

氏 名 藤 江 敬 子
 学位(専攻分野) 博 士 (薬 学)
 学 位 記 番 号 論 薬 博 第 625 号
 学位授与の日付 平 成 12 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 新規エラスターゼ阻害物質 FR 901277 の発見とその薬理学的性質に関する研究

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

炎症とは本質的には生体防御反応と考えられるが、しばしば治癒を上回る速度で過剰に進行し、生理学的に重篤な機能障害を伴う病的状態に移行することがある。好中球エラスターゼは炎症時種々の刺激により放出される中性タンパク分解酵素であり、細胞外マトリックスを構成するタンパクに対して広い基質特異性と強力な分解活性を持つことから、結合組織の傷害における意義が推察されている。通常エラスターゼ活性は内因性エラスターゼ阻害物質 α_1 -antitrypsin により制御を受けているが、肺気腫、慢性関節リウマチ、嚢胞性線維症、敗血症、ARDS など多くの疾患において、過剰なエラスターゼ活性の遊離と α_1 -antitrypsin の分解失活により、いわゆるエラスターゼ-アンチエラスターゼ不均衡状態が生じているとの報告がある。

筆者は、エラスターゼを阻害してこの不均衡状態を是正することにより炎症性疾患における組織破壊、ひいては機能障害を抑制することができると考え、微生物生産物から好中球エラスターゼ阻害剤の探索を行った。その結果、放線菌の培養液より強力な好中球エラスターゼ阻害活性を持つ FR 901277 とその関連物質を発見した。本論文はこれらの物質の発見、物理化学的性質、生物活性及び各種炎症モデルに対する薬理作用について論じたものである。

第一章 新規エラスターゼ阻害物質 FR 901277 及びその関連物質の発見と培養・単離・物理化学的性質

ヒト好中球エラスターゼ阻害剤創出のためのスクリーニング系の確立、及びスクリーニングより見出された FR 901277 とその関連物質の培養、精製と物理化学的性質を明らかにした。これらの物質は、放線菌 *Streptomyces resistomycificus* No. 7622 の生産する新規な低分子量環状ペプチドであった。

第二章 FR 901277 及びその関連物質の薬理学的プロファイルと肺気腫モデルに対する効果

本章ではまず、FR 901277 と関連物質の *in vitro* 及び *in vivo* 酵素阻害活性について論じた。これらの物質は、エラスターゼに比較的特異的なキモトリプシン型セリンプロテアーゼを広く阻害することが明らかになり、好中球エラスターゼに対する阻害様式は拮抗型阻害であった。エラスターゼ誘発マウス足浮腫モデルに対する有効性を検討したところ、FR 901277 は静脈内投与、皮下投与及び経口投与のいずれにおいても有意な抑制を示し、体内動態が良好であることが確認された。

次に、エラスターゼ-アンチエラスターゼ不均衡の関与が最も研究されている疾患が肺気腫であることに鑑み、エラスターゼ誘発ハムスター肺出血モデル及び肺気腫モデルにおける FR 901277 の作用について論じた。FR 901277 は急性肺傷害の指標である肺出血反応を、気管内投与、全身的投与のいずれにおいても有意に抑制した。肺気腫モデルにおいて、エラスターゼは遅発性に肺胞組織の崩壊及び肺機能パラメーターの異常を惹起するが、これらに対しても FR 901277 は気管内投与により有意な改善を示した。

FR 901277 は水に難溶性であるため、より溶解性の高いスルホン化誘導体 FR 134043 を作製した。同誘導体は *in vitro* 酵素阻害及び肺出血モデル、肺気腫モデルにおいて、原体である FR 901277 とほぼ同等の活性を示すことが確認された。

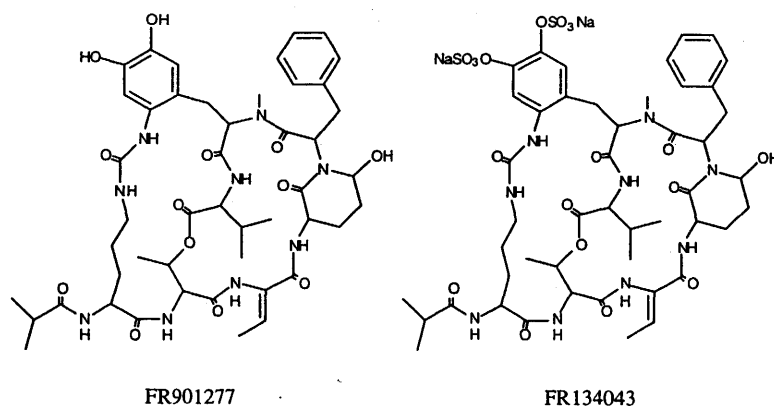
第三章 起炎剤刺激による好中球からのエラスターゼ分泌と急性炎症モデルにおける好中球エラスターゼの役割

