

Leukotriene A₄ hydrolase 阻害薬の
抗搔痒作用に関する研究

学位論文：博士(創薬) 甲第4号
(薬科学)

2010年9月

岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科

医療情報学専攻

辻 文雄

Leukotriene A₄ hydrolase 阻害薬の抗搔痒作用に関する研究

目次

略号一覧表	・・・	3
序章		
第1節 搔痒治療薬開発の社会的意義	・・・	4
第2節 難治性搔痒の発現メカニズム	・・・	4
第3節 ロイコトリエン A ₄ 加水分解酵素をターゲットとした搔痒治療薬の可能性	・・・	6
第4節 2つの機能を持つロイコトリエン A ₄ 加水分解酵素	・・・	7
第5節 エポキシド加水分解作用とそのメカニズム	・・・	8
第6節 アミノペプチダーゼ作用とそのメカニズム	・・・	9
第7節 既存のロイコトリエン A ₄ 加水分解酵素阻害薬	・・・	10
第8節 本研究の目的	・・・	12
第1章 新規ロイコトリエン A ₄ 加水分解酵素阻害薬 SA6541 の皮膚炎抑制作用		
第1節 研究の目的	・・・	14
第2節 ロイコトリエン A ₄ 加水分解酵素阻害薬 SA6541 の合成	・・・	14
第3節 SA6541 のロイコトリエン A ₄ 加水分解酵素阻害作用	・・・	14
第4節 5-Hydroperoxyeicosatetraenoic acid (5-HPETE) 誘発マウス皮膚炎モデルの作製	・・・	16
第5節 Arachidonic acid (AA) 誘発マウス皮膚炎モデルの作製	・・・	18
第6節 5-HPETE 誘発マウス皮膚炎に対する SA6541 の効果	・・・	20
第7節 AA 誘発マウス皮膚炎に対する SA6541 の効果	・・・	23
第8節 結果と考察	・・・	25
第9節 結論	・・・	26
第2章 新規ロイコトリエン A ₄ 加水分解酵素阻害薬 SA6541 の搔痒抑制作用		
第1節 研究の目的	・・・	27
第2節 SA6541 の薬理作用プロファイリング	・・・	27
第3節 SA6541 経口投与後の血漿中濃度推移	・・・	28
第4節 5-HPETE 誘発マウス搔痒モデルの作製	・・・	29
第5節 5-HPETE 誘発マウス搔痒モデルに対する SA6541 の効果	・・・	30
第6節 受動皮膚アナフィラキシー反応誘発マウス搔痒モデルに対する SA6541 の効果	・・・	32

第7節 結果と考察	・・・34
第8節 結論	・・・34
第3章 結語	・・・35
参考文献等	・・・37
謝辞	・・・40
研究業績リスト	・・・41

略号一覧表

アミノ酸の略号

Ala (A): alanine アラニン	Leu (L): leucine ロイシン
Arg (R): arginine アルギニン	Lys (K): lysine リジン
Asn (N): asparagine アスパラギン	Met (M): methionine メチオニン
Asp (D): aspartic acid アスパラギン酸	Phe (F): phenylalanine フェニルアラニン
Cys (C): cysteine システイン	Pro (P): proline プロリン
Gln (Q): glutamine グルタミン	Ser (S): serine セリン
Glu (E): glutamic acid グルタミン酸	Thr (T): threonine トレオニン
Gly (G): glycine グリシン	Trp (W): tryptophane トリプトファン
His (H): histidine ヒスチジン	Tyr (Y): tyrosine チロシン
Ile (I): isoleucine イソロイシン	Val (V): valine バリン

薬理学に関する略号

AA: Arachidonic acid (アラキドン酸)
ACE: Angiotensin converting enzyme (アンジオテンシン変換酵素)
BLT1: Leukotriene B ₄ receptor 1 (ロイコトリエン B ₄ 第一受容体)
BLT2: Leukotriene B ₄ receptor 2 (ロイコトリエン B ₄ 第二受容体)
ECP: Eosinophil cationic protein (好酸球カチオン性蛋白質)
FLAP: 5-Lipoxygenase activating protein (5-リポオキシゲナーゼ活性化蛋白質)
HETE: Hydroxyeicosatetraenoic acid (ヒドロキシエイコサテトラエン酸)
HHT: Hydroxyheptadecatrienoic acid (ヒドロキシヘプタデカトリエン酸)
HPETE: Hydroperoxyeicosatetraenoic acid (ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸)
IC ₅₀ : 50% inhibitory concentration (50%阻害濃度)
IL: Interleukin (インターロイキン)
LT: Leukotriene (ロイコトリエン)
LTA ₄ H: Leukotriene A ₄ hydrolase (ロイコトリエン A ₄ 加水分解酵素)
LX: Lipoxin (リポキシン)
MBP: Major basic protein (主要塩基性蛋白質)
MPO: Myeloperoxidase (ミエロペルオキシダーゼ)
PG: Prostaglandin (プロスタグランジン)
TNF- α : Tumor necrosis factor- α (腫瘍壊死因子 α)
TRPV1: Transient receptor potential vanilloid 1 (バニロイド受容体タイプ 1)
TX: Thromboxane (トロンボキサン)

序章

第1節 掻痒治療薬開発の社会的意義^{1,2)}

痒みは「引っ掻きたいという欲求を引き起こす不快な皮膚感覚」と定義され、皮膚および一部粘膜に特有の感覚である。痒みには抗ヒスタミン薬が奏効する痒みと抗ヒスタミン薬に抵抗する痒みとがある。抗ヒスタミン薬など従来の治療が奏効しない痒みを難治性掻痒といい、内科領域では慢性腎不全、尿毒症、維持透析患者、胆汁うっ滞性黄疸、原発性胆汁肝硬変、皮膚科領域では結節性痒疹、アミロイド苔癬、乾癬、アトピー性皮膚炎などに認められる。難治性掻痒は非常に耐えがたく、その痒みによる掻破行動により、一部はその感覚を快感へ、一部は内因性の起痒物質の遊離を促進して痒みの増強へと導く。このような痒みの悪循環を「itch-scratch cycle」と呼んでいる³⁾。この悪循環における持続した掻破により皮膚炎等の症状がさらに悪化する。また、痒みは不快な感覚であることから、患者のQOLの低下を招く。以上のことより、痒みの抑制は臨床上極めて重要な治療目標の一つとなっており、特に難治性掻痒に対する新規掻痒治療薬の開発が望まれている。

第2節 難治性掻痒の発現メカニズム^{1,2)}

抗ヒスタミン薬が奏効しない難治性掻痒の発現メカニズムとしては、①掻痒発現にプロテイナーゼ（トリプターゼ）、組織障害性蛋白（eosinophil cationic protein (ECP)、major basic protein (MBP))、活性酸素、サイトカイン（interleukin (IL) -1, IL-2, IL-8, IL-13, IL-31, tumor necrosis factor- α (TNF- α) など）、leukotriene (LT) B₄など、ヒスタミン以外のケミカルメディエーターが関与している場合、②ヒスタミンH₄受容体が関与している場合、③神経線維が角層直下まで進入し、外部からの刺激を受けやすい状態になっている場合、④オピオイドの関与する中枢性機序が作動している場合、などが推定される。

①のメディエーターのうち、特にアラキドン酸代謝物（**Figure 1**）の掻痒への関与について多くの研究が行われてきた。慢性掻痒性皮膚疾患に対し、アラキドン酸代謝を抑制するグルココルチコイドは抗炎症作用に加え、痒みを軽減する⁴⁾。グルココルチコイドやホスホリパーゼA₂阻害薬によりマウスにおけるサブスタンスP誘発の掻き動作が抑制されること⁵⁾から、サブスタンスPによる掻き動作の誘発にアラキドン酸代謝物が関与することが示唆される。アラキドン酸の代謝にはシクロオキシゲナーゼと5-リポキシゲナーゼが重要な役割を担う。シクロオキシゲナーゼ代謝物に関し、prostaglandin (PG) E₂はマウスにおいて掻き動作を誘発しない⁶⁾が、thromboxane (TX) A₂受容体（TPプロスタノイド受容体）作動薬（U-46619）の皮内注射が10 nmol/siteの低用量で掻き動作を誘発することや、この動作がTPプロスタノイド受容体拮抗薬で抑制されること、さらに、TPプロスタノイド受容体欠損マウスでは掻き動作が認められないことが報告されている⁷⁾。皮膚内でトロンボキサン合成酵素が主にケラチノサイトに発現していることやTPプロスタノイド受容体がケラチノサイトおよび一次感覚神経に発現していることから、TXA₂が表皮ケラチノサイト

から産生・遊離され、一部は一次神経に直接作用し、一部はオートクライン的に再びケラチノサイトに作用して痒みを誘発・増強している可能性が考えられる⁷⁾。

5-リポキシゲナーゼ代謝物として LTB_4 、システイニルロイコトリエン (LTC_4 、 LTD_4 、 LTE_4) および 5-hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE) が挙げられるが、マウスにおけるサブスタンス P 誘発の掻き動作が LTB_4 受容体拮抗薬で抑制され、システイニルロイコトリエン受容体拮抗薬では抑制されないことから、 LTB_4 が痒みの発生に関与することが示唆されている⁵⁾。 LTB_4 のマウスへの皮内投与は、0.03 nmol/site をピークとして非常に低用量で掻き動作を誘発するが、 LTD_4 ではその行動は認められない⁵⁾。このことは、 LTB_4 が非常に強力な内因性の起痒物質であることを示唆する。 LTB_4 合成酵素は皮膚ケラチノサイト等に発現している⁵⁾。 LTB_4 の受容体には LTB_4 receptor 1 (BLT1) および LTB_4 receptor 2 (BLT2) 受容体があり、 LTB_4 に対する親和性は BLT1 受容体のほうが高い⁸⁾。サブスタンス P や LTB_4 誘発の掻き動作は BLT1 受容体拮抗薬で抑制される。BLT1 受容体は白血球に主に発現しているが、一次感覚神経の内、特に transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) 受容体発現陽性神経にも発現している⁹⁾。TRPV1 受容体陽性一次感覚神経は痒みの伝達に重要であることが報告されており、 LTB_4 の作用点が少なくとも TRPV1 および BLT1 受容体発現陽性一次感覚神経であることが示唆される。サブスタンス P などの掻痒誘発物質は一部一次感覚神経への直接作用に加え、表皮ケラチノサイトに作用して LTB_4 を産生し、それが一次感覚神経を刺激して掻き動作が誘発されると考えられる。

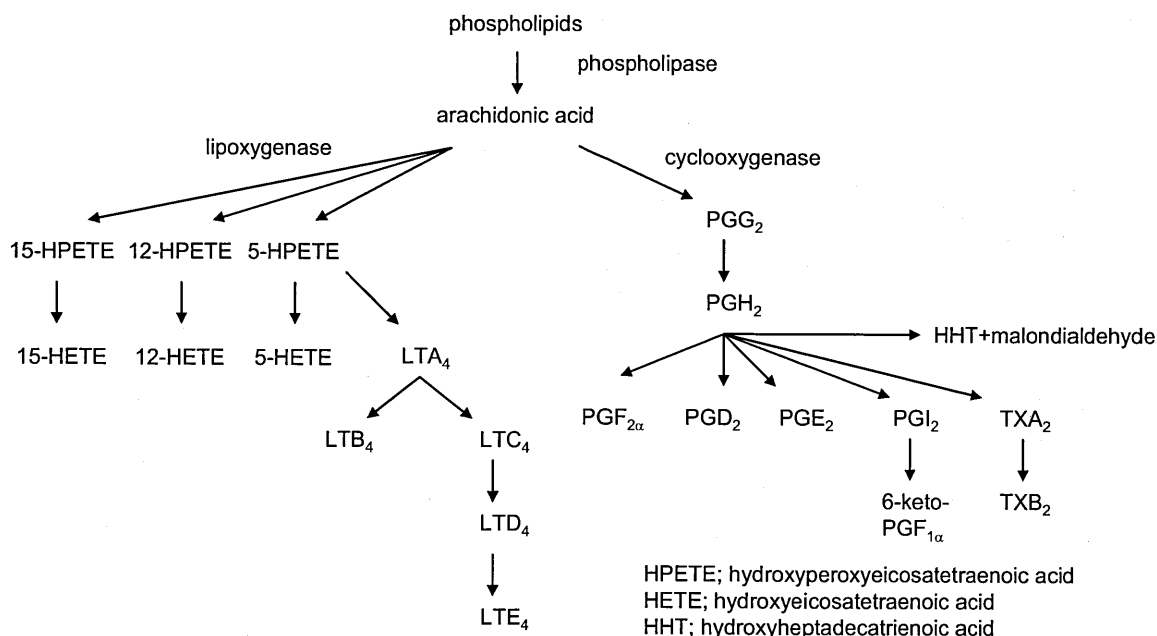


Figure 1. アラキドン酸カスケード

第3節 ロイコトリエン A₄加水分解酵素をターゲットとした掻痒治療薬の可能性

前節で示したように、LTB₄は非常に強力な内因性の起痒物質であり、掻痒治療薬開発の一つの重要なターゲットであると考えられる。LTB₄はアラキドン酸代謝における5-リポキシゲナーゼ経路で、エポキシド体であるLTA₄がLTB₄合成酵素すなわちLTA₄加水分解酵素(LTA₄ hydrolase、LTA₄H)によって加水分解されて生成する(Figure 2)¹⁰⁾。このLTB₄は起痒物質であるとともに炎症性メディエーターの一つとして多形核白血球(好中球)の遊走反応および凝集反応を誘導し^{11,12)}、これらの細胞の血管内皮細胞への接着を促進する¹³⁾。その結果、血管透過性が亢進して浮腫が形成されるなど、炎症の徴候が出現する。LTB₄は好中球、単球、マクロファージ、ケラチノサイト、リンパ球、肥満細胞など種々の細胞で産生される¹⁴⁾。関節リウマチ患者の関節液中¹⁵⁾、炎症性大腸炎患者の結腸粘膜炎中¹⁶⁾ではLTB₄濃度が優位に上昇しており、乾癬の皮膚病変部では生物活性を示す濃度のLTB₄が認められている¹⁷⁾。このようにLTB₄は関節リウマチ、乾癬、炎症性大腸炎などの炎症性疾患の病態形成に重要な役割を果たしていると考えられる。また、最近LTB₄の動脈硬化症との関連性を示唆する研究も報告されている¹⁸⁾。したがって、5-リポキシゲナーゼ経路のいずれかを抑制し、LTB₄の産生を抑制する、もしくはLTB₄の受容体への結合を阻害することは掻痒および炎症をターゲットとした有望な薬物となりえると考えられる。

