放線菌由来の抗 MAC 活性物質

的に全て感染死した。したがって評価は、カイクが72時間以内に感染死する菌数 (2.5×10^7 CFU/カイク・g) を接種後、84時間まで観察することにした。この条件下で臨床のMAC治療薬を評価したところ、治療の中心である薬剤クラリスロマイシンと、重症例に注射投与するアミノグリコシド系抗菌薬（カナマイシン、ストレプトマイシンおよびアミカシン）が両感染モデルで治療効果を示した。一方、耐性化の予防を目的としてクラリスロマイシンと併用されるリファンピシンおよびエタンブトールは、治療効果を示さなかった。これらの結果は、報告されているマウスMAC症モデルでの治療効果と同様の傾向を示しており、カイクMAC症モデルをスクリーニングに利用できること結論づけた。

抗MAC活性物質の探索

カイクモデルの構築に先行して、陸棲および海洋由来の放線菌培養液約1,500サンプルについて、抗MAC活性物質のスクリーニングを行った。まず、微量液体希釈法により抗 *M. avium* および *M. intracellulare* 活性を評価し、生育阻害活性の強かった培養液から優先的に、活性物質の単離精製および構造解析を行った結果、7種8成分の既知化合物を得た（図1）。これらの化合物は、

0.00313–6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲でMIC値を示したが、カイクMAC症モデルでは、chartreusin, griseoviridin, ohmyungsamycin A および B の4成分のみが治療効果を示し、そのED₅₀値はそれぞれ23, 35, 8.5, および42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示した。したがって、構築したカイクMAC症モデルは治療効果を示す可能性のある候補化合物のスクリーニングにおいても、有効な一手段となり得ることが示された。

第2章 抗真菌薬 AmB の抗真菌活性を増強する併用薬の探索

【背景・目的】

ポリエン系抗真菌薬 AmB は、広い抗真菌スペクトルと強力な殺真菌作用を示し、耐性菌の出現もほとんど見られない優れた深在性真菌症治療薬である。しかし、その作用機序は真菌細胞膜のエルゴステロールとの直接的な結合であるため、ヒト細胞膜のコレステロールにもわずかに影響し、腎障害や低カリウム血症などの重篤な副作用を引き起こすことが問題とされている。そこで本研究では、AmB の抗真菌活性を増強する化合物との併用により、少ない投与量でも同等の抗真菌作用を発揮させることで副作用の問題を克服できると考

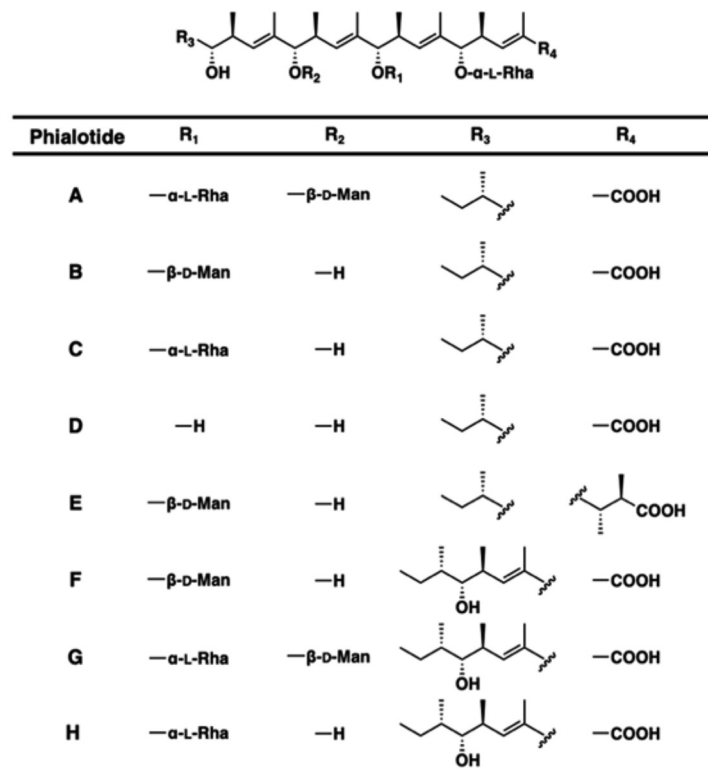


図2 Phialotide A-H の構造

え、微生物資源からの探索を行った。その結果、真菌 *Pseudophialophora* sp. BF-0158 株の培養液中から、phialotide A から H と命名した 8 成分の新規 AmB 活性増強物質を見いだした (図 2)。

【方法・結果】

培養および単離精製

香川県小豆島の土壌より分離された本生産真菌を、スクロースとグルコースを主成分とする生産培地を用いて、ジャーファーメンターで通気攪拌培養 (27°C, 68 時間, 回転数: 300 rpm, 通気量: 3 L/min) を行った。得られた菌体をアセトン抽出 (1 L), 酢酸エチル抽出 (pH 3, 200 mL×2) および分取 HPLC (ODS カラム) により精製を行い, phialotide A (10.4 mg), B (14.0 mg), C (2.49 mg), D (1.83 mg), E (4.88 mg), F (4.58 mg), G (7.20 mg) および H (5.05 mg) を白色粉末として単離した。

構造解析

Phialotide A は、高分解能 ESI-MS スペクトルよりその分子式を $C_{47}H_{80}O_{19}$ と決定し、不飽和度は 8 を示した。構造は、重メタノール中で測定した各種 NMR スペクトルの解析により明らかにした (図 3)。まず、 1H - 1H COSY および HOHAHA スペクトルの解析より、太線で示した部分構造 I-VII の存在が示唆され、次いで HMBC スペクトルの相関より、部分構造 I-IV を含む鎖状ポリケチド、2 つのデオキシヘキソース (糖 A および B) および 1 つのヘキソース (糖 C) の存在が明らかになっ

た。糖 A, B および C は、 1H - 1H および ^{13}C - 1H のカップリング定数より、それぞれ α -ラムノース、 α -ラムノースおよび β -マンノースと決定した。さらに phialotide A を酸加水分解したのち、得られた構成糖を蛍光標識化し、これを HPLC 分析することで、マンノースは D 体、2 つのラムノースは L 体であることを明らかにした。さらに各糖は、HMBC 相関よりアグリコンの 5, 9 および 13 位とグリコシド結合していることが明らかとなり、phialotide A の平面構造を決定した (図 3)。アグリコンの立体化学については、 1H - 1H のカップリング定数に基づく二面角情報および ROESY 相関、および各糖とアグリコンとの ROESY 相関から、4S, 5S, 8S, 9S, 12S および 13S と決定した。また、16, 17 および 18 位の不斉炭素については、8 つの全てのジアステレオマーにおいて計算された最安定構造、かつ周辺で確認される ROESY 相関と良い一致を示した 16S, 17R および 18S と推定した。Phialotide B-H の構造については、phialotide A との比較により、アグリコンの炭素鎖が伸長した構造や糖の数が異なった新規構造であることを明らかにした (図 2)。

AmB 増強活性および細胞毒性

4 種の病原真菌 *Candida albicans* ATCC90029 株, *Cryptococcus neoformans* ATCC90113 株, *Rhizopus oryzae* NBRC4705 株および *Aspergillus fumigatus* NBRC33022 株に対する phialotide A の AmB 増強活性を、CLSI M27-A3 および M28-A2 法

