

厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

新規リードスルー惹起物質による
ナンセンス変異型筋疾患治療のための前臨床試験

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松田 良一

平成21 (2009) 年 4月

はじめに

リードスルー薬物による治療法は、遺伝子が維持されたまま翻訳機構に干渉し、正常機能タンパク質の発現を回復させる試みとして国際的に注目されており、ナンセンス変異型筋ジストロフィーにおける筋細胞膜でのジストロフィンの役割を回復するための有効かつ迅速な選択肢となると考えられている。ベッカー型症例の経験から、正常量の20%に相当するジストロフィンでも筋ジストロフィーの進行を遅延させ、患者様のQOLの向上と延命を図ることができるため、人類福祉への直接的還元として大きく寄与するものと考えられる。

我々は、未承認抗生物質ネガマイシンがマウス骨格筋に対してリードスルー活性を持つことを示してきた。本研究「新規リードスルー惹起物質による筋疾患治療のための前臨床試験」において、平成20年度には以下の研究成果を得たので報告する。

- 1) 新規リードスルー惹起物質RD2およびRD3は、リードスルー活性検出コンストラクトを導入したHeLa細胞培養系において容量依存的かつアタルレン (PTC124) より高いリードスルー活性を示した。またmdxマウスに3週間連日投与することで、16~18%の筋線維においてジストロフィン陽性を認めた。
- 2) 新規リードスルー惹起物質RD1の単回・反復投与/回復安全性試験において良好な結果を得た。またDMD患者由来培養筋細胞においてもジストロフィン陽性を認めた。
- 3) ゲンタマイシンとはアミノ基配置の異なる擬二糖類の抗生物質にリードスルー活性を有するものを特定した。

本研究実施にあたり、平成20年度厚生労働省科学研究費「こころの健康科学研究事業」のご援助をいただいたことに深く感謝いたします。

平成21年4月1日 主任研究者 松田良一 (東京大学大学院総合文化研究科)
交付額平成20年度 23,000千円 (直接研究費のみ)

様式A-1 (5)

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

平成21年4月1日

国立精神・神経センター総長 殿

住所 〒153-8902 東京都目黒区駒場3-8-1

研究者 氏名 松田 良一

マツダ リョウイチ



(所属機関 東京大学大学院 総合文化研究科)

平成20年度厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）に係わる研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名（課題番号）：新規リードスルー惹起物質によるナンセンス変異型
筋疾患治療のための前臨床試験（H19-こころ-020）

国庫補助金精算所要額：金 23,000,000円也（うち間接経費 0円）

1. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙
2. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次
3. 厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書
4. 厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書
5. 研究成果の刊行に関する一覧表
6. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況

目次

I. 総括研究報告	
新規リードスルー惹起物質による ナンセンス変異型筋疾患治療のための前臨床試験	
松田良一1
II. 分担研究報告	
リードスルー惹起物質によるmdxマウス骨格筋の機能回復評価	
山田茂8
リードスルー惹起物質の安全性試験	
池田大四郎12
アミノグリコシド系抗生物質とネガマイシン類からの リードスルー治療薬の探索	
高橋良和16
DMD患者の遺伝子解析と筋生検由来培養細胞を用いた評価	
松尾雅文19
DMD患者由来培養筋細胞を用いた評価	
斎藤加代子23
III. 研究成果の刊行に関する一覧表27
研究成果による特許権等の知的財産権の出願状況28
IV. 研究成果の刊行物・別刷29

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
総括研究報告書

新規リードスルー惹起物質によるナンセンス変異型筋疾患治療法のための前臨床試験

主任研究者 松田良一 東京大学大学院総合文化研究科 准教授

研究要旨

アミノグリコシド系抗生物質やジペプチド系抗生物質ネガマイシンはリボソームに結合し、点変異により生じた未熟終止コドン（PTC）とrRNAのA部位との結合を阻害することでPTCを読み越えて翻訳を進行【リードスルー】させ、機能的な全長タンパク質分子を作らせることが知られている。この性質を応用したリードスルー薬物療法は、2,400種を超えるナンセンス変異型遺伝性疾患の包括的薬物療法としても有望であることから、遺伝子導入や幹細胞移植に次ぐ第3の革新的な有効かつ迅速な治療法として期待されている。本研究課題の目的は、ナンセンス変異型筋疾患治療のために、PTCを克服するリードスルー惹起作用をもつ新薬を提案し、リードスルー薬物による治療戦略を確立することにある。

