

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5398954号
(P5398954)

(45) 発行日 平成26年1月29日 (2014. 1. 29)

(24) 登録日 平成25年11月1日 (2013. 11. 1)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K	31/4174	(2006. 01)	A 6 1 K	31/4174
A 6 1 P	1/02	(2006. 01)	A 6 1 P	1/02
A 6 1 P	15/02	(2006. 01)	A 6 1 P	15/02
A 6 1 P	17/00	(2006. 01)	A 6 1 P	17/00
A 6 1 P	17/06	(2006. 01)	A 6 1 P	17/06

請求項の数 6 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-505614 (P2006-505614)
(86) (22) 出願日	平成16年3月1日 (2004. 3. 1)
(65) 公表番号	特表2006-520369 (P2006-520369A)
(43) 公表日	平成18年9月7日 (2006. 9. 7)
(86) 国際出願番号	PCT/FI2004/000109
(87) 国際公開番号	W02004/080456
(87) 国際公開日	平成16年9月23日 (2004. 9. 23)
審査請求日	平成19年1月25日 (2007. 1. 25)
審判番号	不服2010-28898 (P2010-28898/J1)
審判請求日	平成22年12月21日 (2010. 12. 21)
(31) 優先権主張番号	FI20030379
(32) 優先日	平成15年3月14日 (2003. 3. 14)
(33) 優先権主張国	フィンランド (FI)

(73) 特許権者	505300896 ビオキス ファルマ オサケ ユキチュア フィンランド共和国、エフイー-2052 O ツルク、イテイネン ピトケカツ 4
(74) 代理人	100098464 弁理士 河村 洸
(74) 代理人	100149630 弁理士 藤森 洋介
(74) 代理人	100154449 弁理士 谷 征史
(72) 発明者	レイノ、ラッセ フィンランド共和国、エフイー-2116 O メリマスク、ムオナレンギンチエ 2

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シス-ウロカニン酸を用いた細胞内酸性化のための医薬組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞の細胞質を酸性化できる薬学的に許容し得る薬剤もしくはその塩の、ヒトまたは動物において免疫抑制を引き起こすために有用な医薬組成物の製造のための使用であって、有効量の該薬剤がヒトまたは動物に本質的に非解離型で投与され、該組成物の pH が 6 . 1 から 7 . 0 の範囲であり、かつ該薬剤がシス - ウロカニン酸であり、該医薬組成物が皮膚の炎症症状、または口腔、眼または生殖器の粘膜または結合組織の炎症症状の治療または予防のためのものであり、経皮、経粘膜または局所的に投与される使用。

【請求項 2】

前記組成物の pH が 6 . 5 から 7 . 0 である請求項 1 記載の使用。

【請求項 3】

皮膚の炎症症状、または口腔、眼または生殖器の粘膜または結合組織の炎症症状が、乾癬、急性または慢性皮膚炎、歯周炎、結膜炎および膣炎からなる群より選択される請求項 1 または 2 記載の使用。

【請求項 4】

薬学的に許容し得る緩衝薬剤と組み合わせて、活性薬剤として細胞の細胞質を酸性化できる薬学的に許容し得る薬剤またはその塩を含む医薬組成物であって、該組成物の pH が 6 . 1 から 7 . 0 の範囲であり、かつ該薬剤がシス - ウロカニン酸であり、皮膚の炎症症状、または口腔、眼または生殖器の粘膜または結合組織の炎症症状の治療または予防用であって、経皮、経粘膜および局所的に投与される医薬組成物。

10

20

【請求項 5】

pH が 6 . 5 から 7 . 0 の範囲である請求項 4 記載の医薬組成物。

【請求項 6】

皮膚の炎症症状、または口腔、眼または生殖器の粘膜または結合組織の炎症症状が、乾癬、急性または慢性皮膚炎、歯周炎、結膜炎および膣炎からなる群より選択される請求項 4 または 5 記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトまたは動物において、細胞の細胞質を酸性化させ、そして続いて免疫抑制を引き起こすための薬学上許容し得る薬剤の使用に、および免疫抑制によって治療可能な疾患または障害の治療または予防に関する。

10

【0002】

本発明は、ヒトまたは動物において、細胞の細胞質を酸性化させ、そして続いて免疫抑制を引き起こすことのできる薬学上許容し得る薬剤を包含する新規医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

本発明の背景を示すために本明細書において使用される刊行物および他の材料、および特に、実施に関するさらなる詳細を提供する事例は、参考文献により組込まれる。

【0004】

20

皮膚における UV 照射の作用の様式は、光免疫学における主要な難問である。動物およびヒトにおける研究は、UV 露光が、局所および全身の免疫学的反応の鈍さと寛容性の両方を生じさせることを確立した (Schwarz 1999 年)。紫外線 B (UVB) 波長 (280 ~ 315 nm) は、UV 照射の免疫抑制活性のほとんどを占めることが見いだされた。表皮での UVB 光子の直接吸収を担う薬剤には、ウロカニン酸 (UCA) および DNA がある。皮膚の角質層でのヒスチジンの酵素脱アミノ化により合成される内因性トランス - UCA は、UVB 照射にさらすことによりシス - UCA に直接的に光異性化される。インビトロおよびインビボの両方で、UCA の光異性化は、UVB で誘発される免疫抑制において役割を果たすことがよく示された。例えば、UVB 照射により誘発される全身性抑制は、マウスにおいて抗 - シス - UCA 抗体により大部分をくつがえすことができる (Moodycliffe 1996 年)。さらに、いくつかの動物モデルではシス - UCA の局所または全身投与は、UVB 処置と類似の免疫抑制効果を生じる (Gruner, 1992 年; el-Ghorr, 1997 年; Garssen, 1999 年; Wille 1999 年)。いくつかの実験は、UCA が、抗原提示 (Beissert 1997 年、Holan 1998 年)、NK - 細胞の細胞毒性 (Gilmour 1993 年、Uksila 1994 年)、脾臓細胞によるサイトカイン産生 (Holan 1998 年)、マスト細胞の脱顆粒化 (Wille 1999 年) および好中球の活性化 (Kivistoe 1996 年) のような、インビトロでの免疫系の単離細胞における特定の機能を調節する能力があることを示した。

30

【0005】

インビボおよびインビトロのいずれの研究も、どの免疫細胞が、実際に UVB 露出後に UCA と相互作用するか、およびどの機序により、この分子が、分子レベルでの標的細胞の機能に影響を及ぼすかということをまだ明確にしていない。だれもが、UCA は、細胞表面受容体に結合し、そしてシグナリングカスケードを開始させる可溶性媒体であることを予測するであろう。しかし、UCA の推定受容体については、ほとんど知られていない。それは、ヒスタミン H₁ および H₂ 受容体アンタゴニストがシス - UCA で誘発される免疫抑制を部分的に遮断する (Hart 1997 年) ため、ヒスタミン作動性系といくつかの共通の特性を共有する可能性がある。他方ではシス - UCA が、ヒスタミン受容体に直接的に結合しないことが示された (Laihia, 1998 年)。最近、代替研究は、UCA が、GABA 受容体に作用する可能性があることは示したが、しかしこの受容体に結合する UCA の直接的証拠は、いずれにも示されなかった (Laihia, 1998 年; Uusi-Oukari, 2000 年)。

40

【発明の開示】

50

【 0 0 0 6 】

本発明の発明者らは、これまで未知のシス - ウロカニン酸の作用機序を示した。彼らは、驚くべきことに、シス - ウロカニン酸が、サイトゾルでプロトンを放出することができる形態で細胞サイトゾルに移動し、続いて、細胞質を酸性化させ、そしてその結果、免疫抑制薬剤として作用することを示した。

【 0 0 0 7 】

したがって、第一の態様によって、本発明は、細胞の細胞質を酸性化できる薬学的に許容し得る薬剤もしくはその塩の、ヒトまたは動物において免疫抑制を引き起こすために有用な医薬組成物の製造のための使用であって、有効量の該薬剤がヒトまたは動物に本質的に非解離型で投与され、該薬剤が組成物の pH を 6 . 1 から 7 . 0 の範囲に調整する担体と混合される使用に関する。

10

【 0 0 0 8 】

別の態様によって、本発明は、薬学上許容し得る担体と組み合わせて、活性物質として細胞の細胞質を酸性化することができる薬学上許容し得る薬剤またはその塩を包含するものであって、その担体が、細胞外の pH で薬剤が解離するのを基本的に防止し、そしてその担体は、6 . 1 から 7 . 0 までの pH 範囲に、組成物の pH を維持することができる医薬組成物に関する。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 0 9 】

好ましい実施態様により、薬学上許容し得る薬剤は、6 . 7 から 7 . 4 までの範囲で、好ましくは 6 . 9 から 7 . 3 までの範囲で、最も好ましくは約 7 . 0 のその解離定数を有する酸である。

