

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**

2014年2月

杉本 義幸

Yoshiyuki SUGUMOTO

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**

2014年2月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科
生命理工学専攻 分子生理学研究

杉本 義幸

Yoshiyuki SUGUMOTO

【目次】

【略語一覧】	4
【図表一覧】	10
【第一章】 諸言	13
1-1 細胞膜蛋白質とその機能	
1-2 創薬における課題と本研究の目的	
1-3 標的分子に最適な薬物を創製するための方法論	
【第二章】 選択性付与のための標的部位の同定	19
2-1 序論	
2-2 材料および方法	
2-2-1 実験の概略	
2-2-2 $\beta 1/\beta 2$ キメラ受容体および変異 βAB の作製	
2-2-3 細胞の培養、キメラ受容体および変異受容体のトランスフェクション	
2-2-4 細胞膜標本の調製と受容体結合実験	
2-2-5 統計解析	
2-2-6 分子モデリング	
2-3 結果	
2-3-1 $\beta 1/\beta 2$ キメラ受容体を用いた(-)-RO363 の相互作用部位の解析	
2-3-2 $\beta 1AR$ のアミノ酸置換による(-)-RO363 の変化	
2-3-3 (-)-RO363 の $\beta 1AR$ への結合における Leu110、Thr117、Phe359 の寄与	
2-3-4 Leu110、Thr117、Phe359 の受容体活性化状態での役割	
2-3-5 分子モデリング	
2-4 考察	

【第三章】 分子の修飾により目的とする薬効を最大化するアプローチ…………… 39

3-1 序論

3-2 材料および方法

3-2-1 実験の概略

3-2-2 動物

3-2-3 細胞

3-2-4 PSMA 発現 PC-3 細胞株の作製

3-2-5 2C9 キメラ抗体 ch-2C9 の作製

3-2-6 IL-2 融合抗体 ch-2C9-IL-2 の作製

3-2-7 抗体のビオチン化

3-2-8 フローサイトメトリー

3-2-9 抗体の PSMA 蛋白質との結合活性評価

3-2-10 ADCC 活性評価

3-2-11 CTLL-2 細胞増殖活性評価

3-2-12 IL-2 融合抗体のエフェクター細胞による細胞傷害活性評価

3-2-13 抗腫瘍活性評価

3-3 結果

3-3-1 キメラ受容体 ch-2C9 の前立腺癌細胞への結合反応性

3-3-2 ch-2C9 の ADCC 活性

3-3-3 IL-2 融合抗体 ch-2C9-IL-2 のヒト前立腺癌細胞株反応性

3-3-4 2C9 由来 PSMA 抗体の PSMA 蛋白質に対する結合活性

3-3-5 ch-2C9-IL-2 の生物活性

3-3-6 PSMA 抗体の *in vivo* 抗腫瘍活性

3-4 考察

【第四章】 疾患で重要なシグナルに着目したスクリーニング系の使用…………… 59

4-1 諸言

4-2 材料および方法

4-2-1	実験の概略	
4-2-2	動物	
4-2-3	ヒト TRPV1 発現細胞の作製	
4-2-4	カプサイシン刺激による Ca^{2+} 応答の評価	
4-2-5	酸刺激による Ca^{2+} 応答の評価	
4-2-6	熱刺激による Ca^{2+} 応答の評価	
4-2-7	ウェスタンブロット	
4-2-8	ラット後根神経節細胞を用いた評価	
4-2-9	炎症性疼痛モデル	
4-2-10	統計解析	
4-3	結果	
4-3-1	hTRPV1 の PKC による感作	
4-3-2	K-685 の TRPV1 活性化に対する作用	
4-3-3	K-685 の PKC 活性化に対する作用	
4-3-4	ラット後根神経節細胞における PKC 感作による PKC 活性化	
4-3-5	ラット炎症性疼痛モデルにおける K-685 の作用	
4-4	考察	
	【第五章】 統括と展望	82
	【謝辞】	88
	【参考文献】	90
	【研究業績】	108

【略語一覧】

5-HT	5-hydroxytryptamine (5-ヒドロキシトリプタミン:セロトニン)
A-425619	1-isoquinolin-5-yl-3-(4-trifluoromethyl-benzyl)urea
A-784168	1-[3-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]-N-[4-(trifluoromethylsulfonyl)phenyl]-1,2,3,6-tetrahydropyridine-4-carboxamide
A-795614	N-1 <i>H</i> -indazol-4-yl-N'-[(1 <i>R</i>)-5-piperidin-1-yl-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -inden-1-yl]urea
AA	arachidonic acid (アラキドン酸)
AM	acetoxymethyl ester (アセトキシメチルエーテル)
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity (抗体依存性細胞傷害)
ADCP	antibody-dependent cellular phagocytosis (抗体依存性細胞貪食)
ANOVA	analysis of variance (分散分析)
APC	antigen presenting cell (抗原提示細胞)
AR	adrenergic receptor (アドレナリン受容体)
asialo-GM1	monosialotetrahexosylganglioside (モノシアロテトラヘキソシルガングリオシド)
ATP	adenosine triphosphate (アデノシン三リン酸)
<i>B. anthracis</i>	<i>Bacillus anthracis</i> (炭疽菌)
BCTC	N-(4-Tertiarybutylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl)tetrahydro-pyrazine-1(2 <i>H</i>)-carbox-amide
BiTE	bispecific T cell engager (Micromet 社二重特異性低分子抗体フォーマット)
BLyS	B-lymphocyte stimulator (B 細胞刺激因子)
BSA	bovine serum albumin (ウシ血清アルブミン)
CA	constitutively active (構成的活性化)

cAMP	cyclic adenosine monophosphate (環状アデノシン一リン酸)
CCR4	C-C chemokine receptor type 4 (CC ケモカイン受容体 4)
CD	cluster of differentiation (表面抗原分類)
cDNA	complementary DNA (相補的 DNA)
CFA	complete Freund's adjuvant (完全フロントアジュバント)
CGRP	calcitonin gene-related peptide (カルシトニン遺伝子関連ペプチド)
CMC	complement-mediated cytotoxicity (補体介在性細胞傷害)
COMT	catechol <i>O</i> -methyl transferase (カテコール <i>O</i> メチルトランスフェラーゼ)
COX	cyclooxygenase (シクロオキシゲナーゼ)
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (細胞傷害性 T リンパ球抗原 4)
CYP	cyanopindolol (シアノピンドロール)
DAG	diacylglycerol (ジアシルグリセロール)
DEAE	diethylaminoethyl (ジエチルアミノエチル)
dhfr	dihydrofolate reductase (ジヒドロ葉酸レダクターゼ)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium (ダルベッコ変法イーグル培地)
DNA	deoxyribonucleic acid (デオキシリボ核酸)
EBNA	Epstein-Barr virus nuclear antigen (エピスタインバーウイルス核抗原)
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (エチレンジアミン四酢酸)
ED ₅₀	50% effective dose (50%有効投与量)
EGFR	epithelial growth factor receptor (上皮成長因子受容体)
EGTA	ethyleneglycol bis(2-aminoethylether)tetraacetic acid (エチレングリコールビス 2 アミノエチルエーテル四酢酸)
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule (上皮細胞接着因子)
ERK	extracellular signal-regulated protein kinase (細胞外シグナル調節キナーゼ)

FBS	fetal bovine serum (ウシ胎児血清)
FDA	Food and drug administration (米国食品医薬品局)
FDSS	Functional drug screening system
FITC	fluorescein isothiocyanate (フルオレセインイソチオシアネート)
FLAG	DYKDDDDK 配列から成るエピトープタグ
FLIPR	Fluorescence image plate reader
Flt1	fms-like tyrosine kinase-1 (fms 様チロシンキナーゼ 1)
GD2	disialoganglioside (ジシアロガングリオシド)
GDP	guanosine diphosphate (グアノシン二リン酸)
GF 109203X	2-[1-(3-dimethylaminopropyl)indol-3-yl]-3-(indol-3-yl)maleimide
GnRH	gonadotropin releasing hormone (ゴナドトロピン放出ホルモン)
GPIIb/IIIa	glycoprotein IIb/IIIa (糖蛋白質 IIb/IIIa 複合体)
GPCR	G-protein coupled receptor (G 蛋白質共役型受容体)
GTP	guanosine triphosphate (グアノシン三リン酸)
HBSS	Hanks' balanced salt solution (ハンクス平衡塩溶液)
hCγ1	human Cγ1 (ヒト Cγ1 鎖)
HEK	human embryonic kidney
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HER2	human epidermal growth factor receptor 2 (ヒト上皮成長因子受容体 2)
hIgG1	human IgG1 (ヒト IgG1)
hIL-2	human IL-2 (ヒト IL-2)
hTRPV1	human TRPV1 (ヒト TRPV1)
HTS	high throughput screening (ハイスループットスクリーニング)
IC	immune complex (免疫複合体)
IC ₅₀	50% inhibitory concentration (50%抑制濃度)

ICI118551	(±)-1-[2,3-(dihydro-7-methyl-1 <i>H</i> -iden-4-yl)oxy]-3-[(1-methylethyl)amino]-2-butanol
IgE	immunoglobulin E (イムノグロブリン E)
IGF-1	insulin-like growth factor 1 (インスリン様成長因子 1)
IgG	immunoglobulin G (イムノグロブリン G)
IL	interleukin (インターロイキン)
IL-6R	IL-6 receptor (IL-6 受容体)
IP ₃	inositol trisphosphate (イノシトール三リン酸)
K-685	(2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i>)- <i>N</i> -[(3 <i>R</i>)-3-hydroxy-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-5-quinolyl]-5-(4-isopropoxyphenyl)-5-(4-trifluoromethylphenyl)-2,4-pentadienamide
KIR	killer inhibitory receptor (キラー細胞抑制受容体)
MAC	membrane attack complex (細胞膜傷害性複合体)
MEK	MAPK/ERK kinase (MAPK/ERK キナーゼ)
MHC	major histocompatibility complex (主要組織適合性抗原複合体)
mIgG	mouse IgG (マウス IgG)
MK-DTPA	1,4-methyl-benzyl isothiocyanate diethylenetriamine pentaacetic acid
MLCK	myosin light chain kinase (ミオシン軽鎖キナーゼ)
MMAE	monomethyl auristatin E (モノメチルオーリスタチン E)
mRNA	messenger RNA (メッセンジャーRNA)
MTX	methotrexate (メトトレキサート)
NGF	nerve growth factor (神経成長因子)
NK 細胞	natural killer cell (ナチュラルキラー細胞)
NK2 受容体	neurokinin 2 receptor (ニューロキニン 2 受容体)
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drug (非ステロイド性抗炎症薬)

PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis (ポリアクリルアミド電気泳動)
PAP	prostate acid phosphatase (前立腺酸性ホスファターゼ)
PBMC	peripheral blood mononuclear cell (末梢血単核球)
PBS	phosphate buffered saline (リン酸緩衝生理食塩水)
PCR	polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)
PDBu	phorbol 12,13-dibutyrate (ホルボール 12,13-ジブチラート)
PEG	polyethylene glycol (ポリエチレングリコール)
PGE ₂	prostaglandin E ₂ (プロスタグランジン E ₂)
PGI ₂	prostaglandin I ₂ (プロスタグランジン I ₂)
PI3K	phosphoinositide 3-kinase (PI3 キナーゼ)
PIP ₂	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸)
PK1	prokineticin 1 (プロキネティシン 1)
PK2	prokineticin 2 (プロキネティシン 2)
PKA	protein kinase A (プロテインキナーゼ A)
PKC	protein kinase C (プロテインキナーゼ C)
PLC	phospholipase C (ホスホリパーゼ C)
PSA	prostate-specific antigen (前立腺特異的抗原)
PSMA	prostate-specific membrane antigen (前立腺特異的膜抗原)
PVDF	polyvinylidene difluoride (ポリフッ化ビニリデン)
QOL	quality of life (生活の質)
RANKL	receptor activator of nuclear factor κ -B ligand (破骨細胞分化因子)
rIgG	rat IgG (ラット IgG)
RI	radioisotope (放射性同位体)
RIPA buffer	radioimmunoprecipitation assay buffer (放射性免疫沈降アッセイ用溶解バッファー)

RNA	ribonucleic acid (リボ核酸)
(-)-RO363	(-)-1-(3,4-dimethoxyphenethylamino)-3-(3,4-dihydroxy)-2-propanol
rpm	rotation per minute (回転/分)
RSV	respiratory syncytial virus (RS ウイルス)
SCID	severe combined immune deficiency (重症複合型免疫不全症)
SD ラット	Sprague-Dawley rat (スプラーグドローリーラット)
SDS	sodium dodecyl sulfate (ドデシル硫酸ナトリウム)
T-0509	(-)-(R)-1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-[(dimethoxyphenyl)amino]ethanol
TCR	T cell receptor (T 細胞受容体)
TMD	transmembrane domain (細胞膜貫通領域)
TNF	tumor necrosis factor (腫瘍壊死因子)
TNFR	TNF receptor (TNF 受容体)
TriomAb	Trion Pharma 社 trifunctional antibody フォーマット
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane (トリスヒドロキシルアミノメタン)
TRPV1	transient receptor potential vanilloid 1 (一過性受容体電位バニロイド 1)
TRH	thyrotropin releasing hormone (甲状腺ホルモン放出ホルモン)
VEGF	vascular endothelial growth factor (血管内皮細胞成長因子)
WT	wild type (野生型)

【図表一覧】

第一章

- 図 1-1 Drugbank database 登録の 989 薬物の標的分子を分類した例
- 図 1-2 1996 年より 2010 年までの新規医薬品の承認数
- 図 1-3 臨床試験の中止理由
- 図 1-4 本研究において検討した手法
- 表 1-1 蛋白質医薬品で検討されている分子修飾

第二章

- 図 2-1 β AR の構造と機能
- 図 2-2 イソプロテレノールの β 2AR との結合に重要なアミノ酸残基
- 図 2-3 β 1 選択的アゴニストの構造
- 図 2-4 実験の概略図
- 図 2-5 β 1/ β 2 キメラ受容体の構造
- 図 2-6 β 1AR と β 2AR の TMD2 および TMD7 のアミノ酸配列
- 表 2-1 β 1/ β 2 キメラ受容体に対する(-)-RO363 の親和性
- 表 2-2 TMD2 のアミノ酸残基についてアラニンスキャニングを実施した β 1AR に対する(-)-RO363 の親和性
- 表 2-3 TMD7 のアミノ酸残基についてアラニンスキャニングを実施した β 1AR に対する(-)-RO363 の親和性
- 図 2-7 [125 I]CYP の β 1AR への結合に対する(-)-RO363 の置換曲線の Leu110、Thr117、Phe359 へのアラニンスキャニングによる変化
- 表 2-4 Leu110、Thr117、Phe359 へのアラニンスキャニングを掛け合わせた β 1AR に対する(-)-RO363 の親和性
- 図 2-8 [125 I]CYP の β 1AR への結合に対する(-)-RO363 の置換曲線の Leu110、Thr117、Phe359 へのアラニンスキャニングの掛け合わせによる変化
- 表 2-5 構成的活性化型 β 1AR (CA- β 1AR) に Leu110、Thr117、Phe359 のアラニ

ンスキャニングを行ったことによる(-)-RO363 の親和性変化

図 2-9 野生型 β 1AR と構成的活性化型 β 1AR に Leu110、Thr117、Phe359 のアラ
ニンスキャニングを行った場合の(-)-RO363 の親和性変化比較

図 2-10 (-)-RO363 の β 1AR への結合モデル

第三章

図 3-1 前立腺癌の病態と治療方法

表 3-1 承認されている抗体医薬品の一覧

図 3-2 抗体医薬の作用

図 3-3 実験の概略図

図 3-4 PSMA 抗体の前立腺癌細胞反応性

図 3-5 PSMA 抗体の前立腺癌細胞に対する ADCC 活性

図 3-6 IL-2 融合 PSMA 抗体 ch-2C9-IL-2 の前立腺癌細胞反応性

図 3-7 PSMA 抗体の PSMA 蛋白質への結合活性

表 3-2 PSMA 抗体の PSMA 蛋白質への結合活性

図 3-8 ch-2C9-IL-2 の生物活性

表 3-3 LNCaP 細胞マウス担癌モデルでの抗体の抗腫瘍活性

第四章

図 4-1 炎症性疼痛

図 4-2 炎症状態における TRPV1 の感作

図 4-3 K-685 の構造

図 4-4 実験の概略図

図 4-5 293EBNA/hTRPV1 細胞における PDBu 添加に伴う Ca^{2+} 流入

図 4-6 293EBNA/hTRPV1 細胞における Ca^{2+} 流入に対する K-685 の作用

表 4-1 293EBNA/hTRPV1 細胞における Ca^{2+} 流入に対する K-685 の作用

図 4-7 PKC 活性化に伴う ERK リン酸化に対する各種薬物の作用

図 4-8 TRPV1 機能を評価する二つの方法

- 図 4-9 ラット後根神経節細胞における PKC を介した TRPV1 の感作
- 図 4-10 ラット後根神経節細胞における内向き電流に対する K-685 の作用
- 図 4-11 CFA モデルにおける機械刺激性アロディニアに対する K-685 の作用
- 図 4-12 CFA モデルにおける熱刺激性痛覚過敏に対する K-685 の作用
- 図 4-13 CFA モデルで生じる浮腫に対する K-685 の作用

第五章

- 図 5-1 創薬研究の流れにおいて各方法論を適応できるポイント
- 図 5-2 現在議論されている将来の医薬の状況

【第一章】 諸言

1-1 細胞膜蛋白質とその機能

生体は脂質、糖類、核酸、蛋白質などにより構成される。これらの生体成分のうち、蛋白質は医薬品の主たる作用点である(長野哲雄ら編, 2004)。生体は多数の蛋白質から構成され、蛋白質の機能は恒常性の維持に重要な役割を果たす。また、個々の蛋白質は核、小胞体、細胞質、細胞膜など、その機能に応じた局在を示す。

疾患の多くでは、蛋白質の発現および機能の異常が生じる。健康であれば、このような異常は生体恒常性の維持機能により是正される。薬物治療においては、疾患の原因や症状の改善を目的に、積極的に患者に薬物を投与する。細胞は外界の情報を受容体などの細胞膜蛋白質を介して細胞内に伝え、細胞の恒常性維持を行う。

その細胞膜蛋白質は、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薬物受容体、細胞接着因子、細胞膜酵素、トランスポーターなどに分類される。生体内の組織を構成する細胞は、これらの細胞膜蛋白質の中でその組織の環境に合った分子を発現し、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。加えて、細胞表面は体内に吸収された薬物が細胞膜の透過なしに接触しうる面であり、低分子医薬のみならず、抗体医薬をはじめとする蛋白質医薬も作用することができる。

これらの知見から、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蛋白質であると考えられる。実際、細胞膜蛋白質は、これまでに報告されている薬物の標的のうち約半数を占めるという解析結果がある(図 1-1、Rask-Andersen M *et al.*, 2011)。一方、細胞膜蛋白質以外の標的分子としては核内受容体が 4%、可溶性酵素が 22%、受容体や酵素、イオンチャネル、トランスポーターには分類されない分子群(酵素蛋白質と相互作用する分子や、構造蛋白質、リガンド分子)が 12%を占める。これらの蛋白質を標的とする薬物は抗炎症薬や癌を対象とするものが多い(Rask-Andersen M *et al.*, 2011)。

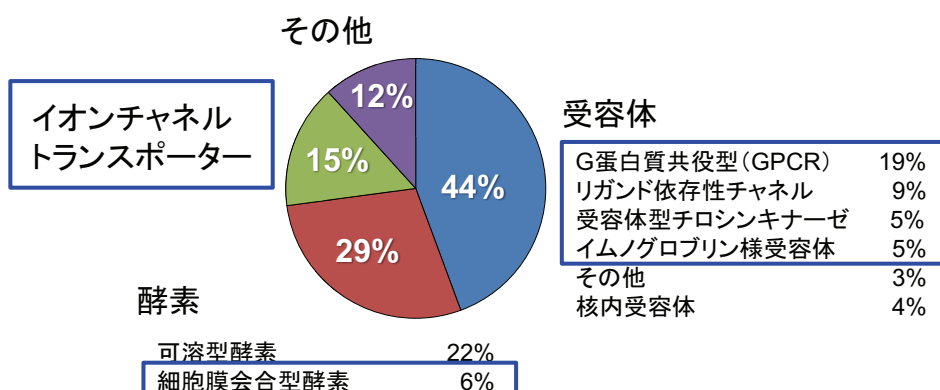


図 1-1 Drugbank database 登録の 989 薬物の標的分子を分類した例

文献 (Rask-Andersen M *et al.*, 2011) のデータよりグラフを作成した。細胞膜蛋白質を青色の枠で示した。

1-2 創薬における課題と本研究の目的

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が、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 (図 1-2、Mullard A *et al.*, 2011)。これは疾患に対して標的蛋白質の設定を誤ったという側面もあるが、設定した標的分子に対して必ずしも最適の候補分子を創製できてはいないという点も大きい。最適の候補分子を選択するための方法論は十分に確立されてはおらず、創薬研究において大きな課題となっている。

新規医薬品承認数(FDA)

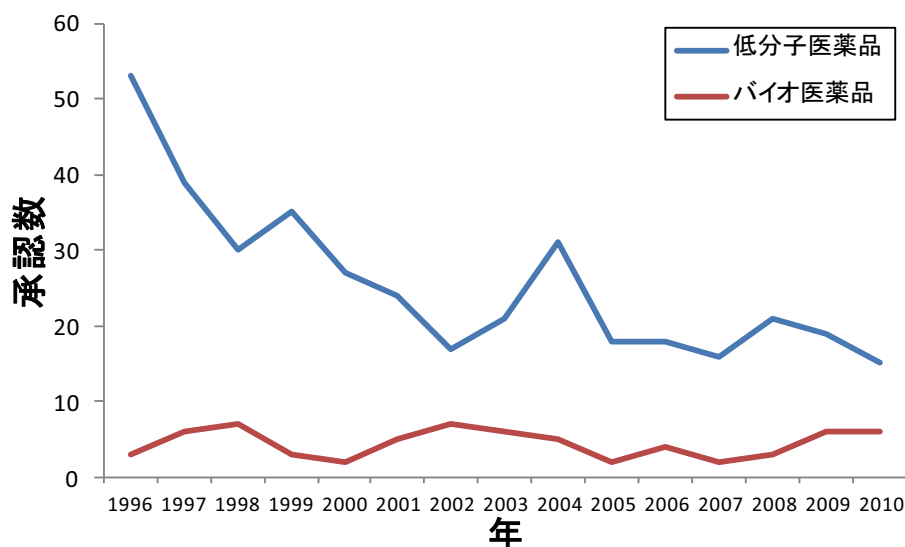


図 1-2 1996 年より 2010 年までの新規医薬品の承認数

米国食品医薬品局 (FDA) に承認された新規医薬品の数について、文献 (Mullard A *et al.*, 2011) のデータよりグラフを作成した。

過去の臨床試験での中止理由について解析した報告によると (Arrowsmith J, 2011a; Arrowsmith J, 2011b; 中林哲夫, 2012)、有効性すなわち薬効に起因する課題が最も多くの割合を占めていることがわかる (図 1-3)。薬物が医薬品となるために満たさなければならない条件は安全性、体内動態、候補品の物性など様々な要素において複数あるが、薬効に関連する条件としては、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) を行うことが挙げられる。本研究においてはこれらの 3 点について、各々異なる標的蛋白質についての例ではあるが、モデルケースとして解析を実施した。

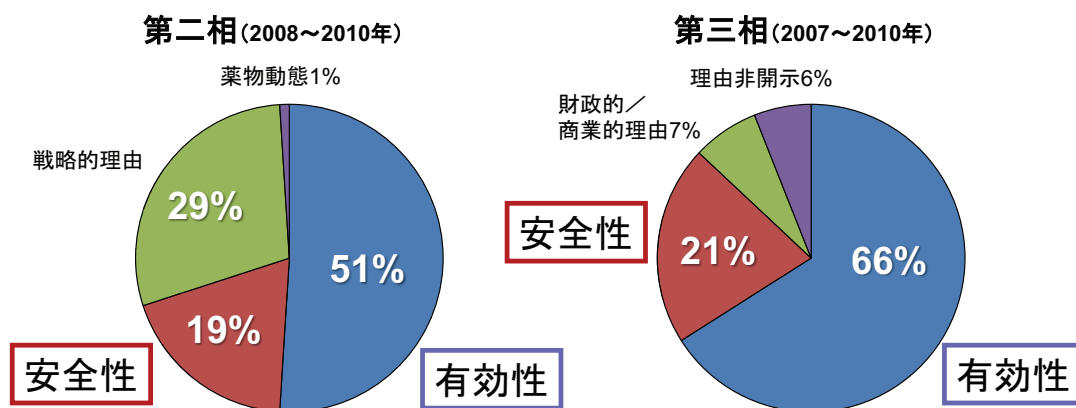


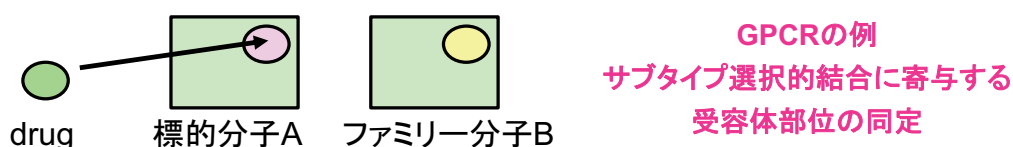
図 1-3 臨床試験の中止理由

文献 (Arrowsmith J, 2011a; Arrowsmith J, 2011b; 中林哲夫, 2012) のデータよりグラフを作成した。

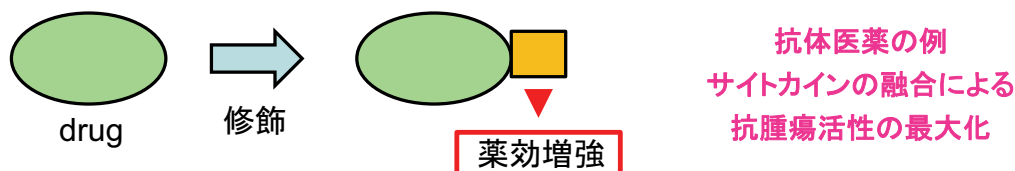
1-3 標的分子に最適な薬物を創製するための方法論

前項で述べた、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3点に関して、標的分子に最適な薬物を創製するための方法論という視点で考えた。本研究で検討した方法論について図 1-4 に示す。

① 選択性付与のための標的部位の設定



② 薬効を最大化する分子の修飾によるアプローチ



③ 疾患／病態に重要なシグナルに着目したスクリーニング系

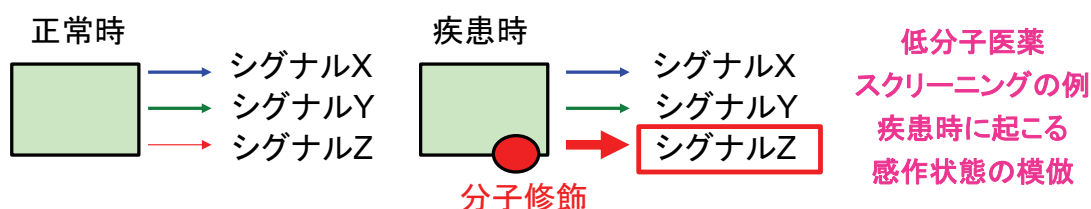


図 1-4 本研究において検討した手法

第一の点に関しては、標的分子に対して相同性の高いファミリー分子があった場合に、薬物の機能的な活性を保持した上で標的選択性を付与できるような部位を同定するアプローチが有効であると考えられる。本方法論について、GPCRの一つ、 β アドレナリン受容体(β AR)を例にとり、 β 1 サブタイプ選択的にアゴニスト活性を示す化合物の β 1 選択性決定部位を同定した。

第二の点に関しては、疾患の治療にとって有益な(治療効果を生む)薬理作用を探る索し、それを最大化するための方法論が考えられる。検討している分子そのものでは薬理作用の最大化が難しい場合がある。また、薬物は毒性を生じない投与量で薬効を示す必要がある。薬物に体内分布、動態面の課題がある場合には、設定された投与量では薬物の血中濃度が薬理作用を発揮するための閾値にまで到達できない場合もある。このような場合に、化学構造の改変や、機能分子の付与などの修飾を加えて薬理作用を最大化できる可能性が考えられる。この観点で、蛋白質医薬品においては数種類の分子修飾が検討されている(表 1-1)。本方法論について、抗体医薬を例にとり、前立腺癌に発現する抗原(Prostate-specific membrane antigen: PSMA)の抗

腫瘍活性を、抗体と IL-2 の融合分子の創製により最大化できるか検討した。

第三の点に関しては、疾患において特徴的に認められる標的分子の機能変化を特定し、その機能を指標に薬物のスクリーニングを行うという方法論が考えられる。本方法は、標的分子に複数の機能活性があり、その中の特定の機能に疾患特異的な変化が認められる場合に有効であると考えられる。本方法論について、低分子医薬のスクリーニングを例にとり、炎症性疼痛に対して有効であることが示唆されるカプサイシン受容体 (Transient receptor potential vanilloid 1: TRPV1) のアンタゴニストについて、炎症状態に生じる TRPV1 の感作状態を模倣した機能評価系を用いて活性評価を実施した。

表 1-1 蛋白質医薬品で検討されている分子修飾

蛋白質医薬品で検討されている分子修飾の一部について、その種類と目的、例を示した。示した例のうち*EMD-273063 および#catumaxomab は現在、日本で承認されていない(catumaxomab は欧州でのみ承認)。

目的	種類	例
血中安定性の向上	PEG結合	certolizumab pegol (PEG化TNF α 抗体) など
	Fc結合	etanercept (TNFR細胞外ドメインのFc融合蛋白質) など
患部への移行性向上	アルブミン結合	Nab-paclitaxel (paclitaxelをアルブミンと結合し、ナノ粒子化) など
	リポソーム製剤	liposomal doxorubicinなど
薬理活性向上	毒物結合	trastuzumab emtansin (maytansin標識HER2抗体) など
	R結合	ibritumomab tiuxeten (RI標識CD20抗体) など
	サイトカイン融合	EMD-273063* (IL-2融合GD2抗体) など
	二重特異性抗体	catumaxomab# (EpCAMとCD3の二重特異性抗体) など

【第二章】 選択性付与のための標的部位の設定

2-1 序論

β アドレナリン受容体(β AR)はGPCRのファミリーに属しており、 β 1、 β 2、 β 3の3種類のサブタイプがクローニングされている(Rohrer DK and Kobilka BK, 1998)。これら3種類の β ARは、生体内でノルエピネフリン(norepinephrine)やエピネフリン(epinephrine)に代表されるカテコールアミン類によって活性化され、G蛋白質の一種であるG α sを介して交感神経系のシグナルを伝達する(図2-1)。また、3種類の β ARの局在には差が認められ、各々の受容体刺激による薬理的効果にも大きな違いが認められる(図2-1)。 β 1ARは主として心筋細胞に発現しており、心筋の陽性変力作用および変時作用を司る。それに対して β 2ARは気管や末梢血管の平滑筋に存在し、平滑筋の弛緩作用に関わる(図2-1)。 β 3ARは脂肪組織や消化管平滑筋に見られ、脂肪分解や平滑筋の弛緩に関わっている(図2-1)。このような薬理学的特性の差異から、 β ARのサブタイプ選択的なリガンドは臨床上有用である。 β 1選択的アゴニストは急性時の心不全治療薬として用いられ、 β 2選択的アゴニストは気管支喘息治療薬として用いられるものが多い(図2-1)。そのため、そのサブタイプ選択性が副作用の軽減などの観点から非常に重要である。例えば気管支喘息治療薬として用いられる β 2選択的アゴニストは作用が持続されることが重要であり、COMT(Catechol O-Methyl Transferase)による代謝を受けにくい修飾を施してものが多い。従って、 β 2選択性が低いと心臓に刺激が長時間加わることになり問題となる。このような点は β 1選択的アゴニストを強心薬として用いる場合も同様である。以上のことからサブタイプ選択性に寄与する受容体部位の同定が、副作用のより低いアゴニストのデザインにとって重要である。

