

氏名	いわむらひろゆき 岩村浩幸
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	論薬博第653号
学位授与の日付	平成13年9月25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	炎症細胞由来各種メディエーターの作用解析に有用な特異的酵素阻害剤, 産生阻害剤および受容体リガンドの開発とその応用
論文調査委員	(主査) 教授市川厚 教授川寄敏祐 教授佐藤公道

論文内容の要旨

序論

種々の炎症性疾患において、血球細胞の好中球、単球、マクロファージ、肥満細胞、リンパ球などが、病態の発現と進行に重要な役割を持つことが明らかとなっている。これらの細胞は、病態の種類と程度に応じて種々のメディエーターを介して炎症に関与しているが、それらはさらに複雑な相互作用をしていると考えられる。このようなメディエーターについて、炎症細胞の持つプロテアーゼ活性やメディエーター自身の遺伝子発現あるいは翻訳を特異的に阻害する薬剤、また、受容体に作動あるいは拮抗するリガンドなどは、炎症細胞の作用を解明する際に極めて有用である。例えばアスピリンによるシクロオキシゲナーゼ阻害と炎症性疾患との関連や、最近ではロイコトリエンやトロンボキサンの拮抗剤のアレルギー疾患への適用によって明らかになった知見も多く、それらの治療効果とともにその薬理学的試薬としての価値は高い。様々な炎症細胞から遊離されるメディエーターの特異的な阻害薬または受容体リガンドを開発し、種々のモデルへ応用して、それらメディエーターの作用機構を明らかにすることが本研究の目的とする課題である。

第一章 好中球エラスターゼ特異的阻害剤 ONO-5046—関節炎軟骨破壊におけるエラスターゼおよび活性酸素の相互作用についての検討への応用

関節炎患者の関節腔には多量の好中球が出現するが、好中球エラスターゼの軟骨破壊における役割と他のメディエーターとの相互作用について検討するため、特異的エラスターゼ阻害剤として見出された ONO-5046 を用いた。ウシ鼻軟骨切片をラット好中球と共培養し、好中球を PMA, オブソニン化ザイモザン, FMLP+サイトカラシン B, A-23187 で刺激した。軟骨破壊はグリコサミノグリカンの減少を指標に評価した。その結果、活性化好中球による軟骨破壊は、いずれの刺激の場合も ONO-5046 によって濃度依存的に著明に抑制された。活性酸素の炎症への関わりを考慮して、活性酸素消去剤を用いたところ、カタラーゼのみが軟骨破壊を有意に抑制した。さらに、このカタラーゼは、好中球刺激時の β -グルクロニダーゼの遊離には影響せずエラスターゼ活性を低下させることが判明した。以上のことから、活性化好中球による軟骨破壊には、刺激の種類に関わらずエラスターゼが重要な役割を持つことが明らかとなり、さらに H_2O_2 とその代謝物である HOCl が、好中球から遊離されるエラスターゼ活性に影響を及ぼしていることが示唆された。

第二章 単球サイトカイン産生抑制剤 JTE-607—エンドトキシンショック時の単球由来サイトカインの役割についての検討への応用

単球特異的にサイトカイン産生を阻害する JTE-607 を見出し、エンドトキシンショックモデルにおけるサイトカインの役割を検討した。JTE-607 は *in vitro* でエンドトキシンで刺激した単球からの IL-1 β , TNF α , IL-8 などの mRNA 発現および遊離を強力に抑制するが、好中球、内皮細胞や線維芽細胞からの IL-8 産生は抑制せず、また、ステロイドと異なり T 細胞からの IL-2 産生にも影響しなかった。さらに、単球の他の機能である活性酸素の産生や貪食能にも影響しなかった。このように、JTE-607 は単球に特異的なサイトカイン産生抑制剤であることが示された。C. parvum で感作してエンドトキシンにて誘発したショックモデル動物を用いて評価したところ、JTE-607 の投与量に依存して死亡率を抑制し、それに

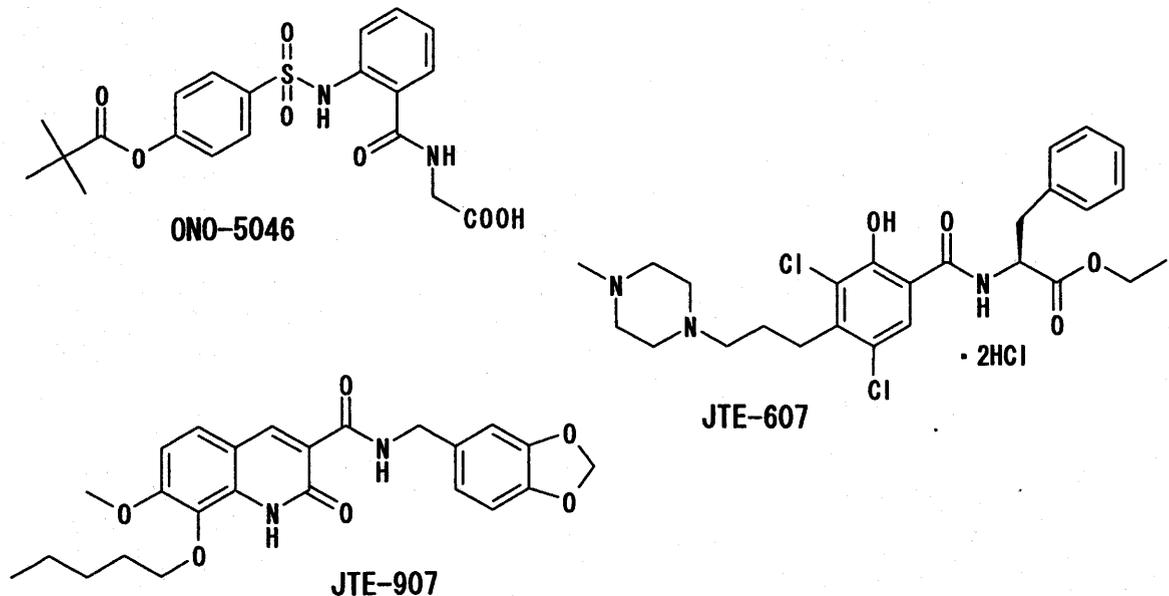
相関して血中の TNF α 量も減少していた。以上のことから、単球由来の TNF α などが、エンドトキシンショック時の病態において重要であることが示唆された。

