

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591065

研究課題名（和文） 各種アンジオテンシン II 型受容体ブロッカーの特性を生かした新たな創薬へ向けて

研究課題名（英文） Drug discovery of utilizing of characteristics of angiotensin II type 1 receptor blockers

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（和文）：各種アンジオテンシン II 型（AT1）受容体のドラッグエフェクトを検討した。特異的な作用として、カンデサルタンは、洗浄に抵抗性で受容体に強固に結合していること、イルベサルタンは、抗炎症作用の強いこと、バルサルタンは AT1 受容体選択性の高いことがわかった。また、新規 ARB をデザインする前に、オルメサルタンに特徴的な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を同定し、さらに、アゴニスト作用のあるオルメサルタン類似化合物も見いだした。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the drug (molecular or differential) effects of angiotensin II type 1 (AT1) receptor blockers. We found that candesartan has strong blocking effect of cell signaling after wash-out. In addition, irbesartan has a strong anti-inflammation and valsatan showed a highly selective behavior for AT1 receptor. Before designing a new ARB, we identified the olmesartan, olmesartan-related compound R239470 and R794847, which induced inverse agonism, antagonism and agonism, respectively.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：(1) ドラッグエフェクト (2) クラスエフェクト (3) イノシトールリン酸産生能 (4) 細胞外シグナル調節キナーゼ活性

## 1. 研究開始当初の背景

アンジオテンシン II (Ang II) 1 型 (AT1) 受容体ブロッカー (ARB) は、レニン・アンジオテンシン (RA) 系抑制薬であり、高血圧の発症・進展抑制に重要な役割を演じている。ARB は、心・腎疾患の発症率や死亡率を減少させるとともにその安全性も証明され、降圧

治療の中心的な存在である。日本では、6 種類の ARB が発売されているが、どれを用いることが患者治療に最も適しているか、さらに、効果はどれも一緒なのかについてはよくわかっていない。しかし、最近、ARB の種類により、それぞれ異なった効果を発揮する可能性が基礎的検討から示唆されている。その

効果の違いは、受容体からの解離作用、受容体への結合様式、インバースアゴニズムの有無、さらに化学構造の違いなどの分子学的な特徴に起因すると考えられ、各 ARB が AT1 受容体へ結合し作用する分子メカニズムの理解を深める研究を重ねてきた。

殆どの ARB に共通する化学構造として、ビフェニル基とテトラゾル基を含んでおり、AT1 受容体の Lys<sup>199</sup> と His<sup>256</sup> に結合すると考えられている (Miura S et al. *Curr Hypertens Rev.* 2005)。さらに、カンデサルタン、バルサルタンやオルメサルタンは、カルボキシル基を含んでいる。このカルボキシル基は、陰性荷電しており、カンデサルタンのカルボキシル基は、AT1 受容体の Gln<sup>257</sup> と結合していた (Yasuda N, Miura S et al. *EMBO Rep.* 2008)。また、ロサルタンにはヒドロキシル基が無いが、オルメサルタンには、ヒドロキシル基とカルボキシル基があり、この僅かな化学構造の違いが AT1 受容体への結合力の差をもたらしていた (Miura S et al. *J Biol Chem.* 2006)。さらに、この化学構造の僅かな違いは、AT1 受容体に対する結合様式 Surmountable と Insurmountable にも関与していた。AT1 受容体は、自律活性を持つため、ARB のインバースアゴニズムの強弱を検討し (Miura S et al. *J Biol Chem.* 1999, 2002, *Hypertens Res.* 2003 & *Mol Endocrinol.* 2008)、ロサルタンのインバースアゴニズムは弱い、オルメサルタンとバルサルタンでは、強力であることがわかった。また、伸展刺激による AT1 受容体活性化に対するカンデサルタンのインバースアゴニズムの分子機構についても報告した (Yasuda N, Miura S et al. *EMBO Rep.* 2008)。AT1 受容体の自律活性は少ないが、高血圧から心・腎不全発症・増悪には数十年を要するため、ARB の中でも強力なインバースアゴニズムを有する ARB の使用を考慮すべきと考えている。このように、基礎的研究では各 ARB の違いが証明されている。

最近では、小規模臨床研究ではあるが、各 ARB の効果が比較検討されている。例えば、バルサルタンがロサルタンより左室肥大を抑制し、カンデサルタンがロサルタンよりも血中単球遊走因子濃度を減少させたことなどである。私たちの検討においても、バルサルタンがロサルタンより冠動脈ステント留置後の再狭窄率を有意に減少させたと報告した (Iwata A, Miura S et al. *Circ J.* 2006)。従って、すべての ARB は一様ではなく、少しずつ効果は異なることが臨床的にも示唆されている。

