

井 城 綸 沙 (富山大学大学院 医学薬学教育部 博士後期課程3年)

Tsukasa Iki (Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Science, Ph.D. Program Third year, University of Toyama)



### 骨格筋萎縮により正常マウスの認知機能は低下する

我々はこれまでに、若齢のアルツハイマー病 (AD) モデルマウスの後肢を不動化すると記憶障害の発症が早まることと、萎縮した骨格筋で増加する因子ヘモペキシンを明らかにした。そこで本研究では、筋萎縮による記憶障害がADとは無関係のマウスでも起こりうるかどうかと、そのメカニズムを解明することを目的とした。

12週齢の正常マウスの後肢を不動化すると骨格筋が萎縮し、物体認知記憶が低下した。萎縮した骨格筋ではヘモペキシン発現量が増加した。現在は骨格筋ヘモペキシンのノックダウンにより記憶障害を予防できるかを検討している。以上、AD素因とは関係なく骨格筋萎縮が若齢マウスの記憶障害を発症させることを初めて見出した。

### Skeletal muscle atrophy reduces cognitive function in normal mice

Our previous study revealed that muscle atrophy shifted the onset of memory dysfunction earlier in young mice model of Alzheimer's disease (AD). The atrophied muscles secreted hemopexin, and i.c.v. infusion of hemopexin induced cognitive impairment in young AD and wild-type mice. This indicates the possibility that hemopexin is directly involved in the onset of cognitive impairment. This study aimed to elucidate the onset of the skeletal muscle atrophy-driven memory impairment and establish a new strategy to prevent cognitive impairment by approaching skeletal muscle hemopexin. Normal mice (ddY, 11-13 weeks old) were used. To investigate effects of skeletal muscle atrophy specifically, we used young mice rather than aged or accelerated senescence mice. The hindlimbs were immobilized by cast-attachment for 14 days. After the cast immobilization, wet weights of hindlimb muscles were significantly lower in cast-attached mice than those in non-cast mice. Object recognition memory in the cast-attached mice was impaired. Hemopexin levels in the skeletal muscle and hippocampus were increased in cast-attached mice. We are investigating prevention of memory deficit by hemopexin antisense oligo injection to muscle.

These indicate that skeletal muscle atrophy induces cognitive impairment in young mice independently of AD pathology.

ラムヤ・ディープティ・プリギラ (バーゼル大学薬学部)

Ramya Deepthi Puligilla (PhD student, Department of Pharmaceutical Technology, University of Basel)



## 脊椎動物スクリーニングモデルとしてのゼブラフィッシュ稚魚

ゼブラフィッシュは、毒物学、創薬等の研究分野においてモデル生物として広く用いられ、疾患特性、分子メカニズム、臨床的関連性がヒトと類似していることから前臨床モデルとしても用いられている。ゼブラフィッシュは自然免疫と獲得免疫の両方を持つが、胚発生の初期においては、自然免疫に依存している。マクロファージやスカベンジャー内皮細胞のようなゼブラフィッシュ胚の自然免疫因子は、形態や機能において哺乳類と類似している。ゼブラフィッシュ稚魚モデルは、様々な薬物の循環動態や、腎臓及びマクロファージクリアランスのような薬理的側面を研究するための初期段階のスクリーニングツールとして使用されている。このモデルを用いて行われたミトコンドリア毒性、腎毒性、神経毒性、行動解析などの薬効及び毒性研究が報告されている。ゼブラフィッシュは、透明度が高く、低コストであり、大規模な産卵が容易であるため、薬物スクリーニングに用いられる他の動物モデルと比較して、費用対効果の高いモデルといえる。

## Zebrafish larvae as a vertebrate screening model

Zebrafish (*Danio rerio*) is widely used as a model organism in research fields like toxicology, drug discovery, and disease modeling. Zebrafish is used as a preclinical model for human diseases due to the similarity in disease characteristics, molecular mechanisms, and clinical relevance. Zebrafish have both innate and adaptive immune responses. However, during early embryonic development, it relies upon innate immunity for its defense. Zebrafish embryo's innate immune elements, like macrophages and scavenger endothelial cells, mirror the mammalian system in morphology and function. The zebrafish larvae model is used as an early-stage screening tool for studying pharmacological aspects like the circulation behavior and the renal and macrophage clearance of a variety of drugs. Drug effects and toxicity studies such as mitochondrial toxicity, nephrotoxicity, neurotoxicity, and behavior analysis were reported using this model. Optical transparency, low cost, and easy spawning on large scales make zebrafish a cost-effective model compared to other animal models used in drug screening.

