

論文の内容の要旨

論文題目: 4型および5型環状ヌクレオチド・ホスホジエステラーゼ (type IV and type V cyclic nucleotide phosphodiesterases) 阻害剤の生化学的および薬理的解析

氏名: 廣瀬 了

<Introduction>

細胞内の環状ヌクレオチド濃度は、cAMP、cGMPを対応するヌクレオチド 5'-三リン酸から合成するアデニル酸シクラーゼ、グアニル酸シクラーゼと、cAMP、cGMPを分解、不活性化する環状ヌクレオチド・ホスホジエステラーゼ(PDE)の、2つの酵素群で制御されている。現在、哺乳動物において、PDEは基質特異性、反応速度、活性制御因子、阻害剤に対する感受性、および遺伝子の塩基配列の相同性から、11のファミリーに分類されている(Table 1)。近年、PDEに関する分子生物学的および薬理的な知見の増加し、非選択的なPDE阻害剤の副作用を軽減し、有効性を高めるために、各PDEファミリーに選択的な阻害剤が活発に探索されている。本研究では、気管支喘息への適用のためにPDE4 (low K_m , cAMP-specific PDE)阻害剤の、勃起不全および狭心症への適用のためにPDE5 (cGMP-binding, cGMP-specific PDE)阻害剤の研究を行なった。

<PDE4 阻害剤の探索>

PDE4は気管平滑筋と炎症細胞の両方に発現しており、初期の選択的PDE4阻害剤rolipramは気管平滑筋弛緩作用および抗炎症作用を有することが示されている。これらの根拠から、PDE4阻害剤は、気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、アトピー性皮膚炎およびその他の炎症性疾患を対象に探索されてきた。しかし、PDE4阻害剤は、いくつかの認容できない副作用(悪心、嘔吐、下痢など)を惹起するため、未だ臨床で用いられているものはない。特に、嘔吐惹起は、中枢神経系のPDE4を阻害することが原因のひとつであると考えられている。最近の研究で、rolipramはPDE4酵素阻害活性($IC_{50} \approx 1 \mu M$)よりも高い親和性でPDE4酵素に結合する($K_D \approx 3 nM$)ことが示された。この事実から、PDE4はrolipramに対して高親和型、低親和型の2つの構造(conformer)で存在しているという仮説が提示された。低親和型PDE4 conformerは従来の $[^3H]$ -cAMPの分解活性により、一方、高親和型PDE4 conformerは $[^3H]$ -rolipram結合実験により検出される。高親和型PDE4 conformerは、発現の組織分布においては、高親和性rolipram結合部位とも呼ばれる。高親和性rolipram結合部位は脳に多く発現しているため、PDE4阻害剤は本結合部位の占有(高親和型PDE4 conformerの阻害)により嘔吐を惹起している可能性がある。そこで、PDE4阻害剤で惹起される嘔吐の作用機作を明らかにするために、*in vivo*の動物モデルを用いて高親和性rolipram結合部位の嘔吐への関与を調べ、また、*in vitro*でのPDE4阻害剤の神経細胞に対する作用を検討した。

最初に、スンクス(*Suncus murinus*: ジャコウネズミ)を用いて *ex vivo* $[^3H]$ -rolipram 結合実験を行なった。スン

Table 1 Summary of PDE isozyme families

Family (No. of genes)	Characteristics	K_m (μM) cAMP; cGMP	Tissue distribution	Examples of inhibitors
PDE1 (3)	Ca ²⁺ /calmodulin-stimulated	1-30; 3	heart, brain, lung, smooth muscle	vinpocetin, zaprinast
PDE2 (1)	cGMP-stimulated	50; 50	adrenal gland, heart, lung, liver, platelets	EHNA
PDE3 (2)	cGMP-inhibited, cAMP-specific	0.2; 0.3	heart, lung, liver, adipose tissue, platelets, cardiac muscle	milrinone, cilostamide
PDE4 (4)	cAMP-specific, cGMP-insensitive	4; >3000	kidney, brain, liver, lung, immunocytes	rolipram, denbufylline, picamilast, CDP840
PDE5 (1)	cGMP-specific	150; 1	lung, platelets, kidney, vascular smooth muscle	sildenafil, zaprinast, dipyridamole, E4021
PDE6 (3)	cGMP-specific	2000; 60	photoreceptors	sildenafil, zaprinast, dipyridamole, E4021
PDE7 (2)	cAMP-specific, high-affinity	0.2; >1000	T lymphocytes, skeletal muscle, brain, heart, pancreas	none selective
PDE8 (2)	cAMP-specific, IBMX-insensitive	0.06; not active	testis, ovary, liver, skeletal muscle, heart, kidney, small intestine	none selective
PDE9 (1)	cGMP-specific, IBMX-insensitive	not active; 0.17	kidney, liver, lung, brain	none selective
PDE10 (1)	cAMP-specific	0.05; 3.0	brain, testis	none selective
PDE11 (1)	dual-specificity	0.7; 0.5	skeletal muscle, kidney, liver	none selective

