

B, The representative pictures of BMMs from WT and IQGAP1<sup>-/-</sup> mice at day 7 of primary cultured in the presence of 5% serum and 20 ng/ml of M-CSF (growing condition). The elongation ratio (ratio between longest and shortest cell axis) was measured. The result is expressed by mean ± SEM of ≥70 cells from each population over three separate experiments (p<0.01).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013440.s003 (0.05 MB PDF)

**Figure S4** WT and IQGAP1<sup>-/-</sup> BM-derived macrophages (BMMs) were placed on upper Boyden chambers, and 100 ng/ml SDF-1α or 50 ng/ml VEGF was placed in lower chambers for 6 hours. The number of migrated cells was counted in high power

field (X20 objective). Data were obtained at least 3 independent cultures in each group from duplicated samples. N.S. represents non-significant.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013440.s004 (0.10 MB PDF)

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NU TF MUF. Performed the experiments: NU MR JO RM RC. Analyzed the data: NU. Contributed reagents/materials/analysis tools: RM WFB. Wrote the paper: NU TF MUF.

## References

- Silvestre JS, Mallat Z, Tedgui A, Levy BI (2008) Post-ischemic neovascularization and inflammation. *Cardiovasc Res* 78: 242–249.
- Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C (1994) Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 55: 410–422.
- Ochoa O, Sun D, Reyes-Reyna SM, Waite LL, Michalek JE, et al. (2007) Delayed angiogenesis and VEGF production in CCR2<sup>-/-</sup> mice during impaired skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R651–661.
- Shireman PK (2007) The chemokine system in arteriogenesis and hind limb ischemia. *J Vasc Surg* 45(Suppl A): A48–56.
- Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, et al. (2007) Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* 204: 1057–1069.
- Shireman PK, Contreras-Shannon V, Ochoa O, Karia BP, Michalek JE, et al. (2007) MCP-1 deficiency causes altered inflammation with impaired skeletal muscle regeneration. *J Leukoc Biol* 81: 775–785.
- Brecht N, Gomez E, Bignon M, Khallou-Laschet J, Dussiot M, et al. (2008) Modulation of macrophage activation state protects tissue from necrosis during critical limb ischemia in thrombospondin-1-deficient mice. *PLoS One* 3: e3950.
- Shibuya M, Claesson-Welsh L (2006) Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 312: 549–560.
- Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, et al. (2006) VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 124: 175–189.
- Heschel C, Lehmann R, Honold J, Assmus B, Aicher A, et al. (2004) Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation* 109: 1615–1622.
- Tojo T, Ushio-Fukai M, Yamaoka-Tojo M, Ikeda S, Patrushev NA, et al. (2005) Role of gp91phox (Nox2)-containing NAD(P)H oxidase in angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Circulation* 111: 2347–2355.
- Benson LB, Kan HM, Wang N, Wallrabe H, Davidson LA, et al. (2007) IQGAP1 regulates cell motility by linking growth factor signaling to actin assembly. *J Cell Sci* 120: 658–669.
- Brown MD, Sacks DB (2006) IQGAP1 in cellular signaling: bridging the GAP. *Trends Cell Biol* 16: 242–249.
- Le Clainche C, Schlaepfer D, Ferrari A, Klingauf M, Grohmanova K, et al. (2007) IQGAP1 stimulates actin assembly through the N-WASP-Arp2/3 pathway. *J Biol Chem* 282: 426–435.
- Briggs MW, Sacks DB (2003) IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. *EMBO Rep* 4: 571–574.
- Mateer SC, Wang N, Bloom GS (2003) IQGAPs: integrators of the cytoskeleton, cell adhesion machinery, and signaling networks. *Cell Motil Cytoskeleton* 55: 147–155.
- Brandt DT, Marion S, Griffiths G, Watanabe T, Kaibuchi K, et al. (2007) Dia1 and IQGAP1 interact in cell migration and phagocytic cup formation. *J Cell Biol* 178: 193–200.
- Yamaoka-Tojo M, Ushio-Fukai M, Hilenski L, Dikalov SI, Chen YE, et al. (2004) IQGAP1, a novel vascular endothelial growth factor receptor binding protein, is involved in reactive oxygen species-dependent endothelial migration and proliferation. *Circ Res* 95: 276–283.
- Meyer RD, Sacks DB, Rahimi N (2008) IQGAP1-dependent signaling pathway regulates endothelial cell proliferation and angiogenesis. *PLoS One* 3: e3848.
- Ikeda S, Yamaoka-Tojo M, Hilenski L, Patrushev NA, Anwar GM, et al. (2005) IQGAP1 regulates reactive oxygen species-dependent endothelial cell migration through interacting with Nox2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2295–2300.
- Yamaoka-Tojo M, Tojo T, Kim HW, Hilenski L, Patrushev NA, et al. (2006) IQGAP1 mediates VE-cadherin-based cell-cell contacts and VEGF signaling at adherence junctions linked to angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1991–1997.
- White CD, Brown MD, Sacks DB (2009) IQGAPs in cancer: a family of scaffold proteins underlying tumorigenesis. *FEBS Lett* 583: 1817–1824.
- Li S, Wang Q, Chakladar A, Bronson RT, Bernards A (2000) Gastric hyperplasia in mice lacking the putative Cdc42 effector IQGAP1. *Mol Cell Biol* 20: 697–701.
- Couffignal T, Silver M, Zheng LP, Kearney M, Witzensbichler B, et al. (1998) Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol* 152: 1667–1679.
- Urao N, Inomata H, Razvi M, Kim HW, Wary K, et al. (2008) Role of nox2-based NADPH oxidase in bone marrow and progenitor cell function involved in neovascularization induced by hindlimb ischemia. *Circ Res* 103: 212–220.
- Shireman PK, Quinones MP (2005) Differential necrosis despite similar perfusion in mouse strains after ischemia. *J Surg Res* 129: 242–250.
- Segal BH, Kuhns DB, Ding L, Gallin JI, Holland SM (2002) Thioglycollate peritonitis in mice lacking C5, 5-lipoxygenase, or p47(phox): complement, leukotrienes, and reactive oxidants in acute inflammation. *J Leukoc Biol* 71: 410–416.
- Brennan AM, Suh SW, Won SJ, Narasimhan P, Kauppinen TM, et al. (2009) NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat Neurosci* 12: 857–863.
- Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, et al. (2005) Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol* 175: 342–349.
- Munugalavada V, Borneo J, Ingram DA, Kapur R (2005) p85alpha subunit of class IA PI-3 kinase is crucial for macrophage growth and migration. *Blood* 106: 103–109.
- Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griendling KK (1998) p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem* 273: 15022–15029.
- Limbourg A, Korff T, Napp LC, Schaper W, Drexler H, et al. (2009) Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. *Nat Protoc* 4: 1737–1746.
- Heil M, Schaper W (2004) Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis). *Circ Res* 95: 449–458.
- Heil M, Eitenmuller I, Schmitz-Rixen T, Schaper W (2006) Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *J Cell Mol Med* 10: 45–55.
- Usatyuk PV, Gorshkova IA, He D, Zhao Y, Kalari SK, et al. (2009) Phospholipase D-mediated activation of IQGAP1 through Rac1 regulates hyperoxia-induced p47phox translocation and reactive oxygen species generation in lung endothelial cells. *J Biol Chem* 284: 15339–15352.
- Niethammer P, Grabher C, Look AT, Mitchison TJ (2009) A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* 459: 996–999.
- Noritake J, Watanabe T, Sato K, Wang S, Kaibuchi K (2005) IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration. *J Cell Sci* 118: 2085–2092.
- Bogatkevich GS, Ludwicka-Bradley A, Singleton CB, Bethard JR, Silver RM (2008) Proteomic analysis of CTGF-activated lung fibroblasts: identification of IQGAP1 as a key player in lung fibroblast migration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295: L603–611.
- Takahashi K, Suzuki K (2006) Regulation of protein phosphatase 2A-mediated recruitment of IQGAP1 to beta1 integrin by EGF through activation of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Cell Physiol* 208: 213–219.
- Fan J, Frey RS, Rahman A, Malik AB (2002) Role of neutrophil NADPH oxidase in the mechanism of tumor necrosis factor-alpha-induced NF-kappa B activation and intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells. *J Biol Chem* 277: 3404–3411.
- Nakhaei-Nejad M, Zhang QX, Murray AG (2009) Endothelial IQGAP1 regulates efficient lymphocyte transendothelial migration. *Eur J Immunol* 40: 204–213.

