

氏名	とみ た やす ひこ 富 田 泰 彦
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 727 号
学位授与の日付	平 成 17 年 1 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	炎 症 性 内 臓 疾 患 に お け る 分 泌 型 ホ ス ホ リ パ ー ゼ A_2 の 関 与

論文調査委員 (主査) 教授 金子周司 教授 河合明彦 教授 富岡 清

論 文 内 容 の 要 旨

Phospholipase A_2 (PLA $_2$) は細胞膜リン脂質から sn-2 位特異的に脂肪酸を加水分解により遊離させる酵素であり、これまでに12種のアイソフォームが同定されている。そのうち IV, VI 型は細胞質内に分布し IV 型は細胞質型 (cPLA $_2$), VI 型はカルシウム非依存型 (iPLA $_2$) として区別される。また, I, II, V, X 型などは細胞外に分泌され, 分泌型 (sPLA $_2$) に分類される。本酵素により生成される遊離脂肪酸およびリゾリン脂質は, それ自体, あるいは特に前者に関してはアラキドン酸のシクロオキシゲナーゼ等の酵素による代謝生成物が様々な生理活性をもつメディエータとして機能し, 炎症の惹起・進展に関与することが知られている。急性呼吸窮迫症候群, 急性膵炎および炎症性腸疾患はいずれも炎症性の内臓疾患であり, 発症進展のメカニズムは完全には解明されておらず, また治療法も確立されていない。前二者に関しては非常に致死率の高い疾患であり, 炎症性腸疾患に関しては寛解と増悪を繰り返す難治性の疾患である。これら病態において, 炎症時に発現が誘導される sPLA $_2$ -IIA, また急性膵炎に関しては消化酵素 sPLA $_2$ -IB の関与がこれまでに示唆されてきた。本研究においては, 分泌型 PLA $_2$ 特異的阻害薬である S-5920 ((sodium[[3-(aminooxoacetyl)-2-ethyl-1-(phenylmethyl)-1H-indol-4-yl]oxy]acetate) および, そのメチル体であり経口吸収性を持つ S-3013 ((methyl[[3-(aminooxoacetyl)-2-ethyl-1-(phenylmethyl)]-1H-Indol-4yl]oxy]acetate) を用い, 臨床と相関を持つ病態モデル動物におけるこれら PLA $_2$ の病態惹起・進展への関与を検討した。

第 1 章 急性呼吸窮迫性肺傷害モデルにおける組織傷害への PLA $_2$ の関与

急性呼吸窮迫性肺傷害は, 外傷や他臓器の疾患, それらに続く敗血症を誘引とする重篤な呼吸機能低下病態であり, 致死率の高い疾患である。今回の研究においては本病態のモデルとして, オレイン酸 (OA) 誘発ウサギ急性肺傷害モデルを用いた。OA を静脈内に持続的に注入すると, 注入開始 1 時間目から血中酸素飽和度および肺の弾性の低下が見られ, 3 時間後までにはそれらの低下は著明となった。また肺組織の病理学的所見においては肺組織の強い浮腫, 細胞浸潤, 出血が認められた。S-5920 を OA 処置開始後 1 時間から静脈内に持続的に投与したところ, 各パラメータとも著明な改善が認められた。次に, 肺サーファクタントの組成を検討したところ, 病態動物では, 肺胞形態の維持を担うフォスファチジルグリセロール (PG) 含量の低下, フォスファチジルコリンの PLA $_2$ による代謝生成物であり, 細胞毒性を有するリゾフォスファチジルコリン (LPC) 含量の増加が見られた。これらの比 (LPC/PG) は傷害の程度に相関を示し, S-5920 の病態惹起後 1 時間からの S-5920 の投与は LPC/PG を著明に減少させた。このことから, 本病態において sPLA $_2$ は病態惹起 1 時間程度までに肺サーファクタントの分解により同組成に変化をさせることにより肺組織傷害を引き起こすことが示唆された。

第 2 章 重症急性膵炎モデルにおける PLA $_2$ の関与

重症急性膵炎は, 胆嚢結石や長期のアルコール摂取が誘引となって胆汁が膵管内に漏出することにより各種消化酵素が活性化され, 膵組織の自己消化が引き起こされる疾患である。さらに腹腔内にそれら酵素が漏出・全身循環することにより多臓器不全に陥り非常に高い致死率を示す。本研究においては, 本病態モデルとして, タウロコール酸と膵型 PLA $_2$ である PLA $_2$ -IB を外来性に膵管内へ注入して膵炎を惹起したラットを用いた。本モデルは, 膵 PLA $_2$ の膵よりの漏出過程を強く

