

厚生省新薬開発研究事業

微生物の二次代謝産物に由来する  
難病治療薬（E-64）の開発研究

# 昭和56年度研究報告書

班長 今堀和友

昭和57年3月

## ま え が き

難病治療薬 E-64 の開発研究を開始して 3 年を経過した。この間われわれは、あくまで患者に投与できる医薬品の開発を念頭におきつつも、基礎的研究を幅広く展開することを重要視し、研究を進めてきた。

この地道な基礎的研究の集積により、第 3 年次に当る本年度においては、E-64 およびその類縁体が治療薬として有用であることを示す結果が数多く得られた。それらは本報告書中に精しく述べられているが、その中よりいくつかの例を挙げれば次のようになる。

まず筋ジストロフィーの成因に関与すると思われる、カテプシン B, L およびカルシウム依存性中性プロテアーゼを本薬剤は不可逆的に失活させるし、*in vivo* の投与でも阻害がみられる。反面毒性はきわめて低く、種々の医薬品中でも最も低い部類に属することが明らかになった。

一方、本薬剤の臨床の応用を目ざし、次のような新しい研究を展開した。すなわち経口投与の場合を考え、腸間での吸収効率をあげるため、E-64 のエステル体を合成し、期待通りの結果を得たことと、また、よりヒトの疾患に近いと思われる筋ジストロフィーハムスターをモデル動物とし、これへの投与の研究を開始したことである。

なお前にも述べた様に、本組織では着実に基礎的研究を進めてきているので、本報告書の内容の一部は単に新薬開発の一例としてだけでなく、細胞内プロテアーゼの動態や、細胞内蛋白代謝の研究にも資する所があろうと思われる。その方面でも本報告書が活用されれば幸いである。

おわりに、本研究のために絶大な援助を賜った厚生省薬務局の方々、これに応じて研究推進に努力を傾倒された班員の皆様、さらに班の運営のためあらゆる援助を頂いた大正製薬の開発部の方々に深謝するものである。

班を代表して  
今 堀 和 友

# 目 次

まえがき

## I E-64 類縁体の開発

1. E-64 類縁体の製造……………沢田 二郎 9
2. E-64 類縁体の *in vivo* におけるプロテアーゼ阻害 ……沢田 二郎 13
3. E-64-c エステル誘導体の生物薬剤学的研究……………沢田 二郎 29
4. E-64 類縁体の安全性に関する研究……………大関 正弘 35
5. E-64 およびその類縁体の筋ジストロフィーハムスターにお  
ける生体内動態 ……大関 正弘 39
6. E-64-c の生体内動態に関する研究 (その 2) ……大関 正弘 47

## II 酵素レベルでの効果

7. カルシウムプロテアーゼとイノシトール燐脂質の代謝回転 ……西塚 泰美 57
8. カルシウムプロテアーゼ類の性質とこれに対する E-64 およ  
び類縁体の阻害効果 ……今堀 和友 63
9. E-64-c の心筋蛋白質分解に及ぼす影響……………江橋 節郎 69
10. 筋ジストロフィーハムスターにおけるチオール性カテプシ  
ンの活性に対する E-64 投与の効果 ……勝沼 信彦 73
11. 筋ジストロフィーチキンにおける筋ガングリオシドの代謝  
に関する研究 ……宮武 正 79

### Ⅲ 細胞・組織レベルでの効果

12. 初代培養肝細胞の蛋白代謝に及ぼすロイペプチンと E-64 の  
影響 .....市原 明 83
13. 培養筋細胞の変性に及ぼす E-64-c の作用 .....小沢鉄二郎 87
14. 培養筋細胞の蛋白代謝に及ぼす E-64-c の影響 .....石浦 章一 91
15. ニューロフィラメント変性に対する E-64-c の効果 (続報) …杉田 秀夫 97
16. 脳ミエリン蛋白の *in vitro* における分解に対する E-64 の  
効果について .....宮武 正 103
17. 移植筋の再生に及ぼす E-64 の効果 .....寺尾 寿夫 107

### Ⅳ 個体レベルでの効果

18. ラット組織に存在するチオールプロテアーゼインヒビター  
について .....勝沼 信彦 115
19. E-64-c の一般薬理作用.....福原 武彦 121  
～諸種摘出臓器標本に及ぼす影響～
20. E-64-c のグルタチオン関連酵素系への影響.....北川 晴雄 131
21. E-64 およびその類縁体の筋ジストロフィー・ハムスターに対  
する薬効に関する研究 .....大関 正弘 135

## I E-64 類縁体の開発

1. E-64 類縁体の製造 ..... 沢田 二郎
2. E-64 類縁体の *in vivo* におけるプロテアーゼ阻害 ..... 沢田 二郎
3. E-64-c エステル誘導体の生物薬剤学的研究 ..... 沢田 二郎
4. E-64 類縁体の安全性に関する研究 ..... 大関 正弘
5. E-64 およびその類縁体の筋ジストロフィーハムスターにおける生体内動態 ... 大関 正弘
6. E-64-c の生体内動態に関する研究 (その2) ..... 大関 正弘

# 1. E-64 類縁体の製造

沢田二郎\*

研究協力者 花田和紀\* 玉井正晴\* 安達孝\*  
小熊清司\* 柏木敬子\* 小西直子\*  
大村貞文\*

## 目 的

E-64 類縁体, 中でも E-64-c が *in vitro* で  $\text{Ca}^{2+}$ -activated neutral protease (CANP) および Cathepsin B, L などのチオールプロテアーゼを最も強く阻害し, その製造面の検討からも有用性が高いことが報告されてきた。

しかしながら, これを本研究の最終目標である筋ジストロフィーの治療薬として開発しようとする時, さらに高い生体内利用性を目指した改良が望まれる。すなわち, 人患者への投与を想定し, その標的器官である骨格筋, あるいは心臓への薬物の移行性に留意しなければならない。

この目的にそって, ラット, モルモット, 犬等の哺乳動物に投与した時の, 上記酵素の変動を一つの指標としてより優れた bioavailability を有する薬物の製造を志向して, E-64-c の prodrug 化を主題とし, 併せて既報の E-64-a 等についても比較検討した。

本研究の目的は, これらの薬物の製造法を確立し, 有用な化合物を供給することにある。

## 方 法

E-64-c のエチルエステル体である Ep-453 は E-64-c 合成の中間体でありその合成経路は図1に示した通りである。この詳細はすでに報告した<sup>1)</sup>。Ep-460, Ep-461 はいずれも E-64-

a の中間産物である。この合成はすでに報告<sup>1)</sup>したのでここではその概要を図2に示す。

Ep-487 は E-64-a 製造法に準じ図3の方法によった。次にこの方法を具体的に説明する。

1. L-トランスエポキシコハク酸モノエチルエステル

D-酒石酸より既報<sup>2)</sup>の方法に従い立体選択的に合成した。

2. N-(t-Butoxycarbonyl-L-leucyl)-1,4-diaminobutane

N-(t-Butoxycarbonyl-L-leucyl)-N'-benzyloxycarbonyl-1,4-diaminobutane 10 g をメタノール 100 ml に溶解し, 5% Pd-C 0.5 g および Pd-black 0.3 g を加え弱い水素気流下室温にて 5 hr 激しく攪拌した。触媒を汜別後, 減圧下メタノールを十分留置し, 得られた油状の目的物 6.23 g をそのまま次の反応に用いた(収率90%)。

3. N-(t-Butoxycarbonyl-L-leucyl)-N'-acetyl-1,4-diaminobutane

N-(t-Butoxycarbonyl-L-leucyl)-1,4-diaminobutane 7.6 g および triethylamine 2.81 g をジクロロメタン 50 ml に溶解し, acetyl chloride 2.0 g のジクロロメタン溶液を氷冷攪拌下滴下し, 氷冷下2時間, ついで室温で1時間攪拌した。反応液を 1 N HCl 溶液, 飽和重曹水および飽和食塩水で順次洗浄し, 乾燥後濃縮乾固した。得られた残渣を酢酸エチル-エチルエーテルより結晶化して目的物 7 g を得た(収率81%)。

