

動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発

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: S1P3 受容体拮抗薬のリード化合物として ID102455 を得た。S1P3 は心臓・血管内皮細胞・平滑筋細胞に発現していた。また、S1P 刺激は内皮細胞の運動制御を Rap1 を介して行っていることを明らかにした。

分担研究者

- (1) トーアエイヨー株式会社製品開発部
小出 友紀
- (2) 北海道大学医学部分子細胞病理学
澤 洋文
- (3) 国立循環器病センター研究所循環器形態部
福原 茂朋

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、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 S1P 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 S1P 受容体の作働薬・拮抗薬を開発することを目的とする。

スフィンゴシン1-リン酸(S1P)は活性化血小板から分泌され、S1P受容体(これまでに5つの受容体; S1P₁-S1P₅が明らかにされている)を発現する血管内皮細胞と血管壁細胞に作用することで生物学的作用を示す。S1P₃受容体はなかでもRhoを活性化することで細胞運動を抑制すると考えられており、細胞遊走を促進するRacを抑制するS1P₂とは機能が違うと考えられている。本研究ではこのS1P₃受容体の拮抗薬を開発し、動脈硬化症の発症におけるS1Pの機能を明らかにするとともに治療に結びつけることを目的とする。

S1P₁-S1P₅のなかでも S1P₃ の特異的拮抗薬の開発に焦点をあわせている。S1P₃ 特異的シグナルの解明もあわせて行うために S1P₃ 受容体の臓器ごとの分布についても調べる。

B. 研究方法

(1) S1P₃/EDG3 受容体拮抗薬のスクリーニングと候補化合物の合成

- ①スクリーニングに用いた細胞: S1P₁/EDG1, S1P₂/EDG5 または S1P₃/EDG3 をそれぞれ恒常発現させた CHO-K1 細胞を用いた。
- ②スクリーニング方法: S1P による [Ca²⁺]_i 上昇の抑制作用を、FLIPR® Calcium 3 Assay Kit (Molecular Devices Corporation, CA, USA) また

は Fura-2™ (Molecular Probes, Inc., OR, USA) に用いて測定した。

③有望な候補化合物の関連誘導体は、有機合成装置 ChemiStation™ PPW2000、High-Performance FLASH Chromatography (HPFC) system Horizon™ または Quad3™ を用いて行った。

④ *In silico* スクリーニング:

Catalyst® を用いて、構造活性要求を表す薬理活性モデルを作成し、市販 2,723,883 化合物から成る、統合データベース 2004 (Namiki Shoji Co., Ltd., Tokyo, Japan) を対象に *in silico* スクリーニングを行った。

(2) 合成化合物・スクリーニングで抽出した化合物の検定

- ① CHO-K1 S1P₁ S1P₂ または S1P₃ 株をもちいた。
- ② S1P 依存性の ERK/MAPK の活性化の抑制効果をそれぞれの細胞株で検討して、受容体特異性を確認した。

(3) 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の解明

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) 培養液を使用した。

②Rap1 の活性化の検討: HAEC、HUVEC を S1P 100 ng/ml の濃度で刺激した際の Rap1 の活性化を FRET (Fluorescence resonance energy transfer) の原理を基にした活性化可視化プローブを用いて調べた。Rap1 の活性化と細胞の運動・形態変化を観察するために FRET 顕微鏡と time-lapse 顕微鏡をあわせて使用した。

(4) 動物個体での S1P の機能評価のためのマウスの作製 (骨髄からの血管新生にかかわる細胞への S1P の関与をモニターリングするマウスの作製) Vascular Endothelial cadherin

の二つの分子のプロモーター依存性に Green fluorescent protein (GFP) を発現するマウスを作製した。このマウスを用いて種々の血管新生誘導条件化 (虚血・妊娠) における骨髄の血管前駆細胞の発現を FACS で解析した。

