

200935019A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 松田 良一

平成22 (2010) 年 5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21年度には以下の研究成果を得たので報告する。

新規リードスルー惹起物質#4は、リードスルー活性検出コンストラクトを導入したHeLa細胞培養系やREADマウスにおいて容量依存的な顕著なリードスルー活性を示し、経口投与においても活性を確認した。またmdxマウスに3週間以上連日投与することで、筋線維でのジストロフィン蓄積や血清クレアチンキナーゼ活性の低下、筋機能改善等を確認し一定の治療効果が認められた。また単回・反復投与/回復安全性試験において良好な結果を得た。

アミノグリコシド系抗生物質やネガマイシン誘導体からもリードスルー誘起活性をもつ薬物候補を特定し、mdxマウスに投与することで筋線維でのジストロフィン蓄積や血清クレアチンキナーゼ活性の低下を確認した。アミノグリコシド系抗生物質A、ネガマイシン誘導体N3の評価により、毒性を回避する新規誘導体創製の可能性を開いた。

本研究実施にあたり、平成21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22年5月24日 研究代表者 松田良一（東京大学大学院総合文化研究科）
交付額平成21年度 20,000千円（直接研究費のみ）

様式A (7)

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

平成22年5月24日

厚生労働大臣 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



(所属研究機関 東京大学)

平成21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 20,000,000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

.....11

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

.....15

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

.....19

研究成果による特許権等の知的財産権の出願状況

.....20

IV. 研究成果の刊行物・別刷

.....21

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

研究代表者 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、READマウス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ネガマイシン類似物質、ネガマイシン誘導体、アミノグリコシド系抗生物質を評価した。特定したリードスルー惹起薬物候補のうち#4とN3について疾患モデル動物での薬効の検証を行い、#4について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）

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（READマウス）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）であるためイムノブ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READマウスを構築した。作出されたREAD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、さらに合成ネガマイシン誘導体をREAD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。

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物候補に関し、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、筋力（握力、等尺性収縮張力、単収縮張力、強縮張力、疲労度）を指標に機能回復についてmdxマウスを用いて検討した。

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の濃度で腹腔内、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、腹腔内連続投与を行い、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#4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。

READ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#4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、用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からの探索において、ゲンタマイシンと同等以上のリードスルー活性を示し、体内動態特性が良く、重篤な副作用をもたないアミノグリコシド系抗生物質を数種特定した。またネガマイシン関連物質VS32は顕著な抗菌活性をもち、ゲンタマイシンと同程度のリードスルー活性を示した。

ネガマイシン誘導体25種を合成し評価したところ、ゲンタマイシンと同程度の活性をもつN3を特定した。

カナマイシン類縁体の探索から、アミノグリコシド系抗生物質誘導体数種にリードスルー活性を見出した。

リードスルー惹起物質の効果検討

新規リードスルー惹起化合物#4やネガマイシン誘導体N3のmdxマウスへの皮下投与(1mgを3~4週間連日)により、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。

アミノグリコシド系抗生物質Aのmdxマウスへの腹腔内投与により、血清クレアチンキナーゼ活性の低下とジストロフィンタンパク質の蓄積を確認した。また、握力・等尺性収縮張力・単収縮張力・強縮張力・疲労度を測定したところ、筋力の回復が見られた。

リードスルー惹起物質の安全性試験

SPF施設における#4の単回投与安全性試験では、500mg/kgの濃度まで腹腔内、皮下および強制胃内投与において問題は無く、反復投与/回復安全性試験では、膀胱に試料不溶物の沈着が見られた以外は250mg/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

#4はmdxマウスにおいても治療効果が認められたことから、患者様に負担をかけない経口薬候補として有望であることがわかった。

N3やVS32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READ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、SPF施設での安全性試験を行った結果、#4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や血清クレアチンキナーゼ活性の低下が見られること等を確認し、250mg/kg/dayの2週間連続投与による亜急性毒性試験においても良好な結果を得た。またネガマイシン誘導体N3やアミノグリコシド系抗生物質Aもmdxマウス骨格筋にジストロフィンタンパク質を回復させたことから、更なる構造活性相関研究を実施することで、より臨床現場に近い薬物候補の提案が期待できる。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、今回特定した薬物候補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

