

ホスホジエステラーゼ 7A (PDE7A) 阻害薬の 免疫および皮膚反応における作用

後藤 恵*, 門嶋-山岡 久美子

Effect of Phosphodiesterase 7A Inhibitor on Immune and Skin Reaction

Megumi GOTO* and Kumiko KADOSHIMA-YAMAOKA

Asubio Pharma Co., Ltd., 6-4-3 Minatojima-Minamimachi, Chuo-ku, Kobe 650-0047, Japan

(Received October 29, 2010; Accepted November 30, 2010)

Phosphodiesterase 7A (PDE7A) has been suggested to be involved in activation of T lymphocytes. In the present study, a possible involvement of PDE7A in function of immune cells and skin reaction was investigated using ASB16165, an inhibitor for PDE7A. ASB16165, which has an IC_{50} value of 15 nM for human PDE7A, suppressed immune responses, cytokine production by T lymphoblasts, cytotoxic T lymphocyte (CTL) induction, NKT cell proliferation and cytokine production. Also, ASB16165 suppressed keratinocyte proliferation and cytokine production *in vitro*. In phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) induced skin inflammation model, ASB16165 showed inhibitory effect on skin edema and TNF- α production in skin, and proliferation of skin epidermal keratinocyte *in vivo*. These indicate that PDE7A inhibitors such as ASB16165 will be beneficial for the patients with immunological disorders and skin disorders with TNF- α production or keratinocyte hyperproliferation (e.g. psoriasis).

Key words—phosphodiesterase 7A (PDE7A), cAMP, CTL, NKT, keratinocytes; formononetin

はじめに

ホスホジエステラーゼ (PDE) は、細胞内セカンドメッセンジャーである cAMP および cGMP をそれぞれ 5'-AMP 及び 5'-GMP に加水分解することにより、細胞内のシグナル伝達を調節する酵素である。PDE は、現在までに 21 種の遺伝子がクローニングされ、これらはアミノ酸配列の相同性、生化学的特性及び阻害薬に対する感受性の違いから 11 種類のファミリー (PDE1~PDE11) に分類されている^{1, 2)}。PDE7 は cAMP を特異的に分解する PDE ファミリー分子であり、同じく cAMP を基質

とする PDE4 の阻害薬であるロリプラムに非感受性の PDE として 1993 年に同定された³⁾。PDE7 には PDE7A 及び PDE7B の 2 つの遺伝子が存在し、各々少なくとも 3 種のスプライスバリエーションの存在が報告されている。PDE7A は、脾臓やリンパ節、血中リンパ球といった免疫系の細胞に特異的に発現し、PDE7B はリンパ球では検出されず、脳や肝臓、心臓、甲状腺や骨格筋といった非リンパ組織に多く発現が認められている^{4, 5)}。

免疫応答と PDE7 との関係に関する知見としては、PDE7 は T 細胞などの免疫細胞に発現していることが報告されており、さらに PDE7A のアン

* アスビオファーマ株式会社, 〒 650-0047 神戸市中央区港島南町 6 丁目 4 番 3 号, e-mail: goto.megumi.u5@asubio.co.jp
本論考は、後藤 恵, 山岡 久美子の博士論文をもとに再構成したものである。

チセンスオリゴヌクレオチドがT細胞の増殖とIL-2産生を強く抑制することが報告されている。これらの結果はPDE7がT細胞の活性化において重要な役割を担っていることを示唆している。一方で、PDE7阻害薬単独ではT細胞の活性化抑制には不十分でありPDE4阻害薬との併用によってのみ顕著な抑制作用を示すという報告や、PDE7AのノックアウトマウスでT細胞機能に異常がないという報告もあり、T細胞におけるPDE7の役割について明確な結論は得られていない。一方、皮膚におけるPDE7の役割についての報告はない。我々は、PDE7の生理学的な役割を解析する目的で、PDE7A選択的な阻害薬ASB16165を使用し検討を行った。

1. PDE 7A 阻害薬 ASB16165

ASB16165 (1-Cyclohexyl-N-[6-(4-hydroxy-1-piperidiny)-3-pyridinyl]-3-methyl-1H-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxamide monohydrate (Fig.1) のPDE7阻害活性及びその他のPDEに対する特異性を明らかにするため各種リコンビナントヒトPDEを用いて酵素阻害活性を測定した。その結果、ASB16165はPDE7Aに対して強力な抑制作用を示し、そのIC₅₀は15 nMであった。一方、PDE4に対する阻害作用は弱く、IC₅₀は2.1 μMで、PDE7Aに対するIC₅₀よりも約140倍高値であった。その他のPDEに対するIC₅₀は10 μM程度もしくはそれ以上であり、ASB16165は選択的な

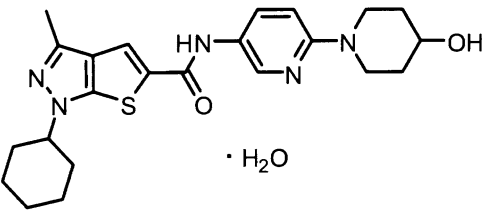


Figure 1 Molecular structure of ASB16165

PDE7A阻害薬であることが確認された (Table 1).

