

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

# 博士論文概要

## 論文題目

細胞膜蛋白質に作用する薬物の  
標的選択性と作用に関する研究

Selectivity and pharmacological effects of  
drugs that target cell surface proteins

申請者

杉本	義幸
Yoshiyuki	SUGIMOTO

生命理工学専攻 分子生理学研究

2013年12月

多くのヒト疾患では、蛋白質の発現、局在、機能に異常が生じる。その異常を是正することが薬物治療の第一歩となる。細胞膜には、G 蛋白質共役型受容体 (G-protein coupled receptor: GPCR)、イオンチャネル共役型受容体、酵素共役型受容体などの機能分子受容体、細胞接着因子、細胞膜酵素、トランスポーターなどの細胞膜蛋白質が存在する。細胞膜蛋白質を介して外界の情報は細胞内に伝えられ、細胞は恒常性を維持する。個々の細胞は組織環境に合った細胞膜蛋白質を発現し、その組織において適切な機能を発揮すると考えられる。言い換えれば、細胞膜蛋白質はその組織の細胞を特徴付ける分子の一つと考えることができる。体内に吸収された低分子薬物や抗体医薬などの蛋白質医薬は、細胞内へ透過することなく細胞膜蛋白質と接触して細胞へ作用しうる。従って細胞膜蛋白質は、薬物の作用標的として非常に適した性質をもつ分子であると考えられる。一方、医薬となる薬物が満たすべき安全性、体内動態、薬効などの条件は多数挙げられる。薬効に関連する課題には、(1) 標的蛋白質に対する薬物の選択性が高いこと、(2) 薬物が疾患の治療にとって有益な薬理作用を示すこと、(3) 疾患の治療に重要な機能指標で薬物の選択 (スクリーニング) を行うこと、の三点が重要である。本研究は、これらの課題の解決を目指した。すなわち  $\beta 1$  アドレナリン受容体アゴニスト、サイトカイン融合抗体、カプサイシン (バニロイド) 拮抗薬の研究を各々の課題解決モデルとして位置づけ、疾患治療薬創製を順次展開した。

第1章では、創薬における薬物の設計、疾患治療における分子標的薬の位置づけに関して、これまでの知見と課題をまとめている。医薬品として上市された薬物の半数近くは細胞膜蛋白質を標的にするとされている。ヒトゲノム配列が解読された後、様々な創薬分子標的候補が見出された。しかし創薬の成功確率を飛躍的に向上させる結果とはならなかった。依然として疾患治療に有効な標的蛋白質の選択や、標的分子に対する薬物候補分子の作動の最適化は大きな課題となっている。標的に最適な候補分子を選択する方法論は十分に確立されてはおらず、創薬研究の大きな課題となっている。

第2章では、課題(1)、すなわち標的蛋白質に対する薬物の選択性に関し、 $\beta$  アドレナリン受容体に対するアゴニストの検討結果を示した。 $\beta$  アドレナリン受容体は交感神経の作用組織に発現する GPCR の一種であり、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$  のサブタイプがある。 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$  受容体はそれぞれ、心筋、気管支平滑筋、脂肪組織で多く発現している。内因性のアゴニストであるノルエピネフリンは交感神経刺激の伝達を担い、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$  の各サブタイプに対して選択性なく作用を示す。ノルエピネフリンなどのカテコラミン類は、細胞膜貫通部位 (transmembrane domain: TMD) に結合する。これらの低分子が受容体と結合する際に重要な官能基や、結合の際に相互作用するアミノ酸配列がサブタイプ間で保存されている。心筋の収縮に対して促進作用を有する  $\beta 1$  受容体アゴニスト化合物は、急性心不全治療薬として用いられているが、 $\beta 2$  受容体 (アゴニスト

