

特別講演 1

進化するマクロライドの非抗菌活性

喜多英二

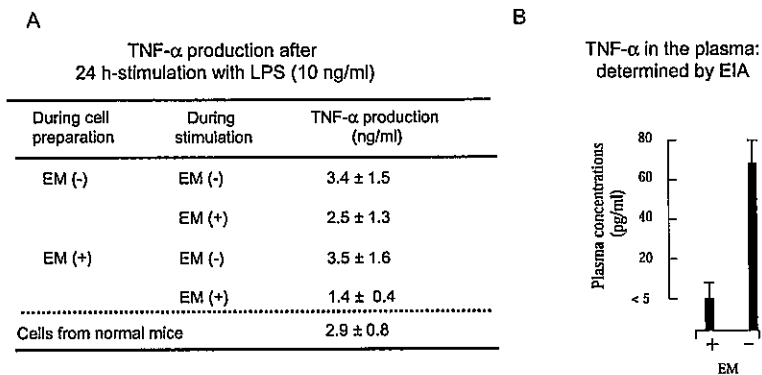
I. はじめに

14員環系マクロライドが有する非抗菌活性の研究は、マクロライド新作用研究会とともに発展し、既に長い歴史を有し、実に多くの新知見を見出してきた。作用標的には、病原体のみならず宿主細胞も含まれ、その作用は抗生剤の基本原則である「選択毒性」の範疇を超えている。このことが、マクロライドの非抗菌活性発現機構の解明をより困難なものにしてきた。私たちは、真核細胞と原核細胞に共通に存在するエレメントをターゲットにすることで、マクロライドの非抗菌活性作用機序を解明できるものと考えて、研究を展開してきた。本稿ではその一端をご紹介します、新作用研究会会員からのご意見、ご批判を仰ぎたい。

II. 薬剤濃度と細胞の応答性

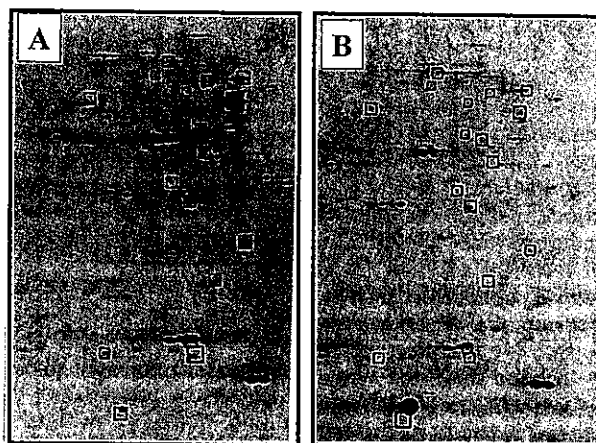
マクロライドが抗菌活性を示さない緑膿菌に対し、増殖抑制を示さない濃度で本菌の菌体外産物 (elastase, protease, phospholipase等) や、菌体周囲を取り巻くアルギネートの産生抑制効果を発現することが早くから見出されたのに引き続き、他の病原体においても同様の作用が報告された。しかし一方で、増殖環境からマクロライドが除去されると、急激にこれら菌体外産物の産生が、回復もしくは増加する現象も認められた。このことは、マクロライドの病原体に対する作用が可逆的であり、リバウンド現象を生じることを示唆していた。また *in vitro* で *mitogen* 刺激によるリンパ球や単球のサイトカイン産生に対する作用も条件によって異なることが認められた。この差異の多くは、マクロライド剤と細胞の接触時間や、薬剤の溶解

図1. 細胞内マクロライド濃度の急激な変化は細胞応答を変える



- A. EM (10 mg/kg/day)を7日間経口投与後、脾細胞浮遊液をEM (2 mg/ml)添加 もしくは非添加のbuffer, mediumを用いて調整。大腸菌内毒素(10 ng/ml)で24時間刺激後の培養上清中TNF- α 量をELISA定量。
- B. EM (10 mg/kg/day)を7日間経口投与マウスの腹腔内に、大腸菌内毒素(10 μ g)投与24時間後の血中TNF- α 量をELISA定量。

