

平成15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

目 次

課題番号

<p>20030895A KH21009</p>	<p>リン脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用</p>	<p>西島正弘 …… 1</p>
<p>896A KH21010</p>	<p>低酸素センサーを介する虚血性および変性性神経疾患の機序解明と新規治療薬開発</p>	<p>芝崎 太 …… 6</p>
<p>897A KH21011</p>	<p>細胞内情報伝達分子を標的とした抗ウイルス剤および抗癌剤の開発</p>	<p>松田道行 …… 19</p>
<p>898A KH21012</p>	<p>抗動脈硬化性リポ蛋白質HDLの代謝制御機構</p>	<p>新井洋由 …… 25</p>
<p>899A KH21013</p>	<p>ゲノム修復と細胞分裂に関連する因子の構造機能解析と応用に関する研究</p>	<p>葛西正孝 …… 33</p>
<p>900A KH21014</p>	<p>難治性疼痛に関与するATP受容体の機能解析と医療への応用</p>	<p>井上和秀 …… 39</p>
<p>901A KH21015</p>	<p>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</p>	<p>望月直樹 …… 47</p>
<p>902A KH21016</p>	<p>天然物由来シグナル伝達制御物質の探索と創薬への応用に関する研究</p>	<p>上原至雅 …… 51</p>
<p>903A KH21017</p>	<p>肥満／糖尿病発症予防のためのターゲット遺伝子の同定と制御法の開発</p>	<p>江崎 治 …… 55</p>
<p>904A KH21018</p>	<p>ゲノム情報にもとづいた移植免疫抑制にかかわる遺伝子の検索と創薬への応用に関する研究</p>	<p>絵野沢 伸 …… 59</p>
<p>905A KH21019</p>	<p>神経・免疫・内分泌相関による生体防御機構の解明と創薬</p>	<p>田平 武 …… 62</p>
<p>906A KH21020</p>	<p>レクチン機能を利用した血管における生体防御システムの解明と創薬への応用</p>	<p>若宮伸隆 …… 67</p>
<p>907A KH21021</p>	<p>感染症に関連した免疫異常の解析と新規制御物質の開発</p>	<p>鈴木和男 …… 74</p>
<p>908A KH21022</p>	<p>自己免疫性膵炎発症に関連するIgG 4型抗体の認識する自己抗原の検索、ならびに特異的診断システムの開発</p>	<p>川 茂幸 …… 84</p>
<p>909A KH21024</p>	<p>動物細胞におけるラフト等の脂質膜ドメインを介した生体機能調節機構の解析と疾病関連因子探索への応用</p>	<p>北川隆之 …… 89</p>
<p>910A KH21025</p>	<p>新規サイトカインの炎症性疾患における役割の解析と創薬への応用</p>	<p>山越 智 …… 95</p>
<p>911A KH21026</p>	<p>マイクロアレイDNAチップを用いた各種病態関連発現遺伝子の解析</p>	<p>辻本豪三 …… 104</p>
<p>912A KH21027</p>	<p>細胞死をもたらすストレスシグナル伝達機構の解析および生体防御機構の解明</p>	<p>桃井 隆 …… 111</p>
<p>913A KH22071</p>	<p>ウイルスの侵入および発芽過程を標的とした次世代抗インフルエンザ薬の開発</p>	<p>鈴木康夫 …… 118</p>
<p>914A KH22072</p>	<p>サイトカインシグナル制御分子による慢性関節リウマチの治療薬の開発</p>	<p>吉村昭彦 …… 121</p>
<p>915A KH22073</p>	<p>T細胞の活性化およびヘルパーT細胞サブセットの分化を特異的に制御する手法の樹立</p>	<p>宮武昌一郎 …… 125</p>
<p>916A KH22082</p>	<p>変異型HB-EGFノックインマウスによる循環器疾患の解析</p>	<p>目加田英輔 …… 133</p>

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

研究要旨 S1Pが血管内皮細胞の走化性を誘導することを明らかにした。EDG3/S1P3受容体拮抗薬のリード化合物を得て、この構造変換体を合成した。また、S1Pによる血管新生誘導に対しての薬剤効果判定可能なマウスを作製した。

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

A. 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S1P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。

B. 研究方法

血管内皮細胞のS1P刺激による細胞内情報伝達系の活性化機構

(1) 培養細胞—HUVEC(ヒト臍帯静脈内皮細胞)を継代培養し(5継代まで)とHAEC(ヒト大動脈血管内皮細胞)を用いた。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。