当該年度において、個体レベルでのリードスルー活性検出系となるトランスジェニック（Tg）マウスの確立、それらを用いたリードスルー惹起化合物の探索とその投与方法の検討を行い、新規リードスルー惹起薬物候補として未承認アミノグリコシド系抗生物質5種とネガマイシン類似物質5種を特定した。また経皮吸収型薬物送達法の確立に成功した。特定したネガマイシン類似リードスルー惹起薬物候補のうち3種について、疾患モデル動物やナンセンス変異型DMD患者骨格筋由来培養細胞での薬効の検証と小動物を用いた安全性試験を行い、良好な結果を得た。

分担研究者

山田茂（東京大学総合文化研究科准教授）

池田大四郎（財団法人微生物化学研究会

微生物化学研究センター

副センター長）

高橋良和（財団法人微生物化学研究会

微生物化学研究センター

副センター長）

松尾雅文（神戸大学医学部小児科 教授）

斎藤加代子（東京女子医科大学遺伝子医療

A. 研究目的

mRNAの翻訳中に点変異によって生じたPTCがくると、リボソームは正常の翻訳終止点と同様に認識し、遊離因子の作用によりmRNAを遊離し、タンパク質合成を終了してしまう。したがって機能的全長タンパク質が合成されず、種々の遺伝性疾患が生じる。遺伝性疾患の5~15%はナンセンス変異症例であり、薬物によりPTCを読み越えて翻訳を進行【リードスルー】させ、全長タンパク質分子を作らせることができれば、全長タンパク質の合成が回復し症状の改善が期待される。

本研究は、独自のリードスルー活性解析系として、3種のPTCをそれぞれ挿入したβ-ガラクトシダーゼとルシフェラーゼのデュアルレポーター遺伝子を組み込んだ3種のTgマウス系統を作成し、これらを用いてリードスルー惹起薬物候補の投与経路や投与量の最適化を行い、新規リードスルー惹起物質のナンセンス変異型筋ジストロフィーに対する治療効果と安全性を検証することを目的としている。

B. 研究方法

リードスルー惹起物質の探索

リードスルー活性の定量的検出系として、最初の治験対象であるデュシェンヌ型筋ジストロフィーのモデル動物 (mdxマウ

ス) を用いることは不都合が多い。指標となるジストロフィンが巨大分子 (427KDa) であるためイムノプロットでの転写効率は低く、その存在量は他の筋タンパク質に比べて少ないためである。そこで生体内でのリードスルー活性解析における薬効評価を定量化かつ効率化する目的で、βガラクトシダーゼ遺伝子とルシフェラーゼ遺伝子を直列に並べ、mdxマウスエクソン23の未熟終止コドンを含む27塩基配列をはさんでつないだデュアルレポーター遺伝子を作り、これをサイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリβ-アクチンハイブリッドプロモーターにつないだコンストラクト (mdxマウスのエクソン23のPTC前後12mer周辺配列を含む27mer) をマウス受精卵に導入し、Ochre, Amber, Opal (TAA, TAG, TGA) の3種類のPTCをそれぞれ含む3系統のTgマウスを構築した。作出されたTgマウス全身切片のX-gal染色では、横隔膜を含む骨格筋や心筋での強い発現を確認しており、通常はβガラクトシダーゼのみを翻訳するが、リードスルーが起きるとルシフェラーゼも翻訳され、ルシフェリン-ガラクトシダーゼとルシフェリンを用いてルミノメータにより測定することで、両酵素活性の比でリードスルー活性を表すことができる。

ネガマイシンのin silico三次元データ解析や、(財)微生物化学研究会にて微生物二次代謝産物として単離された未承認抗生物質群から選定された候補物質をTgマウスに一週間連日皮下投与した。大腿部骨格筋組織抽出液のルシフェラーゼ活性と β -ガラクトシダーゼ活性をルミノメータで定量し、リードスルー活性をルシフェラーゼ活性/ β -ガラクトシダーゼ活性として算出した。リードスルー活性が認められた物質について、その投与方法を検討した。

また新たなリードスルー惹起物質候補を得るため、ネガマイシン分子中に含まれる多くのヘテロ原子およびそのヘテロ原子に結合した活性水素による電子授受に着目したin silico探索を試みた。

リードスルー惹起物質の効果検討

特定したリードスルー惹起薬候補に関し、ジストロフィンタンパク質の蓄積や血清クレアチンキナーゼ活性、自発運動量、握力を指標に機能回復についてmdxマウスを用いて検討した。