well-known non-selective inhibitor; caffeine, theophylline, pentoxifylline, 3-isobutyl-1-methylxanthine. reference: Essayan (2001). *J. Allergy Clin. Immunol.*, 108, 671-680.

Table 2 Inhibition of rat PDE4 activity, and affinity to the high-affinity rolipram binding site in membranes of *S. murinus* and rat

	Inhibition of PDE4 activity; IC ₅₀ (nM)	Inhibition of [³ H]-rolipram binding; K _i (nM)	
		rat	<i>S. murinus</i>
denbufylline	850 ± 70	6.5 ± 1.0	6.4 ± 0.2
Ro20-1724	14,000 ± 3,000	26 ± 2	N.T.
rolipram	1,200 ± 100	2.9 ± 0.3	2.5 ± 0.5
piclamilast	1.1 ± 0.1	0.67 ± 0.08	0.79 ± 0.19
CDP840	16 ± 1	13 ± 3	10 ± 3
cilomilast	170 ± 5	40 ± 9	N.T.
YM976	4.3 ± 0.8	13 ± 2	N.T.
BAY198004	1,500 ± 200	15 ± 1	N.T.
roflumilast	0.49 ± 0.01	0.77 ± 0.18	N.T.
AWD12281	8.1 ± 1.6	61 ± 14	N.T.
KF19514	290 ± 30	0.74 ± 0.05	0.92 ± 0.25

PDE4 activity was evaluated with 1 μM cAMP. [³H]-Rolipram binding assay was conducted by incubation with 2 nM [³H]-rolipram for 4 h at 30°C. Compounds designated with bold letters indicate those used in the *ex vivo* [³H]-rolipram binding assay. Each value represents the mean ± s.e. mean of 3 to 6 experiments. N.T.: not tested.

クスは食虫目の1種であり、嘔吐の研究によく使用される。*In vitro* の解析から、[³H]-rolipram はスクス前脳の細胞膜画分に高い親和性で結合し、その結合定数、最大結合量はラットの脳とほぼ同一であった。5つの PDE4 阻害剤 (PDE4 酵素阻害活性の強さに大きな差を有し、[³H]-rolipram 結合阻害活性の強さもある程度の差を示す: Table 2) をスクスに腹腔内投与し、嘔吐惹起作用を測定した。その結果、5化合物すべてが、スクスで嘔吐を惹起した (Table 3)。そこで、嘔吐を惹起する薬物量をスクスに投与した後、脳を摘出し、*in vivo* での薬物による脳の高親和性 rolipram 結合部位の占有を調べた。5つの化合物は、脳の細胞膜画分の *ex vivo* [³H]-rolipram 結合容量を投与量依存的に減少させた (Figure 1, Table 3)。PDE4 阻害剤の嘔吐を惹起する投与量と *in vivo* で高親和性 rolipram 結合部位を占有する投与量には、高い相関性が認められた (Figure 2)。この結果は、PDE4 阻害剤で惹起される嘔吐は、脳の高親和性 rolipram 結合部位の占有 (高親和型 PDE4 conformer の阻害) が原因であることを強く示唆するものである。したがって、PDE4 阻害剤の嘔吐惹起作用を最小限に抑えるために考えられるひとつの方法は、高親和性 rolipram 結合部位への親和性が *in vitro* で弱い化合物を探索することである。

次に、11個の PDE4 阻害剤 (構造、および PDE4 酵素阻害活性の強さと [³H]-rolipram 結合阻害活性の強さに関する生化学的性質が多様である: Table 2) を選択し、これらの化合物の神経細胞内 cAMP 量に対する作用を検討した (Figure 3, Table 4)。11個の化合物は、いずれもβアドレナリン受容体作動薬で惹起されるラット大脳皮質神経細胞内の cAMP 量を増加させた。PDE4 阻害剤の cAMP 量上昇作用は、化合物の [³H]-rolipram 結合阻害活性の強さと相関したが、PDE4 酵素阻害活性の強さとは相関しなかった (Figure 4A, B)。したがって、高親和型 PDE4 conformer が、大脳皮質神経細胞内の cAMP 量の調節に関与していることが示唆された。高親和性 rolipram 結合部位は脳内に広範に分布していることから、嘔吐惹起に関与しているとされる脳幹神経核の神経細胞においても、cAMP 量は高親和型 PDE4 conformer によって調節されている可能性が考えられ