20

【 0 0 1 0 】

酸は、好ましくは、シス - ウロカニン酸またはその塩であるが、しかし、それらに限定されるものではない。上に定義される範囲でその解離定数を有し、そして細胞内側に蓄積することができるあらゆる他の薬学上許容し得る非毒性の薬剤が有用である。このような薬剤は、無機または有機酸、好ましくはシス - ウロカニン酸のような、飽和、またはさらに好ましくは不飽和カルボン酸部分が結合した複素環を有する有機酸であり得る。例えば、複素環基は、イミダゾール（シス - ウロカニン酸に関しては）または細胞質 pH でプロトンを供与し、そしてそれにより細胞質を酸性化する能力を有するあらゆる他の複素環または多複素環基であり得る。他の適切な複素環基の例としては、チアゾール、チオフェン、フラン、オキサゾール、チアゾール、テトラゾール、ピラゾール、ピリジン、ピリミジンおよびトリアジンが言及され得る。

30

【 0 0 1 1 】

薬学上許容し得る薬剤は、1 つの単独の成分、またはより好ましくは 2 つまたはそれより多くの成分の混合物であり得る担体と混合される。成分の内の 1 つは、適切には、組成物の pH を所望の値に調節する緩衝薬剤である。

【 0 0 1 2 】

特に、シス - ウロカニン酸が活性薬剤である場合、組成物の pH を、6 . 5 から 7 . 0 まで、好ましくは 6 . 7 から 7 . 0 までに調節することが好ましい。この pH 範囲内では、シス - ウロカニン酸は、なお非解離である一方で、トランス - ウロカニン酸は、完全に解離される。したがって、このような組成物は、シス - ウロカニン酸に関して特異的である。

40

【 0 0 1 3 】

pH を 6 . 5 ~ 7 . 0 に調節する適切な緩衝薬剤の例としては、55 mM 塩化ナトリウムを補足した 50 mM リン酸ナトリウム、120 mM 塩化ナトリウムを補足した 50 mM クエン酸ナトリウム、および 133 mM 塩化ナトリウムを補足した 10 mM ピペス (Pipes) が言及され得る。

【 0 0 1 4 】

本発明による方法および組成物は、免疫抑制が増大されることにより治療可能なあらゆる

50

る疾患または障害の治療または予防に有用である。本明細書で使用される用語「免疫抑制」は、免疫反応の望ましくない有害な影響を防止する手段での免疫系の細胞の活性および機能に影響を及ぼすことによる体の免疫系の調節、特に下方調節に該当する。本発明の方法および組成物の標的細胞の例は、顆粒球（好中球、エオシン好酸球、好塩基球）、NK細胞、T - および B - リンパ球、単核細胞、マクロファージ、マスト細胞、および樹状細胞のような抗原提示細胞、およびそれらの前駆細胞および特異的機能性および表現型サブセットである。最も好ましくは、本発明の方法および組成物の標的細胞は、好中球およびNK細胞のような生来の免疫系細胞である。

【0015】

その免疫系の細胞の適切な機能は、生活環境で見られる、侵入病原体、寄生虫および物理的有害物質（例えば、吸入された顕微鏡下の粒子）にさえ対する宿主の生存に必須であることが十分に確立される。正常には、免疫細胞は、十分に編成された方法で、局所的に感染性 / 損傷を加える薬剤を認識し、単離し、そして排除する。この目的のために、免疫細胞は、種々の生化学反応機構を装備し、そしてそれは、感染性攻撃のあいだじゅう活性になる。例えば、好中球性白血球、好中球は、非常に特異的な酵素複合体 N A D P H オキシダーゼ系を含有し、そしてそれは、細胞活性化に標的にされたときに、多量の毒性酸素代謝産物を発生でき、そして生物学的材料に対して多数の損傷影響を発揮でき、そして他の細胞型についての前炎症性シグナルとしても作用し得る。一般に、白血球活性化は、宿主の免疫応答の必須部分であり、そして感染性襲撃の解決を促進し、そして治癒過程を開始する局所炎症性反応にいたる。しかし、正常な宿主組織が、外来または損傷を受けた構造として、またはある種の病理学的状態に関連した宿主の免疫系の過剰活性化により不適切に識別される場合、正常な組織は、宿主それ自身に対するそれらの完全破壊能力を引き出す免疫細胞によって攻撃される。このような状態の例として、局所および全身性炎症性疾患、自己免疫疾患およびアレルギー症状のような群の症状が言及され得る。特異的疾患または障害の例としては、接触過敏症または遅延型過敏症のような過敏反応が言及され得る。好ましくは、本発明の方法および組成物により治療または予防され得る症状は、好ましい標的細胞の活性化を伴う局所または全身性炎症反応（乾癬、急性または慢性皮膚炎などの皮膚の炎症症状；歯周炎、結膜炎、膣炎のような口腔、眼および生殖器の粘膜または結合組織の炎症症状；乳腺炎などの乳腺の炎症症状など）；または脈管炎、急性移植拒絶反応、慢性閉塞性肺疾患、喘息、再灌流傷害、および敗血症関連組織損傷のような疾患の病因または進行において認識された炎症性成分を明示するあらゆる他の局所または全身症状である。しかし、本発明により治療または防止され得る症状は、前述の例に制限されない。

【0016】

本発明の目的のために、薬学上許容し得る薬剤は、全身または局所のいずれかで、種々の経路によって投与することができる。適切な投与形態としては、例えば、経口処方；静脈内、筋肉内、皮内および皮下注射などの非経口注射；および粘膜、局所、経皮、吸入、鼻内または直腸処方が挙げられる。特に適切な処方は、軟膏、ゲル、クリーム、ペースト、溶液、懸濁液、ローションおよび乳液の形態での局所処方などの局所的送達のための処方である。

【0017】

薬学上許容し得る薬剤の必要用量は、治療される特定の症状、症状の重篤度、治療の期間、投与経路および使用される特定の化合物によりで変化するであろう。局所処方において、薬学上許容し得る酸の量は、典型的には 0 . 0 1 から 5 0 % までの範囲、好ましくは 0 . 1 から 1 0 % までの範囲にあり得る。

【0018】

本発明は、以下の実験の部において詳細に説明される。

【0019】

実験の部

本研究の目的は、モデル細胞であるヒト抹消血好中球において放射性標識 U C A の結合

10

20

30

40

50

を調査することである。この細胞はUCAによって影響を及ぼされることが示されている (Kivisto 1996年)。典型的なリガンド - 受容体相互作用を示すことができる代わりに、我々は、UCAが、例外的な結合特性を有し、そしてそれは、無傷のUCAをサイトゾルに迅速にそして不可逆的に蓄積させることを見出した。ウロカニン酸は、哺乳類の皮膚におけるUV照射 - 吸収物質である。シス - UCAは、インビボで動物モデルでの免疫抑制物質であるが、しかし標的細胞の種類および作用の様式は、はっきりしないままである。我々は、その機能がUCAによって影響を及ぼされることが知られており、そして炎症反応で主要な役割を果たすことが知られている免疫細胞型である、生きているヒトの多形核好中球でのUCAの結合および作用の部位を調査した。我々は、サイトゾルで集中するほぼ95%の細胞結合分画で、予想外に高いインキュベーション濃度 (30 mM) までの放射性標識シス - およびトランス - UCAの線状の濃度依存性蓄積を観察した。異性体は、サイトゾル中で未結合および非代謝形態であるように見えるので、我々は、UCAが、従来の受容体 / タンパク質 - リガンド相互作用と異なる機序を通して作用し得るかどうかが疑問を持った。その異性体は、細胞内pHに影響を及ぼした。FACS分析は、細胞外pH 6.5でシス - UCAによる好中球の細胞内区分の酸性化が、トランス - UCA (p = 0.00031) によるより明らかに大きかったのに対して、異性体は、中性より上のpHで酸性化しなかったことを示した。pH 6.5での同じ条件でシス - UCAは、トランス - UCA (p = 0.023) より多くの好中球の呼吸バースト活性を阻害した。この型の立体特異性は、2つの異性体の異なったpK_a値によって表現することができ、そして我々は、細胞内酸性化を通してシス - UCA作用についてのモデルを提案する。我々は、シス - UCAが、細胞外pH 6.1 ~ 7.0 枠での細胞内酸性化を通して好中球の活性化および機能を阻害することによって、生来の免疫性を抑制する可能性がある」と結論する。

