

論文の内容の要旨

論文題目 新規気管支喘息治療薬としての CCR3 拮抗薬に関する研究

氏名 鈴木恵子

【序論】

気管支喘息は気管支のアレルギー炎症が慢性化した呼吸器疾患で、気道過敏性の亢進や可逆性の気道狭窄を起こして喘鳴や咳などの症状をきたす。気道や肺胞内には好酸球が集積した組織傷害像が認められ、病態の悪化・慢性化には好酸球が関与することが知られている。現在、長期管理の基本薬剤として吸入ステロイド、重症度に応じて経口ステロイドや $\beta 2$ 刺激薬、ロイコトリエン拮抗薬などの併用が用いられるが、副作用や有効率に課題があり、新規薬剤の開発が望まれている。

CC ケモカイン受容体 3 (CCR3) は好酸球に発現し、遺伝子欠損マウスなどの知見より、アレルギー炎症における好酸球の遊走制御に重要な役割を果たすことが示唆されている。アレルギーに関与する肥満細胞や Th2 リンパ球も CCR3 を発現するが、生体における機能は不明である。一方、Th1 リンパ球や B リンパ球、マクロファージ、好中球は CCR3 を発現しない。CCR3 に作用するケモカインは CCL11、CCL24、CCL26、CCL13、CCL5、CCL7 などが知られ、気管支喘息やアトピー性皮膚炎患者においてこれらの発現上昇が報告されている。このように、CCR3 は好酸球の遊走に関わり、喘息病態への関与が示唆されることから、好酸球選択的な創薬標的として注目される。

現在、CCR3 を標的とした薬剤として CCL11 中和抗体がアレルギー性結膜炎を適応に臨床開発中である。CCR3 拮抗薬はいくつかの低分子化合物が前臨床研究段階であるが、これまでに *in vivo* 作用を明らかにした報告は無く、新規治療薬としての有用性は証明されていない。本研究では、新規 CCR3 拮抗薬の薬理作用を解析することにより生体における CCR3 の機能を明らかにし、気管支喘息治療における新たな方向性を打ち出した。

【第1章】

生体における CCR3 の機能を明らかにすることを目的に、新規 CCR3 拮抗薬の *in vitro* および *in vivo* 薬理作用の解析を試みた。検討に用いた化合物 YM-355179 は、数万化合物のハイスループットスクリーニングにより見出したプロトタイプ YM-207086 の誘導体合成により創製した。

YM-355179 は CCL11 の CCR3 結合を IC_{50} 値 7.6 nM で抑制し、CCL11 誘発細胞内 Ca^{2+} シグナルを IC_{50} 値 8.0 nM で抑制した。さらに、細胞遊走および好酸球脱顆粒を IC_{50} 値それぞれ 24 および 29 nM で抑制し、細胞活性化機能を強力に抑制した。一方、他のケモカイン受容体 CCR1、CCR2、CCR4 あるいは CCR5 には作用を示さず、CCR3 選択性が示唆された。また、YM-355179 は CCL11 のみならず CCL24 や CCL26、CCL13、CCL5 を刺激とした際の Ca^{2+} シグナルや細胞遊走についても同等の強力な抑制作用を示した。病態では種々の CCR3 作動性ケモカインの関与が示唆されることから、臨床開発が先行している CCL11 中和抗体に比較して CCR3 拮抗薬は有効性に優れると考えられた。

ところで CCR3 拮抗薬には種差の問題があり、喘息モデル動物として汎用されるげっ歯類やモルモットでの評価は困難であることが分かった。しかしながら、サル好酸球を用いた検討を試みた結果、CCR3 拮抗薬の作用はヒトとサルで相関し、*in vivo* 評価にはサルを用いることが好ましいと判断することができた。以下、サル評価モデルを構築して CCR3 拮抗薬の薬理作用を解析した。

まず、サル *in vivo* において CCL11 が好酸球の遊走を誘発するかどうか検証することを目的にサル皮膚内好酸球浸潤モデルを構築した。CCL11 を背部に皮内注射し、4 時間後に皮膚を切除して好酸球浸潤の指標として好酸球性陽イオン蛋白 (ECP) をラジオイムノアッセイ法を用いて定量した。その結果、CCL11 濃度依存的に皮膚組織中の ECP 含有量が上昇し、サル *in vivo* において CCL11 が好酸球の遊走因子として機能することを初めて証明した。

さらに、気管支喘息の病態により即したモデルとしてサル肺内好酸球浸潤モデルを構築した。サルを麻酔して気管支ファイバースコープを挿入し、気管支の 4-5 分岐した地点で CCL11 を注入して経時的に肺胞洗浄を行い、ライトギムザ染色にて白血球を計測したところ、CCL11 は濃度依存的かつ時間依存的に肺への好酸球浸潤を誘発した。このモデルにおいて YM-355179 は好酸球数を有意に減少させ、CCR3 拮抗薬が好酸球の肺内浸潤を抑制することを初めて証明した。さらに、リンパ球および好塩基球・肥満細胞の浸潤数も CCR3 拮抗薬により減少し、生体においてこれら細胞の CCR3 が機能的な役割を果たしていることを初めて明らかにした。一方、単球・マクロファージや好中球の浸潤には影響を与えなかった。以上、CCR3 拮抗薬は気管支喘息の病態悪化に関与する白血球に選択的に作用することを明らかにし、優れた効果で安全性の高い新規気管支喘息治療薬として有望であることを示した。

