

博士學位論文

内容の要旨
および
審査の結果の要旨

薬学研究科

第44号

令和3年5月

徳島文理大学

は し が き

この冊子は、学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号）第8条による公表を目的として、本学において博士の学位を授与した者の「論文内容の要旨および論文審査の結果の要旨」を収録したものである。

目 次

| (学位記番号) | (氏 名) | (論 文 題 目) | (頁) |
|---------|---------|--|-----|
| 甲第53号 | 北 岡 泰 介 | d-ROMs・BAPを用いた神経発達障害の酸化ストレス評価と臨床応用への検討に関する研究 | 1 |
| 甲第54号 | 柳 本 剛 志 | 神経栄養因子関連化合物の合成とその生物活性評価および作用機序に関する研究 | 7 |

| | |
|---------|---|
| 氏名 | きたおか たいすけ 北岡 泰介 |
| 本籍 | 高知県 |
| 学位の種類 | 博士（薬学） |
| 学位記番号 | 甲第 53 号（課程博士） |
| 学位授与年月日 | 令和 3 年 3 月 15 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規定第 4 条第 1 項該当（課程博士） |
| 学位授与の題目 | d-ROMs・BAP を用いた神経発達障害の酸化ストレス評価と 臨床応用への検討に関する研究 |

指導教員 教授 京谷 庄二郎

論文審査委員 (主査) 教授 井上 正久

(副査) 教授 喜多 紗斗美

(副査) 教授 角 大悟

(副査) 教授 土屋 浩一郎

(徳島大学 薬学部)

論文の内容要旨

北岡 泰介

Autism spectrum disorder (ASD) は、社会的コミュニケーション能力の欠如及び限定された行動・興味を特徴とする発達障害であり、その発症率は近年増加傾向にある。

ASD の診断は米国精神医学会が編集する Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 第5版(DSM-5) で基準が定められているが、基準となる症状を満たすカットオフラインは曖昧であり、客観的・生物学的な検査判定基準はない。また、その治療方針は養育者から得られた情報や医師の所見に基づき選択されるが、治療評価の客観的指標もない。特に小児の場合、副作用の観点からも薬物療法における適切な用量調整は重要であり、治療評価の客観的指標の必要性は高い。

ASD の発症には遺伝的要因の関与が指摘されており、遺伝学的研究が近年広く進められている。その他、環境的要因、脳の炎症性変化、自己免疫異常、ミトコンドリア機能異常などとの関連が報告されており、酸化ストレスとの関連も示唆されているが、この分野の研究は十分に進んでおらず、臨床で広く応用されているバイオマーカーはない。

そのため、本研究では酸化ストレスマーカーを用い、ASD の酸化ストレス評価及び臨床応用への検討を行うこととした。神経発達障害では、酸化ストレスとの関連が報告されており、酸化ストレスマーカーに関する研究もいくつか見受けられる。しかしこれらのマーカーは、特殊な機器が必要なため、臨床で即時に測定できるものではなく、かつ、生体内での総合的なストレスを評価できるものではない。一方、現在酸化ストレスマーカーとして頻用される 8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) は、尿を試料とするため非侵襲的に生体内での酸化ストレスを評価できる長所を持つ。しかし、日中の活動状況や採取時刻により値が変動するため、誤差要因を減らすには 24 時間蓄尿が必要であり、抗酸化能の評価はできない。本研究では対象者に小児を含むため、試料採取や結果の精度には注意が必要であり、24 時間蓄尿は身体的に困難であると考えた。

そこで本研究では、迅速で効率よく測定ができ、様々な疾患の評価指標に用いられている、末梢血で測定が可能な酸化ストレスマーカーの Reactive oxygen metabolites (d-ROMs) と Biological antioxidant potential (BAP) に着目した。d-ROMs、BAP によ

る酸化ストレス評価法は、同一検体・同一機器で酸化値と抗酸化値を測定・評価することが可能である。また迅速かつ簡便な手技で安定した酸化ストレス評価が可能であり、臨床で利用しやすい。d-ROMs 値は酸化ストレス度、BAP 値は抗酸化力を表す。また、BAP/d-ROMs 比は酸化ストレスと抗酸化力の平衡を示す抗酸化能と定義している。

