

氏名(本籍)	阿部純子
学位の種類	薬学博士
学位記番号	薬第307号
学位授与年月日	平成2年6月27日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当

学位論文題目 活性型ビタミンD₃及びその新規誘導体の生理作用に関する研究

(主査)
論文審査委員 教授 橋本嘉幸 教授 佐藤進
教授 大内和雄

論文内容要旨

1919年に抗くる病因子としてビタミンD₃が発見されてから今日に至るまで、単離・同定された代謝物は20種近くに及ぶ。その中で、活性の本体“活性型ビタミンD”は1 α ,25(OH)₂D₃であるが、これは7-デヒドロコレステロールが皮膚で紫外線を受け、ステロイドB環が開裂し、ビタミンD₃になった後、肝臓で25位、続いて腎臓で1 α 位が水酸化されて完成する。その作用発現は一般のステロイドホルモンと同様に核内レセプターを介するものである。元来1 α ,25(OH)₂D₃の作用はCa代謝調節作用と呼ばれてきたが、上記のレセプターの分布はCa代謝関連臓器である小腸、腎臓、骨ばかりではなく、皮膚、胸腺、骨髄細胞など身体中のほとんどすべての組織・細胞に及ぶ。従って主作用であるCa代謝調節作用とは独立した新しい生理作用の解明及びその臨床応用に多くの注目が集まっている。

現在、1 α ,25(OH)₂D₃の作用は、

- ① Ca代謝調節作用
- ② 分化誘導作用
- ③ 免疫調節作用

に大別される。

第一のCa代謝調節作用とは、小腸からのCa吸収促進及び副甲状腺ホルモン(PTH)と共同して骨からのCa溶出を助ける(骨塩動員作用)ことを示す。

第二の分化誘導作用は、1981年須田等により、骨髄性白血病細胞M1が1 α ,25(OH)₂D₃により、マクロファージ(M ϕ)へ分化することが初めて発見されたことに端を発するものである。

筆者等は分化及び免疫調節作用の解明として、リンホカインの一つであるIL-3を産生する骨髄単球性白血病細胞WEHI-3細胞を用いて1 α ,25(OH)₂D₃の影響を検討した。その結果、腫瘍細胞であるWEHI-3細胞は無制限な増殖を繰り返すが、1 α ,25(OH)₂D₃により細胞周期においてG₀/G₁期からS期への移行が阻害されて増殖が抑制された。IL-3産生も1 α ,25(OH)₂D₃により抑制された。形態学的観察及び生化学的指標(貪食能、non-specific esterase活性、NBT還元能、Fcレセプター発現)から、M ϕ へ分化したことが確認された。更にWEHI-3細胞由来M ϕ が、免疫学的機能を有するに至ったか否かを検討した。その結果、M ϕ は異物の認識(IL-3産生亢進)、異物への接近(細胞の遊走;細胞骨格の変動としてゲルゾリントタンパク質の合成促進)及び異物の貪食(カテプシン系酵素の合成促進)が確認され、生化学的のみならず、免疫機能的にも活性があることが明らかになった。(第一部第一章)

1 α ,25(OH)₂D₃の分化誘導作用は上記のような血球系細胞のみならず、皮膚などの上皮性細胞にも及ぶことが黒木等により明らかにされ、表皮細胞の分化異常が原因で表皮部分が肥厚して

いく乾癬という皮膚疾患がビタミンDで治癒することが報告された。しかしながら、詳細な解析は線維芽細胞に対して報告されているのみで、表皮細胞については未だなされていない。そこで explant-outgrowth culture 法を用いて、未治療患者の皮膚切片を用い、in vitro で $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の表皮細胞に対する効果を検討した。その結果、正常表皮細胞に対して $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は 1 nM で DNA 合成を抑制するのに対し、乾癬表皮細胞では、皮疹部・無疹部共に 100 nM で初めて抑制効果を示した。DNA 抑制効果発現のための $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の濃度は、正常と乾癬の間に100倍の差があるという結果は、線維芽細胞を用いた報告とよく一致し、乾癬患者では $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の細胞増殖抑制効果に対して抵抗性であることが示された。(第一部第二章)

従って $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の細胞増殖抑制効果を乾癬患者で求めるならば、投与量が高くなり、逆に $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の本来の作用である血中 Ca 上昇作用が side effect となってしまう。乾癬に限らず、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の新しい作用を新型薬剤として開発していくことは、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の血中 Ca 上昇作用が短所にもなるわけで、この二つの作用が分離できるものならば、高 Ca 血症 (hyper-calcemia) の恐れを考慮することなく、臨床応用が望めるのである。

