

# 博士論文審査報告書

## 論 文 題 目

細胞膜蛋白質に作用する薬物の  
標的選択性と作用に関する研究

Selectivity and pharmacological effects of  
drugs that target cell surface proteins

申 請 者

杉本	義幸
Yoshiyuki	SUGIMOTO

生命理工学専攻 分子生理学研究

2014 年 2 月

ヒト疾患に対する治療薬は、多岐にわたる安全性、体内動態、薬効の諸条件を完全に満たさなくてはならない。このために有効な疾病治療薬を見出す創薬には、膨大なプロセスと資源の投入を要する。例えば数十万～数百万種の化合物ライブラリーから疾病治療薬候補分子をスクリーニングする手法では、臨床試験で成功する確率は最終的に数万分の一に過ぎない。しかしヒトゲノム情報が解読されて以後、疾病・病態の分子基盤の解明が進み、より合理的な創薬標的の設定が可能になってきた。個々の細胞は適切な機能を発揮し、種々の蛋白質を発現する。特に細胞膜蛋白質は、組織環境の変動や異常を細胞内に伝えるゲートウェイとして機能する。実際に、細胞膜蛋白質と相互作用をもつ低分子薬物、サイトカインや抗体医薬など、上市された医薬品の約半数は細胞膜蛋白質を標的とする。こうした創薬では、薬効に関して、(1) 標的蛋白質に対する高い選択性、(2) 疾患治療に有益な薬理作用、(3) 病態と関連する機能指標による薬物選択プロセス (スクリーニング)、の三点が極めて重要である。本研究は、これらの3種の課題解決を目指した。すなわち $\beta 1$  アドレナリン受容体アゴニスト、サイトカイン融合抗体、カプサイシン (バニロイド) 拮抗薬の研究を各々の課題解決モデルとして位置づけ、疾患治療薬創製を順次展開した。

第1章では、創薬における薬物設計と、分子標的薬に関する知見と課題をまとめている。医薬品の約半数は細胞膜蛋白質を標的とする。技術発展はありながら創薬の成功確率は向上せず、有効な標的蛋白質の選択や、標的分子に対する薬物候補分子の作用の最適化が大きな課題となっている。特に標的に最適な候補分子を選択する方法論が確立されていない。これらが創薬研究の大きな課題となっていることを論じ、本研究を行う意義を示した。

第2章では、課題(1)、すなわち標的蛋白質に対する薬物の選択性に関する $\beta$  アドレナリン受容体アゴニストの検討例を示した。 $\beta$  アドレナリン受容体は交感神経の作用組織に発現するG蛋白質共役型受容体(GPCR)の一種であり、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ のサブタイプがある。各々の受容体はそれぞれ、心筋、気管支平滑筋、脂肪組織で多く発現している。内因性のアゴニストであるノルエピネフリンは交感神経刺激の伝達を担い、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ の各サブタイプに対して選択性なく作用を示す。ノルエピネフリンなどのカテコラミン類は、細胞膜貫通部位(TMD)に結合する。心筋の収縮に対して促進作用を有する $\beta 1$ 受容体アゴニスト化合物は、急性心不全治療薬として用いられているが、 $\beta 2$ 受容体(アゴニストは気管支拡張作用を示す)との選択性が副作用回避のために非常に重要である。そこで、カテコラミンと類似の部分構造を有し、かつ $\beta 1$ 受容体に高い選択性を有するアゴニスト(-)-RO363について、 $\beta 1$ 選択性を生じる受容体部位の同定を試みた。まず、 $\beta 1$ と $\beta 2$ の間でTMDを置換したキメラ受容体を作製し、(-)-RO363の受容体に対する結合の変化を解析した。その結果、N末端より第2および第7のTMD(TMD2およびTMD7)が(-)-RO363の結合に重要であることを示した。次に、TMD2

および TMD7 の中で  $\beta 1$  と  $\beta 2$  の間で保存されていないアミノ酸残基にアラニンスキャンニングを実施し、(-)-RO363 の受容体に対する結合の変化を解析した。その結果、TMD2 の Leu110、Thr117、TMD7 の Phe359 が重要であることを示した。さらに、 $\beta 1$  受容体の活性化状態を模倣する構成活性変異体 (Leu323Lys 変異体) に Leu110、Thr117、Phe359 の Ala 変異を導入し、(-)-RO363 の親和性低下幅を解析した。その結果、Phe359 の Ala 置換による親和性低下幅は構成活性変異体でより大きかった。従って、アゴニストの結合によるコンフォメーション変化により、Phe359 の位置が大きく変動することが示された。最後に、GPCR の一種、ロドプシンの立体構造より  $\beta 1$  受容体の構造モデルを構築し、 $\beta 1$  受容体と (-)-RO363 の結合について、実験結果を元に三次元モデルを構築した。このモデルは、より  $\beta 1$  選択性の高い  $\beta$  アドレナリン受容体アゴニストの創製に活用できる。

