カビからのおくりもの!新規ALS治療薬シーズの発見

日本大学薬学部　草間　國子

ALSについて

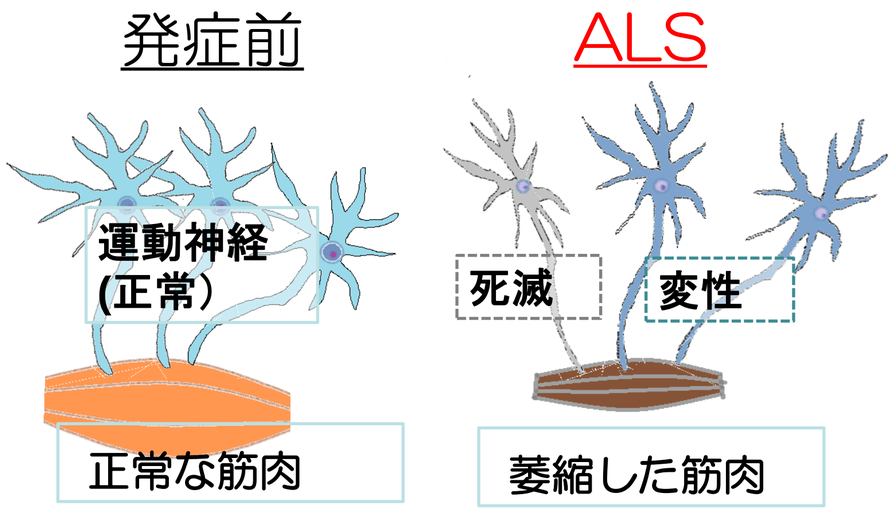
①本疾患は脳と脳幹・脊髄の**運動神経が変性・脱落**が進行性に起こり、体を次第に動かせなくなり寝たきりになる。人工呼吸を施さなければ2-5年で死に至る。

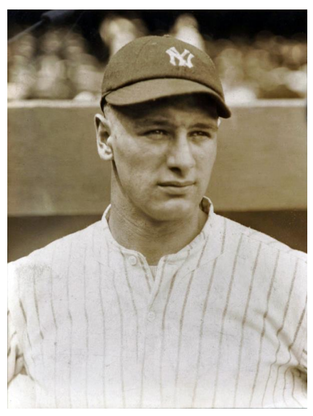
- 我が国の登録患者数9557名（H28年度）。
- Lue Gherig病とも呼ばれる。

②**孤発性SALS**（家族歴なし）が90%を占め、残りが**家族性FALS**（遺伝性約２０種類の関連遺伝子が判明）である。

③凝集性タンパク質**TDP-43**(DNA/RNA結合性核内タンパク質）原因説が現在最も有力。

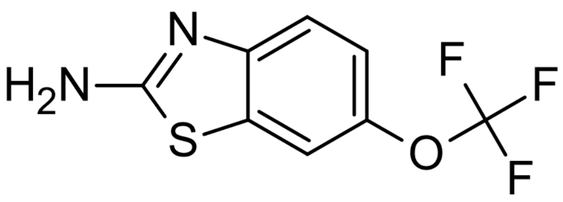
④本邦で使用できる薬剤は2種のみである。しかし有効性は十分とはいえず、新薬開発が急がれている。



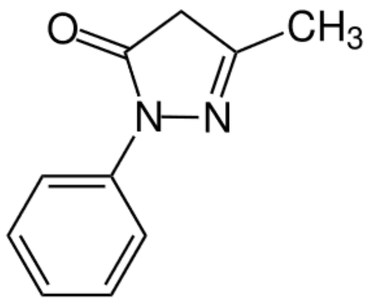


Lue Gherig（1903 - 1941）
・・Fans, for the past two weeks you have been reading about a bad break. Yet today I consider myself the luckiest man on the face of the Earth.
（ALSに罹患し引退した時の演説 Wikipedia）

【現在使用されている２薬剤】



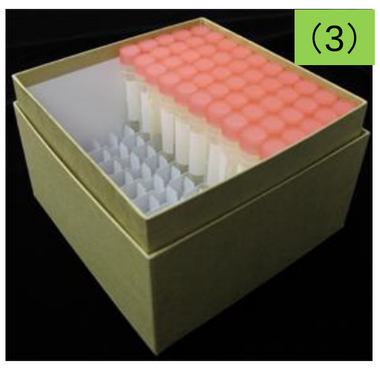
リルゾール(リルテック錠®Sanofi）1日100 mg 分2内服
日本では有効性検証できず。海外データで球症状発症型等で生存性を有意に延長した。



