

論文の内容の要旨

論文題目 GPCR を標的とした新規薬剤開発のための薬理学的研究

氏 名 桜 井 卓

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は7回膜貫通型の細胞膜受容体であり、外界からの信号を認識し細胞内に生理反応を惹起することで、細胞情報伝達機構の制御に深く関与する。GPCRはヒトゲノムにおいて巨大なスーパーファミリーを形成しており、無機及び有機イオン、金属、アミン、脂質、ペプチド、核酸など多種多様な分子種をリガンドとして認識することで、極めて広範囲のシグナル及び細胞機能制御に関与していることが知られている。従ってGPCRを介したシグナル伝達機構の解明は、生命現象の基礎や病態生理の理解とその合理的な治療法創出のために極めて重要である。また、現在臨床で使われている医薬品化合物の30%-50%はGPCRに作用しているとされ、GPCRは医薬品の標的分子としても重要である。こうした創薬標的分子としての重要性からGPCR研究が進む一方で、GPCRの活性化機構及びシグナル伝達機構は従来考えられていた以上に複雑であることが近年明らかとなってきた。これに伴い、安全で効果的な新薬を創出するために、薬物とGPCRの相互作用の分子機構の理解がより一層必要となっている。本研究ではGPCRを標的とした新規薬剤開発を目的として、異なるGPCRに作用する三種類のリード化合物を題材として、その受容体相互作用に関する分子機構の解明に取り組んだ。

第一章 GPR81 作動薬の探索及びリード化合物の薬理学的解析

GPR81は乳酸をリガンドとするGPCRであり、乳酸刺激に応答した脂肪分解抑制作用を有している。脂肪分解の抑制は、脂質の成分である血中遊離脂肪酸量の低下に繋がることから、GPR81は、脂質が過剰に蓄積する状態である脂質異常症の治療薬の創薬標的としての可能性が示唆されている。GPR81のサブタイプであるGPR109aは、ニコチン酸受容体であり、GPR81と同様に脂肪分解抑制作用を有している。ニコチン酸は脂質異常症の有効な治療薬として既に臨床の場で使用されている一方で、皮膚紅潮の副作用を惹起することが深刻な問題となっている。これはGPR109aが皮膚細胞に発現しているためだと考えられており、この点GPR81の発現は脂肪細胞に限局されていることから、GPR81選択的な作動薬の創出は、皮膚紅潮を伴わない新しい脂質異常症治療薬の創出に繋がることが期待される。

第一章では、high-throughput screening (HTS)によるGPR81選択的な作動薬の探索及び得られた化合物の薬理学的解析を実施した。まずGPR81安定発現細胞を用いた細胞内cAMP濃度測定系を構築し、約70万化合物に対してHTSを実施した。その結果、アミノチアゾール系のヒット化合物AT1を見出した。AT1は 810 ± 93 nMのEC₅₀値を示し、完全作動薬として挙動した。続いて、活性向上と物性改善を指向した最適化研究を実施し、リード化合物AT2を創出

した。AT2はAT1と同様にGPR81に対する完全作動薬であり、 58 ± 5.4 nMのEC₅₀値でGPR81を活性化した。一方で皮膚紅潮の原因分子であるGPR109aに対しては30 μMまで濃度を上げても活性を示さず、AT2はGPR81に対して極めて選択的な化合物であることが明らかとなった。続いて3T3-L1脂肪細胞を用いてAT2の作用を調べた。その結果、AT2はトリグリセリドから加水分解で生じるグリセロール量を濃度依存的に抑制することから、脂肪細胞において脂肪分解抑制作用を有することを確認した。また、AT2の脂肪分解抑制活性はニコチン酸のそれと同程度であることが示された。そこで動物モデルを使って、AT2の薬効及び副作用を調べた。10 mg/kgのAT2を絶食マウス及び給餌マウスに腹腔内投与したところ、血中遊離脂肪酸量はそれぞれ約35%及び50%低下することが確認された。この条件下でAT2が副作用を起こさないことを確認するために、皮膚紅潮の指標である皮膚血流量を測定した。その結果、ニコチン酸は顕著な血流量の上昇を惹起するのに対して、AT2投与時には血流量の上昇は認められなかった。

第二章 MCHR1拮抗薬MQ1の阻害様式に関する研究

MCHR1はメラニン凝集ホルモン(MCH)をリガンドとするGPCRであり、MCHR1欠損マウスを用いた機能解析などから摂食及びエネルギー消費に関わることが示唆されている。こうした知見からMCHR1の拮抗薬の抗肥満薬としての可能性に期待が集まっている。武田薬品工業株式会社では、MCHR1に対するHTS及び最適化研究を実施し、メチルキノリン系のリード化合物MQ1を創出した。

