

生体における新規 Selective Glucocorticoid Receptor Modulator
(JTP-117968)の抗炎症作用および副作用の評価に関する研究

2022 年

栗本 貴史

新潟大学大学院自然科学研究科博士後期課程

生命・食料科学専攻

略 語

- AP-1 (Activator Protein -1 : アクチベータータンパク質 1)
- AR (Androgen receptor : アンドロゲン受容体)
- ATCC (American Type Culture Collection : アメリカンタイプカルチャーコレクション)
- BMD (Bone mineral density : 骨密度)
- cDNA (Complementary deoxyribonucleic acid : 相補的デオキシリボ核酸)
- CIA (Collagen-induced arthritis : コラーゲン誘発関節炎)
- Dkk-1 (Dickkopf) -1
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium : ダルベッコイーグル最小必須培地)
- DMSO (Dimethyl sulfoxide : ジメチルスルホキシド)
- ER α (Estrogen receptor : エストロゲン受容体) α
- ER β (Estrogen receptor : エストロゲン受容体) β
- FBS (Fetal bovine serum : ウシ胎児血清)
- GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase : グリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素)
- GR (Glucocorticoid receptor : グルココルチコイド受容体)
- GRE (Glucocorticoid response elements : グルココルチコイド応答配列)
- HMM (Hepatocytes maintenance medium : 肝細胞維持培地)
- HPLC (High-performance liquid chromatography : 高速液体クロマトグラフィー)
- IL-1 β (Interleukin : インターロイキン) -1 β
- IL-6 (Interleukin : インターロイキン) -6
- LPS (Lipopolysaccharide : リポポリサッカライド)
- MC (Methylcellulose : メチルセルロース)
- MMTV (Murine mammary tumor virus : マウス乳癌ウイルス)
- MR (Mineralocorticoid receptor : ミネラルコルチコイド受容体)
- mRNA (Messenger Ribonucleic acid : 伝令リボ核酸)
- MS (Mass spectrometer : 質量分析計)
- NF κ B (Nuclear Factor kappa B : 核内因子 κ B)
- PBS (Phosphate-buffered saline : リン酸緩衝生理食塩水)
- PCR (Polymerase chain reaction : ポリメラーゼ連鎖反応)
- PEPCK (Phosphoenolpyruvate carboxykinase : ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ)
- PR (Progesterone receptor : プロゲステロン受容体)
- RNA (Ribonucleic acid : リボ核酸)
- SGRM (Selective glucocorticoid receptor modulator : 選択的グルココルチコイド受

容体モジュレーター)

TA (Transactivation : トランス活性化)

TAT (Tyrosine aminotransferase : チロシンアミノトランスフェラーゼ)

TNF α (Tumor necrosis factor : 腫瘍壊死因子) α

TR (Transrepression : トランス抑制)

目 次

第1章 緒 論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・6

第2章 JTP-117968 の基本プロフィール・・・・・・・・17

第1節 緒 言

第2節 材料及び方法

第3節 結 果

第4節 考 察

第5節 要 約

第3章 JTP-117968 のマウス LPS チャレンジモデルおよび CIA モデルにおける作
用・・・・・・・・39

第1節 緒 言

第2節 材料及び方法

第3節 結 果

第4節 考 察

第5節 要 約

第4章 JTP-117968 のマウス大腿骨 BMD およびヒト骨芽細胞に対する作用・・・・・・・・56

第1節 緒 言

第2節 材料及び方法

第3節 結 果

第4節 考 察

第5節 要約

第5章 総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 69

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 71

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 72

SUMMARY・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 76

第1章 緒論

グルココルチコイド(図 1-1)は、Lewis Hasting Sarett がメルク研究所にてコルチゾンの合成に成功して(Sarett, 1946)以来、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、自己免疫性肝炎およびネフローゼ症候群等の自己免疫・炎症性疾患に幅広く処方されている。一方グルココルチコイドは、特に全身的に投与した際に、糖尿病、骨粗鬆症、中心性肥満および高血圧等多くの副作用を引き起こす(Schacke et al., 2002; van der Goes et al., 2010) (図 1-2)。グルココルチコイドの局所製剤(吸入剤、軟膏剤および点眼剤等)の開発は、これらの副作用を大幅に低減した(表 1-1)。しかしながら、経口および注射製剤を用いたグルココルチコイドの全身的投与は多くの自己免疫疾患をコントロールするために必要とされている。上述の副作用はグルココルチコイドの投与期間や投与量に応じて発現する(表 1-2)ことから、使用する用量や投与期間に制限がかけられている。そのため、有益な抗炎症作用は維持され、副作用が低減した SGRM は、臨床現場より最も求められている薬剤の一つである。

グルココルチコイドはステロイド受容体ファミリーに属する GR (図 1-3) を介して主に遺伝子発現を制御する。GR の主要な作用メカニズムとして 2 つに大別されることが知られている。一つは GRE を介して TAT、PEPCK のような分子の mRNA 発現を活性化する TA と呼ばれるメカニズムであり、もう一つは GRE 非依存的に NF κ B、AP-1 のような転写因子の結合を阻害する TR と呼ばれるメカニズムである(図 1-4)。一部の抗炎症性のタンパクが TA 活性により誘導されることが報告されている(図 1-5)が、一般的にグルココルチコイドの抗炎症作用は主に TR を介して発揮される一方、問題となるグルココルチコイドの副作用の多くは TA により引き起こされると考えられている。

最近数十年間において、ZK-216348 (Schacke et al., 2004)、LGD-5552 (Lopez et al., 2008; Miner et al., 2007)、Org 214007-0 (van Lierop et al., 2012)および

MK-5932 (Brandish et al., 2014; Bungard et al., 2011)のように、GRを介したTR活性とTA活性を分離することにより、抗炎症作用を維持し、副作用を低減させるSGRMの開発が数多く実施されてきた(Sundahl et al., 2015) (図1-6)。しかしながら、これらの化合物は臨床開発段階に至っていない。一方、mapracorat/ZK-245186/BOL-303242-X および AZD7594は局所投与SGRMとして臨床試験が実施されている(Baiula and Spampinato, 2014; Brown et al., 2019; Schacke et al., 2009; Zhang et al., 2009)。さらに経口投与可能なSGRMとしてfosdagrocorat/PF-04171327 および AZD9567 の臨床試験が行われている (Hegelund Myrbäck et al., 2020; Stock et al., 2009)。fosdagrocorat については、ランダム化臨床第1相試験において、反復投与の良好な忍容性および安全性プロファイルが示されている(Tammara et al., 2013)。安全性プロファイルに加え、fosdagrocoratは中等度から重度の関節リウマチ患者においてプレドニゾンと同等の有効性を示すことが報告されている(Buttgereit et al., 2019)。しかしこれまでに承認・上市に至った薬剤は存在しない。

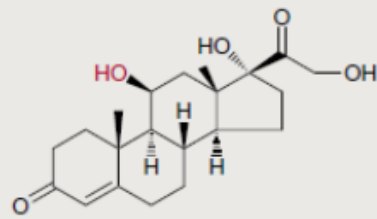
日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所において、同様の戦略で抗炎症作用を有し、副作用が低減している SGRM の開発を開始し、非ステロイド骨格を有する JTP-117968、(4b' S, 7' R, 8a' S)-4b'-benzyl-7'-hydroxy-N-(2-methylpyridin-3-yl)-7'-(trifluoromethyl)-4b', 6', 7', 8', 8a', 10'-hexahydro-5' H-spiro[cyclopropane-1, 9'-phenanthrene]-2'-carboxamide を見出した。JTP-117968 は、経口 SGRM として開発されていた fosdagrocorat の活性本体 PF-802、(4bS, 7R, 8aR)-4b-Benzyl-7-hydroxy-N-(2-methylpyridin-3-yl)-7-(trifluoromethyl)-4b, 5, 6, 7, 8, 8a, 9, 10-octahydrophenanthrene-2-carboxamide と類似構造を有する化合物である (図 1-7)。

本学位論文では、まず第2章において JTP-117968 の GR および他のステロイド受容体ファミリーへの作用を検討するとともに、本化合物の TR、TA 作用についてプレドニゾンや PF-802 との比較検討を実施した。続いて第3章において、JTP-117968 の抗炎症

作用について、マウス LPS チャレンジモデルおよび CIA モデルを用いて検討した。また第 4 章において、JTP-117968 の反復投与によるマウス大腿骨 BMD に及ぼす影響を検討するとともに、骨形成を負に制御する Dkk-1 の mRNA 発現に対する作用をヒト初代骨芽細胞において検討した。

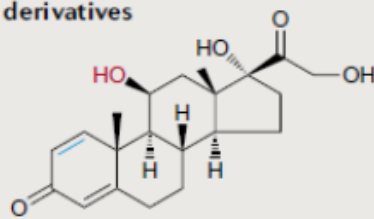
Short acting

Endogenously derived

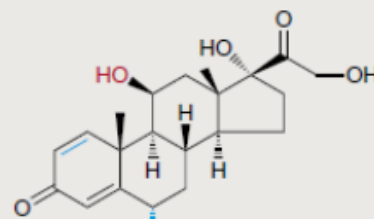


Cortisol (hydrocortisone)

Synthetic derivatives

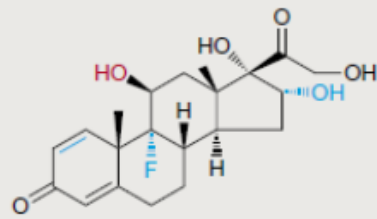


Prednisolone



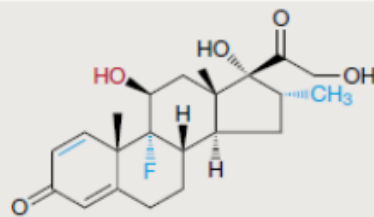
Methylprednisolone

Intermediate acting

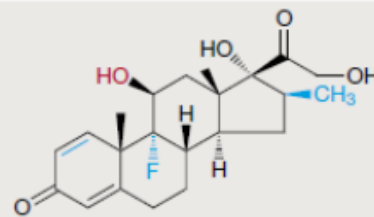


Triamcinolone

Long acting



Dexamethasone



Betamethasone

図 1-1. 主な既存グルココルチコイド(Hardy et al., 2020)

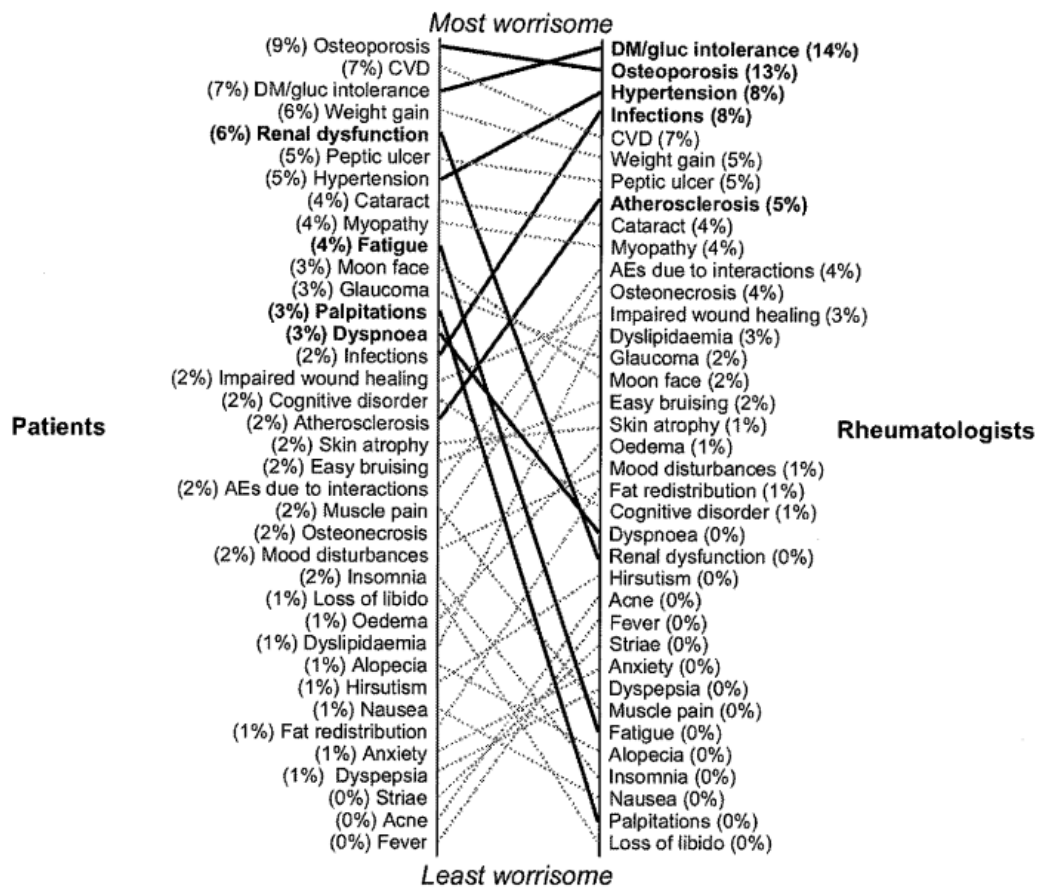


図 1-2. 全身投与グルココルチコイド使用時に問題となる副作用について（自己免疫疾患患者と膠原病専門医の立場より）（van der Goes et al., 2010）

表 1-1. グルココルチコイド剤型の代表例（河合，2009）

DDS		製剤例	特 徴
経口剤	錠 剤	各種錠剤	通常 1 錠中には成人副腎の 1 日分泌量に近い用量を含有
	散 剤	各種散剤	微量の減量に便利
	シロップ	リンデロンシロップ	小児用
坐 剤		リンデロン坐剤	潰瘍性大腸炎に適応
注射剤	水溶性剤	ソル・メドロール デカドロン注射液	パルス療法など大量投与可能 //
	懸濁剤	ケナコルト-A デボ・メドロール ハロアート	局注で持続効果 // 関節内投与のアンテドラッグ
	ターゲット製剤	リメタゾン	初めてのリボ製剤
外用剤	皮膚外用剤	各種軟膏，クリー ム，ローション バンドル	ステロイドの種類，剤形ともに多種類あり 皮膚外用のアンテドラッグ
	噴霧剤（鼻）	アルデシンAQ	噴霧剤のアンテドラッグ（点鼻液）
		フルナーゼ	// （ // ）
	（気管支）	フルタイド	// （エアソール）
	（口腔）	サルコート	// （ドライパウダー）
	点眼剤	各種点眼剤	
	口腔用剤	ケナログ アフタッチ	軟膏 付着型の錠剤
浸透性外用剤	ファルネラート・ ファルネゾン	外用剤だが関節に浸透して作用する	

表 1-2. グルココルチコイドの副作用と発現時期（河合，2009）

数時間から (大量投与)	数日から (中等量以上)	1～2 ヶ月 (中等量以上)	3 ヶ月以上 (少量でも)
高血糖 不整脈	高血圧 不整脈 高血糖 精神障害 浮腫	感染症(細菌) 無菌性骨壊死 骨粗鬆症 満月様顔貌 高脂血症 精神障害 緑内障 ステロイド筋症 消化性潰瘍 高血糖	感染症(ウイルス・結核) 満月様顔貌 二次性副腎不全 骨粗鬆症 高脂血症・動脈硬化 白内障・緑内障 ステロイド筋症 消化性潰瘍 高血糖

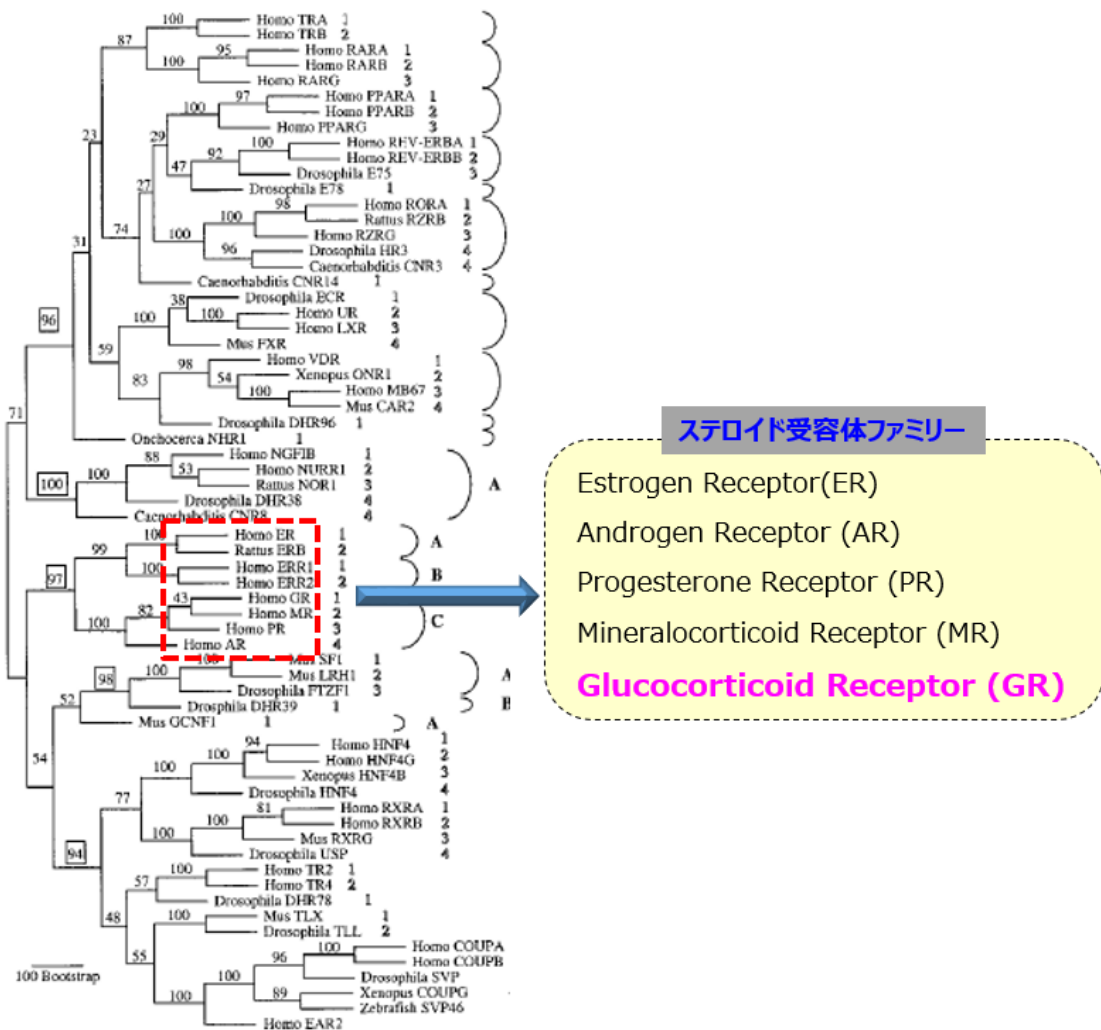


図 1-3. 核内受容体およびステロイド受容体ファミリー (Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999 一部改変)

