

Mini Review

iNOSダイマー形成阻害薬の治療薬としての可能性

大塚真理, 磯前和男, 石井二三夫

エスエス製薬株式会社中央研究所

Inhibitors of the dimerization of inducible nitric-oxide synthase as potential therapeutic agents

Nitric oxide (NO) plays an important role in various physiological processes. NO is synthesized by a family of NO synthases (NOS). Among the three isoforms of NOS, inducible NOS (iNOS) is closely related to inflammatory and autoimmune diseases. The suppression of excess NO production in participating cells may be helpful in improving disease status. NO inhibitors acting via the new mechanism of dimerization of iNOS are reviewed.

The oxygenase domains of two NOS monomers interact to form a dimer, and the NOS isoforms are only active as homodimers. 3-(2,4-difluorophenyl)-6-{2-[4-(1H-imidazol-1-ylmethyl) phenoxy]ethoxy}-2-phenylpyridine (PPA250), N-[(1,3-benzodioxol-5-yl)methyl]-1-[2-(1H-imidazol-1-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(methoxycarbonyl)-piperazine-2-acetamide (Compound 2) and other imidazole derivatives inhibit this step and cause the inhibition of NO production. Crystallographic studies have shown that Compound 2 blocks dimerization through coordinating the heme in the iNOS monomer. PPA250 suppressed the development of arthritis after clinical symptoms had appeared in animal models. PPA250 and Compound 2 also decreased the serum concentration of NO in mice treated with lipopolysaccharide.

These results indicate that inhibitors of iNOS homodimerization could be useful therapeutic agents for rheumatoid arthritis, septic shock and other diseases in which NO is involved. In addition, these inhibitors may present new research tools for exploring iNOS dimerization processes.

Rec.10/18/2002, Acc.11/15/2002, pp93-98

Mari Ohtsuka, Kazuo Isomae, Fumio Ishii

Central Research Laboratories, SSP Co., Ltd.

Key words inducible nitric-oxide synthase, dimerization, inhibitor, imidazole, arthritis

一酸化窒素 (nitric oxide: NO) は, 生体内において種々の細胞から産生されるガス状のラジカルであり, L-arginine (Arg) がNO産生酵素 (NO synthase: NOS) のホモダイマーによりNADPH依存性に酸化され, L-citrullineに変換される過程で生成される^{1, 2)}. NOSには, 神経型 (neuronal, nNOS), 誘導型 (inducible, iNOS), 内皮型 (endothelial, eNOS) の3つのアイソフォームがある^{1, 2)}. nNOSとeNOSは主として構成的に発現し, その活性はCa²⁺依存性 calmodulinにより調整されており, 神経伝達や血管トーン調節など生理的な役割を担っている¹⁾. 一方, iNOSは種々のタイプの細胞において, 感染や炎症などにより誘導された interferon- (IFN), interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor- (TNF-) などのメディエーターにより転写レベルでその発現が誘導され, 産生された多量のNOは生体防御機構を活性化する一方, 細

胞障害を引き起こす^{3, 4)}. iNOSの持続的な発現によるNOの過剰産生は, 敗血症や関節リウマチなど, さまざまな炎症性疾患や自己免疫疾患で認められ, その発症・増悪に深く関係していると考えられている⁵⁻⁸⁾.

これらの疾患の治療薬をめざして, NOの産生を阻害する薬物が開発されてきた. Hobbsらは¹⁾, NO阻害薬を作用機作から(1)細胞内へのArgの取り込みを阻害しNOSの基質を枯渇させる薬物, (2)NOSがArgの酸化触媒作用を行うために必要なコファクターの供給を減少させる薬物, (3)NADPH/Flavin類を介した電子の流れを阻害する薬物, (4)NOS発現を阻害する薬物, (5)NOSへの基質の結合を阻害する薬物, (6)NOのスカルベンジャーに分類している. これらに加えて, 最近になりiNOSの酵素活性に必須なホモダイマー形成をターゲットとする新しいタイプのNO産生阻害薬が登場した⁹⁻¹¹⁾.

