

# 学位論文

ドラッグリポジショニングを指向した  
気道粘液産生抑制薬の創製に関する基礎薬理学的研究

2021年3月

イシバシ ジュンペイ  
石橋 純平

## 略語表

本論文では以下の略語を使用した.

AP-1	: activator protein-1
BSA	: bovine serum albumin
cAMP	: cyclic adenosine monophosphate
cGMP	: cyclic guanosine monophosphate
COPD	: chronic obstructive pulmonary disease
CSE	: cigarette smoke extract
DEX	: dexamethasone
DR	: drug repositioning
EGF	: epidermal growth factor
EGFR	: epidermal growth factor receptor
ELISA	: enzyme-linked immuno sorbent assay
ERK	: extracellular signal-regulated kinase
FBS	: fetal bovine serum
GAPDH	: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GR	: glucocorticoid receptor
LDH	: lactate dehydrogenase
LPS	: lipopolysaccharide
MAPK	: mitogen-activated protein kinase
MKP-1	: mitogen-activated protein kinase phosphatase 1
NF- $\kappa$ B	: nuclear factor kappa B
PDE	: phosphodiesterase
PGE2	: prostaglandin E2
PgR	: progesterone receptor
PI3K	: phosphatidylinositol-3 kinase
PKA	: protein kinase A
QOL	: quality of life
Sp1	: specificity protein 1
TGF- $\alpha$	: transforming growth factor-alpha
TNF- $\alpha$	: tumor necrosis factor-alpha

## 論文要旨

炎症性呼吸器疾患は気道や肺における炎症を基礎とする疾患の総称である。代表的な疾患には気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患 (COPD) が挙げられ、両疾患とも慢性的な気道炎症を基礎とする呼吸器疾患である。近年、治療の進歩やガイドラインの策定により病態のコントロールが可能となりつつあるが、依然として国内における有病率は高く、潜在的なものも含めると両疾患の患者数は 1000 万人にもものぼる。気管支喘息と COPD では炎症の原因や病態などさまざまな違いがあるが、どちらの疾患にも共通してみられる症状に気道粘液の過剰産生、すなわち痰がある。痰の喀出には咳嗽が伴い、これが患者 QOL の低下につながる事が知られている。さらに、慢性的な気道粘液の過剰産生を呈する患者は、症状の増悪や予後不良を招きやすいことが報告されている。特に気管支喘息では、急性増悪時に気道内腔に粘液が貯留することで換気障害が引き起こされ、これが重度の場合には喘息死の原因となる。以上のことから呼吸器疾患の治療において、気道粘液産生制御の重要性が認識されつつある。しかしながら、現在の呼吸器疾患では、疾患の基礎となる炎症の抑制と呼吸機能の改善を中心とした治療が行われており、積極的な気道粘液産生の制御は行われていない。例えば、気管支喘息の治療には、抗炎症を目的として吸入ステロイド薬が、気管支拡張を目的として  $\beta_2$  刺激薬や抗コリン薬が用いられるが、喀痰治療薬は用いられていない。これは喀痰治療薬に関する臨床研究が少数であることに加えて、既存の薬で著明な作用を示すものが無いことが原因である。既存の喀痰治療薬は分泌物のクリアランスを促進するものと気道分泌物の産生・分泌を抑制するものに大別される。特に気道分泌の抑制作用を持つものとして、ステロイド薬、抗コリン薬、マクロライド系抗菌薬などが知られているが、気道分泌を抑制する薬物に関する報告はまだ少なく、基礎研究のさらなる発展が求められている。

気道では、気道液と気道上皮の線毛細胞によって、侵入した病原微生物や微粒子などの異物を捕捉・排出する粘液線毛クリアランスが形成されている。気道液は水分量の多いゾル層と、高分子糖タンパクであるムチンを主成分とした粘弾性の高いゲル層に分かれている。ムチンの中でも気道では主に MUC5AC と MUC5B が発現しており、特に MUC5AC は気管支喘息において気道上皮の杯細胞の増加とともに分泌が増加することが知られている。MUC5AC は重合することで粘液の粘性を増加させる性質をもち、病態時にみられる粘稠な気道粘液の一因だと考えられている。さらに近年の報告では、MUC5AC が気道粘液の性質に寄与するだけでなく、気道過敏性の亢進や気道炎症といった病態への寄与が示唆されている。以上のように、MUC5AC は気道粘液の粘性に寄与する主要成分であり、病態への関与が示唆されていることから、その産生の制御が呼吸器疾患の治療につながるとして注目されている。

ドラッグリポジショニングは既存薬に新たな作用を見出し、これまでの適応とは異なる疾患へと利用する創薬手法である。既存薬を利用した開発は、開発中止のリスクが低い、一部試験のスキップにより開発期間を短縮・コストを抑制できるといった利点がある。ドラッグリポジショニングの成功例は数多く報告されており、近年では、偶発的な発見に基づくリポジショニングだけでなく、既存薬の作用を詳細に解析し、それを基にして戦略的にリポジショニングを狙う手法が試みられている。

第1章では、臨床において慢性気道炎症性患者の喀痰および後鼻漏症状に有効であることが示唆されているホスホジエステラーゼ阻害薬、ibudilast の MUC5AC 産生に対する作用を *in vitro*、*in vivo* 実験系により調べた。*In vitro* 実験の標本には粘液産生能をもつヒト肺粘液性類表皮癌細胞株 NCI-H292 を用いた。Ibudilast は transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) 刺激 (10 ng/ml) により亢進した MUC5AC 産生を濃度依存的 (1–100  $\mu$ M) に抑制した。Ibudilast は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) または、LPS (10  $\mu$ g/ml) + タバコ煙抽出物の混合刺激による MUC5AC 産生も同様に抑制したことから、ibudilast は刺激種に依存しない MUC5AC 産生抑制作用をもつと考えられた。さらに MUC5AC mRNA 発現に対する ibudilast の作用を調べたところ ibudilast (100  $\mu$ M) は TGF- $\alpha$  刺激による MUC5AC mRNA 発現の亢進を抑制した。また、MUC5AC promoter (-3752/+68) を用いた luciferase assay において ibudilast (100  $\mu$ M) は TGF- $\alpha$  による MUC5AC 遺伝子の転写亢進を抑制した。これらのことから、ibudilast の MUC5AC 産生抑制作用は MUC5AC 遺伝子の転写抑制によるものだと考えられた。また、TGF- $\alpha$  の受容体である epidermal growth factor receptor (EGFR) 下流の ERK1/2 リン酸化の MUC5AC 発現への関与が報告されていたことから、ibudilast の ERK1/2 リン酸化に対する作用を調べた。その結果、TGF- $\alpha$  によるリン酸化 ERK1/2 の増加を ibudilast は濃度依存的 (1–100  $\mu$ M) に抑制した。また、ERK1/2 リン酸化阻害の MUC5AC 産生に対する影響を調べるため、MEK-ERK 阻害薬 U0126 (20  $\mu$ M) の作用を調べたところ、U0126 は TGF- $\alpha$  による MUC5AC 産生の亢進を抑制した。これらのことから、ibudilast は ERK1/2 リン酸化の抑制を介して MUC5AC 産生を抑制すると考えられた。さらに、ibudilast の MUC5AC 産生抑制作用および ERK1/2 リン酸化抑制作用に対して、PDE 阻害による PKA の活性化が寄与するかを調べた結果、両作用は PKA 阻害薬 H89 (10  $\mu$ M) の存在下においても消失しなかった。このことから、ibudilast の MUC5AC 産生抑制作用に対する PDE 阻害による PKA 活性化の寄与は小さいものと考えられた。加えて、*in vivo* 実験では lipopolysaccharide (LPS) の気管内投与モデルを用いて MUC5AC 産生および MUC5AC mRNA 発現に対する ibudilast の作用を調べた。LPS 投与群では気管支肺胞洗浄液中の MUC5AC 量の増加および肺組織中 MUC5AC mRNA の増加がみられ、これはステロイド薬 dexamethasone (1 mg/kg, i.p.) 投与群で抑制された。一方で ibudilast (20 mg/kg, i.p.) 投与群では、dexamethasone と同様に MUC5AC 産生および MUC5AC mRNA 発現が抑制された。

これらの結果から *ibudilast* は *in vivo* においても MUC5AC 産生抑制作用を持つと考えられた。以上より、従来、気管支喘息治療薬、脳循環改善薬として用いられているホスホジエステラーゼ阻害薬 *ibudilast* が MUC5AC 産生抑制作用をもつこと、およびその作用が ERK1/2 のリン酸化抑制および MUC5AC 遺伝子の転写抑制を介したものであることを明らかにした。

第 2 章では、既存薬ライブラリー 640 種を対象として新規 MUC5AC 産生抑制薬のスクリーニングを行った。実験標本には NCI-H292 細胞を用い、MUC5AC 産生の誘導には TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) を用いた。NCI-H292 細胞に対して TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) と被験薬 (2  $\mu$ M) を共処理し、24 時間後の培養上清中の MUC5AC 量を ELISA 法により測定し、各被験薬の MUC5AC 産生に対する作用を評価した。スクリーニングの結果、640 種の既存薬の中で、約 4%、25 種の化合物に MUC5AC 産生抑制作用が確認された。これら 25 種の化合物のうち、ステロイド骨格を持つ化合物は 17 種であったが、ステロイド薬が MUC5AC 産生抑制作用を示すことは既知であったことから、ステロイド系化合物を除いた 8 種に着目した。これら 8 種の中で、再現よく MUC5AC 産生を抑制した刺激性下剤の *bisacodyl* に着目した。*Bisacodyl* の MUC5AC 産生に対する濃度依存性を調べたところ、*bisacodyl* は 0.1–1  $\mu$ M で濃度依存的に TGF- $\alpha$  誘導性の MUC5AC 産生を抑制した。さらに MUC5AC mRNA 発現に対する作用を調べたところ、MUC5AC 産生を抑制した濃度において *bisacodyl* は TGF- $\alpha$  による MUC5AC mRNA 発現を抑制した。以上の結果より、640 種の既存薬の中から新規 MUC5AC 産生抑制薬として、刺激性下剤 *bisacodyl* を見出した。また、その作用は MUC5AC mRNA 発現の抑制によるものであることを明らかにした。

既存薬に着目し、気道粘液主要成分 MUC5AC 産生に対する作用を解析した結果、気道粘液産生抑制薬へのドラッグリポジショニング候補化合物として、ホスホジエステラーゼ阻害薬 *ibudilast* と刺激性下剤 *bisacodyl* を見出した。*Ibudilast* については、臨床研究において慢性気道炎症患者の喀痰・後鼻漏症状に対して有効性を示すという作用が報告されており、本研究の成績も含めて考えると、気道粘液抑制産生抑制薬としてリポジショニングできる可能性は高いだろう。一方で *bisacodyl* に関しては、詳細な作用機序の解明や *in vivo* における有効性の確認など、さらなる検討が必要である。また、気道粘液産生抑制薬としての利用を考えると、従来の下剤としての作用は副作用となり回避すべきものとなる。下剤としての *bisacodyl* が経口薬または坐剤として使用されていることを考えると、投与方法を吸入剤や鼻腔噴霧剤に変更することで、下剤としての作用を回避しつつ、気道粘液産生抑制薬としての作用を期待できるかもしれない。以上、本研究の成果により見出された *ibudilast*、*bisacodyl* の気道粘液産生抑制薬としてのリポジショニング、あるいは作用機序の解明を通じて、多くの呼吸器疾患に共通する喀痰症状に対して有効な治療薬の開発に繋がることが期待される。

## 目次

緒論.....	1
第1章 PDE 阻害薬 ibudilast による MUC5AC 産生抑制作用とその機序解明 .....	6
第1節 背景.....	7
第2節 実験材料および方法.....	8
第1項 試薬.....	8
第2項 抗体.....	8
第3項 Primer 配列 .....	9
第4項 細胞培養.....	10
第5項 MUC5AC protein 分泌量の評価.....	10
第6項 Quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) .....	11
第7項 Western blotting .....	11
第8項 遺伝子導入および luciferase assay .....	12
第9項 統計処理.....	12
第3節 実験成績.....	13
第1項 PDE 阻害薬 ibudilast の MUC5AC 産生に対する作用 .....	13
第2項 Ibudilast による MUC5AC 産生抑制作用の機序解明.....	17
第3項 Ibudilast の MUC5AC 産生抑制および ERK1/2 リン酸化阻害作用に対する cAMP-PKA 経路の寄与 .....	21
第4項 LPS 投与モデルマウスにおける MUC5AC 産生に対する ibudilast の作用 .....	23
第4節 考察および小括.....	25
第1項 考察.....	25
第2項 小括.....	28
第2章 既存薬ライブラリーを用いた新規 MUC5AC 産生抑制薬の探索.....	29
第1節 背景.....	30
第2節 実験材料および方法.....	31

第1項	試薬	31
第2項	抗体	31
第3項	Primer 配列	32
第4項	細胞培養	32
第5項	MUC5AC protein 分泌量の評価	33
第6項	Quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR)	33
第7項	Western blotting	34
第8項	既存薬ライブラリーを用いた MUC5AC 産生抑制薬のスクリーニング	34
第9項	LDH 活性を指標とした細胞毒性試験	35
第10項	MUC5AC mRNA 安定性の評価	35
第11項	統計処理	35
第3節	実験成績	36
第1項	新規 MUC5AC 産生抑制薬の探索	36
第2項	刺激性下剤 bisacodyl による MUC5AC 産生抑制作用およびその機序解明	44
第3項	刺激性下剤 sodium picosulfate およびその活性代謝物 desacetyl bisacodyl の MUC5AC 産生に対する作用	51
第4節	考察および小括	54
第1項	考察	54
第2項	小括	57
	総括	58
	参考文献	59
	謝辞	64

## 緒論

### 1.炎症性呼吸器疾患と喀痰症状について

炎症性呼吸器疾患は気道や肺における炎症を基礎とする疾患の総称である。代表的な疾患には、気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患 (COPD) などが挙げられ、両疾患とも慢性の気道炎症を基礎とする疾患である。近年、治療の進歩やガイドラインの策定により、病態のコントロールが可能となり、国内における死亡者数は気管支喘息では減少傾向、COPD では頭打ちとなっている。その一方で、両疾患の潜在的な患者数が 1000 万人にもものぼることや、既存の治療が奏効しない重症例の存在も考えると、日本国民の健康を脅かす疾患であることに変わりはない。

気管支喘息、COPD では、基礎となる炎症の原因やその病態などさまざまな違いがあるが、どちらの疾患にも共通して気道粘液の過剰産生、いわゆる喀痰の症状がみられる<sup>(1)</sup>。痰の排出には咳が伴うことから、患者の quality of life (QOL) 低下の原因となることが知られている。さらに、気道粘液の過剰産生が QOL 低下だけでなく、病態悪化の原因となることも報告されている。例えば、気管支喘息では、急性増悪時に気道内腔に粘液が貯留することで換気障害が引き起こされる。また、気管支喘息により死亡した患者の剖検肺では広範囲に気道を塞ぐ粘液栓が観察され、これによる窒息が直接の死因と考えられている<sup>(2)</sup>。COPD においても、慢性的な粘液産生を呈する患者では呼吸機能の低下や死亡率の増加がみられることが報告されている<sup>(3)</sup>。以上のような報告から、呼吸器疾患の治療において、気道粘液産生制御ならびに喀痰症状治療の重要性が見直されつつあり、2019 年には「咳嗽・喀痰の診療ガイドライン」が策定されている。

気道粘液産生制御や喀痰症状のケアの重要性が見直されつつある一方で、現在の炎症性呼吸器疾患の治療では、疾患の基礎となる炎症の抑制と呼吸機能の改善を中心とした治療のみが行われている。例えば、気管支喘息の治療には、抗炎症を目的として吸入ステロイド薬が、気管支拡張を目的として  $\beta_2$  刺激薬や抗コリン薬が用いられるが、喀痰治療薬は用いられていない (喘息予防・管理ガイドライン 2018)。これは喀痰治療薬に関する臨床研究が少数であることに加えて、既存の薬で著明な作用を示すものが無いことが原因である。既存の喀痰治療薬は分泌物のクリアランスを促進するものと、気道粘液の産生・分泌を抑制するものに大別される (Table 1)。前者には気道粘液の粘性を低下させるものや、肺サーファクタントの分泌により気道粘液と気道上皮の粘着性を低下させるもの、粘液を輸送する線毛細胞の運動を亢進するものなどが含まれる。一方で、後者には、杯細胞過形成を抑制するものや、副交感神経を抑制するもの、化学伝達物質の制御により粘液分泌を制御するものが含まれる。気道粘液産生を抑制する薬物としてはステロイド薬、抗コリン薬、マクロライド系抗菌薬などが知られているが<sup>(4-8)</sup>、気道粘液産生を抑制する薬物に関する報告はまだ少なく、基礎研究のさらなる発展が求められている。



Table 1 喀痰治療薬の分類 「咳嗽・喀痰の診療ガイドライン 2019」 より一部改変

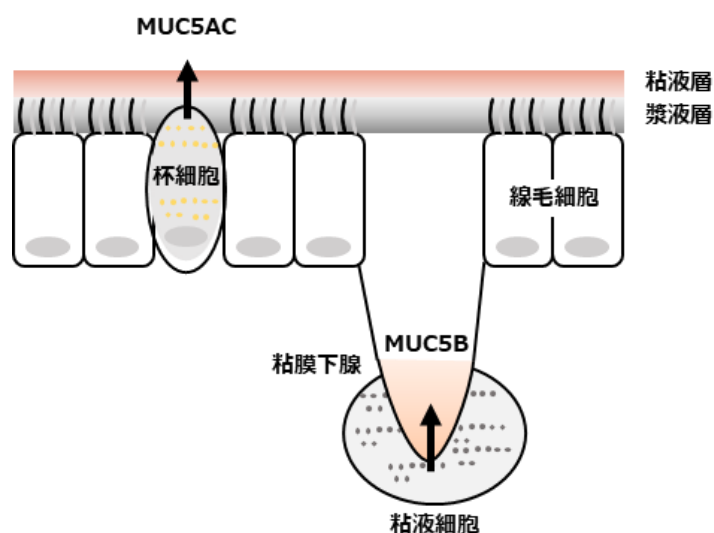
		作用	代表的な治療薬
粘液産生・分泌の抑制	杯細胞過形成の抑制	杯細胞化生・過形成を抑制し、気道粘液産生を抑制する	マクロライド系抗菌薬、 フドステイン
	副交感神経の抑制	副交感神経の前後線維末端から放出されるアセチルコリンと 粘液細胞上のムスカリン受容体との結合を阻害する	抗コリン薬
	化学伝達物質の抑制	活性酸素、プロテアーゼ、脂質メディエータ、サイトカイン等を 制御することで粘液の産生や分泌を制御する	抗アレルギー薬、LTRA、 コルチコステロイド
分泌物の排除促進	粘液溶解	ムチンを分解して気道粘液の粘稠度を低下させる	アセチルシステイン、 ブロムヘキシン塩酸塩
	粘液修復	気道粘液構成成分を正常化させる	L-カルボシステイン
	粘液潤滑	肺サーファクタントの分泌亢進により、気道粘液と 気道上皮との粘着性を低下させる	アンブロキシソール塩酸塩
	線毛運動賦活	線毛運動を賦活化させることで、粘液線毛 クリアランスを促進する	$\beta 2$ 刺激薬
	上皮細胞からの水分 過剰分泌の抑制	気道上皮細胞のクロライドチャンネルを介する水分の過剰分泌を抑制し、 線毛運動に適したゾル層の厚さに調節する	マクロライド系抗菌薬
	咳嗽誘発	咳嗽反射を亢進させる	ACE 阻害薬

## 2. 粘液線毛クリアランスとムチン分子 MUC5AC について

呼吸器は常に呼吸によって侵入してくる病原性微生物や微粒子などの異物に曝されており、それら異物を排除する主たる防御機構として粘液線毛クリアランスが存在している<sup>(1)</sup>。気道上皮は気道分泌物によって被膜されており、下層には粘性の低い漿液層が上層には粘弾性の高い粘液層が存在している (Fig. 1)。気道に侵入した異物は粘液層によって捕捉され、漿液層中の線毛細胞による輸送を受けることで気道外へ排出されている。粘液線毛クリアランスは粘液層のレオロジカルな性状、線毛運動、線毛周囲の水分量などにより規定されている。これらの因子に大きく影響するのが、高分子糖タンパク質のムチンである。ムチンはジスルフィド結合により重合する性質をもち、粘液に適度な粘弾性を生み出し、異物の捕捉を可能にしている。適量のムチンが気道防御に重要である一方で、病態時にみられる過剰量のムチンは病態悪化の原因となる。気道炎症によりムチン産生が過剰となると、気道粘液の粘性が増加する。粘性の高い気道粘液は、気道からの異物排除を阻害し、炎症の悪化を引き起こす。

そのため、呼吸器疾患の治療では、過剰となったムチン産生を制御することが重要である。

ヒトのムチン遺伝子はこれまでに 17 種あることが報告されており、気道においては MUC5AC と MUC5B が主に発現している<sup>(1,9)</sup>。MUC5AC は気道上皮の杯細胞から、MUC5B は粘膜下腺の粘液細胞から主に産生される。MUC5B を欠損したマウスが気道感染に対して脆弱になる一方で、MUC5AC の欠損マウスでは特に影響は見られない<sup>(10)</sup>。また、MUC5AC を欠損すると気管支喘息モデルマウス粘液栓の解消、気道過敏性の減弱がみられることや、急性肺障害モデルマウスにおける肺組織中への好中球浸潤が減少することが報告されている<sup>(11, 12)</sup>。MUC5B、MUC5AC の機能には未解明な点が多いが、MUC5B は気道防御、MUC5AC は病態時における寄与が大きいと考えられている。従って、呼吸器疾患の治療においては、ムチン分子の中でも特に MUC5AC 産生の制御が重要である。



