



Title	Structure-specific Effects of Lipidated Oxytocin Analogs on Intracellular Calcium Levels, Parental Behavior, Plasma and Cerebrospinal Fluid Oxytocin Concentrations in Mice
Author(s)	Cherepanov, Stanislav
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61884
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (Cherepanov Stanislav)	
論文題名	Structure-specific Effects of Lipidated Oxytocin Analogs on Intracellular Calcium Levels, Parental Behavior, Plasma and Cerebrospinal Fluid Oxytocin Concentrations in Mice. 脂質化オキシトシン類似化合物の構造特異的な細胞カルシウム濃度、両親養育行動、血漿・脳脊髄液中のオキシトシン濃度に対する効果
論文内容の要旨	
〔目的〕	
<p>Oxytocin (OT) is a neuroendocrine nonapeptide that plays an important role in social memory and behavior. Nasal administration of OT has been shown to improve trust in healthy humans and social interaction in autistic subjects in some clinical trials. However, OT has two unfavorable characteristics: OT is short-acting and shows poor permeability across the blood-brain barrier, because it exists in charged form in the plasma and has short half-life. To assess this, we designed and synthesized three new oxytocin analogues which contained palmytoil acid groups in different positions. Lipo-oxytocin-1, 2 and 3 (LOT-1, LOT-2, LOT-3).</p>	
<p>The main goal for this study: Can OT lipidated analogs to be useful for ASD patients and has more high and prolong effect than OT? For answering for these questions we used <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> methods.</p>	
〔方法ならびに成績〕	
<p>We investigated calcium release measurement <i>in vitro</i> and parental behavior on ASD mice model. Also we measured level of OT in plasma and cerebro-spinal fluid (CSF) of wild-type mice after injection of LOT-1. For Calcium release measurement we used cell lines (HEK-293), which expressed OT-receptors. Activation of Ca release from these cells after application of drug will be evidence of direct activity on oxytocin receptors. For model of ASD, we used CD38KO mice, because mice with this phenotype have disrupted oxytocin release from brain and demonstrate signs of autistic symptoms. We Used ELISA-kit for determination of OT in plasma and CSF.</p>	
<p>In HEK-293 cells, all three LOTs demonstrated comparably weak effects on the elevation of intracellular free calcium concentrations after OT receptor activation, compared to the effects of OT. The three LOTs and OT exhibited different time-dependent effects on recovery from impaired pup retrieval behavior in sires of CD38-knockout mice. Sires treated with LOT-1 showed the strongest effect, while others had no or little effects at 24 hours after injection.</p>	
<p>With regard to the long-lasting effect of LOT-1, we measured CSF and plasma OT levels at two time points after drug administration (30 minutes and 24 hours). At 30 minutes after OT injection, the level of OT in plasma and CSF was slightly higher than that in PBS-treated controls, while no such difference was observed following injection of LOT-1. After 24 hours, mice treated with LOT-1 showed elevated plasma and CSF OT levels, while OT-treated animals did not. The data support the suggestion that LOT-1 is metabolized in the blood and transformed to OT. If long-term conversion to OT is the main mechanism underlying the behavioral effects of LOT-1, this could explain the long-lasting effect of LOT-1 as well as its slight or absent acute effect.</p>	
〔総括〕	
<p>We applied a lipidation strategy using palmitoyl acid to improve the drug-like properties of OT. Lipidation of OT at two positions successfully yielded LOT-1 a peptide drug with long-lasting activity. Based on our results, LOT-1 is potentially useful for psychiatric diseases, including ASD. LOT-2 and LOT-3 exhibited less beneficial activity compared to LOT-1, contrary to our initial expectations, they yielded insight into the mechanisms underlying the effects of LOT-1</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (Cherepanov Stanislav)	
	氏 名 (職)
論文審査担当者	主 査 教授 小坂 浩隆
	副 査 教授 片山 泰一
	副 査 教授 山末 英典

論文審査の結果の要旨

オキシトシン(oxytocin, OT)は社会性記憶、社会性行動の調節作用をもつ神経ペプチドである。OTの経鼻投与により自閉スペクトラム症(autism spectrum disorder, ASD)者の対人コミュニケーション障がいが改善することが期待され、多くの臨床試験が実施されている。しかしながら、天然型OTは体内で分解されやすいため、作用時間が短い。加えて、脳血液閂門(blood-brain barrier, BBB)の透過性が低いため、脳内に移行しにくい。このためASD治療薬として、BBB透過性が高く、作用時間の長いOT製剤の開発が望まれている。

Cherepanov氏は、脂質化により得られたOT類似化合物にこれらの問題点を克服する可能性があるか否かを明らかにするために研究を行った。本研究では、3つのOT類似化合物、すなわちlipo-oxytocin-1(LOT-1; Mizuno, A., Cherepanov, S. M. et al. Brain Sci. 5: 3-13, 2015)、lipo-oxytocin-2(LOT-2) およびlipo-oxytocin-3(LOT-3) の主な薬理作用をOTを対照にして比較検討した。LOT-1は、OT分子の1番目のシステイン残基のアミノ基、2番目のチロシン残基の水酸基の両方にパルミチン酸が1つずつ付加されるように合成された。LOT-2では1番目のシステイン残基のアミノ基のみに、LOT-2では2番目のチロシン残基の水酸基のみにパルミチン酸が1つ付加されている。

まず、GFP(enhanced green fluorescent protein)でタグ標識したヒトOT受容体をヒト腎由来HEK-293細胞に安定的に発現させた細胞株に各化合物を添加し、OT受容体活性化による細胞内カルシウム濃度の上昇反応を調べた。各化合物の50%効果濃度(EC₅₀)はOTと比較して高い値を示した。次に、養育行動としての仔運び行動が障害されているCD38ノックアウトマウスに各化合物を腹腔内注射したところ、化合物によって異なる行動様式が観察された。LOT-1は投与30分後には効果を示さなかったが、投与24時間後にOTより効率よく仔運び行動を回復させた。一方、LOT-2は投与30分後の効果はOTよりも顕著であったが、投与24時間後に効果はほとんど認められなかった。LOT-3の30分、24時間後の効果は顕著ではなかった。これらの結果は、OT類似化合物がそれぞれの構造に特異的な薬物動態をマウス個体内でとることを示している。

本研究は、脂質化によって得られた3種類のOT類似化合物の作用を培養細胞レベル、動物個体の行動レベルで解析した斬新なものといえる。今後、社会性記憶、社会性行動の薬物をデザイン、開発する上で重要な基礎的知見となりうる結果が提示されており、学位の授与に値すると考えられる。