Table 3 Emetic activity and inhibition of *ex vivo* [³H]-rolipram binding of PDE4 inhibitors in *S. murinus*

	Dose (mg kg ⁻¹ , i.p.)	Incidence of vomiting episodes	Emetic activity; ED ₅₀ (mg kg ⁻¹ , i.p.)	Inhibition of <i>ex vivo</i> [³ H]-rolipram binding; ID ₃₀ (mg kg ⁻¹ , i.p.)
rolipram	0.5 0.25 0.1	5/ 5 4/ 5 1/ 5	0.16	0.21 ± 0.05
piclamilast	5 2.5 1	10/10 6/10 2/10	1.8	7.2 ± 2.6
CDP840	30 20 10	8/ 9 3/10 2/15	20	11 ± 1
KF19514	0.1 0.05 0.025 0.01	10/10 7/10 5/10 0/10	0.030	0.020 ± 0.001

Emesis was studied by incidence of vomiting incidence (number of responders per number of animals tested) of emesis episodes. After administration of the drug, the animals were watched continuously for 120 min. ED₅₀ values were evaluated by analysis of percent occurrence of emetic incidence versus log dose presentation. ID₃₀ values of inhibition of *ex vivo* [³H]-rolipram binding are calculated from data in Figure 1 and expressed as the means ± s.e. mean.

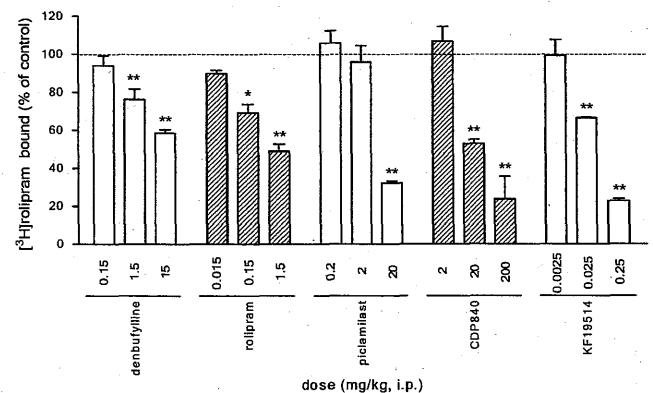


Figure 1 Inhibition of *ex vivo* [³H]-rolipram binding to brain membrane of *S. murinus* by the PDE4 inhibitors. Drugs were intraperitoneally administered 30 min before preparation of brain membrane fractions. [³H]-Rolipram binding assay was conducted by incubation with 3 nM [³H]-rolipram for 30 min at 30°C. Results are expressed as the means ± s.e. mean of 3 experiments. The asterisks, * and **, indicate significant differences at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively, compared with vehicle-administered animals (Dunnett's test).

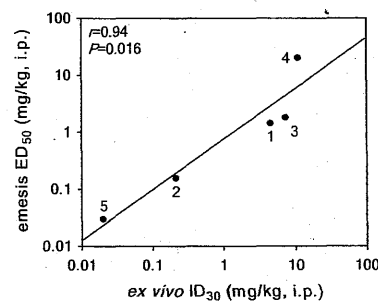


Figure 2 Correlation between emetic activity of the PDE4 inhibitors and inhibitory activity of *ex vivo* [³H]-rolipram binding. The compounds included in these analyses are as follows: denbufylline (1), rolipram (2), piclamilast (3), CDP840 (4), KF19514 (5). The diagonal line represents the line of unity. The inset values, r and P , indicate the correlation coefficient and the probability of error of the Pearson's regression analysis.

Table 4 Pharmacological effect of PDE4 inhibitors on rat cortical neurons and mouse T-lymphocytes

	cAMP accumulation in neurons; EC ₅₀ (nM)	inhibition of allo-MLR; IC ₅₀ (nM)
denbutylline	4,200	340 ± 110
Ro20-1724	950	1,600 ± 400
rolipram	140	77 ± 23
piclamilast	150	0.83 ± 0.08
CDP840	2,000	23 ± 5
cilomilast	7,300	300 ± 100
YM976	460	20 ± 2
BAY198004	11,000	3,000 ± 1,100
roflumilast	56	4.4 ± 1.2
AWD12281	5,900	59 ± 6
KF19514	43	20 ± 10

EC₅₀ value of cAMP accumulation was calculated from average of cAMP contents from 6 experiments. IC₅₀ values of inhibition of allo-MLR are calculated from each of three experiments, respectively, and described as the means ± s.e.mean.

