

201208005B

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

生体防御タンパク質に注目した、漢方薬の作用メカニズムの解明・有効成分
の同定と新規治療薬の開発

平成 22 年度～平成 24 年度 総合研究報告書

研究代表者 水島 徹

平成 25 (2013) 年 3 月

目次

I. 総合研究報告

生体防御タンパク質に注目した、漢方薬の作用メカニズムの解明・有効成分の同定と新規治療薬の開発 -----1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----12

III. 研究成果の刊行物・別刷 -----15

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

（総合）研究報告書

生体防御タンパク質に注目した、漢方薬の作用メカニズムの解明・有効成分
の同定と新規治療薬の開発

研究代表者 水島 徹 慶應義塾大学薬学部教授

研究要旨

HSP70が紫外線によるシワを防ぐこと、及びその分子機構を解明し、*J. Invest. Dermatol.*に掲載した。これによりHSPを増やす生薬や天然物への注目が高まり、本研究の成果であるアルニカやヤバツイの様々な商品への応用が開始されている。

HSP70、及びSOD誘導生薬のスクリーニングを行った。その結果、アルニカなど10種のHSP70誘導生薬、及びサルビアなど13種のSOD誘導生薬を発見した。これらのHSP70誘導生薬は、既存のHSP70誘導薬（テプレノン）よりも強力なHSP70誘導能、及び抗潰瘍作用（マウス）を示した。またサルビアは、PC-SODよりも強力な間質性肺炎、及び炎症性腸疾患抑制効果（マウス）を示した。尚、本研究の成果であるアルニカの特許を化粧品会社へライセンスアウトし、アルニカを配合した化粧品（抗シミ化粧品）を発売した。

一方、HSP70誘導生薬（ヤバツイ）から新たに同定した、HSP70誘導物質、ユーパリノライドA、ユーパリノライドBに関しては、その成果を*Biochem. Pharmacol.*で発表するとともに、そのHSP誘導機構を解明した。

アルニカからHSP70誘導物質の単離、同定を試みた。オープンカラムで粗分けした後、分取用HPLCで分画し、誘導物質の単離・構造決定に成功した。

一方サルビア等からのSOD誘導物質の単離、同定に成功し、この物質が肺線維症モデルや潰瘍性大腸炎モデルでPC-SODよりも高い有効性を示すことを見出した。

さらに我々はHSP47、及びHO-1（我々の研究からそれぞれ、抗シワ化粧品、及び炎症性疾患治療薬のターゲット分子として有望であることが示されている）誘導生薬のスクリーニングを行った。HSP47誘導生薬として単離したワイルドタイムに関しては、その外用剤を開発し、抗シワ効果を確認した。一方、HO-1誘導生薬として単離した、マジヨラムに関しては、肺線維症、小腸潰瘍、喘息に関する有用性を示した。さらに、ワイルドタイムからHSP47誘導物質三種、マジヨラムからHO-1誘導物質二種の同定に成功した。

A. 研究目的

我々はこれまで、様々な疾患に対して HSP や SOD などの生体防御タンパク質が保護的に働くことを報告してきた。HSP は様々なストレスによって誘導され、細胞をストレスに耐性化する。また我々は、HSP が抗炎症作用やタンパク質の変性を抑制する作用を持つことを発見した。一方我々はテプレノン（胃薬）が HSP を誘導する（但し、誘導能はあまり高くない）ことを発見し、テプレノンはこの作用により胃潰瘍を抑制していることを証明した。さらに小腸潰瘍や炎症性腸疾患（炎症と細胞死が主な原因）、及びアルツハイマー病などの神経変性疾患（タンパク質の変性が原因）に対しても HSP が保護的に働くこと、及びテプレノンが有効であることを見出した（現在これらの疾患に対するテプレノンの臨床試験を行っている）。

活性酸素による組織傷害は間質性肺炎や炎症性腸疾患（いずれも難病）などの炎症性疾患の主要な原因である。そこで活性酸素を消去する SOD は古くから注目されてきたが、その血中安定性が低いために医薬品としての開発は成功しなかった。そこで我々は、SOD にリン脂質を結合させ安定化させた PC-SOD を開発し、間質性肺炎、及び炎症性腸疾患に対する第二相臨床試験でその有効性を示した。しかし生物製剤である PC-SOD は生産コスト、及び製剤としての安定性に問題があり、低分子の SOD 誘導薬が望まれていた。

長年使われてきた漢方薬は、その安全性・有効性が確認されていることから、医薬品原料として注目されてきた。しかし現在まで、漢方薬由来の物質が新規医薬品として認可されたケースは少ない。我々はその原因として、そのような医薬品開発の多くが、受容体や酵素の阻害など西洋医薬品と同じ機構をターゲットとしており、漢方薬の特徴である緩やかな作用・副作用の少なさとマッチしていないこと、即ち漢方薬は西洋医薬品とは違う独自のターゲット（生体防御タンパク質の効果を高めるなど）を持っていることを考えている（研究計画で述べるように、この考えを支持する成果を最近あげた）。

そこで本研究で我々は、漢方薬（生薬）ライブラリーから HSP 誘導生薬、及び SOD 誘導生薬を検索し、誘導物質の同定、及び動物モデルでの評価を行い、疾患治療薬として開発する化合物を決定する。

ゲノム創薬などにより、21 世紀は新薬の開発ラッシュになると予想されていた。しかし現実には、発売される新薬の数は年々減少しており、製薬企業は医薬品開発戦略の変更を迫られている。この主な原因は臨床試験で発生する副作用であり、作用の強い医薬品より副作用の少ない医薬品を開発すべきであると考えられる。これまでの医薬品は受容体や酵素の阻害・活性化剤が主であり、生体内のバランスを大きく変えることにより副作用を導くと考えられる。そこで我々は、疾患というストレスに対して生体が自らを守るために誘導する生体防御タンパク質を増強させるタイプの医薬品が有用であると考えている。即ち、疾患に対する生体防御タンパク質の誘導が不十分であるために疾患が発症すると考え、医薬品によりその不足分を補うという考えである。生体が本来持っている反応を助けるだけであるので、副作用を起こしにくいと期待される。HSP 誘導薬や PC-SOD が間質性肺炎などの難病に有効であるという臨床結果は、このような医薬品は安全面で優れているだけでなく、従来型の医薬品では効果をあげられなかった疾患にも有効であることを示唆している。

本研究が成功すれば、種々の難病に対する治療薬が生まれるだけでなく、新しい医薬品開発戦略（生体防御タンパク質をターゲットとする医薬品を検索する材料として漢方薬を用いる）を製薬企業へ示すことになり、大きな波及効果が期待できる。

B. 研究方法

最近我々は、共同研究している中国企業（北京泰徳製薬）から得た漢方薬（生薬）ライブラリー（約 600 種）から HSP の誘導生薬をスクリーニングし、テプレノンよりも強力、かつ安全な数多くの HSP 誘導生薬を得た（特許出願済み）。我々はこの中からヤバツイを選択し、その HSP 誘導物質の同定に成功した（特許出願準備中）。この誘導物質

を小腸潰瘍、炎症性腸疾患、アルツハイマー病の動物モデルで評価したところ、テプレノンよりも強力な効果を示した。この結果は、漢方薬（生薬）ライブラリーからスクリーニングした HSP 誘導物質が医薬品として有用であることを示唆している。また最近我々は、HSP が間質性肺炎（有効な治療薬はなく、致死率は 80%を超える）、COPD（世界中で患者数が増大しており、有効な治療薬がない）、及び ALS やハンチントン舞踏症などの神経変性疾患の発症を抑制することを見出した。

そこで本研究で我々は、この漢方薬（生薬）ライブラリーをさらに充実させ、HSP 誘導生薬のスクリーニングを行い、有望な生薬を複数選択する。そして、誘導物質の同定、及び動物モデルでの評価を行い、種々の疾患治療薬として開発する HSP 誘導物質を決定する。

一方最近我々は、PC-SOD が間質性肺炎や炎症性腸疾患だけでなく、活性酸素による組織傷害がその主な原因となっている、腎炎、肝炎、膵炎、喘息、COPD、アトピー性皮膚炎の動物モデルにおいて有効性を示すことを見出した。そこで本研究で我々は、上述のライブラリーから SOD 誘導物質を検索・同定し、種々の疾患治療薬として開発する SOD 誘導物質を決定する。

（１） 漢方薬（生薬）ライブラリーの整備

上述の HSP 誘導生薬（ヤバツイ）は、化粧品として商品化が決定している。この成果を評価した北京泰徳製薬は中国政府から特別の許可を得て、2000 種以上の生薬を供与してくれることになった（最近では生薬を海外に出すことに中国政府は慎重になっており、このようなライブラリーを有する研究機関は国内にほとんどない）。そこでこの生薬の溶解法や投与法を確立し、スクリーニングの準備を行う。

