

新規タキキニンNK<sub>1</sub>受容体拮抗薬T-2328の  
抗嘔吐作用に関する生理薬理学的研究

平成21年度筑波大学博士論文

渡邊 裕美

## 目次

第1章 序論	1
第1節 タキキニンおよびタキキニン受容体	
第2節 タキキニン NK <sub>1</sub> 受容体と疾患	
第3節 癌化学療法により誘発される嘔吐	
第4節 NK <sub>1</sub> 受容体拮抗薬の抗嘔吐作用	
第2章 本研究の目的	12
第3章 タキキニン NK <sub>1</sub> 受容体拮抗薬 T-2328 の薬理的性質	14
第1節 緒言	
第2節 材料および方法	
2.1 使用動物	
2.2 タキキニン NK <sub>1</sub> 受容体結合試験	
2.3 タキキニン NK <sub>2</sub> および NK <sub>3</sub> 受容体結合試験	
2.4 種々の受容体およびイオンチャンネルに対する結合試験	
2.5 スナネズミにおける GR73632 誘発 foot tapping	
2.6 フェレットにおけるシスプラチン誘発嘔吐	
2.7 使用薬物	
2.8 統計解析	
第3節 結果	
3.1 結合試験	

3.2 スナネズミにおける GR73632 誘発 foot tapping

3.3 フェレットにおけるシスプラチン誘発嘔吐

第4節 考察

#### 第4章 タキキニン NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬 T-2328 の持続的抗嘔吐作

用・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・31

第1節 緒言

第2節 材料および方法

2.1 使用動物

2.2 フェレットにおけるシスプラチン誘発嘔吐

2.3 スナネズミにおける GR73632 誘発 foot tapping に対する抑制作用

2.4 [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]substance P 誘発モルモット回腸縦走筋標本の収縮

2.5 血漿中および脳内 T-2328 濃度の測定

2.6 使用薬物

2.7 統計解析

第3節 結果

3.1 遅発性嘔吐

3.2 急性嘔吐

3.3 スナネズミにおける GR73632 誘発 foot tapping に対する抑制作用

3.4 血漿中および脳内 T-2328 濃度

3.5 [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]substance P 誘発モルモット回腸縦走筋標

本の収縮

第4節 考察

第5章 総括 . . . . . 54

引用文献 . . . . . 56

## 第1章 序論

### 第1節 タキキニンおよびタキキニン受容体

タキキニンはC末端構造に Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>を有する一群のペプチドの総称である。哺乳類に存在する主要なタキキニンはサブスタンス P、ニューロキニン A およびニューロキニン B であり、サブスタンス P は前駆体ペプチドである  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -プレプロタキキニン-A から、ニューロキニン A は  $\beta$ -、 $\gamma$ -プレプロタキキニン-A から、ニューロキニン B はプレプロタキキニン-B から生成される (Otsuka and Yoshioka, 1993)。生体内の存在量はサブスタンス P が最も多く、ニューロキニン A はサブスタンス P の半分程度、ニューロキニン B はサブスタンス P の 1/10 以下である (Otsuka and Yoshioka, 1993)。サブスタンス P、ニューロキニン A およびニューロキニン B は中枢神経系および末梢組織に存在しており、神経伝達物質または神経修飾物質として働く (Otsuka and Yoshioka, 1993; Maggi et al. 1993; Chahl, 2006)。その作用はタキキニン NK<sub>1</sub>、NK<sub>2</sub> および NK<sub>3</sub> と呼ばれる受容体を介して発現する。これら 3 つのタキキニン受容体すべてに対してサブスタンス P、ニューロキニン A およびニューロキニン B は作動薬として作用するが、それぞれの受容体に対して異なる親和性を有している (Otsuka and Yoshioka, 1993; Regoli et al. 1994)。サブスタンス P は NK<sub>1</sub> 受容体に対して高い親和性を有しており、ニュー

ロキニン A およびニューロキニン B はそれぞれ NK<sub>2</sub> および NK<sub>3</sub> 受容体に高い親和性を有している。タキキニン受容体は 350 から 500 アミノ酸から成る 7 回膜貫通型 G タンパク質共役受容体であり (Nakanishi, 1991), タキキニンの C 末端配列を認識する (Chahl, 2006)。タキキニンが受容体に結合すると共役している Gq が活性化され、ホスホリパーゼ C (PLC) が活性化される。PLC はホスファチジルイノシトール 2 リン酸 (PIP<sub>2</sub>) をイノシトール 3 リン酸 (IP<sub>3</sub>) とジアシルグリセロール (DAG) に加水分解する。IP<sub>3</sub> は細胞内の Ca<sup>2+</sup> ストアから Ca<sup>2+</sup> を放出させ、DAG はプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化を介して細胞膜上の L 型カルシウムチャンネルを開口させ、Ca<sup>2+</sup> を流入させる (Khawaja and Rogers, 1996)。各受容体の分布はオートラジオグラフィや免疫組織化学的検査により調べられており、NK<sub>1</sub> 受容体は中枢神経系および末梢組織に、NK<sub>2</sub> 受容体は主として末梢組織に、NK<sub>3</sub> 受容体は主として中枢神経系に分布していることが知られている (Otsuka and Yoshioka, 1993)。

## 第 2 節 タキキニン NK<sub>1</sub> 受容体と疾患

タキキニン NK<sub>1</sub> 受容体は、げっ歯類においては回腸、大腸、耳下腺、顎下腺、膀胱、皮膚といった末梢組織と中枢神経系 (前頭皮質、運動皮質、感覚野、視覚野、嗅皮質、嗅内皮質、線条体、側坐核、中隔、視床前腹側核、視床前背側核、視索上核、扁桃核、視床、腹側視床下部、海馬歯状回、海馬 CA1-3 領域、不確帯、黒質、弧束核、

上丘，下丘，脚間核，中脳水道周囲灰白質，背外側中脳水道周囲灰白質，手綱核，背側縫線核，小脳，脳幹，脊髄など）に分布している（Otsuka and Yoshioka, 1993; Mantyh et al. 1989）。最近，ヒト死後脳を用いたオートラジオグラフィーも行われており，高密度な [<sup>125</sup>I]substance P の結合が上オリーブ核，尾状核，被殻，側坐核，対角帯核，中隔，青斑核，海馬歯状回および中脳水道周囲灰白質に，中密度の結合が前頭皮質，視覚野，側頭皮質，前頭前野，縫線核，扁桃核，嗅内皮質および海馬 CA1-CA3 領域に，弱い結合が腹外側視床および小脳に認められることが報告された（Rigby et al. 2005）。したがって NK<sub>1</sub> 受容体はヒトの中樞神経系においてもげっ歯類とほぼ同様の分布をしていると考えられる。

中樞神経系に広く発現している NK<sub>1</sub> 受容体は，種々の行動，内分泌および自律神経機能に関与しており，その内因性リガンドであるサブスタンス P とともに侵害受容，情動（不安や抑うつ）および嘔吐などへ関与することが示唆されている（Alvaro and Di Fabio, 2007）。

サブスタンス P は一次求心性繊維に存在し（Hökfelt et al. 1975 (a) ; Hökfelt et al. 1975 (b)），脊髄後角ニューロンを興奮させること（Murase and Randić, 1984），機械的刺激や熱刺激による脊髄の侵害受容反射を増大させること（Wiesenfeld-Hallin, 1986），動物に疼痛関連行動を誘発させること（Hylden and Wilcox, 1981）が報告されている。情動に関わる脳部位（前頭前野，中隔野，側坐核，海馬，扁桃核，縫線核，青斑核など）にもサブスタンス P が存在しており（Roberts et al, 1984; Menetrey and Basbaum, 1987），情動の制御に関与する神経伝

達物質（セロトニン、ノルアドレナリン、ドーパミン、GABA、グルタミン酸、アセチルコリンなど）と共存している（Hökfelt et al, 1976; Gale et al. 1978; Mai et al. 1986; Caberlotto et al. 2003）。またヒトにおいてサブスタンス P は嘔吐中枢の一部である弧束核に高発現している（McRitchie and Törk, 1994）。

NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬の薬理作用も種々の評価系を用いて検討されている。NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬は疼痛の動物モデルにおいて鎮痛作用を示す（Lembeck et al. 1981）。また背側縫線核のセロトニン性ニューロンや青斑核のノルアドレナリン性ニューロンの神経発射を増加させ（Haddjeri and Blier, 2001; Millan et al. 2001; Santarelli et al. 2001; Gobbi et al. 2007）、抗不安様作用および抗うつ様作用を示す（Ebner and Singewald, 2006）。種々の嘔吐モデルにおいて抗嘔吐作用を示すことも報告されている（Gardner et al. 1995）。

このように NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬は様々な疾患の新規治療薬となる可能性が示唆されているため、薬理的にも薬物動態学的にもより優れた化合物を求めて、多くの製薬企業によって新規 NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬の開発が進められてきた（Alvaro and Di Fabio, 2007）。最初の NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬はサブスタンス P の配列を基にした合成展開により見出されたペプチド性化合物であった。しかしながらペプチド性化合物は、複雑な化学構造、低い代謝安定性および生物学的利用率が医薬品としての弱点となり、その後は非ペプチド性化合物の開発が進められた（Quartara and Altamura, 2006）。1991年に初の非ペプチド性 NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬が創製され（Snider et al, 1991）、それまでは不可能



であった経口投与が可能となり、痛み（神経因性疼痛や頭痛など）、大うつ病、社会恐怖、尿失禁および癌化学療法誘発嘔吐を適応症とした臨床試験が実施されてきた。NK<sub>1</sub>受容体拮抗薬は、痛み（Rupniak and Kramer, 1999）および大うつ病（Keller et al. 2006）を適応症として行われた臨床試験では期待された効果を示さなかったが、少人数の社会恐怖患者（Furmark et al. 2005）や切迫性尿失禁を伴う過活動性膀胱患者（Green et al. 2006）を対象として実施されたパイロットスタディーでは症状を改善したことが報告されている。うつ病、不安障害および過活動性膀胱を適応症とした NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬の開発は現在も続けられており、大規模臨床試験による有効性の検証が待たれる。

一方、癌化学療法による嘔吐を適応症とした臨床試験では、Merck社によって開発された NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬であるアプレピタントの制吐作用が確認された。5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬とステロイドの併用による標準的治療を受けた患者群に比べ、標準的治療法にアプレピタントの投与が追加された患者群では嘔吐の発症が少ないことが二つの大規模臨床試験で示されたのである（Hesketh et al. 2003; Poli-Bigelli et al. 2003）。この結果に基づき、アプレピタントは癌化学療法の初期及び反復期に副作用として起こる急性および遅発性の悪心・嘔吐の予防に他の制吐薬と併用する薬剤として FDA に承認された。

### 第3節 癌化学療法により誘発される嘔吐

嘔吐反応は、延髄最後野や弧束核を中心とする嘔吐中枢の興奮によって起こる食道上部の弛緩と腹部内圧の上昇によって胃内容物を吐出する反応である。この反応は有害物質を体外に排出するという防御反応であるが、一方で妊娠中のつわり、動揺病、精神的・心理的な刺激、脳圧亢進、消化器疾患が原因で起こる防御反応とはいえないものも多数ある。さらに全身麻酔後にみられる術後悪心・嘔吐や医薬品の副作用としての悪心・嘔吐もある。医薬品の副作用としての悪心・嘔吐のなかで最も嘔吐の程度や頻度が激しいものは癌化学療法によるものである。

癌化学療法による副作用の中でも、悪心・嘔吐は出現頻度が高く、患者に最も嫌われている症状である。強い悪心・嘔吐は代謝不均衡や自己管理および生活機能低下、栄養不良、食欲不振、創傷離開、食道断裂などを招き、患者の一般状態および精神状態を低下させ、抗癌治療の中止にもつながりかねないものである（NCCN (National Comprehensive Cancer Network ; 米国包括癌センターネットワーク) Clinical Practice Guidelines in Oncology –Antiemesis. v.2.2009）。

抗癌剤による嘔吐は急性嘔吐、遅発性嘔吐、予測性嘔吐、突出性嘔吐および難治性嘔吐の5つに分類される（Navari and Province, 2006）。急性嘔吐は抗癌剤投与後24時間以内に発現する嘔吐であり、遅発性嘔吐は抗癌剤投与24時間後以降に発現する嘔吐、予測性嘔吐は抗癌剤投与前に認められる嘔吐（前回治療時に嘔吐を経験した患

者に多い) である。突出性嘔吐は適切な制吐剤の投与を受けているにもかかわらず発現する嘔吐である。難治性嘔吐は化学療法時に制吐療法を施行したがコントロール不良で、次の化学療法施行時においても制吐剤を処方したにもかかわらず発現する嘔吐である。これら5つの嘔吐のうち、急性嘔吐については以下に示す機序によって発現することがほぼ明らかとなっている；すなわち、生体内の5-HTの約90%が合成・貯蔵される消化管粘膜が抗癌剤の影響を受け、エンテロクロマフィン細胞から5-HTを遊離する。その結果、求心性迷走神経末端の5-HT<sub>3</sub>受容体が刺激され、延髄にある嘔吐中枢を介して嘔吐が誘発される、というものである (Cubeddu et al. 1990; Fukui et al. 1992; Fukui et al. 1993)。遅発性嘔吐の発現機序はいまだ十分には解明されていないが、消化管運動や血液-脳関門の障害、副腎ホルモンや抗癌剤の代謝物の蓄積などが関与する可能性が示唆されている (Roila et al. 2002)。予測性嘔吐は以前に受けた化学療法により急性または遅発性嘔吐を経験したことにより起こる古典的条件付け反応と考えられている。

継続して起こる難治性嘔吐は治療により好転させるのが困難であることから、突出性嘔吐はしばしば臨床的難題となっている。一般に悪心・嘔吐は治療よりも予防がはるかに容易である。治療の各サイクルにおいて最適な制吐剤療法を使用して嘔吐の発現を予防することは予測性嘔吐の抑制にもつながる (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology –Antiemesis. v.2.2009)。抗癌剤誘発嘔吐に対する制吐療法として、1980年代から1990年代前半まではドーパミン

