

## 鼻茸線維芽細胞におけるマトリックス蛋白分解酵素 (MMP) 産生に及ぼすマクロライドの作用

金井 憲一 洲崎 春海

昭和大学医学部耳鼻咽喉科学教室

浅野 和仁

昭和大学医学部第一生理学教室

The Influence of Macrolide Antibiotics on Matrix Metalloproteinases (MMPs) Production from Nasal Polyp Fibroblasts in Vitro

Kenichi KANAI, Harumi SUZAKI

Department of Otorhinolaryngology, School of Medicine, Showa University, Tokyo, Japan

Kazuhito ASANO

Department of Physiology, School of Medicine, Showa University, Tokyo, Japan

The influence of macrolide antibiotics, roxithromycin (RXM) and josamycin (JM) on matrix metalloproteinases (MMPs) production was examined by using human nasal fibroblasts (NPFs) stimulated with lipopolysaccharide (LPS). NPFs, 5 to 7 generations, were stimulated with  $1.0 \mu\text{g/ml}$  LPS in the presence of various concentrations of macrolides for 24 h. The concentrations of MMPs, MMP-2 and -9, and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 in the culture supernatants were examined by ELISA. RXM, but not JM, could inhibit the production of both MMP-2 and -9 from NPFs, which was increased by LPS stimulation. The minimum concentration of RXM showing suppressive effect on MMPs production was  $7.5 \mu\text{g/ml}$ . On the other hand, RXM scarcely affected TIMP-2 production from NPFs induced by LPS stimulation. We then examined the influence of RXM on MMPs mRNA expression in NPFs after LPS stimulation. Addition of the agent into cell cultures caused the reduction in mRNA expression, which was enhanced by LPS stimulation.

### はじめに

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の導入によってびまん性汎細気管支炎や慢性副鼻腔炎等の慢性炎症性気道疾患の治療成績が飛躍的に向上したことは周知の事実である。本療法の作用機序は好中球をはじめとする炎症性細胞に

対するマクロライド薬の抗炎症作用によっていることが推測されているものの不明な点が少なくない。

上・下気道における慢性炎症反応発現部位を組織学的に観察すると基底膜の肥厚、粘膜下腺の肥大・過形成、気道線毛上皮破壊、杯細胞の増加等が観察される<sup>4,5)</sup>。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っている<sup>1,2)</sup>. この種の変化を組織リモデリングと呼び, リモデリング発現には線維芽細胞や上述した炎症性細胞が産生する matrix metalloproteinase (MMP) が重要な役割を果たしているとされている<sup>2,3)</sup>. マクロライド少量長期投与により上・下気道では炎症性細胞の浸潤や組織の病的変化が著明に抑制されることが報告されている<sup>1)</sup>ものの, その機序については不明な点が多い. そこで今回, 鼻茸線維芽細胞を用いてマクロライド薬の MMP 産生に及ぼす効果について検討したので報告する.

## 材料と方法

### 線維芽細胞の誘導

手術時に摘出した鼻茸から分離・培養した線維芽細胞を実験に使用した. 摘出鼻茸組織を 500U/ml のペニシリン, 500  $\mu$ g/ml のストレプトマイシン, 5.0  $\mu$ g/ml のファンギゾンを含む滅菌した PBS でよく洗浄後, 組織を細切, 10%牛胎児血清を含む RPMI1640 培地 (培地) に浸漬, スライドグラスで圧平し, CO<sub>2</sub> incubator 内で培養した. 線維芽細胞が増殖後, 組織を除去, 細胞が 10×10 cm のシャーレにコンフルントになるまで培養した. その後, 培養細胞を 0.25%トリプシンで処理, 10%牛胎児血清を含む RPMI-1640 培地で 2 倍に希釈, 再

度培養する操作を繰り返し, 5-7 代目の線維芽細胞を被験細胞として実験に使用した.

### 薬剤

本実験で使用したマクロライド薬は Aventis Pharm 株式会社から提供していただいた RXM および SIGMA 株式会社から購入した ジョサマイシン (JM) であった. これらの薬剤を 100%メタノールに 20mg/ml の濃度に溶解したものを培養液で所定の濃度に希釈し実験に使用した.

### 細胞の培養とサンプルの調整

培養線維芽細胞をトリプシンで処理しシャーレから剥離後, 洗浄, 培地 1ml 当り  $2.5 \times 10^5$  個の細胞浮遊液を作製した. 細胞浮遊液 1ml を 24 穴のプレートに播種, 2 時間静置後, 死細胞と非付着細胞を除去し, 各種濃度に調整した LPS ならびに RXM あるいは JM を添加, 24 時間培養した. 培養終了後, 上清を採取, MMP 測定用のサンプルとした. MMP mRNA 発現検索のための細胞は培養後 12 時間目に採取した.

