

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08593

研究課題名(和文)新規非ペプチド型アンジオテンシン タイプ 受容体選択的作動薬の開発

研究課題名(英文)Development of non-peptide type of angiotensin II type 1 receptor ligand as a biased agonist

研究代表者

三浦 伸一郎(Miura, Shinichiro)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：20343709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは、3種類の非ペプチド型アンジオテンシンII 1型(AT1)受容体リガンドを biased ligand候補として作成した。イノシトールリン酸(IP)産生能およびextracellular signal-regulated kinase(ERK)1/2活性化を測定した。リガンドA、BとCは、IP産生能に対して、各々ニュートラルアンタゴニスト、インバースアゴニストとアゴニストであった。一方、リガンドBとCは、ERK1/2活性に対してagonistであった。このように、biased ligandの非ペプチド型AT1受容体リガンドを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AT1受容体は、心血管系疾患の発症・進展に強く関わっており、Biased ligandsの概念を基に心不全治療薬を開発する。AT1受容体をターゲットとした適切な急性心不全治療薬は、Gタンパク質共役経路は阻害し、アレスチン経路を作動するAT1受容体選択的作動薬の開発である。以上より、私たちは、非ペプチド型AT1受容体選択的作動薬(Biased ligands)をデザイン・合成する。新規化合物がどの細胞内シグナルを伝達しているかを確認し、心不全に効果的なシグナルを選択的に伝達しているかを検討する。

研究成果の概要(英文)：We synthesized three non-peptide type of AT1 receptor ligands (Compound A, B and C) as candidates of biased ligands. Inositol phosphate (IP) production and extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 activation were measured and examined binding modes of receptor-ligand by competition binding study, and subsequently analyzed whether these ligands would induce IP production and ERK1/2 activation. Compound B and C decreased and increased IP production, respectively, whereas Compound A did not change IP production. Compound B and C, but not Compound A, activated ERK1/2. L112A had a key role of IP production. In conclusions, compound A, B and C were a neutral antagonist, an inverse agonist, and an agonist with regard to IP production, respectively. On the other hand, Compound B and C, but not Compound A, were agonists to ERK1/2 activation. Thus, we developed non-peptide type of AT1 receptor compound as a biased ligand.

研究分野：循環器病学

キーワード：アンジオテンシンII Biased ligands 非ペプチド型 細胞内シグナル

1. 研究開始当初の背景

アンジオテンシン (Ang) タイプ I (AT1) 受容体拮抗薬 (ARB) は、降圧薬・心保護薬として多く処方されている。ARB は、Ang II の刺激を阻害し降圧を発揮する G 蛋白質共役経路の阻害に加えて、強心作用を示す アレスチン経路も阻害するため、心不全治療薬としては不適切である。理想の心不全治療薬は、G 蛋白質共役経路は阻害し、アレスチン経路を作用する AT1 受容体選択的作動薬である。本研究では、新規非ペプチド型 AT1 受容体選択的作動薬 (Biased ligands) をデザイン・合成する。現在、ペプチド型作動薬は、開発中であるが、ペプチド型は易分解性で不安定で効果が一定せず未だ上市されていない。したがって、非ペプチド型選択的作動薬を開発し、心不全に有用な治療薬であることを基礎研究により検証し、臨床に有効な薬剤開発を目指す。

2. 研究の目的

非ペプチド型 AT1 受容体選択的作動薬をデザイン・合成する。AT1 受容体の G タンパク質共役経路活性化に重要なアミノ酸部位に抵触せず、アレスチン活性化に重要な部位に結合可能なように ARB から側鎖を付加しデザイン・合成する。非ペプチド型作動薬と AT1 受容体に対する結合能試験から B_{max} を測定、AT1 受容体への結合能を測定する。イノシトールリン酸 (IP) 産生能および extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 活性化を測定した。多様な細胞内シグナルの中でどのシグナルを活性化しているか、心不全治療に有用なシグナルであるかを選別する。

3. 研究の方法

(1) 非ペプチド型 AT1 受容体選択的作動薬をデザイン・合成

AT1 受容体拮抗薬 (ARB) の AT1 受容体側結合部位の候補のアミノ酸部位を参考にデザインし合成した。

(2) AT1 受容体人工変異体の作成

AT1 受容体人工変異体を Mutagenesis Kit により作成した。

(3) 非ペプチド型作動薬と AT1 受容体に対する結合能試験から B_{max} や AT1 受容体への結合能を測定細胞膜の AT1 受容体発現量を ^{125}I -[Sar¹, Ile⁸]Ang II を用いた Binding study により測定した。Competition binding study は、 K_d 値を平衡状態で ^{125}I -[Sar¹, Ile⁸]Ang II 結合能から求めた。細胞膜、 ^{125}I -[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 - ベスタ - により反応を止める。結合した ^{125}I -[Sar¹, Ile⁸]Ang II をガンマカウンタ - により測定し、Computer Program Ligand[®] により解析した。

