特異的 $G_{q/11}$ 阻害薬 (YM-254890) の 薬理学的プロファイル

川崎 富久, 上村 俊雄, 谷口 昌要, 高崎 淳

要約: 我々は土壌細菌 QS3666 株が生産する新規環状デプシペプチド YM-254890 が, ADP 惹起ヒト血小板凝集を強く阻害することを発見した. 詳細な作用機構の検討を行った結果, 本剤は特異的な $G_{q/11}$ 阻害薬であり, 作用点は $G_{q/11}$ の GDP/GTP 交換反応であることが判明した. YM-254890 は ADP 刺激後の $[Ca^{2+}]_i$ 増加, P-セレクチン発現および血小板 shape change を阻害した. また, 本剤はコラーゲン, TRAP, アラキドン酸, U46689 惹起血小板凝集を ADP と同様に阻害したが, PMA, リストセチン, thapsigargin, A23187 惹起血小板凝集を阻害しなかった. YM-254890 は, 高ずり応力条件下における血小板凝集やコラーゲン表層上での血小板壁血栓形成を阻害するばかりか, 種々の in vivo 血栓症モデルにおいても強力な抗血栓作用を発現し, 血栓溶解剤との併用効果も確認された. さらに, YM-254890 はマウス血管内膜肥厚モデルにおいて, 血管傷害 3 週間後の内膜肥厚形成を抑制した. しかし, 本剤は G_q ばかりではなく G_{11} も阻害することから強い末梢血管拡張作用を有し, 全身投与では降圧用量との安全域が狭いため, その臨床応用には慎重な用法用量の設定が必要と考えられた. そこで, ラットラウリン酸誘発下肢壊死モデルにおいて, ラウリン酸傷害後の動脈内に単回投与を行ったところ, 既存薬である PGE_1 やクロピドグレルより強い薬効が確認され, 安全域も広がった. YM-254890 は $G_{q/11}$ が関与する種々の疾患の治療薬となり得る可能性が示唆された. また, 本剤は $G_{q/11}$ の GDP/GTP 交換反応を阻害するユニークな化合物であり, G タンパク質活性化機構, $G_{q/11}$ 媒介性シグナル伝達あるいは $G_{q/11}$ の生理機能を解明する有用なバイオプローブとなることが期待される.

1. はじめに

微生物, 植物, 海洋生物は多種多様な構造と特異性の高い生理活性を有する天然有機化合物を二次代謝産物として生産し, 医薬品などの有用物質として人類に多大な恩恵を与えてきた. 抗生物質ペニシリン, 高脂血症治療薬プラバスタチン, 免疫抑制薬タクロリムスなどがその代表例として挙げられる. これら天然有機化合物の化学構造的多様性は人知の及ばないものであり, ポストゲノム時代と呼ばれる 21 世紀の医薬品開発にも大きな役割を果たすことが期待される.

動脈血栓は心筋梗塞, 狭心症, 脳血栓症, 末梢動脈閉塞症などの疾患を引き起こし, その予防と治療に様々な標的分子を阻害する抗血小板薬が用いられている. その中で, シクロオキシゲナーゼ阻害薬であるアスピリンおよび ADP 受容体阻害薬であるクロピドグレルが臨床的に汎用されているが, 血栓防止効果の有効性は臨床ニーズを満足させるものではなく, 前者には消化管傷害の副作用やジレンマの問題点が, 後者にはノンレスポンスの存在や薬物相互作用が報告されており, より効果や利便性の高い抗血小板薬の開発が望まれている.

