

炎症性肺疾患における好中球浸潤抑制作用を有する
新規ビタミン D₃誘導体の創薬研究

2013年

高野 泰宏

目次

目次.....	- 1 -
図目次.....	- 3 -
表目次.....	- 5 -
略語一覧.....	- 6 -
序論.....	- 8 -
ビタミンD ₃ の概略.....	- 8 -
肺疾患とビタミンD ₃	- 9 -
肺における免疫機能.....	- 9 -
肺における 1 α ,25(OH) ₂ D ₃ 産生とその推定機能.....	- 10 -
炎症性肺疾患と好中球.....	- 12 -
好中球浸潤のメカニズム.....	- 12 -
呼吸器疾患と好中球.....	- 13 -
COPD の病態と好中球.....	- 14 -
ALI/ARDS と好中球.....	- 14 -
CF と好中球.....	- 15 -
本研究の目的と意義.....	- 15 -
本研究の目的.....	- 15 -
本論文の構成.....	- 16 -
第1章 炎症性肺疾患モデルにおける 1 α ,25(OH) ₂ D ₃ の好中球浸潤抑制作用の証明 ..	- 18 -
1.1 炎症性肺疾患モデルでの好中球浸潤抑制評価.....	- 18 -
1.2 ハムスターLPS 誘発急性肺炎モデルにおける 1 α ,25(OH) ₂ D ₃ の好中球浸潤抑制作用の検討.....	- 19 -

1.2.1	材料と方法	- 19 -
1.2.2	結果	- 21 -
1.2.3	考察	- 23 -
1.3	この章の小括	- 25 -
第2章	血中カルシウム濃度上昇作用と乖離したビタミンD ₃ 誘導体の創製	- 26 -
2.1	ビタミンDによる血中カルシウム濃度の制御	- 26 -
2.2	血中カルシウム濃度上昇作用と乖離した化合物取得の試み	- 27 -
2.3	この研究が目指す化合物デザインの方向性	- 29 -
2.4	化合物取得のためのスクリーニング	- 31 -
2.4.1	材料と方法	- 31 -
2.4.2	結果	- 37 -
2.4.3	考察	- 43 -
2.5	この章の小括	- 45 -
第3章	TEI-A00114の作用プロファイルの検討	- 46 -
3.1	ハムスターLPS誘発急性肺炎モデルでのTEI-A00114作用の経時変化	- 47 -
3.1.1	材料および方法	- 47 -
3.1.2	結果	- 47 -
3.1.3	考察	- 48 -
3.2	ヒト全血を用いた、IL-8、TNF α 、IL-1 β 産生に対するTEI-A00114の作用	- 49 -
3.2.1	材料および方法	- 49 -
3.2.2	結果	- 50 -
3.2.3	考察	- 54 -
3.3	ヒト肺線維芽細胞のIL-8産生におけるTEI-A00114の作用	- 54 -
3.3.1	材料および方法	- 55 -
3.3.2	結果	- 55 -
3.3.3	考察	- 57 -
3.4	ヒト全血を用いたCD14発現に対するTEI-A00114の作用	- 58 -
3.4.1	材料および方法	- 58 -
3.4.2	結果	- 59 -
3.4.3	考察	- 60 -
3.5	この章の小括	- 61 -
	総括	- 63 -
	参考文献	- 65 -
	主要論文目録	- 72 -
	謝辞	- 73 -
	審査	- 76 -

图目录

Fig. 0-1 Activation process of neutrophil..... - 12 -

Fig. 1-1 Time course of LPS-induced acute lung inflammation in Syrian golden hamster BALFs over the time course. - 21 -

Fig. 1-2 Effect of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on neutrophil and monocyte number in BALFs in LPS-inhaled hamsters..... - 22 -

Fig. 1-3 Effect of dexamethasone-21-acetate on neutrophil and monocyte number in BALFs in LPS-inhaled hamster..... - 23 -

Fig. 2-1 Relationship between VDR binding affinity and anti-neutrophil infiltration activity..... - 29 -

Fig. 2-2 Chemical structures of TEI-A00113 and TEI-A00114 , and their VDR, DBP binding affinities and ED_{40} of hamster ALI model. - 30 -

Fig. 2-3 Chemical structures of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and vitamin D_3 analogues used in this study..... - 38 -

Fig. 2-4 Effect of TEI-A00114 on neutrophil and monocyte number in BALF in LPS-inhaled hamsters..... - 40 -

Fig. 2-5 Effects of TEI-A00114 and $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on plasma calcium level in hamsters or rats - 41 -

Fig. 2-6 Effects of TEI-A00114 and $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on IL-8 production by LPS or IL- 1β -stimulated cells in human peripheral whole blood..... - 42 -

Fig. 3-1 Time course of neutrophil infiltration after LPS inhalation in LPS-inhaled hamsters..... - 48 -

Fig. 3-2 IL-8 production from human peripheral whole blood stimulated by LPS,

TNF α , IL-1 β or TNF α +IL-1 β - 50 -

Fig. 3-3 Effect of TEI-A00114 on the production of IL-8 from LPS-stimulated
human peripheral whole blood. - 51 -

Fig. 3-4 Effects of TEI-A00114 on production of IL-8 from human peripheral whole
blood stimulated by TNF α , IL-1 β or TNF α +IL-1 β - 52 -

Fig. 3-5 Effects of TEI-A00114 and dexamethasone on the production of TNF α or
IL-1 β from LPS-stimulated human peripheral whole blood. - 53 -

Fig. 3-6 IL-8 production from normal human lung fibroblast stimulated by IL-1 β ,
TNF α or LPS..... - 56 -

Fig. 3-7 Effect of TEI-A00114 on IL-8 production from TNF α or IL-1 β -stimulated
quiescent normal human lung fibroblast..... - 57 -

Fig. 3-8 Effects of TEI-A00114 on expression of CD14 in human peripheral whole
blood, PBMC or PMN stimulated by IL-1 β - 60 -

表目次

Table 0-1 Local production and effects of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in the respiratory tract.
..... - 11 -

Table 2-1 Biological activities of the vitamin D_3 analogues Screening results of
vitamin D_3 analogue activity on VDR binding and DBP binding,
effects of plasma calcium in rats, and inhibition of neutrophil
recruitment in the lung in the hamster model of ALI. - 39 -

Table 2-2 Solubility of vitamin D_3 analogues in 0.3% (v/v) ethanol-saline - 43 -

略語一覽

ALI: acute lung injury
ARDS: acute respiratory distress syndrome
BAL: bronchoalveolar lavage
BALF: bronchoalveolar lavage fluid
CF: cystic fibrosis
CINC: cytokine-induced neutrophil chemoattractant
COPD: chronic obstructive pulmonary disease
CYP: cytochrome P450
DBP: vitamin D binding protein
DTT: dithiothreitol
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
FCS: fetal calf serum
GRO: growth-related oncogene
HBSS: Hank's balanced salt solution
HPLC: high performance liquid chromatography
ICAM: intercellular adhesion molecule
I κ B: inhibitor- κ B
IL: interleukin
KC: keratinocyte-derived chemokine
LBP: LPS binding protein
LPS: lipopolysaccharide
MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1

MIP: macrophage inflammatory protein

NF- κ B: nuclear factor κ B

NHLF: normal human lung fibroblast

PAF: platelet activation factor

PBMC: peripheral blood mononuclear cell

PBS: phosphate buffered saline

PMN: polymorphonuclear leukocyte

PTH: parathyroid hormone

RXR: retinoid X receptor

TNF α : tumor necrosis factor α

VDR: vitamin D receptor

VDRE: vitamin D receptor response element

序論

ビタミンD₃の概略

ビタミンDは、古典的には生物が海から上陸した時、生体内カルシウム濃度の恒常性を維持し、少ないカルシウムを効率よく体内に取り込む役割を担う基幹物質であり、血中カルシウム濃度やリンの恒常性維持、骨形成、骨代謝、骨質の改善を司っていると考えられている[1-3]。

ビタミンDは、植物が β -シトステロールから生産するビタミンD₂と動物がコレステロールから産生するビタミンD₃の総称である。ビタミンD₃はそのままでは生理活性を發揮できず、肝臓および腎臓でそれぞれCYP27A1, CYP2R1 およびCYP27B1により1 α 位および25位が水酸化され、1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ (1 α ,25(OH)₂D₃) に代謝されて初めて生理活性を發揮する。1 α ,25(OH)₂D₃は活性型ビタミンD₃と呼ばれており、1 α 位と25位に水酸基が導入されるとビタミンD₃の受容体結合能は数十万倍高められる。生合成された1 α ,25(OH)₂D₃は血液中に存在するビタミンD結合蛋白質(DBP)と結合し、標的部位へ運搬される。標的部位において1 α ,25(OH)₂D₃は細胞内に存在するビタミンD受容体(VDR)と結合し、核内へ移行する。核内へ移行したVDR-1 α ,25(OH)₂D₃は更に9-シスレチノイン酸受容体(RXR)と結合してヘテロダイマーを形成し、このヘテロダイマーであるRXR-VDR-1 α ,25(OH)₂D₃複合体がビタミンD₃依存性遺伝子上流に存在するビタミンD応答配列(VDRE)に結合する。そしてここに転写共役活性化因子(co-activator)

を含む基本転写活性装置が結合して複合体を形成し、転写がスタートする。このような生理活性発現機構から、現在ではビタミンD₃はビタミンというカテゴリーではなくホルモンとして分類されている[4]。

ビタミンD₃は抗くる病因子として発見され、骨カルシウム代謝に対する作用はよく研究されている。しかしながら現在ではVDRはカルシウム代謝に関連した組織(小腸、人、骨、副甲状腺)以外にも、皮膚、筋、血管、免疫系細胞、脳神経細胞などをはじめほぼ全身組織でその存在が確認されており、何らかの生理的な機能を担っていると考えられている。事実、今日までに骨カルシウム代謝作用以外には細胞増殖抑制作用、細胞分化誘導促進作用、副甲状腺ホルモン合成および分泌抑制作用、インシュリン分泌促進作用、免疫調節作用など多くの生理活性が報告されている。1971年に活性型ビタミンD₃の化学構造が明らかになって以来、多数の誘導体が化学合成されて生理活性が評価されており[5]、いくつかのビタミンD₃誘導体は既にくる病、骨粗鬆症、二次性副甲状腺機能亢進症、乾癬の治療薬として臨床応用されている[2]。さらに白血病、乳がん、前立腺がん、大腸がんなどある種のがんに対しては治療効果を期待し、細胞増殖抑制作用や細胞分化誘導作用の比活性が高い誘導体を用いた基礎研究が活発であり[6]、また前立腺肥大症の治療を狙って臨床開発されている化合物も存在する[7]。しかしながらビタミンD₃の免疫調節作用に着目した創薬研究は他疾患に比べて遅れており、今後可能性が検討されていくものと考えられる。一方、ビタミンD₃の投与過剰により高カルシウム血症が生じ、生体に重篤な悪影響を与えることが知られている。現在までに臨床応用されているビタミンD₃誘導体は薬効と高カルシウム血症発症の間の乖離が狭いため、投与量が厳しく制限されている[8, 9]。このため、ビタミンD₃の医薬品研究においては1 α ,25(OH)₂D₃の持つ血中カルシウム濃度上昇作用と目的とする生理活性を分離し、血中カルシウム上昇を低減しつつ治療効果を発揮できる誘導体の開発は長らく中心課題となっており、広く世界中で研究が行われている[10]。

肺疾患とビタミンD₃

肺における免疫機能

肺気管の総面積は70m²に及ぶとされており、呼吸により外部大気と直接接触する部位となっている。そのため肺は外敵(ウイルス、細菌、各種刺激物質)から生体を守る

ための局所生体防衛機構を発達させている。肺には外敵から身を守るための免疫システムとして非特異的かつ敏速に異物を排除する機構が備わっており、この反応には気道上皮細胞、肺胞マクロファージ、樹状細胞が関与していると考えられている。これらの細胞はいずれも異物を認識する受容体にて異物を検知して活性化され、生体防衛システムの引き金が引かれると考えられている[11]。気道上皮細胞は異物侵入時の最初の物理的バリアーであり、異物を感知して活性化されて抗菌物質の放出、ケモカインやサイトカインを放出する。肺胞マクロファージは異物を認識して貪食し、これを除去する。また樹状細胞は自分自身に発現している受容体により局所環境の状態を認識し、ケモカインを放出すると共にリンパ節へ移動して T 細胞へ抗原提示を行い、免疫システムを活性化すると考えられている。このように、肺は外界との接触により様々な侵入物に曝される器官であり、生体側は精巧な生体防衛メカニズムを発達させている。次項に述べるように、ビタミン D₃はこの生体防衛メカニズムの一環としての機能を担っていると考えられている。

肺における 1 α ,25(OH)₂D₃ 産生とその推定機能

生体内で 1 α ,25(OH)₂D₃ を生成する律速酵素であるとされている 1 α -hydroxylase は気道上皮細胞、肺胞マクロファージ、樹状細胞、リンパ球にもその発現が認められ、肺局所にて活性型ビタミン D₃ が生成されて免疫調節に関与している証と考えられている。現在までに考えられている肺における活性型ビタミン D₃ の生理作用は、抗菌ペプチド cathelicidin の分泌促進、CD14 発現亢進、ケモカイン産生抑制、樹状細胞の機能抑制、T 細胞の機能調節などであり、これらの作用は病原性微生物の侵入に対する生体側レスポンスや喘息のようなアレルギー反応において重要な役割を果たしていると考えられている。一方、疫学研究によりヒトはビタミン D 欠乏状態ではウイルス感染症、結核を生じやすいことが示されており、また喘息の重篤度悪化や COPD の増悪が引き起こされると指摘されている。Table 0-1 に Hansdottir らにより集約された、肺常在性細胞およびリンパ球における 1 α ,25(OH)₂D₃ 産生とその機能の一覧を示す[12]。現在では肺は 1 α ,25(OH)₂D₃ の標的器官の一つとして考えられており、活性型ビタミン D₃ 誘導体による治療対象となり得ると考えられる。

Table 0-1 Local production and effects of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in the respiratory tract. (Hansdottir et al. [12])

Cell type	Conversion of $25(\text{OH})\text{D}_3 \rightarrow 1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ effects
Airway epithelium	Constitutive	Increase CD14 and cathelicidin; dampens $\text{IFN}\beta$ and chemokine response during viral infection
Alveolar macrophages	Upon activation	Increase the antimicrobial peptide cathelicidin
Dendritic cells	Increase with differentiation	Inhibits dendritic cell differentiation, maturation, and function; decreases IL-12 and increases IL-10; alters T-cell activation
T-lymphocytes	At least when activated	Inhibits proliferation; modulates cytokine production (inhibits Th_1 and Th_{17} cytokines but increase T_{Reg})
B-lymphocytes	Unclear	Inhibits proliferation of activated B-cells and generation of plasma cells

炎症性肺疾患と好中球

好中球浸潤のメカニズム

好中球は非特異的免疫機構の一員として位置付けられており、接着、走化、貪食、殺菌などの一連の機序により病原体（主に細菌）を生体から排除する役割を担っている。細菌が生体内に侵入すると炎症が発生し、補体成分 C5a や IL-8 が放出される。血液中の好中球はセレクチンと糖鎖リガンドの低親和性相互作用により血管壁に沿ってローリングする。TNF α や IL-1 β をはじめとする pre-inflammatory cytokine やロイコトリエン B₄ などの脂質性メディエーターは内皮細胞のセレクチンを活性化することでローリングをサポートする。引き続き好中球の CD18 family (CD11b, CD11a) が活性化され、血管内皮の ICAM-1 と結合する。その後好中球は血管内皮細胞で構成される基底膜をくぐり抜けて感染、炎症部位へ遊走し、各種メディエーターを放出、貪食能により生体防衛機能を発揮する。また細菌を貪食した好中球は早期にアポトーシスに陥り、組織に障害を与えることなくマクロファージや網内系で処理されることが考えられている[13]。上記の概略を Fig. 0-1 に示す。

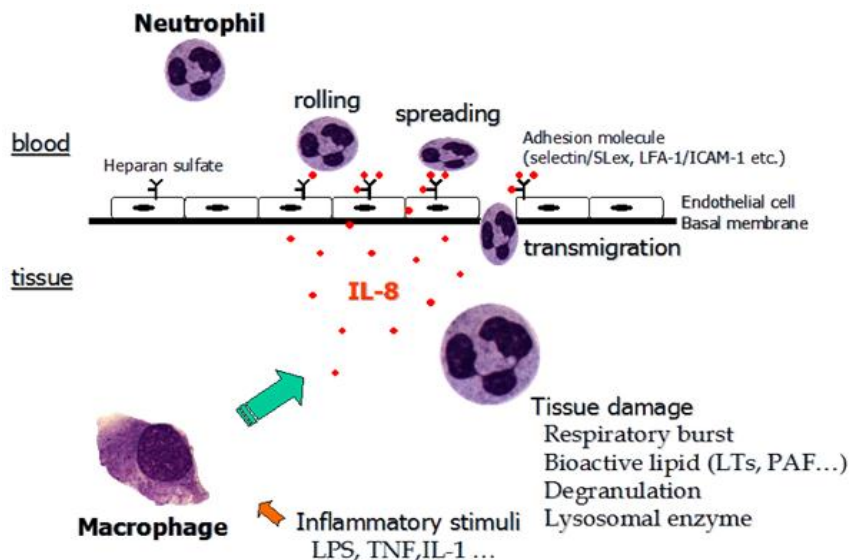


Fig. 0-1 Activation process of neutrophil

ところで、好中球遊走や活性化を引き起こす因子については複数知られており、補体成分 C5a、ロイコトリエン B₄、血小板活性化因子(PAF)、ケモカインがある。近年、ヒト肺における好中球浸潤においては IL-8 が重要な役割を果たすことが解明されてきており、研究が続けられている[14]。ケモカイン細胞遊走に関わるタンパク質性の因子であり、現在までに 40 種類以上が知られている。ケモカインはよく保存された 4 つのシステイン残基のうち最初の 2 つの位置から、CXC、CC、C、CX3C の 4 つのサブファミリーに分類されている。IL-8 に代表される好中球走化性活性を有するケモカインは主に CXC サブファミリーに属する。ラットの好中球走化性因子は CINC_s (Cytokine-induced neutrophil chemoattractant) として同定されている CXC ケモカインで、CINC-1、CINC-2 α 、CINC-2 β 、CINC-3/MIP-2 の 4 種類が知られている。これらの因子はヒト GRO (Growth-related oncogene) に相同性が高いが、IL-8 のホモログは得られていない。マウスの好中球走化性因子は KC (Keratinocyte-derived chemokine) と MIP-2 (Macrophage inflammatory protein) が知られており、KC はラット CINC-1 の、MIP-2 はラット CINC-3 のホモログである。ヒト GRO にも α 、 β 、 γ の 3 つのアイソフォームが知られているが、互いに相同性が非常に高く、構造的に CINC-1、2、3 やマウス KC、MIP-2 との間に明確な対応関係にはない。また、ヒトでは IL-8 のレセプターとして CXCR1、CXCR2 の 2 種類が知られており、CXCR2 は GRO のレセプターとしても機能する。マウスでは KC と MIP-2 のレセプターである CXCR2 のみ知られている。またラットについても CINC-1、2、3 共通のレセプターとして CXCR2 レセプターのみが存在すると考えられている[15]。ケモカインの抗体を用いた検討により、肺炎モデルにおいて好中球浸潤が抑制されることが報告されており[16]、ケモカイン作用の阻害は好中球浸潤の抑制を意図した有望な作用点の一つになり得ると考えられている。

呼吸器疾患と好中球

呼吸器系は外気を吸入することによって空気中の病原微生物や無機、有機の異物の直接的な侵入に曝されやすい臓器である。そのため、これらを排除するための防衛機構として、肺の免疫は呼吸器疾患の病態において重要な機能を担っている。呼吸器系の免疫機構を大別すると、非特異的防衛機構と特異的防衛機構の 2 つがあるが、病原性微生物が肺胞内に侵入した際の非特異的防衛機構の中心を担う細胞は肺胞マクロフ

フェージと好中球であるとされている[17]。肺胞マクロフェージは恒常的に肺胞内に存在し、病原体の侵入により活性化されると IL-1 や TNF α などの pro-inflammatory cytokine を産生し、また好中球遊走因子のひとつである IL-8 を産生する。炎症時に産生されるこれらのサイトカインは、好中球が血管内皮に接着し、炎症局所へ浸潤する過程に関わる細胞間接着因子の発現に重要な役割を担っている。呼吸器病態における好中球の関与については、以前からその重要性が指摘されており、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、急性肺損傷／急性呼吸促迫症候群 (ALI/ARDS)、嚢胞性肺線維症(CF)、一部の重症喘息では特徴的な肺組織内への好中球浸潤、活性化が認められている[18]。以下の項でその概要を述べる。

COPD の病態と好中球

COPD は気流制限による労作性呼吸困難を特徴とする疾患で、喫煙などの吸入性肺傷害物質による肺の慢性炎症が主たる病態であると考えられている。肺胞領域では、肺胞壁の破壊による肺弾力性の低下の結果、呼気が困難になるとともに、肺胞の表面積が縮小してガス交換効率の低下を引き起こす。気道領域では平滑筋肥大、線維化、喀痰の分泌亢進が発生して気道閉塞が生じることが知られており、これらの病態形成には好中球やマクロフェージ由来のプロテアーゼ、活性酸素が重要な役割を演じているとされている。COPD 患者の喀痰では好中球数の増加が認められ、また喀痰上清では IL-8、好中球エラスターゼの活性亢進も認められる。現在では、マクロフェージや気道上皮細胞から産生された IL-8 により好中球が遊走し、COPD の慢性炎症病態を形成すると推察されている。

