

新規PDE4阻害剤XT-611の骨芽細胞形成作用機序の解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/16272

氏名	山本新也
生年月日	
本籍	愛知県
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第333号
学位授与の日付	平成12年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	新規PDE4阻害剤XT-611の骨芽細胞形成作用機序の解析
論文審査委員(主査)	横川 弘一(研究科・助教授)
論文審査委員(副査)	正宗 行人(研究科・教授) 大熊 勝治(研究科・教授) 鈴木 永雄(研究科・教授) 宮本 謙一(医病院・教授)

学位論文要旨

〈Abstract〉

1,6-Heterocycle-condensed purines were designed and synthesized based on the study of structure-activity relationship of alkylxanthine derivatives. Among them, 3,4-dipropyl-4,5,7,8-tetrahydro-3*H*-imidazo [1,2-*i*]-purin-5-one (XT-611) showed highly potent and most selective inhibitory activity against PDE 4 isoenzyme. This study investigated the effects of XT-611 on the osteoblast formation in the *in vitro* bone marrow culture system. When assayed mineralized nodules by staining with Alizarin red S 16 days after the culture, XT-611 increased the number of mineralized nodule by treatment on day 3 for 24 hr, but not by treatment in later stage, day 7 for 24 hr. XT-611 also increased ALP-positive cell nodule by treatment on day 3 for 24 hr. During culture of bone-marrow cells, prostaglandin (PG) E₂ production was increased with a peak at day 4 and then gradually decreased, but XT-611 inhibited the decrease in the PGE₂ production by treatment on day 3 for 24 hr. Moreover, XT-611 enhanced the expression of COX-2 mRNA, but not of COX-1 mRNA. The spontaneous PGE₂ production, the effects of XT-611 on PGE₂ production and mineralized nodule formation were almost completely inhibited by cyclooxygenase (COX) inhibitors, especially COX-2 inhibitors. The effect of XT-611 was significantly inhibited by an inhibitor of protein kinase A, H-89. On the other hand, the tracheal-relaxant activity of heterocycle-condensed purines was closely correlated with their PDE 4-inhibitory activity. These compounds did not have any positive-chronotropic action or adenosine antagonistic action in isolated heart preparations, which are the particular adverse reactions of alkylxanthines. Among them, XT-611

did not cause emesis in *Suncus murinus*, which are most important adverse reaction of PDE 4 inhibitors.

This study indicated that XT-611, which showed selective and potent PDE 4 inhibitory activity, exhibited osteoblast formation by synergistic effect with PGE₂. Because of lacking some adverse reactions known in other PDE 4 inhibitors, this compound seems to be a candidate for therapeutic drug of the bone loss diseases.

近代社会において骨粗鬆症は、その患者数並びに社会的な重要性からみて、加齢に伴う骨疾患の中で主要な疾患となっている。骨粗鬆症は、骨量（骨塩量+骨基質量）の減少とそれに伴う微細な骨構造の破壊により腰痛や骨折を引き起こし、高齢者の寝たきり状態の原因となり、結果、患者の Quality of Life を著しく低下させる。そのため近年、その予防と治療に対する関心と社会的な要求が急速に高まってきており、各種の骨粗鬆症治療薬の開発が行われている。

骨組織は、常に破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成を繰り返しており、このバランスにより骨の新陳代謝と形成が行われている。骨粗鬆症は、その際の骨吸収と骨形成の連鎖のサイクルの破綻により両者のバランスが骨吸収優位に働き、全身的な骨量減少に至る疾患である。従って、骨粗鬆症治療薬としては、骨吸収と骨形成のいずれか、あるいは両方を改善する薬剤が有効であると考えられる。現在、骨粗鬆症に対して骨吸収を抑制して骨量の減少を予防するもの、カルシウム摂取量の改善を目的とするものが臨床で繁用されている。これに対し、女性ホルモン剤やイプリフラボンなどは骨形成を促進して骨量を回復させるとしているが、副作用の点や効果の確実性の点に問題があるため決定打とはなり得ていない。従って、骨芽細胞の分化の過程や骨芽細胞機能の調節機序を解明し、これらを標的とした薬剤を開発することは骨粗鬆症研究の大きな課題の一つである。

近年、種々の phosphodiesterase (PDE) 阻害剤のうち PDE 4 阻害剤が骨芽細胞形成促進作用を示すことが明らかになった。しかしながら、PDE 4 阻害剤を骨粗鬆症治療薬として開発するにあたり、これらの中枢神経系、とりわけ催吐作用が大きな障害となる。