そこで, 我々は微生物二次代謝産物ライブラリーを用い血小板凝集阻害物質の探索を行った. その結果, 東京都奥多摩町で採取した *Chromobacterium* 属の土壌細菌 QS3666 株が生産する YM-254890 (図 1-a) が ADP 惹起ヒト血小板凝集を強く阻害することを発見した(1). 興味深いことに, 本剤は ADP ばかりかコラーゲン, トロンビン受容体アゴニスト (TRAP), アラキドン酸および U46619 で惹起したヒト血小板凝集も強く阻害したが, PMA, リストセチン, Thapsigargin

図1 YM-254890の構造(a)とヒト血小板凝集阻害活性(b)

b) 健康人ボランティアより3.8%クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採血を行い、遠心操作により30万/ μ lの多血小板血漿を調製した。また、多血小板血漿からさらなる遠心操作により血小板ペレットを回収しTyrode-Hepesバッファーを用いて洗浄操作を行い、30万/ μ lの洗浄血小板を調製した。アッセイには血小板凝集計(MCMヘマトレーサー212)を用いた。データは3例の実験のIC₅₀値の平均値±標準誤差。(文献2より改変)

およびA23187で惹起したヒト血小板凝集には影響せず(2)(図1-b), 従来の抗血小板薬とは作用点が異なることが示唆され, 作用機構の解明を行うとともに抗血小板薬としての薬理学的プロファイルを詳細に検討した。

2. YM-254890の作用機構の解明

ADPは2種類のADP受容体P2Y₁およびP2Y₁₂を介して血小板凝集を惹起することが知られている。P2Y₁はG_{q/11}共役型の受容体でPLC β 活性化に基づく細胞内Ca²⁺濃度上昇を引き起こし, P2Y₁₂はG_i共役型の受容体でアデニル酸シクラーゼ阻害に基づくcAMP産生低下を誘発する。YM-254890がADP凝集を阻害することから, まずP2Y₁発現細胞の2MeSADP惹起Ca²⁺濃度上昇およびP2Y₁₂発現細胞の2MeSADP惹起cAMP産生阻害に対する影響を検討した。その結果, YM-254890はG_{q/11}共役型のP2Y₁シグナル伝達を選択的に阻害した(3)。既述したように, YM-254890はADP惹起血小板凝集以外にもG_{q/11}媒介性のTRAP, U46619惹起血小板凝集を阻害することから, YM-254890はG_{q/11}媒介性のシグナル伝達経路を特異的に阻害している可能性が考えられた。そこで, 種々のG_{q/11}共役受容体刺激による細胞内Ca²⁺濃度上昇に対するYM-254890の効果を検討した結果, UTP惹起P2Y₂発現細胞, ロイコトリエンD₄惹起CysLT-R1, -R2(ロイコトリエン受容体)発現細胞およびメタコリン惹起M₁(ムスカリン受容体)発現細胞の細胞内Ca²⁺濃度上昇をすべて強く阻害した(3)。

一方, G_s共役型の β_2 (アドレナリン受容体)発現細胞のイソプロテレノール惹起cAMP産生およびG_i共役型のP2Y₁₂発現細胞の2MeSADP惹起cAMP産生低下を阻害しなかった(3)。以上より, YM-254890はG_{q/11}, G_sおよびG_iのうち, G_{q/11}を介するシグナル伝達経路を選択的に阻害することが示唆された。G_i共役型受容体刺激はアデニル酸シクラーゼ阻害を示すものが多いが, 好中球走化性因子fMLP受容体(FPR)はG_iを介してPLC β を活性化することが知られている。そこで, 好中球様に分化させたHL60細胞を用いてfMLP惹起Ca²⁺濃度上昇に対するYM-254890の効果を検討した結果, YM-254890はこれを阻害しなかった(3)。したがって, YM-254890はPLC β あるいはその下流のシグナル伝達は阻害せずにG_{q/11}の活性化を阻害することが示唆された。

さらに詳細な作用点を解明するため, G_{q/11}活性化機構(受容体-G_{q/11}相互作用, GDP/GTP交換反応およびGTP結合型G_{q/11}によるPLC β 活性化)のどの段階を阻害するかを検討した。まず, G_{q/11}活性化型変異体Q209L, R183Cによる転写活性化能に対する作用を検討した結果, YM-254890はGTPase活性が弱いために活性化型になった変異体R183C由来のシグナルを強く阻害するが, GTP結合型に固定されたために活性化型になった変異体Q209L由来のシグナルには弱い阻害しか示さなかった(3)。この結果より, YM-254890の作用点はGTP結合型G_{q/11}によるPLC β 活性化ではなく, 受容体-G_{q/11}相互作用あるいはGDP/GTP交換反応であることが示唆された。さらに,