【0020】

方法

ウロカニン酸および[¹⁴C] 標識異性体の合成

トランス - ウロカニン酸 (トランス - UCA、3 - (1H - イミダゾール - 4 - イル) - 2 - プロペン酸) を、シグマ (Sigma) (米国ミズーリ州セントルイス (St. Louis, MO, USA)) から購入した。シス - UCAを、UV光異性化を用いてトランス - UCAから製造した (下記参照)。UCA異性体の化学的純度は、高圧液体クロマトグラフィ - (HPLC) によって99.7%より上であった。

【0021】

[¹⁴C] 放射性標識トランス - およびシス - UCAの合成は、図1に概説される。我々は、いくつかの修正を伴ってGriffithら (1983年) の手法を利用して、液体アンモニア中で酢酸ホルムアミジン (1) およびジヒドロキシアセトン (2) を縮合させて、(3) を得ることによって、[¹⁴C] トランス - UCA (6) の合成を開始した。遊離塩基 (4) への(3)の中和の後、それを、4 - イミダゾールカルボアルデヒド (5) に酸化させた (Lindgrenら、1980年)。Morrisonら (Mohammad 1991年) の改良法を使用して、ノエバナゲル条件下で、[2 - ¹⁴C] マロン酸 (アマシャム・ファルマシア (Amersham Pharmacia)、英国リトル・チャールフォント (Little Chalfont, UK)) と(5)の縮合は、トランス - UCA (6) をもたらした。化合物 (6) (138 mg、1ミリモル) を、水 (500 ml) に溶解させた。溶液は、固形水酸化カリウムでpH 9にされ、そしてその後、4時間、10 で、窒素雰囲気下で照射された。ハナウ (Hanau) のクウォーツ水銀高圧ランプ (500 W、270 - 350 nm、溶媒として水) を備えたノルマグ (Normag) の下降フィルム光反応器で、光異性化を行った。得られた混合物 (HPLCによりトランス / シス約30 / 70) を、乾固するまで蒸散させ、そして残渣を、12.5 mM酢酸に溶解させた。この溶液を、pH 9に調整し、そして継続溶離液として12.5 mM (500 ml)、25 mM (500 ml) および100 mM (1000 ml) 酢酸を使用したイオン交換カラム (25 × 2.3 cm、200 ~ 400メッシュ、酢酸塩形、バイオ - ラッド (Bio - Rad) 1 - × 8) 上でクロマトグラフィーにかけた。シス - UCAは、約1

100 ml の後に現れ、そしてトランス - U C A は、主に 1300 ml 溶離液体積の後に現れた。分画からの溶媒の除去、続いてジエチルエーテルで洗浄し、そして五酸化リン上で 65 真空で乾燥させて、純粋 $[^{14}\text{C}]$ トランス - および $[^{14}\text{C}]$ シス - 異性体 (6) および (7) を得た。前工程からの (6) の収量は、35 mg (25%)、融点 226 であつた。HPLC (下を参照) による生成物 (6) の化学的純度は、99.8% より上であり、そして特異的活性は、2.2 mCi / ミリモルであつた。(7) の対応収量は、85 mg (58%)、融点 176 ~ 178 であつた。HPLC 分析は、材料が 5.8 Ci / ミリモルの特異的活性を有し、99.5% より大きな化学的純度であることを示した。実験で使用される場合、放射性標識および非標識シス - およびトランス - 異性体を、それぞれ、100 mM および 30 mM 濃度まで、インキュベーション緩衝液中に直接溶解させた。トランス - U C A の解離は、必要な場合、水浴中で穏やかな加温により促進した。

10

【0022】

U C A の HPLC 分析

アミノプロピル固定相カラム・リクロソルブ (Lichrosorb) NH_2 、ハイパー (Hibar) RT、250 × 4 mm、5 μm (メルク、ドイツ ダームスタット (Darmstadt)) を使用した。溶離液は、アセトニトリルと 2% (v/v) 酢酸および 0.5% (w/v) 酢酸アンモニウムの水溶液との 50% (v/v) 混合物であつた。異性体は、268 nm で検出され、そして滞留時間は、 T_r (シス) 3.7 分および T_r (トランス) 5.4 分であつた。

【0023】

シンチレーション計数

試料を、オプチフェーズ Hi Safe 2 シンチレーション液 (EG & G ワラック、フィンランド ツルク (Turku)) と混合し、そして $[^{14}\text{C}]$ U C A 放射性活性を、ラックベータ 1214 シンチレーションカウンター (EG & G ワラック) で測定した。計数効率率は、96.7% $\pm$ 0.12% (平均 $\pm$ SEM、n = 48) であつた。

20

【0024】

好中球の精製

末梢血好中球を、健全な提供者のヘパリン化血または軟膜から単離した。赤血球を、6% デキストラン T-500 (ファルマシア、スウェーデン) で沈殿させた。好中球を、フィコール - ハイパーク (Ficoll-Hypaque) (ファルマシア) での遠心分離により白血球に富むデキストラン血漿から分離し、残りの赤血球の低張溶解により精製し、そして Ca - および Mg - 不含 HBS 溶液で洗浄した。細胞内 pH 実験のために、好中球を、赤血球溶解なしに調製した。細胞、媒体および遠心分離機を、温度変動を避けるために、細胞調製のあいだ室温に保持させた。フローサイトメトリー分析により、99.6% の分離好中球は、CD11b⁺ / CD35⁺、98% CD45⁺、98% CD62L⁺ / CD32⁺、2.0% HLA-DR⁺、2.1% CD3⁺、1.0% CD8⁺、1.2% CD4⁺、および 0.8% CD14⁺ 細胞であつた。

30

【0025】

呼吸バースト活性の分析

呼吸バースト活性は、好中球機能の尺度として使用された。U C A 異性体は、記述されたとおり (Kivisto ら、1996 年) オプソニン化チモサンを用いた化学ルミネセンスアッセイで試験した。ピーク値を記録した。

40

【0026】

全細胞結合アッセイ

単離好中球を、2 ~ 10 × 10⁶ 細胞 / ml で、HBS (pH 7.4) に再懸濁させた。 $[^{14}\text{C}]$ シス - または $[^{14}\text{C}]$ トランス - U C A 保存溶液を添加して、0.1 μM ~ 30 mM までの濃度範囲を生じ、そして二重に、管を、30 分間、4 °C (または 25 °C および 37 °C) でインキュベートした。その後、細胞を、氷冷 HBS で 1 回洗浄し、そして液体シンチレーション容器に移した。各標準濃度から得たサンプルを測定することによって、インキュベーション管中の総 $[^{14}\text{C}]$ U C A 活性を測定し、そしてブランクのシ

50

ンチレーション値を、データ分析の前に差し引いた。洗浄工程において同じ緩衝液を使用して、示されるとおり、50 mM クエン酸ナトリウム / 120 mM NaCl 緩衝液で、いくつかの結合実験を行なった。

【0027】

好中球サイトゾルおよび膜分画の調製

膜、サイトゾルおよび核内での細胞結合UCAの局在化を、前記のとおり [^{14}C] シス - UCA との全細胞のインキュベーションの後に調べた。HBSSを用いた洗浄の後、細胞を、10 mM ピペス、10 mM KCl、3 mM NaCl、4 mM MgCl_2 (pH 7.0) を含有する氷冷溶解緩衝液 (プロテイナーゼ阻害剤として 0.5 mM PMSF、10 μM ロイペプチンおよび 10 μM ベプスタチン A (全て、シグマから) を補足) 中に懸濁させた (200 $\times$ 10⁶ 細胞 / ml)。細胞膜を、氷上での超音波処理により破壊した。溶解液を、遠心分離 (800 $\times$ g、25、10 分) し、そして後期核上清を、溶解緩衝液中のショ糖の不連続クッションに積層させた。超遠心分離 (120000 $\times$ g、4、45 分) の後、注意深いピペット採取により、サイトゾル、膜、および核 / 残骸分画を回収し、そして [^{14}C] 活性を測定した。

【0028】

好中球サイトゾルのゲル濾過

サイトゾルタンパク質の巨大分画のために、試料 (0.5 ~ 2.5 ml) を、4 で、平衡セファクリル S - 200 ゲル濾過 (ファルマシア) カラムにかけ、そしてタンパク質を、約 0.6 ml / 分の流速で、PBS (pH 7.0) で溶出させた。タンパク質の溶出を、254 nm でのフロースルー UV モニターおよび電位差記録装置を用いて追跡した。典型的な作業は、30 の 6 ml 分画から構成され、そしてほとんど6時間続いた。様々な分子量のタンパク質の溶出体積を、標準タンパク質と 0.6 ~ 2000 kDa のサイズのペプチドとのカクテルを用いて測定した。

