

氏 名 (本国籍)	奥村 貴子 (三重県)
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	農博乙第 128 号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 13 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 2 項該当
学位論文題目	新規シクロオキシゲナーゼ・2 阻害薬 CIAA と新規 EP <sub>4</sub> 受容体拮抗薬 CJ-023,423 の薬理作用に関する研究
審査委員会	主査 岐阜大学 教授 河合 啓 一 副査 静岡大学 教授 田原 康 孝 副査 岐阜大学 教授 高見澤 一 裕 副査 岐阜大学 教授 木 曾 真 副査 信州大学 教授 千 菊 夫 副査 岐阜大学 教授 海 野 年 弘

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

プロスタランジン(PG)は、炎症、血管新生、骨吸収などの末梢組織や、発熱、睡眠、疼痛など中枢神経に関わっており、オキシゲナーゼ(COX)によって産生され、生体内で多彩な役割を果たしている。COX にはアイソザイム 1 と 2 が明らかにされており、COX-2 によって産生される PGE<sub>2</sub> は、炎症や疼痛に関わっており、そのシグナルは EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> および EP<sub>4</sub> の 4 つの受容体を介して伝達されていることが明らかにされている。これらの研究には、特徴的な性質を持つ化合物が利用されてきており、生命科学の発展に大きく貢献してきた。

CIAA ([6-chloro-2-(4-chlorobenzoyl)-1*H*-indol-3-yl]acetic acid) は、中枢組織よりも末梢組織に多く分布する特徴を持つ新規選択的 COX-2 阻害剤である。また、CJ-023,423 (N-[(2-[4-(2-ethyl-4,6-dimethyl-1*H*-imidazo[4,5-c]pyridine-1-yl)phenyl]ethyl)amino] Carbonyl]-4-methylbenzensulfonamide) は新規選択的 EP<sub>2</sub> 受容体拮抗薬である。本研究は、これら新規薬物の薬理作用について、既知の COX-2 阻害剤である celecoxib および rofecoxib と比較し、中枢および末梢組織における COX-2 活性の分離、炎症性疼痛試験における COX-2 の中枢と末梢における寄与率の数学的解析、および CJ-023,423 をラット炎症性疼痛試験とラットアジュバント関節炎試験にて評価し、EP<sub>4</sub> 受容体の炎症性疼痛や炎症、骨破壊への関与を明らかにすることを目的として行った。

脳内より血漿中に高濃度に分布することが知られている COX-2 阻害剤である CIAA が、ラット全血を用いた *in vitro* 評価系を用いて COX-2 を選択的に阻害することを明らかにした。この結果を踏まえ、ラットのカラゲニン誘発足浮腫および浮腫足における PGE<sub>2</sub> の産生、並びにリポポリサッカライド誘発発熱および発熱脳における PGE<sub>2</sub> の産生に対する CIAA の薬理作用を既存の COX-2 阻害剤である celecoxib および rofecoxib と比較し、CIAA における解熱作用に対する抗浮腫作用の比の値や脳内 PGE<sub>2</sub> 産生阻害作用に対する足での PGE<sub>2</sub> 産生阻害作用の比の値が celecoxib と rofecoxib の比の値よりも低く、各々の薬物の脳

内と血漿中の濃度比と高い相関を示すことを明らかにした。このように、CIAA を用いることにより中枢と末梢における COX-2 の機能を薬理的に分離できることを示し、CIAA が末梢組織や器官における COX-2 の役割を薬理的に調べるための有効なツールになることを提示した。

以上の結果を踏まえ、炎症性疼痛であるラットカラゲニン誘発圧過敏試験と熱過敏試験を用いて、CIAA と celecoxib を経口投与した場合の各々の ID 値を実験的に求め、これらの数値を導入した連立 2 次方程式を立て、末梢と中枢における COX-2 の寄与率を数学的に解析する方法を考案した。この解析結果から、圧過敏では末梢と中枢の COX-2 寄与率がそれぞれ 53% と 47% と算出されほぼ同程度であり、一方熱過敏では、これらの値が前者で 97%、後者で 3% であったことから、主に末梢の COX-2 が寄与していること明らかにした。ここで提案した数学的解析法は、COX-2 が関与している生理、病理現象における中枢と末梢の COX-2 の寄与率を求める解析法として有用であることを主張し、さらに酵素阻害剤のみならず、受容体作動薬や拮抗薬にも本解析法が適用可能であることも言及している。