（２） HSP、及び SOD 誘導生薬のスクリーニングと、誘導物質の同定

HSP、あるいは SOD 遺伝子プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したプラスミドを導入した細胞を用いて一次スクリーニングを行い、イムノブロット法で二次スクリーニングを行う。毒性の少ない誘導薬を得たいので、三次スクリーニングではそ

の生薬の細胞毒性を調べ、細胞毒性を示さない濃度で HSP、あるいは SOD を誘導するものを選択する。四次スクリーニングではその生薬をマウスに投与し、目的のタンパク質を誘導するかを検討する。

これらの結果から有望な生薬を選択し、その誘導物質の同定を行う。オープンカラムで粗分けした後、分取用 HPLC で分画し、誘導物質の構造を決定する。合成可能な物は合成し、難しいものは大量の生薬から精製する。

（３） HSP、及び SOD 誘導物質の疾患治療薬としての評価

それぞれの誘導物質の効果をまず試験管内で評価する。HSP 誘導物質に関しては、炎症抑制作用、細胞保護作用、及びタンパク質凝集抑制作用の程度を調べる。また SOD 誘導物質に関しては、活性酸素消去作用を調べる。次にその効果が HSP、あるいは SOD を介しているかを、siRNA を用いて検証する。

最終的には、種々の疾患動物モデルを用いて評価する。治療効果が見られた場合、その効果が HSP、あるいは SOD を介しているかを、そのタンパク質を誘導出来ないマウスを用いて判断する。有用な薬理効果が見られた場合には、他の臓器の状態を精査し副作用が表れていないかを調べる。尚、HSP 誘導物質の場合は GGA と、SOD 誘導物質の場合は PC-SOD と治療効果を比較する。結果を総合的に判断し、それぞれの疾患治療薬として開発する誘導物質を決定する。

C. 研究結果

2010 年度

我々は、自ら発見した HSP 誘導生薬（ヤバツイ）を化粧品として発売した。世界初の HSP 誘導化粧品として評価され、この分野のトップ商品になっている。この成果を評価した北京泰徳製薬は、中国政府から特別の許可を得て、2000 種以上の生薬を我々に提供してくれた。我々はこれら生薬の溶解法や投与法を確立し、2500 種以上の生薬からなる生薬ライブラリーを確立した（最近では生薬を海外に出すことに中国政府は慎重になっており、このようなライブラリーを有する研究機関は国内にほとんどない）。

そしてこのライブラリーを用いて、HSP70、及び SOD 誘導生薬のスクリーニングを行っ

た。その結果、アルニカなど 10 種の HSP70 誘導生薬、及びサルビアなど 13 種の SOD 誘導生薬を発見した。これらの HSP70 誘導生薬は、既存の HSP70 誘導薬（テプレノン）よりも強力な HSP70 誘導能、及び抗潰瘍作用（マウス）を示した。またサルビアは、PC-SOD よりも強力な間質性肺炎、及び炎症性腸疾患抑制効果（マウス）を示した。尚、アルニカは来年度発売する化粧品に配合されることが決定され、我々はアルニカの特許を化粧品会社へライセンスアウトし、現在共同で化粧品開発を行っている。

次に我々は、アルニカから HSP70 誘導物質の単離、同定を試みた。オープンカラムで粗分けした後、分取用 HPLC で分画し、誘導物質の単離・構造決定に成功した。この誘導物質はテプレノンよりも強力な HSP70 誘導能を有しており、現在アルツハイマー病抑制効果などを検討している。

一方サルビア等からの SOD 誘導物質の単離、同定も進めている。サルビアに関しては、比活性を 30 倍以上上げることに成功した。

このように生体防御タンパク質誘導生薬のスクリーニングがうまくいっているので、研究計画を発展的に変更し、HSP47、及びHO-1

（我々の研究から、医薬品や化粧品のターゲット分子として有望であることが示唆されている生体防御タンパク質）の誘導生薬のスクリーニングも開始することにした。

2011年度

我々は、本研究の成果であるアルニカの特許を化粧品会社へライセンスアウトし、10月にアルニカを配合した化粧品（抗シミ化粧品）を発売した。HSP70が紫外線による傷害やシミを抑えると共に、紫外線により傷ついた皮膚を修復するという我々の研究成果（*JBC* 2010（2報）など）が評価され、消費者から高い評価を得ている。

一方、HSP70誘導生薬（ヤバツイ）から新たにHSP70誘導物質、ユーパリノライドA、ユーパリノライドBを同定した。両物質はテプレノンより30倍以上高い HSP70誘導能を示すにも関わらず、全く毒性を示さなかった（*Biochem Pharmacol* 2012）。また両物質は、胃潰瘍、アルツハイマー病、及び紫外線依存皮膚傷害モデルでテプレノンよりも高い有

効性を示した（特許出願済み）。同様の薬理効果はアルニカから単離・同定したHSP70誘導物質・ヘレナリンに関しても見られた。

また我々はサルビアからSOD誘導物質の単離・同定に成功し、この物質が肺線維症モデルや潰瘍性大腸炎モデルでPC-SODよりも高い有効性を示すことを見出した。

さらに我々はHSP47、及びHO-1（我々の研究からそれぞれ、抗シワ化粧品、及び炎症性疾患治療薬のターゲット分子として有望であることが示されている）誘導生薬のスクリーニングを行い、HSP47誘導生薬として、エイメイソウ、ワイルドタイムなど5種類、HO-1誘導生薬として、マンケイシ、カッコウ、マジョラムなど8種類の生薬を同定した。この内、ワイルドタイムには抗シワ効果、マジョラムには潰瘍性大腸炎抑制効果を確認した。2012年度

我々は、HSP70が紫外線によるシワを防ぐこと、及びその分子機構を解明し、*J. Invest. Dermatol.*（皮膚科学の分野で最も評価の高い学術誌）に掲載した。これによりHSPを増やす生薬や天然物への注目が高まり、本研究の成果であるアルニカやヤバツイの様々な商品への応用が開始されている。

一方、HSP70誘導生薬（ヤバツイ）から新たに同定した、HSP70誘導物質、ユーパリノライドA、ユーパリノライドBに関しては、その成果を*Biochem. Pharmacol.*で発表するとともに、そのHSP誘導機構を解明した。

またサルビアから単離したSOD誘導物質に関しては、COPDや慢性腎不全のモデルでも高い有効性を示すことを見いだした。また、HSP47誘導生薬として単離したワイルドタイムに関しては、その外用剤を開発し、抗シワ効果を確認した。一方、HO-1誘導生薬として単離した、マジョラムに関しては、肺線維症、小腸潰瘍、喘息に関する有用性を示した。さらに、ワイルドタイムからHSP47誘導物質三種、マジョラムからHO-1誘導物質二種の同定に成功した。

D.考察

結果の欄に記載した

E.結論

我々の研究により、数多くの有望な生薬

が発見された。一方我々は、HSP がシミやシワに有効であることを遺伝子改変マウスを用いた研究などにより明らかにした。これにより、HSP 誘導生薬の化粧品としての応用へ道を開き、実際本研究期間中に七種もの化粧品が発売された。今後は、HO-1 や SOD の有用性を証明し、その誘導生薬の商品化につなげる。

一方本研究で我々は、上述の HSP70、HSP47、HO-1、SOD に関する誘導生薬から誘導物質の単離に成功し、その一部のものに関しては、肺線維症、小腸潰瘍、喘息、COPD、アルツハイマー病、紫外線皮膚傷害に有効であることを示した。今後はこれらの誘導物質の医薬品としての開発を進めていく。

F.健康危険情報

該当なし

G.研究発表

1. 論文発表

1. Yamakawa, N., Suemasu, S., Kimoto, A., Arai, Y., Ishihara, T., Yokomizo, K., Okamoto, Y., Ohtsuka, M., Tanaka, K. and Mizushima, T. Low direct cytotoxicity of loxoprofen on gastric mucosal cells. *Biol. Pharm. Bull.* 33, 398-403. (2010)
2. Matsuda, M., Hoshino, T., Yamashita, Y., Tanaka, K., Maji, D., Sato, K., Adachi, H., Sobue, G., Ihn, H., Funasaka, Y. and Mizushima, T. Prevention of ultraviolet B radiation-induced epidermal damage by expression of heat shock protein 70. *J. Biol. Chem.* 285, 5848-5858. (2010)
3. Tanaka, K., Ishihara, T., Azuma, A., Kudoh, S., Ebina, M., Nukiwa, T., Sugiyama, Y., Tasaka, Y., Namba, T., Ishihara, T., Sato, K., Mizushima, Y. and Mizushima, T. Therapeutic effect of

lecithinized superoxide dismutase (PC-SOD) on bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 298, L348-L360. (2010)

