

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49号

令和7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63号 | 小 路 美 彩 | 3連続アセタール構造を持つ架橋型核酸を含むオリゴ核酸の合成と物性評価 | 1 |
| 甲第64号 | 田 口 央 基 | 近位尿管領域由来不死化細胞を用いたシスプラチン腎障害発症機構の解明 | 7 |
| 甲第65号 | 佃 京 華 | 神経回路機能障害の膜電位感受性色素を用いた光計測に関する研究 — Cuprizone 誘発性脱髄による前頭前野障害と加齢による海馬機能変調 — | 14 |
| 甲第66号 | 富 田 淳 子 | 大規模レセプト調剤履歴を用いた生活習慣病薬の交付・使用に関する薬剤疫学評価 | 20 |
| 甲第67号 | 花 城 帆 乃 佳 | <i>syn</i> 配座固定プリンヌクレオチドを含むオリゴ核酸の合成と非B型DNA形成能評価 | 26 |

| | |
|---------|--|
| 氏名 | しょうじ みさ 小路 美彩 |
| 本籍 | 徳島県 |
| 学位の種類 | 博士（薬学） |
| 学位記番号 | 甲第 63 号 |
| 学位授与年月日 | 令和 7 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 | 3 連続アセタール構造を持つ架橋型核酸を含む オリゴ核酸の合成と物性評価 |
| 指導教員 | 教授 張 功幸 |
| 論文審査委員 | （主査）教授 吉田 昌裕 （副査）教授 堂上 美和 （副査）教授 山本 博文 |

mRNA を標的とするアンチセンス核酸は、翻訳を阻害してタンパク質の発現量を制御することができるため、創薬への応用が期待されている。アンチセンス核酸は一般的に様々な化学修飾が施されており、中でも、糖部の 2'位と 4'位を架橋でつないだ 2',4'-架橋型核酸が注目を集めている。架橋型核酸は、その 2',4'-架橋により、糖部の立体配座を RNA の配座と同じ N 型へと固定化することができるため、それを含むオリゴ核酸は一般的に高い RNA 結合親和性を示す。また、架橋部の立体障害のために高いヌクレアーゼ抵抗性も有している。このような架橋型核酸は、核酸医薬材料として頻繁に利用されている 2',4'-BNA/LNA や ENA をはじめとして、これまでに数多く開発されてきた。これまでの研究から架橋型核酸の架橋部の構造がオリゴ核酸の物性・性質に影響を与えることが示唆されており、架橋部にヘテロ原子や様々な置換基を導入することにより、オリゴ核酸の特性が改善することが明らかになっている。一方で、既存のものを凌駕するような架橋型核酸は未だ不足しており、有望な核酸材料の開発が望まれている。そのような中、興味深い分子デザインとして、連続するアセタールを含むユニークな構造からなる、架橋部 6'位に酸素原子を持つ架橋型核酸に着目した。これは 6'-酸素原子の周りに構築される水和ネットワークにより標的核酸との結合親和性の向上が期待される。そこで、著者は、このような構造活性相関の知見を基に、新たな架橋型核酸として、2'位かつ 6'位に酸素原子を持つ、3 つの連続アセタール構造を持つ Me-TaNA を設計した (Figure 1)。

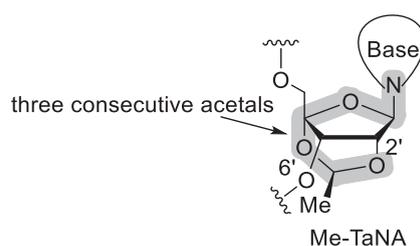


Figure 1. Molecular design of Me-TaNA.

第一章は、Me-TaNA を含むオリゴ核酸を合成し、相補鎖核酸との二重鎖安定性及びヌクレアーゼ抵抗性の評価を行った。また、架橋部のメチル基が二重鎖安定性やヌクレアーゼ抵抗性に与える影響を調べるため、無置換 TaNA との比較を行った。それぞれの合成に関しては、5-メチルウリジンを出発原料としてオリゴ核酸合成の材料となるホスホアミダイト体へと誘導し、DNA 自動合成機を用いてオリゴ核酸に導入した。

合成した修飾オリゴ核酸の相補鎖核酸に対する二重鎖の熱安定性を T_m 測定により評価した。その結果、Me-TaNA を含むオリゴ核酸は天然のオリゴ核酸よりも相補鎖 RNA との二重鎖を劇的に安定化し、核酸材料として頻繁に利用されている 2',4'-BNA/LNA や ENA 修飾のものと同様の高い RNA 結合親和性を示した。また、Me-TaNA 修飾の相補鎖 RNA に対する二重鎖の安定化能は相補鎖 DNA に対するものよりも高く、Me-TaNA 修飾は RNA 選択性を有することが示された。従って、Me-TaNA を含むオリゴ核酸は 2',4'-BNA/LNA や ENA 修飾に匹敵する実用レベルの相補鎖核酸認識能を持ち、かつ核酸創薬に好都合な RNA 選択性を有することが示された。一方、無置換 TaNA 修飾との比較により、架橋部のメチル基は二重鎖の安定性に影響を与えないことが示された。核酸塩基識別能においては、Me-TaNA 修飾は対応する塩基と選択的に結合できることが確認され、2',4'-BNA/LNA や ENA 修飾と同様の十分な塩基選択性を有することが示された。また、Me-TaNA を含む二重鎖の全体的な構造は CD 測定により A 型の二重らせん構造であることが確認され、1 カ所修飾しただけでも RNA 二重鎖様の構造をとることが示された。

次に、Me-TaNA を含むオリゴ核酸のヌクレアーゼに対する抵抗性を評価した。その結果、Me-TaNA 修飾は天然のオリゴ核酸の抵抗性を大幅に向上し、ENA 修飾と同様の高いヌクレアーゼ抵抗性を有することが明らかになった。また、無置換 TaNA 修飾との比較により、Me-TaNA の架橋部のメチル基はヌクレアーゼ抵抗性の向上に大きく寄与していることが示された。

以上の結果から、Me-TaNA は高い RNA 結合親和性及び高いヌクレアーゼ抵抗性を有しており、アンチセンス核酸にとって有望な修飾核酸であることが示唆された。

また、最近では、二重鎖 DNA を標的とするアンチジーン核酸への関心が高まっており、2',4'-架橋型核酸を含むオリゴ核酸は二重鎖 DNA に対して高い三重鎖形成能を有することが報告されている。そこで、Me-TaNA を含むオリゴ核酸においてもアンチジーン核酸としての有用性を調べるため、 T_m 測定により評価を行った。その結果、Me-TaNA を含むオリゴ核酸は 2',4'-BNA/LNA や ENA 修飾と同等以上の高い三重鎖形成能を有することが明らかになった。また、無置換 TaNA 修飾との比較により、Me-TaNA の架橋部のメチル基は三重鎖の安定化に寄与することが示された。これらのことから、Me-TaNA 修飾はアンチジーン核酸としても有望であることが示唆された。

第二章は、前章で Me-TaNA を含むオリゴ核酸は優れた物性を有することが明らかになったため、Me-TaNA を上回る特性を持つ新たな材料の開発を目指した。架橋部のメチル基をよりかさ高くした、比較的合成が容易である 4 種類の TaNA 誘導体 (Hydroxymethyl-TaNA, Methoxymethyl-TaNA, Aminomethyl-TaNA, Acetamidomethyl-TaNA) に関して、それらを含むオリゴ核酸の相補鎖核酸との二重鎖安定性及びヌクレアーゼ抵抗性を評価した (Figure 2)。これらの合成については、共通の合成中間体からそれぞれ

れ対応する官能基変換を行い、オリゴ核酸合成の材料となるホスホロアミダイト体へと誘導した後、DNA 自動合成機を用いてオリゴ核酸に導入した。

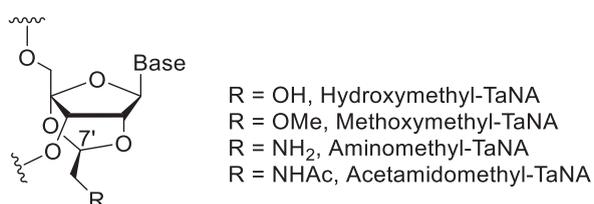


Figure 2. Structure of Me-TaNA derivatives.