本研究の目的は、酸化ストレスマーカーの d-ROMs、BAP が ASD の診断・治療評価等で臨床に応用できるかを検討することである。

第一章では、定型発達 (Typical development: TD) 児を対象とし、これまで報告がなかった TD 児の d-ROMs・BAP 値を測定し、成長・発達による変化及び年齢による基準値を検討した。その結果、TD 児は年齢が高いほど d-ROMs 値が低くなり ($r = -0.809$, $p < 0.001$)、年齢が高いほど BAP/d-ROMs 比は高くなる ($r = 0.743$, $p < 0.001$) 傾向が認められた。また、年齢による d-ROMs 値の推移が既存の酸化ストレスマーカーである 8-OHdG と近似しており、8-OHdG との互換性も明らかとなった。本章において、各年齢群における TD 児の d-ROMs・BAP 値が示されたことで、疾患を有する小児と年齢別の直接比較が可能となった。

第二章では、第一章で得られた各年齢群における TD 児の d-ROMs・BAP 値を用いて、未治療 ASD 児と比較した。また、主観的評価の PARS-TR スコアと d-ROMs・BAP 値との関連性を検討し、d-ROMs と BAP が、未治療 ASD 児のストレス評価における客観的指標になりうるかについて検討した。その結果、d-ROMs 値と BAP/d-ROMs 比において、2-6 歳群では TD 児と ASD 児に有意な差が認められなかったが、7-15 歳群では ASD 児の d-ROMs 値は TD 児に比べ有意に高く ($p < 0.001$)、BAP/d-ROMs 比は有意に低値 ($p < 0.001$) であることが明らかになった。ASD 児は心理的ストレスが高く、TD 児に比べストレス対応能力が乏しいため就学後の集団生活におけるストレスに常時暴露されていることが本結果に影響した可能性が考えられた。また、本章では主観的評価である PARS-TR スコアが高いほど d-ROMs 値も高くなる有意な相関が 2-6 歳群 ($r = 0.343$, $p = 0.045$) と 7-15 歳群 ($r = 0.791$, $p < 0.001$) のいずれの年齢群においても認められた。これらのことより、d-ROMs 値は、7-15 歳の就学児において、臨床で簡便に用いることが出来る、ASD のストレス評価及び臨床的重症度の評価にも応用できる客観的指標となりうる可能性が明らかとなった。

第三章では、不注意、多動性及び衝動性を特徴とする Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) を併存した ASD (ASD/ADHD) 児を対象とし、薬物治療介入前後の d-ROMs・BAP 値に着目し、d-ROMs と BAP が ASD/ADHD 児の薬物治療評価の客観的指標になりうるかについて検討した。その結果、薬物治療開始後、d-ROMs 値の有意な減少 ($p < 0.001$) と BAP/d-ROMs 比の有意な増加 ($p < 0.001$) が認められた。また主観的評価である PARS-TR スコアは治療開始後有意に減少 ($p < 0.001$) し、ADHD-RS スコアも有意に減少 ($p < 0.001$) した。薬物療法によって誘発される行動の変化と中核症状の改善は、日常生活の心理的ストレスを軽減する要因であり、それによって d-ROMs 値と BAP/d-ROMs 比が変動した可能性も考えられた。さらに、7-14 歳の就学児では d-ROMs 値と PARS-TR スコアの薬物治療開始前後の変化値において有意な相関関係 ($r = 0.39, p = 0.01$) が認められ、ADHD-RS スコアも薬物治療開始前後の変化値において d-ROMs 値と有意な相関関係 ($r = 0.44, p = 0.004$) が認められた。このことから主観的評価と客観的指標の関連についても明らかになった。本章において、就学児における ASD/ADHD 患者に対する薬物治療効果の評価に d-ROMs が応用できる可能性が明らかとなった。

以上、本研究は、酸化ストレスマーカーの d-ROMs、BAP が客観的評価として ASD の診断・治療評価等で臨床に応用できるかを検討することを目的として行った。

本研究より得られた知見から、d-ROMs は、就学児における ASD の病態及び薬物治療評価に対して、臨床症状や主観的評価スコアに付帯するマーカーとして臨床で即時に応用できる有用な客観的指標であると考えている。

論文審査結果の要旨

本論文は、神経発達障害に含まれる Autism spectrum disorder (ASD) の病態や薬物治療評価における酸化ストレスの客観的指標を探索することを目的として行われた研究について論じている。現在 ASD のスクリーニングや病態の評価方法は行動観察を判定基準としており、生物学的な客観的指標はない。特に小児の薬物療法では薬物の種類や処方量を慎重に検討すべきであり、治療評価の客観的指標の必要性は高い。