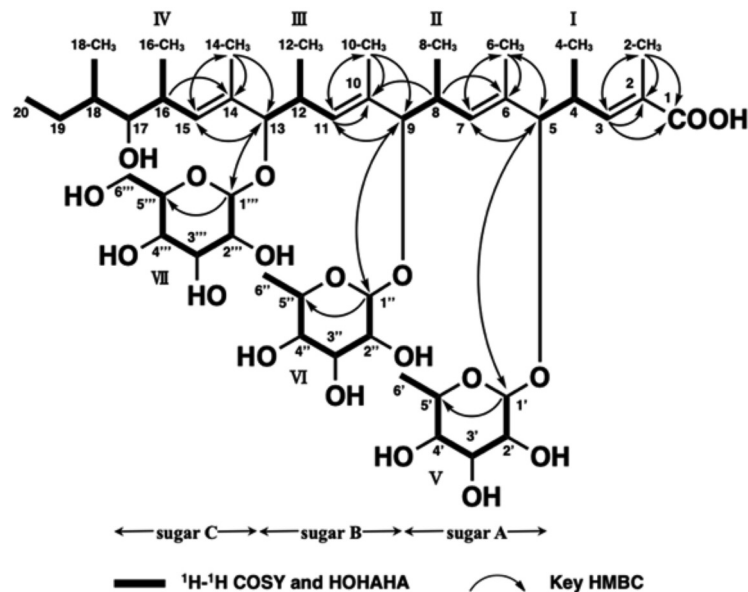


図 3 Phialotide A の構造解析

表1 Phialotide A の抗真菌活性および AmB 増強活性

	<i>C. albicans</i>		<i>C. neoformans</i>		<i>R.oryzae</i>	
	MIC* ¹	Ratio* ²	MIC* ¹	Ratio* ²	MIC* ¹	Ratio* ²
Phialotide A alone	>128		>128		>128	
AmB alone	0.50		2.0		1.0	
+ Phialotide A (0.25 μ g/mL)	0.25	2	2.0	1	1.0	1
+ (0.50 μ g/mL)	0.125	4	1.0	2	0.50	2
+ (1.0 μ g/mL)	0.0313	16	0.50	4	0.25	4
+ (2.0 μ g/mL)	0.0313	16	0.50	4	0.25	4
+ (4.0 μ g/mL)	0.0313	16	0.50	4	0.125	8

*¹ MIC value: μ g/mL *² Ratio = MIC_{AmB}/MIC_{AmB+ phialotide A}

に準じた微量液体希釈法により評価した。まず、phialotide A は単独で4種真菌に対し、128 μ g/mL で抗真菌活性を示さなかった。次に、phialotide A と AmB の併用効果を調べた結果、*C. albicans*, *C. neoformans* および *R. oryzae* に対して濃度依存的に AmB の抗真菌活性を増強したが、*A. fumigatus* に対しては増強活性を示さなかった (表1)。これは、phialotide B-H についても同様の傾向を示した。また、phialotide A 併用時の AmB のヒト胎児腎細胞 HEK293 に対する細胞毒性を、細胞膜障害の指標となる乳酸脱水素酵素 (LDH) を定量することで評価した。その結果、phialotide A (4–32 μ g/mL) は AmB の細胞毒性は増強せず、濃度依存的に AmB の毒性を低減することが明らかになった。

総括

本研究では、2つのアプローチにより微生物由来の感染症治療薬の探索を行った。第1章では、カイコ MAC 症モデルを構築し、治療効果を示す天然物を見いだした。今後、カイコモデルをスク

リーニングに初期に利用することで、治療効果を示す可能性が高い抗 MAC 活性物質の効率的な取得が期待される。また第2章では、単独では抗真菌活性を示さずに、AmB の抗真菌活性のみを増強する新規化合物 phialotide 類を発見した。このような活性を示す化合物の報告は他の研究グループからではなく、AmB 併用薬という新しい真菌症治療薬の可能性として、今後の発展が期待される。

〈参考文献〉 主論文 (原著論文)

- 1) [Yagi A., Yamazaki H., Terahara T., Yang T., Hamamoto H., Imada C., Tomoda H., Uchida R.](#) Development of an in vivo-mimic silkworm infection model with Mycobacterium avium complex. *Drug Discov Ther.*, **14**, 287–295 (2020).
- 2) [Yagi A., Uchida R., Kobayashi K., Tomoda H.](#) Polyketide glycosides phialotides A to H, new potentiators of amphotericin B activity, produced by *Pseudophialophora* sp. BF-0158. *J. Antibiot.*, **73**, 211–223 (2020).

Studies on phytochemical constituents and biological activity of Mongolian traditional medicinal plants; *Oxytropis*, *Brachanthemum*, *Calligonum*, and *Apocynum* species

Buyanmandakh Buyankhishig

Tohoku Medical and Pharmaceutical University Division of Pharmacognosy

For many thousands of years, plants have been considered to be one of the major sources of food and medicines that are usually used as primary health care for humans. In this contemporary era, many researchers are paying their attention on the investigations of the medicinal plants for they might reach to success in the field of drug discoveries and developments in the future. Moreover, up to date, chemical constituents and bioactivities of numerous plant species which grow not only in Mongolia but also worldwide have not been investigated yet.

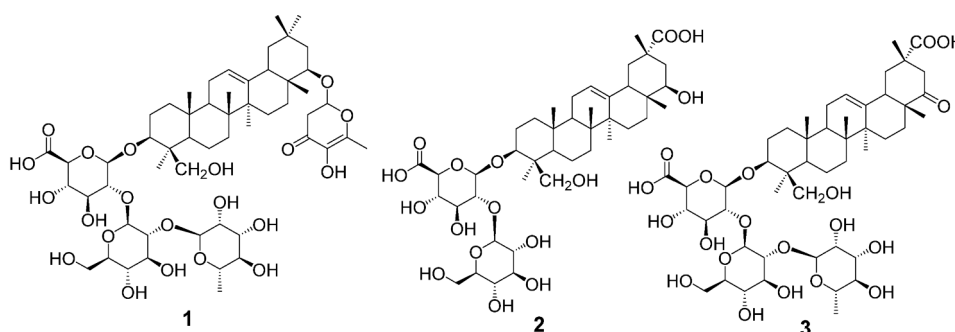
In addition, zoonotic diseases, including trypanosomiasis, have been posing one of the big issues happening in livestock husbandry of Mongolia. Due to the consequences of the zoonotic diseases, financial losses have been widely observed in the animal industry which is vital sector of the Mongolian economy. Hence, studying highly effective compounds from Mongolian native plants is a really essential way to combat zoonotic diseases, especially trypanosomiasis.

In this study, we focused on studying chemical constituents and biological activities of four plant species, named *Oxytropis lanata*, *Brachanthemum gobicum*, *Calligonum mongolicum*, and *Apocynum*

pictum. Typically, this diploma thesis was written with five chapters that will be briefly explained below.

Chapter one generally covers medicinal plants growing in Mongolia and Worldwide and their brief history. Therefore, the conditions of animal husbandry and zoonotic diseases in Mongolia and the overview of some biological activities were written in this chapter.

