

## 論文の内容の要旨

論文題目 慢性気道感染症のエリスロマイシン療法における遺伝子および遺伝子制御マーカーの研究

氏名 稲葉 敦

マクロライド系抗菌薬は細菌のリボソームに作用し、タンパク合成を阻害することで抗菌作用をきたす。細菌と真核生物のリボソームでマクロライド系抗菌薬の結合性は異なることから選択性の高い抗菌薬として臨床でよく用いられている。1980年代にそれまで致死的な疾患であったびまん性汎細気管支炎 (diffuse panbronchiolitis: DPB)において、エリスロマイシン (erythromycin: EM)を代表とする14員環マクロライド系抗菌薬を少量(400から600 mg)長期(数ヶ月から1年以上)投与することで、著しく生命予後が改善したことをきっかけに、マクロライド系抗菌薬はその抗菌活性以外の作用が注目されるようになった。これまでの研究によってマクロライド系抗菌薬はヒトの様々な細胞や組織に作用して、炎症性サイトカインやROS (reactive oxygen species)、細胞接着因子などの産生を抑制したり、炎症細胞のapoptosisを促進したりすることで抗炎症作用を来すことが明らかになっている。その中でも特に好中球と気道上皮細胞への作用が慢性気道感染症の改善に寄与していると考えられている。

現在、14、15員環マクロライド系抗生物質は、DPBにのみならず、その過剰な好中球性炎症を抑える作用を期待して、慢性副鼻腔炎 (chronic sinusitis: CS)や副鼻腔気管支症候群 (sinobronchial syndrome: SBS)、気管支拡張症 (bronchiectasis: BE)、難治性喘息、急性増悪を繰り返す慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease: COPD)においても用いられている。しかし、その有効性は患者によって程度が異なり、その治療効果マーカーの探索、作用点の解明が求められている。これまでの研究の多くは培養細胞やモデル動物を用いたものが中心であり、本研究では臨床の場合においてEMを用いたマクロライド少量長期療法によって呼吸器症状の改善を認めた患者の治療前後の血液を用いてRNA-seq (RNA sequencing)による網羅的遺伝子発現解析を行い、これまでの研究では明らかにならなかった作用点や治療マーカーを探索することを試みた。また検出された作用点や治療マーカーがBEAS2-B (A culture of a human bronchial epithelial cell line transformed with SV40 virus)を用いた気道上皮細胞モデルにおいても、マクロライド添加によって遺伝子発現変動が認められるか検討を行った。

研究協力施設である複十字病院において2016年6月1日~2018年4月30日の間、上述の慢性気道疾患の診断となり、好中球性炎症の関与が考慮される患者のうち、2か月以上の喀痰を伴う咳嗽を認め、主治医が新規にマクロライド少量長期療法を導入することとした成人患者を対象とした。合計10名の患者(男性1名、女性9名)が研究に参加し、EM内服導入時と、その6週間±2週間後の外来受診時に、1回ずつ血液検体の採取(PAX gene blood RNA

tubes)と visual analog scale (VAS)による臨床症状の評価を行った。VAS では治療効果を判定するために7つの症状の程度（息切れの程度、咳の強さ、胸の痛み、痰の色、痰の量、痰の切れの悪さ、睡眠困難など）について定量的評価を行った。10名の内1名がEM内服を自己中断しており、2名が2回目のVASを得ることができなかった。その他7例のVASの結果で minimally important difference (MID)を10mmとしたとき、患者番号3、4、5、10番で改善項目数が3項目と最も多く、マクロライド少量長期療法に対して比較的感受性が高い群と考えられた。その内、患者番号4番は「痰の色」について欠損値があったため、患者番号3、5、10番の採血検体を用いてRNA-seqを行った。

VASによって選択した3症例の治療前後の血液(計6サンプル)から PAXgene Blood RNA Kit (Qiagen)を用いて total RNA の抽出、TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit (Illumina)を用いて mRNA の精製、ライブラリー作成を行った。NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2 (150 Cycles) (Illumina)、NextSeq 500 シークエンサー (Illumina)を使用し、ライブラリーの両端の配列解析 (paired-end シークエンス)を行った。

