

博士論文番号：0881004

選択的グルコルチコイド受容体アゴニスト (SEGRA) の
探索研究

加藤 雅智

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 動物細胞工学講座

(河野 憲二 教授)

平成23年5月18日提出

所属 (主指導教員)	動物細胞工学講座 (河野 憲二)		
氏名	加藤 雅智	提出	平成 23年5月18日
題目	選択的グルココルチコイド受容体アゴニスト (SEGRA) の探索研究		

要旨

ステロイドは、現在でもなお最も強力な抗炎症薬のひとつとして種々疾患に使用されている。しかしながら、このステロイド療法は長期間の使用などにより重篤な副作用(骨粗しょう症、糖尿病誘発、成長障害など)を示すことが明らかとなっている。そのため、眼科領域においては、全身の副作用を和らげることが可能なため、局所投与することが多い。しかし、局所投与とはいえ慢性的に使用すると副作用を引き起こすことが報告されている。内眼部および外眼部における炎症性眼疾患に対して、ステロイドの注射や点眼療法が行われているが、注射・点眼ともに副作用としてステロイド緑内障(眼圧上昇)や白内障を発症することが報告されている。これらの副作用のうち眼圧上昇は失明に至る可能性がある重篤な副作用であり、ステロイドによる眼疾患治療において大きな問題となっている。この眼圧上昇作用と主薬効を乖離できる化合物を見出すことができれば、種々眼疾患に対して有用な治療薬となる可能性が高く、本研究ではそのような化合物の探索を目指した。また眼科以外の炎症性疾患においても、既存ステロイドで引き起こされてしまう副作用(骨粗しょう症、皮膚の萎縮など)をも乖離できる可能性がある。

ステロイドはグルココルチコイドレセプター (GR) を介して様々なタンパク質の転写調節作用を発現する。これまでの報告から、抗炎症作用は主に転写抑制作用 (transrepression) に起因し、眼圧上昇などの副作用は主に転写活性化作用 (transactivation) に起因すると考えられている。最近になって、ステロイド骨格を有さず、この2つの作用が乖離している GR アゴニスト (selective glucocorticoid receptor agonist (SEGRA)) が報告された。そこで我々は、この報告された SEGRA (ZK209614) を用いて、化合物をスクリーニングするための *in vitro* 評価系 (GR 結合活性、transrepression 活性および transactivation 活性) の構築と眼科疾患モデルでの *in vivo* 評価(ターゲットバリデーション)を実施した。その結果、*in vitro* 評価系にて ZK209614 は従来のステロイドであるデキサメタゾン (DEX) と同程度の GR 結合活性を示し、transrepression に選択的な特性を示した。引き続き実施した *in vivo* 評価系においても ZK209614 は眼局所にて薬効(ラット・カラゲニン惹起結膜炎モデル、ラット・アレルギー性結膜炎モデル)を示し、副作用(ネコ・眼圧への影響)を高濃度の点眼液を用いても示さなかった。

以上の結果から、ZK209614は *in vitro* 評価系と *in vivo* 評価系の両方で **SEGRA** としての特性（薬効に選択的）を示すことが明らかとなり、**SEGRA** というターゲットが眼科疾患で有望な創薬ターゲットであると証明できた。これまでに本化合物がステロイド高眼圧の動物モデルにおいて乖離できたとの報告はなく、本研究で初めて証明することができた。

次に上述の評価系は、十分に新規化合物探索にも使用できると考えられたため、新規 **SEGRA** 化合物のスクリーニングを開始した。ZK209614 ならびに別の骨格を持つ **SEGRA** 化合物と報告されている **AL-438** を参考に構造を展開し、様々な位置に多種の置換基を導入して 1500 化合物以上の新規誘導体を合成した。これら合成した化合物は、*in vitro* 評価系を用いた一次スクリーニングを実施した。その結果、**GR** 結合活性を示し、**SEGRA** としての性質（**transrepression** 選択的）を示す新規の化合物群を見出すことができた。次に新規化合物群の中で **transrepression** 活性が強力な化合物から順に *in vivo* 評価系を用いた二次スクリーニングおよび三次スクリーニングを実施し、点眼投与により十分な薬理効果を示し、眼圧上昇作用を示さない化合物を見出した。

以上のスクリーニング結果から、十分な薬理作用を示し、眼圧への影響がほとんど認められなかったキノリン骨格をもつ化合物 **X** を有望な新規化合物として選出した。今回、我々がスクリーニングを経て見出した新規 **SEGRA** 化合物 **X** は、*in vitro* 評価系および *in vivo* の動物モデルにおいて、明らかに既存のステロイドと違うプロファイルを示し、副作用を乖離した新規の抗炎症・抗アレルギー点眼薬になり得ると考えられた。今後、本化合物を用いた眼疾患治療剤の臨床開発試験が期待され、眼疾患で困っている多くの患者さんへ本化合物を届けられるよう見守りたい。

目次

序論	6
材料と方法	9
化合物	
培養細胞	
グルココルチコイド受容体結合活性の測定	
HCE-T 細胞における IL-6 遊離抑制作用評価系 (transrepression assay)	
Tyrosine amino-transferase (TAT) 発現誘導作用評価系 (transactivation assay)	
TAT 活性測定	
動物	
ラット・カラゲニン惹起結膜炎モデル	
ラット・アレルギー性結膜炎モデル	
マウス・アレルギー性結膜炎モデル	
ネコの眼圧測定	
ラットの眼圧測定	
統計解析	
結果	14
グルココルチコイド受容体結合活性測定	
In vitro transrepression 活性測定	
In vitro transactivation 活性測定	
ラット・カラゲニン惹起結膜炎モデル (抗炎症作用)	
ラット・能動感作アレルギー性結膜炎モデル (抗アレルギー作用)	
ネコ・眼圧への影響	
新規 SEGRA 化合物のスクリーニング	
新規 SEGRA 化合物の in vitro プロファイル	
化合物 X のマウス・アレルギー性結膜炎抑制作用	
化合物 X のラット眼圧への影響	
化合物 X とステロイドの作用比較	
考察	19

図表	24
謝辞	42
参考文献	43

序論

本来、ステロイドとは性ホルモン、ミネラルコルチコイド、グルココルチコイドを含む総称だが、一般的にはグルココルチコイドをステロイドと呼んでいる。ステロイド療法の歴史は古く、1936年に内因性ステロイドである cortisone が抽出され、1948年に Hench らは cortisone 注射をリウマチ患者に行い、全く歩けなかった患者が歩けるようになったという、劇的な効果を報告した (Hench et al., 1948)。その後、様々な合成ステロイドが開発され、現在でもなお最も強力な抗炎症薬のひとつとして種々疾患に使用されている (Figure 1)。しかしながら、このステロイド療法は長期間の使用などにより重篤な副作用 (骨粗しょう症、糖尿病誘発、成長障害など) を示すことが明らかとなってきた (Schäcke et al., 2002)。そのため、ステロイドの局所投与は全身の副作用を和らげることが可能となるため、皮膚、呼吸器および眼の領域で特に使用されている。しかし、たとえ局所投与とはいえ慢性的に使用すると皮膚の萎縮 (Maibach et al., 1992)、易感染性 (McDonough et al., 2008)、白内障 (James et al., 2007) および緑内障 (Kersey et al., 2006) などの局所性の副作用を引き起こすことが報告されている。近年、眼科領域においてはステロイド剤の眼局所注射が頻繁に使用されるようになってきた。一方、結膜炎などの外眼部における炎症性眼疾患に対しても古くからステロイドの点眼療法が行われているが、注射・点眼ともに副作用としてステロイド緑内障 (眼圧上昇) や白内障を発症することが報告されている。これらの副作用のうち眼圧上昇は失明に至る可能性がある重篤な副作用であり、ステロイドによる眼疾患治療において最も大きな問題となっている。

日常生活で得る情報の 80%以上は視覚に依存しているといわれ、視覚の障害は日常生活に重大な影響を与える。現在、本邦において使用されているステロイド点眼液は、フルオロメトロン、リン酸ベタメタゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、酢酸プレドニゾロン、メタスルホ安息香酸デキサメタゾンナトリウムなどを主成分とした点眼液が数種類存在している。上記ステロイド点眼剤の中でも、フルオロメトロンは眼圧上昇などの副作用が他のステロイド点眼剤に比べて著しく少ないことが報告されているが、その理由としては眼内への薬物移行やフルオロメトロン代謝物の活性などが関与していると報告されている (Kato et al., 2006)。しかし、ステロイド点眼剤による眼圧上昇のメカニズムに関しては、いまだ十分に解明されていない。一般的には、ステロイド剤が線維柱帯細胞に作用し、ミオシリン遺伝子の転写を促進して、最終的に細胞外マトリックスが房水流出抵抗を上昇させることが高眼圧にいたる原因のひとつと考えられている (Tamm, 2002)。

ステロイドはグルココルチコイド受容体に結合して、遺伝子発現を調節することが知られている。そのメカニズムとしては、細胞内で少なくとも **transrepression**、**transactivation** と呼ばれる 2 つのメカニズムが存在することが報告されている (Evans, 1989)。ステロイドは細胞内に移行した後、細胞質に存在するグルココルチコイド受容体と結合し、その複合体は核内へ移行する。その後、遺伝子の発現を抑制する方向に働いたり (**transrepression**)、発現を促進する方向へ働いたりする (**transactivation**) (Figure 2; Coghlan et al, 2001)。このうち **transactivation** 作用がステロイドによって引き起こされる主な副作用に関与していると考えられている (Schäcke et al., 2004)。もちろん、眼局所の副作用に関しても同様に、この発現促進作用により、多くの細胞外マトリックスなどのタンパク質が凝集し、房水の流出を阻害することがひとつの要因であると考えられている (Renfro et al., 1992)。実際、ステロイド処置により、**glycosaminoglycans**、**elastin** や **fibronectin** の発現量が増加することが組織培養の研究から明らかとなっている (Wordinger et al., 1999)。さらにヒトの線維柱帯細胞の間隙にもステロイドの投与により **glycosaminoglycans** が蓄積している事実が確認されており (Spaeth et al., 1977)、ウサギでも同様の現象が確認されている (Ticho et al., 1979)。このような報告が多数認められることから、眼圧上昇に **transactivation** 作用が関与していることはほぼ間違いない。

線維柱帯細胞にデキサメタゾン処置すると、数種類の遺伝子発現が増強される (Rozsa et al., 2006)。最も顕著に誘導される遺伝子としては、**55 kDa** のミオシリンをコードする **TIGER/MYOC** 遺伝子が有名である。しかし、そのミオシリンの役割に関しては、現在も不明な点が多く、房水流出の阻害に関与するのか否かに関しては、まだ結論に至るような研究結果は得られていない。

一方、抗炎症作用には **transrepression** 作用と **transactivation** 作用の両作用が関与しているが、**transrepression** 作用が主に寄与している信じられている。なぜなら、多くの炎症性メディエーターは **activator protein-1 (AP-1)**、**nuclear factor-kB (NF-kB)** または **nuclear factor of activated T cells (NF-AT)** などの転写調節因子により発現調節されており、ステロイドはそれら転写調節因子の活性を抑制するためである (Cato et al., 1996)。代表的な炎症性メディエーターとしては、**Interleukin (IL) -1**、**TNF- α** 、**IL-4**、**IL-6**、**I-CAM** などが知られている。その **transrepression** 作用のメカニズムとしてはグルココルチコイド受容体と上記転写因子との直接的なタンパク-タンパク結合が関与している。2 量体を形成不可能なグルココルチコイド受容体を導入したトランスジェニックマウスでは、**transactivation** 作用が著しく弱まったにもかかわらず、ステロイドの抗炎症は十分に確認されたことから、**transrepression** 作用は抗炎症作用に関与し、その作用を生体内で分離できる可能性を示唆している (Reichardt

et al., 2001)。

そこで我々は、近年 **transrepression** 作用と **transactivation** 作用が乖離した選択的グルココルチコイド受容体アゴニスト (**SEGRA**) と報告された **ZK209164** 化合物 (**Schäcke et al., 2004**) を用いて、その化合物が **in vitro** 評価系にて **transrepression** 作用と **transactivation** 作用が乖離しているのか否か、また **in vivo** 動物モデルでも点眼投与した際に **in vitro** 評価結果を反映して、薬理作用を保持したまま副作用が軽減されているのか否かを解明するため、本研究を実施した。また、上記のターゲットバリデーションが完了後に、今回確立した評価系を用いて新規の化合物をスクリーニングし、これまでに報告されていない化合物 **X** を見出し、そのプロファイルに関して検討したので報告する。

材料と方法

化合物

既存ステロイド薬であるデキサメタゾン は SIGMA 社から購入した。ZK209614 と RU24858 は参天製薬株式会社により合成され、¹H-NMR により構造と純度 (95%以上) の確認を行った後に実験に使用した。また、新規に合成した約 1500 化合物に関しても、すべて ¹H-NMR により構造と純度 (95%以上) の確認を行ったものを使用した。0.1% フルオロメトロン点眼液 (フルメトロン 0.1) および 0.1% ベタメタゾン点眼液 (リンデロン点眼液) はそれぞれ、参天製薬株式会社および塩野義製薬株式会社から購入した。その他の一般的な試薬は特級試薬を試薬メーカーから購入して使用した。

