O-16

iNOS 誘導阻害と創薬 - 新しいタイプの鎮痛薬の可能性 -

守時 英喜, 久山 哲廣, 天野 雄一郎, 貫田 寛,
岩本 武史*, 安田 恒雄*, 郡 英明*

徳島大学薬学部薬理学教室, (株)大塚製薬工場栄養研究所*

緒言

疼痛性疾患に使用されている非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) の鎮痛作用と副作用の消化器障害は表裏一体の関係にあるため、より副作用のない鎮痛薬の開発が望まれている。ところで新規 benzoyl-pyrazolopyrimidine 誘導体 (BZPP、図 1) はイースト誘発疼痛、酢酸ライシング、サブスタンス-P 誘発疼痛、熱傷モデル、座骨神経絞扼モデル等において鎮痛効果を示すが NSAID とは異なり、シクロオキシゲナーゼ阻害活性は示さず、連続投与によっても胃腸障害は認められていない。また、麻薬性鎮痛薬が著効を示す熱板法では無効であった (Yasuda et al., American Pain Society 14th Annual Meeting, 1995)。従って、従来知られている鎮痛薬とは異なる作用機序を有していると推測されるが、その作用機序は不明である。NO は痛みに対する感受性を増大させ、痛覚過敏を引き起こすことが報告されている。今回、痛覚との関連があると考えられている NO 系¹⁾ およびアデノシン²⁾ に対する BZPP の作用を検討した。私達はラット胸部大動脈を endotoxin (LPS) や IL-1 β でプライムしておく平滑筋で NOS が誘導され、L-arginine (Arg) を適用すると NO を介して内皮非依存的にラット胸部大動脈を弛緩させることを既に報告している^{3,4)}。この系を利用して BZPP が LPS や IL-1 β によって引き起こされる iNOS の誘導阻害作用を持つかどうかを、チロシンカイネース阻害剤、PKC 阻害剤や蛋白合成阻害剤の作用と比較検討し、BZPP が iNOS 誘導のシグナル伝達のどのレベルに影響を与えているか Arg-弛緩、cGMP 産生、NO $_2^-$ 産生、iNOS mRNA 発現に対する影響、PKC 阻害作用などをマーカーにして推論した。また、BZPP が血管、腸管、心房においてアデノシンの取り込みを阻害してアデノシンの作用を増強することも明らかになった。

Fig.1

実験方法

細胞培養 細胞は 1.7×10^5 cells/ml の濃度で培養プレートにまき、4代継代培養して実験に用いた。
iNOS mRNA LPS 適用 4 時間後、標本を凍結し反応を停止させた。Isogen 法にて total RNA を抽出し、逆転写酵素で cDNA を調整した。iNOS プライマーを用い iNOS mRNA を増幅させた。同時に

発現のマーカーとしてG3PDHの増幅も行い、iNOS/G3PDHの比を算定することによりiNOS mRNA発現を評価した。

疼痛モデルにおける効果判定 イースト疼痛モデルは20%イースト液0.1 mlを、サブスタンス-P疼痛モデルはサブスタンス-P 25 ngを左足趾皮下に注射して作成した。検体は5%アラビアゴム液に懸濁させ、1時間前に経口投与した。

結果と考察

疼痛モデルにおける benzoyl-pyrazolopyrimidine (BZPP) 誘導体の効果

イースト (20 % 液) をラット左足趾皮下に投与して作成したイースト誘発疼痛モデルにおいても、インドメタシンが有効である酢酸ライシングにおいても BZPP はインドメタシンよりも効果はやや劣るが強い鎮痛作用を示した(図2)。興味あることに BZPP はインドメタシンが無効であったサブスタンス-P誘発疼痛モデル、熱傷モデル、坐骨神経絞扼モデルにおいても有効であった(図2)。ところが麻薬性鎮痛薬モルヒネが効果を示す熱板法においては BZPP は無効であった(図2)。

Fig.2 Effect of BZPP on the substance P (25 ng/site)- and yeast (20 %, 0.1 ml)-induced hyperalgesia, assessed by the Randall-Selitto method, and on the hot plate (58 °C)-induced hyperalgesia in rats. Indomethacin and morphine were used for comparison.