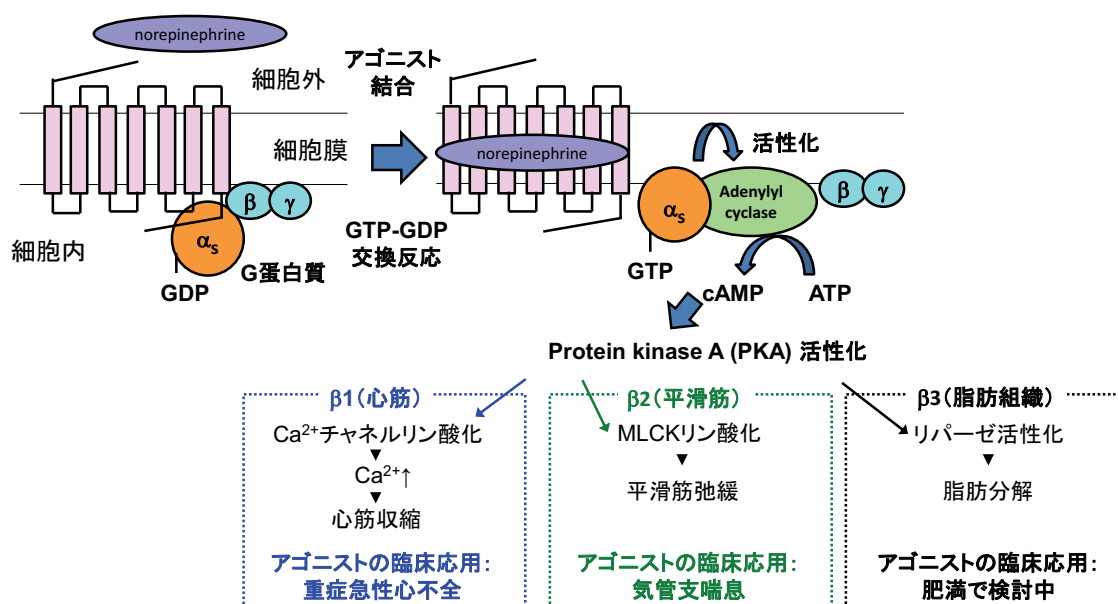


図 2-1 βAR の構造と機能

βAR にアゴニストであるノルエピネフリンが結合すると、Gα_sサブユニットのGTP-GDP 交換反応が惹起され、Gα_sサブユニットとGβγサブユニットに解離する。GTP 結合型のGα_sサブユニットはエフェクター分子であるアデニル酸シクラーゼ (adenylyl cyclase) を活性化し、セカンドメッセンジャーcAMP の生成を介してプロテインキナーゼ A (PKA) を活性化する。PKA は3種類のサブタイプおよび発現組織に応じて異なる分子をリン酸化し、細胞に合ったシグナルを伝達することで細胞応答を惹起する。

βAR のアゴニストの結合部位としては、図 2-2 に示すようにイソプロテレノール (isoproterenol) をはじめとするカテコールアミン類のものが報告されており、細胞膜貫通部位 (TMD) に存在することが知られている (Dixon RA *et al.*, 1987; Ji TH *et al.*, 1988)。カテコールアミンのアミン窒素はβ2AR の第三膜貫通部位 (TMD3) の Asp113 と相互作用し (Strader CD *et al.*, 1988)、また、二つのカテコール性水酸基はβ2AR の TMD5 に存在する Ser204 および Ser207 と水素結合を形成することが示されている (Strader CD *et al.*, 1989)。β2AR の TMD6 の Phe290 (Strader CD *et al.*, 1994) および Asn293 (Wieland K *et al.*, 1996) はそれぞれカテコール性芳香環およびβ位の水酸基と相互作用することが示されている。これらの結合部位はβAR のサブタイプを通じて保存されている。

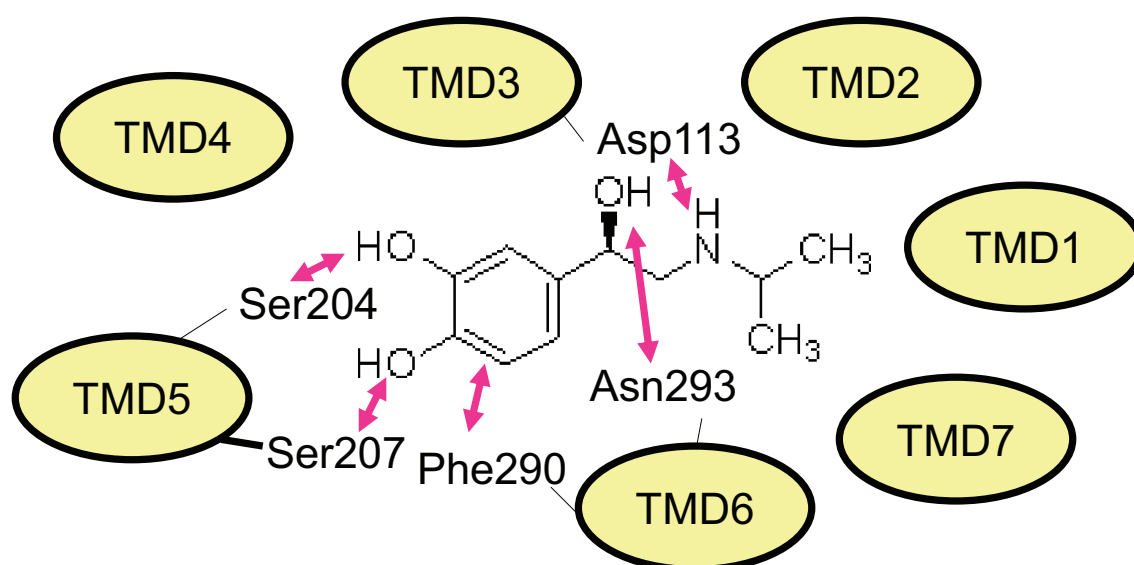


図 2-2 イソプロテレノールの β 2AR との結合に重要なアミノ酸残基

β 2AR の 7 箇所 の TMD およびイソプロテレノール、結合に重要なアミノ酸を細胞外より見た模式図として示した。

また、カテコールアミン類の β AR サブタイプ選択性は低いため、これらの結合部位のサブタイプ選択性への寄与は少ないと推測される。一般的に臨床で用いられる β 1 選択的アゴニストはカテコールアミン構造またはそれに類似する構造を有しているだけでなく、アミンに大きな置換基を結合していることが特徴である。そのため、この大きな置換基が上で述べた結合部位以外の部位と相互作用する可能性が考えられている。カテコールアミン骨格以外の置換基との結合部位としてはたらく受容体部位について、サブタイプ選択的アンタゴニストである ICI118551 (β 2 選択的) およびベタキシロール (betaxolol) (β 1 選択的) の選択性に β 2AR あるいは β 1AR の TMD6 および TMD7 が重要な役割を果たしているという報告 (Frielle T *et al.*, 1988) がなされている。しかしながら、サブタイプ選択的アゴニストの選択性を決める部位についての知見はほとんど得られていなかった (Kurose H *et al.*, 1998)。

これまでの研究において、 β 2 選択的アゴニストの β 2 選択性に寄与する受容体部位について解析がなされ、その結果、 β 2AR の TMD2 と TMD7 が β 2 選択的結合をもたらす結合ポケットを形成しており、TMD7 に存在する Tyr308 との結合が重要な役割を担っていることが示唆された (Kikkawa H *et al.*, 1998; Isogaya M *et al.*, 1998; Isogaya

M *et al.*, 1999)。そして、コンピュータを用いた分子モデリングから、Tyr308 が β_2 選択的アゴニストのアミンに結合している置換基と相互作用するというモデルが構築された (Isogaya M *et al.*, 1998; Isogaya M *et al.*, 1999)。一方、 β_1 AR についても、TMD2 は β_1 選択的結合に必要であることが示唆されている (Isogaya M *et al.*, 1999)。さらに分子モデリングの結果から、 β_1 AR の TMD2 だけでなく TMD7 も結合ポケットを形成することが示唆されていた (Isogaya M *et al.*, 1999)。しかしながら、この研究において用いられていたアゴニスト [T-0509 およびデノパミン (denopamine)] は β_1 選択性が低く [K_i (β_2) / K_i (β_1) が約 10]、TMD7 の β_1 選択的結合への関与についての結合実験による解析は未だなされていなかった。

(-)-RO363 [(-)-1-(3,4-dimethoxyphenethylamino)-3-(3,4-dihydroxy)-2-propanol] は T-0509 およびデノパミンと同様の 3,4-dimethoxyphenethylamine 骨格を有するアゴニストである (図 2-3)。本化合物の K_i (β_2) / K_i (β_1) は約 100、 K_i (β_3) / K_i (β_1) は約 3000 であり、非常に高い β_1 選択性を有する (McPherson GA *et al.*, 1984; Molenaar P *et al.*, 1997)。

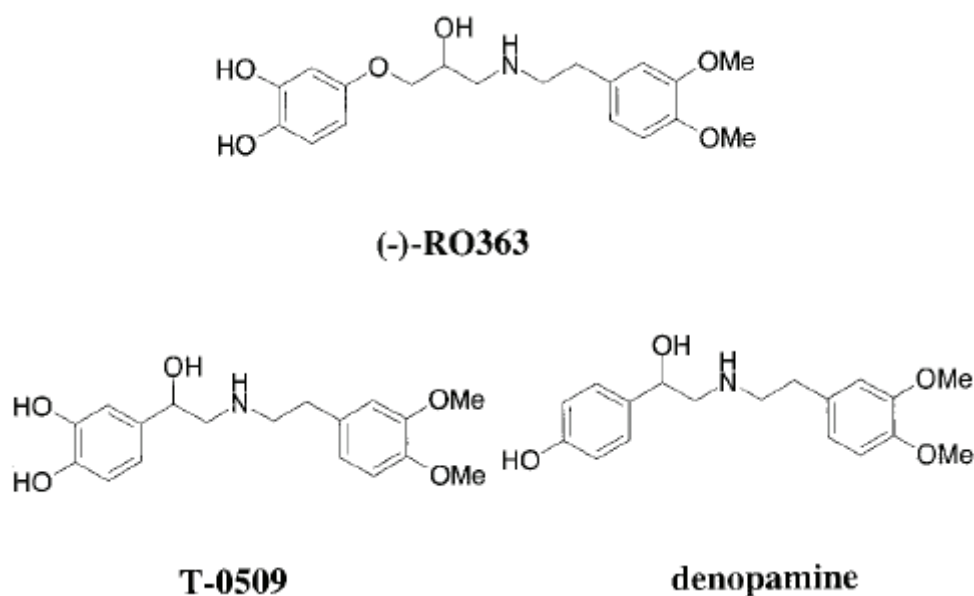


図 2-3 β_1 選択的アゴニストの構造

そこで、まだ検討されていない β_1 AR の TMD7 に存在する各アミノ酸残基が

(-)-RO363 の $\beta 1$ 選択的結合に対してどのように関与しているかについて、また、これらの結合部位が受容体機能とどのように関わっているかについて解明することを目的として実験を行った。

2-2 材料および方法

2-2-1 実験の概略

以下、図 2-4 に本章における実験の概略を示す。

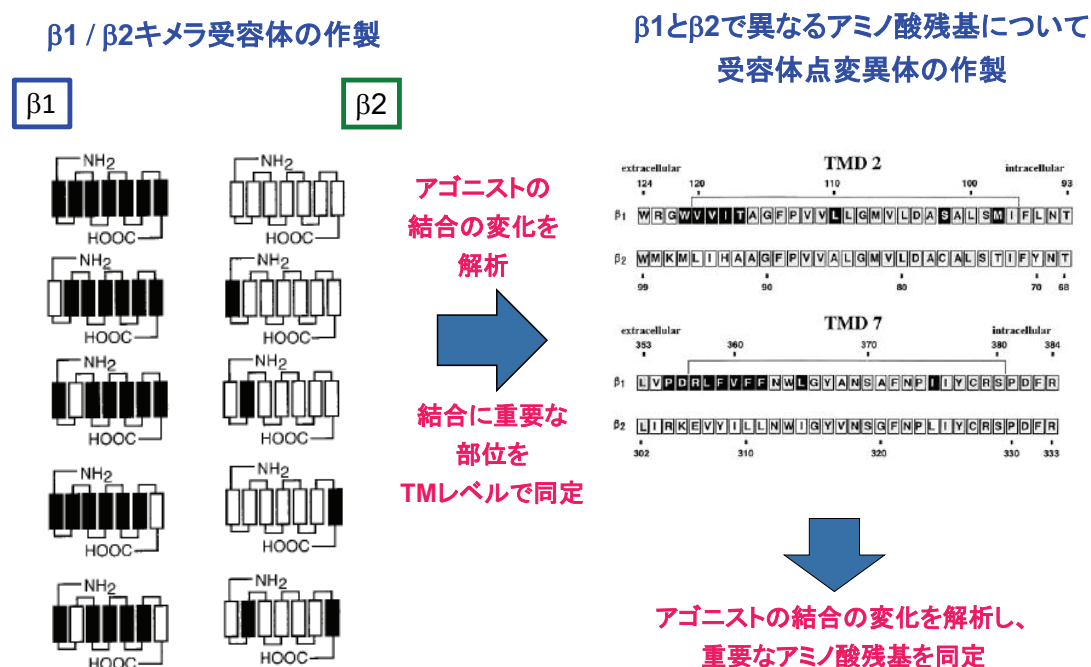


図 2-4 実験の概略図

文献(Sugimoto Y *et al.*, 2002) に用いられている図を用いて、本章で行った実験の概略を示した。

2-2-2 $\beta 1/\beta 2$ キメラ受容体および変異 βAR の作製

ヒト $\beta 1AR$ 、ヒト $\beta 2AR$ およびヒト $\beta 1AR$ 、ヒト $\beta 2AR$ のキメラ受容体の cDNA は、以前の研究で作製されたもの(Kikkawa H *et al.*, 1998)、すなわち以下のアミノ酸残基の構成から成る各キメラ受容体を用いた(図 2-5)。これらの cDNA を発現ベクター pCMV5 あるいは pEF/myc/cyto に組み込んだコンストラクトを構築して発現実験に用いた。

CH1: $\beta 1$ Met1-Ala84/ $\beta 2$ Lys60-Leu413

- CH2: $\beta 2$ Met1-Phe71/ $\beta 1$ Ile97-Cys131/ $\beta 2$ Glu107-Leu413
 CH3: $\beta 2$ Met1-Val295/ $\beta 1$ Lys347-Pro381/ $\beta 2$ Asp331-Leu413
 CH4: $\beta 2$ Met1-Phe71/ $\beta 1$ Ile97-Cys131/ $\beta 2$ Glu107-Val295/ $\beta 1$ Lys347-Pro381/
 $\beta 2$ Asp331-Leu413
 CH5: $\beta 2$ Met1-Ala59/ $\beta 1$ Lys85-Val477
 CH6: $\beta 1$ Met1-Phe96/ $\beta 2$ Ile72-Cys106/ $\beta 1$ Glu132-Val477
 CH7: $\beta 1$ Met1-Val346/ $\beta 2$ His296-Pro330/ $\beta 1$ Asp382-Val477
 CH8: $\beta 1$ Met1-Phe96/ $\beta 2$ Ile72-Cys106/ $\beta 1$ Glu132-Val346/ $\beta 2$ His296-Pro330/
 $\beta 1$ Asp382-Val477

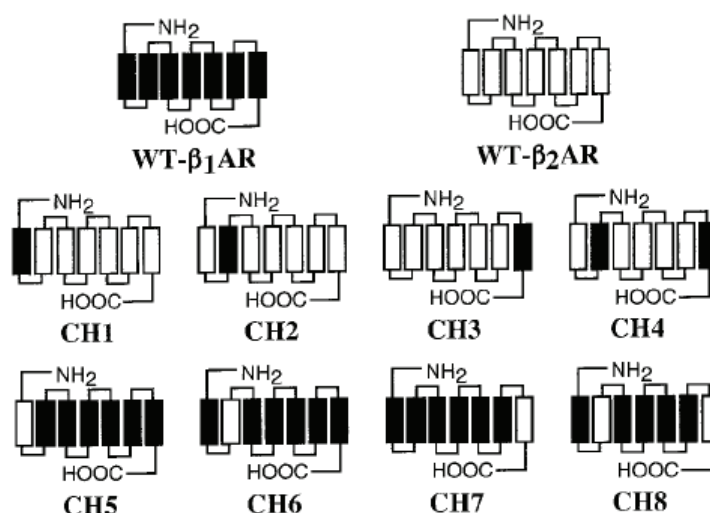


図 2-5 $\beta 1/\beta 2$ キメラ受容体の構造

受容体の TMD を長方形で示した。WT- $\beta 1$ AR、WT- $\beta 2$ AR の TMD をそれぞれ、黒色、白色の長方形で示した(出典: Sugimoto Y *et al.*, 2002)。

$\beta 1$ と $\beta 2$ の間で異なるアミノ酸残基(図 2-6)をアラニンに置換した変異 $\beta 1$ AR は Quick Change™ site-directed mutagenesis Kit (Agilent Technologies, La Jolla, CA, USA) を用いて作製した。キメラおよびアラニン置換体の PCR による増幅配列を確認した後、増幅した配列を残りの受容体部分をコードする DNA フラグメントと連結し、全長のキメラ受容体およびアラニン置換型 $\beta 1$ AR を得た。また、構成的活性化型 $\beta 1$ AR のアラニン置換型変異体は、構成的活性化を生じる点変異[Leu323 の Lys への変異:L323K と略す。(Lattion A *et al.*, 1999)]をコードする DNA フラグメントを L323K- $\beta 1$ AR の cDNA

[Dr. Susanna Cotecchia (University of Lausanne, Lausanne, Switzerland) より供与]から切り出し、また、Leu110 および Thr117 のそれぞれの位置のアラニン置換をコードするフラグメントを各々のアラニン置換型 β 1AR の cDNA から切り出して両者を連結し、さらに残りの受容体部分をコードする DNA フラグメントを連結し、発現ベクター pCMV5 あるいは pEF/myc/cyto に組み込んだコンストラクトを構築して発現実験に用いた。

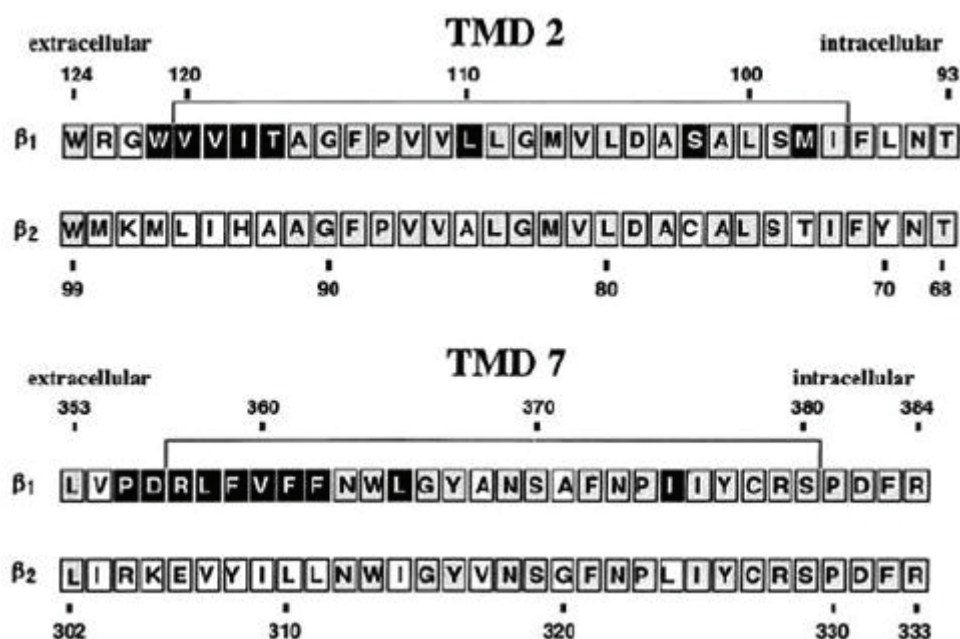


図 2-6 β 1AR と β 2AR の TMD2 および TMD7 のアミノ酸配列

β 1AR と β 2AR の間で保存されているアミノ酸残基を灰色で示し、 β 2AR の対応する部位とは異なっている β 1AR のアミノ酸残基を黒色で示した(出典: Sugimoto Y *et al.*, 2002)。

2-2-3 細胞の培養、キメラ受容体および変異受容体のトランスフェクション

受容体結合実験に用いる細胞膜試料の調製には COS-7 細胞を使用した。10%のウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) および 10 μ g/mL のゲンタマイシンを含む培地 (Dulbecco's modified Eagle medium: DMEM) 中で予め培養しておいた細胞をトランスフェクションの前日に 100-mm ディッシュに $1.0 - 1.5 \times 10^6$ 細胞/ディッシュとなるように播種した。この細胞に DEAE-デキストラン法を用いて各種 β AR のトランスフェクションを行った (Cullen BR, 1987)。トランスフェクションの 3 日後に細胞を回収して細胞膜試料の調製に用いた。

2-2-4 細胞膜試料の調製と受容体結合実験

トランスフェクションを行って3日後のCOS-7細胞を氷冷したリン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline: PBS)で3回洗浄し、氷冷した lysis 緩衝液[10 mM Tris/HCl (pH7.4), 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 5 μ g/mL leupeptin, 10 μ g/mL benzamidine, 10 μ g/mL soybean trypsin inhibitor]を加えて細胞を回収した。この細胞懸濁液を45000 \times gで10分遠心し、沈殿を lysis 緩衝液に再懸濁後、ホモジナイズして細胞膜試料とした。この細胞膜試料は液体窒素で凍結後、受容体結合実験に用いるまで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。細胞膜標本の蛋白質濃度はLowry法に従い定量した(Lowry OH *et al.*, 1951)。

受容体結合実験はTME緩衝液[75 mM Tris/HCl (pH7.4), 12.5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA]中で、放射性リガンドとして[¹²⁵I]標識シアノピンドロール([¹²⁵I]cyanopindolol: [¹²⁵I]CYP) (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA)を用いて行った。細胞膜試料、[¹²⁵I]CYP および0.1 mM GTPの存在下、(-)-RO363を加えて37 $^{\circ}$ Cで60分間インキュベートした。氷冷したTM緩衝液[25 mM Tris/HCl (pH7.4), 1 mM MgCl₂]を加えた後、セルハーベスター(Brandel, Gaithersburg, MD, USA)を用いてガラス繊維濾紙(Whatman GF/C filter) (Whatman, Maidstone, UK)上に回収した。2回洗浄して濾紙に残った放射活性を γ カウンターで測定した。

[¹²⁵I]CYPの解離定数(K_d)および最大結合量(B_{max})の値は、結合飽和曲線を描いて算出した。5 μ Mのプロプラノロール[(\pm)-propranolol]存在下で求めた非特異的結合を全結合から引くことにより特異的結合を求めた。[¹²⁵I]CYPの濃度を50 pMに固定して(-)-RO363の結合置換曲線を描き、次項に示すようにIC₅₀値から K_i 値を求めて(-)-RO363の受容体結合親和性の指標とした。

2-2-5 統計解析

結果は全て平均値 \pm 標準誤差で示した。結合置換実験の結果についてはGraphPad PRISM (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)を用いて非線形回帰分析を行ってIC₅₀値を求め、阻害定数(K_i)を求めた(Cheng Y and Prusoff WH, 1973)。

これらの結果について一元配置分散分析(1-way ANOVA)を実施した後に、

Dunnett テストによる検定を行った。 $P < 0.05$ の場合に統計学的有意差があると判定した。本解析は JMP software (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行った。

2-2-6 分子モデリング

SYBYL software (Tripos, St. Louis, MO, USA) の Biopolymer モジュールを用いてロドプシンで報告されている構造 (Baldwin JM *et al.*, 1997) を鋳型として $\beta 1AR$ の α 炭素の構造モデルを構築した。(-)-RO363 と $\beta 1AR$ の結合モデルは、以下の仮定の下に、文献に示された方法 (Tanimura R *et al.*, 1994) に倣い、SYBYL software におけるエネルギー最小化プログラム MAXIMIN2 を用いてエネルギー的に最適なモデルを計算の上、構築した。

- (1) Asp138 ($\beta 2AR$ における Asp113 に相当) がプロトン化されたアミンと相互作用する。
- (2) Ser229 および Ser232 (それぞれ、 $\beta 2AR$ における Ser204 および Ser207 に相当) がカテコール核の水酸基と相互作用する。
- (3) Phe341 ($\beta 2AR$ における Phe290 に相当) がカテコール核の芳香環と相互作用する。

2-3 結果

2-3-1 $\beta 1/\beta 2$ キメラ受容体を用いた(-)-RO363 の相互作用部位の解析

$\beta 1AR$ と $\beta 2AR$ の TMD1、2、7 を互いに置換したキメラ受容体 (図 2-5) を作製し、(-)-RO363 の親和性を解析した。 $\beta 1AR$ の TMD2 または TMD7、さらにその両方を $\beta 2AR$ のものと置き換えることにより(-)-RO363 の受容体への親和性は有意に減少した (表 2-1)。一方、 $\beta 2AR$ の TMD2、TMD7、およびその両方を $\beta 1AR$ のものと置き換えることにより(-)-RO363 の受容体への親和性は有意に増加した (表 2-1)。

表 2-1 β_1/β_2 キメラ受容体に対する(-)-RO363 の親和性(出典:Sugimoto Y *et al.*, 2002)

	B_{max} (pmol/mg protein)	K_d for [125 I]CYP (pM)	K_i for (-)-RO363 (nM)
WT- β_1 AR	38 ± 5.7	57 ± 13	22 ± 6.2
CH1	2.1 ± 0.26	54 ± 17	1100 ± 150 ^a
CH2	12 ± 1.5	46 ± 6.4	42 ± 5.8 ^c
CH3	28 ± 8.6	80 ± 19 ^b	240 ± 110 ^b
CH4	22 ± 5.7	76 ± 17	15 ± 1.8 ^c
CH5	41 ± 2.3	120 ± 12 ^{a,c}	25 ± 1.9 ^c
CH6	7.2 ± 0.77	72 ± 10	720 ± 190 ^a
CH7	1.3 ± 0.045	130 ± 5.8 ^{a,c}	120 ± 7.8 ^c
CH8	0.27 ± 0.016	67 ± 4.7	1200 ± 200 ^a
WT- β_2 AR	14 ± 7.5	39 ± 7.0	870 ± 100

a は野生型 β_1 AR (WT- β_1 AR)と比較して統計学的に有意であったことを示す($P < 0.01$)。*b* および *c* は野生型 β_2 AR (WT- β_2 AR)と比較して統計学的に有意であったことを示す(それぞれ $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。

2-3-2 β_1 AR のアラニンスキャニングによる(-)-RO363 の親和性の変化

β_1 AR の TMD2 に存在するアミノ酸残基のうち β_2 AR とは異なっている部分に注目し (図 2-6)、これらについてアラニンスキャニングを実施した変異体について結合実験を行った。その結果、TMD2 に存在する Leu110 および Thr117、TMD7 に存在する Phe359 を変異させた場合に(-)-RO363 の受容体への親和性が有意に減少した(表 2-2、表 2-3、図 2-7)。

表 2-2 TMD2 のアミノ酸残基についてアラニンスキャンニングを実施した β 1AR に対する (-)-RO363 の親和性(出典:Sugimoto Y *et al.*, 2002)

	B_{max} (pmol/mg protein)	K_d (pM) for [125 I]CYP	K_i (nM) for (-)-RO363
WT	38 \pm 5.7	57 \pm 13	22 \pm 6.2
M98A	33 \pm 10	78 \pm 25	20 \pm 5.5
S102A	97 \pm 1.3	60 \pm 14	24 \pm 4.0
L110A	17 \pm 4.8	65 \pm 19	140 \pm 24**
T117A	13 \pm 2.0	75 \pm 12	54 \pm 4.9*
I118A	60 \pm 5.9	56 \pm 17	20 \pm 1.1
V119A	24 \pm 5.1	49 \pm 17	20 \pm 4.1
V120A	20 \pm 1.0	79 \pm 4.2	28 \pm 1.3
W121A	35 \pm 5.6	59 \pm 21	20 \pm 2.0

*および**は WT- β 1 と比較して統計学的に有意であったことを示す(それぞれ $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。

表 2-3 TMD7 のアミノ酸残基についてアラニンスキャンニングを実施した β 1AR に対する (-)-RO363 の親和性(出典:Sugimoto Y *et al.*, 2002)

	B_{max} (pmol/mg protein)	K_d (pM) for [125 I]CYP	K_i (nM) for (-)-RO363
WT	38 \pm 5.7	57 \pm 13	22 \pm 6.2
P355A	3.7 \pm 0.30	27 \pm 1.7*	22 \pm 2.8
D356A	4.6 \pm 0.096	47 \pm 1.9	36 \pm 5.0
R357A	25 \pm 4.2	40 \pm 6.6	32 \pm 0.51
L358A	3.7 \pm 0.015	25 \pm 1.9*	25 \pm 5.5
F359A	13 \pm 1.5	50 \pm 8.8	90 \pm 6.0**
V360A	19 \pm 4.0	37 \pm 8.1	40 \pm 0.058
F361A	N.D.	N.D.	N.D.
F362A	2.5 \pm 0.061	27 \pm 0.50*	23 \pm 5.5
L365A	8.6 \pm 1.2	26 \pm 5.8*	22 \pm 3.0
I375A	12 \pm 1.4	31 \pm 6.3	19 \pm 1.9

**は WT- β 1 と比較して統計学的に有意であったことを示す($P < 0.01$)。F361A は受容体の発現が十分でなく評価を行えなかった。(not determined: N.D.)

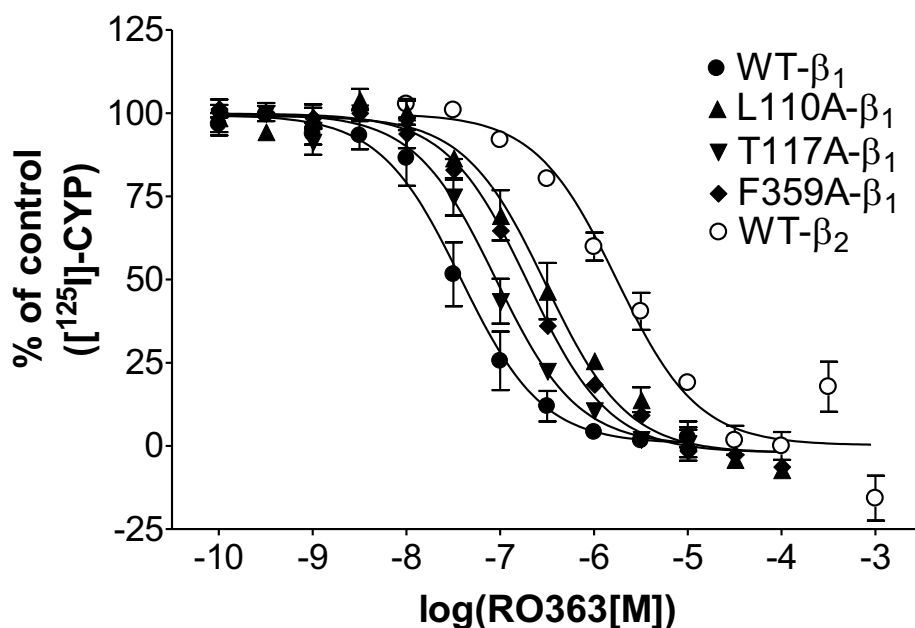


図 2-7 $[^{125}\text{I}]\text{CYP}$ の $\beta_1\text{AR}$ への結合に対する(-)-RO363 の置換曲線の Leu110、Thr117、Phe359 へのアラニンスキャニングによる変化

WT- $\beta_1\text{AR}$ (●)、Leu110- $\beta_1\text{AR}$ (▲)、Thr117- $\beta_1\text{AR}$ (▼)、Phe359- $\beta_1\text{AR}$ (◆)、WT- $\beta_2\text{AR}$ (○) への $[^{125}\text{I}]\text{CYP}$ 結合に対する(-)-RO363 の置換曲線を示した(出典: Sugimoto Y *et al.*, 2002)。

2-3-3 (-)-RO363 の $\beta_1\text{AR}$ への結合における Leu110、Thr117、Phe359 の寄与

Leu110、Thr117、Phe359 の 3 個のアミノ酸残基が(-)-RO363 と $\beta_1\text{AR}$ の結合に関与していることが示唆された。そこでこの 3 個のアミノ酸残基の複数に同時に変異を入れることにより(-)-RO363 の $\beta_1\text{AR}$ への親和性がどのように変化するかを調べる目的で L110A/T117A、L110A/F359A、T117A/F359A、L110A/T117A/F359A の変異 $\beta_1\text{AR}$ を作製し、受容体結合実験を行った。その結果、TMD2 と TMD7 のアミノ酸残基の変異を掛け合わせるにより、(-)-RO363 の $\beta_1\text{AR}$ への親和性は 20 倍以上減少し、 $\beta_2\text{AR}$ に対する K_i 値に近くなった(表 2-4、図 2-8)。