Chapter two describes phytochemical and biological investigations on the aerial parts of *Oxytropis lanata*, which belongs to the family Fabaceae. As a result of the phytochemical analysis, three new oleanane-type saponins (**1**, **2**, and **3**) and 33 known compounds, namely saponins, flavonoids, oxazole alkaloids, and glycosides were obtained from aerial parts of this plant. In terms of compounds **28**, **29**, **33**, and **34**, they were previously isolated from the roots of *O. lanata* while other compounds were reported for the first time to the aerial parts. For trypanocidal screening, 5,7,4'-trihydroxyisoflavone (**25**) exhibited inhibitory activity against *T. congolense* ($IC_{50} = 10.5 \mu M$), the causative agent of African trypanosomiasis in animals; this activity was little weak to compare



Chemical structures of previously unreported oleanane-type saponins isolated from the aerial parts of *O. lanata*

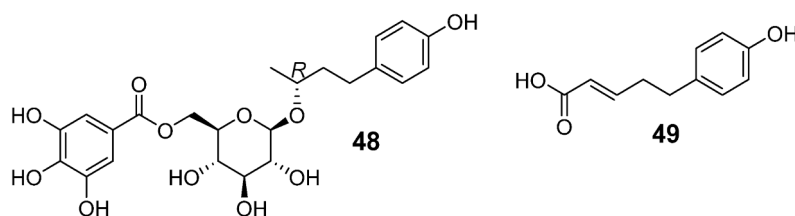
with 2-(2,3-dihydroxyphenyl)-5-(2''-hydroxyphenyl) oxazole ($IC_{50} = 1.0 \mu M$) isolated from roots of this plant. Furthermore, anti-hyaluronidase experiments of some compounds were carried out based on the traditional usage of *O. lanata* as used for treatment of inflammatory diseases. Saponins, 3-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl]-3 β ,24-dihydroxyolean-12-en-22-oxo-29-oic acid (**3**) and dehydroazukisaponin V (**9**) showed a potent inhibitory activity.¹⁾

In **chapter three**, absolute configurations of compounds isolated from *Brachanthemum gobicum*, which included in the family Asteraceae, were discussed. Drs B. Odonbayar and Ph.D T. Murata performed almost all of the experiments in this research work of *B. gobicum*. Consequently, 11 new and 40 known compounds were isolated from aerial parts of this plant. However, there were some compounds with the racemic mixture before purifying pure enantiomers by using chiral phase HPLC. After purification of them, absolute configurations of **37**, **38**, **39**, **41**, **44**, and **45** were elucidated by spectral data obtained from specific rotation and ECD spectra. For compounds **40**, **42**, **43**, **46**, and **47**, absolute configurations were not determined due to the inadequate yield of enantiomers. In the trypanocidal screening, compounds **37**, **38**, **39**, **40**, **44**, and **45** showed inhibitory activities. Among them, compounds **38** ($IC_{50} = 2.8 \mu M$) and **44** ($IC_{50} = 2.4 \mu M$) inhibited

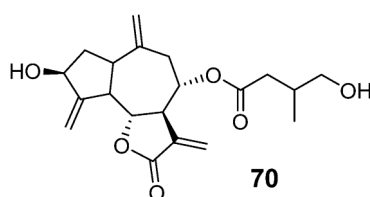
more efficiently than others.²⁾

Chapter four presents phytochemical and biological investigations on the aerial parts of *Calligonum mongolicum*, which is one of the largest genera in the family Polygonaceae. As the result of the phytochemical studies, two new compounds, named *R*-4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanol 2-*O*-(6-*O*-galloyl)- β -D-glucopyranoside (**48**) and 5-(4-hydroxyphenyl) 2-pentenoic acid (**49**), and 20 known (**50**–**69**) compounds, including flavonols, flavanonols, flavanols, alkaloids, a monoterpene, a phenol, and glycosides, were isolated for the first time from this plant. Compound **48** was not reported previously to literature, while compounds **49** and **50** were newly obtained from a natural source. With regard to an examination of the trypanocidal activities, all of the isolated compounds did not show significant activity. In the anti-phenoloxidase screening, however, catechin (**54**) was roughly ten times higher phenoloxidase inhibitory activity ($IC_{50} 9.1 \mu M$) compared with epicatechin (**55**) ($IC_{50} 148.3 \mu M$). Generally, compounds **54** and **55** have a similar molecular structure except for their stereochemistry, and this result was supported by a reproducibility test using pure guaranteed authentic samples.³⁾

Chapter five illustrates phytochemical investigations of *Apocynum pictum*, which belongs to the family Apocynaceae. By doing phytochemical investigations on the aerial parts of *A. pictum*, one



Chemical structures of new compounds isolated from the aerial parts of *C. mongolicum*



Chemical structures of new compound isolated from the aerial parts of *A. pictum*

new (**70**) and 20 known compounds (**71 – 90**), including flavonoids, sesquiterpenoids, glycosides, and amino acids, were isolated. Therefore, these compounds were obtained from this species for the first time. It is interesting that no previous research works on the genus *Apocynum* reported that quaiane-type sesquiterpenes are one of the chemical constituents in this genus.⁴⁾

Reference

- 1) **Buyanmandakh Buyankhishig**, Toshihiro Murata, Keisuke Suganuma, Javzan Batkhuu, Kenroh Sasaki, Hyaluronidase inhibitory saponins and a trypanocidal isoflavonoid from the aerial parts of *Oxytropis lanata*. *Fitoterapia*, 2020, 145, 104608.
- 2) Batsukh Odonbayar, Toshihiro Murata, Keisuke Suganuma, Yoshinobu Ishikawa, **Buyanmandakh Buyankhishig**, Javzan Batkhuu, Kenroh Sasaki, Acylated lignans isolated from *Brachanthemum gobicum* and their trypanocidal activity. *Journal of Natural Products*, 2019, 82, 774 – 784.
- 3) **Buyanmandakh Buyankhishig**, Toshihiro Murata, Batsukh Odonbayar, Javzan Batkhuu, Kenroh Sasaki, New compounds from the aerial parts of *Calligonum mongolicum*. Accepted to *Phytochemistry Letters*, 2020.
- 4) Orkhon Banzragchgarav, Toshihiro Murata, Gendaram Odontuya, **Buyanmandakh Buyankhishig**, Keisuke Suganuma, Bekh-Ochir Davapurev, Noboru Inou, Javzan Batkhuu, Kenroh Sasaki, Trypanocidal activity of 2,5-diphenoloxazoles isolated from the roots of *Oxytropis lanata*. *Journal of Natural Products*, 2016, 79, 2933 – 2940.