また、ジストロフィン遺伝子にTGAのナンセンス変異を有するDMD患者からインフォームドコンセントを得て、筋生検により樹立した筋細胞株を用いて生化学的・免疫組織化学的に薬効を評価した。

リードスルー惹起物質の安全性試験

SPF施設において、ICRマウスに0～500mg/kgの濃度で静脈内、皮下および強制胃内へ単回投与した。経過観察、胸腺・心臓・肺・脾臓・腎臓の臓器重量測定と解剖所見から急性毒性を検討した。同様に、静脈内連続投与を行い、投与期間中(2週間)と投与後(3週間)の経過観察と体重測定、解剖所見と臓器重量測定、血清の生化学分析(22項目;総タンパク質、アルブミン、尿素窒素、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン、アスパラギン酸トランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アルカリフォスファターゼ、乳酸脱水素酵素、アミラーゼ、クレアチンキナーゼ、 γ -グルタミルトランスぺプチターゼ、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、総ビリルビン、グルコース)から、亜急性毒性を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究課題の解決に当たっては、動物実験が必要不可欠かつ唯一の手段であったため動物愛護の観点に配慮しつつ、科学的観点に基づく適正な動物実験を実施した。

「動物の愛護及び管理に関する法律(改正動物愛護管理法)」や「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(飼養保管基準)」の規定と、「厚生労働省の

所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を踏まえ策定された「東京大学動物実験マニュアル」に準拠し、東京大学大学院に設置された動物実験委員会と組み替えDNA実験委員会の指針に従い、承認を得て行われたものである。具体的に目的に適した実験動物種の選定、動物実験成績の精度及び再現性を左右する実験動物の数、遺伝学的及び微生物学的品質並びに飼養条件を考慮した上で動物実験計画を立案し、麻酔使用による苦痛の除去・軽減、実験個体数の削減等を徹底し適切に利用することに配慮した。

C. 研究結果

リードスルー惹起物質の探索

ネガマイシン分子の立体構造に類似した低分子RD2およびRD3は、これまでにリードスルーを惹起することが知られているゲンタマイシンやネガマイシンより高いリードスルー活性を示した。また皮下注射だけでなく、内服によっても活性を示した。

Tgマウスと同様のデュアルレポーターコンストラクトをHeLa細胞に一過的に導入し、培養液にRD2あるいはRD3を加えて48時間培養し、それらのリードスルー活性を測定したところ、容量依存的なリードスルー活性を示した。

微生物二次代謝産物として単離された疑似二糖類IMC2970, IMC2974, AG-402, AG-501, AG-502の5種について、ゲンタマイシンと同程度のリードスルー活性をもつことを確認した。またネガマイシンの化学構造に立脚したバーチャルスクリーニングにより得られた300種の化合物から、50種の化合物を選定し生物活性を調べたところ、VS32およびVS29が顕著な抗菌活性を示した。

リードスルー惹起物質の効果検討

RD2あるいはRD3のmdxマウスへの皮下投与(1mgを3週間連日)により、16~18%の筋線維においてジストロフィンタンパク質の蓄積を認めた。血清クレアチンキナーゼ活性が未投与mdxマウスのそれに比べ有意に低下した。

自発的運動量・握力・等尺性収縮張力を測定することにより、RD1の皮下/強制胃内投与による筋力の回復を評価したところ、対照マウスとほぼ同等のレベルまでの回復が見られた。またナンセンス変異型DMD患者由来培養細胞にRD1を投与したところ、ジストロフィンの発現が僅かに促進されることがウエスタンブロットにより確認された(神戸大)。同様にRD1処理した患者由来培養細胞において、50, 100ug/mLの濃度でジストロフィン陽性の免疫染色像が得られた(東京女子医大)。

リードスルー惹起物質の安全性試験

コンベンショナル施設におけるRD2およびRD3の反復投与（50mg/kg）において、PBS投与の対照マウスに比べ体重変化や血清生化学検査では異常は認められなかった。

SPF施設におけるRD1の単回・反復投与／回復安全性試験では、500mg/kgの濃度まで体重・臓器重量、解剖所見、22項目の血清生化学分析において異常はみられなかった。

D. 考察

RD2（分子量：274）およびRD3（分子量：217）は、リードスルー検出コンストラクトを導入したHeLa細胞の培養系でAtaluren（PTC124、分子量：284）よりも高いリードスルー活性を示し、ヒト由来細胞においても活性を示すことが確認された。mdxマウスにおいても治療効果が認められたことから、両者は患者に負担をかけない経口薬として有望であることがわかった。