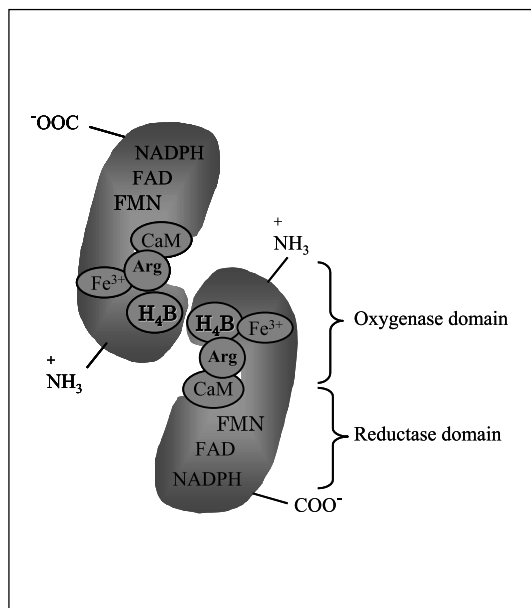


図1 NOSダイマーの模式図(Stuehr DJより²⁾ 一部改変)。

Arg: L-arginine, CaM: calmodulin, H₄B: tetrahydrobiopterin, Fe³⁺: heme

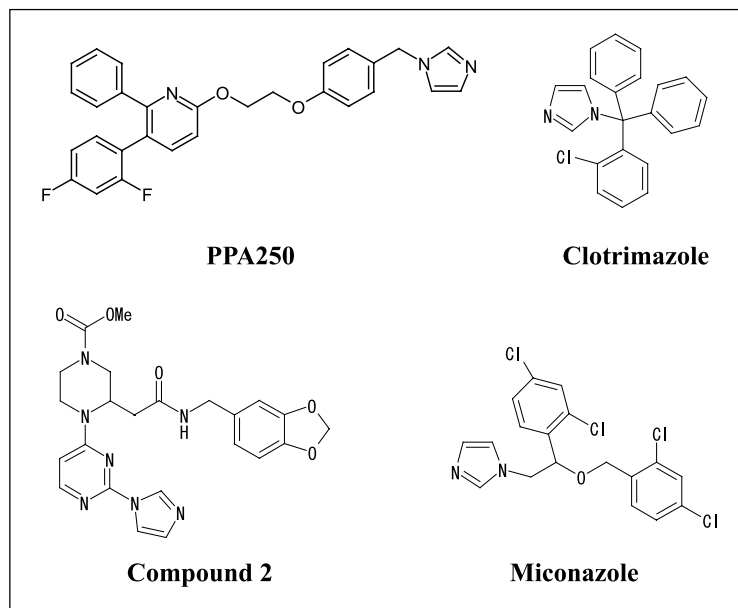


図2 iNOSダイマー形成阻害薬の化学構造式。

本稿では、iNOS阻害薬、とくにiNOSダイマー形成阻害薬とその治療への応用について概説する。

iNOSのダイマー形成とその酵素活性発現

NOSは、モノマーではNOS活性を示さず、ホモダイマーを形成して初めてNOを産生することが知られている¹²⁻¹⁴⁾。すなわち、図1に示すように、モノマーサブユニットは、NADPH, FAD, FMNおよびcalmodulin結合部位のあるC末側のreductase domainとheme, tetrahydrobiopterin (H₄B)およびArg結合部位のあるN末側のoxygenase domainで構成されている。そのダイマー形成はhemeの挿入により開始され、これが急速なconformational changeを引き起こす¹²⁻¹⁴⁾。Heme含有NOSモノマーはダイマー形成の中間物質であり、H₄BとArgの存在により安定化し活性なダイマーとなる^{12, 15)}。触媒中の電子の流れは、一つのモノマーのreductase domainからもう一方のモノマーのoxygenase domainへ起こるため、NOSの完全に共役した酵素活性にはダイマー形成が必須である¹⁶⁾。

iNOSのダイマー形成はoxygenase domain部分のみであるのに対し¹⁷⁾、eNOSとnNOSではoxygenase domainのhead-to-head interactionのみならず、reductase domainのtail-to-tail interactionと両domain間のhead-to-tail interactionも関わっていることが示唆されている¹⁸⁾。さらに、oxygenase domain部分のダイマー形成様式も、iNOSとその他のアイソ

