

細胞内ATP量を向上させる 核酸プロドラッグの開発

九州大学 先導物質化学研究所

准教授 穴田 貴久

2023年10月12日

CONTENTS

1. 本日の発表要旨
2. イントロダクション
3. 今回の開発研究について
4. まとめ

アーカイブ資料に掲載しないデータがございます。
ご了承くださいませようお願いいたします。

CONTENTS

1. 本日の発表要旨

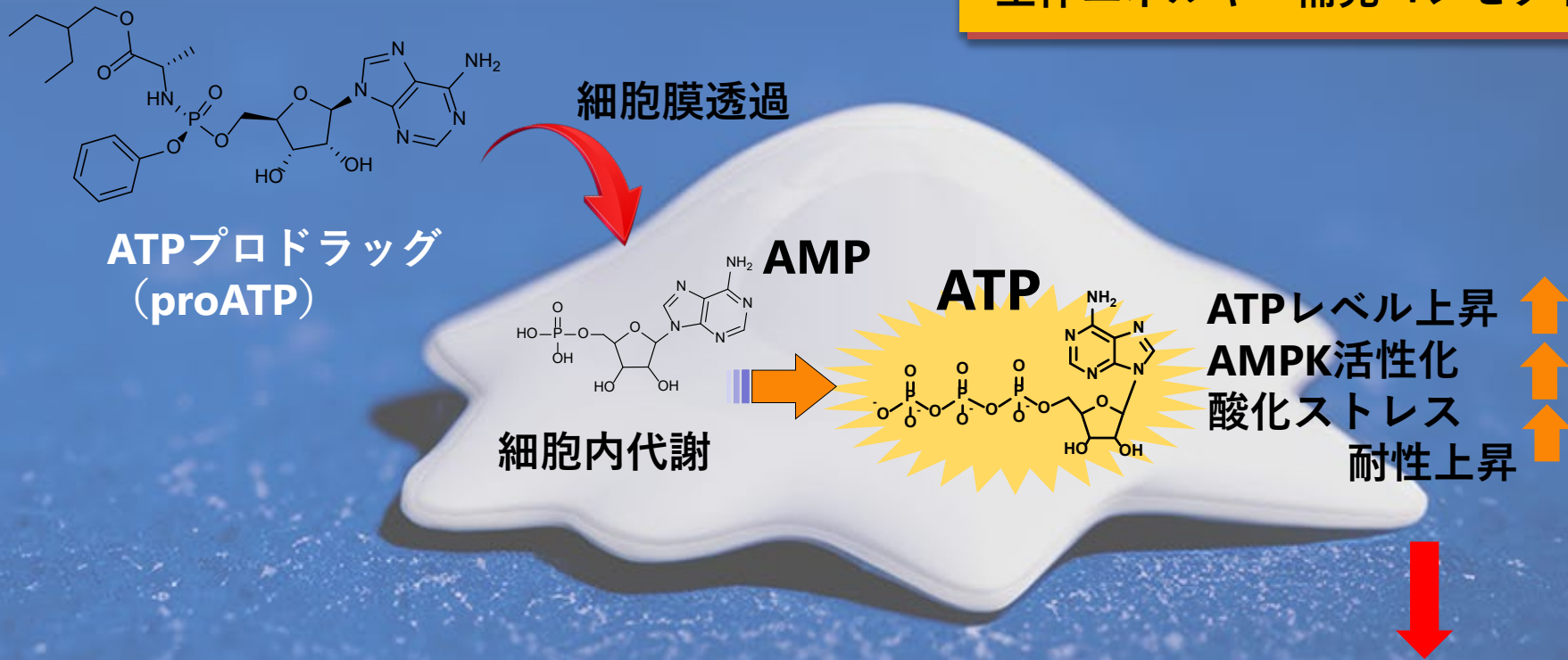
2. イントロダクション

3. 今回の開発研究について

4. まとめ

1. 本日の発表要旨 老化や疾患によって減少する細胞内ATPレベルを上昇させる
世界初のATPプロドラッグの開発に成功した

生体エネルギー補完コンセプトの提案



抗老化薬、加齢性疾患予防・治療薬への応用 ← 生物個体レベル（線虫）の寿命延長効果

CONTENTS

1. 本日の発表要旨
2. イントロダクション
3. 今回の開発研究について
4. まとめ

CONTENTS

1. 本日の発表要旨

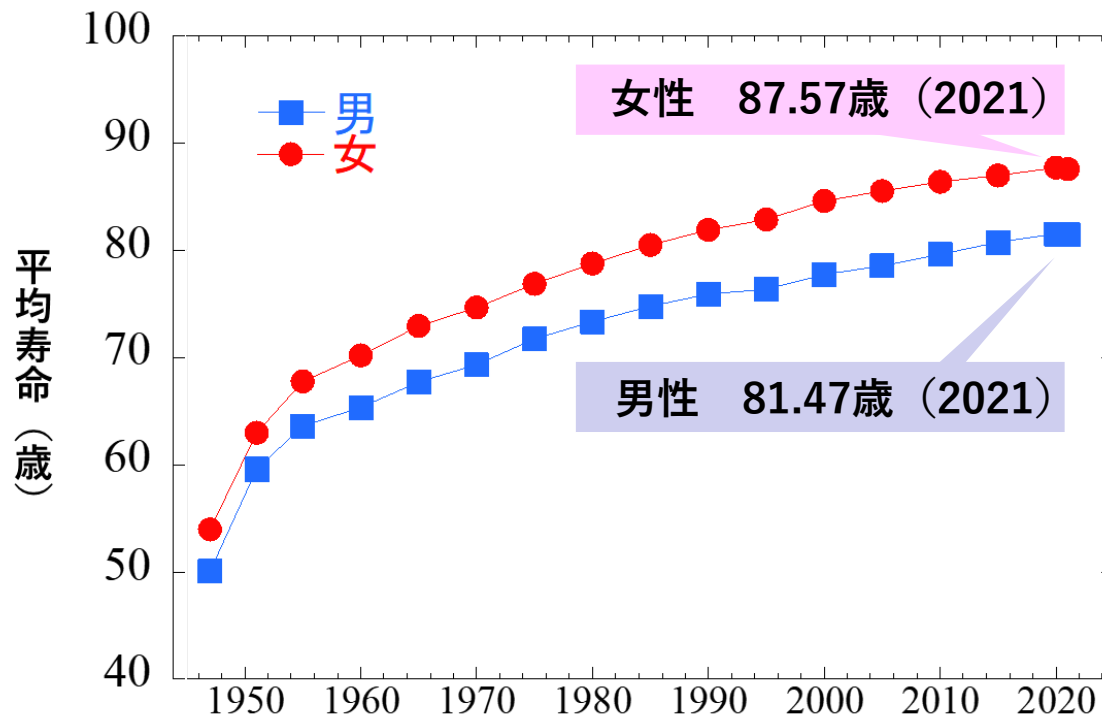
2. インTRODクシヨN

3. 今回の開発研究について

4. まとめ

2. イントロダクション

日本人の平均寿命の推移

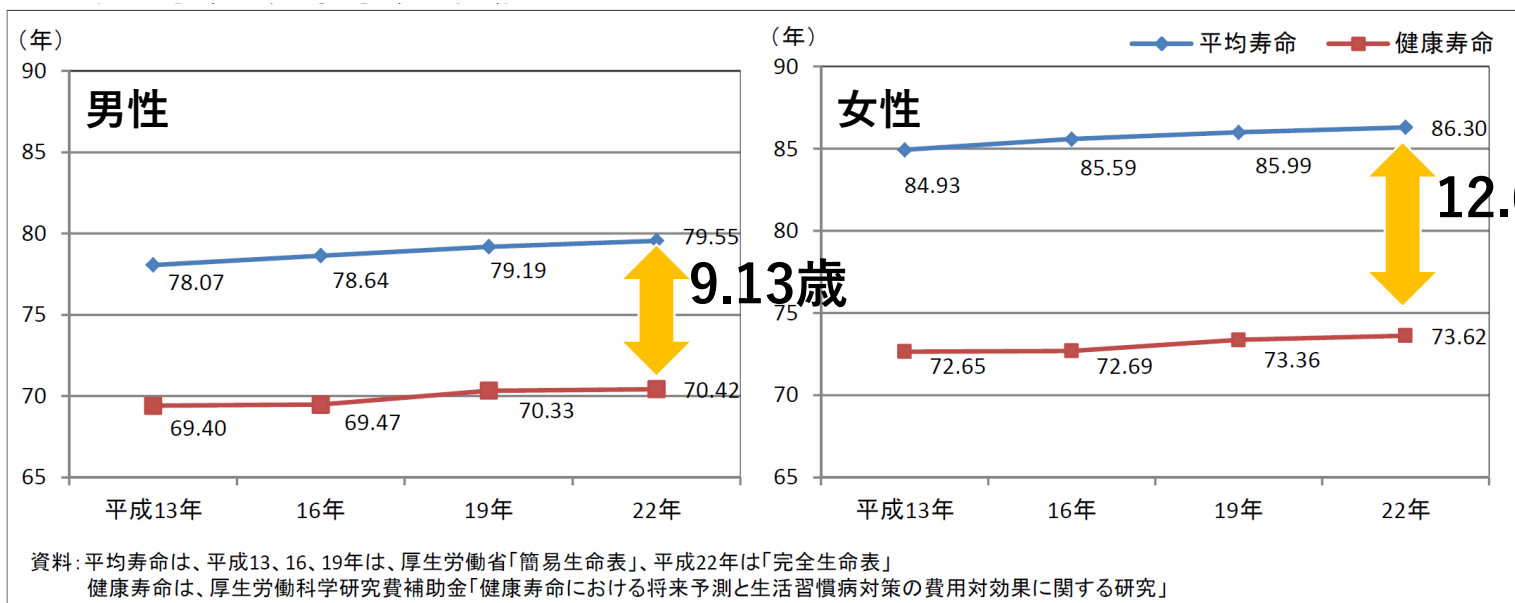


厚生労働省 平均寿命の年次推移、簡易生命表より

1947年に比べて男女とも30年以上平均寿命が長くなった
今後さらに伸び、2050年には女性の平均寿命は90歳を超えると予想されている

老化に関する研究、技術が進めば予想よりもさらに平均寿命が長くなると考えられている

平均寿命と健康寿命

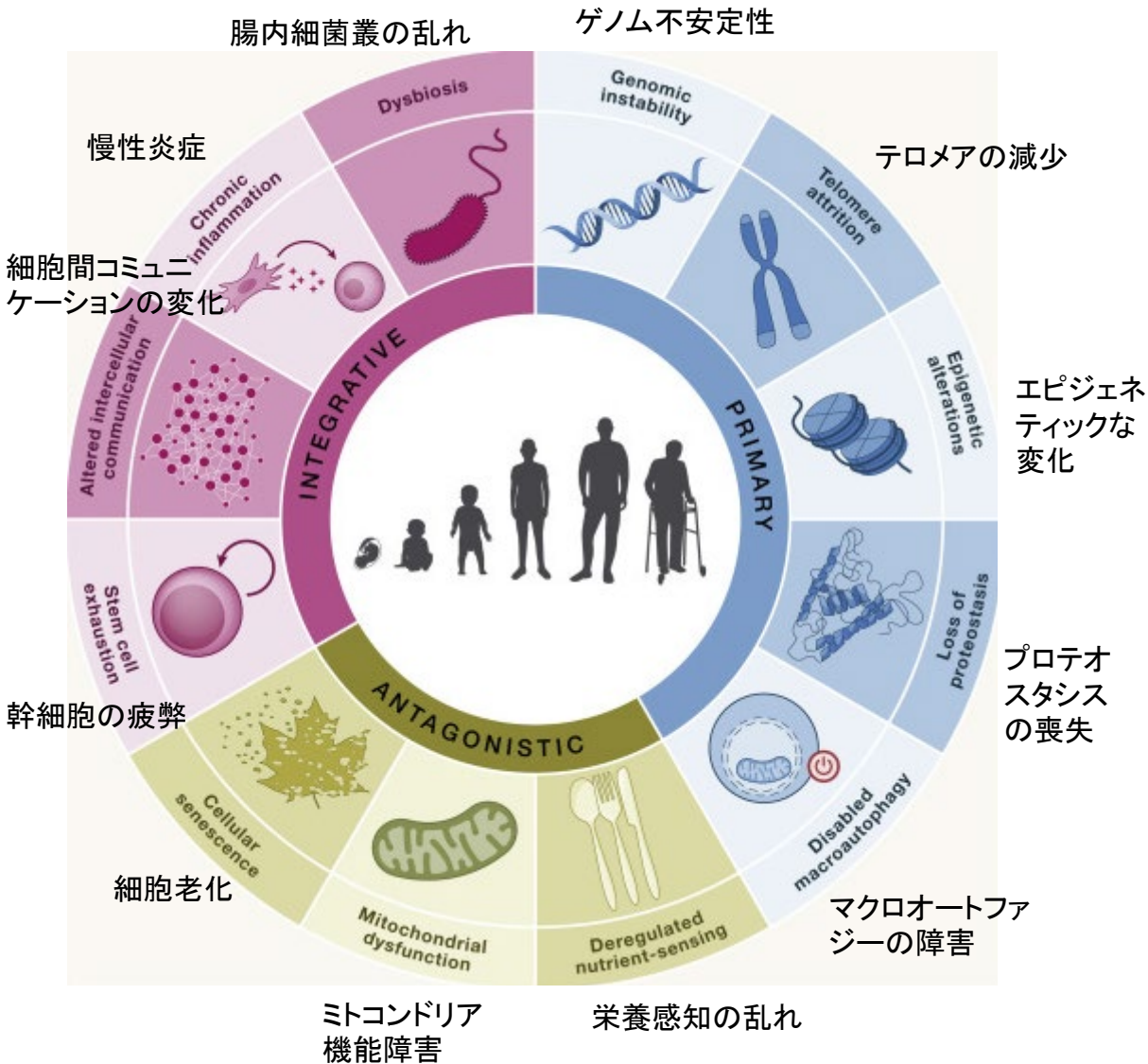


