

学位論文内容要旨

氏名：佐藤 大史

印

題目：カルシウム感知受容体 (CaSR) 作動薬ウパシカルセトの結合様式解析と薬理学的研究

要旨：

【背景】

二次性副甲状腺機能亢進症 (SHPT) は血液透析患者における主要な合併症であり、慢性腎臓病の進行に伴って生じる。腎機能の低下は、ビタミン D が活性化されず、カルシウムの吸収が不十分となり、血液中のカルシウム濃度が低下する。副甲状腺から分泌される副甲状腺ホルモン (PTH) は、カルシウムとリンのホメオスタシスを維持する役割を担っているが、低下した血中カルシウム濃度を正常化しようとして PTH が過剰に分泌される。さらに、PTH の過剰分泌により骨代謝異常が生じ、骨折、異所性石灰化、心機能障害などのリスクが増大する^{1),2)}。この副甲状腺からの PTH 分泌は、副甲状腺細胞表面に存在するクラス C の G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の 1 つであるカルシウム感知受容体 (CaSR) によって制御されている。CaSR の細胞外 N 末端ドメインには、細胞外カルシウムレベルを感知する Ca^{2+} 結合部位とホモ二量体形成に関与するドメイン (Venus flytrap domain) が存在し、高 Ca^{2+} 状態での CaSR の活性化は PTH の合成・分泌を抑制する。一方、低 Ca^{2+} 状態では CaSR の活性が低下し、PTH の合成・分泌が促進される³⁾。CaSR が PTH 分泌を制御するこのメカニズムは、SHPT において重要な治療ターゲットである。

シナカルセト、エボカルセトおよびエテルカルセチドは、SHPT 治療のために臨床で使用されている主な CaSR 作動薬である (Figure 1)。3 剤とも CaSR を活性化し、PTH 分泌を抑制することで血中 Ca^{2+} 濃度を低下させる。シナカルセトとエボカルセトは CaSR の 7 回膜貫通領域の Glu837⁴⁾、エテルカルセチドは細胞外領域の Cys482 に、それぞれ相互作用する⁵⁾。

本研究で用いるウパシカルセトは、グルタチオンなどの γ -グルタミルペプチドの「コク味」研究で見出された新規 SHPT 治療薬であり、2021 年に日本で承認された (Figure 1)。ウパシカルセトは、細胞外低 Ca^{2+} 濃度域では CaSR を活性化せず、細胞外 Ca^{2+} 濃度依存的に CaSR 活性を増強する強力な正のアロステリ

ック効果を有する⁶⁾。一方、ウパシカルセトの CaSR に対する結合部位や、*in vivo* における副甲状腺過形成、異所性石灰化および骨構造に対する影響については明らかになっていない。そこで本研究では、ウパシカルセトの CaSR 結合部位、並びに慢性腎不全 (CKD) モデルラットで生じる異所性石灰化および骨構造への影響を明らかにした。

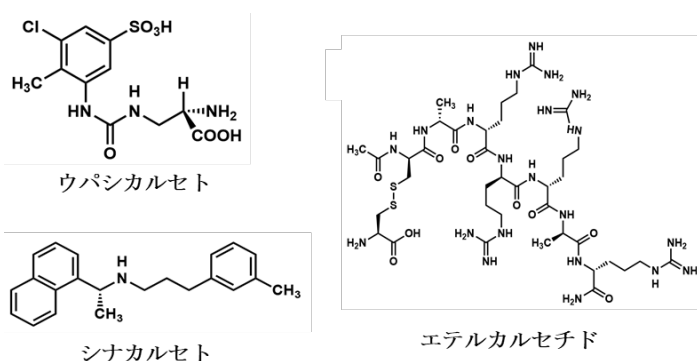


Figure 1. 主な SHPT 治療薬の化学構造

【方法】

➤ 各種 CaSR とウパシカルセトの結合親和力評価

結合親和力評価には Scintillation Proximity Assay (SPA) 法を用いた。HEK-293 細胞、CaSR 発現 HEK 細胞および変異 CaSR をコードしたプラスミドでトランスフェクションした変異 CaSR-HEK 細胞について大量培養し、超遠心とホモジナイズ処理により膜タンパク質を回収した。WGA PEI Type A PVT SPA シンチレーションビーズ (PerkinElmer 社) をバッファー (50 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl₂, 0.5% CHAPS, pH 7.4) に懸濁し、各膜タンパク質溶液を加え、4°C で 2 時間プレインキュベート後、ウパシカルセト、L-トリプトファンまたはシナカルセトのいずれかを加えた後、³H]-ウパシカルセト (終濃度 0.25 又は 0.7 kBq) を加え、室温で 60 分間反応させた。MicroBeta2 (PerkinElmer 社) を用いて測定値をカウントし、特異的結合量を算出した。

