

〔別紙2〕

審査の結果の要旨

氏名 鈴木 聡文

肺高血圧症は肺動脈圧の上昇を認め、呼吸困難や心不全を引き起こし、適切な治療をしない場合には発症から平均3年で死に至る難治性希少疾患である。本疾患では内因性プロスタサイクリン(PGI₂)の産生低下が認められ、そのため身体活動に著しい制限のある重篤な患者にはPGI₂製剤の持続静注療法が適用される。しかし、PGI₂は非常に不安定であるため、有効血中濃度を下回ることがないように投与量を増やすと低血圧や出血傾向などの副作用を起こすなど、その治療法には種々の問題点があった。

ここで鈴木聡文君は、PGI₂受容体(IP)のアゴニストを探索するのではなく、アロステリックモジュレーターを開発することで、上記問題点を克服した新たな肺高血圧症治療薬の開発を目指した。これは肺高血圧症治療薬開発の新たなコンセプトである。アロステリックモジュレーターとは、受容体上で内因性アゴニストとは異なる部位に結合し、内因性アゴニストの受容体感受性を調節（本研究では、増強）する薬理作用を有した化合物である。アロステリックモジュレーターは、PGI₂とは別の部位に結合するので、PGI₂アナログ化合物ではなく、新規母核を有した化合物を取得できる可能性がある。すなわち、高い安定性で、経口投与可能な血中半減期の長い新薬が期待できる。これにより、不安定なPGI₂製剤を投与することなく、あるいは少量投与と併用すれば、副作用の軽減及び病態の改善が期待される。

まず大規模スクリーニングを実施するにあたり、IPはGs共役のGPCRであるため、IP刺激により産生されるcAMPを活性測定の指標とした。ヒトIP強制発現細胞にアゴニストであるIloprostと共に評価化合物を添加し、産生されたcAMPを定量することで化合物を評価した。14万強の化合物ライブラリーを対象にスクリーニングしたところ、Hit化合物TS-000005を得ることに成功し、その後、同様の母核を有する周辺化合物90種の中から、さらに高活性なTS-000040を得ることができた。さらに、TS-000005の構造を基に合成展開することで、さらに高活性な新規化合物TS-000065を創出することに成功した。

Epoprostenolの用量反応曲線を2倍左シフトさせるのに必要なTS-000065の濃度は 4.3 μMであった。また、アロステリックモジュレーターは、使用するアゴニストとの組み合わせが重要であることが知られており、TS-000065では、4種のIPアゴニストのうちEpoprostenol

あるいはBeraprostとの組み合わせの時の薬理活性は、他のアゴニストとのそれよりも高いことが明らかになった。

アロステリックモジュレーターは、アゴニストとは異なる部位に結合し、アゴニストの作用をモジュレートする。本研究で見出された化合物がアゴニストの結合部位に結合しないことを確かめるために、Binding assayを実施した。その結果、TS-000040及びTS-000065はアゴニストと競合することなく、受容体感受性を向上させていることが示唆された。さらにTS-000065の作用がIPを直接介していること確認するために、 β -Arrestin recruitmentアッセイ及び受容体Internalizationアッセイを実施した。これは、IP刺激によって引き起こされる β -Arrestin recruitment及び受容体Internalizationを、遺伝子改変したIP及び β -Galactosidaseを用いて評価する手法である。この結果、cAMPアッセイの時と同様にTS-000065はBeraprostの用量反応曲線を左シフトさせたため、TS-000065の作用はIPを介していることが確認された。

本研究で見出されたヒット化合物はキラルな化合物である。そのキラリティーと薬理活性との関係性を検討するため、キラルカラムで光学分割したところ、先に溶出した化合物のみ薬理活性を有していたことから、立体選択的アロステリックモジュレーターであることを明らかにした。

ここまではすべて遺伝子組換え体を用いて被検化合物を評価してきたが、創薬コンセプトを検証する上で、標的細胞で同様の作用を確認する必要がある。本研究の標的細胞は、肺動脈血管平滑筋細胞であるが、そのモデルとしてヒト大動脈血管平滑筋細胞を用いてcAMPアッセイを実施したところ、TS-000065はEpoprostenolの用量反応曲線を左シフトさせ、その左シフト値は3.9 μ Mであり、これまでと同様の結果が得られた。すなわち、生体内で標的臓器及び標的細胞のIPにTS-000065が作用することができれば、仮説通りにアロステリックモジュレーター作用が認められ、Epoprostenolの血管拡張作用は増強されることが期待される。

PGI₂は、主に血管内皮細胞で産生され、血管平滑筋を弛緩させることで血管拡張作用をもたらす。創薬コンセプトを検証する上で、任意の動物の摘出血管を用いて、その作用をTS-000065が増強させることを確認する必要がある。そこで、TS-000065の種差への影響を検討するために、マウス、ラット、モルモット、イヌ、ウサギ及びブタの6種のIP強制発現細胞を作製し、cAMPアッセイを実施したところ、モルモット、イヌ及びウサギの3種では、TS-000065の作用が確認されたため、モルモットの摘出血管を用いることにした。一方、マウス、ラット及びブタの3種では、TS-000065の作用は認められなかった。こうした種差の原因として、ヒトと各々の種間におけるIPのホモロジーが低いため、受容体を構成するアミノ酸の違いによって、TS-000065の受容体への結合が妨げられたことやアロステリック作用をもたらすようなコンフォメーションをとれなくなったことなどが考えられる。前述の結果を踏まえ、モルモット胸部大動脈リング標本を用いて、被検化合物がBeraprostの血管拡張作用を増強させることが可能かどうか確かめるために、マグヌス試験を実施した。その結果、TS-000065は、Beraprostの血管拡張作用を増強させた。また、PGI₂は血小板のIPに作用

して、血小板凝集抑制をもたらすことが知られている。そこでモルモット血小板を用いて、被検化合物の血小板への作用を確かめたところ、TS-000065は、Beraprostの血小板凝集抑制作用を増強させた。このように、Cell-based assayだけでなく血管拡張という指標でコンセプト検証できたことで、今後の*in vivo*への応用が強く期待された。

以上のように鈴木君は、IPのアロステリックモジュレーターを初めて見出し、創薬コンセプトを確立した。さらに、Hit化合物の構造を基に合成展開し、構造活性相関の知見を踏まえ、高活性な新規化合物を創出することに成功すると共に、立体選択的アロステリックモジュレーターであることを明らかにした。本研究の標的細胞モデルとして、ヒト大動脈血管平滑筋細胞を、及び標的組織モデルとしてモルモット胸部大動脈リング標本を用いて、新規化合物の有効性を確認した。本研究で開発されたIPのアロステリックモジュレーターは、First in classの医薬品リード化合物として位置づけられ、その知見及び成果は医学・薬学研究に貢献するものと期待できることから、本研究は博士(薬学)の授与に値するものと判断された。