## 2. 研究の目的

これまでの私たちの研究成果および各 ARB のドラッグエフェクトを再検討し、受容体から解離しにくく、受容体への結合力やインバースアゴニズム (受容体が活性化するときの構造変化をブロック) が強力な新規 ARB に必要な特性を見いだした。

## 3. 研究の方法

6種類の ARB のアンタゴニスト、インバースアゴニスト作用を全く同じ実験系にて実施した。基礎的な実験として、(1) AT1 受容体との結合能試験、(2) インバースアゴニズム効果、(3) 受容体との結合様式、(4) リガンド洗浄試験を行った。また、人工変異 AT1 受容体を使用した各 ARB と AT1 受容体との特異的結合部位について決定した。さらに、そのデータをもとに (5) コンピューターモデリングを行い、各 ARB の結合様式の違いを明らかにした。受容体非活性化に重要な AT1 受容体のアミノ酸部位をターゲットとした新たな ARB のデザインに必要な情報を得た。

### (1) AT1 受容体との結合能試験

細胞膜、<sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>]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停止した。結合した <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>]Ang II を  $\gamma$ -カウンターにより測定し、Computer Program Ligand<sup>®</sup>により解析した。

### (2) インバースアゴニズム効果

人工変異自律活性型 AT1 受容体を使用し、イノシトールリン酸 (IP) 産生能の測定により評価した。DNA の細胞への導入後、各 ARB で処理し、<sup>3</sup>H]-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。

### (3) 受容体との結合様式

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について、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 AT1 受容体側結合部位の候補はわかっており、様々な AT1 変異受容体にて検討した。

### (4) リガンド洗浄試験

AT1 受容体の発現した細胞を使用し、各種 ARB を加え、1 から 5 回まで洗い流した。その後、受容体との結合能や IP 産生能を測定した。また、細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) 活性能についても測定した。

(5) コンピューターモデリング

Bovine ロドプシンを基本にして、CHARMm (Accelrys)を使用し、結合エネルギーを計算後、プログラム Modeler (Accelrys)にて作製した。

4. 研究成果

これまでの各 ARB のドラッグエフェクトの報告に加えて、後述の (1) から (3) のようなイルベサルタン、カンデサルタン、バルサルタンについて新たな知見を見いだした。

(1) イルベサルタン

イルベサルタンにおける他の ARB と異なる化学構造部位は、シクロペンタン環を有しているところである。イルベサルタンの AT<sub>1</sub> 受容体に対する解離定数 (Kd 値) は、1.9 nM であり AT<sub>1</sub> 受容体への結合親和性が高く、Ang II (1.2 nM) とほぼ同等、ロサルタン (11 nM) の約 1/6 であった。モデリングにより AT<sub>1</sub> 受容体の脂溶性ポケットに対して強力に相互作用していることが推測された。また、イルベサルタンのインバースアゴニズムは、ロサルタンよりも強力であった。イルベサルタンは、内皮細胞において、炎症物質である単球走化活性因子 (MCP) -1 分泌を有意に抑制していたが、ロサルタンではその作用が弱かった (図 1)。さらに、イルベサルタンによる MCP-1 分泌抑制作用は、核内因子 kappa B の活性抑制を介していることが示唆された。3T3-L1 細胞における検討では、低濃度のイルベサルタン (1 μM) にて、ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) γが活性化され、アディポネクチンの分泌量が有意に増加していることがわかった (Fujino M, Miura S et al. Hypertens Res. 2010)。

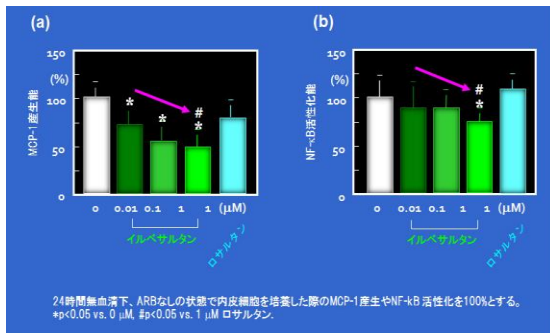


図 1. イルベサルタンとロサルタンの MCP-1 産生 (a) と NF-κB 活性化 (b) に対する効果

(2) カンデサルタン

洗浄試験における各 ARB の AT<sub>1</sub> 受容体への結合率は、カンデサルタン ≥ オルメサルタン > テルミサルタン ≥ バルサルタン ≥ イルベサルタン > ロサルタンであった (図 2)。洗

