

## ライソゾーム病の酵素製剤の適正使用法の確立と遺伝子・細胞治療法の開発

所 属 国立成育医療センター 臨床検査部

研究者 奥山 虎之

研究期間 平成19年4月～平成22年3月

### 研究要旨

酵素補充療法が可能となったムコ多糖症II型について、成人症例での多施設共同投与試験を実施し、生化学的にも臨床的にも明らかな改善があり、重篤な副作用は認めなかった。また、ムコ多糖症VI型モデルラットに正常肝臓の移植を行い、脾臓の病理所見の改善など、肝臓移植の有用性を示唆する成績を得た。

### 研究分担者

(1) ジェンザイム・ジャパン株式会社

臨床開発部 藤井教尚

員会の承認を得た。

### C. 研究結果

#### (1) ムコ多糖症II型酵素補充療法臨床研究

投与症例すべてで、尿中グルコサミノグリカンの正常化(図1)、肝臓・脾臓サイズの縮小を認めた。また、多くの症例で、6分間歩行距離の延長、FVCの改善、関節可動域の拡大を認めた。多くの症例で、抗 Idursulfase 抗体が検出されたが、投与を断念するほどの重篤な投与関連副反応は認めなかった。

### A. 研究目的

我が国でもっとも頻度の高いムコ多糖症であるムコ多糖症II型(ハンター症候群)の酵素補充療法を成人男性10症例で行い、その効果と安全性を検討する。ムコ多糖症VI型モデルラットに正常ラット肝臓を同種同系移植し、その治療効果を検討する。

### B. 研究方法

#### (1) ムコ多糖症II型酵素補充療法臨床研究：

米国 Genzyme 社による Idursulfase 倫理供給プログラムを利用し日本人成人男性症例に対して多施設共同治療研究を実施した。Idursulfase 倫理供給プログラムは2007年2月7日から開始された。2007年10月5日の承認後は各施設で順次市販品へと切りかえ、各症例で投与開始から1年後までの有効性及び安全性を評価した。

(2) ムコ多糖症モデルラットの肝臓移植実験：生後2～3ヶ月のムコ多糖症VI型モデルラットに、正常ラット肝臓を移植し、その脾臓などの肝臓以外の臓器での効果を病理学的に検討した。

(倫理面への配慮)

各医療機関で未承認薬投与に関する施設内倫理委

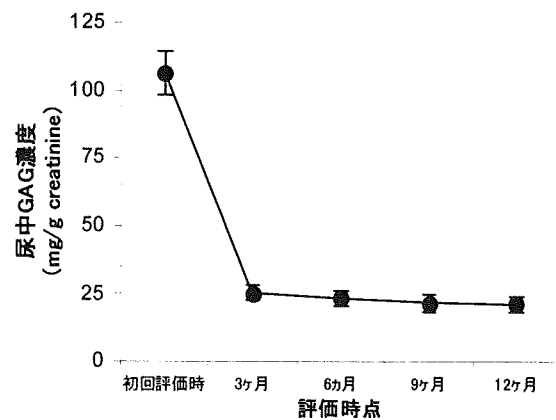


図1. 尿中GAGの推移

#### (2) ムコ多糖症モデルラットへの肝臓移植：

罹患 MPR ラット移植前後脾臓組織を用いた HE、AB染色の検討では、図2のHE染色で示したように、罹患 MPR ラットの脾臓で観察された細胞グリコサンミングリカンの蓄積を示す細胞質の空胞化およ

び図3のAB染色で示したようにアリュージャンブルー陽性細胞が大量に存在していることが確認出来た(図2)。これは移植肝臓が産生分泌されたイゾネートサルファターゼが、脾臓細胞に取り込まれ、ムコ多糖の分解を促進した結果と考えられる。

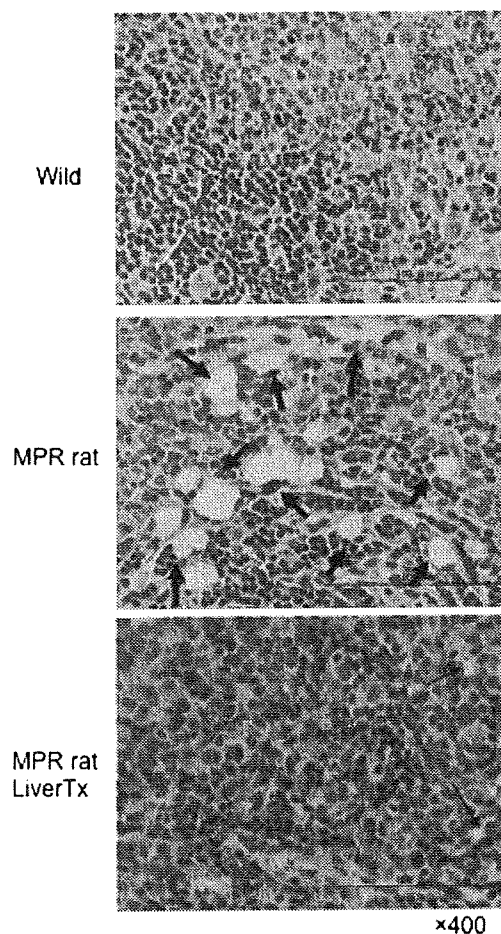


図2. ラット脾臓のHE染色標本。肝臓移植により、ムコ多糖症に特徴的な空胞が消失し、正常組織に近い組織像に変化している。

#### D. 考察

ムコ多糖症はライソゾーム病の代表的な疾患の一つであり、頻度も比較的高い。特に、ムコ多糖症II型は最も患者数の多いライソゾーム病の一つであり、その治療法の開発は臨床的に重要である。今回の検討で、ムコ多糖症II型の酵素補充療法が、日本人成人症例で有効かつ安全に実施できることが明らかとなった。酵素補充療法は、週1回の点滴静脈注射を一生続ける必要があり、その負担は大きい。永続的治療として、造血幹細胞移植が実施されているが、生着不全やGVH反応などで死に至る場合も少なくない。これに対して、

生体肝移植は日本では比較的安全に実施できる。今回、モデルラットの肝臓移植で一定の効果が得られたことから、肝臓移植の臨床応用も考慮する必要がある。

#### E. 結論

ムコ多糖症II型の酵素補充療法の有効性と安全性を日本人成人症例を対象とした臨床研究で明らかにした。肝臓移植がライソゾーム病治療に有用であることを示唆する成果をモデルラットを用いた動物実験で得た。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Okuyama T, Tanaka A, Suzuki Y, Ida H, Tanaka T, Cox GF, Eto Y, Oorii T. Japan Elaprase((R)) Treatment (JET) study: Idursulfase enzyme replacement therapy in adult patients with attenuated Hunter syndrome (Mucopolysaccharidosis II, MPS II). *Mol Genet Metab.* 2009; Aug 24.

##### 2. 学会発表

- 1) 田中藤樹、古城真秀子、小倉和郎、久保田哲夫、大橋十也、田中あけみ、鈴木康之、奥山虎之、衛藤義勝、折居忠夫: Maroteaux-Lamy 症候群における酵素補充療法の有効性評価. 第112回日本小児科学会学術集会. 奈良, 2009.
- 2) 小田絵里、田中藤樹、右田王介、岡田美智代、小須賀基通、小崎里華、大澤真木子、奥山虎之: Pompe スクリーニング; 日本人特有の遺伝子多型の影響. 第112回日本小児科学会学術集会. 奈良, 2009.
- 3) 小田絵里、田中藤樹、右田王介、岡田美智代、小須賀基通、小崎里華、大澤真木子、奥山虎之: Pompe スクリーニング; 日本人特有の遺伝子多型の影響. 第51回日本小児神経学会総会. 米子, 2009.
- 4) 小田絵里、田中藤樹、右田王介、小須賀基通、小崎里華、大澤真木子、奥山虎之: Pompe 病スクリーニングの検討. 第4回ポンペ病研究会. 東京, 2009.

- 5) Eri Oda, Toju Tanaka, Ohsuke Migita, Motomichi Kosuga, Makiko Osawa, Torayuki Okuyama: Screening for Pompe disease by Fluorometric Assay of alpha-Glucosidase Activities in Dried Blood Spots. The 11th International Congress of Inborn Errors of Metabolism (ICIEM) from 29 August through 2 September 2009 in San Diego, California, USA.
- 6) Eri Oda, Toju Tanaka, Ohsuke Migita, Motomichi Kosuga, Makiko Osawa, Torayuki Okuyama: Screening for Pompe disease by Fluorometric Assay of alpha-Glucosidase Activities in Dried Blood Spots. International Symposium of Lysosomal Storage Diseases.
- 7) 小田絵里、田中藤樹、右田王介、小須賀基通、小崎里華、大澤真木子、奥山虎之: Pompe スクリーニングの検討. 第 51 回日本先天代謝異常学会総会、東京、2009.
- 8) 田尾絵里子、四元淳子、小須賀基通、田中藤樹、大森美香、川目裕、奥山虎之: ムコ多糖症の患者家族における酵素補充療法と新生児マス・スクリーニングに関する意識調査. 第 51 回日本先天代謝異常学会総会、東京、2009.
- 9) 守本倫子、田中藤樹、宮寄治、小須賀基通、本村朋子、泰地秀信、奥山虎之: ムコ多糖症児の上気道狭窄に対する酵素補充療法の効果. 第 51 回日本先天代謝異常学会総会、東京、2009.
- 10) 小田絵里、田中藤樹、右田王介、小須賀基通、小崎里華、大澤真木子、奥山虎之: 「ポンペ病新生児マス・スクリーニングの開発」成育代謝異常症研究会、東京、2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし

(予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

## ライソゾーム病の酵素製剤の適正使用法の確立と遺伝子・細胞治療法の開発

所属 国立成育医療センター 臨床検査部  
研究者 奥山 虎之

### 研究要旨

酵素補充療法が可能となったムコ多糖症II型について、成人症例での多施設共同投与試験を実施し、その有効性と安全性を確認した。また、ムコ多糖症VI型モデルラットに正常肝臓の移植を行い、一定の治療効果を示唆する所見を得た。

### 研究分担者

- (1) ジェンザイム・ジャパン株式会社  
臨床開発部 藤井教尚

### A. 研究目的

我が国でもっとも頻度の高いムコ多糖症であるムコ多糖症II型(ハンター症候群)の酵素補充療法を成人10症例で行い、その効果と安全性を検討する。ムコ多糖症VI型モデルラットに正常ラット肝臓を同種同系移植し、その治療効果を検討する。

### B. 研究方法

(1)ムコ多糖症II型酵素補充療法臨床研究:米国Genzyme社によるIdursulfase倫理供給プログラムを利用し多施設共同治療研究を実施した。Idursulfase倫理供給プログラムは2007年2月7日から開始された。2007年10月5日の承認後は各施設で順次市販品へと切り替わり、各症例で投与開始から1年後までの有効性及び安全性を評価した。

(2)ムコ多糖症モデルラット肝臓移植:生後2~3ヶ月のムコ多糖症VI型モデルラットに、正常ラット肝臓を移植し、その肝臓以外の組織での効果を検討した。

### (倫理面への配慮)

各医療機関で未承認薬投与に関する施設内倫理委員会の承認を得た。また、JET Studyに参加した全症例において、同意説明文書にて本治療研究に関する説明を行い、同意を得た。

### C. 研究結果

#### (1)ムコ多糖症II型酵素補充療法臨床研究

投与症例すべてで、尿中グルコサミノグリカンの正常化、肝臓・脾臓サイズの縮小を認めた。また、多くの症例で、6分間歩行距離の延長、FVCの改善、関節可動域の拡大を認めた。多くの症例で、抗Idursulfase抗体が検出されたが、投与を断念するほどの重篤な投与関連副反応は認めなかった。

