血小板凝集阻害剤 —RGD からペプチドミメティクスまで—

尾 島 巖*・董 慶**・Subrata Chakravarty*

Platelet Aggregation Inhibitory Agents : From RGD to Peptide Mimetics

Iwao OJIMA, Qing DONG and Subrata CHAKRAVARTY*

This review covers the recent advances in the development of highly potent inhibitors of platelet aggregation as potential therapeutic drugs for thrombosis related to cardiovascular and cerebrovascular diseases. The discovery of RGD sequence-directed cell surface receptors (the integrins) has led to extensive research in the development of small RGD-containing peptides and their mimetics as antithrombotic agents. These agents work by inhibiting platelet aggregation through competitive blocking of fibrinogen to the platelet surface receptor, GPIIb/IIIa. The pharmacophoric nature of the aspartic acid and arginine side chains of the RGD unit has allowed the development of strategies for rational design, largely based on assumed bioactive RGD conformations and lead optimization. Applications of such strategies, from RGD peptides to peptide hybrids and then to non-peptide mimetics, are described. Also discussed is the important issue of specificity toward GPIIb/IIIa, keeping in view that the RGD unit is a key recognition signal for a variety of cell surface receptors.

Key words : Inhibitor ; Platelet aggregation ; GPIIb/IIIa receptor ; RGD peptide ; Peptide hybrid ; Peptide mimetics ; Fibrinogen ; Integrin .

1. はじめに

血小板は、複雑な傷治療メカニズムの主要な構成要素であり、身体の損傷部分の血管壁に付着し互いに凝集することによって止血栓を形成することはよく知られている。しかしながら、この重要な身体補修機構と本質的に同じプロセスが病理生理学的な状況下で、心臓血管や脳内血管に起こると心臓発作や脳卒中を引き起こす。このことは血小板が、補修を必要とする損傷血管壁と動脈硬化症の破碎した斑組織を区別できないことに起因する¹⁾。血栓症における血小板の役割が明らかにされるまでは、血栓溶解剤は外科治療および非外科治療にごく普通に用いられた。しかしこれらの血栓溶解剤はそれら自体必ずしも効果的でなく、また多くの症例が示すように、ひどい血栓性血管再閉鎖を引き起こしたりする²⁾。したがって血栓症の進展および再発を効果的に制御できる治療薬開発の必要性は明らかである。このような観点からの血栓症治療薬の発見および開発の標的として、血小板

の凝集機能の制御が取り上げられたのである^{3,4)}。このアプローチが既存の薬とは全く異なる新世代の抗血栓薬の開発競争をもたらした。

従来の血栓症治療は、血小板凝集がトロンビン、エピネフリン、ADP、コラーゲン等を介した刺激を必要とするという知見に基づいていた。例えば、トロンビンは、血小板を活性化し、同時にフィブリノゲンをフィブリンに変換する機能を有するが、この作用は、水蛭 *Hirudo medicinalis* から単離されるヒルディン(hirudine)によって特異的に阻害される⁵⁻⁷⁾。トロンボキサン A_2 は血小板凝集を活性化すると同時に他の活性化アゴニストと血小板の相互作用を促進するが、アスピリンは、アラキドン酸からのトロンボキサン A_2 生合成に関連する血小板の情報伝達を阻害することによって、その生成を抑制すると考えられている^{1,2)}。しかしながら、このような、個々の活性化物質およびそのカスケードを阻害するという方法は、その他種々ある活性化カスケードを放置状態に置くという欠点がある。対照的に、プロスタサイクリンは、アゴニストを必要としない血小板情報伝達機構の阻害剤であり、血小板 c-AMP と酸化窒素のレベルを上昇させることによって血小板凝集を抑制する⁸⁾。生体内でプロ

* Department of Chemistry, State University of New York at Stony Brook ()
** ()

スタサイクリンは短寿命であり、止血の微妙なバランスの保持に重要な役割を果たしている。しかし治療薬としては、c-AMP が関与するほかの生体機能に広範に影響を与えてしまうので好ましくない⁹⁾。したがって可逆的にまた特異的に、アゴニストの種類とは無縁に血小板凝集を阻害し、他の生体プロセスに影響を与えない治療薬の開発が望まれる。

2. インテグリンと GPIIb/IIIa 受容体

細胞癒着と凝集が、細胞膜に存在する受容体と細胞外基質蛋白質の相互作用に起因し、それらの受容体のいくつかは、インテグリン(integrin)¹⁰⁾あるいはサイトアドヒジン(cytoadhesins)¹¹⁾と呼ばれる、構造的に関連する糖蛋白質受容体に属することが発見されて、この生化学的にきわめて重要なプロセスに鋭いメスが入ることになった。インテグリンの特徴は、これらの受容体が Arg-Gly-Asp(RGD)配列を有するリガンド蛋白を認識することである。このことは糖蛋白質の癒着が RGD 配列を含む小さなペプチドによって阻害される事実から明らかである¹²⁾。この RGD 配列はインテグリンの認識に不可欠であるが、もちろん RGD 以外の認識部位も存在するので、各インテグリンは単一あるいは数個の糖蛋白質リガンドを選択的に認識する。したがって各種インテグリンによる RGD 配列認識は、広い意味で、細胞癒着、分化、癌細胞の転位等の重要かつ微妙な細胞認識システムに必須な役割を果たしているといえる¹³⁻¹⁶⁾。

血小板は糖蛋白質受容体 GPIb/IX および GPIIb/IIIa を有する。前者は、von Willebrand 因子を介して血小板が

損傷を受けた血管壁や血栓生成を誘起する表面組織に癒着するのに必要であり¹⁷⁾、後者は、主としてフィブリノゲン(fibrinogen)に血小板が結合し血小板凝集を起こすのに必須である¹⁸⁻²¹⁾。フィブリノゲンには、2つの RGD ユニットがあり、血小板同士を架橋して結合する^{20,19)}。血小板上には約 4 万 5 千個の GPIIb/IIIa 受容体が存在するので¹⁾、フィブリノゲンによる交叉結合は、血小板凝集のカスケードを発動させて血栓形成に導くのである(図 1)¹⁸⁻²¹⁾。

