

氏名	興井 隆
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博乙第283号
学位授与の日付	平成16年9月30日
学位授与の要件	論文博士(学位規則第4条第2項)
学位授与の題目	粘膜防御性抗潰瘍薬 irsogladine maleate の胃粘膜保護作用機序に関する研究
論文審査委員(主査)	米田 幸雄(自然科学研究科・教授)
論文審査委員(副査)	鈴木 永雄(自然科学研究科・教授), 山田 清文(自然科学研究科・教授), 田熊 一徹(自然科学研究科・助教授), 谷浦 秀夫(自然科学研究科・助教授)

学位論文要旨

Abstract: The effect of irsogladine on the cyclic nucleotide degradation by purified bovine brain and heart phosphodiesterases (PDEs) was investigated. Irsogladine inhibited cAMP hydrolysis by PDEs purified from both brain and heart, while it had little influence on cGMP hydrolysis. On one hand, irsogladine inhibited non-selectively PDE isozymes at least from PDE1 to PDE4. We found that irsogladine increased intracellular cAMP content by PDE inhibition in the isolated human neutrophils. And so, the effect of irsogladine on O_2^- production in the human neutrophils was investigated. Irsogladine caused dose-related inhibition of O_2^- production by human neutrophils activated by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, zymosan, GTP- γ S, A23187 and 4-phorbol 12-myristate 13-acetate. The effects of irsogladine and PDE inhibitors on intercellular communication via gap junction were investigated by the Lucifer Yellow-transfer method in cultured rabbit gastric epithelial cells. The capacity of intercellular communication was enhanced by irsogladine mediated the increase of intracellular cAMP *via* PDE inhibition. We observed gap junctions in rat and human gastric surface mucous cells using the freeze-fracture method. Gap junctions developed during the maturation of surface mucous cells. Additionally, gap junctions between surface mucous cells in the patients with gastric ulcer were fewer than in the healthy volunteers. Therefore, the loss of intercellular communication via gap junction between gastric surface mucous cells might play an important role in tissue homeostasis and be associated with gastric ulcer formation. The effects of irsogladine and selective inhibitors of PDE4 on ischemia-reperfusion-induced gastric injuries were investigated in rats. Irsogladine and PDE4 inhibitor such as rolipram inhibited the gastric injury produced by ischemia-reperfusion, as well as the increase in TNF- α levels and

MPO activity. Irsogladine prevented the formation of gastric mucosal lesions induced by 60 mM monochloramine (NH₂Cl). Its protective effect was diminished by an inhibitor of nitric oxide synthase N^G-nitro-L-arginine methylester (L-NAME). Furthermore, irsogladine ameliorated the NH₂Cl-induced decrease in gastric mucosal blood flow, which was also reversed by pretreatment with L-NAME.

Benzoguanamine 誘導体の irsogladine maleate (2,4-diamino-6-(2,5-dichlorophenyl)-s-triazine maleate) (ガスロン N[®]、以下 irsogladine と表記) は、日本新薬 (株) において新規に開発された粘膜防御性の胃炎・胃潰瘍治療剤である。Irsogladine は胃液分泌に対して影響を及ぼすことなく、各種の実験潰瘍モデルに対して幅広い有効性を示す。本研究は irsogladine の胃粘膜保護作用機序の詳細を明らかにすることを目的とした。

Irsogladine は胃粘膜の cAMP 量を増加させることが知られている。著者は irsogladine が cAMP 含量を増加させる機序として phosphodiesterase (PDE) 阻害活性を有するか否かについて検討を加え、以下の結果を得た。Irsogladine はラット腺胃の cAMP を増加させる一方で、cGMP には明らかな作用を示さなかった。非特異的 PDE 阻害剤の 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) 存在下では、irsogladine の cAMP 増加作用を認めなかった。主に PDE1, PDE2, PDE4 各アイソザイムで構成されているウシ脳由来精製 PDE による cAMP の加水分解を irsogladine はほぼ完全に阻害した。また、ウシ心臓由来精製 PDE を構成する PDE1 ならびに PDE3 による cAMP の加水分解を irsogladine は阻害した。以上のことから、irsogladine はアイソザイム非特異的に PDE を阻害し、cAMP の加水分解を阻害することが明らかとなった。

