

令和元年6月10日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15468

研究課題名(和文)オレアノール酸グルコシドをリード化合物とした新規抗メチル水銀薬の開発

研究課題名(英文)Development of novel anti-methylmercuric drug based on oleanolic acid glucoside

研究代表者

中村 亮介 (Ryosuke, Nakamura)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：50383659

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)：オレアノール酸(OA)サポニン誘導体の中で、すでに臓器への水銀蓄積を抑制することで抗メチル水銀(MeHg)活性を示すことを見出していたOA 3-グルコシドに加え、OA3位オルトエステル体に抗MeHg活性が認められた。in vivoにおいてこれらの化合物の抗MeHg活性をさらに検証したところ、OA 3-グルコシドは臓器への水銀蓄積を抑えるだけでなく、MeHgによる中枢神経障害を軽減させることで、メチル水銀による運動機能障害を改善させる可能性が示された。またOA3位オルトエステル体は主に低濃度MeHgばく露条件において水銀の臓器蓄積を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は食餌を介して微量ながらも絶えずMeHgにばく露し続けている。本研究で見出したOA3-グルコシドおよびOA3位オルトエステル体は、腸管におけるMeHgの吸収を抑制することで効果を発揮しているものと考えられ、日常的に摂取することで低濃度MeHgの影響を予防する効果も期待できる。これは、日常的に魚介類の摂取等によりばく露される量のMeHgが胎児へのリスクとなりうる妊婦において特に有効性が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Oleanolic acid(OA) 3-orthoester was found as compounds exhibiting anti-methylmercury (MeHg) activity, in addition to OA 3-glucoside which has already been shown to exhibit anti-MeHg activity by suppressing mercury accumulation in organs.

OA 3-glucoside not only suppressed mercury accumulation in organs but also ameliorated motor dysfunction due to MeHg by suppressing neuropathy caused by MeHg.

In addition, OA orthoester suppressed the accumulation of mercury in the organ under low concentration MeHg exposure condition.

研究分野：毒性学

キーワード：メチル水銀 抗メチル水銀薬 サポニン化合物 オレアノール酸サポニン誘導体

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国は、水銀汚染を原因とした深刻な健康被害を呈する水俣病を経験した。一方、世界規模でみると、アマゾン川流域や中国等、未だ深刻な水銀汚染が認められる地域が存在する。水銀は工業的に有用な物質であるため、温度計や圧力計等の計器、電極、水銀灯、歯科用アマルガムなど多様な用途があり、これらの製造・使用・廃棄の工程で排出される。また、水銀は地殻に含有するため、食物中の水銀濃度をゼロにすることはできない。水銀は主として環境中に存在する微生物によってメチル水銀 (MeHg) へ変換される。MeHg は食物連鎖により濃縮されるため、マグロ等の高次消費者へ蓄積し、それらを摂取することで、我々は微量ながらも絶えず MeHg ばく露を受け続けている。

高濃度 MeHg の毒性は詳細に研究されており、水俣病に代表される神経毒性をはじめ、腎臓、肝臓、心臓等様々な臓器へ影響を及ぼすことが示されている。低濃度 MeHg に関しては近年、MeHg の胎児期のばく露が運動機能に影響を与える可能性 (Suzuki K. et al. Environ Res 2010) や、成人期に“耐容週間摂取量”相当の低濃度 MeHg を長期間摂取することで、心疾患のリスクを高める可能性 (Yaginuma-Sakurai K. et al. Neurotoxicol Teratol 2010) が示唆されており、MeHg は現在の我が国におけるばく露状況に即した低濃度反復ばく露によっても我々の健康へ悪影響を与える可能性が懸念される。

MeHg の急性中毒に対しては、キレート作用を持つ N-アセチルシステインや 2,3-ジメルカプトプロパンスルホン酸等が用いられ、MeHg の体外排出を促進することで臨床薬として使われている。実験的には α -トコフェロールやグルタチオン等の化合物が MeHg による神経傷害に対し保護的に働くことされる (Watanabe J et al. J. Toxicol Sci 2009; Saneliu C et al. Neurotoxicology 2001) が、これらは主として高濃度 MeHg ばく露に対する効果を検討しており、マグロなどの MeHg を含有する食事から日常的にばく露されるような MeHg の低濃度・反復ばく露に対する解毒薬研究はみられない。研究代表者は、平成 27-28 年度科研費若手(B)(課題番号 15K18887) の助成により、生薬由来サポニン化合物の探索を行い、オレアノール酸 (OA) 3-グルコシドが MeHg の腸管吸収を阻害することで MeHg の臓器移行を抑制する新規作用点をもつ抗 MeHg 薬となる可能性を見出した。

