

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15304

研究課題名(和文) 神経活性ステロイド生合成促進剤：抗不安薬ヘリポジョニング可能な既存薬の探索

研究課題名(英文) Enhancer of neuroactive steroids biosynthesis: search for agents potentially repositioned as anxiolytic drugs

研究代表者

楠瀬 翔一 (Kusunose, Shoichi)

東京理科大学・薬学部薬学科・助教

研究者番号：60868470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：LC/ESI-MS/MSにGirard試薬Pとそのアイソトポログである2H5-Girard試薬Pによる誘導体化を組み合わせ、培養細胞が産生するアロプレグナノロン(AP)量の薬剤処理の有無による差を解析する方法を開発した。isotope-coded derivatizationを基盤とするラット脳内APの高感度かつ信頼性に優れたLC/ESI-MS/MS定量法の開発した。これらの開発した方法を用い、デュロキセチン、ダボキセチン、プロプラノロールによる脳内AP生合成促進作用を初めて見出し、脳内APレベル上昇がこれらの薬物の抗不安作用に関与する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で新たにAP生合成促進作用が見出されたデュロキセチン、ダボキセチン、プロプラノロールと、既にAP生合成促進作用が知られている薬剤(フルオキセチンやパロキセチン)は共通した部分構造(アリールオキシプロパンアミン構造)を有しており、この構造がAP合成に関わる酵素の活性化に関与する可能性が示唆された。また、本研究開発された培養細胞を用いたスクリーニング系、ラット脳内AP分析法は、今後のAP生合成促進を基盤とした新たな抗不安薬探索の推進に寄与するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We developed a method to evaluate differences in the amount of allopregnanolone (AP) produced by cultured cells with and without drug treatment by combining high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS) with derivatization using Girard's reagent P and its isotopologue (2H5-Girard's reagent P). We also developed a highly sensitive and reliable LC/ESI-MS/MS/MS method for determination AP levels in rat brain based on isotope-coded derivatization. Using these methods, we found for the first time that duloxetine, dapoxetine, and propranolol promote AP biosynthesis in the rat brains, indicating that the increase in AP level in the brain may be involved in the anxiolytic effects of these drugs

研究分野：分析化学

キーワード：神経活性ステロイド 抗不安薬 アロプレグナノロン スクリーニング ドラッグリポジョニング  
アリールオキシプロパンアミン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

不安障害の生涯有病率は約 4% であり、頻度の高い精神・神経疾患である。また不安障害を訴える患者は近年増加傾向にある。現在、我が国において不安障害の治療薬としてセロトニン選択的再取り込み阻害薬 (SSRI) やベンゾジアゼピン系薬剤 (BZD) が用いられるが、SSRI は即効性に乏しく、眠気、吐き気、食欲低下等の副作用頻度が高い。また BZD は即効性があるものの、長期使用で依存症を生じやすく乱用の危険があり、筋弛緩、健忘等の副作用を引き起こす可能性がある。従来の治療薬にはそれぞれ欠点があることから、新規作用機序を有する抗不安薬の研究・開発が望まれている。

申請者は新たな抗不安薬のターゲット分子として、神経活性ステロイド (NAS) に着目した。NAS は内分泌組織または脳内で生成され、中枢神経にて細胞膜受容体に結合し、作用するステロイドホルモンの総称である。その中でも、アロプレグナロン (AP) は代表的な NAS の一つとして知られており、近年、不安障害、うつ病など精神神経疾患との関係が注目されている。AP は  $\gamma$ -アミノ酪酸 A 型 (GABA<sub>A</sub>) 受容体のアロステリックモジュレーターとして働くことが分かっており、GABA<sub>A</sub> 受容体に結合することで GABA による Cl<sup>-</sup>の細胞内への流入を促進し、抗不安、鎮静、鎮痛及び抗痙攣作用に関与することが知られている。実際に、マウスを用いた行動試験において、AP は抗不安作用を示すことが証明されている。従って、脳内 AP は不安障害やその他の精神疾患のターゲットとなる可能性を有している。

また、近年、ある疾患のために開発された医薬品を別の疾患の治療薬として再開発する、ドラッグリポジショニングが創薬の現場で注目を集めている。この手法は臨床レベルにおける安全性・体内動態が確認されていること、既存データを活用できることが大きな利点であり、医薬品開発の確実性を上げ、開発コストを抑えることが期待できる。一部の向精神薬は動物実験において脳内 AP レベルを上昇させる可能性が報告されていることから、申請者は既存薬の中から抗不安薬へとリポジショニングすることが可能なのではと考えた。しかし、脳内 AP レベルを上昇させる医薬品を探索するための系は確立されておらず、AP 生合成系を作用点とした医薬品は未だ開発されていない。

