



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	げっ歯類炎症モデルにおける選択的プロスタグランジンE2 産生阻害剤の薬理作用に関する研究
Author(s)	杉田, 竜介
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	乙第7053号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r7053
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70006
Type	doctoral thesis
File Information	Ryusuke_Sugita.pdf



げっ歯類炎症モデルにおける選択的プロスタグランジン E₂ 産生阻害剤の
薬理作用に関する研究

杉 田 竜 介

2018 年 3 月

目次

第 1 章 緒論.....	1
第 2 章 選択的プロスタグランジン E ₂ 産生阻害剤の合成.....	6
2-1 緒言.....	6
2-2 方法.....	7
2-3 ベンゾチアゾール誘導体 BT4c の獲得.....	9
2-4 ベンゾチアゾール骨格からキノリン骨格への変遷および Q4e、Q4b の獲得	11
2-5 各誘導体の合成法	13
第 3 章 選択的プロスタグランジン E ₂ 産生阻害剤がモルモット発熱モデル、関節炎モデル および炎症性疼痛モデルに及ぼす影響の解析	16
3-1 緒言.....	16
3-2 材料および方法.....	17
3-3 結果.....	22
3-4 考察.....	25
第 4 章 選択的プロスタグランジン E ₂ 産生阻害剤がラット発熱モデルおよび関節炎モデル に及ぼす影響の解析.....	37
4-1 緒言.....	37
4-2 材料および方法.....	38
4-3 結果.....	42
4-4 考察.....	44

第5章 選択的プロスタグランジン E ₂ 産生阻害剤を用いた、ラット炎症性疼痛モデルにおけるプロスタグランジン E ₂ およびプロスタグランジン I ₂ シグナルの寄与の解析.	55
5-1 緒言.....	55
5-2 材料および方法.....	56
5-3 結果.....	59
5-4 考察.....	62
第6章 総括	73
化学の部：一般手順、材料および実験項.....	76
引用文献	100
謝辞	108

略語一覽

COX	cyclooxygenase
cPGES	cytosolic prostaglandin E synthase
CSF	cerebrospinal fluid
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
EIA	enzyme immunoassay
EP	prostaglandin E ₂ receptor
FBS	fetal bovine serum
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
ID ₅₀	50% inhibitory dose
IL	interleukin
IP	prostaglandin I ₂ receptor
6-keto PGF _{1α}	6-keto prostaglandin F _{1α}
mPGES-1	microsomal prostaglandin E synthase-1
mPGES-2	microsomal prostaglandin E synthase-2
LPS	lipopolysaccharide
NSAIDs	nonsteroidal anti-inflammatory drugs
PBS	phosphate-buffered saline
PG	prostaglandin
PGDS	prostaglandin D synthase
PGES	prostaglandin E synthase
PGIS	prostaglandin I synthase

PWL	paw withdrawal latency
TX	thromboxane
TXAS	thromboxane A synthase
UD ₅₀	50% ulceration dose

第1章 緒論

“炎症”は外傷や病気に対する重要な生体防御反応である。炎症では“発赤”、“発熱”、“腫脹”、“疼痛”を特徴とする徴候が生じるが（ケルスの 4 徴候）、これらの反応は傷害部位の修復を目的として起こる。炎症は崩壊した細胞や血小板から分泌されるヒスタミン、プロスタグランジン（prostaglandin, PG）などの種々の化学伝達物質によって誘導される。放出された化学伝達物質は血管に作用して血管透過性を亢進させ、それにより血漿成分の滲出が容易となり、傷害局所への炎症細胞の浸潤を促す。また、ロイコトリエンなどは好中球の遊走を促進する。傷害局所に集積した好中球は貪食によって病原体あるいは壊死組織を除去するとともにサイトカインやタンパク質分解酵素を産生し、さらに炎症を増強させる。組織の傷害が一段落するとマクロファージが遊走され、残った壊死組織などを除去する。こうした一連の反応を経て炎症は終焉し、組織の修復が完了する。しかしながら、関節リウマチなどの自己免疫疾患においては炎症が収束せずに長期間持続し、慢性炎症となる¹。最近の研究により、糖尿病や肥満、癌などの生活習慣病の病態にも慢性炎症が関わっていると言われており、慢性炎症と病気との関わりが注目されてきている^{2,3}。

炎症の 4 徴候の 1 つである“痛み”もまた外傷や病気に対する生体防御のための重要な警告反応である。生まれながら痛みを感じない先天性無痛症患者では、皮膚、軟部組織、骨関節に様々な外傷を受けやすく、また患者自身はその受傷に気づかずに重症化してしまうことが多い⁴。一方で、通常の経過あるいは外傷の治療に要する妥当な時間を超えて痛みが持続する慢性疼痛では警告反応の役割を逸脱し、それ自体が有害な病態をもたらす⁵。慢性炎症病態では慢性痛が生じている場合もあり、生活の質が著しく低下する。実際、関節リウマチ患者が最も改善を望む症状は痛みであると報告されている⁶。

非ステロイド性抗炎症剤（nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs）は変形性関節症や関節リウマチ、抜歯後疼痛などに広く用いられている薬剤である。NSAIDs の作用機序はシクロオキシゲナーゼ（cyclooxygenase, COX）-1 および COX-2 の阻害である。COX-2 は炎症刺激によって発現が誘導される酵素で、炎症反応において主要な役割を果たしていると言われている。一方、COX-1 は恒常的に発現している酵素で、消化管保護作用などに関わることが知られている⁷。そのため、NSAIDs によって COX-1 が阻害されると消化管粘膜保護作用が減弱し、その結果、胃潰瘍などの消化管障害を発症すると考えられている⁸。そこで、次世代の NSAIDs としてセレコキシブやロフェコキシブ、バルデコキシブなどの COX-2 選択的阻害剤が開発された^{9,10}。

予想された通り、COX-2 選択的阻害剤は従来の NSAIDs と比較して消化管障害作用が弱いことが示された¹¹⁻¹³。しかしながら、ロフェコキシブの大腸癌予防効能追加を目的とした長期比較臨床試験において、心筋梗塞や脳梗塞といった心血管イベントのリスクを増大させることが明らかになった^{14,15}。この結果を受けてロフェコキシブは市場から撤退したが、アメリカでは副作用被害者による集団訴訟が起こされるなど大きな社会問題に発展した。バルデコキシブも同様に心血管イベントリスクが増大することが臨床試験で示されたため撤退となった¹⁶。ロフェコキシブおよびバルデコキシブの心血管イベントリスク増大のメカニズムは明らかにされていないものの、トロンボキサン（thromboxane, TX） A_2 と PGI_2 の不均衡が原因とする仮説が提唱されている¹⁷。 TXA_2 は血液凝固作用を有し、COX-1 を介して血小板から産生される。一方、 PGI_2 は血液凝固抑制作用を有し、血管内皮において主に COX-2 を介して産生される。すなわち、COX-2 選択的阻害剤の服用により血液凝固抑制作用を有する PGI_2 の産生が抑制される一方で、血液凝固作用を有する TXA_2 の産生には影響しないことから、これらの調節因子のバランスが血液凝固優位に傾くことで心血管系に悪影響を及ぼすと考えられる。したがって、より副作用の少ない新たな消炎鎮痛剤の開発が望まれている。

PG は細胞内でアラキドン酸カスケードによって生合成される生理活性物質である (Fig. 1-1)。アラキドン酸は COX によって PGH_2 となり、 PGH_2 はさらに PGE 合成酵素 (PGE synthase, PGES)、PGI 合成酵素 (PGI synthase, PGIS)、PGD 合成酵素 (PGD synthase, PGDS) および TXA 合成酵素 (TXA synthase, TXAS) などの合成酵素によって種々の PG に変換される。これらの最終産物のうち、 PGE_2 は最も代表的な炎症メディエーターとして知られており、炎症性疼痛においても重要な役割を果たしていると考えられている。 PGE_2 は PGES によって PGH_2 から生成されるが、PGES には細胞質 PGES (cytosolic PGES, cPGES)、ミクロソーム PGES (microsomal PGES, mPGES) -1 および mPGES-2 の 3 つのサブタイプが存在することが知られている。cPGES は多くの細胞の細胞質に恒常的に発現しており、生体の恒常性維持に必要な PGE_2 産生に関わっている¹⁸。mPGES-2 は膜に恒常的に発現しているが、その機能については不明な点が多い。mPGES-1 は同じく膜型の PGES だが、cPGES や mPGES-2 とは異なりインターロイキン (interleukin, IL) -1 や リポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) などの炎症刺激によって発現が誘導される。さらに炎症部位や腫瘍組織など、COX-2 が高発現している部位において mPGES-1 と COX-2 の共発現が認められている¹⁹。これらの情報から、mPGES-1 が炎症性疾患の病態に関わる主要な PGES として機能していると考えられている。2002 年に植松らによって mPGES-1 ノックアウトマウスが作製されて以降²⁰、炎症反応および炎症性疼痛における mPGES-1 の重要性が明らかにされてきた^{21, 22}。したがって、mPGES-1 の阻害あるいは PGE_2 産生を選択的に抑制した場合でも、COX-2 選択的阻害剤と同程度の抗炎症作用が期待される。さらに、 PGH_2 から PGE_2 への変換はプロスタノイド合成の最終段階であることから、 PGE_2 産生を選択的に抑制しても PGI_2 および TXA_2 の産生プロファイル、すなわち心血管イベントリスクには影響を与えないことが期待される²³。したがって、mPGES-1 阻害剤などの選択的 PGE_2 産生阻害剤が新たな消炎鎮痛薬のターゲットとして注目されている。

一方、同じくプロスタグランジンの一種である PGI_2 も炎症反応において重要な役割を果たしていると言われている。 PGI_2 受容体 (IP) ノックアウトマウスでは酢酸ライジングモデルにおいてライジング反応が抑制されることが報告されている^{24, 25}。また、IP アンタゴニストがげっ歯類の関節炎モデルにおいて抗炎症作用および鎮痛作用を示したことが報告されている^{26, 27}。したがって、IP アンタゴニストもまた消炎鎮痛薬のターゲットとして注目されている。 PGE_2 と PGI_2 はいずれも COX-2 の下流で産生されるため、COX-2 選択的阻害剤により PGE_2 と PGI_2 両方の産生が抑制されるが、 PGE_2 と PGI_2 のどちらが炎症反応においてより重要であるかを直接比較検証した研究結果はこれまで報告されていない。そこで本研究では、 PGE_2 、 PGI_2 それぞれのシグナルを阻害する化合物を用いて、炎症および炎症性疼痛における PGE_2 および PGI_2 の寄与について検証することを目的とした。第 2 章では、モルモット・ラットそれぞれに活性を有する新規選択的 PGE_2 産生阻害剤の取得を行なった。第 3 章ではモルモット炎症および炎症性疼痛モデルにおける PGE_2 の寄与について、モルモットで活性を示す選択的 PGE_2 産生阻害剤を用いて検証した。第 4 章ではラット炎症モデルにおける PGE_2 の寄与について、ラットに活性を示す選択的 PGE_2 産生阻害剤を用いて検証した。第 5 章では、ラット炎症性疼痛モデルにおいて選択的 PGE_2 産生阻害剤および IP アンタゴニストを用いて、それぞれを単独投与あるいは併用した場合の鎮痛作用について検証した。

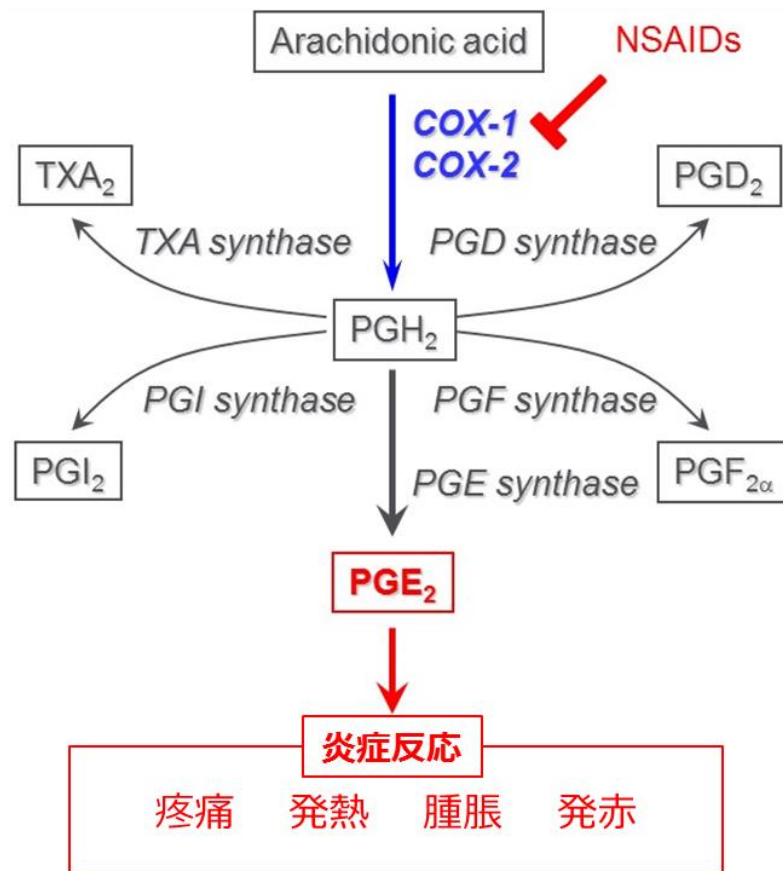


Fig. 1-1. The arachidonic acid cascade

第2章 選択的 PGE₂ 産生阻害剤の合成

2-1 緒言

これまでに臨床応用されている NSAIDs は COX-1, 2 あるいは COX-2 選択的阻害剤であるため、PGE₂ を含む全ての（あるいは複数の）プロスタノイド産生が抑制される。そのため、炎症性疼痛における PGE₂ の寄与について検証するためには PGE₂ を選択的に抑制する化合物が必要である。これまでに mPGES-1 阻害による選択的 PGE₂ 産生阻害剤はいくつか報告されているものの、経口投与によって評価できる化合物の報告はほとんどない²⁸。腹腔内投与あるいは皮下投与など経口以外の投与方法の場合、投与部位において炎症が発生し、実験的に誘導した炎症が抑制されてしまう counter-irritation が発生する可能性がある²⁹。したがって、化合物の薬理作用を正しく評価するためには経口投与可能な選択的 PGE₂ 産生阻害剤を用いるのが妥当と考え、本章では独自の化合物の取得を行った。

2-2 方法

マクロファージアッセイ

モルモットマクロファージアッセイおよびラットマクロファージアッセイはそれぞれ第3章3-2、第4章4-2に記載した方法で実施し、PGE₂とTXB₂量をEIAキット(Assay Designs)を用いて測定した。

代謝安定性試験

代謝安定性試験は肝ミクロソームを用いて実施した。モルモット肝ミクロソームは Male Dunkin-Hartley guinea pig (In Vitro Technology)、ラット肝ミクロソームは Pooled SD1 rat liver microsome-male (XENOTECH) を使用した。反応溶液は、10 mM D-グルコース-6-リン酸二ナトリウム塩一水和物 (オリエンタル酵母)、1 unit/ml グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (オリエンタル酵母) および 3.3 mM 塩化マグネシウム (ナカライテスク) を添加した 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に、上記の各ミクロソーム (0.1 mg/ml) を添加したものである。反応溶液に評価化合物 (1 μ M) を添加した後 37°C に加温し 10 分間ブレインキュベーションした。 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリジン酸 (オリエンタル酵母) を最終濃度が 1 mM となるように添加して 30 分間インキュベートし、氷冷した後アセトニトリルを添加して反応を停止させた。代謝物の解析は LC-MS/MS を用いて行なった。

LC-MS/MS 解析

LC-MS/MS 解析には代謝安定性試験後に得られたアセトニトリル層を回収して用いた。LC-MS/MS 測定は以下の機器を用いて行なった。

HPLC システム : Agilent シリーズ 1100 (Agilent Technologies)

Mass Spectrometry : API 4000 (Applied Biosystems)

カラム : Shim-pack XR-ODS column (2 mm × 30 mm, Shimadzu Corp.)

移動相 : A : 5 mM 酢酸アンモニウム : アセトニトリル = 5 : 95
B : 5 mM 酢酸アンモニウム : アセトニトリル = 95 : 5

グラジエント : A/B = 99/1 (0 min) , 50/50 (0-0.1 min) , 50/50 (0.01-0.5 min)
0/100 (0.5-1 min) および 0/100 (1-1.75 min)

流速 : 0.75 ml/min

検出モード : MRM (multiple reaction monitoring)

2-3 ベンゾチアゾール誘導体 BT4c の獲得

選択的 PGE₂ 産生阻害剤の候補として、化合物 BT1a のようなベンゾチアゾール誘導体が知られていた（第一三共社内情報より）。この BT1a (Fig. 2-1) はモルモット由来マクロファージにおける PG 産生阻害評価系において、TXA₂ の産生を抑制することなく PGE₂ 産生を選択的に抑制した (PGE₂ IC₅₀ = 1.9 uM , TXA₂ IC₅₀ > 30 uM)。

BT1a をリード化合物として、より高活性・高選択性および物性プロファイルの向上した化合物の取得を目的として誘導体展開を行なった。BT1a の分子構造をベンゾチアゾール部 (A 環部)、ピペリジンカルボン酸部 (B 環部) およびアミノシクロヘキサン環部 (C 環部) の 3 箇所の部分構造に分割して構造変換・修飾を行うことにより効率的に誘導体展開を行なった。

誘導体展開で合成した代表的な化合物を Fig. 2-1 に示す。C 環部の展開においてシスの相対立体配置でかつメチル基上に水酸基を導入することにより BT1a と比較して活性が約 30 倍向上した BT4b (IC₅₀ = 0.064 uM) を見出した。興味深いことに、BT4b の鏡像体である BT4b' はプロスタノイド産生の選択性こそ示すものの、その活性は約 10 倍程度弱いことが判明した。次に、C 環部を最も良い活性を示したアミノアルコール体に固定して A 環部の展開を行なった。その結果、A 環部の 6 位にメチルを導入することにより活性が増強した BT4d (IC₅₀ = 0.023 uM) を得た。さらにこれをフッ素基に変換することによりモルモットミクロソーム中の代謝安定性が 37.4%まで改善した BT4c を見出した。

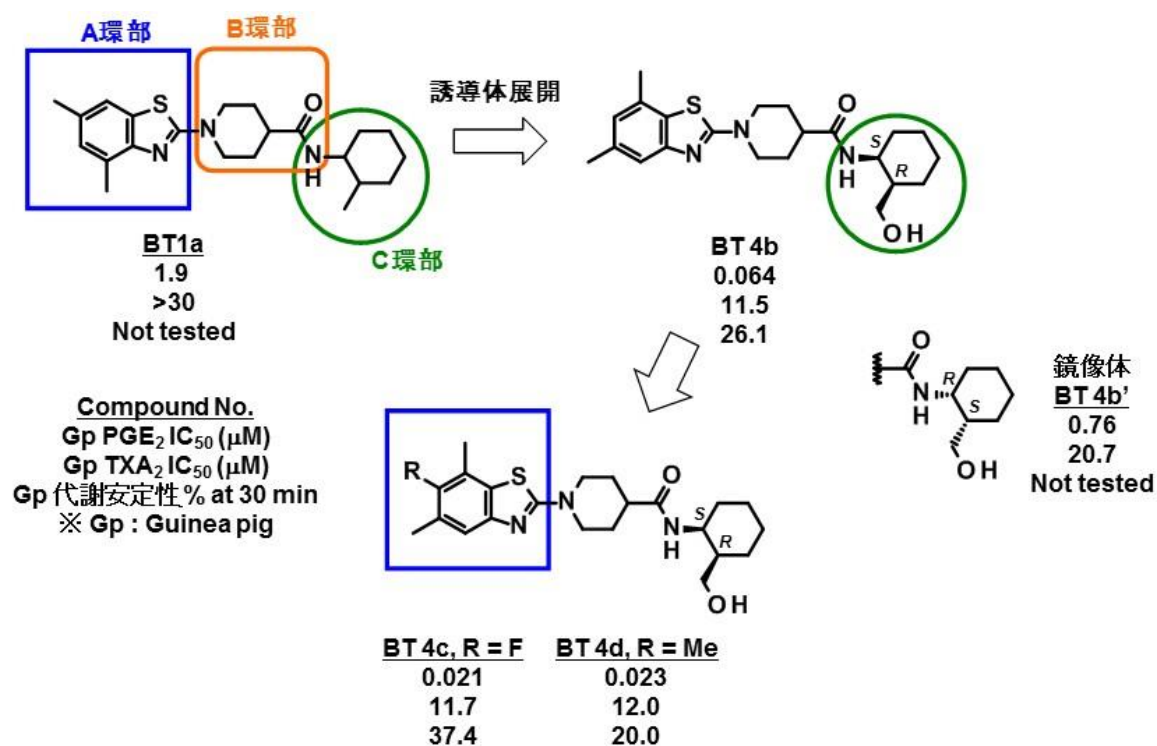


Fig. 2-1. Improvement of an *in vitro* PGE₂ production inhibition activity through structure modification of BT1a

2-4 ベンゾチアゾール骨格からキノリン骨格への変遷および Q4e、Q4b の獲得

前項で得られたベンゾチアゾール誘導体はモルモット由来の細胞において、プロスタノイドの産生阻害の高い選択性を示すと共に、強い PGE₂ 産生阻害活性を示すことが明らかになった。一方、消炎鎮痛剤の評価において一般的に用いられる薬効動物であるラット由来のマクロファージに対しては PGE₂ 産生阻害活性が大幅に減弱した (IC₅₀ = 1.5 μM)。そこで、ラットに対する活性の向上を目指し、さらなる誘導体展開を行なった。

誘導体展開により得られた化合物のラット由来のマクロファージに対する活性および代謝安定性を Fig. 2-2 に示す。最初に、A 環部のベンゾチアゾール骨格を種々の二環性縮環および単環芳香族環への変換を行なった。その結果、ラットマクロファージにおいて十分な活性および PG 選択性を示す 1 位置換ベンゾイミダゾール誘導体を見出すと共に、より活性プロファイルが改善した 3 位フェニル置換キノリン誘導体を見出した。見出されたキノリン誘導体 Q4c はラットミクロソーム中の代謝安定性が 0% と非常に悪かったため、ラットにおける代謝安定性の改善を目指して再度 C 環部の変換を行なった。シクロヘキサン環上のヒドロキシメチル基の配置を変換することにより、代謝安定性が改善した 1,3 トランス体 Q4d および 1,4 シス体 Q4h を得た。次に、ヒドロキシメチル基をより極性の高い置換基であるカルバモイル基へと変換することにより、代謝安定性がさらに改善した Q4e および Q4i を得た。カルバモイル基の窒素原子上にアルキル基を導入すると、活性は向上する傾向が見られる一方で、代謝安定性は悪くなることが判明した (Q4f)。さらに、カルバモイル基をカルボキシル基へと変換することにより、活性・代謝安定性を両立した Q4b を見出した。

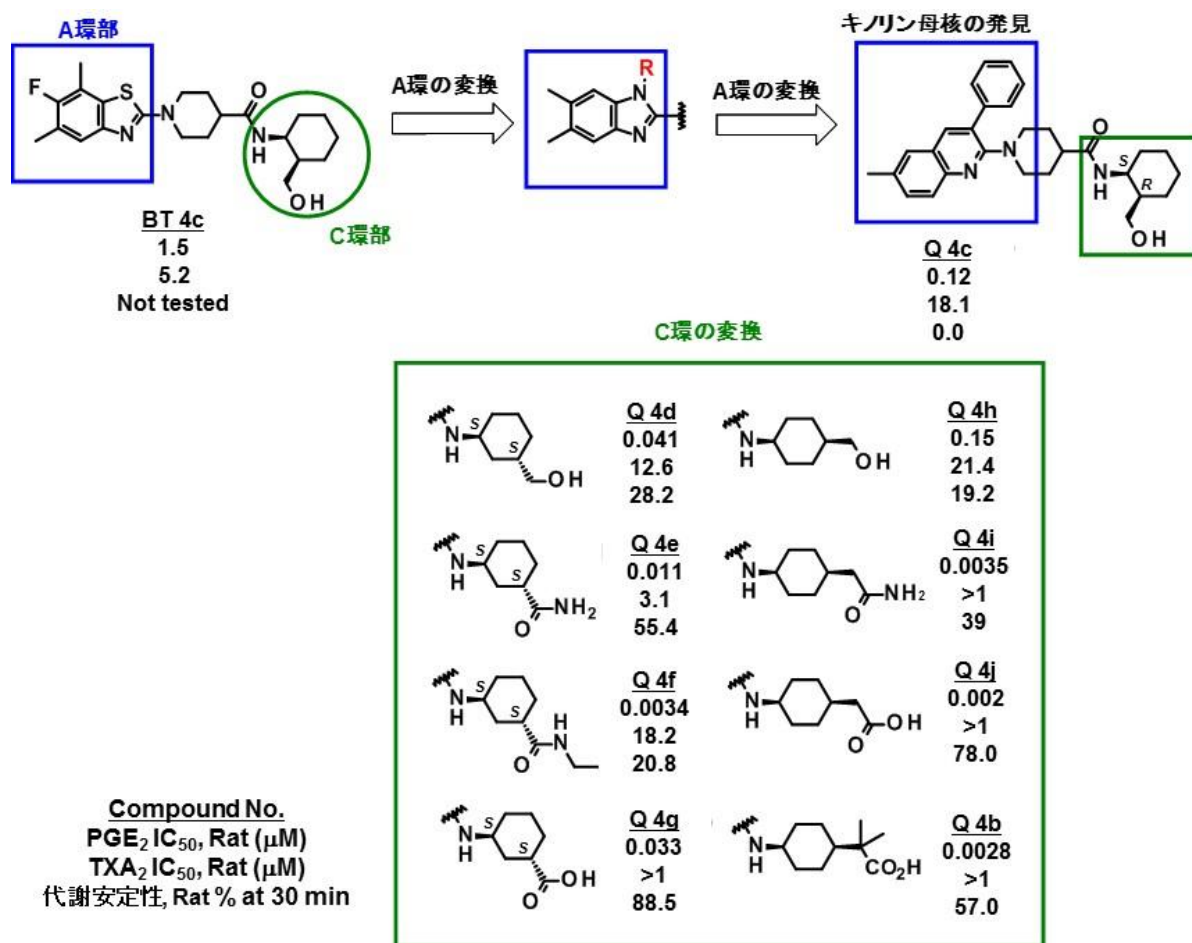


Fig. 2-2. Improvement of rat PGE₂ production inhibition activity through structure modification of BT4c

2-5 各誘導体の合成法

Fig. 2-3 に各誘導体の一般合成法を示す。A 環に相当する二環性縮環化合物、B 環に相当する二置換環状アミン化合物、および C 環に相当するモノ置換アミン化合物を順に縮合することで、コンバージェントに様々な誘導体の合成が可能である。二環性縮環化合物 (BT1, BI1, Q1) に対して、ピペリジンカルボン酸誘導体を付加させることで化合物 BT2、BI および Q2 が得られる。エステル基を加水分解し、得られたカルボキシル基を別途合成したアミノシクロヘキサン誘導体と縮合して化合物 BT4、BI4 および Q4 を得ることができる。本項に記載の化合物は全てこの方法に従って合成した。代表例として、Q4b の具体的な合成を Fig. 2-4 に示す。

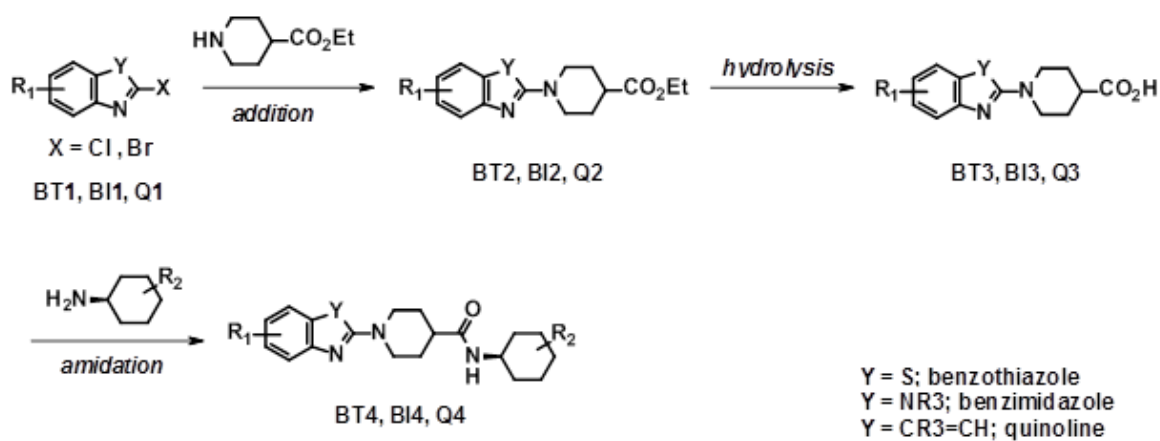


Fig. 2-3. A general synthetic method of benzothiazole, benzoimidazole, and quinoline derivatives

