

ラジカル物質TEMPOの 揮発使用により脳組織を保護する

群馬大学

食健康科学教育研究センター

教授 鳥居 征司

2022年9月15日

ラジカル物質TEMPOの揮発使用により脳組織を保護する

概要

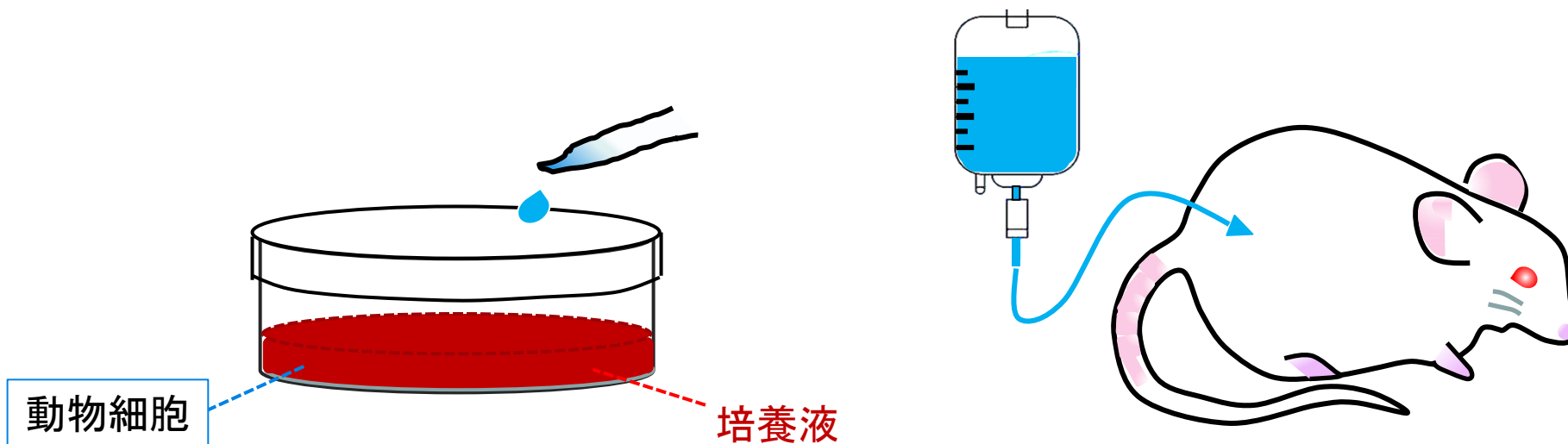
低分子化合物の2,2,6,6-テトラメチル-1-ピペリジニルオキシル(通称 TEMPO)が常温で揮発し、遠隔地の生細胞に作用して酸化ストレス性細胞死を阻害することを初めて示した。またマウスを用いた脳梗塞モデル実験で、気化したTEMPOを自然吸入したことで脳組織の保護が可能となることを示した。

発明の背景

- 酸化ストレスを伴う細胞死が様々な虚血障害に関与することから、抗酸化機能を持つ薬剤が細胞や組織の保護を果たす可能性がある。
- 例えば、ラジカル捕捉剤のエダラボン(MCI-186)は、日本で開発され世界に先駆けて承認された脳梗塞急性期の脳保護薬である。しかし、エダラボン以外に臨床的エビデンスが確立された細胞保護薬は存在しない。
- フェロトーシスは鉄に依存するプログラムされた細胞死の一種であり、過酸化脂質の蓄積を特徴とする。脳虚血障害をはじめとする酸化ストレスを伴う細胞死がフェロトーシスである可能性が報告されている。
- フェロトーシス阻害剤のFerrostatin-1などの神経細胞死への応用が検討されているが、細胞・組織レベルの結果にとどまり、個体(生体)の効果は明らかでない。脳神経疾患の急性期治療などに有用な、酸化ストレスに対して速やかに組織保護を図ることのできる薬剤が求められている。