【0029】

タンパク質濃度アッセイ

標準として仔ウシアルブミンを使用したバイオ - ラッド (ドイツ、ミュンヘン) タンパク質アッセイで、タンパク質濃度を測定した。

【0030】

細胞内 pH の観察

好中球における細胞内 pH レベルを、pH 感受性蛍光染料 2', 7' - ビス - (2 - カルボキシエチル) - 5 - (および - 6) - カルボキシフルオレセイン (BCECF、アセトキシメチルエステル; モレキュラー・プローブス、オランダ、ライデン) を利用したフローサイトメトリーで観察した。約 30 $\times$ 10⁶ 細胞を、30 分間、25 で 0.35 μM BCECF を含有する 10 ml HBSS (pH 7.4) 中でインキュベートし、HBSS で 2 回洗浄し、そして 1 ml の 154 mM NaCl 中に再懸濁させた。既知UCA濃度および照合された pH を示す適量 (235 μl) のインキュベーション培地を、ポリスチレン管中で細胞 (4.5 $\times$ 10⁵ 細胞 / 15 μl NaCl) に適用し、約 20 分間、25 でインキュベートし、そしてフローサイトメトリーで分析した。

【0031】

細胞内 pH の検量を、 K^+ / H^+ イオン透過担体ナイジェリシンを使用してインサイチュで行なった。過剰の pH 検量緩衝液 (10 mM ピペス、131 mM KCl、pH を、6.10、6.50、6.80、7.10、7.40 および 7.60 または 7.70 に調整した) および 10 μM ナイジェリシンを、154 mM NaCl 中の BCECF 標識細胞に添加した。細胞を、室温に保持し、そして 45 分以内にフローサイトメトリーによって分析した。UCA と共に、またはUCAなしにインキュベートした細胞を、同時に、細胞内 pH について分析した。検量緩衝液中のものと同じ値に pH を調整した。細胞内 pH は、BCECF 蛍光強度検量曲線から決定した。

【0032】

統計的分析

結果は、平均 $\pm$ SEMとして表した。結合研究および機能性試験でのデータの統計学的有意性は、二方向スチューデントt検定で計算した。パーソンの相関係数を、細胞試料のHPLCおよびシンチレーション計数により検出されるUCA異性体濃度について測定した。相関関係についてのp値は、フィッシャーのZトランスフォーメーションの後測定した。

【0033】

結果

好中球サイトゾルでのUCA蓄積物

単離ヒト末梢血好中球に対するUCAの結合を試験するために、放射性活性 $[^{14}\text{C}]$ 標識UCA異性体を合成した。30分間、4℃で、HBS-S中でUCAとインキュベートした細胞は、100nMから30mMまでの試験濃度範囲にわたって、線状の用量依存様式で両方の異性体を取込んだ(図2)。全結合の比率は、シス-UCAについて $4.5\% \pm 1.1\%$ (範囲2.9~6.6%)、そしてトランス-UCAについて $7.1\% \pm 3.2\%$ (範囲3.7~17%)であった(両方の異性体について二重に、 $n=12$ の測定値)。この取込の興味深い特性は、我々が、従来のリガンド-受容体結合で予測するような、 $[^{14}\text{C}]$ UCA放射性標識の非標識(「冷」)UCAによる置換を示すことができなかったことであった(図3)。サイトゾル、細胞膜および核区画中の細胞-結合UCAの分布を調査するために、細胞を、最初に上のとおり放射性標識UCAとインキュベートし、そしてその後、それらを溶解させ、そして120.000 $\times$ gショ糖クッション上に分画した。超遠心分離管中の内容物を、サイトゾル、膜および核分画に分けた。各分画の体積を正確に測定した。その後、適量の分画での $[^{14}\text{C}]$ UCA活性を測定し、そして総UCA含有量を、各分画について計算した。独立のインキュベーション実験($n=4$)は、好中球取込シス-UCAの $92.0\% \pm 2.2\%$ が、サイトゾルで回収されたことを示した(図4A)。膜に対する結合(平均 $2.7\% \pm 1.8\%$)は、サイトゾルで見られたもの($p=3.7 \times 10^{-5}$)より明らかに低かった。残りの細胞結合シス-UCA($5.3\% \pm 2.1\%$)は、細胞溶解液の核(およびおそらく非溶解細胞)分画で検出された(図4A)。

【0034】

UCAは、サイトゾルタンパク質に結合されない。

細胞中に取込まれたUCAのほとんどが、サイトゾルで見られたので、我々は、サイトゾルUCAが、好中球サイトゾルの分子成分に結合されたかどうかを決定した。 $[^{14}\text{C}]$ UCA前インキュベートした細胞のサイトゾルを、ショ糖超遠心分離で分離し、そしてS-200ゲル濾過カラムにかけた。その後、サイトゾル分画を収集し、そして放射活性を、各分画で測定した。図5Aおよび5Bで示されるとおり、 $[^{14}\text{C}]$ 活性は、検出可能なタンパク質を含まない低分子量分画で見られた。この溶出パターンは、 $[^{14}\text{C}]$ シス-UCA単独が、ゲル濾過カラムにかけられる経路と一致し(図5C)、そしてUCAが、好中球サイトゾルでのいずれの主要な溶解性タンパク質分画にも結合されないことを示唆した。

【0035】

別の溶解後標識試験は、 $[^{14}\text{C}]$ UCA前インキュベートされた細胞を用いた実験から得られる結果を立証するために行われた。この試験では、非標識好中球サイトゾルを、記述どおりに分離し、そしてその後、適量のサイトゾルを、氷上で、一晚、5mMシス-またはトランス- $[^{14}\text{C}]$ UCAとインキュベートした。その後、サイトゾルを、S-200で分画した。タンパク質関連 $[^{14}\text{C}]$ UCA活性は観察されず、そして溶解前インキュベーションに類似の溶出プロファイルを記録した。したがって、好中球サイトゾル中の主要な溶解性タンパク質分画は、細胞溶解の前後で、蓄積UCAを結合することができないということが示された。

【0036】

UCAは、好中球サイトゾルにおいて無傷なままである。

次に、我々は、サイトゾル中の $[^{14}\text{C}]$ UCAが、放射性活性標識のどれくらいが無傷

10

20

30

40

50

のUCAと結合したかを測定することによって、取込後に好中球によって代謝されたかどうかを試験した。これは、氷上で、一晚、10%トリクロロ酢酸(TCA)を用いて $[^{14}\text{C}]$ UCA標識好中球のサイトゾルタンパク質を沈殿させることによって行われた。その後、放射活性標識の量を、シンチレーション計数により、沈殿およびタンパク質不含上清の両方で測定し、そして上清中の無傷のUCAの含有量を、HPLCによって測定した。全 $[^{14}\text{C}]$ UCA活性は、上清で見られ、そしてTCAの添加の直後、およびタンパク質沈殿物を沈降させた後のサイトゾル中の放射活性を比較した場合、回収はシス-UCAについては $102\% \pm 3.9\%$ ($n=9$)であり、トランス-UCAについては $100.2\% \pm 0.9\%$ ($n=4$)であった。タンパク質ペレットでは、放射活性は見られなかった。さらに重要には、無傷のシス-およびトランス-UCAのクロマトグラフィーで測定した濃度は、同じ試料中のシンチレーション計数によって達成された濃度と相関関係があり(図6)、UCA異性体は、好中球サイトゾルにおいて代謝されなかったことを示した。UCA異性体で前処理されなかった細胞では、HPLC分析によって内因性UCAは見られなかった(データは示されず)。

【0037】

UCAは、細胞外および細胞内pHを低下させる。

これまでに報告された結果は、典型的な細胞表層受容体アゴニストのような挙動をする代わりに、UCAは、好中球の内側に高濃度で蓄積し、そこで、UCAは溶解性の細胞内タンパク質に結合したりも、明らかな代謝にかけたりもしないことを示す。それ自体、UCAは、細胞に入り、そしてサイトゾルの物理-化学的微小環境(pH、イオン能力、イオン強度)を改変することによって細胞機能を調節する小イオン(例えば、 K^+ 、 Na^+ 、 H^+ 、 Cl^-)に類似する。したがって、我々は、高レベルの無傷のUCAが、酸としてのサイトゾルにおけるその受動的存在により簡単に細胞変化をし得ることを仮定した。 pK_a が、トランス-UCA(Robertsら、1982年、KrienおよびKermici 2000年)については4.0および6.1、そしてシス-UCA(Robertsら、1982年)については3.3および7.0の周辺であるので、1つの可能性のある作用の態様は、生理学的pHでのサイトゾルの酸性化であり得る。最初に緩衝溶液で、そしてその後無傷の細胞で、pHにおけるUCAの効果を試験することによってそのような可能性が近づいた。異性体は、1mMより上の濃度で、用量依存的様式で、標準PBS緩衝液(pH 7.0)においてpHを低下させた(図7A)。UCA異性体を、HBSS緩衝液(pH 7.4)に添加したとき、1mMより上の濃度が、再度、用量依存的にpHを下降させた(図7B)。興味深いことに、HBSS緩衝溶液のpHを、UCA添加前に6.5に、すなわちシス-UCAの第二の pK_a より下に調整した場合、トランス-UCAのみが、pHを際立って減じることができ(図7B)、シス-UCAが、このpHで部分的に脱プロトン化されるのみであることを示唆した。