**Fig. 1** 下気道における粘液線毛クリアランス系  
「咳嗽・喀痰の診療ガイドライン 2019」より一部改変

MUC5AC 発現は増殖因子 (TGF- $\alpha$ 、EGF、amphilegulin) 炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-13、IL-17)、環境汚染物質 (タバコ煙抽出物、acrolein)、LPS、neutrophil elastase、などさまざまな刺激により亢進することが報告されている<sup>(13)</sup>。中でも、増殖因子とその受容体である epidermal growth factor receptor (EGFR) は MUC5AC 発現に重要な役割を果たしている<sup>(2, 14)</sup>。チロシンキナーゼ一体型受容体である EGFR の下流では MAPK (mitogen-activated protein kinase) 経路や PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase) 経路が活性化し、MUC5AC 発現が増加する。さらに、気管支喘息や COPD 患者の肺において EGFR 発現が増加することが報告されており、粘液産生亢進への寄与が示唆されている<sup>(15, 16)</sup>。これらのことから、EGFR は MUC5AC・粘液産生制御の重要な標的と考えられている。

### 3. ドラッグリポジショニングについて

近年、新薬開発にかかる期間や研究開発費用は増加しており、従来のプロセスによる新薬開発は困難を極めている。新薬開発を妨げる要因はさまざまあるが、その中のひとつとして、候補化合物の毒性、副作用を理由とした開発中止が挙げられる。実際に、候補化合物の開発中止の理由を調べた研究では、毒性、副作用による開発中止が半数を占めることが報告されている<sup>(17)</sup>。このような背景から、効率的な新薬開発のため、毒性や副作用による開発中止リスクの低い創薬戦略が必要とされている。その戦略の一つとして、既存薬を新たな疾患の治療薬として再開発するドラッグリポジショニング (DR) が注目されている<sup>(18)</sup>。臨床ですでに使用されている既存薬は、上市される際に、基本的な安全性が確認された化合物であり、これを対象とすることで、予期せぬ副作用による開発中止のリスクを抑制することができる。また、既存のデータを利用することで、DR では一部の開発プロセスをスキップすることができ、新薬開発の期間と費用を大幅に削減できる。以上の理由から、DR は効率的な新薬開発の手法とされており、DR に基づいた医薬品研究・開発は年々増加傾向にある。DR による医薬品開発の成功例も多く、代表的な例として、シルデナフィル、サリドマイドが挙げられる (Table 2)<sup>(19)</sup>。PDE5 阻害薬であるシルデナフィルは従来、高血圧の治療薬として開発されたが、その中途において、勃起不全の改善作用が偶然見出された。のちの研究により、シルデナフィルが陰茎海綿体の PDE5 を阻害することで、陰茎海綿体平滑筋を弛緩させ、血流量を増加させることで、勃起を維持するという機序が明らかにされ、現在では、勃起不全の治療薬として用いられている。一方、サリドマイドは鎮静薬として開発された薬剤だが、強力な催奇形性のため、販売が禁止された。しかしながら、その後、副作用発生の機序解明を目的とした薬理研究により、血管新生抑制、サイトカイン産生抑制、アポトーシス誘導などさまざまな作用が見出された。そして、これらの機序をもとにして、厳密な管理のもと、多発性骨髄腫の治療に用いられており、さらにその他のがんに対する有効性も検討されている<sup>(20)</sup>。これまでの DR ではシルデナフィルのような、「偶発的」な発見によるリポジショニングが主であったが、近年では、サリドマイドのように既存薬の作用を薬理的に再解析することで「戦略的」にリポジショニングを試みる手法が主流となりつつある。本研究では、効率的に気道粘液産生抑制薬を開発するため、ドラッグリポジショニングを指向し、MUC5AC 産生抑制作用をもつ既存薬を見出すことを目指した。

Table 2. ドラッグリポジショニングの成功例

薬名	既存の適応	新たな適応	承認年	手法
ジドブジン	がん	HIV/AIDS	1987	化合物ライブラリースクリーニング
ミノキシジル	高血圧	脱毛症	1988	後向き臨床研究
シルデナフィル	狭心症	勃起不全	1998	後向き臨床研究
サリドマイド	つわり	らい性結節性紅斑、 多発性骨髄腫	1998、2006	適応外使用、薬理学的分析
セレコキシブ	鎮痛消炎	家族性大腸腺腫症	2000	薬理学的分析
アトモキシセチン	パーキンソン病	ADHD	2002	薬理学的分析
デュロキシセチン	うつ病	腹圧性尿失禁	2004	薬理学的分析
リツキシマブ	がん	関節リウマチ	2006	後向き臨床研究
ラロキシフェン	骨粗鬆症	乳がん	2007	後向き臨床研究
フィンゴリモド	腎移植拒絶	多発性硬化症	2010	薬理学的分析、構造分析
ダボキシセチン	鎮痛、抗うつ	早漏	2012	薬理学的分析
トピラマート	てんかん	肥満	2012	薬理学的分析
ケトコナゾール	真菌感染症	クッシング症候群	2014	薬理学的分析
アスピリン	鎮痛	大腸がん	2015	後向き臨床研究、薬理学的分析

以上の背景より、本研究ではさまざまな呼吸器疾患に伴う気道粘液の過剰産生を抑制する薬物の創製を目的とした。これを達成するために、ドラッグリポジショニングを指向し、気道粘液主要成分 MUC5AC の産生に対する既存薬の作用を解析した。第 1 章では臨床において喀痰症状に有効であることが示唆されている PDE 阻害薬 ibudilast の MUC5AC 産生に対する作用およびその機序解明、第 2 章では、既存薬ライブラリーを用いた新規 MUC5AC 産生抑制薬の探索を行った。

## 第 1 章

# PDE 阻害薬 *ibudilast* による MUC5AC 産生 抑制作用とその機序解明

## 第1節 背景

ホスホジエステラーゼ (PDE) は細胞内シグナルを伝えるセカンドメッセンジャーの cyclic AMP (cAMP) や cyclic GMP (cGMP) といった環状ヌクレオチドを加水分解する酵素であり、細胞内の環状ヌクレオチド濃度の調節に関与している。環状ヌクレオチドを介したシグナルはさまざまな細胞・生理的反応に関与しており、その寄与は細胞増殖・分化、遺伝子発現、炎症、アポトーシス、代謝経路など多岐にわたる。そのため、環状ヌクレオチドの調節に関わる PDE は多くの疾患の治療標的として注目されている<sup>(21)</sup>。気管支喘息や COPD などの炎症性呼吸器疾患においては、気管支拡張や抗炎症作用を目的として、ibudilast、roflumilast、キササンチン誘導体などの PDE 阻害薬がすでに上市されている。

非選択的ホスホジエステラーゼ阻害薬 ibudilast は気管支喘息治療薬、脳循環改善薬として用いられ、気管支拡張作用、脳血管拡張作用を持つことが知られている。近年では、中枢神経系における抗炎症作用を持つことが明らかになり、多発性硬化症、慢性神経性疼痛などへのドラッグリポジショニングの候補薬として注目されている<sup>(22)</sup>。さらに、ibudilast は慢性気道炎症性患者の喀痰および後鼻漏症状に有効であることが示唆されている<sup>(23)</sup>。本章では、この臨床報告から「ibudilast が気道粘液の主要成分である MUC5AC の産生を抑制する」との仮説を立て、ibudilast の MUC5AC 産生に対する作用を *in vitro*、*in vivo* 実験系により調べた。

## 第2節 実験材料および方法

### 第1項 試薬

研究に際し、使用した主な試薬を以下に示す。

Trypsin (BD Biosciences, NJ, USA). Penicillin-streptomycin (Gibco, MA, USA), fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, Little Chalfont, UK). 1 kb DNA ladder (Invitrogen, CA, USA). Blocking One-P, Nonidet<sup>®</sup> P-40 (NP-40), および N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (以上, ナカライテスク, 京都, 日本). RPMI1640 (日水製薬, 東京, 日本). Dual Luciferase Reporter Assay System, FuGENE<sup>®</sup>HD, および PureYield<sup>™</sup> Plasmid Midiprep System (以上, Promega, CA, USA). QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany). Recombinant human TGF- $\alpha$  (R&D systems, MN, USA). Bovine serum albumin (BSA), dexamethasone, lipopolysaccharide, PMA (以上, Sigma-Aldrich, MO, USA). PrimeScript<sup>™</sup> RT Master Mix, RNAiso Plus, TB Green<sup>®</sup> Premix Ex *Taq*<sup>™</sup> II (以上, タカラバイオ, 滋賀, 日本), ibudilast (東京化成工業, 東京, 日本). Actinomycin D, dimethyl sulfoxide, glutamine, Triton X-100, および U0126 (以上, 富士フィルム和光純薬, 大阪, 日本)

その他の試薬および無機塩類は市販の特級品を使用した。

### 第2項 抗体

本研究に際し、使用した抗体を以下に示す。

Mouse monoclonal anti-mucin 5AC (MUC5AC) (Clone 45M1) (LVC, MA, USA). HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG および HRP-conjugated sheep anti-rabbit IgG (富士フィルム和光純薬). Rabbit polyclonal anti-phospho-p44/p42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Thr204) および rabbit polyclonal anti-p44/p42 MAPK (ERK1/2) (Cell signaling technology, MA, USA).

### 第3項 Primer 配列

Oligonucleotide は、Sigma genosys 社に合成を依頼した。本研究に際し、使用した primer の配列を以下に示す。

Human- <i>GAPDH</i> forward	5'- ACCATCTTCCAGGAGCGAGA-3'
Human- <i>GAPDH</i> reverse	5'- CAGTCTTCTGGGTGGCAGTG-3'
Human- <i>MUC5AC</i> forward	5'-TCCACCATATACCGCCACAGA-3'
Human- <i>MUC5AC</i> reverse	5'-TGGACCGACAGTCACTGTCAAC-3'
Murine- <i>Gapdh</i> forward	5'-ACCATCTTCCAGGAGCGAGA-3'
Murine- <i>Gapdh</i> reverse	5'-CAGTCTTCTGGGTGGCAGTG-3'
Murine- <i>Muc5ac</i> forward	5'-CAGCCGAGAGGAGGGTTTGATCT-3'
Murine- <i>Muc5ac</i> reverse	5'-CAGTCTTCTGGGTGGCAGTG-3'



#### 第4項 細胞培養

培養に用いた器具類は全て、オートクレーブ、あるいは乾熱滅菌による滅菌処理を施し、溶液類の調製には超純水製造装置 (Direct-Q® 5UV, Merck Millipore) により精製した超純水を用いた。また、全ての操作はクリーンベンチ内で無菌的に行った。

##### (1) 細胞株の培養

ヒト肺粘液性類表皮癌 NCI-H292 細胞は、American Type Culture Collection (VA, USA) より入手した。本細胞は  $1.0 \times 10^6$  cells/ml となるように 10% FBS, 100 unit/ml penicillin および 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin を含む RPMI1640 に懸濁し、培養皿またはフラスコに播種 ( $1.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) 後、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下に培養した。

##### (2) 試薬処理

NCI-H292 細胞を  $1.8 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、5 日間の培養により 100%コンフルエントに到達後、無血清培地に置換した。24 時間の無血清培養後、各薬物を含む無血清培地にて、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間の静置培養を行った。

#### 第5項 MUC5AC protein 分泌量の評価

細胞培養上清中に分泌された MUC5AC protein 量は ELISA 法により測定した。NCI-H292 細胞に各試薬を処理後、培養上清を採取し、遠心 (500×g, 4°C, 4 min) 後の上清を実験サンプルとした。回収したサンプルを Nunc-immuno™ Plate に 100  $\mu\text{l/well}$  で添加し、サンプルが乾燥するまで 42°C で静置した。乾燥後、150  $\mu\text{l/well}$  の 0.05 % Tween-20 in PBS (0.05 %-PBS-T) で 3 回洗浄し、2% BSA in PBS を 200  $\mu\text{l/well}$  添加し、室温で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング溶液を除去し、0.05 % PBS-T で 3 回洗浄を行った後、1 次抗体として mouse monoclonal anti-MUC5AC antibody (45M1, 1:200) を 100  $\mu\text{l/well}$  添加し、反応 (4°C, overnight) させた。再度、0.05 % PBS-T で 3 回洗浄を行い、2 次抗体として、HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG antibody (1:10000) を 100  $\mu\text{l/well}$  添加し、反応 (室温, 1 h) させた。さらに、0.05 % PBS-T で 3 回洗浄を行い、3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) による呈色反応 (室温, 30 min, 遮光) の後、100  $\mu\text{l/well}$  の 2 M 硫酸溶液で反応を停止させた。450 nm における吸光度を ARVO™ X4 (Perkin elmer, NJ, USA) で測定した。NCI-H292 細胞に PMA (50 nM) を処理し、24 時間後に得られた培養上清を標準物質として、これを段階希釈し、450 nm における吸光度を測定し、検量線を作製した。この検量線をもとに、各サンプルの吸光度から培養上清中の相対的な MUC5AC protein 量を算出した。

## 第 6 項 Quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR)

培養細胞を PBS で洗浄した後、RNAisoplus (Takara) を加え、total RNA を抽出した。得られた total RNA の収量は UV (260 nm) の吸光度により算出した。なお、total RNA 抽出の際に用いた試薬・器具類は全てオートクレーブを行った。回収した total RNA 0.5 µg を鋳型とし、PrimeScript® RT Master Mix (Takara) を用いて逆転写反応 (1 cycle at 37°C for 15 min, 85°C for 5 sec, 4°C) を行った。得られた逆転写産物を用いて、TB Green Premix Ex Taq™ II を用い、CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-rad) にて Real-time PCR (1 cycle at 95°C for 30 sec, 40 cycle at 95°C for 5 sec, 60°C for 1 min) を行った。内部標準には GAPDH を用い、反応の定量化は、目的 PCR 産物が検出される最初の PCR cycle (threshold cycle (Ct)) を用いた comparative Ct method (以下の式) にて行った。

$$\text{Fold change} = 2^{-[(\text{CT, X-CT, R})_{\text{TEST}} - (\text{CT, X-CT, R})_{\text{CONTROL}}]}$$

CT, X: CT of the interest gene

CT, R: CT of the reference gene (GAPDH)

## 第 7 項 Western blotting

培養細胞を TBS で 2 回洗浄後、120 µl/dish の lysis buffer (150 mM sodium chloride, 50 mM Tris-Hydrochloride, 0.5 % sodium deoxycholate, 5 mM EDTA, 50 mM phenylmethsulfonil fluoride, 1% SDS, 1% NP-40, 1 mM PMSF) を加え、細胞溶解液を回収した。得られた細胞溶解液を遠心 (10,000 × g, 4°C, 15 min) し、その上清 100 µl をサンプルとした。得られたサンプルは bicinchoninate (BCA) 法により、標準物質として BSA を用いて作製した検量線をもとにタンパク濃度を定量した。10 µg のタンパク量となるサンプルを 10 % polyacrylamide gel で SDS-PAGE を行った後、PVDF 膜に転写した。転写した PVDF 膜は 5 % skim milk/0.1% Tween-20 in TBS でブロッキング (室温, 1 h) した。その後、rabbit polyclonal anti-phospho-p44/p42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Thr204)、 rabbit polyclonal anti-p44/p42 MAPK (ERK1/2) (1:1000) を用いて 1 次抗体反応 (4°C, overnight) を行った。さらに、0.1 % Tween-20 in TBS (0.1 % TBS-T) で 3 回洗浄した後、Peroxidase HRP-conjugated sheep anti-rabbit IgG (1:20000) を用いて 2 次抗体反応 (室温, 1 h) を行った。2 次抗体反応後に 0.1 % TBS-T で 3 回洗浄した後、SuperSignal® West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher, MA, USA) により PVDF 膜上の免疫複合体を検出した。また、検出には ChemiDoc™ MP システム (Bio-rad) を用いた。

## 第 8 項 遺伝子導入および luciferase assay

MUC5AC promoter (-3752/+68) in pGL3 は、Dr. Carol B. Basbaum より譲受したものをを用いた<sup>(24)</sup>。

### (1) 遺伝子導入

24-well plate に NCI-H292 細胞を  $1.8 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、48 時間の培養後、FuGENE HD を用いて、以下のプロトコールに従って遺伝子導入を行った。プラスミド DNA と FuGENE HD、導入効率補正用の pGL 4.74 [hRluc/TK] vector (Promega) を 1 well あたり 0.5  $\mu$ g: 1.5  $\mu$ l: 5 ng の割合で Opti-MEM (Invitrogen) 中にて混合した。混合液を 15 分間室温にて静置した後、培養液中へ 25  $\mu$ l/well で添加し、6 時間培養した後、実験に用いた。

### (2) Luciferase 活性の測定

遺伝子導入した細胞を無血清培地にて 6 時間培養した後、各薬物を含む無血清培地で 24 時間培養を行った。その後、100  $\mu$ l/well の Passive Lysis Buffer (Promega) を加え、室温にて 15 分間振盪し、細胞を溶解させた。得られた細胞溶解液を回収し、遠心 (10,000 $\times$ g, 4°C, 15 min) し、上清 80  $\mu$ l をサンプルとした。サンプル中に含まれるタンパク質量は Bradford 法により測定した。また、サンプル 20  $\mu$ l の firefly および renilla luciferase 活性を Dual-Luciferase Assay System (Promega) とルミノメーター(Lumat LB9507, EG&G)を用いて測定した。得られた firefly luciferase 活性を renilla luciferase 活性またはタンパク質量によって補正を行い、各サンプルの relative luciferase activity を算出した。

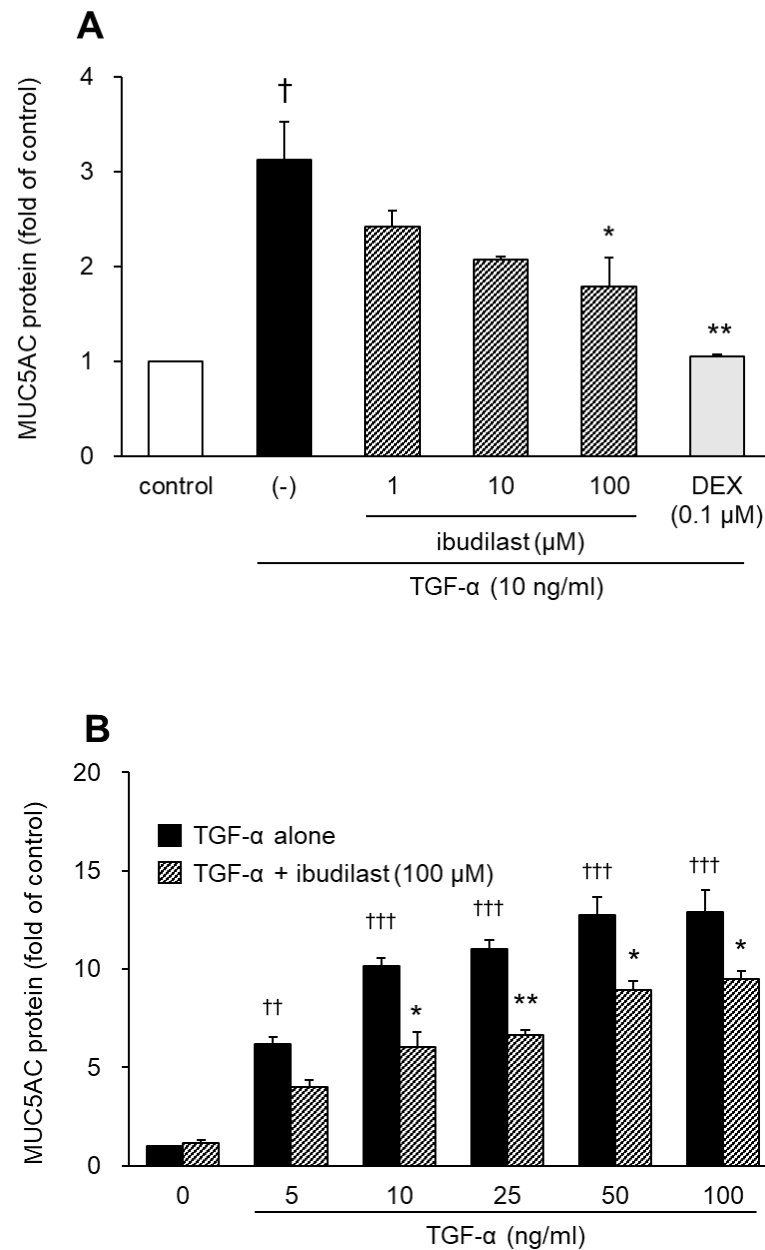
## 第 9 項 統計処理

実験データは全て平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。本研究の多群間の比較における有意差検定にはソフトウェア GraphPad Prism (MDF) を用い、One-way ANOVA を行い、Student-Newman-Keuls 試験により 5%未満の危険率を持って有意とみなした。