図2. EMの大腸菌蛋白合成に与える作用



EM(-)

EM(+)

EM共存下でマクロライド耐性大腸菌にhigh-salt stressを与えた後の、菌体内には発現が抑制される蛋白と産生が誘導される蛋白が存在した。

□; EM (5 μg/ml) 存在下で培養した大腸菌菌体内で、対照大腸菌に比して産生量が減少もしくは検出し得なかった蛋白

○; EMによって誘導された蛋白

の仕方などに起因している。細菌と異なり宿主細胞では、マクロライド細胞内に十分取り込まれることが必要であり、そのためには薬剤と細胞の接触時間が重要で、培養中に薬剤の一部が(顕微鏡レベルでの)沈殿をきたすような条件下では生体内と異なった結果を招く¹⁾。

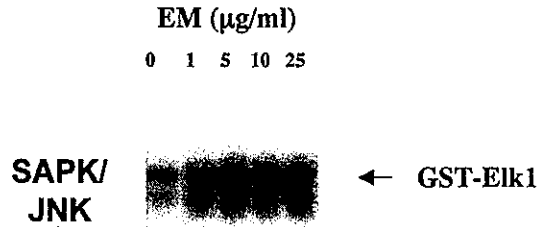
またマクロライド投与を受けた個体から臓器を摘出後、細胞浮遊液を作成する時点で薬剤がbuffer液中に存在しないと、生体内とは異なる反応を示すことになる。ロキシシロマイシン (RXM, 5 mg/kg/day) を7日間経口投与したマウスの脾細胞を調整する時点で、RXM (1 mg/ml) 含有もしくは非含有bufferを用いた時のLPS (10ng/ml) 刺激に対するTNF- α 産生量を比較すると、その産生量に大きな差異がみられ、刺激中に同薬剤が共存することで、その結果はさらに複雑に変化する(図1)。しかし、同RXM投与マウス体内でのLPS (10mg) 投与後の血中TNF- α 量は明らかに減少していた。このような事実は、マクロライドの細胞内外濃度の急激な変化が薬剤処理細胞に対するストレスとなり、産生蛋白の誘導産生に影響すると考えられた。このような急激な薬剤濃度変化によ

るストレスは、細菌に対しても認められ、マクロライド共存下で耐性大腸菌にhigh-salt stressを与えると、ストレス蛋白の誘導は抑制された(図2)。しかし逆に、マクロライド共存下で増殖させた耐性大腸菌を、1/10濃度の薬剤環境に移すと、急激に産生蛋白が増加することも認められた。このような現象は、マクロライドの存在がストレス応答を制御する一方で、薬剤濃度変化によりストレス蛋白誘導が生じることを、示唆するものである。

Ⅲ. リボゾームに対するストレス作用

マクロライドの細胞内標的であるリボゾームに対する作用から、ストレス誘発機序の解明を試みた。近年、 α -sarcin, ricin, Shiga toxin等のribotoxinとしての作用が詳しく解析され、“ribotoxic stress”の概念が確立されている。ricin A chainやShiga toxin A-subunitはRNA N-glycosidase活性を持つ酵素で、7千個のヌクレオチドから構成されるリボゾームRNA (rRNA)のうち、28S rRNAの5'末端から数えて4324番目の一個のアデニン(A4324)とリボース間のN-グリコシド結合を加水分解することによって、リボゾームを不活性化

図3. EMは内毒素刺激によるB細胞のSAPK/JNK活性化を増強する



マウス脾臓由来B細胞をEM (1~25 $\mu\text{g/ml}$) で24時間前処置後, 大腸菌内毒素 (10ng/ml) で18時間刺激後に, GST-Elk1 fusion 蛋白をJNKの基質としてimmunocomplex kinase assayを実施。

