

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 関 隆行

アラキドン酸代謝経路としてプロスタグランジンを産生する系およびロイコトリエンを産生する系が古くから知られているが、近年、チトクローム P450 (CYP)によって、ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (HETE) やエポキシエイコサトリエン酸 (EET) を産生する経路が注目されている。20-HETE は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腎血流量および脳血流量を調節している。本論文は、20-HETE の生理作用を明らかにするとともに、アラキドン酸-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、さらに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もので、序論とそれに続く 4 章からなる。

序論において、研究の背景を述べた後、第 1 章において大正製薬 (株) 医薬研究所で見出された 20-HETE 産生を強力かつ特異的に阻害する化合物 *N*-(4-*n*-butyl-2-methylphenyl)-*N*'-hydroxyformamide (HET0016)について阻害活性を検討した。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およびヒト腎臓由来ミクロソームを用いて HET0016 のアラキドン酸代謝試験を行った結果、強力な阻害活性を示した。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わかった。

第 2 章では、ラット組換え CYP4A 酵素を用いて阻害活性を解析している。3 つの酵素分子種 (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 値は極めて低い値 (12-22 nM) であった。一方、ラット組換え CYP2C11 を用いて 11,12-EET 産生阻害を調べた結果、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。ラットリコンビナント CYP4A1 酵素を用

いて阻害様式を検討した結果、非競合阻害であることがわかった。

第3章では、シクロスポリン A (CsA)誘発腎障害モデルラットにおける 20-HETE の尿中排泄量と CYP4A タンパク発現の経時的変化について解析している。CsA 処理により、血清中尿素窒素値、クレアチニン値は顕著に上昇した。また、その時の尿中 20-HETE 排泄量は対照と比較して 15 倍も高い値を示し、この 20-HETE の排泄量の増加と腎機能障害を示す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。そこで、CsA 誘発腎障害モデルラットに対する 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は 20-HETE が直接的な原因ではないことが明らかとなった。

第4章では、HET0016 の類縁化合物である TS-011 (*N*-(3-chloro-4-morpholin-4-yl)phenyl-*N'*-hydroxyformamide) の 20-HETE 産生阻害活性について検討している。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を検討したところ、TS-011 は HET0016 を含めて、それまでに同定されていた 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。次に、TS-011 の虚血性脳梗塞に対する効果を検討した。その結果、TS-011 の投与により、脳梗塞体積を 35%減少させることが明らかとなった。また、20-HETE のラット頸動脈内投与が、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 濃度は梗塞側が非梗塞側より、上昇しており、TS-011 投与によって用量依存的に脳組織中 20-HETE 濃度の低下がすることを明らかにした。したがって、TS-011 は脳梗塞治療剤として有用な薬剤となる可能性があり、現在、米国にて臨床試験を実施中である。

以上、本論文はアラキドン酸から 20-HETE への酸化反応を触媒する P450 酸化酵素に対する阻害薬を開発し、その新たな脳梗塞治療薬としての可能性を示したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。