活性化好中球が、虚血再灌流、helicobacter pylori (H.pylori) 感染、non-steroidal anti-inflammatory drugs 処置など種々の条件下で惹起される消化管粘膜障害の発症に深く関与している。Rolipram などの PDE4 選択的阻害剤が好中球の活性化を抑制することが報告されていることから、irsogladine のヒト活性化好中球に対する作用を検討し、以下の結果を得た。Irsogladine は PDE4 が高発現しているヒト好中球の cAMP を濃度依存性に増加させたが、IBMX 共存下では、irsogladine の cAMP 増加

作用は認めなかった。Irsogladine は N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine (fMLP)、zymosan、G 蛋白活性化剤の guanosine-5'-[γ -thio]triphosphate tetrasodium、 Ca^{2+} イオノフォアの A23187 ならびに protein kinase C 活性化剤の phorbol 12-myristate 13-acetate の各種刺激に基づく活性化好中球からの O_2^- 産生遊離を抑制した (Fig. 1)。Rolipram ならびに IBMX も irsogladine と同様に各種刺激による O_2^- 産生遊離を抑制した。Irsogladine ならびに rolipram の fMLP 刺激による O_2^- 産生遊離抑制作用は、A kinase 阻害剤の H-89 処置により消失した。以上のことから、irsogladine は PDE4 阻害作用に基づく cAMP 量の増加を介して、ヒト好中球の活性化を抑制するものと考えられた。

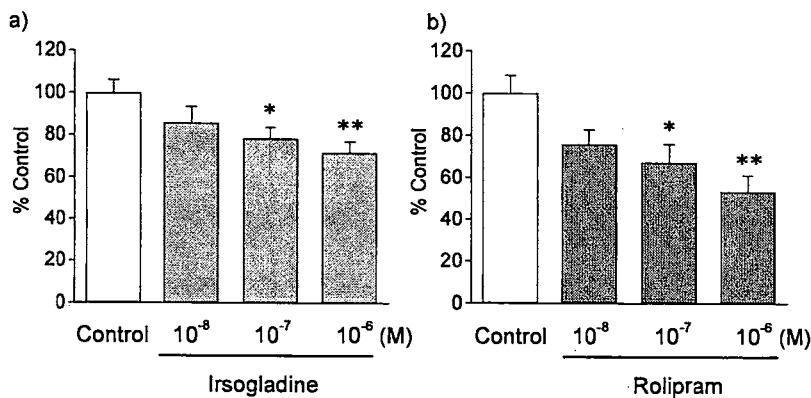


Fig. 1 Effects of irsogladine (a) and rolipram (b) on the fMLP (10^{-6} M)-induced O_2^- production in human neutrophils. O_2^- was measured by the lucigenin-enhanced chemiluminescence method. O_2^- production was expressed as percentage of the control value. Each column represents the mean \pm S.E of 10 experiments.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ as compared with control (Dunnett's test).

胃粘膜上皮細胞、なかでも表層粘液細胞間にはギャップ結合が非常に発達している。この表層粘液細胞間のコミュニケーションは胃粘膜組織の恒常性の維持、ひいては粘膜防御機能に密接に関わっている可能性が考えられる。そこで、PDE 阻害を介して胃粘膜の cAMP 増加させる irsogladine の細胞間コミュニケーション能に対する作用を培養ウサギ胃上皮細胞を用いて検討し、以下の結果を得た。Irsogladine は細胞内 cAMP

を増加させる濃度において細胞間コミュニケーション能を活性化した。非選択的な PDE 阻害剤である theophylline や IBMX も培養ウサギ胃上皮細胞における細胞間コミュニケーション能を活性化した。Theophylline 共存下では irsogladine の細胞間コミュニケーション活性化作用は著しく減弱した。以上のことから、irsogladine は PDE 阻害に基づく細胞内 cAMP 濃度の増加を介して細胞間コミュニケーションを活性化するものと考えられた。

