

<はじめに>

哺乳動物において、環状ヌクレオチド・ホスホジエステラーゼ(PDE)は、11のファミリーに分類されている。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者に発現しており、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(高親和性rolipram 結合部位)。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、嘔吐の動物モデルおよび初代培養神経細胞を用いて高親和性rolipram 結合部位の嘔吐への関与を検討した。

最初に、スunks (*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。In vitro の解析から、 $[^3H]$ -rolipram の前脳細胞膜画分への結合において、その結合定数、最大結合量は、スunksとラットでほぼ同一であった。5つのPDE4阻害剤(Table 1)をスunksに腹腔内投与し、嘔吐惹起作用を測定した。その結果、5つの化合物すべてが、スunksで嘔吐を惹起した。そこで、嘔吐を惹起する薬物量をスunksに投与した後に脳を摘出し、*in vivo*での薬物による脳の細胞膜画分の高親和性rolipram 結合部位の占有を調べた。5つの化合物は、*ex vivo* $[^3H]$ -rolipram 結合容量を投与量依存的に減少させ、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 1)。したがって、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)が原因であることが示唆された。この結果から、PDE4 阻害剤の嘔吐惹起作用を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と結論が得られた。

次に、11個のPDE4阻害剤を選択し、 β アドレナリン受容体作動薬で

Table 1 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 $[^3H]$ -rolipram binding; K_i (nM)	
		rat	<i>S. murinus</i>
denbutylline	850 \pm 70	6.5 \pm 1.0	6.4 \pm 0.2
Ro20-1724	14,000 \pm 3,000	26 \pm 2	N.T.
rolipram	1,200 \pm 100	2.9 \pm 0.3	2.5 \pm 0.5
piclamilast	1.1 \pm 0.1	0.67 \pm 0.08	0.79 \pm 0.19
CDP840	16 \pm 1	13 \pm 3	10 \pm 3
cilomilast	170 \pm 5	40 \pm 9	N.T.
YM976	4.3 \pm 0.8	13 \pm 2	N.T.
BAY198004	1,500 \pm 200	15 \pm 1	N.T.
roflumilast	0.49 \pm 0.01	0.77 \pm 0.18	N.T.
AWD12281	8.1 \pm 1.6	61 \pm 14	N.T.
KF19514	290 \pm 30	0.74 \pm 0.05	0.92 \pm 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 $^{\circ}C$. Compounds designated with bold letters indicate those used in the *ex vivo* $[^3H]$ -rolipram binding assay. Each value represents the mean \pm s.e.m. of 3 to 6 experiments. N.T.: not tested.

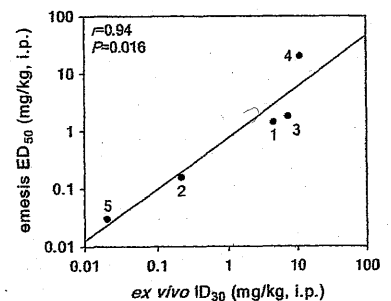


Figure 1 Correlation between emetic activity of the PDE4 inhibitors and inhibitory activity of *ex vivo* $[^3H]$ -rolipram binding. The compounds included in these analyses are as follows: denbutylline (1), rolipram (2), piclamilast (3), CDP840 (4), KF19514 (5). The diagonal line represents the line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

惹起されるラット大脳皮質神経細胞内の cAMP 量の上昇に対する作用を検討した。その結果、11個の化合物の cAMP 量上昇作用は、化合物の $[^3\text{H}]$ -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 2A, 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る。一方、これらの化合物のTリンパ球の増殖抑制作用(allo-MLR 抑制)は、化合物の PDE4 酵素阻害活性の強さと $[^3\text{H}]$ -rolipram 結合阻害活性の強さの両方に相関した(Figure 2C, D)。このことから、T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。

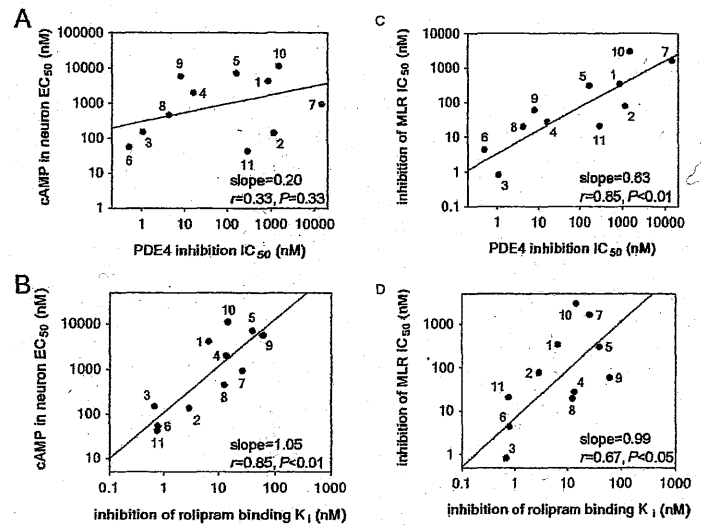


Figure 2 Comparison of pharmacological activities of PDE4 inhibitors in elevation of cAMP levels in cortical neurons (A, B) and inhibition of mouse allo-MLR (C, D) with inhibition of rat PDE4 catalytic activity (A, C) or displacement of $[^3\text{H}]$ -rolipram binding to rat brain membrane (B, D). The compounds included in these analyses are as follows: denbufylline (1), rolipram (2), picamilast (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.

