

## 3位に置換基を有するヘキソース誘導体の 好中球接着阻害作用

柏村 直樹\*, 野間 誠司\*\*, 北川 優\*\*, 出口 修平\*\*, 辻 淳一\*\*  
土井田貴子\*\*, 稲垣 稔\*, 西川 司朗\*, 大川 勝徳\*\*\*

\*三重大生物資源学部 \*\*東洋紡績(株)医薬研究所 \*\*\*金沢大学教育学部

### Effect of 3-*O*-Substituted Hexose Derivatives on the Adhesion of Neutrophil

Naoki KASHIMURA\*, Seiji NOMA\*\*, Masaru KITAGAWA\*\*  
Syuhei DEGUCHI\*\*, Junichi TSUJI\*\*, Takako TOIDA\*\*  
Minoru INAGAKI\*, Shiro NISHIKAWA\*  
and Masanori OHKAWA\*\*\*

\*Faculty of Bioresources, Mie University, \*\*Pharmaceuticals Research Center, Toyobo Co. Ltd.  
\*\*\*Faculty of Education, Kanazawa University

#### Abstract

Inhibitory effect of some 3-*O*-substituted hexose derivatives on neutrophil adhesion and its oxidative burst were investigated. Adhesion was inhibited by 3-*O*-lauroyl-D-glucose (1, TK-125), 3-*O*-lauroyl-D-allose (2) and 3-*O*-lauroyl-*N*-allosamine (3), at the concentration of  $10^{-5}$  M, by 15-100%, as incubated at 37°C for 30 min in the presence of FMLP, PMA, or PAF. Generation of hydrogen peroxide in the same system was also inhibited by 1, 2, and 3. Several other 3-*O*-acyl derivatives were shown to exhibit no or less than 20% inhibition at the concentration of  $10^{-5}$  M.

**key words** : cell adhesion • 3-*O*-lauroyl-D-hexose derivatives • neutrophil • hydrogen peroxide

#### 緒 言

白血球の一種である好中球 (PMN) は正常状態では血管内に留まることなく流れている。しかし、一旦炎症が生じると炎症性細胞から産出されるインターロイキン-1 (IL-1), 癌細胞壊死因子 (TNF) 等の炎症性サイト

カインによって血管内皮細胞が、また血小板活性化因子 (PAF), ロイコトリエン B4 (LTB4) 等の好中球活性化因子によって好中球が刺激される。そうすると各々に接着分子が発現, 活性化され, これらの接着分子を介して好中球は内皮細胞に粘着する<sup>1)</sup>。接着分子としては好中球にはインテグリンの一種である糖タンパク質 Mac-1 とシアルルイス X, ルイス X といった糖タンパク質糖鎖, 内皮細胞には糖タンパク質 ICAM-1, ELAM-1, GMP-140 の存在が知られている。内皮細胞に粘

着した好中球は形態変化を起こし血管間隙を通り炎症部位に浸潤しさらに炎症を悪化させる。従って、好中球と血管内皮細胞の接着を阻害する薬物は新しい抗炎症剤になるものと考えられる<sup>2)</sup>。

近年、フルオレン誘導体リューメジン<sup>3)</sup>、クマリン誘導体クロロクロメン<sup>4)</sup>等の低分子化合物、あるいは接着分子の抗体<sup>5)</sup>、断片<sup>6)</sup>のようなタンパク質、セレクチンを介する接着阻害剤として現在臨床試験が行われているシアリルルイス X 関連の可溶性糖類<sup>7)</sup>が好中球の接着阻害作用を有する化合物として報告されているが、単糖誘導体についてはトリベノシド<sup>8)</sup>、アミプリロース<sup>9)</sup>などの部分置換グルコフラノースの抗炎症作用が報告されているだけで、研究がきわめて少ない。我々は細胞接着阻害活性を有する新規糖質誘導体の分子設計を目的に種々の脂溶性単糖誘導体を系統的に検索しており、これまでに二、三のリボーストリベンゾエート誘導体や部分置換ヘキサース誘導体に好中球のキーホールリンベットヘモシアニン (KLH) への接着を阻害する作用があることを見いだした<sup>8), 9)</sup>。今回は3位に各種置換基を有するヘキサース誘導体について調べた結果を報告する。

