

## 副作用の少ない非ステロイド系抗炎症薬の開発への戦略

水島 徹

## A Strategy for Development of NSAIDs with Lower Risk for Side Effects

Tohru MIZUSHIMA

Graduate School of Medical and Pharmaceutical Sciences, Research Institute for Drug Discovery,  
Kumamoto University, 5-1 Oe-honmachi, Kumamoto City 862-0973, Japan

(Received August 22, 2007)

Nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) are one of the most frequently used classes of medicines worldwide. The major clinical problem encountered with the use of NSAIDs is gastrointestinal complications. In the USA, about 16,500 people per year die as a result of NSAID-associated gastrointestinal complications. COX-2-specific NSAIDs have been developed as safer for the gastrointestinal tract, although the risk of cardiovascular thrombotic disease has recently been noted with the use of COX-2-specific NSAIDs. To find the strategy for the development of gastrointestinal safe NSAIDs other than COX-2-specific NSAIDs, we examined the molecular mechanism for NSAID-induced gastric ulcer formation. We found that NSAIDs induce gastric mucosal cell death in a manner independent of COX inhibition and that this cytotoxic effect is due to their membrane permeabilization activity, which is not required for the antiinflammatory activity of NSAIDs. Furthermore, we showed that in addition to COX inhibition by NSAIDs, direct cytotoxicity of NSAIDs is required for NSAID-induced gastric ulcer formation. These results suggest that NSAIDs that have neither membrane permeabilization activity nor COX-2 specificity would be safe for both the gastrointestinal tract and cardiovascular system and we are now chemically synthesizing such NSAIDs.

**Key words**—nonsteroidal antiinflammatory drugs; gastrointestinal complication; membrane

## 1. はじめに

アスピリン、インドメタシンなどの非ステロイド系抗炎症薬 (nonsteroidal antiinflammatory drugs; NSAIDs) は、優れた解熱・鎮痛・消炎薬として、最もよく使われている医薬品の1つである。<sup>1)</sup>それはステロイドなど他の抗炎症薬に比べ、その副作用が少ないなど NSAIDs が大変使い易いためである。NSAIDs の市場は大変大きく、全世界で約1兆5000億円である。特に高齢者に多く処方されることから (イギリスでの調査では、65歳以上の患者の15%が NSAIDs を使用していた)、今後この市場は社会の高齢化に伴いさらに拡大すると思われる。

一方 NSAIDs の胃潰瘍誘発副作用が臨床現場で大きな問題になっている (全米の1996年の NSAIDs 潰瘍による死者は年間16500人で、エイズ

死亡者よりも多かった)<sup>2)</sup> わが国でも、NSAIDs 長期服用者の20–30%は胃潰瘍のためにその使用を中止しなければならないという統計が報告されている。近年胃潰瘍誘発副作用の少ない NSAIDs として、COX-2 選択的 NSAIDs が開発されたが、後述するように、最近これにはその COX-2 選択性を原因とする新たな副作用 (血栓を起こし易くし心筋梗塞を誘発する) があること、及び長期投与では従来の NSAIDs と同程度の胃潰瘍誘発能を持つことが報告され、COX-2 選択的 NSAIDs に代わる、新しい胃潰瘍を起こさない NSAIDs の開発が社会的に強く望まれている。

NSAIDs はシクロオキシゲナーゼ (COX) の阻害剤であり、COX には COX-1 と COX-2 という2つのサブタイプが存在する。COX は生理活性物質であるプロスタグランジン (PG) 生合成の律速酵素である。炎症部位において発現している COX は主に COX-2 であり、炎症部位で PG は炎症を増悪している。そこで NSAIDs は COX-2 を阻害し PG を低下させることにより抗炎症作用を発揮してい

熊本大学大学院医学薬学研究部・創薬研究センター  
(〒862-0973 熊本市大江本町5-1)

e-mail: mizu@gpo.kumamoto-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第127年会シンポジウム S41 で発表したものを中心に記述したものである。