ネガマイシンのバーチャルスクリーニングにより得られたVS32およびVS29の構造は、毒性を回避する新しいネガマイシン誘導体創製の可能性を示した。

E. 結論

リードスルー活性検出系となるTgマウスの確立、それらを用いたリードスルー惹起化合物の探索とその投与方法の検討、モデル動物での薬効検証を行った結果、RD2およびRD3については経口投与が可能であること、モデル細胞培養系において顕著なリードスルー活性を認められること、mdxマウスにおいてジストロフィンの回復が見られること等を確認した。また未承認アミノグリコシド系抗生物質群からの新規リードスルー惹起物質の特定は、薬物候補になるだけでなく、擬似三糖・四糖の選択的加水分解や半合成による擬似二糖ライブラリー構築を進めることで毒性を回避する新規ネガマイシン類縁体創製の可能性を開いた。分担研究機関である微化研は長年にわたる経験と独自の微生物資源を有し、腎毒性が軽減されたアミノグリコシドの開発に優れた実績があるため、迅速に候補化合物の可能性を見出すことができる。

リードスルー惹起薬物はナンセンス変異の種類とその周辺配列に対する特異性や副作用が異なることが知られており、候補物質は数多く存在した方が患者にとって有利と考えられるため、今後、RD2やRD3の安全性試験を含む有効性についての詳細な検討を進めながらリードスルー惹起薬物候補物質を可能な限り増やすつもりである。

G. 研究発表

1. 論文発表

Allamand V, Bidou L, Arakawa M, Shiozuka M, Hatin I, Paturneau-Jouas M, Gartioux C, Butler-Browne GS, Mouly V, Rousset JP, Matsuda R, and Guicheney P Antibiotic-mediated readthrough of premature stop codons leads to the stabilization of laminin 2 chain mRNA in congenital muscular dystrophy myotubes. *J. Gene Med.*, 10: 217-224 (2008)

Hayashi Y, Regnier T, Nishiguchi S, Sydnes MO, Hashimoto D, Hasegawa J, Katoh T, Kajimoto T, Shiozuka M, Matsuda R, Noda M, and Kiso Y. Efficient total synthesis of (+)-Negamycin, a potential chemotherapeutic agent for genetic diseases. *Chem. Comm.* 20: 2379-81 (2008)

Shima A and Matsuda R, The Expression of Myogenin, but Not of MyoD, is Temperature-Sensitive in Mouse Skeletal Muscle Cells., *Zool. Sci.* 25 : 1066-1074 (2008)

松田良一, 塩塚政孝 リードスルー療法の最前線, *医学の歩み* 226: 397-401 (2008)

松田良一, 抗生物質とエキソン・スキップによる筋ジストロフィーの治療, *メディカルバイオ* 5: 26-31 (2008)

塩塚政孝, 我妻玲, 松田良一, 筋ジストロフィーの薬物治療ーリードスルー薬物による挑戦ー, *小児科診療* 72: in press (2009)

2. 学会発表

島亜衣, 松田良一, 筋分化制御因子 myogeninの温度依存的発現, 日本動物学会関東支部大会 (2008)

Shima A and Matsuda R, Expression of myogenin, but not of MyoD, is temperature-sensitive in mouse skeletal muscles. 第41回日本発生生物学学会 (2008)

島亜衣, 松田良一, マウス骨格筋における温度依存性分化制御機構, 日本動物学会第79回大会 (2008)

塩塚政孝, 川本忠文, 我妻玲, 嶋田健一, 佐々木博之, 野々村禎昭, 松田良一, ナンセンス変異を無効化する経皮的薬剤投与の評価, 日本動物学会第79回大会 (2008)

島亜衣, 松田良一, マウス骨格筋における
温度依存性分化制御機構, 東京大学生命
科学ネットワークシンポジウム
(2008)

Shiozuka M, Kawamoto T, Wagatsuma
A, Sasaki H, Nonomura Y, and
Matsuda R, Readthrough-inducing
ointment: the new approach for the
treatment of genetic disorders
caused by nonsense mutations.,
The 3rd New directions in biology
and disease of skeletal muscle
meeting (2008)

塩塚政孝, 我妻玲, 松田良一, 筋ジストロ
フィーの薬物治療 -リードスルー薬物
による挑戦-, 第25回小児神経筋疾患
懇話会 (2008)