#### (2)ムコ多糖症モデルラットへの肝臓移植:

罹患MPRラット移植前後脾臓組織を用いたHE、AB染色の検討では、図2のHE染色で示したように、罹患MPRラットの脾臓で観察された細胞グリコサンミングリカンの蓄積を示す細胞質の空胞化および図3のAB染色で示したようにアリュースャンブルー陽性細胞が大量に存在していることが確認出来た。一方、罹患MPRラット肝移植5ヶ月後の脾臓に顕著である空胞およびアリュースャンブルー陽性細胞がほとんど消失していることが確認された。これは移植肝臓から産生された酵素が脾臓組織に蓄積しているムコ多糖が分解され、組織学的な改善できていることを示している。

### D. 考察

ムコ多糖症はライソゾーム病の代表的な疾患の一つであり、頻度も比較的高い。とくに、ムコ多糖症II型は最も患者数の多いライソゾーム病の一つであり、その治療法の開発は臨床的に重要である。今回の検討で、

ムコ多糖症II型の酵素補充療法が、日本人成人症例で有効かつ安全に実施できることが明らかとなった。成人症例は、知的障害がなく、全身状態の進行も緩徐であり、酵素補充療法に適した病態である。欧米での臨床試験は若年者を対象としていたので、本研究の成果は、臨床的意義が大きい。

酵素補充療法は、週 1 回の点滴静脈注射を一生続ける必要があり、その負担は大きい。永続的治療として、造血幹細胞移植も実施されているが、生着不全やGVH反応などで死に至る場合も少なくない。これに対して、生体肝移植は日本では比較的安全に実施できる。今回、モデルラットの肝臓移植で一定の効果が得られたことから、肝臓移植の臨床応用も考慮する必要がある。

#### E. 結論

ムコ多糖症II型酵素補充療法が、成人症例にも有効かつ安全に実施できることが明らかとなった。ムコ多糖症の治療として、生体肝移植の有用性を示唆する結果が、モデルラットを使った動物実験で明らかとなった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Okuyama T, Tanaka A, Suzuki Y, Ida H, Tanaka T, Cox GF, Eto Y, Orii T. Japan Elapraser((R)) Treatment (JET) study:Idursulfase enzyme replacement therapy in adult patients with attenuated Hunter syndrome (Mucopolysaccharidosis II, MPS II).Mol Genet Metab. 2009:Aug 24.

##### 2. 学会発表

- 1) 田中藤樹、古城真秀子、小倉和郎、久保田哲夫、大橋十也、田中あけみ、鈴木康之、奥山虎之、衛藤義勝、折居忠夫:Maroteaux-Lamy 症候群における酵素補充療法の有効性評価. 第 112 回日本小児科学会学術集会. 奈良, 2009.
- 2) 小田絵里、田中藤樹、右田王介、岡田美智代、小須賀基通、小崎里華、大澤真木子、奥山虎之: Pompe スクリーニング;日本人特有の遺伝子多型の

影響. 第 112 回日本小児科学会学術集会. 奈良, 2009.

- 3) 小田絵里、田中藤樹、右田王介、岡田美智代、小須賀基通、小崎里華、大澤真木子、奥山虎之: Pompe スクリーニング;日本人特有の遺伝子多型の影響. 第 51 回日本小児神経学会総会. 米子, 2009.
- 4) 小田絵里、田中藤樹、右田王介、小須賀基通、小崎里華、大澤真木子、奥山虎之:Pompe 病スクリーニングの検討. 第 4 回ポンペ病研究会、東京,2009.
- 5) Eri Oda, Toju Tanaka, Ohsuke Migita, Motomichi Kosuga, Makiko Osawa, Torayuki Okuyama: Screening for Pompe disease by Fluorometric Assay of alpha-Glucosidase Activities in Dried Blood Spots. The 11th International Congress of Inborn Errors of Metabolism (ICIM) from 29 August through 2 September 2009 in San Diego, California, USA.
- 6) Eri Oda, Toju Tanaka, Ohsuke Migita, Motomichi Kosuga, Makiko Osawa, Torayuki Okuyama: Screening for Pompe disease by Fluorometric Assay of alpha-Glucosidase Activities in Dried Blood Spots. International Symposium of Lysosomal Storage Diseases.
- 7) 小田絵里、田中藤樹、右田王介、小須賀基通、小崎里華、大澤真木子、奥山虎之:Pompe スクリーニングの検討. 第 51 回日本先天代謝異常学会総会、東京,2009.
- 8) 田尾絵里子、四元淳子、小須賀基通、田中藤樹、大森美香、川目裕、奥山虎之:ムコ多糖症の患者家族における酵素補充療法と新生児マス・スクリーニングに関する意識調査. 第 51 回日本先天代謝異常学会総会、東京,2009.
- 9) 守本倫子、田中藤樹、宮寄治、小須賀基通、本村朋子、泰地秀信、奥山虎之:ムコ多糖症児の上気道狭窄に対する酵素補充療法の効果. 第 51 回日本先天代謝異常学会総会、東京,2009.
- 10) 小田絵里、田中藤樹、右田王介、小須賀基通、小

崎里華、大澤真木子、奥山虎之:「ポンペ病新生児  
マス・スクリーニングの開発」成育代謝異常症研究会、  
東京,2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
  2. 実用新案登録
  3. その他
- 該当なし

## 冠・脳血管攣縮の抑制薬としてのS1P3受容体拮抗薬の 開発

所 属 国立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  
研究期間 平成19年4月～平成22年3月

研究要旨： S1P(スフィンゴシン 1-リン酸)受容体選択的拮抗作用を有する TY-52156 を見出し、さらに TY-53958 をスクリーニングにより得た。S1P による冠状動脈の収縮を S1P3 拮抗薬が抑制することを突き止めた。さらに、S1P が血管あるいは、血小板から放出される際のトランスポーターとして Spns2 を同定した。S1P が血栓による血管攣縮にどのように関与するのかを明らかにするための Spns2 ノックアウトマウスの作製に着手した。

### 分担研究者

- (1) トーアエイヨー株式会社東京研究所  
村上 晶
- (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、現在の日本の主要な死因である心血管疾患・脳血管疾患の原因として重要な病態である。血小板凝集抑制・高脂血症治療薬・糖尿病治療薬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発想から S1P 受容体の拮抗薬を創薬することを目的として研究を行った。

本研究の目的は、S1P3特異的受容体拮抗薬を創薬して、臨床適応と考える血管攣縮を予防あるいは阻害することである。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 S1P1-S1P5の5つの受容体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と考えられている。

本研究ではS1P3の拮抗薬を開発し、血管攣縮に対するこの薬剤の効果を判定して、臨床使用に発展させる。まず、血管攣縮に対しての抑制効果を

- ①ex vivoの実験で確認すること
- ②薬剤の生体の血管以外への作用を調べること
- ③S1P3が発現する内皮細胞・平滑筋細胞への影響
- ④他の組織・臓器でのS1P3の発現を検討して、副作用の発現予想を行うことを目的とした。

研究開始時点では TY52156 をすでに開発していたが、新たに有効な薬剤をさらに創出して低濃度でかつ吸収の良い薬剤を開発することを目指した。生物学的に S1P の情報伝達研究を進めて、S1P の生体での機能(生理的ならびに病態)を突き止

めて S1P3 拮抗薬の適応症を探る研究となることを目標にした。このため、S1P トランスポーター Spns2 の詳細な検討を行うことを最終年度の目標にした。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ヒト組織を使用して 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

#### ●S1P<sub>3</sub>/EDG3 受容体拮抗薬のスクリーニングと新規化合物の合成

(1) S1P<sub>3</sub>/EDG3 受容体拮抗薬のスクリーニングのために、S1P<sub>1</sub>/EDG1, S1P<sub>2</sub>/EDG5, S1P<sub>3</sub>/EDG3, S1P<sub>4</sub>/EDG6 及び S1P<sub>5</sub>/EDG8 をそれぞれ恒常発現させた CHO-K1 細胞を調整して用いた。候補化合物による S1P 由来[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇の抑制作用を、蛍光カルシウム指示薬である FLIPR<sup>®</sup> Calcium 3 Assay Kit (Molecular Devices Corporation, CA, USA)または Fura-2<sup>™</sup> (Molecular Probes, Inc., OR, USA) を用いて測定した。測定機器には蛍光セルアッセイシステム FlexStation<sup>®</sup> (Molecular Devices Corporation, CA, USA)を用いた。

(2)S1P<sub>3</sub>/EDG3 受容体拮抗薬の候補化合物の合成 S1P<sub>3</sub>/EDG3 受容体拮抗薬として有望な候補化合物の関連誘導体の合成は、パーソナル有機合成装置 ChemiStation<sup>™</sup> PPW2000 (Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan) によるパラレル合成と、High-Performance FLASH Chromatography (HPFC) system Horizon<sup>™</sup>または Quad3<sup>™</sup> (Biotage AB and Biosystems, Uppsala, Sweden) を用いて精製を行い、throughput の向上を図った。

#### (3) In silico スクリーニング

創薬支援ソフトウェア Catalyst<sup>®</sup> (Accelrys, Inc., CA, USA) を用いて、S1P<sub>3</sub>/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

ニングを行い、論理的創薬手法に依る高活性化化合物の効率的探索を図った。

## ● S1P 阻害薬の薬効評価

### (1) ラット摘出心 Langendorff 灌流標本

ペントバルビタールナトリウムを用いてラットを麻酔後、速やかに心臓を摘出し、ADInstruments ラングンドルフシステム (ADInstruments Japan Inc.) に取り付けた。灌流には Krebs-Henseleit 溶液 (mM: NaCl 118.0, NaHCO<sub>3</sub> 25.0, KCl 4.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 3.0, glucose 11.0, EDTA 0.5) を用い、70 mmHg の灌流圧下で定圧灌流を行った。灌流液温は 37±0.2°C とし、酸素分圧が 550 mmHg 以上となるように 95%O<sub>2</sub> ± 5%CO<sub>2</sub> の混合ガスでバブリングした。灌流量 (冠血流量) (CF) の変化は、循環系の途中に装着した電磁血流プローブを介して測定した。約 20 min の通常灌流による安定化の後、化合物 (0.1 μM) 又は溶媒を循環系に約 5 分程度灌流し、灌流状態が安定した後に S1P (0.1 μM) 及び化合物 (0.1 μM) を含む溶液を負荷して灌流量の変化を測定した。CF 値は解析ソフト PowerLab Chart (ADInstruments Japan Inc.) 上で演算処理を行い (1/3 最大値+2/3 最小値の数値を算出)、CF 値を示すデータとして採用した。

### (2) 脳底動脈を用いた血管収縮能への評価

体重 9.30kg~10.95kg のビーグル犬を使用し、ペントバルビタールナトリウムの静脈内投与にて麻酔を行った。後頭部を切開して頭蓋骨を切り取り、脳を取り出して脳幹部の脳底動脈をていねいに摘出し、氷冷 Krebs-bicarbonate 液 (mM ; NaCl:118.0, KCl:4.7, CaCl<sub>2</sub>:2.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:1.2, MgSO<sub>4</sub>:1.2, NaHCO<sub>3</sub>:25.0, Glucose:11.0, pHは7.2) に浸漬させた。摘出した脳底動脈は実体顕微鏡下で結合組織を取り除いた後、長さ約3 mmのリング標本とした。リング標本は、混合ガス(95%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>)が通気された温度37°Cの Krebs-bicarbonate 液10 mLを満たしたオルガンバス中に、輪状筋方向の収縮が測定できるように三角形の二対の金具を介して固定した。発現する収縮は歪圧力計 (AP-621G, 日本光電) を介してマルチコーダー (MC6621, GRAPHTEC) 上に記録した。標本には初期負荷として約1.5g の張力を与え、約0.5g~1gの安定した静止張力が得られた段階から実験に使用した。なお、S1P 又はアンタゴニストを添加する前に 最終濃度が 60 mMとなるように KCl 溶液を添加して標本の反応性を確かめた。S1P は適切な濃度 (0、1、5、10 μM) となるように、Krebs-bicarbonate 液を満たしたオルガンバス中に添加した。なお、S1P による血管収縮強度は、60 mM KCl溶液による収縮反応に対する比として算出した。S1P (5 μM) による収縮反応がプラトーに達した後、TY-52156 を所定濃度 (1、3、10 μM) となるようにオルガンバス中に累積添加し抑制率を算出した。

