

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07108

研究課題名(和文)オレアノール酸サポニン誘導体ライブラリーを用いた新規抗メチル水銀薬の探索

研究課題名(英文) Exploration of Novel Anti-Methylmercury Agents Using Oleanolic Acid Saponin Derivatives Library

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：新規抗メチル水銀(MeHg)薬を見出すため、抗MeHg薬の候補化合物であるオレアノール酸-3-グルコシド(OA3Glu)のMeHg毒性に対する保護効果の検討。オレアノール酸サポニン誘導体ライブラリーを用いより抗MeHg活性の高い化合物の探索を行ったところ、OA3GluはMeHgによる神経伝達障害、運動障害を軽減させる効果があることが示唆され、オレアノール酸のC3位に結合する単糖の種類による抗MeHg活性の違いを検討したところ、C3位にガラクトースが結合したオレアノール酸-3-ガラクトシドはin vitroにおいてOA3Gluと同程度の抗MeHg活性を示した。

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。本研究で見出したオレアノール酸-3-グルコシドはMeHgによる神経伝達障害を軽減する作用があると考えられた。日常的に魚介類の摂食等によりばく露されるMeHgに対する予防薬・治療薬は現在までに見られないが、OA3GluはこのようなMeHgばく露に対して有効な高MeHg薬となりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the protective effect of oleanolic acid-3-glucoside (OA3Glu), a candidate compound for anti-MeHg drugs, against MeHg toxicity, and found that OA3Glu was effective in reducing MeHg-induced neurotransmission and motor disorders. We also searched for compounds with higher anti-MeHg activity using a library of oleanolic acid saponin derivatives and investigated the difference in anti-MeHg activity depending on the type of monosaccharide attached to the C3 position of oleanolic acid. The results showed that oleanolic acid-3-galactoside, which has galactose attached to the C3 position, exhibited the same level of anti-MeHg activity as OA3Glu in vitro.

研究分野：毒性学

キーワード：メチル水銀 抗メチル水銀化合物 オレアノール酸サポニン誘導体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国は、水銀汚染を原因とする水俣病を経験した。一方、世界規模で見ると、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ある。水銀は多様な用途で産業利用されているのみならず、地殻に含有されており、地球環境中を循環しているため、食物中の水銀量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。

MeHg の毒性は、高濃度ばく露によるもの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 の影響は長らく明らかになっていなかったが、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、一生涯摂取し続けても健康影響が現れないとされる“耐容週間摂取量”相当の低濃度 MeHg を、成人期に魚を介し長期間摂取すると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ている。

高濃度 MeHg の一時的なばく露に対しては、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、MeHg の体外排出を促進する臨床薬として使われている。実験的にはキレート剤に加え、抗酸化物質やカルシウム拮抗薬等が MeHg 毒性に効果を示すことが報告されている (Saneliu C et al. Neurotoxicol 2001; Watanabe J et al. J Toxicol Sci 2009) が、これらは食餌から摂取される濃度と比べ、非常に高濃度の MeHg を単回または短期間ばく露する条件で検討しているものが多く、低濃度 MeHg ばく露に対する効果や、長期間投与時の安全性についてのエビデンスが少なかった。研究代表者は平成 27-28 年度、平成 29-30 年度科研費若手研究(B)の助成により、生薬由来オンジサポニンの骨格であるオレアノール酸 (OA) のサポニン誘導体である OA-3-グルコシド (OA3Glu) を MeHg の毒性を抑制する“抗 MeHg 活性”を示す化合物として見出した。

2. 研究の目的

本研究では、(1) OA3Glu の *in vivo* における MeHg 毒性抑制作用を明らかにすること、(2) 低濃度 MeHg ばく露の毒性に対し、より効果の高い新規抗 MeHg 薬を OA サポニン誘導体ライブラリーから見出すことを目的とした。また、既存の *in vivo* における MeHg 毒性評価方法では低濃度 MeHg に対する化合物の効果を評価することが困難だったため、(3) *in vivo* における低濃度 MeHg の影響評価方法の検討を行った。

3. 研究の方法

(1) OA3Glu の *in vivo* における MeHg 毒性抑制作用の解明

抗 MeHg 薬の候補化合物として見出した OA3Glu の抗 MeHg 活性の機序について、*in vivo* において検討した。BALB/c、雄性、5 週齢のマウスに OA3Glu (100 µg/kg) を前投与し、1 時間後に MeHg (2, 4 mg/kg) をばく露した。MeHg および OA3Glu は週 5 回 4 週間にわたり経口投与した。投与期間終了後に、四肢それぞれにかかる重量を測定する Dynamic weight bearing (DWB) test により運動機能の評価を行った。また、大脳および小脳において電気生理学的解析を行った。