表 2-4 Leu110、Thr117、Phe359 へのアラニンスキャニングを掛け合わせた β_1 AR に対する (-)-RO363 の親和性(出典: Sugimoto Y *et al.*, 2002)

	B_{max} (pmol/mg protein)	K_d for [125 I]CYP (pM)	K_i for (-)-RO363 (nM)
WT- β_1	38 \pm 5.7	57 \pm 13	22 \pm 6.2
L110A/T117A- β_1	4.8 \pm 0.56	35 \pm 1.7	78 \pm 5.8
L110A/F359A- β_1	15 \pm 1.4	77 \pm 12	580 \pm 58**
T117A/F359A- β_1	3.5 \pm 0.61	110 \pm 21	470 \pm 100**
L110A/Thr117A/F359A- β_1	2.8 \pm 0.52	95 \pm 24	560 \pm 95**
WT- β_2	14 \pm 7.5 ^a	39 \pm 7.0 ^a	870 \pm 100 ^a

**は WT- β_1 と比較して統計学的に有意であったことを示す($P < 0.01$)。a はデータの比較のために表 2-1 から引用した値である。

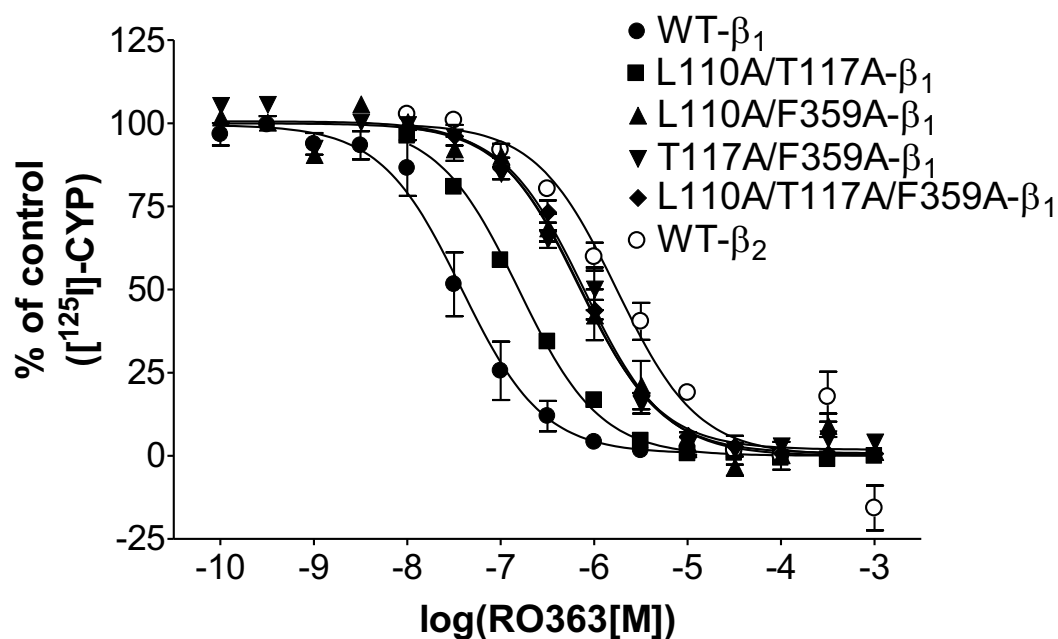


図 2-8 [125 I]CYP の β_1 AR への結合に対する(-)-RO363 の置換曲線の Leu110、Thr117、Phe359 へのアラニンスキャニングの掛け合わせによる変化

WT- β_1 AR (●)、Leu110/Thr117- β_1 AR (■)、Leu110/Phe359- β_1 AR (▲)、Thr117/Phe359- β_1 AR (▼)、Leu110A/Thr117/Phe359- β_1 AR (◆)、WT- β_2 AR (○) への [125 I]CYP 結合に対する(-)-RO363 の置換曲線を示した(出典: Sugimoto Y *et al.*, 2002)。

2-3-4 Leu110、Thr117、Phe359 の受容体活性化状態での役割

GPCR は G 蛋白質にシグナルを伝達しない状態のコンフォメーション(不活性化状態)と、シグナルを伝達する状態のコンフォメーション(活性化状態)との間の平衡状態

にあり、アゴニストは結合によりこの平衡を活性化状態に傾けると考えられている (Lebon G *et al.*, 2012)。Leu110、Thr117、Phe359 のアミノ酸残基が受容体の活性化に対してどのように関わっているかを検討するために、アゴニスト非存在下でも活性化型の状態(構成的活性化:constitutively active)にある β 1AR 変異体(CA- β 1AR) (Lattion A *et al.*, 1999)を用いた。この変異体はアゴニスト非存在下で WT- β 1AR の 3 倍の cAMP 産生を示し(データは示さず)、(-)-RO363 への親和性は 3.5 倍増加した(表 2-5)。これらのことから、この変異 β 1AR は受容体の活性化コンフォメーションを模倣していると考えられる。そこで、CA- β 1AR に Leu110、Thr117、Phe359 のアラニンスキャニングを実施して(-)-RO363 との受容体結合実験を行った。

CA- β 1AR における Leu110、Thr117、Phe359 のアラニンスキャニング(それぞれ CA-L110A、CA-T117A、CA-F359A)によって(-)-RO363 の受容体への親和性はそれぞれ 5 倍、6 倍、13 倍に減少した(表 2-5)。一方、WT- β 1AR にアラニンスキャニングを実施した場合の親和性の減少は、L110A では 7 倍、T117A では 2.5 倍、F359A では 4 倍であった(表 2-2、表 2-3)。両実験の結果を比較すると、L110A および T117A では野生型のコンフォメーションの場合と活性化型コンフォメーションの場合とではそれほど劇的な差はみられなかった一方で、F359A では活性化型コンフォメーションでの変化の方が大きかった(図 2-9)。

表 2-5 構成的活性化型 β 1AR(CA- β 1AR)に Leu110、Thr117、Phe359 のアラニンスキャニングを行ったことによる(-)-RO363 の親和性変化(出典:Sugimoto Y *et al.*, 2002)

	B_{max} (pmol/mg protein)	K_d (pM) for 125 I-cyanopindolol	K_i (nM) for (-)-RO363
WT- β_1	38 \pm 5.7 ^a	57 \pm 13 ^a	22 \pm 6.2 ^a
CA- β_1	1.6 \pm 0.2	86 \pm 20	6.1 \pm 1.1
CA-L110A- β_1	0.64 \pm 0.086	97 \pm 28	29 \pm 7.8
CA-T117A- β_1	0.21 \pm 0.043	39 \pm 6.6	35 \pm 3.9*
CA-F359A- β_1	2.9 \pm 0.26	100 \pm 5.4	77 \pm 5.8**

*および**は CA- β_1 と比較して統計学的に有意であったことを示す(それぞれ $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。a はデータの比較のために表 2-1 から引用した値である。

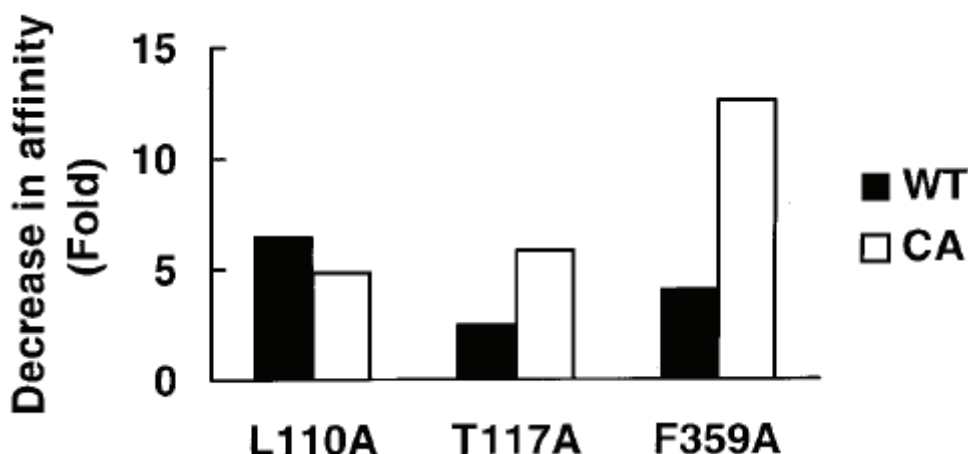


図 2-9 野生型 β 1ARと構成的活性化型 β 1ARに Leu110、Thr117、Phe359 のアラニンスキヤニングを行った場合の(-)-RO363の親和性変化比較

各アミノ酸残基のアラニン置換による(-)-RO363の K_i 値の変化を表 2-2、表 2-3、表 2-5の結果より算出して示した(出典: Sugimoto Y *et al.*, 2002)。

2-3-5 分子モデリング

β 1ARと同じくクラス A ファミリーの GPCR に属し (Audet M and Bouvier M, 2012)、三次元立体構造に関する報告 (Baldwin JM *et al.*, 1997) のあった GPCR であるロドプシンをモデルに、ロドプシンと β 1AR の間のアミノ酸配列の相同性から、(-)-RO363 の β 1AR への結合について分子モデリングを実施した。本モデリングは 2-2-5 に示す仮定の下で実施した。図 2-8 に示すように、本仮定の下では Asn344 (β 2AR の Asn293 に相当) は(-)-RO363 の β 位の水酸基とは近い位置をとらなかった。今回構築したモデルにおいては、Asn344 は(-)-RO363 の β 位の水酸基ではなく、エーテル部分の酸素と相互作用する可能性が考えられた。以前の研究において構築したモデル (Isogaya M *et al.*, 1999) と同様に、TMD2 と TMD7 に存在するアミノ酸残基がポケットを形成し、Leu110 と Phe359 がそれぞれ、ポケットの上部と下部に位置することが示唆された (図 2-10)。Phe359 は(-)-RO363 のアミン置換基の芳香環と疎水性相互作用を介して高親和性結合に関与すると考えられた (図 2-10)。一方、Thr117 は(-)-RO363 のアミン置換基芳香環のメキシ基と近い位置をとり、このメキシ基と水素結合を介して相互作用すると考えられた (図 2-10)。

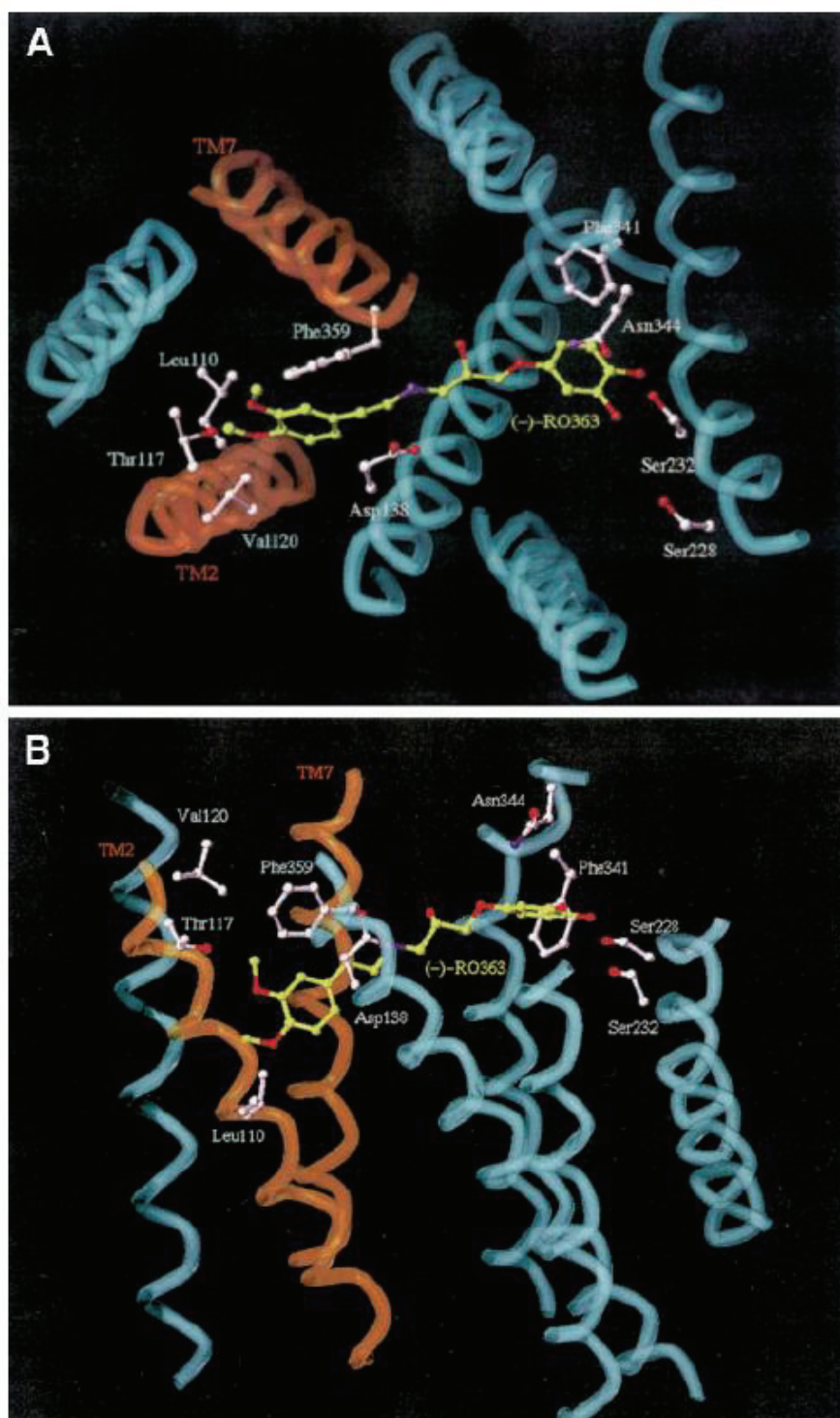


図 2-10 (-)-RO363 の β_1 AR への結合モデル

2-2-6 項に示す方法でモデリングを実施した。細胞外から見た図(A)および細胞膜側から見た図(B)を示した(出典: Sugimoto Y *et al.*, 2002)。

2-4 考察

β 1AR の選択的アゴニストのサブタイプ選択性に関与する受容体部位は、内因性 β 1アゴニストであるノルエピネフリンについて、TMD のレベルでは同定されていたが (Frielle T *et al.*, 1988; Isogaya M *et al.*, 1999)、アミノ酸残基のレベルでの知見は得られていない。その他にはT-0509およびデノパミンについて β 1ARのTMD2のLeu110、Thr117、Val120 がその β 1 選択性に重要な役割を示すことが示唆されている (Isogaya M *et al.*, 1999)のみであり、 K_i 値で10倍以上の選択性をもつ β 1アゴニストのサブタイプ選択性をもたらす部位についてはこれまで報告されていない。

本研究において、T-0509およびデノパミンと全く同じアミン置換基を有し、さらにカテコールアミン類似構造を有しながら(図 2-3)、 β 1AR に高い選択性を示す(-)-RO363 (McPherson GA *et al.*, 1984; Molenaar P *et al.*, 1997)に着目した。 β 1ARと β 2ARのキメラ受容体(図 2-5)を用いた受容体結合実験を行い、 β 1ARのTMD2またはTMD7、さらにその両方を β 2ARのもの置き換えることにより(-)-RO363の受容体への親和性が減少し、逆に β 2ARのTMD2、TMD7、およびその両方を β 1ARのもの置き換えることにより(-)-RO363の受容体への親和性が増加することを見出した(表 2-1)。このことからTMD2およびTMD7が(-)-RO363の β 1選択性にとって重要であることが示唆された。さらに β 1ARのTMD2およびTMD7に存在するアミノ酸残基のうち β 2ARとは異なっている部分(図 2-6)に注目し、これらについてアラニンスキャニングを実施して変異体について結合実験を行い、Leu110、Thr117、Phe359を変異させた場合に(-)-RO363の受容体への親和性が有意に減少することを示した(表 2-2、表 2-3、図 2-7)。Leu110およびThr117は(-)-RO363と非常に似た構造をもつT-0509およびデノパミンの場合にも結合に重要と考えられた部位であった (Isogaya M *et al.*, 1999)。しかしながら、L110A、T117A、F359Aでの K_i 値の減少はこの3個のアミノ酸残基のみで β 1ARと β 2ARの K_i 値の差を説明しようとするには非常に小さかった(表 2-2、表 2-3、図 2-7)。このことから(-)-RO363の β 1選択性は単一のアミノ酸残基で決定されているのではないと考えられた。このことは β 2ARではTMD7に存在するTyr308が複数の β 2選択的アゴニストの β 2選択性を決定するための“key residue”としてはたらくと考えられること (Kikkawa H *et al.*, 1998; Isogaya M *et al.*, 1998; Isogaya M *et al.*, 1999)とは対照的な結果である。

しかし、キメラ受容体での検討(表 2-1)によれば、TMD2 および TMD7 の両方を β 1AR と β 2AR の間で置換することで受容体との親和性がほぼ完全に逆転することから、他の TMD の寄与はないと考えられた。そこで、Leu110、Thr117、Phe359 の 3 残基が協同して結合部位を形成しており、これらのうち一つの残基だけを置換しても、他の 2 残基がその不足を補ってしまうためにアラニン置換体での親和性の減少が大きく出ないのではないかという仮説を立てた。そこで Leu110、Thr117、Phe359 の複数の残基をアラニンに置換した L110A/T117A、L110A/F359A、T117A/F359A、L110A/T117A/F359A の β 1AR 変異体を作製して結合実験を行ったところ、TMD2 と TMD7 に同時に変異を入れることにより(-)-RO363 の親和性はさらに大きく減少し、 β 2AR に対する K_i 値に近くなった(表 2-4、図 2-8)。このことは Leu110、Thr117、Phe359 の 3 残基が協同して結合部位を形成していることを強く示唆している。

以上の結果から、 β 1AR の TMD2 と TMD7 が(-)-RO363 の β 1 選択性にとって重要な結合部位を協同して形成することが示唆された。 β 1AR に限らず、ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)受容体(Zhou WZ *et al.*, 1994; Ballesteros J *et al.*, 1998)、タキキニン NK2 受容体(Donnelly D *et al.*, 1999)、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン(TRH)受容体(Perlman JH *et al.*, 1997)、セロトニン 5-HT_{2A} 受容体(Sealfon SC *et al.*, 1995)など、いくつかの GPCR で TMD2 と TMD7 は三次元的に近い位置をとることが報告されている。GPCR の TMD2 の中央付近にはアスパラギン酸残基が、TMD7 の中央付近にはアスパラギン残基が高い割合で保存されている(Gether U and Kobilka BK, 1998)。この 2 残基の間での水素結合を介した TMD2 と TMD7 の間の相互作用により、TMD2 と TMD7 は空間的に近い位置をとるのだと推測される。さらに、GPCR には TMD1 の中央付近にもアスパラギン残基が、TMD3 の細胞質側にアスパラギン酸残基、アルギニン残基、チロシン残基が保存されている。この TMD3 の 3 組の残基は GPCR 間で高く保存され、GPCR の活性化に重要な役割を果たす DRY モチーフを形成しており(Ballesteros J *et al.*, 1998; Gether U and Kobilka BK, 1998)。G 蛋白質との結合および G 蛋白質 α サブユニットの GTP-GDP 交換反応の触媒作用を司っている(Acharya S and Karnik SS, 1996)。また、TMD7 の中央付近のアスパラギン残基もまた GPCR で高く保存されている NPXXY モチーフを形成しており(Konvincka K *et al.*, 1998;

Abdulaev NG *et al.*, 1998)、受容体の活性化やアゴニストによる受容体の細胞内在化に関与している。これらの残基の間での水素結合を介したネットワークが TMD1、2、3、7 の間でポケットを形成させ、GPCR のアゴニストによる活性化に重要な役割を果たしていると推測される。そして、このネットワークを破壊するような変異を導入することによって受容体がアゴニスト非存在下でも活性化して下流のシグナルを伝達するようになる例が α_{1B} AR (Scheer A *et al.*, 1996; Scheer A *et al.*, 1997) および β 2AR (Rasmussen SG *et al.*, 1999)などで報告されている。また、ロドプシン (Sheikh SP *et al.*, 1996; Farrens DL *et al.*, 1996) や β 2AR (Gether U *et al.*, 1997) では TMD3 および TMD6 が活性化によってダイナミックなコンフォメーション変化を引き起こすことが報告されている。これらの場合の受容体のコンフォメーションはアゴニストによる活性化時のコンフォメーションをある程度反映していると考えられるが、実際に生理的にアゴニストが結合してからどのような機序でコンフォメーション変化が生じるかは明らかではない。

(-)-RO363 は TMD2 と TMD7 で形成されるポケットに結合して β 1 選択性を示すと考えられるが、この結合によって、TMD1、2、3、7 の間の機能ネットワークに変化をきたし、受容体の活性化まで惹起するのであれば、 β 1AR と β 2AR の、アゴニストの結合によるコンフォメーション変化の違いで β 1 選択性が制御されている可能性がある。

そのような可能性を考え、本研究ではアゴニスト非存在下で cAMP を産生すると報告された構成的活性化型変異体 (L323K- β 1AR) (Lattion A *et al.*, 1999) の Leu110、Thr117、Phe359 にアラニンスキヤニングを実施して (それぞれ CA-L110A、CA-T117A、CA-F359A)、結合実験を行った。もしこの部位が活性化状態で大きなコンフォメーション変化を生じるのであれば、これらの残基と(-)-RO363 との距離が変化するため、アラニン置換による親和性の減少の幅に変化が生じると考えられる。しかしながら、CA-L110A、CA-T117A、CA-F359A の全てで親和性は CA- β 1AR に比べて減少したものの、CA-L110A、CA-T117A における親和性減少の程度は野生型の場合と比べ劇的には変化しなかった (表 2-5、図 2-9)。一方、CA-F359A における親和性減少の程度は野生型の場合よりも構成的活性化型でより大きかった (表 2-5、図 2-9)。この結果は Leu110 および Thr117 と(-)-RO363 との距離は活性化時にもそれほど変化しないが、Phe359 と(-)-RO363 との距離は活性化時により近い可能性を示唆している。

本結果は、Phe359が活性化時のコンフォメーションの違いで $\beta 1$ 選択性を制御している可能性があることを示唆している。

本研究で得られた結果は $\beta 1AR$ の構造についての新たな情報を与えるものであり、 $\beta 1AR$ により選択的なアゴニストのデザイン、ひいてはより副作用の低い $\beta 1$ 選択的アゴニスト医薬品のデザインへと繋がっていくものと期待される。

【第三章】 分子の修飾により目的とする薬効を最大化するアプローチ

3-1 序論

前立腺癌は男性が罹患する悪性腫瘍の中で高い割合を占めており、他癌種と比較して罹患率および死亡数が高いことが報告されている (Siegel R *et al.*, 2012)。進行性でなく転移もない低リスクの症例では外科手術あるいは放射線療法が行われる (Kawachi MH *et al.*, 2010、図 3-1)。前立腺癌は男性ホルモンに依存性があることから、局所進行例あるいは転移性の症例では抗アンドロゲン療法に代表されるホルモン療法が行われる (Kawachi MH *et al.*, 2010、図 3-1)。これらの治療には有効性が認められるものの、多くの症例では再発を生じる (Aggarwal R and Ryan CJ, 2011)。前立腺癌において、ホルモン療法抵抗性の獲得は予後不良に繋がる。ドセタキセル (docetaxel) がホルモン療法抵抗性前立腺癌に対して承認を得ている (Tannock IF, 2004; Petrylak DP, 2004)ものの、ホルモン抵抗性症例の多くでは化学療法に抵抗性である (Mathew P and DiPaola R, 2007)。従って、新規の治療法の開発が望まれている (図 3-1)。

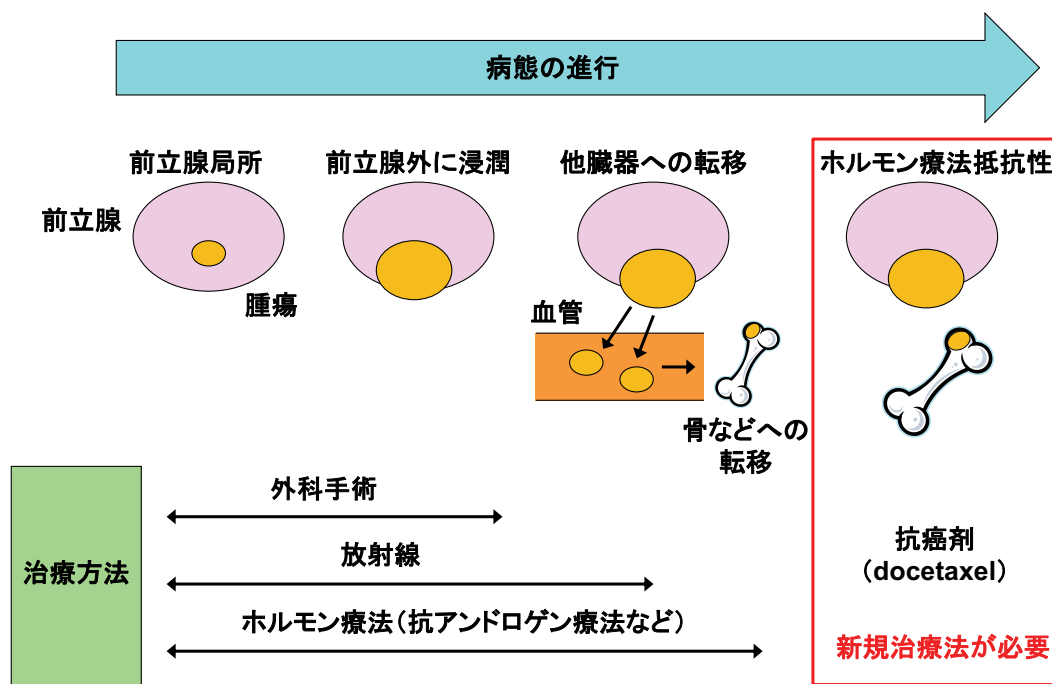


図 3-1 前立腺癌の病態と治療方法

近年、抗体医薬が注目を集めており、様々な疾患で臨床において治療薬として使用されている(Welner LM *et al.*, 2012、表 3-1)。いくつかの抗体医薬は特定の癌において有効であることが示されており(Welner LM *et al.*, 2012、表 3-1)、ホルモン療法抵抗性の前立腺癌においても抗体医薬が有効である可能性が考えられる。前立腺癌において治療標的の一つと考えられている分子が前立腺特異的膜抗原(prostate-specific membrane antigen: PSMA)であり、ほぼ全ての前立腺癌症例で発現が認められるII型膜蛋白質である(Israeli RS, 1994)。PSMAの発現は低分化、転移性、ホルモン療法抵抗性の症例で高いことが知られている(Israeli RS, 1994; Wright GL Jr *et al.*, 1996; Bostwick DG *et al.*, 1998; Sweat SD *et al.*, 1998)。前立腺特異的抗原(prostate-specific antigen: PSA)や前立腺酸性ホスファターゼ(prostate acid phosphatase: PAP)も前立腺癌のマーカーと考えられている分子であるが、これらの分子は分泌蛋白質であり、前立腺癌への機能的な寄与は明らかではない。PSMAは前立腺癌細胞に発現する葉酸加水分解活性とペプチダーゼ活性を有する分子であり、その発現は前立腺癌の進行と相関すると報告されている(Israeli RS, 1994; Wright GL Jr *et al.*, 1996; Bostwick DG *et al.*, 1998; Sweat SD *et al.*, 1998)。構造的な観点では、PSMAは717アミノ酸から成る大きな細胞外領域を有しており(Israeli RS *et al.*, 1994)、PSMA反応性の抗体による前立腺癌細胞へのアクセスが可能と考えられる。このように、PSMAは前立腺癌細胞における抗体治療標的として有望と考えられる。

表 3-1 承認されている抗体医薬品の一覧

2013 年現在、日米欧三極(米国を US、欧州を EU、日本を JP と表記)のいずれかで承認されている抗体医薬品についてまとめた。国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部ウェブサイトにもまとめられている表を一部改変して示した(原出典: <http://www.nihs.go.jp/dccb/TEXT/Mab-T1.pdf>)。構造については mIgG、rIgG はそれぞれ、マウス IgG、ラット IgG であることを示す。単に IgG と記載されている場合はヒト IgG であることを示す。NA は未承認(not approved)であることを、取り消し線は 2013 年時点で承認取り消しとなっていることを示す。標的分子、化学修飾における略語の詳細は冒頭の略語一覧を参照。

	名称	商品名	構造	標的分子	主な適応疾患	承認年		
						US	EU	JP
マウス抗体	muromonab-CD3	Otrhoclone OKT3	IgG2a	CD3	腎移植後の急性拒絶反応	1986	NA	1991
	ibritumomab tiuxetan	Zevalin	IgG1κ (MX-DTPA: ⁹⁰ Y 標識)	CD20	B細胞性非ホジキンリンパ腫 ibritumomab tiuxetanの集積部位の確認	2002	2004	2008
		Zevalin	IgG1κ (MX-DTPA: ¹¹¹ In 標識)					
	iodine 131 tositumomab	Bexxar	IgG2aκ (¹³¹ I 標識)	CD20	非ホジキンリンパ腫	2003	NA	NA
	catumaxomab	Removab	mIgG2aκ (EpCAM), rIgG2bλ (CD3)	EpCAM, CD3	癌性腹水	NA	2009	NA
キメラ抗体	abciximab	ReoPro	IgG1 (Fab)	GPIIb/IIIa	心筋虚血	1994	NA	NA
	rituximab	Rituxan / MabThera	IgG1κ	CD20	B細胞性非ホジキンリンパ腫	1997	1998	2001
	basiliximab	Simulect	IgG1κ	CD25	腎移植後の急性拒絶反応	1998	1998	2002
	infliximab	Remicade	IgG1κ	TNFα	関節リウマチ	1998	1999	2002
	cetuximab	Erbtux	IgG1κ	EGFR	頭頸部癌、結腸・直腸癌	2004	2004	2008
	brentuximab vedotin	Adcetris	IgG1 (MMAE 修飾)	CD30	ホジキンリンパ腫	2011	2012	2013
	daclizumab	Zenapax	IgG1κ	CD25	腎移植後の急性拒絶反応	1997	1999	NA
ヒト化抗体	palivizumab	Synagis	IgG1κ	RSV F protein	RSウイルス感染	1998	1999	2002
	trastuzumab	Herceptin	IgG1κ	HER2	転移性乳癌	1998	2000	2001
	gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	IgG4κ (calicheamicin 修飾)	CD33	急性骨髄性白血病	2000	refused	2005
	alemtuzumab	Campath	IgG1κ	CD52	B細胞性慢性リンパ性白血病	2001	2001	NA
	omalizumab	Xolair	IgG1κ	IgE	喘息	2003	2005	2009
	efalizumab	Raptiva	IgG1κ	CD11	尋常性乾癬	2003	2004	NA
	bevacizumab	Avastin	IgG1κ	VEGF	結腸・直腸癌	2004	2005	2007
	natalizumab	Tysabri	IgG4κ	α4 integrin	多発性硬化症	2004	2006	NA
	tocilizumab	Actemra	IgG1κ	IL-6R	キャッスルマン病、関節リウマチ	2010	2009	2005
	ranibizumab	Lucentis	IgG1κ Fab	VEGF-A	加齢性黄斑変性	2006	2007	2009
	eculizumab	Soliris	IgG2/4κ	C5	発作性夜間血色素尿症	2007	2007	2010
	certolizumab pegol	Cimzia	Fab' (PEG 修飾)	TNFα	関節リウマチ、重症クローン病	2008	2009	2012
	mogamulizumab	Poteligeo	IgG1κ	CCR4	CCR4陽性成人T細胞白血病リンパ腫	NA	NA	2012
	pertuzumab	Perjeta	IgG1κ	HER2	HER2陽性手術不能または再発乳癌	2012	2013	2013
	trastuzumab emtansine	Kadcyla	IgG1κ (maytansine 修飾)	HER2	HER2陽性転移・再発乳癌	2013	NA	2013
	obinituzumab	Gazyva	IgG1	CD20	慢性リンパ性白血病	2013	NA	NA
	ヒト抗体	adalimumab	Humira	IgG1κ	TNFα	関節リウマチ	2002	2003
panitumumab		Vectivix	IgG2κ	EGFR	結腸・直腸癌	2006	2007	2010
golimumab		Simponi	IgG1κ	TNFα	関節リウマチ	2009	2009	2011
ustekinumab		Stelara	IgG1κ	IL-12/23-p40	乾癬	2009	2009	2011
canakinumab		Ilaris	IgG1κ	IL-1β	クリオピリン関連周期性症候群	2009	2009	2011
ofatumumab		Arzerra	IgG1κ	CD20	慢性リンパ性白血病	2009	2010	2013
denosumab		Prolia / Xgeva / Ranmark	IgG2	RANKL	骨病変、骨粗鬆症	2010	2010	2012
ipilimumab		Yervoy	IgG1κ	CTLA4	黒色腫	2011	2011	NA
belimumab		Benlysta	IgG1λ	BlyS	全身性エリテマトーデス	2011	2011	NA
raxibacumab		Raxibacumab	IgG1λ	<i>B. anthracis</i> toxin	吸入炭疽、肺炎	2012	NA	NA

