

平成 21年 5月 11日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006-2008
 課題番号：18590916
 研究課題名（和文）アンジオテンシン II 受容体拮抗薬のインバースアゴニズムの分子機構と臓器保護効果
 研究課題名（英文）Molecular mechanisms and organ protection of inverse agonism on angiotensin II receptor antagonist
 研究代表者
 三浦 伸一郎（MIURA SHINICHIRO）
 福岡大学・医学部・准教授
 研究者番号 20343709

研究成果の概要：

アンジオテンシンII (Ang II) 1型(AT₁)受容体拮抗薬 (ARB) のインバースアゴニスト作用には、ARBの化学構造の僅かな違いによるAT₁受容体への結合部位の差異が重要であることがわかった。しかし、ARBの中でもインバースアゴニスト作用の強いものと弱いものがあり、さらに、強いものでもAT₁受容体への結合部位が異なっていた。さらに、このインバースアゴニスト作用は、腎保護作用に重要であることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	600,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：アンジオテンシン II 1型受容体拮抗薬、インバースアゴニスト、腎保護作用

1. 研究開始当初の背景

最近、G蛋白共役型受容体 (GPCRs) の研究分野では、多くの新知見が発表されている。例えば、受容体自身の持続的自然活性の存在、インバースアゴニスト (逆作動薬) の存在、ホモ型やヘテロ型二量体形成、受容体の核内移行、細胞内蛋白による受容体活性化、受容体結合蛋白の存在などである。以前、私たちもこのGPCRに属するアンジオテンシンII (Ang II) 2型 (AT₂) 受容体には、持続的自然活性があり、Ang II非依存性にその構造を変化すること無しに二量体を形成し、アポト

et al. EMBO J 2000, J Biol Chem 2005)。さらに、Ang II 1型受容体 (AT₁受容体) にも持続的自然活性が存在することを細胞モデルにおいて証明した (*Miura S et al. FASEB J 1999*)。また、AT₁受容体を過剰発現させるとイノシトールリン酸 (IP) 産生能 (平滑筋収縮に関連するシグナル) がAng II非依存性に増加していることもわかった (*Miura S et al. Hypertens Res 2003*)。これらは、AT₁受容体自身が出すシグナルの例であるが、ここで問題は、AT₁受容体拮抗薬 (ARB) がAT₁受容体自身の出すシグナルとAng IIがAT₁受容体に結合し出すシグナルの両方のシグナル

を抑制できるのかということにある。今回のテーマのインバースアゴニストとは、受容体自身の出すシグナルを抑制する薬、すなわち、受容体を部分活性型から不活性型へ移行させる薬である。さらに、私たちはIP産生能においてAT₁/Ang IIシグナルとAT₁シグナルの両者を抑制する薬であり、ARBの中にはこの作用を持つARBと持たないARBの存在することをin vitroにおいて証明した (Miura S et al. *Hypertens Res* 2003, *Curr Hypertens Rev* 2005)。しかし、in vivoにおける有用性や分子メカニズムについては良く分かっていなかった。

2. 研究の目的

現在、日本では6種類のARBが臨床使用されており、高血圧治療における使用頻度は増加の一途をたどっている。しかし、これらARBの降圧効果に多少の差はあるが患者に使用する場合にARBが使い分けられているわけではない。最近のARBの大規模臨床試験によると、それぞれの試験デザインは違うが、ARBの心不全に対する効果、心筋梗塞後のイベント発症の抑制や腎保護作用の結果が異なっている。これらの効果には、本来のARBの作用であるAng IIによるシグナル抑制作用が関与していることはもちろんであるが、インバースアゴニストとしての作用の違いがこのような結果の違いをもたらした可能性もある。そこで本研究では、ARBのインバースアゴニストとしてどのような働きがあるのかについてIn vitroにおける受容体分子機構の探索からIn vivoでの動物モデルによる効果を検証した。分子機構としては、ARBがAT₁受容体のどのアミノ酸と結合することがインバースアゴニストとして重要であるかを人工変異AT₁受容体にて検討した。次に、ARBのどの化学構造部がインバースアゴニストとしての役目を担っているかを多数のARB類似化合物を作成し検討した。さらに、ARBのインバースアゴニストとしての作用がClass Effectであるかについて、インバースアゴニストのあるARBと無いARBを使用し、Dahl食塩感受性ラットにおける臓器保護の面から心不全や腎不全予防効果の違いを検証した。