## 実験方法

### 1. 糖質誘導体

糖質誘導体はすべて文献法に従って合成した。接着阻害実験、過酸化水素生成抑制実験には DMSO 0.1% 溶液として調製しバッファーで希釈して用いた。

### 2. Adherence assay

PMN はヘパリン処理したヒト静脈血から Mono-Poly Resolving Medium (ICN Biomedicals) を用いて単離した。PMN の蛍光標識は PAG buffer (PIPES buffer containing 0.003% human serum albumin and 0.1% glucose) 中、5, 6-carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester (Molecular Probes, Inc.) 10 $\mu$ M で 37°C 10 分間インキュベートし、上記バッファーで洗浄後再びバッファーを添加した。2 mg/ml のキーホールリンベットヘモシアニン (KLH) (Sigma Chem. Co.) 50  $\mu$ l を加えた 96 穴マイクロプレートに 10<sup>-6</sup>~10<sup>-4</sup>M の糖質誘導体、好中球活性化因子として 10<sup>-7</sup>M の血小板活性化因子 (PAF), formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP)

または phorbol myristyl acetate (PMA) を含む PAGCM buffer (PAG buffer containing 1mM CaCl<sub>2</sub> and 1mM MgCl<sub>2</sub>) を加え、そこに蛍光標識 PMN (1 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/well) を添加した (final volume 1ml)。37°C, 3 時間インキュベーション後 0.01M PBS (pH 6.7) で 3 回洗浄した。0.3% Triton  $\times$ 100 150  $\mu$ l を加え接着した PMN を溶解し、マイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度 (Em. 530nm, Ex. 485nm) を測定することにより接着した PMN 量を算出した。

### 3. Hydrogen peroxide assay

PMN - KLH の接着阻害の系における PMN からの過酸化水素の生成は Nathan の方法<sup>10)</sup> を用いて測定した。Adherence assay と同様に KLH をコートした 96 穴プレートに糖質誘導体、3 種の好中球活性化因子 (10<sup>-7</sup>M), PMN (5 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/well) を添加し、10U/ml の horseradish peroxidase, 40  $\mu$ M スコポレチン, 1mM NaN<sub>3</sub> を含む PAGCM buffer 中、37°C, 1 時間インキュベーションした。マイクロプレートリーダーを用いてスコポレチンの蛍光強度 (Em. 460 nm, Ex. 360nm) の減少を測定することにより生成した過酸化水素量を算出した。

### 4. マウスオキサゾン耳浮腫<sup>11)</sup>

雄 ICR マウス (B. W. 30-35g) の腹部にオキサゾンの 0.5% エタノール溶液 0.1ml を塗布することにより感作した。4 日後、オキサゾンの 0.5% アセトン溶液 20  $\mu$ l を右の耳に塗布し炎症を惹起した。糖質誘導体はアセトンに溶かし 1 mg/耳になるようにオキサゾン溶液と同時に耳に塗布した。24 時間後耳を直径 6 mm の大きさに切りとり重量を測定した。浮腫率は次式に従って求めた。Swelling (%) = (Right ear weight - Left ear weight) / (Left ear weight)  $\times$  100。

### 5. Cytotoxicity assay

細胞毒性は PMN - KLH の接着阻害の系における PMN からの乳酸脱水酵素 (LDH) の漏出を市販のキットを用いて測定した<sup>12)</sup>。