する。 α -sarcinは, ricin A chain作用部位に隣接する一個のリン酸ジエステル結合 (G4325/A4326間) を一個加水分解することによってリボゾームを不活性化する。これらのリボトキシンの作用によって, 細胞のタンパク質合成が阻害 (ペプチド鎖伸長反応が停止) され, 細胞は死に至る。真核細胞内の28Sリボゾーム上のこれらリボトキシン作用部位周辺の12塩基からなるプリン塩基に富む領域 (S/R loop) は細菌でも23SrRNA上に保存されておりペプチド鎖伸長因子結合部位にあたる。蛋白合成の停止で, 細胞は死に至ることになる。しかし, ribotoxinの中でShiga toxinの様にlipid raft中の特異レセプター (Gb3) に結合して細胞内に取り込まれる毒素では, mitogen-activated protein kinase (MAPK) ファミリーの一員であるstress-activated protein kinases (SAPK) /c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化を導く。この活性が持続すると, Bcl2の作用に拮抗し, caspase3の活性化を生じ, 細胞はアポトーシスに陥る。しかし, ribotoxic stressは同時にmitogen-activated protein kinase phosphatase 1 (MKP-1) をも活性化する。活性化MKP-1には, 活性化SAPK/JNK1の機能制御作用が存在するため, ribotoxic stressの強度や持続時間によって, 標的細胞の運命は異なる。SAPK/JNKの活性化と同時に, ERK型MAPKの活性化につながり, サイトカイン等の新たな蛋白合成を招きえる²⁾。標的細胞が特異レセプターを有するか否かで, ribotoxinに対する細胞の応答運命は異なってくる。マクロライドの細胞内標的がリボゾームであることから, 本剤にもこのようなribotoxic stress作用が

存在し得る可能性は十分に考えられる。

マウス脾臓からイムノカラムで分離したB細胞をエリスロマイシン (EM, 1~50mg/ml) 存在下で24時間培養後, LPS (10ng/ml) を添加しさらに24時間培養後の細胞内SAPK/JNK活性化を, GST-Elk1 fusion蛋白を基質としたimmunocomplex kinase assay法により測定した。その結果, EMは1 mg/ml以上の濃度で, LPS刺激B細胞内でのSAPK/JNK活性化を亢進させ得ることが確認された (図3)²⁾。ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) を用いた実験から, EMは50mg/mlでもHUVECの蛋白合成を抑制しなかった。一方ヒト末梢血多核白血球をEM (10mg/ml) 存在下で8時間処理後に, 緑膿菌由来のLPS (1 mg/ml) とphospholipase C (50ng/ml) で同時刺激時には, アポトーシスは顕著に抑制されたのに対し, 刺激後または刺激時に同濃度のEM処理を施すと, アポトーシスは顕著に亢進した。これらの結果は, RNase活性や脱プリン作用などの毒素生物活性を有さないマクロライドでは, SAPK/JNK活性化レベルとMAPKの活性化レベルのバランスが細胞の応答運命を規定するようと思われる。特にSAPK/JNK活性化経路はp53非依存性アポトーシス誘導経路として重要であり, さらに, 細胞内情報伝達系の活性化シグナルの相違は, 薬剤と細胞の接触タイミングや時間の長さによること, さらにこれら二つの要因は活性化刺激を受けるまでの細胞内薬剤濃度を規定するものと推察される。これらの要因が, マクロライドのアポトーシスに対する作用効果の差異となって現われているものと, 考えられる。

特にマクロライドの長期投与における生体内細胞の応答性変化を、一週間毎に細胞内情報伝達の変化をSAPK/JUK活性化レベルの変化で調べると、細胞応答性に大きな相違が確認され、既に報告したサイトカインmRNA発現の変化¹⁾と同じ傾向であることが、確認された。

真核細胞に対するribotoxic stressが²⁾、28SrRNAのSR-loopを標的としているが³⁾、細菌の23SrRNAにもSR-loopは保存されており、マクロライドの細菌に対する作用もこの領域を標的にしていることが推測される。特にメチル化されたりボゾーム中の塩基存在部位にこの作用がでやすいことから、マクロライドに耐性を示す病原細菌にribotoxic stressが発揮されやすいとも推測される。

