



Title	アレルギー性鼻炎治療薬ラマトロバンの新たな作用機序の解明
Author(s)	杉本, 洋美
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47258
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	すぎもと ひろみ 杉 本 洋 美
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 2 0 7 3 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 11 月 27 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	アレルギー性鼻炎治療薬ラマトロバンの新たな作用機序の解明
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 土 井 健 史 (副査) 教 授 八 木 清 仁 教 授 馬 場 明 道 教 授 松 田 敏 夫

論 文 内 容 の 要 旨

ラマトロバンは、アレルギー性鼻炎に効果を示すトロンボキサン A_2 (Tx A_2) 受容体 (TP) 拮抗薬として開発され、2000 年 5 月にバイナス錠として上市された。ラマトロバンは、TP 拮抗作用により鼻上毛細血管の透過性亢進を抑制し即時相の鼻閉に効果を示すほか、RANTES の産生抑制および細胞接着分子の発現抑制により好酸球の浸潤を間接的に抑制し、遅発相の鼻閉にも効果を示すと考えられている。しかしながら、好酸球上には機能的な TP の発現が確認されていないことから、ラマトロバンの好酸球浸潤抑制に対する作用機序の解明が待たれていた。ラマトロバンのこの好酸球に対する作用機序を検討していた際、Th1 細胞および Th2 細胞の発現比較検討により Th2 細胞特異的に発現している新たな受容体として Chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells (CRTH2) が同定された。CRTH2 は Th2 細胞、好酸球、好塩基球に選択的に発現する受容体として注目を集めたが、その後リガンドが PDG $_2$ であり発現細胞の遊走および好酸球の脱顆粒を促すことが明らかになった。さらに、近年シクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害薬であるインドメタシンおよびペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR γ) のアゴニストである 15d-PGJ $_2$ が CRTH2 に結合し、好酸球の遊走および脱顆粒を誘導することが報告された。

CRTH2 のアレルギー性炎症への関与が示唆される中、CRTH2 拮抗薬のアレルギー性炎症に対する抑制効果を期待し、CRTH2 拮抗薬の探索を開始した。その結果、CRTH2 拮抗作用を有する化合物として見出されたのが、これまで TP 拮抗薬として市販されていたアレルギー性鼻炎治療薬のラマトロバンであった。

本研究では、これまで TP 拮抗薬として知られてきたラマトロバンの CRTH2 に対する作用を CRTH2 安定発現細胞およびヒト好酸球を用いて検討した。次に、CRTH2 の生体内機能をラット *in vivo* モデルを用いて解析するため、ラット CRTH2 cDNA をクローニングし、その組織発現パターンおよび薬理学的性質を明らかにした。最後に、*in vivo* における CRTH2 の役割、とくに白血球の遊走活性に関する役割およびこれらの機能に対するラマトロバンの作用について検討した。

まず、CRTH2 安定発現細胞を用いて、 ^3H 標識 PGD $_2$ が CRTH2 安定発現細胞に高親和性で結合し ($K_d=6.3 \text{ nM}$)、本実験系において、ラマトロバンが ^3H 標識 PGD $_2$ の CRTH2 に対する結合を濃度依存的に阻害することを示した ($\text{IC}_{50}=100 \text{ nM}$)。本実験により、これまで TP 選択的拮抗薬として考えられていたラマトロバンが CRTH2 結合作用を有することを明らかにした。次に、 ^3H 標識ラマトロバンが CRTH2 安定発現細胞に特異的に結合し、 K_d 値は 7.2 nM であることを示した。 ^3H 標識ラマトロバンは、ヒト血小板上の TP に対して K_d 値 8.7 nM で結合することが文献にて報告されている。本実験により、ラマトロバンは CRTH2 および TP に同様の親和性をもって結合することを

明らかにした。また、CRTH2 安定発現細胞を用いたカルシウム流入実験により、ラマトロバンが PGD₂ によるカルシウム流入を濃度依存的に抑制し (IC₅₀ 値 30 nM) pA₂ 値は 8.5 であることを示した。本実験により、ラマトロバンが CRTH2 および TP (pA₂ 値 8.9) に同様の阻害活性を示し、その阻害様式は競合阻害であることを示した。さらに、ヒト好酸球を用いた検討で、ラマトロバンが PGD₂ によるヒト好酸球の遊走を CRTH2 拮抗作用により濃度依存的に抑制することを示し (IC₅₀ 値 170 nM)、ラマトロバンが CRTH2 拮抗作用により直接好酸球の浸潤を抑制している新たな作用機序を示唆した。