GPIIb/IIIa 受容体は、GPIIb(α -サブユニット)と GPIIIa(β -サブユニット)からなるヘテロ二量体で²²⁾、2つのサブユニット間に共有結合は存在せず、カルシウムイオンがこのヘテロ二量体形成に必須である(図 2)²³⁻²⁵⁾。GPIIb 受容体は、1170 個のアミノ酸残基を有し²⁶⁾、残り 15% は糖質である²⁷⁾。また、GPIIIa 受容体は、762 個のアミノ酸残基を有し²⁸⁾、その細胞外領域はシステイン(Cys)に富んだ抗プロテアーゼ部位を含有し、大きなジスルフィドループによってアミノ基末端と中間部分とを結合している²⁹⁾(図 2)。GPIIb/IIIa 受容体は、他のインテグリンと異なり、リガンド特異性が低く³¹⁾、フィブリノゲン以外の糖蛋白質、例えば、フィブロネクチン(fibronectin)^{21,32)}、von Willebrand 因子³³⁾、ビトロネクチン(vitronectin)³⁴⁾ 等も認識する。しかし、血小板凝集を引き起こすのは2つの RGD ユニットを有するフィブリノゲンに限られている(図 1)。

したがってドラッグデザインの観点からすると、RGD モデルを出発点とした GPIIb/IIIa 受容体のアンタゴニストを創薬し、フィブリノゲンの癒着を阻害することに

Fig. 1 Pictorial representation of the processes of platelet adhesion and aggregation.

Fig. 2 Diagrammatic representation of platelet receptor GPIIb/IIIa.

よって、従来の薬とは異なった、理想に一歩も二歩も近づいた血栓症治療薬を開発できる可能性があることになる。

前述したように、血小板がフィブリノゲンを交叉結合剤として凝集する時には、各種の活性化物質による血小板(受容体)の活性化が先行する。したがって、GPIIb/IIIa 受容体の活性化を阻害するのは、ひとつのアプローチである。チクロピジン(ticlopidine)は、ADP を活性化物質とする血小板凝集の阻害に特異的な効果を示し臨床試験でも良い結果が得られている³⁸⁾。しかしながら、現在のところ、ほとんどの研究は、活性化状態のGPIIb/IIIa 受容体のアンタゴニストの開発に向けられている。いくつかの活性 GPIIb/IIIa 受容体のモノクローナル抗体は、GPIIb/IIIa 受容体に非常に高い親和性を示し、フィブリノゲンの癒着を効果的に阻害する。これらのモノクローナル抗体は現在、phase III 臨床試験中である^{1,2)}。この治療剤の欠点として免疫反応を誘起する可能性が高いことと、凝集阻害からの回復が遅いことが挙げられる。

さて、天然に存在する GPIIb/IIIa アンタゴニストとして最も強力で、しかも RGD 配列を持つ構造的に類似したペプチドがヘビ毒から単離され、ディスインテグリン(disintegrin)と名づけられた^{39,40)}。これらのペプチドは詳細に研究され、RGD を含む小ペプチドを GPIIb/IIIa のアンタゴニストとして開発する基礎を作ったと言える。一連の RGD 含有小ペプチドが強力な GPIIb/IIIa アンタ

ゴニストとなることが見いだされたが、ペプチドに特徴的な生体適応性の低さから、経口活性は期待できず、研究開発の方向は、経口活性の強いペプチド類縁体、非ペプチドに絞られてきている。もちろん、血液(血小板)保存あるいは人工臓器等体外循環系での凝血防止目的には体内で分解の速いペプチド系の薬剤が好適であろう。

3. RGD ペプチドとそのハイブリッド—合理的デザインの第一歩

RGD 含有ペプチドは、ヘビ毒起源のディスインテグリンの研究と並行して、フィブロネクチンの細胞表面への癒着に関連して研究された¹²⁾。フィブロネクチンの108個のアミノ酸配列が決定され、さらにその癒着部位の解明がフラグメントを用いて行われ、RGDS 配列が最小の単位とされた¹²⁾。後に、RGD 配列が絶対必須な最小単位であり、Ser 残基は置換可能であることが判明した⁴¹⁾。RGD 配列が薬理活性基本単位であることがわかると、次は RGD ユニットに付随するアミノ酸残基が当然合理的デザインの焦点となる。実際、RGDX テトラペプチドにおいて、X 残基は重要で、親油性のアミノ酸残基を導入すると、血小板凝集阻害活性の増大が見られた(RGDS < RGDV < RGDF < RGDW)⁴²⁻⁴⁴⁾。この傾向は、RGD ハイブリッドにおいても同様である。Searle 社では、Arg と Gly を融合して非ペプチド化した一連の RGD ハイブリッド(1)を開発したが、置換基 Y をフェ

ニル, 1-ナフチル, 3-インドイルと換えると活性が増大した (IC_{50} ヒト PRP/ADP: (a) Ph, $1.6 \mu M$, (b) 1-Np, $1.2 \mu M$, (c) 3-Ind, $0.85 \mu M$)⁴⁵⁾。ここで血小板凝集阻害活性の表示について触れておきたい。この小論では特別に注釈がない限り, 血小板濃度を規定の値に濃縮したヒト血清 (Platelet Rich Plasma) を使用し ADP を活性化剤とする血小板凝集を用いたアツセイ系での阻害活性 (IC_{50} 表示) を示すことにする。

RGDS の N 末端をアセチル化し, C 末端をアミド化しても活性が保持されたという知見は⁴³⁾, 後に述べるように, 環状ペプチド化へのアプローチを合理的なものにした。

既に, トリプシン, トロンビンのようなセリンプロテアーゼの酵素阻害剤研究の過程で, *p*-アミジノフェニル基が Arg 側鎖の良いミミック (擬態) となることが見いだされていたので⁴⁶⁻⁴⁸⁾, Searle 社では 1 の Arg 残基を *p*-アミジノフェニル基に換えて, 高活性な RGD ハイブリッド 2 ($IC_{50}=0.053 \mu M$, イヌ PRP/ADP) を開発した (スキーム 1)⁴⁹⁾。Hoffmann-La Roche 社でも同様に *p*-

Scheme 1 Development of a peptide hybrid mimicking RGDS.