第 3 章では、課題 (2)、すなわち薬物の有益な薬理作用について、前立腺特異的膜抗原 (PSMA) に対する抗体の創出を事例に示した。PSMA は葉酸加水分解酵素、カルボキシペプチダーゼ酵素活性を有する II 型膜糖蛋白質である。PSMA は前立腺癌で特異的に高発現し、前立腺癌治療の標的分子として期待できる。PSMA の酵素活性を単純に阻害するだけでは、十分な抗腫瘍効果は示されない。そこで PSMA が細胞膜蛋白質であることに着目し、抗 PSMA マウスモノクローナル抗体 2C9 を利用した抗前立腺癌抗体医薬の創出に着手した。まず 2C9 抗体の性状や活性を解析し、前立腺癌治療抗体として有望であることを確認した。次に 2C9 の定常領域をヒト IgG1 型に置き換えたキメラ抗体 ch-2C9 を作製した。ヒト末梢血単核球細胞 (PBMC) をエフェクター細胞として、ヒト前立腺癌細胞株と ch-2C9 とを共存させたところ、癌細胞に対して抗体依存性細胞傷害活性を示した。さらに NK 細胞や T 細胞を介した免疫反応による抗腫瘍活性の増強を想定し、ch-2C9 と IL-2 との融合抗体 ch-2C9-IL-2 を作製した。抗体と共存させて活性化したヒト PBMC をエフェクター細胞として用い、抗体のヒト前立腺癌細胞株に対する細胞傷害活性を評価した。その結果、ch-2C9-IL-2 は ch-2C9 よりも高い細胞傷害活性を示した。このことから、IL-2 融合抗体化によるリンパ球の活性化が有効であることが *in vitro* で確認できた。さらにヒト前立腺癌細胞株のマウス *in vivo* 担癌モデルで抗腫瘍活性を評価したところ、ch-2C9-IL-2 は ch-2C9 よりも高い抗腫瘍活性を示した。以上は、薬物と細胞膜標的分子との相互作用する微小環境を分子設計に反映させ、薬効を向上させた成功例となった。

第 4 章では、課題 (3)、すなわち機能指標による薬物選択について、カプサイシン (バニロイド) 受容体 (TRPV1) アンタゴニストの検討結果を示した。TRPV1 は 6 回膜貫通型の非選択的カチオンチャネルである。唐辛子成分カプサイシンの受容体であり、酸や 43°C 以上の熱によっても活性化する。カプサイシン拮抗活性を指標に選別された TRPV1 アンタゴニスト化合物について、標的分子の生理機能と薬効との関連を調べる研究に着手した。TRPV1

は後根神経節、三叉神経節などの知覚神経に高発現し、TRPV1欠損マウスでは痛覚反応が抑制される。このことから、TRPV1アンタゴニストは疼痛治療薬となると期待しうる。炎症では、知覚神経の周囲でATPやブラジキニンなどのメディエーターが産生され、次いでGPCRを介した蛋白質キナーゼC (PKC)の活性化がおこる。TRPV1がPKCによりリン酸化を受けると、各種刺激に対する活性化閾値が減少する。特に、温度閾値は体温以下にまで下降するため、体温でTRPV1の活性化が生じ、疼痛機序に連鎖する。そこで、リン酸化による感作状態を模倣する*in vitro*試験系を検討した。ホルボールエステルによりPKCを活性化させ、TRPV1をリン酸化してカルシウム流入を惹起する試験系を構築した。本系でTRPV1アンタゴニスト群を評価したところ、代表化合物K-685はTRPV1に対して抑制活性を示した。*in vivo*炎症性疼痛モデルの評価では、K-685は機械刺激性アロディニアおよび温熱性痛覚過敏反応に対して抑制作用を示した。本結果は、リン酸化によるTRPV1感作模倣試験系が炎症性疼痛治療薬の選別評価に有用であることと、TRPV1アンタゴニストK-685が炎症性疼痛の治療薬となる可能性を示した。

第5章では、創薬プラットフォーム構築の視点から本研究を総括している。本研究で示した各々のモデルでは、解決できる課題、導入すべき局面が異なるが、各々の成果、知見を統合することで新たなアイデアを生む可能性がある。本研究で検討した方法論を創薬スキームの各段階で適応させ、成功確率を向上させる効果を論じている。さらに、創薬研究の課題およびその解決についての提言を今後の展望として述べている。

以上をまとめると、本研究は、細胞膜蛋白質を創薬標的とする疾患治療候補分子の創製に際し、現代の創薬プロセスにおける諸課題の解決手法を具体的に示した。特筆すべき点は、低分子医薬と抗体医薬の事例を組み合わせ考察を一般化した点である。“ゲノム創薬”の時代が到来したが、ヒトゲノム情報を単純に利用するだけでは、創薬の抱える本質的な課題は解決しない。新しい薬理機序を有する医薬の創製では、疾患・病態の分子基盤を正確に捉えて薬効を最適化し、成功確率を上げることが必要である。膨大な選択肢が取りうる創薬プロセスの中で、本研究は、経験則だけに依存せず、合理的な創薬設計手法を実証した。従って本研究は、よりよい医薬品の創製に繋げ、薬学、医学領域の発展に深く貢献するものと考えられる。よって本論文は博士（理学）の学位論文として相応しいものと認める。

2014年2月

(主査) 早稲田大学教授	博士（理学）（早稲田大学）	加藤 尚志
早稲田大学教授	理学博士（早稲田大学）	並木 秀男
早稲田大学教授	理学博士（名古屋大学）	大山 隆
早稲田大学研究招聘教授	医学博士（東京大学）	浅野 茂隆