

血管拡張薬ヒドララジンの
FAD 依存性酵素に対する
阻害作用に関する研究

2017 年 1 月

川崎祥平

血管拡張薬ヒドララジンの FAD 依存性酵素に対する 阻害作用に関する研究

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生物機能科学専攻
博士（農学）学位論文

川崎 祥平

略語

ACE	angiotensin converting enzyme、 アンジオテンシン変換酵素
AI	angiotensin I、アンジオテンシン I
AII	angiotensin II、アンジオテンシン II
ARB	angiotensin receptor blocker、 アンジオテンシン受容体ブロッカー
AT1	angiotensin II type 1 receptor、 アンジオテンシン 1 型受容体
AQC	6-aminoquinoryl carbamate
CID	collision-induced dissociation、衝突誘起解離
DAO	diamine oxidase、ジアミン酸化酵素
DNMT	DNA methyltransferase、 DNA メチル基転移酵素
DR	drug repositioning、ドラッグリポジショニング
hAG	human angiotensinogen、 ヒトアンジオテンシノーゲン
HDC	histidine decarboxylase、ヒスチジン脱炭酸酵素

HDP	hypertensive disorders of pregnancy、 妊娠高血圧症候群
Hdz	Hydralazine、ヒドララジン
HNMT	histamine <i>N</i> -methyl transferase、 ヒスタミン <i>N</i> メチル基転移酵素
HPLC	high performance liquid chromatography、 高速液体クロマトグラフィー
hRN	human renin、ヒトレニン
IUGR	intrauterine growth restriction、 子宮内胎児発育遅延
iPS 細胞	induced pluripotent stem cells、 人工多能性幹細胞
LC-MS/MS	liquid chromatography tandem mass spectrometer、 液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計
LSD1	lysine specific demethylase 1、 リジン特異的脱メチル化酵素
MALDI-QIT-TOF/MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-

Quadrupole Ion Trap- Time-of-Flight Mass Spectrometer、

レーザーイオン化四重極イオントラップ飛行時間型
質量分析装置

MAO	monoamine oxidase、モノアミン酸化酵素
<i>m/z</i>	mass-to-charge ratio、質量電荷比
Olm	olmesartan、オルメサルタン
PAH	pregnancy-associated hypertension
RAS	renin-angiotensin system、 レニン・アンジオテンシン系
SAM	<i>S</i> -adenosylmethionine、 <i>S</i> -アデノシルメチオニン
SSAO	semicarbazide-sensitive amine oxidase、 セミカルバジド感受性アミノキシダーゼ
TCP	tranylcypromine、トラニルシプロミン
UPLC	ultra performance liquid chromatography
VAP-1	vascular adhesion protein-1、血管接着因子 1

目次

第1章 序論	6
第2章 妊娠高血圧モデルマウスにおける ヒドララジンによるモノアミンオキシダーゼ-B の 阻害と <i>tele</i> -メチルヒスタミンの増加	9
要旨	9
背景	11
材料と方法	16
結果	26
考察	30
第3章 リジン特異的脱メチル化酵素 1 に対する ヒドララジンの阻害作用	35
要旨	35
背景	37
材料と方法	41
結果	44
考察	45

第4章	結語	51
	謝辞	53
	参考文献	54
	図	67

第一章 序論

血管拡張薬として古くから高血圧の治療に用いられているヒドララジン (Hdz) は、特に全妊婦の約 8% を占め、妊娠後期の母体高血圧とタンパク尿を主病態とする妊娠高血圧症治療の第一選択薬として広く使用されている。しかしその一方で、頭痛や悪心、嘔吐、頻脈などの副作用が報告され、降圧作用を示すメカニズムと共に、副作用の原因となる機構も詳細には分かっていない。

当研究室ではこれまでに、妊娠高血圧モデルマウス (PAH マウス) を用いた研究において、血圧の上昇に伴い体内濃度が上昇し、Hdz またはアンジオテンシン受容体阻害薬オルメサルタン (Olm) の投与により、血圧低下と共に正常妊娠マウスと同レベルまで減少する物質としてエタノールアミンを同定した (3)。そこで本研究では、Hdz 投与時にのみ変化する物質を探索することで、Hdz の作用メカニズムを解析できるのではないかと考え、Hdz 投与特異的に血圧低下と連動して量的変化を示す物質の探索を目的として研究を開始した。

薬剤非投与或いは Hdz、Olm 投与の組み合わせで、妊娠 19 日目の PAH マウスから母獣血漿を採材し、HPLC 分析を行ったところ、Hdz 投与時のみ増加するピークを検出した。この物質を単離し、

MALDI-QIT-TOF/MS 分析による分子量測定並びに構造解析を行った結果、本物質がヒスタミンの代謝産物である *tele*-メチルヒスタミン (*t*HM) であることが判明した。Hdz の投与では、ヒスタミンの明らかな減少が認められなかったことから、*t*HM の増加は生成の亢進ではなく、代謝の抑制が原因であることが予想された。*t*HM はモノアミンオキシダーゼ-B (MAO-B) による α -アミノ基の酸化的脱アミノ化を通して代謝される。

そこで、*t*HM を基質とした MAO-B 活性に対する *t*HM の影響を調べる目的で、既知の MAO-A/B の阻害剤であるトラニルシプロミン (TCP) をコントロールとして、酵素反応阻害実験を行った。その結果、Hdz は *t*HM を基質とした MAO-B 反応を *in vitro* で抑制したことから、PAH マウスへの Hdz 投与による *t*HM の増加が、*in vivo* での MAO-B 活性阻害に起因する可能性が示唆された。

ところで MAO は、補酵素として FAD を要求する酸化還元酵素であるが、同様な FAD 依存性酵素としてヒストンリジン特異的脱メチル化酵素 1 (LSD1) が知られている (4)。タンパク質メチル化リジン残基の酸化的脱メチル化反応を触媒する LSD1 が、MAO-A/B 阻害剤である TCP により阻害される (5) ことから、私は Hdz も LSD1

の活性を阻害しているのではないかと仮説を立てた。そこで、合成ヒストンペプチドを基質とする *in vitro* 脱メチル化活性の測定系を用いてこの仮説を検証した結果、Hdz 存在下で LSD1 の活性が低下した。このことから、Hdz が LSD1 による内在性タンパク質の脱メチル化活性も同様に阻害する可能性が示唆された。

本研究において、一般的に血管弛緩剤として使用されている Hdz の作用メカニズムを解明する目的で、Hdz 投与時の内因性物質の生化学的変化に着目することで、FAD 依存性酵素に対する阻害効果を見出し、Hdz の作用発現に関して新たな知見を得るに至った。

第二章 妊娠高血圧モデルマウスにおけるヒドララジンによるモノアミンオキシダーゼ-B の阻害と *tele*-メチルヒスタミンの増加

要旨

血管拡張薬として古くから高血圧の治療に用いられている Hdz は、特に妊娠時特有の疾患である HDP の第一選択薬として広く用いられている。その一方で、近年いくつかの分子標的が報告されているものの、直接的に Hdz の降圧作用に結びつくメカニズムや、頭痛をはじめとする副作用の発現機構については未だ明らかとなっていない。

本研究では Hdz の作用点を明らかにすることを目的とし、私の研究室で開発された PAH マウスを用いて、Hdz 投与時特異的に血圧の正常化と連動して量的変化を示す物質の探索を行った。探索には、アミノ基を有するアミノ酸やアミン、ペプチドを高感度に検出する蛍光検出法を用いた。物質の同定には MALDI-QIT-TOF/MS 解析を行い、Hdz に応答して特異的に増加する物質として *t*MH を同定した。更にこの *t*MH 上昇のメカニズムを明らかにするため、*t*MH の代謝系

に注目し、*t*MH の分解を触媒する MAO-B の活性に対する Hdz の作用を *in vitro* の実験系で調べた。その結果、Hdz は *t*MH の MAO-B による代謝産物である *t*-MIAA の産生を阻害した。これらの結果は、妊娠高血圧モデルマウスにおいて Hdz が MAO-B の活性を抑制し、母獣血中に *t*MH が上昇したことを示唆している。

背景

妊娠時の母体では、胎盤を通して胎児への酸素や栄養素の供給を行うために体液量が増加するが、血圧等様々な恒常性が維持されている (6)。しかし、妊娠恒常性が維持できなくなると、様々な妊娠時疾患を引き起こす。例えば、HDP は、全妊婦の約 8% と高頻度に認められ、妊娠後期における母体高血圧とタンパク尿を主病態とする (7、8)。さらに、母体では心臓や肝臓、胎盤など様々な組織の障害を、また胎児では子宮内発育遅延 (IUGR) を呈し、重篤な場合には、母子ともに死に至る危険性のある疾患である。しかし、妊婦や胎児を研究対象とすることへの倫理的な問題や、HDP モデル動物の開発が進んでいない等の技術的な問題が本病態研究上の障壁となっており、詳細な発症メカニズムはいまだ不明である為、有効な治療法も確立されていない (9)。

HDP の病態発症原因に関連して、ヒトの HDP 患者でアンジオテンシン II (Ang II) に対する感受性が亢進していることが報告されている (10)。この報告から、代表的な血圧上昇系であるレニン・アンジオテンシン系 (RAS) の HDP への関与が考えられた。RAS では、

基質であるアンジオテンシノーゲンが酵素レニンによる特異的分解を受け、10 アミノ酸からなるアンジオテンシン I (AI) を生成する。AI はさらにアンジオテンシン変換酵素 (ACE) による切断を受け、8 アミノ酸からなる AII へと変換される。AII はその受容体アンジオテンシン 1 型受容体 (AT1) を介して、血管平滑筋の収縮や、副腎におけるアルドステロンの分泌促進によるナトリウム貯留を介した血圧上昇作用を有する (11) (図 1)。

当研究室では、これまでに、オスのヒトレニン (hRN) 遺伝子導入マウス (hRN マウス) とメスのヒトアンジオテンシノーゲン (hAG) 遺伝子導入マウス (hAG マウス) を交配して、妊娠後期に著しい高血圧やタンパク尿を呈し、ヒトの妊娠高血圧症と同様の病態を示す妊娠高血圧モデルマウス (PAH マウス) の作出に成功している (12)

(図 2)。妊娠後期に胎仔・胎盤で産生されるオス親由来の hRN が母体血中へ透過し、母体血中の hAG と反応することで過剰な AII が産生され、母体血圧が上昇する PAH マウスは、ヒト HDP の動物モデルとして広く使われている。病態発症前の妊娠 13 日目より、AT1 阻害薬 (ARB) の一種であるオルメサルタン (Olm) を浸透圧ポンプで PAH マウスに投与したところ、母体病態である妊娠後期の高血圧

や心肥大、また、胎盤構造変化の著しい改善が認められ、産仔においても IUGR の程度が大幅に改善され、心臓の病態の発症を予防出来ることが明らかとなっている (13)。

このように PAH マウスでは、その病態形成に AT1 の作用亢進が重要であることが明確である一方で、このモデルにおいても、AT1 を介したシグナルの亢進から病態形成に至るまでの詳細な機構を含めた病態の全体像は、未だ明らかとなっていない。これまでに PAH マウスの胎盤で発現する遺伝子のマイクロアレイ解析や、病態形成の引き金となるタンパク質の研究が行われ、徐々に病態形成に関わる機能高分子が明らかになりつつある (13)。その一方で、ヒトやげっ歯類の HDP では、ホモシステインやセロトニン、オキシトシンと行ったアミノ酸やアミン、ペプチド類の変動が報告されている (14、15) ものの、PAH マウスを用いた生体低分子に着目した解析はほとんど行われていなかった。

このような病態形成に関与する生体低分子には、共通して「官能基」がある。これらは糖や脂肪酸、アミノ酸と言った範疇を超えて、広く一般的に、しかしその物質の性質を決めている重要な部分である。特に極性が大きく、反応性に富むアミノ基を持つアミノ酸や重要なシ

グナリング分子であるカテコールアミン、アミノ糖、リポアミンを含む有機分子の大きくて重要なサブグループであり、これらの中には、血圧の恒常性維持に関わるものや、或いはその制御不全の結果変動するものも少なくない。

そのため当研究室の先行研究では、PAH マウスと野生型正常妊娠マウスを比較し、量が変動している生体低分子の探索が行われた。その際、アミンを特異的に抽出し、6-アミノキノリン-*N*-サクシンイミジルカルバミン酸を用いてアミノ基を蛍光誘導体化・高感度に検出する方法が確立された (16)。この技術と MALDI-QIT-TOF/MS の技術を組み合わせることにより、PAH マウスに対して ARB のみならず血管拡張剤である Hdz 投与時に母獣血中で低下する物質として、エタノールアミンが同定された (3)。

しばしば治療薬開発において、その主作用及び副作用発現の観点から、薬物自体の動態や代謝は盛んに研究される一方で、薬物投与によって引き起こされる内因性物質の合成や代謝といった生化学的な変化に着目した研究は少ない。ARB や Hdz により血圧降下と共に変動するエタノールアミンを同定した先行研究は、疾患における生体の薬剤応答性と薬剤そのものの作用点を解明する可能性を示した。

本研究では、血管弛緩剤として **HDP** の第一選択薬として広く用いられている **Hdz** の作用点を明らかにすることを目的とし（図 3）、**PAH** マウスを用いて **Hdz** 投与時特異的に血圧の正常化と連動して量的変化を示す物質の探索を行った。

材料と方法

試薬

ヒスタミン及びメチルヒスタミンの二塩酸塩と(R)(-)- α -メチルヒスタミン二塩酸塩、トラニルシプロミンの塩酸塩、ラサギリンのメシル酸塩、ブラジキニンフラグメント 1-7 はシグマアルドリッチ社 (St. Louis, MO, USA) から購入した。MALDI-MS 純度の 2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHBA) マトリクスは島津ジーエルシー社 (Kyoto, Japan) から購入した。ヒドララジン塩酸塩は和光純薬工業社 (Osaka, Japan) より購入した。1-イミダゾール酢酸塩酸塩は東京化成工業社 (Tokyo, Japan)、メチルイミダゾール酢酸塩酸塩はサンタクルズ社 (CA, USA) より購入した。AccQ-Tag Ultra-Fluor™ 誘導体化試薬キットは Waters 社 (Milford, MA, USA) から購入した。安定同位体ラベルヒスタミン (histamine- $\alpha,\alpha,\beta,\beta$ - d_4 (d_4 -ヒスタミン)) の塩酸塩は CDN アイソトープ社 (Quebec, Canada) から購入した。オルメサルタンは第一三共社 (Tokyo, Japan) より供与いただいた。溶媒及び全ての試薬は HPLC グレードのものを用了。

動物実験

妊娠高血圧モデルマウス（Pregnancy associated hypertensive: PAH マウス）は、当研究室で繁殖維持しているヒトレニン遺伝子導入マウスのオスと、ヒトアンジオテンシノーゲン遺伝子導入マウスのメスを交配して実験に用いた（1）。マウスの飼育と交配方法は先行報告に準じ、温度 22℃湿度 40-60%にて、12 時間ごとの明暗周期が管理された環境で、自由摂食自由飲水条件下で飼育を行った（2）。妊娠マウスは、2.5~5 ヶ月齢の初産に条件をそろえた。夕方 16-19 時の間に、1 匹飼いのオスマウスのケージにメスマウスを入れ、翌日の 8-11 時にプラグの確認を行い、プラグのついた日を妊娠 1 日目とした。胎仔数が 5 匹以上の妊娠マウスを実験個体として用いた。動物実験は、国立大学法人筑波大学動物実験取扱規程に基づき、動物実験委員会の承認を得て実施した。

薬剤投与方法

オルメサルタンは、妊娠期間を通して正常血圧範囲（90～120 mmHg）に制御するために、15 mg/Lの濃度にて妊娠13日目から19日目まで飲水経口投与した。ヒドララジンは妊娠13-15日目までは62.5 mg/L、

妊娠15-17日目は250 mg/L、妊娠17日目から出産までは375 mg/Lの濃度で飲水中に溶解し、自由飲水により投与した。

血漿サンプルの調製

妊娠19日目のマウスをイソフルラン麻酔下にて下大静脈から全血を採取した。血液抗凝固剤には、0.5 M EDTAもしくはヘパリンを用いた。次に、得られた血液を遠心分離（4 °C、1,500 g、10分間）に供し、上清の血漿を回収した。血漿は直ちに液体窒素で凍結し、測定までの間-80°Cで保存した。

血漿からのアミンの抽出

UPLC分析に供するために、先行報告（3）と同様の手法にて、100 μ lの血漿からアミンを抽出した。内部標準物質として0.6 nmolの α -メチルヒスタミンを血漿に加えた後、500 μ lの 0.4N HClO₄を加え、ボルテックスにて攪拌して15分間氷上で静置した。次に、遠心分離（4 °C、13,000 g、30分間）によりタンパク質を沈殿させ、560 μ lの上清を回収した。上清は560 μ lの5N NaOHにてアルカリ化し、塩飽和した1-ブタノールを1 mLを添加した。室温、13,000 g、10分間の遠心分離を行い、有機層を回収した。500 μ lの0.1 N NaOHを加え、