流し後に、ERK 活性と IP 産生能を測定したところ、最もカンデサルタンの AT<sub>1</sub> 受容体活性化に対する阻害作用が強力であった。しかし、カンデサルタン-7H (カンデサルタンのカルボキシル基なし) では、これらの作用は減弱した。さらに、カンデサルタンの強力な作用は、AT<sub>1</sub>-Q257A 変異受容体において減弱した。カンデサルタンのドラッグエフェクトとして、洗浄に対して最も抵抗性のある ARB であることがわかった。この作用の発現には、カンデサルタンのカルボキシル基が関与し、さらに、AT<sub>1</sub> 受容体の Gln<sup>257</sup> との特異的な結合性が重要であることが示唆された (Kiya Y, Miura S et al. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2012)。

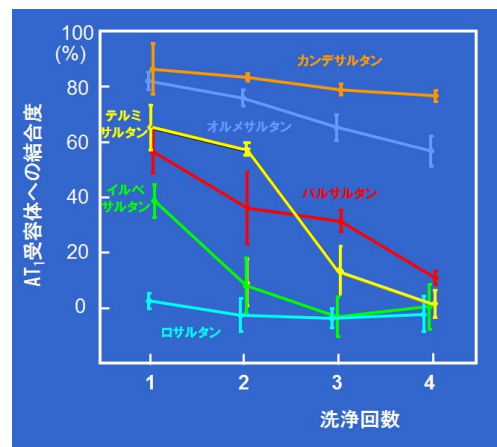


図 2. 各 ARB の AT<sub>1</sub> 受容体への結合率

(3) バルサルタン

バルサルタンは、ドラッグエフェクトとして、AT<sub>1</sub> 受容体の選択性が AT<sub>2</sub> 受容体に対して非常に高いことが指摘されている。私たちも、バルサルタンの AT<sub>1</sub> や AT<sub>2</sub> 受容体に対する結合定数を検討したところ、AT<sub>1</sub> 受容体では 7.25 nM、AT<sub>2</sub> 受容体では 234 x 10<sup>3</sup> nM であり、AT<sub>1</sub> 受容体の選択性は、AT<sub>2</sub> 受容体に対して約 32,000 倍であることがわかった (図 3)。さら

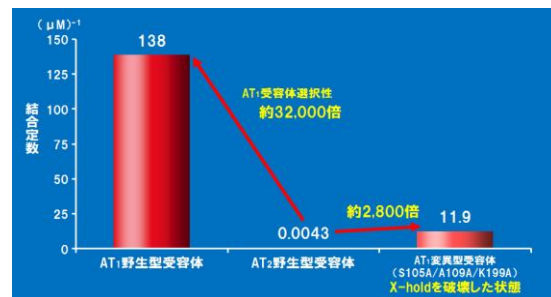


図 3. バルサルタンの AT<sub>1</sub> 受容体や AT<sub>2</sub> 受容体におけるアンジオテンシン II 拮抗作用

に、AT<sub>1</sub> 受容体のアミノ酸部位に変異を加え、

バルサルタンが AT<sub>1</sub> 受容体へ特異的に結合できなくなることを人工的に作り出して実験を行った (AT<sub>1</sub> 変異型受容体である AT<sub>1</sub>-S105A/A109A/K199A 受容体を作製)。バルサルタンのこの AT<sub>1</sub> 変異型受容体に対する結合定数は 84 nM であり、バルサルタンの AT<sub>1</sub> 受容体の選択性は、約 2,800 倍へ著しく低下していた。バルサルタンの AT<sub>1</sub> 受容体側の Ser<sup>105</sup>、Ser<sup>109</sup>、Lys<sup>199</sup> へ結合が AT<sub>1</sub> 受容体選択性に重要であることがわかった (Miura S et al. *J Int Med Res.* 2012)。

次に、新規 ARB をデザインする前に、オルメサルタンに特徴的な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を同定し、さらに、アゴニストに作用のあるオルメサルタン類似化合物を見いだすこととした。

オルメサルタンのカルボキシル基をカルバモール基へ置換すると、IP 産生能に対して、オルメサルタンのインバースアゴニスト作用がなくなり、アンタゴニストとなった。さらに、オルメサルタンのカルボキシル基をカルバモール基へ置換し、フェノール基をビフェノール基へ付加したオルメサルタン類似化合物はアゴニスト作用を示した。このように、私たちは、僅かに ARB の化学構造を変えるだけで、薬理学的作用を変化させることに成功した。また、この際、インバースアゴニスト、アンタゴニスト、アゴニストが結合する AT<sub>1</sub> 受容体のアミノ酸部位は共通しており、新規 ARB を開発する一助となる情報を得ることができた。

#### 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 8 件)

1. Kiya Y, Miura S, Matsuo Y, Karnik SS, Saku K. Abilities of candesartan and other AT<sub>1</sub> receptor blockers to impair angiotensin II-induced AT<sub>1</sub> receptor activation after washout. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2012. (in press) 査読有
2. Miura S, Saku K. Efficacy and Safety of Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker/Calcium Channel Blocker Combination Therapy: Focus on a Single-pill Fixed-dose Combination of Valsartan/Amlodipine. *J Int Med Res.* 2012;40:1-9. 査読有
3. Miura S, Karnik SS, Saku K. Angiotensin II type 1 receptor blockers: Class effects vs. Molecular effects. *J Renin*