### MMP の測定

上述した方法によって採取した培養上清中の MMP-2, MMP-9, TIMP-2 の濃度を市販の ELISA Kit (Amersham International) を用

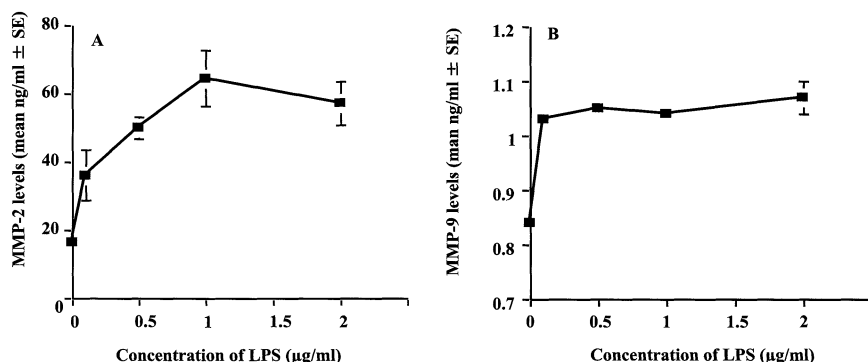


Fig. 1 Influence on MMP-2 and MMP-9 production from nasal polyp fibroblasts by LPS stimulation *in vitro*.

いて測定した。

mRNA 発現の検索

Cataldo ら (2002) の報告<sup>4)</sup>に準じた RT-PCR 法によって培養線維芽細胞における MMP mRNA 発現を検索した。

結 果

1. 線維芽細胞からの MMP 産生におよぼす LPS の効果

線維芽細胞に各種濃度に調整した LPS を添加，細胞を培養し，MMP 産生に及ぼす LPS の効果を検討した。Fig. 1A に示したように線維芽細胞を LPS で刺激したところ，線維芽細胞からの MMP-2 の産生が LPS

の濃度依存的に増加，1.0  $\mu\text{g/ml}$  の LPS 刺激によりその産生が最高となった。また，MMP-9 ならびに TIMP-2 の線維芽細胞からの産生も LPS の刺激により著明に増加した (Fig. 1B, Fig. 2)。

2. LPS 刺激による線維芽細胞からの MMP 産生におよぼす RXM と JM の効果

線維芽細胞培養系に各種濃度の RXM あるいは JM を添加，LPS 刺激による MMP 産生に及ぼすマクロライド薬の効果を検討した。Fig. 3A に示したように 7.5  $\mu\text{g/ml}$  の RXM を培養系に添加したところ培養線維芽細胞からの MMP-2 産生が有意に抑制された。また，RXM は MMP-2 と同様に MMP-9 の線維芽からの産生を抑制した

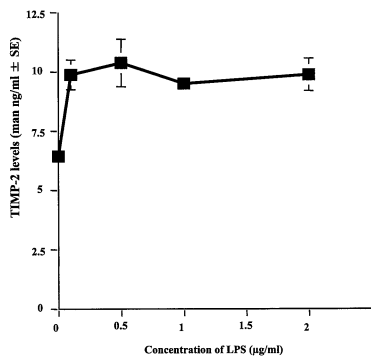


Fig. 2 Influence on TIMP-2 production from nasal polyp fibroblast by LPS stimulation *in vitro*.

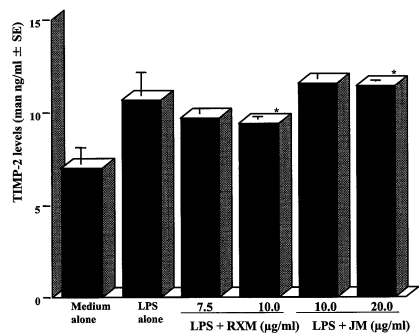


Fig. 4 Influence of macrolide antibiotics on TIMP-2 production from Nasal polyp fibroblasts by LPS stimulation (1.0  $\mu\text{g/ml}$ ) *in vitro*. \* : N.S. (vs LPS alone)

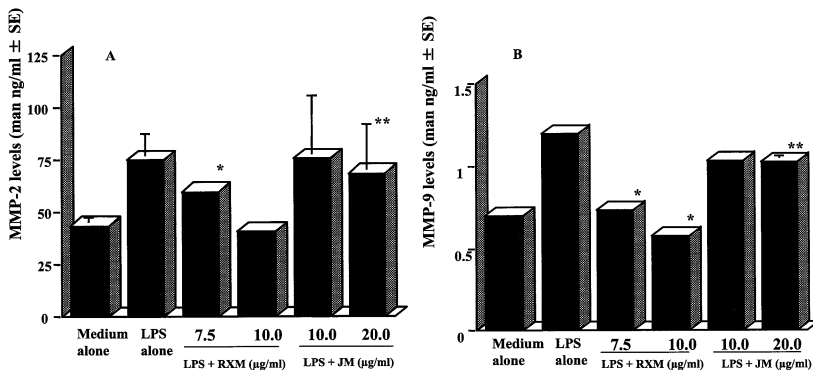


Fig. 3 Influence of macrolide antibiotics on MMP-2, -9 production from Nasal polyp fibroblasts by LPS stimulation (1.0  $\mu\text{g/ml}$ ) *in vitro*. \* :  $P < 0.05$  (vs LPS alone) \*\* : N.S. (vs LPS alone)

