

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：35307

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790113

研究課題名(和文) NSAIDの作用分子機構の解明とその創薬応用

研究課題名(英文) Identification of molecular mechanism for actions of NSAID and its application for drug development

研究代表者

山川 直樹 (Yamakawa, Naoki)

就実大学・薬学部・講師

研究者番号：20583040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：(1) DNAチップを用いて、対象既存薬NSAIDsにより発現が変化する遺伝子を解析した。その結果、熱ショックタンパク質関連の遺伝子の発現を変化させる一連のNSAIDを同定した。特に興味深い結果として、カルボン酸系のNSAIDsにおいてHSP25及びHSP27の発現を大きく変化させることを見出した。(2) 標的遺伝子の網羅的解析から優れた抗炎症作用を示し、かつ、細胞毒性の弱いNSAIDを同定したが、動物レベルでは期待された効果が得られなかった。そこで、同定したNSAIDの誘導体を合成したところ、胃潰瘍副作用の少ない新規化合物を見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have examined the gene changing expression frequency after target NSAIDs treatment. As a result, we identified a series of NSAIDs that changed heat shock protein-related genetic expression. As a result of being interesting, we found that carboxylic acid-based NSAIDs greatly changes expression of HSP25 and HSP27. We identified a cytotoxic weak NSAID with superior anti-inflammatory action. However, an expected effect was not provided at the animal level. Therefore we synthesized the derivative of the target NSAID that we identified and discovered new compounds with a few gastric ulcer side effects.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：医薬品探索

1. 研究開始当初の背景

NSAIDs について：アスピリンやインドメタシンに代表される非ステロイド系抗炎症薬 (NSAIDs) は優れた抗炎症作用に加え、胃潰瘍副作用や、癌やアルツハイマー病の発症を抑制する作用など様々な作用が知られているが、その分子機構は不明であった。これまでの研究において、私は、胃潰瘍を起こしにくい NSAID を有機合成することにより NSAID 潰瘍発症機構を明らかにした。本研究提案は、有機合成により数多くの NSAIDs を合成し、NSAIDs の抗炎症・抗癌・抗アルツハイマー作用に関する分子機構を解明すると共に、優れた抗炎症・抗癌・抗アルツハイマー病作用を持つ NSAIDs など、臨床的に有用な NSAIDs の発見を目指した研究である。

2. 研究の目的

本研究の概略：NSAIDs はシクロオキシゲナーゼ (COX) という酵素の阻害剤であり、例えば、この作用により抗炎症作用を発揮する (COX 依存に合成されるプロスタグランジン (PG) は炎症増悪因子である)。一方で、メタアナリシスを含む疫学調査などから、NSAID を長期服用することにより、癌やアルツハイマーの発症リスクが低減することが明らかとなっている。実際米国では、癌の再発予防薬として NSAIDs の使用が認可されている。しかしながら、NSAID のこれらの新しい薬効に関する分子機構はほとんど分かっていなかった。これまでの研究において、私は、DNA チップを用いた網羅的解析により、NSAID によってその発現が変化する種々の遺伝子を同定した。そこで本研究ではこの研究を継続し、より大規模な NSAIDs に関する網羅的解析を行い、NSAID の胃潰瘍副作用、抗炎症・抗癌・抗アルツハイマー病作用に関与する新しい作用を同定する。また既に同定している作用 (HO-1・CHOP・TJ 遺伝子・小胞体シャペロン・HSP の産生を促進する作用、膜傷害作用) 及び新しく同定した NSAID の作用の強い (あるいは弱い) 既存 NSAID を検索する。

DNA チップ解析：最近我々は、NSAID の作用に関する網羅的解析を行った。その結果、アポトーシス誘導能を持つ転写因子 CHOP、熱ショック蛋白質 (HSP)、小胞体シャペロン (GRP78 など)、ヘムオキシゲナーゼ (HO-1) など、様々な遺伝子の発現が NSAIDs により誘導されること、及び NSAID が膜傷害作用を持つことを見出した (*Cancer Res* 2005)。そして、NSAID が抗炎症タンパク質である HO-1 を誘導することが NSAID の抗炎症作用に (*JBC* 2006, 2010a)、NSAID が細胞膜を傷害し CHOP を誘導し胃粘膜細胞にアポトーシスを誘導することが NSAID の胃潰瘍副作用に (*Cell Death Differ* 2004; *JBC* 2005; Asano, Yamakawa *et al.* *JPET* 2009 など)、NSAID が

