急性膵炎におけるアデノシン取りこみ阻害薬KF24345の薬効メカニズム

水谷, 未来 Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

https://doi.org/10.15017/22024

出版情報:九州大学,2011,博士(薬学),課程博士 バージョン: 権利関係:

急性膵炎におけるアデノシン取りこみ阻害薬

KF24345 の薬効メカニズム

水谷 未来

目次

要旨	3
略語一覧	5
序論	7

第一章	マウス急性膵炎モデルにおける組織および血中アデノ				
	シン	関連物質の変動に対する KF24345 投与の	影響		
	1-1	実験材料および方法	14		
	1-2	結果	17		
	1-3	考察	21		
第二章	末梢	肖血白血球の活性化に対するアデノシン	および		
	KF2	4345 の作用			
	2-1	実験材料および方法	25		
	2-2	結果	29		
	2-3	考察	32		
結話			34		

がロ ā百	34
参考文献	35
謝辞	42
図表	43

要旨

KF24345 は、細胞膜上のヌクレオシドトランスポーターに結合することに より、細胞内へのアデノシン取り込みを阻害する薬剤である。KF24345 は、 致死性の急性膵炎モデルであるコリン欠乏エチオニン含有食(CDE diet)処 置マウスにおいて、組織障害による膵および肝酵素の血中への逸脱および致 死を有意に改善する。これらの薬効はアデノシン受容体拮抗薬の併用により 消失することから、内在性アデノシンの増加を介していることが示唆される。 しかし、本モデルにおいて KF24345 が薬効を発揮する際に、どの臓器および 細胞で内在性アデノシンを増加させているか不明であった。急性膵炎は膵臓 を原発とする全身性の炎症病態であるが、組織学的に重篤な炎症臓器として 他に肝臓などが挙げられる。また、炎症増悪に伴い血中サイトカインの上昇 が顕著である。よって、私は KF24345 が薬効を発揮する場所として炎症状態 の膵臓、肝臓もしくは血中の細胞を想定し、本研究を行なった。

CDE diet 誘発急性膵炎マウスの膵および肝組織中のアデノシンおよび関 連物質量を測定し、正常群と比較した。その結果、病態群の膵および肝組織 において、アデノシンの産生源であるアデノシン三リン酸の減少に加え、ア デノシン代謝物の一つであるヒポキサンチンの増加が認められたことから、 炎症組織にてアデノシン産生が亢進していると考えられた。しかし、アデノ シン自体の明確な変動は認められず、KF24345を投与してもアデノシンは増 加しなかった。このことから、炎症局所ではアデノシンが細胞外に長く滞留 できないこと、その消失経路が少なくともアデノシン取り込みに依存してい ないことが示唆された。一方、血漿中のアデノシンについては、病態進行に 伴う増加に加え、KF24345の投与によりさらなる増加が認められた。このこ とから、本モデルにて KF24345 が薬効を発揮する場所は、炎症組織よりむし ろ循環血中の細胞であると考えられた。

急性膵炎では、炎症性白血球、特に好中球や単球/マクロファージの活性

化が病態増悪に重要と考えられている。末梢血由来多型核白血球(PMN)の fMLP 誘発活性酸素産生およびエラスターゼ放出、または末梢血由来単核球 (PBMC)のリポポリサッカライド刺激サイトカイン産生に対し、アデノシ ンは単独で抑制作用を示した。一方、KF24345 単独の作用は弱く、アデノシ ン作用の増強も認められなかった。しかし、PMN または PBMC に一定量の 赤血球を混和した条件において、アデノシンは単独で抑制作用を示さず、 KF24345 を添加することで、初めて抑制作用を示した。

以上の結果から、CDE diet 誘発急性膵炎マウスにおいて、KF24345 は主に 赤血球のアデノシン取り込みを阻害することで内在性アデノシンを増加さ せ、炎症性白血球の活性化を抑制することにより薬効を発揮することが示唆 された。

略語一覧

SIRS: systemic inflammatory response syndrome DIC: disseminated intravascular coagulation PLA₂: phospholipase A₂ ARDS: acute respiratory distress syndrome MODS: multiple organ dysfunction syndrome PAF: platelet activating factor GTP: guanosine triphosphate cAMP: cyclic adenosine monophosphate SAH: S-adenosylhomocysteine ATP: adenosine triphosphate ADP: adenosine diphosphate AMP: adenosine monophosphate Hx: hypoxantine INO: inosine HPLC: high performance liquid chromatography 5'-NT: 5'-nucleotidase AK: adenosine kinase ADA: adenosine deaminase NTs: nucleoside transporters CNT: concentrative nucleoside transporter ENT: equilibrative nucleoside transporter NBTI: nitrobenzylthioinosine es: equilibrative sensitive ei: equilibrative insensitive

LPS: lipopolysaccharide

fMLP: N-formylmethionyl-leucyl-phenyl-alanine

TNF-α: tumor necrosis factor-α

CDE diet: choline deficient ethionine supplemented diet

GOT: glutamic oxaloacetic transaminase

GPT: glutamic pyruvic transaminase

LDH: lactate dehydrogenase

Bil: billirubin

ALP: alkaline phosphatase

TG: triglyceride

EDTA: ethylenediamine-N, N, N', N'-tetraacetic acid

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

DMSO: dimethylsulfoxide

FBS: fetal bovine serum

HBSS: Hanks' balanced salt solution

PBMC: peripheral blood mononuclear cells

PBS: phosphate buffered saline

PMN: polymorphonuclear neutrophil

MED: most effective dose

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

序論

急性膵炎とは

(病態)

急性膵炎は膵の浮腫、出血、壊死および血清膵酵素(アミラーゼ、リパー ゼ)の上昇を特徴とする炎症性の臓器疾患である¹⁾。その発症および進展の 詳細な機作は複雑で、充分には解明されていないが、膵外分泌不全から膵組 織内で消化酵素が活性化し、それによって起こる膵組織の自己消化および虚 血状態が発症に関与するとされる。一方、ケモカイン、サイトカイン、血小 板活性化因子および活性酸素などが進展に関与するとされる。

急性膵炎の軽症例は一過性かつ可逆性であり、時間経過と共に自然治癒に 向かい、死亡することはほとんどない²⁾。これに対し重症例では、膵酵素の 活性化による組織障害を契機に、大量に産生された炎症性ケモカイン、サイ トカインが血管内皮細胞や白血球を活性化する。その結果、主に好中球の血 管内皮への接着、遊走、臓器集積が全身的に波及し、いわゆる全身性炎症反 応症候群 (SIRS)の状態となる³⁾。この状態になると血管透過性が亢進して 体液が third space へ移行し、有効循環血漿量が減少しショック状態に至るこ とが多い。また、消化管や腹腔内での出血傾向を示し、播種性血管内凝固症 候群 (DIC) へと移行する。さらに、膵から逸脱した PLA₂ により肺胞の毛 細血管が傷害され、急性呼吸促迫症候群 (ARDS) や呼吸不全、最終的には 感染症を含めた多臓器不全 (MODS) を合併する⁴⁾。重症化した急性膵炎の 死亡率は、改善されつつあるものの現在でも約 10%と高く、難治性疾患の一 つに指定されている⁵⁾。

(治療薬)

重症急性膵炎を原発とした全身性合併症の治療は現在でも難しく、対症療 法の域を出ていない。循環動態の安定(血圧、脈拍の維持と適正な尿量の確 保)のための輸液、感染症合併の予防のための抗菌薬、膵酵素活性化の抑制

のためのプロテアーゼ阻害薬などが内科的治療の基本である⁶⁾。今後の治療 薬に求められる要素として、急性膵炎から MODS への進展抑制が重要とさ れている。これまで、血小板活性化因子 (PAF) 拮抗薬⁷⁾、PLA₂阻害薬⁸⁾な どが開発された経緯があるが、本疾患の新たな治療薬として加わるには至っ ていない。

アデノシンとは

(薬理作用)

アデノシンは内在性のプリンヌクレオシドであり、細胞膜上の受容体へ結 合して様々な生体反応を調節する⁹⁾。現在、アデノシン受容体は A₁、A_{2A}、 A_{2B} および A₃の4種に分類されており、全てが7回膜貫通・グアノシン三 リン酸(GTP)結合タンパク共役型受容体に属する。アデノシン A₁および A₃受容体はアデニル酸シクラーゼ抑制型 G_iタンパクに共役し、細胞内環状 アデノシンーリン酸(cAMP)レベルを低下させる。一方、アデノシン A_{2A} および A_{2B}受容体はアデニル酸シクラーゼ活性型 G_sタンパクに共役し、細 胞内 cAMPレベルを上昇させる。

アデノシンの代表的な in vivo 作用として、A₁ 受容体刺激による心拍数低下や心筋伝導遅延、ならびに A₂ 受容体刺激による血圧低下や血小板凝集抑制等¹⁰⁾が知られている。このような作用を介して、アデノシンは生体の恒常性を維持する方向、すなわち、細胞、組織等の傷害や機能不全に対して保護的に働くことが知られている。

(産生および代謝)

正常状態では、アデノシンは主に細胞内で S-アデノシルホモシステイン (SAH)から SAH ヒドロラーゼにより産生される。一方、虚血、外傷、ス トレス、炎症等の侵襲状態では、アデノシン三リン酸(ATP)の分解亢進を 契機に、ecto-5'-ヌクレオチダーゼ(5'-NT)によるアデノシンーリン酸(AMP) の脱リン酸化により産生される¹¹⁻¹³⁾。アデノシンは、細胞内外のアデノシン キナーゼ (AK) により AMP に、あるいはアデノシンデアミナーゼ (ADA) によりイノシン (INO) に代謝される。また、イノシンは加水分解酵素によ りヒポキサンチン (Hx) に代謝される (Fig. 1)。

(細胞内へのアデノシン取り込み)

細胞内外の酵素を介した産生および代謝反応に加えて、アデノシンは細胞 膜上のヌクレオシドトランスポーター(NTs)を介して細胞内外を移動する。 NTs はヌクレオシドおよび核酸塩基の細胞膜輸送を担うトランスポーター で、ヌクレオチド生合成のサルベージ経路において重要な役割を果たす。加 えて、NTs はアデノシンシグナルの終結、種々の抗腫瘍および抗ウイルス作 用を有するヌクレオシド誘導体の標的組織への取り込みに関与し、薬物動態 学や薬動力学においても重要な機能タンパク質である¹⁴⁾。

NTs は、ナトリウムイオン濃度に依存した 13 回細胞膜貫通型の濃縮型ト ランスポーター (CNT) と、11 回細胞膜貫通型タンパクである受動拡散型ト ランスポーター (ENT) に大別される¹⁵⁾。同定されている 3 種の CNT はニ トロベンジルチオイノシン (NBTI) 非感受性である。CNT1 はピリミジンヌ クレオシド、CNT2 はプリンヌクレオシドを選択的に輸送するが、CNT3 の 基質選択性は低い¹⁶⁾。

