

学 位 論 文 題 名

エンドセリン受容体サブタイプおよびその特異的アゴニスト，
アンタゴニストに関する研究

学位論文内容の要旨

エンドセリン受容体 (ET) - 1 は, Yanagisawa らによってブタ大動脈内皮細胞の培養上清中から強力な血管収縮活性を指標に単離, 構造決定された新規ペプチドである。更に, その後の多くの研究により ET - 1 は血管内皮細胞だけでなく腎尿細管や気道などの上皮細胞や神経細胞からも産生され, 種々の組織に対して多彩な生理作用を有していることが明らかになった。ET - 1 には二つのイソペプチド (ET - 2, ET - 3) が存在し, これら ET イソペプチドの作用は少なくとも二種類の ET 受容体すなわち ET - 1, ET - 2 に特異性の高い ET_A , 及び ET イソペプチドすべてに同等の親和性を有する ET_B を介して行われている。また肺, 心臓, 腎臓などでは ET_A , ET_B の両受容体の mRNA が発現している。実際に蛋白質レベルでの両受容体の発現量や存在比は明確でなく, かつ両受容体の生理的役割については不明な点が多い。従って, ET - 1 の多彩な生理作用や病態との関連性を明らかにするには, 受容体サブタイプ特異的作用物質 (アンタゴニスト, アゴニスト) の開発が重要である。本研究の目的は, ET 受容体サブタイプの選択性の高い薬剤を見だし, これら一連の研究に有用であることを示すことにある。まず, ブタ各組織を用いて ET 受容体結合実験系を確立した。大動脈平滑筋膜画分, 培養大動脈平滑筋細胞及び心筋膜画分への $[^{125}I]$ ET - 1 結合は ET - 1 によって $IC_{50}=0.1\sim0.19nM$ で阻害されるが, ET - 3 では IC_{50} 値 $3.9\sim70nM$ と低親和性であり, 一方, 小脳, 腎皮質膜画分などでは ET - 1, ET - 3 が共に $IC_{50}=0.07\sim0.11nM$ で $[^{125}I]$ ET - 1 結合を阻害した。すなわち前者には ET_A , 後者には ET_B が存在していた。ET イソペプチドは, いずれも 21 残基のアミノ酸から成り, 4 残基の Cys が 1 - 15 及び 3 - 11 間でジスルフィド結合を形成している。Hiley らはこの Cys をすべて Ala に置換した直鎖状の ET - 1 アナログ $[Ala^{1, 3, 11, 15}]$ ET - 1 (4 AlaET - 1) が血管収縮活性をほとんど失っているにもかかわらずラット小脳ホモジェネートには ET - 1 及び ET - 3 と同等の結合活性を有していることを報告した。この報告は, 4 AlaET - 1 がある種の ET 受容体サブタイプを認識していることを示唆していた。そこで, 4

4 AlaET - 1 の ET 受容体サブタイプへの親和性について検討した。その結果、4 AlaET - 1 は ET_B への親和性を保持したまま ET_A への親和性を著しく減少させ、1700倍 ET_B 選択的であった。更に4 AlaET - 1 は ET_B を介した反応である内皮依存性の血管弛緩反応を惹起することより、ET_B 選択的アゴニストであることが明らかとなった。次に4 AlaET - 1 の構造活性相関について検討した。4 AlaET - 1 の ET_B 親和性はN末端の α -アミノ基をアセチル化した N-Ac-4 AlaET - 1 及びN末端側のアミノ酸5残基を除去した4 AlaET - 1 (6-21) でもほとんど変わらないが、C末端からの Trp²¹ を除去するとほとんど結合活性を失った。また、N-Ac-4 AlaET - 1 (10-21) は親和性の低下が見られるが、830倍 ET_B 選択的であった。しかし、4 AlaET - 1 (11-21) では、ET_B 選択的な結合活性を消失し、更にアゴニスト活性も消失した。ET - 1 の ET_A 活性発現には少なくとも2個のジスルフィド結合によって形成される立体構造とC末端の Trp²¹ が必要であることが知られている。一方、ET - 1 の ET_B 活性発現には Glu¹⁰ から Trp²¹ までの配列が重要であることが明らかとなった。