合成した TaNA 誘導体を含むオリゴ核酸の相補鎖核酸に対する二重鎖の熱安定性を T_m 測定により評価した。その結果、いずれの TaNA 誘導体においても Me-TaNA 修飾と同様の高い RNA 結合親和性及び RNA 選択性を有することが示された。従って、架橋部にメチル基よりもかさ高い置換基を導入しても、相補鎖 RNA に対する二重鎖の安定性に影響を与えないことが示唆された。また、CD 測定により 4 種類の TaNA 誘導体を含む二重鎖の構造は、Me-TaNA と同様、RNA 二重鎖様の構造になっていることが示された。

次に、3 種類の TaNA 誘導体 (Methoxymethyl-TaNA, Aminomethyl-TaNA, Acetamidomethyl-TaNA) を含むオリゴ核酸のヌクレアーゼに対する抵抗性を評価した。その結果、いずれの TaNA 誘導体においても Me-TaNA 修飾と同様の高いヌクレアーゼ抵抗性を有することが示された。

さらに、二重鎖 DNA に対する三重鎖の熱安定性は、いずれの TaNA 誘導体においても Me-TaNA 修飾と同様の高い三重鎖形成能を示した。従って、メチル基よりもかさ高い置換基を導入しても、二重鎖 DNA に対する三重鎖の安定性に大きな影響を与えないことが示唆された。

以上の結果から、架橋部に比較的かさ高い置換基を持つ TaNA 誘導体に関しても Me-TaNA と同様の高い RNA 結合親和性及び高いヌクレアーゼ抵抗性を有することが示された。従って、将来的に TaNA を母格として、架橋部の置換基をさらに種々検討することにより、高い二重鎖安定性や高いヌクレアーゼ抵抗性に加え、さらに別の新しい機能を付与させた有用な材料の開発ができると考えられる。

以上、本研究により、Me-TaNA 及び TaNA 誘導体を含むオリゴ核酸は高い RNA 結合親和性及び高いヌクレアーゼ抵抗性、さらに高い三重鎖形成能を有することが示された。近年では、1 つのオリゴ核酸から様々な誘導体を合成できるオリゴ核酸合成後修飾法が報告されている。この手法を利用することで、TaNA の架橋部に様々な置換基を導入したオリゴ核酸が効率的に合成でき、今回合成した TaNA 誘導体を上回る新たな材料の創出につながることを期待される。このように、TaNA 誘導体は核酸医薬材料として有望であり、今後の核酸創薬や核酸テクノロジーの進展に役立つと考えられる。

論文審査結果の要旨

本論文は 2 つの章から構成されており、3 連続アセタール構造を含む架橋型核酸を設計し、それを含むオリゴ核酸の合成と物性評価について論じている。mRNA を標的とするアンチセンス核酸は一般的に様々な化学修飾が施されており、中でも、糖部の 2'位と 4'位を架橋でつないだ架橋型核酸が近年、注目を集めている。この架橋型核酸はこれまで多数報告されているが、核酸材料として実用されているものは少なく、高い RNA 結合親和性及び高いヌクレアーゼ抵抗性を併せ持つ有望な核酸材料の開発が望まれている。そこで著者は、構造活性相関の知見を基に、高い特性を有することが期待される架橋部に 2 つの酸素原子を持つ、ユニークな構造から成る Me-TaNA 及びその誘導体を設計し、本架橋型核酸の合成と物性評価を行った。

第一章では、この Me-TaNA を合成し、それを含むオリゴ核酸の物性評価を行った。また、比較検討のため無置換 TaNA についても合成した。合成に関しては、出発原料 5-メチルウリジンからオリゴ核酸合成の材料となるホスホロアミダイト体をそれぞれ合成し、DNA 自動合成機を用いて、修飾オリゴ核酸を合成した。物性の評価方法としては、合成した修飾オリゴ核酸の標的核酸に対する二重鎖の安定性及びヌクレアーゼに対する抵抗性、二重鎖 DNA に対する三重鎖の安定性の評価を実施し、核酸材料として利用されている 2',4'-BNA/LNA や ENA 修飾のものと比較した。二重鎖の安定性においては、Me-TaNA 修飾オリゴ核酸は 2',4'-BNA/LNA 及び ENA 修飾に匹敵する実用レベルの相補鎖核酸認識能を持ち、かつ核酸創薬に好都合な RNA 選択性を有することが示された。また、架橋部のメチル基が二重鎖の安定性に与える影響について調べるため、無置換 TaNA 修飾オリゴ核酸と比較検討を行った。その結果、Me-TaNA 修飾の二重鎖の安定性は無置換 TaNA 修飾と同様であり、架橋部のメチル基は二重鎖の安定性に影響を与えないことが示された。ヌクレアーゼに対する抵抗性においては、Me-TaNA 修飾は ENA 修飾と同様、高いヌクレアーゼ抵抗性を有することが明らかになり、架橋部のメチル基はヌクレアーゼ抵抗性の向上に大きく寄与することが示された。二重鎖 DNA に対する三重鎖の安定性においては、2',4'-BNA/LNA 及び ENA 修飾と同等以上の高い

三重鎖形成能を有することが明らかになり、架橋部のメチル基は三重鎖の安定化に寄与することが示された。

第二章では、架橋部にメチル基よりもかさ高い置換基を持つ 4 種類の TaNA 誘導体 (Hydroxymethyl-TaNA, Methoxymethyl-TaNA, Aminomethyl-TaNA, Acetamidomethyl-TaNA) を合成し、それらを含むオリゴ核酸の物性評価を行った。合成に関しては、共通の合成中間体からそれぞれ対応する官能基変換を行い、ホスホロアミダイト体を合成した後、DNA 自動合成機を用いて、修飾オリゴ核酸を合成した。合成した TaNA 誘導体を含むオリゴ核酸のいずれの場合においても、Me-TaNA 修飾と同様、高い RNA 結合親和性及び高いヌクレアーゼ抵抗性、さらに高い三重鎖形成能を有することが示された。従って、架橋部にかさ高い置換基を導入しても、二重鎖及び三重鎖の安定性に影響を与えず、高いヌクレアーゼ抵抗性を維持できる可能性が示唆された。

以上のように著者は、3 連続アセタールを持つ TaNA 誘導体の合成に成功した。更に本架橋型核酸を含むオリゴ核酸は高い RNA 結合親和性、高いヌクレアーゼ抵抗性、高い三重鎖形成能を有することを見出した。近年では、様々な種類のオリゴ核酸が効率的に合成できるオリゴ核酸合成後修飾法が報告されており、この手法を用いることにより、今回合成した TaNA 誘導体を上回る特性を持つ新たな材料の創出につながることを期待される。以上得られた知見により、今後の核酸創薬や核酸テクノロジーの進展が期待され、薬学的に重要であると考えられる。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) 吉田 昌裕

副査 (教授) 堂上 美和

副査 (教授) 山本 博文

| | |
|---------|--|
| 氏名 | たぐち ひろき 田口 央基 |
| 本籍 | 徳島県 |
| 学位の種類 | 博士（薬学） |
| 学位記番号 | 甲第 64 号 |
| 学位授与年月日 | 令和 7 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 | 近位尿細管領域由来不死化細胞を用いた シスプラチン腎障害発症機構の解明 |
| 指導教員 | 教授 角 大悟 |
| 論文審査委員 | （主査）教授 鈴木 真也 （副査）教授 深田 俊幸 （副査）准教授 堀ノ内 裕也 |