攪拌の後、遠心分離（室温、13,000 *g*、10分間）を行い、再び有機層を回収した。400 μ lの0.1N HClと700 μ lの*n*-へプタンを加え、5分間振盪の後、室温、13,000 *g*、10分間の遠心分離を行い、水層にアミンを抽出した。回収したアミンは遠心エバポレーターにて乾固し、後述のAQC誘導体化反応を行った。

LC-MS/MS分析に供するにあたっては、メタノールクロロホルム抽出法を行った。内部標準物質としては1 nmolの*d4*-ヒスタミンを100 μ lの血漿に加えた。400 μ lのメタノールと100 μ lのクロロホルムを血漿サンプルに加え、ボルテックスにて攪拌し、総量が900 μ lとなるようにMilli-Q水を添加した。4 $^{\circ}$ C、13,000 *g*、10分間の遠心分離を行った後、上清の水層を回収して後述のLC-MS/MS分析に供した。

AQC誘導体化反応

UPLC用のアミン抽出を行った血症サンプルは10 μ l のMilliQ水と、10 μ L のAccQ-Tag Ultra ホウ酸バッファーを加え、予めアセトニトリルに溶解させた10 μ L のAccQ-Fluor 試薬を加えた後、速やかに10秒間攪拌し、遮光して1分間静置することで誘導体化反応を行った。AccQ-Fluor試薬は、アミノ酸分析用に開発された誘導体化試薬

で、6-aminoquinolyl carbamile (AQC) 基が第1級または第2級のアミノ基と反応し、安定な蛍光性の誘導体を生成する。誘導体化の後、混合液は遠心エバポレーターにて乾固し、30 μ lの0.1% TFAにて溶解して分析用バイアルへ移し、後述のUPLC分析に供した。

UPLC分析条件

装置は Acquity™ UPLC system (Waters) を用いた。AQC 化したサンプルは COSMOSIL 2.5 μ NAP 分析カラム (nacalai tesque, Kyoto, Japan) にて分離した。カラム温度は40°C、流速は0.25 ml/min、また、移動相 A には 0.1% TFA、移動相 B には TFA を 0.1%含むメタノールを用いた。溶出条件は、移動相 B の割合が 0% (0 - 10 min)、0% から 30% (10 - 40 min)、30% から 100% (40 -40.5 min)、100% (40.5- 50.5 min), 100% から 0% (50.5 - 51 min), 0% (51 -66 min) となるようグラジエント溶出を行った。測定は ACQUITY UPLC 蛍光検出器 (Waters) により行い、励起波長 250nm、蛍光波長 475 nm で検出した。目的ピークは、後述の質量分析解析に供した。

MALDI-QIT-TOF/MS

MS¹ と MS² スペクトルは Axima Resonance 質量分析計 (Shimadzu-Biotech, Kyoto, Japan) を用い、窒素レーザー (337 nm) にて測定した (2)。データの取得と変換は Launchpad software (Shimadzu Biotech) にて行った。1% (w/v) のDHBAマトリクス溶液は0.06%濃度のTFAを含む40%アセトニトリルに溶解して用いた。単離して乾固したアミンはMilli-Q水にて溶解した後、0.5 μ lを0.5 μ lのマトリクス溶液と共にMALDI-プレート (Kratos analytical, Manchester, UK) に滴下し、サンプルマトリクス共結晶を形成させるために室温にて乾固した。MS¹とMS²の両方のモードで、イオンは2つの電極間で電荷を印加されることで引き出され、加速電圧10kVでTOFチューブ内に放出された。コリジョンガスにはアルゴンを用いた。マススペクトルは90任意単位強度のレーザーを200回照射した合計値から得た。CIDの制御値は200とした。外部キャリブレーションはブラジキニンフラグメント1-7 (monoisotopic mass of [(M+H)⁺ = 757.4]) と DHBAマトリクス (monoisotopic mass of [(M+H)⁺ = 155.03]) を標準試薬として用いた。

in vitro MAO-B 反応

12.5 μ l の 10 mM 濃度の HEPES バッファー (pH 7.5) に終濃度の 4 倍濃度の阻害剤を溶解し、5 μ g の MAO-B を含む 25 μ l バッファー溶液を加え、37°C にて 2.5 分間のプレインキュベーションを行った。次に、12.5 μ l の 800 μ M tMH を基質として 37°C にて 12 時間酵素反応を行った。反応後、2 nmol の IAA を内部標準物質として添加した後、終濃度 95% となるようにアセトニトリルを加え、氷上にて 10 分間静置して除タンパク操作を行った。サンプルは 4 °C、13,000 g、10 分間の遠心分離を行った後、上清の水層を回収して後述の LC-MS/MS 分析に供した。

LC-MS/MS 分析

LC-MS/MS 分析は、トリプル四重極型質量分析計 LCMS-8050-Nexera X2 超高速液体クロマトグラフィーシステム（島津製作所）を用いた。解析はポジティブ・エレクトロスプレーイオン化-多重反応モニタリング (multiple-reaction monitoring: MRM) モードで行った。カラムには SeQuant ZIC-HILIC カラム（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 3.5 μ m）を使用し、サンプルに由来するカラムへの

汚染を防ぐ目的で、ZIC-HILIC guard-fitting カラム(内径 1.0 mm、長さ 14 mm, Millipore 社) をカラムのインレット前部に接続した。移動相 A として 0.1%ギ酸を、また移動相 B として 0.1%を含むアセトニトリル混合溶媒をそれぞれ使用した。流速は 0.2 ml/min、カラムオーブンは 50℃の条件で分析を行った。分離のグラジエント条件は以下のように行った：0～1.0 分 (%B = 95) →1.0～10.0 分 (%B = 95→5) →10.0～18.0 分 (B% = 5) →18.0～18.1 分 (%B = 5→95) →18.1～25.0 分 (%B = 95)。

MS/MS 部の最適化は以下のように行った。ヒーティングブロック温度：400℃、脱溶媒管 (DL) 温度：250℃、イオン化部温度：300℃、イオン化電圧：4.0 kV, 60 V、ヒーティングガス (空気) 流量：10 l/min、ネブライザーガス (窒素) 流量：3 l/min、ドライイングガス (窒素) 流量：10 l/min、衝突誘起開裂 (collision-induced dissociation：CID)

(アルゴン) ガス圧力：230 kPa。定量のための各物質の測定イオン (プリカーサーイオン→プロダクトイオン) には以下を用いた：*t*MH (126.20 > 109.10)、*tele*-メチルイミダゾール酢酸 (*tele*-methylimidazoleacetic acid：*t*-MIAA, 141.15 > 95.10)、イミダゾール酢酸 (imidazoleacetic acid：IAA, 124.90 > 80.90 (-))、*d4*ヒスタ

ミン (116.20 > 99.10)。各測定イオンの設定は、それぞれのプリカーサーイオンスキャンおよびプロダクトイオンスキャンにより行った。全ての分析及びデータプロセッシングには、LabSolutions ver. 5.60 ソフトウェア（島津製作所）を用いた。

検量線

検量線作成用標準溶液として、分析直前にストック溶液からそれぞれ *t*MH 及び *t*MIAA を、5.0, 7.5, 10.0, 25.0 pmol/インジェクション及び 0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 pmol/インジェクションとなるように蒸留水で希釈することにより調製した。*t*MH の検量線作成にあたり、血漿サンプルは内部標準として 1 nmol の *d4*-ヒスタミンをスパイクし、上記の方法で LC-MS/MS 分析を行った。*t*MIAA の検量線作成においては、MAO-B 反応産物に対し内部標準として 2 nmol の IAA をスパイクし、LC-MS/MS 分析に供した。

阻害曲線

それぞれの阻害剤実験における *t*MIAA の 50% 阻害用量 (50% inhibitory concentration : IC₅₀) は非線形回帰法により求め、用量阻

害曲線はコンピュータ解析プログラムである GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) を用いて算出した。

統計処理

統計学的検定は、GraphPad Prism 4 を用いて算出した。群間比較において Student's *t* 検定並びに Welch's 補正を行った。統計的な有意差は、 $p < 0.05$ とした。

結果

Hdz 特異的に増加する物質の探索と同定

妊娠 19 日目の PAH マウス母獣血漿の液体クロマトグラフィー (UPLC) 分析の結果を図 4 から図 6 に示した。青い矢印はヒスタミン (後述)、アスタリスクは AQC 誘導体化により非特異的に検出されるピーク、黒矢印は内部標準物質のピーク、赤い矢印は Hdz 投与時に増加したピークをそれぞれ表している。クロマトグラムの比較の結果、ARB では変化せず、Hdz 投与時に特異的に血中で増加する物質を検出した。このピークの面積を比較したところ、非投与のマウスに比較して 1.5-2 倍増加していた。この物質を単離し、MALDI-QIT-TOF/MS で分子量を求めたところ、 m/z 297.36 (MS^1) であり、さらに CID の結果 AQC が脱離した m/z 126.20 が生成した (MS^2) ことから、この物質がアミノ基を有し、分子量が 125 であることが判明した (図 7)。そこでデータベース (Human Metabolome Database) を用いてアミノ基をもっている物質を検索した結果、本物質がヒスタミンの代謝物質である *tele*-メチルヒスタミン (*t*MH) が候補アミンとしてヒットした。そこで、市販の *t*MH と Hdz 投与

PAH マウスの血漿をそれぞれ AQC ラベル化し、それぞれクロマトグラフしたところ、完全にピークの溶出位置が一致した。さらにこの標準 tMH について MALDI-QIT-TOF/MS 分析を行ったところ、MS¹ 並びに CID で得られた MS² の解裂パターンが、Hdz 投与 PAH マウス血漿から得られた AQC-アミンと一致した (図 8)。これらの結果より、本物質が tMH であると結論づけた。

tMH の定量解析

LC-MS/MS による定量分析をおこなうために、市販の tMH を用いて tMH の mol (横軸) に対して得られたピーク面積値 (縦軸) から最小 2 乗法により一次回帰直線を作成したところ、5~25pmol の間で直線性を示した (図 9A)。得られたクロマトグラムから相対定量を行ったところ、非投与群に比べ、Hdz 投与群では 2.29 倍増加していることが判明した (図 10)。

tMH はヒスタミンの代謝経路のうち、ヒスタミン N メチル基転移酵素 (HNMT) によりイミダゾール環 *tau* 位の窒素原子がメチル化を受けることで生成し (17)、モノアミン酸化酵素-B (MAO-B) により α アミノ基が酸化的脱アミノ化されて代謝される (18) (図 11)。

Hdz の投与により、ヒスタミンのメチル化が亢進した結果 *t*MH が蓄積したと仮定すると、基質であるヒスタミンの消費が予想されるはずである。しかし、今回ヒスタミンピークの明らかな減少は認められなかった（図 4-6）ことから、*t*MH の増加はヒスタミンのメチル化の亢進ではないと推論した。

in vitro における MAO-B 反応に対する Hdz の阻害効果

そこで、PAH マウスへの Hdz 投与が、*t*MH の MAO-B による酸化脱アミノ化反応が抑制されているのではないかと仮説を立て、MAO-B 反応における *t*MH の脱アミノ化産物である *tele*-メチルイミダゾール酢酸 (*t*-MIAA) の産生を *in vitro* で測定し、*t*MH 分解に対する Hdz の効果を検討した。この目的のために、LC-MS/MS を用いた *t*-MIAA の定量系を確立した。標準 *t*-MIAA を用いて *t*-MIAA の mol（横軸）に対して得られたピーク面積値（縦軸）から最小 2 乗法により一次回帰直線を作成したところ、0～0.1 pmol の間で直線性を示した（図 9B）。

次に、*in vitro* における MAO-B 反応を検出するために、バッファ一濃度と反応時間、酵素量の条件検討を行った。HEPES バッファ一

(pH 7.5) の濃度を 10 mM、50 mM、100 mM の三点を検討したところ、10 mM にて最も *t*-MIAA の産生が認められた (図 12)。酵素反応の時間は 3 時間と 6 時間、12 時間の三点で比較したところ、12 時間にて *t*-MIAA の高い生成が認められた (図 13)。一反応あたりの酵素量は 5 μ g で、阻害剤の効果を検証するために十分な *t*-MIAA が検出された (図 14)。最適化した反応条件は図 15 にまとめた。次に、*in vitro* で *t*MH を基質とするヒト組換え MAO-B の酵素反応系に、Hdz、MAO-B の特異的阻害剤であるラサギリ (19) 及び MAO-A 及び B に対する阻害剤として知られるトラニルシプロミン (TCP) (20) を添加し阻害実験を行い、*t*-MIAA 生成量を定量した。その結果、他の MAO 阻害剤同様に Hdz の濃度依存的に *t*-MIAA の生成が阻害され、それぞれの IC₅₀ は、0.16 μ M、1.72 μ M そして 54.62 μ M であった (図 16)。

考察

これまでに Hdz が、MAO の反応を *in vitro* で阻害することは報告されていた (21)。この研究では分光学的に活性検出が迅速かつ簡便なアミンであるキヌラミン (22) やベンジルアミン (23) が基質として用いられていた。この方法は *t*MH を含む他のアミンに適応できないため、Hough と Domino は、*t*MH の場合は、放射性ラベル *t*MH を用いて、生成した *t*MIAA をクロマトグラフィーで分画しその放射活性を測定する方法を報告した (18)。しかし、これまで *t*MH を基質とした MAO-B の反応での Hdz の阻害活性については調べられていなかった。従って今回の結果は、*t*MH を基質とした MAO-B の反応での Hdz の阻害活性を *in vitro* で証明した初めての報告である。

質量分析の結果では、目的物質の S/N 比が低めではあるものの (図 7、8)、ブランクフラクションのみの MS スペクトルと比較し、サンプル特異的なピークに着目した解析を行っているため、確実性のあるデータであると思われる。更に、CID により AQC のカルボニル基とアミンの C-N 結合が最も開裂しやすい為、目的のアミンが検出さ

れたと考えられる。 m/z 126.20 以外のピークとしては、 m/z 145.09 は、AQC 基からカルボニル基が除かれたイオン、 m/z 152.07 は t MH にカルボニル基が付加されたイオンであるとアサインされる (図 7、8)。

t MH は炎症やアレルギーに関与するヒスタミンの代謝産物である。ヒスタミンはヒスチジン脱炭酸酵素によりヒスチジンから合成され、HNMT により t MH に変換され、MAO-B によって最終的に t MIAA へと代謝される経路と、ジアミン酸化酵素 (DAO) によりイミダゾール酢酸へと代謝される経路が存在する (図 11)。Hdz 投与による t MH の増加は、HNMT の活性亢進と MAO-B 活性抑制のいずれかに起因するのではないかと予想された。HNMT の活性が上昇したことで t MH が増加したとすると、同時にヒスタミン量の減少が起きると考えられた。図 4 と図 6 を比較すると、Hdz 投与により t MH は増えた一方で、ヒスタミンは変化しないことが明らかとなった (青矢印のピーク)。そのため、Hdz により MAO-B の活性が阻害されたのではないかと仮定した。

UPLC 分析と LC-MS/MS 分析では、前処理や誘導体化の過程でアミンを選択的に測定する系を用いたため、本研究では t MIAA 及び

イミダゾール酢酸の解析は行っていない。これらのヒスタミン関連代謝物についても測定を行うと、より正確に Hdz 投与による *t*MH 増加現象を捉えることができると考えられる。また、*t*MH は尿中に排泄されることが知られている (24)。そのため、尿中 *t*MH 量に関しても、Hdz 投与により変化するのかどうか検討する余地がある。

*t*MH 量もしくは *t*MIAA 量の定量により、*in vitro* における MAO-B 活性の測定が可能と考えられた (図 11)。最適化を行う過程 (図 12-14) で、*t*MH の代謝量よりも *t*MIAA の産生量の方が阻害剤の効果を比較しやすかったことから、本研究では *t*MIAA 量を測定し、MAO-B 反応条件の検討を行った。図 15 の反応条件にて *t*MIAA が充分量産生されたことから、阻害剤の濃度を多点とり、阻害曲線をフィッティングした (図 16)。ラサギリンと TCP の IC₅₀ はそれぞれ 0.16 と 1.72 μ M であり、これらの濃度は先行報告の IC₅₀ と同程度であり (19、20)、*in vitro* MAO-B 反応の測定系は有効であると考えられる。

ヒトに Hdz を投与した際の最高血漿中濃度は、経口投与で 0.4～1.3 μ g/mL、静脈内注射で 0.16～0.61 μ g/mL とされており (Hdz 添付文書)、Hdz の分子量 160.176 から、0.99～8.12 μ M に相当する。

Hdz の IC₅₀ は 54.62 μ M であったことから (図 16)、*in vivo* においても *t*MH を基質とした MAO-B 反応に対して、Hdz は阻害作用を示すと予想される。

MAO-B の発現が高い組織としては、神経系の他に血小板やリンパ球などが挙げられる (25)。また、細胞内のミトコンドリア外膜に局在することが知られている (26)。Hdz は血液脳関門を通過することから (Hdz 添付文書)、細胞膜透過性は高いと考えられるため、おそらく Hdз による *t*MH を基質とした MAO-B 反応の阻害は、血小板中にて起きていると推測される。