フォームでは異なるため¹⁹⁾、ここをターゲットとする阻害薬は高いアイソフォーム特異性が期待される。

1999年にSennequierらは、imidazole系抗真菌薬のclotrimazoleとmiconazoleがiNOSのダイマー形成を阻害することを初めて報告し⁹⁾、その翌年、McMillanらはpyrimidine imidazoleコアを有する化合物群を基にcombinatorial chemistryを用いて、強力なiNOSダイマー形成阻害薬を見出したことを報告している¹⁰⁾。筆者らの見出したiNOSダイマー形成阻害薬PPA250もまたimidazole化合物であり¹¹⁾、他の骨格のものは今のところ見つかっていない(図2)。

iNOSダイマー形成阻害薬の分子機構

iNOSダイマー形成阻害薬は、iNOSダイマーの酵素活性を直接阻害せず、iNOSモノマーがダイマーを形成する過程を阻害することによりNO産生を抑制する。

図3Aに示すように、マウスのマクロファージ細胞株であるRAW 264.7細胞のLPS/IFN刺激により誘導されたiNOSタンパク質は、SDS-PAGE(未熱変性)によりモノマーとダイマーに分離され、PPA250は用量依存的にダイマー量を減少させたが、図3Bに示すように変性条件下で検出されるiNOSタンパク質の総発現量には影響を及ぼさなかった¹¹⁾。PPA250はダイマー形成阻害を示す濃度において、刺激RAW 264.7細胞からのNO産生を阻害し、そのIC₅₀は82 nMであった¹¹⁾。

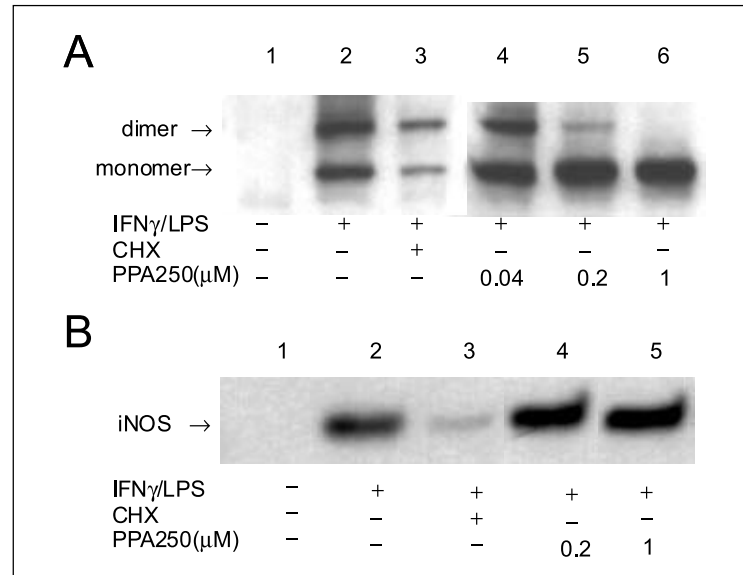


図3 PPA250の作用はiNOSダイマー形成を阻害する。

RAW264.7細胞をIFN とLPSで刺激すると同時に薬物処理して18時間培養後、細胞融解試料を熱変性せずに (A), あるいは熱変性後に (B), ウェスタンブロット法で解析した。CHX: cycloheximide

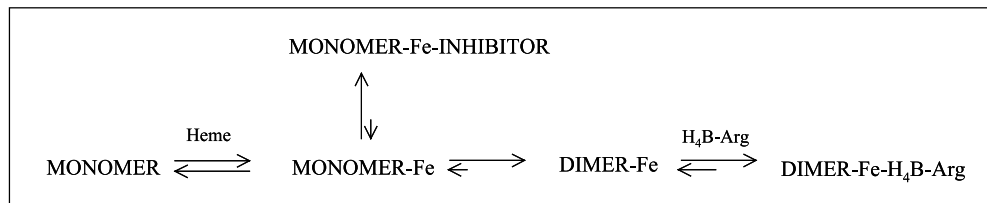


図4 imidazole誘導体によるiNOSダイマー形成阻害モデル。

McMillanらは¹⁰⁾, LPS/IFN 刺激RAW 264.7細胞のcell lysateをゲルろ過でiNOSのモノマーとダイマーに分離し, Compound 2処理によりダイマー形成が阻害されることを示した. その分子機構として, 結晶解析の結果より, Compound 2がiNOSモノマーのhemeに配位結合してモノマー間の相互作用を立体的に妨害し, さらに安定なiNOS monomer-heme-inhibitor complexを形成して, 非可逆的にダイマー形成を抑制することを報告している (図4)^{10, 20)}. PPA250に関しては, 分子レベルでの作用機作は未検討であるが, 同様のことが考えられる. また, Compound 2のヒトグリア芽細胞腫のA-172に対するNO産生阻害のIC₅₀は0.6 nMであった. PPA250およびCompound 2のNO産生阻害作用は, iNOS阻害薬のN^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA)と比較して500倍以上強かった^{10, 11)}.