5-リポキシゲナーゼ経路の阻害薬としては、5-リポキシゲナーゼ阻害薬、5-lipoxygenase activating protein (FLAP) 阻害薬の研究が行われており、5-リポキシゲナーゼ阻害薬が喘息治療薬として上市されている¹⁹⁾。また、BLT1受容体への結合を阻害することを目的にその受容体拮抗薬の開発が進められており、数種の化合物に関して臨床試験が実施されているが、これまでに上市されたものはない²⁰⁾。一方、LTB₄の生合成経路の最終段階で作用するLTA₄Hを阻害し、LTB₄の産生を抑制することは、BLT1およびBLT2の両受容体に対する親和性を考慮することなくその効果を発揮できる可能性がある。

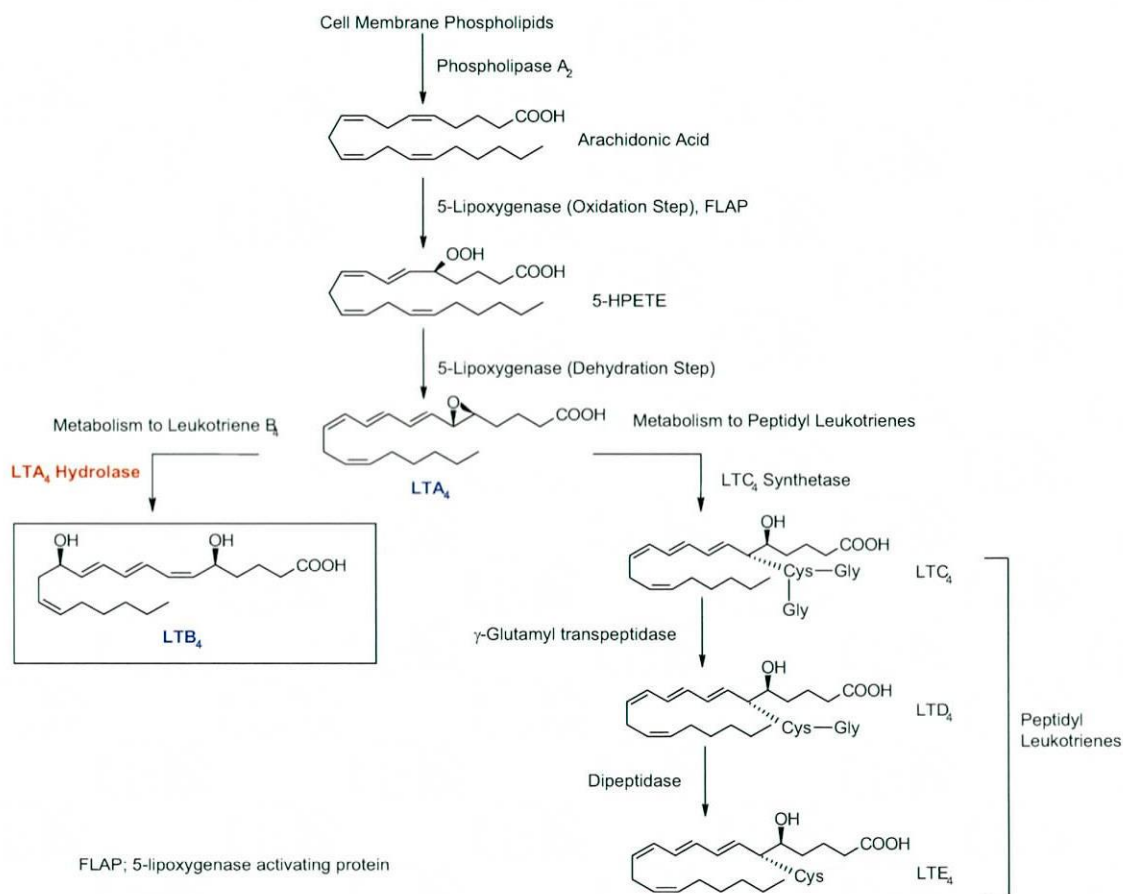


Figure 2. ロイコトリエン類の生合成経路

第4節 2つの機能を持つロイコトリエンA₄加水分解酵素²¹⁾

アミノ酸 610 残基から成る LTA₄H (EC 3.3.2.6) は、一つの亜鉛原子を持つ分子量 69KDa の亜鉛含有金属酵素である。本酵素はアミノペプチダーゼ M、サーモライシンなどの亜鉛含有金属プロテアーゼと同様、亜鉛結合部位のモチーフが HEXXH(X₁₈)E と表され、金属酵素の MA 族 M1 ファミリーに分類される²²⁾。実際、LTA₄H おける活性中心の亜鉛は His²⁹⁵、His²⁹⁹ および Glu³¹⁸ によって配位されている (Figure 3)。

この LTA₄H は細胞質²³⁾および核^{24,25)}に存在し、また、最近では細胞膜結合型も報告されている²⁶⁾。第3節で述べたが、本酵素は不安定なエポキシド型脂肪酸である LTA₄ を安定なジオール体である LTB₄ に変換する高い基質特異性があり、LTB₄ 生合成経路の最終の律速段階で作用する。また、このエポキシド加水分解作用は、LTA₄ の炭素鎖バックボーンへの水の立体特異的な付加がカルボカチオン中間体を経て、LTA₄ のエポキシド部位から 7 炭素離れた C12 位で起こるという点も他酵素には見られない特徴である。

一方、亜鉛結合部位のモチーフや亜鉛含有金属酵素のホモロジーから推察されるように、LTA₄H はペプチド結合を切断するアミノペプチダーゼ作用を有することも報告されている。エポキシド加水分解作用とは異なり、アミノペプチダーゼ作用は 1 価アニオンやアルブミ

ンによって活性化される。このアミノペプチダーゼ作用は、アルギニルジペプチド、トリペプチドなど種々の基質に作用する²⁷⁾。また、炎症や生体（宿主）防御に関連するペプチドのプロセッシングに関係していると一般的に考えられている。上皮細胞に LTA_4H が過剰発現していることと腫瘍形成との関連性について報告されており、ベスタチンが DNA 合成を抑制して細胞増殖を抑制することからそのアミノペプチダーゼ作用との関連性が示唆されている。また、エンケファリンは LTA_4H の基質となり、加水分解されるが、そのエンケファリン受容体が上皮細胞の核内に存在する。エンケファリンは上皮細胞の増殖を抑制しているが、 LTA_4H のペプチダーゼ作用により核内でエンケファリンの分解が起こると細胞増殖の方向に向かうと考えられる。このように LTA_4H の核内での存在とそのアミノペプチダーゼ作用との関連性が考えられている²⁵⁾。

このように、 LTA_4H は LTA_4 を LTB_4 に変換する基質特異性の高いエポキシド加水分解作用、および亜鉛含有金属酵素が本来保持するアミノペプチダーゼ作用の 2 つの機能を併せ持っている。

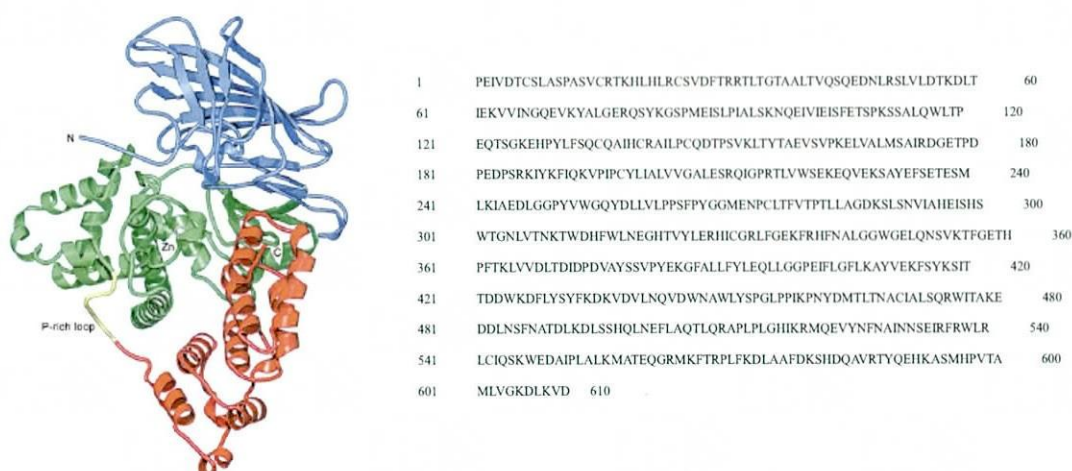


Figure 3. ヒト LTA_4H の構造²⁸⁾とアミノ酸一次配列

第5節 エポキシド加水分解作用とそのメカニズム²¹⁾

炎症性メディエーターである LTB_4 の生物活性発現には、C12 位の水酸基の立体構造と二重結合の配置が重要である。そこで LTA_4H は LTA_4 の C12 位の水酸基が *R* 体となり、また Δ^6 -シス- Δ^8 -トランス- Δ^{10} -トランス体の共役トリエンを形成するように加水分解を触媒する。この反応は非常にユニークなメカニズムで、エポキシ部分（C5、C6 位）から離れた C12 位で水酸基の立体特異的な付加が起こる。生化学研究、点突然変異および X 線結晶構造解析の結果から LTA_4H のエポキシド加水分解作用のメカニズムは以下のように考えられている。

まず LTA_4 の C5、C6 位エポキシド部分が亜鉛に配位すると、 LTA_4 の炭素鎖バックボア

ンである脂肪酸 C7 位から C20 位は折れ曲がった配座で酵素の溝深くにすっぽりとハマる。一方、C1 位カルボキシレート ($-\text{COO}^-$) 部分は正電荷を有する Arg⁵⁶³ 側鎖グアニド基と直接イオン結合を形成する。さらに触媒部位の亜鉛および Glu²⁷¹ が不安定なアリルエポキシド部位に接近する。そして亜鉛および Glu²⁷¹ 側鎖カルボン酸は水分子を分極することによって活性化し、エポキシドが開環する。この際、S_N1 反応が起こるためにカルボカチオンが生成する。分子の一方から水分子の求核攻撃を受けられるように加水分解される C12 位が平面性 sp^2 を保ったまま、この正電荷は共鳴したトリエン系 (C6 位から C12 位) で非局在化している。Asp³⁷⁵ は C12 位へ求核攻撃する水分子を活性化すると共に、LTB₄ の 12-(*R*) 水酸基の位置および立体特異的な付加反応を制御する。また、基質である LTA₄ が酵素の溝深くに湾曲した形で相互作用することは、LTB₄ の Δ^6 -シス体形成に有利に働いていると考えられる。すなわち、LTA₄ の C6 位と C7 位の間には自由回転があるので、湾曲した形で相互作用することにより酵素は遷移状態においてこの炭素-炭素結合をシス寄りの配座状態に保っているようであり、カルボカチオン中間体からシス体の形成を促進しているようである (Figure 4)。

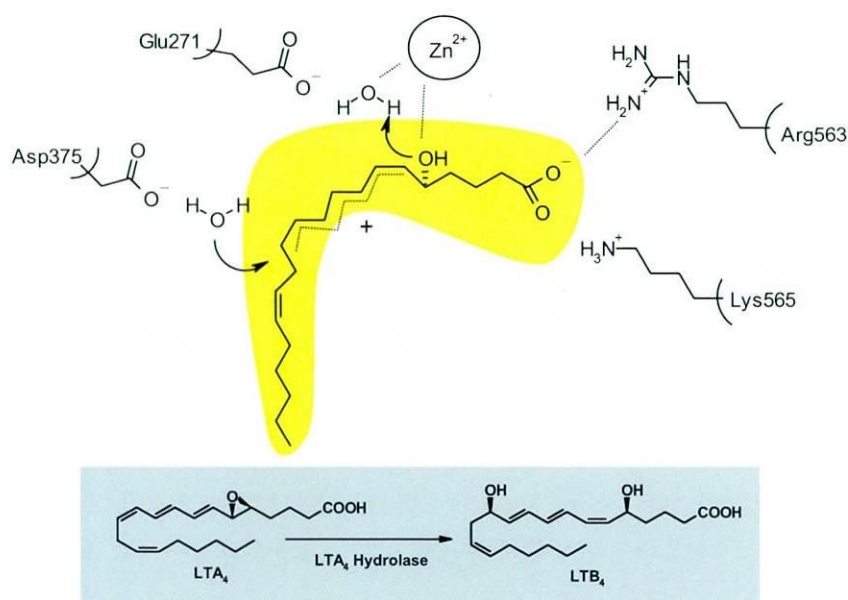


Figure 4. エポキシド加水分解作用のメカニズム

第 6 節 アミノペプチダーゼ作用とそのメカニズム 21)

一方、LTA₄ H のアミノペプチダーゼ作用におけるアミド結合の切断は、サーモライシン等の亜鉛含有金属プロテアーゼの基質切断と同様のメカニズムに従って進行していると考えられている。

これまでの本酵素の点突然変異の研究から、ペプチド基質の N 末端認識部位として LTA₄ H の Glu²⁷¹ が同定されている。したがって、ペプチド基質の N 末端は Glu²⁷¹ と相互

作用しており、Glu²⁷¹がLTA₄Hのペプチド切断におけるエキソペプチダーゼ作用にとって重要な役割を果たす。また、LTA₄と親和性の高いトリペプチド基質の場合、基質のC末端側のカルボキシレートはArg⁵⁶³/Lys⁵⁶⁵と相互作用する。さらに、アミノペプチダーゼ作用にはGlu²⁹⁶およびTyr³⁸³が必要である。すなわち、基質切断部位のアミドカルボニル基の酸素に亜鉛が配位し、そのカルボニル基に対して水分子の攻撃が促進されるようにGlu²⁹⁶が水分子を分極する。さらにTyr³⁸³がプロトンドナーとして基質切断部位のアミノ基へプロトンを与え、ペプチド結合の切断が完了する (Figure 5)。