Hdz の降圧作用もしくは投薬により生じる副作用が、FAD 依存性酵素を介するものなのか否かは、さらなる検討の余地がある。例えば、Hdz の投与により MAO-B の基質であるドーパミンが増加することで、神経抑制型のドーパミン受容体 D2 の作用が増強され、血圧降下が生じる可能性が考えられる。また、ドーパミンなどの神経伝達物質が過剰になることが悪心などの副作用に関係していると予想される。

本章では Hdз 投与 PAH マウスの血中で *t*MH が上昇することを検出した。この PAH マウス体内での *t*MH レベルの増加は、Hdz が MAO-B の活性を *in vivo* で阻害し *t*MH の代謝を抑制した結果、母

体血中に α MH が蓄積したことによる可能性が示唆された。Hdz は前述のように、血管拡張作用を示すことから、臨床的にも経口投与できる降圧剤として HDP 治療の第一選択薬として使用されているが(1)、その一方で頭痛や吐き気、動悸・頻脈等の副作用があることも報告されている (2)。しかしながら、Hdz の薬効と副作用の関係についての知見の蓄積は不十分である。モデル動物を用いて Hdz を投与した際の体内物質の代謝変化を観測し、*in vitro* でその生化学的分析を行った今回の研究結果は、Hdz の副作用の発現メカニズムに関する基礎的な知見を与えるものであると考えられる。

第三章 リジン特異的脱メチル化酵素 1 に対するヒドララジンの阻害作用

要旨

ヒドララジン (Hdz) は血管平滑筋に作用し血管を弛緩させる降圧剤である。近年、血管新生の促進やがんの増殖抑制との関連が報告され、多様な作用が存在することが示唆されている。第二章の研究で、Hdz が FAD 依存性のモノアミンオキシダーゼ (MAO) -B に対して阻害作用を示すことを明らかにしてきた。一方、タンパク質リジン特異的脱メチル化酵素 LSD1 も MAO-B と同じく FAD 要求性酵素である。更に、LSD1 は既知の MAO-A/B 阻害剤である TCP により阻害される。

LSD1 はヒストンの酸化的脱メチル化反応を触媒し、転写調節に関与することが知られている。リジン残基のメチル化はモノメチル化、ジメチル化、トリメチル化が知られており、ヒストンや様々なタンパク質はメチル化されることによって活性が制御され、特にヒストンに関してはクロマチン構造の調節によって転写が制御される。

従来リジン残基のメチル化は不可逆的なものと考えられていたが、2004 年の研究により、脱メチル化反応を担う酵素として初めて LSD1 が同定された。LSD1 の代表的な基質はヒストン H3 や H4 のメチル化リジンである。

本章では、既知の MAO-A/B 阻害剤である TCP が、同じく FAD 依存性酵素である LSD1 を阻害し、第二章の結果から、Hdz が MAO-B を阻害することが分かっていたため、Hdz も LSD1 の活性を阻害しているのではないかと考え、解析を始めた。そこで、合成ヒストンペプチドを基質とする *in vitro* 脱メチル化活性の測定系を用いてこの仮説を検証した結果、Hdz 存在下で LSD1 の活性が低下した。このことから、Hdz が LSD1 による内在性タンパク質の脱メチル化活性も同様に阻害する可能性が示唆された。

背景

近年、ヒドララジン (Hdz) は血管新生の促進 (27) やがんの増殖抑制 (28、29) との関連が報告され、多様な作用が存在することが示唆されている (図 3)。第二章の研究から、Hdz は *tele*-メチルヒスタミンを基質としたモノアミンオキシダーゼ (MAO) -B 反応に対して阻害作用を示すことが明らかとなった。

薬剤が主たる作用以外に、複数の作用を持つことはよく知られている (30)。西洋医学の礎とも言えるアスピリンは、元々は抗炎症・鎮痛薬として使用されてきたが、抗血小板薬として臨床利用可能であることが報告された (31)。ミノキシジルはアドレナリン β 受容体を阻害する降圧剤として開発されたが、後の研究から男性型脱毛症の治療薬として働くことが明らかとなった (32)。また、シルデナフィルはホスホジエステラーゼ 5 を抑制する狭心症治療薬として臨床開発される過程で勃起促進効果を持つことが見出され、バイアグラとして非常に大きな売上を上げている (33)。薬害として有名なサリドマイドも複数の作用を持つ。当初サリドマイドは睡眠導入剤として利用されたが、胎児の催奇形性を引き起こすことから

販売中止になった。しかしその後、血管新生抑制作用を示すことが明らかにされた (34)。この作用は、胎児に対しては手足の毛細血管の成長を妨げ、奇形を発生させる原因となるが、がんの血管新生をも抑制することから、現在は多発性骨髄腫の治療薬として用いられている (35)。サリドマイドは他に、ハンセン病に対して劇的な改善効果を持つことも知られている (36)。

MAO-B は補酵素として FAD を要求する酸化還元酵素である。FAD 依存性酵素には他に、ポリアミンオキシダーゼや L-アミノ酸オキシダーゼ (37)、グリセロール 3-リン酸デヒドロゲナーゼ、サルコシンオキシダーゼ、D-アミノ酸オキシダーゼなどが知られている (表 1)。そこで、Hdz も MAO-B 以外の FAD 依存性酵素に対して作用点を持つことが予想された (図 17)。

興味深いことに、既知の MAO-A/B 阻害剤であるトラニルシプロミン (TCP) は、タンパク質リジン特異的脱メチル化酵素、LSD1 の活性を阻害することが報告されている (5)。MAO 阻害薬は抗うつ剤として古くから臨床利用されてきたため (38)、既存の薬剤を LSD1 阻害薬として開発できる可能性があり、研究は大きく進んでいる。

LSD1 はヒストンの酸化的脱メチル化反応を触媒する翻訳後修飾

により、転写調節に関与する (38)。翻訳後修飾はタンパク質構造の増強や触媒作用の活性化など、機能の調節に関わっており、メチル化やリン酸化、アセチル化、グリコシル化、ユビキチン化、SUMO 化、ADP-リボシル化、ニトロシル化、カルボキシル化、およびスルホン化などが知られている (39)。このような修飾は、安定性や溶解性、タンパク質分解に対する耐性などを制御し、細胞増殖や分化など様々な生体内現象に関わっている (39)。1964 年に初めて RNA 合成制御にヒストンのアセチル化とメチル化が関与することが報告されて以来 (40)、タンパク質やヒストンのメチル化は細胞内制御機構に広く関わることが明らかになってきた (39)。タンパク質リジンのメチル化はモノメチル化、ジメチル化、トリメチル化が知られており (図 18)、SET ドメインを含む酵素群や DOT1/DOT1L などの SAM 依存性リジンメチル基転移酵素により触媒される (41、42)。リジン残基のメチル化状態は、転写活性化や抑制化、クロマチンリモデリング、シグナル伝達、などにおいて重要な役割を果たす (42)。従来リジン残基のメチル化は不可逆的なものと考えられていたが、2004 年の研究により、脱メチル化反応を担う酵素として初めて LSD1 が同定された (4)。LSD1 の主な基質はヒストン H3 や H4 のメチル化リ

ジンであり、ヒストン以外には p53 (K370) や DNMT1 (K1096)、E2F1 (K185)、MYPT1 (K442)、STAT3 (K140)、HIV Tat (K51) HSP90 (K615)、MTA1 (K532) などが報告されている (43-52)。LSD1 はこれらの基質と SWIRM ドメインや Tower ドメインを介して相互作用し、がんや様々な疾患に関与する (53) (図 19)。

そこで私は、既知の MAO-A/B 阻害剤である TCP が、同じく FAD 依存性酵素である LSD1 を阻害し、第二章の結果から、Hdz が MAO-B を阻害することが分かっていたため、Hdz も LSD1 の活性を阻害するのではないかと考え、解析を始めた (図 20)。

材料と方法

試薬

ヒドララジン塩酸塩は和光純薬工業社 (Osaka, Japan) より購入した。ヒト組換え体 LSD1 及び活性評価キット (BML-AK544) は Enzo Life Sciences (Plymouth Meeting, PA, USA)より購入した (図 21)。LSD1 活性評価キットには、合成ヒストンペプチド (H3K4Me2)、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)、CELLestial®Red Peroxidase Substrate、過酸化水素水 (H₂O₂)、DMSO、TCP、反応バッファー、半分容量 96 穴マイクロプレートが含まれている。基質として用いた合成ヒストンペプチドは以下の配列であり、四番目のリジン残基にジメチル修飾が入ったものである。

NH₂-ARTKQTARKSTGGKAPRKQLA-COOH

in vitro LSD1 活性測定

TCP と Hdz は終濃度の 20 倍となるように反応バッファーに溶解した。合成ヒストンペプチドは反応バッファーにて溶解し、0.5 mM のストック溶液を作製した。LSD1 は反応バッファーで 0.1 µg/µl に

希釈した。HRP は反応バッファーにて希釈し、反応系の 50 倍濃度のストック溶液を作製した。CELLestial®Red Peroxidase Substrate は DMSO に溶解し、反応系の 100 倍濃度のストック溶液を調製した。実験を行う直前に、ストック溶液から反応系の 2 倍濃度の HRP 溶液と基質溶液を調製した。2 倍濃度の基質溶液には、合成ヒストンペプチドと CELLestial®Red Peroxidase Substrate を溶解させた。

まず、96 穴マイクロプレート上で終濃度の 20 倍濃度の阻害剤 5 μl と 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の LSD1 溶液 5 μl をピペッティングにて混合し、23°C で 30 分間のプレインキュベーションを行った。プレインキュベーション終了後、2 倍濃度の HRP 溶液を 45 μl 加え、ピペッティングにて混合した。次に、8 連ピペットを用いて 2 倍濃度の基質溶液を 45 μl 加え、ピペッティングにて混合した後、30 秒以内に蛍光波長の測定を開始した。蛍光波長は分光蛍光光度計 Wallac 1420 ARVOsx

(パーキンエルマーライフサイエンス社) を用い、530 nm の波長で励起し、590 nm の蛍光波長を測定した。1 サンプルあたりの測定時間は 0.1 秒、励起光の強度は 3000 に設定し、約 30 秒毎に 20 分間、蛍光波長を測定した。実験のコントロールは、阻害剤なしをポジティブコントロール、ペプチドなしをネガティブコントロールとした。反

応系における LSD1 と合成ヒストンペプチドの終濃度は、それぞれ 5 $\mu\text{g/ml}$ と 20 μM である。

次に、得られた蛍光強度から縦軸を蛍光強度、横軸を時間にとり、Excel（マイクロソフト社）にてグラフを作成した。グラフの近似直線をとった場合、一定の時間以上になると徐々に傾きが小さくなる。そのため、近似直線の直線性が高い範囲までの傾きを算出し、データの比較を行った。

統計処理

統計学的検定は第二章と同様に、GraphPad Prism 4 を用いて算出した。群間比較においてStudent's *t*検定並びにWelch's 補正を行った。統計的な有意差は、 $p<0.05$ とした。

結果

LSD1 活性測定の方法

LSD1 による脱メチル化反応が進行する際には H_2O_2 が副次的に生成される (図 21)。そのため、先行報告では H_2O_2 の産生量を測定し、LSD1 の脱メチル化活性を評価している (4)。そこで、本研究では HRP 存在下で H_2O_2 と反応して蛍光色素が生じる系を用いて、LSD1 に対する HdZ の脱メチル化活性を測定することとした (図 21)。

LSD1 活性の測定

合成ヒストンペプチドを基質とした LSD1 の *in vitro* 脱メチル化活性を測定し、縦軸を蛍光強度、横軸を時間にプロットして近似曲線を作成した (図 22)。このグラフから、青の時間範囲で近似直線の直線性が高く、範囲外になると直線の傾きは小さくなることが明らかとなった。*in vitro* の実験系において LSD1 の脱メチル化反応は速いことが知られていること (4) から、反応開始後 172 秒までの範囲で近似直線の傾きを求め、薬剤の阻害効果を比較した (図 23)。その結果、TCP は既報 (5) と同程度の 20 μM で LSD1 の活性が低下し、HdZ は 2 mM の濃度で活性が減少した。

考察

Hdz は TCP と同様に用量依存的に LSD1 の活性を減少させたことから、これら 2 つの薬剤は LSD1 に対して阻害活性を持つと考えられる。しかしながら、Hdz の LSD1 に対する作用濃度は TCP と比較して非常に高いことが本研究から明らかとなった。この濃度の違いの要因としては、LSD1 に対する選択性の違いが考えられる。第二章の研究において、MAO-B に対する TCP の IC_{50} は $1.72\ \mu\text{M}$ 、Hdz は $54.62\ \mu\text{M}$ であったことから（図 16）、Hdz の FAD 依存性酵素に対する結合能は TCP よりも低いことが推測される。また、Hdz は MAO 活性を可逆的に抑制すること（21）から、おそらく LSD1 に対して、共有結合は作らずに阻害作用を示したと考えられる。

Hdz の生体内挙動は、経口投与及び静脈注射された場合、肝臓にて抱合を受けてすみやかに尿中に排泄される（54-56）。ヒトに Hdz を投与した際の最高血漿中濃度は経口投与で $0.4\sim 1.3\ \mu\text{g/mL}$ 、静脈内注射で $0.16\sim 0.61\ \mu\text{g/mL}$ とされており（Hdz 添付文書）、Hdz の分子量 160.176 から、 $0.99\sim 8.12\ \mu\text{M}$ に相当する。このため、実際にヒトにおいて Hdz による LSD1 の阻害が起きているかについては

疑問が持たれる。以上のことから、*in vivo*における血管平滑筋に対する LSD1 の抑制を介した Hdz の影響は軽微なものであると予想され、LSD1 の阻害が降圧作用に結びついているとは考えにくい。

血圧と LSD1 の関連についてはノックアウトマウスの解析がされており、LSD1 のヘテロノックアウトマウスは食塩感受性高血圧になりやすいことが報告されている (57)。このことから、LSD1 の阻害が起きると血圧は上昇すると予想され、今回の結果とは一見矛盾する。しかし、酵素活性の抑制は一過的な場合と恒常的な場合では挙動が異なるため、今後の解析が必要と考えられる。

また、本章の背景で記述したように Hdz は幾つかの分子標的が報告されているが、血圧を制御する分子としてはセミカルバジド感受性アミノオキシダーゼ (SSAO) が挙げられる (58、59)。SSAO は血管接着因子 1 (VAP-1) としても知られており、細胞膜接着型と血中可溶型の 2 種が存在する (60)。どちらのフォームも一級アミンの酸化還元酵素として機能し、酸化的脱アミノ化が起きると H_2O_2 が産生される (61-63)。詳細な分子機構は明らかにされていないが、Hdz によって SSAO が阻害されると H_2O_2 の発生が抑えられ、血圧の降下に繋がると示唆されている (59)。

この様に、Hdz の降圧作用と LSD1 の関連性は希薄であるが、近年の研究における LSD1 の主な注目は、がん疾患とのつながりである (53)。がんの発生や増悪化にはエピジェネティックスの異常が関与している (64)。エピジェネティックスとは DNA の塩基配列の変化を伴わず、染色体の変化によって遺伝子発現を制御するシステムのことである (65)。DNA のメチル化やヒストンのメチル化、アセチル化などの翻訳後修飾は、エピジェネティックスの一部であることが広く知られている。これら化学的修飾を触媒する酵素の異常ががん細胞において多数見つかっている (66)。したがって、がん細胞におけるエピジェネティックスの異常な状態を正常な状態に変換することが出来れば、がん治療が可能になると考えられる。

LSD1 は前立腺がん細胞、乳がん細胞、急性骨髄性白血病細胞など様々ながん細胞の増殖に関与することが報告されている (40)。そのため、LSD1 は抗がん剤の新たな分子標的として期待されている。本研究で実験のコントロールに用いた TCP は、急性骨髄性白血病の治療薬として現在臨床試験が行われている (67、68)。

興味深いことに、TCP は人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の作製効率に関連することが知られている (69)。iPS 細胞は 2006 年に Oct4、

Sox2、Klf4、c-Myc の 4 つの遺伝子をマウス線維芽細胞に導入して作製可能なことが発表され (70)、2007 年にはヒトの皮膚細胞からも導入できることが報告された (71)。iPS 細胞作製には、遺伝子の導入にウイルスベクターを用いること、また c-Myc ががん遺伝子として機能することから安全性が問題視されてきた。そのため、より安全な作製方法についての研究が進められてきた。2011 年に、導入遺伝子は Oct4 のみで、その他を低分子化合物で代替したマウス iPS 細胞の作製法が開発された (72)。この時に用いられた 4 種の化合物のうちの 1 つが TCP である。更に 2013 年には、低分子化合物のみでマウス線維芽細胞から iPS 細胞が作成可能であることが発表された (69)。2013 年の報告では、化合物のみでの作製に TCP は必須ではないが、導入効率に大きく関わるということが明らかとなっている (69)。TCP が作用する分子としては MAO-A/B と LSD1 が考えられるため、iPS 細胞の導入時に LSD1 が関与し、エピジェネティックスを制御していることが推定される。