本研究で著者は、迅速かつ簡便な手技で安定した評価が可能な酸化ストレスマーカーの Reactive oxygen metabolites (d-ROMs) と Biological antioxidant potential (BAP) が ASD の診断・治療評価で臨床に応用できるかを検討し、d-ROMs が就学児における ASD の病態及び薬物治療評価に対する客観的指標として有用であることを明らかにした。これらをまとめた本論文は次の三つの章から構成されている。

第一章では、定型発達 (Typical development: TD) 児における d-ROMs 値と BAP 値を測定し、これまで報告がなかった TD 児の基準値を明らかにした。加齢に伴う d-ROMs 値の推移は既存の酸化ストレスマーカーである 8-OHdG と近似しており、8-OHdG との互換性が認められた。また、d-ROMs 値と BAP 値には性差がないことを確認している。本章において、各年齢群における TD 児の基準値が示されたことで、疾患を有する小児と年齢別の直接比較が可能となっている。

第二章では、就学児において、d-ROMs 値が ASD のストレス評価及び臨床的重症度の評価に応用できる可能性を明らかにした。本章では、第一章で得られた TD 児の基準値と未治療 ASD 児の値を比較検討している。その結果、就学児における d-ROMs 値は TD 児に比べ ASD 児は有意に高かった。著者は、ASD の特徴でもある「社会的コミュニケーション能力の欠如」に起因するストレス対応能力が乏しいため、成長しても ASD 児の酸化ストレスは低下しないのではないかと指摘している。さらに、ASD 児は心理的ストレスも強いことから、就学後の集団生活におけるストレスに常時暴露されていることも本結果の原因ではないかと推察している。本章では、さらに主観的評価の PARS-TR スコアと d-ROMs・BAP 値との関係についても検討している。その結果、就学児において PARS-TR スコアが高いほど d-ROMs 値も高くなる有意な相関が認められ、主観的評価と

客観的指標の関連が明らかとなった。

第三章では、Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) を併存した ASD (ASD/ADHD) 児に対する薬物治療効果の評価に d-ROMs が応用できるという知見を得た。本章では、薬物治療前後の d-ROMs・BAP 値と主観的評価の PARS-TR 及び ADHD-RS スコアの関連を検討している。その結果、就学児において d-ROMs 値と PARS-TR 及び ADHD-RS スコアの薬物治療前後の変化値の関係において有意な相関関係が認められ、主観的評価と客観的指標の関連が明らかとなった。

以上、これらの研究結果より、d-ROMs は、就学児における ASD の病態及び薬物治療評価に対して、主観的評価を補完する有用な客観的指標として臨床で応用できると考える。本研究で見出されたこれらの結果は、今後の ASD の診断・治療評価において大いに貢献できるものと判断できる。また、既に、筆頭著書として査読付き学術論文 1 報をはじめ他に関連論文 2 報を発表しており、業績としても十分である。よって、本論文は博士（薬学）の学位に値するものと認める。

| | | | | |
|--------|--------|----|-----|---|
| 論文審査委員 | 主査（教授） | 井上 | 正久 | 印 |
| | 副査（教授） | 喜多 | 紗斗美 | 印 |
| | 副査（教授） | 角 | 大悟 | 印 |
| | 副査（教授） | 土屋 | 浩一郎 | 印 |

（徳島大学 薬学部）

| | |
|---------|---|
| 氏名 | やなぎもと つよし 柳本 剛志 |
| 本籍 | 徳島県 |
| 学位の種類 | 博士（薬学） |
| 学位記番号 | 甲第 54 号（課程博士） |
| 学位授与年月日 | 令和 3 年 3 月 15 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規定第 4 条第 1 項該当（課程博士） |
| 学位授与の題目 | 神経栄養因子関連化合物の合成とその生物活性評価および 作用機序に関する研究 |
| 指導教員 | 教授 今川 洋 |
| 論文審査委員 | （主査）教授 吉田 昌裕 （副査）教授 福山 愛保 （副査）教授 張 功幸 （副査）教授 難波 康祐 |