\* 大正製薬株式会社総合研究所

I E-64 類縁体の開発

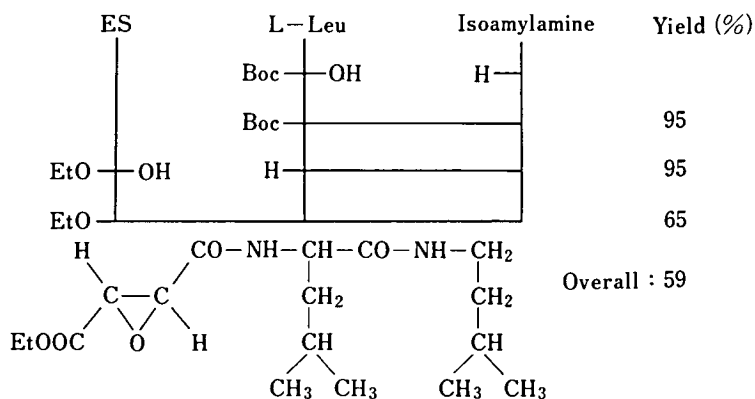


図1 Ep-453 の製造

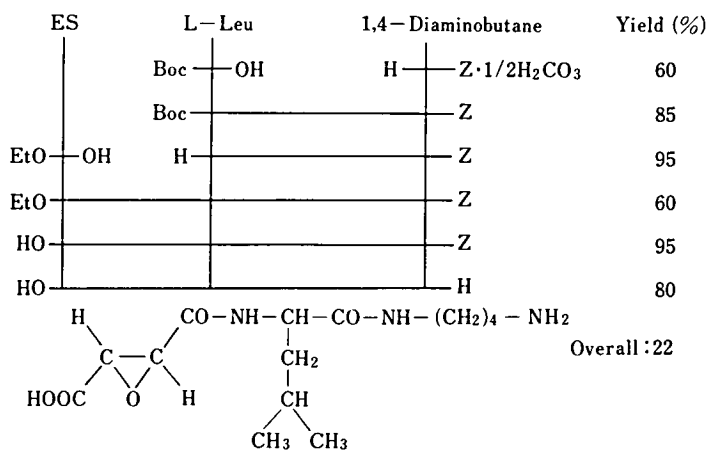


図2 E-64-a の製造

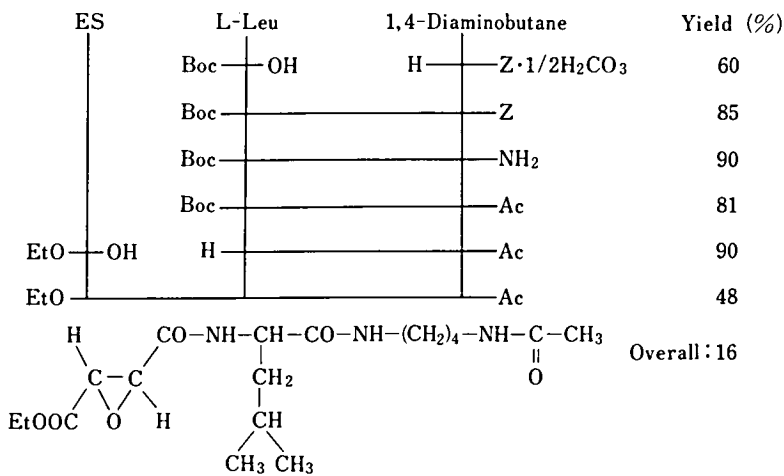
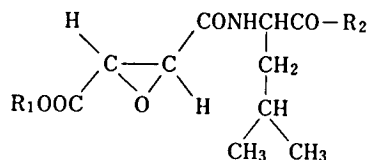


図3 Ep-487 の製造

1. E-64 類縁体の製造

表1 E-64 類縁体の昭和56年度製造量



Compounds	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Total amount (g)
E-64-a	H	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	154.8
Ep-460	H	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NHCOOCH <sub>2</sub> -	15.0
Ep-461	Et	"	28.5
Ep-487	Et	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NHCOCH <sub>3</sub>	7.37
Ep-453	Et	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH< CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	24.7

4. N-L-Leucyl-N'-acetyl-1, 4-diaminobutane  
N-(t-Butoxycarbonyl-L-leucyl)-N'-acetyl-1, 4-diaminobutane 5.95 g を 99% 蟻酸 180 ml に溶解し室温で 4 時間攪拌した。蟻酸を減圧下留去した後、水に溶解し、氷冷下 10% 苛性ソーダ溶液でアルカリ性とした後、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を飽和食塩水で洗浄、乾燥、濃縮し得られた油状の目的物 3.8 g をそのまま次の反応に使用した (収率 90%)。

5. N-[N-(L-3-trans-Ethoxycarbonyloxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-N'-acetyl-1, 4-diaminobutane (Ep-487)

N-L-Leucyl-N'-acetyl-1, 4-diaminobutane 3.8 g, L-trans-epoxysuccinic acid monoethyl ester 2.5 g, N-methylmorpholine 1.9 g および 1-hydroxybenzotriazol 2.53 g をテトラヒドロフラン 50 ml に溶解し、氷冷攪拌下、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride 3.58 g を徐々に加えた。氷冷下 2 時間、室温で 2 時間攪拌後濃縮し、残渣を酢酸エチルに溶解した。酢酸エチル溶液を 1 N HCl, 飽和重曹水 および 飽和食塩水で順次洗浄し乾燥後濃縮乾固した。得られた白色粉末を酢酸エチル-エチルエーテルより結晶化し目的物 2.8 g を得た (収率 48%)。

m. p. 173~174°C,  $[\alpha]_D^{25} = +44.4^\circ$  (C=1, MeOH), 元素分析: Calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>:

C, 56.09; H, 8.11; N, 10.90. Found: C, 56.17; H, 7.94; N, 7.94.

結果および考察

E-64-c, E-64-a など E-64 類縁体の生体内利用率を向上させる具体的な手段としてこれらの prodrug 化を試みた。この可能性を検討する目的で表 1 に示す誘導体を得た。まず E-64-c のエチルエステル体を得、その有用性について検討した。この結果は別項で報告する (製剤学的検討の項参照)。E-64-a の誘導体 Ep-461 も、この目的に則して得られた化合物である。この化合物の場合、その CANP 或いは Cathepsin の阻害作用の面からみると十分目的に適う化合物であったが、ベンジルオキシカルボニル基 (Z 基) に起因すると思われるラットでの体重増加抑制作用が認められたので Z 基をアセチル基 (Ac 基) に交換した Ep-487 を得、基礎的な検討材料に供した。

Ep-453, Ep-487 はいずれも腹腔内投与で筋ジストロフィーハムスター BIO 14.6 の骨格筋および心臓の CANP および Cathepsin B, L の活性を強く抑制しており (別項参照), 実用性の面からこのような prodrug 化が有意義であることを示唆している。また、このような修飾により経口剤としても十分可能性が出てきたことは特筆に値する。なお、本研究により得られ



## I E-64 類縁体の開発

た化合物の一覧を表1に一括して示す。これらの化合物は主として、生物薬剤学的研究および薬効評価試験に供された。

### 結 論

E-64-c の prodrug 化により実用に即した改善を主目的に製造面から本研究を進め、そのエチルエステル体である Ep-453 が、腹腔内投与での生体内利用率の向上のみならず、経口剤としても十分利用しうる可能性があるという結

果を得、さらに本化合物の製造法を確立した。併せて、E-64-a に関する同様な知見から、E-64 の類縁体の prodrug に関する基礎を確立した。

### 参 照 文 献

- 1) 沢田二郎：E-64 及びその類縁体の製造に関する研究，昭和54年度研究報告書，9，1980.
- 2) 沢田二郎：L-トランスエポキシコハク酸製造法に関する研究，昭和54年度研究報告書，15，1980.

## 2. E-64 類縁体の in vivo におけるプロテアーゼ阻害

沢田 二郎\*

研究協力者 花田和紀\* 玉井正晴\* 小熊清司\*  
安達孝\* 柏木敬子\* 岡崎忠靖\*  
小西直子\* 大村貞文\*

### 目 的

E-64 およびその類縁体は種々の動物由来の精製された  $\text{Ca}^{2+}$ -activated neutral protease (CANP) およびカテプシン B, L, H 等のチオールプロテアーゼを強く阻害することはすでに詳しく報告されている。一方, in vivo の作用についてもラット肝, あるいは筋ジストロフィーチキン骨格筋等において確認されている<sup>1,2)</sup>。

本年度, 本研究班では新たに実験モデル動物として筋ジストロフィーハムスター (BIO 14.6 系) を用い薬効評価実験が拡大されることになったが, 筋ジストロフィー治療薬を志向する場合, その標的臓器として重要な骨格筋, あるいは心筋での CANP, あるいはカテプシン群の挙動を明確に把握することは極めて重要であろう。本研究は該モデル動物であるジストロフィーハムスターに E-64 およびその類縁体を投与した時の上記プロテアーゼの変動を追跡し, 本薬物による治療法を確立する目的で行われた。

なお, 本研究を実施するに際し, CANP およびカテプシン群の微量標本を用いた分別定量法を確立し, 本法を用いジストロフィーハムスターの臓器, 特に心筋, 骨格筋におけるこれらのプロテアーゼの薬物投与による影響を正常動物と対比させながら詳しく調べた。この結果について報告する。

### 材料および方法

#### 1) E-64 およびその類縁体

本研究に使用した E-64 およびその類縁体の構造を図 1 に示した。Ep-454 のみエポキシコハク酸部分が DL 体であるが, 他の類縁体はすべて L 体である。なお, 構成アミノ酸はすべて L 体である。

#### 2) 使用動物

ラットは静岡県実験動物農業協同組合より入手した 7~8 週令のウィスター系, 雄性を使用した。筋ジストロフィーハムスター (BIO 14.6) および同系列の無発症ハムスター (BIO F<sub>1</sub>B) は, BIO-RESEARCH CONSULTANTS, Inc. (ケンブリッジ, 米国) より, 正常対照のゴールデンハムスターは金丸動物店より入手し使用した。いずれも雄性で, 購入後, 当社研究所で 1 週間予備飼育したのち, 7~12 週令で実験に供した。

#### 3) 薬物投与方法

##### i) 腹腔内投与

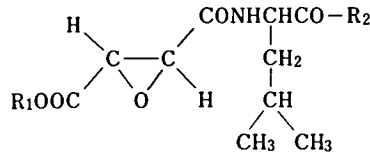
特記しない限り 0.1% Tween-80 を含む 0.5% CMC 溶液に薬物を 50 mg/ml の割合で懸濁または溶解し使用した。

##### ii) ミニポンプ法

E-64-a は水溶液として, E-64-c は重曹で中和後水溶液として用いた。なお, オスモティックミニポンプは Alzet® (東海医理科) を使用した。

\* 大正製薬株式会社総合研究所

I E-64 類縁体の開発






	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
E-64	H	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NHC-NH <sub>2</sub>    NH
E-64-a	H	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>
Ep-460	H	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NHCOOCH <sub>2</sub> 
Ep-461	Et	"
Ep-487	Et	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NHCOCH <sub>3</sub>
Ep-479	H	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> NH <sub>2</sub>
E-64-c	H	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH 
Ep-453	Et	"
Ep-454	Et	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> 

