

氏 名	竹澤 公美子
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博士 甲第757号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成28年 3月 10日
学位論文題目	Epidermal growth factor receptor inhibitor AG1478 inhibits mucus hypersecretion in airway epithelium (上皮成長因子受容体阻害薬 AG1478 は気道上皮における粘液の過剰分泌を抑制する)
審査委員	主査 教授 山本 学 副査 教授 西村 正樹 副査 教授 今井 晋二

## 論文内容要旨

※整理番号	764	(ふりがな) 氏名	たけざわ くみこ 竹澤 公美子
学位論文題目	<b>Epidermal growth factor receptor inhibitor AG1478 inhibits mucus hypersecretion in airway epithelium</b> (上皮成長因子受容体阻害薬AG1478は気道上皮における粘液の過剰分泌を抑制する)		
<p>【目的】</p> <p>杯細胞化生、粘液腺過形成、鼻茸形成や線維化といった組織リモデリングおよび、好中球・好酸球浸潤は、慢性副鼻腔炎や気管支喘息のような慢性気道炎症疾患の特徴である。これまでの研究結果から好酸球と上皮細胞の相互作用による血小板由来成長因子(PDGF)や血管内皮細胞成長因子(VEGF)などの組織リモデリングに関わるサイトカインやMUC5AC ムチンの産生に、上皮細胞における上皮成長因子(EGF)受容体の transactivation が関わっていると考えられる。本研究では、上気道炎症におけるEGF受容体の役割を明らかにする目的で、<i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> での実験を行った。</p> <p>【方法】</p> <p>&lt;<i>In vitro</i>&gt; 粘表皮癌由来の気道上皮系細胞株であるNCI-H292細胞を、10% FBS, ペニシリン, ストレプトマイシン添加のRPMI-1640培地で培養を行った。培養細胞は6ウェルプレートで培養し、細胞がコンフルエントに達したとき、FBSなしの培地に継代して18時間培養を行った。その後、LPS (10 µg/mL) または TNF-α (10 ng/mL) で刺激し、EGF受容体阻害薬であるAG1478 (1- 1000 nM) を添加して、さらに24時間培養した。培地を採取して1500gで15分遠心分離を行ったのち、上清を回収してELISA法でMUC5AC ムチンおよびIL-8値を測定した。同様に、LPS または TNF-α で刺激したNCI-H292細胞をMUC5ACは18時間後、IL-8は6時間後にそれぞれ回収してリアルタイムPCR法でmRNAの発現を確認した。</p> <p>&lt;<i>In vivo</i>&gt; LPS (0.1 mg/0.1 mL) を3日間連続して点鼻し、ラット鼻粘膜上皮の粘液産生モデルを作成した。AG1478 (1, 10 mg/kg) をLPS点鼻投与の1時間前に腹腔内投与、あるいは1時間後に点鼻投与した。最終処置の24時間後に、ペントバルビタールの過剰投与で安楽死させた。ラット頭部を切断して10%中性緩衝ホルマリンで72時間固定し、5%トリクロロ酢酸で7日間脱灰した。標本は切歯乳頭のレベルで切断して冠状断切片を作成し、パラフィンに包埋した。組織片は4 µm厚に薄切し、アルシアンブルー・過ヨウ素酸シッフ(AB/PAS)染色およびヘマトキシリン・エオジン(H.E.)染色を行った。AB/PAS染色を行ったスライドを用いて、Image Analyzer (Image-Pro Plus J) でラット鼻中隔両端の鼻粘膜上皮における粘液顆粒面積の割合(area of mucosubstance, %)を測定した。さらに、H.E.染色を行ったスライドを用いて、鼻中隔両端の鼻粘膜上皮内における好中球数を測定した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

(続 紙)

**【結果】**

<In vitro> LPS 刺激および TNF- $\alpha$  刺激によって NCI-H292 細胞からの MUC5AC・IL-8 産生は亢進し、AG1478 はその作用を濃度依存性に抑制した。同様に、LPS または TNF- $\alpha$  で刺激した NCI-H292 細胞では MUC5AC mRNA および IL-8 mRNA 発現が亢進し、AG1478 (1000 nM) は MUC5AC mRNA・IL-8 mRNA 発現のいずれも抑制した。