Shima A and Matsuda R, Mouse
skeletal muscle differentiation is
controlled in a
temperature-dependent manner.,
The American Society for Cell
Biology 48th Annual Meeting (2008)

Shiozuka M, Kawamoto T, Wagatsuma
A, Shimada K, Sasaki H, Nonomura
Y and Matsuda R

Readthrough-inducing ointment: the
new approach for the treatment of
nonsense mutation-mediated

disorders., The American Society
for Cell Biology 48th Annual
Meeting (2008)

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

PCT出願 (PCT/JP2007/063436)

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

リードスルー惹起物質による疾患モデルマウスの機能回復実験
分担研究者 山田茂 東京大学大学院総合文化研究科 准教授

研究要旨

デュシェンヌ型筋ジストロフィーのモデル動物であるmdxマウスを用い、自発的運動量・握力・等尺性収縮張力を測定することにより、リードスルー惹起物質による筋力の回復を評価した。自発運動量と握力測定の結果から、対照マウスとほぼ同等のレベルまでの回復が見られた。

A. 研究目的

筋力低下が見られるジストロフィン欠損マウス（mdxマウス）にリードスルー惹起化合物を投与してジストロフィンを合成させることにより、筋力の回復がin vivoで確認できるかどうか検討することを目的としている。その方法として、自発的運動量測定、握力測定、等尺性収縮張力測定を試みた。

B. 研究方法・C. 研究結果

1. 自発的運動量の測定

筋力低下が見られるジストロフィン欠損マウス（mdxマウス）の自発的運動量を測定するため、回転車輪のついた運動ケージ（シナノ製作所）に1匹毎入れて3日間予備飼育（自発的運動は行わせない）した後、自発的運動を開始させた。mdxマウスの野生型系統であるC57BL/10ScSn（以下B10

とする）マウスを対照マウスとし、運動期間は1ヶ月とした。B10マウス、mdxマウスともに、最初の7日間は1日の走行距離が漸増的に長くなる傾向が見られ、10日目以降は、B10マウスが8,000m/day、mdxマウスが5,000m/day に安定していく傾向が見られた。1日の平均走行距離は、B10マウスが 8352 ± 643 m/day、mdxマウスが 4754 ± 477 m/dayであり、mdxマウスの自発的運動量はB10マウスのおよそ半分であることが明らかになった。

2. 握力測定

小動物用の握力測定装置を参考にして市販のフォースゲージ（日本計測システム株式会社）に縦70mm、横55mmのステンレス製の金網を取り付けたものをマウス握力測定装置として試作した。このフォースゲージは、精度 $\pm 0.2\%$ FS、繰り返し精度： $\pm 0.1\%$ FSで、100N（10kgf）で

0.01N (1gf) の1/10000分解能力をもつ。マウスの握力は、動物を測定用の網上に置き、尾を手で水平に引いた時、動物が引かれた力に耐え切れず掴んだ網を離してしまうまでの最大の力（握力）を測定することができる。

この装置の信頼性を検討するため、1) 測定値の妥当性、2)測定結果の再現性、3) 握力と疲労の関係、4)握力と体重の関係、5)握力と筋変性過程の関係、6)握力とmdxマウスにリードスルー惹起化合物を投与したときの影響について検討した。

1) 測定値の妥当性

B10マウスを用いて握力を測定した。マウスを金網にのせ握力を測り、その後十分に休息を与えた後、測定を繰り返すことを合計5回行い、その平均値をマウス握力として用いた。本研究で試作した装置での測定値は過去の先行研究と比較して同等であるかそれ以上の値を示した。

2) 測定結果の再現性

1日目と2日目に同時刻に握力の測定を行ったところ、1日目と2日目の測定値はほぼ同じであり、再現性を有することが確認された。

3) 握力と疲労の関係

15秒間隔で10回連続握力測定した時の握力の減衰過程を調べたところ、1回目の測定から回数を重ねる毎に徐々に低下傾向を

示し、1回目と10回目と比較すると20-25%の握力低下が見られた。

4) 握力と体重の関係

体重の影響を検討するため、2-8週齢のB10マウスの握力を測定したところ、体重が10g以下であると安定した測定ができなものの、18-20g以上であると安定した測定が行えることが明らかになった。