D<sub>2</sub> 受容体拮抗薬であるメトクロプラミドの大量投与やメトクロプラミドとステロイドの併用療法が用いられていた。しかし、D<sub>2</sub> 受容体拮抗作用に基づく錐体外路症状や鎮静作用が出現することに加え (Kris et al. 1983), 制吐作用も不十分であった。その後、メトクロプラミドが高用量では 5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗作用を示すことが報告された (Gralla et al. 1981)。この報告に基づき、選択的 5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗作用を有する化合物が副作用のない制吐剤となりうることが期待されるようになり、開発が進められた。その結果、1990 年代半ばにはオンダンセトロンなどの 5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬が承認・発売され、5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬とステロイドとの併用療法が標準的治療法となった。5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬は D<sub>2</sub> 受容体拮抗薬に比べて副作用が少なく、急性嘔吐に対しては高い有効率を示した。しかし遅発性嘔吐に対する抑制作用は不十分であった (Aapro, 2005)。そのため遅発性嘔吐に対しては、5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬にステロイドおよびメトクロプラミドを併用する 3 剤併用療法が推奨されてきた。しかしながら最近になって、NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬であるアプレピタントの遅発性嘔吐に対する有効性が臨床試験において示された (Hesketh et al. 2003; Poli-Bigelli et al. 2003)。アプレピタントは日本ではいまだ承認されていないが (承認申請中)、欧米ではすでに臨床で使用されている。米国包括がんセンターネットワーク (NCCN) のガイドラインは、遅発性嘔吐の予防にはステロイド、5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬およびアプレピタントの 3 剤併用療法を用いることを推奨している (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology –Antiemesis. v.2.2009)。

#### 第4節 NK<sub>1</sub>受容体拮抗薬の抗嘔吐作用

嘔吐発現への NK<sub>1</sub> 受容体の関与は、カプサイシン類縁体である *resiniferatoxin* の抗嘔吐作用が中枢においてサブスタンス P を枯渇させることによるものである、と報告されたことから注目されるようになった (Andrews and Bhandari, 1993). NK<sub>1</sub> 受容体の内因性リガンドであるサブスタンス P は、フェレットやイヌに嘔吐を誘発させる (Carpenter et al. 1984; Knox et al. 1993). サブスタンス P は求心性迷走神経の神経伝達物質であると考えられており (Diemunsch and Grélot, 2000), ヒトおよび動物において嘔吐中枢の一部である弧束核にサブスタンス P 様免疫活性が認められる (McRitchie and Törk, 1994; Leslie, 1985; Dockray and Sharkey, 1986). NK<sub>1</sub> 受容体も弧束核, 最後野など嘔吐中枢を構成する部位に存在している (Baude and Shigemoto, 1998; Watson et al. 1995). また, *in vivo* オートラジオグラフィーで NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬である CP-99994 が弧束核の NK<sub>1</sub> 受容体に結合することも示された (Watson et al. 1995). ヒト脳では, 経口投与されたアプレピタントが NK<sub>1</sub> 受容体に結合することがポジトロン断層法 (PET) を用いた研究により確認されている (Hargreaves, 2002). フェレットの脳幹スライス標本を用いた電気生理学的研究では, サブスタンス P により誘発される弧束核ニューロンの発射が, NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬によって抑制されることも示された (Saito et al. 1998). さらに抗癌剤 (シスプラチンやシクロフォスファミド), 放射線, 硫酸銅およびモルヒネなどにより誘発される嘔吐を CP-99994 が抑制することが報告され

(Bountra et al. 1993), NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬の制吐剤としての可能性が示された。

化学療法誘発嘔吐の標準治療薬である 5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬は、主として消化管の求心性腹部迷走神経末端に存在する 5-HT<sub>3</sub> 受容体へのセロトニンの結合を阻害することで抗嘔吐作用を発揮する。一方、NK<sub>1</sub> 受容体は消化管にも発現しているが、弧束核、最後野など嘔吐中枢を構成する脳部位にも発現している。そこでフェレットへのシスプラチン投与による誘発嘔吐モデルを用いて、NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬の作用部位に関する検討が行われた。NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬は、弧束核近傍への注入によりシスプラチン誘発嘔吐を抑制した。しかしながら末梢性に投与された場合は、脳内移行性を有する化合物のみが嘔吐を抑制した (Tattersall et al. 1996)。したがって NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬は脳内、特に嘔吐中枢における NK<sub>1</sub> 受容体を遮断することによって抗嘔吐作用を発現することが示唆された。

NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬は、硫酸銅やモルヒネにより誘発される嘔吐および抗癌剤により誘発される遅発性嘔吐など、5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬では抑制することができない嘔吐も抑制する。遅発性嘔吐の発現機序はいまだ不明であるが、硫酸銅誘発嘔吐は胃粘膜刺激により反射的に誘発されるものであり、モルヒネ誘発嘔吐は中枢のドーパミン受容体へ作用することで誘発されるものである。NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬がこのように種々の要因によって誘発される嘔吐を抑制することができるのは、嘔吐中枢に存在する NK<sub>1</sub> 受容体を遮断することによって嘔吐発現の最終共通路を抑制するからである、という仮説が提唱されて

いる (Tattersall et al. 1996; Tattersall et al. 2000) .

## 第2章 本研究の目的

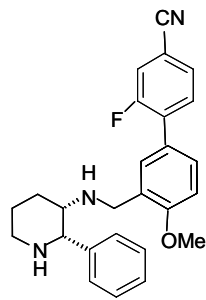
タキキニン NK<sub>1</sub> 受容体は中枢神経系に広く発現しており、種々の行動、内分泌および自律神経機能に関与している。薬理学的研究および最近の臨床試験結果は、脳内の NK<sub>1</sub> 受容体を遮断することにより、抗嘔吐作用、抗うつ作用、抗不安作用が発現することを示唆している。そのため、強力かつ選択的な NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬の開発が現在も続けられている。

NK<sub>1</sub> 受容体の内因性リガンドであるサブスタンス P は弧束核および最後野において NK<sub>1</sub> 受容体に結合し、嘔吐を誘発させる。また NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬は幅広い抗嘔吐活性を示し、制吐剤としての有用性が注目されている。最近、Merck 社によって開発された NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬アプレピタントは、これまでの標準的治療法では効果が不十分であった癌化学療法により誘発される遅発性嘔吐にも有効であることが示された。

我々は強力な NK<sub>1</sub> 受容体拮抗作用および良好な脳内移行性を有する NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬の創製を目的として合成展開を行い、新規 NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬 T-2328 (2-fluoro-4'-methoxy-3'-[[[ (2*S*,3*S*)-2-phenyl-3-piperidinyl]amino]methyl]-[1,1'-biphenyl]-4-carbonitrile dihydrochloride) を得た (Fig. 1)。本研究では、受容体結合試験やマグヌス試験などの *in vitro* 試験、脳内移行性の指標として汎用されているスナネズミの foot tapping に対する抑制作用を観察する *in vivo* 試



験を行い、T-2328 の薬理学的な特性を明らかにした。また、抗嘔吐作用をフェレットのシスプラチン誘発嘔吐モデルを用いて検討し、T-2328 の癌化学療法誘発嘔吐の治療薬としての有用性を検証した。



**Fig. 1** Chemical structure of T-2328

### 第3章 タキキニン NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬 T-2328 の薬理的性質

#### 第1節 本章の目的

本章では、T-2328 の NK<sub>1</sub> 受容体に対する阻害作用および選択性を受容体結合試験にて検討し、脳内移行性をスナネズミの foot tapping を指標として検討した。さらに、フェレットを用いてシスプラチン誘発嘔吐に対する T-2328 の抗嘔吐作用を検討した。

#### 第2節 材料および方法

##### 2.1 使用動物

雄性スナネズミ (48-62 g; 日本 SLC, 静岡) は群飼した。雄性フェレット (1.1-1.6 kg; Marshall Farms, North Rose, NY, USA) は単独飼育した。動物は相対湿度 55±5%, 12 時間照明 (明期; 7:00-19:00, 暗期; 19:00-7:00) に維持された飼育室で、室温 23±2°C (スナネズミ) または 25±1°C (フェレット) にて、飼料および水の自由摂取下で飼育した。スナネズミには標準的な固形飼料 (CRF-1, オリエンタル酵母, 東京) を、フェレットにはネコ用固形飼料 (CS, オリエンタル酵母) を与えた。

すべての動物実験は「動物実験に関する日本薬理学会指針」および「田辺製薬株式会社動物倫理委員会指針」に基づいて実施された。

## 2.2 タキキニン NK<sub>1</sub> 受容体結合試験

ヒトリンパ芽球腫由来の IM-9 細胞（大日本製薬株式会社，大阪）を 10% fetal bovine serum (JRH, Lenexa, KS, USA) を含む RPMI1640 培地（岩城硝子株式会社，千葉）にて，37 度，95%O<sub>2</sub>，5%CO<sub>2</sub> で培養した。

結合実験時には，細胞を Tris-HCl 緩衝液 A（50 mM Tris-HCl (pH7.4)，150mM NaCl，3 mM MnCl<sub>2</sub>，0.02% BSA）で洗浄し，インキュベート用緩衝液（40 μg/ml bacitracin，4 μg/ml leupeptin，4 μg/ml chymostatin，4 μg/ml phosphoramidom を添加した Tris-HCl 緩衝液 A）で 8×10<sup>6</sup> cells/ml に再懸濁した。この細胞懸濁液 0.5 ml（4×10<sup>6</sup> cells）に 0.3 nM [<sup>3</sup>H][Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>] substance P および各種濃度の T-2328 を添加して 60 分間室温で反応させた。非特異的結合の判定には 2 μM L-703,606（選択的 NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬）を用い，総結合量から非特異的結合量を減じることによって [<sup>3</sup>H][Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>] substance P の特異的結合量を求めた。特異的結合量は総結合量の 85–95%であった。遊離および結合 [<sup>3</sup>H][Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>] substance P は，セルハーパーバスター（M-24R, Brandel Inc., Gaithersburg, MD, USA）を用い，予め 0.3% polyethylenimine を処置した GF/C glass filter（Brandel Inc.）で吸引ろ過した後，3 ml の氷冷 Tris-HCl 緩衝液（除 0.02% BSA ; pH 7.4）で 2 回洗浄することにより，分離した。8 ml のクリアゾール I（ナカライテスク，京都）を加え，液体シンチレーションカウンター（TRI-CARB4640 または 2200CA, Packard Instrument Co., Meriden, CT, USA）にてフィルター上の放射活性を測定した。なお，一連の

実験は duplicate で行った.

阻害定数 (Ki) は統計ソフトウェア GraphPad Prism (Graphpad, San Diego, CA, USA) を用いて算出した.

### 2.3 タキキニン NK<sub>2</sub> および NK<sub>3</sub> 受容体結合試験

ヒト型 NK<sub>2</sub> 受容体に対する T-2328 の作用については, ヒト型 NK<sub>2</sub> 受容体を安定発現させた CHO 細胞から調製された膜標品 (CRM033 ; NEN Life Science Products, Inc., Boston, MA, USA) を用いて検討した. 10 µg protein の NK<sub>2</sub> 受容体細胞膜標品を Tris-HCl 緩衝液 B (20 mM Tris-HCl (pH7.4), 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.1% BSA) 中で 0.4 nM [<sup>3</sup>H]SR-48968 および T-2328 とともに室温にて 60 分間反応させた. 非特異的結合の判定には 10 µM ニューロキニン A (NK<sub>2</sub> 受容体作動薬) を用いた. 本アッセイ系におけるニューロキニン A の阻害定数は 8.7 nM であった.

ヒト型 NK<sub>3</sub> 受容体に対する T-2328 の作用については, ヒト型 NK<sub>3</sub> 受容体を安定発現させた CHO 細胞から調製された膜標品 (CRM065 ; NEN Life Science Products, Inc.) を用いて検討した. 1 µg protein の NK<sub>3</sub> 受容体細胞膜標品を Tris-HCl 緩衝液 B 中で 0.3 nM [<sup>3</sup>H]SR-142801 および T-2328 とともに室温にて 60 分間反応させた. 非特異的結合の判定には 3 µM SB-223412 (選択的 NK<sub>3</sub> 受容体拮抗薬) を用いた. 本アッセイ系における SB-223412 の阻害定数は 10.3 nM であった.

[<sup>3</sup>H]SR-48968 (NK<sub>2</sub> 受容体結合試験時) または [<sup>3</sup>H]SR-142801 (NK<sub>3</sub>

受容体結合試験時の Bound/Free 分離には, セルハーベスター (M-24R, Brandel Inc.) を用い, 予め 0.3% polyethylenimine を処置した GF/C glass filter (Brandel Inc.) で吸引ろ過した後, 3 ml の氷冷 Tris-HCl 緩衝液 B (除 0.1% BSA ; pH 7.4) で 3 回洗浄することにより受容体と結合したリガンドを分離した. 7 ml のクリアゾール I (ナカライテスク) を加え, 液体シンチレーションカウンター (TRI-CARB4640 または 2200CA, Packard Instrument Co.) にてフィルター上の放射活性を測定した.

阻害定数 ( $K_i$ ) は統計ソフトウェア GraphPad Prism (Graphpad) を用いて算出した. なお, 被験化合物の濃度が  $10 \mu\text{M}$  の時の阻害率が 50%未満であった場合,  $K_i$  は算出せず,  $IC_{50} > 10000 \text{ nM}$  と表記した.

#### 2.4 種々の受容体およびイオンチャンネルに対する結合試験

13 種類の受容体およびイオンチャンネルに対する結合試験を実施し, T-2328 の受容体選択性を評価した. 結合試験を行った受容体およびイオンチャンネルは以下の通りである ; ドーパミン  $D_1$  受容体, ドーパミン  $D_{2S}$  受容体,  $GABA_A$  受容体作動薬結合部位,  $GABA_A$  塩素イオンチャンネル,  $GABA_B$  受容体, 非選択的グルタミン酸受容体, ストリキニン感受性グリシン受容体, ヒスタミン  $H_1$  受容体, オピエート  $\kappa$  および  $\mu$  受容体, セロトニン  $5-HT_1$  および  $5-HT_3$  受容体, N 型  $Ca^{2+}$  チャンネル. 最初に  $10 \mu\text{M}$  の T-2328 による阻害率を求め, 阻害率が 50%以上であった受容体およびイオンチャンネルについては低

濃度での試験を追加し,  $K_i$  値を求めた. これらの結合阻害試験は MDS Panlabs Pharmacology Services (現 MDS Pharma Services, Bothell, WA, USA) にて実施された.