図1 E-64 およびその類縁体の構造

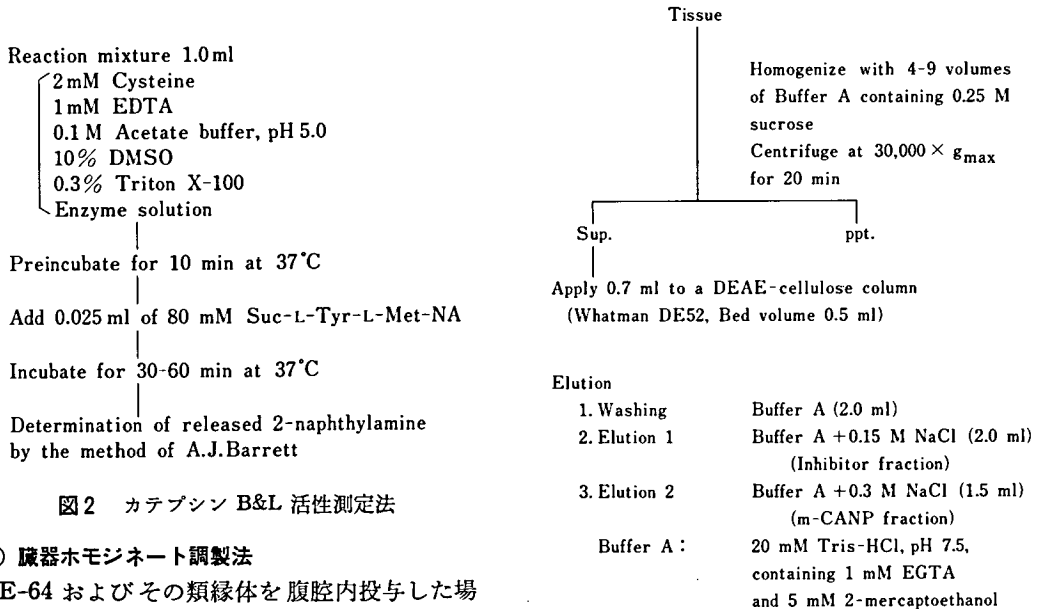


図2 カテプシン B&L 活性測定法

4) 臓器ホモジネート調製法

E-64 およびその類縁体を腹腔内投与した場合 3 時間後、オスモティックミニポンプを用いて投与した場合はミニポンプを除去した直後にいずれも放血致死させ、直ちに下大静脈より 50~100 U/ml ヘパリンを含む生食水を通し、可能な限り臓器中の血液を除去した後、取り出した臓器を -80°C に凍結保存した。

臓器は細断した後、0°C で 0.1% Triton

図3 DEAE セルロースを応用した CANP 分画法

X-100 を含む PBS (pH 7.4) を加え、ウルトララックスホモジナイザー (Janke & Kun- kel 社製) を用いて、骨格筋 (大腿四頭筋) の場合は 20%, 心臓および肝臓では各 10% ホモジネートを調製し、トレックスガーゼで濾過し、そ

2. E-64 類縁体の in vivo におけるプロテアーゼ阻害

表1 新規基質の種々のカテプシンによる加水分解性 (勝沼らのデータより)

Substrate	Cathepsin (U/mg protein)			
	B	L	H	C
BANA	0.559	0.183	0.822	0.123
Suc-L-Tyr-L-Met-NA	2.246	1.565	0	0.050

の汙液を酵素液とした。

5) 酵素活性測定法

i) カテプシン B&L は Succinyl-L-Tyr-L-Met-2-naphthylamide を基質として、図2のごとく反応させ、遊離する 2-naphthylamine を A. J. Barrett の方法<sup>3)</sup>で測定した。

ii) カテプシン D; 0.1 M 酢酸 buffer (pH 3.8), 0.3% Triton X-100, 0.84 mg [<sup>14</sup>C]-methylhemoglobin (0.2 μCi/mg) および酵素液を含む全量 0.2 ml の反応液を 30°C, 30分間 incubate した後、TCA 上清の放射能を測定し、酵素活性とした。

iii) Acid phosphatase; 6.0 mM Sodium *p*-nitrophenylphosphate, 33 mM acetate buffer (pH 5.0), 0.3% Triton X-100 および酵素液を含む反応液 3 ml を 37°C, 10分間 incubate した後、1 N NaOH 1 ml を加えて反応を停止し、遊離した *p*-nitrophenol を 405 nm の吸光度で測定した。

iv) CANP 活性測定法

上述の様にして採取した臓器を用い図3に示すように処理して K. Suzuki ら<sup>4)</sup>により新たに定義された m-CANP fraction を得た。この m-CANP fraction の活性を [<sup>14</sup>C] methyl casein を基質として既報の方法<sup>5)</sup>で測定した。

等電点沈殿法による測定は既報の方法<sup>6)</sup>に準じて行った。

なお、ここで必要に応じて測定した蛋白量はいずれも Lowry 法<sup>7)</sup>によった。

結 果

1. Succinyl-L-Tyr-L-Met-2-naphthylamide を用いるカテプシン B & L 活性測定法

特異性が高く、かつ、高感度のカテプシン活

性測定用基質の開発を目指し、勝沼らとの協同研究でメチオンをベースとして約30種のペプチドを新たに合成して検討した結果、表1に示すように Succinyl-L-Tyr-L-Met-2-naphthylamide が従来カテプシン B あるいは H 用基質として良く用いられて来た N-α-Benzyl-L-Arg-2-naphthylamide (BANA) よりカテプシン B および L に対して、特異性、感受性共に、はるかに高いことがわかった。

この基質の特異性をさらに検討するため、ラット肝ホモジネートを用い本基質を分解する酵素活性の E-64 に対する感受性を検討した。図4に示すようにその活性は非常に低濃度の E-64 でほぼ完全に阻害されることから、この Succinyl-L-Tyr-L-Met-2-naphthylamide の分解は大部分カテプシン B および L 様酵素によるものと考えられる。一方 L-Tyr-L-Met-naphthylamide は E-64 に比較的感受性の低いカテプシン C によってよく分解される基質であるが、事実本基質の分解活性の E-64 に対する感受性は、図4に示したように、前者と比べてはるかに低い。CANP はこれらの基質に作用しない。したがって Succinyl-L-Tyr-L-Met-naphthylamide を分解する動物臓器ホモジネート中の活性のほとんどはカテプシン B および L と考えられ、さらに両酵素のこの基質に対する感受性に大差がないことからその全活性は両酵素の和であると考えられる (カテプシン B & L と表示する)。

この基質を用いると 50~100 mg の湿重量に相当する臓器ホモジネートでもカテプシン B & L 活性が測定でき、表2に示したように、その活性の強さは肝臓>心臓>筋肉の順であった。

2. E-64 およびその類縁体の in vitro におけるカテプシン B & L 阻害活性

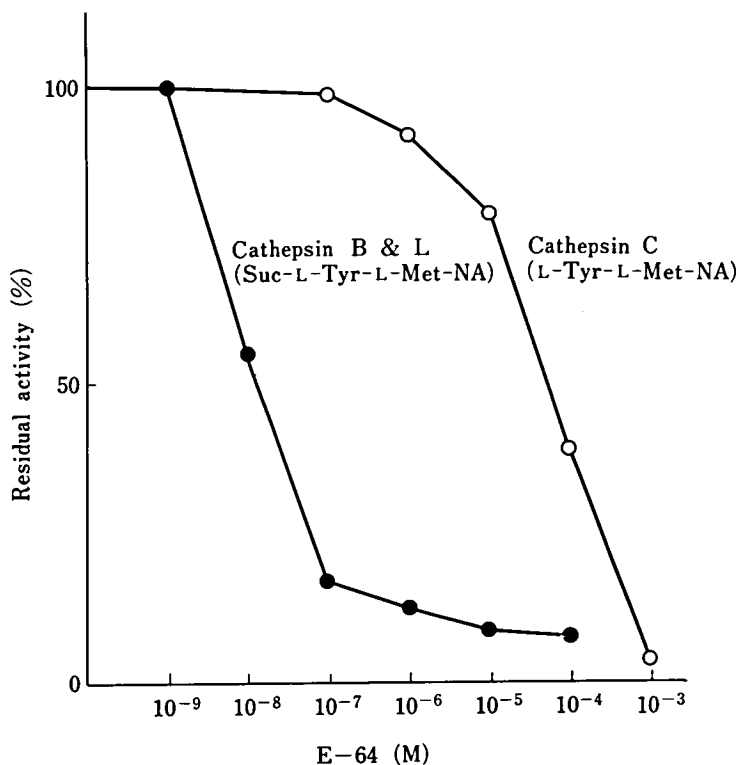


図4 E-64 の Succinyl-L-Tyr-L-Met-NA の加水分解阻害活性

表2 Succinyl-L-Tyr-L-Met-NA のラット臓器ホモジネートによる加水分解性

Tissues	Release of 2-naphthylamine (nM/min/g·tissue)	
	pH 5.0	pH 6.0
Muscle	16.1	465
Heart	52.6	17.1
Liver	329	289

ラット心臓ホモジネートを用い、*in vitro* での E-64 およびその類縁体のカテプシン B & L 阻害活性を測定した結果を図5に示した。すべての化合物が  $10^{-7} \sim 10^{-9}$  M という非常に低い濃度で阻害を示しており、その強さの傾向は、Hashida ら<sup>1)</sup> および A. J. Barrett ら<sup>8)</sup> による肝臓由来の精製カテプシンでの結果とよく符合する。

中でも、Ep-460 は特に強い阻害活性を示したが、エポキシコハク酸のフリーカルボキシル基をエステル化した高脂溶性誘導体である Ep-453, 454 および 461 は対応するフリー体に比

べて *in vitro* では比較的弱い阻害活性しか示さなかった。

### 3. E-64 およびその類縁体のラットにおけるカテプシン B & L 阻害活性

E-64 およびその類縁体の単回投与による *in vivo* でのカテプシン B & L 阻害活性は、図6に示すように *in vitro* での結果と多少違い、E-64-a が最も強く、また、*in vitro* では比較的弱かったエステル体の Ep-453 および 487 にもかなり強い阻害活性が見られた。このことは、これらの薬物の組織への移行性が極めて重要な要因であることを意味しており、エステル