(5) S1P₃ 受容体の発現

①組織：北海道大学附属病院でのヒト剖検症例のうち心疾患を認めない症例の固定標本を用いた。
②免疫染色方法：10% goat normal serum に 30 分反応させた後、Rabbit anti-Human Sphingolipid Receptor (Edg3/S1P3) (US Biological 社, S5451-02) を 200 倍に希釈 (5 microgram/ml) して 4°C overnight で反応させた。反応後 0.02% Tween20/PBS で洗浄した。免疫反応の検出は Avidin-Biotin peroxidase complex 反応で行い Diaminobenzidine で発色を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト材料は北海道大学医学研究科遺伝子解析審査委員会において承諾された遺体の解剖および組織の保存と使用に関する承諾書の内容に基づき、匿名化して解析した。S1P3 受容体の発現の検索は発現を検索するものであり、遺伝性疾患の解析を目的とはしておらず倫理面に関しては問題が無いと判断した。動物実験については各分担研究者の所属する施設の規定と委員会の承認を得ておこなった。

C. 研究結果

S1P3 拮抗薬のスクリーニング結果と合成

7,250 化合物の市販化合物ライブラリーに対して S1P₃/EDG3 受容体拮抗薬のスクリーニングを行い、S1P₃/EDG3 受容体拮抗薬として有望な ID102455 (IC₅₀ < 0.5 μM) を得た。

スクリーニングによって得られたこれらの化合物群の定量的活性値に基づく構造活性相関情報を用いて、S1P₃/EDG3 受容体拮抗作用の 3 次元薬理活性空間を考察した Pharmacophore model を作成した。同モデルを用いて *in silico* スクリーニングを実施し、S1P₃/EDG3 受容体拮抗作用が期待できる化合物を購入して *in vitro* スクリーニングに供した。結果、有望な S1P₃/EDG3 受容体拮抗薬として ID6754 (IC₅₀ < 1 μM) を見出した。

ID102455 の特異性の検定

CHO-K1 の S1P 受容体株 (S1P1, S1P2, S1P3) を用いて S1P 依存性の ERK/MAPK の活性化の阻害効果を調べたところ ID102455 は S1P3 のみ選択的に阻害することがわかった。

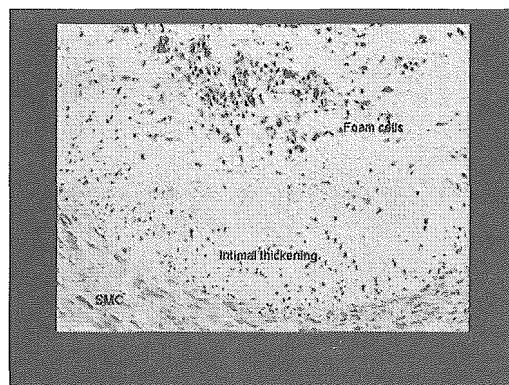
S1P の生物学的作用とくに血管内皮細胞への影響：S1P による細胞運動と細胞接着の亢進

100 nM の S1P 刺激で HUVEC, HAEC ともに顕著な細胞膜ラフリングを示した。マイクロペットの先端から S1P を放出することで細胞の局所での Rap1 の活性化がおきることがわかった。Rap1 の活性化は膜の伸展部位でおきており、またエバネッセント顕微鏡を用いて細胞接着斑での Rap1 の活性化も検討したところ、新に作られる接着斑と消失するまでの接着斑で Rap1 の活性化がおきることをわかった。

S1P3 受容体の発現

左室の心筋および心筋内の小動脈には、S1P3 受容体に対する明らかな免疫陽性反応が認められた。また図に示すように心外膜における冠状動脈の平

滑筋、内皮細胞および内膜肥厚部に集簇している



foamy macrophage でも S1P3 受容体の発現が観察された。

他の臓器では脾臓の小血管の平滑筋に S1P3 受容体に対する陽性反応が認められ、また、大腸では陰窩上皮および小血管に S1P3 受容体に対する免疫陽性反応が認められた。また大腸の間質内の平滑筋に S1P3 受容体の発現が認められた。