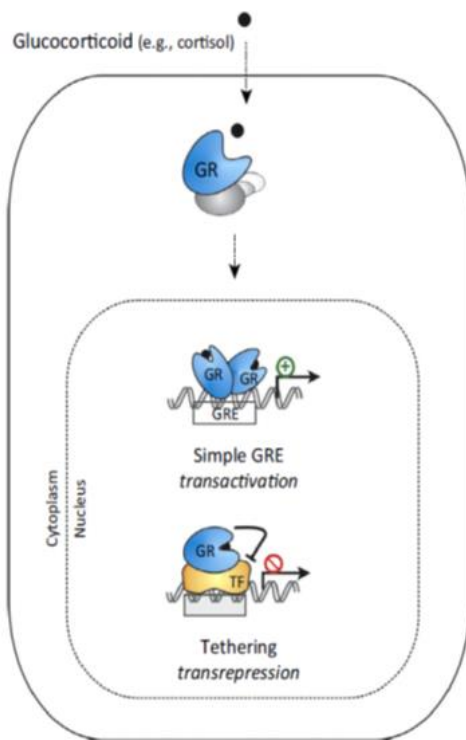


図 1-4. GR を介した TA および TR 作用メカニズム (De Bosscher et al., 2016)

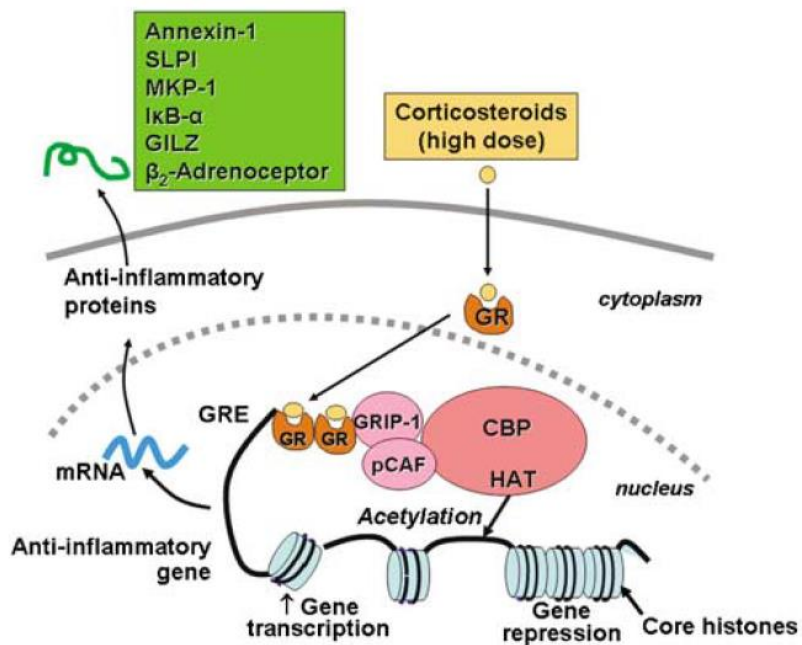


図 1-5. TA 作用による抗炎症タンパクの発現 (Barnes, 2006)

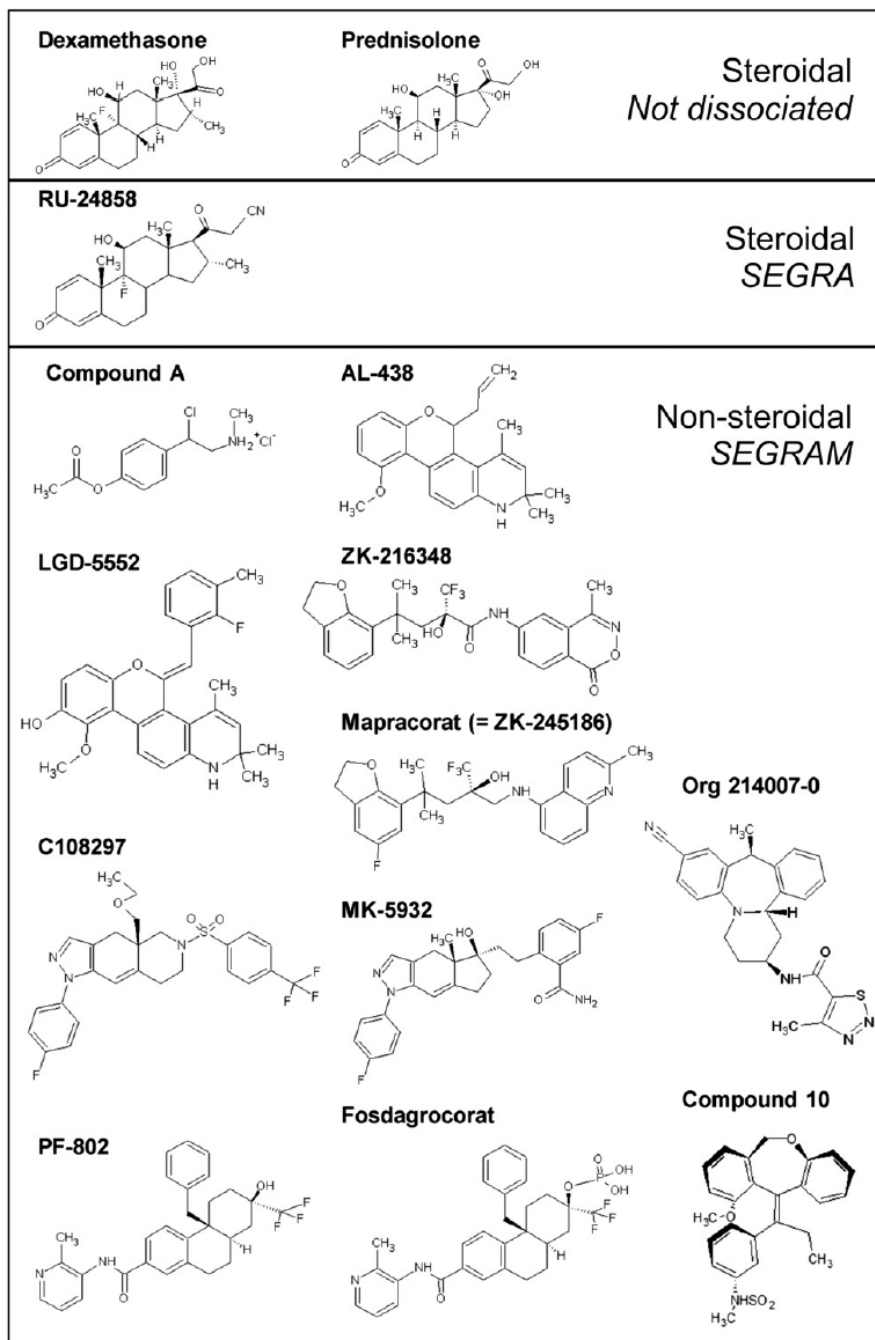


図 1-6. 合成グルココルチコイドと各種 SGRM の構造(Sundahl et al., 2015)

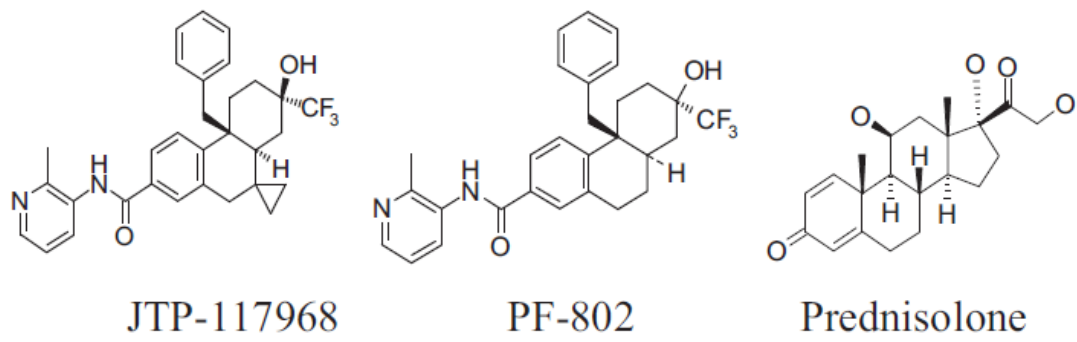


図 1-7. JTP-117968、PF-802 およびプレドニゾロンの構造

第2章 JTP-117968 の基本プロファイル

第1節 緒言

グルココルチコイドは GR を介して多くの遺伝子発現を制御する。GR の主要な作用メカニズムとして、GRE を介して mRNA 発現を活性化する TA と GRE 非依存的に転写因子の結合を阻害する TR が知られている。一般的にグルココルチコイドの抗炎症作用は主に TR を介して発揮される一方、問題となるグルココルチコイドの副作用の多くは TA により引き起こされると考えられている。最近数十年間において、GR を介した TR 活性と TA 活性を分離することにより、抗炎症作用を維持し、副作用を低減させる SGRM の開発が数多く実施されてきた (Sundahl et al., 2015)。本章においては新規 SGRM である JTP-117968 の基本プロファイルとして、GR および他のステロイド受容体ファミリーへの作用について検討を行うとともに、本化合物の TR、TA 作用についてプレドニゾロンや PF-802 との比較検討を実施した。

第2節 材料及び方法

化合物および試薬

JTP-117968およびPF-802は、日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所にて合成された。その他の化学物質については標準試薬を使用した。

核内受容体競合アッセイ

GR、PR、AR、ER α およびER β 競合アッセイは、PolarScreen™ competitor assay kits (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて添付のプロトコールに従い実施した。96ウェル黒色丸底プレートに被験物質存在下、それぞれの核内受容体タンパクに対応する蛍光リガンド (Fluormone™ トレーサー) を添加した。同プレートをシェーカーにて攪拌し、2時間以上インキュベート後、励起波長531 nmおよび蛍光波長595 nmにおける各ウェルの蛍光偏向値をマルチラベルリーダーEnvision™ (PerkinElmer)にて測定した。核内受容体タンパクとFluormone™ トレーサーの複合体に対して、被験物質がFluormone™ トレーサーを置換することで蛍光偏向値は低下する。被験物質の各核内受容体に対する親和性を蛍光偏向値の低下値より算出した。陽性対照化合物として、デキサメタゾン (GRアッセイ)、プロゲステロン (PRアッセイ)、テストステロン (ARアッセイ) およびエストラジオール (ER α およびER β アッセイ) を用いた。

MRレポータージーンアッセイ

被験物質のMRに対するアゴニスト/アンタゴニスト活性評価は、Human MR Reporter Assay System (Indigo Biosciences)を用いて添付のプロトコールに従い実施した。アゴニスト活性評価については、被験物質が添加された96ウェルアッセイプレートに、ルシフェラーゼcDNAが組み込まれたMRレポーター細胞を播種した。37°C、5%CO₂条件下にて、22~24時間培養後にSteady-Glo® Luciferase Assay System (Promega)を用いて調製した Steady-Glo® Reagentを各ウェルに添加した。ルシフェラーゼ活性は、マルチラ

ベルリーダーEnvision™にて測定した。陽性対照化合物としてアルドステロンを用いた。アンタゴニスト活性評価については、96ウェルアッセイプレートにて被験物質およびMRレポーター細胞を30分間培養後、アルドステロンを終濃度100 pMとなるように各ウェルに添加した。22~24時間培養後に、アゴニスト活性評価と同様の方法でルシフェラーゼ活性を測定した。陽性対照化合物としてスピロノラク톤を用いた。

A549細胞のIL-6産生

ヒト肺上皮細胞A549細胞(ATCC)は、100 U/mLペニシリン-ストレプトマイシン(Thermo Fisher Scientific Inc.)および10%非働化FBS(Moregate Biotech)を含有したHam's F12K培地(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)を用いて培養された。96ウェルカルチャープレートにA549細胞を 1×10^4 cells/ウェルとなるように播種し37°C、5%CO₂存在下にて一晩培養した。その後細胞を媒体(0.1%DMSO)または被験物質存在下で1時間培養し、3 ng/ml リコンビナントTNF α (R&D Systems)を添加後さらに20時間培養した。培養後得られた培養上清中のIL-6濃度測定は、Quantikine human IL-6 Immunoassay (R&D Systems)を用いて、添付のプロトコールに従い実施した。450 nmの波長における各ウェルの吸光度は、マルチプレートリーダーVERSAmix (Molecular Devices)を用いて測定した。1000 nMプレドニゾロンによるIL-6産生阻害を100%阻害、媒体(0.1% DMSO)による阻害を0%阻害と定義し、各濃度の被験物質の阻害率を算出した。

MMTVプロモーター活性化アッセイ

被験物質のMMTVプロモーター誘導活性評価について、MMTV発現A549細胞を用いて実施した。MMTVルシフェラーゼシステム(pGL4.36, Promega)を安定的に発現させたA549細胞を、100 U/mLペニシリン-ストレプトマイシン、150 μ g/mL ハイグロマイシン B (Sigma-Aldrich)および10%非働化FBSを含有したHam's F12K培地を用いて培養した。96ウェル黒色カルチャープレートに上記細胞を 5×10^3 cells/ウェルとなるように播種し、37°C、5%CO₂存在下にて一晩培養した。その後細胞を、媒体(0.1%DMSO)または被

験物質存在下で引き続き24時間培養した。培養終了後、Steady-Glo® ルシフェラーゼアッセイシステムに含まれるSteady-Glo® 試薬を各ウェルに添加した。ルシフェラーゼ活性は、マルチラベルリーダーEnvision™にて測定した。1000 nMプレドニゾロンによるMMTVプロモーター活性化を100%、媒体による活性化を0%と定義し、各濃度の被験物質の活性化率を算出した。

H4-II-EC3細胞におけるTAT活性評価

被験物質のTAT活性誘導作用評価について、ラット肝癌細胞株H4-II-EC3細胞 (ATCC) を用いて実施した。H4-II-EC3細胞を、100 U/mLペニシリン-ストレプトマイシン、5%非働化FBSおよび20%ウマ血清 (ATCC) を含有した高グルコースDMEM培地を用いて培養した。96ウェルカルチャープレートに上記細胞を 2×10^4 cells/ウェルとなるように播種し、37°C、5%CO₂存在下にて一晩培養した。各ウェルの細胞をPBSで1回洗浄後、媒体 (0.1%DMSO) または被験物質存在下で、100 U/mLペニシリン-ストレプトマイシン、10% charcoal stripped非働化FBS (Sigma) を含有した高グルコースDMEM培地を用いて引き続き約20時間培養した。培養終了後、PBSにて各ウェルを1回洗浄し、Glo Lysisバッファ (Promega) により細胞を溶解した。培養プレートを140 gにて5分間遠心して得られる細胞溶解液中のTAT活性を以下の通り測定した。96ウェル平底プレートの各ウェルに30 μLの上記細胞溶解液および150 μLの反応液 (5.2 mM L-tyrosine disodium, 10.8 mM α-ketoglutaric acid, 0.06 mM pyridoxal-5'-phosphate, 200 mM potassium phosphate buffer, pH7.4) を添加し、37°Cにて90分間インキュベートした。10N KOHを各ウェルに20 μL加え、室温にてさらに30分間インキュベートし反応を停止した。Lysisバッファのみのウェルをブランクウェルとし、各ウェルの331 nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーVERSAmixにて測定した。1000 nMプレドニゾロンによるTAT活性誘導を100%、媒体 (0.1% DMSO) による活性誘導を0%と定義し、各濃度の被験物質の活性誘導率を算出した。

ヒト初代培養肝細胞におけるTAT mRNA発現誘導評価

凍結保存されたヒト初代培養肝細胞をBiopredic社より購入し、実験に供した。HMM (Lonza) 中で凍結肝細胞を融解後、2.5% charcoal-stripped FBS含有HMMにて細胞懸濁液を調製した。BioCoat™ Collagen I 48-well plates (BD Biosciences)に 1×10^5 cells/ウェルとなるように細胞を播種し、37°C、5%CO₂存在下にて一晩培養した。培養上清を除去し、媒体 (0.1%DMSO) または被験物質を含む2.5% charcoal-stripped FBS含有HMMを添加し、引き続き24時間培養した。培養上清を除去し、Gene Elute Filtration Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)を用いて細胞中のtotal RNAを抽出した。定量的リアルタイムPCRは、Taqman® RNA-to-Ct™ 1-Step kits on StepOnePlus™ (Thermo Fisher Scientific Inc.)を用いて添付のプロトコールに従い実施した。Thermo Fisher Scientific Inc. より購入したプライマー/プローブ セット、TAT (Hs00356930_m1) および GAPDH (Hs99999905_m1) を実験に使用した。媒体添加時のヒトTAT mRNA発現を100%と定義し、媒体添加群に対する各濃度の被験物質のTAT mRNA発現誘導率を算出した。

マウス肝臓中TAT活性評価

動物実験方法については、事前に日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所における動物倫理委員会の承認を得た。雌性BALB/cマウスは日本エスエルシーから購入した。マウスは紫外線照射された水道水および通常飼料 (CRF-1 ; 日本チャールズリーバー株) を自由摂取させ、12時間の明暗周期 (明期 : 8~20時、暗期 : 20~8時)、温度 $23 \pm 3^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ に環境統御された飼育室で維持した。

In vivo における被験物質のTAT活性誘導作用評価について、以下の方法にて実施した。雌性BALB/cマウスへ被験物質を経口投与し、6時間後に各個体の肝臓を麻酔下にて採取した。また、血漿中の被験物質濃度測定のため血液を取得した。約50mgの肝臓組織を2 mLのホモジナイズバッファー (140 mM KCl in 20 mM KH₂PO₄ buffer, pH 7.4) に

浸漬し、Mixer Mill (Retsch) を用いて 30 Hz 条件下にて2分間ホモジナイズした。得られた肝ホモジネートを、4°C、14000 g条件下において20分間遠心後、上清30 μ Lを採取し、TAT活性測定に供した。TAT活性は、前述と同様の方法で測定した。同ホモジネート上清サンプルのタンパク濃度をPierce™ 660 nm Protein Assay (Thermo Scientific)を用いて測定し、各サンプルのタンパク量当たりのTAT活性を算出した。30 mg/kgプレドニゾン投与群のTAT活性を100%、媒体 (0.5%MC) 投与群のTAT活性を0%と定義し、各用量の被験物質のTAT活性誘導率を算出した。

被験物質のマウス血漿中および肝臓中濃度測定

雌性BALB/cマウスへ被験物質を経口投与した際の、血漿中および肝臓中濃度を測定した。肝臓サンプルは、前述の肝臓中TAT活性評価時と同様の方法で採取した。血漿および肝臓サンプルをそれぞれ2倍量のアセトニトリルと混合し、4°C、11000 g条件下において5分間遠心した。遠心上清中の被験物質の濃度をHPLC (Prominence UFLC XR; Shimadzu)付属MS apparatus(LC-MS2010A; Shimadzu)により測定した。

統計学的解析

各データは平均値±標準偏差にて表記した。統計解析には、統計ソフトウェア StatLight 2000 (Yukms Corp.)を用いた。2群間の比較において、F-test により等分散性が確認された場合、Student' s t-testを実施した。F-test により等分散性が確認されなかった場合、Welch' s t-testを実施した。多群間の比較において、Bartlett' s homoscedasticity testにより等分散性が確認された場合、Dunnett' s multiple comparison testを実施した。Bartlett' s homoscedasticity testにより等分散性が確認されなかった場合、Steel' s multiple comparison testを実施した。