P2Y₁ 受容体へのアゴニスト [³H]-2MeSADP の高親和性結合に対して YM-254890 は影響を与えなかったことから、YM-254890 は受容体- $G_{q/11}$ 相互作用を阻害していないことが判明した (図 2-a). これらの結果より、YM-254890 の作用点は受容体- $G_{q/11}$ 相互作用ではなく、GDP/GTP 交換反応であることが示唆された. そこで、[³⁵S]-GTP γ S 結合実験を用いてアゴニスト依存性の $G_{q/11}$ の GDP/GTP 交換反応に対する作用を検討した結果、YM-254890 はこれを濃度依存的に阻害した (図 2-b). 以上より、YM-254890 の作用点は $G_{q/11}$ の GDP/GTP 交換反応であることが強く示唆された.

3. YM-254890 の in vitro 抗血小板作用

一方、ヒト血小板を用いて YM-254890 の抗血小板作用について詳しい解析を行った. YM-254890 は ADP 惹起の血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 増加作用を MRS2179 (特異的 P2Y₁ 阻害薬) と同様に強く阻害した ($IC_{50}=0.92 \mu M$) が、thapsigargin 惹起の血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 増加作用には影響しなかった (2). YM-254890 は ADP (図 3-a) および TRAP (図 3-b) で惹起した血小板 P セレクチン発現を強く阻害した (IC_{50} はそれぞれ $0.51 \mu M$ および $0.16 \mu M$) が、MRS2179 は ADP 惹起血小板 P セレクチン発現のみを阻害した (2). YM-254890 はアゴニストにかかわらず G_q 共役型受容体を介した血小板放出反応を阻害しようと考えられた. また、ヒト化抗 GPIIb/IIIa モノクローナル抗体である YM337 は血小板膜糖タンパク質 IIB/IIIa (GPIIb/IIIa) へのビオチン化フィブリノーゲンの結合を強く阻害 ($IC_{50}=0.16 \mu M$) するのに対して、YM-254890 は阻害効果を示さなかった (2). 一方、YM-254890 は FITC ラベルフィブリノーゲンの TRAP 惹起洗浄血小板への結合を YM337 同様強く阻害した ($IC_{50}=0.47 \mu M$) (2). これは、YM-254890 によりトロンビン受容体 (PAR-1) からのシグナル伝達が阻害され、GPIIb/IIIa の活性化が抑制されたためであると考えられた. また、ADP 惹起後の血小板 shape change は YM-254890 により完全に阻害されたが、コラーゲン、TRAP、アラキドン酸、U46619、A23187 惹起後の血小板 shape change は阻害されなかった (2). ADP 刺激後の shape change には P2Y₁-PLC β シグナルが関与することが知られている (4). 一方、コラーゲン、TRAP、アラキドン酸、U46619、A23187 惹起後の shape change においては、 G_q 非依存的シグナル経路の存在が示唆された. 文献的には TRAP や U46619 刺激後の shape change には $G_{12/13}$ -Rho の関与が (5)、コラーゲンや A23187 刺激

