

氏名	加藤靖子
生年月日	
本籍	兵庫県
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第598号
学位授与の日付	平成15年9月30日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	PAR-1受容体拮抗薬の薬理学的研究
論文審査委員(主査)	米田 幸雄(自然科学研究科・教授)
論文審査委員(副査)	横井 毅(医学系研究科・教授) 山田 清文(薬学部・教授) 谷浦 秀夫(自然科学研究科・助教授) 萩田喜代一(摂南大学・助教授)

## 学位論文要旨

### Abstract

The antiplatelet and antithrombotic effects of FR171113, 3-(4-chlorophenyl)-2-(2,4-dichlorobenzoylimino)-5-(methoxycarbonylmethylene)-1,3-thiazolidin-4-one, a non-peptide protease-activated receptor 1 (PAR1) antagonist, were evaluated in guinea pigs. FR171113 inhibited Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> (a synthetic PAR1 agonist peptide)-induced and thrombin-induced aggregation of guinea pig platelets in a concentration-dependent manner in vitro (IC<sub>50</sub> = 1.5 μM and 0.35 μM, respectively). Subcutaneous administration of FR171113 (0.1 – 3.2 mg/kg) produced a dose-dependent inhibition of platelet aggregation ex vivo. The ED<sub>50</sub> value of FR171113 for platelet aggregation was 0.49 mg/kg s.c. However, FR171113 did not have an inhibitory effect on ADP- or collagen- induced platelet aggregation in vitro and ex vivo. One hour after FR171113 treatment at 1.0 mg/kg s.c., significant inhibition of arterial thrombosis without a prolongation of thrombin time or coagulation time was seen in the

FeCl<sub>3</sub>-induced carotid artery thrombosis model in guinea pigs. Furthermore, FR171113 did not prolong bleeding time even at 32 mg/kg s.c., which is a much higher dose than that required in the thrombosis model. These observations indicate that FR171113 has desirable antiplatelet effects both in vitro and in vivo and that its in vivo antithrombotic activity is efficacious without causing a prolongation of bleeding time.

トロンビンは細胞障害部位で形成されるセリンプロテアーゼの一つである。トロンビンは、フィブリノーゲンを切断してフィブリン血栓を形成することが良く知られているが、様々な細胞に作用する生理活性物質でもある (Scott ら、2001)。例えばトロンビンは血小板を活性化して凝集させ、セロトニン、ADP などを放出させるアゴニスト作用を示す。また、単球に対して正の遊走因子として働く。さらにトロンビンは、リンパ球、繊維芽細胞、血管平滑筋細胞に対して増殖作用を示し、血管内皮細胞に対しては プロスタサイクリン、PDGF、PAF、Tissue Factor などの産生を促進する。また CD62-P の細胞表面への輸送を促進し、好中球の接着を促す。トロンビンが示すこれらの生理作用は一見さまざまな方向性を示すように思われるが、血管系をはじめ組織における炎症、傷害に際し、修復ならびに増殖を司る情報伝達物質の一つとして役割を担っていると考えると、一連の現象であることが理解される (Fig. 1)。これらの多様なトロンビンの作用は以前より共通の受容体を介して発現すると考えられていたが、1991年 Vu ら (Vu ら、1991) によりトロンビン受容体がクローニングされたことが契機となり、それまで不明であったトロンビンによる情報伝達機構が明らかとなった。Vu らがクローニングしたトロンビン受容体は、その後現在までに二種のサブタイプ、PAR-3 (Ishihara ら、1997) および PAR-4 (Xu ら、1998) がそれぞれ発見されたことから、PAR-1 受容体と呼ばれるようになった (PAR: protease activated receptor)。PAR-2 受容体はトロンビンでは活性化されず、トリプシンなどにより活性化される (Borm ら、1996)。

PAR-1 受容体は、細胞膜を7回貫通し、三量体Gタンパクと共役するロドプシン型タンパクであるが、その活性化機序は PAR-1 受容体のクローニングまでに知られていたりガンド結合型受容体とは異なる。最初にトロンビンが受容体の細胞外N末端の高親和性部位に結合し、そこから約10アミノ酸N末端よりの Arg / Ser 間を切断することにより受容体内に組み込