# 心不全の治療標的としてのアデニル酸シクラーゼ

— 酵素サブタイプを標的とした創薬

Adenylyl cyclase as a target of heart failure therapy



石川 義弘

Yoshihiro ISHIKAWA

横浜市立大学大学院医学研究科循環制御医学

◎慢性心不全治療における $\beta$ 遮断薬は、各国のガイドラインにも記載されている標準的治療薬となっている。しかし導入には副作用も多く、同じ標準的治療薬であるRAS系阻害薬に比べて使い勝手が悪い。これは臓器選択性や心機能抑制効果によるところが大きい。そこで臓器選択性が高く、心機能抑制をもたない $\beta$ 遮断薬があればよい。そのひとつの可能性が、心臓型アデニル酸シクラーゼの阻害薬である。心臓型アデニル酸シクラーゼは心臓に高発現し、 $\beta$ 受容体の下流に位置する。遺伝子操作動物や薬理実験から、同酵素の活性阻害は心機能低下を起こさずに心筋保護作用を示すことがわかっている。さらに長年にわたって使用されてきた抗ウイルス薬の一部に心臓型酵素の阻害作用があることもわかっている。近年では細胞内酵素サブタイプが創薬標的の新しい潮流となっているが、心不全治療においても同様の可能性があるかもしれない。

**Key word** 心不全, アデニル酸シクラーゼ, cAMP, 心臓型サブタイプ

創薬の対象がこれまでにない広がりを見せている。これまでの主体であった低分子化合物から、抗体を用いた生物学的製剤へのシフトがあるかと思えば、古典的な受容体作動薬だけでなく、細胞内酵素サブタイプを標的としたシフトがある。後者の代表例は間違いなくパイアグラ®であろうが、それ以外にもPKCなどのサブタイプを標的にした新薬の開発があいついでいる。つい最近の『Nature Review』にまとめられたように、アデニル酸シクラーゼも認知症やParkinson病の治療、さらには鎮痛薬としての開発が進んでいる<sup>1)</sup>。本稿ではそのなかでも、すでに一部が実用化されている心不全への応用を、その背景を中心にまとめてみたい。

## 交感神経と心機能

心機能は心筋収縮力によって規定される。神経内分泌因子による心機能調節の最大因子が交感神経であることは古典的に知られている。交感神経活動亢進によって、神経シナプス末端から分泌さ

れたノルアドレナリンが、心筋細胞膜上に存在する $\beta$ カテコールアミン受容体に結合する。 $\beta$ カテコールアミン受容体は活性化型となり、共役する刺激性G(Gs)蛋白質を活性化する。活性化されたGs蛋白質は、同じく膜結合型酵素であるアデニル酸シクラーゼを活性化する。活性化となったアデニル酸シクラーゼは、ATPを基質としてcAMPを産生する。cAMPは細胞内セカンドメッセンジャーとして、cAMP依存性リン酸化酵素であるプロテインキナーゼA(PKA)を活性化する。そしてこのPKAが心機能調節にかかわるさまざまな蛋白質をリン酸化することによって、心筋の細胞機能を調節していく(図1)<sup>2)</sup>。

## 急性心不全とカテコールアミン

心不全を心機能の低下した状態と一般的に定義するのなら、急激に低下した心収縮力を回復させてやることが心不全の治療となる。交感神経刺激が心機能を上げるなら交感神経を刺激してやればよい。つまり $\beta$ カテコールアミン受容体を活性化

し、アデニル酸シクラーゼの活性化を経て、心筋細胞内 cAMP 濃度の上昇と PKA の活性化を引き起こし、心収縮力を増強する。したがって薬物治療としての急性心不全の治療は、このプロセスのどこを活性化しても同様の効果が得られるはずである。一般的にはドパミンなどのカテコールアミン製剤による受容体レベルの刺激、あるいは心筋細胞内 cAMP 濃度を上昇させるためのホスフォジエステラーゼ(PDE)阻害薬の使用となる。後者はミルリノンに代表されるように、サイクリックヌクレオチド分解酵素である PDE を阻害することによって、cAMP の産生を変えずに分解を抑制し、結果的に細胞内 cAMP 濃度を高めようというものである。あるいはアデニル酸シクラーゼの直接刺激剤であるコルホルシングルパートでも cAMP 産生が亢進して cAMP 濃度は上昇する。いずれにせよ心筋細胞内の cAMP を上げることが目的となる。

以上の心不全治療薬は、きわめてオーソドックスなカテコールアミンシグナルの活性化という観点に基づいた治療薬である。交感神経系のβカテコールアミン受容体やアデニル酸シクラーゼ、さらにホスフォジエステラーゼはすべての臓器に発現するから、いかなればドパミンにせよ PDE 阻害薬、アデニル酸シクラーゼ刺激薬はすべての臓器の交感神経系のシグナルを増強することになる。心臓における交感神経刺激効果は比較的前面に出てくるので強心効果として現れるが、すべての臓器の交感神経シグナルを活性化してしまうのがよいのかは別の論議となってしまう。

### 慢性心不全とカテコールアミン

慢性心不全の治療は急性心不全とは治療のベクトルが反対向きとなる。長期にわたって亢進しすぎてしまった交感神経系を、いかに上手に抑制してやるのが治療のポイントとなる。さきに述べた交感神経系シグナルの抑制という観点から、RAS 系を除けばβカテコールアミン受容体阻害薬、つまりβ遮断薬がもっとも多く用いられる。

ところが、RAS 系阻害薬の導入が比較的簡単であるのに比べてβ遮断薬はかならずしも容易ではない。慢性心不全では低下してしまった心機能を

交感神経で何とか補っていることを考えると、交感神経刺激を遮断してしまえば、心機能が一過性にせよ低下することは避けられない。そこでβ遮断薬はきわめて低用量からの導入となる。ちなみにカルベジロールの最小容量錠はわが国では 1.25 mg(アーチスト®)であるが、アメリカでは 3.125 mg(Coreg®)である。いかにわが国では低用量に関心があるかわかる。しばらく前まで心不全患者へのβ遮断薬の導入が入院で行われていたことも考えると、いかに重要な問題であるのかがみえてくる。これ以外にも、β遮断薬には臓器選択性の問題がある。β受容体は肺気管支にも発現するため、気管支喘息や慢性肺気腫の患者にβ遮断薬をはじめするには注意が必要である。慢性心不全患者の多くが虚血性心疾患をもっていることを考えると、喫煙者の割合がきわめて高い。そのため慢性心不全と肺気腫の合併は珍しくなく、これもβ遮断薬を導入する足かせとなっている。