### 第3節 実験成績

#### 第1項 PDE 阻害薬 ibudilast の MUC5AC 産生に対する作用

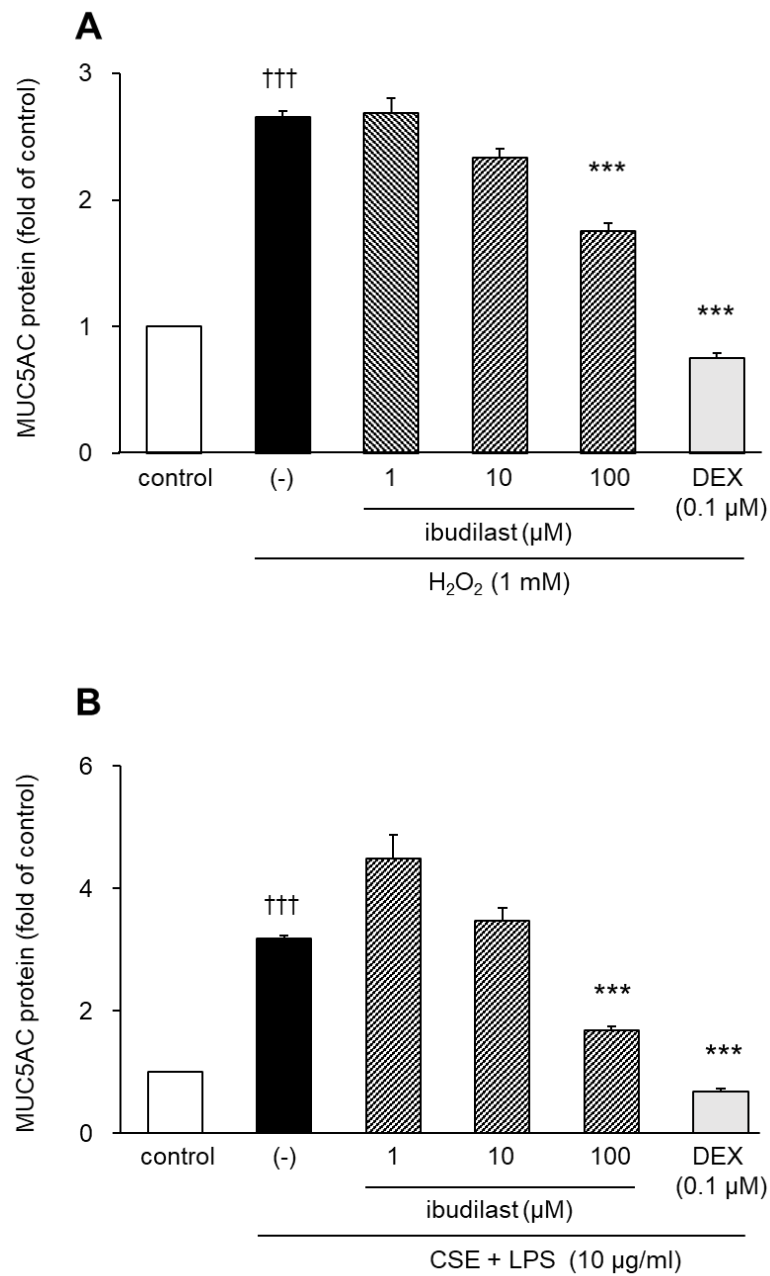
まず、ibudilast の *in vitro* における MUC5AC 産生に対する作用を調べた。実験標本には粘液産生能をもつヒト肺粘液性類表皮癌細胞株 NCI-H292 を用いた。また、MUC5AC 産生の誘発には EGFR リガンドである TGF- $\alpha$  を用い、刺激後 24 時間の培養上清に分泌された MUC5AC 量を ELISA 法によって測定した。NCI-H292 細胞を TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) で刺激することにより、MUC5AC 産生はコントロール群の 3.1 倍まで亢進した。さらに、この亢進は陽性対照薬のステロイド薬 dexamethasone (DEX, 0.1  $\mu$ M) の共処理により、コントロールレベルまで抑制された。一方で、ibudilast (1—100  $\mu$ M) を共処理した群では、濃度依存的に MUC5AC 産生の亢進が抑制され、100  $\mu$ M において有意な抑制作用を示した (Fig.2A)。また、MUC5AC 産生は TGF- $\alpha$  の濃度依存的 (5—100 ng/ml) に亢進し、50 ng/ml において最大となった (Fig.2B)。いずれの TGF- $\alpha$  濃度による MUC5AC 産生亢進も ibudilast (100  $\mu$ M) の共処理により抑制され、最大反応がみられた TGF- $\alpha$  (50, 100 ng/ml) においても有意な抑制作用がみられた。



**Fig. 2. Ibudilast suppressed TGF- $\alpha$ -induced MUC5AC production in dose-dependent manner.**

(A) NCI-H292 cells were co-treated with TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) and indicated dose of ibudilast or dexamethasone (DEX, 0.1  $\mu$ M) for 24 h. (B) NCI-H292 cells were co-treated with TGF- $\alpha$  (5, 10, 25, 50, or 100 ng/ml) and ibudilast (100  $\mu$ M) for 24 h. Secreted MUC5AC protein in the culture media were measured by ELISA. Results represent the mean $\pm$ S.E.M. (n=3; \* $P$  < 0.05, \*\*  $P$  < 0.01 vs treated with indicated concentration of TGF- $\alpha$  alone, <sup>†</sup>  $P$  < 0.05, <sup>††</sup>  $P$  < 0.01, <sup>†††</sup>  $P$  < 0.001 vs control).

次に、他の刺激により誘発した MUC5AC 産生に対する ibudilast の作用を調べた。NCI-H292 細胞を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) またはタバコ煙抽出物 (CSE) と LPS (10 µg/ml) の混合物により刺激し、MUC5AC 産生を誘発した。MUC5AC 産生は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) 刺激によりコントロール群の 2.7 倍、CSE と LPS (10 µg/ml) 刺激では 3.1 倍まで亢進し、これらの亢進は DEX (0.1 µM) の共処理により抑制された。一方で ibudilast (1—100 µM) を共処理した群では、どちらの刺激による MUC5AC 産生の亢進も濃度依存的に抑制された (Fig. 3A,B)。これらの結果から ibudilast が *in vitro* においてさまざまな刺激による MUC5AC 産生の亢進を抑制することが明らかとなった。



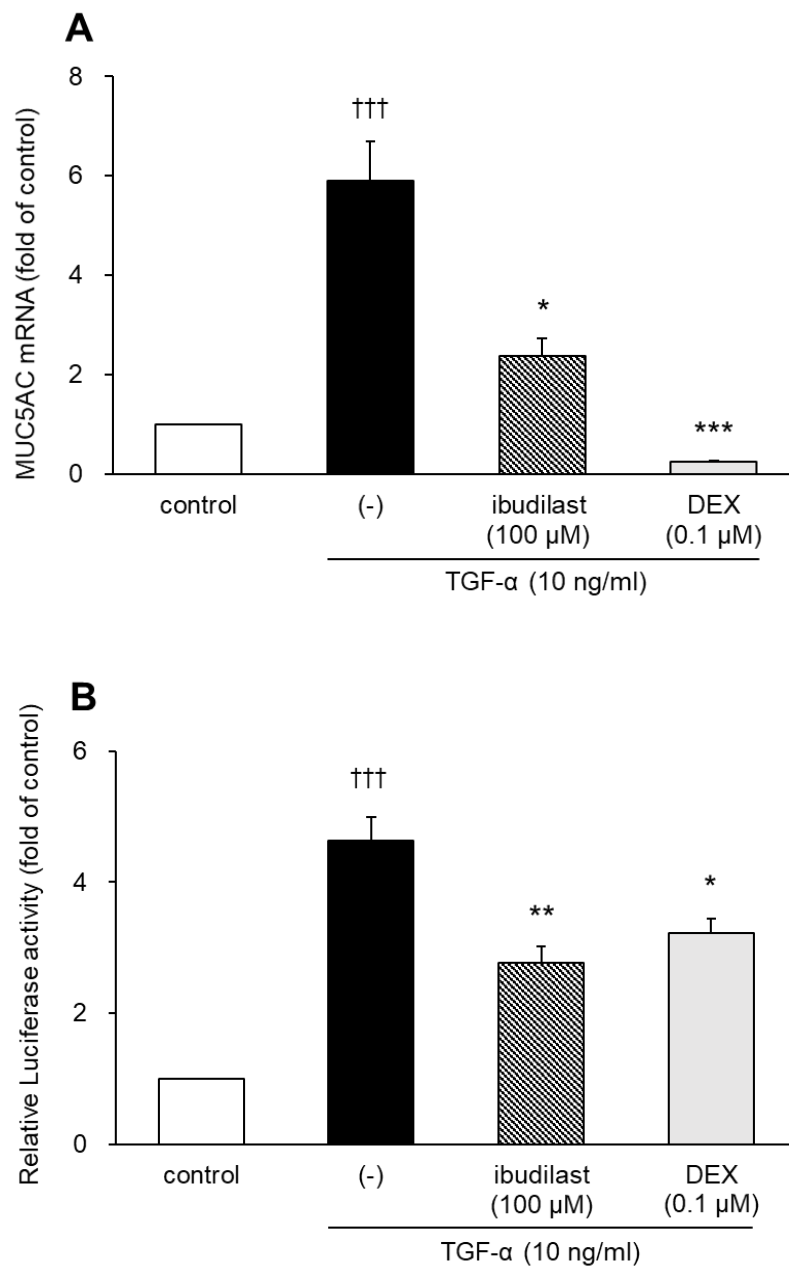
**Fig. 3. Ibudilast suppressed MUC5AC production induced by various stimuli.**

NCI-H292 cells were co-treated with (A) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) or (B) Cigarette Smoke Extract (CSE) + LPS (10 µg/ml) and ibudilast (100 µM) or dexamethasone (0.1 µM) for 24 h. Secreted MUC5AC protein in the culture media were measured by ELISA. Results represent the mean±S.E.M. (n=3; \*\*\*  $P < 0.001$ , vs treated with each stimulus alone, †††  $P < 0.001$  vs control).

## 第2項 IbudilastによるMUC5AC産生抑制作用の機序解明

IbudilastによるMUC5AC産生抑制作用の機序を解明するため、MUC5AC mRNA発現に対する作用を調べた。12時間のTGF- $\alpha$  (10 ng/ml) 刺激によりMUC5AC mRNA発現はコントロール群の5.9倍まで亢進し、この亢進はDEX (0.1  $\mu$ M)により完全に抑制された。一方でibudilast (100  $\mu$ M)を共処理した群においても、TGF- $\alpha$ によるMUC5AC mRNA発現の亢進は有意に抑制された (Fig. 4A)。さらに、MUC5AC promoter領域 (-3752/+68)を含むレポータープラスミドを用いたluciferase assayにより、MUC5AC遺伝子の転写に対するibudilastの作用を調べた。TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) 刺激により、MUC5AC遺伝子の転写活性はコントロール群の4.6倍まで亢進し、これはDEX (0.1  $\mu$ M)により抑制された。一方で、ibudilast (100  $\mu$ M)を共処理した群においても、転写活性の亢進が有意に抑制された (Fig. 4B)。これらの結果から、ibudilastがTGF- $\alpha$ によるMUC5AC mRNA発現の亢進を抑制することが明らかになり、その機序がMUC5AC遺伝子の転写抑制であることが示唆された。





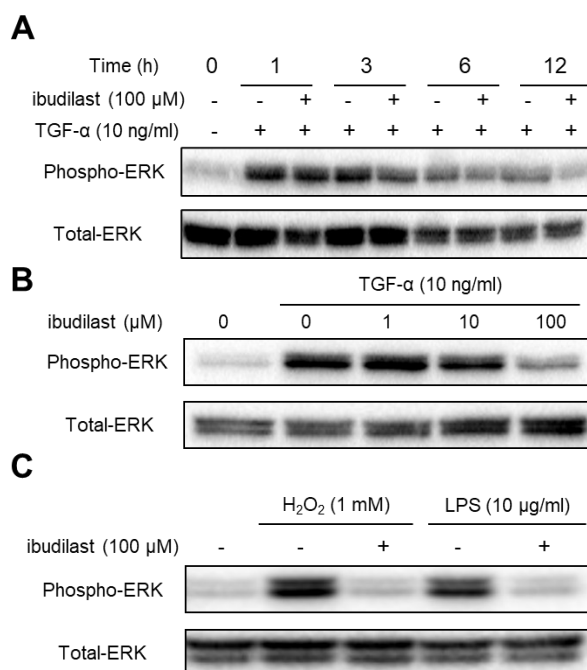
**Fig. 4. Ibudilast repressed TGF- $\alpha$ -induced *MUC5AC* gene transcription.**

(A) NCI-H292 cells were co-treated with TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) and ibudilast (100  $\mu$ M) or dexamethasone (0.1  $\mu$ M) for 12 h. MUC5AC mRNA were measured by qRT-PCR and normalized to *GAPDH*. (B) NCI-H292 cells were transfected with luciferase reporter plasmid containing human MUC5AC promoter (-3752/+68). Transfected cells were co-treated with TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) and ibudilast (100  $\mu$ M) or dexamethasone (0.1  $\mu$ M) for 12 h. Cell lysates were collected and luciferase activity was measured. Results represent the mean $\pm$ S.E.M. (n=3; \* $P$  < 0.05, \*\*  $P$  < 0.01, \*\*\*  $P$  < 0.001, vs group treated with TGF- $\alpha$  alone, †††  $P$  < 0.001 vs control).

Ibudilast に MUC5AC 遺伝子の転写抑制作用がみられたことから、転写の上流である細胞内シグナル分子の活性化に対する作用を調べた。EGFR の下流ではさまざまなシグナル分子が活性化されるが、MUC5AC の発現には ERK1/2 の活性化が重要な役割を果たすことが報告されている<sup>(25-28)</sup>。このことから、ibudilast の ERK1/2 リン酸化に対する作用を調べた。NCI-H292 細胞を TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) により刺激すると、ERK1/2 のリン酸化は刺激後 1 時間をピークに亢進し、刺激後 12 時間までリン酸化の亢進が維持された。一方、ibudilast (100  $\mu$ M) を共処理した群では、刺激後 1、3 時間の ERK1/2 リン酸化に影響は見られなかったが、刺激後 6 時間以降において、ERK1/2 のリン酸化が阻害された (Fig. 5A)。さらに TGF- $\alpha$  刺激後 12 時間では、ibudilast (1—100  $\mu$ M) の共処理により、ERK1/2 のリン酸化が濃度依存的に阻害された (Fig. 5B)。加えて、ibudilast (100  $\mu$ M) は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) または LPS (10  $\mu$ g/ml) どちらの刺激による ERK1/2 リン酸化も阻害した (Fig. 5C)。これらのことから、ibudilast はさまざまな刺激による ERK1/2 のリン酸化を阻害することが明らかになった。

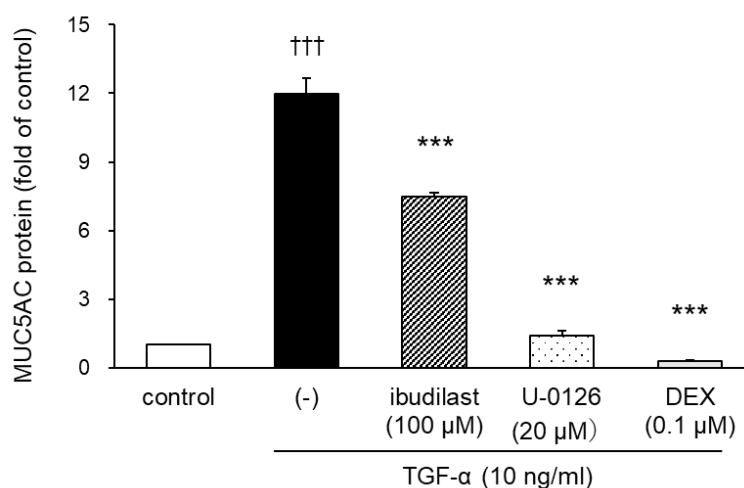
さらに、ERK1/2 リン酸化阻害の MUC5AC 産生に対する寄与を調べるため、MEK-ERK 阻害薬 U0126 の MUC5AC 産生に対する作用を調べた。その結果、抑制作用の強さは異なるものの、ibudilast (100  $\mu$ M) と同じく、U0126 (20  $\mu$ M) は TGF- $\alpha$  による MUC5AC 産生の亢進を有意に抑制した (Fig. 6)。

以上より、ibudilast の MUC5AC 産生抑制作用は、MUC5AC mRNA 発現の抑制を介しており、その機序には MUC5AC 遺伝子の転写抑制および ERK1/2 リン酸化の阻害が一部関与することが示唆された。



**Fig. 5. Ibudilast inhibited ERK1/2 phosphorylation induced by various stimuli.**

(A) NCI-H292 cells were co-treated with TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) and ibudilast (100  $\mu$ M) for indicated time. (B) NCI-H292 cells were co-treated with TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) and ibudilast (1-100  $\mu$ M) for 12 h. (C) NCI-H292 cells were co-treated with ibudilast (100  $\mu$ M) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) or LPS (10  $\mu$ g/ml) for 12 h. Phosphorylated-ERK1/2 and total-ERK1/2 in cell lysate were analyzed by western-blotting.

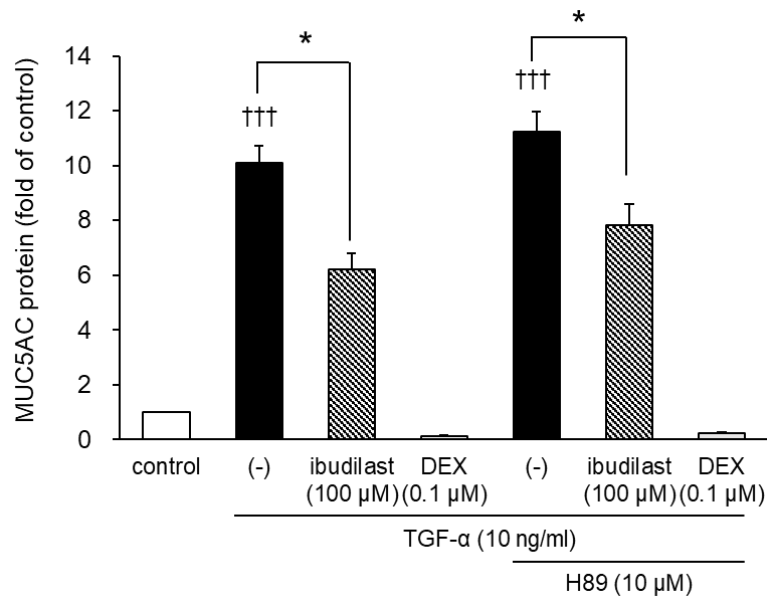


**Fig. 6. U0126, a MEK-ERK inhibitor, suppressed TGF- $\alpha$ -induced MUC5AC production**

NCI-H292 cells were co-treated with TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) and ibudilast (100  $\mu$ M) or MEK-ERK inhibitor U0126 (20  $\mu$ M) for 24 h. Secreted MUC5AC protein in the culture media were measured by ELISA. Results represent the mean $\pm$ S.E.M. (n=3; \*\*\*  $P < 0.001$ , vs treated with TGF- $\alpha$  alone, †††  $P < 0.001$  vs control).

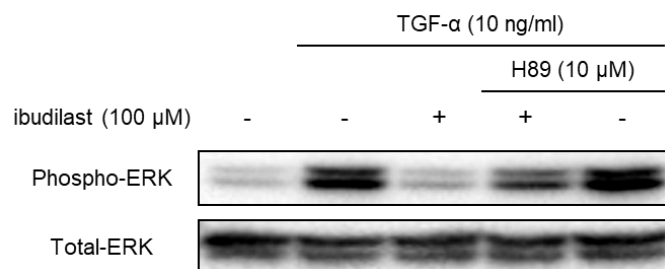
### 第3項 Ibudilast の MUC5AC 産生抑制および ERK1/2 リン酸化阻害作用に対する cAMP-PKA 経路の寄与

先行研究において、ibudilast と同じ PDE 阻害薬が、細胞内 cAMP の増加とそれに伴う PKA の活性化により MUC5AC 産生を抑制することが報告されている<sup>(29, 30)</sup>。本項では、ibudilast の MUC5AC 産生抑制作用、ERK1/2 リン酸化阻害作用に対する cAMP-PKA 経路の寄与を調べた。その結果、PKA 阻害薬 H89 (10  $\mu$ M) 存在下でも ibudilast (100  $\mu$ M) は TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) による MUC5AC 産生の亢進を抑制した (Fig. 7)。また、ERK1/2 リン酸化阻害作用に関しても同様であり、H89 (10  $\mu$ M) 存在でも ibudilast (100  $\mu$ M) は ERK1/2 リン酸化を阻害した (Fig. 8)。



**Fig. 7. Ibudilast suppressed TGF- $\alpha$ -induced MUC5AC production in the presence of H89**

NCI-H292 cells were pre-treated with H89 (10  $\mu$ M) for 1 h. Then, cells were co-treated with TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) and ibudilast (100  $\mu$ M) or dexamethasone (DEX, 0.1  $\mu$ M) for 24 h. Secreted MUC5AC protein in the culture media were measured by ELISA. Results represent the mean $\pm$ S.E.M. (n=3; \* $P$  < 0.05, vs group co-treated with TGF- $\alpha$  and H89, †††  $P$  < 0.001 vs control).