IV. 抗炎症作用

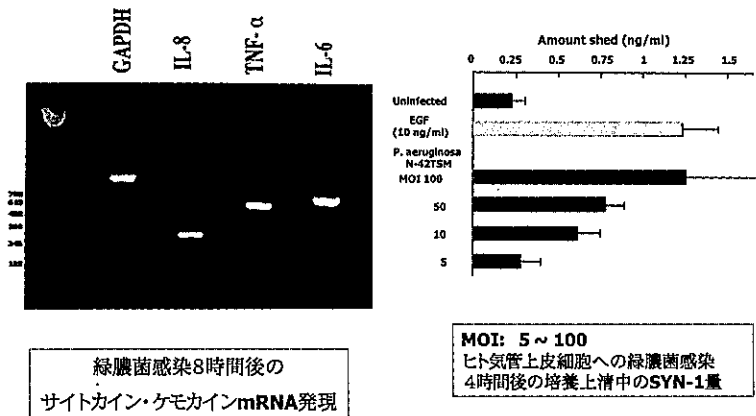
マクロライド新作用研究の早くから、本剤には抗炎症効果が存在することが、知られていた。その多くは、好中球やリンパ球の遊走・接着に関与する細胞表面のエフェクター分子や上皮細胞や単球・マクロファージ・樹状細胞からのケモカインや炎症性サイトカイン産生を、マクロライドが転写レベルで制御すると言うものであり、多くの研究者から支持されている。しかし、実験系によってはその効果が全く見られないか、逆に促進作用すら認められることも知られている。このことは、実験系における薬剤処理の仕方や時間、細胞調整時における薬剤濃度の問題など、多々要因が存在することを、既に述べた。しかし、ヒトにみられる長期投与を想定すれば、抗炎症効果の発現は疑いのないものと思われる。

近年の生体防御研究のなかで、著しい進展をみせているのが「栄養と免疫・内分泌」の領域である。筆者らも、「癌とマクロライド」研究の中で、補助的療法としてのマクロライド長期投与において、著しいcachexia改善効果を認め、その効果が血中IL-6値の低下と相関していることを明らかにした³⁾。さらに、その後の動物モデルを用いた研究から、担癌状態や慢性感染（抗酸菌感染）などにおける栄養状態の低下（食事量減少、体重減少、毛羽立ち、脱毛など）に対し、マクロライド併用はその進行を遅らせるか、改善することが確認さ

れた。この効果は、血中のIL-1, IL-6, TNF- α の減少と関連し、同時にleptin値のレベル低下とも相関していた。そこでleptin作用に拮抗するghrelinの産生に対するマクロライドの効果を検討した。結核菌（H37RV）気管感染C57BL/6マウスでは、感染4週日以降に血中leptin値が有意に上昇するが、EM（10mg/kg/day）を感染2週目から投与を開始したマウスでは、血中leptin値が非感染マウスとほぼ同レベルに抑えられ、感染6週目においても正常値の最大1.5倍に留まり（EM未処置感染マウス：平均3.2倍に上昇）、マクロ所見でも食欲低下・痩せ・毛羽立ちなどは観察されずにいた。免疫学的解析では、PPD抗原特異的CD4 T細胞がこのghrelin産生を担っていたことである⁴⁾。未処置マウスとの間で、肺内結核菌数に有意の差異を認めなかったが、foot-pad response及びPPD特異的T細胞増殖応答に有意の差異が認められ、感染後の50%生存日数の有意の延長を認めた。さらに興味あることは、正常マウスへのEM長期投与では、このようなghrelin産生亢進を認めなかったことである。一方endotoxin shock modelにおいては、EM（10mg/kg/day）の3日間前投与により、内毒素投与後の血中leptin値、TNF- α 及びIL-6値がいずれもEM未処置マウスに比し有意に低値であり、血中ghrelin値は逆に高値であることが確認された。

