

令和 6 年 5 月 2 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07123

研究課題名（和文）くも膜下出血合併症予防・治療薬の天然物からの探索と開発

研究課題名（英文）Search and development of drugs for prevention and treatment of subarachnoid hemorrhage complications from natural products.

研究代表者

和田 俊一（Wada, Shun-ichi）

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・主任研究員

研究者番号：40450233

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）：くも膜下出血（SAH）治療薬となり得る物質の探索、評価を行った。Trehaloseと類縁体3化合物は、ラットSAHモデルにおいて、いずれも脳神経細胞の生存率を上げ、炎症を抑制する傾向を示した。一つの類縁体は、他の化合物より500倍ほど強い効果を示し、今後、これをリードにした治療薬開発への展開が期待される。また、本研究では新たな治療薬として有望な天然抗酸化物質の探索を行った。研究例の少ないものを多く含む23化合物が精製、同定され、このうち、5つは新規化合物であった。天然物化学的な観点からは、新規化合物の発見効率が高いプロジェクトとなったものと言える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

くも膜下出血は、投薬により合併症を抑制することで予後が改善できるものと考えられるが、過去20年以上、新たな治療薬の開発はほとんど進んでいない。本研究で注目されたtrehalose類縁体や、新たに発見された抗酸化物質をもとに開発される治療薬が死者や社会復帰困難な患者を減らせるようであれば、社会への貢献が大きいものと期待される。また、本研究で注目した有効化合物の作用機構について理解を深めることで、脳血管障害や関連疾患の病態や治療における基礎的かつ全般的な分子機構の把握に役立つものと期待される。さらに本研究は、天然物化学分野における新規化合物探索法にも新たに効率的な一例を加えたものと言える。

研究成果の概要（英文）：The substances that could be used as therapeutic agents for subarachnoid hemorrhage (SAH) were searched and evaluated. Trehalose and three analogs showed a tendency to increase the survival rate of brain neurons and suppress inflammation in a rat SAH model. One analog was about 500 times more effective than other compounds, and it is expected that this analog will lead to the development of therapeutic drugs in the future. In addition, natural antioxidants that are promising as new therapeutic agents for SAH were searched in this research. Twenty-three compounds, many of which have been poorly studied, were purified and identified, and five of these were new compounds. Considering the recent difficulty in discovering new compounds in the field of natural product chemistry, this result can be regarded to be highly efficient.

研究分野：天然物利用

キーワード：くも膜下出血 トレハロサミン trehalosamine トレハロース trehalose 抗酸化物質 食品植物 微生物

1. 研究開始当初の背景

くも膜下出血は脳卒中の中で最も予後の悪い疾患である。発症から 4 日後以降に発生する血管攣縮からの脳梗塞を主とした合併症を抑えることで予後の改善が期待できるが、このために用いられる新たな治療薬は過去 20 年間ほとんど開発されてこなかった。そんな中で、微生物、節足動物、海藻など多くの生物に存在する二糖のトレハロースが、ウサギやラットのくも膜下出血モデルにおいて顕著な治療効果を示すことが報告されていた (DOI: 10.1186/1479-5876-10-80)。本研究者は、研究開始当初、放線菌から新規 trehalose 類縁体の lentztrehalose 類を発見しており、また過去に所属機関で発見されていた、同じく trehalose 類縁体である 4-trehalosamine から誘導体を数十種類合成していた。この誘導体の中で糖型界面活性剤に分類されるものの一部は、培養細胞レベルの実験において、他の trehalose 類に比べて 500 ~ 3000 倍強い、炎症関連タンパク質の発現抑制やオートファジー誘導作用を示していた。こうした生物活性の強さから、くも膜下出血の治療においても、トレハロースより強い効果が見られるのではないかと期待された。