第三章 カンナビノイド CB₂ 受容体のインバースアゴニスト JTE-907—足浮腫における免疫細胞の末梢型カンナビノイド受容体の関与についての検討への応用

大麻成分であるカンナビノイドの受容体のうち、CB₂ はマクロファージおよび肥満細胞などの血球細胞に多量に発現していることが明らかとなっている。この CB₂ に特異的なインバースアゴニストとして JTE-907 を見出し、その *in vitro* および *in vivo* における作用を調べ、CB₂ の役割について検討した。JTE-907 はヒト、マウス、ラットの Gi に共役する CB₂ に対して特異的で強い親和性を有し、また、CB₂ 発現細胞をフォルスコリンで刺激した際の cAMP 産生を濃度依存的に増強し、インバースアゴニストであることが示された。次にカラゲニン誘発マウス足浮腫モデルでは、JTE-907 は投与量に依存して明らかな抗足浮腫作用を示した。この *in vivo* の結果は、CB₂ のインバースアゴニストが単独で抗炎症作用を持つことを示すとともに、マクロファージや肥満細胞 CB₂ に作用する内因性リガンドの炎症への関与を示唆するものであった。

総括

本研究では、特異的好中球エラスターゼ阻害剤、単球特異的サイトカイン産生阻害剤、カンナビノイド CB₂ 受容体特異的インバースアゴニストを用いることにより、好中球、単球、マクロファージ、肥満細胞などが、多くのメディエーターを介して病態に重要な役割を果たしていることを示唆する知見を得た。すなわち、1) 好中球由来のエラスターゼと活性酸素が相互に作用し、関節炎における軟骨破壊に影響を及ぼしていること、2) エンドトキシンショック時の死亡原因として、単球に由来する TNF α などの炎症性サイトカインが重要であること、3) マクロファージや肥満細胞などに高発現しているが、その役割が不明であったカンナビノイド CB₂ 受容体が、カラゲニン足浮腫に関与していることである。以上のことから、これらの化合物は炎症細胞由来メディエーターあるいはそれらの受容体の作用を解析する上で非常に有用であると考えられた。



論文審査の結果の要旨

生体の生理、病態生理のメカニズムを理解するために、生理活性を有する有機化合物を合成し、その受容体・酵素・細胞特異的な反応機作を解明することは有効である。

本論文は、好中球エラスターゼ特異的阻害剤、単球特異的サイトカイン産生阻害剤、カンナビノイド CB₂ 受容体特異的インバースアゴニストをそれぞれ合成し、それらを用いて好中球、単球、マクロファージ、肥満細胞、リンパ球などの産生・分泌するメディエーターの、病態の発症と進展において果たす役割を明らかにしたものである。

第一章では、著者は好中球による関節炎軟骨破壊を指標にして、特異性の高い好中球エラスターゼ阻害剤 ONO-5046 を

開発し、それを用いて、好中球由来のエラスターゼと活性酸素とが相互に作用し、関節炎における軟骨破壊の進展に影響を及ぼしていることを明らかにした。この結果は、関節炎軟骨破壊を標的とする薬物の開発に有益な知見である。

第二章では、著者は単球特異的サイトカイン産生阻害剤 JTE-607 を開発し、それを用いてエンドトキシンショック時の死亡原因として、単球に由来する TNF α などのサイトカインの作用・分泌が重要であることを明らかにした。JTE-607 はエンドトキシン刺激による単球からのサイトカイン (IL-1 β , TNF α , IL-8 など) mRNA の産生をすべて阻害するが、好中球、内皮細胞および線維芽細胞からの IL-8 mRNA の産生は阻害しなかった。さらに、JTE-607 は *C. parvum* で感作してエンドトキシンにて誘発したショックモデル動物の血中 TNF α を減少させるとともに、死亡率を低下させた。この結果は、エンドトキシンショック時の病態形成には単球由来の TNF α が重要であることを示唆している。

第三章では、著者は、マクロファージや肥満細胞などに高発現しているがその役割がこれまで不明であったカンナビノイド CB₂ 受容体の生体作用を明らかにするため、同受容体に特異的なインバースアゴニストとして JTE-907 を開発した。JTE-907 はヒト、マウス、ラットの Gi 共役型受容体である CB₂ に特異的に結合するが、フォルスコリンで刺激した際の cAMP 産生を濃度依存的に増強することからインバースアゴニストであることが示された。次いで、この JTE-907 はカラゲニン誘発マウス足浮腫作用を濃度依存的に阻害することから、著者は、マクロファージや肥満細胞の CB₂ 受容体に作用する内因性リガンドは抗炎症作用を示す新規薬物のターゲットになり得ることを示唆した。

これら3種類の有機化合物は炎症性由来メディエーターあるいはそれらの受容体の作用を解析する上で有用であると考え

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。

さらに、平成13年6月20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。