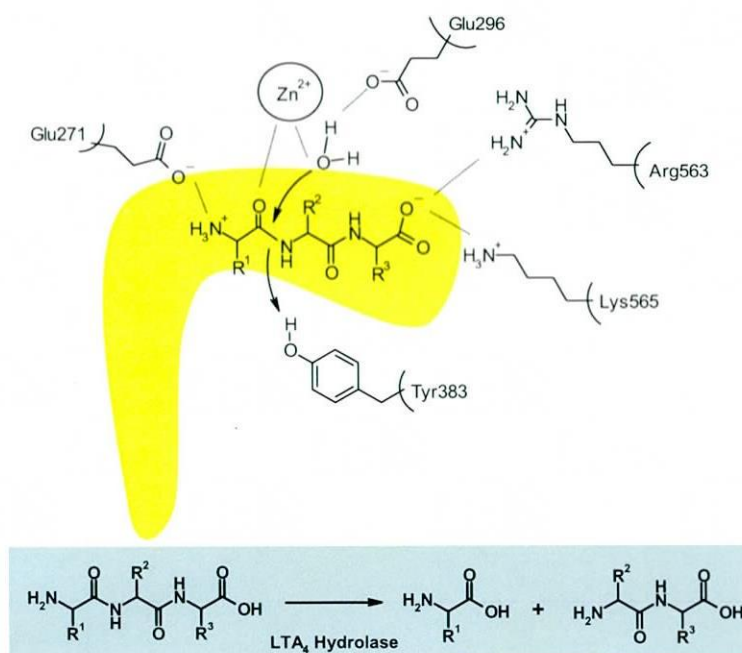


Figure 5. アミノペプチダーゼ作用のメカニズム

第5節および本節で示したように、LTA₄Hの2つの酵素作用は活性部位で機能するアミノ酸残基が一部重複する。特にGlu²⁷¹は2つの触媒反応に関与するアミノ酸残基であるが、2つの酵素反応において異なる化学的役割を担っている点がユニークである (Figure 4 および 5)。

第7節 既存のロイコトリエンA₄加水分解酵素阻害薬

近年報告されているLTA₄H阻害薬は主にLTA₄アナログ、基質遷移状態アナログ、キレーティングアナログおよびノンペプチド非キレーティングアナログの4つに分類される²⁹⁾。その代表例を以下に示す。

LTA₄アナログとしては、LTA₄の平面性を有するトリエン部分をベンゼンやチオフェン等の芳香環に置換し、さらに末端の脂溶性側鎖をアリールアルキル鎖に変換した化合物であるRP64966が報告されている (Figure 6)。本化合物のLTA₄Hに対するIC₅₀値は1.5 μM

であり、5 mg/kg の経口投与で血中の LTB₄ の産生を阻害する³⁰⁾。

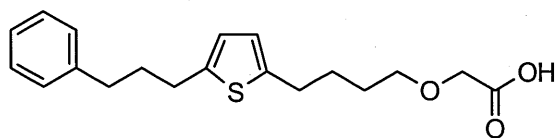


Figure 6. RP64966 の構造式

基質遷移状態アナログとしては、アミノペプチダーゼ阻害薬のベスタチン (Figure 7) に阻害作用があることが報告されており、ヒト LTA₄H のエポキシド加水分解作用 (第 5 節参照) に対する IC₅₀ 値は 4 μM、アミノペプチダーゼ作用 (第 6 節参照) に対する IC₅₀ 値は 0.3 μM である³¹⁾。

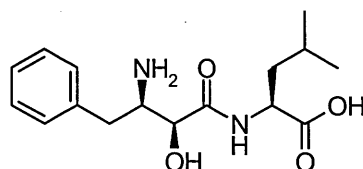


Figure 7. ベスタチン (bestatin) の構造式

キレーティングアナログとしては、亜鉛含有メタロプロテアーゼである中性エンドペプチダーゼ EC3.4.24.11 の阻害薬であるケラトルファンが非競合的阻害を示し、また、その誘導体が非常に強く LTA₄H を阻害することが報告されている³²⁾。アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬であるカプトプリルにも LTA₄H 阻害作用があり、ヒト LTA₄H のエポキシド加水分解作用 (前述第 5 節参照) に対する IC₅₀ 値は 11 μM、アミノペプチダーゼ作用 (前述第 6 節参照) に対する IC₅₀ 値は 0.07 μM と報告されている。カプトプリルは LTA₄H に対する競合的で可逆的な阻害薬である³³⁾ (Figure 8)。

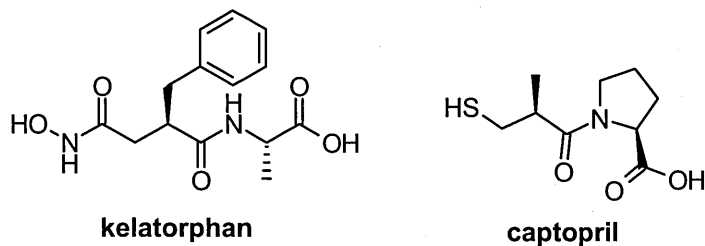


Figure 8. ケラトルファンとカプトプリルの構造式

ノンペプチド非キレーティングアナログ (Figure 9) である SC-57461A はリコンビナントヒト LTA₄H のエポキシド加水分解作用を IC₅₀ 値 2.5 nM と非常に強く阻害し、マウスへの経口投与 (10 mg/kg) によって全血中の LTB₄ の産生をほぼ完全に抑制する³⁴⁾。ベンゾチアゾールを有する JNJ-26993135 はエポキシド加水分解作用 (第 5 節参照) に対する IC₅₀

値は 12 nM、アミノペプチダーゼ作用（第 6 節参照）に対する IC₅₀ 値は 6 nM である³⁵⁾。また、本化合物はマウスにおけるアラキドン酸誘発耳介浮腫を経口投与量 1~30 mg/kg で用量依存的に抑制する。JNJ-26993135 は *in vitro* におけるカルシウムイオノフォア誘発脂質メディエーター産生においてもマウス全血中の LTB₄ の産生を IC₅₀ 値 0.3 μM で抑制し、抗炎症メディエーターである lipoxin (LX) A₄ の産生には影響しない。同様に *in vivo* モデルであるザイモザン誘発腹膜炎マウスモデルにおいても、本化合物 30 mg/kg の経口投与は LTB₄ 産生を有意に抑制し、LXA₄ 産生を維持または増加させる³⁵⁾。DG-051 は LTA₄H を IC₅₀ 値 47 nM で阻害し、*in vitro* モデルにおいて、ヒト全血中の LTB₄ 産生を IC₅₀ 値 37 nM で抑制する。現在、本化合物は心筋梗塞の治療薬として米国で臨床試験第 II 相が実施されている³⁶⁾。

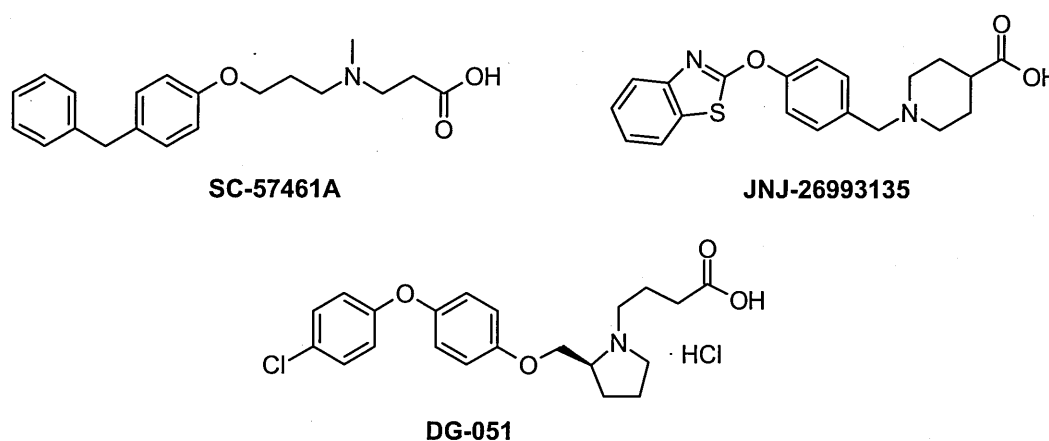


Figure 9. ノンペプチド非キレーティングアナログの構造式

第 8 節 本研究の目的

これまで述べてきたように、炎症性疾患と密接な関連があるメディエーターの一つで、強力な起痒物質であり、多形核白血球（好中球）誘引作用のある LTB₄ の生理作用を抑制することは抗炎症薬および掻痒治療薬開発の有望な手段となりえると考えられる。これまで幾つかの BLT1 受容体拮抗薬の臨床試験が実施されてきたが、上市には至っていない。

一方、LTB₄ の生合成経路の最終段階で作用する LTA₄H を阻害することによって LTB₄ の産生を抑制することは、LTB₄ 受容体である BLT1、BLT2 のいずれに対しても親和性を考慮することなくその抗炎症効果が発揮できる。そこで新たな抗炎症薬および掻痒治療薬創出を目指し、LTA₄H を強力に抑制する新規化合物 SA6541 を見出した。LTA₄H 活性部位付近での SA6541 の推定結合様式を Figure 10 に示す。本研究では SA6541 の抗炎症作用および掻痒抑制作用について検討した。

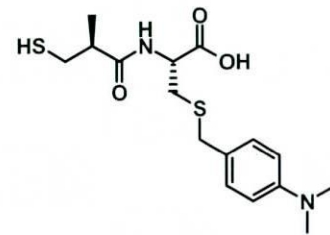
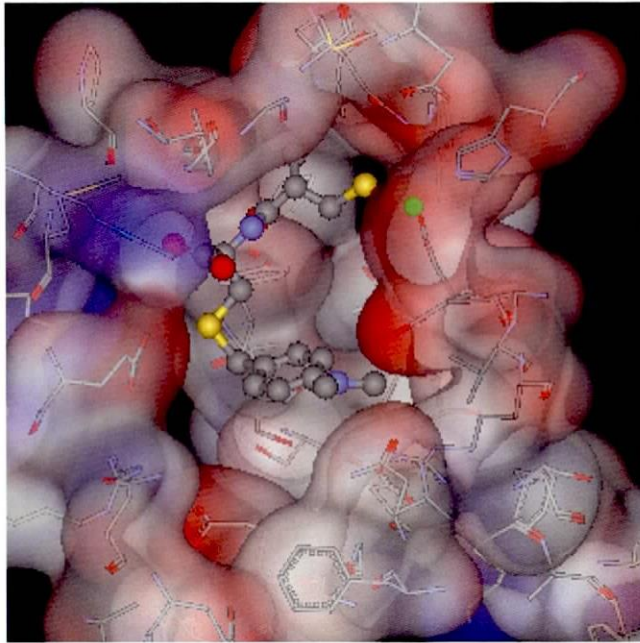


Figure 10. LTA₄H 活性部位付近での SA6541 の推定結合様式
(緑色は亜鉛原子を示す)

第1章 新規ロイコトリエン A₄加水分解酵素阻害薬 SA6541 の皮膚炎抑制作用

第1節 研究の目的

これまでの検討の結果、カプトプリルをシード化合物とした構造展開によって新規 LTA₄H 阻害薬 SA6541 を見出した。SA6541 の抗炎症作用についてマウス皮膚炎モデルを用いて検討した。

第2節 ロイコトリエン A₄加水分解酵素阻害薬 SA6541 の合成

薬理試験を行うにあたり、SA6541 (S-(4-dimethylaminobenzyl)-N-[(2S)-3-mercapto-2-methylpropionyl]-L-cysteine) を合成した。合成ルートを Figure 11 に示す。

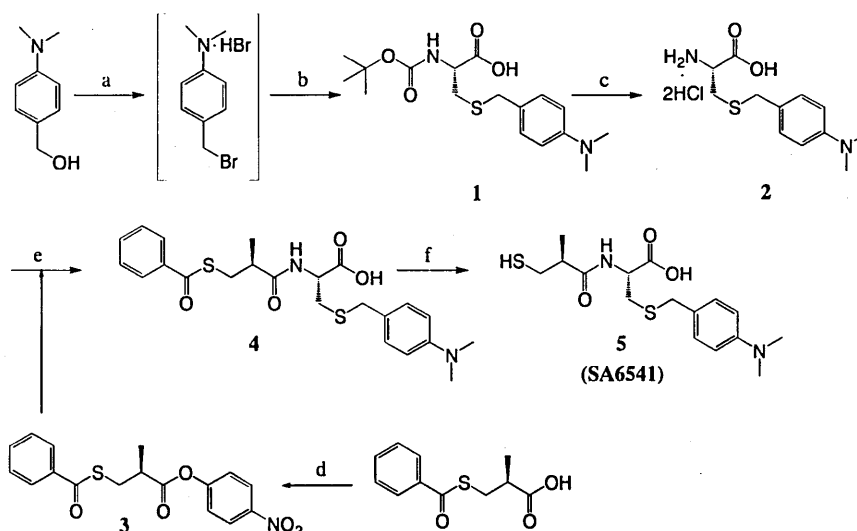


Figure 11. SA6541 の合成経路

SA6541 の合成には以下の試薬を用いた。4-Dimethylaminobenzaldehyde (Nacalai Tesque)、N-t-butoxycarbonylcysteine (Kokusan Chemical Works)、thiobenzoic acid (Sigma-Aldrich Japan)、methylacrylic acid (Sigma-Aldrich Japan)、p-nitrophenol (Nacalai Tesque)。

第3節 SA6541 のロイコトリエン A₄加水分解酵素阻害作用

実験方法

LTA₄H 阻害作用の測定

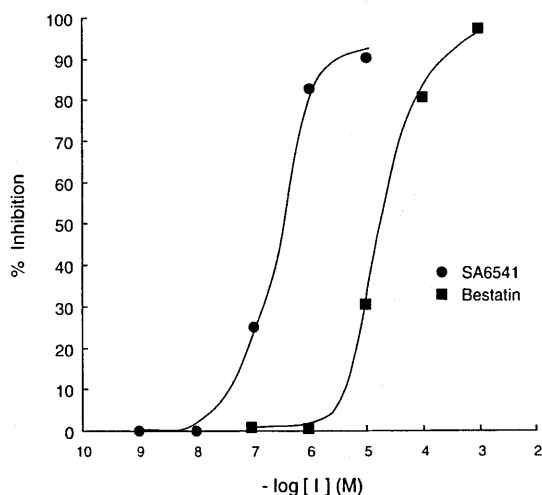
LTA₄H はモルモット肺より単離精製し、酵素アッセイに用いた。LTA₄H 阻害作用は以下の方法により測定した³⁷⁾。

前処理として 60 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.8)、3 mM ジチオスレイトール、LTA₄H および評価化合物からなる反応混合物を 26°C で 1 分間インキュベーションした。次に 50 mM 未満の水酸化リチウムを含む LTA₄ のエタノール溶液を加え、最終的に 60 μM の濃度とした。この反応混合物を 26°C で 1 分間インキュベーションした後、酸性アセトニトリル溶液 (アセトニトリル: エタノール: 酢酸 = 150 : 50 : 3、100 μL) を加えることによって反応を停止させ、さらに、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析の内部標準として PGB₂ を加えた。この反応混合物を -20°C で 30 分間保ち、次いで 4°C で 5 分間遠心分離 (10,000 × g) を行った。上清の一定量 (25 μL) を HPLC で分析した (カラム: TSK ODS-80TS 4.6 × 75 mm、移動相: 0.05% EDTA 含有アセトニトリル: メタノール: 水: 酢酸 = 900 : 300 : 800 : 1.8 混合溶液 pH 5.6、流速: 1.0 mL/分、検出器: UV 270 nm)。LTA₄H 阻害作用は生成した LTB₄ を定量することによって測定した。また、IC₅₀ 値は少なくとも独立した 3 濃度における用量反応滴定を 2 回行い、線形回帰分析によって算定した。

実験結果

SA6541 のモルモット由来 LTA₄H 阻害作用

SA6541 および LTA₄H 阻害作用を有するベスタチンの LTA₄H に対する薬物濃度-酵素阻害曲線および阻害活性 (IC₅₀ 値) を Figure 12 に示す。



Compounds	IC ₅₀ *(M)
SA6541	2.7 × 10 ⁻⁷
Bestatin	5.5 × 10 ⁻⁵

* The IC₅₀ values were calculated by linear regression analysis of dose-response titration.

