

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：32409

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2020

課題番号：18H06111・19K21229

研究課題名（和文）環状ホスファチジン酸類縁体を用いた多発性硬化症の新規治療薬開発

研究課題名（英文）2-carba-cyclic phosphatidic acid derivative is a novel drug candidate for multiple sclerosis

研究代表者

山本 梓司 (yamamoto, shinji)

埼玉医科大学・保健医療学部・助教

研究者番号：70823318

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は多発性硬化症（multiple sclerosis；MS）治療薬として開発を目指す2-カルバ環状ホスファチジン酸（2ccPA）の薬理作用メカニズム解析を行った。2ccPAは神経炎症関連遺伝子群の発現抑制、抗炎症性脂質の発現量増加による神経保護作用を有し、脱髄抑制効果を持つことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者が目指している2ccPAによるMS治療薬開発は、我が国の難病であるMSに苦しむ多くの患者のQOLの向上に資するものである。2ccPAはすでに、変形性関節症治療薬として米国FDA安全性試験をクリアし、化学合成法が確立されており、薬剤として十分な供給が可能である。また知的財産権の取得にも配慮しており、今後に向けて高い将来性を持つと考えている。

研究成果の概要（英文）：Multiple sclerosis (MS) is a chronic demyelinating disease of the central nervous system characterized by recurrent and progressive demyelination/remyelination cycles, neuroinflammation, oligodendrocyte loss, and axonal pathology. Cyclic phosphatidic acid (cPA) is a natural phospholipid mediator with a unique cyclic phosphate ring structure at the sn-2 and sn-3 positions of the glycerol backbone. We previously reported that the administration of cPA reduced cuprizone-induced demyelination. 2-Carba-cPA (2ccPA) is the compound in which one of the phosphate oxygen is replaced with a methylene group at the sn-2 position. In the present study, we investigated the effects of 2ccPA on the cuprizone-induced demyelination. We demonstrated that 2ccPA protected oligodendrocytes via suppression of the mitochondrial apoptosis pathway. These data indicate that 2ccPA may be a promising compound for the development of new drugs to treat demyelinating disease and ameliorate the symptoms of MS.

研究分野：神経薬理学

キーワード：多発性硬化症 脱髄 クプリゾン 2ccPA

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (MS) は中枢神経性の「脱髄」を特徴とした難病指定疾患である。患者数は全国に約 12000 人おり、欧米では若年成人を侵す神経疾患の中で最も多く、近年、我が国での患者数も増加傾向にある。脱髄の再発と寛解を繰り返す再発寛解型 MS と、その後の脱髄進行が止まらない進行型 MS が存在する [1, 2]。免疫抑制メカニズムを主体とする既存薬は、再発寛解型 MS を抑制する効果を持つが、残念ながら進行期に移行してしまった患者にはあまり効果がない (INFORMS 試験、American Academy of Neurology 67th Annual Meeting 2015)。そのため脱髄を進行させる神経炎症反応の抑制、及び破壊されたミエリンを再生する根本的治療薬が強く求められている。

2ccPA は、自然界に存在する環状ホスファチジン酸 (cPA (図 1A)) の人工合成誘導体であり、cPA より高い生体内安定性・生理活性をもつ (図 1B) [3, 4, 5]。どちらも独特な環状リン酸構造を有し、神経細胞の生存・分化促進、神経障害性疼痛の抑制をはじめ多彩な生理活性に不可欠であることが示されている [6, 7, 8]。我々は MS モデルマウスであるクプリゾン (CPZ) 誘導脱髄モデルマウスの脱髄進行、運動機能障害を、cPA および 2ccPA 投与により抑制することを見出した (特願 2013・

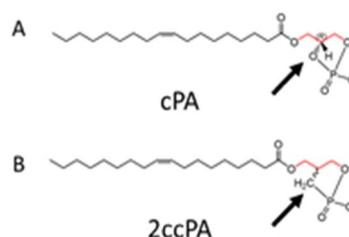


図 1 cPA (A) と 2ccPA (B) の化学構造

012859 脱髄疾患治療薬) [9]。2ccPA は cPA を上回る脱髄抑制効果、さらにミエリン再生を促進する効果を示した [10] (PCT 国際特許取得済: 特許第 6007264 号)。

また、2ccPA が生体内で代謝された際、構造変化により 2ccPA 類縁体 (特許申請の都合上、以下 X-PA とする) となり、X-PA も脱髄抑制効果を有する可能性が示唆された。従って、本研究において X-PA の脱髄抑制効果の検討も行った。

## 2. 研究の目的

本研究は 2ccPA を MS 治療薬として応用を目指すために、2ccPA の「神経炎症抑制作用」と「ミエリン再生効果」における薬理学的作用点、作用メカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 多発性硬化症モデルマウス作製法

