新規タキニン NK-2 受容体拮抗薬 TAC-363 の薬理作用

東出康志,* 矢田部順子, 荒井洋子, 中島義春,
柴田昌裕, 山浦哲明
富士レビオ株式会社, 医薬研究所

Pharmacological Profiles of a Novel Tachykinin NK-2 Receptor Antagonist, TAC-363

Yasushi HIGASHIDE,* Yoriko YATABE, Yoko ARAI,
Yoshiharu NAKAJIMA, Masahiro SHIBATA,
and Tetsuaki YAMAURA

Pharmaceuticals Research Laboratories, Fujirebio Inc.,
51 Komiya-cho, Hachioji, Tokyo 192, Japan

(Received July 10, 1996)

We examined the pharmacological profiles of a novel tachykinin NK-2 receptor antagonist, *N*^α-(*tert*-butylcarbonyl)-L-glutaminy-L-tryptophyl- α -azaphenylalanine 2-benzoyloxyethylamide (TAC-363). *In vitro* studies showed that TAC-363 caused a rightward shift of the contraction response curve with a slight inhibition of maximal response for the neurokinin A (NKA)-induced contraction of the hamster trachea and parallel rightward shift of the curve for the substance P (SP)-induced contraction of the guinea-pig ileum. The pA₂ values were 9.82 and 8.42 on the contraction by NKA and SP, respectively. The selectivity of TAC-363 to NK-2 receptor was 25 times higher than that to NK-1 receptor. The compound did not affect the histamine and acetylcholine-induced contraction of the guinea-pig ileum. Intravenous administration (0.1—1 mg/kg) of the compound inhibited dose-dependently both NKA- and capsaicin-induced bronchoconstriction in guinea-pigs. The inhibitory effect of the compound lasted up to 60 min on NKA-induced bronchoconstriction in guinea-pigs. These results suggest that TAC-363 is a potent and selective NK-2 receptor antagonist, which is effective *in vitro* and *in vivo*. It may be useful in the treatment of NKA-dependent pathology, especially bronchial asthma.

Key words—neurokinin A; NK-2 receptor; antagonist; TAC-363; neuro-peptide

タキキニンはC末端側に共通のアミノ酸配列, Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂ を有する神経ペプチドで, 哺乳類ではサブスタンス P (SP), ニューロキニン A (NKA), ニューロキニン B (NKB) の3種類が知られている.¹⁻³⁾ タキキニンの薬理作用は受容体を介して発現するが, タキキニンの受容体としては, NK-1, NK-2 及び NK-3 の3種類が知られており, それぞれ SP, NKA 及び NKB が最も強く作用する.⁴⁾

SP 及び NKA は一次知覚神経 C-線維中に含有されており, カプサイシンをはじめ, ブラジキニン, ヒスタミン, 電気刺激等によって放出され,⁵⁾ 種々の反応を示す. NKA は, 血管, 気管, 腸管, 膀胱等の摘出平滑筋標本に対して, 強い収縮作用を示す.⁶⁾ 特に NKA の気道平滑筋

Fig. 1. Chemical Structure of TAC-363 (*N*^α-(*tert*-Butylcarbamoyl)-L-glutaminy-L-tryptophyl- α -aza-phenylalanine 2-benzyloxyethylamide)

収縮活性はヒスタミンの 1000 倍, SP の 100 倍, NKB の 10 倍であり, 最も強力な平滑筋収縮物質である.⁷⁾ また, NKA は気道過敏性や咳嗽を誘発する作用を有することも知られており, 種々の疾患への関与が考えられている. これらのことから, NKA 拮抗薬の臨床応用が期待され, これまでに, ペプチド性拮抗薬としては, R396,⁸⁾ FK224⁹⁾ 及び MEN10627¹⁰⁾ などが, 非ペプチド性拮抗薬としては SR48968¹¹⁾ 及び GR159897¹²⁾ などが報告されている.

我々はこれまでに新規タキキニン NK-2 受容体拮抗薬の探索研究を行い, α -aza-アミノ酸含有ペプチド誘導体, *N*^α-(*tert*-butylcarbamoyl)-L-glutaminy-L-tryptophyl- α -aza-phenylalanine 2-benzyloxyethylamide (TAC-363: Fig.1) を見いだした.¹³⁾ 今回, TAC-363 の *in vitro* での受容体選択性について, 摘出平滑筋標本を用いて, また *in vivo* における作用をモルモット気道収縮反応を用いて検討した.