➤ *In silico* アプローチによるドッキングポーズの推定

In silico アプローチには Schrödinger package program (Schrödinger LLC 社) を使用した。ウパシカルセトと相互作用する可能性のある CaSR のアミノ酸を選択するために、Protein Preparation Wizard program を使用して CaSR の ECD 領域の結晶構造 (PDB 5K5S, 5FBH, 5FBK)^{7),8)} をもとに、側鎖相互作用に対する相互作用フィンガープリントを出力ドッキングポーズに使用することで、相互作用するアミノ酸の頻度を決定した。さらに、ウパシカルセトと CaSR の結合モデルを検討するために、側鎖相互作用に対する相互作用フィンガープリントを用いて、変異型 CaSR タンパク質に対する相対的結合能力と一致するドッキングポーズをフィルタリングした。選択したドッキングポーズの分子動力学シミュレーションは、Schrödinger suite の Desmond プログラムを用いて行った。各タンパク質-リガンド複合体は、水和モデルを作成するために緩衝距離 10 Å の立方体ボッ

クスに配置し、0.15M の NaCl 濃度でイオン化した。それぞれの系の全電荷は、必要に応じて Na⁺イオンまたは Cl⁻イオンを加えて中和した。各シミュレーションは合計 120 ナノ秒実行し、シミュレーションは各系について 3 回繰り返した。

➤ CKD ラットモデルに対するウパシカルセトの薬効評価

雄性 Sprague-Dawley ラットまたは Wistar ラットを 1 週間の馴化後、0.75% のアデニンを含む CE-2 固形飼料を自由摂取させた（正常群に対しては通常の CE-2 固形飼料を与えた）。曝露 3-4 週間後、ラットの血液生化学パラメータ（血清 iPTH、Cre、UN、Ca、P）をスクリーニングし、目的の病態を示したラットに対して 1mL/kg のウパシカルセト（0.2mg/kg、1mg/kg）または生理食塩水のいずれかを *i.v.*投与（週 3 回）または *s.c.*投与（1 日 1 回）した。治療開始 21 日後または 28 日後、ラットをイソフルラン麻酔下で腹腔灌流により安楽死させ、その後組織（胸部大動脈、右大腿骨）を採取した。

血管石灰化評価は、近位胸部大動脈を切り取り、ホルマリン固定した近位胸部大動脈を 3 分割し、包埋してパラフィンでブロックした。ブロックからの薄切断面をスライスし、von Kossa 染色キット（Polysciences 社）を用いて染色し、BZ-X710 顕微鏡（Keyence 社）と BZ-H3A Analyzer ソフトウェア（Keyence 社）を用いて画像化した。

骨形態評価は、大腿骨の皮質間隙率を測定した。右大腿骨をエタノールに浸し、2〜8°C で保存し、マイクロフォーカス X 線装置（Scan Xmate-L090; Comscan Techno 社）を用いて骨を撮影した。これらの画像を専用ソフトウェア（TRI/3D-BON; ラトックシステムエンジニアリング社）を用いて解析した。

【結果および考察】

ウパシカルセトは、アミノ酸と同様に CaSR のポジティブアロステリックモジュレーターであり⁶⁾、化学構造は芳香族アミノ酸と類似していることから、ウパシカルセトの CaSR 結合部位はアミノ酸と同じであるという仮説を立てた。この仮説を確認するため、L-トリプトファンがウパシカルセトの CaSR への結合能に及ぼす影響について SPA 法を用いて評価した。まず、[³H]-ウパシカルセトと CaSR の結合がウパシカルセト濃度依存的に抑制されたことから、系の妥当性を確認した (Figure 2A)。次に、ウパシカルセトと CaSR の特異的結合は、L-トリプトファンの添加によって濃度依存的に減少した (Figure 2B, IC₅₀:4.3 mM)。一方、シナカルセトは 100 μM までの濃度では、ウパシカルセトの CaSR への結合に影響を与えなかった (Figure 2C)。この結果から、ウパシカルセトは CaSR のアミノ酸結合部位に作用することが強く示唆された。

