

## 論文の内容の要旨

論文題目 経口血小板増加薬 YM477 の薬理学的作用に関する研究

氏 名 新谷 麻理

血小板は止血機構に重要な役割を果たしている血液成分の一つである。血小板は、様々なサイトカインによって造血幹細胞から造血前駆細胞、巨核球へと方向付けされた後、成熟した巨核球の細胞質から生じる無核片として産生される。この過程で特に重要な役割を担っているサイトカインがトロンボポエチン (TPO) である。TPO は 332 アミノ酸残基からなるタンパク質であり、1994 年に初めてクローニングされた。1990 年代後半には TPO 製剤の臨床試験が実施され、化学療法後の血小板減少等の血小板減少症に対して有効性が確認された。しかしながら、TPO 製剤投与によって中和抗体が誘導されることが判明し、その中和抗体が内因性の TPO の作用を抑制することにより、血小板減少症が発症したことから、臨床試験が中断された。本研究では、TPO 製剤で問題となった中和抗体の懸念が少なく、血小板減少症の主たる治療法である血小板輸血の問題点である感染等の危険性が少ないと考えられる低分子化合物の中から TPO と同様の作用を有する化合物の探索を実施し、新規 TPO 受容体作動薬 YM477 (1-(3-chloro-5-{{4-(4-chloro-2-thienyl)-5-(4-cyclohexylpiperazin-1-yl)-1,3-thiazol-2-yl}carbonyl}-2-pyridyl)piperidine-4-carboxylic acid) を創出した。本論文では YM477 の薬理学的作用について研究した。

第1章では、*in vitro*におけるYM477の薬理作用を検討した。YM477は、TPO受容体への刺激に応じて増殖するヒトTPO受容体発現Ba/F3細胞の増殖を促進したが、親株のBa/F3細胞の増殖を促進しなかった。また、YM477はリコンビナントヒトTPO(rhTPO)と同様に、ヒトTPO受容体発現Ba/F3細胞内のSTAT3、STAT5のチロシン残基およびERKのスレオニン残基のリン酸化を誘導した。このことから、YM477はヒトTPO受容体に作用し、TPO様の作用を示す可能性が示唆された。TPOの生体内での主な薬理作用は、造血幹細胞から巨核球への分化・成熟促進作用であることから、CD34<sup>+</sup>細胞(ヒト造血幹・前駆細胞を含む集団)から巨核球への分化促進および成熟に与えるYM477の影響を検討した。YM477はヒト臍帯血CD34<sup>+</sup>細胞からのヒト巨核球形成を濃度依存的に促進させ、他の血球系への分化促進には影響を与えなかった。また、YM477存在下でヒト末梢血CD34<sup>+</sup>細胞を培養した際に生成する巨核球の細胞核の多倍体の分布はrhTPO存在下で培養した巨核球と類似したものであり、有意な差は認められなかった。これらの結果から、YM477はTPOと同様に造血幹細胞から巨核球への分化・成熟を促進することが示された。本章において、YM477は*in vitro*でTPOと同等の作用を示すことを明らかにした。

第2章では、YM477の*in vivo*評価の実施を目的として、YM477の種特異性を検討した。TPO受容体は血小板に発現しており、TPOは血小板内情報伝達を惹起させることから、この作用を利用し、種特異性の検討を行った。検討した範囲では、YM477はヒトおよびチンパンジーの血小板にのみ細胞内情報伝達を誘導したことから、TPO受容体へのYM477の作用は種特異性が高いことが示された。

YM477がTPO受容体への作用において、厳格な種特異性を持つことが判明したものの、*in vivo*実験でのチンパンジーの使用は困難である。そこで、第3章では、免疫不全マウスであるNOD/SCIDマウスにヒト造血幹細胞を移植し、ヒト血小板を産生するマウスモデルを作成した。モデルマウス末梢血中において、ヒト血小板がその寿命が約10日であるにもかかわらず6ヶ月以上検出されたことから、マウス体内でヒト血小板が安定的、継続的に産生されることが示唆された。また、モデルマウス血液中のヒト血小板はアゴニストの刺激により活性化したことから、マウスの末梢血中に産出されたヒト血小板は機能的であると考えられた。従って、機能的なヒト血小板を体内で安定して産生するモデルマウスが確立できたと考えられた。次に、本評価系を用いて、YM477のヒト血小板増加作用を検討した。YM477をヒト造血幹細胞移植NOD/SCIDマウスに14日間経口投与した結果、YM477を1mg/kg/day以上投与した群では、投与開始14日目に有意なヒト血小板数の増加が認められ

た。YM477 の投与終了後、ヒト血小板数は薬剤投与開始時の値まで減少した。以上の結果により、YM477 は TPO と同様に *in vivo* で血小板増加作用を有することが示された。