発明の背景

- 従来の薬剤のスクリーニングと生体への適用実験は、ほとんどが水系におけるものであった。



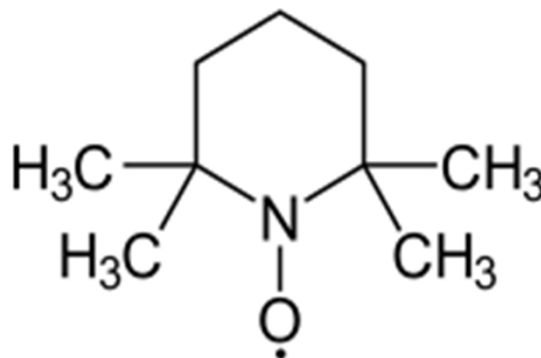
- 細胞や動物実験で有効な化合物が臨床試験を突破するのは容易ではなく、多くは溶解性や組織浸透性、毒性の問題が表出する。

発明の背景

- **TEMPO**は有機合成における酸化反応の触媒として使用される。

2,2,6,6-テトラメチル-1-ピペリジニルオキシ, ラジカル

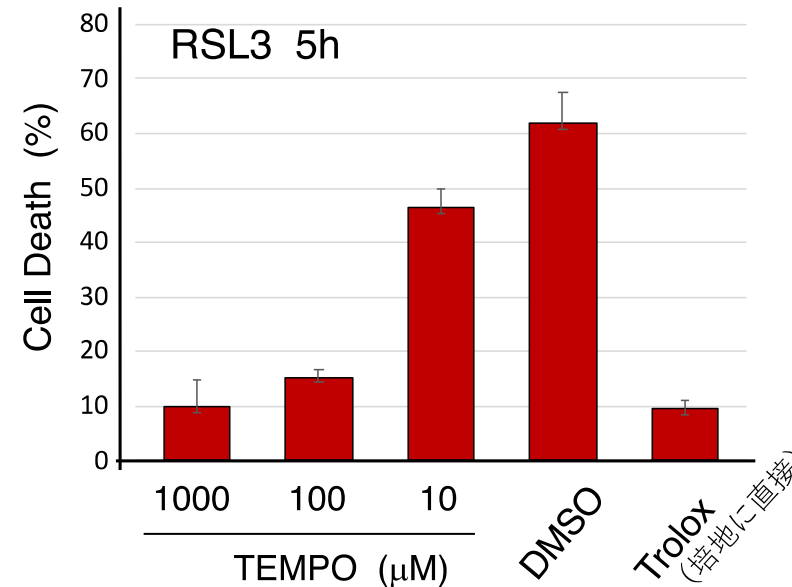
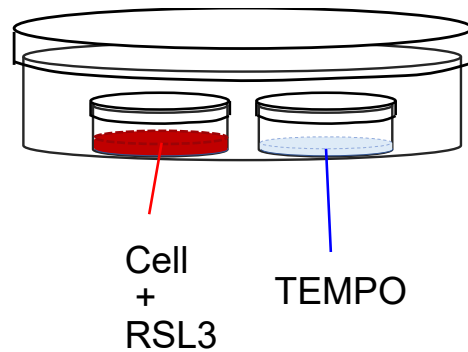
TEMPO



- **TEMPO**は細胞実験などではラジカル捕捉剤として使用され、フェロトーシスを阻害することも既に報告されている。

① 揮発TEMPO によるフェロトーシス抑制

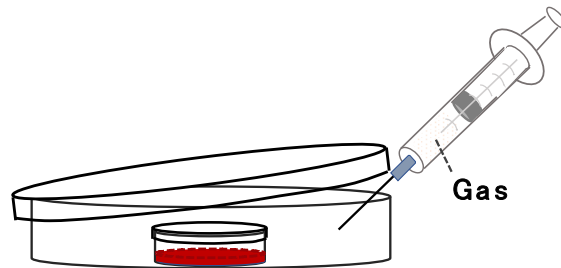
平均値±標準誤差で示した(n = 3)