【0038】

細胞内pHに対するUCAの効果を試験するために、好中球に、蛍光pH指標染料BCECFを加え、そしてUCA処理細胞の蛍光を、FACSで測定した。上のデータが示すとおり、UCAそれ自身は、異性体およびその溶液の初期pHに依存して、試験溶液のpHを低下させることができる。他方では、細胞内pHが、環境のpHによって影響を受けることが十分に知られている。したがって、UCA添加による試験溶液の酸性化が、細胞内のBCECF蛍光に影響を及ぼす可能性がある人工産物(artefact)を避けるために、我々は、UCAの添加後、試験溶液のpHを、当初のpHに戻して調整した。これらのpH制御条件下で、3mMトランス-およびシス-UCAは、pH 7.4で、細胞内BCECF信号に対する明らかな影響を示さなかった(図8A、下部棒線)。対照的に、pHが、6.5に調整された場合、シス-UCAは、サイトゾル酸性化の指標として蛍光信号で、 $15\% \pm 4.0\%$ まで明らかな減少を引き起こした($p=0.022$ 、 $n=4$ 、対のt検定(paired t test))(図8A、上部棒線)。図8は、細胞のBCECF信号および呼吸バースト活性を同時に測定する3つの独立した実験から得られるデータを示す(以下参照)。第四の実験は、細胞内BCECF蛍光測定のみについて行なわれた。さらに、ト

ランス - U C A は、 $pH 6.5$ で $9.4\% \pm 4.1\%$ まで明らかに蛍光信号を減少させた ($p = 0.032$, $n = 4$) が、しかしその効果は、ほとんど伝えられなかった。しかし、 $3mM$ シス - U C A とランス - U C A のあいだの対応の B C E C F 蛍光減少の違いは、非常に際立っていた ($p = 0.00031$, $n = 4$) (図 8 A、上部棒線)。

【0039】

サイトゾルを酸性化するシス - U C A の能力のさらに特定の調査を達成するために、正確な細胞内 pH を、 K^+ / H^+ イオン透過担体ナイジェリシンの使用により測定した。 $6.1 \sim 7.7$ の範囲のいくつかの pH の緩衝溶液中での U C A との好中球のインキュベーションは、 $3mM$ シス - U C A が、 $pH 7$ より下では用量 - および細胞外 pH - 依存的様式で、細胞内 pH を低下させるのに対して、ランス - U C A は、些細な効果のみを示すことを示した (図 9)。 $0.3mM$ 濃度のシス - U C A は、同じ pH 範囲で非常に小さな効果を示した (示されなかった)。

【0040】

U C A は、立体特異的に、そして pH 依存的に好中球の呼吸バーストを阻害する。

上に示されるデータは、僅かに酸性の環境でシス - U C A のみが、サイトゾル pH を際立って減少させるとができるのに対して、生理学的 pH では、ランス - も、シス - 異性体もなんらの影響を示さなかったことを示唆する。どのように U C A のサイトゾル酸性化効果が、先に報告された好中球呼吸バースト活性の阻害と相関関係にあるかを試験するために、我々は、好中球の同じバッチにより、そして上に記述されたのと同じ実験条件下で、すなわち、試験溶液の pH が、U C A 添加の後にその当初のレベルに戻して調整される場合、オプソニン化チモサムで誘導される化学ルミネセンスに対する $3mM$ U C A の影響を測定した。図 8 B に示されるとおり、ランス - U C A は、 $pH 7.4$ で化学ルミネセンスに影響を示さなかったのに対して、 $14\% \pm 4.0\%$ ($n = 3$) の阻害が、 $pH 6.5$ で観察された。同じ条件下でシス - U C A は、それぞれ、 $15\% \pm 8.4\%$ および $44\% \pm 1.3\%$ まで呼吸バースト活性を抑制した。興味深いことには、試験溶液の pH が、U C A 補足後、調整されないままであった場合、ランス - U C A は、それぞれ、 $pH 6.22 \pm 0.02$ (名目上 $pH 7.4$) および 5.87 ± 0.06 (名目上 $pH 6.5$) で、 $31\% \pm 8.4\%$ および $48\% \pm 4.0\%$ まで化学ルミネセンスを阻害した。シス - U C A についての対応の阻害は、 $pH 6.60 \pm 0.02$ (名目上 $pH 7.4$) で、 $41\% \pm 10\%$ 、そして $pH 6.33 \pm 0.07$ (名目上 $pH 6.5$) で、 $48\% \pm 1.6\%$ であった。

【0041】

得られた呼吸バースト応答データを、インキュベーション培地中の測定された pH に対してプロットした場合、細胞外 pH を低下させることが、 $3mM$ U C A の存在下で呼吸バースト活性を抑制することは明らかである (図 8 C)。そのプロットは、シス - U C A が、ランス - U C A より細胞外 pH 範囲 $6.1 \sim 7.0$ において細胞に対するより顕著な阻害活性を保有するのに対して、 $pH 7$ より上では差異が見られないことも示す。呼吸バースト活性が、同じ細胞中の別個の細胞内 B C E C F 蛍光の機能として計算される場合、呼吸バースト活性の抑制は、細胞外または細胞内酸性化のいずれかを通して U C A 異性体により引き起こされる細胞内 pH の減少に関連することが観察され得る (図 8 D)。

【0042】

結論

U C A は弱い有機酸であるので、細胞の内側の U C A の蓄積が、サイトゾルの pH を調節し得る。しかし、これは、一般に、入ってくる U C A 分子のプロトン化状態による。U C A は、2つのプロトン供与部分、カルボキシル基およびイミダゾール基を有する多塩基酸である。カルボキシル基の pK_a は、ランス - U C A については 4.0 で、そしてシス - U C A については 3.3 であり (Roberts 1982年)、そしてそれから、特に全ての U C A 分子が、ヘンダーソン - ヘーゼルバルチ方程式 ($H - H$ 方程式) によって、 4 より上の pH でカルボキシル基で脱プロトン化されるという結果になる。したがって、生理学的 pH 範囲で、イミダゾリル基単独のプロトン化状態は、分子がプロトンを供与でき、そし

てそれにより酸性化を促進するかどうかを決定する。トランス - U C A のイミダゾリル pK_a は、6 . 1 (Robertsら 1982年、KrienおよびKermici 2000年)であり、一方シス - U C A の pK_a は、潜在的に、カルボキシル部分とイミダゾリル部分のあいだの分子内水素結合により生じるシス - 異性体の安定化互変異性体形態により、明らかに高い7 . 0 である (Roberts 1982年)。結局、 pH 7 . 0 およびその上でのみ、シス - U C A のイミダゾリル基が、脱プロトン化を好むのに対して、トランス - U C A は、同じ pH でほとんど完全に脱プロトン化される。本研究で、これは、 pH 6 . 5 に調整された H B S S 緩衝液中のトランス - U C A の添加が pH を下降させた一方で、シス - U C A は、ほとんど影響を示さなかった実験によって明瞭に示し得た。

【 0 0 4 3 】

生きている細胞におけるサイトゾルを酸性化する U C A の能力が、2つの主要なパラメーターによることが推定され得る：細胞外空間の pH とサイトゾルの当初の pH 。U C A は、皮膚に主に見られるので、誰もが、生理学的環境の状況でこれらの2つのパラメーターを考慮するに違いない。ヒトの皮膚は、4 ~ 6 付近の表面 pH を示す酸マントルを有することがよく知られている。

