

好中球

好中球のMMP産生能に及ぼすロキシシロマイシンの効果

金井憲一¹⁾ 浅野和仁²⁾ 洲崎春海¹⁾

はじめに

慢性副鼻腔炎やびまん性汎細気管支炎の治療にエリスロマイシンをはじめとする14員環マクロライド系抗生物質の少量長期投与療法が行われ、良好な結果が報告されているものの、その治療機序に関しては不明な点が多い。上下気道における炎症反応発現部位の組織学的検討では基底膜の肥厚、粘膜下腺の肥大・過形成、気道線毛上皮破壊、杯細胞の増加などが観察される^{1,2)}。また、これらの組織学的変化は好中球、マクロファージ等の炎症性細胞の著明な浸潤を伴う^{3,4)}と同時に、上述した炎症性疾患の発症・増悪化には好中球が重要な役割を果たしていることが知られている³⁾。好中球の炎症局所への血中からの遊走には細胞外マトリックスの変性が必須であることもよく知られている⁵⁾。そこで今回、好中球の細胞外マトリックス分解酵素 (MMP) 産生に及ぼす14員環マクロライド系抗生物質の効果をヒト末梢血好中球とロキシシロマイシン (RXM) を用いて検討したので報告する。

材料と方法

薬剤：

本実験で使用したロキシシロマイシン (RXM) はAventis Pharmaceutical Co. Ltd. (Tokyo, Japan) から提供していただいた原末である。実験に際してはこの原末を100%メタノールに20mg/mlの濃度に溶解後、培養液で所定の濃度に希釈した。

好中球の分離：

健常者5名 (男性, 25~30歳) から採取した血液を用い、phosphate-buffered saline (PBS) で2倍に希釈し、Mon-Poly Resolving Medium (Flow Laboratories, Inc., MacLean, VA, USA) に重層後、1,000g

で30分間 (25℃) 遠心し単核球を分離、PBSで3回洗浄を行った。次に、CD-16+ monoclonal antibody-coated magnetic beads (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて上記単核球から好中球を分離した。ギムザ染色によって採取細胞中の好中球の割合を確認したところ97%以上であった。

細胞培養：

1×10^5 cells/mlに調整した好中球を24穴のプレートに播種し各種濃度のRXMを添加し1時間前処置を行った。次に1.0 μ g/mlのLPSを添加し24時間培養後、上清を採取しMMP測定用のサンプルとした。また、mRNAの発現、およびNF- κ B, AP-1の活性化検索のための細胞は培養後それぞれ12時間、4時間後に採取した。

MMP, TIMPの測定：

上述した方法によって採取した培養上清中のMMP-9, TIMP-1の濃度を市販のELISAキット (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA) を用いて測定した。

mRNA発現の検索：

CATALDOら (2002) の報告に準じたRT-PCR法によって好中球におけるMMP-9ならびにTIMP-1 mRNA発現を検索した。

NF- κ BおよびAP-1活性化の検索：

市販のNF- κ B (p50, p65) 測定用ELISAキット (Active Motif, Carlsbad, CA, USA) およびAP-1 (Fra 1, Jun B) 測定用ELISAキット (同社) を用いてNF- κ BおよびAP-1の活性化を調べた。

¹⁾ 昭和大学医学部耳鼻咽喉科学教室, ²⁾ 昭和大学医学部第一生理学教室

Fig. 1. Influence of roxithromycin (RXM) on MMP-9 production from neutrophils in response to lipopolysaccharide (LPS) stimulation ($1.0 \mu\text{g/ml}$).