### (3) Zebrafish を用いた TY-52156 の発生への影響の検討

野生型 ABstrain、transgenic zebrafish として Tg (fli:GFP) Tg (cm1c:RFP) を使用した。飼育は通常の 28 度で行い、Embryo は E3medium をもちいた。

### (4) 動物個体への TY-52156 の影響

ラット血圧および心拍数は、ラット・マウス用無加温型非観血式血圧計 MK-2000 (muromachi kikai Co, Ltd., Japan) の手順書に従い、収縮期血圧 (SBP) および心拍数 (HR) を測定した。血圧および心拍数は、化合物投与前1時間、化合物投与直前0時間、化合物投与後1、2、3、4、5、6および24時間に経時的に測定した。TY-52156 (10および30 mg/kg) を経口投与し、Control群には溶媒を経口投与した。動物: 7 週齢のSD ラット雄を用いた。7 日間の馴化後雄を 8 週齢で供試した。

試験物質: TY-52379 及び 塩酸ベニジピンを用いた。各投与溶液は必要量に対し 0.5w/v% トラガントゴム溶液を添加、5 mg/mL 又は 2 mg/mL 濃度に調製した。

投与方法及び期間: 投与方法は 5 ml/kg あるいは 10 mL/kg の条件で、金属製胃ゾンデ又はディスプレイシリンジを用いた強制経口投与 (10、30 及び 100 mg/kg) とした。TY-52379 及び塩酸ベニジピンの投与回数は一回とし、バソプレシン投与 4 hr 及び 1 hr 前とした。バソプレシンは 0.25 IU/kg を大腿静脈に挿入したカテーテルより投与した。

評価項目: 試験動物はペントバルビタールナトリウムで麻酔を施し、背位に固定した。心電図波形は、標準第II誘導で測定用アンプとポリグラフィシステムを介して、循環動態解析ソフトウェア (MP/VAS3, Ver. 1.1R17b, ㈱フィジオテック) で記録した。心電図の解析はバソプレシンの投与前から投与後 5 min まで連続しておこなった。ST 下降面積 (AUC) を算出し、虚血に対する改善度を客観的に測定した。

## ● S1P の生理学的作用

### (1) S1P 刺激により血管内皮細胞で誘導される遺伝子の同定

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) を用いた。8 時間の血清飢餓後に S1P 1 mM で 1、3、と 6 時間刺激した。それぞれの細胞から RNA を抽出して cDNA とした後に、DNAarray 解析を行った。TY-52156 の処理は刺激前 30 分間行って、処理の有無によって遺伝子発現を検討した。microarray 解析: Agilent 社の microarray を用いて調べた。Quality control としては二つのサンプル以上で一貫した結果の得られたものを採用した。さらに誘導率が 2 倍以上あるいは、0.5 倍 (半分に低下した) ものを誘導による有意差があると判断した。



(2) 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。

(3) 血管内皮細胞・平滑筋細胞の S1P3 受容体活性化による情報伝達系の検討

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) 及びヒト冠動脈平滑筋細胞 (HCASMCs) を用い、S1P 刺激 (1 $\mu$ M) による接着分子の発現及び Rho の活性化を western blot 法により評価した。さらに、PKC の細胞膜移行、細胞内 Ca のオシレーションに S1P3 が関わるか否かを検討した。

(4) Zebrafish を用いた S1P トランスポーターの同定

ENU 変異により心臓に発生異常を起こした変異体 (Cardia Bifida 変異体) を Cmlc2:RFP との交配により確認した。Cardia bifida は S1P 受容体異常が原因の一つになっており、この表現型を示すものは S1P トランスポーターの異常である可能性がある。cardia bifida に着目してスクリーニングを行った。

(5) S1P 刺激による血管内皮細胞からの Ang2 の遊離作用を検討

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) を用いて S1P による Ang2 の遊離作用を検討するための実験系の構築をおこなった。Tie2-EGFP の局在変化の検討と細胞間接着を live animal で可視化するための Zebrafish も作製した。

● S1P3 の生体での発現部位の検討

(1) ヒト剖検材料ならびに単球細胞を用いた S1P3 受容体の発現の検討

抗体: S1P3/Edg3 および S1P1/Edg1 に対する抗体は MBL 社 (MA) から販売されている抗体を用いた。ヒト各種臓器のパラフィン切片を用いた。S1P<sub>1</sub>/Edg1, S1P<sub>3</sub>/Edg3, S1P<sub>2</sub>/Edg5, S1P<sub>4</sub>/Edg6, S1P<sub>5</sub>/Edg8 に対する抗体は United States Biological 社 (Swampscott, MA) から販売されている抗体を用いた。各抗体に対して data sheet に基づいて、1:250, 1:1,500, 1:1,500, 1:250, 1:1,500 倍の希釈倍率で検討を行った。

(2) 免疫染色方法:

通常の免疫染色に従った (臓器は中性緩衝ホルマリン溶液にて固定し、エタノールで脱水した後、パラフィン包埋し、薄切し、シランにてコートしたスライドグラスに乗せ、以下の染色を行なった)。1,000mL の 0.01M Citric acid (pH 6.0) を入れ、加圧下にて、2分30秒間加熱することで、抗原賦活化を行った。ABC 法にしたがって、一次抗体、二次抗体 (Peroxidase label) を用い、3,3'-diaminobenzidine を含んだ基質溶液で発色させた。検鏡は Nikon 社 Eclipse 80i を用い画像 file を作製した。

単球細胞株 (U937 および THP-1 細胞) での S1P3/Edg3 および S1P1/Edg1 の検討

1) phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で 100 ng U937 細胞は 3 日間、THP-1 細胞は 24 時間培養し単球マクロファージに分化させた後、イムノブロット解析で S1P 受容体の発現を確認した。

2) Flowcytometry による解析分化前後での S1P 受容体の発現の検討

Clear Block (MBL) にて室温 5 分間 Fc receptor blocking を行った。抗 S1P1/Edg1 抗体は 1000 倍希釈で抗 S1P3/Edg3 抗体は 500 倍希釈で、対照群の isotype control は 1  $\mu$ g/ml で室温 1 時間反応させた。その後 5% FCS/PBS 洗浄後 FITC-anti Rabbit IgG を 500 倍で室温 1 時間反応させ 5% FCS/PBS 洗浄後 FACS Canto にて解析した。

対象: 剖検により作製されたヒト冠動脈 (18 部位)、ヒト脳内動脈 (9 部位) のパラフィン切片を用いて、以下の方法により免疫組織学的方法を行った。

(3) S1P3・Spns2 の発現の検討

1) 抗体: S1P3/Edg3 に対する抗体は Santa Cruz 社 (H-70, sc-30024) を用いた。sphingolipid transporter Spns2 の抗体は細胞内ドメイン (spns82) または細胞外ドメイン (spns527) を抗原として作成した 2 種類の polyclonal 抗体を用いた。

対象: C57BL/6 及び Balb/c マウス

2) 免疫染色方法:

切片の作成: 臓器は中性緩衝ホルマリン溶液にて固定し、エタノールおよびキシレンで脱水した後、パラフィン包埋した。もしくは臓器採集後、O.C.T. compound を用いて凍結後、4% paraformaldehyde もしくは Acetone で 4 $^{\circ}$ C、15 分間固定を行なった。パラフィン切片については以下の方法で染色を行った。抗原賦活化も行った。1 次抗体 (spns82 は 4000 倍、spns527 は 3000 倍、S1P3/Edg3 は 200 倍で 1% BSA/Tween 20/PBS(-) で希釈した。) を 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。その後 Envision (+) (ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体、DAKO) を室温で 90 分間反応させた。反応後 Tween 20/PBS(-) で 5 分ずつ 3 回洗浄した。発色反応は 3,3'-diaminobenzidine を用いた。凍結切片での免疫染色は以下のように行った: 抗 Edg3 抗体は通常の臓器は 250 倍、脳は 400 倍希釈で、抗 Spns2 抗体は通常臓器 4000

倍、脳は 5000 倍で反応させた。その後はパラフィン切片と同様の手順で染色を行った。免疫染色を行った slide は顕微鏡で観察の後、Nikon 社 Eclipse 80i を用いて画像にした。

(4) RT-PCR 法による Spns2 mRNA の発現検討。

i) マウス各臓器から Trizol を用いて RNA を抽出し、DNase 処理後、Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) および random primer を用いて cDNA を作成した。

ii) Mus musculus spinster homolog2, mRNA (NCBI NM-153060) の sequence に基づいて、SPNS2 548-568F、SPNS2 945-923R の primer を設計した。

iii) PCR は Paq500 DNA Polymerase (Stratagene) を用いて、10 x PCR Buffer 2  $\mu$ l, 2 mM dNTP (each) 4  $\mu$ l, 10  $\mu$ M Primer (F&R) 1  $\mu$ l each, Taq 0.2  $\mu$ l, template cDNA 1  $\mu$ l, DW 10.8  $\mu$ l の系で行った。

### ●S1P 拮抗薬の毒性試験

(1) 動物：5 週齢の SD ラット雄を 7 日間の検査・馴化後 6 週齢で供試した。

(2) 試験物質：TY-52379 を用いた。投与溶液は必要量に対し 0.5w/v% トラガントゴム溶液を添加し、超音波処理下で懸濁溶液を調製した。

(3) 投与方法及び期間：投与方法は 5 ml/kg 又は 10 mL/kg の条件で、胃ゾンデを用いた強制経口投与 (100、500 及び 1000 mg/kg) とした。投与期間は 4 日間とした。反復投与で発現した毒性変化の可逆性を検討するため、1 週間の回復期間を設けた。各用量、4 日間投与後の剖検群 (主群) 及び回復群を設定し、各群 3 例で実施した。

(4) 評価項目：生存例の行動、外観、尿検査 (電解質バランス)、体重、摂餌量、摂水量等の一般状態を観察した。血液学的検査及び血液化学的検査は、投与又は回復期間終了後、絶食 (16 hr 以上) し、採血したものを用いた。血液化学的検査は血漿及び血清を用いた。剖検時には、右大腿骨から骨髄を採取し骨髄塗抹標本作製し骨髄検査 (赤芽球、顆粒球、単球及びリンパ球の比率検査) を実施した。臓器を 10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、パラフィン包埋、薄切後にヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本作製し鏡検し、病理組織学的検討を行った。

(5) TY-52379 血漿中濃度：主群及び回復群と独立した化合物投与群 (各群 3 例) で、各用量投与後 1、2、4、6、8、10 及び 24 hr に頸動脈より採血し、血漿中 TY-52379 濃度を LC/MS/MS で測定し、最高血漿中濃度 ( $C_{max}$ )、最高血漿中濃度到達時間 ( $T_{max}$ ) 及び濃度時間曲線下面積 ( $AUC_{0-24 hr}$ ) を算出した。

(倫理面への配慮)

北海道大学での研究は 2008 年 9 月 30 日付で「病理検体を用いた宿主タンパク質および感染等による外来タンパク質の発現の検討」の内容として、

北海道大学医学研究科・医学部 医の倫理委員会で承認されている札幌市東徳洲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化をおこない検体のみを用いた。また今回の S1P 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いません。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)。

動物実験に関しては、個々の施設での実験計画書の提出と承認後に行った。トーアエイヨー株式会社における実験動物の飼育管理及び動物実験 (動物を利用する試験研究) の計画・実施に際し、科学的及び動物福祉の観点からも遵守すべき事項を定め、実験動物の飼育管理及び動物実験を適正に実施することを目的に制定された、トーアエイヨー実験動物利用に関する規程に基づき実施した。