この構想を基に、化学構造を modify することにより多岐にわたる $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の作用を分離することを目的に、多くの誘導体が合成されてきた。筆者等は $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の構造上、二つの部分、トリエン部分と側鎖部分に注目し、新規誘導体の合成にあたった。

その中で側鎖部分の改造により合成された新誘導体、特に22位の炭素が酸素に置換された $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 型、すなわち 22-oxa- $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が最終的に選出された。数々の合成誘導体の生理活性を明らかにするため、まず in vitro において分化誘導作用と Ca 代謝調節作用を検討した。分化誘導作用について $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ により M ϕ へ分化するヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 の NBT 還元能を指標として、その誘導活性を $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ と比較した。その結果、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ よりも強い誘導能を有するものとして、22-oxa- $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が選ばれたので、この結果を確認するため前述の WEHI-3細胞を用いて $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ と比較検討した。増殖抑制と分化の活性として、貪食能、Fc レセプターの発現、non-specific esterase 活性、NBT 還元能の4指標を $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ と比較したが、いずれも10-100倍22-oxa- $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の方がより強い活性を示した。HL-60、WEHI-3細胞と2種の細胞を用いて、同一の結果が導きだされたことから、22-oxa- $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ よりも強い分化誘導活性を有することは確実となった。次に逆に in vitro の Ca 作用として Raisz の系に基づく骨吸収能について $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ と比較した。その結果22-oxa- $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に比して 1/50程度の活性しか持たなかった。以上より、22-oxa- $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は in vitro において $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の分化誘導作用と Ca 代謝調節作用を分離できたものと思われる。(第二部第一章)

引き続き *in vivo* の作用検討に移った。Ca 作用については、正常マウス、ビタミンD欠乏ラットの2系統を用いて行なった。まず正常マウスでは、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は $3\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 静注で有意に血清Caレベルを上昇させるが、 $22\text{-oxa-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ はその100倍量にあたる $300\ \mu\text{g}/\text{kg}$ を投与しても、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ のレベルを越えなかった。ビタミンD欠乏ラットにおけるCaの腸管吸収については、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は $0.1\ \mu\text{g}/\text{kg}$ で既に有意に活性を示すが、 $22\text{-oxa-}1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ はその1000倍量の $100\ \mu\text{g}/\text{kg}$ を投与しても $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ によるレベルを越えなかった。更にビタミンD欠乏ラットにおける骨塩動員作用についても、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は濃度依存的に血清Caレベルを上昇させるが、 $22\text{-oxa-}1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は $100\ \mu\text{g}/\text{kg}$ を投与しても全く上昇させなかった。以上より $22\text{-oxa-}1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の血中Ca上昇作用は $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に比べて非常に弱く高Ca血症の誘発を考えなくとも臨床に有効であることが支持された。

逆に *in vivo* での有用な活性の探索として、分化誘導能のみならず、免疫調節作用をも含めて薬効の探索を試みている。

その一例として、まずヒツジ赤血球 (SRBC) 免疫に対する primary immune response として脾臓細胞の抗体産生能を調べた。免疫する SRBC の量を、マウスが最大限の抗体産生を引き起こす量の $1/50$ という少ない量にして、免疫により起こる抗体産生も中程度に低下した状態を作成する。この際の抗体産生の増減を評価した結果、 $22\text{-oxa-}1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は bell shape 型の反応をとり、 $2\ \text{ng}/\text{kg}$ 投与で最も強力に抗体産生を示した。 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ や他の oxa 化合物も同様の反応型を示したが、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ではその最適濃度は $100\ \text{ng}/\text{kg}$ で、活性の優劣は、 $22\text{-oxa-}1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が最も低濃度で最大活性を示した。(第二部第二章)

より臨床応用に拡大していくために、 $22\text{-oxa-}1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の薬剤としての開発の標的の一つとして慢性関節リウマチ (RA) を取り上げた。RA の治療は抗炎症剤として、非ステロイド、次にステロイド剤の投与、それに伴い抗リウマチ剤として注射金剤、免疫調節剤などの投与がなされるが、副作用や、リバウンドも重篤である例が多く、より有効な薬剤の開発が強く望まれている。RA に関しては、MRL/1, NZB/W F1, BXSB 等幾つかの自己免疫疾患モデルマウスが開発され、各々特徴的な発症の進展を見せるため、免疫調節剤の開発には欠かせない動物モデルである。この中から MRL/1 を用いて *in vivo* での $22\text{-oxa-}1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の効果を検討した。MRL/1 の免疫異常は helper T cell の異常亢進及び polyclonal B cell activation と言えるが、胸腺における T cell の分化異常にも起因している。この異常 T cell はリンパ節腫脹を誘発し、また関節炎や lupus 腎炎・血管炎をも伴い激しい病像を形成し死に至る。本マウスにおける $22\text{-oxa-}1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の効果を、延命実験及び24週齢での解剖実験に分けて検討した。前者の系では、2及び $100\ \text{ng}/\text{kg}$ 投与群の2グループに分けて検討したが、 $100\ \text{ng}/\text{kg}$ 投与群では延命に対して効果はなかったが、 $2\ \text{ng}/\text{kg}$ 投与群では有意に延命効果を示した。腎臓の機能を示す指標として

