

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究 重点研究報告書

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

動脈硬化症進展阻止のための血管内皮細胞特異的発現 EDG受容体作働薬・拮抗薬の開発

所 属 国立循環器センター研究所 循環器形態部
研究者 望月 直樹

分担研究者

- (1) トーアエイヨー株式会社製品開発部 長井晶彦
- (2) 大阪大学微生物研究所腫瘍ウイルス分野 黒川量雄

要 旨

HUVECs(ヒト臍帯静脈内皮細胞)を用いて S1P(スフィンゴシン 1-リン酸)受容体 EDG(Endothelial Differentiation Gene)の細胞内情報伝達系を検討した。ERK の活性化は Gibg 依存性であった。アダプター蛋白質 Crk のリン酸化を S1P 刺激により認め、この Crk のリン酸化は Gibg 依存性且つ VEGF 受容体の Transactivation が必要であった。S1P 依存性の内皮細胞の遊走には Crk が必要であることを明らかにした。Crk のリン酸化を時間的・空間的に可視化可能とする FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer)理論に基づいたプローブを開発した。EDG 受容体の拮抗薬・作働薬は in silico screening によりその候補薬剤を見つけ、現在 EDG 受容体発現細胞株で細胞内 Ca と ERK/MAPK の抑制あるいは亢進を指標に薬効評価を行なっている。

1. 研究目的

動脈硬化症は高齢化社会では不可避の病気であり、死因の大半である心血管疾患・脳血管疾患の原因として重要な病態である。これまでの血小板凝集抑制だけでは抑えきれない動脈硬化症を内皮細胞で発現する EDG 受容体を制御することで動脈硬化症を治療するという考えで EDG 受容体の作働薬・拮抗薬を創薬することを目的とする。EDG 受容体のリガンドであるスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) リゾフォスファチジン酸 (LPA) の構造からライブラリーのなかで類似の構造を有する化合物を選択しさらに合成を行っていき、スクリーニングは細胞内 Ca の測定により薬効を判定する。この際に EDG 受容体の細胞内情報伝達系のなかで Ca を上昇させる三量体 GTP 結合蛋白質 Gαq 以外の Gαi, Gα13 についての検討が必要になる。委託研究では開発した薬剤の妥当性・有効性を Ca 以外の情報伝達系に対しても評価できるようにすることが目的である。

血管内皮細胞と血小板の関係は血栓形成とそれに引き続く内皮細胞側の防御機構を考える上で非常に重要な関係である。血小板から分泌される S1P, LPA がどのように血管内皮細胞の増殖や遊走に関わるかを調べることはすなわち EDG 受容体による内皮細胞の制御を調べることに他ならない。本研究では EDG 受容体の細胞内情報伝達系を詳細に調べることと EDG 受容体関連薬(作働薬・拮抗薬)を創薬することを目的としている。予め生物学的作用を十分に検討する必要があると判断し本研究班では情報伝達系の解析と実際の薬物スクリーニングを並行に行っていく。実際にスクリーニングを開始するにあたりスクリーニング系の確立と合理的創薬設計ソフトウェアを用いた薬物構造学的検討により候補薬剤を選択していく。