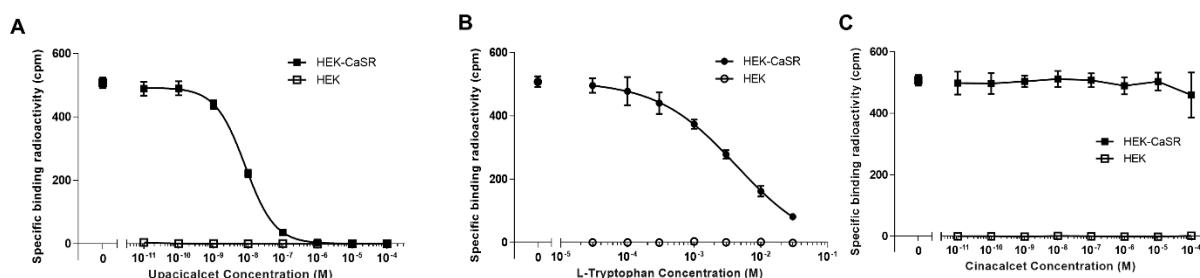


Figure 2. $[^3\text{H}]$ -ウパシカルセト (0.25kBq) と CaSR との結合に対する各化合物の影響

A) ウパシカルセト B) L-トリプトファン C) シナカルセト、■又は●:CaSR 発現 HEK293 細胞膜、□又は○:HEK293 細胞膜。エラーバーは n=3 の平均値±S.D.を示す。

続いて、CaSR に対するウパシカルセトの詳細な結合様式を明らかにする検証を行った。すなわち、CaSR のアミノ酸結合部位を構成する各アミノ酸残基をアラニン置換し、ウパシカルセトとの結合能への影響を評価した。

まず、ウパシカルセトと既報の CaSR の ECD 領域の結晶構造^{7),8)}との *In silico* ドッキングモデルによりアラニン置換する 8 つのアミノ酸 (Arg66、Trp70、Ser147、Ser170、Ser272、Glu297、Ser302、Ile416) を選択した。さらに、エテルカルセチドの結合部位である Cys482、およびシナカルセトの結合部位である Glu837 についても評価した。各アラニン変異型 CaSR に対するウパシカルセトの相対的結合能を評価した結果、C482Y、E837A および S272A 以外の変異型で、結合能は低下した (Figure 3)。

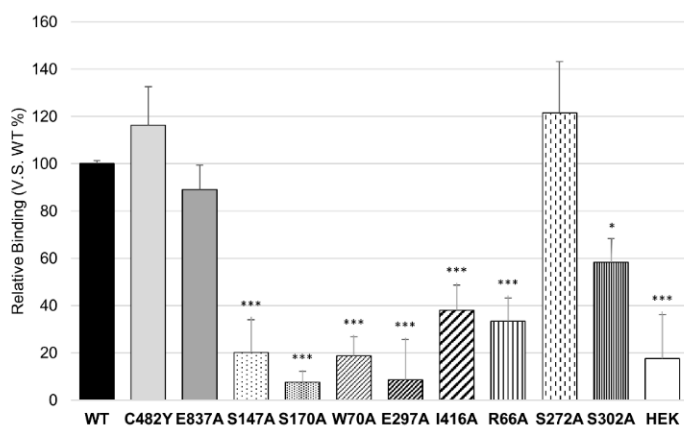


Figure 3. 野生型 CaSR と $[^3\text{H}]$ -ウパシカルセト (0.7 kBq) 結合能に対する CaSR の各変異の影響

エラーバーは n=3 の平均値 + S.D.を示す。統計解析は、野生型に対し各変異型の相対結合能について Dunnett 検定を用いた (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$)

以上の結果から、ウパシカルセトと相互作用する CaSR アミノ酸残基を設定し、分子動力学シミュレーションを用いて実験結果と矛盾しない安定的な結合様式を見出した (Figure 4 A,B)。