アレルギー疾患における μ オピオイド受容体の一塩基多型の影響と 免疫動態に関する基礎的・臨床的研究

川上 佳織

東北医科薬科大学大学院薬学研究科 病態生理学教室

アレルギーは本来、生体の重要な防御機構である免疫反応が、全身的または局所的に生体を障害する病的状態を示す。公衆衛生環境の向上や生活環境の変化と共に、近年、先進国のみならず途上国においてもその有病率が増加している。アレルギー疾患の病態は、患者をとりまく環境に起因する環境要因と、患者が持つ遺伝的要因が相互に作用して、多様なフェノタイプや治療応答性を示す。したがって、適切な診断と効果的な治療を行うために疾患の発症や増悪に関わる免疫学的機序を解析し、病態を正確に理解しなければならない。気道におけるアレルギーは“one airway, one disease”という概念が提唱されているように、上気道の疾患は下気道の疾患と連動しており、気管支喘息と慢性副鼻腔炎は密接に関係している。そこで本研究は、気道におけるアレルギー疾患の重症化および難治化に関するメカニズムについて、免疫学的解析手法を用いて基礎的・臨床的な検討を行った。

第1章では、以前より関係が指摘されていた精神的ストレスがアレルギー疾患を悪化させる機序について、 μ オピオイド受容体 (MOPR) 遺伝子 (*OPRM1*) の一塩基多型 [A118G (rs1799971)] と喘息病態の関連性に焦点をあて、臨床および基礎的な検討を行った。気管支喘息は気道の慢性炎症による変動性を持った気道狭窄や咳で特徴付けられる疾患である。精神的ストレスは気管支喘息の増悪に関与する頻度の高い危険因子であり、情動をつかさどる脳領域である前帯状皮質や島を活性化させることにより Th2 型免疫応答を亢進させ、喘息病態の悪化に関与する。私の所属する研究グループではこれまで、MOPR が精神的ストレスによるアレルギー性好酸球炎症の増悪に重要な役割を担うことを報告している。

しかし、精神的ストレスによる喘息増悪に関与する遺伝的要因は十分に解明されていない。そこで私は、MOPR の機能的変化をもたらす主要な一塩基多型であり、36~48%のアジア人持つとされる

一塩基多型 [*OPRM1* A118G (rs1799971)] が喘息病態に与える影響を解析した。

まずはじめに、岩手医科大学病院呼吸器外来へ通院した 486 症例を対象とし、rs1799971 の遺伝子多型を解析できた 292 人について本研究を実施した。喘息患者 292 人のうち、rs1799971 における AA 野生型、AG ヘテロ接合型、および GG ホモ接合型の割合はそれぞれ 36%、41%、および 23%であった。メサコリンに対する気道過敏性を比較したところ、rs1799971 の GG ホモ接合体を有する患者は、rs1799971 の A アレルを有する患者と比較して気道過敏性が有意に亢進していた。

次に、*OPRM1* G118 SNP が喘息の重症度に影響を与えるメカニズムを明らかとするために、*OPRM1* G118 と機能的に同等の SNP を保有する *Oprm1* G112 マウス (GG マウス) と野生型マウス (*Oprm1* A112; AA マウス) を用いて喘息徴候を比較した。OVA 誘発型気管支喘息モデルマウスにおいて、喘息患者と同様に GG マウスは AA マウスと比較して気道過敏性が有意に亢進しており、気管支肺胞洗浄 (BAL) 液中の好酸球数の増加、血清中 IgE 量の増加、気道上皮細胞に占める杯細胞の割合の増加が認められた。このような喘息徴候の増悪には、GG マウスの肺における Th2 サイトカイン産生 CD4⁺ エフェクター T 細胞、エフェクターメモリー T 細胞およびセントラルメモリー T 数の増加が関与している可能性が明らかとなった。OVA を 1 回吸入した 48 時間後の GG マウスの気管支リンパ節 (BLN) では、AA マウスと比較して Th2 細胞数が有意に増加していた。一方で、BLN からのリンパ球遊出過程への本 SNP の関与は限定的であると考えられたことから、GG マウスの肺における Th2 型免疫応答の亢進には、BLN における Th2 細胞の分化亢進が関与している可能性が示唆された。さらに、BLN における Th2 細胞分化の亢進には、末梢組織に発現する本 SNP が関与している可能性が示唆された。

そこで、最後に私は T 細胞に発現する本 SNP が Th2 細胞の分化亢進に与える影響を解析した。In vitro の実験において、抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体、IL-2、IL-4、抗 IFN- γ 抗体の存在下で培養したナイーブ T 細胞をモルヒネによって刺激したが、AA マウスと比較して GG マウス由来の T 細胞における IL-4 産生亢進は観察されなかった。MOPR は T 細胞以外にも、B 細胞や樹状細胞にも発現していることから、本 SNP による Th2 細胞の分化亢進には、他の免疫細胞に発現する MOPR を介したシグナルが重要な役割を担う可能性が示唆された。

本研究成果は、*OPRM1* A118G (rs1799971) による喘息増悪メカニズムを明らかにした最初の報告である。本研究の成果から、*OPRM1* A118G SNP が気管支喘息の増悪に関与する新たな遺伝的要因として理解され、重症喘息患者の病態評価と新たな個別医療の推進につながることを期待される。

第 2 章では、難治性疾患に指定されている好酸球性副鼻腔炎における末梢血中 T 細胞ならびに樹状細胞の免疫学的特徴、および性が好酸球性副鼻腔炎患者の末梢血中の免疫細胞のフェノタイプに与える影響を解析した。好酸球性副鼻腔炎は鼻茸や鼻副鼻腔粘膜に好酸球の著しい浸潤を伴う易再発性で難治性の成人発症疾患であり、ニカワ状の鼻汁や早期からの嗅覚異常を特徴とする。さらに、好酸球性副鼻腔炎患者では慢性副鼻腔炎患者と比較して気管支喘息やアスピリン過敏症、薬物アレルギーなど他の疾患を併発する割合が高い。好酸球性副鼻腔炎の発症には、鼻腔粘膜組織における好酸球の集積と活性化、ならびに Th2 型免疫応答の亢進が深く関与すると考えられているが、その病態形成に関わる T 細胞や樹状細胞の免疫学的特徴はいまだ十分に明らかとなっていない。そこで私は、好酸球性副鼻腔炎患者における末梢血中樹状細胞の表面マーカーと主要なサブセットの特徴を解析した。さらに、好酸球性副鼻腔炎患者の末梢血中の CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞のサイトカイン産生能の多様性についても年齢、性別を一致させた健常者と比較して検討した。

研究参加者は、東北医科薬科大学病院に通院している 14 人の好酸球性副鼻腔炎患者、および対照群として東北医科薬科大学の学生、職員とその家族から 14 人の健常者を募集した。本研究の結果、好酸球性副鼻腔炎患者の末梢血液中には IL-4、IFN- γ をそれぞれ、または両方発現した T 細胞お

よび Th1 型 Treg 細胞、Th2 型 Treg 細胞のような特定のフェノタイプが健常者と比較して増加していることが明らかとなった。樹状細胞の解析では、好酸球性副鼻腔炎患者の末梢血液中の I 型ミエロイド樹状細胞 (mDC1s) による免疫制御が増強しており、形質細胞様樹状細胞 (pDCs) の機能が低下していることが明らかとなった。さらに、男性患者の末梢血液中の IL-4 産生 CD8⁺T 細胞の割合および pDCs における CD86 発現レベルは、女性患者のそれらよりも有意に高いことが明らかとなった。このように、特定のフェノタイプを示す免疫細胞の増加が好酸球性副鼻腔炎の病態に深く関わっていること、そしてその免疫メカニズムには性が関与する可能性が示された。本研究の成果は、好酸球性副鼻腔炎患者の治療応答性や病態の把握に貢献できるとともに、免疫制御を利用した好酸球性副鼻腔炎に対する有効な治療法の開発に向けた基盤情報となることが期待される。

このように、アレルギー疾患は免疫応答のみならず、組織または免疫細胞に発現した受容体によるシグナル伝達との相互作用や、生命現象の本質的因子との相互作用によって、発症や増悪および病態が複雑に制御されている可能性がある。本研究によって、*OPRM1* A118G SNP (rs1799971) シグナルによる気管支喘息の病態の制御や、性による Th2 型免疫応答の制御など、その一端を解明することができた。本研究は、アレルギー疾患のより詳細な病態の理解に貢献することができ、これらの知見を応用したアレルギー疾患の悪化予測や効果的な治療戦略の創発につながる基盤情報を提供できるものと考えられる。

主論文

- 1) The A118G single-nucleotide polymorphism in *OPRM1* is a risk factor for asthma exacerbation. In submission.
- 2) Altered immune regulation of dendritic cells and enhanced cytokine production of T cells in the pathogenesis of eosinophilic chronic rhinosinusitis. *International Archives of Allergy and Immunology*, In press, DOI: 10.1159/000512591.

