



<講演>

エンドセリンの発見から創薬まで—今後の課題

後藤先生は今年3月に筑波大学を定年退官され、特任教授に就任されました。また、8月からはJST サテライト茨城の館長として、産学をコーディネートするお仕事もされています。エンドセリンの発見から未発表の最新の知見まで、お話をうかがいたいと思います。(西村暉)

●エンドセリン発見のきっかけ●

血管は原則として内膜（エンドセリウム）、中膜（ミディア）、外膜（アドベンティティア）の3層からできています。内膜は1層の内皮細胞からなり、脆弱な構造です。中膜は平滑筋層で、血管の収縮装置です。外膜は結合組織です。内皮細胞は綿棒でこすると剥がれて平滑筋がむき出しになります。平滑筋層に血液が触れると凝固を起こしやすくなるため、内皮細胞は血液と平滑筋が直接接するのを防ぐための防御壁の役割を果たしている程度と考えられていました。ところが、1980年に米国のファーチゴット（R・Furchgott）が、内皮細胞から血管を強力に拡張させる物質が遊離することを発見しました。その物質が一酸化窒素であることを解明するのに7年の歳月を要しましたが、彼は98年にノーベル生理学・医学賞を受賞しています。

その間に内皮細胞の培養技術が確立され、内皮細胞の培養液を血管に作用させたところ、予想に反して強力な収縮因子が発見されました。これは85年ごろに米国で発表されています。当時、私の研究室の大学院生だった柳沢君（柳沢正史・米テキサス大教授）が活性物質の検索を始め、これがエンドセリン発見のきっかけになりました。

我々はまずオーガンバスに栄養液を入れて保温し、スパイラル状に切った動脈血管を懸垂しました。そこに内皮細胞の培養液を入れると収縮が起こり、栄養液を洗ってもなかなか元に戻らないことがわかりました。細胞培養などでは一般に仔牛血清を培養液に混合して用いますが、血清にはタンパク質やペプチド類が多く含まれ、少量の活性ペプチドの単離・精製を困難にします。そこで次に、血清を含まない培養液で内皮細胞の培養を試みたところ、培養に支障はなく、培養液の血管収縮活性も同様に認められることが判明しました。この無血清培養液を大量（約10l）集め、活性ペプチドを単離精製してみました。高速液体クロマトグラフィー（HPLC）のカラムに内容物をすべて吸着させておき、アセトニトリルの濃度を漸増させて吸着物を少しずつ溶出させ、その溶液を1分単位で貯めていきます。40本の分画から少しずつ取り出した溶液を前述のオーガンバスの中に注入して血管収縮活性を示した分画を収集し、単離・精製して構造決定すると、



後藤 勝年

筑波大学 特任教授
JST サテライト茨城 館長

ごとう・かつとし

1962年名古屋市立大学薬学部卒業。
1971年東京大学薬学部薬学系研究科博士課程修了。同年東京大学薬学部助手、1974～1977年、ウェストバージニア大学医学部薬理学教室客員研究員を経て1977年筑波大学基礎医学系助教授、1990年同大学教授に。1992年循環器バイオシステム特別プロジェクト長、1995年筑波大学基礎医学系長、2000年筑波大学先端学際領域研究（TARA）センター長、2004年筑波大学大学院人間総合科学研究科長を務める。2006年筑波大学特任教授。日本薬理学会評議員、米国薬理学会会員（FASEB会員）、日本心血管内分泌代謝学会理事、Pharmacological Review誌 Editorial Board Memberなどを歴任し、現在はJ. Cardiovasc. Pharmacol.誌 Editorial Board Memberを兼務。1990年第2回つくば賞受賞。



21個のアミノ酸からなるペプチド（短いタンパク質）であることがわかりました。N末端がシステイン、C末端がトリプトファンで、4つあるシステインは自動的に酸化されてS-S結合になっています。かなり固定された3次元構造を持つこのペプチドは、内皮（エンドセリウム）にちなんで、エンドセリン（ET）と名づけました。

これらのタンパク質やペプチドを産生する遺伝子をアミノ酸組成から推測し、鋳型のDNA（オリゴヌクレオチド）を合成してET遺伝子のクローニングを試みました。クローニングされたEt cDNAから、まず最初に203個のアミノ酸からなるタンパク質（前駆体）が翻訳されます。この前駆体が酵素分解されて39個のアミノ酸からなる中間体（ビッグET）を産生し、さらに分解されて、活性物質が生じてくることがわかりました。前駆体の特殊なアミノ酸配列（塩基性アミノ酸のリジン、アルジニンが並んだものなど）を認識する分解酵素によって前駆体が切断され、中間体へと分解されていくわけですが、この分解酵素はどの細胞にも存在するプロセッシング酵素と呼ばれるものです。そして最終段階として、ビッグETのTrp-Valのところで切断され、活性物質であるETが産生されてきます。この酵素はETに特有の酵素と思われ、「エンドセリン変換酵素」と名づけました。