*Angiotensin Aldosterone Syst.* 2011;12:1-7. 査読有

4. Miura S, Matsuo Y, Kiya Y, Karnik SS, Saku K. Molecular mechanisms of the antagonistic action between AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 391:85-90: 2010. 査読有
5. Fujino M, Miura S, Kiya Y, Tominaga Y, Matsuo Y, Karnik SS, Saku K. A small difference in the molecular structure of AT<sub>1</sub> receptor blockers induces AT<sub>1</sub> receptor-dependent and -independent beneficial effects. *Hypertens Res.* 33:1044-1052:2010. 査読有
6. Bhuiyan MA, Ishiguro M, Hossain M, Nakamura T, Ozaki M, Miura S, Nagatomo T. Binding sites of valsartan, candesartan and losartan with angiotensin II receptor 1 subtype by molecular modeling. *Life Sci.* 85:136-140: 2009. 査読有
7. Qin Y, Yasuda N, Akazawa H, Ito K, Kudo Y, Liao CH, Yamamoto R, Miura S, Saku K, Komuro I. Multivalent ligand-receptor interactions elicit inverse agonist activity of AT<sub>1</sub> receptor blockers against stretch-induced AT<sub>1</sub> receptor activation. *Hypertens Res.* 32:875-883: 2009. 査読有
8. Bhuiyan MA, Hossain M, Miura S, Nakamura T, Ozaki M, Nagatomo T. Constitutively active mutant N111G of angiotensin II type 1 (AT<sub>1</sub>) receptor induced homologous internalization through mediation of AT<sub>1</sub>-receptor antagonist. *J Pharmacol Sci.* 111:227-234: 2009. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

1. 三浦伸一郎。ARB は成熟したのか? ~ イルベサルタンのペンタゴンアタッチメントを識る ~ / - 第 34 回日本高血圧学会総会、(2011 年 11 月 9 日、長崎)
2. 三浦伸一郎。ARB の Class effects と Drug effects。第 47 回日本臨床生理学会総会、ランチョンセミナー 2、2010 年 11 月 19 日、前橋。
3. 三浦伸一郎。ARB の化学構造の違いを臨床に活かせるか? ~ イルベサルタンのペンタゴンアタッチメントが生み出す特性 ~。第 33 回日本高血圧学会、2010 年 10 月 16 日、福岡。
4. 木谷嘉博、三浦伸一郎、藤野正礼、Sadashiva S Karnik、朔啓二郎。イルベサルタンの AT<sub>1</sub> 受容体非依存性効果—ロサルタンとの比較。第 33 回日本高血圧学

- 会、2010年10月15-17日、福岡。
5. 三浦伸一郎。ARBの化学構造の違いを臨床に活かせるか？第75回日本循環器学会総会・学術集会、2010年8月3日、横浜。
  6. Kiya Y, Miura S, Fujino M, Karnik SS, Saku K. A small difference in the molecular structure of AT1 receptor blockers induces AT1 receptor-dependent and -independent beneficial effects. 第14回日本心血管内分泌代謝学会。3.31-4.1.2010, Nara, Japan.
  7. 三浦伸一郎。高血圧患者の病態に合わせたARBの選択は可能か？。The 74<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 3.5-7. 2010, Kyoto, Japan.
  8. Kiya Y, Miura S, Fujino M, Akazawa H, Komuro I, Saku K. Differences between Angiotensin II- and Mechanical Stretch-induced Changes in the Conformation of Transmembrane III in an AT1 Receptor. The 74<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 3.5-7. 2010, Kyoto, Japan.
  9. 木谷嘉博、三浦伸一郎、藤野正礼、朔啓二郎。オルメサルタンのダブルチェーンドメインの臨床・薬理的な有用性。第52回日本腎臓学会学術総会、2009年6月3-5日、横浜。
  10. Miura S, Mastuo Y, Kiya Y, Saku K. Molecular mechanisms of AT2 receptor as a dominant negative receptor against AT1 receptor-induced cell signaling. The 26<sup>th</sup> Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section. 2009. 12. 4-5, Sapporo.
  11. 三浦伸一郎。降圧療法のココがポイント。第47回日本社会保険医学会総会、2009年11月12-13日、長崎。
  12. 三浦伸一郎。ARBのクラスエフェクトとドラッグエフェクト。第32回日本高血圧学会、2009年10月1日、大津。

## 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

(3) 連携研究者：なし