2. 免疫細胞における PDE7A 阻害薬の作用

1) T細胞活性化刺激における PDE7A 阻害薬の作用

T細胞の活性化に対する新規PDE7A阻害薬ASB16165の作用の有無を明らかにする目的で、マウス脾臓由来のT細胞を用いて抗CD3/CD28抗体刺激におけるASB16165の効果を検討した。その結果、ASB16165はT細胞の増殖及び培養上清中のサイトカイン (IL-2, IFN-γ) 産生を濃度依存的かつ有意に抑制した (Fig.2)。PDE4阻害薬ロリプラムやカルシニューリン阻害薬FK506も同様の抑制作用を示した。

次に既に活性化したT細胞に対するASB16165の作用を明らかにするため、マウスT細胞を抗CD3抗体刺激とIL-2培養により作製した活性化T細胞 (Tリンフォブラスト) を用い、IL-12刺激で誘導されるIFN-γ産生に対するASB16165の効果を検討した。その結果、ASB16165はTリンフォブラストからのIFN-γ産生を濃度依存的かつ有意に抑制した (Fig.3)。PDE4阻害薬ロリプラムも抑制作用を示したが、カルシニューリン阻害薬FK506は抑制作用を示さなかった。一方、細胞内cAMP上昇薬であるフォルスコリン及びdb-cAMPが抑制作用を示したことから、本試験系において細胞内cAMP濃度の上昇がIL-12刺激によるIFN-γ産生に対して抑制的に働くことが示唆された。また本試験系において、ASB16165の効果に対するプロテインキナーゼA (PKA) 阻害薬の作用を検討した結果、PKA阻害薬によりASB16165による抑制作用の一部が解除された (Data not shown) ことから、ASB16165の効果の少なくとも一部が、PDE7阻害によるcAMP上昇と、それによるPKAの活性化を介していることが示唆された。

以上より、PDE7選択的阻害薬である

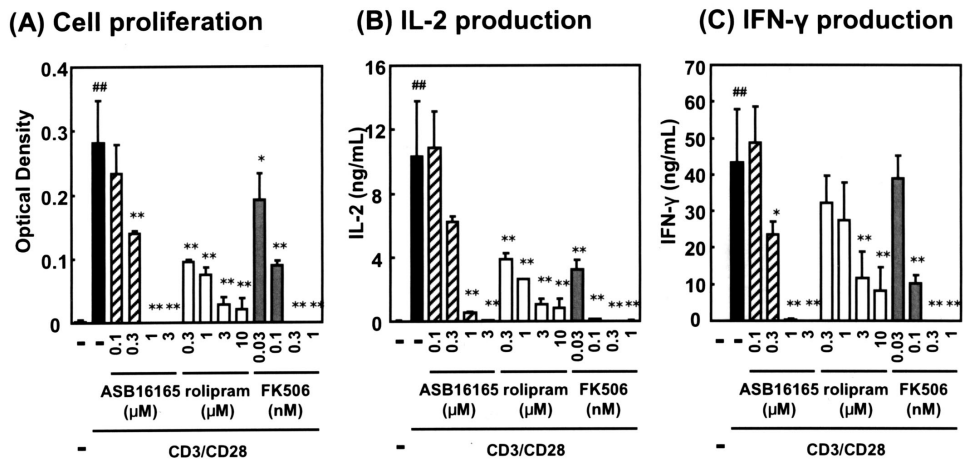
Table 1 Inhibitory activity of ASB16165 to PDEs

IC ₅₀ value (μM) ^a								
PDE1A3	PDE2A3	PDE3cat	PDE4cat	PDE5cat	PDE7A1	PDE8A1	PDE9A2	PDE10A1
≈10 ^b	>10	>10	2.1	>10	0.015	>10	>10	>10

^a, >10 means that the inhibitory activity was less than 50% at 10 μM.

^b, Inhibition at 1 μM and 10 μM were 3% and 59%, respectively.

PDE activity, the hydrolysis of cAMP or cGMP to 5'-AMP or 5'-GMP, was determined by a modification of the two-step reaction in which 5'-nucleotidase was used to convert 5'AMP or 5'GMP to adenosine or guanosine in combination with PDE. The reaction mixture (50 μL final volume) contained 20 mM Tris (pH 7.5), 1 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 330 μg/mL metal-free BSA, 2 units/mL 5'-nucleotidase, 0.05 μM [3H]-cAMP or 0.15 μM [3H]-cGMP and one of PDE isozymes in the presence of various concentration of ASB16165 and 1% DMSO. The substrate was [3H]-cAMP for PDE7A1, PDE1A3, PDE2A3, PDE3cat, PDE4cat, PDE8A1 and PDE10A1 or [3H]-cGMP for PDE5cat and PDE9A2. In the case of PDE1A3 and PDE2A3 assay, 50 units/mL calmodulin plus 3 mM CaCl₂ and 1 μM cGMP was added to the reaction mixture, respectively. The concentration of each PDE in the reaction mixture was set to hydrolyze about 20% of substrate added to the reaction mixture. The reaction was initiated by adding the substrate, carried out for 2 h at 25°C and terminated by adding 100 μL of 50% slurry of QAE-sephadex A-25 in 10 mM HEPES pH 7.0. After settling for about 2 min, 50 μL of supernatants were transferred to another plate containing 100 μL of 50% slurry of QAE-sephadex A-25 in each well and mixed. After settling for about 2 min, 20 μL of supernatants were transferred to a LumaPlate™ (PerkinElmer). The radioactivity of each well in the LumaPlate™ was counted using the TopCount® NTX microplate scintillation and luminescence counter (PerkinElmer).



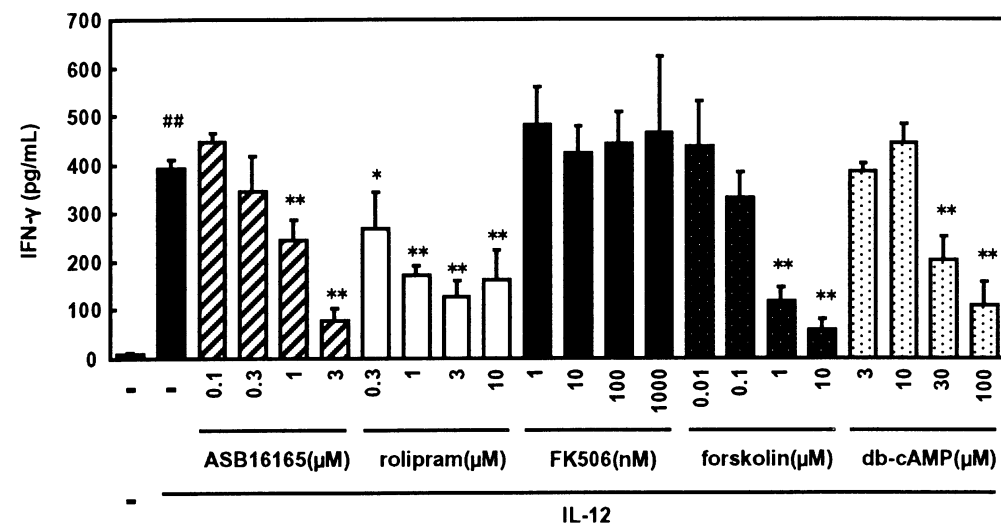


Figure 3 Effect of ASB16165 on IL-12-induced IFN- γ production by T lymphoblasts.