Figure 12. SA6541 およびベスタチン (bestatin) のロイコトリエン A₄加水分解酵素に対する薬物濃度-酵素阻害曲線および IC₅₀ 値

SA6541 は LTA₄H を濃度依存的に抑制し、その IC₅₀ 値はベスタチンの 1/200 であった。

第 4 節 5-Hydroperoxyeicosatetraenoic acid (5-HPETE) 誘発マウス皮膚炎モデルの作製

実験方法

使用薬物

5-Hydroperoxyeicosatetraenoic acid (5-HPETE、Biomol) を用いた。

使用動物および飼育環境条件

6-7 週齢の雄性 ICR マウスを、12 時間の明暗サイクル (7:00 に点灯) 下、室温 23±1°C および湿度 55±10% に保って飼育した。固型飼料と水は自由に与えた。実験はヘルシンキ宣言の提言に従って実施した。

5-HPETE 誘発マウス耳介炎症モデル

5-HPETE (0.1% ethanol saline 懸濁液) 25 μL を 30 ゲージ針のマイクロシリンジを用いてマウス耳介に皮内注射した。皮内注射後各時間に過剰量の麻酔薬によって致死させ、処置部位を 6 mm ガスケットパンチで打ち抜き、試料を 0.5%ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド/80 mM リン酸緩衝液 0.75 mL (ミエロペルオキシダーゼ活性測定用) あるいは 1 mL エタノール (LTB₄ 測定用) 中に静置した。

ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性の測定³⁸⁾

サンプルをホモジナイズ (均質化) し、2 回凍結と融解を繰り返した後、15 分間遠心分離 (12,000×g) を行った。上清の一部 (30 μL) を 96 穴プレート中、リン酸緩衝生理食塩水 100 μL および 0.22 M リン酸緩衝液 75 μL で希釈し、次にテトラメチルベンジジン/過酸化水素を含む酵素基質 (Amersham 社製) 35 μL と 37°C で 5 分間混合した。1.0 M 硫酸 30 μL を加えて反応を停止し、各サンプルの波長 450 nm における吸光度をマイクロタイタープレートリーダーを用いて測定した。活性は打ち抜いた耳介組織 (0.2826 cm²) の面積を用いて補正し、OD/min/cm² として表した。

LTB₄ の測定

サンプルをホモジナイズ (均質化) し、15 分間遠心分離 (12,000×g) を行った。上清を減圧下濃縮し、残留物を 0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) 3 mL に溶解した。溶液を C18 SepPak カラム (Waters 社製) に展開し、1%酢酸含有 25%メタノール水溶液で

洗浄した。LTB₄は1%酢酸含有80%メタノール水溶液で溶出し、濃縮乾固を行った。この抽出方法ではLTB₄の回収率は89%であった。LTB₄は酵素免疫アッセイキット(Amersham社製)を用いて定量した。LTB₄量は打ち抜いた耳介組織(0.2826cm²)の面積を用いて補正し、pg/cm²の値として表した。

実験結果

5-HPETE 誘発マウス耳介炎症

種々の濃度の5-HPETE懸濁液をマウス耳介に皮内注射した4時間後の好中球浸潤(MPO活性として)をFigure 13に示す。5-HPETE(10 µg/site)の注射によって明らかな好中球浸潤が認められた。

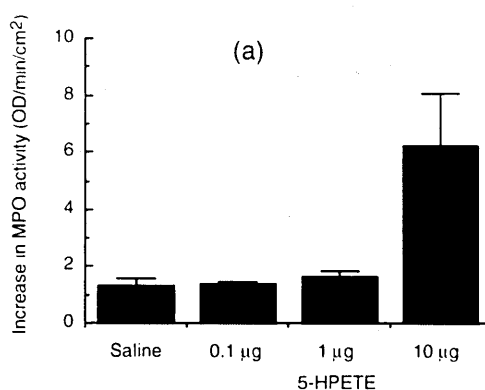


Figure 13. 5-HPETE 注射4時間後のマウス耳介内好中球浸潤

次に、5-HPETE(5 µg/site)皮内注射後の種々の時間における好中球浸潤(MPO活性として)をFigure 14に示す。皮内注射24時間後まで好中球浸潤の増加が認められた。

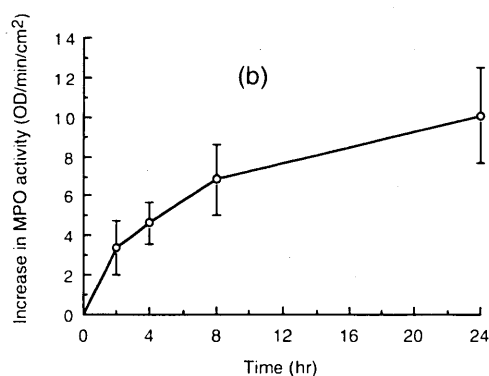


Figure 14. 5-HPETE(5 µg/site)注射後のマウス耳介内好中球浸潤

5-HPETE (5 $\mu\text{g}/\text{site}$) 皮内注射後の耳介内 LTB_4 濃度の上昇を **Figure 15** に示す。耳介内 LTB_4 濃度は 5-HPETE 注射後速やかに上昇し、注射 2 時間後には低いレベルに戻った。

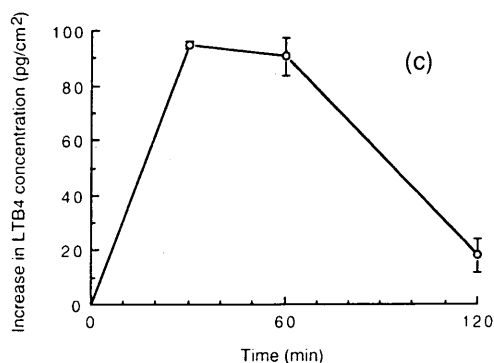


Figure 15. 5-HPETE (5 $\mu\text{g}/\text{site}$) 注射後のマウス耳介内 LTB_4 濃度

第 5 節 Arachidonic acid (AA) 誘発マウス皮膚炎モデルの作製

実験方法

使用薬物

Sodium arachidonic acid (AA, Sigma) を用いた。

使用動物および飼育環境条件

6-7 週齢の雄性 ICR マウスを、12 時間の明暗サイクル (7:00 に点灯) 下、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ および湿度 $55 \pm 10\%$ に保って飼育した。固型飼料と水は自由に与えた。実験はヘルシンキ宣言の提言に従って実施した。

AA 誘発マウス耳介炎症モデル

AA (0.1% ethanol saline 懸濁液) 25 μL を 30 ゲージ針のマイクロシリンジを使用してマウス耳介に皮内注射した。皮内注射後各時間に過剰量の麻酔薬によって致死させ、処置部位を 6 mm ガスケットパンチで打ち抜き、試料を 0.5% ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド / 80 mM リン酸緩衝液 0.75 mL (ミエロペルオキシダーゼ活性測定用) あるいは 1 mL エタノール (LTB_4 測定用) 中に静置した。

ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性の測定

第 1 章第 4 節で述べた方法で実施した。

PGE₂ の測定

サンプルをホモジナイズ（均質化）し、15分間遠心分離（12,000×g）を行った。上清を減圧下濃縮し、残留物を0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液（pH 3.0）3 mLに溶解した。溶液をC18 SepPak カラム（Waters 社製）に展開し、1%酢酸含有25%メタノール水溶液で洗浄した。PGE₂は1%酢酸含有80%メタノール水溶液で溶出し、濃縮乾固を行った。この抽出方法ではPGE₂の回収率は96%であった。PGE₂は酵素免疫アッセイキット（Amersham 社製）を用いて定量した。PGE₂量は打ち抜いた耳介組織（0.2826cm²）の面積を用いて補正し、pg/cm²の値として表した。

実験結果

AA 誘発マウス耳介炎症

種々の濃度のAA懸濁液をマウス耳介に皮内注射した4時間後の好中球浸潤（MPO活性として）をFigure 16に示す。AA（1 μg/site）の注射によって明らかな好中球浸潤が認められた。

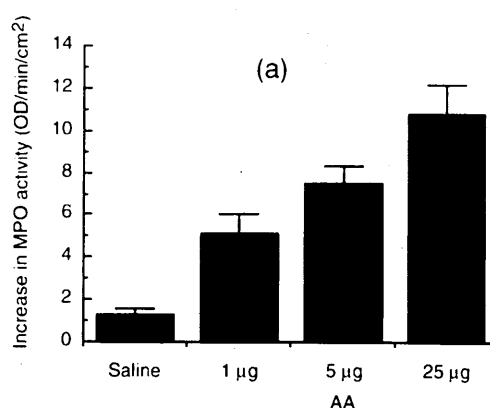


Figure 16. AA 注射 4 時間後のマウス耳介内好中球浸潤

次に、AA（2 μg/site）皮内注射後の種々の時間における好中球浸潤（MPO活性として）をFigure 17に示す。皮内注射8時間で好中球浸潤の増加がピークとなり、その後減少した。

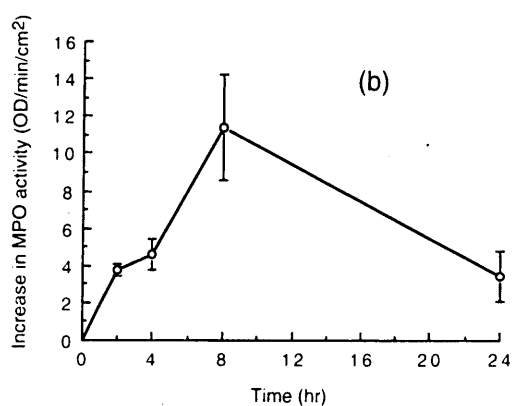


Figure 17. AA (2 µg/site) 注射後のマウス耳介内好中球浸潤

AA (2 µg/site) 皮内注射後の耳介内 PGE₂ 濃度の上昇を Figure 18 に示す。耳介内 PGE₂ 濃度は AA 注射後速やかに上昇し、注射 2 時間後には低いレベルに戻った。

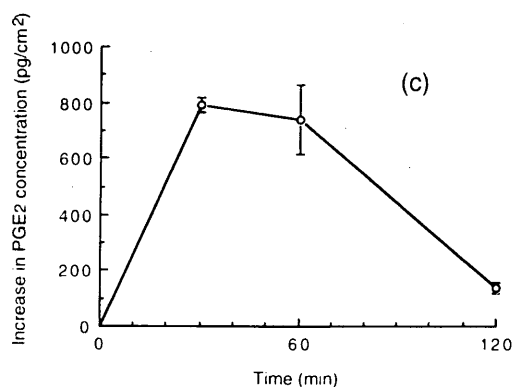


Figure 18. AA (2 µg/site) 注射後のマウス耳介内 PGE₂ 濃度

第 6 節 5-HPETE 誘発マウス皮膚炎に対する SA6541 の効果

実験方法

使用薬物

5-Hydroperoxyeicosatetraenoic acid (5-HPETE、Biomol)、SA6541 (参天製薬株式会社) および indomethacin (Sigma) を用いた。

使用動物および飼育環境条件

6-7 週齢の雄性 ICR マウスを、12 時間の明暗サイクル (7:00 に点灯) 下、室温 23±1℃ および湿度 55±10% に保って飼育した。固型飼料と水は自由に与えた。実験はヘルシンキ

宣言の提言に従って実施した。

5-HPETE 誘発マウス耳介炎症モデル

5-HPETE (200 µg/mL、0.1% ethanol saline 懸濁液) 25 µL を 30 ゲージ針のマイクロシリンジを用いてマウス外耳に皮内注射した。好中球集積の測定用に、皮内注射後 8 時間で過剰量の麻酔薬によって致死させ、処置部位を 6 mm ガスケットパンチで打ち抜き、試料を 0.5%ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド/80 mM リン酸緩衝液 0.75 mL 中に静置した。LTB₄、PGE₂ および LTC₄/D₄/E₄ 測定用に、皮内注射後 30 分で過剰量の麻酔薬によって致死させ、処置部位を 6 mm ガスケットパンチで打ち抜き、試料を 1 mL エタノール中に静置した。

SA6541 および indomethacin の投与

対照マウスには経口投与用基剤のみを経口投与し、薬物投与マウスには SA6541 10 および 50 mg/kg、あるいは indomethacin 5 mg/kg を経口投与した。経口投与 1 時間後、5-HPETE 25 µL を 30 ゲージ針のマイクロシリンジを用いてマウス耳介に皮内注射した。好中球集積の測定の場合は、5-HPETE 皮内注射 2 時間後に再度薬物を経口投与した。

ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性の測定

第 1 章第 4 節で述べた方法で実施した。

LTB₄、PGE₂ および LTC₄/D₄/E₄ の測定

サンプルをホモジナイズ (均質化) し、15 分間遠心分離 (12,000×g) を行った。上清を減圧下濃縮し、残留物を 0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) 3 mL に溶解した。溶液を C18 SepPak カラム (Waters 社製) に展開し、1%酢酸含有 25%メタノール水溶液で洗浄した。LTB₄、PGE₂ および LTC₄/D₄/E₄ は 1%酢酸含有 80%メタノール水溶液で溶出し、濃縮乾固を行った。LTB₄、PGE₂ および LTC₄/D₄/E₄ は酵素免疫アッセイキット (Amersham 社製) を用いて定量した。LTB₄、PGE₂ および LTC₄/D₄/E₄ 量は打ち抜いた耳介組織 (0.2826cm²) の面積を用いて補正し、pg/cm² の値として表した。

統計解析

対照群と薬物投与群の差は Dunnett の多重比較検定を用いて解析した。

実験結果

5-HPETE 誘発マウス耳介炎症に対する SA6541 の作用

5-HPETE 誘発マウス耳介炎症における好中球浸潤に対する SA6541 の作用を Figure 19

に示す。SA6541 50 mg/kg、2回の投与は、5-HPETE 注射 8 時間後の好中球浸潤を統計学的に有意に抑制した。一方、indomethacin は 5-HPETE 誘発マウス耳介炎症における好中球浸潤に対して影響を及ぼさなかった。

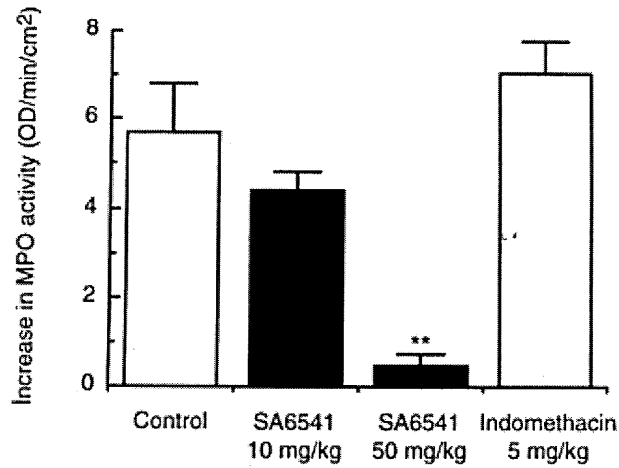
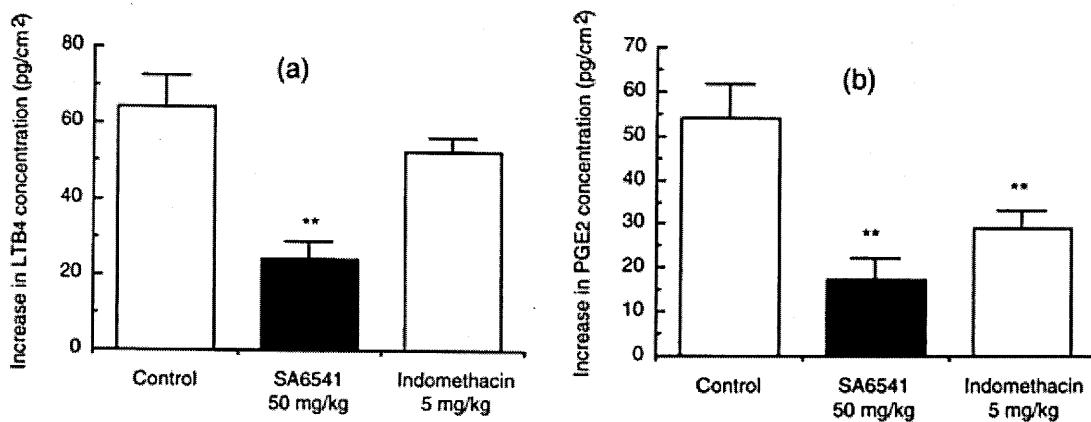


Figure 19. 5-HPETE 誘発マウス耳介内好中球浸潤に対する SA6541 の作用
**** $P < 0.01$ vs the control group**

5-HPETE 誘発マウス耳介炎症における LTB_4 、 PGE_2 および $LTC_4/D_4/E_4$ 濃度上昇に対する SA6541 の作用を Figure 20 に示す。SA6541 50 mg/kg の投与は、5-HPETE 注射 30 分後の LTB_4 および PGE_2 の上昇を統計学的に有意に抑制したが、 $LTC_4/D_4/E_4$ の上昇には影響を及ぼさなかった。一方、indomethacin は 5-HPETE 誘発マウス耳介炎症における PGE_2 の上昇を統計学的に有意に抑制したが、 LTB_4 および $LTC_4/D_4/E_4$ の上昇には影響を及ぼさなかった。



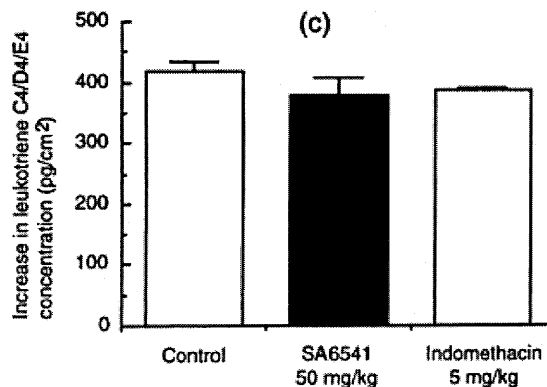


Figure 20. 5-HPETE 誘発マウス耳介内 LTB₄ (a)、PGE₂ (b) および LTC₄/D₄/E₄ (c) 濃度上昇に対する SA6541 の作用
****P<0.01 vs the control group**

第 7 節 AA 誘発マウス皮膚炎に対する SA6541 の効果

実験方法

使用薬物

Sodium arachidonic acid (AA、Sigma)、SA6541 (参天製薬株式会社) および indomethacin (Sigma) を用いた。

使用動物および飼育環境条件

6-7 週齢の雄性 ICR マウスを、12 時間の明暗サイクル (7:00 に点灯) 下、室温 23±1°C および湿度 55±10% に保って飼育した。固型飼料と水は自由に与えた。実験はヘルシンキ宣言の提言に従って実施した。

AA 誘発マウス耳介炎症モデル

AA (80 µg/mL、0.1% ethanol saline 懸濁液) 25 µL を 30 ゲージ針のマイクロシリンジを用いてマウス耳介に皮内注射した。好中球集積の測定用に、皮内注射後 8 時間に過剰量の麻酔薬によって致死させ、処置部位を 6 mm ガスケットパンチで打ち抜き、試料を 0.5% ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド/80 mM リン酸緩衝液 0.75 mL 中に静置した。LTB₄ および PGE₂ 測定用に、皮内注射後 30 分に過剰量の麻酔薬によって致死させ、処置部位を 6 mm ガスケットパンチで打ち抜き、試料を 1 mL エタノール中に静置した。

SA6541 および indomethacin の投与

対照マウスには経口投与用基剤のみを経口投与し、薬物投与マウスには SA6541 50

mg/kg、あるいは indomethacin 5 mg/kg を経口投与した。経口投与 1 時間後、AA 25 μ L を 30 ゲージ針のマイクロシリンジを用いてマウス耳介に皮内注射した。好中球集積の測定の場合は、AA 皮内注射 2 時間後に再度薬物を経口投与した。

ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性の測定

第 1 章第 4 節で述べた方法で実施した。

LTB₄ および PGE₂ の測定

サンプルをホモジナイズ (均質化) し、15 分間遠心分離 (12,000 \times g) を行った。上清を減圧下濃縮し、残留物を 0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) 3 mL に溶解した。溶液を C18 SepPak カラム (Waters 社製) に展開し、1%酢酸含有 25%メタノール水溶液で洗浄した。LTB₄ および PGE₂ は 1%酢酸含有 80%メタノール水溶液で溶出し、濃縮乾固を行った。LTB₄ および PGE₂ は酵素免疫アッセイキット (Amersham 社製) を用いて定量した。LTB₄ および PGE₂ 量は打ち抜いた耳介組織 (0.2826cm²) の面積を用いて補正し、pg/cm² の値として表した。

統計解析

対照群と薬物投与群の差は Dunnett の多重比較検定を用いて解析した。

実験結果

AA 誘発マウス耳介炎症に対する SA6541 の作用

AA 誘発マウス耳介炎症における好中球浸潤に対する SA6541 の作用を **Figure 21** に示す。SA6541 50 mg/kg、2 回の投与は、AA 注射 8 時間後の好中球浸潤を統計学的に有意に抑制した。一方、indomethacin は AA 誘発マウス耳介炎症における好中球浸潤に対して影響を及ぼさなかった。

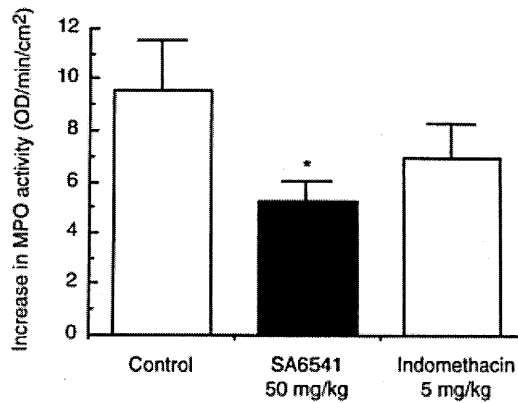


Figure 21. AA 誘発マウス耳介内好中球浸潤に対する SA6541 の作用
* $P < 0.05$ vs the control group

AA 誘発マウス耳介炎症における LTB_4 および PGE_2 濃度上昇に対する SA6541 の作用を Figure 22 に示す。SA6541 50 mg/kg の投与は AA 注射 30 分後の LTB_4 の上昇を統計学的に有意に抑制したが、 PGE_2 の上昇には影響を及ぼさなかった。一方、indomethacin は AA 誘発マウス耳介炎症における PGE_2 の上昇を統計学的に有意に抑制したが、 LTB_4 の上昇には影響を及ぼさなかった。

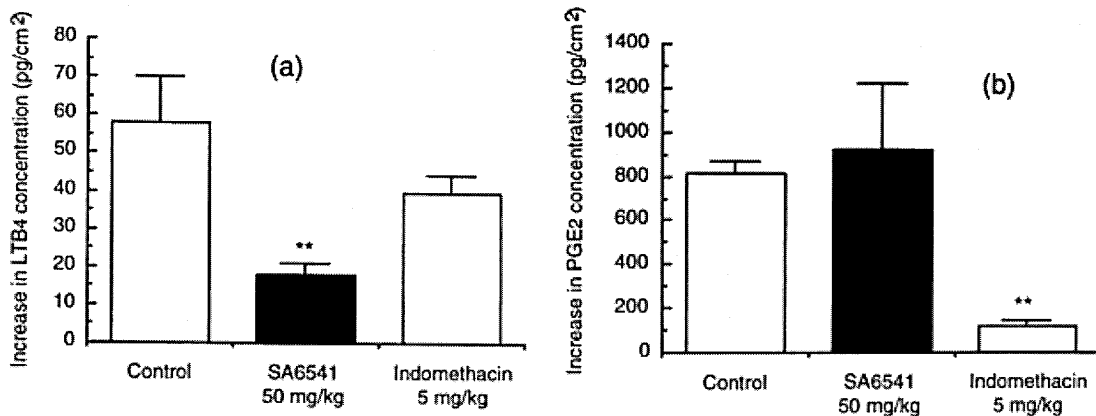


Figure 22. AA 誘発マウス耳介内 LTB_4 (a) および PGE_2 (b) 濃度上昇に対する SA6541 の作用
** $P < 0.01$ vs the control group

第 8 節 結果と考察

以上の検討から次のような知見が得られた。

1. SA6541 は強力な LTA_4H 阻害薬であった (モルモット LTA_4H に対する IC_{50} 値は 270 nM、Figure 12)。

2. アラキドン酸から 5-リポキシゲナーゼによって LTA_4 が生成するが、その中間体である 5-HPETE の皮内注射により LTB_4 産生と好中球浸潤を生じた (**Figure 13**、**Figure 14** および **Figure 15**)。一方、5-HPETE の皮内注射ではアラキドン酸の皮内注射に比べて PGE_2 はほとんど産生されなかった (**Figure 20b**、**Figure 22b**)。したがって、5-HPETE 誘発皮膚炎モデルにおいては 5-リポキシゲナーゼ代謝産物が重要な役割を演じると推察された。
3. SA6541 は経口投与によってマウス 5-HPETE 誘発皮膚炎モデルにおける LTB_4 産生および好中球浸潤を抑制した (**Figure 19** および **Figure 20a**) が、 $LTC_4/D_4/E_4$ 産生には影響しなかった (**Figure 20c**)。したがって、5-リポキシゲナーゼ代謝物において LTB_4 が好中球浸潤に重要であることが示唆された。
4. アラキドン酸の皮内注射によって LTB_4 、 PGE_2 産生および好中球浸潤 (**Figure 16**、**Figure 17**、**Figure 18** および **Figure 22a**) が認められた。したがって、アラキドン酸誘発皮膚炎モデルでは広範なアラキドン酸代謝物が関与することが推察された。
5. SA6541 は経口投与によってマウス AA 誘発皮膚炎モデルにおける LTB_4 産生および好中球浸潤を抑制した (**Figure 21** および **Figure 22a**) が、 PGE_2 産生には影響しなかった (**Figure 22b**)。したがって、AA 代謝物全体においても LTB_4 が好中球浸潤に重要であることが示唆されたが、SA6541 による好中球浸潤抑制が完全ではない (**Figure 21**) ことから、他の AA 代謝物も好中球浸潤に重要であることが推察される。
6. **Figure 22b** の成績から、SA6541 は今回実験に用いた用量 (50 mg/kg) においてはシクロオキシゲナーゼに影響しないと推定されるが、5-HPETE 注射による PGE_2 産生は抑制する (**Figure 20b**)。予備検討において LTB_4 の皮内注射が PGE_2 産生を引き起こすことを確認しており、SA6541 によって LTB_4 の産生が抑制された結果として PGE_2 産生も抑制されたと推察される。