培養細胞

Transrepression 評価系に使用した SV40 不死化ヒト角膜上皮細胞株 (HCE-T) は理研バイオリソースセンターから入手した。本細胞株は 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。培養液は、SHEM medium (supplemented hormone epithelial medium: 15 % FBS, 5 µg/mL insulin, 0.1 µg/mL cholera toxin, 10 ng/mL human EGF, 40 µg/mL gentamicin containing D-MEM/Ham's F12) と 10% FBS 含有の D-MEM/Ham's F12 medium を使用した。

Transactivation 評価系には H4-II-E-C3 細胞株 (ラット肝細胞系) を大日本住友製薬から購入して使用した。本細胞株は 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。培養液は、100 U/ml penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 10% FBS を含有した αMEM を使用した。また評価時の培養液としては、10% FBS 含有 αMEM を使用した。

グルココルチコイド受容体結合活性の測定

デキサメタゾン、ZK209614、新規合成した化合物のグルココルチコイド受容体結合活性は Glucocorticoid Receptor Competitor Assay Kit, Green (Invitrogen) を用いて競合アッセイ法により測定した。測定手技はキットに記載されたインストラクションに従って操作し、各化合物のヒト・リコンビナントグルココルチコイド受容体との結合能は、フルオレセイン標識した化合物との競合アッセイに基づき数値を算出した。評価時の陰性対照には、競合させる標識化合物を含まない場合の蛍光偏光を測定し、その値を 0% と規定した。また、陽性対照には、被験物質に代えて 1 mM のデキサメタゾンを添加してアッセイを実施し、その値を 100% と規定した。マルチウェルプレート上の各ウェルの蛍光偏光を測定するため、機器は Analyst™ HT を使用した。

HCE-T細胞におけるIL-6 遊離抑制作用評価系 (transrepression assay)

IL-6 は炎症に関与する主要なサイトカインのひとつであり、HCE-T 細胞を lypopolysaccharide (LPS) で刺激すると、多量に上清中に遊離される。したがって、この遊離される IL-6 を指標に transrepression 作用を評価した。HCE-T 細胞をハーベストし、 2.0×10^5 cells/mL になるよう SHEM medium で懸濁した。96 well プレートに 1 ウェルあたり 2.0×10^4 cells/0.1 mL/well となるように HCE-T 細胞を分注した。一晚インキュベーションした後、培養液を除き、新たに 80 μ L の 10% FBS-DMEM/F12 medium を添加した。さらに 10 μ L の被験物質が含まれる溶液と 10 μ L の 1 μ g/mL LPS (100 ng/mL) 溶液を添加した。4 時間、37°Cにてインキュベーション後、各ウェルから培養上清を回収し、その上清中に含まれる IL-6 濃度の測定に使用するまで、-80 °Cにてサンプルを保存した。上清中 IL-6 量の測定には、R&D System 社の Human IL-6 ELISA Kit を使用した。操作はキットに添付されたインストラクションに従って操作した。

Tyrosine amino-transferase (TAT) 発現誘導作用評価系 (transactivation assay)

TAT は糖新生に関与する酵素の一つであり、TAT 遺伝子の上流にはグルコシルコイドにより活性化されるプロモーター領域が存在するため、本酵素の発現誘導作用を指標に transactivation 作用を評価した。ラットの肝培養細胞である H4-II-E-C3 細胞を 4.0×10^5 cells/mL になるように培養液へ懸濁し、96 well プレートに 1 ウェルあたり 4.0×10^4 cells/0.1 mL/well となるように細胞を分注した。細胞を播種 3 日後、新鮮な培養液を 100 μ L 各ウェルに追加した。その翌日、培養液を取り除き、新たに測定用の培養液を 90 μ L 添加した。そこへ 10 μ L の被験物質を含む溶液を添加した。24 時間インキュベーションした後、発現誘導された TAT の酵素活性を測定するため、以下の操作を実施した。

TAT活性測定

24 時間インキュベーションした後、培養液を除き、細胞を PBS (-) で一度洗浄した。次に用時調整した solubilization buffer (125 mM K_2HPO_4 , pH7.6, 1 mM EDTA, pH8.0, 1 mM DTT, 0.5% Nonidet P- 40) を 50 μ L 添加し、氷上に 10 分間静置した。その後、各ウェルに 130 μ L の L-tyrosine 溶液(7 mM stock 溶液; 63.5 mg を含有した 32 mL の 125 mM K_2HPO_4 と 150 μ L の 10 N KOH の混合液: アッセイ直前に 6 mL の 125 mM KH_2PO_4 と 10 mL の tyrosine stock 溶液を混合) し、10 μ L の pyridoxal phosphate (1 mM stock 溶液; 4.8 mg を含有する 10 mL の 125 mM K_2HPO_4) と 10 μ L of α -ketoglutaric acid (200

mM stock 溶液; 368 mg を含有する 10 mL の 125 mM K_2HPO_4 と 150 μ L の 10 N KOH 混合液) を添加した。プレートを 37°C で 30 分間インキュベーションした後、各ウェルに 5 μ L の 10N KOH を添加し、すぐに攪拌することで酵素反応を停止させた。さらに、37°C で 15 分間プレートをインキュベーションした後、サンプル 150 μ L を 96well の UV 用プレートに移し、プレートリーダーを用いて 340 nm における吸光度を測定した。各ウェルの吸光度は TAT の酵素活性を示す指標として表した。

動物

カラゲニン惹起結膜炎モデルには、6 週令の雄性 Wister ST ラットを日本エスエルシー株式会社から購入して使用した。ラットのアレルギー性結膜炎モデルには、5 週令の雄性 Brown Norway ラットを Charlesriver laboratories Japan Inc. から、マウスのアレルギー性結膜炎モデルには 5 週令の Balb/c マウスを日本エスエルシーから購入して使用した。ステロイド高眼圧モデルには、1 歳以上の雄性的ネコを LSG Corporation から購入、または 5 週令の雄性 Brown Norway ラットを Charlesriver laboratories Japan Inc. から購入して使用した。すべての動物は 12 時間の明暗サイクル (light on 7 am to 7 pm) 下、室温 23 \pm 1°C、湿度 55 \pm 10 % に保ち飼育した。なお、すべての動物は自由給水にて、ラットおよびマウスは自由給餌、ネコは 80 g/day にて給餌した。これらの動物実験に関する操作は、試験期間を通して ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research に基づき、さらに参天製薬株式会社、動物倫理委員会の承認および監視下で実施された。

ラット・カラゲニン惹起結膜炎モデル

1% のカラゲニン溶液を全身麻酔下のラット上眼瞼結膜内へ 50 μ l/site 注入した。被験点眼液は、両眼へカラゲニン注射の 1 時間前から 1 時間間隔で合計 5 回、5 μ l を点眼により投与した。ラットはカラゲニン惹起の 4 時間後に安楽殺し、上部眼瞼結膜に形成された浮腫を切り出し、その重量を測定することにより点眼液の抗炎症効果を判定した。

ラット・アレルギー性結膜炎モデル

ラットの眼球結膜へ 1 μ g の ovalbumin (OA) を吸着させた 1 mg の aluminum hydroxide gel を各眼へ注射することにより能動的に感作した。感作の 2 週間後、3 ng の OA を上部眼瞼結膜に注射することにより 1 回目のアレルギー性結膜炎を惹起した (1st challenge)。さらにその翌日に 3 ng の OA を上部眼瞼結膜に注射することにより 2 回目のアレルギー性結膜炎を惹起した (2nd

challenge)。アレルギー症状の指標である血管透過性の評価は、結膜組織への Evans' blue 色素の漏出量を測定することにより評価した。1% Evans' blue を含有する生理食塩液を 2nd challenge の直前にラットの尾静脈内へ投与した (1.5 ml/kg)。被験点眼液は 2 回目のアレルギー性結膜炎惹起の 3 時間、1 時間、15 分前に点眼投与により 5 μ l 投与した。2nd challenge の 30 分後、ラットを安楽殺し、上部眼瞼組織を切り出した。組織サンプル内の Evans' blue を有機溶媒 (5 ml の 0.5% sodium sulfate in acetone (3:7 v/v)) で 48 時間以上、室温で抽出した。サンプルを 1,500 rpm で 10 分間遠心分離した後、抽出された色素量は吸光度計 (Beckman Instruments Inc., CA, USA) を用いて 620 nm での吸光度を測定することにより算出した。なお、Evans' blue 色素を希釈し標準線を作成し、サンプル中の Evans' blue 含有量を算出した。

マウス・アレルギー性結膜炎モデル

新規化合物のスクリーニングには、多くの試験を効率よく実施するため、マウスのアレルギー性結膜炎モデルを用いた。マウスの腹腔内に 1 μ g の OA を吸着させた 1 mg の aluminum hydroxide gel を注射することにより能動的に感作した。感作の 5 日後にもブースターのため、2 度目の感作を実施した。初回感作から 10 日目から 14 日目まで、連日 5% の OA を点眼することによりアレルギー性結膜炎を惹起した (1st-4th challenge)。さらにその翌日の OA 点眼による 5 回目のアレルギー性結膜炎惹起時に新規化合物の効果を評価した (5th challenge)。アレルギー症状の指標である血管透過性の評価は、結膜組織への Evans' blue 色素の漏出量を測定することにより評価した。0.5% Evans' blue を含有する生理食塩液を 5th challenge の直前にマウスの尾静脈内へ投与した (3.0 ml/kg)。被験点眼液は 5 回目のアレルギー性結膜炎惹起の 4 時間前に 1 回、点眼投与により 5 μ l 投与した。5th challenge の 30 分後、マウスを安楽殺し、色素が漏出した眼瞼組織を切り出した。組織サンプル内の Evans' blue を有機溶媒 (0.5 ml の 0.5% sodium sulfate in acetone (3:7 v/v)) で 48 時間以上、室温で抽出した。サンプルを小型遠心分離機で 12,000 rpm で 5 分間遠心分離した後、抽出された色素量は吸光度計 (Beckman Instruments Inc.) を用いて 620 nm での吸光度を測定することにより算出した。なお、Evans' blue 色素を希釈し標準線を作成し、サンプル中の Evans' blue 含有量を算出した。

ネコの眼圧測定

まず、12 週間にわたりネコをヒトとの接触で興奮しないように順化させた。その後、眼圧測定に馴染むように接触型眼圧計のチップ先端を眼にあてる練習を 12 週間実施した。眼圧測定は接触型の眼圧計 (model 30 classic, Mentor O&O

Inc, MA, USA) を使用した。ネコに局所麻酔薬 (ミドリン P、Santen Pharamaceutical Co, Ltd., Osaka, Japan) を点眼し角膜へチップをあてて眼圧を測定した。最初にすべてのネコの眼圧を 2~3 週間測定し、眼圧値が安定したネコを使用した。なお、眼圧値には日内変動があることが知られているため、実験期間中は午後 2 時から 5 時の間に測定した。被験点眼液は 1 日 4 回、おおよそ午前 9 時、午後 0 時、午後 3 時、午後 6 時に点眼投与した。点眼期間は実験により 7 日または 28 日間投与した。

ラットの眼圧測定

眼圧測定はリバウンド型の小動物用眼圧測定計 (TonoLab Tonometer) を使用した。試験開始前に、ラットを眼圧測定にならすため、2 週間の間に 4 回、眼圧測定を実施した。本測定は無麻酔下で 7 回測定し、最高値と最低値を除いた 5 回の平均値を一眼の眼圧値とした。なお、眼圧値には日内変動があることが知られているため、実験期間中は午後 2 時から 5 時の間に測定した。被験点眼液は 1 日 4 回、おおよそ午前 9 時、午後 0 時、午後 3 時、午後 6 時に点眼投与した。点眼期間は 3 週間の間 5 日/週で投与した。

統計解析

データは平均値 \pm 標準誤差 (S.E.) で表記した。2 群間の比較に関しては t-test を用い、3 群以上の比較に関しては、一元配置分散分析を実施後に多群間比較検定を実施した。

カラゲニン惹起結膜炎モデルおよびアレルギー性結膜炎モデルでは、SAS system 8.2 (SAS Institute Inc., USA) に基づいた EXSAS[®] version 7.1.2 (Arm Co. Ltd., Japan) を使用して統計学的な解析を実施した。ZK209614 処置群と基剤処置群の比較には一元配置分散分析に引き続き Dunnet-type の多重比較分析を行った。Dexamethasone 処置群と基剤処置群との比較には F-test に引き続き Student's t-test を行った。

眼圧値に関しても SAS system 8.2 (SAS Institute Inc., USA) に基づいた EXSAS[®] version 7.1.2 (Arm Co. Ltd., Japan) を使用して統計学的な解析を実施した。薬剤処置群と生理食塩液処置群または基剤処置群は F-test に引き続き Student's t-test または Aspin-Welch t-test を行った。

すべての統計学的解析は有意水準を 5% に設定した。

結果

グルココルチコイド受容体結合活性測定

ZK209614 およびデキサメタゾンの構造式を Figure 3 に示した。ZK209614 は SEGRA 化合物として報告されており (Schäcke et al., 2004)、その分子量は 476.46 である。本試験において、ZK209614 は非常に強力なグルココルチコイド受容体結合活性を示し、その強度はデキサメタゾンとほぼ同程度であった (Figure 4)。ZK209614 とデキサメタゾンの結合率 50% 阻害濃度 (IC_{50}) を算出した。その結果、ZK209614 の IC_{50} 値は 3.4 nM、デキサメタゾンの IC_{50} 値は 9.9 nM であった。すなわち、ZK209614 はヒトのグルココルチコイド受容体にデキサメタゾンとほぼ同程度の結合活性を示した。また、本測定キットの説明書にデキサメタゾンの IC_{50} 値は本キット用いた場合、11.4 nM と記載されており、ほぼ今回の評価結果と同等であった。よって、今回の測定は問題なく実施されていると考えられた。

