

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

平成17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1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

第 1 分野

課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川 西 徹 …… 1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒 方 勤 …… 11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 …… 13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 …… 17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野 口 博 司 …… 25

第 2 分野

KH21004	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	望 月 直 樹 …… 31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田 上 昭 人 …… 35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井 上 和 秀 …… 47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃 井 隆 …… 58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小 川 誠 司 …… 66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花 田 賢 太 郎 …… 70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG 1 蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香 坂 隆 夫 …… 77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若 宮 伸 隆 …… 86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢 野 友 啓 …… 96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿 部 淳 …… 102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤 本 純 一 郎 …… 108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江 崎 治 …… 113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 …… 117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 …… 120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 ……	124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 ……	129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 ……	134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 ……	142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 ……	148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 ……	152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 ……	156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 ……	160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 ……	167
 第3分野			
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 ……	175
KH31025	生薬及び漢方処方の科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 ……	185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤 由起子 ……	194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 ……	200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用－非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立－	吉里 勝利 ……	210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 ……	218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 ……	226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 ……	235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 ……	243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 ……	252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 ……	257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ ……	261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 ……	410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 ……	418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 ……	422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 ……	428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 ……	431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 ……	437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 ……	442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 ……	452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 ……	459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 ……	464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 ……	466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 ……	471
第6分野			
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 ……	479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 ……	500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 ……	511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 ……	516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 ……	524
第7分野			
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法の確立に関する研究	乾 賢一 ……	531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 ……	540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 ……	548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

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 ID102455 の誘導体 TY-52156 を用いて S1P3 に対する効果ならびに生体でのこの薬剤の効果を検討し、冠血管拡張作用を有す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) 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター
分子病態・診断部門
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・拮抗薬を創薬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 受容体が血管内皮細胞に及ぼす作用は明らかになっていない。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

① S1P₃/EDG3 受容体拮抗薬のスクリーニングのために、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。候補化合物による S1P 由来 [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。測定機器には蛍光セルアッセイシステム FlexStation[®] II (Molecular Devices Corporation, CA, USA) を用いた。

② S1P₃/EDG3 受容体拮抗薬の候補化合物の合成 S1P₃/EDG3 受容体拮抗薬として有望な候補化合物の関連誘導体は、パーソナル有機合成装置 ChemiStation[™] PPW2000 (Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan) および、High-Performance FLASH Chromatography (HPFC) system Horizon[™] または Quad3[™] (Biotage AB and Biosystems, Uppsala, Sweden) を用いて、合成・精製の効率化を図った。

③ *In silico* スクリーニング

創薬支援ソフトウェア Catalyst[®] (Accelrys, Inc., CA, USA) を用いて、S1P₃/EDG3 受容体拮抗薬の構造活性要求を表す薬理活性モデル (Pharmacophore model) を作成し、市販化合物データベースおよび設計化合物の *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 株を使って薬剤の特異性を調べた。

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 S1P3 受容体の作用についての検討

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞を S1P で刺激した場合の S1P3 拮抗薬による ERK/MAPK の阻害効果について検討した。

(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)

血管新生には、主に既存の血管内皮細胞の分岐が

重要であるが、さらに vasculogenesis として骨髄の細胞が一部新生血管に組み込まれていることが示されている。S1P による骨髄細胞動員の可能性を確認するために、血管内皮細胞であり、かつ緑色蛍光 (EGFP) を発する細胞をマウス個体で検出するシステムを構築した。

Cre/loxP システムを用いて、血管内皮細胞特異的に Cre を発現するマウスを作製した。血管内皮細胞の特異性は Vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) のプロモーターを用いた。loxP 依存的に EGFP を発現するマウスは大阪大学宮崎純一教授から供与された。

(5) S1P 受容体ファミリー分子の組織発現

①組織：札幌東徳州会病院で承諾をいただいた検体で匿名化ができていないものについて組織を研究に使用させていただいた。

②免疫染色方法：抗体：S1P1 (Edg1), S1P3 (Edg3), S1P2 (Edg5), S1P4 (Edg6), S1P5 (Edg8) に対する抗体は過去の報告に基づいて、免疫組織学的に有用だと考えられた United States Biological 社 (Swampscott, MA) から販売されている抗体を用いた。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)