る。一方胃粘膜では主に COX-1 が発現している。胃粘膜で PG は、胃粘膜を保護するという有益な働きをしている。<sup>3,4)</sup> アスピリン、インドメタシンなどの従来の NSAIDs は COX-1、及び COX-2 をともに阻害するので、胃粘膜で PG を低下させるため、胃潰瘍を導くと考えられていた。そこで近年開発されたのが、COX-2 を選択的に阻害する COX-2 選択的 NSAIDs (セレコキシブ、ロフェコキシブなど) である。わが国ではまだ認可されていないが、COX-2 選択的 NSAIDs は北米を中心に大変よく使われており、セレコキシブ、ロフェコキシブはともに年間 4000 億円以上売り上げている (ロフェコキシブに関してはごく最近、その血栓誘発副作用のため、市場から撤退した)。

しかし最近では、NSAIDs 潰瘍の発症がその COX 阻害作用のみでは説明できないと考えられるようになってきた。例えばインドメタシンをラットに経口投与する場合、胃潰瘍を発症させるために必要なインドメタシンの濃度は、胃粘膜の PG 合成を完全に抑制するのに必要な濃度に比べ、10 倍以上も高いことが知られている。このように NSAIDs 潰瘍の発症には、COX 阻害以外の別の作用も関与していることが明らかになってきたが、この別の作用が何であるかは不明であった。われわれは NSAIDs が胃粘膜細胞を直接傷害する (胃粘膜細胞死を導く) ことが、この別の作用の実体ではないかと考え、研究を開始した。

## 2. NSAIDs によるネクローシス、アポトーシス誘導<sup>5-8)</sup>

最初にわれわれは、生体内の胃粘膜細胞の状態をよく反映している (粘液産生が起こる、粘膜細胞への分化が起こるなど) モルモット胃粘膜初代培養細胞を用いて、NSAIDs による細胞死を *in vitro* で再現することを試みた。Figure 1 に示すように、種々の濃度のインドメタシンで胃粘膜細胞を 1 時間又は 16 時間処理すると、濃度依存的な細胞死が観察され、インドメタシンによる細胞死を *in vitro* で再現することに成功した。処理時間の違いにより細胞死に必要なインドメタシン濃度が異なっていたため、それぞれどのような細胞死が起きているのかを検討した。その結果 Fig. 1 に示すように、アポトーシスの特徴の 1 つである DNA 断片化、クロマチンの凝集、カスパーゼの活性化は、16 時間処理した細

胞では検出されたが、1 時間処理した細胞では検出されなかった。したがってインドメタシンは、低濃度長時間処理時にはアポトーシスを、高濃度短時間処理時にはアポトーシス以外の細胞死、すなわちネクローシスを誘導して胃粘膜細胞を直接傷害することが分かった。なお、使用しているインドメタシン濃度は、通常の服用時の血中濃度に比べるとかなり高いものの、胃内で溶解した場合の胃内濃度と同程度と考えている。

次にわれわれはこの細胞死 (アポトーシス、ネクローシス) が NSAIDs の COX 阻害作用とは無関係 (非依存) であることを確認するために実験を行い以下に述べる 2 つの結果を得た。1 つは、培地中にかなりの高濃度の PG を添加しても、この NSAIDs によるアポトーシス、及びネクローシスが抑制されないという結果、もう 1 つは、アポトーシス、及びネクローシスを誘導するために必要な NSAIDs の濃度は、COX を阻害するために必要な濃度に比べ 10 倍以上高いという結果である。以上の結果は、NSAIDs によるアポトーシス、及びネクローシス誘導が、COX 阻害作用には依存していないことを示している。

## 3. NSAIDs による膜傷害作用<sup>9,10)</sup>

アポトーシス、及びネクローシスに関する NSAIDs のターゲットが COX ではないことが分かったが、それではターゲットは何であろうか？ われわれは NSAIDs が膜リン脂質と相互作用するという論文<sup>11)</sup>に注目し、NSAIDs が膜傷害性を持ち、これがアポトーシス、及びネクローシス誘導の原因ではないかと考えた。そこで 10 種類以上の NSAIDs を用いて、その膜傷害性とアポトーシス、及びネクローシス誘導性の相関性を調べた。その結果、調べた限りすべての NSAIDs はアポトーシス、及びネクローシスを誘導するだけでなく、赤血球からのヘモグロビンの漏出を促進し膜傷害性を持つことが分かった。さらに蛍光物質であるカルセインを封入したリポソーム (リン脂質のみからなる)