国立循環器病センターでは動物実験委員会の承認のもと、当該動物実験の指針に則り苦痛を与えないことを考慮した実験を行った。

### C. 研究結果

C-1: S1P3 拮抗薬 TY52156 と関連化合物の開発 TY-52156 の *in vitro* における薬効プロフィール冠血管への効果：

S1P 添加群 (0.1  $\mu$ M) では劇的に冠血流量が低下するのに対して S1P<sub>3</sub> 受容体拮抗薬である TY-52156 処理群 (0.1  $\mu$ M) では明確にその作用を抑制した (Figure 1)。一方、他の S1P 受容体拮抗薬である VPC23019 (S1P<sub>1</sub> 受容体拮抗薬) 及び JTE013 (S1P<sub>2</sub> 受容体拮抗薬) (各 0.1  $\mu$ M) ではこれらの冠血流量に対する拮抗作用は観察されなかった。また、TY-52156 の S1P に対する拮抗作用の特異性を確認すべく、トロンボキササン A2 の類似体である U-46619 (0.1  $\mu$ M) を用いた冠血流量低下作用に対する TY-52156 の拮抗作用を確認したところ、明確な拮抗作用を示さなかった。

#### 脳底動脈への効果

さらに S1P による血管収縮反応に対する TY-52156 の効果を、イヌ摘出脳底動脈を用いて組織レベルで検証した。まず S1P による血管収縮反応の用量設定試験を実施した結果、5  $\mu$ M で化合物の効果を判定するのに十分な血管収縮反応が確認された (60 mM KCl での収縮反応を 100% としたとき、約 20-30% の収縮反応)。そこで、S1P (5  $\mu$ M) 刺激により摘出血管の収縮反応がプラトーに達した後、TY-52156 の累積投与 (1、3、10  $\mu$ M) を行い、血管収縮反応への影響を観察したところ濃度依存的な収縮反応の解除が観察された。

#### 冠攣縮抑制効果

TY-52379 投与群及び塩酸ベニジピン投与群の ST 電位変化値及び AUC を Fig. 1 に示す。溶媒投与群では、バソプレシン静脈内投与後 1 min から ST 電位の下降が観察され、AUC は -0.517 であった。

バソプレシン投与による ST 電位低下に対し、TY-52379 の 30 及び 100 mg/kg 投与群で、AUC は -0.216、及び-0.212 mV・min と ST 電位低下の抑制傾向を示し、また 100 mg/kg 投与群では、バソプレシン投与後 3 min での ST 変化率に対して有意な抑制効果を示した。バソプレシン投与後、1-5 min の時間-ST 下降面積 (AUC)を計算した結果、TY-52379 がバソプレシン投与による ST 電位低下を抑制した。以上の結果から TY-52379 が冠攣縮抑制効果を有することが示唆された。

#### 新たな S1P3 選択的阻害剤 TY-53958

選択的な S1P3 受容体拮抗薬として見出した TY-52156 を基盤とした創薬手法に加え、S1P3 受容体拮抗薬として既知骨格を精査し、それらの融合による新規化合物の創出を目指した。その結果、TY-52156 (IC<sub>50</sub>=0.47 μM) に匹敵する S1P3 受容体拮抗作用を有し (IC<sub>50</sub>=0.41 μM)、かつ良好な選択性を示す TY-53958 を見出した。新規に見出された TY-53958 の S1P3 受容体への結合様式を推定すべく、S1P3 受容体に特異的な 263 番目のアミノ酸残基 フェニルアラニン (F263) に変異を入れた受容体安定細胞株 (S1P3-F263L) を用い、野生型と比較してその阻害活性に変化が生じるかを検証した。その結果 (Table.2)、TY-53958 の S1P3 受容体拮抗作用の変化は TY-52156 のそれと類似した傾向を示した。

#### TY-52379 の心筋梗塞巣縮小効果

ラット心筋梗塞モデルにおける TY-52379 (TY-52156 塩酸塩) の梗塞サイズへの影響、及び心筋傷害マーカーとなる血漿中 CK 値の挙動について検証を行った。虚血時間 15 min モデルでは、溶媒対照群及び TY-52379 投与群の虚血領域の大きさはそれぞれ虚血領域が 36.2±2.6% (n=6) 及び 33.0±4.7% (n=8) であったのに対して、心筋梗塞サイズはそれぞれ 45.5±4.1% (n=6) 及び 38.1±6.4% (n=8) と若干減少傾向を示した (Fig.1)。心筋障害の生化学的マーカーとして知られる血漿中 CK 値も梗塞サイズと同様の傾向を示したが有意ではなかった

#### C-2: TY-52156 の血管以外への作用

##### (1) 発生への影響

野生型 Zebrafish を用いた TY-52156 の発生に及ぼす影響を検討したが、初期発生、体軸形成における異常を誘導しなかった。時間経過で blastomere の形成から somite 形成、gastrulation などを観察していったが、細胞に効果を示す 100 nM 以上の高濃度でも発生への影響はみられなかった。さらに、血管発生・心臓発生を可視化する Zebrafish を用いて心血管系への影響を検討したが、明かな発生異常は認めなかった。

##### (2) 毒性試験

初期毒性試験として、TY-52379 の 4 日間反復経

口投与毒性試験を実施した。その結果、いずれの投与量でも死亡例は認められなかった。体重推移及び摂餌量は溶媒対照群に比べ 500 mg/kg 以上の群で低値傾向を示したが、体薬により順調な体重及び摂餌量の増加が認められ、回復性が確認された。尿検査、摂水量は溶媒対照群に比べ有意な差は認められなかった。500 mg/kg 以上の群でヘモグロビン濃度の低値傾向、1000 mg/kg 群で赤血球、ヘマトクリット値の低値傾向が認められた。回復群では、溶媒対照群に比べ 500 mg/kg 以上の群で赤血球数 (500 mg/kg のみ低値傾向) 及びヘモグロビン濃度の有意な低値、網状赤血球の比率及び絶対数の有意な高値、1000 mg/kg 群でヘマトクリット値及び平均赤血球ヘモグロビン濃度の有意な低値が認められた。上記変化より TY-52379 による貧血が疑われたが、骨髓検査では主群でいずれの用量においても溶媒対照群との間に顕著な変化は認められなかった。しかし回復群では 1000mg/kg 群で赤芽球の比率の有意な増加が観察された。

病理組織学的検査では 500 mg/kg 以上の群で軽微な小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。脾臓では、主群において 1000 mg/kg 群の 1 例で軽微な髓外造血の亢進が認められた。胸腺では、軽度な萎縮が認められる例があった。

#### C-3: S1P の生理的作用

##### HUVEC での S1P による遺伝子発現誘導

S1P 刺激によって、解析として意味のある遺伝子は array 上の 41059 遺伝子のなかで、Quality control で 31970 遺伝子が解析該当遺伝子となりさらに有意な変動を示したものは 656 遺伝子であった。具体的には、VCAM-1、ICAM-1C、chemokine が増加した。また、ほかに CSF2、Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3、selectin E、interferon regulatory factor (IRF1)が顕著に増加した。

その他、スフィンゴシン 1 燐酸シグナルにかかわる遺伝子として S1P1 と S1P2、SPHK1 (sphingosin kinase 1)の発現増加を認めた。

HUVECs を S1P によって刺激した際に発現が増加する遺伝子が TY-52156 により 1 時間ではそれほど抑制効果を示さないが、同じ遺伝子でも 3 時間では抑制傾向、さらに 6 時間では強い抑制を認めた。TY-52156 は 1 μM では抑制傾向が弱い 10 μM では強い抑制が見られた。

##### S1P の血管接着における機能

(1) Ang2 は S1P によって血管内皮細胞からの分泌が促進される: HUVECs に Ang2-EGFP を発現させて HUVECs 内に蓄積された EGFP でマークされる Ang2 が S1P により減少するか否かを検討して、S1P 刺激による Ang2 分泌機能を検討した。

(2) Ang1 により Tie2 受容体は細胞間接着部位へ局在化する

(3) 細胞間接着にかかわる Tie2 と VE-cad の動態を

モニターリングするための Zebrafish を構築した。S1P の細胞間接着機能を調べるための、モデル動物を作製した：z(Zebrafish)Tie2-EGFP, zVE-cad-EGFP を血管内皮細胞特異的に安定に発現するように Fli1 プロモーターあるいは Flk1 プロモーターで zTie2-EGFP, zVE-cad-EGFP を発現する Zebrafish の構築をおこなった。このための plasmid を作製し、さらに野生型 Zebrafish の embryo に plasmid とトランスポゼース mRNA を injection して血管での発現を確認できた。Germline に引き継がれるか否かは、次世代の Zebrafish での血管での緑色蛍光を確認することで、これらの line の establishment を検証できる。

#### C-4: S1P3 と Spns2 の発現

##### S1P3 の発現

血管の平滑筋層では陽性反応が認められた。特に動脈硬化巣に発現が認められた。また血管周囲の脂肪組織にも陽性反応が認められる症例が存在した。血管以外で免疫染色陽性反応を認めた臓器としては、副腎の髄質、胃底腺の細胞、腸管の陰窩部の細胞、また中枢神経系では海馬の神経細胞に陽性像が認められた症例があった。肝硬変の肝臓で肝細胞に陽性所見を認めた症例も存在した。検索した臓器の中では精巣、甲状腺、肺胞上皮細胞では発現は認められなかった。

##### マクロファージでの S1P 受容体の発現

S1P1/Edg1 は血管平滑筋および動脈硬化巣に集簇した foam cells、一方 S1P3/Edg3 は血管平滑筋にはタンパク質の発現は認められず、動脈硬化巣に集簇した foam cells に免疫陽性反応現を認めた

分化前と分化後の S1P 受容体の発現を調べたところ、U937 細胞で軽度の S1P3/Edg3 の発現が変化していることが示唆された。しかし、Flowcytometry にて S1P3/Edg3 および S1P1/Edg1 の発現を検索した結果、S1P3/Edg3 および S1P1/Edg1 は発現を認めたが、分化の前後でいずれのタンパク質も著明な変化は認められなかった。

##### Spns2 の発現

マウスの脳、腎臓、心臓、肺で両抗体ともほぼ同様の免疫反応を得ることが出来た。脳では実質の小血管の内皮および血管平滑筋に陽性反応を認めた。腎臓では血管の内皮および血管平滑筋、また spns82 では糸球体にも陽性所見を認めた。心臓では冠状動脈の内皮および血管平滑筋、また spns527 では心筋周囲の内皮細胞に陽性反応が確認された。肺では肺胞上皮および血管内皮細胞に陽性反応を認めた。

抗 Spns2 抗体を用いた免疫染色ではホルマリン固定したパラフィン切片、凍結切片の 4% paraformaldehyde もしくは Acetone 固定等種々の方法を検討した結果、凍結切片を用いて Acetone で 4℃、15 分間固定した条件が最適であることが判明した。マウスの脳、腎臓、心臓、肺で両抗体と

もほぼ同様の免疫反応を得ることが出来た。脳では実質の小血管の内皮および血管平滑筋に陽性反応を認めた。腎臓では血管の内皮および血管平滑筋、また spns82 では糸球体にも陽性所見を認めた。心臓では冠状動脈の内皮および血管平滑筋、また spns527 では心筋周囲の内皮細胞に陽性反応が確認された。肺では肺胞上皮および血管内皮細胞に陽性反応を認めた。

RT-PCR 法を用いてマウス各臓器での Spns2 の mRNA の発現を検討した結果、脳、腎臓、心臓、肺での mRNA の発現が強かった。

#### C-5: Spns2 の同定

Zebrafish の変異体 (cardia bifida) を呈する変異体の詳細な解析を行った。まず二股心臓を Cmlc2:RFP line で確認した。さらに in situ hybridization で心室ミオシン・心房ミオシンの mRNA の発現も調べたところ二箇所に分れていたため、間違いなく cardia bifida の変異体であることが証明できた。