(2) Rap1の活性化の検討—HAECをS1P 100 ng/mlの濃度で刺激した際のRap1の活性化をGST-RaiGDS(Rap1-binding domain)のpull-down法で調べた。また、時間的空間的活性化を調べるためにRap1の活性化モニターリングプローブRaichu-Rap1をtransfectして、マイクロピペットからS1Pで細胞を刺激し、タイムラプス顕微鏡で観察した。

(3) 血管内皮細胞遊走時におけるRap1の必要性の確認—単層培養した血管内皮細胞をピペットの先で傷つけることにより、細胞の運動を一方方向性に決定できる。この際に間隙を埋めるように遊走する内皮細胞がRap1の活性化が必要か否かを調べる目的でRap1の水解促進因子Rap1GAPIIをアデノウイルスで感染させて、その運動性を検討した。

EDG受容体拮抗薬・作働薬のスクリーニングと合成

(1) EDG安定発現Hela細胞株の構築
EDG1/S1P₁, EDG5/S1P₂, EDG3/S1P₃, EDG2/LPA₁, EDG4/LPA₂またはEDG7/LPA₃をそれぞれ安定発現させたHela細胞株を構築した。

(2) EDG安定発現Hela細胞株を用いたセルベースドアッセイ

評価化合物添加時のS1P刺激による細胞内カルシウムイオン濃度($[Ca^{2+}]_i$)上昇の抑制を指標としてEDG拮抗作用の評価およびEDGサブタイプ選択性の評価を行った。 $[Ca^{2+}]_i$ の濃度変化は1波長励起蛍光カルシウム指示薬Calcium Green-1(Molecular Probe)によってS1P添加後、30秒間追跡した。

(3) EDG拮抗剤のランダムスクリーニング

EDG1/S1P₁, EDG5/S1P₂またはEDG3/S1P₃をそれぞれ安定発現させたHela細胞株を用いて、多様性を考慮して選択された低分子8,000化合物ライブラ

リーのランダムスクリーニングを行った。測定は 96 穴プレートフォーマットで、マルチプレート用自動蛍光測定装置 Fluoroscanner Ascent FL (Labsystems) を用いて行った。評価化合物濃度 10 μ M で S1P による $[Ca^{2+}]_i$ の濃度上昇を 30% 以上抑制する化合物をヒット化合物とした。

(4) EDG3/S1P₃ 拮抗剤薬理活性モデルの作成および *in silico* スクリーニング

EDG3/S1P₃ 拮抗作用を表す薬理活性モデルの作成はソフトウェア Catalyst (Accelrys) を用いて行った。Catalyst を用いて、拮抗剤のコンフォメーション空間の網羅解析、薬理活性モデル解析および化合物 3 次元データベースに対して仮想的に薬理活性作用を判定する (*in silico* スクリーニング) を行った。

(5) EDG3/S1P₃ ホモロジーモデルの構築およびドッキングスタディ

EDG3/S1P₃ ホモロジーモデルの構築はタンパク質モデリングソフトウェア InsightII (Accelrys) を用いた。ヒト EDG3/S1P₃ 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) をテンプレートとして構築した。構造最適化は高温分子動力学計算 (CHARMM) により行った。評価化合物と EDG3/S1P₃ のドッキングスタディは、Arg114 の ω アミノ基と、評価化合物の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り行った。

血管新生可視化モデルマウスでの拮抗薬・作働薬の評価系の確立

(1) 血管内皮細胞特異的プロモーター VE-Cadherin promoter 制御 Cre 発現マウスの作製—VE-Cadherin promoter は P. Huber 博士より頂いた VE-Cad 遺伝子上流-2.5kb の DNA に Cre recombinase cDNA を繋ぎ合わせたものを transgene とした。この DNA を ES 細胞に挿入して得たマウスを VE-Cad-Cre マウスとした。

(2) マウス角膜での血管新生のモニターリング—VE-cad-Cre/EGFP マウスの角膜にポケットを作製し、そこに Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) を含有する pellet を挿入し、数日後の血管形成を蛍光実体顕微鏡で観察して、検討した。S1P 100 nM の pellet でも同様に血管新生の誘導の有無も調べた。

(倫理面への配慮)