この結果、内毒素投与72時間後の死亡率は、EM未処置マウスは100%死亡であるのに対し、EM処置群では45~60%の死亡率に留まった。これらの事実は、血中に炎症性サイトカインが上昇するような条件下でのみ、マクロライドがghrelin-leptin系の制御効果を発現しえることを示唆するものである。また先に述べたPPD特異CD4T細胞に、PPD抗原刺激を加えた後にはghrelin受容体の発現が顕著に亢進することも確認しており、免疫個体への再感染時に特異免疫のみならず、栄養状態の亢進によるinnate resistanceの維持にも、マクロライドが関与するものと期待される。事実、ストレス付加実験において、EM処置マウスはghrelin産生の亢進とNK活性の上昇を認めるのに対し、EM未処置マウスでは著しいleptin産生亢進とNK活性の低下が認められた。マクロライドがghrelin-leptin系の制御効果により発現する抗炎症作用は、acquired immu-

図4. ヒト気管上皮細胞 (BEAS-2B) への緑膿菌感染によるSYN-1遊離とサイトカイン・ケモカイン産生の誘発



nityとinnate immunityの両抵抗性充進に寄与し得ると考えられ、慢性疾患における宿主栄養状態と生態防御の両面から、本薬剤の長期投与は臨床効果を発現しえると、期待される。

V. 粘膜感染制御作用

呼吸器粘膜上皮での感染成立には、病原体が粘膜上皮細胞に接着することが前提条件である。このさい、細胞表面のプロテオグリカンが微生物の細胞への接着のための非特異的レセプターとして働く。気道上皮細胞には、プロテオグリカンのなかでもシンデカン・ファミリーが豊富であり、とりわけシンデカン1 (SYN-1) がシンデカン・ファミリーの主要な構成成分である。微生物が気道粘膜上皮細胞に接着すると、標的になった細胞はシンデカンを細胞表面から放出し、このことによって微生物の粘膜細胞への接着と定着を阻止しようとする。

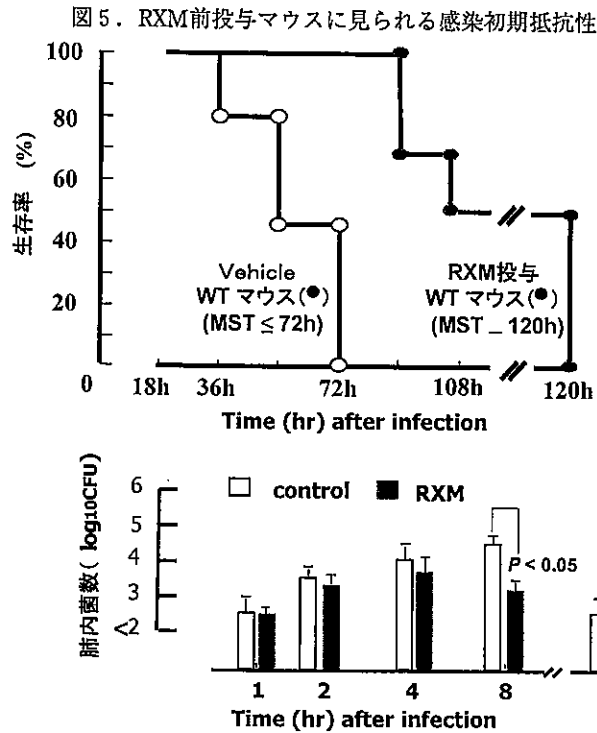
いくつかの臨床研究によって、細菌性肺炎を繰り返し起こした患者や重症の肺炎の患者、特に幼弱な子供の患者では、気管支・肺泡洗浄液 (BALF) 中にSYN-1が豊富に存在していることが明らかにされている。このような臨床的な観察は、微生物の接着のさいのSYN-1の放出が、気道における微生物感染に対する局所性の防御反応と密接に関連していることを示唆している。