エダラボン(ラジカット注® 田辺三菱）
1日 30 mg iv点滴、重症度3度以下の比較的低い患者が主な対象。ALSAQ-40のスコアの低下を有意に軽減した。

新医薬品資源としての菌類と抽出液ライブラリー

- 菌類は未記載種が100万種とされ、従来よりペニシリン、スタチン剤など多くの薬剤、生理活性物質、新規化合物をもたらしてきた。新規医薬品ソースとして今なお期待される。
- 本チームの菌学者廣瀬により採取単離した菌株をもとに（1）、日本大学では本邦由来約620種のカビ（２）由来抽出液ライブラリー（３）から3種のin vitroアッセイにより、ゲッシ類ALSモデルで有効な新構造の活性物質YY-1を発見した。



(1)長野県にてマツ落葉の標本を採取
(2)菌株の単離ならびにストック
(3)培養液ライブラリーと中規模培養の様子

自主創造 日本大学 NIHON UNIVERSITY
日本大学産官学連携知財センター（NUBIC）
〒102-8275　東京都千代田区九段南4-8-24　日本大学会館
Tel: 03-5275-8139　Fax: 03-5275-8328　E-mail: nubic@nihon-u.ac.jp　http://www.nubic.jp
Nubic

カビからのおくりもの!新規ALS治療薬シーズの発見

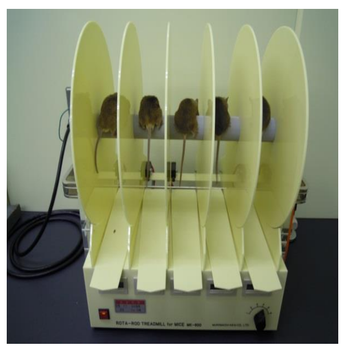
日本大学薬学部　草間　國子

方法

① ALSの原因に基づく3つの*in vitro*アッセイ系：次の3つの活性に関してすべて満たす分子を求めて真菌抽出液ライブラリーからクリーニングを行った。

- **ALS**
  - 酸化ストレス ― 活性酸素種(ROS)除去活性の測定　**ROS assay**
  - グルタミン酸興奮毒性 ― ミトコンドリアグルタチオン欠乏下の興奮性神経細胞死の抑制　**ODAP-EA assay**
  - 変異タンパク質による運動神経毒性 ― SOD1-G93A発現細胞の細胞死抑制　**Dual-luciferase assay**

②動物実験：購入したSOD1-G93A(B6SJL) を自家繁殖し得られた遺伝子保持(hemizygote)雌雄 について、生後45、60もしくは105日目（実験進行中）からNUH322由来のYY-1を週6回経口投与した。
運動はRotaRod (15 rpm)を用い、300秒を上限して週1回測定した。



RotaRod 測定

結果

＜活性物質YY-1＞NUH322より分取したYY-1はMS、NMR（ COSY、HMBC、NOESY、*dif.* NOE), CD等により構造解析し、分子式$C_{10}H_{14}O_3$の新規物質であると判定された。

＜絞り込まれた14真菌＞

NUH	Name	ROS	ODAP	SOD1
6	*Colletotrichum gloeosporioides*	*	+, NS	**
8	*Penicillium* sp.	*	+, NS	**
204	*Arthrbotrys oligospora*	**	+, NS	+, NS
228	*Cladosporium macrocarpum*	+, NS	±	*
252	*Repetophragma goidanichii*	+, NS	+, NS	+, NS
303	Sympoventuriaceae	*	*	+, NS
312	*Penicillium glabrum*	**	*	+, NS
316	*Trichoderma polysporum*	**	*	*
319	*Mariannaea* sp.	**	*	+, NS
320	*Arthrinium* sp.	**	*	+, NS
322	**Pleosporales sp.**	**	*	**
323	Helotiales sp.	**	*	+, NS
329	Venturiaceae sp.	**	*	**
330	Melanommataceae sp.	**	*	*

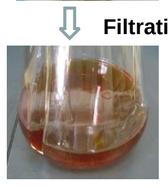
* p< 0.05, ** p< 0.01 +, NS: not significant

＜NUH322からの培養と精製＞

子嚢菌門 Ascomycotaクロイボタケ綱
Dothideomycetesプレオスポラ目
Pleosporales　採集地: 長野県菅平高原

NUH322 liquid culture (3 weeks)

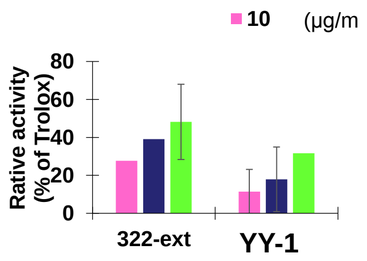
⇩ Filtration (322A culture)