る。一方、これらの化合物のリンパ球の増殖抑制作用も解析した(Table 4)。リンパ球混合反応(allo-MLR)抑制作用は、化合物の PDE4 酵素阻害活性の強さと³H]-rolipram 結合阻害活性の強さの両方に相関した(Figure 4C, D)。このことから、リンパ球の増殖には、低親和型 PDE4 conformer と高親和型 PDE4 conformer の両方が関与していることが推測される。これらの結果は、単に化合物の高親和性 rolipram 結合部位への親和性を低下させるだけでは、中枢作用を抗炎症作用から分離するのは困難であることを示している。

本研究の結果から、PDE4 阻害剤の嘔吐惹起作用を低下させ、さらに抗炎症作用との分離を図るためには、脳透過性のない化合物を見出すことが有効であることが示唆される。さらに、脳透過性に関わらず、脳の高親和性 rolipram 結合部位を *in vivo* で占有しない化合物の探索研究も有意義である。
<PDE5 阻害剤の探索>

PDE5 は、主に血管平滑筋、気管平滑筋および血小板に発現している。PDE5 阻害剤は、抗血小板作用、弱い強心作用、および血管平滑筋弛緩作用を有することが示されている。よく知られた PDE5 阻害剤 sildenafil は、陰茎海綿体の平滑筋を弛緩させ、男性の勃起不全の治療に有効である。血小板凝集反応は、PDE5 阻害剤の強さを評価するのに便利な測定系である。ヒトおよびウサギの血小板は、専ら PDE3 (cGMP-inhibited, cAMP-specific PDE)と PDE5 を発現している。細胞内の cGMP あるいは cAMP の上昇により血小板の凝集は抑制され、選択的 PDE5 阻害剤の血小板凝集抑制作用は cGMP 量の増加を介していることがわかっている。

PDE5 阻害剤の探索から、KF31327 (3-ethyl-8-[2-(4-hydroxymethyl-piperidino)benzylamino]-2,3-dihydro-1H-imidazo[4,5-g]quinazoline-2-thione dihydrochloride)を見出した(Figure 5)。そこで、KF31327 の先行して開発されている sildenafil に対する違いを明確にし、疾患治療に優位な点を見出すことにした。KF31327 は、PDE5 を sildenafil よりも強く阻害した(Table 5)。反応速度論的解析から、KF31327 は非拮抗的阻害剤であった(K_i=0.16 nM)。KF31327 は PDE5 に対して高い選択性を示したが、PDE3 に対して IC₅₀=38 nM と弱いながらも阻害活性を有していた。次に、collagen で惹起されるウサギ血小板凝集反応に対する KF31327 と sildenafil の抑制作用を比較した。Nitroglycerin

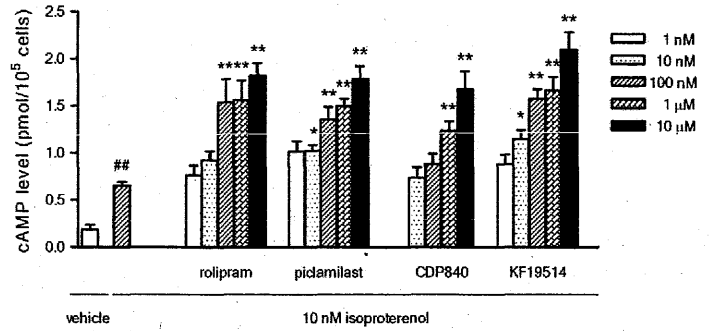


Figure 3 Effects of PDE4 inhibitors on the intracellular cAMP level in cultured cortical neurons. Cells were incubated for 10 min at room temperature with various concentrations of the PDE4 inhibitors and 10 nM isoproterenol. Results are presented as the means ± s.e.mean of 6 experiments. The symbols, # and ##, indicate significant differences at $P < 0.01$ compared with vehicle-treated cells and 10 nM isoproterenol-treated cells, respectively (Student's unpaired t-test). The asterisks, * and **, indicate significant differences at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively, compared with isoproterenol-treated cells (Dunnett's test).