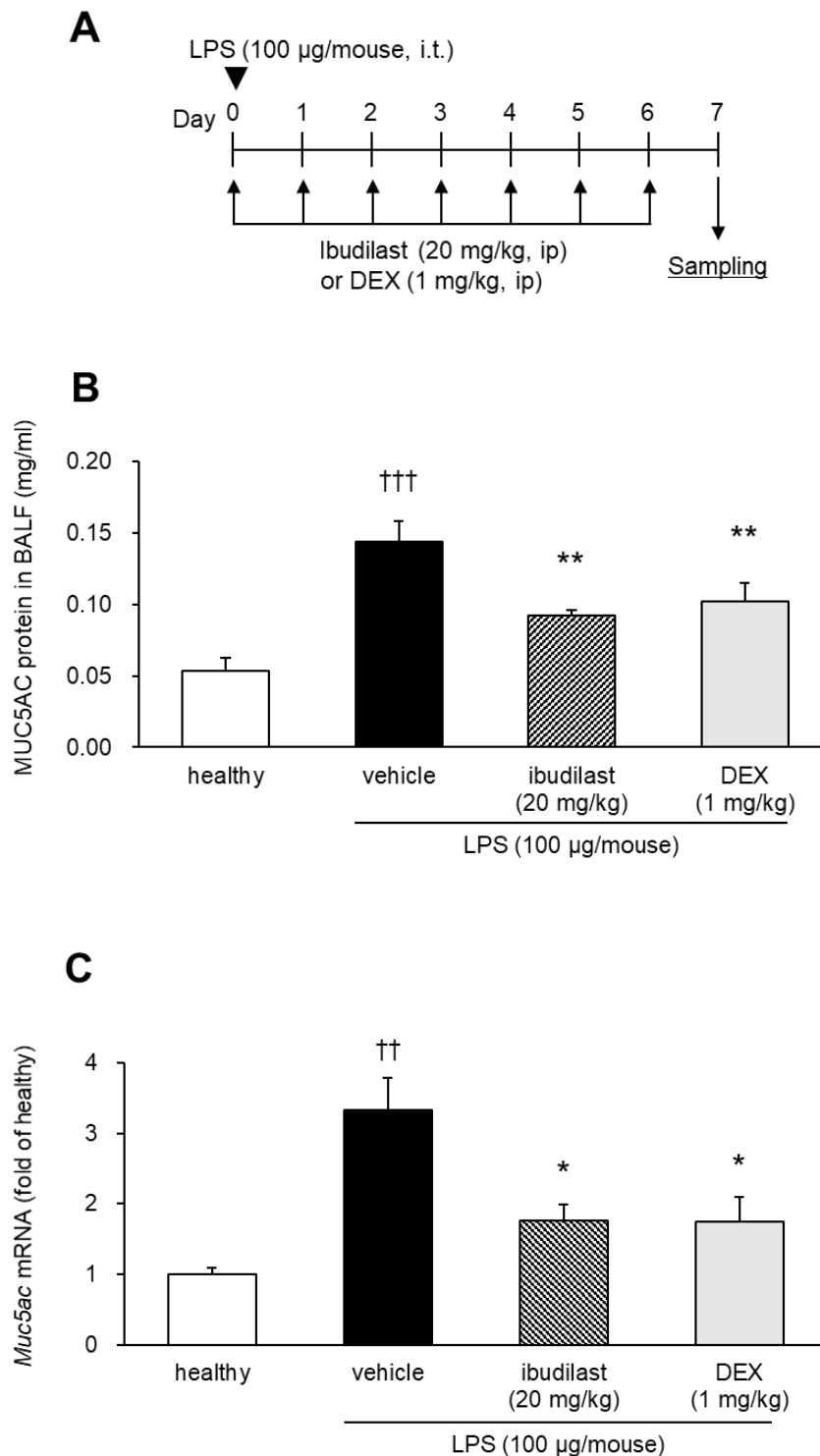


**Fig. 8. Ibudilast suppressed TGF- $\alpha$ -induced ERK1/2 phosphorylation in the presence of H89**

NCI-H292 cells were pre-treated with H89 (10  $\mu$ M) for 1 h. Then, cells were co-treated with TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) and ibudilast (100  $\mu$ M) for 12 h. Phosphorylated-ERK1/2 and total-ERK1/2 in cell lysate were analyzed by western-blotting.

#### 第4項 LPS 投与モデルマウスにおける MUC5AC 産生に対する ibudilast の作用

本項では ibudilast の *in vivo* における MUC5AC 産生に対する作用を調べた。8 週齢の雄性 ICR マウスに LPS (100  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) を気管内投与し、7 日後に気管支肺胞洗浄液 (BALF) および肺組織を回収した。また、ibudilast (20 mg/kg) および dexamethasone (1 mg/kg) は腹腔内に投与した (Fig. 9A)。Healthy 群と比較して、LPS 投与群では BALF 中の MUC5AC 量の増加がみられ、過去の報告と一致して、この増加は DEX 投与により抑制された<sup>(31)</sup>。一方、ibudilast 投与群でも MUC5AC 量の減少がみられ、DEX 投与群と同程度の値を示した。(Fig. 9B)。また、肺組織中の *Muc5ac* mRNA 発現に関しては、healthy 群と比較して LPS 投与群で 3.3 倍の亢進がみられ、この増加は DEX 投与により抑制された。一方で、ibudilast 投与群でも、DEX 投与群と同程度まで *Muc5ac* mRNA 発現が抑制された (Fig. 9C)。これらの結果より、ibudilast は *in vivo* においても MUC5AC 産生および *Muc5ac* mRNA 発現抑制作用をもつことが明らかになった。



**Fig. 9. Ibudilast suppressed MUC5AC mRNA and protein expression in LPS-treated mice.**

(A) Schematic diagram of experimental protocol. (B) MUC5AC protein in BALF were measured by ELISA. (C) The expression level of *Muc5ac* mRNA in lung were measured by qRT-PCR and normalized to *Gapdh*. Results represent the mean±S.E.M. (n=8-13; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , vs vehicle administered group, ††  $P < 0.05$ , †††  $P < 0.001$  vs healthy).

## 第4節 考察および小括

### 第1項 考察

#### 1. IbudilastによるMUC5AC産生抑制作用の機序に関して

まず、ibudilastのMUC5AC産生抑制作用の特徴として、TGF- $\alpha$ によるMUC5AC産生亢進の最大反応を抑制し、その一方でTGF- $\alpha$ の有効濃度には影響を与えないという点が挙げられる。TGF- $\alpha$ によるMUC5AC産生は50, 100 ng/mlで同程度の亢進を示しており、最大反応を示している。ここにibudilastを共処理すると、これらの最大反応は抑制された (Fig. 2B)。また、今回の実験において、最も低濃度であるTGF- $\alpha$  (5 ng/ml) の条件では、ibudilastを共処理した群でもMUC5AC産生亢進がみられており、ibudilastはTGF- $\alpha$ の有効濃度範囲には影響しないものと考えられた。これらの特徴から、ibudilastは非競合的な機序によりMUC5AC産生を抑制していると考えられ、TGF- $\alpha$ とEGFRの結合を競合的に阻害するような作用を持たないことが示唆された。

さらに、ibudilastがEGFRリガンド以外の刺激によるMUC5AC産生も抑制する (Fig. 3A,B) 点も特徴的である。このことからibudilastの作用点はEGFRではなく、各刺激に共通して活性化する分子だと考えられる。今回用いたTGF- $\alpha$ 、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、LPS、CSEほどの刺激も共通してERK1/2を活性化することが報告されている<sup>(32,33)</sup>。IbudilastはMUC5AC産生抑制作用を示す100  $\mu$ Mにおいて、いずれの刺激によるERK1/2リン酸化に対しても阻害作用を示した (Fig. 5B,C)。これに加えて、MEK-ERK阻害薬U0126がTGF- $\alpha$ によるMUC5AC産生亢進を抑制した (Fig. 6)。これらのことから、ibudilastのMUC5AC産生抑制作用の一部は、ERK1/2リン酸化阻害を介したものであると考えられる。また、ibudilastによるERK1/2リン酸化阻害作用は、処理後6時間以降でみられており (Fig. 5A)、作用の発現までに時間を要することがわかる。このことから、ibudilastの作用機序は、U0126のようなERK1/2上流のシグナル分子の活性を直接阻害するものではないと考えられ、MKP-1などの脱リン酸化酵素発現を誘導する機序が示唆されているだろう。

また、ibudilastはTGF- $\alpha$ によるMUC5AC mRNA発現の亢進を抑制し (Fig. 4A)、*in vivo*においてもLPS投与により亢進したMUC5AC mRNA発現を抑制した (Fig. 9C)。これらの作用はMUC5AC遺伝子の転写抑制を介したもの (Fig. 4B) であると考えられる。ERK1/2の下流では、Sp1、AP-1、NF- $\kappa$ Bなどの転写因子が活性化し、MUC5AC遺伝子の転写に関わることが報告されている<sup>(27,28,34-36)</sup>。IbudilastがERK1/2リン酸化の阻害を介して、転写因子の活性化を抑制している可能性が考えられるが、詳細に関してはさらなる検討が必要である。



以上より、ibudilast の MUC5AC 産生抑制作用の機序は、ERK1/2 リン酸化の阻害と、それに続く MUC5AC 遺伝子の転写抑制を介したものであると考えられる。また、これまでも、ERK1/2 リン酸化阻害作用を示す化合物が MUC5AC 産生を抑制することが報告されており<sup>(30, 37-41)</sup>、本研究も合わせて考えると、MUC5AC 産生制御の標的として EGFR と ERK1/2 の重要性が改めて示唆されているだろう。その一方で、EGFR、ERK1/2 は細胞の生存・増殖に関与していることから抗がん剤の標的ともなっており、これらの分子を標的とした薬剤には抗がん剤と同様の副作用を生じることが想定される。一方で、ibudilast は ERK1/2 リン酸化阻害作用を示すものの、著明な細胞毒性はみられず、臨床での使用においても抗がん剤様の副作用を示す報告はない。そのため、ibudilast による ERK1/2 リン酸化抑制の機序解明を通じて、標的分子を同定することができれば、副作用の少ない気道粘液産生抑制薬の標的として提唱することができるかもしれない。

## 2. 先行研究との比較

先行研究において ibudilast と同様の PDE 阻害薬が MUC5AC 産生抑制作用を持つことが報告されている。M Mata らは PDE4 阻害薬 rofulmilast が A549 細胞において、EGF による MUC5AC 産生を抑制することを報告している<sup>(29)</sup>。また、Jiyun Lee らは PDE4 阻害薬 rolipram が中耳上皮細胞 HMEEC 細胞において、肺炎レンサ球菌による MUC5AC 産生を抑制することを報告している<sup>(30)</sup>。これらの報告では、用いている細胞や刺激種は異なるものの、いずれも PDE 阻害により増加する cAMP 下流の PKA 依存的に MUC5AC 産生が抑制されている。一方で ibudilast の MUC5AC 産生抑制作用は PKA 阻害薬 H89 の存在下でも消失しなかった (Fig. 7)。また、ERK1/2 リン酸化阻害作用に関しても、H89 存在下でも完全には消失しなかった (Fig. 8)。これらのことから、ibudilast の作用は先行研究とは異なり、PKA 非依存的なものであると考えられた。

また、ibudilast は非選択的な PDE 阻害薬であり、さまざまなサブタイプの PDE を阻害することが報告されている (Table.3)<sup>(42)</sup>。Ibudilast の MUC5AC 産生抑制作用は 1,10  $\mu\text{M}$  ではみられず、100  $\mu\text{M}$  でみられている。100  $\mu\text{M}$  において ibudilast は cAMP 特異的な PDE だけでなく、cGMP 分解に寄与する、PDE1A3、PDE5A2、PDE9A2、PDE10A1、PDE11A1 といった PDE サブタイプに対しても阻害作用を示す。このことから、ibudilast の作用に PDE 阻害による cGMP の増加が関与する可能性が考えられる。さらに、cGMP 分解に寄与する PDE5,6 特異的阻害薬 sildenafil が粘液産生を抑制することも報告されており、ibudilast の作用に対する cGMP の寄与に関してはさらなる検討が必要だと考えられる<sup>(43)</sup>。

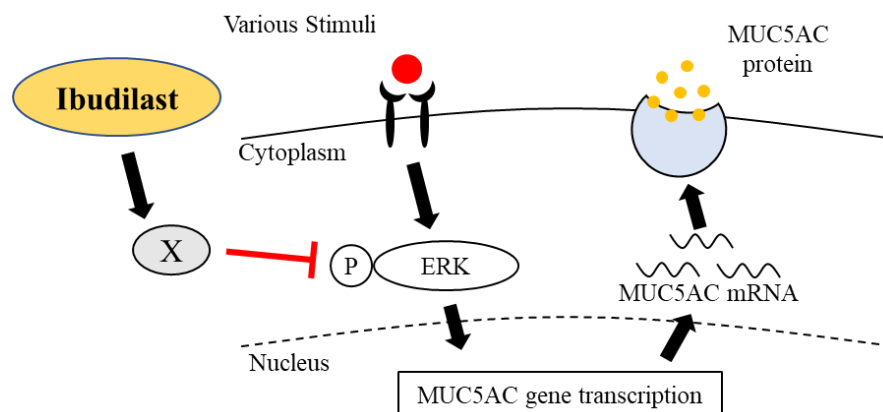
Table 3. ヒト PDE に対する ibudilast の阻害作用

PDE サブタイプ	基質	Ibudilast Ki ( $\mu\text{M}$ )
PDE1A3	cAMP	39.2 $\pm$ 4.6
PDE1A3	cGMP	<b>93.5<math>\pm</math>5.3</b>
PDE2A3	cAMP	92.8 $\pm$ 5.4
PDE3A	cAMP	9.5 $\pm$ 0.63
PDE3B	cAMP	77.6 $\pm$ 9.9
PDE4A4	cAMP	4.1 $\pm$ 0.19
PDE4B2	cAMP	3.3 $\pm$ 0.44
PDE4C2	cAMP	6.3 $\pm$ 0.94
PDE4D3	cAMP	3.7 $\pm$ 0.27
PDE5A2	cGMP	<b>51.6<math>\pm</math>1.8</b>
PDE7A2	cAMP	57.8 $\pm$ 11
PDE8A1	cAMP	49.7 $\pm$ 5.8
PDE9A2	cGMP	>400
PDE10A1	cAMP	2.22 $\pm$ 0.28
PDE10A1	cGMP	<b>1.27<math>\pm</math>0.2</b>
PDE11A1	cAMP	8.9 $\pm$ 1.56
PDE11A1	cGMP	<b>43.1<math>\pm</math>6.2</b>

PDE 阻害薬および $\beta_2$  刺激薬はどちらも細胞内 cAMP を増加させる薬物であるが、MUC5AC 産生に対する寄与については、抑制的・促進的に働くという相反する報告がされている。先述したように、PDE 阻害薬は MUC5AC 産生を抑制するとの報告がある。一方で、 $\beta_2$  受容体を介した刺激は MUC5AC 産生亢進や杯細胞の過形成を引き起こすことが報告されている<sup>(44, 45)</sup>。 $\beta_2$  受容体はアデニル酸シクラーゼの活性化を介して細胞内 cAMP の増加に加えて、 $\beta$  アレスチンと相互作用することで ERK など様々なシグナルを活性化させることが報告されている。また、気管支喘息モデルマウスにおいて  $\beta$  アレスチンを欠損すると粘液産生が低下することが報告されている<sup>(44)</sup>。そのため、 $\beta_2$  刺激薬にみられる粘液産生亢進作用は、細胞内 cAMP の増加ではなく、 $\beta$  アレスチンを介したものであることが示唆されており、両薬物に関する報告は矛盾するものではないと考えられる。 $\beta_2$  刺激薬は気管支拡張作用をもち、気管支喘息の治療に重要な役割を果たしているが、気道粘液産生の制御という観点から考えると、PDE 阻害薬がより適しているだろう。

## 第2項 小括

本章の結果より、PDE 阻害薬 *ibudilast* が *in vitro*, *in vivo* のどちらにおいても MUC5AC 産生を抑制することが明らかとなった。また、その中心的な作用機序は ERK1/2 リン酸化の阻害と MUC5AC 遺伝子の転写抑制であると考えられた (Fig. 10)。一方で、*ibudilast* の ERK1/2 リン酸化阻害作用の機序や、cAMP-PKA 経路への依存性に関しては、さらなる検討が必要である。しかしながら、本研究の成績に加えて、気道炎症患者の喀痰症状に有効であるとの臨床報告も合わせて考えると、*ibudilast* を気道粘液産生抑制薬としてドラッグリポジショニングできる可能性は十分にあるだろう。



**Fig. 10. Mechanism of the inhibitory effect of *ibudilast* on MUC5AC production**

## 第 2 章

# 既存薬ライブラリーを用いた 新規 MUC5AC 産生抑制薬の探索

## 第1節 背景

気道粘液の主成分である MUC5AC は、炎症性呼吸器疾患において、杯細胞の過形成とともにその発現が増加する。MUC5AC は気道粘液の粘性を増加させる性質に加えて、呼吸器疾患の病態への関与が示唆されており、炎症性呼吸器疾患の治療において、MUC5AC 産生を制御することが重要である。MUC5AC 産生を抑制する薬に関しては、糖質コルチコイド薬である dexamethasone が MUC5AC 遺伝子の転写抑制により、MUC5AC 産生を抑制することが報告されている<sup>(46)</sup>。その一方で、IL-13 による MUC5AC 産生は dexamethasone により抑制されないことが報告されており、ステロイド薬が粘液産生に対して有効でない場合の存在が示唆されている<sup>(46,47)</sup>。さらに、気管支喘息や COPD の患者の中にはステロイドが著効しない抵抗性の患者が一定数存在しており、呼吸器疾患における MUC5AC 産生の制御はステロイド薬だけでは不十分であると考えられる。

これまでの研究により、MUC5AC 産生が炎症性サイトカイン、増殖因子、微粒子などさまざまな刺激により亢進することが報告されている。中でも、増殖因子とその受容体である EGFR は MUC5AC 発現に中心的な役割を果たしており、MUC5AC 産生制御の重要な標的と考えられている。

以上の背景から、本章では EGFR リガンド TGF- $\alpha$  刺激による MUC5AC 産生を指標としたスクリーニング系を用いて、既存薬ライブラリーから新規 MUC5AC 産生抑制薬、特にステロイド薬以外の薬物を見つけ出し、気道粘液産生抑制薬へのリポジショニング候補化合物として提唱することを目的とした。

## 第2節 実験材料および方法

### 第1項 試薬

研究に際し、使用した主な試薬を以下に示す。

Desacetyl bisacodyl (Cayman Chemical, MI, USA). Trypsin (BD Biosciences, NJ, USA). Penicillin-streptomycin (Gibco, MA, USA). Fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, Little Chalfont, UK). MTX—LDH (極東製薬, 東京, 日本). Nonidet® P-40 (NP-40), N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (以上, ナカライテスク, 京都, 日本). RPMI1640 (日水製薬, 東京, 日本). Recombinant human TGF- $\alpha$  (R&D systems, MN, USA), bovine serum albumin (BSA), dexamethasone (以上, Sigma-Aldrich, MO, USA). PrimeScript™ RT Master Mix, RNAiso Plus, TB Green Premix Ex *Taq*™ II, (以上, タカラバイオ, 滋賀, 日本). Bisacodyl, sodium picosulfate (以上, 東京化成工業, 東京, 日本). Actinomycin D, dimethyl sulfoxide, glutamine, triton X-100 (以上, 富士フィルム和光純薬, 大阪, 日本)

### 第2項 抗体

本研究に際し、使用した抗体を以下に示す。

Mouse monoclonal anti-mucin 5AC (MUC5AC) (Clone 45M1) (LVC, MA, USA), HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG, HRP-conjugated sheep anti-rabbit IgG (富士フィルム和光純薬), rabbit polyclonal anti-phospho-p44/p42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Thr204), rabbit polyclonal anti-p44/p42 MAPK (ERK1/2), rabbit monoclonal anti-Akt (pan), rabbit monoclonal anti-phospho-Akt (Ser473), rabbit monoclonal anti-p38 MAPK, rabbit polyclonal anti-phospho-p38 (Thr180/Tyr182), (Cell signaling technology, MA, USA)

### 第3項 Primer 配列

qRT-PCR に用いた primer は、Sigma genosys 社に合成を依頼した。本研究に際し、使用した primer の配列を以下に示す。

Human-*GAPDH* forward 5'- ACCATCTTCCAGGAGCGAGA-3'

Human-*GAPDH* reverse 5'- CAGTCTTCTGGGTGGCAGTG-3'

Human-*MUC5AC* forward 5'-TCCACCATATACCGCCACAGA-3'

Human-*MUC5AC* reverse 5'-TGGACCGACAGTCACTGTCAAC-3'

### 第4項 細胞培養

培養に用いた器具類は全て、オートクレーブ、あるいは乾熱滅菌による滅菌処理を施し、溶液類の調製には超純水製造装置 (Direct-Q® 5UV, Merck Millipore) により精製した超純水を用いた。また、全ての操作は、クリーンベンチ内で無菌的に行った。