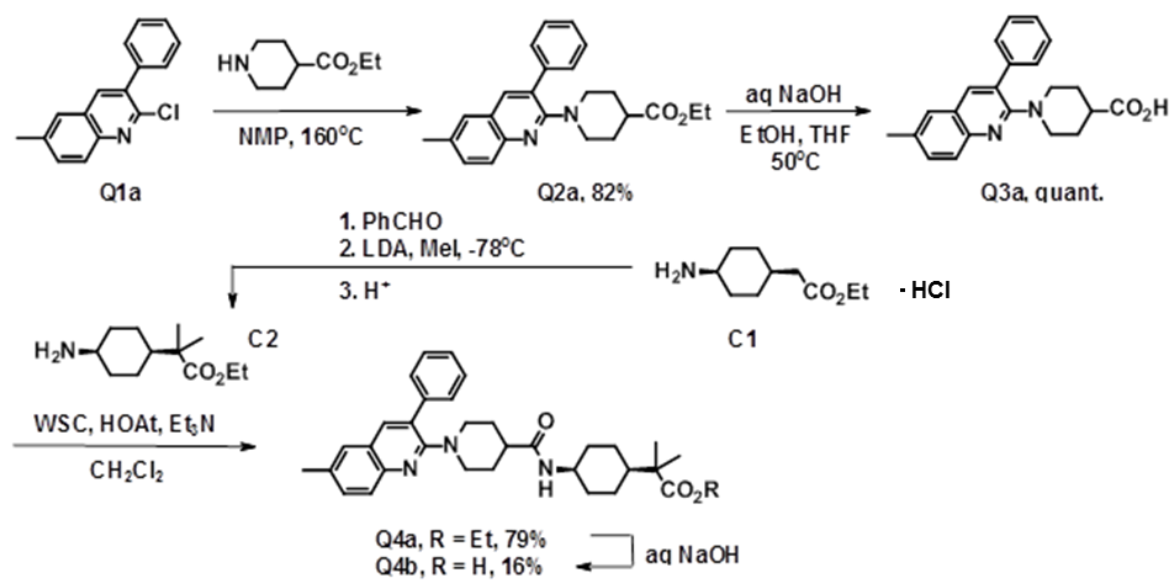


Fig. 2-4. Synthesis of compound Q4b

第3章 選択的プロスタグランジン E₂ 産生阻害剤がモルモット発熱モデル、関節炎モデル、および炎症性疼痛モデルに及ぼす影響の解析

3-1 緒言

第2章では、モルモットおよびラットそれぞれに活性を有する選択的 PGE₂ 産生阻害剤の取得に成功した。本章ではモルモットに活性を有する化合物 BT4c (以後、化合物 A) を用いて、モルモット炎症モデルにおける薬理作用を評価した。また、既存 NSAIDs であるインドメタシンおよびモルモットに活性を有する mPGES-1 阻害剤として報告されている MF63³⁰ の薬理評価も実施し、化合物 A との比較を行なった。

3-2 材料および方法

化合物

選択的 PGE₂ 産生阻害剤として、第 2 章で合成した化合物 A を用いた (Fig. 3-1A)。インドメタシンは Sigma-Aldrich より購入したものをを用いた。試験に供する化合物は 20% *N*, *N*-ジメチルアセタミド、20% Tween80、および生理食塩水の混合溶媒 (DTS 溶液) に溶解し、2 ml/kg b.w. の投与用量で経口投与した。ただし、アジュバント誘導性関節炎モデルにおいて 1 日 2 回投与を実施した際は、DTS 溶液による体重低下などの望ましくない作用を避けるために投与用量を 1 ml/kg b.w. とした。

動物

実験動物は 4 週齢の雌性 Slc Hartley モルモット (日本エスエルシー) を用いた。動物は室温を $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度を $55 \pm 20\%$ に維持した飼育室にて飼育し、毎日 20 時から 8 時までを暗期とした。特に記載がない限り、餌および水は自由摂取とした。動物は使用前に 1 週間馴化飼育を行なった。全ての実験手順は第一三共株式会社の動物飼育指針に沿って実施した。

モルモットマクロファージアッセイ

モルモット腹腔マクロファージの調製は Moriya らの手法を参考に実施した³¹。流動パラフィン (和光純薬工業) を雌性モルモットに 50 ml/kg b.w. の投与用量で腹腔内に投与した。その 4 日後にイソフルラン麻酔下にて頸動脈より放血死させた後に、腹腔内を 50 ml の氷冷ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (Thermo Fisher Scientific) で洗浄し、洗浄液を回収した。洗浄液はガーゼを用いてろ過を行ない、ろ液を 1000 rpm、4°C で 5 分間遠心した。上清およびパラフィンを丁寧に除去し、10% ウシ胎児血清 (fetal bovine

serum, FBS) および 1% ペニシリン/ストレプトマイシン含有 RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific) に懸濁し、1000 rpm、4°C で 5 分間遠心した。上清を取り除き、Red Blood Cell Lysis buffer (Sigma-Aldrich) を 5 ml 添加して細胞を懸濁した後に 3 分間静置した。10% FBS 含有 RPMI-1640 で 2 回洗浄した後、細胞数をカウントして 2×10^5 cells/ well となるように調整し、アスピリン (Sigma-Aldrich) を終濃度が 100 μ M となるように添加した後に 96 穴培養プレートに細胞を播種し 2 時間培養した。非接着細胞を洗浄操作で除去した後に化合物を添加して 1 時間培養し、LPS を終濃度が 10 μ g/ml となるように添加した後に 37°C、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した (経時変化を観察する試験では培養時間を 2、4、7、24 および 48 時間とした)。ブランクには LPS の代わりに 10% FBS 含有 RPMI-1640 を 10 μ l 添加した。培養終了後、上清を回収し PGE₂ および TXB₂ 含量を EIA キット (Assay Designs) を用いて測定した。

ウェスタンブロット

LPS で刺激したマクロファージは経時的に回収し、5 mM EDTA および Protease inhibitor cocktail (Roche) を含む氷冷リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) 中で超音波処理を 10 秒間 $\times$ 2 回施した。セルライセート中のタンパク含有量を BCA タンパク質アッセイキット (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定し、タンパク量に換算して 5 μ g のライセートを SDS-PAGE により分離し、PVDF 膜 (Merck Millipore) に転写した後に 5% スキムミルクを含むトリス緩衝液中で 30 分間ブロッキングを行なった。PVDF 膜に mPGES-1 抗体 (Cayman Chemical) あるいは COX-2 抗体 (Immuno-Biological Laboratories) を添加して 1 時間インキュベートした。ペルオキシダーゼ標識の二次抗体と 1 時間インキュベートした後に ECL-plus (Life Technologies) を用いて検出した。

血中濃度測定試験

化合物 A はモルモットに 10 mg/kg b.w.経口投与した (n = 3)。血液サンプルは投与後 0.5、1、2、4、6、8、24 時間に採取し、12000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離して血漿を回収した。血漿中の化合物濃度は LC-MS/MS 法により測定した。

LC-MS/MS 解析

LC-MS/MS 解析は第 2 章に記載の方法と同様の条件で実施し、化合物 A はアセトニトリルで抽出した。化合物 A の検出イオンピークは m/z 420.9→209 を選択した。

炎症組織中のプロスタノイド含量測定試験

本試験は牛山らの手法を参考に実施した³²。前日より一晩絶食した後に、20%イースト (Brewer's yeast, Sigma-Aldrich) 懸濁液をモルモットの右後肢足底皮下に 0.1 ml 投与し、炎症を惹起した。イースト投与の 4 時間後に、動物を炭酸ガスにより安楽殺した後に速やかに右足を切除、重量を測定して液体窒素を用いて急速凍結した。凍結した足サンプルは Cryo-press® (Microtec Co., Ltd.) を用いて粉碎処理し、その後 10 mM EDTA および 100 µM インドメタシンを含んだ PBS を足重量の 4 倍量添加し、Polytron®ホモジナイザーで 1 分間ホモジナイズ処理を行なった。ホモジネートは 9,500 x g、4°C で 5 分間遠心分離し、上清をプロスタノイド測定まで -20°C に保存した。化合物 A、MF63 およびインドメタシンはそれぞれ足組織回収の 2、4 および 5 時間前に経口投与した (n = 5)。足組織中の PGE₂、6-keto PGF_{1α} および TXB₂ 含量はそれぞれの EIA キット (Cayman Chemical) を用いて測定した。

イースト誘導性発熱モデル

本試験は小林らの手法を参考に実施した³³。20%イースト懸濁液 2 ml をモルモットの

背部皮下に投与した。投与 18 時間後に直腸温を Digital rectal thermometer (Physitemp Instruments) で測定し、直腸温が 39.5°C 以上に上昇した個体を発熱試験に使用した。化合物あるいは溶媒 (DTS 溶液) を経口投与し、投与後 1 時間ごとに 5 時間まで直腸温を測定した (n = 5-7)。イースト非投与群をコントロール群とした。

アジュバント誘導性関節炎モデル

本試験は Winder らの手法を参考に実施した³⁴。アジュバントは加熱滅菌 *Mycobacterium butyricum* (BD biosciences) を乾熱滅菌した流動パラフィンを用いて 2 mg/ml となるように調製し、Sonifier Cell Disruptor 200 (Branson Ultrasonic) で 50 Hz で 5 分間断続的に超音波処理を行なった。調製したアジュバントはモルモットの右後肢足蹠皮内に 0.05 ml (100 µg/animal) 投与し、投与日を Day 0 とした。化合物 A およびインドメタシンはそれぞれ 1 日 2 回および 1 回投与した (n = 6)。足体積は Plethysmometer (Ugo Basile) を用いて Day 7 まで 1 日 1 回測定した。

胃粘膜障害試験

本試験は Jahn らの手法を参考に実施した³⁵。モルモットの糞食を防止するため、前日夕刻にエリザベスカラーをモルモットに装着し、絶食を実施した。化合物投与の 4 時間後に動物を安楽殺し、胃を摘出した (n = 5~10)。摘出した胃は 10 ml PBS で洗浄した後に噴門部を鉗子で留め、幽門部から 10% ホルマリン液を 10 ml 注入した後に幽門部も鉗子で留めて 10 分間固定処理した。胃の大湾に沿って切開した後に胃の粘膜を実体顕微鏡で観察し、出血斑の全長を計測した。出血斑の全長が 2.0 mm 以上の個体を胃障害陽性と判定し、胃障害陽性個体率を群ごとに算出した。

イースト誘導性熱性痛覚過敏モデル

本試験は Hargreaves らの手法を参考に実施した³⁶。前日夕刻より絶食した後に、20% イースト懸濁液 0.1 ml をモルモットの左後肢足底皮下に投与した。投与の 2 および 3 時間後にプランター試験装置 (Hargreaves Apparatus, Ugo Basile) を用いて熱刺激を与えてから逃避行動を起こすまでの潜時 (paw withdrawal latency, PWL) を測定し、3 時間時点での PWL が 7 秒以下の個体を試験に使用した。化合物あるいは DTS 溶液を経口投与し、PWL を投与後 1 時間ごとに 4 時間まで測定した (n = 5~6)。

統計解析

マクロファージアッセイおよび血中濃度測定試験では、結果は全て平均値±標準偏差で示した。統計解析は Dunnett の多重比較検定を実施した。炎症組織中プロスタノイド測定試験では、化合物によるプロスタノイド産生阻害率を以下のように算出した： $1 - \{(\text{化合物投与個体のプロスタノイド量}) - (\text{イースト無処置個体のプロスタノイド量})\} / \{(\text{溶媒投与群のプロスタノイド量}) - (\text{イースト無処置個体のプロスタノイド量})\} \times 100$ 。50%阻害用量 (ID₅₀, mg/kg b.w.) は化合物の投与量と抑制率の間の回帰直線を最小二乗法により求めて算出した。発熱試験では、化合物による抑制率を以下のように算出した： $1 - \{(\text{化合物投与個体の直腸温}) - (\text{イースト無処置個体の直腸温})\} / \{(\text{溶媒投与群の直腸温}) - (\text{イースト無処置個体の直腸温})\} \times 100$ 。ID₅₀ (mg/kg b.w.) は化合物の投与量と抑制率 (各用量の最大値) の間の回帰直線を最小二乗法により求めて算出した。胃粘膜障害試験では、UD₅₀ (障害発生率が 50%の用量) は胃障害陽性率を元にプロビット法を用いて算出した。

3-3 結果

化合物 A はモルモットマクロファージアッセイにおいて PGE₂ を選択的に抑制する

モルモットマクロファージアッセイにおいて、LPS 処置により COX-2 および mPGES-1 の発現がそれぞれ 7 および 24 時間をピークに上昇した (Fig. 3-1B)。さらに、LPS 処置により PGE₂ 産生が 24 時間をピークに上昇した (Fig. 3-1C)。これらの結果から、化合物評価時のマクロファージ培養時間は 24 時間とした。TXB₂ 産生も LPS 刺激により検出限界以下から 13.2 ng/ml まで上昇した。化合物 A は PGE₂ の産生を濃度依存的に抑制し、IC₅₀ は 19.6 nM であったが、一方で TXB₂ の産生は促進した (Fig. 3-1D)。MF63 も PGE₂ 産生を選択的に抑制し、IC₅₀ は 63 nM であった (Fig. 3-1E)。

化合物 A は DTS 溶液使用時にモルモットにおいて良好な体内動態を示す

化合物 A のモルモットにおける薬物動態プロファイルを評価した。化合物 A は懸濁用溶媒として汎用される 0.5% メチルセルロース溶液懸濁では経口吸収性が悪かったため (データ無し)、DTS 溶液を溶媒として使用した。化合物 A (10 mg/kg b.w.) は経口投与後に速やかに吸収され、投与 0.5 時間後に最大血漿中濃度 (C_{max}) 6.7 μM まで上昇し、その後 1、2、4、6 および 8 時間後にはそれぞれ 5.7 μM、4.3 μM、3.1 μM、1.3 μM および 0.68 μM と減少し、24 時間後には検出限界以下となった。血中半減期 (t_{1/2}) は 2.7 時間であった (Fig. 3-2)。

化合物 A は炎症組織において PGE₂ 産生を選択的に抑制する

in vivo における PGE₂、TXB₂ および 6-keto PGF_{1α} 産生に化合物 A が及ぼす影響をイースト投与により炎症を誘導した足組織を用いて評価した。イースト投与 4 時間後における TXB₂ 産生上昇はわずかであった一方で、PGE₂ と 6-keto-PGF_{1α} 産生は大幅に増加した。

化合物 A は PGE₂ 産生を抑制し、ID₅₀ は 3 mg/kg b.w.未満であったが、6-keto PGF_{1α}および TXB₂ 産生は亢進した (Fig. 3-3A)。MF63 も同様に PGE₂ 産生を抑制し (ID₅₀ は 10 mg/kg b.w.未満)、6-keto PGF_{1α}および TXB₂ 産生は亢進する傾向を示した (Fig. 3-3B)。対照的に、インドメタシンは測定した全てのプロスタノイド産生を抑制し、PGE₂ の ID₅₀ は 2.4 mg/kg b.w.であった (Fig. 3-3C)。

化合物 A はイースト誘導性発熱を改善する

化合物 A の解熱作用を、モルモットイースト誘導性発熱モデルを用いて評価した。イーストの皮下注射により直腸温の上昇が認められ、投与 18 時間後に 39.8°C に達した。化合物 A は用量依存的に解熱作用を示し、ID₅₀ は 6.9 mg/kg b.w.であった (Fig. 3-4A)。MF63 も用量依存的に解熱作用を示し、ID₅₀ は 9.2 mg/kg b.w.であった (Fig. 3-4B)。インドメタシンは 30 mg/kg b.w.で強力な解熱作用を示した。

化合物 A はアジュバント誘導性関節炎モデルにおいて抗炎症作用を有する

化合物 A の抗炎症作用を、モルモットアジュバント誘導性関節炎モデルを用いて評価した。Fig. 3-5A に示すように、アジュバント処置をした動物の足は処置翌日より緩やかに肥厚し始め、処置 6 日後より急激に肥厚した。化合物 A は 100 mg/kg b.w.を 1 日 2 回投与した群でのみ足の肥厚を抑制した (Fig. 3-5A)。インドメタシンは 100 mg/kg b.w.を 1 日 1 回投与した群で足の肥厚を抑制した (Fig. 3-5B)。インドメタシン 100 mg/kg b.w.投与群では体重増加が抑制していたが、化合物 A 投与群ではいずれの投与用量においても体重増加への影響は認められなかった (Fig. 3-5C, D)。

化合物 A は既存 NSAIDs と比較して消化管障害のリスクが低い

化合物 A およびインドメタシンの胃粘膜障害作用を、モルモットを用いて評価した。

インドメタシンは用量依存的に胃障害作用を示し、50%陽性率 (UD₅₀) は 15 mg/kg b.w. であった。また、インドメタシンの in vivo PGE₂ 産生抑制試験の ID₅₀ (2.4 mg/kg b.w., Fig. 3-3C) に対する UD₅₀ の比をセーフティーマージンとして算出したところ、6.25 であった。一方、化合物 A は 100 mg/kg b.w.を経口投与した群でのみ胃障害作用が認められ、その時の胃障害陽性率は 20%であった (Table 1)。また、化合物 A の in vivo PGE₂ 産生抑制試験の ID₅₀ が 3 mg/kg b.w.未満 (Fig. 3-3A) で、UD₅₀ は 100 mg/kg b.w.以上であることからセーフティーマージンは 30 以上であった。

化合物 A はイースト誘導性熱性痛覚過敏モデルにおいて、既存 NSAIDs よりも鎮痛作用が弱い

化合物 A の鎮痛作用を、モルモットイースト誘導性熱性痛覚過敏モデルを用いて評価した。イースト処置により、PWL が 19.5 秒 (無処置個体) から 4.8 秒まで短縮した。インドメタシン 30 mg/kg b.w.投与群では投与の 3 および 4 時間後に PWL を有意に延長した。一方、化合物 A は 100 mg/kg b.w.投与時においても PWL の延長作用は認められなかった (Fig. 3-6)。

3-4 考察

第3章では第2章にて合成した選択的 PGE₂ 産生阻害剤である化合物 A の薬理作用について、モルモットを用いて既存 NSAIDs すなわち非選択的 COX 阻害剤であるインドメタシンおよび mPGES-1 阻害剤である MF63 と比較した。マクロファージアッセイでは LPS 刺激により COX-2 の発現が亢進し、続いて mPGES-1 の発現が亢進した。PGE₂ 産生量は mPGES-1 の発現に相関していた。化合物 A は PGE₂ の産生を抑制し、TXB₂ の産生を亢進した。一方、mPGES-1 阻害剤である MF63 は PGE₂ 産生を抑制したが、TXB₂ の産生に影響を与えなかった。これまでの研究で、MF63 は A549 細胞を用いた試験で PGE₂ を抑制すると共に PGF_{2α} 産生を亢進することが報告されていることから³⁰、本試験においても TXB₂ 以外の他のプロスタノイドの産生を亢進している可能性がある。遺伝的に mPGES-1 を欠損させると PGE₂ 以外のプロスタノイド産生が亢進することが報告されている^{37, 38}。全てのプロスタノイドは共通の基質である PGH₂ から合成されることから、PGE₂ 産生が抑制されたことにより基質である PGH₂ が蓄積し、その後、他のプロスタノイドに転換されたことが示唆される。これまでの報告を見る限り、PGE₂ 産生抑制から他のプロスタノイド産生亢進に繋がるメカニズムは他に知られていない。したがって、化合物 A は PGES（おそらく mPGES-1）阻害剤であると考えられる。

化合物 A は DTS 溶液で溶解した条件で良好な血中暴露を示したため、in vivo 炎症モデルを用いて化合物 A の薬理作用を評価した。イースト誘導性足部炎症モデルでは、インドメタシンが全てのプロスタノイド産生を抑制したのに対し、化合物 A および MF63 は PGE₂ 産生のみを選択的に抑制した。この試験ではイースト処置によって 6-keto-PGF_{1α} 産生が増加しており、化合物 A あるいは MF63 投与によりその産生がさらに亢進した。TXB₂ の産生も化合物 A によって亢進していたが、その程度は 6-keto-PGF_{1α} の方が顕著であり、この結果は化合物 A による PGE₂ 以外のプロスタノイドの亢進プロファイルが

組織や細胞における各種合成酵素の発現量に依存していることを示唆している。

解熱作用は NSAIDs のよく知られた薬理作用の一つであり、風邪などの病原菌の感染により引き起こされる発熱は COX-2 および mPGES-1 によって誘導された PGE₂ を介して起こることが知られている^{39,40}。本章では化合物 A のモルモットにおける解熱作用を評価した。その結果、化合物 A はインドメタシンおよび MF63 と同等の解熱作用を示した。化合物 A の解熱作用は 5 時間時点で低下していたが、これは化合物 A の C_{max} が 0.5 時間であり、その後比較的速やかに消失する血中動態を反映していると考えられる。したがって、血中動態が改善された化合物は薬理作用が持続することが期待される。

既存 NSAIDs および COX-2 選択的阻害剤はリウマチや変形性関節症患者に使用されており、PGE₂ がこれらの病態に関与していることが知られている⁴¹⁻⁴³。本章では化合物 A が関節炎モデルにおいて抗炎症作用を示すか否かを検討した。アジュバント接種日から 100 mg/kg b.w. の化合物 A を 1 日 2 回投与したところ、個体の体重増加を抑制せずに足部の浮腫を抑制した。一方、インドメタシンは 100 mg/kg b.w. の 1 日 1 回投与により浮腫を抑制したが、この用量では体重増加が有意に抑制されていたことから、消化管障害などの副作用が発生していた可能性が示唆された。こうした副作用は炎症反応にも影響することが予想されるため、本検討においてインドメタシンで認められた抗炎症作用は消化管障害などの副作用によって引き起こされた可能性が高い。インドメタシンはラットアジュバント誘導性関節炎の陽性対照薬として薬理試験に使用されることが多いが、その時の用量は概ね 3 mg/kg b.w. 程度である。一方、今回のモルモットアジュバント誘導性関節炎モデルでは 100 mg/kg b.w. でのみ有意に浮腫の抑制が認められた。正確な原因は不明だが、インドメタシンの薬理作用についてラットとモルモットで種差が存在する可能性が考えられる。したがって、既存 NSAIDs や COX-2 選択的阻害剤と化合物 A の抗炎症作用の比較は、他の動物モデルを用いたさらなる精査が必要であろう。

既存 NSAIDs の代表的な副作用として消化管障害が知られている。我々は化合物 A の

胃潰瘍形成リスクについて評価した。インドメタシンは強い胃障害を引き起こし、セーフティーマージンは 6.25 であった。これに対し、化合物 A のセーフティーマージンは 30 以上であった。これらの結果は、化合物 A は既存 NSAIDs と比較して消化管障害リスクが低いことを示唆している。これまでの研究でも、PGE₂ 産生あるいは PGE₂ シグナルの選択的抑制は消化管障害リスクが低いことが示唆されている。例えば、MF63 はヒト mPGES-1 ノックインマウスにおいて粘膜障害を起こさず、リスザルにおいても血便を誘発しない³⁰。さらに、PGE₂ 受容体 (EP4) アンタゴニストが抗炎症作用を示す一方で消化管障害を誘発しないことも報告されている^{44, 45}。PGE₂ だけでなく PGI₂ も胃粘膜保護に寄与することが知られており⁴⁶、本試験においてはインドメタシンが全てのプロスタノイド産生を抑制するのに対し、化合物 A は 6-keto-PGF_{1α} (PGI₂) の産生は抑制しない。よって、既存 NSAIDs とは異なり、化合物 A を投与した動物では残存する PGI₂ が胃粘膜を保護しており、これが消化管障害作用の弱い理由であると考えられる。

最後に、化合物 A の炎症性疼痛モデルにおける鎮痛作用を評価した。本モデルにおいてインドメタシンは鎮痛作用を示した一方で、化合物 A は PGE₂ 産生を正常レベルにまで抑制する用量である 100 mg/kg b.w.を投与した場合でも鎮痛作用が認められなかった。選択的 PGE₂ 産生阻害剤が既存 NSAIDs や COX-2 選択的阻害剤と同等の鎮痛作用を有するかに関する結論はまだ出ていない。MF63 の鎮痛作用はモルモット LPS 誘導性熱性痛覚過敏モデルで報告されているが³⁰、一方で mPGES-1 欠損マウスではザイモサン誘導性痛覚過敏モデルで鎮痛作用を示さなかったことが報告されている⁴⁷。PGE₂ だけでなく PGI₂ もまた炎症および炎症性疼痛に関わることが報告されており²⁴、PGI₂ の受容体アンタゴニストがマウス慢性関節炎モデルにおいて疼痛および炎症を抑制することが報告されている²⁶。化合物 A は PGE₂ 産生を抑制するが、6-keto-PGF_{1α} (PGI₂) の産生を亢進することから、PGI₂ が疼痛知覚に寄与しているために鎮痛作用が認められなかった可能性がある。

本章で得られた知見をまとめた図を Fig. 3-7 に示す。選択的 PGE₂ 産生阻害剤を用いた検討から、炎症反応のうち発熱および腫脹は主に PGE₂ を介していることが示唆されたが、疼痛に関しては PGE₂ 以外のプロスタノイドの関与が示唆された。この点を明らかにするために次章以降さらなる検討を行なった。

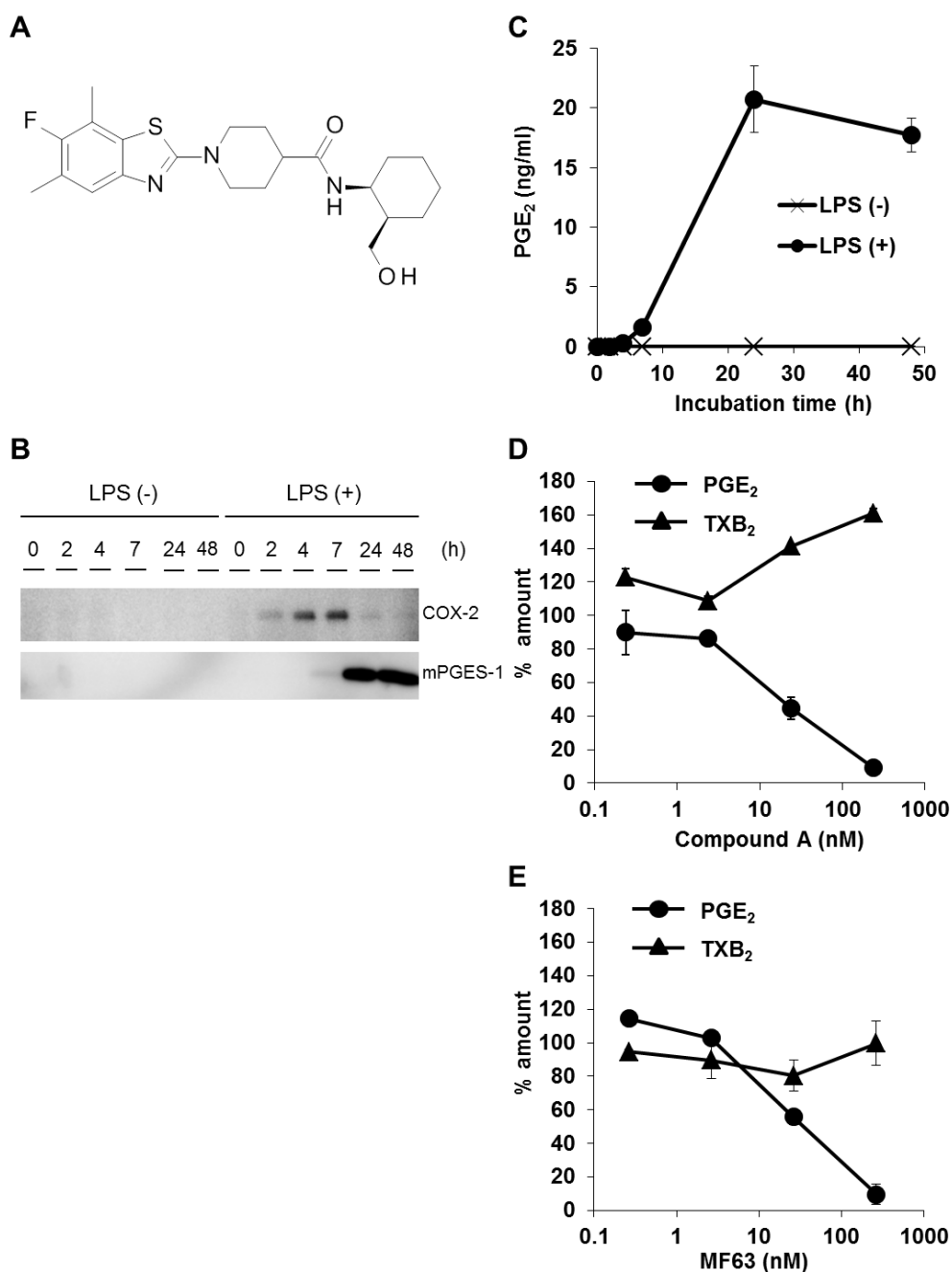


Fig. 3-1. Inhibitory effect of compound A on LPS-induced prostaglandin synthesis in guinea pig macrophages. (A) Chemical structure of compound A. (B) Time-course analysis of COX-2 (upper) and mPGES-1 (lower) expression after LPS stimulation in guinea pig macrophages. (C) Time-course analysis of PGE₂ synthesis with or without LPS stimulation in guinea pig macrophages. (D and E) Dose dependent effect of compound A (D) and MF63 (E) on the production of PGE₂ and TXB₂ in guinea pig macrophages. Data are expressed as % amount of LPS-stimulated control. Results are shown as the mean $\pm$ S.D. (in duplicate).