ALI/ARDS と好中球

ALI は肺への直接障害 (肺炎など) あるいは間接障害 (敗血症など) を引き起こす様々な原因により発症し、肺の急性炎症とそれに伴う血管透過性亢進を特徴とする疾患である。本来、活性化された好中球から放出される活性酸素とプロテアーゼは、流血中や組織中では本来生体内に豊富に存在するスカベンジャーや拮抗物質により即座に不活化される。しかしながら ALI/ARDS では、好中球が肺血管内に集積し、血管内皮細胞に密着することにより、好中球は両細胞の間隙に生じた微小循環内に活性酸素やプロテアーゼを放出して組織障害をもたらすと考えられている。

CF と好中球

粘液腺を有する各種の器官が侵される疾患で、第七染色体にある遺伝子の異常で発症し、常染色体劣性遺伝の形式を取る。臓器障害は肺をはじめ膵、肝、腸管、汗腺など多岐に亘るが、肺の病変が臨床的に問題となることが多い。肺病変としては、慢性で反復性の気道感染を繰り返し、末梢気道の破壊と高度閉塞性換気障害を示し、少数の長期生存例を除いて 10 代で呼吸不全を呈して死亡する。その原因としては気道上皮における Cl⁻イオンの分泌障害と過剰の水吸収による線毛上皮輸送系の障害や感染防御機構の障害が原因であるとされている。気管支拡張病変に加え、緑膿菌などによる慢性で反復性の気道感染、気道炎症を生じ、結果として末梢気道の高度の破壊と高度の閉塞性換気障害を呈する。持続的な気道感染は好中球の浸潤、活性化を引き起こし、活性化された好中球から放出される活性酸素やプロテアーゼが組織障害をさらに悪化させると考えられている。

本研究の目的と意義

本研究の目的

本研究は、活性型ビタミン D₃ が有する多彩な生理作用の中で、IL-8 産生抑制作用に着目し、好中球浸潤が認められる炎症性肺疾患に適応する新たな治療薬を創製することを目的とし、活性型ビタミン D₃ 誘導体の治療薬としての可能性について検討を行うことを目的としている。

好中球は生体防衛の最前線に位置して生体を守るのが本来の機能であるが、炎症性肺疾患の病態においてはその剣は生体に向けられている。このような状態においては活性化された好中球の機能を抑制することが治療戦略として非常に重要である。一部の ALI では好中球エラスターゼ阻害剤が臨床応用されており[19]、好中球や好中球エラスターゼの除去療法も検討されている[20]。がしかし COPD においてはまだ炎症や病態進行を止めることはできておらず、新たな治療薬、治療方法の開発が望まれている。前述したようにビタミン D と肺疾患の関連についての研究は、主にビタミン D 欠乏時における罹患リスクの増加と、これを予防するためにサプリメントとしてビタミン D を摂取するという観点からのものであり、肺疾患を罹患した患者に活性型ビタミン D₃ 製剤を投与し、治療効果を検討した試みは知られていない。そこで本研究においては

好中球浸潤抑制の観点から、活性型ビタミン D₃ の炎症性肺疾患治療薬としての可能性を検討した。

本論文の構成

前述したように、ビタミン D と肺疾患の関係において、以前からビタミン D 欠乏状態ではウイルス感染症や結核の罹患率が高いことが指摘されている。また喘息や COPD についても罹患リスクや重症度が增大されるとの報告があるが、活性型ビタミン D₃ を用いた積極的な治療介入についての報告はない。そこで、本研究第 1 章では生体物質である 1 α ,25(OH)₂D₃ が炎症性肺疾患モデルにて好中球浸潤抑制作用を有するか否かを検証し、活性型ビタミン D₃ が炎症性肺疾患治療薬になり得るか否かの検討を行った。

活性型ビタミン D₃ 誘導体を治療薬として使用する場合、血中カルシウム濃度上昇作用により、その投与量は厳しく制限されている。目的とする薬理活性と血中カルシウム濃度上昇作用を乖離させることができれば、治療目的でより高用量の活性型ビタミン D₃ の投与が可能となり、活性型ビタミン D₃ が持つ有益な生理活性作用を疾患治療に応用することがより容易になると期待が持てる。そこで、本研究第 2 章では血中カルシウム上昇活性と好中球浸潤抑制活性を分離させるため、活性型ビタミン D₃ 誘導体のビタミン D 結合蛋白質 (DBP) およびビタミン D 受容体 (VDR) の結合親和性に着目し、各種誘導体の合成展開を実施して血中カルシウム濃度上昇作用と好中球浸潤抑制活性が乖離した化合物の取得を目指し、TEI-A00114 という新規の活性型ビタミン D₃ 誘導体を創製したことを報告する。

活性型ビタミン D₃ には IL-8 産生抑制の他、pro-inflammatory cytokine である TNF α 、IL-1 β の産生抑制[21, 22]、CD14 の発現亢進作用[23, 24]が知られている。TNF α 、IL-1 β は炎症性肺疾患に関わる重要なメディエーターであり、肺における炎症カスケードに深く関わりとされている。そこで第 3 章では TEI-A00114 の作用プロファイル検討として、ヒト全血を用いた *in vitro* アッセイを実施して TEI-A00114 の示す好中球浸潤抑制のメカニズムについてより詳細な検討を行った。また炎症カスケードに対する効果検討の一環として、TNF α 、IL-1 β 刺激で IL-8 産生が惹起される肺線維芽細胞に対する TEI-A00114 の効果を検討した。また従来から活性型ビタミン D₃ は CD14 発現亢進作用

を示すことが報告されており、食細胞における菌クリアランス能の亢進作用が期待されている。そこでTEI-A00114にもCD14発現亢進作用があるか否かの検討を実施した。これらの結果を総合し、TEI-A00114は好中球浸潤抑制作用とCD14発現亢進作用を併せ持つ、新しいタイプの抗炎症剤になり得ることを報告する。

また、総括において本論文の結語と今後の展望を述べる。

第1章 炎症性肺疾患モデルにおける $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の好中球浸潤抑制作用の証明

1.1 炎症性肺疾患モデルでの好中球浸潤抑制評価

本研究のコンセプトを証明するため、生体物質である $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が好中球浸潤を伴う肺炎症動物モデルにおいて好中球浸潤を抑制するか否かにつき検討を行った。乾癬において活性型ビタミン D_3 誘導体が真皮から表皮への好中球浸潤を抑制することは既に知られており[25]、肺においても同様の効果が得られると期待した。しかしながら、*in vivo* において活性型ビタミン D_3 が肺炎症における好中球浸潤を抑制するか否かについては報告されていなかった。好中球浸潤を伴う肺炎症の病態モデルは、起炎物質として LPS を用い、急性肺炎症を惹起する系がラット、マウス、ウサギ等の動物で報告されており、活性型ビタミン D_3 の好中球浸潤抑制活性を評価するには適した *in vivo* 病態モデルであると考えられた。そこで最も汎用されているラット及びマウスを用いて LPS 誘発急性肺炎症モデルを構築し、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が好中球浸潤抑制作用を示すか否かの検討を試みた。しかしながら、モデル構築の検討が進むにつれ、炎症のコントロールが難しく系の再現性に乏しい、浸潤好中球数が少なく今後想定される多数の化合物のスクリーニングにて活性の強弱を判定するに不安がある等の課題が存在することが判明した。またウサギの使用は実験群数および実験コストの観点から現実的な選択

肢とはなり得なかった。種々検討の結果、エラスターゼ阻害剤の評価系として報告されていた、ゴールデンハムスターを用いた LPS 誘発急性肺炎モデル[26]をベースに LPS 投与方法を経気道投与から吸入投与へ変更し、マウス、ラットの4~10倍の浸潤好中球数を呈する系を構築した。本評価系は化合物のスクリーニングにも耐えうると考えられた。 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の投与ルートは経口投与の他、直接肺内へ投与する可能性を視野に入れて経気道投与も実施した。

1.2 ハムスターLPS 誘発急性肺炎モデルにおける $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の好中球浸潤抑制作用の検討

1.2.1 材料と方法

使用薬物

LPS は Difco Laboratories 社製の *Escherichia coli*,0111:B4 を使用し、生理食塩水に懸濁して 2 mg/mL の溶液を調製した。Dexamethasone-21-acetate は Sigma-Aldrich 社より購入した。経口投与に使用したメチルセルロースはナカライテスクから購入した。 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は帝人株式会社生物医学研究所にて合成し、HPLC にて純度検定を行った。化合物は 100%エタノールに溶解し、264 nm におけるモル分子吸光係数を $18200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ として定量した。また化合物は -20°C にて保存した。フローセンは武田薬品工業から購入した。その他の試薬は和光純薬工業から購入した。

使用動物

雄性ゴールデンハムスター (8-10 週齢、体重 120-140 g) は日本チャールズブリバー株式会社から購入した。動物は恒温 ($24\pm 2^\circ\text{C}$)、恒湿 ($55\pm 15\%$) の動物飼育室にて実験日まで飼育した。

LPS 誘発肺炎モデルの作成方法

市販の超音波ネブライザー (オムロン社 NE-U12) に LPS 溶液 (2 mg/mL) を入れ、ミスト状になった LPS を送風ポンプにて自家製アクリルチャンバー (30 cm × 38 cm × 50 cm、容量 57 L) へ導き、この中にハムスターを入れて 30 min LPS を吸入させ、肺炎症を惹起させた。LPS ミストの流量は 4.7 L/min に調節した。なお動物実験における動

物の取り扱いに関しては、帝人株式会社生物医学総合研究所動物実験倫理規定に従った。

評価化合物の調製と投与

$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は 0.3% (v/v) エタノール-0.02% (v/v) Triton-X100 にて溶解した。LPS 吸入直後直ちに小動物麻酔装置 (バイオマシナリー社製 Model TK-4) にてフローセンにて麻酔を行い、1 mL/kg の投与量で自家製ゾンデにて経気道により投与した。また経口投与の場合は 10% (v/v) エタノール-0.1%(v/v) Triton X-100 にて溶解し、LPS 吸入 1 h 前に 5 mL/kg で投与を行った。Dexamethasone-21-acetate は 0.5% (w/v) カルボキシメチルセルロース水溶液に懸濁し、5 mL/kg にて経口投与を行った。

気管支肺胞洗浄 (BAL) の実施および気管支肺胞洗浄液 (BALF) の採取

動物にウレタンを腹腔内投与し、全身麻酔下にて気管切開を行った。気管からカニューレを挿入し、生理食塩水 2 mL を入れたプラスチック製ディスプレイシリンジにて BAL を実施した。洗浄は 3 回実施し、計 6 mL の BALF を回収した。BALF は動物用全自動血球計測器 (日本光電 Celltac α 、Model MEK-6258) にて白血球画分の総細胞数をカウントした。一部をサンプリングし、Sakura Seiki CF-120 Auto Smear にて塗抹標本を作成し、細胞染色キット (Dade Behring 社, Differential Quick Stain kit) にて染色した。染色した標本は光学顕微鏡 (ニコン社 OPTIPHOT) にて検鏡し、細胞 200 個をカウントして細胞種の比率を算出し、BALF 中の好中球、単球それぞれの細胞数を算出した。(※本モデルにて BALF 中に認められる浸潤細胞は好中球、単球のみであったため、この 2 種の細胞の比率合計は 100%である)

BALF 中アルブミン濃度の測定

BALF を 4°C 下 13000×g にて 2 min 間遠心し、その上清をアルブミン測定キット (和光純薬 A/G B-Test Wako) を用いて分光光度計 (日立 U-1080 Auto Sipper Photometer) にて測定した。

統計解析

Abacus Concept 社の StatView version 4.11 を使用し、平均値±標準誤差(SEM)にて表記

した。また有意差検定は Dunnett の多重比較検定を用い、 $p < 0.05$ を統計学的有意差が認められると判断した。

1.2.2 結果

ハムスターLPS 誘発急性肺炎症モデルにおける BALF 中細胞数、アルブミンの経時変化

結果を Fig. 1-1 に示す。BALF 中に認められる細胞種は好中球と単球のみであり、好酸球や好塩基球は認められなかった。好中球と単球の比較は好中球が大多数を占めていたが、単球数も経時的に増加していた。LPS 吸入後 24 h の時点で好中球、単球数が最大に達し、好中球数はその後減少に転じたが単球数は 48 h 後でも維持されたままであった。また BALF 中アルブミン濃度も LPS 吸入後 24 h で最大に達し、BALF 中細胞数と一致したパターンを示した。これらの結果から、本病態モデルは 24 h をピークとする好中球主体の急性肺炎症が惹起されていると考えられる。ゆえに、本モデルにおける薬効評価は LPS 吸入後 24 h の時点で実施することとした。

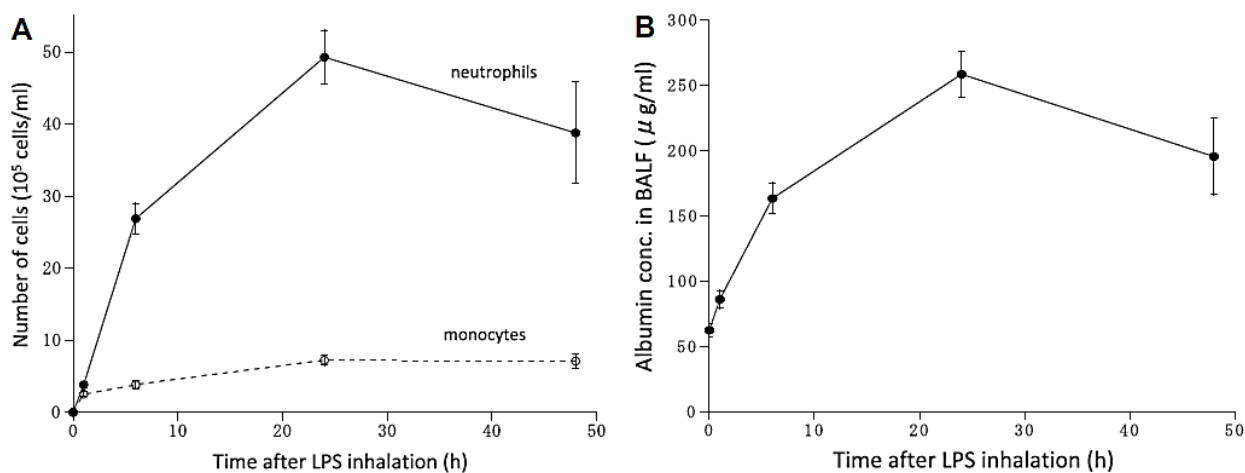


Fig. 1-1 Time course of LPS-induced acute lung inflammation in Syrian golden hamster BALFs over the time course (t=0, 1, 6, 24, and 48 h). Data are presented as mean \pm SEM (n=8–36) from four independent experiments. (A) Number of neutrophils and monocytes. (B) Albumin concentration.

ハムスター-LPS 誘発急性肺炎モデルにおける $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の効果

経口投与および経気道投与の結果を Fig. 1-2 に示す。両投与経路において $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は肺内好中球浸潤を濃度依存的に抑制した。活性強度の指標として、vehicle 投与群と比較して 40%抑制を示す投与量(ED_{40})を用量-反応曲線により求めたところ¹、経口投与および経気道投与でそれぞれ $3.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ であった。一方、単球浸潤に対して有意な抑制作用は認められず、作用は好中球に対して選択的であることが示された。

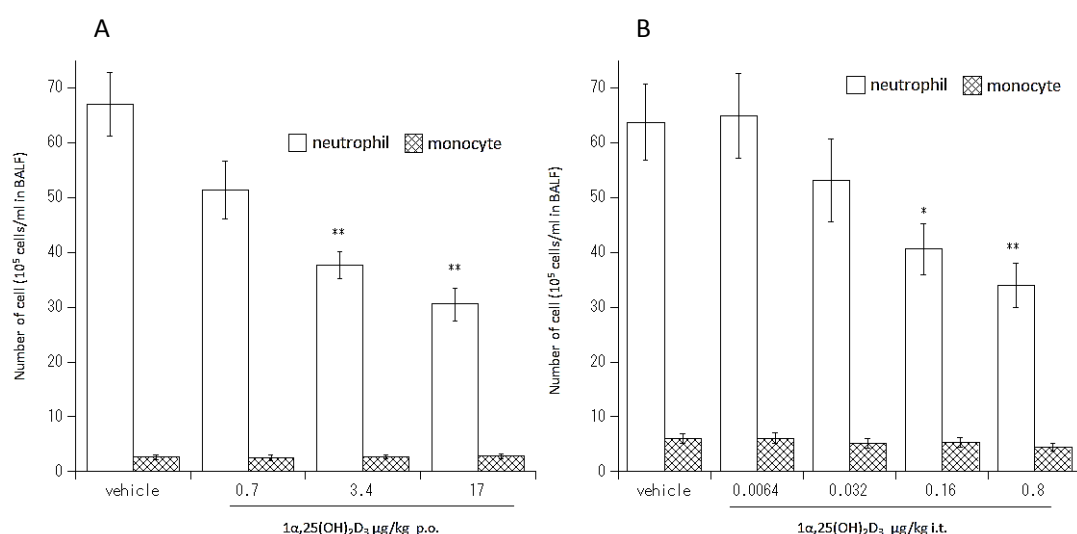


Fig. 1-2 Effect of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on neutrophil and monocyte number in BALFs in LPS-inhaled hamsters. Hamsters were inhaled with 2 mg/ml LPS and administered $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (A) perorally before 1 h of LPS inhalation or (B) intratracheally immediately after LPS inhalation. BALFs were collected after 24 h following LPS inhalation, and neutrophils and monocytes were counted. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. vehicle (Dunnett's t test). Data are presented as mean \pm SEM ($n=7-10$).

¹ 検討した投与量範囲では最大抑制活性が 50%に到達しないものがあるため、化合物の活性強度の指標は 40%抑制率を与える化合物投与量とした。

ハムスター-LPS 誘発急性肺炎モデルにおける dexamethasone-21-acetate の効果

評価結果を Fig. 1-3 に示す。経口投与にて dexamethasone-21-acetate は濃度依存的に好中球および単球浸潤を抑制した。好中球浸潤抑制における ED_{40} 値は 8.6 mg/kg であった。

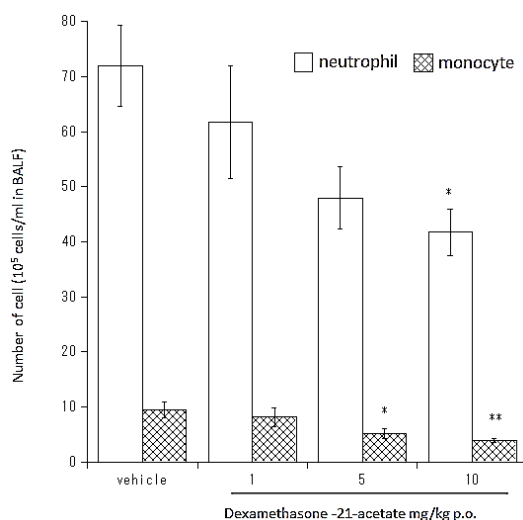


Fig. 1-3 Effect of dexamethasone-21-acetate on neutrophil and monocyte number in BALFs in LPS-inhaled hamsters. Hamsters were inhaled with 2 mg/ml LPS and administered dexamethasone-21-acetate perorally before 1 h of LPS inhalation. BALFs were collected after 24 h following LPS inhalation, and neutrophils and monocytes were counted. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. vehicle (Dunnett's t test). Data are presented as mean \pm SEM ($n=8-10$).