後のそれには Src/Syk ミオシン軽鎖キナーゼ経路の重要性が知られている (6). YM-254890 の血小板凝集阻害のスペクトラムについては図 1-b に既述したが、この中で phorbol esters (PMA)、 Ca^{2+} -ATPase 阻害薬 (thapsigargin)、GPIb-vWF modulators (リストセチン)、 Ca^{2+} イオノフォア (A23187) 惹起による血小板凝集反応は G_q 非依存的であることが知られており、YM-254890 による阻害は認められなかった. また、YM-254890 のコラーゲン凝集阻害活性は、用いるコラーゲン濃度に依存し、低濃度コラーゲンで惹起した場合は G_q 依存的なトロンボキサン A_2 の関与が大きいため YM-254890 の阻害は強く認められるが、高濃度コラーゲンで惹起した場合には、 G_q 非依存的な PLC $\gamma 2$ 経路の寄与度が大きくなり YM-254890 の阻害活性は大きく減弱した (7). 哺乳動物のほとんどの組織は構造的にも機能的にも非常に類似した G_q と G_{11} を共に発現しているが、血小板は例外で G_q しか発現していない (8). 従って、YM-254890 の抗血小板作用は G_q 阻害によるものであると考えられ、これら YM-254890 の抗血小板作用は G_q ノックアウトマウス (9) のフェノタイプと一致していた.

次に、生理的な重要性が注目されている流動条件下での血小板凝集および血小板血栓形成における影響を検討した. 高ずり応力惹起血小板凝集は臨床での狭窄した冠動脈での病態生理においてその重要性が示唆されている (10). 興味あることに、高ずり応力惹起血小板凝集には従来のアゴニスト惹起血小板凝集で主役を演じるフィブリノーゲンではなくフォンビルブラント因子 (vWF) が重要な役割を果たすことが明らかとなっている. 液相中の vWF はずり応力のない状況下では血小板と結合することはないが高ずり応力がかかると GPIb と結合し、これを引き金に血小板が活性化され血小板膜上の GPIIb/IIIa は立体構造を変化させる. これにて vWF と GPIIb/IIIa との非可逆的な結合が成立し血小板凝集塊が形成される (11). YM-254890 はコーンプレート型回転粘度計を用いたずり応力惹起血小板凝集を濃度依存的に阻害した ($IC_{50}=0.57 \mu M$). この阻害強度はアゴニスト惹起血小板凝集阻害活性とほぼ同等であった. 図 1-b に既述したように YM-254890 はリストセチン凝集を阻害しないが GPIb-vWF 結合で開始されるずり応力惹起血小板凝集を阻害したことより、ずり応力惹起血小板活性化反応における G_q の関与が伺われる. しかしながら、コーンプレート型ずり応力惹起血小板凝集計は古典的血小板凝集計と同様、閉鎖系の攪拌システムであり、生体内の血流の再現という点では不満が残る. そこで生

図2 リガンド/P2Y₁/G_{q/11}の相互作用に与えるYM-254890の影響

a) P2Y₁発現細胞膜への³H-2methylthio-ADP (2MeSADP)の結合親和性は38 nMであった。GTP γ Sを添加してG_{q/11}をGTP結合型(P2Y₁とG_{q/11}が乖離)にするとその親和性は低親和性となる(103 nM)。しかし、10 μ M YM-254890共存下でも³H-2MeSADPの結合親和性は変わらなかった。これは、YM-254890は2MeSADPとP2Y₁、P2Y₁とG_{q/11}の相互作用に影響しないことを示している。b) P2Y₁発現細胞膜を2MeSADPで刺激するとGDPとGTPの交換反応が起きるが、これは³⁵S-GTP γ Sの結合で検出できる。このリガンド依存的な³⁵S-GTP γ Sの結合はYM-254890で濃度依存的に抑制された。これは、YM-254890がGDPとGTPの交換反応を阻害していることを示している。(文献3より改変)

理的血流状況のin vitro実験系での再現を目的とした実験系として汎用されるフローチャンバシステム(12)を用いてYM-254890の高ずり応力下でのin vitro血小板壁血栓形成に及ぼす影響を検討した。ガラスプレート上に固相化したI型コラーゲンへの高ずり応力下血小板壁血栓形成を検討したところ、YM-254890はこれを濃度依存的に阻害した(IC₅₀=25 nM, 図3-c, d)。興味深いことにYM-254890は、アゴニスト惹起血小板凝集阻害活性や高ずり応力惹起血小板凝集阻害活性と比較して流動条件下コラーゲン上での血小板血栓の成長をより低濃度で阻害した。高ずり応力下、コラーゲン表面上での血小板壁血栓形成機序については、血漿中のvWFが固相コラーゲンに結合し、徐々に局所濃度を増した付着vWFがGPIbと結合して一層性の強固な血小板粘着層が形成し、この血小板粘着層を足場にしてフィブリノーゲン、vWF、GPIa/IIa、GPIV、GPVI、 $\alpha_v\beta_3$ などが関与して血栓の三次元的成長を構築するものとされているが今だ不明の点も多い。その過程にG_qが関与することがYM-254890を用いた実験から強く示唆された。血小板の活性化機構におけるYM-254890の作用点を図4に示した。