2. E-64 類縁体の in vivo におけるプロテアーゼ阻害

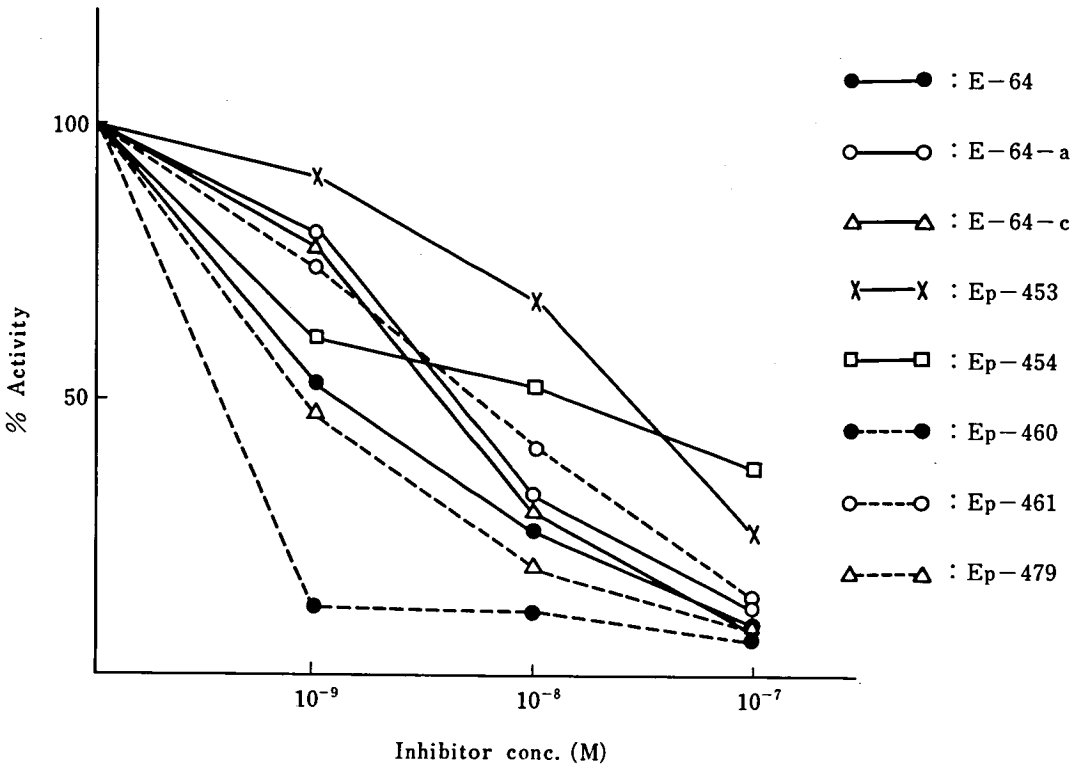


図5 In vitro における E-64 およびその類縁体によるラット心臓ホモジネート中  
カテプシン B & L 阻害活性

体は対応するフリー体の prodrug となりうることを示唆している。

次に5日間連投した時の結果を図7に示した。単回投与と比べて残存酵素活性にあまり大きな差はなく、E-64 類縁体には組織内への顕著な蓄積効果はないと思われた。

なお、本実験で、Ep-461 では体重減少が認められ、保護基による毒性が示唆されたので、以後はそのベンジルオキシカルボニル基をアセチル基に変えた Ep-487 に切り替えた。

次に、最も強い活性を示した E-64-a を用い、100 mg/kg をラットに腹腔内投与した後の酵素活性の変動を経時的に調べたところ、カテプシン B & L 活性は筋肉、心臓共に、ほぼ3時間後から回復をはじめ、24時間後にほぼ元のレベルに戻った(図8)。

一方、E-64-a は同じライソゾーム酵素であ

るカテプシン D および Acid phosphatase のレベルにはあまり大きな影響を与えないという事実、本物質が試験管内でライソゾーム膜に何ら影響を与えない事実を考え合わせると、その作用はクロロキンのようなライソゾームに対する直接作用ではないといえる。

E-64-a による in vivo でのカテプシン B & L 阻害活性は、図9に示すように肝臓>筋肉>心臓の順に強く、この差は阻害剤の臓器細胞内への移行性の差を反映していると思われる。カテプシン D は E-64 類縁体では直接阻害されないにもかかわらず、肝臓で若干低下していた。この理由については今のところ十分説明できない。

4. 筋ジストロフィーハムスター (BIO 14.6) 諸臓器の酵素活性および E-64-a 投与による影響

まず、無発症 F<sub>1</sub>B および正常ゴールデンハム

I E-64 類縁体の開発

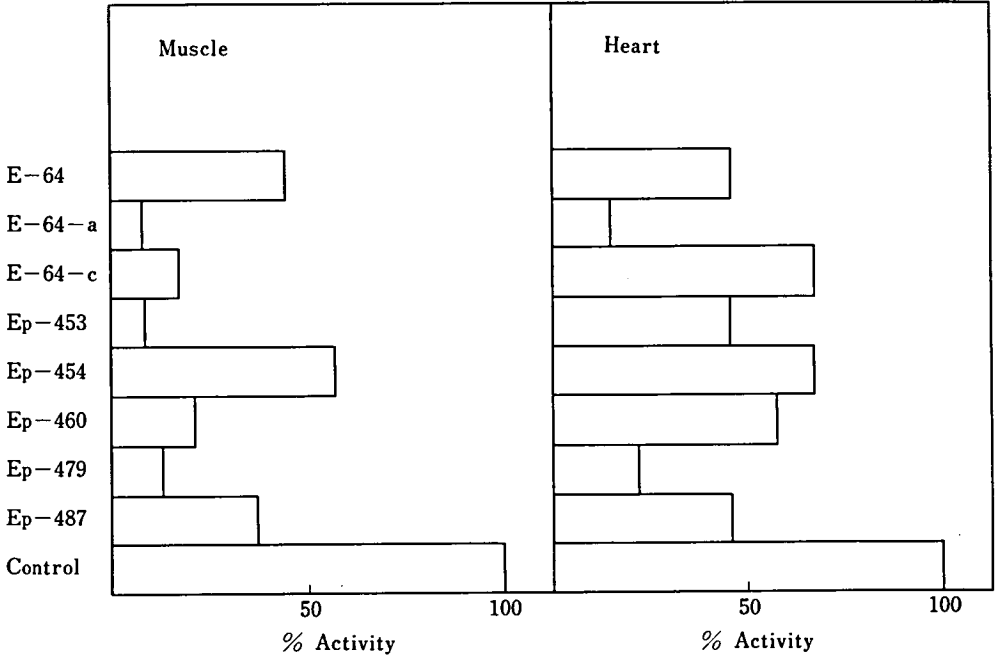


図6 In vivo における E-64 およびその類縁体によるラット筋肉および心臓カテブシン B & L 阻害活性  
 ウィスター系ラット (7週令) に 100 mg/kg 腹腔内投与した。(n=4)

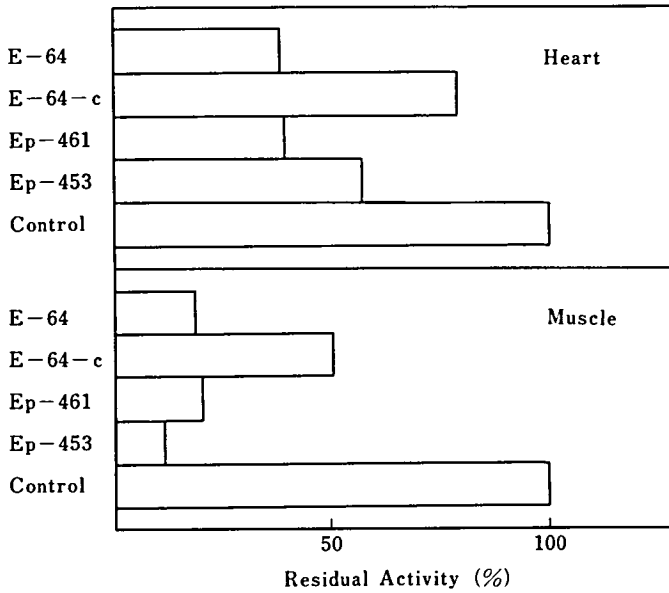


図7 E-64 およびその類縁体の5日間連続投与によるラット筋肉および心臓カテブシン B & L 阻害活性  
 ウィスター系ラット (7週令) に 100 mg/kg/day 腹腔内投与した。(n=4)