第3節 結果

JTP-117968 の核内受容体への結合活性および作用評価

JTP-117968 の各種核内受容体への結合活性を評価した。JTP-117968 は、GR に対し既存グルココルチコイドの一つであるプレドニゾロンとほぼ同等の結合活性を示し、その IC₅₀ 値は 6.8 nM であった。JTP-117968 は、GR への結合活性と比較して弱いものの、プレドニゾロンと同様に PR に対して結合活性を示し、その IC₅₀ 値は 3400 nM であった。一方 JTP-117968 は、AR、ER α および ER β に対して、10000 nM までほとんど結合活性を示さなかった。また MR に対して、JTP-117968 は 1000 nM までアゴニストおよびアンタゴニスト作用をほとんど示さなかった。一方、プレドニゾロンは強力な MR アゴニスト活性を示し、その EC₅₀ 値は 1.4 nM であった (表 2-1)。

JTP-117968 は、新規経口 SGRM として臨床ステージで開発されていた fosdagrocorat の活性体である PF-802 と類似した構造を有している。そのため PF-802 についても核内受容体に対する結合活性評価を実施した。その結果、PF-802 は JTP-117968 と同等の GR および PR 結合活性を示し、その IC₅₀ 値はそれぞれ 2.7 nM および 1300 nM であった。また JTP-117968 と同様に、MR に対して 1000 nM までアゴニストおよびアンタゴニスト作用をほとんど示さなかった (表 2-1)。

JTP-117968 の *in vitro* における TR および TA 活性評価

まず、JTP-117968 の *in vitro* における TR 活性を調べるために、TNF α 刺激された A549 細胞の IL-6 産生に対する作用を評価した。JTP-117968 の TR 活性は、1000 nM においてプレドニゾロン 1000 nM の TR 活性と比較して約 50%の活性を示した。異なる実験において、10000 nM の JTP-117968 は、1000 nM とほぼ同等の TR 活性を示した (データには示していない)。PF-802 は、JTP-117968 と比較して約 100 倍低濃度から TR 活性を示した。一方 PF-802 は、JTP-117968 と比較して約 10%高い最大 TR 活性を示した (図 2-1)。

次に、JTP-117968 の *in vitro* における TA 活性を調べるために、MMTV/A549 レポータージーンアッセイを実施した。JTP-117968 は、プレドニゾン 1000nM の TA 活性に対して極めて低い活性を示し、その最大活性は約 10%であった (図 2-2)。一方 PF-802 は、以前の報告 (Hu et al., 2011) とは異なり、JTP-117968 と比較して明らかに強い TA 活性を示し、その最大 TA 活性は約 40%であった (図 2-2)。

続いて、JTP-117968 の *in vitro* における機能的な TA 活性を調べるために、肝癌細胞株を用いた TAT 誘導アッセイを実施した。本評価系においても、JTP-117968 はプレドニゾン 1000nM の TA 活性に対して極めて低い活性を示し、その最大活性は約 10%であった (図 2-3)。また PF-802 についても、上記のレポータージーンアッセイと同様に JTP-117968 と比較して明らかに強い TA 活性を示し、その最大 TA 活性は約 30%であった (図 2-3)。

ヒト初代培養肝細胞の TAT mRNA 発現に対する JTP-117968 と PF-802 の効果比較

これまでの細胞株を用いた検討に加え、ヒト初代肝細胞における JTP-117968 と PF-802 の TAT mRNA 誘導活性の比較を行った。いずれの化合物も、プレドニゾンと比較して TAT mRNA 誘導活性は低かった (図 2-4)。PF-802 は、媒体添加群に対して明らかな TAT mRNA 誘導活性を示した (1000 nM において、媒体添加群に対して 450%誘導)。JTP-117968 は、PF-802 と比較して非常に低い誘導活性を示した (1000 nM において、媒体添加群に対して 150%誘導) (図 2-4)。

In vivo TAT 活性に対する JTP-117968 と PF-802 の効果比較

In vivo における JTP-117968 と PF-802 の TA 活性比較を実施した。マウスへの JTP-117968 (100 mg/kg) を経口投与により、投与 6 時間後に得られる肝臓のホモジネート中の TAT 活性誘導はわずかに認められ、30 mg/kg プレドニゾンの誘導作用の約 10%であった。一方、PF-802 (30 mg/kg) の TAT 活性誘導作用は、30 mg/kg プレドニゾンの誘導作用の約 50%であった (図 2-5)。PF-802 の TAT 活性誘導作用は、1 mg/kg 以上

でほぼプラトーに達していた (図 2-6)。 *In vitro* における検討と同様に、JTP-117968 の *in vivo* TA 活性は PF-802 と比較して明らかに低下していた。

マウスにおける被験物質の血漿中および肝臓中薬物濃度

100mg/kg JTP-117968 投与 6 時間後におけるマウス血漿中の濃度は、30 mg/kg PF-802 投与時の濃度と比較して高かった (JTP-117968: 13 μ M, PF-802; 9.7 μ M)。JTP-117968 の血漿中濃度は、PF-802 と同様に投与 6 時間まで維持されていた一方、プレドニゾロンの濃度は投与後速やかに低下していた。JTP-117968 の肝臓組織と血漿中濃度比は、PF-802 およびプレドニゾロンと比較して高かった (表 2-2)。

表 2-1. JTP-117968 の各種核内受容体への結合親和性および機能評価

化合物	核内受容体結合 アッセイ 核内受容体					レポーター遺伝子 アッセイ MR	
	GR	PR	AR	ER α	ER β	アゴニ スト	アンタゴ ニスト
	IC50 (nM) ^a	IC50 (nM) ^a	IC50 (nM) ^b	IC50 (nM) ^c	IC50 (nM) ^c	EC50 (nM) ^d	IC50 (nM) ^d
JTP-117968	6.8	3400	>10000	>10000	>10000	>1000	>1000
PF-802	2.7	1300	>10000	>10000	>10000	>1000	>1000
Prednisolone	6.7	3700	>10000	NT	NT	1.4	NT
Dexamethasone	3.0	870	>10000	NT	NT	1.9	NT
Progesterone	NT	39	NT	NT	NT	NT	NT
Testosterone	NT	NT	20	NT	NT	NT	NT
Estradiol	NT	NT	NT	36	30	NT	NT
Aldosterone	NT	NT	NT	NT	NT	0.04	NT
Spirolactone	NT	NT	NT	NT	NT	NT	24

^a データは独立して duplicate で実施した 3 試験から算出した平均値を示す。

^b データは独立して duplicate で実施した 2 試験から算出した平均値を示す。

^c データは duplicate で実施した 1 試験の平均値を示す。

^d データは triplicate で実施した 1 試験の平均値を示す。

NT: not tested.

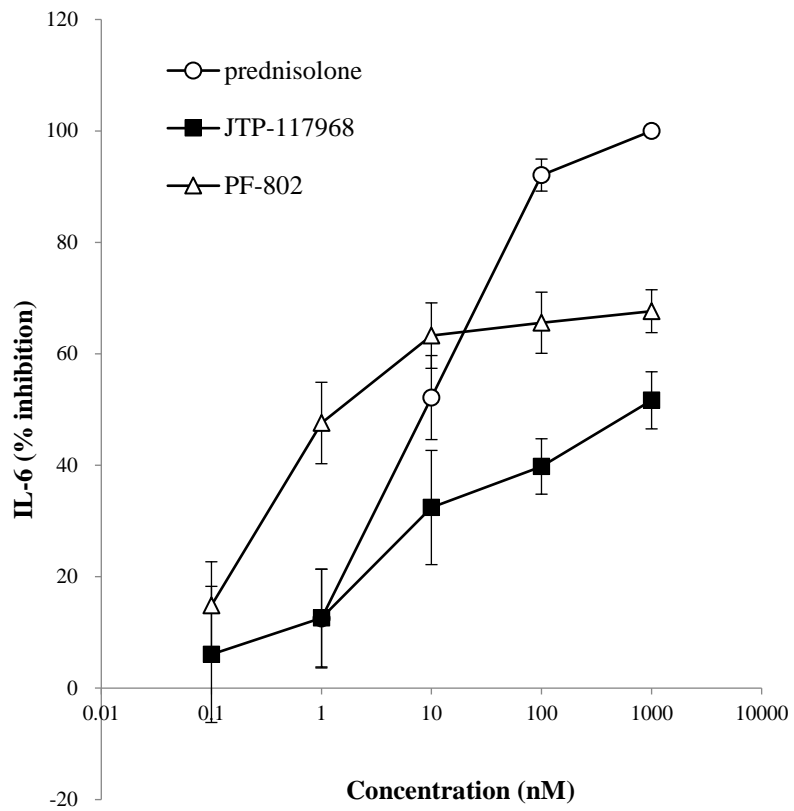


図 2-1. A549 細胞における TNF α 誘導性 IL-6 産生に対する JTP-117968 の作用
 データは triplicate で実施した 1 試験の平均値 \pm 標準偏差を示す。

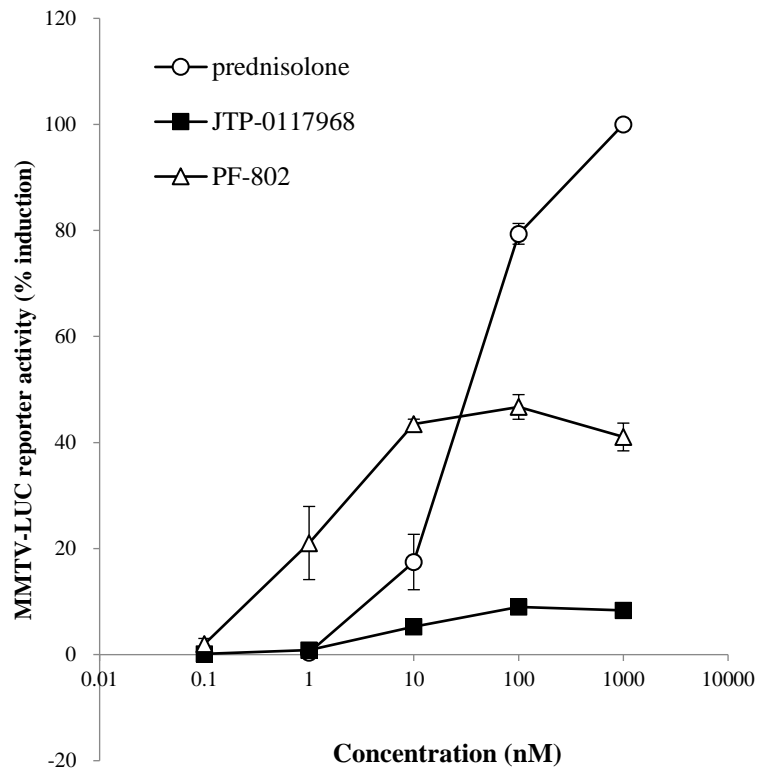


図 2-2. MMTV/A549 細胞における MMTV プロモーター活性に対する JTP-117968 の作用
 データは triplicate で実施した 1 試験の平均値±標準偏差を示す.

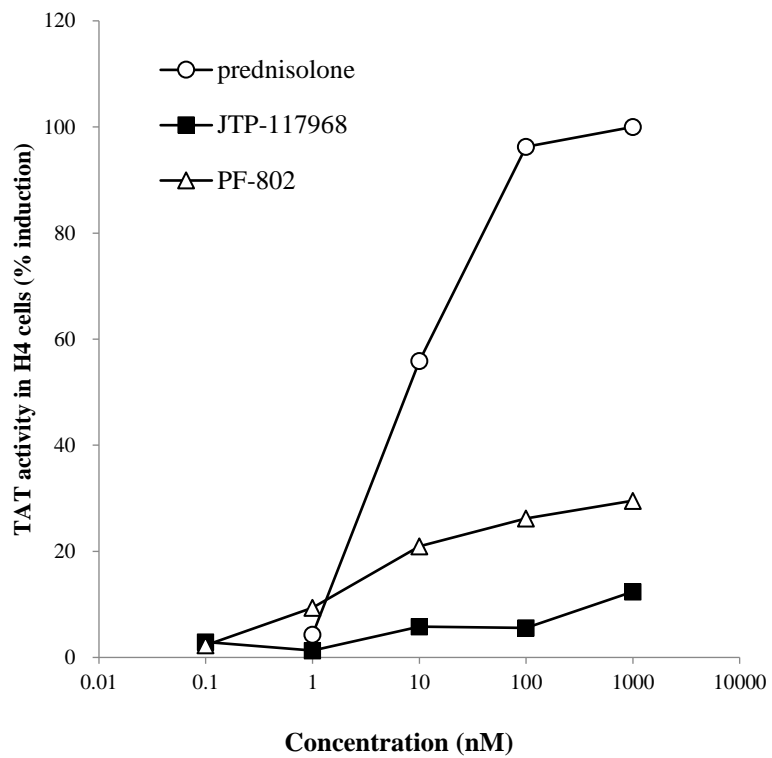


図 2-3. ラット肝癌細胞株における TAT 活性に対する JTP-117968 の作用
 データは独立して duplicate で実施した 2 試験から算出した平均値を示す.

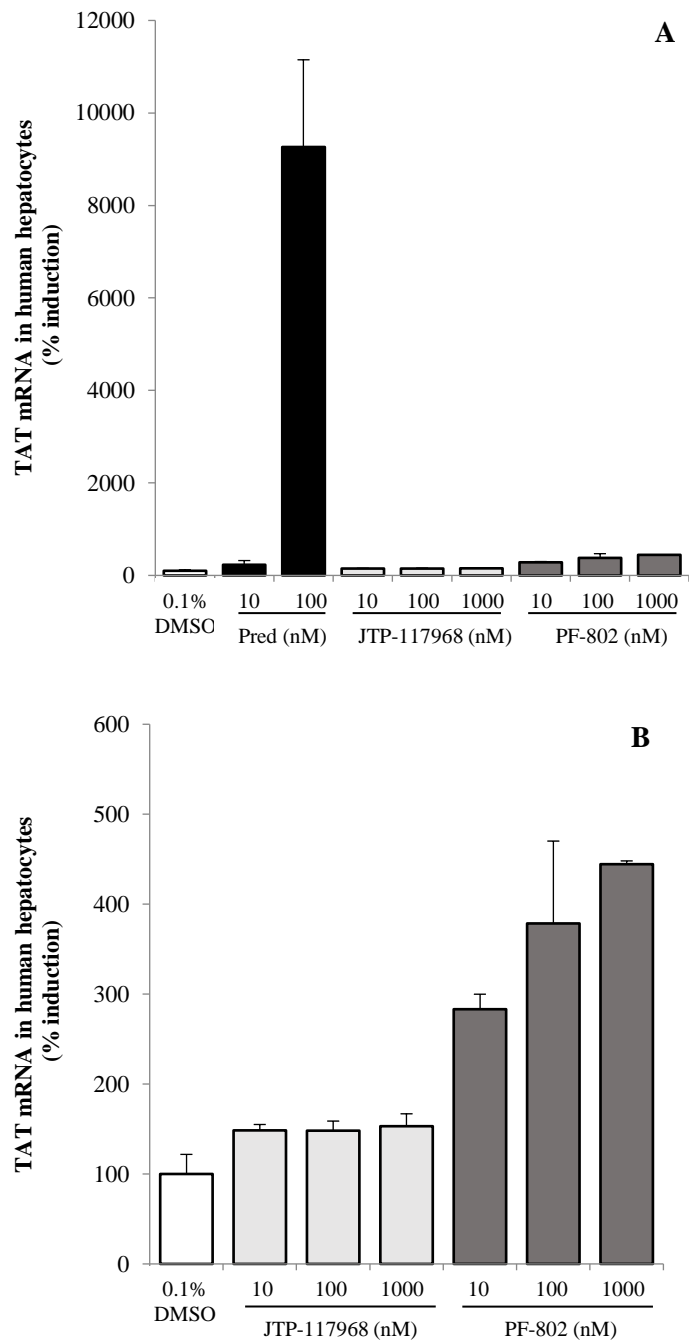


図 2-4. 初代ヒト肝細胞における TAT mRNA 発現に対する JTP-117968 と PF-802 の作用比較

データは独立して triplicate で実施した 2 試験の代表から算出した平均値±標準偏差を示す. Figure B. は、Figure A における 0.1% DMSO、JTP-117968 および PF-802 の作用について拡大して表示.

Pred: prednisolone.

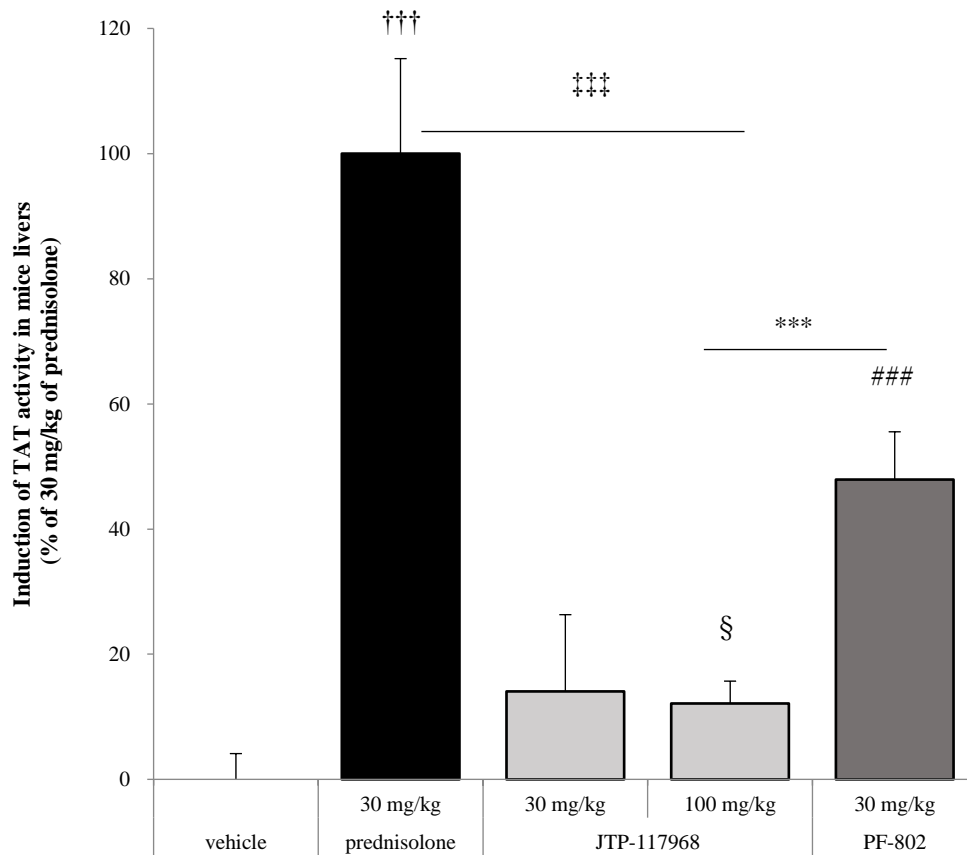


図 2-5. マウス肝臓中 TAT 活性に対する JTP-117968 と PF-802 の作用比較

データは平均値±標準偏差を示す (n=5) . ††† P <0.001 versus vehicle using Welch's t test. ### P <0.001 versus vehicle using Student's t test. § P <0.05 versus vehicle using Steel's test. ††† P <0.001 versus prednisolone at a dose of 100 mg/kg of JTP-117968 using Welch's t test. *** P <0.001 versus PF-802 at a dose of 100 mg/kg of JTP-117968 using Student's t test.