以前の研究において、前立腺癌細胞株 LNCaP 細胞を免疫したマウスより 2C9 というモノクローナル抗体が得られており、本抗体の認識抗原は PSMA であると同定されている (Kato K *et al.*, 2003)。2C9 は PSA や PAP に対する抗体が反応しない低分化の前立腺癌患者検体に対して染色性を有する (Kato K *et al.*, 2003)。2C9 による染色パターンは他の PSMA 抗体と類似しており、PSA 抗体や PAP 抗体による染色パターンとは異なっている (Kato K *et al.*, 2003)。さらに、2C9 は PSMA の細胞外領域を認識する (Kato K *et al.*, 2003)。従って、2C9 は低分化およびホルモン治療抵抗性の前立腺癌の治療や診断に有効である可能性がある。

本研究では、2C9 のヒト IgG1 (hIgG1) 型キメラ抗体を作製し、本抗体の抗体依存性細胞傷害 (antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC) 活性などの生物学的活性について検討した。ADCC 活性は抗体医薬の作用メカニズムの一つと考えられている (Welner LM *et al.*, 2012、図 3-2)。さらに、サイトカイン融合抗体も有効なアプローチと考えられており (Ortiz-Sánchez E *et al.*, 2008; Kendra *et al.*, 1999; Becker *et al.*, 1996a, 1996b, 1996c; Lode HN *et al.*, 1998; Xiang R *et al.*, 1999; Imboden M *et al.*, 2001)、いくつかのサイトカイン融合抗体が治療可能性について臨床試験で検討されている (Ortiz-Sánchez E *et al.*, 2008; Holden SA *et al.*, 2001; Neal ZC *et al.*, 2004; Osenga KL *et al.*, 2006; King DM *et al.*, 2004; Ko YJ *et al.*, 2004; Connor JP *et al.*, 2004)。2C9 の生物活性について検討した結果、hIgG1 型キメラ抗体に ADCC 活性が見出されたため、NK 細胞あるいは他の免疫細胞を活性化することにより 2C9 による前立腺癌細胞傷害活性を増強できないか検討する目的で IL-2 融合抗体について検討を行った。

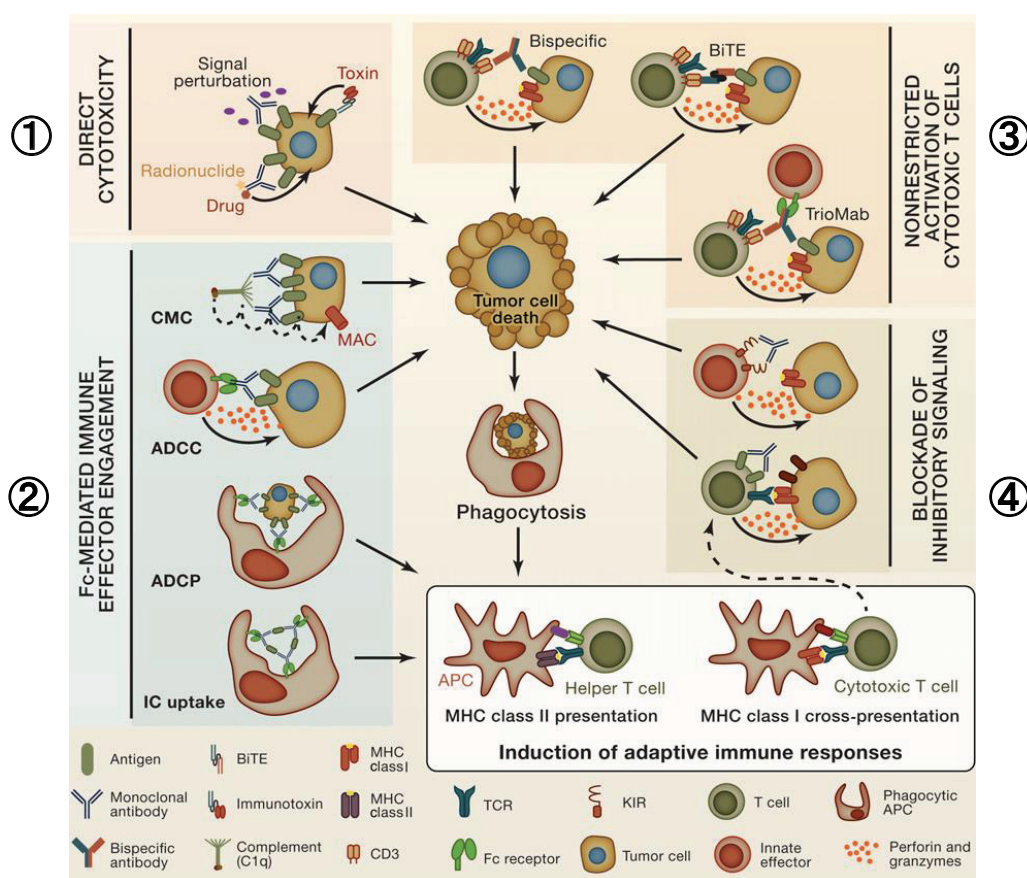


図 3-2 抗体医薬の作用

抗体医薬の作用の種類を以下のように分類して示した。文献に示されていた図(原出典: Welner LM et al., 2012)を引用し、記載を加えて示した。①細胞に直接傷害活性を示すもの、②抗体の定常領域を介した免疫反応により傷害活性を示すもの、③T 細胞受容体非依存的に細胞傷害性T細胞を活性化するもの、④免疫細胞の抑制性シグナルを阻害するものに分類される。抗体依存的細胞傷害(ADCC)活性は NK 細胞を介した傷害活性であり、②に属する。略語の詳細については冒頭の略語一覧を参照。

3-2 材料および方法

3-2-1 実験の概略

以下、図 3-3 に本章における実験の概略を示す。

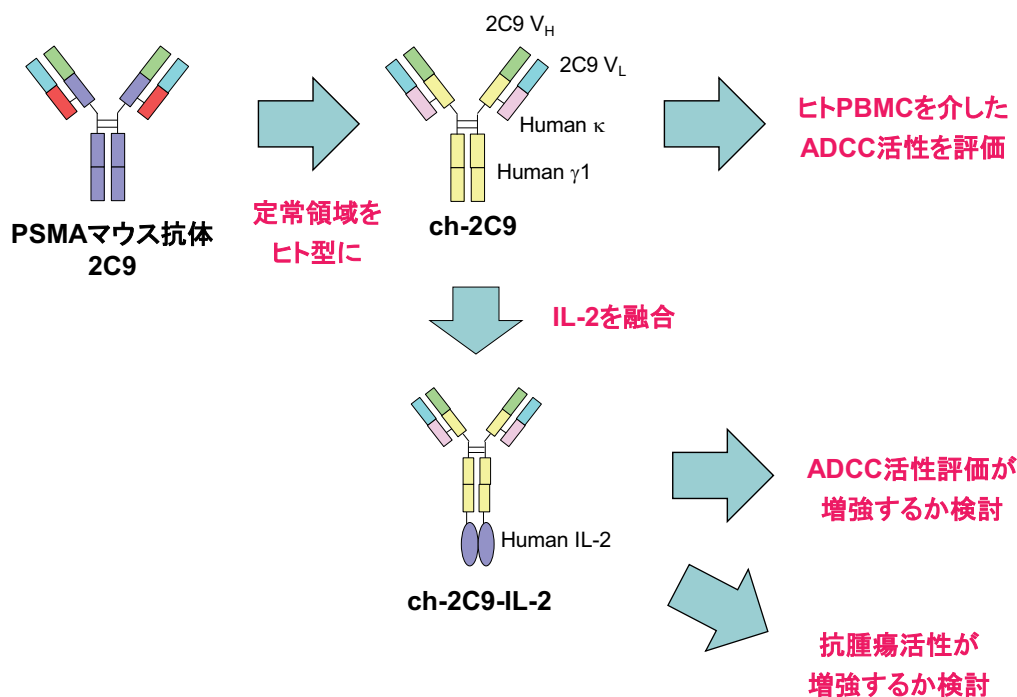


図 3-3 実験の概略図

3-2-2 動物

日本クレア (Tokyo, Japan) より購入した、雄性 SCID マウス (Fox CHASE C.B-17/Icr-scid Jcl) を用いた。

3-2-3 細胞

マウスハイブリドーマ 2C9 は愛知医科大学で樹立されたものを用いた (Kato K *et al.*, 2003)。YB2/0 細胞、LNCaP 細胞、CTLL-2 細胞は ATCC (Manassas, VA, USA) より購入した。PC-3 細胞は DS Pharma Biomedical (Osaka, Japan) より購入した。HEK-293F 細胞は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) より購入した。

3-2-4 PSMA 発現 PC-3 細胞株の作製

PSMA をコードする cDNA を pKANTEX93 (Nakamura K *et al.*, 2000) にサブクローニングし、pKANTEXPSMA12 とした。pKANTEXPSMA12 を Aat II により消化して線

状化し、PC-3 にエレクトロポレーション法により導入した。遺伝子導入細胞を 0.2 mg/mL G418 存在下で培養し、PSMA 発現を指標にスクリーニングした。PSMA 高発現 G418 耐性株を限界希釈法にてクローン化し、得られた PSMA 高発現株を PSMA/PC-3 と名付け、実験に使用した。

3-2-5 2C9 キメラ抗体 ch-2C9 の作製

ハイブリドーマ 2C9 より mRNA を Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen) を用いて単離し、両端に *Eco* RI-*Not* I アダプター配列をもつ cDNA を TimeSaver cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, USA) を用いて合成した。重鎖および軽鎖 cDNA をアガロースゲル電気泳動により単離し、*Eco* RI で消化した後に λ ZAPII ベクターと連結し、Gigapack III Gold Packaging Extracts (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて λ ファージにパッケージングした。2C9 の重鎖および軽鎖 cDNA を単離し、HybondN+フィルター上に固定した。フィルター上の定常領域配列を ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems (GE Healthcare Biosciences) を用いて検出した。得られたファージクローンを *in vivo* excision 法にて プラスミドに変換した。重鎖および軽鎖 cDNA を pKANTEX93 にサブクローニングして pKANTEX2C9 とし、定常領域が hIgG1 であるキメラ抗体の発現ベクターとして用いた。

pKANTEX2C9 を *Aat* II より消化して線状化し、YB2/0 細胞にエレクトロポレーション法にてトランスフェクションした。遺伝子導入細胞を 1.0 mg/mL G418 存在下で培養し、抗体産生量を指標にスクリーニングした。抗体高産生 G418 耐性株に対してメトトレキサート (methotrexate: MTX) によりジヒドロ葉酸レダクターゼ (dehydrofolatereductase: dhfr) 系を利用して遺伝子増幅を行い、抗体の高発現クローンを得た。

ch-2C9 産生株を、5% Daigo's GF21 (Nippon Pharmaceutical, Tokyo, Japan) を含む培地 [Hybridoma SFM (Invitrogen)] [H-SFM(GF5)] 中に $1 - 2 \times 10^5$ 細胞/mL の密度で播種し、5 - 7 日間培養した。培養上清よりキメラ抗体 ch-2C9 を Prosep-A (Millipore, Billerica, MA, USA) を用いて精製した。

3-2-6 IL-2 融合抗体 ch-2C9-IL-2 の作製

pKANTEX2C9 中のヒト C γ 1 (hC γ 1) 遺伝子配列を hC γ 1 の C 末端にヒト IL-2 (hIL-2)

配列を連結した遺伝子配列に置換した。この hIL-2 融合 ch-2C9 抗体 (ch-2C9-IL-2) 発現ベクターを pKANTEX2C9-hIL-2 とした。pKANTEX2C9-hIL-2 を *Aat* II により消化して線状化し、YB2/0 細胞にエレクトロポレーション法によりトランスフェクションした。遺伝子導入細胞を 1.0 mg/mL G418 存在下で培養し、抗体産生量を指標にスクリーニングした。抗体高産生 G418 耐性株に対して MTX により *dhfr* 系を利用して遺伝子増幅を行い、IL-2 融合抗体の高発現クローンを得た。

ch-2C9-IL-2 産生株を H-SFM(GF5) 培地中に $1 - 2 \times 10^5$ 細胞/mL の密度で播種し、6 日間培養した。培養上清よりキメラ抗体 ch-2C9-IL-2 を Prosep-A を用いて精製した。

3-2-7 抗体のビオチン化

抗体 を 1 mg/mL の PBS 溶液とし、1/4 体積の炭酸ナトリウム緩衝液 (pH9.2) および 1/4 体積の NHS-LC-biotin (Thermo Scientific, Rockford, IL USA) 溶液 (*N,N*-dimethylformamide にて 1 mg/mL の濃度に溶解) を添加して室温で 3 時間、ビオチン化反応を行った。反応後、150 mM の NaCl を含む 10 mM クエン酸緩衝液 (pH6.0) にて透析した。

3-2-8 フローサイトメトリー

細胞を 1% のウシ血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA) を含む PBS (BSA-PBS) により 10 μ g/mL に希釈した一次抗体溶液中に懸濁し、4°C で 30 分間インキュベートした。細胞を PBS により 3 回洗浄した後、BSA-PBS により希釈した FITC 標識二次抗体もしくは FITC 標識ストレプトアビジン (一次抗体がビオチン化抗体の場合) を加えて 4°C で 30 分間インキュベートした。細胞を PBS で 3 回洗浄した後、細胞を PBS に懸濁し、フローサイトメーター EPICS Elite (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を用いて解析した。

3-2-9 抗体の PSMA 蛋白質との結合活性評価

PSMA の細胞外ドメインに N 末端に FLAG タグを付加した蛋白質 (FLAG-PSMA) を HEK-293F 細胞に一過性に発現し、FLAG アフィニティーゲル (Sigma, St. Louis, MO, USA) を用いて精製した。FLAG-PSMA 蛋白質に対する抗体の結合のカイネティクス を Biacore T100 (GE Healthcare Biosciences) により解析した。PSMA 抗体を

Series S CM5 センサーチップ (GE Healthcare Biosciences) 上にアミンカップリング法により固定化し、ランニング緩衝液 (HBS-EP buffer: 0.01 M HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% surfactant P20) (GE Healthcare Biosciences) に希釈した FLAG-PSMA をセンサーチップ上に 3 分間流し、相互作用を解析した。その後、ランニング緩衝液を 30 分間流して抗体の解離について解析した後、3 mM MgCl₂ によりガンドを再生した。結合速度定数 (k_a)、解離速度定数 (k_d)、解離定数 (K_D) を Biacore T100 evaluation software (GE Healthcare Biosciences) により求めた。結合モデルとして 1:1 Binding Model を用いた。

3-2-10 ADCC 活性評価

健常人末梢血より Lymphoprep (Axis-Shield, Oslo, Norway) を用いて末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells: PBMCs) を調製し、エフェクター細胞として用いた。ヒト前立腺癌細胞株 PC-3、PSMA/PC-3、LNCaP をそれぞれ (1×10^6 細胞)、Na₂⁵¹CrO₄ (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) により 37°C で 1 時間標識した。細胞を 3 回洗浄した後、⁵¹Cr 標識された細胞を標的細胞として用いた。96 ウェルマイクロプレートで標的細胞 (1×10^4 細胞/ウェル) とエフェクター細胞 (2×10^5 細胞/ウェル) を混合し、ch-2C9 を加えて 37°C で 4 時間インキュベートした。プレートを遠心し、γカウンターにより上清中の ⁵¹Cr 放射活性を定量した。以下の式を用いて細胞傷害活性を算出した。

$$\% \text{ cytotoxicity} = 100 \times (E-S) / (M-S)$$

E は各ウェルにおける放射活性、S は標的細胞のみのウェルにおける放射活性、M は標的細胞を 1 M の HCl により溶解したウェルにおける放射活性を示す。

3-2-11 CTLL-2 細胞増殖活性評価

CTLL-2 細胞 (5×10^4 細胞/ウェル) を 96 ウェルマイクロプレートに分注し、ch-2C9-IL-2 もしくは hIL-2 (Pepro Tech, Rocky Hill, NJ, USA) 存在下で 72 時間培養した。その後、WST-1 をウェルに加えて 3 時間インキュベートした。各ウェルの OD₄₅₀ を測定し、細胞数の指標として用いた。

3-2-12 IL-2 融合抗体のエフェクター細胞による細胞傷害活性評価

3-2-10 項と同様の方法で調製したエフェクター細胞 (5×10^4 細胞/ウェル) を 96

ウェルマイクロプレートに分注し、Flt1 抗体、ch-2C9、ch-2C9-IL-2 の各抗体を加えて 37°C で 72 時間培養した。その後、3-2-8 項と同様の方法で ^{51}Cr 標識した標的細胞 (1×10^4 細胞/ウェル)を加え、37°C で 4 時間、各抗体の存在下でインキュベートした。プレートを遠心し、 γ カウンターにより上清中の ^{51}Cr 放射活性を定量した。3-2-10 項と同様の方法で各ウェルの細胞傷害活性を算出した。

3-2-13 抗腫瘍活性評価

NK 細胞を一過性に減少させることで腫瘍の生着率を向上させる目的で、5 週齢の雄性 SCID マウスに asialo-GM1 抗体 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を腹腔内投与した。asialo-GM1 抗体を投与した 2 日後に、Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) に懸濁した LNCaP 細胞 (1×10^7 細胞) を皮下移植した。移植の 19 日後に腫瘍体積を指標に動物を群分けした (平均 177- 178 mm^3)。腫瘍体積は以下の式を用いて算出した。

$$\text{Tumor volume (mm}^3\text{)} = 0.5 \times (\text{major diameter}) \times (\text{minor diameter})^2$$

ch-2C9 (70 μg : 467 nmol)、ch-2C9-IL-2 (84 μg : 467 nmol) もしくは生理食塩水を群分けの翌日から 1 日 1 回、5 日間静脈内投与した。細胞移植の 56 日後における、腫瘍が完全に退縮したマウスの割合を抗体の抗腫瘍活性の指標として用いた。

3-3 結果

3-3-1 キメラ抗体 ch-2C9 の前立腺癌細胞への結合反応性

抗 PSMA マウス抗体 2C9 の定常領域を hIgG1 と置き換えたキメラ抗体の前立腺癌細胞株に対する反応性をフローサイトメトリーにより評価した。本キメラ抗体 ch-2C9 は PC-3 細胞には反応しない一方で、PC-3 細胞に PSMA をトランスフェクションした細胞株 PSMA/PC-3 細胞には反応性を示した (図 3-4A、B)。また、ch-2C9 は PSMA を内在性に発現する LNCaP 細胞にも反応性を示した (図 3-4C)。

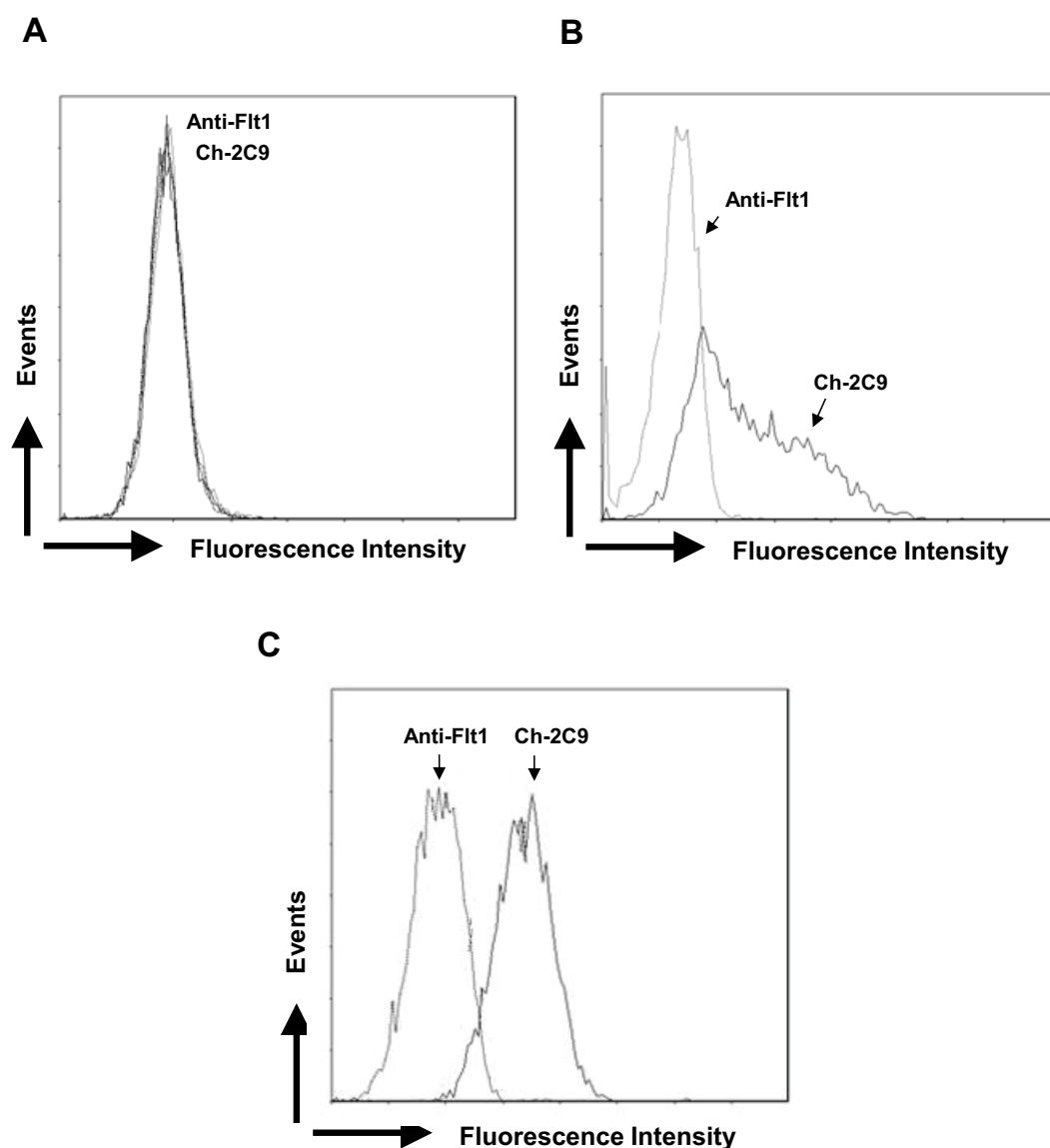


図 3-4 PSMA 抗体の前立腺癌細胞反応性

PC-3 細胞 (A)、PC-3/PSMA 細胞 (B)、LNCaP 細胞 (C) に対する PSMA 抗体 ch-2C9 の反応性をフローサイトメトリーにより評価した。抗体は 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で用いた。陰性対照として Flt1 抗体を用いた (出典: Sugimoto Y *et al.*, 2014)。

3-3-2 ch-2C9 の ADCC 活性

ADCC 活性は抗体医薬の薬効の一端を担うと考えられることから、ch-2C9 のヒト前立腺癌細胞株に対する ADCC 活性を、ヒト末梢血単核球 (PBMC) を用いて評価した。その結果、ch-2C9 は PC-3 細胞に対して ADCC 活性を示さない一方で、PSMA/PC-3 細胞には ADCC 活性を示した (図 3-5A、B)。フローサイトメトリーでの結果と同様に、

ch-2C9 は PSMA を内在性に発現する LNCaP 細胞にも ADCC 活性を示した(図 3-5C)。

一方、ch-2C9 は PBMC の非存在下では LNCaP 細胞の生存に影響を与えなかった(データは示さず)。

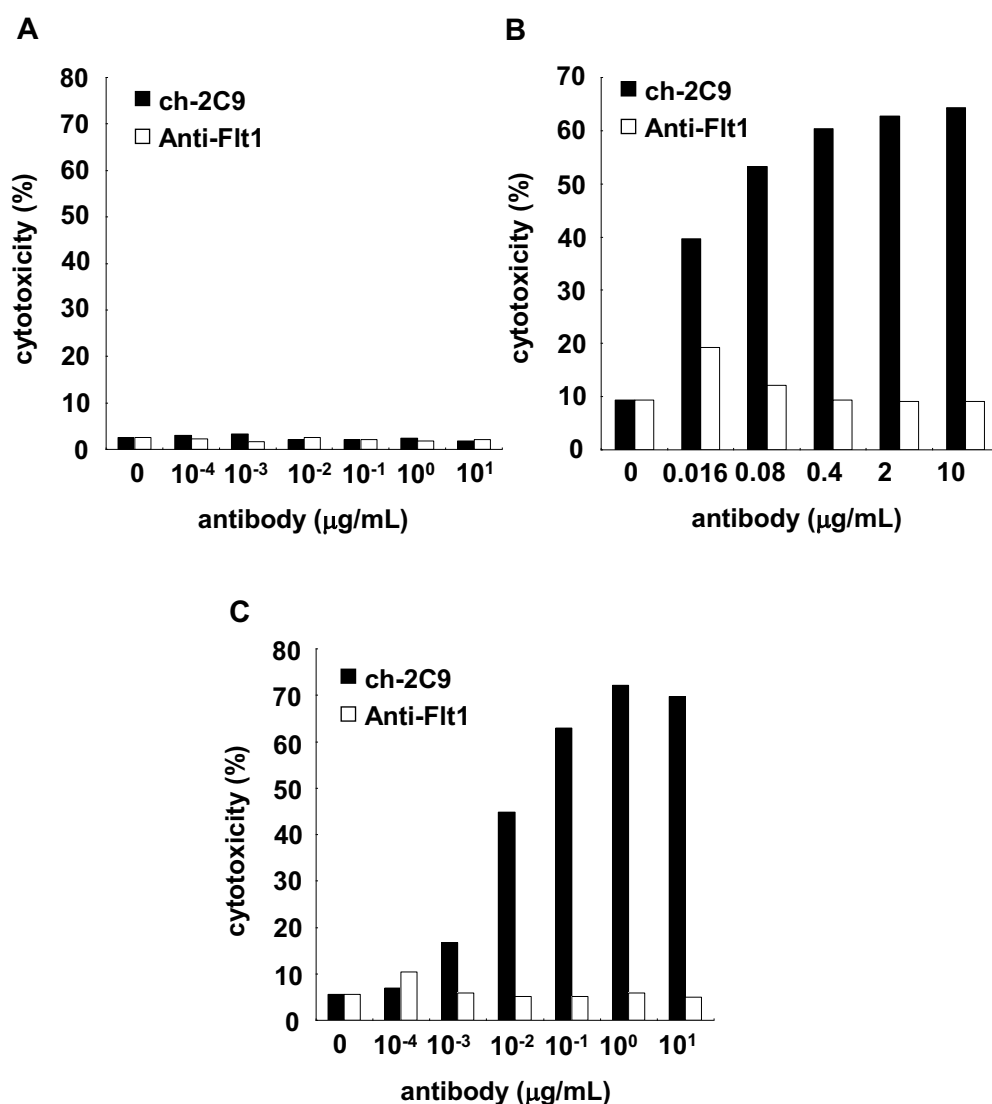


図 3-5 PSMA 抗体の前立腺癌細胞に対する ADCC 活性

⁵¹Cr 標識した PC-3 細胞(A)、PC-3/PSMA 細胞(B)、LNCaP 細胞(C)を用いて各細胞に対する PSMA 抗体 ch-2C9 の ADCC 活性を培養上清中の ⁵¹Cr 放射活性を定量することにより評価した。陰性対照として、Flt1 抗体を用いた(出典:Sugimoto Y *et al.*, 2014)。

3-3-3 IL-2 融合抗体 ch-2C9-IL-2 のヒト前立腺癌細胞株反応性

ch-2C9 の抗腫瘍活性を増強する目的で、hIL-2 配列を ch-2C9 重鎖の C 末端に付加した融合抗体 ch-2C9-IL-2 を作製した。本融合抗体の可変領域配列の結合特性を評価する目的で、ヒト前立腺癌細胞株を用いたフローサイトメトリーを実施した。その結果、ch-2C9-IL-2 は PC-3 細胞には反応性を示さなかった一方で、LNCaP 細胞には ch-2C9 と同程度に反応性を示した(図 3-6)。

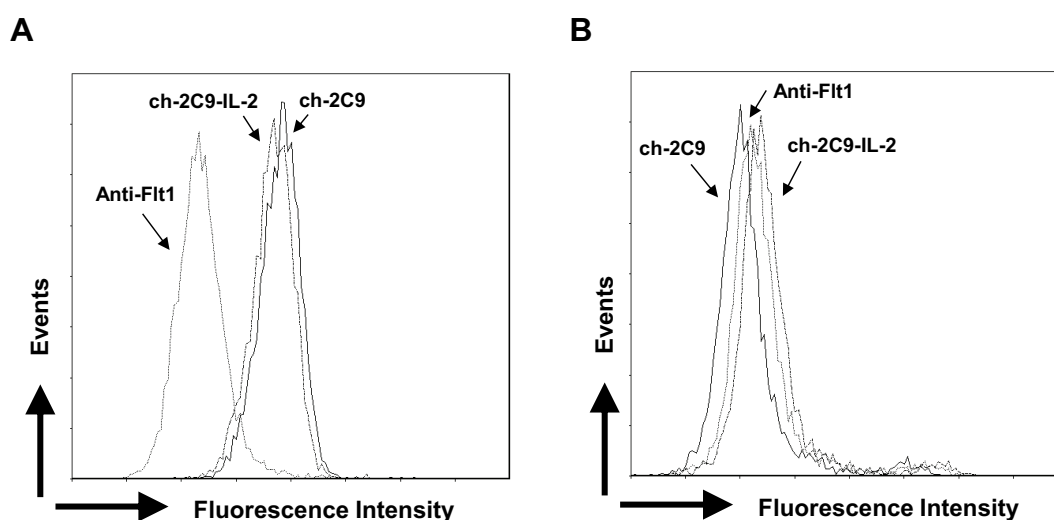


図 3-6 IL-2 融合 PSMA 抗体 ch-2C9-IL-2 の前立腺癌細胞反応性

LNCaP 細胞(A)、PC-3 細胞(B)に対する PSMA 抗体 ch-2C9 およびその IL-2 融合抗体 ch-2C9-IL-2 の反応性をフローサイトメトリーにより評価した。抗体は 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で用いた。陰性対照として、Flt1 抗体を用いた(出典:Sugimoto Y *et al.*, 2014)。

3-3-4 2C9 由来 PSMA 抗体の PSMA 蛋白質に対する結合活性

PSMA 抗体の PSMA 蛋白質に対する結合活性を Biacore により評価した。ch-2C9 および ch-2C9-IL-2 はセンサーチップ上に固定化された PSMA 蛋白質に結合し、その解離は非常に遅かった(図 3-7A)。カインेटクス解析の結果、ch-2C9 のヒト PSMA 蛋白質への結合における K_D は 11.2 nM、解離速度定数(k_d)は 5.93×10^{-5} (1/s)と算出された(表 3-2)。また、ch-2C9-IL-2 もヒト PSMA 蛋白質に結合し、その解離は遅く(図 3-7B)、本結合における K_D 値、 k_d 値はそれぞれ、9.39 nM、 5.17×10^{-5} (1/s)となった(表 3-2)。