松田 康佑 (富山大学大学院 医学薬学教育部 博士後期課程1年)

Kosuke Matsuda (Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Science, Ph.D. Program First year, University of Toyama)



### 自然発症アトピー性皮膚炎モデルマウスを用いたミロガバリンの作用解析

アトピー性皮膚炎 (AD) は代表的な難治性掻痒疾患であり、新規治療薬の開発及び探索が急務である。そこで我々は新規ガバペンチノイドであるミロガバリンに着目し、自然発症 AD モデルマウスを用いた作用解析を行った。

AD モデルマウスにミロガバリンを経口投与すると、マウスの自発的掻き動作数は有意に抑制された。また、健常マウスを用いたロタロッド試験では、同用量のミロガバリンはマウスの協調運動機能に影響を及ぼさなかった。最後に AD モデルマウスに対しミロガバリンを大槽内投与すると、マウスの自発的掻き動作は有意に抑制された。

以上より、ミロガバリンは主に中枢に作用し AD モデルマウスに対し鎮痒作用を示すことが示唆される。

### Behavioral analysis of effects of mirogabalin using a mouse model of atopic dermatitis

Atopic dermatitis (AD) is one of chronic itch diseases. Itch caused by AD is intractable, so that it reduces the quality of life of AD patients. In this study, we investigated whether a novel gabapentinoid, mirogabalin, attenuated AD pruritus using spontaneous AD model mice.

When mirogabalin (10 mg/kg) was orally administrated, spontaneous scratching behaviors of AD model mice were significantly reduced. Then we examined whether mirogabalin affected locomotor function in healthy mice by Rotarod test. When mirogabalin (10 mg/kg) was orally administrated, locomotor function did not change. Furthermore, intracisternal injection of mirogabalin (10 µg/site) in AD model mice also significantly suppressed scratching behavior.

These results indicate mirogabalin has antipruritic effect via central nervous system for AD model mice.

マニユエル・セルナー (バーゼル大学薬学部)

Manuel Sellner (Computational Pharmacy, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Basel)



## 小さな分子、大きな可能性：オフターゲット解析のための多目的プラットフォーム

医薬品開発における安全性の問題は、開発が失敗する最も一般的な理由である。従って、早期に副作用を特定することは、医薬品開発を成功させる上で非常に重要であり、開発期間、前臨床試験に使用する動物および関連する総コストの大幅な削減につながる。コンピュータによる立体構造に基づいた化合物デザインは効率的な手法であり、ここ数年の間に飛躍的な進歩を遂げてきた。分子ドッキングやスコアリングのような古典的手法と最先端のディープラーニングモデルを組み合わせることで、ヒトにおける多くのオフターゲット化合物との結合によって引き起こされる毒性を予測できるオンラインプラットフォームを開発した。さらに、このプラットフォームは、望ましくないリガンド-タンパク相互作用に関する構造的知見を示し、それを回避するヒントも提供する。質の高い構造データに焦点を当て、複数の計算プロトコルとモデルから得られた結果をまとめ、コンセンサスを得られた予測を導き出すことで高い信頼性が得られる。

## Small Molecules, Big Opportunities: A Multi-Purpose Platform for Off-Target Analysis

Safety issues are the most common reason for the failure of drug candidates. Thus, the early identification of adverse effects is of major importance for successful drug development and can lead to a significant reduction of development time, animals used in preclinical studies, and the total associated costs. Computational structure-based design methods are often time and resource efficient and have experienced immense improvement during the past years. By combining classical methods such as molecular docking and scoring with state-of-the-art deep learning models, we develop an online platform that enables us to predict potential toxicity triggered by compound binding to a large number of known human off-targets. In addition, the platform offers structural insight into unwanted ligand-protein interactions providing potential hints on how to avoid them. Focusing on high quality structural data and combining results from several computational protocols and models into a consensus prediction provides a high degree of confidence.