札幌市東徳州会病院において承諾された遺体の解剖に関する承諾書の内容に基づき、匿名性に重きをおいた。また今回のスフィンゴシン 1-リン酸受容体の発現の検索は臓器における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は、倫理面に関しては問題が無いと判断した。これらの配慮は日本病理学会の指針に沿うものである。

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 *in vitro* スクリーニングを行い、S1P₃ 受容体拮抗薬として有望な ID102455 を得た。しかし、ID102455 はドラッグライクな構造を有しておらず、構造修飾によるドラッグライクな構造への変換および活性向上が必要とされた。

ID102455 の分子官能基の共通性を検索条件 (2 次元構造検索) として、市販化合物データベースから、ID102455 関連誘導体化合物群を購入し、スクリーニングに供した。さらに、これらの誘導体

の構造活性相関情報を考慮して、S1P₃ 受容体拮抗薬活性向上を指向した関連誘導体の合成を行った。その結果、S1P₃ 受容体選択的拮抗薬として有望な TY-52156 を見出した。(S1P₃ IC₅₀ = 0.47 μM, S1P₁ 阻害率 21.4% (1 μM), S1P₂ 阻害率 1.3% (1 μM)) TY-52156 は S1P₁/EDG1 および S1P₂/EDG5 受容体には顕著な拮抗活性を示さず、S1P₃ 受容体に高い選択性を有していた。

心臓に対する作用

S1P₃ 受容体拮抗薬の心臓直接的作用を評価すべく、左心室内圧 (LVSP)、左心室発生圧 (LVDP)、左心室一次微分値 (LV±dP/dt)、心拍数 (HR) および冠灌流量 (CF) の測定を行った。(Langendorff 標本 (モルモット)) その結果、TY-52156 は 3 × 10⁻⁷ M において ΔCF を 11 mL/min 増加させ、直接的な冠血流増加作用が確認された。本作用は、現在、強心薬として上市されている PDEIII 阻害剤ピモベンダン (アカルディ®) とほぼ同等であった。

S1P の血管内皮細胞に対する効果

① ERK/MAPK 活性化の検討

S1P1, S1P2, S1P3 をそれぞれ独立に発現する CHO-K1-S1P1, -S1P2, S1P3 を S1P で刺激した。時間依存的には 3-5min を peak にした ERK/MAPK のリン酸化を認めた。ERK の活性化は濃度依存性であり、100nM で刺激前との優位差を認めたので、この細胞系の実験では 100 nM S1P を以降使用した。トーマエイヨーで市販化合物ライブラリーから S1P 依存性の細胞内 Ca²⁺ の増加を抑制するスクリーニングを行って、候補として得た ID102455 について CHO-K1-S1P3 細胞での S1P 依存性 ERK/MAPK の抑制を調べたところ、50 nM で 100 nM S1P による活性化を阻害した。同薬剤は S1P1, S1P2 に対しては阻害効果を示さなかった。したがって、ID102455 が S1P3 特異的拮抗作用をもつことがわかった。

しかし、トーマエイヨーの研究により、細胞毒性が強いことから、これらの誘導体の構造活性相関情報を考慮して合成された新規化合物である TY-52156 についても、同様な S1P3 以下のシグナルに及ぼす影響を検討した。まずは HUVEC に対する阻害効果を検討したが、S1P3 の阻害だけでは、ERK の活性化の抑制効果は認めなかった。現在 CHO-K1-S1P3 についての阻害実験を行っている。

② 血管内皮細胞の運動調節

100 nM の S1P 刺激で HUVEC, HAEC ともに Rac, Rho の活性化をプルダウン法で確認できた。この Rac, Rho の活性化は 50 μM ID10245 の前処理で一部抑制した。

血管内皮細胞の運動性について、wound healing アッセイで検討したところ、S1P 刺激により wound closure が促進されるが、ID102455 が培養液中に存

在すると wound closure が抑制されることから、S1P3 受容体刺激が運動性の制御に関わることが明らかになった。

血管平滑筋細胞は S1P3 受容体を発現する。1mM S1P で刺激すると顕著なストレスファイバー形成が 30 分後には観察できた。この S1P 依存性のストレスファイバーは ID102455 の前処理で抑制されることから、Rho を介した情報伝達系が血管平滑筋に存在していることが明らかになった。