卵巣摘出マウスにおける新規選択的エストロゲン受容体モジュレーター BE360 の 抗うつ作用およびその作用機序解明に関する研究

佐久間若菜

東北医科薬科大学大学院薬学研究科 薬理学教室

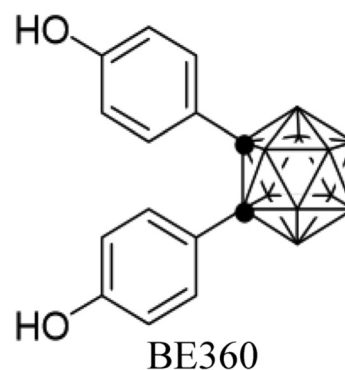
更年期とは閉経前後5年ずつの10年を指し、更年期障害は「更年期に現れる多種多様な症状の中で基質的变化に起因しない症状を更年期症状と呼び、これらの症状で日常生活に支障をきたす状態」と定義されている。現在、日本人女性の平均寿命は右肩上がりであり、令和元年簡易生命表によると87.45歳に達している。一方、閉経年齢は平均寿命ほど伸びてはいない。現代の日本人女性の閉経年齢を約50歳と見積もると、人生の約2分の1を更年期から閉経後の状態で送ることになる。したがって、更年期および閉経に伴う身体各所への影響を検討することは女性の生活の質（Quality of life: QOL）を維持するための重要な課題の一つといえる。

更年期障害の主な原因は閉経により卵巣機能が低下し、それに伴いこれまで精密に制御されてきたエストロゲンの血中濃度が急激に減少することによる。これに加えて身体的変化、精神・心理的な要因、社会文化的な環境因子などが複合的に関与することによって症状が発現すると考えられている。うつ病も同様の要因により発症する疾患の一つとして挙げられるが、閉経前と閉経後を比較すると、閉経後においてうつ病の罹患率が14倍も高いという報告がある。

更年期障害に対する薬物療法の代表的なものの一つとしてホルモン補充療法（Hormone replacement therapy: HRT）が挙げられるが、これはエストロゲンを中心とする製剤を投与する治療法で、更年期障害に対して第一選択となっている。しかしながら、HRTは年齢や閉経後の経過期間、使用時の副作用リスク、HRT実施前・中・後における検査による管理が必要など様々な条件や問題点がある。加えて、禁忌症例や慎重投与ないし条件付きで投与可能な症例なども多数あることから、より効果的で安全な治療法の確立に向け、生薬や補完療法なども含めて治療戦略が模索されている。その中でも近年注目されている治療薬候補の一つとして

選択的エストロゲン受容体モジュレーター（Selective estrogen receptor modulator: SERM）が挙げられる。SERMは臓器や組織によってエストロゲン作用や抗エストロゲン作用を示す化合物の総称で、エストロゲンと類似の立体構造を有する。エストロゲンのメリットを残しつつ、脂質代謝や凝固系などへ悪影響を及ぼさないより優れたSERMの開発が期待されている。このような背景を受けて、当大学の薬学部創薬化学教室において新規化合物のSERMとして炭素を含む多面体ホウ素クラスターを有するBE360（1,2-bis(4-hydroxyphenyl)-o-carborane）が開発された（Fig. 1）。BE360は骨粗鬆症や認知症モデルに対して有効性を示すことが報告されており、これらの疾患の治療薬になり得る可能性が示唆されている。しかしながら、更年期症状の中でも特に気分障害（うつ様症状）に対する効果については未検討である。したがって、本研究では更年期モデル動物のうつ様症状に対するBE360の作用およびそのメカニズムについて行動薬理的、神経化学的ならびに分子生物学的に検討した。

卵巣摘出（Ovariectomy: OVX）動物は閉経後に発症し得る骨粗鬆症のモデルとして使用されている。当研究室において、OVX後に精神・心理的要



Unmarked vertices of icosahedra = BH
● = C

Fig. 1. Structure of carborane compound BE360.

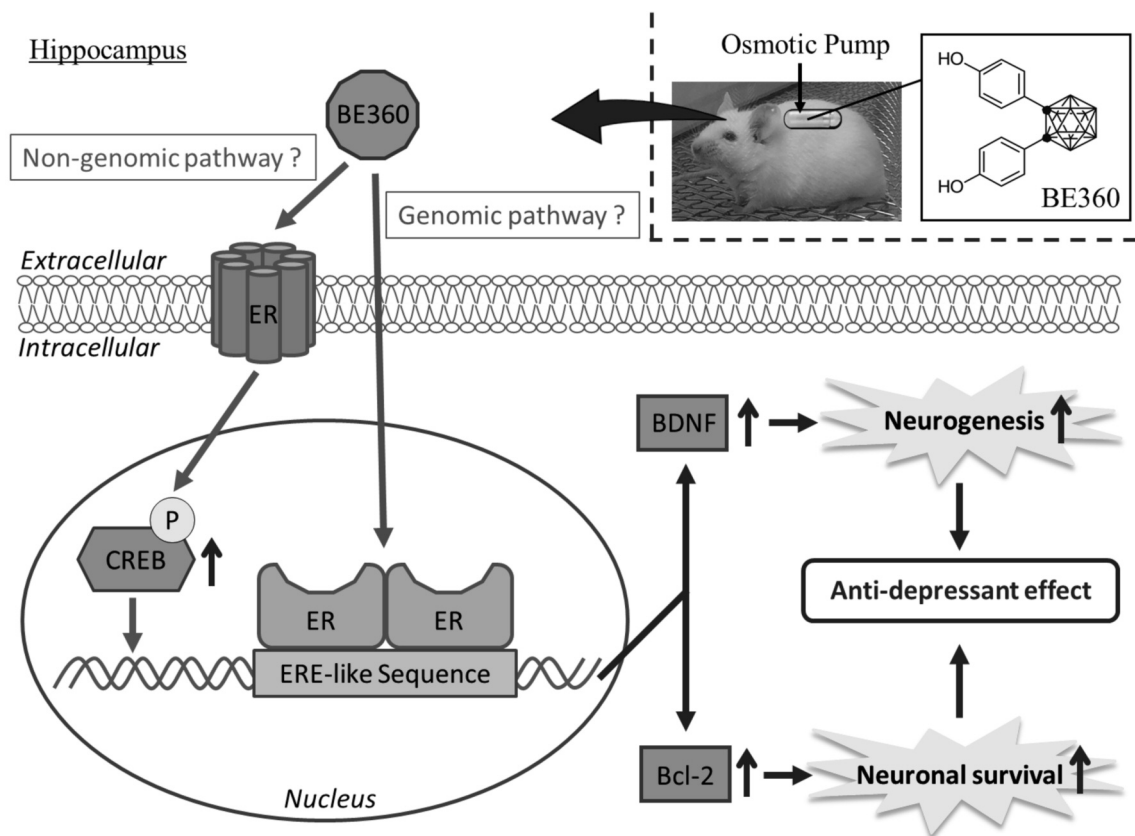


Fig. 2. Schematic illustration of the antidepressant mechanism of BE360 in OVX mice.