ETの薬理作用を調べるべく、ラットの血圧反応（麻酔したラットの頸動脈に直接カテーテルを入れ、脈圧を測定）を測定しました。生体内で産生される活性物質では最強の血管収縮物質といわれるアンジオテンシンIIと、ETの作用を比べてみました。アンジオテンシンIIを静脈投与すると（1ショット）血圧が急上昇し、すぐに下がってきます。ところが、ETでは血圧が急降下した後、じわじわと上昇に転じ、それが非常に長く続きます。これほど長く作用が続く生体内物質は、ETが初めてだと思います。

単離精製から薬理実験に至るまでを論文にして88（昭和63）年に『Nature』に投稿しました。これがETに関する世界初のペーパーです。これを見て真っ先につくばへ来られたのが、82年にプロスタサイクリンの発見でノーベル生理学・医学賞を受賞したジョン・ヴェイン博士（Jhon R.Vane=英国・ウィリアム・ハーヴェイ研究所）です。彼の研究業績に基づく点滴静注用製剤「フローラン」は、今日も肺高血圧症治療薬として使われています。ヴェイン博士が88年12月に英国で開催したワークショップには欧米と日本から約80人が参加し、実質的な“第1回国際エンドセリン会議”となりました。スイスのロシュ社の研究所からは、後に我々の研究と深い関わりを持つマーチン・クローゼル（Martine Crozel）博士、ジーン・ポール・クローゼル（Jean-Paul Crozel）博士も夫妻で出席されています。

●エンドセリンの役割の解明●

ヒト染色体遺伝子の解析によって、ETにはアミノ酸組成が異なる3ケのファミリー（ET-1、ET-2、ET-3）があることも判明しました。興味深いことに、イスラエルに生息する蛇（アナヘビ）の蛇毒の一成分であるサラフォキシンは類似の構造をしています。この蛇に噛まれると心筋梗塞で死亡したりするのは、蛇毒のターゲットが冠血管だからです。ヒトの組織で遺伝子の



分布を調べてみると、ET-1は中枢神経系や内皮細胞に非常に多く分布していました。3つのファミリーはそれぞれ分布が異なり、役割も異なると推測されます。(図1)

ETの受容体(レセプター)は2種類ありますが、ETA受容体は京大のグループ、ETB受容体は我々のグループがクローニングし、1990年に『Nature』に並んで掲載されました。ETA受容体はET-1、ET-2との親和性が非常に大きく、ET-3はあまり認識しません。ETB受容体は3つとも同等に認識するという違いがあります。

ETがETB受容体を刺激すると、内皮細胞から一酸化窒素が遊離され、血管が弛緩します。前述のラットの実験で血圧が急

降下したのは、このルートによるもので、作用は一過性です。一方、血管の平滑筋にあるETA受容体を刺激すると、強烈で持続的な収縮が起こります。ETの作用機構(細胞内シグナル伝達など)についてはその後、非常に詳しい研究が行われていますが、本日は省略します。

ETのように今までにない性質を持つ新しい物質は未知の働きをもっており、その働きをブロックする薬を開発すれば、医薬品として使える可能性があります。ET発見直後から世界中で拮抗薬の開発が始まり、万有製薬が世界初のET受容体拮抗薬「BQ-123」を開発しました。これは5個のアミノ酸からなる環状のペプチドで、ストレプトマイセス・ミサキエンシスというカビ(放線菌)の代謝産物から見いだされた物質です。その後、藤沢薬品(現アステラス製薬)、武田薬品も続けました。余談になりますが、藤沢薬品の強力な免疫抑制剤「FK506」は、ストレプトマイセス・ツクバエンシスという、つくばの土に生息するカビの代謝産物から発見されたペプチドです。

これらの拮抗薬は研究ツールとしては大変に活躍しましたが、ペプチドは経口投与すると消化管の中で分解されてしまうため、医薬品として使うには至りませんでした。非ペプチドの経口投与可能な拮抗薬は、ロシュ社のクローゼル夫妻が93年に世界で最初に開発し、『Nature』に発表しました。ラットを人工的に急性腎不全の状態にすると、血流が急減しますが、この薬をあらかじめ経口投与しておいたラットは症状がかなり抑えられたのです。これはクモ膜下出血と同じモデルです。クモ膜下の血管外にあふれ出た血液を手術で取り除いても、数日後には5割以上の確率で脳血管攣縮(れん縮)を発症します。脳血流が急減する致命的な疾患ですが、拮抗薬の事前投与で発症を抑えることができます。