### β遮断薬に代わる交感神経作動薬

急性にせよ慢性にせよ、心不全治療にβカテコールアミン受容体作動薬が全世界的に使われているのは、治療効果がはっきりしているからである。つまり、βカテコールアミン受容体シグナルの制御によって心不全のコントロールが可能である。しかるに受容体レベルでの作動薬には副作用が多い。ならば、受容体レベルではなく、もっと下流のシグナル分子を標的にすればよいことになる。受容体、G 蛋白質、アデニル酸シクラーゼ、PDE、PKA のそれぞれが標的となりうるが、サブタイプが十分にあるのはアデニル酸シクラーゼと PDE に絞られる。PKA や G 蛋白質では普遍的発現のため、受容体よりも選択性が悪くなる。アデニル酸シクラーゼと PDE には酵素サブタイプが多数存在し、サブタイプ特異的な作動薬が開発できれば、臓器特異性を高めて副作用の発現を減らすことができる。

PDE を標的とするならば、サブタイプとして狙うのはⅢ型 PDE であろう。Ⅲ型 PDE は心臓、血管や血小板に発現し、別々の遺伝子からなる 2 種類の亜種(A および B)をもつ。阻害薬としては、すでにミルリノンなどで効果が証明されている急

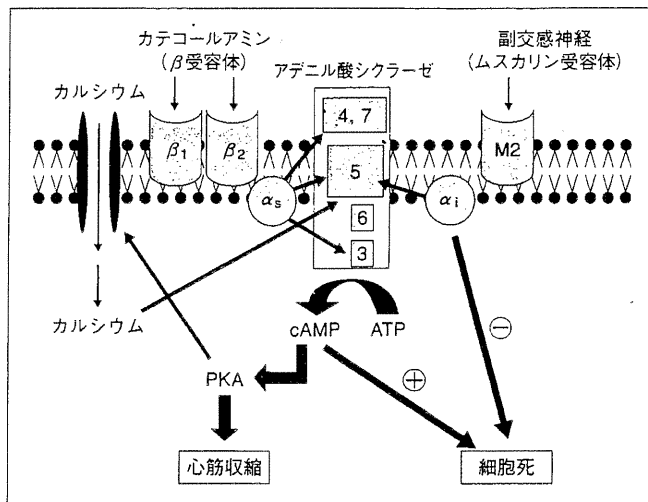


図 1 心筋細胞における自律神経調節とcAMP

交感神経と副交感神経は心筋細胞内 cAMP 濃度を調節して PKA 活性を変化させることにより、心機能を制御している。5 型サブタイプは心臓型ともよばれ成人心臓に高度に発現し、交感神経による刺激と副交感神経による抑制を受けることが知られている。交感神経活動の慢性的な亢進は心筋細胞死を引き起こし、心不全の増悪を招く。5 型サブタイプの酵素活性阻害は結果的に交感神経刺激の低下と副交感神経刺激の最大化を引き起こすこととなり、心筋細胞死の予防が可能になる。

性心不全の治療に広く使用されている。慢性心不全への応用となれば、PDE を刺激してやればよい。心筋細胞内の cAMP 濃度を低下させ、 $\beta$ 遮断薬と同様の効果が期待できるはずであるが、残念ながら遺伝子操作動物をはじめとする支持データが揃っていない。あるいは出づらいのかもしれない<sup>3)</sup>。

アデニル酸シクラーゼを標的とするならば、心臓型アデニル酸シクラーゼであろう。アデニル酸シクラーゼにはすくなくとも 9 種類のサブタイプがあり、それぞれに特異的な組織分布と生化学的性状を有する。心臓には多数のサブタイプが発現するが、なかでも 5 型と 6 型は心臓型とよばれ、心臓にとりわけ多く発現することが知られている。6 型は酵素活性がきわめて低く、胎児期の発現が最大であり、成長とともに減少する。5 型は反対に高い酵素活性をもち、胎児期に発現が少なく、加齢とともに増加していく。そのため 6 型を胎児型、5 型を成人型アデニル酸シクラーゼとしている<sup>4)</sup>。

### 5型アデニル酸シクラーゼの特徴

心不全患者の大半が中年以上であることを考えるなら、心不全治療の標的とすべきは 5 型のアデニル酸シクラーゼであろう。もともとアデニル酸シクラーゼ活性は脳と心臓で高いことが知られていたが、脳からはじめて分離されたのが 1 型、心臓から分離されたのが 5 型である。脳と心臓に高発現し、脳ではとくに線条体に多く、末梢では心筋にもっとも多く、他の組織にも少ないが発現が認められる。生化学的には、他のサブタイプと同様に Gs 蛋白質によって刺激されるが、Gi 蛋白質によって抑制されるものは 5 型を含めて少数である。したがって 5 型は交感神経で刺激され、副交感神経で抑制される性質をもつ。このことは 5 型が心臓に高発現し、心機能が自律神経の強い制御を受けることと関連をもつと考えられる。

### 5型アデニル酸シクラーゼの役割

5 型サブタイプの欠損動物モデルの性状は、いくつかの研究グループから報告されているが、い

ずれも心機能低下をきたさないことがわかっている。心臓のアデニル酸シクラーゼ酵素活性の低下はせいぜい30%程度であり、心機能の低下は定常状態ではみられない。これは5型サブタイプが心臓に高発現し、精製標本は高い酵素活性を示すという性質からは意外なものであった。おそらく心臓に高発現してはいても、発現の絶対量が少ないために心機能低下を起こさないと考えられる。しかるに欠損動物では高濃度のカテコールアミンに対する反応は落ちており、5型サブタイプは強い交感神経刺激にのみ反応するサブタイプかもしれない<sup>5)</sup>。もっとも特徴的な性質は、各種ストレスに対する心筋保護作用である。高圧負荷モデルにおいて心肥大は起こるが、心筋収縮力の低下がきわめて少なく、通常みられる心筋細胞死も少ない。つまり心不全を起こさない<sup>6)</sup>。慢性カテコールアミン負荷によっても心肥大は起こすが、心不全の発症が妨げられる。これは5型欠損により、各種ストレスに対する代償機構としての心肥大は起こすが、非代償期への移行がみられないことを意味す

る<sup>7)</sup>。さらに特徴的なことは、5型欠損モデルは長期生存性が高まることである。高圧負荷などのストレスに対する抵抗性だけでなく、加齢によっておこる酸化ストレスに対する抵抗性の増加に由来すると考えられる。

心不全患者の多くが高齢者で、高血圧や慢性的な交感神経活動亢進による心不全を発症していることを考えると、5型サブタイプの薬物による抑制は理にかなっているのかもしれない。

### 5型サブタイプの選択的作動薬の開発

アデニル酸シクラーゼの直接刺激薬であるコルホルシンドルパート(商品名アデール<sup>®</sup>)は漢方薬に使用されていた植物由来の化合物であるフォルスコリン誘導体として開発されたが、実は5型サブタイプの選択的刺激である。他のサブタイプに比較して、心臓型サブタイプに対する選択制がきわめて高い<sup>8)</sup>。アデニル酸シクラーゼは受容体に比べて脱感作やダウンレギュレーションが少ないため、心臓選択的にアデニル酸シクラーゼを選択的に刺激してやることは、急性心不全の治療において有用であると考えられる。これ以外にもフォルスコリン誘導体を合成して構造活性連関を調べた結果、心臓型だけでなく他のサブタイプへの選択性を決める側鎖構造が明らかになっている。これにより、肺型サブタイプを選択的に刺激する化合物も合成されている。さらに、フィッティング分析とよばれる蛋白結晶構造を利用した既存の解析だけでなく、量子力学的な解析によってサブタイプ選択性の検討がさらに容易になることもわかってきた<sup>9)</sup>。これらの方法を駆使することにより、創薬はさらに発展することになると思われる。