In vitro transrepression 活性測定

Figure 5 に示したように ZK209614 とデキサメタゾンは LPS により誘導される IL-6 の遊離量を用量依存的に抑制した。ZK209614 の最高抑制率 (デキサメタゾンの最高抑制率を 100% として算出) は 73% であった。また、ZK209614 の IC_{50} 値 (ZK209614 の最高活性を 100%) は 14 nM と算出された。またデキサメタゾンの IC_{50} 値も 14 nM であった。以上の結果から、ZK209614 はデキサメタゾンの IC_{50} 値と同程度の transrepression 活性を示したが、最高抑制率 (Efficacy) に関してはデキサメタゾンよりも若干劣っていた。

In vitro transactivation 活性測定

ZK209614 をラットの H4-II-E-C3 細胞に処置すると、高濃度領域では TAT の発現を濃度依存的に誘導したが、その作用には限界があり、デキサメタゾンより弱い作用であった (Figure 6)。その最高活性はデキサメタゾンと比較すると 53% しか TAT の誘導を引き起こさなかった。さらに、ZK209614 は、最高活性の 50% に到達する化合物濃度 (EC_{50}) は 320 nM と算出された。一方、デキサメタゾンは非常に強力な transactivation 活性を示し、算出された EC_{50} 値は 1.2 nM であった。Figure 5 の結果と本結果をあわせて考えると、ZK209614 はデキサメタゾンに比べて transactivation 作用が弱く、transrepression 選択的に作用することが in vitro の評価系により証明された。

ラット・カラゲニン惹起結膜炎モデル（抗炎症作用）

1%のカラゲニン溶液をラットの眼瞼結膜へ注射することにより、結膜の浮腫を形成させる結膜炎モデルを使用し、ZK209614 とデキサメタゾンの抑制作用を検討した。この結膜浮腫は、通常カラゲニンの注射 4 時間から 12 時間まで同程度に観察される。今回、我々は ZK209614 とデキサメタゾンのカラゲニン惹起 4 時間後の浮腫に対する効果を検討した。Figure 7 に示したように、0.1%または 1%の ZK209614 点眼液を投与したラットでは結膜浮腫の形成を統計学的に有意に抑制した。また、陽性対照として使用した 0.1%のデキサメタゾンも有意な抑制効果を確認できたため、本試験系は問題なく実施されたと考えられた。

さらにベタメタゾン点眼液の本モデルに対する効果を検討した。その結果、0.02%および 0.1%のベタメタゾン点眼液は結膜の浮腫形成を統計学的に有意に抑制した (Figure 8)。本結果から、1%の ZK209614 点眼液と 0.02%のベタメタゾン点眼液がほぼ同程度の効果を示していたため、ZK209614 点眼液は約 5 倍の濃度が必要だと考えられた。

ラット・能動感作アレルギー性結膜炎モデル（抗アレルギー作用）

能動的に感作したラットの結膜へ抗原を注射するとアレルギー性結膜炎が惹起され、結膜の血管透過性が亢進するため、ZK209614 とデキサメタゾンの抗アレルギー作用を検討する目的で本モデルを使用した。Figure 9 に示したように、アレルギー性結膜炎モデルにより惹起された結膜部位の血管透過性亢進に対して、ZK209614 懸濁液は点眼投与により、濃度依存的に抑制効果を示した。その抑制効果は 0.1%と 1%の点眼液を投与した群にて、統計学的に有意な抑制効果を示した。またデキサメタゾンも本モデルに対して、0.1%で有意な抑制効果を示すことが確認された。

ネコ・眼圧への影響

Figure 10 および Figure 11 に示したように、0.1% フルオロメトロン、0.1% ベタメタゾン、1% RU24858 または 1% ZK209614 をネコに 1 日 4 回点眼投与後に眼圧への影響が認められる否かを検討した。各薬物の点眼期間は 7 日間または 28 日間で検討した。Figure 10 に示したように生理食塩液の投与ではネコの眼圧になんら影響を与えなかった。現在市販されているステロイド点眼剤であるフルオロメトロンおよびベタメタゾンの処置により、点眼開始わずか 4 日後から眼圧が上昇した。その眼圧の上昇の程度は、最高値としては約 4 mmHg の上昇を点眼開始 18 日目に示した。またこれらステロイド点眼剤による眼圧上昇作用は点眼投与を実施期間中、継続して認められた。点眼投与を中断後、各ステロイド点眼群の眼圧は、中断の 4 日後に速やかにベースラインの眼圧値ま

で低下したため、本実験で認められた眼圧の上昇はステロイド点眼液の投与によるものであることを、より明確に確認することができた。本試験から、ネコにおいてステロイドの眼圧上昇を評価する期間は7日間で十分だと考えられた。

次に Figure 11 に示したように、1% RU24858 および 1% ZK209614 に関しても同様にネコ眼圧への影響を検討した。化合物のポテンシャルを検討するため、両化合物は十分に高濃度における作用を検討する必要があると考えられたため、1%懸濁液を調製して点眼した。RU24858 はステロイド骨格を持つグルココルチコイド受容体アゴニストであるが、*in vitro* では SEGRA 様のプロファイルを持つ化合物であると初めて報告された化合物である (Belvisi et al., 2001)。しかし、本検討においては、RU24858 の点眼投与によりステロイド点眼液の場合と同様に点眼期間中にネコの眼圧上昇が認められた。また点眼投与中断7日後に眼圧はベースラインまで降下したことから、1%の RU24858 は点眼投与により、ネコの眼圧を上昇させる作用を示すことが証明された。一方、1%の ZK209614 を同様に点眼してもネコの眼圧に変化は認められず、点眼投与中断後も眼圧の変動が認められなかった。以上のことから、ZK209614 は 1%の濃度で 1 週間点眼しても、ネコの眼圧を上昇させないことが明らかとなった。

新規SEGRA化合物のスクリーニング

Figure 12 に新規 SEGRA 化合物をスクリーニングしていくためのフローならびに実際に評価した化合物数を示した。1 次スクリーニングとして、3 つの *in vitro* 評価 (グルココルチコイド受容体結合活性、*transrepression* 作用評価、*transactivation* 作用評価) を実施した。今回、新規に合成した化合物数は 1567 化合物に及んだ。化合物に関しては Figure 13 に示したような構造展開を主に実施し、AL-438 をシード化合物として、置換基を変換していくことにより、種々の化合物を合成した。なお、合成の方向性は 1 次スクリーニング結果を参照しながら、合成担当者と協議を経て、新規化合物の合成とスクリーニングを繰り返し実施した。次に 2 次スクリーニングとして、*in vivo* 動物モデルにおける点眼投与による薬理作用 (抗アレルギー作用) を評価した。本評価は 122 化合物を評価し、スループットを上げるためにマウスのアレルギー性結膜炎モデルを使用した。最後に 3 次スクリーニングとして、点眼投与により抗アレルギー作用の強力だった順に 7 化合物を選択し、*in vivo* 動物モデルにおける副作用 (眼圧への影響) を評価した。その結果、いずれの化合物もステロイドのような眼圧上昇作用は認められなかったが、7 化合物中、比較的 TAT 産生亢進作用の高かった 2 化合物で上昇傾向が認められた。残りの 5 化合物は眼圧への影響は認められなかった。以上のスクリーニング結果から、1 化合物を新規 SEGRA 化合物の代表として選択し、化合物 X とした。

新規SEGRA化合物のin vitroプロファイル

新規合成して in vitro 評価した化合物に関して、 10^{-5}M における活性を最高活性として、そのプロファイルを可視化するために 2 次元グラフへプロットした (Figure 14)。X 軸には transrepression 作用、Y 軸には transactivation 作用をプロットした。本研究で新たに合成した化合物は、ほとんどすべての化合物で transrepression 作用が transactivation 作用よりも優位なエリアにプロットされた。なお、既存のステロイドは 10^{-5}M では transrepression、transactivation 作用ともに 100%を示し、本研究で新たに合成され、評価したほとんどすべての化合物が in vitro 評価系で SEGRA としてのプロファイル (transrepression 選択性が高い) を示していることが証明された。最終的に候補として選択した化合物 X は Figure 14 中に茶色の丸で示した。

また、化合物 X の in vitro 評価系における用量反応を検討した結果を Figure 15 に示した。化合物 X の transrepression 評価系における作用を青線で、transactivation 作用を黒線でプロットした。化合物 X はどちらの評価系においても、濃度依存的に活性を示したが、transactivation 作用を発揮するためには高濃度必要であり、さらに 10^{-5}M でもデキサメタゾンの 40%程度しか作用が認められなかった。この結果から、化合物 X は in vitro 評価系において、transrepression 選択的であることが証明された。なお、デキサメタゾンの用量反応性は Figure 5 と 6 に示した通り、transrepression、transactivation の両評価系でほぼ同程度の活性を示し、乖離は認められていない。

化合物Xのマウス・アレルギー性結膜炎抑制作用

Figure 16 の (A) に 0.03%~0.5%までの化合物 X の効果を検討した結果を示した。投与は最終惹起の 4 時間前に 1 回点眼投与した。抗アレルギー作用の評価は抗原惹起 30 分後の結膜における血管透過性の亢進を血管からの色素漏出量を測定することにより評価した。その結果、化合物 X はマウスのアレルギー性結膜炎反応に伴う結膜部位の血管透過性亢進を用量依存的に抑制した。その抑制効果は 0.1%、0.3%および 0.5%の点眼液を投与した群にて、統計学的に有意な抑制効果を示した。

さらに既存のステロイド点眼液で一番使用されている 0.1% フルオロメトロン点眼液と化合物 X のマウス・アレルギー性結膜炎モデルに対する効果を検討した (Figure 16 (B))。抗アレルギー作用の評価は抗原惹起 30 分後の結膜における血管透過性の亢進を血管からの色素漏出量を測定することにより評価した。その結果、両化合物ともに最終惹起の 4 時間前に 1 回点眼投与することで、強力な抗アレルギー作用を示した。その抑制効果は統計学的に有意な差を示し、

どちらの抑制率も 29%と同程度であった。以上の結果から、化合物 X はフルオロメトロンと同程度の薬理作用を臨床でも示す可能性が期待された。

化合物Xのラット眼圧への影響

0.01%から 1%の化合物 X 点眼液を 1 日 4 回、3 週間、1 週間に 5 日間点眼してラットの眼圧に変化が認められるか否かを検討した (Figure 17)。眼圧測定はすべてのポイントで午後 2 時から 5 時の間に測定した。その結果、化合物 X は今回検討したいずれの濃度においてもほとんど眼圧に変動は認められなかった。一方、フルオロメトロン点眼液は Figure 10 に示したようにネコで眼圧上昇を引き起こしたが、ラットでも点眼投与により点眼開始 1 週間後から眼圧上昇作用が認められた。眼圧の上昇の程度は点眼期間中さらに上昇し、最終点眼日 (19 日目) に最高値として約 4 mmHg 上昇した。点眼投与を中断後、フルオロメトロン点眼群の眼圧は、中断の 4 日後には速やかにベースラインの眼圧値まで低下した。以上の結果から、化合物 X を 1%の濃度まで 3 週間点眼してもラットの眼圧を上昇させず、ヒトでも副作用を示しにくい可能性が予想された。

化合物Xとステロイドの作用比較

Figure 18 に化合物 X とデキサメタゾンの *in vitro* 評価系での比較ならびに化合物 X とフルオロメトロンの *in vivo* 評価系での比較をまとめた。その結果、今回、我々がスクリーニングを経て探索した新規 SEGRA 化合物 X は、*in vitro* 評価系および *in vivo* の動物モデルにおいて、明らかに既存のステロイドと違うプロファイルを示し、副作用を乖離した新規の抗炎症・抗アレルギー点眼薬になり得ると考えられた。

考察

本研究の前半部分では、ZK209614 が SEGRA としての特性を持つことを *in vitro* および *in vivo* の評価系を用いて証明することができた。本結果は以前に報告されている Schäcke et al.が発見・報告した SEGRA の知見をさらに広げることができた成果である (Schäcke et al., 2004)。この研究結果は、本化合物の点眼投与により、動物モデルにおいて眼圧上昇を示さず、治療効果のみを示すことを証明した初めての報告となる。同時に、この結果は ZK209614 やその他の SEGRA 様の化合物が、古典的なステロイド剤と違い眼炎症疾患の治療に有利なプロファイルを持っていることを示唆している。さらに、本研究の後半部では、新規 SEGRA 化合物の探索研究を実施した。1567 化合物をスクリーニングした結果、有望な化合物として選択した化合物 X についても、ZK209614 と同様に既存のステロイド剤とは違うことが証明された。したがって、本化合物がステロイドに代わる抗炎症薬、特に眼炎症疾患に関して有望な候補となる可能性が示された。

ステロイドは非常に強力な幅広い抗炎症薬として知られている。眼科領域では、様々な前眼部や後眼部の疾患に対して硝子体内注射や点眼により、ステロイドが投与されている。実際にいくつかの種類ステロイド化合物が点眼薬として存在している。それらステロイド性点眼液は、その眼圧上昇作用に強弱があるものの、ほとんどすべてのステロイド性点眼液で眼圧が上昇する。ある程度の眼圧上昇が長期間持続すると視神経が傷害され、ステロイド性緑内障を発症してしまう (Kersey et al., 2006)。緑内障により一旦視野が欠損すると、回復は難しく、非常に厄介な合併症のひとつである。