2. 研究の目的

低濃度 MeHg ばく露に対して有効な新規抗 MeHg 薬を OA サポニン誘導体化合物ライブラリーより新たに見出すこと、最近見出した OA 3-グルコシドの作用点を明らかにすることを目的とし、(1) OA サポニン誘導体ライブラリーからの新規抗 MeHg 薬の創薬、(2) *in vivo* における OA3-グルコシドおよび新規抗 MeHg の MeHg 毒性抑制作用の検証を目指した。

3. 研究の方法

(1) OA サポニン誘導体ライブラリーからの新規抗 MeHg 薬の創薬

OA サポニン誘導体ライブラリーからの新規抗 MeHg 化合物の探索

MeHg の毒性影響に対する化合物の評価には MeHg 吸収部位である腸管を想定し、ヒト腸管由来の Caco-2 細胞を用い検討を行った。細胞に OA サポニン誘導体 (1-10 μ M) を前処理し、一時間後に MeHg (1-10 μ M) をばく露し、24 時間培養後に細胞生存率を指標に影響評価した。次に、OA サポニン誘導体を Caco-2 細胞へ前処理した後、20 分後に放射標識した $^{14}\text{CH}_3\text{HgCl}$ を細胞にばく露し、30 分後に放射活性を測定することで、Caco-2 細胞内への MeHg 取込みに対する候補化合物の効果について検討した。

OA に結合するグルコースの結合部位の違いによる抗 MeHg 活性変化の検討

OA の C3 位もしくは C28 位にグルコースが結合した化合物 (OA 3-グルコシド、OA 28-グルコシド、OA 3,28-ジグルコシド：図 1) について抗 MeHg 活性の違いを検討した。と同様に Caco-2 に化合物を添加した一時間後に MeHg をばく露し、24 時間後に細胞生存率を測定した。また、化合物を Caco-2 細胞へ前処理した後、20 分後に $^{14}\text{CH}_3\text{HgCl}$ をばく露し、30 分後に放射活性を測定することで、Caco-2 細胞内の MeHg 量を測定した。

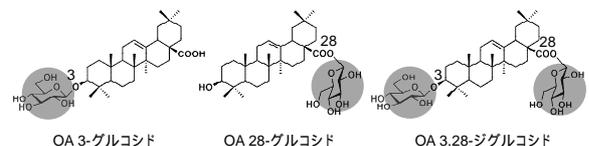


図 1 OA3 グルコシドの構造

(2) MeHg 毒性予防・軽減作用を持つ生薬由来化合物の効果の検証 (*in vivo*)

OA-3 グルコシドの抗 MeHg 活性の検証

MeHg に関して、神経症状を主とした中毒を起こしうる高濃度ばく露群および実社会においてばく露しうる低濃度ばく露群を含む複数条件を設定し検討を行った。OA-3 グルコシドを前投与し、1 時間後に MeHg をばく露した。MeHg および化合物は週 5 回 4 週間経口投与した。実験 4 週目に回転する円柱棒の上にマウスを乗せ、落下するまでの経過時間を測定する Rota rod 試験を行い、運動機能を評価した。投与期間の終了後に脳をパラフィン包埋した後切片を HE 染色し、組織学的検討を行った。

OA3 位オルトエステル体の抗 MeHg 活性の検証

MeHg 濃度は の実験と同様に設定した。(1) で新たに見出した OA3 位オルトエステル体を前投与し、1 時間後に MeHg をばく露した。MeHg および化合物は週 5 回 4 週間経口投与した。ばく露期間中は週 1 回体重を測定した。最終ばく露 24 時間後に解剖し、脳、肝臓、腎臓を採取した。肝臓・腎臓の水銀含有量を測定することで、MeHg の体内蓄積及び排出への影響について検討した。また、脳組織における炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6) 濃度を測定し MeHg による脳組織の障害に対する影響について検討した。

