

令和 7 年 6 月 17 日現在

機関番号：35307

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K06572

研究課題名（和文）Nrf2を活性化する抗炎症薬の定量的構造活性相関の解析

研究課題名（英文）Quantitative structure-activity relationship analysis of anti-inflammatory drugs with activate Nrf2

研究代表者

山川 直樹（Yamakawa, Naoki）

就実大学・薬学部・教授

研究者番号：20583040

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、非ステロイド系抗炎症薬（熱や痛みを和らげる、ステロイドではない薬）が抗酸化作用を示すことに着目し、既存の薬の中からHEK-293細胞株（ヒトの腎臓から作られた、実験によく使用される細胞）においてNrf2-ARE経路（細胞をストレスから守るしくみ）を効果的に活性化させる化合物を発見した。また、この化合物の構造活性相関（薬の構造を変えて効き目の違いを調べること）に関する解析から、Nrf2-ARE経路の活性化とHO-1（生態防御に働く酵素の一種）の誘導に寄与する鍵構造を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、NSAIDs（熱や痛みを和らげる、ステロイドではない薬）の抗酸化活性（体の中の有害な物質を取り除いて細胞を守る力）に注目し、生体における酸化ストレス（体の中で発生する有害な物質が細胞を傷つける状態）に対して防御作用を示す新しいタイプのNSAIDの創製を目指して研究を実施した。具体的には、既存のNSAIDsの中からHEK-293細胞（ヒトの腎臓から作られた、実験によく使用される細胞）に対する抗酸化作用が強いNSAIDを発見し、化学構造の観点から薬理活性に関与する鍵構造を同定した。本研究で得られた成果は、医薬品開発に直結する点においても社会的貢献性が極めて高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the fact that nonsteroidal anti-inflammatory drugs (non-steroidal drugs that relieve fever and pain) have antioxidant effects, and discovered a compound from existing drugs that effectively activates the Nrf2-ARE pathway (a mechanism that protects cells from stress) in HEK-293 cell lines (cells made from human kidneys and often used in experiments). In addition, by analyzing the structure-activity relationship of this compound (changing the structure of the drug to examine differences in effectiveness), we identified the key structure that contributes to the activation of the Nrf2-ARE pathway and the induction of HO-1 (a type of enzyme that works in ecological defense).

研究分野：創薬化学

キーワード：非ステロイド系抗炎症薬 Nrf2-ARE経路 酸化ストレス 構造活性相関

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) Nrf2

核因子赤血球系 2-関連因子 2(Nrf2)は、酸化ストレスにより活性化される転写因子であり、炎症増悪因子に関わる遺伝子発現の抑制や、生体防御に関与する遺伝子群の転写を促進することから、新しいタイプの抗炎症薬を創製する上でのターゲットとして注目されている。

Nrf2 は平常時において、細胞質内で Kelch 様 ECH 結合タンパク質 1(Keap1)と呼ばれるタンパク質と結合しているが、酸化ストレスの影響を受けるとまず Keap1 から解離して核内へ移行する。次いで、遺伝子上流に存在する抗酸化剤応答配列(ARE)に結合し、抗酸化作用や薬物代謝に関与する酵素などの発現を誘導する。近年、Nrf2-ARE 経路を活性化する様々な化合物が発見され、抗酸化作用を期待した治療薬の候補として研究が進められている。

(2) Nrf2-ARE 経路を活性化する薬物

Nrf2 を活性化させる化合物の探索は古くから行われており、これまでに医薬品をはじめ天然物や食品由来の成分に至る多くの分子が同定されている。また、Nrf2-ARE 経路の活性化には、抗炎症作用や細胞保護効果をもたらすことが報告されている。例えば、ブロッコリーなどのアブラナ科野菜に含まれるスルフォラファンはヘムオキシゲナーゼ(HO-1)やNAD(P)Hデヒドロゲナーゼキノン1(NQO1)などの抗酸化酵素の発現を誘導し、マウスモデルにおいて炎症性腸疾患や神経炎症の抑制効果が示されている。また、tert-ブチルヒドロキノン(tBHQ)は、リポ多糖(LPS)誘導性の炎症モデルで抗炎症作用を示すことが報告されている。さらに、フマル酸ジメチル(DMF)は多発性硬化症の治療薬として実際に臨床使用されており、その作用機序にNrf2-ARE経路の活性化が関与している。