SYN-1の放出を左右する要因としては、宿主側

の要因と病原微生物側の要因とがあり、宿主側の要因としては、Martrilysin (matrix metalloproteinase MMP-7) とFurinがある。Martrilysinは基質金属プロテアーゼに属し、肺、肝、乳腺などの上皮によって産生され、病原体に対する宿主の防御も含め全般的なホメオスタシスの過程に関与している、直接的にSYN-1の放出を制御する。Fusinはほぼすべての型の宿主細胞によって産生され、哺乳動物のプロ・タンパクやプロ・ホルモンの分解、細菌毒素の活性化に関与し、間接的にSYN-1の放出を制御する。病原微生物側の要因としては、微生物が産生する蛋白分解性の毒素があり、直接的または間接的にSYN-1の放出を制御する。我々は「病原体接着に伴うSYN-1遊離の制御が顕性・不顕性感染を規定する重要な因子である」との仮説に基づき、その基礎研究を進めると同時に、マクロライド剤にその制御作用があるか検討した。

1. シンデカン放出とサイトカイン・ケモカインの産生:

培養ヒト気道上皮細胞 (BEAS-2B株) に緑膿菌 N-42TSM株を感染させた後のSYN-1の培養液中へのSYN-1放出量を測定した。図4の左図は、感染12時間後の細胞におけるIL-8, TNF- α , IL-6のメッセンジャーRNA (mRNA) の発現をしめしたものであり、右図は、感染2時間後の培養上清中のSYN-1をELISAで定量した結果である。MOI (細



マクロライド耐性肺炎球菌気管感染後の生存曲線 (A) と、肺内菌数の推移 (B)

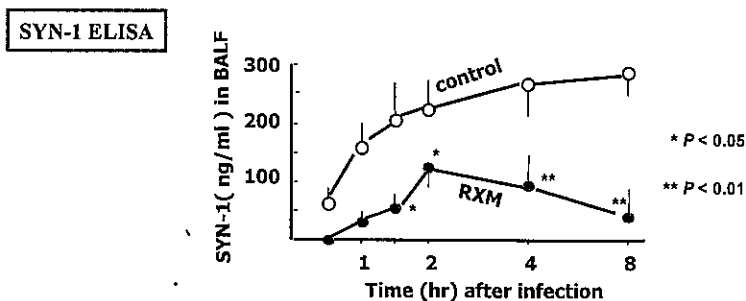
胞あたりの感染菌数) を高くするとSYN-1の培養液中への放出が著しく高まる。このように、気道上皮細胞は、細菌感染によってSYN-1を放出するとともに、ケモカイン・サイトカインmRNAを発現するようになる。さらに、感染BEAS-2B細胞におけるIL-8産生とSYN-1放出とのカイネティクスを比較すると、SYN-1遊離量は感染直後から直線的に上昇し、感染8時間でピークに達した後も高い濃度を維持するが、IL-8の濃度はSYN-1濃度が高値に達した感染4～6時間頃から直線的な上昇を始める。すなわち、SYN-1放出がIL-8産生に先行して起こり、SYN-1放出がIL-8などのサイトカイン産生の引き金を引いたと考えられる。この感染系でも、BEAS-2B細胞をRXM (5 μg/ml) で48時間前処置した時にSYN-1遊離とIL-8産生の抑制が観察されたが、24時間前処置や感染時の同時投与では有意な抑制作用は認められない⁵⁾。

2. RXM投与による肺炎連鎖球菌感染の制御:

Balb/c系のマウスに、マクロライド耐性肺炎連

鎖球菌強毒株 (NMU112株) を気管内に感染させた時の生存曲線を見ると、マウスは重篤な菌血症を起こして感染36時間後から死に始め、72時間までに全マウスが死亡する (図5)。一方、RXM (5 mg/kg/day) を7日間前投与した動物では、最終的には全てのマウスが死亡するが有意に平均生存日数が延長した。興味あることに、肺内生菌数は感染8時間前後に差異をみとめたが、その後はRXM投与群と非投与群で有意の差異は認めなかった。しかし、肺の病理組織には顕著な差異が現われ、非投与群は出血性肺炎に菌血症を伴って感染後72時間までに死亡した。気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中のSYN-1濃度の推移を検索した結果、RXM非投与群では投与群に比して有意にSYN-1量が高値で、感染後の時間経過とともにほぼ直線的に上昇を続け、4時間でピークに達した後8時間でもなお高い濃度が維持されていた (図6)。これに対して、RXM投与群ではSYN-1の放出は一過性で、感染後2時間をピークに減少し、8時間ではほとんど検出できなくなった。さらに、これら