## 2.5 スナネズミにおける GR73632 誘発 foot tapping

ハロタン吸入麻酔下で雄性スナネズミの頭皮を切開し, 頭蓋骨を露出させた. カフ付きの 25 ゲージ注射針を十字縫合の 1 mm 右側より 4.5 mm 深部へ刺入することにより,  $NK_1$  受容体作動薬 GR73632 (0.05–50 pmol/5  $\mu$ l) を直接脳室内へ投与した. 投与後, プラスチック製の観察ケージ (15.5 cm $\times$ 22 cm $\times$ 12 cm) にスナネズミを移し, 正向反射が回復した直後から 5 分間の foot tapping の持続時間を測定した. Foot tapping は, 移動量の増加を伴わない, 後肢のリズミックな反復性の tapping とした (Bristow and Young, 1994).

T-2328 (0.01–0.1 mg/kg) およびアプレピタント (0.3–3 mg/kg) の脳への移行性を検討するために, 両化合物を GR73632 の脳室内投与直前にハロタン麻酔下で陰茎静脈より投与した.

測定終了後, スナネズミは過量のジエチルエーテルにより安楽死させた.

## 2.6 フェレットにおけるシスプラチン誘発嘔吐

フェレットを観察用ケージに移して 2 時間馴化させた後に, ハロタン麻酔下にて抗癌剤であるシスプラチン (5 mg/kg) を腹腔内投与した. T-2328 (0.1 および 0.3 mg/kg) はシスプラチン投与直後, 24

時間後および48時間後の計3回、尾静脈より投与した。動物の行動はシスプラチン投与直後から72時間後までビデオカメラ(TK-N1100;ビクター,横浜)を用いて撮影し、録画した(HM-DR10000,ビクター)。嘔吐は、空嘔吐(吐物を伴わない腹部の著しい収縮運動)や嘔吐(胃や腸からの固形または液状の内容物の口からの吐出)から成る一連のリズミカルな腹部収縮運動とした(Rudd et al. 1996)。また、嘔吐のエピソードは、空嘔吐と空嘔吐または嘔吐の間に5秒以上の間隔がある場合、およびその間にフェレットが移動した場合、別のエピソードとしてカウントすることとした。実験期間中(72時間)、1時間毎の嘔吐エピソードの発現回数を経時的に計測した。実験終了後、フェレットは過量のジエチルエーテルにより安楽死させた。

## 2.7 使用薬物

T-2328, アプレピタントおよびSB-223412は田辺製薬株式会社(現田辺三菱製薬株式会社)にて合成された。 $[^3\text{H}][\text{Sar}^9, \text{Met}(\text{O}_2)^{11}]$  substance P (47 Ci/mmol) および $[^3\text{H}]$ SR-48968はNEN Life Science Products, Inc.より購入した。L-703,606 oxalate salt (Research Biochemicals International RBI, Natick, MA, USA), ニューロキニンA (Calbiochem-NoVabiochem Co., Ltd., San Diego, CA, USA),  $[^3\text{H}]$ SR-142801 (Amersham Pharmacia Biotech UK, Ltd., Buckinghamshire, England), GR73632 (Research Biochemicals International), シスプラチン(cis-platinum(II) diammine dichloride; Sigma-Aldrich, Inc., St.Louis,

MO, USA) およびその他の試薬は市販品を用いた。

シスプラチンは 70–75 度に加温した生理食塩液に溶解し、徐々に冷却して 40–50 度で 5 ml/kg の容量にて腹腔内投与した。T-2328 は DMSO に溶解して生理食塩液で希釈し (DMSO 最終濃度: 1%), 5 ml/kg (スナネズミ) または 2 ml/kg (フェレット) の容量にて静脈内投与した。

## 2.8 統計解析

結果は平均値±標準誤差で示した。対照群との比較は一元配置分散分析後, Dunnett 型多重比較検定により行った。有意水準は両側 5% とした。

# 第 3 節 結果

## 3.1 結合試験

T-2328 およびアプレピタントは $[^3\text{H}][\text{Sar}^9, \text{Met}(\text{O}_2)^{11}]\text{substance P}$  のヒト型タキキニン  $\text{NK}_1$  ( $\text{hNK}_1$ ) 受容体への結合を著明に阻害した (Table 1)。両化合物の  $\text{NK}_1$  受容体に対する  $K_i$  値はそれぞれ 0.08 nM および 1.3 nM であり, T-2328 の  $\text{NK}_1$  受容体に対する親和性はアプレピタントよりも 16 倍以上強かった。また T-2328 のヒト型タキキニン  $\text{NK}_2$  ( $\text{hNK}_2$ ) および  $\text{NK}_3$  ( $\text{hNK}_3$ ) 受容体に対する親和性は,  $\text{NK}_1$  受容体に対する親和性の約  $1/44000$  および約  $1/3800$  であった (Table 1)。



13種類の受容体およびイオンチャンネルに対する T-2328 の親和性を Table 2 に示す。T-2328 はオピエート  $\kappa$  および  $\mu$  受容体に対して  $\mu$  モルオーダーの親和性を示したが、その他の受容体およびイオンチャンネルに対する IC50 は 10  $\mu$ M 以上であった。

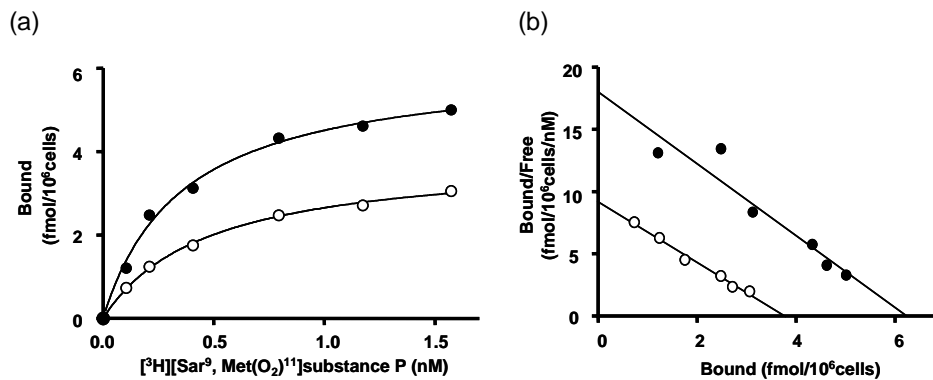
次にヒト型タキキニン NK<sub>1</sub> 受容体に対する [<sup>3</sup>H][Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]substance P の選択的結合のスキッチャード解析により、T-2328 の阻害様式を検討した。Fig. 2 に示すように、[<sup>3</sup>H][Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]substance P の結合は飽和性を示し、スキッチャード解析から算出された K<sub>d</sub> 値は 0.35 nM であり、Bmax は 6.2 fmol/10<sup>6</sup> cells であった。0.3 nM の T-2328 存在下では、K<sub>d</sub> 値は変化しなかったが (0.41 nM)、[<sup>3</sup>H][Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]substance P によってラベルされた総受容体数は 3.8 fmol/10<sup>6</sup> cells に減少した。

**Table 1 Inhibition constants (K<sub>i</sub>) of T-2328 and aprepitant in radioligand binding assays for human tachykinin receptors**

Drugs	Receptors	K <sub>i</sub> or IC50* (nM)	95% confidence interval (nM)
T-2328	hNK1	0.08	0.06 - 0.09
	hNK2	3537	2921 - 4284
	hNK3	309	202 - 473
Aprepitant	hNK1	1.30	1.07 - 1.57
	hNK2	>10000*	
	hNK3	1205	756 - 1922

**Table 2 Affinities for various receptors and ion channels**

Receptor	Source	Radioligand	IC50 or Ki* ( $\mu$ M)
Dopamine D <sub>1</sub>	human recombinant	[ <sup>3</sup> H]SCH-23390	> 10
Dopamine D <sub>2S</sub>	human recombinant	[ <sup>3</sup> H]spiperone	> 10
GABA <sub>A</sub> , agonist site	rat brain	[ <sup>3</sup> H]muscimol	> 10
GABA <sub>A</sub> , Cl channel	rat cerebral cortex	[ <sup>3</sup> H]TBOB	> 10
GABA <sub>B</sub>	rat cerebellum	[ <sup>3</sup> H]GABA	> 10
Glu, non-selective	rat brain	[ <sup>3</sup> H]L-Glu	> 10
Gly, strychnine-sensitive	rat spinal cord	[ <sup>3</sup> H]strychnine	> 10
Histamine H1	guinea pig brain	[ <sup>3</sup> H]pyrilamine	> 10
Opiate $\kappa$	human recombinant	[ <sup>3</sup> H]diprenorphine	1.89 *
Opiate $\mu$	human recombinant	[ <sup>3</sup> H]diprenorphine	3.65 *
5-HT <sub>1</sub> , non-selective	rat cerebral cortex	[ <sup>3</sup> H]5-HT	> 10
5-HT <sub>3</sub>	human recombinant	[ <sup>3</sup> H]GR-65630	> 10
Ca channel, N-type	rat brain	[ <sup>125</sup> I] $\omega$ -conotoxin GVIA	> 10



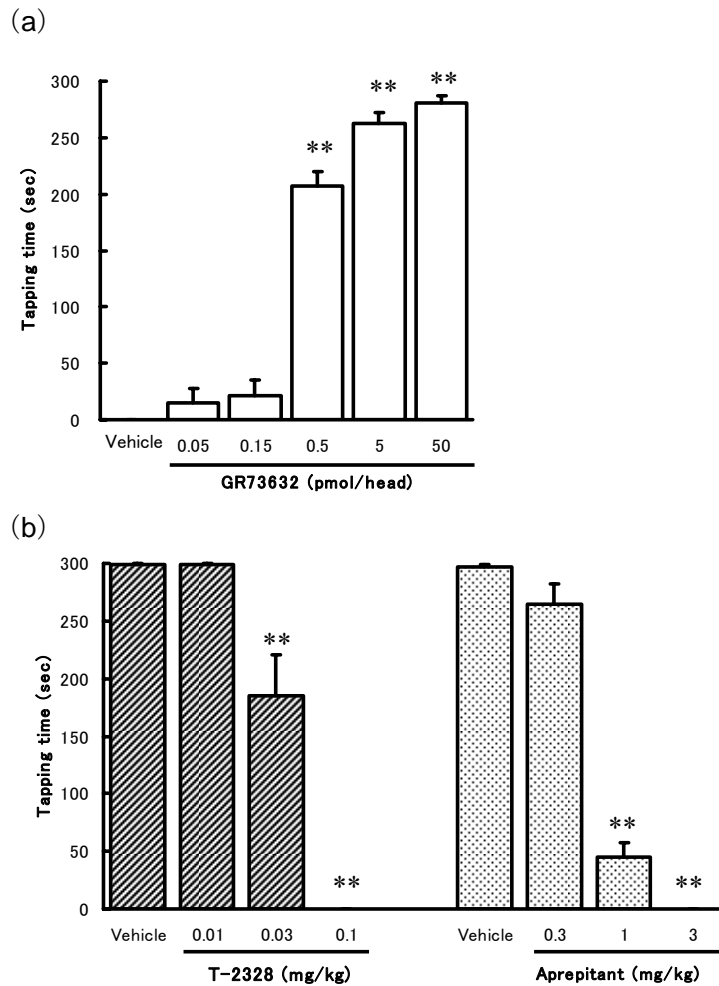
**Fig. 2 The nature of T-2328 antagonism.** (a) Saturation of [<sup>3</sup>H][Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]substance P binding to NK1 receptors in human IM9 cells. (b) Scatchard analysis of specific [<sup>3</sup>H][Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]substance P binding in human IM9 cells in the absence or presence of 0.3 nM T-2328. Cells were incubated with increasing concentrations of [<sup>3</sup>H][Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]substance P in the absence (closed circle) or presence of 0.3 nM T-2328 (open circle).

### 3.2 スナネズミにおける GR73632 誘発 foot tapping

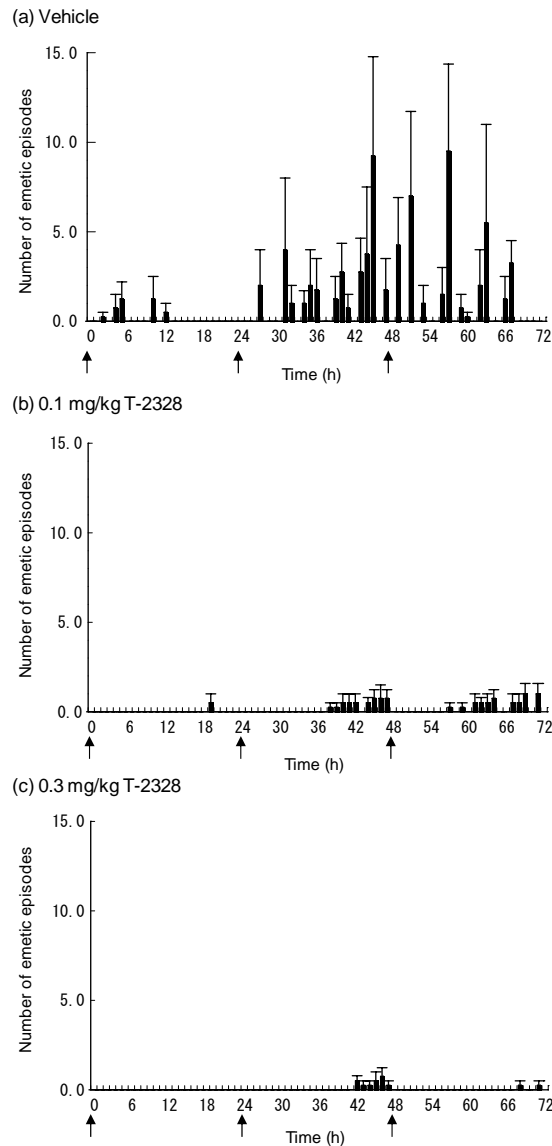
NK<sub>1</sub> 受容体作動薬である GR73632 (0.05 pmol–50 pmol) の脳室内投与により, 用量依存的に foot tapping が誘発された (Fig. 3 (a)). 最小有効量は 0.5 pmol であり, 最高用量である 50 pmol の GR73632 の投与では観察期間中にわたって foot tapping が誘発された. 一方, 溶媒の投与では foot tapping はまったく誘発されなかった. そこで拮抗作用の検討には最大下用量である 5 pmol の GR73632 を用いることとした. T-2328 (0.01–0.1 mg/kg) およびアプレピタント (0.3–3 mg/kg) は静脈内投与で, 5 pmol の GR73632 により誘発された foot tapping を用量依存的に抑制し, 最大用量でほぼ完全に抑制した (Fig. 3 (b)).