4. YM-254890のin vivo抗血栓作用ならびに抗動脈硬化作用

種々の血栓症モデルにおけるYM-254890のin vivo抗血栓作用を検討した。まず、Foltsらの方法(13)に従い、カニクイザルの大腿動脈に内皮傷害と機械的狭窄による血小板血栓モデルの作成を行った。図5-aに

示すように血管狭窄部への血小板凝集塊の集積による周期的な血流の低下(cyclical flow reductions)を観察することができ、薬剤の静脈内累積投与での薬効評価が可能な血小板血栓モデルを構築した(2)。本モデルにおいてYM-254890は用量依存的に血栓形成時間を延長し、0.3 μ g/kgで有意な血栓形成時間の延長が認められた(図5-b)。この抗血栓作用はex vivo血小板凝集阻害活性とほぼ関連していた(図5-c)。

マウス塩化鉄惹起頸動脈血栓モデルにおいては、30 μ g/kg, i.v.(5分前投与)あるいは1 mg/kg, p.o.(1時間前投与)で有意な抗血栓作用が発現した(14)。さらに、ラット電気刺激誘導頸動脈血栓モデルにおいては、3 μ g/kg, i.v.(5分前投与)以上で有意な抗血栓作用が発現した(15)。これらの結果より、YM-254890は種々のin vivo血栓モデルにおいて用量依存的な抗血栓作用を発現することが確認された。

次に、ラット電気刺激誘導頸動脈血栓モデルを用いて血栓溶解剤(改変型t-PA, パミテプラーゼ)との併用効果を検討した。電気刺激後、血管の完全閉塞を確認した5分後にYM-254890とパミテプラーゼを静脈内投与し、血栓溶解およびその後60分間の血流開存状況をドップラー血流計を用いて評価した。血栓溶解剤投与60分間の血管開存状況を図6-aに、再開通時間、再開通率および再閉塞率を図6-bに示す。YM-254890の併用投与により、用量依存的に血管開存状況は改善し(図6-a)、再開通時間の短縮と再開通後の再閉塞率の減少が認められた(図6-b)。本モデルではYM-254890は30 μ g/kgで有意な抗血栓作用を発現した(15)。

図3 血小板膜上でのPセレクトリン発現 (a, b) と固相化コラーゲン上での血小板壁血栓形成 (c, d)

ADP (a) あるいは TRAP (b) 刺激後の血小板膜上の P セレクトリン発現を FACS により検出した。データは 5 例の平均値 + 標準誤差。## $P < 0.01$ (Student- t 検定, 未刺激群との比較), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Dunnett 多重比較検定, 溶媒群との比較)。c) 全血中の血小板を DioC6 (3) で蛍光標識し, I 型コラーゲンを固相化したフローチャンバーに高ずり速度下 (1,500 /s) で 7 分間灌流した。共焦点レーザー顕微鏡の断層像から構築した血小板血栓の三次元画像。左は溶媒群を, 右は 100 nM 添加群の代表例を示す。上段は水平面, 下段は斜めから見た 3D イメージ画像。d) 血栓量に及ぼす YM-254890 の抑制効果。データは 5 例の平均値 + 標準誤差。** $P < 0.01$ (Dunnett 多重比較検定, 溶媒群との比較)。(文献 2 より改変)