また、CRTH2 安定発現細胞を用いたカルシウム流入実験において、ラマトロバンがインドメタシンおよび 15d-PGJ₂ によるカルシウム流入を完全に阻害することを示し、pA₂ 値はそれぞれ 8.6 および 8.5 であることを示した。本実験結果により、インドメタシンおよび 15d-PGJ₂ が CRTH2 上でラマトロバンと結合部位を共有していることを示唆した。もともと DP、COX そして PPAR γ といった 3 種の異なるタンパク質と相互作用する分子として同定され、異なる生理活性を有する PGD₂、インドメタシンそして 15d-PGJ₂ が CRTH2 上で TP 拮抗作用を有するラマトロバンと結合部位を共有することは非常に興味深い。

次に、CRTH2 の生体内機能をラット *in vivo* モデルを用いて解析するため、ラット CRTH2 cDNA をクローニングし、その組織発現パターンおよび薬理的性質を明らかにした。ラット CRTH2 cDNA はマウスおよびヒト CRTH2 cDNA と比較したところ、アミノ酸レベルでそれぞれ 89% および 75% と高い相同性を示した。ラット CRTH2 mRNA の組織分布を調べたところ、肺、脳、卵巣および脾臓に強い発現を示し、マウス CRTH2 mRNA の組織発現パターンと類似していた。また、*in vitro* 試験系でラット CRTH2 がリガンド結合、リガンド選択性、G タンパク質共役、セカンドメッセンジャー、細胞遊走活性においてほぼ同様の薬理的性質を示すことを明らかにし、CRTH2 がこれらの種において同様の役割を担っていることを示唆した。

最後に、*in vivo* における CRTH2 の役割、とくに白血球の遊走活性に関する役割およびこれらの機能に対するラマトロバンの作用について検討した。CRTH2 選択的アンタゴニストの DK-PGD₂ (300 μ g/rat) または vehicle をラット尾静脈に投与し、末梢血および骨髄中リンパ球、好酸球および好中球数を測定した。その結果、DK-PGD₂ 投与群では vehicle 投与群と比較して DK-PGD₂ 投与後 30 分または 60 分をピークとして末梢血中リンパ球、好酸球および好中球数の増加が認められ、骨髄中リンパ球、好酸球および好中球数の減少が認められた。本実験におけるラマトロバンの効果を検討した結果、DK-PGD₂ 誘導末梢血中総白血球および好酸球数の増加はラマトロバン処置群において用量依存的かつ有意に抑制された。以上の結果から、ラット CRTH2 は骨髄から末梢への白血球動員に関与し、ラマトロバンは骨髄から末梢への白血球動員特に好酸球の遊走を抑制することが示唆された。

本研究結果から、これまで TP 選択的拮抗薬として市販されていたラマトロバンが CRTH2 拮抗作用を有し、*in vitro* のみならず *in vivo* においても CRTH2 拮抗作用により好酸球の PGD₂ に対する遊走活性を抑制することが示唆された。つまり、ラマトロバンの好酸球浸潤抑制に対する作用機序として、これまで考えられていた TP 拮抗作用による間接的な抑制に加え、CRTH2 拮抗作用により直接好酸球の遊走を抑制している新たな作用機序が考えられた。ラマトロバンは TP 拮抗作用と CRTH2 拮抗作用を有し、これら 2 種類の受容体拮抗作用により鼻閉の即時相および遅発相ともに抑制効果を発揮することが推察される。CRTH2 は好酸球の他にも Th2 細胞および好塩基球にも発現していることから、ラマトロバンは好酸球、Th2 細胞および好塩基球の関与するアレルギー反応をはじめとし、各種疾患に対するさらなる治療効果が期待される。

論文審査の結果の要旨

杉本さんは、本論文において、アレルギー性鼻炎治療薬として市販されているラマトロバン（トロンボキサン A2 受容体拮抗薬）について種々の実験を行い、新たな作用機序を明らかにした。

杉本さんは、ラマトロバンがトロンボキサン A₂ 受容体に対する結合活性に加え、Chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells (CRTH2) に対しても結合活性を有し、その親和性は両者において同等であり、結合阻害様式については競合的阻害であることを示した。また、ラマトロバンがヒト好酸球のプロスタグ

ランジン D2 に対する遊走活性を濃度依存的に抑制することを示し、ラマトロバンがその CRTH2 拮抗作用により好酸球の浸潤を直接抑制していることを明らかにした。これらの結果より、ラマトロバンはトロンボキサン A2 受容体および CRTH2 の 2 種類の受容体拮抗作用により、鼻閉の即時相および遅発相における抑制効果を発揮できることが推測された。

さらにラットを用いて行った実験より、ラマトロバンは、CRTH2 が関与する骨髄から末梢への白血球（特に好酸球）の遊走を抑制することを示し、CRTH2 の炎症局所への遊走作用に加え、アレルギー反応時の好酸球遊走に深く関与していることが確認された。これにより、ラマトロバンは CRTH2 が関与する様々な疾患の治療に寄与する可能性が示され、さらに CRTH2 の機能を解析する上で非常に有用なツールとなり得ることが判明した。

以上の結果は、博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。