1.2.3 考察

LPS 誘発急性肺炎モデルはヒトにおける ALI のモデルであると考えられている[27, 28]。報告により LPS 投与方法が異なるものの、いずれも肺内に好中球浸潤を伴う炎症が惹起され、好中球遊走に關与するケモカインが重要な役割を果たしているとされている[28-32]。またウサギの IL-8 はヒト IL-8 と相同性があるとされており、ウサギを用いた LPS 誘発急性肺炎モデルにおいてヒト抗 IL-8 抗体が好中球浸潤を抑制することが知られている[16]。先行研究において、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が種々の細胞系（正常ヒト皮膚線維芽細胞[33]、ヒト全血[34]、正常ヒトケラチノサイト[35]、ヒト初代近位尿管上皮細胞[36]、鼻茸由来ヒト線維芽細胞[37]、ヒト前立腺細胞[38]）、において IL-8 産生を抑制することが報告されている。また我が国で乾癬治療薬として用いられている活性型ビタミン D_3 誘導体 Tacalcitol ($1\alpha,24(\text{R})(\text{OH})_2\text{D}_3$) は好中球浸潤抑制作用を示すことが

知られているが、作用機序の一部はケラチノサイトからの IL-8 産生抑制により説明できると考えられている[25]。また、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による IL-8 産生抑制の機序として、メラノーマ由来 A3 細胞および肺線維芽細胞由来 MRC-5 細胞における解析により、この反応は NF- κ B 阻害を介して発現する可能性が指摘されている[39, 40]。ALI の病態においては IL-8 が好中球浸潤に重要な役割を果たすと考えられており、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が ALI モデルのひとつである LPS 誘発急性肺炎モデルにて好中球浸潤抑制作用を示すことは理に適っていると考えられる。Meduri らは ALI/ARDS 治療においてグルココルチコイド投与の有用性について言及しており[41]、好中球浸潤の抑制はその作用機序のひとつと考えられる。本検討においても dexamethasone の好中球浸潤抑制作用が認められ、臨床におけるグルココルチコイドの有効性を再現する結果が得られている。ところで、経口投与時の ED₄₀ 値で比較した $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ と dexamethasone の投与量は $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の方が遥かに少なく、この実験事実は $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ もまた ALI/ARDS の治療薬として有用である可能性を示唆していると考えられる。また、今回の検討で $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は単球の浸潤を抑制せず、好中球浸潤に対してより選択的に働くことが示唆された。細菌感染時には単球はこれを異物として認識し、貪食することで生体防衛の一端を担っている。グルココルチコイドは強力な免疫抑制剤であるが、生体防衛を担う細胞の機能も全て非選択的に抑制するため、易感染性を引き起こすことが問題のひとつとして知られている[42-44]。今回示された、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の作用は好中球浸潤抑制に対して選択的であるため、単球が関与する生体防衛機能を落とすことなく好中球浸潤を抑制できる可能性がある。単球の遊走に関わるケモカインは MCP-1 (Macrophage chemoattractant protein-1) であるが、MCP-1 に対する $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の作用についてはいくつかの報告が存在する。ヒト前駆脂肪細胞およびマウス培養メサンギウム細胞を用いた検討では $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は MCP-1 産生を抑制するとされているが[45, 46]、初代ヒト尿管上皮培養細胞を用いた検討では、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は IL-1 α 刺激による IL-8 産生を抑制するのに対し MCP-1 産生はむしろ亢進することが報告されており[36]、MCP-1 に対する $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の作用は細胞により異なる可能性が示唆されている。肺においては肺泡毛細血管膜および気道系の組織構成細胞 (structure cell) は種々の刺激の種類に応じて特異的なケモカインを産生することがわかっている。好中球、単球、マクロファージ、血管内皮細胞は LPS、TNF α 、IL-1 β のいずれにも反応して IL-8

を産生するが、IL-6 によっては産生しない。逆に、好中球、単球、マクロファージは LPS、TNF α 、IL-1 β 、IL-6 のいずれに反応しても MCP-1 は産生しない。ところが肺線維芽細胞と肺胞上皮細胞は TNF α や IL-1 β と反応して IL-8 と MCP-1 の両方を発現する [47]。ハムスターにおいて同様の機序が成立していると仮定すると、ハムスター LPS 誘発急性肺炎モデルにおいて認められた肺内への単球浸潤は、LPS により誘導された TNF α 、IL-1 β が肺線維芽細胞と肺胞上皮細胞に作用し、単球遊走に関与するケモカイン産生を誘導したものと考えられるが、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ はこのプロセスには作用を及ぼさない可能性がある。この点については更なる検討が必要で、肺線維芽細胞や肺胞上皮細胞を用いた *in vitro* MCP-1 産生系を構築し、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の作用を評価した上で考察しなければならないと考えられる。

ところで、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の血中半減期は数時間であるが、高カルシウム血症の回復より求めた生物学的半減期は 1.5 日であることが知られている [1]。そのため $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の血中カルシウム濃度上昇作用は連続投与で増大し、高カルシウム血症を引き起こす懸念がある。活性型ビタミン D₃ 製剤を炎症性肺疾患治療薬として使用する場合、特に COPD 等における慢性炎症状態の改善を期待する場合には長期間にわたる連続投与が必要であると考えられるが、血中カルシウム濃度の上昇により治療に必要とされるに十分な量を投与できない可能性がある。この問題を解決するには、好中球浸潤抑制活性を保持しつつ血中カルシウム濃度上昇作用がなるべく少ないビタミン D₃ 誘導体を開発する必要がある。この問題については第 2 章にて論じる。

1.3 この章の小括

- ハムスター LPS 誘発急性肺炎モデルにて、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が好中球浸潤抑制作用を有することが示された。 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は好中球浸潤のみを抑制し、単球に対しては無作用であった。一方、dexamethasone は好中球、単球浸潤を共に抑制した。
- 活性型ビタミン D₃ は好中球に選択的な浸潤抑制作用を示し、炎症性肺疾患治療薬となり得る可能性が示唆された。

第2章 血中カルシウム濃度上昇作用と乖離したビタミンD₃誘導体の創製

2.1 ビタミンDによる血中カルシウム濃度の制御

カルシウムは食物や飲料から摂取され、大部分は骨や歯に存在し、生体の構造を保つための屋台骨として機能している。それと共にカルシウムは筋肉（骨格筋、血管平滑筋、心筋）や神経などの神経活動に必須のイオンであり、また細胞内情報伝達や種々の酵素活性においても重要な役割を果たしていることが知られている。このような事情から、生体のカルシウム濃度は厳密に制御されており、正常ヒトでの正常範囲は補正血清カルシウム値で8.4~10.0 mg/dLとされている[48]。血中カルシウム濃度が高値に外れた場合、筋力低下、疲労、食欲低下、吐き気その他、多飲多尿、尿路結石のリスクがあり、逆に低値に外れた場合は手足のけいれん、しびれ、頻脈、不眠、うつ等の症状が引き起こされる。血中カルシウム濃度は副甲状腺ホルモン(PTH)と活性型ビタミンD₃、カルシトニンの相互作用により、腸からの吸収、腎からの排泄、骨からの放出、骨形成の間で無機リンと拮抗的にそのバランスを保っており、そこには緻密なフィードバック機構が存在している[1]。また、健康食品の分野では、ビタミンDは骨の健康維持、管理の目的でサプリメントとして広く用いられているが、これには20世紀初期にビタミンDの摂取量不足により、欠乏症としてくる病などが発症することが良く知

られるようになったことがその一因とされている。しかしながら第二次世界大戦後、特発性の高カルシウム血症とそれに関連する動脈弁上部狭窄の発症がビタミン D 強化食品にあることがわかり、現在では大用量のビタミン D 摂取は有害作用があることが広く認識されている。

第1章で述べたように、ビタミン D₃ は生体内で 1 α ,25(OH)₂D₃ に変換されて初めて生理作用を発揮する。食品やサプリメントからビタミン D₃ を摂取する場合、250 μ g/day (10,000 U/day) を6ヶ月間摂取しても安全である旨が報告されているが[49]、医薬品として活性型ビタミン D₃ を投与する場合、1 α ,25(OH)₂D₃ の場合の薬理量は 0.01~0.1 μ g/kg (60 kg ヒトで 0.6~6 μ g)、中毒量は 0.5 μ g/kg 以上 (60 kg ヒトで 30 μ g) と遥かに低いことが知られている[50]。ビタミン D₃ により引き起こされる血中カルシウム濃度上昇作用は hypercalcemic action と呼ばれており、ビタミン D₃ 誘導体を医薬品として開発する場合には常に意識しなければならない問題である。この hypercalcemic action が投薬継続の是非を決めると言っても過言ではない。

2.2 血中カルシウム濃度上昇作用と乖離した化合物取得の試み

1971年に活性型ビタミン D₃ の化学構造が解明されてから、これまでに 3000 を超えるビタミン D 誘導体が化学合成され、生理活性が検討されている[5]。化合物デザインの方角性としては、血中輸送の最適化と組織、細胞への移行特異性を向上させることで血中カルシウム濃度上昇作用と乖離させる方向、あるいは核内転写因子複合体リクルートメントに着目し、遺伝子転写のレベルで乖離させようとする方向が挙げられる。後者については同じステロイドレセプターのスーパーファミリーに属するエストロゲン受容体において成功例が存在し[51-53]、ビタミン D 受容体でも同様の化合物が創製できることを期待して研究が進められている。一方前者については CYP24A1 による側鎖の酸化的代謝速度を化学修飾により低下させ、生体内での活性物質の半減期を長くし、血中カルシウム濃度上昇作用を発現しないよう極めて低濃度で薬効を発揮させようとするもの[54]、DBP 結合親和性に着目し、低 DBP 結合親和性によるクリアランス速度の増加と標的組織への移行性向上を狙ったもの[55-59]が知られている。本研究が目指す炎症性肺疾患においては、薬剤の投与ルートとして経口投与の他、吸入投与が

広く用いられている[60, 61]。吸入投与により炎症局所へ高濃度の薬剤を速やかに到達させることができるため、肺炎症を抑制するにあたっては吸入投与のメリットを活かした製剤設計を優先して考えるべきである。高濃度の薬剤を速やかに肺病巣へ到達させ、全身的な副作用を低減するという方向で薬剤のコンセプトを考えた場合、ドラッグデザインの方向性として DBP 結合親和性に着目し、血中カルシウム濃度上昇作用と乖離させるアプローチは有用であると考えられる。そこで次節に述べるような考え方に沿って新規ビタミン D₃ 誘導体の創製に着手した。

2.3 この研究が目指す化合物デザインの方向性

前述したように低DBP結合親和性を有する化合物は、*in vivo*において血中カルシウム濃度上昇作用が弱いことが報告されている。血中カルシウム濃度上昇作用を含む生理活性作用はVDRを介する反応であり、その活性はVDR結合親和性に比例すると考えられている。ハムスターLPS誘発急性肺炎モデルで観察された好中球浸潤抑制活性もVDR結合親和性に比例すると考えられるが、化合物のスクリーニングを実施するにあたりこの点を確認しておく必要がある。そこで様々なVDR結合親和性を示す活性型ビタミンD₃誘導体12化合物(1 α ,25(OH)₂D₃を含む)について、本モデルにおいて好中球浸潤抑制活性を測定しVDR結合親和性との相関を分析した。結果をFig. 2-1に示す。

好中球浸潤抑制活性とVDR結合親和性の間には正の相関が存在し、相関係数は0.22であった。また、Fig. 2-2に示すように、TEI-A00114の側鎖の(5E)-(2S)-2-hydroxy-2-methyl-cyclopentanone-5-ylidene構造中の2位の立体化学を反転させたジアステレオマー、TEI-A00113ではDBP結合親和性は若干上がるがVDR結合親

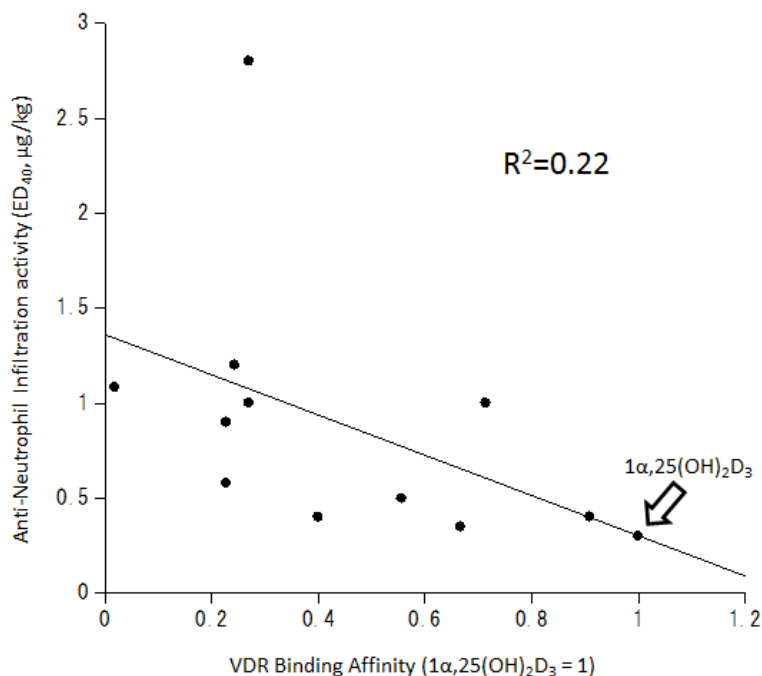


Fig. 2-1 Relationship between VDR binding affinity and anti-neutrophil infiltration activity. VDR binding affinities are expressed as relative activity that 1 α ,25(OH)₂D₃=1. Anti-neutrophil infiltration activities are expressed as ED₄₀ (μ g/kg) of hamster ALI model.

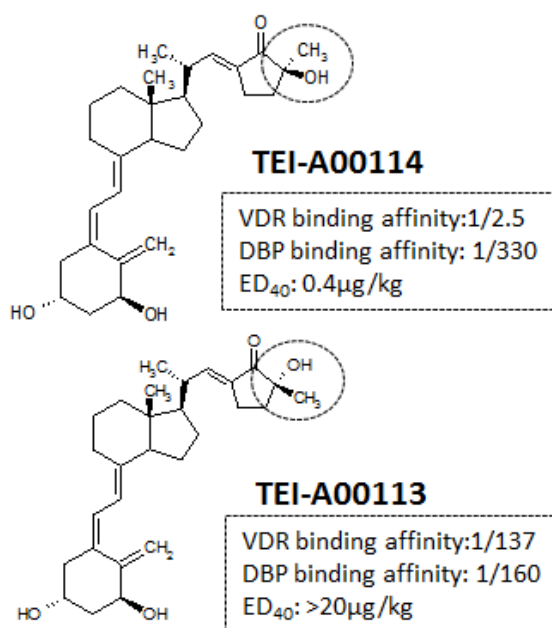


Fig. 2-2 Chemical structures of TEI-A00113 and TEI-A00114 and their VDR, DBP binding affinities and ED₄₀ (μg/kg) of hamster ALI model.

和性は著しく低下することがわかっている。TEI-A00114 の ED₄₀ 値は 0.4 μg/kg であるが TEI-A00113 は 20 μg/kg を投与しても有意な抑制作用を示さないことがわかった。

以上2点の実験結果より、VDR 結合親和性と好中球浸潤抑制活性は比例すると考え、ドラッグデザインの方向性を低 DBP 結合親和性、高 VDR 結合親和性と定めた。

スクリーニングには帝人ファーマ株式会社生物医学研究所保有の活性型ビタミン D₃ 誘導体のうち上記の性質を満たすもの、及び上記の事情を考慮して新たに合成展開した化合物を用いた。また VDR 結合親和性は有するが生理活性を有さない化合物を排除する目的で、ヒト骨髄白血病細胞 HL-60 の分化誘導活性を有するか否かを確認した。これらの基準を満たす約 60 化合物をハムスター LPS 誘発急性肺炎モデルにて評価し、次段階の評価に進めるに相応しいと思われる化合物を 7 つ選択した。これら 7 化合物についてラットを用いた 2 週間連続経口投与にて血中カルシウム濃度上昇作用を評価し、次に述べるような解離指標を算出して最も望ましいと考えられる化合物を 1 つ選択した。また、最終的な製剤として吸入剤をイメージし、ネブライザーの使用も想定し、水溶液への分散性が高い化合物が望ましいことを考慮し、いくつかの化合物については水溶液への溶解性を検討した。

2.4 化合物取得のためのスクリーニング

2.4.1 材料と方法

使用薬物

ハムスターLPS 誘発急性肺炎モデル作成および活性型ビタミン D₃ 誘導体投与に使用した、LPS、カルボキシメチルセルロースは第1章と同様のものを使用した。

[³H]1 α ,25(OH)₂D₃、[³H]25(OH)D₃ および[³H]26,27-dimethyl-1 α ,25(OH)₂D₃ はアマシャム・ライフサイエンス社より購入した。

1 α ,25(OH)₂D₃ および TEI 化合物 (TEI-A00114, TEI-A00359, TEI-B00022, TEI-B00377, TEI-B00868, TEI-B00869, TEI-C00188) は既報[62, 63]に則り帝人株式会社生物医学研究所にて合成し、HPLC にて純度検定を行った。1 α ,25(OH)₂D₃ および TEI-B00022, TEI-B00377 は 100%エタノールに溶解し、264 nm におけるモル分子吸光係数を 18200M⁻¹cm⁻¹ として定量した。また TEI-A00114, TEI-A00359, TEI-B00868, TEI-B00869, TEI-C00188 は 100%エタノールに溶解し、251 nm におけるモル分子吸光係数を 28990 M⁻¹cm⁻¹ として定量した。また、化合物は-20°Cにて保存した。フローセンは武田薬品工業から購入した。その他の試薬は和光純薬工業から購入した。なお、実験に使用した TEI-化合物の ¹H-NMR スペクトルデータは下記の通りである。

■ TEI-A00114

(5Z,7E)-(1S,3R)-20(R)-[(5E)-(2S)-2-Hydroxy-2-methyl-cyclopentanone-5-ylidene]methyl-9,10-secopregna-5,7,10(19)-triene-1,3-diol

C₂₈H₄₀O₄, ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ : 6.54 (d, *J* = 10.6 Hz, 1 H), 6.37 (d, *J* = 11.2 Hz, 1 H), 6.01 (d, *J* = 11.2 Hz, 1 H), 5.32 (s, 1 H), 4.98 (s, 1 H), 4.43 (br., 1 H), 4.23 (br., 1 H), 0.88-2.62 (m, 20 H), 1.26 (s, 3 H), 1.06 (d, *J* = 6.6 Hz, 3 H), 0.58 (s, 3 H).

■ TEI-A00359

(5Z,7E)-(1S,3R)-20(R)-[(6E)-(2R)-2-Hydroxy-2-methyl-cyclohexanone-6-ylidene]methyl-9,10-secopregna-5,7,10(19)-triene-1,3-diol

C₂₉H₄₂O₄, ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ : 6.37 (d, *J* = 11.2 Hz, 1 H), 6.29 (d, *J* = 9.6 Hz,

1 H), 6.03 (d, $J = 11.5$ Hz, 1 H), 5.32 (s, 1 H), 4.99 (s, 1 H), 4.42 (m, 1 H), 4.23 (m, 1 H), 3.71 (br., 1 H), 2.81-2.86 (m, 2 H), 1.23-2.57 (m, 20 H), 1.30 (s, 1 H), 1.04 (d, $J = 6.6$ Hz, 3 H), 0.58 (s, 3 H).

■ TEI-B00022

(5Z,7E)-(1S,3R,25R)-26-Methyl-9,10-secocholesta-5,7,10(19)-triene-1,3,25-triol-26-one

C₂₈H₄₄O₄, ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ: 0.53(s, 3 H), 0.90 (d, $J = 6.3$ Hz, 3 H), 0.81-2.02 (m, 20 H), 1.37 (s, 3 H), 2.22 (s, 3 H), 2.28-2.35 (m, 1 H), 2.57-2.63 (m, 1 H), 2.79-2.85 (m, 1 H), 4.23 (br., 1 H), 4.43 (br., 1 H), 5.00 (s, 1 H), 5.33 (s, 1 H), 6.01 (d, $J = 11.5$ Hz, 1 H), 6.38 (d, $J = 11.5$ Hz, 1 H).

■ TEI-B00377

(5Z,7E)-(1S,3R,25R)-26-Dimethylamino-9,10-secocholesta-5,7,10(19)-triene-1,3,25-triol-26-one

C₂₉H₄₇NO₄, ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ: 0.53 (s, 3 H), 0.90 (d, $J = 5.9$ Hz, 3 H), 1.00-2.50 (m, 23 H), 1.50 (s, 3 H), 3.09 (s, 6 H), 4.25-4.35 (m, 1 H), 4.35-4.45 (m, 1 H), 4.87 (s, 1 H), 5.00 (sept, $J = 6.3$ Hz, 1 H), 5.23 (s, 1 H), 6.01 (d, $J = 11.5$ Hz, 1 H), 6.37 (d, $J = 11.5$ Hz, 1 H).

■ TEI-B00868

(5Z,7E)-(1S,3R)-20(R)-[(5E)-2-Methyl-cyclopentanone-5-ylidene]methyl-9,10-secopenna-5,7,10(19)-triene-1,3-diol

C₂₈H₄₀O₃, ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ: 6.38 (d, $J = 11$ Hz, 2 H), 6.01 (d, $J = 11$ Hz, 1 H), 5.32 (s, 1 H), 4.99 (s, 1 H), 4.43 (br., 1 H), 4.22-4.24 (br., 1 H), 2.80-2.85 (m, 1 H), 2.56-2.69 (m, 1 H), 1.3-2.8 (m, 22 H), 1.13 (d, $J = 7$ Hz, 3 H), 1.06 (d, $J = 6.6$ Hz, 3 H), 0.58 (s, 3 H).

■ TEI-B00869

(5Z,7E)-(1S,3R)-20(R)-[(5E)-2-Methyl-cyclopentanone-5-ylidene]methyl-9,10-secopregn-5,7,10(19)-triene-1,3-diol

C₂₈H₄₀O₃, ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ: 6.39 (d, *J* = 10.3 Hz, 1 H), 6.38 (d, *J* = 11.9 Hz, 1 H), 6.00 (d, *J* = 11.5 Hz, 1 H), 5.32 (s, 1 H), 4.99 (s, 1 H), 4.43 (s, 1 H), 4.24 (s, 1 H), 2.80-2.86 (m, 1 H), 1.3-2.8 (m, 23 H), 1.14 (d, *J* = 6.9 Hz, 3 H), 1.05 (d, *J* = 6.6 Hz, 3 H), 0.57 (s, 3 H).

■ TEI-C00118

(5Z,7E)-(1S,3R)-20(R)-[(5E)-2-Ethyl-cyclopentanone-5-ylidene]methyl-9,10-secopregna-5,7,10(19)-triene-1,3-diol

C₂₉H₄₂O₃, ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ: 6.38 (d, *J* = 11 Hz, 2 H), 6.01 (d, *J* = 11 Hz, 1 H), 5.32 (s, 1 H), 4.99 (s, 1 H), 4.43 (br., 1 H), 4.23 (br., 1 H), 2.81-2.86 (m, 1 H), 1.30-2.80 (m, 25 H), 1.04 (d, *J* = 7 Hz, 3 H), 0.96 (t, *J* = 7 Hz, 3 H), 0.57 (s, 3 H).