因として拘束浸水ストレスを負荷したストレス負荷 OVX モデルを作製し閉経後のうつ様症状を反映するか否かを検討したところ、その妥当性が認められた。よって本研究でもこのモデルを採用し、BE360 は OVX 手術後から 14 日間持続皮下投与し、拘束浸水ストレスは手術後 8~14 日目に 1 日 1 時間負荷した。その後、抗うつ作用のスクリーニング試験である強制水泳試験 (Forced swimming test: FST) を実施したところ、ストレス負荷 OVX マウスにおいて延長した無動時間が BE360 の投与により有意に短縮した。このことから BE360 は抗うつ作用を有することが示唆された。次に、BE360 の生殖器への影響を検討するために子宮重量を測定した。その結果、 17β -Estradiol および Tamoxifen 投与群では著しい子宮重量の増加が観察されたのに対し、BE360 投与群では子宮重量の変化は確認されなかった。したがって、BE360 は生殖器への悪影響が少ない可能性が示された。

エストロゲン受容体は細胞膜と核内に存在し、細胞膜上の受容体を介した経路は non-genomic 経路、核内にある受容体を介した経路は genomic 経路と呼ばれており、神経保護作用を有するエスト

ラジオールはこれらの経路を介してその作用を発揮するとされている。細胞膜エストロゲン受容体を介したシグナル伝達経路の下流に位置する転写因子の一つとして CREB (c-AMP response element binding protein) があり、リン酸化によって活性化される。うつ病では、海馬歯状回などの脳特定部位における神経新生細胞の減少が知られており、神経新生や神経保護に関与する因子として脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor: BDNF) や抗アポトーシス因子 (B-cell lymphoma-2: Bcl-2) が挙げられる。この BDNF や Bcl-2 は転写因子の CREB により発現量が調節されていることから、CREB を介したシグナル伝達は神経新生や神経保護において重要であるとされている。ストレス負荷 OVX マウスにおける海馬歯状回の p-CREB 発現量を免疫組織化学的染色法にて検討したところ、Vehicle 投与群と比較し BE360 投与群では p-CREB の蛍光強度が有意に増加することが認められた。次に CREB の活性化により産生される BDNF と Bcl-2 のストレス負荷 OVX マウスにおける海馬での発現量を Western blotting 法にて検討した。その結果、BE360 投与群において BDNF

と Bcl-2 共に発現量が有意に増加していた。これらの分子が関与する背側海馬歯状回における神経新生細胞の変化を検討するため、新生細胞のマーカである 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) および未熟神経細胞のマーカである Doublecortin (DCX) を用いて評価した。ストレス負荷 OVX マウスの海馬歯状回においてコントロール群と比較し、BrdU/DCX 陽性細胞数が減少していた。その減少は、BE360 投与によりコントロールレベルまで有意に改善した。したがって、BE360 の投与により神経新生促進および神経保護効果が引き起こされていることが示唆された。

本研究結果を総括すると、ストレス負荷 OVX マウスに BE360 を持続皮下投与することにより細胞膜上のエストロゲン受容体を介する CREB のリン酸化と核内エストロゲン受容体の活性化に起因して BDNF/Bcl-2 経路の活性化が起こり、それらに

伴い海馬歯状回での神経新生ならびに神経保護が促進し、その結果として抗うつ作用を表す可能性が示唆された (Fig. 2)。さらに、BE360 は従来の女性ホルモンとは異なり生殖器への影響が少ないことから、BE360 は女性の更年期におけるうつ様症状に起因する QOL の低下に福音をもたらす可能性を示した。

主論文 (原著論文)

Sakuma W, Nakagawasai O, Nemoto W, Odaira T, Ogawa T, Ohta K, Endo Y, Tan-No K. Antidepressant effect of BE360, a new selective estrogen receptor modulator, activated via CREB/BDNF, Bcl-2 signaling pathways in ovariectomized mice. *Behavioural Brain Research*. 2020; 393: 112764.

糖尿病性神経障害性疼痛における脊髄内アンジオテンシン変換酵素2の役割の解明 — レプチン欠損2型糖尿病モデルマウスを用いた検討 —

山縣 涼太

東北医科薬科大学大学院薬学研究科 薬理学教室

糖尿病はインスリンの機能不全により生じる慢性高血糖を主徴とし、腎症や網膜症、神経障害をはじめとする様々な合併症を誘発することで罹患患者の quality of life (QOL) 低下を招くことから、早期の治療が望まれる。これらの合併症の中でも神経障害は比較的早期に発症することに加え、発症率も高く、糖尿病患者の少なくとも半数が神経障害を合併している。さらに、糖尿病患者の20-34%が痛みを伴う神経障害を経験することが知られている。糖尿病性神経障害性疼痛の治療にはアミトリプチリンやデュロキセチン、プレガバリンといった薬物が使用されているが、鎮痛効果が限定的であることに加え、治療継続が困難となる副作用を認めることから、既存の治療法だけでは十分な疼痛管理を行えていないのが現状である。したがって、これらの患者のQOLを改善するためにも、糖尿病性神経障害性疼痛に対する新規治療標的の探索が望まれている。

Renin-angiotensin (Ang) system (RAS) は、生体内の体液量や電解質バランスの調節ならびに血圧の維持に関与しており、古くから知られている循環RASと、組織局所で機能する組織RASが存在する。循環RASでは、腎臓の傍糸球体細胞から放出された renin が肝臓で産生された angiotensinogen (AGT) に作用して Ang I を産生し、この Ang I は肺や血管内皮細胞に発現する Ang 変換酵素 (ACE) により Ang II へと変換される。Ang II は RAS の主要な生理活性ペプチドであり、G タンパク質共役型受容体の Ang II type 1 (AT1) および Ang II type 2 (AT2) 受容体を活性化することで生理作用を示す。また、Ang II に ACE2 が作用することにより生成される Ang (1-7) は、G タンパク質共役型受容体の Mas 受容体に結合して、Ang II の AT1 受容体を介する生理作用を抑制する。すなわち、ACE2/Ang (1-7)/Mas 受容体体系は ACE/Ang II/AT1 受容体体系に相反する作用を示し、RAS 内において拮抗的な役割を担ってい

る。一方で、腎臓や血管、脳、肺、肝臓などには循環RASとは独立し、局所で Ang II をはじめとする Ang 関連ペプチドを産生する機構である組織RASが存在する。組織RASにより局所で産生された Ang 関連ペプチドはオートクリンあるいはパラクリン作用により近傍の細胞に働き、臓器・組織の構造や機能の維持、疾患の進展に関与している。

我々はこれまでに脊髄における組織RASが疼痛伝達に関与することを報告している。すなわち、ACE/Ang II/AT1 受容体系を介する p38 MAPK のリン酸化が脊髄疼痛伝達機構において促進的な役割を示し、この系の活性化が streptozotocin (STZ) 誘発性1型糖尿病モデルマウスの糖尿病性神経障害性疼痛の一因であることを明らかにしている (*Mol Pharmacol*, 2016, 90:205-213)。一方で、この神経障害性疼痛は Ang (1-7)/Mas 受容体系の活性化により抑制される (*Eur J Pain*, 2019, 23:739-749)。これらの結果は、脊髄内 Ang 系が糖尿病性神経障害性疼痛の調節において極めて重要な役割を果たすことを示している。しかしながら、STZ は高血糖とは無関係に末梢神経を直接活性化することにより、神経障害性疼痛を誘発することが報告され (*Mol Pharmacol*, 2008, 73:995-1004; *J Biol Chem*, 2015, 290:15185-15196)、STZ マウスが糖尿病性神経障害性疼痛の研究に適した動物モデルではない可能性が示されている。加えて、糖尿病患者の約90%は2型糖尿病であり、2型糖尿病に伴う神経障害性疼痛に脊髄内 Ang 系が関与しているかは不明である。