反映する致死性の高い病態モデルであり、腹水内および血清中の sPLA₂ 活性、また膵消化酵素であるアミラーゼ、リパーゼの著明な増大が認められた。この sPLA₂ 活性は、in vitro で sPLA₂-IB 特異的抗体添加によりそのほとんどが抑制された。本モデルに sPLA₂ 阻害剤 S-5920 を病態惹起前より投与したところ、有意な生存率の改善、腹水内および血清中の sPLA₂、アミラーゼおよびリパーゼ活性の抑制、および組織病変の有意な改善が見られた。しかしながら、病態惹起後に本薬剤を投与した場合の効果は限定的であった。以上のように、S-5920 は膵管内に注入した sPLA₂-IB もしくは、病態惹起直後に膵内において活性化された内因性の sPLA₂-IB のいずれかもしくは双方を阻害することにより膵炎症状を軽減し、生存率の改善をもたらしたことが示された。

第3章 潰瘍性大腸炎モデルの病態形成における PLA₂ の関与

炎症性腸疾患はクローン病と潰瘍性大腸炎に大別され、ともに症要因の不明な難治性の疾患である。デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) により誘発される大腸炎モデルは、臨床上の潰瘍性大腸炎と病変部位および組織像ともに類似することが報告されている。本モデル病変部位における PLA₂ 活性および発現を検討したところ、分泌型 PLA₂ の活性の著しい上昇、sPLA₂-IIA 特異的抗体による病変部に一致した強い免疫染色性が認められた。この sPLA₂ 活性の上昇に続いて、好中球浸潤の指標であるミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性の上昇が見られた。次に sPLA₂-IIA に対して強い阻害活性をもつ新規化合物 S-3013 を本モデルに対し DSS 処置11日目より経口にて投与したところ、大腸炎症状 (びらん、大腸組織萎縮) の有意な改善が認められ、また病変組織中の PLA₂ および MPO 活性の抑制がみられた。また、in vitro において sPLA₂ 活性は、S-3013 の活性体 S-5920 の添加によりほぼ完全に抑制され、sPLA₂-IIA 特異的抗体の添加によっても80%程度抑制された。このことは S-3013 が sPLA₂-IIA の抑制を介して本モデルに奏効することを示唆する。さらに PLA₂ が本病態形成に関与するメカニズムの検討を行うため、S-3013 投与モデル動物における各種エイコサノイドおよびリゾリン脂質の病変部位中での含量を測定したところ、PGE₂ に関しては病態形成により上昇が見られ、S-3013 処置により更なる上昇が見られたが、その他に関して変動は見られなかった。このことから、病態形成に対する PLA₂ の関与は、アラキドン酸カスケードを介さない可能性が示された。

上記3章の結果において、急性窮迫性肺傷害、急性膵炎および炎症性大腸炎モデルの病変部位もしくは血中において sPLA₂ 活性の上昇が認められ、この活性を新規 sPLA₂ 特異的阻害剤の投与により抑制することにより、発症の抑制および病態が改善した所見は、病態惹起時に見られる sPLA₂ 活性が病態惹起・進展の原因として関与することを強く示唆している。急性窮迫性肺傷害および急性膵炎病態モデルにおいては、sPLA₂ 阻害剤の薬効はその投与タイミングに制限を受けること、また炎症性大腸炎病態モデルにおいては sPLA₂ 活性が2相性のピークを伴って変動することから、これら病態モデルにおけるその惹起・進展において本酵素の関与する過程は局限されるものと推測される。以上から、sPLA₂ 阻害剤がこれら炎症性内臓疾患に対し、適切なステージで投与されることにより効果的な治療薬となりうるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

Phospholipase A₂ (PLA₂) は細胞膜リン脂質から sn-2 位特異的に脂肪酸を加水分解により遊離させる酵素である。これまでに同定された12種のアイソフォームのうち IV, VI 型は細胞質内に分布し IV 型は細胞質型 (cPLA₂)、VI 型はカルシウム非依存型 (iPLA₂) として区別される。また、I, II, V, X 型などは細胞外に分泌され、分泌型 (sPLA₂) に分類される。本酵素により生成される遊離脂肪酸およびリゾリン脂質は、それ自体、あるいは特に前者に関してはアラキドン酸のシクロオキシゲナーゼ等の酵素による代謝生成物が様々な生理活性をもつメディエータとして機能し、炎症の惹起・進展に関与することが知られている。急性呼吸窮迫症候群、急性膵炎および炎症性腸疾患はいずれも炎症性の内臓疾患であり、発症進展のメカニズムは完全には解明されておらず、また治療法も確立されていない。前二者に関しては非常に致死率の高い疾患であり、炎症性腸疾患に関しては寛解と増悪を繰り返す難治性の疾患である。これら病態において、炎症時に発現が誘導される sPLA₂-IIA、また急性膵炎に関しては消化酵素 sPLA₂-IB の関与がこれまでに示唆されてきた。そこで申請者は、分泌型 PLA₂ 特異的阻害薬である S-5920 ($[[[3-(\text{aminooxoacetyl})-2\text{-ethyl-1}-(\text{phenylmethyl})-1H\text{-indol-4-yl]oxy]acetate}$) および、そのメチル体であり経口投与による吸収性を有する S-3013 ($(\text{methyl}[[[3-(\text{aminooxoacetyl})-2\text{-ethyl-1}-(\text{phenylmethyl})]-1H\text{-indol-4yl]oxy)acetate}$) を用い、臨床と相関を持つ病態モデル動物におけるこれらの PLA₂ の病態惹