一方、ENT はヒトにおいて 4 種同定されており、NBTI に対する親和性の 相違に基づき、NBTI 感受性受動拡散(es)型の ENT1 および NBTI 非感受性 受動拡散(ei)型の ENT2、pH 感受性を有する ENT3 および ENT4 に分類さ れる。ENT1 は NBTI に高親和性の結合部位を有し、nmol/L 濃度の NBTI に より、細胞内へのヌクレオシド取り込みがほぼ完全に阻害されるのに対し、 ENT2 は µmol/L 濃度の NBTI でなければ阻害されない¹⁷⁾。また、ENT1 はユ ビキタスに発現が認められるのに対し、ENT2 は骨格筋に多く発現する¹⁸⁾。 冠血管拡張薬として用いられている dilazep および dipyridamole は、ENT1 を

阻害することが知られている^{19,20)}。

急性膵炎とアデノシンの関連

(炎症反応におけるアデノシンの関与)

アデノシンは白血球上のアデノシン受容体に結合することにより、リポポ リサッカライド(LPS)などの刺激による活性化マクロファージの炎症性サ イトカイン産生を抑制する²¹⁻²³⁾。また、fMLPなどの刺激による好中球のプ ライミング、脱顆粒、活性酸素産生、血管内皮細胞への接着などを抑制する ²⁴⁻²⁷⁾。急性膵炎病態では、種々の侵襲条件下と同じく組織中 ATP の分解が検 出されており、内因性アデノシンレベルの上昇が示唆される²⁸⁾。したがって、 本病態では恒常性の維持に基づいた抗炎症作用を発揮すべく、炎症局所で内 因性アデノシンレベルが亢進しやすい環境になっていることが予想される。

(膵機能におけるアデノシンの関与)

抗炎症作用を発現することに加え、アデノシンは膵機能にも影響を及ぼす ことが報告されている。アデノシンは、膵血管床に存在する A₂ 受容体を介 して血管を弛緩させ、膵血流を増加させることが知られている^{29,30)}。また、 膵の腺房および外分泌細胞にはアデノシン受容体の存在が示唆されており、 アデノシンはラット膵腺房からのアミラーゼ遊離を in vitro レベルで促進³¹⁾ し、加えて、主に A₂ 受容体を介してセクレチン誘発イヌ膵外分泌を増強す る³²⁾ことが報告されている。したがって、アデノシンによる血流増加作用お よび膵外分泌の促進作用は、それぞれ膵組織の虚血状態および膵外分泌不全 の是正につながることが考えられる。

(急性膵炎に対するアデノシン取り込み阻害薬の有用性)

以上の知見から、アデノシンは、抗炎症および膵機能保全作用を発揮する ことが予想される。しかし、アデノシンは細胞外の代謝酵素による分解に加 え、NTs を介して各組織の細胞内に速やかに取り込まれるため、その作用は 短時間で消失する。大量のアデノシンもしくはアデノシン受容体アゴニスト を全身的に投与することにより、虚血傷害抑制作用や抗炎症作用などを in vivo レベルで検出することは可能であったが、同時に心拍数減少、血圧低下、 鎮静などの副作用も発現することから、これら薬剤の疾患治療への応用は限 定される。これに対し、アデノシン取り込み阻害薬の対象は、炎症状態にて 活性化した 5'-ND を介して産生された細胞外アデノシンであると考えられ、 局所的にアデノシンを増強することから副作用がより少ないことが期待さ れる。したがって、急性膵炎において、アデノシン取り込み阻害を介して細 胞外アデノシンの薬理作用を適切に増強することは、内因性アデノシンによ る抗炎症作用、膵血流増加作用および膵外分泌不全是正作用等から、より効 果的に急性膵炎病態を改善すると考えられた。

アデノシン取り込み阻害薬 KF24345 の薬効

(In vitro 活性プロファイル)

KF24345 は、協和発酵キリン株式会社にて創製されたアデノシン取り込み 阻害薬である(Fig. 2)。KF24345 は、ENT1 を発現するモルモット脳膜画分 への NBTI 結合を強く阻害(K_i値: 2.0 nmol/L)し、ヒトを含む各種動物(マ ウス、ウサギ、ハムスター)の洗浄赤血球における in vitro アデノシン取り 込みを濃度依存的に阻害した(IC₅₀値: 30-130 nmol/L)³³⁾。また、ENT1 発 現細胞における KF24345 の in vitro ヌクレオシド取り込み阻害活性(IC₅₀値: 12 nmol/L)は、ENT2 発現細胞に比べて約 100 倍強力(IC₅₀値: 1100 nmol/L) であり、ENT1 への選択性が高いことが示された³⁴⁾。

(In vivo 薬効)

In vivo 抗炎症作用として、KF24345(10 mg/kg、経口投与)は、LPS をマ ウスに投与することによって誘発される血中腫瘍壊死因子(TNF-α)の上昇 および血中白血球減少を有意に抑制した。これらの薬効は、アデノシン受容 体拮抗薬の併用により減弱したことから、内在性アデノシンを介していることが示唆された³³⁾。

より臨床病態に近い炎症疾患モデルに対する薬効として、KF24345(10 mg/kg、経口投与)は、セルレインの腹腔内投与により誘発される軽症型の マウス急性膵炎モデルにおいて、膵組織の浮腫および膵酵素の血中への逸脱 を有意に抑制した。この薬効はアデノシン受容体拮抗薬の併用により減弱し た³⁵⁾。さらに、コリン欠乏エチオニン含有食(CDE diet)により誘発される 重症型のマウス急性膵炎モデルにおいて、KF24345は組織障害による膵およ び肝酵素の血中への逸脱および致死を有意に改善した。この薬効は予防的

(CDE diet 開始時から)のみならず治療的(CDE diet 開始 32 時間後から) 投与でも認められた。この薬効もアデノシン受容体拮抗薬の併用により減弱 したことから、マウス急性膵炎モデルにおける KF24345の薬効は内在性アデ ノシンを介していることが示唆された³⁶⁾。

KF24345の薬効メカニズムについて

このように、アデノシン取り込み阻害薬 KF24345 が in vivo レベルで炎症 病態を改善し、その薬効に内在性アデノシンの関与が示唆されている。しか しながら、代表的な重症膵炎モデルである CDE diet 誘発急性膵炎マウスに おいて KF24345 が薬効を発揮する際に、どの臓器および細胞に作用して内在 性アデノシンを増加させているか明らかになっていない。

虚血・炎症時における細胞外アデノシン濃度上昇の機作として、細胞外で アデノシンが産生される可能性と、細胞内で産生されたアデノシンが NTs を介して汲み出された結果、細胞外アデノシンが増加する可能性が考えられ る。前者を示唆する知見として、ecto-5'-NT 阻害薬が虚血時において細胞外 アデノシン濃度の増加を抑制し、組織障害を悪化させる³⁷⁾こと、ecto-5'-NT 欠損マウスにおいて細胞外アデノシンの不足によって LPS 誘発 in vivo 白血 球浸潤が亢進することが報告されている³⁸⁾。一方で、細胞内アデノシン代謝の一端を担う AK を阻害すると、虚血時において細胞内アデノシン濃度が上昇することから、NTs を介してアデノシンが細胞外に汲み出される可能性も考えられる³⁹⁾。

炎症病態において、細胞内で産生されたアデノシンが細胞内から細胞外へ 移動するならば、NTs に対する阻害は、細胞外アデノシンの作用を増強せず、 炎症病態に対し無効もしくは悪化することが予想される。しかしながら、 我々の検討では複数の炎症病態モデルにおいて、KF24345 が病態改善効果を 示した。このことから、少なくとも検討したモデルについては、細胞外にて ecto-5'-NT を介して AMP からアデノシンが産生されている可能性が高い。 KF24345 は、産生されたアデノシンの細胞内取り込みを阻害することによっ て、炎症局所もしくは血中の内因性アデノシンレベルを上昇させていること が予想される。

急性膵炎は、膵臓を原発とする全身性の炎症病態であるが、組織学的に重 篤な炎症病態を示す臓器として、他に肝臓、肺、腎臓などが挙げられる¹⁾。 また、炎症増悪に伴い血中サイトカインの上昇も顕著である。よって、本モ デルにおいて KF24345 が薬効を発揮する場所は、炎症臓器もしくは血中の細 胞であることが想定される。

本研究の目的

私は、マウス重症急性膵炎モデルにおいて KF24345 が薬効を発揮する場所 として炎症状態の膵臓、肝臓もしくは血中の細胞を想定し、病態惹起による 組織および血漿中のアデノシン関連物質の変動を調べた。また、その変動に 対する KF24345 投与の影響を調べた。さらにその結果に基づき、血球細胞の 活性化に対するアデノシンおよびアデノシン取り込み阻害薬の作用を調べ た。

第一章 マウス急性膵炎モデルにおける組織および血中アデノ シン関連物質の変動に対する KF24345 投与の影響

1-1 実験材料および方法

1-1-1 実験動物

マウス急性膵炎モデルの作成には、雌性 CDF1 マウス(6-8 週令、日本チャールスリバー)を使用した。動物は恒温(22-24℃)、恒湿(50-60%)、一日12時間照明(7:00-19:00)の飼育室でプラスチック製ケージに収容し、市販の固形飼料(FR-2、船橋農場)と飲料水を自由に摂取させて飼育した。

マウス全血を用いた ex vivo アデノシン取り込み実験には、雄性 ddY マウス(使用時 4 週令、日本 SLC)を用いた。

1-1-2 試薬および測定キット

KF24345 は協和発酵キリン(株)にて合成されたものを使用した。

Dilazep、dipyridamole、エチオニンは Sigma より購入した。[2,8-³H] -adenosine は Du pont より購入した。イーグル培地は日水製薬より購入した。 HEPES、6 mol/L 塩酸はナカライテスクより購入した。Triton X-100 は米山 薬品より購入した。シンチレーションカクテル EX-H は同仁化学より購入し た。フタル酸-n-ジブチルは関東化学より購入した。Soluene-350 は Packard より購入した。過塩素酸、炭酸カリウム、グルコース、炭酸水素カリウム、 4 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液は和光純薬工業より購入した。生理食塩液 は大塚製薬より購入した。アデノシン測定キットはヤマサ醤油より購入した。

In vivo 評価薬物として、KF24345 は 6 mol/L 塩酸で pH3.5 に調整した 5 w/v%グルコース水溶液に溶解し、5 mL/kg の容量で静脈内投与した。

1-1-3 マウス全血を用いた ex vivo アデノシン取り込み実験

マウスに KF24345(0.3、1、3 mg/kg)を尾静脈から投与し、投与5、30、 90 分後にエーテル麻酔下で腹部大静脈よりクエン酸(最終濃度は約 0.38 w/v%) 採血した。control 群のマウスには溶媒のみを投与した。