【 0 0 4 4 】

角質層を、層ごとに切り離した場合、 pH は徐々に増大し、そして角質層の全除去の後、残りの表皮での pH は、約 6 . 9 である (OehmanおよびVahlquist、1994年)。深部層では、内側の体のほぼ中性の pH が達成された。最近の分析は、U C A が、ヒトの角質層で主要な pH 調節因子であるという証拠を提供する (KrienおよびKermici 2000年)。U C A の大半は、角質層にある；しかし、シス - U C A レベルの上昇が、1 ~ 4 時間以内に尿で、続いて総体 U V B 露出で検出されうる (Kammayerら、1997年) ので、明らかな量の U C A が、(表) 皮膚中に、およびそれを通して明らかに拡散する。細胞内環境を考慮すると、休止中の好中球サイトゾルの pH は、7 . 0 ~ 7 . 4、すなわちイミダゾリル pK_a の上であり、そしてそれは、両方の U C A 異性体が、好中球サイトゾル中で脱プロトン化状態で主に存在することを示唆する。イミダゾリル pK_a より上の細胞外 pH (トランス - U C A については 6 . 1、そしてシス - U C A については 7 . 0) では、U C A 分子の大半は、脱プロトン化形態にあり、そして、サイトゾルに入った後に明らかな酸性化は起こらない。対照的に、イミダゾリル pK_a の値より下の pH では、U C A は、主に、細胞参入時にサイトゾルの酸性化を促進する能力のあるプロトン化形態で存在するであろう。さらに、H - H 方程式により、U C A 関連プロトンの量、したがってサイトゾル pH の減少は、サイトゾルおよび酸性の細胞外環境のあいだの膜間 pH 差異に直接比例することが、推測されうる。これらの仮説についての実験的支持を提供するために、我々は、U C A 処理細胞でのサイトゾル pH における変化を測定した。細胞外 pH が、インキュベーション混合物中で 7 . 4 に、すなわち、両方の U C A 異性体のイミダゾリル基の pK_a の値より上に厳密に制御された場合、誰もが予想し得るとおり酸性化は観察されなかった。他方では、制御された pH 6 . 5 で、7 . 0 のイミダゾリル pK_a を有するシス - U C A は、サイトゾル pH を明らかに減少させた一方で、トランス - U C A (pK_a 6 . 1) は、些細な影響のみを示した。これは、H - H 方程式を使用した計算から推定可能でもある： pH 6 . 5 で、シス - U C A の 70 % を超えるものがプロトン化されおり、そしてトランス - U C A の 70 % が脱プロトン化状態にある。理論上、細胞外 pH を 6 . 1 より下に低下させることは、我々に、サイトゾル pH でのトランス - U C A で誘発される低下を検出させたが、しかし、その限定された操作上の pH 範囲のために、B C E C F 染料を用いてこれを試験することが可能ではなかった。一緒に考慮して、表皮の上部の生存可能な層 (upper viable layer) でのように僅かに酸性の環境で、シス - U C A は、事実上、サイトゾル pH を減少させるプロトンシャトルとして作用できることは明らかである。U C A のこの独特の特性は、トランスからシスへの光異性化による U C A の変化した空間構造に起因するイミダゾリル pK_a のシフトから生ずる。

【 0 0 4 5 】

U C A 製剤が、本発明で提案された pH 範囲で処方されるべきであると示唆する科学お

10

20

30

40

50

よび特許文献における先のデータはない。Stabらによる米国特許第5,494,676号明細書には、1%トランス-UCAの光異性化反応が、UV光で照射する前にNaOHでpHが6.9に調節された水溶液中で行なわれたことが記述された。等量のトランス-UCAおよびシス-UCAを含有するこの溶液は、その後、局所のO/Wクリーム処方を製造するために使用された。しかし、局所製剤のpHは、本発明の好ましいpH範囲にpH調節も、あるいはpH緩衝化もなされなかった。

【0046】

結論として、本研究は、初めて、インビボで免疫細胞におけるUCAの立体特異的作用を説明し得るデータを示す。逆説的には、UCAによる細胞機能の調節は、直接的に立体異性化に依存するものではなく、むしろトランスからシス-UCAへの光変換の後に、分子の酸-塩基特性における微細であるが重要な変化にあるように見える。

10

【0047】

本発明は、さらに、以下の限定されない実施例によって例示される。

【0048】

本発明による処方の例

ゲル組成物1(%w/w)

シス-ウロカニン酸	0.1~10
カルボポール974	1.5
プロピレングリコール	12.5
緩衝剤	0.01~1
精製水	残部

20

【0049】

ゲル組成物2(%w/w)

シス-ウロカニン酸	0.1~10
ナトロゾル(ヒドロキシエチルセルロース)	1.0
緩衝剤	0.01~1
精製水	残部

【0050】

クリーム組成物1(%w/w)

シス-ウロカニン酸	0.1~10
プロピレングリコール	50
セトステアリルアルコール	15
ラウリル硫酸ナトリウム	1
緩衝剤	0.01~1
精製水	残部

30

【0051】

クリーム組成物2(%w/w)

シス-ウロカニン酸	0.1~10
セトステアリルアルコール	6.75
プロピレングリコール	40
ラウリル硫酸ナトリウム	0.75
ポロキサマー407	1
鉱油	5
線状ペトロラタム12.	5
緩衝剤	0.01~1
精製水	残部

40

【0052】

軟膏組成物(%w/w)

シス-ウロカニン酸	0.1~10
鉱油	5

50

緩衝剤

0 . 0 1 ~ 1

ペトロラタム

残部

【 0 0 5 3 】

本発明の方法は、多様な実施態様の形態で組込まれ、その少数のみが、本明細書に開示されることがよく理解される。他の実施態様が存在し、そして本発明の概念から逸脱しないことは、当業者にとって明らかである。したがって、記述された実施態様は、例示であって、そして限定的に見なされるべきでない。

【 0 0 5 4 】

[参考文献]

Beissert, S., T. Mohammad, H. Torri, A. Lonati, Z. Yan, H. Morrison, and R.D. Granstein. 1997. Regulation of tumor antigen presentation by urocanic acid. *J. Immunol.* 159: 92. 10

El-Ghorr, A.A., and M. Norval. 1997. The effect of chronic treatment of mice with urocanic acid isomers. *Photochem Photobiol* 65: 866.

Garssen, J., M. Norval, J. Crosby, P. Dortant, and H. Van Loveren. 1999. The role of urocanic acid in UVB-induced suppression of immunity to *Trichinella spiralis* infection in the rat. *Immunology* 96: 298. 20

Gilmour, J.W., J.P. Vestey, S. George, and M. Norval. 1993. Effect of phototherapy and urocanic acid isomers on natural killer cell function. *J. Invest. Dermatol.* 103:169.

Griffith, R., and R. Dipietro. 1983. An improved preparation of imidazole 4(5)-methanol hydrochloride. *Synthesis* 83:576.

Gruner, S., W. Diezel, H. Stoppe, H. Oesterwitz, and W. Henke. 1992. Inhibition of skin allograft rejection and acute graft-versus-host disease by cis-urocanic acid. *J. Invest. Dermatol.* 98: 459 30

Hart, P.H., A. Jaksic, G. Swift, M. Norval, A.A. el-Ghorr, and J.J. Finlay-Jones. 1997. Histamine involvement in UVB-and cis-urocanic acid-induced systemic suppression of contact hypersensitivity responses. *Immunology* 91: 601.

Holan, V., L. Kuffova, A. Zajicova, M. Krulova, M. Filipec, P. Holler, and A. Janacek. 1998. Urocanic acid enhances IL-10 production in activated CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* 161:3237.

Kammeyer, A., S. Pavel, S.S. Asghar, J.D. Bos, and M.B. Teunissen. 1997. Prolonged increase of cis-urocanic acid levels in human skin and urine after single total-body ultraviolet exposures. *Photochem. Photobiol.* 65:593. 40

Kivistoe, K., K. Punnonen, J. Toppari, and L. Leino. 1996. Urocanic acid suppresses the activation of human neutrophils in vitro. *Inflammation* 20:451.

Krien, P.M., and M. Kermici. 2000. Evidence for the existence of a self-regulated enzymatic process within the human stratum corneum-an unexpected role for urocanic acid. *J. Invest. Dermatol.* 115:414. 50

Laihia, J.K., M. Attila, K. Neuvonen, K. Pasanen, L. Tuomisto, and C.T. Jansen. 1998. Urocanic acid binds to GABA but not to histamine (H_1 , H_2 , or H_3) receptors. *J. Invest. Dermatol.* 111:705.

Lindgren, G., K.-E. Stensjoe, and K. Wahlberg. 1980. Synthesis and photocyclization of some 4(5)-arylethenylimidazoles. *J. Heterocyclic. Chem.* 17:679.

Mohammad, T., and H. Morrison. 1991. A general approach to the synthesis of ^{14}C labeled acrylic acids. *J. Label. Comp. Radiopharm.* 9:1010.

10

Moodycliffe, A.M., Bucana, C.D., Kripke, M.L., Norval, M., and Ullrich, S.E. 1996. Differential effects of a monoclonal antibody to cis-urocanic acid on the suppression of delayed and contact hypersensitivity following ultraviolet irradiation. *J. Immunol.* 157:2891.

Oehman, H., and A. Vahlquist. 1994. In vivo studies concerning a pH gradient in human stratum corneum and upper epidermis. *Acta Derm. Venereol.* 74:375.

Roberts, J.D., C. Yu, C. Flanagan, and T.R. Birdseye. 1982. A nitrogen-15 nuclear magnetic resonance study of the acid-base and tautomeric equilibria of 4-substituted imidazoles and its relevance to the catalytic mechanism of α -lytic protease. *J. Am. Chem. Soc.* 104:3945.