アミジノフェニル基を RGDV ミミックとして導入した RGD ハイブリッド 3 ($IC_{50}=0.3 \mu M$) を報告している (スキーム 2)⁵⁰⁾。

筆者の研究室では, 2つの RGD ユニットの有するハイブリッドの研究を行った。RGD ユニットの分岐状に 2つにすると, RGD ユニットひとつのものよりも明らかに活性の増加が見られたが (4, $IC_{50}=13 \mu M$), さらに

Scheme 2 Development of a peptide hybrid mimicking RGDV.

N 末端にヘキサノイル基を導入したハイブリッド 5 ($IC_{50}=0.3 \mu M$) および, *p*-グアニジノベンゾイルセリンを導入した 6 ($IC_{50}=0.087 \mu M$) では活性の顕著な増加が見られた⁵¹⁾。

このような RGD ハイブリッドの構造活性相関研究は, RGD 配列が GPIIb/IIIa の受容体による認識にとって不可欠ではなく, Arg の側鎖塩基部分と Asp のカルボキシル基との距離および相対角度が重要であることを強く示唆した。この知見は, 次に述べる環状 RGD ペプチドを用いた立体配座の研究とそこから得られた 3 次元立体モデルに基づいた擬態ペプチド化, および非ペプチド化にとって不可欠であった。

4. 環状 RGD ペプチド—RGD ミメティクス開発のための 3 次元モデル

RGD ペプチドの立体配座解析は, 前述したヘビ毒から単離された強力な血小板凝集阻害物質, ディスインテグリンから始まった。マムシ (*Viperidae*) 属のヘビ毒蛋白

質は高い類似性を示し、Cys 残基を多く含有するので、いくつかのジスルフィド結合を形成してかなり固定化した3次元構造をとっていると考えられたからである。

最初に3次元構造がNOESY スペクトルを基に決定されたのは⁵²⁾、*Echis carinatus* から単離されたヘビ毒エキスタチン(echistatin)である^{53,54)}。RGD ユニットはこの蛋白質のひとつのヘヤーピン状ループの先端にあり、この分子の自由度の高い外郭にあって他分子との相互作用に適した位置を占めていることが判明した⁵²⁾。また、マレー産の *Agkistrodon rhodostoma* から単離されたヘビ毒蛋白質キストリン(kistrin)においても、RGD ユニットは長いループの先端部に位置していることがわかった⁵⁵⁾。これらのNMR 解析および分子モデル解析では、RGD が比較的直鎖状に伸びた立体配座をとっていることが示唆された⁵⁶⁾。

面白いことに、水蛭から単離されたディスインテグリンと、ヘビ毒から単離されたものとの類似性を比較してみると、GPIIb/IIIa の受容体への結合部位と推定されるループに RGD ユニットが存在する以外には、全く類似性のないことがわかる(スキーム3)^{57,58)}。この事実、RGD ユニットの立体配座が受容体との結合の特異性を規定しているのではないかという仮説を支持する。

しかしながら、この仮説を基に直鎖の小 RGD ペプチドの立体配座解析を試みるのは自由度が高すぎて意味が

ない⁵⁹⁾。環状 RGD ペプチドを用いて立体配座を固定化し、系統的に立体配座を変化させて構造活性相関を調べるのが上策である。

このアプローチで高活性な環状 RGD ペプチドを見いだした最初の例のひとつは、SmithKline 社の SK & F 106760(7, $IC_{50}=0.36 \mu M$)である⁶⁰⁾。この環状ペプチド7は、いわば、前述した Ac-RGDS-NH₂ を、ペンタペプチドに組み込み、Arg 残基を *N*-メチル化し、Cys 残基を Pen 残基に置換し、さらに Cys 残基を導入してジスルフィド結合により環化したものであり、血漿中でも良い安定性を示し3時間後にも失活しない。7はフィブリノゲンと同等の GPII/IIIa 受容体への親和性を示し、同じアミノ酸配列を持つ直鎖ペンタペプチドの約100倍の活性を持つ。

7の Cys および Pen 残基を、メルカプトアリール基2つをジスルフィド架橋して置換した環状ペプチド8(SK & F 107260: $IC_{50}=0.057 \mu M$)は、さらに高い活性を示した⁶⁰⁾。

環状 RGD ペプチド7, 8 およびその類縁体の立体配座解析はNMR, X線結晶解析(8), 分子モデル解析によって詳細に行われ、高活性化化合物は turn-extended-turn 構造を持ち、Ca(Asp)-Ca(Arg)間の距離は6.8 Åあるいはそれ以上であることが判明した⁶¹⁾。この結果は、前述したヘビ毒から単離されるディスインテグリンの

Scheme 3 Amino acid sequence homology for snake venom and leech derived platelet aggregation inhibitors.

7 (SK&F 106760)

8 (SK&F 107260)

RGD 部分が伸張した立体配座であるという推察⁵⁶⁾と良く一致している。8 は、ゆっくりと変換する2つの立体配座を持つが、主たる立体配座では Asp 残基で C₇-turn が見られた⁶²⁾。そこで、γ-turn 要素を含むペプチドミメティクス 9 および 10 を合成してみたところ、活性の大きな低下なく血小板凝集を阻害することが確められた (9, IC₅₀=1.11 μM; 10, IC₅₀=0.72 μM, イヌ PRP)⁶³⁾。ベンゾジアゼピンおよび前述した *p*-アミノフェニル基を導入したペプチドミメティクス 11 (IC₅₀=0.15 μM) ではさらに良い活性を示した⁶⁴⁾。

同様なアプローチで Genentech 社は、チオエーテルおよびスルホキシドで架橋した環状ペプチドを開発した⁶⁵⁾。D-チロシン残基を有する 12 (G-4120) の2つのジアステレオマーを分離したところ、ひとつは高活性で (IC₅₀=0.15 μM) 前述したヘビ毒蛋白質キストリンと同等の活性を示した。もうひとつのジアステレオマーは 15 分の 1 の活性しかなかった。12 の高活性ジアステレ

