

氏名（本籍） 山 村 桂 子

学位の種類 博 士（薬 学）

学位記番号 薬 第 480 号

学位授与年月日 平 成 16 年 9 月 3 日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 炎症におけるシクロオキシゲナーゼ-2の役割と
その選択的阻害薬の有用性
—ラットのカラゲニン胸膜炎モデルを用いた解析—

論文審査委員 (主 査) 教 授 大 内 和 雄

教 授 永 沼 章

教 授 大 島 吉 輝

論文内容要旨

シクロオキシゲナーゼ (COX) は、プロスタグランジン (PG) 生合成過程において鍵となる酵素である。細胞に何らかの刺激が加わるとホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) が活性化され、細胞膜のリン脂質からアラキドン酸が切り出される。COX は切り出されたアラキドン酸を基質とし、各種 PG の中間体である PGG₂ および PGH₂ を生成する。PGG₂ を経て生成された PGH₂ は、各細胞の持つそれぞれの PG 合成酵素により各 PG に変換される。現在、COX 遺伝子には、COX-1 遺伝子および COX-2 遺伝子の 2 種類があることが明らかにされている。COX-1 はほとんど全ての細胞に構成的に発現し、細胞の生理機能の調節にかかわる PG を生成する housekeeping 遺伝子産物である。一方の COX-2 は、成長因子、サイトカインおよびその他の炎症性メディエーターによって炎症時に発現誘導され、炎症の場において重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、COX-2 発現細胞には常に COX-1 も発現しており、産生された PG は COX-1 あるいは COX-2 のいずれを介して産生されたものか明らかでないため、炎症反応に関与する PG と COX-2 との関係は必ずしも明確ではない。更に、COX-2 は炎症の進展過程だけではなく、炎症の修復過程においても重要な役割を果たしていることも示唆されている。そこで、本研究では、急性炎症モデルであるラットのカラゲニン胸膜炎モデルを用いて、炎症の進展および修復過程の双方に焦点をあて、COX-2 の役割について解析した。

第 1 章 ラットのカラゲニン胸膜炎モデルにおける炎症反応の解析

カラゲニン胸膜炎における炎症反応とプロスタノイドおよび COX-1、COX-2 の関与について解析した。胸腔内に貯留した滲出液量および静脈内に注射した色素の胸腔内への漏出量から血管透過性反応を調べた。また、滲出液中の PGE₂、トロンボキサン(TX)B₂ および 6-keto-PGF₁ のレベルの経時変化を調べると共に、滲出液中に浸潤した白血球における COX-1 および COX-2 の発現を調べた。その結果、滲出液中の各プロスタノイドのレベルは、血管透過性反応が亢進している炎症初期にほぼ一致して高値を示した。また、浸潤白血球中の COX-1 は炎症の経過を通して検出され、その発現レベルに明らかな変化は認められなかった。一方、COX-2 は炎症の初期 (炎症惹起 3~7 時間) においてのみ検出された。このように、血管透過性反応が亢進している時期に一致して滲出液中のプロスタノイドのレベルが高く、同時に浸潤白血球中に COX-2 が検出された。これらの結果から、カラゲニン胸膜炎においては、COX-2 を介して産生されたプロスタノイドが血漿滲出に関わっている可能性が示唆された。

第 2 章 ラットのカラゲニン胸膜炎急性期における COX-2 阻害薬の効果

まず、5 種類の COX 阻害薬の COX-1 および COX-2 に対する阻害活性について *in vitro* の実験系で検討した。その結果、IC₅₀ 値で比較するとインドメタシンは COX-2 よりも COX-1 を約 2 倍強く阻害し、ピロキシカムはいずれに対しても同程度の阻害作用を示した。一方、メロキシカムは、COX-1 よりも COX-2 を約 12 倍強く阻害し、ニメスリドおよび NS-398 は COX-2 に対してさらに強い選択性を示し、COX-1 に対し

てはほとんど阻害作用を示さなかった。そこで、これら 5 種類の COX 阻害薬のうち NS-398、メロキシカム、ピロキシカムと COX-1 に対して選択的阻害作用を持つアスピリンを用い、カラゲニン胸膜炎における抗炎症作用と滲出液中のプロスタノイドレベルとの関係について検討した。その結果、COX-1 および COX-2 に対する選択性の違いにも拘わらず、いずれの薬物も投与量の違いはあるもののカラゲニン胸膜炎を惹起して 5 時間後における滲出液量および血管透過性反応を同程度に低下させた。一方、各プロスタノイドレベルに対しては薬物間に差がみられ、PGE₂ レベルに対しては、いずれの薬物もほぼ同程度に低下させたが、TXB₂ および 6-keto-PGF_{1α} レベルに対しては、メロキシカム、ピロキシカムおよびアスピリンは低下させたが、COX-2 特異性の高い NS-398 の作用は、他の 3 者と比較して明らかに弱い作用であった。以上の結果から、カラゲニン胸膜炎モデルでは、滲出液中のプロスタノイドの中で主として PGE₂ が COX-2 を介して産生される可能性が示唆された。

