

審査の結果の要旨

氏名 稲葉 敦

本研究はエリスロマイシン(erythromycin: EM)を用いたマクロライド少量長期療法における遺伝子および遺伝子制御マーカーの探索を目的として、臨床の場でマクロライド少量長期療法に感受性を示した患者の末梢血を用いてRNA-seq (RNA sequencing)を行い、網羅的遺伝子発現解析、パスウェイ解析、タンパク質相互作用解析を行った。また相互作用の多い発現変動遺伝子の中からマーカー候補遺伝子を選択し、感受性群と非感受性群で発現の変化に差が認められるか、また気道上皮細胞モデルにおいてもEM添加によって発現の変動が認められるか実験を行った。今回の研究によって以下の結果を得ることができている。

1. 研究協力施設である複十字病院の外来において10名の患者が研究に参加した。平均年齢は69.8±7.12歳、診断は気管支拡張症4例、副鼻腔気管支症候群4例、肺非結核性抗酸菌症2例であった。研究参加者に喫煙歴のある患者や、慢性閉塞性肺疾患、喘息、心疾患の既往のある患者は含まれなかった。また、糖尿病や慢性腎機能障害、透析など免疫能に影響を与える疾患の既往のある患者や、ステロイドなどの免疫抑制剤を使用している患者は含まれなかった。
2. マクロライド少量長期療法の前後でvisual analog scale (VAS)を用いて7つの臨床症状(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)の評価を行い、治療効果判定を行った。10名の患者の内、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。このうち患者番号4番で「痰の色」について欠損値があったため、患者番号3、5、10番の血液検体を用いてRNA-seqを行った。
3. RNA-seqによって得られたリードカウントデータを用いて、網羅的遺伝子発現解析を行い175 genes (127 protein coding gene、48 ncRNA)で有意差を認めた。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、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)パスウェイ解析とタンパク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に関係するものであった。

4. 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。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。
5. 選択した4つの候補遺伝子については、定量的 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)によって、VAS の結果から感受性群とされた4症例ではいずれも 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例の相対発現量を用いて、投与前後の発現変化を統計学的に検討したところ、*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。
6. 気道上皮細胞株である BEAS-2B を用いた実験では EM 5 µg/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)。この条件で *HSP90AA1* のみ EM 5 µg/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、本論文はマクロライド感受性の患者から得られた末梢血を用いた RNA-seq を行い、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、*ALPL*、*GZMA*、*HSP90AA1*、*TOMM7* は有力な候補遺伝子であることを示した。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。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、個人によって治療感受性が異なる原因の解明、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、学位の授与に値するものと考えられる。