

学位論文題名

新規NF-kappaB抑制薬、
Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) の
マウス喘息モデルに対する効果に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

気管支喘息は、気道における慢性の好酸球性炎症と気道構造の変化(リモデリング)、そして非特異的な物質に対する気道収縮反応、と定義される気道過敏性の亢進を招く疾患である。気管支喘息の有病率は増加傾向にあることが示唆されているが、喘息患者の多くは低用量の吸入ステロイドによって安定した経過が得られる。しかしながら高用量の吸入ステロイドなどの投与下でも症状がコントロールされない重症喘息と呼ばれる患者が10%程度存在するとされており、気管支喘息の新たな治療薬の開発が望まれている。

NF-kappaB (NF- κ B) は種々の炎症性サイトカインやケモカインの産生に関与している転写因子である。気管支喘息患者の気道上皮ではNF- κ Bの発現が亢進していることが示されている。マウス喘息モデルに対してノックアウト等の手法でNF- κ Bを抑制すると好酸球性炎症が減弱することが報告されており、気管支喘息の病態にはNF- κ Bの亢進が関与していることが考えられるが、これまでに臨床応用されたNF- κ B抑制薬は存在しない。

Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) は慶応大学梅澤らによって合成された新規NF- κ B抑制薬である。DHMEQはNF- κ Bに特異的に結合し、核内への移行やDNAへの結合を阻害することによってその働きを抑制するといった機序が報告されている。薬理作用として、関節炎モデル、同種異系間の心移植モデル、アトピー性皮膚炎モデルなどに対する抗炎症効果が既に報告されており、これまで一切の副作用発現が認められていない。DHMEQを呼吸器疾患の動物モデルに投与した報告はこれまでに存在しない。

本研究では、マウスを用いた気管支喘息モデルにおけるDHMEQの効果について、マウスへのDHMEQの投与、また気道上皮細胞や炎症細胞を用いた*in vitro*の実験系によって明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】

DHMEQが喘息の病態に与える効果を評価するため、主に気道炎症について評価を行う「急性期喘息モデル」と、気道リモデリングについて評価を行う「慢性期喘息モデル」をそれぞれBALB/c(メス、6週齢)を用いて作成した。ovalbumin(OVA)を用いた抗原感作後、急性期モデルでは経鼻投与で3日間、慢性期モデルでは週に3回、計6週間OVAを噴霧することにより抗原曝露を行った。DHMEQは各抗原曝露の20~30分前に腹腔内に投与した。

気管支肺胞洗浄(BAL)や気道過敏性測定は最終抗原曝露の24時間後、気管にカニューレを挿入することで行った。気道過敏性については塩化メサコリン吸入に対する肺抵抗、肺コンプライアンスの変化を測定し、その指標とした。

肺組織は最終抗原曝露の24時間後に採取し、periodic acid-Schiff(PAS)染色、Masson trichrome染色、 α -smooth muscle actin(α -SMA)の免疫染色を行った。また肺組織の一部からRNAを抽出し、RT-PCRにてeotaxin、MUC5ACの測定を行った。

細胞実験として、OVAに感作されたマウスの脾細胞、あるいは抗ダニIgE抗体陽性の健常

人の血液より分離した末梢血単核球から産生される IL-5、IL-13 の測定を行った。また気道上皮細胞として BEAS-2B を用い、IL-4 もしくは TNF- α の刺激で産生される eotaxin の測定を行った。

【結果】

気管支肺胞洗浄液中 (BALF) で増加している総細胞数、好酸球数が DHMEQ の投与により抑制された。また BALF 中の IL-5 や IL-13 といった Th2 サイトカインも抑制された。肺組織中の RNA を測定したところ eotaxin の発現が低下しており、BALF 中の好酸球数が抑制された結果と合致していた。血清中の OVA 特異的 IgE 抗体も同様に低下が認められた。また PAS 染色による肺組織切片の評価を行い、気道粘液産生が低下していることが示された。肺組織 RNA における MUC5AC の発現量も低下しており、PAS 染色で認められた結果と一致した。気道リモデリングの評価として気道周囲の線維化、 α -SMA 発現の評価を行い、どちらも有意な抑制が認められた。加えてメサコリン吸入に対する気道過敏性も抑制されることが示された。なお慢性期モデルではマウスの体重変化を測定したが、対照群と DHMEQ 投与群の間に明らかな差は認められなかった。

OVA 感作マウスから採取した脾細胞を OVA で刺激し産生される IL-5、IL-13 は DHMEQ の投与により有意に抑制された。同様にヒト末梢血単核球から産生される IL-5、IL-13 も同様に抑制された。また気道上皮細胞を IL-4 や TNF- α で刺激することにより産生される eotaxin も DHMEQ の投与により有意な低下が認められた。

【考察】

喘息の病態には NF- κ B を含む様々な分子メカニズムや多くの細胞が関与していることが推測されている。過去に DHMEQ は T 細胞の増殖能や活性化を抑制すること、樹状細胞の活性化や末梢血単核球からの炎症性サイトカイン産生を抑制することが示されている。今回我々は、気道上皮細胞からの eotaxin 産生、あるいはマウス脾細胞やヒト末梢血単核球からの Th2 サイトカイン産生が DHMEQ によって抑制されることを示した。マウスを用いた気管支喘息モデルにおいて認められた DHMEQ の効果は、これら様々な細胞の機能を抑制した結果である可能性が考えられる。