は気管支拡張作用を示す)との選択性が副作用回避のために非常に重要である。そこで、カテコラミンと類似の部分構造を有し、かつ $\beta 1$ 受容体に高い選択性を有するアゴニスト(-)-1-(3,4-dimethoxyphenethylamino)-3-(3,4-dihydroxy)-2-propanol [(-)-RO363]について、 $\beta 1$ 選択性を生じる受容体部位の同定を試みた。まず、 $\beta 1$ と $\beta 2$ の間でTMDを置き換えたキメラ受容体を作製し、(-)-RO363の受容体に対する結合の変化を解析した。その結果、N末端より第2および第7のTMD(TMD2およびTMD7)が(-)-RO363の結合に重要であることが示された。次に、TMD2およびTMD7の中で $\beta 1$ と $\beta 2$ の間で保存されていないアミノ酸残基をAlaに置換した変異体を作製し、(-)-RO363の受容体に対する結合の変化を解析した。その結果、TMD2のLeu110、Thr117、TMD7のPhe359が重要であることが示された。さらに、 $\beta 1$ 受容体の活性化状態を模倣する構成活性変異体(Leu323Lys変異体)にLeu110、Thr117、Phe359のAla変異を導入し、(-)-RO363の親和性低下幅を解析した。その結果、Phe359のAla置換による親和性低下幅は構成活性変異体でより大きかった。したがって、アゴニストの結合によるコンフォメーション変化により、ダイナミックにPhe359の位置が変動することが示された。最後に、GPCRの一種、ロドプシンの立体構造より $\beta 1$ 受容体の構造モデルを構築し、 $\beta 1$ 受容体と(-)-RO363の結合について、実験結果を元に三次元モデルを構築した。このモデルは、より $\beta 1$ 選択性の高い $\beta$ アドレナリン受容体アゴニストの創製に活用できる。

第3章では、課題(2)、すなわち薬物の有益な薬理作用について、前立腺特異的膜抗原(prostate-specific membrane antigen; PSMA)に対する抗体の創出を事例に示した。PSMAは750アミノ酸から成る分子量約110kDaのII型膜糖蛋白質であり、葉酸加水分解酵素、カルボキシペプチダーゼ酵素活性を有する。PSMAは前立腺癌で高い特異的発現を認めることから、前立腺癌治療の標的分子として期待されている。PSMAの酵素活性を単純に阻害するだけでは、十分な抗腫瘍効果は示されない。そこでPSMAは細胞表面に存在する蛋白質であることに着目し、抗PSMAマウスモノクローナル抗体2C9を利用した抗前立腺癌抗体医薬の創出に着手した。まず2C9抗体の性状や活性を解析し、前立腺癌治療抗体として有望であることを確認した。次に2C9の定常領域をヒトIgG1型に置き換えたキメラ抗体ch-2C9を作製した。ヒト末梢血単核球細胞(PBMC)をエフェクター細胞として、ヒト前立腺癌細胞株とch-2C9とを共存させたところ、抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性を介した抗腫瘍活性を示した。さらにNK細胞やT細胞を介した免疫反応による抗腫瘍活性の増強を想定し、ch-2C9とIL-2との融合抗体ch-2C9-IL-2を作製した。ヒト前立腺癌細胞株にch-2C9-IL-2を添加したところ、細胞傷害活性を示したが、ヒトPBMCを共存させた系ではさらに細胞傷害活性が増強した。このことから、IL-2融合抗体化によるリンパ球の活性化が有効であることが*in vitro*で確認できた。さらにヒト前立腺癌細胞株を免疫不全マウスの皮

下に移植し、抗腫瘍活性を *in vivo* で評価したところ、ch-2C9-IL-2 は ch-2C9 よりも高い抗腫瘍活性を示した。以上は、薬物と細胞膜標的分子との相互作用する微小環境を分子設計に反映させ、薬効の向上させた成功例となった。

