新抗炎症薬 CS-600 のプロスタグランジン合成阻害を中心とする薬効作用機序

松田啓一・大西清方・謝 智恵・山崎光郎*, 田中頼久**, 田中喜一郎***

CS-600, a new anti-inflammatory agent. Inhibitory activity on prostaglandin biosynthesis CS-600, sodium 2-[4-(2-oxocyclopentan-1-yl methyl) phenyl] propionate, which has potent anti-inflammatory and analgesic activities, showed a weak inhibitory activity to the *in vitro* PG synthesis with bovine seminal vesicle microsomes (IC_{50} : $760 \mu M$). Its main metabolite, which was produced by stereospecific reduction of the cyclopentanone moiety to hydroxy cyclopentane, exhibited a potent inhibitory activity (IC_{50} : $9 \mu M$) to the enzyme. The stereospecific configuration (trans-OH, SRS) was essential for the inhibitory activity. Oral administration of CS-600 to rats markedly decreased the urinary PGE_2 and $F_{2\alpha}$ levels, suggesting that the active metabolite was produced and inhibited PG synthesis *in vivo*. In a culture system of 3T6 fibroblasts, CS-600 was effectively converted to the active metabolite and inhibited the PGE_2 production of the fibroblasts.

Keiichi Matsuda・Kiyokata Ohnishi・Tomoe Sha・Mitsuo Yamazaki*
Yorihisa Tanaka**・Kiichiro Tanaka***

*Biological Research Laboratories, **Analytical and Metabolic Research Laboratories, ***Research Institute, Sankyo Co., Ltd.

プロスタグランジン (PG) 類は、生体の膜脂質に含まれるアラキドン酸などの不飽和脂肪酸 (C_{20}) に由来する生理活性物質群であり、炎症においても他のメディエータと協同して、炎症特有の生体反応を誘起、増強していると考えられている¹⁾。また、Vane ら²⁾により、非ステロイド抗炎症薬が、PG 合成酵素、特に cyclooxygenase を阻害することが示され、以来、PG 合成酵素阻害作用が、抗炎症薬の薬効の指標の一つとなっている。

CS-600 は、図 1 に示す化学構造をもち、抗炎症、鎮痛、解熱作用において、他の非ステロイド抗炎症薬にまさるすぐれた薬効を示し、また消化管障害作用の少ない新規薬物である³⁾。この薬効の作用機序を、PG 合成阻害を中心に検討した結果を述べる。

図 1 $C_{15}H_{17}NaO_3 \cdot 2H_2O$

材 料

$[^{14}C]$ アラキドン酸, $[^3H]PGE_2$, $[^3H]PGF_{2\alpha}$ は、New England Nuclear より入手し、 PGE_2 および $F_{2\alpha}$ のラジオイムノアッセイキットは Clinical Assay 社より購入した。CS-600 およびその $[^{14}C]$ 標識化合物 ($43.1 \mu Ci/mg$)、CS-600 代謝物標品は、当社化学研究所において調製された。

方 法

(1) PG 合成阻害活性測定

ウシおよびヒツジ精囊ミクロソーム PG 合成酵素は、Takeguchi ら⁴⁾の方法で調製した。この酵素標品 ($1 mg/ml$) に、薬物、エビネフリン ($1 mM$)、グルタチオン ($2 mM$) を加え、 $0.1 M$ Tris-HCl, pH 7.6 で、 $30^\circ 5$ 分間予温したのち $[^{14}C]$ アラキドン酸 ($10 \mu M$) を加え、さらに 10 分間反応させた。塩酸を加え、pH 3 で酢酸エチル抽出し、生成された PGE_2 を TLC で分離定量した。薬物による PGE_2 量の減少から酵素阻害度をみた。

(2) ラット尿中 PGE_2 , $F_{2\alpha}$ の測定

以前に報告した方法⁵⁾を用いた。16時間絶食したウィスター・今道系ラット (雄性, $200 \sim 250 g$) に薬物を経口投与し、1 時間後に水を経口で与え ($2.5 ml/100 g$)、4

時間尿中の PGE_2 および $\text{F}_{2\alpha}$ を抽出, カラム分離して, おおのラジオイムノアッセイで定量した.

(3) PG ラジオイムノアッセイ

Levine ら⁶⁾による二抗体により, ラジオイムノアッセイキットを用い, PGE_2 および $\text{F}_{2\alpha}$ を定量した.