この変異体の変異責任遺伝子をポジショナルクローニングで調べていったところ、Spinster2 遺伝子の 153 番目の Arg が Ser に置換されたために心臓が二つになっていることがわかった。以降 zSpns (R153S) と命名した。Spns2 が細胞膜を 1 2 回貫通するアミノ酸の 2 次構造をとっていることが判明した。トランスポーター分子であることが予想できたので、Sphingoine kinase を安定に発現する CHO 細胞に zSpns2-EGFP(R153S)あるいは ZSpns2-EGFP WT あるいは hSpns2-EGFP (WT ヒト)を発現させて S1P の細胞外への排出を検討したところ Zebrafish, human Spns2 とともに S1P の排出を促進した。しかし、Spns2(R153S)はまったく S1P の排出が認められなかったことから、S1P のトランスポーター活性が消失した変異体であることがわかった。

##### Spns2 の血管形成への影響

Spns2 と Fli1:EGFP Tg との交配によって得られた胚の血管形成を計時的に観察した。胚発生 2 4 時間以内に形成される体幹の大血管である背側大動脈、後主静脈の形態学的な異常は認めなかった。また、背側大動脈から背側に向かって伸長する体節間血管も背側吻尾吻合血管に到達する経過中に異常は認めなかった。背側吻尾吻合血管も正常に形成された。野生型の Fli1:EGFP TG 由来の胚に Spns2 mRNA を injection して Spns2 の発現が増加した時には、体幹の血管形成に異常を示した。一胚に 500 pg - 1ng によってこの異常が見られたが、それ以下の低発現では血管形成の異常は認めなかった。以上の結果から、Spns2 は血管形成には不可欠ではないが、過剰に S1P が胚で細胞外に排出されるときには胚発生に異常を伴うことがわかった。

##### Spns2 の細胞膜での発現

zSpns2, hSpns2 のカルボキシ末端(12 回膜貫通型 S1P トランスポーターのカルボキシ末端細胞内ドメイン)に EGFP タグが付加されるように細胞発現

ベクターを構築した。CHO 細胞に発現させて、局在を調べたところ細胞膜に局在した。他の Spns ファミリー分子の Spns1, Spns3 についても同様に局在を検討したところ、Spns1 は細胞膜に、Spns3 は細胞内小器官の膜に局在した。

#### floxed spns2 マウスの作製

Chr11:72265140-72303406 bp, - strand に位置している。exon1 を target するべく、遺伝子配列情報をもとに、PCR を行ったが、G、C 塩基配列に富んでいるために増幅できなかった。

このために、exon2 を target することにした。PCR で増幅ができた。

キメラマウスは 2 系統が確立できた。このキメラマウス (ICR 系で ES 細胞は B6×CBA) と野生型マウスの交配を行い、germline への transmission も確認できた。

#### D. 考察

##### S1P の血管収縮作用について

S1P は GPCR であり、そのサブタイプには S1P<sub>1</sub>~S1P<sub>5</sub> 受容体が報告されている。これまで、摘出心臓を用いた灌流試験において、S1P が冠血流量を著しく低下させることが報告されている。しかし、どの受容体サブタイプが本作用に関与しているか不明であったが、本研究により S1P<sub>3</sub> 受容体はその機序に中心的な役割を果たしている可能性が示唆された。我々はこれまでに市販化合物ライブラリーに対して S1P<sub>3</sub> 受容体拮抗作用の *in vitro* スクリーニングを行い、得られたヒット化合物からドラックライクな構造への変換、及び活性の向上を指向した化合物展開により、医薬として有望な選択的 S1P<sub>3</sub> 受容体拮抗薬、TY-52156 を見出した。また本研究では、イヌ摘出脳底動脈を用いた検討で TY-52156 は S1P による血管収縮反応を抑制した。TY-53958 の S1P<sub>3</sub> 受容体阻害形式は、TY-52156 と類似することが示唆された。F263 は S1P<sub>3</sub> 受容体に特異的なアミノ酸残基であり、S1P<sub>3</sub> 受容体選択性 (vs S1P<sub>1</sub> 受容体) に寄与していることが報告されている。TY-52156 及び TY-53958 は S1P<sub>3</sub>-F263L を用いた検討で約 1/20 にまで受容体拮抗作用が減弱したことから、本残基への強い相互作用が想定された。一方、S1P の S1P<sub>3</sub> 受容体への結合に寄与するアミノ酸残基 (R114/E115、F119) に対してこれら薬剤がどのような挙動を示すかは現状不明である。

S1P<sub>3</sub> 受容体拮抗薬は class effect として単独処理で冠血流量増加作用を示すと考えられた。これまで、TY-52156 を含めた異なる母核の S1P<sub>3</sub> 受容体拮抗薬で、摘出心における冠血流量増加作用を確認している。TY-53958 が本作用を有するかは未確認であるが、TY-53958 関連誘導体 (S1P<sub>3</sub> 受容体への IC<sub>50</sub><1.0 uM、難溶性で医薬として不適)は、ラット摘出心を用いた検討で、薬剤単独 (0.1 uM) により、Ca<sup>2+</sup> 拮抗薬 (Amlodipine) に匹敵する顕著な冠血流量増加作用を示すこと、冠血流量増加の一因となる L 型 Ca<sup>2+</sup> チャネル阻害作用及び Rho kinase 阻害作用を示さないこと (いずれも 10 uM で検討) を確認している (data

not shown)。冠血流量増加に寄与する機序は多数想定されるが、今後、本拮抗薬の冠血流量増加作用の機序解明とともに、これら化合物の *in vivo* での実証が課題である。

ラット心筋梗塞モデルを用いた検討から、選択的な S1P<sub>3</sub> 受容体拮抗薬は心筋梗塞サイズに影響を与えない可能性が示唆された。S1P の心保護作用に関与する受容体については様々な報告がある (S1P<sub>1</sub>、S1P<sub>2</sub> 又は S1P<sub>3</sub> 受容体の単独又は 2 種類)。試験に供した TY-52739 (TY-52156 塩酸塩) は単独処理で冠血流量増加作用が確認されており、このことが梗塞サイズの減弱に繋がる期待もあったが、本検討で顕著な効果は確認できなかった。S1P<sub>3</sub> 受容体拮抗作用による梗塞サイズの増悪及び寛解作用が相殺された可能性、又は他の受容体からの代償機能が作用した可能性もある。これらの点は様々なプロファイルを有する化合物を評価することで明らかとなるが、少なくとも本検討から S1P<sub>3</sub> 受容体に選択的な拮抗薬は虚血再灌流後 24 hr における心筋梗塞サイズに対しては寛解又は増悪作用を示さず、本薬剤が心疾患をターゲットとした治療薬に供する懸念が一つ払拭された。

S1P が直接冠攣縮反応を生じる報告は未だない。しかし、S1P は活性化血小板から放出されること、S1P 血漿中濃度と冠動脈疾患に相関があること、S1P が著しい冠血流量の低下作用を示し S1P<sub>3</sub> 受容体拮抗薬が有意な寛解作用を示すことから、S1P が血管攣縮性疾患の発症に寄与し、その機序に S1P<sub>3</sub> 受容体に関与することが想定される。これらを鑑みると、急性冠動脈疾患に代表される血栓が引き金となった冠血管攣縮に伴う広範囲の梗塞形成に S1P-S1P<sub>3</sub> 受容体が重要な役割を果たし、S1P<sub>3</sub> 受容体拮抗薬がその治療法として極めて有用であることを示唆するものである。今後、S1P の病態への関与を検証する必要がある。

S1P がまずどこで生成され、血管に発現する S1P 受容体に作用するかを調べることは重要である。S1P が細胞内で作られ、細胞膜表面に発現する S1P 受容体に作用するには輸送体が必要であると考えられていた。昨年度の S1P 輸送体 Spns2 を同定し本年度は血管形成における Spns2 の機能をゼブラフィッシュを用いて調べた。

S1P<sub>3</sub> 受容体拮抗薬が攣縮性狭心症に対し有用な治療薬となることが示された。しかし TY-52379 は狭心症症状を寛解させたがまだ十分強力とはいえない。S1P が直接冠攣縮反応を生じる報告は未だない。しかし、S1P は活性化血小板から放出されること、S1P 血漿中濃度と冠動脈疾患に相関があること、S1P が著しい冠血流量の低下作用を示し S1P<sub>3</sub> 受容体拮抗薬が有意な寛解作用を示すことから、S1P が血管攣縮性疾患の発症に寄与し、その機序に S1P<sub>3</sub> 受容体に関与することが想定される。これらを鑑みると、急性冠動脈疾患に代表される血栓が引き金となった冠血管攣縮に伴う広範囲の梗塞形成に S1P-S1P<sub>3</sub> 受容体が重要な役割を果たし、S1P<sub>3</sub> 受容体拮抗薬がその治療法として極めて有用であることを示唆するものである。今

後、S1Pの冠動脈投与による狭心症症状の誘発可能性及び拮抗薬の効果について検証する必要がある。

#### S1P トランスポーターの同定

もともと S1P1 が血管内皮細胞で作用するときには血管弛緩 (AKT-eNOS を介して) をおこし、S1P2, S1P3 は血管平滑筋に発現して血管収縮をおこすと考えられている。正常血管における S1P トランスポーターの機能を解明していくことが今後の S1P-S1P 受容体を介した生理的機能の解明には必須であると考えた。

血管平滑筋にも Spns2 が発現するのか? 血小板から遊離される S1P は Spns2 を介して排出された S1P であるのか? を今後調べていく必要がある。とくに S1P が血栓症のない状態で如何なる生理作用を示しているのかは、全貌が解明されておらず骨髄からの破骨細胞の骨外への遊走誘導による骨粗鬆症の抑制など新たな知見も得られており、S1P1 受容体の発現細胞の同定とともに S1P の遊離機構の解明は平行しておこなっていくべきと考えられた。

Spns2 の変異体では血管形成に障害がないことがわかった、つまり Spns2 が血管形成に不可欠ではないことを示している。ただし Spns2 の高発現により血管形成を含む体幹部の形成に異常をきたすことから S1P が体幹形成に重要であることが示唆された。さらに、本研究では血管内腔の形成は観察しておらず 管腔形成の異常の有無は本研究では検討していない。この点は今後さらに、血球の流れを可視化できる Tg フィッシュとの交配により調べる必要があると考えた。

どの細胞から輸送体によって細胞外に分泌された S1P が S1P3 受容体に作用するのかを確認することは、生体での S1P の作用を知る上で非常に重要であると考え。血栓から(血小板あるいは赤血球)の S1P あるいは血管内皮細胞からの S1P のいずれが S1P3 を活性化するかは、重要な問題である。従って今後は、S1P の細胞あるいは組織特異的な欠損による生体機能への影響を調べる必要があると考えられた。

#### S1P3 と S1P トランスポーター Spns2 の発現

今回施行した S1P<sub>3</sub>/Edg3 のヒトの各臓器を用いた免疫組織学的検索において、各臓器に存在する血管では、中膜平滑筋および動脈硬巣周囲部に免疫陽性反応が認められた。さらに S1P<sub>3</sub>/Edg3 は副腎の髄質、胃底腺の腺細胞、腸管陰窩部の細胞、中枢神経系の神経細胞、血管周囲の脂肪細胞にも免疫陽性反応を認めた。以上の結果から S1P<sub>3</sub>/Edg3 は全身各臓器の動脈の平滑筋、および消化管、中枢神経系、副腎等に発現が認められており、S1P<sub>3</sub> 受容体拮抗薬の投与をする際には、精神神経症状、消化管症状、肝機能、副腎機能等にも留意して投与を行う必要があることが予想された。TY-52156 の作用する受容体

が、血管以外にも存在することを考慮して副作用の検討を行うことが重要であることが示唆された。

本研究では動脈硬化巣を伴った動脈において局在の相違を認めた。S1P1/Edg1 は血管平滑筋および動脈硬化巣に集簇した foam cells、一方 S1P3/Edg3 は血管平滑筋にはタンパク質の発現は認められず、動脈硬化巣に集簇した foam cells にタンパク質の発現を認めたことからマクロファージにおける S1P の作用と S1P3 拮抗薬の作用も重要であることが示唆された。動脈硬化症の進展には、マクロファージをふくめた炎症機転が関与しており S1P3 の拮抗薬が動脈硬化症の治療にも使用可能であることが予想できた。