2. E-64 類縁体の in vivo におけるプロテアーゼ阻害

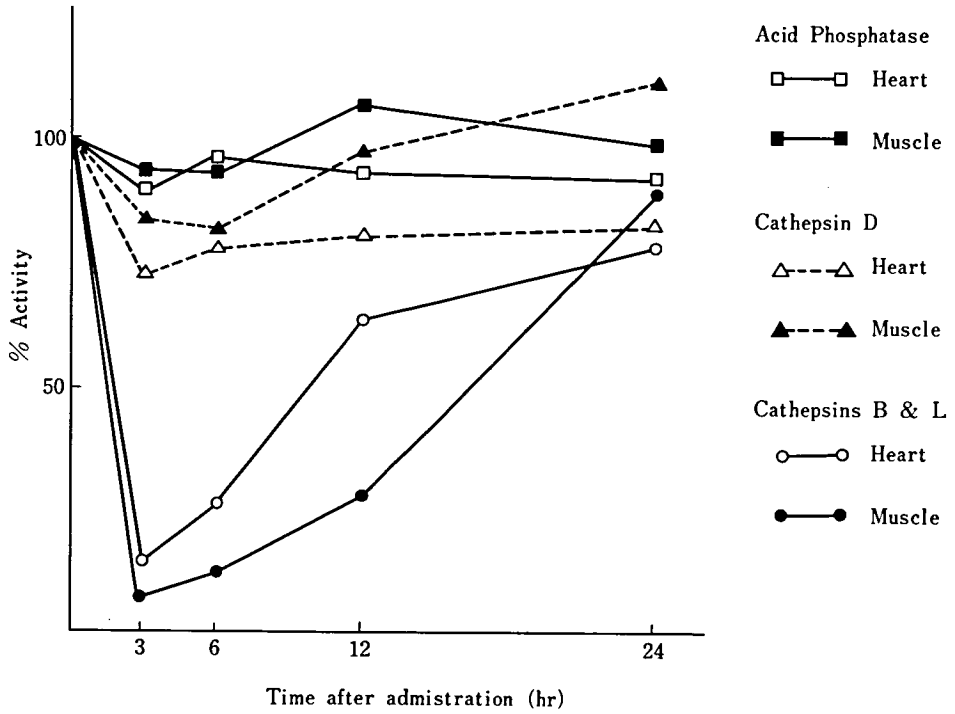


図8 E-64-a 投与後のラットライソゾーム酵素活性の経時変化  
 ウィスター系ラット (6週令) に 100 mg/kg 腹腔内投与した。(n=4)

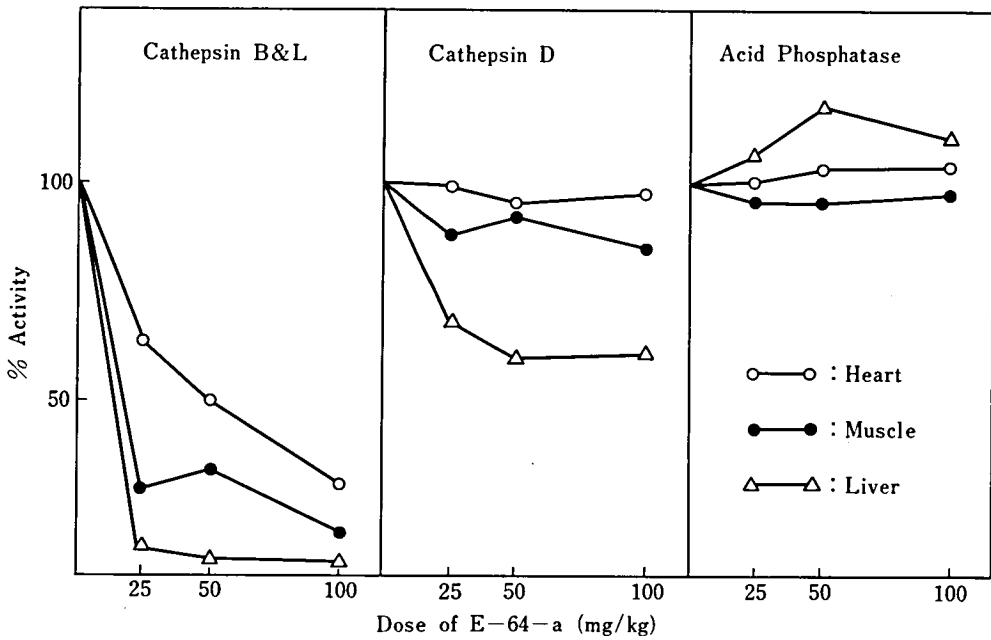


図9 E-64-a によるラット臓器カテプシン B & L 阻害活性の用量依存性  
 ウィスター系ラット (8週令) に腹腔内投与した。(n=4)



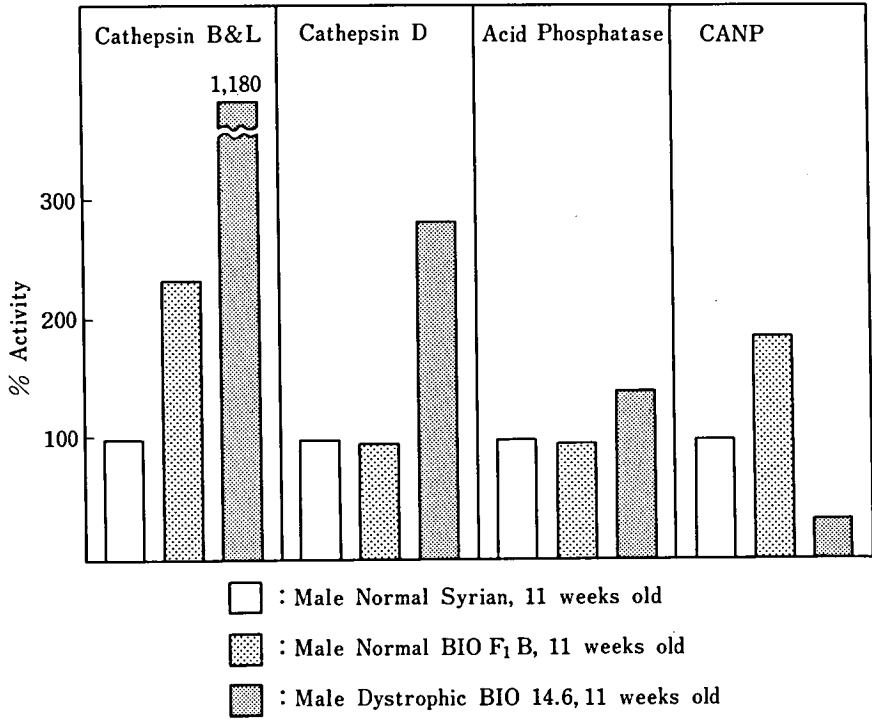


図10 筋ジストロフィーハムスターと無発症ハムスターの筋肉中酵素活性の比較

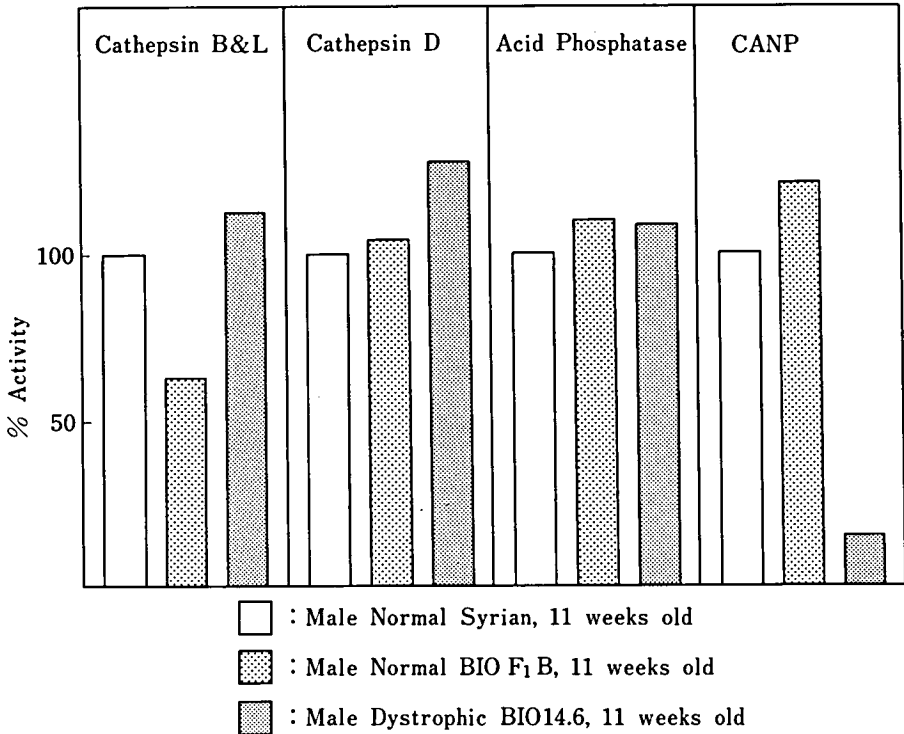


図11 筋ジストロフィーハムスターと無発症ハムスターの心臓中酵素活性の比較

2. E-64 類縁体の in vivo におけるプロテアーゼ阻害

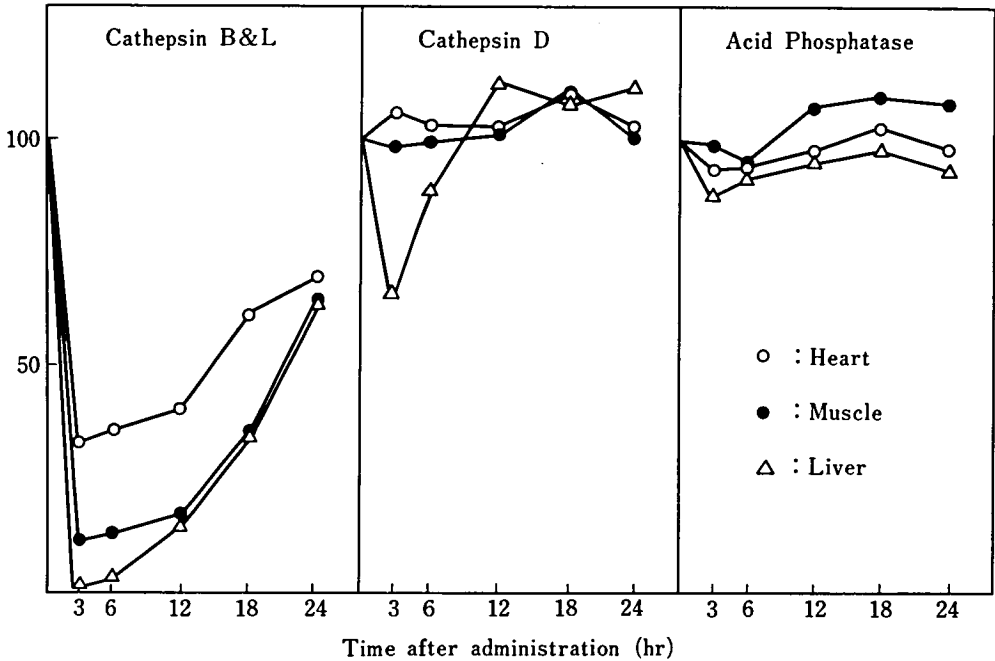


図12 E-64-a 投与後の正常ハムスター臓器中ライソゾーム酵素活性の経時変化  
 ゴールデンハムスター (8週令) に100 mg/kg 腹腔内投与した。(n=4)