水島 徹

1990 年東京大学薬学部卒、1992 年山之内製薬㈱研究員、1994 年九州大学助手、1997 年岡山大学助教授、2004 年熊本大学教授、2006 年創薬研究センター長。現在、LTT バイオファーマ㈱取締役、再春館製薬所㈱技術アドバイザー、JST 開発責任者などを兼務。

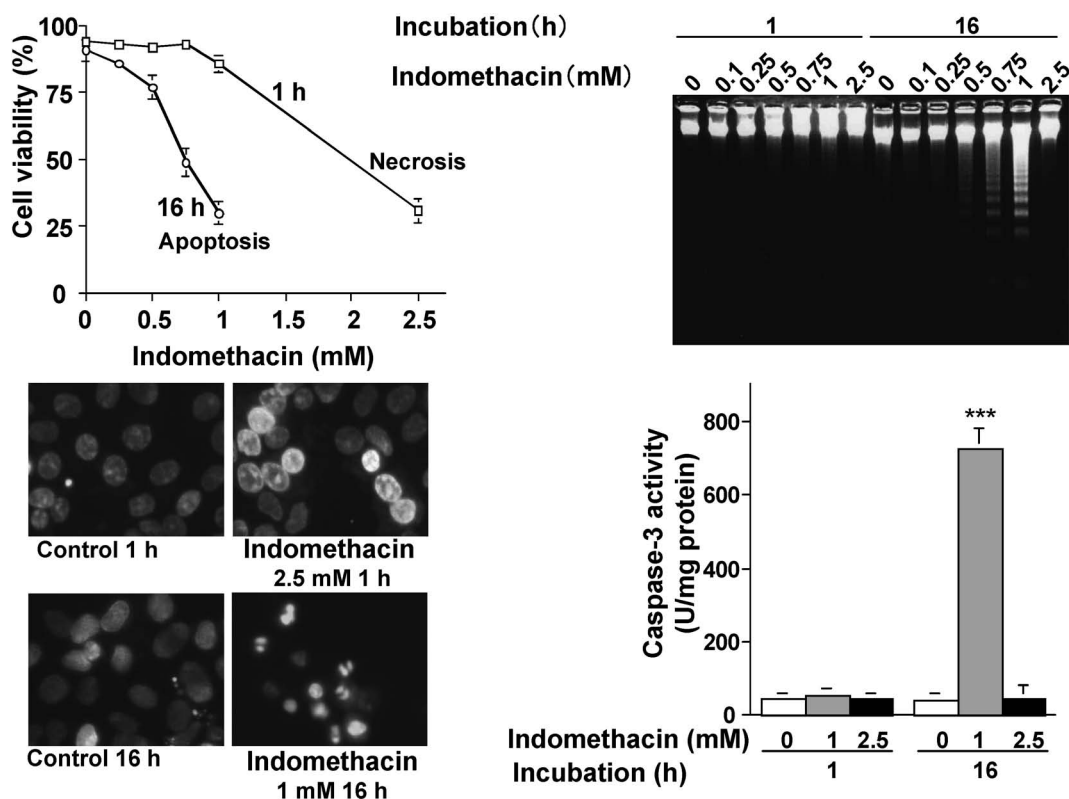


Fig. 1. Cultured Gastric Mucosal Cells Were Incubated with Indicated Concentrations of Indomethacin for 1 hr or 16 hr.

Cell viability was determined by the trypan blue exclusion test. Chromosomal DNA was extracted and analyzed by 2% agarose gel electrophoresis. After staining with both Ho 342 and PI, cells were observed under fluorescence microscope. Cell lysates were prepared and their activity of caspase-3 was measured by fluorometric assay using Ac-DEVD-MCA. Values are mean  $\pm$  S.E. ( $n=3$ ).