S1P の拮抗薬を開発する上で S1P の生理作用、分泌のメカニズムを解明することは必須であると考えた。S1P1-S1P3 特異的拮抗薬が開発されても、上流の S1P の排出機構がわからないと S1P シグナルの全貌が解明されたとはいえない。特に受容体拮抗薬が生理的な S1P の作用を抑制してしまうことによる副作用の出現を回避できるような思案も必要であろう。

動脈硬化巣を伴った動脈において局在の相違を認めた。S1P1/Edg1 は血管平滑筋および動脈硬化巣に集簇した foam cells、一方 S1P3/Edg3 は血管平滑筋にはタンパク質の発現は認められず、動脈硬化巣に集簇した foam cells にタンパク質の発現を認めたことからマクロファージにおける S1P の作用と S1P3 拮抗薬の作用も重要であることが示唆された。動脈硬化症の進展には、マクロファージをふくめた炎症機転が関与しており S1P3 の拮抗薬が動脈硬化症の治療にも使用可能であることが予想できた。

S1P の拮抗薬を開発する上で S1P の生理作用、分泌のメカニズムを解明することは必須であると考えた。S1P1-S1P3 特異的拮抗薬が開発されても、上流の S1P の排出機構がわからないと S1P シグナルの全貌が解明されたとはいえない。特に受容体拮抗薬が生理的な S1P の作用を抑制してしまうことによる副作用の出現を回避できるような思案も必要であろう。

えられた。

#### S1P の薬剤としての発展性

毒性に関しては 100 mg/kg で若干の貧血状態は TY-52379 が生体内で代謝され何らかの PHZ 様の代謝物が生じた結果と考え、化合物由来の毒性と推察している。また貧血の改善の休薬後の遅延は TY-52379 の脂溶性による脂肪組織への蓄積による毒性の遷延化の可能性もあり今後の無毒化にむけた薬剤の改変に活用していくべき結果と判断した。

毒性に関しては 100 mg/kg で若干の貧血状態は TY-52379 が生体内で代謝され何らかの PHZ 様の代謝物が生じた結果と考え、化合物由来の毒性と推察している。また貧血の改善の休薬後の遅延は TY-52379 の脂溶性による脂肪組織への蓄積に

よる毒性の遷延化の可能性もあり今後の無毒化にむけた薬剤の改変に活用していくべき結果と判断した。

### S1P3 拮抗薬の血管以外での作用の可能性

TY-52156 の動物個体での安全性についての研究を行い、その安全性が確認できた。Zebrafish では S1P2 のノックダウンにより 2 分心臓が形成されてしまう (miles apart として報告されている)。この異常は、心臓の原基が lateral palte mesoderm にありこの左右の原基が正中で融合することが、心臓の tubulation に不可欠であると考えられている。この左右の原基の融合に、S1P, S1P2 受容体シグナルが重要であるので、S1P2 の発現減少により心臓が二つに別れたままの状態になると予想されている。S1P3 にも同様な作用を補助する機能があるとすると、S1P3 拮抗薬の TY-52156 でも 2 分心臓を起こしてしまう可能性もあったが、今年度の研究で、その可能性は否定することができた。

S1P が抗炎症作用、催炎症促進に作用するのは重要である。なぜならば、血栓症だけに S1P 受容体拮抗薬を投与するだけでなく、毎日服薬することになると、炎症を抑制する作用を抑制してしまうことになり、臨床的問題が生じるからである。本研究課題では、S1P による内皮細胞接着への影響を検討するための実験系の構築を試みて、最終年度ではこれらの系を用いて S1P3 拮抗薬の血管内皮細胞への接着への生体での効果を検証可能にすることを計画することが重要であると考えている。

### E. 結論

選択的 S1P3/EDG3 受容体拮抗活性を有する TY-52156 を見出し、さらに TY-53958 をスクリーニングにより得た。S1P による冠状動脈の収縮を S1P3 拮抗薬が抑制することを突き止めた。さらに、S1P が血管あるいは、血小板から放出される際のトランスポーターとして Spns2 を同定した。S1P が血栓による血管攣縮にどのように関与するのかを明らかにするための Spns2 ノックアウトマウスの作製に着手した。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- (1) Myoishi M, Hao H, Minamino T, Watanabe K, Nishihira K, Hatakeyama K, Asada Y, Okada K, Ishibashi-Ueda H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML, Mochizuki N, Kitakaze M. Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation* 116, 1226-1233, 2007
- (2) Seguchi O, Takashima S, Yamazaki S, Asakura M, Asano Y, Shintani Y, Wakeno M, Minamino T, Kondo H, Furukawa H, Nakamaru K, Naito A, Takahashi T, Ohtsuka T, Kawakami K, Isomura T, Kitamura S, Tomoike H,

Mochizuki N, Kitakaze M. A cardiac myosin light chain kinase regulates sarcomere assembly in the vertebrate heart. *J Clin. Invest* 117; 2812-2824, 2007

(3) An siRNA against JC virus (JCV) agnoprotein inhibits JCV infection in JCV-producing cells inoculated in nude mice. *Neuropathology*. (in press)

(4) Oligodendrocyte Lineage Transcription Factor 2 Inhibits the Motility of a Human Glial Tumor Cell Line by Activating RhoA. *Mol. Cancer. Res.* 5, 1099-1109, 2007.

(5) DDX1 promotes proliferation of the JC virus through transactivation of its promoter. *Microbiol Immunol.* 51: 339-347, 2007

(6) Identification of DDX1 as a JC virus transcriptional control region-binding protein. *Microbiol Immunol.* 51: 327-337, 2007

(7) Orba Y, Sunden Y, Suzuki T, Nagashima K, Kimura T, Tanaka S, Sawa H\*: Pharmacological cdk inhibitor R-Roscovitine suppresses JC virus proliferation. *Virology* 370: 173-183, 2008 (\* corresponding author)

(8) Matoba T, Orba Y, Suzuki T, Makino Y, Shichinohe H, Kuroda S, Ochiya T, Itoh H, Tanaka S, Nagashima K, Sawa H\*: An siRNA against JC virus (JCV) agnoprotein inhibits JCV infection in JCV-producing cells inoculated in nude mice. *Neuropathology* 28: 286-294, 2008 (\* corresponding author)

(9) Koyama T, Nakaoka Y, Fujio Y, Hirota H, Nishida K, Sugiyama S, Okamoto K, Yamauchi-Takahara K, Yoshimura M, Mochizuki S, Hori M, Hirano T, Mochizuki N. Interaction of scaffolding adaptor protein Gab1 with tyrosine phosphatase SHP2 negatively regulates IGF-I-dependent myogenic differentiation via the ERK1/2 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 283:24234-24244, 2008

(10) Kidoya H, Ueno M, Yamada Y, Mochizuki N, Nakata M, Yano T, Fujii R, Takakura N. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J.* 27: 522-534, 2008

(11) Suzuki T, Yamanouchi S, Sunden Y, Orba Y, Kimura T, Sawa H\*: Natalizumab has no direct biological effect on JC virus infectivity in permissive human neural cell lines. *J Med Virol* (\* corresponding author) (in press)

(12) Suzuki T, Orba Y, Okada Y, Sunden Y, Kimura T, Tanaka S, Nagashima K, Hall WW, Sawa H\*: The human polyoma JC virus agnoprotein acts as a viroporin. *PLoS Pathogens* (\* corresponding author) (in press)

(13) Orba Y, Suzuki T, Makino Y, Kubota K, Tanaka S, Kimura T, Sawa H\*: Large T antigen promotes JC virus replication in G2-arrested cells by inducing ATM- and ATR-mediated G2 checkpoint signaling. *J Biol Chem* 285(2): 1544-1554, 2010 (\*corresponding author)

(14) Tabata M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Miyata K, Ito Y, Endo M, Urano T, Zhu HJ, Tsukano H, Tazume H, Kaikita K, Miyashita K, Iwawaki T,

Shimabukuro M, Sakaguchi K, Ito T, Nakagata N, Yamada T, Katagiri H, Kasuga M, Ando Y, Ogawa H, Mochizuki N, Itoh H, Suda T, Oike Y.  
Angiopoietin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance. *Cell Metab* 10: 178-188, 2009

(15) Kawahara A, Nishi T, Hisano Y, Fukui H, Yamaguchi A, and Mochizuki N. The sphingolipid transporter spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors. *Science* 323: 524-527, 2009

(16) Akira Murakami, Hiroshi Takasugi, Shinya Ohnuma, Yuuki Koide, Atsuko Sakurai, Satoshi Takeda, Takeshi Hasegawa, Jun Sasamori, Takashi Konno, Kenji Hayashi, Yoshiaki Watanabe, Koji Mori, Yoshimichi Sato, Atsuo Takahashi, Naoki Mochizuki, and Nobuyuki Takakura : Sphingosine 1-Phosphate Regulates Vascular Contraction via SIP3 Receptor: Investigation Based on a New SIP3 Receptor Antagonist. *Mol Pharmacol* in press, 2010.

## 2. 学会発表

(1) Ohtake N, Niikura K, Suzuki T, Nagakawa K, Sawa H, Ijiri K: Solid surface-promoted cellular uptake of immobilized virus-like particles. The 9th RIES-Hokudai International Symposium, January 2008, Sapporo, Japan

(2) Niikura K, Ohtake N, Suzuki T, Nagakawa K, Sawa H, Ijiri K: Package of Desired Proteins into Self-assembled Virus-like Particles. International Symposium on Engineering Micro-/Nano-Materials based on Self-Assembling and Self-Organization (ISEM2008), March 2008, Tokyo, Japan

(3) Ohtake N, Niikura K, Suzuki T, Nagakawa K, Sawa H, Ijiri K: Sialic Acid-Promoted Cellular Uptake of Immobilized Virus-Like Particles. XXIV International Carbohydrate Symposium, July 2008, Oslo, Norway

(4) Nagakawa K, Niikura K, Ohtake N, Suzuki T, Matsuo Y, Sawa H, Ijiri K: Gold nanoparticle Array based on viral structure. Korea-Japan Joint Forum (KJF) 2008 on Organic Materials for Electronics and Photonics (KJF2008), Chitose, Japan

(5) Ohtake N, Niikura K, Suzuki T, Nagakawa K, Sawa H, Ijiri K: Protein-enclosed nano capsules based on the self-assembly of viral proteins. The 2008 Asian Conference on Nanoscience and Nanotechnology (AsiaNANO2008), November 2008, Biopolis, Singapore

(6) Nagakawa K, Niikura K, Ishizuka N, Suzuki T, Matsuo Y, Sawa H, Ijiri K: The array of Gold nanoparticle based on a viral structure using sugar recognition. The 2008 Asian Conference on Nanoscience and Nanotechnology (AsiaNANO2008), November 2008, Biopolis, Singapore

(7) Sawa H: Cellular factors exploited by neurotropic virus. The 9th International Symposium Hamamatsu University School of Medicine COE Program Medical Photonics "Viruses Shed Light on Neuroscience", February 9th, 2008, Congress Center, Act City Hamamatsu, Japan (invited speaker)

(8) 福井一、花岡龍毅、川原敦雄、望月直樹 ゼブラフィッシュ Seryl-tRNA synthetase (SerRS) の新たな血管形成調節機能 第14回小型魚類研究会 岡崎、2008/9/20,21

(9) Suzuki T, Orba Y, Sunden Y, Kimura T, Sawa H : Viroprotein activity of JCV agnoprotein. The 9th International Symposium in NeuroVirology, June 2-6, 2009, Florida, USA

(10) Nagakawa K, Niikura K, Ohtake N, Suzuki T, Matsuo Y, Sawa H, Ijiri K: Gold nanoparticle array based on the surface structure of virus. International Symposium on Engineering Neo-Biomimetics, Oct. 9-10, Tokyo, Japan