【背景】

シスプラチン (CDDP; cis-diamminedichloro-platinum(II)) は、臨床応用された最初の白金系抗がん剤であり、現在も精巣がん、卵巣がん、肺がんなどの幅広い固形がんの治療に使用されている。しかし、CDDP は主に腎臓から排泄されるため、CDDP 化学療法を受けている患者の約 30%で腎障害が発症する。CDDP 腎障害の発症は、化学療法の中止や減薬を検討する必要があるため、患者の予後に重大な影響を及ぼす。また、実験動物に CDDP を投与する研究により、CDDP が腎臓近位尿細管 S3 領域に特異的な障害を引き起こすことが示されている。しかし、この CDDP による S3 領域特異的な毒性発現の分子機序は、明らかになっていない。

本研究では、「CDDP の S3 領域における高感受性には何が関与しているのか？」を学術的な「問い」として位置付け、CDDP 腎障害における責任因子を特定することを目的とした。具体的には、同一種由来で近位尿細管 S1, S2, S3 領域由来の 3 種揃った唯一の細胞株であるマウス腎臓近位尿細管領域由来不死化細胞を活用することで、各領域における CDDP の反応性の違いについて詳細な検討に取り組んだ。

【第 1 章 白金系抗がん剤による各領域由来不死化細胞間での感受性の比較】

本章では、マウス腎臓近位尿細管 S1, S2, S3 細胞を用いて、白金系抗がん剤に対する感受性の評価、腎障害マーカーの解析、および細胞内 Pt 蓄積量の比較を行った。また、CDDP の細胞内輸送に関与するトランスポーターのタンパク質発現量を解析し、細胞間で比較した。その結果、実験動物を用いた先行研究と同様に、近位尿細管 S3 領域由来である S3 細胞が白金系抗がん剤に対して最も高い感受性を示すことが明らかとなった。また、この高感受性は、細胞内 Pt 蓄積量やトランスポーターの発現量では説明できず、その他の要因が関与する

可能性が示唆された。次章より、S3細胞におけるCDDP高感受性の機序を明らかにするために、CDDP曝露後の細胞間での応答性の違いを比較し、CDDP腎障害の解明を目指した。

【第2章 S3細胞におけるCDDP高感受性にフェロトーシスが関与する】

CDDP腎障害における細胞死には、活性酸素種（ROS）の増加による酸化ストレスの亢進が関与することが報告されている。しかし、CDDP曝露による細胞毒性において、近位尿細管細胞のどの領域で、どのような種類の細胞死が起こるかについては明らかになっていない。本章では、S1, S2, S3細胞を用い、S3細胞がROS関連物質（パラコート（PQ）、過酸化水素、クメンヒドロペルオキシド、*tert*-ブチルヒドロペルオキシド）に対しても脆弱であるかを調べ、CDDPに対するS3細胞の高感受性にROSが関与するかについて検討した。

ROS関連物質に対する細胞毒性試験の結果からLC₅₀値を算出して比較したところ、すべてのROS関連物質に対して、S3細胞がS1, S2細胞より2~3倍高い値を示した。一方、S3細胞におけるCDDPの感受性は、S1, S2細胞より10~15倍高い値を示したことから、S3細胞におけるCDDPの高感受性には、ROS以外の要因が関与するのではないかと考えた。そこで、細胞内でROSを産生することが既に知られているPQを比較対象として更なる検討に取り組んだ。その結果、CDDP曝露後のS3細胞では、細胞内ROS量の増加に加え、抗酸化タンパク質の減少、細胞内遊離Fe²⁺量の増加、および細胞内過酸化脂質の増加といった複数の要因から鉄依存性細胞死（フェロトーシス）が誘導されることが明らかとなった。

【第3章 CDDP短時間曝露による遅発性腎障害機構の解明】

CDDP腎障害は、ラットを用いた研究で投与後3~5日目に発症することが報告されている。一方、CDDPは投与後72時間以内に90%以上が尿中に排泄されることが知られている。これらの研究論文から、CDDPは腎臓から速やかに排泄されるにもかかわらず、遅発性の腎障害を引き起こすというユニークな特性

を持つ。しかし、CDDP による遅発性腎障害の発症機序に関する詳細な研究は行われていない。本章では、CDDP による遅発性腎障害の分子機構を明らかにするため、実験動物および S1, S2, S3 細胞を用いた検討に取り組んだ。

CDDP を腹腔内単回投与したマウスにおいて、CDDP の腎臓組織中 Pt 蓄積量は投与後 15 分でピークに達し、腎障害は投与後 4 日目に発症した。このことから、既報通り CDDP は、投与後速やかに腎臓に取り込まれた後、数日後に腎障害を引き起こした。次に、S1, S2, S3 細胞を用いた *in vitro* 実験においても、CDDP の細胞内 Pt 蓄積量は曝露後 15 分でピークを示した。さらに、CDDP の 15 分間曝露によって、いずれの細胞においても培養日数依存的に増強する細胞死が観察され、特に S3 細胞で高感受性を示した。これらの結果から、S1, S2, S3 細胞においても CDDP による遅発性毒性が検出できることが明らかとなった。また、CDDP 曝露によって S1, S2, S3 細胞では、DNA 付加体形成を介した細胞周期障害が誘導され、その影響が S3 細胞で最も大きいことを明らかにした。

【第 4 章 CDDP 耐性細胞を用いた新規腎障害責任因子の探索】

一部のがん細胞は、CDDP 化学療法において CDDP 耐性を獲得することが報告されている。がん細胞における CDDP 耐性の獲得は、治療効果を低下させ、がんの再発や転移、生存率の低下につながる可能性があり、CDDP 化学療法における臨床上的大きな課題である。CDDP 耐性獲得機構として、細胞内 Pt 蓄積の低下、SH 基を有するグルタチオンやメタロチオネインなどの CDDP との結合による CDDP の不活化などが報告されている。これらの研究は、各種がん細胞の培養細胞株に対して CDDP 耐性を獲得させることで検討が行われてきた。一方、副作用の標的となる腎臓近位尿細管細胞に CDDP 耐性を獲得させる研究は、ほとんど行われていない。本章では、近位尿細管細胞の中でも特に CDDP に対して高感受性を示す S3 細胞を親株細胞として、CDDP 耐性細胞 (CisR 細胞) を樹立し、S3 細胞と CisR 細胞間での性状解析を行うことで、これまで報告されていなかった新規 CDDP 腎障害の責任因子の同定が可能になるのではないかと考え、検討に取り組んだ。

S3 細胞に CDDP を低濃度で曝露し、生存した細胞のみを継代することで、最終的には、CDDP に約 14 倍の耐性を獲得した細胞 (CisR 細胞) を樹立した。さらに、CDDP を曝露した CisR 細胞では、S3 細胞と比較して、細胞内 Pt 量が増加し、DNA 中 Pt 量は低下していた。この結果から、CisR 細胞では細胞質中で CDDP と結合するデオイタンパク質が高発現しているのではないかと仮説を立てた。DNA マイクロアレイ法によって、CisR 細胞においてセレノプロテイン P (SeP) の発現量が 10.68 倍増加しており、タンパク質発現量も同様に増加していた。さらに、S3 細胞に対する SeP ノックダウンを検討したところ、SeP のタンパク質発現量の増加が CDDP による細胞毒性の抑制に寄与することが示唆された。今後は、CDDP 腎障害に対する新規治療標的として SeP の確立を目指すため、SeP による CDDP 腎障害の防御機構について詳細な検討を行う。

論文審査結果の要旨

本論文は4章からなり、近位尿細管 S1, S2, S3 領域由来不死化細胞 (S1, S2, S3 細胞) を使用することで、シスプラチン (CDDP) 腎障害の発症機構の解明を目的とした研究について論じられている。