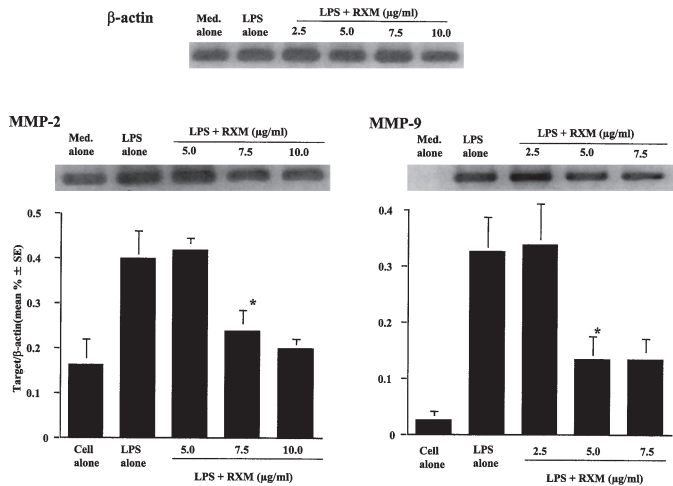


Fig. 5 Influence of macrolide antibiotics on MMP mRNA expression in nasal polyp fibroblasts induced by LPS stimulation (1.0 μg/ml) *in vitro*. \* : P<0.05 (vs LPS alone)

(Fig. 3B). しかしながら、培養系への JM の添加は、その添加量が 20.0 μg/ml であっても MMP の産生には何ら影響が認められなかった (Fig. 3A, B). 次に、MMP の不活化作用を有するとされている TIMP-2 の産生に及ぼすマクロライド薬の効果を検討した。Fig. 4 に示したように RXM, JM 共に LPS 刺激によって誘導される TIMP-2 の産生には何ら影響を及ぼさなかった (Fig. 4).

### 3. MMP mRNA 発現に及ぼすロキシシロマイシンの効果

線維芽細胞培養系に各種濃度の RXM を添加、LPS 刺激による MMP mRNA 発現に及ぼすマクロライド薬の効果を検討した。Fig. 5 に示すように線維芽細胞を LPS で刺激したところ、MMP-2mRNA と MMP-9mRNA の発現が増強され、この発現増強は培養系への 7.5. μg/ml 以上の RXM 添加によって有意に抑制された。

## 考 察

鼻茸線維芽細胞からの MMP 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 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 ないしは 300mg の RXM を経口投与すると血中濃度が徐々に上昇、6.8 μg/ml から 10.0 μg/ml で平衡に達することが報告されている<sup>5,6)</sup>。本実験で観察された RXM の MMP 産生抑制濃度は 7.5 μg/ml であったことから、本実験の結果は炎症性刺激による線維芽細胞からの MMP 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。

MMP はその基質特異性から MMP-1, MMP-2, MMP-3 等いくつかに分類され、本実験で検討した MMP-2 と MMP-9 は基底膜の重要な構成成分である IV 型ならびに VII 型コラーゲンやラミニンを特異的に分解することが知られている<sup>3)</sup>。これら酵素の発現亢進により血管内皮や粘膜上皮の基底膜が破壊され、その結果多量の血液成分が漏出、浮腫が増強されると考えられている<sup>3)</sup>。また、基底膜のこれら酵素による破壊は好中球等の炎症性細胞の局所への浸潤に必須の現象であるともされている。したがって、ここに示した結果は RXM が線維芽細胞

からの MMP-2 や MMP-9 の産生を抑制し、炎症反応発現部位の浮腫や同部位への炎症性細胞の浸潤を調節、炎症性疾患の発症や増悪化を抑制していることを示唆しているであろう。

各種細胞から産生された MMP の活性は同時に産生・放出されるインヒビター、TIMP によって調節されていることが知られている<sup>7)</sup>。そこで次に、RXM が線維芽細胞からの TIMP 産生にどのような影響を及ぼすのかを検討したところ、RXM の培養系への添加量が 10.0  $\mu$ g/ml であっても TIMP 産生は全く抑制されなかった。このことは、マクロライド薬投与中に産生された MMP を TIMP が不活化、組織障害を防御している可能性のあることを示唆しているのかもしれない。炎症局所への好酸球や好中球等の炎症性細胞の浸潤には細胞接着因子、ICAM-1 や VCAM-1 の血管内皮細胞での発現が必須で、これら接着分子の発現を TIMP が有意に抑制することが報告されている<sup>8)</sup>ことから、本実験の結果 (Fig. 4) はマクロライド薬の TIMP 産生非抑制作用が炎症局所への炎症性細胞の浸潤抑制に寄与している可能性も推察される。