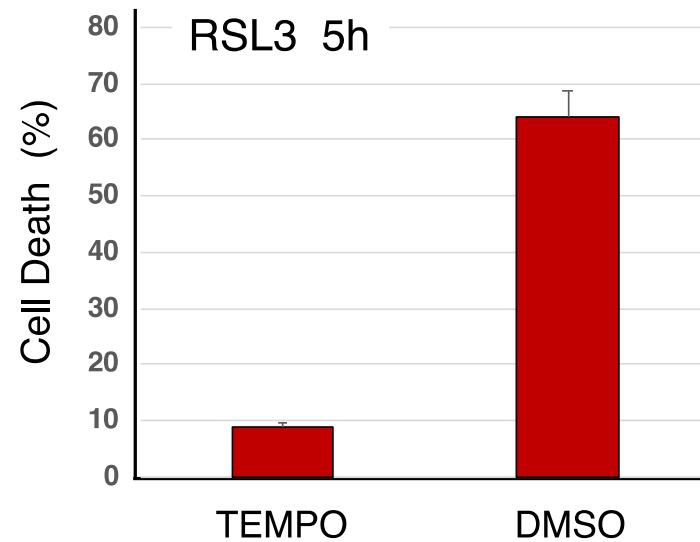
TEMPOは濃度依存的にRSL3で誘導されるヒト浸潤性線維肉腫HT1080細胞のフェロトーシスを阻害した。RSL3の代わりに別のフェロトーシス誘導試薬であるErastin (10 μ M)を使用した場合や、異なる癌細胞種の Calu1, Panc1 を用いても、同様の結果が得られた。

⇒ 本実験では、水に添加したTEMPOが細胞培養液に直接混じり込むことはないため、揮発した後に、気体状態を介して細胞に作用したと考えられる。

② 気体状態のTEMPO によるフェロトーシス抑制



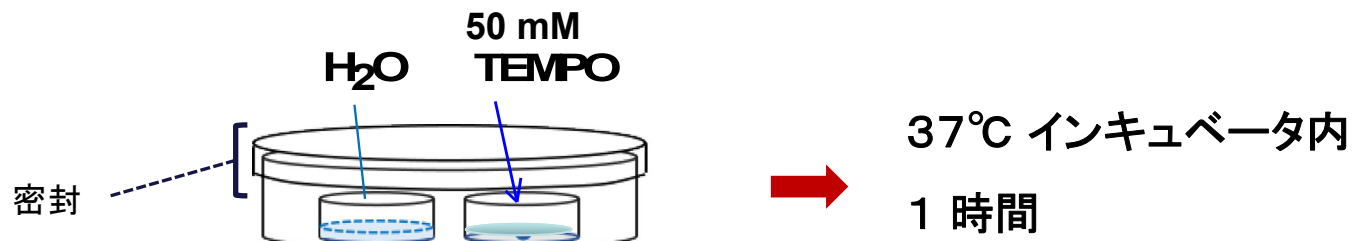
アルミニウムガスバッグに空気と $1 \mu\text{L}$ の TEMPO (100mM) を投入して、 37°C インキュベータ内で3時間放置したのち、ガスタイトシリンジでガスバッグ内の気体 (10mL) を採取した。