を用いて、カルセインの漏出を指標とした膜傷害試験を行った。その結果、すべての NSAIDs がカルセインを漏出させ、NSAIDs はリン脂質（細胞膜上のタンパク質ではなく）をターゲットとして、膜傷害を起こすことが分かった。さらに Fig. 2 に示すように、これら NSAIDs による膜傷害性とアポトーシス、及びネクローシス誘導性は大変よく相関しており (Fig. 2), NSAIDs はその膜傷害性を介して、アポトーシス、及びネクローシスを誘導し、胃粘膜細胞を直接傷害することが強く示唆された。

#### 4. NSAIDs 誘導性遺伝子の網羅的解析<sup>12,13</sup>

細胞が強いストレスを受け細胞膜の機能が大きく低下したとき、ネクローシスが起これると一般に考えられている。一方、膜傷害がアポトーシスを誘導する機構はよく分からなかった。そこでわれわれはアポトーシスを誘導する条件で胃粘膜細胞を NSAIDs で処理し、誘導される遺伝子を DNA チップを使って網羅的に解析した。その結果 GRP78 など、小胞体ストレス応答（小胞体が傷害を受け小胞体内に変性したタンパク質が蓄積すると誘導されるストレス

応答）に関与する遺伝子を複数同定し、NSAIDs が小胞体ストレス応答を誘導することが初めて分かった。最近小胞体ストレス応答誘導により、アポトーシス誘導性を持つ転写因子 CHOP が誘導されることが報告された。そこでわれわれは NSAIDs によるアポトーシス誘導が CHOP を介する可能性を考え実験を行った。まずわれわれは、mRNA、及びタンパク質レベルで、種々の NSAIDs が CHOP を誘導することを確認した。CHOP の誘導には、ATF6, ATF4, 及び XBP-1 という 3 種の転写因子が関与することが知られているが、われわれは種々の NSAIDs によりこれらすべての転写因子が活性化されることを示した。さらにこの NSAIDs による CHOP 誘導が NSAIDs によるアポトーシス誘導に関与していることを以下の 2 つの実験で示した。まず CHOP のドミナントネガティブ変異タンパク質を発現することにより、NSAIDs によるアポトーシス誘導が抑制されることを見出した。さらに Fig. 3 に示すように、CHOP のノックアウトマウスから調製した細胞では、NSAIDs によるアポトー

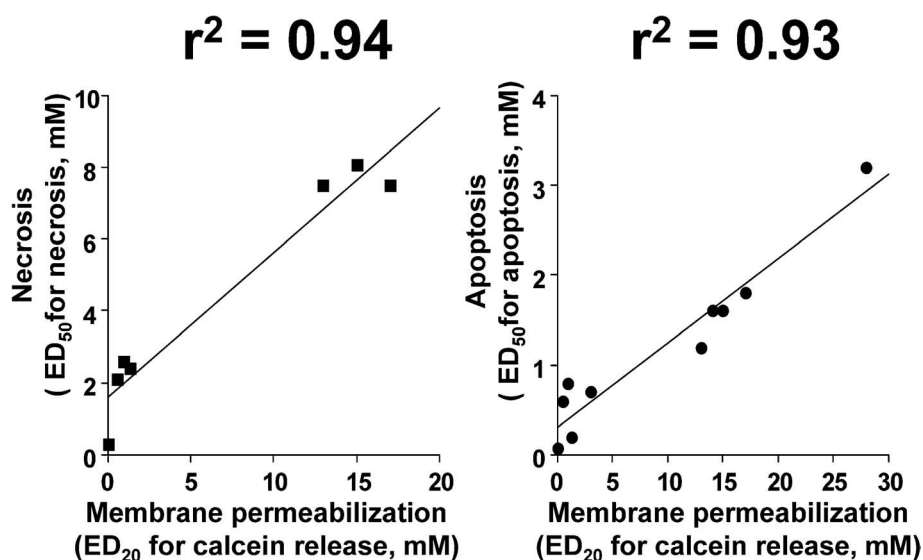


Fig. 2. ED<sub>20</sub> Values for Membrane Permeabilization (calcein release), ED<sub>50</sub> Values for Apoptosis and Necrosis Are calculated and Plotted