第4章では、課題(3)、すなわち機能指標による薬物選択について、カプサイシン(バニロイド)受容体(transient receptor potential vanilloid 1; TRPV1)アンタゴニストの検討結果を示した。TRPV1は6回膜貫通型の非選択的カチオンチャンネルである。唐辛子の成分であるカプサイシン受容体であることで知られ、酸や43℃以上の熱によっても活性化する。TRPV1は脳、脊髄、膵臓、腎臓など広い組織で発現し、特に後根神経節、三叉神経節などの知覚神経に高発現する。カプサイシン拮抗活性を指標にして選別されたTRPV1アンタゴニスト化合物について、さらに標的分子の生理機能と薬効との関連を調べる研究に着手した。TRPV1欠損マウスでは痛覚反応が抑制され、TRPV1は痛覚伝達に重要な役割を担う。これらのことから、TRPV1のアンタゴニストは疼痛治療薬となる可能性があると考え、その検証を進めた。炎症では、知覚神経の周囲でATPやブラジキニンなどのメディエーターが産生され、次いでGPCRを介した蛋白質キナーゼC(protein kinase C; PKC)の活性化がおこる。TRPV1がPKCによりリン酸化を受けると、各種刺激に対する活性化閾値が減少する。特に、温度刺激に対する閾値は体温以下にまで下降すると、体温でTRPV1の活性化が生じ、疼痛機序に連鎖する。そこで、リン酸化による感作状態を模倣する*in vitro*試験系について検討した。ホルボールエステル添加してPKCを活性化させ、TRPV1をリン酸化することによりカルシウム流入を惹起する試験系を構築した。本系でTRPV1アンタゴニストを評価したところ、代表化合物K-685はTRPV1に対して抑制活性を示した。さらに*in vivo*炎症性疼痛モデルで評価した結果、K-685は機械刺激性アロディニアおよび温熱性痛覚過敏反応に対して抑制作用を示した。K-685は本モデルで浮腫には影響しないため、抗炎症作用でなく、知覚神経のTRPV1に作用していると考えられた。本結果は、リン酸化によるTRPV1感作模倣試験系が炎症性疼痛治療薬の選別評価に有用であることと、TRPV1アンタゴニストK-685が炎症性疼痛の治療薬となる可能性を示した。

第5章では、創薬プラットフォーム構築の視点から本研究を総括している。ヒト疾患における病態からの正常化を目的にして、細胞膜蛋白質を標的とする創薬は今後も発展が続く。膨大な選択肢が取りうる創薬のプロセスの中で、成功確率を上げ、新しい薬理機序を有する医薬を創製していくためには、経験則だけに依存しない合理的手段の導入が必須である。本研究で示した各々のモデルでは、解決できる課題、導入すべき局面が異なるが、各々の成果、知見を統合することで新たなアイデアを生む可能性がある。創薬標的分子を確定し、これまでに想定できなかった薬理・薬効作用を発掘し、よりよい医薬品の創製に繋げ、広く薬学、医学領域の発展に深く貢献するものと考えられる。