Shiozuka M, Wagatsuma A, Kawamoto T, Sasaki H, Shimada K, Takahashi Y, Nonomura Y, and Matsuda R. Transdermal delivery of a readthrough-inducing drug: a new approach of gentamicin administration for the treatment of nonsense mutation-mediated disorders. *J. Biochem.* 147: 463-470 (2010)

Kikkawa N, Ohno T, Nagata Y, Shiozuka M, Kogure T, and Matsuda R. Ectopic calcification is caused by elevated levels of serum

inorganic phosphate in mdx mice.
Cell Struc. Func., 34: 77-88 (2009)

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-, 小児科診療 72: 763 (2009)

2. 学会発表

Shima A and Matsuda R, Low temperature-induced inhibition of myogenic differentiation is cancelled by IGF-I and vitamin C. 14th International Congress of the World Muscle Society (2009)

島垂衣, 松田良一, IGF-IとビタミンCは低温におけるマウス骨格筋細胞の分化を回復させる, 日本動物学会第80回大会 (2009)

吉川奈美子, 大野智久, 長田洋輔, 塩塚政孝, 松田良一, 高濃度リン酸培養は骨格筋細胞に骨分化を誘導する, 日本動物学会第80回大会 (2009)

長田洋輔, 本田悠介, 松田良一, 筋衛星細胞のモデルであるリザーブ細胞培養系を用いた筋衛星細胞活性化の研究, 日本動物学会第80回大会 (2009)

島垂衣, ER Burton, HL Sweeney, 松田良一, ビタミンCとIGF-Iは低温におけるマウス骨格筋細胞分化を回復させる, 第32回日本分子生物学会 (2009)

Shiozuka M, Wagatsuma A, Kawamoto T, Sasaki H, Shimada K, Takahashi Y, Nonomura Y, and Matsuda R. Transdermal delivery of a readthrough-inducing drug. The American Society for Cell Biology 49th Annual Meeting (2009)

吉川奈美子, 松田良一, 小暮敏博, 塩塚政孝, Mdxマウス骨格筋の異所的石灰化, 東京大学生命科学シンポジウム (2010)

島垂衣, ER Burton, HL Sweeney, 松田良一, ビタミンCとIGF-Iは低温におけるマウス骨格筋細胞分化を回復させる, 東京大学生命科学シンポジウム (2010)

塩塚政孝, 我妻玲, 川本忠文, 佐々木博之, 野々村禎昭, 松田良一, 皮膚外用剤を用いたナンセンス変異型遺伝性疾患の新しい治療法, 東京大学生命科学シンポジウム (2010)

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

「ナンセンス変異型疾患の治療方法」
PCT出願 (PCT/JP2007/063436)

「リードスルー誘導剤，及びナンセンス変
異型遺伝性疾患治療薬」特願2010-021817

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

研究分担者 山田茂 東京大学大学院総合文化研究科 准教授

研究要旨

デュシャンヌ型筋ジストロフィーモデルのモデル動物であるmdxマウスを用いて、握力及び等尺性収縮による張力測定を行うことによって、リードスルー惹起物質による筋力の回復レベルを評価した。2-4週間にわたるリードスルー惹起物質の連続投与により、mdxマウスの握力および等尺性収縮による張力に回復傾向が認められ、筋疲労耐性も向上した。

A. 研究目的

筋力低下がみられるジストロフィン欠損マウス（以下mdxマウスとする）にリードスルー惹起物質を投与することによるジストロフィンタンパク質の発現と筋力の回復の関係を生体内で検討するために、握力測定および等尺性収縮による張力測定を行った。

B. 研究方法

リードスルー惹起物質の投与

雄性mdxマウスにリードスルー惹起物質を2-4週間連続して腹腔内投与した。なお、対照動物としてmdxマウスの野生型系統であるC57BL/10ScSn（以下B10マウスとする）マウスを用いた。動物実験の施行にあたっては、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」（文部