第1章では、実験動物を用いた先行研究と同様に、近位尿細管 S3 領域由来である S3 細胞が白金系抗がん剤に対して最も高い感受性を示すことを明らかにし、この S3 細胞における高感受性は、細胞間における細胞内 Pt 蓄積量やトランスポーターの発現量では、説明できないことを示している。そこで著者は、CDDP 曝露後の S1, S2, S3 細胞間での反応性の違いについて着目し、研究を展開した。

第2章では、CDDP による S3 細胞の高感受性に活性酸素種 (ROS) が関与するのかについて検討を行っている。CDDP を曝露した S3 細胞では、細胞内 ROS 量の増加だけでなく、細胞内過酸化脂質量も増加しており、この増加は細胞内遊離 Fe^{2+} 量の増加や過酸化脂質の消去に関与するグルタチオンペルオキシダーゼ 4 (GPX4) のタンパク質発現量が低下することに起因することを見出している。その結果、CDDP を曝露した S3 細胞ではフェロトーシスが誘導されており、S3 細胞における CDDP 高感受性に関与していることを示唆している。

第3章では、CDDP による遅発性腎障害の分子機構を明らかにするため、S1, S2, S3 細胞を用いた検討に取り組むことで、S1, S2, S3 細胞においても CDDP による遅発性毒性が検出できることを明らかにしている。また、CDDP 曝露によって S1, S2, S3 細胞では、DNA 付加体形成を介した細胞周期障害が誘導され、その影響が S3 細胞で最も大きいことを見出している。

第4章では、近位尿細管細胞の中でも特に CDDP に対して高感受性を示す S3 細胞を親株細胞として、CDDP 耐性細胞 (CisR 細胞) を樹立し、S3 細胞と CisR 細胞間での性状解析を行うことにより、CisR 細胞ではセレン含有タンパク質であるセレノプロテイン P のタンパク質発現量が増加していることを見出してい

る。また、SePのタンパク質発現量を増加させることで、CDDPによる細胞毒性が軽減されることを明らかにしている。

以上、これらの研究より、近位尿細管領域由来不死化細胞であるS1, S2, S3細胞がCDDP腎障害の発症機構解明に有用であることを見出し、CDDPによる様々な細胞応答について明らかにしている。本研究で得られた結果は、CDDP腎障害の発症機構の解明に大きく貢献できるものであると判断できる。また、筆頭著者として学術論文3報を含む、計6報を既に発表しており、業績としても十分である。よって、本博士論文は博士（薬学）の学位に値するものと評価された。

| | | |
|--------|---------|-------|
| 論文審査委員 | 主査（教授） | 鈴木 真也 |
| | 副査（教授） | 深田 俊幸 |
| | 副査（准教授） | 堀ノ内裕也 |

| | |
|---------|--|
| 氏名 | つくだ きょうか 佃 京華 |
| 本籍 | 香川県 |
| 学位の種類 | 博士（薬学） |
| 学位記番号 | 甲第 65 号 |
| 学位授与年月日 | 令和 7 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 | 神経回路機能障害の膜電位感受性色素を用いた光計測に 関する研究 -Cuprizone 誘発性脱髄による前頭前野障害と加齢による海馬機能変調- |
| 指導教員 | 教授 富永 貴志 |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 野地 裕美 |
| | (副査) 教授 山田 麻紀 |
| | (副査) 講師 小林 卓 |

神経細胞は、活動電位を軸索といわれる突起構造を用いることで情報を遠くまで伝え（伝導）、処理している。脳の神経細胞の多くは軸索が髄鞘（ミエリン）によって覆われた有髄神経であり、それにより神経の伝導速度を飛躍的に高めた跳躍伝導を可能にしている。この有髄神経の軸索が集積して走行している領域を白質と呼び、脳の離れた領域や左右半球間を接続して、特定領域間で情報のやり取りを行っている。難病として知られる多発性硬化症（Multiple Sclerosis ; MS）では、この髄鞘が破壊（脱髄）されることで脳内の領野間の情報伝達が阻害され、様々な神経症状がおこると考えられている。これまでに MS の病態は、分子病理学的な観点や fMRI などの非侵襲的機能評価を用いて調べられてきた。しかし、神経回路レベル、特に脳内の左右大脳半球間における機能的な欠損については解析手法が限られており、十分には解明されていない。そこで本研究では、脱髄による前頭前野の神経回路機能障害を明らかにすることを目的として、これまでに前頭前野の急性脳スライスにおける広範囲の神経回路解析に成功している膜電位感受性色素を使用したイメージング（VSDI）と免疫組織学的解析を組み合わせ、Cuprizone（CPZ）誘発性脱髄モデルマウスにおける前頭前野の神経興奮伝播障害について解析した。また、後半では、加齢による脳内炎症を伴った神経回路機能の変調を明らかにすることを目的とし、上記と同様の解析手法により、記憶の座とされる海馬における、神経回路機能障害と脳内炎症の関係について解析した。

本博士論文は 4 つの章からなり、第 1 章 諸論では本研究の背景および目的を述べると共に、多発性硬化症と CPZ モデルの関連性や半球間の情報伝達において重要な役割を果たす脳梁（Corpus Callosum; CC）と前帯状皮質（Anterior Cingulate Cortex; ACC）、MS モデルの作製に古くから用いられている CPZ の給餌投与による脱髄のメカニズムと神経病理、そして VSDI の特徴と病態モデルへの適用について述べた。

第 2 章では、「膜電位感受性色素イメージング法を用いた CPZ 誘発性脱髄によるマウス前頭前野障害の解明」について述べた。銅キレーター CPZ は、げっ歯類で髄鞘の脱落を引き起こすことが知られている。また、脱髄の病態が MS を代表とする脱髄関連疾

患の病態に類似していることから、MS 動物モデルの作製に古くから用いられている。特に、CPZ は投与を中止すると髄鞘の再生が起こるため、脱髄と再髄鞘化の研究に適している。CPZ の脱髄効果は CC で顕著であり、CC は大脳の大脳半球間の情報伝達を担う主要構造である。CC は前頭前野の ACC で重要な役割を果たしているが、脱髄が神経興奮伝播に与える影響については未解明である。そこで、本研究では脱髄によるマウス前頭前野の神経回路機能障害を解明する目的で、これまでに先行研究で前頭前野の急性冠状断脳スライスにおける広範囲の神経回路解析に成功した膜電位感受性色素を使用した VSDI を用いて、CPZ 誘発性脱髄モデルマウスにおける前頭前野の神経興奮伝播を可視化した。その結果、CPZ 投与による左右大脳半球間の神経興奮伝播の障害は、前頭前野において、特定の冠状断スライス標本で最も深刻であることが明らかになった。また、CPZ 投与を中止すると半球間の神経興奮伝播はほぼ回復したが、組織化学的評価では顕著な回復が見られなかった。これらの結果は、CPZ モデルのような病態モデルにおいて生理学的アッセイを用いる必要性を示している。

第 3 章では、「膜電位感受性色素イメージング法を用いた加齢による海馬機能変調の解明」について述べた。近年、医学や医療技術のめざましい進歩により、寿命は延び、高齢人口が急増している。そのため、加齢に伴う神経変性疾患や認知機能障害（アルツハイマー病など）の有病率も上昇している。したがって、神経変性疾患や加齢に伴う通常の認知障害の根底にあるメカニズムの解明は、高齢化に伴う認知機能低下を予防または改善するために重要である。最近では、加齢に伴う神経回路の過興奮が問題視されており、代表的な認知機能障害であるアルツハイマー病でも重要な危険因子である。神経回路の過興奮は、電気生理学的手法や神経活動マーカーの上昇を通じて度々示されるが、神経回路自体の興奮性を直接可視化した研究は限られている。これらの知見の蓄積にもかかわらず、正常な加齢動物における海馬の機能的な理解は未だ不十分であり、神経興奮伝播を可視化した例はほとんどない。そこで、本研究では、海馬における加齢による脳内炎症を伴った神経回路の変調を明らかにすることを目的とし、VSDI により 70 週齢のマウスにおける海馬神経興奮伝播を可視化し、さらに、その光計測に用いたスライスを使用して、脳内炎症に関与するミクログリアとアストロサイトについての免疫組織化学的解析をおこなった。その結果、VSDI では老齢マウスにおいて海馬 CA1 領域での過