健康寿命：健康上の問題で日常生活が制限されることなく生活できる期間

平均寿命と健康寿命の差「不健康な期間」を縮小することが重要



老化を遅らせ、健康寿命が延伸することで平均寿命が延びることが望ましい



老化を引き起こす要因

老化とは・・・

加齢とともに細胞や臓器の機能、それらを統合する機能が低下し、個体の恒常性を維持が困難になることで、最終的に死に至る過程

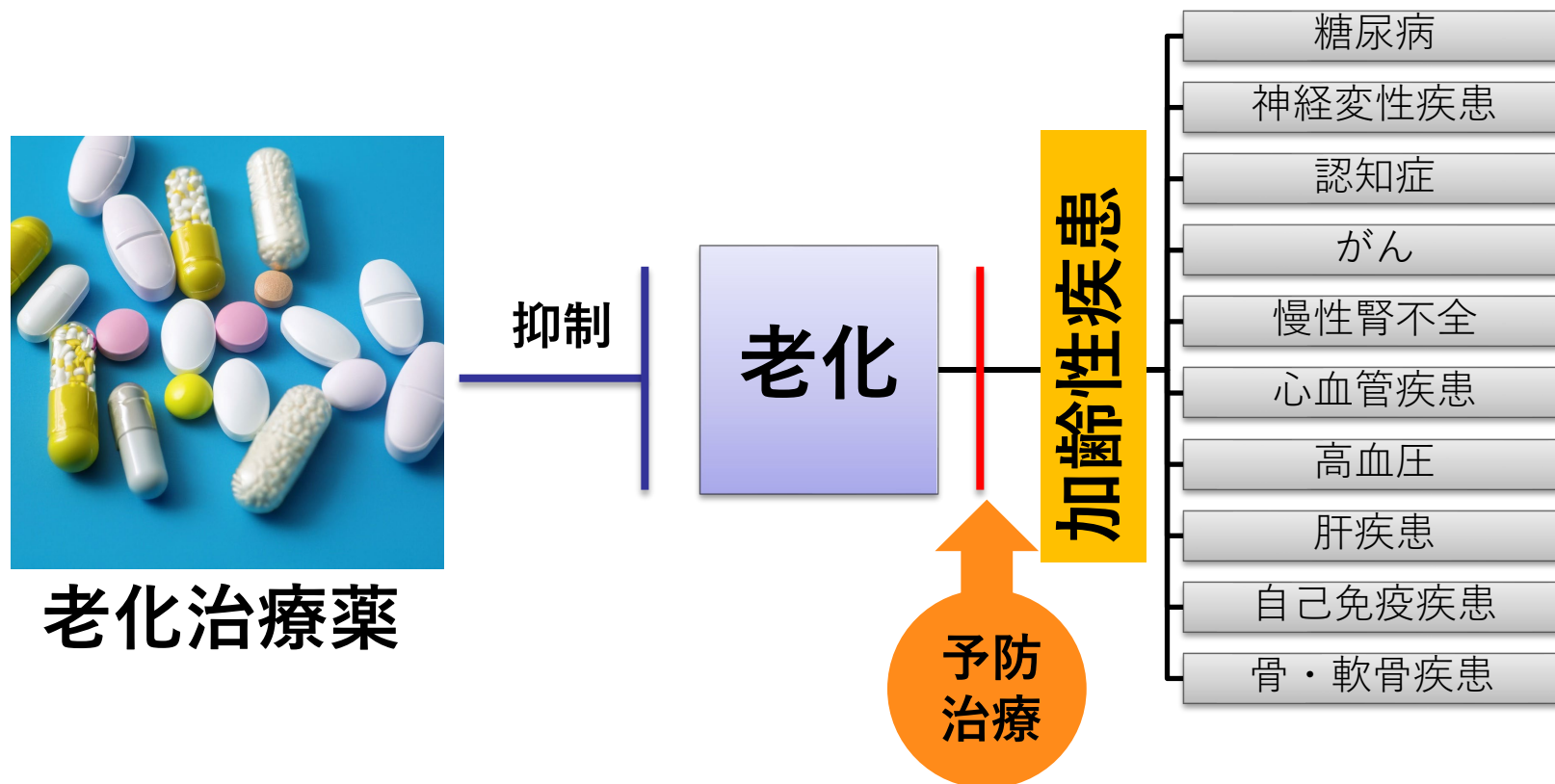
老化は外的、内的な要因により非常に複雑なプロセスで進むこと、研究に長期間を要するなどのため研究が進んでいなかった

近年、モデル生物を用いた老化制御に関する遺伝子の発見などにより、急速に発展してきている

加齢は多くの疾患の最大のリスクファクターである

老化研究の進展により、老化プロセスに介入し、老化を遅らせる、止める、巻き戻すなどの抗老化治療が可能となってきた。

老化抑制は幅広い加齢性疾患を同時に予防できる



老化メカニズムの解明に伴って、老化を抑制できる可能性がある物質、方法が見出されてきている

1. 栄養・代謝センシング

- ・ 食事制限
- ・ メトホルミン
- ・ レスベラトロール
- ・ ラパマイシン
- ・ ニコチンアミド誘導体 (NAD⁺前駆体)
- ・ タウリン

2. セノリティック薬

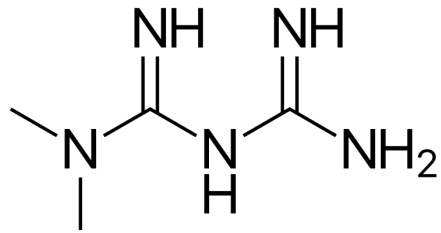
- ・ 抗アポトーシス因子阻害薬
- ・ GLS1阻害薬
- ・ 老化細胞除去ワクチン

3. 血液成分

- ・ 細胞外小胞
- ・ 分泌因子

4. 細胞初期化因子

- ・ 山中因子 (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc)