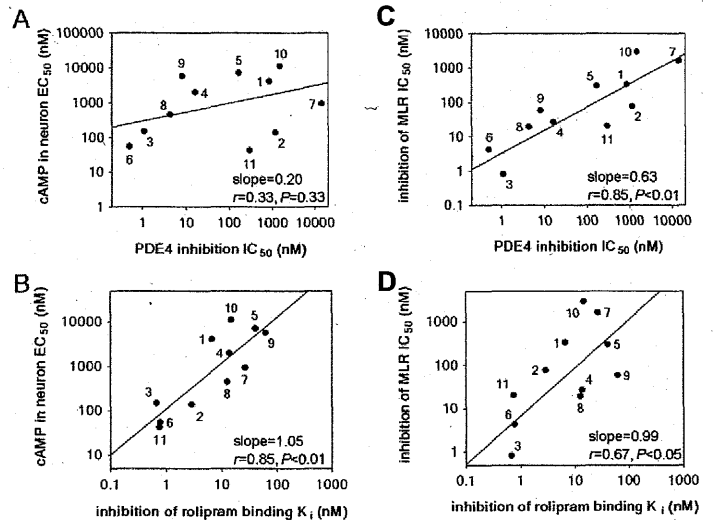


Figure 4 Comparison of pharmacological activities of PDE4 inhibitors in elevation of cAMP levels in cortical neurons (A, B) and inhibition of mouse allo-MLR (C, D) with inhibition of rat PDE4 catalytic activity (A, C) or displacement of [³H]-rolipram binding to rat brain membrane (B, D). The compounds included in these analyses are as follows: denbutylline (1), rolipram (2), piclamilast (3), CDP840 (4), cilomilast (5), roflumilast (6), Ro20-1724 (7), YM976 (8), AWD12-281 (9), BAY19-8004 (10) and KF19514 (11). The diagonal line represents the line of approximation. The inset values, r and P , indicate the correlation coefficient and the probability of error of the Pearson's regression analysis.

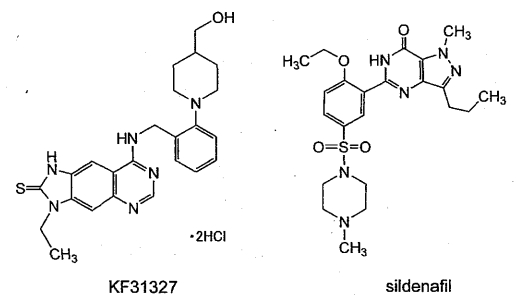


Figure 5 Structure of KF31327 and sildenafil

(一酸化窒素産生剤)存在下で、KF31327はcollagenで惹起されるウサギ血小板の凝集を0.1 μM以下の濃度で抑制し、その作用はsildenafilと同等以上であった(Figure 6A)。このときいずれの化合物によっても細胞内のcGMP量は上昇し、cAMP量は変化しなかった(Figure 7A)。したがって、nitroglycerin存在下では、KF31327による血小板の凝集抑制作用はcGMP量の上昇が原因であると考えられる。一方、nitroglycerin非存在下では、KF31327は血小板の凝集抑制に高濃度(1, 10 μM)を必要とし、このとき細胞内の環状ヌクレオチド量はいずれも上昇した(Figure 6B, 7B)。これに対して、10 μM sildenafilは細胞内のcGMP量を上昇させたにもかかわらず、血小板の凝集を抑制しなかった。この結果は、nitroglycerin非存在下でのKF31327による血小板の凝集の抑制作用には、cAMP量の上昇が関与していると考えられる。Sildenafilは細胞内cAMP量を上昇させなかったことから、高濃度のKF31327の作用はPDE3阻害が原因である可能性がある。血管平滑筋、血小板を含むほとんどの心血管系の組織ではPDE3とPDE5の両方が発現しており、cAMPとcGMPは血管拡張作用、抗血小板作用の伝達物質として協調的に働いていると推測されている。したがって、弱いPDE3阻害作用を有する非拮抗的な強いPDE5阻害剤というKF31327の特性は、多くの心血管系の病態に有効である可能性がある。

Table 5 PDE inhibition profiles of KF31327 and sildenafil in each PDE isozyme (PDE1-5) fraction prepared from canine trachea and PDE6 prepared from rat retina

	Inhibition of PDE activity; IC ₅₀ (nM)	
	KF31327	sildenafil
PDE1	380 ± 30	780 ± 110
PDE2	670 ± 120	80,000 ± 5,000
PDE3	38 ± 3	35,000 ± 2,000
PDE4	800 ± 50	22,000 ± 4,000
PDE5	0.074 ± 0.005	2.7 ± 0.2
PDE6	0.37 ± 0.005	62 ± 3

IC₅₀ values were determined using 1 μM [³H]-cAMP as substrate for PDE1, PDE2, PDE3 and PDE4 and 1 μM [³H]-cGMP as substrate for PDE5 and PDE6. The values except for PDE6 represent the means ± s.e.mean of 3 experiments.