また、臨床医として実際にくも膜下出血患者の治療経験が豊富な共同研究者との相談の結果、trehalose 類の開発がうまく軌道に乗らなかった場合に備えて、別種の化合物についても治療薬候補として探索することとした。臨床ではくも膜下出血や脳梗塞の治療において、抗酸化物質の edaravone が有効性を示しているが、腎毒性を始めとした副作用がしばしば問題となる。また、抗酸化物質として機能するものは世の中に無数に存在し、天然物に限っても、これまで積極的な探索がほとんどなされていなかったこともあり、未知の化合物が多く存在するものと考えられたが、現在、脳卒中治療薬として使用されているものは edaravone のみである。未知の天然抗酸化物質の中には edaravone より脳卒中治療効果が高く、毒性の低い物質が存在するものと期待された。

2. 研究の目的

培養細胞レベルで強い生物活性を示した trehalose 類縁体について、脳卒中治療薬としての開発を目指した評価、検討を行う。また、微生物や食品植物から新たな抗酸化物質の探索を行い、同様に脳卒中治療薬としての評価、開発を進める。脳卒中治療薬としての開発については、既知物質であっても有効性の見られるものについては進めるが、天然物化学的な観点から、新規化合物の発見、報告については特に重視し、意識して研究を行うこととした。

3. 研究の方法

保有する trehalose 類縁体のうち、供給の都合や *in vitro* 実験での活性の強さから 3 つを選び、共同研究先の弘前大学においてラットくも膜下出血モデルでの治療効果の評価を行った。またより多くのサンプルについて迅速な評価を行うために、微生物化学研究所沼津支所動物施設において、マウスの脳出血モデル系と脳梗塞モデル系の立ち上げについても検討を行った。

抗酸化物質の探索に関しては、所属研究機関が保有する数万サンプルの微生物培養抽出物ライブラリーに加え、スパイス、ハーブ類を中心に、薬膳、漢方薬なども含む、400 種余りの食品植物抽出物ライブラリーを構築し、探索源とした。評価系としては、培養細胞には乳類溶血液処理を施し、酸化ストレスを与えた際の、抗酸化物質による抑制作用を評価する系を構築し、当初の探索に用いた。後に、より多くのサンプルについて速やかに評価するため、薄層クロマトグラフィー (TLC) をテトラゾリウム塩で染色する系を開発し、一次スクリーニングでの多サンプルの評価や、精製時各ステップでのフラクション評価に用いた。培養細胞や TLC の系で有効性が見られた化合物については、有機溶媒による抽出、二相分配、各種カラムを用いたクロマトグラフィーにより単離精製し、NMR や MS の測定により同定、構造決定を行った。

4. 研究成果

(1) 動物実験

先行研究で得られていた trehalose 類縁体、誘導体群

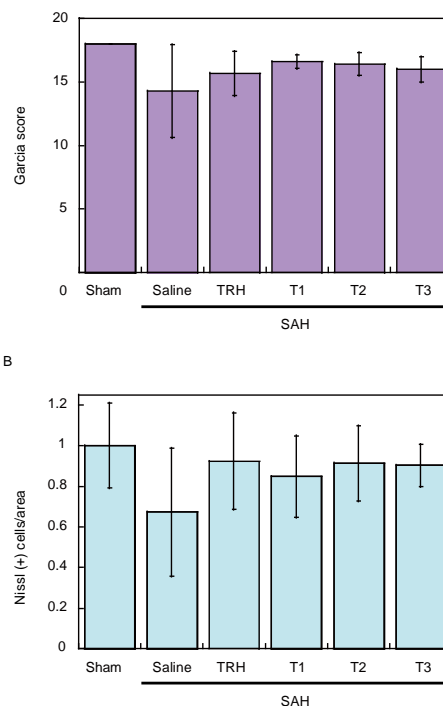


図1. くも膜下出血モデルラットに対する trehalose 類縁体の治療効果

くも膜下出血モデルラットに trehalose (TRH) と類縁体 3 種 (T1 - T3) を腹腔内投与した際の治療効果について評価を行った。TRH、T1、および T2 は 1.5 g/kg、T3 は 3 mg/kg 投与した。合計 6 つの評価項目のうち、2 つの結果を示す。(n = 5, Mean ± SD)