オマーの NMR および分子モデル解析によると、この環状ペプチドの RGD 部分は固定した彎曲(cup-shaped)構造をとっており、タイプ II' 型 β-turn が D-Tyr 残基を *i* + 1 の位置として観測された⁶⁶⁾。ベンゾジアゼピンを Asp 残基の擬態ユニットとして用いた非ペプチドミメティクス 13 (IC₅₀=0.055 μM) は、立体配座解析の結果を踏まえてデザインされた高活性化化合物である⁶⁷⁾。さらに非ペプチド化を進めた 14 (IC₅₀=0.12 μM) も良い活性を示した⁶⁷⁾。

c-GRGDSPA の NMR による立体配座解析で RGDS 部分が β-turn をとっているという知見⁶⁸⁾に基づきステロイド骨格を用いて β-turn 擬態化合物 15 が合成されたが⁶⁹⁾、15 は非常に低い活性(IC₅₀=100 μM)しか示さず、この β-turn 仮設が妥当でないことがわかる。

これらの例の他にも、ジスルフィド架橋を用いない環状 RGD 含有ペプチドを合成し、RGD 部分の活性立体配座を明らかにしようという試みがなされている。12 を

モデルにしたシクロヘキサペプチド 16 は⁷⁰⁾、12 より一桁低い活性を示し、3-アミノメチルベンゾイル残基を有するシクロテトラペプチド 17 は、優れた活性($IC_{50}=0.02 \mu M$)を示した⁷¹⁾。筆者の研究室でも、RGDF 配列を有する一連のシクロペプチドを合成して構造活性相関と NMR(ROESY)による立体配座解析を行ったが、面白いことに *c*-RGDFP($IC_{50}=8.8 \mu M$)と *c*-RGDFPAG($IC_{50}=3.7 \mu M$)の Phe 残基の立体配座を逆にして *D*-Phe 残基にしたところ両方とも活性を失った。立体配座解析では、この *L*-Phe から *D*-Phe への変換によって Arg および Asp 残基側鎖の相対位置に大きな変化がみられ、このことが活性を失う原因と解釈できる⁷²⁾。

5. 直鎖 RGD ペプチドミメティクスの最適化

環状 RGD ペプチドの立体配座解析により、RGD ユニットは、直鎖型あるいは彎曲型をとっているのが望ましいことが判明したが、創薬の過程におけるリード化合物からの最適化には、いろいろなアプローチがあり、経験則、試行錯誤を経て高活性化化合物が得られるケースが多い。ここでは、いくつかの代表的な例を挙げて検討してみたい。

Hoffmann-La Roche 社は、前述した *p*-アミノフェニル基を Arg 残基ミミックとして用い、C 末端にフェノキシ酢酸を導入した一連のペプチドハイブリッドおよ

び非ペプチドを開発した⁵⁰⁾。リード化合物となったのは、トロンボキサン A_2 受容体のアンタゴニスト 18 である。18 は C 末端がメチルエステルであるが、GPIIb/IIIa 受容体にはごく弱い親和性しか示さない。しかし、C 末端をカルボキシル基にした誘導体 19($IC_{50}=7.4 \mu M$)は、GPIIb/IIIa 受容体に対して良い親和性を示し、さらに最適化されたペプチドミメティクス 20($IC_{50}=0.03 \mu M$)は、GPIIb/IIIa アンタゴニストとして高活性を示した⁵⁰⁾。この事実、C 末端のカルボキシル基が GPIIb/IIIa 受容体の認識にとって非常に重要であることを示唆している。さらに、アミノ基とカルボキシル基の距離は高活性発現にきわめて重要であり、それは RGDS を直鎖状に引き伸ばした立体配座におけるこの 2 つの極性基間距離とはほぼ同じであることが確かめられた⁵⁰⁾。20 の Gly 残基の代わりに Tyr 残基を導入し、フェノキシ酢酸の代わりにピペリジニルオキシ酢酸を導入した化合物 21(Ro 44-9883, $IC_{50}=0.03 \mu M$)は現在 Phase II 臨床試験中である。

ペプチドからペプチドミメティクスへの変換のアプローチとして Hoffmann-La Roche グループは、スキーム 4 に示すように Arg と Asp 残基を“LINK”によって固定すれば、Gly は不要になるはずだという作業仮説を立て、“LINK”として *m*-アミノベンゾイル基を導入し、いくつかの活性化化合物を合成した⁵⁰⁾。22($IC_{50}=0.2 \mu M$)

Scheme 4 Rationale for RGD inhibitors without glycine substitutions.

はその一例である。もちろん見方を変えれば、*m*-アミノベンゾイル基は、伸張型の Gly 残基と Arg 残基の一部の擬態と考えることができるが、“DELINK”という考え方はより創造的である。

既に述べたように、Searle 社では RGD ペプチドハイブリッド 2 を開発したが、2 は現在、静脈投与で血栓溶解の促進、血栓性血管再閉鎖の予防、不安定なアンギナの治療等に用いるのを目的として臨床試験に入っている⁴⁹⁾。2 はペプチド性なので、生体中での寿命は短い。しかし、2 の Asp-Phe 部分をピリジン含有 β -アミノ酸残基に変換したペプチドミメティクス 23 (SC-53297, IC₅₀=0.12 μ M) は経口活性がある⁷³⁾。ピリジル基をフェニル基に換えた SC-52389 (IC₅₀=5.3 μ M) は約 50 分の 1 の活性しかない⁷³⁾。

GPIIb/IIIa 受容体と高活性 RGD ペプチドミメティクスとの結合は、両者に存在するアミノ基あるいはグアニジル基あるいはグアニジル基とカルボキシル基とのイオ

