

免疫活性化剤ビザンチンの開発

徳島文理大学薬学部 微生物学教室 櫻井 純

抗菌剤は、感染症の治療において革命的な進歩をもたらしたことは周知のことである。しかしながら、その治療に抗菌剤が繁用、乱用されるにしたがい、耐性菌の出現が深刻な問題となっている。現在使用されている抗菌剤は、殺菌、静菌作用など、微生物にダメージを与える作用を有しているため、微生物は、これらの作用を打破する手段を新たに持つことで抗菌剤の作用から免れる機構、すなわち、耐性機構を構築し、その結果、抗菌剤と耐性菌とのしのぎ合いになっている。また、ガン治療の第一線で使用されている制癌剤は、低い特異性、重篤な副作用、さらには、低い薬効など、多くの問題があるのは周知の事で、感染症やガン治療にこれらの諸問題を克服した薬剤の出現が待たれている。これらの問題の解決策の一つとして、宿主の免疫力の活性化による微生物やガン細胞を排除する方法が注目されてきた。

結核菌細胞表層糖脂質に存在する trehalose-6,6'-dimycolate、(TDM)(トレハロースの 6, 6' 位に β -分岐 α ヒドロキシ長鎖脂肪酸であるミコール酸が二分子エステル結合)は、マクロファージ(M ϕ)活性化作用を有するが、強い毒性を有することが知られてきた。その後、*Corynebacterium matruchotii* に存在する TDM と類似体、trehalose-6,6'-dicorynomycolate (TDCM)は、TDM と比較すると毒性が低いにもかかわらず、M ϕ 活性化作用を有していることが報告された。しかしながら、TDCM は、4つの不斉中心を有しており、大量合成が困難であるため、薬剤として実用化する方向には至らなかった。そこで、今回、33種類の不斉中心を持たない TDCM 類似体 (TBU)を合成し、TBU の In vitro における貪食細胞に対する効果、そして、in vivo における細菌、及び、癌細胞に対する免疫賦活作用について解析した。

免疫賦活作用の指標として、初期感染防御に重要な役割を演じているマクロファージに注目し、種々のTBUで処理されたマウスの腹腔M ϕ の貪食能を蛍光ビーズの取り込み量を指標として、また、M ϕ 内の活性酸素産生能についてはH₂DCFDAを用い測定した。次に、in vivo におけるTBUの効果を検討するため、これらのTBUを尾静脈投与したマウスの末梢血中のサイトカイン(IL-6、TNF- α 、IFN- γ)遊離量をELISA法により測定した。その結果、各々のTBU、及び、TDCMの中でM ϕ の貪食能、及び、活性酸素産生能、マウスの末梢血中へのIL-6、

IFN- γ 遊離作用は、脂肪側鎖がC10を有する α -分岐エステル型のTBU64、アミド型のTBU89及び、 β -分岐エステル型のTBU101が、高い活性を示すことが判明した。特に、TBU101(ビザンチン)は、M ϕ の貪食能、活性酸素産生能、及び、マウスの末梢血中へのサイトカイン遊離能において最も高い活性を示した。一方、TNF α の遊離は、ほとんど認められなかった。

ビザンチンのヒト由来細胞である THP-1 細胞に与える作用を検討するため、ビザンチン処理による mRNA 発現についてサイトカイン、及び、ケモカイン関連に焦点をあて DNA マイクロアレイにより網羅的に解析した。その結果、34,090 種類の mRNA の内、ケモカインである MIP-1 β 、IL-8 の mRNA 発現が顕著であることが判明した。そこで、33 種の TBU で 2 時間処理したヒト由来細胞、THP-1 細胞、A549 細胞、そして、DLD-1 細胞、の培養上清を用い、細胞からの MIP-1 β 、及び、IL-8 遊離を測定した。その結果、本剤処理細胞が MIP-1 β の最も高い遊離量を示し、TBU64と比較すると、約 8~10 倍高いことが明らかとなった。また、IL-8 の遊離も同様の結果であった。一方、この条件下においても、TNF α の遊離は、ほとんど認められなかった。次に、THP-1 細胞からの MIP-1 β 遊離メカニズムを検討するため、種々の細胞内シグナル伝達阻害剤、及び、リン酸化特異的抗体を用い解析した。その結果、ビザンチン処理による THP-1 細胞からの MIP-1 β の遊離は、PKC δ 、ERK1/2、そして、NF- κ B の阻害剤で強く阻害されること、さらに、これらのタンパクが特異的にリン酸化される事が判明し、このビザンチンの作用は、PKC δ 、ERK1/2、そして、NF- κ B を経由する系が密接に関係していることが推察される。さらに、ビザンチンの THP-1 細胞に対する細胞毒性試験、及び、Ames 試験を行ったが、THP-1 に対する細胞毒性も、変異原性もないことが明らかとなった。従って、ビザンチンは、ヒト由来単球・マクロファージ系の細胞に対して毒性を示さず、MIP-1 β 、IL-8 などケモカイン遊離活性が最も高い化合物であることが判明した。