実 験 の 部

1. 実験材料 1) 使用動物——体重 140—200 g の Syrian 系雄性ハムスター及び 300—500 g の Hartley 系雄性モルモット (日本エスエルシー, 浜松) を使用した. 試験動物は実験に供するまで恒温恒湿下 (22±2°C, 55±15%), 照明時間 12 時間 (8:00—20:00) にて飼育した. 飼料及び水は自由に摂取させた.

2) 使用薬物——TAC-363 は自社合成した. SP 及び NKA はペプチド研究所 (大阪) より, ヒスタミン及びアセチルコリンは和光純薬工業 (大阪) より, カプサイシンは Sigma (St. Louis) より購入した.

2. 実験方法 1) ハムスター摘出気管 NKA 収縮反応——Maggi らの方法¹⁴⁾ に準じて行った. すなわち, ハムスターより気管を摘出し, 幅 3—5 mm の環状の切片標本作製した. 気管切片は 30 ml の Tyrode 液 (137 mM NaCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.05 mM MgCl₂, 0.4 mM Na₂HPO₄, 5.5 mM glucose, 11.9 mM NaHCO₃) 中に 0.5 g 負荷で懸垂した. 浴槽は 37°C に保ち, 95% O₂ + 5% CO₂ 通気下に 1 時間の安定化の後, 実験を行った. 反応はアイソメトリックトランスデューサー (TB-651T, 日本光電工業, 東京) にて等尺性に測定した. 1×10⁻⁵ M のインドメタシン存在下に, 被験薬の非処置下及び処置下の NKA 累積適用による濃度反応曲線を得た. 被験薬は NKA 適用の 10 分前に処置した. 平滑筋収縮反応は, NKA による最大反応に対する百分率で示した.

2) モルモット摘出回腸収縮反応——モルモットより摘出した回腸標本を 30 ml の Tyrode 液中に 0.5 g 負荷で懸垂した. 浴槽は 32°C に保ち, 95% O₂ + 5% CO₂ 通気下に 1 時間の安定化の後, 実験を行った. 反応はアイソトニックトランスデューサー (TD-112S, 日本光電工業) にて等張性に測定した. SP, アセチルコリン, 及びヒスタミンについてそれぞれ被験薬の非処置

下及び処置下の累積適用による濃度反応曲線を得た。被験薬は各収縮物質適用の10分前に処置した。平滑筋収縮反応は、各収縮物質による最大反応に対する百分率で示した。

3) モルモット気道収縮反応——モルモット気道収縮は Konzett-Rössler 法¹⁵⁾の変法で測定した。すなわち、モルモットをウレタン (1.2 g/kg, i.p.) 麻酔下にガラミン (5 mg/kg, i.v.) にて不動化し、直ちに気管カニューレを挿入し、閉鎖型人工呼吸器 (SN-480-7, シナノ製作所, 東京) を用いて毎分70回, 1回3.9—5.5 mlの人工呼吸を行った。外頸静脈に挿入したカニューレより NKA (2 nmol/kg), 又はカプサイシン (10 nmol/kg) を投与し、気道収縮を惹起し、8 cm H₂Oの圧を負荷した気管カニューレの側枝からの air overflow 量を測定した。気道収縮は、気道を閉塞して得た最大収縮に対する百分率で表した。被験薬は収縮物質投与の5分前に静脈内投与した。

4) 作用持続性の検討——Murai らの方法¹⁶⁾を若干改変して実施した。前項と同様に人工呼吸を施行したモルモットに、外頸静脈に挿入したカニューレより NKA (2 nmol/kg) を投与して気道収縮を惹起した。15分後に被験薬を静脈内投与し、さらにその1分後より15分毎に5回 NKA を投与して気道収縮を惹起し、被験薬投与前の気道収縮からの抑制率を求めた。気道収縮は、気道を閉塞して得た最大収縮に対する百分率で表した。