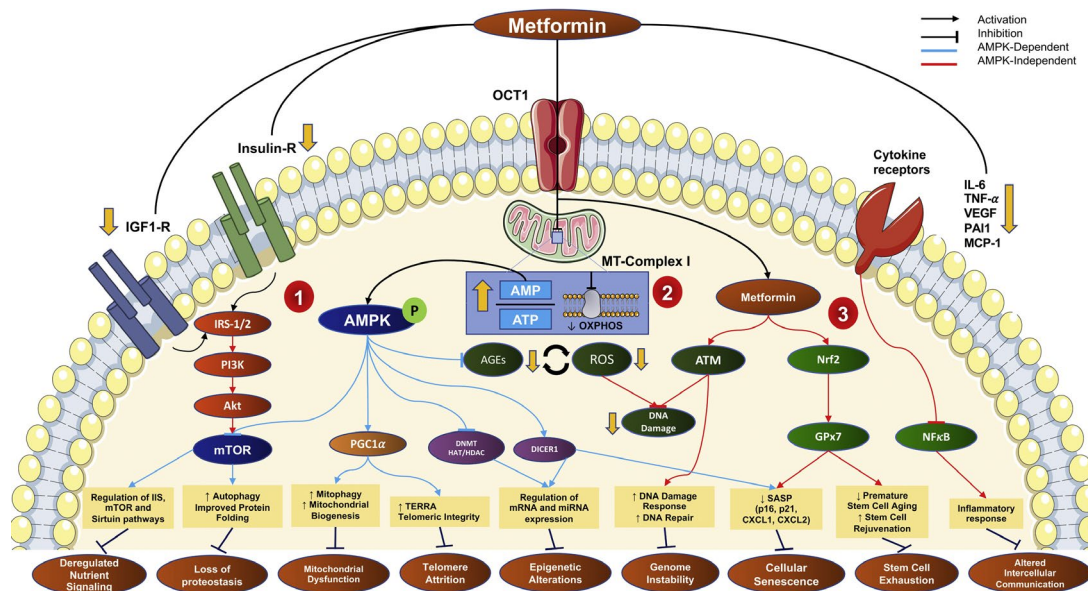


メトホルミンの化学構造

2型糖尿病治療薬として古くから知られていた

イギリス大規模データからメトホルミンを服用している糖尿病患者の方が非糖尿病患者よりも生存率が高くなっていたことから、メトホルミンが糖尿病を緩和するだけでなく、何らかの機能により死亡リスクを低下させることが示された。(CA Bannister et al., diabetes Obes Metab, 16, 1165, 2014)

現在、アメリカで加齢性疾患抑制効果を検証する治験 (Targeting Aging with Metformin) が進められている。



作用機序：ミトコンドリア機能を抑制し、ATP産生を低下させることでAMPキナーゼ (AMPK) を活性化させる。

肝臓糖新生抑制、筋肉のインスリン感受性向上などの効果があり、低濃度でマウスや線虫の寿命を延長する

(A Martin Montalvo et al., Nat Commun, 4, 2192, 2013他)

ニコチンアミド誘導体（NAD⁺前駆体）

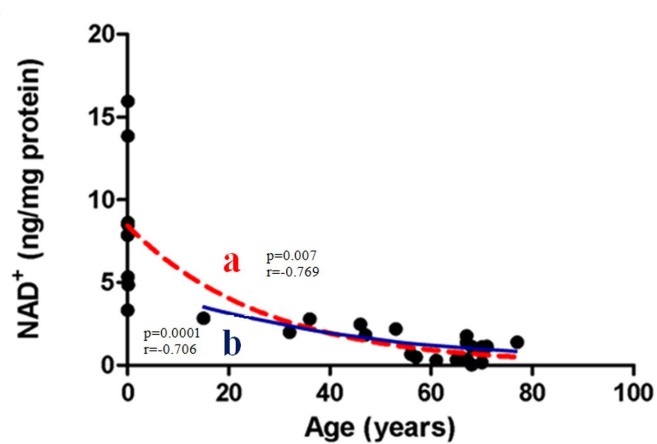
NAD⁺（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド）は全ての生物に存在し、電子伝達系における通貨として働く補酵素である。

全身性に老化とともにNAD⁺量が減少していくことが知られている（左図）。

長寿遺伝子として知られるサーチュインの活性化に関わる。

誘導体投与によって線虫やマウスの寿命が延長する。

NMNやNRはサプリメントとして市販されている。

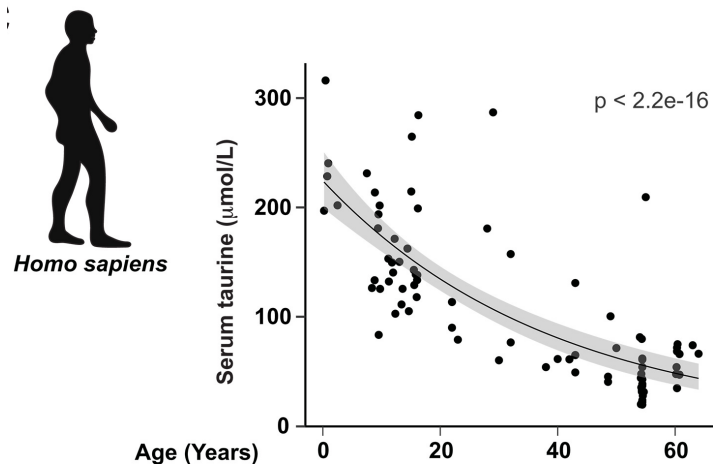


H Massudi, et al, Plos One, 7, e42357, 2012より引用

世界中で安全性、効用を検討する臨床試験が行われ、慶應義塾大学医学部ではNMNの健常者に対する臨床試験が行われた（J Irie et al., Endocr J, 67, 153, 2020）。

タウリン

最近、線虫、マウス、サル、ヒトで**加齢に伴ってタウリン濃度が減少**することが報告され、タウリンを補充することによって細胞老化の抑制や炎症の抑制効果により、線虫、マウスの寿命、サルの健康寿命が延びることが報告された（P Singh, et al, Science, 380, eabn9257, 2023）。



CONTENTS

1. 本日の発表要旨

2. 本研究の背景

3. 今回の開発研究について

4. まとめ

抗老化・健康長寿のための薬剤開発



老化関連疾患 発症率 **高**
(NASH、糖尿病、神経変性疾患、
心血管疾患、がん、骨関連疾患など)

加齢

高 → → → → → → → → エネルギー代謝 → → → → → → → → 低
高 → → → → → → → → 細胞内ATP濃度 → → → → → → → → 低

加齢によって細胞のエネルギー代謝機能が低下し、身体機能の低下、老化を招く

ATPと老化：加齢によって細胞のエネルギー代謝機能が低下し、身体機能の低下、老化を招く

種	測定対象	若年に対する老年のATP減少率	文献
1	ヒト 赤血球	加齢に伴い約50%減少	Eur J Clin inv, 1997, 27, 327
2	ヒト 線維芽細胞	加齢に伴い約50%減少	PNAS, 2006, 103, 1727
3	ヒト 外側広筋のATP産生率	10年ごとに5%減少	PNAS, 2005, 102, 5618
4	ヒト ハッチンソン・ギルフォード・プロジェリア症候群（早老症）患者線維芽細胞	約50%減少	Mechan Ageing Dev, 2010, 131, 2
5	マウス ウェルナー症候群（早老症）モデル肝細胞	約40%減少	FASEB J, 2010, 24, 158
6	ラット 心筋	10~17%減少	Trends Endocrinol Metab, 2013, 24, 495
7	マウス 脳、網膜	約60%、30%減少	Exp Eye Res, 2014, 122, 50
8	線虫 個体	約80%減少	Aging Cell, 2002, 1, 82

老化に伴って細胞内ATP量が減少する

ミトコンドリア障害と糖尿病、がん、神経変性疾患などの加齢性疾患との関連

(Integr Med, 2014, 13, 35)

本研究の特徴：ATPを老化におけるkey moleculeとして捉える

1

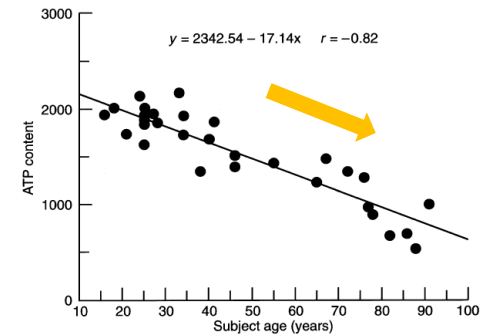


Figure 1. Correlation between erythrocyte (RBC) ATP content (pmol 10^{-4} RBC) and subject age (years) in healthy control subjects. (●), ATP.

2

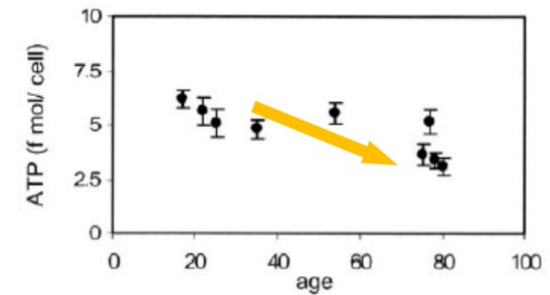


Fig. 2. Cellular ATP levels decrease as a function of age. ATP was measured as described in *Materials and Methods*. Values are the mean of three independent experiments, presented with SDs.