T lymphoblasts were generated by culturing T cells on anti-CD3 mAb-coated dishes for 1 day and subsequent incubation with IL-2 (50 U/mL) for 2 days. CD3 mAb-coated dishes has been prepared by incubating with anti-CD3 mAb (10 μ g/mL in PBS) for 3 h at 37°C and washed with PBS before use. lymphoblasts (1.2×10^6 cells/mL) were activated by restimulation with IL-12 (100 ng/mL) for 24 h at 37°C, and IFN- γ protein level in the supernatant was measured by ELISA. Test compounds (ASB16165, rolipram, FK506, forskolin or db-cAMP) were added to the assays 30 min prior to the activation. The data are expressed as mean \pm SD of triplicate cultures. $^{##}P < 0.01$, compared with the group in which T lymphoblasts were cultured without IL-12 for 24 h (Student's t-test) $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, compared with the group in which no test compound was added and T lymphoblasts were cultured with IL-12 for 24 h (Dunnett's test).

ASB16165 が T 細胞の活性化に伴う増殖とサイトカイン産生及び活性化 T 細胞からのサイトカイン産生を抑制すること、その作用が cAMP 上昇を介していることが示された。これらの知見は、PDE7A が T 細胞の増殖と機能に重要な役割を担っていることを示唆する。

2) 細胞傷害性 T 細胞における PDE7A 阻害薬の作用

細胞傷害性 T 細胞 (CTL) は、CD8⁺ T 細胞が分化し細胞傷害活性を獲得したエフェクター細胞であり、自己免疫疾患の発症と病態形成に重要な役割を担っていると予想される。CD8⁺ T 細胞に

対する ASB16165 の効果を明らかにする目的で、CD8⁺ T 細胞の CTL への分化に対する ASB16165 の効果を検討した。異なる主要組織適合抗原 (MHC, マウスでは H-2 抗原) を有する 2 系統のマウスのリンパ球を用いて一方向混合リンパ球反応 (MLR) を行い、同種異系 (アロ) 特異的な CTL を誘導し、P815 ターゲット細胞に対する傷害活性を測定したところ、ASB16165 は濃度依存的かつ有意に傷害活性の誘導を抑制した (Fig.4)。一方、PDE4 阻害薬ロリプラムの効果は部分的で、最大効果は ASB16165 と比較して弱かった。カルシニューリン阻害薬 FK506 は傷害活性に対して非常に強い抑制作用を示した。

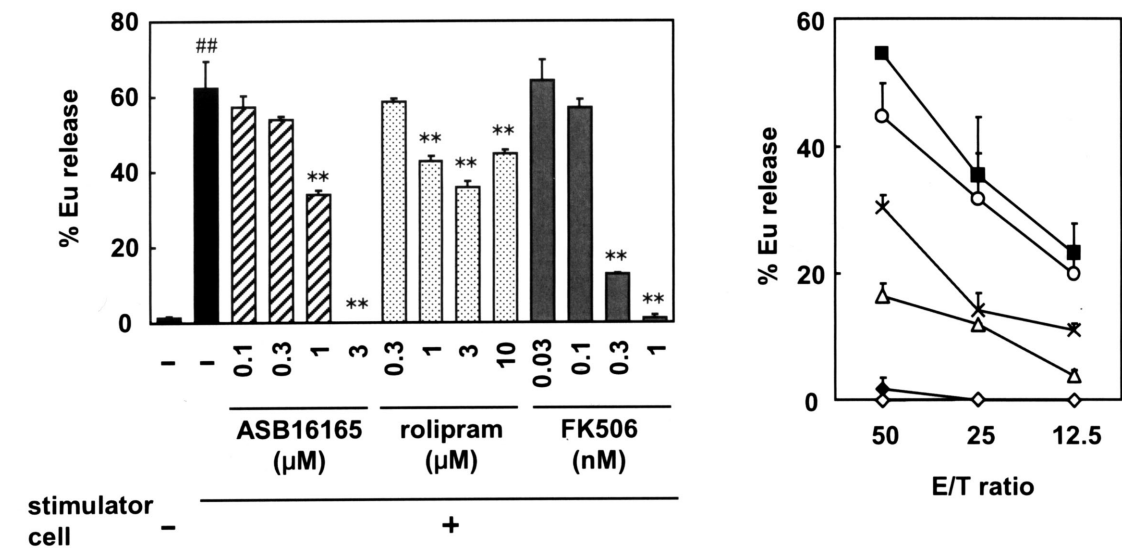


Figure 4 Effect of PDE7 inhibitor ASB16165 on induction of CTL activity in MLR.