Baer らの方法⁴⁰⁾に準じて、マウス全血を用いて KF24345 の ex vivo アデノ シン取り込み阻害作用を調べた。採取した血液 100 µL に、2 µmol/L の [³H] -adenosine (100000-150000 dpm) 100 µL を加え、10 秒後に 2 µmol/L の dilazep 200 µL を加えることにより、血球へのアデノシン移行を停止させた。フタル 酸-n-ジブチルを 300 µL 添加後、10000 × g で 15 秒間遠心して血球を分取し た。分取した血球に 1% Triton X-100 を 200 µL、soluen-350/EtOH (1:2、v/v) を 500 µL 添加することにより可溶化処理した。これにシンチレーションカ クテル EX-H を 8 mL 加え、液体シンチレーションカウンター (LS6500、 Beckman) にて血球に取り込まれた [³H] -adenosine の放射活性を測定した。

アデノシン取り込み阻害率(%)は、以下の式から算出した。

(Ave. CONT – DRUG) / (Ave. CONT – Ave. BLANK) \times 100

CONT:溶媒処置群の血球放射活性(dpm count)

BLANK:溶媒処置群の赤血球へ dilazep を加えた後に [³H] -adenosine を添 加した群の血球放射活性 (dpm count)

DRUG: KF24345 処置群の血球放射活性 (dpm count)

Ave. CONT: CONT の平均値

Ave. BLANK: BLANK の平均値

1-1-4 マウス急性膵炎モデルの作成および評価

Suzukiらの方法⁴¹⁾に準じて、マウスに CDE diet 誘発急性膵炎を惹起した。 CDE diet は、エチオニンを 0.5 w/w%の重量比でコリン欠乏食(オリエンタ ル酵母工業)に混合することにより調製した。CDE diet の対照として、飼育 用標準粉末飼料(コリン含有エチオニン不含、オリエンタル酵母工業)を使 用した。

1-1-4-1 致死観察

マウスを24時間絶食後、CDE diet で72時間飼育して急性膵炎を惹起した。 正常食群のマウスには飼育用標準粉末飼料を与えた。CDE diet 開始72時間 後に通常食に切り替え、以後、CDE diet 開始144時間後まで飼育した。CDE diet 開始24時間後から144時間後まで8時間毎に致死を観察した。生存率 を算出し、薬物の膵炎病態改善の指標とした。

1-1-4-2 血清パラメータ測定

マウスを24時間絶食後、CDE diet で48時間飼育して急性膵炎を惹起した。 正常食群のマウスには飼育用標準粉末飼料を与えた。CDE diet 開始48時間 後にエーテル麻酔下で腹部大静脈から採血した。血液サンプルは4℃で1200 ×g、10 分間遠心して血清を採取し、オートアナライザー(AU510 または AU600、Olympus)を用いて血清中アミラーゼ、リパーゼ、グルタミック・ オキザロアセティック・トランスアミナーゼ(GOT)、グルタミック・ピル ビック・トランスアミナーゼ(GPT)および乳酸脱水素酵素(LDH)を測定 した。

1-1-5 血漿および組織中アデノシンの測定

1-1-5-1 血漿サンプルの測定

ペントバルビタール麻酔(100 mg/kg、腹腔内投与)下で開腹し、抗凝固 剤として EDTA 溶液、アデノシン分解阻害剤として ADA 阻害液(共に測定 キットに添付)およびアデノシン血球移行阻害剤として dipyridamole(終濃 度約 0.006%となるよう生理食塩液にて希釈)を入れておいたシリンジを用 いて腹部大静脈から採血した。血液サンプルは自動血球計数器(MEK-6158、 日本光電)でヘマトクリット値を測定後、4℃、毎分 3000 回転で 15 分間遠 心分離して血漿を分取した。抗アデノシン抗体と[¹²⁵I]-adenosine を用いたラ ジオイムノアッセイ法に基づくアデノシン測定キットに従って血漿中のア デノシン濃度を測定した。

1-1-5-2 膵および肝組織抽出液サンプルの測定

ペントバルビタール麻酔(100 mg/kg、腹腔内投与)下で開腹し、肝臓お よび膵臓の一部を切除後、直ちに液体窒素中にて冷却した金属製クランプに て瞬間凍結した。約24時間凍結乾燥後、乾重量を測定し、氷冷した0.6 mol/L 過塩素酸1 mL を添加し、ポリトロンホモジナイザー(POLYTRON、 Kinematica)にて破砕した。2°C、1000×gで3分間遠心分離後、上清500 μ L を採取し、17.25 w/v% 炭酸カリウムを加えて中和した。再び2°C、10000×g で3分間遠心分離し、上清を組織抽出液とした。組織抽出液中のアデノシン、 ATP、ADP、AMP、INO および Hx 濃度を C₃₀ カラム (Develosil RPAQUEOUS 4.6×250 mm、野村化学)を用いた HPLC-UV 法にて測定した。

1-1-6 統計学的解析

測定値は平均値±標準誤差で表示した。ID₅₀値の算出および有意差検定に は統計解析ソフト SAS (Release 6.12、SAS institute Inc.)を用いた。

ID₅₀値の算出は Probit 法にて行った。生存率の有意差検定には Fisher の正 確確率検定を用いて行い、危険率 5%未満を有意差ありとした。血清パラメ ータ、血漿および組織中アデノシン関連物質の有意差検定には Wilcoxon の 順位和検定、あるいは F-test で等分け散か否かを確認後、Student's t-test また は Aspin-Welch test を行なった。危険率 5%未満を有意差ありとした。

1-2 結果

急性膵炎治療の基本は絶食絶飲であるため、薬剤の投与経路は非経口に限 定される。例えば、急性膵炎の治療に使用されているプロテアーゼ阻害薬は 静注製剤である。KF24345 が臨床に即した投与方法でも急性膵炎に対する薬 効を発揮する可能性を検討するため、まず、KF24345 を静脈内投与後、採取 した血液を用いてアデノシン取り込み実験を行なった。

1-2-1 KF24345(静脈内投与)の ex vivo アデノシン取り込み阻害作用

KF24345 は、各採血時間で用量依存的にマウス赤血球のアデノシン取り込みを阻害した。投与5、30、90分後の MED はそれぞれ 0.3 mg/kg 以下、0.3 mg/kg 以下、1 mg/kg であり、化合物投与5分後の ID₅₀ 値は 0.36 mg/kg であった(Fig. 3)。

以上の結果から、静脈内投与による in vivo 薬効発現の可能性が示唆されたため、次に CDE diet 誘発マウス急性膵炎に対する KF24345(静脈内投与)の効果を検討した。

1-2-2 CDE diet 誘発マウス急性膵炎に対する KF24345(静脈内投与)の効果

本病態の惹起に用いるエチオニンは、必須アミノ酸であるメチオニンの代 謝アナログであり、膵腺房細胞内のホスホリパーゼ C の活性化を阻害する ことにより膵外分泌不全を惹起する。エチオニンにより誘発される膵外分泌 不全の本態は、分泌顆粒中の消化酵素と膵腺房細胞内でライソゾームから逸 脱したライソゾーム酵素との融合であり、これにより膵腺房細胞内での消化 酵素の活性化が惹起される。本モデルは非侵襲性の代表的な重症急性膵炎モ デルであり、高い致死率を伴う⁴²⁾。

1-2-2-1 致死観察

対照群と KF24345 投与群の摂餌量の平均値は、ほぼ同一であった。

対照群では、CDE diet 開始 64 時間後より死亡が観察され、最終的に CDE diet 開始 144 時間後の生存率は 24% であった。正常食群の生存率は実験全期 間を通して 100% であった。この病態惹起マウスに対し、KF24345(1.5 mg/kg)

を CDE diet の摂取開始と同時に尾静脈内投与し、以後 CDE diet 摂取開始 36 時間後まで 12 時間毎に計 4 回尾静脈内投与した。正常食群および対照群の マウスには溶媒 (pH3.5 の 5 w/v%グルコース液)を投与した。その結果、 KF24345 投与群の最終的な生存率は 76% であり、対照群と比較して有意に高 かった (Fig. 4)。

1-2-2-2 血清パラメータ

対照群と KF24345 投与群の摂餌量の平均値は、ほぼ同一であった。

CDE diet 開始 48 時間後において、対照群の血清中アミラーゼ、リパーゼ、 GOT、GPT、LDH が正常食群と比較して上昇した(Table 1)。この病態惹起 マウスに対し、KF24345(1.5 mg/kg)を CDE diet の摂取開始と同時に尾静脈 内投与し、以後 CDE diet 開始 36 時間後まで 12 時間毎に計 4 回尾静脈内投 与した。正常食群および対照群のマウスには溶媒(pH3.5 の 5 w/v%グルコー ス液)を投与した。その結果、KF24345 は対照群の GOT、GPT および LDH の上昇を有意に抑制した。一方、KF24345 はアミラーゼおよびリパーゼの上 昇に影響しなかった。

以上の結果から、KF24345 は静脈内投与でアデノシン取り込みを阻害し、 急性膵炎病態を改善することが示された。そこで、本病態において血中およ び炎症組織中のアデノシン関連物質を測定し、その時間的推移を調べた。

1-2-3 CDE diet 誘発急性膵炎マウスの炎症組織および血漿中アデノシン関連物 質の時間的推移

CDE diet 開始 0、16、24、48 時間後に採血し、血清中のリパーゼ、GPT お よび LDH を測定した。その結果、CDE diet 開始 24、48 時間後において膵酵 素の血中への逸脱を示すリパーゼ (Fig. 5A) が、CDE diet 開始 16、24、48 時間後において肝酵素の血中への逸脱を示す GPT (Fig. 5B)、炎症による組 織障害を反映する LDH (Fig. 5C) が正常群に比べて顕著に上昇し、全身的 な炎症病態が惹起された。

上記と同様の実験スケジュールにてマウス膵および肝組織抽出液中のア デノシンを定量し、その時間的推移を調べた。その結果、膵組織中アデノシ ンの明確な変動は認められなかった(Fig. 6A)。一方、CDE diet 開始 48 時間 後において肝組織中アデノシンの有意な上昇が認められた(Fig. 6B)。また、 同抽出液中の ATP、ADP、AMP、INO および Hx を定量し、その時間的推移 を調べた(Table 2)。CDE diet 開始 24 時間後の病態マウスの肝および膵組織 において、ATP、ADPの減少および Hx の顕著な上昇が認められた(Fig. 7)。 本モデルにおける組織中 Hx の時間的推移は、炎症臓器によって若干異なっ ており、肝組織中 Hx は CDE diet 開始 24 時間後に最大となり、同 48 時間後 には顕著に減少した。一方、膵組織中 Hx は CDE diet 開始 16 時間後に最大 に達し、以後漸減する傾向を示した。

さらに、上記と同様の実験スケジュールにて血漿中アデノシンを定量し、 その時間的推移を調べた。その結果、CDE diet 開始 24、48 時間後に血漿中 アデノシンの上昇傾向が認められ(Fig. 8)、炎症により血中に漏出した組織 内酵素(リパーゼ、GPT、LDH)の変動パターンと同調するものであった。 一方、炎症組織(肝および膵)中アデノシンの変動は、血中パラメータの変 動よりも遅いもしくは明確に検出されず、病態の進展と同調したものではな かったが、アデノシンの産生源である ATP および ADP の減少、アデノシン の代謝物の一つである Hx の顕著な上昇は CDE diet 開始 24 時間後に認めら れた(Table 2)。