(4) IP 産生能

AT1 受容体機能である血管収縮シグナルの IP 産生能を測定し評価した。方法は、細胞を ^3H -myoinositol とともに 5% CO₂ の 37 °C 下、10% 血清の DMEM にて 24 時間培養しラベリングした。その後、細胞を洗浄し、LiCl を加えた後、[Sar¹]Ang II や ARB を加え培養した。培養液を除去し、perchloric acid 法により soluble IP を取り出し測定した。

(5) ERK 1/2 活性化を測定

AT1 受容体機能である ERK 1/2 活性化をウエスタンブロッティング法により測定した。

(6) In vitro の結果から非ペプチド型 AT1 受容体選択的作動薬の候補を見出した後、その in vivo における Biased ligands の役割を見出すために、マウス心機能障害モデルを作製する。

4 . 研究成果

(1) 非ペプチド型 AT1 受容体選択的作動薬をデザイン・合成

非ペプチド型 AT1 受容体選択的作動薬の候補として 3 種類を利用した(リガンド A、リガンド B、リガンド C)。

(2) AT1 受容体人工変異体の作成

AT1 受容体人工変異体として、L112A、Q257A、Y292A と N295A を作成した。

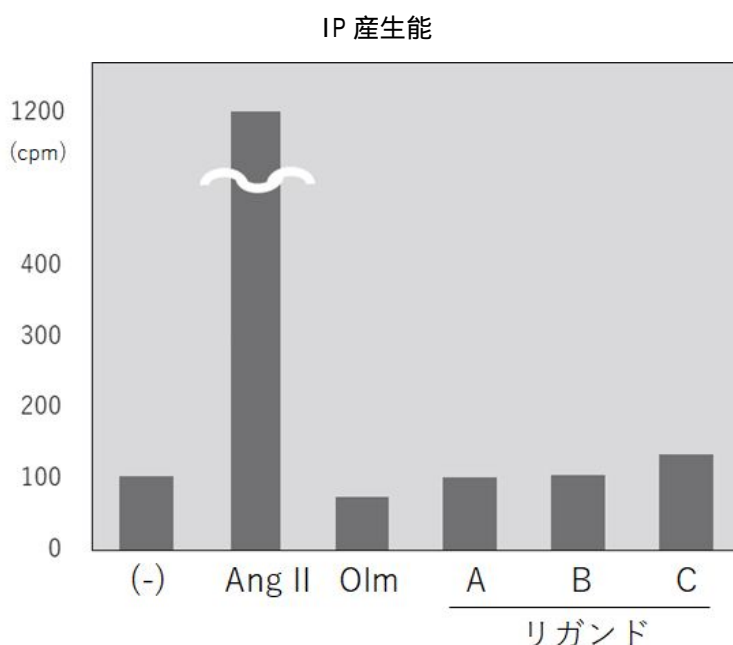
(3) 非ペプチド型作動薬の AT1 受容体に対する結合能

リガンド A、リガンド B、リガンド C の wild-type の AT1 受容体に対する結合能 (Kd 値) は、各々 0.8 nM、21 nM、48 nM であった。また、リガンド A、リガンド B、リガンド C の AT1 L112A 受容体に対する Kd 値は、各々 37 nM、23 nM、31 nM であった。

Ligand	WT	L112A	Y292 A	N295
[Sar1,Ile8]Ang II	0.8±0.4	1.3±0.3	2.1±0.9	7.0±2.0
Olmesartan	2.3±0.8	27±7	47±15	334±105
Ligand A	0.8±0.3	37±12	6.3±3.8	69±8
Ligand B	21±10	23±7	95±7	>10000
Ligand C	48±12	31±5	30±8	>10000

(4) IP 産生能

野生型 AT1 受容体に対するリガンド B とリガンド C は、各々 IP 産生能を減少と増加させた。リガンド A の IP 産生能には変化を認めなかった。さらに、AT1 受容体の L112A の部分が IP 産生能には重要であることが分かった。



Ang II, アンジオテンシンII; Olm, オルメサルタン.

(5) ERK 1/2 活性化を測定

リガンド B とリガンド C は、ERK1/2 を活性化させた。リガンド A の ERK1/2 には変化を認めなかった。

したがって、リガンド A、リガンド B とリガンド C は、IP 産生能に対して、各々ニュートラルアゴニスト、インバースアゴニストとアゴニストであった。一方、リガンド B とリガンド C は、ERK1/2 活性に対してアゴニストであったが、リガンド A は、ニュートラルアゴニストであった。このように、Biased ligand の非ペプチド型 AT1 受容体リガンドを見出した。

(6) 高脂肪食負荷による Apolipoprotein E-Knockout Mice に Ang II を infusion することによるマウス心機能障害モデルを作製した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suematsu Yasunori, Tashiro Kohei, Morita Hidetaka, Ideishi Akihito, Kuwano Takashi, Miura Shin-ichiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Angiotensin Receptor Blocker and Nephilysin Inhibitor Suppresses Cardiac Dysfunction by Accelerating Myocardial Angiogenesis in Apolipoprotein E-Knockout Mice Fed a High-Fat Diet	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2021/9916789	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	末松 保憲 (Suematsu Yasunori) (70716927)	福岡大学・医学部・講師 (37111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関