心臓型サブタイプを選択的に刺激できるのなら、選択的な抑制も可能と考えられる。コンピュータ解析手法を用いることにより、既存のライブラリーの85万種類の化合物から5型選択的阻害薬が複数同定された。このなかにはすでに臨床において長年使用されてきた抗ウイルス薬(带状疱疹治療薬)も含まれている。培養心筋細胞を使用した実験では、5型抑制薬による心筋細胞収縮力の低下はみられないが、カテコールアミン曝露による細胞死の顕著な減少がみられている<sup>10,11)</sup>。また、

#### サイド メモ

#### コンピュータを用いた創薬

創薬の歴史は化合物のスクリーニングの歴史である。かつては膨大な数のライブラリー化合物の性状を人手をかけて薬理学的実験によって決定し、求める化合物を検索していった。1990年代からこの薬理学的実験にロボット技術が導入され、検索速度が上昇した。2000年代からは薬理学的実験だけに頼るのではなく、コンピュータ技術が導入された。コンピュータシミュレーションによる創薬手法には、蛋白質の結晶構造をもとにして、その構造に低分子化合物がどのように適合するかを決定していくフィッティングモデル解析が一般的である。ただしこの手法では、対象となる蛋白質の結晶構造が決定されていることが前提となる。量子力学的手法、とくに第一原理解析を用いた手法では、蛋白構造ではなく化合物本体の性質を原子レベルで解析することにより、いわゆる HOMO および LUMO ギャップなどの計算を行い、化合物ごとの共通インデックスを求めていく。古典的な薬理学的実験の重要性は現在も変わらないが、さまざまなロボット技術やコンピュータ技術を組み合わせることにより、創薬技術そのものは革新的に進歩しつつある。

マウスにおける心筋梗塞モデルでは 5 型阻害薬の投与によって生存率の顕著な上昇と心機能維持および心筋細胞死の低下がみられている。

### おわりに

心不全の病態生理の理解は過去数十年で飛躍的に進歩したにもかかわらず、人類の最大死因のひとつであることは変わらない。アメリカにおいてもいまだに DRG における最多疾患を占めている。心不全の克服はすべての循環器専門医の目標であるといっても過言ではないであろう。さまざまな心不全治療薬がこれまでに開発されてきており、新しい治療薬の使用開始と同時に心不全の病態生理の理解も進んできている。アデニル酸シクラーゼ阻害薬がどのような心不全治療薬となるのかは未知数であるが、心不全のさらなる理解と克服の一助となることを願ってやまない。

### 文献

- 1) Pierre, S. et al. : *Nat. Rev. Drug Discov.*, **8** : 321-335, 2009.
- 2) Ishikawa, Y. et al. : *Circ. Res.*, **80** : 297-304, 1997.
- 3) Sun, B. et al. : *Cell. Signal.*, **19** : 1765-1771, 2007.
- 4) Ishikawa, Y. et al. : *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **41** : S1-S4, 2003.
- 5) Okumura, S. et al. : *Circ. Res.*, **93** : 364-371, 2003.
- 6) Okumura, S. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100** : 9986-9990, 2003.
- 7) Yan, L. et al. : *Cell*, **130** : 247-258, 2007.
- 8) Toya, Y. et al. : *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **30** : 97-108, 1997.
- 9) Eguchi, H. et al. : *Lett. Drug Des. Discov.*, **4** : 434-441, 2007.
- 10) Iwatsubo, K. et al. : *J. Biol. Chem.*, **279** : 40938-40945, 2004.
- 11) Onda, T. et al. : *J. Biol. Chem.*, **276** : 47785-47793, 2001.
- 12) Iwatsubo, K. et al. : *Expert Opin. Ther. Targets*, **7** : 441-451, 2003.

\* \* \*

平成 2 1 年 度

厚生労働科学研究費研究成果等普及啓発事業  
医療技術実用化総合研究：基礎研究成果の臨床応用推進研究

トランスレーショナル研究成果発表会

要 旨 集

日時：平成 2 2 年 2 月 2 3 日（火） 1 3 時 3 0 分～1 7 時 0 5 分  
場所：財団法人 がん研究振興財団 国際研究交流会館

主催：財団法人 医療機器センター

## 高齢者に向けた心不全治療薬の開発

研究代表者：横浜市立大学 石川 義弘

### 研究目的：

心不全はすべての心臓病の末期像であり、我が国民の3大死因のひとつである。心不全治療の世界標準指針は慢性的に亢進した交感神経活動の抑制であり、レニンアンジオテンシン系阻害剤とベータアドレナリン受容体遮断薬（ベータ遮断薬）はその代表薬として使用されている。然るにベータ遮断剤導入に当たっての最大の副作用は一過性の心機能抑制であり、とくに高齢者には大きな妨げとなる。さらに呼吸機能抑制もあり、肺気腫などの合併症の多い高齢者では大きな問題である。

ベータアドレナリン受容体の働きは細胞内アデニル酸シクラーゼ酵素を活性化し、細胞内cAMP濃度を高めて心機能を調節することであり、ベータ遮断薬の薬理効果はアデニル酸シクラーゼ活性の抑制に他ならない。ベータ遮断薬による呼吸機能抑制の本質は、肺気管支にもベータアドレナリン受容体が発現するため、ベータ遮断薬によって気管支の収縮が起こることである。ベータアドレナリン受容体は3つのサブタイプしかないが、アデニル酸シクラーゼには9つのサブタイプが知られており、心臓型とよばれるサブタイプ(5型)は心臓に特異的に発現する。従って心臓型アデニル酸シクラーゼを選択的に阻害することが出来れば、呼吸器抑制を起さずにベータ遮断剤と同等の心不全治療ができるはずである。

これまでの我々の遺伝子操作動物や薬理実験結果から、心臓型サブタイプを欠損させた動物では、定常状態の心機能低下はないが、心不全など様々な病態生理下ではむしろ心筋保護作用を示すことがわかった。さらに80万種類以上の薬剤をコンピュータモデルにて検討した結果、心臓型サブタイプを選択的に抑制できる化合物が複数同定された。これには市販の抗ウイルス剤の一部を含む。