3. 研究の方法

1) 人工変異型AT₁受容体によるインバースアゴニストとしてのARBの選別

持続的自然活性を持つ人工変異型受容体としてAT₁-N111G受容体とAT₁-F77A/N111G受容体を使用した。多数のARBについて、これら人工変異型受容体を使用し、IP産生能におけるインバースアゴニストの役割を再評価した。

①変異体の作成

ラット AT₁ 受容体 DNA を使用した。Mutagenesis キットにより変異体を作成した。

②DNAの細胞への導入

DNAは、リポフェクタミン法にて細胞へ導入した。導入48時間後、リガンド-受容体結合能試験に使用する細胞膜を窒素圧付加法にて精製した。

③イムノプロット法

DNAの細胞への導入後、各ARBで処理し、細胞を溶解液に溶かした。その後、Polytron homogenizerにより破碎し、遠心後、その上清をサンプルとした。サンプルを電気泳動液に溶解後、SDS-polyacrylamide gel 電気泳動、Membraneヘトランスファー後、一次抗体、二次抗体と反応させ、Enhanced chemiluminescence systemによりバンドを出し、Digital imageにより分析した。

④リガンド-受容体結合能試験

細胞膜、¹²⁵I-[Sar¹, Ile⁸]Ang IIと各種ARBやAng IIを1時間インキュベーションし、平衡状態に達したら、セルハーベスターにより反応を止めた。結合した¹²⁵I-[Sar¹, Ile⁸]Ang IIをγカウンターにより測定した。

⑤IP産生能の測定

DNAの細胞への導入後、各ARBで処理し、³H]-myoinositolとともに24時間、10 mM LiClと20分間、Ang IIを加え45分間でインキュベーションした。培養液を除き、細胞内からラベルされたIPをPerchloric acid extraction法により抽出し測定した。

2) インバースアゴニストとしてのARBとAT₁受容体との結合様式

ARBの様々な類似化合物を合成した。ARBの側鎖の構造部、例えばカルボキシル基やヒドロキシル基がインバースアゴニズムに重要であるかをリガンド-受容体結合能試験とIP産生能を測定し検討した。さらに、AT₁受容体側のどのアミノ酸がその結合に関与しているかも人工変異型AT₁受容体を作成し分析した。以前からの研究により、ARBの共通した部のビフェニルテトラゾール基は、AT₁受容体側のLys¹⁹⁹、His²⁵⁶と結合していることを見出している。そこで、K199A、H256Aの変異受容体を作成した。ARBの側鎖の構造部であるカルボキシル基やヒドロキシル基は、私たちのAT₁-ARB結合コンピューターモデリングの結果から、Ser¹⁰⁵、Val¹⁰⁸、Ser¹⁰⁹、Tyr¹¹³、Gln²⁵⁷と結合すると推測しており、S105A、V108A、V108G、S109A、Y110F、Q257Aの変異受容体を作成し検討した。

3) インバースアゴニストとしてのARBによるAT1受容体構造変化の抑制様式

AT1受容体の活性化時の構造変化はmethanethiosulfonylethyl-ammoniumによるSubstituted cysteine accessibility mapping (SCAM)法により測定した。具体的には、インバースアゴニズムを持つARBでは、AT1受容体の構造が変化できず、AT1受容体との結合部を変異させた受容体では、そのARBのインバースアゴニズムが発揮されず、受容体の構造が活性型へ変化することが予想され、この現象をSCAM法により捉えた。