(2) OA サポニン誘導体ライブラリーからの新規抗 MeHg 薬の探索

OA の C3 位に結合する糖の種類異なるサポニン誘導体および、それぞれの誘導体の C28 位のカルボキシ基をマスクし不活化させた誘導体について抗 MeHg 活性の違いを検討した。OA3Glu、OA-3-ガラクトシド (OA3Gal)、OA-3-マンノシド (OA3Man)、OA-3-キシロシド (OA3Xyl)、OA-3-アラビノシド (OA3Ara) (図 1) および、それぞれの誘導体の C28 位のカルボキシ基をマスクし不活化させた誘導体を合成し、ヒト腸管由来 Caco-2 細胞およびヒト神経芽細胞種由来 SH-SY5Y 細胞にそれぞれの OA サポニン誘導体 (1-10 µM) を前処理した後 24 時間培養後に MeHg (5 µM) をばく露し、24 時間後に MTT アッセイにより細胞生存率を測定した。

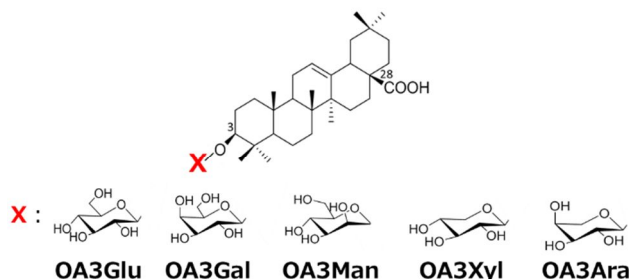


図 1 C3 位の単糖が異なる OA サポニン誘導体

(3) *in vivo* における低濃度 MeHg の影響評価方法の検討

毒性を呈さない低濃度 MeHg ばく露に対する OA3Glu の効果を検討するために、まず *in vivo* における低濃度 MeHg の影響を評価する実験系の構築を試みた。酸化ストレスに対する感受性

が高い抗酸化酵素グルタチオンペルオキシダーゼ 4 (GPx4) ヘテロ欠損 (GPx4^{+/-}) マウスを本検討に用いた。Wild Type (GPx4^{+/+}) および GPx4^{+/-} マウスに GPx4^{+/+} マウスでは影響が認められない低濃度 (1 mg/kg) の MeHg を週 5 回、4 週間にわたり経口投与し、MeHg の主たる毒性発現臓器である脳および GPx4 の活性が高い精巣を摘出し、パラフィン包埋後へマトキシリン&エオジン染色し、組織学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) OA3Glu の *in vivo* における MeHg 毒性抑制作用の解明

DWB test によって前肢・後肢にかかる重量を測定したところ、MeHg 投与群において Control 群と比べて前肢にかかる重量が大きい傾向が認められた。また、MeHg + OA3Glu 投与群では MeHg 投与群に比べて有意に前肢にかかる重量が小さく、Control 群と同等だった (図 2)。このことから、MeHg ばく露によって生じた前肢・後肢の重量バランスの異常が OA3Glu により解消されたことが示唆された。

大脳における電位変化を測定したところ、MeHg のばく露濃度が増加するにつれ興奮性シナプス後電位 (fEPSP) が低下する傾向が認められ、MeHg 4 mg/kg 投与群では Control 群と比較し、fEPSP が有意に低かった。また、OA3Glu 処理により MeHg ばく露による fEPSP の低下が抑えられ、MeHg 4 mg/kg + OA3Glu 投与群では fEPSP は MeHg 4 mg/kg 投与群と比較すると有意に高く、Control 群と同レベルとなった (図 3A)。小脳においても、MeHg のばく露濃度が増加するにつれ fEPSP が低下する傾向が認められ、MeHg 4 mg/kg 投与群において Control 群と比較し、fEPSP が有意に低かった。また、OA3Glu 処理により MeHg ばく露による fEPSP の低下が抑えられた (図 3B)。以上の結果より、OA3Glu は大脳、小脳において MeHg による神経伝達障害を抑制し、MeHg による四肢機能の障害を軽減させることが示唆された。

(2) OA サポニン誘導体ライブラリーからの新規抗 MeHg 薬の探索。

C3 位に結合する単糖が異なる OA サポニン誘導体のうち OA3Gal は、Caco-2、SH-SY5Y どちらの細胞においても OA3Glu と同程度の細胞死抑制が認められた。OA3Man は、OA3Xyl、OA3Ara は MeHg による細胞死を抑制する作用は認められたものの、SH-SY5Y 細胞において添加濃度が上昇するにしたがって細胞生存率が低下した (図 4)。また、それぞれの誘導体の C28 位のカルボキシ基をマスクしても、抗 MeHg 活性に大きな違いは認められなかった。以上より、OA サポニン誘導体は、OA の C3 位の糖の構造によらず抗 MeHg 活性を示すものの、グルコースおよびガラクトースが結合した誘導体が抗 MeHg 薬の候補化合物として適当であると考えられた。また、OA の C28 位のカルボキシ基は抗 MeHg 活性に対する寄与は小さいことが示唆された。