### 2. 研究の目的

申請者は、*in vitro* のスクリーニング系を構築することができれば、効率よく新規抗不安薬候補を見つけることができると考えた。具体的には、AP 生合成系を有している中枢神経系由来の細胞株に対して候補薬剤を処理し、その後培養培地中に放出された AP を測定することで、脳内 AP レベルを上昇させる可能性のある薬剤を見出す。そこで、本研究では AP の合成促進を作用機序とした抗不安薬を、ドラッグリポジショニング手法により開発することを究極の目標とする。そのために、培養細胞株を利用した AP 生合成促進薬の新規スクリーニング系を構築し、既存薬から脳内 AP レベル上昇作用を有する抗不安薬候補薬剤を見出すこととする。

### 3. 研究の方法

(1) 細胞培養上清中や実験動物脳内の微量な AP を正確に分析するために、Girard 試薬 P 誘導体化と高速液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析 (LC/ESI-MS/MS) を組み合わせ、高感度な AP の分析の検討を行った。具体的には、AP と物理化学的性質の類似した立体異性体との分離のための LC 条件検討、誘導体化の有無による感度比較を行った。

(2) 培養細胞を用いた AP 生合成促進剤の簡便なスクリーニング系の開発を目指した。すなわち、Girard 試薬 P (GP) とそのアイソトポログである <sup>2</sup>H<sub>5</sub>-Girard 試薬 P (d<sub>5</sub>-GP) による誘導体化を組み合わせ、培養細胞が産生する AP 量の薬剤処理の有無による差を解析する方法の開発を試みた。ラットグリア細胞由来の細胞株である C6 に 20 nM progesterone 含有無血清培地中で、各種薬剤を 24 時間処理した。その後、回収された培養培地上清中の AP を酢酸エチルにより抽出し、vehicle 群を GP に、薬剤処理群をそのアイソトポログである d<sub>5</sub>-GP によりそれぞれ誘導体化し、2 検体を混合し LC/ESI-MS/MS による分析を行い、得られたピーク面積を比較した。

(3) 薬剤投与によるラットの脳内 AP レベル変動を解析するために、GP と d<sub>5</sub>-GP を用いた isotope-coded derivatization (ICD) を基盤とするラット脳内 AP の高感度かつ信頼性に優れた LC/ESI-MS/MS 定量法の開発した。ラットの全脳をメタノール-酢酸 (99:1, v/v) 中でホモジナイズ後、これを遠心分離して上清を得、Strata-X カートリッジにより AP を精製し、GP 誘導体化後、AP-d<sub>5</sub>-GP を添加後、LC/ESI-MS/MS に付した。

(4) (2)、(3) で開発した方法を用いて、種々の薬物を投与されたラット脳内 AP レベルの変動について評価した。検討薬物として、すでに AP 生合成の促進効果が知られているフルオキセチンやパロキセチンと同様の部分構造 (アリアルオキシピロパンアミン構造) を有する化合物をいくつか選択した。

### 4. 研究成果

(1) APには3位と5位の立体配置が異なる3種の立体異性体, pregnanolone (5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-one), epiallopregnanolone (5 $\alpha$ -pregnan-3 $\beta$ -ol-20-one), epipregnanolone (5 $\beta$ -pregnan-3 $\beta$ -ol-20-one) が存在し, これらのGP誘導体のESI-MS/MS挙動はAPのそれと同じである. したがって, 脳内APの正確な定量にはLCによってAP誘導体を他の異性体から分離する必要がある. 検討の結果, 移動相にアセトニトリル-10 mM ギ酸アンモニウム (1:2, v/v), カラムにYMC-Triart C18を用いることで, AP-GPを他の異性体のGP誘導体から分離して検出することができた. また, GP誘導体化を導入することで, 誘導体化しない場合と比較して感度が600倍向上し, GP誘導体化がAPの高感度分析に有効であることが確認された.

(2) 検量線は, 40 pg/mLのAP含有培養上清 (vehicle 処理群に相当) をGPで, 10-160 pg/mLのAP含有培養上清 (薬剤処理群に相当) をd<sub>5</sub>-GPで誘導体化後, 混合し, LC/ESI-MS/MSにより測定して作成した. その結果, ピーク面積比 (AP-d<sub>5</sub>-GP/AP-GP) とAP濃度間に良好な直線性が確認された ( $r^2 \geq 0.997$ ). 本法によりAP生合成に影響を与える薬剤を探索できるか確認するために, 脳内APレベルの増加作用が知られているフルオキセチンを10  $\mu$ Mで処理したところ, 培養上清中AP量はvehicle 処理群に対して約2倍に増加した. また, AP合成を阻害するfinasterideの処理 (10 nM) により, 培養上清中AP量が約30%に減少した. このように, 本法により薬剤処理に伴うC6細胞のAP産生量の変動を明確に捉えることが可能であった.