TEMPO(ガス)を含む空気を培養皿に加えると細胞死率が減少し、RSL3誘導性フェロトーシスは阻害された。

⇒ 本実験では、加温により放出されたTEMPOの気体成分(ガス)の存在により、フェロトーシスが阻害されたと考えられる。

③ TEMPO の揮発および再溶解

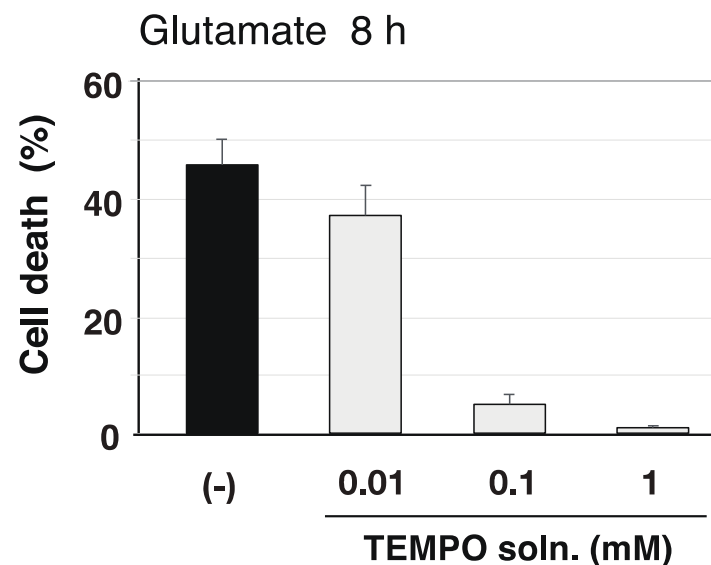


計測方法	TEMPO濃度 (mM) (ストック側)	TEMPO濃度 (mM) (受容側)
LC/MS	38.27	6.85
Absorption spectroscopy	38.50	6.80

TEMPO水溶液(50 mM, 1 mL)を含む小皿とH₂O(水)を入れた小皿を並べてディッシュに入れ、37°Cで1時間加温した。それぞれの皿のTEMPO濃度をLC-MSおよび吸光度により測定した。

