

Title	Study on Selectin Blocker : Sugar Mimic using Molecular Modeling Method
Author(s)	平松, 靖幸
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/42850">http://hdl.handle.net/11094/42850</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	平 松 靖 幸 ひら まつ やす ゆき
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 15587 号
学位授与年月日	平成12年4月6日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Study on Selectin Blocker -Sugar Mimic using Molecular Modeling Method- (セレクチン阻害剤の研究—分子モデリングの手法による糖鎖ミミック)
論文審査委員	(主査) 教授 小林 祐次  (副査) 教授 高木 達也 教授 北 泰行 教授 土井 健史

#### 論文内容の要旨

炎症時において好中球、好酸球などの炎症性細胞の炎症組織への過剰な浸潤が炎症反応を増悪させ、種々の炎症性疾患を引き起こすことが知られている。炎症反応の初期段階で血管内皮細胞上の E-及び P-selectin と呼ばれる接着分子と血流中の炎症性細胞上のシアリルルス X (sLe<sup>x</sup>) と呼ばれる糖鎖との相互作用が生じる。この現象が引き金となり、炎症性細胞は炎症部位への浸潤へと導かれる。従って、セレクチンと sLe<sup>x</sup> との相互作用を阻害することが、各種炎症性疾患の治療につながると考え、その治療薬の開発に着手することとなった。

セレクチンには、E-selectin の他、血小板上及び血管内皮細胞上に発現する P-selectin、白血球細胞上に発現する L-selectin 等のサブタイプが存在する。これらのサブタイプも E-selectin の天然リガンドである sLe<sup>x</sup> と結合できることが明らかになっている。現在、セレクチン阻害剤の一つとして 5糖 sLe<sup>x</sup> 化合物 (cylexin) の臨床応用が検討されている。しかしながら、その実用化には複雑な糖鎖構造を有する sLe<sup>x</sup> の合成、天然糖鎖を持つ生体内での不安定性などの解決すべき問題が多く残されている。これらの問題を解決する手段として、糖鎖ミミックが考えられる。そこで、糖鎖ミミックの検討に着手することにしたが、現在糖鎖ミミックに関する一般的な方法は、見出されていない。

一般に、新たにリガンドをデザインする場合、ターゲット蛋白と既知リガンドの相互作用が解析される。一方、ターゲット蛋白が未知の場合は、活性の明らかになっている化合物群に対して構造活性相関が検討される。このようにして、活性発現に重要な官能基とその位置関係 (ファーマコフォア) が明らかになると、この情報を基に活性向上のための構造最適化が行われる。また、新たな骨格を見出すためには、3次元データベース検索あるいは、*de novo* デザインによる方法が用いられる。

このような創薬過程の手順は、新規セレクチン阻害剤を見出す上でも有効と考えられる。そこで我々はまず、天然リガンドである sLe<sup>x</sup> を用いて活性発現に重要な要素についての解析を検討した。現在、リガンド側 (sLe<sup>x</sup>) の構造活性相関及びレセプター側 (セレクチン) のポイントミュレーションデータが報告されている。また、NMR により推定されているセレクチンに結合する際の sLe<sup>x</sup> のコンフォメーションも明らかになっている。しかしながら、セレクチンのうち、その立体構造が明らかになっているのは、E-selectin のみで、他のサブタイプについては明らかにされていない。そこで、我々はまず E-selectin とリガンドとの複合体構造モデルの構築に着手した。

また、先に述べたように、セレクチンには E,R,L3種のセレクチンサブタイプが存在するが、どのセレクチンとリガンドとの結合をブロックすることが治療薬を見出す上で最も重要であるかは明らかになっていない。しかし、今後

それらを明らかにし、各セレクトインに対して特異的に結合する誘導体を見出すことは、治療薬を研究する上で意義あることである。そこで、次にサブタイプの一つの P-selectin とリガンドの結合様式解析のための検討を行った。