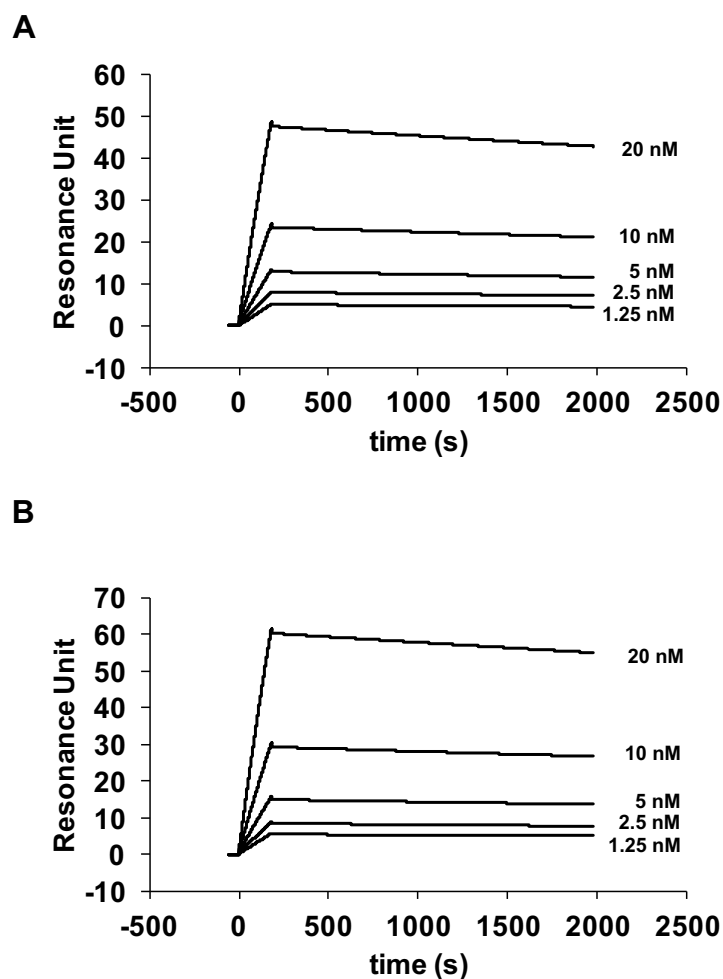


図 3-7 PSMA 抗体の PSMA 蛋白質への結合活性

ch-2C9(A)あるいは ch-2C9-IL-2(B)を CM5 センサーチップ上に固定化した anti-human IgG にキャプチャーした。ヒト PSMA 蛋白質 (FLAG-PSMA) に対する ch-2C9 あるいは ch-2C9-IL-2 の結合におけるカイネティクスを Biacore により解析した (出典: Sugimoto Y *et al.*, 2014)。

表 3-2 PSMA 抗体の PSMA 蛋白質への結合活性

図 3-4 に示した実験におけるカイネティクス解析により算出されたパラメーターを示した (出典: Sugimoto Y *et al.*, 2014)。

	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)
ch-2C9	5.29×10^3	5.93×10^{-5}	11.2
ch-2C9-IL-2	5.51×10^3	5.17×10^{-5}	9.39

3-3-5 ch-2C9-IL-2 の生物活性

IL-2 融合抗体 ch-2C9-IL-2 の hIL-2 部分を介した生物活性の評価として、増殖に IL-2 依存性を持つ T 細胞株 CTLL-2 細胞を ch-2C9-IL-2 もしくは hIL-2 の存在下で培養し、細胞増殖活性を評価した。その結果、ch-2C9-IL-2 は CTLL-2 細胞に対して hIL-2 と同程度の増殖活性を示した(図 3-8A)。

次に、エフェクター細胞を介した活性を評価した。まず 3-3-3 項に示した ADCC 活性評価条件において ch-2C9-IL-2 の ADCC 活性を評価したところ、ch-2C9-IL-2 は ch-2C9 と同程度の ADCC 活性を示した(データは示さず)。次に、ヒト PBMC と ch-2C9 もしくは ch-2C9-IL-2 とをプレインキュベーションした後に、標的細胞である LNCaP 細胞と PBMC、抗体を共存させ細胞傷害活性を評価した。本条件では、ch-2C9-IL-2 は LNCaP 細胞に対して ch-2C9 よりも高い傷害活性を示した(図 3-8B)。

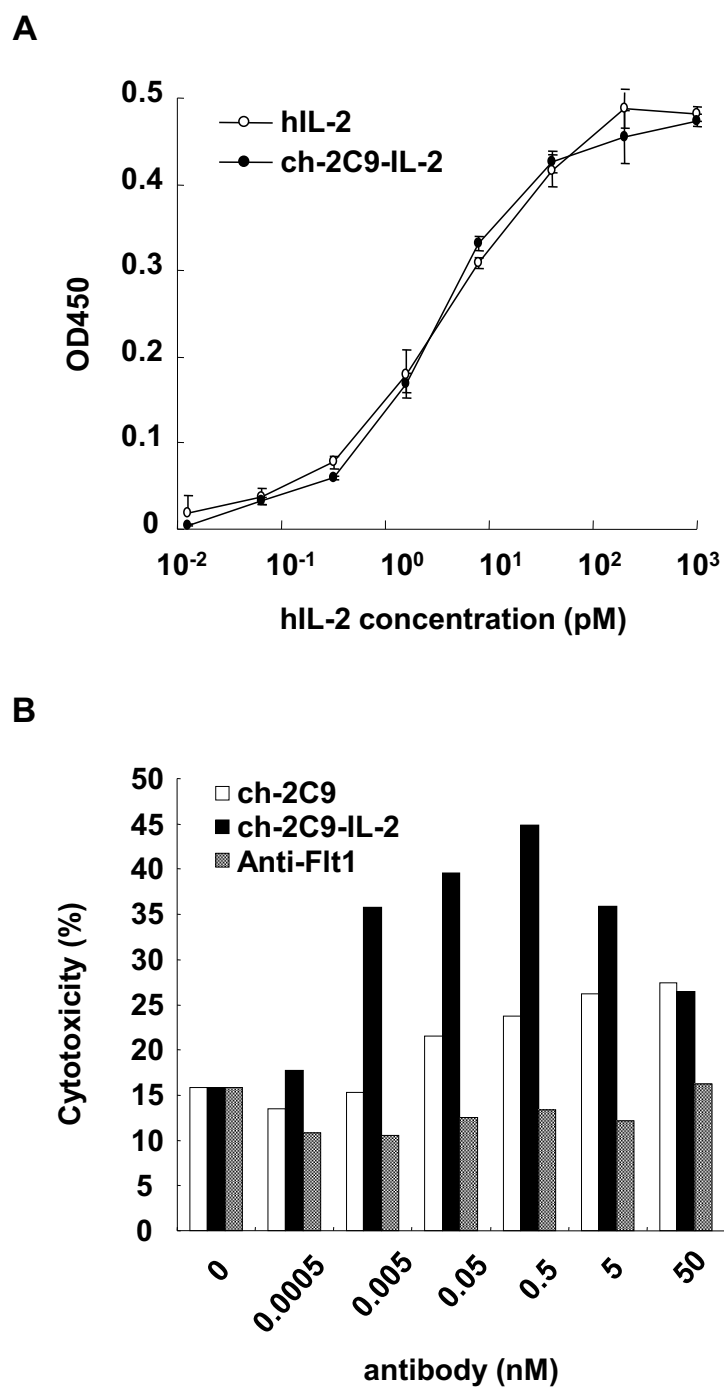


図 3-8 ch-2C9-IL-2 の生物活性

(A) hIL-2 もしくは ch-2C9-IL-2 の存在下で CTLL-2 細胞を 72 時間培養し、細胞の生存率を WST-1 により定量した。(B) ヒト PBMC を ch-2C9 あるいは ch-2C9-IL-2 存在下で 72 時間培養した後、⁵¹Cr 標識した LNCaP 細胞を添加して 4 時間インキュベートし、LNCaP 細胞に対する傷害活性を評価した(出典: Sugimoto Y *et al.*, 2014)。

3-3-6 PSMA 抗体の *in vivo* 抗腫瘍活性

ヒト前立腺癌細胞担癌モデルを用いて ch-2C9 および ch-2C9-IL-2 の抗腫瘍活性を評価した。LNCaP 細胞を皮下移植した SCID マウスにおいて ch-2C9 および ch-2C9-IL-2 を静脈内投与したところ、ch-2C9-IL-2 投与群では生理食塩水 (saline) 投与群に比べて腫瘍の成長が抑制される傾向が認められた。この傾向は同じ分子数 (467 nmol) の ch-2C9 を投与した群では顕著ではなかった。細胞移植の 56 日後に腫瘍の消失した個体数の割合を生理食塩水、ch-2C9、ch-2C9-IL-2 投与群で比較するとそれぞれ、0%、20%、60%であった(表 3-3)。

表 3-3 LNCaP 細胞マウス担癌モデルでの抗体の抗腫瘍活性

SCID マウスに LNCaP 細胞を皮下移植し、腫瘍が生着した後に ch-2C9 あるいは ch-2C9-IL-2 を 1 日 1 回、5 日間静脈投与した。細胞移植後 56 日時点において腫瘍が完全退縮した個体の割合を示した(出典: Sugimoto Y *et al.*, 2014)。

Saline	ch-2C9	ch-2C9-IL-2
0% (0/5)	20% (1/5)	60% (3/5)

3-4 考察

2C9 はヒト前立腺癌細胞株 LNCaP を免疫して得られた新規 PSMA 抗体である (Kato K *et al.*, 2003)。2C9 は PSMA 発現細胞の細胞表面に反応する (Kato K *et al.*, 2003) ことから、2C9 は癌治療抗体としての応用可能性が考えられた。今回、本 2C9 の生物学的性質について検討するとともに、抗腫瘍活性の最適化について検討した。2C9 の定常領域を hIgG1 型に変換したキメラ抗体 ch-2C9 を作製した。ch-2C9 は PSMA 遺伝子導入細胞 (PSMA/PC-3) および、PSMA を内在性に発現する LNCaP 細胞に反応性を示し (図 3-4)、2C9 と同様に PSMA を発現する細胞の表面に結合することが示された。ch-2C9 の生物活性の検討として、ヒト PBMC を介した ADCC 活性を検出した (図 3-5)。加えて、ch-2C9 は PSMA 蛋白質に遅い解離速度定数で結合することが示された (図 3-7、表 3-2)。解離の遅い抗体の薬効を解析した例として、rituximab を改変して作製された CD20 抗体 veltuzumab が報告されている (Goldenberg DM *et al.*,

2009)。Veltuzumab は担癌マウスモデルで rituximab と比較して高い抗腫瘍活性を示すことが報告されている (Goldenberg DM *et al.*, 2009)。Veltuzumab に高い *in vivo* 抗腫瘍活性が認められている Raji 細胞において、ADCC 活性および補体介在性細胞傷害活性に rituximab と明確な差が認められないため (Goldenberg DM *et al.*, 2009)、少なくとも本モデルにおいては解離速度の遅さが抗腫瘍活性の高さに寄与している可能性が考えられる。抗腫瘍活性が高い理由は明確ではないが、このような性質は抗体が腫瘍組織に集積した後に解離しにくいことを示唆しており、腫瘍組織での抗体の滞留性が高い可能性がある。この抗体の滞留性が薬効の持続に寄与する可能性がある (橋本せつ子, 森本香織編, 2009)。従って、ch-2C9 においても、その解離の遅さが抗腫瘍活性を高める方向に働く可能性が考えられる。

これまでの報告から、PSMA 抗体単独での抗腫瘍活性は限定的であると予想されたため、抗体の抗腫瘍活性を増強するための修飾が必要と考えられる (Ma D *et al.*, 2006; Milowsky MI *et al.*, 2004)。PSMA は抗体の結合後に細胞内に取り込まれる性質があると報告されている (Liu H *et al.*, 1998) ため、これがエフェクター細胞による抗腫瘍活性を弱めている可能性がある。PSMA 抗体の抗腫瘍活性を高める方法としては、ラジオアイソトープ (Milowsky MI *et al.*, 2004; Bander NH *et al.*, 2005) もしくは細胞毒性薬物 (Ma D *et al.*, 2006; Kantoff P *et al.*, 2010; Petrylak DP *et al.*, 2011; Petrylak DP *et al.*, 2012; Mega AE *et al.*, 2012) とのコンジュゲートが臨床試験で検討されている。これらは細胞内への抗体の取り込みに着目したアプローチであるが、結合したアイソトープや細胞毒性薬物により、毒性が生じる可能性がある。エフェクター細胞を介した抗腫瘍活性を増強させるアプローチとしては、サイトカイン融合抗体が有効な手法の一つである (Ortiz-Sánchez E *et al.*, 2008)。IL-2 はメラノーマおよび腎臓癌を対象に臨床で使用されている (Antony GK and Dudek AZ, 2010)。PSMA 抗体 HuJ591 と低用量 IL-2 を併用した臨床試験によると、数例で PSA の安定化が認められている (Nanus DM *et al.*, 2003)。IL-2 は細胞傷害性 T 細胞および NK 細胞に対して強い免疫刺激活性があるため、IL-2 融合抗体は免疫細胞を介した治療効果が期待される。IL-2 融合抗体には免疫刺激以外の効果も考えられる。しかしながら、IL-2 を静脈内投与する場合、体内半減期の短さと非特異的な組織分布のため、その作用を最大化す

るためには高い投与量が必要となる(Ortiz-Sánchez E *et al.*, 2008; Atkins MB *et al.*, 1999; Rosenberg SA *et al.*, 1998)。高用量 IL-2 の投与は心血管系および呼吸器系への副作用を伴うため、非特異的な組織分布を回避することは重要である(Ortiz-Sánchez E *et al.*, 2008)。PSMA 抗体への IL-2 の融合は上記の課題を改善することが期待される(Ortiz-Sánchez E *et al.*, 2008)。

以上の背景から、IL-2 融合 PSMA 抗体は前立腺癌組織に効率よく分布し、リンパ球を *in situ* で長期間活性化することが示唆される。EpCAM を標的とする huKS-IL-2 (EMD-273066) (King DM *et al.*, 2004; Ko YJ *et al.*, 2004) や GD2 を標的とする hu14.18-IL-2 (EMD-273063) (Holden SA *et al.*, 2001; Neal ZC *et al.*, 2004; Osenga KL *et al.*, 2006) の IL-2 融合抗体が臨床試験で評価されている。両 IL-2 融合抗体の試験で、免疫刺激活性が確認されている(King DM *et al.*, 2004; Ribas A *et al.*, 2009)。IL-2 融合 PSMA 抗体の報告はこれまでにないため、ch-2C9 重鎖の C 末端に hIL-2 を融合した IL-2 融合抗体 ch-2C9-IL-2 を作製した。ch-2C9-IL-2 は ch-2C9 の結合活性(図 3-6)および ADCC 活性(データは示さず)を保持しており、T 細胞株 CTLL-2 の実験(図 3-8A)から ch-2C9-IL-2 の IL-2 部分は IL-2 の機能をほぼ保持していると考えられた。ch-2C9-IL-2 の ADCC 活性増強作用について検討するため、ch-2C9-IL-2 存在下で 72 時間活性化させた後に ADCC 活性を評価した(図 3-8B)。本条件では LNCaP 反応性の細胞傷害性 T 細胞の数は非常に少ないと考えられるため、本実験系では NK 細胞が主要なエフェクター細胞であると考えられた。本実験を実施した結果 ch-2C9-IL-2 は ch-2C9 よりも高い細胞傷害活性を示し(図 3-8B)、IL-2 による NK 細胞の活性化の寄与が示唆された。本結果は IL-2 融合抗体 ch-2C9-IL-2 がリンパ球を介した細胞傷害活性を増強することで治療効果を示す可能性を示唆している。

実際、ch-2C9-IL-2 は前立腺癌細胞株 LNCaP の *in vivo* 担癌モデルにおいて、ch-2C9 よりも高い抗腫瘍活性を示した(表 3-3)。本実験においては、腫瘍の生着率向上の目的で、細胞の移植前に asialo-GM1 抗体により一過性に NK 細胞を減少させる条件で評価を実施している。文献(Tsuchiya Y *et al.*, 1993)から、抗体投与を開始した時点(細胞移植 19 日後)では NK 細胞のレベルは回復していると考えられ、NK 細胞の作用を検出できる実験系で評価が行われていると考えられる。マウスモデルでの抗

体のエフェクター細胞は単球であるとする報告もある(Uchida J *et al.*, 2004; Biburger M *et al.*, 2011; Nimmerjahn F and Ravetch JV, 2008)が、IL-2 での活性向上という点を考慮すると、本系においては IL-2 融合抗体化による NK 細胞の活性化が寄与している可能性が示唆される。

本研究の結果により示された ch-2C9-IL2 の活性から、本 IL-2 融合 PSMA 抗体は次世代の前立腺癌治療薬となる可能性が考えられた。本研究は薬剤(PSMA 抗体)の薬効(抗腫瘍活性)を、薬剤の修飾(IL-2 融合抗体化)により最大化した事例と考えることができ、時にこのようなアプローチが有効であることを示唆している。

【第四章】 疾患で重要なシグナルに着目したスクリーニング系の使用**4-1 序論**

Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) は Ca^{2+} 透過性の非選択的カチオンチャンネルであり、侵害性刺激によって生じる痛覚刺激を伝達する (Tominaga M *et al.*, 1998; Palazzo E *et al.*, 2012; Caterina MJ *et al.*, 1997)。TRPV1 はカプサイシンなどのバニロイドリガンド (Tominaga M *et al.*, 1998; Caterina MJ *et al.*, 1997) や脂質 [アナンダミド (anandamide) (Zygmunt PM *et al.*, 1999)、リポキシゲナーゼ産物 (Hwang SW *et al.*, 2000)、N-オレイルドパミン (*N*-oleoyldopamine) (Chu CJ *et al.*, 2003)]、酸 (pH6.0 以下)、熱 (43°C 以上) によって活性化される。末梢において、TRPV1 は後根神経節、三叉神経節において、サブスタンス P やカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP: calcitonin gene-related peptide) を含む無髄の C 線維および有髄の A δ 線維に発現が認められる (Palazzo E *et al.*, 2012; Holzer P *et al.*, 1988)。中枢神経系における TRPV1 の発現も報告されている (Huang J *et al.*, 2006)。

現在、関節リウマチのような炎症状態に起因する慢性痛は難治性の疼痛と考えられている。非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID: non-steroidal anti-inflammatory drug) は炎症性疼痛に有効性を示すものの、重症のリウマチ患者など炎症に基づく慢性痛の一部では NSAID 抵抗性を示すことが知られており (Kitagawa Y *et al.*, 2013)、抗炎症作用に基づかない疼痛治療薬が期待されている。TRPV1 は炎症性疼痛に関与すると考えられている (Huang J *et al.*, 2006)。TRPV1 のノックアウトマウスでは炎症状態で熱刺激性痛覚過敏を生じない (Davis JB *et al.*, 2000; Caterina MJ *et al.*, 2000)。また、炎症状態において、神経成長因子 (nerve growth factor: NGF) (Chuang HH *et al.*, 2001)、ブラジキニン (bradykinin) (Moriyama T *et al.*, 2005)、プロテアーゼ (Amadesi S *et al.*, 2009)、ATP (Tominaga M *et al.*, 2001) などのメディエーターが産生されることが報告されている (図 4-1)。これらの炎症を促進するメディエーターの受容体は痛覚受容性の神経末端で TRPV1 と共局在することが知られている (Huang J *et al.*, 2006、図 4-1、図 4-2)。これらのメディエーターによる刺激はホスホリパーゼ C (phospholipase C: PLC) 経路を活性化し、プロテインキナーゼ C (protein kinase C: PKC) を活性化する

(図 4-2)。TRPV1 が PKC によりリン酸化されると、カプサイシン、酸、熱による TRPV1 活性化閾値が低下すると報告されている (Crandall M *et al.*, 2002; Premkumar LS *et al.*, 2000; Vellani V *et al.*, 2001; Numazaki M *et al.*, 2002、図 4-2)。特に、温度閾値は 37°C 以下にまで低下すると報告されている (図 4-2)。このことは、炎症状態では体温においても TRPV1 の活性化が生じており、この感作状態が疼痛の悪化に寄与することを示唆する (Vellani V *et al.*, 2001; Numazaki M *et al.*, 2002)。

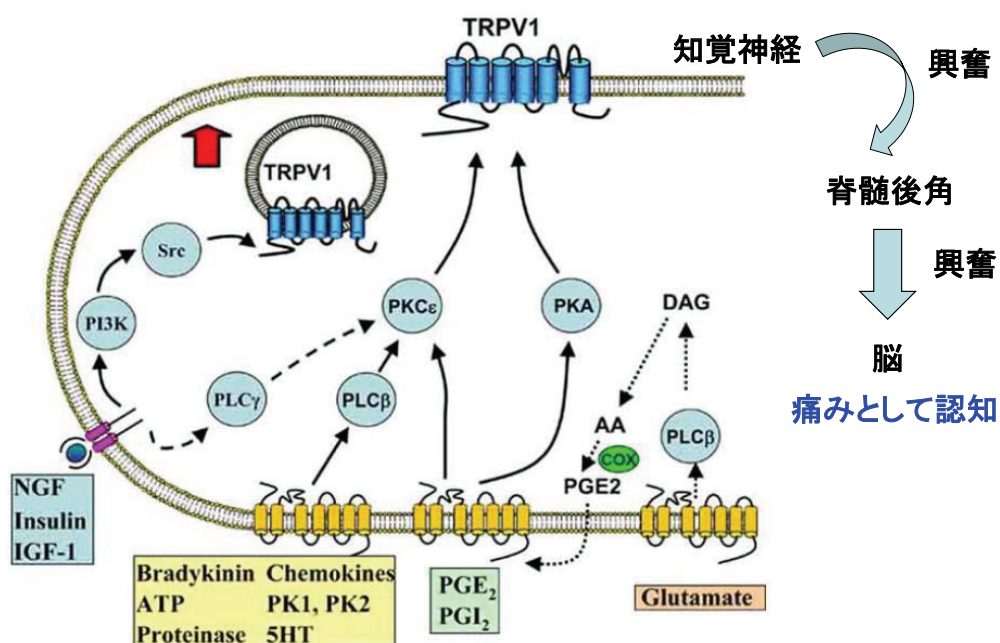


図 4-1 炎症性疼痛

文献に示された図 (Huang J *et al.*, 2006) を引用して、補足説明を加えた上で示した。炎症性メディエーターは知覚神経上に受容体を有し、それ自体が発痛物質として機能する一方で、TRPV1 分子の修飾も行なう。知覚神経の興奮は脊髄後角を介して脳に伝わり、痛みとして認知される。略語の詳細は冒頭の略語一覧を参照。

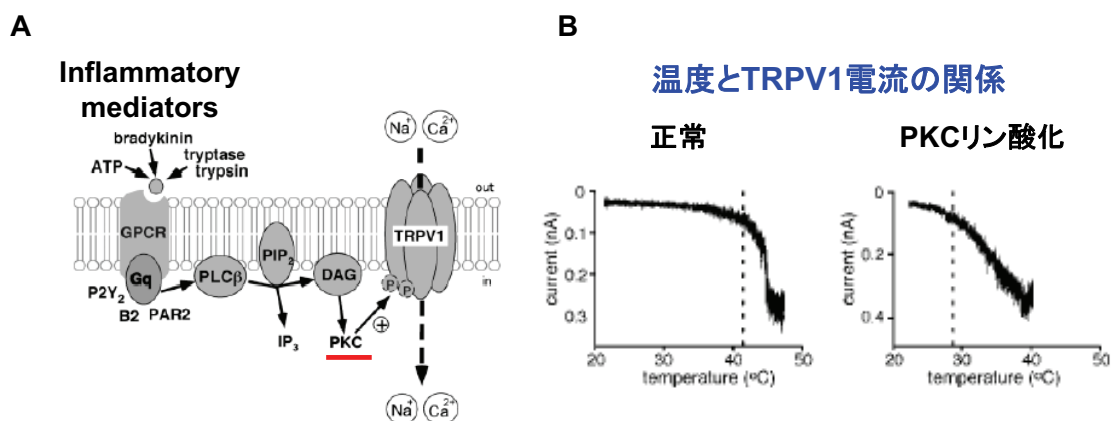


図 4-2 炎症状態における TRPV1 の感作

知覚神経細胞における炎症性メディエーターによる TRPV1 のリン酸化の模式図(A)および、PKCによりリン酸化された TRPV1 の温度活性化閾値の低下(B)を示した。文献に示された図(A: Tominaga M, 2004; B: Numazaki M *et al.*, 2002)を引用して、補足説明を加えた上で示した。PIP₂、IP₃、DAG はそれぞれホスファチジルイノシトール二リン酸、イノシトール三リン酸、ジアシルグリセロールを示す。

PKC アイソフォームの中では、PKC ϵ が TRPV1 の感作に寄与することが示唆されている(Numazaki M *et al.*, 2002; Khasar SG *et al.*, 1999; Srinivasan R *et al.*, 2008)。PKC ϵ のノックアウトマウスでは、痛覚過敏が抑制されることが報告されている(Khasar SG *et al.*, 1999)。一方、PKC ϵ のドミナントネガティブ体の強制発現は TRPV1 の感作を抑制することが報告されている(Srinivasan R *et al.*, 2008)。これらの結果は PKC による TRPV1 の感作が炎症における疼痛の悪化に大きな役割を果たすことを示唆する。従って、この病的な TRPV1 の感作を抑制することは炎症性疼痛の改善に有効であると考えられる。炎症性疼痛の治療薬を考えた場合、このような TRPV1 の感作を指標にしたスクリーニング系を用いることが重要と考えられる。創薬研究においては、多くの化合物群から候補化合物を選択するために、自動化された分析機器などを用いて多検体を評価できるようカスタマイズされたシステム[ハイスループットスクリーニング(HTS)]が用いられている。しかしながら、これまで薬剤の HTS に用いられてきた Ca²⁺評価系では感作状態での温度刺激による TRPV1 活性化を評価することは難しい。その理由は、細胞の温度状態を、感作により低下した温度閾値と 43°C の間で制御する必要のある点が挙げられる。加えて、温度刺激による Ca²⁺応答はカプサイシンや酸刺

激によって生じる反応よりも小さいという点も課題の一つである。これまでにカプサイシンや酸刺激による Ca^{2+} 評価系を使用した報告は多くなされているものの、PKC により感作された TRPV1 による Ca^{2+} 応答を測定する HTS 評価系の報告はほとんど認められない。TRPV1 アンタゴニスト A-425619 の感作 TRPV1 に対する作用を評価した報告がある (El Kouhen R *et al.*, 2005)。現在 Ca^{2+} を指標とした HTS 評価系においては、システムの温度制御は気相インキュベーターでの温度制御であり、TRPV1 のようなチャネルを介した早い変化を鋭敏に惹起できるよう速やかに温度を変化させることが難しく、さらに気相の温度環境を細胞プレート中の培養液の温度に速やかに、かつ正確に反映させることは難しい。この理由で、上記 A-425619 の評価においては、室温に置いた細胞プレートに、 50°C に加温した溶液を添加することで温度刺激を加えている。この方法では温度刺激を再現よく正確に行うことはできない。さらに本文献での検討では、神経細胞を用いた、より生理的な条件でリン酸化感作 TRPV1 の機能に対する化合物の評価は行えていない。炎症性疼痛の疼痛症状を改善する TRPV1 アンタゴニストについてはいくつか報告がある (Honore P *et al.*, 2005; Pomonis JD *et al.*, 2003; Watabiki T *et al.*, 2011; Kitagawa Y *et al.*, 2013) もの、PKC によるリン酸化感作を受けた TRPV1 に対するアンタゴニストの作用については、これまでに十分に調べられていない。

これまでの研究において、経口投与可能な TRPV1 アンタゴニストとして、5,5-diarylpentadienamide 骨格を有する新規化合物群が見出されていた (Saku O *et al.*, 2012)。これらの化合物はヒトおよびラット TRPV1 を介したカプサイシンによる Ca^{2+} 応答を抑制し、ラット神経因性疼痛モデルで疼痛症状を改善した。本研究において、これらの化合物の PKC 感作 TRPV1 に対する作用を検討した。まず初めに、PKC により TRPV1 をリン酸化した状態で、温度刺激による TRPV1 の機能を評価する *in vitro* 実験系を構築した。本実験は、通常温度閾値と感作下での温度閾値の間の温度である 40°C に TRPV1 発現細胞を置き、ホルボールエステルを加えることで活性化を惹起した。次に、以前の研究で見出した TRPV1 アンタゴニスト (Saku O *et al.*, 2012) を評価した。その後、ラット後根神経節細胞において同様の感作が検出できるか検討した。さらに、ラット後根神経節細胞を用いて、経口投与において良好な体内動態を示す

TRPV1 アンタゴニスト (2*E*,4*Z*)-*N*-[(3*R*)-3-hydroxy-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-5-quinoly]-5-(4-isopropoxyphenyl)-5-(4-trifluoromethylphenyl)-2,4-pentadienamide (K-685: 図 4-3、Saku O *et al.*, 2012) について、ホルボールエステルにより感作された TRPV1 を 34°C で刺激した際に生じる内向き電流に対する作用を評価した。最後に、完全フロイントアジュバント(CFA)によるラット炎症性疼痛モデルを用いて、K-685 の炎症性疼痛に対する作用を評価した。

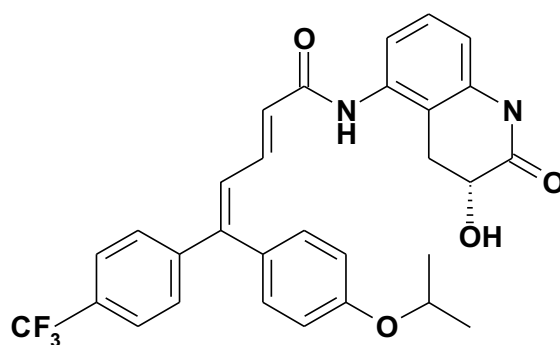


図 4-3 K-685 の構造

4-2 材料および方法

4-2-1 実験の概略

以下、図 4-4 に本章における実験の概略を示す。

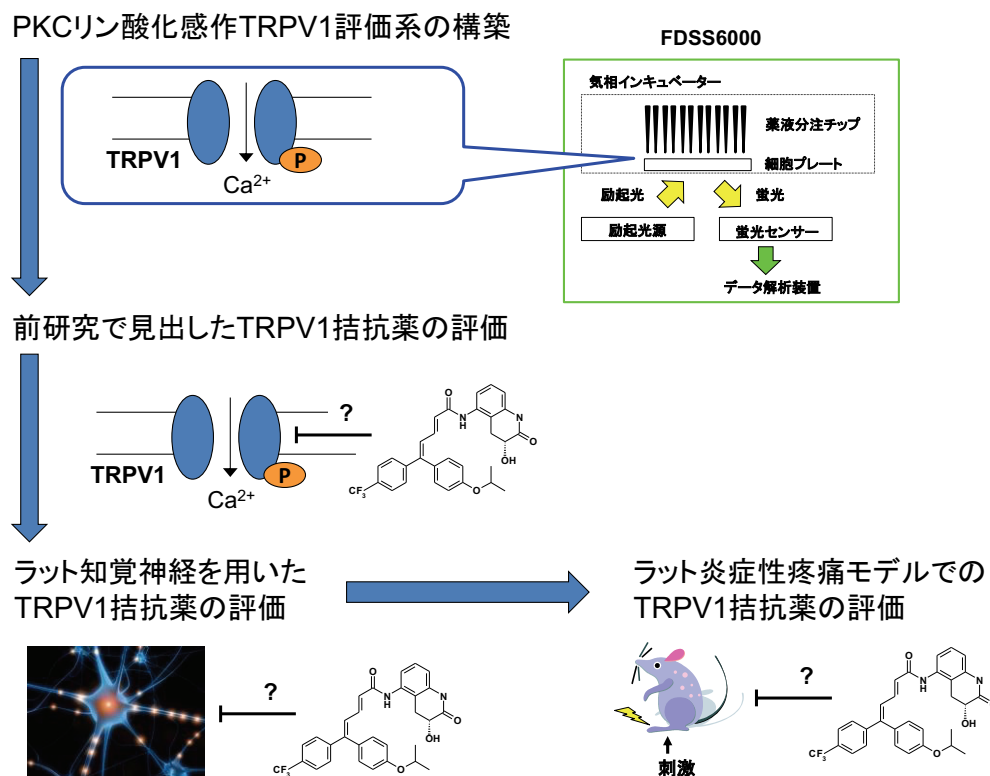


図 4-4 実験の概略図

4-2-2 動物

日本チャールス・リバー (Yokohama, Japan) より購入した、雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットを用いた。

4-2-3 ヒト TRPV1 発現細胞の作製

ヒト TRPV1 (hTRPV1) をコードする cDNA を GeneCopoeia (Rockville, MD, USA) より購入し、制限酵素により切り出して pcDNA3.1(+)/Hygro の *Hind* III および *Bam* HI サイトにサブクローニングして hTRPV1 の発現ベクターとして用いた。

293EBNA 細胞に hTRPV1 発現ベクターを Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen) によりトランスフェクションした。遺伝子導入細胞を 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のハイグロ

マイシン B (hygromycin B) 存在下で培養し、ハイグロマイシン B 耐性株を限界希釈法でクローン化した。各クローンのカプサイシン反応性を 4-2-4 項の方法で評価し、反応性に優れるクローンを以下に示す機能評価実験において、hTRPV1 発現細胞 (293EBNA/hTRPV1) として使用した。

