

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462578

研究課題名(和文) マクロライドの作用機序の解明と新しい併用療法の開発

研究課題名(英文) Investigation for the mechanism of macrolide and development for combination therapy with macrolide

研究代表者

石永 一 (Ishinaga, Hajime)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50335121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：マクロライドの少量長期投与はびまん性汎細気管支炎や慢性気管支炎、慢性副鼻腔炎に効果的であるが、その機序はまだ十分解明されていない。MKP-1は最近ステロイドなどの抗炎症薬の効果にかかわっていることが報告されているが、ムチン遺伝子発現に対しては不明である。今回我々はクラリスロマイシンにてMKP-1発現が亢進することを明らかにした。またクラリスロマイシンはp38シグナルを介してMUC5AC遺伝子発現を抑制することも示した。今回の結果はマクロライドの効果におけるMKP-1の新しい役割を明らかにムチン過分泌に対する創薬に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Low-dose, long-term macrolide therapy is effective in patients with chronic airway diseases such as diffuse panbronchitis, chronic bronchitis, and chronic sinusitis. However, the mechanism underlying this clinical efficacy remains unclear. It was recently reported that MKP-1 appears to mediate the effects of several anti-inflammatory drugs, including glucocorticoids, but the role of MKP-1 on mucin gene expression in the presence of macrolide remains unknown in human airways. Here, we show that MKP-1 protein is induced by clarithromycin, and that clarithromycin suppresses TNF- α -induced MUC5AC mucin gene expression in a p38 MAPK-dependent manner in human airway epithelial cells, NCI-H292 cells. Our study thus provides new insights into the role of MKP-1 on the effect of macrolides, and may help in the development of new therapeutic strategies against mucin overproduction.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：MUC5AC マクロライド MKP-1 p38

1. 研究開始当初の背景

マクロライド系抗菌薬は、耳鼻咽喉科領域においては慢性副鼻腔炎に、呼吸器科領域では難治性疾患に指定されているびまん性汎細気管支炎や肺気腫、気管支喘息など、粘液過分泌の病態で苦しむ患者の治療に広く用いられている薬剤である。このような実臨床での使用は、抗炎症作用や粘液産生抑制作用、免疫賦活作用などを期待されて投与されているのであるが、未だその作用機序は十分解明されていない。これまでのところ Shinkai M et al がクラリスロマイシンは緑膿菌由来産物が誘導する ERK を介した MUC5AC 遺伝子発現の亢進を抑制したと報告しているがそれ以上詳細に検討した報告はない。

(Shinkai M et al, Macroklde antibiotics as immunomodulatory medications: proposed mechanisms of action. Pharmacol & Ther. 2008, 117,393-405.)

当科は以前からマクロライドに関する研究を数多く手掛けており、(Otsu K, Ishinaga H, et al. Effects of a novel nonantibiotic macrolide, EM900, on cytokine and mucin gene expression in a human airway epithelial cell line. Pharmacology 2011. 88(5-6):327-32.)

(Kim DY, Takeuchi K, Ishinaga H et al. Roxithromycin suppresses mucin gene expression in epithelial cells. Pharmacology. 2004 Sep;72(1):6-11.)

マクロライドの研究をすみやかに遂行しうると考えられる。またこれまで細胞内シグナル伝達や核内シグナル伝達の研究も行っており、マクロライドの作用機序を解明していくのに十分な知識や実験手技を習得している。(Ishinaga H et al. TGF-beta induces p65 acetylation to enhance bacteria-induced NF-kappaB activation. EMBO J. 2007 Feb 21;26(4):1150-62.)

2. 研究の目的

本研究において、ヒトの気道上皮を用いてマクロライドの粘液産生抑制のメカニズムを解明し、これまでより効果の高い薬剤の開発を目指す。またマクロライドとの相乗効果が期待できる薬剤を検討し、新しい治療法の可能性を探る。

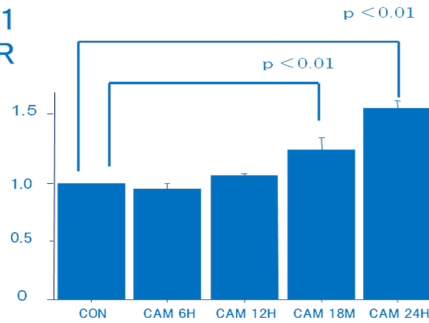
3. 研究の方法

1) NCI-H292 細胞を用い、クラリスロマイシン単独刺激下に MKP-1, IL-10, TGF- β , CYLD 遺伝子など介在分子になりうる mRNA 発現亢進の有無を定量的 PCR を用いて測定する。2) NCI-H292 細胞に 1) で有意に発現亢進した分子をターゲットにした siRNA を用いてノックダウンし、TNF- α + クラリスロマイシン投与下の MUC5AC 遺伝子 (MUC5AC 遺伝子) 発現を定量的 PCR を用いて検討する。3) 2) でクラリスロマイシンの粘液産生抑制作用に影響を及ぼす介在分子が特定できたら、その下流に位置すると思われる NF-kB や AP-1 活性、p38、ERK シグナル経路に対する影響をルシフェラーゼアッセイやウェスタンブロッティング、PCR 法を用いて検討する。

4. 研究成果

粘液産生亢進のシグナルを抑制する介在分子の候補としては、MAPK 脱リン酸化酵素である MKP-1、抗炎症性サイトカインである IL-10 や TGF- β , NF-kB の抑制作用が知られている CYLD などが挙げられる。この中で、我々は予備実験において、クラリスロマイシン単独刺激にて MKP-1 遺伝子発現が亢進することを最初に確認した。