本研究は学際的プロジェクトであり、心臓型サブタイプの選択的な抑制剤を、高齢者にも安心して使える心不全治療薬として開発することを目的とする。

### 方法および結果

我々の同定した心臓型サブタイプ阻害剤の個体レベルでの効果を、心臓型サブタイプ遺伝子操作動物において検討した。同阻害剤のイソプロテレノール刺激状態での心機能抑制効果は、野生種では認められないが、心臓型サブタイプ過大発現マウスでは高度であり、またPDE阻害剤に対する反応性は不変であったことから、同阻害剤の生体での作用点は、心臓型アデニル酸シクラーゼ酵素であることが確認された。さらに慢性カテコラミン負荷モデルにおいて、同阻害剤の効果を、既存の標準薬であるメトプロロール（ベータ遮断剤）と比較検討した。両薬の導入において、メトプロロールは心機能を有意に低下させたのに比較して、同阻害剤による心機能低下はみられなかった。また3週間のカテコラミン負荷によって、コントロール群では心筋肥大とともに心機能の顕著な低下がみられたが、メトプロロール群および同阻害剤群では心機能の低下はみられなかったが、心肥大は同阻害群のみでみられた。同阻害群においてはトレッドミルテストにおける運動能も維持されており、また心筋細胞レベルでの細胞死も予防され、心筋組織の繊維化も減少していた。中枢系における運動能力は不変であり、中枢アデニル酸シクラーゼに対する副作用はみられなかった。さらに冠動脈結索モデルにおいて虚血モデルを作製、同様に阻害剤の効果を検討したところ顕著な生存率の上昇が見られた。この程度はメトプロロールと同様であった。

### 考察：

心臓型サブタイプは、遺伝子欠損によっても心機能が低下しない。その阻害剤では急性の心不全が起こらず心臓保護効果を示すと考えられ、本年度の研究で、薬理学的効果として動物実験で証明された。そのような薬剤は既に抗ウイルス剤として長年にわたって市販されており、安全性も確認されているため、早急な臨床応用が可能であり、医師主導型臨床試験の適応とも考えられる。細胞内酵素サブタイプの選択的抑制剤は、バイアグラに代表されるように次世代創薬の標的である。アデニル酸シクラーゼは9つのサブタイプを持った



め、それぞれのサブタイプが創薬の対象となり、既に世界各国で薬剤開発が行われ、英国では睡眠障害を対象として脳型サブタイプの阻害剤開発が進んでいる。心臓型サブタイプ抑制剤の開発は、高齢者に向けた副作用の少ない薬としてだけでなく、我々の長年の研究成果に裏づけされたコンピュータによる予測技術を含めて、次世代の創薬手法の代表例となることが考えられ、わが国に普及を目指していきたい。

平成21年度  
厚生労働科学研究費研究成果等普及啓発事業  
医療機器開発推進研究

# ナノメディシン研究成果発表会 要 旨 集

日時：平成22年2月24日（水）9時30分～18時20分  
場所：財団法人 がん研究振興財団 国際研究交流会館

主催：財団法人 医療機器センター

## 新規磁性薬剤化合物の画像診断への応用

研究代表者：横浜市立大学 石川 義弘

### 研究目的：

エレクトロニクス材料分野を中心として、有機磁性体の研究開発が進んでいる。かつて磁性体は無機化合物のみであると考えられていたが、80年代より多数の有機磁性体化合物の発見や合成が進んでおり、実用化に向けた検討が進められている。我々は材料分野の研究に用いられてきた、物理学的な計算手法である第一原理解析法を駆使することにより、有機化合物に磁性を予測する方法を開発した。本手法を用いることにより、医療、とりわけMRIを中心とした画像解析に有用であると考えられる有機化合物を中心に、磁性予測を行い、MR画像診断における「機能を有する造影剤」として開発し、新規画像診断技術として開発していくことが目的である。

### 方法および結果：

第一原理解析法はこれまで超伝導材料やエレクトロニクス材料の開発に用いられてきた手法であり、この手法の応用により、有機化合物に磁性を予測することが可能となった。この磁性予測技術を用いて、医薬材料化合物の磁性予測を行った。さらに解析精度を上げるために様々な計算手法を導入すると共に、実際の化合物合成を行い、その磁性を測定することにより、我々の磁性解析法を改善していった。これまで3年間の試行錯誤の結果から、単に磁性を予測するだけでなく、磁性を設計し、既存の非磁性体化合物を磁性化する手法を開発することが出来た。このことは既存の薬理化合物に対して磁性化設計を行い、新規磁性薬理化合物として再開発できることを意味する。

我々の同定した磁性有機化合物のひとつに、抗がん作用を有するものがある(EI236)。我々はこの化合物の抗がん剤としての薬理作用を検討すると共に、磁性特性を用いた磁場による誘導作用、交流磁場賦課による発熱作用を検討すると共に、磁性特性によるMRIにおける造影効果を検討した。

EI236はマグネタイトに匹敵する磁性を有することが磁場磁化曲線から明らかとなった。極低温から37度にいたるまで、幅広い温度帯において強磁性を示すことがわかった。またEI236は薬理効果としての抗腫瘍作用を持つことがわかった。悪性黒色腫細胞をはじめとして、様々ながん細胞に対して腫瘍増殖を抑制することが判明した。抗腫瘍効果はDNAに直接作用し、がん細胞の細胞死を誘導するメカニズムが示唆されている。

またEI236を培養がん細胞に添加し、磁石で誘導することによって、抗がん作用自体が誘導されることがわかった。このことは、EI236自身が磁場誘導され、抗がん作用が同時に誘導されたことを示す。同様の実験を、マウス尾部に発生させた悪性黒色腫において検討した。EI236を全身投与し、尾部に永久磁石を当てることによって、EI236を悪性黒色腫局所に誘導した。コントロール群、EI236全身投与群、EI236全身投与+磁場誘導群の3群において治療効果の比較を行ったところ、磁場誘導群において顕著な腫瘍の縮小および退縮が認められた。

以上の性質を持つEI236がMR造影剤として機能するかを検証するために、ファントム実験および動物モデルにおいて造影効果を検討した。ファントム実験においては様々な環境設定を行い、同化合物のMRシグナルが濃度依存的に上昇することを確認した。さらにT1およびT2などの測定の諸条件の検討を行った。これにより単なるファントムのみならず組織中においても濃度依存的にMRシグナルが上昇することがわかった。これらの検討結果を元に、前述の尾部腫瘍モデルにおいて、マウスに同化合物を経静脈的に全身投与した後に、永久磁石を尾部腫瘍に作用させたところ、マウス尾部に同化合物が集積し、MRシグナルの増強として造影できることを証明した。これらの結果から、EI236は磁場によって誘導可能な抗がん剤であり、MRの造影剤として機能することがわかった。

**考察：**

本研究プロジェクトの目的である有機磁性体のMR造影剤の開発に際して、E I 2 3 6 がファントム実験および動物実験によってMR造影剤として作用することが実証された。このことは、薬理的な機能(抗がん効果)をもつ有機磁性体化合物が、薬理的効果を発揮すると同時に、MRにおける造影機能を示すことを証明したことになる。ファントム実験等から、濃度測定が可能であることがわかっており、これは抗がん剤の局所集積量を定量出来ることを意味する。抗がん剤の局所における定量は、これまで実現されたことは無く、MR画像診断としての応用のみならず、抗がん剤治療の開発にも大きな進歩をもたらす可能性がある。さらに、同様の薬剤開発によって今後の薬物治療と画像診断にも大きな影響を及ぼす可能性がある。

cAMPシグナルを標的にしたヒアルロン酸産生制御メカニズムの研究  
Regulation of hyaluronic acid production via cAMP signal

石川義弘、横山詩子  
Yoshihiro Ishikawa and Utako Yokoyama

Synopsis)