多くの研究者がステロイドの強力な抗炎症作用を維持したまま、副作用を軽減したプロファイルを持つ新規化合物の探索や研究に注力してきた。その過程で、ステロイドの作用メカニズムが徐々に明らかとなり、**transrepression** と **transactivation** の 2 種類のメカニズムが示され、その後の研究に大きな影響を与えている (Coghlan et al, 2001)。このメカニズムが提唱されて以来、急速に SEGRA の探索研究が注目を集め、この 2 つの作用を乖離するための研究が多くなされている。その中で、Schäcke et al.は ZK209614 という高いグルココルチコイド受容体結合活性を持つ化合物を見出した (Schäcke et al., 2004)。本化合物はラセミ体の化合物で、彼らのグループはさらにこの光学異性体の片方を分離し、(+)-enantiomer である ZK216348 に関して詳しく研究している。その報告の中で、ZK216348 は **transrepression** と **transactivation** の作用に差があり、**transrepression** 選択的な作用を示すことが報告されている。彼らは

ZK216348 に関して詳細な検討を実施して報告しているが、ZK209614 に関しては報告されていない。そこで我々は ZK209614 に関して今回の研究で検討した。我々の検討結果でも *in vitro* 評価系にて十分なグルココルチコイド受容体結合活性を示し、**transrepression** と **transactivation** の作用に差が認められ、**tranrepression** 選択的な作用を示した。従って、*in vivo* の検討をする場合にも光学異性体を分離する必要性は低いと考え、ZK209614 を用いて *in vivo* 動物モデルに関して検討を実施した。

Transrepression 活性を評価する方法としては、いくつかの評価方法が報告されている (Schäcke et al, 2004; López et al., 2008; Wüst et al., 2009)。しかし、今回、我々は新たにヒトの角膜上皮細胞株 (HCE-T) を用いた評価系を確立した。その理由としては、*in vivo* の動物モデルとして眼に関する炎症およびアレルギーモデルを使用しようとして計画していたためである。さらに、**SEGRA** のようなコンセプトを証明するには、全身での作用を検討するよりも、局所での作用を検討する方が適しているとの仮説を立てていたことも関与している。一方、**transactivation** 活性の評価系に関しても、本来であればヒトの眼内にある線維柱帯細胞を用いた測定系を構築できると良いと考えていた。さらに、その発現亢進を測定する指標としては、ステロイド処置により著しく発現上昇すると報告されているタンパク質であるミオシリンを用いることができれば、眼局所での眼圧上昇と密接な繋がりを持つ素晴らしい **transactivation** 評価系になり得ると考えられた。しかし、線維柱帯の培養細胞に関しては入手可能であったが、ミオシリンの役割が不明であること、ならびにミオシリンの発現量を定量することが困難であったために、今回は評価系を確立することができなかった。現状では、ミオシリンを定量できるような **ELISA** 法の報告がない上、ミオシリンに対する抗体すら販売されておらず、測定系を確立することができなかった。従って、今回の検討では、以前から **transactivation** 活性の評価系として報告のあるラット肝細胞株を用いた **TAT** 酵素の発現誘導作用にて評価を実施した。最終的には、**TAT** の発現誘導作用の評価で十分に *in vivo* 動物モデルにおける眼圧上昇関連の副作用を予測することができた。

ZK209614 に関して検討した *in vitro* 評価の結果をまとめると、ZK209614 は、ヒトのグルココルチコイド受容体に対して、強力な古典的ステロイドとして知られているデキサメタゾンと同程度の結合活性を示した。また、**transrepression** 作用もデキサメタゾンより少し劣るものの、ほぼ同程度の活性を示したが、**transactivation** に関しては明らかにデキサメタゾンよりも作用が弱かった。以上の結果から、ZK209614 は十分に **SEGRA** としてのプロファルを *in vitro* 評価系で示したと考えられたため、次に *in vivo* 評価系にて ZK209614 の詳細プロファイルを検討することとした。

一般的な結膜炎やアレルギー性結膜炎などの外眼部の炎症性疾患において、眼局所の浮腫と充血は高頻度で観察される他覚症状として認識され、実際に点眼薬の臨床試験においても常時使用されているパラメーターである (Davies et al., 1993; Netland et al., 2000)。また、アレルギー性結膜炎における結膜の浮腫は、結膜での血管透過性の亢進がひとつの直接的な原因だといわれている。従って、我々は *in vivo* の動物モデルとして、浮腫形成と血管透過性の亢進への作用を検討可能な 2 つのモデルを選択し、ZK209614 の効果を検討した。また、わざわざ 2 つのモデルで検討を実施した理由としては、ZK209614 が *in vitro* の *transrepression* 評価系にて、わずかではあるが、デキサメタゾンよりも作用が弱かったことが関係している。その為、抗炎症作用のみでなく、抗アレルギー作用に関しても効果を検証した。その結果、Figure 7 に示すようにカラゲニン惹起結膜炎モデルにおける浮腫形成を十分に抑制し、さらに Figure 9 に示すようにアレルギー性結膜炎モデルにおける血管透過性亢進をも十分に抑制した。しかし、Figure 8 のベタメタゾン点眼液と比較すると、同程度の効果を示すためには ZK209614 点眼液は 5 倍程度高濃度必要だと考えられた。したがって、ネコの眼圧上昇作用を評価する際には、ベタメタゾン点眼液 (0.1%) より 10 倍高濃度の 1% ZK209614 点眼液を使用して評価した。一方、ZK209614 点眼液のアレルギー性結膜炎モデルに対する効果は、デキサメタゾンと比較すると若干弱かった (Figure 9)。この結果から考察されることとしては、非常に強力な抗アレルギー作用を示すためには、少しは *transactivation* 作用が関与している可能性が考えられた。しかし、ZK209614 点眼液は、*in vivo* 動物モデルにおいて著しく効果が弱いわけではなく、十分に抗炎症作用と抗アレルギー作用の両方を保持していることが確認できた。

Zhan et al. がネコのモデルを使ってデキサメタゾンやプレドニゾロンを点眼投与することにより、眼圧上昇が認められることを報告している (Zhan et al., 1992)。このネコの眼圧評価モデルは、ヒトでのステロイド点眼による眼圧上昇と同じような発症の経過や点眼中断後の回復過程などを再現できていると報告されている (Mindel et al., 1980)。さらに Bhattacharjee et al. もこのネコのモデルの再現性を確認しており、眼圧上昇の程度は使用するステロイドにより差が認められ、実際にそれらステロイドをヒトで使用した際の眼圧の上昇程度と似ていると報告されている (Bhattacharjee et al., 1999)。眼圧を測定する動物種としては、ウサギが一般的であり、眼圧の測定も比較的簡便であるが、ステロイドによる眼圧上昇に関しては、ウサギよりもネコの方が報告も多く確実性が高い。そのため、我々もネコのモデルを用いて本研究を実施した。その結果、我々も彼らの報告と同様にステロイドの点眼投与によりネコの眼圧が上昇することを確認した (Figure 10)。しかしながら、Bhattacharjee et al. が報告して

いる眼圧が上昇してくる時期とは違いがあり、彼らの報告では約 1 週間程度かけて徐々に眼圧が上昇したが、我々の検討では点眼開始の 4 日後から十分な眼圧上昇が確認された。この理由は明らかではないが、点眼回数（我々の検討では 4 回/日、Bhattacharjee et al. の報告では 3 回/日）や点眼間隔などの点眼用法に若干の違いがあったため、差が認められたのではないかと推測された。

RU24858 は初めて **transrepression** と **transactivation** 作用の乖離が **in vitro** 評価系で示唆された化合物である (Belvisi et al., 2001)。しかしながら、今回の我々の検討では 1% の RU24858 懸濁液の点眼により、ネコの眼圧が上昇した。このことから、RU24858 は眼局所投与した場合、**in vivo** 動物モデルでは **SEGRA** としてのプロファイルを示さないことが明らかとなった。しかし、この結果は以前の RU24858 に関する **in vivo** モデルでの報告 (Vayssière et al., 1997) と一致しており、RU24858 は **in vitro** 評価においては **transactivation** 作用が弱く、**transrepression** 選択的に作用するが、**in vivo** では期待されたような副作用の乖離は認められていない。その報告によると、**Transrepression** に基づく副作用を観察していた可能性を示唆していたが、今回の我々の検討でも眼圧上昇に対して乖離が認められなかった点から、本化合物自体が **in vivo** では **transactivation** 作用や副作用を減弱できない可能性が考えられた。また、RU24858 はステロイド特有の骨格を保持しているが、ZK209614 はそのような骨格を持たない。今回の結果は **SEGRA** の **transrepression** と **transactivation** の乖離度合いだけで無く、化合物構造が **in vivo** のモデルでは重要である可能性も考えられた。今後、ステロイド骨格を持つ **SEGRA** と持たない **SEGRA** がより多く見いだされ、その **in vivo** モデルでの特性が明らかになれば、この仮説について検証できることになるであろう。

現在、多くの製薬会社が **SEGRA** の特性を持つ薬理的・毒性学的に優れた化合物探索を実施していることが特許情報などから確認されている (Berlin, 2010)。しかしながら、報告されているすべての **SEGRA** はまだ臨床試験も実施していないような早期のステージの化合物か、開始していても **Proof of concept** を証明できるような試験結果はまだ公表されていない。その中で最も開発段階が進んでいる **SEGRA** 化合物は ZK245186 であり、本試験で検討した ZK209614 と同様の骨格を持つ化合物である。現在、皮膚と眼科領域を対象にこの化合物の臨床試験が進められている (Schäcke et al, 2009)。本臨床試験結果が明らかになり、予想通りの結果が得られた場合、**in vitro** 評価系や **in vivo** の動物モデルで認められた結果から、ヒトでの効果と副作用の乖離を予測できることになる。さらに、この臨床試験によって **SEGRA** のコンセプトが明確に示されたら、他の多くの **SEGRA** 化合物も臨床試験を実施するであろうし、ZK245186 に関しては多くの疾患への適応拡大を見込んだ臨床試験が開始されるであろう。

本研究から ZK209614 の点眼薬は古典的なステロイド薬と比べて、メリットのある点眼薬になる可能性があり、ステロイド骨格を保持しない SEGRA 化合物も同様の可能性を持っている。すなわち、SEGRA 化合物は現在のステロイド点眼薬を置き換えるポテンシャルを持ったターゲットであると考えられた。

本研究に引き続き、新規 SEGRA 化合物の探索を開始した。最終的に 1567 化合物を新規に合成し、スクリーニングすることができた。ZK209614 を検討した評価系を利用してスクリーニングしたため、そのポテンシャルを比較できる。我々が選択した化合物 X と ZK209614 を比較すると、transrepression 活性は化合物 X の方が強力で、transactivation 活性は化合物 X の方が弱い結果となった。したがって、化合物 X の方が SEGRA としてのポテンシャルは優れている可能性が高い。一方、化合物 X は AL-438 をシード化合物として構造展開したため、ZK209614 とは基本骨格に違いがある。したがって、グルココルチコイド受容体アゴニスト活性に関しては、ほぼ同程度のプロファイルを示すが、構造特異的な他の作用に関しては違いがある可能性が考えられた。他のターゲットに作用があるか否かについては、多くの評価系にて検討する必要がある、今後、化合物 X に関して明確にしていく必要があるひとつのポイントだと考えている。

また、化合物 X の transrepression 作用と transactivation 作用は、in vivo においてまだ少数のモデルでしか検証できていない。今後、より多くの動物モデルにおける transrepression 作用や transactivation 作用を確認してみたい。また、今回のスクリーニングでは IL-6 の産生抑制作用と TAT 産生亢進作用しか確認できていない。この点も今後の課題であるため、DNA マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現変動の変化や transactivation 評価系の考察で前述した、線維柱帯細胞におけるミオシリンの発現を確認していきたいと考えている。

最後に、後半の研究成果をまとめると、今回我々がスクリーニングを経て見出した新規 SEGRA 化合物 X は、in vitro 評価系および in vivo の動物モデルにおいて、明らかに既存のステロイドと違うプロファイルを示し、副作用を乖離した新規の抗炎症・抗アレルギー点眼薬になり得ると考えられた。

図表

**Steroids: The most effective therapy in inflammatory diseases
Long-term use cause side effects**

Indications: Rheumatoid arthritis (関節リウマチ),
Asthma (喘息), Dermatitis (皮膚炎),
Conjunctivitis (結膜炎), etc...

Side-effects: Osteoporosis (骨粗しょう症), Skin
atrophy (皮膚萎縮), Diabetes mellitus
(糖尿病), Glaucoma (緑内障), etc...