以上の結果から、アデノシンレベルが増加しやすい環境と予想される CDE diet 開始 24 時間後において KF24345 の作用を調べた。

1-2-4 CDE diet 誘発急性膵炎マウスの炎症組織および血漿中アデノシン関連物 質の変動に対する KF24345(静脈内投与)の作用

CDE diet 開始 24 時間後に KF24345 (1.5 mg/kg) を静脈内投与し、投与 10、 30、90 分後の肝および膵組織中アデノシンを検出した。その結果、肝および 膵組織中のアデノシンの変動に対して、KF24345 は明確な作用を示さなかっ た (それぞれ Fig. 9A、9B)。

また、同抽出液中の ATP、ADP、AMP、INO および Hx を定量した(Table 3)。その結果、病態マウスの肝および膵組織におけるアデノシン関連物質の 変動、特にアデノシンの産生誘導を示唆する Hx の増大に対し、KF24345 は 明確な作用を示さなかった(Fig. 10)。

さらに、CDE diet 開始 24 時間後に KF24345 (1.5 mg/kg) を静脈内投与し、 投与 3、10、30、90 分後の血漿中アデノシン濃度を測定した (Fig. 11)。そ の結果、正常群において KF24345 は血漿中アデノシン濃度に影響しなかった。 一方、膵炎惹起群において、KF24345 は投与 3 分後の血漿中アデノシンを vehicle 投与群に比べて有意に増加させ、投与 10 および 30 分後の血漿中アデ ノシンを vehicle 投与群に比べて増加させる傾向を示した。

1-3 考察

炎症組織では、その状態を正常に戻すため内在性アデノシンが増加しやす い環境になっていることが予想される。本モデルの場合、膵、肝などの組織 がその環境に該当する。これらの組織では、正常状態と異なり、ATP分解か ら始まる AMP の一過的な増加、それに伴う 5'-NT の活性化によりアデノシ ンが産生されると考えられる。本検討でも病態惹起群においてアデノシンの 産生源と考えられる ATP、ADP の減少が認められた。

CDE diet による急性膵炎惹起後の血漿および組織中アデノシンの時間的 推移を調べた結果、血漿中アデノシンが病態惹起 24 時間後において上昇傾 向を示し、血中の炎症パラメータ(GPT、LDH)の変動パターンと同調して

いたのに対し、肝および膵組織中アデノシンの変動は、血中の炎症パラメー タの変動よりも遅いか、あるいは明確に検出されず、病態の進展に同調して いなかった。しかしながら、アデノシンの産生源である ATP、ADPの減少に 加え、アデノシンの代謝産物である Hx が病態惹起 16-24 時間後にかけて顕 著な増大を示したことから、アデノシンを直接検出するには至らなかったも のの、病態の進展と同調して組織中アデノシンも一過的に増大したことが強 く示唆された。病態惹起による Hx の増大量に比べて血漿中アデノシンの増 大量が小さいことから、このアデノシン増大は、組織炎症に伴って産生され たアデノシンの一部が血中に漏出した結果であることが推察された。

増加したアデノシンは、生体内の恒常性を保つべく抗炎症効果を発揮する 一方、細胞内に取り込まれるか、細胞外の ADA により分解されて消失する ものと考えられる。これまで、虚血や炎症等の侵襲条件下において、組織中 の ADA 活性が亢進することが報告されている^{43,44)}。本モデルにて産生誘導 が示唆されるにもかかわらず、組織中アデノシン濃度の顕著な変動が認めら れなかったのは、重篤な組織障害を契機に細胞内外で活性化した ADA によ り、炎症臓器局所にアデノシンが滞留し難い環境になっているためと考えら れた。

また、膵および肝組織中アデノシンに対し KF24345 は明確な作用を示さな かった。このため、病態惹起により顕著な増大を示した Hx にも注目し、炎 症組織においてアデノシン取り込み阻害によるアデノシン代謝への影響が 認められるか調べたが、KF24345 は Hx の増大にも影響しなかった。このこ とから、炎症組織中のアデノシン代謝においてアデノシン取り込みの寄与は 大きくないことが示唆された。

一方、血中における細胞外アデノシンの消失経路も膵および肝組織と同じ く、細胞内への取り込みもしくは ADA による分解と考えられ、炎症病態で は血中 ADA 活性が亢進する^{45,46)}ことが報告されている。しかしながら、本

モデルでは血中における ADA 活性亢進の程度が炎症組織局所に比べて低い ため、病態惹起による血中アデノシン濃度の上昇が検出できたものと考えら れた。この場合、血中のアデノシン代謝において、細胞内取り込み作用の寄 与が相対的に高くなっていると予想される。KF24345 が炎症組織中のアデノ シン濃度に影響しなかった一方、血中アデノシン濃度を上昇させたのは、ア デノシン取り込み阻害の効果が発現し易い代謝環境にあるためと考えられ た。

血中において、増加したアデノシンを取り込む細胞は血球細胞もしくは血 管内皮細胞と考えられる。これらの細胞においては、ENT1 が NTs の主要構 成要素とされ、細胞外アデノシン濃度を高めるには ENT1 を阻害することが 有効と考えられている。KF24345 は、内在的に ENT1 を発現する組織膜画分 への NBTI 結合や、赤血球のアデノシン取り込みを強力に阻害する。また、 ENT1 および ENT2 強制発現細胞を用いた検討から、ENT1 に対し選択的に作 用するものと考えられる。ENT1 はアデノシンの濃度勾配に依存した細胞内 取り込み活性を有する。KF24345 が正常マウスの血漿中アデノシン濃度に影 響しなかったのは、正常な代謝状態では主に細胞内にてアデノシン産生およ び代謝が行なわれ (Fig. 1)、細胞内外のアデノシン濃度が低い状態で平衡状 態になっていることから、ENT1 阻害による影響が小さかったためと考えら れた。

以上、炎症状態でも虚血状態と同様にアデノシン関連物質が変動すること が明らかになった。また、KF24345 が炎症臓器のアデノシン濃度に明確な作 用を示さなかったのに対し、血中では投与後の一過的なアデノシン濃度上昇 作用を示したことから、主に炎症組織にて産生されることによって増加した アデノシンの細胞内取り込みを KF24345 が阻害することにより、血中アデノ シン濃度の上昇につながったと考えられた。本検討では KF24345 の投与によ り、病態マウスにおける血中アデノシン濃度が約 1.5-2 µmol/L まで上昇した。

このアデノシン濃度は好中球や単球/マクロファージの活性化を十分抑制す るレベル(Fig. 12-14)であり、KF24345の血中アデノシン濃度上昇作用が抗 炎症効果に寄与していることが示唆される。よって、急性膵炎において KF24345が薬効を発揮する場所は、炎症臓器局所より、むしろ循環血中の細 胞である可能性が考えられた。

第二章 末梢血白血球の活性化に対するアデノシンおよび KF24345の作用

2-1 実験材料および方法

2-1-1 試薬および測定キット

KF24345 は協和発酵キリン(株)にて合成されたものを使用した。

Adenosine、dilazep、dipyridamole、adenosine deaminase、cytochalasin B、fMLP、 lucigenin は Sigma より購入した。Pyr-Pro-Val-pNA は Nova Biochem より購入 した。[2,8-³H] -adenosine は Du pont より購入した。LPS (E. coli O55:B5) は DIFCO より購入した。HEPES はナカライテスクより購入した。イーグル 培地、RPMI1640 培地は日水製薬より購入した。Triton X-100 は米山薬品より 購入した。シンチレーションカクテル EX-H、EDTA-2Na は同仁化学より購 入した。フタル酸-n-ジブチル、DMSO、塩化アンモニウムは関東化学より購 入した。Soluene-350 は Packard より購入した。4 mol/L 水酸化ナトリウム水 溶液は和光純薬工業より購入した。FBS、200 mmol/L L-glutamine、HBSS は GIBCO より購入した。PBS は MP Biomedicals より購入した。Dextran T500、 Ficoll-Paque、Human TNF-α ELISA system は Amersham Pharmacia より購入し た。生理食塩液は大塚製薬より購入した。

In vitro 評価薬物として、アデノシン、dilazep、dipyridamole、KF24345 は すべて DMSO 溶液を作成し、各種アッセイバッファにて希釈したものを実 験に供した。LPS は 10 mg/mL になるように PBS に溶解し、使用時に RPMI1640 培地で希釈した。溶血バッファは塩化アンモニウム 4.15 g、炭酸水素カリウ ム 0.50 g、EDTA19 mg を蒸留水 500 mL に溶解して調製した。cytochalasin B、 fMLP、Pyr-Pro-Val-pNA、lucigenin はすべて DMSO 溶液を作成し、各種アッ セイバッファにて希釈したものを実験に供した。

2-1-2 ヒト血球細胞を用いた in vitro アデノシン取り込み実験

Baer らの方法⁴⁰に準じて、ヒト血球細胞を用いて KF24345 の in vitro アデ ノシン取り込み阻害作用を調べた。ヒト血球細胞については、協和発酵キリ ン(株)内の成人男性ボランティアよりクエン酸採血(最終濃度は約 0.38 w/v%)したものを使用した。

生理食塩液にて血漿を洗浄除去した血液もしくは分画した血球細胞の懸 濁液 40 µL にアッセイ用培地 (0.38 w/v% クエン酸および 0.24 w/v% HEPES 含有イーグル培地) 60 µL を加えた血球浮遊液 100 µL に、2 µmol/L の [³H] -adenosine (100000-150000 dpm) 100 µL を加え、10 秒後に 2 µmol/L の dilazep 200 µL を加えることにより、血球へのアデノシン移行を停止させた。フタル 酸-n-ジブチルを 300 µL 添加後、10000 × g で 15 秒間遠心して血球を分取し た。分取した血球に 1% Triton X-100 を 200 µL、soluen-350/EtOH (1:2、v/v) を 500 µL 添加することにより可溶化処理した。これにシンチレーションカ クテル EX-H を 8 mL 加え、液体シンチレーションカウンターにて血球に取 り込まれた [³H] -adenosine の放射活性を測定した。

2-1-3 単核球 (PBMC)の in vitro サイトカイン産生

Bouma らの方法⁴⁷⁾に準じて、ヒト PBMC における LPS 誘発 TNF-α 産生に 対するアデノシンおよびアデノシン取り込み阻害薬の作用を検討した。

協和発酵キリン(株)内の成人男性ボランティアの血液 50 mL(ヘパリン 採血)と 5.9 w/v% Dextran T500/生理食塩液 17 mL を混和し、室温で約 20 分 間静置することによって白血球を分取(上層:白血球、下層:赤血球)した。 Ficoll-Paque 上に白血球層を重層し、室温で毎分 1700 回転、30 分間遠心(遠 心機: RL-500、トミー精工)した。界面の単核球層を採取し、氷冷した RPMI1640 培地で洗浄後、細胞数を測定した。1.2-1.5×10⁶ cells/mL になるよ うに RPMI1640 培地で調製し、96 ウェルプレートに 70 μL ずつ播種した。 アデノシン取り込み阻害薬または溶媒(1% DMSO/RPMI1640 培地)を 10 μ L 加えて 37℃で 60 分間インキュベートした後、アデノシンまたは溶媒 (1% DMSO/RPMI1640 培地)を 10 μ L、100 μ g/mL LPS または溶媒 (RPMI1640 培 地)を 10 μ L 加え、37℃で 6 時間インキュベートした。室温で毎分 2000 回 転、10 分間遠心し、上清を採取した。上清中の TNF-α 濃度を Human TNF-α ELISA system に従って測定した。ADA の添加実験では、アデノシンおよび アデノシン取り込み阻害薬または溶媒添加時に ADA またはコントロール溶 媒 (50 w/v% glycerol/RPMI1640 培地)を 10 μ L (約 15 units) 加えた。