10 週齢雄 C57BL/6j マウスに 0.2%CPZ を含む粉末飼料を自由摂取で最も脱髄が進行する 5 週間後まで飼育し、オリゴデンドロサイト特異的細胞死による脱髄モデルマウスを作製した。

### 2ccPA および X-PA の投与

化学合成された 2ccPA および X-PA は、CPZ 投与と同時に開始し、5 週間後まで連日腹腔内投与 (1.6mg/kg/day) した。コントロールマウスは通常粉末飼料で飼育し、5 週間生理食塩水を連日腹腔内投与した。

### X-PA の脱髄抑制効果確認試験

#### 1) 脳梁組織を用いた脱髄の評価

X-PA 投与による CPZ 誘導脱髄に対する抑制効果を検討するために、ミエリン特異的染色である Black-Gold II 染色を用い、染色濃度によりミエリン量を評価した。

#### 2) ロータロッドを用いた運動機能障害試験

マウス用ロータロッドトレッドミルを用い、CPZ 投与 5 週間後のマウス運動機能を測定した。ロッド上での運動継続可能時間は、300 秒間の記録時間内に、回転するロッドから最初に落下するまでの時間を評価した。また、運動機能障害回数は、ロッドから落下後もすぐに運動を継続させ、300 秒間におけるロッドからの落下あるいはロッドに捕まる行動の合計回数を評価した。

### Gene chip 遺伝子発現解析

マウス脳梁組織を採取し、3 匹の脳梁を 1 サンプルとして コントロール、CPZ、CPZ+2ccPA、2ccPA の 4 群について遺伝子発現量の変動について比較検討を行った。

### リポミクス脂質網羅解析

2ccPA 投与したマウス脳梁組織を採取し、リポミクス解析技術を用いて、脱髄抑制およびミエリン再生の際に変動する脂質分子の解析を行った。本リポミクス解析は秋田大学中西助教 (リポドーム大戸主任研究員) の協力により行われた。

## 4. 研究成果

## X-PA の脱髄抑制効果確認試験結果

2ccPA の生体内代謝構造物である X-PA を作製し、CPZ 誘導脱髄モデルマウスに投与し、脱髄抑制効果が得られるかどうか検討した。

CPZ 投与群は脱髄の進行により体重減少が生じる。X-PA 投与は、CPZ による体重減少を抑制しなかった (図 2A)。

コントロールマウスでは脳梁のミエリン構造が高濃度にミエリン染色されるが、CPZ 投与マウスでは脱髄によりミエリン構造が破壊される為、ミエリン染色濃度が低い。X-PA 投与マウスはミエリン量が保持され、脱髄を抑制する効果が得られた (図 2B-E)。

CPZ 誘導脱髄により運動継続時間が低下し、運動障害回数が増加した。X-PA 投与は運動継続可能時間が回復し (図 2F)、運動機能障害回数の減少を示し (図 2G)、有意な運動機能改善効果を示した。

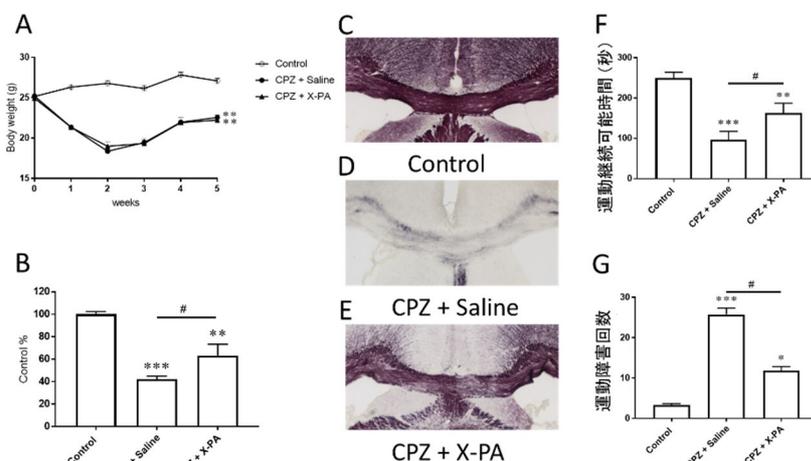


図 2 X-PA 脱髄抑制確認試験

## Gene chip 遺伝子発現解析

2ccPA の脱髄抑制における生理活性を多角的に解析するため、マウス脳梁組織の Genechip 解析を実施した。2ccPA がミクログリア (CD22 antigen、chemokine receptor、purinergic receptor P2X など) に作用し神経炎症系の抑制に作用すること、ミエリンタンパク (MOBP: myelin associated oligodendrocytic basic protein、Opalin: oligodendrocytic myelin paranodal and inner loop protein など) の遺伝子発現に関与しミエリン再生効果を持つことが示唆された。また、2ccPA が免疫機能を調節する樹状細胞機能に作用すること等が明らかとなった (図 3)。