### 3.3 フェレットにおけるシスプラチン誘発嘔吐

フェレットにおいて, 抗癌剤であるシスプラチン (5 mg/kg, i.p.) は投与 24 時間後以降に著明な嘔吐を誘発させた (Fig.4 (a)). 嘔吐エピソード数は, 投与 0-24 時間後では  $4.0 \pm 2.1$  回 (急性嘔吐) であったのに対し, 投与 24-72 時間後では  $70.3 \pm 9.5$  回 (遅発性嘔吐) であった. T-2328 (0.1, 0.3 mg/kg, i.v.) は一日一回の反復投与により急性および遅発性の両嘔吐を著明に抑制した (Fig. 4 (b), (c)). 遅発性嘔吐のエピソード数は 0.1 mg/kg および 0.3 mg/kg の T-2328 投与により, それぞれ  $10.5 \pm 3.1$  回および  $3.0 \pm 1.2$  回に減少しており, 統計学的有意差が認められた ( $p < 0.01$ ).



**Fig. 3 Effects of T-2328 and aprepitant on GR73632-induced foot tapping in gerbils.** (a) Dose-response to GR73632 following i.c.v. administration. (b) Inhibition by T-2328 and aprepitant of GR73632-induced foot tapping in gerbils. Results are shown as the mean  $\pm$  S.E.M. from 5 animals per group. \*\* $p < 0.01$  compared with vehicle.



**Fig. 4 Effect of T-2328 on the cisplatin-induced emesis in ferrets.** Vehicle (a) or T-2328 (b, c) were intravenously administered at 0, 24 and 48 h after cisplatin administration. The arrows indicate the administration time of vehicle or T-2328. Results are shown as the mean numbers of emetic episodes ( $\pm$  S.E.M.) in 1 h during the 72 h observation period from 4 animals per group. In delayed phase of emesis (24-72 h), total number of emetic episodes in each group was  $70.3 \pm 9.5$ ,  $10.5 \pm 3.1$  and  $3.0 \pm 1.2$ , respectively. The reduction of delayed emesis in both T-2328-treated groups (b, c) was statistically significant ( $P < 0.01$ ).

#### 第4節 考察

T-2328 はヒト型 NK<sub>1</sub> 受容体に対する放射性リガンドの結合を著明に抑制した。K<sub>i</sub> 値は 1 nM 以下であり、アプレピタントに比べて 16 倍以上強力であった。また NK<sub>2</sub> および NK<sub>3</sub> 受容体に対する親和性は、NK<sub>1</sub> 受容体に対するそれに比べ、それぞれ 1/10000 および 1/1000 以上弱いものであった。したがって T-2328 はタキキニン受容体サブタイプの中でも NK<sub>1</sub> 受容体を選択的に阻害することが示された。さらに、ドーパミン受容体 (D<sub>1</sub> および D<sub>2s</sub>)、ヒスタミン受容体 (H<sub>1</sub>)、セロトニン受容体 (5-HT<sub>1</sub> および 5-HT<sub>3</sub>)、GABA 受容体 (GABA<sub>A</sub> 受容体作動薬結合部位、GABA<sub>A</sub> 塩素イオンチャネルおよび GABA<sub>B</sub> 受容体)、非選択的グルタミン酸受容体、ストリキニン感受性グリシン受容体、N 型カルシウムチャンネルに対し、T-2328 (10 μM) は阻害作用を示さなかった。オピエート κ および μ 受容体に対しては阻害作用を示したが、K<sub>i</sub> 値は 1 μM 以上であった。したがって、T-2328 は NK<sub>1</sub> 受容体に対して高い選択性を有することが示された。

ペプチド性の NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬の多くは、特異的リガンドの結合を競合的に阻害することが報告されている。しかしながら、非ペプチド性拮抗薬の阻害様式を化学構造から予測することは困難である。例えば、CP-122,721 (McLean et al. 1996) や SDZ NKT343 (Walpole et al. 1998) など、いくつかの非ペプチド性拮抗薬は非競合的な阻害薬であるが、CP-122,721 の類縁体である CP-99,994 は競合的な阻害薬である (McLean et al. 1993)。本章の飽和結合試験において、0.3 nM の

T-2328 を添加することにより, NK<sub>1</sub> 受容体に対する [<sup>3</sup>H][Sar<sup>9</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>] substance P の B<sub>max</sub> は減少したが, K<sub>d</sub> 値は変化しなかった. したがって T-2328 は NK<sub>1</sub> 受容体に非競合的に作用することが示唆された.

脳内に存在する NK<sub>1</sub> 受容体は様々な中枢性疾患に関与していることが知られており, 脳内移行性を有する NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬はそれらの治療薬となり得ることが示唆されている. NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬の脳内移行性の評価には, スナネズミにおいて NK<sub>1</sub> 受容体作動薬の脳室内投与により誘発される foot tapping が汎用されている (Bristow and Young, 1994; Rupniak and Williams, 1994). Foot tapping とは, 移動量の増加を伴わない後肢のリズミックな反復性の tapping である (Bristow and Young, 1994). この特徴的な反応は NK<sub>1</sub> 受容体作動薬の脳室内投与により誘発されるが, NK<sub>2</sub> および NK<sub>3</sub> 受容体作動薬では誘発されない (Graham et al. 1993). したがって脳内に存在する NK<sub>1</sub> 受容体の活性化により誘発される反応であることが示唆される. また脳内移行性を有する NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬は末梢性投与で foot tapping を抑制する. 一方, 脳内移行性の低い化合物は脳室内投与では foot tapping を抑制するが, 末梢性投与ではこれを抑制しない (Bristow and Young, 1994; Rupniak and Williams, 1994). 以上のことから本試験系は, NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬の脳内移行性を簡便かつ定量的に評価することが可能な試験系であるといえる (Hale et al. 1998). そこで T-2328 による脳内 NK<sub>1</sub> 受容体の阻害作用を, NK<sub>1</sub> 受容体作動薬 GR73632 の脳室内投与により誘発されるスナネズミの foot tapping を指標として検討した. T-2328 は静脈内投与で GR73632 誘発 foot tapping を抑制した. したが

って、T-2328 は末梢性投与により脳内に移行し、脳内の NK<sub>1</sub> 受容体を阻害することが示唆された。また T-2328 が foot tapping をほぼ完全に抑制する用量はアプレピタントよりも 30 倍低用量であった。

持続性の嘔吐は癌化学療法における主要な副作用である (Navari and Province, 2006)。化学療法により誘発される嘔吐は、その発現時間から抗癌剤投与後 24 時間以内に誘発される急性嘔吐と 24 時間後以降に誘発される遅発性嘔吐に大別される。急性嘔吐は 5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬によって抑制されるが、遅発性嘔吐は 5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬では十分には抑制されない (Aapro, 2005)。最近、遅発性嘔吐の発現にはサブスタンス P および NK<sub>1</sub> 受容体が関与していることが示唆された。また脳内移行性を有する NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬アプレピタントはヒトおよび動物において遅発性嘔吐を抑制するが (Hesketh et al. 2003; Poli-Bigelli et al. 2003; Tattersall et al. 2000)、脳内移行性の低い NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬は無効である (Rupniak et al. 1997) ことが報告されている。T-2328 は脳内移行性を有することが示唆されたため、抗嘔吐作用について検討を行うこととした。

抗癌剤の中でも高度の催嘔吐性を有するシスプラチンは嘔吐する動物、スンクス、イヌ、ネコ、ブタおよびフェレットなど、すべてに嘔吐を誘発させる。これらの動物のうちフェレットでは、シスプラチン投与により急性および遅発性の両嘔吐が誘発され (Rudd et al. 1994)、5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬が急性嘔吐を抑制するが遅発性嘔吐は完全には抑制しないこと (Rudd and Naylor, 1994) が報告されている。これらの特徴は、化学療法を受けている患者でみられる嘔吐と同様



であることから、フェレットにおけるシスプラチン誘発嘔吐モデルは抗癌剤誘発嘔吐の治療薬開発に汎用されている。今回の実験においても、シスプラチンはフェレットにおいて 72 時間にわたる持続性の嘔吐を誘発させた。そこで、シスプラチン誘発嘔吐に対する T-2328 の作用を検討したところ、本化合物はスナネズミにおける foot tapping を抑制する用量と同じ用量の静脈内投与によってこれを抑制した。急性嘔吐は求心性神経末端に存在する 5-HT<sub>3</sub> 受容体の活性化により惹起されるが、T-2328 は 5-HT<sub>3</sub> 受容体に対する親和性を有していない。したがって T-2328 の抗嘔吐作用は、脳内の NK<sub>1</sub> 受容体を阻害することにより発現していることが示唆された。

我々は T-2328 のシスプラチン誘発嘔吐に対する抗嘔吐作用を静脈内投与により検討した。高用量の抗癌剤を投与されている患者の多くは、重篤な口腔粘膜炎を罹患しており、薬剤の経口投与が困難である (Kraut and Fauser, 2001)。したがって、注射可能な NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬は化学療法誘発嘔吐の治療に有用であると考えられる (Meurer et al. 2006)。

本章での実験において我々は、結合試験にはヒト型 NK<sub>1</sub> 受容体を発現している細胞を、脳内移行性の評価にはスナネズミを、抗嘔吐作用の評価にはフェレットを用いた。異なる動物種間における NK<sub>1</sub> 受容体のアミノ酸配列は相同性が高いことが知られている。ヒト型とマウス型、ラット型、モルモット型およびスナネズミ型の NK<sub>1</sub> 受容体間でのアミノ酸配列の相同性はすべて 94%以上である (Engberg et al. 2007)。一方でヒト型とラット型の NK<sub>1</sub> 受容体では、膜貫通部位

における 2 個のアミノ酸配列の違いが非ペプチド性 NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬の作用強度に大きく影響することが知られている (Saria, 1999).  
しかしながら, ヒト, スナネズミ, モルモットおよびフェレットの NK<sub>1</sub> 受容体に対しては, 非ペプチド性 NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬は同等の親和性を示し, 種差は認められないことが確認されている (Rupniak et al. 1997; Beresford et al. 1991).

本章では, T-2328 がヒト型 NK<sub>1</sub> 受容体に対して高い親和性と選択性を有しており, 非競合的にこれを阻害することを示した. また本化合物は末梢性投与により脳内へ移行し, 脳内 NK<sub>1</sub> 受容体を遮断することによってシスプラチン誘発嘔吐を抑制すると考えられた. したがって T-2328 は脳内 NK<sub>1</sub> 受容体の遮断により治療効果が期待される疾患, 特に癌化学療法誘発嘔吐の新規治療薬となり得ることが示唆された.

## 第4章 タキキニン NK<sub>1</sub>受容体拮抗薬 T-2328 の持続的抗嘔吐作用

### 第1節 本章の目的

我々は強力な NK<sub>1</sub>受容体拮抗作用および良好な脳内移行性を有する NK<sub>1</sub>受容体拮抗薬の創製を目的として合成展開を行い、新規 NK<sub>1</sub>受容体拮抗薬 T-2328 を見出した (Watanabe et al, 2008). T-2328 は [<sup>3</sup>H][Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]substance P の NK<sub>1</sub>受容体への選択的結合を非競合的に阻害し、その阻害定数は Ki=0.08 nM であった. 一方, NK<sub>2</sub>および NK<sub>3</sub>受容体に対する親和性は, NK<sub>1</sub>受容体に対するその約 1/44000 および約 1/3800 であった. またスナネズミにおいて NK<sub>1</sub>受容体作動薬である GR73632 の脳室内投与により誘発される foot tapping を T-2328 は静脈内投与により抑制した. さらに本化合物がフェレットにおいて抗癌剤であるシスプラチンによって誘発される嘔吐を抑制することを確認した. そこで本章では, フェレットにおけるシスプラチン誘発急性嘔吐および遅発性嘔吐に対する T-2328 の抗嘔吐作用についてさらに詳細に検討した. またその抗嘔吐作用を, 癌化学療法によって誘発される嘔吐の標準治療薬である 5-HT<sub>3</sub>受容体拮抗薬オンダンセトロンのもので比較した.

## 第2節 材料および方法

### 2.1 使用動物

雄性フェレット (1.1-1.6 kg; Marshall Farms, North Rose, NY, USA) は単独飼育した。雄性スナネズミ (51-67 g; 日本 SLC, 静岡) および雄性 Hartley モルモット (275-450 g, 日本 SLC) は群飼した。動物は相対湿度 55±5%, 12 時間照明 (明期 ; 7:00-19:00, 暗期 ; 19:00-7:00) に維持された飼育室で, 室温 23±2°C (モルモットおよびスナネズミ) または 25±1°C (フェレット) にて, 飼料および水の自由摂取下で飼育した。モルモットおよびスナネズミには標準的な固形飼料 (CRF-1, オリエンタル酵母, 東京) を, フェレットにはネコ用固形飼料 (CS, オリエンタル酵母) を与えた。

すべての動物実験は「動物実験に関する日本薬理学会指針」および「田辺製薬株式会社動物倫理委員会指針」に基づいて実施された。

### 2.2 フェレットにおけるシスプラチン誘発嘔吐

前章の第 2 節 2.6 項に示した方法の一部を改変して実験を行った。以下に方法を簡潔に記す。

ハロタン麻酔下にてフェレットに抗癌剤であるシスプラチンを 5 mg/kg (遅発性嘔吐試験) または 10 mg/kg (急性嘔吐試験) の用量で腹腔内投与した。遅発性嘔吐試験時にはシスプラチン投与直後から 72 時間後まで, 急性嘔吐試験時にはシスプラチン投与直後から 24 時間後まで, ビデオカメラを用いてフェレットの行動を撮影・録画し

た。観察期間中、1時間毎の嘔吐エピソードの発現回数を経時的に計測し、総嘔吐エピソード数を算出した。遅発性嘔吐試験時には、T-2328 (0.03–1 mg/kg) およびオンダンセトロン二塩酸塩 (0.3–3 mg/kg) をシスプラチン投与直後または40時間後に尾静脈より投与した。急性嘔吐試験時には、T-2328 (0.03 mg/kg) およびオンダンセトロン二塩酸塩 (0.1–1 mg/kg) をそれぞれシスプラチン投与直後および30分前に尾静脈より投与した。

### 2.3 スナネズミにおける GR73632 誘発 foot tapping に対する抑制作用

前章の第2節 2.5項に示した方法に準じて実験を行った。本章では T-2328 の作用持続について検討する目的で、T-2328 (1 mg/kg) を NK<sub>1</sub> 受容体作動薬 GR73632 の脳室内投与の4または24時間前にハロタン麻酔下で陰茎静脈より投与した。

### 2.4 [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]substance P 誘発モルモット回腸縦走筋標本の収縮

雄性 Hartley モルモットの頭部を打撲後、放血致死させた。速やかに回腸を摘出して長さ 15-20 mm の縦走筋標本作製し、10 ml の Tyrode buffer を満たしたオルガンバスに 1.0 g の負荷をかけて懸垂した。Tyrode buffer は 37°C に保温し、95%O<sub>2</sub>+5%CO<sub>2</sub> で通気した。Tyrode buffer の組成は以下の通りである：137.9 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 11.9 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> およ

び 5.6 mM glucose. 縦走筋標本の収縮はトランスデューサーによって測定し、歪圧力用アンプ (AP-621G, 日本光電) で増幅後, chart recorder (WR370 ; Graphtec, 横浜) にて記録した.