エピジェネティックスに関係して、Hdz は DNA メチル基転移酵素 (DNMT) に対して阻害作用を持つことが報告されている (29、30)。哺乳類の DNA のうち CpG アイランドは大部分がメチル化さ

れている (73)。DNMT は DNA のメチル化を制御して遺伝子発現を調節している。がんにおいては、DNMT の発現や活性が過剰になり、がん抑制遺伝子プロモーターが過度にメチル化され、がんの発生や増悪を抑えきれなくなっている (74)。そのため、DNMT を阻害することでがん抑制遺伝子を再活性化し、がんを縮小できると考えられている。DNMT 阻害薬として代表的なアザシチジンやデシタビン は、骨髄異形性症候群の治療薬として臨床試験が実施されており (75)、Hdz も DNMT に対して阻害作用を示すことから、卵巣がんや脳腫瘍をはじめとした固形腫瘍の患者に対して臨床実験が行われている (76-78)。

本章の背景では、薬剤が元々の薬理効果とは異なる作用を示す例を示した。挙げた例の多くは偶然による発見によるものであるが、近年では積極的に新規効能を探索しようとする研究が行われ、この手法はドラッグリポジショニング (DR) と呼ばれている (31、79)。DR は、薬物動態が明らかとなっている既存薬を対象とすることから、薬剤の開発コストを抑えることができると期待されており、製薬会社では専用の研究機関を設ける動きもある。従来、高血圧の治療薬として使用されてきた Hdz が、DNMT の阻害効果を期待して臨床試

験に用いられるようになり、現在ではその高い安全性に注目されるようになってきている。そのため、**DR** 初期スクリーニングの化合物ライブラリーに **Hdz** が加えられるようになってきた (80)。

本研究から、**Hdz** が **LSD1** を阻害することでエピジェネティックスの変化に関与している可能性が示唆された。上述の様に、**Hdz** は **DNMT** 阻害剤として研究が加熱している一方、**LSD1** に対しても阻害活性を示しうること、また研究が加速している **DR** の分野においても、**Hdz** の **LSD1** に対する作用を加味することは、**Hdz** のエピジェネティックス制御機構を理解する上で重要な知見をもたらすと考えられる。

第四章 結語

本研究では、*in vitro*において Hdz が *t*HM を基質とした MAO-B 反応を抑制することが明らかとなった。このことから、*in vivo*においても Hdz が MAO-B を阻害する可能性が示唆された。更にモデルペプチドを用いた実験で、Hdz が LSD1 に対しても阻害活性を示したことから、Hdz が細胞内タンパク質の脱メチル化反応を阻害する可能性が考えられる。また、今後更なる解析を進めるにあたって、カロリメーターなどを用いて MAO-B や LSD1 中の FAD に対する Hdz の結合能を厳密に評価する必要がある。

Hdz の降圧作用もしくは投薬により生じる副作用が、FAD 依存性酵素を介するものなのか否かは、さらなる検討の余地がある。例えば、Hdz の投与により MAO-B の基質であるドーパミンが増加することで、神経抑制型のドーパミン受容体 D2 の作用が増強され、血圧降下が生じる可能性が考えられる。また、ドーパミンなどの神経伝達物質が過剰になることが悪心などの副作用に関係していると予想される。他方、LSD1 のヘテロノックアウトマウスは食塩感受性高血圧になりやすいことが報告されている (51) ことから、LSD1 の阻害が起けると血圧は上昇すると予想され、今回の結果とは一見矛盾する。しか

し、酵素活性の抑制は一過的な場合と恒常的な場合では挙動が異なる。そのため、培養細胞やノックアウトマウスの解析を行うことで、Hdz の LSD1 に対する阻害効果を検証できると考えられる。

謝辞

本研究を遂行し、学位論文を執筆するにあたり、ご指導、ご支援および激励を頂きました皆様に、心より感謝いたします。

本研究について、多大なご支援、ご指導を賜りました指導教官の深水昭吉教授（筑波大学生命領域学際センター）に深く感謝いたします。

また、技術指導や議論をいただきました加香孝一郎講師（筑波大学生命環境系）、石田純治講師（筑波大学生命領域学際センター）、永島祐介博士（小野薬品工業）、狩野明彦氏（筑波大学生命環境科学研究科）に深く感謝いたします。加えて、筑波大学深水研究室および谷本研究室の皆様に感謝いたします。

最後に、筑波大学大学院博士後期課程への進学に対して理解と協力をいただきました両親へ感謝の意を表して謝辞といたします。

引用文献

1. Takagi, K., Yamasaki, M., Nakamoto, O., Saito, S., Suzuki, H., Seki, H., Takeda, S., Ohno, Y., Sugimura, M., Suzuki, Y., Watanabe, K., Matsubara, K., Makino, S., Metoki, H., and Yamamoto, T. (2015) A review of best practice guide 2015 for care and treatment of hypertension in pregnancy. *Hypertens. Res. Pregnancy* **3**, 65-103
2. Magee, L. A., Cham, C., Waterman, E. J., Ohlsson, A., and von Dadelszen, P. (2003) Hydralazine for treatment of severe hypertension in pregnancy: Meta-analysis. *BMJ* **327**, 955-960
3. Kako, K., Nakamura, A., Nagashima, Y., Ishida, J., and Fukamizu, A. (2015) Detection of ethanolamine altering in fetuses of pregnancy-associated hypertensive mice treated with vasodepressors by using UPLC and MALDI-TOF/MS. *J. Chromatogr. B* **1006**, 93-98
4. Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J. R., Cole, P. A., Casero, R. A., and Shi, Y. (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**, 941-953
5. Lee, M. G., Wynder, C., Schmidt, D. M., McCafferty, D. G., and Shiekhata, R. (2006) Histone H3 lysine 4 demethylation is a target of nonselective antidepressive medications. *Chem. Biol.* **13**, 563-567

6. Murphy, V. E., Smith, R., Giles, W. B., and Clifton, V. L. (2006) Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta, and fetus. *Endocr. Rev.* **27**, 141-169
7. Granger, J. P., Alexander, B. T., Bennett, W. A., and Khalil, R. A. (2001) Pathophysiology of pregnancy-induced hypertension. *Am. J. Hypertens.* **14**, 178S-185S
8. Steegers, E. A., von Dadelszen, P., Duvekot, J. J., and Pijnenborg, R. (2010) Pre-eclampsia. *Lancet* **376**, 631-644
9. Ishida, J., Matsuoka, T., Saito-Fujita, T., Inaba, S., Kunita, S., Sugiyama, F., Yagami, K., and Fukamizu, A. (2011) Pregnancy-associated homeostasis and dysregulation: Lessons from genetically modified animal models. *J. Biochem.* **150**, 5-14
10. Gant, N. F., Daley, G. L., Chand, S., Whalley, P. J., and MacDonald, P. C. (1973) A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy. *J. Clin. Invest.* **52**, 2682-2689
11. Ichikawa, I., and Harris, R. C. (1991) Angiotensin actions in the kidney: renewed insight into the old hormone. *Kidney Int.* **40**, 583-596
12. Takimoto, E., Ishida, J., Sugiyama, F., Horiguchi, H., Murakami, K., and Fukamizu, A. (1996) Hypertension induced in pregnant mice by placental renin and maternal angiotensinogen. *Science* **274**, 995-998
13. Sakairi, A., Ishida, J., Honjo, K., Inaba, S., Nakamura, S.,

- Sugiyama, F., Yagami, K., and Fukamizu, A. (2008) Angiotensin type 1 receptor blockade prevents cardiac remodeling in mice with pregnancy-associated hypertension. *Hypertens. Res.* **31**, 2165-2175
14. Cikot, R. J., Steegers-Theunissen, R. P., Thomas, C. M., de Boo, T. M., Merkus, H. M., and Steegers, E. A. (2001) Longitudinal vitamin and homocysteine levels in normal pregnancy. *Br. J. Nutr.* **85**, 49-58
 15. De Geest, K., Thiery, M., Piron-Possuyt, G., and Driessche, R. V. (1985) Plasma oxytocin in human pregnancy and parturition. *J. Perinat. Med.* **13**, 3-14
 16. Nagashima, Y., Kako, K., Kim, J., and Fukamizu, A. (2012) Enhanced histamine production through the induction of histidine decarboxylase expression by phorbol ester in jurkat cells. *Mol. Med. Rep.* **6**, 944-948
 17. Bowsher, R. R., Verburg, K. M., and Henry, D. P. (1983) Rat histamine *N*-methyltransferase. Quantification, tissue distribution, purification, and immunologic properties. *J. Biol. Chem.* **258**, 12215-12220
 18. Hough, L. B., and Domino, E. F. (1979) *Tele*-methylhistamine oxidation by type B monoamine oxidase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **208**, 422-428
 19. Chen, J. J., Swope, D. M., and Dashtipour, K. (2007) Comprehensive review of rasagiline, a second-generation

- monoamine oxidase inhibitor, for the treatment of parkinson's disease. *Clin. Ther.* **29**, 1825-1849
20. Atkinson, R. M., and Ditman, K. S. (1965) Tranylcypromine: a review. *Clin. Pharmacol. Ther.* **6**, 631-655
 21. Hellerman, L., and Erwin, V. G. (1968) Mitochondrial monoamine oxidase. II. Action of various inhibitors for the bovine kidney enzyme. Catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.* **243**, 5234-5243
 22. Weissbach, H., Smith, T. E., Daly, J. W., Witkop, B., and Udenfriend, S. (1960) A rapid spectrophotometric assay of monoamine oxidase based on the rate of disappearance of kynuramine. *J. Biol. Chem.* **235**, 1160-1163
 23. Turini, P., Sabatini, S., Befani, O., Chimenti, F., Casanova, C., Riccio, P. L., and Mondovì, B. (1982) Purification of bovine plasma amine oxidase. *Anal. Biochem.* **125**, 294-298
 24. Raithel, M., Hagel, A., Albrecht, H., Zopf, Y., Naegel, A., Baenkler, H., Buchwald, F., Schultis, H., Kressel, J., and Hahn, E.G. (2015) Excretion of urinary histamine and *N*-tele methylhistamine in patients with gastrointestinal food allergy compared to non-allergic controls during an unrestricted diet and a hypoallergenic diet. *BMC gastroenterol.* **15**, 41
 25. Stahl, S. M., and Felker, A. (2008) Monoamine oxidase inhibitors: a modern guide to an unrequited class of antidepressants. *CNS spectrums* **13**, 855-871

26. Edmondson, D. E., Binda, C., Wang, J., Upadhyay, A. K., and Mattevi, A. (2009) Molecular and mechanistic properties of the membrane-bound mitochondrial monoamine oxidases. *Biochemistry* **48**, 4220-4230
27. Knowles, H. J., Tian, Y. M., Mole, D. R., and Harris, A. L. (2004) Novel mechanism of action for hydralazine: Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by inhibition of prolyl hydroxylases. *Circ. Res.* **95**, 162-169
28. Deng, C., Lu, Q., Zhang, Z., Rao, T., Attwood, J., Yung, R., and Richardson, B. (2003) Hydralazine may induce autoimmunity by inhibiting extracellular signal-regulated kinase pathway signaling. *Arthritis Rheum.* **48**, 746-756
29. Segura-Pacheco, B., Perez-Cardenas, E., Taja-Chayeb, L., Chavez-Blanco, A., Revilla-Vazquez, A., Benitez-Bribiesca, L., and Duenas-González, A. (2006) Global DNA hypermethylation-associated cancer chemotherapy resistance and its reversion with the demethylating agent hydralazine. *J. Transl. Med.* **4**, 32
30. Nosengo, N. (2016) Can you teach old drugs new tricks? *Nature* **534**, 314-316
31. Wood, A. and Patrono, C. (1994) Aspirin as an antiplatelet drug. *N. Engl. J. Med.* **330**, 1287-1294
32. Wood, A. and Price, V. (1999) Treatment of Hair Loss. *N. Engl.*

- J. Med.* **341**, 964–973
33. Ashburn, T. T. and Thor, K. B. (2004) Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 673–683
34. D’Amato, R. J., Loughnan, M. S., Flynn, E. and Folkman, J. (1994) Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 4082–4085
35. Singhal, S., Mehta, J., Desikan, R., Ayers, D., Roberson, P., Eddlemon, P., Munshi, N., Anaissie, E., Wilson, C., and Dhodapkar, M. (1999) Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* **341**, 1565–1571
36. Sampaio, E. P., Kaplan, G., Miranda, A., Nery, J. A., Miguel, C. P., Viana, S. M., and Sarno, E. N. (1993) The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. *J. Infect. Dis.* **168**, 408–414
37. Gaweska, H. and Fitzpatrick, P. (2011) Structures and mechanism of the monoamine oxidase family. *Biomol. Concepts* **2**, 365–377
38. Shi, Y. and Whetstine, J. R. (2007) Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases. *Mol. Cell* **25**, 1–14
39. Burg, J. M., Link, J. E., Morgan, B. S., Heller, F. J., Hargrove, A. E., and McCafferty, D. G. (2015) KDM1 class flavin - dependent protein lysine demethylases. *Peptide Science* **104**,

40. Allfrey, V. G., and Mirsky, A. E. (1964) Structural modifications of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Science* **144**, 559
41. Martin, C. and Zhang, Y. (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **6**, 838–849
42. Bannister, A. and Kouzarides, T. (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* **21**, 381–395
43. Tsai, W. -W., Nguyen, T., Shi, Y. and Barton, M. (2008) p53-targeted LSD1 functions in repression of chromatin structure and transcription *in vivo*. *Mol. Cell Biol.* **28**, 5139–5146
44. Huang, J., Sengupta, R., Espejo, A. B., Lee, M. G., Dorsey, J. A., Richter, M., Opravil, S., Shiekhattar, R., Bedford, M. T., and Jenuwein, T. (2007) p53 is regulated by the lysine demethylase LSD1. *Nature* **449**, 105-108
45. Wang, J., Hevi, S., Kurash, J. K., Lei, H., Gay, F., Bajko, J., Su, H., Sun, W., Chang, H., and Xu, G. (2009) The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat. Genet.* **41**, 125-129
46. Kontaki, H. and Talianidis, I. (2010) Lysine methylation regulates E2F1-induced cell death. *Mol. Cell* **39**, 152–160
47. Cho, H. S., Suzuki, T., Dohmae, N., Hayami, S., Unoki, M., Yoshimatsu, M., Toyokawa, G., Takawa, M., Chen, T., Kurash, J. K., Field, H. I., Ponder, B. A., Nakamura, Y., and Hamamoto,

- R. (2011) Demethylation of RB regulator MYPT1 by histone demethylase LSD1 promotes cell cycle progression in cancer cells. *Cancer Res.* **71**, 655-660
48. Yang, J., Huang, J., Dasgupta, M., Sears, N., Miyagi, M., Wang, B., Chance, M. R., Chen, X., Du, Y., Wang, Y., An, L., Wang, Q., Lu, T., Zhang, X., Wang, Z., and Stark, G. R. (2010) Reversible methylation of promoter-bound STAT3 by histone-modifying enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 21499-21504
49. Sakane, N., Kwon, H., Pagans, S., Kaehlcke, K., Mizusawa, Y., Kamada, M., Lassen, K. G., Chan, J., Greene, W. C., and Schnoelzer, M. (2011) Activation of HIV transcription by the viral Tat protein requires a demethylation step mediated by lysine-specific demethylase 1 (LSD1/KDM1). *PLoS Pathog.* **7**, e1002184
50. Abu-Farha, M., Lanouette, S., Elisma, F., Tremblay, V., Butson, J., Figeys, D., and Couture, J.F. (2011) Proteomic analyses of the SMYD family interactomes identify HSP90 as a novel target for SMYD2. *J. Mol. Cell. Biol.* **3**, 301-308
51. Nair, S., Li, D. Q. and Kumar, R. (2013) A core chromatin remodeling factor instructs global chromatin signaling through multivalent reading of nucleosome codes. *Mol. Cell* **49**, 704–718
52. Greer, E. L. and Shi, Y. (2012) Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat. Rev. Genet.* **13**,

53. Mimasu, S., Sengoku, T., Fukuzawa, S., Umehara, T., and Yokoyama, S. (2008) Crystal structure of histone demethylase LSD1 and tranylcypromine at 2.25 Å. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **366**, 15-22
54. Caldwell, J., and Sever, P. S. (1974) The biochemical pharmacology of abused drugs; III. Cannabis, opiates, and synthetic narcotics. *Clin. Pharmacol. Ther.* **16**, 989-1013
55. Zak, S. B., Bartlett, M. F., Wagner, W. E., Gilleran, T. G., and Lukas, G. (1974) Disposition of hydralazine in man and a specific method for its determination in biological fluids. *J. Pharm. Sci.* **63**, 225-229
56. O'Malley, K., Segal, J., Israili, Z., Boles, M., McNay, J., and Dayton, P. (1975) Duration of hydralazine action in hypertension. *Clin. Pharmacol. Ther.* **18**, 581-586
57. Krug, A. W., Tille, E., Sun, B., Pojoga, L., Williams, J., Chamarthi, B., Lichtman, A. H., Hopkins, P. N., Adler, G. K., and Williams, G. H. (2013) Lysine-specific demethylase-1 modifies the age effect on blood pressure sensitivity to dietary salt intake. *Age*, **35**, 1809-1820
58. Conklin, D., Langford, S., and Boor, P. (1998) Contribution of serum and cellular semicarbazide-sensitive amine oxidase to amine metabolism and cardiovascular toxicity. *Toxicol. Sci.* **46**, 386-392