興奮性が見られた。免疫染色では、老齢マウスにおいて VSDI の電気刺激によりミクログリアおよびアストロサイトがより顕著に活性化されることが明らかになった。これらの結果は、加齢に伴う神経回路の興奮性増大と同時に、脳内炎症の発生に対する脆弱性の増大を示唆している。

本研究は、CPZ 誘発性脱髄モデルを用いて、機能的評価が組織学的評価を補完する重要性を示し、前頭前野における神経回路機能の障害と回復過程を可視化した点で意義深い。特に、神経興奮伝播の障害が特定の部位で顕著であること、神経回路の機能的な回復が組織学的評価と必ずしも一致しないことを明らかにした点は、脱髄疾患の病態解明や治療法開発に貢献するものである。また、加齢に伴う海馬神経回路の過興奮とグリア細胞の過剰活性化を示すことで、認知機能低下やアルツハイマー病の理解に新たな知見を加えた。これらの結果は、神経回路の機能評価が今後の脱髄疾患や加齢関連疾患の予防・治療戦略における重要な基盤となることを示唆している。

最後に第1章から第3章までで得られた知見を第4章にまとめ、本論文の総括とした。

論文審査結果の要旨

本論文は、膜電位感受性色素 (VSD) イメージング手法を用いて広角視野での細胞膜電位の変化を可視化し、毒物誘発性脱髄モデルマウスの前頭前野での両側性神経伝導障害、及び、加齢による海馬機能変調、について、神経回路レベルでの解明を目指して行われた研究であり、4つの章で構成されている。

第1章では、緒論として、主に研究背景（先行研究）をまとめている。中枢神経系における代表的な脱髄疾患と知られている多発性硬化症とクプリゾン（CPZ、正式名称は Bis(cyclohexanone) Oxalyldihydrazone）によって誘発される脱髄モデルの関連性、CPZの給餌投与による脱髄のメカニズムと神経病理、及びVSDイメージングの特徴と病態モデルへの適用について述べられている。

第2章では、実験結果について述べている。①CPZ誘発性脱髄マウスモデルの冠状断前頭前野スライスを用いてVSDイメージングを行い、②脱髄した脳の特定の位置でのスライスにおいて、顕著な半球間連絡の障害が生じること、③CPZ投与を中止し再髄鞘化させた回復マウスでは、髄鞘形成の回復は不十分であるものの半球間の神経活動伝播はほぼ回復するという、非常に興味深い3点の生理学的知見を見出した。また、神経回路研究における生理学的手法を用いた機能解析と組織病理学的手法による構造解析に違いもあることから、双方を組み合わせた評価の必要性を示した。

第3章では、70週齢の老齢マウスの海馬スライスを用いてVSDイメージングと蛍光染色を行い、加齢に伴う海馬機能変調の解析結果を示した。VSDイメージングでは老齢マウスにおいて過興奮の傾向が見られた。また、免疫蛍光染色では老齢マウスにおける加齢に伴うミクログリアの活性化と、刺激によるミクログリアおよびアストロサイトの活性化が見られ、老化脳の炎症性グリア細胞の刺激に対する過敏性が示された。アルツハイマー病での、根本的な原因として、近年、過興奮や脳内炎症が注目されていることから、加齢脳での生理学的な特徴の理解はアルツハイマー病の発症予防のために重要であることを示唆した。

第4章では、総括として第1章から第3章までに得られた主要な知見をまとめ、考察している。

以上のように、本論文では、広角視野での膜電位感受性色素イメージング手法は、脳神経活動を解析する上で非常に有用な手法であることを示した。特に、この手法による生理学的解析と、組織学的解析を組み合わせることで、CPZ投与を中止した回復マウスでは、半球間の神経活動伝播は回復するものの脳梁の再髄鞘化は部分的な回復にとどまるという新奇な発見を提示した。回復マウスで観察された構造的回復と機能的回復の不一致は、生理学的評価と組織学的評価を統合することの重要性を示しており、VSDを用いたイメージング技術は、組織学的評価では見逃される可能性のある機能的代償メカニズムの解明にも貢献すると考えられる。本研究の内容は、主論文1報として公表されており、業績としても充分である。したがって、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） | 野地 裕美 |
| | 副査（教授） | 山田 麻紀 |
| | 副査（講師） | 小林 卓 |

| | |
|---------|---|
| 氏名 | とみだ じゅんこ 富田 淳子 |
| 本籍 | 香川県 |
| 学位の種類 | 博士（薬学） |
| 学位記番号 | 甲第 66 号 |
| 学位授与年月日 | 令和 7 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 | 大規模レセプト調剤履歴を用いた生活習慣病薬の交付・ 使用に関する薬剤疫学評価 |

| | | |
|------|----|--------|
| 指導教員 | 教授 | 飯原 なおみ |
|------|----|--------|

| | | |
|--------|--------|------|
| 論文審査委員 | （主査）教授 | 芳地 一 |
|--------|--------|------|

| | | |
|--|--------|------|
| | （副査）教授 | 代田 修 |
|--|--------|------|

| | | |
|--|--------|-------|
| | （副査）講師 | 小林 隆信 |
|--|--------|-------|

論文の内容要旨

富田 淳子

高齢化が進む日本では医療費は増大し、中でも薬剤費の占める割合は大きく2割を超えている。生活習慣病薬は高齢になるほど使用割合は高くなり、長期使用されることから、予期しない作用・副作用が生じたり飲み残しや不必要な処方継続による残薬が発生したりする。結果として、健康被害や薬の過剰交付が生じることとなり、これは国民医療費の増加の要因となり得る。生活習慣病薬は多くの疾患に用いられ、その使用状況は薬の種類や地域の医療体制、患者一人ひとりの性格や習慣によって様々である。薬の使用状況を把握し、個々の患者の状態に応じた生活習慣病薬の適正使用を推し進めることが、医療費適正化に寄与すると考えられる。

医療データベースが以前から存在する諸外国では、薬の使用状況や交付状況に焦点を当てた医薬品使用研究が薬剤疫学研究の一領域として存在し、医薬品適正使用や医療費削減の施策などにデジタルデータが活用されている。一方、日本においては、デジタルデータにより医薬品使用状況を大規模に評価した研究は少なく、デジタルデータの医療施策への活用は十分ではない。

本研究は、日本の医療における生活習慣病薬の医薬品使用状況と問題点を明らかにし、デジタルデータを数値化することで、その指標を医療施策に適用できるツール開発ならびに医療施策立案への活用を目指している。このために、病院や薬局が変更しても患者を追跡できるレセプトデータベースのうち二つの大規模データベースの調剤履歴を用いて、日本の55歳以上の生活習慣病薬の交付・使用状況について解析した。

まず、悉皆性が高く長期間の患者追跡が可能な匿名医療保険等関連情報データベース (National Database of Health Insurance Claims and Specific Health Checkups of Japan, NDB) を用いて、生活習慣病薬の中でも、心血管疾患 (cardiovascular diseases, CVD) の予防に用いられる脂質異常症治療薬 (lipid-modifying agent,

LMA) に着目した研究に取り組んだ。HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (スタチン) に注目し、スタチンの継続率と薬物治療アドヒアランスの proportion of days covered (PDC) を解析した。その結果、スタチン開始者の多くは、開始後間もなくスタチン使用を中止していたことが示された。また、継続率と薬物治療アドヒアランスは、CVD 一次予防者と二次予防の女性において低いことが見出された。これまでの海外の報告では、一次予防、二次予防いずれにおいてもスタチンの継続率は女性で低いとされ、本研究結果とは異なっている。