BZPP は LPS による iNOS の誘導を阻止する

内皮を除去したラット胸部大動脈標本に LPS を共存させておいて L-arginine (Arg) を適用すると血管は弛緩する(図3)。この LPS によるプライミング効果はタンパク合成阻害剤である actinomycin-D, cycloheximide や glucocorticoid を摘出直後から処置しておくくと完全に阻止された。従って LPS が血管平滑筋において iNOS の誘導を引き起こし、その結果 Arg から NO が産生され、cGMP の産生が増加して血管が弛緩することを示唆している。

次に Arg の弛緩作用に対する BZPP の効果を検討した。神経絞扼による疼痛を阻害すると報告されている BZPP を血管摘出直後から LPS と共存させ、6-8 時間経過後洗浄して BZPP を除去し、さらに 1-2 時間静置した後、Arg の弛緩作用を観察した(図3)。BZPP を処置しておくくと Arg による弛緩と cGMP 産生は抑制・阻害された。このことは BZPP が NOS の誘導を阻害して NO 産生を抑制していることを示唆している。ところが Arg に対して感受性を獲得した時点、すなわち NOS の誘導

が既に起こったと考えられる時点でBZPPで処置しても、もはや抑制作用は示さないこともこの推論を支持している。

Fig.3 **A:** Inhibition by BZPP of LPS-primed, arginine-induced relaxation (left) and LPS-primed, arginine-stimulated cGMP formation (middle) in rat thoracic aorta. Preparations were treated with LPS (300 ng/ml) for 8 h. BZPP was applied 30 min before LPS treatment, and was present throughout the experiments. Herbimycin A (Herb A, 1 μM), RO 31-8220 (RO, 3 μM) and H-7 (30 μM) were used for comparison. Preparations were incubated with LPS (300 ng/ml) for 8 h. Amounts of cGMP were measured after incubation with 10 μM arginine for 60 s. Inhibitory effect of BZPP on LPS-primed, NO₂⁻ accumulation of cultured vascular smooth muscle cells (right). Amounts of NO₂⁻ were measured after incubation with LPS (300 μM) for 24 h. BZPP was applied 30 min before addition of LPS.

一方、ACh やニトロプルシドによる弛緩と cGMP 産生に対しては BZPP は何の影響も与えておらず (data not shown), 抑制効果は Arg に特異的であることも明らかになった。このことは BZPP が内皮機能を阻害するのではなく、またグアニレートサイクเลส以降の経路を阻害するのではなく、Arg から NO 産生に至るまでの経路を阻害していることを物語っている。

同様の抑制作用はチロシンカイネース阻害剤や PKC 阻害剤にも認められた。すなわち、血管摘出直後よりチロシンカイネース阻害薬のハービマイシン A (1 μM) あるいは PKC 阻害剤 RO 31-8220 や H-7 (30 μM) を共存させておくと、6-8 時間経過しても Arg による弛緩反応の発現および cGMP 産生の増大は認められなかった (図 3)。

血管平滑筋培養細胞における NOS 誘導を BZPP は阻止する

培養平滑筋細胞においても BZPP が LPS および IL-1β の刺激による NOS の誘導を阻止するかどうか検討した (図 3、図 4)。NOS 誘導の指標として NO₂⁻ 産生量を測定した。Arg を添加した培地で血管平滑筋培養細胞を LPS 300 ng/ml で 24 時間、あるいは IL-1β 10 ng/ml 共存下で 8 時間インキュベートすると NO₂⁻ の蓄積量は増大した。しかし BZPP 30 μM を共存させておくと LPS や IL-1β による NO₂⁻ 蓄積はベースルまで低下した。対照として用いたチロシンカイネース阻害剤ハービマイシン A と PKC 阻害剤 RO-31-8220 も BZPP と同様の抑制効果をを示した。すなわち BZPP が LPS や IL-1β による NOS 誘導を阻害することが示唆された。

Fig.4 Inhibitory effects of BZPP on NO₂⁻ accumulation of IL-1β primed cultured vascular smooth muscle cells. Amounts of NO₂⁻ were measured after incubation with IL-1β (10 ng/ml) for 24 h. Herbimycin A (1 μM) and RO 31-8220 (3 μM) were used for comparison.