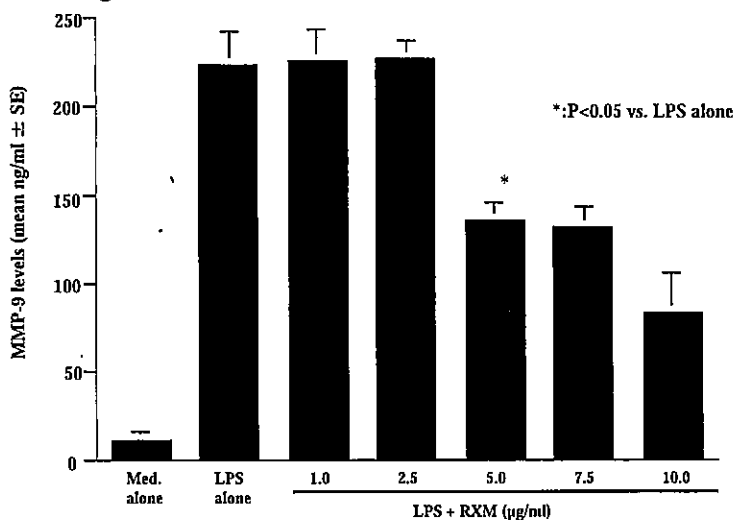
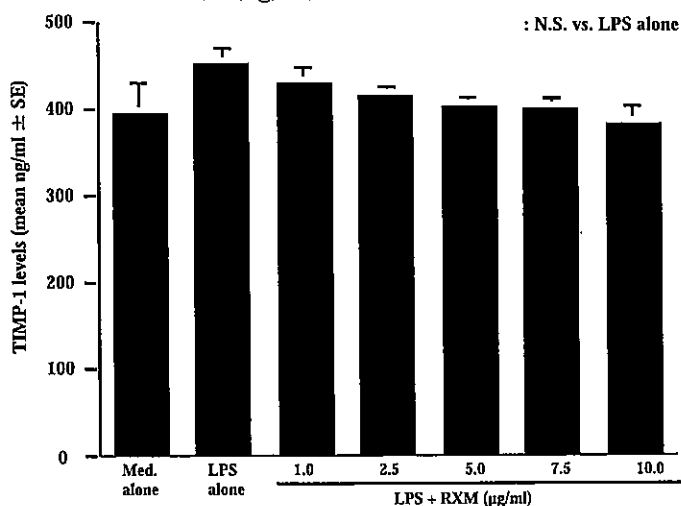


Fig. 2. Influence of roxithromycin (RXM) on TIMP-1 production from neutrophils in response to lipopolysaccharide (LPS) stimulation ($1.0 \mu\text{g/ml}$).



結果

1. LPS刺激による好中球からのMMP-9およびTIMP-1産生に及ぼすRXMの効果

細胞培養系に各種濃度のRXM添加しMMP-9, TIMP-1の産生に及ぼす薬剤の影響を検討した。好中球を $1.0 \mu\text{l/ml}$ のLPSで刺激すると著明なMMP-9の産生を認めた。 $1.0 \mu\text{g/ml}$ ならびに $2.5 \mu\text{g/ml}$ の

RXMの添加ではLPS刺激によるMMP-9産生にはなんら影響を認めなかった。しかし、 $5.0 \mu\text{g/ml}$ 以上のRXMを細胞培養系に添加したところ、LPS刺激による好中球からのMMP-9産生は有意に抑制された (Fig. 1)。一方、RXMはMMP-9の不活化作用を有するとされているTIMP-1の産生に対しては抑制作用を示さなかった (Fig. 2)。

Fig. 3. Influence of roxithromycin (RXM) on MMP-9 mRNA expression in neutrophils stimulated with lipopolysaccharide (LPS) ($1.0 \mu\text{g/ml}$).