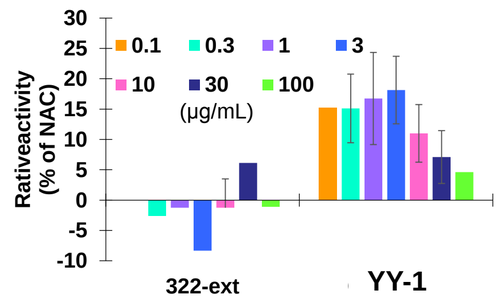
322-culture (5.4 L) 3 weeks
↓ Extracted with EtOAc
322-E
↓ 2667.3 mg, Silica gel C.C.
- 322-E1, E2
- 322-E3 ↓ 299.9 mg, rp-HPLC, 25% CH_3CN → **YY-1 206.7 mg**
- 322-E4 ↓ 65.4 mg, rp-HPLC, 25% CH_3CN → 6 2.4 mg; 7 4.0 mg
- 322-E5

＜*In vitro*活性＞

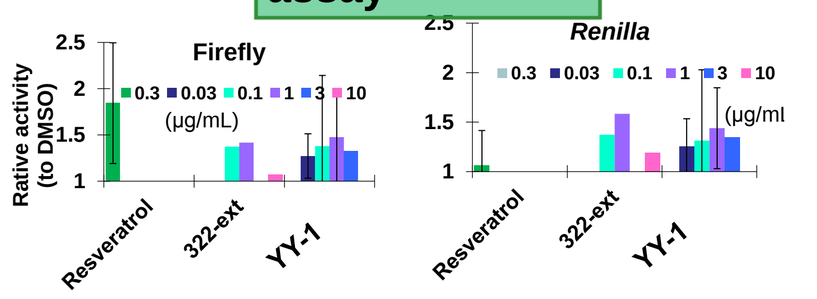
ROS assay



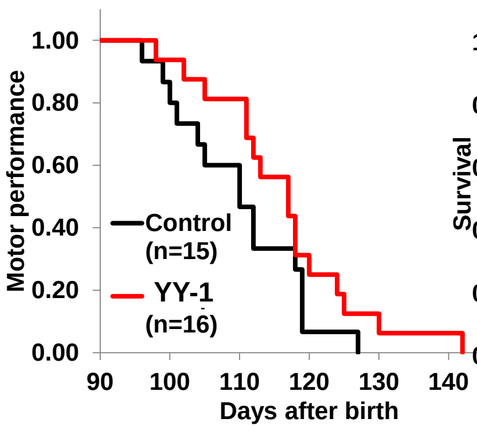
ODAP-EA assay

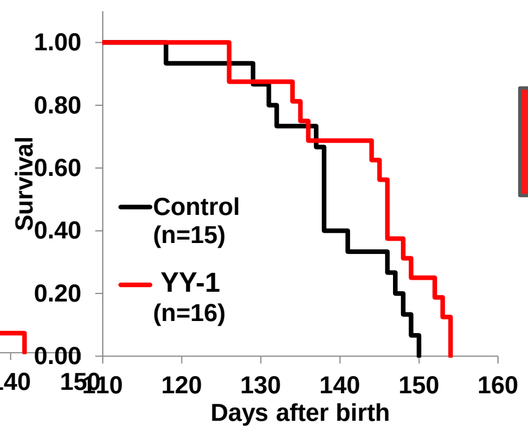


Dual-luciferase assay



＜ALSモデル動物実験＞





第1回 (小規模試験 n= 16)　生後60日から経口投与

性別	頭数	YY-1 *p.o.*	運動	生存
雄	5	1 mg/kg	1日延長	8日延長
	5	10 mg/kg	5日短縮	9日延長
雌	実施せず			

第2回 (大規模試験 n= 62)　生後45日から経口投与

性別	頭数	YY-1 *p.o.*	運動	生存
雄	15	5 mg/kg	1日延長	差なし
雌	16		7日延長	8日延長

まとめ

真菌由来新規化合物YY-1はALS治療薬としての*in vitro*の三活性を兼ね備え、ALSモデルマウスに対し、発症抑制ならびに寿命延長効果を示した。体重変動、肝・腎の組織像から毒性も低いことが推定されている。

応用分野・用途

モデルマウスでの最適な投与条件を見出した後で、ヒトへの臨床応用を目指したい。

自主創造 日本大学 NIHON UNIVERSITY

日本大学産官学連携知財センター（NUBIC）

〒102-8275　東京都千代田区九段南4-8-24　日本大学会館
Tel: 03-5275-8139　Fax: 03-5275-8328　E-mail: nubic@nihon-u.ac.jp　http://www.nubic.jp