2. 研究方法

- (1) HUVEC(ヒト臍帯静脈内皮細胞)を継代培養し(5継代まで)、実験を行なった。細胞培養には HuMedia (KURABO)に 2% fetal bovine serum, 10ng/ml human epidermal growth factor, 1μg/ml hydrocortisone, 50μg/ml Gentamicin, 50ng/ml Amphotericin B, 5ng/ml human fibroblast growth factor, 10μg/ml heparin を添加した培養液を用いた。血清飢餓状態で8時間以上培養後 S1P 刺激を5分間行い、アダプター蛋白質 Crk のリン酸化と ERK/MAPK のリン酸化を調べた。
- (2) Crk のリン酸化は細胞を可溶化 (150 mM NaCl, 20 mM Tris hydrochloride (pH 7.5), 1.5mM MgCl₂, 1mM Na₃VO₄, 1% Triton X-100, 10mM NaF, and protease inhibitor cocktail) 後、遠心し、可溶性画分を SDS-PAGE 後イムノプロットを anti-Crk (Transduction laboratory)を用いて行なった。ERK/MAPK の活性化は Crk と同様に行ない、anti-phospho-ERK 抗体 (NEB) を用いた。リン酸化 Crk は非リン酸化 Crk と電気泳動上の移動度が違うために容易に検出可能である。さらに、Src キナーゼ活性が S1P 依存性の ERK の活性化に関与しているか否かを Src のキナーゼ活性阻害薬 PP2 ならびに Src の 527Tyr をリン酸化させて Src を不活性化する Csk の強制発現により検討した。
- (3) トーアエイヨーから提供された、新しい EDG 受容体拮抗薬候補薬剤について、Crk のリン酸、ERK/MAPK のリン酸化への効果を調べた。
- (4) アダプター蛋白質 Crk の細胞遊走効果を検討した。S1P 刺激後の細胞の遊走を Time-lapse 蛍光顕微鏡を用いて検討した。血清飢餓状態の HUVEC 細胞を S1P 100nM で刺激後 100 個の細胞をそれぞれ Cell

tracking system (Roper) で追跡しその移動速度を測定した。

- (5) 細胞遊走機構の細胞内情報伝達系の検討のために PTX(百日咳毒素), bARK-CT (beta-adrenergic receptor kinase の C 末端)で HUVEC 細胞を前処置してその効果を調べた。EGF 受容体・VEGF 受容体の S1P 刺激によるリン酸化をしらべることで EDG 受容体によるチロシンキナーゼ型受容体への transactivation 機構を検討した。
- (6) 細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定による EDG アゴニスト及びアンタゴニスト評価系の構築及び評価
効率的なアンタゴニストスクリーニングを行うために、EDG-1 または 3 を安定発現した HeLa 細胞を 96-well プレートに播種し、蛍光 Ca^{2+} 指示薬 Calcium Green1 により SPP 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 上昇の化合物による抑制を指標としたセルベースドアッセイを行った。これまでに得た EDG-5, EDG-6, EDG-8 についても同様に細胞株を作る予定である。
- (7) コンピュータケミストリーを活用した新規アンタゴニストの探索
我々は、すでに非リン酸誘導体 EDG1,3 アンタゴニストを見出しているが、アンタゴニスト活性を有する新規化合物を見出すべく、合理的創薬設計ソフトウェア-Catalyst (Accelrys 社)を用いて、3次元データベース検索 (in silico スクリーニング)を行なった。
- (8) 細胞内情報伝達機構をこれまでの生化学的検索方法から、イメージングを用いた検討方法に変えるべく、Crk リン酸化のモニターリング蛋白質を作製する。

3. 研究成果

(1) HUVEC を S1P で刺激した際の ERK/MAPK の活性化

血清飢餓ごの HUVEC を S1P で刺激すると 3-5min を peak にした Erk/MAPK のリン酸化を認めた。濃度依存性の ERK の活性化を認め、100nM で刺激前との優位差を認めたので以降 HUVEC の刺激に際しては 100nM を使用した。ERK の活性化は HUVEC では PTX 依存性であった。また、bARK-CT をアデノウイルスを用いて細胞に導入後に S1P で刺激を行なっても ERK の活性化が認められないことより、 $G_i\beta\gamma$ 依存性に ERK が活性化されていることを明らかにした。PP2 と Csk の強制発現 (アデノウイルス) では ERK の活性化は抑制されなかった。また、EGF 受容体の transactivation による ERK 活性化の有無を検討したが ERK の活性化は EGF 受容体のキナーゼ阻害薬 AG1478 では阻害されなかった。