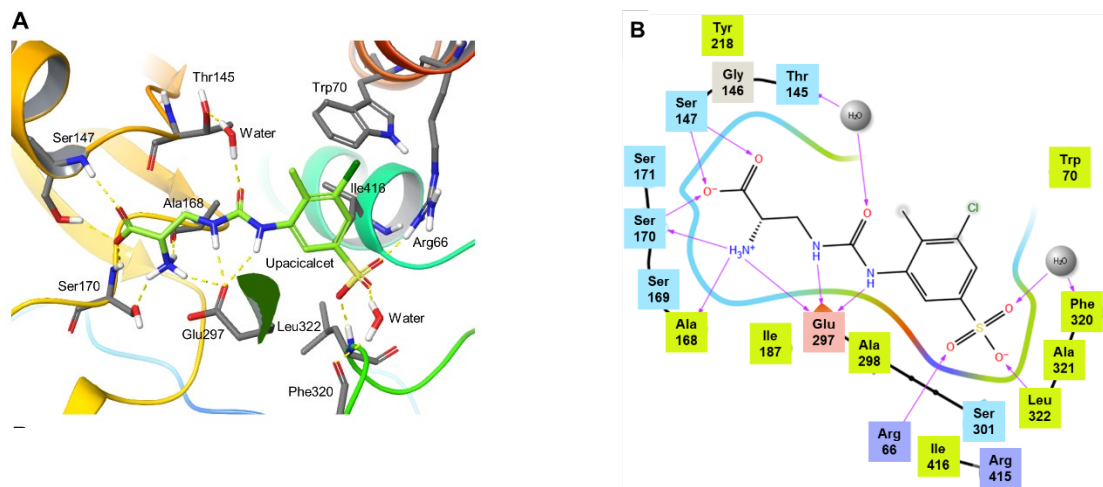


Figure 4. ウパシカルセトの CaSR に対する結合様式

A : CaSR とウパシカルセトの 3D 結合様式。黄色破線は水素結合を示す

B : ウパシカルセトと CaSR アミノ酸残基との相互作用。赤：負電荷、青：正電荷、緑：疎水的

ウパシカルセトと CaSR との結合では、これまでの CaSR 作動薬と異なり、CaSR の Arg66、Leu322 および Phe320 がウパシカルセトのスルホ基と相互作用することを確認した。ウパシカルセトの構造活性相関研究において、スルホ基を除去した場合、活性が大幅に低下したことから、ウパシカルセトのスルホ基と CaSR 残基 (Arg66、Leu322 および Phe320) との相互作用が、CaSR 作動活性発現に重要であることが示唆された (Figure 4B)。

次に、血清 iPTH 値が正常群に比べて有意に上昇し、SHPT の病態が確立された CKD モデルラットを用いて、ウパシカルセトの異所性石灰化および骨構造に対する影響を評価した。ウパシカルセトは、投与開始後 7 日目から CKD 対照群と比較して血清 iPTH 値を有意に抑制した。また、血管石灰化に対する効果を確認するため、胸部大動脈の von Kossa 染色を行った (Figure 5A)。Von Kossa 陽性面積比は、CKD 対照群で正常群より有意に高かった。0.2mg/kg および 1mg/kg のウパシカルセト投与群では、CKD 対照群よりも有意に低く（それぞれ 41% および 99% の減少）、用量依存的であった (Figure 5B)。

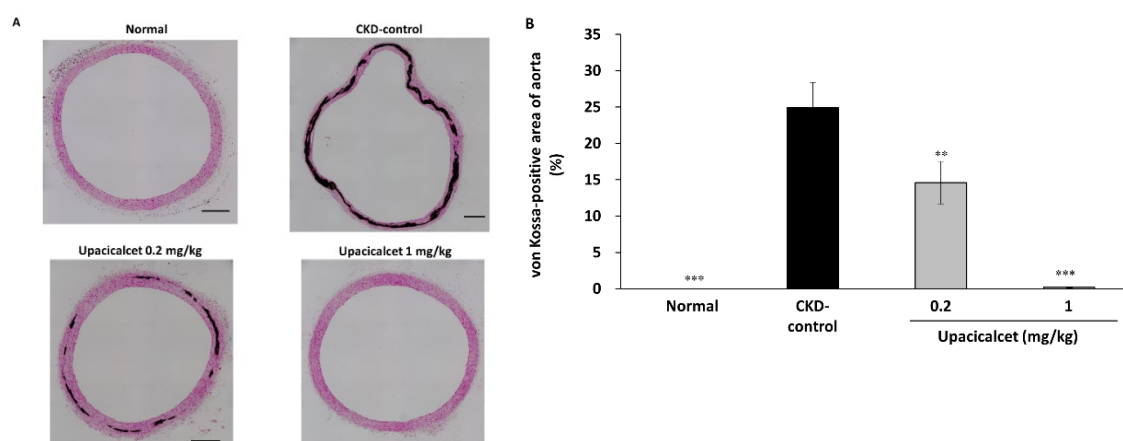


Figure 5. CKD モデルラットの血管石灰化に対するウパシカルセトの効果

A：胸部大動脈の von Kossa 染色像、スケールバー:300 μ m。B：血管断面積に対する Von Kossa 陽性面積比。エラーバーは平均値 \pm S.E.M.を示す (n=11~14)。統計解析は、病態コントロールに対し Dunnet 検定を行った (** P<0.01, *** P<0.001)

