

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32403

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16531

研究課題名（和文）抗ネクロトーシ作用を持ち合わせた抗酸化化合物の探索と脳血管障害の新規治療の検討

研究課題名（英文）Search for antioxidant compounds with anti-necroptosis effects and investigation of novel treatments for cerebrovascular disease

研究代表者

玄 美燕 (Xuan, Meiyuan)

城西大学・薬学部・助教

研究者番号：50711751

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：脳梗塞中心の細胞死は制御不可能とされ、治療が放棄されてきたが、近年、制御可能なネクローシス様細胞死として、「ネクロトーシス」の存在が発見された。ネクロトーシス抑制は、脳梗塞の治療領域を拡大する可能性が示唆された。本研究では、酸化ストレスが大きく関与する脳梗塞の治療薬として、抗酸化作用と抗ネクロトーシス作用の両方を兼ね備えた化合物を探索することを目的とした。申請者は、スクリーニングより候補化合物FAD041を見出した。FAD041は、酸化ストレス傷害に対して強い細胞保護効果を示し、その作用メカニズムには、FAD041の抗酸化作用や抗ネクロトーシス作用が寄与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の特色は、抗酸化作用とネクロトーシス抑制作用の両方を兼ね備えた化合物を探索することにより、これまで制御不能なネクローシス様細胞死の領域である虚血中心部の障害を含めて、効率よく虚血性細胞死を抑制し、新しい虚血性脳血管障害の治療薬の開発を目指すことにある。ネクロトーシスの発見以来、虚血性疾患以外の神経変性疾患、悪性腫瘍、ウイルス感染や免疫性疾患などの組織障害にもこの細胞死が関与することが明らかになっている。また、これらの疾患には、酸化ストレスが大きく関与することから、本研究は、虚血性脳血管疾患のみならず、新しい細胞死が関与する多くの疾患の治療薬の創出にも有意義な情報提供ができると考えている。

研究成果の概要（英文）：In cerebral infarction, cell death in the infarct core was believed to be uncontrollable, and treatment had been abandoned. However, in recent years, the existence of "necroptosis" was discovered as a controllable necrotic-like cell death. It has been suggested that inhibition of necroptosis may expand the treatment field for cerebral infarction. In this study, the aim was to search for a compound that has both antioxidant and anti-necroptosis effects as a treatment for cerebral infarction, which is closely related to oxidative stress. The applicant found a candidate compound, FAD041, through screening. FAD041 showed a strong cytoprotective effect against oxidative stress injury, and it was suggested that the antioxidant and anti-necroptosis effects of FAD041 may contribute to the mechanism of action.

研究分野：神経薬理学

キーワード：抗ネクロトーシス 抗酸化 酸化ストレス 脳保護効果 フェルラ酸誘導体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞をはじめとした虚血性脳血管障害は、超高齢社会を迎えた日本の死亡原因の第4位であるとともに、麻痺や認知障害など予後不良による医療・介護費の増大も大きな社会問題として、その対策が急がれている。虚血性脳血管障害の発症時には、血流の著しい減少によって脳細胞が数分以内に壊死(ネクローシス)に陥る。一方、虚血周辺部では、虚血による障害に加えて血流再開に伴う活性酸素種(ROS)の産生増大による酸化ストレスによって、プログラム細胞死であるアポトーシスが誘導され、脳障害を進行させる。ネクローシスは不可逆的な細胞死であり、制御が困難であるが、アポトーシスは、早期の薬物治療で制御可能であることから、これまではアポトーシスをターゲットとした抗酸化物質による脳保護療法が注目され、多くの基礎・応用研究がなされてきた。ところで、近年、新たなプログラム細胞死(ネクロトーシス)の存在が明らかになり、これまで困難であるとされていた虚血中心部まで脳保護治療領域が拡大できる可能性が示されたことから、申請者も注目するようになった(業績; Xuan *et al.* 2015)。ネクロトーシスを抑制する化合物としてネクロスタチン-1(Nec-1, M.W.: 259.3)が発見され、マウス脳虚血モデルの虚血中心部において脳保護効果を示すことが報告された(Degterev *et al.* 2008)。このネクロトーシスの発見は、これまでの常識であった「ネクロトーシス様細胞死は偶然かつ制御不能な細胞死である」という概念を覆すものであり、ネクロトーシスの抑制が脳梗塞の新たな治療ターゲットとして有効である可能性を示した。

また、ネクロトーシスの発生および進行の過程には、酸化ストレスの関与が明らかになっている。これらの過程においてROSが新たに産生され、障害が進行するといった悪循環が生じることも報告されている(Vandabeele *et al.* 2010; Upton *et al.* 2010; Fukui *et al.* 2012)。従って、抗酸化作用に加えてネクロトーシス抑制作用を併せ持つ化合物を開発できれば、急性期から慢性期にわたる虚血中心部だけでなく、その周辺部における脳組織障害をトータル的に軽減できる可能性があり、既存の抗酸化化合物や抗ネクロトーシス化合物よりも強い脳保護効果が期待できる。しかし、先に見出されたネクロトーシス抑制剤Nec-1やその誘導体は、抗酸化活性を有しておらず、アポトーシス抑制作用を示さない(Degterev *et al.* 2008)。現在、国内外においても、抗酸化作用を有し、かつ特異的にネクロトーシスを抑制できる化合物の報告例はない。