スターとの骨格筋および心臓の酵素活性を比較した(図10, 11)。BIO 14.6 は、無発症動物に比べ骨格筋でカタペシン B & L が約6~10倍, カテプシンDが約3倍高く, Acid phosphatase も若干上昇していた。しかし心臓ではいずれの酵素も上昇しているが, その程度は軽微である。

BIO 14.6 に E-64-a を 100 mg/kg 腹腔内投与した場合, 正常ゴールデンハムスター (図12) およびラット (図6) の場合と比べて, カテプシン B & L 活性の回復が遅く, 36時間後でも, いずれの臓器においても元のレベルまでには戻らなかった (図13~15)。

このように BIO 14.6 における E-64-a のカタペシン B & L 阻害作用は, 正常ラットあるいはハムスターよりも, より顕著であった。

一方, CANP 活性は既報の等電点沈殿法<sup>5)</sup>で測定すると BIO 14.6 は骨格筋, 心臓共に, F<sub>1</sub>B および正常ハムスターに比べてはるかに低い値を示した (図10, 11)。この点について後でさらに詳しくふれる。

5. E-64 類縁体のオスモティックミニポンプ投与による臓器酵素活性への影響

以上の実験ではすべて E-64 類縁体を腹腔内へ投与したが, 動物体内に埋め込み, 薬物を持続的に一定量ずつ徐々に放出させることのできるオスモティックミニポンプを用い, BIO 14.6 に E-64-c を 50 mg/kg/day になるように調整し, 2週間投与した。骨格筋のカテプシン B & L は強く抑制され, ほぼ正常動物のレベルまで低下しており, カテプシンDおよび Acid phosphatase 共にわずかに抑制傾向がみられた (図16)。心臓ではカタペシン B & L のみが正常レベルまで抑制され, 他の酵素活性には影響がなかった (図17)。一方, 肝臓ではカタペシン B & L は, ほぼ正常レベルまで抑制されていたが, カテプシンD, Acid phosphatase 共に, 約20%程度上昇していた (図18)。これら酵素の上昇は, すでに報告したように大量投与により発現する肝および腎での弱い副作用<sup>9)</sup>を反映しているとも考えられるが, 現在のところ, この原因は明らかではない。

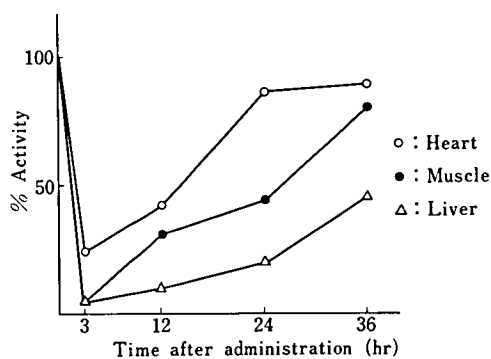


図13 E-64-a 投与後の筋ジストロフィーハムスター臓器中カテプシン B & L 活性の経時変化  
 BIO 14.6 ハムスター (9週令) に 100 mg/kg 腹腔内投与した。(n=4)

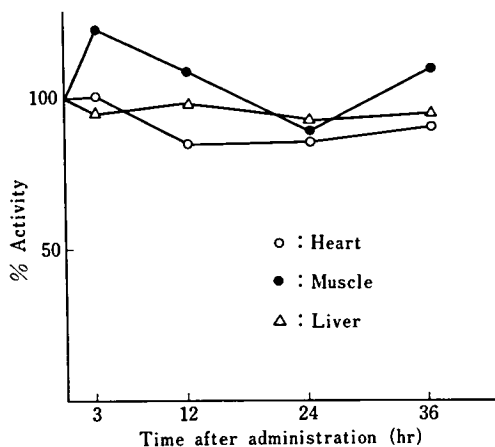


図15 E-64-a 投与後の筋ジストロフィーハムスター臓器中 Acid phosphatase 活性の経時変化  
 BIO 14.6 ハムスター (9週令) に 100 mg/kg 腹腔内投与した。(n=4)

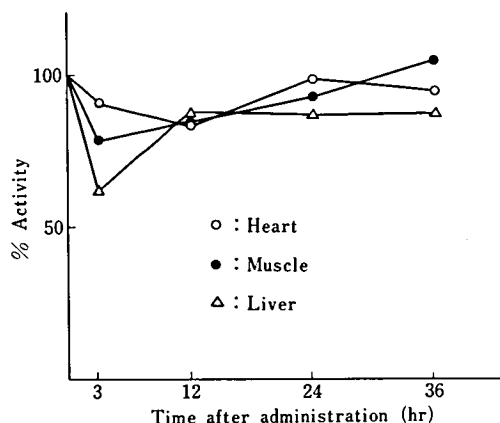


図14 E-64-a 投与後の筋ジストロフィーハムスター臓器中カテプシンD活性の経時変化  
 BIO 14.6 ハムスター (9週令) に 100 mg/kg 腹腔内投与した。(n=4)

次にラットでの比較において、最も強い作用を示した E-64-a と上述の E-64-c をオスモティックミニポンプを用いて正常ハムスターに投与し、比較した結果、E-64-a の方がカテプシン B & L をより強く阻害し、加えて肝におけるカテプシン D および Acid phosphatase 等の上昇が認められず、カテプシン B & L 阻害活性に関する限り、E-64-a の方が E-64-c より優れていることがわかった (図19~21)。

6. 筋ジストロフィーハムスター臓器中 CANP 活性

上述のように、従来採用してきた等電点沈殿法を用いると筋ジストロフィーハムスターの骨格筋および心臓中 CANP 活性はゴールデンハムスターのその約 20% しか認められなかった (図16, 17)。両者の CANP の等電点が違う可能性もあるので、精査した結果、図22~24に示した様に、肝では両者に差がなかったが、骨格筋および心臓では、至適 pH に違いがあり、その活性の最大値は筋ジストロフィーの方がかなり低かった。

等電点沈殿法は比較的簡便な CANP 測定法ではあるが、この方法がすべての臓器標本に適用しうるか否かは明らかではない。そこで上記の結果を確認するため、内在性インヒビターを完全に除去することの出来る DEAE-cellulose カラムクロマト法との比較を試みた。図25に示すようにカラム法での測定値は等電点沈殿法のそれと違い、骨格筋では BIO 14.6 の方がわずかではあるが高くなり、心臓でもほぼ同程度であった。また正常ハムスターでも等電点沈殿法での測定値より高く、活性回収率がカラム法の方が高いことがわかった。この事は等電点沈殿法では CANP の失活性が高いか、あるいは内在性インヒビターの混在がさけられないことを意味しており、ハムスターの臓器を材料とする限りカ

2. E-64 類縁体の in vivo におけるプロテアーゼ阻害

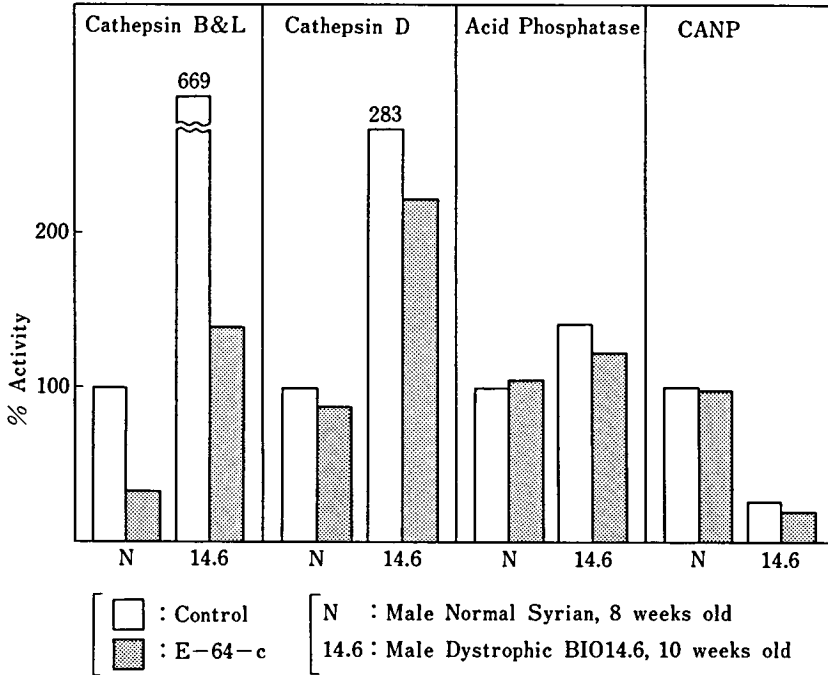


図16 E-64-c を2週間継続投与した筋ジストロフィーハムスターの筋肉中酵素活性 50 mg/kg/day になるようオスモティックミニポンプを用いて投与した。