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た。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ことが判った。

<PDE5 阻害剤の探索>

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おり、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。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)が見出された。そこで、先行して開発されている sildenafil に対する KF31327 の違いを明確にし、疾患治療に優位な点を見出すことを試みた。

KF31327 ($\text{IC}_{50}=0.074$ nM)の PDE5 阻害活性は、sildenafil ($\text{IC}_{50}=2.7$ nM)よりも強かった。反応速度論的解析から、KF31327 は非拮抗的阻害剤であった。KF31327 は PDE5 に対して高い選択性を示したが、PDE3 に対して弱いながらも阻害活性を有していた($\text{IC}_{50}=38$ nM)。血小板凝集反応は、PDE5 阻害剤の強さを評価するのに好適な測定系である。ヒトおよびウサギの血小板は、PDE5 と PDE3 (cGMP-inhibited, cAMP-specific PDE)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る。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 (一酸化窒素産生剤)存在下で、KF31327 は血小板の凝集を 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 3A)。この時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 4A)。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 ($1\sim 10$ 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 3B, 4B)。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、非拮抗的阻害による cGMP のレベル、分布の変化、または弱い PDE3 阻害作用による cAMP 量の上昇が影響していると考えられた。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ことが判った。

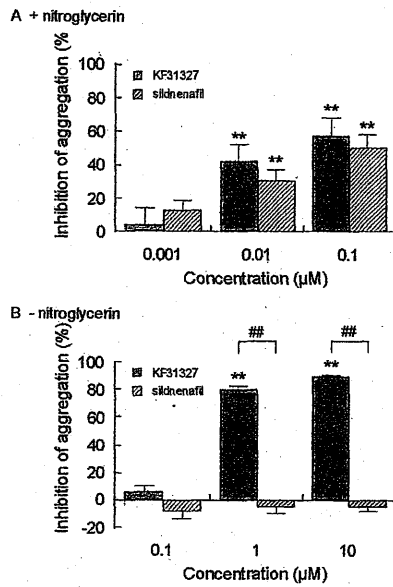


Figure 3 Inhibitory effects of KF31327 (gray bars) and sildenafil (hatched bars) on collagen-induced platelet aggregation in rabbit washed platelets in the presence (A) and absence (B) of nitroglycerin. Platelets were pre-incubated for 5 min with 10 μM nitroglycerin and each of drugs at indicated concentration, and then challenged with 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of collagen for 10 min. Values represent mean \pm 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).

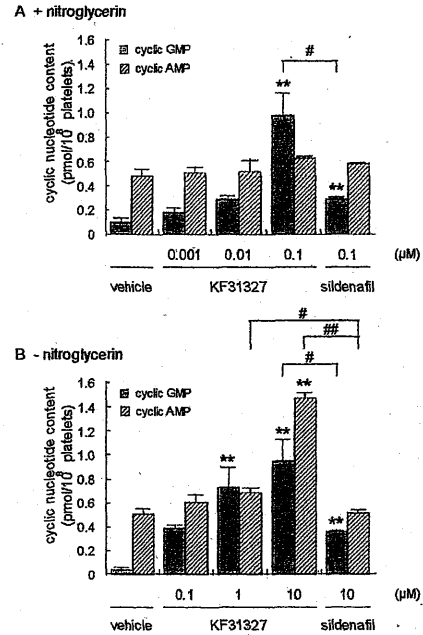


Figure 4 Cyclic nucleotide levels in rabbit washed platelets after 5 min incubation with drugs in the presence (A) or the absence (B) of 10 μM nitroglycerin just before the induction of aggregation by collagen. Values are presented as means \pm s.e.mean (n = 3). **: P<0.01 compared with vehicle. # And ##: 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).

以上、本研究は 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示し、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。その結果、*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新しいスクリーニングの指標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 が非拮抗的 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 以上の血小板凝集抑制作用を示すことを明らかにし、心血管系の病態に有効である可能性があることを明らかにした。

これらの結果は PDE を標的とする薬剤の開発に大きく貢献するものであり、博士(薬学)の学位論文として十分な価値があるものと認められる。