(3) 活性炭処理した脳ホモジネートに各濃度のAP標準品を添加し検量線を作成したところ 0.40 - 10 ng/g tissue の範囲で良好な直線性 ( $r^2 \geq 0.998$ ) が得られた. さらに日内及び日間変動試験 (RSD  $\leq 4.0\%$ ) 及び添加回収試験 (98.1 - 108.3%) の結果も良好であった. 本分析法がラットの脳内APの増減を検出できるか精査する目的で, 10 mg/kgのフルオキセチン, イミプラミン, または生理食塩水をWistar系雄性ラット (8週齢) に腹腔内投与した. 生理食塩水 ( $n=13$ ), イミプラミン ( $n=6$ ) を投与したラットの脳内APレベルは全て0.40 ng/g tissue (LOQ) 以下であったのに対し, フルオキセチン ( $n=6$ ) を投与するとそれは2.4 - 7.9 ng/g tissue と有意に上昇した. このように開発した定量により薬物投与に伴う脳内APレベル変動を追跡できることが確認された.

(4) (2)で開発した方法を用いて, アリールオキシプロパンアミン構造を有するもののうち, フルオキセチンと同様にセロトニン再取り込み阻害作用を有するダボキセチン, デュロキセチンのAP生合成に与える影響を試験した. 10  $\mu$ Mのダボキセチン, デュロキセチンをC6細胞に処理したところ, これらの薬剤は10  $\mu$ Mフルオキセチンとほぼ同等のAP生合成促進作用を有することが示唆される結果を得た. また, (3)で開発した方法を用いて, 10 mg/kgのダボキセチン, デュロキセチン投与後のラット脳内AP量を確認したところ, それぞれ<0.51 - 2.7 ng/g tissue ( $n=6$ , 1例は定量下限未達), 1.48 - 3.83 ng/g tissue ( $n=6$ )であり, どちらも有意な脳内APレベル上昇が確認された. さらに, プロプラノロール (アリールオキシプロパンアミン構造を有する $\beta$ 遮断薬) についても (3)の方法で試験したところ, 20 mg/kg tissueの量をラット腹腔内投与することで, その脳内APは0.48 - 2.09 ng/g tissue ( $n=6$ , 1例は定量下限未達) と有意に増加した. 一方で, アトモキセチン (ノルアドレナリン選択的再取り込み阻害薬, アリールオキシプロパンアミン構造を有する) も試験したが, 脳内APレベルの上昇は認められなかった. これらの結果から, アリールオキシプロパンアミン構造を有する全ての薬物がAP上昇能を有するわけではないことが判明した.

本研究により, 培養細胞, ラットを用いてAPの生合成を促進する薬剤を探索する手法を開発することができた. また, 開発した方法によりデュロキセチン, ダボキセチン, プロプラノロールの脳内APレベル上昇作用が初めて見出され, それぞれの薬物の中枢作用にAPが関与している可能性が示唆された.

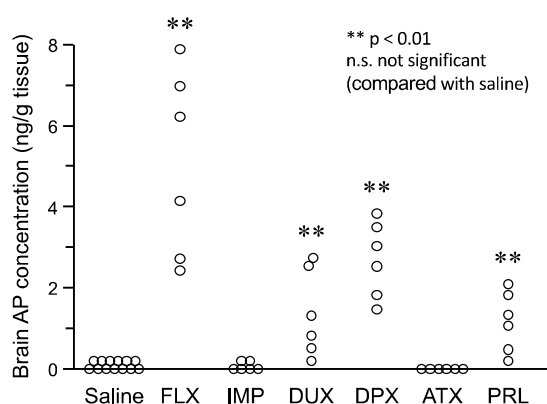


図. 薬剤投与後のラット脳内AP濃度  
Saline: 生理食塩水, FLX: フルオキセチン, IMP: イミプラミン,  
DUX: デュロキセチン, DPX: ダボキセチン, ATX: アトモキセチン,  
PRL: プロプラノロール

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 Toma Shibuya, Shoichi Nishimoto-Kusunose, Ayaka Hirakawa, Kazumi Yoshizawa, Tatsuya Higashi	4. 巻 7
2. 論文標題 LC/ESI-MS/MS analysis of progesterone-derived steroids produced in SH-SY5Y cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Medical Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 60-70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.24508/mms.2023.06.007	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平川 彩夏, 田中 あすか, 楠瀬 翔一, 吉澤 一巳, 東 達也
2. 発表標題 C6細胞とLC/ESI-MS/MSを用いたアロプレグナロン生合成促進剤のスクリーニング系開発の試み
3. 学会等名 第46回日本医用マスペクトル学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平川 彩夏, 田中 あすか, 楠瀬 翔一, 吉澤 一巳, 東 達也
2. 発表標題 ICDに基づくラット脳内アロプレグナロンのLC/ESI-MS/MS定量法の開発
3. 学会等名 第32回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渋谷 斗磨, 楠瀬 翔一, 東 達也
2. 発表標題 Progesterone処理したSH-SY5Y細胞培養上清中プレグナステロイドのLC/ESI-MS/MS分析
3. 学会等名 第29回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平川 彩夏, 田中 あすか, 楠瀬 翔一, 吉澤 一巳, 東 達也
2. 発表標題 アリールオキシプロパンアミン構造をもつ薬物の中樞作用にアロプレグナノロンが関与する可能性
3. 学会等名 第34回バイオメディカル分析シンポジウム (BMAS2022)
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