(3) NSAIDs と Nrf2-ARE 経路活性化との関連性

アスピリンやインドメタシンに代表される非ステロイド系抗炎症薬(NSAIDs)は優れた消炎鎮痛薬であり、世界中で最もよく処方されている医薬品の一つである。一般にNSAIDsは酵素シクロオキシゲナーゼ(COX)の阻害剤であり、この酵素が媒介して産生されるプロスタグランジン(PG)の働きを抑制することで抗炎症作用を示すが、一部のNSAIDsにはNrf2-ARE経路の活性化を介した抗酸化作用を示すことが報告されている。すなわち、NSAIDsによるNrf2-ARE経路の活性化が、炎症を抑制する新たなメカニズムとして注目されている。そこで我々は、Nrf2-ARE経路を活性化させるNSAIDsの化学構造に着眼し、分子中のどのような基本骨格や官能基が薬理活性の発現に寄与しているのかについて疑問を抱いた。

2. 研究の目的

以上のような背景のもと、本研究では、(1) NSAIDsの抗酸化作用に着目し、Nrf2-ARE経路を活性化させるNSAIDsについて網羅的なスクリーニングを実施する。(2) (1)で得られたヒット化合物について、Nrf2-ARE経路を介した抗酸化作用を示すことを検証する。(3) NSAIDsの化学構造とNrf2-ARE経路の活性化作用及び抗酸化作用との構造活性相関を解析し、どの化学的構造要素が薬理活性に寄与しているかを明らかにし、新しいタイプの抗炎症の創製について、その可能性を探求することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Nrf2-ARE 経路を活性化させる NSAIDs の網羅的解析

国内外から入手した約 80 種類の既存薬 NSAIDs のライブラリーを構築し、これらの化合物を用いてNrf2-ARE経路の活性化作用を調べた。対象とする細胞は、安定な細胞株であること、細胞培養が簡便であること、シグナルの応答性が高いこと、バックグラウンドノイズレベルが低いことなどの観点から、ルシフェラーゼ遺伝子が導入されたHEK-293細胞株(ヒト胎児の腎由来の細胞株)を用いた。具体的には、HEK-293細胞に対する化合物のNrf2-ARE経路の活性化作用について、ルシフェラーゼレポーターアッセイ法で評価した。

(2) 抗酸化作用の検証

(1)で得られたヒット化合物について、HEK-293細胞における抗酸化酵素の誘導効果を調べた。本研究において対象とする抗酸化酵素は、Nrf2-ARE経路により直接転写誘導される主要な抗酸化酵素の一つであること、酸化ストレス応答だけでなく抗炎症や細胞保護作用にも関与していること、一部のNSAIDsによる誘導効果が既に報告されていることなどの観点から、HO-1を標的とした。具体的には、HEK-293細胞におけるヒット化合物のHO-1誘導作用を、ウエスタンブロットティング法を用いて評価した。一方で、Nrf2-ARE経路の活性化に依存しない抗酸化作用の関与を確かめる目的で、非細胞系におけるヒット化合物の直接的な活性酸素種(ROS)の消去活性についても検討を行った。

(3) 構造活性相関の解析

(1)及び(2)の研究で得られた知見に基づき、NSAIDsの薬理活性に関する構造活性相関の解析を実施し、特定の化学構造が Nrf2-ARE 経路の活性化に与える影響について評価を行った。その際、ヒット化合物に共通する構造的特徴や官能基の有無に着目し、分子内の電子供与性基や疎水性部分が Nrf2-ARE 経路の活性化に及ぼす影響を検証した。また、ヒット化合物の構造の一部を段階的に改変したアナログ化合物についても評価した。

4. 研究成果

(1) Nrf2-ARE 経路の活性化作用

HEK-293 細胞株を用いて、NSAIDs の Nrf2-ARE 経路の活性化作用をレポーターアッセイ法で評価した結果、化合物の活性に差異が認められた。図1は、化合物濃度が 1 μ M (A)と 10 μ M (B)における Control 群に対する相対的な活性倍率の分布を示す。図1より、Control 群よりも活性が低い化合物の割合は、化合物濃度が 1 μ M では全体の 35%以下、化合物が 10 μ M では全体の 23%以下であった。一方で、化合物濃度が 1 μ M では全体の 5%の化合物が、10 μ M では全体の 9%の化合物がそれぞれ Control に対して 1.4 倍以上の効果を示した。これらの活性倍率に分布する化合物の中から、細胞生存率に影響を与えない濃度で用量依存的かつ時間依存的に有効性を示す化合物を絞り込み、(2)の研究対象とした。