第9節 結論

LTB_4 が皮膚炎の特に好中球浸潤において重要な役割を果たすことが示唆された。SA6541 は経口投与において皮膚炎を抑制する可能性が考えられた。

第2章 新規ロイコトリエン A₄加水分解酵素阻害薬 SA6541 の搔痒抑制作用

第1節 研究の目的

新規 LTA₄H 阻害薬 SA6541 は 50 mg/kg 以上の経口投与によって、マウス皮膚炎を抑制することを第1章において示した。そこで SA6541 の抗搔痒作用についてマウス搔痒モデルを用いて検討した。

第2節 SA6541 の薬理作用プロファイリング

本化合物の搔痒に関与する可能性が示唆されている受容体や他の酵素に対する影響を検討した (Cerep にて実施)。結果を Table 1 に示す。検討方法は以下のとおりである。

受容体への結合能：受容体特異的放射性リガンドに対する SA6541 (3 μM) 共存時の結合阻害率 (%) を算出。

細胞機能アッセイ (VR1)：刺激作用はカプサイシン (1 μM) を 1 とした場合の SA6541 (3 μM) の刺激の割合 (%)、遮断作用はカプサイシン (30 nM) を 1 とした場合の SA6541 (3 μM) 共存時の遮断の割合 (%) を算出。

酵素アッセイ (COX1、COX2、12-lipoxygenase)：酵素によるアラキドン酸から代謝物生成反応における SA6541 (3 μM) 存在時の阻害率 (%) を算出。

Table 1. SA6541 の In vitro 薬理学的評価結果

Receptor/Ion Channel/Enzyme	% or % Inhibition of Control at 3 μM	Reference Compound	IC50 or EC50 of Reference Compound (nM)
Cannabinoid CB1 (human)	-3	CP55940	1.1
Cannabinoid CB2 (human)	-7	WIN55212-2	4.3
Histamine H1 (human)	-6	Pyrilamine	6.6
Histamine H2 (human)	0	Cimetidine	230
Leukotrienes BLT1 (LTB4) (human)	-5	LTB4	0.5
Leukotrienes CysLT1 (LTD4) (human)	-2	LTD4	1
Muscarinic M1 (human)	-3	Pirenzepine	16
Muscarinic M2 (human)	-13	Methoctramine	81
Muscarinic M3 (human)	-6	4-DAMP	0.7
Neurokinin NK1 (human)	-36	[Sar ⁹ ,Met ^{(O₂)11}]-SP	0.28
Opioid kappa (KOP) (rat)	-4	U50488	1.5
Opioid mu (MOP) (human)	2	DAMGO	1.7
Prostanoid EP1 (human)	-16	PGE2	2.3
Prostanoid EP4 (human)	12	PGE2	1.7
Prostanoid TP (TXA2/PGH2) (human)	8	U44069	38
Proteinase-activated PAR2 (human)	8	SLIGRL-NH2	110
Serotonin 5-HT1A (human)	23	8-OH-DPAT	0.77
Serotonin 5-HT2A (human)	-15	Ketanserin	1.4
Serotonin 5-HT3 (human)	-12	MDL72222	12
Vanilloid VR1 (human)	-3	Capsaicin	13
Vanilloid VR1 (human)	-8	Capsazepine	280
COX1 (human)	39	Diclofenac	7.4
COX2 (human)	54	NS398	25
12-Lipoxygenase (human)	9	NDGA	1300

LTB₄: leukotriene B₄; LTD₄: leukotriene D₄; TXA₂: thromboxane A₂; PGH₂: prostaglandin H₂; COX: cyclooxygenase; 4-DAMP: 4-diphenylacetoxy-N-methylpiperidine methiodide; SP: substance P; DAMGO: [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-enkephalin; 8-OH-DPAT: 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin; NDGA: nordihydroguaiaretic acid.

SA6541 は 3 μM の濃度においてシクロオキシゲナーゼ-2 の活性を 54%抑制したが、他の受容体や酵素への影響はほとんど認められなかった。

なお、モルモット LTA₄H に対する IC₅₀ 値は 0.27 μM (第 1 章) であるが、ヒト LTA₄H に対する IC₅₀ 値は 0.025 μM (Scottish Biomedical Ltd.にて実施) であった。

第 3 節 SA6541 経口投与後の血漿中濃度推移

第 1 章において、SA6541 は 50 mg/kg、2 回の経口投与で 5-HPETE 誘発皮膚内好中球浸潤をほぼ完全に抑制した (Figure 19) が、LTB₄ 産生抑制は完全ではなかった (Figure 20)。そこで、抗搔痒作用を検討するにあたり、SA6541 の経口投与量を 100 mg/kg とし、経口投与後の未変化体血漿中濃度推移を検討した。

実験方法

使用薬物

SA6541 (参天製薬株式会社) を用いた。

使用動物および飼育環境条件

5-6 週齢の雄性 ICR マウスを、12 時間の明暗サイクル (7:00 に点灯) 下、室温 23±1°C および湿度 55±10% に保って飼育した。固型飼料と水は自由に与えた。実験は参天製薬動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。

SA6541 の血漿中濃度測定

SA6541 (100 mg/kg) 経口投与後 0.5、1、2、4 および 6 時間のマウス血液をヘパリン含有シリンジで採取した。採取後速やかに遠心により血漿を分離し、EDTA 存在下、塩酸酸性下にて -80°C で保存した。SA6541 血漿中濃度は液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC/MS) を用いて測定した。

実験結果

SA6541 (100 mg/kg) 経口投与後の血漿中濃度推移

SA6541 (100 mg/kg) 経口投与後の血漿中濃度推移を **Figure 23** に示す。経口投与 30 分後の血漿中濃度は 684 nM であり、第 2 節の結果 (**Table 1**) を考慮すると、SA6541 (100 mg/kg) 経口投与で認められる現象は特異的な LTA₄H 阻害に基づくものと考えられる。

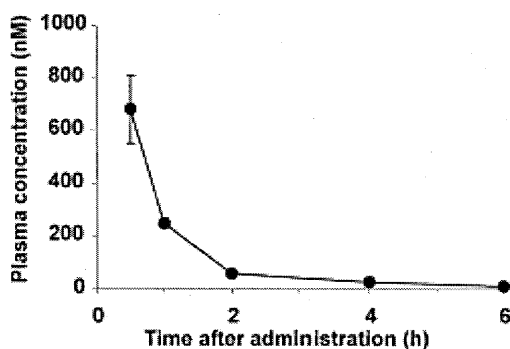


Figure 23. SA6541 (100 mg/kg) 経口投与後の血漿中未変化体濃度推移

第 4 節 5-HPETE 誘発マウス搔痒モデルの作製

実験方法

使用薬物

5-Hydroperoxyeicosatetraenoic acid (5-HPETE、Biomol) を用いた。

使用動物および飼育環境条件

5-6 週齢の雄性 ICR マウスを、12 時間の明暗サイクル (7:00 に点灯) 下、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ および湿度 $55 \pm 10\%$ に保って飼育した。固型飼料と水は自由に与えた。実験は参天製薬動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。

5-HPETE 誘発マウス搔痒モデル

実験 2 日前にマウスの背部を除毛した。5-HPETE (0.1% ethanol saline 懸濁液) 50 μL を 27 ゲージ針のマイクロシリンジを用いてマウス背部に皮内注射することによって搔痒反応を惹起した。マウスを観察容器に入れ、ビデオカメラを用いて観察者のいない状態で 60 分間録画した。その後、ビデオを再生して 5-HPETE 注射部位への 60 分間の搔破行動の回数を計測した。マウスは通常一度に数回引っ掻くが、その一連の搔破を 1 回として計測した³⁹⁾。

統計解析

Sham 群と 5-HPETE 注射群の差は Dunnett の多重比較検定を用いて解析した。

実験結果

5-HPETE 誘発マウス搔痒モデル

第 1 章の結果から 5-HPETE 用量を予測し、2 用量の検討を行った。その結果、好中球浸潤を引き起こす場合と同じ用量 (5 $\mu\text{g}/\text{site}$) で搔痒反応を引き起こした (Figure 24)。

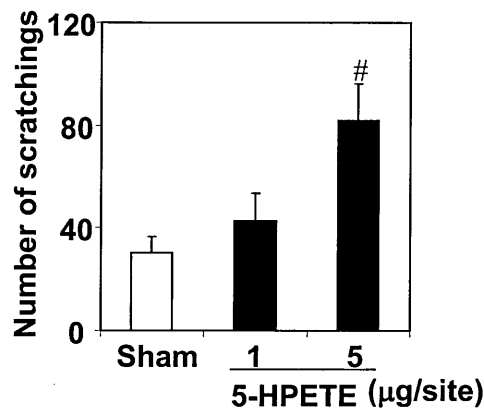


Figure 24. 5-HPETE 皮内注射後の搔破回数

$P < 0.05$ vs the sham group

第 5 節 5-HPETE 誘発マウス搔痒モデルに対する SA6541 の効果

実験方法

使用薬物

5-Hydroperoxyeicosatetraenoic acid (5-HPETE、Biomol) および SA6541 (参天製薬株式会社) を用いた。

使用動物および飼育環境条件

5-6 週齢の雄性 ICR マウスを、12 時間の明暗サイクル (7:00 に点灯) 下、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ および湿度 $55 \pm 10\%$ に保って飼育した。固型飼料と水は自由に与えた。実験は参天製薬動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。

5-HPETE 誘発マウス搔痒モデル

実験 2 日前にマウスの背部を除毛した。5-HPETE (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.1% ethanol saline 懸濁液) 50 μL を 27 ゲージ針のマイクロシリンジを用いてマウス背部に皮内注射することによって搔痒反応を惹起した。マウスを観察容器に入れ、ビデオカメラを用いて観察者のい

ない状況で 60 分間録画した。その後、ビデオを再生して 5-HPETE 注射部位への 60 分間の搔破行動の回数を計測した。マウスは通常一度に数回引っ掻くが、その一連の搔破を 1 回として計測した。

SA6541 の投与

対照マウスには経口投与用基剤のみを経口投与し、薬物投与マウスには SA6541 100 mg/kg を経口投与した。経口投与 30 分後、5-HPETE 50 μ L を 27 ゲージ針のマイクロシリンジを用いてマウス背部に皮内注射した。

血管透過性の測定

マウスに 5-HPETE 皮内注射と同時に 0.5% Evans blue 0.25 mL を静脈内注射し、60 分後に 5-HPETE 注射部位を採取した。採取した皮膚サンプルは 1N KOH 0.7 mL を用いて溶解し、0.6N H_3PO_4 とアセトンの混合液 (5 : 13) 9.3 mL を加えて色素を抽出した。抽出色素は 620 nm で比色定量した^{40,41}。

統計解析

対照群と Sham 群および薬物投与群との差は Student の t 検定を用いて解析した。

実験結果

5-HPETE 誘発マウス搔痒モデルに対する SA6541 の効果

5-HPETE 誘発マウス搔痒モデルに対する SA6541 の作用を **Figure 25** に示す。SA6541 の 100 mg/kg 経口投与は、5-HPETE 注射による引っ掻き回数の増加を統計学的に有意に抑制した (**Figure 25a**)。一方、SA6541 は 5-HPETE 注射による血管透過性亢進にはほとんど影響を与えなかった (**Figure 25b**)。

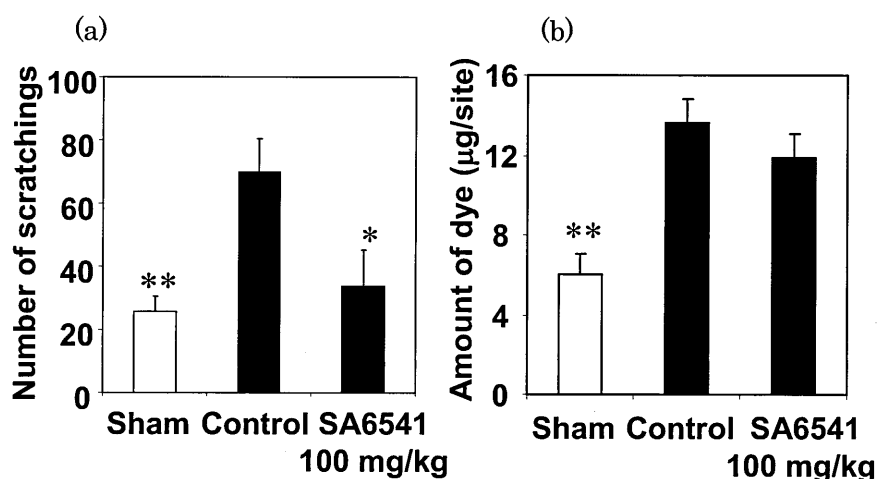


Figure 25. 5-HPETE 誘発マウス搔痒モデルに対する SA6541 の作用

(a : 引っ掻き回数、b : 血管透過性)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the control group

第 6 節 受動皮膚アナフィラキシー反応誘発マウス搔痒モデルに対する SA6541 の効果

実験方法

使用薬物

Dinitrophenyl (DNP)-conjugated bovine serum albumin (DNP-BSA; 岐阜薬科大学薬理学研究室より供与)、SA6541 (参天製薬株式会社) および ketotifen fumarate (Sigma) を用いた。

使用動物および飼育環境条件

5-6 週齢の雄性 ICR マウスを、12 時間の明暗サイクル (7:00 に点灯) 下、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ および湿度 $55 \pm 10\%$ に保って飼育した。固型飼料と水は自由に与えた。実験は参天製薬動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。

受動皮膚アナフィラキシー反応誘発マウス搔痒モデル

実験 2 日前にマウスの背部を除毛した。実験前日に抗 DNP マウスモノクローナル IgE 抗体 (岐阜薬科大学薬理学研究室より供与) をマウス背部皮内に注射した。0.5% Evans blue および 0.1 mg/mL DNP-BSA を含む生理食塩水 0.25 mL を 27 ゲージ針のマイクロシリンジを用いてマウスに静脈内注射することによって搔痒反応を惹起した⁴²⁾。マウスを観察容器に入れ、ビデオカメラを用いて観察者のいない状況で 60 分間録画した。その後、ビデオを再生して抗 DNP マウスモノクローナル IgE 抗体注射部位への 60 分間の搔破行動の回数を計測した。マウスは通常一度に数回引っ掻くが、その一連の搔破を 1 回として計測した。