ンの相互作用に基づくと考えられる。GPIIb の 301-303 番アミノ酸配列が DGR であることから、ここが RGD 結合部位である可能性もある⁷⁴⁾。2 の Asp 残基側鎖のカルボキシル基をテトラゾール基に変換すると、イオン結合能力はカルボキシル基と同等であるにもかかわらず、完全に活性を失う。これは水素結合によるイオンの結合の強化が重要な役割を果たしていると考えられる。このアミン塩基とカルボキシル基の相互作用の強弱をメチルグアニジン、アミノベンゼン、ベンジルアミン、イミダゾリルベンゼンをモデルとして *ab initio* 計算した結果を図 3 に示す。図 3 から解るように、アミノフェニル基とカルボキシル基の相互作用が最も強い。アミノ基とグアニジル基では、水素結合の数は同じなので、この差はイオンの相互作用自体の差異に帰着するはずである。アミノフェニル基は、イオン化した際、電荷の非局在化が 2 つの窒素原子にとどまり (グアニジウムイオンでは 3 つの窒素原子に非局在化する)、双極子モーメントはイオンの相互作用に有利に働くためと考えたと説明がつく (図 4)。図 3 の計算結果によれば、アミノメチルフェニル基、イミダゾリルフェニル基は、明らかに不利な相互作用しかない。実際、2 のアミノフェニル基をこれらの塩基性置換基に変換すると *p*-アミノメチルフェニ

Fig. 3 Relative energy of complexes based on *ab initio* calculations.

Fig. 4 Reinforced ionic bonding is aided in A by a favorable dipole moment alignment.

ル基では活性が40分の1に低下、イミダゾリルフェニル基では全く活性がなかった⁷⁵⁾。

これらの知見には一貫性があり物理有機化学的に興味深い、この理論を Merck 社で開発された一連の高活性化合物に適用するのには無理がある。

Merck 社は、アミン塩基(RGD では Arg 側鎖のグアニ

ジニル基)とカルボキシル基間の結合を通した距離が10-20 Åの範囲に入る化合物を自社保有のサンプルからコンピュータ検索で選び出して活性試験を行い、24(IC₅₀=26 μM)をリード化合物として最適化を行った⁷⁶⁾。N 末端の修飾とアミン-カルボキシル基間の距離の最適化により、N 末端がピペリジニル基である 25(IC₅₀=0.26 μM)が得られ、さらに C 末端 Tyr 残基の N 置換基にスルホニル基を導入して最適化し高活性な 26(L-700, 462, IC₅₀=0.011 μM)を得た⁷⁶⁾。Merck 社の 25, 26 等の化合物が RGD ペプチドミメティクスだとすると、前述したアミジノフェニル基の重要性とは統一性がなく、今後の検討が必要である。26 で、Try 残基への *n*-ブチルスルホニル基の導入が活性を一桁上げる鍵となったが、分子モデル解析によると、これは、今までに明らかにされた GPIIb/IIIa と RGD ユニットとの結合部位のほかに非結合性相互作用を持つ部位“exocite”が存在することを示唆しており⁷⁶⁾、今後の創薬デザインに重要な情報を与えている。

Dr. Karl Thomae 社は、ピフェニルを導入して立体配座を固定した高活性 RGD ミメティクス 27(BIBU 52, $IC_{50}=0.06 \mu M$)を開発したが、さらにトリアゾロンを導入して単純な構造でかつ高活性な 28($IC_{50}=0.030 \mu M$)を得た⁷⁷⁾。

これらの例に示すように RGD ペプチドからペプチドハイブリッドそして非ペプチドへの流れは、かなりの進展を遂げている。しかし、これらのペプチドミメティクスが実際どのように GPIIb/IIIa 受容体と結合するのかについては、まだ統一的な解釈に至っていない。

6. 血小板凝集阻害剤の受容体特異性

前述したように、GPIIb/IIIa 受容体は、他のインテグリンと異なり、異なった糖蛋白質の認識の許容範囲が広い。このことは、この受容体が柔軟な構造を持っていることを示唆しており、アンタゴニストのデザインを多彩にする利点があるが、同時に受容体特異性に関して重要な問題を提起している。例えば、ヘビ毒蛋白質ディスインテグリンや RGD ペプチドおよびミメティクスは、種々の癒着蛋白質(adhesive proteins)の GPIIb/IIIa 受容体への癒着を阻害するが、同時に他の RGD 依存インテグリン、例えばビトロネクチン受容体($\alpha_v\beta_3$)やフィブロネクチン受容体($\alpha_1\beta_1$)、の働きを阻害する可能性があり、このことが重大な副作用を引き起こす原因になりかねない。したがって、高活性な血小板凝集阻害剤を開発する際に、その GPIIb/IIIa 受容体特異性に注目する必要がある。

受容体特異性に関する初期の研究例に、RGDV(GPIIb/IIIa: $\alpha_v\beta_3$ 選択性=1.05; $IC_{50}=127 \mu M$)の Arg 残基側鎖グアニジンに *p*-アミジノベンジル基に換えて得られた 3(前出)では、顕著な GPIIb/IIIa 特異性の上昇が見られた(GPIIb/IIIa: $\alpha_v\beta_3$ 選択性= 5.6×10^5 , $IC_{50}=0.3 \mu M$ ⁵⁰⁾)。前述した 20, 21 も非常に高い GPIIb/IIIa 特異性(ビトロネクチン受容体 $\alpha_v\beta_3$ に対して)を示すので(20, $>2.0 \times 10^7$; 21, 8.75×10^7)、*p*-アミジノフェニル基の導入が、GPIIb/IIIa 受容体特異性に大きな効果を持っていることは確かなようである⁵⁰⁾。

ヘビ毒蛋白質ディスインテグリンの受容体特異性に関

しても興味ある結果が報告されている⁷⁸⁾。ヘビ毒蛋白質 62 種の受容体特異性を調べたところ、唯一東南アジア産のガラガラヘビ、*Sistrurus m. barbouri* から単離されたものが GPIIb/IIIa への受容体特異性を示した。この有効成分はバルボリン(barbourin)と名づけられたペプチドで、他のディスインテグリンとの類似性が高いが、RGD 配列が KGD 配列になっているのが特徴である⁷⁸⁾。