TJ (タイトジャンクション) 遺伝子を誘導すること、アポトーシスを促進すること、及び PG を減らすことが NSAID の抗癌作用に (*JBC* 2003, 2009a, 2009b; *Cancer Res* 2005; Takehara, Yamakawa *et al.* *Biochem Pharmacol* 2009)、NSAID が小胞体シャペロンを誘導すること、及び PG を減らすことが NSAID の抗アルツハイマー病作用に (*Biochem J* 2007; *JBC* 2007a, 2009c; *J Neurosci* 2011)、それぞれ関与することを発見した。そこで本研究で私は、NSAID によってその発現が変化する遺伝子がストレスタンパク質に関連する遺伝子であることに注目し、炎症性サイトカイン・ケモカイン、細胞接着因子、及び炎症関連転写因子に対する効果を網羅的に検討し、効果が見られた場合は遺伝子ネットワーク解析を行い、その分子機構を解明する。また、これらのノックアウトマウスと上述の疾患に関する動物モデルを組み合わせ、ストレスタンパク質による薬理効果を検討する。この研究により、NSAIDs が持つ多彩な薬理作用に関わる遺伝子とその役割を理解できると考えている。

NSAID の胃潰瘍副作用：上述のように NSAID は優れた抗炎症効果を示す反面、臨床現場では NSAID の胃潰瘍副作用 (NSAID 潰瘍) が大きな問題になっている (1996 年米国では 16500 人が NSAID 潰瘍で亡くなっており、これは全米のエイズ死亡者を上回っている)。また、COX-2 選択的 NSAIDs の服用により心筋梗塞の発症リスクが高まることが報告されている (COX-1 が血液凝固促進因子を、COX-2 が血液凝固阻害因子をそれぞれ産生しているため)。これまでに私は、膜傷害性がなく、かつ COX-2 選択性がない NSAID は、胃潰瘍も心筋梗塞も起こしにくい真に安全な NSAID になると考え、既存の COX-2 選択性を持たない NSAIDs の中から、最も膜傷害性の少ない NSAID としてロキソプロフェン (COX-2 選択性がないにも関わらず比較的胃潰瘍を起こしにくい NSAID として、我が国で最もよく使われている NSAID) を同定した (Yamakawa *et al.* *Biol Pharm Bull* 2010)。さらにロキソプロフェンの誘導体を数多く合成し、その中からほとんど膜傷害性を持たないフルオロロキソプロフェンを発見した。私は、この化合物が十分な抗炎症作用を持つにも関わらず、胃潰瘍をほとんど起こさないことを発見した (Yamakawa *et al.* *J Med Chem* 2010; Yamakawa *et al.* *Bioorg & Medic Chem* 2011、現在、製薬企業と共同で前臨床試験を行っている)。この一連の研究により、臨床的に有用な NSAID を発見出来ただけでなく、我々の仮説 (NSAID の膜傷害作用が NSAID 潰瘍の発症に必要な) を、有機合成化学的手法を用いて証明した。そこで本研究で私は、NSAID の胃潰瘍副作用に関連性の高い遺伝子を上述の DNA チップ解析により同定し、各遺伝子の発現変化が、NSAIDs の胃潰瘍副作用にどのように関与しているのかを明らかにする。ま

た、遺伝子の発現変化が強い(あるいは弱い)既存 NSAIDs の周辺化合物の有機合成を行い、胃潰瘍副作用の少ないより有用な NSAIDs を創製する。この研究により、NSAIDs が持つ胃潰瘍副作用に関わる遺伝子とその役割を理解できると考えている。

まとめ :以上まとめると、NSAIDs はこれまで長年使用されてきたので、その副作用などが充分理解されているという利点があり、癌、及びアルツハイマーの予防薬として世界的に注目されている。そこで私は、NSAIDs が持つ多彩な薬理作用に与る分子機構を明らかにすれば、胃潰瘍を起こしにくい NSAIDs や、優れた抗炎症・抗癌・抗アルツハイマー作用を持つ NSAIDs を発見できると考えた。本研究はこのアイデアを分子生物学的手法と有機合成化学的手法とを組み合わせることで解決するものである。一方、我々は NSAID と生体膜との相互作用に関しても先駆的な研究を行ってきた。例えば胃潰瘍副作用の少ない NSAID の場合、膜傷害性が少ない NSAID を得るために、NSAID と膜との相互作用をシミュレーションし合成戦略を立てた結果、高い確率で膜傷害性の少ない NSAID を得ることが出来た。以上の結果から、副作用の軽減を目的とした分子設計は臨床的に有用な NSAID の発見に有効であることが考えられる。そこで本研究でも有効性かつ安全性の高い NSAID を合成し、得られた化合物を疾患動物モデルで評価し、医薬品開発に繋げたいと考えている。

