

2022年度 北陸大学特別研究助成【 連携研究 】報告書 -最終-

代表者	所属	薬学部	職位	教授	氏名	高橋 達雄
-----	----	-----	----	----	----	-------

研究課題名	フレイルの予防と改善を目指したフラバノン誘導体を基盤とする創薬研究
-------	-----------------------------------

交付額	8,500,000	円
-----	-----------	---

研究成果の概要

日本では現在75歳以上の後期高齢者における要介護者等の割合が30%を超えており、超高齢社会を迎えた現在において、要介護者等の増加は社会的にも個人レベルでも深刻な問題となっている。健康長寿社会の実現のためには健康寿命を延伸し、要介護者等を減らすことが必要不可欠である。フレイルは、要支援・要介護状態に至る前段階（未病）として位置づけられており、フレイルの予防・改善を行うことで健康長寿社会の実現を目指す。本研究では、フレイルと密接に関係する変形性関節症（OA）、骨粗鬆症、サルコペニア、感染症、認知機能障害に焦点を当て、天然物にも含まれるフラバノン誘導体を用い、それぞれの病態に対して予防・改善効果を有する化合物の創出を目的とする。

1. 変形性関節症

OAは、加齢などの要因により関節軟骨の摩耗・変性が起こり、歩行障害や関節変形を呈し、日常生活に支障をきたす疾患である。甘草に含まれるフラバノン誘導体liquiritigeninは、エストロゲン受容体（ER）を介してPI3K/Akt経路およびERKを活性化することにより軟骨細胞の増殖を促進し、その結果、軟骨基質の産生を増加させることを明らかとした。また、OAモデルマウスに高用量（30 mg/kg）のliquiritigeninを投与することにより、OAモデルマウスの関節病変が改善された。

2. 骨粗鬆症

骨粗鬆症は、骨量の減少とそれに伴う骨強度の低下を特徴とする疾患であり、要介護の原因となる大腿骨近位部骨折をきたす。カラケツメイに含まれるフラバノン誘導体butinは、骨芽前駆細胞においてWnt非依存的にβ-cateninを増加させ、骨芽細胞への分化を促進させることを明らかとした。骨粗鬆症モデルマウスにbutinを投与すると、骨芽細胞の増加とそれに伴う骨量の増加を認めたことから、骨粗鬆症に対する予防・改善効果を立証することができた。

3. サルコペニア

サルコペニアは加齢に伴い筋量や筋力が低下した状態であり、フレイルの要因の一つである。合成フラバノン誘導体であるAB044は、筋芽細胞においてWnt非依存的にリン酸化GSK3を減少させ、β-cateninの分解を抑制することによって骨格筋への分化・融合を促進することを明らかとした。不活動性筋萎縮マウスではヒラメ筋の重量が低下したが、AB044を投与するとβ-catenin増加に伴ってヒラメ筋重量の低下が有意に抑えられた。

4. 感染症

高齢者のフレイル危険因子のひとつに視力低下がある。ヘルペスウイルスは様々な眼疾患を引き起こすが、中でも急性網膜壊死（ARN）は失明率が高い。そこで、網膜におけるウイルス増殖を抑制するフラバノン類をスクリーニングするために、単純ヘルペスウイルス1型（HSV-1）および水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）をヒト網膜色素上皮細胞株ARPE-19に感染させ、本学で合成された33種類のフラバノン誘導体およびカルコン誘導体について検討した。その結果、RO-016、AB-043、AB-045の3種類が抗ウイルス作用を示した（IC50値：8.4～25.2 μM）。

5. 認知機能障害

要介護者等について、介護が必要になった主な原因について見ると、「認知症」が18.1%と最も多い。数種類の合成フラバノン誘導体およびスチルベン誘導体について、神経系株細胞（Neuro2a細胞）に対する神経栄養因子様作用（神経分化誘導作用と神経細胞保護作用）を試験した。フラバノン誘導体ではAB-055-6に、スチルベン誘導体ではMM-027に非常に強い神経突起誘導作用（＝神経分化誘導作用）が見いだされ、いずれもNOを介した作用であることが示唆された。さらにMM-027による神経突起伸展はNO-cGMP-PKG経路を介することが明らかになった。また、AB-055-6については神経突起伸展作用だけではなく、小胞体ストレスによる細胞死に対して防御作用も示す傾向が認められた。