起・進展の関与を検討した。

第1章 急性呼吸窮迫性肺障害モデルにおける組織障害へのPLA₂の関与

急性呼吸窮迫性肺障害は、外傷や他臓器の疾患、それらに続く敗血症を誘引とする重篤な呼吸機能低下病態である。申請者は、本病態のモデルとしてオレイン酸(OA)誘発ウサギ急性肺障害モデルを用い、S-5920の薬効を評価した。S-5920をOA処置開始後1時間から静脈内に持続的に投与したところ、血中酸素飽和度、肺の弾性の低下、さらに肺組織の強い浮腫、細胞浸潤、出血において著明な改善が認められた。次に、肺サーファクタントの組成を検討したところ、病態動物では、肺胞形態の維持を担うフォスファチジルグリセロール(PG)含量の低下、フォスファチジルコリンのPLA₂による代謝生成物であり、細胞毒性を有するリゾフォスファチジルコリン(LPC)含量の増加が見られた。これらの比(LPC/PG)は傷害の程度に相関を示し、S-5920の病態惹起後1時間からのS-5920の投与はLPC/PGを著明に減少させた。このことから、本病態においてsPLA₂は病態惹起1時間程度までに肺サーファクタントの分解により同組成に変化をさせることにより肺組織傷害を引き起こすことが示唆された。

第2章 重症急性膵炎モデルにおけるPLA₂の関与

重症急性膵炎は、胆嚢結石や長期のアルコール摂取により胆汁が膵管内に漏出することにより各種消化酵素が活性化され、膵組織の自己消化が引き起こされる疾患であり、腹腔内にそれら酵素が漏出・全身循環することにより多臓器不全に陥り非常に高い致死率を示す。申請者は、本病態モデルとしてタウロコール酸と膵型PLA₂であるPLA₂-IBを外来性に膵管内へ注入して膵炎を惹起したラットを用いてsPLA₂阻害剤S-5920の効果を検討した。本病態モデルにsPLA₂阻害剤S-5920を病態惹起前より投与したところ、有意な生存率の改善、腹水内および血清中のsPLA₂、アミラーゼおよびリパーゼ活性の抑制、および組織病変の有意な改善が見られた。しかしながら、病態惹起後に本薬剤を投与した場合の効果は限定的であった。以上のように、S-5920は膵管内に注入したsPLA₂-IBもしくは、病態惹起直後に膵内において活性化された内因性のsPLA₂-IBのいずれかもしくは双方を阻害することにより膵炎症状を軽減し、生存率の改善をもたらしたことが示された。

第3章 潰瘍性大腸炎モデルの病態形成におけるPLA₂の関与

炎症性腸疾患はクローン病と潰瘍性大腸炎に大別され、ともに症要因の不明な難治性の疾患である。デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)により誘発される大腸炎モデルは、臨床上の潰瘍性大腸炎と病変部位および組織像ともに類似することが報告されている。申請者は、本モデル病変部位におけるPLA₂活性および発現を検討し、分泌型PLA₂の活性の著しい上昇、sPLA₂-IIA特異的抗体による病変部に一致した強い免疫染色性を見いだした。次にsPLA₂、特にIIAに対し強い阻害活性をもつ新規化合物S-3013を、本モデルに対しDSS処置11日目より経口にて投与したところ、大腸炎症状の有意な改善が認められた。また、このsPLA₂活性は、*in vitro*にてS-3013の活性体S-5920の添加によりほぼ完全に抑制され、sPLA₂-IIA特異的抗体の添加によっても80%程度抑制された。このことはS-3013がsPLA₂-IIAの抑制を介して本モデルに奏効することを示唆する。さらにS-3013投与モデル動物における各種エイコサノイドおよびリゾリン脂質の病変部位中での含量を測定したところ、PGE₂に関しては病態形成により上昇が見られ、S-3013処置により更なる上昇が見られたが、その他に関して変動は見られなかった。このことから、病態形成に対するPLA₂の関与は、アラキドン酸カスケードを介さない可能性が示された。

以上、申請者は急性呼吸窮迫性肺障害、急性膵炎および炎症性大腸炎の各疾患について動物実験モデルを作成し、これら病変とsPLA₂活性の上昇との因果関係を明らかにするとともに、新規sPLA₂特異的阻害剤の投与が発症の抑制および病態の改善を示すことを初めて見いだした。以上から、sPLA₂阻害剤がこれら炎症性内臓疾患に対し、適切なステージで投与されることにより効果的な治療薬となりうるものと結論でき、本研究の成果は、sPLA₂選択的阻害薬の臨床応用に関して有益な薬理的知見を与えるものと考えられる。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

更に、平成16年12月27日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。