## 結果および考察

本研究では、KLH に対する PMN の接着阻害活性と接着した PMN からの過酸化水素生成抑制作用を見る

二つの系を用い、さらに阻害活性の見いだされたものについては、一部 *in vivo* モデルを用いて抗炎症作用の有無を調べた。

KLH は好中球に対して、CD11b/CD18 (Mac-1) 依存性接着の基質となる事が報告されており<sup>13)</sup>、好中球と血管内皮細胞との相互作用を見るうえで内皮細胞の代替タンパクとして用いることができ一次スクリーニングを行う上で有用である。3位に各種置換基を有するヘキソース誘導体の  $10^{-4}$  M における接着阻害作用と過酸化水素生成抑制作用を表に示した。その結果、エチル、ベンジル、ベンジル、フェニルカルバモイル、*t*-ブチル、ナフチルカルバモイル、トシル基を有するものはまったく阻害活性を示さなかった。一方、大川ら<sup>14)</sup>が以前、制ガン剤の開発を目指して合成した長鎖の脂肪酸エステルあるいはアミドを有する化合物には強い活性が見られた。その中でも炭素数 12 のラウリン酸を有するグルコース、アロース、アロサミンに特に顕著な活性がみられた。また、これら接着阻害作用を示した化合物には  $10^{-4}$  M の濃度においては好中球からの乳酸脱水酵素 (LDH) の漏出作用が見られたが、10分の1の濃度の  $10^{-5}$  M では何れの化合物においても LDH の漏出は認められず、各化合物間での接着阻害作用の差が明確になった。その構造と活性との間には、炭素数 10 よりも 12 の脂肪酸エステルを有する誘導体で活性が高くなること、ヘキソースとしてはグルコース < アロース < アロサミンの順となること等の関係があることが明らかになった。 $10^{-5}$  M では LDH 漏出が認められなかったが  $10^{-4}$  M での LDH の漏出と  $10^{-5}$  M での接着阻害活性に相関が見られた事よりこれら誘導体は好中球膜を何らかのメカニズムにより攪乱し、その結果接着分子タンパクに影響を与えている事が推察された。

Shappell<sup>15)</sup> は KLH に接着活性化した PMN からスーパーオキシドが産生されることを報告している。生成したスーパーオキシドは不均一化反応により過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) となることより、この  $H_2O_2$  生成量を測定することにより PMN の活性化の程度を見る事ができる。過酸化水素生成抑制は蛍光物質スコポレチンが  $H_2O_2$  によって蛍光をもたない酸化型スコポレチンになることを利用して測定した。その結果、表に示したように、過酸化水素生成抑制作用も、長鎖脂肪酸を有する誘導体で強く、先ほどの接着阻害とほぼ同様の結果になっ

た。生理的条件において PMN から産生されたスーパーオキシドはさらに別の PMN あるいは血管内皮細胞を活性化させ炎症を進展させる。従って、ラジカルスカベンジャーあるいは PMN からの活性酸素生成抑制という観点から開発されている抗炎症剤もいくつか報告されており<sup>15), 16)</sup>、接着阻害作用にこういった作用を併せ持つ事は抗炎症剤にとって有効であると思われる。

図に *in vitro* で作用の強かった 3 種のラウリン酸化合物のうち TK-125 を取り上げ *in vivo* 試験に供した結果を示した。マウスオキゾロン耳浮腫は遅延型過敏症のモデルであり炎症部位での好中球の関与が報告されている<sup>17)</sup>。従って、細胞接着阻害作用を有する化合物はこのモデルで効果ができる可能性がある。また、直接炎症部位である耳に塗布することにより化合物の吸収分布等の影響を少なくした。その結果、これまでに報告してきたリボーストリベンゾエート誘導体 TK-50 には前回同様、浮腫を抑制する作用が見られたのに対して、TK-125 はこのモデルではまったく効果が認められなかった。

