

氏 名（本籍） にい 新 くら 倉 かず 和 あき 明

学 位 の 種 類 博 士（薬 学）

学 位 記 番 号 薬 第 4 9 7 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 8 年 1 月 1 8 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

新規 vacuolar ATPase 阻害薬の薬理学的研究 - vacuolar ATPase  
のサブタイプの存在の可能性とその阻害薬の骨吸収亢進疾患  
に対する有用性-

論 文 審 査 委 員 (主 査) 教 授 大 内 和 雄  
教 授 永 沼 章  
教 授 大 泉 康

# 論文内容要旨

骨では絶えず骨形成と骨吸収が繰り返されているが、両者がバランスをとっていることで骨量は維持されている。骨粗鬆症を始めとした骨減少を伴う様々な疾患は、その引き金となる要因は異なっているが、最終的には骨吸収量が骨形成量を上回ることによって引き起こされる。従って、骨形成を阻害することなく、骨吸収を抑制することができれば多くの骨吸収亢進疾患に対して有益であると思われる。骨吸収過程において、骨表面に破骨細胞が接着した後、そこに酸性環境が作り出されることが骨の主要成分である collagen と hydroxyapatite の分解に重要な意味を持っている。液胞型 ATPase (V-ATPase) は、破骨細胞の細胞膜上に存在し、ATP のエネルギーを基に  $H^+$  を放出し、酸性環境を作り出す役割を担っている。しかし、V-ATPase は破骨細胞の細胞膜のみならず広く分布しており、その阻害薬の臨床応用は V-ATPase に対する選択性が鍵となる。本研究では骨吸収抑制を目的とした新規構造を有する V-ATPase 阻害薬 (FR 化合物 ; FR167356, FR202126) の薬理研究を通し、化合物による V-ATPase 阻害の選択の実現が可能であることを示すとともに、臨床応用への改良点を明らかにしたものである。

## 第 1 章 V-ATPase 阻害薬の各種 $H^+$ 輸送性 ATPase に対する阻害作用

マウス破骨細胞の細胞膜 (V-ATPase)、マウス肝臓ミトコンドリア内膜 (F-ATPase) 及びウサギ胃粘膜ミクロソーム (P-ATPase) を用い、 $H^+$  輸送活性を測定した。本研究で用いた FR 化合物 (FR167356, FR202126) は V-ATPase の  $H^+$  輸送活性を濃度依存的に阻害する一方、V-ATPase の  $H^+$  輸送活性を 100 % 抑制する濃度においても F- 及び P-ATPase を全く阻害せず、新しい骨格を有する V-ATPase 特異的な阻害薬であることが示された。V-ATPase は多くのサブユニットから構成されており、ATP 分解活性 (ATPase) 部位によって得られるエネルギーを基に  $H^+$  輸送部位で  $H^+$  輸送を行っている。FR167356 は V-ATPase の ATPase 活性を阻害したので、FR167356 の  $H^+$  輸送阻害作用は ATPase 活性の阻害に基づくことが判明した。一方、破骨細胞の細胞膜以外の V-ATPase に対しても FR167356 は阻害作用を示したが、それらの中でライソソームの V-ATPase に対する阻害作用は破骨細胞の細胞膜の V-ATPase 阻害作用に比べて弱かった。このことは、FR167356 が V-ATPase 阻害作用においてライソソームの V-ATPase に対する阻害は弱いという選択性を持ち、既報の V-ATPase 阻害薬 (SB242784) にはない特徴を有していることが示された。それと同時にライソソームの V-ATPase は他の V-ATPase とは異なっており、V-ATPase にはサブタイプが存在することが示唆された。

## 第 2 章 細胞レベルでの V-ATPase 阻害選択性の検証

まず、一過性に酸性化させた破骨細胞からの V-ATPase 活性に基づく  $H^+$  放出を、細胞内 pH をモニターすることで測定した。この細胞内 pH 変化を FR167356 が阻害したことから、FR167356 は細胞レベルでも破骨細胞の細胞膜の V-ATPase を抑制できることが示された。次に、破骨細胞の V-ATPase の *in vitro* での機能に対する作用を調べた。新生児マウスの頭蓋冠器官培養系において、PTH を添加すると

