

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 国立循環器病センター研究所 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) 大阪大学微生物病研究所腫瘍ウイルス分野 黒川量雄

要 旨

血管内皮細胞では SIP(スフィンゴシン 1-リン酸)刺激により EDG 受容体から VEGF 受容体の transactivation を誘導しアダプター分子 Crk が遊走を調節していることを明らかにした。また、EDG3 受容体拮抗薬のリード化合物を探索し 2-デシルチアゾリジン誘導体を発見した。

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 SIP と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コンピューターケミストリー技術で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^{2+} 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^{2+} 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^{2+} 以外の情報伝達系に対しても評価できるようにする。

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 SIP, 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①EDG 受容体の細胞内情報伝達系を詳細に調べること②EDG 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薬物スクリーニングを並行に行っていく。

2. 研究方法

血管内皮細胞の SIP 刺激による細胞内情報伝達系の活性化機構

(1) 使用した細胞は 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, 10 ng/ml human epidermal growth factor, 1 μg/ml hydrocortisone, 50 μg/ml Gentamicin, 50 ng/ml Amphotericin B, 5 ng/ml human fibroblast growth factor, 10 μg/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 SIP 刺激を 5 分間行い、ERK/MAPK のリン酸化を調べた。

(2) SIP による細胞増殖作用と催遊走・運動作用はそれぞれ ERK/MAPK のリン酸化とアダプター蛋白質 Crk のリン酸化を検討することにより調べた。細胞を可溶化 (150 mM NaCl, 20 mM Tris hydrochloride (pH 7.5), 1.5 mM MgCl₂, 1mM Na₃VO₄, 1% Triton X-100, 10 mM NaF, and protease inhibitor cocktail) 後、遠心し、可溶性画分を SDS-PAGE 後イムノブロットを 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。

(3) トーアエイヨーでの細胞内 Ca 測定によるスクリーニングで得られ提供された新しい 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。

EDG 受容体拮抗薬の (a) *in silico* スクリーニングと (b) ハイスループットスクリーニング

(1) EDG3 アンタゴニストファーマコファーマモデルの作成

EDG3 アンタゴニストファーマコファーマモデルの作成はソフトウェア Catalyst® (Accelrys, USA) を用いて検討を行った。Catalyst はコンフォメーション空間の網羅解析、ファーマコファーマモデル解析およびマルチコンフォメーションデータベースを活用した *in silico* スクリーニング機能を備えた新規活性化合物探索のための創薬支援ソフトウェアである。

EDG3 アンタゴニストとしての構造要求を満たすために必要な官能基はカルボン酸 (negative ionizable: NegI)、アミノ基 (positive ionizable: PosI)、イオウ原子 (H-bond acceptor: HBA) およびアルキル鎖 (hydrophobic: HYD) であると推定した。EDG3 アンタゴニストの最安定コンフォメーションから $\Delta E=18$ kcal/mol の範囲内で、quasi-random sampling によるコンフォメーション空間の網羅解析を行った。発生コンフォメーションは CHARMM 力場によって、二面角内での共役勾配法、デカルト座標での共役勾配法およびデカルト座標での擬似ニュートン法によって最適化し、1 化合物につき最大で 255 個の安定コンフォメーションを得た。

(2) EDG1 および EDG3 アンタゴニストスクリーニング系

EDG1 安定発現 HeLa 細胞株 (HeLa-EDG1 cells) または EDG3 安定発現 HeLa 細胞株 (HeLa-EDG3 cells) を用いたセルベースドアッセイを行った。化合物ライブラリーより多様性を考慮し選択した 7,250 化合物を選択して、EDG1 および EDG3 アンタゴニストスクリーニング系を用いてランダムスクリーニングを行った。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 Ca²⁺指示薬 Calcium Green1 により SIP 刺激による細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_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。

(3) EDG2, 4, 5 および 7 安定発現細胞株の樹立

EDG サブタイプ選択性の評価を可能とする為、EDG2, 4, 5 および 7 安定発現細胞株 (HeLa 細胞) を構築した。EDG cDNA の恒久的導入には neomycin 耐性遺伝子を有するベクターを用いて、neo 選択を行い細胞株を樹立した。EDG 受容体の発現確認は、M2-anti-FLAG モノクローナル抗体 (Sigma 社) を用いたイムノブロット、及び RT-PCR 法により行った。