バルボリンは、ビトロネクチンの M21 色素腫(melaroma)細胞への癒着を mM のレベルでも阻害しないが、血小板凝集阻害能力は、エキスタチン(前出)の約 1/2 である($IC_{50}=0.3 \mu M$)。特筆すべきことに、バルボリンと他の 2 つのヘビ毒蛋白質、テルゲミニン(tergeminin)、エリスティコフィン(eristicophin)は、K(R)GD 配列の次に Trp 残基を持っている(スキーム 5)。これら 3 つのペプチドは、フィブロネクチン受容体 $\alpha_5\beta_1$ の弱いアンタゴニストであるが($IC_{50}>600 nM$)、RGDD 配列を有するエキスタチンは非常に強いアンタゴニストである($IC_{50}=1\sim 2 nM$)⁷⁸⁾。したがって、KGDW あるいは RGDW 配列における Trp 残基の存在が、 $\alpha_5\beta_1$ 受容体への親和性を効果的に低下させる鍵となっていると考えられる。このことは、受容体特異性の高い血小板凝集阻害剤の開発に重要な情報である。

7. おわりに

血栓症の治療に関連して、血小板凝集阻害剤の開発研究をまとめてみたが、誌面の都合で割愛した研究報告も多数ある。しかし、主な研究の流れと今後解決されるべき問題点は、述べるできたと思う。この分野の研究は、HIV プロテアーゼの阻害剤と並んで、医薬化学(medicinal chemistry)と有機合成化学にとって意味のあるテーマを数多く与えているように思える。癒着蛋白質およびヘビ毒蛋白質における RGD 配列の発見に始まり、小 RGD ペプチドによるフィブリノゲンの GPIIb/IIIa 受容体への癒着阻害に基づく血小板凝集の抑止、環状 RGD ペプチドを用いた立体配座解析、RGD ペプチドハイブリッドから非ペプチド化へと、いわば現代医薬化学研究の粋が結集されていると言って良い。これらの研究を通して、特異性の高い血栓症治療薬が開発されて、心

Barbourin	EAGEECDGSPENPCDDAATCKLRPGAQCADGLCCDQCRFMKKGTVCRVCRVAKGDW	NDTCTGQSADCPNGLYG
Tergemin	EAGEECDGSPANPCDDAATCKLRPGAQCADGLCCDQCRFMKKGTVCRVCRVARGDW	NDTCTGQSADCPNGLYG
Eristicophin	ZRQEPCATGPCCRRCKFKRAGKVCRVARGDW	NDYCTGKSCDCPRNPWNG
Echistatin	ECESGPCCRNCKFLKEGTICKRARGDD	MDDVCNGKTCDPRNPHKGA

Scheme 5 Amino acid sequence homology of barbourin compared to other snake venom peptides.

臓発作や脳卒中の危険にさらされている多くの人々に福音をもたらすことを願うとともに、ペプチドミメティクスを探針として、生体内で最も基本的な現象である細胞癒着の詳細な機構が解明されることを期待する。

(平成6年2月3日受理)

文 献

- 1) B.S. Collier, "The Heart and Cardiovascular System", 2nd ed., ed. by H.A. Fozzard, E. Haber, R.B. Jennings, A.M. Katz, H.E. Morgan, Raven, New York, 1991, pp.219-274
- 2) B.S. Collier, *N. Engl. J. Med.*, **322**, 33 (1990)
- 3) E. Ruoslahti, M.D. Pierschbacher, *Cell*, **44**, 517 (1986)
- 4) *idem*, *Science*, **238**, 491 (1987)
- 5) J.H. Chesebro, V. Fuster, *Circulation*, **83**, 1815 (1991)
- 6) J. Dodt, H.-P. Muller, U. Seemuller, J.Y. Chang, *FEBS Lett.*, **165**, 180 (1984)
- 7) B.S. Collier, *Annu. Rev. Med.*, **43**, 171 (1992)
- 8) R.R. Gorman, S. Bunting, O.V. Miller, *Prostaglandins*, **13**, 377 (1977)
- 9) J.W. Aiken, R.R. Gorman, R.J. Shebuski, *ibid.*, **17**, 483 (1979)
- 10) R.O. Hynes, *Cell*, **48**, 549 (1987)
- 11) E.F. Plow, J.C. Loftus, E.G. Levin, D.S. Fair, D. Dixon, J. Forsyth, M.H. Ginsberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6002 (1986)
- 12) M.D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Nature*, **309**, 30 (1984)
- 13) S.B. Carter, *Nature (London)*, **208**, 1183 (1965)
- 14) I.V. Ali, R.O. Hynes, *Cell*, **14**, 439 (1978)
- 15) J.P. Thiery, J.L. Duband, G.C. Tucker, *Annu. Rev. Cell Biol.*, **1**, 91 (1985)
- 16) M.L. Basara, J.B. McCarthy, D.W. Barnes, L.T. Furcht, *Cancer Res.*, **45**, 2487 (1985)
- 17) B. Savage, S.J. Shattil, Z.M. Ruggeri, *J. Biol. Chem.*, **267**, 11300 (1992)
- 18) M. Ginsberg, M.D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, G. Marguerie, E.F. Plow, *ibid.*, **260**, 3931 (1985)
- 19) E.F. Plow, M.D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, G.A. Marguerie, M.H. Ginsberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 8057 (1985)
- 20) T.K. Gartner, J.S. Bennett, *J. Biol. Chem.*, **260**, 11891 (1985)
- 21) D.M. Haverstick, J.F. Cowan, K.M. Yamada, S.A. Santoro, *Blood*, **66**, 946 (1985)
- 22) E.F. Plow, S.E. D'Souza, M.H. Ginsberg, *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, **18**, 324 (1992)
- 23) L.K. Jennings, D.R. Phillips, *J. Biol. Chem.*, **257**, 10458 (1982)
- 24) L.A. Fitzgerald, D.R. Phillips, *ibid.*, **260**, 11366 (1985)
- 25) S.J. Shattil, L.F. Brass, J.S. Bennett, P. Pandhi, *Blood*, **66**, 92 (1985)
- 26) M. Ponez, R. Eisman, R. Heidenreich, S.M. Silver, G. Vilaire, S. Surrey, E. Schwartz, J.S. Bennett, *J. Biol. Chem.*, **262**, 8476 (1987)
- 27) J.J. Calvette, A. Henschen, J. Gonzalez-Rodriguez, *Biochem. J.*, **261**, 561 (1989)
- 28) L.A. Fitzgerald, B. Steiner, S.C.J. Rall, S.S. Lo, D.R. Phillips, *J. Biol. Chem.*, **262**, 3936 (1987)
- 29) J. Beer, B.S. Collier, *ibid.*, **264**, 17564 (1989)
- 30) S.C.-T. Lam, E.F. Plow, M.H. Ginsberg, *Blood*, **73**, 1513 (1989)
- 31) G.A. Marguerie, E.F. Plow, T.S. Edgington, *J. Biol. Chem.*, **254**, 5357 (1979)
- 32) E.F. Plow, R.P. McEver, B.S. Collier, V.L. Woods, G.A. Marguerie, M.H. Ginsberg, *Blood*, **66**, 724 (1985)
- 33) R. Pytela, M.D. Pierschbacher, M.H. Ginsberg, E.F. Plow, E. Ruoslahti, *Science*, **231**, 1559 (1986)
- 34) Z.M. Ruggeri, L. DeMarco, L. Gatti, R. Bader, R.R. Montgomery, *J. Clin. Invest.*, **72**, 1 (1983)
- 35) S. Timmons, M. Kloczewiak, J. Hawiger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4935 (1984)
- 36) E.F. Plow, A.H. Sruoji, D. Meyer, G.A. Marguerie, M.H. Ginsberg, *J. Biol. Chem.*, **259**, 5388 (1984)
- 37) D.H. Farrell, P. Thiagarajan, D.W. Chung, E.W. Davie, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 10729 (1992)
- 38) D. McTavish, C. Foulds, K.L. Goa, *Drugs*, **40**, 238 (1990)
- 39) M.K. Dennis, W.J. Henzel, R.M. Pitti, M.T. Lipari, M.A. Napier, T.A. Deisher, S. Bunting, R.A. Lazarus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2471 (1990)
- 40) R.J. Gould, M.A. Polokoff, P.A. Friedman, T.F. Huang, J.C. Holt, J.J. Cook, S. Niewiarowski, *Soc. Exp. Biol. Med.*, **195**, 168 (1990)
- 41) M.D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 5985 (1984)
- 42) Z.M. Ruggeri, R.A. Houghten, S.R. Russell, T.S. Zimmerman, *ibid.*, **83**, 5708 (1986)
- 43) J. Samanen, F.E. Ali, T. Romoff, R. Calvo, E. Sorenson, J. Vasko, B. Storer, D. Berry, D. Bennett, M. Strohsacker, D. Powers, J. Stadel, A. Nichols, *J. Med. Chem.*, **34**, 3114 (1991)
- 44) M.H. Charon, A. Poggi, M.B. Donati, G. Marguerie, "Peptides: Chemistry, Structure and Biology. Proceedings of the Eleventh American Peptide Symposium", ed. by J.E. Rivier, G.R. Marshall, ESCOM, Leiden, 1989; pp.82-83