（徳島大学 薬学部）

論文の内容要旨

柳本 剛志

神経栄養因子は神経細胞の分化や成熟、生存維持などに働くタンパク質でありアルツハイマー病などの神経変性疾患の治療への応用が期待される。しかし、生体内での安定性や血液脳関門を通過できないなどの課題がある。そのため、タンパク質である神経栄養因子に代わり、神経栄養因子様の生物活性を持つ低分子化合物が医薬品リードとして期待されている。著者の所属研究室では、神経栄養因子の一種である NGF の活性を増強することで神経突起を伸展する活性を持つネオビブサニン B (1) に関する研究に取り組んでいる。そして、1 の構造を基に、1 と同等の生物活性を示す NVC (2) を開発している。本論文では、2 に加えて、低分子でありながら NGF 様の活性を持つ *trans*-バングレン (3)、および神経栄養因子産生を促進するスピロテヌイペシン A (4) の、それぞれ異なる生物活性を示す 3 つの化合物に着目し、それらの作用機序解明と、新たな高活性化合物の創製に繋がる分子設計法の開発を目的に研究を展開した (Fig. 1)。

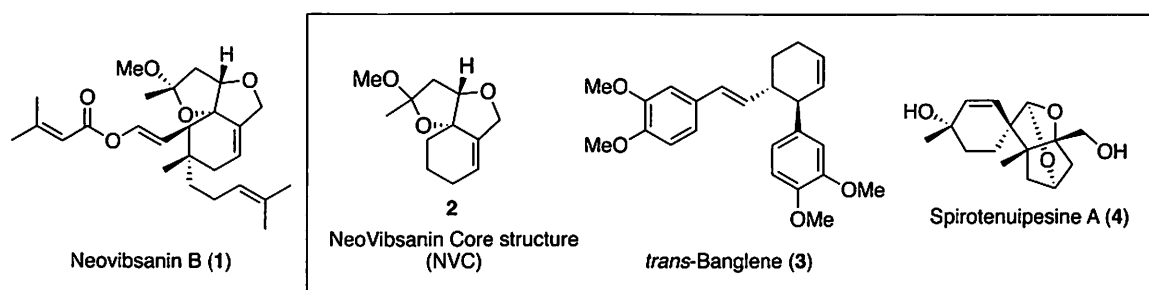


Fig. 1 神経栄養因子様の生物活性を示す化合物

まず、著者は NVC (2) と *trans*-バングレン (3) およびスピロテヌイペシン A (4) が共通構造としてシクロヘキセン環を持つことに着目し、新たな活性化合物設計の着想を得た。すなわち、2 つの活性化合物の構造を共通部分を介して重ね合わせることで、両分子の活性を併せ持つことが期待できるハイブリッド化合物を設計する方法を考案した。この構造重ね合わせによる設計は、天然には存在し得ない多様な活性を持つ新奇

なシード骨格の創出に有効である。さらに、2分子の活性を1分子に保有させることで、2種類の化合物を一挙に投与する場合と比較して、代謝系への負担軽減や薬物動態の調査および投与設計が容易になるなど医薬品シーズの観点からの利点が期待できる。まず著者は、本手法によって2と3から導かれるハイブリッド化合物5の合成に取り組んだ。

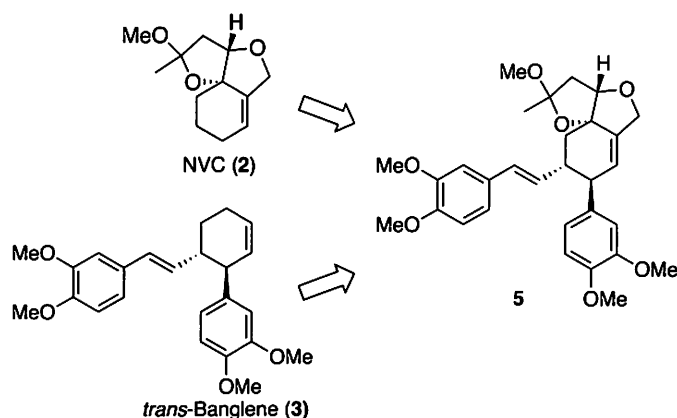
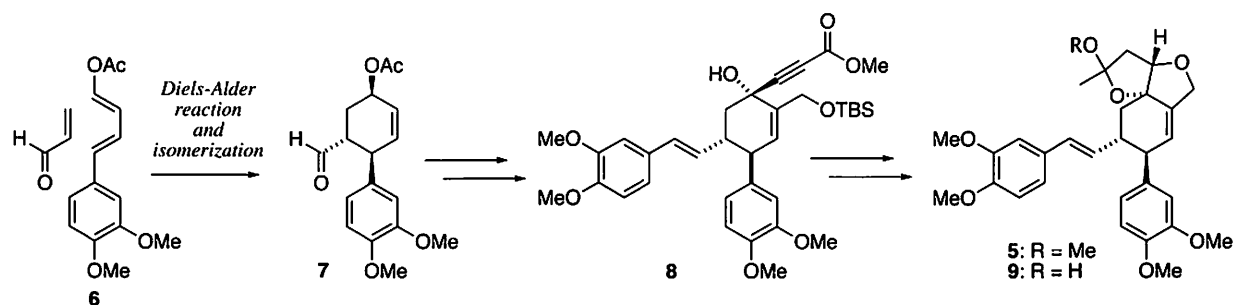