LPSはサイトカインを介してNOSを誘導するが、LPS と IL-1β によるNOSの発現/誘導にチロシンカイネースや PKC等のリン酸化酵素が介在しているらしいことは知られている。血管平滑筋培養細胞やマクロファージで LPS が NOS の誘導を引き起こし、この誘導はチロシンカイネース阻害剤⁵⁾や PKC 阻害剤⁶⁾で阻止されることが報告されている。Arg の NO を介した血管弛緩作用の発現は LPS により血管平滑筋で NOS が誘導されたためであるが、この NOS の誘導/発現経路にはチロシンカイネースや PKC が介在していると推測される。BZPP が iNOS 誘導のシグナル伝達路のリン酸化を阻害して iNOS の発現を抑制する可能性は BZPP の作用機序の候補の一つとして浮上して来た。

BZPP は LPS による iNOS mRNA の発現を抑制する

これらの実験から BZPP は血管平滑筋において iNOS の誘導を抑制していることが推定されたので、BZPP がどのレベルで iNOS の発現を抑制しているかを知るため RT-PCR法により iNOS mRNA の発現をマーカーにして検討した(図5)。LPS 適用 4 時間後、iNOS mRNA は発現した。BZPP (30 μM) を共存させておくと iNOS mRNA の発現は抑制されていた。すなわち BZPP は転写レベルに影響を与えていることが明らかになった。

Fig.5 **A:** Agarose-gel electrophoresis of the RT-PCR product for G3PDH and iNOS. **B:** Effect of BZPP on iNOS mRNA expression. Aortic tissues were incubated with 300 ng/ml of LPS for 8 h. BZPP (30 μM) was applied 30 min before priming by LPS. After incubation for 8 h, arterial segments were used for RT-PCR. The ordinate shows iNOS expression assessed as the iNOS/G3PDH ratio.

BZPP のアデノシン増強作用

アデノシンはモルモット摘出心耳の自発収縮を濃度依存的に抑制した。BZPPを前処置しておくともアデノシンの陰性変力作用は増強されたが、アデノシンの取り込み機構に対して抵抗性を有し、アデノシンデアミネースに対して安定な誘導体 NECA (N-ethylcarboxamidoadenosine) の陰性変力作用は増強を受けなかった。モルモット回腸を 0.1 Hz で電気刺激して発現する収縮をアデノシンは抑制

するが、あらかじめ BZPP を共存させておくとアデノシンの抑制効果は増強された (図 6 B)。
 アデノシンは 4~6 週齢の若いラットの摘出胸部大動脈のリング状標本を内皮依存性に NO を介して弛緩させる。BZPP を前処置しておくとアデノシンによる血管弛緩は増強された (図 6 C)。
 これらのことは BZPP が組織へのアデノシンの取り込みを阻害していることを示唆している。

Fig.6 Potentiating effect of BZPP on adenosine-induced negative inotropic response of guinea-pig atria (A), adenosine-induced inhibition of guinea-pig ileum twitch response (B) and adenosine-induced relaxation of rat thoracic aorta (C). BZPP was added for 30 min before application of adenosine.

Fig.7 Possible site of action of BZPP in signal transduction pathway of LPS-primed iNOS expression. TKI, tyrosine kinase inhibitors; PKCI, protein kinase C inhibitors. BZPP possibly inhibits 1) adenosine uptake into cells or its intracellular degradation, thus elevating effective concentration of adenosine, or 2) LPS- or cytokine-primed production of iNOS mRNA, thus preventing iNOS expression and NO formation. Increase in the concentration of adenosine and reduction of NO formation may alleviate hyperalgesia.

