

博士(薬学) 飛彈 隆之

学位論文題名

レチノイン酸受容体・リラキシン-3受容体への
作用物質を用いた受容体の免疫学的・
薬理学的役割の研究

-創薬研究アプローチを用いた受容体の機能解析に関する研究-

学位論文内容の要旨

この論文では、核内受容体およびG-タンパク質共役受容体(GPCR)の機能が明確ではない受容体に着目して、そのパスウェー最適かつハイスクリーニング化可能な実験系を構築し、特徴付けされた化合物や物質を道具として活用し、受容体やリガンドに関する情報と組み合わせて、リガンドの新たな薬理活性の発見や受容体機能の解析を行った。以下の研究に基づいている。

1. 血球系細胞におけるRARを介さないRXRパスウェーの存在
2. RAR α の免疫学的機能解析-RAR α 選択的化合物の移植片対宿主病への応用
3. リラキシン-3受容体の薬理学的機能解析

核内受容体の一つであるレチノイン酸レセプター(RAR)には、相同性が高い α 、 β 、 γ のサブタイプが存在し、all-*trans* retinoic acid(atRA、ビタミンA酸)がその生体内リガンドである。RARは、RARに相同性が高いレチノイドXレセプター(RXR)とヘテロダイマーとして働くことが知られており、RARのリガンド依存的にRXR/RARのヘテロダイマーが転写を活性化することが知られている。atRAの機能解析は古くから行われていたが、それらの機能にどのRARサブタイプが関与しているのかについては分かっていないことも多かった。またRXRの生体内リガンドはatRAの光学異性体である9-*cis* retinoic acid(9cRA)である。9cRAはRARのアゴニストでもあり、9cRAがどちらのパスウェーで働くのか、そのパスウェーに違いがあるのか、またRXR特異的なパスウェーについての詳細は分かっていないかった。

RAR、RXRに特異的な化合物を評価するため、各サブタイプのレセプター発現系を構築し、その細胞を用いてバインディングアッセイや、分泌型のアルカリフィオスマターゼ(PLAP)を用いた転写活性測定系を構築した。またメディシナルケミストとの共同でRARサブタイプ特異的なアゴニストやアンタゴニストを創出した。ER-27191はRARの全てのサブタイプにatRAと同程度の強さで結合するが転写活性化能を有しないパンアンタゴニストであり、ER-35795はRXRにのみ結合するRXRアゴニスト、ER-38925はRAR α 特異的アゴニストであると特徴付けた。

最初にこれらの特徴付けられた化合物を用いて、9cRAやRXRアゴニストで導かれる細胞機能に関与するパスウェーの解析を試みた。骨髄性白血病細胞株HL60はatRAや9cRAによって分化誘導される。また我々の見出したRXR特異的アゴニスト(ER-35795)によっても分化誘導される。分化誘導の際に、atRAでHL60細胞内のRAR β mRNAが誘導されるが、9cRAの高濃度またはER-35795ではmRNAの誘導は観察されなかった。また、atRAや低濃度の9cRAでの分化誘導はRARア

ンタゴニスト (ER-27191) で完全に抑制された。一方 RXR アゴニストや高濃度の 9cRA で誘導された HL60 細胞の分化は、ER-27191 によって抑制されなかった。この ER-27191 耐性の分化誘導は、RXR ホモダイマー・アンタゴニスト (LG100754) と ER-27191 の存在下で抑制されることを見出した。9cRA による分化誘導はその濃度によって RAR アンタゴニストに対する感受性が異なり、低濃度では RAR を介して、高濃度では RXR を介してそのパスウェーを変えうることを示した。また、HL60 の分化誘導作用のみならずリンパ球の LPS 刺激による増殖作用にもこのパスウェーが存在することを示した。これら二つの細胞系で得られた結果より、RAR の活性化とは別に、RXR ホモダイマーにより独自に活性化される機能発現パスウェーが存在することを明らかにすることことができた。

次に ER-38925 を用いた RAR α の免疫抑制効果と GVHD への応用について検討した。

RAR α アゴニストである Am-80 が関節リウマチの動物モデルで効果を示したり、我々が見出した RAR α 特異的なアゴニストが自然発症腎炎モデルで自己抗体産生抑制作用と糸球体腎炎の発症抑制効果を示したりすることが知られていた。そこで RAR α と免疫抑制作用に着目し、新たな疾患への適用とその免疫抑制のメカニズムについて調べた。具体的には新規 RAR α 特異的なアゴニスト ER-38925 を用いて、移植片対宿主病 (GVHD) 治療薬への応用の可能性とリンパ球活性化への RAR α パスウェーによる抑制作用のメカニズムを解析した。