著者は胃粘膜上皮細胞間コミュニケーションが胃粘膜防御機能や潰瘍の発症・治癒に何らかの役割を果たしていると考え、ラットやヒトの胃粘膜上皮細胞のギャップ結合の組織学的あるいは形態学的な検索を行った。コネクシン32に対するモノクローナル抗体を用い、間接蛍光抗体法により免疫染色を行った結果、ラット胃粘膜表層粘液細胞の細胞膜上に豊富な特異蛍光が観察された。凍結切断レプリカ法を用いてラット胃粘膜表層粘液細胞の側面細胞膜を観察した結果、細胞の成熟に伴いギャップ結合が発達することが明らかとなった。さらにヒト胃粘膜生検試料から得た凍結活断レプリカの観察から、胃潰瘍患者の潰瘍辺縁部の表層粘液細胞で見られるギャップ結合の発現頻度は健常人の正常粘膜表層粘液細胞のものと比較して低いことが明らかとなった。

ラットの虚血再灌流胃粘膜障害に対する irsogladine ならびに rolipram などの選択的 PDE4 阻害剤の作用を検討し、下記の結果を得た。Irsogladine はラット虚血再灌流胃粘膜障害の発症を抑制した (Fig. 2)。Rolipram ならびに Ro-20-1724 も虚血再灌流胃粘膜障害の発症を抑制した。Irsogladine ならびに rolipram は虚血再灌流による障害胃における TNF- α 産生を抑制した。さらに、irsogladine ならびに rolipram は虚血再灌流による障害胃における MPO 活性の増加、すなわち好中球の浸潤を抑制した。以上の結果から、irsogladine は PDE4 阻害作用を介して炎症性サイトカインの TNF- α 産生や好中球の浸潤を抑制し、ラットの虚血再灌流胃粘膜障害に対して保護的に作用すると考えられた。

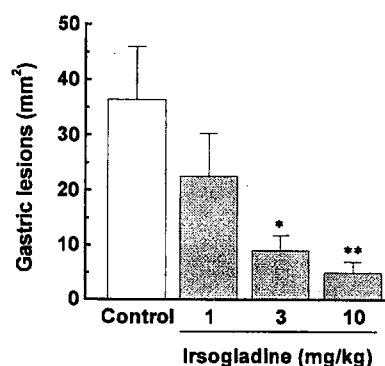


Fig. 2 Effect of irsogladine on gastric injuries induced by ischemia-reperfusion in rats. Rats were subjected to ischemia for 30 min, followed by reperfusion for 60 min. Irsogladine (1-10 mg/kg) was given p.o. 60 min prior to ischemia. Each column represents the mean \pm S.E. of 8 rats. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the control-group (Dunnett's test).

近年、胃炎ならびに胃・十二指腸潰瘍の病因として *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染が重要視されている。*H. pylori* 感染胃粘膜障害モデルとして知られるラットのモノクロラミン誘起胃粘膜障害に対する irsogladine の保護作用について検討し、下記の結果を得た。Irsogladine はラットのモノクロラミン誘起胃粘膜障害の発症を抑制した。モノクロラミン誘起胃粘膜障害に対する irsogladine の抑制作用は N^G -nitro-L-arginine methylester (L-NAME) の前処置で消失した。iNOS 選択的阻害剤である aminoguanidine は irsogladine の抑制効果に対して影響を及ぼさなかったことから、irsogladine の防御作用に寄与する NO は cNOS に由来している可能性が考えられた。Irsogladine はモノクロラミン投与による胃粘膜 cGMP 量の低下を抑制し、この抑制作用も L-NAME の前処置により消失した (Fig. 3)。Irsogladine は L-NAME 依存性にモノクロラミン処置による胃粘膜血流の低下を抑制した。以上の結果から、モノクロラミン誘起胃粘膜障害に対して irsogladine は NO 依存性の粘膜保護作用を示し、この irsogladine の保護作用には NO 依存性の胃粘膜血流の維持が重要であると考えられた。