A. Garcia score による神経機能の評価結果。

B. Nissl 染色による神経細胞数の確認結果。

のうち、供給量の多さと、培養細胞レベルでの生物活性の強さを考慮し、3つの化合物 (T1 - T3、未公表のため仮名)を選び、trehalose とともにラットくも膜下出血モデルでの治療効果の評価試験を行った。神経学的評価 (Garcia score、図 1A)、血腫、神経細胞死 (Nissl 染色、図 1B)、炎症 (TNF および Iba 1 染色) および血液脳関門 (Rat IgG 染色)の計 6 項目の評価を行った。検体数が少なかったこともあり、いずれの評価系でも有意差を得るには至らなかったが、血種残存量以外の評価項目ではいずれも trehalose 類全てで、症状の改善傾向が見られた。T3 は他の trehalose 類化合物に比べ 1/500 量での投与であったが、遜色のない結果となっており、またこれまでの予備実験において特に毒性が見られていなかったため、今後はこの化合物やこの構造をもとにして開発された誘導体について、検体数を増やした更なる検討を行っていく予定である。

弘前大学での動物実験ではラットやウサギを用いた実験が可能であるものの、施設の規模や使用環境の点から行える回数や使用できる検体数が限られるため、評価対象とする化合物の数にも限りがある。このため、微生物化学研究所内でまずマウスを用いた脳卒中治療効果の評価実験を行い、多数の化合物の中から弘前大学でのより高度な動物実験に進めるものを選ぶシステムの構築を目指した。まずは、くも膜下出血モデルや脳内出血モデルの構築を目指したが、個体ごとに結果のばらつきが大きく、化合物評価に適した系の開発には至らなかった。また、現在では頸動脈結紮による脳梗塞モデルの構築を目指している。これに関しては結果のばらつきは減ったものの、手技的に難しいものであるため、短時間に多検体を用意、使用するのはまだ困難である。担当職員が手技の訓練中である。抗酸化物質の評価については、脳卒中モデルの確立を待たず、まずはマウスで有効な抗酸化活性を示す化合物を簡単に選抜することが可能な系として、X 線照射により与えられる酸化ストレスの抑制作用を評価する系を構築中である。

(2) 抗酸化物質の探索源と評価、探索系の構築

抗酸化物質の探索源として、既に利用可能であった微生物培養抽出物ライブラリーに加え、多様で毒性の低い抗酸化物質の宝庫と考えられた食品植物に注目し、抽出物ライブラリーを作製した。市販のスパイス、ハーブや、薬膳、漢方薬、野菜、果物など、約 400 種類を集め、100% メタノール、50% メタノール、水、DMSO で順次抽出し、それぞれの抽出液をスクリーニングサンプルとした。

評価系としては一般的な抗酸化物質の評価系である DPPH ラジカル消去評価の系を導入し使用するとともに、培養細胞をほ乳類溶血液で処理して与えた酸化ストレスを抑制する作用を評価する系を作製した。細胞株としては、10 株ほどについて使用を検討したが、神経細胞のモデルと考えたヒト神経芽細胞腫株 3 種のうち、扱いやすかった SH-SY5Y を用いることとした。溶血液としては大量に安価なものが入手しやすかった豚のものを用いた。また細胞内の活性酸素レベルについては H2DCFDA により検出した。これらを組み合わせ一度に 240 サンプルの評価が可能な系を立ち上げた。当初はこの評価系を新たな抗酸化物質の探索や、抽出液サンプルから抗酸化物質を精製する際の確認評価に用いていたが、スクリーニングではより多くのサンプルを迅速に測定する必要があり、また精製時には、各段階ごとに、用意から結果が得られるまで数日かかるこの系では進行が遅れることとなったため、より早く抗酸化物質の探索、評価が可能な系を構築することとした。

DPPH を使用する系では、特異性が低く感度が高すぎたため、細胞、組織の酸化ストレス緩和に有効性の高い抗酸化物質を特定するためには適さないようであった。抗酸化物質や還元剤の検出が可能な別の色素について検討したところ、培養細胞の溶血液処理系で有望と考えられた物質は、テトラゾリウム塩の一種の色素化合物で染色されることが確認された。この色素化合物で染色されるもの全てが必ずしも細胞の実験系で有効性を示したわけではなかったが、高確率で対応が見られ、また、TLC で展開した化合物群の中から迅速かつ選択的に有望な抗酸化物質を染色することが可能であったため、一次スクリーニングや精製時にはこの評価系を用いることとした。