VDR 結合親和性の測定

既報[64]に述べた方法により、ニワトリ小腸粘膜細胞を用い、VDR 結合親和性を測定した。すなわち 0.2 mg の小腸粘膜画分を 25 mM Phosphate buffer, pH 7.4, 0.1 M KCl, 1 mM DTT に加え、1 mg の Gelatin を添加した。15000 dpm の [³H]1α,25(OH)₂D₃ (比活性 180 Ci/mmol)、10 μl を添加し、さらに 40 μl のエタノールまたは 40 μl のビタミン D₃ 誘導体含有タノールを添加した。25°Cにて 60 min インキュベートした後、40%(w/v) の polyethylene glycol 1 mL を添加して反応を停止させ、2260×g にて 60 min 遠心して VDR に結合した [³H]1α,25(OH)₂D₃ を含む沈殿画分を採取し、液体シンチレーションカウンタ (Tri-Carb liquid scintillation counter Model 3255、Packard 社) にて放射活性を測定した。なお各種ビタミン D₃ 誘導体の VDR 結合親和性の比較は、50% displacement を与えるモル濃度にて行った。

DBP 結合親和性の測定

DBP 結合親和性の測定は、既報[65]に従ってウシ血清 DBP を用い、radio-competitive protein binding assay にて実施した。FCS を 50 mM PBS (pH 7.0)にて 2500 倍に希釈し、

この希釈液 200 μl に [³H]25(OH)D₃ (480 pg, 50000 dpm/tube) を 100 μl の 50 mM PBS (pH 7.0)-0.01% (w/w) Triton X-100 およびエタノールで希釈した各種濃度のビタミン D₃ 誘導体 10 μl を添加し、4°C で一晩インキュベートした。500 μl の dextran-coated charcoal を添加して激しく攪拌し、更に 15 min インキュベートした後、2000×g で 10 min 遠心した。上清 500 μl をサンプリングしてジオキサシンシンチレーターを用い、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定することにより、DBP に結合したビタミン D₃ 誘導体量を算出した。

ビタミン D₃ 誘導体の水溶液への溶解性の測定

100%エタノールに溶解した 1 α ,25(OH)₂D₃ およびビタミン D₃ 誘導体を 0.2%(v/v) Triton X-100-生理食塩水および生理食塩水のみの中に投入し、エタノールの最終濃度が 0.3% (v/v) かつ化合物の最終濃度が 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう調製した。溶液を激しく攪拌した後、2 mL ずつサンプリングして 10 mL の共栓付き試験管に分注し、内部標準物質として [26,27-methyl-³H]1 α ,25(OH)₂D₃ (放射活性 179 Ci/mmol; 26000 dpm) を加え、4 mL のクロロホルム-メタノール (1:1) を加えて激しく攪拌後、クロロホルム層から 1 mL サンプリングし、クロロホルム除去後に 18% (v/v) isopropanol-n-hexane に溶解し、HPLC システム (島津製 LC-10AS ポンプに紫外可視分光モニター SPD10AV/VIS を接続し、データ処理装置 CR-5A を使用した) にて順相カラム (Zorbax Sil カラム、4.6×250 mm、DuPont 社) を用い、移動層は 18% (v/v) isopropanol-n-hexane にて分離を行い、UV 吸収 (測定波長は化合物毎に前述したものをを用いた) をモニターしてビタミン D₃ 誘導体を定量した。また 1 α ,25(OH)₂D₃ 分画に溶出される放射活性を測定し、クロロホルム抽出および HPLC 操作による回収率を計算して補正した。

使用動物

雄性ゴールデンハムスター (8-10 週齢、体重 120-140 g) は日本チャールズリバー株式会社から購入した。また雄性 SD ラット (6 週齢) は日本エスエルシー株式会社から購入した。動物は恒温 (25±2°C)、恒湿 (55±15%) の動物飼育室にて実験日まで飼育した。

LPS 誘発急性肺炎モデルの作成方法

第1章と同様の方法にて作成した。ただし吸入投与においては投薬プロトコールの都合上、LPS 吸入時間を 25 min とした。

評価化合物の調製と経口、経気道投与法

LPS 誘発急性肺炎モデルでの評価は、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ および TEI-化合物は第2章と同様の方法で調製し、投与を実施した。

TEI-A00114 の吸入投与法

上述した方法にてハムスターを 25 分間 LPS 吸入暴露させた後、TEI-A00114 を 1%(v/v) エタノール-0.005%(v/v) Tween 80 に溶解し、オムロン社製ネブライザー NE-U12 にてミストを発生させた。ミストは送風ポンプにて小動物用鼻口部吸入暴露装置 (Shibata Scientific Technology, SIS-30EX) へ送り (送風量: 20 L/min)、ハムスターへ吸入暴露させた。投与量は曝露時間を変えることにより調節し、曝露時間 4 min、16 min、64 min の 3 用量を設定した。吸入暴露装置からミストの一部を 100% エタノール溶液中に回収し、逆相カラム (100-5C₁₈, 4.6×250 mm, GL サイエンス社) を用いた HPLC システム (島津製 LC-10AS ポンプに紫外可視分光モニター SPD-10AV/VIS を接続し、データ処理装置 CR-5A を使用した) にて定量した。移動層の溶媒組成はアセトニトリル/リン酸ナトリウム (pH 3.0) = 50:50 (v/v) を用い、吸光度 264 nm にてモニターした。得られた結果から既報[66]に従い吸入投与量を計算した。

気管支肺胞洗浄(BAL)の実施および気管支肺胞洗浄液 (BALF) の採取

第1章と同様の方法で実施した。

血漿中カルシウム濃度の測定

ハムスターにおける血中カルシウム濃度上昇作用に関しては、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 投与後、24, 48, 72 h 後にエーテル麻酔下にて眼底静脈からヘパリン処理した毛細管にて採血した。サンプルは 4°C 下 1000×g にて 10 min 遠心して血漿を調製し、カルシウム測定キット (第一化学薬品、Autosera Ca) を用いて自動分析装置 (日立 7070 オートアナライザー) にて測定した。

ラットにおける血中カルシウム濃度上昇作用に関しては、評価化合物を 10%(v/v) エ

タノール-0.1%(v/v) Triton X-100 に溶解し、2 mL/kg にて1日1回で連続14日間の経口投与を実施した。エーテル麻酔下にて眼底静脈からヘパリン処理した毛細管にて、投与開始後1, 3, 7, 14日目に採血を実施した。なお、採血は当日分の投与を行う前に実施した。サンプルは4°C下1000×gにて10 min 遠心して血漿を分離し、カルシウム測定キット（第一化学薬品、Autosera Ca）を用いて自動分析装置（オリンパス AU-600 オートアナライザー）にて測定した。

評価化合物のスクリーニング方法

ラットにおける血中カルシウム濃度上昇作用は、ひとつの化合物について3用量にて評価し、用量-反応曲線を描いて血漿カルシウムが1 mg/dL 上昇するのに必要な投与量を求め、この値を ΔCa (mg/kg) と定義した。好中球浸潤抑制活性については3用量にて評価し、用量-反応曲線を作成し、vehicle 投与群に比して40%抑制するために必要な投与量 (ED₄₀ (μg/kg)) を求めた。各評価化合物の活性強度は1α,25(OH)₂D₃ の ΔCa (0.53 μg/kg) と ED₄₀ (0.3 μg/kg) を100とした相対強度にて表示した。

本研究の目的は、好中球浸潤抑制活性を保持しつつ血中カルシウム濃度上昇作用ができるだけ低い化合物を見出すことにあり、目的とする生理活性（好中球浸潤抑制作用）と副作用（血中カルシウム濃度上昇作用）がなるべく乖離していることが望ましい。すなわち、ED₄₀ はなるべく大きく、 ΔCa はなるべく小さいことが望ましいと考えられる。この性質を数値にて表現するため、解離指標 (dissociation index) を下記の計算式にて算出し、この値がもっとも大きい化合物を最終候補化合物として選択した。

$$\text{Dissociation index} = \frac{\text{ED}_{40}}{\Delta \text{Ca}}$$

ヒト全血を用いた IL-8 産生抑制作用の検討

ヒト健常人ボランティアからヘパリン処理シリンジにて末梢血を採血した。採血した全血を96穴培養プレート (Becton Dickinson 社製) に0.2 mL/well となるよう分注し、100%エタノールに溶解した評価薬物（化合物の添加により血液中のエタノールの最終濃度が0.1% (v/v) となるよう調製）を添加した。評価薬物添加1h後に刺激物質としてLPSとrecombinant IL-1βを、最終濃度がそれぞれ1 μg/mL, 10 ng/mLとなるよう添加し、37°Cで24h、CO₂ インキュベーター内で95% CO₂-5% O₂ 条件下にて培養した。培養終

了後に培養上清を回収して-20°Cで保存し、IL-8 の ELISA キット (Duoset™、Genzyme 社) にて IL-8 産生量を定量した。

統計解析

第2章と同様の方法により行った。

2.4.2 結果

評価化合物スクリーニング結果

1次スクリーニングの結果選ばれた7つの TEI-化合物の構造式を Fig. 2-3 に示す。化合物の特徴として、A および C、D 環部分には修飾を加えず、側鎖部分のみが構造修飾された化合物であった。7化合物の VDR、DBP 結合親和性、ハムスターLPS 誘発急性肺炎モデルでの好中球浸潤抑制活性、ラット2週間連続経口投与での血中カルシウム濃度上昇作用、Dissociation index の数値を Table 2-1 にまとめた。Dissociation index で最も大きな値を示した化合物は TEI-A00114 であり、この化合物を最終候補化合物として選択した。

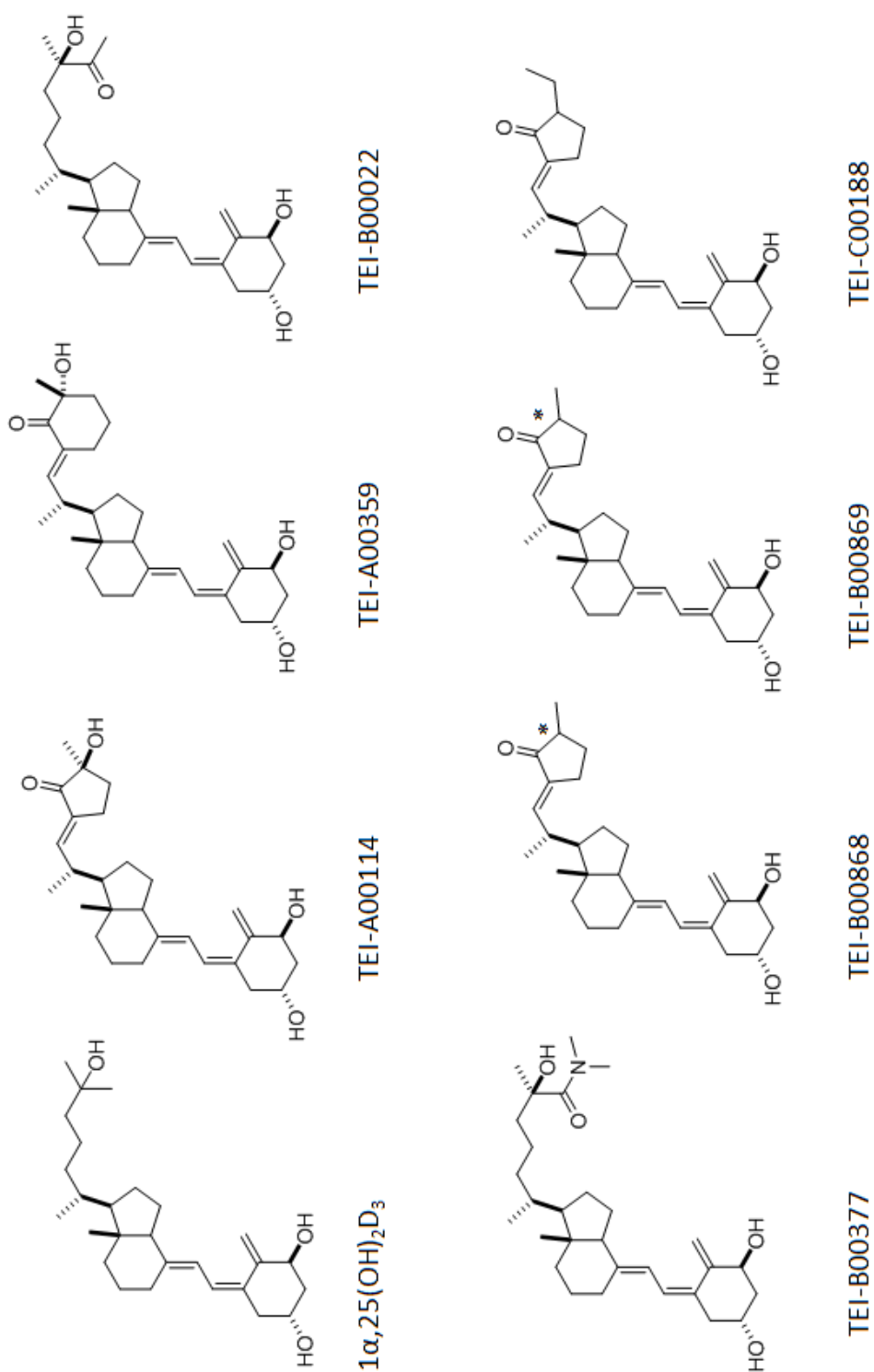


Fig. 2-3 Chemical structures of 1α,25(OH)₂D₃ and the vitamin D₃ analogues used in this study. *; Stereochemistry is not determined.

Table 2-1 Biological activities of the vitamin D₃ analogues. Screening results of vitamin D₃ analogue activity on VDR binding and DBP binding, effects of plasma calcium in rats, and inhibition of neutrophil recruitment in the lung in the hamster model of ALL.

Compound	Binding studies			In vivo studies		
	VDR (%)	DBP (%)	Plasma calcium (A) (%)	Inhibition of neutrophil recruitment (B) (%)	Dissociation index B/A ratio	
1 α ,25(OH) ₂ D ₃	100	100	100	100		1
	K _d = 3.0 × 10 ⁻¹¹ M			ED ₄₀ = 0.3 μ/kg		
	M					
TEL-A00114	40.0	0.30	1.12	79.3		70.8
TEL-B00869	27.0	2.33	1.45	76.4		52.7
TEL-B00377	27.0	0.03	0.39	12.2		31.3
TEL-C00188	55.6	16.4	4.00	63.2		15.8
TEL-B00022	90.9	1.69	9.09	80.0		8.80
TEL-B00868	24.4	3.13	15.9	25.5		1.60
TEL-A00359	66.7	0.50	100	81.8		0.82

Binding affinity is based on 50% effective dose. Inhibitory activity of neutrophil recruitment is based on 40% effective dose (ED₄₀), adjusted by molar ratio. The effects on increasing plasma calcium levels were determined by peroral administration over a two-week period. The estimated dose required to increase the plasma calcium level in rats by 1 mg/dL (Δ Ca) was calculated by the dose-response curve of each compound and expressed as a molar concentration. The "dissociation index" is the ratio of a compound's inhibitory activity against neutrophil recruitment (B) divided by its ability to increase plasma calcium level (A).

TEI-A00114 のハムスターLPS 誘発急性肺炎モデルにおける好中球浸潤抑制作用

Fig. 2-4 に TEI-A00114 の経口投与、経気道および吸入投与における肺内好中球浸潤抑制作用を示す。TEI-A00114 は経口、経気道、吸入投与で好中球浸潤抑制作用を示し、単球の浸潤には影響を及ぼさなかった。ED₄₀ 値はそれぞれ 7.6, 0.4, 0.2 μg/kg であった。

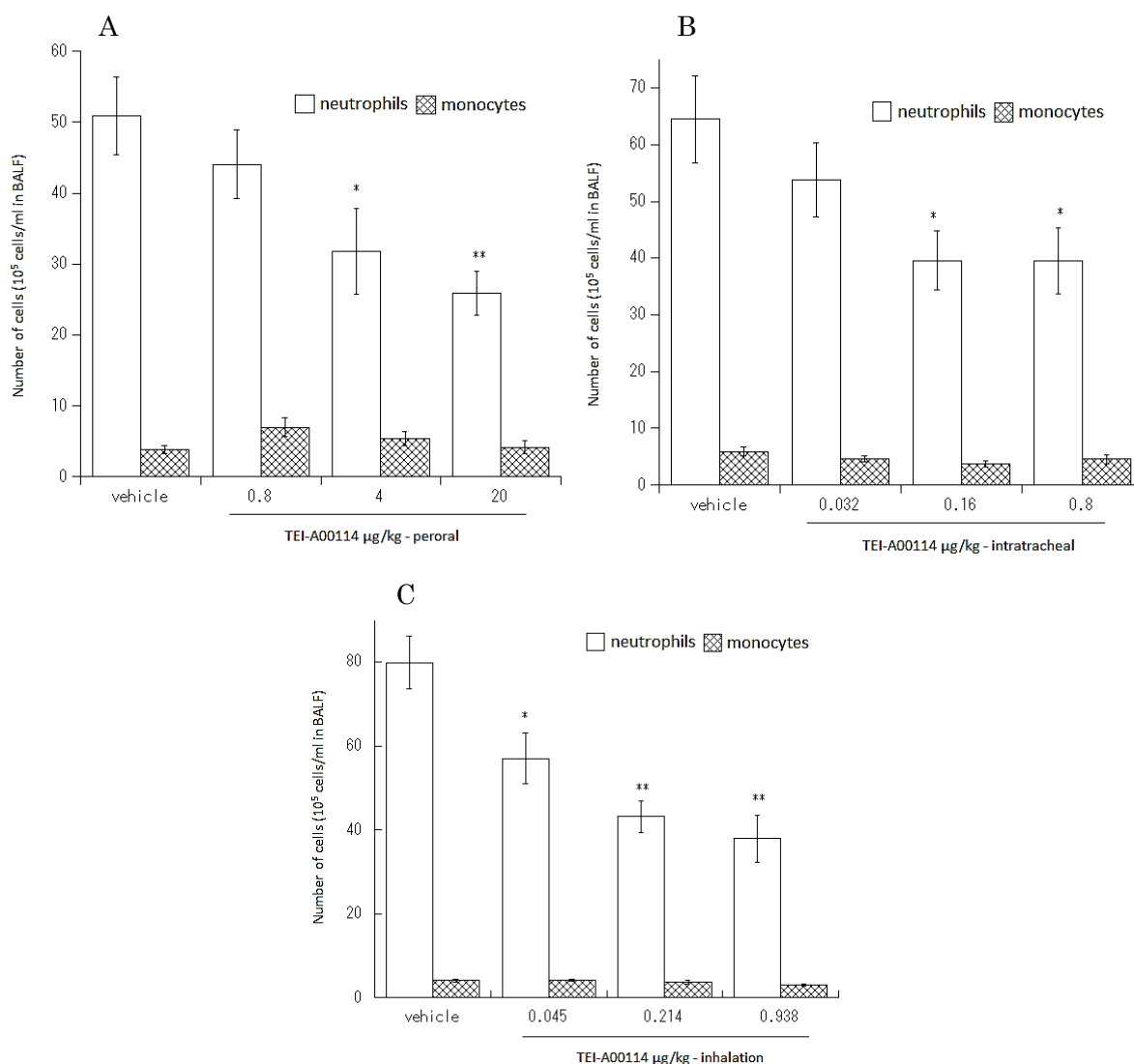


Fig. 2-4 Effect of TEI-A00114 on neutrophil and monocyte number in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in lipopolysaccharide (LPS)-inhaled hamsters. Hamsters were inhaled with 2 mg/mL LPS and administered TEI-A00114 (A) perorally 1 h before LPS inhalation, (B) intratracheally immediately after LPS inhalation, (C) and by inhalation after LPS inhalation. BALF was collected 24 h after LPS inhalation, and neutrophils and monocytes were counted. *p<0.05, **p<0.01 vs. vehicle (Dunnett's *t* test). Data are expressed as mean ± SEM values (n=9–10).

