

論文の内容の要旨

論文題目

20-Hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE)産生酵素阻害薬に関する研究

関 隆行

アラキドン酸 (AA) 代謝経路としては prostaglandins を産生する cyclooxygenase 系、leukotrienes を産生する lipoxygenase 系が古くから知られているが、近年、cytochrome P450s (CYP)によって、hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) や epoxyeicosatrienoic acids (EETs)を産生する経路が脚光を浴びており、その生理作用が次第に明らかにされつつある。20-HETE は血管平滑筋細胞等で産生される強力な血管収縮物質で、腎臓内の微小動脈および、脳動脈において筋原性の反応を媒介していることが知られており、腎血流量および脳血流量の自動調節において、重要な役割を司っていることが報告されている。AA から 20-HETE を産生する ω 水酸化酵素として、ラットにおいては4つの異なる CYP4 の分子種が知られており、それら4つの分子種 CYP4A1-3、および CYP4A8 は全て腎臓や脳に発現していることが報告されている。また、ヒトに関しては CYP4F2、CYP4F3、CYP4A11 が主な 20-HETE 産生酵素であると考えられており、肝臓、腎臓、脳、好中球に発現している。これまでの報告では虚血性脳血管疾患、心臓の虚血再灌流障害、腎臓疾患、高血圧症、糖尿病、尿毒症、妊娠中毒症において 20-HETE の産生量が増加することが報告されているが、これらの病態時における 20-HETE の役割は未だに明らかになっていない。これまで、20-HETE 産生阻害

薬に関してはいくつか報告されているが、いずれも酵素阻害活性が弱く、特異性も有していない。そこで、20-HETE の生理作用を明らかにする目的で、AA-20-HETE 産生経路の特異的阻害薬を見出し、その特異性、酵素阻害機構を解析した。また、20-HETE の病態時における役割を明らかにする目的で、腎疾患モデルおよび脳血管疾患モデルにおける病態解析および 20-HETE 産生酵素阻害薬の薬理作用を検討した。これまでのところ、20-HETE 産生酵素を標的分子とした治療薬の開発は例がなく、本研究の検討結果から治療薬開発の可能性が見い出された。

大正製薬（株）医薬研究所において high throughput screening により、20-HETE 産生を強力かつ特異的に阻害する化合物 *N*-hydroxy-*N'*-(4-*n*-butyl-2-methylphenyl) formamidine (HET0016) を見出した。この HET0016 の 20-HETE 産生酵素に対する阻害活性は、自然発症高血圧ラットの腎臓から抽出したミクロソームを用いて AA 代謝試験を行った結果、その IC₅₀ 値は 35.2±4.4 nM と阻害活性が非常に強力であった。また、HET0016 は高い濃度域で EETs の産生をも阻害していたが、その IC₅₀ 値はおよそ 100 倍弱く、20-HETE 産生酵素に対する特異性を有していた。また、ラットと同様にヒト腎臓由来ミクロソームに対しても強力に 20-HETE 産生を阻害した (IC₅₀ 値: 8.9±2.7 nM)。HET0016 は主たる薬物代謝酵素である他の CYP 群やシクロオキシゲナーゼに対する阻害効果は極めて弱いことが明らかになり、HET0016 はラットおよびヒトにおいて強力かつ選択的な 20-HETE 産生酵素阻害薬であることが明らかとなった。

ラットリコンビナント CYP4A 酵素を用いて、3 つの分子種 (CYP4A1-3) の 20-HETE 産生に対する HET0016 の阻害活性を確認した結果、HET0016 の IC₅₀ 値はそれぞれ 17.7 nM、12.1 nM、22.3 nM であった。一方、CYP4A2、3 の 11,12-EET 産生に対する HET0016 の IC₅₀ 値はそれぞれ 12.7 nM、26.6 nM であった。HET0016 の CYP4A 酵素に対する特異性を調べるために、ラットリコンビナント CYP2C11 を用いた 11,12-EET 産生阻害試験を実施した結果、CYP2C11 のエポキシ化反応に対する HET0016 の阻害活性は CYP4A 酵素に対する阻害活性の約 30 倍高い値であった。リコンビナント CYP4A1 酵素を用いた酵素速度論的検討の結果、2 つの異なる HET0016 濃度 (20, 40 nM) におけるミカエリス定数が不変であったことから HET0016 が非競合阻害であることが明らかとなった。また、CYP4A1 の酵素量と酵素反応の初速度をプロットした結果、阻害様式は不可逆的な阻害を示していた。以上の結果から、