そこで、この二次予防でのみ観察された性差の知見がスタチン以外の LMA においても同様であるかを確認するため、スタチンの他、エゼチミブ、フィブラートを単独で開始した者 (つまり、開始前及び開始時に他の LMA を使用していない者) において、薬剤クラス別に、継続率、薬物治療アドヒアランス (PDC)、再開率を算出し、CVD 予防別に比較した。使用開始後に間もなく薬を中止する傾向はいずれの薬剤クラス、いずれの予防でも観察されたが、継続率と薬物治療アドヒアランスの顕著な性差は二次予防のスタチン開始者でのみ観察され、女性で低かった。二次予防のスタチンを除いては、いずれの薬剤クラス、いずれの予防においても、継続率の性差は無視できるほど小さく、薬物治療アドヒアランスの性差もわずかであった。この性差の理由として考えられうることに、スタチンの有害事象の発現が女性で多いことがあげられる。しかし、スタチンの再開率は比較的高く、いずれの予防においても再開率に性差がないことを考慮すると、観察された性差が有害事象の発現に起因するとは考えにくく、スタチン使用における性差の理由を明らかにするためには更なる研究が必要である。

これら上記の研究を通して、薬物治療アドヒアランス指標には PDC の他に medication possession ratio (MPR) があり、MPR は薬物治療アドヒアランスの実態を示すだけでなく、医薬品の過剰交付の程度を測ることができることに気づいた。そこで過剰交付に着目した研究に、高齢者のレセプト情報を多く含む DeSC データベースを用いて取り組んだ。日本における 5 つの生活習慣病薬 (第 3 世代カルシウム拮抗薬、アンギオテンシン II 受容体拮抗薬、スタチン、ジペプチジルペプチダーゼ-4 阻害薬、ビッグアニド系薬) の過剰交付を、まず、MPR により特定して個々の患者の過剰交付の程度を求め、つぎに、

過剰交付者の割合ならびに年間の過剰日数及び過剰コストを算出した。さらに、過剰交付に関連する因子・理由を、定量的・定性的に解析した。いずれの薬剤クラスにおいても過剰交付者の割合は約 16 %で、年間 1 か月以上の過剰な薬を持つ患者の割合は 1~2 %であった。しかし、過剰な薬の日数が 983 日/年や、過剰な薬の金額が約 9 万円/年の者がいた。過剰交付に大きく関連していた因子・理由は、「早めの交付」と「入院処方」であり、皆保険制度や医療施設へのフリーアクセスといった日本の医療制度や、DPC 病院における入院中の持参薬使用ルールといった施策が過剰交付に大きく影響していることが示唆された。

本研究は、二つの大規模レセプトデータベースの調剤履歴を用いて日本の生活習慣病薬の交付・使用について、医薬品使用状況を可視化し、医薬品使用課題のある患者の特定、患者個々の医薬品過剰交付レベルの算出、及び、過剰交付を生み出す要因の特定を可能にした。レセプトというデジタルデータを数値化して見出された個々の患者の医薬品使用上の課題（継続率や薬物治療アドヒアランスの低い患者の検出、薬の過剰交付傾向にある患者の検出など）を、電子処方箋システムにおいてリアルタイムで提示できるツールが開発されれば、医師は処方段階で過剰な処方を回避でき、薬剤師は一層丁寧な服薬指導・フォローアップができる。さらに、デジタルデータの数値化にもとづいて見出された医薬品使用課題のある患者を集団で捉えることで、医療施策立案へ活用できると考える。このような薬剤疫学評価により導き出された指標を患者の薬物治療において活用できる社会の到来は、医療安全の向上や医療効率化を導くと考える。

論文審査結果の要旨

本論文は、大規模レセプト調剤履歴を用いて日本の生活習慣病薬の交付・使用状況について薬剤疫学的に評価した研究について論じている。高齢化が進む日本では、膨大な医療費の適正化を図るため、医薬品の適正使用に向けた取り組みが推進され、電子処方箋などデジタルデータ運用が開始されている。しかし、デジタルデータを用いて医薬品の使用状況を評価した日本の研究報告は少なく、デジタルデータの医療施策への活用は限られている。本研究は、日本の医療における生活習慣病薬の医薬品使用状況と問題点を明らかにし、デジタルデータを数値化することで、その指標を医療施策に適用できるツール開発ならびに医療施策立案への活用を目指している。

第一章では、緒論として研究背景である日本の医療費や医療制度について述べ、本論文の研究目的と概要を提示した。第二章では、薬剤疫学におけるレセプトデータ研究と、本研究で用いられた二つのレセプトデータベースの特徴について解説した。

第三章、第四章では、悉皆性の高い匿名医療保険等関連情報データベース（NDB）を用いて、日本の脂質異常症治療薬開始者の調剤履歴を解析し、医薬品使用課題のある患者を明らかにした。第三章ではまず、HMG-CoA還元酵素阻害薬（スタチン）開始者の継続率と薬物治療アドヒアランスの proportion of days covered (PDC) を解析し、スタチンの使用状況を明らかにした。スタチン開始者の多くは、開始後間もなくスタチン使用を中止し、また、心血管疾患一次予防者と二次予防の女性において継続率と薬物治療アドヒアランスが低いことを見出した。

続く第四章では、スタチン以外の脂質異常症治療薬においても第三章の結果と同様の性差があるかを確認するため、スタチン、エゼチミブ、フィブラートの継続率、薬物治療アドヒアランス（PDC）、再開率を心血管疾患予防別に比較した。薬の種類や心血管疾患予防別に関わらず、使用開始後間もなく薬を中止する傾向が観察され、二次予防のスタチン開始者でのみ、継続率と薬物治療アドヒアランスに顕著な性差があり、女性で低いことを明らかにした。さらに二次予防のスタチンを除いては、薬の種類や心血管疾患予防別に関わらず、継続率と薬物治療アドヒアランスの性差はほとん

どなかったことも示した。

第五章では、民間事業者が提供する DeSC データベースを用いた生活習慣病薬の過剰交付の研究について述べている。この研究では、薬物治療アドヒアランスの medication possession ratio (MPR) が薬の過剰交付の程度を算出できることに着目し、MPR を用いて血圧降下剤、脂質異常症治療薬、糖尿病治療薬の過剰交付を特定し、日本の医療制度における過剰交付の実態及び過剰交付に関連する因子と理由を明らかにした。年間に1か月以上の過剰な薬をもつ患者の割合はわずかであったが、中には無視できないほど過剰な薬をもつ者がいた。また、過剰交付に関連する因子と理由は、「早めの交付」や「入院処方」が大きく関連していることを明らかにした。これらの結果は、日本の医療制度や施策が影響していると示唆された。

本論文は、大規模医療データベースを用いることで、日本の医薬品使用状況を可視化し、医薬品使用に課題のある患者やその課題の要因を特定できることを示した。これらの研究結果は、医薬品の適正使用や医療者間の情報共有に活用できるだけでなく、デジタルデータ応用の幅を広げ、薬物治療における医療安全の向上や医療効率化に貢献できると期待できる。また、筆頭著者として査読付きの学術論文 4 報を既に発表しており、業績としても十分である。したがって、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） 芳地 一

副査（教授） 代田 修

副査（講師） 小林 隆信

| | |
|---------|---|
| 氏名 | はなしろ ほのか 花城 帆乃佳 |
| 本籍 | 沖縄県 |
| 学位の種類 | 博士（薬学） |
| 学位記番号 | 甲第 67号 |
| 学位授与年月日 | 令和7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 | <i>syn</i> 配座固定プリンヌクレオチドを含むオリゴ核酸の合成と 非B型DNA形成能評価 |
| 指導教員 | 教授 張 功幸 |
| 論文審査委員 | （主査）教授 田中 好幸 （副査）教授 今川 洋 （副査）教授 加来 裕人 |