(3) *in vivo* における低濃度 MeHg の影響評価方法の検討

低濃度 MeHg 投与の影響を脳組織において検討したところ、GPx4^{+/+} および GPx4^{+/-} のどちらにおいても MeHg ばく露の有無による組織学的な違いは認め

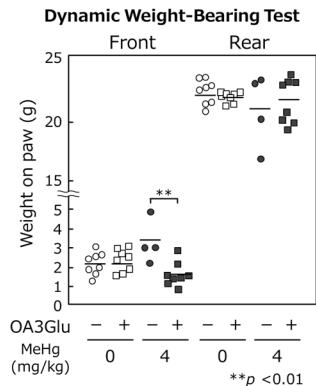


図 2 MeHg による四肢障害に対する OA3Glu の抗 MeHg 効果の検討

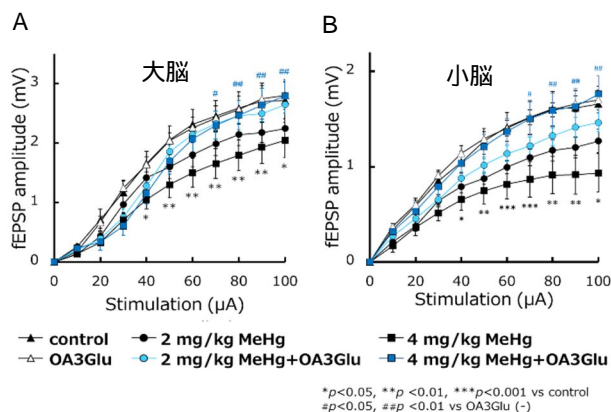


図 3 MeHg による神経伝達障害に対する OA3Glu の効果の検討

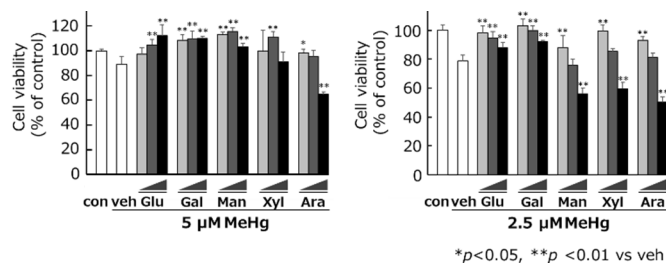


図 4 MeHg による細胞死に対する C3 位の単糖が異なる OA サポニン誘導体の効果の検討

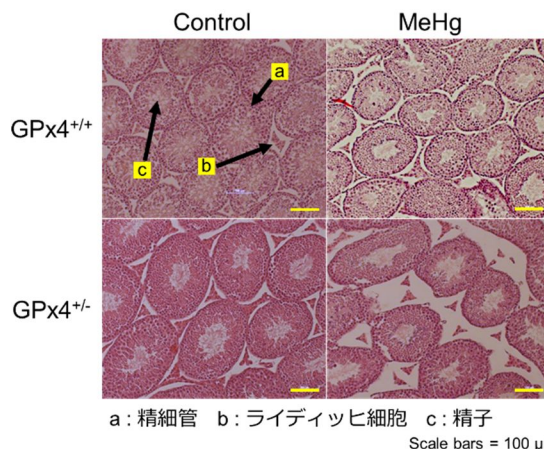


図 5 GPx4^{+/-} マウス精巣における MeHg の影響

られなかった。一方、精巣組織において、MeHg ばく露により GPx4^{+/-} において GPx4^{+/+} と比較してより顕著なライディッヒ細胞の萎縮が認められた(図5)。GPx4^{+/-} の脳組織における低濃度 MeHg の影響についてはさらなる検討が必要だが、精巣組織においては、GPx4^{+/-} は GPx4^{+/+} よりも低濃度 MeHg に対する感受性が高いことが示唆された。このことから、GPx4^{+/-} マウスは低濃度 MeHg の影響を評価する実験系に用いることができる可能性が示された。

以上より、OA3Glu は MeHg による神経毒性を軽減させることで MeHg に対する保護効果を示すことが示唆された。今後、OA3Glu の毒性レベルの高濃度 MeHg に対する効果だけではなく、低濃度 MeHg 影響評価系の構築を進め、OA3Glu の低濃度 MeHg ばく露に対する効果についても検討していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中村亮介, 高根沢康一, 大城有香, 浦口晋平, 白畑辰弥, 小西成樹, 岩井孝志, 小林義典, 田辺光男, 山元 恵, 清野正子
2. 発表標題 メチル水銀毒性に対するオレアノール酸3-グルコシドの効果
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 中村亮介, 岩井孝志, 白畑辰弥, 小西成樹, 高根沢康一, 大城有香, 浦口晋平, 田辺光男, 小林義典, 清野正子
2. 発表標題 メチル水銀による神経障害に対するoleanolic acid-3-glucosideの効果
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryosuke Nakamura
2. 発表標題 Protective effect of oleanolic acid-3-glucoside on methylmercury toxicity
3. 学会等名 NIMD FORUM 2022（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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