

神経変性疾患治療薬候補化合物の探索の効率化を目的とした

真菌代謝産物ライブラリー創製

小菅 康弘

日本大学薬学部 薬理学研究室

#### 【研究目的】

難治性の神経疾患の治療薬創製を最終目標とし、本研究では、真菌に潜在するストレス応答機構を利用することで、神経保護薬のシーズとなる二次代謝産物ライブラリーを構築するとともに、新たなスクリーンモデルを確立および開発することを目的とする。

#### 【研究達成度】

以下の通り、申請書に記載した計画の多くを達成した。また、本研究の遂行過程で開発したスクリーンモデルを用いて見出した新技術について特許を出願した。(特願 2022-010060)

- ①菌体ライブラリーの拡充と新規培養法の確立
- ②ミクログリアモデル BV2 細胞及び HT22 細胞を用いたスクリーンモデルの開発と検索
- ③神経障害性疼痛モデルマウスの確立と植物エキスの治療効果の検証

#### 【研究結果】

##### ①菌体ライブラリーの拡充と新規培養法の確立 (廣瀬)

これまでに、病原微生物学研究室で保有している *Aspergillus* 属 10 節 36 種 82 菌株について、①ポテトデキストロース培地 (PD) もしくはジクロラン・グリセロール培地 (DG18)、② 4  $\mu$ g/mL イトラコナゾール添加 PD もしくは DG18、③ 10  $\mu$ g/mL Tunicamycin 添加 PD もしくは DG18 で 1 週間もしくは 2 週間振盪培養、酢酸エチルで抽出後乾固し、アッセイ用試料を得た。また、新たな真菌試料を獲得するために青森県八甲田山および岩手県五葉山において土壌や植物根の採集を行った。ベイト法や表面殺菌法により分離培養を試みた結果、それぞれ 206 株、129 株を得ることに成功した。これらの菌株については引き続き形態観察や rRNA 等の塩基配列情報を基に種同定を進める予定である。

##### ②ミクログリアモデル BV2 細胞及び HT22 細胞を用いたスクリーンモデルの開発と検索 (小菅)

HT22 細胞において Tunicamycin を用いた開発した小胞体ストレス抑制薬検索法に加えて、ミトコンドリア機能抑制薬 (IAP) を用いた *in vitro* 虚血モデルを開発した。また、ミクログリアのモデル細胞である BV2 細胞を入手し Lipopolysaccharide (LPS) を用いた神経炎症モデルを確立した。

そこで、ALS モデルマウスの運動機能低下抑制効果と生存日数延長効果を有すること報告した (Kosuge Y, et al. 2020) 植物由来エキスが及ぼす影響を検証した。その結果、MBP は BV2 細胞の増加を抑制するだけではなく、LPS 活性化による炎症性サイトカインの産生を抑制した。さらに、菌体試料の小胞体ストレス抑制を解析したところ、培地の変化により抑制作用が増加する傾向が認められた。今後はこの培地変化が及ぼす影響を詳細に検討する。加えて、ヒト表皮角化細胞株 HaCaT 細胞を購入し、表皮細胞のストレスにおいても検証する系を構築することで、多角的な評価を行う予定である。

### ③神経障害性疼痛モデルマウスの確立と植物エキスの治療効果の検証（小菅）

化合物の in vivo 検証モデルを拡充するため、神経変性疾患と同様に神経炎症がその発症や病態形成に関与することが明らかになりつつある神経障害性疼痛モデルマウスの作製を行った。坐骨神経を半周結紮（ligation）したマウスでは、機械的アロディニアが 21 日間持続することが報告されているが、我々もその結果を再現することに成功した。本モデルを用いて MBP の効果を検証したところ、疼痛維持期でアロディニアを改善することを見出した。また、この効果は既存の治療薬よりも強力で、持続的であったため、特許申請をおこなった。

今後は、これらの in vivo、in vitro モデルを活用し菌体試料に潜在する作用を検証するとともに、成分検索にも取り組む予定である。

#### 【特許申請についての準備状況】 1 件の特許出願済，1 件を出願準備中

本研究の遂行過程で開発した 1 つの新技术について以下の通り特許を出願した。

- ① 小菅康弘，宮岸寛子，高橋愛 神経障害性疼痛治療薬、特願 2022-010060（2022 年 1 月 26 日）（日本大学/武蔵野免疫研究所）

なお、本研究の成果と歯学部及び松戸歯学部との成果とあわせて出願準備中（NUBIC へ相談済み）

#### 【競争的資金申請への準備状況，獲得を目指す外部研究費の種類】

以下の大型民間助成金，科研費，学内助成金を獲得済である

- ①（公益財団法人）発酵研究所 2021-2022 年度一般研究助成金（300 万円）  
代表者：小菅康弘，研究分担者：廣瀬大，石内勘一郎
- ② 2022-2024 年度 科研費 基盤研究（C）（416 万円：直接経費：320 万円、間接経費：96 万円）  
代表者：小菅康弘，研究分担者：三枝禎，
- ③ 令和 4，5 年度 日本大学学術研究助成金独創的・先駆的研究（2000 万円×2 年）  
代表者：小菅康弘，研究分担者：廣瀬大，三枝禎，川戸貴行，西村克史，谷川実，斎藤稔  
をはじめ、その他計 5 件の民間財団に申請した。

#### 【研究成果の発信】

学会等への発表

1. 2021 年 6 月 株式会社シー・アクト 社内講演会（東京），招待講演，小菅康弘 細胞内ストレス応答機構を応用した創薬研究の現状と展望
2. 2021 年 9 月 日本防菌防黴学会 第 48 回年次大会 ポスター発表 萩生田遼，小田尚幸，川上裕司，廣瀬大 一般住宅から分離された好乾性真菌 *Aspergillus Restricti* 節の新しい分類体系に基づく多様性評価の試み
3. 2021 年 10 月 株式会社武蔵野免疫研究所 社内講演会（Zoom），招待講演，小菅康弘 宮古島産植物由来エキスを活用した神経疾患治療・予防薬の創製
5. 2022 年 3 月 日本薬学会第 142 年会 ポスター発表 高橋愛，宮岸寛子，石毛久美子，小菅康弘，  
筋萎縮性側索硬化症モデルマウス及び神経障害性疼痛モデルマウスにおける宮古ビデンス・ピローサエキスの治療効果
6. 2022 年 3 月 日本薬学会第 142 年会 ポスター発表 鶴田こむぎ，宮岸寛子，鈴木直人，石毛久美子，廣瀬大，鈴木豊史，小菅康弘 宮古ビデンス・ピローサは筋萎縮性側索硬化症モデルマウスにおける活性化ミクログリアを抑制する