DNA の高次構造は、一般的に知られている B 型 DNA の他に Z 型 DNA、三重鎖、四重鎖などの「非 B 型 DNA」構造もとる。このような特殊な DNA 構造は細胞内で局所的かつ一時的に形成され、転写、翻訳、複製など遺伝子発現の制御に重要な役割を担っている。DNA が多様な構造を形成できる要因の一つとしてプリン塩基の配向性がある。通常、プリン塩基の配座は *syn* 型と *anti* 型の平衡状態であるものの、*syn* 配座は熱力学的に不安定であるため、生体内に最も多く存在する B 型 DNA 中のプリン塩基は *anti* 型をとる。一方、*syn* 型のプリン塩基を含む核酸高次構造として、Z 型 DNA やアンチパラレル型のグアニン四重鎖などが知られている。これら非 B 型 DNA は生体内でタンパク等によってその形成が誘導されるものの、*in vitro* で形成させるには低 pH や高塩濃度など特殊な条件を必要とする。そのような背景下、*syn* 型プリンヌクレオチドを含む核酸高次構造の安定性向上を目指し、8 位に様々な置換基を導入したグアノシンアナログが開発された。これらは、8 位置換基と糖部との立体障害を避けるため *syn* 型を有利にとる。しかし、メチル基やブロモ基のように置換基が小さい場合、*syn* 型への偏りが十分でなく *anti* 型もとることが知られている。一方、フェニル基のように大きい置換基の場合、*syn* 型をとりやすくなるものの置換基のかさ高さゆえに天然の構造と大きく異なり、タンパクに認識されず生物学的機能を発現しない可能性も考えられる。そこで著者は、小さい置換基でプリン塩基を *syn* 型に固定できれば、天然の *syn* 型プリンヌクレオチドの等価体として機能する新たな核酸材料になると考えた。本研究では、*syn* 配座固定プリンヌクレオチドを含むオリゴ核酸を合成し、非 B 型 DNA として Z 型 DNA とパラレル型フーグスティーン二重鎖の二つの評価を行った。

一つ目の Z 型 DNA は、 $d(CG)_n$ のようなプリン塩基とピリミジン塩基が繰り返される配列で形成されやすい。通常は右巻きの B 型 DNA をとり、塩濃度の上昇に従ってプリン塩基のみ *anti* 型から *syn* 型に反転することで左巻き Z 型 DNA に遷移する。通常この B-Z 遷移は高塩濃度で起こるが、仮にプリン塩基を *syn* 型に固定できればより低塩濃度で Z 型 DNA を形成することが可能になると考えた (Figure 1)。

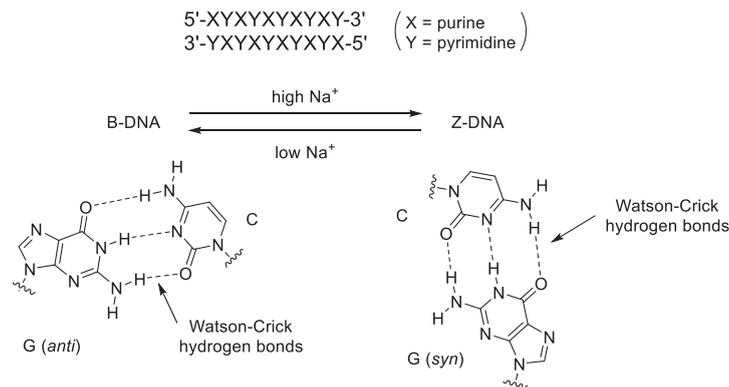


Figure 1. *syn* 型プリン塩基による Z 型 DNA の形成

パラレル型フーグスティーン二重鎖は、ホモプリン鎖とホモピリミジン鎖からなり、フーグスティーン面での水素結合を介して平行な二重鎖を形成する。しかし、CG 塩基対の形成において、*anti* 型のグアニン塩基を認識するにはシトシンはプロトン化される必要があるため、パラレル型フーグスティーン二重鎖の形成には酸性条件を必要とする。仮にプリン塩基を *syn* 型に固定できれば、フーグスティーン側でワトソクリック様水素結合を形成できるため、シトシンのプロトン化が不要となり、かつ水素結合も三本形成できるため安定なパラレル型二重鎖を pH 非依存的に形成できると考えた。一方、AT 塩基対も同様にワトソクリック様水素結合をもつ安定な二重鎖を形成できる可能性がある (Figure 2)。

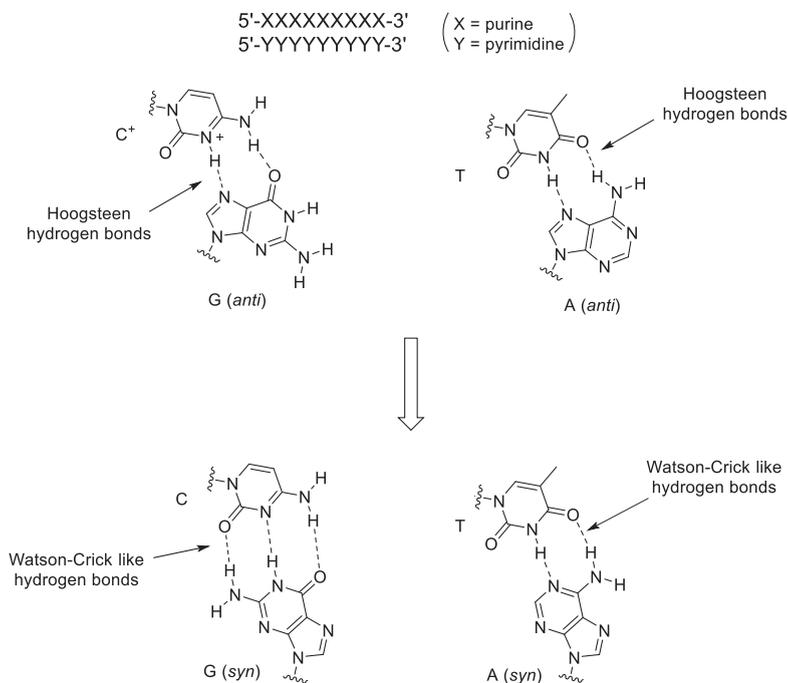


Figure 2. *syn* 型プリン塩基によるパラレル型二重鎖の形成

以上のことを実現するため、分子デザインとして Figure 3 に示しているような構造を設計した。これらのものはプリン塩基部 8 位と糖部 1'位を小さなエチレンユニットで架橋しているため、生物学的機能を妨げず天然の *syn* 型プリンヌクレオチドの等価体として機能することが期待される。