第 3 章 COX-2 阻害薬の *in vivo* における特異性

ラットの胃における PGE₂ 産生および胃粘膜傷害作用に対する COX 阻害薬の効果を検討した。ラットの胃内腔に高張 (1 M) 食塩液を注入すると、COX-1 由来とされる PGE₂ の産生が時間依存的に増加した。この PGE₂ 産生の増加は、COX-2 に対して選択性を有するニメスリドおよびメロキシカムによって抑制されなかった。一方、選択性のないピロキシカムは PGE₂ 産生を強く抑制した。これらの結果から、*in vitro* で見られた COX 阻害薬の COX-1 および COX-2 に対する選択性の違いは *in vivo* においても反映されることが示唆された。更に、メロキシカム、ピロキシカムあるいはインドメタシンをラットに単回経口投与した場合の胃粘膜傷害の発生を検討し、メロキシカムは、ピロキシカムに比べて胃粘膜傷害作用が弱いことを示した。従って、COX-2 に対して選択性を示す薬物は抗炎症作用と副作用の胃粘膜傷害作用とが分離された有用な抗炎症薬になる可能性が示唆された。また、滲出液中に検出されるプロスタノイドの中で、PGE₂ が血漿滲出に最も大きく関与していることが推測された (第 2 章) が、TXB₂ や 6-keto-PGF_{1α} の関与も否定できないため、COX-2 阻害薬を投与した場合の滲出液中の各プロスタノイドレベルと血管透過性反応との相関について解析した。その結果、PGE₂ レベルのみが血管透過性反応と有意な相関を示したことから、カラゲニン胸膜炎における血漿滲出には、プロスタノイドの中で PGE₂ が最も大きく関与していることが示唆された。

第 4 章 ラットのカラゲニン胸膜炎急性期におけるデキサメタゾンの効果

ステロイド性抗炎症薬であるデキサメタゾンを用いて、カラゲニン胸膜炎における抗炎症作用 (滲出液量、血管透過性反応、滲出液中のプロスタノイドレベル、および胸腔内への好中球および単核球の浸潤に対する作用) を調べ、同時に COX-2 の発現および PLA₂ 活性に対する作用を検討し、ステロイド性抗炎症薬の抗炎症作用機序を明らかにすることを試みた。その結果、デキサメタゾンは COX-2 の発現を高用量でのみ低下させた。また、PLA₂ 活性は、高用量のデキサメタゾンによっても影響されなかった。COX-2 の発現および PLA₂ 活性には影響しない低用量のデキサメタゾンによって滲出液量、血管透過性反応およ

びプロスタノイドレベルは低下し、このとき浸潤好中球数も有意に減少した。以上の結果から、デキサメタゾンのプロスタノイドレベル低下作用および血漿滲出抑制作用は、炎症部位における COX-2 発現とも PLA₂ 活性とも相関しないことが示唆された。デキサメタゾンのプロスタノイドレベル低下作用は炎症部位への白血球浸潤の抑制によること、また、デキサメタゾンの血漿滲出抑制作用には、白血球浸潤抑制を介したプロスタノイド産生抑制によるもののほか、それ以外の機序も関与している可能性を示唆した。

第 5 章 ラットのカラゲニン胸膜炎後期における COX-2 の役割

カラゲニン胸膜炎後期の壁側胸膜から細胞を採取し、COX-2 の発現を調べた結果、カラゲニン溶液を注射して 12～24 時間後の中皮細胞に COX-2 の強い発現が見られた。また、カラゲニン胸膜炎を惹起して 14 時間後の滲出液中には、PGE₂、TXB₂ および 6-keto-PGF_{1α} が検出されたが、6-keto-PGF_{1α} レベルは他に比べて明らかに高値であった。これらのプロスタノイドレベルはいずれもアスピリンによって低下した。一方、6-keto-PGF_{1α} レベルは、NS-398 およびニメスリドによって有意に低下したが、TXB₂ レベルは変化せず、PGE₂ レベルも NS-398 によって低下しなかった。更に、カラゲニン胸膜炎を惹起して 24 時間後には、胸膜の明らかな肥厚が認められ、この胸膜の肥厚はニメスリドにより抑制された。以上の結果から、炎症の後期中皮細胞に発現した COX-2 は PGI₂ 産生を介して胸膜の増生肥厚に関与している可能性が示唆された。胸膜の肥厚は炎症の修復過程の一環と考えられ、カラゲニン胸膜炎においても COX-2 が炎症の修復過程に関与していることが示唆された。