ロシュ社は後に、これに少し改良を加えたSO₂NH₂(スルホンアミド)剤の「ボセンタン」(商品名:トラクリア)を開発しました。SO₂NH₂の一部はインシュリンの分泌を促進するので、糖尿病治療薬としても使われています。このSO₂NH₂系と、スミスクライン&フレンチ(現グラクソ・スミスクライン)がSBDD(構造に基づいたドラッグデザイン)で開発したジフェニールインダン系を中心に開発が進み、90年代後半までには日本を含む世界の有力な製薬企業のほとんどがET受容体拮抗薬を持つに至りました。し

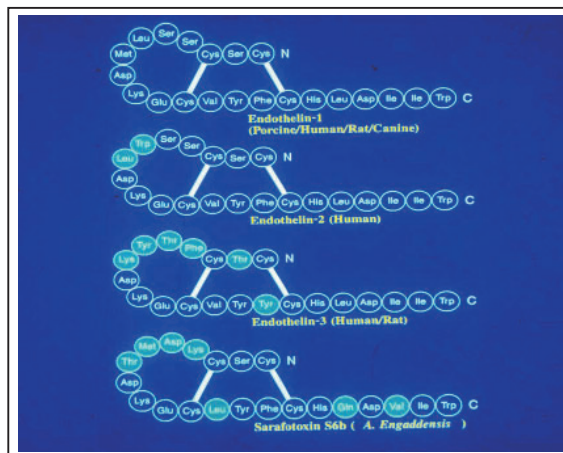


図1 エンドセリンファミリーの
アミノ酸組成



かし、薬が出揃っても ET の働きが完全に解明されていたわけではなく、ET 受容体拮抗薬の適応となる疾患も確定していなかったのです。

当時、我々は生体内で産生される ET の役割の解明研究に着手していました。方法は遺伝子操作動物（トランスジェニック、ノックアウト）、受容体拮抗薬による解析、病態モデル動物の解析などがあり、柳沢君はアメリカへ行って遺伝子操作動物を使った研究を進めました。柳沢君の業績を一つ紹介しておきます。黒いマウスの ETB 受容体をノックアウトすると、斑点があるマウスや白いマウスが生まれてきます。ET はメラノサイト（メラニン色素合成細胞）の成長に不可欠で、成長後もノックアウトの影響が続きます。人間も強い紫外線に当たって皮膚に ET が大量に産生されると、肌が黒くなり、さらに高じると、メラノーマ（悪性黒色腫）ができます。これ以外にも、ETB 受容体をノックアウトすると、腸管内の神経生育が妨げられ、蠕動運動がうまくできなくなる巨大結腸症も発症します。稀な遺伝病であるヒルシュスプルング病と同じ症状です。実験自体はそれ程困難な仕事ではありませんが、普通はここで終わってしまうことが多くあります。柳沢君は ET 関係の遺伝子をそれぞれノックアウトしたマウスを作製し、成長過程で ET 系の遺伝子が果たしている役割を調べ上げました。ここまでくると、すばらしい仕事になります。

●肺高血圧症への関与を証明●

ET の強力な血管収縮作用と高血圧の関連については、多くの研究者が関心を持つと予想されたので、我々は普通の高血圧（本態性高血圧）ではなく、肺高血圧症を対象に選びました。短期間に激しい症状が出て、物質の関与の解析がしやすいことも選んだ理由です。

マメ科の西洋クローバの一種に、モノクロタリンというアルカロイドが含まれていますが、これを羊や馬が食べると、肺高血圧を発症して死んでしまいます。モノクロタリンの試薬をマウスに注射すると、肝臓を通る間に活性物質に変わり、肺循環に入って内皮細胞に炎症を起こし、約 4 週間で心肥大の症状が出てきます。心臓の筋肉は脳の神経と同じく原則として増殖しないので、心肥大になると個々の細胞が大きくなります。一定の大きさまでは適応能力の範囲ですが、限界を超えると細胞を養うことができなくなり、心不全に陥って死に至ります。胸空内の現象である肺循環は外からではわからないので、右心室にカテーテルを入れて圧（肺動脈圧に匹敵）を測ります。試薬を投与したマウスは右室圧が高くなり、右室肥大が起きて重量も増えてきます。症状の進行に連れて活性物質の血中濃度がかなり高くなり、関与が明らかになったので、今度はあらかじめ ET の作用をブロックしておきました。当時、唯一のアンタゴニスト（拮抗薬）であった BQ-123 を万有製薬にご提供いただきましたが、ペプチドは餌に混ぜるなどして飲ませることができません。持続的に投与するため、浸透圧で少しずつ滲出させていくオスモティック・ミニポンプをマウスの皮下に埋め込み、4 週ほど経過を見ました。その結果、右心圧の上昇が薬物の容量依存的に抑えられ、右心室の肥大も抑えられました。