4. 研究成果

(1) OA サポニン誘導体ライブラリーからの新規抗 MeHg 薬の創薬

OA サポニン誘導体ライブラリーからの新規抗 MeHg 化合物の探索

OA をアグリコンとするサポニン誘導体について抗 MeHg 作用を検討したところ、OA の C3 位オルトエステル体は MeHg ばく露による細胞死を有意に抑制した。(図 1A) 次に、OA3 位オルトエステル体が Caco-2 細胞への MeHg 取込みへ与える影響について検討した。OA3 位オルトエステル体を Caco-2 細胞へ 20 分間前処理し、5 μ M の MeHg を 30 分間ばく露したところ、OA3 位オルトエステル体は 3 μ M の前処理によって細胞内 MeHg 量を有意に減少させた(図 1B)。

以上より Caco-2 細胞において、OA3 位オルトエステル体は細胞内への MeHg 蓄積を抑制することで MeHg 毒性抑制作用を示すことが示唆された。

OA に結合するグルコースの結合部位の違いによる抗 MeHg 活性変化の検討

OA の C3 位にグルコースが結合した OA3-グルコシドが抗 MeHg 活性を示したことから、OA 骨格へのグルコースの結合部位の違いによる抗 MeHg 活性の違いについて細胞生存率を指標に検討したところ、OA 3-グルコシドが有意に MeHg による細胞死を抑制した一方で、OA 28-グルコシド、OA 3,28-ジグルコシドは MeHg による細胞死にはほとんど影響を与えなかった(図 2)。次に、これら化合物が Caco-2 細胞内への MeHg 取り込みへ与える影響について検討したところ、OA 3-グルコシドは細胞内 MeHg 量を有意に減少させた一方で、OA 28-グルコシド、OA 3,28-ジグルコシドは細胞内 MeHg 量にほとんど影響を与えなかった(図 3)。

以上より、OA サポニン誘導体の抗 MeHg 活性には C3 位へのグルコースの結合および C28 位カルボキシ基の活性が重要である可能性が示された。

(2) MeHg 毒性予防・軽減作用を持つ生薬由来化合物の効果の検証 (in vivo)

OA-3 グルコシドの抗 MeHg 活性の検証

In vitro で MeHg 毒性抑制作用が示唆された候補化合物について in vivo において効果を検証した。

まず、OA 3-グルコシドについて、MeHg による神経障害に対する効果を検証した。MeHg による運動機能障害に対する OA 3-グルコシドの効果を検討するため、Rota rod 試験を行ったところ、4 mg/kg MeHg ばく露群において、OA 3-グルコシドは落下までの経過時間を延長させた。

また、MeHg による中枢神経障害に対する OA 3-グルコシドの効果を検討した。4 mg/kg MeHg 群において、コントロール群では見られなかった小脳プルキンエ細胞の凝集が認められた一方、4 mg/kg MeHg 投与前に OA 3-グルコシドを処理すると、凝