20

Rotstein OD, PE Nasmith, and S Grinstein. 1987. The Bacteroides by-product succinic acid inhibits neutrophil respiratory burst by reducing intracellular pH. *Infect. Immun.* 55:864.

Schwarz, T. Ultraviolet radiation-induced tolerance. 1999. *Allergy* 54:1252.

Uksila, J., J.K. Laihia, and C.T. Jansen. 1994. Trans-urocanic acid, a natural constituent of the human skin, inhibits human NK cell activity. *Exp. Dermatol.* 3:61.

30

Uusi-Oukari, M., S.L. Soini, J. Heikkilae, A. Koivisto, K. Neuvonen, P. Pasanen, S.T. Sinkkonen, J.K. Laihia, C.T. Jansen, and E.R. Korpi. 2000. Stereospecific modulation of GABA_A receptor function by urocanic acid isomers. *Eur. J. Pharmacol.* 400:11.

Wille, J.J.A.F. Kydonieus, and G.F. Murphy. 1999. Cis-urocanic acid induces mast cell degranulation and release of preformed TNF- α : A possible mechanism linking UVB and cis-urocanic acid to immunosuppression of contact hypersensitivity. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 12:18.

40

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 5 】

【図 1】 $[^{14}C]$ 放射線標識されたトランス - およびシス - UCA の化学合成についての略図である。

【図 2】 生きた好中球へのUCAの蓄積を示す。データ点は、ブランク値を差し引いた後の二重の管 (duplicate tubes) での平均 $\pm$ SEM を表す。細胞 (7.0×10^6 細胞 / ml HBSS) を、30 分間、4 で、 $[^{14}C]$ UCA 異性体とインキュベートし、洗浄し、そしてシンチレーション容器に移した。「総UCA」と名づけられた細胞なしのコン

50

トロール容器は、インキュベーション管によるあらゆる非特異的結合効果を排除するために同様のインキュベーションを受けた。陰影線付記号、概算 c p m 値は、技術上の最大計数限界により、 $> 10^7$ c p m を示す総 U C A 試料について使用された。

【図3】非標識シス - U C A による $[^{14}\text{C}]$ シス - U C A 取込みの置換を示す。単一の提供者の新たに抜かれた静脈血から単離された好中球を、p H 7 . 4 での置換について2回の機会（7日離れて）で分析した。細胞（実験1では $7.4 \times 10^6 / \text{ml}$ 、および実験2では $6.3 \times 10^6 / \text{ml}$ ）を、1時間、所定の温度で、10 mM 非標識シス - U C A を伴うか、または伴わない 1 mM $[^{14}\text{C}]$ シス - U C A を含有する H B S S （総体積 200 μl ）中でインキュベートした。実験1では、細胞をインキュベートした後にペレットとしてのみ洗浄したのに対して、実験2では、洗浄媒体（H B S S）中に細胞を再懸濁させた。データは、三重のインキュベーションから得られる。

10

【図4】細胞分画中、そしてインキュベーション温度による取込まれたシス - U C A の分布を示す。A、4 でインキュベートされた細胞の種々の分画における対応（proportional） $[^{14}\text{C}]$ 活性（平均 $\pm$ S E M、 $n = 4$ つの独立実験）。軟膜から単離された好中球（ $50 \sim 200 \times 10^6$ 細胞 / ml ）を、20 ~ 30 分間、4 で、1 または 5 mM $[^{14}\text{C}]$ シス - U C A とインキュベートした。超音波処理により細胞を破壊し、細胞分画を、ショ糖超遠心分離により分離し、そしてその結合活性を各分画で測定した。B、末梢血の好中球へのシス - U C A の取込に対するインキュベーション温度の効果（平均 $\pm$ S E M、 $n = 4$ つの独立実験）。C、インキュベーション温度による細胞の分画におけるシス - U C A の分布（二重のインキュベーションの平均 $\pm$ S E M）。

20

【図5】S - 200 ゲル濾過でのサイトゾル関連 $[^{14}\text{C}]$ シス - U C A の溶出を示す。好中球（ $160 \sim 190 \times 10^6$ ）を、20 分間、4 で、1 mM $[^{14}\text{C}]$ U C A 異性体とインキュベートし、洗浄し、溶解させ、そしてショ糖超遠心分離で分画した。サイトゾル分画を、ゲルに載せ、そしてタンパク質含有量および U C A 活性を、溶出で測定した。A、 $[^{14}\text{C}]$ シス - U C A とインキュベートした細胞のサイトゾル。B、 $[^{14}\text{C}]$ トランス - U C A とインキュベートした細胞のサイトゾル。C、同じ条件での標準分子量タンパク質マーカーおよびシス - U C A 単独での溶出。

【図6】実験条件下での U C A 代謝の欠如を示す。種々の結合アッセイから得られる $[^{14}\text{C}]$ U C A 標識好中球のサイトゾルタンパク質を、一晚、氷上で 10 % T C A で沈殿させた。放射活性標識の量を、シンチレーション計数により沈殿物およびタンパク質不含上清中で測定し、そしてその上清中の無傷（非代謝）U C A 異性体の含有量を、H P L C により測定した。データは、シス - U C A（ $n = 7$ ）およびトランス - U C A（ $n = 2$ ）を用いた1組の全細胞インキュベーションから、そして両方の異性体（矢印）との溶解後インキュベーションを用いた2つの実験から得られる結果を表す。パーソンの相関係数および p 値は、両方の異性体について計算された。

30

【図7】標準インキュベーション緩衝液での U C A 異性体の p H 効果を示す。シス - U C A およびトランス - U C A の勾配濃度を含む、（A）P B S 緩衝液（p H 7 . 0）中で、そして（B）H B S S 緩衝液（p H 7 . 4）中で p H を測定した。

【図8】U C A 異性体によるサイトゾルの呼吸バースト活性と酸性化との関係を示す。3つの独立の実験で、好中球を、3 mM シス - またはトランス - U C A とインキュベートし、そして呼吸バースト化学ルミネセンスおよび p H 指標蛍光について同時に分析した。A、同じ細胞外 p H でのコントロールレベルと比較した細胞内 p H 指標染料蛍光。細胞を、B C E C F に載せ、洗浄し、U C A とインキュベートし、そしてフローサイトメトリーで分析した。含有率を、幾何学上の平均蛍光強度から計算した。B、同じ p H での U C A なしのコントロールレベルに比較した呼吸バースト応答。結果は、3つの実験の各々の内の2つの平行の分析から得られる。A および B では、細胞外培地の p H を、U C A を添加した後に、6 . 5 または 7 . 4 に調節した。C、細胞外 p H の機能としての U C A との呼吸バースト応答。データは、p H が測定されるのみであって、3 mM U C A の添加の後に調整されない同時インキュベーションで補足された上の3つの実験から得られる。D、細胞内酸性化への呼吸バーストの従属性。シス - U C A（ $p = 0.048$ ， $n = 12$ ）およ

40

50

びトランス - U C A ($p = 0.065$, $n = 11$) についての相関係数を、B と同じ実験から計算した。

【図 9】インサイチュで、U C A で処理した好中球での細胞内 pH 検量を示す。B C E C F 標識細胞を、種々の pH で高カリウム・ピペス緩衝液においてプロトンイオン透過担体ナイジェリシンを用いた処理の後、pH 参照細胞として使用した。他の B C E C F 標識細胞を、検量緩衝液のものと同じ pH レベルに調節した低カリウム・ピペス緩衝液中の 3 m M U C A と共に、または伴わずにインキュベートした。フローサイトメトリーで得られた B C E C F 中央蛍光強度を使用して、細胞内 pH を計算した。