4) インバースアゴニズムの有無によるARBのDahl食塩感受性モデルラットにおける効果の違い

Dahl食塩感受性心不全ラットに、9週齢より高食塩水を与え、16週齢より3群（ARB非投与群、オルメサルタン投与群、インバースアゴニスト作用のないオルメサルタン類似化合物投与群）に分類し、21週齢まで観察した。毎週、非観血的血圧・脈拍測定した。また、4週毎に心臓エコーによる評価を実施した。さらに、腎機能の評価も行った。

4. 研究成果

1) ARBのインバースアゴニズムの分子機構

①リガンドがアンタゴニストとして作用するかインバースアゴニストとなるかは、その化学構造の僅かな違いが関与している可能性が示唆されていたが明らかではなかった。そこで、ARBのオルメサルタンとその類似化合物を用いて検討を行った。その結果、受容体結合能試験より、オルメサルタンは、AT1受容体のTyr¹¹³、Lys¹⁹⁹、His²⁵⁶とGln²⁵⁷に結合していることがわかった。また、IP産生能の結果より、オルメサルタンの側鎖のカルボキシル基やヒドロキシル基がインバースアゴニスト作用発現に重要であり、その相手側（AT1受容体）のアミノ部位はTyr¹¹³やHis²⁵⁶であることはわかった。これらのアミノ酸の部位は、GPCR活性化時の構造変化に重要な膜貫通部（TM）3やTM6に属していた。また、コンピューターモデリングにより、前述したオルメサルタンのカルボキシル基—Tyr¹¹³（AT1受容体）やヒドロキシル基—His²⁵⁶（AT1受容体）の結合の重要性を確認した（図1）。私たちは、受容体がリガント（ARB）の化学構造の僅かな違いを認識し、結合に関与する受容体側のアミノ酸部位が如何にインバースアゴニスト作用の発現に重要であるかを分子レベルで示すことができた（Miura *S et al. J Biol Chem. 2006*）。

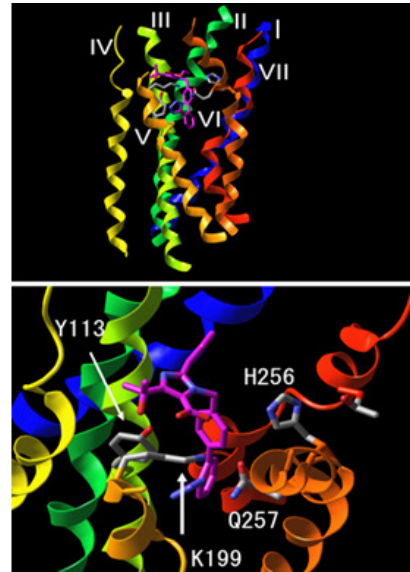
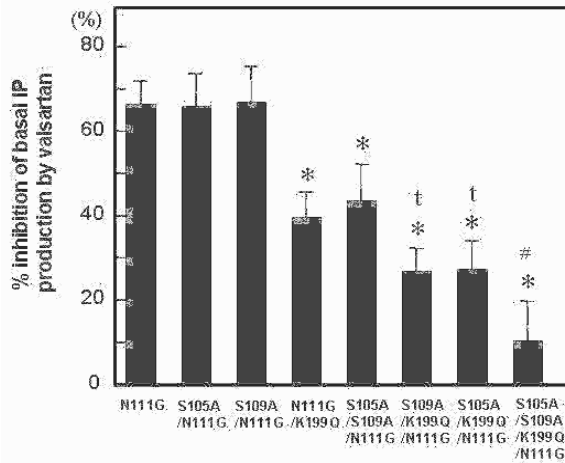