59. Vidrio, H., Medina, M., Gonzalez-Romo, P., Lorenzana-Jimenez, M., Diaz-Arista, P., and Baeza, A. (2003) Semicarbazide-sensitive amine oxidase substrates potentiate hydralazine hypotension: possible role of hydrogen peroxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **307**, 497-504
60. Bono, P., Salmi, M., Smith, D.J., and Jalkanen, S. (1998) Cloning and characterization of mouse vascular adhesion protein-1 reveals a novel molecule with enzymatic activity. *J. Immunol.* **160**, 5563-5571
61. Wong, M. Y., Saad, S., Pollock, C., and Wong, M. G. (2013) Semicarbazide-sensitive amine oxidase and kidney disease. *Am. J. Physiol.-Renal Physiol.* **305**, F1637-F1644
62. Jalkanen, S., and Salmi, M. (2008) VAP-1 and CD73, endothelial cell surface enzymes in leukocyte extravasation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 18-26
63. Wong, M., Saad, S., Zhang, J., Gross, S., Jarolimek, W., Schilter, H., Chen, J. A., Gill, A. J., Pollock, C. A., and Wong, M. G. (2014) Semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) inhibition ameliorates kidney fibrosis in a unilateral ureteral obstruction murine model. *Am. J. Physiol.-Renal Physiol.* **307**, F908-F916
64. Dawson, M. A., and Kouzarides, T. (2012) Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* **150**, 12-27
65. Wolffe, A. P., and Matzke, M. A. (1999) Epigenetics: regulation

- through repression. *Science* **286**, 481-486
66. Esteller, M. (2008) Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1148-1159
 67. Mould, D. P., McGonagle, A. E., Wiseman, D. H., Williams, E. L., and Jordan, A. M. (2015) Reversible inhibitors of LSD1 as therapeutic agents in acute myeloid leukemia: clinical significance and progress to date. *Med. Res. Rev.* **35**, 586-618
 68. C Zheng, Y., Yu, B., Z Jiang, G., J Feng, X., X He, P., Y Chu, X., Zhao, W., and M Liu, H. (2016) Irreversible LSD1 inhibitors: Application of tranylecypromine and its derivatives in cancer treatment. *Curr. Top. Med. Chem.* **16**, 2179-2188
 69. Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., Zhao, T., Ye, J., Yang, W., Liu, K., Ge, J., Xu, J., Zhang, Q., Zhao, Y., and Deng, H. (2013) Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* **341**, 651-654
 70. Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676
 71. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872
 72. Li, Y., Zhang, Q., Yin, X., Yang, W., Du, Y., Hou, P., Ge, J., Liu,

- C., Zhang, W., and Zhang, X. (2011) Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules. *Cell Res.* **21**, 196-204
73. Ehrlich, M., Gama-Sosa, M. A., Huang, L. H., Midgett, R. M., Kuo, K. C., McCune, R. A., and Gehrke, C. (1982) Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res.* **10**, 2709-2721
74. Figueroa, M. E., Skrabanek, L., Li, Y., Jiemjit, A., Fandy, T. E., Paietta, E., Fernandez, H., Tallman, M. S., Grealley, J. M., Carraway, H., Licht, J. D., Gore, S. D., and Melnick, A. (2009) MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. *Blood* **114**, 3448-3458
75. Yang, X., Lay, F., Han, H., and Jones, P. A. (2010) Targeting DNA methylation for epigenetic therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* **31**, 536-546
76. Zambrano, P., Segura-Pacheco, B., Perez-Cardenas, E., Cetina, L., Revilla-Vazquez, A., Taja-Chayeb, L., Chavez-Blanco, A., Angeles, E., Cabrera, G., and Sandoval, K. (2005) A phase I study of hydralazine to demethylate and reactivate the expression of tumor suppressor genes. *BMC Cancer* **5**, 44
77. Candelaria, M., Gallardo-Rincon, D., Arce, C., Cetina, L., Aguilar-Ponce, J. L., Arrieta, O., Gonzalez-Fierro, A., Chavez-Blanco, A., de la Cruz-Hernandez, E., Camargo, M. F., Trejo-

- Becerril, C., Perez-Cardenas, E., Perez-Plasencia, C., Taja-Chayeb, L., Wegman-Ostrosky, T., Revilla-Vazquez, A., and Duenas-Gonzalez, A. (2007) A phase II study of epigenetic therapy with hydralazine and magnesium valproate to overcome chemotherapy resistance in refractory solid tumors. *Ann. Oncol.* **18**, 1529-1538
78. Chavez-Blanco, A., Perez-Plasencia, C., Perez-Cardenas, E., Carrasco-Legleu, C., Rangel-Lopez, E., Segura-Pacheco, B., Taja-Chayeb, L., Trejo-Becerril, C., Gonzalez-Fierro, A., Candelaria, M., Cabrera, G., and Duenas-Gonzalez, A. (2006) Antineoplastic effects of the DNA methylation inhibitor hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid in cancer cell lines. *Cancer Cell Int.* **6**, 2
79. Ashburn, T. T., and Thor, K. B. (2004) Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 673-683
80. Candelaria, M., Herrera, A., Labardini, J., González-Fierro, A., Trejo-Becerril, C., Taja-Chayeb, L., Pérez-Cárdenas, E., de la Cruz-Hernández, E., Arias-Bofill, D., and Vidal, S. (2011) Hydralazine and magnesium valproate as epigenetic treatment for myelodysplastic syndrome. Preliminary results of a phase-II trial. *Ann. Hematol.* **90**, 379-387

Renin-Angiotensin System: RAS

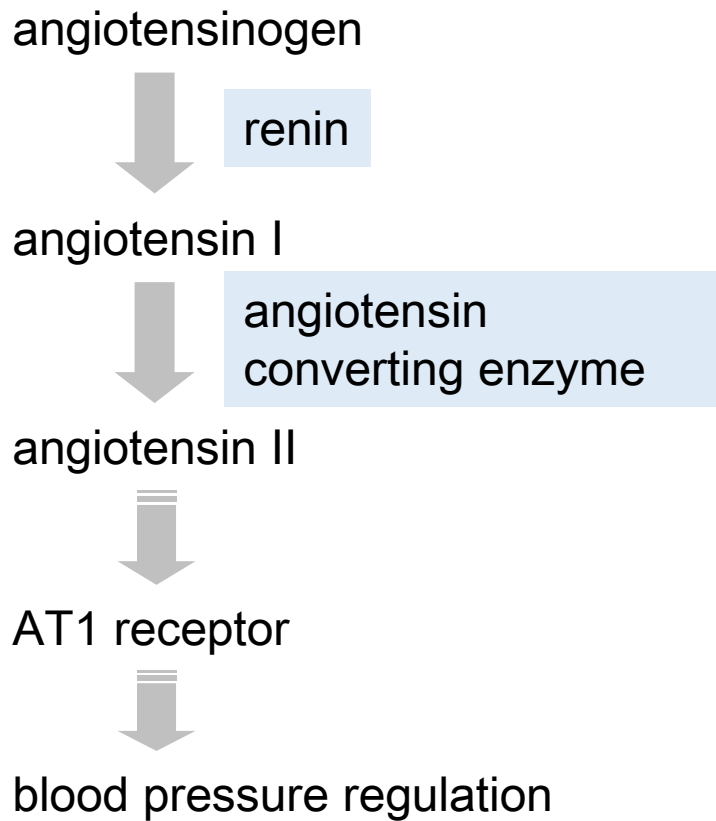


図1: レニン・アンジオテンシン系の模式図

AT1 receptor: Angiotensin II type 1 receptor

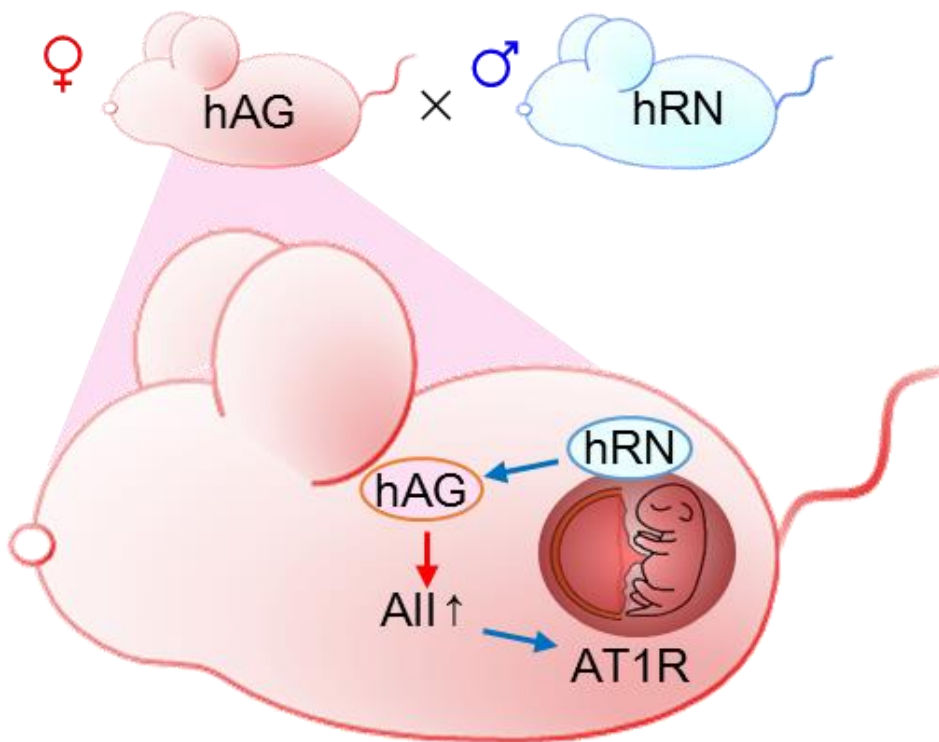


図2: 妊娠高血圧モデルマウスの模式図

hAG: human angiotensinogen

hRN: human renin

All: angiotensin II

AT1R: angiotensin II type 1 receptor

永島祐介博士の学位論文より一部抜粋して改変

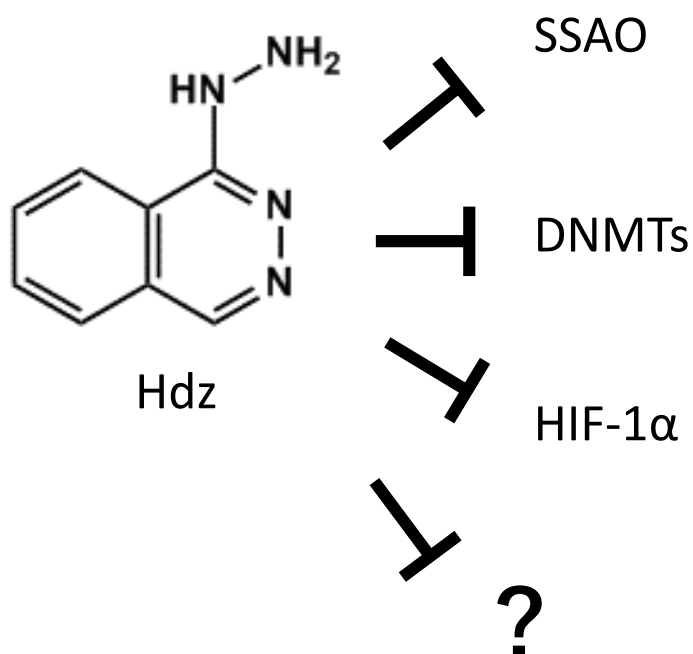


図3: 近年のヒドララジンに関する研究

Hdz: ヒドララジン

SSAO: セミカルバジド感受性アミノキシダーゼ

DNMT: DNAメチル基転移酵素

HIF: 低酸素誘導因子

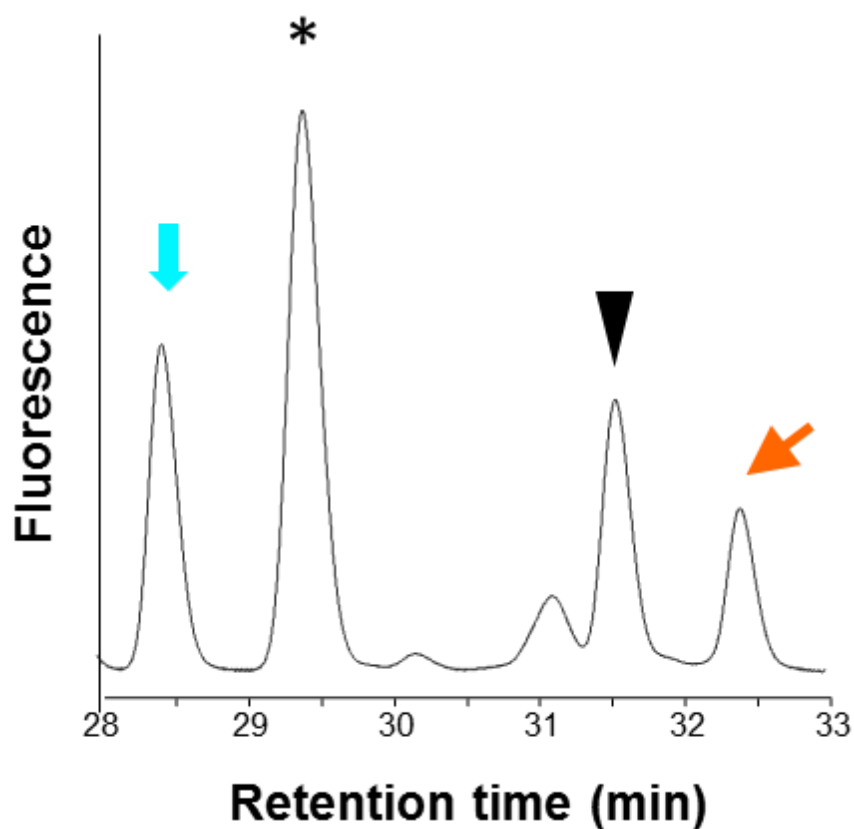


図4: 妊娠19日目における
薬剤非投与のPAHマウス母獣血漿のHPLC分析結果

青い矢印はヒスタミン、アスタリスクはAQC誘導体化により非特異的に検出されるピーク、黒矢印は内部標準物質のピーク、赤い矢印はHdz投与時に増加したピークをそれぞれ表している。

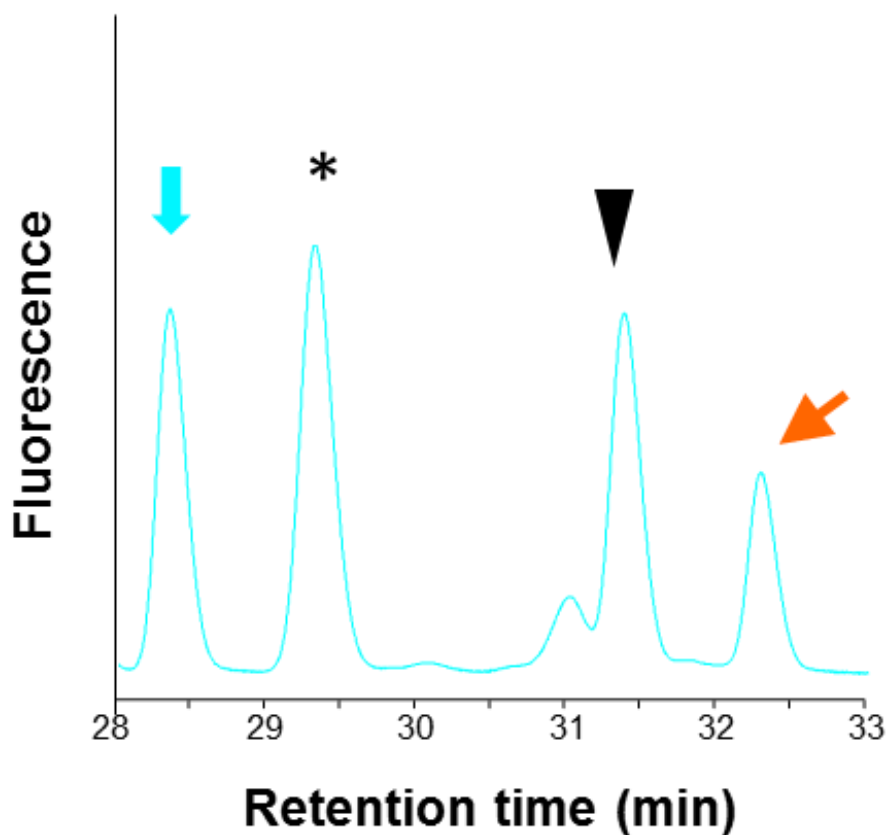


図5: 妊娠19日目における
Olm投与のPAHマウス母獣血漿のHPLC分析結果

青い矢印はヒスタミン、アスタリスクはAQC誘導体化により非特異的に検出されるピーク、黒矢印は内部標準物質のピーク、赤い矢印はHdz投与時に増加したピークをそれぞれ表している。