5) 握力と筋変性過程の関係

B10マウスの前頸骨筋に50 μ Lの50%グリセロールを注射し、筋変性を誘発後、12時間、1、2、3、5、7、14、28日後に握力を測定し、その回復過程を検討した。この筋変性モデルでは、筋細胞の90%がエバンスブルー陽性細胞となり、そのほとんどが壊死することを確認している。再生過程は以下のとおりである。注射直後から5日目までは筋変性および炎症反応が見られ、同時に筋衛星細胞の活性化、分裂が見られる。7-14日目になると多数の再生筋線維ができ、28日目にはほぼ再生が完了する。握力を経時的に測定したところ、筋変性12時間後には対照マウスの50%にまで減少し、14日後までに80-90%回復し、28日後にはほぼ100%回復した。この握力の回復過程は、筋再生過程とほぼ一致していると考えられる。

6) 握力とmdxマウスにリードスルー惹起化合物を投与したときの影響

In silicoスクリーニングによって得られたリードスルー活性惹起化合物をmdxマウスに5週間皮下投与し、握力の変化を検討した。mdxマウスの握力はB10マウスの70%程度であるが、薬物投与によりB10マウスレベルにほぼ回復した。これらの結果から、本研究で試作した小動物用握力測定装置は、再現性を有し、リードスルー活性惹起化合物の薬理効果を検討することができると考えられる。

3. 等尺性収縮張力の測定

リードスルー活性惹起化合物を投与したときのmdxマウスの筋力の回復状態を評価するために、自発的運動量や握力だけでなく、等尺性収縮張力の測定も試みている。mdxマウスに麻酔をかけ、膝関節を固定し、下腿部分の皮膚を切開してアキレス腱を露出させ、それをフォースゲージ（日本計測システム株式会社）と結合させた。腓腹筋表面に電極を取り付け、診断用神経筋電気刺激装置（日本光電工業株式会社）により電気刺激を行った。測定に際し、最大等尺性収縮張力が得られるように、筋長や刺激電圧量を調整した。等尺性収縮張力は、筋横断面積（筋重量、筋長、密度 $1.06\text{mg}/\text{mm}^{-3}$ より算出）により標準化した。

（倫理面への配慮）

本動物実験は東京大学動物実験マニュアルに準拠し、動物実験委員会の指針に従い、承認を得て行われたものである。

D. 考察・E. 結論

今後他のリードスルー惹起物質の筋力回復評価を行うと同時に、投与法の改善・長期投与による機能回復の詳細を検討するつもりである。

G. 研究発表

1. 論文発表

山田茂. 有酸素運動とアンチエイジング PP. 280-283. 日本抗加齢医学会・専門医・指導士認定委員会 編集 アンチエイジング医学の基礎と臨床. (株) メジカルビュー社 2008.

山田茂. レジスタンストレーニングとアンチエイジング PP. 284-287. 日本抗加齢医学会・専門医・指導士認定委員会 編集 アンチエイジング医学の基礎と臨床. (株) メジカルビュー社 2008.

山田茂. 身体トレーニング. 運動生理学からみた身体機能の維持・向上 宮村実晴 編集. 真興交易 (株) 医書出版部 2008.

2. 学会発表

山田茂. 骨格筋肥大に対する幹細胞の役割.

第142回日本体力医学会関東地方会
2008.

Ota A, Morooka H, Yamamoto E,
Yamada S. Fitness Test in Japanese
University. 50th ICHIPER・SD
Anniversary World Congress 2008.

Makanae Y, Yanagimoto A, Ikari T,
Yamada S. The Effect of Mechanical
Stimulation on Decrease of
Subcutaneous Fatty Tissue by
Developed Underwear. 50th
ICHIPER・SD Anniversary World
Congress 2008.

Yamada S, Komazawa J, Makanae Y.
Intercellular Signal Transduction to
Induce Muscle Hypertrophy in
Mouse. 50th ICHIPER・SD
Anniversary World Congress 2008.

山田茂. Lin⁻, CD34⁻, Sca-1⁺, c-Kit⁺細
胞の骨格筋肥大に伴う動態. 東京大学生
命科学研究ネットワークシンポジウム
2008.

Yamada S. The Dynamic State
Accompanying Skeletal Muscle
Hypertrophy of stem cell in blood.
The American Society for Cell
Biology Annual Meeting. 2008.