通常は心臓から出てくる血液は肺の隅々まで循環してガス交換を行い、きれいな酸素を含んだ血液が全身に行き渡ります。ところが、肺高血圧症になると、中膜の平滑筋が内皮細胞の毛細血管の領域まで増殖してきて、血液が通る管空が細く、短くなり、血管数も減ってしまいます。このような場合、血管拡張薬を投与しても簡単には拡張しませんが、ET受容体拮抗薬を持続的に投与することにより、これらの症状が改善されたわけです。我々はこれらの結果を93年、『Circulation Research 誌』に投稿しました。これは世界で初めて内因性ETの病態への関与を納得できる形で証明したものです。(図2)ほかに慢性心不全など、アンタゴニストの事前投与で症状の進行が抑えられる例をいくつか証明しました。また、我々の方法をモデルにして、さまざまな物質の慢性疾患に対する経時的解析が行われるようになりました。

臨床分野の医学誌では世界的一流誌といわれる『New England Journal of Medicine』に掲載されたカナダの研究グループの論文では、肺高血圧とETの産生が極めて平行な関係であることも明らかにされました。

我々はET拮抗薬が二次的な肺高血圧症にも効果があることを検証しました。心臓疾患を有する子供の患者ではうっ血に起因する二次的肺高血圧を発症し、ETの血中濃度が非常に高くなっています。このような患者では、心疾患を治療すると肺高血圧症も回復し、血中のET濃度が下がってきます。このような疾患の動物モデルにおいて、ET拮抗薬を投与すると、肺高血圧症が非常に緩解する現象も確認しています。

●クモ膜下出血、リウマチと広がる臨床応用●

基礎医学的のみならず臨床に直結するデータが揃ったにもかかわらず、世界中の製薬企業はどれも動きません。肺高血圧症は患者数が少ない難病指定の病気で、採算が合わないことが大きな理由だと思いますが、この状況に業を煮やして立ち上がったのがマーチン・クローゼル博士です。ロシュから独立してアクテリオンというベンチャー企業を設立し、採算の目途もつけた上で最初のターゲットを肺高血圧症と定め、ET拮抗薬だけで勝負するという大きな賭けに出ました。

肺高血圧症は診断が難しく、薬の効果を簡単に知る方法ありませんが、患者は少し体を動かすだけで息切れして苦しくなります。そこで、彼女らは6分間に歩ける距離で症状の変化や薬効を調べる方法を編み出しました。たとえば、360mしか歩けなかった人が、20週後に437mまで歩けるようになったという結果が得られましたが、これは画期的な現象といえます。(図3)欧米では02年と03年に、日本では05年に拮抗薬が認可され、肺高血圧症の患者に大きな光明が差してきました。1年間臨床応用され、日本でも良好な結果が出ています。前述したクモ膜下出血後の脳血管攣縮の発症をほぼ100%近く抑える静脈注射用拮抗薬の開発も最終段階を迎えています。