1.0 g の負荷 40 分後に NK<sub>1</sub> 受容体作動薬である [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]substance P (10 nM) を添加して組織を収縮させ, 収縮が最大張力に達した後, 新鮮な Tyrode buffer で 3 回洗浄した. この操作を 20 分間隔で繰り返し, 少なくとも 5 回は収縮が誘発されることを予備検討において確認した上で, T-2328 の作用検討を以下の手順で行った.

1.0 g の負荷 40 分後に, 10 nM の [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]substance P の添加・洗浄を 20 分間隔で 2 回行った. 続いて種々の濃度の T-2328 を添加し, その 20 分後に [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]substance P を添加した. T-2328 添加前の組織の収縮長 (2 回目の [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]substance P 添加により組織が収縮した長さ) を基準値として, これに対する収縮抑制率を算出した. さらに T-2328 の作用持続性を検討するため, 組織を洗浄した後, T-2328 非存在下で [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]substance P の添加・洗浄を 20 分間隔で 2 回行い, その収縮長を測定した. IC50 値は統計ソフトウェア GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA, USA) を用いて非線形回帰により算出した.

## 2.5 血漿中および脳内 T-2328 濃度の測定

ハロタン麻酔下で, シスプラチン誘発嘔吐試験終了後のフェレットの腹部大動脈より, ヘパリン処理した注射筒を用いて全採血し, 脳を摘出した. 血漿および脳サンプルは測定まで -80 度で保存した.

全脳は蒸留水とともにテフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズし、20%脳ホモジネートを作製した。シクロヘキサン/ジエチルエーテル(1:1)での抽出後、T-2328の含量をHPLC (Shimadzu SPD-10A ; 島津, 京都)にて定量した。

## 2.6 使用薬物

T-2328は田辺製薬株式会社(現田辺三菱製薬株式会社)にて合成された。[Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>] substance P (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA), GR73632 (Research Biochemicals International), シスプラチン (cis-platinum (II) diammine dichloride ; Sigma-Aldrich, Inc.) およびオンダンセトロン二塩酸塩 (ZOFRAN INJECTION ; 三共, 東京) は市販品を用いた。

シスプラチンの調製および投与容量は、前章第2節2.7項に準じた。オンダンセトロン二塩酸塩は生理食塩液に希釈し、2 ml/kgの容量でフェレットに静脈内投与した。T-2328はDMSOに溶解し、*in vitro*試験ではTyrode bufferで、*in vivo*試験では生理食塩液で希釈した(DMSO最終濃度: 1%)。 *in vivo*試験における投与容量は5 ml/kg (スナネズミ) および2 ml/kg (フェレット) とし、静脈内投与した。

## 2.7 統計解析

結果はすべて平均値±標準誤差で示した。統計解析には Student's *t*-test または一元配置分散分析後に Dunnett's の多重比較検定を用いた。有意水準は両側 5%とした。

### 第3節 結果

#### 3.1 遅発性嘔吐

抗癌剤であるシスプラチン (5 mg/kg) は投与 24 時間以内に  $31.3 \pm 16.2$  回の嘔吐エピソード (急性嘔吐) を, 投与 24–72 時間後の間に  $68.0 \pm 12.5$  回の嘔吐エピソード (遅発性嘔吐) を誘発させた (Fig. 5(a); シスプラチン投与直後に溶媒を投与した群の嘔吐エピソード数の経時変化). しかしながら, この用量のシスプラチンで誘発される急性嘔吐はエピソード数が試験ごとに大きく異なっていた (Fig. 5 (a); シスプラチン投与直後に溶媒を投与した群の嘔吐エピソード数の経時変化, Fig. 7 (a) および Fig. 9 (a); シスプラチン投与 40 時間後に溶媒を投与した群の嘔吐エピソード数の経時変化, の 0–24 h を参照). したがって被験薬物間の作用比較には不適と判断し, 遅発性嘔吐についてのみ解析することとした.

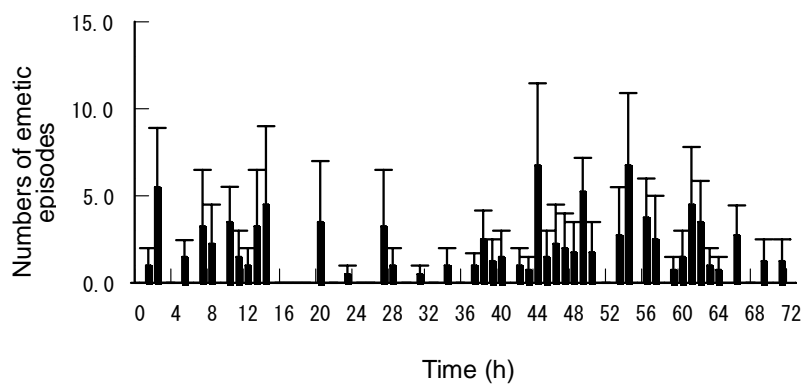
遅発性嘔吐は, シスプラチン処置直後に 0.3 または 1 mg/kg の T-2328 を静脈内投与することにより有意に抑制された (Fig. 5 (b), (c); シスプラチン投与直後に 0.3 または 1 mg/kg の T-2328 を投与した群の嘔吐エピソード数の経時変化, および Fig. 6; Fig. 5 のデータにおいてシスプラチン処置 24–72 時間後に誘発された嘔吐エピソード数の累積数). 次に, シスプラチン処置の 40 時間後に T-2328 を投与することにより, その抗嘔吐作用についてさらに検討した. T-2328 (0.03–0.3 mg/kg) はすでに誘発されている嘔吐に対しても用量依存的な抗嘔吐作用を示し, 0.3 mg/kg で完全に嘔吐を抑制した (Fig. 7 (b)



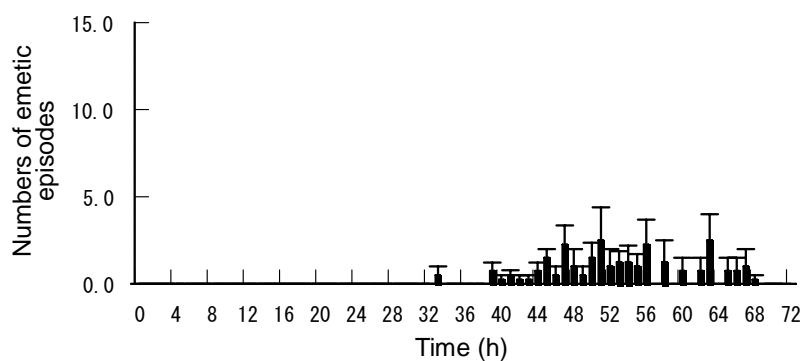
— (d) ; シスプラチン投与 40 時間後に T-2328 (0.03–0.3 mg/kg) を投与した群の嘔吐エピソード数の経時変化, および Fig. 8 ; Fig. 7 のデータにおいてシスプラチン投与 40–72 時間後に誘発された嘔吐エピソード数の累積数).

一方, オンダンセトロン (0.3–3 mg/kg) はシスプラチン投与 40 時間後の投与で一過性に遅発性嘔吐を抑制した (Fig. 9 (b) – (d) ; シスプラチン投与 40 時間後にオンダンセトロン (0.3–3 mg/kg) を投与した群の嘔吐エピソード数の経時変化). しかしながら, オンダンセトロン投与後 32 時間 (シスプラチン処置 40 時間後–72 時間後) における溶媒投与群とオンダンセトロン投与群の嘔吐エピソード数の間に統計学的有意差はみとめられなかった (Fig. 10 ; Fig. 9 のデータにおいてシスプラチン処置 40–72 時間後に誘発された嘔吐エピソード数の累積数).

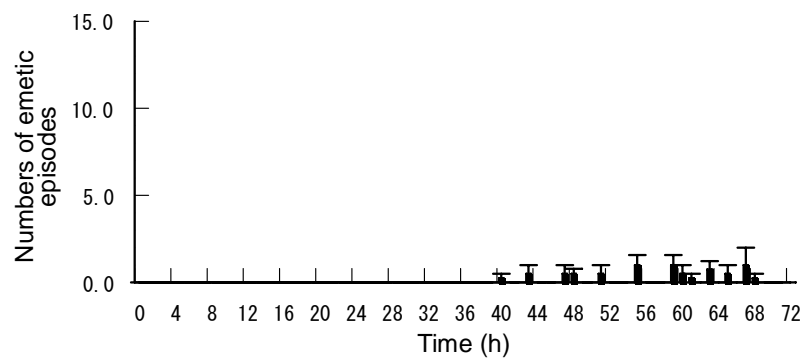
a) Vehicle



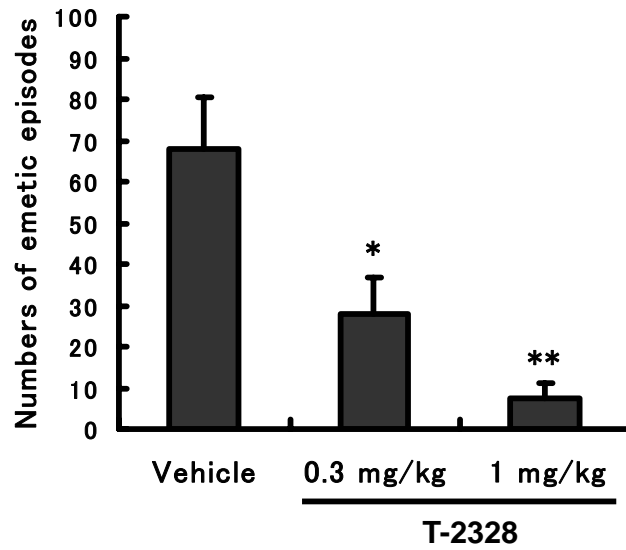
b) 0.3 mg/kg T-2328



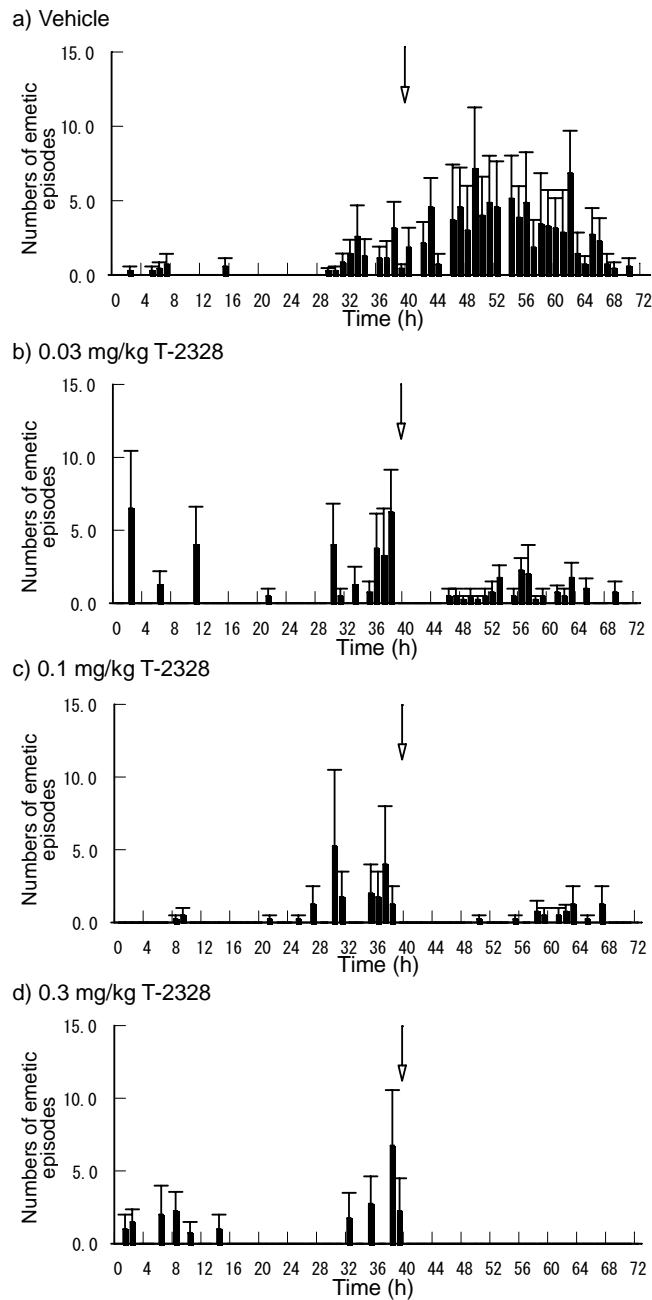
c) 1 mg/kg T-2328



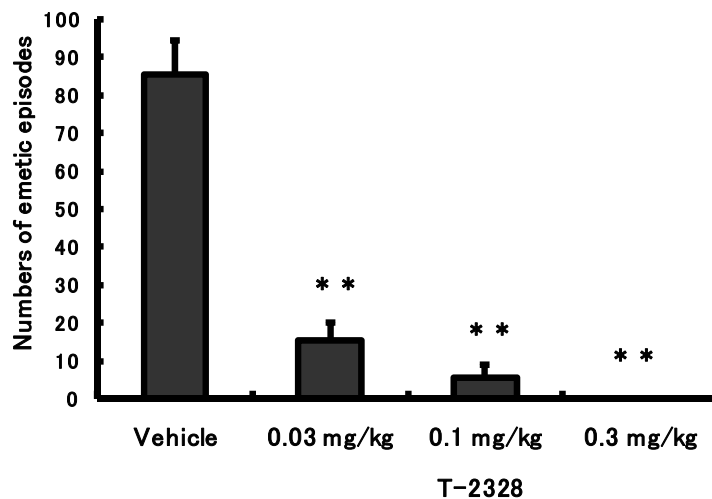
**Fig. 5 Effect of T-2328 on the cisplatin (5 mg/kg, i.p.) –induced acute and delayed emesis in ferrets.** Ferrets were intravenously treated with vehicle (a) or T-2328 (b, c) immediately after cisplatin administration. Results are shown as the means  $\pm$  S.E.M. of emetic episodes in 1 h during 72 h observation period from 4 animals per group.