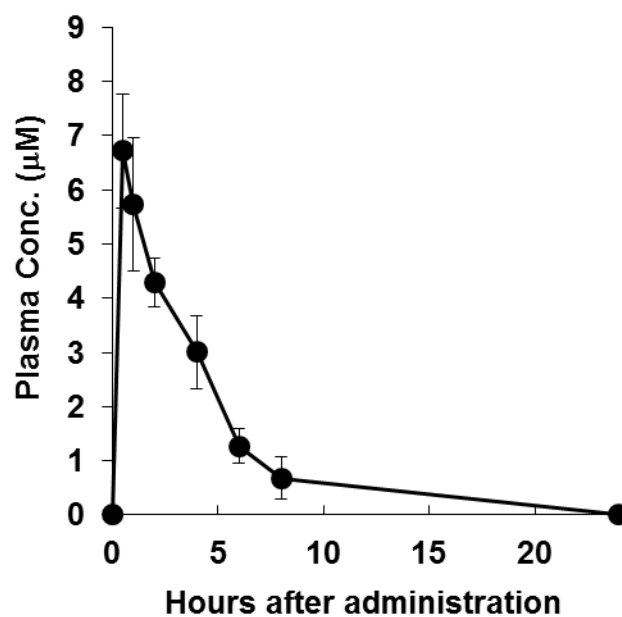


Fig. 3-2. Time-course of plasma concentration of compound A after oral administration (10 mg/kg) in guinea pigs. Results are shown as the mean $\pm$ S.D. ($n = 3$ /time point).

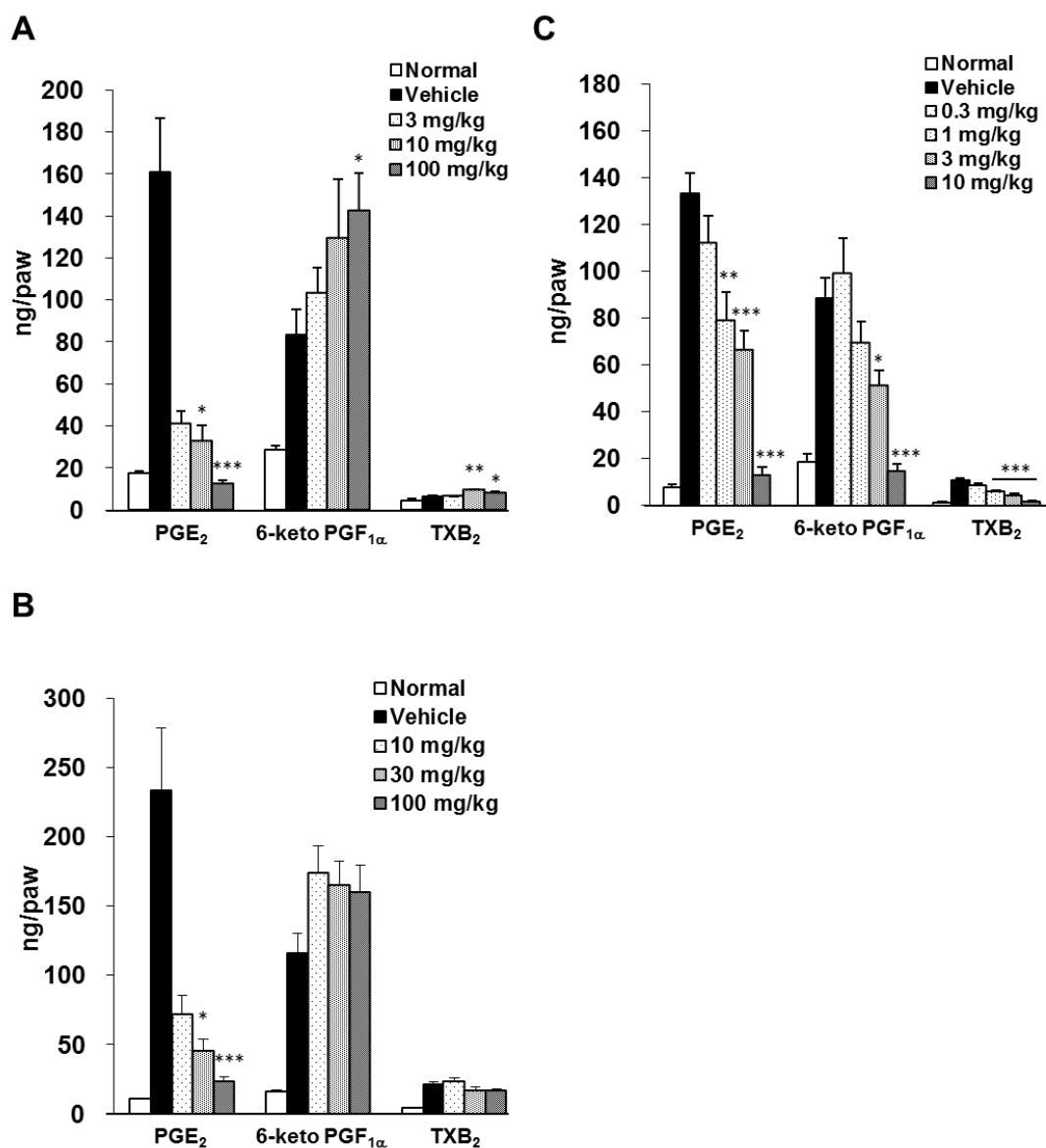


Fig. 3-3. Inhibitory effect of compound A (A), MF63 (B) and indomethacin (C) on yeast-induced prostaglandin synthesis in guinea pigs. Right hind paw was injected 0.1 ml of 20% suspension of brewer's yeast. Paw tissues were harvested 4 h after yeast injection. Compound A, MF63 and indomethacin were orally administered 2 h, 4 h and 5 h before harvest, respectively. Results are shown as the mean $\pm$ S.E.M. ($n = 5$).

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ for compound- versus vehicle-treated animals.

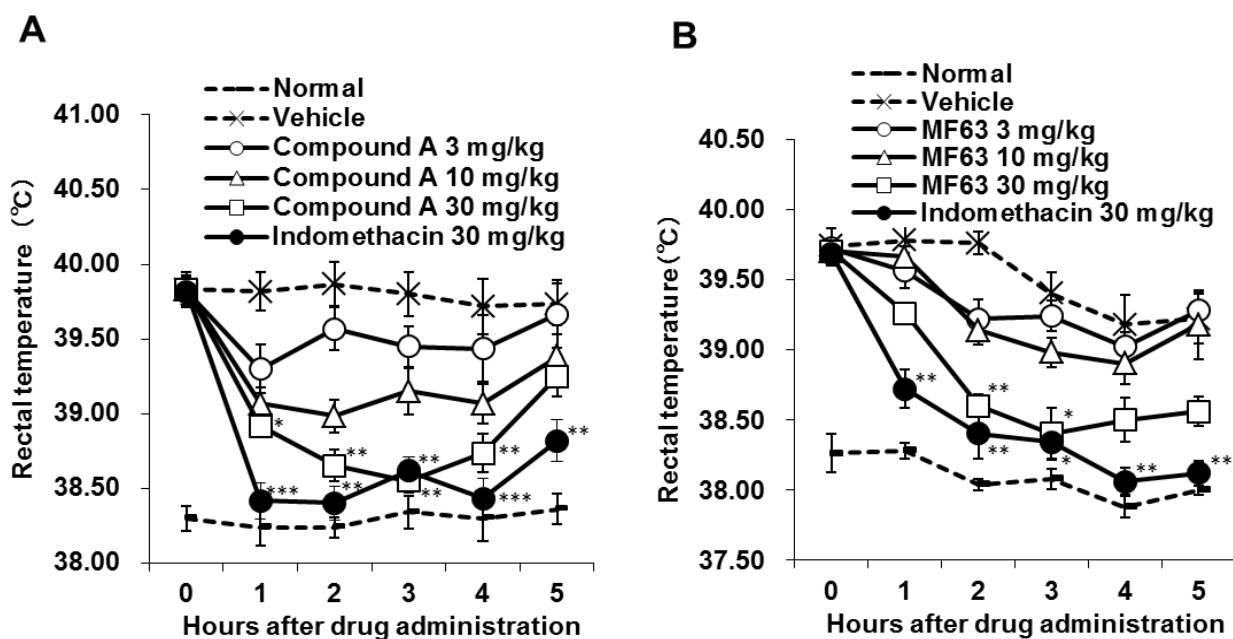


Fig. 3-4. Anti-pyretic effect of compound A (A) and MF63 (B) on the yeast-induced pyrexia in guinea pigs. Pyrexia was induced by the subcutaneous injection of 2 ml of 20% suspension of brewer's yeast. After 18 h, each compound or vehicle (DTS solution) was orally administered to animals which cause fever. Rectal temperature was measured every one hour until 5 h after administration. Results are shown as the mean $\pm$ S.E.M. ($n = 5-7$ /group). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ for compound- versus vehicle-treated animals.

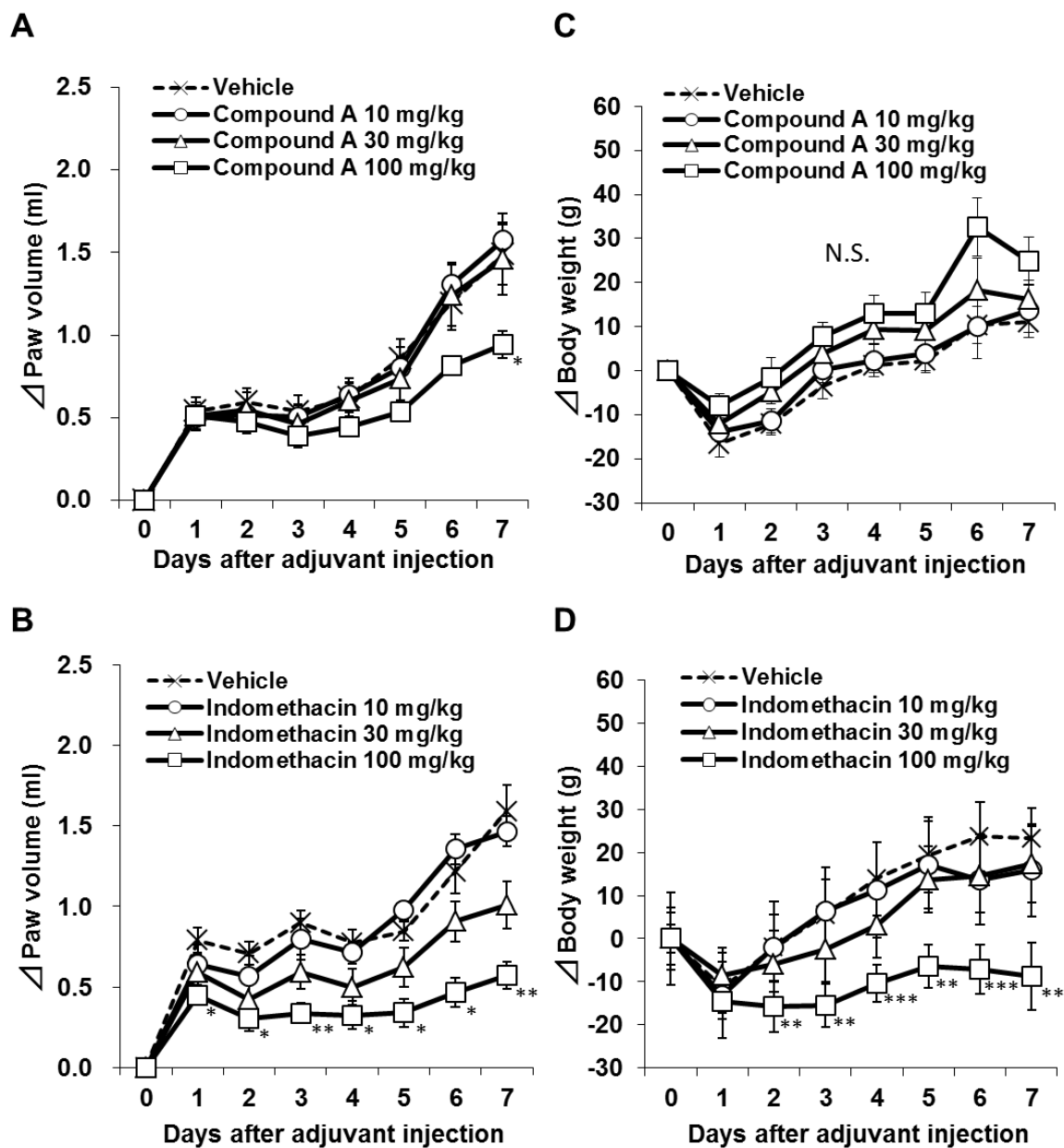


Fig. 3-5. Effect of compound A (A and C) and indomethacin (B and D) on the development of adjuvant arthritis (A and B) and weight gain (C and D) in guinea pigs. Animals received a single, right hind footpad intradermal injection of *M. butyricum* (100 μ g/0.05 ml/paw) in a liquid paraffin emulsion. Compound A or indomethacin or vehicle (DTS solution) was orally administered b.i.d. and q.d., respectively, from Day 0. Results are shown as the mean $\pm$ S.E.M. (n = 6/group). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ for compound- versus vehicle-treated animals.

Table 1. Effect of compound A and indomethacin on gastric mucosal lesion formation in guinea pigs.

	Dose (mg/kg)	Total length of hemorrhage lesions (mm, mean±S.E.M)	Incidence of lesion positive animals (%)	UD ₅₀ (mg/kg)
Compound A	0	0.6±0.4	0	>100
	30	1.0±0.6	0	
	100	4.0±2.3	20	
Indomethacin	3	3.0±1.4	20	15
	10	1.8±0.9	20	
	30	15.2±5.6	80	
	100	43.6±9.5	90	

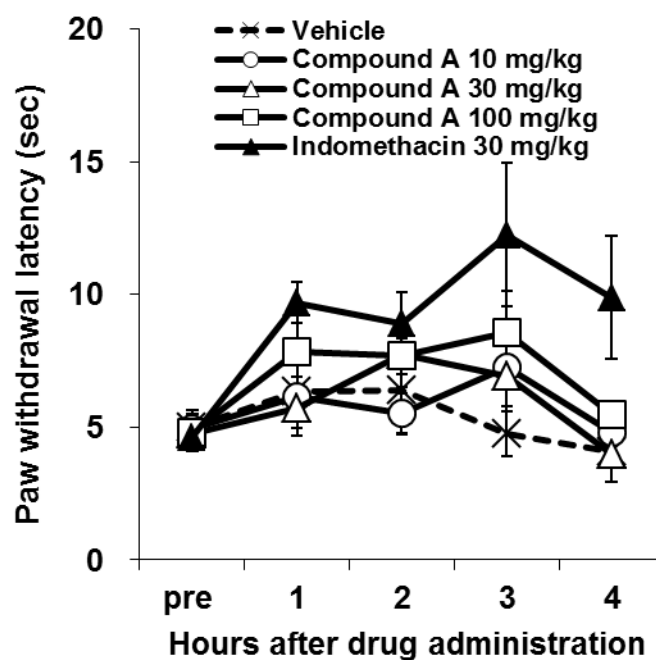


Fig. 3-6. Analgesic effect of compound A and indomethacin on yeast-induced thermal hyperalgesia in guinea pigs. Left hind paw was injected 0.1 mL of 20% suspension of brewer's yeast. After hyperalgesia-induced animals were selected, compound A, indomethacin, or vehicle (DTS solution) was orally administered. Paw withdrawal latency was measured 1, 2, 3 and 4 h after administration. Results are shown as the mean $\pm$ S.E.M. ($n = 5-6/\text{group}$). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ for compound- versus vehicle-treated animals.

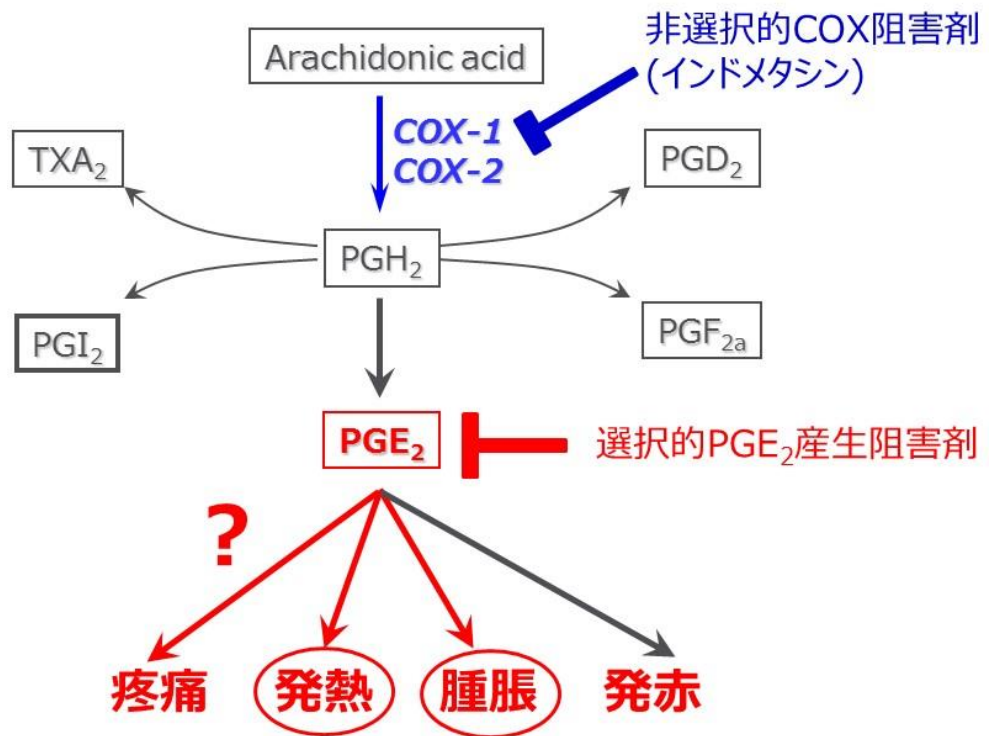


Fig. 3-7. Graphical summary of this chapter. Among inflammatory responses, heat and swelling are mediated mainly by PGE₂. On the other hand, pain is suggested to be mediated by other prostanoids than PGE₂.

第4章 選択的プロスタグランジン E₂ 産生阻害剤がラット発熱モデルおよび関節炎モデルに及ぼす影響の解析

4-1 緒言

第3章では、モルモット発熱モデル、関節炎モデルおよび炎症性疼痛モデルを用いて、選択的 PGE₂ 産生阻害剤の薬理作用を検討した。化合物 A は *in vitro*、*in vivo* いずれにおいても PGE₂ を選択的に抑制し、さらに解熱作用、抗炎症作用を示したものの、炎症性疼痛モデルにおける鎮痛作用は既存 NSAIDs よりも弱かった。一般に、薬剤の解熱作用、抗炎症作用および鎮痛作用の試験ではラットが用いられており⁴⁸、実際にラットで有効な薬剤が臨床応用に繋がった例も多い。したがって、本章では選択的 PGE₂ 産生阻害剤の薬理作用を精査することを目的として、ラット発熱モデルおよび関節炎モデルにおける化合物の薬理作用を評価した。化合物は第2章で合成したラットに活性を有する化合物 Q4e（以後、化合物 B）を用いた。

4-2 材料および方法

化合物

選択的 PGE₂ 産生阻害剤として、第 2 章にて合成した化合物 B を用いた (Fig. 4-1)。セレコキシブは Cayman Chemical より購入したものをを用いた。試験に供する化合物は全て 0.5% メチルセルロース 400 溶液 (和光純薬工業株式会社) に溶解し、3~5 ml/kg b.w. の投与用量で経口投与した。

動物

実験動物は 5 または 6 週齢の雄性または雌性 Lewis ラット (日本チャールス・リバー) を用いた。ラットマクロファージアッセイでは 8 週齢の Sprague-Dawley ラット (日本エスエルシー) を用いた。動物は室温を $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度を $55 \pm 20\%$ に維持した飼育室にて飼育し、毎日 20 時から 8 時までを暗期とした。特に記載がない限り、餌および水は自由摂取とした。動物は使用前に 1 週間馴化飼育を行なった。全ての実験手順は第一三共株式会社の動物飼育指針に沿って実施した。

A549 細胞アッセイ

ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞株である A549 細胞を、10% FBS、100 units/ml ペニシリン、100 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン (Pen/Strep, Thermo Fisher Scientific) 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific) を用いて $2.5 \times 10^4/\text{well}$ となるように調製し、96 穴培養プレートに播種して 37°C 、5% CO_2 条件下で 24 時間培養した。非接着細胞を除去した後に、化合物あるいは溶媒を添加した 1% FBS、Pen/Strep 含有 DMEM 200 μl を添加し、 37°C 、5% CO_2 条件下で 1 時間培養した。その後 IL-1 β (PeproTech) を終濃度 10 ng/ml となるように添加し、 37°C 、5% CO_2 条件下で 24 時間培

養した。培養終了後、上清を回収し PGE₂、6-keto PGF_{1α}、PGF_{2α}および TXB₂ 含量を EIA キット (Assay Designs) を用いて測定した。尚、IL-1β 処置 24 時間後に IL-1β 無処置細胞と IL-1β 処置細胞のセルライセートを回収し、ウェスタンブロット試験に供した。

ラットマクロファージアッセイ

ラット腹腔マクロファージの調製は山木らの手法を参考に実施した⁴⁹。ペプトン (BD Biosciences) およびスターチ (BD Biosciences) をそれぞれ 5% となるように生理食塩水に懸濁し、121°C で 15 分オートクレーブ処置した。室温に戻した後に、体重 100 g 当り 5 ml の用量で Sprague-Dawley ラットに腹腔内投与した。4 日後にラットをイソフルラン麻酔下にて頸動脈より放血死させた後、第 3 章「モルモットマクロファージアッセイ」の項と同様の手法によって細胞を回収し、マクロファージアッセイを行なった。培養終了後、上清を回収し PGE₂、6-keto PGF_{1α}、PGF_{2α}および TXB₂ 含量を EIA キット (Assay Designs) を用いて測定した。尚、LPS 処置後 1、2、4、8 および 24 時間後にそれぞれ LPS 無処置細胞と LPS 処置細胞のセルライセートを回収し、ウェスタンブロット試験に供した。

ウェスタンブロット

A549 細胞アッセイで回収した細胞およびマクロファージアッセイで回収した細胞は、5 mM EDTA および protease inhibitor cocktail (Roche) を含む氷冷 PBS 中で超音波処理を 10 秒間 × 2 回施した。セルライセート中のタンパク含有量を BCA タンパク質アッセイキット (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定し、タンパク量に換算して 10 μg (A549 細胞) あるいは 5 μg (ラットマクロファージ) のセルライセートを SDS-PAGE により分離し、以下第 3 章「ウェスタンブロット」の項と同様の手法により mPGES-1 および COX-2 発現を検出した。

血中濃度測定試験

化合物 B はラットに 30 mg/kg b.w.経口投与した (n = 3)。血液サンプルは投与後 0.5、1、2、3、4 および 8 時間に尾静脈より採取し、12,000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離して血漿を回収した。脳組織は化合物投与 4 時間後に回収して重量を測定し、10 mM EDTA と 100 μ M インドメタシンを添加した生理食塩水を脳重量の 4 倍量添加して Polytron[®] homogenizer にて 4°C で 60 秒間ホモジナイズした。血漿中および脳組織中の化合物濃度は LC-MS/MS 法により測定した。

LC-MS/MS 解析

LC-MS/MS 解析は第 2 章に記載の方法と同様の条件で実施し、化合物 B はアセトニトリルで抽出した。化合物 B の検出イオンピークは m/z 471 $\rightarrow$ 329 を選択した。

LPS 誘導性発熱モデル

本試験は中村らの手法を参考に実施した⁵⁰。LPS (10 μ g/2 ml/kg b.w., lot No. 0111:B4, Sigma-Aldrich) を雄性 Lewis ラット (n = 5) に腹腔内投与し、発熱を誘導した。化合物は LPS 投与の直後に経口投与した。直腸温は Digital rectal thermometer (Physitemp Instruments, Inc.) を用いて LPS 投与前ならびに LPS 投与 1、2、3 および 4 時間後に測定した。LPS 非投与動物をコントロールとした。最終測定後に動物を安楽殺し、脳脊髄液 (cerebrospinal fluid, CSF) を後頭下穿刺により採取した。CSF 中 PGE₂ および 6-keto PGF_{1 α} 濃度は EIA キット (Cayman Chemical) を用いて測定した。

アジュバント誘導性関節炎モデル

アジュバント誘導性関節炎モデルは Winder らの手法に若干の修正を加えて実施した³⁴。アジュバントは加熱殺菌 *Mycobacterium butyricum* (lot No. 7047934, BD Biosciences)

を乾熱滅菌した液状パラフィン（和光純薬工業）に 2 mg/ml となるように懸濁し、Sonifier Cell Disruptor 200（Branson Ultrasonic）を用いて超音波粉碎処置を行なった。アジュバント（100 μ g *M. butyricum*/0.05 ml/paw）を雌性 Lewis ラットの右足底皮内投与し、この日を Day 0 とした。アジュバントによる足部の肥厚が最大化した Day 19 に動物を足体積の平均値が等しくなるように群分けを実施した（n = 6）。化合物あるいは溶媒は 1 日 1 回 Day 19 から Day 21 まで経口投与した。アジュバント接種した足の体積を Day 19 から Day 22 まで Plethysmometer（Ugo Basile）を用いて測定した。アジュバント非接種動物をコントロールとし、結果はそれぞれの個体の足体積からコントロール群の足体積の平均値を引いた値を Increased foot volume（ml）として示した。

統計解析

in vitro アッセイおよび血中濃度測定試験の結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で示し、その他の結果は全て平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。in vitro 試験では、IC₅₀ は 4 用量漸増法により算出した。統計解析は Dunnett の多重比較検定により実施した。

4-3 結果

化合物 B は PGE₂ 産生を選択的に抑制する

化合物 B の PGE₂ 抑制活性および選択性をヒトとラットの細胞アッセイ系を用いて評価した。A549 細胞アッセイでは、IL-1 β 処置により COX-2 と mPGES-1 の発現が亢進し、PGE₂ 産生が増加した (Fig. 4-2A)。本試験系では PGE₂ の他に 6-keto PGF_{1 α} と PGF_{2 α} 産生も増加していたが、TXB₂ 産生の増加はわずかであった (Fig. 4-2B)。化合物 B は PGE₂ を選択的に抑制し、IC₅₀ は 12.8 nM であったが (Fig. 4-2C)、PGE₂ 以外のプロスタノイドの産生は化合物の濃度依存的に亢進していた (Fig. 4-2D-F)。産生が亢進したプロスタノイドのうち、PGF_{2 α} の亢進された量が最も多かった。セレコキシブは全てのプロスタノイド産生を抑制し、PGE₂、6-keto PGF_{1 α} 、PGF_{2 α} および TXB₂ の IC₅₀ はそれぞれ 0.5、0.7、1.3 および 0.8 nM であった (Fig. 4-2G)。ラットマクロファージアッセイでは、LPS 刺激により COX-2 と mPGES-1 発現が 24 時間後まで時間依存的に亢進し、PGE₂ 産生は mPGES-1 発現と相関していた (Fig. 4-3A)。LPS 刺激により PGE₂、6-keto PGF_{1 α} 、PGF_{2 α} および TXB₂ の産生が増加した (Fig. 4-3B)。化合物 B は PGE₂ 産生を抑制し、IC₅₀ は 1.9 nM であった (Fig. 4-3C)。一方、化合物 B により TXB₂ 産生は亢進したが、化合物 B による PGF_{2 α} 産生亢進はわずかで、6-keto PGF_{1 α} 産生は変化しなかった (Fig. 4-3D-F)。セレコキシブは全てのプロスタノイド産生を抑制し、PGE₂、6-keto PGF_{1 α} 、PGF_{2 α} および TXB₂ の IC₅₀ はそれぞれ 0.8、0.9、3.1 および 3.2 nM であった (Fig. 4-3G)