ここで得られたセレクトイン-リガンドの結合様式は、セレクトイン阻害活性を発現するためのファーマコフォアモデルを提示した。我々はこのモデルを満たす骨格として、ラクトース部分を Ser-Glu ジペプチド基に変換した化合物を見出した。このジペプチド構造には、アミノ酸の立体化学の違いから4つの立体異性体が存在するため、それぞれの立体異性体が合成され、その活性が確認された。その結果、E-selectin に対しては、ヘテロキラルな異性体 (L-Ser-D-Glu, D-Ser-L-Glu) は、優れた阻害活性を示し、ホモキラルな異性体 (L-Ser-L-Glu, D-Ser-D-Glu) の活性は、非常に弱いものであった。そこで、E-selectin に対する活性発現に及ぼす立体的効果を明確にするために、それぞれの立体異性体の E-selectin に対する相互作用様式を解析した。その結果、活性発現には重要な官能基の配置とともに  $\beta$ -turn 構造の形成が大きく寄与していることが示唆された。

さらに、新たに見出されたジペプチド誘導体には、糖骨格としてまだフコースが存在する。このフコースは、セレクトイン阻害活性に必須であることが報告されている。従って、この部位を非天然なものにミミックすることは、新たなセレクトインブロッカーを見出す上で重要である。そこで、先の Ser-Glu ジペプチド骨格を用いて、フコース部位を構造類似である非天然の5員環フコースへ変換することを検討した。その結果、この化合物は6員環フコース誘導体と同様に E-selectin に結合することが示された。つまり、sLe<sup>x</sup>のフコースは、非天然5員環フコースに変換可能であることが示された。

ここまで得られた知見から、セレクトイン-リガンドの結合様式の検討で得られたファーマコフォアモデルの有用性が示唆されている。このモデルを検索式として3次元データベース検索を行えば、新規骨格化合物が容易に見出されることが期待される。しかしながら、一般的な商用の試薬のデータベースは、ファーマコフォアに含まれるフコース、B30のような特殊な官能基を含む化合物は多く含まれない。そこで、活性発現に重要な官能基は、同機能を有する官能基に変換できると考え、新たなファーマコフォアモデルを構築した。このモデルを検索式として、3次元データベース検索を行ったところ、構造的に新規なセレクトイン阻害活性を有する化合物を見出した。さらにこの化合物の配座解析の結果から活性発現の要因を明らかにし、その知見に基づく構造最適化に成功した。

これら一連の検討によって、我々は糖鎖ミミックに成功し、構造的に新規なセレクトイン阻害剤を見出した。このことは、糖鎖をターゲットとした医薬品開発に新たな可能性を示すと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

末梢血中の好中菌、好酸菌などの炎症性細胞が炎症組織へ浸潤して、炎症修復機能を発揮する。しかしこの浸潤が継続し過剰に起こると炎症を悪化させる。したがってこの過剰な細胞浸潤を制御できれば各種炎症疾患の治療につながると思われる。本論文ではサイトカインにより血管内皮細胞上に発現誘導される接着分子 E-セレクトインが血流中の炎症性細胞上の糖鎖シアルルイス X (sLe<sup>x</sup>) と相互作用することで、細胞がローリング現象を起こし、これが引き金となって炎症部位への浸潤が始まる事に着目し、相互作用の阻害剤を探索した。まず E-セレクトインおよびそのサブタイプである P-セレクトインと sLe<sup>x</sup> の複合体モデルを分子動力学計算より構築した。次に共同研究者が見出した sLe<sup>x</sup> の硫酸基誘導体で強い阻害活性を示す GSC-150 について上の結果と比較し、Ser-Glu ジペプチドを骨格とする変換体を見出し、その構造活性相関を解析した。得られた情報よりファーマコフォアモデルを用いて3次元データベース検索から非糖非ペプチド新規骨格化合物を見出し、配座解析よりその最適化を行い糖鎖ミミックに成功した。以上のように平松君の本研究は糖鎖をターゲットとした創薬といった医薬品開発の新しい道を切り開くことに貢献するものであり、博士論文として価値あるものと認める。