PAF, FMLP 等の好中球活性化因子には好中球膜表面に各々レセプターが存在しておりそれを介して好中球の活性化を起こすことが知られている<sup>17)</sup>。一方、PMA は細胞内情報伝達において重要な役割を演じているプロテインキナーゼ C (PKC) を直接刺激することにより好中球の活性化を起こす<sup>18)</sup>。また、PKC のインヒビターであるスタウリスポリンは PMN と内皮細胞の両方の接着分子の発現を阻害することが報告されている<sup>19)</sup>。TK-50 は PAF, FMLP で好中球を刺激したときに有効であったが、PMA 刺激に対しては阻害効果を示さなかった。一方、TK-125 等は PMA に対しても同様に効果がみられた。TK-125 と TK-50 とは *in vivo* モデルで効果に差があること、および *in vitro* の実験においても TK-125 は PMA 刺激を受けた PMN の接着も阻害すること等から、今回のこれらの化合物はこれまでに報告してきたリボース誘導体とはその作用メカニズムが異なることが推察された。TK-125 の作用メカニズムは明らかではないが LDH 漏出と相関していることより、膜に対して何らかの作用を及ぼしている、即ち膜蛋白攪乱で非特異的に接着阻害を起こしている可能性が示唆された。

これまで、臨床において抗リウマチ薬として金チオグルコース等の金製剤が用いられており、また、フェノー

ル性配糖体アクテオサイド<sup>20)</sup>に白血球の活性化抑制が報告されている。抗炎症作用を示すものとしては抗リウマチ作用が知られている 1, 2-*O*-isopropylidene-3-*O*-(3-*N*, *N*-dimethylaminopropyl)- $\alpha$ -D-glucofuranose, アミプリロース<sup>7)</sup>, 微小循環改善作用が報告されている ethyl 3,5,6-tri-*O*-benzyl- $\beta$ -D-glucofuranoside, トリベノシド<sup>6)</sup>が報告されている。しかし, 単糖を基本骨格にした医薬品は非常に少ない。糖質は一般的に毒性が少ないことを特徴としているが, 薬理作用も低い事より, 医薬品としてはこれまであまり省みられなかったものと思われる。今後は低毒性を保持したまま, より薬理作用の強い糖質性抗炎症剤の開発を目的に研究を進めていく予定である。

## 要 約

C-3位に置換基を有するヘキソース誘導体の好中球の細胞接着と活性酸素生成に及ぼす影響が調べられた。好中球が, FMLP, PMA, または PAF の存在下, タンパク質 KLH に 37°C, 30 分間に接着する *in vitro* の反応が 3-*O*-ラウロイル-D-グルコース (TK-125), 3-*O*-ラウロイル-D-アロース, および 3-*O*-ラウロイル-D-アロサミンによって, 15-100% 阻害された。これらの誘導体は, 好中球の過酸化水素生成反応も同じ程度に阻害した。同じ糖の濃度で, 他の各種 C-3 置換ヘキソース誘導体が調べられたが, いずれも阻害率は 20% 以下か全く活性がなかった。

Table Inhibitory effect of 3-*O*-substituted hexose derivatives on the adhesion of neutrophils to KLH