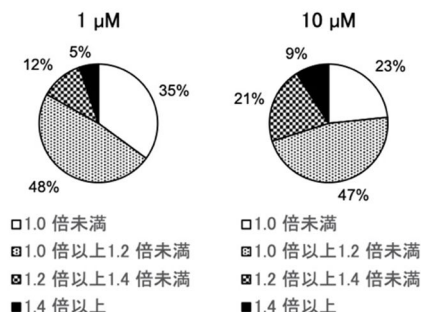


図1. Control群と比較したNrf2-ARE経路活性化作用

(2) Nrf2-ARE 経路を介した抗酸化作用

(1)で抽出したヒット化合物について、HEK-293 細胞における抗酸化酵素の誘導効果を調べた結果、HO-1 の誘導が確認された。図2は、ウエスタンブロッティング法を用いて、Control (C) 及び Nrf2-ARE 経路を活性化

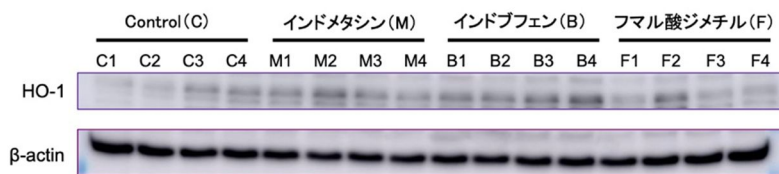


図2. ウエスタンブロッティング法によるHO-1タンパクの検出

化させる化合物 (10 μ M) によって誘導された HO-1 のバンドを電気泳動で分離した様子を示す。インドブフェン (B) は(1)で抽出したヒット化合物の 1 つであり、Nrf2-ARE 経路を活性化する濃度で HO-1 を誘導することが確認された (B1-B4)。この効果は、多発性硬化症の治療薬として臨床使用されているフマル酸ジメチル (F) や骨髄細胞で Nrf2-ARE 経路を活性化することが知られているインドメタシン (M) を用いた場合でも確認された (F1-F4, M1-M4)。一方で、インドブフェンの非細胞系における直接的な 3 種の ROS (スーパーオキシドアニオン、過酸化水素、ヒドロキシラジカル) に対する消去活性を調べた結果、ヒドロキシラジカルに対する強い消去活性 (72 ± 10%) が認められた。すなわち、ヒット化合物として抽出したインドブフェンは、HEK-293 細胞において Nrf2-ARE 経路を介して細胞内の抗酸化防御系を増強すると同時に、非細胞系においては ROS に対する直接的なスカベンジャー活性を示すことで、酸化ストレスに対する保護効果を発揮することが示唆された。このことから、インドブフェンは Nrf2-ARE 経路の活性化を指標とした抗酸化薬開発のリード化合物としての可能性を有すると考えられる。

(3) 構造活性相関の解析

(1)で抽出したヒット化合物には、Nrf2-ARE 経路の活性化作用と HO-1 の誘導効果との間に用量依存的な相関関係が認められた。これらの構造活性相関を解析すると、Nrf2-ARE 経路の活性化には、カルボキシ基を含む炭素鎖にヘテロ原子を含む環構造が結合していることが重要であり、この部分構造が活性化の強弱に関与していることが示唆された。例えば、図3に示したインドブフェン (B) の Nrf2-ARE 経路の活性化作用は、その部分構造 (P1-P3) のうち、P2 に依存していることが示唆された。すなわち、分子内に同様のカルボキシ基を含む炭素鎖を有していても、結合している環構造の種類やその置換基の有無、ヘテロ原子の性質 (窒素、酸素、硫黄など) によって Nrf2-ARE 経路の活性化作用に顕著な違いが認められた。特に、芳香族環に窒素原子や酸素原子を含む複素環構造を持つ化合物は、より高い活性化作用を示す傾向があり、一方でヘテロ原子を含まない環構造では活性が低下することが確認された。これらの結果は、特定の部分構造の化学的性質が転写因子 Nrf2 の安定化や核移行、または Keap1 との結合阻害に影響を与えている可能性を示している。