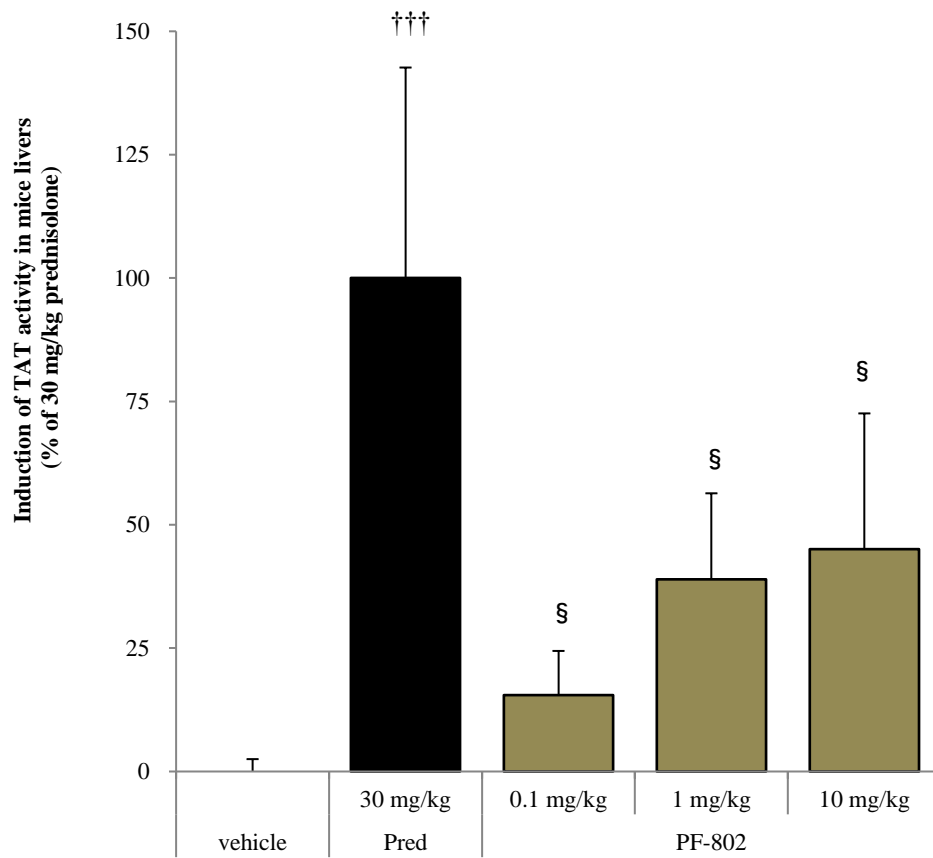


図 2-6. マウス肝臓中 TAT 活性に対する PF-802 の作用

データは平均値±標準偏差を示す (n=5) . †††P<0.001 versus vehicle in the Aspin-Welch t test. §P<0.05 versus vehicle in the Steel test.

Pred: prednisolone.

表 2-2 マウスにおける被験物質の血漿中および肝臓中薬物濃度

化合物	用量 (mg/kg)	投与後の血漿中濃度 (μM)			2.5 hr における肝臓中濃度 (μM)	2.5 h における肝臓中： 血漿中分布比
		1 hr	2.5 hr	6 hr		
JTP-117968	30	6.4 ^a	7.8 ± 0.8	7.0 ± 1.4	75.0 ± 9.1	9.6 ± 1.3
	100	NT	NT	12.5 ± 3.5	NT	NC
PF-802	0.1	NT	0.06 ± 0.006	0.06 ± 0.01	NT	NC
	1	NT	0.6 ± 0.07	0.6 ± 0.2	NT	NC
	10	NT	6.0 ± 0.6	NT	NT	NC
	30	13.6 ± 2.0	11.9 ± 0.6	9.7 ± 0.8	80.8 ± 8.2	6.8 ± 0.4
Prednisolone	10	4.6 ± 0.2	0.5 ± 0.1	ND	0.6 ± 0.2	1.2 ± 0.1

データは平均値±標準偏差を示す (n=3-5) .

^aデータは平均値を示す (n=2) .

NT: not tested, ND: not detected, NC: not calculated.

第4節 考 察

コルチゾール、プレドニゾンおよびデキサメタゾン等のグルココルチコイド製剤が臨床現場で使用されるようになってから長い年月が経過した。これらの薬剤はその強力な治療効果のため、今日においても種々の自己免疫・炎症疾患へ処方されている。しかしながら、グルココルチコイドは、糖尿病、骨粗鬆症、中心性肥満、筋萎縮および高血圧等数多くの副作用を引き起こす。吸入剤や軟膏剤といった局所グルココルチコイド製剤の普及によりこれらの副作用は減少した一方、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、自己免疫性肝炎およびネフローゼ症候群等多くの自己免疫疾患の治療を目的としてグルココルチコイド製剤の全身的投与は未だに必要とされる。グルココルチコイドの全身的投与は、前述の副作用発現のため使用方法が制限される。そのため、抗炎症・抗免疫作用は維持しつつ副作用が低減した SGRM は世界的に最も必要とされる薬剤の一つと考えられている。近年、ZK-216348(Schacke et al., 2004)、LGD-5552(Lopez et al., 2008; Miner et al., 2007)および Org 214007-0(van Lierop et al., 2012)のように GR を介した TR 作用が TA 作用よりも優位な SGRM の開発が数多く実施されてきたが、これまでに承認、上市に至った SGRM はない。

本章においては、新規 SGRM である JTP-117968 の基本プロファイルとして、GR および他のステロイド受容体ファミリーへの作用について検討を行うとともに、本化合物の TR、TA 作用についてプレドニゾンや PF-802 との比較検討を実施した。JTP-117968 は高選択性かつ強力な GR への結合活性を示した。既存のグルココルチコイドとは異なり、JTP-117968 は MR に対してアゴニストおよびアンタゴニスト活性のいずれも有していなかった(表 2-1)。そのため JTP-117968 を投与する際には、グルココルチコイドの MR を介した高血圧や電解質異常等の副作用(Frey et al., 2004)が低減されることが期待される。

続いて、GR リガンドの TR 活性評価系として汎用されているヒト TNF α 刺激による

A549 細胞の IL-6 産生評価系における JTP-117968 の作用を検討した。その結果、JTP-117968 は部分的な TR 活性を示し、その最大効果はプレドニゾン 1000 nM の TR 活性に対し約 50%であった (図 2-1)。一方、JTP-117968 の TA 活性について、TA 評価系として広く用いられている MMTV/A549 細胞評価系において検討した。その結果、JTP-117968 の TA 活性は非常に低く、その最大効果はプレドニゾン 1000 nM の TA 活性に対し約 10%であった (図 2-2)。続いて、H4-II-EC3 肝癌細胞株における TAT 評価系において、JTP-117968 の TA 活性を評価した。本評価系は TA 活性に基づく代表的な機能評価系の一つとして報告されている。検討の結果、先述の MMTV/A549 細胞評価系と同様に、JTP-117968 の TA 活性は非常に低く、その最大効果はプレドニゾン 1000 nM の TA 活性に対し約 10%であった (図 2-3)。これらの結果より、非ステロイド骨格を有する新規グルコルチコイド選択的リガンドである JTP-117968 は、プレドニゾンのような既存のグルコルチコイドと比較して TR/TA 活性の乖離が改善されていることが示された。

JTP-117968 は、すでに臨床第 2 相試験において開発されていた新規経口 SGRM である fosdagrocorat の活性体 PF-802 と類似構造を有している (Hu et al., 2011)。そこで、PF-802 の核内受容体への結合活性および TR/TA 活性について、JTP-117968 と比較検討した。検討の結果、PF-802 は JTP-117968 と同程度の GR への結合活性を示した (IC₅₀; 2.7 nM)。また PF-802 は PR に対して弱い結合活性を示す一方、AR や ER に対して結合活性を示さなかった。本化合物は、JTP-117968 と同様に、MR に対するアゴニスト、アンタゴニストいずれの活性も示さなかった (表 2-1)。PF-802 は、JTP-117968 よりも約 100 倍低濃度より TR 活性を示した一方、最大 TR 活性は JTP-117968 よりもわずかに高かった (図 2-1)。PF-802 の TR 活性は、以前 Hu らが、IL-1 β 刺激による A549 細胞の IL-6 産生評価系において報告している結果 (Hu et al., 2011) と類似していた。注目すべきことに、PF-802 の TA 活性は、MMTV/A549 レポーター遺伝子評価系および TAT 誘導

評価系において JTP-117968 と比較して明らかに高く、PF-802 はほとんど TA 活性を有さないとする Hu らの報告(Hu et al., 2011)と異なる結果が得られた(図 2-2、図 2-3)。さらに TA 活性評価に関して、肝癌細胞株のような不死化細胞よりも生理的であると考えられるヒト初代肝細胞を用いて、JTP-117968 と PF-802 の TAT mRNA 発現誘導活性を比較検討した。その結果、両化合物ともに、プレドニゾロンと比較すると非常に弱い TAT 発現誘導作用であったが、PF-802 は明らかに部分的 TA 活性を示した(図 2-4)。この結果は、以前 Hu らが報告している結果(Hu et al., 2011)と類似していた。一方、JTP-117968 は PF-802 と比較しても明らかに弱い TAT 発現誘導活性を示し、不死化細胞株を用いた検討と同様の結果が得られた(図 2-4)。最後に、JTP-117968 と PF-802 の *in vivo* における TA 活性の検討を行った。着目すべきことに、マウス肝臓における JTP-117968 の TA 活性は、プレドニゾロンと比較して大幅に低下していた(図 2-5)。一方、30 mg/kg の PF-802 投与群はプレドニゾロン投与群に対して約 50%の TAT 活性誘導作用を示した(図 2-5)。また PF-802 の用量反応性試験を実施した結果、マウス肝臓における TAT 活性に対して、これまでの *in vitro* 試験にて得られた結果と同様に、部分的アゴニスト活性を示すことが明らかとなった(図 2-6)。また、マウス血漿および肝臓中における JTP-117968 の濃度は 30 mg/kg PF-802 投与群のマウスにおける PF-802 の濃度と同レベルに達していた(表 2-2)。これらの結果より、JTP-117968 の低い *in vitro* TA 活性が、*in vivo* におけるプレドニゾロンや PF-802 に対する大幅な TA 活性の低下に寄与していると考えられた。

以上の結果より、非ステロイド骨格を有する新規 GR 選択的リガンドである JTP-117968 は部分的な TR 活性を維持しつつ、TA 活性が大幅に低下している化合物であることが明らかとなった。臨床第 2 相試験において開発されていた新規経口 SGRM である fosdagrocorat の活性体 PF-802 は、JTP-117968 と類似構造を有しているが、両化合物の最大 TR 活性は同等であった。注目すべきことに、JTP-117968 の TA 活性は *in vitro*

のみならず *in vivo* の試験においても PF-802 と比較して大幅に低下していた。これらの知見より、JTP-117968 が既存の SGRM と比較して良好な TR/TA 活性乖離を有する SGRM である可能性が示された。

第5節 要約

JTP-117968 の基本プロファイルを検討した結果、高選択的かつ強力な GR への結合活性を示した。既存のグルコルチコイドとは異なり、JTP-117968 は MR に対してアゴニストおよびアンタゴニスト活性のいずれも有していなかった。また JTP-117968 は、部分的な TR 活性を維持しつつ、TA 活性が大幅に低下している化合物であることが明らかとなった。JTP-117968 の TA 活性は *in vitro* のみならず *in vivo* の試験においても既存ステロイド並びに PF-802 と比較して大幅に低下していた。これらの知見より、JTP-117968 が既存 SGRM と比較して良好な TR/TA 活性乖離を有する SGRM である可能性が示された。

第3章 JTP-117968 のマウス LPS チャレンジモデルおよび CIA モデルにおける作用

第1節 緒言

第2章においては JTP-117968 の基本プロファイルとして、高選択的かつ強力な GR への結合活性に加え、部分的な TR 活性を維持しつつ TA 活性が大幅に低下している化合物であることを確認した。一般的にグルココルチコイドの抗炎症作用は主に TR を介して発揮される一方、一部の抗炎症性タンパクは TA 活性により誘導されることが報告されている (Barnes, 2006; Moreno, 1997; Reuter et al., 2012; Shipp et al., 2010)。本章においては、JTP-117968 の *in vivo* における TR 活性を評価するために、マウス LPS チャレンジモデルにおける作用を検討した。続いて JTP-117968 の炎症病態への作用を確認する目的で、マウス CIA モデルにおける薬効についてプレドニゾロンや PF-802 との比較検討を実施した。

第2節 材料及び方法

化合物および試薬

JTP-117968およびPF-802は、日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所にて合成された。その他の化学物質については標準試薬を使用した。

マウスLPSチャレンジモデルにおける抗炎症作用評価

動物実験方法については、事前に日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所における動物倫理委員会の承認を得た。マウスLPSチャレンジモデルにおける被験物質の抗炎症作用評価について、血漿中TNF α 産生量を指標に以下の方法にて実施した。雌性BALB/cマウスへ媒体（0.5%MC）あるいは被験物質を経口投与し、1時間後にPBSで溶解した*Escherichia coli* LPS (from strain 0111:B4, Sigma-Aldrich Co.)を各個体の静脈内に投与した。LPS投与90分後に血液を採取し、得られた血漿成分を-80°Cにて保存した。血漿中TNF α 量は、mouse TNF α Immunoassay (R&D systems) を用いて、添付のプロトコールに従い測定した。LPS投与を行わないマウスの血漿中において、TNF α は検出されなかった。

マウスコラーゲン誘発関節炎モデルにおける抗炎症作用評価

動物実験方法については、事前に日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所における動物倫理委員会の承認を得た。マウスコラーゲン関節炎モデルにおける被験物質の抗炎症作用評価について、山口ら (Yamaguchi et al., 2012) の方法に従い検討を行った。ウシ2型コラーゲン (Collagen Research Center) を0.01 Mの酢酸を用いて2 mg/mLとなるように溶解し、同容量の完全フロイントアジュバント (Difco Laboratories) と混合しエマルジョンを作成した。7週令の雄性DBA1/NCr1jマウスの尾根部に、上述のエマルジョンを2型コラーゲン量が100 μ gとなるように皮内投与を実施した (Day 1)。Day1より21日後に各個体の体重に基づいて各群9あるいは10匹となるように群分けを行い、2型コラーゲン量が100 μ gとなるように再度エマルジョンの皮内投与を実施した (Day 22)。

媒体 (0.5%MC) あるいは被験物質をDay22からDay35まで14日間連日経口投与を行った。各肢全体 (スコア0: 腫脹なし、スコア1: 部分的な腫脹、スコア2: 肢全体の腫脹)、各肢の指 (スコア0: 腫脹なし、1本の指腫脹、2本以上の指腫脹) についてのスコアを目視により判定して合算した各肢の関節炎スコアとし、四肢の関節炎スコアの平均値を各個体の関節炎スコアとした。スコアリングについては、ブラインド下にて実施した。

被験物質の最終投与翌日に、イソフルラン麻酔下にて腹部大動脈放血によりマウスを安楽死処置したのちに、各マウスより脾臓を採取した。トリミングされた脾臓の相対重量は、解剖時の体重および脾臓の絶対重量より算出した。

統計学的解析

各データは平均値±標準偏差にて表記した。統計解析には、統計ソフトウェア StatLight 2000 (Yukms Corp.) を用いた。2群間の比較において、F-testにより等分散性が確認された場合、Student' s t-testを実施した。F-testにより等分散性が確認されなかった場合、Welch' s t-testを実施した。多群間の比較において、Bartlett' s homoscedasticity testにより等分散性が確認された場合、Dunnett' s multiple comparison testを実施した。Bartlett' s homoscedasticity testにより等分散性が確認されなかった場合、Steel' s multiple comparison testを実施した。

第3節 結果

マウス LPS チャレンジモデルにおける JTP-117968 の作用

マウスへの LPS チャレンジより誘導される血漿中 TNF α 産生は、プレドニゾン等のグルココルチコイドにより抑制されること (Mihara et al., 2008)、グルココルチコイドの TR 作用の標的である NF κ B が LPS チャレンジによる TNF α 産生を主に制御していることが報告されている (Higuchi et al., 2006)。そこで、JTP-117968 の *in vivo* TR 活性を把握する目的で、LPS チャレンジによる TNF α 産生に対する作用を検討した。初めにプレドニゾンの作用を検討し、以前の報告と同様に用量に応じた TNF α 産生抑制作用を確認した (図 3-1)。続いて JTP-117968 の評価を実施した結果、LPS チャレンジによる TNF α 産生に対して、30 mg/kg および 100 mg/kg 投与群はいずれも有意な抑制作用を示し、媒体群に対する抑制率はそれぞれ 49% および 51% であった (図 3-2)。JTP-117968 の構造類似化合物である PF-802 は、副腎切除マウスへの LPS チャレンジによる TNF α 産生をほぼ完全に抑制することが報告されている (Hu et al., 2011)。そこで PF-802 の評価を検討した結果、30 mg/kg 投与群において有意な抑制作用を示し、媒体群に対する抑制率は 72% であった (図 3-2)。さらに PF-802 の用量反応性試験を実施した結果、以前の報告とは異なり抑制作用がほぼプラトーに達しており、最大効果はプレドニゾンと比較して明らかに低下していた (図 3-3)。

マウス CIA モデルにおける JTP-117968 の作用

既存グルココルチコイドが効果を示す慢性自己免疫疾患モデルにおける JTP-117968 の作用を検討した。マウス CIA モデルはヒトの関節リウマチと類似した病態を有する動物モデルであることが広く知られており、既存グルココルチコイドの投与により関節炎の進行が抑制されることが報告されている (Mihara et al., 2008; van Lierop et al., 2012)。そのため本モデルにおける JTP-117968 の薬効評価を実施した。まずプレドニゾンの効果を検討した結果、媒体投与群の経時的な関節炎スコアの上昇に対して報告と

同様に用量に応じた抑制作用を示し、Day 36 における媒体群に対する抑制率はそれぞれ7% (0.03 mg/kg 群)、70% (0.3 mg/kg 群) および93% (3 mg/kg 群) であった (図 3-4、図 3-5)。続いて JTP-117968 の評価を実施した結果、関節炎スコアの上昇に対して有意な抑制作用を示し、Day 36 における媒体群に対する抑制率はそれぞれ 51% (10 mg/kg 群) および80% (30 mg/kg 群) であった (図 3-6、図 3-7)。また PF-802 についてもプレドニゾンと同様に関節炎スコアの上昇抑制作用を示し、Day 36 における媒体群に対する抑制率はそれぞれ 42% (0.03 mg/kg 群)、89% (0.3 mg/kg 群) および97% (3 mg/kg 群) であった (図 3-4、図 3-5)。

マウス CIA モデルにおいて、関節炎スコアの上昇に伴い、脾臓の相対重量が増加することが報告されている (Kwon et al., 2014; Madan et al., 2012; Sohn et al., 2013)。そこで、本モデルにおける脾臓の相対重量に対する JTP-117968 の作用について追加検討を実施した。Day 36 における媒体群の脾臓相対重量は、正常動物群と比較して上昇しており、JTP-117968 の投与により脾臓相対重量の上昇が有意に抑制された。媒体群の脾臓相対重量の上昇に対する抑制率はそれぞれ 78% (10 mg/kg 群) および 107% (30 mg/kg 群) であった (図 3-8)。プレドニゾンおよび PF-802 も同様に用量に応じた脾臓相対重量上昇抑制作用が確認され、媒体群の脾臓相対重量の上昇に対する抑制率はそれぞれ 4% (0.03 mg/kg プレドニゾン群)、68% (0.3 mg/kg プレドニゾン群)、104% (3 mg/kg プレドニゾン群)、34% (0.03 mg/kg PF-802 群)、96% (0.3 mg/kg PF-802 群) および 132% (3 mg/kg PF-802 群) であった (図 3-9)。

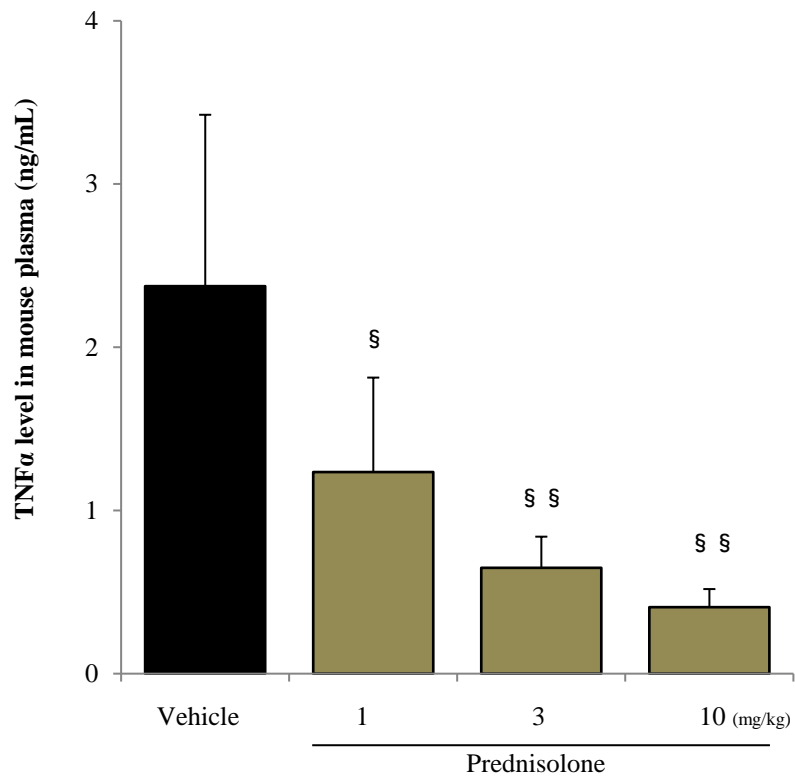


図 3-1. LPS チャレンジモデルにおける TNF α 産生に対するプレドニゾロンの作用
 データは平均値 \pm 標準偏差を示す (n=7) . § P <0.05 and §§ P <0.01 versus vehicle using Steel' s test.