齊 藤 元 弥 (富山県立大学大学院 工学研究科 生物・医薬品工学専攻 博士前期課程1年)

Motoya Saito (First-year master's student, Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Toyama Prefectural University)



### 大腸菌 L-form 細胞内での Penicillin 特異的な ROS, RNS の産生

薬剤耐性 (AMR) は深刻な問題である。抗生物質の標的である細胞壁を持たない L-form 細胞は、過去には抗生物質を投与した再帰性尿路感染症患者から単離されている。L-form 培養は嫌気条件が必要であり、これは細胞壁阻害に付随した酸素呼吸からの活性酸素種 (ROS) の発生が原因だと考えられている。一方、我々の結果では嫌気条件下において硝酸呼吸の亢進による大腸菌 L-form の生育阻害がペニシリン特異的に確認された。この結果から L-form 化に伴う既存の ROS 発生経路以外の存在が示唆された。抗生物質の作用機序の解明は重大な課題だが、その多くは未解明である。今回は L-form 細胞を利用して明らかになった抗生物質の致死性と抗生物質開発に関する新たな知見を提供する。

### Penicillin specifically leads to ROS & RNS generation in E.coli L-form

Antimicrobial resistance (AMR) is a major concern within clinical settings. Bacterial L-form has no cell wall that is a target for antibiotics. In the past, L-form was isolated from recurrent urinary patients, suggesting the possibility of L-form as AMR. L-form typically requires anaerobic condition for cultivation. In previous research, it is thought that inhibition of cell wall synthesis causes reactive oxygen species (ROS) generated from aerobic respiration. On the other hand, from our result, the growth of L-form cells is inhibited by adding nitrate as a substrate for nitrate respiration even under anaerobic condition. However, growth inhibition of nitrate could be confirmed using only Penicillin as a cell wall inhibitor, using Fosfomycin could be not. It indicates that the production of ROS resulting in antibiotics is just not only caused by stimulated central carbon metabolism through inhibition of cell wall synthesis. It is crucial to understand how antibiotics kills bacteria, but even these traditional antibiotics remains unclear. Our research provides new insights into the lethality of antibiotics in ROS production and the possibility of developing novel antibiotics.

アレクサンドラ・ブラゴジェヴィッチ (バーゼル大学薬学部)

Aleksandra Blagojevic (Molecular Pharmacy, University of Basel)



### 自然から学ぶ：ヒルに由来するタンパク質が、新しい宿主免疫調節物質としてどのように機能するか

補体系は、病原体に対する初期防御系であるが、宿主細胞に反応して臨床症状を引き起こすこともある。補体を標的とした治療薬への関心も高まっており、天然物の中には補体阻害剤として作用するリード化合物が見出されている。例えば、アマゾンヒル由来のギガスタシンは、補体や凝固反応に不可欠なセリンプロテアーゼを阻害する。治療薬としてのギガスタシンの可能性を探るため、このタンパク質を大腸菌で発現させ、その分子的・機能的特性を明らかにした。ギガスタシンは10個のジスルフィド結合を持つにも関わらず、可溶性タンパク質として高い収量と純度で発現させることができた。ギガスタシンの優れた熱安定性により、HPLC精製によってエンドトキシンを除去し、凍結乾燥と長期保存を可能にした。発色基質アッセイにより、ギガスタシンが補体 (C1s、MASP2) および凝固系 (XIIa) のプロテアーゼを阻害することが確認され、SPR分析により標的特異性が裏付けられた。ここで重要なのは、ギガスタシンはヒト、サルおよびマウスの血清中で、補体の古典経路およびレクチン経路に対して強力な阻害活性を示したことである。我々の研究は、ギガスタシンは前臨床候補としてあるいはPK/PD特性を向上させた誘導体の分子鋳型として、補体を介する疾患の治療薬の有望な選択肢であることを証明した。

### Learning from nature: How a leech derived protein can act as lead structure for novel host defense modulation strategies

The complement system is a first-line-of-defense barrier against pathogens, yet can turn against host cells to cause clinical conditions. To address the growing interest in complement-targeted therapeutics, nature can provide valuable lead structures for complement inhibitors. Owing to their intricate host defense evasion strategies, parasites are particularly interesting; e.g., gigastasin from the giant Amazon leech impairs serine proteases that are vital for complement and coagulation responses.