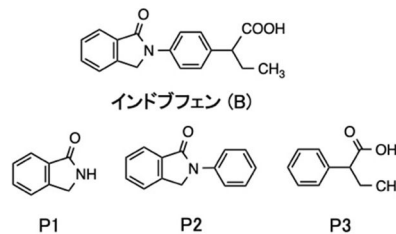


図3. インドブフェンの構造とその部分構造

(4) 創薬展開の可能性

本研究により、一部の NSAIDs は Nrf2-ARE 経路を活性化し、抗酸化酵素 HO-1 の誘導を介して細胞内の酸化ストレス応答を高める効果を示すことが明らかとなった。さらに、これらの化合物は非細胞系においても活性酸素種、特にヒドロキシラジカルに対して強い直接的なスカベンジャー活性を示し、間接的および直接的な二重の抗酸化作用を併せ持つことが示唆された。構造活性相関解析の結果からは、カルボキシ基を含む炭素鎖にヘテロ原子を含む環構造が結合した部分構造が、Nrf2-ARE 経路の活性化において重要な構造要素であることが確認され、これは今後の抗酸化・抗炎症薬の分子設計において有効な指針となると考えられる。これらの知見は、既存薬の構造を基盤としながら Nrf2-ARE 経路を標的とした新規作用機序を持つ抗炎症薬の創出に向けた創薬展開に資するものであり、副作用の軽減や新たな疾患領域への応用が期待される。

< 引用文献 >

Staufeno-Ferrari, L. Badaro-Garcia, S. Hohmann, M. S. N. Manchope, M. F. Zaninelli, T. H. Casagrande, R. Verri, W. A., Jr. Contribution of Nrf2 Modulation to the Mechanism of Action of Analgesic and Anti-inflammatory Drugs in Pre-clinical and Clinical Stages. *Front Pharmacol*, 9: 1536 (2004).

R. J. Fox, M. Kita, S. L. Cohan, L. J. Henson, J. Zambrano, R. H. Scannevin, et al., BG-12 (dimethyl fumarate): a review of mechanism of action, efficacy, and safety. *Curr Med Res Opin*, 30(2): 251-62 (2014).

N. Yoshinaga, N. Arimura, H. Otsuka, K. Kawahara, T. Hashiguchi, I. Maruyama, et al., NSAIDs inhibit neovascularization of choroid through HO-1-dependent pathway. *Lab Invest*, 91(9): 1277-90 (2011).

A. Eisenstein, B. K. Hilliard, S. D. Pope, C. Zhang, P. Taskar, D. A. Waizman, et al., Activation of the transcription factor NRF2 mediates the anti-inflammatory properties of a subset of over-the-counter and prescription NSAIDs. *Immunity*, 55(6): 1082-1095 e5 (2022).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Naoki Yamakawa, Ami Furusawa, Ai Kameyama	4. 巻 12
2. 論文標題 Nonsteroidal anti-inflammatory drugs , Oxidative stress , Superoxide anion radical , Hydrogen peroxide , Hydroxyl radical	5. 発行年 2025年
3. 雑誌名 The Shujitsu University journal of pharmaceutical sciences	6. 最初と最後の頁 37-45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田坂 祐一、長尾 春花、穂山 遥香、山川 直樹
2. 発表標題 非ステロイド性抗炎症薬の化学構造とNrf2活性化作用の関連に関する基 礎的検討
3. 学会等名 日本薬学会143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山川 直樹、古澤 阿実、亀山 藍衣、田坂 祐一
2. 発表標題 非ステロイド性抗炎症薬の抗酸化作用に関する基礎的検討
3. 学会等名 日本薬学会144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 亀山 藍衣、田坂 祐一、出石 恭久、北村 佳久、山川 直樹
2. 発表標題 非ステロイド性抗炎症薬のNrf2活性化作用と構造活性相関に関する検討
3. 学会等名 日本薬学会144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 亀山藍衣, 田坂祐一, 出石恭久, 北村佳久, 山川直樹
2. 発表標題 非ステロイド性抗炎症薬のHEK293細胞におけるNrf2活性化作用
3. 学会等名 第63回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 槇野 美桜、亀山 藍衣、田坂 祐一、出石 恭久、北村 佳久、山川 直樹
2. 発表標題 Nrf2活性化作用を示す非ステロイド性抗炎症薬の探索
3. 学会等名 日本薬学会145年会
4. 発表年 2025年

1. 発表者名 岡本 依里子、亀山 藍衣、田坂 祐一、出石 恭久、北村 佳久、山川 直樹
2. 発表標題 インドブフェンのNrf2活性化作用に対する構造活性相関に関する検討
3. 学会等名 日本薬学会145年会
4. 発表年 2025年

1. 発表者名 山川 直樹、亀山 藍衣、田坂 祐一、出石 恭久、北村 佳久
2. 発表標題 インドブフェンのNrf2活性化作用とH0-1の誘導効果
3. 学会等名 日本薬学会145年会
4. 発表年 2025年

〔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 分担 者	田坂 祐一 (Tasaka Yuichi) (00574758)	就実大学・薬学部・准教授 (35307)	

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
---------	---------