Spleen cells from C57BL/6N mice (responder, H-2D^b) and MMC-treated spleen cells from BALB/c mice (stimulator, H-2D^b) were cocultured in the presence of various concentration of ASB16165, rolipram or FK506 for 4 days, and cytotoxicity of MLR-induced CTL was assessed by Eu release assay using Eu-labeled P815 cells as target. In brief, cytotoxicity assay was performed by incubating the effector cells with the Eu-labeled P815 target cells (2×10^4 cells) in 96-well round bottom plate for 4 h at 37°C. The number of effector cells was dependent on the effector/target cell ratio (E/T ratio). To determine the spontaneous release and maximum release of Eu, 0.1 mL of Eu release assay medium and 1% TritonX-100 were added instead of effector cells, respectively. After 4 h incubation, the supernatant was transferred to 96-well fluorescence plate and mixed with 4-5 times volume of Enhancement solution (PerkinElmer). The Eu release was assessed by time-resolved fluorescence using EnVisionTM 2102 Multilabel Reader (PerkinElmer). The percentage of released Eu of each sample was calculated as (experimental release - spontaneous release) / (maximum release - spontaneous release) \times 100. (A) Effect of ASB16165, rolipram and FK506 on CTL activity induction (E/T ratio=50). (B) Effect of ASB16165 on CTL activity induction at various E/T ratios. \blacksquare , 0 μ M (i.e. 0.1% of DMSO); \circ , 0.1 μ M; \times , 0.3 μ M; \triangle , 1 μ M; \diamond , 3 μ M of ASB16165 and \blacklozenge , MLR was performed without stimulator cells. The data are expressed as mean \pm SD of triplicate assays. $^{##}P < 0.01$, compared with the group in which MLR was performed without stimulator cells (Student's t-test). $^{**}P < 0.01$, compared with the control group, in which no test compound was added (Dunnett's test).

以上より、PDE7A が CTL の分化において重要な役割を担っていることが示唆され、CTL がエフェクターとして機能するような種々の自己免疫疾患の治療において、ASB16165 などの PDE7A 阻害薬が治療薬として有用である可能性を示唆する。¹⁰⁾

3) NKT 細胞における PDE7A 阻害薬の作用

Natural Killer T (NKT) 細胞は、T 細胞マーカー

(e.g. T 細胞抗原レセプター /T cell receptor, TCR) 及び NK 細胞マーカー (e.g. NK1.1) の両方を有する T 細胞サブセットであり、活性化された後速やかに Th1/Th2/Th17 サイトカインを産生する。また、NK 細胞と同様に癌細胞などの標的細胞に対して細胞傷害作用を有するが、加えて自己免疫疾患などの様々な疾患 (e.g. I 型糖尿病, 多発性硬化症, 強皮症, 肝炎) においても重要な役割を担うことが示唆されている。

(A) cell proliferation

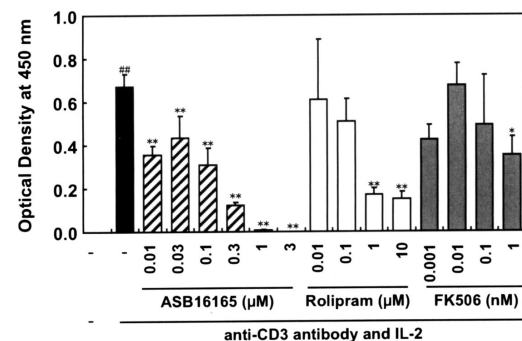
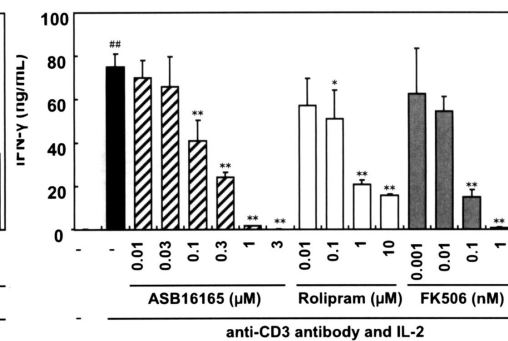
(B) IFN- γ 

Figure 5 Effects of ASB16165, rolipram and FK506 on cell proliferation and production of IFN- γ by isolated murine NKT cells.

For purification of NKT cells, spleen cells from C57BL/6N mice were first labeled with biotin-conjugated anti-NK1.1 mAb, and NK1.1+ cells were subsequently collected by positive selection using anti-biotin microbeads and MACS Systems (Miltenyi Biotech). The enriched NK1.1+ cells were then labeled with FITC-conjugated anti-TCR β mAb and PE-conjugated streptavidin. NKT cells (TCR β + /NK1.1+ cells) were purified by sorting with FACS Aria (BD). NKT cells (5×10^4 cells/well, the purity of the cells was 90.3%) were stimulated with IL-2 (100 U/mL) for 96 h in the presence or absence of various concentration of ASB16165, rolipram, or FK506 in the anti-CD3 mAb-coated plates that has been prepared by incubating with anti-CD3 mAb (10 $\mu\text{g/mL}$ in PBS) for 3 h at 37°C and washed with PBS before use. (A) Cell proliferation was assessed at 96 h using Cell Counting kit. (B) IFN- γ protein levels in the supernatant were measured using ELISA at 96 h. The data are expressed as mean \pm SD of triplicate assays. ^{##} $P < 0.01$, compared with the control group in which cells were not stimulated (Student's t-test). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the control group in which cells were stimulated and no compound was added (Dunnett's test).

NKT細胞におけるPDE7Aの役割を解析する目的で、マウスより単離したNKT細胞を用い、抗CD3抗体とIL-2で刺激した際の増殖及びサイトカイン産生に対するASB16165の効果を検討した。その結果、ASB16165はNKT細胞の増殖及びサイトカイン産生を有意に抑制することが明らかとなった (Fig. 5)。同様の効果が細胞内cAMP上昇薬によっても認められたことから (Data not shown), NKT細胞の細胞増殖およびサイトカイン産生にcAMPが寄与し、ASB16165はPDE7A阻害作用を介して細胞内のcAMP量を上昇させることにより抑制作用を示した可能性が示唆された。本結果は、NKT細胞の増殖及び機能におけるPDE7Aと細胞内cAMPの役割を示す新たな知見である。¹¹⁾

