

氏 名	かわ ばた かず ひ と 川 湊 和 一 十
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	論 薬 博 第 639 号
学位授与の日付	平 成 13 年 1 月 23 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	好中球エラスターゼの組織傷害機序ならびにその急性肺傷害の病態における関与

論文調査委員	(主 査) 教 授 佐 藤 公 道 教 授 市 川 厚 教 授 川 寄 敏 祐
--------	---

論 文 内 容 の 要 旨

炎症局所における好中球エラスターゼ（以下エラスターゼ）と内因性プロテアーゼ阻害物質との不均衡は、エラスターゼによる組織破壊をもたらすと考えられている。この機序として、内因性プロテアーゼ阻害物質が高分子であるために好中球と組織の隙間に移行できない可能性や好中球由来の活性酸素種により酵素阻害作用が酸化失活する可能性などが提唱されている。しかしながら、このような機序が示唆されている急性肺傷害等の疾患にエラスターゼが実際にどのように関与しているかは十分に解明されていない。その要因として、全身投与可能で炎症局所においても酵素阻害活性が減弱しないエラスターゼ阻害薬がないこと、*in vivo*における特異的エラスターゼ活性測定法が開発されていないことが挙げられる。これらの問題解決のためにも、また新しい治療薬創出のためにも、合成低分子エラスターゼ阻害薬の開発が重要である。本研究では、このような可能性を有する化合物として約700化合物のスクリーニングの結果見出された sivelestat (*N*-[2-[4-(2, 2-dimethylpropionyloxy)phenylsulfonamino]benzoyl]aminoacetic acid) の薬理学的特性を詳細に調べると共に、本阻害薬を用いて以下の新知見を得た。

第1章 Sivelestat の *in vitro* および *in vivo* 薬理学的特性

Sivelestat はエラスターゼに対して特異性が高く拮抗阻害作用を示す合成低分子エラスターゼ阻害薬であり、そのヒトおよびハムスターエラスターゼに対する IC_{50} 値はそれぞれ0.044および0.037 μM であった。活性酸素種の一つである HOCl 処理によって、内因性高分子エラスターゼ阻害物質である α_1 -プロテアーゼインヒビター (α_1 -PI) のエラスターゼ阻害作用は失活したが、sivelestat のエラスターゼ阻害作用は全く影響を受けなかった。また、sivelestat の静脈内持続投与は、ヒトエラスターゼ惹起ハムスター肺出血を用量依存的に抑制したが、 α_1 -PI と同様の高分子プロテアーゼ阻害物質であるウリナスタチンの全身投与は本肺出血に無効であった。したがって、sivelestat は内因性高分子プロテアーゼ阻害物質とは異なり、分子量による立体的制約や活性酸素種による不活性化を受けることなく静脈内投与時でも炎症部位に到達しうると考えられる。

第2章 *In vivo* におけるエラスターゼ活性測定方法の確立

特異的合成基質として *N*-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val *p*-nitroaniline を用いた場合、一般的な反応時間である30分では血漿中に添加したヒトエラスターゼ (0.01—1 $\mu g/ml$) 活性の上昇を検出できなかったが、反応時間を24時間に延長することで、内因性阻害物質が存在する血漿中においてもこれらの活性を定量的に測定可能となった。本法を用いた場合、sivelestat は末梢血をオプソニン化ザイモザンで刺激した際に認められる血漿中エラスターゼ活性上昇を阻害し、 IC_{50} 値はヒトおよびハムスターでそれぞれ22.8および15.0 μM であった。さらに、この刺激法における sivelestat の *ex vivo* 内因性エラスターゼ50%阻害用量 (ED_{50} 値) は0.17 mg/kg/hr であった。

第3章 内因性高分子プロテアーゼ阻害物質存在下におけるエラスターゼの組織傷害機序

α_1 -PI などの各種内因性高分子阻害物質は、遊離型エラスターゼによる関節軟骨傷害を抑制したが、関節軟骨結合型エラスターゼによる関節軟骨傷害に対する抑制作用は用いた阻害物質の分子量に依存して著しく低下し、高濃度においても部

分的な抑制作用しか認められなかった。一方、sivelestat の傷害抑制作用はいずれの型のエラスターゼによる場合でも同等の強さであった。したがって内因性高分子プロテアーゼ阻害物質は、たとえ存在していても基質結合型エラスターゼの活性を十分に抑制できないために、エラスターゼによる組織傷害がもたらされるものと考えられる。

第4章 エラスターゼの急性肺傷害進展における役割

ハムスターにエンドトキシンを吸入させて誘発した急性肺傷害モデルでは、肺胞洗浄液 (BALF) 中の蛋白含量増加などの肺傷害の進展と BALF 中エラスターゼ活性上昇の時間推移が一致することを見出した。本急性肺傷害モデルにおいてエンドトキシン吸入2時間後から sivelestat (0.1, 0.3 および 1 mg/kg/hr) を静脈内持続投与すると、上記の肺傷害の進展とエラスターゼ活性の上昇は用量依存的に抑制され、組織学的所見も改善された。したがって、エラスターゼは急性肺傷害の進展に重要な役割を有していることが明らかとなった。