(11) Ohtake N, Niikura K, Suzuki T, Mikuni S, Matsuo Y, Nagakawa K, Kinjo M, Sawa H, Ijiri K: Preparation of functionalized virus-like particles enabling pH-mediated release of target molecules, March 25-26, 2010, Tomakomai, Japan

(12) 福井一. Seryl-tRNA synthetase (SARS) contributes to the vascular development in zebrafish. 第61回日本細胞生物学会 名古屋(2009)6月2-4日

(13) Fukuhara S. ANGIOSTASIS AND ANGIOGENESIS REGULATED BY ANGIOPOIETIN-1/TIE2 RECEPTOR SYSTEM. The 7th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology. Ewha Womans University, Seoul, Korea, 2009.8.20-21

(14) Fukuhara S. ANGIOSTASIS AND ANGIOGENESIS REGULATED BY ANGIOPOIETIN-1/TIE2 RECEPTOR SYSTEM. Japan-Mexico Workshop. Mexico city, 2009.2.25-27

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特願 2008-245177

「スフィンゴシン1-リン酸の新規トランスポーター分子」 望月直樹他、3名

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし



## 冠・脳血管攣縮の抑制薬としてのS1P3受容体拮抗薬の 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(スフィンゴシン1-リン酸)受容体拮抗薬TY-52156からさらに修飾基の変換により新たにTY-53958を開発した。S1P3の生理的作用として、心保護作用を有し、ラット心筋梗塞モデルを用いた検討によりS1P3受容体拮抗薬自体が心筋障害を誘発する可能性は低いことがわかった。昨年同定したS1PトランスポーターSpns2の発現をRT-PCRならびに免疫組織学的に検討した結果、血管内皮細胞と平滑筋細胞に認めた。Spns2は血管形成には不可欠ではないことがわかった。

### 分担研究者

- (1) 北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター  
澤 洋文
- (2) トーアエイヨー株式会社 東京研究所 村上 晶
- (3) 国立循環器病センター研究所 福原茂朋

### A. 研究目的

本研究の目的は、S1P3特異的受容体拮抗薬を創薬して、臨床適応と考える血管攣縮を予防あるいは阻害することである。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S1P1-S1P5の5つの受容体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と考えられている。

本研究ではS1P3の拮抗薬を開発し、血管攣縮に対するこの薬剤の効果を判定して、臨床使用に発展させる。まず、血管攣縮に対しての抑制効果を

- ① ex vivoの実験で確認すること
- ② 薬剤の生体の血管以外への作用を調べること
- ③ S1P3が発現する内皮細胞・平滑筋細胞への影響
- ④ 他の組織・臓器でのS1P3の発現を検討して、副作用の発現予想を行うことを目的とした。

さらに、TY52156から新たに有効な薬剤をさらに創出して低濃度でかつ吸収の良い薬剤を開発することを目指した。生物学的にS1Pの情報伝達研究を進めて、S1Pの生体での機能(生理的ならびに病態)を突き止めてS1P3拮抗薬の適応症を探る研究となることを目標にした。このため、S1PトランスポーターSpns2の詳細な検討を行うことを最終年度の目標にした。

### B. 研究方法と材料

#### 1) S1P3受容体拮抗薬のスクリーニング

S1P3受容体拮抗薬のスクリーニングのために、S1P1, S1P2 又は S1P3 受容体をそれぞれ恒常発現させたCHO-K1細胞を調製して用いた。候補化合物によるS1P(0.01 uM)由来 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の抑制作用を、蛍光カルシウム指示薬であるFura-2<sup>TM</sup>(Molecular Probes, Inc., OR, USA)を用いて測定した。測定機器には蛍光セルアッセイシステムFlexStation®(Molecular Devices Corporation, CA,

USA)を用いた。評価化合物のS1P3受容体への結合様式を検討するために、S1P3受容体変異株(S1P3-F263L)を用い、上記と同様の検討を実施した。

#### 2) S1P3受容体拮抗薬の候補化合物の合成

S1P3受容体拮抗薬として有望な候補化合物の関連誘導体の合成は、パーソナル有機合成装置ChemiStation<sup>TM</sup> PPW2000(Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)によるパラレル合成と、High-Performance FLASH Chromatography (HPFC) system Horizon<sup>TM</sup>またはQuad3<sup>TM</sup>(Biotage AB and Biosystems, Uppsala, Sweden)を用いた精製にて行った。

#### 3) ラット心筋梗塞モデルへの影響評価

左冠動脈前下行枝を結紮後、再還流障害へのTY-52379の効果を調べた。エバンスブルー-トリフェニルテトラゾリウムクロライドで染色し、虚血領域率(虚血領域/左心室面積(虚血領域+非虚血領域))及び心筋梗塞サイズ(梗塞領域/虚血領域)を算出した。TY-52379(100 mg/kg)は虚血前4 hrに経口投与した。心筋梗塞サイズはCK値でも検討した。血漿中のCK値は、再灌流24 hr後に採血した血液サンプルを遠心分離により血漿を分離・採取した。血漿中CK値は島津生化学自動分析装置にて測定した。

#### 4) S1P3・Spns2の発現の検討

1) 抗体: S1P3/Edg3に対する抗体はSanta Cruz社(H-70, sc-30024)を用いた。sphingolipid transporter Spns2の抗体は細胞内ドメイン(spns82)または細胞外ドメイン(spns527)を抗原として作成した2種類のpolyclonal抗体を用いた。

対象: C57BL/6及びBalb/cマウス

#### 2) 免疫染色方法:

切片の作成: 臓器は中性緩衝ホルマリン溶液にて固定し、エタノールおよびキシレンで脱水した後、パラフィン包埋した。もしくは臓器採集後、O.C.T.

compound を用いて凍結後、4% paraformaldehyde もしくは Acetone で 4°C、15 分間固定を行なった。パラフィン切片については以下の方法で染色を行った。抗原賦活化も行った。1 次抗体 (spns2 は 4000 倍、spns527 は 3000 倍、S1P3/Edg3 は 200 倍で 1% BSA/Tween 20/PBS(-) で希釈した。) を 4°C で一晩反応させた。その後 Envision (+) (ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体、DAKO) を室温で 90 分間反応させた。反応後 Tween 20/PBS(-) で 5 分ずつ 3 回洗浄した。発色反応は 3,3'-diaminobenzidine を用いた。凍結切片での免疫染色は以下のように行った: 抗 Edg3 抗体は通常の臓器は 250 倍、脳は 400 倍希釈で、抗 Spns2 抗体は通常臓器 4000 倍、脳は 5000 倍で反応させた。その後はパラフィン切片と同様の手順で染色を行った。免疫染色を行った slide は顕微鏡で観察の後、Nikon 社 Eclipse 80i を用いて画像にした。

3) RT-PCR 法による Spns2 mRNA の発現検討。

i) マウス各臓器から Trizol を用いて RNA を抽出し、DNase 処理後、Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) および random primer を用いて cDNA を作成した。

ii) Mus musculus spinster homolog2, mRNA (NCBI NM-153060) の sequence に基づいて、SPNS2 548-568F、SPNS2 945-923R の primer を設計した。

iii) PCR は Pfu94 DNA Polymerase (Stratagene) を用いて、10 x PCR Buffer 2  $\mu$ l, 2 mM dNTP (each) 4  $\mu$ l, 10  $\mu$ M Primer (F&R) 1  $\mu$ l each, Taq 0.2  $\mu$ l, template cDNA 1  $\mu$ l, DW 10.8  $\mu$ l の系で行った。

### 5) Spns2 の変異体 Zebrafish の血管形成についての検討

(1) Zebrafish: 野生型 ABstrain、と transgenic line Fli1:EGFP (血管内皮細胞特異的 EGFP 発現 fish) は定法にしたがって飼育した。Spns2 変異体も同様に飼育した。

(2) Spns2 変異体と、Fli1:EGFP トランスジェニックフィッシュ (Tg) を交配させて、Spns2 の遺伝子変異を持つ個体の血管の発生パターンを可視化できる個体を作製した。

(3) Spns2 の血管形成への影響を Spns2 mRNA の胚への injection によって検討した。胚は Fli1:EGFP Tg 個体から得られた血管可視化ゼブラフィッシュを用いた。

(4) 顕微鏡観察: 血管の発生の形態学的検討は、Fli1:EGFP/Spns2 個体を 24 hours post ferturization (hpf) から sequential に time point をとって野生型 Fli1:EGFP 個体の血管と比較によって行った。緑色蛍光の検出により血管を描出するように実体顕微鏡を使用した。明視野観察も同時に行った。

(5) human Spns2 (zSpns2) と human Spns2 (hSpns2) の cDNA に EGFP (C 末端) をタグとして挿入して、培養細胞に発現させて、Spns2 の局在を検討した。

### 6) floxed spns2 マウスの作製

target ベクターの構築のための遺伝子情報とし

て NCBI と MGI から Spns2 の情報を入手した。

target ベクターの構築は、Frp で neo (+) polyA を挟み込み、さらに外側に loxP 配列が配置されるようにした。recombinant ES 細胞の選択とキメラマウスの作製は、定法通りに行った。

### (倫理面への配慮)

北海道大学での研究は、北海道大学動物実験委員会で承認されている。国立循環器病センターでのゼブラフィッシュを用いた動物実験は申請を行い、遺伝子組み換えの許可も得たのち (課題番号 09-26) に動物実験の取扱い指針に従って実験を行った (承認番号 9001)。トーアエイヨー株式会社における実験動物の飼育管理及び動物実験 (動物を利用する試験研究) の計画・実施に際し、科学的及び動物福祉の観点からも遵守すべき事項を定め、実験動物の飼育管理及び動物実験を適正に実施することを目的に制定された、トーアエイヨー実験動物利用に関する規程に基づき実施した。

## C. 研究結果

### C-1, 新たな S1P3 選択的阻害剤 TY-53958

選択的な S1P3 受容体拮抗薬として見出した TY-52156 を基盤とした創薬手法に加え、S1P3 受容体拮抗薬として既知骨格を精査し、それらの融合による新規化合物の創出を目指した。その結果、TY-52156 ( $IC_{50}=0.47$   $\mu$ M) に匹敵する S1P3 受容体拮抗作用を有し ( $IC_{50}=0.41$   $\mu$ M)、かつ良好な選択性を示す TY-53958 を見出した。新規に見出された TY-53958 の S1P3 受容体への結合様式を推定すべく、S1P3 受容体に特異的な 263 番目のアミノ酸残基 フェニルアラニン (F263) に変異を入れた受容体安定細胞株 (S1P3-F263L) を用い、野生型と比較してその阻害活性に変化が生じるかを検証した。その結果 (Table.2)、TY-53958 の S1P3 受容体拮抗作用の変化は TY-52156 のそれと類似した傾向を示した。

### C-2, TY-52379 の心筋梗塞巣縮小効果

ラット心筋梗塞モデルにおける TY-52379 (TY-52156 塩酸塩) の梗塞サイズへの影響、及び心筋傷害マーカーとなる血漿中 CK 値の挙動について検証を行った。虚血時間 15 min モデルでは、溶媒対照群及び TY-52379 投与群の虚血領域の大きさはそれぞれ虚血領域が  $36.2\pm 2.6\%$  ( $n=6$ ) 及び  $33.0\pm 4.7\%$  ( $n=8$ ) であったのに対して、心筋梗塞サイズはそれぞれ  $45.5\pm 4.1\%$  ( $n=6$ ) 及び  $38.1\pm 6.4\%$  ( $n=8$ ) と若干減少傾向を示した (Fig.1)。心筋障害の生化学的マーカーとして知られる血漿中 CK 値も梗塞サイズと同様の傾向を示したが有意ではなかった。

### C-3, Spns2 の発現

マウスの脳、腎臓、心臓、肺で両抗体ともほぼ同様の免疫反応を得ることが出来た。脳では実質の小血管の内皮および血管平滑筋に陽性反応を認めた。腎臓では血管の内皮および血管平滑筋、ま