科学省告示第71号）、および日本学術会議によりまとめられた「実験動物の適正な実施に向けたガイドライン」を遵守した。

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70 mm、横55 mmのステンレス製の金網を取り付けたものを試作した。このフォースゲージは、精度 $\pm 0.2\%FS$ 、繰り返し精度： $\pm 0.1\%FS$ 、最大100N（10kgf）測定可能で、0.01 N（1gf）の1/10000分解能力をもち、ピーク測定が可能である。マウスの握力測定は以下の通りである。マウスを測定用の網の上に置き、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。実際の握力測定は、2分間のインター

バルを挟みながら、5回測定を行い、その平均値を算出した。なお、測定された握力は体重で除することにより標準化した。

等尺性収縮による張力測定

等尺性収縮による張力測定は、パーソナルコンピューター、AD/DAコンバーター、電極、フォースゲージにより構成される等尺性収縮張力測定システムにより行った。ネブタール麻酔下でマウス下腿三頭筋を剖出し、下腿三頭筋の長さを測定した。次に、アキレス腱を踵骨部で切り離して木綿糸で縛り、フォースゲージに装着した。同時に電気刺激用の白金電極1本を膝の位置に挿入した。なお、下腿三頭筋表面の乾燥を防ぐために、表面を生理食塩水で塗布した。

単収縮張力測定

単発電気刺激で発生した、単収縮張力が最大になるように、刺激電圧の大きさ(0~20V)と筋長を調節した。なお、筋長の測定はマイクロメーターで行った。

強収縮張力測定

最大単収縮張力を示す刺激電圧(0.5ms幅の短矩形波)の大きさと筋の長さで、振動数80~100Hz、200msバーストで行った。なお、発揮張力は、筋横断面積(筋重量、筋長、密度 $1.06 \text{ mg}\cdot\text{mm}^{-3}$ より算出)により標準化した。

筋疲労/回復力測定

筋疲労測定は、強収縮力測定条件で、刺激バーストを繰り返し行った(例えば150回の繰り返し)。筋回復力測定は、筋疲労測定後、安静時間を挟んだのち再び筋疲労測定を行い、収縮張力の回復の割合を求めた。

C. 研究結果

mdxマウスにリードスルー惹起物質を2週間連続して腹腔投与してもB10マウスおよび生理的食塩水を投与したmdxマウスと比較して体重に変化は認められなかった。また、飼育ケージ内での活動量や情動行動に特に異常は認められなかった。握力測定を行った結果、mdxマウスの握力はB10マウスの握力よりも25%低下しているのに対し、リードスルー惹起物質を投与したmdxマウスの握力の低下率は13%であった。mdxマウスにリードスルー惹起物質を4週間連続して腹腔内投与して、等尺性収縮による張力測定を行った結果、単収縮張力、強収縮張力、筋疲労耐性はいずれも回復傾向が認められた。

D. 考察

本研究は、ジストロフィン欠損マウスにリードスルー惹起物質の連続投与を行い、筋力の回復が認められるか否か検討した結果、握力や等尺性収縮による張力、筋疲労

耐性いずれも回復傾向が認められた。これは、リードスルー惹起物質が、ジストロフィンタンパク質の発現を誘導することにより日常活動での筋収縮による筋損傷を軽減し、過剰な炎症反応が抑制され、正常な筋線維が多数存在しているからと推測される。このことは、リードスルー惹起物質を投与されたmdxマウスの筋線維径に大小不同が比較的少なく、結合組織量も少ない傾向が認められる結果と一致する。今後、ヒラメ筋、腓腹筋、前脛骨筋、長指伸筋等に対するリードスルー効果を筋機能の改善という観点からさらに検討する。

E. 結論

2-4週間にわたるリードスルー惹起物質の連続投与により、mdxマウスの握力や等尺性収縮による張力、筋疲労耐性に回復傾向が認められた。

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

研究分担者 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、マウス腹腔内、皮下および強制胃内への単回投与安全性試験と腹腔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（#4）は急性毒性試験においては500mg/kg、亜急性毒性試験においては250mg/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。

および強制胃内に単回投与し、その後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

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#4物質0.2mLを、4週齢ICRマウス（♀、日本チャールズリバー）に腹腔内、皮下お

