

氏 名	戸嶋 一郎
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士乙第418号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成27年 9月 9日
学位論文題目	Anti-inflammatory effects of a novel non-antibiotic macrolide, EM900, on mucus secretion of airway epithelium.  (抗菌作用を持たない新規マクロライド、EM900、の気道上皮からの粘液産生における抗炎症効果)
審査委員	主査 教授 寺田 智祐 副査 教授 依馬 正次 副査 教授 目良 裕

## 論文内容要旨

※整理番号	422	(ふりがな) 氏名	とびいし 3う 戸島 一郎
学位論文題目	Anti-inflammatory effects of a novel non-antibiotic macrolide, EM900, on mucus secretion of airway epithelium (抗菌作用を持たない新規マクロライド、EM900、の気道上皮からの粘液産生における抗炎症効果)		
<p><b>【研究の目的】</b></p> <p>慢性副鼻腔炎に対する14員環マクロライドの少量長期投与(マクロライド療法)は、その臨床的有用性が確立され、現在広く用いられている、最も有効な薬物療法である。臨床効果はその抗菌作用によるものではなく、粘液分泌抑制をはじめとする様々な抗炎症作用に由来することが判明している、マクロライド療法は、鼻漏・後鼻漏などの過分泌症状が中心で好中球炎症が主体の慢性副鼻腔炎に特に有効であることが知られている。我々の研究室では、14員環マクロライドのエリスロマイシン(EM) やクラリスロマイシン(CAM) が有する粘液産生抑制作用について、培養ヒト気道上皮細胞や、リポ多糖(LPS)を点鼻して作成したラット鼻粘膜上皮の粘液産生モデルを利用して、<i>in vivo</i>と<i>in vitro</i>の両面から明らかにしている。</p> <p>一方、14員環マクロライドの使用頻度の増加と長期投与に伴い、耐性菌の増加が問題になっている。そこで、北里大学北里生命科学研究所では、抗菌活性を持たず、抗炎症作用のみを有する免疫調節薬を開発し、エリスロマイシンの新規誘導体であるEM900が合成された。こうした薬剤が臨床で使用できれば、耐性菌の増加を生じない免疫調節薬として極めて有用である。そこで申請者は、抗菌作用を持たないEM900の抗炎症作用の中で、臨床効果に最も重要な粘液産生抑制作用について、<i>in vivo</i>と<i>in vitro</i>の両面から検討を行った。</p> <p><b>【方法】</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・<i>In vivo</i> : LPSで刺激したラット鼻粘膜上皮の粘液産生モデル エーテル麻酔下にF344ラットに0.1mgのLPS(100<math>\mu</math>l)を3日間連続点鼻投与して、鼻粘膜上皮に杯細胞化生、粘液産生、好中球浸潤を生じる炎症モデルを作成した。EM900(1~10mg/kg)をLPS投与1時間前に内服させ、最終点鼻24時間後にラット鼻腔の冠状断切片を作成し、鼻粘膜上皮における粘液産生と好中球浸潤に対する影響をCAMの作用と比較検討した。粘液産生の程度については、上皮内における粘液顆粒の占める面積の割合を、画像分析装置を用いて測定した。</li> <li>・<i>In vitro</i> : TNF-<math>\alpha</math>刺激による培養気道上皮細胞からの粘液分泌 TNF-<math>\alpha</math>(20 ng/ml)刺激による培養ヒト気道上皮細胞(NCI-H292細胞)からのMUC5ACムチン産生に対する、EM900、CAM、EM(10<sup>-4</sup>~10<sup>-6</sup>M)の作用をELISA法とRT-PCR法</li> </ul>			

- (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。

で検討した。

#### 【結果】

・ *In vivo*: LPS 点鼻によりラット鼻粘膜上皮に杯細胞化生と粘液産生、好中球浸潤が認められた。EM900 (1~10mg/kg) 内服により、濃度依存性に鼻粘膜上皮における粘液産生が抑制された。こうした EM900 の粘液産生抑制作用は CAM とほぼ同等であった。LPS 刺激によるラット鼻粘膜上皮の好中球浸潤に対しても、EM900 と CAM は同様に抑制する傾向が疑われたが、統計学的有意差は認められなかった。