まとめ

以上、各種疼痛モデルに有効である benzoyl-pyrazolopyrimidine 誘導体 (BZPP) は血管平滑筋における LPS/IL-1 β による iNOS 誘導阻害作用とアデノシン増強作用とを有することが明らかになった。

アデノシンをヒトに静脈内投与すると鎮痛作用が認められることが報告されているが²⁾, BZPP に認められたアデノシン増強作用と鎮痛との関連は興味あるところである。

今回の研究で BZPP はサイトカインの産生・遊離を抑制することにより血管の iNOS 誘導を阻害

するか、あるいはサイトカインによって刺激される iNOS の発現/誘導に至るシグナル伝達路の蛋白リン酸化を阻害して iNOS の誘導を阻止しているという可能性が示唆された。また、持続性疼痛には痛覚過敏と NO 合成酵素の活性化が関与していることが示されているが¹⁾、BZPP 誘導体の鎮痛作用は iNOS の誘導阻害に基づくのかどうかは興味あるところであり、新しいタイプの鎮痛薬を考える上でサゼステイブである。

文献

- 1) Meller ST and Gebhart GF: Topical Review; Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* **52**, 127-136 (1993)
- 2) Belfrage M, Sollevi A, Segerdahl M, Sjolund KF and Hansson P: Systemic Adenosine infusion alleviates spontaneous and stimulus evoked pain in patients with peripheral neuropathic pain. *Anesth Analg* **81**, 713-717 (1995)
- 3) Moritoki H, Takeuchi S, Hisayama T, Kondoh W: NO synthase responsible for L-arginine- induced relaxation of rat aortic rings in vitro may be an inducible type. *Br J Pharmacol* **107**, 361-366 (1992)
- 4) Moritoki H, Takeuchi S, Kondoh W, Hisayama T, Hasizume M and Noda K: Role of endotoxin in L-arginine-induced relaxation of rat thoracic aorta mediated by muscle-derived nitric oxide. *Arch Int Pharmacodyn* **327**, 152-162 (1994)
- 5) Marczin N, Papapetropoulos A and Catravas JD: Tyrosine kinase inhibitors suppress endotoxin- and IL-1 β -induced NO synthesis in aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol* **265** (Heart Circ.Physiol. 34) H1014-H1018 (1993)
- 6) Severn A, Wakelman MJO & Liew FY : The role of protein kinase C in the induction of nitric oxide synthesis by murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **188**, 997-1002 (1992)

Abstract - Possible mechanism of benzoyl-pyrimidopyrimidine derivatives as novel analgesics. Hideki MORITOKI, Tetsuhiro HISAYAMA, Yuichiro AMANO, Kan KIDA, Takesi IWAMOTO*, Tsuneo YASUDA* & Hideaki KOHRI* (Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokushima, Tokushima 770, and *Ohotsuka Pharmaceutical Factory, Naruto 772, Japan). *Folia Pharmacol. Jpn.* **108**, Supp 1, 149P~154P (1996)

Benzoyl-pyrimidopyrimidine derivatives (BZPP) has been demonstrated to alleviate hyperalgesia in experimental model of peripheral neuropathic pain. Activation of iNOS causes hyperalgesia and that adenosine contributes analgesia. In this connection, we investigated the mechanism of action of BZPP in vasculature as a model system, with reference to adenosine and iNOS induction/NO. BZPP prevented LPS- or IL-1 β -primed initiation of L-arginine-induced relaxation and cGMP formation in rat thoracic aorta, and nitrite accumulation of cultured aortic smooth muscle cells. Treatment of rat aortic segments with LPS induced iNOS mRNA in 8 h. BZPP attenuated the expression of LPS-stimulated iNOS mRNA, assessed as iNOS/G3PDH ratio. In addition, BZPP potentiated adenosine-induced negative inotropic response of guinea-pig atria, adenosine-induced inhibition of guinea-pig ileum twitch response and adenosine-induced relaxation of rat aorta. Therefore, it is conceivable that inhibitory effect on iNOS induction and subsequent reduction of NO formation, and potentiating action on adenosine-induced effects may be responsible for the analgesic effect of BZPP.