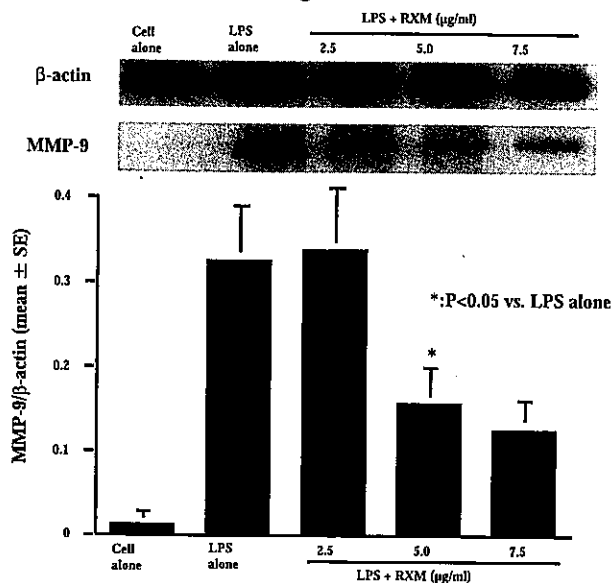
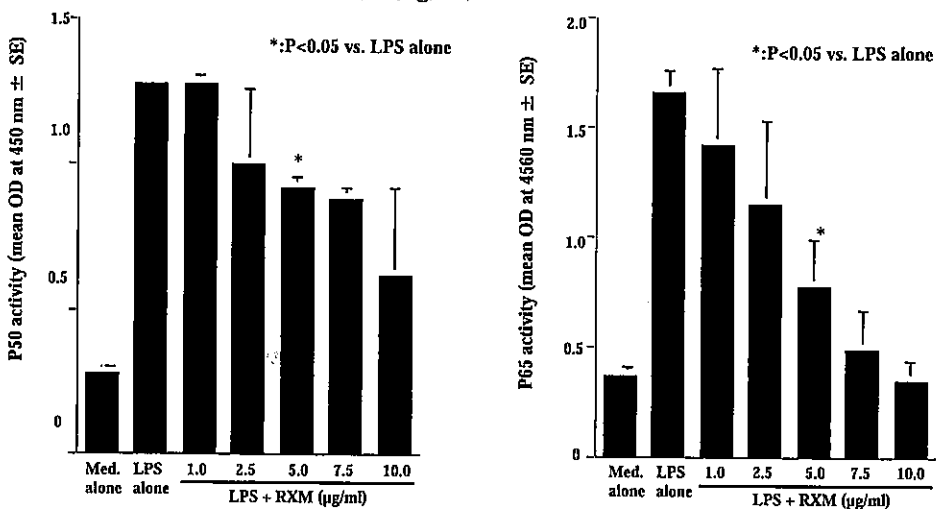


Fig. 4. Influence of roxithromycin (RXM) on NF- κ B activation in neutrophils by lipopolysaccharide (LPS) stimulation ($1.0 \mu\text{g/ml}$).



2. MMP-9ならびにTIMP-1 mRNA発現に及ぼすRXMの効果

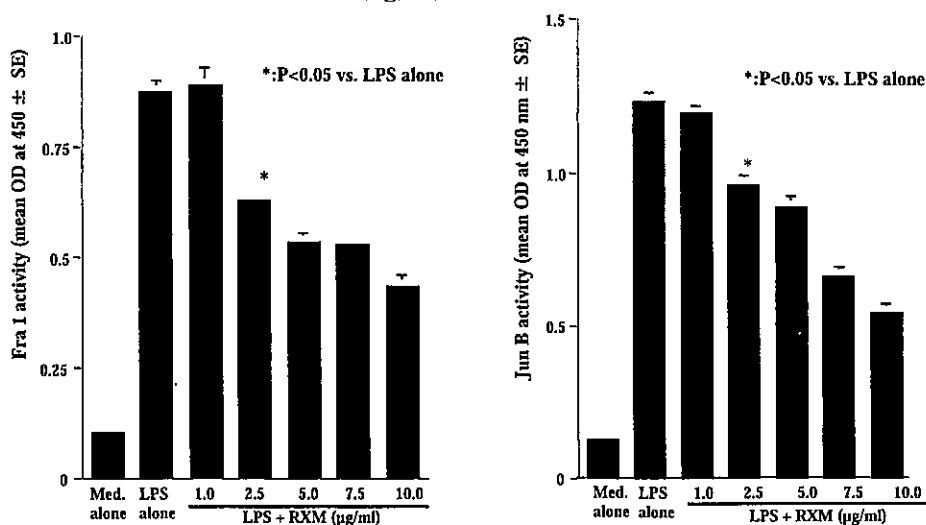
細胞培養系に各種濃度のRXMを添加し1時間前処置した後LPS ($1.0 \mu\text{g/ml}$) で好中球を刺激し、mRNA発現に及ぼすマクロイド薬の効果を検討した。Fig. 3に示すようにLPS刺激によりMMP-9