TEI-A00114 の血中カルシウム濃度上昇作用

TEI-A00114 の血中カルシウム濃度上昇作用について、ハムスター単回経口投与およびラット2週間連続経口投与において検討した。比較対照として1 α ,25(OH)₂D₃を使用した。結果をFig. 2-5に示す。ハムスター単回経口投与では、1 α ,25(OH)₂D₃は100 μ g/kg投与の3日目で初めて有意な血中カルシウム濃度上昇作用を認めたが、TEI-A00114は1000 μ g/kgを投与しても有意な血中カルシウム濃度上昇作用は認められなかった。また、ラット2週間連続投与における血中カルシウム濃度上昇作用に関して、1 α ,25(OH)₂D₃の Δ Caは0.53 μ g/kgであった。これに対してTEI-A00114の Δ Caは47.3 μ g/kgを示し、その作用強度は1 α ,25(OH)₂D₃の約89分の1（モル比）に低減されていた。

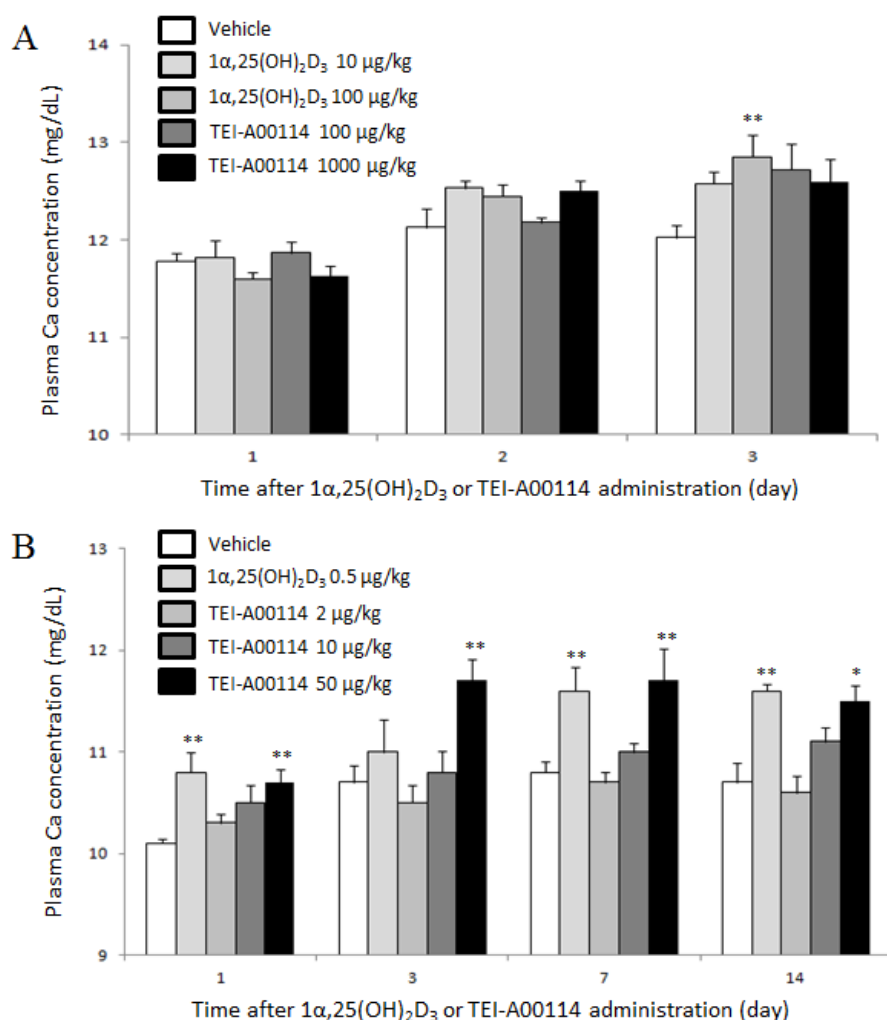


Fig. 2-5 Effects of TEI-A00114 and 1 α ,25(OH)₂D₃ on plasma calcium level in hamsters or rats (A) Hamsters were administered TEI-A00114 or 1 α ,25(OH)₂D₃ perorally and blood samples were collected at days 1, 2, and 3 after administration, and the levels of calcium in plasma were measured. (B) SD rats were administered TEI-A00114 (2, 10, and 50 μ g/kg) or 1 α ,25(OH)₂D₃ 0.5 μ g/kg perorally once daily for 14 days, blood samples were collected at days 1, 3, 7, and 14 after administration, and the levels of plasma calcium were measured. * p <0.05, ** p <0.01 vs. vehicle (Dunnett's t test). Data are expressed as mean \pm SEM values (n=3-6).

ヒト全血を用いた TEI-A00114 の IL-8 産生抑制作用

LPS および IL-1 β 刺激の結果を Fig. 2-6 に示す。いずれの刺激剤を用いても、TEI-A00114 は濃度依存的に IL-8 産生を抑制した。その ED₄₀ 値は LPS 刺激の場合は 9.8×10^{-8} M、IL-1 β 刺激の場合は 1.8×10^{-9} M を示し、TEI-A00114 は LPS 刺激より IL-1 β 刺激による IL-8 産生をより強く抑制した。陽性対照として同時比較した $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の活性強度から判断して、これら評価系における TEI-A00114 の IL-8 産生抑制活性は $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ と同等であると考えられる。

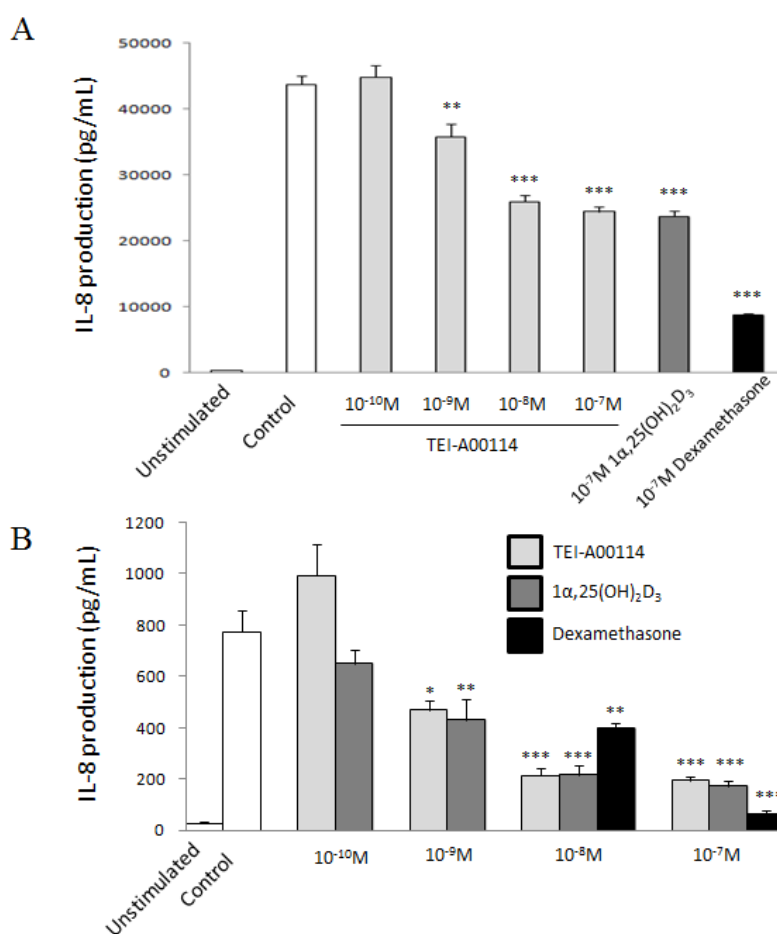


Fig. 2-6 Effects of TEI-A00114 and $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on interleukin (IL)-8 production by LPS- or IL-1 β -stimulated cells in human peripheral whole blood. Human whole blood was stimulated by (A) LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or (B) IL-1 β (10 ng/mL) for 24 h. TEI-A00114, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, or dexamethasone was added at the final concentrations indicated 1 h before the addition of LPS or IL-1 β . IL-8 concentrations of culture supernatants were measured by ELISA. Data are expressed as mean \pm SEM values of triplicate culture. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with control (Dunnett's t test).

ビタミン D₃ 誘導体の水溶液への溶解性

検討した化合物の中では、TEI-A00114 の溶解性が最も高く、1 α ,25(OH)₂D₃ の溶解性の約 4.4 倍を示した (Table 2-2)。これは側鎖への極性基 (カルボニル基および水酸基) を導入したことによる効果と思われた。Dissociation index で TEI-A00114 に次ぐ成績を示した TEI-B00869 の溶解性は 1 α ,25(OH)₂D₃ 以下であった。

Table 2-2 Solubility of vitamin D₃ analogues in 0.3% (v/v) ethanol-saline

Compounds	Solubility (%)
1 α ,25(OH) ₂ D ₃	17.54
TEI-A00114	76.47
TEI-B00869	13.95
TEI-B00377	-
TEI-C00188	15.04
TEI-B00022	32.00
TEI-B00868	13.95
TEI-A00359	-

Vitamin D₃ analogues were dissolved in 0.2% (v/v) Triton X-100 and measured their concentration using HPLC method as controls (100% solubility). Vitamin D₃ analogues were also dissolved in 0.3% (v/v) Ethanol-saline and measured their concentrations. Each solubility are calculated using the following formula. Solubility (%) = compound concentration in 0.3% (v/v) ethanol-saline/ compound concentration in 0.3% (v/v) ethanol-saline containing 0.2% (v/v) Triton X-100.

2.4.3 考察

現在までに血中カルシウム濃度上昇作用と目的とする生理活性が乖離したビタミン D₃ 誘導体はいくつか報告されているが[5, 10, 58, 59, 67-69]、臨床応用されている化合物はわずかである[55, 70]。組織、細胞特異的な生理活性を示すとされるビタミン D₃ 誘導体も報告されている[71, 72]が、選択的エストロゲンモジュレーターのように転写共役因子レベルでの作用分離が達成され、臨床応用されている化合物は知られていない。複数のビタミン D₃ 誘導体を用いた先行研究により、化合物に低 DBP 結合親和性の性質を付与することは血中カルシウム濃度上昇作用を回避させるための方策の一つであると考えられている。このような状況下において、低 DBP 結合親和性に着目したアプローチは血中カルシウム濃度上昇作用と乖離したビタミン D₃ 誘導体を創製する上で依然として意義があると考えられ、実際このアプローチは本研究において TEI-A00114 の創製に結びついた。また、本検討における一連の TEI-化合物の評価結果から、血中カル

シウム濃度上昇作用と好中球浸潤抑制活性の乖離に関して次のような事実が明らかになった。TEI-A00359 はその側鎖中に cyclohexanone 構造を有しており、好中球浸潤抑制活性は TEI-A00114 とほぼ同等の値を示す。しかしながら TEI-A00359 の血中カルシウム濃度上昇作用は $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ とほぼ同等であり、好中球浸潤抑制作用との間に乖離は認められなかった。このことから側鎖にある cyclopentanone 構造が血中カルシウム濃度上昇作用との乖離には重要であると考えられる。また TEI-A00114 のジアステレオアイソマーである TEI-A00113 は、側鎖中に cyclopentenone 構造を有するが、その (5E)-(2S)-2-hydroxy-2-methyl-cyclopentanone-5-ylidene 構造中の 2 位の立体化学が反転して 2R となった化合物である。TEI-A00113 は TEI-A00114 と比して VDR 結合親和性が約 55 分の 1 に低下しているが、逆に DBP 結合親和性は約 2.1 倍強い。この化合物をハムスター LPS 誘発急性肺炎モデルにて好中球浸潤抑制作用を評価したところ、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ でも有意な抑制は認められず、VDR 結合親和性の低下が好中球浸潤抑制活性の低下を引き起こしたものと考えられる。また、これらの実験事実は、側鎖中にある (5E)-(2S)-2-hydroxy-2-methyl-cyclopentanone 構造が好中球浸潤抑制活性を保持しつつ、血中カルシウム濃度上昇活性との乖離に重要であることを示唆している。

呼吸器疾患において吸入投与は一般的に広く用いられている薬剤の投与方法であり、標的部位へ効率よく薬剤を到達させ、かつ全身的な副作用を軽減できることが知られている[61, 73]。今回、TEI-A00114 は吸入投与により好中球浸潤抑制作用を示しており、臨床応用においても吸入投与が選択できる期待が持てる。ビタミン D 誘導体はその構造から見て脂質性が高く、一般的に水溶性溶媒への溶解性は悪い。吸入剤形を設計する上での特殊性として、使用可能な添加剤の種類が少なく、かつそれらの使用量の上限も低いという事情がある。化合物が水溶液中に均一に分散可能であれば、吸入投与として懸濁型ネブライザーが使用でき、溶液状態での化合物安定性の確認が必要であるものの製剤化のハードルは低くなると考えられる。TEI-A00114 の水溶液への分散性は $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ よりも遥かに高いため、懸濁型ネブライザー製剤を設計するにあたり望ましい性質を有していると考えられる。

近年、活性型ビタミン D₃ の有する免疫調節作用が着目され、治療薬としての応用可能性を検討すべく多数の試みがなされている[67]。さらに低 DBP 結合親和性を有し、抗炎症作用や免疫調節作用、抗がん作用を発揮する誘導体の開発も行われている[74]。

活性型ビタミン D₃ を生成する律速酵素とされる 1 α -hydroxylase は様々な組織の細胞、気道上皮細胞[75]、肺胞マクロファージ[76-78]、樹状細胞[79, 80]、リンパ球[81]で発現していることが報告されており、全身的な骨カルシウム代謝だけでなく肺局所において活性型ビタミン D₃ が生理機能の調節に働いている可能性が示唆されている。肺における活性型ビタミン D₃ の作用としては抗菌活性ペプチドである cathelicidin の発現亢進の誘導[82]、サイトカイン産生抑制[83]、樹状細胞活性化の抑制[83]、T 細胞活性化抑制[83]が報告されていて、これらの生理作用は細菌感染により生じる免疫応答やアレルギー性喘息等のアレルギー反応において重要な働きをするものと考えられている[12, 84]。近年、嚢胞性肺線維症患者由来の気道上皮細胞において、1 α ,25(OH)₂D₃ が IL-6、IL-8 の産生を抑制することが示されている[85]。嚢胞性肺線維症では肺内への好中球浸潤が認められることから[86-88]、活性型ビタミン D₃ を用いた嚢胞性肺線維症治療の可能性が示唆されると考察されているが、現状では好中球浸潤抑制剤としての活性型ビタミン D₃ の可能性については十分に調べられておらず、実験データの積み重ねが必要である。このような状況において、血中カルシウム濃度上昇作用を低減し、かつ吸入投与で活性を示す TEI-A00114 の登場は、好中球が関与する炎症性肺疾患の病態改善に新たな治療の選択肢を提供できる可能性を示唆している。

2.5 この章の小括

- 血中カルシウム濃度上昇作用との乖離の方向性を高 VDR 結合親和性、低 DBP 結合親和性を有する活性型ビタミン D₃ 誘導体と定め、好中球浸潤抑制作用と血中カルシウム濃度上昇作用を評価してスクリーニングを実施した。
- ハムスターLPS 誘発急性肺炎モデルおよびラット 2 週間連投による血中カルシウム濃度上昇作用から判断し、好中球浸潤抑制作用と血中カルシウム濃度上昇作用が最も乖離した化合物として TEI-A00114 を選択した。
- TEI-A00114 の肺内好中球浸潤活性強度は 1 α ,25(OH)₂D₃ の 79%であったが、calcemic action は 1 α ,25(OH)₂D₃ の 1.1%であった。(いずれもモル比)
- ヒト全血において、TEI-A00114 は LPS、IL-1 β 刺激による IL-8 産生を抑制し、その活性強度は 1 α ,25(OH)₂D₃ と同程度であった。

第3章 TEI-A00114 の作用プロファイルの検討

LPS 誘発急性肺炎モデルにおいて、主たる炎症の場は呼吸細気管支～肺泡領域であり、この領域において最初に LPS 刺激に応答する細胞は肺泡マクロファージであると考えられる。肺泡マクロファージは LPS 刺激により IL-8 を産生すると共に pro-inflammatory cytokine である TNF α 、IL-1 β を産生し、これらが autocrine に作用して更なる IL-8 産生を誘導すると同時に、paracrine 的に肺の常在性細胞に作用して IL-8 の産生を誘導する、一連の炎症カスケードが存在するとされている[89]。つまり、好中球浸潤には LPS 刺激により炎症反応が惹起され、LPS により直接 IL-8 が産生される反応と、LPS 刺激により産生された TNF α 、IL-1 β がエフェクター細胞に作用して IL-8 を産生する反応が寄与していると考えられ、後者においては LPS に直接応答しない細胞が IL-8 産生のエフェクター細胞として機能すると考えられる。そこで、これらのサイトカインネットワークに TEI-A00114 がどのような効果を及ぼすかを解析する目的で次のような検討を行った。

1. TEI-A00114 が肺泡マクロファージからの LPS 刺激による IL-8 産生を直接抑制する場合、炎症早期の好中球浸潤に対して抑制効果が認められるはずである。そこでハムスターLPS 誘発急性肺炎モデルにおける TEI-A00114 の好中球浸潤抑制作用の経時変化（投与後 1, 6, 24 h）を検討した。
2. 単球系細胞に対する TEI-A00114 の効果を検討するため、ヒト全血を用い、LPS、TNF α 、IL-1 β 刺激における TEI-A00114 の IL-8 産生抑制効果を検討した。

3. Paracrine 作用による TEI-A00114 の IL-8 産生抑制作用を検討するため、ヒト線維芽細胞の TNF α 、IL-1 β 刺激による IL-8 産生に対する TEI-A00114 の効果を検討した。

3.1 ハムスターLPS 誘発急性肺炎モデルでの TEI-A00114 作用の経時変化

3.1.1 材料および方法

使用薬物、使用動物、LPS 吸入肺炎モデル作成方法、経気道投与は第1章、第2章と同様の方法により行った。LPS 吸入後直ちに 4 μ g/kg で TEI-A00114 を経気道投与し、LPS 吸入から 1, 6, 24 h 後の好中球浸潤抑制作用を測定した。また統計手法は各評価ポイントにおいて vehicle 投与群と TEI-A00114 投与群の 2 群間を Student's *t* test により解析し、 $p < 0.05$ を統計学的有意差が認められると判断した。

3.1.2 結果

結果を Fig. 3-1 に示す。LPS 吸入 1, 6 h 後では TEI-A00114 は好中球浸潤抑制作用を示さず、24 h 後のポイントのみで好中球浸潤を有意に抑制した。この結果は TEI-A00114 は LPS 吸入後早期に惹起される好中球浸潤には作用を及ぼさず、その作用発現には一定の時間が必要とされることを示唆しているものと考えられる。

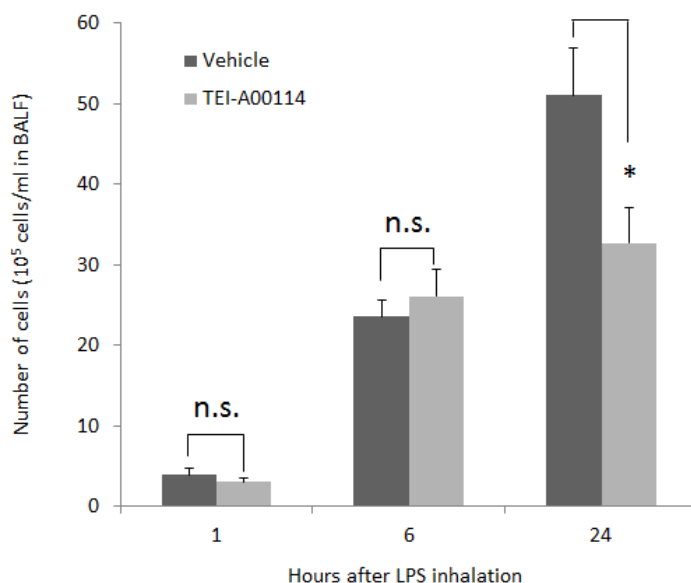


Fig. 3-1 Time course of neutrophil infiltration after LPS inhalation in LPS-inhaled hamsters. Hamsters were administrated vehicle or TEI-A00114 (4 µg/kg i.t.) immediately after LPS (2 mg/mL) inhalation. BALFs were collected at 1, 6 or 24 h after LPS inhalation. * $p < 0.05$ vs. vehicle (Student's t test). Data are expressed as mean \pm SEM values (n=8).

