

氏 名	まる やま たか ゆき 丸 山 隆 幸
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 674 号
学位授与の日付	平成 14 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	細胞膜透過性の選択的 Ins(1,4,5)P ₃ 拮抗剤, 2APB の発見とその特異性と有用性に関する研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 市 川 厚 教 授 佐 藤 公 道 教 授 半 田 哲 郎

論 文 内 容 の 要 旨

細胞は、神経伝達物質やホルモンなどの様々な外来刺激に応答して多彩な生理機能を示す。その際、カルシウム (Ca) イオンは細胞内情報伝達のメッセンジャーとして重要な役割を果たしている。Ca²⁺ の主な供給源は、細胞内 Ca ストアおよび細胞外液である、細胞内 Ca ストアからの Ca²⁺ の放出には、セカンドメッセンジャーである Inositol-1,4,5-trisphosphate (Ins(1,4,5)P₃) の受容体を介したものと、Ins(1,4,5)P₃ には非感受性であるが、細胞内 Ca²⁺ 濃度 ([Ca²⁺]_i) の上昇により Ca²⁺ を放出するリアノジン受容体を介したものがある。一方、細胞外からの Ca²⁺ の流入には、電位依存性チャネル、Ca 透過性チャネル、受容体活性化 Ca チャネルなど様々なチャネルが関与していることが知られている。これらの多くのチャネルにより調節される細胞内 Ca シグナル機構を明らかにするためにはそれぞれのチャネルの選択的阻害剤が有力なツールとなるが、ニフェジピン、ベラパミルや SK&F96365 など、細胞外からの Ca²⁺ 流入阻害剤の有用性は報告されているものの、細胞内 Ca ストアからの Ins(1,4,5)P₃ による Ca²⁺ 放出を細胞外からの添加で特異的に制御し得るものは知られていない。そこで、著者は、細胞外からの添加で Ins(1,4,5)P₃ 受容体機能を阻害する化合物を探索し、2APB (2-aminoethyl diphenylborinate) を発見し、その研究ツールとしての有用性を明らかにするとともに、2APB と合わせて、利用可能な各種 Ca チャネル阻害剤を用いて、ラット由来の膵臓腺房細胞における [Ca²⁺]_i 調節と分泌応答について詳細に検討した。

第一章 細胞膜透過性の Ins(1,4,5)P₃ 拮抗剤の 2APB の発見とその作用特異性について

ラット小脳由来のミクロソーム標本を用いた Ins(1,4,5)P₃ 受容体結合阻害作用および Ins(1,4,5)P₃ による Ca 放出に対する抑制作用を指標とし、多数の化合物をスクリーニングすることにより、2APB を見出した。2APB は 0.1 μM の Ins(1,4,5)P₃ による Ca 放出を抑制し、その IC₅₀ 値は、42 μM であった。血小板や好中球での各種リガンド刺激による [Ca²⁺]_i 上昇に対して、2APB は細胞外からの添加で阻害作用を示した。さらに、2APB は摘出ウサギ大動脈標本において、アンジオテンシン II およびノルアドルナリンによって惹起される収縮反応を非競合的様式で抑制した。Ins(1,4,5)P₃ 誘発 Ca²⁺ 放出およびヒト血小板でのリガンド刺激による [Ca²⁺]_i 上昇に対する阻害作用を指標として、2APB の構造特異性について検討したところ、その分子内の B 原子は必須であり、モノフェニル、トリフェニル体は不活性であり、ジフェニル構造がその活性発現に重要であることが明らかとなった。

次に、2APB の作用の特異性を明らかにするために、細胞膜各種受容体の結合能、Ins(1,4,5)P₃ および cAMP 産生能、さらに他の Ca チャネル活性への影響について検討した。LTB₄、FMLP、TXA₂、エンドセリン、および PGE₂ 受容体への結合実験において、2APB は 100 μM で全く阻害作用を示さず、非特異的に細胞膜受容体を阻害する作用は無いと考えられた。また、ヒト血小板でのリガンド刺激による Ins(1,4,5)P₃ 産生抑制作用や、単独での cAMP 産生作用も認められなかった。2APB は細胞外液に Ca²⁺ が存在しない場合でも、ラット膵臓腺房細胞での CCK-8 やカルバコールによる [Ca²⁺]_i 上昇を阻害し、摘出ウサギ大動脈標本でのアンジオテンシン II 収縮をほぼ完全に抑制した。さらに、リアノジン感受性 Ca ストアからの Ca²⁺ 放出にも無影響であったことから、2APB は細胞内の Ca ストアの内、Ins(1,4,5)P₃ 感受性 Ca ストアか

らの Ca^{2+} 放出を特異的に抑制すると考えられた。一方、高濃度塩化カリウム添加による脱分極刺激によって惹起される収縮には全く影響しなかったことから細胞膜上に存在する膜電位依存性の Ca チャネルには作用しないと考えられた。