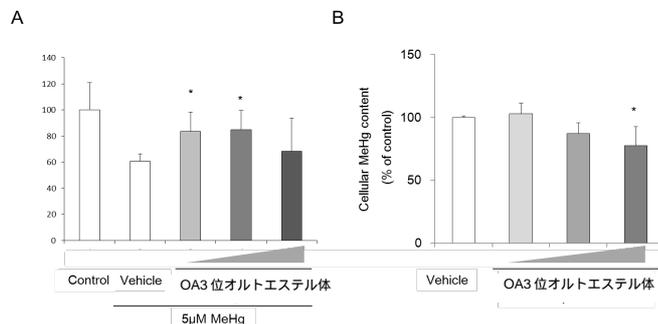


図 2 OA3 位オルトエステル体の抗 MeHg 作用

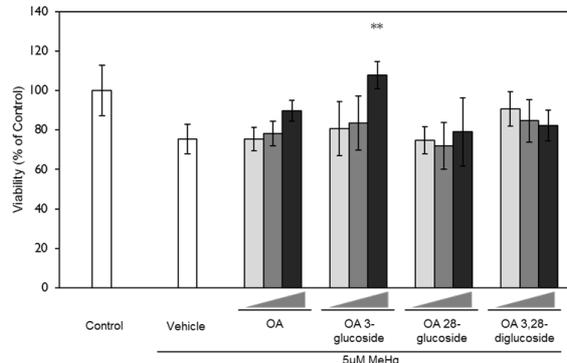


図 3 MeHg による細胞死に対する OA グルコシドの効果

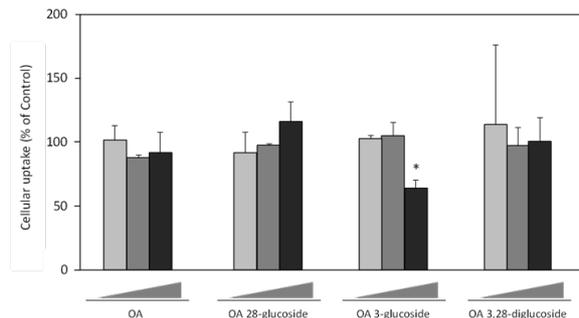


図 4 細胞内 MeHg 取り込みに対する OA グルコシドの効果

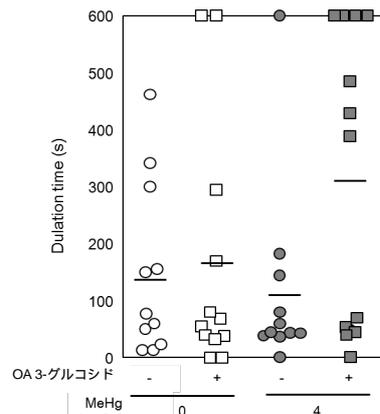


図 5 MeHg による運動神経障害に対する OA3-グルコシドの効果

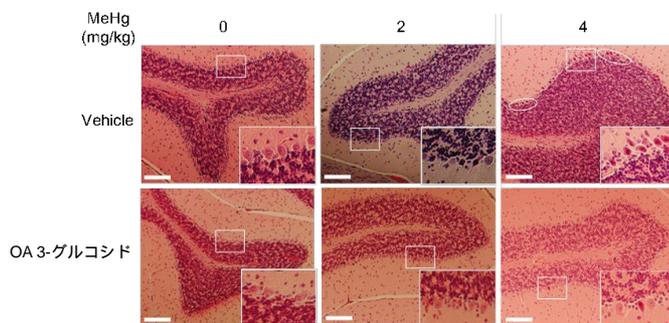


図 6 MeHg による小脳組織障害に対する OA3-グルコシドの効果

集したプルキンエ細胞の数は減少した(図6)。

これらの結果より、OA3Glu は大脳皮質及び小脳において MeHg による中枢神経障害を改善し、MeHg による運動機能障害を軽減させることが示唆された。

OA3 位オルトエステル体の抗 MeHg 活性の検証

次に、OA3 位オルトエステル体の抗 MeHg 作用に関してマウスを用いて検討した。週 5 回、4 週間にわたり OA3 位オルトエステル体及び MeHg をマウスに経口投与し、解析を行った。

投与終了後、MeHg が高蓄積する臓器である肝臓、腎臓における総水銀濃度を測定したところ、いずれの MeHg ばく露濃度においても OA3 位オルトエステル体処理により肝臓・腎臓中総水銀濃度が減少する傾向が認められた。中でも低濃度 MeHg (0.02 mg/kg) ばく露群において顕著な肝臓・腎臓中総水銀濃度の減少が認められた(表1)。

また、MeHg は脳組織において炎症性サイトカインの放出を誘導することが報告されているため、次に炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6) の脳組織中産生量を測定した。IL-1 β , IL-6 のどちらのサイトカインも MeHg ばく露濃度が上昇するにつれ産生量が増加し、5 mg/kg MeHg ばく露群で有意に脳組織中産生量が増加したが、OA3 位オルトエステル体は MeHg による IL-1 β , IL-6 産生の上昇を有意に抑制した(図7AB)。

以上より、OA3 位オルトエステル体は低濃度 MeHg ばく露条件において臓器中への水銀蓄積を抑制し、高濃度 MeHg ばく露条件においても MeHg による中枢神経障害を抑制する可能性が示された。