MKP-1 Q-PCR



そこでMKP-1にターゲットを絞りさらなる検討を行った。

(1) まずはクラリスロマイシンのNCI-H292細胞に対する細胞毒性について検討した。25 $\mu\text{g/ml}$ と75 $\mu\text{g/ml}$ の濃度のクラリスロマイシンで24時間処理し、alamar blue アッセイを行った。結果は両濃度でコントロールのDMSOと変わらず細胞毒性は示さなかった。

(2) 次に25 $\mu\text{g/ml}$ のクラリスロマイシンがTNFで誘導されたMUC5AC遺伝子発現亢進ならびにMUC5AC蛋白を抑制するかどうかを定量的PCR法やWestern blottingで検討した。結果はクラリスロマイシンは有意にMUC5AC遺伝子もMUC5AC蛋白発現も抑制していた。

(3) 続いてクラリスロマイシンがMKP-1蛋白発現を誘導するかどうかをWestern blotting法を用いて検討した。結果はクラリスロマイシン投与後12時間以降、24時間までMKP-1蛋白の発現が亢進された。

(4) ここでMKP-1をノックダウンするためにMKP-1 siRNAを用いることにした。まずノックダウンの効果をみるために、クラリスロマイシンで誘導したMKP-1 mRNAをMKP-1 siRNAでノックダウンした。結果はコントロールsiRNAに比して優位にMKP-1 mRNAを抑

制した。

(5) 今後はコントロール siRNA とMKP-1 siRNAを導入した群に分けて、TNFで誘導されたMUC5AC遺伝子発現亢進に対するマクロライドの抑制作用がどうなるか定量的PCR法を用いて検討した。結果はコントロールに比してMKP-1 siRNAを導入した群ではマクロライドの抑制作用を減弱させていた。

これらの検討より、クラリスロマイシンはMKP-1を介してムチン遺伝子であるMUC5AC遺伝子発現を抑制していることが判明した。

(6) これまでの諸家の報告より、MKP-1はp38やERKを不活性化させるとのことであり、p38MAPKとクラリスロマイシンの粘液産生抑制作用との関係を検討した。まずはTNFで誘導されたMUC5AC遺伝子発現亢進にp38がかかっているかSB203580というp38阻害剤を用いて検討した。結果はSB203580を使用することにより、TNFで誘導されるMUC5AC遺伝子発現は著明に抑制され、p38が関与していることが証明された。

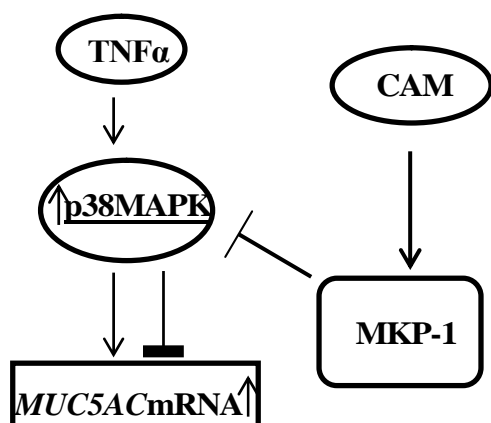
またwestern blottingでTNF刺激をするとp38のリン酸化が亢進することも併せて確認した。

(7) さらにMKP-1とp38がかかっているかどうか調べるために、MKP-1 siRNAを導入し、TNFで誘導したp38のリン酸化にどのような影響を与えるのか検討した。結果は、MKP-1 siRNAを導入することによりp38のリン酸化は増強されることが判明した。

今回の検討を要約すると、クラリスロマイシンのMUC5AC遺伝子発現抑制作用は、まずクラリスロマイシンがMKP-1を誘導し、誘導されたMKP-1がp38のリン酸化を不活性化させることにより引き起こされていると結論づ

けられた。

(クラリスロマイシンの粘液産生抑制作用における作用機序)



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Ishinaga H, (1 番目) 他 6 名. Interleukin-33 induces mucin gene expression and goblet cell hyperplasia in human nasal epithelial cells. Cytokine 90:60-65, 2017. 査読あり

Shah SA, Ishinaga H (2 番目) 他 1 名. Pathogenesis of eosinophilic chronic rhinosinusitis. J Inflamm 13:11, 2016. DOI:10.1186/s12950-016-0121-8. 査読あり

Iwamoto T, Okamoto A, Ishinaga H (3 番目) 他 5 名. A novel approach to predict cetuximab-induced hypersensitivity reaction: detection of drug-specific IgE on basophils. Cancer Med 5(6):1004-12, 2016. 査読あり

Takeuchi K, Kitano M, Ishinaga H (3 番目) 他 6 名. Recent advances in primary ciliary dyskinesia. Auris Nasus

Larynx 43(3):229-36, 2016. 査読あり

Hou B, Ishinaga H (2 番目) 他 7 名. Circulating microRNAs as novel prognosis biomarkers for head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Biol Ther 16(7):1042-6, 2015. 査読あり

[学会発表](計 3 件)

1) 石永一、演題「マクロライド系抗菌薬によるムチン遺伝子発現抑制に対する MKP-1 の役割」マクロライド新作用研究会、H26, 7, 18 東武レバントホテルフロント(東京・墨田区)

2) 石永一、演題「マクロライド系抗菌薬によるムチン遺伝子発現抑制に対する MKP-1 の役割(第 2 報)」マクロライド新作用研究会、H28, 7, 30 飯田橋レインボービル(東京・新宿区)

3) 石永一、演題「好酸球性副鼻腔炎における粘液産生について」、日本アレルギー学会、H28, 6, 17 東京国際フォーラム(東京・千代田区)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

石永 一 (ISHINAGA HAJIME)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 50335121