第二章 2APB および受容体活性化 Ca 流入阻害剤, SK&F96365 を用いたラット膵臓腺房細胞における分泌および細胞内 Ca 応答の検討

単離ラット膵臓腺房細胞を用いて、分泌刺激剤による分泌反応と、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化に及ぼす SK&F96365 と 2APB の作用を検討した。灌流標本を用いた経時的観察において、高濃度 CCK-8 (100 pM) で刺激した場合に認められる分泌と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加の持続相に対して、SK&F96365 は 30 μM では部分的に、100 μM ではほぼ完全に抑制したが、初期相に対しては全く影響しなかった。生理的濃度の CCK-8 (5 pM) で刺激した場合は、30 μM の SK&F96365 は律動性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変動 (Ca オシレーション) の頻度を減弱させた。この時の分泌反応にはほとんど影響しなかった。また、100 μM の SK&F96365 は CCK-8 による Ca オシレーションに大きく影響し、一過性の上昇に続く減少、というパターンに変化させた。この時、分泌反応の持続相も有意に阻害した。これらの結果から、ラットの膵臓から単離した腺房細胞において認められる分泌刺激剤による持続的な反応は、SK&F96365 によって選択的に阻害される受容体活性化 Ca^{2+} 流入に依存していることが示唆された。一方、2APB は生理的濃度の CCK-8 (2 pM) によって生じる Ca オシレーションを完全に抑制した。また、高濃度の CCK-8 (100 pM) によっておこる一過性のパターンの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇に対して、2APB (100 μM) は、生理的濃度の CCK-8 によって惹起される Ca オシレーションに類似したパターンに変化させた。それぞれ最大作用を示す濃度で、2APB と SK&F96365 を併用すると、CCK-8 (100 pM) による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加は相加的に抑制されたことから、2APB は SK&F96365 に感受性の受容体活性化 Ca チャネルを阻害しないとされた。

以上、著者は $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ 受容体機能を調節する細胞膜透過性の初めてのキャンディデートとしての 2APB を発見し、これが $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ 受容体の生理的役割を研究する上で大変に有用なツールとなることを明らかにした。さらに、2APB および SK&F96365 を用いた検討から、ラット膵臓腺房細胞において認められる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化と分泌反応に及ぼす $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ 受容体、および持続的反応の維持における受容体活性化 Ca 流入機構の生理的役割を明らかにした。本研究は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 調節機構の解明に重要な知見を与えるものであり、特に、2APB を用いた研究から $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ 受容体の病態生理的役割解明に関する研究が進展し、その誘導体の研究から $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ 受容体拮抗剤の臨床応用の可能性が期待される。

論文審査の結果の要旨

細胞内情報伝達の重要なメッセンジャーである細胞内カルシウム (Ca) イオンをコントロールする機構は複数あることが知られている。なかでも、細胞内 Ca ストアからの Ca 放出に関わる inositol-1, 4, 5-trisphosphate ($\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$) 受容体を介する機構はその重要性が示唆されているが、生理的、病的な細胞代謝での関与の程度は明らかではない。その主な原因は、 $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ 受容体を選択的に阻害する化合物がこれまで開発されていないためである。この観点から、著者は $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ 受容体を介する機構を選択的に阻害する化合物の探索を行い、2APB (2-aminoethoxydiphenyl borinate) を見出し、本化合物が各種動物の生理的代謝あるいは病的代謝における $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ 受容体の関与を証明するための優れたプローブになることを明らかにした。

著者は、まずラット脳ミクロソーム標本を用いた $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ 受容体結合阻害作用、および $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ による Ca 放出に対する抑制作用を指標に、約 5,000 種類以上の候補化合物をスクリーニングして、その中から 2APB を選択した。2APB は $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ 刺激による Ca 放出を IC_{50} 値 42 μM で阻害し、細胞外からの添加により血小板や好中球でのリガンド刺激に対する細胞内 Ca 濃度の上昇を完全に阻害した。さらに、摘出ウサギ大動脈標本におけるアンジオテンシン II およびノルアドレナリン刺激による Ca 依存性の収縮反応を非競合的様式で抑制した。2APB の構造特異性を細胞レベルで検討した結果、その分子内の Borone 原子とジフェニル構造は活性発現に必須であることを明らかにした。また、2APB はリガンド刺激による受容体を介する多様な細胞内情報伝達系に全く影響を与えず、 $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ 感受性 Ca ストアからの Ca 放出反応のみを特異的に抑制することを見出し、反応特異性の高い化合物であることを明らかにした。

次いで、2APB が単離ラット膵臓腺房細胞において CCK-8 刺激による酵素分泌反応を濃度依存的に抑制するという事実を見出し、この系を用いて細胞機能と細胞内 Ca 変化および $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ 受容体との相関関係を解析し、2APB が細胞内

Ca 変化に依存する細胞機能を解析するための有効なツールになることを証明した。

以上、著者は、Ins(1,4,5)P₃ 受容体機能を調節する細胞膜透過性の初めてのキャンディデートとして 2APB を発見し、本化合物が細胞内の Ca をコントロールする機構において果たす Ins(1,4,5)P₃ 受容体の役割、および生理的、病的な細胞代謝における Ins(1,4,5)P₃ 受容体由来の Ca の役割を解明するために有効なツールとなることを明らかにした。よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。さらに、平成14年6月13日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。