## 早稲田大学 博士 (理学) 学位申請 研究業績書

氏名 杉本 義幸 印

(2014年2月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者 (申請者含む)
論文 ○	<ol style="list-style-type: none"> <li data-bbox="288 409 1455 584">1. The therapeutic potential of a novel PSMA antibody and its IL-2 conjugate in prostate cancer. <i>Anticancer Res.</i> 34(1): 89-98. January 2014, <u>Yoshiyuki Sugimoto</u>, Maiko Hirota, Kazuhiro Yoshikawa, Makoto Sumitomo, Kogenta Nakamura, Ryuzo Ueda, Rinpei Niwa, Toshiyuki Suzawa, Motoo Yamasaki, Kenya Shitara, Takashi Kato, Kazuyasu Nakamura.</li> <li data-bbox="217 622 1455 864">○ 2. K-685, a TRPV1 antagonist, blocks PKC-sensitized TRPV1 activation and improves the inflammatory pain in a rat complete Freund's adjuvant model. <i>J. Pharmacol. Sci.</i> doi: 10.1254/jphs.13088FP. [Epub ahead of print], <u>Yoshiyuki Sugimoto</u>, Hiroko Miura-Kusaka, Kiyotoshi Mori, Yozo Kojima, Kazuaki Inoue, Atsushi Inayoshi, Osamu Saku, Eri Atsumi, Hiroshi Ishida, Yoshisuke Nakasato, Yoshimitsu Kato, Shiro Shirakura, Shin-ichiro Toki, Katsumi Shinoda, Nobuyuki Suzuki.</li> <li data-bbox="217 902 1455 1111">○ 3. Beta(1)-selective agonist (-)-1-(3,4-dimethoxyphenethylamino)-3-(3,4-dihydroxy)-2-propanol [(-)-RO363] differentially interacts with key amino acids responsible for beta(1)-selective binding in resting and active states. <i>J. Pharmacol. Exp. Ther.</i> 301(1): 51-8. April 2002, <u>Yoshiyuki Sugimoto</u>, Reiko Fujisawa, Ryuji Tanimura, Anne Laure Lattion, Susanna Cotecchia, Gozoh Tsujimoto, Taku Nagao, Hitoshi Kurose.</li> <li data-bbox="288 1149 1455 1285">4. Discovery of novel 5,5-diarylpentadienamides as orally available transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) antagonists. <i>J. Med. Chem.</i> 55(7): 3436-51. April 2012, Osamu Saku, Hiroshi Ishida, Eri Atsumi, <u>Yoshiyuki Sugimoto</u>, Hiroshi Kodaira, Yoshimitsu Kato, Shiro Shirakura, Yoshisuke Nakasato.</li> <li data-bbox="288 1323 1455 1460">5. Binding pockets of the beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors for subtype-selective agonists. <i>Mol. Pharmacol.</i> 56(5): 875-85. November 1999, Masafumi Isogaya, <u>Yoshiyuki Sugimoto</u>, Ryuji Tanimura, Rie Tanaka, Hideo Kikkawa, Taku Nagao T, Hitoshi Kurose.</li> <li data-bbox="288 1498 1455 1635">6. Identification of a key amino acid of the beta2-adrenergic receptor for high affinity binding of salmeterol. <i>Mol. Pharmacol.</i> 54(4): 616-22. October 1998, Masafumi Isogaya, Yoko Yamagiwa, Shigeo Fujita, <u>Yoshiyuki Sugimoto</u>, Taku Nagao, Hitoshi Kurose.</li> <li data-bbox="288 1673 1455 1809">7. Mechanism underlying the block of human Cav3.2 T-type Ca<sup>2+</sup> channels by benidipine, a dihydropyridine Ca<sup>2+</sup> channel blocker. <i>Life Sci.</i> 88(19-20): 898-907. May 2011, Atsushi Inayoshi, <u>Yoshiyuki Sugimoto</u>, Jun Funahashi, Saori Takahashi, Masahiro Matsubara, Hideaki Kusaka.</li> <li data-bbox="288 1848 1455 1984">8. Galpha(12/13) mediates alpha(1)-adrenergic receptor-induced cardiac hypertrophy. <i>Circ. Res.</i> 91(10): 961-9. November 2002, Yoshiko Maruyama, Motohiro Nishida, <u>Yoshiyuki Sugimoto</u>, Shihori Tanabe, Justin H. Turner, Tohru Kozasa, Teiji Wada, Taku Nagao, Hitoshi Kurose.</li> </ol>