ET_A 選択的アンタゴニスト BE-18257B(cyclo(D - Glu - L - Ala - allo - D - Ile - L - Leu - D - Trp)) は、大動脈平滑筋膜画分、培養大動脈平滑筋細胞及び心筋膜画分への [¹²⁵I] ET - 1 結合をそれぞれ IC₅₀ = 1.4, 0.47, 0.8 μ M にて阻害した。一方、小脳、腎皮質膜画分への [¹²⁵I]ET - 1 結合は100 μ M でもほとんど阻害しなかった。また、Scatchard 解析より、BE-18257B は ET_A への [¹²⁵I]ET - 1 結合を競合的に阻害することが明らかとなった。更に、in vitro 及び in vivo で ET - 1 の作用を抑制したが、それ自体はアゴニスト活性を有していなかった。以上より、BE-18257B は競合的 ET_A アンタゴニストであることが明らかになった。この BE-18257B をリード化合物として高活性誘導体 BQ-123 (cyclo (D - Asp - L - Pro - D - Val - L - Leu - D - Trp)) が開発され、ET_A の生理的、病態生理的役割の解明が進みつつある。

次に、ET 受容体サブタイプに選択的なリガンド BQ-123 および 4 AlaET - 1 を用いてブタ肺組織における ET 受容体サブタイプの存在比について明らかにした。気管支及び肺実質膜画分において ET - 1 結合部位は単一の高親和性結合部位のみであった。一方、ET - 3 には複数の異なる親和性を持った結合部位の存在が示唆されたが、直接的な証明はなされなかった。小脳膜画分の ET_B に比べ大動脈平滑筋細胞の ET_A (IC₅₀ = 7.3 nM) に2500倍選択的な BQ-123 は、気管支及び肺実質膜画分への [¹²⁵I] ET - 1 結合を二相性に阻害し、その高親和性部位の存在比はそれぞれ65%、30%であり、IC₅₀ 値は6.4~6.5 nM であった。一方、ET_B に6700倍選択的な 4 AlaET - 1 を用いるとそれぞれの組織の高親和性部位の存在比を25%、60%で、IC₅₀ 値は0.52~0.57 nM であった。

BQ-123 ($1 \mu\text{N}$) 又は 4 AlaET - 1 ($0.1 \mu\text{M}$) を共存させることによりそれぞれの高親和性部位をブロックすると 4 AlaET - 1 及び BQ-123 は $[^{125}\text{I}]$ ET - 1 結合を一相性に阻害し、気管支での IC_{50} 値は 0.61 及び 0.8nM であり、肺実質では 0.61 及び 7.7nM であった。すなわち、いずれの組織においても ET_A および ET_B のみが存在していることが示唆された。更に、4 AlaET - 1 ($0.1 \mu\text{M}$) 存在での ET - 3 の阻害曲線は気管支及び肺実質のいずれにおいても Hill 係数は 1 となり、 IC_{50} 値も ET_A に対する ET - 3 の IC_{50} 値になった。また、BQ-123 ($1 \mu\text{M}$) 存在下での ET - 3 の阻害曲線は ET_B での ET - 1 の阻害曲線と等しくなった。すなわち、ET - 3 は ET_A 及び ET_B を区別するにはその選択性が不十分であり、それゆえ ET_A 及び ET_B の混在する組織での Hill 係数が低くなることを示している。更に、オートラジオグラフィーを検討した結果、ブタ肺組織の $[^{125}\text{I}]$ ET - 1 結合部位は、 ET_A 及び ET_B からなり、気管支及び血管には ET_A が、肺実質には ET_B が優位に存在することが明らかにになった。

ET - 3 は、4 AlaET - 1 に比べると ET_B 選択性が低いことが明らかとなった。そこで、より ET_B に選択的な物質として、4 AlaET - 1 N 末端側のアミノ酸 5 残基を除去して、更に N 末端 Leu の α -アミノ基をアセチル化した BQ-3020 を開発した。BQ-3020 は、ブタ小脳膜画分への $[^{125}\text{I}]$ ET - 1 結合を IC_{50} 値 0.2nM にて阻害するがブタ大動脈平滑筋細胞には IC_{50} 値 940nM と ET - 3 より 13 倍 ET_B に選択的リガンドであった。また、ブタ小脳膜分画への $[^{125}\text{I}]$ BQ-3020 結合は、ET - 1、ET - 3 及び BQ-3020 によって IC_{50} 値 $0.07 \sim 0.17 \text{nM}$ にて阻害されるが、BQ-123 では IC_{50} 値 16.7nM であった。更に、ブタ小脳膜画分での Scatchard 解析より、 $[^{125}\text{I}]$ BQ-3020 及び $[^{125}\text{I}]$ ET - 1 は共通の結合部位、すなわち ET_B を認識していることが明らかになった。