mRNA発現は増強された。2.5 $\mu\text{g/ml}$ のRXM添加ではMMP-9 mRNA発現は抑制されなかったが5.0 $\mu\text{g/ml}$ 以上のRXM添加ではMMP-9 mRNA発現は有意に抑制された (Fig. 3)。

3. NF- κ B, AP-1の活性化に及ぼすRXMの効果

細胞培養系に各種濃度のRXMを添加し1時間

Fig. 5. Influence of roxithromycin (RXM) on AP-1 activation in neutrophils by lipopolysaccharide (LPS) stimulation ($1.0 \mu\text{g/ml}$).



前処置した後LPS ($1.0 \mu\text{g/ml}$) で好中球を刺激し、NF- κ B, AP-1の活性化に及ぼすマクロイド薬の効果を検討した。被験細胞から核タンパクを抽出、p50, p65およびFra 1, Jun Bの活性をELISA法によって調べた。Figs. 4, 5に示すとおり、好中球をLPS刺激することにより有意にp50, p65およびFra 1, Jun Bの活性が誘導された。培養系に $5.0 \mu\text{g/ml}$ 以上のRXMを添加することによってp50, p65の活性化は抑制された (Fig. 4)。また $7.5 \mu\text{g/ml}$ 以上のRXMの添加によりFra 1, Jun Bの活性化も有意に抑制された (Fig. 5)。

考 察

好中球からのMMP-9産生に及ぼすマクロライド薬の効果を*in vitro*において検討したところ、14員環マクロライド薬であるRXMがLPSの刺激によって誘発されるMMP-9の産生を濃度依存的に抑制することが判明した。ヒトに 150mg ないし 300mg のRXMを経口投与すると血中濃度が徐々に上昇、 $6.8 \mu\text{g/ml}$ から $10.0 \mu\text{g/ml}$ で平衡に達することが報告されている^{6,7)}。本実験で観察されたRXMのMMP-9産生抑制濃度は $5.0 \mu\text{g/ml}$ であったことから、本実験の結果は炎症性刺激による好中球からのMMP-9産生をRXMが生体内においても抑制している可能性のあることを示唆している。

また本実験の結果はその産生抑制は転写因子レベルで調整されている可能性あることをも示唆している。

びまん性汎細気管支炎や慢性副鼻腔炎、嚢胞性肺線維症等の慢性炎症性気道疾患では基底膜の肥厚と多核白血球、特に好中球の著明な浸潤が観察される^{3,8,9)}。またこれらの炎症性疾患においては浮腫、粘膜下腺の拡張、胚細胞の増加、扁平上皮化生などが観察される^{3,8-10)}。このような組織学的変化は気道リモデリングと呼ばれ、細胞外マトリックスの広範な変化を伴っている¹¹⁾。

MMPは Zn^{2+} endopeptidase (proteinase) ファミリーのうちの細胞外マトリックスを分解する酵素の総称であり、生理的および病理的な組織破壊に重要な役割を果たしている^{12,13)}。MMP-9はgelatinase Bとも呼ばれ基底膜の重要な構成成分であるIV型、VII型コラーゲン、ラミニンを特異的に分解しリモデリングを惹起する主たる蛋白である。更にMMP-9は好中球を含む多くの炎症性細胞から産生されこれら細胞の血中から組織への遊走に不可欠である。またMMP-9は微小血管の透過性を亢進し浮腫を引き起こし、細胞の遊走を亢進することも示されている¹⁴⁻¹⁶⁾。これら報告はRXMの好中球からのMMP-9産生抑制作用が同薬剤の慢性気道炎症疾患における治療メカニズムのひとつであ