シークエンサーから出力された fastq ファイルは fastQC (version 0.11.5)でクオリティチェック、PRINSEQ (version 0.20.4)によってクオリティコントロールを行い、各サンプルの総リード数の平均は29030565 ペアリードとなった。ヒトゲノム標準配列 (GRCh37)へのシークエンスデータのアライメントは HISAT2 (version 2.0.4)を用いて行い、平均の Alignment rate は90.6%であった。HISAT2 から出力された SAM フォーマットのアウトプットを、BAM フォーマットに samtools (version 1.3.1)を用いて変換し featureCounts (version 1.5.0)を用いて各遺伝子領域にアライメントされたリード数の抽出を行った。

featureCounts で得られたリードカウントデータから R のプログラムである stats (version 3.5.1)を用いて主成分分析を行ったところ、患者間の発現変動パターン之差が、マクロライド少量長期療法前後によってもたらされる差よりも大きいことが示唆された。したがって発現変動解析では edgeR (version 3.22.3)と DESeq2 (version 1.20.0)を用いて EM 内服前後で患者を対応させたうえで2群間対応有の解析を行った。edgeR で175 genes、DESeq2 で30 genes が DEG (Differentially expressed genes)として検出され、DESeq2 で検出された遺伝子は全て edgeR で検出された遺伝子に含まれた。edgeR で有意差を認めた175 genes (127 protein coding gene、48 ncRNA)のうち、3例全てで発現が亢進もしくは減弱した68 protein coding gene (亢進45 genes、減弱23 genes)について、Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID v.6.8)を用いて Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)パスウェイ解析を、The Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes Protein (STRING version 10.5) database を用いてタンパク質相互作用解析を行った。KEGG パスウェイ解析では、有意に発現変動していると評価されたパスウェイは ribosomal protein とミトコンドリア電子伝達系複合体Iを構成するタンパク (NDUFS5、NDUFS4、NDUFA6、NDUFA1)に関するものであった。

タンパク質相互作用解析では6つのネットワーク、①ribosomal protein、②ミトコンドリア

ア電子伝達系複合体 I、③granzyme と heat shock protein 90 alpha、④hemoglobin など赤血球由来、⑤defensin、⑥alkaline phosphatase が検出された。このうち①②③のネットワークを構成する遺伝子はいずれも発現が亢進しており、④⑤⑥を構成する遺伝子はいずれも発現が低下していた。②③⑥の3つのネットワークは①ribosomal protein のネットワークと関係性を持ち、いずれもこれまでマクロライドとの関連の報告のないものであった。68 protein coding gene のうちタンパク質相互作用を有していた 44 genes は全体で 238 対の相互作用を有していた。実際の臨床の間では、個々の患者が複雑な病態を有し、エリスロマイシン療法が長期間にわたることを考えると、単一の遺伝子の発現変動がマクロライドの作用を代表して反映できると仮定するのではなく、マクロライドの作用点が複数の遺伝子ネットワークの中に分散して存在することを想定し、それぞれのネットワークの中の遺伝子を選択して組み合わせ、それら複数の遺伝子のバイオシグナチャー (biosignature) としてマーカーを構成することを目指すことがより実用であると考へた。そのため②③⑥の複数のネットワークの中から比較的相互作用の多い遺伝子である *ALPL* (alkaline phosphatase)、*GZMA* (granzyme A)、*HSP90AA1* (heat shock protein 90 alpha family class A member 1)、*TOMM7* (translocase of outer mitochondrial membrane 7) をマクロライド少量長期療法の新たな作用点や治療効果マーカーの候補遺伝子として選択した。