マウスでの急性 GVHD (aGVHD) モデルにおいて、ER-38925 は 1 mg/kg から、生存期間の延長を示した。ER-38925 を投与した aGVHD マウスの脾臓細胞の細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の殺細胞活性は薬物の用量依存的に低くなっていた。また、*in vitro* のリンパ球混合反応においては、ER-38925 が T 細胞の増殖を抑制したことから、aGVHD モデルでの抑制効果は T リンパ球の分裂抑制に基づく CTL の誘導抑制であることが示唆された。

また aGVHD モデルでの血中のサイトカインを定量したところ、コントロール群では IL-12 や、IFN- γ といった Th1 型のサイトカインが増加していたが、ER-38925 投与群ではこれらサイトカインの血中レベルは低下していたことから、aGVHD 発症抑制機構として CTL 増殖抑制作用に加えて、Th1 サイトカインの産生抑制によることが示唆された。

さらに、マウスの慢性 GVHD モデルでも ER-38925 投与群では、DNA に対する自己抗体価が有意に抑制されることが明らかとなった。これらのことから、RAR α アゴニスト、ER-38925 の急性・慢性 GVHD に対する免疫抑制剤としての新規薬剤としての可能性を見出すことができた。

最後に核内受容体研究で得られた経験やノウハウを元に、薬物のターゲットとして実績の高い細胞膜受容体である GPCR をターゲットに、レセプターに関する各種情報に基づく実験系構築からのアプローチによる創薬研究を行った。

インスリンスーパー・ファミリーに属し既知のペプチドであったリラキシン-3 が GPCR135 のリガンドであることが報告された。リラキシン-3 は、その mRNA レベルでの発現解析では、脳内の橋と呼ばれる部分の限られた細胞に発現が限局していること、また、受容体である GPCR135 も視床下部に発現していることが知られていた。視床下部領域が摂食行動に重要な役割を果たしていることが知られていたため、リラキシン-3 にもその作用があると仮説を立て、その検証を行った。

まず、ハイスループット性の高い PLAP を応用したレポーター・アッセイ・スクリーニング系を構築した。GPCR シグナルの下流で転写活性化に関与する CREB (CRE Binding protein) が結合する配列 CRE (cAMP Response Element) を PLAP gene の上流に挿入した GPCR シグナル依存的転写活性系を HEK293 細胞で構築した。リラキシン-3 をペプチド合成しこの系で GPCR135 への活性を調べたところ、転写活性系による EC50 は 0.3nM 程度であり、報告と遜色のないアゴニスト活性であることを確認した。

脳室内にリラキシン-3 を単回で投与したところ、投与後 2 時間の摂餌量が増加することを見出した。そこで、脳室内にリラキシン-3 を連続投与したところ、投与初日からラットの摂餌量が増加すると共に体重が有意に増加することを見出した。投与 2 週間後には、精巣周囲の脂肪量がリラキシン-3 投与群で有意に増加し、肥満マーカーとなるインスリン、レプチニンの血中濃度も有意に上昇したことを見出した。これらのことから、リラキシン-3 の摂食・代謝調節への関与を初めて明らかにすると共に、リラキシン-3 アンタゴニストの創出は抗肥満薬としての開発の可能性があることを示した。

今回見出した受容体情報からの創薬研究は、治療薬の開発への道としてはまだ途上であるが、受容体の遺伝子情報から

最適かつハイスループット化可能な実験系構築し、既知の情報と特徴付けされた化合物、物質を道具として駆使することで、新たな薬理活性や機能解析に結びつけることで新規なターゲットを見出すことができるアプローチの一つであることを示すことができた。

学位論文審査の要旨

主査教授 松田 正
副査教授 有賀 寛芳
副査教授 南 雅文
副査准教授 上原 孝

学位論文題名

レチノイン酸受容体・リラキシン-3受容体への 作用物質を用いた受容体の免疫学的・ 薬理学的役割の研究

-創薬研究アプローチを用いた受容体の機能解析に関する研究-

この論文では、核内受容体およびG-タンパク質共役受容体 (GPCR) の機能不明の受容体に着目して、受容体の活性測定のためのハイスループットスクリーニング化可能な実験系を構築し、特徴付けした化合物を活用することで、新たな薬理活性の発見と受容体機能の解析、創薬ターゲットとしての評価を行い、以下を明らかにした。