3. 皮膚におけるPDE7A阻害薬の作用

1) ヒト表皮ケラチノサイトにおけるPDE7A阻害薬の作用

皮膚におけるPDE7Aの役割を明らかにする目的で、ヒト表皮ケラチノサイトを用い、細胞機能及び細胞増殖におけるPDE7A阻害薬ASB16165の作用を検討した。

*in vitro*においてヒト表皮ケラチノサイトをTPA及びA23187で刺激したところ、TNF- α が産生され、このTNF- α 産生をASB16165は有意に抑制した (Fig.6)。次にASB16165の細胞増殖に対する作用を検討したところ、ASB16165による有意な増殖抑制作用が認められた (Fig.7)。PDE4阻害薬のロリプラムは、TNF- α 産生及び細胞増殖のい

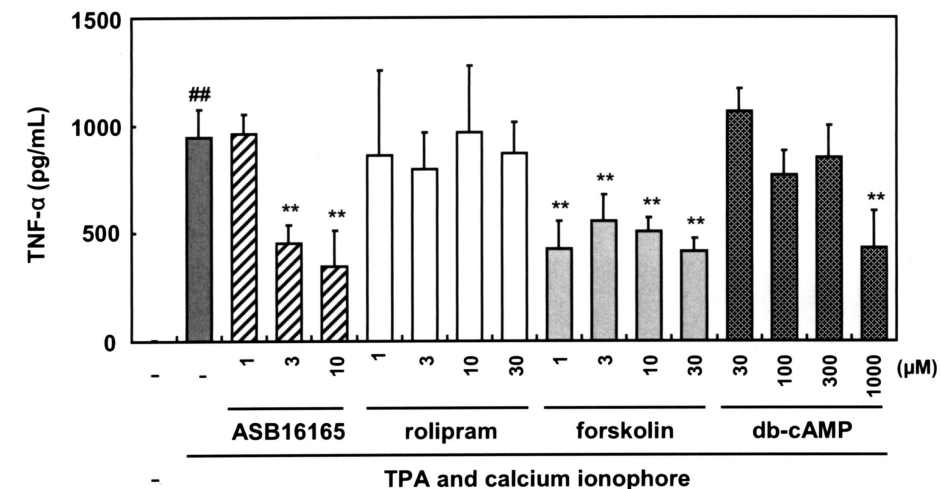


Figure 6 Effect of ASB16165 on TNF- α production by human epidermal keratinocytes stimulated with TPA and calcium ionophore.

Human keratinocytes were incubated with various concentration of ASB16165, rolipram, forskolin and db-cAMP for 30 min in 96-well collagen I-coated flat bottom plate, and TPA (100 ng/ml) and A23187 (1 $\mu\text{g/mL}$) were added to the culture. After incubation for additional 8 hr, the concentration of TNF- α in the culture supernatant was determined by ELISA. The data are expressed as mean \pm SD of triplicate cultures. ^{##} $P < 0.01$, compared with the group in which keratinocytes were not activated with TPA plus calcium ionophore (Student's t-test). ** $P < 0.01$, compared with the group in which keratinocytes were activated and no test compound was added (Dunnett's test).

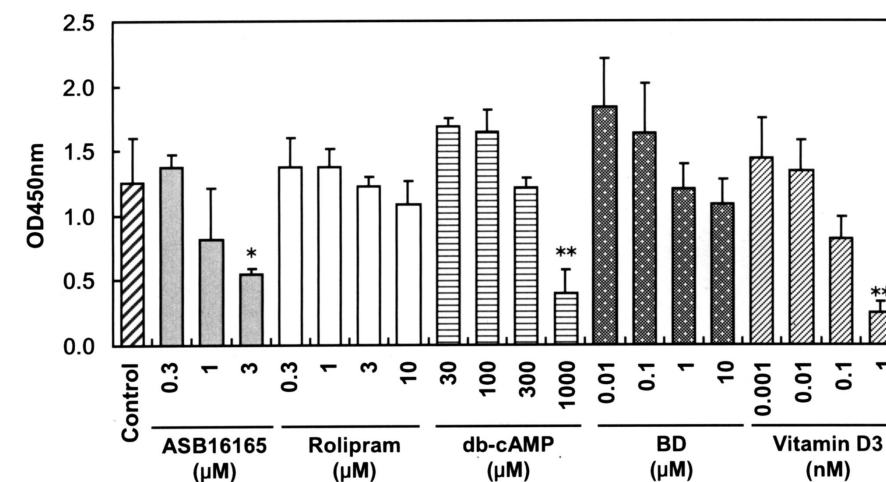


Figure 7 Effect of ASB16165 on cell proliferation of human epidermal keratinocytes *in vitro*.

Human keratinocytes were incubated with various concentrations of ASB16165, rolipram, db-cAMP, betamethasone (BD) and vitamin D3 in 96-well collagen I-coated flat bottom plate. After incubation for 48 h, cell proliferation was analyzed with BrdU incorporation assay. The data are expressed as mean \pm SD of triplicate cultures. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, compared with the control group in which no test compound was added (Dunnett's test).

れに対しても殆ど抑制作用を示さなかった。一方、これらの試験系で細胞内 cAMP 上昇薬であるフォルスコリン或いは db-cAMP が有意な抑制作用を示したことから、これらの試験系において cAMP が細胞内のセカンドメッセンジャーとして寄与している可能性が示唆された。

以上の結果より、ヒト表皮ケラチノサイトにおいて、ASB16165 が細胞機能及び増殖を抑制したことから、皮膚ケラチノサイトにおいて PDE7A が重要な役割を担っていることが示唆された。

2) TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) 誘発耳浮腫モデルにおける PDE7A 阻害薬の作用

TPA 誘発耳浮腫モデルは、強力な発癌プロモーターとして知られるホルボールエステル (TPA) を皮膚に塗布することにより惹起される皮膚炎モデルであり、初期の浮腫にケラチノサイトからの TNF- α 産生が関与する可能性が示唆されている。また我々は、PDE7A が正常マウスの耳介組織¹²⁾の表皮層に発現することを確認している。そこで