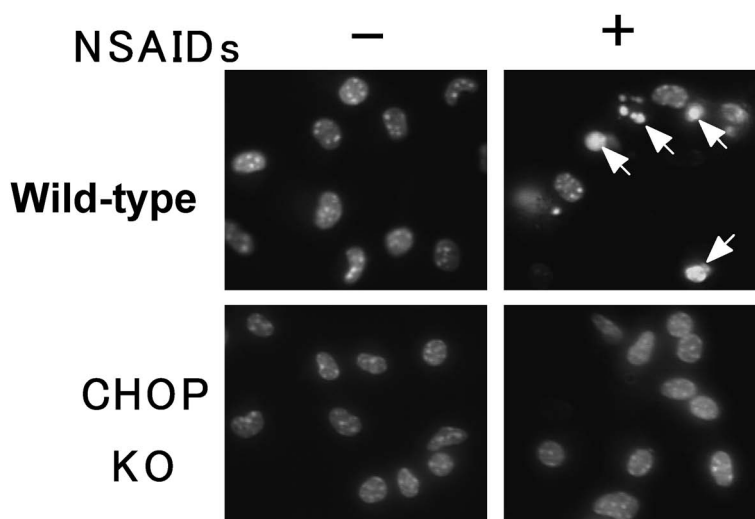


Fig. 3. Peritoneal Macrophages from Wild-type or CHOP Deficient Mice Were Treated with 1 mM Indomethacin for 24 h Cells were stained with Hoechst dye 33258 and observed under a fluorescence microscope. Arrows indicate condensed chromatin.

シス誘導が全くみられないことを示した。以上の結果は、NSAIDsは小胞体ストレス応答（CHOP）を誘導することにより、アポトーシスを起こすことを示唆している。

それではNSAIDsの膜傷害性がどのようなメカニズムで小胞体ストレス応答を誘導するのであろうか？ われわれは細胞内カルシウム濃度上昇の関与を考えた。それは細胞質膜の損傷により細胞外から内へのカルシウムの流入が促進され、細胞内カルシウム濃度が上昇すること、及びカルシウムイオノフォアなどにより細胞内カルシウム濃度を上昇させた

とき、小胞体ストレス応答が誘導されることを根拠としている。実際にわれわれは調べた限りすべてのNSAIDsにより細胞内カルシウム濃度が上昇すること、及び細胞内でカルシウムをキレートしその効果を消失させるBAPTA-AMにより、NSAIDsによるアポトーシス誘導が抑制されることを見出した（田中ら未発表）。以上の結果は、NSAIDsによるアポトーシス誘導に、細胞内カルシウム濃度の上昇が関与していることを示している。そこでわれわれは現在、NSAIDsによるアポトーシス誘導は、細胞質膜の傷害により細胞内カルシウム濃度が上昇し、そ

の結果 CHOP が誘導されるために起こると考えている。

### 5. NSAIDs 潰瘍発症機構<sup>6,14,15)</sup>

以上の研究から、NSAIDs によるアポトーシス、及びネクローシス誘導機構がある程度理解されるようになってきた。それでは、この NSAIDs による直接細胞傷害（胃粘膜細胞死）は、胃潰瘍発症に本当に関与しているのだろうか？ われわれは、NSAIDs が胃潰瘍を導くためには、胃粘膜で COX を阻害し PG を低下させることに加え、NSAIDs による胃粘膜細胞死が必要であるという新しい仮説を考えた。この仮説を証明するためにわれわれは、新しい NSAIDs 潰瘍に関する動物モデルを考案した。それは低用量インドメタシンの静脈注射と、細胞傷害性のある COX-2 選択的 NSAIDs の経口投与を組み合わせるモデルである。前述のように細胞傷害に必要な濃度に比べ、インドメタシンの COX を阻害するために必要な濃度は低い。そのため低用量インドメタシンの静脈注射により、胃粘膜で COX を阻害し PG を低下させながら、細胞傷害は起こらないようにすることができる。逆に細胞傷害性のある COX-2 選択的 NSAIDs の経口投与では、経口投与なので胃内での NSAIDs の濃度はかなり高くなり細胞傷害は起こしながら、胃粘膜の PG を低下させないようにすることができる（胃粘膜で主に発現している COX-1 は阻害しないため）。そこで仮に

われわれの仮説が正しく、すなわち NSAIDs が胃潰瘍を導くためには、胃粘膜で COX を阻害し PG を低下させることに加え、NSAIDs による胃粘膜細胞死が必要であるならば、低用量インドメタシンの静脈注射、及び細胞傷害性のある COX-2 選択的 NSAIDs の経口投与、それぞれ単独では潰瘍は起こさないが、両者を同時に投与すると胃潰瘍が発症することが予想される。実際 Fig. 4 に示すように、低濃度インドメタシンの静脈注射、及びセレコキシブ（最も細胞傷害性の強い COX-2 選択的 NSAIDs）の経口投与を同時に行ったときのみ、胃潰瘍の発症がみられた。またセレコキシブの代わりにロフェコキシブ（ほとんど細胞傷害性を持たない）を用いた場合には、ほとんど胃潰瘍が発症しなかった。以上の結果はわれわれの仮説の妥当性、すなわち NSAIDs が胃潰瘍を導くためには、胃粘膜で COX を阻害し PG を低下させることに加え、NSAIDs による胃粘膜細胞死が必要であることを示唆している。