Hyaluronic acid is a kind of mucopolysaccharide and exists abundantly as extracellular matrix in skin, article, lens and other organs. Skin folding as seen with aging is shown to be related to a decrease in the content of hyaluronic acid in skin. Supplemental uptake of hyaluronic acid and addition to cosmetic ointment as well as direct skin injection of hyaluronic acid itself have been commonly employed. Further, in the treatment of article inflammation or lens injury, hyaluronic acid has been used widely in medicine. It has been known that stimulation of G protein-coupled receptors is necessary to produce hyaluronic acid, leading to increased cell migration or proliferation. However, the exact molecular mechanism of this signal transduction in cells has remained undetermined. We have investigated the molecular mechanisms of hyaluronic acid production through cAMP signal in our laboratory. We have demonstrated that the activation of cAMP signal is essential and resulting increase in hyaluronic acid synthase enzyme expression follows. Because cAMP is produced by adenylyl cyclase, a membrane-bound enzyme that is activated by Gs protein, leading to the conversion of ATP to cAMP, it is necessary to investigate the molecular mechanisms of adenylyl cyclase activation that leads to increased hyaluronic acid production. Adenylyl cyclase enzyme has many isoforms, from type I to IX, which show distinct tissue distribution and biochemical properties. Because the hyaluronic acid production has been best demonstrated in vascular smooth muscle cells in our laboratory, we examined adenylyl cyclase isoforms that are responsible for hyaluronic acid production. We also examined the effect of stimulating these adenylyl cyclase isoforms in an isoform-specific manner using forskolin derivatives that have increased specificity to these isoforms. We also examined the effect of overexpressing adenylyl cyclase isoforms in these cells to explore changes in intracellular cell signaling as well as changes in hyaluronic acid production. Accordingly, we found that specific isoforms of adenylyl cyclase are more responsible for hyaluronic acid production and thus cell migration thereafter, and that these isoforms play an important role in not only hyaluronic acid production, but regulating vascular function such as vasodilatation or endothelial thickening. Our results have indicated that it is important to understand the role of each adenylyl cyclase to regulate hyaluronic acid production. Pharmacological stimulation of a specific

isoform of adenylyl cyclase may enable us to enhance the production of hyaluronic acid specifically. Development of such specific stimulator of adenylyl cyclase may be used in the treatment of conditions where decrease in hyaluronic content is involved. Indeed, our results have suggested that such strategy is pharmacologically feasible.

#### 概要

ヒアルロン酸はムコ多糖の一種であり、皮膚をはじめとして関節や硝子体などにおける細胞外器質として豊富に存在する。ヒアルロン酸の産生に G 蛋白共役型のホルモン刺激が関与することは以前より知られていたが、その詳細なメカニズムは不明であった。G 蛋白共役型のホルモン刺激によってヒアルロン酸産生の亢進とともに、細胞増殖や遊走が亢進することが報告されてきたが、これらの細胞機能を特異的に制御することが可能なのか、あるいはその細胞内シグナルの制御は独立して行われているのかは不明であった。我々の研究室では、G 蛋白共役型ホルモンによる cAMP シグナルの分子メカニズムを長年にわたって研究してきたが、最近の成果によればヒアルロン酸の産生制御には cAMP シグナルの活性化が必要であり、平滑筋細胞や繊維芽細胞においてヒアルロン酸産生酵素の一つである Has2 の転写レベルでの亢進が重要な役割を果たしていることがわかった。さらにこれらの作用は cAMP 産生酵素であるアデニル酸シクラーゼサブタイプ依存性に起こることがわかり、特定のサブタイプを対象とした制御剤の開発が可能であることを示唆した。

## 1. 緒言

ヒアルロン酸はムコ多糖の一種であり、皮膚をはじめとして関節や硝子体などにおける細胞外器質として豊富に存在する。加齢に伴う皮膚のたるみやシワではヒアルロン酸含有量の低下が関与しており、近年では健康補助食品としての摂取や、化粧品の添加物としての使用、さらには美顔術としてのアルロン酸注入が行われている。これ以外にも関節炎や角結膜上皮障害における治療など、幅広く医療に利用されている。ヒアルロン酸の産生に G 蛋白共役型のホルモン刺激が関与することは以前より知られていたが、その詳細なメカニズムは不明であった。G 蛋白共役型のホルモン刺激によってヒアルロン酸産生の亢進とともに、細胞増殖や遊走が亢進することが報告されてきたが、これらの細胞機能を特異的に制御することが可能なのか、あるいはその細胞内シグナルの制御は独立して行われているのかは不明であった。

我々の研究室では、G 蛋白共役型ホルモンによる cAMP シグナルの分子メカニズムを長年にわたって研究してきたが、最近の成果によればヒアルロン酸の産生制御には cAMP シグナルの活性化が必要であり、平滑筋細胞や繊維芽細胞においてヒアルロン酸産生酵素の一つである Has2 の転写レベルでの亢進が重要な役割を果たしていることがわかった (1)。さらに cAMP シグナルの標的酵素として、従来考えられていたプロテインキナーゼ A 以外に、Epac と呼ばれる G 蛋白質調節因子が細胞遊走の調節に重要な役割を果たしており、プロテインキナーゼ A と Epac に機能分担が存在することがわかってきた(2, 3)。このことは、ヒアルロン酸産生と細胞遊走の制御メカニズムが異なる可能性を示唆する。

本申請では、G 蛋白共役型ホルモンによるアデニル酸シクラーゼの活性化が引き起こす cAMP シグナルがヒアルロン酸産生を如何に制御するかを検討し、血管平滑筋細胞を含めて細胞外器質の産生を特異的に制御する酵素サブタイプを含めた検討をおこなった。さらに特定のアデニル酸シクラーゼサブタイプの制御剤が、将来的な薬物開発の対象となりうるかについて検討した。

## 2. 実験

### HAS 発現の定量

トータル RNA はプールされたラット組織から抽出した。cDNA の合成および RT-PCR は過去の文献に記載された方法を用いた。PCR 増幅に用いたプライマーの塩基配列はラットのものを用い、遺伝子バンクからの配列を元に合成した。定量的な RTPCR 反応においては、それぞれのテンプレートは少なくとも 3 回の定量を行い、再現性を検討した。それぞれの遺伝子の定量に当たっては GAPDH をコントロールとして用いた。GAPDH の定量に当たっては、市販のキットである TaqMan Rodent GAPDH control reagent kit (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いた。

### 細胞培養

Wister ラットの血管平滑筋細胞を初代培養して使用した。ラット胎生期 21

日を中心に採取した。組織片は切り刻まれ、800 $\mu$ l の collagenase/dispase enzyme mixture を添加し、37 度にて 15 分間の消化をおこなった。細胞浮遊液を遠心し、培養液を 4collagenase mixture II に変えてさらに 37 度において 12 分間おこなった。細胞浮遊液は growth media mixture に移され、35 mm の Poly-L-Lysin 皿を用いて培養を行った。培養期待は 5% CO<sub>2</sub> の条件であり、37 度にて施行した。細胞はそれぞれ 4-6 回の継代培養中に使用し、alpha-smooth muscle actin の発現が 99% 以上に見られることを確認して使用した。

#### ヒアルロン酸の定量

ヒアルロン酸は細胞培養液中に放出された量を定量した。牛軟骨から抽出されたヒアルロン酸結合蛋白をラテックスにラベルし、凝集を指標として定量することで行った(LPIA Ace, Fujirebio Inc, Tokyo)。ヒアルロン酸の定量は duplicate で製造者のプロトコールに基づいて行い、Hitachi 7070 analysis system (Hitachi, Tokyo)を用いて 800 nm における吸光度分析をおこなった。