4

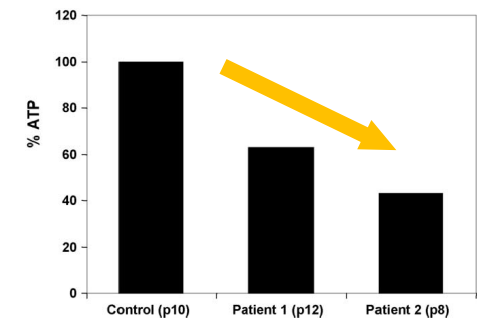
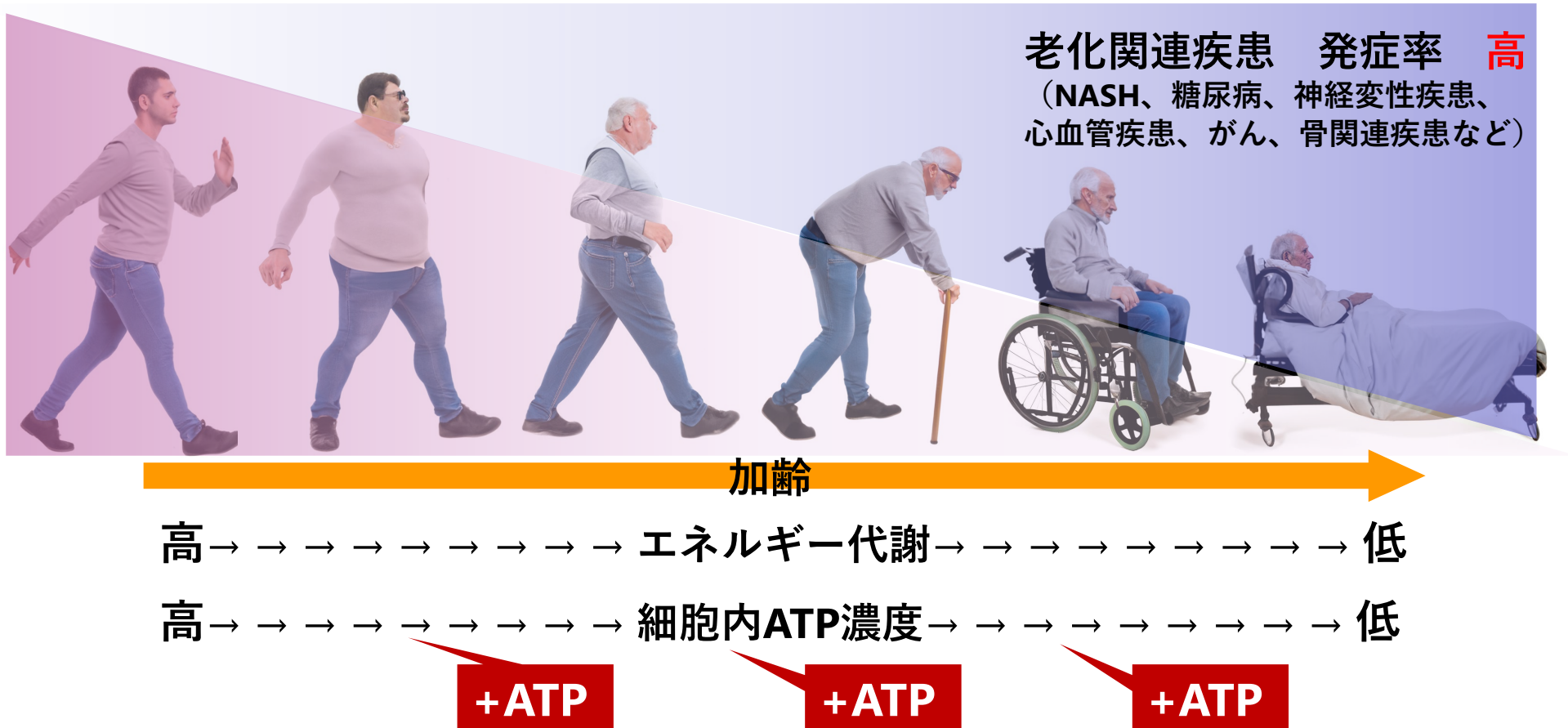


Fig. 5. ATP levels of dermal fibroblasts measured as described in Section 2. The measurements were repeated with cells at different passage numbers and the results obtained showed a similar decrease in the ATP content in the cells that agreed within 10% of the ones shown in this figure.

抗老化・健康長寿のための薬剤開発



低下したATPを薬によって補完することができれば抗老化や老化関連疾患の予防・治療に効果がある？

加齢によって細胞のエネルギー代謝機能が低下し、身体機能の低下、老化を招く

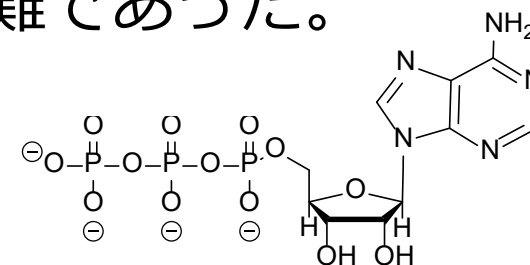
従来技術とその問題点

ATP製剤は、めまいなどの改善のために投与されることがある。

しかし、ATPは体内安定性が極めて低く、負電荷を多く有する高い親水性のため細胞膜透過性が低く、細胞内に入らない（細胞内ATP濃度の上昇は困難）。

ATPをそのまま投与しても薬としての効果が低く、
これまでは抗老化や加齢性疾患の治療への適用は困難であった。

→ATP投与による抗老化の効果は不明



**<本研究> 細胞膜透過性・生体内安定性を有する
世界初のATPプロドラッグ (proATP) を開発**

CONTENTS

1. 本日の発表要旨

2. イントロダクション

3. 今回の開発研究について

4. まとめ

3. 今回の開発研究について 本研究の戦略

アデノシンーリン酸 (AMP) をアミドリリン酸化し、細胞内酵素反応、加水分解反応によってATPへと変換される**ATPプロドラッグ (proATP)**を合成した。

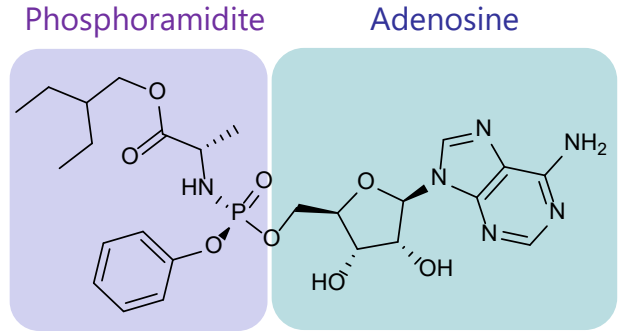
本薬剤の特性

- ①細胞膜透過性
- ②AMPに変換 →一時的にAMP濃度が上昇することに
- ③ATPに変換
→細胞内ATP濃度上昇

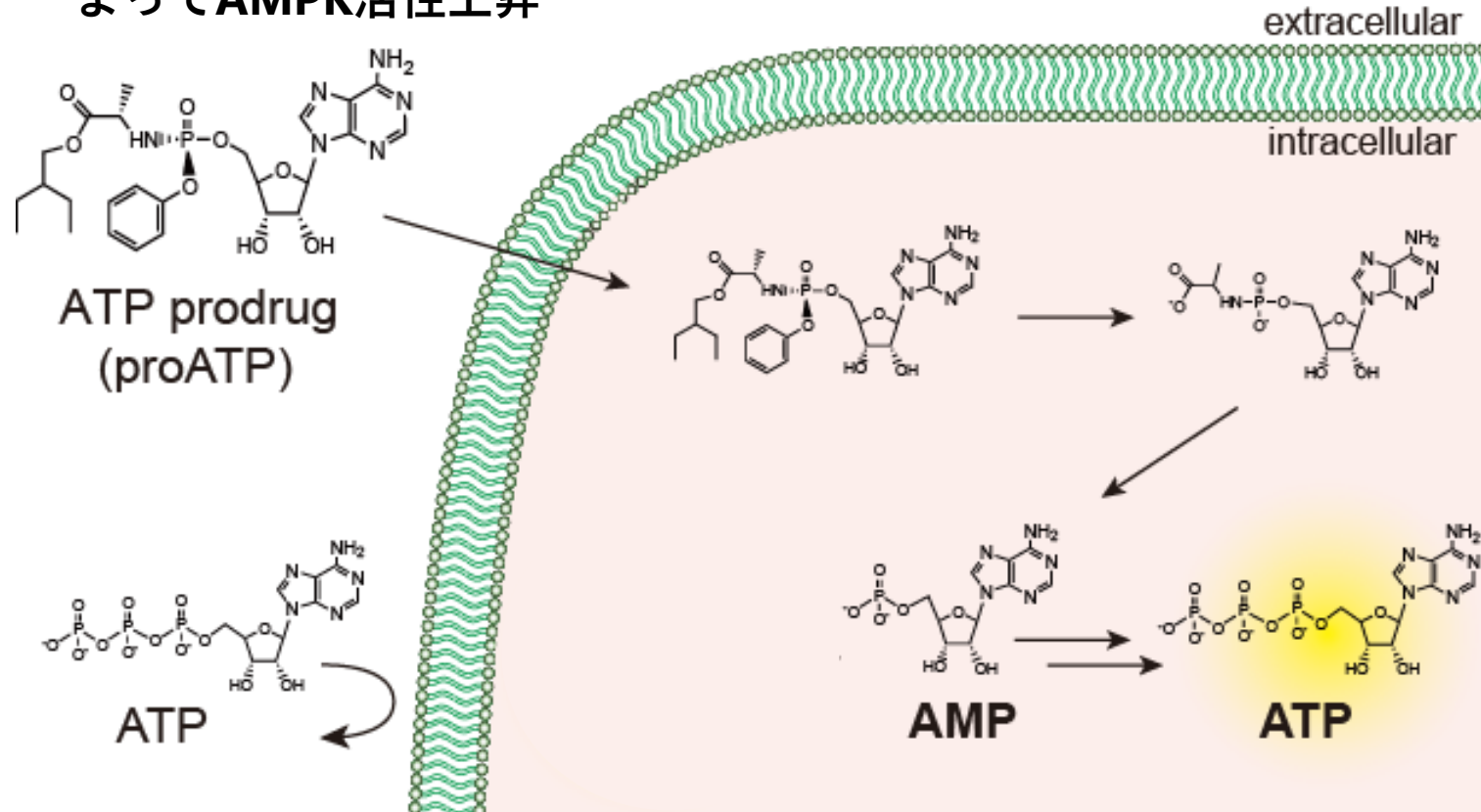
これまでに同様の細胞内代謝によって**三リン酸化され**薬効を発揮する種々の核酸プロドラッグが報告されている。