4. Ishihara, T., Tanaka, K., Tashiro, S., Yoshida, K. and Mizushima, T. Protective effect of rebamipide against celecoxib-induced gastric mucosal cell apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 79, 1622-1633. (2010)
5. Hoshino, T., Matsuda, M., Yamashita, Y., Takehara, M., Fukuya, M., Minoda, K., Maji, D., Ihn, H., Adachi, H., Sobue, G., Funasaka, Y. and Mizushima, T. Suppression of melanin production by expression of HSP70. *J. Biol. Chem.* 285, 13254-13263. (2010)
6. Namba, T., Tanaka, K., Ito, Y., Hoshino, T., Matoyama, M., Yamakawa, N., Isohama, Y., Azuma, A. and Mizushima, T. Induction of EMT-like phenotypes by an active metabolite of leflunomide and its contribution to pulmonary fibrosis. *Cell Death Differ.* 17, 1882-1895. (2010)
7. Tanaka, K., Tanaka, Y., Namba, T., Azuma, A. and Mizushima, T. Heat shock protein 70 protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Biochem. Pharmacol.* 80, 920-931. (2010)
8. Namba, T., Hoshino, T., Suemasu, S., Takarada-Iemata, M., Hori, O., Nakagata, N., Yanaka, A. and Mizushima, T. Suppression of expression of endoplasmic reticulum chaperones by *Helicobacter pylori* and its role in exacerbation of NSAID-induced gastric lesions. *J. Biol. Chem.* 285, 37302-37313. (2010)
9. Yamakawa, N., Suemasu, S., Matoyama, M., Tanaka, K., Katsu, T., Okamoto, Y., Ohtsuka, M. and Mizushima, T. Synthesis and biological evaluation of loxoprofen derivatives. *Bioorg. & Medic. Chem.* 19, 3299-3311. (2011)

10. Tanaka, K., Tanaka, Y., Suzuki, T. and Mizushima, T. Protective Effect of β -(1,3-1,6)-D-glucan against irritant-induced gastric lesions. *Br. J. Nutr.* 106, 475-485. (2011)
11. Hoshino, T., Murao, N., Namba, T., Takehara, M., Adachi, H., Katsuno, M., Sobue, G., Matsushima, T., Suzuki, T. and Mizushima, T. Suppression of Alzheimer's disease-related phenotypes by expression of heat shock protein 70 in mice. *J. Neurosci.* 31, 5225-5234. (2011)
12. Takehara, M., Hoshino, T., Namba, T., Yamakawa, N. and Mizushima, T. Acetaminophen-induced differentiation of human breast cancer stem cells and inhibition of tumor xenograft growth in mice *Biochem. Pharmacol.* 81, 1124-1135. (2011)
13. Mizushima, T. Drug discovery and development focusing on existing medicines: Drug re-profiling strategy *J. Biochem.* 49, 499-505. (2011)
14. Tanaka, K., Tanaka, Y., Miyazaki, Y., Namba, T., Sato, K., Aoshiba, K., Azuma, A. and Mizushima, T. Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase on pulmonary emphysema. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 338, 810-818. (2011)
15. Ishihara, T., Suemasu, S., Asano, T., Tanaka, K. and Mizushima, T. Stimulation of gastric ulcer healing by heat shock protein 70. *Biochem. Pharmacol.* 82, 728-736. (2011)
16. Namba, T., Tanaka, K., Hoshino, T., Azuma, A. and Mizushima, T. Suppression of expression of heat shock protein 70 by gefitinib and its contribution to pulmonary fibrosis. *PLoS ONE* 6, e27296. (2011)
17. Hoshino, T., Namba, T., Takehara, M., Murao, N., Sugimoto, Y., Narumiya, S., Matsushima, T., Suzuki, T. and Mizushima, T. Improvement of cognitive function in Alzheimer's disease model mice by genetic and pharmacological inhibition of the EP₄ receptor. *J. Neurochem.* 120, 795-805. (2012)
13. Yamashita, Y., Ikeda, T., Matsuda, M., Maji, D., Hoshino, T. and Mizushima, T. purification and characterization of hsp-inducers from *eupatorium lindleyanum* *Biochem. Pharmacol.* 82, 909-922. (2012)
14. Asano, T., Tanaka, K., Suemasu, S., Ishihara, T., Tahara, K., Suzuki, T., Suzuki, H., Fukudo, S. and Mizushima, T. Effects of β -(1,3-1,6)-D-glucan on irritable bowel syndrome-related colonic hypersensitivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 420, 444-449. (2012)
15. Tanaka, K., Sato, K., Aoshiba, K., Azuma, A. and Mizushima, T. Superiority of PC-SOD to other anti-COPD drugs for elastase-induced emphysema and alteration in lung mechanics and respiratory function in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 302, L1250-L1261. (2012)
16. Yamakawa, N., Suemasu, S., Okamoto, Y., Tanaka, K., Ishihara, T., Asano, T., Miyata, k., Ohtsuka, M. and Mizushima, T. Synthesis and biological evaluation of derivatives of 2-{2-fluoro-4-[(2-oxocyclopentyl)methyl]phenyl}propanoic acid: Non-steroidal anti-inflammatory drugs with low gastric ulcerogenic activity. *J. Med. Chem.* 55, 5143-5150. (2012)
17. Mizushima, T. Development of NSAIDs with lower gastric side effect. *Frontier of Gastrointestinal Research* 30, 71-78. (2012)
18. Tanaka, K., Azuma, A., Miyazaki, Y., Sato, K. and Mizushima, T. Effects of lecithinized superoxide dismutase and/or pirfenidone against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *CHEST* 142, 1011-1019. (2012)
18. Tanaka, K., Shirai, A., Ito, Y., Namba, T., Tahara, K., Yamakawa, N. and Mizushima, T. Expression of 150-kDa

- oxygen-regulated protein (ORP150) stimulates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and dysfunction in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425, 818-824. (2012)
19. Suemasu, S., Yamakawa, N., Ishihara, T., Asano, T. Tahara, K., Tanaka, K. Matsui, M., Okamoto, Y., Otsuka, M., Takeuchi, K., Suzuki, S. and Mizushima, T. Identification of a unique NSAID, fluoro-loxoprofen with gastroprotective activity. *Biochem. Pharmacol.* 84, 1470-1481. (2012)
20. Matsuda, M., Hoshino, T., Yamakawa, N., Tahara, K., Adachi, H., Sobue, G., Maji, D., Ihn, H. and Mizushima, T. Suppression of UV-induced wrinkle formation by induction of HSP70 expression in mice. *J. Invest. Dermatol.* 133, 919-928. (2012)
2. 学会発表 (招待講演のみ)
- 1 Tohru Mizushima Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase (PC-SOD) on idiopathic pulmonary fibrosis in humans and bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. 2nd International Conference on Drug Discovery and Therapy (2010) (Dubai)
- 2 水島徹 我が国の医薬品開発発展のための提言 第三回熊本創薬シンポジウムでの招待講演 (2010) (熊本)
- 3 水島徹 薬剤性間質性肺炎における EMT の関与 国立医薬品食品衛生研究所での招待講演 (2010) (熊本)
- 4 水島徹 ドラッグリプロファイリング 日本薬学会での招待講演 (2010) (熊本)
- 5 水島徹 徐放性 PGE1 製剤の開発 アステラス製薬 (株) 研究所での招待講演 (2010) (静岡)
- 6 水島徹 徐放性 PGE1 製剤の開発 武田薬品工業 (株) 研究所での招待講演 (2010) (大阪)
- 7 水島徹 創薬研究者養成プログラム 熊本大学 GP フォーラムでの招待講演 (2010) (熊本)
- 8 水島徹 薬剤性肺傷害における、EMT の役割 肺サーファクタント分子病態研究会 (2010) (札幌)
- 9 水島徹 HSP70 によるメラニン産生抑制、及び紫外線に対する保護 日本化粧品学会 (2010) (東京)
- 10 Tohru Mizushima Protective role for HSP70 against various diseases. 8th international workshop on the molecular biology of stress response (2010) (Seorak)
- 11 Tohru Mizushima Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase (PC-SOD) on idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) in humans and bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. American Thoracic Society International Conference (2010) (New Orleans)
- 12 水島徹 紫外線に対する熱ショックタンパク質の効果と化粧品への応用 明日の化粧品科学を創造する FJ セミナー (2010) (東京)
- 13 水島徹 NSAID 潰瘍発症機構の解明と、胃潰瘍副作用の少ない NSAID の開発 整形外科痛みを語る会 (2010) (淡路島)
- 14 水島徹 レバミピドによるアポトーシス抑制機構 ムコスタ小腸研究会 (2010) (大阪)
- 15 水島徹 温故知新創薬研究への挑戦 関水教授還暦記念シンポジウム (2010) (東京)
- 16 水島徹 熱ショックタンパク質の多彩な薬理作用とその応用 消化器病態生理勉強会 (2010) (東京)
- 17 水島徹 熱ショックタンパク質の多彩な薬理作用とその応用 日本蘇生学会での招待講演 (2010) (宇都宮)
- 18 水島徹 薬剤性肺傷害における、EMT の役割 日本分子生物学会・生