骨吸収が亢進して培地中の Ca 濃度が上昇するが、これを FR 化合物は阻害した。さらに、in vitro で分化させた破骨細胞を象牙切片上で培養して形成される骨吸収窩形成を、FR167356 は抑制した。以上より FR 化合物は破骨細胞の細胞膜の V-ATPase を阻害することにより、in vitro の骨吸収を抑制することが示唆された。次に、マクロファージにおける LDL 由来の cholesterol ester 蓄積あるいは肝細胞における LDL 分解を測定し、細胞レベルでのライソソームの V-ATPase の機能に対する FR167356 の作用を解析した。FR167356 は、V-ATPase に基づく破骨細胞の in vitro 機能をほぼ 100 % 抑制する濃度においても、cholesterol ester 蓄積あるいは LDL 分解に対しては弱い抑制効果しか示さなかった。従って、FR167356 は細胞レベルにおいてもライソソームの V-ATPase を阻害する作用は弱く、第 1 章に述べた結論が細胞レベルにおいても再現された。

### 第 3 章 骨吸収抑制薬としての V-ATPase 阻害薬の特徴 - 既存薬との比較

まず、FR 化合物は PTH 以外の IL-1 あるいは IL-6 による in vitro の骨吸収も阻害し、骨吸収因子に左右されない骨吸収阻害作用が確認された。次に骨吸収阻害薬として既に臨床応用されている elcatonin 及び bisphosphonate と FR 化合物の作用を in vitro 及び in vivo の実験で比較し、V-ATPase 阻害薬の特徴について解析した。頭蓋冠器官培養系において、いずれの化合物とも骨吸収抑制作用を示したが、bisphosphonate と培養した頭蓋冠は、その後 薬剤を培地中から除去しても骨吸収が抑制されたままであった。これは bisphosphonate が骨に強い結合力を持っていることに起因すると考えられ、bisphosphonate に暴露された骨では骨代謝回転が停止してしまう恐れがあると考えられた。一方、FR 化合物を除去すると阻害作用は発現せず、骨吸収阻害は FR 化合物の存在に依存していた。次に、雌性ラットの甲状腺、副甲状腺及び卵巣を摘出し、Ca 制御を行う内因性のホルモンを枯渇させ、そこへ retinoic acid を投与することで高カルシウム血症モデルを作製し、in vivo での骨吸収阻害作用を調べた。このモデルにおいて FR 化合物を経口投与すると、投与後より経時的に血清 Ca 濃度が低下し、in vivo においても速やかに骨吸収阻害効果を示すことが示唆された。一方、bisphosphonate は、単回投与では有効性を示さず、連続投与によってのみ作用を示し、骨吸収抑制効果の発現が遅いことが明らかになった。また、ペプチドホルモンの誘導体である elcatonin は、経口投与ができず、注射による投与しか行えないため、速やかな骨吸収抑制効果は表れるものの、その持続時間が非常に短かった。以上のように、FR 化合物は骨への蓄積性のない点及び即効性で薬効が持続する点で、bisphosphonate や elcatonin よりも優れていることが示唆された。

### 第 4 章 骨粗鬆症モデルラットの骨密度減少に対する V-ATPase 阻害薬の作用

骨粗鬆症における骨量低下は骨吸収亢進が原因であるとされており、ラットの卵巣摘出による病態モデルで FR167356 を評価した。骨粗鬆症モデルにおける骨量減少に対し、FR167356 の投与は著しい改善効果を示した。FR167356 は、骨吸収マーカーである尿中 deoxypyridinoline レベルを低下させ、また骨形態計測の結果と合わせて考えると、FR167356 による骨量回復は骨吸収抑制によってもたらされたと考え

られた。SB242784 でも FR167356 と同様に骨量回復が認められたが、体重増加抑制や血漿生化学検査における異常が誘発された。しかし、FR167356 ではそのような所見は認められず、それはライソソームの V-ATPase に対する阻害作用が弱いためである可能性が示唆された。また、正常ラットに FR167356 を投与した場合でも骨量増加が認められ、FR167356 は骨形成には影響を及ぼさず、骨吸収のみを抑制できることが示唆された。

## 第5章 歯周病モデルラットの歯槽骨破壊に対する V-ATPase 阻害薬の作用

V-ATPase 阻害薬の他の疾患への適応を探る目的で歯周病モデルでの歯槽骨破壊に対する作用を調べた。雄性ラットの下顎第一、第二臼歯間に wire を挿入し、炎症に基づく歯槽骨破壊モデルを作製した。本モデルにおいて FR202126 を経口投与することにより、歯槽骨の破壊を抑制できることが明らかになった。一方、collagenase 阻害作用を基に臨床で歯周病に用いられている doxycycline は、本モデルによる歯槽骨破壊を全く抑制できなかった。