(4) 3T6 繊維芽細胞 PG 産生阻害の測定

スイス白色マウス 由来 3T6 繊維芽細胞 (大日本製薬, 組織培養センターより購入) を用い, Carty ら⁷⁾の方法で, 薬物による PGE_2 産生の阻害をみた. Dulbecco-Eagle 培地, 10% 仔ウシ血清中で, 対数増殖後期の 3T6 細胞 (8×10^5 個) に, 薬物およびアラキドン酸 ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$) を加え, 37° で反応させ, 培地中に生成された PGE_2 量をラジオイムノアッセイで測定した.

(5) 3T6 繊維芽細胞による CS-600 の代謝

[^{14}C] CS-600 ($3.2 \mu\text{M}$) と 3T6 繊維芽細胞 (5×10^5 個) を, Dulbecco-Eagle 培地, 10% 仔ウシ血清中, 37° で反応させ, 一定時間後培養液を採取し, 70% エタノールで抽出し TLC で分離分析した.

結 果

(1) CS-600 の PG 生合成酵素阻害

ウシおよびヒツジ精囊ミクロゾームの PG 生合成酵素に対する CS-600 の阻害活性 (IC_{50}) は, おおの 760 μM , 1020 μM であった. indomethacin (IC_{50} : 0.4 μM , 0.6 μM), ketoprofen (IC_{50} : 0.3 μM , 0.4 μM) などにくらべいじむしく微弱である.

(2) ラット尿中 PG 量への影響

in vivo PG 生合成に対する CS-600 の作用をみる目的で, ラット尿中の PG 量を測定した. 薬物無投与の場合, ラット 4 時間尿中の PGE_2 および $\text{F}_{2\alpha}$ 量は, おおの 3~5 ng/body, 0.7~1.5 ng/body であったが, CS-600 を経口投与すると, 図 2 に示すように, PGE_2 および $\text{F}_{2\alpha}$ 量ともに薬用量に応じて著明に減少した. PGE_2 の減少でみると, CS-600 の ID_{50} は, 2.5 mg/kg, indomethacin の ID_{50} は 3.6 mg/kg であった.

この結果から, CS-600 は生体レベルの PG 生合成を著明に抑制しており, 酵素レベルの生合成に対する作用と際立った差異があることがわかった.

(3) CS-600 の活性代謝物

PG 生合成系への CS-600 の作用が, 酵素レベルと生体レベルで相異なる理由の一つとして, CS-600 の代謝物に PG 生合成酵素の阻害活性があることが考えられる. CS-600 代謝の初発反応は, 5 員環ケトンの OH 基への還元反応であり, trans-OH 体と cis-OH 体が生成する. さらに種々の代謝物が生じるが, 血中にもっとも多い CS-600 代謝物は trans-OH 体である⁸⁾.

まず, CS-600 経口投与ラット血漿中の代謝物の PG 生合成酵素阻害作用を検討した. 血漿から CS-600 およ

図 2 effect of CS-600 and indomethacin on 4-hr urinary excretion of PGE_2 and $\text{F}_{2\alpha}$ in rat.

図 3 PG synthetase inhibition by CS-600 metabolites in rat plasma

The metabolites were extracted and separated by TLC. PG synthetase inhibition was estimated as described in METHOD.

びその代謝物を抽出し, TLC 分離分画の酵素阻害活性をみると, 図 3 に示すように, trans-OH 体分画に強い活性がみられ, cis-OH 体分画をはじめ他の分画にはほとんど阻害活性がみられなかった. また, 尿より抽出単離された種々の CS-600 代謝物の PG 生合成酵素阻害活性も検討したが, trans-OH 体以外のものにはほとんど活性が認められなかった.