③血管透過性の調節

これまでに S1P が N-cadherin の制御にかかわるといふ報告がある。本研究では、S1P の 30 分前処理によって蛍光ラベルデキストランの透過性を検討した。S1P 処理によって、透過性は低下した。また VE-cadherin 依存性の接着を、VE-cadherin の細胞外ドメインでコートされた培養皿への接着性で検討したところ、S1P により接着性が亢進した。したがって、S1P には N-cadherin だけではなく Ve-cadherin 依存性の血管内皮細胞接着制御があることが示唆された。

S1P3 受容体の発現

①冠状動脈硬化巣における S1P 受容体の発現:

前述した条件の下で S1P1 (Edg1), S1P3 (Edg3), S1P2 (Edg5), S1P4 (Edg6), S1P5 (Edg8) の免疫組織学的検索を行った結果、冠状動脈の動脈硬化巣においては、S1P1 (Edg1) 受容体に対する強い免疫陽性反応が認められた。S1P1 (Edg1) は図 1 に示すように平滑筋、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。

また、S1P5 (Edg8) の発現も同様に平滑筋、内皮細胞および foamy macrophage で強い陽性反応を認めた。S1P2 (Edg5) は平滑筋での陽性反応は比較的弱かったが、内皮細胞での陽性反応は認められた。

S1P の血管内皮細胞前駆細胞の骨髄からの動因効果評価のため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、EGFP レポーターマウスと交配した。予想したように、子マウスでは VE-Cadherin プロモーター依存性つまり、血管でのみ EGFP を発現していた。また興味深いことに、出生後一ヶ月程度で血管での EGFP の発現が消失したが、心臓の虚血を心筋梗塞モデルで誘導すると再度血管での EGFP の発現が見られるようになった。

虚血部位へ浸潤した細胞が GFP 陽性であることから、虚血により骨髄から動員された細胞が GFP で明らかになった。実際骨髄細胞を Flow Cytometry で調べたところ、GFP 陽性細胞の 90% が CD45 陽性細胞であった。たぶんこの現象は、骨髄から誘導された血球系細胞(VE-Cadherin の

プロモーター活性化もしている内皮細胞の性質も備えているが)が虚血心筋で何らかの機能を果たしている可能性が考えられた。虚血のないマウスに S1P 刺激を行ったときの骨髄の GFP 陽性細胞の出現を確認することで S1P が骨髄からの炎症細胞の動員に関わるか検討可能になった。

D. 考察

S1P₃/EDG3 受容体拮抗剤 ID102455 はドラッグライクな構造ではないため、薬剤として開発を目指すためには大規模な構造修飾が不可欠であった。2次元構造検索により得られたドラッグライクな化合物群にも S1P₃ 受容体拮抗活性を有する化合物を見出したが、S1P₃ 受容体拮抗活性は軒並み 1/10 以下に低下した。しかし、これらの誘導体から得られた構造活性相関情報を活用し、合成展開を図り、活性が向上し S1P₃/EDG3 受容体に選択的な拮抗薬として TY-52156 を見出した。本化合物は Langendorff 標本にて直接的な冠血管拡張作用を有していること、FTY720 誘発性の徐脈の抑制作用を有していること、および経口吸収性評価にて高い生物学的利用率が確認され、経口投与可能な医薬品開発の可能性の曙光が認められた。今後、TY-52156 による冠血管拡張作用が S1P₃/EDG3 受容体を介している明確な実験的証拠を得るための検討を行う予定である。

中間報告でも Rap1 が細胞の極性形成と運動方向の決定に重要であることを既に報告したが、今回は運動性制御にかかわる Rho ファミリー低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho, Rac の活性化に S1P3 がかわることを明らかにした。HUVEC を S1P3 拮抗薬で前処理すると顕著に Rho, Rac の活性化が抑制された。

細胞の運動性について、wound healing アッセイで S1P の効果を検討したところ明らかに S1P が wound closure を促進して、これに対して S1P3 拮抗薬が抑制効果を示したことから、内皮細胞の運動性を S1P3 が調節していることがわかった。Rho はアクチンストレスファイバー形成を促進し、Rac は膜伸展を促進することから、S1P 刺激による Rho ファミリー分子の活性化が血管内皮細胞の運動を亢進させていると考えられた。S1P1, S1P2, S1P3 のいずれも HUVEC に発現しているために、どれがどれだけ重要かは今回判定はできなかったが少なくとも S1P3 拮抗薬で運動障害が起きたことから、S1P3 の貢献があることは間違いないと考えた。