まれているペプチド(SFLLRN.....)が露出する。この新たに露出したペプチドが自己に対するアゴニストとして働き、受容体のアゴニスト結合部位に結合することによってシグナル伝達が起こる。このアゴニスト部位のアミノ酸配列に相当する合成ポリペプチドである SFLLRNPNDKYEPF (PAR-1 受容体アゴニストペプチド-14 : TRAP-14 または PAR-1 AP-14) を細胞に加えると受容体の切断を必要とせず、受容体を直接活性化する。つまり PAR-1 受容体は、PAR-1 受容体活性化ポリペプチドによって活性化されるペプチド受容体の特殊な形態であるといえる。

代表的なトロンビン阻害剤としては Argatroban が知られているが、血液凝固時間の延長による出血傾向が懸念されるため、トロンビンを直接阻害することなく、受容体を介したトロンビンの作用を選択的に阻害する受容体拮抗薬は優れた抗血栓薬として期待できる。著者らは、トロンビンの多彩な生理作用に関する研究報告とともに、PAR-1 受容体に関する研究が進展したこと、特に PAR-1 受容体活性化ポリペプチドの最小シーケンス(SFLLRN)の発見やアゴニストペプチドと異なる配列のポリペプチド(FLLRN)による PAR-1 受容体の不活性化(Vassalloら、1992)、等の研究報告を鑑み、PAR-1 受容体拮抗薬の探索研究を開始した。スクリーニング系としてヒト血液を用い、PAR-1 受容体を介した凝集反応である SFLLRN 誘発血小板凝集反応を特異的に抑制するシーズを探索した結果、藤沢薬品工業の化合物ライブラリーより FR101906 を発見するに至った。

本研究では、シーズをもとに化学変換された非ペプチド化合物としては世界初の PAR-1 受容体拮抗薬である FR171113 を用いて、PAR-1 受容体の循環器系および炎症系における薬理学的な検討を行い、新規メカニズムを有する PAR-1 受容体拮抗薬の可能性を追求した。

## 第 1 章要約

1. FR171113 の各種凝集惹起剤による凝集反応に対する作用を検討した結果、FR171113 は PAR-1 受容体を介する凝集反応にのみ特異的に抑制作用を示した。
2. ヒト血小板を用い FR171113 の拮抗様式を検討した結果、FR171113 は PAR-1 受容体に対し競合拮抗を示し、 $pA_2$  は 7.29 であった。
3. FR171113 のトロンビンプロテアーゼ活性および APTT、PT、TT に対する作用を検討した結果、FR171113 は酵素阻害活性作用を持たないこと、

および血液凝固系に作用を示さないことが明らかとなった。

4. PAR-1 の受容体ファミリーである PAR-2 受容体および PAR-4 受容体に対する FR171113 の選択性を検討した結果、100  $\mu$ M においても無作用であった。FR171113 は PAR-1 受容体に対し特異的に拮抗作用を示すことが明らかとなった。

## 第 2 章要約

1. ヒト PAR-1 受容体のアゴニストペプチドである SFLLRN を用いて各種動物における血小板凝集反応を検討した結果、モルモットが最適であることが明らかとなった。
2. *in vitro* における血小板凝集抑制作用をヒトおよびモルモットで比較した結果、PAR-1 受容体拮抗薬である FR171113 は両者においてほぼ同等の有効性を示した。
3. モルモットの血液を用いて APTT、PT、TT に対する作用を検討した結果、FR171113 は酵素阻害活性作用を有しておらず、血液凝固系にも作用を示さなかった。
4. 生体内により近い条件を想定し、ヒトおよびモルモット全血凝集反応を検討した結果、FR171113 は全血の部分成分である富血小板血漿 (PRP) を用いたときとほぼ同等の有効性を示した。
5. モルモットにおいて s.c. 投与による *ex vivo* 血小板凝集抑制作用を検討した結果、FR171113 は PAR-1 受容体を介する凝集反応にのみ特異的に抑制作用を示した。
6. s.c. 投与によるモルモット FeCl<sub>3</sub> 誘発血栓形成モデルを検討した結果、FR171113 は血液凝固系を制御することなく有効性を示した。
7. モルモットにおいて s.c. 投与による出血時間の延長作用を検討した結果、FR171113 は抗血栓作用を示す薬効用量では無作用であった。