【図 1】

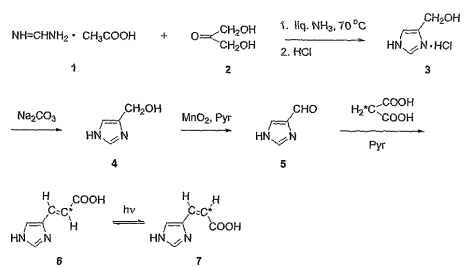
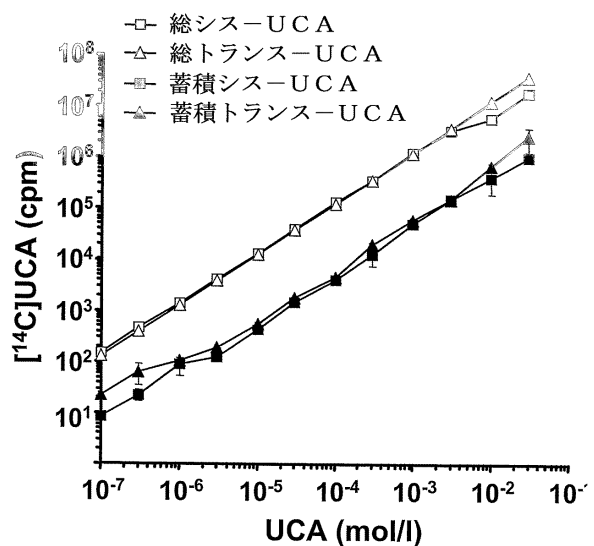
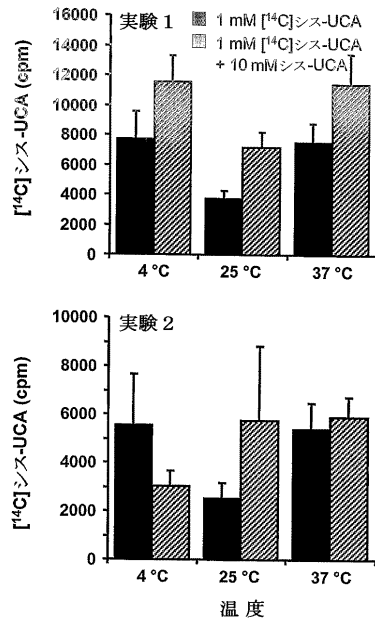


FIG. 1

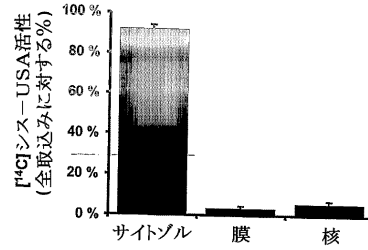
【図 2】



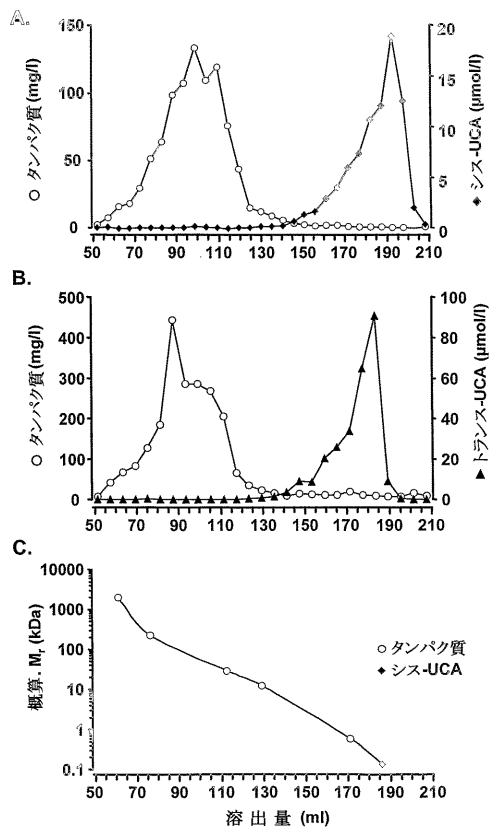
【図 3】



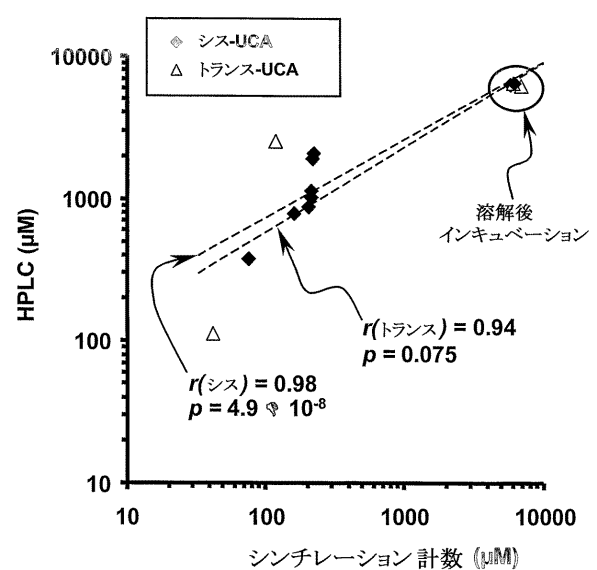
【図 4】



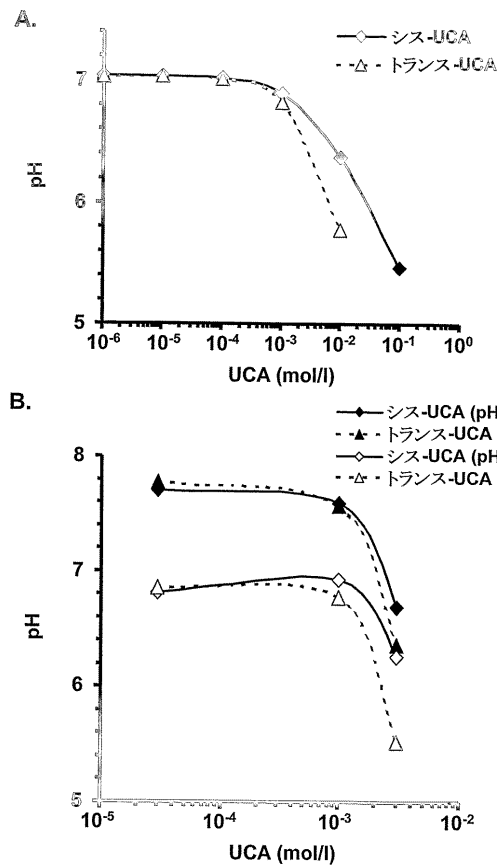
【図 5】



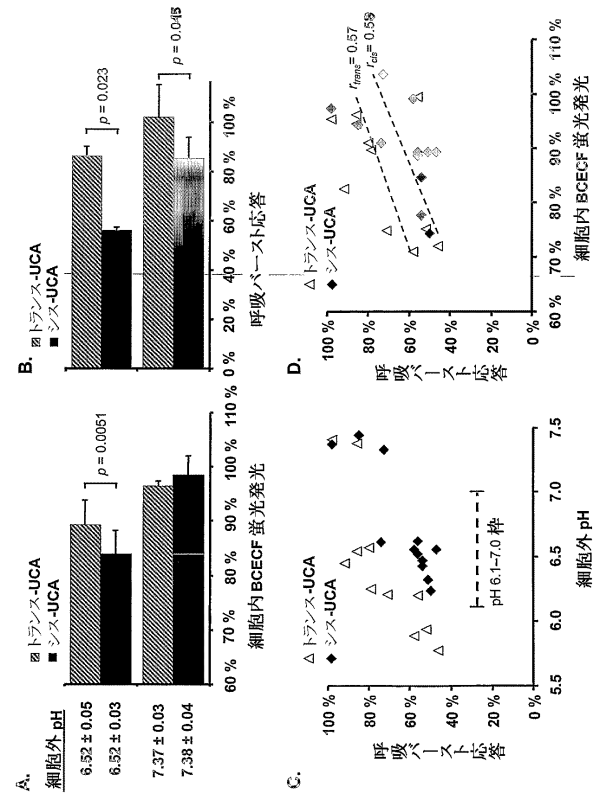
【図 6】



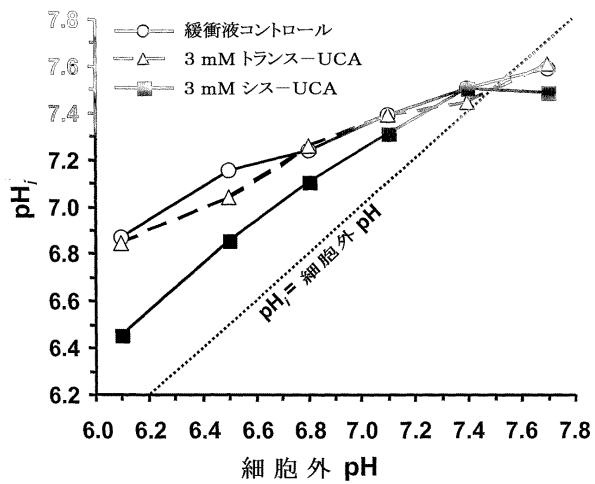
【図 7】



【図 8】



【図 9】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 19/04	(2006.01)	A 6 1 P 19/04	
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/08	(2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5

(72)発明者 ライヒア、ヤルモ
フィンランド共和国、エフィー - 2 1 4 2 0 リエト、バーランチエ 6 9

合議体

審判長 内田 淳子

審判官 穴吹 智子

審判官 岩下 直人

(56)参考文献 特開平 0 4 - 2 3 0 3 2 1 (J P , A)
特表平 0 8 - 5 0 8 4 7 4 (J P , A)
特開平 0 7 - 0 0 2 6 7 0 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K45/00-45/08

A61K31/33-31/80