<In vivo> LPS 点鼻刺激によって生じたラット鼻粘膜上皮の杯細胞化生と粘液産生、好中球浸潤は、AG1478 (1, 10 mg/kg) の腹腔内投与で濃度依存性に抑制された。この作用は AG1478 (1, 10 mg/kg) の点鼻投与でも同様に、濃度依存性に抑制された。

**【考察】**

粘液産生および好中球浸潤は、気道炎症疾患に特徴的で、MUC5AC ムチンが粘液産生や杯細胞化生に、IL-8 が好中球浸潤にそれぞれ寄与している。本研究で、EGF 受容体阻害薬である AG1478 は培養気道上皮細胞 (NCI-H292 細胞) からの LPS あるいは TNF- $\alpha$  刺激によって生じる MUC5AC ムチン・IL-8 産生および mRNA 発現を濃度依存性に抑制した。この結果は、LPS または TNF- $\alpha$  刺激による MUC5AC ムチンと IL-8 産生に上皮細胞における EGF 受容体の transactivation が重要な役割を担っていることを示唆している。

本研究では、AG1478 の腹腔内投与は LPS 点鼻刺激によるラット鼻腔上皮の杯細胞化生および粘液産生、好中球浸潤を著明に抑制することを明らかにした。これまでに卵白アルブミンによる下気道アレルギー性炎症のラット・マウスモデルで、EGF 受容体阻害薬である AG1478 やゲフィチニブが下気道における粘液産生や好中球・好酸球浸潤を抑制することが報告されており、これらの結果は慢性副鼻腔炎や気管支喘息といった難治性の気道疾患に対して、EGF 受容体のシグナル経路を標的とした治療の可能性を示唆している。しかし、臨床で肺癌に対して用いられるゲフィチニブなどの EGF 受容体阻害薬は、急性肺障害などの副反応が問題となる。本研究では LPS 点鼻によるラット鼻粘膜上皮の粘液産生モデルを用い、AG1478 の局所点鼻投与の作用についても検討したところ、腹腔内投与と同様にラット鼻腔上皮の杯細胞化生および粘液産生、好中球浸潤を著明に抑制した。

**【結論】**

EGF 受容体阻害薬である AG1478 は、LPS または TNF- $\alpha$  刺激による培養気道上皮細胞からの MUC5AC ムチンと IL-8 産生を著明に抑制した。また、ラット鼻粘膜上皮において、LPS 刺激による杯細胞化生、粘液産生および好中球浸潤は、AG1478 の腹腔内投与・点鼻投与のいずれでも濃度依存性に抑制された。

このことから、EGF 受容体の transactivation が気道炎症において重要な役割を担っていること、そして EGF 受容体阻害薬の局所投与が慢性副鼻腔炎などの難治性上気道疾患に対する新たな治療手段となりうることを示唆される。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	764	氏名	竹澤 公美子
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11 ポイント、600 字以内で作成のこと。)</p> <p>本研究は <i>in vitro</i> では、培養気道上皮細胞 (NCI-H292 細胞) を LPS または TNF-<math>\alpha</math> で刺激後、EGF 受容体阻害薬である AG1478 を添加し MUC5AC ムチン・IL-8 値を測定し、また mRNA の発現を確認した。<i>in vivo</i> では、LPS 点鼻刺激によるラットに AG1478 を腹腔内あるいは点鼻投与した。頭部の冠状断切片を作成し AB/PAS 染色後に粘液顆粒面積を測定、また H. E. 染色後に好中球数を計測した。</p> <p>その結果について検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) EGF 受容体阻害薬である AG1478 は、培養気道上皮細胞 (NCI-H292 細胞) から LPS または TNF-<math>\alpha</math> 刺激によって生じる MUC5AC ムチン、IL-8 産生および mRNA 発現を濃度依存性に抑制すること。</li> <li>2) LPS 点鼻刺激によるラットへの AG1478 の腹腔内投与と局所点鼻投与は鼻腔上皮の杯細胞化生および粘液産生、好中球浸潤を著明に抑制すること。</li> </ol> <p>本論文は、気道炎症における EGF 受容体の transactivation の役割と難治性上気道疾患に対する EGF 受容体阻害薬の局所投与が新たな治療手段となりうる可能性について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 555 字)</p>			