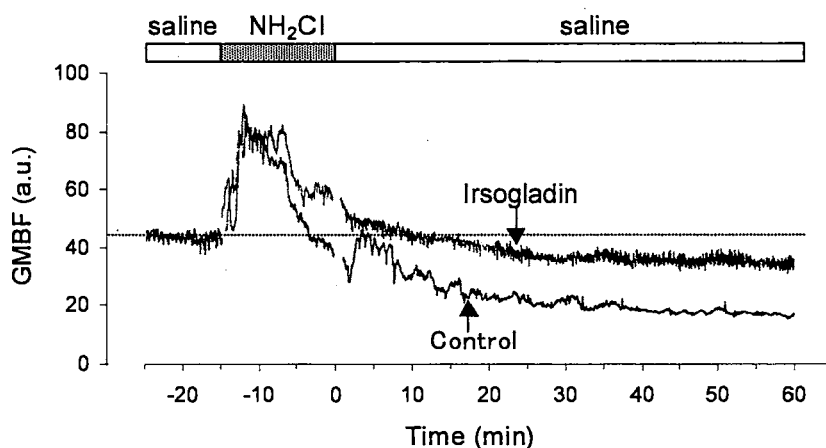


Fig. 3 Representative recordings showing the decrease in gastric mucosal blood flow caused by 60 mM NH_2Cl application under pentobarbital anesthesia. GMBF was measured by laser Doppler flowmetry. After the stomach was exposed to NH_2Cl for 15 min and rinsed several times with saline, the GMBF response was consecutively measured for 60min. An arbitrary unit (a.u.) was used to give the relative blood flow value. Irsogladine inhibits the NH_2Cl -induced decrease in GMBF.

以上総括すると、irsogladine は PDE 阻害による cAMP の増加を介して、好中球の活性化および炎症性細胞からの $\text{TNF-}\alpha$ などのサイトカイン産生を抑制し、抗炎症効果を発揮する。また、cAMP の増加を介して胃粘膜上皮粘液細胞間コミュニケーションを活性化させることで粘膜防御機能の強化に寄与する。一方で、irsogladine は粘膜防御に極めて重要な役割を果たしている胃粘膜血流を NO 依存性に維持調節することで、*H. pylori* 感染など各種粘膜障害刺激に対して保護的に作用するものと考えられた。

学位論文審査結果の要旨

本研究は、新規粘膜防御性胃炎・胃潰瘍治療剤 irsogladine maleate の作用機序解明のために、異なる新しい観点からの検討を行ったものである。

Irsogladine の胃粘膜 cAMP 量増加作用について、phosphodiesterase (PDE) 阻害の観点から検討したところ、ウシ脳由来およびウシ心臓由来の精製 PDE による cAMP の加水分解を、それぞれ irsogladine はほぼ完全に阻害した。irsogladine は、PDE4 選択的阻害剤の rolipram の場合と同様に、PDE4 が高発現するヒト好中球の cAMP 量を増加させるだけでなく、各種刺激に基づく好中球からの O_2 産生遊離を抑制した。また、irsogladine は PDE 阻害を介して培養ウサギ胃上皮細胞の cAMP を増加させ、細胞間コミュニケーション能を活性化した。事実、ラットやヒトの胃粘膜表層粘液細胞に発現するギャップ結合を、凍結切断レプリカ法を用いて形態学的に検索した結果、ギャップ結合を介する細胞間コミュニケーションが、胃粘膜防御機能や胃潰瘍の発症に関与する可能性が示された。さらに、irsogladine は rolipram と同様に、胃粘膜中の TNF- α 産生や好中球の浸潤を抑制し、ラットの虚血再灌流胃粘膜障害の発症を抑制することが明らかとなった。また、Helicobacter pylori 菌による感染胃粘膜障害モデルである、ラットのモノクロラミン誘起胃粘膜障害に対する irsogladine の作用について検討したところ、モノクロラミン誘起胃粘膜障害に対して irsogladine は NO 依存性の粘膜保護作用を示した。したがって、この保護作用出現には NO 依存性の胃粘膜血流維持が重要であると推察される。

以上の研究成績は、新規抗潰瘍薬の作用機序を解明しただけでなく、胃粘膜における cAMP の機能的意義追究上多大なる貢献が期待されるので、委員会は本論文が博士(薬学)に値すると判断する。