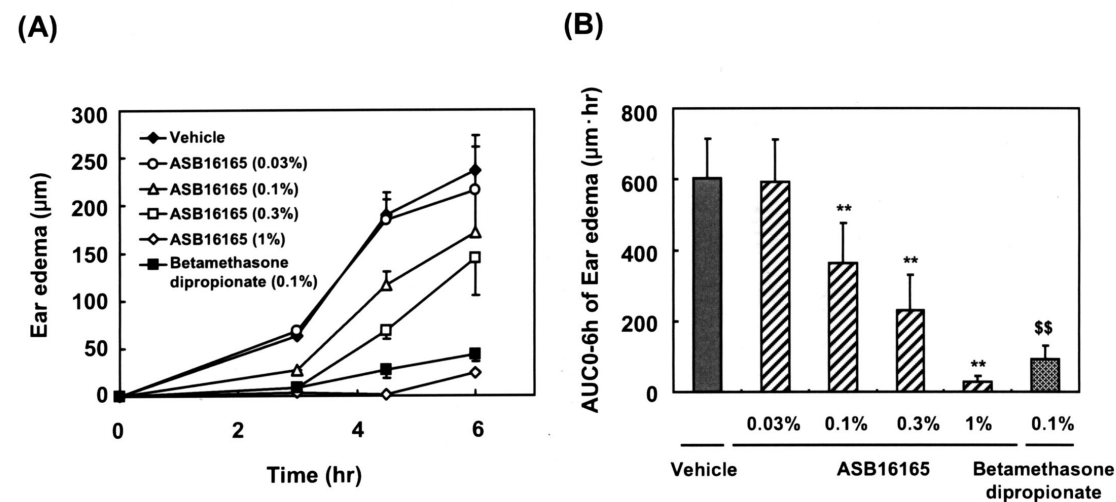


Figure 8 Effect of ASB16165 on TPA-induced ear edema in mice.

20 μ l of TPA (50 μ g/ml) containing indicated concentration of ASB16165 or betamethasone dipropionate was applied topically to the both sides of the right ear of BALB/c mice. Ear thickness was measured using a thickness gauge at various time points. The increase in ear thickness (edema) was determined by subtracting ear thickness before painting from that of each time point. (A) The increase of ear thickness at each time points. (B) Area under the curve from 0 hr to 6 hr shown in A. The data are expressed as mean \pm SD (N=7). ** P < 0.01, compared with vehicle (Dunnett's test). \$\$\$ P < 0.01, compared with vehicle (Student's t-test)

TPA 誘発皮膚炎モデルを用い、皮膚炎症における PDE7A の役割を明らかにするため ASB16165 の作用について検討を行ったところ、ASB16165 が TPA 誘発皮膚炎モデルの初期の浮腫反応を用量依存的に抑制することが明らかとなった (Fig. 8)。また、本モデルにおける耳介組織中の TNF- α 産生量を測定したところ、ASB16165 が TNF- α 産生に対して抑制作用を示した (Fig.9)。

ASB16165 が *in vitro* においてヒト表皮ケラチノサイトからの TNF- α 産生を抑制すること、TPA 誘発皮膚炎モデルの初期の浮腫にケラチノサイトからの TNF- α 産生が関与している可能性を考え合わせると、TPA 耳浮腫モデルにおける ASB16165 の耳介浮腫抑制作用の少なくとも一部は、表皮ケラチノサイトからの TNF- α 産生抑制に基づくものである可能性が示唆される。

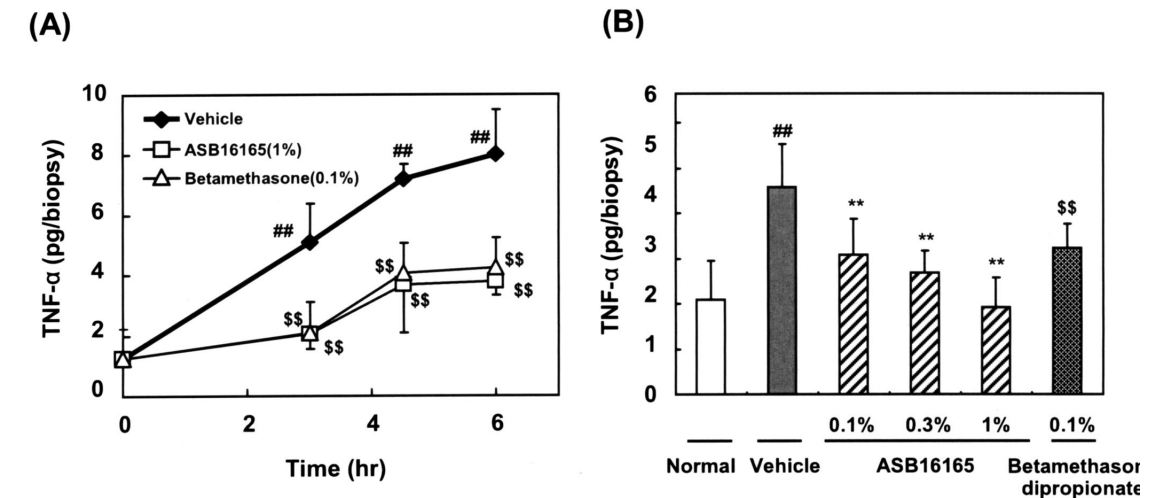


Figure 9 Effect of ASB16165 on TPA-induced TNF- α production in the application site of the skin.

20 μ l of TPA (50 μ g/ml) containing indicated concentration of ASB16165 or betamethasone dipropionate was applied topically to the both sides of the right ear of BALB/c mice, and ear biopsy samples were taken using a punch at 3 hr after TPA application. The biopsies were homogenized vigorously in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) with 150 mM NaCl, 1 mM EDTA and protease inhibitor cocktail, and the homogenate was incubated on ice for 15 min in the presence of 0.1% Triton X-100. The homogenate was centrifuged at 14,000 rpm for 10 min at 4°C. After the centrifugation, TNF- α in the supernatants were measured using ELISA kit. (A), Effects of 1% ASB16165 and 0.1% betamethasone dipropionate (time course). (B), Effects of various concentrations of ASB16165 at 3 hr after TPA application. The data are expressed as mean \pm SD (N = 5 for a, N = 7 for b). \$\$\$ P < 0.01, compared with vehicle (Student's t-test). ### P < 0.01, compared with normal (Student's t-test). ** P < 0.01, compared with vehicle (Dunnett's test).