2. 研究の目的

申請者は、これまでにフェルラ酸(FA)の抗酸化作用を増強した誘導体(FAD)を複数デザインし、その脳保護作用を評価してきた。そこで本研究では、新たにネクロトーシス抑制作用を併せ持つFADを探索し、その効果を詳細に検討することにより、虚血性脳血管障害に対する効果的な治療薬となり得るかについて検討した。

3. 研究の方法

1. 抗酸化作用を有し、かつ理論計算化学により抗ネクロトーシス作用を有する可能性がある化合物のスクリーニングを行った。
 - (1). 100種類のFAD(合成済み)について、抗酸化活性を指標にスクリーニングを実施した。
 - (2). (1)で抽出した化合物を、既存のネクロトーシス抑制剤Nec-1をモデルとして、ネクロトーシス誘発経路の調節蛋白質RIPK1との結合部位についてドッキングシミュレーションやフラグメント分子軌道法などにより評価し、Nec-1に近いスコアを示すものに絞り込んだ。その結果、抗酸化作用を有し、かつRIPK1との結合部位がNec-1と同等なスコアを示す数種類の

候補化合物を抽出した。

2. 酸化ストレスを誘導した培養神経細胞に対する候補化合物の細胞保護効果についてスクリーニングを行った。

虚血性脳血管障害において、酸化ストレスが脳障害の進展や悪化に大きく関与することから、培養神経細胞（Neuro-2a 細胞）に過酸化水素（ H_2O_2 ）を処置することで酸化ストレス傷害を誘導し、誘導される細胞死に対する候補化合物の抑制効果を評価した。

3. 酸化ストレス傷害に対して強い細胞保護効果を示した化合物について、その細胞保護作用メカニズム解析を行った。

- (1). 細胞内の ROS の産生や酸化ストレスマーカー（4-HNE、8-OHdG）を評価することにより、酸化ストレス抑制効果を評価した。
- (2). ネクロトーシスは、膜の破綻と細胞内容物の放出を伴うため、染色により形態学的評価を行った。
- (3). ネクロトーシスは、RIPK1、RIPK3 および MLKL の活性化に応じて引き起こされることから、これらの活性化とシグナル経路に関与する因子の蛋白質の発現変化を Western Blot 法より評価した。

4. 研究成果

1. 抗酸化作用を有し、理論計算化学により抗ネクロトーシス作用を有する可能性がある化合物のスクリーニングを行った。その結果、抗酸化作用を有し、かつ RIPK1 との結合部位が Nec-1 と同等なスコアを示す候補化合物を抽出した。
2. 酸化ストレスを誘導した培養神経細胞に対する候補化合物の細胞保護効果についてスクリーニングを行った。実験 1 で抽出した候補化合物を用いて、酸化ストレスによって誘導された細胞死に対して細胞保護効果を示すかを検討した。その結果、低濃度から濃度依存的に強い細胞保護効果を示す FAD041 を見出すことができた。
3. FAD041 の細胞保護作用メカニズムにネクロトーシス抑制作用が寄与するかを検討するため、酸化ストレス処置後にネクロトーシス様細胞死の割合を経時的に評価した。その結果、過酸化水素処置から 9 時間後にネクロトーシス様細胞死の顕著な増加が観察された。それに対して、FAD041 は強いネクロトーシス様細胞死抑制効果を示した。また、ネクロトーシス誘発経路の標的蛋白質 RIPK1 の活性化を経時的に評価した結果、 H_2O_2 処置から 3 時間後に顕著に活性化することが分かった。それに対して、FAD041 は RIPK1 の活性化を顕著に抑制する傾向を示し、その効果は Nec-1 より強かった。そのことから、FAD041 の抗ネクロトーシス作用を有する可能性が示唆された。また、酸化ストレスにより誘発されるアポトーシスに対する抑制効果についても検討した。 H_2O_2 処置後誘発されるアポトーシスの割合を経時的に評価した。その結果、アポトーシスは、 H_2O_2 処置 24 時間後に顕著に増加した。それに対して、FAD041 は有意なアポトーシス抑制効果を示した。加えて、FAD041 の細胞保護効果において抗酸化作用が寄与するかを検討した結果、 H_2O_2 処置下に増加した酸化ストレスマーカー（4-HNE、8-OHdG）と ROS は、FAD041 により顕著に抑制されることが明らかになった。それらのことから、酸化ストレス傷害に対する FAD041 の強い細胞保護効果には、化合物の