気道リモデリングと NF- κ B との関連について、線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化、線維芽細胞からの TGF- β の産生、気道平滑筋細胞の増殖などの機能が NF- κ B の制御下にあることが報告されている。さらに NF- κ B の活性化に必要な I κ B kinase を抑制することによってマウス喘息モデルにおける気道リモデリングが抑制されることも過去に示されており、今回の我々が示した結果と合致するものである。ステロイドを含め、気管支喘息の治療に現在用いられている薬は気道リモデリングの進展に対しあまり効果がないことが知られており、NF- κ B 抑制によって得られる気道リモデリングに対する効果は重要であると考えられる。

DHMEQ に明らかな副作用がないことは、これまで複数の報告において示されており、今回我々も慢性期モデルにおいてマウスの体重変化に有意な差を認めないことを確認した。DHMEQ は特異的に NF- κ B の核内移行を阻害することが示されている。この特異性こそが他の NF- κ B 抑制薬に認められない DHMEQ の特徴であり、これまで明らかな副作用発現を認めない理由であると考えられている。しかしながら長期間 DHMEQ を投与することによる易感染性の有無や他の生理機能に与える影響を調べることは今後必要であると考えられる。

【結論】

マウス喘息モデルにおいて認められる好酸球性気道炎症や気道リモデリング、気道過敏性の亢進が DHMEQ の投与によって抑制された。喘息の病態に関与する気道上皮細胞や炎症細胞からのケモカイン、サイトカインの産生も DHMEQ により抑制された。DHMEQ は気管支喘息の治療において有効である可能性が示された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	笠原	正典
副査	教授	西村	孝司
副査	教授	上出	利光
副査	教授	有賀	正
副査	教授	西村	正治

学位論文題名

新規NF-kappaB抑制薬、 Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) の マウス喘息モデルに対する効果に関する研究

Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) は慶応大学梅澤らによって合成された新規 NF-kappaB 抑制薬であり、NF-kappaB に特異的に結合し、核内への移行や DNA への結合を阻害することによってその働きを抑制するといった機序が報告されている。本研究では、マウス気管支喘息モデルにおける DHMEQ の効果について、急性及び慢性モデルでの *in vivo* 投与実験と、気道上皮細胞や炎症細胞を用いた *in vitro* 実験によって明らかにすることを目的とした。

マウス喘息モデルを用いた検討では、気管支肺胞洗浄液中 (BALF) の総細胞数、好酸球数、Th2 サイトカイン (IL-5、IL-13) の増加が DHMEQ の投与により抑制された。肺組織では eotaxin mRNA の発現が低下しており、BALF 中好酸球数が抑制された結果と合致した。また肺組織における PAS 染色、及び MUC5AC mRNA 発現の検討から、気道粘液産生が DHMEQ 投与により低下していた。慢性モデルによる気道リモデリングの評価は気道周囲の線維化、 α -SMA の発現を指標とし、どちらも DHMEQ により有意な抑制が認められた。加えてメサコリン吸入に対する気道過敏性も抑制された。

In vitro 実験でマウス脾細胞、あるいはヒト末梢血単核球から産生される IL-5、IL-13 は DHMEQ により有意に抑制された。また、気道上皮細胞から産生される eotaxin も DHMEQ の投与により有意に低下した。

結論として、マウス喘息モデルにおいて認められる好酸球性気道炎症、気道リモデリング、気道過敏性の亢進が DHMEQ の投与によって抑制された。喘息病態に関与する気道上皮細胞や炎症細胞からのケモカイン、サイトカインの産生も DHMEQ により抑制された。以上より DHMEQ は気管支喘息の新たな治療薬になる可能性が示された。

質疑応答では、上出教授より、①気管支喘息における他の免疫抑制薬投与の報告、②マウスに用いた DHMEQ の投与量設定、③TGF- β の受容体発現程度の変化、の 3 点について質問があった。申請者は、①現在、免疫抑制薬の投与は症例報告レベルでありエビデンスのある投与方法ではないこと、②DHMEQ の投与量は過去の報告を参考に、これまでの最大投与量である 40mg/kg としたこと、③TGF- β 受容体の発現レベルについては、今後の検討課題で

ある、と回答した。

西村孝司教授からは①重症喘息モデルとしてはマウス好中球喘息モデルを用いたほうがよいのではないか、②免疫抑制に関わる副作用の検討として、Th1 サイトカインの分泌抑制について検討すべきではないか、の 2 点について質問があった。申請者は、①最初に行う実験として、今回は典型的な Th2 気道炎症モデルを用いたが、今後は好中球性炎症をターゲットとした系についても検討を行いたいこと、②副作用の観点から易感染性の問題は重要であり、今後検討していきたい、と答えた。

有賀教授からは、人への将来的応用を考えると、完成した気道リモデリングに対する効果をマウスにおいても検討したほうがよいのでは、の質問があった。申請者は他の NF-kappaB 抑制薬を用いた過去の報告でも気道リモデリングを一旦完成させた後より投薬を開始し、リモデリング消退に対する効果を検討したのがあること、本研究でも同様の検討が望ましいと考えている旨を説明した。

西村正治教授からは、実際に患者に用いる際には吸入ステロイドに加える形になることが予想されるが、本研究ではステロイドへの add-on 効果はみているのかどうか、について質問がなされ、申請者は急性期モデルにおける好酸球性気道炎症においては、ステロイドに DHMEQ を併用することにより更なる抗炎症効果が認められることを確認している旨の説明をした。

この論文は、新規 NF-kappaB 抑制薬である DHMEQ の効果について、気道炎症、気道リモデリング、気道過敏性といった気管支喘息の病態に対し *in vivo*、*in vitro* の系を用いて検討されていることにつき高く評価され、今後はヒトへの将来的応用を視野に、局所（気道）投与を目的とした製剤の開発、効果の検討が進むことが期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。