本研究では、ラットのカラゲニン胸膜炎モデルを活用し、炎症における COX-2 の役割とその選択的阻害薬の有用性について検討した。その結果、COX-2 は炎症初期における血漿滲出に PGE₂ 産生を介して重要な役割を果たしていることを示唆した。一方、COX-2 は炎症の修復過程にも関与しており、COX-2 を介して産生される PGI₂ が胸膜の肥厚に関与している可能性を示した。このように、COX-2 は炎症急性期と後期で、それぞれ炎症の進展と修復に関与し、二面性を有していることが示唆された。また、COX-2 を選択的に阻害する薬物は主作用の抗炎症作用と副作用の胃粘膜傷害作用とが分離された有用な抗炎症薬になる可能性を示した。

審査結果の要旨

シクロオキシゲナーゼ (COX) には COX-1 および COX-2 の 2 種類のアイソフォームが存在する。COX-1 はほとんど全ての細胞に構成的に発現し、細胞の生理機能の調節にかかわるプロスタグランジン (PG) の合成に関与している。一方の COX-2 は、起炎性メディエーターによって炎症部位の細胞に発現誘導され、COX-2 を介して産生される PG が炎症の場において重要な役割を果たしているとされている。しかし、COX-2 を発現する細胞には常に COX-1 が存在しており、産生された PG は COX-1 あるいは COX-2 のいずれを介して産生されたものか明らかではないため、炎症反応に関与する PG と COX-2 との関係は必ずしも明確ではない。そこで本研究では、ラットのカラゲニン胸膜炎モデルを活用して、炎症の進展および修復過程の双方に焦点をあて COX-2 の役割について解析した。

まず、カラゲニン胸膜炎における炎症反応と PG ならびに COX-1 および COX-2 の関与について解析した。すなわち、血管透過性反応が亢進している時期に一致して滲出液中の PGE₂、TXB₂ および 6-keto-PGF_{1α} のレベルが高いこと、および浸潤白血球中には COX-2 が誘導されていることを示し、本モデルにおける血漿滲出には、COX-2 を介して産生される PG が関わっている可能性を示唆した。次に、COX-2 選択的阻害薬を投与することにより血漿滲出が抑制され PGE₂ レベルのみが低下することを示した。また、各種の PG のレベルの中で PGE₂ のレベルだけが血管透過性反応と有意な相関関係があることを明らかにし、本モデルにおける血漿滲出には滲出液中の PG の中で PGE₂ が最も大きく関与している可能性を示した。また、ラットに COX 阻害薬を経口投与することにより、COX-2 に対して選択性を示す阻害薬は選択性を持たない阻害薬に比べて胃粘膜傷害作用が弱いことを示し、COX-2 選択的阻害薬は抗炎症作用と副作用である胃粘膜傷害作用とが分離された有用な抗炎症薬になる可能性を示した。

さらに、ステロイド性抗炎症薬であるデキサメタゾンのカラゲニン胸膜炎における抗炎症効果を検討し、低用量のデキサメタゾンは浸潤白血球中における COX-2 の発現にも PLA₂ 活性にも影響せず、胸腔内への白血球の浸潤を抑制することによって PGE₂ のレベルを低下させ、血漿滲出を抑制する可能性を示した。

最後に、カラゲニン胸膜炎後期相において COX-2 が中皮細胞に発現していること、および COX-2 を介して産生される PGI₂ (安定代謝物である 6-keto-PGF_{1α} として測定) が胸膜の肥厚に関与している可能性を示した。胸膜の肥厚は炎症の修復過程の一環と考えられることから、本モデルにおいて COX-2 が炎症の修復過程に関与していることを示唆した。

以上、本研究では、ラットのカラゲニン胸膜炎モデルを用いて、COX-2 が炎症急性期と後期においてそれぞれ炎症の進展と修復に関与していること、および COX-2 選択的阻害薬の抗炎症薬としての有用性について明らかにした。以上の一連の研究成果により、本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。