iNOSは炎症時のみ誘導されるため, iNOSダイマー形成阻害薬は構成的に発現している他のNOSアイソフォームには影響しにくいと考えられるが, 近年, eNOSやnNOS

も誘導されるという報告もあり^{21, 22)} 治療薬として長期的に用いることを想定すると生理的役割を担っている他のNOSアイソフォームには影響しないものが望ましい. Compound 2はNOS過剰発現細胞を用いた実験結果より, NOの産生を抑制する濃度はeNOSと比較すると1000倍, nNOSとは5倍の差があり, iNOS特異性が高い¹⁰⁾. 一方, PPA250のアイソフォーム特異性については検討中である.

iNOSダイマー形成阻害薬のNO関連疾患に対する治療効果

関節リウマチや変形性関節炎患者の滑膜細胞および軟骨細胞ではiNOS mRNAやタンパク質の発現が認められ⁵⁻⁷⁾, 滑膜液中でNOの安定な酸化物の一つであるnitrite濃度が上昇していることから^{5, 7)}, NOはこれらの疾患の発症と増悪に関連していると考えられている.

筆者らは, 関節リウマチモデルであるコラーゲン誘発関節炎マウスを用いてPPA250の治療効果を検討した. マウ

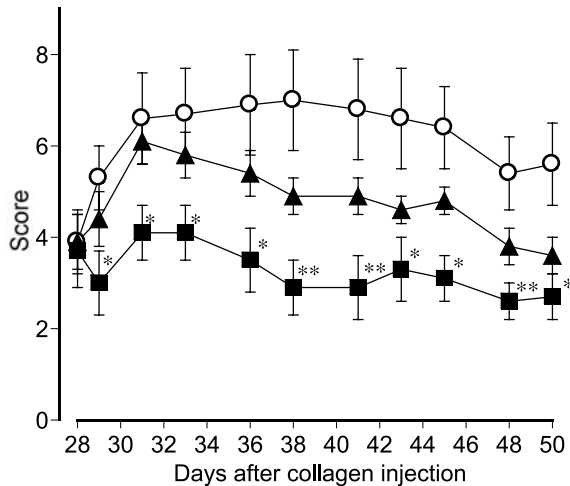


図5 PPA250はコラーゲン誘発関節炎マウスの炎症スコアを改善する。

DBA/1Jマウス(9週齢・雄性)をフロイントの完全アジュバントで乳化した牛型コラーゲンで免疫し、その21日後に追加免疫した。さらに一週間後に、関節炎を発症したマウスを選別して群分けした後、PPA250を22日間経口投与した。溶媒対照群(○), PPA250 10 mg/kg 投与群(△), PPA250 30 mg/kg 投与群(■), ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, 1群8匹

スに型コラーゲンを免疫した21日後に追加免疫を行い、さらに7日後に関節炎の発症が認められたマウスを選別、群分けし、PPA250の10あるいは30 mg/kgを1日1回経口投与した。その結果、図5に示すようにPPA250は炎症スコアを改善した。さらに、別の関節リウマチモデルであるアジュバント関節炎ラットに対しても、PPA250の治療効果が認められている¹¹⁾。

これらの動物モデルにおいては、関節炎の発症に伴いiNOSの誘導とNO産生が認められるが²³⁻²⁷⁾、NOSへの基質の結合を阻害するL-NMMAやN^G-nitro-L-arginine methyl esterなどのiNOS阻害薬は、これらのモデルに対して予防効果を示すが^{23-25, 27)}、一部有効とする報告もあるものの、治療的投与は無効である^{23, 27)}。PPA250がiNOSダイマー形成阻害作用以外に、これらのモデルの発症・増悪に関連したIL-1やTNF- α など、他の因子に対する作用も有するか否かについては現在のところ不明であるが、iNOSダイマー形成阻害というメカニズムの違いが有利に作用した可能性も考えられる。なお、関節炎モデルに対するCompound 2の効果は報告されていない。

さらに、iNOSノックアウトマウスがエンドトキシン(LPS)による致死に対して抵抗性を示すことから²⁸⁾、敗血症ショックもまたiNOSが関連していると考えられてい