(4) EDG3 ホモロジーモデルの構築およびドッキングスタディ

EDG3 ホモロジーモデルの構築は InsightII®ソフトウェアを用いた。ヒト EDG3 配列 Q99500 (swissprot) を用いて、膜貫通領域 (TMs) をウシロドプシン X 線構造 1F88 (PDB) から構築した。可変領域 (VRs) は α 炭素間距離マトリックスを指標に類似既知構造から構築した。構造最適化は Amber 力場 Discover® による高温分子動力学計算により行った。ドッキングスタディは Arg114 の側鎖アミノ基と、SIP のリン酸基の酸性水素原子またはアンタゴニストのカルボン酸酸性水素原子の距離を 2.5 Å 以内に制限して高温分子動力学計算による構造最適化を行った。

3. 研究成果

SIP による内因性 EDG 受容体刺激での細胞内情報伝達系の検討による EDG 受容体作働薬・拮抗薬の評価系の確立

(1) HUVEC を SIP で刺激した際の ERK/MAPK の活性化

血清飢餓後の HUVEC を SIP 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(百日咳毒素)感受性であった。また、 β ARK-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、 $G_{i\beta}$ 依存性にERKが活性化されていることを明らかにした。PP2(チロシンキナーゼ抑制薬)とCsk(C-terminal Src kinase)のアデノウイルスによる強制発現では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 $G_{i\beta}$ 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。

EDG受容体拮抗薬の探索と合成

(1) EDG3アンタゴニストATZ-1の関連誘導体合成

13年度の研究により、EDG3アンタゴニストである2-デシルチアゾリジン誘導体(ATZ-1)を市販のAvailable Chemical Directory(ACD)データベース(MDL, USA, 216,599化合物)の*in silico*スクリーニングにより見出している。14年度はさらに、ATZ-1の活性向上と構造活性相関情報の収集を目的とした関連誘導体の合成を種々システインとアルデヒドの縮合反応により行った。

ATZ-1のアルキル鎖を変換した誘導体群、フェニル基を導入した誘導体群、およびチアゾリジン環を6員環のチアジナンに拡大した誘導体群をそれぞれ合成した。それらの中から、*m*-ヘプチルフェニルチアゾリジン誘導体(PTZ-1)にATZ-1を上回るEDG3アンタゴニスト活性が見出された。PTZ-1のフェニル基はS1Pの二重結合と類似の役割を果たすミメティクスである。フェニル基の導入によりEDG3アンタゴニスト活性を向上させることができた。

(2) EDG3アンタゴニストファーマコファーモデルの作成

ATZ-1およびPTZ-1関連誘導体の構造活性相関情報を基にして、EDG3アンタゴニストファーマコファーモデルの作成を行った。すべての活性誘導体のコンフォメーション解析を行い、それらの重ね合わせ解析を行った。最も重なり合う安定コンフォメーションを導く、それらの構造的な要求を考察してEDG3アンタゴニストファーマコファーモデルを構築した。このモデルでは、アルキル鎖の疎水性相互作用が二つのHYDとして表現されている。EDG3アンタゴニストファーマコファーモデルを用いて、さらなる*in silico*スクリーニングを行うことにより、より優れたEDG3アンタゴニストを見出すことができた。このアンタゴニストは10 μ MにてHUVECsのS1P刺激によるERKのリン酸化を阻害したことから、細胞増殖抑制作用が期待できる。現在、この化合物の関連誘導体を合成し、構造活性相関情報を収集すると共に、EDG2, 4, 5および7サブタイプ選択性評価を進めている。

(3) ドッキングスタディによるEDG3-EDG3アンタゴニスト相互作用の検討結果

S1PおよびPTZ-1とEDG3ホモロジーモデルとのドッキングスタディを行い、EDG3アゴニストの活性コンフォメーションとEDG3アンタゴニストの活性コンフォメーションの比較を行った。

S1PはARG114およびGlu115との相互作用により、膜貫通領域の3rd helix(TM-3)に沿ってアルキル鎖が位置しており、アルキル鎖の末端がTyr92とTrp256の π - π スタッキング作用によって安定化されて

いると考えられた。一方、PTZ-1 は TM-2-TM-3 間の細胞外可変領域のチアゾリジン環が EDG3 アンタゴニストの活性コンフォメーションを規定している。PTZ-1 のアルキル鎖は Tyr92 と疎水性相互作用しており、Tyr92 が EDG3 アンタゴニスト活性発現に重要な役割を果たしていると考えられた。

(4) EDG1 及び EDG3 をターゲットとした化合物ライブラリーランダムスクリーニング

評価した 7,250 化合物中で、ヒット化合物 (10 μ M での EDG アンタゴニスト活性) は 141 化合物であった。これらの化合物の大半は *in silico* スクリーニングから見出された EDG アンタゴニストとは構造的特徴が全く異なるものであった。