3.1.3 考察

TEI-A00114 は LPS 吸入後 1, 6 h の好中球浸潤を抑制しないことから、LPS 吸入の初期段階における肺胞マクロファージからの IL-8 産生を TEI-A00114 は抑制しないと考えられる。ところで dexamethasone は肺胞マクロファージに対して強い抗炎症作用を有することが知られており、LPS 吸入肺炎モデルにおいて 1 h より BALF 中 TNF α 濃度の上昇を抑制し[90]、3 h で好中球浸潤抑制作用を示すことが報告されている[91]。また本研究における検討の一環として、SD ラットを用いた LPS 誘発急性肺炎モデルにて dexamethasone が LPS 吸入後 6 h で好中球浸潤を抑制すること、BALF 中 TNF α 濃度上昇がほぼ 100%抑制されることを観察している (Data are not shown)。これらの知見から、気道常在性細胞に対する LPS 刺激によるサイトカイン産生に抑制作用を有する薬剤であれば LPS 吸入後 3~6 h で好中球浸潤抑制が観察されることが考えられる。しかし TEI-A00114 は LPS 吸入後 6 h での好中球浸潤に対して抑制作用を示さないことから、炎症惹起物質として LPS を使用した場合に限定的である可能性はあるが、LPS 刺激により直接惹起される気道常在性細胞からの IL-8 産生抑制作用は有さないと考えられ、また LPS 吸入後 6 h までに観察される好中球浸潤に関わる過程は TEI-A00114 の主たる作用点ではない可能性がある。具体的には LPS に直接応答して誘導されるロイコトリ

エンB₄産生やCINC-1、MIP-2等の好中球遊走因子の産生とそれに引き続く好中球遊走、pro-inflammatory cytokineであるTNF α やIL-1 β により誘導される接着因子ICAM-1の発現とそれを介するトランスマイグレーション[92]に対してTEI-A00114は作用を及ぼさないと思われる。これらの作用を検討するにはそれぞれにつき適切な*in vitro*評価系にてTEI-A00114の作用を調べなければならないが、本実験結果は、本モデルで観察されたTEI-A00114の好中球浸潤抑制作用はこれら以外の過程に作用することにより発現する可能性を示唆している。

ところで、ヒト全血での検討により、LPSそれ自体が単球からIL-8産生を惹起すると同時にTNF α 、IL-1 β の産生も惹起し、これらの因子がautocrine、paracrineに作用して更なるIL-8の産生を惹起する可能性が指摘されている[34]。TEI-A00114の好中球浸潤抑制作用がLPS吸入後6hまでは認められず、24hで認められることは、LPS刺激により肺胞マクロファージから産生されたTNF α 、IL-1 β がエフェクター細胞に作用してIL-8産生を惹起し、この過程をTEI-A00114が抑制している可能性が考えられる。そこでヒト全血を用いて1) LPS刺激後のIL-8産生経時変化、2) TNF α 、IL-1 β 刺激後のIL-8産生経時変化およびTEI-A00114の作用について検討した。またTEI-A00114がLPS刺激によるTNF α 、IL-1 β 産生を抑制することでIL-8産生を抑制している可能性も考えられるため、3) LPS刺激後のTNF α 、IL-1 β 産生経時変化の経時変化に対するTEI-A00114の作用についても検討を行った。これらの結果について次項で述べる。

3.2 ヒト全血を用いた、IL-8、TNF α 、IL-1 β 産生に対するTEI-A00114の作用

3.2.1 材料および方法

ヒト全血を用いた各種サイトカイン抑制作用の検討

ヒト全血の採血、使用機材、薬剤の添加条件、細胞培養条件は第2章と同様の方法にて行った。TNF α 、IL-1 β はR&D Systems社より購入した。またTNF α 、IL-1 β 測定のためのELISA kitはIL-8と同様にGenzyme社のDuoset™を使用した。なおTEI-A00114およびdexamethasoneの使用濃度はTakahashiらの条件[34]に従い10⁻⁷ Mとし、刺激物質添加の1h前に培養液へ添加した。

ヒト全血を LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、TNF α (20 ng/mL)、IL-1 β (10 ng/mL) あるいは TNF α (20 ng/mL) + IL-1 β (10 ng/mL) で刺激し、IL-8 産生に対する TEI-A00114 および dexamethasone の効果を経時的(1, 2, 4, 8, 24 h)に検討した。

ヒト全血を LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)にて刺激し、遊離する TNF α 、IL-1 β に対する TEI-A00114 および dexamethasone の作用比較を経時的(1, 2, 4, 8, 24 h)に解析した。

3.2.2 結果

LPS, TNF α , IL-1 β 刺激に対する IL-8 産生経時変化の解析

結果を Fig. 3-2 に示す。LPS 刺激による IL-8 産生は 4 h まで急激に増加し、その後緩やかとなり 48 h まで増加を続けた。TNF α あるいは IL-1 β で刺激した場合、LPS 刺激に比べて 8 h 未満での IL-8 産生能は非常に低く、また刺激後 24 h での評価においても IL-8 産生レベルは LPS 刺激に比べそれぞれ 18 および 22%であった。TNF α と IL-1 β を同時に添加した場合は LPS 刺激に比べ 55%の IL-8 産生 (刺激後 24 h) を示し、相加的な作用が認められた。

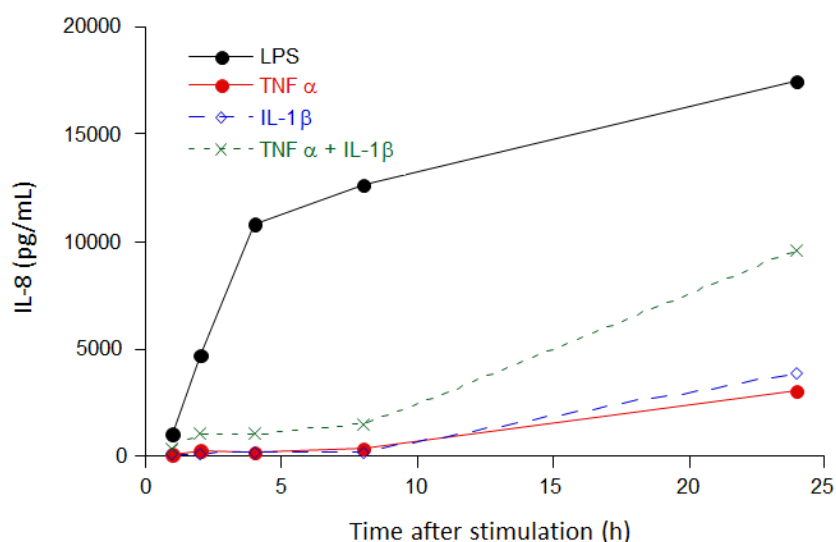


Fig. 3-2 IL-8 production from human peripheral whole blood. Human peripheral whole blood was stimulated by LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or TNF α (20 ng/mL) or IL-1 β (10 ng/mL) or TNF α (20 ng/mL) + IL-1 β (10 ng/mL) for 1, 2, 4, 8 and 24 h, and centrifuged 1000 \times g for 5 min at 4 $^{\circ}\text{C}$ to separate plasma. The level of IL-8 was measured by ELISA. Data are expressed as mean value of duplicate culture.

IL-8 産生経時変化 (LPS 刺激)に対する TEI-A00114 の作用

結果を Fig. 3-3 に示す。LPS 刺激による IL-8 産生を TEI-A00114 は 24, 48 h でそれぞれ 55, 27%の抑制を示した。また Dexamethasone は 24, 48 h でそれぞれ 91, 75%の抑制を示した。TEI-A00114 は 8 h 未満では抑制作用が認められなかったが、dexamethasone は 50%前後の抑制を示した。この条件で IL-8 の産生は二相性を示し、前半～12 h の IL-8 は TNF α あるいは IL-1 β 非依存性で、12 h 以降の産生は anti-TNF α 抗体あるいは anti-IL-1 β 抗体により抑制されることが報告されている[93]。従って、12, 24 h で観察された IL-8 産生抑制作用の機序としては TEI-A00114 が TNF α あるいは IL-1 β により惹起される IL-8 を阻害したか、TEI-A00114 が TNF α あるいは IL-1 β 産生を抑制した可能性が考えられる。第2章で論じたように、少なくとも LPS 刺激後 24 h において TEI-A00114 は IL-1 β 刺激による IL-8 産生を抑制することがわかっている。そこでこの現象をより詳細に解析するため、全血を TNF α および IL-1 β で直接刺激した場合の IL-8 産生に対する TEI-A00114 の作用、および TEI-A00114 の TNF α 、IL-1 β 産生抑制作用について検討した。

IL-8 産生経時変化 (TNF α , IL-1 β , TNF α +IL-1 β 刺激)に対する TEI-A00114 の作用

結果を Fig. 3-4 に示す。TEI-A00114 (10^{-7} M)は TNF α 、IL-1 β 、TNF α +IL-1 β 刺激によ

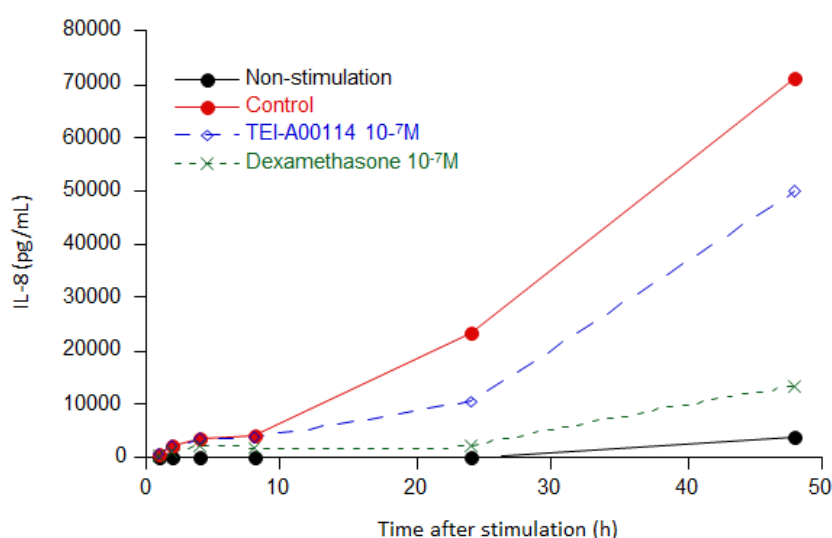


Fig. 3-3 Effect of TEI-A00114 on the production of IL-8 from LPS-stimulated human peripheral whole blood. Human peripheral whole blood was stimulated by LPS (1 μ g/mL) for 1, 2, 4, 8, 24 and 48 h, and centrifuged 1000 \times g for 5 min at 4 $^{\circ}$ C to separate plasma. TEI-A00114 (10^{-7} M) or dexamethasone (10^{-7} M) was dissolved in ethanol and added to whole blood at t= -1 h. The level of IL-8 was measured by ELISA. Data are expressed as mean value of duplicate culture.

り産生される IL-8 を 24 h で 76%、87%、67%抑制した。また、LPS 刺激の場合と同様に、8 h 未満での抑制は認められなかった。

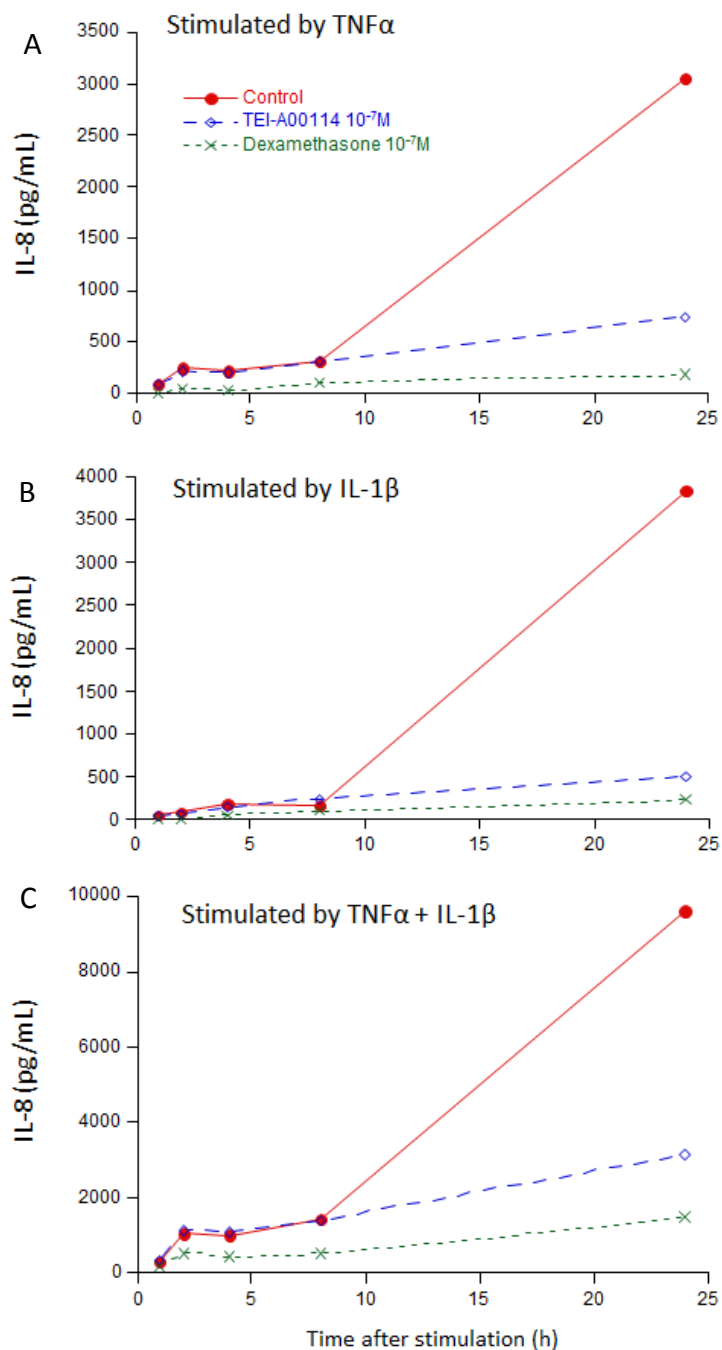


Fig. 3-4 Effects of TEI-A00114 on production of IL-8 from human peripheral whole blood stimulated by (A) TNF α , (B) IL-1 β or (C) combination of TNF α and IL-1 β for 1, 2, 4, 8 and 24 h, and centrifuged 1000 \times g for 5 min at 4 $^{\circ}$ C to separate plasma. The level of IL-8 was measured by ELISA. Data are expressed as mean value of duplicate culture.

TNF α 、IL-1 β 産生経時変化(LPS 刺激)に対する TEI-A00114 の作用

結果を Fig. 3-5 に示す。TNF α 産生レベルは 4 h で peak となりその後漸減した。TEI-A00114 は 4 h において 54%の抑制を示し、Dexamethasone は 84%の抑制を示した。IL-1 β は 8 h まで急激に増加し、その後 48 h までほぼ一定の値を示した。TEI-A00114 は 8 h で 34%の抑制を示し、dexamethasone は 84%抑制した。

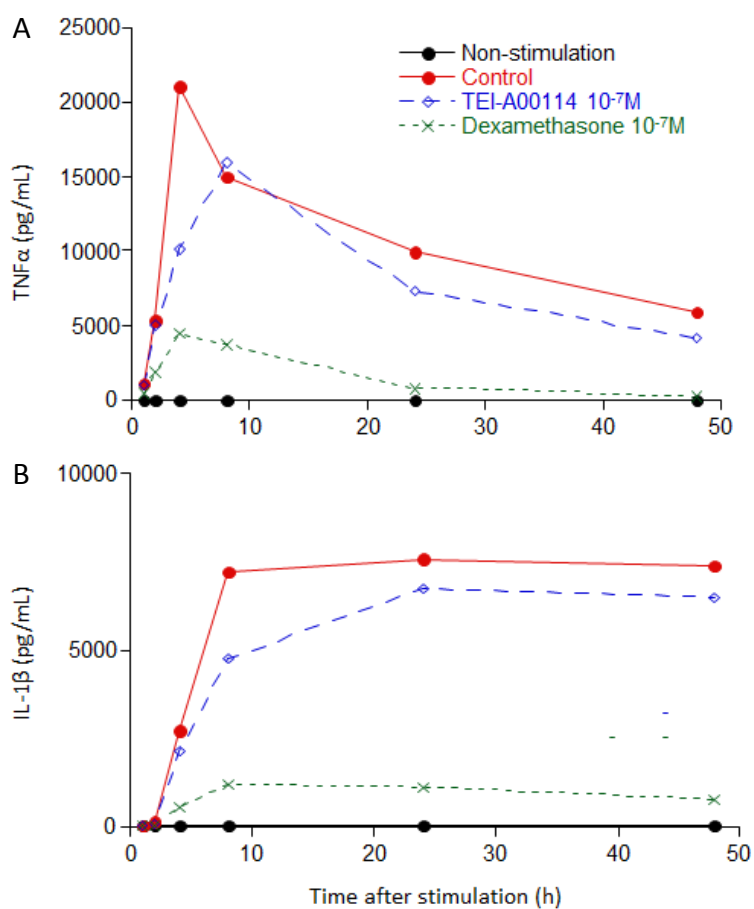


Fig. 3-5 Effects of TEI-A00114 and dexamethasone on the production of soluble (A) TNF α , (B) IL-1 β from LPS-stimulated human peripheral whole blood. Human peripheral whole blood was stimulated by LPS (1 μ g/mL) for 1, 2, 4, 8, 24 and 48 h, and centrifuged 1000 \times g for 5 min at 4 $^{\circ}$ C to separate plasma. TEI-A00114 or dexamethasone was dissolved in ethanol and added to whole blood at t= -1 h. The level of TNF α and IL-1 β were measured by ELISA. Data are expressed as mean value of duplicate culture.

3.2.3 考察

TEI-A00114 は LPS 刺激により産生される TNF α 、IL-1 β を抑制するが、その作用は協力であるとは言えず、かつ抑制作用は刺激後 6~8 h に限定されていた。従ってこれらの抑制作用が刺激後 24 h の IL-8 産生抑制作用に貢献しているとしても、その寄与は限定的であると考えられる。一方で TNF α 、IL-1 β を刺激剤として用いた場合、これらにより惹起される IL-8 産生は TEI-A00114 により強く抑制された。これらの事実を総合すると、TEI-A00114 は LPS に直接応答して誘導される IL-8 産生に対して明確な抑制作用を示さず、IL-1 β あるいは TNF α で誘導される IL-8 産生を抑制することにより好中球浸潤抑制作用を発揮すると考えられる。ヒト全血において LPS 刺激後 8 h までの IL-8 産生を TEI-A00114 が抑制しないという結果は、ハムスターLPS 誘発急性肺炎モデルにて TEI-A00114 が LPS 吸入後 1, 6 h では好中球浸潤抑制作用を示さないという実験結果と整合性があり、*in vivo* の試験結果を説明し得るものと考えられる。

ヒト全血を LPS で刺激した場合、刺激後 6 h で産生される IL-8 の由来は主に単球であることが確認されている[34]。従って、本検討結果から TEI-A00114 は単球が LPS 刺激に応答して産生する IL-8 に対して抑制効果を示さないと考えられる。刺激後 24 h で観察される IL-8 は依然として主に単球由来であると考えられるが[34]、この時点において TEI-A00114 は VDR を介して TNF α 、IL-1 β 刺激により特異的に活性化される転写因子を抑制している可能性が考えられる。また TNF α 、IL-1 β 刺激による IL-8 産生誘導は刺激後 8 h から 24 h で急激に増大するが、この間に何らかの因子が誘導され、TEI-A00114 は VDR を介してその因子の作用を抑制し、その結果 IL-8 産生を抑制する可能性も考えられる。さらにグルココルチコイドのように TEI-A00114 が I κ B のような抗炎症作用のあるタンパクを誘導する可能性も否定できず、今後より詳細な検討が必要である。

3.3 ヒト肺線維芽細胞の IL-8 産生における TEI-A00114 の作用

肺常在性細胞は気道上皮細胞、肺線維芽細胞、肺内皮血管細胞、常在性肺胞マクロファージなどから構成されている。ハムスターLPS 誘発急性肺炎モデルにおいて最初に LPS に応答する細胞は肺胞マクロファージであると考えられるが、その後は様々な細胞が関与して炎症カスケードが進行し、病態を形成するものと考えられる。そこで

炎症カスケードにおける TEI-A00114 の作用プロファイル解析の一環として、肺線維芽細胞 (NHLF) の IL-8 産生能に対する TEI-A00114 の作用を検討した。

3.3.1 材料および方法

使用細胞および培地

細胞、継代数：Clonetics 社より購入した NHLF2387 (17 才白人男性ドナー) を使用し、購入時初代培養から 10 PDL までの継代数を評価に供した。

培地：線維芽細胞基礎培地 (FGM) を基に、培養条件によって以下の 3 種の培地を使い分けた。

FGM (+)：基礎培地+2 % FCS+bFGF+insulin+1 % Pen/Strep

FGM (sera)：基礎培地+2 % FCS+1 % ペニシリン/ストレプトマイシン

FGM (-)：基礎培地+0.1 % BSA+1 % ペニシリン/ストレプトマイシン

継代培養：FGM (+) 中 75 cm² culture flask で行った。サブコンフルエントな状態で 1-4 もしくは 1-2 split で植え継いだ。

Cell seeding：評価に足る細胞数まで増殖させた時点で、FGM (sera) に懸濁させた後、マルチウェルプレートに 2.0×10^4 cells/cm² の密度で細胞を seed した。Seed 後、細胞がコンフルエントに増殖するまで 2~3 日間培養し評価に供した。なお、増殖能の評価においては対数増殖を維持する目的でサブコンフルエントの条件で評価に供した。

薬剤処理：評価当日に、刺激物質および被験薬剤添加 FGM (sera) に培地を交換して薬剤処理を開始した。なお、薬剤添加培地中のエタノール (被験薬剤溶媒) および PBS (刺激物質溶媒) の濃度は終濃度で 0.1% (v/v) となるよう調整した。

IL-8 濃度測定：DuoSetTM human IL-8 development system (Genzyme 社) を使用した。

3.3.2 結果

刺激条件の検討

TEI-A00114 の作用を検討するにあたり、本検討で用いる肺線維芽細胞の IL-8 産生能を把握する目的で、IL-1 β 、TNF α および LPS で刺激後 24 h での IL-8 産生を検討した。本細胞における IL-8 産生は IL-1 β および TNF α 刺激では強力に誘導されるのに対し、LPS 刺激では用いた最高濃度である 100 ng/mL においても無刺激群の約 1.3 倍と殆ど産生誘

導は観察されないことを確認し (Fig. 3-6)、本細胞が LPS 刺激に対して応答せず、一方で TNF α および IL-1 β 刺激に対して IL-8 を産生する性質を有することがわかった。ところで、活性型ビタミン D₃ 誘導体は種々の細胞において増殖抑制作用を示すことが知られおり、観察される IL-8 産生抑制作用は IL-8 産生抑制活性そのものと細胞増殖抑制作用が足し合わされたものとなる可能性がある。そこで細胞増殖作用の影響を除去するため、評価 24 h 前より血清枯渇により細胞増殖を停止させた状態で評価を実施した。

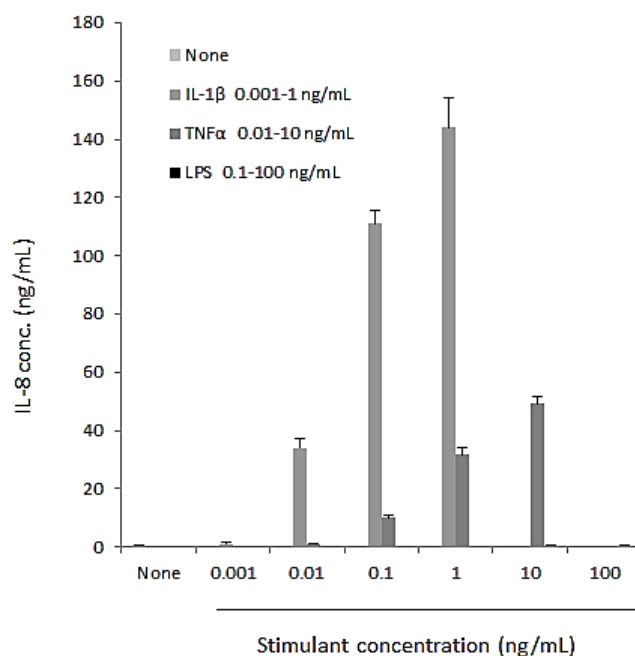


Fig. 3-6 IL-8 production from normal human lung fibroblast. Normal human lung fibroblast was stimulated by IL-1 β (0.001-1 ng/mL) or TNF α (0.01-10 ng/mL) or LPS (0.1-100 ng/mL) for 24 h. The levels of IL-8 were measured by ELISA-kit. Data are expressed as mean \pm SEM values (n=3).