3. 統計解析 結果は平均値±標準誤差で示した。ED₅₀値は最小二乗法によって求めた回帰式より算出し、信頼限界は Fieller の式により算出した。平均値の差は Dunnett の検定を用いて検定し、危険率5%未満の場合に有意とした。

結 果

1. ハムスター摘出気管 NKA 収縮反応

TAC-363 は NKA による濃度反応曲線を、濃度依存的に高濃度側へ移動したが、一部最大反

Fig. 2. Effect of TAC-363 on Neurokinin A (NKA)-Induced Contraction of Isolated Hamster Trachea

A preparation of trachea was placed in an organ bath filled with Tyrode's solution at 37°C under a resting tension of 0.5 g. Neurokinin A (NKA) was cumulatively added to the bath. The response to NKA was measured isometrically. TAC-363 was added to the bath 10 min before the application of NKA.

(A) Dose-response curves for NKA, (○): control, (●): TAC-363 3×10^{-10} M, (▲): 1×10^{-9} M, (■): 3×10^{-9} M.

(B) Schild plot of the data. Each point represents the mean ± S.E. of 6 experiments.

応の抑制も認められた。Shild plot の傾きは 1.28 であり, pA_2 値は 9.82 ± 0.06 ($n=6$) であった (Fig. 2).

2. モルモット摘出回腸収縮反応

TAC-363 は SP による濃度反応曲線を, 濃度依存的に高濃度側へ平行移動した。Shild plot の

Fig. 3. Effect of TAC-363 on Substance P (SP)-Induced Contraction of Isolated Guinea-pig Ileum

A preparation of ileum was placed in an organ bath filled with Tyrode's solution at 32°C under a resting tension of 0.5 g. Substance P (SP) was cumulatively added to the bath. The response to SP was measured isotonicly. TAC-363 was added to the bath 10 min before the application of SP.

(A) Dose-response curves for SP, (○): control, (●): TAC-363 1×10^{-8} M, (▲): 3×10^{-8} M, (■): 1×10^{-7} M.

(B) Schild plot of the data. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 6 experiments.

Fig. 4. Effect of TAC-363 on Acetylcholine (ACh) and Histamine (His)-Induced Contraction of Isolated Guinea-pig Ileum

A preparation of ileum was placed in an organ bath filled with Tyrode's solution at 32°C under a resting tension of 0.5 g.

(A) Acetylcholine or (B) histamine was cumulatively added to the bath. The response to acetylcholine or histamine was measured isotonicly. TAC-363 was added to the bath 10 min before the application of agonists. (○): control, (●): TAC-363 1×10^{-5} M, (■): 3×10^{-5} M. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 6 experiments.

傾きは 1.11 であり, pA_2 値は 8.42 ± 0.17 ($n=6$) であった (Fig. 3). アセチルコリン及びヒスタミンによる収縮に対しては, $3 \times 10^{-5} M$ まで明らかな作用を示さなかった (Fig. 4).

3. NKA 誘発モルモット気道収縮反応

2 nmol/kg (i.v.) の NKA 投与により, $96.0 \pm 6.0\%$ ($n=4$) の気道収縮反応が惹起された. TAC-363 はこの NKA による気道収縮反応を用量依存的に抑制し, その ED_{50} 値は 0.3 (95% 信頼限界: 0.2—0.4) mg/kg (i.v.) であった (Fig. 5A). 作用持続性の検討において, TAC-363 1 mg/kg (i.v.) は投与 1 分後に最大抑制 ($100.0 \pm 0.0\%$, $n=4$) を示し, 投与 60 分後でも $78.0 \pm$

Fig. 5. Effect of TAC-363 on NKA-Induced Airway Constriction in Anesthetized Guinea-pigs

Guinea-pigs were anesthetized by i.p. injection of urethane (1.2 g/kg) and airway constriction was measured according to Konzett-Rössler method.

(A) TAC-363 was administered intravenously 5 min before NKA (2 nmol/kg, i.v.) injection. Airway constriction is represented as a percentage of maximal increase in respiratory overflow.

(B) NKA (2 nmol/kg) was injected intravenously every 15 min for 75 min. TAC-363, (Δ): 0.1 mg/kg, ($\bullet$): 0.3 mg/kg, ($\circ$): 1 mg/kg, was administered intravenously 1 min before the second injection of NKA. Data are represented as percent inhibition from the first response for NKA. Each column or point represents the mean $\pm$ S.E. of 4 experiments. **: $p < 0.01$, significantly different from the control group (Dunnett's test).