以上の諸成績から、5内因性高分子プロテアーゼ阻害物質のエラスターゼ阻害活性がエラスターゼが遊離型の場合と比較して基質結合型の場合に著しく低下することが、エラスターゼと内因性プロテアーゼ阻害物質の間に不均衡が生じる機序のひとつであること、エラスターゼは急性肺傷害の進展に重要な役割を果たしていることが示唆される。さらに、sivelestat は立体的制約や活性酸素種による不活性化を受けることなく炎症部位に到達可能で、基質結合型エラスターゼに対しても強い阻害活性を有し、エラスターゼによる組織障害を *in vivo* で効果的に抑制することを明らかにした。これらの知見は、急性肺傷害等の炎症性疾患に対する治療薬創製に有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

顆粒球に存在する好中球エラスターゼ (以下エラスターゼと呼ぶ) は、細胞外マトリックス構成成分、血液凝固因子、補体成分、免疫グロブリン等の多岐にわたる蛋白を分解する、極めて基質特異性の低い、プロテアーゼである。生理的状态では、高濃度に存在する内因性プロテアーゼ阻害物質の働きにより自己組織の傷害をもたらす可能性は低いが、炎症時には炎症局所におけるエラスターゼ/阻害物質不均衡が起こるために、エラスターゼが急性肺傷害や慢性関節リウマチなどの炎症性疾患に伴う組織傷害をもたらすと考えられている。しかし、そのような不均衡が生じる機序については不明の点が多く残されている。著者は、先ず低分子エステラーゼ阻害薬を探索し、次に *in vivo* における特異的なエステラーゼ活性測定法を確立を試み、さらに、それらを活用して、エラスターゼ/阻害物質不均衡発現機序や当該阻害薬の急性肺傷害治療薬としての可能性を検討し、以下の新知見を得た。

- (1) 約700化合物をスクリーニングした結果、sivelestat (*N*-[2-[4-(2,2-dimethylpropionyloxy)phenylsulfonylamino]benzoyl]aminoacetic acid) が、ヒトを含む各種動物においてエラスターゼに対して特異性が高い阻害薬であり、内因性高分子プロテアーゼ阻害物質を失活させる活性酸素種によっても阻害活性が消失しないなどの性質を持つこと、また、その静脈内投与によりエラスターゼで惹起したモルモット皮膚血管透過性亢進およびハムスター肺出血を抑制することを示した。
- (2) 合成基質 MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-*p*-nitroaniline を用い、*in vivo* において特異的にエラスターゼ活性を測定する方法を確立した。この方法により、sivelestat が末梢血をオプソニン化ザイモザンで刺激した際に認められる血漿中エラスターゼ活性上昇を抑制すること (IC₅₀ 値はヒトで 22.8 μ M, ハムスターで 15.0 μ M)、この刺激法における sivelestat の *ex vivo* 内因性エラスターゼ50%阻害用量は 0.17 mg/kg/hrであることを示した。
- (3) 内因性阻害物質のエラスターゼ阻害作用は、エラスターゼが遊離型の場合に比べ、標的組織結合型の場合止は著しく低下したが、sivelestat の阻害作用の強さはどちらの型のエラスターゼ活性に対しても同等であることを明らかにした。
- (4) ハムスターにエンドトキシンを吸入させて誘発した急性肺傷害モデルでは、肺胞洗浄液中の蛋白含量増加などの肺傷害の進展と同液中のエラスターゼ活性上昇の時間経過が一致することを見いだした。さらに、この急性肺傷害モデルにおいて、肺傷害の進行が十分に確認できるエンドトキシン吸入開始2時間後から sivelestat (0.1, 0.3, 1.0 mg/kg/hr) を静脈内持続投与しても、肺胞洗浄液中の蛋白含量増加とエラスターゼ活性上昇は用量依存的に抑制され、且つ組織学的所見も改善されること明らかにした。

以上の諸成績は、内因性高分子プロテアーゼ阻害物質のエラスターゼ阻害活性が組織結合型エラスターゼに対して著しく低下することがエラスターゼ/阻害物質不均衡を惹起する機序の一つであること、エラスターゼは急性肺傷害に伴う肺の炎

症性病変の進展に重要な役割を果たしていることを示唆している。一方、sivelestat は、活性酸素種による不活性化を受けることなく、低分子であるが故に炎症局所に到達可能で、組織結合型エラスターゼに対しても強い阻害活性を有することから、急性肺傷害に対する有用な治療薬になる可能性があることを示している。これらの知見は、急性肺傷害等の炎症性疾患に対する治療薬創製に有用であると考えられる。

よって、本論文を博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成12年12月 8 日に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。