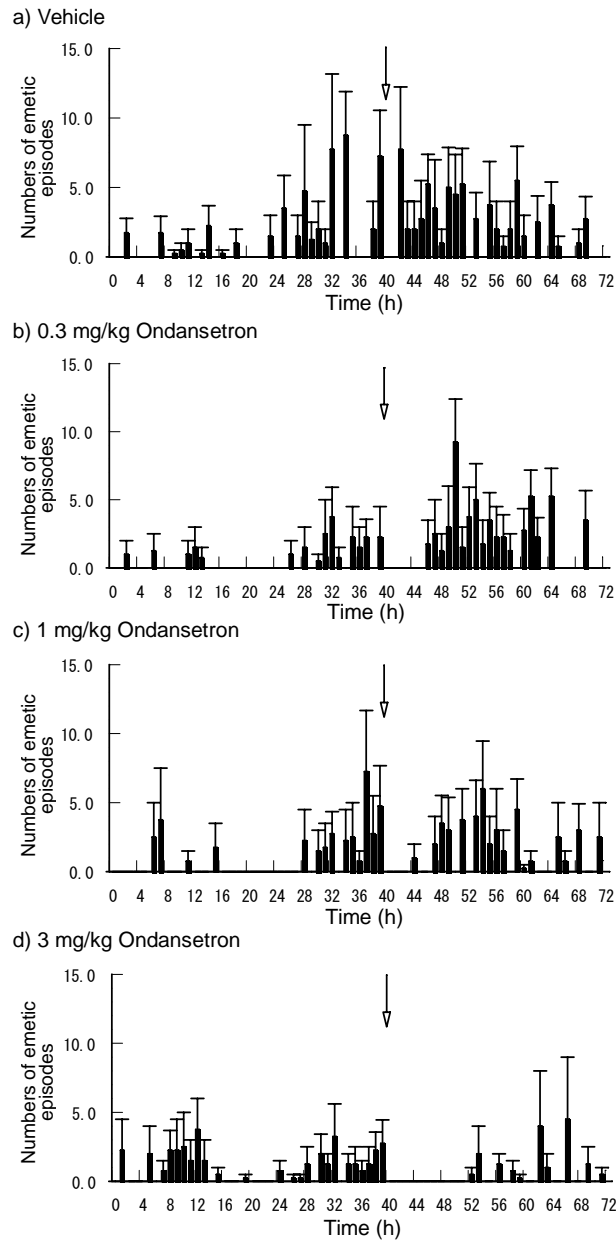
**Fig. 6** Long-lasting effects of T-2328 on the emetic response induced by cisplatin (5 mg/kg, i.p.) in ferrets. Ferrets were intravenously treated with T-2328 or vehicle immediately after the cisplatin administration. Results are shown as the means  $\pm$  S.E.M. of emetic episodes in 24-72 h observation period from 4 animals per group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with vehicle.



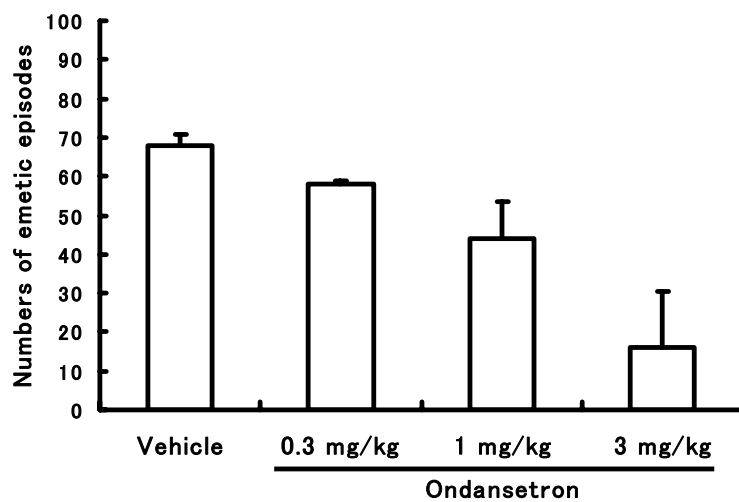
**Fig. 7 Effect of T-2328 against the delayed emesis.** Ferrets were intravenously treated with vehicle (a) or T-2328 (b, c, d) 40 h after the cisplatin administration. The arrows indicate the administration point of the vehicle or T-2328. Results are shown as the means  $\pm$  S.E.M. of emetic episodes in 1 h during 72 h observation period from 4 – 7 animals per group.



**Fig. 8 Inhibitory effect of T-2328 on the cisplatin (5 mg/kg, i.p.) -induced delayed emesis in ferrets.** Ferrets were intravenously treated with T-2328 or vehicle 40 h after cisplatin administration. Results are shown as the means  $\pm$  S.E.M. of emetic episodes in 40-72 h period from 4 – 7 animals per group. \*\* $p < 0.01$  compared with vehicle.



**Fig. 9** Effects of ondansetron on the delayed emesis induced by cisplatin (5 mg/kg, i.p.) in ferrets. Ferrets were intravenously treated with vehicle (a) or ondansetron (b, c, d) 40 h after the cisplatin administration. The arrow indicates the administration point of vehicle or ondansetron. Results are shown as the means  $\pm$  S.E.M. of emetic episodes in 1 h during 72 h observation period from 4 animals per group.

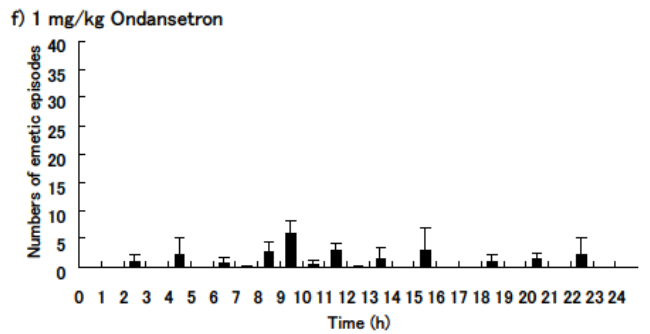
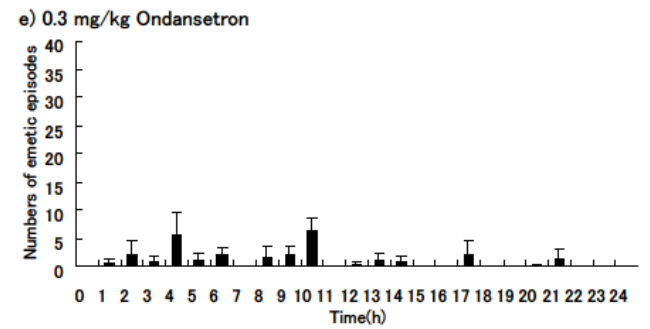
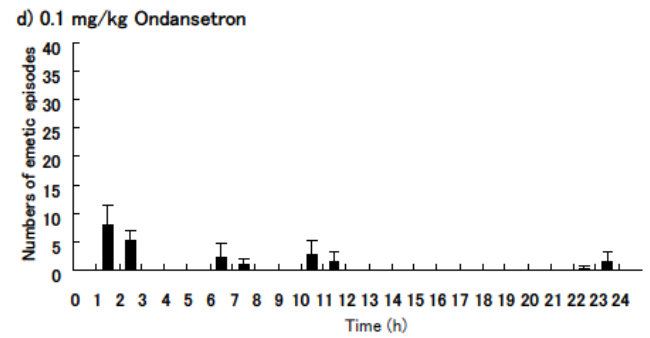
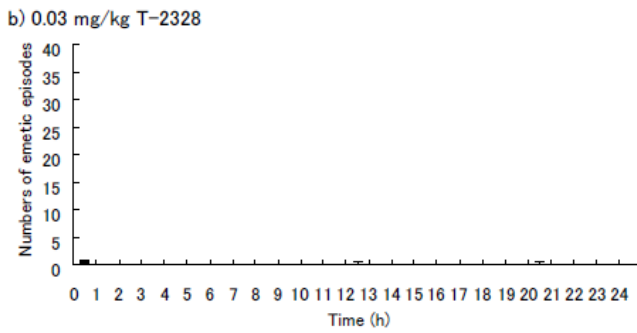
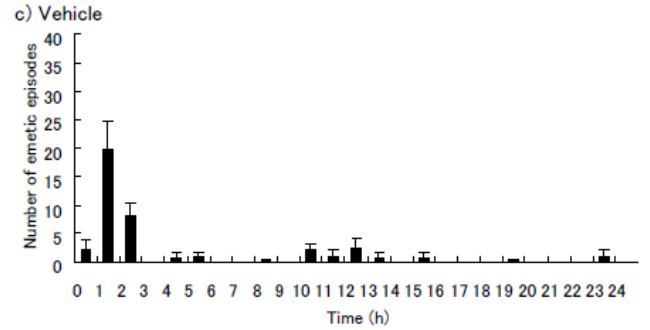
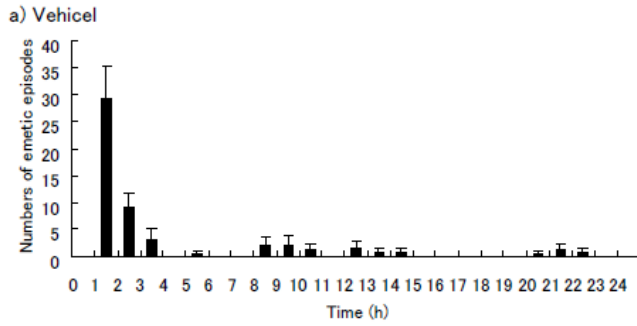


**Fig. 10** Inhibitory effects of ondansetron on the cisplatin (5 mg/kg, i.p.) -induced delayed emesis in ferrets. Ferrets were intravenously treated with ondansetron or vehicle 40 h after cisplatin administration. Results are shown as the means  $\pm$  S.E.M. of emetic episodes in 40-72 h period from 4 animals per group.

### 3.2 急性嘔吐

高用量のシスプラチン (10 mg/kg) は投与直後から 4 時間後までの間に、重篤な嘔吐を誘発させた (Fig. 11 (a), (c) ; 溶媒投与群の嘔吐エピソード数の経時変化). Table 3 に示すように、24 時間の観察期間のうち、最初の 4 時間に総嘔吐エピソード数の約 80%が誘発された. T-2328 (0.03 mg/kg) およびオンダンセトロン (0.3 および 1 mg/kg) は、10 mg/kg のシスプラチンの投与によって 4 時間以内に誘発される嘔吐をほぼ完全に抑制した (Fig. 11 (b), (e), (f) ; T-2328 (0.03 mg/kg) およびオンダンセトロン (0.3 および 1 mg/kg) 投与群の嘔吐エピソード数の経時変化). しかしながら、オンダンセトロン (0.3, 1 mg/kg) はシスプラチン投与 4–24 時間後の間に誘発される嘔吐エピソード数を増加させる傾向を示した (統計学的な有意差はみとめられず). 一方、T-2328 は 24 時間にわたって嘔吐をほぼ完全に抑制した.





**Fig. 11** Effects of T-2328 (a, b) and ondansetron (c-f) on the acute emesis induced by cisplatin (10 mg/kg, i.p.) in ferrets. Results are shown as the means  $\pm$  S.E.M. of emetic episodes in 1 h during 24 h observation period from 3-4 animals per group.

**Table 3** Effects of T-2328 and ondansetron on the acute emesis induced by cisplatin (10 mg/kg, i.p.) in ferrets

Drugs		Numbers of emetic episodes	
		0-4 h	4-24 h
Vehicle		41.8 ± 7.0	11.5 ± 2.4
T-2328	0.03 mg/kg	0.5 ± 0.5 **	0.5 ± 0.3 **
Vehicle		29.8 ± 6.8	10.0 ± 3.7
Ondansetron	0.1 mg/kg	13.3 ± 3.2	9.7 ± 2.9
	0.3 mg/kg	3.3 ± 2.0 *	23.8 ± 13.9
	1 mg/kg	1.0 ± 1.0 *	25.0 ± 11.4

Results represent the means ± S.E.M. of the emetic episodes in 0-4 h period or 4-24 h period during 24 h observation from 3-4 animals per group. \*p<0.05, \*\*p<0.01 compared with vehicle.

### 3.4 スナネズミにおける GR73632 誘発 foot tapping に対する抑制作用

前章の第3節 3.2 項において、NK<sub>1</sub> 受容体作動薬 GR73632 の脳室内投与によりスナネズミに foot tapping が誘発されること、T-2328 は末梢性投与によってこれを抑制することを示した。本項では、末梢性に投与した T-2328 による foot tapping 抑制作用の持続性について検討した。T-2328 は、GR73632 の脳室内投与 4 時間前の静脈内投与でも foot tapping を完全に抑制した (Table 4)。また 24 時間前の静脈内投与でも foot tapping を抑制する傾向を示し (p=0.07), 抑制率は 24.6% であった。

**Table 4 Inhibitory effect of T-2328 (1 mg/kg, i.v.) on GR73632 (i.c.v.)-induced foot tapping in gerbils**

Time after administration	Tapping time (sec)		Inhibition (%)
	Vehicle	T-2328	
4 h	300.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	100
24 h	299.0 ± 0.4	226.3 ± 21.4	24.6

Gerbils were i.v. treated with T-2328 or vehicle 4 or 24 h before GR73632 injection. Results represent the means ± S.E.M. of tapping time from 3 animals per group.