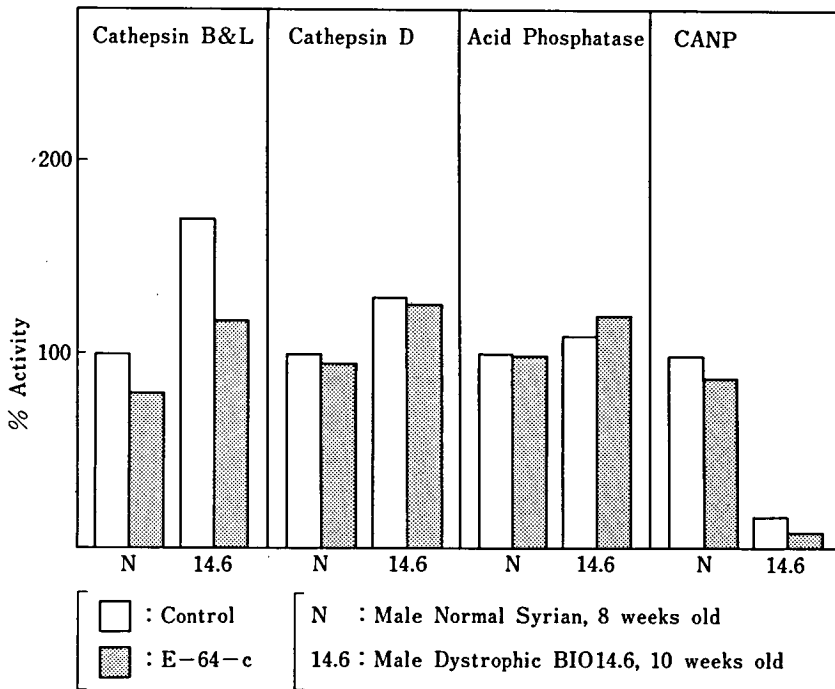


図17 E-64-c を2週間継続投与した筋ジストロフィーハムスターの心臓中酵素活性 50 mg/kg/day になるようオスモティックミニポンプを用いて投与した。

I E-64 類縁体の開発

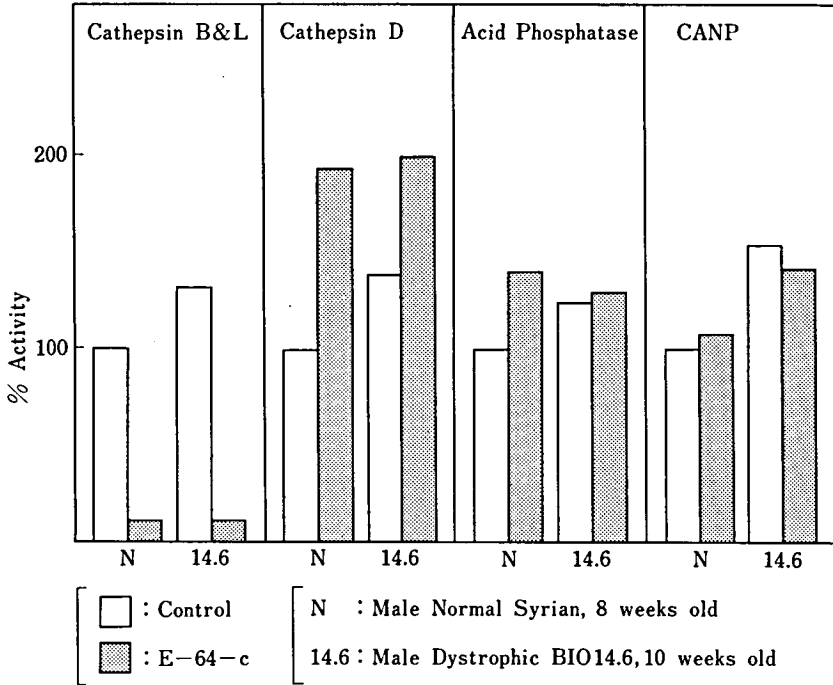


図18 E-64-cを2週間継続投与した筋ジストロフィーハムスターの肝臓中酵素活性 50 mg/kg/day になるようオスモティックミニポンプを用いて投与した。

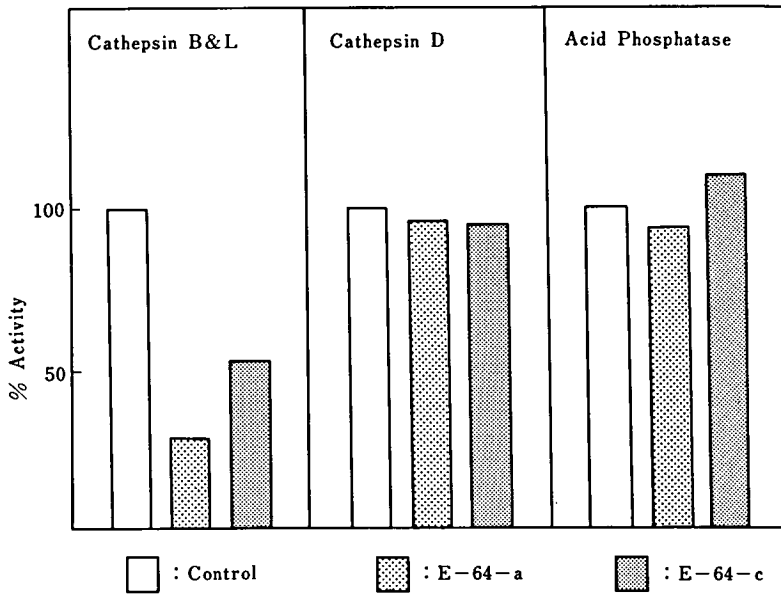


図19 E-64-a および E-64-c の1週間継続投与による筋肉中酵素阻害活性の比較 ゴールデンハムスター (8週令) に 50 mg/kg/day になるようオスモティックミニポンプを用いて投与した。(n=4)

2. E-64 類縁体の in vivo におけるプロテアーゼ阻害

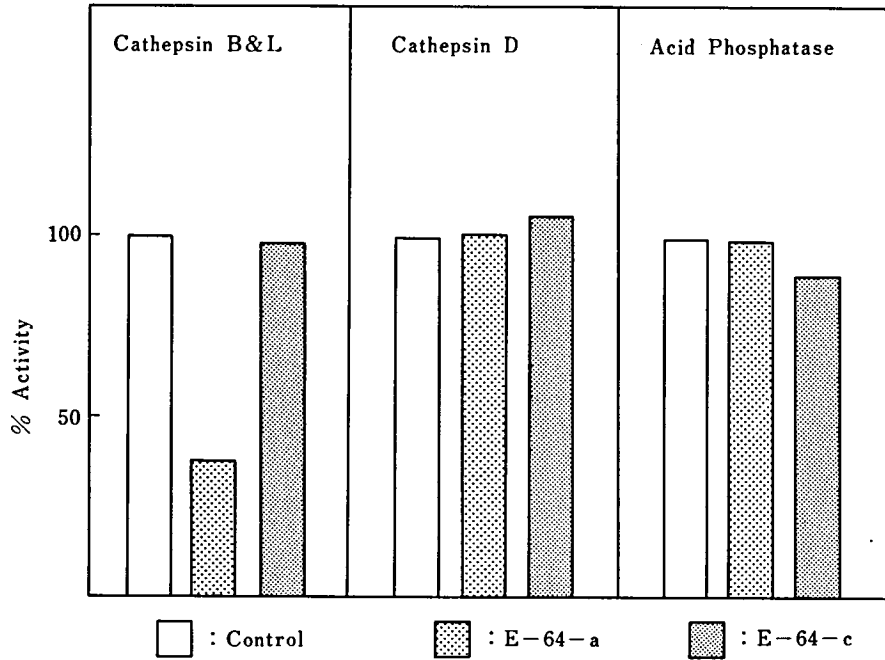


図20 E-64-a および E-64-c の1週間継続投与による心臓中酵素阻害活性の比較  
 ゴールデンハムスター(8週令)に50 mg/kg/day になるようオスモティックミニポンプを用いて投与した。(n=4)

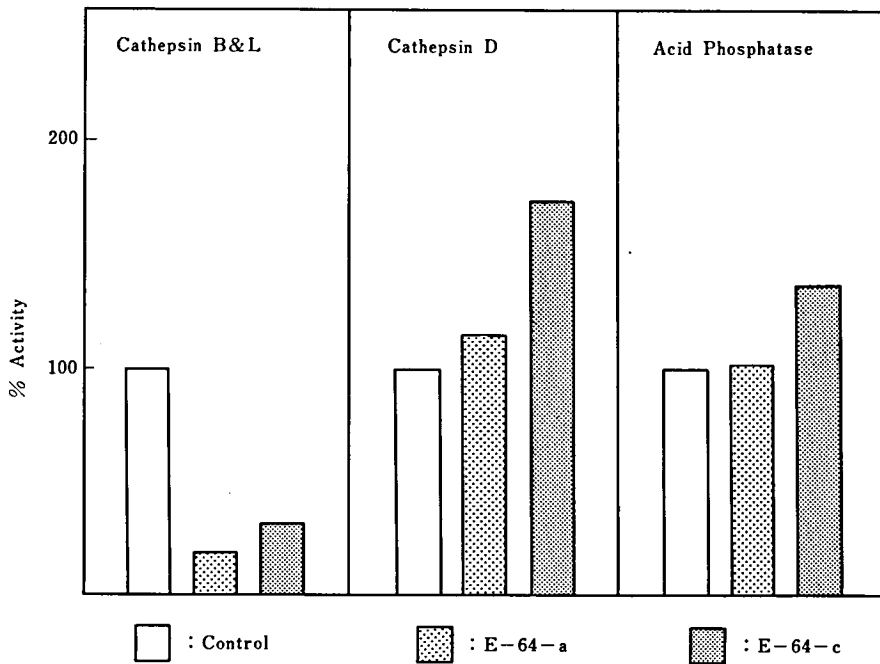


図21 E-64-a および E-64-c の1週間継続投与による肝臓中酵素阻害活性の比較  
 ゴールデンハムスター(8週令)に50 mg/kg/day になるようオスモティックミニポンプを用いて投与した。(n=4)