る疾患の一つである。事実、敗血症患者や動物モデルにおいて、NOの酸化物であるnitrateの血清レベルが上昇しており^{8, 30)}、L-NMMAなどのiNOS阻害薬により敗血症患者やラットにおける低血圧症が改善され^{1, 29)}、LPSによるマウスの致死も抑制される³⁰⁾。PPA250の経口投与やCompound 2の腹腔内投与もまた、敗血症マウスの血清NO上昇に対して抑制効果を示した^{10, 11)}。

Compound 2は、*in vitro*でのiNOS活性阻害は強いものの、経口投与での有効性が不明のため、経口投与で有効なPPA250の方が臨床治験実施には一歩進んでいると言える。

おわりに

本稿では、iNOSの酵素活性に必須なダイマー形成を抑制することによりマクロファージからのNO産生を抑制するiNOSダイマー形成阻害薬を紹介し、さらに、iNOSダイマー形成阻害薬のPPA250が実験的関節炎モデルに対して治療効果があったことを示した。しかし、炎症部位で誘導されたiNOSがどの程度ダイマーとして存在しているのか、阻害薬の投与により増加したiNOSモノマーはその後どうなるのか、投与中止時や飲み忘れ時のリバウンド作用は激しいものではないかなど、不明な点も多く、その詳細な解析が必要であろう。

NOの過剰産生は、敗血症・関節リウマチの他にも、出血性ショック・全身性エリテマトーデス・シェーグレン症候群・血管炎・変形性関節炎・乾癬・接触性皮膚炎などの疾患で認められる^{1, 3, 5-8)}。iNOSダイマー形成阻害薬はNO関連疾患に対する治療薬として期待されると同時にiNOSダイマー形成の分子機構を解明する上でも有用なツールになると考えられ、今後の研究の進展が強く望まれる。

文献

- 1) Hobbs AJ, Higgs A, Moncada S: Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 39: 191-220, 1999.
- 2) Stuehr DJ: Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta*, 1411: 217-230, 1999.
- 3) Clancy RM, Amin AR, Abramson SB: The role on nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum*, 41: 1141-1151, 1998.
- 4) Salkowski CA, Detore G, McNally R, van Rooijen N, Vogel SN: Regulation of inducible nitric oxide synthase messenger RNA expression and nitric oxide production by lipopolysaccharide in vivo: the roles of macrophages, endogenous IFN- γ , and TNF receptor-1-mediated signaling. *J*