例：レムデシビル (COVID-19 に対する抗ウイルス治療薬) やソホスブビル (HCV治療薬) など

- ・ 反応機序が明らか
- ・ 臨床応用され、安全性が保証

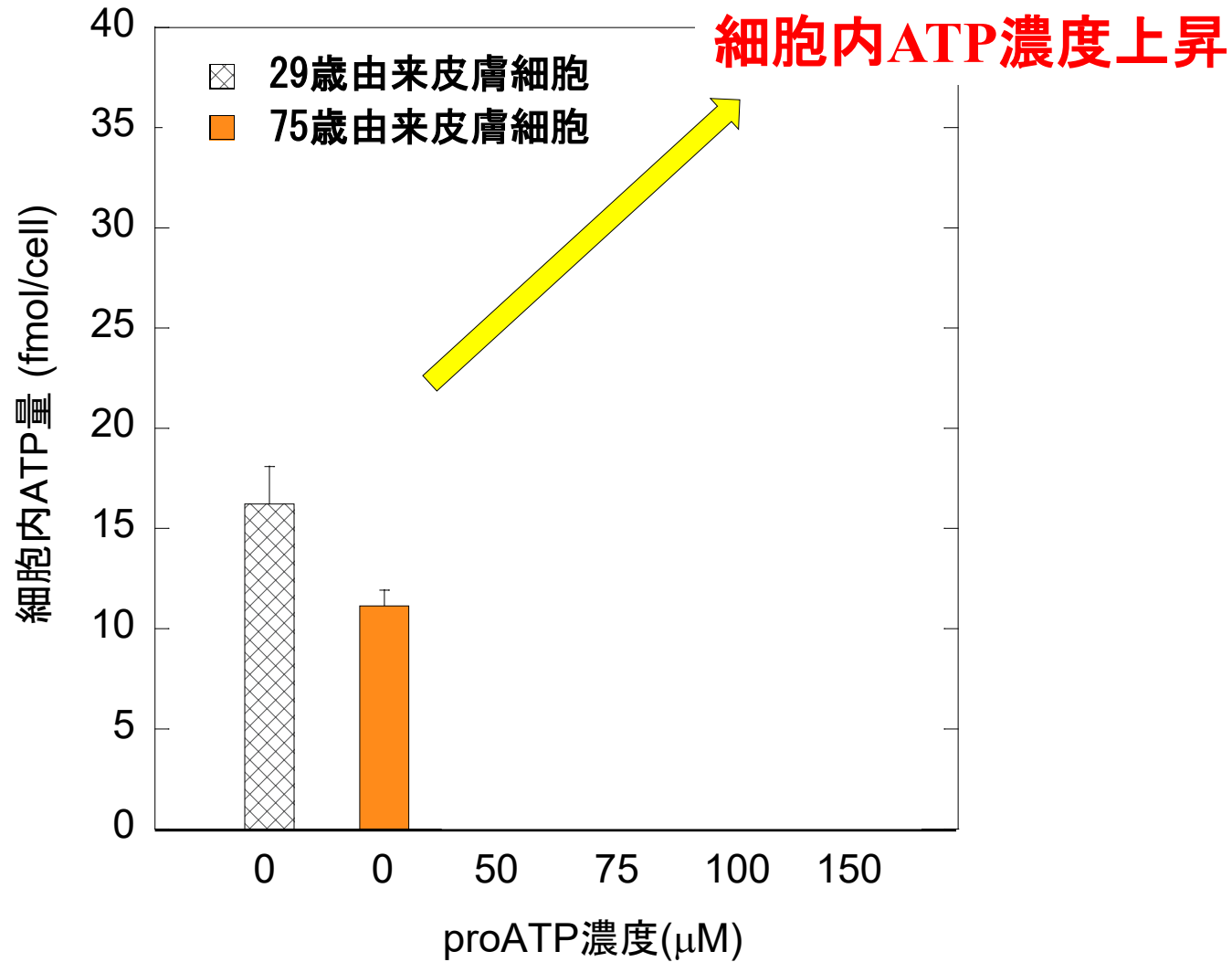


開発したproATPの化学構造



細胞内ATP量の評価（ヒト皮膚細胞に対する効果）

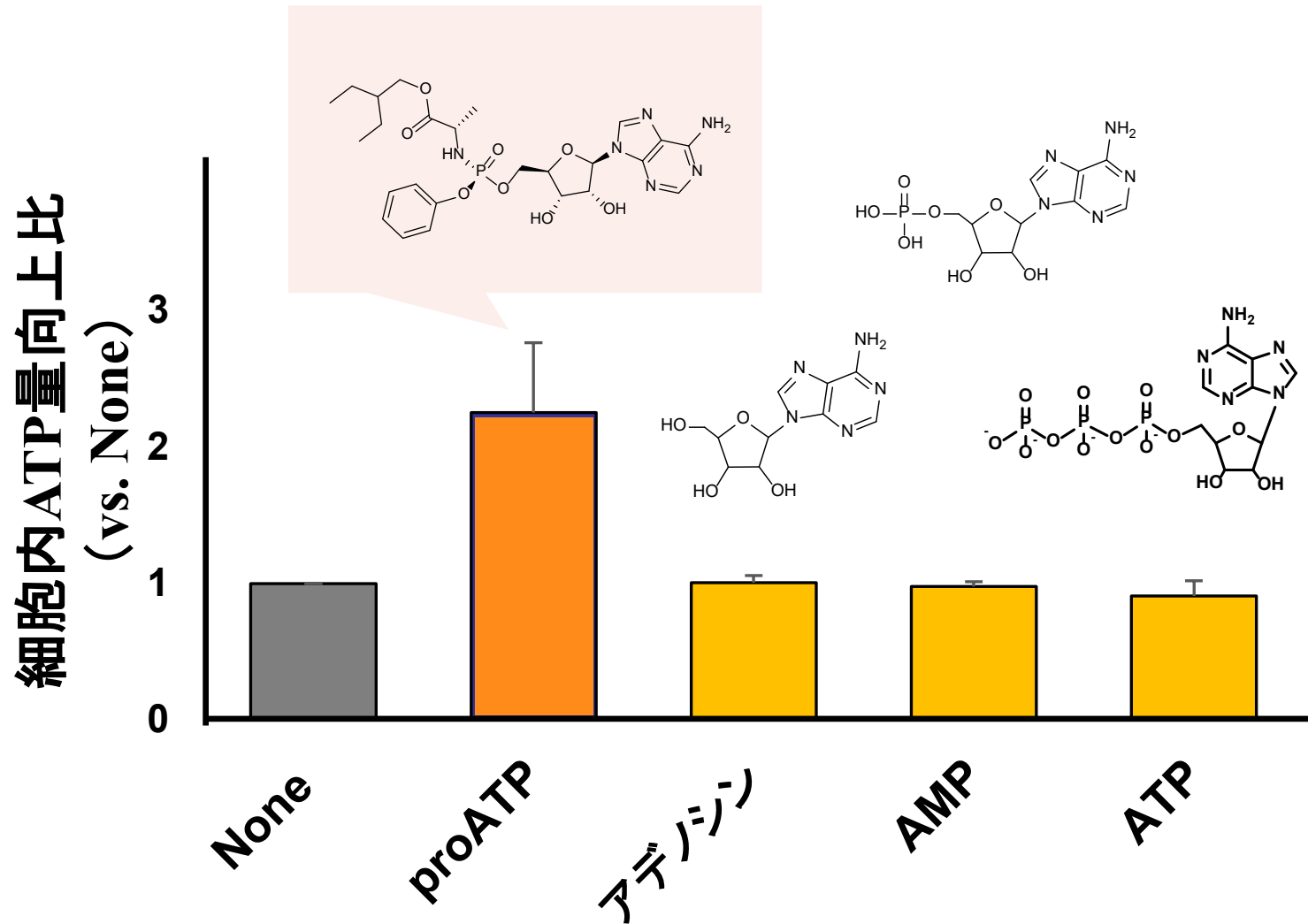
細胞：ヒト皮膚細胞、薬剤：それぞれ100 μM （0.5% DMSOを含む水溶液）になるように培地に添加し、24時間後ATP量を測定