#### (1) 細胞株の培養

ヒト肺粘液性類表皮癌 NCI-H292 細胞は、American Type Culture Collection (VA, USA) より入手した。本細胞は  $1.0 \times 10^6$  cells/ml となるように 10% FBS、100 unit/ml penicillin および 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin を含む RPMI1640 に懸濁し、培養皿またはフラスコに播種 ( $1.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) 後、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下に培養した。

#### (2) 試薬処理

NCI-H292 細胞を  $1.8 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、5 日間の培養により 100%コンフルエントに到達後、無血清培地に置換した。24 時間の無血清培養後、各薬物を含む無血清培地にて、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で静置培養を行った。

## 第5項 MUC5AC protein 分泌量の評価

細胞培養上清中に分泌された MUC5AC protein 量は ELISA 法により測定した。NCI-H292 細胞に各試薬を処理後、培養上清を採取し、遠心 (500×g, 4°C, 4 min) 後の上清を実験サンプルとした。回収したサンプルを Nunc-immuno™ Plate に 100 µl/well で添加し、サンプルが乾燥するまで 42°C で静置した。乾燥後、150 µl/well の 0.05 % Tween-20 in PBS (0.05 %-PBS-T) で 3 回洗浄し、2% BSA in PBS を 200 µl/well 添加し、室温で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング溶液を除去し、0.05 % PBS-T で 3 回洗浄を行った後、1 次抗体として mouse monoclonal anti-MUC5AC antibody (45M1, 1:200) を 100 µl/well 添加し、反応 (4°C, overnight) させた。再度、0.05 % PBS-T で 3 回洗浄を行い、2 次抗体として、HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG antibody (1:10000) を 100 µl/well 添加し、反応 (室温, 1 h) させた。さらに、0.05 % PBS-T で 3 回洗浄を行い、3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) による呈色反応 (室温, 30 min, 遮光) の後、100 µl/well の 2 M 硫酸溶液で反応を停止させた。450 nm における吸光度を ARVO™ X4 (Perkin elmer, NJ, USA) で測定した。NCI-H292 細胞に PMA (50 nM) を処理し、24 時間後に得られた培養上清を標準物質として、これを段階希釈し、検量線を作製した。この検量線をもとに、各サンプルの吸光度から培養上清中の相対的な MUC5AC protein 量を算出した。

## 第6項 Quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR)

培養細胞を PBS で洗浄した後、RNAisoplus (Takara) を加え、total RNA を抽出した。得られた total RNA の収量は UV (260 nm) の吸光度により算出した。なお、total RNA 抽出の際に用いた試薬・器具類は全てオートクレーブを行った。回収した total RNA 0.5 µg を鋳型とし、PrimeScript® RT Master Mix (Takara) を用いて逆転写反応 (1 cycle at 37°C for 15 min, 85°C for 5 sec, 4°C) を行った。得られた逆転写産物を用いて、TB Green Premix Ex Taq™ II を用い、CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-rad) にて Real-time PCR (1 cycle at 95°C for 30 sec, 40 cycle at 95°C for 5 sec, 60°C for 1 min) を行った。内部標準には GAPDH を用い、反応の定量化は、目的 PCR 産物が検出される最初の PCR cycle (threshold cycle (Ct)) を用いた comparative Ct method (以下の式) にて行った。

$$\text{Fold change} = 2^{-[(\text{CT}, \text{X}-\text{CT}, \text{R})_{\text{TEST}} - (\text{CT}, \text{X}-\text{CT}, \text{R})_{\text{CONTROL}}]}$$

CT, X: CT of the interest gene

CT, R: CT of the reference gene (*GAPDH*)



## 第7項 Western blotting

培養細胞を TBS で 2 回洗浄後、120  $\mu$ l/dish の lysis buffer (150 mM sodium chloride, 50 mM Tris-Hydrochloride, 0.5 % sodium deoxycholate, 5 mM EDTA, 50 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 1% SDS, 1% NP-40, 1 mM PMSF) を加え、細胞溶解液を回収した。得られた細胞溶解液を遠心 (10,000  $\times$  g, 4°C, 15 min) し、その上清 100  $\mu$ l をサンプルとした。得られたサンプルは bicinchoninate (BCA) 法により、標準物質として BSA を用いて作製した検量線をもとにタンパク濃度を定量した。10  $\mu$ g のタンパク量となるサンプルを 10 % polyacrylamide gel で SDS-PAGE を行った後、PVDF 膜に転写した。転写した PVDF 膜は 5 % skim milk/0.1% Tween-20 in TBS でブロッキング (室温, 1 h) した。その後、rabbit polyclonal anti-phospho-p44/p42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Thr204)、 rabbit polyclonal anti-p44/p42 MAPK (ERK1/2)、 rabbit monoclonal anti-Akt (pan)、 rabbit monoclonal anti-phospho-Akt (Ser473)、 rabbit monoclonal anti-p38 MAPK、 rabbit polyclonal anti-phospho-p38 (Thr180/Tyr182) (1:1000) を用いて 1 次抗体反応 (4°C, overnight) を行った。さらに、0.1 % Tween-20 in TBS (0.1 % TBS-T) で 3 回洗浄した後、HRP-conjugated sheep anti-rabbit IgG (1:20000) を用いて 2 次抗体反応 (室温, 1 h) を行った。2 次抗体反応後に 0.1 % TBS-T で 3 回洗浄した後、 SuperSignal<sup>®</sup> West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher, MA, USA) により PVDF 膜上の免疫複合体を検出した。また、検出には ChemiDoc<sup>™</sup> MP システム (Bio-rad) を用いた。

## 第8項 既存薬ライブラリーを用いた MUC5AC 産生抑制薬のスクリーニング

被験薬には東京大学創薬機構より提供していただいた既存薬ライブラリー 640 種 (2 mM in DMSO) を用いた。24-well plate に NCI-H292 細胞を  $1.8 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、5 日間の培養により 100%コンフルエントに到達後、無血清培地に置換し、24 時間培養した。その後、TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) と被験薬 (0.02—2  $\mu$ M, 0.1 % DMSO) を 24 時間共処理し、培養上清を回収した。培養上清中の MUC5AC 量を ELISA 法により測定し、得られた相対的 MUC5AC 量をもとに fold of control (FC) の値を算出した。control 群を抑制率 100 %、TGF- $\alpha$  単独処理群を抑制率 0 % とし、以下の式に従って各被験薬の MUC5AC 産生抑制率 (%) を算出した。そして、60 % 以上の抑制率を示したものをヒット化合物として定義した。また、抑制作用を示さなかった被験薬の抑制率は 0 % として表記した。

$$\text{MUC5AC 産生抑制率 (\%)} = 100(1 - (\text{Sample(FC)} - \text{control(FC)}) / (\text{TGF-}\alpha(\text{FC}) - \text{control(FC)}))$$

#### 第9項 LDH 活性を指標とした細胞毒性試験

24-well plate に NCI-H292 細胞を  $1.8 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、5 日間の培養により 100%コンフルエントに到達後、無血清培地に置換し、24 時間培養した。その後、被験薬を 24 時間処理し、培養上清を回収した。得られた培養上清中の LDH 活性を MTX-LDH (極東製薬) を用いて測定し、被験薬の細胞毒性を評価した。

#### 第10項 MUC5AC mRNA 安定性の評価

MUC5AC mRNA 安定性に対する薬物の作用は、転写抑制薬 Actinomycin D を用い、MUC5AC mRNA の経時間的な分解を調べることで評価した。12-well plate に NCI-H292 細胞を  $1.8 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、5 日間の培養により 100%コンフルエントに到達後、無血清培地に置換し、24 時間培養した。その後、bisacodyl (1  $\mu$ M) を 1 時間前処理し、その後転写阻害薬 actinomycin D (5  $\mu$ g/ml) を培養液中に添加した。0、1、3、6 時間後において、total RNA を回収し、qRT-PCR 法により MUC5AC mRNA 発現を測定した。

#### 第11項 統計処理

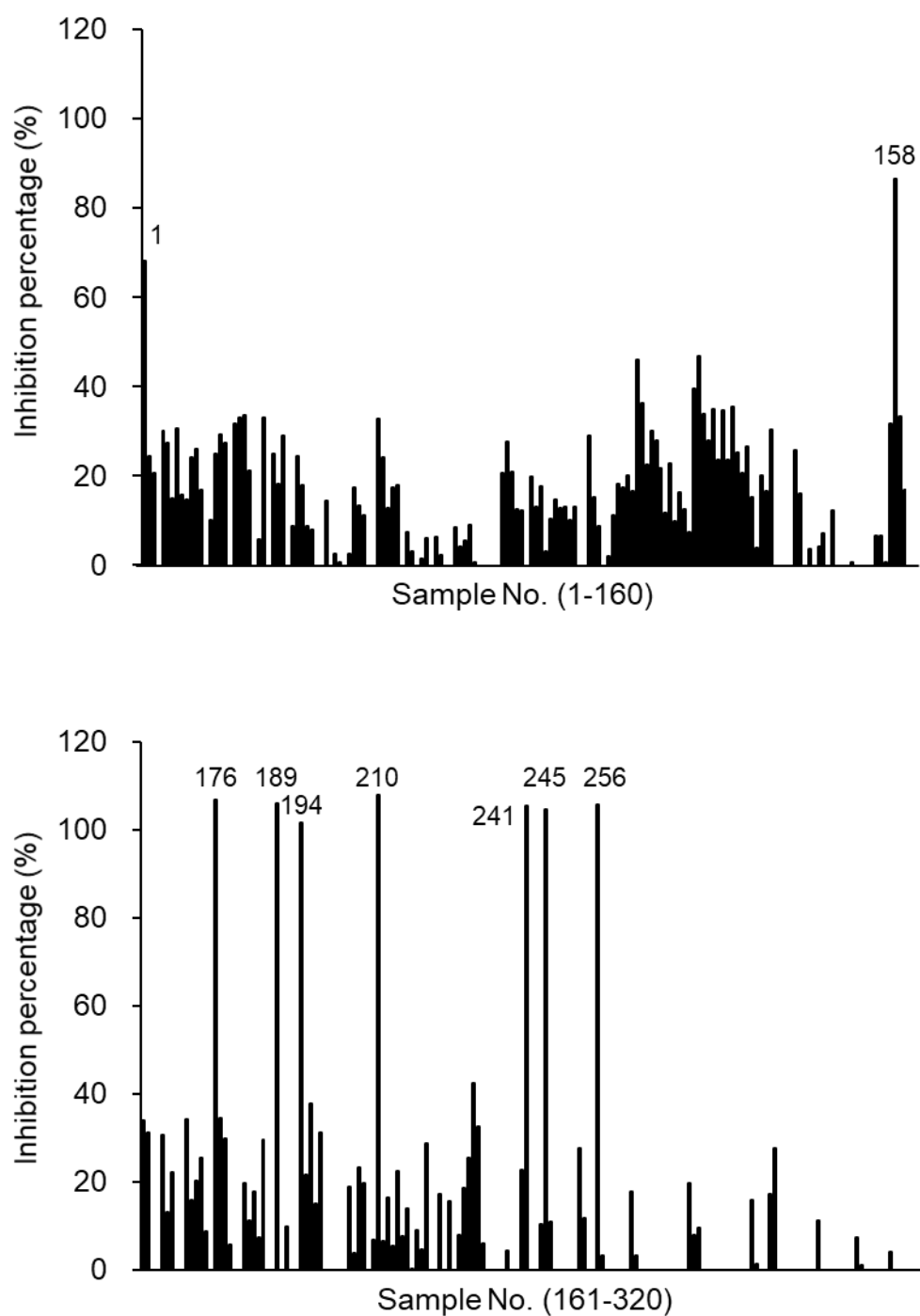
実験データは全て平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。本研究の多群間の比較における有意差検定にはソフトウェア GraphPad Prism (MDF) を用い、One-way ANOVA を行い、Student-Newman-Keuls 試験により 5%未満の危険率を持って有意とみなした。

### 第3節 実験成績

#### 第1項 新規 MUC5AC 産生抑制薬の探索

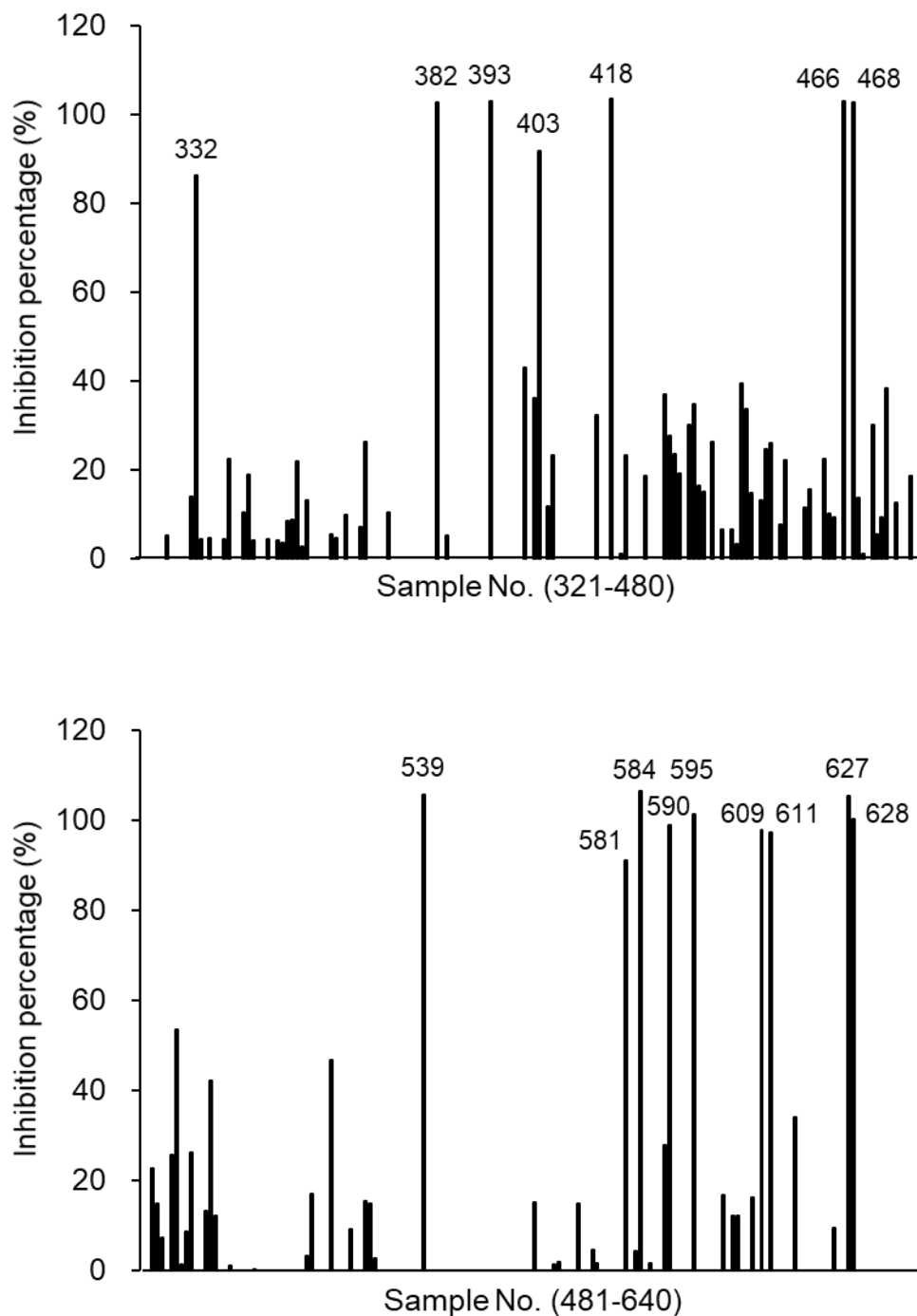
既存薬で構成された化合物ライブラリー640種を対象とし、MUC5AC産生を抑制する薬物の探索を行った。実験標本にはNCI-H292細胞を用い、本細胞をTGF- $\alpha$  (10 ng/ml および被験薬 (2  $\mu$ M) で24時間共処理した。培養上清中に分泌されたMUC5ACをELISA法により測定し、得られた結果より、各被験薬のMUC5AC産生に対する抑制率を算出し、60%以上の抑制率を示したものをヒット化合物とした。

スクリーニングの結果 (Fig.11)、640種の既存薬の中から、全体の約4%に相当する25種類の化合物にMUC5AC産生抑制作用を見出した (Fig. 12)。これらヒット化合物の内、17種がステロイド骨格を持つ化合物であり、残り8種が非ステロイド系の化合物であった。さらに、ステロイド系化合物の17種の内訳は、糖質コルチコイド様の薬物が12種、黄体ホルモン様の薬物が2種 (algestone acetophenide、chlormadinone acetate)、強心配糖体が3種 (digoxin、digitoxigenin、strophantine octahydrate) であった (Table 4)。また、非ステロイド系化合物の内4種は抗がん剤であった。



**Fig. 11. Screening of 640 approved drugs for inhibitors of MUC5AC production (Sample No. 1—320)**

NCI-H292 cells were co-treated with TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) and test drugs (2  $\mu$ M) for 24 hr. Secreted MUC5AC protein in the culture medium were measured by ELISA. The data represent the average value of duplicate wells in a single experiment.



**Fig. 11. Screening of 640 approved drugs for inhibitors of MUC5AC production (Sample No. 321—640)**

NCI-H292 cells were co-treated with TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) and test drugs (2  $\mu$ M) for 24 hr. Secreted MUC5AC protein in the culture medium were measured by ELISA. The data represent the average value of duplicate wells in a single experiment.

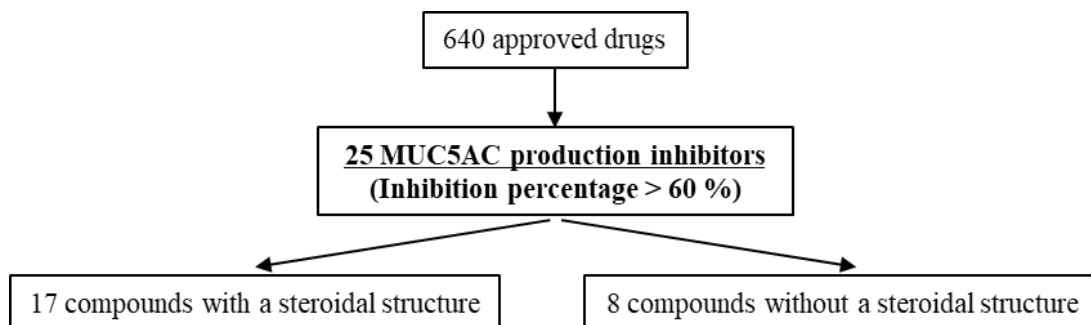


Fig. 12 Summary of screening results

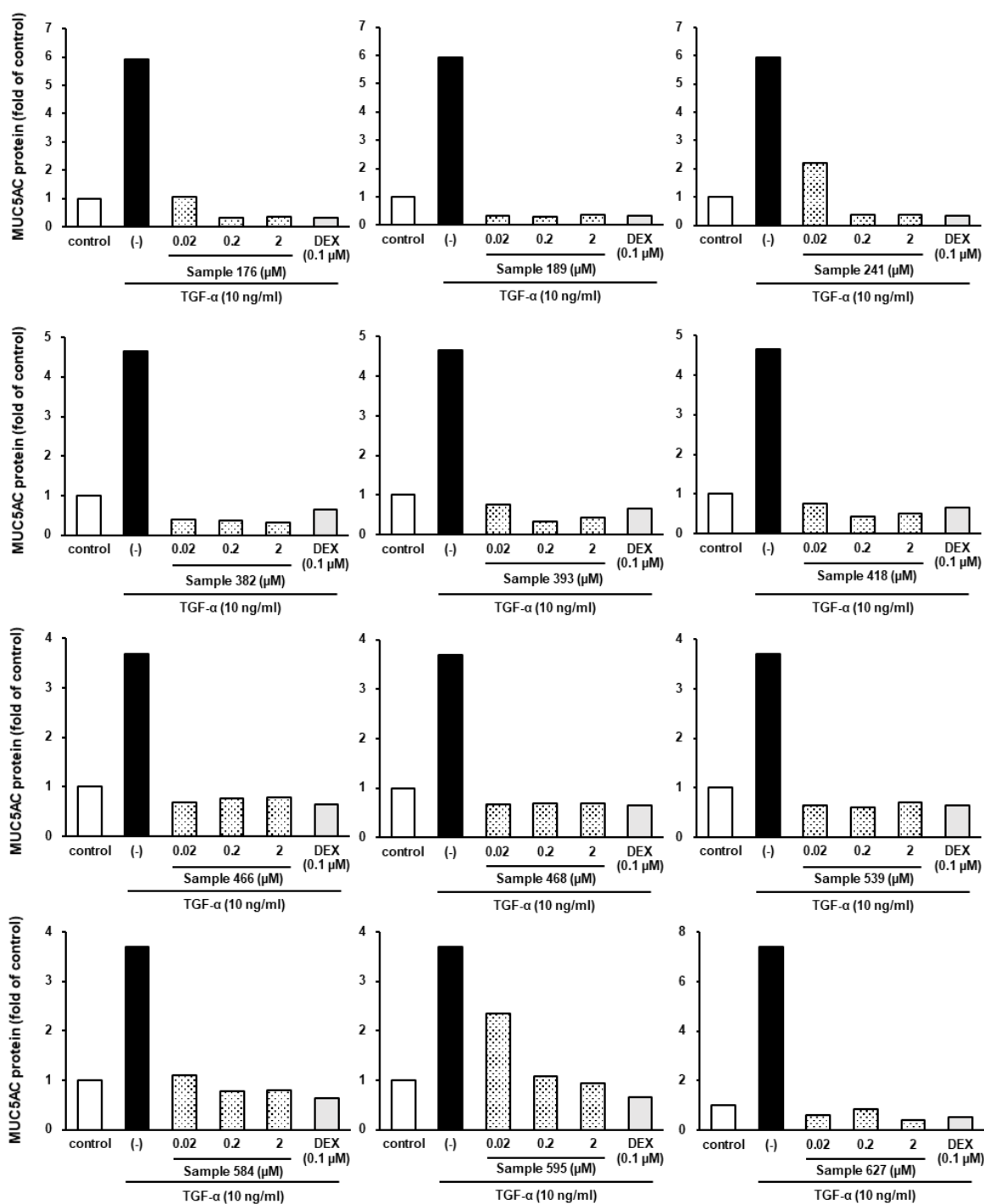
Table 4. 25 hit compounds classification and MUC5AC production inhibition percentage