OA3-グルコシドは高濃度の MeHg ばく露において MeHg による神経障害を抑制する一方で、OA3 位オルトエステル体は低濃度 MeHg ばく露に対して顕著に臓器への水銀蓄積を抑制する効果があることが示唆された。これらの化合物がそれぞれ異なる濃度の MeHg ばく露条件において効果を示したことから、2 種の化合物を併用することにより幅広い濃度条件の MeHg ばく露に対応することができる可能性が考えられた。今後、これら化合物の MeHg 毒性抑制効果の作用メカニズムに関して解析を進めていく必要がある

以上の結果から、オレアノール酸のサポニン誘導体 OA 3-グルコシド、OA3 位オルトエステル体はどちらも MeHg の細胞への取り込みを抑制することによって臓器への蓄積を低下させ、MeHg による生体影響を防ぐ治療薬・予防薬となる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nakamura R, Shirahata T, Konishi N, Takanezawa Y, Sone Y, Uruguchi S, Kobayashi Y, Kiyono M. Oleanolic acid 3-glucoside, a synthetic oleanane-type saponin, alleviates methylmercury toxicity *in vitro* and *in vivo*. *Toxicology* 417, 15-22, 2019, 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

中村亮介、高根沢康一、曾根有香、浦口晋平、白畑辰弥、岩井孝志、小林義典、田辺光男、清野正子 メメチル水銀による神経伝達障害に対するオレアノール酸 3-グルコシドの効果 日本薬学会第 139 年会 2019.3.21、幕張メッセ(千葉市)

中村亮介、高根沢康一、曾根有香、浦口晋平、白畑辰弥、小林義典、清野正子 メメチル水銀毒性に対するオレアノール酸 3 位オルトエステル体の効果 フォーラム 2018 衛生薬学・環境トキシコロジー 2018.9.10、アルカス佐世保(長崎県佐世保市)

中村亮介、高根沢康一、曾根有香、浦口晋平、白畑辰弥、小林義典、清野正子 オレアノール酸サポニン誘導体による抗メチル水銀活性の評価 日本薬学会第 138 年会 2018.3.26、金沢駅周辺(石川県金沢市)

表1 肝臓・腎臓中総水銀濃度

Experimental group		Total Hg content (ppm)	
MeHg (mg/kg)	OA3 位	liver	kidney
	オルトエステル		
0	-	0.23 ± 0.22	1.99 ± 1.83
	+	0.00 ± 0.00	0.091 ± 0.01
0.02	-	0.38 ± 0.15	5.65 ± 1.06
	+	0.01 ± 0.11 [#]	0.674 ± 0.06 ^{##}
1.0	-	1.89 ± 0.74 [*]	31.3 ± 5.3 ^{**}
	+	1.73 ± 0.37 [*]	28.2 ± 3.3 ^{**}
5.0	-	13.40 ± 3.5 ^{**}	77.4 ± 17 ^{**}
	+	9.46 ± 5.1 ^{**}	73.7 ± 28 ^{**}

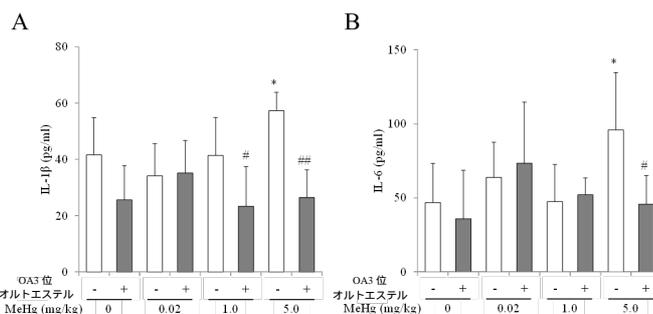


図7 脳組織中炎症性サイトカイン産生に対する OA3 位オルトエステル体の影響

〔産業財産権〕

○取得状況（計 1 件）

名称：抗水銀剤

発明者：清野正子、小林義典、白畑辰弥、中村亮介

権利者：学校法人北里研究所

種類：特許

番号：特許第 6323900 号

取得年：2018 年

国内外の別： 国内

※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、研究者個人に帰属されます。