proATP添加により細胞内ATP量が濃度依存的に上昇する
老化によって低下した細胞内ATPレベルを補完できる可能性

細胞内ATP量の評価（既存薬との比較）

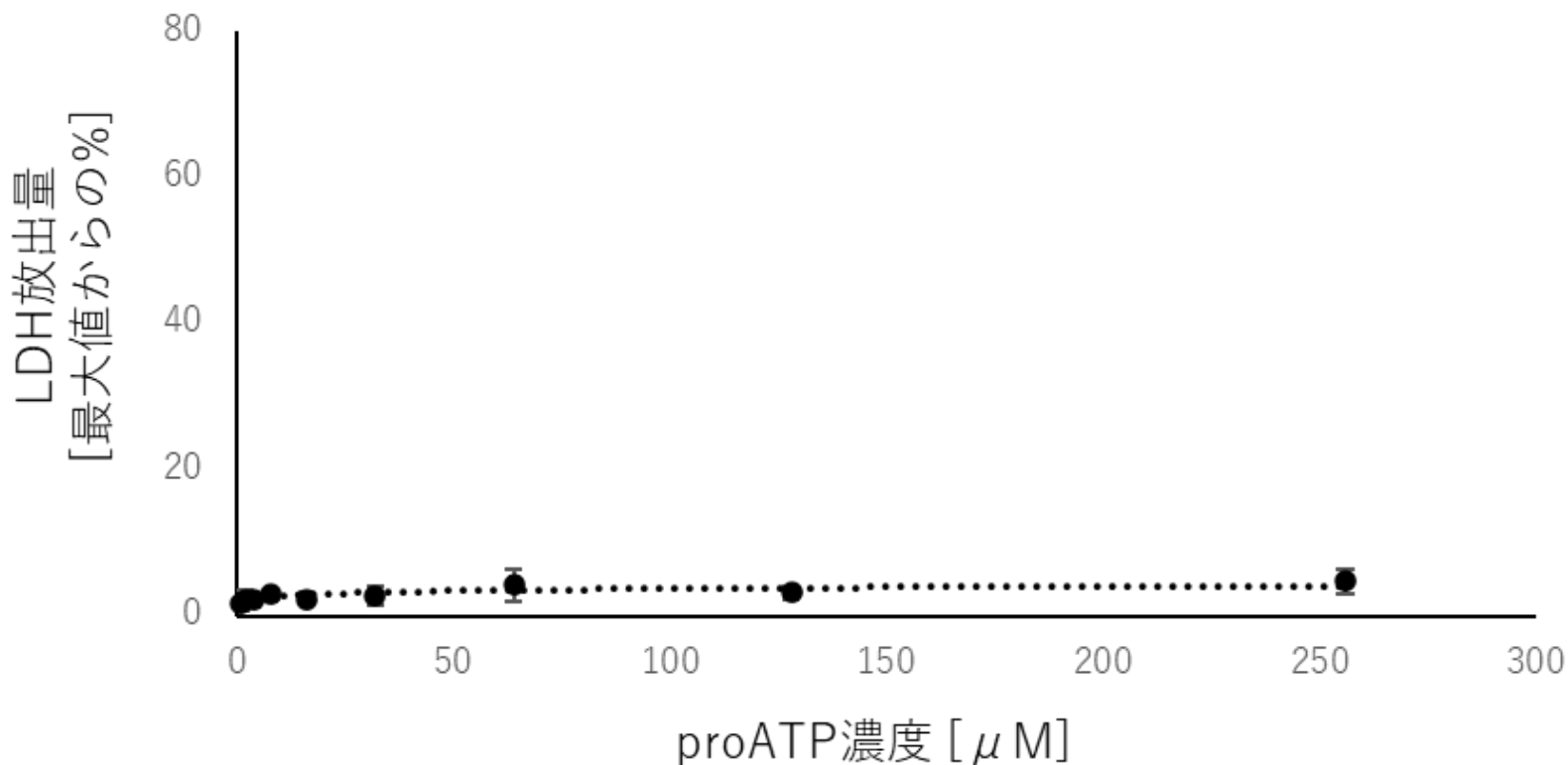
細胞：ヒト75歳由来皮膚細胞、薬剤：それぞれ100 μ Mになるように培地に添加し、24時間後ATP量を測定



ATPなどの既存アデノシン誘導体を添加しても
細胞内ATP量の上昇はみられなかった

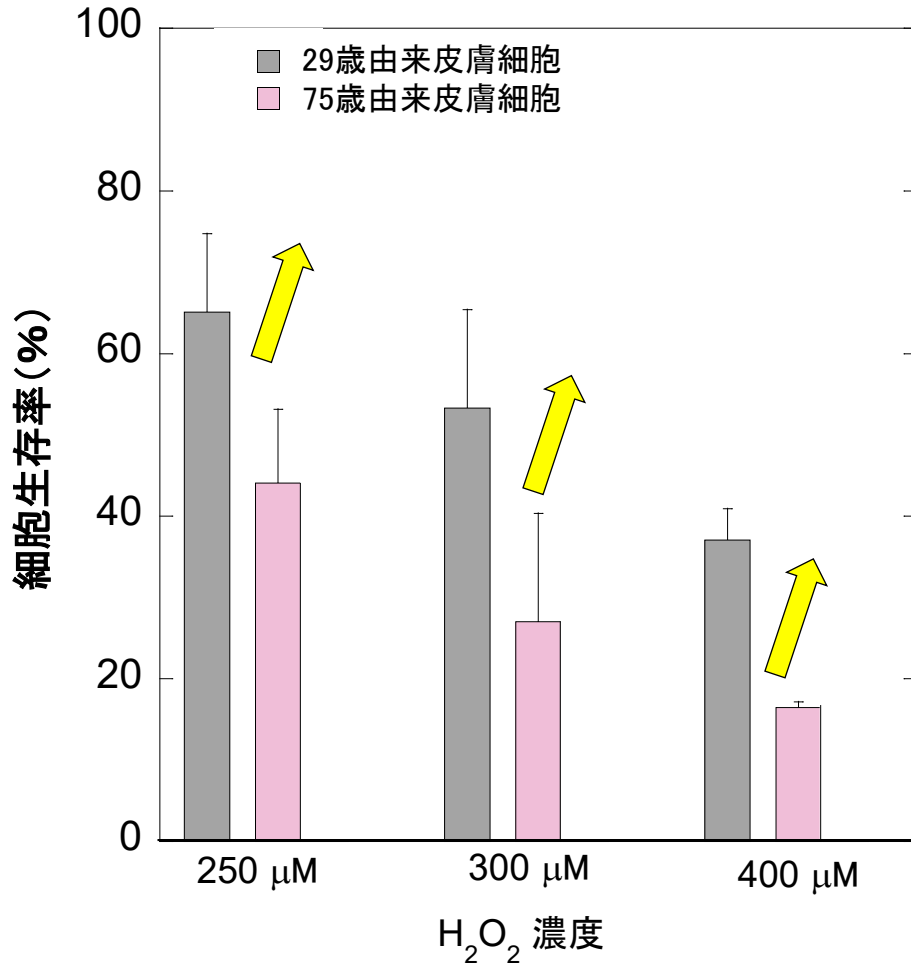
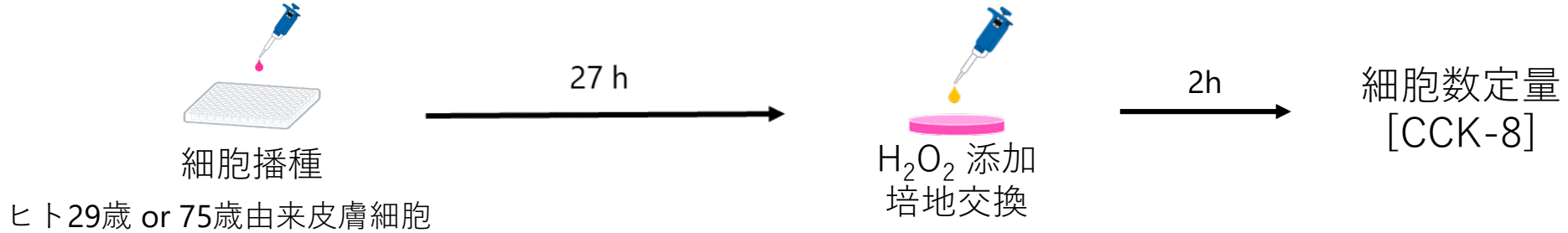
細胞：ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF）、乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）アッセイ
界面活性剤により完全に細胞を傷害したときのLDH量を100%として算出した

細胞傷害性



proATPの添加濃度を上げてても細胞毒性はほとんどなかった

ATPレベル上昇による効果（抗酸化ストレス）



- ・ 老齡細胞は酸化ストレスに対する抵抗性が若年細胞よりも低い
- ・ proATP添加により老齡細胞の酸化ストレス耐性が向上した
→ ATPレベル上昇による細胞のロバストネス（機能維持）に重要

proATPの細胞内メカニズム

proATPは細胞内で代謝され、まず細胞内AMP濃度が上昇

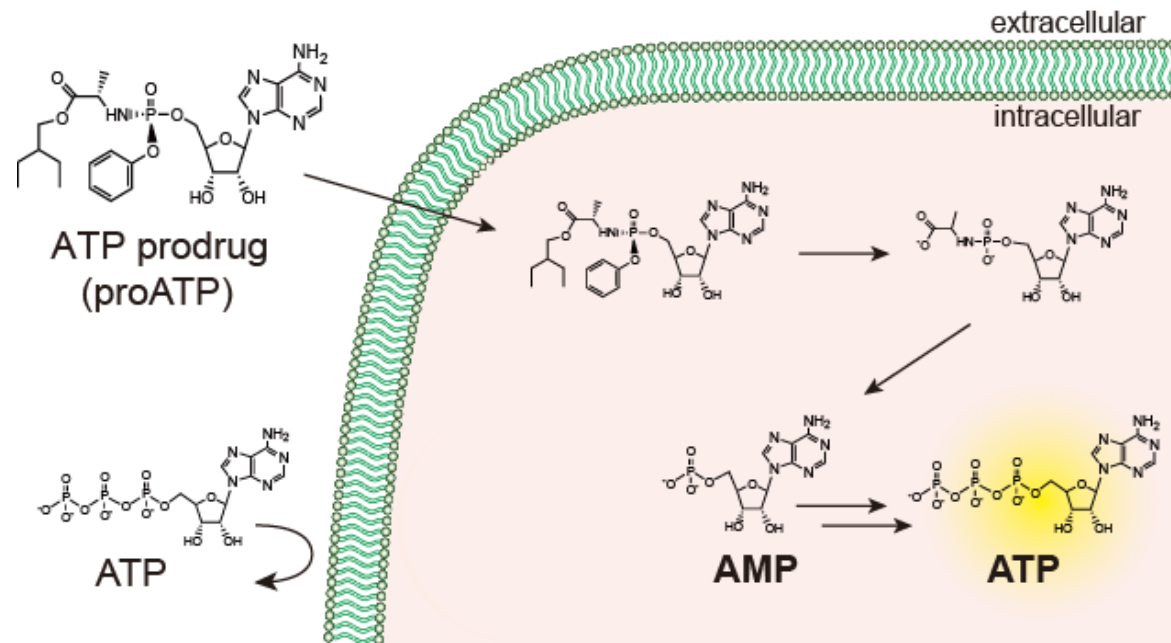
AMP (AMP/ATP) 濃度上昇は細胞のエネルギーセンサー
(代謝のマスタースイッチ) であるAMP活性化プロテインキナーゼを活性化させる
(AMPの上昇は、細胞がエネルギー不足だと認識する)