### 3.5 血漿中および脳内 T-2328 濃度

本章 3.1 項において、5 mg/kg のシスプラチンにより誘発された遅発性嘔吐に対する T-2328 の抗嘔吐作用を、シスプラチン処置直後および 40 時間後に T-2328 を静脈内投与することにより検討した。それらの試験の終了時、すなわち T-2328 静脈内投与の 72 時間後および 32 時間後の血漿中および脳内における T-2328 の濃度を測定した。その結果、すべてのサンプルに検出可能な量の T-2328 が存在していることが確認された。また T-2328 の血漿中および脳内濃度は用量依存的に増加していた (Table 5)。T-2328 の分子量は 415.51 であることから、0.3 mg/kg を投与した 32 時間後および 72 時間後の脳内濃度は、それぞれ 41.6 nM および 19.0 nM と算出された。

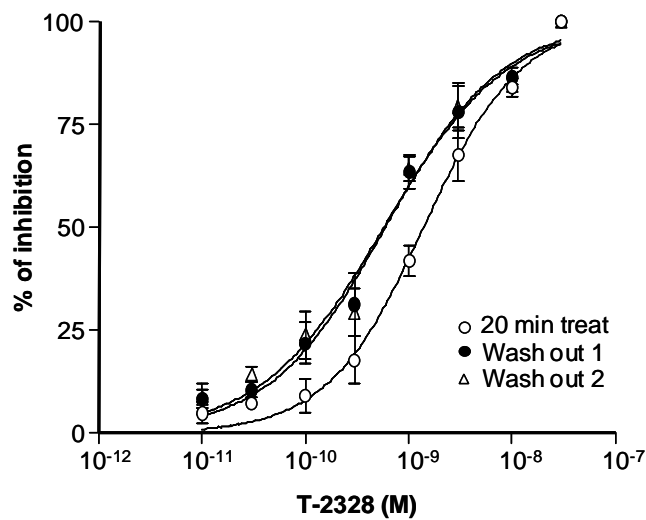
**Table 5 Concentrations in plasma and brain of T-2328 in cisplatin-treated ferrets**

Dose (mg/kg)	Plasma and brain concentrations of T-2328			
	32 h after administration		72 h after administration	
	plasma (ng/ml)	brain (ng/g)	plasma (ng/ml)	brain (ng/g)
0.03	1.8 ± 1.1	6.0 ± 2.4		
0.1	4.0 ± 1.8	10.3 ± 1.3		
0.3	19.0 ± 11.2	17.3 ± 4.4	3.6 ± 1.9	7.9 ± 1.6
1			30.1 ± 22.7	27.6 ± 12.3

The values are the mean ± S.E.M. (n=4)

3.6 [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]substance P 誘発モルモット回腸縦走筋標本の収縮

T-2328 は, NK<sub>1</sub> 受容体作動薬[Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]substance P (10 nM) によるモルモット回腸縦走筋の収縮を濃度依存的に抑制した (Fig. 12 ; 20 min treat). その IC<sub>50</sub> 値は 1.4 nM であった. また, この抑制作用は新鮮な Tyrode buffer で洗浄を繰り返しても消失しなかった (Fig. 12 ; Wash out 1, 2).



**Fig. 12** Concentration-dependent effect of T-2328 on the [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]substance P-induced contraction in the guinea pig ileum. The peak height of the NK<sub>1</sub> agonist-induced contractile response was expressed as percentage of the pre-drug treatment response. The contractile responses were assessed during the treatment with (open circle), after the first (closed circle) and second (open triangle) washout of T-2328. Each symbol and bar represents the mean ± S.E.M. of 4 preparations.

#### 第4節 考察

癌化学療法において、持続的に誘発される嘔吐は患者にとって大きな苦痛となっている (Navari and Province, 2006). フェレットにおいて抗癌剤であるシスプラチン (5 mg/kg) の単回腹腔内投与は急性期 (24 時間以内) および遅延期 (24–72 時間) に嘔吐を誘発させた. また高用量のシスプラチン (10 mg/kg) は投与直後から 4 時間の間にピークを示す重篤な嘔吐を誘発させた. 急性嘔吐は腹部求心性迷走神経に存在する 5-HT<sub>3</sub> 受容体が刺激されることにより誘発されることがわかっているが (Cubeddu et al. 1990; Fukui et al. 1992; Fukui et al. 1993), 遅発性嘔吐の発現メカニズムはいまだに十分に解明されていない. 5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬は化学療法を受けている患者の急性嘔吐の発現を抑制できるが, 遅発性嘔吐に対する抑制作用は十分ではない (Aapro, 2005). 今回の実験において, 5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬オンダセトロンは 0.3 mg/kg で急性嘔吐をほぼ完全に抑制したが, 遅発性嘔吐は 3 mg/kg でも一過性にしか抑制できなかった. したがって, シスプラチンにより誘発された急性および遅発性嘔吐は, その経時変化および 5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬への反応性という点で癌化学療法を受けている患者でみられる嘔吐と同様であることが確認された.

嘔吐中枢の一部である弧束核において, [<sup>3</sup>H]substance P が高密度に結合することなどから (Watson et al. 1995), サブスタンス P およびその受容体である NK<sub>1</sub> 受容体が嘔吐の発現に関与することが示唆されている (Saito et al. 2003). T-2328 は静脈内投与で脳内に移行する,

強力かつ選択的な NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬である (Watanabe et al. 2008). 5 mg/kg のシスプラチンによって誘発された急性および遅発性嘔吐は 0.3 mg/kg 以上の用量の T-2328 によって著明に抑制された. 高用量のシスプラチン (10 mg/kg) により誘発された急性嘔吐もまた 0.03 mg/kg の T-2328 によって抑制された. さらに T-2328 は, 遅発性嘔吐が既に誘発されてからの投与 (シスプラチン投与 40 時間後の投与) でも, 0.03 mg/kg 以上の用量で嘔吐を抑制した. 一方, オンダンセトロンは急性嘔吐を 0.3 mg/kg 以上の用量で抑制したが, 遅発性嘔吐は 3 mg/kg でも十分に抑制することはできなかった. 以上の結果から, 遅発性嘔吐の抑制は急性嘔吐の抑制によるものではないと考えられる. オンダンセトロンの遅発性嘔吐に対する抗嘔吐作用が一過性であったのは, 半減期の短さに起因する可能性が考えられた. しかしながら 5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬の遅発性嘔吐に対する抗嘔吐作用は, 投与間隔や投与経路を変更したり, 他剤と併用しても弱いものであることが報告されている (Gralla, 1995). したがって, NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬は急性嘔吐だけでなく, 5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬では制御が困難な遅発性嘔吐も抑制できることが示された.

T-2328 は末梢性投与で, スナネズミにおいて NK<sub>1</sub> 受容体作動薬 GR73632 の脳室内投与により誘発される foot tapping を抑制することから, 脳内移行性を有することを前章にて示した. 本章では, 脳内へ移行した T-2328 による NK<sub>1</sub> 受容体阻害作用の持続性を GR73632 誘発 foot tapping を用いて検討した. T-2328 は静脈内投与の 4 時間後においても foot tapping を完全に抑制し, 24 時間後においても foot

tapping を減少させる傾向を示した。したがって、脳内 NK<sub>1</sub> 受容体を持続的に阻害している可能性が示唆された。

T-2328 はフェレットのシスプラチン誘発嘔吐試験においても持続的な抗嘔吐作用を示した。そこで遅発性嘔吐試験の終了時における脳内の T-2328 濃度を測定したところ、検出可能な濃度の T-2328 が存在していた。遅発性嘔吐試験の終了時、すなわち T-2328 の静脈内投与 32 時間後および 72 時間後における脳内濃度は 41.6 および 19.0 nM であり (0.3 mg/kg 投与群)、NK<sub>1</sub> 受容体作動薬誘発回腸収縮の IC<sub>50</sub> 値である 1.4 nM を明らかに上回っていた。しかしながら、T-2328 の血漿タンパク結合率は 99% 以上であることから (データ示さず)、脳内フリー体濃度は 1.4 nM よりも低値であり、薬効発現に必要な濃度には達していなかったと考えられた。

一方、NK<sub>1</sub> 受容体作動薬によって誘発されたモルモット回腸縦走筋の収縮を T-2328 は濃度依存的に阻害し、その阻害作用は洗浄を繰り返した後も持続した。したがって本化合物は NK<sub>1</sub> 受容体を持続的に阻害することが示された。拮抗薬が受容体の active site に結合する場合、または持続的な拮抗薬である場合、その阻害様式は非競合的である。T-2328 はヒト型 NK<sub>1</sub> 受容体を非競合的に阻害することが前章において確認されており、本化合物が持続的な NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬であることを支持する。以上のことから、T-2328 は脳内に長時間存在することに加えて、その脳内濃度が減少した後も NK<sub>1</sub> 受容体を持続的に阻害することによって、持続的な抗嘔吐作用を発現させている可能性が示唆された。



本章では、NK<sub>1</sub>受容体拮抗薬が急性嘔吐だけでなく、5-HT<sub>3</sub>受容体拮抗薬では制御が困難な遅発性嘔吐も抑制できることを示した。また T-2328 の持続的な抗嘔吐作用は、脳内に長時間存在することに加え、NK<sub>1</sub>受容体を持続的に阻害することによるものである可能性が示唆された。したがって新規 NK<sub>1</sub>受容体拮抗薬 T-2328 は、癌化学療法の有効な治療薬となり得ると考えられた。

## 第5章 総括

我々は強力な NK<sub>1</sub> 受容体拮抗作用および良好な脳内移行性を有する NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬の創製を目的として合成展開を行い、新規 NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬 T-2328 を見出した。本研究では T-2328 の薬理的性質について *in vitro* および *in vivo* にて検討した。また、その抗嘔吐作用について抗癌剤誘発嘔吐モデルを用いて検討し、癌化学療法誘発嘔吐の治療薬としての有用性を検証した。

1. T-2328 は [<sup>3</sup>H][Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]substance P の NK<sub>1</sub> 受容体への選択的結合を非競合的に阻害した (K<sub>i</sub>=0.08 nM)。一方、他のタキキニン受容体サブタイプ、その他 13 種類の受容体およびイオンチャンネルに対する親和性は NK<sub>1</sub> 受容体に対するそれよりも弱く (1/1000 以下)、NK<sub>1</sub> 受容体に対して高い選択性を有することが示された。また本化合物はスナネズミにおいて NK<sub>1</sub> 受容体作動薬の脳室内投与により誘発される foot tapping を静脈内投与で抑制したことから、脳内移行性を有することが示唆された。そこでフェレットを用い、抗癌剤であるシスプラチンにより誘発される嘔吐に対する作用を検討したところ、抗嘔吐作用が確認された。

2. T-2328 はシスプラチンにより誘発される急性嘔吐のみならず遅発性嘔吐も抑制した。一方、抗癌剤誘発嘔吐の標準治療薬オンダン

セトロン (5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬) は急性嘔吐を抑制したが、遅発性嘔吐は一過性にしか抑制しなかった。また T-2328 は静脈内投与 4 時間後においても NK<sub>1</sub> 受容体作動薬誘発 foot tapping を完全に抑制したことから、脳内 NK<sub>1</sub> 受容体を持続的に阻害することが示唆された。そこで嘔吐試験終了時 (静脈内投与 32 または 72 時間後) における本化合物の脳内濃度を測定したところ、検出可能な量が存在していることが確認された。さらに NK<sub>1</sub> 受容体作動薬により誘発される回腸縦走筋の収縮を、T-2328 は灌流液から除去された後も持続的に抑制することが確認された。以上のことから、T-2328 は脳内に長時間存在することに加え、脳内濃度が減少した後も NK<sub>1</sub> 受容体を持続的に阻害することによって持続的な抗嘔吐作用を発現させる可能性が示唆された。

本研究の結果から、新規タキキニン NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬 T-2328 は癌化学療法誘発嘔吐の有用な治療薬となり得ることが示唆された。

## 引用文献

- Aapro M. Optimising antiemetic therapy: what are the problems and how can they be overcome? *Curr Med Res Opin.* 2005;21:885-897.
- Alvaro G, Di Fabio R. Neurokinin 1 receptor antagonists--current prospects. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2007;10:613-621.
- Andrews PL, Bhandari P. Resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analogue, has anti-emetic properties in the ferret. *Neuropharmacology.* 1993;32:799-806.
- Baude A, Shigemoto R. Cellular and subcellular distribution of substance P receptor immunoreactivity in the dorsal vagal complex of the rat and cat: a light and electron microscope study. *J Comp Neurol.* 1998;402:181-196.
- Beresford IJ, Birch PJ, Hagan RM, Ireland SJ. Investigation into species variants in tachykinin NK1 receptors by use of the non-peptide antagonist, CP-96,345. *Brit J Pharmacol.* 1991;104:292-293.
- Bountra C, Bunce K, Dale T, Gardner C, Jordan C, Twissell D, Ward P. Anti-emetic profile of a non-peptide neurokinin NK1 receptor antagonist, CP-99,994, in ferrets. *Eur J Pharmacol.* 1993;249:R3-4.
- Bristow LJ, Young L. Chromodacryorrhea and repetitive hind paw tapping: models of peripheral and central tachykinin NK1 receptor activation in gerbils. *Eur J Pharmacol.* 1994;253:245-252.
- Caberlotto L, Hurd YL, Murdock P, Wahlin JP, Melotto S, Corsi M, Carletti

- R. Neurokinin 1 receptor and relative abundance of the short and long isoforms in the human brain. *Eur J Neurosci.* 2003;17:1736-1746.
- Carpenter DO, Briggs DB, Strominger N. behavioral and electrophysiological studies of peptide-induced emesis in dogs. *Federation Proc.* 1984;43:2952-2954.
- Chahl LA. Tachykinins and neuropsychiatric disorders. *Curr Drug Targets.* 2006;7:993-1003.
- Cubeddu LX, Hoffmann IS, Fuenmayor NT, Finn AL. Efficacy of ondansetron (GR 38032F) and the role of serotonin in cisplatin-induced nausea and vomiting. *N Engl J Med.* 1990;322:810-816.
- Diemunsch P, Grélot L. Potential of substance P antagonists as antiemetics. *Drugs.* 2000;60:533-546.
- Dockray GJ, Sharkey KA. Neurochemistry of visceral afferent neurones. *Prog Brain Res.* 1986;67:133-148.
- Ebner K, Singewald N. The role of substance P in stress and anxiety responses. *Amino Acids.* 2006;31:251-272.
- Engberg S, Ahlstedt I, Leffler A, Lindström E, Kristensson E, Svensson A, et al. Molecular cloning, mutations and effects of NK1 receptor antagonists reveal the human-like pharmacology of gerbil NK1 receptors. *Biochem Pharmacol.* 2007;73:259-269
- Fukui H, Yamamoto M, Sato S. Vagal afferent fibers and peripheral 5-HT<sub>3</sub> receptors mediate cisplatin-induced emesis in dogs. *Jpn J*