(2) アダプター蛋白質 Crk の S1P 刺激によるリン酸化

Crk のリン酸化は S1P の濃度依存性に認められた。この Crk のリン酸化は 1 分を peak に 30 分以上持続した。HUVEC 細胞を種々の Growth factor で刺激したときの Crk のリン酸化を調べた。30ng/ml VEGF, 30ng/ml EGF, 30ng/ml bFGF, 30ng/ml HGF, 50ng/ml PDGF-AB で HUVEC を刺激した時の Crk のリン酸化は VEGF でのみ認められた。以上から、S1P 依存性の Crk リン酸化は EDG 受容体から VEGF 受容体を介したシグナル系が活性化されることによると考えられた。Crk のリン酸化は PTX, Adenovirus による β ARK-CT も強発現により抑制されることがわかった。このことから、Crk リン酸化は $G_{i\beta\gamma}$ を介していることを明らかにした。ERK/MAPK は Src の阻害剤で活性化が抑制されなかったが Crk は PP2, CSK の発現でいずれも抑制された。

(3) Crk の S1P 依存性細胞遊走増強作用での役割についての検討

HUVEC を S1P で刺激した際の細胞遊走機構を調べた。S1P により HUVEC は運動速度があがることを明らかにした。これは Cell-track system で細胞の移動距離を観察時間で割った平均の細胞速度を指標として計算した。この細胞運動における Crk の機能を調べた。Crk の優劣変異型 Crk を bicistronic plasmid (pCXN2-Crk R38V-IRES-EGFP, pCXN2-Crk-W169L-IRES-EGFP) を用いて細胞導入した。S1P 依存性の HUVEC 細胞運動はいずれの変異型 Crk でも遊走機能が低下することが明らかになった。また、この運動は VEGF 受容体拮抗薬でも低下することを明らかにした。

(4)新規 S1P 受容体拮抗薬の ERK/MAPK 活性阻害の検討

トーアエイヨー社から提供された 12 コンパウンド(すでに細胞内 Ca の増加作用を抑制する効果があるものとして Screening された化合物)について S1P 依存性の ERK の活性化を調べた。このうち、90%の抑制効果が認められた化合物を得た。この化合物についてはさらに詳細に調べる予定である。

(5) 細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定による EDG アゴニスト及びアンタゴニスト評価系の構築及び評価

ランダムスクリーニングを可能にするために high through put 系での薬効評価が行なえるように EDG 受容体発現細胞株を樹立した。スクリーニングは細胞内 Ca の測定を行なうことで充分スクリーニングが可能なアッセイ系を構築した。

(6)コンピュータケミストリーを活用した新規アンタゴニストの探索

Catalyst を用いて、3次元データベース検索 (in silico スクリーニング)を行い、さらにデータベースからのヒット化合物は EDG1,3 についての in vitro 評価を行った。アンタゴニスト活性は、化合物 10 μ M において 1 μ M SPP 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇の明確な抑制 (30%以上)と定義した。その結果、酸性官能基を有さない誘導体や低分子芳香環誘導体など新たなアンタゴニストが同定された。また、これらのアンタゴニスト関連誘導体 20 化合物を合成し、in vitro 評価を行い、低分子 EDG アンタゴニスト 2-undecyl thiazolidine-4-carboxylic

acidを見出した。SPPの全長が21.17 Åに対してこの低分子アンタゴニストの全長は14.59 Åであり(Fig. 1)、創薬への応用を鑑みた場合、代謝安定性が懸念される脂肪鎖を大幅に縮小させたドラッグライクなアンタゴニストを見出すことができた。また、これらアンタゴニストのEDG1,3選択性についても考察した結果、EDG1はEDG3と比較して、リガンドの構造的要求が大きいことが明らかとなった。一方でLPAをリガンドとするEDGサブタイプに対しては比較的良好な選択性を示した。