まとめ :このように本研究は我々がこれまで独自の観点から世界をリードする形で進めてきた NSAID 研究を土台に、有機合成化学的手法を用いた NSAID の作用機構の解明、及び臨床的に有用な NSAIDs の発見を目指す研究であり、その独創性、先駆性は極めて高いと考えている。また医薬品開発に直結する点において、社会的貢献性の高い研究であると考える。

3. 研究の方法

(1) NSAIDs ライブラリーの充実

最近の新薬の臨床試験では、有効性の高い候補化合物であっても予想外の副作用の発生により開発の中止を余儀なくされる場合が増加している。そこで私が注目しているのは、既存薬 NSAID をリード化合物として有機化学合成を行うことである。既存薬 NSAID の化学修飾により医薬品開発を行うことの最大の利点は、既に臨床で使われている医薬品なので、ヒトでの安全性や体内動態などがよく分かっているため、副作用や体内動態の情報がある程度参考にしながら医薬品開発を進めることができるという点である。しかしながら、全ての既存薬 NSAID を試験研究用として入手することは困難であり、試験研究用として販売されていない NSAID や極めて少量でかつ高額の化合物(選択的 COX-2 阻害薬など)についてもスクリーニングの出発材料と

して取り揃える必要がある。そこで本研究では、これらの入手困難な NSAID の有機合成を行い、我々が既に所有している既存薬 NSAIDs ライブラリーのさらなる充実をはかる。また、これらの化合物の溶解法や細胞・動物への投与法を確立する。

(2) 遺伝子発現変化の網羅的解析と同定

これまでに我々は、胃粘膜細胞を用いたインドメタシンによる遺伝子発現変化の DNA チップ解析(約 4000 のヒト遺伝子を含む DNA チップを使用)に関する技術を構築している。そこで本研究では、ヒトの全遺伝子を含む DNA チップを用いて、種々の細胞(胃粘膜細胞、神経細胞、癌細胞)を対象に(1)で構築した既存薬 NSAIDs 依存に発現が変化する遺伝子の網羅的解析と同定を行う。発現変化が確認された遺伝子の中から、過去の文献等の情報を基に、NSAIDs の薬理作用(抗炎症・抗癌・抗アルツハイマー作用、胃潰瘍副作用)に關与している可能性が高いものを選び、(3)の研究の対象とする。

(3) 遺伝子発現変化の薬理作用との関連性の解明

我々がこれまでに確立してきたそれぞれの薬理作用に関するアッセイシステムを用いて、NSAIDs による遺伝子発現変化が、NSAIDs の多彩な薬理作用にどのように關与しているかを明らかにする。

1 細胞レベルでの検討

抗癌作用に関しては癌細胞を用いた、NSAIDs によるアポトーシス誘導・足場非依存的増殖の抑制・浸潤抑制・運動性抑制などのアッセイシステムを用いる。例えばある遺伝子の siRNA(その遺伝子の発現を抑制する)により、NSAIDs による癌細胞の浸潤抑制が見られなくなった場合には、その遺伝子の発現誘導が NSAIDs による癌細胞の浸潤抑制に關与していることを証明出来る。同様な方法で NSAIDs による各遺伝子の発現変化が、NSAIDs の抗炎症・抗アルツハイマー作用、胃潰瘍副作用にどのように關与しているのかを明らかにする。抗アルツハイマー作用に関しては神経細胞を用いた、アミロイド産生・凝集・分解、アミロイドによる神経細胞死、タウタンパク質のリン酸化などのアッセイシステムを用いる。抗炎症作用に関しては炎症性細胞を用いた、炎症性転写因子 NF- κ B の活性化、炎症性サイトカインの産生、細胞接着因子の誘導、活性酸素の産生などのシステムを用いる。胃潰瘍副作用に関しては胃粘膜細胞を用いた、NSAIDs によるアポトーシス誘導・粘液産生抑制、胃酸分泌細胞を用いた NSAIDs による胃酸分泌促進などのシステムを用いる。