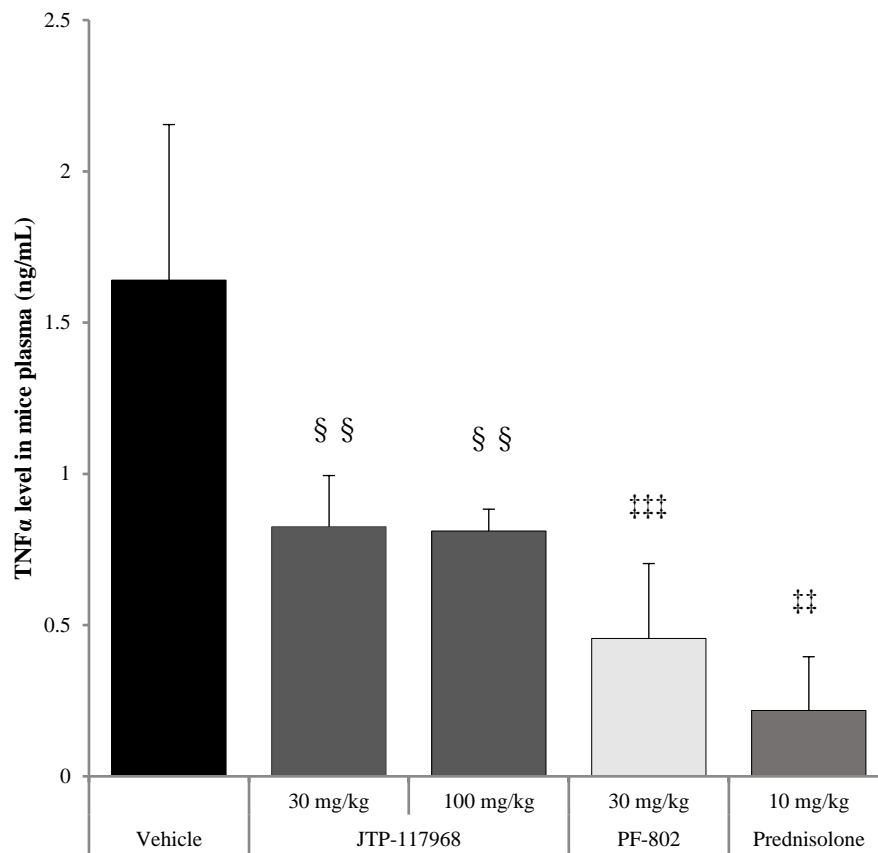


図3-2. LPSチャレンジモデルマウスにおけるTNF α 産生に対するJTP-117968の作用
 データは平均値±標準偏差を示す (n=3-7) . §§§ P <0.01 and §§§§ P <0.001 versus vehicle using Student's t -test. §§§ P <0.01 versus vehicle using Steel's test.

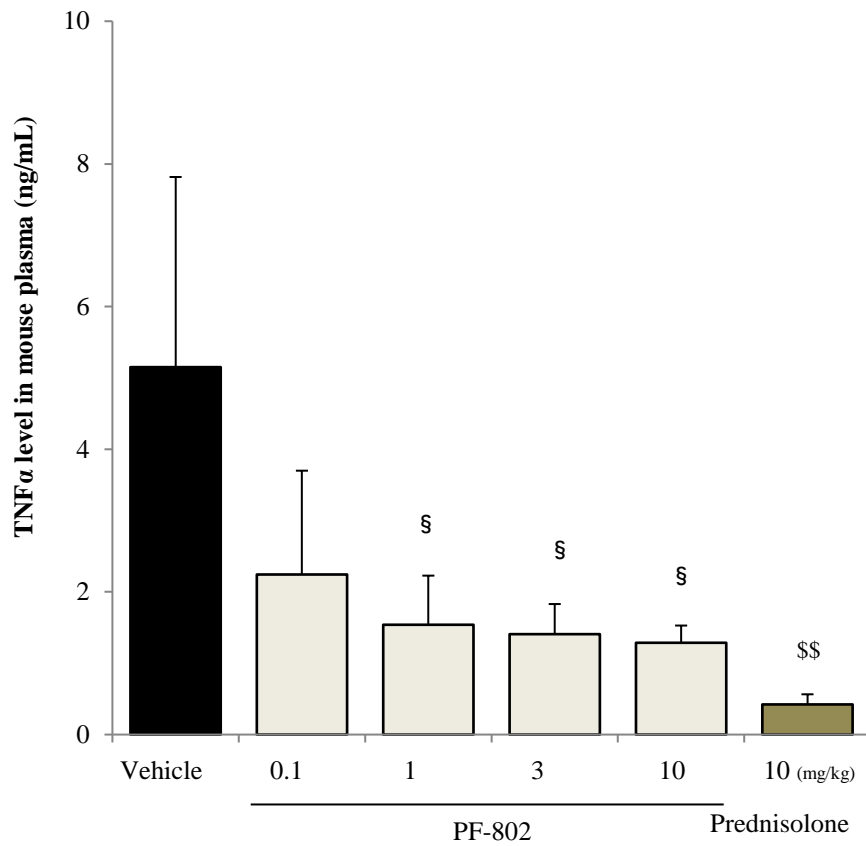


図3-3. LPSチャレンジモデルマウスにおけるTNF α 産生に対するPF-802の作用

データは平均値±標準偏差を示す (n=3-7) . \$\$ P <0.01 versus vehicle using Welch' s t -test. § P <0.05 versus vehicle using Steel' s test.

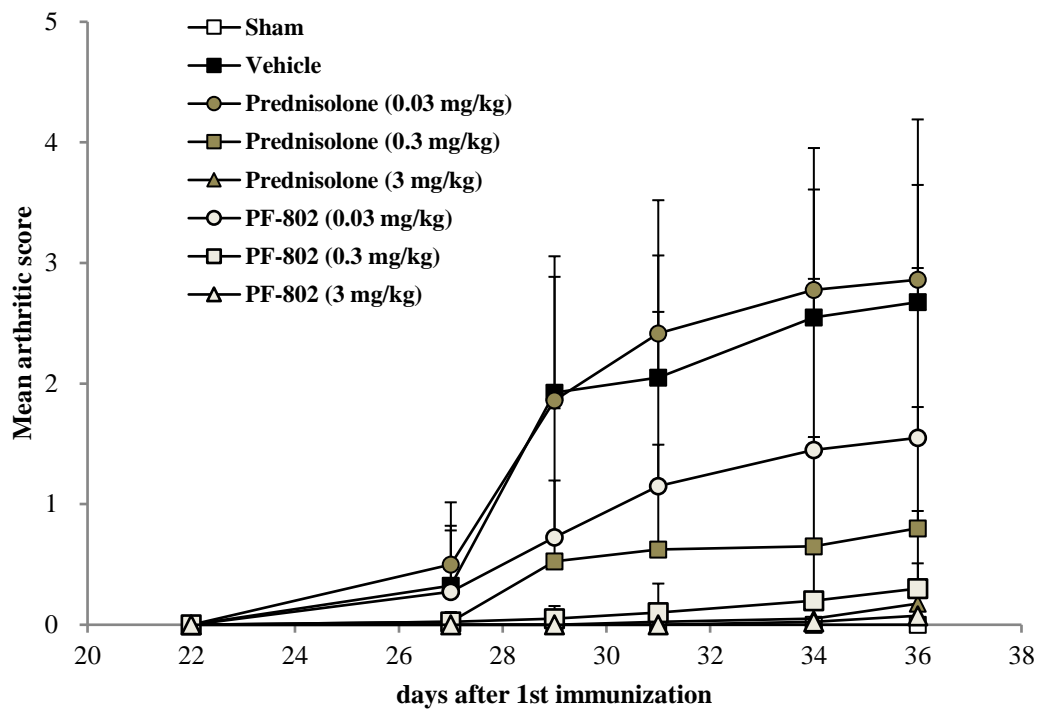


図 3-4. マウス CIA モデルにおける関節炎スコアに対するプレドニゾロンおよび PF-802 の作用（経時変化）
 データは平均値±標準偏差を示す（n=9-10）。

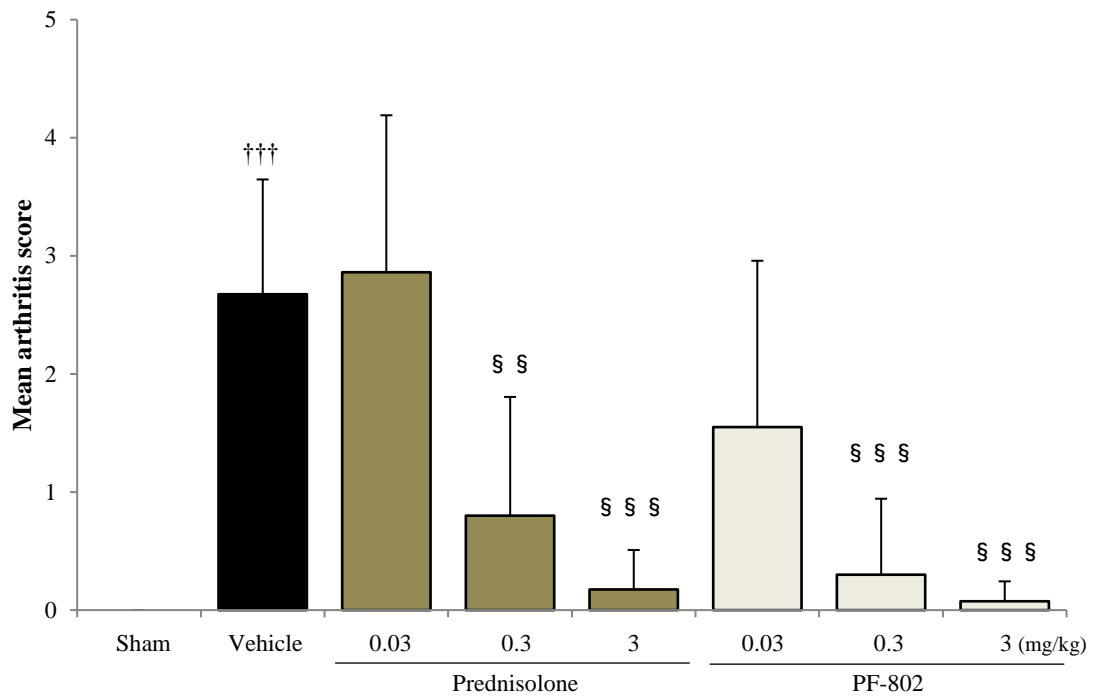


図 3-5. マウス CIA モデルにおける関節炎スコアに対するプレドニゾロンおよび PF-802 の作用 (Day36)

データは平均値±標準偏差を示す (n=9-10) . ††† P <0.001 versus sham using Welch' s t -test. §§ P <0.01, §§§ P <0.001 versus vehicle using Steel' s test.

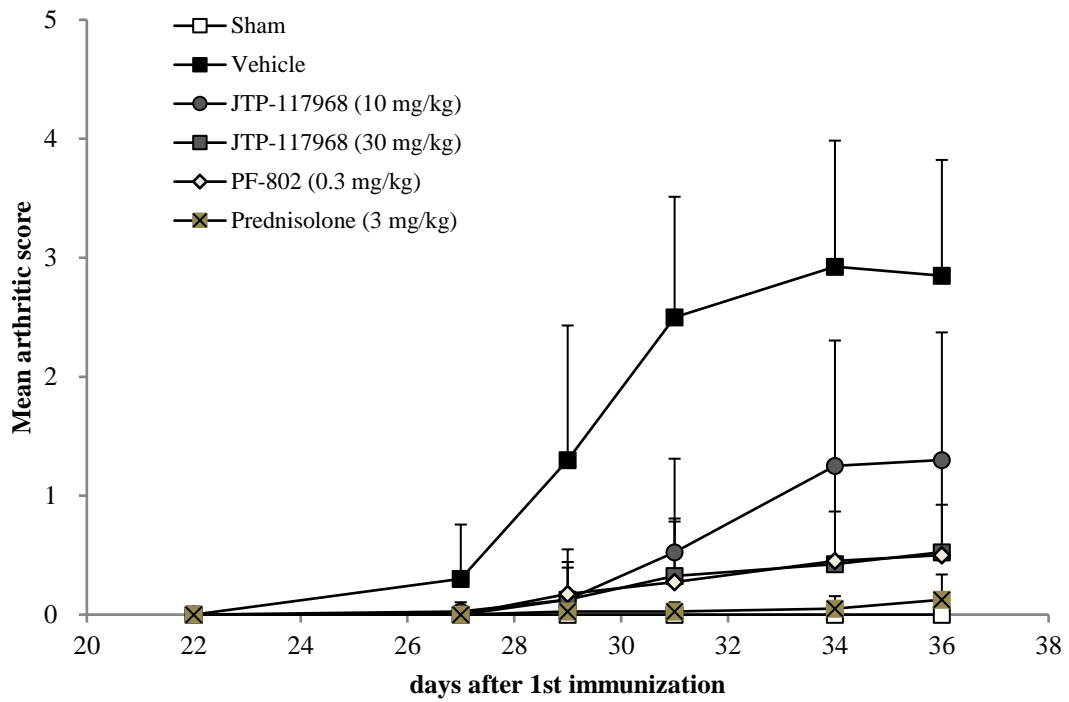


図 3-6. マウス CIA モデルにおける関節炎スコアに対する JTP-117968 の作用（経時変化）
 データは平均値±標準偏差を示す（n=10）。

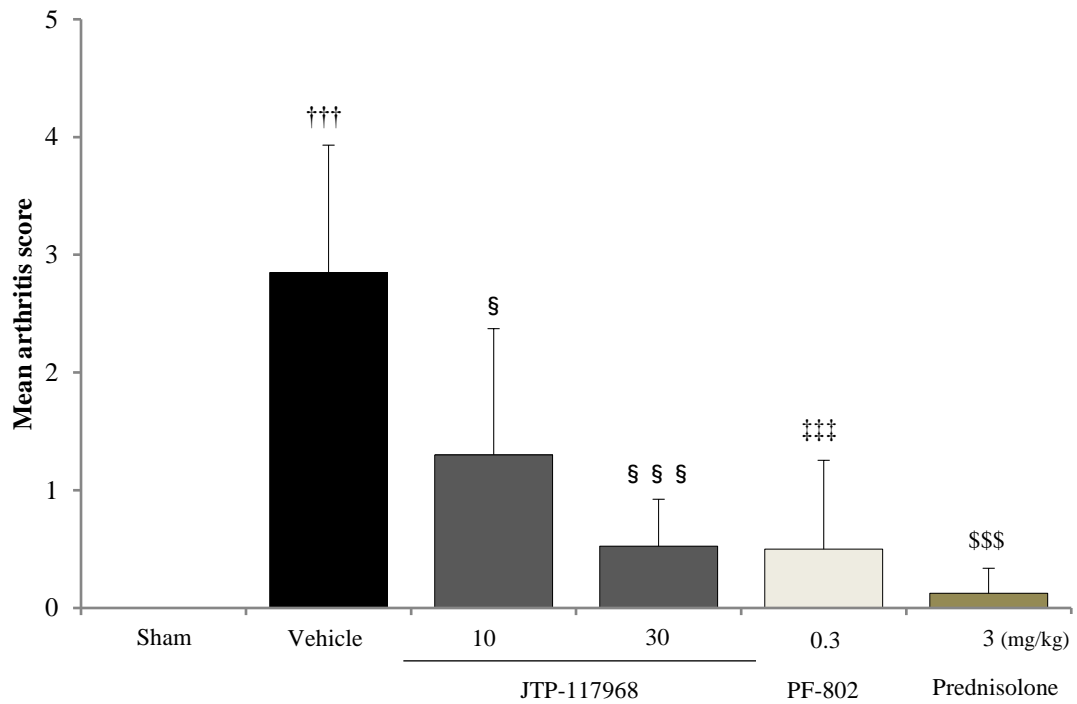


図 3-7. マウス CIA モデルにおける関節炎スコアに対する JTP-117968 の作用 (Day36)

データは平均値±標準偏差を示す (n=10) . ††† P <0.001 versus sham using Welch' s t -test. ††† P <0.001 versus vehicle using Student' s t -test. \$\$\$ P <0.001 versus vehicle using Welch' s t -test. § P <0.05, § § § P <0.001 versus vehicle using Steel' s test.