### 第3章要約

1. ラットにおいてトロンビンや PAR-1 アゴニストペプチドが急性疼痛を発現することを Von Frey filament(機械的接触刺激)法を用いて明らかにした。
2. トロンビンや PAR-1 アゴニストペプチドが誘発する急性疼痛に対し PAR-1 アンタゴニストの FR171113 が抑制作用を示したことにより、急性疼痛に対する PAR-1 受容体の関与が示唆された。
3. ラットにおいてトロンビン、PAR-1アゴニストペプチドおよびトリプシンは、炎症性疼痛の誘発に広く用いられている FCA やカラゲニンと比較して、より早く疼痛反応を発現させた。

### 結論

非ペプチドタイプの PAR-1 受容体拮抗薬である FR171113 の薬理的解析を行い、以下の結論を得た。

- 1, FR171113 は非ペプチド性の化合物としては世界で初めて、PAR-1 受容体に特異的な拮抗薬であることを明らかにした。
- 2, モルモット血栓モデルにおける FR171113 の有効性が明らかとなった。この作用は抗血小板薬として望ましいプロファイルと予想される出血時間延長を伴わない効果であることを示した。
- 3, PAR-1 受容体は循環器系だけでなく炎症系においても薬理作用発現に関与していることを明らかにし、PAR-1 受容体を標的分子とする新薬剤開発の可能性を広げた。

## 学位論文審査結果の要旨

本研究は、血液凝固系における重要なセリンプロテアーゼであるトロンビンについて、その受容体の一つである PAR-1 受容体の病態時における機能調節に関する検討を行うとともに、同受容体拮抗薬の開発と薬理作用追究を行ったものである。

血小板凝集による解析で、新規化合物 FR171113 は PAR-1 受容体を介する凝集反応を特異的に抑制したが、PAR-1 受容体に対し FR171113 は競合拮抗作用を示し、その  $pA_2=7.29$  であった。しかしながら、FR171113 はトロンビン阻害活性を持たないため血液凝固系には無作用であった。一方、ヒト PAR-1 受容体アゴニストペプチドを用いた血小板凝集評価系では、実験小動物を用いる場合モルモットが最適であることが明らかとなったのに対して、FR171113 の *in vitro* 凝集反応系における有効性については、モルモットとヒトで種差は無かった。また、FeCl<sub>3</sub> 誘発血栓モデルにおいては、FR171113 が有意な血栓形成抑制作用を示す用量では出血時間に対し無作用であった。トロンビンおよび PAR-1 受容体アゴニストペプチド TFLLR の末梢投与で、急性疼痛が発現することが機械的接触刺激の評価法で確認された。トロンビン誘発および TFLLR 誘発急性疼痛に対し FR171113 は濃度依存的な抑制作用を示し、急性疼痛における PAR-1 受容体の関与を強く示唆した ( $ED_{50}$ : トロンビン 2.4 mg/kg、TFLLR 2.6 mg/kg)。したがって、FR171113 が非ペプチド性の化合物として、世界で最初の PAR-1 受容体特異的な拮抗薬であることが明らかとなっただけでなく、PAR-1 受容体拮抗薬は優れた抗血栓薬となる可能性が期待される。さらに、循環器系だけでなく炎症系や疼痛系においても、PAR-1 受容体を標的分子とする新薬開発の可能性が推察される。

以上の研究成績は、PAR-1 受容体の非ペプチド性新規拮抗薬の開発に関する先駆的報告であるとともに、PAR-1 受容体を標的分子とする新しい薬物治療分野開拓の可能性を示唆する点で高く評価されるので、本論文は博士（薬学）に値すると判断する。