- 45) F.S. Tjoeng, K.F. Fok, M.E. Zupec, R.B. Garland, M. Miyano, S. Panzer-Knodle, L.W. King, B.B. Taite, N.S. Nicholson, L.P. Feigen, S.P. Adams, "Peptides: Chemistry and Biology. Proceedings of the Twelfth American Peptide Symposium", ed. by J.A. Smith, J.E. Rivier, ESCOM, Leiden, 1991; pp.752-754
- 46) G. Wagner, H. Horn, P. Richter, H. Vieweg, I. Lischke, H.-G. Kazmirowski, *Pharmazie*, **36**, 597 (1981)
- 47) B. Kaiser, F. Markwardt, *Thromb. Haemostas.*, **55**, 194 (1986)
- 48) J. Sturzebecher, F. Markwardt, B. Voight, G. Wagner, P. Walsmann, *Thromb. Res.*, **29**, 635 (1983)
- 49) R.B. Garland, M. Miyano, J. Zablocki, EP 502536 A, 1992
- 50) L. Alig, A. Edenhofer, P. Hadvary, M. Hurzeler, D. Knopp, M. Muller, B. Steiner, A. Trzeciak, T. Weller, *J. Med. Chem.*, **35**, 4393 (1992)
- 51) Q. Dong, M. Eguchi, Y.-I. Oh, I. Ojima, B.S. Coller, Abstr. 13th Amer. Peptide Symp., Edmonton, Canada, P511, 1993
- 52) V. Saudek, R.A. Atkinson, J.T. Pelton, *Biochemistry*, **30**, 7369 (1991)
- 53) Z.-R. Gan, R.J. Gould, J.W. Jacobs, P.A. Friedman, M.A. Polokoff, *J. Biol. Chem.*, **263**, 19827 (1988)
- 54) V.M. Garsky, P.K. Lumma, R.M. Freidinger, S.M. Pitzenberger, W.C. Randall, D.F. Veber, R.J. Gould, P.A. Friedman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 4022 (1989)
- 55) M. Adler, R.A. Lazarus, M.S. Dennis, G. Wagner, *Science*, **253**, 445 (1991)
- 56) M. Adler, G. Wagner, *Biochemistry*, **31**, 1031 (1992)
- 57) J.L. Seymour, W.J. Henzel, B. Nevins, J.T. Stults, R.A. Lazarus, *J. Biol. Chem.*, **265**, 10143 (1990)
- 58) P. Mazur, W.J. Henzel, J.L. Seymour, R.A. Lazarus, *Eur. J. Biochem.*, **202**, 1073 (1991)
- 59) R.E. Cachau, E.H. Serpersu, A.S. Mildvan, J.T. August, L.M. Amzel, *J. Molecular Recognition*, **2**, 179 (1989)
- 60) F.E. Ali, J.M. Samanen, R. Calvo, T. Romoff, T. Yellin, J. Vasko, D. Powers, J. Stadel, D. Bennett, A. Berry, A. Nichols, "Peptides: Chemistry and Biology. Proceedings of the Twelfth American Peptide Symposium", ed. by J.A. Smith, J.E. Rivier, ESCOM, Leiden, 1991; pp.761-762
- 61) C.E. Peishoff, F.E. Ali, J.W. Bean, R. Calvo, C.A. D'Ambrosio, D.S. Eggleston, S.M. Hwang, T.P. Kline, P.F. Koster, A. Nichols, D. Powers, T. Romoff, J.M. Samanen, J. Stadel, J.A. Vasko, K.D. Kopple, *J. Med. Chem.*, **35**, 3962 (1992)
- 62) K. Kopple, P.W. Baures, J.W. Bean, C.A. D'Ambrosio, J.L. Hughes, C.E. Peishoff, D.S. Eggleston, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 9615 (1992)
- 63) J.F. Callahan, J.W. Bean, J.L. Burgess, D.S. Eggleston, S.M. Hwang, K.D. Kopple, P.F. Koster, A. Nichols, C.E. Peishoff, J.M. Samanen, J.A. Vasko, A. Wong, W.F. Huffman, *J. Med. Chem.*, **35**, 3970 (1992)
- 64) T.W. Ku, F.E. Ali, L.S. Barton, J.W. Bean, W.E. Bondinell, J.L. Burgess, J.F. Callahan, R.R. Calvo, L. Chen, D.S. Eggleston, J.G. Gleason, W.F. Huffman, S.M. Hwang, D.R. Jakas, C.B. Karash, R.M. Keenan, K.D. Kopple, W.H. Miller, K.A. Newlander, A. Nichols, M.F. Parker, C.E. Peishoff, J.M. Samanen, I. Uzinskas, J.W. Venslavsky, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 8861 (1993)
- 65) P.L. Barker, S. Bullens, S. Bunting, D.J. Burdick, K.S. Chan, T. Deisher, C. Eigenbrot, T.R. Gadek, R. Gantzios, M.T. Lipari, C.D. Muir, M.A. Napier, R.M. Pitti, A. Padua, C. Quan, M. Stanley, M. Struble, J.Y.K. Tom, J.P. Burnier, *J. Med. Chem.*, **35**, 2040 (1992)
- 66) R.S. McDowell, T.R. Gadek, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 9245 (1992)
- 67) B.K. Blackburn, R.S. McDowell, Abstr. 205th ACS National Meeting, Denver, U.S.A., MEDI 4, 1993
- 68) R. Mizutani, I. Shimada, Y. Ueno, M. Yoda, H. Kumagai, Y.A. Arata, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **182**, 966 (1992)
- 69) R. Hirschmann, P.A. Sprengeler, T. Kawasaki, J.W. Leahy, W.C. Shakespeare, A.B. Smith, III, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 9699 (1992)
- 70) A. Lender, W. Yao, P.A. Sprengeler, R.A. Spanevello, G.T. Furst, R. Hirschmann, A.B. Smith, III, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **42**, 509 (1993)
- 71) S.A. Jackson, S.A. Mousa, W.F. DeGrado, Abstr. 205th ACS National Meeting, MEDI 113, Denver, 1993
- 72) M. Eguchi, G.B. Crull, Q. Dong, I. Ojima, B.S. Coller, Abstr. 13th Amer. Peptide Symp., Edmonton, Canada, P714, 1993
- 73) F.S. Tjoeng, P.R. Bovy, R.B. Garland, R.J. Lindmark, D.E. McMackins, J.G. Rico, T.E. Rogers, J.A. Toth, J.A. Zablocki, M.E. Zupec, S.G. Panzer-Knodle, N.S. Nicholson, A. Salyers, B.B. Taite, M. Miyano, L.P. Feigen, S.P. Adams, Abstr. 13th Amer. Peptide Symp., Edmonton, Canada, P221, 1993