次にブタ小脳膜分画への $[^{125}\text{I}]$ BQ-3020 結合の binding kinetics について $[^{125}\text{I}]$ ET - 1 と比較した。 $[^{125}\text{I}]$ BQ-3020 のブタ小脳膜分画への結合は $[^{125}\text{I}]$ ET - 1 と同様に 4 時間で平衡状態に達した。4 時間インキュベーション後に大過剰の非標識 BQ-3020 ($200 \mu\text{M}$) を添加したが、添加 4 時間後でも 70% の特異的結合は解離しなかった。更に $[^{125}\text{I}]$ ET - 1 結合の ET - 1 による解離も同様であった。 ET_B に結合した ET - 1 は非常に離れにくいことが知られているが、それには ET - 1 の 2 対のジスルフィド結合によって形成される立体構造ではなく、Leu⁶ から Trp²¹ までのアミノ酸配列が重要であることが明らかとなった。

これら ET 受容体サブタイプに選択的なリガンドを用いることにより、ET - 1 の生理的、病態生理的役割の解明が今後更に進むことが期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	長澤	滋治
副査	教授	野村	靖幸
副査	助教授	徳光	幸子
副査	助教授	高橋	和彦

エンドセリン (ET) は1988年に筑波大学の柳沢らによって、ブタ大動脈の内皮細胞の培養上清から分離された血管収縮因子である。その後の研究から、アミノ酸23残基からなるペプチドで、3種類のアイソタイプが存在することが明らかにされた。ETは大動脈以外にも、脳、心臓、肺臓など多くの臓器からも分泌され、それらの臓器の機能調節に働いていることも分かってきた。特に、その微量で強力な血管収縮活性は、本態性高血圧とも関連して基礎-臨床の両面から注目され、世界的に活発な研究が進められている。

その後の研究から、ETはET_A、ET_Bという2種類の受容体を介して生理活性を発現することが明らかにされた。したがって、ETの作用機構や病態との関連性を明らかにするためには、それぞれの受容体を選択的なアゴニストあるいはアンタゴニストの開発が不可欠とされる。また、これらのアゴニストやアンタゴニストに医薬品としての応用も可能なことから、製薬企業の研究所で活発な研究が進められた。

申請者はこのET受容体のアンタゴニスト、アゴニストの開発研究の最先端で活躍し、数々の注目を集めた論文を発表してきた。

本論文はそれらの研究成果を集大成したものであり、主要な研究成果を以下に示す。

1) ET_B受容体を選択的なアゴニスト (4AlaET-1) の開発

ETはアミノ酸21残基からなるペプチドで、4残基のSerが存在する。この4Ser残基をAla残基に置換したペプチド (4AlaET-1) はET_B受容体を選択的に結合して、血管弛緩反応を惹起することを見いだした。さらに、4AlaET-1のアミノ酸残基を置換したペプチドを多数合成し、ETの構造-活性相関についての研究も進め、ET_Bとの選択的な結合にはGlu¹⁰-Trp²¹の領域が必須であることを明らかにした。この研究成果は、ETの活性部位を初めて明らかにしたものとして、世界的な反響を呼んだ。

2) ET_A受容体を選択的なアンタゴニスト (BE-18257) の発見

2種類のET受容体の機能分担を解析するためには、特定のET受容体をブロックする化合物

が不可欠である。申請者はブタ大動脈平滑筋膜画分 (ET_A) とブタ小脳膜画分 (ET_B) への放射標識 ET - 1 の結合阻害を指標として、ET 受容体のアンタゴニストの探索研究を進め、放線菌の培養上清から BE-18257 B と名付けた ET_A 選択的アンタゴニストを分離した。本化合物は 2 残基の L-アミノ酸と 3 残基の D-アミノ酸とからなる環状構造をしたペプチドであった。

さらに本化合物をリード化合物としてさらに活性の高いアンタゴニストの開発研究も試み、3 種類のアミノ酸置換した環状ペプチド (BQ-123) が親化合物よりも微量で強い活性を示すことを見出した。

3) ET_B 受容体を選択的なラジオリガンド [¹²⁵I] BQ-3020 の開発

受容体の解析には、ラジオアイソトープ標識されたリガンドが不可欠とされる。申請者は、4 AlaET - 1 の N-末端側の 5 残基を除いたのち、さらに N-末端アミノ基をアセチル化したペプチド誘導体を合成した。これは、ET - 1 よりも選択的に ET_B 受容体に結合するところから、その Tyr 残基を ¹²⁵I 標識したものを作製し、これが ET_B の選択的な標識に有効なことを明らかにした。

以上の研究成果は、ET の生理的、病理的機能の研究に大きく貢献するのみならず、新しい血管治療薬の開発研究においても有益な手掛かりを与えるものとして国際学会でも高く評価されており、博士 (薬学) の学位に値するものと評価できる。