静止期にある NHLF に対する TEI-A00114 の IL-8 産生抑制作用

結果を Fig. 3-7 に示す。TEI-A00114 は TNF α 、IL-1 β 刺激により産生される IL-8 を抑制した。

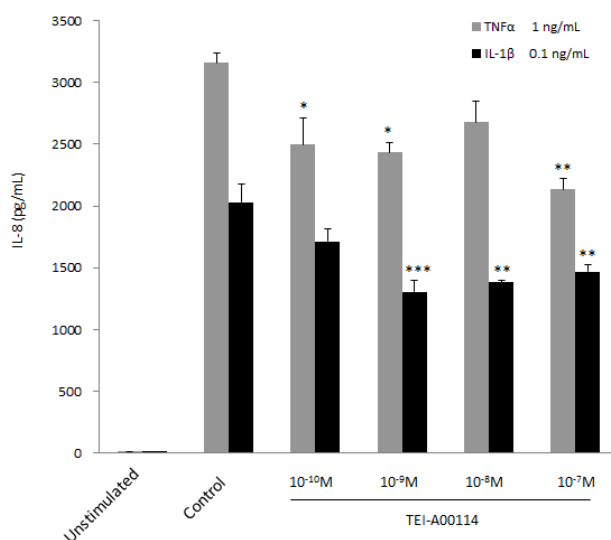


Fig. 3-7 Effect of TEI-A00114 on IL-8 production from TNF α or IL-1 β stimulated quiescent normal human lung fibroblast. Normal human lung fibroblast was stimulated by TNF α (1 ng/mL) or IL-1 β (0.1 ng/mL) for 24 h. TEI-A00114 was added at the final concentrations indicated 1 h before the addition of TNF α or IL-1 β . IL-8 concentrations of culture supernatants were measured by ELISA. Data are expressed as mean \pm SEM values of triplicate culture. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 compared with control (Dunnett's *t* test).

3.3.3 考察

本検討で用いた NHLF では LPS 刺激に応答した IL-8 産生は観察されなかったが、同様な気道由来の肺線維芽細胞を用いた検討において、上気道 (Nasal) 由来の線維芽細胞では LPS 刺激により IL-8 の mRNA 発現が誘導されるのに対して、下気道 (気管支、肺) 由来の線維芽細胞では誘導は認められず、本検討と一致する結果が報告されている[89]。この報告と合わせて、ヒトにおいては、エンドトキシン惹起急性炎症病態における肺線維芽細胞の位置づけは、LPS に直接応答して活性化されるのではなく、主に肺胞マクロファージから産生されると考えられる pro-inflammatory cytokines に応答して IL-8 等のサイトカインを放出し、炎症の拡大および増悪に関与しているものと考えられる。このような状況を踏まえ、本検討においては刺激物質として pro-inflammatory cytokine である TNF α 、IL-1 β を使用し、静止期にある NHLF における IL-8 産生に対する TEI-A00114

の作用を検討した。その結果いずれの刺激物質で刺激した場合においても TEI-A00114 による IL-8 の産生抑制を認めた。本検討により、LPS に応答して放出された TNF α 、IL-1 β に反応して活性化される線維芽細胞からの IL-8 産生は TEI-A00114 により抑制されることが示唆され、肺線維芽細胞は TEI-A00114 の標的部位の一つとなる可能性が示された。今後、他の肺常在性細胞に対する効果も同様に検討し、肺炎症時のサイトカインネットワークに対する TEI-A00114 の効果について精査する必要があると考えられる。

3.4 ヒト全血を用いた CD14 発現に対する TEI-A00114 の作用

CD14 は主に好中球、単球、マクロファージに発現している myeloid cell differentiation antigen であり、LPS 結合タンパク質 (LBP) と結合した LPS が CD14 に結合することで一連の炎症カスケードが惹起されるとされている[94]。生体における CD14 の機能は細菌や病原菌を認識し、生体防衛に必要な反応を惹起してこれらの侵入物を適切に排除することであり[95, 96]、CD14 の発現亢進は生体防衛反応の増強につながると考えられる。ビタミン D₃ には CD14 発現を亢進する作用が知られており[23, 24, 97, 98]、これは侵入物の排除という観点からは望ましい作用であると言える。そこで TEI-A00114 も CD14 発現亢進作用を有することを期待し、検討を行った。

3.4.1 材料および方法

ヒト全血および試薬

社内健常人ボランティアよりヘパリン入り真空採血管を用いて末梢血を 50 mL 採取した。PBMC は末梢血を Hank's balanced salt solution (HBSS) で 2 倍に希釈した後、Ficoll-PaqueR PLUS (Amersham Pharmacia Biotech) を用いた不連続密度勾配遠心により調製した。この遠心で得られた pellet より、1% (w/v) Dextran 500/saline および蒸留水による溶血で赤血球を除去し、PMN を調製した。細胞は HBSS で洗浄後、培養液 (10% heat-inactivated FCS/RPMI-1640 + 2 mM L-glutamine + 50 IU/mL ペニシリン + 50 μ g/mL ストレプトマイシン) に 10⁶ cells/mL となるよう懸濁した。全血あるいは細胞は 0.2 mL/well で 96-well plate (Becton Dickinson 社) に分注し、被験薬を添加して CO₂ インキュベーター内で 95%CO₂-5%O₂ の条件下にて 1 h pre-incubate した。実験は 1 サンプ

ルあたり 3 well で行った。

Recombinant human IL-1 β (R&D Systems 社)は、0.1% (v/v) human serum albumin/PBS を用いて 200 ng/mL 溶液を調製した。この溶液を細胞浮遊液 0.2 mL に 10 μ L 添加し (最終濃度 10 ng/mL)、CO₂ インキュベーター内で 95%CO₂-5%O₂ の条件下にて 24 h 培養した。

細胞表面抗原の測定

Whole blood あるいは細胞懸濁液 100 μ L/sample を anti-CD33, anti-CD44, anti-CD14 抗体 (いずれも Pharmingen 社から購入) で染色後、FACSTM Lysing Solution (Becton Dickinson 社) 2 mL で溶血した。細胞は CellFIXTM (Becton Dickinson) 0.5 mL に懸濁し、CD45⁺細胞を gating した後、CD33 の発現量を元に monocyte (bright), granulocyte (dim), lymphocyte (negative) に分画²[34]、フローサイトメーター FACSCalibur (Becton Dickinson 社)にて CD14 発現量を比較した。

3.4.2 結果

全血

結果を図 (Fig. 3-8) に示す。単球画分に対する TEI-A00114 の CD14 発現増強は培養開始後 6 h から認められ、IL-1 β 添加の有無には影響されなかった。dexamethasone は CD14 発現に対して明確な効果を示さなかった。顆粒球画分に対する TEI-A00114 の CD14 発現誘導は培養開始後 24 h で認められた。CD14 発現は IL-1 β のみでも誘導されるが、TEI-A00114 添加により更に増強された。Dexamethasone は IL-1 β による誘導を完全に抑制したが、IL-1 β 非存在下では明確な効果を示さなかった。

PMN/ PBMC

結果を図 (Fig. 3-8) に示す。PBMC 画分の CD14 発現は、全血の場合と同様に、IL-1 β による影響は認められず、TEI-A00114 で増強された。また、dexamethasone も弱い誘導を示した。多形核白血球画分の CD14 発現も、全血の場合と同様に、IL-1 β のみで誘導

² 好酸球や好塩基球を完全に除外したより厳密な議論を行うためには好中球 = CD15^{bright}, CD33^{dim}, CD45⁺とする必要があるが、ここでは Takahashi らの既報に従って好中球 \equiv 顆粒球 = CD33^{dim}, CD45⁺とみなして検討を行っている。

され、TEI-A00114 添加で増強した。Dexamethasone は IL-1 β による誘導を完全に抑制した。PMN 画分では 24 h 培養することによって多くの細胞に萎縮が認められた (data not shown)が、これは apoptosis による形態変化と考えられる。dexamethasone はこの細胞萎縮を抑制したが TEI-A00114 にはこのような作用は認められなかった。

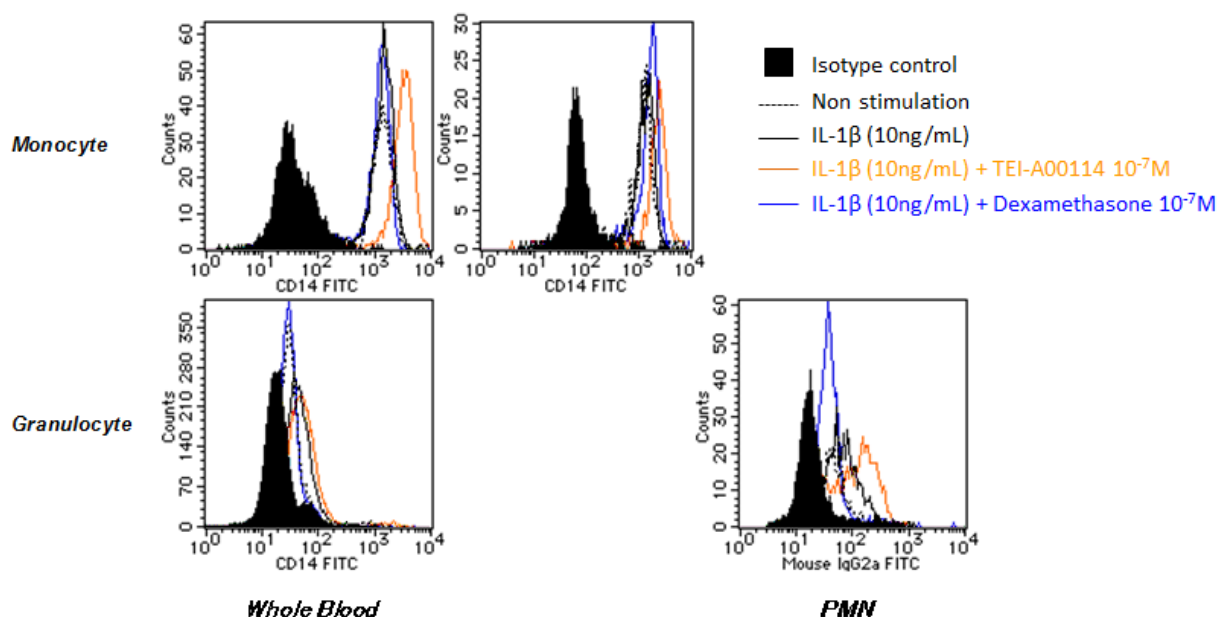


Fig. 3-8 Effects of TEI-A00114 on expression of CD14 in human peripheral whole blood, PBMC or PMN stimulated by IL-1 β . Human peripheral blood cells were stimulated by IL-1 β (10 ng/mL) for 24 h with or without TEI-A00114 or dexamethasone (10^{-7} M).. Data were collected by FACS™ Calibur and analyzed by CellQuest™ software. Leukocytes were gated by anti-CD45-Cy-Chrome® and fractionated by anti-human CD33-PE

3.4.3 考察

上述したように $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が CD14 発現を亢進することは既に報告されているが、本検討により TEI-A00114 も同様の作用を有することが明らかとなった。TEI-A00114 は単球/PBMC、顆粒球/PMN 画分において CD14 発現を亢進する作用を有し、感染病態において菌クリアランスの促進作用が期待できると思われる。

全血の単球画分では IL-1 β 刺激で明確な CD14 の発現亢進作用は認められず、また dexamethasone は CD14 発現に対して何ら影響を与えていないと考えられる。また PBMC 画分において dexamethasone が CD14 発現を亢進しているかのような結果が認められたが、再現性に乏しく明確な作用とは言い難いと判断した。複数回の実験結果を総合し、

単球/PBMC 画分に対しては IL-1 β は CD14 発現に対して影響を及ぼさず、dexamethasone も無作用であると考えられる。一方、全血の顆粒球画分および PMN 画分では IL-1 β 刺激で CD14 発現の亢進が認められ、dexamethasone はその亢進作用を抑制した。ただし dexamethasone は無刺激状態の CD14 発現を抑制する作用は無く、炎症反応により亢進した CD14 発現のみを抑制することから、この反応は広い意味での抗炎症作用の一種であると考えられる。本反応は再現性が認められ、この点においては dexamethasone の作用は TEI-A00114 と対称的であった。この dexamethasone の性質が感染炎症の病態悪化や治療遷延に結びついているという明確な確証は無いが、潜在的な懸念としては十分に考えられる。TEI-A00114 は CD14 発現を亢進するため、菌クリアランス能の側面からグルココルチコイドに対するメリットとなり得る可能性があると考えられる。

3.5 この章の小括

- ハムスターLPS 吸入急性肺炎モデルにおいて、LPS 吸入後 1, 6 h の好中球浸潤を TEI-A00114 は抑制せず、24 h 後の好中球浸潤を抑制した。このことから TEI-A00114 は LPS により惹起される炎症初期の反応に対して作用しない可能性が示唆された。
- ヒト全血を用いた実験により、刺激後 8 h より前の IL-8 産生に対して TEI-A00114 は抑制を示さなかった。また TNF α 、IL-1 β 刺激による IL-8 産生パターンは刺激後 24 h で最大となり、TEI-A00114 はいずれの刺激による IL-8 産生を抑制した。これらの実験結果から、TEI-A00114 は LPS により直接惹起される IL-8 産生ではなく、LPS 刺激により放出される TNF α 、IL-1 β で惹起される IL-8 産生を抑制するものと考えられる。また TEI-A00114 は LPS 刺激による TNF α 、IL-1 β 産生を抑制するものの、作用強度としては強いものではないことから、ハムスターLPS 吸入急性肺炎モデルで観察される好中球浸潤抑制作用は主に TNF α 、IL-1 β 刺激により放出される IL-8 の産生抑制作用により発揮され、TNF α 、IL-1 β 産生抑制作用の寄与は限定的であると考えられる。
- 単球および好中球において、TEI-A00114 は IL-1 β の有無に関わらず CD14 発現を亢進した。一方 dexamethasone は好中球に対して IL-1 β 刺激による CD14 発現亢

進を抑制した。このことから TEI-A00114 は菌クリアランス作用の亢進が期待でき、グルココルチコイドに対してメリットとなる可能性が示唆された。

総括

ビタミン D₃ が有する多彩な生理活性作用のうち、IL-8 産生抑制作用に着目し、好中球浸潤を伴う炎症性肺疾患治療薬の開発を目指した創薬研究を行った。その結果、下記のことが明らかとなった。

- ハムスターLPS 誘発急性肺炎モデルにて、生体物質である 1 α ,25(OH)₂D₃ が肺内好中球浸潤抑制作用を有することが明らかとなった。このことにより、活性型ビタミン D₃ が炎症性肺疾患の治療薬となり得る可能性が示唆された。
- ビタミン D₃ は血中カルシウム濃度上昇を引き起こすことが知られており、そのため活性型ビタミン D₃ は投与量が厳しく制限されている。血中カルシウム濃度上昇と好中球浸潤抑制作用が分離した化合物の取得を目指し、血中カルシウム濃度上昇活性と好中球浸潤抑制活性にてスクリーニングを実施したところ、新規の活性型ビタミン D₃ 誘導体として TEI-A00114 を創製した。TEI-A00114 の好中球浸潤抑制作用は 1 α ,25(OH)₂D₃ の 79%であったが、血中カルシウム濃度上昇作用は 1.1%を示し、十分な好中球浸潤抑制作用を達成するためより高用量の投与が可能であると思われた。また TEI-A00114 はネブライザーを用いた吸入投与にて好中球浸潤抑制作用を示し、吸入剤として開発できる可能性が示唆された。
- TEI-A00114 はハムスターLPS 誘発急性肺炎モデルにて LPS 吸入後 6 h までの好中球浸潤を抑制せず、24 h 後の好中球浸潤を抑制した。ヒト全血を用いた IL-8

産生抑制作用の解析を行い、TEI-A00114 は LPS に直接応答して産生される IL-8 は抑制せず、LPS により誘導される TNF α 、IL-1 β により惹起される IL-8 産生を主に抑制する可能性が示唆された。また、TEI-A00114 は IL-1 β 刺激下において単球および好中球における CD14 発現を亢進し、これら食細胞における菌クリアランス作用を増大させる可能性が示唆された。dexamethasone は好中球において IL-1 β 刺激による CD14 発現を抑制し、TEI-A00114 と対称的な作用を示すことから、TEI-A00114 は菌クリアランスの亢進という面でグルココルチコイドに比してメリットを有する可能性が示唆された。

以上、本研究において得られた知見により、活性型ビタミン D₃ が炎症性肺疾患の新たな治療薬となる可能性を示すことができた。さらに活性型ビタミン D₃ の持つ血中カルシウム濃度上昇作用と好中球浸潤抑制作用が分離し、吸入投与が可能な新規ビタミン D₃ 誘導体 TEI-A00114 を創製し、より高用量の投与を可能とする可能性を示した。TEI-A00114 は CD14 発現亢進作用により菌クリアランスを亢進させる作用を併せ持つことで、グルココルチコイドとは異なる作用プロファイルを有する新しい抗炎症剤となり得る可能性が示唆された。種々の疫学研究により、ビタミン D の欠乏状態が呼吸器感染症、特に気道におけるウイルス感染や結核感染のリスクを増加させることや、COPD や喘息の有病率と相関することが指摘されており[12]、ビタミン D サプリメントによるビタミン D 補充の効果が検討されている。しかしながらこれら疾患に対し、医薬品として活性型ビタミン D₃ を投与し、治療効果を検討する試みはまだ知られておらず、血中カルシウム上昇による投与量制限が研究の進展を阻んでいる一因であると考えられる。本研究では、血中カルシウム濃度上昇作用と乖離した新しいビタミン D₃ 誘導体 TEI-A00114 が好中球浸潤抑制作用と CD14 発現亢進作用を有することを示し、これらの肺疾患を活性型ビタミン D₃ により治療するという、新たな治療の選択肢となり得る可能性を示した。

本研究の成果を元に、これから炎症性肺疾患における新たな治療薬が開発され、この分野における医療がさらに進歩していくことを願いたい。

参考文献

- [1] 尾形悦郎・須田立雄・小椋陽介／編. ビタミン D のすべて: 講談社サイエンティフィク; 1993.
- [2] Holick MF. Vitamin D. 2nd ed. New York: Humana Press; 2010.
- [3] St-Arnaud R. The direct role of vitamin D on bone homeostasis. *Arch Biochem Biophys* **473**: 225-30 (2008)
- [4] Ishizuka S. Situation of drug discovery from vitamin D analogues - now and future. *Medchem News*: 5-10 (2010)
- [5] Kittaka A. Structural refinement of seco-steroidal skeleton and the biological activity through nuclear receptors. *Yakugaku Zasshi* **128**: 1235-50 (2008)
- [6] Carlberg C, Molnar F. Current status of vitamin d signaling and its therapeutic applications. *Curr Top Med Chem* **12**: 528-47 (2012)
- [7] Tiwari A. Elocalcitol, a vitamin D₃ analog for the potential treatment of benign prostatic hyperplasia, overactive bladder and male infertility. *IDrugs* **12**: 381-93 (2009)
- [8] Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E. Selective vitamin D analogs and their therapeutic applications. *Semin Nephrol* **14**: 156-74 (1994)
- [9] Vieth R. The mechanisms of vitamin D toxicity. *Bone Miner* **11**: 267-72 (1990)
- [10] Choi M, Makishima M. Therapeutic applications for novel non-hypercalcemic vitamin D receptor ligands. *Expert Opin Ther Pat* **19**: 593-606 (2009)
- [11] Basu S, Fenton MJ. Toll-like receptors: function and roles in lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**: L887-92 (2004)
- [12] Hansdottir S, Monick MM. Vitamin D effects on lung immunity and respiratory diseases. *Vitam Horm* **86**: 217-37 (2011)
- [13] Yasui K. Neutrophilic inflammation: pathogenesis and clinical figures. *Inflammation and*