		Sample No.	Inhibition percentage (%)	Compound name
With a steroidal structure	Glucocorticoid	176	106.8	deflazacort
		189	106.1	desonide
		241	105.4	isoflupredone acetate
		382	102.6	dexamethasone
		393	103	triamcinolone
		418	103.4	fludrocortisone acetate
		466	102.8	predonisolone
		468	102.8	methylpredonisolone 6-alpha
		539	105.6	betamethasone
		584	106.5	hydrocortisone base
		595	101.2	corticosterone
	627	105.4	budesonide	
	Progesterone	194	101.5	algestone acetophenide
		210	112	chlormadinone acetate
Cardiac glycosides	590	98.8	digoxin	
	609	97.8	digitoxigenin	
	611	97.2	strophantine octahydrate	
Without a steroidal structure	Anticancer drugs	1	68.1	azaguanine-8
		158	86.6	azacytidine-5
		332	86.3	camptothecine (S,+)
		628	100.1	daunorubicin hydrochloride
	anticoagulant drug	245	104.7	acenocoumarol
	antibacterial drug	256	105.8	ciprofloxacin hydrochloride
	antifungal drug	403	91.8	econazole nitrate
	stimulant laxative	581	90.9	bisacodyl

Inhibition percentage は control 群を 100%、TGF- $\alpha$  単独群を 0%として算出した。

続いて、ヒット化合物による MUC5AC 産生抑制作用の再現性および濃度依存性を確認した。糖質コルチコイド活性を持つステロイド系化合物 12 種は、どの化合物もその濃度依存的 (0.02—2  $\mu\text{M}$ ) な抑制作用を示した (Fig. 13)。また、これらの化合物は 2  $\mu\text{M}$  の濃度において、陽性対照薬である dexamethasone (0.1  $\mu\text{M}$ ) と同じく、TGF- $\alpha$  による MUC5AC 産生亢進を control 群と同程度まで完全に抑制した。一方で、黄体ホルモン剤と強心配糖体の 5 種もその濃度依存的 (0.02—2  $\mu\text{M}$ ) に TGF- $\alpha$  による MUC5AC 産生の亢進を抑制した (Fig. 14)。さらに、非ステロイド系の化合物については、一部の化合物では抑制作用の再現性が確認されなかったものの、その他の化合物はその濃度依存的 (0.02—2  $\mu\text{M}$ ) に MUC5AC 産生を抑制した (Fig. 15)。

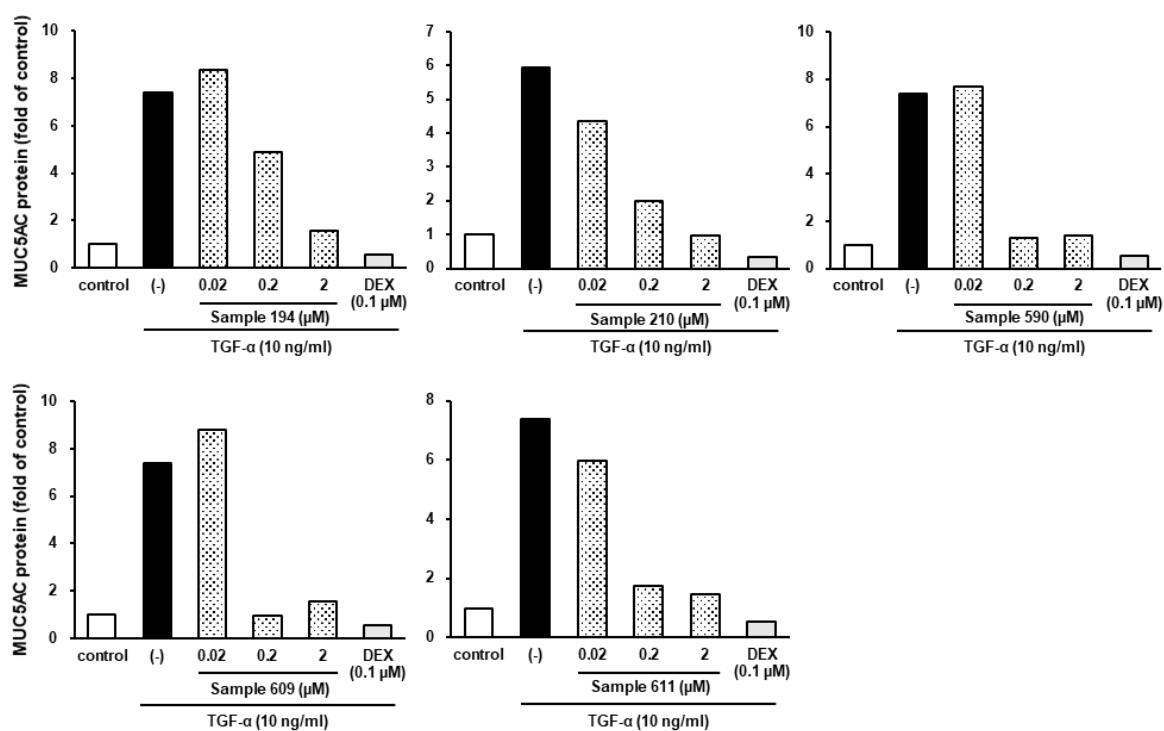
以上、既存薬 640 種を用いた MUC5AC 産生抑制薬スクリーニングの結果、25 種のヒット化合物を見出した。これらヒット化合物の内、ステロイド系化合物はいずれも再現良く MUC5AC 産生を抑制した。しかしながら、ステロイド薬による MUC5AC 産生抑制作用はすでに報告されていたことから、より新規性の高い強心配糖体と非ステロイド系化合物に着目した。また、非ステロイド系化合物のうち、抗がん薬 4 種については副作用の観点から除外した。そして、残りの非ステロイド系化合物、acenocoumarol、ciprofloxacin hydrochloride、econazole nitrate、bisacodyl および強心配糖体について市販品を用いた検討を行った (データ示さず)。これらの化合物の内、bisacodyl のみが再現良く MUC5AC 産生を抑制したため、刺激性下剤の bisacodyl に着目し、機序の解明を行った。



**Fig. 13. Concentration dependence of the hit compounds with a steroidal structure (glucocorticoid like) on TGF- $\alpha$ -induced MUC5AC production.**

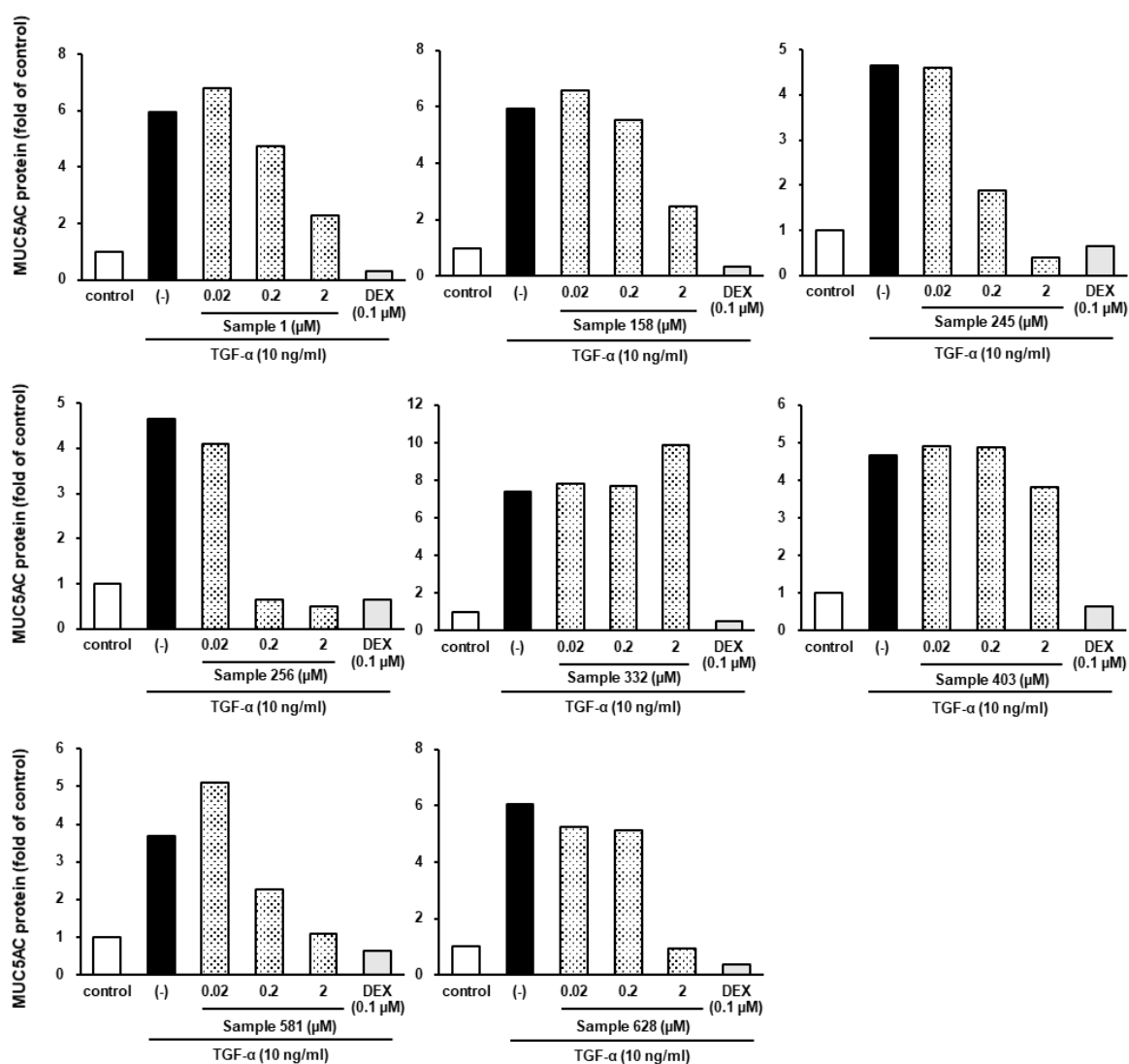
NCI-H292 cells were co-treated with TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) and indicated dose of test drugs or dexamethasone (DEX, 0.1  $\mu$ M) for 24 h. Secreted MUC5AC protein in the culture medium were measured by ELISA. The data represent the average value of triplicate wells in a single experiment.





**Fig. 14. Concentration dependence of the hit compounds with a steroidal structure (not glucocorticoid like) on TGF- $\alpha$ -induced MUC5AC production.**

NCI-H292 cells were co-treated with TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) and indicated dose of test drugs or dexamethasone (DEX, 0.1  $\mu$ M) for 24 h. Secreted MUC5AC protein in the culture medium were measured by ELISA. The data represent the average value of triplicate wells in a single experiment.



**Fig. 15. Concentration dependence of the hit compounds without a steroidal structure on TGF- $\alpha$ -induced MUC5AC production.**

NCI-H292 cells were co-treated with TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) and indicated dose of test drugs or dexamethasone (DEX, 0.1  $\mu$ M) for 24 h. Secreted MUC5AC protein in the culture medium were measured by ELISA. The data represent the average value of triplicate wells in a single experiment.

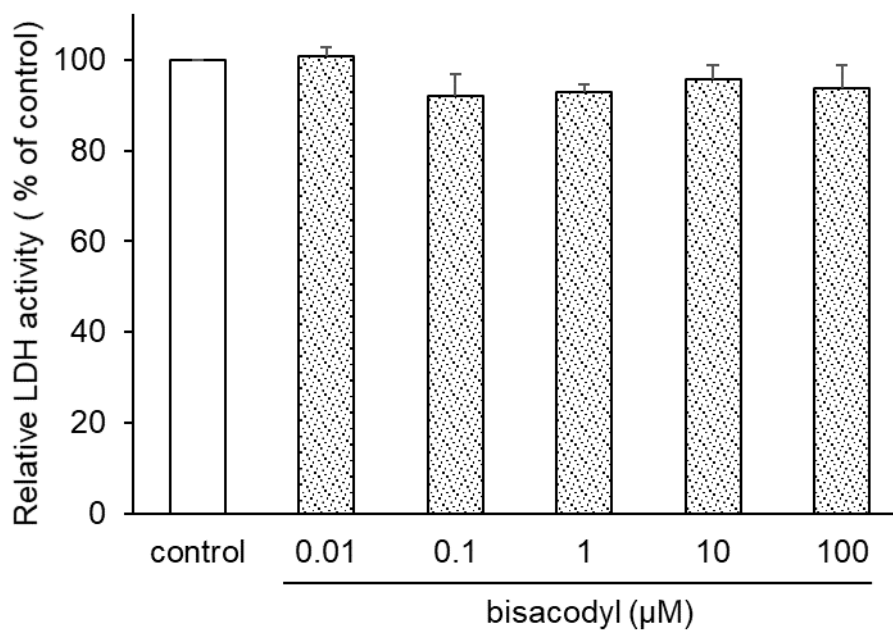
## 第2項 刺激性下剤 bisacodyl による MUC5AC 産生抑制作用およびその機序解明

まず、LDH 活性を指標とした細胞毒性試験を行い、bisacodyl の細胞毒性を評価した。その結果、bisacodyl は最大 100  $\mu\text{M}$  の濃度においても著明な毒性を示さなかった (Fig. 16)。このことから、スクリーニング時における、bisacodyl の MUC5AC 産生抑制作用が細胞毒性の結果による可能性が排除された。

次に、改めて bisacodyl の MUC5AC 産生に対する作用を調べた。TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) 刺激により MUC5AC 産生は control 群の 9.3 倍まで亢進し、この亢進は bisacodyl の共処理によりその濃度依存的 (0.1—1  $\mu\text{M}$ ) に抑制された (Fig. 17A)。また、1  $\mu\text{M}$  における MUC5AC 産生抑制率は約 80%であった。

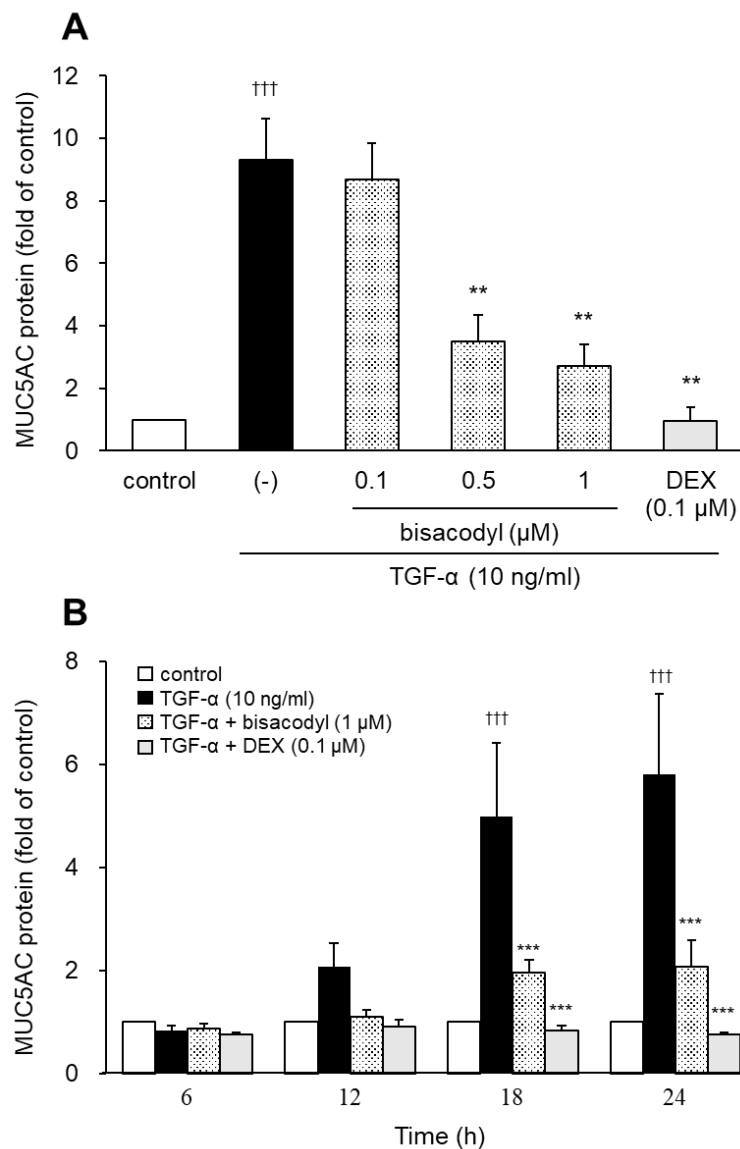
また、経時間的な MUC5AC 産生に対する bisacodyl の作用を調べた。TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) 刺激後 18、24 時間において MUC5AC 産生の亢進がみられ、どちらの時間における亢進も bisacodyl (1  $\mu\text{M}$ ) の共処理により抑制された (Fig. 17B)。

以上の結果から、スクリーニングより見出された bisacodyl が TGF- $\alpha$  による MUC5AC 産生を抑制することが改めて確認された。



**Fig. 16. Bisacodyl had no cytotoxicity in NCI-H292 cells.**

NCI-H292 cells were treated with indicated dose of bisacodyl (0.01-100 μM) for 24 h. LDH activity in the culture supernatant was assessed. Results represent the mean±S.E.M. (n=3)

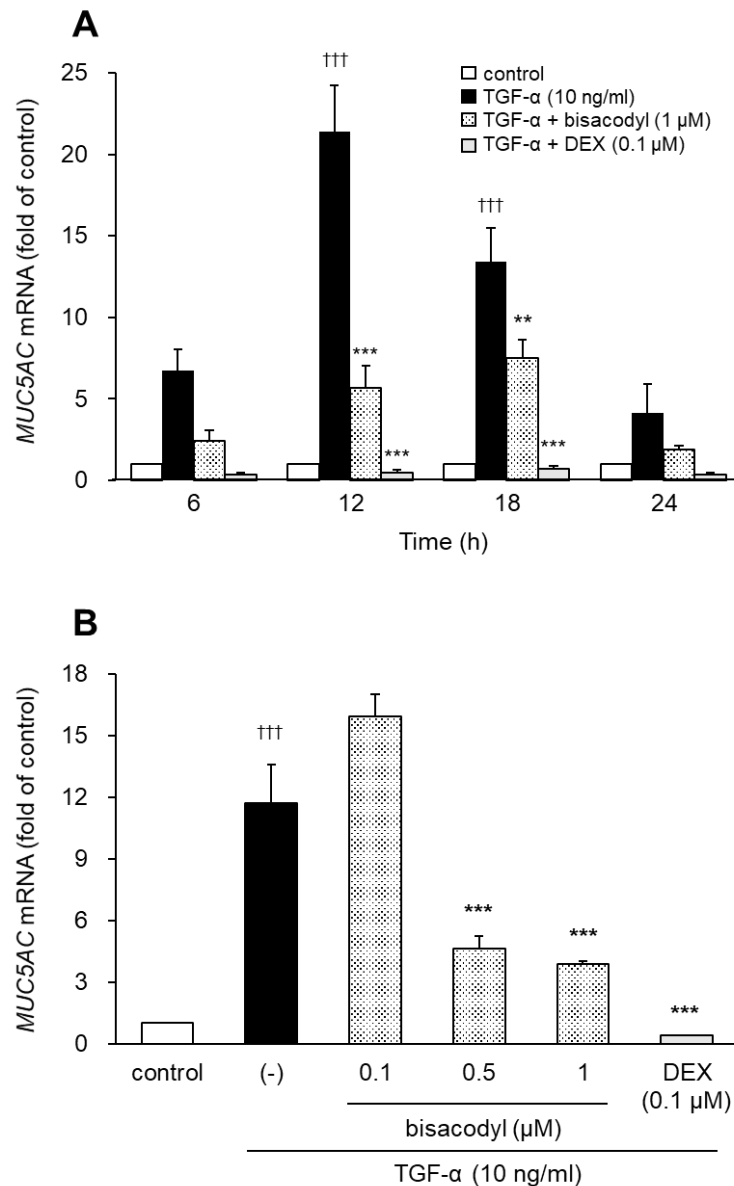


**Fig. 17. Bisacodyl suppressed TGF- $\alpha$ -induced MUC5AC production in dose and time-dependent manner.**

(A) NCI-H292 cells were co-treated with TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) and indicated dose of bisacodyl or dexamethasone (DEX, 0.1  $\mu$ M) for 24 h. (B) NCI-H292 cells were co-treated with TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) and bisacodyl (1  $\mu$ M) for indicated time. Secreted MUC5AC protein in the culture media were measured by ELISA. Results represent the mean $\pm$ S.E.M. (n=3; \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , vs group treated with TGF- $\alpha$  alone, †††  $P < 0.001$  vs control).