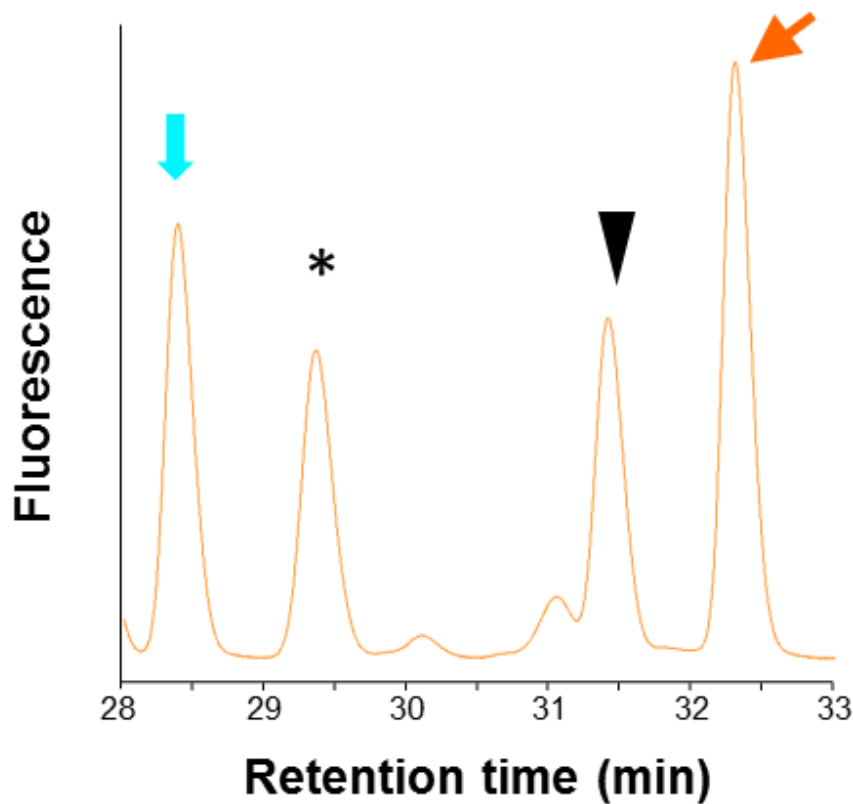


図6: 妊娠19日目における
Hdz投与のPAHマウス母獣血漿のHPLC分析結果

青い矢印はヒスタミン、アスタリスクはAQC誘導体化により非特異的に検出されるピーク、黒矢印は内部標準物質のピーク、赤い矢印はHdz投与時に増加したピークをそれぞれ表している。

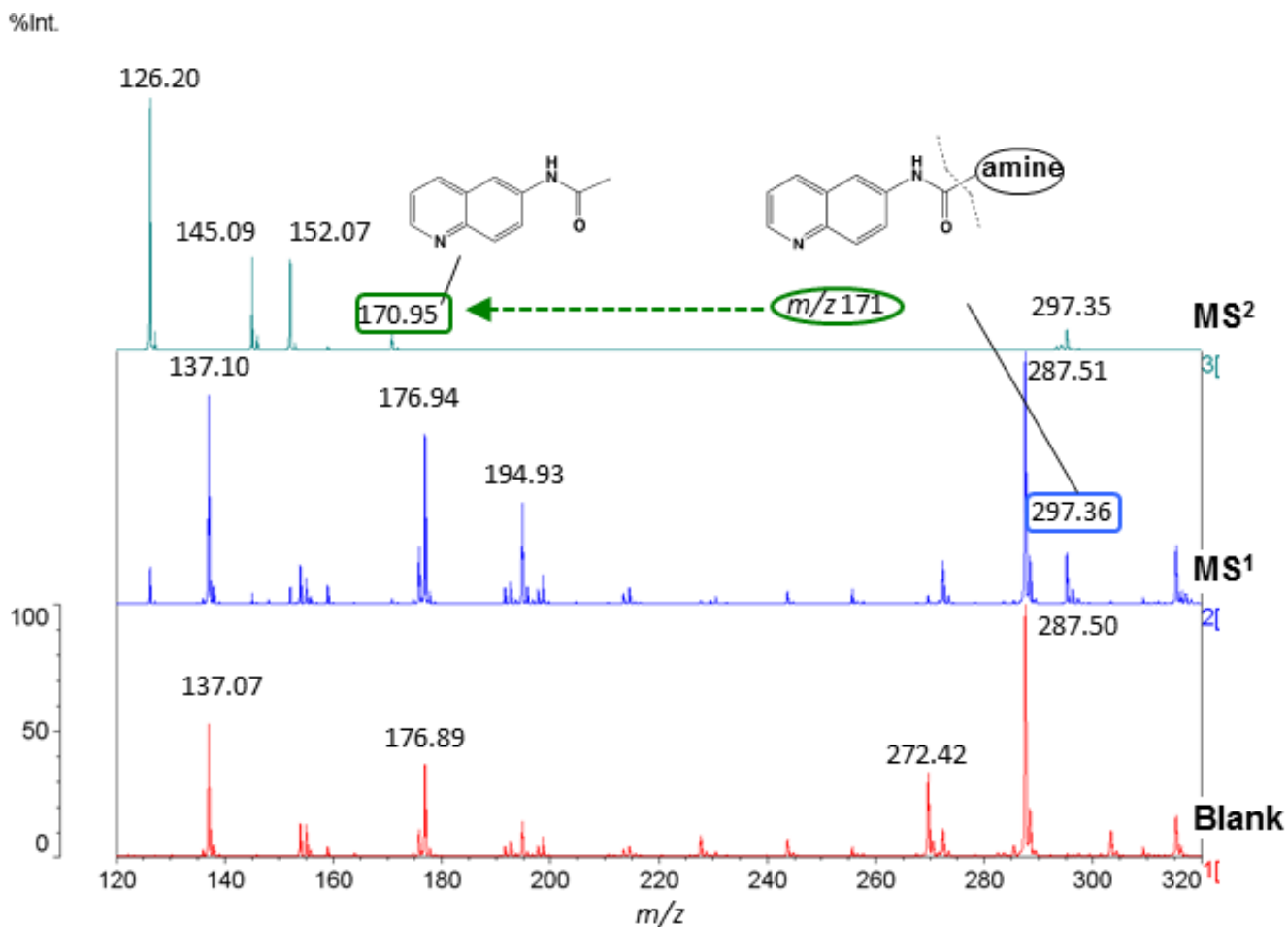


図7: Hdz投与によりPAHマウス母獣血漿中にて増加した物質の質量分析結果

マトリクスのみをMSスペクトルをBlankとして下段、単離したサンプルのMS¹スペクトルを中段に示している。中段の青いボックスで囲んだ m/z 297.36 のイオンをMS²解析した結果を上段に表している。AQC誘導体化由来と考えられるイオンは緑のボックスで囲んだ。

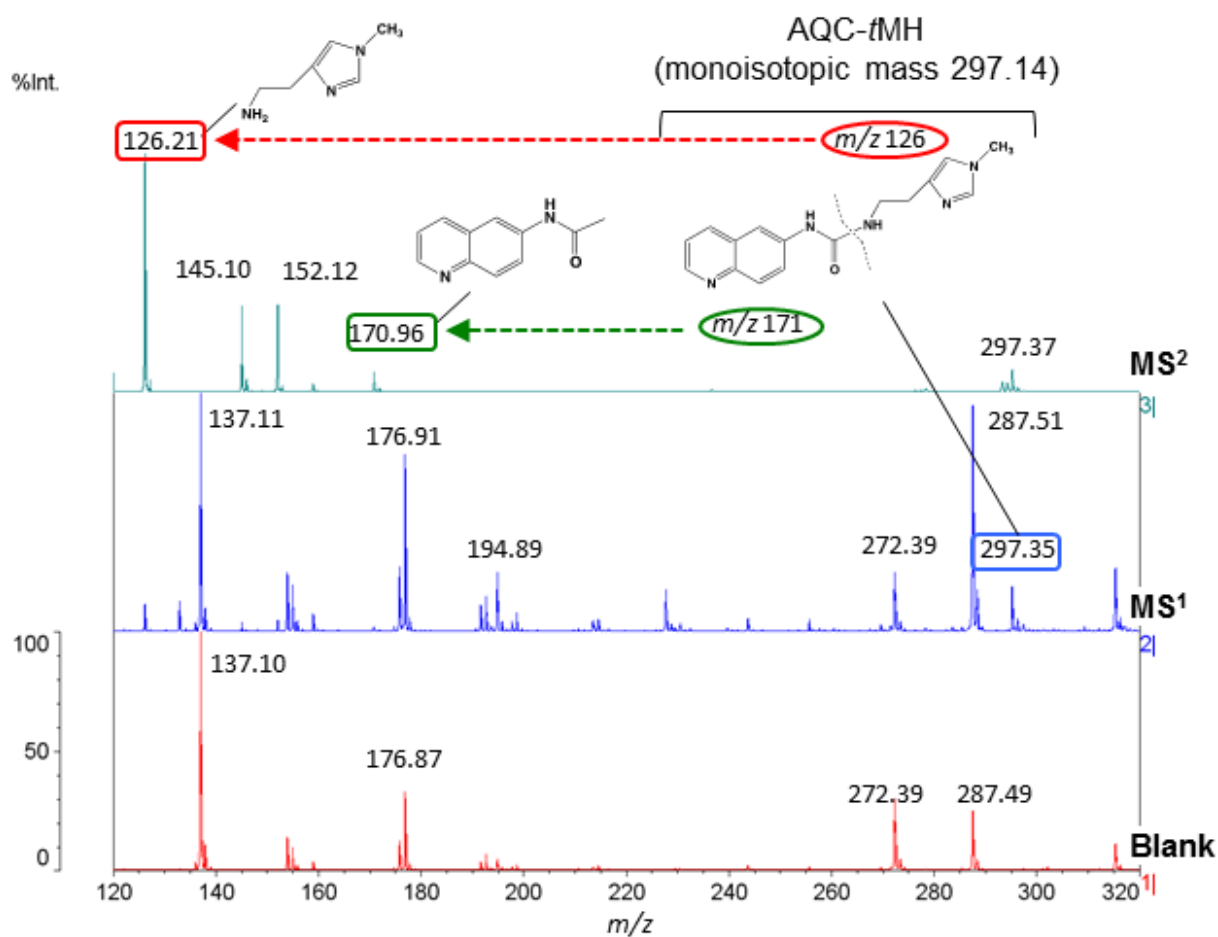
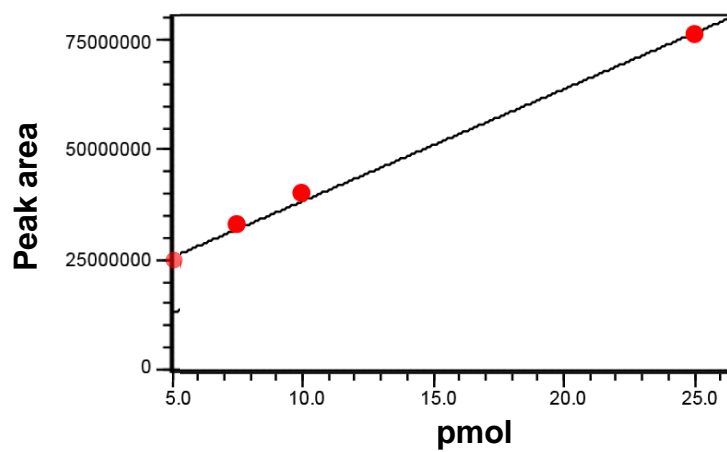


図8: 誘導体化したtMH標準物質の質量分析結果

マトリクスのみMSスペクトルをBlankとして下段、tMH標準物質をのMS¹スペクトルを中段に示している。中段の青いボックスで囲んだ m/z 297.36 のイオンをMS²解析した結果を上段に表している。AQC誘導体化由来と考えられるイオンは緑のボックス、tMHのイオンは赤いボックスで囲んだ。

A



B

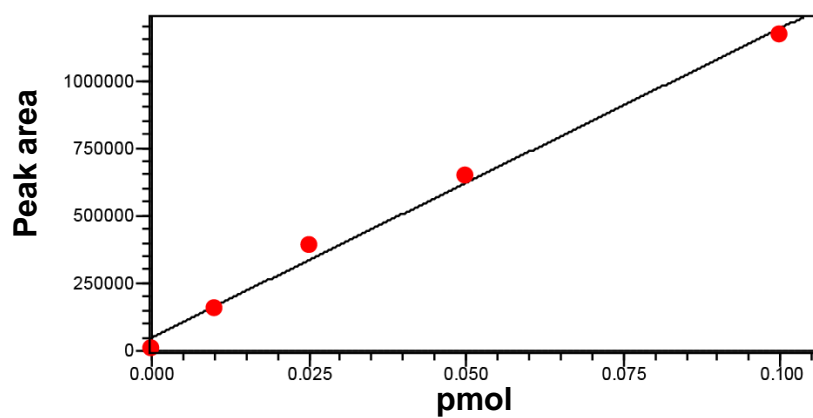


図9: 標準物質の測定による検量線結果

A: tMH

B: t-MIAA

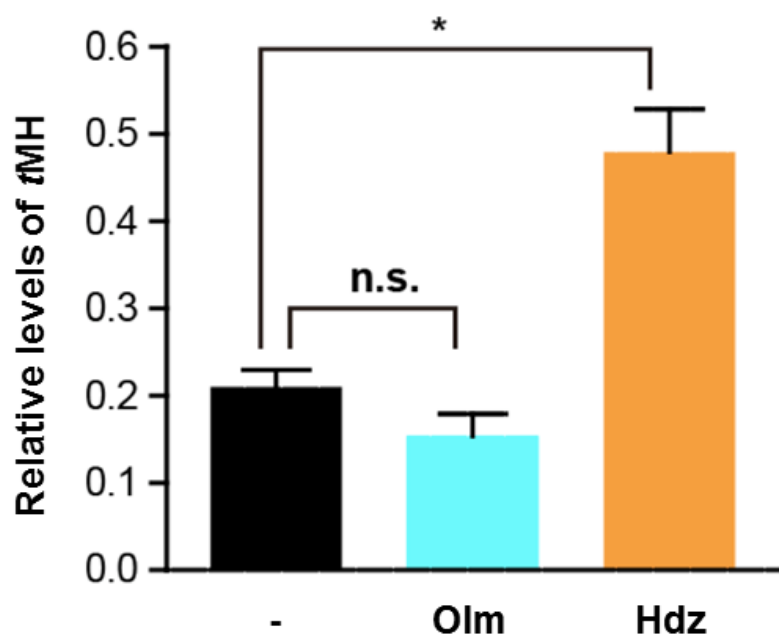


図10: 薬剤投与PAHマウス母獣血漿中のtMH量測定結果

妊娠19日目におけるPAHマウス母獣血漿中のtMH量測定結果の相対値を示す。薬剤非投与群を黒、Olm投与群を青、Hdz投与群をオレンジで示す。サンプル数はそれぞれ8、5、5個体である。