#### siRNA 実験

二重鎖 siRNA をアデニル酸シクラーゼ 2、5、および 6 型の塩基配列から特定部分を選択しておこなった。コントロールには QIAGEN にて作製されたものを用いた。製造者の推奨するプロトコールに基づいて、siRNA (300 pmol)、Lipofectamin RNAiMAX (Invitrogen, San Diego, CA)を用いた。

#### アデノウイルス実験

ラット 2 型アデニル酸シクラーゼ全長 cDNA をシャトルベクターに組み込んで、同サブタイプを発現するアデノウイルスを作製した。作成に当たっては AdenoX adenovirus construction kit (Clontech, Tokyo, Japan)を用いた。6 型アデニル酸シクラーゼを発現するアデノウイルスにおいては、サイトメガロウイルスプロモーターを用いた。作成に当たっては homologous recombination method を用いた。

#### cAMP 産生能の検討

細胞を 24 穴プレートにおいて培養し、24 時間の血清無添加条件のあとに cAMP 産生を定量した。定量に当たっては事前に 0.2 mM IBMX を添加し 20 分間の preincubation をおこなった後に、各試薬を加えてさらに 10 分間 incubate した。産生反応は培養液を除去し、400  $\mu$ l の ice-cold trichloroacetic acid (7.5%) を各穴に加えて終了させた。サンプルは 10  $\mu$ l acetyl anhydride, 20  $\mu$ l triethylamine (Sigma)を加えてアセチル化させた。これらのサンプルを 50 $\mu$ l 取り出し、12,000cpm <sup>125</sup>I-cAMP (Perkin Elmer, Waltham, MA) 50 $\mu$ l ウサギ血清 anti-cAMP 抗体 (diluted 1:3000, Millipore, Billerica, MA)と 4 度の条件で一晩 incubation をおこなった。50  $\mu$ l ヤギ抗ウサギ抗体 (magnetic bead coated, QIAGEN, Tokyo) を加えて室温条件化で揺らしながら 1 時間 incubate した。Bound from free の分離においては、Millipore フィルターを用いておこなった。残存した放射能活性を測定し、標準曲線と対比することにより cAMP 産生量の定量をおこなった。cAMP 産生量は蛋白濃度で補正した。

#### PKA 活性

PKA 活性はアッセイキットを用いて測定した(StressGen Biotechnologies, Ann Arbor, MI)。測定法の詳細は製造者のプロトコールに従った。



### 3. 結果

#### PGE-EP4 シグナルによるヒアルロン酸産生の制御

我々はヒアルロン酸の産生能力を、これまでに検討してきた血管平滑筋細胞を用いて調べた。これまでの研究結果から、動脈管などから採取された血管平滑筋細胞におけるヒアルロン酸産生能力が高いことがわかっている。プロスタグランジン刺激によって、ヒアルロン酸産生が亢進することは従来の結果からも示唆されているが、はたしてどのようなサブタイプによる産生が最も強いのかを検討した。PGE1, PGE2, および EP4 アゴニストである ONO-AE1-329 を用いて刺激したところ、容量依存性にヒアルロン酸産生が増加した。最終的な増加は 48 時間後の定量において判断した。PGE1 刺激によるヒアルロン酸の産生は EP4 アンタゴニストである ONO-AE3-208 によって阻害された。一方で EP1 および EP3 に対する拮抗剤を使用しても抑制は見られていなかった。これらの結果から EP4 による刺激がヒアルロン酸の産生を引き起こすことが推測された。

#### cAMP 産生を介したヒアルロン酸産生の制御

上記の結果から、ヒアルロン酸産生において EP4 の刺激が重要であることが推測された。そこで、EP4 の選択的な刺激剤である ONO-AE1-329 を用いて、血管平滑筋を刺激し、用量依存性と時間依存性を検討することにより、ONO-AE1-329 によるヒアルロン酸産生効果を確認することとした(図 1)。容量依存的な EP4 アゴニストによるヒアルロン酸産生の検討として、血管平滑筋細胞を培養条件下で EP4 の選択的なアゴニストである ONO-AE1-329 を 48 時間に渡って添加し、ヒアルロン酸の産生を比較した。培養液中に浸出するヒアルロン酸を凝集法を用いて定量した。いずれも容量依存性にヒアルロン酸産生が増加していることがわかった。さらに、時間依存的な EP4 アゴニストによるヒアルロン酸産生を検討した。上記と同様に EP4 アゴニストである ONO-AE1-329 を用いて、血管平滑筋細胞を培養し、刺激をおこなった。4、24、2 日、4 日間におけるヒアルロン酸の産生を比較したところ、時間依存性にヒアルロン酸産生が増加することがわかった。さらに EP4 アゴニストによるヒアルロン酸産生は、PKA の選択的阻害によって抑制されたことから、EP4 刺激が cAMP の産生を上昇させ、PKA シグナルを賦活化することによってヒアルロン酸産生を上昇されるメカニズムが確認された。

#### ヒアルロン酸産生の分子メカニズム

ヒアルロン酸の産生に当たっては、これまでに 3 種類のヒアルロン酸産生酵素の存在が知られている。そこで、EP4 を介したシグナル系において、どのサブタイプが関与しているのかを検討した。検討に当たっては、制御メカニズムとしてもっとも基本的な転写調節レベルでの制御が想定されたため、まずは RT-PCR を用いて、mRNA の定量をおこなった。HAS1, HAS2, HAS3 の三つのサブタイプに特異的なプライマーを用いて RT-PCR による、それぞれの定量をおこなった。EP4 選択的な刺激剤である ONO-AE1-329 を  $10^{-6}$  M の濃度にお

いて、血管平滑筋を刺激した後に RNA を抽出し、選択的なプライマーを用いて定量をおこなったところ、HAS1 および HAS3 に比較して、HAS 2 発現の圧倒的な増加が観察された(図 2)。さらにこの結果を確認するために、時間依存的な HAS2mRNA 発現量の変化で観察した。ONO-AE1-329, TGF $\beta$ , PDGF-BB のそれぞれを、10 $\cdot$ 6M, 10ng/ml, 10ng/ml の濃度で刺激し、HAS 2 の発現を RT-PCR において定量した。いずれも時間依存的に発現を増加させたが、ONO-AE1-329 による増加効果が最も強力であることがわかった。

以上の結果から、ヒアルロン酸産生増強の分子メカニズムとして、EP4 刺激を介して PKA の活性化がおり、これによる HAS2 の選択的な転写促進がおり、最終的に血管平滑筋細胞におけるヒアルロン酸分泌が促進されるメカニズムが想定された。

#### 平滑筋におけるアデニル酸シクラーゼサブタイプの発現

EP4 刺激は G 蛋白質共役型受容体の活性化をへて、Gs 蛋白質の活性化、および引き続くアデニル酸シクラーゼの活性化を経て cAMP 産生を引き起こす。この下流に存在する PKA 刺激が HAS 2 の転写促進因子として働くことがわかった。しかるに血管平滑筋には多数のアデニル酸シクラーゼサブタイプが発現している。我々は特定のアデニル酸シクラーゼサブタイプがこのプロセスに重要な役割を果たす仮説をたてた。そこで定量的な RT-PCR 法を用いて、どのアデニル酸シクラーゼサブタイプが血管平滑筋細胞に多く発現するかを検討した。