図 6. RXM 投与マウスにおける気管内感染後のBALF内SYN-1量



感染マウスのBALF中のケモカインを定量すると、RXM非投与群のBALF中では、KCがMCP-1よりも優位であり、BALF中白血球数および肺内ミエロパーオキシダーゼ活性ともに、RXM非投与群で有意に高値であった。このことから、肺内病変の差異は肺内浸潤白血球による二次障害に起因し、菌の増殖度の差異ではないと考えられた。

SYN-1の細胞外ドメインを切断するMMP-7の肺組織内活性をzymographyで測定したところ、RXM投与マウスでは感染後その活性が有意に抑制されており⁶⁾、このことがSYN-1遊離の抑制を招いたものと考えられた。あらかじめRXMをマウスに投与しておくことで、感染に伴う滲出性炎症反応は二次的組織障害を招かないレベルにまで制御されたものと考えられた。

以上の結果から、RXM投与はMMP-7の活性化抑制を介して、病原体の気道粘膜上皮細胞への接着に伴うSYN-1遊離を制御しえると推察された。

VI. まとめ

マクロライド新作用研究会が始まって既に10年以上が経過したが、この間の研究の多くは作用機序解明が求められたため、単一細胞に対するマクロライドの作用解析に固執してきた傾向がある。マクロライド研究で先駆的役割を果たしてきた日本には、既に蓄積された膨大な研究成果が存在する。日本国内での研究もこれらのデータを基に、異なる細胞へのマクロライドの作用が結果としてどのように有機的に反応しあって、個体の中で統合的に効果を発現するのかを、明確にすべき段階に到達しているのではないかと。なぜなら、マクロ

ライドの非抗菌的生体防御調節効果は、一元的なものではなく多岐にわたる作用が総合的に機能し、個々の作用は標的細胞の種類や活性化状態、さらには薬剤処理時期や時間によっても変化するため、たとえ個々のメカニズムが集約的に論じられるとしても、表現される作用は相反する結果を招くことが多いからである。この有機的・統合的作用解明によって初めて、臨床効果をマクロライド研究者以外にも理解し得るものになると考えられる。

ここ数年の間に、マクロライドの非抗菌活性を利用した臨床応用が海外でも実施されるようになり、今後一層の研究発展が期待されるようになった。同時に海外では、テトラサイクリン/ミノサイクリンの非抗菌的作用についての研究が、著しい展開をみせている。このことは、ribotoxic stressを与え得る抗菌剤には、共通の生体防御調節作用が存在し、常在細菌が作り出すリボゾーム作用物質が生命維持に積極的にかかわっているとさえ想像させ得るものであり、更なるマクロライド研究への好奇心がかきたてられる。

文 献

- 1) 喜多英二, 澤木政好, 三笠桂一: マクロライド剤のサイトカイン産生に対する影響。炎症と免疫 3: 68~73, 1995
- 2) 喜多英二: 「志賀毒素の構造と機能」血小板血栓形成の分子機構 (藤村吉博, 他編): p.261~269, 2002, 関西血栓フォーラム出版
- 3) SAKAMOTO M., MIKASA K., MAJIMA T., HAMADA K., KONISHI M., MAEDA K., KITA E. & NARITA N.: Anti-cachectic effect of clarithromycin for patients with unresectable non-small cell lung cancer.

-
- Chemotherapy 47 : 444~451, 2001
- 4) KITA E., *et al.* : Modulation of host resistance to mycobacterial infection through the regulation of ghrelin-leptin balance by macrolides. 2004, in press
- 5) KITA E., MIKASA K. & KASAHARA K. : Syndecan shedding from epithelial cells affects host defense against respiratory infection. Int. Cong. Ser. 1257C : 21~25, 2003
- 6) YASUDA T., KASAHARA K., MIKASA K. & KITA E. : Attenuation of lung inflammatory responses to macrolide-resistant pneumococcal infection by macrolides. 2004, submitted for publication