

## 学 位 論 文 要 旨

博士課程 ①・乙	第 号	氏 名	明石 絵美子
<p>[論文題名]</p> <p>英文題名:Activation of Calcitonin Gene-Related Peptide and Adrenomedullin Receptors by PEGylated Adrenomedullin 邦文題名:PEG化アドレノメデュリンの受容体に対する反応性の評価</p> <p>Biological and Pharmaceutical Bulletin, 43:1799-1803, 2020, 10. 1248/bpb. b20-00373</p> <p>[要 旨]</p> <p>[背景]</p> <p>アドレノメデュリン(AM)は、52個のアミノ酸からなる生理活性ペプチドであり、カルシトニンファミリーに属している。分子内にジスルフィド結合によるリング構造とC末端のアミド構造を持ち、この2つの構造が生理活性発現に必須となる。そのため、リング構造を持たないペプチド断片はアンタゴニストとして機能する。また、AMは calcitonin gene-related peptide(CGRP)、AM1、AM2 受容体と結合する。これらの受容体は、calcitonin receptor-like receptor と receptor activity-modifying protein(RAMP)の複合体で構成されており、RAMPは3つの受容体で異なる。AMが受容体に結合すると、cyclic AMP(cAMP)を産生し、血管拡張作用をはじめ、様々な作用を示す。その中で、抗炎症作用や創傷治癒作用を持つことから、炎症性疾患(IBD)に対する効果が報告されており、臨床応用に向けて研究が進められている。しかし、AMは血中半減期が短いため、治療効果を得るには入院下での持続投与が必要となり、患者の負担を伴う。そこで、我々は、血中持続時間の延長を目的に Polyethylene glycol 化 AM(PEG-AM)を作製した。Polyethylene glycol (PEG)修飾することで、ペプチダーゼによる分解の回避や腎クリアランスの低下により、血中持続時間が延長され、投与量や投与回数の低減が期待できる。一方で、ペプチド本来の活性を損なうことがあるため、細胞における活性の評価は重要となる。本研究では、AMとPEG-AMの細胞内cAMP値の時間的変化を比較し、3つの受容体に対するPEG-AMの活性とアンタゴニストの影響についての研究を行った。</p> <p>[方法]</p> <p>(実験1) <math>10^{-7}</math>M AM、<math>10^{-7}</math>M 5kDa PEG-AM、<math>10^{-5}</math>M 60kDa PEG-AMをAM1受容体発現細胞に添加し、5、15、30、60、120、240分後の細胞内cAMP値を測定した。また、ペプチドの濃度は、受容体において最大活性を示す濃度に設定した。</p>			

(実験2) 3つの受容体をそれぞれ安定発現した細胞株を用いて、アンタゴニスト投与群(CGRP受容体:  $10^{-7}$ M CGRP(8-37)、AM1とAM2受容体:  $10^{-5}$ M AM(22-52))と非投与群に分け、5分間、前処理した。その後、AM( $10^{-10}$ Mから $10^{-6}$ M)またはPEG-AM(5kDa PEG-AM:  $10^{-10}$ Mから $10^{-6}$ M、60kDa PEG-AM:  $10^{-10}$ Mから $10^{-5}$ M)を添加して15分間反応させ、細胞内cAMP値を測定した。活性は、用量反応曲線を用いてpEC50とpA2を求め、評価した。

[結果]

(実験1) AM1受容体において、AMとPEG-AMの細胞内cAMPの時間的変化は、いずれも15分でピークとなった。

(実験2) CGRP、AM1、AM2受容体の全てにおいて、AMとPEG-AMの細胞内cAMP値は濃度依存的に上昇し、最大反応は同程度だった。その反応は、それぞれの受容体に対するアンタゴニストによって遮断された。CGRP受容体において、pEC50値はAM:8.32、5kDa PEG-AM:7.97、60kDa PEG-AM:6.50、pA2値は、AM:7.32、5kDa PEG-AM:8.09、60kDa PEG-AM:8.63だった。AM1受容体において、pEC50値はAM:8.36、5kDa PEG-AM:7.95、60kDa PEG-AM:6.78、pA2値は、AM:4.65、5kDa PEG-AM:5.63、60kDa PEG-AM:5.90だった。AM2受容体において、pEC50値はAM:8.89、5kDa PEG-AM:8.54、60kDa PEG-AM:7.66、pA2値は、AM:5.68、5kDa PEG-AM:6.41、60kDa PEG-AM:6.70だった。

[結論/考察]

AM1受容体において、PEG-AMの細胞内cAMP値の時間的変化はAMと同様であり、PEGの修飾は受容体の活性時間に影響しないことが明らかとなった。また、この時の60kDa PEG-AMの濃度は、AMと比較して濃い濃度であったが、同じ反応を示すことから臨床応用した際にAMと同等の効果が期待できると考えられた。

PEG-AMはCGRP、AM1、AM2受容体全てにおいて活性がみられ、PEGの分子量が増加するにつれて、pEC50値は小さく、pA2値は大きくなった。これらは、PEGが修飾することで、受容体の反応性は減少したと考えられる。しかし、高濃度では、AMと同程度の活性がみられた。その活性は、それぞれの受容体に対するアンタゴニストによって競合的に遮断された。これらのPEG-AMの反応はAMと類似しており、PEG修飾によってAMの受容体選択性は変化しないことが示された。

本研究において、PEG-AMは、3つの受容体に対する結合やアンタゴニストに対する反応が、AMと類似する性質を持つことが明らかとなった。また、これまでの研究でPEG-AMの血中持続時間の延長とIBDモデル動物に対する効果が報告されていることから、AMよりも優れた治療薬になる可能性が示唆された。

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