好中球刺激によるエラスターゼ活性の遊離について検討した。ヒト好中球を種々の起炎剤で刺激するとエラスターゼ活性

の増加が認められたが、単核球共存下ではその活性が増幅される傾向が見られたため、単核球からの好中球刺激因子の産生が示唆された。一方、ラット気管内 LPS 投与後の気管支肺胞洗浄液中にもエラスターゼ活性が認められ、in vivo においても起炎剤刺激で好中球が動員されてエラスターゼを遊離することが示された。

続いて、様々な炎症反応における好中球エラスターゼの役割を検討した。ラット DIC モデルにおいて、FR 134043 はいくつかの血液凝固パラメーターに対して有意な改善を示し、このモデルにおける好中球エラスターゼの関与が示唆された。PMA 誘発マウス耳浮腫モデルでは、FR 134043 とエラスターゼ特異的阻害剤 FK 706 がともに有効であり、少なくとも一部はエラスターゼが関与すると考えられた。しかし、カラゲニン誘発ラット膝関節色素漏出モデルにおいては、FK 706 が無効であるのに対し FR 134043 は有意な抑制を示したため、エラスターゼの関与は少なく、むしろ好中球由来の別のセリンプロテアーゼであるカテプシン G の寄与が推察された。

以上の結果から、FR 901277/FR 134043 は構造及び酵素阻害プロファイルの点で、既存の天然物由来あるいは合成エラスターゼ阻害剤のいずれとも異なるユニークな新規物質であり、in vivo では局所投与に限らず全身的投与によってもエラスターゼ活性を強く抑制するため、臨床薬、特に肺気腫治療薬としての有用性が示された。また、活性化好中球からのエラスターゼ活性遊離が確認されるとともに、ある種の炎症性疾患における好中球エラスターゼの関与が推察され、それらの治療への FR 134043 使用の可能性も示唆された。



論文審査の結果の要旨

好中球エラスターゼは炎症時に種々の刺激により放出される中性タンパク質分解酵素であり、細胞外マトリックスを分解することにより結合組織の傷害に関与していると推察されているが、反応の詳細についてはいまだ明らかにされていない。本論文は、放線菌の培養液より強力な好中球エラスターゼ阻害活性を持つ物質を発見し、それらの各種炎症モデルにおける薬理作用について論じたものである。著者は、まず、ヒト好中球エラスターゼ阻害物質を探索するのに必要な簡便なスクリーニング系を確立し、これを用いて微生物培養液中の阻害活性をスクリーニングし、放線菌 *streptomyces resistomycificus* No. 7622 株培養液中より FR 901277 を含む 4 種類の活性物質を発見した。FR 901277 は既存の天然物由来あるいは合成エラスターゼ阻害剤のいずれとも異なる 2 環性ペプチドラクトン構造を持つ新規物質である。FR 901277 の酵素阻害プロファイルはエラスターゼに対して比較的特異的ながらキモトリプシン型セリンプロテアーゼを広く阻害することがわかった。次に、好中球エラスターゼとの関わりがよく研究されている疾患である肺気腫に対する FR 901277 の有効性をエラスターゼ誘発ハムスター肺気腫モデルにおいて検討した。その結果、気管内投与、全身的投与した FR 901277 がエラスターゼ誘発急性肺出血、及び遅延性肺胞組織の崩壊を強く抑制することを見出し、FR 901277 は肺気腫治療薬として有効であることを明らかにした。また、体内動態を考慮して、FR 901277 と同等な活性を示すが、より溶解性の高いスルホン化誘導体 FR 134043 を合成し、それが肺出血、肺気腫モデルにおいて有効であることを示した。次いで、FR 901277 と FR 134043 の特異な阻害様式を利用して、今まで明らかにされていなかった好中球からのエラスターゼ分泌様式と種々の炎症モデルにおける

エラスターゼの役割を検討した。その結果、ラット気管内に LPS を投与すると、気管支肺胞洗浄液中に遊走した好中球が単核球に由来する物質の協調的作用を受けてエラスターゼを放出することを発見し、肺気腫惹起のメカニズムにマクロファージの関与を示唆した。また、敗血症のモデルである実験的ラット disseminated intravascular coagulation (DIC) において、FR 134043 が血液凝固パラメータを顕著に改善することから、DIC モデルでのエラスターゼの役割が大きいことを明らかにした。同様に、PMA 誘発マウス耳浮腫モデルにおいてエラスターゼの強い関与を明らかにした。一方、これまでにエラスターゼ特異的阻害剤である FK 706 が無効であるとされたカラゲニン誘発ラット膝関節色素漏出モデルにおいて FR 134043 が有効であることから、このモデルでは好中球由来の別のセリンプロテアーゼであるカテプシン G の関与のあることを示唆した。これらの成果は、炎症におけるエラスターゼの意義を明らかにするとともに、選択的な阻害剤の開発に有益な基礎的知見となるものである。

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 11 年 12 月 17 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。