CS-600 由来 trans-OH 体には, 3 個の不斉炭素によ

表 1 inhibition of PG-Synthetase by stereo-isomers of trans-OH

	IC ₅₀
trans-OH	
Racemate	72(μM)
SRS	9
RSS	90
SRR	>1000
RSR	>1000
urinary (SRS)	11

表 2 inhibition of PGE₂ synthesis in 3T6 fibroblasts

drugs	IC ₅₀
CS-600	1.6(μM)
active metabolite (trans OH, SRS)	0.29
aspirin	40
ketoprofen	0.7
indomethacin	0.18

る4種の立体異性体が構造化学上考えられるので、各合成標品のPG合成酵素阻害活性を検討した(表1)。立体異性体のうち、(2S)-2-{4-[(2S-1R)-2-hydroxycyclopentan-1-ylmethyl]phenyl} propionic acid (立体配位 SRS) にのみ強い酵素阻害活性(IC₅₀: 9 μM) が認められ、他の立体配位の異性体には、RSS 配位のものに若干の活性がみられたが、他には活性がなかった。

一方、ラット尿中より単離された trans-OH 体は、化学分析の結果、SRS 配位であることが明らかになっているが⁹⁾、PG合成酵素阻害活性も化学合成標品と一致した。

これらの結果は、生体内で CS-600 から立体特異性をもつ活性代謝物(trans-OH, SRS 配位)が選択的に生成されていることを示している。

(4) 培養細胞系における PG 合成阻害

3T6 繊維芽細胞の培養系において、PGE₂ 生成に対する CS-600 およびその活性代謝物の作用を検討した。CS-600 自身に、著明な PG 合成阻害作用(IC₅₀: 1.6 μM) が認められたが、CS-600 活性代謝物の阻害活性はさらに強く(IC₅₀: 0.29 μM)、indomethacin, ketoprofen と同程度の阻害作用を示した(表2)。

(5) 培養細胞系における CS-600 の変換

酵素レベルの PG 合成をほとんど阻害しない CS-600 が、培養細胞系の PG 合成を著明に抑制した理由を解明する目的で、細胞レベルの CS-600 代謝を調べた。

図 4 formation of trans-OH and cis-OH from CS-600 by cultured 3T6 fibroblast (CS-600[¹⁴C]: 3.2 μM)

3T6 繊維芽細胞培養系に [¹⁴C] CS-600 を加え、一定時間後の培養液を TLC 分離分析すると、trans-OH 体が主代謝物で、若干の cis-OH 体を生じていた。この trans-OH 体生成量は 37°60 分の反応で、加えた CS-600 (3.2 μM) の約 25% に相当し、反応 3 時間では 40% 以上に達した(図4)。

このように細胞レベルでも、CS-600 は活性代謝物に変換することがわかった。また、CS-600 による 3T6 細胞 PG 生成抑制活性は、この活性代謝物の産生量と対応している。

考 察

CS-600 は、フェニルプロピオン酸系の、いわゆる酸性非ステロイド抗炎症剤に属し、著明な鎮痛作用と、消炎解熱作用を示す³⁾。本研究では、CS-600 の作用機序を明らかにする目的で、まず、この種類の抗炎症剤に特有の性質である PG 合成酵素阻害を、ミクロゾーム酵素レベルで調べた。しかし、予想に反し、CS-600 自身は、同じ薬効を示す他剤にくらべ、きわめて弱い阻害活性しか示さなかった。そこで、この薬物に生体あるいは細胞レベルでの PG 合成阻害作用がないかどうかを確認するため、以下の二つの系で検討を加えた。

薬物投与ラットの尿中 PG 量の変動をみる実験系において、CS-600 は、経口投与により、4 時間尿中の PGE₂ および F_{2α} 量を、薬用量に応じて顕著に減少させ、その ID₅₀ は、ラットのカラゲニン足浮腫抑制の ID₅₀³⁾ とほぼ一致した。尿中 PG の減少は、生体レベルでの PG 合成抑制を反映し¹⁰⁾、炎症局所での PG 生成量の低下、すなわち炎症抑制と平行すると考えられる。事実、各種非ステロイド抗炎症剤において、抗カラゲニン浮腫作用と尿 PG 低下作用の ID₅₀ は、よく相関していた¹¹⁾。したがって、CS-600 の抗炎症作用も、PG 合成阻害と生体レベルで密接に関連していると考えられる。

また、PG を効率よく産生する 3T6 繊維芽細胞を用いた培養細胞系の実験において、CS-600 は、細胞の PG E₂ 産生を著明に抑えた。Levine ら¹²⁾、Carty ら⁷⁾ も、

MC-5-5 繊維芽細胞の系で、抗炎症剤により PG 産生が抑えられることを見だしており、3T6 細胞でも、MC-5-5 細胞でも、PGE₂ 産生抑制は、薬剤の抗炎症効力とよく相関することが示される^{11,13}。CS-600 は、細胞レベルでもその抗炎症効果と対応する PG 生合成抑制作用を示した。