- 化学会合同大会でのシンポジウム
(2010) (神戸)
- 19 水島徹 既存薬の新しい薬効の発見とその医薬品開発への展開 熊本県薬剤師会学術研修会特別講演 (2010) (熊本)
- 20 水島徹 熱ショックタンパク質の多彩な薬理作用とその応用 臨床ストレス応答学会大会招待講演 (2010) (熊本)
- 21 水島徹 ドラッグリプロファイリング研究など、現在行っている医薬品開発の紹介と、共同研究開発、連携の提案 富士フィルム(株)での招待講演 (2010) (小田原)
- 22 水島徹 セレコキシブ依存の胃潰瘍に対するレバミピドの効果 日本潰瘍学会シンポジウム招待講演 (2010) (大阪)
- 23 水島徹 胃潰瘍副作用の少ない NSAID の開発 生理研研究会『極性細胞の病態生理解明に向けた多角的アプローチ』招待講演 (2010) (岡崎)
- 24 水島徹 セレコキシブ依存の胃潰瘍に対するレバミピドの効果 日本潰瘍学会シンポジウム招待講演 (2010) (大阪)
- 25 水島徹 特発性肺線維症、潰瘍性大腸炎治療薬としての、レシチン化 SOD の開発 国際フリーラジカル会議招待講演 (2010) (京都)
- 26 水島徹 β グルカンの新機能-HSP 誘導機能と機能性食品、化粧品、医薬品への応用 食品開発展での招待講演 (2010) (東京)
- 27 水島徹 アルツハイマー病と慢性炎症 東京大学医学部での招待講演 (2010) (東京)
- 28 水島徹 既存薬の新しい薬理作用の発見と、適応拡大への応用 鹿児島県薬剤師会特別講演 (2011) (鹿児島)
- 29 水島徹 皮膚における熱ショック蛋白質の役割とその応用 第3回熊本乾癬病診連携フォーラム (2011) (熊本)
- 30 水島徹 トランスクリプトソーム解析による医薬品の副作用機構の解明と、その副作用感受性診断、及び創薬への応用 創薬バイオマーカー探索研究事業研究発表会での招待講演 (2011) (東京)
- 31 水島徹 既存薬の作用分子機構の解明と創薬への展開 日本薬学会での受賞講演 (2011) (東京)
- 32 水島徹 既存薬の作用分子機構の解明と創薬への展開 厚生労働省班会議での招待講演 (2011) (東京)
- 33 Tohru Mizushima Molecular mechanism for NSAID-induced gastric lesions. EULAR panel discussion "Loxoprofen for treatment of Osteoarthritis. (2011) (London)
- 34 水島徹 NSAIDs 潰瘍発症機構の解明 日本炎症・再生医学会での招待講演 (2011) (東京)
- 35 水島徹 ドラッグリプロファイリング研究 慶應義塾大学薬学部での招待講演 (2011) (東京)
- 36 水島徹 ドラッグリプロファイリング研究 金沢大学薬学部での招待講演 (2011) (金沢)
- 37 水島徹 ドラッグリプロファイリング研究 杏林大学医学部での招待講演 (2011) (東京)
- 38 水島徹 ドラッグリプロファイリング研究 慶應義塾大学医学部での招待講演 (2011) (東京)
- 39 水島徹 NSAIDs 潰瘍の発症機構 日本リウマチ学会での招待講演 (2011) (東京)
- 40 水島徹 セルベックスの新しい可能性を求めて 消化器病態生理勉強会での招待講演 (2011) (東京)
- 41 Tohru Mizushima PC-SOD, as a drug for IPF. Invited lecture in Asan Medical Center (2011) (Seoul)
- 42 Tohru Mizushima Protective role for HSP70 against various gastrointestinal diseases and other diseases. Invited lecture in University of Chicago (2011)

- (Chicago)
- 43 Tohru Mizushima PC-SOD, as a drug for IPF. Invited lecture in CKD Pharmaceuticals (2011) (Seoul)
- 44 水島徹 NSAID 潰瘍の発症機構、HSP 誘導薬の効果、副作用の少ない NSAID の開発 生体機能と創薬シンポジウムでの招待講演 (2011) (東京)
- 45 水島徹 毒性のない HSP 誘導薬の化粧品、医薬品としての開発 JST イノベーションプラザ福岡「研究成果報告会」での招待講演 (2011) (福岡)
- 46 水島徹 毒性のない HSP 誘導薬の化粧品、医薬品としての開発 JST イノベーションプラザ福岡「研究成果報告会」での招待講演 (2011) (福岡)
- 47 水島徹 テプレノンによる HSP 誘導とドラッグリプロファイリング研究 日本ハイパーサーミア学会での招待講演 (2011) (名古屋)
- 48 水島徹 セレコキシブ依存の胃潰瘍に対するレバミピドの効果 南九州消化器疾患セミナーの招待講演 (2011) (熊本)
- 49 水島徹 イレッサの肺線維症副作用における HSP70 の役割 HSP/GGA 勉強会の招待講演 (2011) (東京)
- 50 Tohru Mizushima Development of new type of NSAID with lower gastric side effects. Invited lecture in Cytoprotection/Organoprotection: Focus on GI Tract (2011) (St. Petersburg)
- 51 ドラッグリプロファイリング研究の現状と展望 日本潰瘍学会ワークショップでの招待講演 (2011) (つくば)
- 52 ストレス耐性の分子基盤とその創薬応用 日本ストレス学会シンポジウムでの招待講演 (2011) (東京)
- 53 Tohru Mizushima Protective role for HSP70 against various gastrointestinal diseases and other diseases. Invited lecture in Yamaguchi International Symposium on Stress (2011) (Ube)
- 54 DR 研究 (Drug Re-profiling Research) の期待と課題-副作用の少ない NSAIDs の開発やレシチン化 SOD の臨床効果- 丸石製薬 (株) 研究所での招待講演 (2011) (大阪)
- 55 水島徹 NSAID 潰瘍の発症機構とレバミピドの効果 ムコスタ研究会での招待講演 (2011) (大阪)
- 56 水島徹 NSAID 潰瘍の発症機構とレバミピドの効果 三重大学医学部での招待講演 (2011) (大阪)
- 57 水島徹 薬剤性肺線維症の発症機構の解明とその治療法の確立 中外製薬 (株) での社内講演会 (2011) (東京)
- 58 水島徹 既存薬を利用したアルツハイマー病治療薬の開発 日本薬学会シンポジウム招待講演 (2012) (札幌)
- 59 水島徹 NSAID 潰瘍発症機構とその対策 日本消化器病学会招待講演 (2012) (東京)
- 60 Tohru Mizushima PC-SOD, as a drug for IPF. Invited lecture in Asan Medical Center (2012) (Seoul)
- 61 水島徹 ドラッグリプロファイリング研究 武田薬品工業 (株) での招待講演 (2012) (藤沢)
- 62 Tohru Mizushima Protective and therapeutic effects of lecithinized superoxide dismutase (PC-SOD) against pulmonary emphysema. American Thoracic Society International Conference (2012) (San Francisco)
- 63 水島徹 ドラッグリプロファイリング研究 南風病院での招待講演 (2012) (鹿児島)
- 64 Tohru Mizushima Development of new type of NSAID with lower gastric side effects. Invited lecture in CJ Pharma (2012) (Tokyo)
- 65 水島徹 ドラッグリプロファイリ