最終濃度250, 125, 62.5, 0mg/kgとなるよう生理食塩水で溶解した#4物質0.2mLを、4週齢ICRマウス（♀、日本チャールズリバー）に14日間連日腹腔内投与し、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。

(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

250mg/kgのマウス腹腔内連続14日間投与において脾臓に試料不溶物の沈着が観察

されたが、経過観察、体重変化、臓器重量および解剖所見で特に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)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#4は単回投与毒性試験において、500mg/kgの濃度まで異常を認めず、重急性毒性試験において、投与期間中(～250mg/kg, 14日間連続投与)とその後の回復期間(21日間)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。今後これらに加え当該研究代表者らが特定した新規リードスルー誘起物質についても、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

M. Iijima, I. Momose, D. Ikeda. TP-110, a new proteasome inhibitor, down-regulates IAPs in human multiple myeloma cells. *Anticancer Res.* 29: 977-985 (2009)

H. Inoue, T. Someno, T. kato, H. Kumagai, M. Kawada & D. Ikeda. Ceramidastin, a novel bacterial ceramidase inhibitor, produced by *Penicillium* sp. Mer-f17067. *J. Antibiotics* 62: 63-67 (2009)

M. Kawada, I. Momose, T. Someno, G. Tsujiuchi & D. Ikeda. New atpenins, NBRI23477 A and B, inhibit growth of human prostate cancer cells. *J. Antibiotics* 62: 243-246 (2009)

M. Kawada, H. Inoue, I. Usami & D. Ikeda. Phthoxazolin A inhibits prostate cancer growth by modulating tumor-stromal cell interactions. *Cancer Sci.* 100: 150-157 (2009)

I. Momose, S. Kunimoto, M. Osono & D. Ikeda. Inhibitors of insulin-like growth factor-1 receptor tyrosine

kinase are preferentially cytotoxic to nutrient-deprived pancreatic cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380: 171-176 (2009)

T. Watanabe, I. Momose, M. Abe, H. Abe, R. Sawa, Y. Umezawa, D. Ikeda, Y. Takahashi & Y. Akamatsu. Synthesis of boronic acid derivatives of tyropeptin: Proteasome inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19: 2343-2345 (2009)

M. Kawada, H. Inoue, S. Ohba, T. Masuda, I. Momose & D. Ikeda. Leucinostatin A inhibits prostate cancer growth through reduction of insulin-like growth factor-I expression in prostate stromal cells. *Int. J. Cancer* 126: 810-818 (2010)

2. 学会発表

Kawada Manabu, Arakawa Masayuki, Momose Isao, Someno Tetsuya, Ikeda Daishiro. Small molecule modulators of tumor-stromal cell interactions, new natural compounds from fungi. 21st AACR-NCI-EORTC International Conference Molecular Targets and Cancer Therapeutics (2009)

和田俊一, 川田 学, 池田大四郎, 宇佐美伊保美, 井上裕幸, 大庭俊一, 梅沢洋二, 染野哲也 Protein phosphatase 2A特異的阻害物質rubratoin Aによるがん転移の抑制 第68回日本癌学会学術総会(2009)

百瀬 功, 立田大輔, 増田 徹, 池田大四郎 プロテアソーム分解性蛍光タンパク質を用いた腫瘍内プロテアソーム阻害活性のin vivoイメージング 第68回日本癌学会学術総会(2009)

川田 学, 井上裕幸, 増田 徹, 池田大四郎 胃癌—間質相互作用に関わるがん分子標的の解析 第68回日本癌学会学術総会(2009)

荒川正行, 川田 学, 池田大四郎 高造腫瘍性ヒト前立腺癌LNCaP-CRのIFN- γ 耐性機構 第13回日本がん分子標的治療学会学術集会(2009)

和田俊一, 川田 学, 大庭俊一, 宇佐美伊保美, 井上裕幸, 梅沢洋二, 染野哲也, 池田大四郎 Rubratoin AによるPP2A特異的阻害作用とがん転移抑制作用 第13回日本がん分子標的治療学会学術集会(2009)

山崎洋子, 増田 徹, 川田 学, 百瀬功, 池田大四郎 Tryptequivalineによる前立腺癌アンドロゲン依存増殖の阻害作用とその機序 第13回日本

がん分子標的治療学会学術集会(2009)