化合物 B は良好な経口吸収性を示す

化合物 B (30 mg/kg b.w.) は経口投与後に速やかに吸収され、投与の 30 分後に 12.2 μ M となり、投与 1 時間後に C_{max} 19 μ M まで上昇した。投与後 2、3 および 4 時間でそれぞれ 16.3 μ M、13.2 μ M および 8.1 μ M と緩やかに低下し、投与 8 時間後の血漿中濃度は

2.6 μM 、 $t_{1/2}$ は 4.5 時間であった (Fig. 4-4)。また、血中曝露の指標である曲線下面積 ($\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$) は 39.4 $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$ であった。一方で、脳中の化合物 B 濃度は投与後 4 時間で 0.6 μM であり、血漿中濃度の 10 分の 1 未満であった。

ラット LPS 誘導性発熱モデルにおいて化合物 B は PGE_2 産生を抑制し、解熱作用を示す

ラット LPS 誘導性発熱モデルにおける化合物 B の解熱作用を評価した。LPS 処置により直腸温が $36.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ から $37.7 \pm 0.1^\circ\text{C}$ へ 2 層性に上昇し (Fig. 4-5A)、CSF 中の PGE_2 および 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 産生が上昇した (Fig. 4-5B)。化合物 B の 30 mg/kg b.w.投与により解熱作用が認められ、CSF 中の PGE_2 産生を用量依存的に低下させた。この時、CSF 中の 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 産生の低下はわずかであった。セレコキシブは 10 mg/kg b.w.で強力な解熱作用を示し、CSF 中の PGE_2 および 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 産生をほぼ完全に抑制した (Fig. 4-5A, B)。

ラットアジュバント誘導性関節炎モデルにおいて化合物 B は抗炎症作用を示す

化合物 B の抗炎症作用を評価するために、ラットアジュバント誘導性関節炎モデルを用いた。Fig. 4-6 に示したように、ラット足部はアジュバント接種 19 日目 (Day 19) の時点で劇的に肥厚した。化合物 B は 30 mg/kg b.w./day 投与群において有意に足体積の低下が認められたが、その作用はセレコキシブ (10 mg/kg b.w./day) よりも弱かった。

4-4 考察

第4章では第2章にて合成した選択的 PGE₂ 産生阻害剤である化合物 B の薬理作用について、ラットを用いて COX-2 選択的阻害剤であるセレコキシブと比較した。

A549 細胞アッセイでは、IL-1 β 刺激により COX-2 および mPGES-1 タンパクの発現が誘導された。プロスタノイドは PGF_{2 α} 、PGE₂、6-keto PGF_{1 α} 、TXB₂ の順に多く産生された。化合物 B は PGE₂ の産生を選択的に抑制したが、一方で他のプロスタノイドの産生を亢進した。他のプロスタノイドの亢進は第3章で評価を実施した化合物 A においても認められた現象であり、化合物 B も化合物 A と同様に PGE₂ 合成酵素(おそらく mPGES-1) を阻害することにより、PGE₂ 以外のプロスタノイド産生を亢進していると考えられる。産生が亢進されたプロスタノイドの中では PGF_{2 α} の亢進が著しく、その亢進された量は PGE₂ の抑制量よりも 10 倍以上多かった。PGE₂ から他のプロスタノイドへの転換が起こる場合、構造的に 1 分子の PGE₂ が 1 分子の PGF_{2 α} に転換されると予想されるが、本検討結果では抑制された PGE₂ 量以上の PGF_{2 α} 産生が亢進された。この原因を解明するためにはプロスタノイド産生転換のメカニズムについて精査する必要がある。ラットマクロファージアッセイでは、LPS 刺激により COX-2 および mPGES-1 タンパクの発現が誘導され、プロスタノイドは PGE₂、PGF_{2 α} 、6-keto PGF_{1 α} 、TXB₂ の順に多く産生された。化合物 B はラットマクロファージにおいても PGE₂ 産生を選択的に抑制し、PGF_{2 α} および TXB₂ 産生を亢進した。一方で、A549 細胞アッセイとは異なり 6-keto PGF_{1 α} 産生に変化は認められなかった。mPGES-1 ノックアウトマウスおよび mPGES-1 阻害剤を用いたこれまでの研究では、異なるプロスタノイド産生プロファイルの変化が報告されている。たとえばマウス樹状細胞を用いた研究では、mPGES-1 欠損により PGE₂ 産生が減少したが 6-keto PGF_{1 α} や TXB₂ 産生に変化はなく、PGD₂ の産生が亢進すると報告されている⁵¹。他の研究では、mPGES-1 を欠損した常在性マクロファージを LPS で刺激したところ、

野生型と比較して PGE₂ と 6-keto PGF_{1α} の産生が抑制されていたと報告されている³⁷。一方で、ヒト単球を用いた試験において mPGES-1 阻害剤は他のプロスタノイド産生には影響を与えなかったという報告や⁵²、PGE₂ に加えて 6-keto PGF_{1α} と TXB₂ の産生が抑制されたという報告もある²⁸。さらに、マウス腹腔マクロファージを LPS で刺激した実験では、PGE₂ の産生抑制に伴い 6-keto PGF_{1α} 産生が亢進したと報告されている⁵³。これらの結果から、プロスタノイド産生プロファイルの変化は細胞種や組織によって異なると考えられる。

プロスタノイド産生プロファイルの変化は TXA₂/PGI₂ バランスの不均衡、すなわち血液凝固作用を有する TXA₂ 量が抗血小板作用を有する PGI₂ 量を上回ることにより血液凝固にバランスが傾き、その結果、心血管系の恒常性に悪影響を与えるかもしれない。しかしながら、mPGES-1 欠損においては尿中の PGE の代謝物が減少し、PGI₂ の代謝物が増加するが TXA の代謝物は変化しないことが報告されている。また、COX-2 選択的阻害剤によって亢進される頸動脈の血栓性閉塞が、mPGES-1 欠損マウスでは亢進しないことが示されている^{23,54}。したがって、選択的に PGE₂ 産生を阻害した場合でも COX-2 選択的阻害剤のような心血管系への影響は少ないことが期待されるが、最近の研究では mPGES-1 の遺伝子欠損と mPGES-1 阻害剤による薬理的阻害では阻害様式が異なると指摘されていることから⁵³、選択的 PGE₂ 産生阻害剤の心血管系イベントへの影響については、阻害剤の血栓形成への影響を直接評価するなどのさらなる精査が必要と思われる。

化合物 B はラットにおいて良好な経口吸収性を示したことから、ラット in vivo 薬理モデルにおける作用を検討した。LPS 誘導性発熱モデルにおいて、化合物 B は解熱作用を示した。発熱は脳の視床下部において産生される PGE₂ によって調節されていることから^{39,40}、選択的 PGE₂ 産生阻害剤は解熱剤として有用であると考えられる。しかしながら、化合物 B の解熱作用はセレコキシブよりも弱かった。セレコキシブは経口投与時

の脳組織中の最大化合物濃度が血漿中最大濃度とほぼ等しいことが分かっている⁵⁵。本章の検討では、セレコキシブは CSF 中の PGE₂ 産生をほぼ完全に抑制していた一方で、化合物 B は 30 mg/kg b.w.投与時でも CSF 中の PGE₂ を完全には抑制していなかった。これは化合物 B の脳組織中濃度が血漿中濃度の 10 分の 1 未満であり、脳組織における化合物曝露および PGE₂ 産生抑制が不十分であったことが原因と考えられる。

続いて、ラットアジュバント誘導性関節炎モデルにおける化合物 B の作用を評価した。このモデルは関節リウマチの非臨床モデルとして広く用いられているモデルであり、COX-2 選択的阻害剤の有効性が報告されている³²。本章の検討では治療的効果を評価することを目的として、関節炎が形成された後から化合物 B の投与を開始した。その結果、化合物 B は形成された足部の浮腫を改善した。よって、選択的 PGE₂ 産生阻害剤は関節リウマチの治療薬として有用であると考えられる。しかしながら、化合物 B の抗炎症作用はセレコキシブよりも弱かった。この理由としては以下の 2 つの可能性が考えられる。1 つ目は、A549 細胞およびラットマクロファージアッセイの結果から、化合物 B の *in vitro* PGE₂ 産生阻害活性がセレコキシブよりも弱いことが挙げられる。2 つ目には体内動態の差が考えられる。セレコキシブを 2 mg/kg b.w.経口投与した時の C_{max} および AUC_{0→∞} はそれぞれ 11 μM および 41.9 μg·h/ml と報告されている⁵⁵。一方で、本章の検討により化合物 B の C_{max} および AUC_{0→∞} は 30 mg/kg b.w.経口投与時でそれぞれ 19 μM および 39.4 μg·h/ml であることが分かっており、ほぼ 2 mg/kg b.w.のセレコキシブと同等の血中曝露と考えられる。しかしながら、本章の試験におけるセレコキシブの用量は 10 mg/kg b.w.であったことから、より血中曝露が高いことが予想され、これらの差が薬理作用の差に繋がっていることが考えられる。したがって、より *in vitro* 活性が強く、血中動態の良好な選択的 PGE₂ 産生阻害剤であればより強力な抗炎症作用を示すと考えられる。

本章で得られた知見をまとめた図を Fig. 4-7 に示す。選択的 PGE₂ 産生阻害剤を用いた検討から、発熱および腫脹反応は主に PGE₂ を介していることが示唆された。この知

見は第 3 章のモルモット炎症モデルにおいて得られた知見と一致することから、これらの炎症反応における PGE_2 の関与をさらに支持すると思われる。

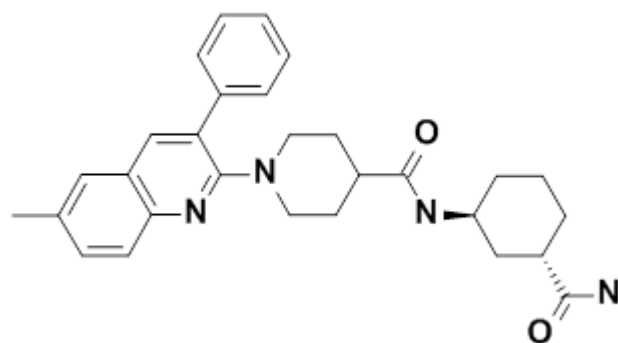


Fig. 4-1. Chemical structure of compound B

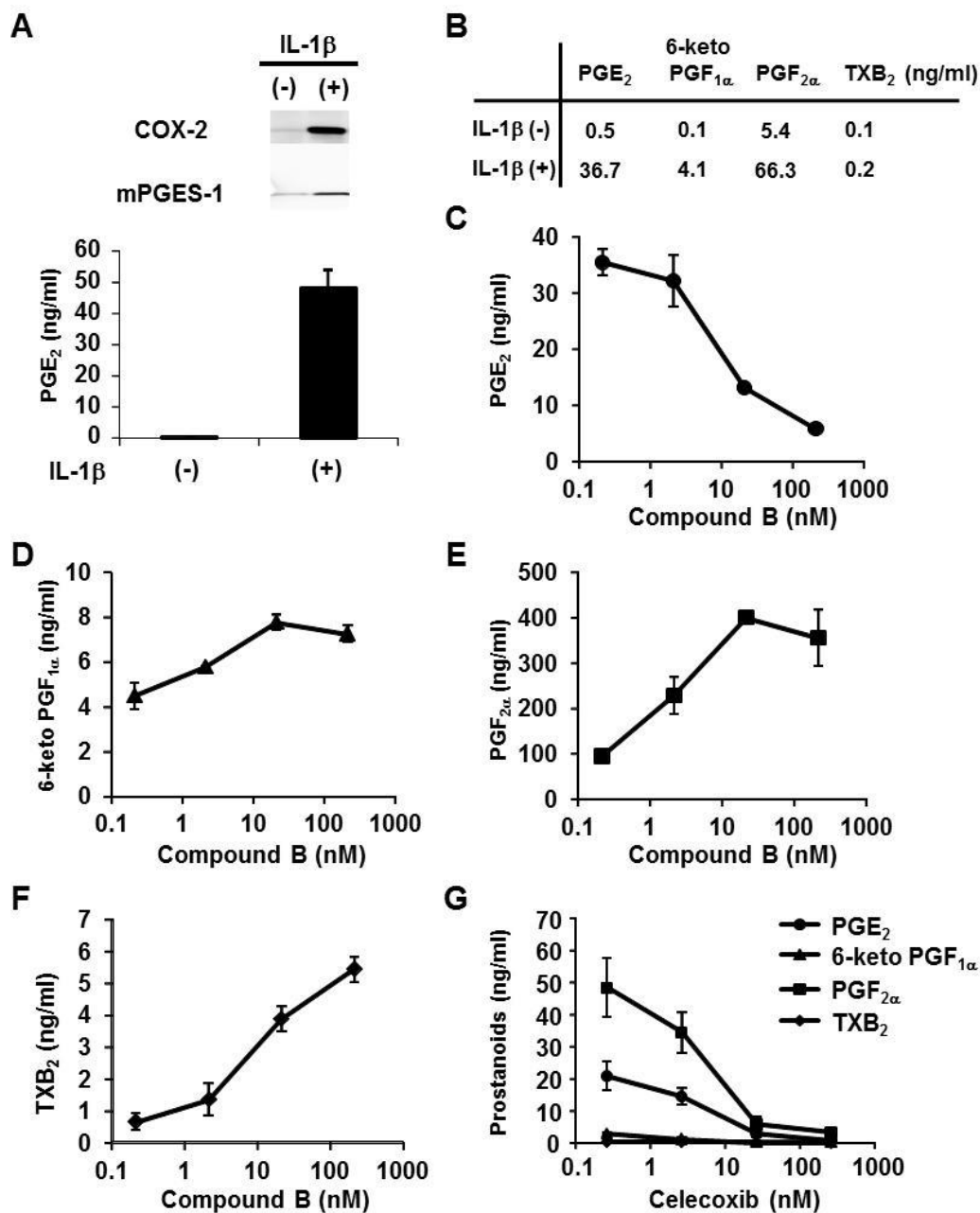


Fig. 4-2. Induction of prostanooids synthesis and inhibitory profile of compound B in A549 cells. **A**, A549 cells were treated with IL-1β for 24 h and the expression of COX-2 and mPGES-1 (upper panel) and the production of PGE₂ (lower panel) were examined. **B**, the production of PGE₂, 6-keto PGF_{1α}, PGF_{2α} and TXB₂ with or without IL-1β treatment. **C-F**, dose-dependent effects of compound B on the production of PGE₂ (c), 6-keto PGF_{1α} (d), PGF_{2α} (e), and TXB₂ (f) in A549 cells. **G**, dose-dependent effects of celecoxib on the production of PGE₂, 6-keto PGF_{1α}, PGF_{2α} and TXB₂ in A549 cells. Results are shown as the mean ± S.D. (in duplicate).

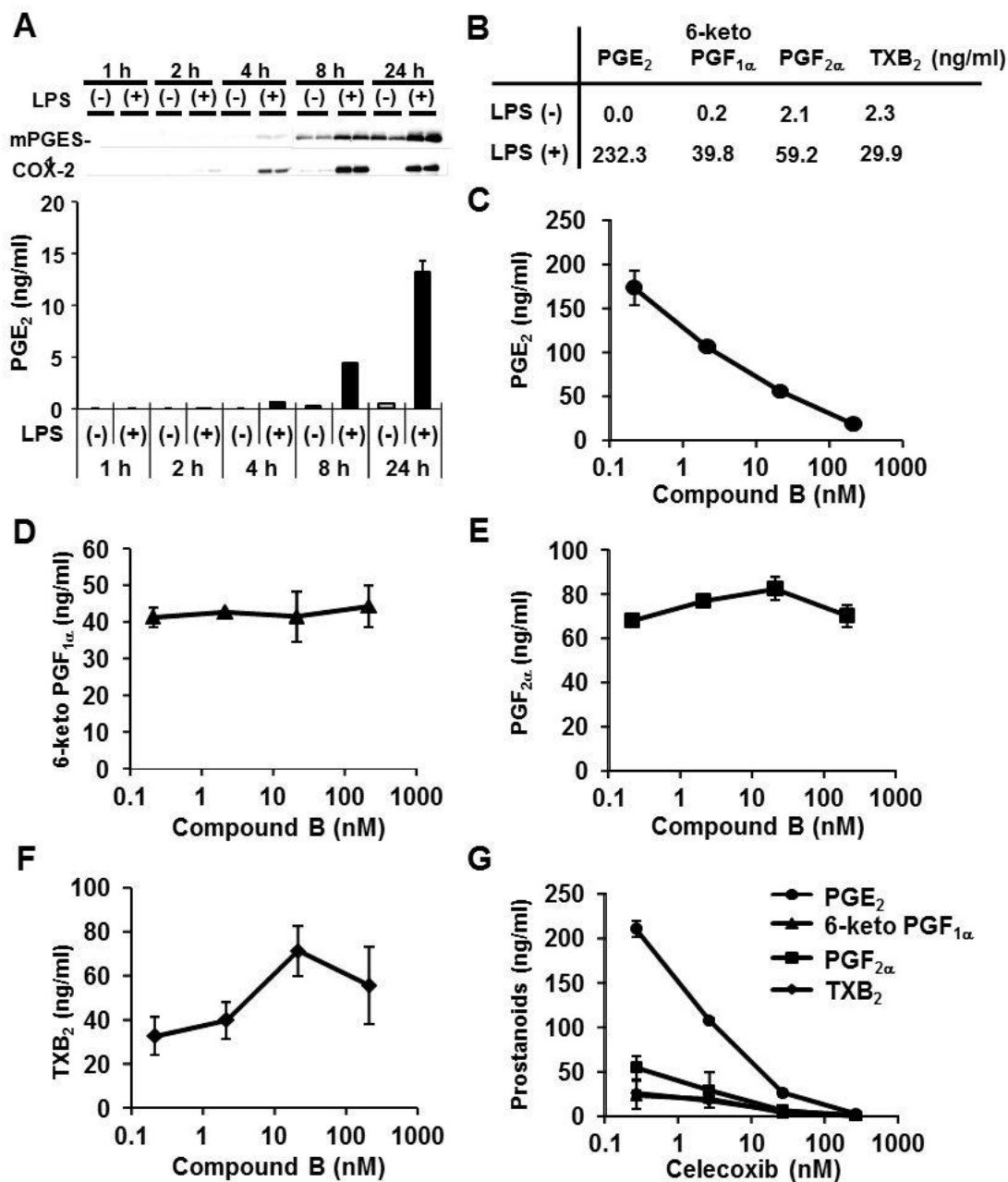


Fig. 4-3. Induction of prostanoids synthesis and inhibitory profile of compound B in rat peritoneal macrophages. **A**, rat macrophages were treated with LPS for 1, 2, 4, 8, and 24 h and the expression of COX-2 and mPGES-1 (upper panel) and the production of PGE₂ (lower panel) were examined. **B**, the production of PGE₂, 6-keto PGF_{1α}, PGF_{2α} and TXB₂ with or without LPS treatment. **C-F**, dose-dependent effects of compound B on the production of PGE₂ (c), 6-keto PGF_{1α} (d), PGF_{2α} (e), and TXB₂ (f) in rat macrophages. **G**, dose-dependent effects of celecoxib on the production of PGE₂, 6-keto PGF_{1α}, PGF_{2α} and TXB₂ in rat macrophages. Results are shown as the mean ± S.D. (in duplicate).

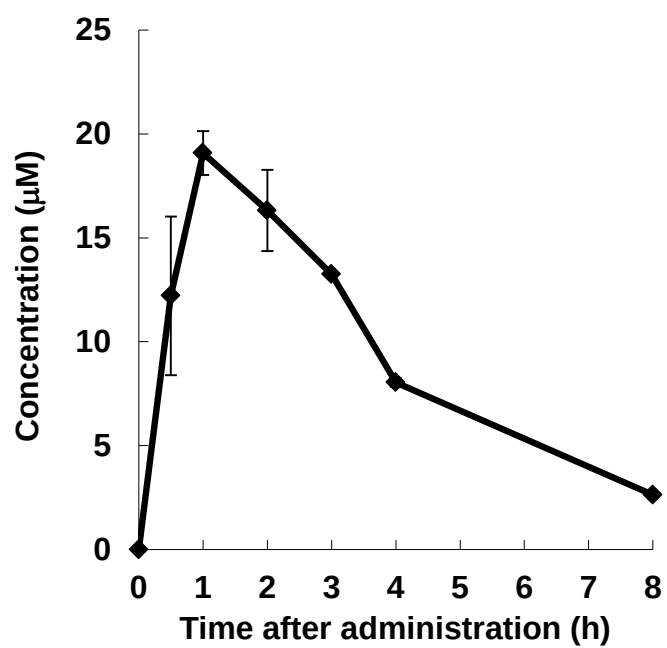


Fig. 4-4. Plasma concentration of compound B after oral administration (30 mg/kg) in rats. Results are shown as the mean $\pm$ S.D. (n = 3/time point).

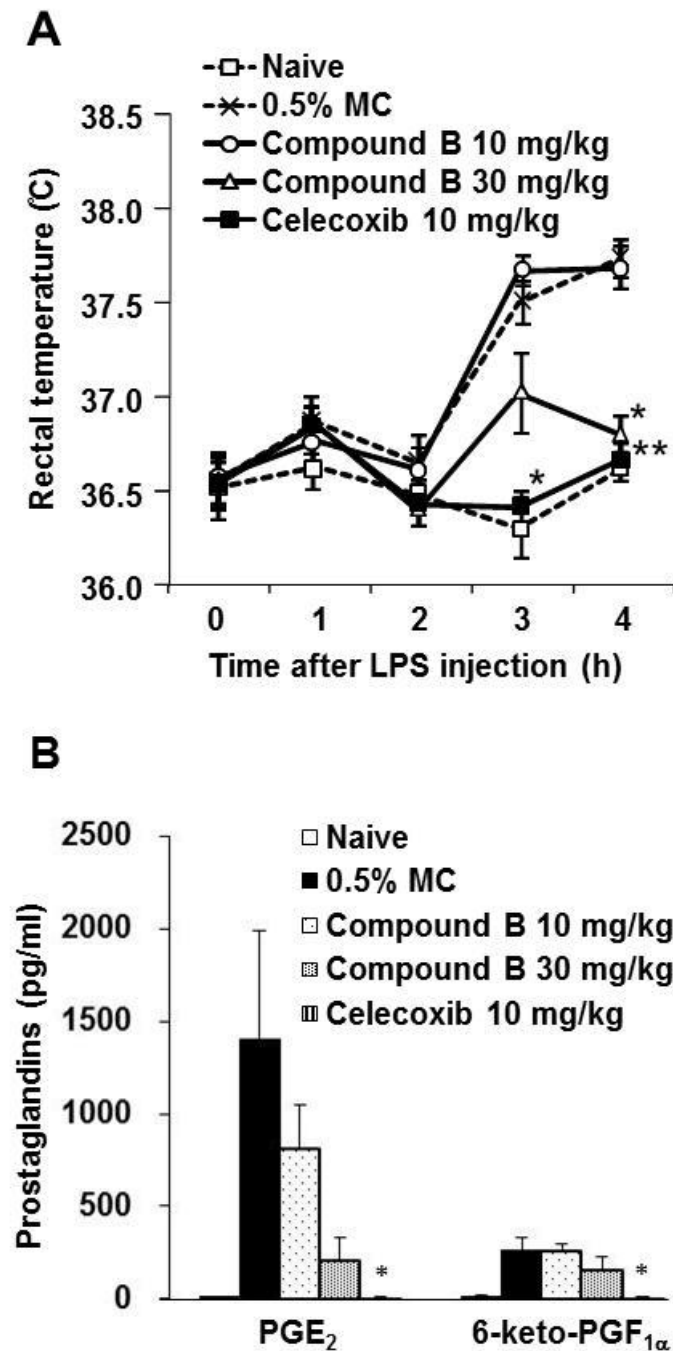


Fig. 4-5. Anti-pyretic effect of compound B in rats. **A**, time course of rectal temperature in a LPS-induced pyrexia model. Male rats received LPS (10 μ g/2 ml/kg) intraperitoneally. Compound B, celecoxib, or 0.5% MC (control) was orally administered just after LPS injection. **B**, PGE₂ and 6-keto-PGF_{1 α} contents in CSF. CSF was obtained by suboccipital puncture 4 h after LPS injection. Results are shown as the mean $\pm$ S.E.M. (n = 5/group). The statistical analysis was performed by Dunnett's test for multiple comparisons.

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ for compound- versus 0.5% MC-treated animals.

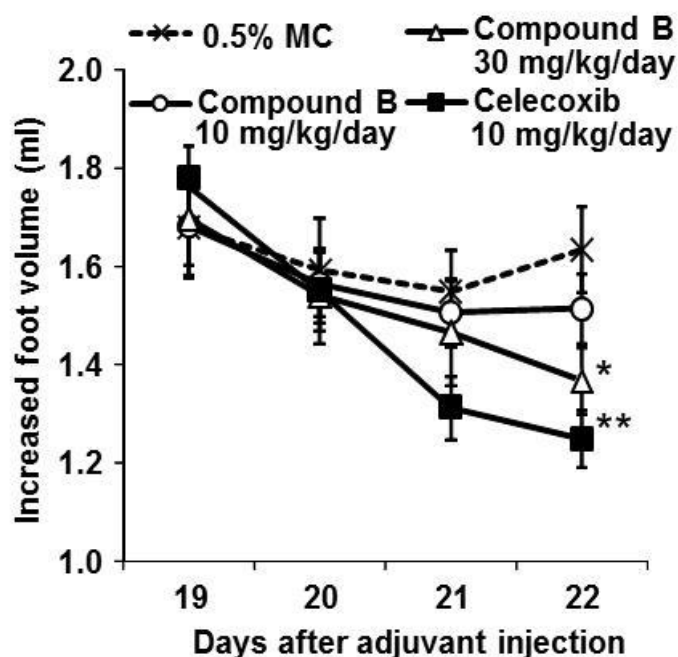


Fig. 4-6. Anti-inflammatory effect of compound B and celecoxib in a rat adjuvant-induced arthritis model. Female rats received a single, right hind-paw intradermal injection of *M. butyricum* (100 μ g/0.05 ml/paw) in a liquid paraffin emulsion on Day 0. Compound B, celecoxib or 0.5% MC (control) was orally administered once a day from Day 19 to Day 21. The increased foot volume of the adjuvant-injected foot was determined from Day 19 to Day 22. Results are shown as the mean $\pm$ S.E.M. (n = 6/group). The statistical analysis was performed by Dunnett's test for multiple comparisons. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ for compound-versus 0.5% MC-treated animals.

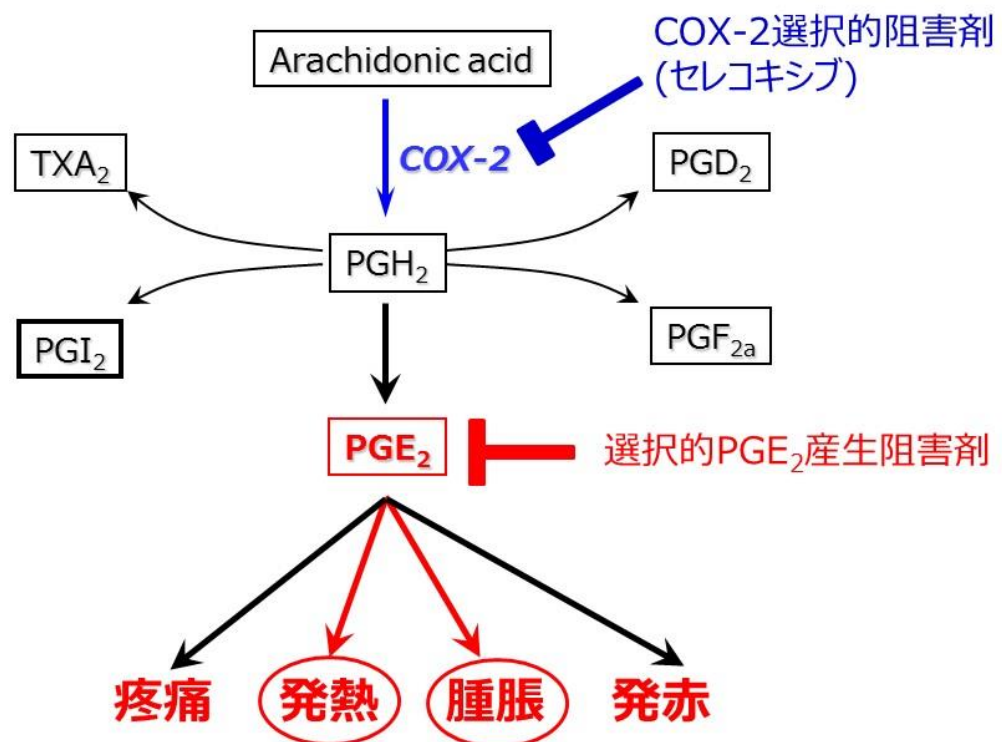


Fig. 4-7. Graphical summary of this chapter. Among inflammatory responses, heat and swelling are mediated mainly by PGE₂. These results are consistent with the result of chapter 3.