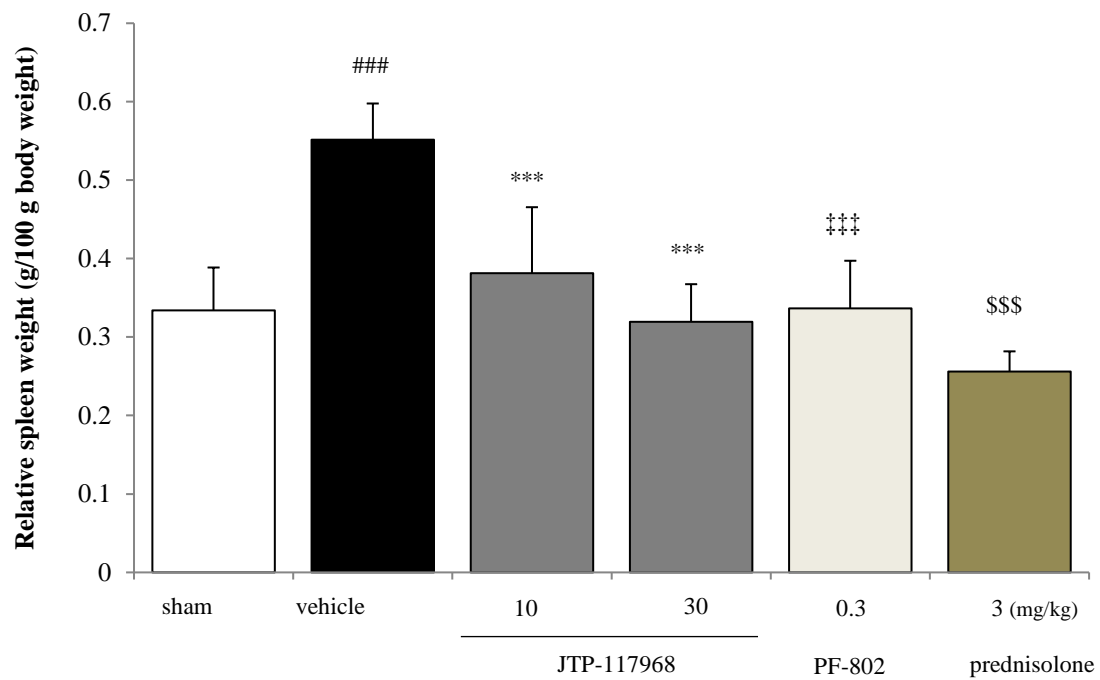


図 3-8. マウス CIA モデルにおける脾臓相対重量に対する JTP-117968 の作用

(Day36)

データは平均値±標準偏差を示す (n=10) .### $P<0.001$ versus sham using Student' s t -test. ††† $P<0.001$ versus vehicle using Student' s t -test. \$\$\$ $P<0.001$ versus vehicle using Welch' s t -test. *** $P<0.001$ versus vehicle using Dunnett' s test.

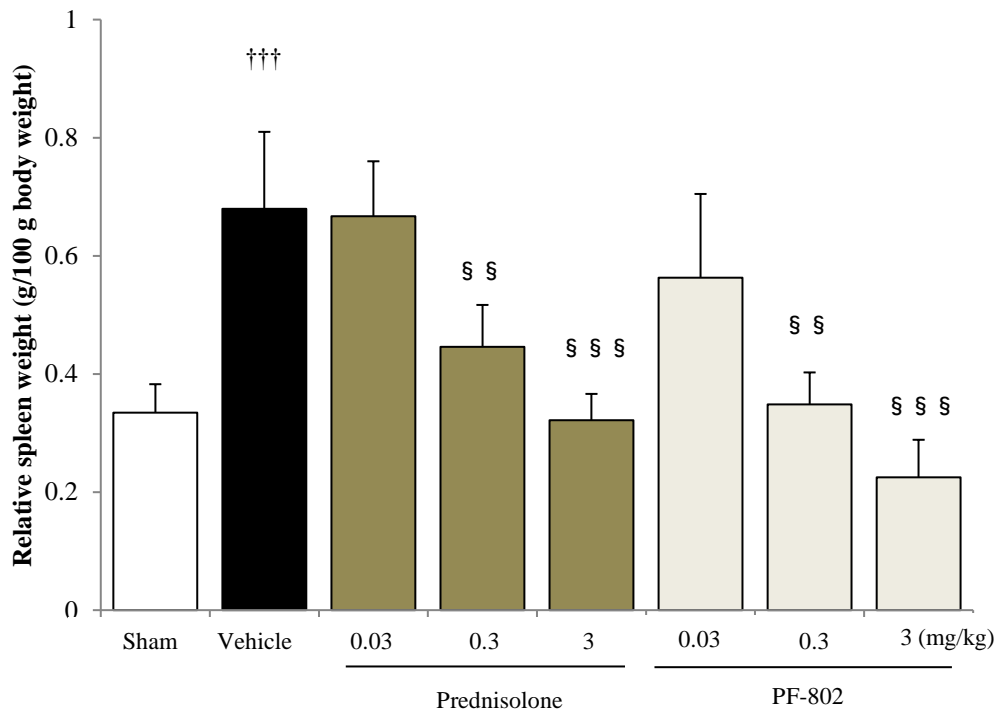


図 3-9. マウス CIA モデルにおける脾臓相対重量に対するプレドニゾロンおよび PF-802 の作用 (Day36)

データは平均値±標準偏差を示す (n=9-10) . ††† $P < 0.001$ versus sham using Welch' s t -test. § § $P < 0.01$, § § § $P < 0.001$ versus vehicle using Steel' s test.

第4節 考察

第2章においては JTP-117968 の基本プロファイルとして、部分的な TR 活性を維持しつつ、TA 活性が大幅に低下している化合物であることを確認した。一般的にグルココルチコイドの抗炎症作用は主に TR を介して発揮される一方、一部の抗炎症性タンパクは TA 活性により誘導されることが報告されている (Barnes, 2006; Moreno, 1997; Reuter et al., 2012; Shipp et al., 2010)。本章においては、まず JTP-117968 の *in vivo* における TR 活性を評価するために、マウス LPS チャレンジモデルにおける作用を検討した。

その結果、JTP-117968 は LPS 投与により誘導された TNF α 産生を有意に抑制し、30 mg/kg JTP-117968 の効果は、100 mg/kg JTP-117968 の効果と同等であることが明らかとなった (図 3-2)。マウスにおける LPS 投与による TNF α 産生の大部分は、TR 作用の主要な標的の一つである NF κ B を介して引き起こされることが知られている (Higuchi et al., 2006)。また 100 mg/kg JTP-117968 投与後のマウス血漿中濃度は、30 mg/kg JTP-117968 投与後の血漿中濃度よりも高いことが第2章において明らかとなっている (表 2-2)。これらの知見より、JTP-117968 が *in vitro* のみならず *in vivo* においても部分的な TR 活性を発揮することが示された。一方、PF-802 についても同様の検討を行った結果、PF-802 は LPS チャレンジモデルにおける TNF α 産生を阻害し、その最大効果は 10 mg/kg プレドニゾン群よりも低かった (図 3-3)。0.1mg/kg から 10 mg/kg にかけて PF-802 投与後の血漿中濃度は用量依存的に増加することも第2章において明らかとなっている (表 2-2)。以上より、PF-802 についても JTP-117968 と同様に *in vitro* のみならず *in vivo* においても部分的な TR 活性を発揮することが示唆された。

続いて JTP-117968 の炎症病態への作用を確認する目的で、マウス CIA モデルにおける薬効についてプレドニゾンや PF-802 との比較検討を実施した。マウス CIA モデルは、グルココルチコイドが抑制作用を発揮する慢性自己免疫疾患モデルとして知られて

いる。注目すべきことに、JTP-117968 は関節炎の進行に対してほぼ完全な抑制作用を示した (図 3-6、3-7)。JTP-117968 は、マウス CIA モデルにおいて、関節炎スコアに加え脾臓の相対重量増加に対して完全な抑制作用を示した (図 3-8)。PF-802 も同様に、関節炎の進行および脾臓の相対重量増加に対して、プレドニゾロンに匹敵する抑制効果を発揮した (図 3-4、3-5、3-9)。Mitogen-activated kinase phosphatase-1 や Annexin 1 などの抗炎症作用を有するタンパクは GR を介した TA 作用により誘導されることが報告されているが (Barnes, 2006; Moreno, 1997; Reuter et al., 2012; Shipp et al., 2010)、今回のマウス CIA モデルにおける検討より、TA 作用が著しく低下した JTP-117968 が既存のグルココルチコイドと同等の抗炎症作用を発揮することが示された。臨床試験において、fosdagrocorat は、関節リウマチ患者に対してプレドニゾロンと同等の有効性を示すことが報告されている (Buttgereit et al., 2019)。故に、部分的な TR 作用を保持している JTP-117968 は、既存グルココルチコイドと同様に関節リウマチに対する効果が期待できると考えられる。幅広い自己免疫疾患に対する効果を見積もるために、今回実施した関節炎モデルに加え、自然発症全身性ループスエリテマトーデスモデルや抗糸球体基底膜抗体誘発腎炎モデル等の動物モデルにおいて JTP-117968 の抗炎症作用を検討することが今後の課題である。

第5節 要約

JTP-117968 の *in vivo* における TR 活性を評価するために、マウス LPS チャレンジモデルにおける作用を検討した。その結果、JTP-117968 が *in vitro* のみならず *in vivo* においても部分的な TR 活性を発揮することが示された。PF-802 についても JTP-117968 と同様に *in vitro* のみならず *in vivo* においても部分的な TR 活性を発揮することが示唆された。続いて JTP-117968 の炎症病態への作用を確認する目的で、マウス CIA モデルにおける薬効についてプレドニゾロンや PF-802 との比較検討を実施した。JTP-117968 は、マウス CIA モデルにおいて、関節炎スコアに加え脾臓の相対重量増加に対して完全な抑制作用を示した。PF-802 も同様に、関節炎の進行および脾臓の相対重量増加に対して、プレドニゾロンに匹敵する抑制効果を発揮した。以上のことから、JTP-117968 は、既存グルココルチコイドと同様に抗炎症作用を発揮することが期待できると考えられる。

第4章 JTP-117968 のマウス BMD およびヒト骨芽細胞に対する作用

第1節 緒言

グルココルチコイドは、自己免疫・炎症性疾患の治療に幅広く処方されている一方、全身的に投与した際に、糖尿病、骨粗鬆症、中心性肥満および高血圧等多くの望まれない副作用を引き起こす(Schacke et al., 2002)。ヒトにおいて経口グルココルチコイドの連日使用により、使用期間中にBMDの低下ならびに急激な骨折リスクの増加が認められることが報告されている(van Staa et al., 2002) (図4-1)。本章においては、TA作用が大幅に低下しているJTP-117968の副作用を評価するために、骨代謝に対する作用を検討した。まず正常マウスの大腿骨BMDに対するJTP-117968の影響を検討した。続いてヒト初代骨芽細胞を用いて、骨形成を負に制御する分子の一つであるDkk-1のmRNA発現に対するJTP-117968の作用を検討した。

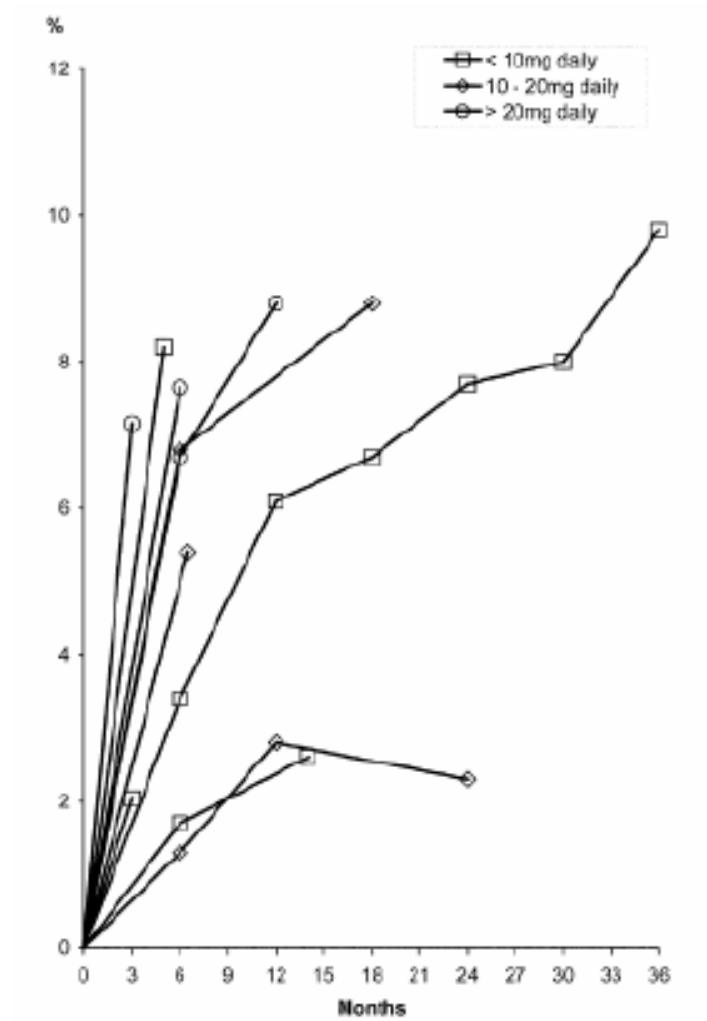


図 4-1. グルココルチコイド服用患者のBMD変化(van Staa et al., 2002)
 横軸は投与期間、縦軸はBMD減少量(%)を示す. mg; プレドニゾロン換算の投与量.

第2節 材料及び方法

化合物および試薬

JTP-117968およびPF-802は、日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所にて合成された。その他の化学物質については標準試薬を使用した。

正常BALB/cマウスのBMDに及ぼす28日間反復投与の影響評価

動物実験方法については、事前に日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所における動物倫理委員会の承認を得た。被験物質の反復投与によるBMDへ及ぼす影響について、Marenzanaら (Marenzana et al., 2011)の方法に従い検討を行った。12週齢の雌性BALB/cマウスに、媒体 (0.5%MC) あるいは被験物質を28日間連日経口投与した。最終投与日の翌日、イソフルラン麻酔下にて腹部大動脈放血によりマウスを安楽死処置したのちに、各マウスより左後肢を採取した。左後肢をトリミングして得られた各マウス大腿骨中のBMDについて、末梢骨QCT装置 LaTheta LCT-100A micro-CT scanner (Aloka)によりスライス厚1mmの条件下にて測定した。

ヒト初代培養骨芽細胞におけるDkk-1 mRNA発現誘導評価

凍結保存されたヒト初代培養骨芽細胞をPromoCell社 (Heidelberg, Germany)より購入し実験に供した。PromoCell Osteoblast Growth Medium中で凍結骨芽細胞を融解し、細胞懸濁液を調製した。24ウェルカルチャープレートに 3×10^4 cells/ウェルとなるように細胞を播種した。37°C、5%CO₂存在下にて8時間培養後、培養上清を除去し、媒体 (0.1%DMSO) または被験物質を含むPromoCell Osteoblast Basal Mediumを添加し、引き続き24時間培養した。培養上清を除去し、Gene Elute Filtration Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)を用いて細胞中のtotal RNAを抽出した。定量的リアルタイムPCRは、Taqman® RNA-to-Ct™ 1-Step kits on StepOnePlus™ (Thermo Fisher Scientific Inc.)を用いて添付のプロトコールに従い実施した。Thermo Fisher Scientific Inc.より購入したプライマー/プローブセット、Dkk-1 (Hs00183740_m1)

および GAPDH (Hs99999905_m1) を実験に使用した。媒体添加時のヒトDkk-1 mRNA発現を100%と定義し、媒体添加群に対する各濃度の被験物質のDkk-1 mRNA発現誘導率を算出した。

統計学的解析

各データは平均値±標準偏差にて表記した。統計解析には、統計ソフトウェア StatLight 2000 (Yukms Corp.)を用いた。2群間の比較において、F-test により等分散性が確認された場合、Student' s *t*-testを実施した。F-test により等分散性が確認されなかった場合、Welch' s *t*-testを実施した。多群間の比較において、Bartlett' s homoscedasticity testにより等分散性が確認された場合、Dunnett' s multiple comparison testを実施した。Bartlett' s homoscedasticity testにより等分散性が確認されなかった場合、Steel' s multiple comparison testを実施した。

第3節 結果

正常BALB/cマウスのBMDに及ぼすJTP-117968の28日間反復投与の影響

既存グルココルチコイドは、強い抗炎症作用を示すことから幅広い自己免疫および炎症性疾患に処方されている。しかし、長期投与により骨粗鬆症をはじめとした有害な副作用を引き起こすことが知られている。経口的なグルココルチコイド投与がBMDの低下および骨折リスクの増加の原因となることが報告されている (van Staa et al., 2002)。

第2章においてJTP-117968は、TA活性がプレドニゾロンと比較して大幅に低下していることが示されているため副作用が低減していることが期待される。マウスへの既存グルココルチコイドの反復投与により、臨床で認められるグルココルチコイド誘発骨粗鬆症と同様に大腿骨BMDが低下することが知られている (Marenzana et al., 2011; Thiele et al., 2012)。そのため正常マウス大腿骨のBMDに及ぼすJTP-117968の影響を検討した。

検討の結果、プレドニゾロンをマウスへ28日間反復投与することにより大腿骨BMDが低下することが確認され、媒体群に対する低下率はそれぞれ1.6% (0.3mg/kg群)、3.3% (3mg/kg群) および 7.0% (30mg/kg群) であった (図4-2、図4-3)。注目すべきことに、JTP-117968の反復投与によるマウス大腿骨におけるBMDの低下は全く認められず、媒体群に対する低下率はそれぞれ、-0.8% (3mg/kg群) および -1.4% (30mg/kg群) であった (図4-2、図4-3)。一方、PF-802はマウス大腿骨BMDを低下させる傾向が認められ、媒体群に対する低下率はそれぞれ-1.2% (0.03mg/kg群)、2.1% (0.3mg/kg群) および 3.0% (3mg/kg群) であった (図4-2、図4-3)。

ヒト初代骨芽細胞のDkk-1 mRNA発現に対するJTP-117968の作用

グルココルチコイド誘発骨粗鬆症は、主に骨芽細胞の骨形成を阻害することにより生じることが報告されている (Tamura et al., 2004)。ヒト骨芽細胞において、グルココルチコイドは骨形成を負に抑制する Dkk-1 の発現を TA メカニズムにより促進する

(Ohnaka et al., 2004; Wang et al., 2008)ため、ヒト初代骨芽細胞を用いて JTP-117968 の Dkk-1 mRNA 誘導活性を検討した。検討の結果、JTP-117968 はプレドニゾロンと比較して Dkk-1 mRNA 発現をほとんど上昇させなかった(1000 nMにおいて、媒体添加群に対して 134%誘導 (JTP-117968) および 1026%誘導 (プレドニゾロン)、図 4-4) 。また JTP-117968 は、PF-802 と比較して低い Dkk-1 mRNA 発現誘導作用を示した(1000 nMにおいて、媒体添加群に対して 170%誘導 (JTP-117968) および 258%誘導 (PF-802)、図 4-5)。