・ *In vitro*: TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) 刺激により培養ヒト気道上皮 (NCI-H292) 細胞からの、MUC5AC ムチン産生が認められたが、EM900 は EM や CAM と同等に  $10^{-6}$ ~ $10^{-4}$  M 濃度で容量依存性に MUC5AC 蛋白の産生を抑制した。また、EM900 は  $10^{-4}$  M 濃度で MUC5AC の mRNA 発現も抑制した。

#### 【考察】

慢性副鼻腔炎に対する 14 員環マクロライド、CAM や EM の少量長期投与は、臨床的有用性が高く本邦で広く用いられているが、薬剤耐性菌を増加させることが問題である。実際に本邦における肺炎球菌の 70~80% は CAM や EM に耐性化していることが報告されている。したがって耐性菌の増加を促進させないため、抗炎症作用を持つが、抗菌作用を有さない薬剤の開発が望まれ、2011 年北里大学で抗菌作用のない新規エリスロマイシン誘導体、EM900 が合成された。

今回の研究で、EM900 の経口投与は *in vivo* で LPS 刺激によるラット鼻粘膜上皮における粘液産生を抑制した。*In vitro* でも EM900 は TNF- $\alpha$  刺激による培養気道上皮細胞からの MUC5AC ムチン産生を抑制した。これは EM900 に気道上皮細胞からのムチン産生を直接抑制する作用があることを証明した初めての論文であるとともに、EM900 の内服が *in vivo* において抗炎症効果が得られることを明らかにした点で重要である。今回の結果は、すでにマクロライド療法として臨床的に有用性が確立されている CAM や EM などと同様に、EM900 にも同等の粘液産生抑制などの抗炎症作用があることを示している。

今回 *in vivo* で使用した EM900 の 1-10mg/kg 内服や CAM の 10mg/kg 内服は、過去の報告からラット気道における組織内濃度の  $10^{-4}$ ~ $10^{-5}$ M に相当する。*In vitro* において EM900、CAM、EM はこうした  $10^{-4}$ ~ $10^{-5}$ M 濃度で、TNF- $\alpha$  刺激による培養気道上皮細胞からのムチン産生を抑制した。TNF- $\alpha$  はヒトの気道において LPS 刺激により分泌されるサイトカインの一つで、LPS 刺激はラットの肺からの TNF- $\alpha$ / $\beta$  産生を促進すること、TNF- $\alpha$  阻害剤は LPS 刺激によるラット鼻粘膜上皮からのムチン産生を抑制することなどが報告されている。これらの結果から、EM900 は気道上皮細胞からのムチン産生を直接阻害することによって、ラット鼻粘膜上皮における LPS 刺激による粘液産生を抑制した可能性が考えられる。一方、EM900 は、CAM と同様に LPS 刺激による好中球浸潤も抑制している可能性があり、粘液産生抑制以外の抗炎症作用については、今後の検討課題である。

#### 【結論】

EM900 は粘液産生抑制などの抗炎症作用を有していて、慢性副鼻腔炎に対して抗菌作用を持たない新たな免疫調整薬としての可能性が期待できる。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	422	氏名	戸嶋 一郎
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>慢性副鼻腔炎に対する 14 員環マクロライドの少量長期投与 (マクロライド療法) は、現在一般臨床で幅広く用いられているが、耐性菌の増加などが問題点として指摘されている。エリスロマイシンの新規誘導体である EM900 は、抗菌活性を持たず、抗炎症作用を有する新しい免疫調節薬である。申請者は、EM900 の抗炎症作用として粘液産生抑制作用について焦点をあて、<i>in vivo</i> 及び <i>in vitro</i> の両側面から検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) LPS 点鼻によりラット鼻粘膜上皮に粘液産生と好中球浸潤が認められた。</li> <li>2) EM900 の経口投与により、濃度依存的に鼻粘膜上皮における粘液産生が抑制された。</li> <li>3) 上記の効果は、クラリスロマイシンの効果と同程度であった。</li> <li>4) EM900 の経口投与により、統計学的有意差はないものの、好中球浸潤も抑制された。</li> <li>5) TNF<math>\alpha</math> 刺激により、培養ヒト気道上皮細胞からの MUC5AC ムチン産生が認められた。</li> <li>6) EM900 は濃度依存的に、MUC5A の蛋白や mRNA 発現を抑制した。</li> </ol> <p>本論文は、マクロライド療法の臨床的問題点を克服する可能性のある新規薬剤 EM900 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 562 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 27 年 9 月 1 日)</p>			