図4 P2Y₁-G_{q/11} シグナルの活性化機構と YM-254890 の作用点

血小板膜の P2Y₁ は $G_q/\beta/\gamma$ の三量体 G タンパク質と複合体を形成しており, G_q には GDP が結合している。この受容体に ADP が結合すると G_q で GDP と GTP の交換反応が起こる。GTP 結合型 G_q は受容体から乖離して phospholipase C (PLC) を活性化し, 産生された inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) によって細胞内カルシウム濃度が上昇する。その結果, 細胞骨格の変化が起き, 血小板が shape change する。YM-254890 は GDP と GTP の交換反応を阻害する結果, リガンドの高親和性結合には影響を及ぼさないが, GTP が結合できないため, PLC 活性化以降のシグナルが活性化しない。

さらに, マウス血管傷害内膜肥厚モデル (16) を用いて YM-254890 の抗動脈硬化作用を検討した。マウス頸動脈を 10% FeCl₃ 溶液で 3 分間傷害すると, 15 分以内で全例に閉塞性血栓が形成するが, その後 48 時

間以内に自己線溶活性により血流は再開通し, 傷害部位に炎症反応が惹起され, 3 週間後には傷害血管内腔の 40-50% が狭窄する新生内膜が形成する (図 7-a-ii)。この内膜肥厚病変にはプルシアンブルー陽性部位が散

図5 カニクイザル大腿動脈血栓モデルにおける YM-254890 の抗血栓作用

ピンセットによるピンチングにより大腿動脈内皮を傷害し、絹糸を用いて部分狭窄を加えることで傷害部位での血小板血栓を作成した。a) YM-254890 累積静脈内投与時の cyclic flow reductions および心拍数・血圧の典型チャート。b) YM-254890 の抗血栓作用。血栓形成時間は溶媒群に対する相対値として算出した。データは各個体の血栓形成時間および各群の中央値。* $P < 0.05$ (Steel 検定, 溶媒群との比較)。c) ADP 惹起血小板凝集阻害活性。データは 5 例の平均値 + 標準誤差。** $P < 0.01$ (Dunnett 多重比較検定, 溶媒群との比較)。(文献 2 より改変)

図6 ラット頸動脈血栓モデルにおける YM-254890 の血栓溶解促進作用および再閉塞予防効果

a) パミテプラーゼ投与後 60 分間の血流再開状況。各バーは各個体を示し、黒は閉塞を白は開通を表す。b) 電気刺激後血流の完全停止 5 分後にパミテプラーゼ (1 mg/kg) と YM-254890 (3-30 $\mu\text{g/kg}$) を静脈内投与した。その後 60 分間の血管再開状況を観察し、再開時間、再開通率、再閉塞率を求めた。データは各個体の再開時間と各群 ($n = 6-8$) の中央値。* $P < 0.05$ (Steel 検定, 溶媒群との比較)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (χ^2 検定, 溶媒群との比較)。(文献 15 より改変)

在し、局所に残存した Fe^{3+} によるラジカル産生が肥厚形成に寄与しているものと考えられる (17)。また、

肥厚部位には免疫組織染色により平滑筋 α アクチン陽性細胞が多数認められ、平滑筋様細胞から成ること

図7 マウス血管傷害内膜肥厚モデルにおける YM-254890 の抗動脈硬化作用

a) マウス頸動脈組織標本例。ホルマリン灌流固定後、傷害部位をパラフィン包埋し、30 μm 間隔で6 μm の輪切り連続切片を作成した。ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、各個体で最も狭窄の強い部位を探索した。i: 正常血管, ii: 塩化鉄刺激3週間後の傷害血管(溶媒群), iii: 塩化鉄刺激3週間後の傷害血管(YM-254890: 3 mg/kg bid 群), スケールは200 μm 。b) 血管傷害3週間後の血管狭窄率を画像解析により算出した。薬剤は血管傷害1時間前および傷害後12時間毎に1週間経口投与した。データは9-23例の平均値+標準誤差。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Dunnett 多重比較検定, 溶媒群との比較)。 (文献 14 より改変)