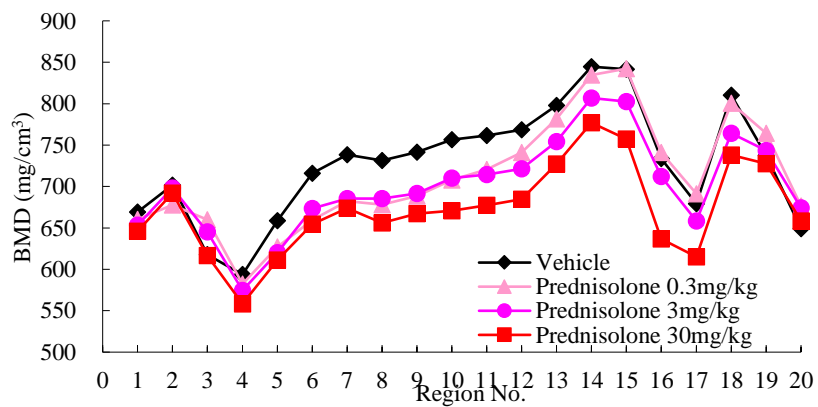
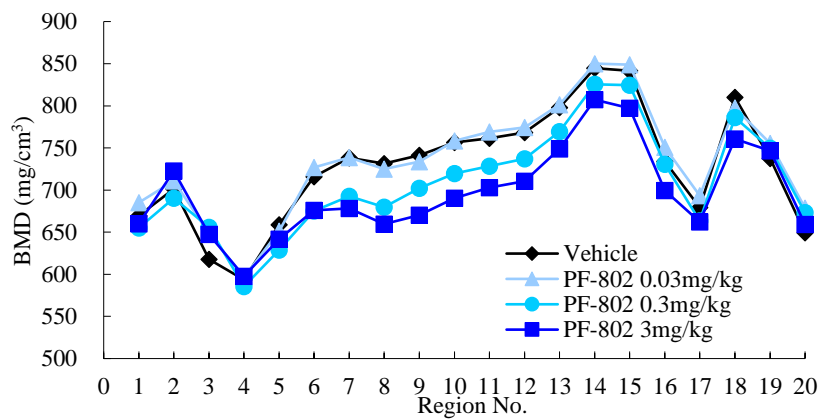
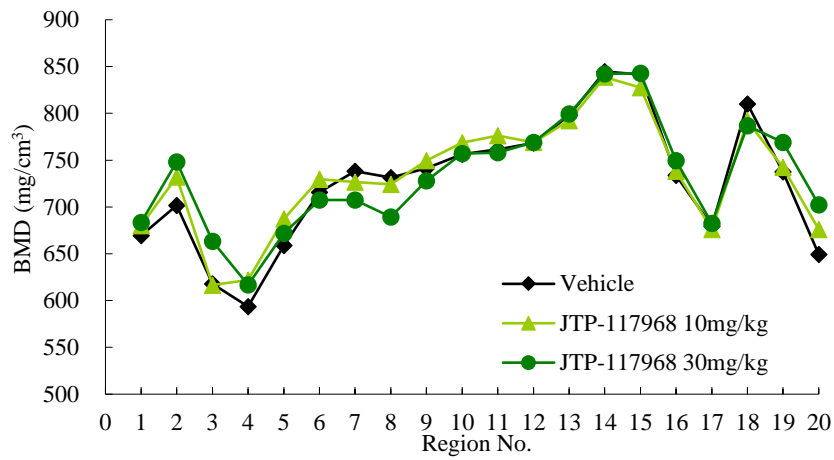


図 4-2. 正常マウス大腿骨 BMD に及ぼす JTP-117968 の 28 日間反復投与の影響 (20 分割解析)
 データは平均値を示す (n=10) .

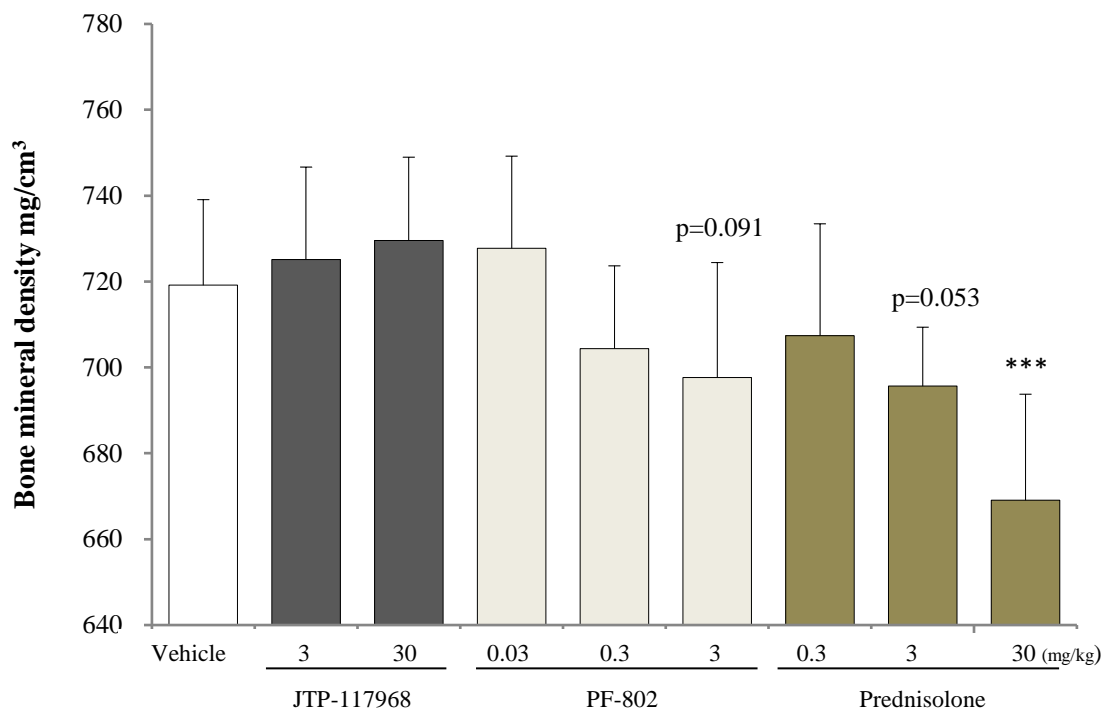


図 4-3. 正常マウス大腿骨 BMD に及ぼす JTP-117968 の 28 日間反復投与の影響 (全骨解析)

データは平均値±標準偏差を示す (n=10) .*** P <0.001 versus vehicle using Dunnett' s test. P =0.091 and P =0.053 versus vehicle also using Dunnett' s test.

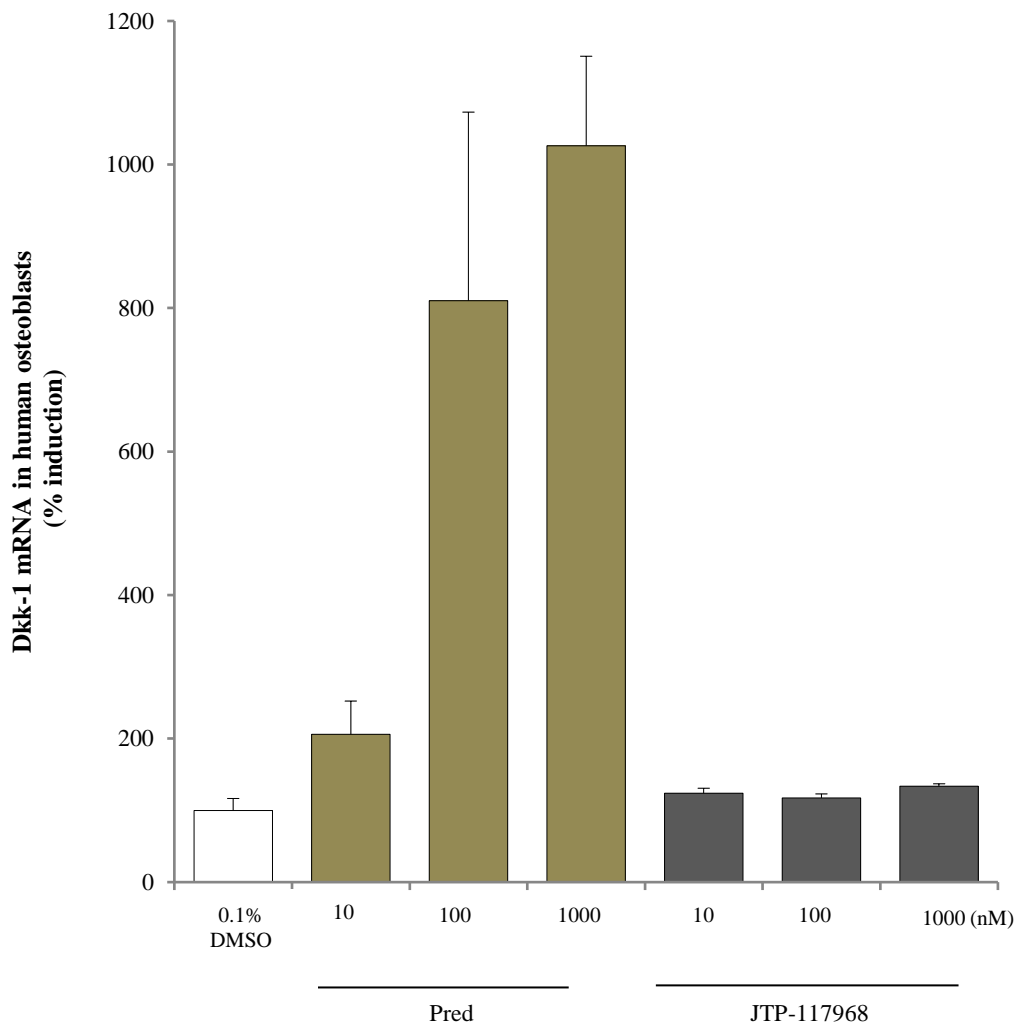


図4-4. 初代ヒト骨芽細胞のDkk-1 mRNA発現に対するJTP-117968の作用
 データは独立して triplicate で実施した 2 試験の代表から算出した平均値±標準偏差を示す.Pred: prednisolone.

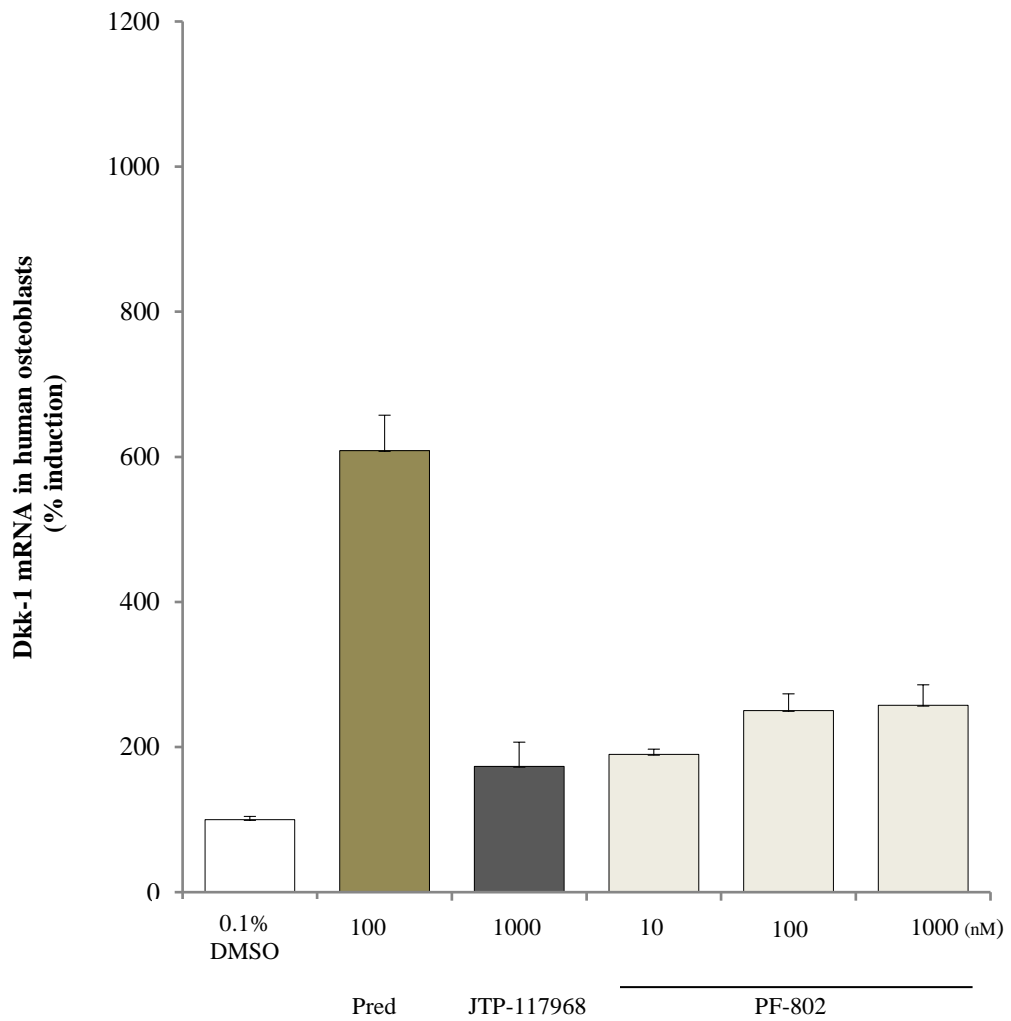


図4-5. 初代ヒト骨芽細胞のDkk-1 mRNA発現に対するPF-802の作用
 データは独立して triplicate で実施した 2 試験の代表から算出した平均値±標準偏差を示す.Pred: prednisolone.

第4節 考察

グルココルチコイドは強力な抗炎症作用を有しており、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、自己免疫性肝炎およびネフローゼ症候群等の自己免疫・炎症性疾患に幅広く処方されている。一方グルココルチコイドは、特に全身的に投与した際に、糖尿病、骨粗鬆症、中心性肥満および高血圧等多くの副作用を引き起こす(Schacke et al., 2002; van der Goes et al., 2010)。上述の副作用はグルココルチコイドの投与期間や投与量に応じて発現することから、使用する用量や投与期間に制限がかけられている。そのため、有益な抗炎症作用は維持され、副作用が低減した SGRM は、臨床現場より最も求められている薬剤の一つである。一般的にグルココルチコイドの抗炎症作用は主に TR を介して発揮される一方、問題となるグルココルチコイドの副作用の多くは TA により引き起こされると考えられている。最近数十年間において、GR を介した TR 活性と TA 活性を分離することにより、抗炎症作用を維持し、副作用を低減させる SGRM の開発が数多く実施されてきた(Sundahl et al., 2015)。

第3章においては、部分的な TR 活性を維持した JTP-117968 が、マウス CIA モデルにおいて、関節炎の進行および脾臓の相対重量増加に対して、プレドニゾロンに匹敵する抑制効果を発揮することを確認した。

本章においては、TA 作用が大幅に低下している JTP-117968 の副作用についてプレドニゾロン並びに PF-802 と比較検討した。ヒトにおいて経口グルココルチコイドの連日使用により、使用期間中に BMD の低下ならびに急激な骨折リスクの増加が認められることが報告されている(van Staa et al., 2002)。そのため副作用評価の一環として、正常マウスの大腿骨 BMD に対する化合物の影響を検討した。まずマウスへのプレドニゾロンの 28 日間反復経口投与を実施した結果、以前の報告(Marenzana et al., 2011)と同様に大腿骨の BMD が低下することが確認された(図 4-2、図 4-3)。注目すべきことに、マウス CIA モデルにおいて関節炎の進行をほぼ完全に抑制した JTP-117968 は、28 日間

反復経口投与後のマウス大腿骨の BMD をほとんど変化させなかった (図 4-2、図 4-3)。

一方、PF-802 はマウスの BMD を低下させる傾向が認められた (図 4-2、図 4-3)。

グルココルチコイド誘発骨粗鬆症は様々な原因によって生じるが、主なメカニズムとして、骨芽細胞による骨形成が減少することによって引き起こされると考えられている (Tamura et al., 2004)。またヒト骨芽細胞において、既存グルココルチコイドは、骨形成を負に制御する Dkk-1 の発現を TA 作用により増加させることが報告されている (Ohnaka et al., 2004; Wang et al., 2008)。JTP-117968 は、マウス大腿骨の BMD への影響がほとんど無かったため、本化合物のヒト初代骨芽細胞における Dkk-1 発現誘導活性を検討した。その結果、JTP-117968 はプレドニゾロンと比較して Dkk-1 mRNA 発現をほとんど誘導しなかった (図 4-4)。さらに JTP-117968 の Dkk-1 mRNA 誘導活性は、PF-802 と比べ低下していた (図 4-5)。

以上のことより、TA 活性が大幅に低下している JTP-117968 は、既存グルココルチコイド並びに既知の SGRM と比較してヒトにおける骨代謝に対する副作用の軽減が期待できると考えられた。

第5節 要約

グルココルチコイドは、特に全身的に投与した際に、糖尿病、骨粗鬆症、中心性肥満および高血圧等多くの副作用を引き起こす(Schacke et al., 2002; van der Goes et al., 2010)。問題となるグルココルチコイドの副作用の多くはTAにより引き起こされると考えられている。

本章においては、TA作用が大幅に低下しているJTP-117968の副作用についてプレドニゾロン並びにPF-802と比較検討した。マウスへの28日間反復経口投与を実施した結果、プレドニゾロンやPF-802とは異なりJTP-117968は、マウス大腿骨のBMDをほとんど変化させなかった。続いてヒト初代骨芽細胞を用いて、骨形成を負に制御する分子の一つであるDkk-1のmRNA発現に対するJTP-117968の作用を検討した。その結果、JTP-117968は、プレドニゾロンおよびPF-802と比較してDkk-1 mRNA発現をほとんど誘導しなかった。以上のことより、JTP-117968は、既存グルココルチコイド並びに既知のSGRMと比較してヒトにおける骨代謝に対する副作用が軽減される可能性が示唆された。

第5章 総括

グルココルチコイドは、長年にわたり関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、自己免疫性肝炎およびネフローゼ症候群等の自己免疫・炎症性疾患に幅広く処方されている。一方グルココルチコイドは、特に全身的に投与した際に、糖尿病、骨粗鬆症、中心性肥満および高血圧等多くの副作用を引き起こすことが問題とされている。グルココルチコイドの局所製剤の開発は、これらの副作用の大幅な低減に貢献しているものの、経口および注射製剤を用いたグルココルチコイドの全身的投与は多くの自己免疫疾患をコントロールするために必要とされている。上述の副作用により使用するグルココルチコイドの用量や投与期間に制限がかけられているため、有益な抗炎症作用は維持され、副作用が低減した SGRM は、臨床現場より最も求められている薬剤の一つとなっている。

最近数十年間において、GRを介したTR活性とTA活性を分離することにより、抗炎症作用を維持し、副作用を低減させるSGRMの開発が数多く実施されてきたが、これまでに承認・上市に至った薬剤は存在していない。日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所において、同様の戦略で抗炎症作用を有し、副作用が低減しているSGRMの開発を開始し、非ステロイド骨格を有するJTP-117968を見出した。JTP-117968は、経口SGRMとして開発されていたfosdagrocoratの活性本体PF-802と類似構造を有する化合物である。

本研究では、まず JTP-117968 の GR および他のステロイド受容体ファミリーへの作用について検討を行った。その結果、JTP-117968 は高選択的かつ強力な GR への結合活性を示すことが示された。また既存のグルココルチコイドとは異なり、JTP-117968 は MR に対してアゴニストおよびアンタゴニスト活性のいずれも有していないことが確認された。また JTP-117968 は、部分的な TR 活性を維持しつつ、TA 活性が大幅に低下している化合物であることが明らかとなった。JTP-117968 の TA 活性は *in vitro* のみならず *in vivo* の試験においても既存ステロイド並びに PF-802 と比較して大幅に低下していた。これらの知見より、JTP-117968 が既存 SGRM と比較して良好な TR/TA 活性乖離を