4. 考 察

7 回膜貫通型受容体の拮抗薬はこれまでアドレナリン受容体・アンジオテンシン受容体拮抗薬に代表されるように、薬効の高い薬剤が臨床で使用されている。EDG 受容体も 7 回膜貫通型受容体に分類され、拮抗薬が開発された場合には効果の鋭い薬剤が生まれることが期待される。本研究では、EDG 受容体作働薬・拮抗薬の開発を目的として、その開発を円滑に進めるための評価系の確立と実際にスクリーニングを行い新規 EDG 受容体関連薬剤を開発している。

HUVEC を用いた細胞内情報伝達系の検討では S1P 刺激により ERK/MAPK の活性化とアダプター蛋白質 Crk のリン酸化を認めた。ERK/MAPK の活性化により細胞増殖が予想され、また Crk が S1P 依存性の情報伝達系に関与することから細胞運動・遊走の亢進が考えられた。実際、優勢劣性変異型 Crk を HUVEC に導入して S1P 依存性の細胞の運動能を調べたところ野生型に比較して、有意に低下していることがわかった。HUVEC 細胞はこれまでの研究で EDG1, EDG3 を発現しているため、EDG1, EDG3 の両方の情報伝達系の結果を反映しており、EDG 受容体の 1-8 までの特異的作働薬・拮抗薬の開発のスクリーニングには適さないと考えた。このため、EDG1-8 までをおのおの発現する cell line が必要と考え、Hela-EDG1 株 Hela-EDG3 株を作製し、スクリーニングを開始した。

ライブラリーランダムスクリーニングではヒット化合物 (10 μ M での EDG アンタゴニスト活性) 141 化合物を得ることができた。ライブラリー規模が小さくとも、多様な化合物をスクリーニングすることにより効率的に EDG アンタゴニストに関する構造活性相関情報を入手することができた。このなかで、EDG-3 特異的に阻害活性のあるものについて、HUVEC を用いて ERK/MAPK の活性阻害を検討したところ、完全ではないものの抑制効果を認めた。生体で薬剤として用いる場合には組織・臓器により EDG 受容体の発現パターンが多様であることが予想され、動物モデルを使っての個体での効果判定が必要であると考えられた。

ATZ-1 の関連誘導体により、EDG3 アンタゴニスト活性の向上した PTZ-1 を見出した。PTZ-1 は S1P の二重結合部分のミメティクスを導入しており、EDG アゴニストである S1P の構造をある程度模倣することによりアンタゴニスト活性の向上を果たすことができた。

ATZ-1 および PTZ-1 の構造活性相関情報を収集し、EDG3 アンタゴニストファーマコファーモデルを構築した。このモデルは EDG3 アンタゴニストの構造活性相関情報を反映させたことにより EDG アンタゴニストを見出す能力が向上していると考えられる。このモデルを用いて、さらなる *in silico* スクリーニングを行い、S1P 刺激による ERK 阻害作用を有する化合物を見出すことができた。

また、ドッキングスタディの結果、EDG3 アンタゴニスト PTZ-1 のアルキル鎖の末端は Tyr92 と相互作用していると考えられた。また、S1P の Tyr92 と Trp256 の相互作用は PTZ-1 には認められないことから、アゴニスト活性発現に重要な役割を果たしていると考えられた。

5. まとめ

血管内皮細胞を S1P 刺激した時の情報伝達系を検討し、HUVEC では ERK/MAPK の活性化と Crk のリン酸化を認めた。EDG1-8 の受容体特異的拮抗薬のスクリーニング系として有用な細胞株 Hela-EDG1, Hela-EDG3 を得た。この細胞株を用いてランダムスクリーニングとファーマコファーモデルで予想し合成した薬剤

の効果調べた。数種類の EDG-3 拮抗薬候補を得た。

6. 研究発表

1. Koide Y, Hasegawa T, Takahashi A, Endo A, Mochizuki N, Nakgawa M, and Nichide A. Development of novel EDG3 antagonists using a 3D database search and their structure-activity relationships. *J Med Chem.* 45: 4629-4638, 2002
2. Nagashima KI, Endo A, Ogita H, Kawana A, Yamagishi A, Kitabatake A, Matsuda M, Mochizuki N. Adaptor protein Crk is required for ephrin-B1-induced membrane ruffling and focal complex assembly of human aortic endothelial cells. *Mol. Biol. Cell.* 13: 4231-4242, 2002
3. Endo A, Nagashima K, Kurose H, Mochizuki S, Matsuda M, Mochizuki N. Sphingosine 1-phosphate induces membrane ruffling and increases motility of human umbilical vein endothelial cells via vascular endothelial growth factor receptor and CrkII. *J Biol Chem.* 277: 23747-54, 2002

7. 知的所有権の取得状況

特になし。