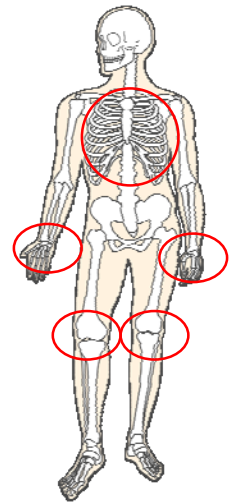


Figure 1. ステロイド薬の使用

ステロイドの適応疾患と報告されている副作用の代表例を示す。全身の様々な部位で起こる多くの炎症性疾患に使用されている。一方、副作用も様々な反応が報告されている。

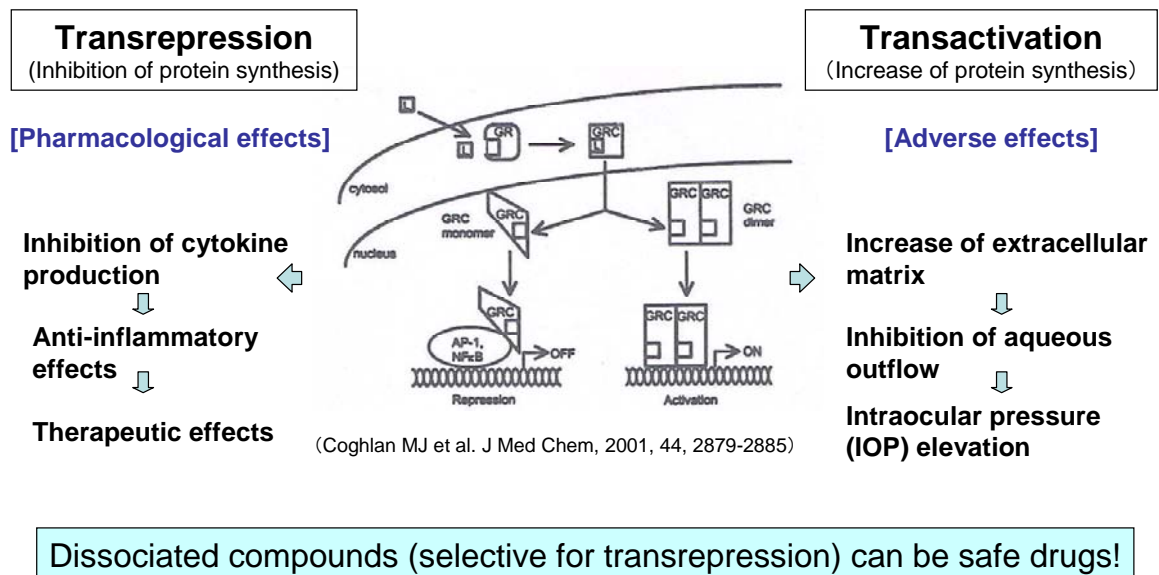


Figure.2 ステロイド薬の主な2つのメカニズム

ステロイドは様々なタンパク質の発現量を調節する。発現抑制作用は transrepression、発現亢進作用は transactivation と表現され、抗炎症などの薬理作用は主に transrepression 作用により発現し、副作用は主に transactivation 作用により発現すると考えられている。

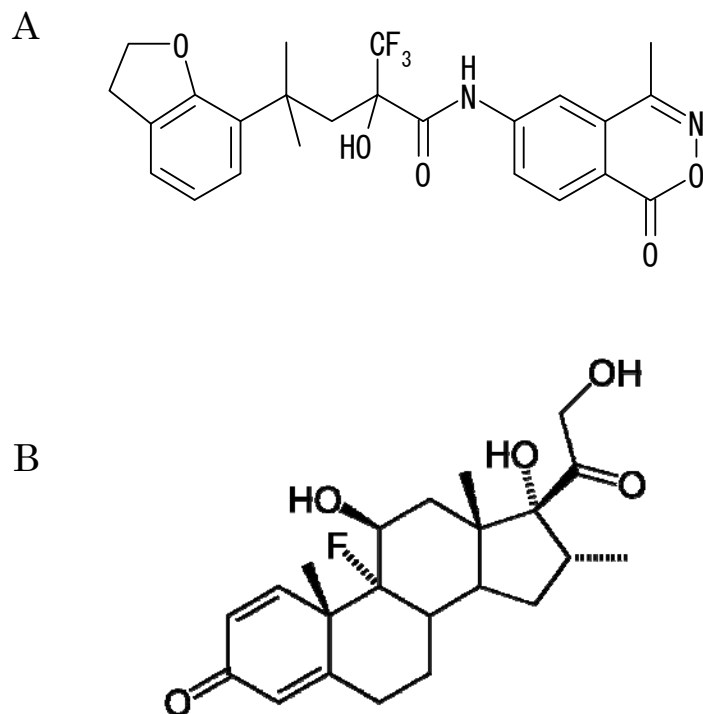


Figure 3. 化合物の構造式

- (A) ZK209614 の構造式 本化合物はステロイド骨格を保有していない。
- (B) デキサメタゾンの構造式 本化合物は古典的な合成ステロイド化合物であり、非常に強力なグルココルチコイド受容体結合活性と作用を示す。

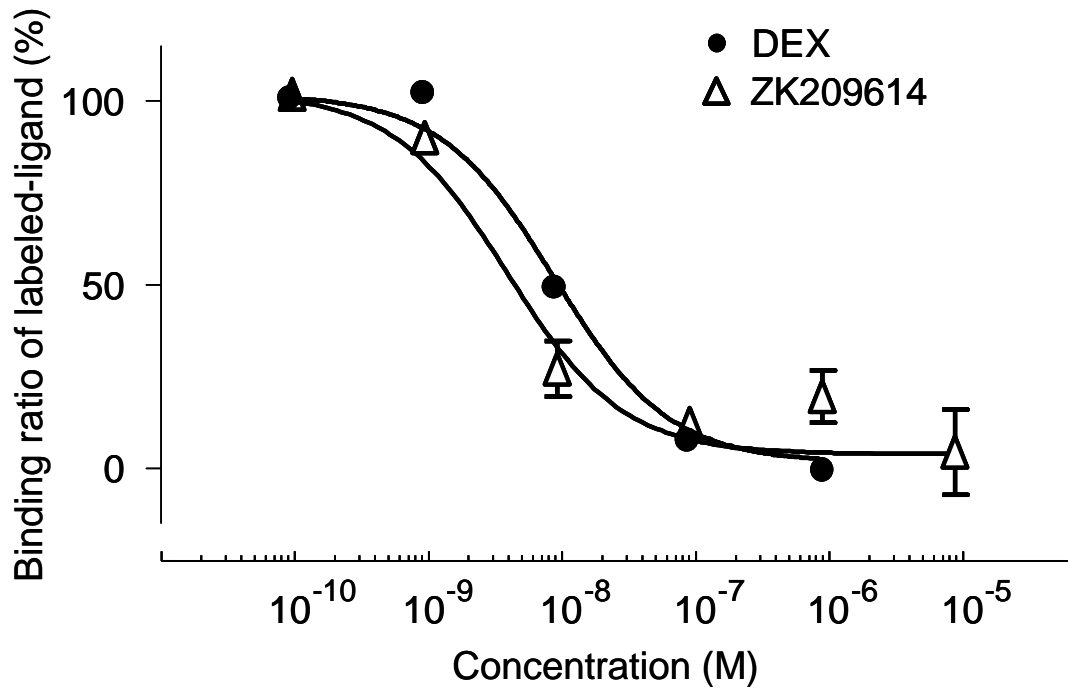


Figure 4 ZK209614 およびデキサメタゾンのグルコルチコイド受容体への結合活性

ヒト・リコンビナント・グルコルチコイド受容体を用いた競合アッセイ法により測定した。各ポイントは3回の試験の平均値±標準誤差で示した。各化合物の IC_{50} 値はZK209614が3.4 nM、デキサメタゾンが9.9 nMと算出された。

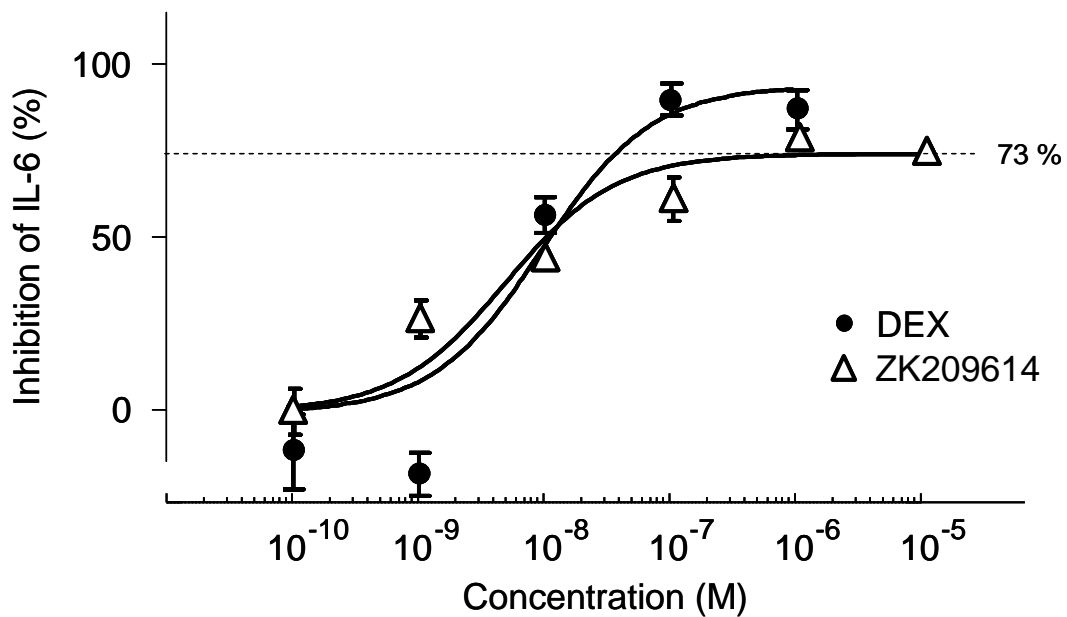


Figure 5 ZK209614 およびデキサメタゾンの HCE-T 細胞における IL-6 遊離抑制作用

HCE-T 細胞を LPS で刺激することで誘導される IL-6 遊離に対する各化合物の抑制作用を検討した。ZK209614[およびデキサメタゾンは濃度依存的に IL-6 遊離抑制作用を示した。ZK209614 は高濃度で一定の抑制効果でプラトーに達し、その最高活性はデキサメタゾンの 73%を示した。なお、各ポイントは 3 回の試験の平均値±標準誤差で示した。両化合物とも IC₅₀ 値は 14 nM と算出された。

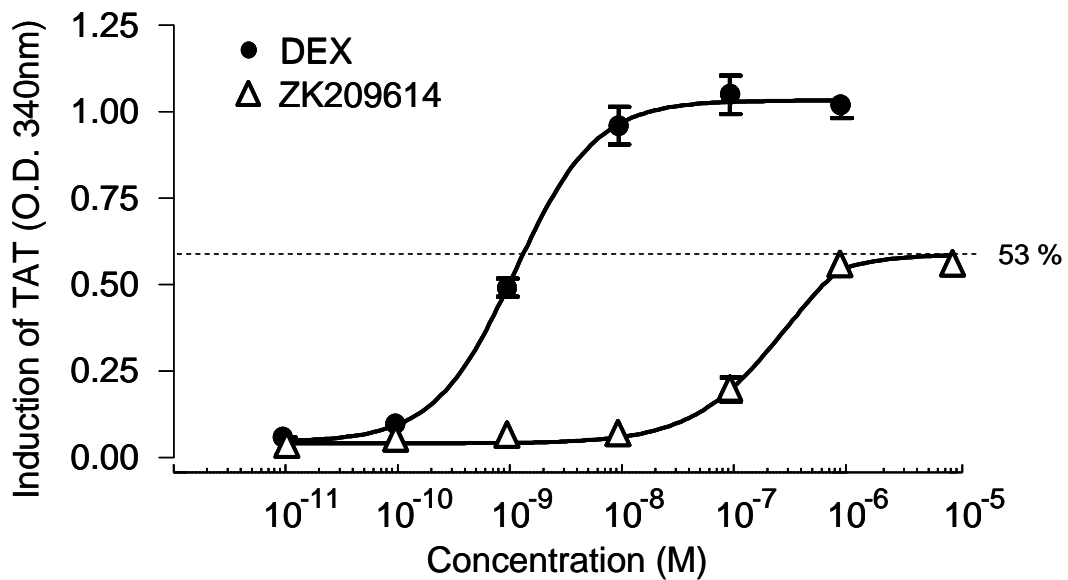


Figure 6 ZK209614 およびデキサメタゾンの H4-II-E-C3 細胞における TAT 産生亢進作用

TAT 産生亢進は各サンプルの TAT 活性を測定した際の 340 nm における吸光度を指標に評価した。ZK209614 の TAT 亢進作用は高濃度添加時のみ確認され、さらに一定の濃度以上でプラトーに達した。その最高活性はデキサメタゾンと比べ、53%しか認められなかった。なお、各ポイントは 3 回の試験の平均値±標準誤差で示した。ZK209614 の EC50 値は 320 nM、デキサメタゾンの EC50 値は 1.2 nM と算出された。