AMPKの活性化は、糖、脂肪、タンパク質合成を抑制し、
疑似運動効果を与える

抗老化薬の一つとして考えられている
メトホルミンはAMPKを活性化する

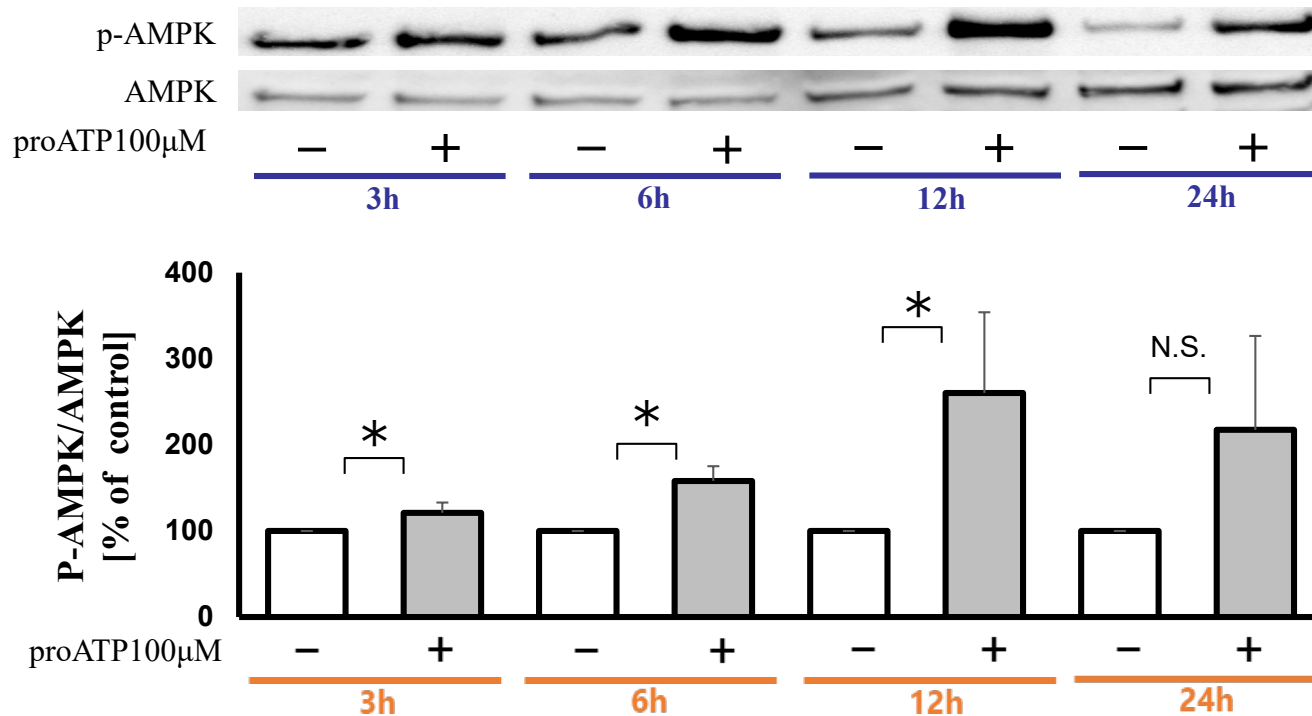
AMPKは長寿遺伝子の一つと考えられている

proATPはAMPKを活性化する？



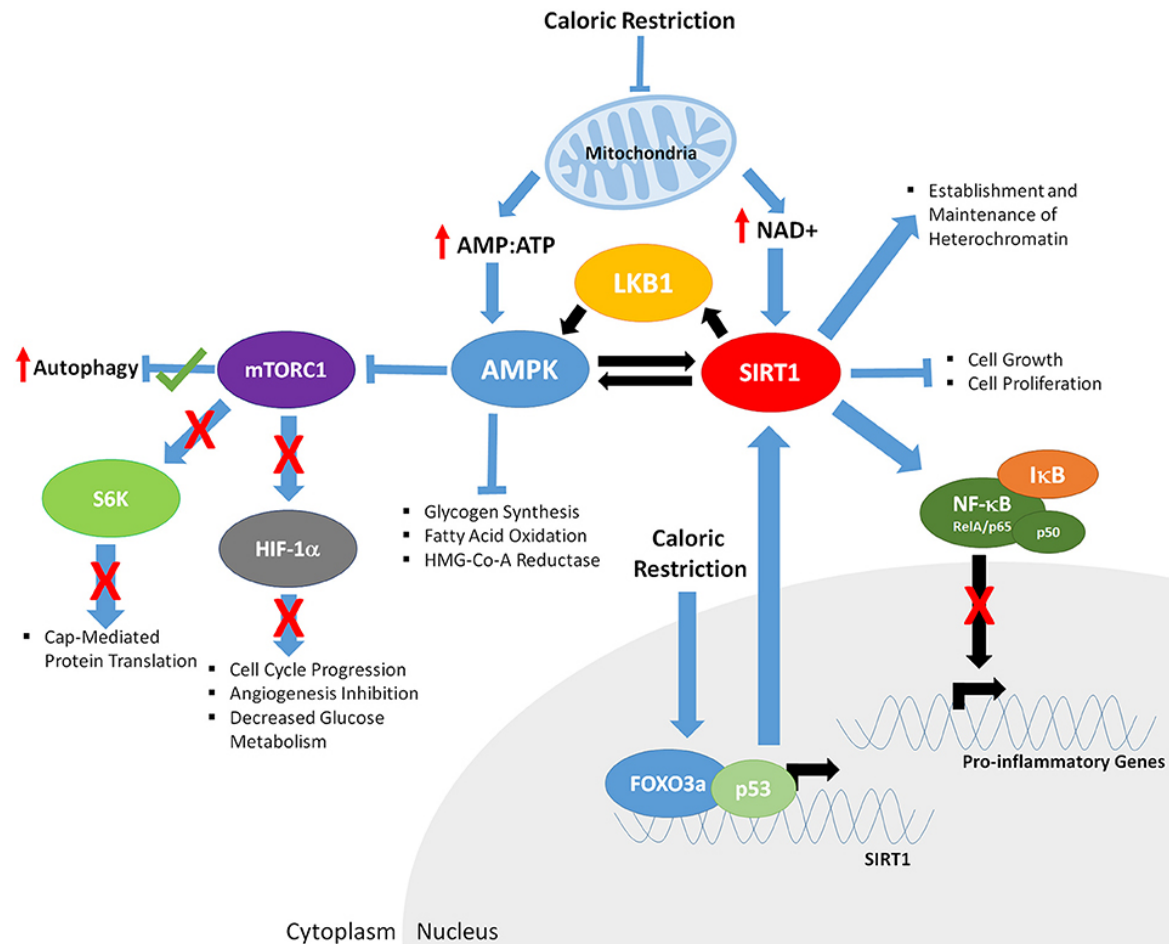
細胞：ヒト皮膚線維芽細胞

ウエスタンブロッティングによるAMPK活性化の評価



proATPはAMPKを活性化させた
 添加3時間から12時間でAMPKが活性化し、ATPレベルが上昇した
 24時間後には活性に抑制傾向が見られた

AMP活性化プロテインキナーゼ (AMPK)



Cytoplasm Nucleus

ZE Gillespie, et al., Front. Genet, 7, 142, 2016より引用

カロリー制限から誘導されるシグナル伝達経路

抗老化治療の研究で最も注目されている経路のひとつ

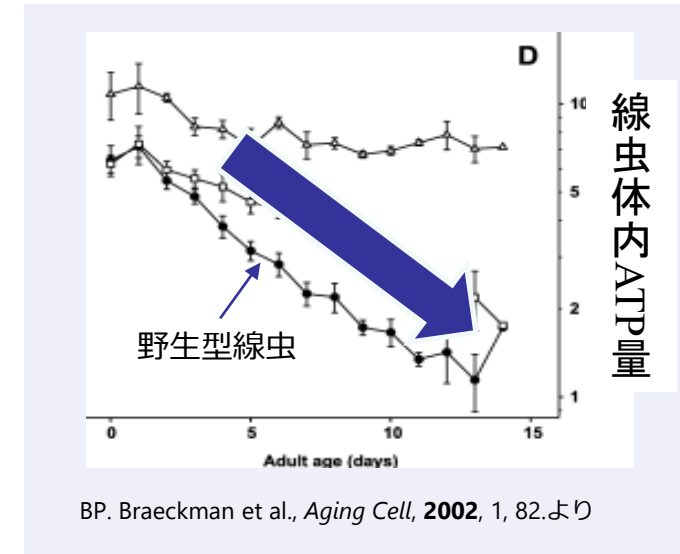
AMPKの活性化が重要な役割を果たす

proATPがメトホルミンなどの従来のAMPK活性化剤と異なるのは、AMPKを活性化した後、すぐにATPの上昇が起こることである
AMPK活性化効果 + ATP上昇効果は個体寿命に影響を与える？

線虫 (Caenorhabditis elegans, C. elegans)

非寄生性の線形動物。体長約1 mm。
全ゲノム配列が解読済み。
平均寿命が約3週間で老化や寿命研究の
モデルとして世界中で使われている。

加齢に伴い細胞内ATP量が大幅に減少 (80%減)
ATP上昇による効果が見やすい?