SA6541 および ketotifen の投与

対照マウスには経口投与用基剤のみを経口投与し、薬物投与マウスには SA6541 (100 mg/kg) あるいは ketotifen (10 mg/kg) を経口投与した。経口投与 30 分後、0.5% Evans blue および 0.1 mg/mL DNP-BSA を含む生理食塩水 0.25 mL を 27 ゲージ針のマイクロシリンジを用いてマウスに静脈内注射した。

血管透過性の測定

マウスに 0.5% Evans blue および 0.1 mg/mL DNP-BSA を含む生理食塩水 0.25 mL を静脈内注射し、60 分後に抗 DNP マウスモノクローナル IgE 抗体注入部位を採取した。採取した皮膚サンプルは 1N KOH 0.7 mL を用いて溶解し、0.6N H₃PO₄ とアセトンの混合液 (5 : 13) 9.3 mL を加えて色素を抽出した。抽出色素は 620 nm で比色定量した^{40,41}。

統計解析

対照群と Sham 群および薬物投与群との差は Student の t 検定を用いて解析した。

実験結果

受動皮膚アナフィラキシー反応誘発マウス搔痒モデルに対する SA6541 の効果

受動皮膚アナフィラキシー反応誘発マウス搔痒モデルに対する SA6541 および ketotifen の作用を **Figure 26** に示す。SA6541 の 100 mg/kg 経口投与は、受動皮膚アナフィラキシー反応による引っ掻き回数の増加を統計学的に有意に抑制した (**Figure 26a**) が、血管透過性亢進は抑制しなかった (**Figure 26b**)。一方、ketotifen は受動皮膚アナフィラキシー反応による引っ掻き回数の増加および血管透過性亢進を統計学的に有意に抑制した (**Figure 26a** および **Figure 26b**)。

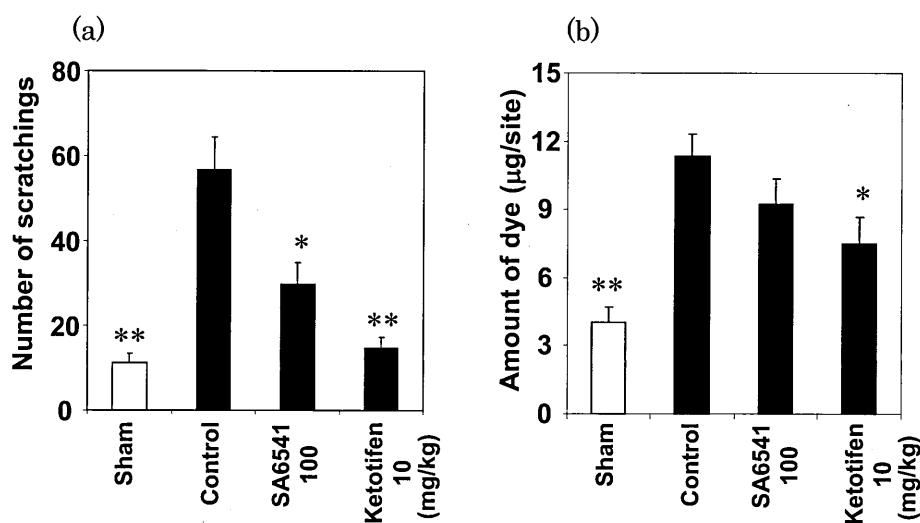


Figure 26. 受動皮膚アナフィラキシー反応誘発マウス搔痒モデルに対する SA6541 の作用
(a : 引っ掻き回数、b : 血管透過性)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the control group

第7節 結果と考察

以上の検討から次のような知見が得られた。

1. SA6541 の LTA_4H に対する特異性は高いと考えられた (Table 1)。
2. 経口投与後の血漿中未変化体濃度から、SA6541 は 100 mg/kg の経口投与において生体内では LTA_4H を特異的に阻害すると考えられた (Figure 23)。
3. 5-HPETE 注射により搔痒反応が認められた。搔痒反応に必要な 5-HPETE の用量は好中球遊走に必要な 5-HPETE の用量に一致した (Figure 24)。
4. SA6541 は経口投与により 5-HPETE 注射により誘発される搔痒反応を抑制した (Figure 25a) が、5-HPETE 注射により誘発される血管透過性亢進には影響しなかった (Figure 25b)。したがって、 LTB_4 は 5-HPETE 誘発搔痒反応に関与するが、5-HPETE 誘発血管透過性亢進には関与しないことが示唆された。
5. SA6541 は経口投与により受動皮膚アナフィラキシー反応により誘発される搔痒反応を抑制した (Figure 26a) が、受動皮膚アナフィラキシー反応により誘発される血管透過性亢進には影響しなかった (Figure 26b)。したがって、 LTB_4 は受動皮膚アナフィラキシー反応誘発搔痒反応に関与するが、受動皮膚アナフィラキシー反応誘発血管透過性亢進には関与しないことが示唆された。

第8節 結論

LTB_4 は少なくとも一部の皮膚搔痒反応において重要な役割を果たすことが示唆された。SA6541 は経口投与において搔痒反応を抑制する可能性が考えられた。

第3章 結語

搔痒のメカニズムは序章第2節で示されるようなメカニズムが推定されるものの未だ不明瞭な点が多い。搔痒に関与するメディエーターのうち、 LTB_4 は既にサブスタンスPおよびノシセプチン誘発搔痒反応に関与することが報告されており^{5,43)}、搔痒反応において重要な役割を果たすと考えられる。また、 LTB_4 は強力な多形核白血球（好中球）誘引作用を有するため^{11,12)}、 LTB_4 の生理作用を抑制することは、抗炎症および搔痒治療薬開発の有望な手段となりえると考えられる。また、 LTB_4 の生合成経路の最終段階で作用する LTA_4H を阻害し LTB_4 の産生を抑制することは、 LTB_4 受容体拮抗薬のようにその受容体であるBLT1およびBLT2の両受容体に対する親和性を考慮することなくその抗炎症および搔痒治療効果が発揮できると考えられる。そこで新たな抗炎症薬創出を目指し、強力に LTA_4H を阻害することにより新規メカニズムに基づく抗炎症および搔痒治療効果を有する化合物を創出すること目的として本研究を開始した。

化合物スクリーニングの結果得られたSA6541は強力な LTA_4H 阻害作用を有し（ IC_{50} 値：270 nM（モルモット）、25 nM（ヒト））、ロイコトリエンの前駆体である5-HPETE皮内注射による LTB_4 産生を50 mg/kgの経口投与によって抑制した。同時にSA6541は5-HPETE皮内注射による好中球浸潤も抑制した。一方、SA6541は5-HPETE皮内注射による $LTC_4/D_4/E_4$ 産生には影響しなかったことから、少なくとも5-リポキシゲナーゼ経路における LTA_4H に対する特異性は確認できた。さらに、SA6541はAA皮内注射による LTB_4 産生を50 mg/kgの経口投与によって抑制し、好中球浸潤を完全ではないものの抑制した。このとき、SA6541はAA皮内注射による PGE_2 産生には影響しなかったことから、SA6541はおそらく50 mg/kgの経口投与ではプロスタグランジン産生に影響しないと考えられた。以上の結果から、 LTB_4 が皮膚炎の特に好中球浸潤において重要な役割を果たすことが示唆され、SA6541は経口投与によって皮膚炎を抑制する可能性が考えられた。

次に、SA6541の搔痒治療効果を検討するにあたり、SA6541の LTA_4H への特異性を再度確認した。経口投与後の血中濃度推移の結果を考え合わせると、SA6541の100 mg/kgの経口投与は特異的に LTA_4H を阻害すると考えられた。そこで、SA6541の搔痒抑制作用を LTB_4 が関与すると考えられるモデルおよび臨床応用を考えた際により一般的なアレルギーが関与すると考えられるモデルを用いて検討した。5-HPETE皮内注射は好中球浸潤を引き起こす用量と同じ用量で搔痒反応を引き起こした。SA6541は100 mg/kgの経口投与によって5-HPETE誘発搔痒反応を抑制したが、血管透過性亢進には影響しなかった。SA6541は5-HPETE皮内注射による LTB_4 産生は抑制するが、 $LTC_4/D_4/E_4$ 産生には影響しないため、 LTB_4 は搔痒反応に関与し、その他の5-リポキシゲナーゼ代謝物が血管透過性亢進に関与すると考えられた。さらに、SA6541は100 mg/kgの経口投与によってアレルギー反応における搔痒反応も抑制した。一方、SA6541はアレルギー反応における血管透過性亢進を抑制せず、抗ヒスタミン薬が血管透過性亢進を抑制することから、アレルギー反応における血管透過性亢進には LTB_4 ではなく、ヒスタミンなどのメディエーターがより重要

であると考えられた。以上の結果から、 LTB_4 は少なくとも一部の皮膚搔痒反応において重要な役割を果たすことが示唆され、SA6541は経口投与によって搔痒反応を抑制する可能性が考えられた。

本研究は LTB_4 が炎症反応および搔痒反応における重要な因子であることを再確認するとともに、 LTA_4H 阻害薬である SA6541 が抗炎症および搔痒治療薬としての可能性を有することを示した。

参考文献等

1. 安東嗣修 日薬理誌 **131**, 361-366, 2008.
2. 高森建二、熊谷裕生 臨床皮膚科 **64**(5 増), 104-107, 2010.
3. Wahlgren, C. F. *J. Dermatol.* **26**, 770-779, 1999.
4. Felix, R., Shuster, S. *Br. J. Dermatol.* **93**, 303-312, 1975.
5. Andoh, T., Katsube, N., Maruyama, M., Kuraishi, Y. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 1621-1626, 2001.
6. Andoh, T., Kuraishi, Y. *Eur. J. Pharmacol.* **353**, 93-96, 1998.
7. Andoh, T., Nishikawa, Y., Miyamoto, T., Nojima, H., Narumiya, S., Kuraishi, Y. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 2042-2047, 2007.
8. Yokomizo, T., Kato, K., Terawaki, K., Izumi, T., Shimizu, T. *J. Exp. Med.* **192**, 421-431, 2000.
9. Andoh, T., Kuraishi, Y. *Mol. Brain Res.* **137**, 263-266, 2005.
10. Brooks, C. D. W., Summers, J. B. *J. Med. Chem.* **39**, 2629-2654, 1996.
11. Ford-Hutchinson, A. W., Bray, M. A., Doig, M. V., Shipley, M. E., Smith, M. J. H. *Nature* **286**, 264-265, 1980.
12. Bray, M. A., Ford-Hutchinson, A. W., Shipley, M. E., Smith, M. J. H. *Br. J. Pharmacol.* **71**, 507-512, 1980.
13. Gimbrone, M. A., Jr., Brock, A. F., Schafer, A. I. *J. Clin. Invest.* **74**, 1552-1555, 1984.
14. Ford-Hutchinson, A. W. *Crit. Rev. Immunol.* **10**, 1-12, 1990.
15. Klickstein, L. B., Shapleigh, C., Goetzl, E. J. *J. Clin. Invest.* **66**, 1166-1170, 1980.
16. Sharon, P., Stenson, W. F. *Gastroenterology* **86**, 453-460, 1984.
17. Iversen, L., Kragballe, K., Ziboh, V. A. *Skin Pharmacol.* **10**, 169-177, 1997.
18. Jala, V. R., Haribabu, B. *Trends Immunol.* **25**, 315-322, 2004.
19. Carter, G. W., Young, P. A., Albert, D. H., Bouska, J., Dyer, R., Bell, R. L., Summers, J. B., Brooks, D. W. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **256**, 929-937, 1991.
20. Hicks, A., Monkarsh, S. P., Hoffman, A. F., Goodnow, R., Jr. *Expert Opin. Investig. Drugs* **16**, 1909-1920, 2007.
21. Haeggström, J. Z. *J. Biol. Chem.* **279**, 50639-50642, 2004.
22. Barrett, A. J., Rawlings, N. D., Woessner, J. F. In *Handbook of Proteolytic Enzymes*: Barrett, A. J., Rawlings, N. D., Woessner, J. F., Eds., Academic Press: San Diego, 1998; pp. 994-996.
23. Gut, J., Goldman, D. W., Jamieson, G. C., Trudell, J. R. *Arch. Biochem. Biophys.* **259**, 497-509, 1987.
24. Brock, T. G., Maydanski, E., McNish, R. W., Peters-Golden, M. *J. Biol. Chem.* **276**,

- 35071-35077, 2001.
25. Brock, T. G., Lee, Y.-J., Maydanski, E., Marburger, T. L., Luo, M., Paine III, R., Peters-Golden, M. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **289**, L224-L232, 2005.
 26. Haeggström, J. Z. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **17**, 111-131, 1999.
 27. Orning, L., Gierse, J. K., Fitzpatrick, F. A. *J. Biol. Chem.* **269**, 11269-11273, 1994.
 28. Thunnissen, M. M. G. M., Nordlund, P., Haeggström, J. Z. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 131-, 2001
 29. Penning, T. D. *Curr. Pharm. Design* **7**, 163-179, 2001.
 30. Labaudiniere, R., Hilboll, G., Leon-Lomeli, A., Lautenschlaeger, H. H., Parnham, M., Kuhl, P., Dereu, N. *J. Med. Chem.* **35**, 3156-3169, 1992.
 31. Orning, L., Krivi, G., Fitzpatrick, F. A. *J. Biol. Chem.* **266**, 1375-1378, 1991.
 32. Penning, T. D., Askonas, L. J., Djuric, S. W., Haack, R. A., Yu, S. S., Michener, M. L., Krivi, G. G., Pyla, E. Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **5**, 2517-2522, 1995.
 33. Orning, L., Krivi, G., Bild, G., Gierse, J., Aykent, S., Fitzpatrick, F. A. *J. Biol. Chem.* **266**, 16507-16511, 1991.
 34. Penning, T. D., Russell, M. A., Chen, B. B., Chen, H. Y., Liang, C-D., Mahoney, M. W., Malecha, J. W., Miyashiro, J. M., Yu, S. S., Askonas, L. J., Gierse, J. K., Harding, E. I., Highkin, M. K., Kachur, J. F., Kim, S. H., Villani-Price, D., Pyla, E. Y., Ghoreishi-Haack, N. S., Smith, W. G. *J. Med. Chem.* **45**, 3482-3490, 2002.
 35. Rao, N. L., Dunford, P. J., Xue, X., Jiang, X., Lundeen, K. A., Coles, F., Riley, J. P., Williams, K. N., Grice, C. A., Edwards, J. P., Karlsson, L., Fourie, A. M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **321**, 1154-1160, 2007.
 36. Sandanayaka, V., Mamat, B., Mishra, R. M., Winger, J., Krohn, M., Zhou, L-M., Keyvan, M., Enache, L., Sullins, D., Onua, E., Zhang, J., Halldorsdottir, G., Sigthorsdottir, H., Thorlaksdottir, A., Sigthorsson, G., Thorsteinnsdottir, M., Davies, D. R., Stewart, L. J., Zembower D. E., Andresson, T., Kiselyov A. S., Singh, J., Gurney, M. E. *J. Med. Chem.* **53**, 573-585, 2010.
 37. Ohishi, N., Izumi, T., Minami, M., Kitamura, S., Seyama, Y., Ohkawa, S., Terao, S., Yotsumoto, H., Takaku, F., Shimizu, T. *J. Biol. Chem.* **262**, 10200-10205, 1987.
 38. De Young, L. M., Kheifets, J. B., Ballaron, S. J., Young, J. M. *Agents Actions* **26**, 335-341, 1989.
 39. Kuraishi, Y., Nagasawa, T., Hayashi, K., Satoh, M. *Eur. J. Pharmacol.* **275**, 229-233, 1995.
 40. Inagaki, N., Goto, S., Yamasaki, M., Nagai, H., Koda, A. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **80**, 285-290, 1986.
 41. Inagaki, N., Goto, S., Nagai, H., Koda, A. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **81**,

58-62, 1986.