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

リードスルー惹起物質の安全性試験

分担研究者 池田大四郎 財団法人微生物化学研究会
微生物化学研究センター 副センター長
沼津創薬医科学研究所 所長

研究要旨

SPF施設内において、マウス静脈内、皮下および強制胃内への単回投与安全性試験と静脈内への連続投与安全性試験（投与14日間、経過観察35日間）を行った。その結果、リードスルー惹起物質（RD1）は500mg/kgの濃度まで体重変化や臓器重量、22項目の血清生化学検査において異常は認められなかった。

A. 研究目的

SPF施設内においてマウスに対する急性および亜急性毒性試験を行うことにより、リードスルー惹起薬物候補化合物の投与経路や投与量の最適化、安全性を検証することを目的としている。

14日間経過観察と体重測定を行った。観察終了後、胸腺、心臓、肺、脾臓および腎臓（左右）を摘出し、解剖所見と臓器重量測定を行った。

連続投与毒性試験

最終濃度500, 250, 125, 62.5, 31.5, 0mg/kgとなるよう生理食塩水で溶解したRD1物質0.2mLを、4週齢ICRマウス（♀、日本チャールズリバー）に14日間連日静脈内投与し、投与期間中（n=3）と投与後21日間（n=2）の経過観察と体重測定を行った。観察終了後、胸腺、心臓、肺、脾臓および腎臓（左右）を摘出し、解剖所見と臓器重量測定を行った。また採取した血清の生化学分析を行った。

B. 研究方法

投与実験は全て微生物化学研究センター沼津創薬医科学研究所内のSPF飼育施設内において実施した。

急性毒性試験

最終濃度500, 250, 125, 62.5, 31.5, 0mg/kgとなるよう生理食塩水で溶解したRD1物質0.2mLを、4週齢ICRマウス（♀、日本チャールズリバー）に静脈内、皮下および強制胃内に単回投与し、その後

(倫理面への配慮)

本研究課題の解決に当たっては、動物実験が必要不可欠かつ唯一の手段であったため動物愛護の観点に配慮しつつ、科学的観点に基づく適正な動物実験を実施した。

「微生物化学研究センターにおける動物実験に関する指針」に準拠し、「微生物化学研究センター動物実験委員会規則」に従い、承認を得て行われたものである。具体的に目的に適した実験動物種の選定、動物実験成績の精度及び再現性を左右する実験動物の数、遺伝学的及び微生物学的品質並びに飼養条件を考慮した上で動物実験計画を立案し、麻酔使用による苦痛の除去・軽減、実験個体数の削減等を徹底し適切に利用することに配慮した。施設及び設備における実験動物の飼養・保管・輸送についても必要な方法で適切に維持管理し、適正な動物実験が実施されることに格別の注意を払い監督した。倫理的・法的・社会的問題に関わる全ての指針を遵守することで、研究が適正に推進されるよう十分に配慮した。

C. 研究結果

500mg/kgのマウス静脈内単回投与において肝臓と脾臓の肥大が観察されたが、特に異常は観察されなかった。連続投与時においても経過観察、体重変化、臓器重量お

よび解剖所見で異常はみられなかった。また22項目(総タンパク質、アルブミン、尿素窒素、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン、アスパラギン酸トランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アルカリフォスファターゼ、乳酸脱水素酵素、アミラーゼ、クレアチンキナーゼ、γ-グルタミルトランスペプチターゼ、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、総ビリルビン、グルコース)における血清生化学検査においても異常は認められなかった。

D. 考察, E. 結論

リードスルー惹起物質RD1は単回・連続投与毒性試験において、投与期間中(～500mg/kg, 14日間連続投与)の体重変化や臓器重量、22項目における血清生化学検査においても異常は認められなかったため、薬物候補として有望である。今後これらに加えRD2やRD3, AG-402, -501, -502, IMC-2970, -2974についても、疾患モデルでの有効性の検討を終えた後に安全性試験を行う予定である。これらのことから安全性の高いリードスルー惹起薬物候補物質を可能な限り増やし、前臨床のProof-of-Conceptを確立するつもりである。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Allamand V, Bidou L, Arakawa M, Floquet C, Shiozuka M, Paturneau-Jouas M, Gartioux C, Butler-Browne GS, Mouly V, Rousset JP, Matsuda R, Ikeda D and Guicheney P. Drug-induced readthrough of premature stop codons leads to the stabilization of laminin $\alpha 2$ chain mRNA in CMD myotubes. *J. Gene Med.*, 2008,10, 217-24.
- Kawada M, Inoue H, Arakawa M and Ikeda D. Transforming growth factor- β I modulates tumor-stromal cell interactions of prostate cancer through insulin-like growth factor-I. *Anticancer Res.*, 2008, 28, 721-730.
- Arakawa M, Someno T, Kawada M and Ikeda D. A new terrein glucoside, a novel inhibitor of angiogenin secretion in tumor angiogenesis. *J. Antibiotics*, 2008, 61, 442-448.
- Kawada M, Inoue H, Usami I and Ikeda D. Phthoxazolin A inhibits prostate cancer growth by modulating tumor-stromal cell interactions. *Cancer Sci.*, 2009, 100, 150-157.
- Momose I, Kunimoto S, Osono M and Ikeda D. Inhibitors of insulin-like growth factor-1 receptor tyrosine kinase are preferentially cytotoxic to nutrient-deprived pancreatic cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2009, 380, 171-176.
- Inoue H, Someno T, Kato T, Kumagai H, Kawada M and Ikeda D. Ceramidastin, a novel bacterial ceramidase inhibitor, produced by *Penicillium* sp. Mer-f17067. *J. Antibiotics*, 2009, 62, 63-67.