RT-PCR の結果から、平滑筋細胞には 1 および 8 型を除くすべてのサブタイプの発現が検出された。この中ではとくに 2 および 6 型の発現がおおいことがわかった。そこで 2 および 6 型のそれぞれの関与を検討するために、siRNA の手法を用いて、それぞれのアデニル酸シクラーゼサブタイプの欠損実験をおこなった。いずれのサブタイプの欠損においても PGE 1 を介した cAMP 産生能は顕著な低下を示した。このことから両サブタイプは、いずれも PGE1 刺激の下流に存在することが推測された。そこでこれらのサブタイプによるヒアルロン酸産生を比較したところ、6 型サブタイプの欠損時においてヒアルロン酸産生能が低下するが、2 型ないし 5 型の欠損時にはそのような産生低下はみられないことがわかった。

さらにアデノウイルスをもちいて、2 型および 6 型サブタイプの過大発現をおこしたところ、2 型サブタイプの過大発現においてはヒアルロン酸産生は上昇しなかったが、6 型サブタイプの過大発現によってヒアルロン酸産生が顕著に増加することがわかった。以上の結果から、血管平滑筋細胞に発現する多数のアデニル酸シクラーゼサブタイプの中でも、6 型サブタイプが EP4 刺激によるヒアルロン酸産生に重要な役割を果たしていることが想定された。

さらに 2 型および 6 型に選択的な刺激薬を用いた実験からは、アデノウイルスによるアデニル酸シクラーゼ蛋白発現と同等の効果が、アデニル酸シクラーゼ選択的刺激薬によって得られることがわかった。このことは、アデノウイルスを使うことなく、薬理的な手法を用いることにより、ヒアルロン酸産生を制御できる可能性を示唆する。

#### 4. 考察

ヒアルロン酸は細胞外器質として様々な作用を持つことが知られているが、その発現調節は十分わかっていない。我々は少なくとも血管平滑筋細胞によるヒアルロン酸産生には EP4 刺激が重要な役割をはたし、EP4 によるアデニル酸シクラーゼの活性化およびヒアルロン酸産生酵素の転写刺激を介して、ヒアルロン酸の産生が上昇することを示した。

これまでの実験で得られた結果で重要と考えられることは、これらの刺激が細胞内シグナル系をへて発揮されるが、関与する酵素サブタイプが特定されたことである。受容体レベルでは EP4 が主要な役割を果たし、その下流にあるアデニル酸シクラーゼのサブタイプに関しては 6 型サブタイプが重要な役割をになっている。さらに大切なことはヒアルロン酸産生酵素サブタイプであり、3 種のサブタイプの中でも 2 型のみが EP4 刺激によって転写活性が増強され、ヒアルロン酸産生を亢進させることがわかった。これらの結果から、ヒアルロン酸産生の分子メカニズムとして、高度に分化した特定のサブタイプを通じたシグナル伝達系が細胞内で構築されている可能性がしめされた。

細胞内には多数の酵素が存在し、その酵素サブタイプには複数存在することが知られている。シグナル伝達の過程においては、異なったサブタイプが相補的に作用し、同じような結果を生む場合と、それぞれのサブタイプが異なった機能を担っている場合がある。PGE 刺激によるヒアルロン酸産生に関しては後者の可能性が考えられる。EP4、アデニル酸シクラーゼ 6 型、およびヒアルロン酸産生酵素 2 型のそれぞれが機能的に共役していることがわかったが、その共役を可能とするメカニズムは不明である。いわゆるカベオリンなどのスカフォールド蛋白質などを通じて、特定のサブタイプ蛋白質が重合している可能性も考えられる。そのような検討に当たっては免疫沈降法や細胞における免疫染色法を用いた検討が必要であると考えられ、今後の検討課題である。また、今回の研究結果から、特定のアデニル酸シクラーゼサブタイプを制御する活性薬理物質が、ヒアルロン酸欠乏組織などにおけるヒアルロン酸産生促進に応用できる可能性が示された。皮膚科学や整形外科分野を含めて、今後どのような分野において活用できるのかを検討する必要がある。

#### 引用文献

1. Yokoyama U, Minamisawa S, Hong Q, Segi-Nishida E, Ghatak S, Iwasaki S, Iwamoto M, Misra S, Tamura K, Hori H, Yokota S, Tool BP, Sugimoto Y, and **Ishikawa Y**: Chronic activation of the prostaglandin receptor EP4 promotes hyaluronan-mediated neointimal formation in the ductus arteriosus. *J. Clin. Invest.* 116; 3026-3034, 2006
2. Ulucan C, Wang X, Baljinnyam E, Bai Y-Z, Okumura S, Sato M, Minamisawa S, Hirotani S, and **Ishikawa Y**: Developmental changes in gene expression of Epac and its upregulation in myocardial hypertrophy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293; H1662-72, 2007
3. Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, Akaike T, Suzuki S, Jin M, Jiao Q, Watanabe M, Otsu K, Iwasaki S, Nishimaki S, Sato M, and **Ishikawa Y**: PGE2-activated Epac promotes neointimal cushion formation of the rat ductus arteriosus by a process distinct from that of PKA. *J. Biol. Chem.* 283; 28702-28709, 2008

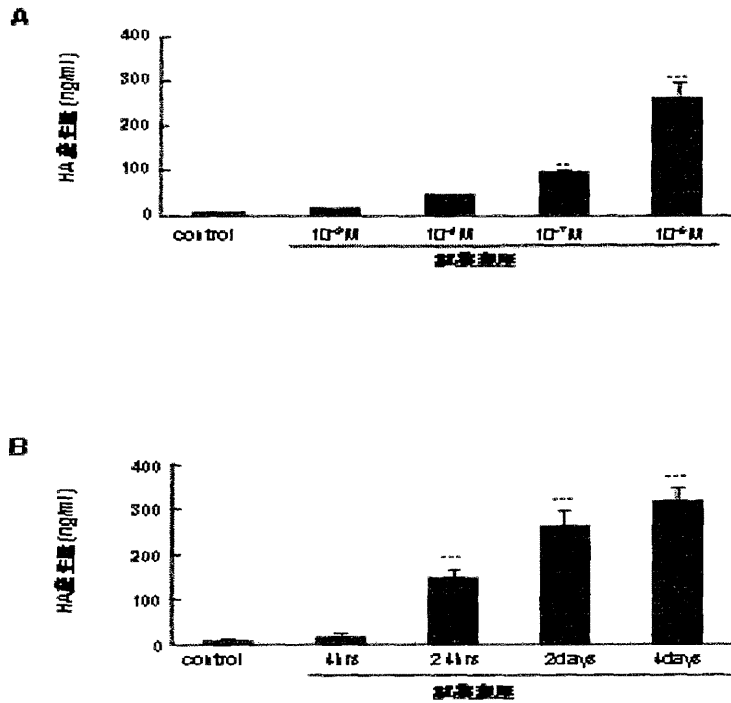


図1. EP4 アゴニストによるヒアルロン酸産生制御

A. 容量依存的な EP4 アゴニストによるヒアルロン酸産生。

血管平滑筋細胞を培養条件下で EP4 の選択的なアゴニストである ONO-AE1-329 を 48 時間に渡って添加し、ヒアルロン酸の産生を比較した。培養液中に浸出するヒアルロン酸を凝集法を用いて定量した。いずれも容量依存性にヒアルロン酸産生が増加している。

B. 時間依存的な EP4 アゴニストによるヒアルロン酸産生。

EP4 アゴニストである ONO-AE1-329 を用いて、血管平滑筋細胞を培養し、刺激をおこなった。4、24、2 日、4 日間におけるヒアルロン酸の産生を比較した。