To explore the therapeutic potential of gigastasin, we expressed the protein in *E. coli* and characterized its molecular and functional properties. Despite containing 10 disulfide bridges, gigastasin could be expressed as soluble protein at good yield and purity. Given its exceptional thermal stability, gigastasin could be subjected to HPLC purification to remove endotoxins and enable lyophilization and long-term storage. Chromogenic substrate assays confirmed that gigastasin inhibits proteases of the complement (C1s, MASP2) and coagulation system (FXIIa), and the target selectivity was corroborated by SPR analysis. Importantly, gigastasin showed potent inhibitory activity towards the classical and lectin pathway of complement in human, monkey, and mouse serum.

Our studies establish gigastasin as promising option for the treatment of complement-mediated diseases, either as preclinical candidate or as molecular template for derivatives with enhanced PK/PD properties.

大 沼 逸 美 (富山大学大学院 医学薬学教育部 博士課程1年)

Iimi Onuma (Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Science, Ph.D. Program First year, University of Toyama)



### Src による TAB1 チロシンリン酸化の分子機構

TAK1 binding protein 1 (TAB1) と p38 は、炎症応答キナーゼ TAK1 の活性化制御に関わる重要な分子である。TAB1 は TAK1 と直接会合して TAK1 を活性化する。その下流で活性化した p38 は TAB1 の Ser/Thr 残基をリン酸化することで TAK1 をフィードバック阻害する。これまでは上記の Ser/Thr 残基リン酸化が研究されてきたが、我々は TAB1 の TAK1 ドメイン内に存在する Tyr-481 に着目した。

本研究では、p38 とがん原遺伝子産物 Src が協調して TAB1 Tyr-481 のリン酸化を促進することを明らかにした。

### Molecular mechanism of Src-mediated tyrosine phosphorylation of TAB1

TAK1 binding protein 1 (TAB1) and p38 are the key factors that regulate TAK1 activation. TAB1 directly binds to TAK1 and facilitates its activation. p38 which is Ser/Thr kinase activated downstream of TAK1 feedback inhibits TAK1 activation via phosphorylation of TAB1. While the above-mentioned Ser/Thr residue phosphorylation has been studied previously, we are focusing on TAB1 Tyr-481 in its TAK1 binding domain.

In this study, we clarified the mechanism by which p38 and proto-oncogene product Src cooperatively phosphorylate TAB1 Tyr-481.

マリア・カルポウチ (バーゼル大学薬学部)

Maria Karpouchtsi (PhD candidate, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Basel)



## メラノーマにおける発がん性 MAPK/PI3K シグナル伝達を標的と する天然物: 標的分子の同定の試み

悪性メラノーマ (悪性黒色腫) は、最も致命的な皮膚癌である。メラノーマでは MAPK/ERK および PI3K/AKT のシグナル伝達経路での変異発現割合が他には類を見ないほど高い。これらの経路に特異的な阻害剤は、臨床では特に標的治療薬との併用において素晴らしい初期結果を示している。しかし、ほとんどの患者は僅か数か月で薬剤耐性を獲得してしまう<sup>1</sup>。従って、メラノーマにおける発癌性 MAPK/PI3K シグナル伝達を標的とした新たな阻害剤が早急に必要とされている。

この問題への取り組みには、汎用的なアプローチが用いられた: MAPK 及び PI3K レベルでの下流経路に対する阻害活性を定量化する画期的なハイコンテンツスクリーニング (HCS) アッセイが開発された。阻害物質探索のために、大学のライブラリーの 2,576 種の粗植物抽出物<sup>2</sup> と 25,696 種の純粋な天然および合成化合物をスクリーニングした。合計 46 種の活性化化合物が、低マイクロモル領域の IC<sub>50</sub> 値を持つ MAPK および / または PI3 経路下流に対する阻害物質として見出された。現在の取り組みは、最有力のヒット化合物のターゲット同定に向けられている。私たちの戦略は、ターゲット分子との結合特性とともに発現タンパク質を用いた酵素阻害に対する類似性検索と評価である。最終的には、これらの新規阻害物質を将来の医薬品開発のリード化合物として開発する事を目指している。