### 6. まとめと展望

以上のわれわれの研究から、胃潰瘍を起こさない NSAIDs を開発するためには、膜傷害性（細胞傷害性）のない NSAIDs、あるいは胃粘膜で PG を低下させない NSAIDs を開発すればいいことが分かる。後者、すなわち胃粘膜で PG を低下させない NSAIDs が、COX-2 選択的 NSAIDs である。しかし前述のように最近、COX-2 選択的 NSAIDs は心

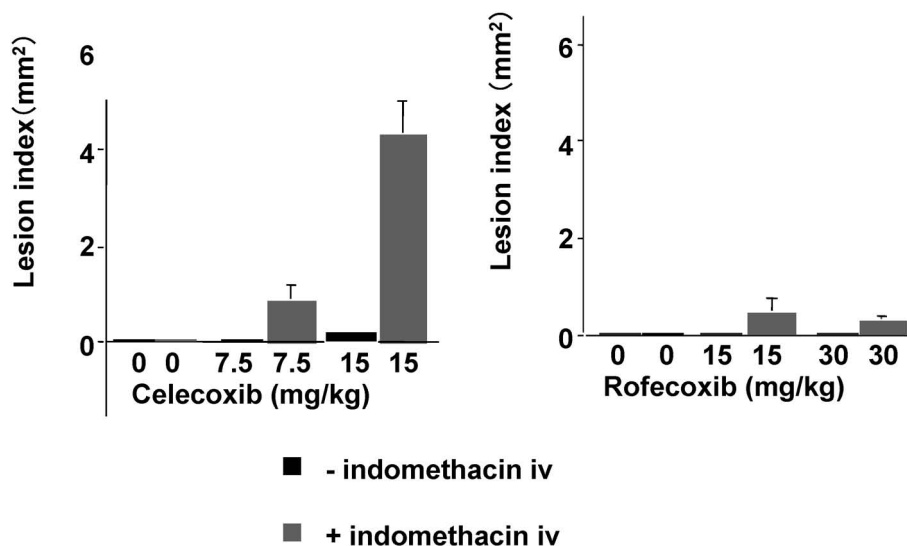


Fig. 4. Rats Were Intravenously Administered with or without 3 mg/kg Indomethacin

After 1 h, animals were orally administered with NSAIDs as indicated. After 6 h, the stomach was removed and scored for hemorrhagic damage. Values are mean  $\pm$  S.E. ( $n=6$ ).

筋梗塞を誘発するという衝撃的な論文が相ついで発表された。血液凝固調節系において、COX-1によって合成されるトロンボキサン A2 が血液凝固を促進するのに対し、COX-2 によって合成されるプロスタサイクリンは血液凝固を阻害する。そこで、COX-2 だけを阻害する COX-2 選択的 NSAIDs は、血液凝固を阻害するプロスタサイクリンだけを減少させるために、血栓をでき易くするのである。実際、COX-2 選択性のない従来の NSAIDs を使用している患者に比べ、COX-2 選択的 NSAIDs を使用している患者の心筋梗塞を起こす危険性は 5 倍以上であるという臨床試験の結果が公表されている。また最近北米では、「心筋梗塞を起こす可能性のある患者には、COX-2 選択的 NSAIDs を使用しないように」という注意文書が配布された。さらに、代表的な COX-2 選択的 NSAIDs であるロフェコキシブがその心筋梗塞誘発副作用のために販売停止となった。そこで COX-2 選択性を高める以外の方法で、NSAIDs 潰瘍を起こさない NSAIDs を開発する必要がある。そこで注目されるのが膜傷害作用のない NSAIDs である。すなわち、COX-2 に対する選択性がなく、かつ膜傷害性のない NSAIDs は、胃潰瘍誘発副作用、及び心筋梗塞誘発副作用のない真に安全な NSAIDs になる。われわれはこのような NSAIDs の発見を目指して現在そのスクリーニングを行っている。