有する SGRM である可能性が示された。

続いて JTP-117968 の *in vivo* における TR 活性を評価するために、マウス LPS チャレンジモデルにおける作用を検討した。その結果、JTP-117968 が *in vitro* のみならず *in vivo* においても部分的な TR 活性を発揮することが示された。PF-802 についても JTP-117968 と同様に *in vitro* のみならず *in vivo* においても部分的な TR 活性を発揮することが示唆された。さらに JTP-117968 の炎症病態への作用を確認する目的で、マウス CIA モデルにおける薬効についてプレドニゾロンや PF-802 との比較検討を実施した。JTP-117968 は、マウス CIA モデルにおいて、関節炎スコアに加え脾臓の相対重量増加に対して完全な抑制作用を示し、プレドニゾロンに匹敵する抑制効果を発揮した。以上のことから、JTP-117968 は、既存グルココルチコイドと同様に抗炎症作用を発揮することが期待できると考えられる。

最後に、TA 作用が大幅に低下している JTP-117968 の副作用についてプレドニゾロン並びに PF-802 と比較検討した。マウスへの 28 日間反復経口投与を実施した結果、プレドニゾロンや PF-802 とは異なり JTP-117968 は、マウス大腿骨の BMD をほとんど変化させなかった。続いてヒト初代骨芽細胞を用いて、骨形成を負に制御する分子の一つである Dkk-1 の mRNA 発現に対する JTP-117968 の作用を検討した。その結果、JTP-117968 は、プレドニゾロンおよび PF-802 と比較して Dkk-1 mRNA 発現をほとんど誘導しなかった。以上のことより、JTP-117968 は、既存グルココルチコイド並びに既知の SGRM と比較してヒトにおける骨代謝に対する副作用が軽減される可能性が示された。

これらの結果より、良好な TR/TA 活性乖離を有する SGRM である JTP-117968 が、既存グルココルチコイドと比較して副作用が低減した免疫炎症疾患治療薬となる可能性を有していることが示唆された。

謝辞

研究結果のとりまとめ及び論文作成にあたり、終始懇切丁寧なご指導、ご鞭撻を賜りました本学 山田宜永教授に心より感謝致します。

また本論文をご精読頂き、貴重なご意見を頂戴しました本学 杉山稔恵教授、中野優教授、山城秀昭准教授、放送大学新潟学習センター 新村末雄所長、京都大学大学院 太田毅教授に深謝致します。

最後に博士号取得に向けて常に支援してくれた家族に深く感謝します。

引用文献

- Baiula, M., and Spampinato, S. (2014). Mapracorat, a novel non-steroidal selective glucocorticoid receptor agonist for the treatment of allergic conjunctivitis. *Inflamm Allergy Drug Targets* 13, 289-298.
- Barnes, P.J. (2006). How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *Br J Pharmacol* 148, 245-254.
- Brandish, P.E., Anderson, K., Baltus, G.A., Bai, C., Bungard, C.J., Bunting, P., Byford, A., Chiu, C.S., Cicmil, M., Corcoran, H., *et al.* (2014). The preclinical efficacy, selectivity and pharmacologic profile of MK-5932, an insulin-sparing selective glucocorticoid receptor modulator. *Eur J Pharmacol* 724, 102-111.
- Brown, M.N., Fuhr, R., Beier, J., Su, H.L., Chen, Y., Forsman, H., Hamren, U.W., Jackson, H., and Aggarwal, A. (2019). Efficacy and safety of AZD7594, an inhaled non-steroidal selective glucocorticoid receptor modulator, in patients with asthma: a phase 2a randomized, double blind, placebo-controlled crossover trial. *Respir Res* 20, 37.
- Bungard, C.J., Hartman, G.D., Manikowski, J.J., Perkins, J.J., Bai, C., Brandish, P.E., Euler, D.H., Hershey, J.C., Schmidt, A., Fang, Y., *et al.* (2011). Discovery of selective glucocorticoid receptor modulator MK-5932. *Bioorg Med Chem* 19, 7374-7386.
- Buttgereit, F., Strand, V., Lee, E.B., Simon-Campos, A., McCabe, D., Genet, A., Tammara, B., Rojo, R., and Hey-Hadavi, J. (2019). Fosdagrocorat (PF-04171327) versus prednisone or placebo in rheumatoid arthritis: a randomised, double-blind, multicentre, phase IIb study. *RMD Open* 5, e000889-e000889.
- De Bosscher, K., Beck, I.M., Ratman, D., Berghe, W.V., and Libert, C. (2016). Activation of the Glucocorticoid Receptor in Acute Inflammation: the SEDIGRAM Concept. *Trends Pharmacol Sci* 37, 4-16.
- Frey, F.J., Odermatt, A., and Frey, B.M. (2004). Glucocorticoid-mediated mineralocorticoid receptor activation and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13, 451-458.
- Hardy, R.S., Raza, K., and Cooper, M.S. (2020). Therapeutic glucocorticoids: mechanisms of actions in rheumatic diseases. *Nature reviews Rheumatology* 16, 133-144.
- Heglund Myrbäck, T., Prothon, S., Edman, K., Leander, J., Hashemi, M., Dearman, M., Edenro, G., Svanberg, P., Andersson, E.-M., Almquist, J., *et al.* (2020). Effects of a selective glucocorticoid receptor modulator (AZD9567) versus prednisolone in healthy volunteers: two phase 1, single-blind, randomised controlled trials. *The Lancet Rheumatology* 2, e31-e41.

- Higuchi, Y., Kawakami, S., Oka, M., Yabe, Y., Yamashita, F., and Hashida, M. (2006). Intravenous administration of mannosylated cationic liposome/NFkappaB decoy complexes effectively prevent LPS-induced cytokine production in a murine liver failure model. *FEBS Lett* 580, 3706-3714.
- Hu, X., Du, S., Tunca, C., Braden, T., Long, K.R., Lee, J., Webb, E.G., Dietz, J.D., Hummert, S., Rouw, S., *et al.* (2011). The antagonists but not partial agonists of glucocorticoid receptor ligands show substantial side effect dissociation. *Endocrinology* 152, 3123-3134.
- Kwon, O.G., Ku, S.K., An, H.D., and Lee, Y.J. (2014). The Effects of Platycodin D, a Saponin Purified from Platycodi Radix, on Collagen-Induced DBA/1J Mouse Rheumatoid Arthritis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014, 954508.
- Lopez, F.J., Ardecky, R.J., Bebo, B., Benbatoul, K., De Grandpre, L., Liu, S., Leibowitz, M.D., Marschke, K., Rosen, J., Rungta, D., *et al.* (2008). LGD-5552, an antiinflammatory glucocorticoid receptor ligand with reduced side effects, in vivo. *Endocrinology* 149, 2080-2089.
- Madan, B., Goh, K.C., Hart, S., William, A.D., Jayaraman, R., Ethirajulu, K., Dymock, B.W., and Wood, J.M. (2012). SB1578, a novel inhibitor of JAK2, FLT3, and c-Fms for the treatment of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 189, 4123-4134.
- Marenzana, M., Greenslade, K., Eddleston, A., Okoye, R., Marshall, D., Moore, A., and Robinson, M.K. (2011). Sclerostin antibody treatment enhances bone strength but does not prevent growth retardation in young mice treated with dexamethasone. *Arthritis Rheum* 63, 2385-2395.
- Mihara, K., Almansa, C., Smeets, R.L., Loomans, E.E., Dulos, J., Vink, P.M., Rooseboom, M., Kreutzer, H., Cavalcanti, F., Boots, A.M., *et al.* (2008). A potent and selective p38 inhibitor protects against bone damage in murine collagen-induced arthritis: a comparison with neutralization of mouse TNFalpha. *Br J Pharmacol* 154, 153-164.
- Miner, J.N., Ardecky, B., Benbatoul, K., Griffiths, K., Larson, C.J., Mais, D.E., Marschke, K., Rosen, J., Vajda, E., Zhi, L., *et al.* (2007). Antiinflammatory glucocorticoid receptor ligand with reduced side effects exhibits an altered protein-protein interaction profile. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19244-19249.
- Moreno, J.J. (1997). Antiflammins: endogenous nonapeptides with regulatory effect on inflammation. *Gen Pharmacol* 28, 23-26.
- Nuclear Receptors Nomenclature Committee (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97(2), 161-163
- Ohnaka, K., Taniguchi, H., Kawate, H., Nawata, H., and Takayanagi, R. (2004). G

- glucocorticoid enhances the expression of dickkopf-1 in human osteoblasts: novel mechanism of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun* 318, 259-264.
- Reuter, K.C., Loitsch, S.M., Dignass, A.U., Steinhilber, D., and Stein, J. (2012). Selective non-steroidal glucocorticoid receptor agonists attenuate inflammation but do not impair intestinal epithelial cell restitution in vitro. *PLoS One* 7, e29756.
- Sarett, L.H. (1946). Partial synthesis of pregnene-4-triol-17(beta), 20(beta), 21-dione-3,11 and pregnene-4-diol-17(beta), 21-trione-3,11,20 monoacetate. *J Biol Chem* 162, 601-631.
- Schacke, H., Docke, W.D., and Asadullah, K. (2002). Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther* 96, 23-43.
- Schacke, H., Schottelius, A., Docke, W.D., Strehlke, P., Jaroch, S., Schmees, N., Rehwinkel, H., Hennekes, H., and Asadullah, K. (2004). Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 227-232.
- Schacke, H., Zollner, T.M., Docke, W.D., Rehwinkel, H., Jaroch, S., Skuballa, W., Neuhaus, R., May, E., Zugel, U., and Asadullah, K. (2009). Characterization of ZK 245186, a novel, selective glucocorticoid receptor agonist for the topical treatment of inflammatory skin diseases. *Br J Pharmacol* 158, 1088-1103.
- Shipp, L.E., Lee, J.V., Yu, C.Y., Pufall, M., Zhang, P., Scott, D.K., and Wang, J.C. (2010). Transcriptional regulation of human dual specificity protein phosphatase 1 (DUSP1) gene by glucocorticoids. *PLoS One* 5, e13754.
- Sohn, K.C., Kang, S.J., Kim, J.W., Kim, K.Y., Ku, S.K., and Lee, Y.J. (2013). Effects of Calcium Gluconate, a Water Soluble Calcium Salt on the Collagen-Induced DBA/1J Mice Rheumatoid Arthritis. *Biomol Ther (Seoul)* 21, 290-298.
- Stock, T., Fleishaker, D., Mukherjee, A., Le, V., Xu, J., and Zeiher, B. (2009). Evaluation of safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of a selective glucocorticoid receptor modulator (SGRM) in healthy volunteers. Paper presented at: The 2009 ACR/ARHP Annual Scientific Meeting (Philadelphia, PA: Arthritis Rheum).
- Sundahl, N., Bridelance, J., Libert, C., De Bosscher, K., and Beck, I.M. (2015). Selective glucocorticoid receptor modulation: New directions with non-steroidal scaffolds. *Pharmacol Ther* 152, 28-41.
- Tammara, B., Miyoshi, S., and Hey-Hadavi, J. (2013). Pharmacokinetic and

- pharmacodynamic characterization of a dissociated agonist of glucocorticoid receptor, following Multiple Dose Administration In Healthy Japanese Adult Subjects. Paper presented at: 2013 ACR/ARHP Annual Meeting (San Diego, CA: Arthritis Rheum).
- Tamura, Y., Okinaga, H., and Takami, H. (2004). Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Biomed Pharmacother* 58, 500-504.
- Thiele, S., Ziegler, N., Tsourdi, E., De Bosscher, K., Tuckermann, J.P., Hofbauer, L.C., and Rauner, M. (2012). Selective glucocorticoid receptor modulation maintains bone mineral density in mice. *J Bone Miner Res* 27, 2242-2250.
- van der Goes, M.C., Jacobs, J.W., Boers, M., Andrews, T., Blom-Bakkers, M.A., Buttgereit, F., Caeyers, N., Choy, E.H., Cutolo, M., Da Silva, J.A., *et al.* (2010). Patient and rheumatologist perspectives on glucocorticoids: an exercise to improve the implementation of the European League Against Rheumatism (EULAR) recommendations on the management of systemic glucocorticoid therapy in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 69, 1015-1021.
- van Lierop, M.J., Alkema, W., Laskewitz, A.J., Dijkema, R., van der Maaden, H.M., Smit, M.J., Plate, R., Conti, P.G., Jans, C.G., Timmers, C.M., *et al.* (2012). Org 214007-0: a novel non-steroidal selective glucocorticoid receptor modulator with full anti-inflammatory properties and improved therapeutic index. *PLoS One* 7, e48385.
- van Staa, T.P., Leufkens, H.G., and Cooper, C. (2002). The epidemiology of corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis. *Osteoporos Int* 13, 777-787.
- Wang, F.S., Ko, J.Y., Yeh, D.W., Ke, H.C., and Wu, H.L. (2008). Modulation of Dickkopf-1 attenuates glucocorticoid induction of osteoblast apoptosis, adipocytic differentiation, and bone mass loss. *Endocrinology* 149, 1793-1801.
- Yamaguchi, T., Kakefuda, R., Tanimoto, A., Watanabe, Y., and Tajima, N. (2012). Suppressive effect of an orally active MEK1/2 inhibitor in two different animal models for rheumatoid arthritis: a comparison with leflunomide. *Inflamm Res* 61, 445-454.
- Zhang, J.Z., Cavet, M.E., VanderMeid, K.R., Salvador-Silva, M., Lopez, F.J., and Ward, K.W. (2009). BOL-303242-X, a novel selective glucocorticoid receptor agonist, with full anti-inflammatory properties in human ocular cells. *Mol Vis* 15, 2606-2616.
- 河合眞一 (2009). 研修医のためのステロイドの使い方のコツ (文光堂) .

Summary

Classic glucocorticoids, such as prednisolone and dexamethasone, are widely prescribed to treat diverse autoimmune and inflammatory diseases, including rheumatic arthritis and systemic lupus erythematosus. Conversely, classic glucocorticoids cause harmful side effects such as osteoporosis, diabetes, central obesity, hypertension and many others, particularly during systemic administration. The side effects mentioned above limit the dose and duration of treatment with classic glucocorticoids. Therefore, selective glucocorticoid receptor modulators (SGRMs), which retain beneficial anti-inflammatory effects but reduce the occurrence of side effects, are among the most anticipated drugs in the clinical field.

Glucocorticoids regulate a wide variety of gene expressions through glucocorticoid receptor (GR) which controls gene transcriptions via multiple and complex mechanisms. The assumption is that there are two major mechanisms of action of GR: one being via transactivation (TA), through activation of mRNA expression of various molecules such as tyrosine aminotransferase via glucocorticoid response elements (GRE), and the other via transrepression (TR), through interference in the binding of transcription factors, such as Nuclear Factor kappa B, to a transcription site of mRNA that is independent of GRE. Although several reports suggest that some anti-inflammatory proteins are induced by TA activity, it is generally believed that anti-inflammatory effects of classic glucocorticoids are largely due to TR, while the problematic side effects associated with classic glucocorticoids are mediated through TA.

Over the past few decades, numerous efforts have been made in the development of SGRMs that retain anti-inflammatory effects while minimizing side effects by favoring TR over TA activity via GR. One of the drug candidates, fosedagrocorat, has been developed clinically as an orally available SGRM that was reported to show efficacy in patients with moderate to severe rheumatoid arthritis comparable to prednisone. However, none of these SGRMs have been approved and marketed to date.

Recently, Central Pharmaceutical Research Institute within Japan Tobacco Inc. discovered JTP-117968, (4b' *S*, 7' *R*, 8a' *S*)-4b'-benzyl-7'-hydroxy-*N*-(2-methylpyridin-3-yl)-7'-(trifluoromethyl)-4b', 6', 7', 8', 8a', 10'-hexahydro-5' *H*-spiro[cyclopropane-1,9'-phenanthrene]-2'-carboxamide, a non-steroidal SGRM.

In the present study, we first confirmed that JTP-117968 showed highly selective and potent GR binding affinity. Unlike classic glucocorticoids, JTP-117968 had neither agonist nor antagonist activity against mineralocorticoid receptor. We also confirmed that JTP-117968 maintained partial TR activity while remarkably reducing the TA activity. The maximum TR efficacy of JTP-117968 was slightly lower than its structural analogue, PF-802, (4b*S*, 7*R*, 8a*R*)-4b-Benzyl-7-hydroxy-*N*-(2-methylpyridin-3-yl)-7-(trifluoromethyl)-4b, 5, 6, 7, 8, 8a, 9, 10-octahydrophenanthrene-2-carboxamide, which is the active form of fosedagrocorat. Notably, the TA activity of JTP-117968 was much weaker than those of prednisolone and PF-802.

Next, we evaluated the anti-inflammatory effect of JTP-117968 on a lipopolysaccharide (LPS) challenge model in mice. We confirmed that JTP-117968 showed the significant inhibitory effect on tumor necrosis factor α release

elicited in LPS-injected mice and exhibited partial TR activity in *in vivo* experiments in line with the result from *in vitro* assay.

Then, we also evaluated the effect of JTP-117968 on the mouse collagen-induced arthritis (CIA) model. Remarkably, JTP-117968 showed an almost completely suppressive effect against the development of arthritis. In addition to the arthritis score, JTP-117968 inhibited the increase in the relative spleen weight in mouse CIA model completely. We also found that PF-802 showed the inhibitory effect on the development of arthritis and the increase in the relative spleen weight in the mouse CIA model comparably with prednisolone. In the clinical trials, fosdagrocorat was demonstrated as showing efficacy in rheumatoid arthritis patients comparable to that of prednisolone. Hence, JTP-117968, which has partial TR activity, is expected to exhibit anti-inflammatory effect against rheumatoid arthritis comparable to that of classic glucocorticoids.

Finally, we examined the effect of JTP-117968, which has exceedingly low TA activity, on the mouse bone metabolism to evaluate the side effect. It is reported that daily oral glucocorticoids treatment leads to a reduction in bone mineral density (BMD) and a rapid increase in the risk of fracture during the treatment period. Therefore, we evaluated the effect of JTP-117968 on the BMD in normal mouse femur. In our experiment, we confirmed that prednisolone reduced the BMD in mouse femur after 28 days of repeated oral administration as reported previously. Strikingly, JTP-117968 hardly altered the BMD in mouse femur after 28 days of repeated dosing. Meanwhile, PF-802 showed the tendency to reduce the BMD in mice. It is assumed that glucocorticoid-induced osteoporosis is

mainly caused by reduction of osteoblastic bone formation. In human osteoblasts, classic glucocorticoids increase the expression of Dickkopf-1 (Dkk-1), which negatively regulates bone formation via a TA mechanism. As JTP-117968 hardly reduced the BMD in mouse femur, we examined the Dkk-1 induction activity of JTP-117968 in human primary osteoblasts. Based on the evaluation, JTP-117968 barely induced Dkk-1 mRNA expression in comparison with prednisolone. Remarkably, the Dkk-1 induction activity of JTP-117968 was even lower than that of PF-802. Therefore, JTP-117968, with minimized TA activity, is expected to have less side effects on bone formation in humans compared with classic glucocorticoids and already reported SGRMs.

In summary, our data demonstrated that JTP-117968, a novel SGRM that maintained the partial TR activity while remarkably reducing the TA activity, has attractive potential as a new therapeutic option against inflammatory and autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis, with minimized side effects compared to classic glucocorticoids.