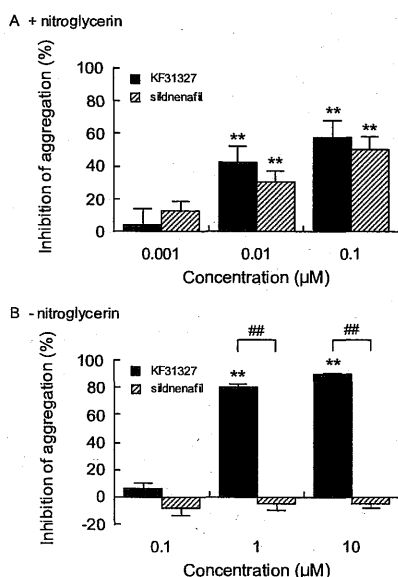


Figure 6 Inhibitory effects of KF31327 (gray bars) and sildenafil (hatched bars) on collagen-induced platelet aggregation in rabbit washed platelets in the presence (A) and absence (B) of nitroglycerin. Platelets were pre-incubated for 5 min with 10 μM nitroglycerin and each of drugs at indicated concentration, and then challenged with 2 μg ml⁻¹ of collagen for 10 min. Values represent mean ± s.e.mean (n=4). **: P<0.01 compared with vehicle. #: P<0.01 KF31327 vs. sildenafil. KF31327 (A and B) and sildenafil (A) concentration dependently inhibited platelet aggregation verified by max-t test (P<0.01).

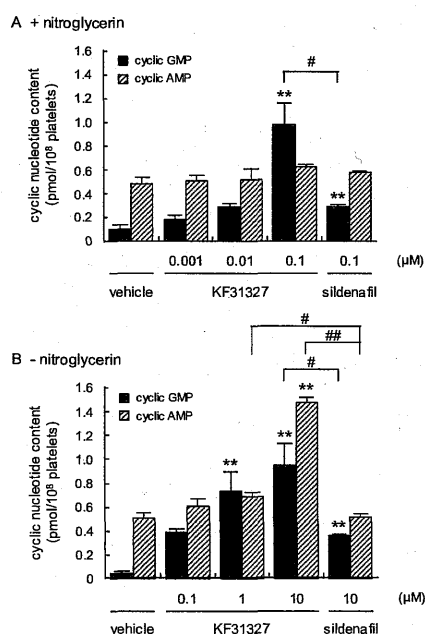


Figure 7 Cyclic nucleotide levels in rabbit washed platelets after 5 min incubation with drugs in the presence (A) or the absence (B) of 10 μM nitroglycerin just before the induction of aggregation by collagen. Values are presented as means ± s.e.mean (n=3). **: P<0.01 compared with vehicle. # And #: P<0.05 and P<0.01 KF31327 vs. sildenafil. cGMP level (A and B) and cAMP level (B) were concentration dependently increased by treatment of KF31327 verified by max-t test (P<0.05).

<まとめ>

PDE4阻害剤の探索において、*ex vivo*の実験により副作用の嘔吐惹起と脳内高親和性rolipram結合部位の占有(高親和型PDE4 conformerの阻害)が相関していることを証明した。さらに、*in vitro*の実験により神経細胞内のcAMP量の調節には、高親和型PDE4 conformerが関与していることを示した。しかし、単に生化学的に高親和性rolipram結合部位への親和性を低下させるだけでは副作用と抗炎症作用の分離は困難であり、*in vivo*で脳の高親和性rolipram結合部位を占有しない化合物の探索というスクリーニング方法を提示することができた。一方、PDE5阻害剤の探索においては、新規化合物KF31327を見出しsildenafilと比較した。KF31327は非拮抗的PDE5阻害剤で、sildenafilよりも効果的に血小板内cGMP量を上昇させ、sildenafilと同等以上の血小板凝集抑制作用を示した。また、KF31327は弱いPDE3阻害作用を有したPDE5阻害剤であり、心血管系の病態に有効である可能性があることを示した。