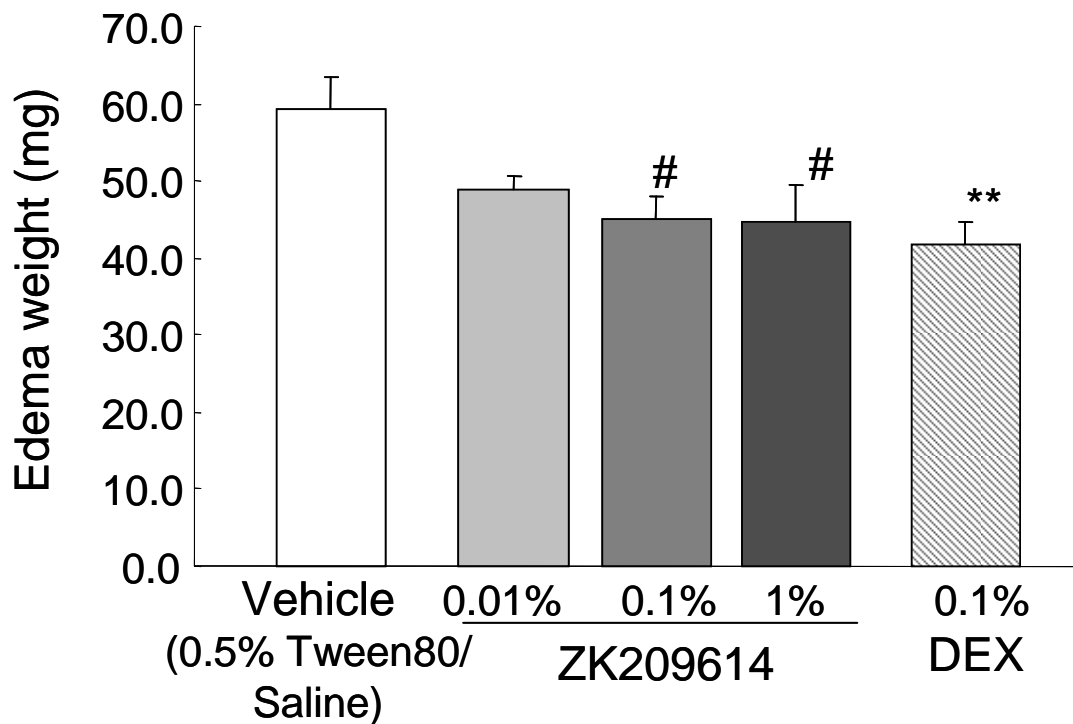


Figure 7 ラット・カラゲニン惹起結膜炎モデルに対する ZK209614 の効果
 異物による結膜の炎症モデルを用いて ZK209614 の抗炎症作用を検討した。投与はカラゲニン惹起の 1 時間前から 1 時間間隔で 5 回投与した。抗炎症作用の評価はカラゲニン惹起 4 時間後に結膜に形成された浮腫の重量を測定することにより評価した。なお、各値は 10 眼の平均値 ± 標準誤差で示した。
 #; P<0.05 vs vehicle (Dunnett の多重比較検定) **; P<0.01 vs vehicle (Student's の t test)

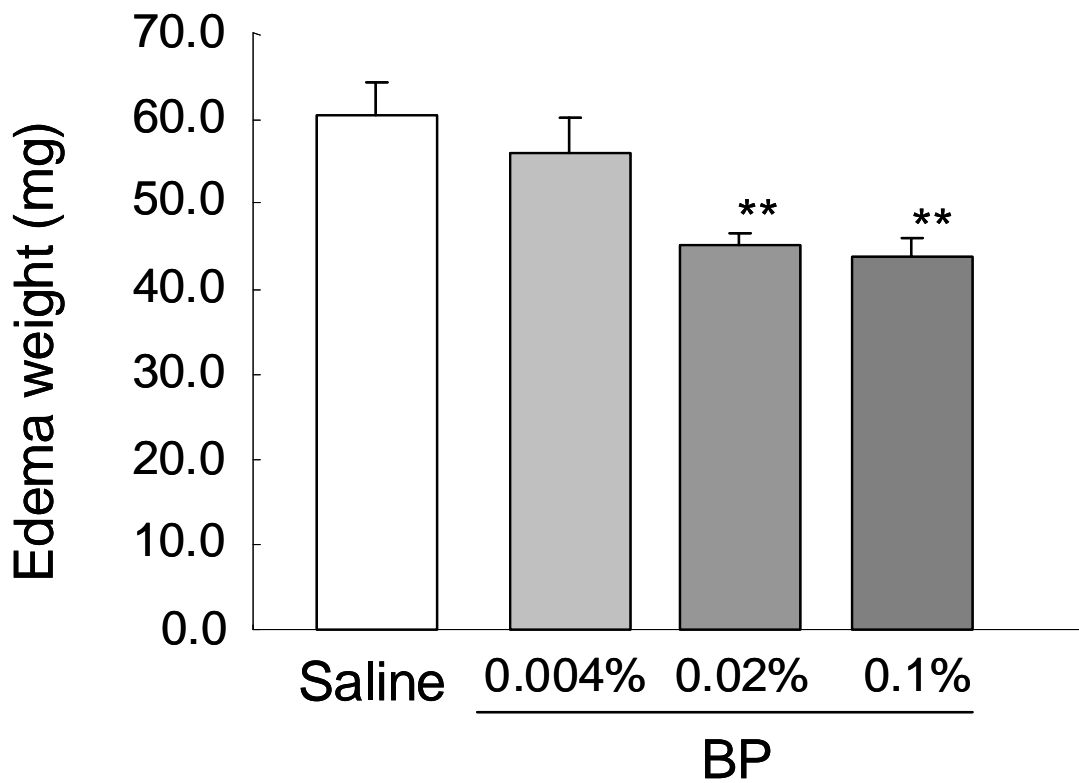


Figure 8 ラット・カラゲニン惹起結膜炎モデルに対するベタメタゾンフォスフェート (BP) の効果

異物による結膜の炎症モデルを用いて BP の抗炎症作用を検討した。投与はカラゲニン惹起の 1 時間前から 1 時間間隔で 5 回投与した。抗炎症作用の評価はカラゲニン惹起 4 時間後に結膜に形成された浮腫の重量を測定することにより評価した。なお、各値は 10 眼の平均値 ± 標準誤差で示した。**; $P < 0.01$ vs Saline (Dunnett の多重比較検定)

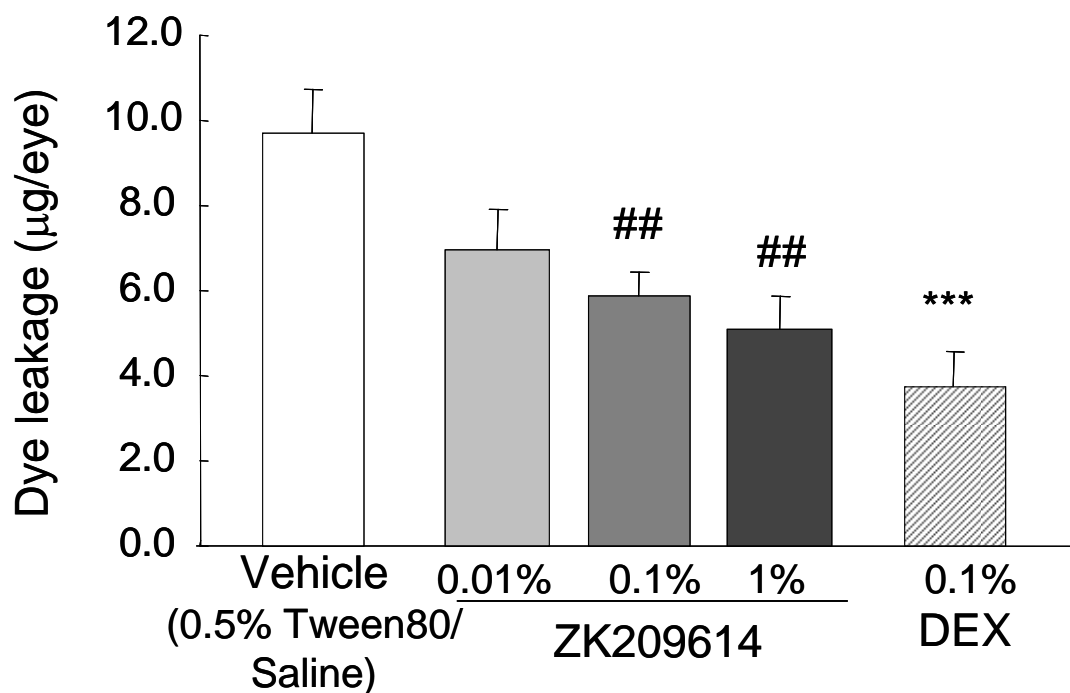


Figure 9 ラット・アレルギー性結膜炎モデルに対する ZK209614 の効果
ラットの 2 回惹起アレルギー性結膜炎モデルを用いて ZK209614 の抗アレルギー作用を検討した。投与は 2 回目の抗原惹起前、3 時間、1 時間、15 分前の 3 回、点眼により投与した。抗アレルギー作用の評価は 2 回目の抗原惹起 30 分後の結膜における血管透過性の亢進を血管からの色素漏出量を測定することにより評価した。なお、各値は 10 眼の平均値 ± 標準誤差で示した。##; P<0.01 vs vehicle (Dunnett の多重比較検定) ***; P<0.001 vs saline (Student の t test)

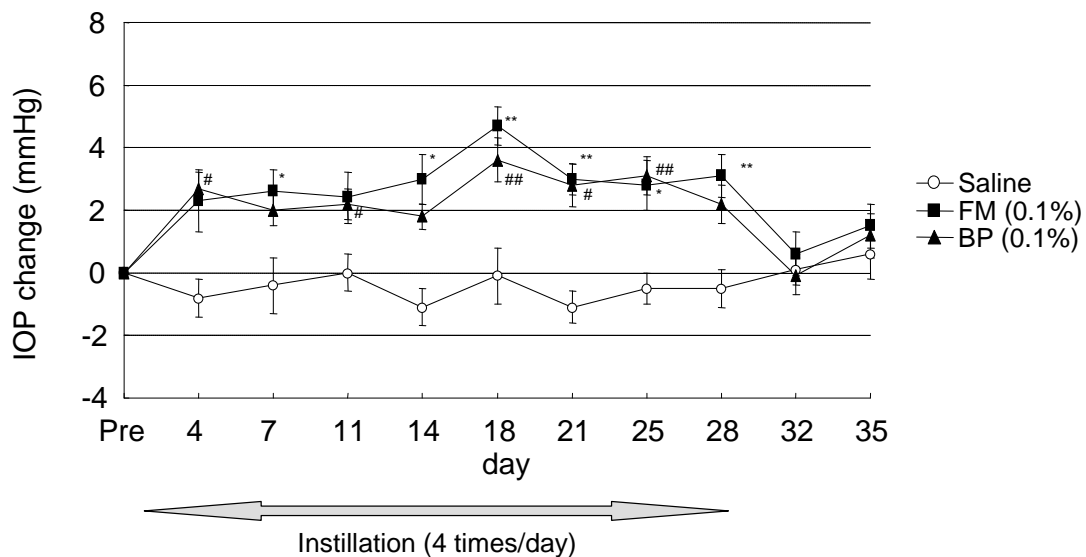


Figure 10 既存のステロイド点眼液のネコ眼圧への影響

現在市販されている 2 種類のステロイド点眼液を 1 日 4 回、28 日間点眼してネコの眼圧に変化が認められるか否かを検討した。眼圧測定はすべてのポイントで午後 2 時から 5 時の間に測定した。FM: 0.1% フルオロメトロン点眼液 BP: 0.1% ベタメタゾン点眼液 なお、各値は 20 眼の平均値 ± 標準誤差で示した。FM: * ; P<0.05, ** ; P<0.01 vs pre IOP (Student の t-test) BP: # ; P< 0.05, ## ; P<0.01 vs pre IOP (Student の t-test)

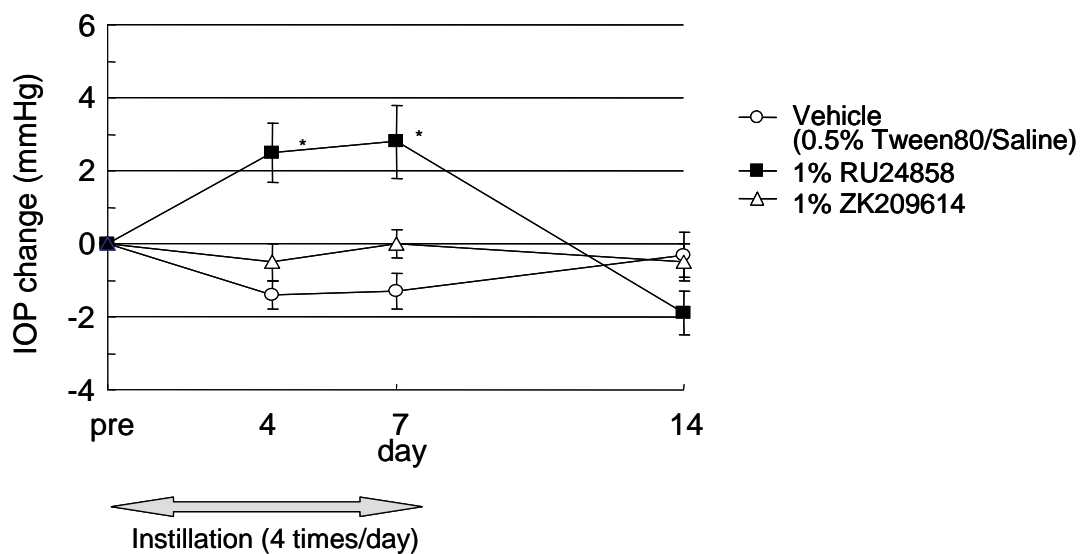


Figure 11 ネコ眼圧への ZK209614 および RU24858 の点眼投与による影響
 ZK209614 (1%) および RU24858 (1%) 点眼液を 1 日 4 回、7 日間点眼してネコの眼圧に変化が認められるか否かを検討した。眼圧測定はすべてのポイントで午後 2 時から 5 時の間に測定した。なお、各値は 20 眼の平均値 ± 標準誤差で示した。* ; $P < 0.05$ vs pre IOP (Student の t-test)