動物の取扱いは各施設の動物実験取り扱い規約に従って行った。

C. 研究結果

S1P 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

(1) HUVEC を S1P で刺激した際の低分子量 Rap1 の活性化

血清飢餓後の HUVEC を S1P (100 nM) で刺激すると 5min を peak にした Rap1 の活性化を認めた。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。

S1P 刺激により細胞膜の進展が見られることが

ら、Rap1 の活性化の局在を Rap1 の活性化を可視化できプローブ (Raichu-Rap1) で観察した。このプローブは Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) の原理を基本に作製しており、FRET 上昇が Rap1 の活性化の指標となるように工夫している。

培養 HAEC 細胞にマイクロピペットで S1P を投与すると投与した部位での細胞膜のラップリングが観察できた。マイクロピペットの位置を変えて、S1P 刺激を行うと、その部位でのラップリングが見えることから S1P は細胞遊走のきっかけとなる細胞膜の進展の誘導にかかわることが示唆された。

このとき Rap1 は細胞膜のラップリング部位で活性化していることがわかった。

(2) S1P 刺激による活性化 Rap1 の標的分子の同定 Rap1 は Ras 蛋白質と標的分子を共有すると考えられている。Rap1 結合蛋白質として RAPL 分子が同定されていたが、血管内皮細胞での局在や発現は調べられていなかった。

RAPL が微小管に局在することがわかった。これは EGFP-tag 付き RAPL を血管内皮細胞に発現すると微小管中心から末梢の微小管に EGFP-RAPL が局在することで明らかになった。S1P 刺激によるラップリングに向かって微小管が形成されることから S1P-Rap1 活性化—RAPL へのシグナルが走化性を決定する細胞極性に重要であることが示唆された。

(3) 細胞遊走時の極性決定に Rap1 活性化は不可欠 wound healing のために血管内皮細胞が遊走するが、rap1GAPII を発現するアデノウイルスを感染させて、Rap1 を不活性化状態にすると細胞遊走による wound healing が抑制された。これは Rap1 の活性化が極性の形成に不可欠であることを示唆した結果である。

EDG 受容体拮抗薬・作働薬のスクリーニングと合成

(1) 新規低分子 EDG3/S1P₃ 拮抗剤構造の探索

我々は S1P の構造を基にした合理的化合物設計手法および *in silico* スクリーニング手法により、すでに EDG3/S1P₃ 拮抗剤である PTZ-1 (Figure 1) を見出している。S1P の構造から *in silico* スクリーニング手法によって導かれた PTZ-1 は溶解性に問題があり、さらなる構造最適化は困難であった。そこで、PTZ-1 の EDG3/S1P₃ 拮抗作用に関与すると考えられる官能基の 3 次元的空间配置を薬理活性モデル (ファーマコフォアモデル) として作成し、この薬理活性モデルを活用して、200 万化合物の市販化合物データベースに対して *in silico* スクリーニングを実施した。その結果、PTZ-1 よりさらに優れた EDG3/S1P₃ 拮抗作用を有するフェニルアラニン誘導体を見出すに至った。(Figure 1) これらのフェニルアラニン誘導体は PTZ-1 と比較して溶解性が改善しており、またアミノ酸由来のドラッグライクな骨格を有していることからさらなる構造最適化に供することができると考えられる。

(2) ランダムスクリーニングによる EDG/S1P 拮抗剤の探索

EDG1/S1P₁, EDG5/S1P₂ または EDG3/S1P₃ をそれぞれ

れ安定発現させた HeLa 細胞株を用いて、8,000 化合物ライブラリーの EDG/S1P 拮抗作用のランダムスクリーニングを行った。初期ヒット化合物として得られた化合物から、受容体選択性に欠ける化合物や細胞毒性を有する化合物等を除去し、最終的に 6 化合物を EDG3/S1P₃ 拮抗剤として見出した。一方、EDG1/S1P₁ または EDG5/S1P₂ 拮抗剤として有望な化合物は見出すことができなかった。