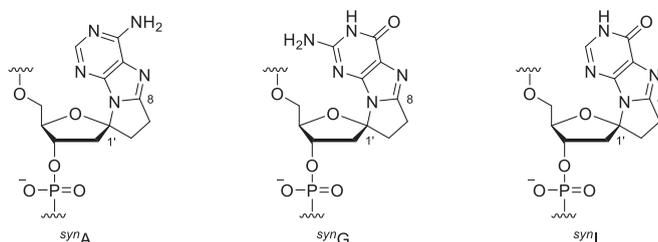


Figure 3. *syn* 型固定プリンヌクレオチド

第一章では、*syn* 配座固定 2'-デオキシアデノシン (^{syn}A)、2'-デオキシグアノシン (^{syn}G)、2'-デオキシイノシン (^{syn}I) を含むオリゴ核酸の合成を試みた。鍵反応に 1,5-水素原子移動を経由するラジカル環化反応を利用して架橋を形成することとした。その結果、2'-デオキシアデノシンの環化は成功したものの、2'-デオキシグアノシンや 2'-デオキシイノシンでは困難であった。そこで、6-クロロプリンを用いて環化反応を行ったところ望みの環化体を得ることができたため、その後塩基部をヒポキサンチンに変換し 2'-デオキシイノシンの合成に成功した。架橋構築できた ^{syn}A と ^{syn}I に関しては、その後オリゴ核酸合成で使用するためのホスホロアミダイト体へと導いた。続いて、 ^{syn}A 及び ^{syn}I のオリゴ核酸への導入を検討した。まず、 ^{syn}A の導入を行うこととし、通常用いられるオリゴ核酸の 5'末端のジメトキシトリチル基を残す手法で合成を行った。しかし、その後の簡易精製において、ジメトキシトリチル基の脱保護に用いる 1%トリフルオロ酢酸水溶液により ^{syn}A の架橋部の開環及び水の付加が起こった。そこで、オリゴ核酸合成で使用する 3%トリクロロ酢酸ジクロロメタン溶液を用いて、DNA 自動合成機上であらかじめ 5'末端のジメトキシトリチル基を脱保護し、簡易精製を行わず直接 HPLC で精製する手法を試みた。その結果、目的のオリゴ核酸を主生成物として単離することに成功した。また、 ^{syn}I に関しても後者の方法で精製することによってオリゴ核酸へ導入することができたため、評価で使用する Z 型 DNA 用配列及びパラレル型フーグスティーン二重鎖用配列からなるオリゴ核酸を合成した。

第二章では、 ^{syn}A または ^{syn}I を含むオリゴ核酸の非 B 型 DNA 形成能を評価した。まず、一つ目の Z 型 DNA 形成能は、円二色性 (CD) スペクトルを用いて B-Z 遷移の midpoint を算出し、天然の配列と比較することで評価した。一般的に、AT、AC、IC 塩基対を含む配列は GC のみの配列に比べ Z 型 DNA を形成しにくいことが知られている。実際に、GC のみの配列は約 2.5 M で B-Z 遷移が起こり、AT 塩基対を含む自己相補二重鎖は 4 M の NaCl 濃度でも Z 型 DNA を示す CD スペクトルは観察されなかった。一方、A を ^{syn}A に置換すると、約 2 M で B-Z 遷移が起こることが明らかとなった。AC 塩基対を含む配列においても同様に ^{syn}A の

導入により低塩濃度で Z 型 DNA を形成した。また、³²P の Z 型 DNA 安定化効果は ³²A より大きく、さらに低い 0.5 M で形成できることが明らかとなった。次に、パラレル型フーグスティーン二重鎖形成能の評価を行った。³²A を含む二重鎖は、pH 7.0 条件下でフーグスティーン二重鎖が解離する時の 295 nm の融解曲線が見られ、また、CD スペクトルによりパラレル二重鎖の特徴である 210 nm 付近の負のコットン効果も確認できた。続いて、³²P を含む二重鎖の中性付近 (pH 6.8–7.4) における pH 依存性を調べたところ、いずれの pH においても 295 nm のはっきりとした融解曲線が観察された。また、天然二重鎖は pH 6.8 から 7.4 の上昇に従い T_m 値は 15 °C 低下したが、一方で ³²P を導入すると 3 °C しか低下せず、pH に非依存的なパラレル型フーグスティーン二重鎖の形成を可能とした。

この *syn* 配座固定プリンヌクレオチドは、*syn* 配座をとったプリンヌクレオチド等価体として、Z 型 DNA やパラレル型フーグスティーン二重鎖に限らず、多方面に利活用できることが期待される。

論文審査結果の要旨

本論文は、天然の *syn* 型プリンヌクレオチドの等価体となる「核酸塩基とリボースの架橋により *syn* 配座に固定された新たな核酸材料」の開発に関して論じたものである。その新規 *syn* 配座固定プリンヌクレオチド誘導体を含むオリゴ核酸の合成と当該オリゴ核酸の構造評価をまとめた本論文は、次の 2 つの章から構成されている。

第一章では、プリン塩基 8 位と糖部 1'位を小さなエチレンユニットで架橋した *syn* 配座固定プリンヌクレオチドを設計し、それを含むオリゴ核酸合成を目指した以下の実験がなされている。架橋部は、1,5-水素原子移動を経由するラジカル環化反応を利用することにより構築している。次に、*syn* 配座固定 2'-デオキシグアノシン (³²G) の合成は達成できなかったものの、2'-デオキシアデノシン (³²A) と 2'-デオキシイノシン (³²I) のホスホロアミダイト体の合成に成功している。続くオリゴ核酸への導入において、通常オリゴ核酸合成で用いられる 5'末端のジメトキシトリチル基を残す手法で合成を行ったが、後の簡易精製における脱トリチル化の酸条件により架橋部の開環及び水の付加が問題となった。そこで、オリゴ核酸合成で使用する酸条件を用いて DNA 自動合成機上で 5'末端の脱トリチル化を行い、簡易精製を行わず直接 HPLC 精製を行うことで目的のオリゴ核酸を得ることに成功している。

第二章では、非 B 型 DNA として Z 型 DNA とパラレル型フーグスティーン二重鎖に着目し、³²A または ³²I を含むオリゴ核酸の非 B 型 DNA 構造形成能の評価が行われている。まず一つ目の Z 型 DNA に関しては、次のような仮説に基づいて実験が行われている。*syn* 配座を有利にとるグアノシンアナログは低塩濃度で Z 型 DNA 構造を誘起するとが報告されているため、著者は今回開発した *syn* 配座固定プリンヌクレオチドを用いることで、より低塩濃度での Z 型 DNA 形成を目指している。その結果、Z 型 DNA の形成が困難とされる AT、AC、IC 塩基対を含む配列においても、³²A または ³²I を導入することにより、天然より低塩濃度での Z 型 DNA 形成を実現している。なお ³²A または ³²I を含む Z 型 DNA では、CG のみの配列と同等以上の熱安定性を有することが示されている。次にパラレル型二重鎖に関しても、以下に示すような成果を上げている。通常、パラレル型二重鎖を形成する際には CG 塩基対はフーグスティーン型塩基対を形成する。この際、シトシン塩基がプロトン化される必要があり、酸性条件でのみパラレル型二重鎖を形成することが知られている。そこで著者は、*syn* 配座固定プリンヌクレオチドを用いることによりフーグスティーン側でワトソン

クリック型塩基対を形成させることで、中性条件でパラレル型二重鎖の形成が可能になるという仮説を立てた。仮説の検証の結果、³²P-A を含む二重鎖について、pH 7.0、塩化マグネシウム添加条件下でパラレル型二重鎖を形成させることに成功している。³²P-I を含む二重鎖では、中性付近 (pH 6.8–7.4) のいずれの pH においてもパラレル型二重鎖形成が確認され、pH に非依存的なパラレル型二重鎖の形成を可能としている。これらの事実より、³²P-A および ³²P-I は、天然核酸塩基に比べて中性条件で熱安定性の非常に高いパラレル型二重鎖を形成させることができる有用な構造素子であると結論している。

以上、これらの研究結果は、この *syn* 配座固定プリンヌクレオチドが天然の *syn* 型プリンヌクレオチドの等価体として機能することを示した有用な研究である。加えて *syn* 配座固定プリンヌクレオチドが、Z 型 DNA やパラレル型二重鎖を積極的に形成させるための有効な構造素子となることも本博士論文によって実証された。*syn* 配座固定プリンヌクレオチドをもちいて作製された Z 型 DNA やパラレル型二重鎖は、それらの結合タンパク質に対するデコイ核酸として機能する可能性がある。このようなデコイ核酸は遺伝子発現制御を通じた医薬品応用・生命現象の解析も期待できる分子であり、*syn* 配座固定プリンヌクレオチドに関する本研究成果は多方面への発展が期待される学術的成果であると考えられる。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) 田中 好幸

副査 (教授) 今川 洋

副査 (教授) 加来 裕人

博士学位論文 内容の要旨および審査の結果の要旨(第49号)

令和7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示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

