

Title	腎障害におけるプロスタグランジン (PG) D2の関与に関する研究 : リポカリン型PGD合成酵素阻害薬AT-56の生化学的・薬理的解析および抗マウスDP2 (CRTH2) 受容体抗体の特性
Author(s)	永田, 奈々恵
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/67075
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (永田 奈々恵)

論文題名

腎障害におけるプロスタグランジン (PG) D₂ の関与に関する研究
-リポカリン型PGD 合成酵素阻害薬AT-56 の生化学的・薬理的解析および抗マウスDP2 (CRTH2) 受容体抗体の特性-

論文内容の要旨

プロスタグランジンD₂ (PGD₂) は、細胞膜のリン脂質の主成分であるアラキドン酸から産生される。まず、細胞膜のリン脂質からアラキドン酸が切り出され、その一部がシクロオキシゲナーゼ(COX)によりPGH₂に変換される。このPGH₂ を基質としてPGD合成酵素によりPGD₂が合成される。PGD合成酵素には、造血器型(H-PGDS, hematopoietic prostaglandin D synthase)とリポカリン型(L-PGDS, lipocalintype prostaglandin D synthase)の2種類が存在する。H-PGDSはグルタチオン転移酵素で、肥満細胞や抗原提示細胞、Th2 リンパ球に分布し、アレルギー反応や炎症反応の進展に関与する。L-PGDSは、ヒト脳脊髄液 (CSF, cerebrospinal fluid) 中の主要タンパク質の1つであるβ-traceと同じタンパク質であり、リポカリンファミリーに属する分子量26,000 の分泌タンパク質で、主に脳、心臓、生殖器で発現し、CSF、血液、精漿、尿など、様々な体液に分泌される。L-PGDSは、PGD₂の合成を触媒するだけでなく、脂溶性低分子の結合と輸送を行う、多機能タンパク質である。産生されたPGD₂は、2つのPGD₂受容体(DP1 とDP2 (CRTH2))を介して、血管拡張作用など、様々な生理作用を示す。また、肥満細胞やTh2リンパ球、マクロファージで産生され、炎症性の脂質メディエーターとして機能する。またPGD₂は、中枢神経系において、くも膜やオリゴデンドロサイトに発現するL-PGDSにより産生され、睡眠物質として機能する。

糖尿病性腎症では腎臓の糸球体が障害される。また、慢性腎臓病の進行過程において、不可逆的な腎臓の線維化が共通してみられる。これを抑制することで、腎臓の機能をより長く保つことが可能となり、患者のQOLを改善することが期待される。

糖尿病合併症の発症機序の1つであるポリオール代謝経路の活性亢進には、AKR1B1 (aldo-keto reductase 1B1) の活性亢進が関与する。AKR1B1はAKRスーパーファミリーの1員で、NADPHを補酵素として、ジカルボニル化合物を還元することが知られている。腎臓の近位尿細管では、AKR1B1によりグルコースから変換されたソルビトールが、フルクトースに変換され、フルクトキナーゼによって代謝される。フルクトース代謝過程では、ATPの消費、炎症性サイトカインの発現や酸化ストレスの増大などが起こり、尿細管間質障害の発症や慢性腎臓病の進展に関与することが報告されている。またAKR1B1は、糖尿病合併症の標的組織である末梢神経、網膜、水晶体や、腎臓などに分布している。従って、この代謝経路を調節しているAKR1B1の阻害剤が糖尿病性腎症の治療薬となる可能性を有している。

著者の属する研究グループでは、L-PGDSの尿中排泄量と腎障害との関連について研究を進めてきた。アドリアマイシン腎症マウスや糖尿病性腎症ラットの腎臓で、L-PGDS発現が亢進することを報告した。更に、DP2 (CRTH2) 受容体ノックアウトマウスでは腎臓の線維化が軽減することを報告した。これらは、PGD₂の合成酵素や受容体の阻害剤が、腎線維化を抑制して、慢性腎臓病の進行を遅延させる可能性を示唆している。また、AKR1B1がPGF_{2α}を産生することを報告した。更に、AKR1B1がNADPH非存在下でPGD₂を産生することを見出した。マウスAKRであるAKR1B3 は、FP受容体を介して脂質生成抑制に関与する。これは、AKRがPGFSとしても機能することを示している。従って、AKR1B1のPGDS活性やPGFS活性の阻害が、糖尿病性腎症の治療戦略の選択肢の1つとなる可能性が考えられる。AKR1B1は既にX線結晶構造が決定されており、AKR tetradと呼ばれる、Asp43、Tyr48、Lys77およびHis110の4つのアミノ酸残基が、AKR活性に重要であることが分かっている。一方、PGDS活性やPGFS活性については、詳細は分かっていた。