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文 (続き)	9. G beta gamma counteracts G alpha(q) signaling upon alpha(1)-adrenergic receptor stimulation. <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 291(4): 995-1000. March 2002, Motohiro Nishida, Shuichi Takagahara, Yoshiko Maruyama, <u>Yoshiyuki Sugimoto</u> , Taku Nagao, Hitoshi Kurose.
総説	1. 物理化学的視点からみたレセプター. 月刊薬事 42(9): 2425-32. 2000年8月, 黒瀬等, 谷村隆次, <u>杉本義幸</u> , 長尾拓. 2. エフェクター機能の増強による次世代抗体医薬の開発. <i>Drug Delivery System</i> 26(6): 611-21. 2011年11月. 中村和靖, <u>杉本義幸</u> , 町野悠介, 夏目暁人, 佐藤光男.
講演	1. $\beta 1$ アドレナリン受容体選択的アゴニスト(-)-RO363 の $\beta 1$ 選択的結合に関与する受容体部位の解析. 第73回日本薬理学会年会(横浜). 2000年3月. <u>杉本義幸</u> , 藤澤礼子, 谷村隆次, 長尾拓, 黒瀬等. 2. $\beta$ アドレナリン受容体選択的アゴニストと結合する受容体部位の解析. 第29回日本心臓血管作動物質学会(津). 1999年2月. <u>杉本義幸</u> , 谷村隆次, 長尾拓, 黒瀬等. 3. $\beta$ アドレナリン受容体選択的アゴニストと結合する受容体部位の解析. 第99回日本薬理学会関東部会(下野). 1998年10月. <u>杉本義幸</u> , 長尾拓, 黒瀬等. 4. 最近の癌抗体療法の話題と今後の展望. 日本薬学会第132年会(札幌). 2012年3月, 中村和靖, <u>杉本義幸</u> , 町野悠介, 加藤明文. 5. Benidipine, a Long-lasting Dihydropyridine Ca <sup>2+</sup> Channel Blocker, Inhibits Aldosterone Secretion through T-type Ca <sup>2+</sup> Channel Blockade. ESH/ISH Hypertension 2008 (Berlin, Germany). 2008年6月, Tetsuya Kitayama, Osamu Akizuki, Atsushi Inayoshi, Jun Funahashi, <u>Yoshiyuki Sugimoto</u> , Saori Takahashi, Masahiro Matsubara, Shiro Shirakura, Yutaka Kanda, Sasaki Katsutoshi, Suzuki Nobuyuki, Hideaki Kusaka. 6. G $\beta\gamma$ counteracts G $\alpha_q$ -signaling upon $\alpha 1$ -adrenergic receptor stimulation. XIVth World Congress of Pharmacology (San Francisco, CA, USA). 2002年7月, 西田基宏, 高河原周一, 丸山芳子, <u>杉本義幸</u> , 長尾拓, 黒瀬等. 7. ラット新生仔心室筋細胞における $\alpha 1$ アドレナリン受容体刺激による G12/13 を介した JNK 活性化経路と Ca <sup>2+</sup> シグナリングの解析. 日本薬学会第121年会(札幌). 2001年3月, 丸山芳子, 西田基宏, <u>杉本義幸</u> , 田中里依, 小笹徹, 長尾拓, 黒瀬等. 8. ラット新生仔心室筋細胞を用いたフェニレフリンによる心肥大のアデノウィルスによる遺伝子導入を用いた解析. 第73回日本薬理学会年会(横浜). 2000年3月. 丸山芳子, 西田基宏, <u>杉本義幸</u> , 田中里依, 長尾拓, 黒瀬等.

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
特許	<ol style="list-style-type: none"><li data-bbox="288 371 1453 472">1. PENTADIENAMIDE DERIVATIVE. WO/2008/007780. International Filing Date: July 13 2007. Yoshisuke Nakasato, Osamu Saku, Eri Atsumi, <u>Yoshiyuki Sugimoto</u>, Hiroshi Ishida.</li><li data-bbox="288 510 1453 611">2. ANTI-Trop-2 ANTIBODY. WO/2011/155579. International Filing Date: June 9 2011. Miki Yamaguchi, Kazunori Kato, Hirofumi Hamada, Kazuyasu Nakamura, <u>Yoshiyuki Sugimoto</u>, Tsuguo Kubota, Masahiro Ikeda.</li></ol>