*: $p < 0.005$

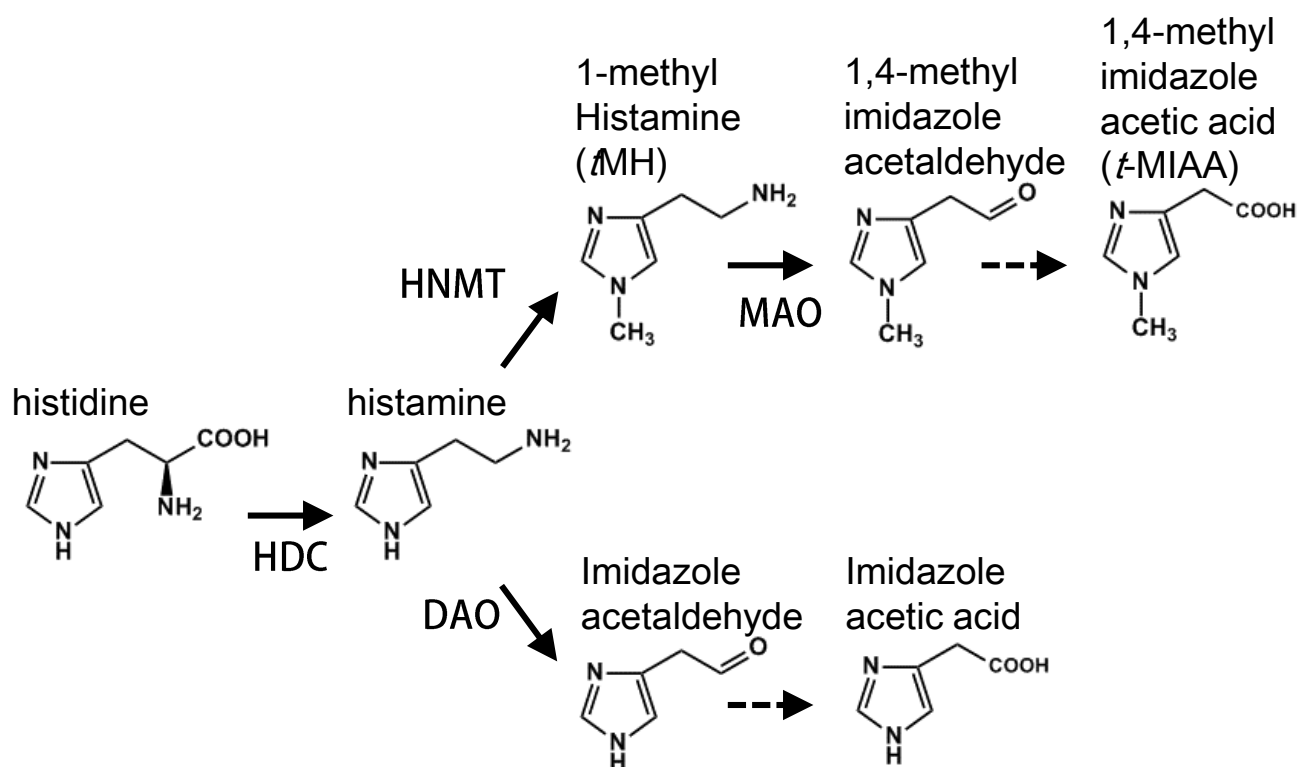


図11: ヒスタミン関連物質の代謝マップ

ヒスタミンはアミノ酸であるヒスチジンからHDCにより合成される。ヒスタミンはHNMTによりイミダゾール環 *tau* 位の窒素原子がメチル化を受けることで生成し、MAOにより α アミノ基が酸化的脱アミノ化されて代謝される経路と、DAOにより直接 α アミノ基が酸化的脱アミノ化を受けて代謝される経路が存在する。

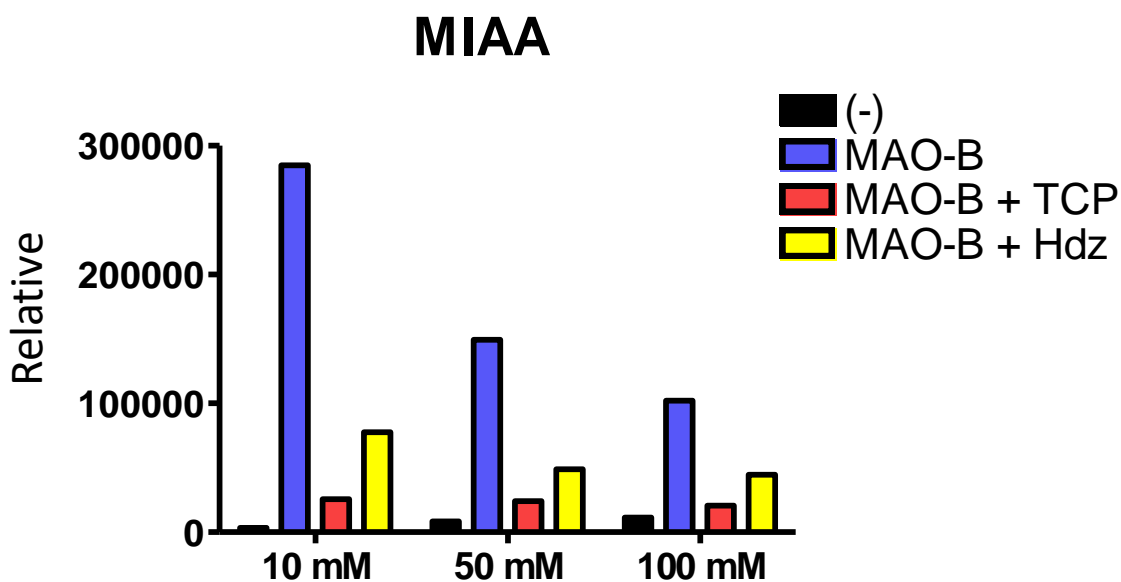


図12: *in vitro* MAO-B 反応のバッファー条件検討

HEPESバッファー（pH 7.5）の濃度を 10 mM、50 mM、100 mM の三点で検討した。酵素なしを黒、MAO-B存在下で阻害剤なしを青、TCP添加を赤、Hdzを黄色で示している。

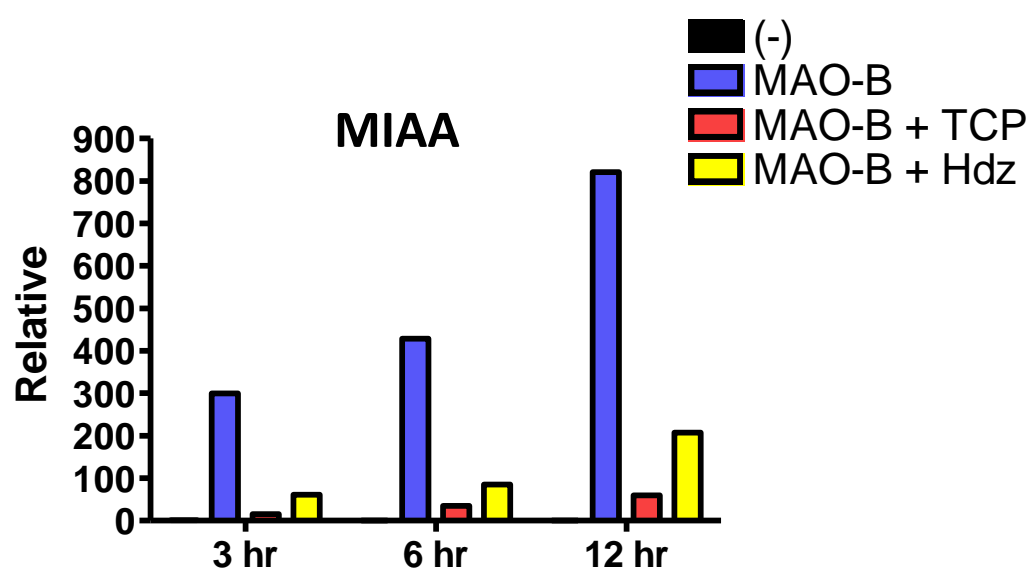


図13: *in vitro* MAO-B 反応時間の条件検討

反応時間を3、6、12時間の三点で比較した。酵素なしを黒、MAO-B存在下で阻害剤なしを青、TCP添加を赤、Hdzを黄色で示している。

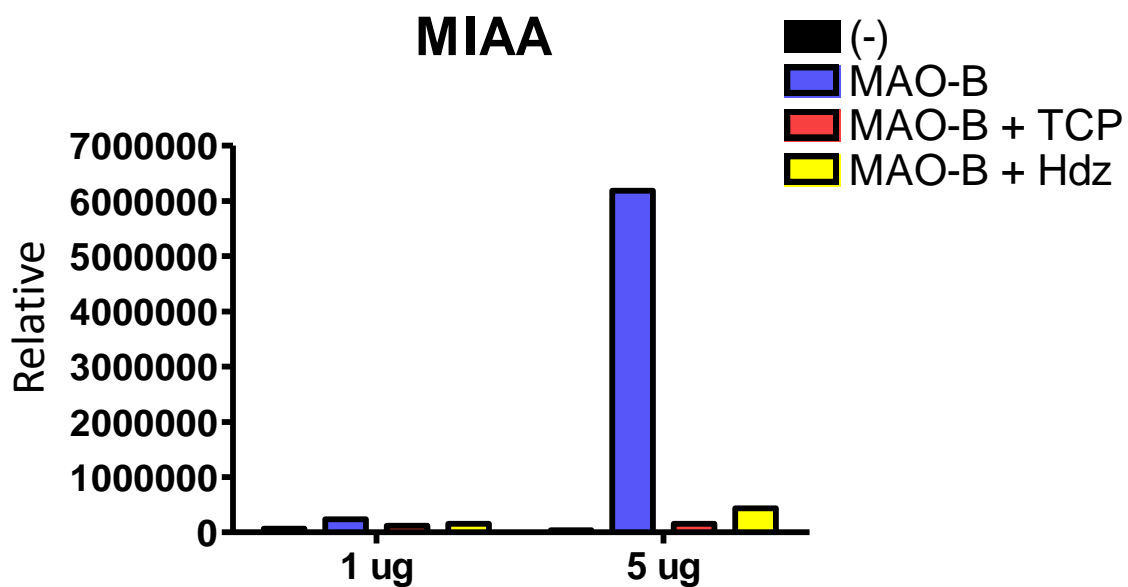
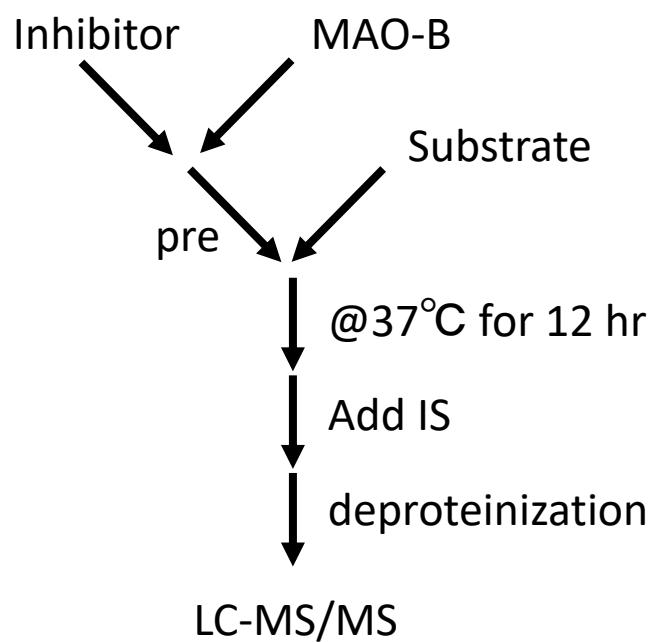


図14: *in vitro* MAO-B 反応の酵素量条件検討

MAO-B量を1 μg と 5 μg にて比較した。酵素なしを黒、MAO-B存在下で阻害剤なしを青、TCP添加を赤、Hdzを黄色で示している。



Buffer	10 mM HEPES (pH 7.5)
Amount of MAO-B	5 µg / reaction
IS	IAA
control	Boiled enzyme

IS: Internal Standard

図15: *in vitro* MAO-B反応条件

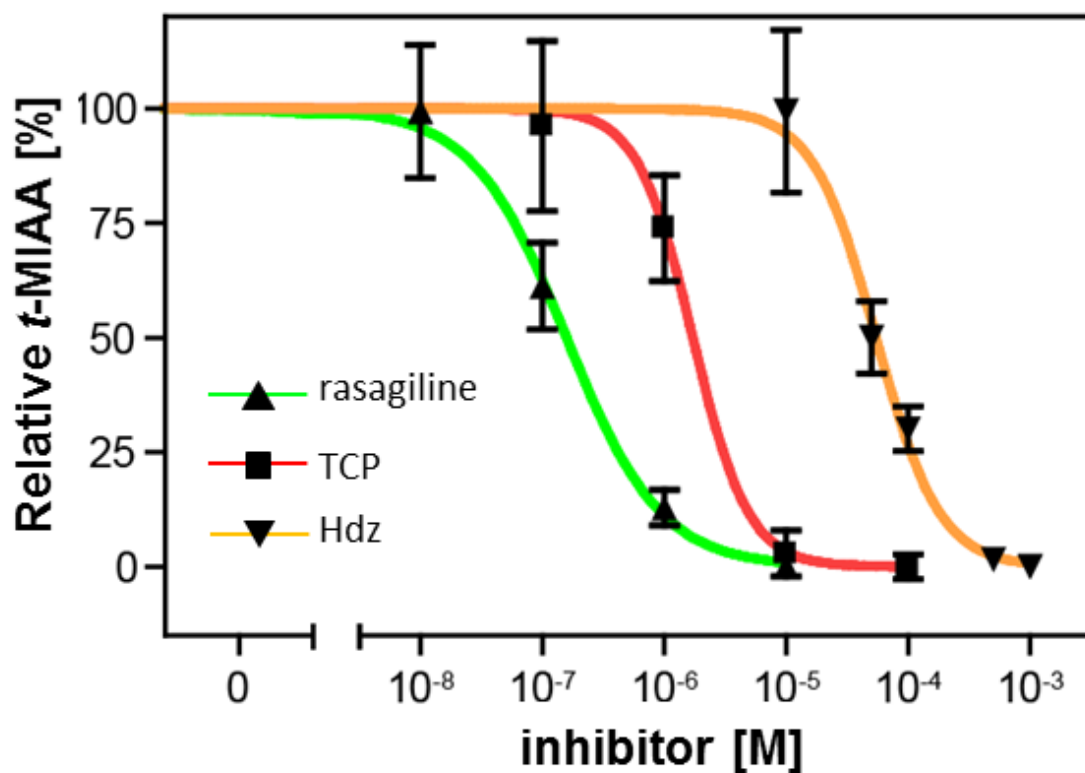


図16: *in vitro* MAO-B 反応の結果に基づく阻害曲線

t-MIAA の産生量の相対値 (%) を縦軸、薬剤の濃度 (M) の対数を横軸にとった。MAO-B特異的阻害剤であるrasagilineを緑、MAO-A/B阻害剤であるTCPを赤、Hdzをオレンジで示している。それぞれのIC₅₀は0.16 μM、1.72 μMそして 54.62 μMである。

表1: FAD依存性酵素の一覧

EC number	Name
EC 1.4.3.4	monoamine oxidase A/B
EC 1.6.3.5	renalase
EC:1.1.99.5	glycerol-3-phosphate dehydrogenase
EC:1.5.3.1	sarcosine oxidase beta subunit
EC:1.4.99.1	D-alanine oxidase
EC:1.4.3.1	D-aspartate oxidase
EC:1.4.3.3	D-amino acid oxidase
EC 1.4.3.2	L-amino acid oxidase
EC 1.5.3.13	<i>N</i> ¹ -acetylpolyamine oxidase
EC 1.5.3.14	polyamine oxidase (propane-1,3-diamine-forming)
EC 1.5.3.15	<i>N</i> ⁸ -acetylspermidine oxidase (propane-1,3-diamine-forming)
EC 1.5.3.16	spermine oxidase
EC 1.5.3.17	non-specific polyamine oxidase
EC 1.14.11.B1/B2	lysine-specific demethylase 1