第 5 章 選択的プロスタグランジン E₂ 産生阻害剤を用いた、ラット炎症性疼痛モデルにおけるプロスタグランジン E₂ およびプロスタグランジン I₂ シグナルの寄与の解析

5-1 緒言

第 4 章ではラットに活性を有する選択的 PGE₂ 産生阻害剤である化合物 B を用いて炎症モデルにおける薬理作用を評価した。その結果、選択的 PGE₂ 産生阻害により解熱作用および抗炎症作用を示し得ることが示唆された。本章では選択的 PGE₂ 産生阻害剤の炎症性疼痛モデルにおける薬理作用について、COX-2 選択的阻害剤であるセレコキシブと比較検討した。また、PGI₂ の寄与を評価するために IP アンタゴニストである RO3244019 を用いて検討を行なった。尚、第 4 章で使用した化合物 B は高用量投与時に弱いながらも鎮静作用が認められた（データ無し）。一般に鎮痛試験は疼痛刺激に対する応答を観察する行動評価であるが、鎮静作用を有する薬剤は行動抑制作用を示すことから、鎮痛試験においては擬陽性が懸念される。したがって、本章では鎮静作用が認められない化合物 Q4b（以後、化合物 C）を用いた。

5-2 材料および方法

化合物

選択的 PGE₂ 産生阻害剤として、第 2 章にて合成した化合物 C を用いた (Fig. 5-1)。セレコキシブは Cayman Chemical より購入したものをを用いた。IP アンタゴニストである RO3244019 ((*R*)-3-フェニル-2-(5-フェニル-ベンゾフラン-2-イルメトキシカルボニルアミノ)-プロピオン)、および EP4 アンタゴニストである CJ-023423 (*N*-[*N*-(2-[4-(2-エチル-4,6-ジメチル-1*H*-イミダゾ [4,5-*c*] ピリジン-1-イル) フェニル] エチル] カルバモイル]-4-メチルベンゼンスルホンアミド) は第一三共株式会社創薬化学研究所にて合成した。試験に供する化合物は全て 0.5%メチルセルロース 400 溶液に溶解し、5 ml/kg b.w.の投与用量で経口投与した。

動物

アジュバント誘導性関節炎疼痛モデルでは、5 または 6 週齢 Lewis ラット (日本チャールス・リバー) を用いた。イースト誘導性炎症性疼痛モデルにおいては 4 または 5 週齢の Wistar-Imamichi ラット (動物繁殖研究所) を用いた。ラットマクロファージアッセイでは 8 週齢の Sprague-Dawley ラット (日本エスエルシー) を用いた。動物は室温を 23 ± 2°C、湿度を 55 ± 20%に維持した飼育室にて飼育し、毎日 20 時から 8 時までを暗期とした。特に記載がない限り、餌および水は自由摂取とした。動物は使用前に 1 週間馴化飼育を行なった。全ての実験手順は第一三共株式会社の動物飼育指針に沿って実施した。

ラットマクロファージアッセイ

第4章で記載した方法と同様にラットマクロファージアッセイを実施した。尚、化合物Cの評価は第4章の化合物Bの評価と同時に実施したため、LPS(－)およびLPS(＋)時のプロスタノイド産生量およびセレコキシブの結果は第4章と同値である。

ラットアジュバント誘導性関節炎疼痛モデル

本試験は葛声らの手法を参考に実施した⁵⁶。アジュバントは第4章のアジュバント誘導性関節炎モデルと同様に調製および投与し、投与日をDay 0とした。Day 18の夕刻より動物を絶食し、Day 19にラットのアジュバント非接種足の足根脛骨関節を2~3秒の間隔を空けて一定の負荷で5回屈曲刺激を与えた。刺激を与えた5回全てで啼鳴反応を示した個体を疼痛陽性個体として試験に用いた。個体を無作為に群分けし、化合物あるいは溶媒を経口投与した (n = 6)。疼痛反応は化合物投与の1、2、3および4時間後に、足根脛骨関節を5回屈曲刺激し、啼鳴反応を示した回数をペインスコアとして測定した。アジュバントを投与していない個体ではペインスコアは0であった。最終測定終了後に動物を安楽殺し、非接種足を切除して重量を測定した。その後液体窒素で急速冷凍し、続く処理の実施まで-80℃に保存した。凍結サンプルは第3章の炎症組織中のプロスタノイド含量測定試験と同様に粉碎・ホモジナイズ処理を行い、ホモジナイズ上清中のPGE₂および6-keto PGF_{1α}含量はそれぞれのEIAキット (Cayman Chemical) を用いて測定した。

イースト誘導性急性炎症性疼痛モデル (Randall-Selitto 法)

本試験はRandallらの手法を参考に実施した⁵⁷。体重60~80 gの雄性Wistar-Imamichiラットを前日夕刻より絶食し、0.1 mlの20%イースト懸濁液を右足底皮内投与した。痛覚過敏刺激として、イースト投与の16および18時間後にAnalgesy-Meter (Ugo-Basile)

を用いて 250 g までの漸増圧負荷をイースト処置足底部に与えた。イースト処置の 18.5 時間後に漸増圧負荷を与え、動物が啼鳴反応を示した負荷 (g) を疼痛閾値として計測した。疼痛閾値が 60~120 g の個体を選抜し、直ちに化合物あるいは溶媒を経口投与した (n = 6)。疼痛閾値は化合物投与後の 1、2、3 および 4 時間後に測定した。最終測定終了後に動物を安楽殺し、炎症足組織を回収した。足組織は上述のラットアジュバント誘導性関節炎疼痛モデルと同様に粉砕・ホモジナイズ処理を行なった。また、腰髄の L5 部位を含む約 2 cm の脊髄組織を回収し、ホモジナイズ処理のみを足組織と同様の手法で行なった。ホモジナイズ上清中の PGE₂ および 6-keto PGF_{1α} 含量はそれぞれの EIA キット (Cayman Chemical) を用いて測定した。

統計解析

in vitro アッセイおよび血中濃度測定試験の結果は平均値±標準偏差で示し、その他の結果は全て平均値±標準誤差で示した。in vitro 試験では、IC₅₀ は 4 用量漸増法により算出した。足組織中プロスタノイド測定において、化合物によるプロスタノイド産生抑制率は以下の式により算出した： $1 - \{(\text{化合物投与個体のプロスタノイド量}) - (\text{炎症非誘導個体のプロスタノイド量})\} / \{(\text{溶媒投与群のプロスタノイド量}) - (\text{炎症非誘導個体のプロスタノイド量})\} \times 100$ 。ID₅₀ は化合物の投与量と抑制率の間の回帰直線を最小二乗法により求めて算出した。有意差検定は、プロスタノイド産生試験においては Dunnett の多重比較検定により実施し、その他の試験は Steel の多重比較検定により実施した。

5-3 結果

化合物 C はラットマクロファージにおいて PGE₂ を選択的に抑制する

ラットマクロファージアッセイにおける化合物 C の阻害プロファイルを評価した。化合物 C は LPS 刺激による PGE₂ 産生を濃度依存的に抑制し、IC₅₀ は 1.9 nM であった (Fig. 5-2B)。化合物 C 処置によって 6-keto PGF_{1α} および PGF_{2α} 産生は抑制されなかったが (Fig. 5-2C, D)、TXB₂ 産生は亢進した (Fig. 5-2E)。

化合物 C はアジュバント誘導性関節炎疼痛モデルにおいて PGE₂ 産生を抑制するが、痛覚過敏を抑制しない

ラットアジュバント誘導性関節炎疼痛モデルにおける化合物 C の鎮痛作用を評価した。アジュバント接種 19 日後に慢性疼痛は誘導され、試験期間中は疼痛が維持されていた。セレコキシブ (10 mg/kg b.w.) が投与後 3 および 4 時間でペインスコアを有意に改善した一方で、化合物 C はいずれの時間においてもペインスコアの改善が認められなかった (Fig. 5-3A)。試験終了後の回収した足組織中の PGE₂ および 6-keto PGF_{1α} 量を測定した。アジュバントの接種により PGE₂ 産生は 0.3 ± 0.08 ng/paw (非接種個体足) から 9.3 ± 1.8 ng/paw まで増加したが、6-keto PGF_{1α} 産生は非接種個体足が 9.5 ± 1.1 ng/paw であったのに対し 10.0 ± 1.0 ng/paw とほとんど変化が認められなかった。化合物 C は最低用量である 1 mg/kg b.w. から選択的に PGE₂ 産生を強く抑制し、ID₅₀ は 1 mg/kg b.w. 未満であった (Fig. 5-3B)。一方、セレコキシブは PGE₂ と 6-keto PGF_{1α} いずれの産生も抑制した (Fig. 5-3B)。

化合物 C はイースト誘導性急性炎症性疼痛モデルにおいて痛覚過敏を抑制しない

イースト誘導性急性炎症性疼痛モデルは NSAIDs の鎮痛作用評価に広く用いられているモデルであるため、本モデルにおける化合物 C の鎮痛作用を評価した。イースト処置により、足組織における PGE₂ および 6-keto PGF_{1α} 産生はそれぞれ 1.1 ± 0.02 ng/paw から 30.9 ± 2.6 ng/paw および 4.0 ± 0.4 ng/paw から 11.9 ± 2.0 ng/paw に増加した。また、脊髄における PGE₂ および 6-keto PGF_{1α} 産生もそれぞれ 0.08 ± 0.02 ng/tissue から 0.37 ± 0.04 ng/tissue および 0.2 ± 0.02 ng/tissue から 0.32 ± 0.04 ng/tissue に増加した。化合物 C は足組織および脊髄の PGE₂ 産生を選択的に抑制し、ID₅₀ はそれぞれ 2.9 mg/kg b.w. および 4.2 mg/kg b.w. であった (Fig. 5-4A, B)。しかしながら、化合物 C 投与による疼痛閾値の変化は認められなかった (Fig. 5-4C)。一方、セレコキシブ (5 mg/kg b.w.) は足組織および脊髄の PGE₂ および 6-keto PGF_{1α} 産生を有意に抑制し (Fig. 5-4A, B)、投与後2および3時間後に有意に疼痛閾値を上昇させた (Fig. 5-4C)。イースト無処置個体の疼痛閾値はおおよそ 300 g 程度であったことから (データ無し)、セレコキシブは炎症性痛覚過敏をほぼ正常レベルにまで改善したと考えられた。

化合物 C と IP アンタゴニストを併用すると痛覚過敏を抑制する

化合物 C が鎮痛作用を示さなかった理由を明らかにするために、他のプロスタノイドが痛覚過敏に寄与している可能性について検討した。PGL₂ が炎症性疼痛に関与するという報告があることから²⁴、IP アンタゴニストである RO3244019 を用いて試験を実施した。アジュバント誘導性関節炎疼痛モデルでは、RO3244019 単剤ではペインスコアを改善しなかったが、興味深いことに、化合物 C と RO3244019 を併用した群においてはセレコキシブと同程度にペインスコアを改善した (Fig. 5-5A)。さらに、イースト誘導性急性炎症性疼痛モデルにおいても、RO3244019 単剤では疼痛閾値に変化は認められなかったが、2 剤を併用した場合にはセレコキシブと同程度に疼痛閾値を上昇させた (Fig. 5-5B)。

EP4 アンタゴニストと IP アンタゴニストを併用するとアジュバント誘導性関節炎疼痛モデルにおいて痛覚過敏を抑制する

PGE₂ 受容体のうち、EP4 受容体が炎症性疼痛において重要な役割を果たしていると言われている⁵⁸。よって、EP4 アンタゴニストである CJ-023423 を用いて IP アンタゴニスト RO3244019 との併用試験を実施した。アジュバント誘導性関節炎疼痛モデルにおいて、CJ-023423 および RO3244019 は単剤ではペインスコアの改善は認められなかったが、2 剤を併用した群では有意にペインスコアを改善した (Fig. 5-6)。

5-4 考察

PGE₂は発熱や浮腫、炎症性疼痛において主要な役割を担っていると考えられており、既存のNSAIDsやCOX-2選択的阻害剤がこれらの症状の治療に広く用いられている。しかしながら、これらの薬剤はPGE₂だけでなくCOX-1およびCOX-2の下流で産生される全てのプロスタノイド産生も抑制する。PGE₂以外のプロスタノイドの中ではPGI₂が炎症および炎症性疼痛に関与していることが報告されているが²⁴⁻²⁶、PGE₂とPGI₂の炎症性疼痛における役割をそれぞれの選択的産生阻害剤あるいは受容体アンタゴニストを用いて直接比較した研究は報告されていない。そこで第5章では選択的PGE₂産生阻害剤である化合物CおよびIPアンタゴニストであるRO3244019を用いて、炎症性疼痛におけるPGE₂とPGI₂の果たす役割について検討を行なった。

最初に、化合物Cのプロスタノイド阻害プロファイルを確認するため、ラットマクロファージアッセイを実施した。化合物Cは第4章で報告した化合物Bと同様にPGE₂産生を選択的に阻害したことから、化合物CもmPGES-1阻害剤であると推定される。第4章で評価した化合物Bは高用量時に若干の鎮静作用が認められたため（データ無し）、鎮痛作用の評価には不適と判断し、そのような作用が見られない化合物Cを用いて炎症性疼痛モデルにおける鎮痛作用を評価した。

ラットアジュバント誘導性関節炎疼痛モデルにおいて、化合物CはPGE₂産生を抑制した一方で6-keto PGF_{1α}産生は抑制せず、むしろ高用量では亢進する傾向を示した。30 mg/kg b.w.を投与した群のPGE₂産生はセレコキシブ投与群と同程度であった。しかしながら、セレコキシブが鎮痛作用を示したにも関わらず化合物Cは30 mg/kg b.w.でも鎮痛作用を示さなかった。化合物Cとは異なり、セレコキシブは6-keto PGF_{1α}産生も抑制していたことから、これらの結果はPGE₂産生のみを抑制しても炎症性疼痛の緩和には不十分であり、PGI₂などの他のプロスタノイド産生も抑制する必要があることを示唆し

ている。イースト誘導性急性炎症性疼痛モデルにおいて、化合物 C は炎症足および脊髄の PGE₂ 産生を選択的に抑制し、30 mg/kg b.w.投与群ではセレコキシブ (5 mg/kg b.w.) 投与群と同程度に PGE₂ 産生を抑制した。しかしながら、本モデルにおいてもセレコキシブが強力な鎮痛作用を示した一方で、化合物 C はいずれの用量でも鎮痛作用を示さなかった。この結果は、アジュバント誘導性関節炎疼痛モデルの結果と同様に、PGE₂ 以外のプロスタノイドが炎症性痛覚過敏に寄与していることを示唆している。

PGE₂ 以外のプロスタノイドの中では PGI₂ が炎症および炎症性疼痛に関与することが多く報告されているため²⁴⁻²⁶、IP アンタゴニストとして報告されている RO3244019⁵⁹ を用いて PGI₂ シグナルの寄与について検討を行なった。アジュバント誘導性関節炎疼痛モデルにおいて、RO3244019 単剤では鎮痛作用を示さなかったが、化合物 C と RO3244019 を併用した場合にセレコキシブと同等の鎮痛作用を示した。イースト誘導性急性炎症性疼痛モデルにおいても同様に 2 剤を併用した場合にのみセレコキシブと同等の鎮痛作用が認められた。これらの結果は、PGE₂ と PGI₂ 両方のシグナルが炎症性痛覚過敏に寄与しており、その両方を同時に阻害することが鎮痛作用発現に必要であることを強く示唆している。

痛覚は末梢で感知した痛み刺激が神経線維の一種である A δ 線維および C 線維によって認識され、後根神経節に存在する侵害受容器において Na⁺や Ca²⁺などの電気信号に変換されることで伝えられる。直接の発痛物質としてはブラジキニンやカプサイシン、ATP などが知られている。PGE₂ あるいは PGI₂ は、神経細胞膜上に発現するそれぞれの G 蛋白共役型受容体に結合し、プロテインキナーゼ A あるいは C を介して上記発痛物質によって電気信号が発生する閾値を低下させることで痛覚過敏を誘導すると考えられている^{60, 61}。本論文で用いた炎症性痛覚過敏モデルにおいても、炎症によって産生された PGE₂ と PGI₂ の両方が侵害受容器における閾値の低下を誘導しており、どちらか一方のシグナルを阻害したとしても他方のシグナルがそれを補う形で痛覚過敏を誘導したた

めに、鎮痛作用の発現には至らなかったと考えられる。ただ興味深いことに、アジュバント誘導性関節炎疼痛モデルではアジュバント接種によって 6-keto PGF_{1α} 産生に変化は見られなかった。この結果は、正常時に存在している PGI₂ も炎症性疼痛のメディエーターとして機能し得ることを示唆している。しかし、当然ながら生体では炎症刺激を与えられた時にのみ痛覚過敏が誘導される。本章での実験結果から正確なメカニズムは不明であるが、アジュバント接種により 6-keto PGF_{1α} 産生は増加しなかったが IP 受容体の発現が増加した結果 PGI₂ シグナルが亢進し、痛覚過敏誘導に寄与していたかもしれない。

PGE₂ のみの抑制では鎮痛作用が不十分であるということを示唆する実験結果は、mPGES-1 ノックアウトマウスを用いた研究で報告されている⁴⁷。この論文では、ザイモサン誘導性痛覚過敏モデルにおいて、mPGES-1 ノックアウトマウスでは痛覚過敏が抑制されなかった。著者らは他のプロスタノイドが PGE₂ の作用を補う形で痛覚過敏に寄与していると考察している。我々の研究においても、化合物 C による選択的 PGE₂ 産生阻害により、mPGES-1 ノックアウトと同様の代償機構が起こっていると考えられる。PGE₂ および PGI₂ 以外のプロスタノイドが末梢性および中枢性痛覚過敏の誘導に関与しているという報告がある。たとえば、脊髄腔内に PGD₂ を投与すると痛覚過敏が誘導される⁶²。正確なメカニズムは不明であるが、PGF_{2α} がアロディニア（通常痛みを感じない程度の接触刺激を痛みと感じる感覚異常）の誘導に関与しているという報告もある⁶³。我々の研究では、PGE₂ と PGI₂ のシグナルを同時に抑制することにより炎症性痛覚過敏を改善できることが示唆されたが、それ以外のプロスタノイドの炎症性疼痛における役割については今後さらなる検討が必要であろう。

最後に、PGE₂ がどの EP 受容体を介して炎症性疼痛に関与しているかを検討した。PGE₂ の受容体として EP1~EP4 の 4 つのサブタイプが知られているが、このうちアジュバント接種によって EP4 の発現が後根神経節において誘導され、炎症性痛覚過敏に寄与することが知られている⁵⁸。さらに、炎症モデルにおいて EP4 受容体のブロックによっ

て抗炎症作用および鎮痛作用を示すことが報告されている^{44,64}。これらの知見を踏まえ、EP4 選択的アンタゴニストとして報告されている CJ-023423^{64,65} を用いて、我々が用いた炎症性疼痛モデルにおける EP4 の関与を検討した。その結果、アジュバント誘導性関節炎疼痛モデルにおいて、CJ-023423 単剤では鎮痛作用が認められなかった。CJ-023423 を用いた中尾らの研究では、カラゲニン誘導性の炎症性痛覚過敏モデルおよび体重負荷測定法を用いたアジュバント誘導性関節炎疼痛モデルをそれぞれ急性および慢性炎症性疼痛モデルとして用いており、いずれのモデルにおいても CJ-023423 が鎮痛作用を示したと報告されている⁶⁴。アジュバントを起炎剤として用いている点は我々が実施したモデルと同様であるが、中尾らは関節炎が十分に誘導されていないアジュバント接種の 2 日後に試験を実施している点が我々の試験条件とは異なる。また他の研究で、アジュバント接種によって後根神経節で EP4 発現が誘導されるのは接種 2~7 日後の間であると報告されていることから、アジュバント接種 7 日までの比較的早期の段階では EP4 が炎症および炎症性疼痛に主に寄与しており、この期間では EP4 アンタゴニストによって鎮痛作用が認められたと考えられる。一方で本研究結果から、関節炎が完全に形成された慢性期では、EP4 のブロックだけでは鎮痛作用を示すには不十分であると考えられる。CJ-023423 と RO3244019 の併用により鎮痛作用が認められたことから、こうした慢性期では EP4 だけでなく IP シグナルも炎症性痛覚過敏に寄与していることが示唆された。EP4 以外の EP 受容体に関しては検討をしてないが、本研究結果から慢性炎症性疼痛における PGE₂ シグナルは主に EP4 を介していることが示唆された。

本章で得られた知見をまとめた図を Fig. 5-7 に示す。本研究により、炎症性痛覚過敏にはアラキドン酸カスケードによって産生される PGE₂ と PGI₂ の両方が寄与しており、その両方を同時に抑制することが鎮痛作用発現に必要であることが初めて明らかとなった。また、PGE₂ のシグナルは 4 つの受容体サブタイプのうち主に EP4 受容体を介して伝えられることが示唆された。

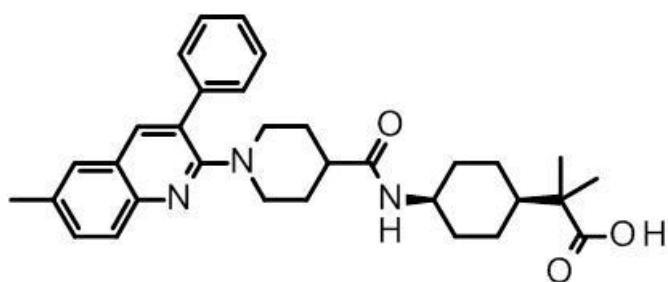


Fig. 5-1. Chemical structure of compound C

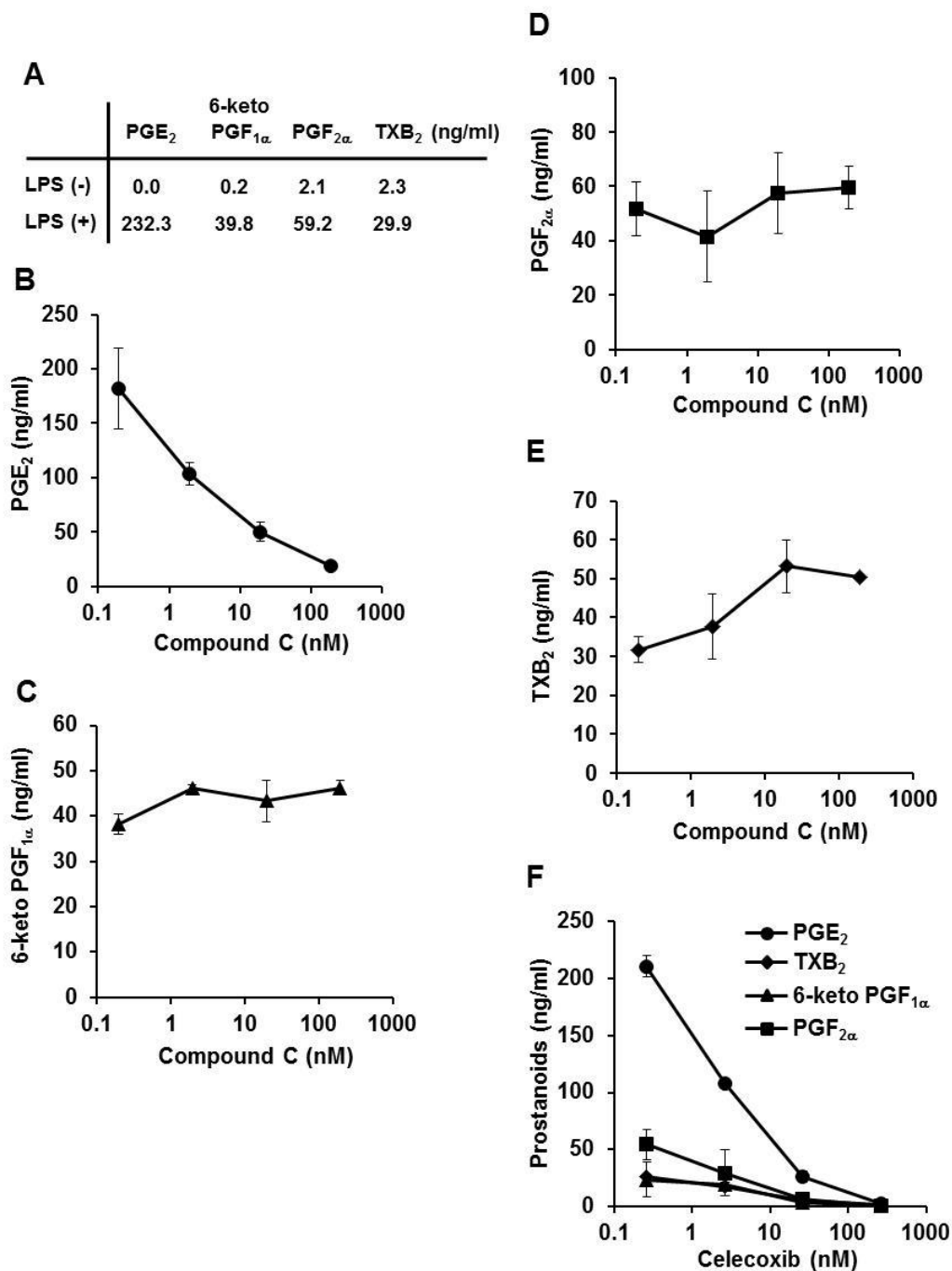


Fig. 5-2. Induction of prostanoids synthesis and inhibitory profile of compound C in rat peritoneal macrophages. A, the production of PGE₂, 6-keto PGF_{1α}, PGF_{2α} and TXB₂ with or without LPS treatment. B to E, dose-dependent effects of compound C on the production of PGE₂ (B), 6-keto PGF_{1α} (C), PGF_{2α} (D), and TXB₂ (E) in rat macrophages. F, dose-dependent effects of celecoxib on the production of PGE₂, 6-keto PGF_{1α}, PGF_{2α} and TXB₂ in rat macrophages. Results are shown as the mean ± S.D. (in duplicate). A representative result from reproduced experiments is shown.

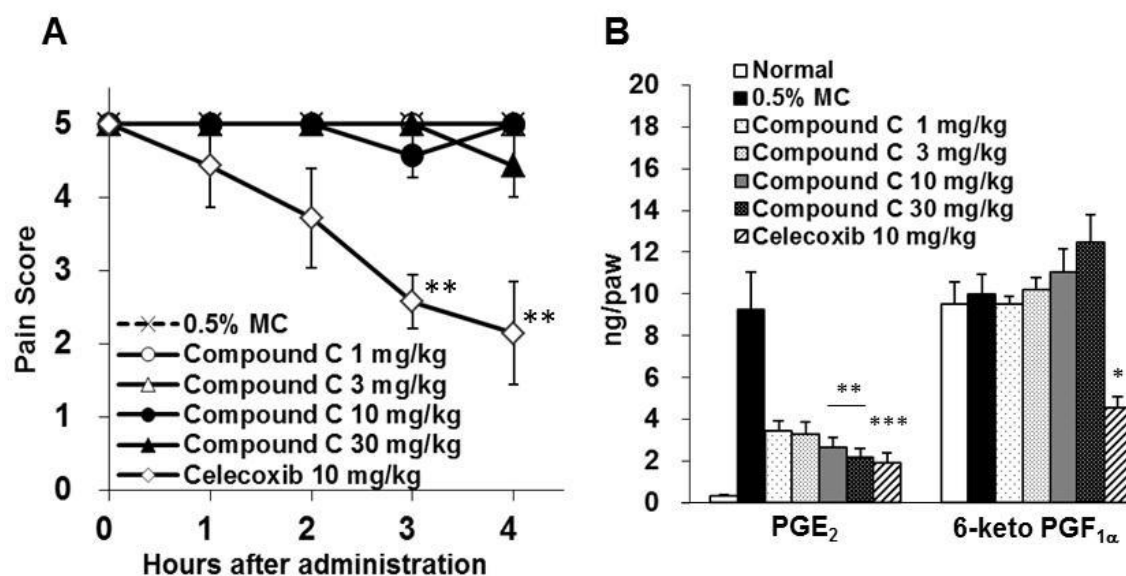


Fig. 5-3. Analgesic effect of compound C and celecoxib in adjuvant-induced chronic inflammatory pain in rats. A, Time course of pain score. Male Lewis rats received a single, right hind-paw intradermal injection of *M. butyricum* (100 μ g/0.05 ml/paw) in a liquid paraffin emulsion on Day 0. At Day 19, animals with established hyperalgesia (pain score = 5) were orally administered compounds or 0.5% MC. Pain response was examined 1, 2, 3 and 4 h after administration. B, Effect of compound C and celecoxib on inflamed tissue prostanooids' production in adjuvant-induced chronic inflammatory pain model. Inflamed paw was obtained after the last measurement of pain score. Results are shown as the mean $\pm$ S.E.M. (n = 6/group). The statistical analysis was performed by Steel's test and Dunnett's test for pain score (A) and prostanooids' content (B), respectively.