そこで、2型糖尿病モデルとしてよく知られているレプチン欠損 *ob/ob* マウスを用いて糖尿病性神経障害性疼痛における脊髄内 Ang 系の関与について行動薬理学的および神経化学的な解析を行った。

まずはじめに、lean および *ob/ob* マウスの血糖値および痛覚過敏を5-20週齢にかけて測定した。接触性および熱性刺激に対する痛覚過敏はそれぞれ、von Frey filament 法および Hargreaves 法によ

り測定した。ob/obマウスは、5-15週齢において高血糖状態にあったが、その後はleanマウスと同程度まで血糖値が低下した。一方、接触性および熱性痛覚過敏は、それぞれ11-14週齢および9-15週齢において観察された。これらの結果より、接触性および熱性痛覚過敏は持続的な高血糖状態に引き続いて発症し、血糖値が正常に戻るまで持続することが明らかとなった。ob/obマウスでは持続的な高血糖状態が、痛覚過敏発症のトリガーとなっている可能性が考えられるため、これを証明する目的で、5-16週齢のob/obマウスに中間型インスリン (s.c., b.i.d.) を投与し、血糖値を正常値レベルまでコントロールした際の痛覚過敏を測定した。その結果、インスリンを投与したob/obマウスでは、高血糖の改善に伴い接触性および熱性痛覚過敏の消失が認められた。これらの結果より、ob/obマウスで認められる痛覚過敏は、高血糖に起因して発症する糖尿病性神経障害性疼痛であることが明らかとなった。

糖尿病性神経障害性疼痛発症下における脊髄内Ang系の変化を明らかにするため、12週齢のob/obマウスの脊髄背側部におけるAng系構成因子の発現量をWestern blot法により解析した。その結果、ob/obマウスの脊髄背側部細胞膜上におけるACE2の発現量は顕著に減少しており、Mas受容体の発現量については減少傾向を示した。一方で、AGT、ACEおよびAT1受容体の発現量に変化は認められなかった。したがって、ob/obマウスの脊髄背側部においてACE2/Ang(1-7)/Mas受容体系の機能低下が生じていることが明らかとなった。

ob/obマウスの脊髄背側部においてACE2の発現量が減少するメカニズムを明らかにするため、免疫組織学的手法により脊髄後角におけるACE2の発現分布を解析した。その結果、脊髄後角(ラミナI-III層)においてACE2は、neuronal nuclei (NeuN)陽性神経細胞およびionized calcium binding adapter protein 1 (Iba-1)陽性ミクログリアに発現し、glial fibrillary acidic protein (GFAP)陽性アストロサイトには発現していなかった。そこで次に、脊髄後角における神経細胞およびミクログリア数の変化を解析したところ、ob/obマウスの脊髄後角ではleanマウスと比較してIba-1陽性ミクログリア数に変化は認められなかったものの、NeuN陽性神経細胞数が有意に減少していた。ob/obマウスにおける神経細胞数の減少は、Western blot法によるNeuN発現量の低下からも確認された。さらに、ob/obマウスの脊髄後角ではACE2陽性神経細胞数が有意に減少していた。これらの結果は、ob/obマウスの脊髄後角で認められるACE2の発現量低下が神経細胞数の減少に起因することを示唆している。

ACE2の発現量低下によるAng(1-7)産生系の機能低下が痛覚過敏の発現に関与しているのか否かを探る目的で、ob/obマウスの脊髄クモ膜下腔内(i.t.)へAng(1-7)を投与し、痛覚過敏の変化を検討した。その結果、Ang(1-7)(3 pmol)は、leanマウスに影響を与えることなく、ob/obマウスで認められる接触性および熱性痛覚過敏を有意に抑制した。また、このAng(1-7)による抗痛覚過敏作用はMas受容体拮抗薬A779(0.3 nmol)の

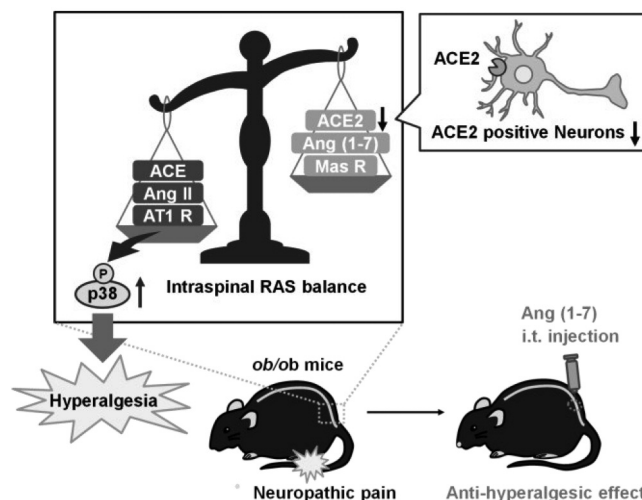


Fig. 1. Putative mechanism by which imbalance of spinal RAS contributes to diabetic neuropathic pain observed in ob/ob mice.

i.t. 同時投与によって完全に拮抗された。なお、Ang (1-7) (3 pmol) および A779 (0.3 nmol) は、*ob/ob* マウスの血糖値には無影響であった。

最後に、Ang (1-7) の抗痛覚過敏作用に対する脊髄内 p38 MAPK の関与を検討した。p38 MAPK 阻害薬 SB203580 (1 nmol) を i.t. 投与した後に痛覚過敏の変化を測定したところ、SB203580 は血糖値に影響を与えることなく、接触性および熱性痛覚過敏を有意に抑制した。加えて、*ob/ob* マウスの脊髄背側部において認められる p38 MAPK のリン酸化は Ang (1-7) (3 pmol, i.t.) により有意に抑制された。さらに、この Ang (1-7) による抑制作用は A779 (0.3 nmol, i.t.) により完全に拮抗された。これら結果より、Ang (1-7) は Mas 受容体を介して *ob/ob* マウスの脊髄背側部における p38 MAPK のリン酸化を抑制し、その結果として抗痛覚過敏作用を示すことが明らかとなった。

本研究成果を総括すると、2 型糖尿病マウスにおいて認められる神経障害性疼痛には ACE2/Ang (1-

7)/Mas 受容体系のダウンレギュレーションが関与していることが明らかとなった (Fig. 1)。このダウンレギュレーションは、脊髄後角における ACE2 陽性神経細胞の減少により引き起こされると考えられる。また、ACE2/Ang (1-7)/Mas 受容体系の活性化は痛覚過敏の抑制に結びつく可能性が示されたことから、Ang (1-7) などの Mas 受容体アゴニストは 2 型糖尿病の合併症である神経障害性疼痛に対して効果的な治療薬となり得ると考えられる。

主論文 (原著論文)

Yamagata R, Nemoto W, Nakagawasai O, Takahashi K, Tan-No K. Downregulation of spinal angiotensin converting enzyme 2 is involved in neuropathic pain associated with type 2 diabetes mellitus in mice. *Biochem Pharmacol*, 174:113825 (2020).