一方、代表的な PDE 阻害剤である theophylline に各種の構造修飾を施したアルキルキサンチンの構造活性相関研究において、N-1 位アルキル基をエチル基からプロピル基に延長することで、PDE 4 阻害作用が顕著に増大することにヒントを得て、著者は、1,6 位複素環縮合プリン化合物をデザインした。そして、これらの化合物群の各種 PDE アイソザイムに対する阻害作用を測定すると共に、マウス骨髄細胞初代培養系を用いて骨芽細胞形成作用とその機序の解明を目的に本研究を行った。

1. 各種薬物の骨芽細胞形成作用

マウス骨髄細胞初代培養系における骨芽細胞の分化シグナルを明らかにするため、parathyroid hormone (PTH)、forskolin、prostaglandin (PG) E₂、theophylline と

いった cAMP 介在性の作用を持つ薬物を培養開始後 3 日目あるいは 7 日目に 24 時間処置した時の、培養 16 日目の石灰化および培養 8 日目の alkaline phosphatase (ALP) 活性陽性細胞の検出を指標として骨芽細胞形成に及ぼす影響を検討した。その結果、PTH は、培養 7 日目に、PGE₂ および theophylline は、培養 3 日目にそれぞれ 24 時間処置したときに骨芽細胞形成促進作用を示した。一方、forskolin は、処置時期に関係なく骨芽細胞形成促進作用を示した。即ち、PTH は、骨芽細胞の未分化な段階には作用を及ぼさないが、ある程度分化が進んだ段階に作用し、theophylline や PGE₂ は、未分化な段階に作用して分化・成熟を促すことが示唆された。そして、forskolin は、分化段階に関係なく作用すると考えられた。

2. Phosphodiesterase (PDE) mRNA の検出

ラット骨髄細胞初代培養系の骨芽細胞形成過程で、細胞中に発現する PDE アイソザイム mRNA の検出を RT-PCR 法を用いて行ったところ、PDE 1 の発現は全般に低く、PDE 3 は培養開始後 7 日目以前ではほとんど発現しておらず、PDE 4 は培養経過とともに発現量が増加し、PDE 7 は培養 4 日目にその発現がピークに達した。よって theophylline は、PDE 4 あるいは PDE 7 を阻害した結果、骨芽細胞形成促進作用を示したと考えられた。

また PDE 4 には、スプライシングの違いにより複数のサブタイプが存在しているため、ラット骨髄細胞初代培養系の骨芽細胞形成過程で細胞中に発現するそれぞれの PDE 4 サブタイプ mRNA の検出も行った。その結果、PDE 4-A および PDE 4-B において培養開始後 3 日目より培養 14 日目まで同程度の強い発現が認められ、PDE 4-C および PDE 4-D は、培養 3 日目より培養 14 日目まで発現が認められるものの、培養 4 日目で最も強く発現していることが明らかとなった。従って、theophylline あるいは PDE 4 阻害剤が骨芽細胞形成促進作用を示す時期には何れの PDE 4 サブタイプも発現していることが明らかとなった。

3. 1,6 位複素環縮合プリン化合物の骨芽細胞形成作用

アルキルキサンチン誘導体は、N-1 位アルキル基をエチル基からプロピル基に延長することで、PDE 4 阻害作用および気管平滑筋弛緩作用が共に顕著に増大することが明らかになっている。これは、N-1 位アルキル基と 2 位または 6 位のオキソ基との分子間相互作用が活性発現に何らかの関与をしていることを示唆している。これらの知見を基にアルキルキサンチン誘導体の N-1 位と 6 位を縮合環化させた 1,6 位複素環縮合プリン化合物をデザインし、これらの化合物群の PDE アイソザイムに対する阻害作用を測定したところ、最も強力かつ選択的に PDE 4 を阻害する 3,4-dipropyl-4,5,7,8-tetrahydro-3H-imidazo [1,2-*f*]-purin-5-one (XT-611) を見いだした。そして、XT-611 は、theophylline あるいは PGE₂ と同様の骨芽細胞形成促進作用を示し、PGE₂ と併用することでこの作用は更に増強された。一方、XT-611 を骨髄細胞初代培養系に添加しても細胞数には何ら影響を与えなかったことより、XT-611 による骨芽細胞形成促進作用は、単なる細胞増殖促進作用によるも