Carbohydrate derivatives	Conc. ( $\mu$ M)	Inhibitory activity* on adhesion of neutrophil						
		Adherent neutrophil			H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> generated			
		PAF	FMLP	PMA	PAF	FMLP	PMA	LDH**
3- <i>O</i> -Ethyl-D-glucose	100	-	-	-	-	-	-	-
3- <i>O</i> -Benzoyl-D-glucose	100	-	-	-	-	-	-	-
3- <i>O</i> -Benzyl-D-glucose	100	-	-	-	-	-	-	-
3- <i>O</i> -Phenylcarbamoyl-D-glucose	100	-	-	-	-	-	-	-
3- <i>O</i> - <i>t</i> -Butylcarbonyl-D-glucose	100	-	-	-	-	-	-	-
3- <i>O</i> -Naphthylcarbamoyl-D-glucose	100	-	-	-	-	-	-	-
3- <i>O</i> -Tosyl-D-glucose	100	-	-	-	-	-	-	-
3- <i>O</i> -(6-Dansylaminocaproyl)-D-glucose	100	-	-	-	-	-	-	-
3- <i>O</i> -Caproyl-D-glucose	100	-	-	-	++++	+++	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-
3- <i>O</i> -Lauroyl-D-glucose (1, TK-125)	100	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+
	10	-	-	-	+++	+	-	-
	1	-	-	-	-	-	-	-
3- <i>O</i> -Caproyl-D-allose	100	++	-	-	++++	++++	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-
3- <i>O</i> -Lauroyl-D-allose (2)	100	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++
	10	+	-	-	++++	++++	-	-
	1	-	-	-	-	-	-	-
3- <i>O</i> -Caproyl-D-allosamine	100	++++	+	++	++++	++++	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-
3- <i>O</i> -Lauroyl-D-allosamine (3)	100	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++
	10	++++	-	-	++++	++++	-	-
	1	-	-	-	+	-	-	-

\*++++; more than 90% inhibition, +++; 75-90% inhibition, ++; 50-70% inhibition,

+; 25-50% inhibition, -; 25-(-25)% inhibition, \*\*release of LDH.

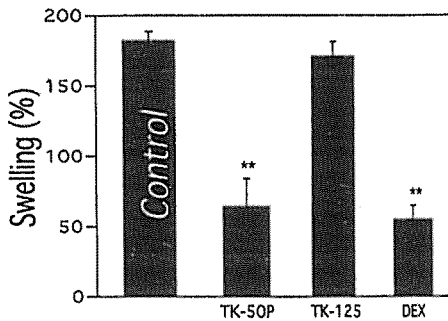


Fig. Inhibition of oxazolone induced mouse contact hypersensitivity by mono-saccharide derivatives.

Bar : S. E. of 4 experiments, \*\* :  $p < 0.01$  vs Control, Dex: Dexamethasone ( $1 \mu\text{g}/\text{ear}$ ), TK-125 : 3-*O*-lauroyl-D-glucopyranose ( $1\text{mg}/\text{ear}$ ), TK-50 P : 1, 3, 5-tri-*O*-benzoyl- $\beta$ -D-ribofuranoside ( $1\text{mg}/\text{ear}$ ). The control group received acetone only.

