

学 位 論 文 要 旨

博士課程 ①・乙	第 号	氏 名	矢野 弥生
<p>[論文題名]</p> <p>Thrombin rapidly digests adrenomedullin: Synthesis of adrenomedullin analogs resistant to thrombin</p> <p>トロンビンによるアドレノメデュリンの分解: トロンビン抵抗性アドレノメデュリンの作成</p> <p>Biochemical and Biophysical Research Communications, 529 778-783. 2020, DOI 10.1016/j.bbrc.2020.06.057</p> <p>[要 旨]</p> <p>アドレノメデュリン(AM(1-52))は 1993 年に褐色細胞腫から発見された 52 個のアミノ酸からなるペプチドであり、最初に報告された生物活性は血小板の cAMP 増加である。その後、AM 欠損マウスは胎性致死となること、全身の血管や心臓で産生されること、血管拡張を伴う強力な降圧作用や抗炎症効果、血管内皮の恒常性維持が報告され、生命維持に必要な不可欠なペプチドと判明した。AM は健常者の血中にも循環しているが肺高血圧症や心不全といった心疾患、敗血症をはじめとする炎症性疾患で上昇しており、トロンビンによる血管透過性の亢進に拮抗し病態を改善しうる方向へ働く。病態モデル動物に投与すると心筋梗塞の梗塞範囲の縮小や肺うっ血の改善が得られるため、当教室では医薬品としての臨床応用を目指している。現在課題としている問題点は 22 分という短い血中半減期である。今回、AM(1-52)の血中での代謝を調べる過程で、拮抗物質であるトロンビンが AM(1-52)の分解酵素と断定した。またトロンビン抵抗性 AM 類縁体を創製し、AM(1-52)と比較した結果、両者は同等の生物活性を持ちながら生物学的利用能はトロンビン抵抗性 AM 類縁体が約 100 倍と向上していたため報告する。</p> <p>AM(1-52)の構造的特徴は一つのリング構造と、C 末端のアミド構造である。両者が活性に必要であり、今回用いた測定法も両者が存在することで AM を認識する測定法である。</p> <p>内因性 AM(1-52)の血中濃度は低値のため、合成 AM(1-52)を血清と血漿で 1 時間反応させ、分解の様子を比較した。血漿中では 10%程度しか分解されないが、血清中では 90 % 以上の AM(1-52)が消失した。AM(1-52)が分解された血清サンプルをクロマトグラフィーの一種である RH-HPLC にかき、分解産物を分取した。得られたサンプルに対して TOF-MS と N 末シークエンスを行った結果、検出されたペプチドは AM (13-44)であった。血清中では AM(1-52)の分解酵素が活性化していると考え、様々なタンパク分解酵素阻害剤を含む血清中で AM(1-52)を反応させると、トロンビン阻害作用のある酵素阻害薬下で分解が抑制された。</p>			

逆にトロンビンと Xa 阻害作用を持たないアプロチニン下では分解が抑制されなかった。トロンビンは健常人の血漿中では活性がほとんどないが、血清中では活性が亢進していること、セリンプロテアーゼであり、トリプシンと同様にアルギニンの隣で目的タンパク質を切断する分解酵素である。今回の結果はトロンビンの性質に矛盾しなかった。リコンビナントヒトトロンビンを AM(1-52)溶液に投与すると AM(13-44)と同じ分子量の分解産物が得られ、直接トロンビン阻害薬のダビガトラン下では血清中での分解が抑制された結果から総合してトロンビンを AM(1-52)の分解酵素と断定した。

トロンビンにより AM が 44/45 で分断されると、リング構造と C 末端が分断されるため AM は活性を失う。対して 12/13 は切断されても活性に影響しない。よって AM(13-52)をキープペプチドとして 44 番目のアルギニンを他のアミノ酸で置換した類縁体をトロンビン抵抗性 AM として創製した。置換したアミノ酸はリジン、アラニン、光学異性体である D 体アルギニンの 3 つである。血清中で AM(1-52)、AM 類縁体を反応させると AM(13-52)は AM(1-52)と同様に 1 時間で 10%以下に減少するがアミノ酸置換体はいずれも 4 時間後も半分以上残存しており、トロンビン抵抗性であった。

次に生物活性を比較するため AM(1-52)の受容体である CLR/RAMP2 受容体を安定的に発現している HEK293 細胞に各類縁体を投与した。この受容体は AM に特異的であり、アゴニスト濃度依存性に細胞内の cAMP と Ca²⁺を増加させる。AM(1-52)と AM(13-52)の比較では pEC₅₀ は 8.61 対 8.84 であり、95%信頼区間は重なっていた。アミノ酸置換体は AM(13-52)をコントロールとして実験を行った。いずれも pEC₅₀ の 95% 信頼区間は重なっていた。AM(13-52)と [Ala-44]AM(13-52)では pEC₅₀ は 8.87 対 8.66 であった。

最後にラットにこれらのペプチドを皮下投与し、AM の血中濃度を経時的に測定した。AM(13-52)の AUC は AM(1-52)の 2 倍であった。一般的に分子量 5000 より大きいものはリンパ管へ吸収されやすい性質があり、分子量 4530 である AM(13-52)は分子量 6029 の AM(1-52)と比較して血中への移行が良好な可能性を考えた。アミノ酸置換体の AUC はいずれも AM(13-52)より良好であったが Ala 置換体は最も高く AM(1-52)の 100 倍であった。

トロンビンは凝固系因子としての役割が有名だがそれ以外にも血管内皮に作用して細胞骨格を変え、血管透過性を亢進させる作用が報告されている。敗血症や心不全ではその活性が上昇しており、病態悪化の方向へ向かわせていると考えられる。AM はトロンビンの拮抗物質であり上記病態下で血中濃度が上昇しているが、トロンビンに分解され相対的にトロンビン優勢になっていると考えればトロンビン抵抗性の AM 類縁体投与は理にかなっている。血管透過性亢進を中心とした全身状態の悪化は原疾患を問わず重症患者の普遍的な問題である。また、心不全や敗血症は世界や日本の死因の上位疾患であり、そのような社会状況下で AM 類縁体の臨床応用は大きな貢献をすることができると考えている。

備考 論文要旨は、和文にあつては 2,000 字程度、英文にあつては 1,200 語程度