14 員環マクロライド薬を細胞に作用させると細胞内へのカルシウムイオンの流入が抑制されることが報告されている<sup>9)</sup>。また、この細胞内へのカルシウムイオンの流入阻止作用は細胞膜の物質透過を抑制することも報告されている<sup>10)</sup>。一方、近年、マクロライド薬は転写因子活性化抑制作用さらには mRNA 発現抑制作用を有することが報告され<sup>11)</sup>、マクロライド薬のこれらの作用と炎症性サイトカイン産生抑制が密接に関係していることも示されている<sup>11)</sup>。そこで次に、本実験で示した RXM の MMP 産生抑制作用機序を検討するために MMP mRNA の発現に及ぼす薬剤の効果を検討したところ、細胞培養系への RXM の添加によって LPS 刺激による MMP mRNA の発現の増強が強く抑制された。これらの結果は、RXM

が LPS 刺激による MMP mRNA の発現を抑制、MMP の産生そのものを調節していることを示唆しているであろう。

MMP は本実験で示したように炎症性刺激によって線維芽細胞から産生されるのみならず、好中球のような多核白血球からも多量に産生されることが知られている<sup>7)</sup>。また、びまん性汎細気管支炎や慢性副鼻腔炎等の慢性炎症性気道疾患ではこれら疾患の病態形成には好中球が重要であることも報告されている<sup>11)</sup>ことから、今後多核白血球からの MMP 産生に及ぼすマクロライド薬の効果を検討する必要がある。

## 参 考 文 献

- 1) KEICHO, N., KUDOH, S.: Diffuse panbronchiolitis-Role of macrolides in therapy- *Am. J. Respir. Med.* 1: 119. 2002.
- 2) 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. 2003.
- 3) LECHAPT-ZALCMAN, E., COSTE, A., d'ORTHO, M. P., et al.: Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in nasal polyps. *J. Pathol.* 193: 233. 2001.
- 4) CATALDO, D.D., TOURNOY, K.G., VERMAELEN, K., et al.: Matrix metalloproteinase-9 deficiency impairs cellular infiltration and bronchial hyperresponsiveness during allergen-induced airway inflammation. *Am. J. Pathol.* 161: 491. 2002.
- 5) KOYAMA, M., TERANO, S., SHIROTUKA, M., et al.: Absorption, metabolism and excretion of RU28965 in human. *Jpn. J. Chemotherapy* 36: 164. 1989.
- 6) NOMA, T., AOKI, K., HAYASHI, M., et al.: Effect of roxithromycin on T lymphocyte proliferation and cytokine production elicited by mite antigen. *Int. Immunopharmac.* 1: 210. 2001.
- 7) BOSSE, M., CHAKIR, J., ROUABHIA, M., et

- al.: Serum matrix metalloproteinase-9: Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with steroid responsiveness in moderate to severe asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159: 596. 1999.
- 8) LEE, K. S., JIN, S. M., KIM, H. J., LEE, Y. C.: Matrix metalloproteinase inhibitor regulates inflammatory cell migration by reducing ICAM-1 and VCAM-1 expression in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 111: 1278. 2003.
- 9) ZHAO, D.M., XUE, H.H., CHIDA, K., et al.: Effect of erythromycin on ATP-induced intracellular calcium response in A549 cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 278: L726. 2000.
- 10) LEURS, R., SMITH, M.J., TIMMERMAN, H.: Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. *Pharmacol. Ther.* 66: 413. 1995.
- 11) DESAKI, M., TAKIZAWA, H., OHTOSHI, T., et al.: Erythromycin suppresses nuclear factor- $\kappa$ B and activator protein-1 activation in human bronchial epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 267: 124. 2000.

---

### 質 疑 応 答

質問 黒野祐一（鹿児島大）

LPSではなく、polysaccharidではないか。グラム陽性菌にはLPSはないと思う。マクロライドが細胞内に吸収されるまである程度の培養時間を必要とするので、あらかじめマクロライドを作用させるほうが抑制作用が強いと思う。

応答 金井憲一（昭和大）

マクロライドは、NF- $\kappa$ Bの活性化を抑制するというデータをもっているため、転写因子レベルで作用していると考えられる。

連絡先：金井 憲一

〒142-0064

東京都品川区旗の台 1-5-8

昭和大学医学部耳鼻咽喉科学教室

TEL 03-3784-8563 FAX 03-3784-0981