若い線虫 (3日)

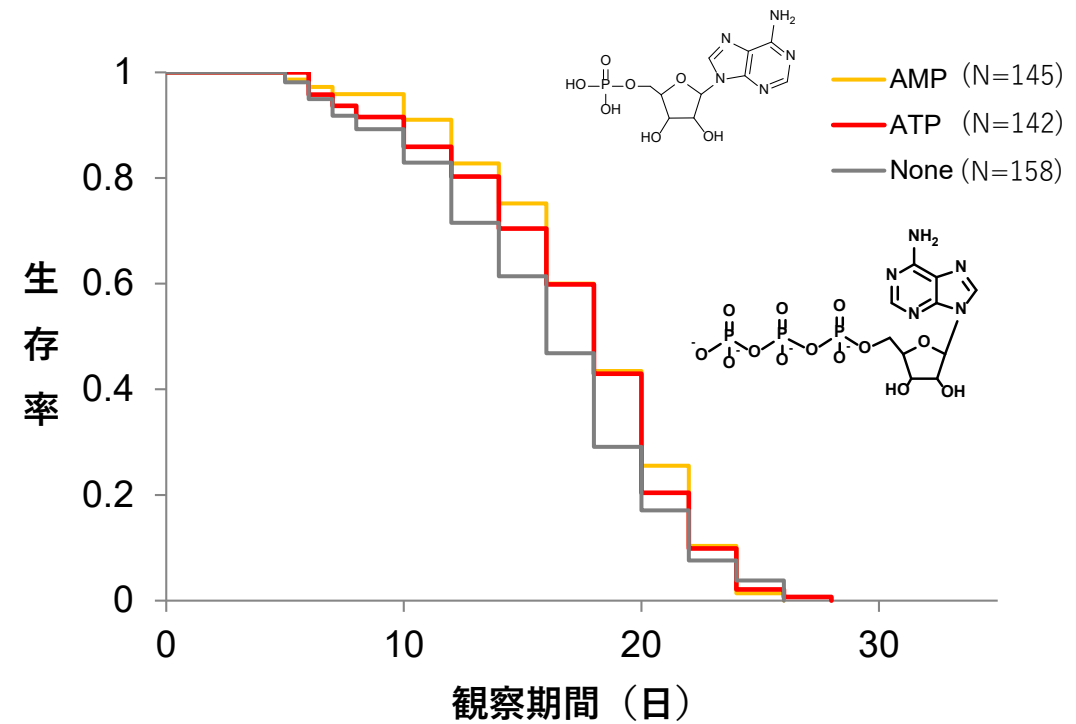
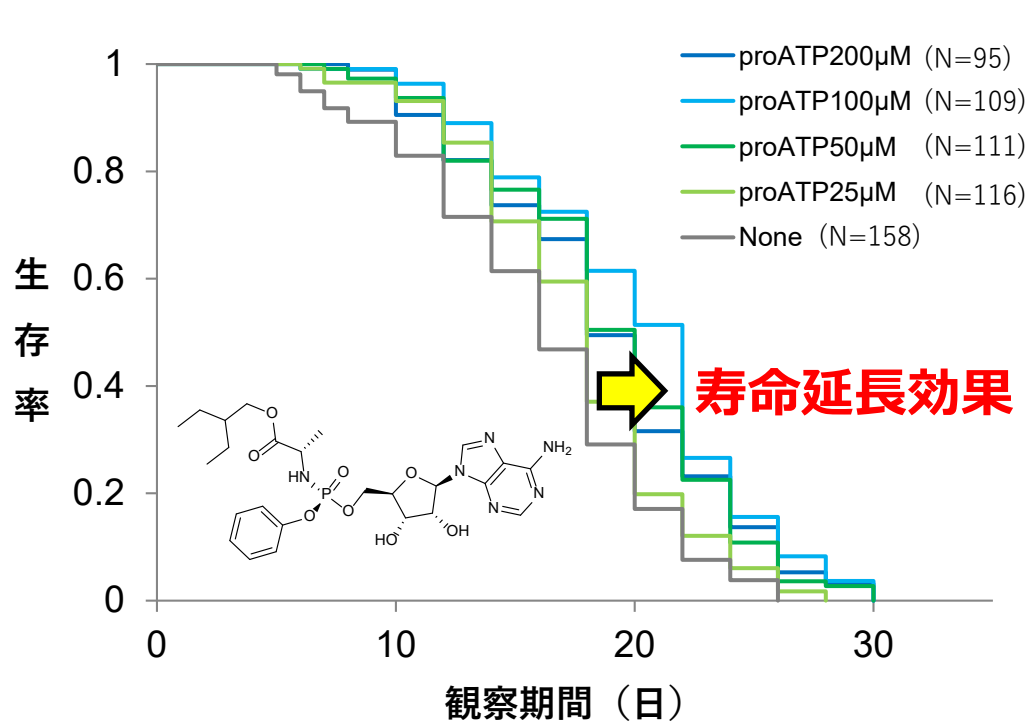


老化した線虫 (18日)

※両動画の拡大倍率が異なるため大きさの比較はできない。動画は時間短縮無し通常速度で表示。

大阪公立大学 中台 枝里子先生との共同研究

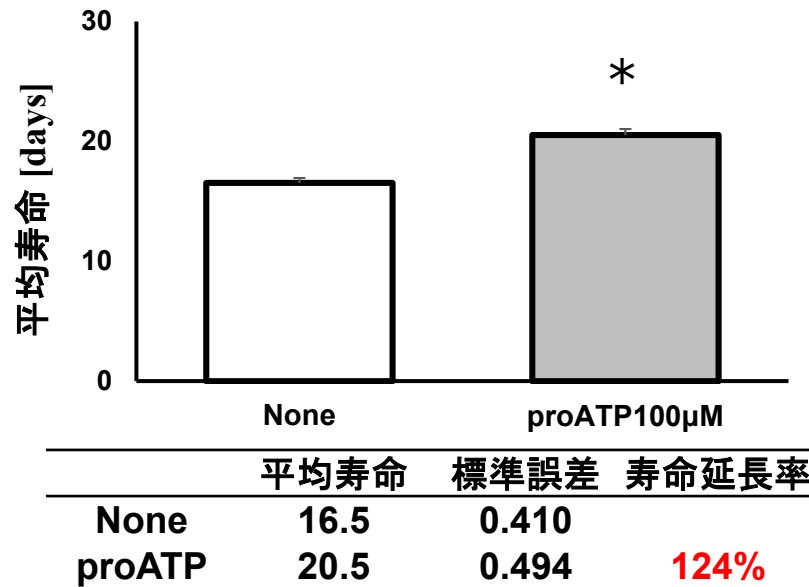
線虫を用いた生存分析



proATP濃度50 µM以上で
有意に寿命が延長

AMP、ATPは薬剤なしコントロール
(None) との有差なし
(延長効果なし)

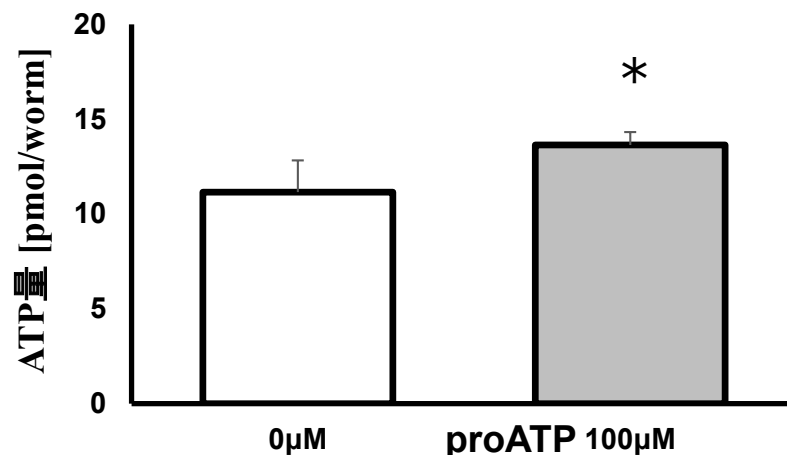
平均寿命比較



従来の抗老化薬候補との比較（寿命延長効果）

薬剤	寿命 (%control)	文献
ニコチンアミドリボシド (NR) (500 µM)	116%	L. Mouchiroud et al., Cell, 2013
メトホルミン (50 mM)	127%	B. Onken et al., PLOS ONE, 2010
ラパマイシン (100 µM)	126%	D. Chen et al., Cell Rep, 2013
レスベラトロール (100 µM)	110%	JG Wood et al., Nature, 2004
proATP (100 µM)	124%	本研究

線虫体内に含まれるATP量比較



proATPは、これまでに寿命延長効果が報告されている従来薬と同等かそれ以上の効果を有する

線虫一匹あたりに含まれるATP量はproATP添加により有意に（123%）上昇していた

ATP量：各条件25匹ずつの平均値

CONTENTS

1. 本日の発表要旨
2. イントロダクション
3. 今回の開発研究について

4. まとめ

新技術の特徴・従来技術との比較

ATPをそのまま投与しても薬としての効果が低かった
→ATP投与による抗老化の効果は不明であった

世界初のATPプロドラッグの開発に成功し、これまでに得られている結果から、細胞内ATPを効果的に増やすことで細胞の抗ストレス、生物個体レベルでの抗老化効果を示すことが示唆された

これまでにAMPKを活性化し、返す刀でATPを上昇させる方法は報告されておらず、新しい作用機序によるプロドラッグとして期待できる

本研究は、生体エネルギー補完法と呼べる新しいコンセプトを確立し、画期的な抗老化、加齢性疾患の予防・治療法を提案していく

想定される用途

- ・ 抗老化薬
 - ・ 加齢に伴って起こる様々な疾患（加齢性疾患）の予防・治療
 - ・ ミトコンドリア病などATP低下が起こる疾患の治療
 - ・ 化粧品（皮膚細胞に対する抗酸化ストレス効果から）
- など

実用化に向けた課題

本プロドラッグの開発からまだ日が浅く、薬理機序や体内動態などの細胞内、生体内におけるメカニズムのより詳細な解明が必要である。

健康寿命延伸に対する効果を現在検討中
線虫体内における抗老化効果のメカニズムを詳細に検討中
さらに効果の高いプロドラッグの開発へ

ATPは生命活動のあらゆる反応に必須であり、本プロドラッグは、広範な応用が可能であると期待できる。今後さらにデータを取得し、何に対してどこまで効果があるのかを検討していく必要がある。

実用化に向けて、線虫以外の動物における効果の検証、安全性の確認が必要である。

老化の定量化法の開発。減少したATPを適切に補完するための定量方法の確立。

企業への期待

マウス、ラットなどの動物における薬剤の体内動態の解明と製剤化技術により生体内で効果的に機能する薬剤とすることができると考えています。

医薬品開発の技術を有する企業との共同研究を希望します。

ストレス耐性向上などの皮膚細胞に対する効果はこれまでにある程度データがでており、化粧品分野への展開も可能性があると考えています。

他にもATP低減が関連する様々な分野への応用展開を希望します。

本事業に関する知的財産権

発明の名称：核酸前駆体

出願番号：特願2022-128175
PCT/JP2023/029131

出願人：九州大学

発明者：穴田貴久、田中賢、
小林慎吾、河原道治

お問い合わせ先

九州大学
オープンイノベーションプラットフォーム (OIP)
サイエンスドリブンチーム

T E L : 092-400-0494

F A X : 092-400-0527

e-mail: transfer@airimaq.kyushu-u.ac.jp