百瀬 功, 立田大輔, 大庭俊一, 増田 徹, 池田大四郎 プロテアソーム分解性蛍光タンパク質を用いた腫瘍内プロテアソーム阻害活性のin vivoイメージング 第13回日本がん分子標的治療学会学術集会(2009)

川田 学, 井上裕幸, 増田 徹, 池田大四郎 胃癌—間質相互作用におけるがん分子標的の解析 第13回日本がん分子標的治療学会学術集会(2009)

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

研究分担者 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

引き続きアミノグリコシド系抗生物質群にリードスルー治療薬としての可能性を追求した。当研究会において以前抗菌活性をターゲットとして誘導体研究がなされたカナマイシン誘導体の中から含フッ素誘導体、ヒドロキシアミノブチリル（HABA）誘導体等に的を絞り検討した。HABA誘導体であり現在臨床現場で使用されている薬剤Aにゲンタマイシンと同等以上のリードスルー活性を見出した。

他方、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候補化合物に関し、300種の化合物より抗菌活性を持つ2種の化合物まで絞り込んだ。一方の化合物は二次評価に値する化合物であった。

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。

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。

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

C. 研究結果

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、最も大きな障害は腎毒性を始めとする種々の毒性である。カナマイシン誘導体の中で含フッ素誘導体およびヒドロキシアミノブチリル（H

A B A) 誘導体は抗菌活性を維持し且つその毒性を軽減させるべく当研究所において誘導体研究がなされた化合物群である。今回はこれらを一次および二次評価した。特にH A B A 誘導体において現在臨床現場で使用されている薬剤Aにゲンタマイシンと同等以上の活性を見出した。さらに、H A B A 誘導体であり、薬剤Aより毒性が軽微であるとされているアミカシンについても評価したが薬剤A、ゲンタマイシンには及ばなかった。

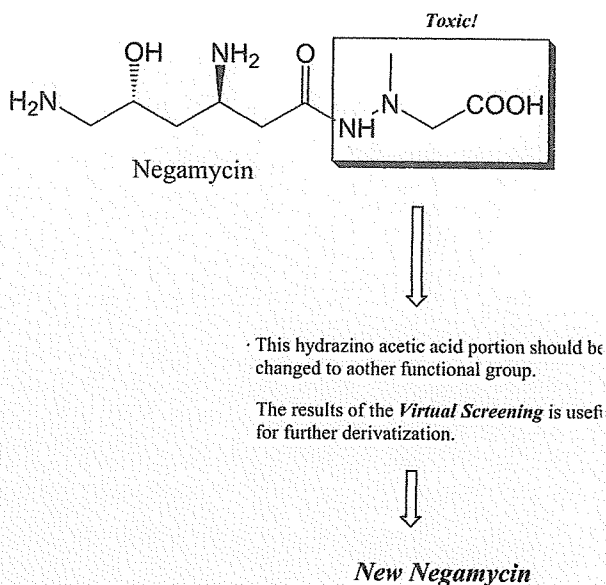
ネガマイシンに関してもアミノグリコシド系抗生物質と同様にその毒性が問題である。その毒性は代謝分解される物質によることが示唆されている。今回、ネガマイシンの化学構造に立脚したバーチャルスクリーニングにより得られた化合物中、抗菌活性を持つ物質は2化合物であり、その一方の化合物は二次評価に値する化合物であることが分かった。

D. 考察

アミノグリコシド系抗生物質についてはH A B A 誘導体にその可能性があることが分かった。一方、H A B A 誘導体であってもアミカシンはゲンタマイシンに及ばないことも明らかとなり、各種H A B A 誘導体を用いて、さらに詳細な構造活性相関研究が必要であることが示唆され

た。

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として、再度、臨床の場に乘せられる。今回、バーチャルスクリーニングにより得た化合物は毒性に関与する部分構造を全く持っていないことから新規ネガマイシン誘導体創製に繋がると考える。



E. 結論

アミノグリコシド系抗生物質に関してはさらなる構造活性相関研究を実施し、より臨床現場に近い一化合物を提案できると考える。