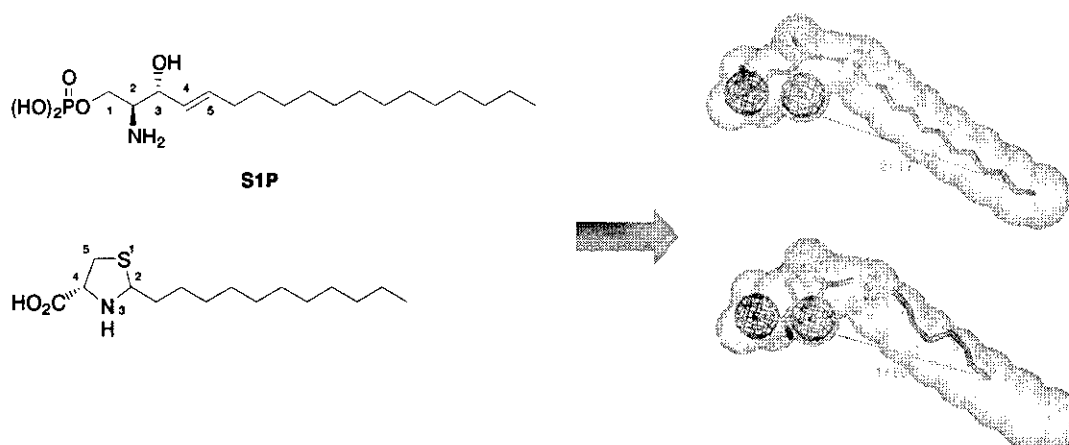


Figure. The comparison of both active conformations, S1P and 2-undecyl thiazolidine-4-carboxylic acid

(7) Crk リン酸化モニターリングプローブ Picchu (phosphorylation indicator of Crk Chimeric Unit)の作製

哺乳類細胞での発現ベクターに Yellow Fluorescent Protein –Crk II- Cyan Fluorescent Protein となるキメラ蛋白質を発現するようにこれを code する DNA を挿入した。Crk は Crk gene から splicing variation によって CrkI と CrkII が作られる。Crk は SH2, SH3 からなるアダプター蛋白質であり、CrkII は SH2-SH3-SH3 からなり N 末の SH3 と C 末の SH3 の間に Tyr 221 がある。ここのリン酸化 Tyr が N 末の SH2 と結合することにより、Crk の intramolecular folding が起こる。この、folding により SH3binding 蛋白質が解離することで Crk の機能が不活性化すると考えられている。つまり、SH2 と Tyr221 の結合の有無を YFP,CFP 間の FRET を monitor することで Crk リン酸化を検討しようと試みた。

(8) Picchu を用いた血管内皮細胞での Crk リン酸化の可視化

このプローブを用いて細胞を S1P 刺激したときの Crk のリン酸化をイメージングした。この FRET の増加は細胞膜のラフリング部位で観察された。陽性 control として用いた VEGF による Crk のリン酸化も同様にラフリング部位で観察された。

4. 考 察

EDG 受容体の細胞内情報伝達系特に今年度は Erk の活性化機構と、細胞接着に関係すると予想される Crk のリン酸化について検討した。HUVEC での ERK/MAPK 活性化は百日咳毒素感受性であるので HUVEC における S1P 依存性の ERK/MAPK 活性化は Gi が重要であることが判明した。さらに詳細に ERK/MAPK の活性化経路を調べたところ $\beta\gamma$ サブユニット依存性であることを明らかにした。これまで Gi からの情報伝達系の下流で EGF 受容体の transactivation が起こりその後 EGF 受容体依存性の ERK/MAPK の活性化が起こることが示されてきた。本実験では AG1437 では S1P 依存性の ERK/MAPK の活性化は抑制されないことから EGF 受容体の transactivation は ERK/MAPK の活性化には関与しないことが明らかになった。加えて、7 回膜貫通型受容体ではこれまで Gi の下流では Src ファミリー分子が ERK/MAPK の活性化に重要であると考えられてきたが、HUVEC では Gi の下流に Src が位置しないことが示唆され HUVEC 細胞での S1P 依存性 Erk 活性化に関して、更に検討する必要があると思われた。