これから開発しようとしている NSAIDs を、われわれは第四世代の NSAIDs と位置付けている。アスピリン、インドメタシンなどの最初に開発された NSAIDs (第一世代の NSAIDs) の胃潰瘍誘発副作用を少しでも減らそうとして、それをプロドラッグ化 (吸収されたあとで活性化されるように) したのが、ロキソニンやボルタレンなどの第二世代の NSAIDs である。しかしそれでも胃潰瘍誘発副作用の問題が完全に解決されなかったので、第三世代の NSAIDs である COX-2 選択的 NSAIDs (ロフェコキシブなど) が開発された。この第三世代の NSAIDs の登場により、胃潰瘍誘発副作用の問題はほぼ解決されたが、一方で心筋梗塞誘発副作用という新たな副作用が生じた。そこでわれわれは、胃潰瘍誘発副作用、及び心筋梗塞誘発副作用のない、真に安全な NSAIDs (COX-2 に対する選択性がなく、かつ膜傷害性のない NSAIDs) を第四世代の

NSAIDs として開発しようと考えている。

## REFERENCES

- 1) Smalley W. E., Ray W. A., Daugherty J. R., Griffin M. R., *Am. J. Epidemiol.*, **141**, 539–545 (1995).
- 2) Singh G., *Am. J. Med.*, **105**, 31S–38S (1998).
- 3) Vane J., *Nature*, **367**, 215–216 (1994).
- 4) Smith C. J., Zhang Y., Koboldt C. M., Muhammad J., Zweifel B. S., Shaffer A., Talley J. J., Masferrer J. L., Seibert K., Isakson P. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 13313–13318 (1998).
- 5) Tomisato W., Tsutsumi S., Rokutan K., Tsuchiya T., Mizushima T., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **281**, G1092–1100 (2001).
- 6) Tomisato W., Tsutsumi S., Hoshino T., Hwang H. J., Mio M., Tsuchiya T., Mizushima T., *Biochem. Pharmacol.*, **67**, 575–585 (2004).
- 7) Tsutsumi S., Namba T., Tanaka K. I., Arai Y., Ishihara T., Aburaya M., Mima S., Hoshino T., Mizushima T., *Oncogene*, **25**, 1018–1029 (2006).
- 8) Namba T., Hoshino T., Tanaka K., Tsutsumi S., Ishihara T., Mima S., Suzuki K., Ogawa S., Mizushima T., *Mol. Pharmacol.*, **71**, 860–870 (2007).
- 9) Tomisato W., Tanaka K., Katsu T., Kakuta H., Sasaki K., Tsutsumi S., Hoshino T., Aburaya M., Li D., Tsuchiya T., Suzuki K., Yokomizo K., Mizushima T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **323**, 1032–1039 (2004).
- 10) Tanaka K., Tomisato W., Hoshino T., Ishihara T., Namba T., Aburaya M., Katsu T., Suzuki K., Tsutsumi S., Mizushima T., *J. Biol. Chem.*, **280**, 31059–31067 (2005).
- 11) Lichtenberger L. M., Wang Z. M., Romero J. J., Ulloa C., Perez J. C., Giraud M. N., Barreto J. C., *Nat. Med.*, **1**, 154–158 (1995).
- 12) Mima S., Tsutsumi S., Ushijima H., Takeda M., Fukuda I., Yokomizo K., Suzuki K., Sano K., Nakanishi T., Tomisato W., Tsuchiya T., Mizushima T., *Cancer Res.*, **65**, 1868–1876 (2005).
- 13) Tsutsumi S., Gotoh T., Tomisato W., Mima

- S., Hoshino T., Hwang H. J., Takenaka H., Tsuchiya T., Mori M., Mizushima T., *Cell Death Differ.*, **11**, 1009–1016 (2004).
- 14) Aburaya M., Tanaka K., Hoshino T., Tsutsumi S., Suzuki K., Makise M., Akagi R., Mizushima T., *J. Biol. Chem.*, **281**, 33422–33432 (2006).
- 15) Tanaka K., Tsutsumi S., Arai Y., Hoshino T., Suzuki K., Takaki E., Ito T., Takeuchi K., Nakai A., Mizushima T., *Mol. Pharmacol.*, **71**, 985–993 (2007).