Biofilm 形成 *Staphylococcus aureus* に対する *in vitro* rifampicin 併用療法の殺菌および耐性に関する研究

宇野 堯

東北医科薬科大学大学院薬学研究科 臨床感染症学教室

化膿性脊椎炎や骨髄炎など整形外科領域の感染症の治療に抗菌化学療法が行われる場合、その治療期間が3カ月以上と長期化する。これは、骨および近傍組織における血流が少ないため、抗菌薬の移行濃度が低いことがあげられるが、人工股関節置換術や人工膝関節置換術などの術後にみられる人工関節周囲感染症（periprosthetic joint infection: PJI）では、デバイス表面上の細菌が biofilm を形成するため治療が遷延する。この biofilm は、一般に抗菌薬や消毒薬が菌体内に入る前の段階で取り込みを阻止し、菌体の生存を維持させる役割がある。したがって、biofilm 形成菌によるデバイス関連感染の治療では biofilm への対応も考慮しなければならない。日本環境感染学会が2012年から2019年の期間に実施した手術部位感染サーベイランスでは、PJI患者の起因菌として staphylococci が73–78%と最も多く分離された。PJIにおいて biofilm 形成を伴う staphylococci が分離された場合、biofilm への浸透性が高いと考えられている rifampicin (RFP) の併用療法が行われている。わが国では RFP の適応菌種に staphylococci は含まれていないが、biofilm 形成 staphylococci による PJI に対し RFP と他の抗菌薬との併用療法が実施されている。しかしながら、こうした RFP の併用療法における治療成績の有効率は76%であったとする一方で、RFP 併用の有無で治療効果に差がなかったとする報告など、一定のエビデンスが得られていない。そこで、本研究では staphylococci のうち分離頻度が最も高い *Staphylococcus aureus* を用いた biofilm 形成菌に対する RFP 併用療法と RFP 耐性に焦点をあて、以下の検討を行った。

第1章では、*S. aureus* の臨床分離株9株と標準株 ATCC 29213 株1株の合計10株を用いた。*S. aureus* による PJI を想定し、ステンレスワッシャーの表面上に biofilm を作成させる「*in vitro* biofilm 形成モデル」を用い、常用量投与における骨組織濃度 (C_{max}) の抗菌薬 (cefazolin: CEZ,

vancomycin: VCM, clarithromycin: CAM および RFP) を単剤で曝露させ、各々の殺菌効果を評価した。その結果、CEZ は10株中4株が殺菌されず、常用量投与で骨組織に移行する CEZ 濃度では十分な殺菌効果が得られない可能性が考えられた。また、biofilm の透過性が低いことが知られている VCM では10株中7株が殺菌されなかった。抗 biofilm 効果が報告されている CAM においても10株中8株が殺菌されなかったが、これは CAM の骨組織移行濃度が CEZ と同様に低いことが原因と考えられた。最も殺菌効果が期待された RFP では、10株中7株が殺菌されなかったことに加え、その生残株は全て最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC) が $>128 \mu\text{g}/\text{mL}$ の高度耐性を示した。Biofilm 形成 *S. aureus* に対し、抗菌薬の単剤曝露による殺菌効果は得られにくく、特に RFP では耐性を獲得しやすいことが明らかになった。

第2章では、第1章と同様の biofilm 形成モデルを用い、RFP をベースとした各抗菌薬 (CEZ, VCM および CAM) との併用による殺菌効果および RFP 耐性について検討した。その併用効果は、RFP と CEZ の併用で被検菌株10株中6株、RFP と VCM では10株中8株、RFP と CAM の曝露では10株中7株が殺菌された。しかしながら、上記3つの併用パターンで曝露させた計30株のうち、殺菌されなかった9株は CEZ, VCM および CAM の感受性を保持したものの、RFP に高度耐性 (MIC: $>128 \mu\text{g}/\text{mL}$) を示した。これら RFP 耐性株の biofilm 形成量をクリスタルバイオレット染色法にて測定し、その親株と比較した。被検菌株10株のうちいずれかの併用曝露で RFP 耐性を獲得した5株中2株の biofilm 形成量は親株に比し1.5倍上昇した ($P<0.05$) が、残り3株では有意な差が認められなかった。本検討において、RFP 耐性の獲得によって biofilm 形成量が上昇する株と不変の株が、臨床株の中に存在することを示した。

第3章では、前述の biofilm 形成量上昇株と不変株に対し、臨床における長期投与を想定した RFP 曝露の継続による biofilm 形成量の変化とその関連因子について検討した。グラム陰性菌の *Pseudomonas aeruginosa* は薬剤排出ポンプの mRNA 発現量が上昇することにより biofilm の形成が上昇すると報告されている。薬剤排出ポンプは、菌体内に入った抗菌薬を菌体外へ排出する役割があるほか、biofilm の構成成分である多糖体や extracellular DNA を排出することで biofilm 形成を増加させることが示唆されている。今回、*S. aureus* においても同様の機能をもつと考えられる薬剤排出ポンプ (NorA, NorB および NorC) をコードしている遺伝子の mRNA 発現量を real-time reverse transcription PCR 法にて確認した。その結果、biofilm 形成量上昇株の *norA* と *norC* の mRNA 発現量がそれぞれ 3.2 倍、4.2 倍に上昇した。一方、biofilm 形成量不変株では *norA* および *norB* の発現量が上昇した。NorA および NorB は主にキノロン系薬や第四級アンモニウム塩が排出されることが知られており、これらのポンプの高発現により抗菌薬や消毒薬に対して耐性を示す。一方、NorC は、キノロン系の排出に関与しているが、その他の役割に関しては明らかになっていない。今後、*S. aureus* における NorC の役割について検討を深める必要があるが、今回 RFP の曝露により biofilm 形成量が上昇した要因の一つに NorC が関与しているかもしれない。

本研究は、biofilm 形成 *S. aureus* による汚染モデ

ルに対し、RFP の併用曝露では完全な殺菌が困難であることを示した。すなわち、被検菌株 10 株中 5 株が *in vitro* 併用療法により RFP 耐性を獲得し、さらに biofilm 形成量も増加することを確認した。新しい抗菌薬が開発されない現状において、既存抗菌薬を組み合わせた難治性感染症の治療法は必要である。Biofilm 形成 *S. aureus* による PJI の抗菌化学療法では、起因菌が RFP 耐性を獲得しやすい株か否か確認することが必要であり、細菌検査において併用薬負荷試験などの新たな検査法を開発し、抗菌薬適正使用に取り組むことが重要である。

〈参考論文〉 主論文 (原著論文)

- 1) Takashi Uno, Takumi Sato, Mariko Yagi, Ryota Ito, Masato Kawamura, Shigeru Fujimura. *In vitro* Rifampicin Combination Chemotherapy Confers Rapidly Rifampicin Resistance for Biofilm-Formed *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology*. **9**: 343 (2020).
- 2) Hajime Nakai, Takumi Sato, Takashi Uno, Emiko Furukawa, Masato Kawamura, Hiroshi Takahashi, Akira Watanabe, Shigeru Fujimura. Mutant selection window of four quinolone antibiotics against clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*. *Journal of Infection and Chemotherapy*. **24**: 83–87 (2018).