HET0016 は非競合阻害であり、不可逆的な阻害様式を持つ強力な 20-HETE 産生阻害薬であることが明らかになった。

Cyclosporine A (CsA) は、現在まで自己免疫疾患や臓器移植の際の免疫抑制剤として広く使用されている薬剤であるが、典型的な腎臓毒性を有する化合物でもある^(160,161)。これまでのところ、CsA による腎障害に対する治療薬は見出されていない。腎臓における血管収縮物質である 20-HETE がこの病態における腎機能障害の原因のひとつとなっている可能性があると考え、CsA 誘発腎障害モデルにおける 20-HETE の病態生理学的役割を明らかにする目的で、20-HETE の尿中排泄量と CYP4A 蛋白発現の経時的変化について解析した。CsA 処置により、血清中尿素窒素値、クレアチニン値は経日的に顕著な上昇を示した。CsA 処置後の尿中 20-HETE 排泄量に対する影響を測定した結果、尿中 20-HETE 排泄量は vehicle 投与群と比較して 15 倍も高い値を示した。また、CsA 処置後 20-HETE の尿中排泄量の増加と腎機能障害を示すパラメータの数値 (血清中クレアチニン値、尿素窒素、尿量) の上昇は非常によく相関していることが明らかとなった。さらに免疫組織化学染色を用いた検討を行った結果、9 日間の CsA 投与後での腎臓には組織病変を認め、腎皮質での抗 CYP4A 抗体の陽性反応は、近位尿細管や遠位尿細管に認められ、Vehicle 投与群と比較してタンパク質発現が亢進していた。以上の結果から、CsA 誘発腎障害モデルでは腎障害と 20-HETE の間に非常に密接の関係があることが証明された。そこで、CsA 誘発腎障害モデルラットにおける HET0016 の薬効評価試験を行ったが顕著な腎臓保護作用は認められず、CsA 誘発腎不全モデルの腎機能低下には 20-HETE が直接的な原因ではないことが明らかとなった。CsA 誘発腎障害ラットにおいては腎臓における ANGII や ET-1 の上昇により、CYP4A 酵素が誘導された結果として 20-HETE の産生が増加していたと考えられる。すなわち、20-HETE は他の原因物質と同様に血管収縮作用を発揮するだけでなく、尿細管においては Na⁺再吸収の阻害によって利尿効果を発揮し、また Na⁺-K⁺-ATPase を阻害することによって ATP の消費を抑制して細胞死を防ぐ効果も発揮している可能性があることが推察された。

新規 20-HETE 産生酵素阻害物質である HET0016 の類縁化合物 TS-011 のヒト、ラット腎臓由来ミクロソームおよびヒトリコンビナント CYP4A、CYP4F 酵素による 20-HETE 産生に対する阻害活性の諸性質を解明し、他の主な CYP 酵素や様々な受容体、広範囲にわたる酵素に対する選択性を確認したところ、新規 20-HETE 産生酵素阻害薬 TS-011 は HET0016

を含めても、これまで同定された 20-HETE 産生阻害薬の中で最も強力かつ特異性が高い阻害薬であることが明らかとなった。

最近の研究から虚血性脳梗塞の発症時には脳脊髄液中の AA 濃度が高くなっている⁽¹⁸⁴⁾ために 20-HETE の濃度が増加し、側副血流の動員を妨害することにより脳障害を引き起こしている可能性があると考えられる。そこで脳梗塞モデルにおける 20-HETE の役割を明らかにするために、脳虚血後の脳梗塞体積を指標に TS-011 の薬効評価を行った。その結果、TS-011 (0.01 mg/kg および 0.1 mg/kg) の投与により、脳虚血 1 時間、再灌流 24 時間後の脳梗塞体積を 35%減少させることが明らかとなった。また、ラットの頸動脈より 20-HETE を注入して脳に与える影響を検討した結果、20-HETE の頸動脈内投与が、脳虚血再灌流後に起こる脳梗塞と類似した梗塞層を形成することが明らかとなり、20-HETE により実験的脳梗塞が惹起されることを初めて明らかとした。さらに、脳梗塞モデルにおける脳組織内 20-HETE 濃度の変化を検討した結果、脳梗塞モデルにおける脳組織内 20-HETE 濃度は梗塞側が非梗塞側より、上昇していることが確認された。さらに、虚血再灌流 6 時間後においては、TS-011 投与群 (0.15 mg/kg および 0.3 mg/kg 投与)で、vehicle 投与群と比較して用量依存的に有意な脳組織中 20-HETE 濃度の低下効果を示すことを明らかにした。また、脳梗塞モデルラットの梗塞側と非梗塞側、両側の脳切片を免疫組織化学染色することにより、ラットの脳には CYP4A 酵素が存在しており、脳梗塞モデルにおける梗塞部位では脳血管における CYP4A 酵素の発現量が上昇していることが明らかとなった。TS-011 は梗塞側、非梗塞側ともに 20-HETE 産生抑制効果を発現し、それぞれ同等レベルまで脳組織中 20-HETE 濃度を低下させた。したがって、TS-011 は脳梗塞モデルにおいて、脳実質内の血管に存在し 20-HETE を産生している CYP4A 酵素を阻害することによって、20-HETE の脳内濃度を低減させていると推定された。以上のことから、TS-011 は脳梗塞モデルにおいて脳内に存在する 20-HETE 産生酵素 CYP4A を阻害し、20-HETE の脳内濃度を減少させることによって、脳梗塞体積の縮小作用を発現した可能性が高いことが示唆された。

本研究の結果から、20-HETE は脳梗塞モデルにおいて、脳梗塞発症原因の一つとなっている可能性が明らかとなった。また、20-HETE 産生酵素阻害薬 TS-011 は顕著な脳梗塞体積縮小作用を示したことから、脳梗塞治療剤として有用となる可能性があり、2005 年現在、米国にて臨床試験を実施中である。