- 74) S.E.D. D'Souza, M.H. Ginsberg, G.R. Matsueda, S.F. Plow, *Nature*, **350**, 66 (1991)
- 75) J.A. Zablocki, M. Miyano, R.B. Garland, D. Pireh, L. Schretzman, S.N. Rao, R.J. Lindmark, S.G. Panzer-Knodle, N.S. Nicholson, B.B. Taite, A.K. Salyers, L.W. King, J.G. Campion, L.P. Feigen, *J. Med. Chem.*, **36**, 1811 (1993)
- 76) G.D. Hartman, M.S. Egbertson, W. Halczenko, W.L. Laswell, M.E. Duggam, R.L. Smith, A.M. Naylor, P.D. Manno, R.J. Lynch, G. Zhang, C.T.-C. Chang, R.J. Gould, *ibid.*, **35**, 4640 (1992)
- 77) V. Austel, W.G. Eisert, F. Himmelsbach, G. Linz, T.H. Muller, H. Pieper, E. Seewaldt-Becker, H. Weisenberger, Abstr. 205th ACS National Meeting, Denver, U.S.A., MEDI 101, 1993
- 78) R.M. Scarborough, J.W. Rose, M.A. Hsu, D.R. Phillips, V.A. Fried, A.M. Campbell, L. Nannizzi, I.F. Charo, *J. Biol. Chem.*, **266**, 9359 (1991)

第 52 卷第 6 号 予 定

巻 頭 言

遷移金属カルボニルを研究の道連れに.....渡部 良久

総説および総合論文

溶媒効果と分子クラスター——とくに含水有機溶媒について.....脇坂 昭弘
 光学活性シッフ塩基-チタンアルコキシド触媒を用いた不斉炭素-炭素結合生成反応.....林 昌彦ら
 1-シクロブテニルケトンを利用する有機合成.....藤原 徹ら
 高配位ケイ素化合物の特性と有機合成への応用.....吉良 満夫
 機能性を有するビニルアニオンおよびアセチリド等価体.....融 健ら
 イオノフォアとしての 1,10-フェナントロリン誘導体の合成と機能.....杉原 秀樹ら

ケミカルスウェア書き

ジラール試薬 T.....十河 正宏

十字路

E_T 値と Z 値 }.....脇坂 昭宏
 McConnel の式 }
 プナグランジン類.....融 健
 イオン選択性電極.....平谷 和久

REVINDEX, 新しい合成ほか