CJ-023,423 は選択的 EP<sub>4</sub> 受容体拮抗薬であることが確認されている。従って、CJ-023,423 は病態における EP<sub>4</sub> 受容体の関与を *in vivo* で調べるための良いツールであると考えられる。そこで、CJ-023,423 を用いて、ラット PGE<sub>2</sub> 誘発熱過敏試験、ラットカラゲニン誘発熱過敏試験、およびラット Complete Freund's Adjuvant 誘発炎症性疼痛に対する抑制効果を調べた。その結果、PGE<sub>2</sub> 誘発熱過敏およびカラゲニンや Complete Freund's Adjuvant 投与による炎症性疼痛を抑制することを明らかにした。さらに、アジュバント関節炎における足浮腫と炎症性バイオマーカー及び骨破壊を抑制することも明らかにしている。これらの結果は、PGE<sub>2</sub> が EP<sub>4</sub> 受容体を介して、炎症性疼痛や慢性炎症と骨破壊に関与していることを示している。

以上記したように、新しい特徴を持つ薬物の開発は様々な生理機能の解明を可能とし、生命科学の発展に大きく貢献すると思われる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本論文は、炎症や疼痛に重要な役割を果たしているプロスタグランジン(PG)E<sub>2</sub> を産生するシクロオキシゲナーゼ 2 (以下 COX-2) の新規選択的阻害剤である [6-chloro-2-(4-chlorobenzoyl)-1H-indol-3-yl]acetic acid (以下 CIAA) の薬理作用から、末梢と中枢における COX-2 活性を分離できることを明らかにするとともに、COX-2 の中枢および末梢組織での寄与率を数学的手法で解明、さらに新規選択的 PGE<sub>4</sub> 受容体拮抗薬である N-[[2-[4-(2-ethyl-4,6-dimethyl-1H-imidazo[4,5-c]pyridine-1-yl)phenyl]ethyl]amino) carbonyl]-4-methylbenzenesulfonamide (以下 CJ-023,423) の薬理的解析から、PGE<sub>4</sub> 受容体が炎症性疼痛と炎症および骨破壊に関与していることを明らかにしたものである。論文内容の概要を以下に記す。

PG を産生する COX のアイソザイム 1 と 2 に対し、ラット全血を用いた *in vitro* の評価系で CIAA が COX-2 を選択的に阻害することを明らかにした。この結果を踏まえ、ラットのカラゲニン誘発足浮腫と浮腫足における PGE<sub>2</sub> 産生、リポポリサッカライド誘発発熱と発熱脳における PGE<sub>2</sub> 産生に関し、CIAA と既知の選択的 COX-2 阻害剤である

celecoxib 及び rofecoxib について薬理的に比較し, CIAA を用いることによって末梢および中枢の COX-2 作用を薬理的に分離できることを実証した。この結果から, CIAA が末梢組織や器官における COX-2 の役割を薬理的に調べるための有益な研究ツールになることを提唱した。

CIAA と celecoxib を用いて, ラットカラゲニン誘発圧過敏および熱過敏試験における両薬物の効果を調べ, 圧過敏における ID<sub>25</sub> 値, 発熱脳および浮腫足における PGE<sub>2</sub> 抑制作用を示す ID<sub>50</sub> 値, 並びに鎮痛作用を示す ID<sub>30</sub> 値または ID<sub>25</sub> 値をそれぞれ求め, これらの値を用いて, 圧過敏と熱過敏における中枢と末梢における COX-2 の寄与率を求めるための連立方程式を考案した。この解を求め, 中枢と末梢における COX-2 の寄与率が圧過敏ではそれぞれ 50%, また熱過敏では大部分中枢の COX-2 が寄与していることを明らかにした。同じ分子に作用する中枢と末梢で異なる分布を持つ 2 つの薬物が存在すれば, ここで考案した連立方程式を用いる数学的解析法が酵素阻害剤のみならず受容体作動薬や拮抗薬など各種の薬物においても, 中枢及び末梢における寄与率の算出に適用可能であることを提唱している。