Figure 1 *In silico* 手法による新規 EDG3/S1P₃ 拮抗剤構造の探索

(3) EDG3/S1P₃ 拮抗剤フェニルアラニン関連誘導体の合成

In silico スクリーニングによって見出された EDG3/S1P₃ 選択的拮抗剤として有望なフェニルアラニン誘導体の関連誘導体の合成を行った。合成には合理的化合物設計手法を採り入れ、EDG3/S1P₃ ホモロジーモデルと新規フェニルアラニン誘導体のドッキングスタディを行い、拮抗作用発現の考察および活性向上の可能性を評価した。また、化合物の合成に関しては、半自動合成装置 QUEST210 (Argonaut Technologies) を用いて、合成の効率化を図った。これらの検討の結果、10 μM 濃度で 80% 以上の EDG3/S1P₃ 選択的拮抗作用を有するフェニルアラニン誘導体群を得るに至った。さらにこれらの誘導体には MAPK/ERK 阻害作用が認められたことから、治療薬としての開発の可能性を鑑みて現在、特許出願を準備中である。今後、更なる拮抗作用の向上によって治療薬として供することが可能な薬剤と成り得ると考えられる。

(4) 新規 EDG1/S1P₁, EDG5/S1P₂, EDG3/S1P₂ 拮抗作用評価系の構築

これまで EDG 拮抗剤の評価系として、EDG1/S1P₁, EDG5/S1P₂ または EDG3/S1P₃ をそれぞれ安定発現させた HeLa 細胞を用いてきた。HeLa 細胞系は操作・維持管理に優れたコストパフォーマンスの良い評価系ではあるが、内因性の EDG/S1P 受容体の影響を受け易く、これまでの検討によって、高次の拮抗作用評価は難しいことが判明した。そこで、より正確な EDG/S1P 拮抗作用の評価を目的として、EDG1/S1P₁, EDG5/S1P₂ または EDG3/S1P₃ をそれぞれ安定発現させた CHO-K1 細胞系を構築した。さらに蛍光カルシウム指示薬には、洗浄操作を必要としない 1 波長励起蛍光カルシウム指示薬 Calcium3 (Molecular Device) を採用してスループットの向上を図った。また、さらなる高次評価のために、2 波長励起蛍光カルシウム指示薬である Fura2 (Molecular Probe) を用いた定量的評価系も併せて構築した。

EDG 受容体拮抗薬・作働薬の個体での評価系の構築

VE-Cadherin promoter 制御 Cre 発現マウス

VE-Cadherin promoter は Tie-2 promoter よりもさらに血管内皮細胞特異的に機能すると考えられている。VE-Cadherin Cre 発現マウスの作製に成功し

た。EGFP レポーターマウスと交配により予想していたように、眼球の血管でも観察可能な血管特異的に EGFP を発現するマウスを作製することができた。このマウスは生後 3 週間までは血管に EGFP を発現しているが、5 週目頃から EGFP が消失する。

昨年作製した Tie-2-Cre/EGFP マウスは生涯、血管系で EGFP を発現するのに対して、VECad-Cre/EGFP マウスはその発現がなくなることが特徴的である。冠状動脈の ligation による心臓の虚血状態でも新生血管が形成されるが、このような状態でも EGFP 陽性の血管が出現するために、新生血管のモニタリングには最適のモデルマウスを作製できた。Embryogenesis の vasculogenesis と病態での angiogenesis の両方のモニターが可能となった。成獣ではまったく EGFP 陽性血管が消えているために、角膜を用いた増殖因子依存性の血管新生観察が容易であった。

VEGF を positive control にして cornea の血管新生を実体蛍光顕微鏡で調べたところ、S1P でも血管新生の誘導がおこることがわかった。この実験系の確立により新規薬剤の検討が可能になった。

D. 考察

HUVEC を用いた細胞内情報伝達系の検討では S1P 刺激により Rap1 の活性化を認めた。Rap1 の活性化の意義について、調べたところ微小管に局在する Rap1 結合蛋白質との結合が誘導される可能性が示唆された。

S1P がこれまで膜のラフリングを起こし、走化性を高めると言われていたが、われわれはタイムラプスで観察して実際にピペットの先端からの S1P による刺激での限定された範囲でのラフリング形成を可視化できた。このラフリング部位にめがけての微小管の形成促進もおこることから S1P-Rap1 活性化が微小管を捉える極性の形成に貢献することを示した。

S1P-EDG 受容体系が血管内皮細胞の走化性の決定に重要であることが判明し、EDG 受容体作働薬・拮抗薬の薬効の判定に利用できるアッセイ系を確立できたと考える。S1P が血管新生において、血管内皮細胞の遊走を促進させる可能性が考えられた。とくにこれまで、心臓の形成においても EDG 受容体の活性化が必要と考えられたので、心臓・血管系からなる循環器系の構築に S1P-EDG 系が特に重要であると考えた。