- ング研究 わかもと製薬 (株) 研究所での招待講演 (2012) (大井町)
- 66 水島徹 ドラッグリポジショニングによる創薬アプローチの現状と今後の展望 味の素製薬 (株) 研究所での招待講演 (2012) (川崎)
- 67 水島徹 消化器治療薬をベースにした新薬開発-その現状と可能性- 日本消化器病学会四国支部会 (2012) (徳島)
- 68 Tohru Mizushima Identification of a unique NSAID, fluoro-loxoprofen with gastroprotective activity. Invited lecture in International Union of Basic and Clinical Pharmacology, GI Satellite Meeting. (2012) (Tokyo)
- 69 水島徹 PC-SOD 吸入製剤の開発 日本 DDS 学会シンポジウム (2012) (札幌)
- 70 水島徹 セルベックスの新しい可能性を求めて 消化器病態生理勉強会での招待講演 (2012) (東京)
- 71 水島徹 ドラッグリプロファイリング研究 医学部薬学部合同サマースクールでの招待講演 (2012) (東京)
- 72 水島徹 ドラッグリプロファイリング研究 バイオメディカル分析科学シンポジウムでの招待講演 (2012) (東京)
- 73 水島徹 ブレオマイシン依存の肺線維化、呼吸機能障害に対する PC-SOD、及びピルフェニドンの効果 第15回間質性肺炎細胞分子病態研究会での招待講演 (2012) (東京)
- 74 Tohru Mizushima Protective role for HSP70 against various gastrointestinal diseases and other diseases. Invited lecture in 11th International Congress of Hyperthermic Therapy (2012) (Kyoto)
- 75 Tohru Mizushima Development of new type of NSAID with lower gastric side effects. Invited lecture in 7th International symposium on cell/tissue injury and
Cytoprotection/Organoprotection: Focus on GI Tract (2012) (Honolulu)
- 76 水島徹 ドラッグリポジショニング (DR) の現状と今後の展望 日本バイオインダストリー協会での招待講演 (2012) (東京)
- 77 水島徹 ドラッグリポジショニング (DR) の現状と今後の展望 医薬基盤研究所での招待講演 (2012) (大阪)
- 78 水島徹 ドラッグリポジショニング (DR) 研究 (既存薬を利用した新薬開発) 慶応義塾大学研究推進本部主催シンポジウムでの招待講演 (2012) (東京)
- 79 水島徹 種々の疾患における熱ショックタンパク質 (HSP) の効果と、HSP 誘導薬による治療 第6回 S-Target 学術講演会での招待講演 (2012) (大阪)
- 80 水島徹 2010 年問題 (新薬が産まれない) の解決策 熊本発の創薬研究での招待講演 (2012) (東京)
- 81 水島徹 ドラッグリポジショニング (DR) 慶応義塾大学医学部呼吸器内科での招待講演 (2012) (東京)
- 82 水島徹 薬剤性肺線維症発症機構の解明とその治療法の確立 臨床ストレス応答学会大会招待講演 (2012) (東京)
- 83 水島徹 ドラッグリポジショニング (DR) の現状と今後の展望 第一三共 (株) 研究所での招待講演 (2012) (東京)
- 84 水島徹 ヒートショックプロテインのシワ抑制効果 明日の化粧品科学を創造する FJ セミナー (2012) (東京)
- 85 水島徹 レシチン化 SOD の開発 東京大学大学院新領域研究科での招待講演 (2013) (柏)
- 86 水島徹 ドラッグリポジショニングとは何か、新薬開発にどのような道が開けるのか レギュラトリーサイエンス エキスパート研修会での招待講演 (2013) (東京)

- 87 水島徹 ドラッグリポジショニング-既存薬を利用した新薬開発-第55回鹿児島消化器病研究会での特別講演 (2013) (鹿児島)
- 88 水島徹 PC-SOD 吸入製剤の開発 日本薬学会シンポジウムでの招待講演 (2013) (横浜)
- 89 水島徹 ストレスから体を守るタンパク質・HSPの働きと、その医薬品・化粧品への応用 榊原記念病院定例講演会での特別講演 (2013) (東京)

H.知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

該当なし

2.実用新案登録

該当なし

3.その他

該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamakawa, N., Suemasu, S., Kimoto, A., Arai, Y., Ishihara, T., Yokomizo, K., Okamoto, Y., Ohtsuka, M., Tanaka, K. and <u>Mizushima, T.</u>	Low direct cytotoxicity of loxoprofen on gastric mucosal cells.	<i>Biol. Pharm. Bull.</i>	33	398-403	2010
Matsuda, M., Hoshino, T., Yamashita, Y., Tanaka, K., Maji, D., Sato, K., Adachi, H., Sobue, G., Ihn, H., Funasaka, Y. and <u>Mizushima, T.</u>	Prevention of ultraviolet B radiation-induced epidermal damage by expression of heat shock protein 70.	<i>J. Biol. Chem.</i>	285	5848-5858	2010
Tanaka, K., Ishihara, T., Azuma, A., Kudoh, S., Ebina, M., Nukiwa, T., Sugiyama, Y., Tasaka, Y., Namba, T., Ishihara, T., Sato, K., Mizushima, Y. and <u>Mizushima, T.</u>	Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase (PC-SOD) on bleomycin-induced pulmonary fibrosis.	<i>Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.</i>	298	L348-L360.	2010
Ishihara, T., Tanaka, K., Tashiro, S., Yoshida, K. and <u>Mizushima, T.</u>	Protective effect of rebamipide against celecoxib-induced gastric mucosal cell apoptosis.	<i>Biochem. Pharmacol.</i>	79	1622-1633	2010
Hoshino, T., Matsuda, M., Yamashita, Y., Takehara, M., Fukuya, M., Mineda, K., Maji, D., Ihn, H., Adachi, H., Sobue, G., Funasaka, Y. and <u>Mizushima, T.</u>	Suppression of melanin production by expression of HSP70.	<i>J. Biol. Chem.</i>	285	13254-13263	2010
Namba, T., Tanaka, K., Ito, Y., Hoshino, T., Matoyama, M., Yamakawa, N., Isohama, Y., Azuma, A. and <u>Mizushima, T.</u>	Induction of EMT-like phenotypes by an active metabolite of leflunomide and its contribution to pulmonary fibrosis.	<i>Cell Death Differ.</i>	17	1882-1895	2010
Tanaka, K., Tanaka, Y., Namba, T., Azuma, A. and <u>Mizushima, T.</u>	Heat shock protein 70 protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice.	<i>Biochem. Pharmacol.</i>	80	920-931	2010
Namba, T., Hoshino, T., Suemasu, S., Takarada-Iemata, M., Hori, O., Nakagata, N., Yanaka, A. and <u>Mizushima, T.</u>	Suppression of expression of endoplasmic reticulum chaperones by <i>Helicobacter pylori</i> and its role in exacerbation of NSAID-induced gastric lesions.	<i>J. Biol. Chem.</i>	285	37302-37313	2010

Yamakawa, N., Suemasu, S., Matoyama, M., Tanaka, K., Katsu, T., Okamoto, Y., Ohtsuka, M. and <u>Mizushima, T.</u>	Synthesis and biological evaluation of loxoprofen derivatives.	Bioorg. & Medic. Chem.	19	3299-3311.	2011
Tanaka, K., Tanaka, Y., Suzuki, T. and <u>Mizushima, T.</u>	Protective Effect of <i>b</i> -(1,3-1,6)-D-glucan against irritant-induced gastric lesions.	Br. J. Nutr.	106	475-485.	2011
Hoshino, T., Murao, N., Namba, T., Takehara, M., Adachi, H., Katsuno, M., Sobue, G., Matsushima, T., Suzuki, T. and <u>Mizushima, T.</u>	Suppression of Alzheimer's disease-related phenotypes by expression of heat shock protein 70 in mice.	J. Neurosci.	31	5225-5234.	2011
Takehara, M., Hoshino, T., Namba, T., Yamakawa, N. and <u>Mizushima, T.</u>	Acetaminophen-induced differentiation of human breast cancer stem cells and inhibition of tumor xenograft growth in mice	Biochem. Pharmacol.	81	1124-1135.	2011
<u>Mizushima, T.</u>	Drug discovery and development focusing on existing medicines: Drug re-profiling strategy.	J. Biochem.	49	499-505.	2011
Tanaka, K., Tanaka, Y., Miyazaki, Y., Namba, T., Sato, K., Aoshiba, K., Azuma, A. and <u>Mizushima, T.</u>	Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase on pulmonary emphysema.	J. Pharmacol. Exp. Ther.	338	810-818.	2011
Ishihara, T., Suemasu, S., Asano, T., Tanaka, K. and <u>Mizushima, T.</u>	Stimulation of gastric ulcer healing by heat shock protein 70.	Biochem. Pharmacol	82	728-736.	2011
Namba, T., Tanaka, K., Hoshino, T., Azuma, A. and <u>Mizushima, T.</u>	Suppression of expression of heat shock protein 70 by gefitinib and its contribution to pulmonary fibrosis.	PLoS ONE.	6	e27296	2011
Hoshino, T., Namba, T., Takehara, M., Murao, N., Sugimoto, Y., Narumiya, S., Matsushima, T., Suzuki, T. and <u>Mizushima, T.</u>	Improvement of cognitive function in Alzheimer's disease model mice by genetic and pharmacological inhibition of the EP ₄ receptor.	J. Neurochem.	120	795-805.	2012
Yamashita, Y., Ikeda, T., Matsuda, M., Maji, D., Hoshino, T. and <u>Mizushima, T.</u>	Purification and characterization of hsp-inducers from <i>eupatorium lindleyanum</i> .	Biochem. Pharmacol..	82	909-922.	2012