図8 ラットラウリン酸下肢壊死モデルにおける YM-254890 の壊死進展予防効果

a) ラウリン酸注入3日後における下肢壊死スコア(5指の総計, 各指の病変スコア基準を右に示す)。データは各群の平均値+標準誤差 ($n = 6-24$)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Steel 検定, 溶媒群との比較)。*** $P < 0.01$ (Wilcoxon 検定, 偽手術群との比較)。b) ラット左大腿動脈内にラウリン酸注入前後の下肢皮膚血流量のドップラーイメージの典型例。左列: 溶媒群, 右列: YM-254890 10 $\mu\text{g/kg}$ 群, 上段: ラウリン酸注入前, 中段: ラウリン酸注入10分後, 下段: ラウリン酸注入15分後に薬剤あるいは溶媒を投与した10分後。(Elsevier の許可を得て文献 19 より改変)

が示唆される(17)。本モデルに対し, YM-254890 を血管傷害1時間前から傷害1週間後まで0.3-3 mg/kg

を1日2回経口投与したところ, 用量依存的な血管狭窄率の低下が認められた(14) (図7a-iii, 図7-b)。対

照薬として用いたクロピドグレルも抗血栓用量で内膜肥厚形成を有意に阻害したがその薬効強度はYM-254890より明らかに弱かった(14)．これはYM-254890の抗血小板作用の広いスペクトラムに起因するのかもしれないし、本モデルの内膜肥厚形成に抗血小板作用以外の $G_{q/11}$ の生理作用が関与している可能性もある．残念なことに、本肥厚モデルでのYM-254890の最小有効用量である1 mg/kgでは全身血圧に有意な低下は認められなかったものの、3 mg/kgでは36%の有意な血圧低下が認められたため、血管拡張作用が肥厚形成に影響を与えた可能性は否定できない．また、培養ラットおよびヒト平滑筋細胞のFCS刺激細胞増殖反応をYM-254890は阻害しなかったことより、本剤に直接的な平滑筋細胞増殖抑制作用はないと考えている(14)．

これまでYM-254890のin vivo動物モデルを用いた抗血栓作用、血栓溶解剤との併用効果および内膜肥厚抑制作用を既述したが、YM-254890は動物種にかかわらず有効用量に比較的近い用量で降圧作用を発現した．生体の血圧調節には $G_{q/11}$ 媒介性シグナル伝達が深く関与していることが報告されており(18)、YM-254890の降圧作用も $G_{q/11}$ 阻害活性に起因すると推定される．そこで、YM-254890の血管弛緩反応をラットaorta摘出リング標本を用いて検討した．YM-254890は、フェニレフリン(1 μ M)、セロトニン(10 μ M)あるいはエンドセリン(30 nM)惹起血管収縮反応を濃度依存的に阻害し(IC_{50} =8.6-16 nM)、YM-254890の降圧作用は強力な血管拡張作用に基づくと考えられた(19)．

5. ラット重症末梢動脈閉塞症モデルにおける下肢壊死進展阻止効果

YM-254890が抗血小板作用に加えて強力な血管拡張作用を有すること、抗血栓用量が降圧用量に近く、全身投与の場合、安全域の慎重な設定が必要となることが予想された．そこでラウリン酸誘発重症下肢壊死モデルにおける本剤の薬効を動脈内局所投与で評価した(19)．薬剤非投与群ではラウリン酸投与3日後には下肢壊死や脱落病変が認められた．ラウリン酸注入15分後にYM-254890を3 μ g/kg以上投与すると病変スコアの有意な改善が認められた(図8-a)．YM-254890を30および100 μ g/kg投与した後、全身血圧はそれぞれ25%および50%有意に低下したが、10 μ g/kg以下では有意な変動は認められなかったことより、薬効用量と降圧用量との安全域は3～10倍と推定された．本実験においては PGE_1 およびクロピ