図1. AT1受容体—オルメサルタンのコンピューター結合モデル（紫色はオルメサルタン）

②他のARBであるバルサルタンについてもインバースアゴニズムの分子機構について検討した。ARBには、共通した化学構造として、バルサルタン、オルメサルタン、ロサルタンともビフェニールテトラゾール基、イミダゾール基を有している、しかし、臨床的には僅かではあるが降圧効果が異なっている。従って、他のARBのAT1受容体との結合様式やインバースアゴニストの強さの違いを検討する必要があると考えられた。私たちは、それぞれのARBは異なったAT1受容体との結合様式を持っているのではないかを仮説を立てて検討した。バルサルタンは、AT1受容体側のSer¹⁰⁵、Ser¹⁰⁹やLys¹⁹⁹に結合し、オルメサルタンと同様に強力なインバースアゴニスト作用を発揮していた。一方、ロサルタンではその作用は弱かった。SCAM法によりバルサルタンは、AT1受容体を不活性の状態に安定化させている可能性が考えられた。また、バルサルタンのインバースアゴニスト作用は、AT1受容体に人工的に変異（S105A/S109A/K199Q）を入れるとその作用を失った（図2）。さらに、AT1受容体—バルサルタンのコンピューターによる結合モデルを作成し検討したところ、Ser¹⁰⁹やLys¹⁹⁹がバルサルタンのフェニール基やテトラゾール基と結合し、Ser¹⁰⁵は、バルサルタンのカルボキシル基と結合している可能性が考えられた（図3）。バルサルタンのインバースアゴニスト作用に重要な結合はLys¹⁹⁹であり、オルメサルタンの場合とは異なっていることが示唆された（Miura *S et al. Mol Endocrinol. 2008*）。



*p<0.05 vs. N111G. †p<0.05 vs. N111G/K199Q. #p<0.05 vs. S105A/K199Q/N111G or S109A/K199Q/N111G.

図2. バルサルタンのAT1人工変異体に対するインバースアゴニスト作用

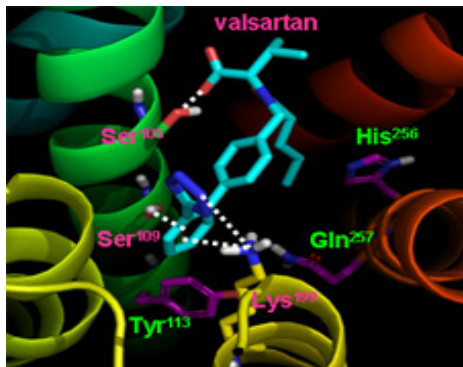


図3. AT1受容体—バルサルタンのコンピューター結合モデル (水色はバルサルタン)

③ARBのインバースアゴニスト作用について、細胞を伸展刺激するモデルを使用して検討した。細胞を伸展刺激するとAT₁受容体がAng II非依存性に活性化するモデルである。この研究では、ARBとしてカンデサルタンとその類似化合物を使用した。伸展刺激するとAT₁受容体のTM7が反時計回転に構造変化することを証明した。カンデサルタンでは、AT₁受容体の活性化を抑制し、インバースアゴニスト作用を有していた。その作用にはカンデサルタンのカルボキシル基とAT₁受容体との結合が重要であることがわかったが、さらに、この際、TM7がさらに構造変化し受容体が不活化されていることが示唆された (Yasuda *et al.* *EMBO Rep.* 2008)。

2) ARBのインバースアゴニズムの臓器保護効果

In vivoにおけるインバースアゴニズムの有用性を検討するため、インバースアゴニズムの有無によるARBのDahl食塩感受性モデルラットにおける効果の違いについて検討した。ARBは低用量を投与したため、プラセボ

群とともに降圧効果を認めなかった (図4)。オルメサルタン投与群では、降圧非依存性にARB非投与群や類似化合物投与群よりも尿蛋白/クレアチニン比を有意に減少させた (図5)。しかし、心機能には有意な変化を認めなかった。