CS-600 の代謝研究の結果、CS-600 は、まず5員環ケトンが OH 基に還元され、trans-OH 体および cis-OH 体が生じ、つづいて種々の代謝物が生成されることが明らかになっている⁹⁾。血漿中および尿中の CS-600 代謝物の PG 生合成酵素阻害活性を検討した結果、血中主代謝物である trans-OH 体に強い酵素阻害活性が認められ、他の代謝物の活性は弱かった。この trans-OH 体は、特定の立体配位 (SRS) をもち、他の配位の化学合成立体異性体にはほとんど PG 生合成酵素阻害活性がみられなかった。また、3T6 繊維芽細胞の PG 産生も、この trans-OH 体によって強く抑制された。

以上の結果から、CS-600 を投与した際、酵素レベル、細胞レベルで強く PG 生合成を抑制する活性代謝物が存在すること、その物質は CS-600 由来、SRS 配位 trans-OH 体と同定されることが明らかになった。

一般に、プロピオン酸系非ステロイド抗炎症剤には、不斉炭素による立体異性体 (isomer) が存在し、異なる生理活性を示すことが知られている。たとえば、naproxen はその d 体 (S 配位) のものが PG 生合成酵素阻害、消炎鎮痛作用が強く¹⁴⁾、ibuprofen では、PG 生合成酵素阻害は d 体 (S 配位) が強いが、薬効は d 体、l 体 (R 配位) と同程度であることが報告されている¹⁵⁾。CS-600 の薬効の主体となる活性代謝物 (trans-OH 体) は、化学構造上考えられる四つの isomer のうちの一つだけ (SRS 配位、d 体) にのみ強い PG 生合成酵素阻害活性が示されるという点でユニークであり、非ステロイド抗炎症剤の PG cyclooxygenase 阻害機構の研究に新

しい手掛りを与えるものかもしれない。また、CS-600 が生体内で、この限定された立体構造をもつ活性代謝物に選択的に変換されること、この変換が培養細胞でも効率よく行われることは興味ぶかい。

文 献

- 1) Lewis, G.P.: J. Reticuloendothel. Soc. 22: 389-402, 1977.
- 2) Vane, J.R.: Nature 231: 232-235, 1971.
- 3) 三坂英一, 山口 武, 飯塚義夫, 鴨志田勝男, 小島高義, 小林 和, 遠藤陽子, 三沢由美子, 小林晋作, 田中喜一郎: 応用薬理 21: 753-771 1981.
- 4) Takeguchi, C., Kohno, E. Sih, C.J.: Biochemistry 10: 2372-2376. 1971.
- 5) 松田啓一, 山崎光郎: 炎症 1: 111-113, 1980.
- 6) Levine, L., Gutierrez, R.M., Van Vunakis, H.: J. Biol. Chem. 246: 6782-6785, 1971.
- 7) Carty, T.J., Eskra, J.D., Lombardino, J.G., Hoffman, W.W.: Prostaglandins 19: 51-59, 1980.
- 8) 田中頼久, 西川優子, 菅野修治, 松田啓一, 山崎光郎, 寺田敦祐, 林 了三: 炎症 (投稿中)
- 9) 成戸俊二, 寺田敦祐: (投稿準備中)
- 10) Frölich, J.C., Wilson, T.W., Sweetman, B.J., Smigel, M., Nies, A.S., Carr, K., Watson, J.T., Oates, J.A.: J. Clin. Invest. 55: 763-770, 1975.
- 11) Matsuda, K., Ohnishi, K., Misaka, E., Yamazaki, M.: Abstr. of 8th Int. Congr. of Pharmacol. 1981, p 725.
- 12) Hong, S.L., Levine, L.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 1730-1734, 1976.
- 13) Levine, L., Pong, S-S., Hong, S.L., Tam, S.: Biochemical Aspect of PG's and TX's, p 15-38, Acad. Press. New York, 1977.
- 14) Tomlinson, R.V., Ringold, H.J., Qureshi, M.C., Forchielli, E.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 46: 552-559. 1972.
- 15) Adams, S.S., Bresloff, P., Mason, C.G.: J. Pharm. Pharmac. 28: 256-257, 1976.