のではなく、前骨芽細胞から成熟骨芽細胞への分化を促進させた結果であると考えられた。

4. XT-611 の骨芽細胞形成作用機序

これまでの検討において、XT-611 の骨芽細胞形成促進作用に PGE₂ の関与が示唆されたことより、マウス骨髄細胞初代培養系における PGE₂ 産生量の検討を行ったところ、PGE₂ の産生は培養開始時より徐々に増加し、培養開始後 4 日目をピークとした後、その産生量は低下した。そして、XT-611 を培養開始後 3 日目に 24 時間処置することで、産生量の低下は有意に抑制され高い産生量が維持された。また、XT-611 を PGE₂ の産生ピークに近い培養 3 日目に処置することで骨芽細胞形成の亢進が見られた。更に XT-611 は、COX-2 mRNA の発現をも亢進させ、COX 阻害剤を培養初期に処置することで ALP 活性陽性細胞の減少がみられ、XT-611 と COX 阻害剤 (indomethacin、flurbiprofen、valeryl salicylate、zaltoprofen、NS-398) を併用処置することで、XT-611 による石灰化をほぼ完全に抑制した。この作用は、COX-2 阻害剤においてより強い傾向が示された。また、XT-611 の骨芽細胞形成作用は、プロテインキナーゼ A 阻害剤 H-89 により完全に抑制された。以上の結果より、XT-611 の骨芽細胞形成促進作用は、COX-2 の誘導と、これに伴って産生された PGE₂ との協力作用により上昇した細胞内 cAMP-プロテインキナーゼ A 系を介したものであることが明らかとなった。

5. 1.6 位複素環縮合プリン化合物の薬理作用

全ての 1,6 位複素環縮合プリン化合物は、モルモット摘出気管に対し気管平滑筋弛緩作用を示し、この作用と PDE 4 阻害作用との間に高い相関関係が認められた。即ち、1,6 位複素環縮合プリン化合物の気管平滑筋弛緩作用に PDE 4 阻害作用が密接に関わっていることが明らかとなった。しかし、モルモット摘出右心房筋に対して心拍亢進作用を示す化合物はほとんどなく、左心房筋に対する adenosine A₁ 拮抗作用も示さなかった。一方、催吐作用は PDE 4 阻害剤の最も重篤な副作用であるため、スunksを用いて嘔吐作用の検討を行った。これより、XT-611 は、催吐作用を示さない新規 PDE 4 阻害剤であることが明らかとなった。

以上、アルキルキサンチン誘導体の構造活性相関を基に 1,6 位複素環縮合プリン化合物をデザインし、この化合物への置換基効果を検討した結果、選択的かつ強力な PDE 4 阻害剤である XT-611 を見出した。そして、XT-611 は、骨芽細胞の分化段階において COX-2 の誘導を介して PGE₂ を産生させ、PGE₂ と協力的に作用して骨芽細胞形成促進作用を示すことを明らかにした。また、XT-611 は、既存の PDE 4 阻害剤において問題となる副作用を発現しない新規な骨粗鬆症治療薬となりうる可能性を示唆したことより、本研究の成果が、今後の骨粗鬆症治療薬並びに PDE 4 阻害剤開発のためのドラッグデザインに対して有用な示唆を与えるものと考えられる。

学位論文審査結果の要旨

高齢化社会に伴う骨粗鬆症患者の増加は、今日の先進諸国における最も深刻な問題の一つである。今日、骨粗鬆症治療薬としては骨吸収抑制剤が臨床での主流をなしているが、骨形成を促進して骨量を回復させる薬剤はほとんどないのが現状である。

申請者は、アルキルキサンチン構造を有する PDE4 阻害剤が骨芽細胞形成作用を示すことに着目し、より副作用の少ない骨粗鬆症治療薬の開発を目的に 1,6 位複素環縮合プリン化合物をデザインした。そして、これらの化合物群の各種 PDE アイソザイムに対する阻害作用を測定するとともに薬理作用を詳細に検討し、以下のことを明らかにした。

- 1) 1,6 位複素環縮合プリン化合物の各 PDE アイソザイムに対する阻害作用を検討し、最も強力かつ選択的に PDE4 を阻害する 3,4-dipropyl-4,5,7,8-tetrahydro-3H-imidazo[1,2-i]-purin-5-one(XT-611)を見いだした。
- 2) マウス骨髄細胞初代培養系において、XT-611 は、細胞数には何ら影響を与えることなく骨芽細胞形成促進作用を示した。
- 3) XT-611 は、骨芽細胞分化の初期段階に作用して、COX-2mRNA の発現を亢進させるなどして PGE₂ 産生を持続させることで、PGE₂ を介する骨芽細胞形成促進作用を示すことを明らかにした。
- 4) 1,6 位複素環縮合プリン化合物は、全て気管平滑筋弛緩作用を示したが³、心拍亢進作用、adenosineA₁拮抗作用を示さなかった。また、XT-611 は、PDE4 阻害剤の最も重篤な副作用である催吐作用を有さないことも明らかにした。

以上、本研究は、アルキルキサンチン誘導体の構造活性相関を基に 1,6 位複素環縮合プリン化合物をデザインすることにより選択的かつ強力な PDE4 阻害剤として XT-611 を見出した。そして、このものは、骨芽細胞形成促進作用を示すが既存の PDE4 阻害剤で問題となる副作用を発現しなかったことより、今後の骨粗鬆症治療薬の開発に極めて有用な示唆を与えるものと考えられる。よって、本論文は博士(薬学)論文に値するものと判定された。