Fig. 2 構造重ね合わせによるハイブリッド化合物の創製

5の合成では、アクロレインを溶媒とする Diels-Alder 反応を鍵反応として、6から7を得た。次いで、Horner-Wadsworth-Emmons 反応、森田-Baylis-Hillman 反応、選択的アルキニル化等を経由して8へと導いた。以降の合成は当研究室で確立した1の合成法を踏襲し、16工程、7.2%の総収率で5の合成を達成した (Scheme 1)。また、9も併せて調製し、5,9の生物活性評価を行った。

Scheme 1 ハイブリット化合物の合成



その結果、5と9のいずれも、2と3のハイブリッド化による相加的な活性の増強は確認されなかった。一方で、9は3由来のNGF様活性を保持しており、ネオビブサン骨格を持つ化合物として初めてPC12細胞に対する分化誘導活性を示した。

また、ハイブリッド化合物の基となる NVC(2)と *trans*-バングレン(3)の作用機序探索にも取り組んだ(Fig. 3). まず, 3 のアリル位に, 蛍光標識基を含む 7 種類の置換基を導入した *trans*-バングレン誘導体を合成し, それらの生物活性評価を行った. その結果, 7 種類の全てのサンプルにおいて, PC12 細胞に対する分化誘導活性は消失したが, 突起伸展促進活性を保持していることを見出した. また, NVC に光親和性標識基を導入した分子プローブ 10 を用いて, 2 に親和性を示すタンパク質の検出に成功した.

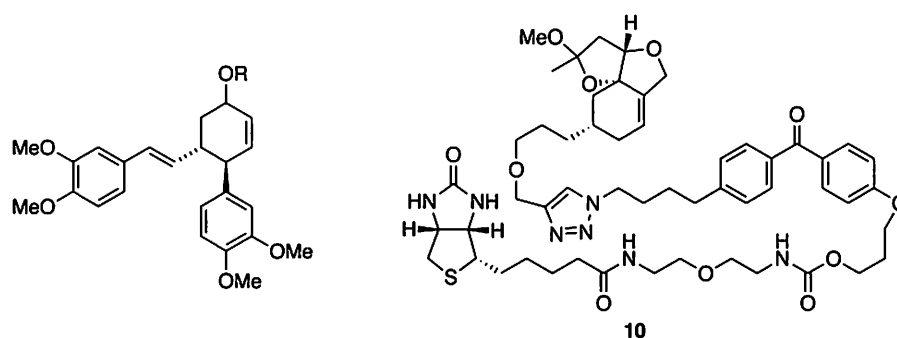
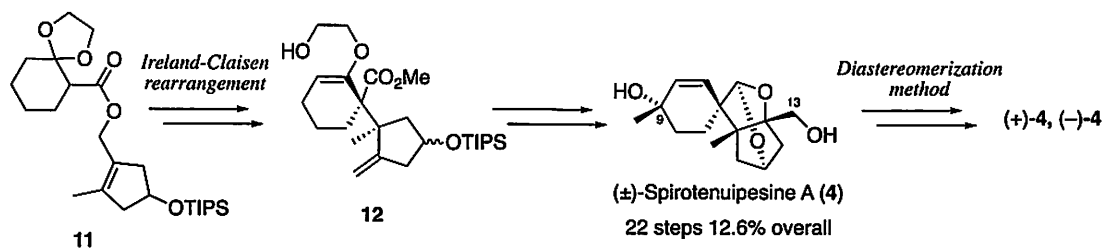