⇒ TEMPOは1時間の加温で約23%が揮発し、約14%が移動した。

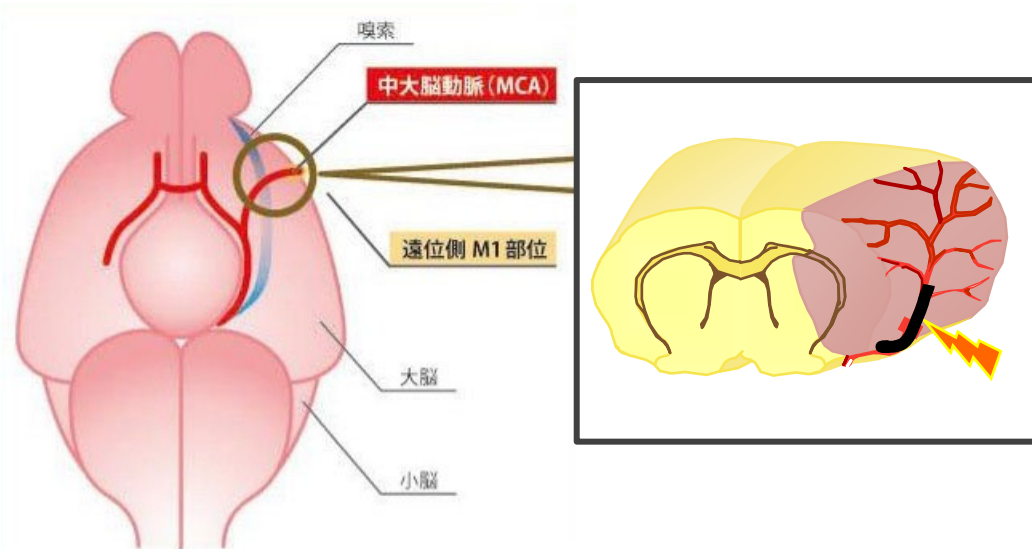
④ 揮発TEMPO による神経細胞死の抑制



TEMPOは濃度依存的にグルタミン酸で誘導されるマウス神経細胞HT22の酸化ストレス性細胞死を阻害した。

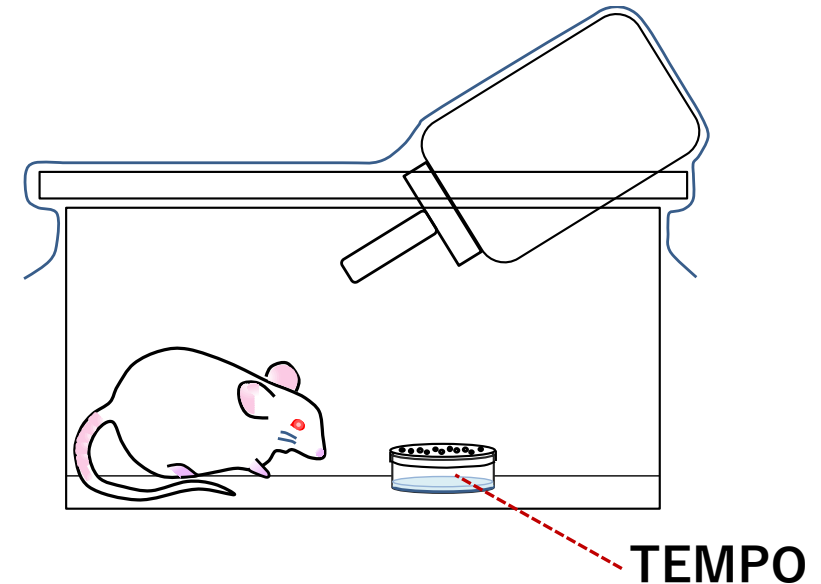
⇒ TEMPO(ガス)はフェロトーシスと同様に神経細胞死を阻害する

⑤ 揮発TEMPO による虚血マウスにおける脳組織障害の抑制



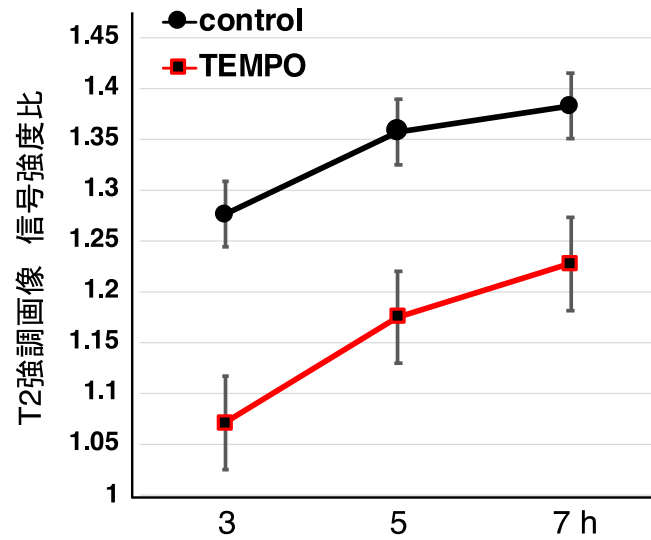
マウスの脳
(日本クレアHPより)

マウス中大脳動脈永久閉塞 (MCAO) による脳梗塞モデルの作製は、文献 (J. Cereb. Blood Flow Metab 1:53,1981) の方法 (Tamuraモデル) に小さな変更を加えて施行した。

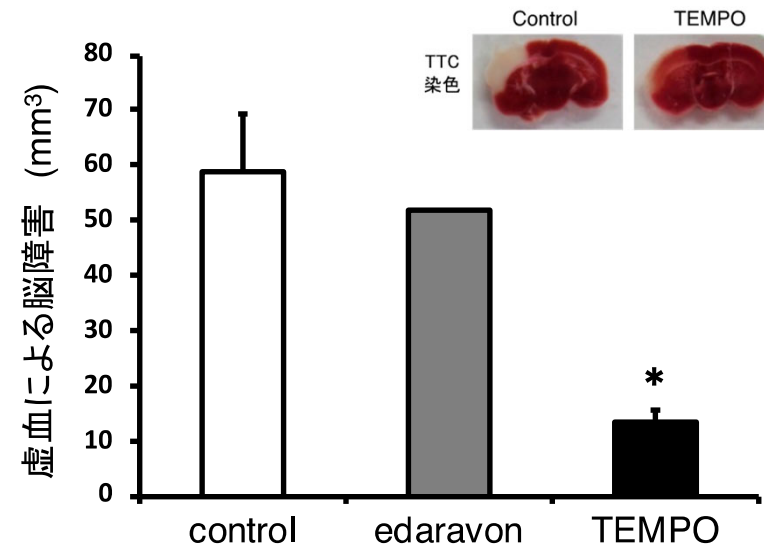


TEMPO吸入投与群については、3.5 c m培養皿に0.1gの綿を敷き、60°Cに加熱した5mLの100mM TEMPO水溶液を染み込ませたものをケージ内中央に留置した。エタラボン投与群は静注投与した。