Bisacodyl による MUC5AC 産生抑制の機序を明らかにするため、MUC5AC mRNA 発現に対する作用を調べた。TGF- $\alpha$  刺激により MUC5AC mRNA 発現は 12 時間をピークとして亢進し、この亢進は bisacodyl (1  $\mu$ M) および DEX (0.1  $\mu$ M) の処理により抑制された (Fig. 18A)。また、TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) 刺激 12 時間後において、濃度依存性を確認した。その結果、bisacodyl は MUC5AC 産生を抑制した濃度 (0.1–1  $\mu$ M) において濃度依存的に MUC5AC mRNA 発現を抑制した (Fig. 18B)。

これらの結果から、bisacodyl が dexamethasone と同じく MUC5AC mRNA 発現を抑制することが明らかとなった。



**Fig. 18. Bisacodyl suppressed TGF- $\alpha$ -induced MUC5AC mRNA expression in dose and time-dependent manner.**

(A) NCI-H292 cells were co-treated with TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) and bisacodyl (1  $\mu$ M) or dexamethasone (DEX, 0.1  $\mu$ M) for indicated time. (B) NCI-H292 cells were co-treated with TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) and bisacodyl (1  $\mu$ M) or dexamethasone (DEX, 0.1  $\mu$ M) for 12 h. MUC5AC mRNA were measured by qRT-PCR and normalized to *GAPDH*. Results represent the mean $\pm$ S.E.M. (n=3; \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , vs group treated with TGF- $\alpha$  alone, <sup>†††</sup>  $P < 0.001$  vs control).

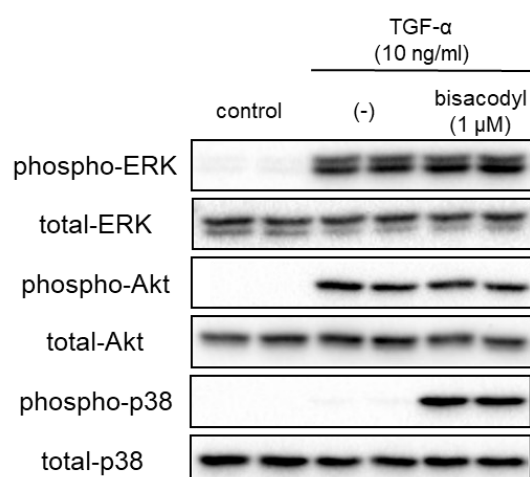
Bisacodyl による MUC5AC mRNA 発現抑制の機序解明のため、シグナル分子に対する影響および MUC5AC mRNA の安定性に対する作用を調べた。

EGFR 下流で活性化する ERK1/2、Akt、p38 のリン酸化に対する bisacodyl の作用を調べた。TGF- $\alpha$  刺激後 1 時間において、ERK1/2、Akt はリン酸化の亢進がみられたが、bisacodyl (1  $\mu$ M) を共処理してもこれらの分子のリン酸化は抑制されなかった (Fig. 19)。また、p38 のリン酸化は TGF- $\alpha$  刺激ではリン酸化の著明な亢進はみられず、bisacodyl の共処理によりむしろ亢進する結果が得られた。

また、bisacodyl の MUC5AC mRNA 安定性に対する作用を、転写阻害薬 actinomycin D を用いた mRNA stability assay により調べた。control 群では転写阻害薬 actinomycin D (5  $\mu$ g/ml) の処理後 1、3、6 時間と経時間的に MUC5AC mRNA 量が減少する傾向がみられた。ここに bisacodyl (1  $\mu$ M) を共処理したが、control 群と比較して MUC5AC mRNA の安定性が低下する作用は見られなかった (Fig. 20)。

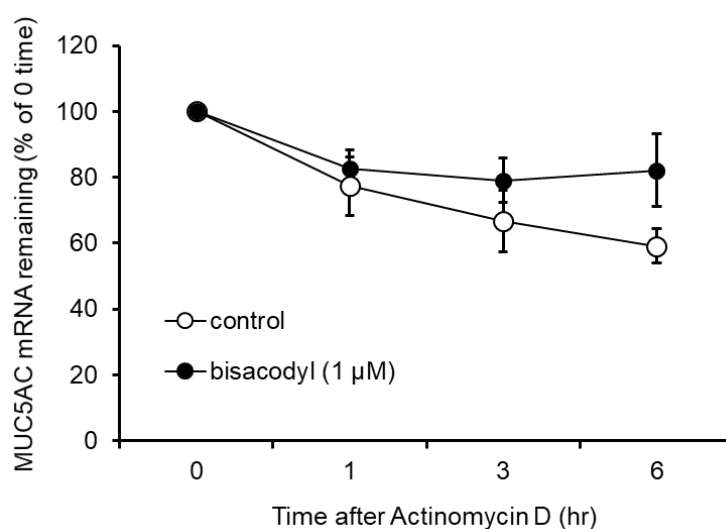
以上、本項の結果より、bisacodyl が TGF- $\alpha$  刺激による MUC5AC 産生および MUC5AC mRNA 発現を抑制することが明らかとなった。また、MUC5AC mRNA 発現抑制の機序に関しては、少なくとも、ERK1/2、Akt、p38 のリン酸化に対する直接の抑制ではないこと、および MUC5AC mRNA 安定性の低下によるものではないことが示唆された。





**Fig. 19. Effect of bisacodyl on TGF- $\alpha$ -induced phosphorylation of ERK1/2, Akt or p38**

NCI-H292 cells were co-treated with TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) and bisacodyl (1  $\mu$ M) for 1 h. Phosphorylated-ERK1/2, Akt, p38 and total-ERK1/2, Akt, p38 in cell lysate were analyzed by western-blotting.



**Fig. 20. Effect of bisacodyl on MUC5AC mRNA stability**

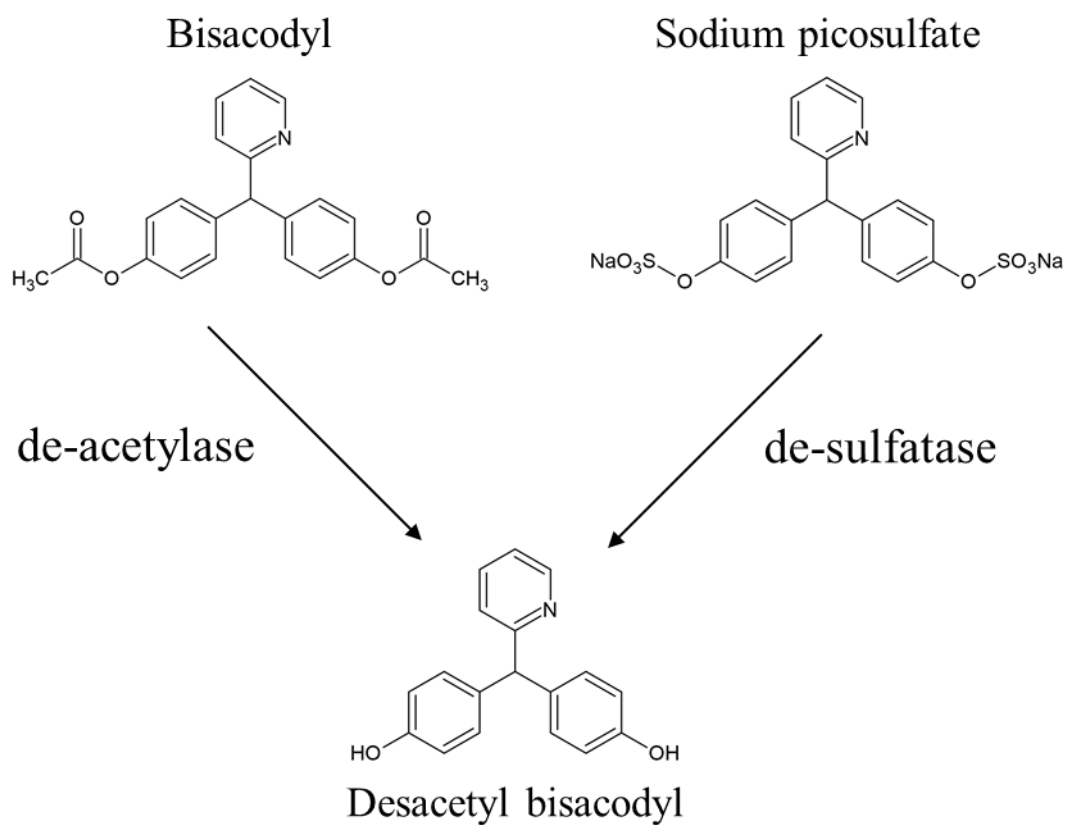
NCI-H292 cells were pre-treated with bisacodyl (1  $\mu$ M) for 1 h. Then cells were co-treated with bisacodyl (1  $\mu$ M) and actinomycin D (5  $\mu$ g/ml) for indicated time. MUC5AC mRNA were measured by qRT-PCR and normalized to *GAPDH*. Results represent the mean $\pm$ S.E.M. (n=3)

### 第3項 刺激性下剤 sodium picosulfate およびその活性代謝物 desacetyl bisacodyl の MUC5AC 産生に対する作用

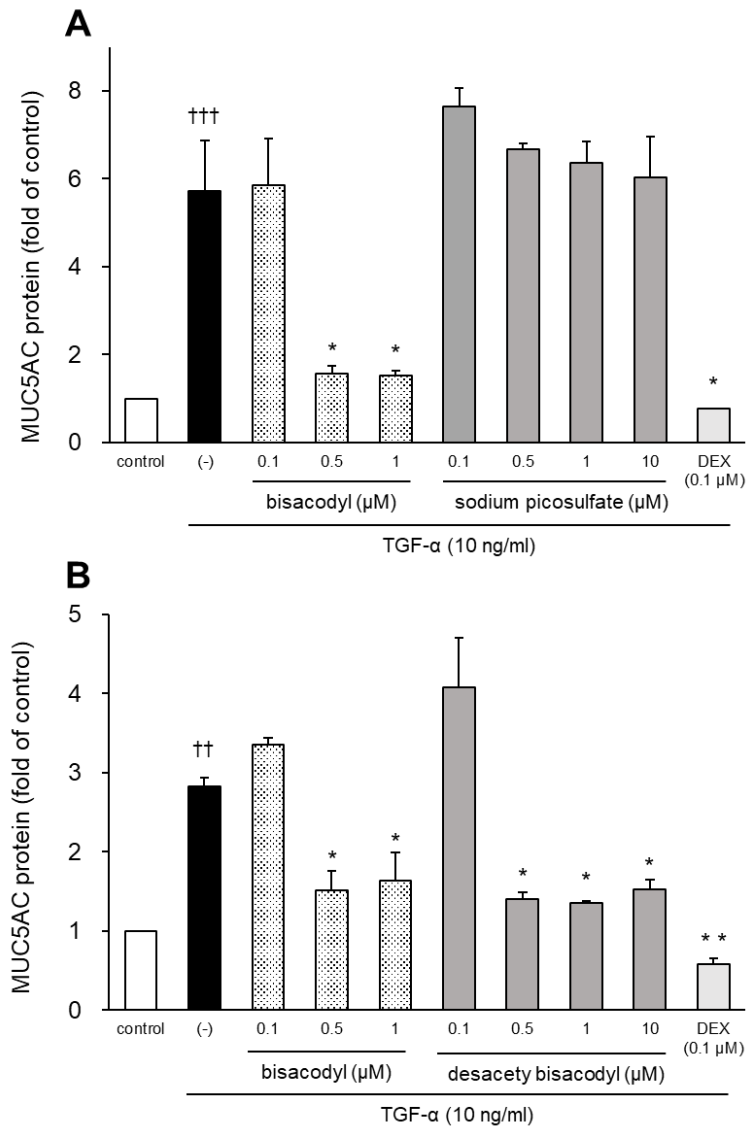
刺激性下剤である bisacodyl が MUC5AC 産生抑制作用を示したことから、同様の刺激性下剤である sodium picosulfate、および bisacodyl と sodium picosulfate に共通する活性代謝物 desacetyl bisacodyl (Fig. 21) の作用を調べた。

TGF- $\alpha$  刺激による MUC5AC 産生の亢進に対して bisacodyl (0.1–1  $\mu$ M) および DEX (0.1  $\mu$ M) が抑制作用を示しているのに対し、sodium picosulfate (0.1–10  $\mu$ M) は抑制作用を全く示さなかった (Fig. 22A)。一方で興味深いことに、活性代謝物である desacetyl bisacodyl は bisacodyl と全く同じ濃度 (0.1–1  $\mu$ M) において濃度依存的な抑制作用を示し、その抑制率に関しても bisacodyl と同程度であった (Fig. 22B)。

Sodium picosulfate に MUC5AC 産生抑制作用がみられなかったことから、本作用は刺激性下剤全般に共通する作用ではないことが明らかになった。その一方で、desacetyl bisacodyl は bisacodyl と同じ濃度において MUC5AC 産生を抑制し、その抑制率も同程度であった。このことから、両化合物が共通の作用機序を介して、MUC5AC 産生を抑制している可能性が示唆されている。



**Fig. 21. The metabolism pathway of bisacodyl and sodium picosulfate**



**Fig. 22. Desacetyl bisacodyl, but not sodium picosulfate, suppressed TGF- $\alpha$ -induced MUC5AC production in dose-dependent manner.**

(A) NCI-H292 cells were co-treated with TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) and indicated dose of bisacodyl (0.1–1  $\mu$ M), sodium picosulfate (0.1–10  $\mu$ M) or dexamethasone (DEX, 0.1  $\mu$ M) for 24 h. (B) NCI-H292 cells were co-treated with TGF- $\alpha$  (10 ng/ml) and indicated dose of bisacodyl (0.1–1  $\mu$ M), desacetyl bisacodyl (0.1–10  $\mu$ M) or dexamethasone (DEX, 0.1  $\mu$ M) for 24 h. Secreted MUC5AC protein in the culture media were measured by ELISA. Results represent the mean $\pm$ S.E.M. (n=3; \*  $P$  < 0.05, \*\*  $P$  < 0.01, vs group treated with TGF- $\alpha$  alone, ††  $P$  < 0.01, †††  $P$  < 0.001 vs control).

## 第4節 考察および小括

### 第1項 考察

本章の結果、既存薬 640 種を対象としたスクリーニングにより、刺激性下剤 bisacodyl が著明な MUC5AC 産生抑制作用を持つことを明らかにした。以下に、1. Bisacodyl による MUC5AC 産生抑制作用の機序、2. Sodium picosulfate および活性代謝物 desacetyl bisacodyl との作用比較、3. Bisacodyl 以外のヒット化合物に関する考察を述べる。

#### 1. Bisacodyl による MUC5AC 産生抑制作用の機序に関して

Bisacodyl は TGF- $\alpha$  による MUC5AC 産生亢進を濃度依存的 (0.1—1  $\mu$ M) に抑制し (Fig. 17A)、同様の濃度において、MUC5AC mRNA 発現の亢進も抑制している (Fig. 18B)。このことから、bisacodyl の MUC5AC 産生抑制作用は、MUC5AC の分泌抑制ではなく、MUC5AC mRNA 発現の抑制によるものだと考えられる。

#### ① Bisacodyl による MUC5AC mRNA 発現抑制の機序に関して

まず、bisacodyl の mRNA 発現抑制作用の特性だが、経時間的な作用を調べた実験において、TGF- $\alpha$  との共処理後 6 時間で抑制傾向がみられている (Fig. 18A)。さらに、bisacodyl (1  $\mu$ M) は単独処理 1 時間において、MUC5AC mRNA 発現を抑制することを見出している (データ示さず)。これらのことから、bisacodyl の作用発現時間は非常に短いと考えられ、その作用に新規タンパク発現の誘導が関与する可能性は低く、mRNA 発現に関与する因子に直接作用するものと考えられる。

mRNA 発現の調節機序には、転写前または転写後における調節が考えられる。転写後調節の代表的な例としては、miRNA による標的 mRNA 分解促進が挙げられる。しかしながら、本研究において、bisacodyl は MUC5AC mRNA 安定性を低下させる作用を持たなかった (Fig. 20)。さらに、MUC5AC mRNA は miRNA による調節を受けにくいことを示唆する報告があり、bisacodyl が miRNA を介して、mRNA 発現を抑制している可能性は低いと考えられる<sup>(48)</sup>。よって、bisacodyl は転写後調節でなく、転写以前の段階に作用点を持つと考えられた。

転写前の調節の標的として考えられるのが、細胞内シグナル分子である。本研究では、MUC5AC mRNA 発現に関与するシグナル分子 ERK、Akt、p38 のリン酸化に対する作用を調べた。Bisacodyl は TGF- $\alpha$  刺激後 1 時間における、ERK、Akt リン酸化を阻害しなかった (Fig. 19)。このことから、bisacodyl は EGFR から ERK、Akt までのシグナルに対する直接の阻害作用を持たないと考えられ、EGFR の競合的阻害薬や EGFR のチロシンキナーゼ阻害薬ではないことが示唆されている。一方で、p38 のリン酸化に関しては、bisacodyl (1  $\mu$ M) の共処理によって亢進している。p38 の活性化は IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  による MUC5AC 産生の亢進に寄与し

ており、これらの刺激による MUC5AC 産生は p38 阻害薬によって抑制されることが報告されている<sup>(26)</sup>。これと一致して、本実験系の TGF- $\alpha$  による MUC5AC 産生の亢進は p38 阻害薬によって抑制された。さらに、bisacodyl と p38 阻害薬を共処理しても MUC5AC 産生抑制作用の減弱は見られなかった (データ示さず)。これらのことから、TGF- $\alpha$  刺激においても p38 の活性化は MUC5AC 産生の亢進に寄与するものであり、bisacodyl の MUC5AC 産生抑制作用に p38 のリン酸化亢進作用は関与しないと考えられる。以上より bisacodyl の作用に EGFR 下流シグナル分子のリン酸化抑制が関与する可能性は低いものと考えられた。

また、遺伝子発現の制御に関しては、エピジェネティクスな制御が考えられる。MUC5AC に関しては、-3718 から -3670 の Promoter 領域に CpG サイトが存在し、本サイトにおけるメチル化およびヒストン H3K9 におけるジメチル化が mRNA 発現の抑制に関与することが示唆されている<sup>(48)</sup>。Bisacodyl がエピジェネティクス制御により MUC5AC mRNA 発現を抑制している可能性が考えられるが、この点に関してはさらなる検討が必要だろう。

以上より bisacodyl の MUC5AC mRNA 発現抑制作用の機序は (1) 短時間で作用が発現する、(2) 転写後調節でない (3) EGFR シグナルの抑制でないことが示唆されており、今後は MUC5AC 遺伝子の転写活性や Sp1、AP-1、NF- $\kappa$ B といった転写因子に対する作用を検討する必要があるだろう。

## ② Bisacodyl の作用点に関する考察

今回、陽性対照薬として用いた dexamethasone は核内受容体である glucocorticoid receptor (GR) への結合を介して MUC5AC 遺伝子の転写を抑制する<sup>(4-6)</sup>。Bisacodyl の作用点として GR が考えられるが、bisacodyl の MUC5AC 産生抑制率や、構造は糖質コルチコイドとは異なっている。さらに、臨床での利用において、bisacodyl が glucocorticoid のような抗炎症作用を示すとの報告はない。そのため、bisacodyl が dexamethasone と同じ GR のアゴニストとして働く可能性は非常に低いだろう。

以上より、bisacodyl は、転写抑制により MUC5AC mRNA 発現を抑制することが示唆された。また、少なくとも bisacodyl が GR のアゴニストである可能性は低いものと考えられた。

## 2. Sodium picosulfate および desacetyl 0bisacodyl との比較

刺激性下剤 sodium picosulfate および活性代謝物 desacetyl bisacodyl の MUC5AC 産生に対する作用を調べたところ、sodium picosulfate に抑制作用は見られず、desacetyl bisacodyl にのみ抑制作用がみられた (Fig. 22A,B)。さらに、抑制を示した濃度、および抑制作用の強さが bisacodyl と同じであった。これらのことから、sodium picosulfate になく、bisacodyl と desacetyl bisacodyl に共通する機序によって MUC5AC 産生が抑制されることが示唆されている。

Sodium picosulfate はプロドラッグであり、大腸細菌叢由来の酵素アリルスルファターゼに

より加水分解され、その作用を発揮することから、sodium picosulfate そのものに腸管運動亢進作用は無い。bisacodyl、desacetyl bisacodyl は  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に腸管運動を亢進することが報告されている<sup>(49)</sup>。しかしながら、気道上皮細胞における細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加は、気道粘液分泌を亢進させることから、この機序は MUC5AC 産生抑制作用に寄与しないと考えられる。Bisacodyl の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  に対する影響に関しては、相反する報告もなされており、神経膠芽腫幹細胞様細胞 GSLCs においては、IP3 受容体 (inositol 1,4,5-triphosphate receptor) を阻害することで、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を減少させることが示唆されている<sup>(50)</sup>。しかしながら、本実験系において、TGF- $\alpha$  誘導性の MUC5AC 産生は、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  キレート薬 BAPTA-AM を処理しても抑制されず、また、bisacodyl と BAPTA-AM を共処理しても変化は見られなかった (データ示さず)。このことから、本実験系において、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の減少が bisacodyl の MUC5AC 産生抑制に寄与する可能性は低いものと考えられる。また、bisacodyl は、マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞において、prostaglandin E2 (PGE2) の産生を増加させることが報告されている<sup>(51)</sup>。しかしながら、PGE2 も杯細胞における粘液産生を増加させることが報告されており、bisacodyl が PGE2 の産生を介して MUC5AC 産生を抑制している可能性も低いだろう<sup>(52)</sup>。