第 4 章では、YM477 のヒト血小板の凝集および活性化に及ぼす影響について検討した。血小板は、凝集・活性化反応を通じて血小板血栓形成に大きな役割を果たしており、TPO はその血小板の活性化を促進することが知られている。一方で、血小板凝集の促進は、血栓形成のリスクを高め、血栓関連疾患発症のリスクとなりうる。そこで、最初に *in vitro* で YM477 が血小板凝集および血小板活性化に与える影響を検討した。YM477 は、単独では血小板凝集および活性化のいずれも惹起しなかった。また、YM477 はアゴニスト刺激により惹起される血小板凝集および血小板活性化を亢進させなかった。一方、TPO は、単独で血小板凝集および活性化を惹起し、アゴニスト刺激による血小板凝集および活性化を亢進させた。この結果から、血小板凝集および血小板活性化亢進作用に対する YM477 の影響は非常に小さいことが示された。

次に、*in vivo* で YM477 が血小板機能に与える影響を検討する目的で、YM477 を投与したヒト造血幹細胞移植 NOD/SCID マウスのヒト血小板の血小板活性化能を評価した。YM477 投与群のヒト血小板の薬剤投与前後の血小板活性化の変化率は vehicle 群と同程度であることが確認された。従って、YM477 はマウス体内で機能的なヒト血小板を産生させることができると考えられた。また、YM477 の長時間の暴露が血小板機能に影響を及ぼさないことも示唆された。

第 5 章では、TPO 受容体に対する YM477 の作用部位について検討を行った。TPO 受容体の細胞外領域は、膜遠位ドメイン (CRH1) と膜近位ドメイン (CRH2) で構成されており、TPO は、CRH1 部位に結合することが示されている。そこで、本検討では 2 種類のヒトとカニクイザルのキメラ TPO 受容体 (カニクイザル CRH1/ヒト CRH2-細胞膜貫通領域、細胞質内領域 (ICD) キメラ TPO 受容体およびヒト CRH1/カニクイザル CRH2-ICD キメラ TPO 受容体) をそれぞれ発現させた Ba/F3 細胞の細胞増殖活性を指標として YM477 の TPO 受容体の作用部位を検討した。YM477 は、カニクイザル CRH1/ヒト CRH2-ICD キメラ TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞の増殖を促進したが、ヒト CRH1/カニクイザル CRH2-ICD キメラ TPO 受容体発現 Ba/F3 細胞の増殖を促進しなかった。YM477 の活性発現にはヒト CRH2 が重要であることから、YM477 の TPO 受容体への結合部位は TPO の結合部位とは異なるものと考えられた。次に、TPO と TPO 受容体の結合に対する YM477 の影響を検討した。TPO 受容体への TPO の結合を阻害すると報告されている低分子化合物 TM41 がヒト血小板への TPO の

結合を阻害することを確認し、同じ実験条件下で YM477 の影響を検討したところ、YM477 はヒト血小板への TPO の結合を阻害しなかった。この結果からもヒト TPO 受容体への YM477 の結合部位は TPO の結合部位とは異なることが示された。

ヒト TPO 受容体への YM477 の結合部位は TPO の結合部位とは異なることが示され、YM477 が TPO 受容体に対して TPO と同時に作用する可能性が考えられたことから、第 6 章では、YM477 と TPO の併用作用について検討した。YM477 は末梢血 CD34<sup>+</sup>細胞からの巨核球形成を、TPO 同様に刺激した。さらに、YM477 は TPO が巨核球産生の最大効果を示す TPO 濃度存在下において濃度依存的に巨核球数を増加させ、最大で約 200% の増加を示した。このように、YM477 は TPO との併用効果を示した。

以上、本論文において、YM477 が TPO 受容体に作用し、*in vitro* で TPO と同等の作用を示すことを証明し、ヒト血小板を長期にわたり産生するモデルマウスにおいて *in vivo* で機能的なヒト血小板を増加させることを示した。さらに、TPO 受容体上の YM477 の作用点が TPO の作用点とは異なることを明らかにし、造血幹細胞に対して TPO と YM477 が相加的に働く可能性を示した。これらの結果から、YM477 が優れた血小板増加薬となることが期待される。なお、YM477 はすでに臨床試験が実施されており、健常人への経口投与により、用量依存的な血小板数の増加が認められ、本研究で示した結果の一部がヒトで証明されている。

このように、YM477 は健常人で忍容性が高く、さらに血小板増加作用を示したことから、現在本薬剤は米国において特発性血小板減少性紫斑病、慢性肝疾患に伴う血小板減少症で臨床試験が進められている。本薬剤が有用な血小板減少治療薬として患者の役に立つ薬剤になることを期待する。