2. 学会発表

山崎洋子、増田 徹、川田 学、百瀬功、池田大四郎 Tryptoquivalinによるアンドロゲン依存性前立腺癌の増殖阻害効果 日本癌学会 (2008)

川田 学、荒川正行、池田大四郎 新規 angiogenin分泌阻害物質terrein glucosideによる血管内皮細胞の管腔形成阻害 日本癌学会 (2008)

Kawada M, Inoue H, Momose I, Masuda T, Ikeda D. Leucinostatin suppress prostate cancer cell growth through the tumor-stromal cell interactions. 20th EORTC-NCI-AACR Symposium on

"Molecular Targets and Cancer Therapeutics" (2008)

Momose I, Tatsuda D, Kawada M, Ikeda D. Inhibitors of mitochondrial ATP synthesis show preferential cytotoxicity to pancreatic cancer cells under glucose-deprived conditions. 20th EORTC-NCI-AACR Symposium on "Molecular Targets and Cancer Therapeutics" (2008)

Watanabe T, Momose I, Abe H, Iijima M, Sawa R, Umezawa Y, Ikeda D, Takahashi Y, Akamatsu Y. Syntheses of boronic acid derivatives of tyropeptin, a proteasome inhibitor. XXth International Symposium on Medicinal Chemistry (2008)

川田 学、井上裕幸、池田大四郎 癌-間質相互作用を介したLeucinostatinによる前立腺癌の抑制 第17回日本がん転移学会学術集会 (2008)

百瀬 功、立田大輔、池田大四郎 エネルギー代謝阻害剤による栄養飢餓選択的細胞毒性第12回がん分子標的治療研究会総会

川田 学、増田 徹、池田大四郎 Leucinostatinによる癌-間質相互作用

を介した前立腺癌の増殖抑制第12回がん分子標的治療研究会総会 (2008)

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

アミノグリコシド系抗生物質とネガマイシン類からの
リードスルー治療薬の探索

分担研究者 高橋良和 財団法人微生物化学研究会
微生物化学研究センター 副センター長

研究要旨

アミノグリコシド系抗生物質は擬似二、三、四糖類があるが天然物由来および半合成の擬似二糖類に集約し研究を進めた。ネガマイシンの化学構造に立脚したバーチャルスクリーニングにより得られた300種の候補化合物から、さらに50種の化合物を選定し、生物活性を調べた。

A. 研究目的

アミノグリコシド系抗生物質群およびネガマイシン類から筋ジストロフィー治療薬を創製すること。

B. 研究方法

当該主任研究者らの作成した β ガラクトシダーゼとルシフェラーゼを未熟終止コドンで連結させた遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを用いたリードスルー活性測定法を用いアミノグリコシド系抗生物質の評価を継続した。アミノグリコシド系抗生物質を遺伝子疾患治療薬として考えた場合、最も大きな障害は毒性となることが予想される。アミノグリコシド系抗生物質の毒性はほぼそのアミノ基の数に比例することから擬似二糖

に集約し筋ジストロフィーマウスを用いた評価を行う。

ネガマイシンは発見された当時、グラム陰性菌に特異的に活性を示したことから臨床研究が行われた化合物である。しかし、体内で代謝分解される物質が毒性を示したことからその開発は断念された。従ってこの点を回避した化合物を創製できれば遺伝子疾患治療薬あるいは抗菌剤として、再度、臨床の場に乗せられる。バーチャルスクリーニングにより得られた50種の化合物について、抗菌活性を1次評価として絞込み、筋ジストロフィーマウスを用いた評価を行う。

C. 研究結果

トランスジェニックマウスを用いた評価