次に, 新規選択的 EP<sub>4</sub> 受容体拮抗薬である CJ-023,423 が PGE<sub>2</sub> 誘発熱過敏, およびカラゲニンや Complete Freund's Adjuvant 投与によって誘発される炎症性疼痛を抑制すること, 並びにアジュバント関節炎における足浮腫, 炎症性バイオマーカー, および骨破壊を抑制することが明らかにした。これらの結果から, PGE<sub>2</sub> が EP<sub>4</sub> 受容体を介して炎症性疼痛, および慢性炎症と骨破壊に関与していることを指摘した。

以上について, 審査委員全員一致で, 本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の博士論文として十分価値あるものと認めた。

#### 【基礎となる学術論文】

- 1) Effects of the selective EP<sub>4</sub> antagonist, CJ-023,423 on chronic inflammation and bone destruction in rat adjuvant-induced arthritis  
Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2008  
Oumura Takako, Murata Yoko, Taniguchi Kana, Murase Akio and Nii, Aisuke,
- 2) Mathematical analysis of involvement ratio between central and peripheral COX-2 in rat pain models with two types of COX-2 inhibitors with different distribution, celecoxib and CIAA  
European Journal of Pharmacology, 2008  
Okumura Takako, Sakakibara Ayano, Murata Yoko and Kita Yasuhiro.
- 3) Pharmacological separation between peripheral and central functions of cyclooxygenase-2 with CIAA., a novel cyclooxygenase-2 inhibitor  
European Journal of Pharmacology, 2006  
Okumura Takako, Murata Yoko, Hizue Masanori, Matsuura Tomomi, Nagane Rie, Kanai Yoshihito, Murase Akio, Sakakibara Ayano, Fujita Isami and Nakao Kazunari.

[既発表論文]

- 1) Effect of prostanoid EP<sub>4</sub> receptor antagonist, CJ-042,794, in rat models of pain and inflammation  
European Journal of Pharmacology, 2008  
Murase Akio, Okumura Takako, Sakakibara Ayano, Tonai-kachi Hiroko, Nakao Kazunari, Takada Junji.
- 2) CJ-023,423, a novel, potent and selective prostaglandin EP<sub>4</sub> receptor antagonist with antihyperalgesic properties  
The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2007  
Nakao Kazunari, Murase Akio, Ohshiro Hiroyuki, Okumura Takako, Taniguchi Kana, Murata Yoko, Masuda Masatoshi, Kato Tomoki, Okumura Yoshiyuki and Takada Junji.
- 3) Ultrasonic vocalization response elicited in adjuvant-induced arthritic rats as a useful method for evaluating analgesic drugs  
Experimental Animals, 2006  
Naito Hiroyuki, Okumura Takako, Inoue Maki and Suzuki Yoshihiko
- 4) Optimization of imidazole 5-lipoxygenase inhibitors and selection and synthesis of a development candidate  
Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2005  
Mano Takashi, Stevens Rodney W., Ando Kazuo, Kawai Makoto, Kawamura Kiyoshi, Nakao Kazunari, Okumura Yoshiyuki, Okumura Takako, Sakakibara Minoru, Miyamoto Kimitaka and Tamura Tetsuya.
- 5) 5-Lipoxygenase inhibitors ; convenient synthesis of 4-[3-(4-heterocyclylphenyl thio)phenyl]-3,4,5,6-tetrahydro-2*H*-pyran-4-carboxamide analogues  
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2005  
Mano Takashi, Stevens Rodney W., Okumura Yoshiyuki, Kawai Makoto, Okumura Takako and Sakakibara Minoru
- 6) 4-[5-Fluoro-3-[4-(2-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)benzyloxy]phenyl]-3,4,5,6-tetrahydro-2*H*-pyran-4-carboxamide, an orally active inhibitor of 5-lipoxygenase with improved pharmacokinetic and toxicology characteristics  
Journal of Medicinal Chemistry, 2004  
Mano Takashi, Okumura Yoshiyuki, Sakakibara Minoru, Okumura Takako, Tamura Tetsuya, Miyamoto Kimitaka and Stevens Rodney W.
- 7) Novel imidazole compounds as a new series of potent, orally active inhibitors of 5-lipoxygenase  
Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2003  
Mano Takashi, Stevens Rodney W., Ando Kazuo, Nakao Kazunari, Okumura Yoshiyuki, Sakakibara Minoru, Okumura Takako, Tamura Tetsuya and Miyamoto Kimitaka