

賀来 敬仁 論文内容の要旨

主 論 文

Immunomodulatory effect of linezolid on Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* supernatant-induced MUC5AC overexpression in human airway epithelial cells

MRSA 培養上清によるヒト気道上皮細胞での MUC5AC 過剰分泌に対する
リネゾリドの抑制効果

賀来 敬仁、柳原 克紀、森永 芳智、山田 康一、原田 陽介、右山 洋平、
長岡 健太郎、中村 茂樹、泉川 公一、河野 茂

(Antimicrobial Agents and Chemotherapy 58: 4131-4137, 2014)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻
(主任指導教員：柳原 克紀教授)

緒 言

リネゾリドは最初のオキサゾリジノン系抗菌薬であり、バンコマイシン耐性腸球菌およびMethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) による感染症に対して使用される。リネゾリドは肺への組織移行性に優れることから、MRSA肺炎において第一選択薬として用いられている。また、抗菌作用だけでなく、TNF- α 産生の抑制などの免疫調節作用も報告されている。抗菌薬の免疫調節作用は、マクロライド系抗菌薬で多く報告されており、その一つに気道粘液中のムチンを構成する主な蛋白であるMUC5ACの過剰分泌の抑制効果がある。MUC5ACの過剰分泌は慢性気道感染症において気道閉塞、気管支拡張、低酸素血症、抗菌薬の浸透性の低下などを引き起こすため、その制御は重要である。また、MRSAが主な原因菌の一つである人工呼吸器関連肺炎でも、ムチンの過剰分泌が報告されている。そこで、今回我々は、MUC5AC過剰分泌に対するリネゾリドの抑制効果について検討した。

対象と方法

リネゾリドのMRSAに対する直接的な抗菌作用を防ぐために、MRSAを72時間培養した培養上清を使用した。0.22 μ mのフィルターを通したMRSA培養上清で、気道上皮細胞 (NCI-H292) を24時間刺激し、気道上皮細胞培養上清のMUC5AC蛋白をELISA法で測定した。また、MRSA培養上清による刺激6時間後および9時間後において、気道上

皮細胞での MUC5AC mRNA の発現量を、RT-PCR を用いて評価した。リネズリド による抑制効果については、ヒトの肺胞上皮被覆液 (ELF) のトラフ値である $5 \mu\text{g/ml}$ とピーク値で $20 \mu\text{g/ml}$ を用いて検討した。また、Western blot 法を用いて、細胞内シグナル解析を行なった。

結 果

まず、MRSA培養上清によるMUC5AC蛋白の過剰分泌について検討した(n=3)。蛋白レベルでの検討では、1/40希釈したMRSA培養上清の刺激によってMUC5AC蛋白が有意に増加した($p < 0.05$)。刺激6時間後と9時間後におけるmRNAの検討では、MRSA培養上清による刺激で6時間後と9時間後でのMUC5ACのmRNAが有意に上昇していた ($p < 0.05$)。次に、MUC5AC過剰分泌に対するリネズリドの抑制効果を検討した。リネズリドは $5 \mu\text{g/ml}$ と $20 \mu\text{g/ml}$ のいずれの濃度においても、MRSA培養上清によるMUC5AC蛋白の過剰産生を有意に抑制した ($p < 0.05$) (n=3)。刺激6時間後のmRNAの検討においてもリネズリドによる抑制効果が認められた ($p < 0.001$) (n=6)。

MRSA培養上清によるMUC5AC過剰分泌の機序を明らかにするために、MAPキナーゼ阻害剤を用いた検討を行った(n=4)。JNK阻害剤およびp38阻害剤ではMUC5AC過剰分泌は抑制されなかったが、MEK1/2阻害剤がMUC5AC蛋白の過剰分泌を有意に抑制した ($p < 0.05$)。最後に、リネズリドによる抑制効果の機序を明らかにするために、Western blot 法による細胞内シグナルの解析を行ったところ、MRSA培養上清によってERK1/2のリン酸化が起こり、リネズリドはそのリン酸化を阻害した。

考 察

リネズリドはMRSA培養上清によるMUC5ACの過剰分泌を抑制した。MRSA培養上清によるMUC5AC過剰分泌の機序は、ERK1/2のリン酸化であり、黄色ブドウ球菌由来のペプチドグリカンによるMUC5AC過剰分泌の報告と同じであった。リネズリドは、このリン酸化を抑制することによって、MUC5AC過剰分泌を抑制していたが、本研究ではMRSA培養上清を使用していることから、気道上皮細胞にリネズリドが直接作用して、抑制効果を示したと考えられた。黄色ブドウ球菌感染症におけるリネズリドの免疫調節作用としては、黄色ブドウ球菌の毒素産生抑制による炎症性サイトカイン産生抑制効果が、これまでに報告されている。本研究で使用したMRSA培養上清にも、MRSAの菌体外毒素が含まれているため、生体でのMRSA感染によるMUC5ACの過剰分泌においては、毒素産生抑制および気道上皮細胞への直接作用の両面で、リネズリドが抑制効果を示す可能性がある。

本研究において、リネズリドの免疫調節作用の一つとして、MUC5AC過剰分泌の抑制効果が示された。気道感染症において、MUC5AC過剰分泌の制御は重要であり、本研究の結果は、MRSAによる気道感染症でリネズリドを使用する根拠の一つになりうると考えられた。