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ for compound- versus 0.5% MC-treated animals.

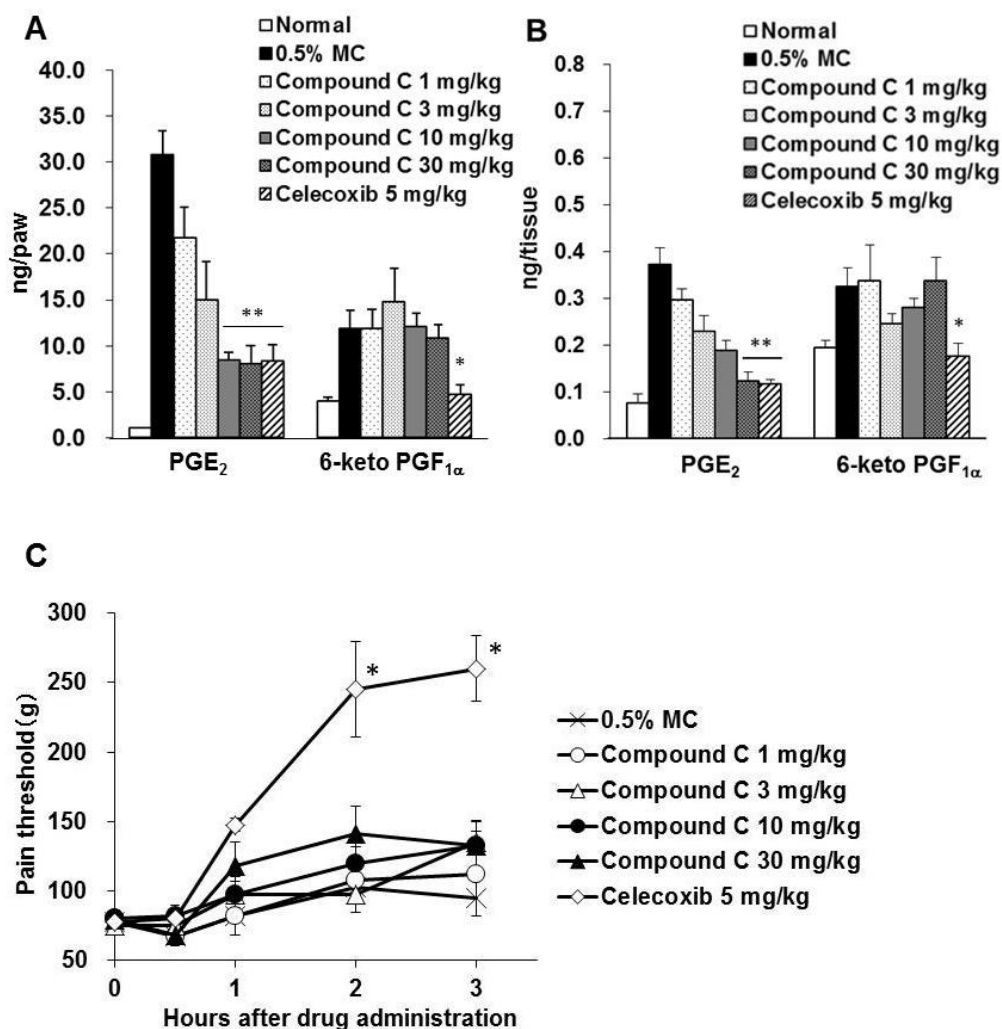


Fig. 5-4. Analgesic effect of compound C and celecoxib in yeast-induced acute inflammatory pain in rats. A, Effect of compound C and celecoxib on inflamed paw prostanoide production in yeast-induced acute inflammatory pain model. Inflamed paw was obtained after the last measurement of pain threshold. B, Effect of compound C and celecoxib on lumbar area of spinal cord prostanoide production in yeast-induced acute inflammatory pain model. Spinal cord was obtained after the last measurement of pain threshold. C, Time course of pain threshold. Male Wister-Imamichi rats received a single, right hind-paw intradermal injection of dead Brewer's yeast (20%/0.1 ml/paw). After 18.5 h, compounds or 0.5% MC were administered orally to animals with established hyperalgesia (pain threshold : 60 ~ 120 g). Pain response was examined 1, 2, 3 and 4 h after administration. Results are shown as the mean $\pm$ S.E.M. (n = 6/group). The statistical analysis was performed by Dunnett's test and Steel's test for prostanoide content (A and B) and pain threshold (C), respectively. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ for compound- versus 0.5% MC-treated animals.

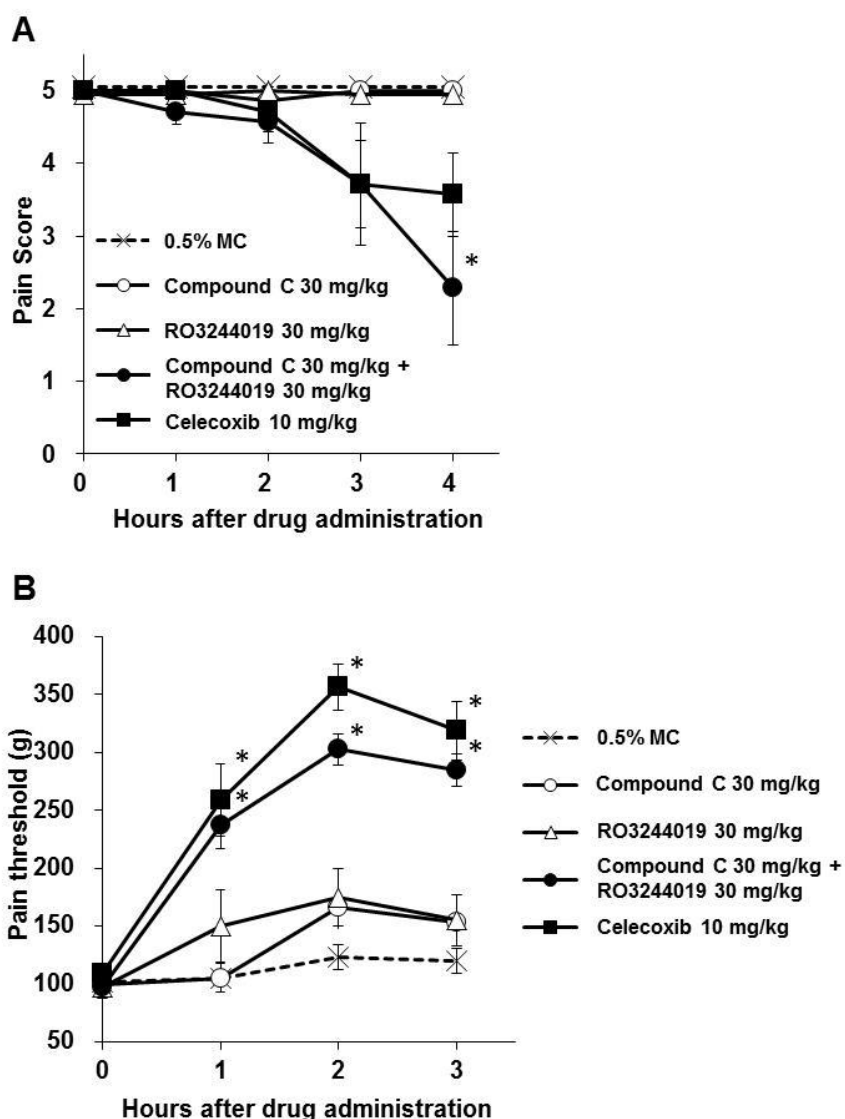


Fig. 5-5. Analgesic effect of compound C and/or RO3244019 in acute and chronic inflammatory pain models. A, Results of adjuvant-induced chronic inflammatory pain model. Male Lewis rats received a single, right hind-paw intradermal injection of *M. butyricum* (100 μ g/0.05 ml/paw) in a liquid paraffin emulsion on Day 0. At Day 19, animals with established hyperalgesia (pain score = 5) were orally administered compounds or 0.5% MC. Pain response was examined 1, 2, 3 and 4 h after administration. B, Male Wister-Imamichi rats received a single, right hind-paw intradermal injection of dead Brewer's yeast (20%/0.1 ml/paw). After 18.5 h, compounds or 0.5% MC were administered orally to animals with established hyperalgesia (pain threshold : 60 g–120 g). Pain threshold was measured 1, 2, 3 and 4 h after administration. Results are shown as the mean $\pm$ S.E.M. (n = 6/group). The statistical analysis was performed by Steel's test for multiple comparisons. *, $p < 0.05$ for compound-versus 0.5% MC-treated animals.

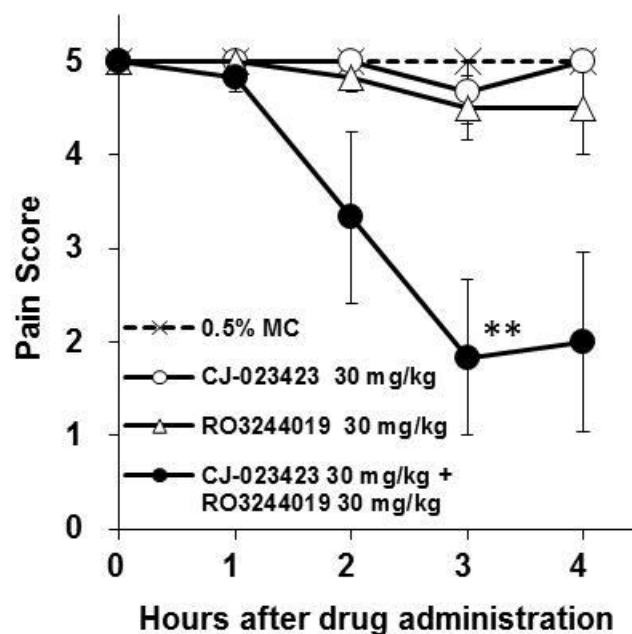


Fig. 5-6. Analgesic effect of CJ-023423 and/or RO3244019 in adjuvant-induced chronic inflammatory pain model. Male Lewis rats received a single, right hind-paw intradermal injection of *M. butyricum* (100 μ g/0.05 ml/paw) in a liquid paraffin emulsion on Day 0. At Day 19, animals with established hyperalgesia (pain score = 5) were orally administered compounds or 0.5% MC. Pain response was examined 1, 2, 3 and 4 h after administration. Results are shown as the mean $\pm$ S.E.M. (n = 6/group). The statistical analysis was performed by Steel's test for multiple comparisons. **, $p < 0.01$ for compound- versus 0.5% MC-treated animals.

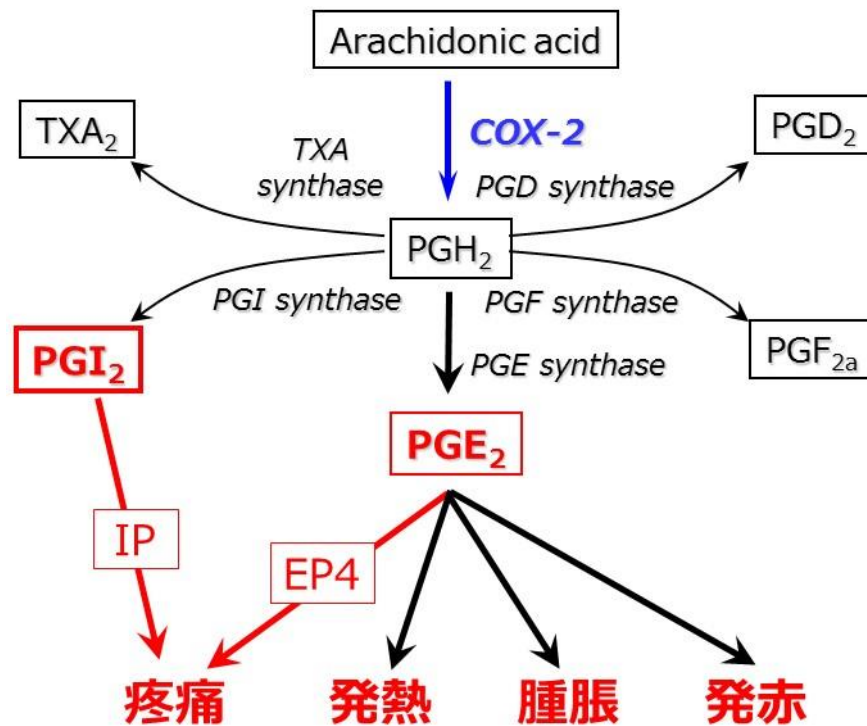


Fig. 5-7. Graphical summary of this chapter. It is suggested that both PGE₂ and PGI₂ signals play important roles in inflammatory pain. Among PGE₂ receptors, the EP4 receptor dominantly contributes to PGE₂ signaling during inflammatory hyperalgesia.

第6章 総括

“炎症”および“痛み”は重要な生体防御反応である一方で、慢性炎症や慢性疼痛においては炎症や痛みの症状自体が患者の生活の質を著しく低下させる。変形性関節症や関節リウマチ、抜歯後疼痛などにおける炎症症状の緩和には NSAIDs が広く用いられている。しかしながら従来の NSAIDs および COX-2 選択的阻害剤では消化管障害や心血管イベントリスクの増大が報告されており^{14, 15}、より副作用リスクの低い薬剤が求められている。これまでの報告では、炎症刺激によって誘導されるプロスタノイドのうち PGE₂ が炎症性疼痛に重要な役割を果たしていると考えられている^{21, 22, 30, 66}。また、PGE₂ 産生のみを抑制した場合、既存 NSAIDs や COX-2 選択的阻害剤で認められる消化管障害や心血管イベントなどの副作用リスクには影響を与えないことが期待されることから、選択的 PGE₂ 産生阻害剤が新たな消炎鎮痛剤のターゲットとして注目されている。しかしながら、選択的 PGE₂ 産生阻害剤は未だ上市されておらず、その抗炎症作用および鎮痛作用については結論が出ていない。そこで本研究では、炎症および炎症性疼痛における PGE₂ の寄与について選択的 PGE₂ 産生阻害剤を用いて精査することを目的とした。

第2章では経口投与可能な選択的 PGE₂ 産生阻害剤の取得を目指した。以前の社内研究でモルモットにおける選択的 PGE₂ 産生阻害活性を見出していたベンゾチアゾール化合物 BT1a からの誘導体展開により、さらに活性が向上且つ代謝安定性も改善した化合物 A を見出した。化合物 A はモルモットに活性を示すものの、炎症モデルで汎用されているラットでは活性が大きく減弱することがわかったため、ラットに活性を有する化合物を取得するためにさらに展開を行なった。その結果、ベンゾイミダゾール骨格がラットに活性を有することを明らかにし、さらに活性と代謝安定性を向上させたキノリン骨格を有する化合物 B および C を見出した。

第3章では、モルモット炎症モデルおよび炎症性疼痛モデルにおけるベンゾチアゾール骨格である化合物 A の薬理作用について、既存 NSAIDs であるインドメタシンおよび

mPGES-1 阻害剤である MF63 と比較検討した。その結果、化合物 A は *in vivo* において PGE₂ 産生を抑制するとともにイースト誘導性発熱モデルおよびアジュバント誘導性関節炎モデルにおいてそれぞれ既存 NSAIDs であるインドメタシンと同等の解熱作用および抗炎症作用を有することが示された。さらに、消化管障害作用を評価した結果、化合物 A はインドメタシンよりも明らかに胃障害作用が弱いことが示された。しかしながら、イースト誘導性炎症性疼痛モデルにおいて、インドメタシンが鎮痛作用を示した一方で化合物 A は鎮痛作用を示さなかった。

第 4 章では、ラット炎症モデルにおけるキノリン骨格化合物 B の薬理作用について、COX-2 選択的阻害剤であるセレコキシブと比較検討を行なった。その結果、化合物 B は *in vivo* で PGE₂ 産生を選択的に抑制し、LPS 誘導性発熱モデルおよびアジュバント誘導性関節炎モデルにおいてそれぞれ解熱作用および抗炎症作用を示した。化合物 B の薬理作用自体はセレコキシブにやや劣るものであったが、*in vitro* 活性および体内動態をより改善させた選択的 PGE₂ 産生阻害剤を得ることによりさらなる薬効が期待できると思われる。

第 5 章では、ラット炎症性疼痛モデルにおけるキノリン骨格化合物 C の薬理作用について、セレコキシブと比較検討を行なった。その結果、化合物 C はアジュバント誘導性関節炎疼痛モデルおよびイースト誘導性炎症性疼痛モデルにおいて、*in vivo* で PGE₂ を十分抑制したにも関わらず鎮痛作用が認められなかった。この結果は第 3 章のモルモットを用いた試験結果と同様であること、さらに COX-2 選択的阻害剤であるセレコキシブはいずれのモデルでも鎮痛作用が認められたことから、炎症性痛覚過敏には PGE₂ だけでなく他のプロスタノイドも寄与している可能性が示唆された。そこで、炎症性疼痛に関与すると報告されている PGI₂ の関与を検証するために、IP アンタゴニスト RO3244019 の薬理作用を評価した。その結果、RO3244019 はいずれの炎症性疼痛モデルにおいても単剤では鎮痛作用を示さなかったが、化合物 C と RO3244019 を併用した場合にセレコ

キシブと同等の鎮痛作用を示した。この結果から、炎症性痛覚過敏においては PGE_2 だけでなく PGI_2 もその誘導に関与しており、その両方を同時に抑制することが鎮痛作用発現に必要であることが強く示唆された。最後に、 PGE_2 の受容体のうちどのサブタイプが炎症性疼痛に重要であるかを検証するために、EP4 アンタゴニスト CJ-023423 を用いた評価を実施した。アジュバント誘導性関節炎疼痛モデルにおいて、CJ-023423 単剤では鎮痛作用が認められなかったが、CJ-023423 と RO3244019 を併用した場合に鎮痛作用が認められた。この結果から、炎症性痛覚過敏における PGE_2 シグナルは主に EP4 を介していることが示唆された。

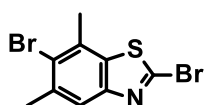
本研究の結果から、腫脹や発熱などの炎症症状は選択的 PGE_2 産生阻害剤により抑制し得ることが示唆された。しかしながら、炎症による疼痛反応は選択的 PGE_2 産生阻害剤では抑制することができず、鎮痛作用を示すためには PGE_2 シグナルと PGI_2 シグナルの両方を同時に阻害する必要があることが示唆された。選択的 PGE_2 産生阻害剤のヒトにおける薬理作用の報告はなく、本研究で認められた結果がヒトにおいても同様であるかは不明だが、選択的 PGE_2 産生阻害剤は非選択的 COX 阻害剤や COX-2 選択的阻害剤とは異なる薬理プロファイルであることが示唆された。本研究は、炎症性痛覚過敏に対して、選択的 PGE_2 産生阻害剤および PGI_2 受容体アンタゴニストそれぞれの単剤では無効であるものの、それらの併用により相乗的に抑制することを初めて示したものであり、全てのプロスタノイド産生を抑制する既存の NSAIDs および COX-2 選択的阻害剤を用いた過去の研究では得ることのできなかつた知見である。したがって、本研究は炎症性痛覚過敏のメカニズムの全貌解明に大きく寄与するものである。

化学の部：一般手順、材料および実験項

特別に言及しない限り、すべての試薬および溶媒は試薬グレードの市販品を購入し使用した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーは昭光サイエンティフィック Purif- α 2 を用いて精製した。薄層クロマトグラフィー (TLC) は Merck pre-coated TLC glass sheets with Silica Gel 60 F254 を使用し、化合物は UV またはリンモリブデン酸エタノール溶液やニンヒドリン溶液などの発色剤を用いて検出した。 ^1H NMR スペクトルは JEOL JNM-EX400 または JNM-ECX-400 を使用し、 CDCl_3 、 CD_3OD または $\text{DMSO}-d_6$ 溶媒を用いて測定した。 ^1H NMR のケミカルシフト値はテトラメチルシランを内部標準物質として相対値を ppm 表記し、データはプロトン数、多重度 (s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet; br, broad)、カップリング定数 (Hz) の順番で表記した。MS スペクトルおよび高分解能 MS スペクトルはそれぞれ Agilent 1100 series LC/MSD mass spectrometers および Waters Xevo Q-ToF MS UPLC system を用いて測定した。元素分析 (CHN, F) は Microcoder JM10 および Dionex ICS-1500 を用いて測定した。

ベンゾチアゾール誘導体の合成

2,6-ジブロモ-5,7-ジメチル-1,3-ベンゾトリアゾール (BT1a)

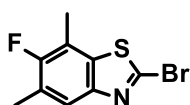


臭化銅(II) (6.26 g, 28.0 mmol) および亜硝酸-*t*-ブチル (3.60 ml, 30.0 mmol) のアセトニトリル (50 ml) 懸濁溶液に、氷冷下、市販の 5, 7-ジメチル-1, 3-ベンゾチアゾール-2-アミンを 20 分かけてゆっくりと滴下した。さらに 30 分攪拌した後、亜硝酸-*t*-ブチル (0.30 ml, 2.50 mmol) を追加した。反応液を室温に戻し 1 時間攪拌した後、1 N 塩酸水溶液を加え、酢酸エチルにて抽出した。有機層を合わせ、水および飽和食塩水に

て洗浄した後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。減圧下にて溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（*n*-ヘキサン/酢酸エチル = 10/1–5/1）にて精製し、標記化合物 1.99 g（収率 27%）を固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.71 (1H, s), 2.61 (3H, s), 2.55 (3H, s); MS m/z 322 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

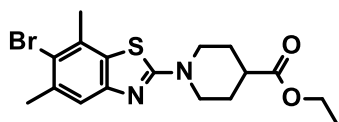
2-ブロモ-6-フルオロ-5,7-ジメチル-1,3-ベンゾトリアゾール (**BT1c**)



6-フルオロ-5,7-ジメチル-1,3-ベンゾチアゾール-2-アミンを用いて、化合物 **BT1a** の合成法に準じて、標記化合物（収率 76%）を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.63 (1H, d, $J = 6.0$ Hz), 2.42 (3H, d, $J = 2.3$ Hz), 2.39 (3H, d, $J = 2.3$ Hz); ; MS m/z 260 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

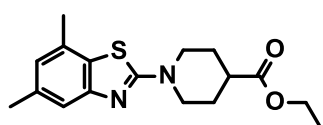
エチル-1-（6-ブロモ-5,7-ジメチル-1,3-ベンゾトリアゾール-2-イル）ピペリジン-4-カルボキシレート (**BT2a**)



化合物 **BT1a** (478 mg, 1.49 mmol) およびエチル 4-ピペリジンカルボキシレート (0.30 ml, 1.93 mmol) のイソプロピルアルコール (6 ml) 溶液に、トリエチルアミン (0.42 ml, 2.98 mmol) を加え、85°C にて 3.5 時間加熱攪拌した。反応液に水を加え、酢酸エチルにて抽出した。有機層を合わせ、水および飽和食塩水にて洗浄した後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。減圧下にて溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（*n*-ヘキサン/酢酸エチル = 9/1–4/1）にて精製し、標記化合物 273 mg（収率 46%）を固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.29 (1H, s), 4.17 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 4.07 (2H, dt, $J = 13.6, 3.9$ Hz), 3.26-3.21 (2H, m), 2.58-2.56 (1H, m), 2.53 (3H, s), 2.46 (3H, s), 2.05-2.04 (2H, m), 1.89-1.81 (2H, m), 1.27 (3H, t, $J = 7.1$ Hz); MS m/z 397 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

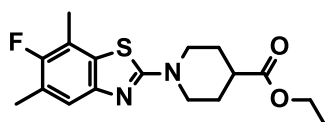
エチルー1- (5,7-ジメチルー1,3-ベンゾトリアゾール-2-イル) ピペリジン-4-カルボキシレート (**BT2b**)



化合物 **BT2a** (1.47 g, 3.70 mmol) のテトラヒドロフラン (15 ml) およびエタノール (10 ml) の混合溶液に、10%水酸化パラジウム (1.0 g) を加え、水素雰囲気下、60°C にて 5 時間攪拌した。反応液にトリエチルアミンを加えた後、セライトろ過した。減圧下にて溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (n-ヘキサン/酢酸エチル = 9/1-1/1) にて精製し、標記化合物 1.10 g (収率 94%) を固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.88 (1H, s), 6.94 (1H, s), 4.19 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 3.95-3.55 (4H, br m), 2.76-2.71 (1H, m), 2.41 (3H, s), 2.39 (3H, s), 2.23-2.20 (2H, m), 2.08-2.02 (2H, m), 1.28 (3H, t, $J = 7.1$ Hz); MS m/z 319 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

エチルー1- (6-フルオロ-5,7-ジメチルー1,3-ベンゾトリアゾール-2-イル) ピペリジン-4-カルボキシレート (**BT2c**)

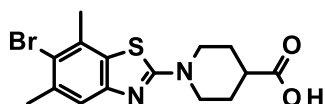


化合物 **BT1c** (1.35 g, 5.18 mmol) を用いて、化合物 **BT2a** の合成法に準じて、標記化合物 (収率 88%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.19 (1H, d, $J = 6.4$ Hz), 4.16 (2H, q, $J = 7.2$ Hz), 4.06 (2H, dt, $J = 13.4, 3.9$

Hz), 3.23-3.20 (2H, m), 2.57-2.55 (1H, m), 2.34 (3H, d, $J = 1.8$ Hz), 2.30 (3H, d, $J = 1.8$ Hz), 2.05-2.03 (2H, m), 1.90-1.80 (2H, m), 1.27 (3H, t, $J = 7.2$ Hz).

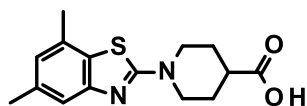
1- (6-ブロモ-5,7-ジメチル-1,3-ベンゾトリアゾール-2-イル) ピペリジン-4-カルボン酸 (**BT3a**)



化合物 **BT2a** (800 mg, 2.01 mmol) のエタノール (20 ml) 溶液に、1 N 水酸化ナトリウム水溶液 (5 ml) を加え、室温にて 15 時間攪拌した。反応液に 1 N 塩酸を加えた後、減圧下、溶媒を留去した。得られた固体を水で洗浄した後、乾燥し標記化合物 759 mg (粗精製品、収率 100%) を固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- D_6) δ : 12.35 (1H, br s), 7.31 (1H, s), 3.95 (2H, dt, $J = 13.3, 3.7$ Hz), 3.27-3.24 (2H, m), 2.59-2.56 (1H, m), 2.47 (3H, s), 2.39 (3H, s), 1.97-1.93 (2H, m), 1.63-1.59 (2H, m); MS m/z 369 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

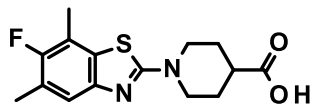
1- (5, 7-ジメチル-1, 3-ベンゾトリアゾール-2-イル) ピペリジン-4-カルボン酸 (**BT3b**)



化合物 **BT2b** (2.04 g, 6.41 mmol) を用いて、化合物 **BT3a** の合成法に準じて、標記化合物 (収率 98%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.24 (1H, s), 6.74 (1H, s), 4.13-4.09 (2H, m), 3.30-3.24 (2H, m), 2.65-2.63 (1H, m), 2.40 (3H, s), 2.37 (3H, s), 2.10-2.05 (2H, m), 1.90-1.87 (2H, m) ; MS m/z 291 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

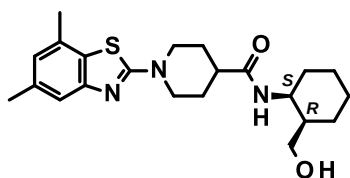
1- (6-フルオロ-5, 7-ジメチル-1, 3-ベンゾトリアゾール-2-イル) ピペリジン-4-カルボン酸 (**BT3c**)



化合物 **BT2c** (1.52 g, 4.52 mmol) を用いて、化合物 **BT3a** の合成法に準じて、標記化合物 (収率 96%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.21 (1H, d, $J = 6.0$ Hz), 4.07 (2H, dt, $J = 13.1, 3.7$ Hz), 3.29-3.22 (2H, m), 2.65-2.63 (1H, m), 2.34 (3H, d, $J = 1.8$ Hz), 2.31 (3H, d, $J = 1.8$ Hz), 2.09-2.07 (2H, m), 1.93-1.83 (2H, m).