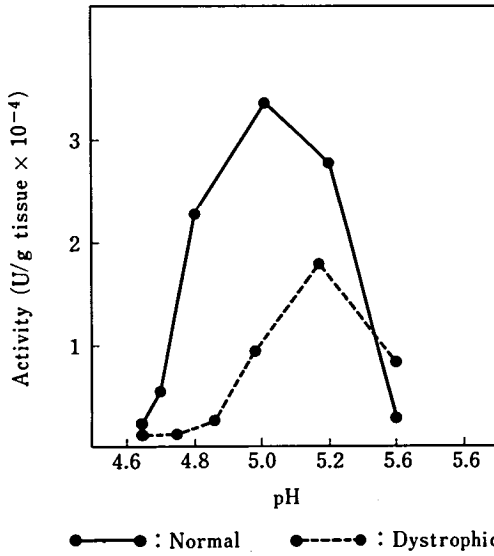


図22 正常および筋ジストロフィーハムスター筋肉ホモジネートの種々の pH における CANP 活性

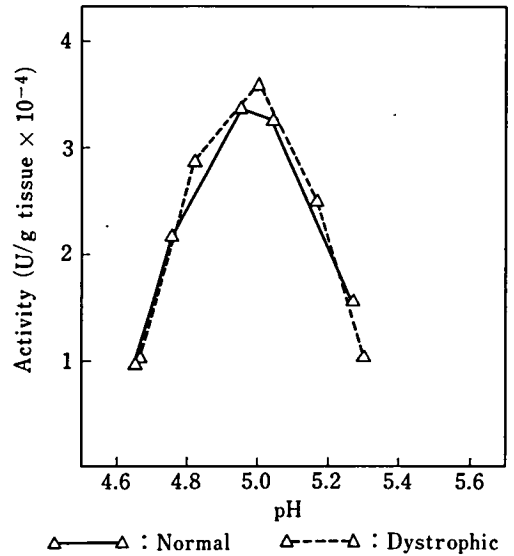


図24. 正常および筋ジストロフィーハムスター肝臓ホモジネートの種々の pH における CANP 活性

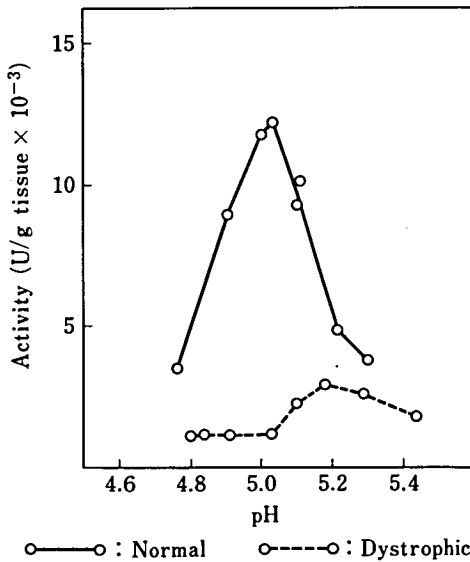


図23 正常および筋ジストロフィーハムスター心臓ホモジネートの種々の pH における CANP 活性

ラム法の方が優れていると思われる。

E-64-c をオスモティックミニポンプを用いて投与した時の CANP 活性は、正常ハムスターでは変わらないが、BIO 14.6 では有意ではないが、低下傾向がみられた。

### 考 察

骨格筋では他の臓器と比べてカテプシン B および L が少なく、その測定には多量の検体が必要であったが、新たに開発した Succinyl-L-Tyr-L-Met-2-naphthylamide を基質として用いることにより、ハムスターのような小動物でも十分測定できるようになった。

オスモティックミニポンプを用いて投与する方法は、50 mg/kg/day 程度の投与量では、徐々に放出するため血中に確認できる程の薬物の存在は認められなかったが、臓器のカテプシン B & L 活性は十分抑制していた。この方法では投与期間中切れ目なく薬物が放出され恒常的に抑制がかかるので、腹腔内単回投与よりも優れた投与方法と思われる。

CANP についてみると、DEAE-cellulose カラムによる部分精製法では低濃度の  $Ca^{2+}$  で活性化される  $\mu$ -CANP はインヒビターと同じ画分に溶出されるので、本法では m-CANP の活性のみを測定していることになる。ヒト筋ジストロフィー症では、m-CANP がその症状の進展に重要な役割をしていると考えられている

## 2. E-64 類縁体の in vivo におけるプロテアーゼ阻害

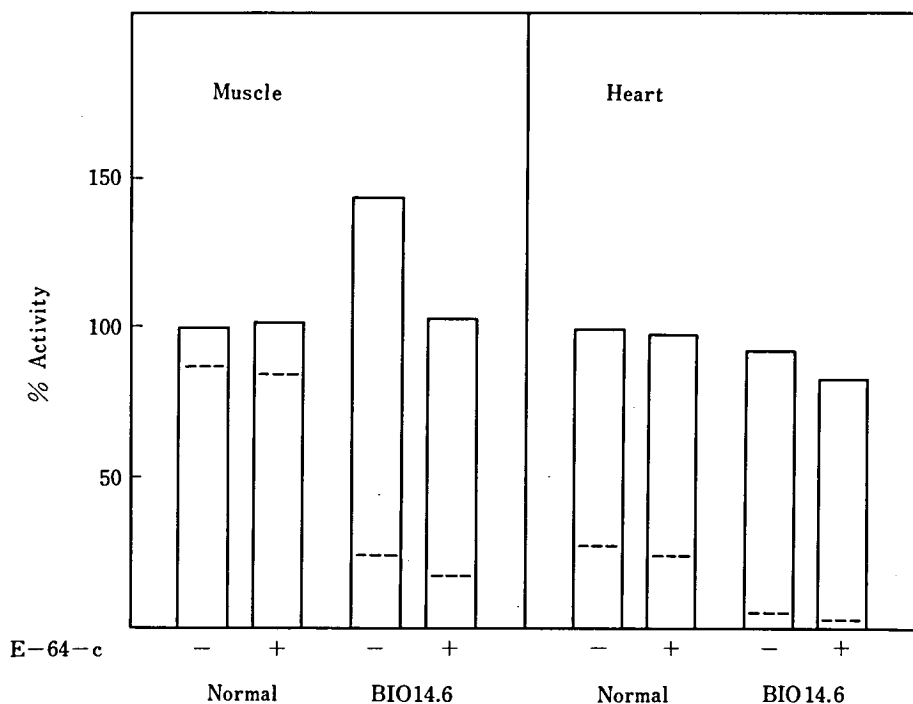


図25 E-64-c を2週間継続投与した筋ジストロフィーハムスター筋肉および心臓中 CANP 活性への影響  
50 mg/kg/day になるようオスモティックミニポンプを用いて投与した。(n=3)  
点線は等電点沈殿法による測定値を示す。

が、 $\mu$ -CANP およびインヒビターの挙動が明確になれば本症での筋肉蛋白代謝におけるCANPの役割がさらに明らかにされると思われる。

上述のように少なくとも m-CANP は、E-64-c 投与により抑制傾向がみられた。今回の実験では例数が少ないため、さらに確認する必要があるが、本報大関の報告によれば、BIO 14.6 に腹腔内 75 mg/kg, 7週間連続投与により有意に m-CANP が抑制されており、E-64 類縁体は十分量の  $\text{Ca}^{2+}$  が存在しうる条件下では、生体内で、CANP を阻害することができることを意味しているように思われる。

### 結 論

1. E-64 類縁体投与による標的臓器、すなわち、骨格筋、心臓の CANP, カテプシン B & L 等の変動を明確に把握するため、その微量定量法を確立した。
2. 筋ジストロフィーハムスター BIO 14.6 に

E-64-a, E-64-c を腹腔内投与およびオスモティックミニポンプ投与方法により投与した時の CANP, カテプシン B & L 等の変動を精査した。

カテプシン B & L は心、骨格筋共に顕著な低下がみられほぼ正常動物レベルにまで抑えられた。CANP (m-CANP) にも明らかな低下傾向が認められた。

3. 本結果は実験動物、特に筋ジストロフィーハムスターにおける治療実験に際して薬物の投与量を設定する上で重要な知見となりうる。

### 参 照 文 献

- 1) S. Hashida, T. Towatari, E. Kominami & N. Katunuma: Inhibition by E-64 derivatives of rat liver cathepsin B and cathepsin L in vitro and in vivo, J. Biochem. 88, 1805-1811, 1980.
- 2) T. Noda, K. Isogai, N. Katunuma, Y. Tarumoto & M. Ohzeki: Effects on cathepsin B,



I E-64 類縁体の開発

- H and D in pectoral muscle of dystrophic chickens (Line 413) of in vivo administration of E-64-c, J. Biochem., 90, 893-896, 1981.
- 3) A. J. Barrett: A new assay for cathepsin B and other thiol proteinases, Anal. Biochem., 47, 280-293, 1972.
- 4) K. Suzuki, S. Tsuji, S. Kubota, Y. Kimura & K. Imahori: Limited autolysis of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated neutral protease (CANP) changes its sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$  ions, J. Biochem., 90, 275-278, 1981.
- 5) 大関正弘: E-64-c の薬効に関する研究(1), 昭和55年度研究報告書, p. 123, 1981.
- 6) 杉田秀夫: Ca 依存性プロテアーゼの活性測定法の問題点, 昭和54年度研究報告書, p. 139, 1980.
- 7) O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. J. Farr & R. J. Romdall: Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
- 8) A. J. Barrett, A. A. Kembhavi, M. A. Brown, H. Kirschke, C. G. Knight, M. Tamai & K. Hanada: L-trans-Epoxy succinyl-leucylamide (4-guanidino) butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L, Biochem. J., 201, 189-198, 1982.
- 9) 大関正弘: E-64-c の急性及び亜急性毒性に関する研究, 昭和55年度研究報告書, p. 99-109, 1981.