6. フラバノンおよびカルコンの分析法

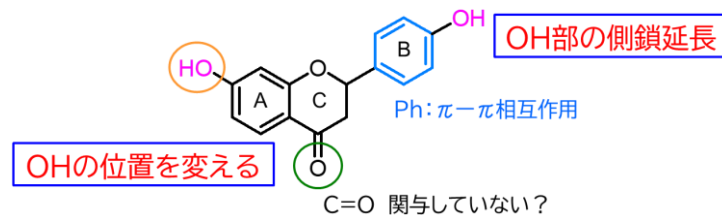
フラバノンbutinおよびカルコンbuteinについて、合成、分光特性の評価、異性体分離（互変異性体および光学異性体）およびHPLC定量法について成果を得た。また、フラバノンliquiritigeninとカルコンisoliquiritigeninの合成と互変異性体における安定性の評価をHPLC分析により行った。

研究成果

①研究成果の学術的意義および社会的意義

1. ロコモティブシンドローム（変形性関節症、骨粗鬆症、サルコペニア）

現在、変形性関節症（OA）には有効な治療薬がなく、liquiritigeninはOAの治療薬もしくはそのリード化合物になり得る。Docking解析の結果からも裏付けられるように、liquiritigeninの標的分子がエストロゲン受容体（ER） α であることも明らかとしており、ER α がOA治療の標的となることを新たに発見した。さらに、Docking解析により、liquiritigeninのA環とB環の水酸基がER α のGly521、His524、Arg394、Glu353と水素結合、Arg394、Glu353付近のH₂Oと水素結合、Phe404と π - π 相互作用することが確認された（図）。これらの結果より、より活性の高いフラバノン誘導体の創出を目指し、複数のフラバノン誘導体を合成して構造活性相関を得た。



OAと同様にサルコペニアにも有効な治療薬がなく、AB044がサルコペニアの予防・治療に有効な化合物となり得る。AB044は、筋芽細胞の β -cateninを増加させることによって筋芽細胞の融合を促進し、筋線維の形成を促進することを明らかにした。筋芽細胞から骨格筋への分化における β -cateninの役割は不明な点が多いが、本研究の成果は β -cateninが骨格筋分化の後期ステージである融合を促進するという新たな知見を提供する。

骨粗鬆症の治療薬は多くのもが上市されているが、骨芽細胞の機能を亢進させるものは数少ない。Butinは他の骨粗鬆症治療薬とは違い、生体において破骨細胞の機能に影響を与えず、骨芽細胞の機能を亢進させることから、破骨細胞の機能を抑制することに起因する副作用（非定型骨折、低カルシウム血症）のリスクも少ない。また、butinは経口投与可能であることも大きな利点であり、上記の特徴を有した骨粗鬆症治療薬がないため、新規骨粗鬆症治療薬としての新規性と優位性があると考えられる。

2. 感染症

ARNは進行が速い上に抗ヘルペスウイルス薬のアシクロビル（ACV）が効きにくいことで知られる。また近年発症率が上昇しているため、現在の低い治療効果を改善することは急務といえる。今回用いたARPE-19細胞は、生体を反映してかACVの効きが悪く（IC₅₀値：4.7～17.2 μ M）、抗ウイルス作用を示した化合物（RO-016、AB-043、AB-045）もIC₅₀値は高めであったことから、単体投与による治療効果はおそらく期待できない。今後ACVとの併用による相乗効果を検討することで、実用化の可能性を探っていきたい。

3. 認知機能障害

これまで探索してきた神経栄養因子様作用を有する化合物は20 μ Mで最大活性を示していたが、本研究で試験したフラバノン誘導体およびスチルベン誘導体は非常に低濃度（1 μ M未満）でより強い活性を示した。これは、これら誘導体が認知機能障害の予防・改善を目指した創薬への期待を高めるものであると同時に、神経細胞に直接作用して効果を表すものとしての新規性も期待される。

4. フラバノンおよびカルコンの分析法

フラボノイド類は古くから研究されてきた植物由来の物質であり、健康食品への応用などが期待され、実際にすでに上市されているサプリメント類などもある。そのため、基本的な物性などはすでに知られているものが多い。本研究では、マイナーフラボノイドとされていたbutinとbutein、また古くから研究されているliquiritigeninとisoliquiritigeninの基本物性を明らかにして、新たな知見を得ることができた。本研究の成果は、医薬品・健康食品開発における安定性の評価など応用研究に欠かせない基礎データを提供することが可能となる。