Fig. 6. Effect of TAC-363 on Capsaicin-Induced Airway Constriction in Anesthetized Guinea-pigs

Guinea-pigs were anesthetized by i.p. injection of urethane (1.2 g/kg) and airway constriction was measured according to Konzett-Rössler method. TAC-363 was administered intravenously 5 min before capsaicin (10 nmol/kg, i.v.) injection. Airway constriction is represented as a percentage of maximal increase in respiratory overflow. Each column represents the mean $\pm$ S.E. of 4 experiments. **: $p < 0.01$, significantly different from the control group (Dunnett's test).

8.1% ($n=4$) の抑制を示した (Fig. 5B). また, TAC-363 は 3 mg/kg (i.v.) で気道収縮反応を惹起しなかった.

4. カプサイシン誘発モルモット気道収縮反応

10 nmol/kg (i.v.) のカプサイシン投与により, $71.2 \pm 11.4\%$ ($n=4$) の気道収縮反応が惹起された. TAC-363 はこのカプサイシンによる気道収縮反応を用量依存的に抑制し, その ED_{50} 値は 0.3 (95% 信頼限界: 0.2—0.4) mg/kg (i.v.) であった (Fig. 6).

考 察

TAC-363 は富士レビオ (株) で創薬されたタキキニン NK-2 受容体拮抗薬である. 今回, ハムスター摘出気管標本の NKA 収縮に対する作用を検討したところ, 濃度依存的に NKA による濃度反応曲線を高濃度側に移動し pA_2 値は 9.82 と算出されたが, 一部最大収縮の抑制が認められ, また Schild plot の傾きが 1.28 となり, 典型的な競合拮抗の様式を示さなかった. しかしながら, TAC-363 による最大収縮の抑制は弱く, より高濃度の TAC-363 を処置した場合にもその抑制は部分的で, pD'_2 値を算出することができず, 典型的な非競合拮抗の様式を示さなかった. また, モルモット回腸のヒスタミン及びアセチルコリンによる収縮を抑制しないことを考え併せると, TAC-363 は受容体以降の伝達経路上において抑制作用を示している可能性は低いと考えられた. また, 予備検討において, TAC-363 がヒト NK-2 受容体への ^{125}I -NKA の結合を阻害することを確認しており, 今回のハムスター気管の NKA 収縮に対する作用は, 主として NK-2 受容体に対する拮抗作用によって示されたものと考えられる.

今回の検討で TAC-363 が一部最大収縮の抑制を示した機構としては, 以下の 2 つの可能性が考えられる. 第 1 はタキキニン受容体サブタイプの認識である. SP, NKA 及び NKB はそれぞれ NK-1, NK-2 及び NK-3 受容体に最も強く作用するが, 相互に他のサブタイプにも作用することが知られていることから, 今回用いたハムスター気管の NKA 収縮反応には, 一部他の受容体サブタイプを介した反応が含まれており, TAC-363 はこの反応を抑制したために, 典型的な競合拮抗の様式を示さなかった可能性が考えられる. しかしながら, ハムスター気管は NKA に対する反応の特に強い組織であり, NK-1 及び NK-3 受容体の選択的作動薬に対してはほとんど反応しないことが知られており,¹⁴⁾ この可能性は低いと考えられる. 第 2 は, TAC-363 の NK-2 受容体に対する結合が強固で, 解離しにくいために典型的な競合拮抗の様式を示さなかった可能性である. TAC-363 は今回用いたよりさらに高濃度を処置した場合, 洗浄後も NKA に対する反応が容易に回復しない結果を認めており (データは示していない), この可能性が高いと考えられる.

今回の結果では, TAC-363 のハムスター気管の NKA 収縮に対する pA_2 値は 9.82 であり, これまでに知られている NK-2 拮抗薬, R396, L659877 及び SR48968 のハムスター摘出気管標本における NKA 収縮に対する pA_2 値がそれぞれ 7.67,¹⁷⁾ 7.92 及び 8.50¹⁸⁾ と報告されていることと比較すると, TAC-363 はいずれの化合物よりも高い活性を示した. また, MEN10627 の報告¹⁰⁾ と比較してもほぼ同等の活性を有していると考えられ, これまでに知られている中で, 最も強い効力を有する NK-2 受容体拮抗薬の 1 つであることが示された.