血管前駆細胞のモニターリングマウスの作製

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胎児期の血管形成 (vasculogenesis と angiogenesis) の両方で GFP 陽性になる細胞を検出した。血管を構成する細胞だけでなく血球への分化を示す細胞も陽性になった。胎児期の A/GM 領域の血管内皮細胞が血球形成にかかわる部位での GEF の発現を認めたため、胎児期の angioblast に発現していることが示唆された。このマウスは 5 週目頃から EGFP が消失するが 0 虚血などの血管新生誘導刺激をおこすと、骨髄内に GFP 陽性細胞が出現し、さらにこの細胞群が新生血管に組み込まれていく所見を得た。つまり、骨髄内に成人でも hemangioblast が出現し、これをモニターリング可能にした。S1P 刺激による血管前駆細胞の誘導、あるいは虚血部位への促進効果なども動物個体で検討可能になった。

D. 考察

ID102455 はドラッグライクな構造を有しておらず、構造修飾による活性向上およびドラッグライク構造への変換が必要とされた。また、構造化相関をもとに選択した ID6754 (IC₅₀ < 1 μM) を見出した。活性向上を図った関連誘導体の合成を行った。その結果、有望な S1P₃/EDG3 受容体拮抗薬として、TY-52162 (IC₅₀ < 0.5 μM) を見出した。ID6754 および TY-52162 は S1P₁ および S1P₂ 受容体には顕著な拮抗活性は示さず、S1P₃ 受容体に高い選択性を有していた。

S1P3 の選択的阻害効果についての検討はトーアエイヨーでは C2+を測定することで行っており、受託研究でも ERK/MAPK の活性化の阻害を指標に検討しているのもその特異性は検証できていると

考える。

これらのリード化合物を基礎にして、さらに構造変換を行い吸収の良い製剤形態や副作用の有無の検討を行っていく予定である。

S1P の血管内皮細胞への効果についての検討で、血管新生を誘導する機序として細胞の運動方向の決定とそのメカニズムの解明を行った。

Crk-C3G-Rap1 シグナルが細胞-基質間接着に重要であることは以前から証明されていた。本研究では、S1P 刺激により Rap1 が活性化されることで接着斑で初めて Rap1 の活性化をイメージングで明らかにすることができた。S1P が血管新生・形成に不可欠であることはノックアウトマウスの研究から示唆されていたが、本研究結果で S1P 刺激が血管内皮細胞の運動-接着を制御していると判明し、不可欠である理由の一端が解明された。

成体の hemangioblast の検討ができるマウスを作成することができた。このマウスは血管新生に貢献するサイトカインを分泌する血球や直接血管に組み込まれる骨髄の血管前駆細胞を検出することができるので、S1P の血管新生誘導効果も次年度には検討可能となる。また申請血管が緑色蛍光でみることができるとともに、動物個体で S1P 誘導性の新生血管の可視化が可能になった。さらに現在開発中の薬剤の新生血管への効果なども検討ができるので、重要な進展と考える。

E. 結論

スクリーニングで ID102455 をヒットし、ドラッグライク誘導体への変換を指向した。その結果選択的 S1P₃ 受容体拮抗活性を有する ID6754 および TY-52162 を見出した。

S1P₃ 受容体が心臓と血管内皮細胞・平滑筋細胞で臓器特異的に発現していることを明らかにした。また、S1P が Rap1 を介して血管新生に不可欠な細胞の運動制御をしていることがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Qu Q, Sawa H, Suzuki T, Semba S, Henmi C, Okada Y, Tsuda M, Tanaka S, Nagashima K : Nuclear entry mechanism of the human polyomavirus JC virus like particle: role of importins and the nuclear pore complex. *J Biol Chem* 279: 27735-27742, 2004

2) Orba Y, Sawa H, Iwata H, Tanaka S, Nagashima K: Inhibition of virus production in JC virus-infected cells by postinfection RNA interference. *J Virol* 78: 7270-7273, 2004

3) Tsuda M, Makino Y, Iwahara T, Nishihara H, Sawa H, Nagashima K, Hanafusa H, Tanaka S: Crk associates with ERM proteins and promotes cell motility toward hyaluronic acid. *J Biol Chem* 279:

46843-46850, 2004

4) Henmi C, Sawa H, Iwata H, Orba Y, Tanaka S, Nagashima K: Isolation of a monoclonal antibody recognizing a cell-surface molecule as a receptor for JC virus. *Biochem Biophys Res Commun* 327: 242-251, 2005

5) Ichinohe T, Watanabe I, Ito S, Moriyama M, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H: Synthetic double-stranded RNA [poly (I:C)] combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *J Virol* 79: 2910-2919, 2005

6) Fujita H, Fukuhara S, Sakurai A, Yamagishi A, Kmioka Y, Nakaoka Y, Masuda M, Mochizuki N. Local activation of Rap1 contributes to directional vascular endothelial cell migration accompanied by extension of microtubules on which RAP1, a Rap1-associating molecule, localizes. *J. Biol. Chem.* 280: 5022-5031, 2005

7) Fukuhara S, Sakurai A, Sano H, Yamagishi A, Somekawa S, Takakura N, Saito Y, Kangawa K, Mochizuki N. Cyclic AMP potentiates VE-cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through Epac-Rap1 signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* 25: 136-146, 2005

8) Endo A, Surks HK, Mochizuki S, Mochizuki N, Mendelsohn ME. Identification and characterization of zipper-interacting protein kinase as the unique vascular smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *J. Biol. Chem.* 279: 42055-42061, 2004

9) Ohki T, Mikhailenko SV, Morales MF, Onishi H, Mochizuki N. Transmission of force and displacement within the myosin molecule. *Biochemistry* 43: 13707-13714, 2004

10) Kamioka Y, Fukuhara S, Hirofumi S, Nagashima K, Masuda M, Matsuda M, Mochizuki N. A novel dynamin-associating molecule, forming-binding protein 17, induces tubular membrane invaginations and participates in endocytosis. *J. Biol. Chem.* 279:40091-40099, 2004

11) Yoshizaki H, Ohba Y, Parrini MC, Dulyaninova NG, Bresnick AR, Mochizuki N, Matsuda M. Cell Type-specific Regulation of RhoA Activity during Cytokinesis. *J. Biol. Chem.* 279: 44756-44762, 2004

12) Ishida J, Hashimoto T, Hashimoto Y, Nishiwaki S, Iguchi T, Harada S, Sugaya T, Matsuzaki H, Yamamoto R, Shiota N, Okunishi H, Kihara M, Umemura S, Sugiyama F, Yagami K, Kasuya Y, Mochizuki N, Fukamizu A. Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. **J. Biol. Chem.** 279: 26274-26279, 2004

2. 学会発表

1) Masuo Y, Ishido M, Morita M, Oka S, Sawa H, Nagashima K, Niki E: Analysis of rat models of hyperkinetic disorder. Neuroscience 2004, the Society for Neuroscience's 34th Annual Meeting, 2004, San Diego, CA, USA

2) Sawa H, Okada Y, Suzuki T, Orba Y, Sunden Y, Henmi C, Semba S, Takahashi H, Tanaka S, Nagashima K: Human polyomavirus agnoproteins disrupts the interaction between HP1 alpha and LBR. 2nd International Conference Polyomaviruses and Human Diseases: Basic and Clinical Perspectives, 2004, Sapporo, Japan.

3) Henmi C, Sawa H, Orba Y, Tanaka S, Nagashima K: Identification of cell surface molecule as a candidate receptor for JC virus. 2nd International Conference Polyomaviruses and Human Diseases: Basic and Clinical Perspectives, 2004, Sapporo, Japan.

4) Suzuki T, Sawa H, Okada Y, Orba Y, Semba S, Nagashima K: JC virus agnoprotein dissociates Fasciculation and elongation protein Zeta I (FEZ1) from microtubules, and facilitates propagation of the viruses. 6th International Symposium on NeuroVirology, and HIV Neuroprotection Workshop, 2004, Sardinia, Italy.

5) アメリカ細胞生物学会 2004 於 ワシントン
Fukuhara S, and Mochizuki N
cAMP potentiates VE-cadherin mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through Epac-Rap1 signaling pathway.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし