

学 位 論 文 題 名

合成ムラミルジペプチド誘導体ロムルチドの造血亢進作用

および感染抵抗性増強作用に関する実験的研究

学位論文内容の要旨

細菌菌体成分の免疫強化作用に関する免疫薬理学的研究は、その活性部位の特定および化学合成による合成免疫強化剤の開発へと発展してきた。ムラミルジペプチド (MDP; N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine) は、細菌細胞壁ペプチドグリカンの有する免疫アジュバント活性を担う最小構造単位として同定され、以来、MDP およびその誘導体の構造活性相関と作用機作に関する研究が進められてきた。現在では、数種の MDP 誘導体がサイトカイン誘発剤として位置づけられ、その臨床応用が検討されている。MDP 誘導体の一つであるロムルチド [MDP-Lys (L18)] は、そのサイトカイン産生誘導作用を介した造血亢進作用に基づき、癌患者における白血球減少症の治療薬として世界に先駆けて本邦で臨床応用された。従来、合成免疫強化剤の癌領域への展開は、癌の免疫学的治療そのものを目的としたものであった。しかし、ロムルチドの場合は、癌治療における補助療法および癌患者の QOL 向上の一助と位置付けられる。このような薬剤の重要性は、癌患者の主な死因が感染症と出血であることから明らかである。抗癌化学療法や放射線療法の副作用である骨髄障害による白血球減少や腸管などの粘膜障害は宿主の易感染化を招き、骨髄障害による血小板減少は出血傾向の主因とされている。近年、白血球減少症にはリコンビナントサイトカインやロムルチドが臨床応用され、治療法が確立されつつある。しかし、血小板減少症には血小板輸血以外に有効な治療法がなく、腸管などの粘膜障害に対する治療法も未だ確立されていないのが現状である。癌患者における治療に伴う副作用の軽減および全身状態の改善を目的とした血小板造血や粘膜防御機構の制御を可能とする治療法の確立は、癌患者の QOL の向上に重要な役割を果たすものと考えられる。以上の背景から、本研究では、実験動物による骨髄障害モデルおよび感染モデルを用いて、MDP 誘導体ロムルチドの血小板増加効果と腸管粘膜における感染防御機構増強効果を明らかにするとともに、それらの作用機構について検討した。

1. 健常モルモットにおいて、ロムルチドはその皮下投与時に血小板増加効果と好中球および単球を主体とする白血球増加効果を示すことが明らかとなった。また、X線照射によるモルモット骨髄障害モデルにおいて、ロムルチドは減少した末梢血小板数を対照群に比較して早期に健常レベルに回復させ血小板回復促進効果を示し、その効果は投与量依存的に発現することが明らかとなった。ロムルチド投与動物では、末梢血小板数の回復に先行して、血清中 IL-6 レベルの上昇と、それに続く骨髄内巨核球数の増加および巨核球のサイズの増大が認められた。以上の結果から、ロムルチドはX線照射によるモルモット実験的血小板減少症に対し、巨核球－血小板造血の亢進に基づく治療効果を示すことが明らかと

なり、その効果には、ロムルチドによる IL-6 産生増強が関与することが示唆された。

2. 抗癌剤 CBDCA 投与によるカニクイサル骨髓障害モデルにおいても、ロムルチドは投与量依存的に血小板回復促進効果とナディアの底上げ効果を示し、ロムルチドの効果は種を越えて認められることが明らかとなった。ロムルチド投与動物では、末梢血小板数の回復に先行して、血清中の SCF, IL-6, および Epo 濃度の増加が認められた。一方、試験管内においてロムルチドはサル単核球の GM-CSF, G-CSF, および M-CSF 産生を増強することが明らかとなった。サイトカイン産生の増強に引き続き、骨髓内では、最終分化段階まで成熟した巨核球の数が増加していることが巨核球の ploidy 解析から明らかとなった。同時に、ロムルチドは、末梢血中の単球数増加効果および骨髓系前駆細胞 (赤芽球系、顆粒球系、単球系およびリンパ球系) の分化成熟促進効果を示した。以上の結果から、ロムルチドの血小板増加効果は、巨核球-血小板造血の各ステージに関与する造血諸因子の産生増強を介して発現していることが示唆された。サルを用いた抗癌化学療法剤による血小板減少症モデルに対する治療効果が示されたことは、血小板減少症治療におけるロムルチドの有用性を示唆するものと考えられた。

3. 健常マウスにおいて、ロムルチドはその経口投与時に CSF 産生増強を介した好中球および単球を主体とする白血球増加効果を示すことが明らかとなった。ロムルチド経口投与により、皮下投与の至適用量 0.1mg/mouse 投与時と同等の薬効を求めるには、10mg/mouse のロムルチドを要した。また、抗癌剤 CBDCA 投与によるカニクイサル骨髓障害モデルにおいて、ロムルチドは 50mg/monkey の連続経口投与によって血小板回復促進効果とナディアの底上げ効果を示し、その効果はロムルチドを 1mg/monkey 皮下投与時と同等であることが明らかとなった。以上の結果から、ロムルチドはマウスおよびサルに経口的に投与しても皮下投与時と同等の造血亢進効果を示すことが明らかとなり、経口剤としての有用性が示唆された。

4. 大腸菌によるマウス敗血症モデルに対して、ロムルチドは感染 1 日前に経口投与することにより投与量依存的に感染抵抗性増強効果を示すことが明らかとなった。同感染モデルに対して、ロムルチド経口投与により、皮下投与の至適用量 0.1mg/mouse 投与時と同等の感染抵抗性増強効果を求めるには、3mg/mouse のロムルチドを要した。各種病原体による敗血症モデルに対するロムルチド経口投与時の有効菌種は、ロムルチド皮下投与時のそれと同様であった。緑膿菌および真菌によるマウス敗血症モデルに対して、ロムルチドはその経口投与時に抗菌剤との併用効果を示した。以上の結果から、マウス敗血症モデルに対してロムルチドは経口投与しても、ロムルチド皮下投与時と同様の効果を示すことが明らかとなった。

5. 消化管が感染成立の舞台になると考えられる X 線照射によるマウス内因性感染モデルにおいて、ロムルチドは 1mg/mouse の割合に連続経口投与することによってロムルチド皮下投与の至適用量 0.1mg/mouse 投与時の効果に優る感染抵抗性増強効果を示し、内因性感染モデルに対するロムルチド経口投与の有用性が示唆された。内因性感染モデルに対するロムルチドの効果は、諸臓器からの大腸菌の分離頻度の低下と分離時期の遅延が確認されたことから、腸管からの大腸菌の侵入の過程を遮断あるいは抑制した結果であることが示唆された。その効果には、ロムルチドが X 線照射による腸管粘膜組織の損傷の回復促進作用とそれに連動すると考えられる X 線照射後の大腸菌を主体とした腸内フローラの爆発的な増殖に対する抑制作用を示すことが関与すると考えられた。以上の結果から、ロムルチドは経口的に投与することにより、腸管防御機構の最前線であるサーフェイスバリアとしての粘膜組織の再構築を介して感染防御効果を示すことが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	東	市郎
副査	教授	谷口	和彌
副査	教授	菊池	九二三
副査	講師	劉	永春

学位論文題名

合成ムラミルジペプチド誘導体ロムルチドの造血亢進作用 および感染抵抗性増強作用に関する実験的研究

ムラミルジペプチド(MDP; *N*-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine)は、細菌細胞壁ペプチドグリカンの有する免疫アジュバント活性を担う最小構造単位である。ロムルチド[MDP-Lys (L18)]は、MDPが有する多彩な生物活性のうち、特にサイトカイン誘発作用を介した造血亢進とそれに関連する感染抵抗性の増強作用をMDP以上に強め、かつMDPの毒性を低減した誘導体である。ロムルチドのサイトカイン誘発剤としての特色は、複数のサイトカインを生体に誘発することで効率よく宿主の生体防御機構を強化することが考えられ、魅力ある薬剤開発の今後の新しい方向性が期待されている。本研究では、実験動物による骨髓障害モデルおよび感染モデルを用いて、ロムルチドによる血小板増加効果および腸管粘膜における感染防御効果の新規生物学的作用を明らかにするとともに、それらの作用機構について検討し、以下の結果を示した。

1. X線照射によるモルモット骨髓障害モデルにおいて、ロムルチドはその皮下投与時に減少した末梢血小板数を対照群に比較して早期に健常レベルに回復させ、血小板回復促進効果を示した。ロムルチド投与動物では、末梢血小板数の回復に先行して、血清中にInterleukin-6 (IL-6) レベルの上昇と、それに続く骨髓内巨核球数の増加および巨核球のサイズの増大が認められた。以上の結果から、ロムルチドは血小板減少モデルにおいて、巨核球-血小板造血の亢進に基づく血小板増加効果を示すこと、その効果には、ロムルチドによるIL-6産生増強が関与することが示唆された。

2. 抗癌剤カルボプラチン投与によるカニクイサル骨髓障害モデルにおいて、ロムルチドはその皮下および経口投与時に血小板回復促進効果と血小板数の減少抑制効果を示し、ロムルチドの効果は種を越えて認められることを明らかにした。ロムルチド投与動物では、末梢血小板数の回復に先行して、血清中のStem cell factor, IL-6, およびErythropoietin濃度の増加が認められた。一方、*in vitro*においてロムルチドはサル単核球のGranulocyte-macrophage-colony-stimulating factor (GM-CSF), Granulocyte-CSF (G-CSF), およびMacrophage-CSF (M-CSF)産生を増強することを明らかにした。サイトカイン産生の増強に引き続き、骨髓内では、最終分化段階まで成熟した巨核球数の増加を巨核球のploidy解析から明らかにした。以上の結果から、ロムルチドのサル血小板増加効果は、巨核球-血小板造血の各

ステージに關与する造血諸因子の產生増強に始まる血小板造血のプロセスを介して発現していることが示唆された。

3. 健常マウスにおいて、ロムルチドはその経口投与時にCSF產生増強を介した好中球および単球を主体とする白血球増加効果を示した。また、各種病原微生物によるマウス敗血症型感染モデルに対して、ロムルチドは感染1日前に経口投与することによって感染抵抗性増強効果を示した。以上の結果から、健常マウスおよびマウス敗血症型感染モデルに対してロムルチドは経口投与しても、ロムルチド皮下投与時と同程度の造血亢進および感染防御効果を示すことが明らかとなった。

4. 消化管が感染防御機構の場となるX線照射によるマウス内因性感染モデルにおいて、ロムルチドは1mg/マウスの割合に連続経口投与することによってロムルチド皮下投与の至適用量0.1mg/マウス投与時の効果に優る感染抵抗性増強効果を示し、当該モデルに対するロムルチド経口投与の有効性が示唆された。内因性感染モデルに対するロムルチドの効果は、ロムルチドがX線照射による腸管粘膜組織の損傷の回復促進作用とそれに連動すると考えられるX線照射後の大腸菌を主体とした腸内フローラの増殖に対する抑制作用が關与すると考えられた。以上の結果から、ロムルチドは経口的に投与することにより、腸管防御機構の最前線であるサーフェイスバリアとしての粘膜組織の再構築を介して感染防御効果を示すことが示唆された。

以上、申請者は動物病態モデルを駆使してのMDP誘導体ロムルチドの生体防御機構における新規作用として、ロムルチドの血小板増加効果および宿主の粘膜防御増強効果とその作用機構を血液学および細菌学的に明らかにした。これらの成果は合成免疫強化剤の新規領域への臨床応用研究に大きく寄与するものと高く評価される。審査員一同は申請者が北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。