さらに S1P の新たな作用として血管透過性の抑制効果が判明した。これまで S1P-N-cadherin による透過性抑制は示唆されていたが、本研究では直接 VE-cadherin 接着が促進されて、血管内皮細胞間同士の接着が促進されるものと考えた。この作用については S1P のいずれの受容体が重要かを調べるのが今後の課題となった。

動物個体を用いた実験にむかうにあたり、臨床

適応症を考慮に入れた動物モデルを作製する予定であるが、血管新生抑制効果があった場合には腫瘍血管構築阻害なども可能であるし、網膜血管の新生抑制効果などは、低酸素での網膜血管の誘導に対する効果も期待できる。

E. 結論

ID102455 から、ドラッグライク誘導體への変換を指向し展開を図り、選択的 S1P₃/EDG3 受容体拮抗活性を有する TY-52156 を見出した。心臓全体では冠拡張作用、抗徐脈作用を有していた。また、S1P₃ 特異的な ERK/MAPK の抑制作用も示した。

S1P₃ の生物学的作用として内皮細胞の運動性の調節、血管平滑筋細胞の収縮調節にかかわることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Sakurai A, Fukuhara S, Yamagishi A, Sako K, Kamioka Y, Masuda M, Nakaoka Y, Mochizuki N. MAGI-1 is required for Rap1 activation upon cell-cell contact and for enhancement of VE-cadherin-mediated cell adhesion. **Mol. Biol. Cell** (in press), 2006

(2) Somekawa S, Fukuhara S, Fujita H, Masuda M, Saito Y, Mochizuki N. Enhanced functional Gap junction neofunction by PKA-dependent and Epac-Rap1-dependent signals downstream of cAMP in cardiac myocytes. **Circ. Res.** 92:655-662, 2005

(3) Cho CH, Kim KE, Byun J, Jang HS, Kim DK, Baluk P, Baffert F, Lee GM, Mochizuki N., Kim J, Jeon BH, McDonald DM, Koh GY. Long-term and sustained COMP-Ang1 induces long-lasting vascular enlargement and enhanced blood flow. **Circ Res.** 97 : 86-94, 2005

(4) Okada, Y., Suzuki, T., Sunden, Y., Orba, Y., Kose, S., Imamoto, N., Takahashi, H., Tanaka, S., Hall, W.W., Nagashima, K., Sawa, H*.: Dissociation of heterochromatin protein 1 from lamin B receptor induced by human polyomavirus agnoprotein: role in nuclear egress of viral particles. **EMBO. Rep.** 6: 452-457, 2005

(5) Suzuki, T., Okada, Y., Semba, S., Orba, Y., Yamanouchi, S., Endo, S., Tanaka, S., Fujita, T., Kuroda, S., Nagashima, K., Sawa, H*.: Identification of FEZ1 as a protein that interacts with JC virus agnoprotein and microtubules: role of agnoprotein-induced dissociation of FEZ1 from microtubules in viral propagation. **J. Biol. Chem.** 280, 24948-24956, 2005 (* corresponding author).

(6) 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

(7) Sawa H, Nagashima T, Nagashima K, Shinohara T, Chuma T, Mano Y, Tachi N, Hall WW. Clinicopathological and virological analyses of familial HTLV-I associated polyneuropathy. **J Neurovirol** 11: 199-207, 2005

2. 学会発表

1) Nagashima K, Semba S, Sawa H: Identification of factors involving JC virus neurotropism. the 8th European Congress of Neuropathology, 2005, Amsterdam, The Netherlands.

2) Sawa H, Suzuki T, Okada Y, Orba Y, Sunden Y, Semba S, Nagashima K: Agnoprotein plays a role in intracellular trafficking of JC virus. 3rd International Conference Polyomaviruses and Human Diseases: Basic and Clinical Perspectives, 2005, Providence, RI, U.S.A.

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

平成17年度

創業等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

平成18年7月31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