4-2-4 カプサイシン刺激による Ca^{2+} 応答の評価

ポリ-D-リジン処理 384 ウェルマイクロプレートに 293EBNA/hTRPV1 細胞を 2.5×10^4 細胞/ウェル で播種し、一晚培養した。細胞に Ca^{2+} 蛍光指示薬である FLIPR Calcium 3 assay kit (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) を 37°C で 1 時間負荷した。その後、細胞を TRPV1 アンタゴニスト存在下で 30 分間 37°C でインキュベートした。インキュベーション後、細胞をカプサイシンで刺激し、蛍光変化を fluorometric imaging plate reader (FLIPR) (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) あるいは Functional Drug Screening System 6000 (FDSS6000) (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu) で測定した。化合物の IC_{50} 値は、表計算ソフトウェア Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) の回帰統計処理プラグインである XLfit (ID Business Solutions, Guilford, UK) を用いて 4 変数のロジスティック式に近似することによって求めた。

4-2-5 酸刺激による Ca^{2+} 応答の評価

文献 (Valenzano KJ *et al.*, 2003) に報告されている方法を一部改変して実施した。ポリ-L-リジン処理 96 ウェルマイクロプレートに 293EBNA/hTRPV1 細胞を 3×10^4 細胞/ウェルで播種し、一晚培養した。培地を除去して細胞を PBS にて洗浄した後、細胞に Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) に希釈した Ca^{2+} 蛍光指示薬 Fluo-4 acetoxymethyl ester (Fluo-4-AM) を 1 時間負荷した。その後、Fluo-4-AM 溶液を 10 mM のクエン酸および 3.5 mM の CaCl_2 を含む HBSS に置換した。細胞に TRPV1 アンタゴニストを加えて 5 分間 37°C でインキュベートした後、 37°C で pH 5.0 の溶液により細胞を刺激した。蛍光変化を FDSS6000 で測定した。化合物の IC_{50} 値は XLfit を用いて 4 変数のロジスティック式に近似することによって求めた。

4-2-6 熱刺激による Ca^{2+} 応答の評価

ポリ-L-リジン処理 96 ウェルマイクロプレートに 293EBNA/hTRPV1 細胞を 3.2×10^4

細胞／ウェルで播種し、一晚培養した。細胞に FLIPR Calcium 3 assay kit (Molecular Devices) を 37°C で 1 時間負荷した。その後、細胞を TRPV1 アンタゴニスト存在下で 30 分間 39°C でインキュベートした。インキュベーション後、細胞を FDSS6000 にセットし、温度設定を 40°C とした状態で細胞を phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) で刺激し、蛍光変化を測定した。化合物の IC₅₀ 値は XLfit を用いて 4 変数のロジスティック式に近似することによって求めた。

4-2-7 ウェスタンブロット

293EBNA/hTRPV1 細胞を 6 ウェルプレートに 4×10^5 細胞／ウェルで播種し、一晚培養した。その後、血清を含まない DMEM で細胞を 24 時間培養した。細胞を PKC 阻害薬 (GF 109203X) もしくは MEK (MAPK/ERK キナーゼ) 阻害薬 (PD98059)、TRPV1 アンタゴニストの存在下で 30 分間インキュベートした後、PDBu を 10 分間処置した。培地を除去した後、氷冷した PBS で洗浄し、予めホスファターゼ阻害剤カクテル (Nakalai Tesque, Kyoto, Japan) を加えて氷冷した細胞溶解用緩衝液 [RIPA buffer (radioimmunoprecipitation assay buffer) (ThermoScientific)] を加えて細胞を剥離した。細胞をホモジナイズし、4°C、15,000 回転／分 (rpm) で 20 分間遠心し、上清を得た。本細胞溶解液を SDS-PAGE に供し、蛋白質を polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜にセミドライ法にて転写した。PVDF 膜を抗細胞外シグナル制御キナーゼ 1/2 (extracellular signal-regulated protein kinase 1/2: ERK1/2) ウサギポリクローナル抗体 (Promega, Madison, WI, USA) もしくは抗リン酸化型 ERK (phospho-ERK) ウサギポリクローナル抗体 (Promega) 存在下でインキュベートした。一次抗体の洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した二次抗体 (GE Healthcare) 存在下でインキュベートした。バンドを高感度化学発光法 (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate: ThermoScientific) および LAS-1000 (Fujifilm, Tokyo, Japan) により可視化した。

4-2-8 ラット後根神経節細胞を用いた評価

SD ラットより後根神経節 (腰椎 L4-L6 部位) を単離し、35-36°C、0.1%トリプシン存在下で 10 分間インキュベートした後、35-36°C、0.1%コラゲナーゼ存在下で 40 分間インキュベートした。ピペッティングにより細胞を分散させた後、後根神経節細胞を 12-mm 径のポリ-D-リジン処理を施したカバーガラスを備えた 35-mm ディッシュに播種し、

37°C、95% 大気/5% CO₂ で 60 分間インキュベートした。ディッシュを顕微鏡にセットし、細胞外液[150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM D-グルコース, 10 mM HEPES (NaOH により pH 7.4 に調整)]を灌流した。単一細胞の膜電流測定は、ガラス電極[2 段式電極作製機 (PP-83: Narishige, Tokyo, Japan) で、芯入りガラス管 (GDC1.5: Narishige) を加工]を用いてホールセルパッチクランプ法にて行った。実験には細胞内液[140 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 11 mM EGTA, 10 mM HEPES (KOH により pH 7.4 に調整)]充填後の電極抵抗値が 3-5 MΩ のガラス電極を使用した。Axopatch 1D instrument (Axon Instruments, Inc., Foster City, CA, USA) および pClamp6 data acquisition software package (Axon Instruments, Inc.) を用い、3.3 Hz もしくは 10 Hz で膜電流を測定した。室温 (22-26°C) 下で細胞を保持電位 -60 mV に固定し、カプサイシン、低 pH、熱の刺激を加えた薬物は細胞外液に希釈し、灌流により添加した。低 pH 刺激の際には、細胞外液を刺激用緩衝液[150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM D-グルコース, 10 mM HEPES (NaOH により pH 5.5 に調整)]に置換した。熱刺激の際には、予め 37°C に加温しておいた細胞外液を細胞に灌流した。本刺激における細胞の温度の実測値は 34°C であった。

4-2-9 炎症性疼痛モデル

100 μL の完全フロイントアジュバント (CFA: DIFCO Laboratories, Detroit, MI, USA) を SD ラットの左後肢足裏に皮下投与して炎症を惹起した。CFA 投与の 24 時間後に K-685 もしくはジクロフェナク (diclofenac) を経口投与して薬効評価を行った。機械刺激性アロディニアの測定は、Chaplan らの方法 (Chaplan SR *et al.*, 1994) に従って、ラットの左後肢足裏真中へ von Frey フィラメントを押し当て、逃避行動 (足を引っ込める、舐める、振る) の有無を観察した。50% 閾値が 4 g 未満を示すラットをアロディニアが発症したものと判定した。ホットプレートテストによる温熱性痛覚過敏の測定には、ホットプレート (Hot/Cold Plate 35100: Ugo Basile, Comerio, Italy) を用いた。48°C の温度に保たれた熱板上にラットを置き、処置側の足をなめる、噛む、振る等の疼痛反応を示すまでの時間 (潜時) を測定した。潜時が正常ラット平均の 70% 未満となったラットを温熱性痛覚過敏が発症したと判定し、薬物評価に用いた。また、足蹠容積測定装置

(plethysmometer TK-101: Muromachi Kikai, Tokyo, Japan)を用いて左後肢足の浮腫を評価した。

4-2-10 統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。データの解析は統計解析ソフトウェア SAS (Release 9.1.3: SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行った。パラメトリックデータ、ノンパラメトリックデータの2群間の比較にはそれぞれ Student's の *t* 検定、Wilcoxon テストを用いて行った。パラメトリックデータの多群間の比較においてはまず一元配置分散分析 (1-way ANOVA) を行い、有意差が認められた場合には、さらに Dunnett テストを行った。ノンパラメトリックデータの多群間の比較においてはまず Kruskal-Wallis テストを行い、有意差が認められた場合には、さらに Steel テストを行った。いずれの検定においても $P < 0.05$ の場合に統計学的有意差があると判定した。

4-3 結果

4-3-1 hTRPV1 の PKC による感作

通常の TRPV1 活性化温度閾値以下の温度である 40°C で、293EBNA/hTRPV1 細胞に PKC 活性化薬であるホルボールエステル PDBu (1 μ M) を添加した。その結果、293EBNA/hTRPV1 細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度は増加し、その一方で PDBu を加えない場合には細胞内 Ca^{2+} 濃度は変化しなかった (図 4-5A、C、E)。この PDBu 添加による Ca^{2+} 濃度上昇は TRPV1 アンタゴニスト [カプサゼピン (capsazepine) および BCTC] もしくは PKC 阻害薬 (GF 109203X) により抑制された (図 4-5A、C、E)。PKC 阻害薬 GF 109203X の処置は TRPV1 アンタゴニスト (カプサゼピンおよび BCTC) と異なり、カプサイシンによる 293EBNA/hTRPV1 細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇には影響を与えなかった (図 4-5B、D、F)。いくつかの実験において PDBu の添加後に小さな一過性の蛍光変化が認められたが、この変化は PDBu を添加していない場合にも認められる変化であった (図 4-5A、C、E)。

一方、hTRPV1 の遺伝子導入を行っていない 293EBNA 細胞においては、PDBu、カプサイシンのいずれの処置も細胞内 Ca^{2+} 濃度を変化させなかった (データは示さず)。

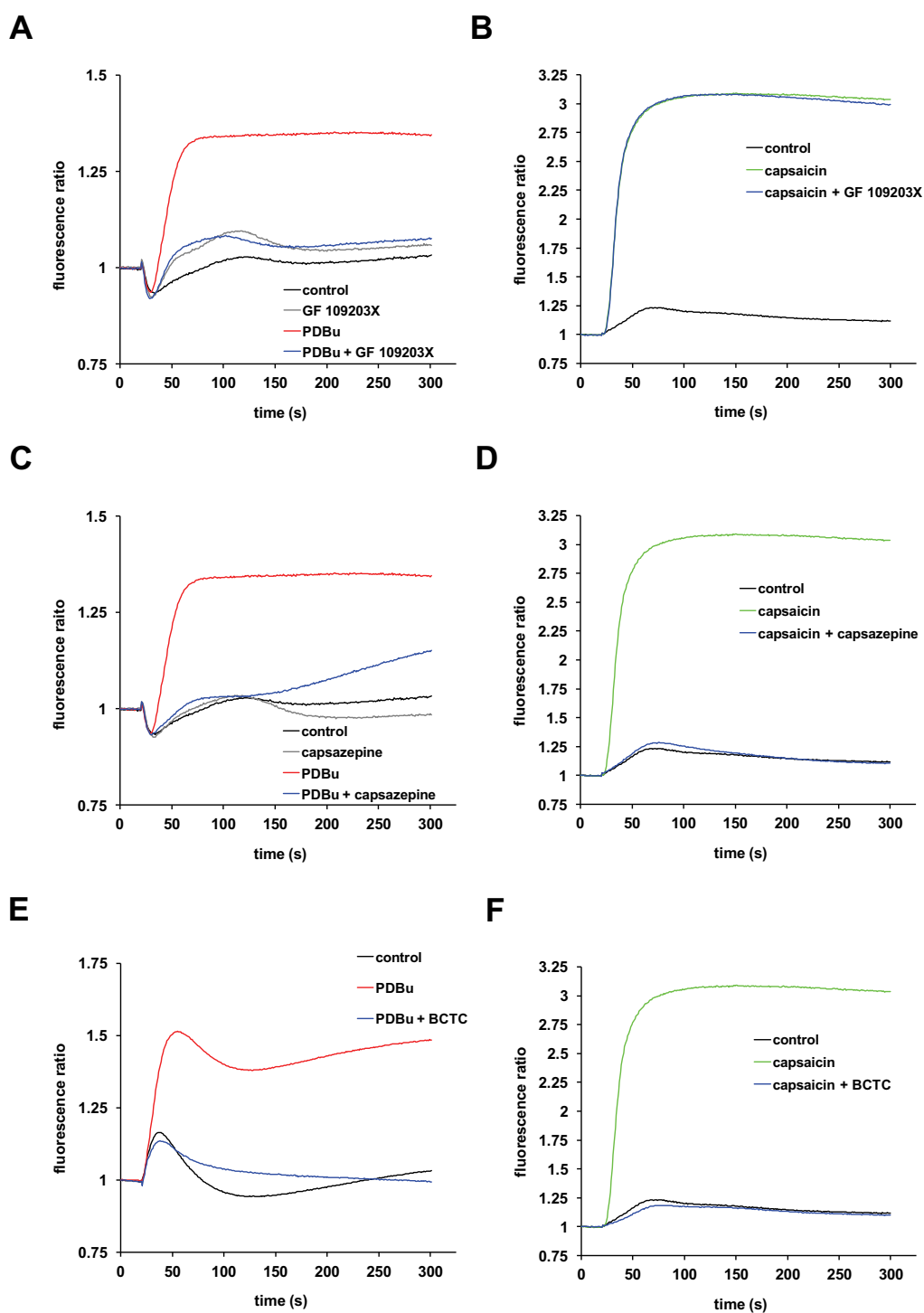


図 4-5 293EBNA/hTRPV1 細胞における PDBu 添加に伴う Ca^{2+} 流入

Calcium-3 を負荷した 293EBNA/hTRPV1 細胞をアンタゴニスト存在下で 30 分間インキュベートした後に 40°C で PDBu (A, C, E) あるいはカプサイシン (B, D, F) を添加し、蛍光の変化を測定した (出典: Sugimoto Y *et al.*, 2013)。

4-3-2 K-685 の TRPV1 活性化に対する作用

4-3-1 項で作製した実験系において、これまでに見出した TRPV1 アンタゴニスト (Saku O *et al.*, 2012) を評価した結果、PDBu (1 μ M) 添加によって生じる 293EBNA/hTRPV1 細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を抑制した(データは示さず)。その代表的な化合物である K-685 はカプサイシン (100 nM) 添加によって生じる 293EBNA/hTRPV1 細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を 0.206 ± 0.041 nM の IC_{50} 値で抑制する化合物であるが(図 4-6、表 4-1)、PDBu 添加によって生じる 293EBNA/hTRPV1 細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を 0.136 ± 0.027 nM の IC_{50} 値で抑制した(図 4-4、表 4-1)。

K-685 は酸刺激 (pH 5.0) によって生じる 293EBNA/hTRPV1 細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇についても抑制し、その IC_{50} 値は 0.261 ± 0.042 nM であった(図 4-6、表 4-1)。

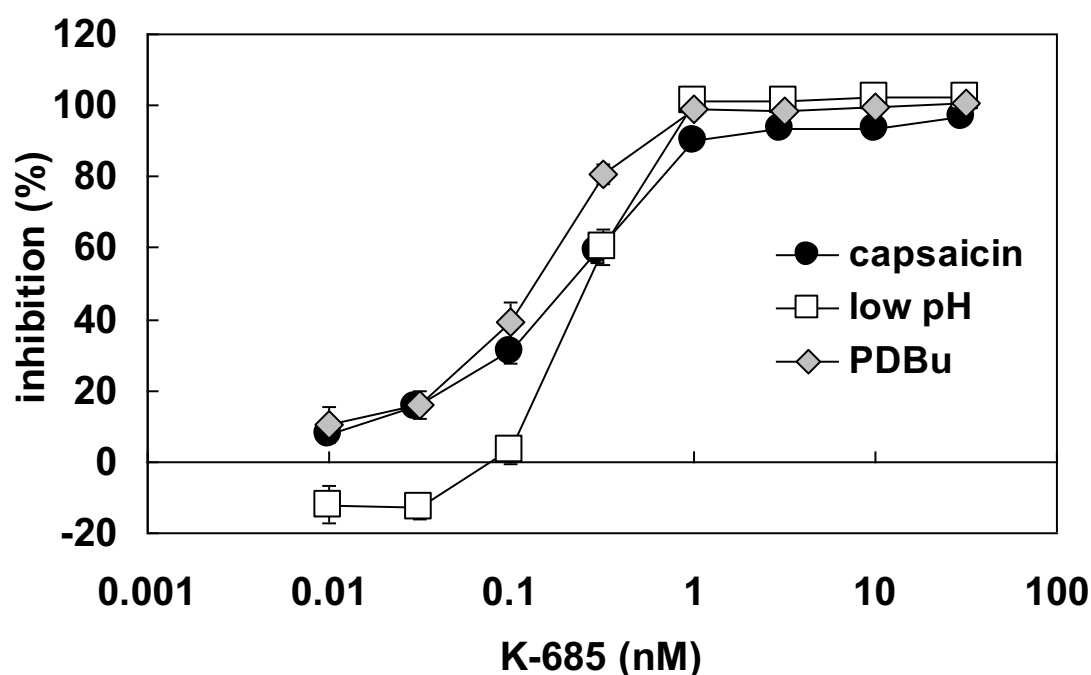


図 4-6 293EBNA/hTRPV1 細胞における Ca^{2+} 流入に対する K-685 の作用

293EBNA/hTRPV1 細胞に K-685 を前処置後、カプサイシン (100 nM)、酸 (pH 5.0)、(1 μ M PDBu) で刺激し、細胞内 Ca^{2+} 流入に対する K-685 の拮抗作用を評価した(出典: Sugimoto Y *et al.*, 2013)。

表 4-1 293EBNA/hTRPV1 細胞における Ca²⁺流入に対する K-685 の作用

図 4-4 に示したグラフより IC₅₀ 値を算出した(出典: Sugimoto Y *et al.*, 2013)。

Capsaicin (100 nM)	Acid (pH 5.0)	PDBu (1 μM)
0.206 ± 0.041	0.261 ± 0.042	0.136 ± 0.027

4-3-3 K-685 の PKC 活性化に対する作用

4-3-2 項で認められた、PDBu 添加による TRPV1 活性化に対する K-685 の抑制作用が PKC 活性化の阻害によるか調べる目的で、PDBu 添加によって生じる細胞内 ERK 活性化をリン酸化型 ERK (phospho-ERK) 特異的抗体を用いたウェスタンブロットにより解析した。その結果、K-685 は他の TRPV1 アンタゴニスト BCTC、カプサゼピンと同様に、PDBu 添加による ERK 活性化には影響を与えなかった(図 4-7)。

一方、本実験系において、PKC 阻害薬 GF 109203X および MEK 阻害薬 PD98059 は PDBu 処置による ERK 活性化を抑制した(図 4-7)。

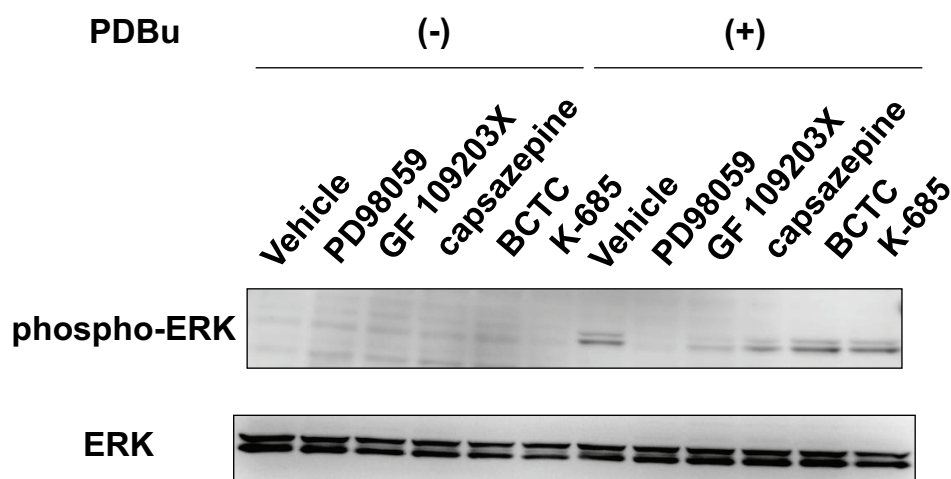


図 4-7 PKC 活性化に伴う ERK リン酸化に対する各種薬物の作用

293EBNA/hTRPV1 細胞に各種薬物を 30 分間前処置した後、PDBu を加えて 37°C で 10 分間刺激して細胞を回収した。Cell lysate を調製し、ERK 抗体あるいは phospho-ERK 抗体を用いてウェスタンブロットを実施した(出典: Sugimoto Y *et al.*, 2013)。

4-3-4 ラット後根神経節細胞における PKC 感作による TRPV1 活性化

より生理的な条件で PKC 感作による TRPV1 活性化を評価する目的で、ラット後根神経節細胞を用いた評価を実施した。TRPV1 機能を評価する方法としてはチャンネルを流入するイオン (Ca^{2+}) を直接蛍光指示薬で検出する方法と、イオンの流入を電流として電気生理学的に検出する方法 (パッチクランプ法) がある (図 4-8)。前者は操作性が高いという利点があるが、微細な変化を検出する感度が低い。一方、後者は検出感度および時間分解能が高いという利点があり、神経細胞のような速い機能変化を評価するのに適している。そこで、パッチクランプ法を用いてラット後根神経節細胞での TRPV1 機能評価を実施した。

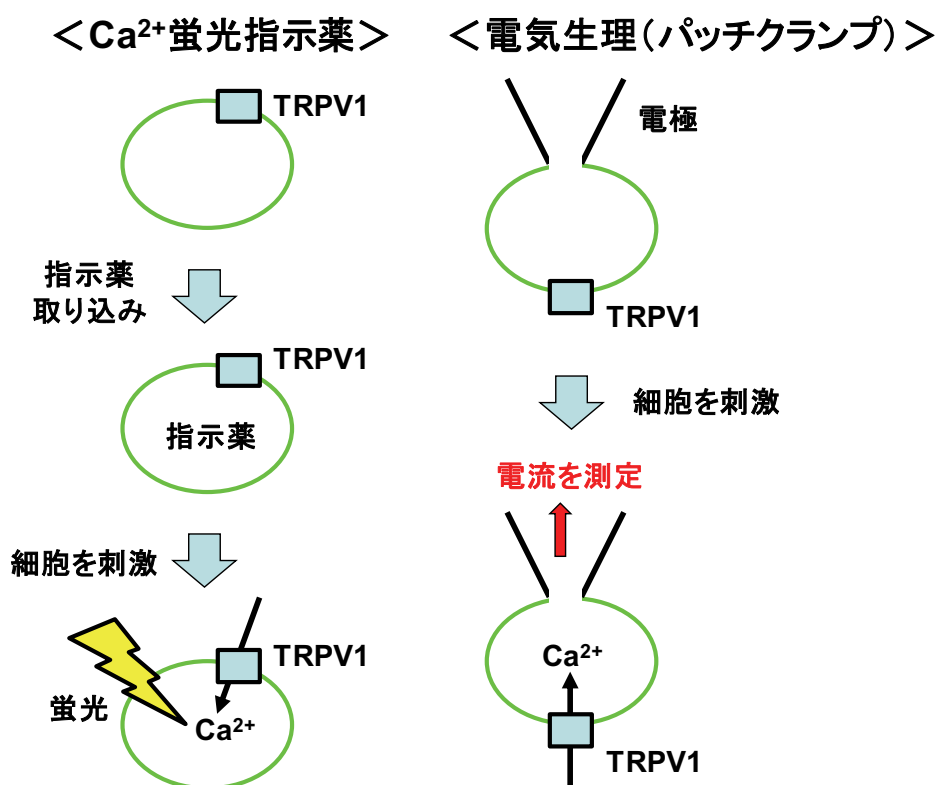


図 4-8 TRPV1 機能を評価する二つの方法

蛍光指示薬で TRPV1 を介して流入した Ca^{2+} を検出する方法と、パッチクランプ法 (ホールセルパッチクランプ法) にて TRPV1 を介した電流を検出する方法を図に示した。

PDBu (1 μM) をラット後根神経節細胞に加えてから熱刺激 (34°C) を与え、パッチクランプ法にて内向き電流をモニターしたところ、PDBu 前処置後に熱刺激に伴う内向き

電流が検出された一方で、PDBu 前処置のない場合には検出されなかった(図 4-9A、B)。この PDBu 前処置に伴う熱刺激誘発内向き電流は TRPV1 アンタゴニスト BCTC (1 μ M) によって抑制された(図 4-9C)。

このラット後根神経節細胞における PDBu 感作による熱刺激誘発内向き電流は K-685 によって抑制され、1 nM の K-685 処置で完全に抑制された(図 4-10)。また、K-685 はラット後根神経節細胞において、カプサイシンあるいは酸によって誘発される内向き電流も抑制した(図 4-10)。

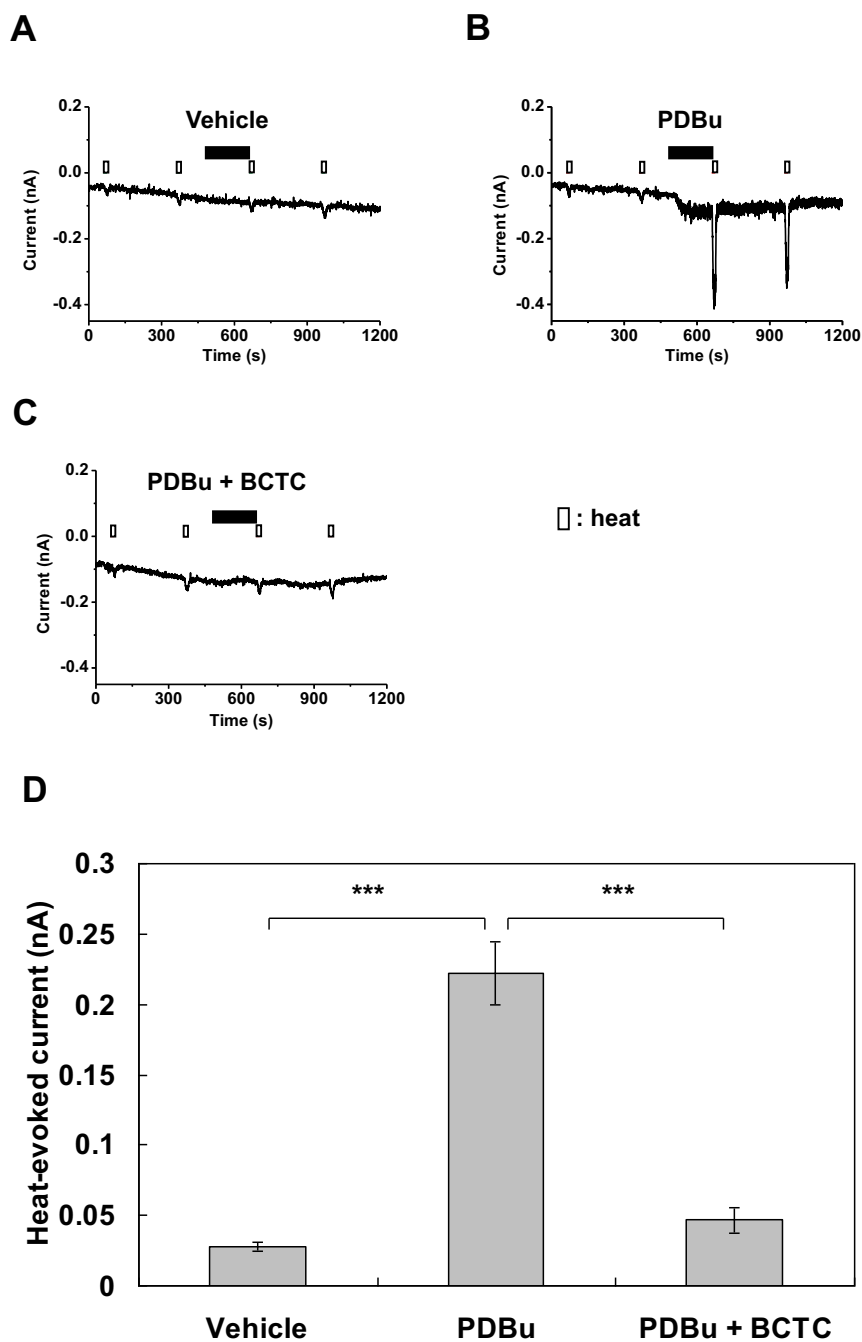


図 4-9 ラット後根神経節細胞におけるPKCを介したTRPV1の感作(出典:Sugimoto Y *et al.*, 2013)

(A) 温度刺激(34°C、15秒)を連続的に加えた。3回目の刺激に先立ち、薬物を3分間前処置した。(B) (A)において、3回目の刺激によって惹起された内向き電流を示した。***はPDBuと比較して統計学的に有意($P < 0.001$)であったことを示す。

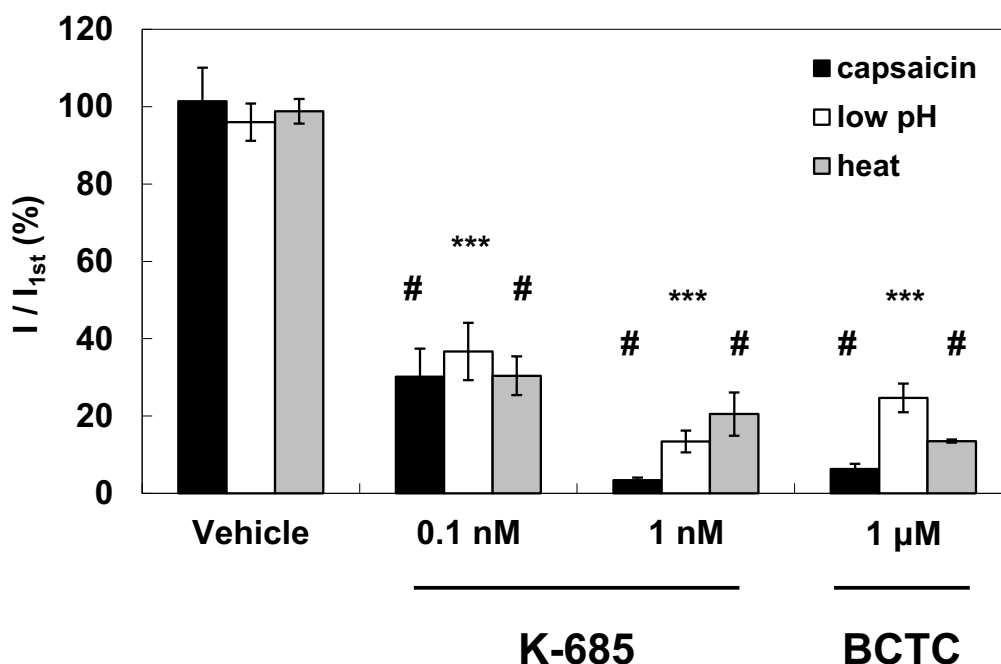


図 4-10 ラット後根神経節細胞における内向き電流に対する K-685 の作用

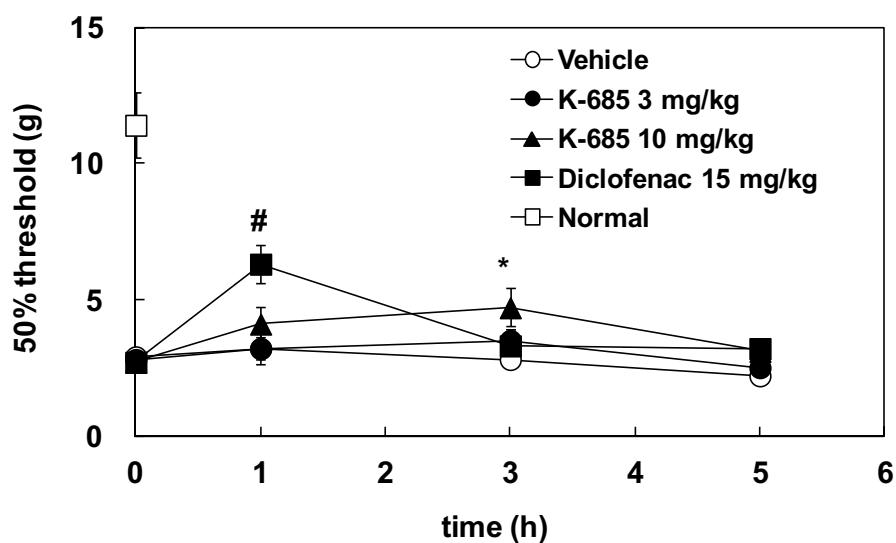
ラット後根神経節細胞に各種の刺激を加え、内向き電流を惹起した。その後、K-685 あるいは BCTC を前処置した後もう一度同じ刺激を施し、内向き電流の薬物前処置による変化を 2 回目の刺激における電流と 1 回目の刺激における電流の比で示した (出典: Sugimoto Y *et al.*, 2013)。***は Dunnett テストにより統計学的に有意 [対溶媒処理条件 (vehicle)、 $P < 0.001$]、#は Steel テストにより統計学的に有意 (対溶媒処理条件 (vehicle)、 $P < 0.05$) であったことを示す。