以上、bisacodyl と desacetyl bisacodyl は同じ濃度において MUC5AC 産生抑制作用を示したことから、両者に共通する機序の存在が示唆されている。しかしながら、これらの薬物の下剤としての作用に関する報告からは、MUC5AC 産生抑制に関わると考えられる機序は見出せず、未知の機序であることが示唆された。

### 3. Bisacodyl 以外のヒット化合物に関して

本研究では、既存薬 640 種を対象とした MUC5AC 新規 MUC5AC 産生抑制薬のスクリーニングを行い、25 種のヒット化合物を見出した。25 種のヒット化合物の中で、17 種がステロイド系化合物であり、典型的な糖質コルチコイド化合物は 12 種であった (Fig. 12, Table 4)。これら 12 種の化合物は 2  $\mu\text{M}$  の濃度において、抑制率 100 % 以上を示しており、TGF- $\alpha$  による MUC5AC 産生亢進を完全に抑制していることがわかる。これらの結果は、dexamethasone が MUC5AC 産生を抑制するという先行研究と一致するものであり、糖質コルチコイド活性をもつステロイド薬が共通して MUC5AC 産生を強力に抑制することが明らかとなった。

一方で、残り 5 種のステロイド系化合物の内、3 種は強心配糖体、2 種は黄体ホルモン剤であった。強心配糖体は強力に MUC5AC 産生を抑制したものの、市販品を用いた検討において、強い細胞毒性を示したことから、スクリーニングでみられた作用は毒性によるものだったと考えられる。

黄体ホルモン剤である algestone acetophenide、chlormadinone acetate は、どちらも 2  $\mu\text{M}$  において糖質コルチコイドと同程度に MUC5AC 産生を抑制している (Fig. 14, Sample 194, 210)。過去の報告で、黄体ホルモンが子宮頸管上皮の MUC5B 産生抑制に関与していることが示唆

されている<sup>(53)</sup>。組織およびムチンのサブタイプは違うものの、黄体ホルモンが気道上皮においても MUC5AC の発現を抑制している可能性が考えられる。両薬剤は progesteron receptor (PgR) の特異的なアゴニストであり、糖質コルチコイド活性は低いとされている。その一方で、chlormadinone acetate に関しては、PgR に対する Ki 値が 2.5 nM、GR に対する Ki 値が 16 nM であり、マウスにおいて糖質コルチコイド様作用を示すことが報告されている<sup>(54)</sup>。今回のスクリーニングでは 2  $\mu$ M と高濃度の処理を行っており、GR の寄与を否定できない。そのため、algestone acetophenide、chlormadinone acetate の MUC5AC 産生抑制作用に PgR、GR どちらが寄与するかについてはさらなる検討が必要だろう。

## 第2項 小括

本章の結果から、既存薬ライブラリーを対象としたスクリーニングにおいて、刺激性下剤である bisacodyl を気道粘液産生抑制薬へのドラッグリポジショニング候補化合物として見出した。また、bisacodyl は TGF- $\alpha$  による MUC5AC 産生および MUC5AC mRNA 発現の亢進を著明に抑制することを明らかにした。その一方で、bisacodyl の MUC5AC mRNA 発現抑制の作用機序解明と *in vivo* における有効性の検討は今後の課題である。また、気道粘液産生抑制薬としての利用を考えると、下剤としての作用は副作用となる。Bisacodyl は経口薬、座薬として使用されており、これらの経路を避けた吸入剤や鼻腔噴霧剤であれば、下剤としての作用を避けつつ、気道粘液産生抑制薬としての作用のみを期待できると考えられる。

以上、さまざまな課題は残るものの、bisacodyl を新規 MUC5AC 産生抑制薬として見出したことは、気道粘液産生抑制薬の開発につながる重要な知見である。



## 総括

多くの呼吸器疾患に共通する気道粘液の過剰産生、並びに喀痰症状は、古くからその存在が認識されていたものの、これまでは炎症の副産物と考えられ、積極的な治療は行われてこなかった。近年の研究により、喀痰症状が患者 QOL の低下に加えて、呼吸器疾患の病態と密接な関係にあることが明らかとなり、気道粘液産生制御の重視性が認識されつつある。しかしながら、現在の喀痰治療薬に著明な作用を示すものがないため、依然としてステロイド薬による抗炎症を主体とした治療戦略が取られている。その一方で、ステロイド薬による炎症の抑制が必ずしも粘液産生に対して有効ではないことが報告されており<sup>(46)</sup>、気管支喘息や COPD にはステロイド抵抗性の患者が一定数存在している。従って、効率的な喀痰症状の治療には、ステロイド薬だけでは不十分であり、新たな気道粘液産生抑制薬が必要だと考えられる。

本研究では、気道粘液産生抑制薬の創製を目指し、気道粘液主要成分である MUC5AC 産生に着目し、これに対する既存薬の作用を調べ、気道粘液産生抑制薬へのドラッグリポジショニングを提唱することを目的として実験を行った。

第 1 章では、臨床において喀痰症状に有効であることが示唆されている PDE 阻害薬 ibudilast に着目し、MUC5AC 産生に対する作用を調べた。その結果、ibudilast が *in vitro*、*in vivo* において MUC5AC 産生抑制作用を示すことを明らかにした。また、その作用機序は ERK1/2 リン酸化阻害作用と MUC5AC 遺伝子の転写抑制であると考えられた。さらに、ibudilast の MUC5AC 産生抑制作用は PKA に非依存的であると考えられ、先行研究にある他の PDE 阻害薬とは異なる、未知の機序により MUC5AC 産生を抑制するものと考えられた。

第 2 章では、既存薬 640 種を用いた MUC5AC 産生抑制薬のスクリーニングを行い、25 種のヒット化合物を見出した。これらヒット化合物の中で、特に新規性が高く、著明な作用を示した bisacodyl について作用機序の解明を行った。その結果、bisacodyl が TGF- $\alpha$  による MUC5AC 産生および MUC5AC mRNA 発現亢進を抑制することを明らかにし、その作用機序が転写抑制であることを示唆した。さらに、bisacodyl の活性代謝物である desacetyl bisacodyl にも MUC5AC 産生抑制作用がみられ、両者に共通する機序が MUC5AC 産生抑制作用に寄与する可能性を示唆した。

以上、本研究では、ibudilast、bisacodyl の MUC5AC 産生抑制作用を明らかにし、気道粘液産生抑制薬のドラッグリポジショニング候補化合物として提唱した。これらの知見は種々の呼吸器疾患にみられる気道粘液の過剰産生に有効な治療薬の開発につながる重要なものである。

## 参考文献

1. Fahy JV, Dickey BF. MEDICAL PROGRESS Airway Mucus Function and Dysfunction. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(23):2233-47.
2. Ha EV, Rogers DF. Novel Therapies to Inhibit Mucus Synthesis and Secretion in Airway Hypersecretory Diseases. *Pharmacology*. 2016;97(1-2):84-100.
3. Rogers DF. Mucoactive agents for airway mucus hypersecretory diseases. *Respir Care*. 2007;52(9):1176-93; discussion 93-7.
4. Chen Y, Nickola TJ, DiFronzo NL, Colberg-Poley AM, Rose MC. Dexamethasone-mediated repression of MUC5AC gene expression in human lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;34(3):338-47.
5. Chen Y, Watson AM, Williamson CD, Rahimi M, Liang C, Colberg-Poley AM, et al. Glucocorticoid receptor and histone deacetylase-2 mediate dexamethasone-induced repression of MUC5AC gene expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012;47(5):637-44.
6. Takami S, Mizuno T, Oyanagi T, Tadaki H, Suzuki T, Muramatsu K, et al. Glucocorticoids inhibit MUC5AC production induced by transforming growth factor- $\alpha$  in human respiratory cells. *Allergol Int*. 2012;61(3):451-9.
7. Cortijo J, Mata M, Milara J, Donet E, Gavaldà A, Miralpeix M, et al. Aclidinium inhibits cholinergic and tobacco smoke-induced MUC5AC in human airways. *Eur Respir J*. 2011;37(2):244-54.
8. Nagaoka K, Yanagihara K, Harada Y, Yamada K, Migiyama Y, Morinaga Y, et al. Macrolides inhibit *Fusobacterium nucleatum*-induced MUC5AC production in human airway epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(4):1844-9.
9. Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev*. 2006;86(1):245-78.
10. Roy MG, Livraghi-Butrico A, Fletcher AA, McElwee MM, Evans SE, Boerner RM, et al. Muc5b is required for airway defence. *Nature*. 2014;505(7483):412-6.
11. Evans CM, Raclawska DS, Ttofali F, Liptzin DR, Fletcher AA, Harper DN, et al. The polymeric mucin Muc5ac is required for allergic airway hyperreactivity. *Nat Commun*. 2015;6:6281.
12. Koeppen M, McNamee EN, Brodsky KS, Aherne CM, Faigle M, Downey GP, et al. Detrimental role of the airway mucin Muc5ac during ventilator-induced lung injury. *Mucosal Immunol*. 2013;6(4):762-75.
13. Thai P, Loukoianov A, Wachi S, Wu R. Regulation of airway mucin gene expression.

- Annu Rev Physiol. 2008;70:405-29.
14. Takeyama K, Dabbagh K, Lee HM, Agustí C, Lausier JA, Ueki IF, et al. Epidermal growth factor system regulates mucin production in airways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(6):3081-6.
  15. Takeyama K, Fahy JV, Nadel JA. Relationship of epidermal growth factor receptors to goblet cell production in human bronchi. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(2):511-6.
  16. Marinaş AE, Ciurea P, Mărgăritescu C, Cotoi OS. Expression of Epidermal Growth Factor (EGF) and its receptors (EGFR1 and EGFR2) in chronic bronchitis. *Rom J Morphol Embryol*. 2012;53(4):957-66.
  17. Waring MJ, Arrowsmith J, Leach AR, Leeson PD, Mandrell S, Owen RM, et al. An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14(7):475-86.
  18. Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(8):673-83.
  19. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(1):41-58.
  20. Amare GG, Meharie BG, Belayneh YM. A drug repositioning success: The repositioned therapeutic applications and mechanisms of action of thalidomide. *J Oncol Pharm Pract*. 2020:1078155220975825.
  21. Keravis T, Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. *Br J Pharmacol*. 2012;165(5):1288-305.
  22. Rolan P, Hutchinson M, Johnson K. Ibudilast: a review of its pharmacology, efficacy and safety in respiratory and neurological disease. *Expert Opin Pharmacother*. 2009;10(17):2897-904.
  23. Tagaya E, Tamaoki J, Arai N, Kondo M, Nagaoka M, Nagai A, et al. Effect of The PDE4 Inhibitor Ibudilast on Sputum and Postnasal Drip Symptoms in patients with chronic airway inflammation. *The Journal of the Japanese Respiratory Society*. 2010; 48, 412.
  24. Li D, Gallup M, Fan N, Szymkowski DE, Basbaum CB. Cloning of the amino-terminal and 5'-flanking region of the human MUC5AC mucin gene and

- transcriptional up-regulation by bacterial exoproducts. *J Biol Chem.* 1998;273(12):6812-20.
25. Kanai K, Koarai A, Shishikura Y, Sugiura H, Ichikawa T, Kikuchi T, et al. Cigarette smoke augments MUC5AC production via the TLR3-EGFR pathway in airway epithelial cells. *Respir Investig.* 2015;53(4):137-48.
  26. Song KS, Lee WJ, Chung KC, Koo JS, Yang EJ, Choi JY, et al. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha induce MUC5AC overexpression through a mechanism involving ERK/p38 mitogen-activated protein kinases-MSK1-CREB activation in human airway epithelial cells. *J Biol Chem.* 2003;278(26):23243-50.
  27. Song JS, Cho KS, Yoon HK, Moon HS, Park SH. Neutrophil elastase causes MUC5AC mucin synthesis via EGF receptor, ERK and NF-kB pathways in A549 cells. *Korean J Intern Med.* 2005;20(4):275-83.
  28. Hewson CA, Edbrooke MR, Johnston SL. PMA induces the MUC5AC respiratory mucin in human bronchial epithelial cells, via PKC, EGF/TGF-alpha, Ras/Raf, MEK, ERK and Sp1-dependent mechanisms. *J Mol Biol.* 2004;344(3):683-95.
  29. Mata M, Sarriá B, Buenestado A, Cortijo J, Cerdá M, Morcillo EJ. Phosphodiesterase 4 inhibition decreases MUC5AC expression induced by epidermal growth factor in human airway epithelial cells. *Thorax.* 2005;60(2):144-52.
  30. Lee J, Komatsu K, Lee BC, Lim JH, Jono H, Xu H, et al. Phosphodiesterase 4B mediates extracellular signal-regulated kinase-dependent up-regulation of mucin MUC5AC protein by *Streptococcus pneumoniae* by inhibiting cAMP-protein kinase A-dependent MKP-1 phosphatase pathway. *J Biol Chem.* 2012;287(27):22799-811.
  31. Nishimoto Y, Hisatsune A, Katsuki H, Miyata T, Yokomizo K, Isohama Y. Glycyrrhizin attenuates mucus production by inhibition of MUC5AC mRNA expression in vivo and in vitro. *J Pharmacol Sci.* 2010;113(1):76-83.
  32. Shao MX, Nadel JA. Dual oxidase 1-dependent MUC5AC mucin expression in cultured human airway epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(3):767-72.
  33. Damiano S, Morano A, Ucci V, Accetta R, Mondola P, Paternò R, et al. Dual oxidase 2 generated reactive oxygen species selectively mediate the induction of mucins by epidermal growth factor in enterocytes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015;60:8-18.
  34. Di YP, Zhao J, Harper R. Cigarette smoke induces MUC5AC protein expression

- through the activation of Sp1. *J Biol Chem.* 2012;287(33):27948-58.
35. Perrais M, Pigny P, Copin MC, Aubert JP, Van Seuningen I. Induction of MUC2 and MUC5AC mucins by factors of the epidermal growth factor (EGF) family is mediated by EGF receptor/Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase cascade and Sp1. *J Biol Chem.* 2002;277(35):32258-67.
  36. Barbier D, Garcia-Verdugo I, Pothlichet J, Khazen R, Descamps D, Rousseau K, et al. Influenza A induces the major secreted airway mucin MUC5AC in a protease-EGFR-extracellular regulated kinase-Sp1-dependent pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012;47(2):149-57.
  37. Zhang SJ, Jiang JX, Ren QQ, Jia YL, Shen J, Shen HJ, et al. Ambroxol inhalation ameliorates LPS-induced airway inflammation and mucus secretion through the extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway. *Eur J Pharmacol.* 2016;775:138-48.
  38. Ge LT, Liu YN, Lin XX, Shen HJ, Jia YL, Dong XW, et al. Inhalation of ambroxol inhibits cigarette smoke-induced acute lung injury in a mouse model by inhibiting the Erk pathway. *Int Immunopharmacol.* 2016;33:90-8.
  39. Jiang DP, Li Q, Yang J, Perelman JM, Kolosov VP, Zhou XD. Scutellarin attenuates human-neutrophil-elastase-induced mucus production by inhibiting the PKC-ERK signaling pathway in vitro and in vivo. *Am J Chin Med.* 2011;39(6):1193-206.
  40. Park JW, Shin NR, Shin IS, Kwon OK, Kim JS, Oh SR, et al. Silibinin Inhibits Neutrophilic Inflammation and Mucus Secretion Induced by Cigarette Smoke via Suppression of ERK-SP1 Pathway. *Phytother Res.* 2016;30(12):1926-36.
  41. Song WY, Song YS, Ryu HW, Oh SR, Hong J, Yoon DY. Tilianin Inhibits MUC5AC Expression Mediated Via Down-Regulation of EGFR-MEK-ERK-Sp1 Signaling Pathway in NCI-H292 Human Airway Cells. *J Microbiol Biotechnol.* 2017;27(1):49-56.
  42. Gibson LC, Hastings SF, McPhee I, Clayton RA, Darroch CE, Mackenzie A, et al. The inhibitory profile of Ibudilast against the human phosphodiesterase enzyme family. *Eur J Pharmacol.* 2006;538(1-3):39-42.
  43. Wang T, Liu Y, Chen L, Wang X, Hu XR, Feng YL, et al. Effect of sildenafil on acrolein-induced airway inflammation and mucus production in rats. *Eur Respir J.* 2009;33(5):1122-32.
  44. Zhou Y, Zhang Y, Guo Y, Xu M, He B.  $\beta$ 2-Adrenoceptor involved in smoking-induced airway mucus hypersecretion through  $\beta$ -arrestin-dependent signaling. *PLoS One.*

- 2014;9(6):e97788.
45. Nguyen LP, Al-Sawalha NA, Parra S, Pokkunuri I, Omoluabi O, Okulate AA, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(43):E9163-E71.
  46. Kibe A, Inoue H, Fukuyama S, Machida K, Matsumoto K, Koto H, et al. Differential regulation by glucocorticoid of interleukin-13-induced eosinophilia, hyperresponsiveness, and goblet cell hyperplasia in mouse airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(1):50-6.
  47. Kanoh S, Tanabe T, Rubin BK. IL-13-induced MUC5AC production and goblet cell differentiation is steroid resistant in human airway cells. *Clin Exp Allergy*. 2011;41(12):1747-56.
  48. Yamada N, Nishida Y, Yokoyama S, Tsutsumida H, Houjou I, Kitamoto S, et al. Expression of MUC5AC, an early marker of pancreatobiliary cancer, is regulated by DNA methylation in the distal promoter region in cancer cells. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2010;17(6):844-54.
  49. Min YW, Ko EJ, Kim JH, Lee JY, Kim HC, Lee WY, et al. Increased Tone of the Human Colon Muscle by Bisacodyl In Vitro. *J Neurogastroenterol Motil*. 2018;24(2):317-23.
  50. Dong J, Aulestia FJ, Assad Kahn S, Zeniou M, Dubois LG, El-Habr EA, et al. Bisacodyl and its cytotoxic activity on human glioblastoma stem-like cells. Implication of inositol 1,4,5-triphosphate receptor dependent calcium signaling. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2017;1864(6):1018-27.
  51. Ikarashi N, Baba K, Ushiki T, Kon R, Mimura A, Toda T, et al. The laxative effect of bisacodyl is attributable to decreased aquaporin-3 expression in the colon induced by increased PGE2 secretion from macrophages. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;301(5):G887-95.
  52. Akaba T, Komiya K, Suzaki I, Kozaki Y, Tamaoki J, Rubin BK. Activating prostaglandin E2 receptor subtype EP4 increases secreted mucin from airway goblet cells. *Pulm Pharmacol Ther*. 2018;48:117-23.
  53. Gipson IK, Moccia R, Spurr-Michaud S, Argüeso P, Gargiulo AR, Hill JA, et al. The Amount of MUC5B mucin in cervical mucus peaks at midcycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(2):594-600.
  54. Schneider J, Kneip C, Jahnel U. Comparative effects of chlormadinone acetate and its 3alpha- and 3beta-hydroxy metabolites on progesterone, androgen and glucocorticoid receptors. *Pharmacology*. 2009;84(2):74-81.

## 謝辞

本研究は、本学薬学部応用薬理学研究室にて行われました。本研究を行うにあたり、多くの方々にご協力いただきました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、多くのご指導、ご鞭撻を頂いた本学薬学部 磯濱洋一郎教授に深く御礼申し上げます。磯濱教授には学士、修士、博士課程の6年間の長きにわたり、若輩かつ頑固者の筆者に、最後まで辛抱強く、熱心なご指導と適切なお助言をいただきましたこと、心より感謝申し上げます。磯濱研究室に所属したこの6年間の経験はこれからの人生において、何にも代えがたい財産であり、貴重な経験をさせていただいたこと、重ねて御礼申し上げます。

本研究を纏めるにあたり、本論文を審査いただき、貴重かつ的確なお助言を賜りました、本学薬学部 早川洋一教授、内海文彰教授、斎藤顕宜教授、早田匡芳准教授に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、直接ご協力いただいた、本学薬学部応用薬理学研究室、石崎誉子修士、齋藤佳奈修士、上野輝修士、井原健氏、大野秀顕学士、大島佳潤氏に深く感謝いたします。

学士から博士課程にわたり、同期である室井慎一学士、村上一仁修士とは6年間苦楽をともにしました。二人の存在が無ければ博士課程に進学し、研究を遂行することは不可能であったことを記すとともに、深甚の謝意を表します。

研究室入室から博士課程にいたるまで、時に折れそうな心の支えとなり、励ましの言葉をくれた秘書の飯塚清美さんに心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、日々有益なお助言をいただき、支えていただきました本学薬学部応用薬理学研究室の皆様へ感謝申し上げます。

本研究により失われた多くの実験動物の命に哀悼の意を表し、ご冥福を心よりお祈り申し上げます。

最後に、研究期間を通して暖かく見守っていただきました家族に心より感謝致します。