- Regeneration* **25**: 173-6 (2005)
- [14] Kunkel SL, Standiford T, Kasahara K, Strieter RM. Interleukin-8 (IL-8): the major neutrophil chemotactic factor in the lung. *Exp Lung Res* **17**: 17-23 (1991)
- [15] Shibata F. The Role of Rat Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractants (CINCs) in Inflammation. *YAKUGAKU ZASSHI* **122**: 263-8 (2002)
- [16] Bao Z, Ye Q, Gong W, Xiang Y, Wan H. Humanized monoclonal antibody against the chemokine CXCL-8 (IL-8) effectively prevents acute lung injury. *Int Immunopharmacol* **10**: 259-63 (2010)
- [17] 川上義和編. 呼吸器疾患の分子生物学: 医学書院; 1998.
- [18] Ota H, Ishii T. Neutrophil. *THE LUNG perspectives* **17**:180-5 (2009)
- [19] Rinka H, Yoshimoto A, Matsuura Y, Miyaichi T, Kan M, Kanji A, et al. Neutrophil elastase inhibitor improves the vascular permeability in patients with sepsis induced ALI/ARDS. *Journal of Japanese Association for Acute Medicine* **18**: 283-90 (2007)
- [20] Seo Y, Abe S, Kurahara M, Okada D, Saito Y, Usuki J, et al. Beneficial effect of polymyxin B-immobilized fiber column (PMX) hemoperfusion treatment on acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Intern Med* **45**: 1033-8 (2006)
- [21] Xue ML, Zhu H, Thakur A, Willcox M. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ inhibits pro-inflammatory cytokine and chemokine expression in human corneal epithelial cells colonized with *Pseudomonas aeruginosa*. *Immunol Cell Biol* **80**: 340-5 (2002)
- [22] Gurlek A, Pittelkow MR, Kumar R. Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃: implications in cell growth and differentiation. *Endocrine reviews* **23**: 763-86 (2002)
- [23] Zhang DE, Hetherington CJ, Gonzalez DA, Chen HM, Tenen DG. Regulation of CD14 expression during monocytic differentiation induced with $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃. *J Immunol* **153**: 3276-84 (1994)
- [24] Takahashi K, Nakayama Y, Horiuchi H, Ohta T, Komoriya K, Ohmori H, et al. Human neutrophils express messenger RNA of vitamin D receptor and respond to $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **24**: 335-47 (2002)
- [25] Sato H, Nakayama Y, Yamashita C, Uno H. Anti-inflammatory effects of tacalcitol ($1,24(R)(OH)_2D_3$, TV-02) in the skin of TPA-treated hairless mice. *J Dermatol* **31**: 200-17 (2004)
- [26] Mitsuhashi H, Nonaka T, Hamamura I, Kishimoto T, Muratani E, Fujii K. Pharmacological activities of TEI-8362, a novel inhibitor of human neutrophil elastase. *Br J Pharmacol* **126**: 1147-52 (1999)
- [27] Seehase S, Lauenstein HD, Schlumbohm C, Switalla S, Neuhaus V, Forster C, et al. LPS-induced lung inflammation in marmoset monkeys - an acute model for anti-inflammatory drug testing. *PLoS One* **7**: e43709 (2012)
- [28] Zarbock A, Allegretti M, Ley K. Therapeutic inhibition of CXCR2 by Reparixin attenuates acute lung injury in mice. *Br J Pharmacol* **155**: 357-64 (2008)

-
- [29] Slofstra SH, Groot AP, Maris NA, Reitsma PH, Cate HT, Spek CA. Inhalation of activated protein C inhibits endotoxin-induced pulmonary inflammation in mice independent of neutrophil recruitment. *Br J Pharmacol* **149**: 740-6 (2006)
- [30] Mitsuhashi H, Hata J, Asano S, Kishimoto T. Appearance of cytokine-induced neutrophil chemoattractant isoforms and immunolocalization of them in lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation in rats. *Inflamm Res* **48**: 588-93 (1999)
- [31] Ge ZJ, Jiang GJ, Zhao YP, Wang GX, Tan YF. Systemic perfluorohexane attenuates lung injury induced by lipopolysaccharide in rats: the role of heme oxygenase-1. *Pharmacol Rep* **62**: 170-7 (2010)
- [32] Goncalves de Moraes VL, Singer M, Vargaftig BB, Chignard M. Effects of rolipram on cyclic AMP levels in alveolar macrophages and lipopolysaccharide-induced inflammation in mouse lung. *Br J Pharmacol* **123**: 631-6 (1998)
- [33] Fukuoka M, Ogino Y, Sato H, Ohta T, Komoriya K. Regulation of RANTES and IL-8 production in normal human dermal fibroblasts by active vitamin D₃ (tacalcitol). *Br J Pharmacol* **124**: 1433-8 (1998)
- [34] Takahashi K, Horiuchi H, Ohta T, Komoriya K, Ohmori H, Kamimura T. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ suppresses interleukin-1 β -induced interleukin-8 production in human whole blood: an involvement of erythrocytes in the inhibition. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **24**: 1-15 (2002)
- [35] Fukuoka M, Ogino Y, Sato H, Ohta T, Komoriya K, Nishioka K, et al. RANTES expression in psoriatic skin, and regulation of RANTES and IL-8 production in cultured epidermal keratinocytes by active vitamin D₃ (tacalcitol). *Br J Dermatol* **138**: 63-70 (1998)
- [36] Kruger S, Kreft B. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ differentially regulates IL-1 α -stimulated IL-8 and MCP-1 mRNA expression and chemokine secretion by human primary proximal tubular epithelial cells. *Experimental nephrology* **9**: 223-8 (2001)
- [37] Rostkowska-Nadolska B, Sliupkas-Dyrda E, Potyka J, Kusmierz D, Fraczek M, Krecicki T, et al. Vitamin D derivatives: calcitriol and tacalcitol inhibits interleukin-6 and interleukin-8 expression in human nasal polyp fibroblast cultures. *Adv Med Sci* **55**: 86-92 (2010)
- [38] Penna G, Fibbi B, Amuchastegui S, Corsiero E, Laverny G, Silvestrini E, et al. The vitamin D receptor agonist elocalcitol inhibits IL-8-dependent benign prostatic hyperplasia stromal cell proliferation and inflammatory response by targeting the RhoA/Rho kinase and NF- κ B pathways. *Prostate* **69**: 480-93 (2009)
- [39] Harant H, Andrew PJ, Reddy GS, Foglar E, Lindley IJ. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ and a variety of its natural metabolites transcriptionally repress nuclear-factor- κ B-mediated interleukin-8 gene expression. *Eur J Biochem* **250**: 63-71 (1997)
- [40] Harant H, Wolff B, Lindley IJ. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ decreases DNA binding of nuclear factor- κ B in human fibroblasts. *FEBS Lett* **436**: 329-34 (1998)
-

-
- [41] Meduri GU, Marik PE, Chrousos GP, Pastores SM, Arlt W, Beishuizen A, et al. Steroid treatment in ARDS: a critical appraisal of the ARDS network trial and the recent literature. *Intensive Care Med* **34**: 61-9 (2008)
- [42] Peter E, Bakri F, Ball DM, Cheney RT, Segal BH. Invasive pulmonary filamentous fungal infection in a patient receiving inhaled corticosteroid therapy. *Clin Infect Dis* **35**: e54-6 (2002)
- [43] Cline JC, Davis SM. Risks of infection or reactivation of tuberculosis associated with chronic corticosteroid therapy. *Ann Pharmacother* **31**: 775-6 (1997)
- [44] Marget W. Corticosteroid therapy. A paradoxical action principle in the treatment of infection. *MMW, Munchener medizinische Wochenschrift* **124**: 33-4 (1982)
- [45] Gao D, Trayhurn P, Bing C. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits the cytokine-induced secretion of MCP-1 and reduces monocyte recruitment by human preadipocytes. *Int J Obes (Lond)*: (2012)
- [46] Zhang Z, Yuan W, Sun L, Szeto FL, Wong KE, Li X, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ targeting of NF-κB suppresses high glucose-induced MCP-1 expression in mesangial cells. *Kidney Int* **72**: 193-201 (2007)
- [47] 医学のあゆみ 呼吸器疾患-state of arts: 医歯薬出版社; 1999.
- [48] National Kidney Foundation. K/DOQI Clinical Practice Guidelines. *Am J Kidney Dis* **4**: S1-S202 (2003)
- [49] Sueki K. New proposal for the Safe Tolerable Upper Intake Level of Vitamin D. *ビタミン* **84**: 437-9 (2010)
- [50] Ueno Y. The Effect of Vitamin D on the Bone Tissue. *Tokyo Jikeikai Medical Journal* **119**: 1-12 (2004)
- [51] Nozaki M. Serm. *Nihon Rinsho Japanese Journal of Clinical Medicine* **64**: 1645-50 (2006)
- [52] Kato S. Molecular mechanism of tissue-specific actions of SERM. *Clin Calcium* **16**: 1469-74 (2006)
- [53] Kato S. Molecular mechanism of tissue-specific actions of sex steroid hormones and SERM for bone remodeling. *Clin Calcium* **15**: 825-30 (2005)
- [54] Posner G.H., Kahrman_M. Vitamin D. 2nd ed. New York: Elsevire Academic Press; 2005.
- [55] Eelen G, Gysemans C, Verlinden L, Vanoirbeek E, De Clercq P, Van Haver D, et al. Mechanism and potential of the growth-inhibitory actions of vitamin D and analogs. *Curr Med Chem* **14**: 1893-910 (2007)
- [56] Bouillon R, Allewaert K, Xiang DZ, Tan BK, van Baelen H. Vitamin D analogs with low affinity for the vitamin D binding protein: enhanced in vitro and decreased in vivo activity. *J Bone Miner Res* **6**: 1051-7 (1991)
- [57] Colston KW, Mackay AG, James SY, Binderup L, Chander S, Coombes RC. EB1089: a new vitamin D analogue that inhibits the growth of breast cancer cells in vivo and in vitro. *Biochem Pharmacol* **44**: 2273-80 (1992)
- [58] Daniel C, Schlauch T, Zugel U, Steinmeyer A, Radeke HH, Steinhilber D, et al.
-

- 22-ene-25-oxa-vitamin D: a new vitamin D analogue with profound immunosuppressive capacities. *Eur J Clin Invest* **35**: 343-9 (2005)
- [59] Van Etten E, Decallonne B, Verlinden L, Verstuyf A, Bouillon R, Mathieu C. Analogs of $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ as pluripotent immunomodulators. *J Cell Biochem* **88**: 223-6 (2003)
- [60] Rau JL. The inhalation of drugs: advantages and problems. *Respir Care* **50**: 367-82 (2005)
- [61] Tayab ZR, Hochhaus G. Pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of inhalation drugs: application to targeted pulmonary delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv* **2**: 519-32 (2005)
- [62] Takenouch K, Gao Q, Manabe K, Sogawa R, Takano Y, Ishizuka S. Vitamin D₃ derivatives and remedies for inflammatory respiratory diseases containing the same. WIPO patent, WO2000/024712, May 4, 2000
- [63] Tanaka H, Gao Q, Manabe K, Furuya M, Ishizuka S, Chokki M, et al. Vitamin D₃ derivatives and remedies for inflammatory respiratory diseases prepared from the same. WIPO patent, WO98/58909, Dec 30, 1998
- [64] Ishizuka S, Bannai K, Naruchi T, Hashimoto Y. Studies on the mechanism of action of $1\alpha, 24$ -Dihydroxyvitamin D₃. II. Specific binding of $1\alpha, 24$ -Dihydroxyvitamin D₃ to chick intestinal receptor. *Steroids* **37**: 33-43 (1981)
- [65] Honda A, Nakashima N, Mori Y, Katsumata T, Ishizuka S. Effects of vitamin D-binding proteins on HL-60 cell differentiation induced by $26,26,26,27,27,27$ -hexafluoro- $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D. *J Steroid Biochem Mol Biol* **41**: 109-12 (1992)
- [66] Wolff RK, Dorato MA. Toxicologic testing of inhaled pharmaceutical aerosols. *Crit Rev Toxicol* **23**: 343-69 (1993)
- [67] Fletcher JM, Basdeo SA, Allen AC, Dunne PJ. Therapeutic use of vitamin D and its analogues in autoimmunity. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* **6**: 22-34 (2012)
- [68] Masuda S, Jones G. Promise of vitamin D analogues in the treatment of hyperproliferative conditions. *Mol Cancer Ther* **5**: 797-808 (2006)
- [69] Takahashi T, Morikawa K. Vitamin D receptor agonists: opportunities and challenges in drug discovery. *Curr Top Med Chem* **6**: 1303-16 (2006)
- [70] Stein MS, Wark JD. An update on the therapeutic potential of vitamin D analogues. *Expert Opin Investig Drugs* **12**: 825-40 (2003)
- [71] Baeke F, Korf H, Overbergh L, Verstuyf A, Thorrez L, Van Lommel L, et al. The vitamin D analog, TX527, promotes a human CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} regulatory T cell profile and induces a migratory signature specific for homing to sites of inflammation. *J Immunol* **186**: 132-42 (2011)
- [72] Rochel N, Moras D. Crystal structure of a vitamin D₃ analog, ZK203278, showing dissociated profile. *Anticancer Res* **32**: 335-9 (2012)
- [73] O'Callaghan C. Targeting drug delivery to the lungs by inhalation. *Mediators Inflamm* **3**: S31-3 (1994)

-
- [74] Mathieu C, Adorini L. The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ analogs as immunomodulatory agents. *Trends Mol Med* **8**: 174-9 (2002)
- [75] Hansdottir S, Monick MM, Hinde SL, Lovan N, Look DC, Hunninghake GW. Respiratory epithelial cells convert inactive vitamin D to its active form: potential effects on host defense. *J Immunol* **181**: 7090-9 (2008)
- [76] Adams JS, Sharma OP, Gacad MA, Singer FR. Metabolism of 25-Hydroxyvitamin D₃ by cultured pulmonary alveolar macrophages in sarcoidosis. *J Clin Invest* **72**: 1856-60 (1983)
- [77] Reichel H, Koeffler HP, Bishop JE, Norman AW. 25-Hydroxyvitamin D₃ metabolism by lipopolysaccharide-stimulated normal human macrophages. *J Clin Endocrinol Metab* **64**: 1-9 (1987)
- [78] Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. Synthesis in vitro of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and 24,25-Dihydroxyvitamin D₃ by interferon- γ -stimulated normal human bone marrow and alveolar macrophages. *J Biol Chem* **262**: 10931-7 (1987)
- [79] Fritsche J, Mondal K, Ehrnsperger A, Andreesen R, Kreutz M. Regulation of 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase and production of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ by human dendritic cells. *Blood* **102**: 3314-6 (2003)
- [80] Hewison M, Freeman L, Hughes SV, Evans KN, Bland R, Eliopoulos AG, et al. Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* **170**: 5382-90 (2003)
- [81] Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Lipsky PE. Modulatory effects of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ on human B cell differentiation. *J Immunol* **179**: 1634-47 (2007)
- [82] Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* **311**: 1770-3 (2006)
- [83] Sigmundsdottir H, Pan J, Debes GF, Alt C, Habtezion A, Soler D, et al. DCs metabolize sunlight-induced vitamin D₃ to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nat Immunol* **8**: 285-93 (2007)
- [84] Finklea JD, Grossmann RE, Tangpricha V. Vitamin D and chronic lung disease: a review of molecular mechanisms and clinical studies. *Adv Nutr* **2**: 244-53 (2011)
- [85] McNally P, Coughlan C, Bergsson G, Doyle M, Taggart C, Adorini L, et al. Vitamin D receptor agonists inhibit pro-inflammatory cytokine production from the respiratory epithelium in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* **10**: 428-34 (2011)
- [86] Conese M, Copreni E, Di Gioia S, De Rinaldis P, Fumarulo R. Neutrophil recruitment and airway epithelial cell involvement in chronic cystic fibrosis lung disease. *J Cyst Fibros* **2**: 129-35 (2003)
- [87] Hayes E, Pohl K, McElvaney NG, Reeves EP. The cystic fibrosis neutrophil: a specialized yet potentially defective cell. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **59**: 97-112 (2011)
- [88] Makam M, Diaz D, Laval J, Gernez Y, Conrad CK, Dunn CE, et al. Activation of critical, host-induced, metabolic and stress pathways marks neutrophil entry into cystic fibrosis lungs. *Proc*
-

- Natl Acad Sci U S A* **106**: 5779-83 (2009)
- [89] Xing Z, Jordana M, Braciak T, Ohtoshi T, Gaudie J. Lipopolysaccharide induces expression of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, interleukin-8, and interleukin-6 in human nasal, but not lung, fibroblasts: evidence for heterogeneity within the respiratory tract. *Am J Respir Cell Mol Biol* **9**: 255-63 (1993)
- [90] O'Leary EC, Marder P, Zuckerman SH. Glucocorticoid effects in an endotoxin-induced rat pulmonary inflammation model: differential effects on neutrophil influx, integrin expression, and inflammatory mediators. *Am J Respir Cell Mol Biol* **15**: 97-106 (1996)
- [91] O'Leary EC, Zuckerman SH. Glucocorticoid-mediated inhibition of neutrophil emigration in an endotoxin-induced rat pulmonary inflammation model occurs without an effect on airways MIP-2 levels. *Am J Respir Cell Mol Biol* **16**: 267-74 (1997)
- [92] Tang WW, Yi ES, Remick DG, Wittwer A, Yin S, Qi M, et al. Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. IX. Contribution of CD11a/ICAM-1 to neutrophil emigration. *Am J Physiol* **269**: L653-9 (1995)
- [93] DeForge LE, Kenney JS, Jones ML, Warren JS, Remick DG. Biphasic production of IL-8 in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human whole blood. Separation of LPS- and cytokine-stimulated components using anti-tumor necrosis factor and anti-IL-1 antibodies. *J Immunol* **148**: 2133-41 (1992)
- [94] Brass DM, Hollingsworth JW, McElvania-Tekippe E, Garantziotis S, Hossain I, Schwartz DA. CD14 is an essential mediator of LPS-induced airway disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **293**: L77-83 (2007)
- [95] Anas A, van der Poll T, de Vos AF. Role of CD14 in lung inflammation and infection. *Crit Care* **14**: 209 (2010)
- [96] Tasaka S, Ishizaka A, Yamada W, Shimizu M, Koh H, Hasegawa N, et al. Effect of CD14 blockade on endotoxin-induced acute lung injury in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* **29**: 252-8 (2003)
- [97] Schaubert J, Oda Y, Buchau AS, Yun QC, Steinmeyer A, Zugel U, et al. Histone acetylation in keratinocytes enables control of the expression of cathelicidin and CD14 by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Invest Dermatol* **128**: 816-24 (2008)
- [98] Moeenrezakhanlou A, Nandan D, Shephard L, Reiner NE. 1 α ,25-Dihydroxycholecalciferol activates binding of CREB to a CRE site in the CD14 promoter and drives promoter activity in a phosphatidylinositol-3 kinase-dependent manner. *J Leukoc Biol* **81**: 1311-21 (2007)

主要論文目録

本学位論文の一部は下記学会誌に発表した。

1. Yasuhiro Takano, Hiroaki Mitsuhashi, Koichi Ueno, $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ inhibits neutrophil recruitment in hamster model of acute lung injury, *Steroids* **76** 1305-1309 (2011)
2. Yasuhiro Takano, Hiroaki Mitsuhashi, Seiichi Ishizuka, Katsushi Takahashi, Manabu Chokki, Kazuya Takenouchi, Qingzhi Gao, Hiroko Tanaka, Atsushi Hazato, Masayasu Tabe, Minoru Furuya, Kenji Manabe, Koichi Ueno, TEI-A00114: A new vitamin D₃ analogue that inhibits neutrophil recruitment in an acute lung injury hamster model while showing reduced hypercalcemic activity, *Steroids* **77** 1535-1542 (2012)

謝辞

本研究に際し、格別たるご指導とご高閲を賜りました千葉大学大学院 薬学研究院 高齢者薬剤学研究室 上野 光一教授に謹んで深くお礼申し上げます。

本論文の作成にあたり、有益なご助言や叱咤激励を賜りました山浦 克典講師、佐藤 洋美助教に心より感謝申し上げます。

本論文の作成にあたり、有益なコメントや暖かいご支援を賜りました高齢者薬剤学研究室の学生の皆様方に厚くお礼を申し上げます。

本研究の遂行にあたり、動物実験をご教授下さり、また本論文の作成にあたり、懇切なご助言やご高閲を賜りました帝人ファーマ株式会社医薬開発研究所 三橋 弘明博士（現、帝人ファーマ株式会社学術第2部長）、新薬創製研究所 一寸木 学博士に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、受容体結合実験をご教授下さり、また本論文の作成にあたり多大なご助言やご高閲を賜りました、帝人ファーマ株式会社新薬創製研究所 石塚 誠一博士（現、米 Pittsburgh University 招聘教授）に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、*in vitro* 実験をご教授下さり、また本論文の作成にあたり、懇切なご助言やご高閲を賜りました、帝人ファーマ株式会社医薬開発研究所 高橋克史博士（現、帝人ファーマ株式会社システム企画部）に厚くお礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、*in vivo* 実験をご教授くださり、また有益なご助言を賜りました仏 Pasteur 研究所細胞薬理学研究室の Bolis VARGAFTIG 教授、Michel CHIGNARD 助教授（現、Infection & Epidemiology department Innate Host Defense and Inflammation Unit Director）に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、多数のビタミン D₃ 誘導体を合成いただいた帝人ファーマ株式会社新薬創製研究所、竹之内 一弥博士（現、帝人ファーマ株式会社医薬企画部）、Qingzhi Gao 博士（現、中国 Tianjin University 教授）、田中 裕子博士（現、ChemoCentryx 社 Senior Scientist）、羽里 篤夫博士（現、帝人ファーマ株式会社生産技術部）、田部 昌泰氏（現、帝人ファーマ株式会社医薬品質保証統括部）、古屋 実氏（現、帝人ファーマ株式会社生物医学総合研究所所長室）、真鍋 健次氏に深くお礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、ご助言、ご協力いただいた、帝人ファーマ株式会社医薬開発研究所薬理研究部の研究員、技術員の皆様に厚くお礼申し上げます。

大学院博士課程で学ぶにあたり、暖かい励まし、懇切なご助言及びご協力を賜りました帝人ファーマ株式会社事業開発部長、上村 孝博士（現、帝人ファーマ株式会社創薬部門長）および群馬大学大学院医学系研究科臨床薬理学准教授、中村 智徳博士に心よりお礼申し上げます。

また、本研究に尊い命を捧げてくれた数多くの動物たちに深く感謝すると共に、心よりご冥福をお祈りいたします。

最後に、本大学院博士課程で学ぶにあたって惜しめない協力を与えて下さり、3年の長き期間にわたって常に心の支えとなり温かく見守ってくれた妻 貴子、娘 実華、

母 雪子に心より感謝を述べて、私の謝辞とかえさせていただきます。

2013年2月6日

高野 泰宏

審査

本学位論文の審査は千葉大学大学院 薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 村山 俊彦

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 医学博士 高野 博之

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 佐藤 信範