2-1-4 多型核白血球 (PMN) のエラスターゼ放出および活性酸素産生

Zhang⁴⁸⁾、Fredholm⁴⁹⁾らの方法に準じて、マウス PMN における fMLP 誘発 エラスターゼ放出および活性酸素産生に対するアデノシンおよびアデノシ ン取り込み阻害薬の作用を検討した。

協和発酵キリン(株)内の成人男性ボランティアの血液 50 mL(ヘパリン 採血)と 5.9 w/v% Dextran T500/生理食塩液 17 mL を混和し、室温で約 20 分 間静置することによって白血球を分取(上層:白血球、下層:赤血球)した。 Ficoll-Paque上に白血球層を重層し、室温で毎分 1700 回転、30 分間遠心した。 分取した PMN 沈殿を生理食塩液で洗浄後、氷冷した溶血バッファ中に浮遊 させ、氷中に 30 分間静置した。4℃で毎分 1700 回転、10 分間遠心して分取 した PMN 沈殿を氷冷した HBSS で洗浄後、細胞数を測定した。約 1 × 10⁶ cells/mL/tube になるように HBSS で調製し、96 ウェルプレートに 66 µL ずつ 播種した。

2-1-4-1 エラスターゼ放出

96 ウェルプレートに 66 µL ずつ播種した PMN を 37℃で 5 分間インキュベ ートした後、0.1 mg/mL の cytochalasin B を 4 µL、アデノシン取り込み阻害 薬/1 v/v% DMSO/HBSS または溶媒を 10 µL 加えて 37℃で 5 分間、さらにア

デノシン/HBSS または溶媒を 10 µL 加えて 37℃で 5 分間インキュベートした。 10 µmol/L fMLP/1v/v% DMSO/HBSS を 10 µL 加え、37℃で 20 分間インキュベ ートした後、氷中に静置した。このプレートを 4℃、毎分 4000 回転で 10 分 間遠心し、上清 50 µL を回収して 96 ウェルアッセイプレートに移した。こ れに、37℃に加温しておいた HBSS を 100 µL、1 mmol/L Pyr-Pro-Val-pNA/1 v/v% DMSO/HBSS を 25 µL 加え、37℃で 30 分間インキュベートした後、50 v/v% 酢酸を 25 µL 加えて氷中に静置し、反応を停止した。マイクロプレー トリーダーで波長 405 nm における吸光度を測定した。

2-1-4-2 活性酸素産生

96 ウェルプレートに 66 µL ずつ播種した PMN を 37℃で 5 分間インキュベ ートした後、0.1 mg/mL の cytochalasin B を 4 µL 加えて 37℃で 2.5 分間、次 にアデノシン取り込み阻害薬/1 v/v% DMSO/HBSS または溶媒を 10 µL 加えて 37℃で 2.5 分間、さらにアデノシン/HBSS または溶媒を 10 µL 加えて 37℃で 5 分間インキュベートした。1 mmol/L lucigenin-1 µmol/L fMLP/1 v/v% DMSO/HBSS を 10 µL 加え、37℃で 5 分間の累積発光量を Multi-Biolmat (LB9505、ベルトールドジャパン)を用いて測定した。

エラスターゼ放出、サイトカインおよび活性酸素産生率(%)は、以下の 式から算出した。

(DRUG-Ave. BLANK) / (Ave. CONT-Ave. BLANK) × 100

CONT:溶媒処置後に刺激した群の産生量

BLANK:溶媒処置後に刺激しなかった群の産生量

DRUG: アデノシン取り込み阻害薬処置後に刺激した群の産生量

Ave. CONT: CONT の平均値

Ave. BLANK: BLANK の平均値

2-1-5 統計学的解析

測定値は平均値±標準誤差で表示した。

2-2 結果

2-2-1 単離白血球の活性化に対するアデノシンおよびアデノシン取り込み阻害薬 の作用

好中球を含む PMN 画分の活性化指標として fMLP 刺激による活性酸素産 生およびエラスターゼ放出、単球/マクロファージを含む PBMC 画分の活性 化指標として LPS 刺激による TNF-α 産生に注目し、アデノシンおよびアデ ノシン取り込み阻害薬の作用を調べた。

2-2-1-1 単離 PMN の活性化に対する作用

Cytochalasin B によりプライミング処理した PMN にアデノシンまたはアデ ノシン取り込み阻害薬を添加した後、fMLP を添加し、活性酸素産生量およ び細胞外に放出されたエラスターゼ活性を測定した。その結果、アデノシン は fMLP 刺激による PMN の活性酸素産生およびエラスターゼ放出を濃度依 存的に抑制した(それぞれ Fig. 12A、13A)。一方、KF24345 および dipyridamole 単独の作用は明確に認められなかった。また、アデノシン (0.3 μ mol/L) の 活性酸素産生 (Fig. 12B、12C) およびエラスターゼ放出 (Fig. 13B、13C) 抑制作用に対し、KF24345 および dipyridamole の影響は認められなかった。

2-2-1-2 単離 PBMC の活性化に対する作用

PBMC にアデノシンまたはアデノシン取り込み阻害薬を添加した後、LPS を添加し、培養上清中の TNF-α 濃度を測定した。その結果、アデノシンは LPS 刺激による PBMC の TNF-α 産生を濃度依存的に抑制した (Fig. 14A)。 一方、KF24345 および dipyridamole は単独で同 TNF-α 産生を抑制する傾向を 示したものの、その作用は弱いものであった。また、アデノシン (1 μ mol/L) の TNF-α 産生抑制作用に対し、KF24345 および dipyridamole の影響は明確に

認められなかった(Fig. 14B、14C)。

以上、単離した PMN および PBMC において、検討したアデノシン取り込 み阻害薬は、いずれもその活性化にほとんど影響せず、アデノシンの抑制作 用に対して無影響であった。本検討では、アデノシン取り込み阻害薬による 細胞外アデノシン作用の増強が不十分であることが推察されたが、その理由 として、PMN および PBMC のアデノシン取り込み活性が赤血球などに比べ て低い、もしくは PMN および PBMC のアデノシン取り込みに対する薬剤の 阻害活性が弱いことが考えられた。そこで、PMN および PBMC のアデノシ ン取り込みに対する KF24345 の阻害活性を調べた。

2-2-2 PMN および PBMC 画分のアデノシン取り込みに対する KF24345 の阻害活性

PMN (Fig. 15A)、PBMC (Fig. 15B) および赤血球画分 (Fig. 15C) は、少 なくともアデノシン添加後 10 分間までインキュベート時間に比例したアデ ノシン取り込み量の上昇が認められた。PMN および PBMC 画分における一 定時間 (10 分間) および一定細胞数 (2×10⁶cells/mL) あたりのアデノシン 取り込み量は、それぞれ赤血球画分と同等および約 1/5 であった。また、PMN および PBMC 画分のアデノシン取り込みに対し、KF24345 の阻害作用は部分 的であり、1 μmol/L における阻害率がそれぞれ約 65%、約 40%で頭打ちであ った。一方、赤血球画分のアデノシン取り込みに対し、KF24345 は 0.3 μmol/L における阻害率が約 90%とほぼ完全に阻害した。

以上の結果から、PMN、PBMC いずれの画分にもアデノシン取り込み能が 認められ、この作用に対して KF24345 が阻害活性を有することも明らかになった。しかしながら、PMN、PBMC におけるアデノシン取りこみ能および KF24345 の阻害作用は、いずれも赤血球画分を用いた場合よりも弱かった。 これに加え、本検討の細胞密度は赤血球の存在する血中環境に比べて低く (全血を用いた場合:約2×10⁹cells/mL、本検討:1-2×10⁶cells/mL)、細胞 外アデノシンレベルに対するアデノシン取り込み阻害の影響が小さいこと も考えられた。よって、アデノシン取り込み阻害薬の薬効には赤血球の関与 が大きいことが示唆されたため、赤血球のアデノシン取り込み阻害を介した PMN および PBMC の活性化抑制作用を調べた。

2-2-3 単離白血球+赤血球画分の活性化に対する作用

2-2-3-1 単離 PMN+赤血球画分の活性化に対する作用

PMN 画分に一定量の赤血球画分を添加した条件にて、fMLP 刺激によるエ ラスターゼ放出に対するアデノシンおよびアデノシン取り込み阻害薬の作 用を調べた。アデノシンは単独でエラスターゼ放出を抑制できなかった(Fig. 16A)。KF24345、dilazep および dipyridamole は、弱いながら一定濃度(1 µmol/L)のアデノシン存在下でエラスターゼ放出を抑制する傾向を示した (Fig. 16B、16C、16D)。

2-2-3-2 単離 PBMC+赤血球画分の活性化に対する作用

PBMC 画分に一定量の赤血球画分を添加した条件にて、LPS 刺激による TNF-α 産生に対するアデノシンおよびアデノシン取り込み阻害薬の作用を 調べた。アデノシンは単独で TNF-α 産生を抑制できなかったが、KF24345、 dilazep および dipyridamole は、アデノシン (0.01-10 µmol/L) 存在下で TNF-α 産生を抑制した (Fig. 17A、17B、17C)。さらに、KF24345 および dilazep (そ れぞれ 1 µmol/L) とアデノシン (10 µmol/L) による TNF-α 産生抑制作用は、 ADA の添加によって解除された (Fig. 18)。

以上の結果から、アデノシン取り込み阻害薬の薬効は、赤血球のアデノシン取り込み阻害を介した細胞外アデノシン作用の増強によることが示唆された。

2-3 考察

急性膵炎において、炎症性白血球、特に好中球や単球/マクロファージの 活性化が病態増悪に関与すると考えられている。好中球は、細菌毒素など外 因性の刺激、あるいは単球/マクロファージや血管内皮細胞が産生する炎症 性サイトカインなど内因性の刺激によって活性化し、血管内皮細胞との接着 を介した炎症組織への浸潤に加え、活性酸素やエラスターゼを放出する。活 性酸素はラジカル作用による強力な殺菌効果を示す反面、宿主由来の細胞に も直接作用して組織障害を引き起こす^{50,51)}。また、エラスターゼは活性化 好中球の脱顆粒に伴って細胞外に放出され、血管内皮細胞を傷害して透過性 を亢進することが知られており、微小循環障害を惹起し、組織の虚血状態を 増悪すると考えられている⁵²⁾。一方、単球/マクロファージは、細菌毒素な ど外界由来の刺激あるいは炎症性サイトカインなど内因性の刺激によって 活性化し、好中球と同様に、活性酸素やタンパク分解酵素を放出することに よって組織障害を引き起こす⁵³⁻⁵⁵⁾。さらには、種々のサイトカインを産生す ることによって、自己および他の免疫系細胞を活性化する作用を有する。