⑤ 揮発TEMPO による虚血マウスにおける脳組織障害の抑制



梗塞作成後 3、5、7時間点で MRI T2強調画像を取得した。



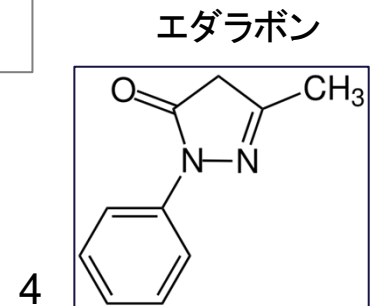
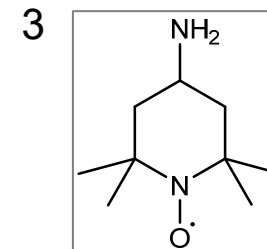
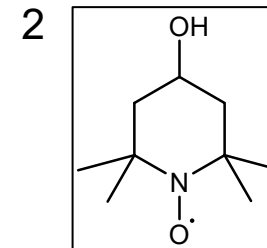
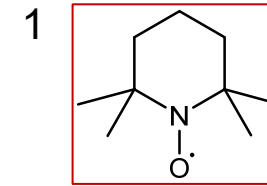
8時間点で脳組織片を2, 3, 5-トリフェニルテトラオリウムクロライド(TTC)染色し、梗塞病変を検出した。

TEMPOを自然吸入投与したマウスでは脳組織障害が強く抑制された。

また TEMPOの濃度の検討を行ったところ、25mMでも全く同等の保護効果を示した。

発明技術の補足

	化合物名	培地添加における阻害効果	揮発作用による阻害効果
1	TEMPO	+	+
2	Hydroxy-TEMPO	+	-
3	Amino-TEMPO	+	-
4	Edaravon	+	-
5	Trolox	+	-
6	Ferrostatin-1	+	-



TEMPO誘導体を含む様々な抗酸化化合物はフェロトーシスを阻害できるが、TEMPOだけは揮発して作用できる。

競合技術との比較

	本発明	競合技術1	競合技術2
構成	TEMPO	ニトロキシド類 (TEMPOL)	PEG化TEMPO
得られる特性	気化使用するTEMPOは、速やかに標的組織へ到達及び浸透できる	経口剤：TEMPOLを含む錠剤、カプセル、顆粒等 非経口剤：溶液、懸濁液、エマルション等 による幅広い使用	高分子ミセルを形成するPEG化TEMPOにより、還元性環境下において長期安定性を示す
適用分野	脳梗塞及び筋萎縮性側索硬化症の治療および予防薬	心臓血管系疾患及び脳虚血再灌流障害の予防及び治療薬	脳梗塞、心筋梗塞、脳浮腫、神経脱落症状、炎症等の治療
投与方法	吸入投与	静脈内投与	静脈内投与

想定される用途（1）

- 虚血性疾患、とくに脳梗塞における超急性期の治療薬
- 筋委縮性側索硬化症（ALS）における神経保護薬
- その他の脳神経疾患，老化などの保護薬・予防薬

実用化に向けた課題

TEMPOは揮発させて使用するため、下記課題を解決する必要がある。

1. 投与形態、投与量、吸入量（溶液濃度、時間等を決定する）
2. 投与デバイスの開発

想定される用途（２）

- 犬・猫など 愛玩動物（伴侶動物）の脳梗塞治療薬
- 愛玩動物のアンチ・エイジング, 老化予防法の提供

企業様への期待

- ① 動物実験に関する産学共同研究 もしくは資金サポート
- ② 揮発性物質の溶媒、樹脂等に関する産学共同研究
- ③ 投与デバイスに関する産学共同研究

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 2,2,6,6-テトラメチル-1-ピペリジニルオキシルの揮発使用による細胞死抑制と組織保護
- 出願番号 : PCT/JP2021/036440
- 出願人 : 国立大学法人群馬大学
- 発明者 : 鳥居征司、久保田知里、輿石一郎、瀧川雄太、水野寛之、神徳亮介

お問い合わせ先

群馬大学
産学連携・知的財産活用センター

TEL 0277-30-1171~1175

FAX 0277-30-1178

e-mail tlo@ml.gunma-u.ac.jp