そこで本研究では、腎障害の病態の軽減を目標に、①PGD₂合成酵素の阻害、②PGD₂受容体の阻害、③PGD₂阻害以外のアプローチという、3つの観点から研究を行った。

まず、サル腎臓におけるL-PGDSの局在を明らかにするために、新規抗ヒトL-PGDS抗体を作製し、免疫染色や*in situ* hybridizationを行い、L-PGDSタンパクがヘンレループを含む遠位尿細管、ボウマン嚢や糸球体ポドサイトにおいて*de novo*合成されていることを明らかにした。この結果は、尿細管間質性にストレスがある状況下では、局所的に産生

されたL-PGDSが慢性腎臓病の進展に積極的に関与する可能性を示唆しており、L-PGDS阻害剤が腎症の病態軽減に有効であると考えられた。

そこで、先行研究により見出されていたAT-56のL-PGDS阻害活性について生化学的・薬理的に評価を行った。大腸菌を用いてL-PGDSを大量発現・精製し、反応速度論的解析を行った結果、AT-56はL-PGDSによるPGH₂からPGD₂への異性化反応を、PGH₂に対し競合的に阻害し、その*K_i*値は75 μMであることが明らかになった。更に、L-PGDSを構成的に発現するTE-671細胞において、AT-56は、Caイオノフォア刺激によるPGD₂産生を用量依存的に抑制したが、PGE₂およびPGF_{2α}産生には影響しなかった。また、ヒトL-PGDSを発現する、ヒトL-PGDS-TGマウスを用いたアレルギー性気道炎症モデルにおいて、AT-56は、気管支肺胞洗浄液中の全細胞数、好酸球および単球数を用量依存的に減少させた。薬物動態解析の結果、AT-56のBioavailabilityは82%と算出され、AT-56は経口投与可能なL-PGDS選択的阻害剤であることが示された。

次に、DP2受容体阻害の有効な戦略である、“DP2受容体に対するPGD₂の結合阻害”に対するアプローチの一つとして、機能性抗体の作製を目標に、受容体の表面抗原を認識する抗マウスDP2受容体抗体の作製を試み、MAb (monoclonal antibody)-1D8を得た。そして、MAb-1D8が、DP2受容体に対するPGD₂の結合を阻害するアンタゴニスト抗体であることを証明した。DP2受容体の結晶構造は未だ決定されていないことから、MAb-1D8のFabとDP2受容体との共結晶化ができれば、結晶を用いたX線結晶構造解析により、DP2受容体の三次元構造が決定され、より選択性の高い阻害薬の開発に結び付くことが期待できる。

先行研究により、AKR1B1がPGFSとしても機能することが分かっている。そこで、PGD₂阻害以外のアプローチとして、AKR1B1のPGF_{2α}産生機構について調べた。AKR1B1は、NADPH存在下ではPGF_{2α}を産生し、NADPH非存在下ではPGD₂を産生した。部位特異的変異導入実験により、AKR1B1のPGFS活性、PGDS活性反応機構を調べた。その結果、AKR活性には、AKR tetradと呼ばれるAsp43、Tyr48、Lys77およびHis110の4つのアミノ酸残基が重要であるが、これとは異なり、PGFS活性やPGDS活性は、Asp43、Lys77およびHis110の3つのアミノ酸残基でcatalytic triadとして活性を出していることを明らかにした。AKR1B1と基質PGH₂の複合体の構造について、ドッキング計算を行った結果、PGH₂は、AKR1B1の活性中心に結合可能であることが分かった。これらの結果から、AKR1B1のHis110が、Asp43やLys77と協奏的に働き、NADPH非存在下ではbaseとして機能してPGD₂を合成し、NADPH存在下ではacidとして機能してPGF_{2α}を合成する、と考えられた。本実験の結果は、AKR1B1のPGFS活性を抑制する選択的AKR1B1阻害剤の開発に有用である。また、PGDS阻害剤だけでなく、PGFS阻害剤も、糖尿病性腎症の治療薬の選択肢の一つとなる可能性を示している。