アデノシンは、細胞膜上の受容体を介して好中球および単球/マクロファ ージの活性化を抑制することが知られている。KF24345 などアデノシン取り 込み阻害薬は、循環血中において細胞外アデノシン濃度を増加させることで 炎症性白血球の活性化を抑制し、抗炎症効果を発揮することが期待される。 これまで、KF24345 の薬効評価として、マウスを用いた in vivo の検討にて LPS 誘発白血球減少および血中 TNF-α 上昇を抑制することが報告されてい る³³⁾。しかし、分画した血球細胞を用いた in vitro 薬効評価については未検 討であった。

そこで、分画した PMN もしくは PBMC を用いて、各種刺激による活性化 に対するアデノシンおよび KF24345 の作用を調べたが、アデノシンは単独で

抑制作用を示すものの、KF24345 単独の作用は弱く、また、アデノシンの作 用に対する明確な影響も認められなかった。そこで、PMN もしくは PBMC 画分のアデノシン取り込み能を調べてみたが、赤血球画分を上回るものでは なかった。また、PMN もしくは PBMC 画分のアデノシン取り込みに対する KF24345 の感受性を調べてみたが、赤血球に対する阻害作用より弱いもので あった。KF24345 が作用する ENT1 は好中球およびマクロファージでの発現 が報告されているが、両細胞には ENT2 も発現している ^{56,57)}ため、KF24345 との親和性が低い ENT2 を介したアデノシン取り込みの寄与が赤血球に比べ て大きいことが考えられる。以上の結果から、血中において KF24345 のアデ ノシン取り込み阻害作用による影響の大部分は、赤血球を介したものと考え られた。

そこで、赤血球存在下で PMN および PBMC を活性化させた条件でアデノ シンおよび KF24345 の作用を調べたが、アデノシンは単独で薬効を示さなか った。これは、産生系が亢進していないような条件でアデノシンを外から加 えただけでは、そのほとんどが速やかに赤血球に取り込まれ、白血球に作用 できなかったためと考えられた。KF24345 などアデノシン取り込み阻害薬に て前処理しておくと、赤血球への取り込み阻害によって細胞外アデノシン濃 度が保たれるため、白血球の活性化、特に PBMC のサイトカイン産生が抑制 されたと考えられた。

以上、炎症性白血球の活性化に対する KF24345 の薬効は、赤血球のアデノ シン取り込み阻害を介した間接的な作用によるものであることが示唆され た。

結語

私は、CDE diet 誘発マウス急性膵炎に対するアデノシン取り込み阻害薬 KF24345の薬効メカニズムを解明するにあたり、KF24345 が薬効を発揮する 場所として炎症状態の膵臓、肝臓もしくは血中の細胞を想定し、本研究を行 なった。その結果、KF24345 のアデノシン増強作用が効果的に発揮されるの は循環血中であり、中でも赤血球のアデノシン取り込み阻害を介して内因性 アデノシンを増加させ、炎症性白血球の活性化を抑制することにより薬効を 発揮する (Fig. 19) ことが示唆された。

参考文献

- 1. 難病情報センター特定疾患情報:重症急性膵炎. http://www.nanbyou.or.jp/sikkan/048.htm
- Wilson C, Heath DI and Imrie CW: Prediction of outcome in acute pancreatitis: a comparative study of APACHE II, clinical assessment and multiple factor scoring systems. Br J Surg 1990; 77: 1260-1264.
- 3. 広田昌彦,坂本快郎,田中洋,近本亮,高森啓史,馬場秀夫:急性膵炎にお ける SIRS と CARS. 最新医学 2007; 62: 1866-1873
- 4. Steer ML: Etiology and pathophysiology of acute pancreatitis. In: Go VLW, DiMagno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA and Scheele GA eds. The pancreas: biology, pathobiology, and disease. 1993; 581-592.
- 木原康之,大槻真:急性膵炎の発症・重症化機序.日消誌 2008; 105: 1157-1165.
- 6. 大槻眞:難治性膵疾患の克服を目指して 厚生労働省特定疾患重症急性
 膵炎の現状と課題 -. 日消誌 2007; 104: 1-9
- Chen C, Xia SH, Chen H, Li XH. Therapy for acute pancreatitis with platelet-activating factor receptor antagonists, World J Gastroenterol. 2008 Aug 14; 14(30):4735-4738.
- Tomita Y, Kuwabara K, Furue S, Tanaka K, Yamada K, Ueno M, Ono T, Maruyama T, Ajiki T, Onoyama H, Yamamoto M, Hori Y. Effect of a selective inhibitor of secretory phospholipase A2, S-5920/LY315920Na, on experimental acute pancreatitis in rats. J Pharmacol Sci. 2004 Oct; 96(2):144-154.
- Jacobson KA. Introduction to adenosine receptors as therapeutic targets. Handb Exp Pharmacol. 2009; (193):1-24.
- 10. Collis MG, Hourani SM. Adenosine receptor subtypes. Trends Pharmacol Sci.1993 Oct; 14(10):360-366.

- 11.Geiger JD, Parkinson FE, Kowaluk EA. Regulators of endogenous adenosine levels as therapeutic agents. In: Jacobson KA, Jarvis MF, editors. Purinergic approaches in experimental therapeutics. New York: Wiley-Liss Inc; 1997. p.55-84.
- 12.Eltzschig HK, Thompson LF, Karhausen J, Cotta RJ, Ibla JC, Robson SC, Colgan SP. Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism. Blood. 2004 Dec 15; 104(13):3986-3992.
- 13.Obata T. Adenosine production and its interaction with protection of ischemic and reperfusion injury of the myocardium. Life Sci. 2002 Sep 20; 71(18):2083-2103.
- 14. Damaraju VL, Damaraju S, Young JD, Baldwin SA, Mackey J, Sawyer MB, Cass CE. Nucleoside anticancer drugs: the role of nucleoside transporters in resistance to cancer chemotherapy. Oncogene. 2003 Oct 20; 22(47):7524-7536.
- 15. Hyde RJ, Cass CE, Young JD, Baldwin SA. The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms. Mol Membr Biol. 2001 Jan-Mar; 18(1):53-63.
- 16. Molina-Arcas M, Casado FJ, Pastor-Anglada M. Nucleoside transporter proteins. Curr Vasc Pharmacol. 2009 Oct; 7(4):426-434.
- 17. Young JD, Yao SY, Sun L, Cass CE, Baldwin SA. Human equilibrative nucleoside transporter (ENT) family of nucleoside and nucleobase transporter proteins. Xenobiotica. 2008 Jul; 38(7-8):995-1021.
- 18. Pennycooke M, Chaudary N, Shuralyova I, Zhang Y, Coe IR. Differential expression of human nucleoside transporters in normal and tumor tissue. Biochem Biophys Res Commun. 2001 Jan 26; 280(3):951-959.

- 19. Plagemann PG, Kraupp M. Inhibition of nucleoside and nucleobase transport and nitrobenzylthioinosine binding by dilazep and hexobendine. Biochem Pharmacol. 1986 Aug 1; 35(15):2559-2567.
- 20. Jarvis SM. Nitrobenzylthioinosine-sensitive nucleoside transport system: mechanism of inhibition by dipyridamole. Mol Pharmacol. 1986 Dec; 30(6):659-665.
- 21. Haskó G, Szabó C, Németh ZH, Kvetan V, Pastores SM, Vizi ES. Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. J Immunol. 1996 Nov 15; 157(10):4634-4640.
- 22. Ezeamuzie CI, Khan I. The role of adenosine A(2) receptors in the regulation of TNF-alpha production and PGE(2) release in mouse peritoneal macrophages. Int Immunopharmacol. 2007 Apr; 7(4):483-490.
- 23.Kreckler LM, Gizewski E, Wan TC, Auchampach JA. Adenosine suppresses lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production by murine macrophages through a protein kinase A- and exchange protein activated by cAMP-independent signaling pathway. J Pharmacol Exp Ther. 2009 Dec; 331(3):1051-1061.
- 24. Bouma MG, Jeunhomme TM, Boyle DL, Dentener MA, Voitenok NN, van den Wildenberg FA, Buurman WA. Adenosine inhibits neutrophil degranulation in activated human whole blood: involvement of adenosine A2 and A3 receptors. J Immunol. 1997 Jun 1; 158(11):5400-5408.
- 25. Nakamura M, Zhao ZQ, Clark KL, Velez DV, Guyton RA, Vinten-Johansen J. A novel adenosine analog, AMP579, inhibits neutrophil activation, adherence and neutrophil-mediated injury to coronary vascular endothelium. Eur J Pharmacol. 2000 May 26; 397(1):197-205.

- 26. Anderson R, Visser SS, Ramafi G, Theron AJ. Accelerated resequestration of cytosolic calcium and suppression of the pro-inflammatory activities of human neutrophils by CGS 21680 in vitro. Br J Pharmacol. 2000 Jun; 130(4):717-724.
- 27. Dianzani C, Brunelleschi S, Viano I, Fantozzi R. Adenosine modulation of primed human neutrophils. Eur J Pharmacol. 1994 Sep 22; 263(1-2):223-226.
- 28. Yan LN, Ozawa K, Kobayashi N. Changes in hepatic energy metabolism in experimental acute pancreatitis. Chin Med J (Engl). 1992 Aug; 105(8):684-688.
- 29. Gross R, Hillaire-Buys D, Bertrand G, Ribes G, Loubatieres-Mariani MM. Diabetes and impaired response of glucagon cells and vascular bed to adenosine in rat pancreas. Diabetes. 1989 Oct; 38(10):1291-1295.
- 30. Quéré I, Hillaire-Buys D, Brunschwig C, Chapal J, Janbon C, Blayac JP, Petit P, Loubatières-Mariani MM. Effects of homocysteine on acetylcholine- and adenosine-induced vasodilatation of pancreatic vascular bed in rats. Br J Pharmacol. 1997 Sep; 122(2):351-357.
- 31.Rodríguez-Nodal F, San Román JI, López-Novoa JM, Calvo JJ. Effect of adenosine and adenosine agonists on amylase release from rat pancreatic lobules. Life Sci. 1995; 57(17):PL253-258.
- 32. Yamagishi F, Homma N, Haruta K, Iwatsuki K, Chiba S. Adenosine potentiates secretin-stimulated pancreatic exocrine secretion in the dog. Eur J Pharmacol. 1985 Dec 3; 118(3):203-209.
- 33.Noji T, Takayama M, Mizutani M, Okamura Y, Takai H, Karasawa A, Kusaka H. KF24345, an adenosine uptake inhibitor, suppresses lipopolysaccharide -induced tumor necrosis factor-alpha production and leukopenia via endogenous adenosine in mice. J Pharmacol Exp Ther. 2002 Jan; 300(1):200-205.
- 34. Hammond JR, Archer RG. Interaction of the novel adenosine uptake inhibitor

3-[1-(6,7-diethoxy-2-morpholinoquinazolin-4-yl)piperidin-4-yl]-1,6-dimethyl-2,4(1H,3H)-quinazolinedione hydrochloride (KF24345) with the es and ei subtypes of equilibrative nucleoside transporters. J Pharmacol Exp Ther. 2004 Mar; 308(3):1083-1093.