## Natural products targeting oncogenic MAPK/PI3K signaling in melanoma: The challenge of identifying the targets

Malignant melanoma is the deadliest type of skin cancer. It harbors an unmatched rate of mutations which frequently arise in the MAPK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways. Specific inhibitors of these pathways and especially combination of targeted therapies show spectacular initial results in the clinic. However, most patients acquire drug resistances within just a few months.<sup>1</sup> Novel inhibitors targeting oncogenic MAPK/PI3K signaling in melanoma are therefore urgently needed.

To tackle this issue, a generic approach was used: An innovative high-content screening (HCS) assay was developed that quantifies downstream inhibitory activity at the MAPK and PI3K levels. To this end, we screened our in-house library of 2,576 crude plant extracts<sup>2</sup> as well as additional 25,696 pure natural and synthetic compounds. A total of 46 active compounds were confirmed as downstream inhibitors of MAPK and/or PI3K with IC<sub>50</sub> values in the low micromolar range. Current efforts aim towards target identification of the most promising hits. Our strategy includes similarity searches and assessment of physical binding as well as enzymatic inhibition with heterologously produced pathway proteins. Ultimately, we envisage to develop these newly discovered inhibitors into lead compounds for future drug development.

[1] Lim, S.Y., *et al.* Mechanisms and strategies to overcome resistance to molecularly targeted therapy for melanoma. *Cancer* **2017**; 123: 2118-2129.

[2] Dürr, L., Hell, T., *et al.* High-Content Screening Pipeline for Natural Products Targeting Oncogenic Signaling in Melanoma. *J Nat Prod* **2022**; 85: 1006-1017.



五十嵐 直 哉 (富山県立大学大学院 工学研究科 生物・医薬品工学専攻 博士前期課程2年)

Naoya Igarashi (Graduate school of engineering · second-year master's student, Toyama Prefectural University)



### 非アルコール性脂肪性肝炎の病態形成におけるマクロファージサブセットの研究

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は生活習慣病を起因として発症する疾患である。また、有効な治療薬は未承認であり、ヒトの病態を正確に反映したモデルマウスも未確立であった。

近年、ヒト NASH に似た病態を呈する新規 NASH モデルマウスが確立された。我々は当該マウスを用いて、NASH 病態における免疫細胞の役割を解析した。その結果、発症早期から異なる2つのマクロファージサブセットが肝臓に集積することを見出した。詳細な解析の結果、一方は線維化誘導に、もう一方は抗炎症・組織修復に関与することが示唆された。

以上から、両マクロファージサブセットの機能やバランスが NASH 病態進展に関わることが示唆された。

### Roles of macrophage subsets in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is caused by lifestyle-related disease such as type 2 diabetes and frequently involves obesity and metabolic syndrome. NASH develops from steatosis and progresses to fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. Nevertheless, an effective drug against NASH has not been approved. Furthermore, an animal model that precisely reflects human NASH pathogenesis has not been established.

Recently, a novel NASH model mouse resembled human NASH pathology was established by Ichimura-Shimizu et al. (*Biosci Biotechnol Biochem.* ;85(4):941-94, 2021). Using this model, we investigated roles of immune cells in the development of NASH. We found that two types of differential macrophage subsets, CD11c<sup>+</sup> and Ly6C<sup>+</sup> macrophages, accumulated in the liver at the early phase of NASH development. Fluorescent immunohistochemistry analysis revealed that CD11c<sup>+</sup> macrophages colocalized with collagen, suggesting that this subset might promote advanced liver fibrosis. In addition, we performed comprehensive gene analysis to elucidate the function of Ly6C<sup>+</sup> macrophages. This macrophage subset upregulated anti-inflammatory- and tissue repair-related genes, indicating that this subset might have a suppressive effect on NASH development (*Int J Mol Sci.* ;23(21):13251, 2022).

Taken together, our data suggest that function and dynamics of two macrophage subsets may play a key role in the progression of NASH.