Asano, T., Tanaka, K., Suemasu, S., Ishihara, T., Tahara, K., Suzuki, T., Suzuki, H., Fukudo, S. and <u>Mizushima, T.</u>	Effects of <i>b</i> -(1,3-1,6)-D-glucan on irritable bowel syndrome-related colonic hypertensivity.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	420	444-449	2012
Tanaka, K., Sato, K., Aoshiba, K., Azuma, A. and <u>Mizushima, T.</u>	Superiority of PC-SOD to other anti-COPD drugs for elastase-induced emphysema and alteration in lung mechanics and respiratory function in mice	Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.	302	L1250-L1261	2012
Yamakawa, N., Suemasu, S., Okamoto, Y., Tanaka, K., Ishihara, T., Asano, T., Miyata, k., Ohtsuka, M. and <u>Mizushima, T.</u>	Synthesis and biological evaluation of derivatives of 2-{2-fluoro-4-[(2-oxocyclopentyl)methyl]phenyl}propionic acid: Non-steroidal anti-inflammatory drugs with low gastric ulcerogenic activity.	J. Med. Chem.	55	5143-5150	2012
<u>Mizushima, T.</u>	Development of NSAIDs with lower gastric side effect.	Frontier of Gastrointestinal Research	30	71-78	2012
Tanaka, K., Azuma, A., Miyazaki, Y., Sato, K. and <u>Mizushima, T.</u>	Effects of lecithinized superoxide dismutase and/or pirfenidone against bleomycin-induced pulmonary fibrosis.	CHEST	142	1011-1019	2012
Tanaka, K. Shirai, A., Ito, Y., Namba, T., Tahara, K., Yamakawa, N. and <u>Mizushima, T.</u>	Expression of 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) stimulates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and dysfunction in mice.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	425	818-824	2012
Suemasu, S., Yamakawa, N., Ishihara, T., Asano, T., Tahara, K., Tanaka, K., Matsui, M., Okamoto, Y., Otsuka, M., Takeuchi, K., Suzuki, S. and <u>Mizushima, T.</u>	Identification of a unique NSAID, fluoro-loxoprofen with gastroprotective activity.	Biochem. Pharmacol.	84	1470-1481	2012
Matsuda, M., Hoshino, T., Yamakawa, N., Tahara, K., Adachi, H., Sobue, G., Maji, D., Ihn, H. and <u>Mizushima, T.</u>	Suppression of UV-induced wrinkle formation by induction of HSP70 expression in mice.	. J. Invest. Dermatol. 133, 919-928.	133	919-928	2012

Low Direct Cytotoxicity of Loxoprofen on Gastric Mucosal Cells

Naoki YAMAKAWA, Shintaro SUEMASU, Ayumi KIMOTO, Yasuhiro ARAI, Tomoaki ISHIHARA, Kazumi YOKOMIZO, Yoshinari OKAMOTO, Masami OTSUKA, Ken-ichiro TANAKA, and Tohru MIZUSHIMA*

Graduate School of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University; Kumamoto 862-0973, Japan.

Received October 22, 2009; accepted December 1, 2009

Pro-drugs of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), such as loxoprofen are widely used for clinical purposes because they are not so harmful to the gastrointestinal mucosa. We recently showed that NSAIDs such as indomethacin and celecoxib have direct cytotoxicity (ability to induce necrosis and apoptosis in gastric mucosal cells) due to their membrane permeabilizing activities, which is involved in NSAID-induced gastric lesions. We show here that under conditions where indomethacin and celecoxib clearly induce necrosis and apoptosis, loxoprofen and its active metabolite loxoprofen-OH, do not have such effects in primary culture of guinea pig gastric mucosal cells. Loxoprofen and loxoprofen-OH induced apoptosis more effectively in cultured human gastric cancer cells than in the primary culture. Loxoprofen and loxoprofen-OH exhibited much lower membrane permeabilizing activities than did indomethacin and celecoxib. We thus consider that the low direct cytotoxicity of loxoprofen observed *in vitro* is involved in its relative safety on production of gastric lesions in clinical situation.

Key words loxoprofen; gastric mucosal cell; membrane permeabilization; gastric lesion

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), such as indomethacin, are a useful family of therapeutics.¹⁾ An inhibitory effect of NSAIDs on cyclooxygenase (COX) activity is responsible for their anti-inflammatory actions because COX is an enzyme essential for the synthesis of prostaglandins (PGs), such as PGE₂, which have a strong capacity to induce inflammation. On the other hand, NSAID use is associated with gastrointestinal complications.^{2–4)}

In 1991, two subtypes of COX, COX-1 and COX-2, which are responsible for the majority of COX activity at the gastrointestinal mucosa and in tissues with inflammation, respectively, were identified.^{5,6)} Since PGE₂ has a strong protective effect on the gastrointestinal mucosa, it is reasonable to speculate that selective COX-2 inhibitors maintain anti-inflammatory activity without gastrointestinal side-effects. In fact, a greatly reduced incidence of gastroduodenal lesions has been reported for selective COX-2 inhibitors (such as celecoxib and rofecoxib).^{7–9)} However, a recently raised issue concerning the use of selective COX-2 inhibitors is their potential risk for cardiovascular thrombotic events.^{10,11)} This may be due to the fact that prostacyclin, a potent anti-aggregator of platelets and a vasodilator, is mainly produced by COX-2 in vascular endothelial cells, while thromboxane A₂, a potent aggregator of platelets and a vasoconstrictor, is mainly produced by COX-1 in platelets.^{12–14)} Because of this concern, rofecoxib was withdrawn from the worldwide market. Therefore, NSAIDs exhibiting gastrointestinal safety, other than selective COX-2 inhibitors, are clinically important.

The inhibition of COX by NSAIDs is not the sole explanation for the gastrointestinal side-effects of NSAIDs.¹⁵⁾ We have recently demonstrated that NSAIDs induce necrosis and apoptosis in cultured gastric mucosal cells and at gastric mucosa in a manner independent of COX inhibition.^{16–20)} We clearly showed that the primary target of NSAIDs for induction of necrosis and apoptosis is cytoplasmic membranes.^{16,18)} As for the molecular mechanism governing this apoptosis, we have proposed the following pathway. Perme-

abilization of cytoplasmic membranes by NSAIDs stimulates Ca²⁺ influx and increases intracellular Ca²⁺ levels, which in turn induces the endoplasmic reticulum (ER) stress response.^{16,21,22)} In this response, an apoptosis-inducing transcription factor, CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) homologous transcription factor (CHOP), is induced and CHOP induces expression of p53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and resulting translocation and activation of Bax, mitochondrial dysfunction, activation of caspases and apoptosis.^{17,23)} Furthermore, we have suggested that both COX inhibition and gastric mucosal cell death are required for the formation of NSAID-induced gastric lesions *in vivo*.^{20,24)}

Loxoprofen has been used clinically for a long time as a standard NSAID in Japan, and clinical studies have suggested that it is safer than other NSAIDs, such as indomethacin.^{25,26)} Loxoprofen is a pro-drug, which is converted (by reduction of the cyclopentanone moiety) to its active metabolite (the *trans*-alcohol metabolite of loxoprofen, loxoprofen-OH) by aromatic aldehyde-ketone reductase only after absorption by the gastrointestinal tract.²⁷⁾ However, the direct cytotoxicity and membrane permeabilization activity of loxoprofen has not been tested. In this study, we found that loxoprofen and loxoprofen-OH have relatively lower membrane permeabilization activities and cytotoxic effects on gastric mucosal cells than other NSAIDs. Based on these observations, we consider that the low direct cytotoxicity of loxoprofen will render its use clinical safe on the gastrointestinal mucosa.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Media RPMI 1640 was obtained from Nissui Pharmaceutical Co. Fetal bovine serum (FBS) and 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) were from Sigma Co. Loxoprofen and loxoprofen-OH were kindly gifted from Daiichi-Sankyo Co. Indomethacin was from Wako Co. Celecoxib was from LKT Laboratories Inc.

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: mizu@gpo.kumamoto-u.ac.jp

Egg phosphatidylcholine (PC) was from Kanto Chemicals Co. Male guinea pigs weighing 200–300 g were purchased from Kyudo Co. The experiments and procedures described here were carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as adopted and promulgated by the National Institute of Health and were approved by the Animal Care Committee of Kumamoto University.

In Vitro Assay of Cytotoxicity of NSAIDs and COX-Inhibition Gastric mucosal cells were isolated from guinea pig fundic glands as described previously.^{28,29} Isolated gastric mucosal cells were cultured for 12 h in RPMI 1640 containing 0.3% v/v FBS, 100 U/ml ampicillin and 100 µg/ml streptomycin in type-I collagen-coated plastic culture plates under the conditions of 5% CO₂/95% air and 37 °C. After removing non-adherent cells, cells attached to the plate were used. Guinea pig gastric mucosal cells prepared under these conditions were previously characterized, with the majority (about 90%) of cells being identified as pit cells.^{28,30} Human gastric adenocarcinoma (AGS) cells were cultured on plastic culture plates without collagen-coating under the same conditions.