- 35. Noji T, Nan-ya K, Katagiri C, Mizutani M, Sano J, Nishikawa S, Karasawa A, Kusaka H. Adenosine uptake inhibition ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis in mice. Pancreas. 2002 Nov; 25(4):387-392.
- 36. Noji T, Nan-ya K, Mizutani M, Katagiri C, Sano J, Takada C, Nishikawa S, Karasawa A, Kusaka H. KF24345, an adenosine uptake inhibitor, ameliorates the severity and mortality of lethal acute pancreatitis via endogenous adenosine in mice. Eur J Pharmacol. 2002 Nov 1; 454(1):85-93.
- 37. Hart ML, Henn M, Köhler D, Kloor D, Mittelbronn M, Gorzolla IC, Stahl GL, Eltzschig HK. Role of extracellular nucleotide phosphohydrolysis in intestinal ischemia-reperfusion injury. FASEB J. 2008 Aug; 22(8):2784-2797.
- 38.Reutershan J, Vollmer I, Stark S, Wagner R, Ngamsri KC, Eltzschig HK. Adenosine and inflammation: CD39 and CD73 are critical mediators in LPS -induced PMN trafficking into the lungs. FASEB J. 2009 Feb; 23(2):473-482.
- 39. Decking UK, Schlieper G, Kroll K, Schrader J. Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release. Circ Res. 1997 Aug; 81(2):154-164.
- 40. Baer HP, Haq A, el-Soofi A, Serignese V, Paterson AR. Potencies of mioflazine and its derivatives as inhibitors of adenosine transport in isolated erythrocytes from different species. J Pharm Pharmacol. 1990 May; 42(5):367-369.
- 41. Suzuki M, Isaji S, Stanten R, Frey CF, Ruebner B. Effect of protease inhibitor FUT-175 on acute hemorrhagic pancreatitis in mice. Int J Pancreatol. 1992 Feb; 11(1):59-65.

- 42.Lombardi B, Estes LW, Longnecker DS. Acute hemorrhagic pancreatitis (massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by DL-ethionine fed with a choline-deficient diet. Am J Pathol. 1975 Jun; 79(3):465-480.
- 43. Kaul A, Chandra M, Misra MK. Adenosine deaminase in ischemia reperfusion injury in patients with myocardial infarction. J Enzyme Inhib Med Chem. 2006 Oct; 21(5):543-546.
- 44. Fröde TS, Medeiros YS. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. Mediators Inflamm. 2001 Aug; 10(4):223-227.
- 45. Kisacik B, Akdogan A, Yilmaz G, Karadag O, Yilmaz FM, Koklu S, Yuksel O, Ertenli AI, Kiraz S. Serum adenosine deaminase activities during acute attacks and attack-free periods of familial Mediterranean fever. Eur J Intern Med. 2009 Jan; 20(1):44-47.
- 46. Ibiş M, Köklü S, Yilmaz FM, Başar O, Yilmaz G, Yüksel O, Yildirim E, Oztürk ZA. Serum adenosine deaminase levels in pancreatic diseases. Pancreatology. 2007; 7(5-6):526-530.
- 47. Bouma MG, Stad RK, van den Wildenberg FA, Buurman WA. Differential regulatory effects of adenosine on cytokine release by activated human monocytes. J Immunol. 1994 Nov 1; 153(9):4159-4168.
- 48.Zhang Y, Fredholm BB. Propentofylline enhancement of the actions of adenosine on neutrophil leukocytes. Biochem Pharmacol. 1994 Nov 29; 48(11):2025-2032.
- 49. Fredholm BB, Zhang Y, van der Ploeg I. Adenosine A2A receptors mediate the inhibitory effect of adenosine on formyl-Met-Leu-Phe-stimulated respiratory burst in neutrophil leucocytes. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1996 Aug-Sep; 354(3):262-267.

- 50. Del Maestro R, Thaw HH, Björk J, Planker M, Arfors KE. Free radicals as mediators of tissue injury. Acta Physiol Scand Suppl. 1980; 492:43-57.
- 51. McCord JM, Wong K. Phagocyte-produced free radicals: roles in cytotoxicity and inflammation. Ciba Found Symp. 1978 Jun 6-8; (65):343-360.
- 52. Suzuki N, Ishii Y, Kitamura S. Mechanism for the increased permeability in endothelial monolayers induced by elastase. Mediators Inflamm. 1994; 3(1):11-16.
- 53. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. Annu Rev Immunol. 2009; 27:669-692.
- 54. Kantari C, Pederzoli-Ribeil M, Witko-Sarsat V. The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. Contrib Microbiol. 2008; 15:118-146.
- 55.Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Takács T, McCarroll J, Saluja AK. The role of NF-kappaB activation in the pathogenesis of acute pancreatitis. Gut. 2008 Feb; 57(2):259-267.
- 56. Morita K, Saida M, Morioka N, Kitayama T, Akagawa Y, Dohi T. Cyclic ADP-ribose mediates formyl methionyl leucyl phenylalanine (fMLP)-induced intracellular Ca(2+) rise and migration of human neutrophils. J Pharmacol Sci. 2008 Mar; 106(3):492-504.
- 57. Soler C, García-Manteiga J, Valdés R, Xaus J, Comalada M, Casado FJ, Pastor-Anglada M, Celada A, Felipe A. Macrophages require different nucleoside transport systems for proliferation and activation. FASEB J. 2001 Sep; 15(11):1979-1988.

謝辞

本研究を行うにあたり、ご懇篤なるご指導とご鞭捷を賜りました九州大学 大学院薬学系研究科薬効安全性学分野黒瀬等教授に深甚なる謝意を表しま す。また、本研究の機会を与えて下さると共に、全面的に御支援下さいまし た協和発酵キリン株式会社安全性研究所所長日下英昭博士、同探索研究所所 長桒原隆博士、同探索研究所主任研究員矢野浩史博士に厚く御礼申し上げま す。また、本研究の遂行にあたり、実験にご協力いただきました協和発酵キ リン株式会社開発本部竹下健一さん、同薬理研究所川合美可さんに心より感 謝申し上げます。



Figure 1 Production and metabolism of adenosine in the normal (A) and adverse (B) condition.

ADA: adenosine deaminase, ADO: adenosine, ADP: adenosine diphosphate, AK: adenosine kinase, AMP: adenosine monophosphate, ATP: adenosine triphosphate, Hx: hypoxanthine, INO: inosine, 5'-N: 5'-nucleotidase, NT: nucleoside transporter, SAH: S-adenosylhomocysteine, SAH: S-adenosylhomocysteine hydrorase, SAM: S-adenosylmethionine, XA: xanthine.



Figure 2 Chemical structure of KF24345.



Figure 3 Inhibitory effects of KF24345 on adenosine uptake in mice ex vivo.

Mice were administered intravenously with 0.3 (\bigcirc), 1 (\Box) or 3 (\blacklozenge) mg/kg of KF24345. Blood samples were collected the indicated times after the treatment and amounts of adenosine uptake were measured as described in 'Materials and Methods'. The values represent the means \pm S.E. of five animals.



Figure 4 Effect of intravenous administration of KF24345 on the mortality in mice with CDE diet-induced acute pancreatitis.

Mice were exposed to CDE diet for 72 hours, and observed up to 144 hours after the onset of CDE diet. Treatment of KF24345 (1.5 mg/kg intravenously) was started with the onset of CDE diet. KF24345 or the vehicle, as control, was administered 4 times every twelve hours thereafter. Values are percentages of the survived out of 10-25 animals. *** P < 0.001, compared with the control group.





Blood samples were collected the indicated times after the onset of normal (\bigcirc) or CDE (\bullet) diet. Serum lipase (A), GPT (B) and LDH (C) were measured as described in "Materials and Methods". The values represent the means \pm S.E. of five animals.



Figure 6 Sequential changes in tissue adenosine in mice with acute pancreatitis induced by CDE diet.

Pancreas (A) and liver (B) samples were collected the indicated times after the onset of normal (\bigcirc) or CDE (\bigcirc) diet. Tissue adenosine was measured as described in "Materials and Methods". The values represent the means \pm S.E. of five animals. * p < 0.05 versus normal diet group.



Figure 7 Changes in ATP metabolite in mouse tissue with acute pancreatitis induced by CDE diet.

Pancreas (A) and liver (B) samples were collected 24 hours after the onset of normal (\Box) or CDE (\blacksquare) diet. Adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP), inosine (INO) and hypoxantine (Hx) were measured as described in "Materials and Methods". The values represent the means \pm S.E. of five animals.





Plasma samples were collected the indicated times after the onset of normal (\bigcirc) or CDE (\bullet) diet. Plasma adenosine was measured as described in "Materials and Methods". The values represent the means \pm S.E. of six or seven animals.



Figure 9 Effects of KF24345 on tissue adenosine in mice with acute pancreatitis induced by CDE diet.

KF24345 was administered intravenously 24 hours after the onset of normal (\triangle) or CDE (\blacktriangle) diet. Vehicle was administered intravenously 24 hours after the onset of normal (\bigcirc) or CDE (\bigcirc) diet. Pancreas (A) and liver (B) samples were collected the indicated times after the administration. Tissue adenosine was measured as described in "Materials and Methods". The values represent the means \pm S.E. of five animals.



Figure 10 Effects of KF24345 on hypoxantine in mouse tissue with acute pancreatitis induced by CDE diet.

KF24345 was administered intravenously 24 hours after the onset of normal (\triangle) or CDE (\blacktriangle) diet. Vehicle was administered intravenously 24 hours after the onset of normal (\bigcirc) or CDE (\bigcirc) diet. Pancreas (A) and liver (B) samples were collected the indicated times after the administration. Tissue hypoxantine was measured as described in "Materials and Methods". The values represent the means \pm S.E. of five animals.



Figure 11 Effects of KF24345 on plasma adenosine in mice with acute pancreatitis induced by CDE diet.

KF24345 was administered intravenously 24 hours after the onset of normal (\triangle) or CDE (\blacktriangle) diet. Vehicle was administered intravenously 24 hours after the onset of normal (\bigcirc) or CDE (\bigcirc) diet. Plasma samples were collected the indicated times after the administration. Plasma adenosine was measured as described in "Materials and Methods". The values represent the means \pm S.E. of four or five animals. * p < 0.05 versus vehicle group.



Figure 12 Effects of adenosine and adenosine uptake inhibitors on fMLP-induced superoxide generation in PMN fractions.