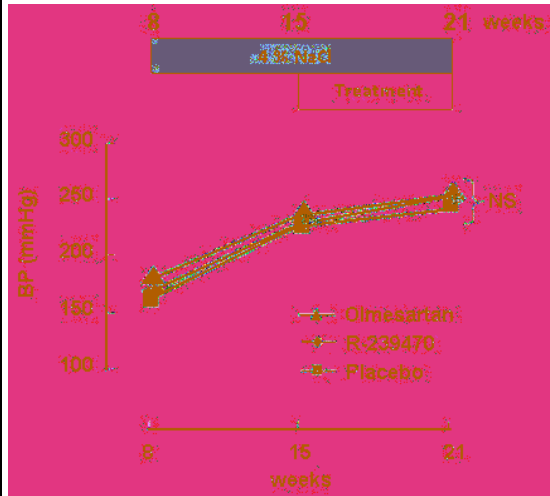


図4. 血圧の変化

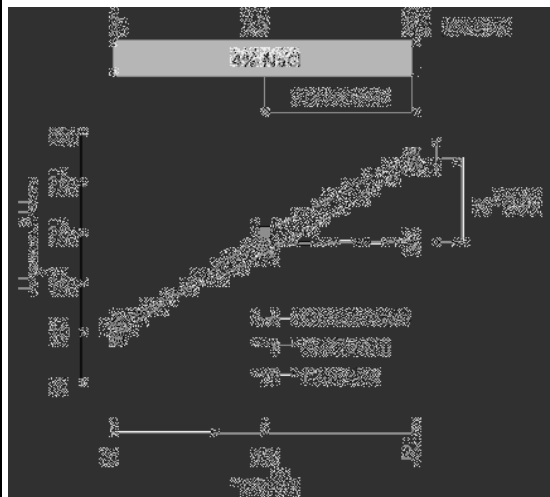


図5. 尿蛋白/クレアチニンの変化

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計4件)

1. Kiya Y, Miura S, Fujino M, Imaizumi S, Karnik SS, Saku K. Clinical and pharmacotherapeutic relevance of the double-chain domain of the angiotensin II type 1 receptor blocker olmesartan. *Clin Exp Hypertens*. 2009. (in press) 査読有
2. Yasuda N*, Miura S*, Akazawa H*, Tanaka T, Qin Y, Kiya Y, Imaizumi S, Fujino M,

- Ito K, Zou Y, Ge J, Fukuhara S, Kunimoto S, Mochizuki N, Fukuzaki K, Sato T, Nakaya H, Saku K, Komuro I. Conformational switch of angiotensin II type 1 receptor underlying mechanical stress-induced activation. *EMBO Rep.* 2008;9:179-186. (*co-first authors) 査読有
3. Miura S, Kiya Y, Kanazawa T, Imaizumi S, Fujino M, Matsuo Y, Karnik SS, Saku K. Differential bonding interactions of inverse agonists of angiotensin II type 1 receptor in stabilizing the inactive-state. *Mol Endocrinol.* 22:139-146:2008. 査読有
 4. Miura S, Fujino M, Hanzawa H, Kiya Y, Imaizumi S, Matsuo Y, Tomita S, Uehara Y, Karnik SS, Yanagisawa H, Koike H, Komuro I, Saku K. Molecular mechanism underlying inverse agonism of angiotensin II type 1 receptor. *J Biol Chem.* 281:19228-19295:2006. 査読有

[学会発表] (計 14 件)