Fig. 3 *trans*-バングレン誘導体および NVC 誘導体

一方, スピロテヌイペシン A(4)についても NVC との構造重ね合わせによる分子設計が可能であるが, まず著者は 4 の生物学的試験の実施を目的として, サンプルの量的供給を目的とする合成ルート開発に取り組んだ(Scheme 2). その結果, Ireland-Claisen 転位による 11 から 12 への変換を鍵として, スピロテヌイペシン A (4) のラセミ合成を, 22 工程, 12.6% の総収率で達成した. また, 4 の誘導体 8 種の合成と, ジアステレオマー法による 4 の両光学異性体の調製を行った. それらを用いて, 構造活性相関を解析した結果, 4 の活性発現には, 天然物である(+)-体と同じ立体化学であることや, 9 位, 13 位アルコール, 二重結合が必須であることを見出した. また, 4 によって産生が促進される神経栄養因子の種類を同定する目的で, NGF の活性を増強する NVC (2) の共存下, 4 の活性評価を行った. その結果, 2 による活性の増強は確認されず, さらに, 抗 NGF 抗体を利用した中和実験でも, 4 による活性が阻害されなかった. これらの結果から, 4 はグリア細胞から NGF とは異なる神経栄養因子の産生を促進していることが明らかとなった.

Scheme 2 スピロテヌイペシン A の全合成



論文審査結果の要旨

本論文は、神経栄養因子関連化合物であるバングレンとネオビブサニン類のハイブリッド化合物の合成及び、スピロテヌイペシン A の全合成と、それらの生物活性評価及び作用機序に関する研究である。神経変性疾患の一種であるアルツハイマー病は、近年その増加が社会問題となっている認知症の主要な原因の一つであるが、その治療薬として実際に認可されている薬剤は数種類に留まっており、根治を目差した医薬品の開発は、解決すべき喫緊の課題である。神経成長因子 (NGF) は、神経の再生、生存維持に関わっていることが知られており、その治療薬としての利用が検討されている。しかしタンパク質である NGF は血液—脳関門を通過せず、実用化は難しい。このような背景のもと、著者はタンパク質である NGF の分化誘導活性と類似の活性を有する有機低分子のバングレンと、NGF の作用を増強し、神経突起の伸長を促進する活性を持つネオビブサニン類に着目し、創薬シーズの開発を見据えた、新たな活性化合物の創製に挑戦した。すなわち、バングレンとネオビブサニン誘導体の骨格に共通するシクロヘキセン環を重ね合わせることで、新規な天然物様のハイブリッド骨格をデザインする手法を考案し、その化合物の合成を行った。その結果、デザインしたハイブリッド化合物が、ネオビブサニン類としては初めて NGF 様の分化誘導活性を持つこと、また比較的高い突起伸長促進活性を示すことを明らかにした。一方著者は、グリア細胞からの神経栄養因子産生を促進する活性を有するスピロテヌイペシン A の全合成にも挑戦し、立体選択的 Ireland-Claisen 転位反応を鍵反応として、その効率的合成に成功した。そしてその活性評価を行うことで、合成品が神経栄養因子産生促進活性を示すことを初めて確認した。また中和抗体を用いた実験から、スピロテヌイペシン A は、グリア細胞から NGF とは異なる神経栄養因子の産生を促進していることも見出した。さらにジアステレオマー化による光学分割の他、各種誘導体の合成も達成し、その活性評価を行うことで構造活性相関も明らかにした。すなわち、構造中の二つの水酸基とアルケンが活性発現に必須であること、天然型の鏡像異性体のみが活性を持つことを明らかにした。一方、ネオビブサニン誘導体を用いた光親和性標識分子を用いて、ネオビブサニンの標的タンパク質の探索にも取り組み、ネオビブサニン類に特異的に親和性をもつタンパク質の検出に成功した。これらの研究結果は、創薬シーズ開発のための分子デザインに、分子ハイブリッドという新しい方法論を提案したと共に、神経栄養因子関連化合物の活性や、作用機序に関して新たな知見を見出した点でも大変意義深く、今後の創薬化学分野の発展に大きく貢献すると考える。よって柳本氏の本研究は、博士(薬学)の学位に値するものと認める。

| | | | |
|--------|------|----|------|
| 論文審査委員 | (主査) | 教授 | 吉田昌裕 |
| | (副査) | 教授 | 福山愛保 |
| | (副査) | 教授 | 張 功幸 |
| | (副査) | 教授 | 難波康祐 |

博士学位論文 内容の要旨および審査の結果の要旨(第44号)

令和3年5月 発行

編集・発行

徳島文理大学大学院薬学研究科
徳島市山城町西浜傍180
〒770-8514 TEL 088-602-8210

印刷

原田印刷出版株式会社
徳島市西大工町4丁目5
〒770-0903 TEL 088-622-2356
FAX 088-622-2357
E-mail: haradapp@khf.biglobe.ne.jp