骨形態に対する効果は、右脛骨の皮質間隙率を評価した。皮質間隙率は CKD 対照群で正常群より有意に高く、1mg/kg のウパシカルセト投与群では空隙が優位に抑制されていた (Figure 6 A,B)。

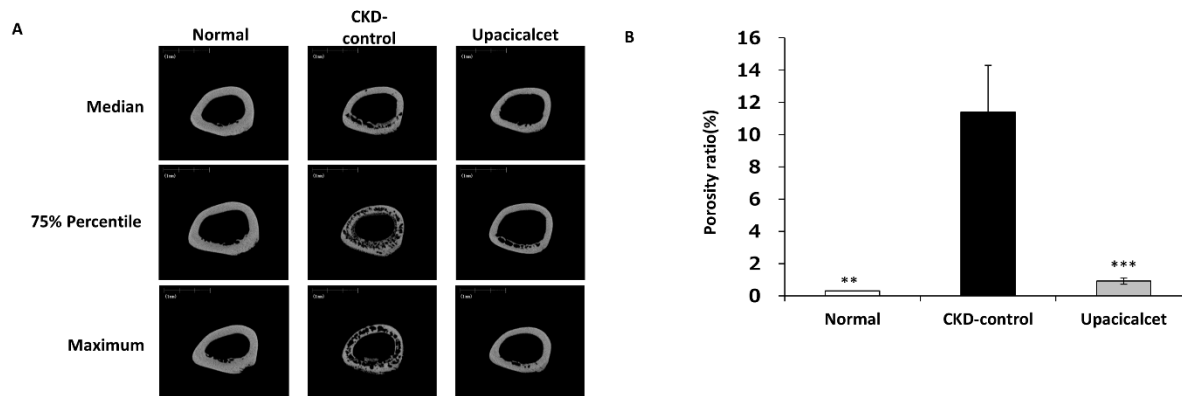


Figure 6. CKD モデルラットの皮質骨空隙に対するウパシカルセトの効果

A：各ラット群における右大腿骨断面の代表的な X 線画像、スケールバー:1 目盛あたり 1 mm。B：皮質骨の空隙率。エラーバーは平均値 \pm S.E.M.を示す。統計解析は、病態コントロールに対し Dunnet 検定を行った (** P<0.01, *** P<0.001)

最近、CaSR の SNPs が血液透析患者の病態生理や治療効果に影響を及ぼすことが報告されている⁹⁾。したがって、CaSR への結合様式が既存薬とは異なるウパシカルセトは、従来の薬剤に反応しない患者にも効果を示す可能性がある。また、今回変異型を評価した CaSR アミノ酸残基のうち Arg66 と Trp70 は、CaSR

の陰イオン結合部位として報告されている¹⁰⁾。陰イオンは CaSR の不活性化状態を安定化させるため、高リン血症患者では CaSR の機能が低下し、SHPT 治療薬の薬効が低下することが示唆されている。高リン血症と関連する SHPT の重要な病態の一つは異所性石灰化であり、これは血液中にカルシウムイオンとリン酸イオンの不溶性塩が形成されることによって起こる。したがって、ウパシカルセトと Arg66 や Trp70 のような陰イオン結合残基との相互作用は、CaSR の不活性化状態を解除し、活性化状態への移行を促進する作用も期待できる。

【結論】

本研究では、ウパシカルセトの CaSR への結合親和能評価や *in silico* 解析による CaSR のアミノ酸結合部位は、シナカルセトやエテルカルセチドなどの従来の薬剤とは大きく異なることを明らかにした。さらに、CKD モデルで SHPT 病態への骨代謝異常リスクの低減効果を明らかにした。本研究成果は、今後の CKD 治療に大きく貢献するものと期待される。

参考文献：

- 1) Cunningham J et.al., *Clin J Am Soc Nephrol* 6: 913–921. (2011)
- 2) Go AS et.al., *N Engl J Med* 13: 1296–305. (2004)
- 3) Lau WL et.al., *Clin J Am Soc Nephrol* 6: 952–961. (2018)
- 4) Miyazaki H et.al., *Bioorg Med Chem Lett* 28: 2055–2060. (2018)
- 5) Alexander ST et.al., *Mol Pharmacol* 88: 853–865. (2015)
- 6) Goto M. et.al., *Eur. J. Pharmacol.*956:175936. (2023)
- 7) Geng Y et.al., *Elife* 5: e13662. (2016)
- 8) Zhang C et al., *Sci Adv* 2: e1600241. (2016)
- 9) Grzegorzewska AE et.al., *Sci Rep* 6: 35188. (2016)
- 10) Centeno PP et.al., *Nat Commun* 10: 4693. (2019)

以上