1- (5, 7-ジメチル-1, 3-ベンゾチアゾール-2-イル) -*N*- [(1*S*, 2*R*) -2- (ヒドロキシメチル) シクロヘキシル] ピペリジン-4-カルボキサミド (**BT4b**)

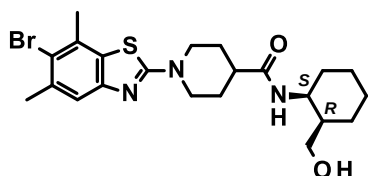


化合物 **BT3b** (358 mg, 1.23 mmol)、[(1*R*, 2*S*) -2-アミノシクロヘキシル] メタノール (241 mg, 1.87 mmol) および、3*H*- [1, 2, 3] トリアゾロ [4, 5-*b*] ピリジン-3-オール (336 mg, 2.47 mmol) のジクロロメタン溶液 (5 ml) にトリエチルアミン (859 μl , 6.17 mmol) および 1-エチル-3-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]カルボジイミド塩酸塩 (712 mg, 3.71 mmol) を加え、室温にて 16 時間半攪拌した。ジクロロメタンを加え希釈した後、0.1 N 塩酸水溶液を加えて中和洗浄した。有機層を飽和食塩水にて洗浄し、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した後、減圧下にて溶媒を留去した。残渣をシリカゲルクロマ

トグラフィー (n-ヘキサン/酢酸エチル = 5/1-0/1) にて精製し標記化合物 401 mg (収率 81%) を固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.23 (1H, s), 6.74 (1H, s), 5.80 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 4.35-4.33 (1H, m), 4.25-4.17 (3H, m), 3.36 (1H, td, $J = 11.2, 4.6$ Hz), 3.21-3.15 (2H, m), 3.10 (1H, td, $J = 11.2, 4.0$ Hz), 2.47-2.43 (1H, m), 2.40 (3H, s), 2.37 (3H, s), 2.03-1.96 (2H, m), 1.93-1.64 (7H, m), 1.41-1.24 (3H, m), 0.93-0.85 (1H, m); MS m/z 402 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

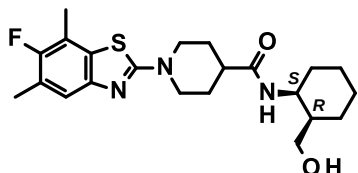
1- (6-ブロモ-5, 7-ジメチル-1, 3-ベンゾチアゾール-2-イル) -N- [(1S, 2R)-2- (ヒドロキシメチル) シクロヘキシル] ピペリジン-4-カルボキサミド (**BT4a**)



化合物 **BT3a** (755 mg, 2.02 mmol) を用いて、化合物 **BT4b** の合成法に準じて、標記化合物 (収率 97%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-D_6) δ : 7.62 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.31 (1H, s), 4.35 (1H, dd, $J = 6.9, 4.6$ Hz), 4.06-4.03 (3H, br m), 3.23-3.12 (4H, m), 2.63-2.59 (1H, m), 2.48 (3H, s), 2.39 (3H, s), 1.82-1.76 (2H, m), 1.63-1.53 (6H, m), 1.42-1.40 (3H, m), 1.30-1.19 (2H, m); MS m/z 480 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

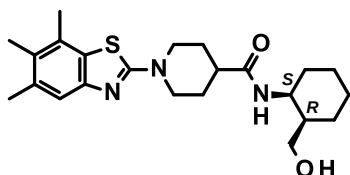
1- (6-フルオロ-5, 7-ジメチル-1, 3-ベンゾチアゾール-2-イル) -N- [(1S, 2R)-2- (ヒドロキシメチル) シクロヘキシル] ピペリジン-4-カルボキサミド (**BT4c**)



化合物 **BT3c** (3.56 g, 11.5 mmol) を用いて、化合物 **BT4b** の合成法に準じて、標記化合物 (収率 97%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-D_6) δ : 7.62 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.19 (1H, d, $J = 6.4$ Hz), 4.35 (1H, dd, $J = 6.4$, 4.8 Hz), 4.04-4.01 (3H, m), 3.23-3.12 (4H, m), 2.60 (1H, tt, $J = 11.5$, 3.7 Hz), 2.31 (3H, d, $J = 1.4$ Hz), 2.25 (3H, d, $J = 1.8$ Hz), 1.81-1.75 (2H, m), 1.67-1.53 (6H, m), 1.42-1.40 (3H, m), 1.27-1.19 (2H, m); MS m/z 420 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

N -[(1*S*, 2*R*)-2-(ヒドロキシメチル)シクロヘキシル]-1-(5,6,7-トリメチル-1,3-ベンゾチアゾール-2-イル)ピペリジン-4-カルボキサミド (**BT4d**)

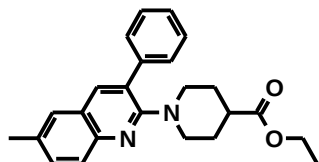


化合物 **BT4a** (100 mg, 0.21 mmol), トリメチルボロキシシン (57.9 μL 0.42 mmol)、炭酸カリウム (115 mg, 0.83 mmol) およびジオキサン (1.4 ml) の混合物に、テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム (36 mg, 0.03 mmol) を加え、アルゴン雰囲気下、160°C にてマイクロウェーブ照射を行なった。反応混合物に酢酸エチルを加え、不溶物をセライトろ過により除去した。ろ液を減圧濃縮し、得られた残渣を NH シリカゲルクロマトグラフィー (n-ヘキサン/酢酸エチル = 4/1-1/1) にて精製し標記化合物 50 mg (収率 57%) を固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-D_6) δ : 7.62 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.14 (1H, s), 4.35 (1H, dd, $J = 6.6$, 4.8 Hz), 4.03 (3H, d, $J = 9.6$ Hz), 3.23-3.08 (4H, m), 2.61-2.58 (1H, m), 2.34 (3H, s), 2.27 (3H, s), 2.16 (3H, s), 1.77 (2H, t, $J = 11.7$ Hz), 1.62-1.58 (6H, m), 1.42-1.40 (3H, m), 1.30-1.20 (2H, m); MS m/z 416 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

キノリン誘導体の合成

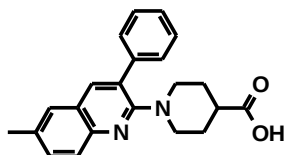
エチル 1- (6-メチル-3-フェニルキノリン-2-イル)ピペリジン-4-カルボキシレート (**Q2a**)



市販の 2-クロロ-6-メチル-3-フェニルキノリン (19.9 g, 78.6 mmol) の *N*-メチルピロリドン (60 ml) 溶液に市販のエチル-4-ピペリジンカルボキシレート (48.5 ml, 315 mmol) を加え、160°C にて 15 時間攪拌した。得られた混合物に水を加え、酢酸エチルにて抽出した。有機層を合わせ、水および飽和食塩水にて洗浄した後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。減圧下にて溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (n-ヘキサン/酢酸エチル = 9/1-1/1) にて精製した。得られた固体をヘキサンにて洗浄し、標記化合物 24.2 g (収率 82%) を固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.75 (1H, s), 7.73 (1H, d, $J = 9.2$ Hz), 7.68-7.63 (2H, m), 7.48-7.39 (4H, m), 7.38-7.32 (1H, m), 4.12 (2H, q, $J = 7.3$ Hz), 3.65 (2H, dt, $J = 13.3, 2.8$ Hz), 2.77 (2H, dt, $J = 13.3, 2.8$ Hz), 2.47 (3H, s), 2.41-2.31 (1H, m), 1.85-1.77 (2H, m), 1.71-1.59 (2H, m), 1.25 (3H, t, $J = 7.3$ Hz); MS m/z 375 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

1- (6-メチル-3-フェニルキノリン-2-イル)ピペリジン-4-カルボン酸 (**Q3a**)

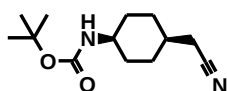


化合物 **Q2a** (20.8 g, 55.5 mmol) のエタノール (50 ml)、テトラヒドロフラン (10 ml) および水 (10 ml) の混合溶液に、8 N 水酸化ナトリウム水溶液 (15 ml, 120 mmol) を加え、50°C にて 1 時間、その後室温にて 14 時間攪拌した。1 N 塩酸水溶液を加えて中和

した後、減圧下にて溶媒を留去した。残渣に水を加え、次いで pH4 程度になるまで 1 N 塩酸水溶液を加えたところ固体が析出した。この反応混合物に n-ヘキサンおよびエーテルを加え固体を濾取した後、水にて洗浄した。得られた個体を減圧下にて乾燥し、標記化合物 19.3 g (収率 100%) を固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.76 (2H, br s), 7.67-7.62 (2H, m), 7.48-7.40 (4H, m), 7.38-7.33 (1H, m), 3.69-3.61 (2H, br m), 2.82 (2H, t, $J = 11.9$ Hz), 2.50-2.39 (1H, m), 2.48 (3H, s), 1.89-1.80 (2H, m), 1.74-1.62 (2H, m); MS m/z 347 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

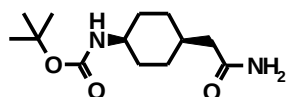
tert-ブチルー [シス-4- (シアノメチル) シクロヘキシル] カーバメート (C3)



市販の tert-ブチルー [シス-4- (ヒドロキシメチル) シクロヘキシル] カーバメート (4.71 g, 20.5 mmol) およびトリエチルアミン (5.72 ml, 41.0 mmol) のジクロロメタン (50 ml) 溶液に、氷冷下、メタンスルホニルクロリド (2.06 ml, 26.6 mmol) を滴下し、0°C にて 2 時間、さらに室温にて 1 時間攪拌した。反応混合物にジクロロメタンを加え希釈した後、1 N 塩酸水溶液を加えて中和洗浄した。有機層を飽和食塩水にて洗浄し、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した後、減圧下にて溶媒を留去した。残渣の *N,N*-ジメチルホルムアミド (30 ml) 溶液に、水 (5 ml) およびシアン化ナトリウム (3.05 g, 62.2 mmol) を加え、90°C にて 12 時間攪拌した。反応混合物に水を加え酢酸エチルにて抽出した。有機層を合わせ、飽和食塩水にて洗浄した後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。減圧下にて溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (n-ヘキサン/酢酸エチル = 3/1-1/2) にて精製し、標記化合物 4.57 g (収率 93%) を固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 4.61 (1H, br s), 3.77 (1H, br s), 2.31 (2H, d, $J = 6.9$ Hz), 1.86-1.67 (5H, m), 1.67-1.55 (2H, m), 1.45 (9H, s), 1.41-1.28 (2H, m).

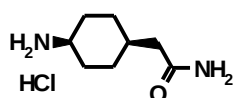
tert-ブチルー [シス-4- (2-アミノ-2-オキソエチル) シクロヘキシル] カーバメート (C4)



化合物 C3 (1.20 g, 5.04 mmol) のエタノール溶液 (10 ml) に 8 N 水酸化ナトリウム溶液 (1 ml) を加え 90°C にて 20 時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮し、水にて希釈した後、酢酸エチルにて抽出した。有機層を合わせ、飽和食塩水にて洗浄した後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。減圧下にて溶媒を留去し、標記化合物 513 mg を固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 7.22 (1H, br s), 6.68 (2H, br s), 3.42-3.40 (1H, br m), 1.96 (2H, d, $J = 7.3$ Hz), 1.83-1.73 (1H, m), 1.55-1.27 (9H, m), 1.38 (8H, s).

2- (シス-4-アミノシクロヘキシル) アセトアミド塩酸塩 (C5)

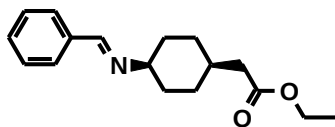


化合物 C4 (513 mg) に市販の 4 N 塩酸ジオキサン溶液 (6 ml) および市販の 5~10% 塩酸メタノール溶液 (1 ml) を加え室温にて 2 時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮した後、酢酸エチルを加え希釈した。減圧下にて溶媒を留去し、標記化合物を定量的に固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 8.07 (3H, br s), 7.31 (1H, br s), 6.74 (1H, br s), 3.18-3.07 (1H, m), 2.01 (2H, d, $J = 7.3$ Hz), 1.91-1.81 (1H, m), 1.68-1.58 (4H, m), 1.51-1.35 (4H, m).

エチルー (シス-4- {[(1E) -フェニルメチレン] アミノ} シクロヘキシル) アセテ

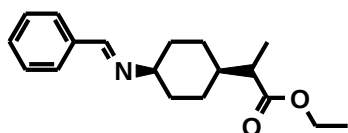
ート (C6)



エチル- (シス-4-アミノシクロヘキシル) アセテート塩酸塩 **C1** (5.60 g, 25.3 mmol) に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を用いて中和し、クロロホルムにて抽出した。さらに水層に 0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液を加え、クロロホルムにて抽出した。有機層を合わせ、飽和食塩水にて洗浄した後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。減圧下にて溶媒を留去し、得られた残渣を乾燥し、油状物 3.50 g を得た。得られた油状物 (1.80 g, 9.72 mmol) のメタノール (49 ml) 溶液に、無水硫酸ナトリウム (9.00 g) およびベンズアルデヒド (0.982 ml, 9.72 mmol) を加えて室温にて 16 時間攪拌した。反応混合物をろ過し、減圧下にて溶媒を留去し、標記化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.32 (1H, s), 7.75-7.73 (2H, m), 7.41-7.38 (3H, m), 4.14 (2H, q, $J = 7.2$ Hz), 3.43-3.39 (1H, m), 2.36 (2H, d, $J = 7.3$ Hz), 2.12-2.06 (1H, m), 1.86-1.54 (8H, m), 1.26 (3H, t, $J = 7.2$ Hz).

エチル-2- (シス-4- {[(1E)-フェニルメチレン] アミノ} シクロヘキシル) プロパノエート (**C7**)

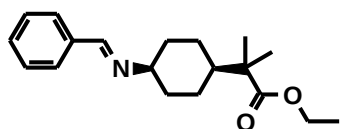


窒素雰囲気下、1.14 M リチウムジイソプロピルアミドのテトラヒドロフラン溶液 (0.353 ml, 0.402 mmol) に、ドライアイス-メタノールで冷却下、化合物 **C6** (50.0 mg, 0.183 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (0.92 ml) を加えた。氷冷下、20 分間攪拌した後、再びドライアイス-メタノールにて冷却した。ヨウ化メチル (34.2 μl , 0.549 mmol)

およびヘキサメチルリン酸トリアミド (70.0 μ l, 0.402 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (0.92 ml) を加え、室温にて 2.5 時間攪拌した。反応混合物に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、酢酸エチルにて抽出した。有機層を合わせ、飽和食塩水にて洗浄した後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。減圧下にて溶媒を留去し、標記化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.31 (1H, s), 7.75-7.73 (2H, m), 7.41-7.39 (3H, m), 4.21-4.09 (2H, m), 3.48-3.41 (1H, m), 2.52-2.45 (1H, m), 1.78-1.67 (8H, m), 1.52-1.46 (1H, m), 1.27 (3H, t, $J = 7.1$ Hz), 1.17 (3H, d, $J = 7.1$ Hz).

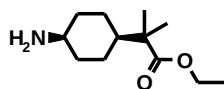
エチル-2-メチル-2-(シス-4-[(1E)-フェニルメチレン]アミノ)シクロヘキシル)プロパノエート (**C8**)



化合物 **C7** を用いて、化合物 **C7** 合成時の方法に準じて標記化合物を定量的に得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.31 (1H, s), 7.76-7.73 (2H, m), 7.41-7.38 (3H, m), 4.14 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 3.54-3.52 (1H, m), 1.77-1.73 (7H, m), 1.41-1.39 (2H, m), 1.27 (3H, t, $J = 7.1$ Hz), 1.17 (6H, s).

エチル-2-(シス-4-アミノシクロヘキシル)-2-メチルプロパノエート (**C2**)



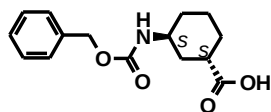
化合物 **C8** (6.51 g, 20.5 mmol) のジクロロメタン (68.3 ml) 溶液に、氷冷下、トリフルオロ酢酸 (2.35 ml, 30.7 mmol) を加えて室温で 2 時間攪拌した。反応液を減圧下にて溶媒を留去した後に 4 N 塩酸-酢酸エチル (10 ml) を加えて再び減圧下にて溶媒を留去した。水 (200 ml) を加えてトルエンで洗浄した。水層に 4 N 水酸化ナトリウム水溶液

(15 ml) を加え、酢酸エチル (150 ml x 1, 100 ml x 2) にて抽出した。有機層を合わせて 4 N 水酸化ナトリウム水溶液 (3 ml) を加えた飽和水酸化ナトリウム水溶液 (300 ml) で洗淨した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ過し、ろ液を減圧下にて溶媒を留去し、真空乾燥することにより 4.02 g の標記化合物 (収率 92%) を朱色油状物として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 4.12 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 3.20-3.17 (1H, m), 1.68-1.34 (11H, m), 1.25 (3H, t, $J = 7.1$ Hz), 1.12 (6H, s); MS m/z 214 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

(1*S*, 3*S*) -3- {[(ベンジルオキシ) カルボニル] アミノ} シクロヘキサンカルボン酸
(C10 第二ピーク) および

(1*R*, 3*R*) -3- {[(ベンジルオキシ) カルボニル] アミノ} シクロヘキサンカルボン酸
(C10 第一ピーク)

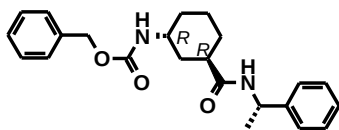


PCT WO2008/075196 出願明細書記載のトランス-3- {[(ベンジルオキシ) カルボニル] アミノ} シクロヘキサンカルボン酸 (120 g) を用いて超臨海流体クロマトグラフィー (ダイセル、キラルパック AD-H、二酸化炭素/メタノール = 75 : 25) にて光学分割を行なった。先に溶出する第一ピークを集めた後、減圧下にて溶媒を留去し、標記化合物 (56.7 g, 光学純度 > 98% ee) を固体として得た。また、後から溶出する第二ピークを集めた後、減圧下にて溶媒を留去し、標記化合物 (55.4 g, 光学純度 > 98% ee) を固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.39-7.29 (5H, m), 5.19-5.05 (2H, br m), 4.79 (1H, br s), 3.91 (1H, br s), 2.63 (1H, br s), 2.03-1.94 (1H, m), 1.83-1.44 (7H, m). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +22.0$ (c 1.01, CHCl_3).

ベンジル- [(1*R*, 3*R*) -3- {[(1*S*) -1-フェニルエチル] カルバモイル} シクロヘキ

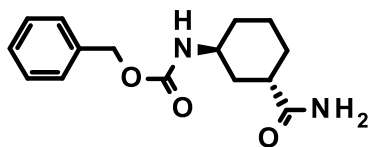
シル] カーバメート (**C11**)



化合物 **C10** 第一ピーク (300 mg, 1.08 mmol) のジクロロメタン (11 ml) 溶液に、3H- [1, 2, 3] トリアゾロ [4, 5-b] ピリジン-3-オール (294 mg, 2.16 mmol)、(1*S*)-1-フェニルエタンアミン (138 μ l, 1.08 mmol)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (414 mg, 2.16 mmol)、およびトリエチルアミン (0.452 ml, 3.24 mmol) を加え、室温にて 20 時間攪拌した。反応混合物に水を加え、クロロホルムにて抽出した。有機層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下にて溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン/酢酸エチル = 100/0-0/100) にて精製し、標記化合物 394 mg (収率 96%) を固体として得た。得られた固体を用いてイソプロピルアルコール溶媒から結晶化を行なった。得られた結晶を用いて X 線結晶構造解析によって絶対立体構造を決定した。絶対立体配置は (1*S*)-1-フェニルエタンアミンの立体配置を基に (1*R*, 3*R*) であると決定した。よって、化合物 **C10** 第二ピークの絶対立体配置は (1*S*, 3*S*) であると決定した。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.37-7.24 (10H, m), 5.75 (1H, br s), 5.15-5.07 (1H, m), 5.10 (2H, s), 4.81 (1H, br s), 3.99-3.95 (1H, m), 2.32-2.26 (1H, m), 1.89-1.83 (2H, m), 1.74-1.62 (5H, m), 1.48 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 1.46-1.40 (1H, m); MS m/z 381 ($\text{M} + \text{H}^+$); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -40.8$ (c 1.08, CHCl_3).

ベンジル [(1*S*, 3*S*)-3-カルバモイルシクロヘキシル] カーバメート (**C12**)

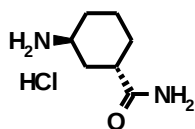


化合物 **C10** 第二ピーク (3.00 g, 10.8 mmol) のジクロロメタン (150 ml) 溶液に、氷冷

下、市販の 1,1'-カルボニルジイミダゾール (2.10 g, 13.0 mmol) を加え、1 時間攪拌した。反応混合物に市販の 28%アンモニア水 (20 ml) を加えた後、室温に戻して 3 時間攪拌した。反応液にジクロロメタンを加え希釈した後、6 N 塩酸を加えて中和洗浄した。有機層を飽和食塩水にて洗浄し、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。減圧下にて溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン/酢酸エチル = 85/15-0/100) にて精製し、標記化合物 (収率 100%) を固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.41-7.31 (5H, m), 5.79-5.28 (1H, m), 5.66 (1H, s), 5.11 (2H, s), 4.92 (1H, s), 3.95 (1H, s), 2.43 (1H, s), 1.92-1.44 (8H, m).

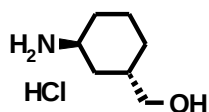
(1*S*, 3*S*) -3-アミノシクロヘキサンカルボキサミド塩酸塩 (**C13**)



化合物 **C12** (3.00 g, 10.9 mmol) のエタノール (100 ml) 溶液に、市販の 10%パラジウム炭素 (300 mg) を加え、水素雰囲気下、室温にて 2.5 時間攪拌した。反応混合物をセライトろ過した後、減圧下にて溶媒を留去した。得られた残渣に 1 N 塩酸エタノール溶液を加えて懸濁させた後、減圧下にて溶媒を留去した。得られた残渣を乾燥し、標記化合物 1.95 g (収率 97%) を固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 3.67-3.60 (1H, m), 2.77-2.73 (1H, m), 2.16 (1H, dt, $J = 13.2, 4.6$ Hz), 1.97-1.82 (2H, m), 1.73-1.53 (4H, m), 1.49-1.40 (1H, m).

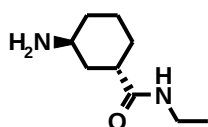
[(1*S*, 3*S*) -3-アミノシクロヘキシル] メタノール塩酸塩 (**C14**)



PCT WO2009/153720A1 出願明細書記載のベンジル- [(1*S*, 3*S*) -3- (ヒドロキシメチル) シクロヘキシル] カーバメートを用いて、化合物 **C13** の合成法に準じて標記化合物 (収率 97%) を得た。

¹H-NMR (CD₃OD) δ: 3.50 (1H, dd, *J* = 10.9, 6.9 Hz), 3.46 (1H, dd, *J* = 10.9, 6.9 Hz), 3.46-3.40 (1H, m), 1.94-1.80 (2H, m), 1.75 (2H, t, *J* = 5.7 Hz), 1.70-1.58 (4H, m), 1.42-1.32 (1H, m).

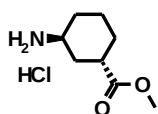
[(1*S*, 3*S*) -3-アミノ-*N*-エチルシクロヘキサンカルボキサミド (**C15**)



化合物 **C10** 第二ピークおよび市販のエチルアミン (2.0 M テトラヒドロフラン溶液) を用いて、化合物 **C12** の合成法に準じて油状物を得た。得られた油状物を用いて、化合物 **C13** の合成法に準じて標記化合物を固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 5.57 (1H, br s), 3.32-3.24 (3H, m), 2.56-2.48 (1H, m), 2.09-1.78 (4H, m), 1.75-1.55 (6H, m), 1.47-1.38 (1H, m), 1.13 (3H, t, *J* = 7.3 Hz).

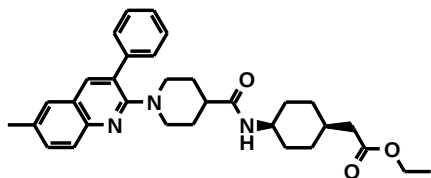
メチルー (1*S*, 3*S*) -3-アミノシクロヘキサンカルボキシレート塩酸塩 (**C16**)



化合物 **C10** 第二ピークおよびメタノールを用いて、化合物 **C12** の合成法に準じて固体 (収率 92%) を得た。得られた固体を用いて、化合物 **C13** の合成法に準じて標記化合物 (収率 72%) を固体として得た。

¹H-NMR (CD₃OD) δ: 3.69 (3H, s), 3.44-3.36 (1H, m), 2.92-2.82 (1H, m), 2.32-2.25 (1H, m), 2.06-1.91 (2H, m), 1.76-1.67 (1H, m), 1.65-1.37 (4H, m).

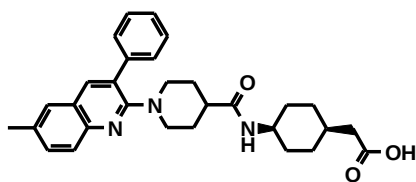
エチルー [シス-4- ({[1- (6-メチル-3-フェニルキノリン-2-イル) ピペリジン-4-イル] カルボニル} アミノ) シクロヘキシル] アセテート (**Q4k**)



化合物 **C1** (183 mg, 0.823 mmol) および化合物 **Q3a** (202 mg, 0.583 mmol)、3H- [1, 2, 3] トリアゾロ [4, 5-b] ピリジン-3-オール (1.75 g, 12.9 mmol) および *N,N*-ジメチルピリジン-4-アミン (72.4 mg, 0.593 mmol) のジクロロメタン溶液 (4 ml) にトリエチルアミン (0.41 ml, 291 mmol) および 1-エチルー3- (3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (340 mg, 1.77 mmol) を加え、室温にて 15 時間半攪拌した。ジクロロメタンを加え希釈した後、0.1 N 塩酸水溶液を加えて中和洗浄した。有機層を飽和食塩水にて洗浄し、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した後、減圧下にて溶媒を留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (n-ヘキサン/酢酸エチル (10%メタノール) = 6/1-1/2) にて精製し標記化合物 262 mg (収率 88%) を固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.76 (1H, s), 7.75 (1H, d, $J = 9.6$ Hz), 7.69-7.63 (2H, m), 7.48-7.40 (4H, m), 7.37-7.32 (1H, m), 5.47 (1H, d, $J = 7.3$ Hz), 4.13 (2H, q, $J = 7.0$ Hz), 4.04-3.97 (1H, br m), 3.76-3.69 (2H, br m), 2.77-2.69 (2H, m), 2.48 (3H, s), 2.26 (2H, d, $J = 7.3$ Hz), 2.17-2.09 (1H, m), 2.00-1.91 (1H, m), 1.73-1.60 (10H, m), 1.26 (3H, t, $J = 7.0$ Hz), 1.25-1.17 (2H, m); MS m/z 514 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_3$: C, 74.82; H, 7.65; N, 8.18. Found: C, 74.92; H, 7.71; N, 8.20.