選択した候補遺伝子については VAS による評価が得られた全 7 例の治療前後の発現量を定量的 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) によって評価し、paired t test で検定を行った。VAS の結果からマクロライド少量長期療法感受性群とされた 4 例 (患者番号 3、4、5、10 番) では、いずれも RNA-seq の結果と一致して、マクロライド少量長期療法後に *ALPL* で発現低下が、*GZMA*、*HSP90AA1*、*TOMM7* では発現亢進が確認された。4 例の相対発現量 ( $\Delta\Delta Ct$  値) を用いて、投与前後の発現変化を統計学的に検討 (paired t test) したところ、*GZMA* ( $P$  value 0.02)、*HSP90AA1* ( $P$  value 0.04) において有意差が認められた。一方、感受性群 4 例と非感受性群 3 例 (患者番号 1、7、8) の 2 群に分けて、相対発現量の比較を行ったところ、いずれの遺伝子でも有意差は得られなかった。

気道上皮細胞株である BEAS-2B を用いた実験では、EM、poly (I:C) (Polyinosinic-polycytidylic acid sodium salt)、LPS (Lipopolysaccharide) を用いて以下の 4 つの方法 (①コントロールとして試薬を加えずに 48 時間培養、②EM 添加し 48 時間培養、③刺激実験開始 24 時間後に poly (I:C) もしくは LPS を添加し 24 時間培養、④EM 添加 24 時間後に poly (I:C) もしくは LPS を追加しさらに 24 時間培養) で刺激実験を行い、いずれも実験開始 48 時間後に RNA 抽出を行った。EM 添加による抗炎症作用の効果を確認するため、添加する EM、poly (I:C)、LPS の濃度を変えながら定量的 RT-PCR によって *IL1B* (interleukin 1 beta) や、*IL6* (interleukin-6)、*CXCL8* (C-X-C motif chemokine ligand 8) の発現を①Control と②EM の比較、③poly (I:C) or LPS と④EM/poly (I:C) or LPS の比較を行って統計学的に検討 (t test) したところ、EM 5  $\mu\text{g}/\text{mg}$  添加のみ安定して control に比べて有意な *IL1B* の発現低下が認められた ( $P$  value 0.01)。 *IL1B* の発現低下が確認された①control と②EM 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の条件で、*ALPL*、

*GZMA*、*HSP90AA1*、*TOMM7* の発現変化について同様に検討を行い、*HSP90AA1* のみ EM 5  $\mu\text{g/ml}$  添加で、有意な発現低下が認められた ( $P$  value 0.01)。マクロライド少量長期療法に感受性を認めた患者の末梢血では発現が亢進していたため、対照的な結果となった。

以上より、マクロライド感受性の患者から得られた末梢血の RNA-seq を用いた網羅的遺伝子発現解析からマクロライド少量長期療法の新たな作用点、治療効果マーカーとして今回、*ALPL*、*GZMA*、*HSP90AA1*、*TOMM7* は有力な候補遺伝子であることが示された。またその背景には EM による複数の ribosomal protein の活性化が関与している可能性が示唆された。今回の結果について文献的考察を行い、マクロライドの新作用機序として①ribosomal protein の発現亢進による p53 を介した抗炎症作用、②*ALPL* 発現低下、③*HSP90AA1* による autophagy の亢進、④granzyme による apoptosis の誘導、⑤*TOMM7* を介した mitophagy の促進、などの存在が示唆された。またこれらの候補遺伝子は気道上皮細胞の刺激実験では患者末梢血と異なる発現変動を認めており、細胞や組織によってマクロライドがもたらす作用が異なる原因の一つとして、ribosomal protein の発現の仕方が細胞や組織によって異なることが考えられた。今回の結果から EM による ribosomal protein の活性化はこれらの作用機序を介して抗菌作用と異なるマクロライドの免疫調節作用を担い、また EM と ribosomal protein の反応性の違いはマクロライド少量長期療法に対する感受性の個人差にも関係している可能性が示された。今回の知見は新たな抗菌作用を持たないマクロライドの創薬への応用や、さらなる慢性気道感染症における抗菌薬以外の治療ターゲットの探索に役立つものと期待される。