Human PMN fractions were primed with 4 μ g/mL of cytocharacin B and then treated with the indicated concentration of adenosine (A) or with the indicated concentrations of KF24345 (B), dipyridamole (C) and 0 (\bigcirc) or 0.3 (\bullet) μ mol/L of adenosine. 5 min after the treatment, lucigenin and fMLP were added and superoxide generation was measured as described in "Materials and Methods". Results are shown as a percentage of the fMLP-induced superoxide generation (Control) observed in the absence of adenosine and the test inhibitor. The values represent mean \pm S.E. of six separate experiments, each performed in duplicate.



Figure 13 Effects of adenosine and adenosine uptake inhibitors on fMLP-induced elastase release in PMN fractions.

Human PMN fractions were primed with 4 μ g/mL of cytocharacin B and then treated with the indicated concentration of adenosine (A) or with the indicated concentrations of KF24345 (B), dipyridamole (C) and 0 (\bigcirc) or 0.3 (\bigcirc) μ mol/L of adenosine. 5 min after the treatment, fMLP were added and the activity of released elastase was measured as described in "Materials and Methods". Results are shown as a percentage of the elastase activity (Control) observed in the absence of adenosine and the test inhibitor. The values represent mean \pm S.E. of five separate experiments, each performed in duplicate.



Figure 14 Effects of adenosine and adenosine uptake inhibitors on LPS-induced cytokine production in PBMC fractions.

Human PBMC fractions were treated with the indicated concentration of adenosine (A) or with the indicated concentrations of KF24345 (B), dipyridamole (C) and 0 (\bigcirc) or 1 (\bullet) µmol/L of adenosine. One hour after the treatment, the fractions were treated with 10 µg/mL of LPS. The supernatants were collected six hours after the LPS-treatment. TNF- α in the supernatant was measured as described in "Materials and Methods". Results are shown as a percentage of the TNF- α production (Control) observed in the absence of adenosine and the test inhibitor. The values represent mean \pm S.E. of eight separate experiments, each performed in duplicate.



Figure 15 Inhibitory effects of KF24345 on adenosine uptake in blood fractions.

Human PMN (A), PBMC (B) or erythrocyte (C) fractions were treated with 0 (\bullet), 0.1 (\triangle), 0.3 (\Box) or 1 (\bigcirc) µmol/L of KF24345. After the treatment, the fractions were incubated with [³H] adenosine for the indicated time and amounts of adenosine uptake were measured as described in 'Materials and Methods'. The values represent the means of two determinants.



Figure 16 Effects of adenosine and adenosine uptake inhibitors on fMLP-induced elastase release in PMN and erythrocyte fractions.

Human PMN and erythrocyte fractions were primed with 4 μ g/mL of cytocharacin B and then treated with the indicated concentration of adenosine (A) or with the indicated concentrations of KF24345 (B), dilazep (C), dipyridamole (D) and 0 (\bigcirc) or 1 (\bigcirc) μ mol/L of adenosine. 5 min after the treatment, fMLP were added and the activity of released elastase was measured as described in "Materials and Methods". Results are shown as a percentage of the elastase activity (Control) observed in the absence of adenosine and the test inhibitor. The values represent mean \pm S.E. of four separate experiments, each performed in duplicate.



Figure 17 Effects of adenosine and adenosine uptake inhibitors on LPS-induced cytokine production in PBMC and erythrocyte fractions.

Human PBMC and erythrocyte fractions were treated with the indicated concentrations of adenosine and 0 (\bullet), 0.01 (\Box), 0.1 (\triangle) or 1 (\bigcirc) µmol/L of KF24345 (A), dilazep (B) or dipyridamole (C). One hour after the treatment, the fractions were treated with 10 µg/mL of LPS. The supernatants were collected six hours after the LPS-treatment. TNF- α in the supernatant was measured as described in "Materials and Methods". Results are shown as a percentage of the TNF- α production (Control) observed in the absence of adenosine and the test inhibitor. The values represent the means of three determinants.



Figure 18 Effects of adenosine deaminase (ADA) on the inhibitions of LPS-induced TNF- α production by adenosine and adenosine uptake inhibitors in PBMC and erythrocyte fractions.

Human PBMC and erythrocyte fractions were treated with (\blacksquare) or without (\Box) ADA and 10 µmol/L of adenosine and 1 µmol/L of KF24345, dilazep or dipyridamole. One hour after the treatment, the fractions were treated with 10 µg/mL of LPS. The supernatants were collected six hours after the LPS-treatment. TNF- α in the supernatant was measured as described in "Materials and Methods". Results are shown as a percentage of the TNF- α production (Control) observed in the absence of adenosine, ADA and the test inhibitor. The values represent mean \pm S.E. of five separate experiments, each performed in duplicate.

Figure 19 Mechanism of inhibitory effects of KF24345 on acute pancreatitis in mice.



	Normal	Control	KF24345
Amylase	5294 ± 132	15247 ± 2333	12088 ± 1253
Lipase	32 ± 10	1804 ± 390	1399 ± 184
GPT	12 ± 2	17200 ± 1203	12188 ± 914 *
GOT	177 ± 8	35798 ± 2392	26659 ± 1735 *
LDH	260 ± 44	43135 ± 3770	29278 ± 2876 *
			(IU/L)

Table 1 Effects of intravenous administration of KF24345 on the serum parameters in mice with CDE diet-induced acute pancreatitis.

* P < 0.05, compared with the control group.

Pancreas						
Time (h)		ATP	ADP	AMP	INO	Hx
0	Pre	9435 ± 220	1281 ± 183	429 ± 50	14.2 ± 1.1	33 ± 3.0
16	Normal diet	9853 ± 256	1064 ± 71	344 ± 10	14.6 ± 1.5	20 ± 0.4
	CDE diet	7440 ± 244	790 ± 26	259 ± 17	11.3 ± 0.4	1998 ± 146
24	Normal diet	8467 ± 435	1098 ± 63	366 ± 53	12.8 ± 1.9	23 ± 1.9
	CDE diet	7381 ± 162	725 ± 22	244 ± 13	9.1	1871 ± 127
48	Normal diet	8162 ± 459	1291 ± 122	456 ± 54	10.2 ± 0.9	22 ± 1.4
	CDE diet	7489 ± 362	1419 ± 169	548 ± 76	19.0 ± 1.9	1017 ± 96

Table 2 Sequential Changes in adenosine metabolites in mouse pancreas and liver with acute pancreatitis induced by CDE diet.

(pmol/mg dry tissue)

Liver						
Time (h)		ATP	ADP	AMP	INO	Hx
0	Pre	6434 ± 613	2676 ± 302	1570 ± 566	3.3	41 ± 4.4
16	Normal diet	7820 ± 225	1654 ± 114	605 ± 78	11.0 ± 3.4	19 ± 1.3
	CDE diet	6062 ± 198	1259 ± 76	499 ± 83	6.0 ± 0.5	1917 ± 325
24	Normal diet	9446 ± 360	2074 ± 147	787 ± 89	5.4 ± 1.8	26 ± 2.1
	CDE diet	6940 ± 499	1760 ± 37	817 ± 35	5.4 ± 0.5	3125 ± 617
48	Normal diet	9967 ± 252	1808 ± 74	631 ± 36	3.4	N.D. *
	CDE diet	4029 ± 738	1014 ± 101	505 ± 46	7.5 ± 1.6	106 ± 35

* N.D.; Not detected

(pmol/mg dry tissue)

Table 3 Effects of KF24345 on adenosine metabolites in mouse pancreas and liver with acute pancreatitis induced by CDE diet.

Pancreas	Normal diet					
Time (min)		ATP	ADP	AMP	INO	Hx
0	Pre	7405 ± 112	1229 ± 60	256 ± 17	22.2 ± 2.9	19.1 ± 1.7
10	vehicle	7767 ± 269	1305 ± 63	266 ± 28	20.3 ± 1.9	18.4 ± 2.4
	KF	7775 ± 368	1257 ± 47	235 ± 12	20.0 ± 0.9	17.2 ± 1.8
30	vehicle	7998 ± 289	1350 ± 34	269 ± 15	17.6 ± 2.7	17.3
	KF	7993 ± 245	1313 ± 72	295 ± 15	19.4 ± 1.3	13.6
90	vehicle	8077 ± 234	1396 ± 52	295 ± 29	18.6 ± 1.4	39.5 ± 26.6
	KF	8344 ± 296	1453 ± 92	327 ± 24	19.2 ± 1.2	14.6
•						

(pmol/mg dry tissue)

Pancreas	CDE diet					
Time (min)		ATP	ADP	AMP	INO	Hx
0	Pre	11789 ± 552	1129 ± 45	366 ± 20	11.6 ± 0.5	2371 ± 244
10	vehicle	10778 ± 609	1102 ± 44	273 ± 8	11.4 ± 1.1	2262 ± 195
	KF	11237 ± 723	1298 ± 107	358 ± 37	13.4 ± 2.8	2600 ± 108
30	vehicle	10261 ± 204	1373 ± 125	399 ± 60	33.6 ± 22.7	2712 ± 330
	KF	9833 ± 459	1040 ± 85	286 ± 38	13.0 ± 1.4	2325 ± 199
90	vehicle	10323 ± 717	1095 ± 69	267 土 15	3.3	1810 ± 347
	KF	6669 ± 329	1077 ± 95	194 ± 29	17.9 ± 1.1	1496 ± 143

(pmol/mg dry tissue)

Liver	Normal diet					
Time (min)		ATP	ADP	AMP	INO	Hx
0	Pre	8186 ± 345	1952 ± 173	437 ± 68	22.1 ± 2.0	64.7 ± 4.4
10	vehicle	8457 ± 591	1806 ± 95	313 ± 18	12.4 ± 2.8	71.1 ± 1.7
	KF	8390 ± 372	1758 ± 82	387 ± 67	8.3 ± 0.3	74.5 ± 2.6
30	vehicle	7015 ± 504	2112 ± 204	812 ± 185	9.7 ± 1.2	66.2 ± 1.8
	KF	8647 ± 488	1832 ± 72	463 ± 50	8.0 ± 0.5	71.9 ± 2.8
90	vehicle	7135 ± 724	2009 ± 170	760 ± 190	13.9 ± 4.1	62.0 ± 6.3
	KF	7583 ± 350	1592 ± 94	402 ± 65	8.0 ± 1.5	51.7 ± 3.9

(pmol/mg dry tissue)

Liver	CDE diet					
Time (min)		ATP	ADP	AMP	INO	Hx
0	Pre	6217 ± 169	2124 ± 102	1149 ± 108	10.9 ± 2.6	2370 ± 270
10	vehicle	6670 ± 247	1787 ± 153	845 ± 77	13.6 ± 0.6	2459 ± 165
	KF	5895 ± 258	1836 ± 63	934 ± 45	15.0 ± 0.9	2195 ± 312
30	vehicle	6215 ± 410	1951 ± 69	1000 ± 51	14.9 ± 0.5	2490 ± 333
	KF	6684 ± 494	1817 ± 115	851 ± 35	16.1 ± 0.7	3483 ± 275
90	vehicle	6128 ± 232	1833 ± 132	929 ± 117	15.4 ± 1.7	2970 ± 326
	KF	6566 ± 183	1927 ± 158	997 ± 145	16.2 ± 1.6	3246 ± 169

(pmol/mg dry tissue)