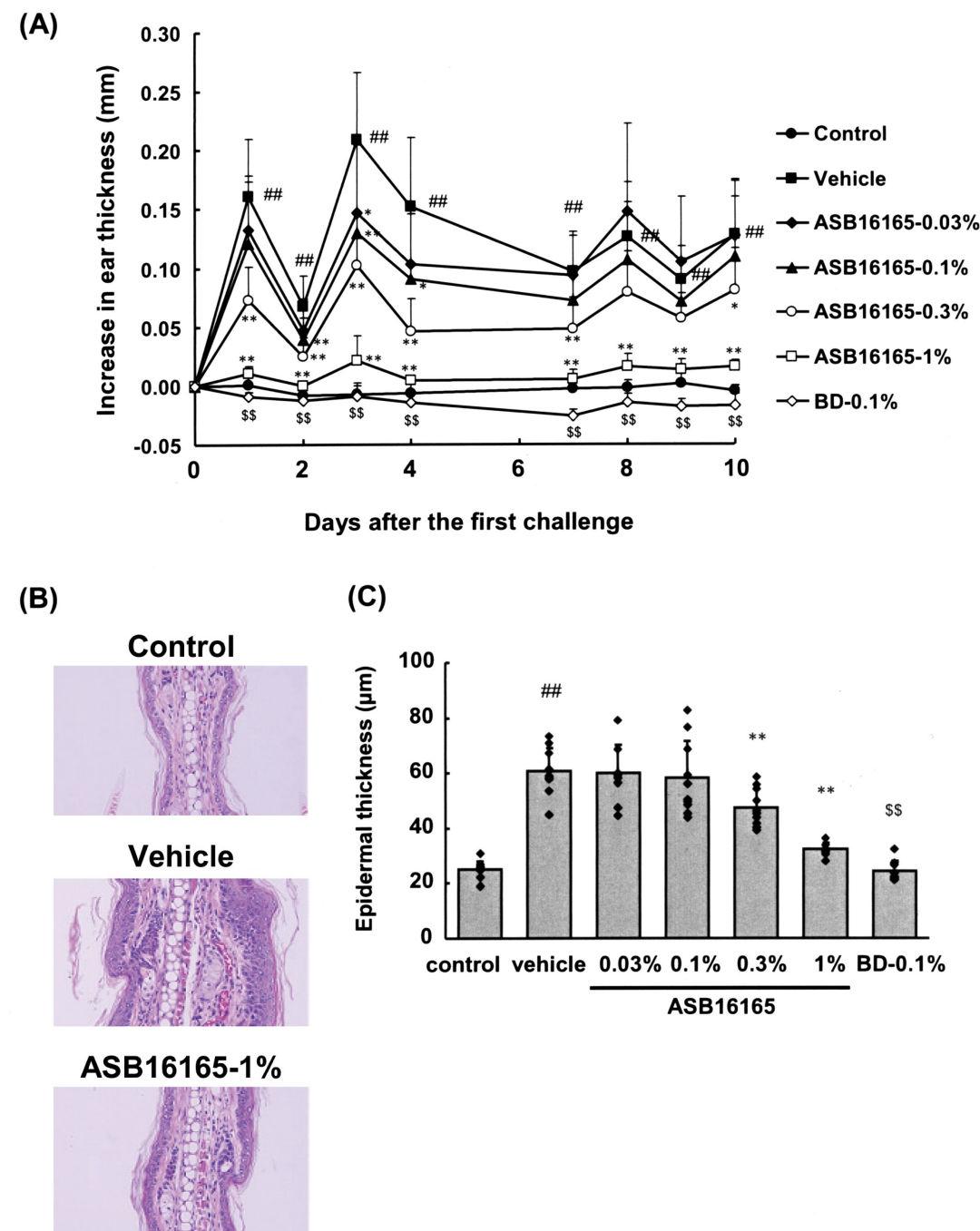


Figure 10 Effect of ASB16165 on increase of ear and epidermal thickness induced by multiple topical application of TPA.

(Figure 10 caption).

20 μ l of TPA (10 μ g/ml) containing indicated concentration of ASB16165 or betamethasone dipropionate was applied topically to the both sides of the right ear of BALB/c mice on days 0, 2, 4, 7 and 9. On the days except those of the TPA application, each compound was dissolved in methanol and applied. Ear thickness was measured everyday except for days 5 and 6 using a thickness gauge. The increase in ear thickness was determined by subtracting ear thickness before painting from that of each time point. Ear samples were excised on day 10 and fixed in 10% (v/v) buffered formalin, embedded in paraffin, and sectioned at 4 μ m. The sections were then stained with hematoxylin and eosin. The thickness of the epidermis (from the basal layer to stratum corneum) was measured at 30 random sites along the length of the specimen (approximately 1 mm) using Lumina Vision version 2. 5. 0.15 (Mitani Corp.). A) The increase of ear thickness at each time points. (B) Representative vertical sections stained with hematoxylin and eosin ($\times 200$). (C) Quantitative analysis of the effect of ASB16165 on the increase of epidermal thickness.

The data are expressed as mean \pm SD (N=10). Control, solvent for TPA was applied instead of TPA solution. Vehicle, TPA but not any compound was applied. ## P < 0.01, compared with control (Student's t-test). * P < 0.05, ** P < 0.01, compared with vehicle (Dunnett's test). \$\$ P < 0.01, compared with vehicle (Student's t-test).