4-3-5 ラット炎症性疼痛モデルにおける K-685 の作用

ラット左後肢足裏への CFA による炎症誘発モデルで炎症性疼痛を惹起し、機械刺激性アロディニアおよび熱刺激性痛覚過敏に対する K-685 の作用を解析した。K-685 の経口投与 (10 mg/kg) により、機械刺激性アロディニアおよび熱刺激性痛覚過敏は有意に改善した (それぞれ 22.5% および 68.9% の改善) (図 4-11、4-12)。熱刺激性痛覚過敏の改善の度合いは NSAID であるジクロフェナク (diclofenac) (15 mg/kg) の場合 (39.0%) よりも高かった (図 4-12)。

一方、K-685 はジクロフェナクとは異なり、CFA 注入によって生じた炎症反応である浮腫には影響を与えなかった (図 4-13)。

A



B

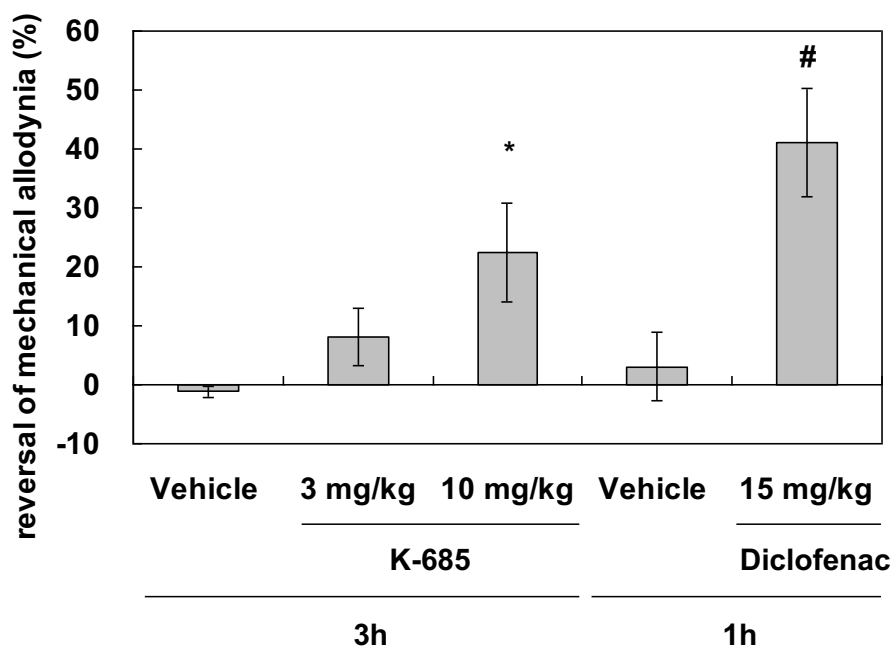
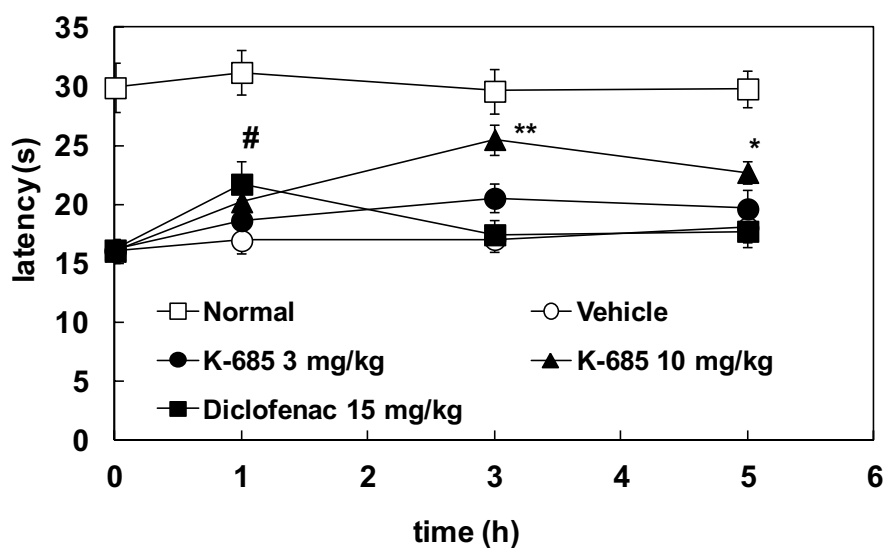


図 4-11 CFA モデルにおける機械刺激性アロディニアに対する K-685 の作用

実験の 24 時間前にラット左肢裏に CFA を処置して炎症を惹起した。薬物を経口投与後、左肢における機械刺激性アロディニアについて評価を行った(出典: Sugimoto Y *et al.*, 2013)。*は Steel テストにより統計学的に有意[対溶媒投与群(vehicle)、 $P < 0.05$]、#は Wilcoxon テストにより統計学的に有意[対溶媒投与群(vehicle)、($P < 0.05$)]であったことを示す。正常動物での値(normal)を比較のため示した。

A



B

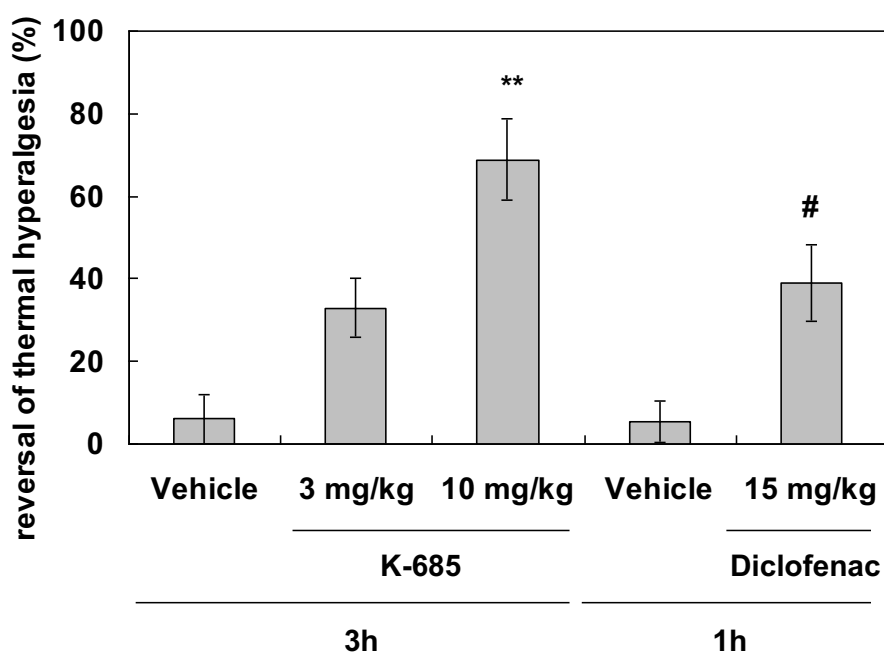


図 4-12 CFA モデルにおける熱刺激性痛覚過敏に対する K-685 の作用

実験の 24 時間前にラット左肢裏に CFA を処置して炎症を惹起した。薬物を経口投与後、左肢における熱刺激性痛覚過敏について評価を行った(出典:Sugimoto Y *et al.*, 2013)。**および*は Dunnett テストにより統計学的に有意[対溶媒投与群(vehicle)、それぞれ $P < 0.01$ および $P < 0.05$]、#は t 検定により統計学的に有意[対溶媒投与群(vehicle)、 $P < 0.01$]であったことを示す。正常動物での値(normal)を比較のため示した。

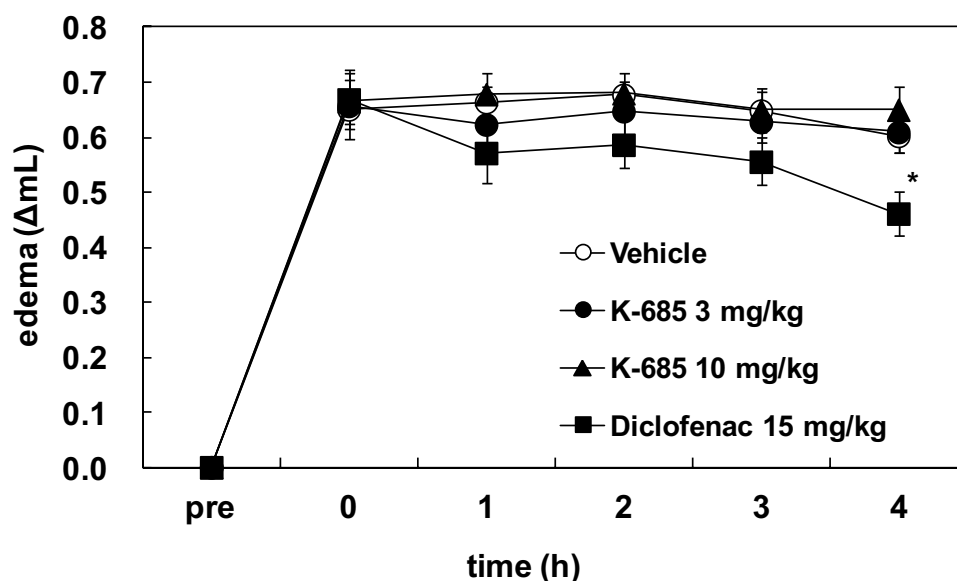


図 4-13 CFA モデルで生じる浮腫に対する K-685 の作用

実験の 24 時間前にラット左肢裏に CFA を処置して炎症を惹起した。薬物を経口投与後、左肢における浮腫について評価を行った (出典: Sugimoto Y *et al.*, 2013)。*は *t* 検定により統計学的に有意 [対溶媒投与群 (vehicle)、 $P < 0.05$] であったことを示す。

4-4 考察

以前の研究において、経口投与可能な TRPV1 アンタゴニストとして、K-685 を含む新規 5,5-diarylpentadienamides 化合物群が見出されていた (Saku O *et al.*, 2012)。また、TRPV1 以外の 12 種類の受容体および 7 種類のイオンチャネルに対する K-685 の作用を評価した結果、K-685 には、これらの分子と比較して 1000 倍以上の TRPV1 選択性があることが見出されている (データは示さず)。従って、TRPV1 は高い TRPV1 選択性を有するアンタゴニストである。本研究において、K-685 の *in vitro* での生物活性、特に PKC によりリン酸化感作された TRPV1 の機能に対する作用について検討した (図 4-5)。PKC によりリン酸化された状態では TRPV1 の温度活性化閾値は 43°C から 37°C 以下にまで低下することが報告されている (Vellani V *et al.*, 2001; Numazaki M *et al.*, 2002)。このことは、PKC によるリン酸化感作が生じた状態では体温であっても TRPV1 が感作している可能性を示唆している。内部にインキュベーターを備えた HTS 蛍光検出機器である FDSS6000 システムを用いて、正常活性化閾値以下の温度である 40°C でホルボールエステル PDBu を添加した後に Ca^{2+} 応答を測定した (図 4-5A、

C、E)。感作時の反応およびそれに対するアンタゴニストの作用を安定して検出するために、293EBNA/hTRPV1 細胞を比較的高い 40°C で刺激した。この *in vitro* 評価系において、PDBu は 293EBNA/hTRPV1 細胞で細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させた (図 4-5A、C、E)。一方、PDBu を添加しない場合には 40°C では 293EBNA/hTRPV1 細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度は変化しなかった (図 4-5A、C、E)。この反応は PKC 阻害薬 GF 109203X で阻害された (図 4-5A)。一方、カプサイシン刺激時の Ca^{2+} 応答は GF 109203X では影響を受けなかった (図 4-5B)。PDBu の添加で惹起された Ca^{2+} 応答は TRPV1 アンタゴニストにより抑制された (図 4-C、E)。これらの結果は、PDBu の添加により生じる Ca^{2+} 応答が PKC により感作された TRPV1 に依存した反応であることを示唆している。GF109203X の添加によって完全に阻害しきれない成分が認められる (図 4-5A) が、本条件での反応を、GF109203X を前処置し PDBu では刺激していない場合と比較すると、更なる蛍光の増加は全く示されていない (図 4-5A)。このことから、本検討で認められた PDBu 添加時の Ca^{2+} 応答は PKC 依存性の現象と説明でき、PDBu による直接的な TRPV1 活性化 (アゴニスト作用) ではないと結論した。

検討した本 *in vitro* 実験系において、TRPV1 アンタゴニスト K-685 は 0.136 ± 0.027 nM という強い IC_{50} 値で PDBu 添加による Ca^{2+} 応答を抑制した (図 4-6、表 4-1)。PDBu 添加によって生じる Ca^{2+} 応答に対する K-685 の阻害活性における potency はカプサイシンや酸による刺激に対する阻害活性と比較して同等であった (図 4-6、表 4-1)。さらに、K-685 の potency は、過去に PDBu による感作下での TRPV1 の熱刺激活性化に対する pIC_{50} 値が 8.70 である A-425619 (El Kouhen R *et al.*, 2005) よりも高かった。K-685 は PDBu によって生じる ERK リン酸化 [PKC 依存的な現象と考えられている (Wang W *et al.*, 2010)] を抑制しなかった (図 4-7) ことから、K-685 による PDBu 添加時の Ca^{2+} 応答抑制は PKC の阻害ではなく、TRPV1 に対するアンタゴニスト活性に依存していると考えられた。これらの結果は、K-685 が PKC による感作下での TRPV1 活性を抑制する可能性を示唆している。

293EBNA/hTRPV1 細胞で認められた PDBu 感作下での TRPV1 活性化は、ラット後根神経節細胞を用いた電気生理学的解析においても確認された (図 4-9)。ラット後根神経節細胞において、K-685 は PDBu によって感作された温度刺激誘発の内向き

電流を抑制した(図 4-10)。本検討において、ラット後根神経節細胞は PDBu 前処置時には 34°C で活性化した。この結果は、K-685 が炎症時に後根神経節細胞において PKC 感作によって生じる TRPV1 活性化を抑制できる可能性を示唆している。さらに、K-685 はラット後根神経節細胞においてカプサイシンや酸の刺激によって生じる内向き電流を抑制する(図 4-10)ことから、K-685 は生理的条件においてもラット TRPV1 に対して幅広いアンタゴニスト活性を示すことが示された。

以前の報告で、TRPV1 をブラジキニンあるいは PKC の刺激によりリン酸化し、温度を段階的に上昇し温度活性化閾値の変化を調べた場合に、正常時には活性化が認められない 30°C 以下の温度でも活性化が生じることが示されている(Vellani V *et al.*, 2001; Numazaki M *et al.*, 2002)。今回の検討では、PDBu の添加は室温(22-26°C)で行っており、この添加時にベースラインの低下が認められている(図 4-9B)。この低下は TRPV1 アンタゴニスト BCTC の添加時には認められない(図 4-9C)ことから、TRPV1 の活性化を示唆している。このベースラインの低下は以前の報告での 30°C での内向き電流と一致する現象であることから、PKC による TRPV1 のリン酸化感作は室温での TRPV1 の機能においても影響を与えていることを示唆している。このように、PKC による TRPV1 のリン酸化感作は、特に PKC の活性化を起こすメディエーターが神経細胞周囲で多く産生される炎症の状態において、TRPV1 に機能に非常に大きな影響を与えることが示唆される。従って、PKC により感作された TRPV1 の機能を抑制する K-685 は炎症性疼痛を改善する可能性が考えられる。

K-685 のラット CFA 炎症モデルへの作用を評価した結果、K-685 は機械刺激性アロディニア(図 4-11)および熱刺激性痛覚過敏(図 4-12)を改善した。K-685 の作用は経口投与 3 時間後に顕著に現れた(図 4-11、4-12)。K-685 の動態解析により、本化合物は血中濃度が最大値に達するまでに時間を要することが示されており(データは示さず)、これが作用発現の時期に影響を与えている可能性がある。本系での K-685 の作用機序について考察すると、K-685 は本モデルで浮腫に影響を与えない(図 4-13)ため、K-685 は抗炎症作用ではなく、TRPV1 の活性を抑制することで抗疼痛作用を示すと考えられる。特に、K-685 はジクロフェナクよりも強く熱刺激性痛覚過敏を抑制した(図 4-12)。他の TRPV1 アンタゴニストにおいても、機械刺激性アロディニアと熱刺激

性痛覚過敏との間の作用の違いについて報告がなされている(Cui M *et al.*, 2006)。本報告では、TRPV1 アンタゴニスト A-784168 の機械刺激性アロディニアの抑制に対する ED₅₀ 値は熱刺激性痛覚過敏に対する ED₅₀ 値よりも9倍大きい値であった(Cui M *et al.*, 2006)。さらに、中枢移行性の低い TRPV1 アンタゴニスト A-795614 が、機械刺激性アロディニアに対して限定的な抑制作用しか示さないことも報告されている(Cui M *et al.*, 2006)。中枢神経系に発現する TRPV1 が CFA モデルにおける機械刺激性アロディニアに関与する可能性が考えられる。これらの実験結果は中枢移行性のある TRPV1 アンタゴニストが CFA モデルで機械刺激性アロディニアに対して有効性を示す可能性を示唆している。中枢神経系に発現する TRPV1 においても PKC による TRPV1 の感作が認められるかは定かではないが、K-685 の中枢移行性(Saku O *et al.*, 2012)が機械刺激性アロディニアに対する改善作用に関与している可能性がある。

以上の結果は、K-685 が炎症性疼痛の治療薬として応用できる可能性を示唆している。本研究において、K-685 が炎症状態において TRPV1 に対し強いアンタゴニスト活性を示すことを *in vitro* (PKC により感作された TRPV1 活性)、*in vivo* (ラット CFA モデル)の実験系により示した。PKC により感作された TRPV1 が炎症性疼痛に対して重要な役割を示すことを示唆すると共に、そのような感作状態での TRPV1 活性を抑制する TRPV1 アンタゴニストが炎症性疼痛の治療に有効であることを示唆している。今回構築した *in vitro* 実験系は、そのような TRPV1 アンタゴニストのスクリーニング系として、非常に有用であると考えられる。したがって、本研究は、疾患に重要な機能指標を薬剤のスクリーニング系として用いることの有用性を示した事例と考えることができる。

【第五章】 統括と展望

第一章において、疾患治療における標的蛋白質に対して最適な薬物候補分子を見出すために重要な点として

- 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3点を挙げた。それを実現するための方法論としてそれぞれ、

- ① 薬物の機能的な活性を保持した上で標的選択性を付与する部位を同定する方法、
- ② 疾患治療に有益な薬理作用を探索し、最大化するための方法、
- ③ 標的分子の疾患特異的な機能変化を特定し、それを指標に薬物のスクリーニングを行う方法

について検討した。本研究において、それぞれ個別の事例について方法論の適応可能性について検討し、成功例を示した。

図 5-1 に、一般的な創薬研究の流れ(長野哲雄ら編, 2004; 吉田稔, 2013)を示し、その中で本研究において検討された方法論を適応できるポイントを示す。

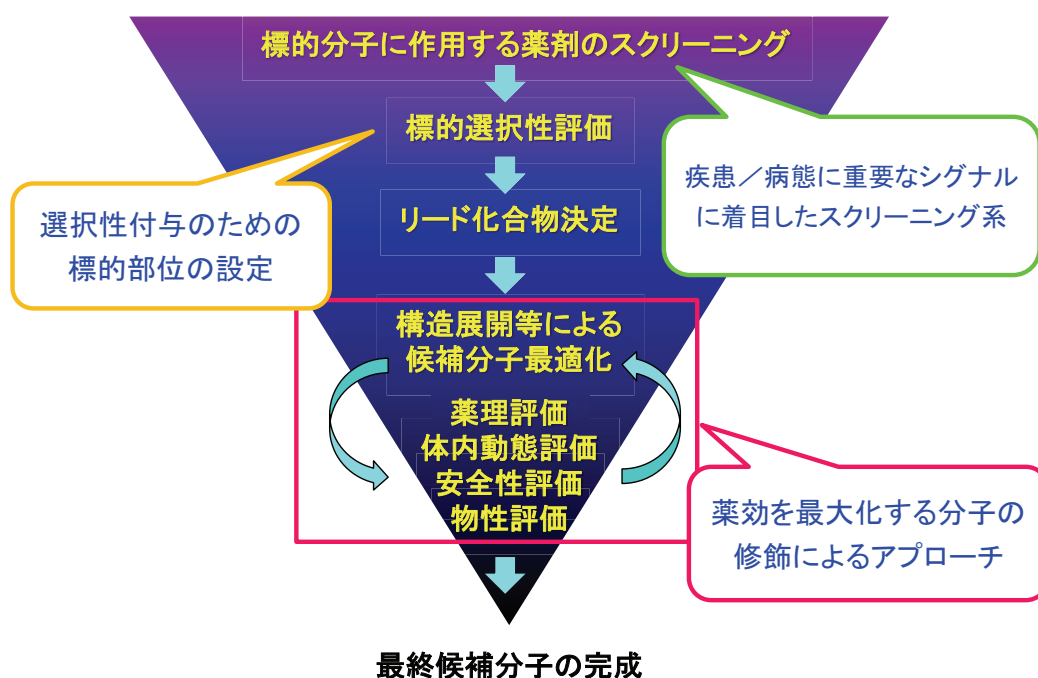


図 5-1 創薬研究の流れにおいて各方法論を適応できるポイント

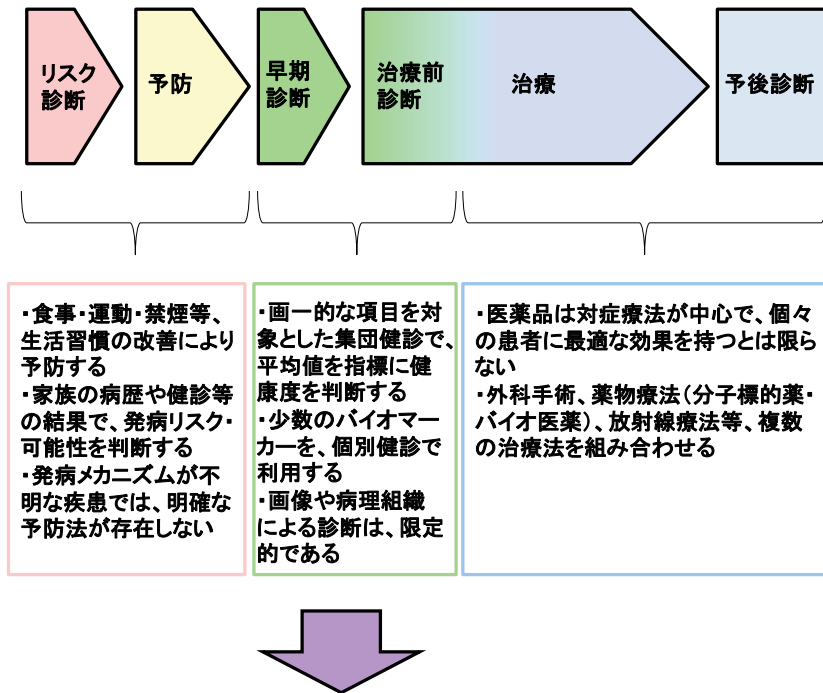
第一段階の薬剤スクリーニングにおいては、必要な機能活性を有する化合物を陽性化合物(ヒット化合物)として抽出できることが重要である。そのためには、疾患において重要な標的分子の機能を同定し、その機能指標で評価を行うことが極めて重要と考えられる。第二段階のヒット化合物の標的選択性評価については、標的分子への選択性を十分に確保することが重要である。安全性面で交差反応性が副作用に繋がりうるファミリー分子があり、かつアミノ酸配列の相同性が極めて近い場合には、本研究で検討したように、選択性付与に重要な標的部位を同定することが有効な手段と考えられる。その後、ヒット化合物の中から、リード化合物が選択され、化合物の最適化研究がなされる。本段階で化合物の薬理活性が望ましいレベルにまで至らない場合には、本研究で検討した分子修飾による薬効最大化というアプローチが有効となる場合もある。

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。しかし、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。実際に今回検討した方法論によって、これまでに想定できなかった薬理・薬効作用をもつ創薬候補分子を発掘することができた。本研究で培った創薬展開によって、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。

第一章で述べたように、過去と比較して現在の創薬の成功確率は向上してはいない。有効な薬剤が上市されにくくなった結果、有効性を示すために必要な臨床試験のハードルは上昇している。逆に、研究開発投資に比べて上市できる薬剤の数が減少し、還元される利益は減少している。この結果、近年ではむしろ生産性の低下が議論されている状況でもある(Pammolli F *et al.*, 2011)。経済産業省の「技術戦略マップ」の取り組みの中で、現時点での医療状況と、それを踏まえ、将来のあるべき姿として議論されている医療状況をまとめた[図 5-2: 経済産業省の調査資料(経済産業省, 2005; 経済産業省, 2010)を参考]。現在の医薬品の課題や患者の生活の質(QOL: quality of life)の向上の重要性、予防医療の重要性が議論されていることがわかる。別の取り組みとして、癌分野においては「今後のがん研究のあり方に関する有識者会議」において議論がなされ、2013年に報告書が発表されている(厚生労働省, 2013)。本報告書においては目標とする将来の状況について「根治・予防・共生 ～患者・社会と協働するがん研究～」というキャッチフレーズでまとめており、具体的に取り組むべき対策として、「がんの根治(難治性がんの根治)」、「がん患者とその家族の苦痛の軽減」、「がん予防と早期発見」、「がんと共に生きる」の項目を挙げている(厚生労働省, 2013)。患者の QOL 向上や予防・早期発見の重要性という点に関して、非常によく似た議論がなされていることがわかる。

<現在の医療>



<将来の医療>

あるべき姿
目標

<健康寿命延伸、最適な医療の実現、医療産業力の強化>

- ・有効な予防法が開発され、疾患発症年齢を遅らせ、重症化を防ぐ
- ・エビデンスに基づく最適な診断治療が、より正確・安全に受けられる
- ・患者のQOLが向上し、高齢化社会を健康に過ごすことができる
- ・医療関連産業分野の技術革新により国際競争力が強化される

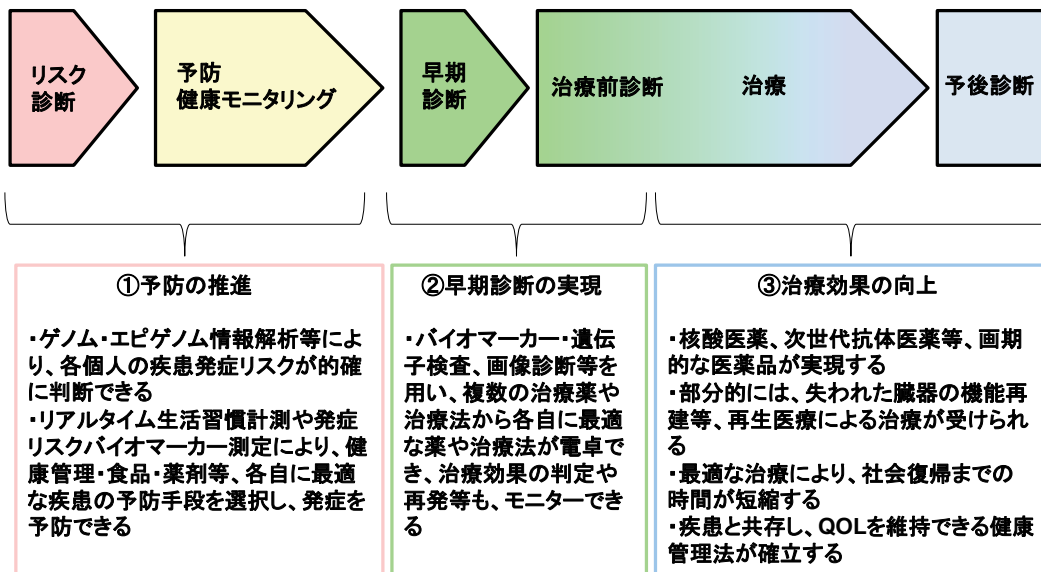


図 5-2 現在議論されている将来の医薬の状況

外部調査報告の内容をもとにまとめた(原出典:経済産業省, 2005;経済産業省, 2010)。

これを考慮すると、現在の創薬研究において、本研究で取り上げた「疾患治療における標的蛋白質に対して最適な薬物候補分子の創製」という課題の他に、以下のような課題が考えられる。

① 標的分子の課題

様々な疾患において、主要なレギュレーターは過去の解析からある程度見出されており、それに作用する薬剤も既に開発、上市されている場合が多い。もちろん、多くの疾患で既存の薬剤でも満たされない医療ニーズはあり、治療薬の開発が望まれている。しかしながら、ゲノム解読以降、遺伝子発現を指標にした標的探索は既に網羅的になされており、同様の手法では新たな標的分子は見出されにくい状況にある。このような現状から、標的分子を選択するための方法論も重要な課題となりつつある。今後は分子の発現量変化以外の指標も取り入れて、疾患における分子変化を様々な指標から検出することが重要と考えられる。また、新規技術開発との連携も必要と考えられる。

また、疾患の解析が進むにつれ、個々の症例で原因や病態が大きく異なることが示されてきており、個別化医療の考え方が普及しつつある。個々の症例により標的とすべき分子が異なり、必要とされる薬剤も異なる。分子標的薬は、薬剤がある特定の状態の患者にのみ有効であることが一般的であり、薬効予測バイオマーカーを設定する必要がある。分子標的薬の開発を考えた場合には、近年その必要が増しており、コンパニオン診断薬(その医薬品の効果や副作用を事前に予測するために用いる臨床診断薬)との同時開発事例も増えている。成功確率を上げるためには、このような点を見据えた戦略策定も重要である。

② 疾患の病態に関する理解

多くの疾患の治療薬研究においては、マウス、ラットなどのげっ歯類を用いた動物モデルが用いられている。動物モデルの病態がヒトの病態と類似しているかは、創製される薬剤の性質を決める上で非常に重要である。この点で、疾患の病態についての理解は不可欠である。さらに、疾患の病態が進行性である場合には、治療対象として想定している病態進行度と、動物モデルの病態進行度が一致しているかという点も重要である。また、動物とヒトでは根本的に生理的に乖離のある面も多い。従って、今後は評価モデルがヒトでの病態を反映しているかを検証することがより重要になると考え

られる。

③ 真の医療ニーズは何か

現在の医薬品開発の多くは、現在行われている治療体系の中で議論されている。すなわち、既存の薬剤で有効でない症例あるいは、耐性を示した症例を対象とすることが多い。もちろんそのような薬剤も必要ではあるが、①で議論したように適切な標的を見出すことは難しい。また、医薬品という治療方法が妥当かという議論もある。

医療ニーズを考えた場合、究極の目標は根治である。進行性の疾患では、自覚症状があった際には病態が既に重篤となっている場合が多い。このような疾患では治療薬がある程度の有効性を示しても対症療法に留まるため、患者の QOL の面から考えると、必ずしも貢献できていないことも多い。このような場合にはむしろ早期診断技術の発展が望まれると思われる。早期の病態が治療対象となることで、根治に繋がる形で医薬品の医療貢献度が増す可能性がある。

創薬の成功確率の向上、創薬を介した医療への貢献を考えた場合には、上記のような課題を複合的に議論する必要がある。標的分子選択の視点、医療への介入方法の視点など、様々な視点から医薬品というものを考え直す時期に来ている。本研究で示した課題解決は一つの側面を示したに過ぎないが、標的分子に対して薬理作用として最適な候補分子を見出すという手法は薬剤を開発する上で極めて基本的な要素であり、本研究を契機として、将来、医療に貢献する創薬研究へと繋がることを期待する。

【謝辞】

本研究の発表にあたり、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました早稲田大学大学院先進理工学研究科 加藤 尚志 教授に謹んで感謝申し上げます。

学位論文審査において、御指導と御高配を賜りました早稲田大学教育・総合科学術院 並木 秀男 教授、大山 隆 教授、理工学術院 浅野 茂隆 研究招聘教授に深く感謝いたします。

本研究の機会を与えていただきました協和発酵キリン株式会社研究本部 岡崎 寛 本部長、研究本部バイオ医薬研究所 中西 聡 所長、研究本部東京リサーチパーク 研究推進部 中村 和靖 部長、製品ポートフォリオ戦略部 佐藤 光男 マネジャー、第一ファインケミカル株式会社 大島 悦男 社長に厚く御礼申し上げます。

多くの励ましをいただきました協和発酵キリン株式会社研究本部バイオ医薬研究所 元木 一宏 主任研究員、開発本部 土岐 眞一郎 マネジャー、鈴木 伸之 マネジャー、営業本部 篠田 克己 マネジャー、協和メデックス株式会社研究所 市村 通朗 所長、独立行政法人医薬基盤研究所 宮崎 洋 博士、九州大学大学院薬学研究院 黒瀬 等 教授、東京大学大学院薬学系研究科 長尾 拓 名誉教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり御助言をいただきました同志社女子大学薬学部 漆谷 徹郎 教授、東邦大学医学部 赤羽 悟美 准教授、岡崎統合バイオサイエンスセンター 西田 基宏 教授、早稲田大学教育学部理学科／大学院理工学研究科 分子生理学研究室の皆様にご深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、直接御協力をいただきました協和発酵キリン株式会社研究本部研究企画部 太田 聡 マネジャー、研究本部探索研究所 稲吉 温 研究員、営業本部 加藤 由充 部員、愛知医科大学医学部先端医学研究センター 吉川

和宏 教授、泌尿器科学講座 住友 誠 教授、中村 小源太 准教授、腫瘍免疫寄附講座 上田 龍三 教授、東レ株式会社医薬研究所 谷村 隆次 博士、磯ヶ谷 昌文 博士をはじめ御協力をいただきました諸兄姉に感謝いたします。

最後に、研究職に進む道を拓いてくれた両親、本研究の遂行を支えてくれた妻 典子をはじめ家族、友人、同僚に感謝いたします。

【参考文献】

【自筆】

Sugimoto Y, Fujisawa R, Tanimura R, Lattion AL, Cotecchia S, Tsujimoto G, Nagao T, and Kurose H. (2002) 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. *J Pharmacol Exp Ther* **301**: 51-58.