## 第6章 血液酸塩基平衡に対する FR 化合物の作用

FR 化合物は *in vitro* で腎臓の V-ATPase に対しても阻害作用を有していたため、*in vivo* でその阻害効果がどのような影響を及ぼすかについて解析した。腎臓の V-ATPase 機能は H<sup>+</sup> 排泄を司ることから、血液の酸塩基平衡を指標として調べた。その結果、FR167356 あるいは FR202126 をラットに投与しても、血液の酸塩基平衡に影響を与えなかった。従って、腎臓の V-ATPase を阻害しても *in vivo* においては他の機構が補うことにより、血液の酸塩基平衡に影響を与えないと考えられた。

本研究を通じ、新規構造を持つ V-ATPase 阻害薬 FR167356 は破骨細胞の細胞膜の V-ATPase を強く阻害するもののライソソームの V-ATPase に対する阻害作用が弱いという選択性があることが示された。このことは同時にライソソームの V-ATPase は他の V-ATPase とは異なる構造を有しており、V-ATPase にはサブタイプが存在することが示唆された。骨吸収に至るまでの過程がどのようなものであろうとも、V-ATPase は骨吸収の最終過程に関与しているため、FR 化合物は様々な因子による骨吸収を顕著に阻害することができた。また、既存の骨吸収阻害剤と比べて、優れた特徴を有することも明らかになった。このような骨吸収阻害作用に基づき、FR 化合物は骨粗鬆症モデルにおける骨量低下や歯周病モデルにおける歯槽骨破壊を抑制することができた。一方、FR 化合物を投与しても血液の酸塩基平衡は影響されなかったことから、腎臓の V-ATPase を阻害することは *in vivo* においては大きな問題にはならないことが示唆された。SB242784 も骨粗鬆症モデルラットに投与すると骨量改善作用を示したが、副作用所見も随伴した。これは、SB242784 は FR 化合物とは異なり、ライソソームの V-ATPase も阻害し、V-ATPase 阻害において選択性がないためであると考えられる。特にライソソームの V-ATPase の役割を考慮すると、V-ATPase 阻害薬の臨床応用においてライソソームの V-ATPase 阻害作用との分離を行うことが重要であることが示唆された。

## 審査結果の要旨

液胞型 ATPase (V-ATPase) は ATP のエネルギーを基に  $H^+$  を輸送する酵素で、細胞外への  $H^+$  排出や細胞内小器官を酸性化する役割を通じ、さまざまな生理作用に関わっている。V-ATPase の subunit には subtype が存在し、その局在についても組織特異性があることが報告され始めていることから、申請者は細胞あるいは細胞小器官特異的な V-ATPase 阻害薬を見出すことができれば、特定の生理機能を抑制する作用機序を持つ新規治療薬を開発することができる可能性を考えた。

本研究により申請者が見出した V-ATPase 阻害薬の FR167356 は、新規の構造を有するだけでなく lysosome の V-ATPase に対する阻害が弱く、これまでにない阻害選択性のある化合物である。その特性を解析するに当たり、申請者は最も適切な測定系 ( $H^+$  輸送系) を導入し、さらに細胞レベルでの確認も行うなど系統立った解析を行っており、それによって得られた結果には十分な信頼性があり、また得られた結果に対する考察は大変優れたものである。申請者は、従来 V-ATPase 阻害選択性があると報告されていた SB242784 には阻害選択性がないことを明らかにし、さらに FR167356 を用いた解析結果から、薬理的解析によっても細胞内の V-ATPase に subtype が存在することを示すことに始めて成功した。すなわち、lysosome の V-ATPase を構成する subunit の中で他の V-ATPase とは異なる lysosome 特異的ともいうべき subunit の有無については、KO マウスの報告と免疫組織学的研究の報告に矛盾点があり明確な見解は得られていなかったが、申請者が行った FR167356 を用いた解析結果は、薬理的な見地から lysosome に特異的な subunit が存在することを予見したものである。

V-ATPase 阻害薬の治療薬としての可能性について、申請者は骨吸収亢進疾患に着目し、FR 化合物には *in vitro* 及び *in vivo* の実験系で骨吸収阻害作用があることを示した。また、骨吸収亢進疾患の代表的な疾患である骨粗鬆症及び歯周病のそれぞれのモデルを活用して FR 化合物の有効性を示すとともに、他の作用機序をもつ既存の治療薬との比較を行い、それらに対する FR 化合物の優位性を明らかにした。また、前述の阻害選択性のない SB242784 との比較を行うことにより、V-ATPase 阻害薬を医薬として開発するには lysosome の V-ATPase を阻害しないことが重要であることを示した。また、腎臓の V-ATPase を阻害しても代償機構が働くために生体には影響がないことを示すことにより、臨床応用することが可能な V-ATPase 阻害薬の特性について明らかにし、この分野の研究の今後の発展のために役立つ大きな研究成果を残した。

以上、一連の研究成果を鑑み、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。