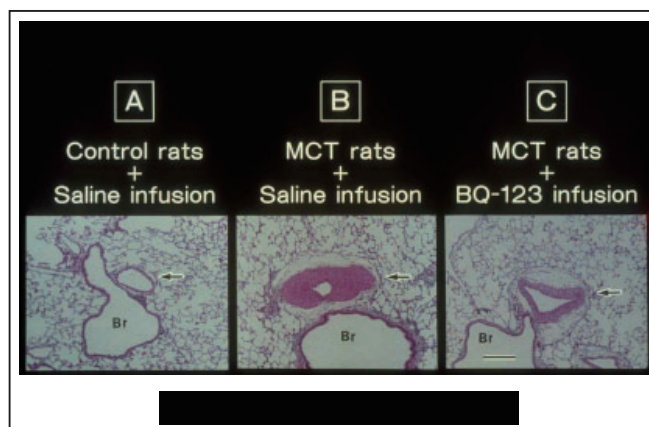


図2 モノクロタリンによる肺高血圧症ラットの肺細動脈肥厚(中)とBQ123持続投与の効果(右)。左の図は正常ラットの肺細動脈を示す。

ET拮抗薬の対象領域は広がってきていますが、この表は現在臨床試験が行われている疾患を表しますが、メラノーマ以外はすべて膠原病（結合組織病 = connective tissue disease）で、この疾患ではかなりの確率で肺高血圧症を伴います。その一つ、全身性強皮症はまず手の先の皮膚が硬くなり、徐々に血管が圧迫されて、初期は寒冷刺激などによるレイノー症候群（白蟻病）に悩まされます。悪化すると、完全に血管が潰れて組織が壊死した指先に潰瘍ができたりするという深刻な病気です。ステロイドも効果が少なく、従来は全く治療法がありませんでしたが、この病気の患者にET受容体拮抗薬を投与し、わずか18週でほぼ完治したという臨床例も出てきました。このような疾患は定量的に評価するのが難しいので、米国のリウマチ学会は衣服を着る、シャワーを浴びるなどの動作についての、質問シートによる治療効果の判定基準を作成しています。約120人の強皮症の患者をプラシボ（偽薬）投与群とボセンタン投与群に分けて薬物の効果を調査しました。その結果、16週間後にはプラシボ群は全ての症状がかなり進行していましたが、ボセンタン群は全ての動作や皮膚の状態が改善するという結果が得られました。これは過去には想像もつかなかった結果で、新たに発見された物質が何らかの影響を及ぼしている場合に、新しい研究や治療領域を切り開いていく例になるのではないかと思います。

私自身の経験やマーチンさんのお話から、自分なりの「創薬道」を考えてみると、候補物質を探すことと、デスバレー（死の谷）を乗り越えることが特に重要だと感じます。そこで、創薬における重要なポイントを宮本武蔵の『五輪書』に倣ってまとめてみました。まず基礎を固める（地の巻）。疾患のニーズを正確に分析して状況を正しく把握し、適切な薬剤と、的確に薬を運ぶドラッグデリバリーを考える（水の巻）。治験戦略では決断と実行力が重要になる（火の巻）。臨床に意欲を持って取り組む現場の若い専門家や患者さん自身の声によく耳を傾ける（風の巻）。そして、最後は強い信念を持つこと（空の巻）です。以上、私のささやかな経験を次のパネルの参考にさせていただければ幸いです。

● 質疑応答

村上 私が筑波大学におりますときETが発見されて、世界に筑波大のライフサイエンスを知らしめ、大変誇りに思いました。筑波大の研究環境はこの発見に何か影響を及ぼしたのでしょうか。

後藤 筑波大はご存知のように講座制をとっていません。我々の研

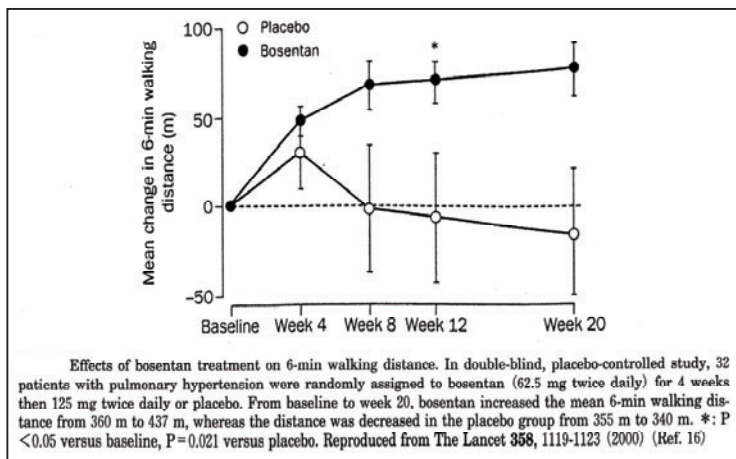


図3 肺動脈疾患患者における6分間歩行距離。プラセボ群（白）では歩行距離が減少傾向にあるが、ボセンタン群（黒）では優位に歩行距離が延長している。



究グループはその利点を最も活かしていたと思います。我々のグループには薬理だけではなく、生化学など他の専門の先生方も加わっていましたが、以前は教授の許可を得ずに勝手に専門領域を超えたチームを勝手につくることはできませんでした。ペプチドの単離精製は薬理の人間には全くできません。化学や生化学の専門家と、必要なときにすぐにグループを組むことができました。我々より数年先行していた米国のグループは生理学教室だけで続けており、いつまで経っても培養液を使った実験を行っていました。しかし、(こうした筑波大のメリットは) その後はあまり効率良く活かされていないという気がします。