Sugimoto Y, Hirota M, Yoshikawa K, Sumitomo M, Nakamura K, Ueda R, Niwa R, Suzawa T, Yamasaki M, Shitara K, Kato T, and Nakamura K. (2014) The therapeutic potential of a novel PSMA antibody and its IL-2 conjugate in prostate cancer. *Anticancer Res* **34**: 89-97.

Sugimoto Y, Kojima Y, Inayoshi A, Inoue K, Miura-Kusaka H, Mori K, Saku O, Ishida H, Atsumi E, Nakasato Y, Shirakura S, Toki S, Shinoda K, and Suzuki N. (2013) K-685, a TRPV1 antagonist, blocks PKC-sensitized TRPV1 activation and improves the inflammatory pain in a rat complete Freund's adjuvant model. *J Pharmacol Sci* **123**: 256-266.

【その他】

Abdulaev NG, and Ringe KD. (1998) Light-induced exposure of the cytoplasmic end of transmembrane helix seven in rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12854-12859.

Acharya S, and Karnik SS. (1996) Modulation of GDP release from transducin by the conserved Glu134-Arg135 sequence in rhodopsin. *J Biol Chem* **271**: 25406-25411.

Aggarwal R and Ryan CJ. (2011) Castration-resistant prostate cancer: Targeted therapies and individualized treatment. *Oncologist* **16**: 264-275.

Amadesi S, Grant AD, Cottrell GS, Vaksman N, Poole DP, Rozengurt E, and Bunnett

NW. (2009) Protein kinase D isoforms are expressed in rat and mouse primary sensory neurons and are activated by agonists of protease-activated receptor 2. *J Comp Neurol* **516**: 141-156.

Antony GK, Dudek AZ. (2010) Interleukin 2 in cancer therapy. *Curr Med Chem* **17**: 3297-3302.

Arrowsmith J. (2011a) Trial watch: phase III and submission failures: 2007-2010. *Nat Rev Drug Discov* **10**: 87.

Arrowsmith J. (2011b) Trial watch: Phase II failures: 2008-2010. *Nat Rev Drug Discov* **10**: 328-329.

Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Margolin K, Abrams J, Sznol M, Parkinson D, Hawkins M, Paradise C, Kunkel L and Rosenberg SA. (1999) High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: Analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol* **17**: 2105-2116.

Audet M, and Bouvier M. (2012) Restructuring G-protein-coupled receptor activation. *Cell* **151**: 14-23.

Baldwin JM, Schertler GF, Unger VM (1997) An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors. *J Mol Biol* **272**: 144-164.

Ballesteros J, Kitanovic S, Guarnieri F, Davies P, Fromme BJ, Konvicka K, Chi L, Millar RP, Davidson JS, Weinstein H, and Sealfon SC. (1998) Functional microdomains in G-protein-coupled receptors. The conserved arginine-cage motif in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem* **273**: 10445-10453.

Bander NH, Milowsky MI, Nanus DM, Kostakoglu L, Vallabhajosula S and Goldsmith SJ. (2005) Phase I trial of ¹⁷⁷lutetium-labeled J591, a monoclonal antibody to

prostate-specific membrane antigen, in patients with androgen-independent prostate cancer. *J Clin Oncol* **23**: 4591-4601.

Becker JC, Pancook JD, Gillies SD, Furukawa K and Reisfeld RA. (1996a) T-Cell-mediated eradication of murine metastatic melanoma induced by targeted interleukin 2 therapy. *J Exp Med* **183**: 2361-2366.

Becker JC, Varki N, Gillies SD, Furukawa K and Reisfeld RA. (1996b) An antibody-interleukin 2 fusion protein overcomes tumor heterogeneity by induction of a cellular immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 7826-7831.

Becker JC, Varki N, Gillies SD, Furukawa K and Reisfeld RA. (1996c) Long-lived and transferable tumor immunity in mice after targeted interleukin-2 therapy. *J Clin Invest* **98**: 2801-2804.

Biburger M, Aschermann A, Schwab I, Lux A, Albert H, Danzer H, Woigk M, Dudziak D and Nimmerjahn F. (2011) Monocyte subsets responsible for immunoglobulin G-dependent effector functions *in vivo*. *Immunity* **35**: 932-944.

Bostwick DG, Pacelli A, Blute M, Roche P and Murphy GP. (1998) Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: A study of 184 cases. *Cancer* **82**: 2256-2261.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, and Julius D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**: 816-824.

Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitzi KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, and Julius D. (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* **288**: 306-313.

Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, and Yaksh TL. (1994) Quantitative

assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* **53**: 55-63.

Cheng Y, and Prusoff WH. (1973) Relationship between the inhibition constant (K_I) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **22**: 3099-3108.

Chu CJ, Huang SM, De Petrocellis L, Bisogno T, Ewing SA, Miller JD, Zipkin RE, Daddario N, Appendino G, Di Marzo V, and Walker JM. (2003) *N*-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *J Biol Chem* **278**: 13633-13639.

Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, and Julius D. (2001) Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature* **411**: 957-962.

Connor JP, Felder M, Hank J, Harter J, Gan J, Gillies SD and Sondel P. (2004) Ex vivo evaluation of anti-EpCAM immunocytokine huKS-IL2 in ovarian cancer. *J Immunother* **27**: 211-219.

Crandall M, Kwash J, Yu W, and White G. (2002) Activation of protein kinase C sensitizes human VR1 to capsaicin and to moderate decreases in pH at physiological temperatures in *Xenopus* oocytes. *Pain* **98**: 109-117.

Cui M, Honore P, Zhong C, Gauvin D, Mikusa J, Hernandez G, Chandran P, Gomtsyan A, Brown B, Bayburt EK, Marsh K, Bianchi B, McDonald H, Niforatos W, Neelands TR, Moreland RB, Decker MW, Lee CH, Sullivan JP, and Faltynek CR. (2006) TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists. *J Neurosci* **26**: 9385-9393.

Cullen BR. (1987) Use of eukaryotic expression technology in the functional analysis of cloned genes. *Methods Enzymol* **152**: 684-704.

Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, and Sheardown SA. (2000) Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* **405**: 183-187.

Dixon RA, Sigal IS, Rands E, Register RB, Candelore MR, Blake AD, and Strader CD. (1987) Ligand binding to the beta-adrenergic receptor involves its rhodopsin-like core. *Nature* **326**: 73-77.

Donnelly D, Maudsley S, Gent JP, Moser RN, Hurrell CR, and Findlay JB. (1999) Conserved polar residues in the transmembrane domain of the human tachykinin NK2 receptor: functional roles and structural implications. *Biochem J* **339**: 55-61.

El Kouhen R, Surowy CS, Bianchi BR, Neelands TR, McDonald HA, Niforatos W, Gomtsyan A, Lee CH, Honore P, Sullivan JP, Jarvis MF, and Faltynek CR. (2005) A-425619 [1-Isoquinolin-5-yl-3-(4-trifluoromethyl-benzyl)-urea], a novel and selective Transient Receptor Potential Type V1 receptor antagonist, blocks channel activation by vanilloids, heat, and acid. *J Pharmacol Exp Ther* **314**: 400-409.

Farrens DL, Altenbach C, Yang K, Hubbell WL, and Khorana HG. (1996) Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* **274**: 768-770.

Frielle T, Daniel KW, Caron MG, and Lefkowitz RJ. (1988) Structural basis of beta-adrenergic receptor subtype specificity studied with chimeric beta 1/beta 2-adrenergic receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 9494-9498.

Gavva NR, Treanor JJ, Garami A, Fang L, Surapaneni S, Akrami A, Alvarez F, Bak A, Darling M, Gore A, Jang GR, Kesslak JP, Ni L, Norman MH, Palluconi G, Rose MJ, Salfi M, Tan E, Romanovsky AA, Banfield C, and Davar G. (2008) Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain* **136**: 202-210.

Gether U, Lin S, Ghanouni P, Ballesteros JA, Weinstein H, and Kobilka BK. (1997) Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta2 adrenoceptor. *EMBO J* **16**: 6737-6747.

Gether U, and Kobilka BK. (1998) G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* **273**: 17979-17982.

Goldenberg DM, Rossi EA, Stein R, Cardillo TM, Czuczman MS, Hernandez-Ilizaliturri FJ, Hansen HJ, and Chang CH. (2009) Properties and structure-function relationships of veltuzumab (hA20), a humanized anti-CD20 monoclonal antibody. *Blood* **113**: 1062-1070.

Holden SA, Lan Y, Pardo AM, Wesolowski JS and Gillies SD. (2001) Augmentation of antitumor activity of an antibody-interleukin 2 immunocytokine with chemotherapeutic agents. *Clin Cancer Res* **7**: 2862-2869.

Holzer P. (1988) Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* **24**: 739-768.

Honore P, Wismer CT, Mikusa J, Zhu CZ, Zhong C, Gauvin DM, Gomtsyan A, El Kouhen R, Lee CH, Marsh K, Sullivan JP, Faltynek CR, and Jarvis MF. (2005) A-425619 [1-isoquinolin-5-yl-3-(4-trifluoromethyl-benzyl)-urea], a novel transient receptor potential type V1 receptor antagonist, relieves pathophysiological pain associated with inflammation and tissue injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **314**: 410-421.

Huang J, Zhang X, and McNaughton PA. (2006) Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Curr Neuropharmacol* **4**: 197-206.

Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, and Oh U. (2000) Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases:

endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 6155-6160.

Imboden M, Murphy KR, Rakhmilevich AL, Neal ZC, Xiang R, Reisfeld RA, Gillies SD and Sondel PM. (2001) The level of MHC class I expression on murine adenocarcinoma can change the antitumor effector mechanism of immunocytokine therapy. *Cancer Res* **61**: 1500-1507.

Isogaya M., Yamagiwa Y., Fujita S., Sugimoto Y., Nagao T., and Kurose H. (1998) Identification of a key amino acid of the beta2-adrenergic receptor for high affinity binding of salmeterol. *Mol Pharmacol* **54**: 616-622.

Isogaya M, Sugimoto Y, Tanimura R, Tanaka R, Kikkawa H, Nagao T, and Kurose H. (1999) Binding pockets of the beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors for subtype-selective agonists. *Mol Pharmacol* **56**: 875-885.

Israeli RS, Powell CT, Corr JG, Fair WR and Heston WD. (1994) Expression of the prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res* **54**: 1807-1811.

Ji TH, Grossmann M, and Ji I. (1998) G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* **273**: 17299-177302.

Kantoff P, Petrylak DP, Pomerantz M, Israel RJ, Olson WC, Ramakrishna T and Morris S. (2010) First-in-human phase I trial of prostate-specific membrane antigen antibody drug conjugate (PSMA ADC) in taxane-refractory prostate cancer. ASCO Annu Meet Abstract no. TPS245.

Kato K, Yoshikawa K, Taki T, Shitara K, Nakamura K, Hirota M, Hanai N, Nakamura K, Kokubo H, Mitsui K, Yamada Y, Honda N, Ueda R, Saga S and Fukatsu H. (2003) Further investigation of the epitope recognized by the new monoclonal antibody 2C9. *Int J Urol* **10**: 439-444.

Kawachi MH, Bahnson RR, Barry M, Busby JE, Carroll PR, Carter HB, Catalona WJ,

Cookson MS, Epstein JI, Etzioni RB, Giri VN, Hemstreet GP 3rd, Howe RJ, Lange PH, Lilja H, Loughlin KR, Mohler J, Moul J, Nadler RB, Patterson SG, Presti JC, Stroup AM, Wake R and Wei JT. (2010) NCCN clinical practice guidelines in oncology: Prostate cancer. *J Natl Compr Canc Netw* **8**: 162-200.

Kendra K, Gan J, Ricci M, Surfus J, Shaker A, Super M, Frost JD, Rakhmilevich A, Hank JA, Gillies SD and Sondel PM. (1999) Pharmacokinetics and stability of the ch14.18-interleukin-2 fusion protein in mice. *Cancer Immunol Immunother* **48**: 219-229.

Khasar SG, Lin YH, Martin A, Dadgar J, McMahon T, Wang D, Hundle B, Aley KO, Isenberg W, McCarter G, Green PG, Hodge CW, Levine JD, and Messing RO. (1999) A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. *Neuron* **24**: 253-260.

Kikkawa H, Isogaya M, Nagao T, and Kurose H. (1998) The role of the seventh transmembrane region in high affinity binding of a beta 2-selective agonist TA-2005. *Mol Pharmacol* **53**: 128-134.

King DM, Albertini MR, Schalch H, Hank JA, Gan J, Surfus J, Mahvi D, Schiller JH, Warner T, Kim K, Eickhoff J, Kendra K, Reisfeld R, Gillies SD and Sondel P. (2004) Phase I clinical trial of the immunocytokine EMD 273063 in melanoma patients. *J Clin Oncol* **22**: 4463-4473.

Kitagawa Y, Tamai I, Hamada Y, Usui K, Wada M, Sakata M, and Matsushita M. (2013) The Orally Administered Selective TRPV1 Antagonist, JTS-653, Attenuates Chronic Pain Refractory to Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs in Rats and Mice Including Post-herpetic Pain. *J Pharmacol Sci* **122**: 128-137.

Ko YJ, Bublely GJ, Weber R, Redfern C, Gold DP, Finke L, Kovar A, Dahl T and Gillies SD. (2004) Safety, pharmacokinetics, and biological pharmacodynamics of the immunocytokine EMD 273066 (huKS-IL2): Results of a phase I trial in patients with

prostate cancer. *J Immunother* **27**: 232-239.

Konvicka K, Guarnieri F, Ballesteros JA, and Weinstein H. (1998) A proposed structure for transmembrane segment 7 of G protein-coupled receptors incorporating an asn-Pro/Asp-Pro motif. *Biophys J* **75**: 601-611.

Kurose H, Isogaya M, Kikkawa H, and Nagao T. (1998) Domains of beta1 and beta2 adrenergic receptors to bind subtype selective agonists. *Life Sci* **62**: 1513-1517.

Lattion A, Abuin L, Nenniger-Tosato M, and Cotecchia S. (1999) Constitutively active mutants of the beta1-adrenergic receptor. *FEBS Letters* **457**: 302-306.

Lebon G, Warne T, Tate CG. (2012) Agonist-bound structures of G protein-coupled receptors. *Curr Opin Struct Biol* **22**: 482-490.

Liu H, Rajasekaran AK, Moy P, Xia Y, Kim S, Navarro V, Rahmati R, and Bander NH. (1998) Constitutive and antibody-induced internalization of prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res* **58**: 4055-4060.

Lode HN, Xiang R, Dreier T, Varki NM, Gillies SD and Reisfeld RA. (1998) Natural killer cell-mediated eradication of neuroblastoma metastases to bone marrow by targeted interleukin-2 therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 2475-2480.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **39**: 265-275.

Ma D, Hopf CE, Malewicz AD, Donovan GP, Senter PD, Goeckeler WF, Maddon PJ and Olson WC. (2006) Potent antitumor activity of an auristatin-conjugated, fully human monoclonal antibody to prostate-specific membrane antigen. *Clin Cancer Res* **12**: 2591-2596.

Mathew P and DiPaola R. (2007) Taxane-refractory prostate cancer. *J Urol* **178**: S36-41.

McPherson GA, Malta E, Molenaar P, and Raper C. (1984) The affinity and efficacy of the selective beta 1-adrenoceptor stimulant RO363 at beta 1- and beta 2-adrenoceptor sites. *Br J Pharmacol* **82**: 897-904.

Mega AE, Petrylak DP, Kantoff P, Stephenson J, Vogelzang NJ, Dreicer R, Shore ND, Stambler N, Carpenito J, D'Ambrosio P and Israel RJ. (2012) Prostate-specific membrane antigen antibody drug conjugate (PSMA ADC): A phase I trial in metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) previously treated with a taxane. ASCO Annu Meet Abstract no. 4662.

Milowsky MI, Nanus DM, Kostakoglu L, Vallabhajosula S, Goldsmith SJ and Bander NH. (2004) Phase I trial of yttrium-90-labeled anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 for androgen-independent prostate cancer. *J Clin Oncol* **22**: 2522-2531.

Molenaar P, Sarsero D, Arch JR, Kelly J, Henson SM, and Kaumann AJ. (1997) Effects of (-)-RO363 at human atrial beta-adrenoceptor subtypes, the human cloned beta 3-adrenoceptor and rodent intestinal beta 3-adrenoceptors. *Br J Pharmacol* **120**: 165-176.

Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Iida T, Segi E, Sugimoto Y, Tominaga T, Narumiya S, and Tominaga M. (2005) Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Mol Pain* **1**: 3.

Mullard A. (2011) 2010 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov* **10**: 82-85.

Nakamura K, Tanaka Y, Fujino I, Hirayama N, Shitara K and Hanai N. (2000) Dissection and optimization of immune effector functions of humanized anti-ganglioside GM2 monoclonal antibody. *Mol Immunol* **37**: 1035-1046.

Nanus DM, Milowsky MI, Kostakoglu L, Smith-Jones PM, Vallabhajosula S, Goldsmith SJ, Bander NH. (2003) Clinical use of monoclonal antibody HuJ591 therapy:

Targeting prostate specific membrane antigen. *J Urol* **170**: S84-88.

Neal ZC, Yang JC, Rakhmilevich AL, Buhtoiarov IN, Lum HE, Imboden M, Hank JA, Lode HN, Reisfeld RA, Gillies SD and Sondel PM. (2004) Enhanced activity of hu14.18-IL2 immunocytokine against murine NXS2 neuroblastoma when combined with interleukin 2 therapy. *Clin Cancer Res* **10**: 4839-4847.

Nimmerjahn F and Ravetch JV. (2008) Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* **8**: 34-47.

Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, and Tominaga M. (2002) Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cε and identification of two target serine residues. *J Biol Chem* **277**: 13375-13378.

Ortiz-Sánchez E, Helguera G, Daniels TR and Penichet ML. (2008) Antibody-cytokine fusion proteins: Applications in cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* **8**: 609-632.

Osenga KL, Hank JA, Albertini MR, Gan J, Sternberg AG, Eickhoff J, Seeger RC, Matthay KK, Reynolds CP, Twist C, Krailo M, Adamson PC, Reisfeld RA, Gillies SD and Sondel PM. (2006) A phase I clinical trial of the hu14.18-IL2 (EMD 273063) as a treatment for children with refractory or recurrent neuroblastoma and melanoma: A study of the Children's Oncology Group. *Clin Cancer Res* **12**: 1750-1759.

Palazzo E, Luongo L, de Novellis V, Rossi F, Marabese I, and Maione S. (2012) Transient receptor potential vanilloid type 1 and pain development. *Curr Opin Pharmacol* **12**: 9-17.

Pammolli F, Magazzini L, Riccaboni M. (2011) The productivity crisis in pharmaceutical R&D. *Nat Rev Drug Discov* **10**: 428-438.

Perlman JH, Colson AO, Wang W, Bence K, Osman R, and Gershengorn MC. (1997) Interactions between conserved residues in transmembrane helices 1, 2, and 7 of the

thyrotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem* **272**: 11937-11942.

Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara PN Jr., Jones JA, Taplin ME, Burch PA, Berry D, Moinpour C, Kohli M, Benson MC, Small EJ, Raghavan D and Crawford ED. (2004) Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Eng J Med* **351**: 1513-1520.

Petrylak DP, Kantoff PW, Frank RC, Shore ND, Rotshteyn Y, Israel RJ, Olson WC, Ramakrishna T and Morris S. (2011) Prostate-specific membrane antigen antibody-drug conjugate (PSMA ADC): A phase I trial in taxane-refractory prostate cancer. ASCO Annu Meet Abstract no.4650.

Petrylak DP, Kantoff PW, Mega AE, Dreicer R, Frank RC, Shore ND, Morris S, Olson WC and Israel RJ. (2012) Prostate-specific membrane antigen antibody drug conjugate (PSMA ADC): A phase I trial in men with prostate cancer previously treated with taxane. ASCO Genitourinary Cancer Symp Abstract no. 107.

Pomonis JD, Harrison JE, Mark L, Bristol DR, Valenzano KJ, and Walker K. (2003) *N*-(4-Tertiarybutylphenyl)-4-(3-cholorpyridin-2-yl)tetrahydropyrazine-1(2*H*)-carbox-amide (BCTC), a novel, orally effective vanilloid receptor 1 antagonist with analgesic properties: II. *in vivo* characterization in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* **306**: 387-393.

Premkumar LS, and Ahern GP. (2000) Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* **408**: 985-990.

Rask-Andersen M, Almén MS and Schiöth HB. (2011) Trends in the exploitation of novel drug targets. *Nat Rev Drug Discov* **10**: 579-590.

Rasmussen SG, Jensen AD, Liapakis G, Ghanouni P, Javitch JA, and Gether U. (1999) Mutation of a highly conserved aspartic acid in the beta2 adrenergic receptor: constitutive activation, structural instability, and conformational rearrangement of

transmembrane segment 6. *Mol Pharmacol* **56**: 175-184.

Ribas A, Kirkwood JM, Atkins MB, Whiteside TL, Gooding W, Kovar A, Gillies SD, Kashala O and Morse MA. (2009) Phase I/II open-label study of the biologic effects of the interleukin-2 immunocytokine EMD 273063 (hu 14.18-1L2) in patients with metastatic malignant melanoma. *J Transl Med* **7**: 68.

Rohrer DK, and Kobilka BK. (1998) Insights from *in vivo* modification of adrenergic receptor gene expression. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**: 351-373.

Rosenberg SA, Yang JC, White DE and Steinberg SM. (1998) Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: Identification of the antigens mediating response. *Ann Surg* **228**: 307-319.

Rowbotham MC, Nothaft W, Duan WR, Wang Y, Faltynek C, McGaraughty S, Chu KL, and Svensson P. (2011) Oral and cutaneous thermosensory profile of selective TRPV1 inhibition by ABT-102 in a randomized healthy volunteer trial. *Pain* **152**: 1192-1200.

Saku O, Ishida H, Atsumi E, Sugimoto Y, Kodaira H, Kato Y, Shirakura S, and Nakasato Y. (2012) Discovery of novel 5,5-diarylpentadienamides as orally available transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) antagonists. *J Med Chem* **55**: 3436-3451.

Scheer A, Fanelli F, Costa T, De Benedetti PG, and Cotecchia S. (1996) Constitutively active mutants of the alpha 1B-adrenergic receptor: role of highly conserved polar amino acids in receptor activation. *EMBO J* **15**: 3566-3578.

Scheer A, Fanelli F, Costa T, De Benedetti PG, and Cotecchia S. (1997) The activation process of the alpha1B-adrenergic receptor: potential role of protonation and hydrophobicity of a highly conserved aspartate. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 808-813.

Sealfon SC, Chi L, Ebersole BJ, Rodic V, Zhang D, Ballesteros JA, and Weinstein H. (1995) Related contribution of specific helix 2 and 7 residues to conformational

activation of the serotonin 5-HT_{2A} receptor. *J Biol Chem* **270**: 16683-16688.

Sheikh SP, Zvyaga TA, Lichtarge O, Sakmar TP, and Bourne HR. (1996) Rhodopsin activation blocked by metal-ion-binding sites linking transmembrane helices C and F. *Nature* **383**: 347-350.

Siegel R, Naishadham D and Jemal A. (2012) Cancer Statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* **62**: 10-29.

Srinivasan R, Wolfe D, Goss J, Watkins S, de Groat WC, Scultoreanu A, and Glorioso JC. (2008) Protein kinase C epsilon contributes to basal and sensitizing responses of TRPV1 to capsaicin in rat dorsal root ganglion neurons. *Eur J Neurosci* **28**: 1241-1254.

Strader CD, Sigal IS, Candelore MR, Rands E, Hill WS, and Dixon RA. (1988) Conserved aspartic acid residues 79 and 113 of the beta-adrenergic receptor have different roles in receptor function. *J Biol Chem* **263**: 10267-10271.

Strader CD, Candelore MR, Hill WS, Sigal IS, and Dixon RA. (1989) Identification of two serine residues involved in agonist activation of the beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem* **264**: 13572-13578.

Strader CD, Fong TM, Tota MR, and Underwood D. (1994) Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem* **63**: 101-132.

Sweat SD, Pacelli A and Murphy GP. (1998) Prostate-specific membrane antigen expression is greatest in prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. *Urology* **52**: 637-640.

Tanimura R, Kidera A, Nakamura H. (1994) Determinants of protein side-chain packing. *Protein Sci* **3**: 2358-2365.

Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Théodore C,

James ND, Turesson I, Rosenthal MA and Eisenberger MA. (2004) Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Eng J Med* **351**: 1502-1512.

Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, and Julius D. (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* **21**: 531-543.

Tominaga M, Wada M, and Masu M. (2001) Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 6951-6956.

Tominaga M. (2004) Molecular mechanisms of thermosensation. *Nihon Yakurigaku Zasshi* **124**: 219-227.

Tsuchiya Y, Yang ZB, Nakahashi S and Arika T. (1993) Acceleration of natural killer (NK) cell recovery by a glucan, sizofiran, in anti-asialoGM1 antibody-treated mice. *Int J Immunopharmacol* **15**: 783-792.

Uchida J, Hamaguchi Y, Oliver JA, Ravetch JV, Poe JC, Haas KM and Tedder TF. (2004) The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. *J Exp Med* **12**: 1659-1669.

Valenzano KJ, Grant ER, Wu G, Hachicha M, Schmid L, Tafesse L, Sun Q, Rotshteyn Y, Francis J, Limberis J, Malik S, Whittemore ER, and Hodges D. (2003) *N*-(4-tertiarybutylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl)tetrahydropyrazine-1(2*H*)-carboxamide (BCTC), a novel, orally effective vanilloid receptor 1 antagonist with analgesic properties: I. *in vitro* characterization and pharmacokinetic properties. *J Pharmacol Exp Ther* **306**: 377-386.

Vellani V, Mapplebeck S, Moriondo A, Davis JB, and McNaughton PA. (2001) Protein

kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J Physiol* **534**: 813-825.

Wang W, Cui Q, Li Y, Li B, Yang X, Cui L, Jin H, and Qu L. (2010) The role of ERK-1/2 in the N/OFQ-induced inhibition of delayed rectifier potassium currents. *Biochem Biophys Res Commun* **394**: 1058-1062.

Watabiki T, Kiso T, Kuramochi T, Yonezawa K, Tsuji N, Kohara A, Kakimoto S, Aoki T, and Matsuoka N. (2011) Amelioration of neuropathic pain by novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist AS1928370 in rats without hyperthermic effect. *J Pharmacol Exp Ther* **336**: 743-750.

Welner LM, Murray JC and Shuptrine CW. (2012) Antibody-based immunotherapy of cancer. *Cell* **148**: 1081-1084.

Wieland K, Zuurmond HM, Krasel C, Ijzerman AP, and Lohse MJ. (1996) Involvement of Asn-293 in stereospecific agonist recognition and in activation of the beta 2-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 9276-9281.

Wright GL Jr, Grob BM, Haley C, Grossman K, Newhall K, Petrylak D, Troyer J, Konchuba A, Schellhammer PF and Moriarty R. (1996) Up-regulation of prostate-specific membrane antigen after androgen-deprivation therapy. *Urology* **48**: 326-334.

Xiang R, Lode HN, Dolman CS, Dreier T, Varki NM, Qian X, Lo KM, Lan Y, Super M, Gillies SD and Reisfeld RA. (1997) Elimination of established murine colon carcinoma metastases by antibody-interleukin 2 fusion protein therapy. *Cancer Res* **57**: 4948-4955.

Xiang R, Lode HN, Gillies SD and Reisfeld RA. (1999) T-Cell memory against colon carcinoma is long-lived in the absence of antigen. *J Immunol* **163**: 3676-3683.

Zhou WZ, Flanagan C, Ballesteros JA, Konvincka K, Davidson JS, Weinstein H, Millar RP, and Sealfon SC. (1994) A reciprocal mutation supports helix 2 and helix 7

proximity in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol Pharmacol* **45**: 165-170.

Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sörgård M, Di Marzo V, Julius D, and Högestätt ED. (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* **400**: 452-457.

経済産業省. (2005) 『技術戦略マップ』 <http://www.meti.go.jp/committee/materials/downloadfiles/g50421a21j.pdf>

経済産業省. (2010) 『技術戦略マップ 2010 バイオテクノロジー ①創薬・診断分野』 http://www.meti.go.jp/policy/economy/gijutsu_kakushin/kenkyu_kaihatu/str2010/a4_1.pdf

厚生労働省. (2013) 『今後のがん研究の有り方について「根治・予防・共生 ～患者・社会と協働するがん研究」』 今後のがん研究あり方に関する有識者会議. <http://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10901000-Kenkoukyoku-Soumuka/0000024969.pdf>

国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部. 『抗体医薬品に関する情報』 <http://www.nihs.go.jp/dbcb/mabs.html>

長野哲雄, 夏苺英昭, 原博 編. (2004) 『創薬化学 第1版』 東京化学同人.

中林哲夫. (2012) 『プラセボ対照試験の導入後に見えてきた課題、臨床開発の動向、そして必要な取り組み』 第22回日本臨床精神神経薬理学会・第42回日本神経精神薬理学会合同年会治験教育セミナー. http://www.pmda.go.jp/regulatory/file/presentation/new_drug/SP-B-7nakabayashi.pdf

橋本せつ子, 森本香織 編. (2009) 『Biacore を用いた相互作用解析実験法』

Springer Japan.

吉田稔. (2013) 『アカデミアの創薬スクリーニング:分子標的からリード化合物発見への戦略 基礎の基礎』 細胞工学 **32**: 634-637.

【研究業績】

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="308 387 1473 566">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 data-bbox="236 611 1473 824">○ 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> 123(3): 256-66. November 2013, <u>Yoshiyuki Sugimoto</u>, Hiroko Miura-Kusaka, Kiyotoshi Mori, Yoza 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 data-bbox="236 869 1473 1048">○ 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 data-bbox="308 1081 1473 1227">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 data-bbox="308 1261 1473 1406">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 data-bbox="308 1440 1473 1585">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 data-bbox="308 1619 1473 1765">7. Mechanism underlying the block of human Cav3.2 T-type Ca²⁺ channels by benidipine, a dihydropyridine Ca²⁺ 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 data-bbox="308 1798 1473 1944">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.

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. β_1 アドレナリン受容体選択的アゴニスト(-)-RO363 の β_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. β 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 回日本心脈管作動物質学会(津). 1999年2月. <u>杉本義幸</u> , 谷村隆次, 長尾拓, 黒瀬等. 3. β 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^{2+} Channel Blocker, Inhibits Aldosterone Secretion through T-type Ca^{2+} 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 α_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 α_1 アドレナリン受容体刺激による $G_{12/13}$ を介した JNK 活性化経路と Ca^{2+} 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.

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)
講演 (続き)	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.
特許	<p>1. PENTADIENAMIDE DERIVATIVE. WO/2008/007780. International Filing Date: July 13 2007. Yoshisuke Nakasato, Osamu Saku, Eri Atsumi, <u>Yoshiyuki Sugimoto</u>, Hiroshi Ishida.</p> <p>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.</p>