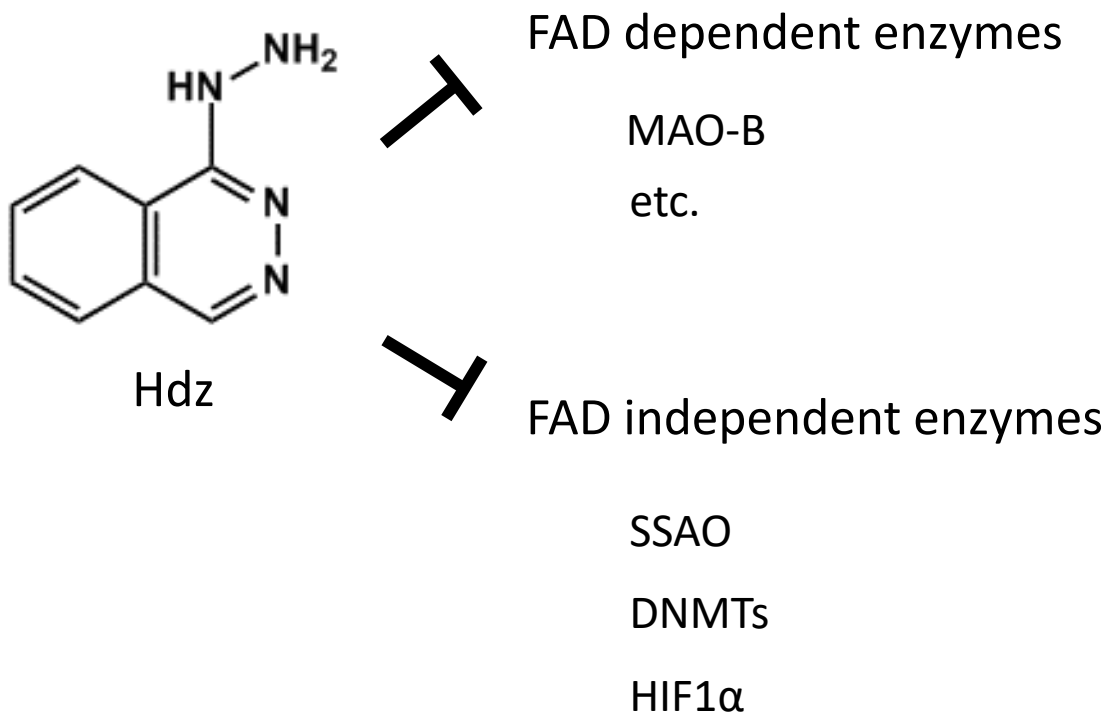


図17: FAD依存性酵素とFAD非依存性酵素に対するHdzの阻害作用の模式図

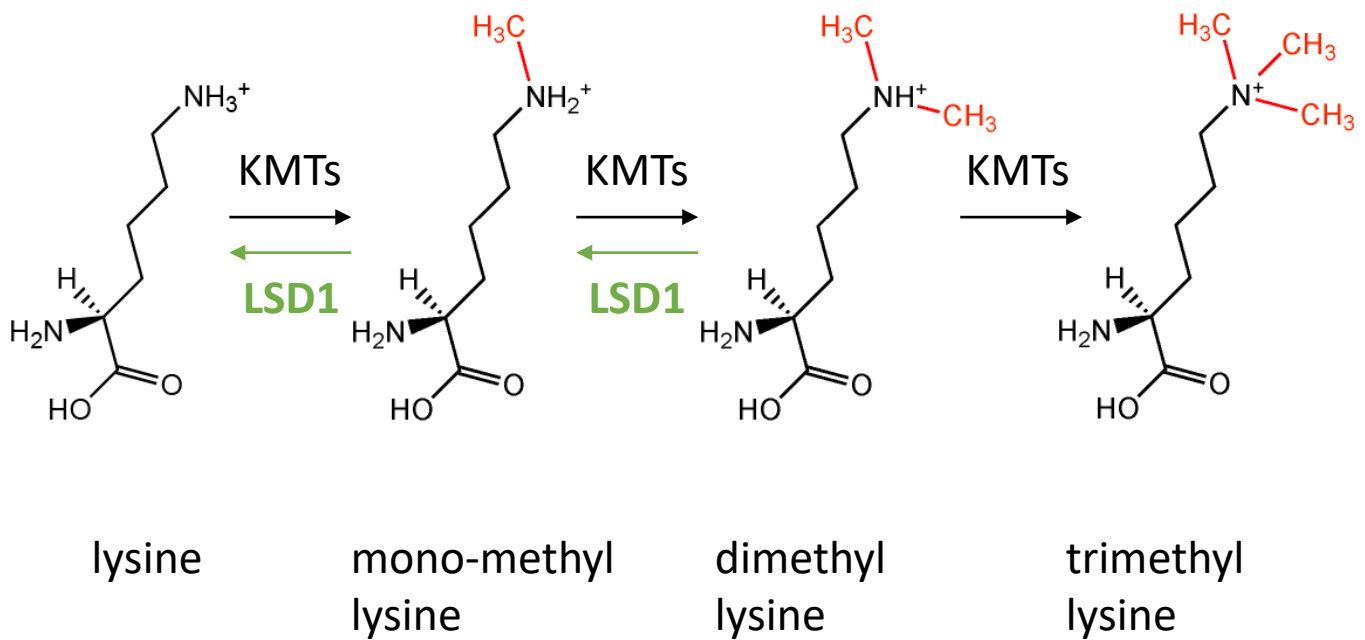


図18: リジンのメチル化と脱メチル化の模式図

KMT: lysine(K) methyltransferase、リジンメチル基転移酵素
 タンパク質リジンのメチル化はモノメチル化、ジメチル化、
 トリメチル化が知られており、KMTによりメチル基が付与さ
 れる。LSD1はジメチルリジン及びモノメチルリジンの脱メチ
 ル化反応を触媒する。

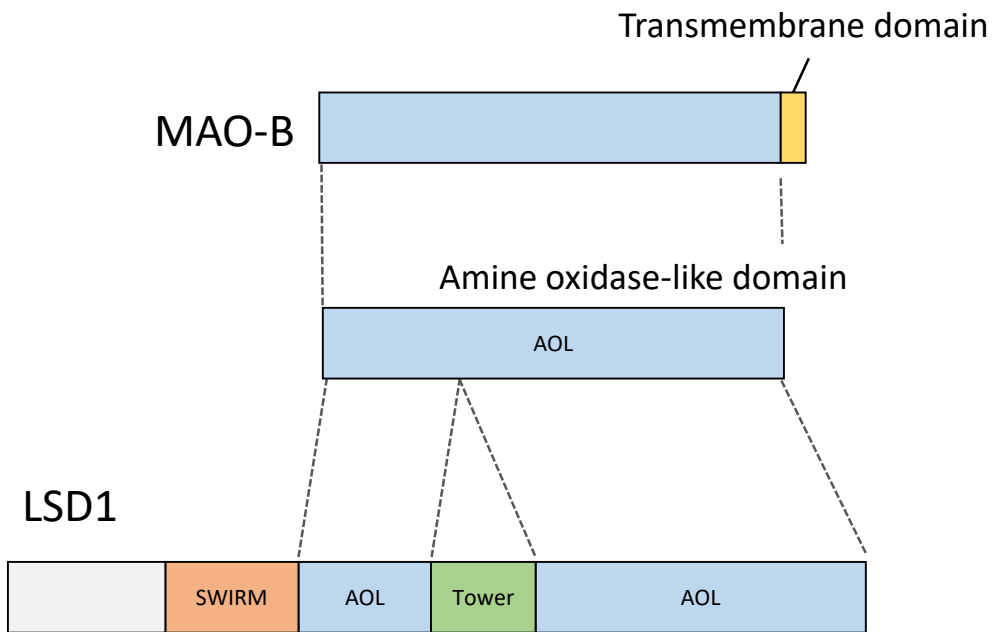


図19: MAO-BとLSD1の構造模式図

Transmembrane domain: 膜貫通ドメイン

Amine-oxidase-like domain: AOL, アミンオキシダーゼ様ドメイン

SWIRM: SWI3p, Rsc8p, and Moria: タンパク質相互作用ドメイン

Tower: タンパク質相互作用ドメイン

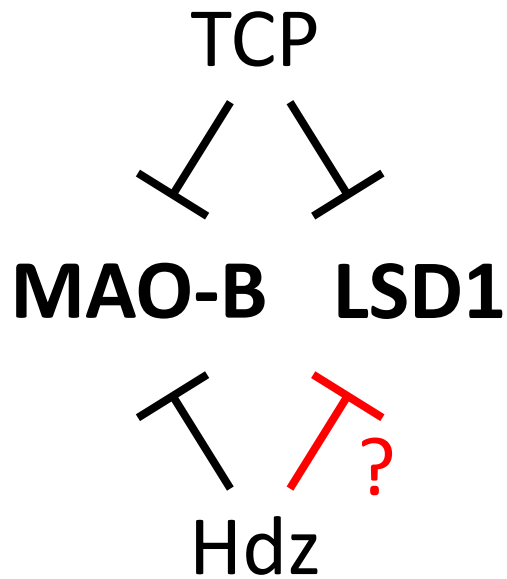


図20: HdzによるLSD1に対する阻害作用の仮説モデル図

既知のMAO-A/B 阻害剤であるTCPが、同じくFAD依存性酵素であるLSD1を阻害し、第二章の結果から、HdzがMAO-Bを阻害することが分かっていたため、Hdz もLSD1の活性を阻害するのではないかと仮説を立てた。

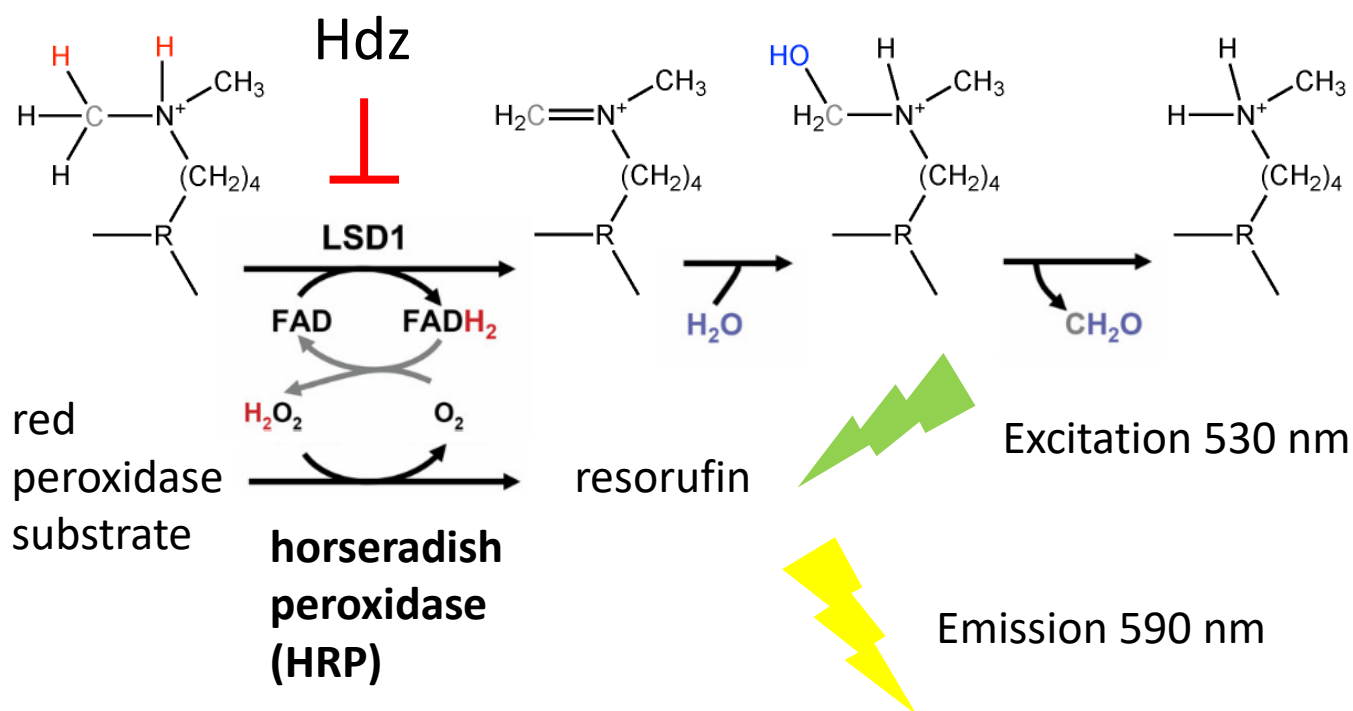


図21: LSD1活性評価系の模式図

red peroxidase substrate: 蛍光色素の前駆体

resorufin: 蛍光色素

LSD1による脱メチル化反応が発生する際にはH₂O₂が副次的に生成される。本研究ではHRP存在下でH₂O₂と反応して蛍光色素が生じる系を用いて、LSD1に対するHdzの脱メチル化活性の測定を行った。

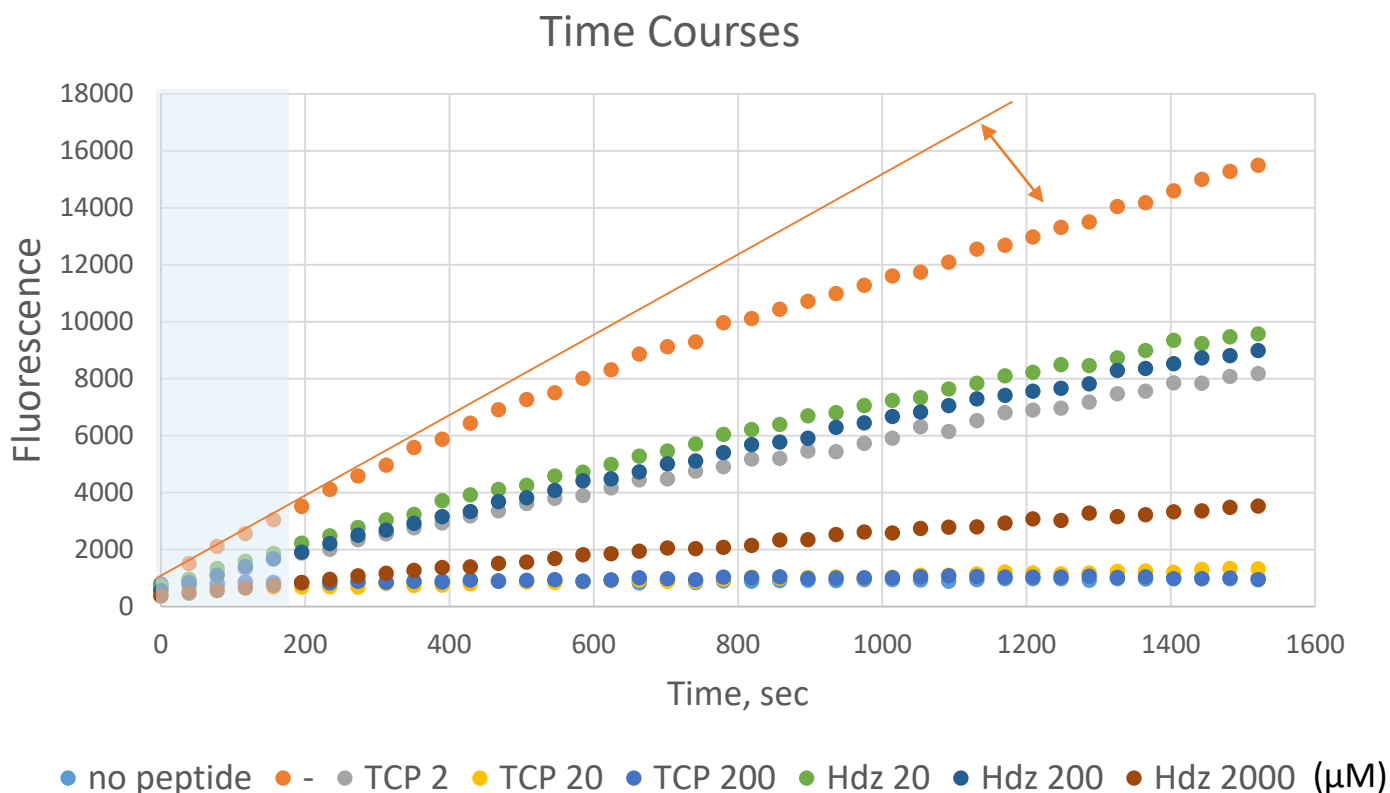


図22: LSD1活性測定の結果 1

530 nmの波長で励起し、590 nmの蛍光波長を測定した蛍光強度を縦軸、横軸を時間にプロットして近似曲線を作成した。青の時間範囲で近似直線の直線性が高く、範囲外になると直線の傾きは小さくなることが明らかとなった。

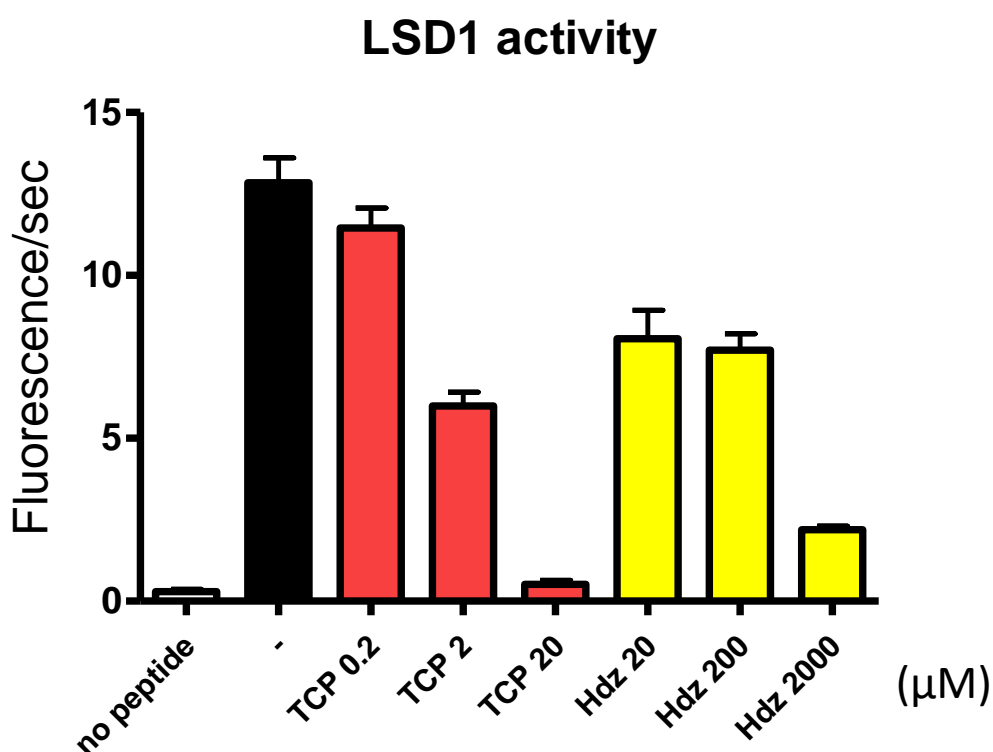


図23: LSD1活性測定の結果 2

図20のうち、反応開始後172秒までの範囲で近似直線の傾きを求め、薬剤の阻害効果を比較した。ペプチドなしを白、阻害剤なしを黒、TCP添加を赤、Hdzを黄色で示している。