NSAIDs were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). Cells were exposed to NSAIDs by changing the entire bathing medium.

We used MTT assay for monitoring cell viability. Cells were incubated for 2 h with MTT solution at a final concentration of 0.5 mg/ml. Isopropanol and hydrochloric acid were added to the culture medium at final concentrations of 50% and 20 mM, respectively. The optical density of each sample at 570 nm was determined spectrophotometrically using a reference wavelength of 630 nm.³¹

The amount of PGE₂ in the medium was determined using an EIA kit (Cayman, Ann Arbor, MI, U.S.A.) according to the manufacturer's protocol.

Apoptotic DNA fragmentation was monitored as previously described.³¹ Cells were collected using a rubber policeman and suspended in 20 µl of lysis buffer, consisting of 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and 0.5% sodium-*N*-lauroylsarcosinate. Proteinase K was added to a final concentration of 1 mg/ml, and the lysate was incubated at 50 °C for 2 h. RNaseA was then added to a final concentration of 0.5 mg/ml and incubated at 50 °C for 30 min. These samples were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis in the presence of 0.5 µg/ml ethidium bromide.

Apoptotic chromatin condensation was monitored as described previously.³¹ Cells were washed with PBS, stained with 10 µg/ml Ho 342 and observed under a fluorescence microscope.

Membrane Permeability Assay Membrane permeability assays were performed as described previously.^{16,18,32} Liposomes were prepared using the reversed-phase evaporation method. Egg PC (10 µmol, 7.7 mg) was dissolved in chloroform/methanol (1:2, v/v), dried, and dissolved in 1.5 ml of diethyl ether. This was followed by the addition of 1 ml of 100 mM calcein-NaOH (pH 7.4). The mixture was sonicated to obtain a homogenous emulsion. The diethyl ether solvent was removed using a conventional rotary evaporator under reduced pressure at 25 °C. The resulting suspension of liposome was centrifuged and washed twice with fresh buffer A (10 mM phosphate buffer, containing 150 mM NaCl) to re-

move untrapped calcein. The final liposome precipitate was re-suspended in 5 ml buffer A. A 0.3 ml aliquot of this suspension was diluted with 19.7 ml of buffer A, following which 400 µl of this suspension was incubated at 30 °C for 10 min in the presence of the NSAID under investigation. The release of calcein from liposomes (the amount of calcein outside the liposomes) was determined by measuring fluorescence intensity at 520 nm (excitation at 490 nm), because the calcein fluoresces very weakly when at high concentrations (when calcein is trapped in liposomes) due to self-quenching.

Hemolysis in erythrocytes were monitored as described^{33,34} with some modifications. Rat erythrocytes were washed twice with buffer A (5 mM HEPES/NaOH (pH 7.4) and 150 mM NaCl) and then suspended in fresh buffer A at a final concentration of 0.5% hematocrit (5×10^7 cells/ml). After incubation with NSAIDs for 10 min at 30 °C, hemolysis was estimated by measuring the absorbance at 520 nm.

Statistical Analyses All values are expressed as the mean ± S.E.M. The Tukey test or the Student's *t*-test for unpaired results was used to evaluate differences between more than three groups or between two groups, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Necrosis- and Apoptosis-Inducing Activities of Loxoprofen and Loxoprofen-OH in Primary Culture of Gastric Mucosal Cells

We previously reported that NSAIDs induce either necrosis or apoptosis depending on treatment conditions; short-term (1 h) treatment of primary cultures of guinea pig gastric mucosal cells with relatively high concentrations of NSAIDs (2.5 mM for indomethacin and 0.2 mM for celecoxib) and long-term (16–24 h) treatment of these cells with relatively low concentrations of NSAIDs (1 mM for indomethacin and 0.05 mM for celecoxib) induces necrosis and apoptosis, respectively.^{18,19,24} Loxoprofen and loxoprofen-OH were tested here for their ability to induce necrosis and apoptosis. Consistent with previous reports,^{18,19,24} cell viability decreased in a dose-dependent manner when guinea pig gastric mucosal cells in primary culture were treated with indomethacin or celecoxib for 1 h. In contrast, loxoprofen and loxoprofen-OH decreased cell viability to a much lesser extent under the same experimental conditions; cell viability of more than 60% was observed even with the highest concentration (20 mM) of loxoprofen and loxoprofen-OH (Fig. 1). We confirmed that cell death highlighted in Fig. 1 was medi-

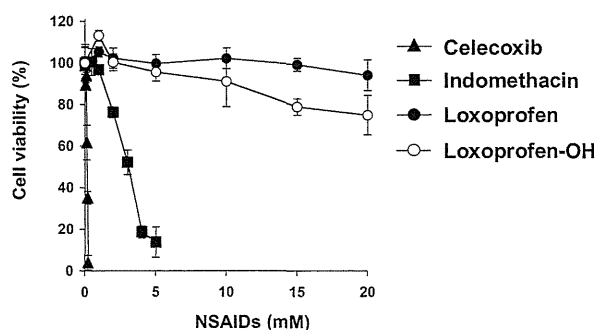


Fig. 1. Necrosis Induced by NSAIDs in Primary Culture of Gastric Mucosal Cells

Cultured guinea pig gastric mucosal cells were incubated with indicated concentrations of NSAIDs for 1 h. Cell viability was determined by the MTT method. Values are mean ± S.E.M. ($n=3$).

ated by necrosis given that no accompanying apoptotic DNA fragmentation or apoptotic chromatin condensation were evident (data not shown).

Similar results to the above were obtained when apoptosis was induced. Treatment of cells for 18 h with indomethacin or celecoxib decreased cell viability in a dose-dependent manner (Fig. 2A), which is also consistent with previous re-

ports.^{18,19,24} Loxoprofen and loxoprofen-OH showed very low activities for decreasing cell viability under these conditions (Fig. 2A). Because cell death as highlighted in Fig. 2 was accompanied by apoptotic DNA fragmentation and apoptotic chromatin condensation (Figs. 2B, C), it is most likely to have been mediated by apoptosis. Overall, the results in Figs. 1 and 2 show that loxoprofen and loxoprofen-

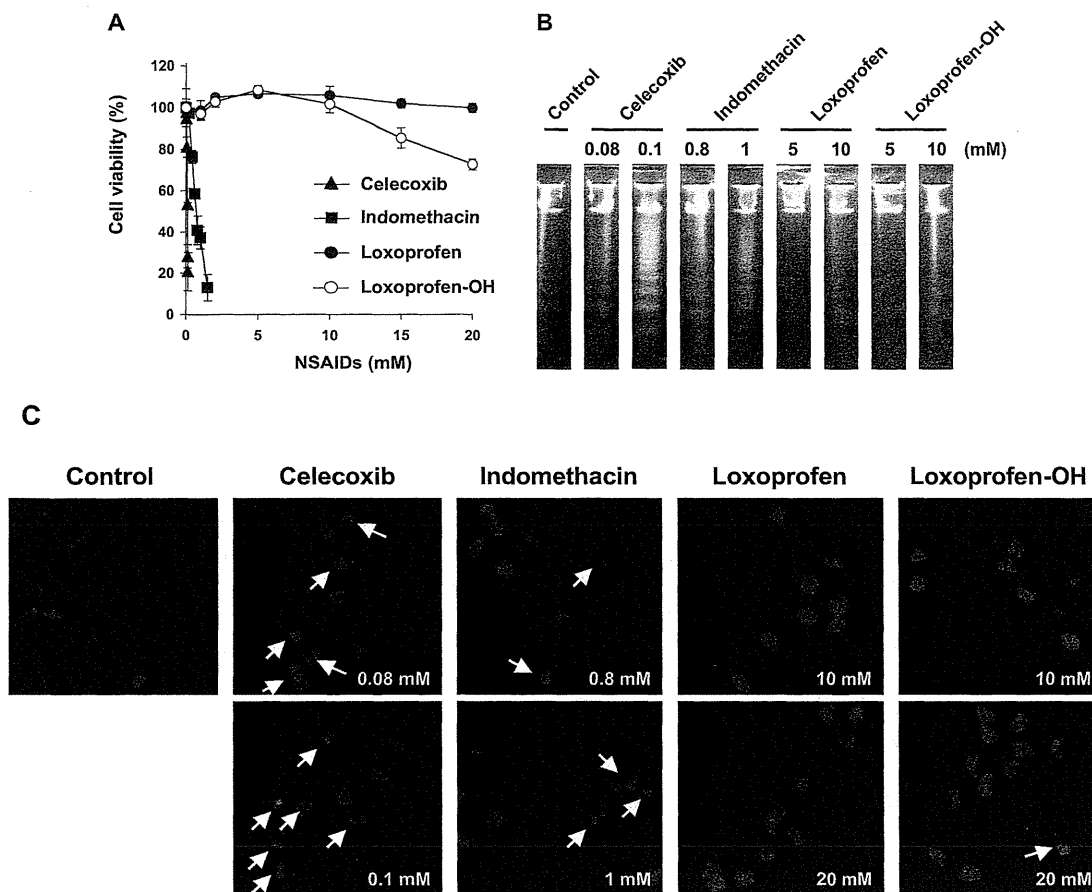


Fig. 2. Apoptosis Induced by NSAIDs in Primary Culture of Gastric Mucosal Cells

Cultured guinea pig gastric mucosal cells were incubated with indicated concentrations of NSAIDs for 18 h. Cell viability was determined by the MTT method. Values are mean \pm S.E.M. ($n=3$) (A). Apoptotic DNA fragmentation (B) and chromatin condensation (C) were monitored as described in Materials and Methods.