2 動物レベルでの検討

これまでに我々は、NSAIDs による CHOP の誘導が NSAIDs 潰瘍の発症に關与していることを、CHOP のノックアウトマウスを用

いて証明することに成功している。そこで本研究では他の遺伝子に関しても、ノックアウトマウスを用いた同様の方法で、NSAIDs による各遺伝子の発現変化が NSAIDs の薬理作用に關与していることを証明する。抗炎症作用に関してはカラゲニン浮腫モデル、胃潰瘍副作用に関してはインドメタシン依存に胃潰瘍を作らせるモデル、抗癌作用に関しては皮下に癌を作らせるモデルをそれぞれ用いる。また、抗アルツハイマー作用を調べるためには、各遺伝子のノックアウトマウスと APP (アミロイドの前駆体) 過剰発現マウスを掛け合わせ記憶学習能力を調べる。以上の解析により、(4) の優れた抗炎症・抗癌・抗アルツハイマー病作用を持つ NSAIDs のスクリーニングにおいて、ターゲットとする遺伝子を決定する。

(4) 標的遺伝子の選別

(1) の研究で構築した NSAIDs ライブラリーから、既に同定している標的遺伝子 (HO-1・CHOP・TJ 遺伝子・小胞体シャペロン・HSP) 及び(3) の研究で決定した標的遺伝子の発現変化作用が強い(あるいは弱い)ものを選択する。標的遺伝子の選定にあたっては、発現変化に必要な絶対的な濃度だけでなく、細胞毒性などの副作用に繋がる有害な作用に比べより低い濃度で発現変化させるといふ点についても重視して行う。

1 一次スクリーニング

それぞれの遺伝子のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したレポータープラスミドを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイシステムによりプロモーターの活性レベルが高いものを選定する。

2 二次スクリーニング

免疫プロット法を用いて、NSAID 依存の各タンパク質の発現を調べる。特に、ストレスタンパク質の発現については詳細に解析を行う。

3 三次スクリーニング

毒性の少ない NSAID を得るため、細胞毒性を調べ、細胞毒性を示さない濃度で対象とするタンパク質を誘導するものを選択する。

4 四次スクリーニング

NSAID を動物に投与し標的遺伝子の発現変化を調べる。最終的には、NSAID の種々の薬理作用を動物実験で検討し、胃潰瘍副作用の少ない既存 NSAIDs、抗炎症・抗癌・抗アルツハイマー作用の強い既存薬 NSAIDs を同定する。

(5) 既存薬 NSAID の誘導体の有機合成

本研究ではヒトでの安全性や体内動態が既に確認されているとう点において、既存薬 NSAIDs を対象としている。しかしながら、(4) で選択した NSAIDs の物理化学的性質や動物での薬効及び体内動態が期待した効

果を示さなかった場合は、候補化合物の周辺化合物を合成する。その際、明確な合成戦略を立てて効率的かつ系統的な有機合成を行う。これまでに私は、例えば胃潰瘍副作用の少ない NSAID の周辺化合物を得る場合、膜傷害性が少ない NSAID を得るために、設計した周辺化合物と膜との相互作用についてコンピュータシミュレーションを行うことにより、高い確率で膜傷害性の少ない化合物を得ることが出来た。そこで、本研究においても、標的する分子(転写因子など)の高次構造が解明されている場合は、MOE(統合計算化学システム)を用いたドッキングシミュレーションを行い誘導体の合成戦略を練る。以上のようにして得られた化合物の作用を細胞・動物を用いて解析し、有用な臨床効果が期待される NSAIDs を選択する。

4. 研究成果

(1) NSAIDs ライブラリーの充実

私はまず、研究の対象となる NSAIDs ライブラリーを充実させた。特に、試験研究用として入手することが困難な NSAIDs についてはそれらの有機合成を行い、既に所有していたライブラリーを含めて国内外で臨床使用されている約 100 種の既存薬 NSAIDs ライブラリーを構築した。また、これらの NSAIDs の溶解性と安定性試験を行い、スクリーニングに最適な試料溶液の調整法を確立した。さらに、副作用や体内動態が原因で臨床開発に失敗した非臨床の候補化合物についてもそれらの有機合成を行い、サブライブラリーを構築した。

(2) 対象既存薬 NSAIDs の作用を分子レベルで網羅的に解析する

DNA チップを用いて、対象既存薬 NSAIDs により発現が変化する遺伝子を解析した。その結果、熱ショックタンパク質関連の遺伝子の発現を変化させる一連の NSAID を同定した。特に興味深い結果として、カルボン酸系の NSAIDs において HSP25 及び HSP27 の発現を大きく変化させることを見出した。