た spns2 では糸球体にも陽性所見を認めた。心臓では冠状動脈の内皮および血管平滑筋、また spns527 では心筋周囲の内皮細胞に陽性反応が確認された。肺では肺胞上皮および血管内皮細胞に陽性反応を認めた。

抗 Spns2 抗体を用いた免疫染色ではホルマリン固定したパラフィン切片、凍結切片の 4% paraformaldehyde もしくは Acetone 固定等種々の方法を検討した結果、凍結切片を用いて Acetone で 4°C、15 分間固定した条件が最適であることが判明した。マウスの脳、腎臓、心臓、肺で両抗体ともほぼ同様の免疫反応を得ることが出来た。脳では実質の小血管の内皮および血管平滑筋に陽性反応を認めた。腎臓では血管の内皮および血管平滑筋、また spns82 では糸球体にも陽性所見を認めた。心臓では冠状動脈の内皮および血管平滑筋、また spns527 では心筋周囲の内皮細胞に陽性反応が確認された。肺では肺胞上皮および血管内皮細胞に陽性反応を認めた。

RT-PCR 法を用いてマウス各臓器での Spns2 の mRNA の発現を検討した結果、脳、腎臓、心臓、肺での mRNA の発現が強かった。

#### C-4, S1P3 の発現

Spns2 の染色と同条件で抗 Edg3 抗体による免疫染色も行った。Edg3 の陽性反応は Spns2 と同様に、脳では実質の小血管の内皮および血管平滑筋、腎臓では血管の内皮および血管平滑筋、心臓では冠状動脈の内皮および血管平滑筋、心筋周囲の内皮細胞、肺では血管内皮細胞に陽性反応を認めた。C57/BL6 と Balb/c マウスでは結果に差異は認められなかった。

#### C-5, Spns2 の血管形成への影響

Spns2 と Fli1:EGFP Tg との交配によって得られた胚の血管形成を計時的に観察した。胚発生の 24 時間以内に形成される体幹の大血管である背側大動脈、後主静脈の形態学的な異常は認めなかった。また、背側大動脈から背側に向かって伸長する体節間血管も背側吻尾吻合血管に到達する経過中に異常は認めなかった。背側吻尾吻合血管も正常に形成された。野生型の Fli1:EGFP TG 由来の胚に Spns2 mRNA を injection して Spns2 の発現が増加した時には、体幹の血管形成に異常を示した。一胚に 500 pg - 1ng によってこの異常が見られたが、それ以下の低発現では血管形成の異常は認めなかった。以上の結果から、Spns2 は血管形成には不可欠ではないが、過剰に S1P が胚で細胞外に排出されるときには胚発生に異常を伴うことがわかった。

#### C-6 Spns2 の細胞膜での発現

zSpns2, hSpns2 のカルボキシ末端(12 回膜貫通型 S1P トランスポーターのカルボキシ末端細胞内ドメイン)に EGFP タグが付加されるように細胞発現ベクターを構築した。CHO 細胞に発現させて、局在を調べたところ細胞膜に局在した。他の Spns フ

ファミリー分子の Spns1, Spns3 についても同様に局在を検討したところ、Spns1 は細胞膜に、Spns3 は細胞内小器官の膜に局在した。

#### C-7 floxed spns2 マウスの作製

Chr11:72265140-72303406 bp, - strand に位置している。exon1 を target するべく、遺伝子配列情報をもとに、PCR を行ったが、G、C 塩基配列に富んでいるために増幅できなかった。このために、exon2 を target することにした。PCR で増幅ができた。キメラマウスは 2 系統が確立できた。このキメラマウス (ICR 系で ES 細胞は B6×CBA) と野生型マウスの交配を行い、germline への transmission も確認できた。

#### D. 考察

トーアエイヨー株式会社の創薬手法と S1P3 受容体の既知骨格の修飾による合成展開から、TY-52156 のバックアップ化合物として有望な TY-53958 を見出した。一方、化合物合成に加え、市販化合物ライブラリー (Enamine 社) から新規母核候補の探索を行ったが、活性、選択性に優れた化合物を見出せなかった。なお、ライブラリー化合物からは S1P1 受容体に選択性を示す化合物は散見されている (data not shown)。これは両受容体の選択性を決定する一因として F263 (S1P3 受容体) 及び L276 (S1P1 受容体) の立体的配置の差異が報告されている。これは、両受容体の同アミノ酸部位近辺の活性空間長が 1.5-1.8 Å (S1P3 受容体) 及び 50-100 Å (S1P1 受容体) と差が認められることによる。よって、活性空間の差が化合物の許容性に影響を与えていると考えられる。見出された S1P1 受容体に選択的作用を示す化合物からの合成展開も考慮したが、S1P3 受容体は活性空間が狭いため、化合物の許容性が低く、また、今回見出された化合物が S1P1 受容体のどの部位に相互作用しているか不明であるため、S1P3 受容体拮抗作用に転化する構造展開は厳しいと考えて、合成展開は断念した。

一方、S1P3-F263L を用いた検討から、TY-53958 の S1P3 受容体阻害形式は、TY-52156 と類似することが示唆された。F263 は S1P3 受容体に特異的なアミノ酸残基であり、S1P3 受容体選択性 (vs S1P1 受容体) に寄与していることが報告されている。TY-52156 及び TY-53958 は S1P3-F263L を用いた検討で約 1/20 にまで受容体拮抗作用が減弱したことから、本残基への強い相互作用が想定された。一方、S1P の S1P3 受容体への結合に寄与するアミノ酸残基 (R114/E115、F119) に対してこれら薬剤がどのような挙動を示すかは現状不明である。

S1P3 受容体拮抗薬は class effect として単独処理で冠血流量増加作用を示すと考えられた。これまで、TY-52156 を含めた異なる母核の S1P3 受

容体拮抗薬で、摘出心における冠血流量増加作用を確認している。TY-53958 が本作用を有するかは未確認であるが、TY-53958 関連誘導体 (S1P3 受容体への  $IC_{50} < 1.0 \mu M$ 、難溶性で医薬として不適)は、ラット摘出心を用いた検討で、薬剤単独 ( $0.1 \mu M$ ) により、 $Ca^{2+}$  拮抗薬 (Amlodipine) に匹敵する顕著な冠血流量増加作用を示すこと、冠血流量増加の一因となる L 型  $Ca^{2+}$  チャネル阻害作用及び Rho kinase 阻害作用を示さないこと (いずれも  $10 \mu M$  で検討) を確認している (data not shown)。冠血流量増加に寄与する機序は多数想定されるが、今後、本拮抗薬の冠血流量増加作用の機序解明とともに、これら化合物の *in vivo* での実証が課題である。

ラット心筋梗塞モデルを用いた検討から、選択的な S1P3 受容体拮抗薬は心筋梗塞サイズに影響を与えない可能性が示唆された。S1P の心保護作用に関与する受容体については様々な報告がある (S1P1, S1P2 又は S1P3 受容体の単独又は 2 種類)。試験に供した TY-52739 (TY-52156 塩酸塩) は単独処理で冠血流量増加作用が確認されており、このことが梗塞サイズの減弱に繋がる期待もあったが、本検討で顕著な効果は確認できなかった。S1P3 受容体拮抗作用による梗塞サイズの増悪及び寛解作用が相殺された可能性、又は他の受容体からの代償機能が作用した可能性もある。これらの点は様々なプロファイルを有する化合物を評価することで明らかとなるが、少なくとも本検討から S1P3 受容体を選択的な拮抗薬は虚血再灌流後 24 hr における心筋梗塞サイズに対しては寛解又は増悪作用を示さず、本薬剤が心疾患をターゲットとした治療薬に供する懸念が一つ払拭された。

S1P が直接冠攣縮反応を生じる報告は未だない。しかし、S1P は活性化血小板から放出されること、S1P 血漿中濃度と冠動脈疾患に相関があること、S1P が著しい冠血流量の低下作用を示し S1P3 受容体拮抗薬が有意な寛解作用を示すことから、S1P が血管攣縮性疾患の発症に寄与し、その機序に S1P3 受容体が関与することが想定される。これらを鑑みると、急性冠動脈疾患に代表される血栓が引き金となった冠血管攣縮に伴う広範囲の梗塞形成に S1P-S1P3 受容体が重要な役割を果たし、S1P3 受容体拮抗薬がその治療法として極めて有用であることを示唆するものである。今後、S1P の病態への関与を検証する必要がある。

S1P がまずどこで生成され、血管に発現する S1P 受容体に作用するかを調べることは重要である。S1P が細胞内で作られ、細胞膜表面に発現する S1P 受容体に作用するには輸送体が必要であると考えられていた。昨年度の S1P 輸送体 Spns2 を同定し本年度は血管形成における Spns2 の機能をゼブラフィッシュを用いて調べた。

Spns2 の変異体では血管形成に障害がないことがわかった、つまり Spns2 が血管形成に不可欠ではないことを示している。ただし Spns2 の高発現により血管形成を含む体幹部の形成に異常をきたすことから S1P が体幹部形成に重要であることが示唆された。さらに、本研究では血管内腔の形成は観察しておらず 管腔形成の異常の有無は本研究

では検討していない。この点は今後さらに、血球の流れを可視化できる Tg フィッシュとの交配により調べる必要があると考えた。

どの細胞から輸送体によって細胞外に分泌された S1P が S1P3 受容体に作用するのかが確認することは、生体での S1P の作用を知る上で非常に重要であると考えられる。血栓から(血小板あるいは赤血球)の S1P あるいは血管内皮細胞からの S1P のいずれが S1P3 を活性化するかは、重要な問題である。従って今後は、S1P の細胞あるいは組織特異的な欠損による生体機能への影響を調べる必要があると考えられた。

本研究では Spns2 の mRNA の発現を RT-PCR によって検索し、マウスの脳、腎臓、心臓、肺で mRNA の発現が強く認められた。さらに抗 Spns2 抗体でその発現部位を検索した結果、凍結切片を Acetone で 4℃、15 分間固定した条件において、脳、腎臓、心臓、肺の血管の内皮および平滑筋で Spns2 の免疫陽性反応が認められた。また、Edg3 の発現も Spns2 の発現と大体一致していた。

## E. 結論

S1P3 特異的阻害剤 TY-52156 からさらに改良した TY-52739, TY-53958 を合成し、冠攣縮抑制効果を確認した。S1P トランスポーター Spns2 が S1P3 と同様に血管に発現することもわかった。さらに病態における S1P トランスポーターの機能を調べることを可能にする floxed spns2 マウスも作製した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Suzuki T, Yamanouchi S, Sunden Y, Orba Y, Kimura T, Sawa H\*: Natalizumab has no direct biological effect on JC virus infectivity in permissive human neural cell lines. **J Med Virol** (\* corresponding author) (in press)

(2) Suzuki T, Orba Y, Okada Y, Sunden Y, Kimura T, Tanaka S, Nagashima K, Hall WW, Sawa H\*: The human polyoma JC virus agnoprotein acts as a viroporin. **PLoS Pathogens** (\* corresponding author) (in press)

(3) Orba Y, Suzuki T, Makino Y, Kubota K, Tanaka S, Kimura T, Sawa H\*: Large T antigen promotes JC virus replication in G2-arrested cells by inducing ATM- and ATR-mediated G2 checkpoint signaling. **J Biol Chem** 285(2): 1544-1554, 2010 (\*corresponding author)

(4) Tabata M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Miyata K, Ito Y, Endo M, Urano T, Zhu HJ, Tsukano H, Tazume H, Kaikita K, Miyashita K, Iwawaki T, Shimabukuro M, Sakaguchi K, Ito T, Nakagata N, Yamada T, Katagiri H, Kasuga M, Ando Y, Ogawa H, Mochizuki N, Itoh H, Suda T, Oike Y. Angiopoietin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance. **Cell Metab** 10: 178-188, 2009

(5) Kawahara A, Nishi T, Hisano Y, Fukui H,