ドグレルを対照薬として、文献上有効性が報告されている用量(20)を用いて薬効比較を行ったが、 PGE_1 (ラウリン酸投与5分前から30分間の持続静脈内投与あるいはラウリン酸投与5分後から15分間の動脈内持続投与)については有意なスコア改善が認められたもののYM-254890より有効性は低く、クロピドグレルについてはラウリン酸注入4時間前および術後3日間経口投与(1日1回)で薬効は認められたものの、ラウリン酸注入2時間後および術後3日間経口投与(1日1回)での薬効は検出できなかった(19)．さらに本実験においては、レーザードップラー血流計を用いた皮膚血流量測定を行った．ラウリン酸注入後、急速な下肢皮膚血流量の低下が惹起されるが、YM-254890の後投与により皮膚血流量は顕著に増加した(図8-b, 右列)(19)．また、 PGE_1 の前投与により皮膚血流量は明らかに増加するがラウリン酸注入後、顕著な低下が認められた(19)．一方、クロピドグレル投与による明らかな血流量増加は認められなかった(19)．本邦では重症末梢動脈閉塞症の治療法として薬物療法その他、カテーテル治療やバイパス術が施行されているが、抵抗性を示す患者も多く毎年5千人以上の患者が四肢切断を余儀なくされ、近年では血管再生療法の臨床応用が試みられている．本剤は従来薬に代わって、患者の予後やQOLを改善する有用な薬剤となり得ると考えられた．

6. おわりに

Gタンパク質を直接修飾してその機能障害を引き起こす細菌毒素としてコレラ毒素および百日咳毒素はこれまでも知られていたが、Gタンパク質に特異的に直接作用する低分子化合物は見つかっていなかった．YM-254890は世界で初めて見出された $G_{q/11}$ 特異的低分子阻害薬であり、Gタンパク質活性化機構、 $G_{q/11}$ 媒介性シグナル伝達あるいは $G_{q/11}$ の生物学的特性を解明する有用なバイオプローブとなることが期待される．また、YM-254890は重症末梢動脈閉塞症をはじめとする $G_{q/11}$ が関与する種々の疾患の治療薬となり得る可能性を有しており、今後の臨床応用が期待される．

謝辞：本稿の査読を賜りました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 伊東 広教授に厚く御礼申し上げます．また、本研究の遂行にあたり多大なるご協力をいただきましたアステラス製薬株式会社薬理研究所 高松肇博士に深謝申し上げます．

文 献

- 1) Taniguchi M, et al. J Antibiot. 2003;15:358-363.
- 2) Uemura T, et al. Br J Pharmacol. 2006;148:61-69.
- 3) Takasaki J, et al. J Biol Chem. 2004;279:47438-47445.
- 4) Jin J, et al. J Biol Chem. 1998;273:2030-2034.
- 5) Bauer M, et al. Blood. 1999;94:1665-1672.
- 6) Riondino S, et al. J Biol Chem. 2005;280:6504-6510.
- 7) Roberts DE, et al. J Biol Chem. 2004;279:19421-19430.
- 8) Milligan G, et al. Biochim Biophys Acta. 1993;1179:208-212.
- 9) Offermanns S, et al. Nature. 1997;389:183-186.
- 10) Goto S, et al. Circulation. 1992;86:1859-1863.
- 11) Ikeda Y, et al. Ann NY Acad Sci. 1997;811:325-336.
- 12) Tsuji S, et al. Blood. 1999;94:968-975.
- 13) Folts JD, et al. Circulation. 1982;65:248-255.
- 14) Kawasaki T, et al. Thromb Haemost. 2005;94:184-192.
- 15) Kawasaki T, et al. Thromb Haemost. 2003;90:406-413.
- 16) Peng L, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002;22:934-939.
- 17) Iwatsuki Y, et al. Thromb Haemost. 2004;92:1221-1228.
- 18) Keys JR, et al. Hypertension. 2002;40:660-666.
- 19) Uemura T, et al. Eur J Pharmacol. 2006;536:154-161.
- 20) Murai T, et al. Arzneimittelforschung. 1989;39:856-859.