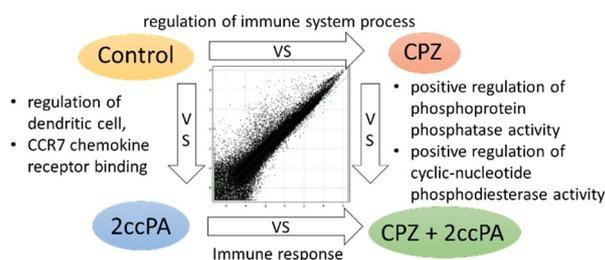


図 3 Gene Chip Array 発現解析

## リポミクス脂質網羅解析

脳梁組織の脂質成分を抽出し、三連四重極型質量分析計 SRM を用いて Lipidomics 解析を実施した。脱髄の進行により減少する DHA 含有リン脂質が、2ccPA を投与したマウスにおいて改善していた。また DHA をリン脂質へ組み込む酵素 (リゾホスファチジン酸アシル転移酵素、LPAAT3) の発現量が 2ccPA により増加した。2ccPA が DHA による神経保護効果に寄与することが明らかとなった (data not shown)。

## 第三者機関による再現性実験

日精バイリス株式会社において 2ccPA の委託試験を行い、研究第三者機関による 2ccPA の効果を再検討した (試験番号 10474)。

## 引用文献

- 1) Matsushima GK, Morell P. *Brain pathology*. 2001; 11(1): 107-116.
- 2) Stangel M. *Curr Pharm Des*. 2012; 18:4471-4.
- 3) Shimizu Y. et al. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2020; 13; 150: 106450.
- 4) Tsukahara R. et al. *J Pharmacol Sci*. 2018; 136(2): 93-96.
- 5) Shimizu Y. et al. *J Chromatogr B*. 2018; 8; 1076: 15-21.
- 6) Fujiwara Y. et al. *J Neurochem*. 2003; 87:1272-83.
- 7) Gotoh M. et al. *PLoS One*. 2012; 7:e51093.
- 8) Gotoh M. et al. *Eur J Pharmacol*. 2010; 649:206-9.
- 9) Yamamoto S. et al. *Eur J Pharmacol*. 2014; 15; 741:17-24.
- 10) Yamamoto S. et al. *J Neuroinflammation*. 2017; 21; 14(1): 142.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shimizu Yoshibumi, Fukasawa Keiko, Yamamoto Shinji, Shibaiki Yuki, Tsukahara Ryoko, Ishikawa Masaki, Iwasa Kensuke, Yoshikawa Keisuke, Gotoh Mari, Murakami-Murofushi Kimiko	4. 巻 150
2. 論文標題 Evaluation of the pharmacokinetics of 2-carba-cyclic phosphatidic acid by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Prostaglandins & Other Lipid Mediators	6. 最初と最後の頁 106450 ~ 106450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.prostaglandins.2020.106450	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu Yoshibumi, Ishikawa Masaki, Gotoh Mari, Fukasawa Keiko, Yamamoto Shinji, Iwasa Kensuke, Yoshikawa Keisuke, Murakami-Murofushi Kimiko	4. 巻 1076
2. 論文標題 Quantitative determination of cyclic phosphatidic acid and its carba analog in mouse organs and plasma using LC-MS/MS	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography B	6. 最初と最後の頁 15 ~ 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jchromb.2018.01.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tsukahara Ryoko, Yamamoto Shinji, Yoshikawa Keisuke, Gotoh Mari, Tsukahara Tamotsu, Neyama Hiroyuki, Ishii Satoshi, Akahoshi Noriyuki, Yanagida Keisuke, Sumida Hayakazu, Araki Masatake, Araki Kimi, Yamamura Ken-ichi, Murakami-Murofushi Kimiko, Ueda Hiroshi	4. 巻 136
2. 論文標題 LPA5 signaling is involved in multiple sclerosis-mediated neuropathic pain in the cuprizone mouse model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 93 ~ 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2018.01.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Shinji, Sakemoto Chiaki, Iwasa Kensuke, Maruyama Kei, Shimizu Kuniyoshi, Yoshikawa Keisuke	4. 巻 144
2. 論文標題 Ursolic acid treatment suppresses cuprizone-induced demyelination and motor dysfunction via upregulation of IGF-1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 119 ~ 122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2020.08.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	室伏 きみ子  (MUROFUSHI Kimiko)  (00103557)		
研究協力者	後藤 真里  (GOTOH Mari)  (80467050)		
研究協力者	中西 広樹  (Nakanishi Hiroki)  (10466740)		
研究協力者	丸山 敬  (MARUYAMA Kei)  (30211577)		
研究協力者	吉川 圭介  (YOSHIKAWA Keisuke)  (10435860)		
研究協力者	岩佐 健介  (IWASA Kensuke)  (00623703)		
研究協力者	石川 将己  (ISHIKAWA Masaki)  (10758684)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------