#### 引用文献

- MARSH, J. and J.A.GOOD, Cell Adhesion and Human Disease, John Wiley & Sons, Chichester, (1995).
- 細胞接着分子 基礎から臨床へ, 医学のあゆみ, 169, (1994).
- BATOR, J.M., M.WEITZBERG and R.M.BURCH, *N*-[9H-(2,7-dimethylfluorenyl-9-methoxy) carbonyl]-L-leucine, NSP15669, prevents neutrophil adherence to endothelium and inhibits CD11b/CD18 upregulation, *Immunopharmacol.*, 23, 139 - 149 (1992).
- BERTOCCHIO, F., F.BREVIARIO, P.PROSERPIO, J.M.WANG, P.GHEZZI, R.A.TRAVAGLI, M.PROSDOCIMI and E.DEJANA, *In vitro* inhibition of human polymorphonuclear cell function by cloricromene, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 339, 697-703 (1989).
- NOWLIN, D. M., F.GORCSAN, M.MOSCINKI, S-L. CHIANG, T.J.LOBL and P.M.CARDARELLI, A novel cyclic pentapeptide inhibits  $\alpha 4 \beta 1$  and  $\alpha 5 \beta 1$  integrin-mediated cell adhesion, *J.Biol. Chem.*, 268, 20352-20359 (1993).
- JAQUES, R., The pharmacological activity of tribenoside, *pharmacology*, 15, 445-460 (1977).
- KIEVAL, R.I., C.T.YOUNG, D.PROHAZKA, C.E. BRINCKERHOFF and D.E.TRENTHAM, Evaluation of a modified hexose sugar, ampirose hydrochloride, in experimental models of synovitis, *J.Rheumatol.*, 16, 67-74 (1989).
- KASHIMURA, N., M.KITAGAWA, J.TSUJI, S.NOMA, S.D. EGUCHI, T.TOIDA, and S.NISHIKAWA, Inhibitory effect of some tri-*O*-benzoyl-D-ribose derivatives on neutrophil adhesion and its oxidative burst, *Carbohydr. Lett.*, 1, 261-268 (1995).
- KASHIMURA, N., M.KITAGAWA, J.TSUJI, S.NOMA, S.D. EGUCHI, T.TOIDA, and S.NISHIKAWA, Inhibitory effect of some partially protected hexose derivatives on neutrophil adhesion and its oxidative burst, *Inflamm. Res.*, 44 (sup. 3), s246 (1995).
- NATHAN, C. F., Neutrophil activation on biological surfaces, *J. Clin. Invest.*, 80, 1550 - 1560 (1987).
- AHNFELT-RONNE, I., H.AAES and T.SKAK-NIELSEN, Effect of ETH615, an inhibitor of leukotriene synthesis and IL-8 gene expression, on murine dermatoses, *Agents & Action*, 39, C166 - C168 (1993).
- DECKER, T. and M-L.LOHMANN-MATTHES, A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity, *J.Immunol. Methods*, 115, 61-69 (1988).
- SHAPPELL, S. B., C.TOMAN, D. C. ANDERSEN, A.A. TAYLOR, M. L. ENTMAN and C. W. SMITH, Mac-1 (CD11b/CD18) mediates adherence-dependent hydrogen peroxide production by human and canine neutrophils, *J.Immunol.*, 144, 2702 - 2711 (1990).
- NISHIKAWA, Y., K.YOSHIMOTO and M.OHKAWA, Chemical and biochemical studies on carbohydrate esters. Plant growth inhibition by an anomeric mixture of synthesis 1-*O*-lauroyl-D-glucopse, *Chem. Pharm. Bull.*, 27 (9), 2011-2015 (1979).
- 西条武俊, ラジカルスカベンジャーの医薬としての可能性, *ファルマシア*, 29 (9), 1014-1019 (1993).
- CHIHIRO, M., H.NAGAMOTO, I.TAKEMURA, K. KITANO, H.KOMATSU, K.SEKIGUCHI, F.TABUSA, T.MORI, M.TOMONAGA, and Y.YABUUCHI, Novel thiazole derivatives as inhibitors of superoxide production by human neutrophils: synthesis and structure-activity relationship, *J.Med. Chem.*, 38, 353-358 (1995).

- 17) GERARD, C and N.P.GERARD, Immunopharmacology of Neutrophils, edited by Hellewell, P.G. and Williams, T.J., Academic press, p115 - 131 (1994).
- 18) SULLIVAN, J. A., J. E. MERRITT, J. M. BUDD, R. F. G. BOOTH, and T.J.HALLAM, Effect of a selective protein kinase C inhibitor, Ro 31-8425, on Mac-1 expression and adhesion of human neutrophil, *Eur. J.Immunol.*, **24**, 621-626 (1994).
- 19) LANE, T.A., G.E.LAMKIN, and E.V.WACEWICZ, Protein kinase C inhibitors block the enhanced expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells activated by interleukin-1, lipopolysaccharide and tumor necrosis factor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **172**, 1273 - 1281 (1990).
- 20) TAKEMOTO, N., T.HATTORI, Y.FUKUDA, H. NISHIKAWA, S.SHOINDO, H.KAWAMURA, T.ENDO, M. MARUNO and Y. SUZUKI, Studies on antinephritic activity of TJC-160 (2) : effects on leukocytes subsets and expression of adhesion molecules in periferal lymphocytes of anti-GBM dephritic rats, *Jap. J. Pharmacol.*, **64** (suppl. I), 312p (1994).