モルモット摘出回腸標本の SP 収縮に対しても TAC-363 は競合的な拮抗作用を示し, その pA_2 値は 8.42 であった. このことから, TAC-363 は NK-1, NK-2 のいずれの受容体に対しても拮抗作用を示し, NK-2 受容体に 25 倍選択的であることが示された. また, アセチルコリン及びヒスタミン収縮に対しては明らかな作用を示さなかったことより, アセチルコリン及びヒス

タミンの受容体には拮抗作用を示さないものと考えられた。NK-3 受容体に対する作用は、予備検討において NK-1 受容体に対する作用より低い活性であることが認められている（データは示していない）。以上の結果から、TAC-363 は強力、かつ選択的な NK-2 受容体拮抗作用を有することが明らかとなった。

In vivo においては、NKA 誘発モルモット気道収縮反応を用量依存的に抑制した。またその作用は、投与 60 分後でも消失せず、持続的であることが示された。TAC-363 はその構造にペプチド結合を有しているが、今回 *in vivo* における作用が持続的であったことから考えると、比較的代謝を受けにくいものと推察される。また、TAC-363 は NK-2 受容体との結合が強固で、解離しにくい可能性も考えられる。

TAC-363 はカプサイシン誘発気道収縮反応に対しても用量依存的な抑制作用を示した。この反応は、カプサイシン刺激によって放出されるタキキニンによって引き起こされるが、NK-1 拮抗薬と NK-2 拮抗薬を用いた検討により、気道収縮を惹起するのは NKA であって、SP の関与はほとんどないことが明らかにされている。¹⁹⁾ TAC-363 はこの反応を抑制したことから、内因性の NKA 放出によって生じる反応に対して抑制作用を発揮すると考えられる。

これまでに報告されているタキキニン拮抗薬の中には、作動薬としての作用を有するものがある。²⁰⁾ そこで、TAC-363 について NKA 様作用の有無を検討した。その結果、データは示さなかったが、*in vitro* では 3×10^{-5} M まで平滑筋収縮作用を示さず、*in vivo* でも気道収縮作用を示さなかった。従って、TAC-363 は作動薬としての作用を有しないと考えられた。

これまでに NKA が強力な気道収縮作用や、長期間持続する気道過敏性亢進反応を引き起こすことが報告されており、²¹⁾ また、抗原誘発気道収縮反応や気道過敏性亢進反応が、NK-2 受容体拮抗薬によって抑制されることから、^{22,23)} NKA は気管支喘息の病態に関与することが示唆されている。さらに、NKA は低用量の吸入で咳嗽を誘発し、その咳嗽がコデインによって抑制されないことから、²⁴⁾ 難治性咳嗽への関与も示唆されている。また、NKA が強力な膀胱収縮作用や、排尿亢進作用を有すること、²⁵⁾ 及び膀胱炎における排尿亢進が NK-2 拮抗薬で抑制されることから、²⁶⁾ 膀胱炎に伴う頻尿への関与が示唆されているなど、種々の疾患に NKA が関与していると考えられている。したがって、NK-2 受容体拮抗薬は、これらの疾患の治療に有用であることが期待されている。

今回の成績から、TAC-363 は強力かつ選択的な NK-2 受容体拮抗作用を有し、*in vivo* において持続的な作用を有することが明らかとなった。TAC-363 は NKA 及び NK-2 受容体の生理的な機能を解明するために、また NKA の関与することが示唆されている疾患の治療に有用な化合物となることが期待される。

引用文献

- 1) von Euler U. S., Gaddum J. H., *J. Physiol.*, **72**, 74 (1931).
- 2) Kangawa K., Minamino M., Fukuda A., Matsuno H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **114**, 533 (1983).
- 3) Kimura S., Okada M., Sugita Y., Kanazawa I., Munekata E., *Proc. Jpn. Acad.*, **59B**, 101 (1983).
- 4) Maggi C. A., Patacchini R., Rovero P., Giachetti A., *J. Auton. Pharmacol.*, **13**, 23 (1993).
- 5) Saria A., Marting C-R., Yan Z., Theodorsson-Norheim E., Gamse R., Lunderberg J. M., *Am. Rev. Respir. Dis.*, **137**, 1330 (1988).