核内受容体のRARは、RXRとヘテロダイマーとして働くことが知られていたが、RARとRXRの生体内リガンドである9-*cis* retinoic acid (9cRA) がどちらの受容体を介して機能を発揮するのか、またRXR特異的な機能についての詳細は分かっていなかった。そこで、9cRAの機能発現とRXRアゴニストを用いて細胞機能について解析した。

骨髓性白血病細胞株HL60は9cRAによって、またRXRアゴニスト、ER-35795によっても分化誘導された。分化誘導の際に、RARのリガンドであるatRAでHL60細胞内のRAR β mRNAが誘導されるが、9cRAの高濃度またはER-35795ではそのmRNA誘導は観察されなかった。さらにRXRアゴニストや高濃度の9cRAで誘導されたHL60細胞の分化はRARアンタゴニストによって抑制されなかった。このRARアンタゴニスト耐性の分化誘導は、RXR ホモダイマー・アンタゴニストで抑制することを見出した。すなわち、9cRAによる分化誘導はその濃度によって、つまり低濃度ではRARを介して、高濃度ではRXRを介してその機能を発揮しうることを示した。また、LPS刺激によるリンパ球増殖作用も、RXRアゴニストによって増殖が

阻害されることを見出した。以上よりRARを介さないRXRの活性化による細胞機能発現シグナル系の存在と、RXRアゴニストの創薬への応用について可能性を示した。

RAR α アゴニストが関節リウマチの動物モデルや自然発症腎炎モデルで発症抑制効果を示したりすることが知られていた。そこで新規RAR α 特異的アゴニストER-38925を用いて、RAR α シグナル系による免疫抑制効果と化合物の移植片対宿主病（GVHD）への応用を検討した。

マウス急性GVHD（aGVHD）モデルにおいて、ER-38925投与による生存期間の延長を見出した。化合物を投与したGVHDマウスの脾臓細胞の細胞傷害性T細胞（CTL）活性は用量依存的に低くなっていた。さらに、*in vitro*のリンパ球混合反応においても化合物はドナーリンパ球の増殖を抑制したことから、GVHDモデルでの効果はTリンパ球の増殖抑制に基づくCTLの誘導抑制であることが示唆された。このモデルでの血中のサイトカインを定量したところ、コントロール群ではIL-12や、IFN- γ といったTh1型のサイトカインが増加していたが、化合物投与群ではこれらサイトカインの血中レベルは低下していた。従って、発症抑制機構へのTh1サイトカインの産生抑制の関与も示唆された。また、マウスの慢性GVHDモデルではER-38925投与群では、DNAに対する自己抗体価が有意に抑制することが明らかとなった。以上のことから、RAR α を介した免疫抑制機構と、RAR α アゴニスト、ER-38925のGVHDに対する新たな発症予防や治療薬としての可能性を示した。

さらに、インスリンスーパーファミリーに属し既知ペプチドであったリラキシン-3がGPCR135のリガンドであることが報告された。そこでリガンドと受容体の発現情報より、摂食行動に重要な役割を果たしていると仮説を立てその検証を行った。

ハイスループット可能な転写活性測定系をHEK293細胞で構築し、合成リラキシン-3がGPCR135への活性を調べ、報告と遜色のないアゴニスト活性であることを確認した。脳室内にリラキシン-3を投与したところ、投与後2時間の摂餌量が増加することを見出し、次に脳室内にリラキシン-3を持続投与したところ、ラットの摂餌量と体重が共に有意に増加することを見出した。投与2週間後の精巣周囲の脂肪量がリラキシン-3投与群で有意に増加し、肥満マーカーであるインスリン、レプチンの血中濃度も有意に上昇することを見出した。以上のことから、リラキシン-3の摂食・代謝調節への関与を初めて明らかにすると共に、リラキシン-3アンタゴニストが抗肥満薬の創薬ターゲットであることを示した。

上記より、既知の情報と特徴付けされた新規化合物をツールとして駆使することで、新たな薬理活性や機能解析の発見に結びつき、新規創薬ターゲットを明らかにすることができた。これらのターゲットも今後の治療薬開発につながることが期待される。

よって本研究は博士（薬学）の学位を授与するに相応しいものである。