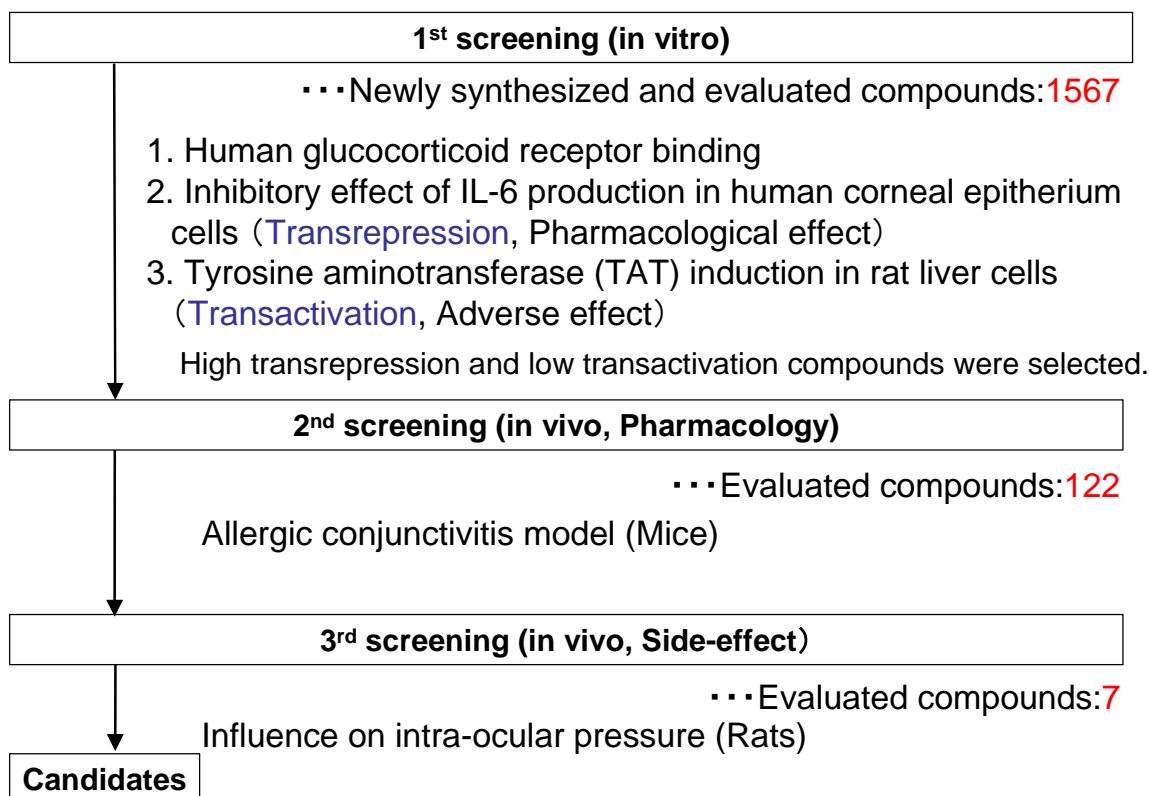
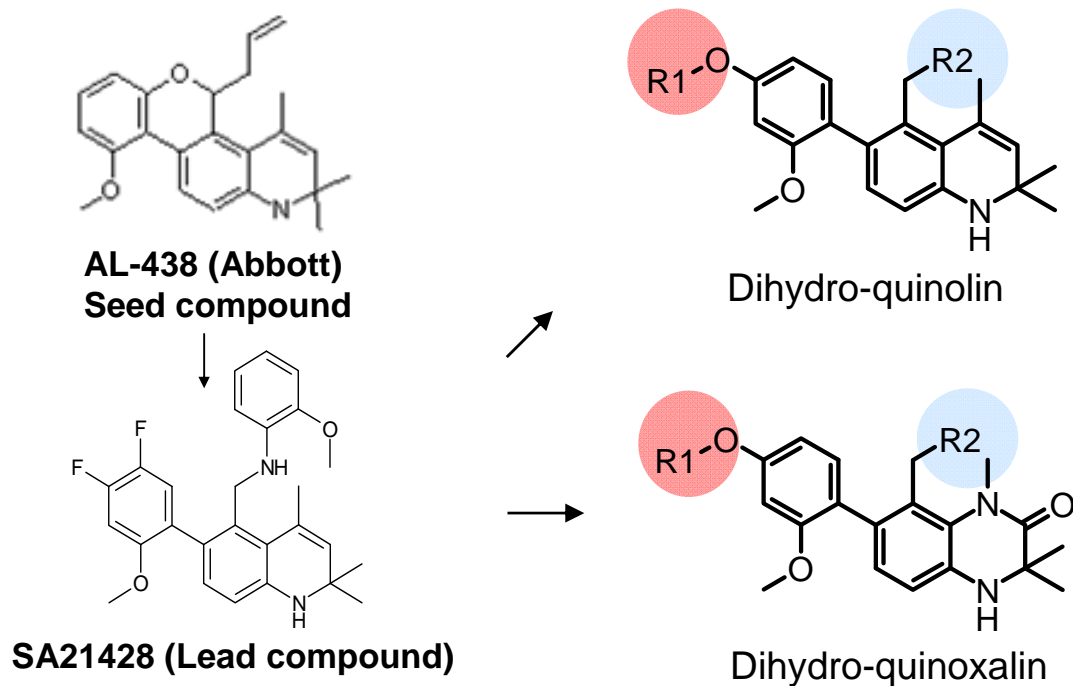


Figure 12 新規化合物評価のスクリーニングフローおよび評価化合物数
 新規の SEGRA 化合物を探索するために実施したスクリーニングのフローを示した。1次スクリーニングとして、3つの in vitro 評価を実施し、2次スクリーニングとして、in vivo の薬効（抗アレルギー作用）を評価し、3次スクリーニングとして、in vivo の副作用（眼圧への影響）を評価した。



R1 Ester-bond, carbamate-bond, sulfonate-bond, amide-bond, etc

R2 Ether, phenyl-amino, thiophene-carbonyl-oxy-type, etc

Figure 13 新規 SEGRA 探索のための合成展開

AL-438 をシード化合物として、置換基を変換していくことにより、種々の化合物を合成し、評価した。なお、合成の方向性は 1 次スクリーニング結果を参照しながら、合成担当者と協議を繰り返して合意しながら、新規化合物の合成とスクリーニングを繰り返し実施した。その基本骨格となったものを示した。

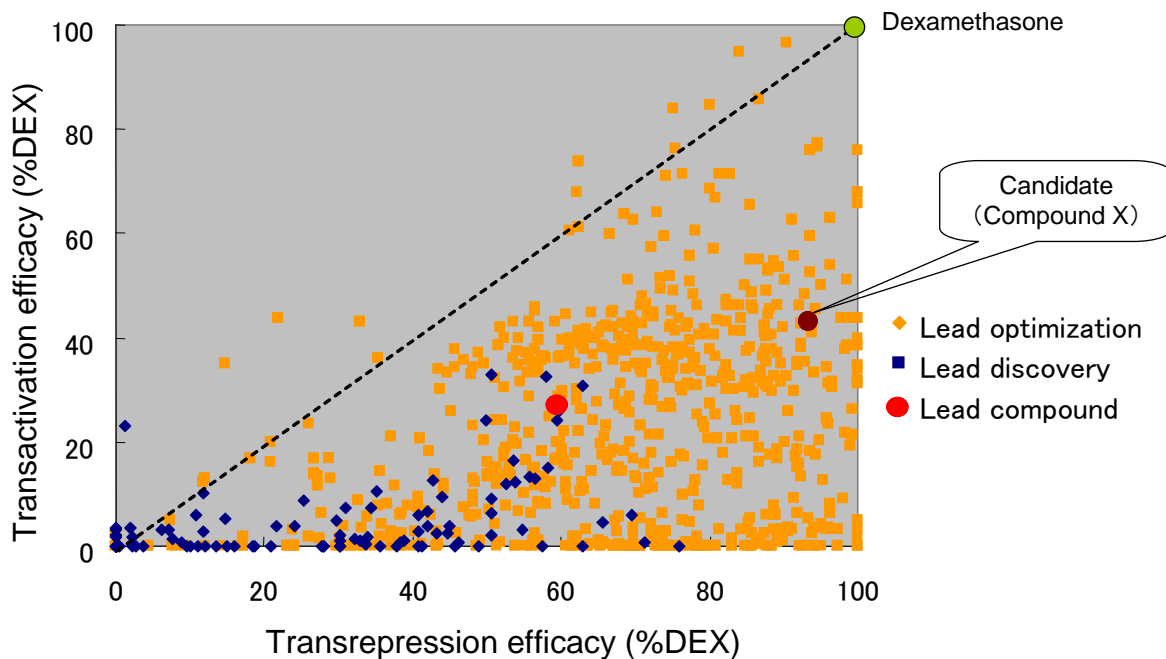


Figure 14 新規合成化合物の transrepression および transactivation プロファイル

新規合成して *in vitro* 評価した化合物のプロファイルを 2 次元グラフへプロットした。X 軸には transrepression 作用、Y 軸には transactivation 作用の最高活性をプロットした。新規化合物探索を開始して初期（リード探索期）に合成された化合物を青色のドットで、リード化合物は赤色の丸で、後期（リード最適化期）に合成された化合物を黄色のドットで表した。候補として選択した化合物を X とし、茶色の丸で示した。

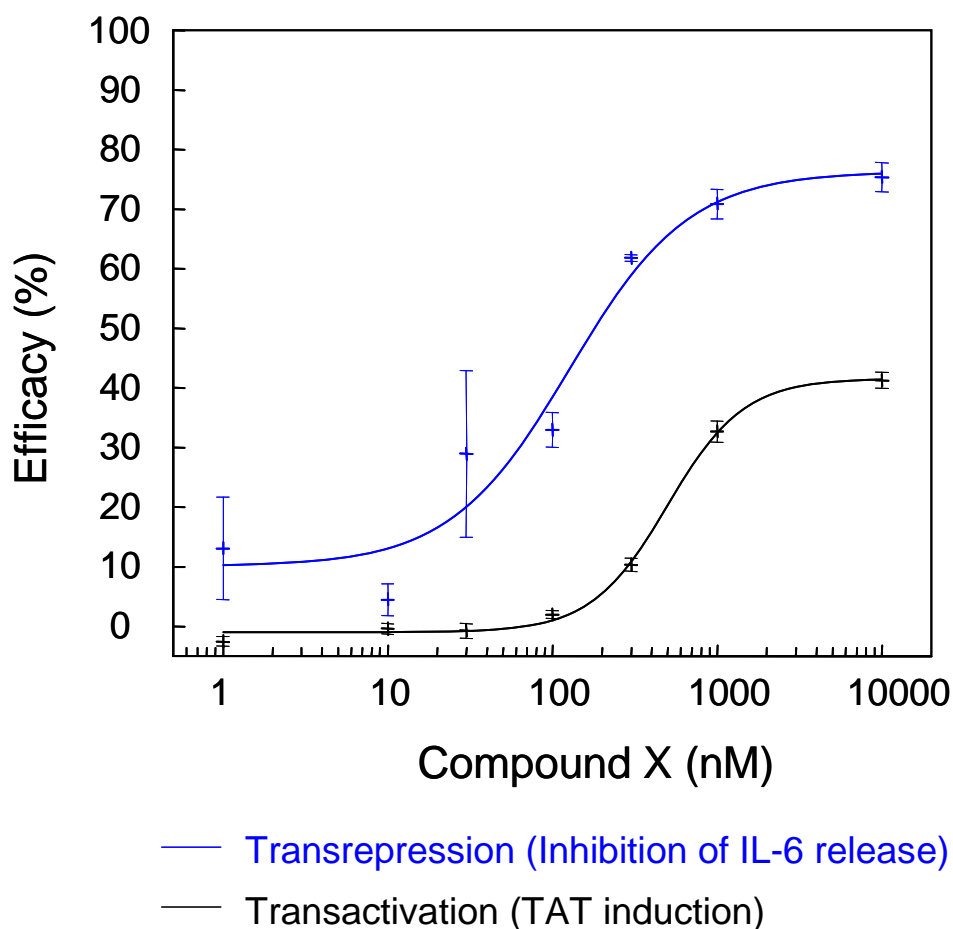
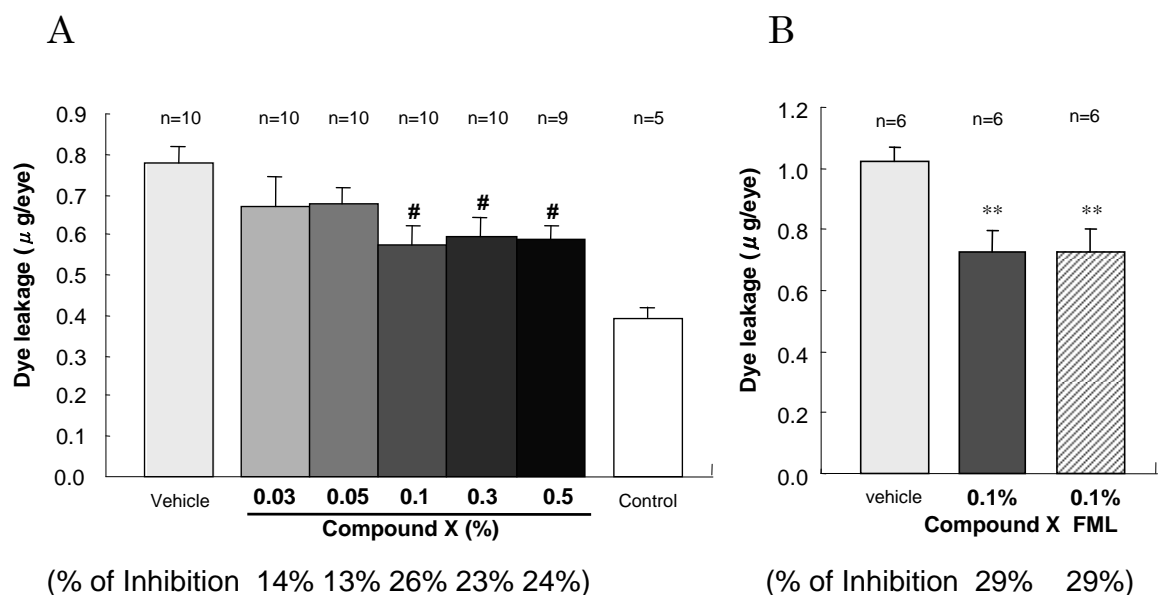