ることを示しているのかもしれない。

大部分のMMPは活性をもたないプロエンザイムの形で細胞から放出され、細胞外でプラスミン等によって活性化される¹⁷⁾。またMMPの細胞外での活性化は同時に産生されるTIMPによって調節されていることも知られている¹⁷⁾。本実験の結果は、炎症性刺激による好中球からのTIMP-1産生はRXMによって抑制されないことを明示していることから、マクロライド療法中に産生される可能性のある少量のMMP-9をTIMP-1が不活化、その結果、気道組織のリモデリングや炎症反応が調整されている可能性のあることが推察される。

参考文献

- 1) CATALDO D. D., TOURNOY K. G., VERMAELEN K., MUNAUT C., FOIDART J. M., LOUIS R., *et al.* : Matrix metalloproteinase-9 deficiency impairs cellular infiltration and bronchial hyperresponsiveness during allergen-induced airway inflammation. *Am. J. Pathol.* 161 : 491~498, 2002
- 2) KOYAMA M., TERANO S., SHIROTUKA M., *et al.* : Absorption, metabolism and excretion of RU28965 in human. *Jpn. J. Chemotherapy* 36 : 164, 1989
- 3) KEICHO N. & KUDOH S. : Diffuse panbronchiolitis-Role of macrolides in therapy-*Am. J. Respir. Med.* 1 : 119~131, 2002
- 4) 間島雄一 : 鼻・副鼻腔のリモデリング。耳鼻免疫アレルギー 21 : 7, 2002
- 5) DELCLAUX C., DELACOURT C., DORTHO M. P., BOYER V., LAFUMA C. & HARF A. : Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 14 : 28~295, 1996
- 6) ASANO K., KAMAKAZU K., HISAMITSU T. & SUZAKI H. : Modulation of Th2 type cytokine production from human peripheral blood leukocytes by a macrolide antibiotic, roxithromycin, *in vitro*. *Int. Immunopharmac.* 1 : 1913~1921, 2001
- 7) NOMA T., AOKI K., HAYASHI M., YOSHIZAKI I. & KAWANO Y. : Effect of roxithromycin on T lymphocyte proliferation and cytokine production elicited by mite antigen. *Int. Immunopharmac.* 1 : 201~210, 2001
- 8) TOMASHEFSKI J. F., ABRAMOWSKY C. R. & DAHMS B. B. : The pathology of cystic fibrosis. In : Davis PB, ed. *Cystic fibrosis*. New York : Marcel Dekker, 1993 : 435~489
- 9) LEE H. S. & MAJIMA Y. : Quantitative cytology of nasal secretions under various conditions. *Laryngoscope* 103 : 533~537, 1993
- 10) TIROUVANZIAM R., KHAZAL I. & PEAULT B. : Primary inflammation in human cystic fibrosis small airways. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 283 : L445~L451, 2002
- 11) ATKINS J. J. & SENIOR R. M. : Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28 : 12~24, 2003
- 12) 奥山 彬, 杉山 徹, 中島元夫 : Cyclin-dependent KinaseおよびMatrix Metalloproteinase阻害剤。癌と化学療法 24 : 1547~1562, 1997
- 13) 大谷吉秀, 藤井正人, 久保田哲朗, 他 : Matrix metalloproteinase (MMP) の研究および臨床の現状。癌と化学療法 25 : 957~968, 1998
- 14) ATKINS J. J. & SENIOR R. M. : Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28 : 12~24, 2003
- 15) HEROUY Y., MELLIOS P., BANDEMIR E., DICHMANN S., NOCKOWSKI P. & SCHOFF E. : Inflammation in stasis dermatitis upregulates MMP-1, MMP-2 and MMP-13 expression. *J. Dermatol. Sci.* 25 : 98~205, 2001
- 16) OHNO I., OHTANI H. & NITTA Y. : Eosinophils as a source of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 16 : 212~219, 1997
- 17) BIRKEDAL-HANSEN H., MOORE W. G. & BODDEN M. K. : Matrix metalloproteinases : a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4 : 197~250, 1993