【第2章】

第1章により、CCR3 が好酸球およびリンパ球、肥満細胞において機能的な役割を果たしていることが分かった。肥満細胞は即時型アレルギー反応の主な原因因子として、また好酸球・Tリンパ球は遅発型アレルギー反応の主な原因因子として知られる。そこで第2章では、アレルギー反応の成立に CCR3 が関与しているのではないかと仮説を立て、CCR3 拮抗薬を用いて検証を行った。検討には抗原誘発マウス耳炎症モデルを用い、化合物はマウス CCR3 拮抗作用を示す薬剤の探索により見出した YM-344031 を用いた。

卵白アルブミン (OVA) を抗原として免疫感作したマウスの耳皮内に OVA を注入すると、2 相性の炎症反応、すなわち 1 時間後および 24 時間後をピークとした耳介腫脹が観察された。CCR3 拮抗薬を投与したところ、即時型および遅発型アレルギー反応の両方が抑制されることが明らかになった。即時型反応の部分抑制は肥満細胞の遊走および活性化に CCR3 が関与することを示し、遅発型反応の強力な抑制

は好酸球やTリンパ球の遊走および活性化にCCR3が重要な役割を果たしていることを示し、従って、アレルギー反応の成立にCCR3が関与することを初めて証明するとともに、CCR3拮抗薬が気管支喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患に対する新規治療薬として有用であることを明らかにした。

【第3章】

ヒスタミンは血管透過性の亢進や気管支平滑筋の収縮を介して喘息病態に関与する。そこで、CCR3拮抗に加えて抗ヒスタミン作用を併せもつ薬剤は、好酸球および肥満細胞の遊走・活性化を抑制するとともに、IgEを介した肥満細胞由来のヒスタミンの作用も抑制できて喘息治療により好ましいのではないかと考えた。その仮説を検証するために、CCR3およびヒスタミンH₁受容体に対するdual拮抗作用を有する化合物YM-344484を用いて薬理作用を解析した。

YM-344484は第1章で用いたYM-355179と同等以上の強力なin vitroおよびin vivo CCR3拮抗作用を示し、さらにヒスタミンH₁受容体を介したCa²⁺シグナルに対して既存の抗ヒスタミン薬ケチフェンに比べて1/6倍の強さの拮抗作用を示した。一方、CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR3、ヒスタミンH₂、セロトニン5-HT_{1A}、5-HT_{2A}、ブラジキニンB₁、B₂、ロイコトリエンBLT₁、CysLT₁、ムスカリンM₁、M₂、M₃およびタキキニンNK₁受容体に対する作用は認められず、CCR3およびヒスタミンH₁受容体に選択的な新規dual拮抗薬であることが示唆された。

ヒスタミン誘発マウス血管透過性亢進モデルにおいてYM-344484は用量依存的に血管透過性亢進を抑制し、in vivoにおける強力な抗ヒスタミン作用を示した。ヒスタミンによる血管透過性の亢進は気道壁の浮腫をもたらして気道狭窄、気道過敏性の亢進に寄与するとともに、気道への血漿蛋白を漏洩させて粘液の粘性を増加させて喘息の病態を悪化させる。したがって、ヒスタミン誘発の微小血管漏洩に対するYM-344484の抑制作用は喘息治療に有益であると考えられた。さらに、YM-344484は抗原誘発マウス喘息モデルにおいて肺内好酸球浸潤を強力に抑制した。このとき好中球および単核球には影響を与えず、好酸球選択的な気道炎症の抑制が示された。血管透過性亢進の抑制および喘息モデルでの細胞浸潤抑制の結果を総合して考察すると、CCR3およびヒスタミンH₁受容体に対するdual拮抗薬は気道狭窄や気道過敏性の亢進の抑制+気道炎症の抑制効果が期待でき、喘息治療に好ましいと考えられた。

【総括】

本研究ではサルin vivoモデルを構築することにより、今まで明らかにされていなかったCCR3拮抗薬のin vivo薬理作用を解析し、CCR3が生体において好酸球やリンパ球、好塩基球・肥満細胞の遊走・活性化に関与することを明らかにした。一方、好中球やマクロファージには作用しないことを証明し、選択的な創薬標的として好ましいことを示した。さらに、CCR3は即時型および遅発型アレルギー反応の成立に関与することを明らかにし、CCR3拮抗薬は優れた効果で安全性の高い新規気管支喘息治療薬として有用であることを明らかにした。さらなる発展形として、CCR3およびヒスタミンH₁受容体に対するdual拮抗薬の有益性を明らかにし、気管支喘息治療における新たな方向性を打ち出した。