- Pharmacol. 1992;59:221-226.
- Fukui H, Yamamoto M, Ando T, Sasaki S, Sato S. Increase in serotonin levels in the dog ileum and blood by cisplatin as measured by microdialysis. *Neuropharmacology*. 1993 ;32:959-968.
- Furmark T, Appel L, Michelgard A, Wahlstedt K, Ahs F, Zancan S, et al. Cerebral blood flow changes after treatment of social phobia with the neurokinin-1 antagonist GR205171, citalopram, or placebo. *Biol Psychiatry*. 2005;58:132-142.
- Gale JS, Bird ED, Spoke EG, Ivejsen LL, Jessel T. Human brain substance P: distribution in controls and Huntington's chorea. *J Neurochem*. 1978;30:633-634.
- Gardner CJ, Twissell DJ, Dale TJ, Gale JD, Jordan CC, Kilpatrick GJ, Bountra C, Ward P. The broad-spectrum anti-emetic activity of the novel non-peptide tachykinin NK1 receptor antagonist GR203040. *Br J Pharmacol*. 1995 Dec;116 (8) :3158-3163.
- Gobbi G, Cassano T, Radja F, Morgese MG, Cuomo V, Santarelli L, Hen R, Blier P. Neurokinin 1 receptor antagonism requires norepinephrine to increase serotonin function. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2007;17:328-338.
- Graham EA, Turpin MP, Stubbs CM. Characterisation of the tachykinin-induced hindlimb thumping response in gerbils *Neuropeptides* 1993;24:228-229.
- Gralla RJ, Itri LM, Pisko SE, Squillante AE, Kelsen DP, Braun DW Jr,

- Bordin LA, Braun TJ, Young CW. Antiemetic efficacy of high-dose metoclopramide: randomized trials with placebo and prochlorperazine in patients with chemotherapy-induced nausea and vomiting. *N Engl J Med.* 1981;305:905-909.
- Gralla, RJ. The clinical approach to chemotherapy-induced emesis. In: Reynolds DJM, Andrews PLR, Davis CJ, editors. *Serotonin and the scientific basis of anti-emetic therapy.* Oxford, Oxford Clinical Communications; 1995. p. 60-67.
- Green SA, Alon A, Ianus J, McNaughton KS, Tozzi CA, Reiss TF. Efficacy and safety of a neurokinin-1 receptor antagonist in postmenopausal women with overactive bladder with urge urinary incontinence. *J Urol.* 2006;176:2535-2540.
- Haddjeri N, Blier P. Sustained blockade of neurokinin-1 receptors enhances serotonin neurotransmission. *Biol Psychiatry.* 2001;50:191-199.
- Hale JJ, Mills SG, MacCoss M, Finke PE, Cascieri MA, Sadowski S, et al. Structural optimization affording 2- (R) - (1- (R) -3,5-bis (trifluoromethyl) phenoxy) -3- (S) - (4-fluoro) phenyl-4- (3-oxo-1,2,4-triazol-5-yl) methylmorpholine, a potent, orally active, long-acting morpholine acetal human NK-1 receptor antagonist. *J Med Chem.* 1998;41:4607-4614.
- Hargreaves R. Imaging substance P receptors (NK1) in the living human brain using positron emission tomography. *J Clin Psychiatry.*

- 2002;63 Suppl 11:18-24.
- Hesketh PJ, Grunberg SM, Gralla RJ, Warr, DG, Roila F, de Wit R, et al.  
The oral neurokinin-1 antagonist aprepitant for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting: a multinational, randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients receiving high-dose cisplatin--the Aprepitant Protocol 052 Study Group. *J Clin Oncol.* 2003;21:4112-4119.
- Hökfelt T, Kellerth JO, Nilsson G, Pernow B. Substance p: localization in the central nervous system and in some primary sensory neurons. *Science.* 1975 (a) ;190:889-890.
- Hökfelt T, Kellerth JO, Nilsson G, Pernow B. Experimental immunohistochemical studies on the localization and distribution of substance P in cat primary sensory neurons. *Brain Res.* 1975 (b) ;100:235-252.
- Hökfelt T, Meyerson B, Nilsson G, Pernow B, Sachs C. Immunohistochemical evidence for substance P-containing nerve endings in the human cortex. *Brain Res.* 1976;104:181-186.
- Hylden JL, Wilcox GL. Intrathecal substance P elicits a caudally-directed biting and scratching behavior in mice. *Brain Res.* 1981;217:212-215.
- Keller M, Montgomery S, Ball W, Morrison M, Snively D, Liu G, Hargreaves R, Hietala J, Lines C, Beebe K, Reines S. Lack of efficacy of the substance p (neurokinin1 receptor) antagonist aprepitant in the treatment of major depressive disorder. *Biol Psychiatry.*



- 2006 ;59:216-223.
- Khawaja AM, Rogers DF. Tachykinins: receptor to effector. *Int J Biochem Cell Biol.* 1996;28:721-738.
- Knox AP, Strominger NL, Battles AH, Carpenter DO. Behavioral studies of emetic sensitivity in the ferret. *Brain Res Bull.* 1993;31:477-484.
- Kraut L, Fauser AA. Anti-emetics for cancer chemotherapy-induced emesis: Potential of alternative delivery systems. *Drugs.* 2001;61:1553-1562.
- Kris MG, Tyson LB, Gralla RJ, Clark RA, Allen JC, Reilly LK. Extrapyramidal reactions with high-dose metoclopramide. *N Engl J Med.* 1983;309:433-434.
- Lembeck F, Folkers K, Donnerer J. Analgesic effect of antagonists of substance P. *Biochem Biophys Res Commun.* 1981;103:1318-1321.
- Leslie RA. Neuroactive substances in the dorsal vagal complex of the medulla oblongata: nucleus of the tractus solitarius, area postrema, and dorsal motor nucleus of the vagus. *Neurochem Int.* 1985;7:191-211.
- Maggi CA, Patacchini R, Rovero P, Giachetti A. Tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists. *J Auton Pharmacol.* 1993;13:23-93.
- Mai JK, Stephens PH, Hopf A, Cuello AC. Substance P in the human brain. *Neuroscience.* 1986;17:709-739.
- Mantyh PW, Gates T, Mantyh CR, Maggio JE. Autoradiographic localization and characterization of tachykinin receptor binding sites in the rat brain and peripheral tissues. *J Neurosci.* 1989 ;9:258-279.

- McLean S, Ganong A, Seymour PA, Snider RM, Desai MC, Rosen T, et al. Pharmacology of CP-99,994; a nonpeptide antagonist of the tachykinin neurokinin-1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993;267:472-479.
- McLean S, Ganong A, Seymour PA, Bryce DK, Crawford RT, Morrone J, et al. Characterization of CP-122,721; a nonpeptide antagonist of the neurokinin NK1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996;277:900-908.
- McRitchie DA, Törk I. Distribution of substance P-like immunoreactive neurons and terminals throughout the nucleus of the solitary tract in the human brainstem. *J Comp Neurol.* 1994;343:83-101.
- Menetrey D, Basbaum AI. The distribution of substance P-, enkephalin- and dynorphin-immunoreactive neurons in the medulla of the rat and their contribution to bulbospinal pathways. *Neuroscience.* 1987;23:173-187.
- Meurer LC, Finke PE, Owens KA, Tsou NN, Ball RG, Mills SG, et al. Cyclopentane-based human NK1 antagonists. Part 2: development of potent, orally active, water-soluble derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006;16:4504-4511.
- Millan MJ, Lejeune F, De Nanteuil G, Gobert A. Selective blockade of neurokinin (NK) (1) receptors facilitates the activity of adrenergic pathways projecting to frontal cortex and dorsal hippocampus in rats. *J Neurochem.* 2001;76:1949-1954.
- Murase K, Randić M. Actions of substance P on rat spinal dorsal horn neurones. *J Physiol.* 1984;346:203-217.

- Nakanishi S. Mammalian tachykinin receptors. *Annu Rev Neurosci.* 1991;14:123-136.
- Navari RM, Province PS. Emerging drugs for chemotherapy-induced emesis. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2006;11:137-151.
- NCCN (National Comprehensive Cancer Network ; 米国包括がんセンターネットワーク) Clinical Practice Guidelines in Oncology –Antiemesis. v.2.2009  
[http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/PDF/antiemesis.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/antiemesis.pdf)
- Otsuka M, Yoshioka K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol Rev.* 1993;73:229-308.
- Poli-Bigelli S, Rodrigues-Pereira J, Carides AD, Julie Ma G, Eldridge K, Hipple A, et al. Addition of the neurokinin 1 receptor antagonist aprepitant to standard antiemetic therapy improves control of chemotherapy-induced nausea and vomiting. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in Latin America. *Cancer.* 2003;97:3090-3098.
- Quartara L, Altamura M. Tachykinin receptors antagonists: from research to clinic. *Curr Drug Targets.* 2006;7:975-992.
- Regoli D, Boudon A, Fauchère JL. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol Rev.* 1994;46:551-599.
- Rigby M, O'Donnell R, Rupniak NM. Species differences in tachykinin receptor distribution: further evidence that the substance P (NK1) receptor predominates in human brain. *J Comp Neurol.*

- 2005;490:335-353.
- Roberts GW, Woodhams PL, Polak JM, Crow TJ. Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat: the hippocampus. *Neuroscience*. 1984;11:35-77.
- Roila F, Donati D, Tamberi S, Margutti G. Delayed emesis: incidence, pattern, prognostic factors and optimal treatment. *Support Care Cancer*. 2002;10:88-95.
- Rudd JA, Naylor RJ. Effects of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists on models of acute and delayed emesis induced by cisplatin in the ferret. *Neuropharmacology*. 1994;33:1607-1608.
- Rudd JA, Jordan CC, Naylor RJ. Profiles of emetic action of cisplatin in the ferret: a potential model of acute and delayed emesis. *Eur J Pharmacol*. 1994;262:R1-2.
- Rudd JA, Jordan CC, Naylor RJ. The action of the NK1 tachykinin receptor antagonist, CP 99,994, in antagonizing the acute and delayed emesis induced by cisplatin in the ferret. *Br J Pharmacol*. 1996;119:931-936.
- Rupniak NM, Williams AR. Differential inhibition of foot tapping and chromodacryorrhoea in gerbils by CNS penetrant and non-penetrant tachykinin NK1 receptor antagonists. *Eur J Pharmacol*. 1994;265:179-183.
- Rupniak NM, Tattersall FD, Williams AR, Rycroft W, Carlson EJ, Cascieri MA, et al. In vitro and in vivo predictors of the anti-emetic activity of

- tachykinin NK1 receptor antagonists. *Eur J Pharmacol.* 1997;326:201-209.
- Rupniak NM, Kramer MS. Discovery of the antidepressant and anti-emetic efficacy of substance P receptor (NK1) antagonists. *Trends Pharmacol Sci.* 1999;20:485-490.
- Saria A. The tachykinin NK1 receptor in the brain: pharmacology and putative functions. *Eur J Pharmacol.* 1999;375:51-60.
- Saito R, Suehiro Y, Ariumi H, Migita K, Hori N, Hashiguchi T, et al. Anti-emetic effects of a novel NK-1 receptor antagonist HSP-117 in ferrets. *Neurosci Lett.* 1998;254:169-172.
- Saito R, Takano Y, Kamiya HO. Roles of substance P and NK (1) receptor in the brainstem in the development of emesis. *J Pharmacol Sci.* 2003;91:87-94.
- Santarelli L, Gobbi G, Debs PC, Sibille ET, Blier P, Hen R, Heath MJ. Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:1912-1917.
- Snider RM, Constantine JW, Lowe JA 3rd, Longo KP, Lebel WS, Woody HA, Drozda SE, Desai MC, Vinick FJ, Spencer RW, et al. A potent nonpeptide antagonist of the substance P (NK1) receptor. *Science.* 1991;251:435-437.
- Tattersall FD, Rycroft W, Francis B, Pearce D, Merchant K, MacLeod AM, et al. Tachykinin NK1 receptor antagonists act centrally to inhibit

- emesis induced by the chemotherapeutic agent cisplatin in ferrets. *Neuropharmacology*. 1996;35:1121-1129.
- Tattersall FD, Rycroft W, Cumberbatch M, Mason G, Tye S, Williamson DJ, et al. The novel NK1 receptor antagonist MK-0869 (L-754,030) and its water soluble phosphoryl prodrug, L-758,298, inhibit acute and delayed cisplatin-induced emesis in ferrets. *Neuropharmacology*. 2000;39:652-663.
- Walpole CS, Brown MC, James IF, Campbell EA, McIntyre P, Docherty R, et al. Comparative, general pharmacology of SDZ NKT 343, a novel, selective NK1 receptor antagonist. *Br J Pharmacol*. 1998;124:83-92.
- Watanabe Y, Asai H, Ishii T, Kiuchi S, Okamoto M, Taniguchi H, et al. Pharmacological characterization of T-2328, 2-fluoro-4'-methoxy-3'-[[[ (2S,3S-2-phenyl-3-piperidiny]amino]methyl]-[1,1'-Biphenyl]-4-carbonitrile dihydrochloride, as a brain-penetrating antagonist of tachykinin NK1 receptor. *J Pharmacol Sci*. 2008;106:121-127.
- Watson JW, Gonsalves SF, Fossa AA, McLean S, Seeger T, Obach S, et al. The anti-emetic effects of CP-99,994 in the ferret and the dog: role of the NK1 receptor. *Brit J Pharmacol*. 1995;115:84-94.
- Wiesenfeld-Hallin Z. Substance P and somatostatin modulate spinal cord excitability via physiologically different sensory pathways. *Brain Res*. 1986;372:172-175.