- Immunol, 158: 905-912, 1997.
- 5) Sakurai H, Kohsaka H, Liu MF, Higashiyama H, Hirata Y, Kanno K, Saito I, Miyasaka N: Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J Clin Invest*, 96: 2357-2363, 1995.
 - 6) McInnes IB, Leung BP, Field M, Wei XQ, Huang FP, Sturrock RD, Kinnimonth A, Weidner J, Mumford R, Liew FY: Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J Exp Med*, 184: 1519-1524, 1996.
 - 7) Farrell AJ, Blake DR, Palmer RMJ, Moncada S: Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis*, 51: 1219-1222, 1992.
 - 8) Ochoa JB, Udekwu AO, Billiar TR, Curran RD, Cerra FB, Simmons RL, Peitzman AB: Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann Surg*, 214: 621-626, 1991.
 - 9) Sennequier N, Wolan D, Stuehr DJ: Antifungal imidazoles block assembly of inducible NO synthase into an active dimer. *J Biol Chem*, 274: 930-938, 1999.
 - 10) McMillan K, Adler M, Auld DS, Baldwin JJ, Blasko E, Browne LJ, Chelsky D, Davey D, Dolle RE, Eagen KA, Erickson S, Feldman RI, Glaser CB, Mallar C, Morrissey MM, Ohlmeyer MHJ, Pan G, Parkinson JF, Phillips GB, Polokoff MA, Sigal NH, Vergona R, Whitlow M, Young TA, Devlin JJ: Allosteric inhibitors of inducible nitric oxide synthase dimerization discovered via combinatorial chemistry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 1506-1511, 2000.
 - 11) Ohtsuka M, Konno F, Honda H, Oikawa T, Ishikawa M, Iwase N, Isomae K, Ishii F, Hemmi H, Sato S: PPA250, a novel orally effective inhibitor of the dimerization of inducible nitric oxide synthase, exhibits an anti-inflammatory effect in animal models of chronic arthritis. *J Pharmacol Exp Ther*, 303: 52-57, 2002.
 - 12) Baek KJ, Thiel BA, Lucas S, Stuehr DJ: Macrophage nitric oxide synthase subunits. Purification, characterization and role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into a dimeric enzyme. *J Biol Chem*, 268: 21120-21129, 1993.
 - 13) Klatt P, Pfeiffer S, List BM, Lehner D, Glatter O, Bächinger HP, Werner ER, Schmidt K, Mayer B: Characterization of heme-deficient neuronal nitric-oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem*, 271: 7336-7342, 1996.
 - 14) Rodriguez-Crespo I, Gerber NC, Montellano O: Endothelial nitric-oxide synthase. Expression in *Escherichia coli*, spectroscopic characterization, and role of tetrahydrobiopterin in dimer formation. *J Biol Chem*, 271: 11462-11467, 1996.
 - 15) Ghosh DK, Husam MA-S, Stuehr DJ: Domains of macrophage NO synthase have divergent roles in forming and stabilizing the active dimeric enzyme. *Biochemistry*, 35: 1444-1449, 1996.
 - 16) Siddhanta U, Presta A, Fan B, Wolan D, Rousseau DL, Stuehr DJ: Domain swapping in inducible nitric-oxide synthase. Electron transfer occurs between flavin and heme groups located on adjacent subunits in the dimer. *J Biol Chem*, 273: 18950-18958, 1998.
 - 17) Ghosh DK, Stuehr DJ: Macrophage NO synthase: characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction. *Biochemistry*, 34: 801-807, 1995.
 - 18) Venema RC, Ju H, Zou R, Ryan JW, Venema VJ: Subunit interaction of endothelial nitric-oxide synthase. Comparisons to the neuronal and inducible nitric-oxide synthase isoforms. *J Biol Chem*, 272: 1276-1282, 1997.
 - 19) Panda K, Rosenfeld RJ, Ghosh S, Meade AL, Getzoff ED, Stuehr DJ: Distinct dimer interaction and regulation in nitric-oxide synthase types I, II, and III. *J Biol Chem*, 277: 31020-31030, 2002.
 - 20) Blasko E, Glaser CB, Devlin JJ, Xia W, Feldman RI, Polokoff MA, Phillips GB, Whitlow M, Auld DS, McMillan K, Ghosh S, Stuehr DJ, Parkinson JF: Mechanistic studies with potent and selective inducible nitric-oxide synthase dimerization inhibitors. *J Biol Chem*, 277: 295-302, 2002.
 - 21) Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ: Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest*, 90: 2092-2096, 1992.
 - 22) Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S: Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 5212-5216, 1994.
 - 23) Stefanovic-Racic M, Meyers K, Meschter C, Coffey JW, Hoffman RA, Evans CH: Comparison of the nitric oxide synthase inhibitors methylarginine and aminoguanidine as prophylactic and therapeutic agents in rat adjuvant arthritis.

- J Rheumatol, 22: 1922-1928, 1995.
- 24) Connor JR, Manning PT, Settle SL, Moore WM, Jerome GM, Webber RK, Tjoeng FS, Currie MG: Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol*, 273: 15-24, 1995.
- 25) Vermeire K, Thielemans L, Matthys P, Billiau A: The effects of NO synthase inhibitors on murine collagen-induced arthritis do not support a role of NO in the protective effect of IFN- γ . *J Leukoc Biol*, 68: 119-124, 2000.
- 26) Cannon GW, Openshaw SJ, Hibbs JB Jr, Hoidal JR, Huecksteadt TP, Griffiths MM: Nitric oxide production during adjuvant-induced and collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 39: 1677-1684, 1996.
- 27) Fletcher DS, Widmer WR, Luell S, Christen A, Orevillo C, Shah S, Visco D: Therapeutic administration of a selective inhibitor of nitric oxide synthase does not ameliorate the chronic inflammation and tissue damage associated with adjuvant-induced arthritis in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 284: 714-721, 1998.
- 28) Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY: Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*, 375: 408-411, 1995.
- 29) Hom GJ, Grant SK, Wolfe G, Bach TJ, Macintyre DE, Hutchinson NI: Lipopolysaccharide-induced hypotension and vascular hyporeactivity in the rat: tissue analysis of nitric oxide synthase mRNA and protein expression in the presence and absence of dexamethasone, N^G-monomethyl-L-arginine or indomethacin. *J Pharmacol Exp Ther*, 272: 452-459, 1995.
- 30) Minnard EA, Shou J, Naama H, Cech A, Gallagher H, Daly JM: Inhibition of nitric oxide synthesis is detrimental during endotoxemia. *Arch Surg*, 129: 142-148, 1994.