PTZ-1 と比較して、EDG3/S1P₃ 拮抗作用に優れたフェニルアラニン誘導体群を見出すことができた。これらの誘導体はリガンドである S1P の構造から離れた直鎖脂肪酸構造を有さない低分子のドラッグライク化合物である。合理的化合物設計手法の活用により拮抗剤に関する構造的な情報が無くとも、ドラッグライクな拮抗剤を得ることができた。一方、ランダムスクリーニングによって構造的に異なる EDG3/S1P₃ 拮抗剤 6 化合物を見出すことができた。これまで、EDG1/S1P₁、EDG5/S1P₂ または EDG3/S1P₃ のサブタイプ別に EDG/S1P 拮抗剤または作働薬の評価を行った結果、EDG3/S1P₃ 拮抗剤として有望な化合物群を見出すことができた。一方、EDG1/S1P₁、EDG5/S1P₂ および EDG3/S1P₃ に対して一様に拮抗作用を有する非選択的 S1P 拮抗剤はランダムスクリーニングによっていくつか見出せたものの、EDG1/S1P₁ 拮抗剤または EDG5/S1P₃ 拮抗剤として有望な化合物は見出すことができなかった。EDG3/S1P₃ 選択的拮抗剤の周辺誘導体の評価による構造活性相関の解析は、より有望な EDG3/S1P₃ 選択的拮抗剤の開発のみならず、非選択的 S1P 拮抗剤の構造との比較により、EDG1/S1P₁ または EDG5/S1P₃ 選択的拮抗剤の開発にも有用な知見を与えることが期待できる。また、新たに開発した高次評価系によって選択性の高い EDG3/S1P₃ 拮抗剤の開発がさらに容易になると考えられる。低分子による EDG3/S1P₃ 選択的拮抗剤の報告は未だ無く、本研究により意義ある成果が得られた。

血管内皮細胞は S1P により運動性が亢進することから、S1P 刺激により血管新生が促進されると考えられている。本研究で開発中の EDG 受容体拮抗薬・作働薬の効果を S1P の血管新生に対する効果で確認できる動物モデルの作製を行った。

血管新生を定量的に調べるには血管新生を可視化することが必要であり、血管特異的に GFP を発現するマウスを作製することが最適であると考えた。血管特異的に Cre を発現するトランスジェニックマウスで VE-Cad Cre マウスを作製した。このマウス loxp-stop-loxp-EGFP のレポーターマウスを交配させて、VE-Cad/EGFP マウスを作製することができた。

本マウスの角膜内での S1P による血管新生作用を可視化できたので本マウスを用いれば、阻害剤・作働薬の効果を検討できることになった。

E. 結論

(1) 血管内皮細胞では S1P-EDG-Rap1-RAPL によるシグナルが細胞の走化性・極性の形成に重要である。

(2) EDG3/S1P₃ 拮抗剤として有望な化合物群を *in silico* スクリーニング手法およびランダムスクリーニング手法によって見出すことができた。特にフェニルアラニン誘導体は MAPK/ERK 阻害作用を有する低分子ドラッグライクな化合物であり、EDG3/S1P₃ 拮抗剤による治療薬としての可能性を明らかにするものであった。

(3) マウス角膜で血管新生を解析できるシステムを確立した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Endo A, Fukuhara S, Masuda M, Ohmori T, Mochizuki N. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor receptor-2(VEGFR-2) identifies a central role for VEGFR-2 in human aortic endothelial cell responses to VEGF. **J. Receptor Signal Transduction** 23: 239-254, 2003

Kogata N, Masuda M, Kamioka Y, Yamagishi A, Endo A, Okada M, Mochizuki N. Identification of fer tyrosine kinase localized on microtubules as a platelet and endothelial cell adhesion molecule-1 phosphorylating kinase in vascular endothelial cells. **Mol. Biol. Cell** 14: 3553-3564, 2003

Kurokawa K, Itoh RE, Yoshizaki H, Ohba Y, Nakamura T, Matsuda M. Co-activation of Rac1 and Cdc42 at Lamellipodia and Membrane Ruffles Induced by Epidermal Growth Factor. **Mol. Biol. Cell**, In press

2. 学会発表

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

“S1P₃ 受容体拮抗薬”, 出願中

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

平成15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16年9月30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