42. Inagaki, N., Nakamura, N., Nagao, M., Musoh, K., Kawasaki, H., Nagai, H. *Eur. J. Pharmacol.* **367**, 361-371, 1999.

43. Andoh, T., Yageta, Y., Takeshima, H., Kuraishi, Y. *J. Invest. Dermatol.* **123**, 196-201, 2004.

謝辞

本研究の発表の機会をお与えくださるとともに本論文のご高閲とご指導を賜りました岐阜薬科大学 機能分子学大講座 薬理学研究室 稲垣直樹教授に深甚なる謝意を表します。

また本論文の審査をお引き受け頂き、数々の有益なご助言を賜りました岐阜大学 丹羽雅之教授、田中稔幸教授、深尾敏幸教授に深く感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、終始ご指導とご助言を頂きました参天製薬株式会社研究開発センター主任研究員 坪井貴司氏、須原寛氏、堀内正人博士に深く感謝いたします。

また、本研究の共同研究者である村上忠弘博士、榎本裕志博士、三宅裕理佳氏、水谷恵子氏に深く感謝いたします。

本研究の機会を与えてくださり終始ご激励を頂きました、元参天製薬株式会社取締役探索研究本部長（現株式会社エムズサイエンス代表取締役）三田四郎博士に深く感謝いたします。

本研究に関する論文投稿および本論文の作成の機会を与えてくださり、終始ご激励とご支援を頂きました参天製薬株式会社研究開発センター長 笹野稔博士、参天製薬株式会社研究開発センター探索研究グループマネージャー 青野浩之博士に深く感謝いたします。

研究業績リスト

主要論文

本論文は下記の論文をもとにまとめたものである。

第1章に関する論文

1. Involvement of leukotriene B₄ in murine dermatitis models.

Fumio Tsuji, Yurika Miyake, Masato Horiuchi, Shiro Mita. *Biochemical Pharmacology* **55**, 297-304, 1998.

第2章に関する論文

2. Role of leukotriene B₄ in 5-lipoxygenase metabolite- and allergy-induced itch-associated response in mice.

Fumio Tsuji, Hiroyuki Aono, Takashi Tsuboi, Tadahiro Murakami, Hiroshi Enomoto, Keiko Mizutani, Naoki Inagaki. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **33**, 1050-1053, 2010.

参考論文等

1. Effects of SA6541, a leukotriene A₄ hydrolase inhibitor, and indomethacin on carrageenan-induced murine dermatitis.

Fumio Tsuji, Yurika Miyake, Hiroshi Enomoto, Masato Horiuchi, Shiro Mita. *European Journal of Pharmacology* **346**, 81-85, 1998.

2. Involvement of leukotriene B₄ in arthritis models.

Fumio Tsuji, Kenji Oki, Koushi Fujisawa, Akihiko Okahara, Masato Horiuchi, Shiro Mita. *Life Sciences* **64**, PL51-56, 1999.

3. Synthesis and biological evaluation of N-mercaptoacylproline and N-mercaptoacylthiazolidine-4-carboxylic acid derivatives as leukotriene A₄ hydrolase inhibitors.

Hiroshi Enomoto, Yuko Morikawa, Yurika Miyake, Fumio Tsuji, Maki Mizuchi, Hiroshi Suhara, Ken-ichi Fujimura, Masato Horiuchi, Masakazu Ban. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **18**, 4529-4532, 2008.

4. Synthesis and biological evaluation of N-mercaptoacylcysteine derivatives as leukotriene A₄ hydrolase inhibitors.

Hiroshi Enomoto, Yuko Morikawa, Yurika Miyake, Fumio Tsuji, Maki Mizuchi, Hiroshi Suhara, Ken-ichi Fujimura, Masato Horiuchi, Masakazu Ban. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **19**, 442-446, 2009.

その他学術論文

1. The effect of substance P on the antigen-induced bronchoconstriction in guinea pigs. Hiroichi Nagai, Fumio Tsuji, Akihida Koda. *Journal of Pharmacobio-dynamics* **13**, 195-199, 1990.
2. The effect of ONO-3708, a novel TxA₂ receptor antagonist, on U-46619-induced contraction of guinea pig and human tracheal strips in vitro and on bronchoconstriction in guinea pigs in vivo. Hiroichi Nagai, Fumio Tsuji, Naoki Inagaki, Kunihiko Kitagaki, Osamu Fukutomi, Akihida Koda, Michio Daikoku. *Prostaglandins* **41**, 375-382, 1991.
3. Participation of collagenase and elastase in LPS-induced airway hyperresponsiveness in guinea pigs. Hiroichi Nagai, Fumio Tsuji, Tsukasa Shimazawa, Shouichi Goto, Kuninori Yoshitake, Akihida Koda. *Inflammation* **15**, 317-330, 1991.
4. Pharmacological study of bacterial lipopolysaccharide-induced airway hyperresponsiveness in guinea-pigs. Hiroichi Nagai, Fumio Tsuji, Shouichi Goto, Akihida Koda. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de therapie* **313**, 161-175, 1991.
5. Pharmacological modulation of antigen-induced airway hyperresponsiveness by thromboxane A₂ inhibitors in guinea pigs. Hiroichi Nagai, Fumio Tsuji, Shouichi Goto, Akihida Koda. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **16**, 1099-1103, 1993.
6. The effects of betamethasone derivatives on endotoxin-induced uveitis in rats. Fumio Tsuji, Kenjiro Sawa, Masatomo Kato, Hiroyuki Mibu, Eiichi Shirasawa. *Experimental Eye Research* **64**, 31-36, 1997.
7. 16beta-methyl-17alpha,21-diesterified glucocorticoids as partial agonists of glucocorticoid in rat endotoxin-induced inflammation. Fumio Tsuji, Kenjiro Sawa, Hiroyuki Mibu, Eiichi Shirasawa. *Inflammation Research* **46**, 193-198, 1997.
8. The effects of betamethasone derivatives on endotoxin-induced uveitis in guinea pigs. Fumio Tsuji, Kenjiro Sawa, Toshimi Ikuse, Eiichi Shirasawa. *Inflammation Research* **46**, 486-490, 1997.
9. Different pharmacokinetics of (4R)-hexahydro-7,7-dimethyl-6-oxo-1,2,5-(3-¹⁴C)dithiazocine-4-carboxylic acid between the fasting and non-fasting rat: role of intestinal microorganisms. Fumio Tsuji, Nobuo Morikawa, Hideo Takashina. *Xenobiotica* **28**, 53-62, 1998.

10. Combination therapy with fumagillin and vaccination with tumor-derived antigenic peptides in B16 melanoma-transplanted mice.
Fumio Tsuji, Koichi Yamada. *International Journal of Immunopharmacology* **20**, 111-124, 1998.
11. Tachykinins as enhancers of prostaglandin E₂-induced intraocular inflammation.
Fumio Tsuji, Muneo Hamada, Eiichi Shirasawa. *Ocular Immunology and Inflammation* **6**, 19-25, 1998.
12. The role of platelet-activating factor in cell infiltration in endotoxin-induced uveitis in guinea pigs.
Fumio Tsuji, Eiichi Shirasawa. *Current Eye Research* **17**, 501-505, 1998.
13. Effects of bucillamine and N-acetyl-L-cysteine on cytokine production and collagen-induced arthritis (CIA).
Fumio Tsuji, Yurika Miyake, Hiroyuki Aono, Yoko Kawashima, Shiro Mita. *Clinical and Experimental Immunology* **115**, 26-31, 1999.
14. Effects of mitogen-activated protein kinase inhibitors or phosphodiesterase inhibitors on interleukin-1-induced cytokines production in synovium-derived cells.
Fumio Tsuji, Kenji Oki, Toshihiko Senda, Masato Horiuchi, Shiro Mita. *Immunology Letters* **68**, 275-279, 1999.
15. Effects of sulfhydryl compounds on interleukin-1-induced vascular endothelial growth factor production in human synovial stromal cells.
Fumio Tsuji, Hidehito Matsuoka, Hiroyuki Aono, Miwa Takai, Masato Horiuchi, Kazuo Nishimura, Shiro Mita. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **23**, 663-665, 2000.
16. Differential effects between marimastat, a TNF- α converting enzyme inhibitor, and anti-TNF- α antibody on murine models for sepsis and arthritis.
Fumio Tsuji, Kenji Oki, Akihiko Okahara, Hiroshi Suhara, Takashi Yamanouchi, Minoru Sasano, Shiro Mita, Masato Horiuchi. *Cytokine* **17**, 294-300, 2002.
17. IL-6-gp130-STAT3 in T cells directs the development of IL-17+ Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state.
Mika Nishihara, Hideki Ogura, Naoko Ueda, Mineko Tsuruoka, Chika Kitabayashi,
Fumio Tsuji, Hiroyuki Aono, Katsuhiko Ishihara, Eric Huseby, Ulrich A K Betz, Masaaki Murakami, Toshio Hirano. *International Immunology* **19**, 695-702, 2007.
18. Bucillamine mechanism inhibiting IL-1 β -induced VEGF production from fibroblast-like synoviocytes.
Fumio Tsuji, Iwao Seki, Hiroyuki Aono, Noriko Odani, Keiko Mizutani, Masahiro Okamoto, Minoru Sasano. *International Immunopharmacology* **7**, 1569-1576, 2007.

19. Preventive effect of TRPV1 agonists capsaicin and resiniferatoxin on ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats.
Kyoko Ueda, Fumio Tsuji, Tomoko Hirata, Masanori Takaoka, Yasuo Matsumura. *Journal of cardiovascular pharmacology* **51**, 513-520, 2008.
20. SA13353 (1-[2-(1-adamantyl)ethyl]-1-pentyl-3-[3-(4-pyridyl)propyl]urea) inhibits TNF-alpha production through the activation of capsaicin-sensitive afferent neurons mediated via transient receptor potential vanilloid 1 in vivo.
Masaaki Murai, Fumio Tsuji, Masafumi Nose, Iwao Seki, Kenji Oki, Chikako Setoguchi, Hiroshi Suhara, Minoru Sasano, Hiroyuki Aono. *European Journal of Pharmacology* **588**, 309-315, 2008.
21. Point mutation of tyrosine 759 of the IL-6 family cytokine receptor, gp130, augments collagen-induced arthritis in DBA/1J mice.
Fumio Tsuji, Miwa Yoshimi, Osamu Katsuta, Miwa Takai, Katsuhiko Ishihara, Hiroyuki Aono. *BMC Musculoskeletal Disorders* **10**, 23, 2009.
22. Preventive effect of SA13353 [1-[2-(1-adamantyl)ethyl]-1-pentyl-3-[3-(4-pyridyl)propyl]urea], a novel transient receptor potential vanilloid 1 agonist, on ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats.
Kyoko Ueda, Fumio Tsuji, Tomoko Hirata, Kenji Ueda, Masaaki Murai, Hiroyuki Aono, Masanori Takaoka, Yasuo Matsumura. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **329**, 202-209, 2009.
23. The investigation of synovial genomic targets of bucillamine with microarray technique.
Kenji Oki, Fumio Tsuji, Koji Ohashi, Masaaki Kageyama, Hiroyuki Aono, Minoru Sasano. *Inflammation Research* **58**, 571-584, 2009.
24. Transient receptor potential vanilloid 1 agonists as candidates for anti-inflammatory and immunomodulatory agents.
Fumio Tsuji, Masaaki Murai, Kenji Oki, Iwao Seki, Kenji Ueda, Hiroyuki Inoue, Lex Nagelkerken, Minoru Sasano, Hiroyuki Aono. *European Journal of Pharmacology* **627**, 332-339, 2010.
25. Effects of SA13353, a transient receptor potential vanilloid 1 agonist, on leukocyte infiltration in lipopolysaccharide-induced acute lung injury and ovalbumin-induced allergic airway inflammation.
Fumio Tsuji, Masaaki Murai, Kenji Oki, Hiroyuki Inoue, Minoru Sasano, Hiroyuki Tanaka, Naoki Inagaki, Hiroyuki Aono. *Journal of Pharmacological Sciences* **112**, 487-490, 2010.

26. Synthesis and pharmacological evaluation of 1,1,3-substituted urea derivatives as potent TNF-alpha production inhibitors.

Hiroshi Enomoto, Ayako Sawa, Hiroshi Suhara, Noriyoshi Yamamoto, Hiroyuki Inoue, Chikako Setoguchi, Fumio Tsuji, Masahiro Okamoto, Yoshimasa Sasabuchi, Masato Horiuchi, Masakazu Ban. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **20**, 4479-4482, 2010.

27. Combined effects of bicillamine and etanercept on a rat type II collagen-induced arthritis model.

Chikako Setoguchi, Fumio Tsuji, Osamu Katsuta, Masahiro Okamoto, Hiroyuki Aono. *Modern Rheumatology* **20**, 381-388, 2010.