Figure 15 化合物 X の *in vitro* 評価系での用量反応

化合物 X の transrepression 評価系における作用を青線で、transactivation 作用を黒線でプロットした。化合物 X はどちらの評価系においても、濃度依存的に活性を示したが、transactivation 作用を発揮するためには高濃度必要であり、さらに 10^{-5} M でもデキサメタゾンの 40%程度しか作用が認められなかった。この結果から、化合物 X は *in vitro* 評価系において、transrepression 選択的であることが証明された。なお、各ポイントは 3 回の試験の平均値 \pm 標準誤差で示した。



FML=Fluorometholone

Figure 16 化合物 X のマウス・アレルギー性結膜炎抑制作用

(A) 化合物 X の点眼投与によるマウス・アレルギー性結膜炎モデルに対する効果（用量反応性） 0.03%～0.5%までの化合物 X の効果を検討した。投与は最終惹起の4時間前に1回点眼投与した。抗アレルギー作用の評価は抗原惹起30分後の結膜における血管透過性の亢進を血管からの色素漏出量を測定することにより評価した。なお、各値は5～10眼の平均値 ± 標準誤差で示した。#; $P < 0.05$ vs vehicle (Dunnettの多重比較検定)

(B) 0.1%の化合物 X と 0.1% フルオロメトロン点眼液のマウス・アレルギー性結膜炎モデルに対する効果 投与は最終惹起の4時間前に1回点眼投与した。抗アレルギー作用の評価は抗原惹起30分後の結膜における血管透過性の亢進を血管からの色素漏出量を測定することにより評価した。なお、各値は6眼の平均値 ± 標準誤差で示した。**; $P < 0.01$ vs vehicle (Studentのt test)

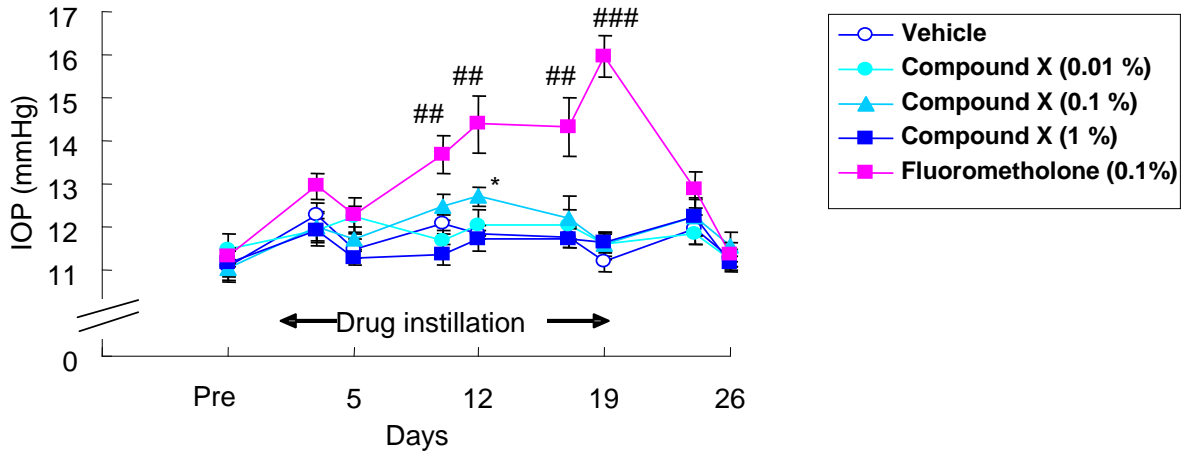


Figure 17 化合物 X のラット眼圧への影響

0.01%から1%の化合物 X 点眼液を1日4回、3週間、1週間に5日間点眼してラットの眼圧に変化が認められるか否かを検討した。眼圧測定はすべてのポイントで午後2時から5時の間に測定した。なお、各値は12眼の平均値 ± 標準誤差で示した。*; P<0.05 vs pre IOP (Student の t-test) ##; P<0.01 vs pre IOP、###; P<0.001 vs pre IOP (Student の t-test)

	GR binding (Efficacy@10⁻⁵M)	Transrepression (Efficacy@10⁻⁵M)	Transactivation (Efficacy@10⁻⁵M)
DEX	100 %	100 %	100 %
Compound X	100 %	79.1 %	27.7 %

	Allergic conjunctivitis (Anti-allergic effect)	IOP elevation (Side-effect)
FML (steroid)	29 % inhibition	3-4 mmHg elevated
Compound X	29 % inhibition	No effect

Figure 18 化合物 X とデキサメタゾンの *in vitro* 評価系での比較ならびに化合物 X とフルオロメトロンの *in vivo* 評価系での比較

新規 SEGRA 化合物 X の *in vitro* 評価と *in vivo* 評価結果を既存のステロイドであるデキサメタゾンやフルメトロンと比較した。化合物 X は *in vitro* 評価系および *in vivo* の動物モデルにおいて、明らかに既存のステロイドと違い、副作用を乖離した新規の抗炎症・抗アレルギー点眼薬になり得ると考えられた。

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始ご懇切なご指導、ご鞭撻を賜りました奈良先端科学技術大学院大学、河野憲二教授に謹んで感謝いたします。

また、本研究の機会を与えてくださいました参天製薬株式会社、黒川 明社長、西畑利明研究開発本部長、笹野 稔リウマチ研究開発センター長ならびに中村雅胤眼科研究開発センター長に心より深謝致します。

さらに本研究を遂行するにあたり、ご助言、ご協力をいただきました参天製薬株式会社の諸氏に深く感謝致します。

参考文献

Belvisi, M.G., Wicks, S.L., Battram, C.H. Bottoms, S.E.W., Redford, J.E., Woodman, P., Brown, T.J., Webber, S.E., Foster, M.L. Therapeutic benefit of a dissociated glucocorticoid and the relevance of in vitro separation of transrepression from transactivation activity. *J Immunol.* 166:1975-1982, 2001.

Berlin, M. Recent advances in the development of novel glucocorticoid receptor modulators. *Expert Opin Ther Pat.* 20:855-873, 2010.

Bhattacharjee, P., Paterson, C.A., Spellman, J.M, Graff, G., Yanni, J.M. Pharmacological validation of a feline model of steroid-induced ocular hypertension. *Arch Ophthalmol.* 117:361-364, 1999.

Cato, A.C., Wade, E. Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Bioessays.* 18:371-378, 1996.

Coghlan, M.J., Kym, P.R., Elmore, S.W., Wang, A.X., Luly, J.R., Wilcox, D., Stashko, M., Lin, C.W., Miner, J., Tyree, C., Nakane, M., Jacobson, P., Lane, B.C. Synthesis and characterization of non-steroidal ligands for the glucocorticoid receptor: selective quinoline derivatives with prednisolone-equivalent functional activity. *J Med Chem.* 44: 2879-2885,

2001.

Davies, B.H., Mullins, J. Topical levocabastine is more effective than sodium cromoglycate for the prophylaxis and treatment of seasonal allergic conjunctivitis. *Allergy* 48:519-524, 1993.

Evans, R.M. Molecular characterization of the glucocorticoid receptor. *Recent Prog Horm Res.* 45:1-27, 1989

Hench, PS., Kendall, EC., Slocumb, CH., Polley, HF. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 24:181, 1949.

James, E.R. The etiology of steroid cataract. *J Ocul Pharmacol Ther.* 23:403-420, 2007

Kato, M., Oda, T., Fukano, Y., Mori, T., Horibe, Y., Shii, D., Kawazu, K., Nakamura, M. Metabolism of Fluorometholone in Human Corneal Epithelial Cell Line and the Steroidal Activity of the Metabolites *Atarashiigannka* 2006 23: 391-395, 2006

Kersey, J.P., Broadway, D.C. Corticosteroid-induced glaucoma: a review

of the literature. *Eye* 20:407-416, 2006.

López, F.J., Ardecky, R.J., Bebo, B. Benbatoul, K., Grandpre, L.D., Liu, S., Leibowitz, M.D., Marchke, K., Rosen, J., Rungta, D., Viveros, H.O., Yen, W.C., Vilar, A.N., Miner, J.N. LGD-5552, an antiinflammatory glucocorticoid receptor ligand with reduced side effects, in vivo. *Endocrinology*. 149:2080-2089, 2008.

Maibach, H.I., Wester, R.C. Issues in measuring percutaneous absorption of topical corticosteroids. *Int J Dermatol*. 31 (Suppl. 1) :21-25, 1992.

McDonough, A.K., Curtis, J.R., Saag, K.G. The epidemiology of glucocorticoid-associated adverse events. *Curr Opin Rheumatol*. 20:131-137, 2008.

Mindel, J.S., Tavitian, H.O., Smith, H. Jr., Walker, E.C. Comparative ocular pressure elevation by medrysone, fluorometholone, and dexamethasone phosphate. *Arch Ophthalmol*. 98:1577-1578, 1980.

Netland, P.A., Leahy, C., Krenzer, K.L. Emedastine ophthalmic solution 0.05% versus levocabastine ophthalmic suspension 0.05% in the treatment of allergic conjunctivitis using the conjunctival allergen challenge model. *Am. J. Ophthalmol*. 130:717-723, 2000.

Reichardt, H.M., Tuckermann, J.P., Göttlicher, M., Vujic, M., Weih, F., Angel, P., Herrlich, P., Schütz, G. Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor *EMBO J.* 20:7168-7173, 2001.

Renfro, L., Snow, J.S. Ocular effects of topical and systemic steroids. *Dermatol Clin.* 10:505-512, 1992.

Rozsa, F.W., Reed, D.M., Scott, K.M., Pawar, H., Moroi, S.E., Kijec, T.G., Krafchak, C.M., Othman, M.I., Vollrath, D., Elner, V.M., Richards, J.E. Gene expression profile of human trabecular meshwork cells in response to long-term dexamethasone exposure. *Mol Vis.* 12:125-141, 2006.

Schäcke, H., Döcke, W.D., Asadulah, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther.* 96:23-43, 2002.

Schäcke H, Rehwinkel H. Dissociated glucocorticoid receptor ligands. *Curr Opin Investig Drugs.* 5:524-528, 2004.

Schäcke, H., Schottelius, A., Döcke, W.D., Strehlke, P., Jaroch, S., Schmees, N., Rehwinkel, H., Hennekes, H., Asadullah, K. Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid

receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:227-232, 2004.

Schäcke, H., Zollner, T.M., Döcke, W.D., Rehwinkel, H., Jaroch, S., Skuballa, W., Neuhaus, R., May, E., Zügel, U, Asadullah, K.
Characterization of ZK 245186, a novel, selective glucocorticoid receptor agonist for the topical treatment of inflammatory skin diseases. *Br J Pharmacol*. 158:1088-1103, 2009.

Spaeth, G.L., Rodrigues, M.M., Weinreb, S. Steroid-induced glaucoma: A. Persistent elevation of interocular pressure. B. Histopathological aspects. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 75:353-381, 1977.

Tamm ER : Myocilin and glaucoma: facts and ideas. *Prog Retin Eye Res* 21 : 395-428, 2002

Ticho, U., Lahav, M., Berkowitz, S., Yoffe, P. Ocular changes in rabbits with corticosteroid-induced ocular hypertension. *Br J Ophthalmol*. 63:646-650, 1979.

Vayssière, B.M., Dupont, S., Choquart, A., Petit, F., Garcia, T., Marchandeu, C., Gronemeyer, H., Rigon, M.R. Synthetic glucocorticoids

that dissociate transactivation and AP-1 transrepression exhibit anti-inflammatory activity in vivo. *Mol Endocrinol.* 11:1245-1255, 1997.

Wordinger, R.J., Clark, A.F. Effects of glucocorticoids on the trabecular meshwork: Towards a better understanding of glaucoma. *Prog Retina Eye Res.* 18:629-667, 1999.

Wüst, S., Tischner, D., John, M. Tuckermann, J.P., Menzfeld, C., Hanisch, U.K., Brandt, J., Lühder, F., Reichardt, H.M. Therapeutic and adverse effects of a non-steroidal glucocorticoid receptor ligand in a mouse model of multiple sclerosis. *PLoS ONE.* 4:e8202, 2009.

Zhan, G.L., Miranda, O.C., Bito, L.Z. Steroid glaucoma: corticosteroid-induced ocular hypertension in cats. *Exp Eye Res.* 54:211-218, 1992.