- 6) Regoli D., Rhaleb N-E., Dion S., Tousignant C., Rouissi N., Jukic D., Drapeau G., *Pharmacol. Res.*, **22**, 1 (1990).
- 7) 野村明広, 内田義之, 大塚眞一, 濱田雅史, 石井幸雄, 山下裕子, 長谷川鎮雄, 後藤勝年, *アレルギー*, **36**, 984 (1987).
- 8) Maggi C. A., Patacchini R., Giuliani S., Rovero P., Dion S., Regoli D., Giachetti A., Meli A., *Br. J. Pharmacol.*, **100**, 588 (1990).
- 9) Morimoto H., Murai M., Maeda Y., Yamaoka M., Nishikawa M., Kiyotoh S., Fujii T., *Eur. J. Pharmacol.*, **262**, 398 (1992).
- 10) Maggi C. A., Astolfi M., Giuliani S., Goso C., Manzini S., Meini S., Patacchini R., Pavone V., Pedon C., Quartara L., Renzetti A. R., Giachetti A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **271**, 1489 (1994).
- 11) Emonds-Alt X., Vilain P., Goulaouic P., Proietto V., Van Broeck D., Advenier C., Naline E., Neliat G., Le Fur G., Breliere J. C., *Life Science*, **50**, PL-101 (1992).
- 12) Beresford I. J. M., Sheldrick R. L. G., Ball D. I., Turpin M. P., Walsh D. M., Hawcock A. B., Coleman R. A., Hagan R. M., Tyers M. B., *Eur. J. Pharmacol.*, **272**, 241 (1995).
- 13) 中島義春, 肥塚美千代, 鬼鞍 肇, 東出康志, 山浦哲明, 伊川 博, 日本薬学会第 116 年会, 金沢, 1996 年 3 月, 講演要旨集 2, p. 271.
- 14) Maggi C. A., Patacchini R., Rovero P., Meli A., *Eur. J. Pharmacol.*, **166**, 435 (1989).
- 15) Konzett H., Rössler R., *Arch. Exp. Pharmacol.*, **195**, 71 (1940).
- 16) Murai M., Morimoto H., Maeda Y., Kiyotoh S., Nishikawa M., Fujii T., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **262**, 403 (1992).
- 17) Maggi C. A., Patacchini R., Giuliani S., Rovero P., Dion S., Regoli A., Giachetti A., Meli A., *Br. J. Pharmacol.*, **100**, 588 (1990).
- 18) Maggi C. A., Patacchini R., Giuliani S., Giachetti A., *Eur. J. Pharmacol.*, **234**, 83 (1993).
- 19) Hirayama Y., Lei Y-H., Barnes P.J., Rogers D. F., *Br. J. Pharmacol.*, **108**, 844 (1993).
- 20) Patacchini R., Astolfi M., Quartara L., Rovero P., Giachetti A., Maggi C. A., *Br. J. Pharmacol.*, **104**, 91 (1991).
- 21) Tamura G., Sakai K., Taniguchi Y., Iijima H., Honma M., Katsumata U., Maruyama N., Aizawa T., Takishima T., *Tohoku J. Exp. Med.*, **159**, 69 (1989).
- 22) Perretti F., Ballati L., Manzini S., Maggi C. A., Evangelista S., *Eur. J. Pharmacol.*, **273**, 129 (1995).
- 23) Boichot E., Germain N., Lagente V., Advenier C., *Br. J. Pharmacol.*, **114**, 259 (1995).
- 24) Takahama K., Fuchikami J., Isohama Y., Kai H., Miyata T., *Regulatory Peptides*, **46**, 236 (1993).
- 25) Maggi C. A., Santicioli P., Giuliani S., Regoli D., Meli A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **238**, 259 (1986).
- 26) Maggi C. A., Giuliani S., Ballati L., Lecci A., Manzini S., Patacchini R., Renzetti A. R., Rovero P., Quartara L., Giachetti A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **257**, 1172 (1991).