第二章では、MQ1のMCHR1阻害作用の分子機構の解明を試みた。MCHR1は、MCH刺激により、Gα_i、Gα_qそしてβ-アレスチンシグナル等の複数のシグナル経路を活性化することが知られている。そこでMQ1が各シグナルに与える影響を調べたところ、上記の全てのシグナル経路を同程度の強さで阻害することが明らかとなった。続いてMQ1の時間依存的な活性増強の可能性について調べた。その結果、MQ1は細胞フリーの結合試験系及びMCHR1安定発現細胞を用いた細胞系いずれにおいても、反応時間を伸ばすことで阻害活性が増強することを確認した。続いてこの時間依存性が、化合物の受容体からの解離速度の遅さに起因する可能性を検証するために、ウォッシュアウト実験を実施した。化合物とMCHR1安定発現細胞を反応後、ウォッシュアウトを行い化合物の阻害活性に与える影響を調べた。この結果、MQ1の阻害活性はウォッシュアウトの有無によって大きく変化することはなく、MQ1の時間依存性は解離速度の遅さに起因することが示唆された。そこでMQ1の解離速度を直接的に調べるために、LC/MS/MSを用いた結合試験系を構築し、速度論的解析を実施した。その結果、MQ1の解離速度定数は 0.53 ± 0.024 h⁻¹であり、時間依存性の無い構造類縁体と比較すると、MQ1はMCHR1からゆっくりと解離する化合物であることが明らかとなった。最後にMQ1の結合部位に関する検証を行った。MCHの濃度依存曲線にMQ1が与える影響を調べたところ、MCHの最大活性を表すEmaxは、MQ1の濃度依存的に低下し、MQ1がアロステリックモジュレーターとしてMCHR1に作用する可能性が示唆された。アロステリックモジュレーターの特徴の一つは、受容体の構造変化を引

き起こすことで、オルソステリックリガンドの受容体への結合速度または解離速度を変化させることである。そこで放射性ラベルした $[^{125}\text{I}]\text{MCH-(4-19)}$ を用いた速度論的解析を実施し、MQ1が $[^{125}\text{I}]\text{MCH-(4-19)}$ の解離速度に与える影響を調べた。その結果、MQ1非存在下での $[^{125}\text{I}]\text{MCH-(4-19)}$ の解離速度は $0.13 \pm 0.028 \text{ min}^{-1}$ であるのに対し、MQ1を添加するとその解離速度は $0.011 \pm 0.0031 \text{ min}^{-1}$ に有意に変化することが明らかとなり、MQ1がMCHR1のアロステリックサイトに結合することが示された。更にMQ1がMCHとは異なるサイトに結合することをより直接的に示すために、MCHR1のトランスメンブレン(TM)ヘリックスに部位特異的な変異導入を行った。その結果、Thr²⁰⁹及びGln²⁷⁶のアラニン置換は、MQ1の活性には影響を与えずにMCHのpEC₅₀値を有意に低下させるのに対し、Ala¹³⁶及びHis¹⁴⁷の変異体は、MCHのpEC₅₀値には影響を与えることなく、MQ1のIC₅₀値を有意に低下させた。これらの結果はMQ1とMCHの結合に関与するアミノ酸が異なることを示しており、両化合物が異なるサイトに結合することを裏付けるものである。以上、複数シグナルの阻害、受容体からの遅い解離及びアロステリックモジュレーションの3つの特徴は、いずれも*in vivo*で強力な薬効を発揮するための重要なプロパティであり、MQ1が拮抗薬とし優れたプロファイルを有していることが示された。

第三章 MT₂メラトニン受容体選択的部分作動薬の薬理的解析

メラトニンは睡眠周期の調節を行うことで生物学的機能のサーカディアンリズム(概日リズム)に関与する神経ホルモンである。メラトニンの機能はMT₁及びMT₂と呼ばれる2種類のメラトニン受容体によって制御されると考えられている。MT₁受容体は、主に神経発火抑制作用や睡眠誘発作用を制御するのに対し、MT₂受容体は概日リズムの位相変化に関与するとされ、MT₂受容体は不眠症や概日リズム性睡眠障害等の治療薬の創薬標的としての可能性が期待されている。武田薬品工業株式会社では、メラトニンよりも強力な活性を有するMT₁/MT₂受容体作動薬の開発を目指した探索研究を実施し、その過程でMT₂受容体に選択的なインデノフラン系の作動薬IF1を創出した。

第三章では、新規睡眠障害治療薬の創出を目的として、IF1のMT₂受容体活性化機構の分子レベルの解析を実施した。2- $[^{125}\text{I}]$ iodomelatoninを用いた結合試験の結果、IF1はMT₂受容体に対して極めて高い親和性及び選択性を示した。続いて、IF1のMT₂受容体作動活性を細胞ベースの評価系で測定したところ、IF1は細胞内cAMP濃度測定系、ERK1/2のリン酸化測定系及びβ-アレスチンシグナル測定系のいずれの測定系においても部分作動薬として挙動した。一般的にβ-アレスチンシグナルはGPCRのインターナリゼーションに関与すると考えられている。そこでIF1がMT₂受容体のインターナリゼーションに与える影響を調べた。興味深いことに、IF1は部分作動薬であるにも関わらず、生理的リガンドのメラトニンよりも強烈的なインターナリゼーションを惹起することが明らかとなった。MT₂受容体に対する高度な選択性は、概日リズム性睡眠障害に特化した初めての治療薬としてのポテンシャルを示唆するものであり、また、強烈的なインターナリゼーション誘発作用は、薬剤投与時にのみ効果を発揮する切れ味の鋭い薬効に繋が

ることが期待される。以上より IF1 は選択性及びインターナリゼーション誘発の観点から、既存の不眠症治療薬とは異なるプロファイルを有していることが明らかとなった。

以上の研究結果より、AT2、MQ1 及び IF1 の三化合物が、新規脂質異常症治療薬、肥満治療薬そして睡眠障害治療薬のリード化合物として、優れたプロファイルを有していることを明らかとした。