

氏名（本籍）	いし ばし じゅん べい 石 橋 純 平 （神奈川県）
学位の種類	博士（薬科学）
学位記番号	甲第42号
学位授与の日付	2021年3月18日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	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

論文審査委員 （主査）教授 早川 洋一
教授 内海 文彰 准教授 早田 匡芳
教授 磯濱洋一郎 教授 斎藤 顕宜

論文内容の要旨

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、気道粘液産生の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 β_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そのものへの関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。ドラッグリポジショニングの代表例としては、ミノキシジルが挙げられる。ミノキシジルは本来高血圧の治療薬として開発されたが、偶発的に発毛効果が見出され、現在では発毛剤として用いられている。これまでのドラッグリポジショニングでは、ミノキシジルのように偶然の発見による適応拡大が一般的であった。その一方で、近年では、既存薬の作用を再解析、リプロファイリングし、効率的にドラッグリポジショニングを狙う手法が主流となっている。

以上の背景より、本研究では、臨床における報告と既存薬ライブラリーを用いたスクリーニングをもとに既存薬の MUC5AC 産生に対する作用をリプロファイリングし、気道粘液産生抑制薬として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た。

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- α (TGF- α) 刺激 (10 ng/ml) により亢進した MUC5AC 産生を濃度依存的 (1–100 μ M) に抑制した。ibudilast は H₂O₂ (1 mM) または、LPS (10 μ 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 μ M) は TGF- α 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 μ M) は TGF- α 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- α の受容体である epidermal growth factor receptor (EGFR) 下流の ERK1/2 リン酸化が MUC5AC 発現に関与

すること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- α によるリン酸化 ERK1/2 の増加を ibudilast は濃度依存的 (1–100 μ 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 μ M) の作用を調べたところ、U0126 は TGF- α 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 産生を抑制していると考えられた。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、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- α (10 ng/ml) を用いた。NCI-H292 細胞に対して TGF- α (10 ng/ml) と被験薬 (2 μ 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。まず、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 μ M で濃度依存的に TGF- α 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と同様の濃度において bisacodyl は TGF- α 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。

論文審査の結果の要旨

気道粘液の過剰産生すなわち痰は炎症を基礎とするほとんどの呼吸器疾患に共通する病的症状である。気道内壁に膠着する粘稠な痰は細気管支を塞ぎ、換気障害の原因となるなど、疾患重篤とも密接な関係にある。従来、粘液産生の亢進は炎症の結果の 1 つであると考えられてきたが、ステロイド薬などで炎症を良好にコントロールできている患者でも痰が問題となる患者は少なくない。しかし、痰を治療するための現行の医薬品である去痰薬の実効性には疑問があり、患者および治療者である医師の双方の立場で満足できる新たな医薬品の開発が望まれている。痰の主成分は気道疾患時に気道上皮で過剰に分化誘導される杯細胞が産生するムチン分子であり、ムチン遺伝子の中でも特に *MUC5AC* 遺伝子の産物として転写・翻訳され気道内腔へと分泌される。このような背景のもと申請者は、気道内の粘液のクリアランスを促進する去痰薬ではなく、*MUC5AC* の産生そのものを抑制する新たな薬物の発見を目的として研究に着手している。特に、既に他の疾患の治療薬として使用されている既存薬の中からそれを見出そうとする「ドラッグリポジショニング」の戦略を採用し、臨床報告から一定の効果が見込まれた薬物の作用を調べるとともに、大規模な既存薬ライブラリーを用いたスクリーニングを行うことによって、新たに 2 つの粘液産生抑制薬を見出している。

まず、服用することで気道粘液の症状が改善したとの臨床報告のあったホスホジエステラーゼ阻害薬で脳循環改善薬であるイブジラストの作用を調べている。実験成績として、粘液産生細胞株である NCI-H292 細胞を実験標本に、本薬物が TGF- α で誘発した *MUC5AC* 産生を濃度依存に抑制することを示すとともに、本作用は刺激種に依存しない

ことも示している。また、作用機序についても分子薬理的な手法を駆使して詳細に調べ、イブラストによる *MUC5AC* 産生抑制作用がホスホジエステラーゼ阻害とは異なる作用機序に基づくことを示唆し、*MUC5AC* 遺伝子の転写を促進する重要な細胞内シグナ

ルである ERK1/2 の阻害に基づく転写抑制作用であることを解明している。さらに、LPS の気管内投与によって作製したマウス気道炎症モデルでも、イブジラストが MUC5AC 産生抑制作用を持つことを示すなど、in vitro のみならず in vivo でも本薬物の有効性を示している。

一方、既存薬から新たな粘液産生抑制薬を見出すために東京大学創薬機構より提供された 640 種の薬物ライブラリーを用いた大規模なスクリーニングも行っている。本スクリーニングの結果、25 種の薬物に著明な MUC5AC 産生抑制作用を見出しており、その内訳は 17 種がステロイド類似物質ではあったものの、8 種の薬物については既存の適用とは無関係な新作用として見出している。これらの中で特に刺激性下剤として利用されているピサコジルに注目し、その作用の特性を NCI-H292 細胞を標本とした in vitro の実験系で調べている。ピサコジルによる MUC5AC 産生抑制作用は処理濃度依存的であり、またその作用機序は MUC5AC 遺伝子の転写および mRNA 発現抑制によるものであることも見出している。

これらの成績は、古くから我が国の臨床の現場で用いられてきている脳循環改善薬のイブジラストあるいは刺激性下剤のピサコジルが、新たに気道粘液産生抑制薬として応用可能である可能性を薬理的な基礎研究によって示したものである。ピサコジルについては、本来の作用である瀉下作用の副作用が不可避と考えられ、実用化に向けては気道内への局所投与などの製剤学的な工夫が必要とは考えられるものの、少なくとも本研究で明らかにしている両薬物の作用機序は臨床応用可能な気道粘液産生抑制薬の創生を考える上で重要な概念として今後の発展が期待できる。

以上、本論文は博士（薬科学）の学位論文として十分に価値あるものと認められる。