尿タンパク値もモニターしたが、2 ng/kg 投与群では30週齢においても有意に尿タンパク値の上昇を抑制した。解剖実験では、種々の免疫パラメータ及び組織学的検索を行なった。胸腺、リンパ節、脾臓のリンパ球の表面抗原の発現の検索としてThy 1.2 (T), B 220 (B) 及びL3T4 (helper T), Lyt-2 (suppressor T) の2重染色を行なった。胸腺やリンパ節においてはほとんどの細胞がThy 1.2陽性だが、発症が進むにつれてその割合が減少し、double positiveの異常T cellが増加する。この異常T cellの発現は脾臓細胞においても認められるが、22-oxa-1 α , 25(OH)₂D₃により有意に是正された。また胸腺では95%以上L3T4, Lyt-2 double positiveだが、発症につれて激減する。リンパ節では発症につれて70%以上L3T4, Lyt-2 double negativeになるが、これらに対しても22-oxa-1 α , 25(OH)₂D₃はyoung controlに近いパターンへ回復させた。リンパ節重量の測定により、腫脹の度合いを調べても、また脾臓細胞の免疫グロブリン産生細胞数やIL-2産生能を測定しても、22-oxa-1 α , 25(OH)₂D₃投与、特に2 ng/kgを中心にした低用量で、顕著な改善効果が示された。更に腎臓及び関節の病理組織学的検索においても、22-oxa-1 α , 25(OH)₂D₃は、前者では血管炎や肉芽腫形成を抑制し、後者では滑膜の造成やパンヌス形成を抑制していることが確認された。以上より血中Ca上昇作用により高Ca血症の誘発の恐れのない、新しい型の抗RA剤として22-oxa-1 α , 25(OH)₂D₃は有力な候補の一つに挙げられよう。(第二部第三章)

1 α , 25(OH)₂D₃の生理作用の探索と作用機構の解明の研究から始まった22-oxa-1 α , 25(OH)₂D₃の研究開発は、新しい医薬品の開発として大いに期待され、それに併せて、本来の1 α , 25(OH)₂D₃の研究も前進するものと思われる。

審査結果の要旨

ビタミンDは生体内で代謝され種々の代謝物に変化し生理活性を発揮するが、その活性体の本体は1アルファ、25-ジヒドロキシD₃で活性型ビタミンD₃と呼ばれる。この物質の生理作用は初期にはCa代謝調節のみが注目されていたが、その後、この物質は様々な生理活性を発揮することが解ってきた。本研究では、1アルファ、25-ジヒドロキシD₃の示す分化誘導作用と免疫調節作用について明らかにされている。

まず、1アルファ、25-ジヒドロキシD₃は骨髄単球性白血病細胞をマクロファージに分化させることが*in vitro*実験により証明された(第1部、1章)。また、本剤は皮膚細胞の分化異常により発生する乾癬に有効であるとの報告に基づきその作用機構についても解析し、本化合物が皮膚表面細胞のDNA合成を抑制することがその一因であることを明らかにした(第1部、2章)。

1アルファ、25-ジヒドロキシD₃を臨床応用する場合に、その副作用となる血中Ca上昇作用を除く目的で新たに合成された22-オキサー1アルファ、25-ジヒドロキシD₃の分化誘導効果について検討した結果、この化合物は1アルファ、25-ジヒドロキシD₃よりも高い活性を示すことが確認された(第2部、1章)。

次に1アルファ、25-ジヒドロキシD₃及びそのオキソ体の免疫に及ぼす効果について検討した。その結果、これらの化合物が強い抗体産生増強作用を示すこと(第2部、2章)、また、自然発症自己免疫病マウスへの投与により延命効果を示すこと、などが明かとなり、さらにその機作についても検討した(第2部、3章)。

以上の研究成果は新しい生理活性を有するビタミンDの開発研究として注目され、博士論文に値するものと判定する。