アダプター分子 Crk は Src ホモロジー(SH2,SH3)を有する蛋白質でチロシンキナーゼ受容体のチロシンリン酸化部位に SH2 を介して結合あるいは p130Cas 蛋白質のリン酸化部位にやはり SH2 を介して結合する。この際 Crk の SH3 に結合している C3G あるいは DOCK180 が Crk と共に移動することでその下流にシグナルを伝えると考えられている。DOCK180 は低分子量 GTP 結合蛋白質 Rac の活性化を引き起こし細胞の葉状突起形成に関わる。つまり Crk の活性化に伴い細胞遊走接着が関与すると考えられた。これまでの研究では 7 回膜貫通型受容体から Crk の活性化機構は不明であり、EDG 受容体の下流での Crk を調べるにはその活性化機構を検討する必要がある。本研究では HUVEC の SPP 刺激による Crk リン酸化は百日咳毒素感受性であり、Gi からの情報伝達が不可欠であった。Gi も $\beta\gamma$ からの作用が主でありしかも ERK/MAPK と同様に EGF 受容体の transactivation によるものではないことも AG1478 により Crk リン酸化が減弱しないことから示唆された。Src

による Crk のリン酸化に関しては PP2, Csk により Crk のリン酸化がやはり同様に減弱しないことから Crk のリン酸化機構をさらに解析する必要があると考えられた。

本研究では S1P 依存性の Crk のリン酸化は VEGF 受容体を介していることを明らかにした。この Crk のリン酸化機構には VEGF 受容体の下流で Src の活性化がおこり引き続いて Crk のリン酸化がおきることを明らかにした。

コンピューターケミストリーの支援による合理的創薬により、SPP の構造情報に基づいた *in silico* スクリーニングおよび効率的 EDG1 および 3 安定発現 HeLa 細胞を用いた *in vitro* スクリーニングによる非リン酸アンタゴニストの発見および効率的関連誘導体合成によるドラッグライクなアンタゴニストの設計に成功した。さらにこれらの構造活性相関情報をコンピューターケミストリーに還元することにより *in silico* スクリーニングの精度が向上し、多様なアンタゴニストを得ることができた。

さらに MAPK/ERK 阻害活性を有する化合物を見出すことができ、治療薬としての開発の可能性を見出すことができた。今後、これらアンタゴニストの関連誘導体合成および、血管新生阻害剤や内皮細胞増殖抑制剤としての開発の可能性について評価する予定である。

5. まとめ

血管内皮細胞を用いて EDG 受容体からの細胞内情報伝達系として増殖刺激の指標である ERK/MAPK の活性化と接着・遊走に関わるアダプター分子 Crk のリン酸化を認めた。この情報伝達系では G1b β から VEGF 受容体の transactivation が重要であることを明らかにした。

合理的創薬設計ソフトウェアを用いて SPP の構造から薬理活性モデルを作成し、3 次元データベース検索によるアンタゴニスト候補化合物の探索を行い実際に EDG 受容体が反応する候補薬剤を選択できた。

6. 研究発表

1. Mochizuki N, Yamashita S, Kurokawa K, Ohba Y, Nagai T, Miyawaki A, and Matsuda M. Spacio-temporal images of growth factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature* 411: 1065-1068, 2001.
2. Ohba Y, Ikuta K, Ogura A, Matsuda J, Mochizuki N, Nagashima K, Kurokawa K, Bruce J. Mayer, Maki K, Miyazaki J, Matsuda M. Requirement for C3G-dependent Rap1 activation for cell adhesion and embryogenesis. *EMBO J* 20: 3333-3341, 2001.
3. Kurokawa K, Mochizuki N, Ohba Y, Mizuo H, Miyawaki A, Matsuda M. A Pair of Fluorescent Resonance Energy Transfer-based Probes for Tyrosine Phosphorylation of the Crkl β Adaptor Protein in Vivo. *J Biol Chem* 276: 31305-31310, 2001.

7. 知的所有権の取得状況

該当なし

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社