1. 藤野正礼、三浦伸一郎、松尾佳野、木谷嘉博、朔啓二郎。イルベサルタンの薬理学的特徴と受容体認識メカニズム。第 31 回日本高血圧学会、2008 年 10 月 9-11 日、札幌。
2. Fujino M, Miura S, Kiya Y, Imaizumi S, Karnik SS, Saku K. A small difference in a chemical structure of ARB induces the differential pharmacological effects. 22nd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, 2008.6.14-19, Berlin, Germany.
3. Miura S, Matsuo Y, Fujino M, Uehara Y, Saku K. Molecular mechanisms of the antagonistic action between the AT₁ and AT₂ receptors. 22nd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, 2008.6.14-19, Berlin, Germany.
4. Miura S, Fujino M, Kiya Y, Matsuo Y, Imaizumi S, Karnik SS, Saku K. Clinical and pharmacotherapeutic relevance underlying the inverse agonism of angiotensin II type 1 receptor blocker. 22nd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, 2008.6.14-19, Berlin, Germany.
5. Miura S, Kiya Y, Imaizumi S, Matsuo Y, Fujino M, Saku K. Molecular Basis of the Stabilization of Angiotensin II Type 1 Receptor by Valsartan. The 57th Annual Scientific Session on American College of Cardiology. 2008. 3.29-3.31, Chicago, USA.
6. Akazawa H, Miura S, Yasuda N, Qin Y, Tanaka T, Itoh K, Liao CH, Kudo Y, Saku K, Komuro I. Molecular and Structural Basis for Mechanical Stress-induced Activation of AT₁ Receptor. The 72th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 3.28-30. 2008, Fukuoka, Japan.
7. Miura S, Saku K. Molecular Mechanisms of Inverse Agonism for Angiotensin II Type 1 Receptor. SYMPOSIUM 7, THE RENIN ANGIOTENSIN ALDOSTERONE SYSTEM AND HYPERTENSION, 6th Congress of the Asian-Pacific Society of Hypertension. 2007.11.16-19, Beijing, China.
8. Yasuda N, Akazawa H, Miura S, Qin Y, Ito K, Kudo Y, Liao CH, Saku K, Komuro I. Molecular Mechanism Of Inverse Agonism In Mechanical Stress-induced Activation Of Angiotensin II Type 1 Receptor. 78th Scientific Sessions of the American Heart Association. 2007.11.4-11.7, Orlando, USA.
9. Yasuda N, Akazawa H, Miura S, Qin Y, Ito K, Kudo Y, Liao C, Zou Y, Saku K, Komuro I. Structural and Molecular Basis for Mechanosensation by Angiotensin II Type 1 Receptor. 第 30 回日本高血圧学会、2007 年 10 月 25-27 日、沖縄。
10. 三浦伸一郎、朔啓二郎。アンジオテンシンレセプターの構造よりみた機能。第 30 回日本高血圧学会、シンポジウム「レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の新しい展開」、2007 年 10 月 25-27 日、沖縄。
11. 三浦伸一郎、朔啓二郎。ARB の新しい展開：インバーサゴニスト vs. アンタゴニスト。第 50 回日本腎臓学会学術総会、ワークショップ 1「慢性腎障害とレニン・アンジオテンシン系」、2007 年 5 月 25-27 日、浜松。
12. Miura S, Kiya Y, Imaizumi S, Tomita S, Matsuo Y, Uehara Y, Saku K. Molecular basis of the stabilization of angiotensin II type 1 receptor by valsartan. The 71th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 3.15-17. 2007, Kobe, Japan.

13. 三浦伸一郎、朔啓二郎。レニン-アンジオテンシン系に新たな展開。AT2 受容体の AT1 受容体シグナルに対するアンタゴニスト的な役割。第 43 回日本臨床生理学会、シンポジウム、2006 年 11 月 9-19 日、福岡。
14. 三浦伸一郎、朔啓二郎。New aspect of angiotensin receptor: Molecular mechanism and pharmacotherapeutic relevance of inverse agonist for angiotensin II type 1 receptor. 第 10 回日本心不全学会、パネルディスカッション、2006 年 10 月 13-15 日、東京。

[図書] (計 3 件)

1. Miura S, Fujino M, Karnik SS, Saku K. Angiotensin Progress. Differential pharmacotherapeutic effects of angiotensin II type 1 receptor blockers. Nova Science Publishers, 2008:221-234.
2. 三浦伸一郎。第 7 章 治療 10. ARB (オルメサルタン)、高血圧ナビゲーター第 2 版 (分担)、メディカルレビュー、2007:262-263。
3. 三浦伸一郎。AT1 受容体活性: 選択的遮断作用と逆活性作用、Annual Review 「腎臓 2007」(分担)、中外医学社、2007:268-274。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 伸一郎 (MIURA SHINICHIRO)
福岡大学・医学部・准教授
研究者番号 20343709

(2) 研究分担者

朔 啓二郎 (SAKU KEIJIRO)
福岡大学・医学部・教授
研究者番号 40183371