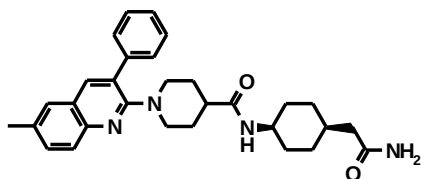
[シス-4- ({[1- (6-メチル-3-フェニルキノリン-2-イル) ピペリジン-4-イル] カルボニル} アミノ) シクロヘキシル] 酢酸 (**Q4j**)



化合物 **Q4k** (377 mg, 0.733 mmol) のエタノール (5 ml) および水 (0.4 ml) 懸濁液に、8 N 水酸化ナトリウム水溶液 (0.7 ml, 5.6 mmol) を加えて 60°C にて 2.5 時間攪拌した。反応混合物に 1 N 塩酸水溶液を加えて酸性とした後、酢酸エチルにて抽出した。有機層を合わせ、飽和食塩水にて洗浄した後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。減圧下にて溶媒を留去し、標記化合物 338 mg (収率 95%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.96 (1H, br s), 8.01 (1H, s), 7.62-7.60 (1H, m), 7.57-7.52 (2H, m), 7.49-7.45 (4H, m), 6.18 (1H, s), 4.00-3.97 (3H, m), 3.45-3.39 (2H, m), 2.50-2.42 (3H, m), 2.50 (1H, s), 2.35 (2H, d, $J = 6.6$ Hz), 1.96-1.37 (13H, m); HRMS calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_3$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$ calcd:486.2756, found:486.2751, Anal. Calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_3 \cdot 3.1\text{H}_2\text{O}$: C, 66.95; H, 7.67; N, 7.76. Found: C, 66.95; H, 7.28; N, 7.38.

N-[シス-4-(2-アミノ-2-オキシエチル)シクロヘキシル]-1-(6-メチル-3-フェニルキノリン-2-イル)ピペリジン-4-カルボキサミド (**Q4i**)

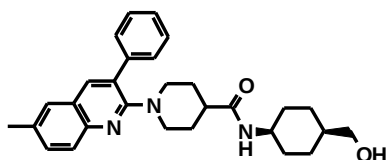


化合物 **Q3a** および化合物 **C5** を用いて、化合物 **Q4k** の合成法に準じて標記化合物 (収率 91%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.75 (1H, s), 7.74 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.68-7.64 (2H, m), 7.48-7.40 (4H, m), 7.37-7.32 (1H, m), 5.50 (1H, d, $J = 7.3$ Hz), 5.40 (2H, br s), 4.05-3.98 (1H, br m), 3.76-3.70 (2H,

br m), 2.77-2.69 (2H, m), 2.48 (3H, s), 2.17 (2H, d, $J = 7.3$ Hz), 2.16-2.08 (1H, m), 1.99-1.89 (1H, m), 1.73-1.59 (10H, m), 1.30-1.19 (2H, m); HRMS calcd for $C_{30}H_{37}N_4O_2$ ($M + H$)⁺ calcd:485.2916, found:485.2910, Anal. Calcd for $C_{30}H_{36}N_4O_2 \cdot 0.33H_2O$: C, 73.44; H, 7.53; N, 11.42. Found: C, 73.59; H, 7.81; N, 11.13.

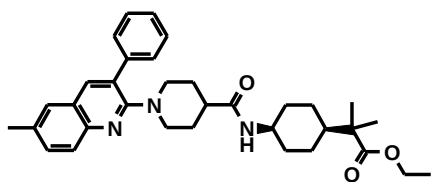
N-[シス-4-(ヒドロキシメチル)シクロヘキシル]-1-(6-メチル-3-フェニルキノリン-2-イル)ピペリジン-4-カルボキサミド (**Q4h**)



PCT WO2004/087680A1 出願明細書記載の（シス-4-アミノシクロヘキシル）メタノール塩酸塩および化合物 **Q3a** を用いて、化合物 **Q4k** の合成法に準じて標記化合物（収率 52%）を得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ : 7.92 (1H, s), 7.69-7.55 (5H, m), 7.52-7.37 (4H, m), 4.38-4.35 (1H, m), 3.76-3.71 (1H, m), 3.62-3.57 (2H, m), 3.27-3.23 (2H, m), 2.66-2.57 (2H, m), 2.44 (3H, s), 2.31-2.23 (1H, m), 1.55-1.24 (14H, m); HRMS calcd for $C_{29}H_{36}N_3O_2$ ($M + H$)⁺ calcd:458.2807, found:458.2810, Anal. Calcd for $C_{29}H_{35}N_3O_2 \cdot 0.25H_2O$: C, 75.37; H, 7.74; N, 9.09. Found: C, 75.08; H, 7.92; N, 8.88.

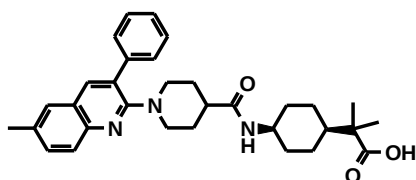
エチル-2-メチル-2-[シス-4-（{[1-(6-メチル-3-フェニルキノリン-2-イル)ピペリジン-4-イル]カルボニル}アミノ)シクロヘキシル]プロパノエート (**Q4a**)



化合物 **Q3a** および化合物 **C9** を用いて、化合物 **Q4k** の合成法に準じて標記化合物（収率 79%）を固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.76-7.73 (2H, m), 7.67-7.64 (2H, m), 7.47-7.40 (4H, m), 7.37-7.32 (1H, m), 5.54 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 4.12 (3H, q, $J = 7.1$ Hz), 3.75-3.70 (2H, m), 2.77-2.70 (2H, m), 2.48 (3H, s), 2.19-2.11 (1H, m), 1.87-1.83 (2H, m), 1.74-1.49 (9H, m), 1.25 (3H, t, $J = 7.1$ Hz), 1.16-1.05 (6H, m), 1.13 (2H, s); MS m/z 542 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

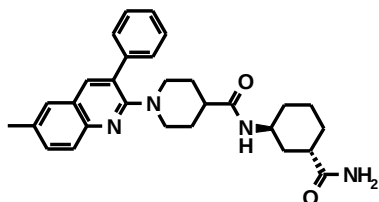
2-メチル-2- [シス-4- ({[1- (6-メチル-3-フェニルキノリン-2-イル) ピペリジン-4-イル] カルボニル} アミノ) シクロヘキシル] プロパン酸 (**Q4b**)



化合物 **Q4a** を用いて、化合物 **Q4j** の合成法に準じて標記化合物（収率 16%）を固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.78-7.76 (2H, m), 7.66-7.63 (2H, m), 7.47-7.41 (4H, m), 7.37-7.33 (1H, m), 5.59 (1H, d, $J = 6.8$ Hz), 4.11-4.06 (1H, m), 3.65-3.60 (2H, m), 2.88-2.81 (2H, m), 2.48 (3H, s), 2.24-2.17 (1H, m), 1.91-1.48 (11H, m), 1.26-1.13 (2H, m), 1.18 (6H, s); HRMS calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_3$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$ calcd:514.3069, found:514.3093, Anal. Calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_3 \cdot 0.9\text{H}_2\text{O}$: C, 72.53; H, 7.76; N, 7.93. Found: C, 72.51; H, 7.83; N, 7.93.

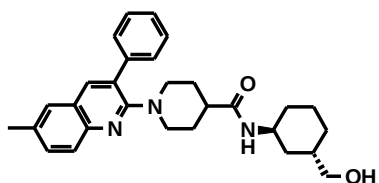
N- [(1*S*, 3*S*) -3-カルバモイルシクロヘキシル] -1- (6-メチル-3-フェニルキノリン-2-イル) ピペリジン-4-カルボキサミド (**Q4e**)



化合物 **Q3a** および化合物 **C13** を用いて、化合物 **Q4k** の合成法に準じて標記化合物 (収率 66%) を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.78 (1H, s), 7.76 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.69-7.66 (2H, m), 7.49-7.42 (4H, m), 7.36 (1H, tt, *J* = 7.4, 1.1 Hz), 5.99 (1H, br s), 5.50 (1H, d, *J* = 6.9 Hz), 5.36 (1H, br s), 4.08-4.01 (1H, m), 3.78-3.71 (2H, m), 2.79-2.71 (2H, m), 2.50-2.45 (1H, m), 2.49 (3H, s), 2.19-2.12 (1H, m), 2.06-1.99 (1H, m), 1.94-1.84 (1H, m), 1.77-1.45 (10H, m); HRMS calcd for C₂₉H₃₅N₄O₂ (M + H)⁺ calcd:471.2760, found:417.2761, Anal. Calcd for C₂₉H₃₄N₄O₂·0.5EtOAc: C, 72.35; H, 7.44; N, 10.89. Found: C, 72.30; H, 7.52; N, 10.89.

N- [(1*S*, 3*S*) -3- (ヒドロキシメチル) シクロヘキシル] -1- (6-メチル-3-フェニルキノリン-2-イル) ピペリジン-4-カルボキサミド (**Q4d**)

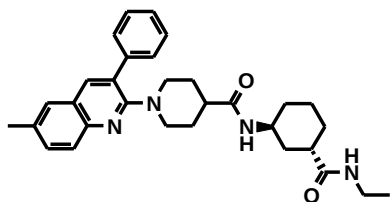


化合物 **Q3a** および化合物 **C14** を用いて、化合物 **Q4k** の合成法に準じて標記化合物 (収率 87%) を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.77 (1H, s), 7.76 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.69-7.66 (2H, m), 7.49-7.42 (4H, m), 7.36 (1H, tt, *J* = 8.0, 1.1 Hz), 5.52 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 4.18-4.12 (1H, m), 3.74 (2H, d, *J* = 13.2

Hz), 3.58-3.48 (2H, m), 2.78-2.71 (2H, m), 2.49 (3H, s), 2.18-2.10 (1H, m), 1.78-1.37 (13H, m), 1.23-1.14 (1H, m); HRMS calcd for C₂₉H₃₆N₃O₂ (M + H)⁺ calcd:458.2807, found:458.2808.

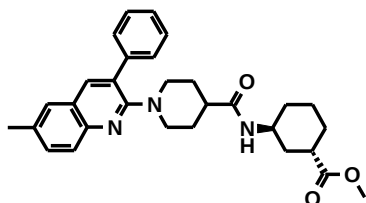
N- [(1*S*, 3*S*) -3- (エチルカルバモイル) シクロヘキシル] -1- (6-メチルー3-フェニルキノリン-2-イル) ピペリジン-4-カルボキサミド (**Q4f**)



化合物 **Q3a** および化合物 **C15** を用いて、化合物 **Q4k** の合成法に準じて標記化合物 (収率 97%) を固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.76 (1H, s), 7.74 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.69-7.63 (2H, m), 7.50-7.39 (4H, m), 7.38-7.31 (1H, m), 5.77 (1H, br s), 5.49 (1H, d, *J* = 6.9 Hz), 4.10-4.03 (1H, m), 3.77-3.69 (2H, m), 3.30 (2H, dt, *J* = 13.6, 6.5 Hz), 2.77-2.69 (2H, m), 2.48 (3H, s), 2.35-2.29 (1H, m), 2.18-2.10 (1H, m), 1.94-1.87 (1H, m), 1.80-1.60 (9H, m), 1.58-1.43 (2H, m), 1.15 (3H, t, *J* = 7.1 Hz); HRMS calcd for C₃₁H₃₉N₄O₂ (M + H)⁺ calcd:499.3073, found:499.3076, Anal. Calcd for C₃₁H₃₈N₄O₂: C, 74.67; H, 7.68; N, 11.24. Found: C, 74.39; H, 7.57; N, 11.13.

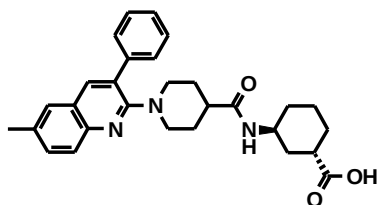
メチルー (1*S*, 3*S*) -3- ([1- (6-メチルー3-フェニルキノリン-2-イル) ピペリジン-4-イル] カルボニル} アミノ) シクロヘキサンカルボキシレート (**Q4l**)



化合物 **C16** および化合物 **Q3a** を用いて、化合物 **Q4k** の合成法に準じて標記化合物 (収率 84%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.76 (1H, s), 7.74 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.66 (2H, d, $J = 6.9$ Hz), 7.48-7.40 (4H, m), 7.35 (1H, t, $J = 7.4$ Hz), 5.37 (1H, d, $J = 7.4$ Hz), 4.13-4.04 (1H, m), 3.73 (2H, d, $J = 13.2$ Hz), 3.69 (3H, s), 2.76-2.69 (2H, m), 2.58-2.52 (1H, m), 2.48 (3H, s), 2.16-2.08 (1H, m), 1.98-1.91 (1H, m), 1.78-1.24 (11H, m), MS m/z 486 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$, Anal. Calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_3 \cdot 0.2\text{H}_2\text{O}$: C, 73.65; H, 7.29; N, 8.59. Found: C, 73.79; H, 7.53; N, 8.36.

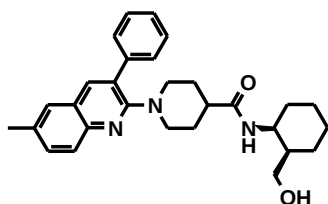
(1*S*, 3*S*) -3- ({[1- (6-メチル-3-フェニルキノリン-2-イル) ピペリジン-4-イル] カルボニル } アミノ) シクロヘキサンカルボン酸 (**Q4g**)



化合物 **Q4i** を用いて、化合物 **Q4j** の合成法に準じて標記化合物 (収率 51%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.77-7.73 (2H, m), 7.67-7.63 (2H, m), 7.48-7.40 (4H, m), 7.34 (1H, tt, $J = 7.4, 1.1$ Hz), 5.46 (1H, d, $J = 7.4$ Hz), 4.13-4.05 (1H, m), 3.75-3.68 (2H, m), 2.77-2.69 (2H, m), 2.67-2.61 (1H, m), 2.47 (3H, s), 2.18-2.09 (1H, m), 2.09-2.02 (1H, m), 1.87-1.32 (11H, m); HRMS calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_3$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$ calcd:472.2600, found:472.2600.

N- [(1*S*, 2*R*) -2- (ヒドロキシメチル) シクロヘキシル] -1- (6-メチル-3-フェニルキノリン-2-イル) ピペリジン-4-カルボキサミド (**Q4c**)



市販の [(1*R*, 2*S*) -2-アミノシクロヘキシル] メタノールおよび化合物 **Q3a** を用い

て、化合物 **Q4k** の合成法に準じて標記化合物（収率 83%）を固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.93 (1H, s), 7.70-7.63 (3H, m), 7.61-7.60 (1H, m), 7.56-7.38 (5H, m), 4.36 (1H, dd, $J = 6.9, 4.6$ Hz), 4.03-3.99 (1H, m), 3.63-3.58 (2H, m), 3.19-3.08 (2H, m), 2.67-2.58 (2H, m), 2.44 (3H, s), 2.42-2.35 (1H, m), 1.60-1.49 (8H, m), 1.42-1.35 (3H, m), 1.26-1.17 (2H, m) ; HRMS calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_2$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$ calcd: 458.2808, found: 458.2818, Anal. Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_2$: C, 76.12; H, 7.71; N, 9.18. Found: C, 76.17; H, 7.68; N, 9.19.

引用文献

1. 日本リウマチ学会, 関節リウマチ診療ガイドライン.
2. T. Suganami, Y. Ogawa : Role of chronic inflammation in adipose tissue in the pathophysiology of obesity. *Nihon Rinsho* 2013;71:225-30.
3. S. L. Cruz NG, Sousa MO, Pietrani NT, Fernandes AP, Gomes KB : The linkage between inflammation and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2013;99:85-92.
4. 犬童 康弘 : 【病気の分子細胞生物学】 筋・神経・精神疾患 先天性無痛無汗症. *生体の科学* 1999;50:379-80.
5. 村山 良介 : 慢性疼痛というもの. *痛みと漢方* 1992;2:1-7.
6. T. Heiberg, A. Finset, T. Uhlig, T. K. Kvien : Seven year changes in health status and priorities for improvement of health in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:191-5.
7. 赤真 秀人、柏崎 禎夫 : Cox-1,-2 と炎症. *リウマチ科* 1995;14:513-18.
8. M. J. Langman, J. Weil, P. Wainwright, et al. : Risks of bleeding peptic ulcer associated with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet* 1994;343:1075-8.
9. J. L. Masferrer, B. S. Zweifel, P. T. Manning, et al. : Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:3228-32.
10. K. Seibert, Y. Zhang, K. Leahy, et al. : Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:12013-7.
11. C. Bombardier, L. Laine, A. Reicin, et al. : Comparison of upper gastrointestinal

- toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med* 2000;343:1520-8.
12. J. L. Goldstein, G. M. Eisen, N. Agrawal, et al. : Reduced incidence of upper gastrointestinal ulcer complications with the COX-2 selective inhibitor, valdecoxib. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20:527-38.
 13. G. Singh, J. G. Fort, J. L. Goldstein, et al. : Celecoxib versus naproxen and diclofenac in osteoarthritis patients: SUCCESS-I Study. *Am J Med* 2006;119:255-66.
 14. R. S. Bresalier, R. S. Sandler, H. Quan, et al. : Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med* 2005;352:1092-102.
 15. J. Couzin : Drug safety. Withdrawal of Vioxx casts a shadow over COX-2 inhibitors. *Science* 2004;306:384-5.
 16. N. A. Nussmeier, A. A. Whelton, M. T. Brown, et al. : Complications of the COX-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after cardiac surgery. *N Engl J Med* 2005;352:1081-91.
 17. Y. Cheng, S. C. Austin, B. Rocca, et al. : Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A₂. *Science* 2002;296:539-41.
 18. T. Tanioka, Y. Nakatani, N. Semmyo, et al. : Molecular identification of cytosolic prostaglandin E₂ synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E₂ biosynthesis. *J Biol Chem* 2000;275:32775-82.
 19. B. Samuelsson, R. Morgenstern, P. J. Jakobsson : Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacol Rev* 2007;59:207-24.
 20. S. Uematsu, M. Matsumoto, K. Takeda, S. Akira : Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E(2) production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin

- E(2) synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway. *J Immunol* 2002;168:5811-6.
21. D. Kamei, K. Yamakawa, Y. Takegoshi, et al. : Reduced pain hypersensitivity and inflammation in mice lacking microsomal prostaglandin synthase-1. *J Biol Chem* 2004;279:33684-95.
 22. C. E. Trebino, J. L. Stock, C. P. Gibbons, et al. : Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:9044-9.
 23. Y. Cheng, M. Wang, Y. Yu, et al. : Cyclooxygenases, microsomal prostaglandin synthase-1, and cardiovascular function. *J Clin Invest* 2006;116:1391-9.
 24. T. Murata, F. Ushikubi, T. Matsuoka, et al. : Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature* 1997;388:678-82.
 25. S. Ohishi, A. Ueno, H. Matsumoto, et al. : Evidence for involvement of prostaglandin I₂ as a major nociceptive mediator in acetic acid-induced writhing reaction: a study using IP-receptor disrupted mice. *Adv Exp Med Biol* 1999;469:265-8.
 26. A. M. Pulichino, S. Rowland, T. Wu, et al. : Prostacyclin antagonism reduces pain and inflammation in rodent models of hyperalgesia and chronic arthritis. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;319:1043-50.
 27. K. R. Bley, A. Bhattacharya, D. V. Daniels, et al. : RO1138452 and RO3244794: characterization of structurally distinct, potent and selective IP (prostacyclin) receptor antagonists. *Br J Pharmacol* 2006;147:335-45.
 28. P. Leclerc, S. C. Pawelzik, H. Idborg, et al. : Characterization of a new mPGES-1 inhibitor in rat models of inflammation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2013;102-103:1-12.

29. D. C. Atkinson, R. Hicks : The anti-inflammatory activity of irritants. *Agents Actions* 1975;5:239-49.
30. D. Xu, S. E. Rowland, P. Clark, et al. : MF63 [2-(6-chloro-1H-phenanthro[9,10-d]imidazol-2-yl)-isophthalonitrile], a selective microsomal prostaglandin E synthase-1 inhibitor, relieves pyresis and pain in preclinical models of inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;326:754-63.
31. Y. Moriya, M. Goto, T. Nakamura, J. Koyama : Hemolysis of sheep erythrocytes with the cell membrane of liquid paraffin-induced guinea pig macrophages. *J Biochem* 1986;100:521-9.
32. S. Ushiyama, T. Yamada, Y. Murakami, et al. : Preclinical pharmacology profile of CS-706, a novel cyclooxygenase-2 selective inhibitor, with potent antinociceptive and anti-inflammatory effects. *Eur J Pharmacol* 2008;578:76-86.
33. S. Kobayashi, H. Takagi : Fever responses to bacterial pyrogens in guinea pigs and application for screening of antipyretic agents. *Jpn J Pharmacol* 1968;18:80-5.
34. C. V. Winder, L. A. Lembke, M. D. Stephens : Comparative bioassay of drugs in adjuvant-induced arthritis in rats: flufenamic acid, mefenamic acid, and phenylbutazone. *Arthritis Rheum* 1969;12:472-82.
35. U. Jahn, R. W. Adrian : [Pharmacological and toxicological testing of new anti-inflammatory agent azapropazon=3-dimethylamine-7-methyl-1,2-(n-propylmalonyl)-1,2-dihydro-1,2,4-benzotriazine]. *Arzneimittelforschung* 1969;19:36-52.
36. K. Hargreaves, R. Dubner, F. Brown, et al. : A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 1988;32:77-88.
37. L. Boulet, M. Ouellet, K. P. Bateman, et al. : Deletion of microsomal prostaglandin E2

- (PGE₂) synthase-1 reduces inducible and basal PGE₂ production and alters the gastric prostanoid profile. *J Biol Chem* 2004;279:23229-37.
38. C. E. Trebino, J. D. Eskra, T. S. Wachtmann, et al. : Redirection of eicosanoid metabolism in mPGES-1-deficient macrophages. *J Biol Chem* 2005;280:16579-85.
 39. D. Engblom, S. Saha, L. Engstrom, et al. : Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis. *Nat Neurosci* 2003;6:1137-8.
 40. S. Saha, L. Engstrom, L. Mackerlova, et al. : Impaired febrile responses to immune challenge in mice deficient in microsomal prostaglandin E synthase-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R1100-7.
 41. D. O. Stichtenoth, S. Thoren, H. Bian, et al. : Microsomal prostaglandin E synthase is regulated by proinflammatory cytokines and glucocorticoids in primary rheumatoid synovial cells. *J Immunol* 2001;167:469-74.
 42. F. Kojima, H. Naraba, S. Miyamoto, et al. : Membrane-associated prostaglandin E synthase-1 is upregulated by proinflammatory cytokines in chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2004;6:R355-65.
 43. D. Claveau, M. Sirinyan, J. Guay, et al. : Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a major terminal synthase that is selectively up-regulated during cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin E₂ production in the rat adjuvant-induced arthritis model. *J Immunol* 2003;170:4738-44.
 44. P. Clark, S. E. Rowland, D. Denis, et al. : MF498 [N-{[4-(5,9-Diethoxy-6-oxo-6,8-dihydro-7H-pyrrolo[3,4-g]quinolin-7-yl)-3-methylbenzyl]sulfonyl}-2-(2-methoxyphenyl)acetamide], a selective E prostanoid receptor 4 antagonist, relieves joint inflammation and pain in rodent models of rheumatoid and osteoarthritis. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;325:425-34.

45. K. Takeuchi, A. Tanaka, S. Kato, et al. : Effect of (S)-4-(1-(5-chloro-2-(4-fluorophenoxy)benzamido)ethyl) benzoic acid (CJ-42794), a selective antagonist of prostaglandin E receptor subtype 4, on ulcerogenic and healing responses in rat gastrointestinal mucosa. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;322:903-12.
46. B. J. Whittle, J. R. Vane : A biochemical basis for the gastrointestinal toxicity of non-steroid antirheumatoid drugs. *Arch Toxicol Suppl* 1984;7:315-22.
47. C. Brenneis, O. Coste, R. Schmidt, et al. : Consequences of altered eicosanoid patterns for nociceptive processing in mPGES-1-deficient mice. *J Cell Mol Med* 2008;12:639-48.
48. J. S. Mogil : Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci* 2009;10:283-94.
49. K. Yamaki, T. Yonezawa, K. Ohuchi : Signal transduction cascade in staurosporine-induced prostaglandin E(2) production by rat peritoneal macrophages. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;293:206-13.
50. H. Nakamura, Y. Yokoyama, K. Ishii, et al. : Effect of a non-steroidal anti-inflammatory drug, tolmetin sodium on arthritic pain, traumatic edema and LPS-induced fever (author's transl). *Yakugaku Zasshi* 1981;101:649-56.
51. S. U. Monrad, F. Kojima, M. Kapoor, et al. : Genetic deletion of mPGES-1 abolishes PGE2 production in murine dendritic cells and alters the cytokine profile, but does not affect maturation or migration. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2011;84:113-21.
52. A. Bruno, L. Di Francesco, I. Coletta, et al. : Effects of AF3442 [N-(9-ethyl-9H-carbazol-3-yl)-2-(trifluoromethyl)benzamide], a novel inhibitor of human microsomal prostaglandin E synthase-1, on prostanoid biosynthesis in human

- monocytes in vitro. *Biochem Pharmacol* 2010;79:974-81.
53. P. Leclerc, H. Idborg, L. Spahiu, et al. : Characterization of a human and murine mPGES-1 inhibitor and comparison to mPGES-1 genetic deletion in mouse models of inflammation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2013;107:26-34.
 54. M. Wang, W. L. Song, Y. Cheng, G. A. Fitzgerald : Microsomal prostaglandin E synthase-1 inhibition in cardiovascular inflammatory disease. *J Intern Med* 2008;263:500-5.
 55. S. K. Paulson, J. Y. Zhang, A. P. Breau, et al. : Pharmacokinetics, tissue distribution, metabolism, and excretion of celecoxib in rats. *Drug Metab Dispos* 2000;28:514-21.
 56. S. Kuzuna, K. Kawai : Evaluation of analgesic agents in rats with adjuvant arthritis. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1975;23:1184-91.
 57. L. O. Randall, J. J. Selitto : A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1957;111:409-19.
 58. C. R. Lin, F. Amaya, L. Barrett, et al. : Prostaglandin E2 receptor EP4 contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;319:1096-103.
 59. J. S. Cefalu, Q. M. Zhu, A. C. Eggers, et al. : Effects of the selective prostacyclin receptor antagonist RO3244019 on the micturition reflex in rats. *J Urol* 2007;178:2683-8.
 60. S. H. Ferreira : Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nat New Biol* 1972;240:200-3.
 61. B. D. Grubb, G. J. Birrell, D. S. McQueen, A. Iggo : The role of PGE2 in the sensitization of mechanoreceptors in normal and inflamed ankle joints of the rat. *Exp Brain Res* 1991;84:383-92.
 62. R. Uda, S. Horiguchi, S. Ito, et al. : Nociceptive effects induced by intrathecal

administration of prostaglandin D2, E2, or F2 alpha to conscious mice. Brain Res 1990;510:26-32.

63. T. Minami, R. Uda, S. Horiguchi, et al. : Allodynia evoked by intrathecal administration of prostaglandin F2 alpha to conscious mice. Pain 1992;50:223-9.
64. K. Nakao, A. Murase, H. Ohshiro, et al. : CJ-023,423, a novel, potent and selective prostaglandin EP4 receptor antagonist with antihyperalgesic properties. J Pharmacol Exp Ther 2007;322:686-94.
65. T. Okumura, Y. Murata, K. Taniguchi, et al. : Effects of the selective EP4 antagonist, CJ-023,423 on chronic inflammation and bone destruction in rat adjuvant-induced arthritis. J Pharm Pharmacol 2008;60:723-30.
66. S. Chandrasekhar, A. K. Harvey, X. P. Yu, et al. : Identification and Characterization of Novel Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 Inhibitors for Analgesia. J Pharmacol Exp Ther 2016;356:635-44.

謝辞

本論文を発表する機会を与えていただき、その作成に際して御指導、御鞭撻を賜りました北海道大学大学院農学研究院 園山慶准教授に謹んで御礼申し上げます。また、本論文作成に際し御助言を賜りました北海道大学大学院農学研究院 内藤哲教授、同 有賀早苗教授、北海道大学大学院先端生命科学研究院 綾部時芳教授、北海道大学大学院農学研究院 加藤英介講師に謹んで御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、実験技術から研究方針まで御指導いただきました第一三共株式会社疼痛神経ラボトリー 窪田一史副主任研究員に厚く御礼申し上げます。また、論文投稿に際し終始御指導、御鞭撻いただきました第一三共株式会社研究統括部 嶋田康平主幹に厚く御礼申し上げます。さらに、本研究の遂行ならびに本論文作成にご協力いただきました第一三共株式会社モダリティ研究所 木方俊宏主任研究員、バイオマーカー推進部 今村勇一郎主任研究員に深く感謝申し上げます。本論文で使用した実験データ取得にご協力いただきました第一三共株式会社安全管理推進部 桑原治美担当課長、メディカルサイエンス部 杉本光太郎主査に深く感謝申し上げます。

最後に、本研究の遂行ならびに本論文作成を終始励まし支えてくれた、妻 綾子、長女 鈴果に、深く感謝します。