(3) 有望な抗酸化物質の同定、構造決定

本研究では共同研究者による動物実験や、その系の構築を待つ期間に、研究代表者は新たな抗酸化物質の探索に特に力を入れることとなった。上記評価系により、食品植物及び微生物より、表 1 に示す 23

表 1 . 本研究で精製同定された抗酸化物質

| 植物抗酸化物質 | |
|-------------------|---|
| 1 | Carnosic acid |
| 2 | <i>p</i> -Cymene-2,3-diol |
| 3 | Malabaricone C |
| 4 | Mahanine |
| 5 | Aspalathin |
| 6 | Verbascoside |
| 7 | New compound A |
| 8 | Eugenol |
| 9 | 4',5,6-Trihydroxy-3',7-dimethoxyflavone |
| 10 | Forsythoside A |
| 11 | Gallic acid |
| 12 | Viscidulin I |
| 13 | Viscidulin III |
| 微生物抗酸化物質 | |
| 14 | Gabosine I |
| 15 | Cephalochromin |
| 16 | Citromyctin |
| 17 | Epicoccamide A |
| 18 | Asperphenalenone E |
| 19 | Aspernolide C |
| 20 | New compound B |
| 21 | New compound C-1 |
| 22 | New compound C-2 |
| 23 | New compound C-3 |
| 夾雑物として精製された非抗酸化物質 | |
| 24 | New compound D |
| 25 | New compound E-1 |
| 26 | New compound E-2 |

化合物を精製し、同定、構造決定した。この中で、3種5個の新規化合物を得ることが出来た。また、精製過程で得られた非抗酸物質の夾雑物でも2種3個の新規化合物が得られた。近年の天然物化学分野での新規化合物発見率から考えるとかなりの好成績であるものと言える。これらの新規化合物については、それぞれ順次論文発表に向けて準備中である。また、上記マウスの実験系が確立され次第、これら一つ一つの化合物について評価を行い、有効性が高いものについて、より高次の開発へと進めていく予定である。

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 1件）

| | |
|--|---------------------------------|
| 1. 著者名 Wada Shun ichi, Arimura Honami, Nagayoshi Miho, Sawa Ryuichi, Kubota Yumiko, Matoba Kazuaki, Hayashi Chigusa, Shibuya Yuko, Hatano Masaki, Takehana Yasuhiro, Ohba Shun ichi, Kobayashi Yoshihiko, Watanabe Takumi, Shibasaki Masakatsu, Igarashi Masayuki | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 Rediscovery of 4 Trehalosamine as a Biologically Stable, Mass Produccible, and Chemically Modifiable Trehalose Analog | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Advanced Biology | 6. 最初と最後の頁 2101309 ~ 2101309 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adbi.202101309 | 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 - |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 和田俊一、澤竜一、久保田由美子、大庭俊一、吉田温子、松波さくら、五十嵐雅之 |
| 2. 発表標題 生物学的安定性が高く、大量生産可能で、化学修飾しやすい trehalose 類縁体としての 4-trehalosamine の再発見 |
| 3. 学会等名 日本応用糖質科学会2022年度大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|---|--------------------------------|-----------------------|
| 産業財産権の名称 新規化合物、その用途、及びその製造方法、並びに、化合物含有組成物、4 - トレハロサミンの製造方法、及び微生物 | 発明者 和田俊一、有村帆波美、五十嵐雅之、永吉美穂、他 | 権利者 公益財団法人微生物化学研究会 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-144962 号 | 出願年 2021年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

| |
|---|
| 公益財団法人微生物化学研究会微生物化学研究所ホームページ https://www.bikaken.or.jp/ |
|---|

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 | 奈良岡 征都 (Naraoka Masato) (10455751) | 弘前大学・医学部附属病院・講師 (11101) | |

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 | | |
|---------|------------------------------------|--------------------|--|
| 米国 | Washington University in St. Louis | School of Medicine | |