これらの知見を利用して、慢性腎臓病の進行遅延を目的にPGD₂合成酵素や受容体に対する創薬が進めば、腎臓病患者のQOL向上に繋がると期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (永田 奈々恵)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	八木 清仁
	副 査	教授	橋本 均
	副 査	教授	上島 悦子

論文審査の結果の要旨

糖尿病合併症の発症メカニズムは複雑多岐にわたるが本研究はプロスタグランジンD2 (PGD₂) の糖尿性腎症への関与を解析することを目的として行われ、慢性腎疾患治療につながる有用な成果をまとめたものである。

第1章ではPGD₂合成酵素に着目した検討をまとめている。PGH₂からPGD₂への異性化反応を触媒するリポカリン型PGD合成酵素 (L-PGDS) が糖尿病性腎症ラットで高発現していることが報告されており本酵素が慢性腎臓病の進展に関与する可能性が示唆されていた。まずL-PGDSの局在性を明らかとするため抗ヒトL-PGDS抗体を作成し、サル腎臓における局在性をin situ hybridizationにより解析した。その結果、サル腎臓においてL-PGDSがHenle's loopを含む遠位尿細管、糸球体ポドサイト、ボウマン嚢上皮細胞でde novo合成されることを明らかとした。低分子化合物ライブラリーから得られたL-PGDS阻害剤AT-56の生化学的・薬理的解析を行った。In vitro及びマウスを用いたin vivoモデルにおいてAT-56が経口投与可能な選択的L-PGDS阻害剤であることを明らかとした。テトラゾール化合物であるAT-56は100mg/kg経口投与では急性毒性は観察されずL-PGDSの選択的阻害剤開発の有用なプロトタイプになると考えられる。

第2章ではPGD₂受容体に着目した検討をまとめている。PGD₂の受容体はDP1、DP2の2種類であるが、申請者らの研究により慢性腎臓病の進行過程でみられる不可逆的な腎線維化にPGD₂が関与し、DP2受容体阻害剤で腎臓の線維化が抑制されることが明らかとなっていた。現在臨床使用されている阻害薬は選択性が低いことから本研究ではDP2受容体の表面構造を認識する抗DP2受容体抗体の作成を行った。その結果抗マウスDP2受容体抗体 (MA b-1D8) の作成に成功し、種々の特性を解析している。MA b-1D8はmDP2を特異的に認識し、mDP2発現細胞に対するPGD₂結合を用量依存的に阻害した。またDP2受容体が関与するcAMP-mediated signalingに対してアンタゴニスト作用を示すことを明らかとした。DP2受容体をターゲットとしたモノクローナル抗体の開発はされたおらずMA b-1D8が初の報告となる。MA b-1D8のFabとDP2受容体の共結晶化ができればDP2受容体三次元構造の決定、より選択性の高い阻害薬開発につながることを期待される。

第3章ではPGD₂阻害以外のアプローチで腎障害を軽減することを目指した検討をまとめている。Aldo-keto reductase 1B1 (AKR1B1) は尿細管間質障害の発症や慢性腎臓病の進展に関与している。申請者らのグループはAKR1B1がNADPH存在下でPGH₂からPGF₂αを合成することを明らかとしている。本研究ではPGF₂αの合成 (PGFS) 活性の反応機構を詳細に検討した。その結果、部位特異的変異導入実験よりAsp43、Lys77、His110の3つのアミノ酸残基で構成されるcatalytic triadが活性に寄与していることを明らかとした。この解析結果より選択的なPGFS阻害剤の開発が可能となると期待される。

以上の解析より、糖尿病性腎症治療に有用な選択的薬物の創成につながることを期待できることから博士 (薬学) 論文に値するものと認める。