次に、in vivoにおけるビザンチンの作用を解析するため、マウス腹腔内投与後、腹腔内におけるケモカイン遊離、細胞数、及び、細胞種の同定を行った。ビザンチンを腹腔内投与して、2、そして、24時間後、0.05% EDTA-PBS(-)溶液で腹腔内を洗浄し、細胞懸濁液を回収し、その上清液中のケモカイン(MIP-2)、M ϕ 活性化サイトカイン(IFN- γ 、IL-17)、そして、炎症性サイトカイン(TNF α)の遊離量を測定した。ビザンチンを腹腔内投与するとマウス腹腔内にIL-17、MIP-2、そして、IFN- γ の遊離が認められたが、TNF α の遊離は、ほとんど認められなかった。

次に、ビザンチンで24時間処理したマウス腹腔内から得られた細胞懸濁液の沈渣を0.05% EDTA-PBS溶液で懸濁し、細胞数を測定後、細胞をリンパ球の抗原であるCD4、NK細胞の抗原であるCD8、単球・マクロファージの抗原であるCD11b抗体で処理し、腹腔に集積する細胞をフローサイメトリーにより解析した。その結果、ビザンチン処理マウスは、コントロールマウスと比較して、いずれの細胞も腹腔内に約10~15倍の細胞集積が認められ、特に、NK細胞の浸潤が顕著であった。以上から、ビザンチンは、著しい免疫賦活作用を有することが明らかとなった。

ビザンチンの高い免疫賦活作用から、本剤によるin vivoにおける細菌増殖阻止効果、さらに、腫瘍の増殖、転移阻止効果が期待される。まず、強力な毒素を産生してガス壊疽を引き起こすウエルシュ菌と日和見感染症の代表的病原菌である緑膿菌感染に対する効果を検討した。ビザンチンをマウスの腹腔に投与24時間後、 5.0×10^7 CFU/mouseのウエルシュ菌、または、 3.0×10^{10} CFU/mouseの緑膿菌を腹腔投与したところ、いずれもマウスの致死は、著しく抑制された。さらに、緑膿菌感染3時間後、本剤を投与した場合、本菌によるマウスの致死は、有意に抑制されたが、ウエルシュ菌の場合、致死は、抑制されなかった。次に、本剤をマウスの腹腔に投与して24時間後、マウス腹水癌モデルとしてFM3A細胞を腹腔に接種し、18日後観察すると、コントロールマウスの場合、精巣、膵臓、横隔膜にガン細胞の定着が認められたが、本剤前投与の場合、ガン細胞の増殖、転移、定着は全く認められなかった。さらに、FM3A細胞を腹腔に接種後、1, 3日後、本剤を投与しても著しい延命効果が認められた。従って、ビザンチンは、強い癌抑制効果を示す事が判明した。一方、ビザンチンのin vivoにおける抗菌、抗腫瘍活性は、100[g/マウスで認められるが、50mg/マウス投与7日後においても、マウスはすべて生存しており、急性毒性がない事が判明した。

以上の結果より、今回、合成したTBUの中で、特に、ビザンチンは、マウスMφの貪食能、活性酸素及びサイトカイン・ケモカイン(MIP-2、IL-17、IFN- γ)産生亢進作用を示して免疫賦活作用を誘導し、抗菌及び抗腫瘍作用を示すことが判明した。従って、安全性試験の結果も考え合わせると、ビザンチンは、強力な免疫賦活作用を基盤とした感染症、及び、腫瘍治療薬になり得ると考える。