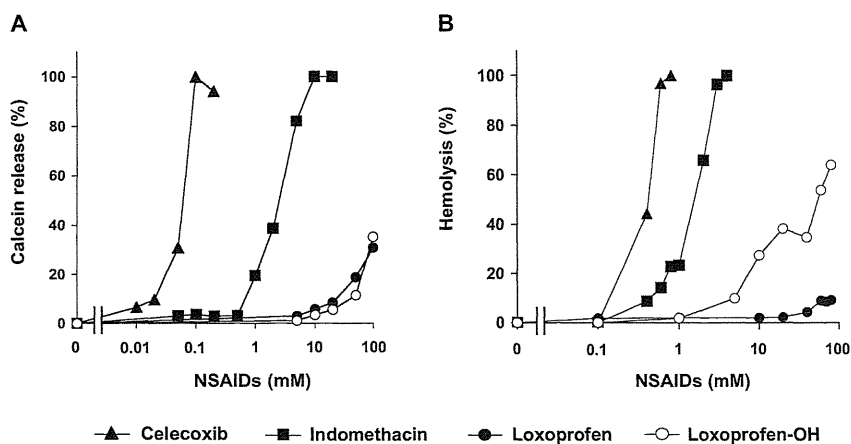


Fig. 3. Membrane Permeabilization by NSAIDs

Calcein-loaded liposomes were incubated for 10 min at 30 °C with indicated concentrations of NSAIDs. The release of calcein from liposomes was determined by measuring fluorescence intensity. Melittin (10 μ M) was used to determine the 100% level of membrane permeabilization (A). Rat erythrocytes were incubated in the presence of each of NSAIDs for 10 min at 30 °C. Hemolysis was estimated by measuring the absorbance at 520 nm (B).

OH induce necrosis and apoptosis to a lesser extent than do indomethacin and celecoxib. Furthermore, although the metabolic conversion of loxoprofen to loxoprofen-OH drastically increases the inhibitory activity on COX, this conversion does not seem to be so apparently associated with a similar increase in direct cytotoxicity.

Membrane Permeabilization Activities of Loxoprofen and Loxoprofen-OH The ability of loxoprofen and loxoprofen-OH to permeabilize the membranes of calcein-loaded liposomes was examined. Calcein fluoresces very weakly when at high concentrations due to self-quenching. Thus, the addition of membrane permeabilizing drugs to a medium containing calcein-loaded liposomes should cause an increase in fluorescence by releasing calcein trapped within the liposomes.¹⁸⁾ As shown in Fig. 3A, indomethacin and cele-

coxib increased the calcein fluorescence in a dose-dependent manner, which is consistent with previous findings.¹⁸⁾ Loxoprofen and loxoprofen-OH also increased the calcein fluorescence, suggesting that they caused membrane permeabilization; however, as the concentrations of loxoprofen and loxoprofen-OH required for membrane permeabilization were much higher than those of indomethacin and celecoxib, their abilities to permeabilize membranes were thus very weak.

Measurement of hemolysis is a standard method for testing the membrane permeabilization activities of drugs. As shown in Fig. 3B, all of the tested NSAIDs caused hemolysis of erythrocytes. The relative potency of each NSAID for hemolysis was approximately similar to that for permeabilization of calcein-loaded liposomes. Celecoxib showed the most potent activity for hemolysis, followed by indomethacin and

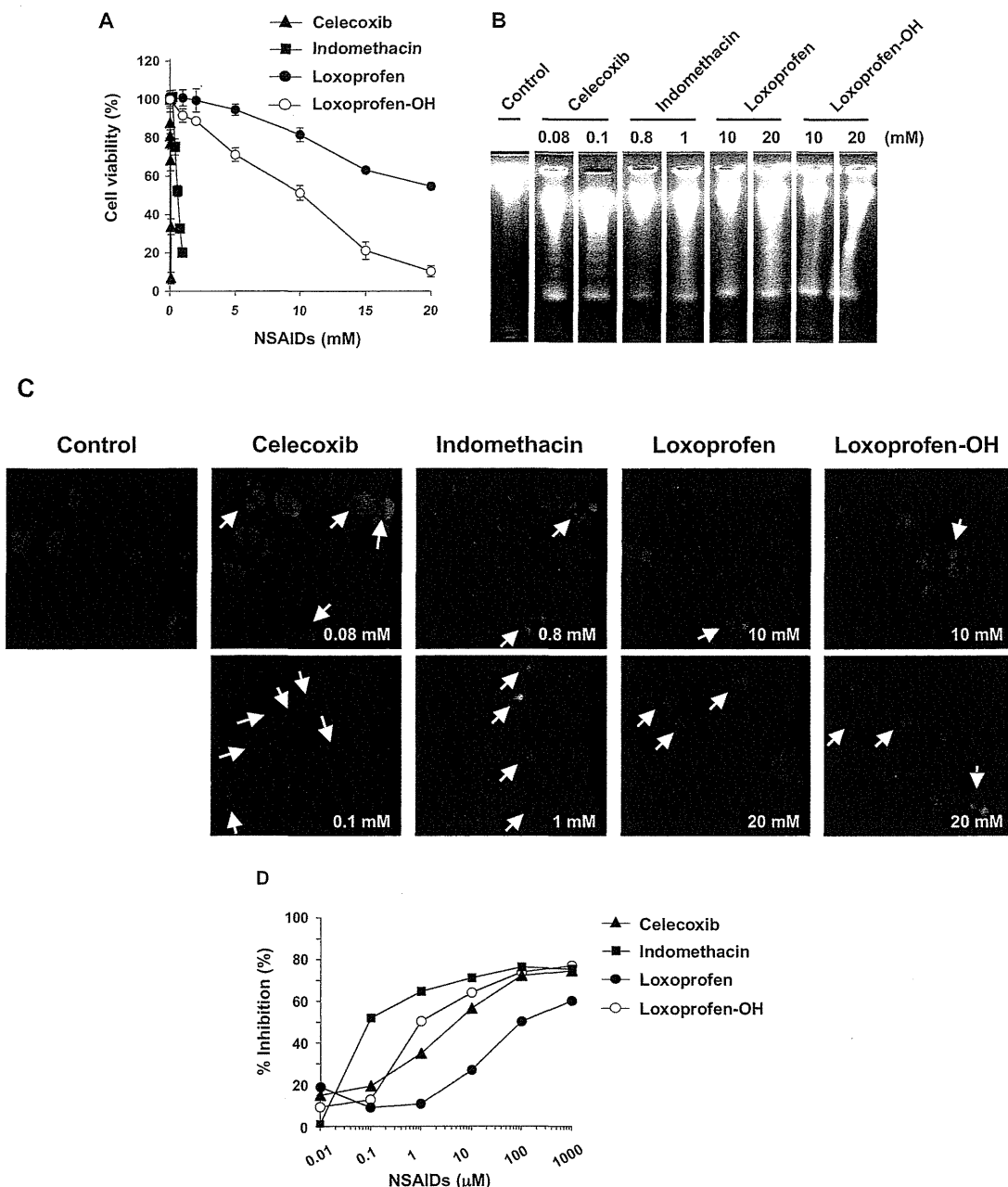


Fig. 4. Apoptosis Induced by NSAIDs in AGS Cells

AGS cells were incubated with indicated concentrations of NSAIDs for 24 h (A–C) or 4 h (D). Cell viability was determined by the MTT method. Values are mean ± S.E.M. (n=3) (A). Apoptotic DNA fragmentation (B) and chromatin condensation (C) were monitored as described in Materials and Methods. The arachidonic acid (50 μM at final) was added and cells were incubated for 15 min. The amount of PGE₂ in culture medium was determined by EIA and results were shown as inhibition of COX synthesis (D).