(3) 対象既存薬 NSAIDs の周辺化合物の有機合成を行う

標的遺伝子の網羅的解析から優れた抗炎症作用を示し、かつ、細胞毒性の弱い NSAID を同定したが、動物レベルでは期待された効果が得られなかった。そこで、同定した NSAID の誘導体を合成したところ、胃潰瘍副作用の少ない新規化合物を見出した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 11 件)

【すべて査読有りの原著論文】

1) Tanaka, K., Kurotsu, S., Asano, T., Yamakawa, N., Kobayashi, D., Yamashita, Y., Yamazaki, H., Ishihara, T., Watanabe, H., Maruyama, T., Suzuki, H. and Mizushima, T.: Superiority of pulmonary administration of mepenzolate bromide over other routes as treatment for chronic obstructive pulmonary disease. *Sci Rep*, 4: 4510 (2014).

2) Yamakawa, N., Suzuki, K., Yamashita, Y., Katsu, T., Hanaya, K., Shoji, M., Sugai, T. and Mizushima, T.: Structure-activity relationship of celecoxib and rofecoxib for the membrane permeabilizing activity. *Bioorg Med Chem*, 22: 2529-2534 (2014).

3) Yamashita, Y., Tanaka, K., Asano, T., Yamakawa, N., Kobayashi, D., Ishihara, T., Hanaya, K., Shoji, M., Sugai, T., Wada, M., Mashimo, T., Fukunishi, Y. and Mizushima, T.: Synthesis and biological comparison of enantiomers of mepenzolate bromide, a muscarinic receptor antagonist with bronchodilatory and anti-inflammatory activities. *Bioorg Med Chem*, 22: 3488-3497 (2014).

4) Hoshino, T., Suzuki, K., Matsushima, T., Yamakawa, N., Suzuki, T. and Mizushima, T.: Suppression of Alzheimer's Disease-Related Phenotypes by Geranylgeranylacetone in Mice. *PLoS One*, 8: e76306 (2013).

5) Ishihara, T., Yamashita, Y., Takasaki, N., Yamamoto, S., Hayashi, E., Tahara, K., Takenaga, M., Yamakawa, N., Kasahara, T. and Mizushima, T.: Prostaglandin E1-containing nanoparticles improve walking activity in an experimental rat model of intermittent claudication. *J Pharm Pharmacol*, 65: 1187-1194 (2013).

6) Matsuda, M., Hoshino, T., Yamakawa, N., Tahara, K., Adachi, H., Sobue, G., Maji, D., Ihn, H. and Mizushima, T.: Suppression of UV-induced wrinkle formation by induction of HSP70 expression in mice. *J Invest Dermatol*, 133: 919-928 (2013).

7) Tanaka, K., Ishihara, T., Sugizaki, T., Kobayashi, D., Yamashita, Y., Tahara, K., Yamakawa, N., Iijima, K., Mogushi, K., Tanaka, H., Sato, K., Suzuki, H. and Mizushima, T.: Mepenzolate bromide displays beneficial effects in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Commun*, 4: 2686 (2013).

8) Yamakawa, N., Suemasu, S., Watanabe, H., Tahara, K., Tanaka, K., Okamoto, Y., Ohtsuka, M., Maruyama, T. and Mizushima, T.: Comparison of

pharmacokinetics between loxoprofen and its derivative with lower ulcerogenic activity, fluoro-loxoprofen. *Drug Metab Pharmacokinet*, 28: 118-124 (2013).

9) Suemasu, S., Yamakawa, N., Ishihara, T., Asano, T., Tahara, K., Tanaka, K., Matsui, H., Okamoto, Y., Otsuka, M., Takeuchi, K., Suzuki, H. and Mizushima, T.: Identification of a unique nsaid, fluoro-loxoprofen with gastroprotective activity. *Biochem Pharmacol*, 84: 1470-1481 (2012).

10) Tanaka, K., Shirai, A., Ito, Y., Namba, T., Tahara, K., Yamakawa, N. and Mizushima, T.: Expression of 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) stimulates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and dysfunction in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 425: 818-824 (2012).

11) Yamakawa, N., Suemasu, S., Okamoto, Y., Tanaka, K., Ishihara, T., Asano, T., Miyata, K., Otsuka, M. and Mizushima, T.: Synthesis and Biological Evaluation of Derivatives of 2-{2-Fluoro-4-[(2-oxocyclopentyl)methyl]phenyl}propanoic Acid: Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs with Low Gastric Ulcerogenic Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55: 5143-5150 (2012).

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山川直樹 (YAMAKAWA, NAOKI)

就実大学・薬学部・講師

研究者番号: 20583040