②研究成果の展開および社会への還元

本研究の成果は、健康食品としての社会実装を目指す。そのためには、科学的なエビデンスが備わった有効性の立証並びに安全性の担保が不可欠である。本研究で得られた知見を基に論文発表や学会発表を通じて研究成果を社会へ発信し、社会実装に向けて官公庁および企業と協働して製品の開発を目指す。

Liquiritigeninは、その配糖体（liquiritin）が「甘草」に含まれており、リクイリチンを含有する甘草抽出物の製品化を目指している。宏輝株式会社は甘草関連化合物の製造と輸入を行っている企業であり、宏輝株式会社の協力のもとliquiritinを高濃度で含む甘草抽出物を得る。社会への流通を目指し、雪印メグミルクのグループ会社であるアミノアップ株式会社と秘密保持契約を締結した。

Butinは、野辺地町の特産品でもある「カワラケツメイ」に含まれており、野辺地町からの委託を受け、butinの骨粗鬆症に対する有効性と分析を行った。野辺地町で市民講座を開催し、研究成果および活用アドバイスを発信した。また、本研究の成果はHP「のへじまち観光公式ガイド」にも掲載されており、カワラケツメイおよびカワラケツメイを含む商品に付加価値をつけて町内事業者の販売意欲および稼ぐ力の向上を図るなど、製品の開発に向けた取り組みを行っている。

主な発表論文等

外部資金

1. 科研費 基盤（C）「骨指向性を有する新規変形性関節症治療薬の創薬研究」（代表・継続）
2. 野辺地町産カワラケツメイ原料調査分析業務（継続）
3. 共同研究 第一三共株式会社「Hypophosphatasia治療薬創製に向けた検討」（継続）
4. 科研費 基盤（C）「ヒトサイトメガロウイルスによるケモカインCCL20を介した炎症性腸疾患の病態解析」（代表・新規）
5. 科研費 基板（B）「自律的再構築による力学的適応性をもつ生体分子モーター人工筋肉の開発」（分担・継続）

特許

1. PCT国際特許出願「軟骨細胞への分化促進剤、軟骨細胞の増殖促進剤および軟骨基質産生促進剤」（PCT/JP2022/034704）
2. 国内特許取得「骨のリモデリング促進剤」（7190185）
3. 米国特許取得「Bone Remodeling Accelerator」（11517603）

学会

1. 「マウス筋芽細胞の筋管形成と尾懸垂マウスの不活動性筋萎縮に及ぼすフラバノン誘導体の作用」西田 有里佳、鈴木 宏一、金澤 佑治、三浦 雅一、松尾 由理、野村 政明、高橋 達雄（日本薬学会第142年会）
2. 「カワラケツメイ由来フラバノンの卵巣切除マウスの骨量減少に対する効果と作用機序の解明」高橋 達雄、鈴木 宏一、川田 幸雄、大本 まさのり、佐藤 友紀、亀井 敬、高橋 寿明、松尾 由理、野村 政明、三浦 雅一（第23回日本補完代替医療学会学術集会）
3. 「リクイリチゲニンのエストロゲン受容体を介した細胞増殖シグナル活性化と変形性関節症モデルマウスに対する治療効果」古山 佳奈、鈴木 宏一、三浦 雅一、松尾 由理、野村 政明、高橋 達雄（日本薬学会第143年会）
4. 「ヒトサイトメガロウイルス91-7S株によるケモカイン産生誘導と遺伝子解析」武本 眞清、堀場 千尋、伊藤 真子、増田 雪花、定成 秀貴、村山 次哉、大黒 徹（第69回日本ウイルス学会学術集会）
5. 「ヒト網膜細胞株におけるHSV-1およびVZVに対する抗ヘルペスウイルス薬の効果比較」鈴木 はる奈、田中 ひなの、嶺井 華、大黒 徹、武本 眞清（日本薬学会第143年会）

HP

1. のへじまち観光公式ガイド 野辺地町観光協会 <https://noheji-kankou.com/kawaraketsumei/>

組織

氏名	所属	役割
◎ 高橋 達雄	薬学部	運動器疾患に対する予防・改善効果の検討
山崎 眞津美	薬学部	神経分化誘導作用と神経保護作用の検討
鈴木 宏一	薬学部	化合物合成及びDocking解析等計算化学
亀井 敬	薬学部	分子設計と合成及び物理化学特性の検討
武本 眞清	薬学部	抗ウイルス作用の検討