抗酸化作用も寄与する可能性が示唆された。

以上より、酸化ストレス傷害に対する FAD041 の強い細胞保護効果は、FAD041 の抗酸化作用や抗ネクローシス作用が寄与する可能性が示唆された。さらに、興味深いことに FAD041 は酸化ストレス条件下で産生される酸化体 (FAD041-C) にも強い細胞保護効果があることを明らかにした。これら酸化体を同定した結果、クマリン誘導体であることが明らかになったが、FAD041 の保護効果に FAD041-C がどれくらい寄与しているかについて現在解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hiroyuki Teramae, Tetsuhide Matsuo, Kazuma Niwatsukino, Ryota Inoue, Shinji Noguchi, Meiyuan Xuan, Tsukasa Yamashita, Jun Takayama, Mari Okazaki, Takeshi Sakamoto.	4. 巻 19
2. 論文標題 Prediction of Molecular Properties by Molecular Orbital Calculations and Machine Learning.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Comput. Chem. Jpn.	6. 最初と最後の頁 43-45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2477/jccj.2020-0005	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13件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 色摩 光一、小川 健太、高山 淳、玄 美燕、松崎 広和、袁 博、岡崎 真理、坂本 武史
2. 発表標題 フェルラ酸誘導体FAD041の合成経路の改善及び収率向上の検討
3. 学会等名 日本薬学会第143年会（札幌）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 駒井 一磨、色摩 光一、小川 健太、高山 淳、玄 美燕、松崎 広和、袁 博、岡崎 真理、坂本 武史
2. 発表標題 抗酸化作用と抗ネクロトーシス作用を有する新規誘導体の合成検討
3. 学会等名 日本薬学会第143年会（札幌）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 玄 美燕、小笠原 晃輔、鈴木 涼介、石黒 直人、小川 健太、高山 淳、坂本 武史、松崎 広和、袁 博、岡崎 真理
2. 発表標題 Neuro-2a細胞の酸化ストレス傷害に対するフェルラ酸誘導体FAD041の保護効果の検討
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玄 美燕, 吉池 未来, 木下 智史, 加藤 洋介, 高山 淳, 坂本 武史, 岡崎 真理
2. 発表標題 FAD024はNrf2経路を介して酸化ストレス傷害からPC12細胞を保護する
3. 学会等名 第64回日本薬学会 関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 周郷 広史, 鈴木 郁実, 加藤 悠花, 松崎広和, 岩田 直洋, 神内 伸也, 日比野 康英, 玄 美燕, 高山 淳, 坂本 武史, 袁博, 岡崎 真理
2. 発表標題 フェルラ酸は光血栓性脳卒中ラットの脳血流低下を軽減する
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青山 隼也, 玄 美燕, 野木 麻理奈, 高山 淳, 坂本 武史, 松崎 広和, 袁 博, 岡崎 真理
2. 発表標題 ラット脳微小血管内皮細胞における酸化ストレス傷害に対するフェルラ酸誘導体 FAD012の保護効果
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥澤 拓真, 色摩 光一, 高山 淳, 玄 美燕, 松崎 広和, 袁 博, 岡崎 真理, 坂本 武史
2. 発表標題 1,2,4-オキサジアゾール環を有するフェルラ酸誘導体の合成の検討
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 周郷 広史, 松崎 広和, 岩田 直洋, 玄 美燕, 高 山淳, 坂本 武史, 袁 博, 岡崎 真理
2. 発表標題 光血栓性脳卒中ラットにおけるフェルラ酸誘導体FAD012の脳保護効果
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 周郷 広史, 松崎 広和, 岩田 直洋, 鈴木 郁実, 野口 真由, 吉松 暢彦, 玄 美燕, 高山 淳, 坂本 武史, 袁 博, 岡崎 真理
2. 発表標題 フェルラ酸誘導体は光血栓性脳卒中ラットの血液脳関門障害を軽減する
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 玄 美燕, 色摩 光一, 嶋崎 晴香, 高山 淳, 松崎 広和, 袁 博, 坂本 武史, 岡崎 真理
2. 発表標題 Neuro-2a細胞におけるH2O2誘発ネクローシス様細胞死に対するFAD041の抑制効果の検討
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 青山 隼也, 玄 美燕, 高山 淳, 坂本 武史, 松崎 広和, 袁 博, 岡崎 真理
2. 発表標題 ラット脳微小血管内皮細胞のH2O2誘発壊死性細胞死に対するフェルラ酸誘導体FAD012の保護メカニズムの検討
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 色摩 光一, 高山 淳, 玄 美燕, 松崎 広和, 袁 博, 岡崎 真理, 坂本 武史
2. 発表標題 フェルラ酸誘導体の抗酸化作用と細胞保護効果の構造活性相関
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 周郷 広史, 野口 真由, 吉松 暢彦, 松崎 広和, 岩田 直洋, 玄 美燕, 高山 淳, 坂本 武史, 袁 博, 岡崎 真理
2. 発表標題 フェルラ酸誘導体FAD012の単回腹腔内投与は光血栓性脳卒中ラットの血液脳関門障害を軽減する
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024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
研究協力者	坂本 武史 (Sakamoto Takeshi) (20187040)	城西大学・薬学部・教授 (32403)	計算科学を応用したフェルラ酸誘導体のデザインと合成
研究協力者	高山 淳 (Takayama Jun) (00582222)	城西大学・薬学部・准教授 (32403)	計算科学を応用したフェルラ酸誘導体のデザインと合成

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