3) TPA 反復塗布皮膚炎モデルにおける PDE7A 阻害薬の作用

角化細胞の増殖は種々の増殖因子によって制御されている。角化細胞の過増殖は自己免疫性の皮膚疾患である乾癬に特徴的な病理像であり、古くからこの疾患における有望な創薬ターゲットの一つと考えられてきた。乾癬に類似した動物モデルとしては、TPA を皮膚に繰り返し塗布することで表皮の過剰増殖が観察される皮膚炎モデルがある。マウス TPA 反復塗布皮膚炎モデルを用い、*in vivo* での表皮ケラチノサイトの細胞増殖における PDE7A の役割について解析を行った。その結果、ASB16165 は耳介厚の肥厚を抑制し (Fig.10A), さらに耳介組織中の表皮厚を測定したところ、表皮厚の増加に対しても用量依存的かつ有意な抑制作用を示した (Fig.10B, C). *in vivo* においても表皮ケラチノサイトの増殖に対し ASB16165 が抑制作用を示したこと、また本モデルが乾癬モデルとして用いられていることから、ASB16165 は乾癬のような表皮の過増殖を伴う疾患に有用であると考えられた。¹³⁾

4. 結語

PDE7A 選択的な阻害薬である ASB16165 を用いた検討より、免疫細胞では T 細胞の活性化による増殖やサイトカイン産生及び、活性化 T 細胞からのサイトカイン産生、細胞傷害性 T 細胞の誘導、NKT 細胞の増殖及びサイトカイン産生において、PDE7A が関与している可能性が示唆された。また、皮膚においては表皮角化細胞の増殖及び機能、或いは皮膚炎症において ASB16165 が抑制作用を示したことから、皮膚炎症や表皮の増殖に PDE7A が関与している可能性が示唆された。

以上より、PDE7A は免疫担当細胞及び皮膚において重要な役割を担っていることが示された。これらの知見より、PDE7A 阻害薬は活性化 T 細胞や CTL, NKT 細胞の関与する免疫異常、あるいは皮膚炎症、皮膚ケラチノサイトの過増殖を伴う乾癬のような疾患の治療に有用である可能性が示唆された。

謝辞 終始御親切な御指導と御助言を賜りました、大阪薬科大学生体防御学研究室 天野富美夫教授に慎んで感謝の意を表します。また本研究の遂行にあたり、御指導と御鞭撻を賜りました北海道大学遺伝子病制御研究所 免疫制御分野 西村孝司教授に謹んで感謝の意を表します。本研究の遂行にあたり多大なる御尽力を賜りましたアスビオファーマ株式会社の皆様に、心より御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Mehats, C.; Andersen, C. B.; Filopanti, M.; Jin, S. L.; Conti, M., *Trends. Endocrinol. Metab.*, **13**, 29-35 (2002).
- 2) Conti, M.; Beavo, J., *Annu. Rev. Biochem.*, **76**, 481-511 (2007).
- 3) Michaeli, T.; Bloom, T. J.; Martins, T.; Loughney, K.; Ferguson, K.; Riggs, M.; Rodgers, L.; Beavo, J. A.; Wigler, M., *J. Biol. Chem.*, **268**, 12925-32 (1993).
- 4) Bloom, T. J.; Beavo, J. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 14188-92 (1996).
- 5) Han, P.; Zhu, X.; Michaeli, T., *J. Biol. Chem.*, **272**, 16152-7 (1997).
- 6) Li, L.; Yee, C.; Beavo, J. A., *Science*, **283**, 848-51 (1999).
- 7) Smith, S. J.; Cieslinski, L. B.; Newton, R.; Donnelly, L. E.; Fenwick, P. S.; Nicholson, A. G.; Barnes, P. J.; Barnette, M. S.; Giembycz, M. A., *Mol. Pharmacol.*, **66**, 1679-89 (2004).
- 8) Yang, G.; McIntyre, K. W.; Townsend, R. M.; Shen, H. H.; Pitts, W. J.; Dodd, J. H.; Nadler, S. G.; McKinnon, M.; Watson, A. J., *J. Immunol.*, **171**, 6414-20 (2003).
- 9) Kadoshima-Yamaoka, K.; Murakawa, M.; Goto, M.; Tanaka, Y.; Inoue, H.; Murafuji, H.; Nagahira, A.; Hayashi, Y.; Nagahira, K.; Miura, K.; Nakatsuka, T.; Chamoto, K.; Fukuda, Y.; Nishimura, T., *Immunol.Lett.*, **122**, 193-7 (2009).
- 10) Kadoshima-Yamaoka, K.; Murakawa, M.; Goto, M.; Tanaka, Y.; Inoue, H.; Murafuji, H.; Hayashi, Y.; Nagahira, K.; Miura, K.; Nakatsuka, T.; Chamoto, K.; Fukuda, Y.; Nishimura, T., *Int. Immunopharmacol.*, **9**, 97-102 (2009).
- 11) Goto, M.; Murakawa, M.; Kadoshima-Yamaoka, K.; Tanaka, Y.; Inoue, H.; Murafuji, H.; Hayashi, Y.; Miura, K.; Nakatsuka, T.; Nagahira, K.; Chamoto, K.; Fukuda, Y.; Nishimura, T., *Cell. Immunol.*, **258**, 147-51 (2009).
- 12) Kadoshima-Yamaoka, K.; Goto, M.; Murakawa, M.; Yoshioka, R.; Tanaka, Y.; Inoue, H.; Murafuji, H.; Kanki, S.; Hayashi, Y.; Nagahira, K.; Ogata, A.; Nakatsuka, T.; Fukuda, Y., *Eur. J. Pharmacol.*, **613**, 163-6 (2009).
- 13) Goto, M.; Kadoshima-Yamaoka, K.; Murakawa, M.; Yoshioka, R.; Tanaka, Y.; Inoue, H.; Murafuji, H.; Kanki, S.; Hayashi, Y.; Nagahira, K.; Ogata, A.; Nakatsuka, T.; Fukuda, Y., *Eur. J. Pharmacol.*, **633**, 93-7 (2010).