

主論文の要旨

**Biochemical and cellular activity of chemically
synthesized elastase inhibitor (S-AFUEI) from
*Aspergillus fumigatus***

〔アスペルギルス症における合成エラスターゼ阻害物質 (S-AFUEI) の
生理活性・生物活性に関する研究〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 呼吸器内科学分野

(指導：橋本 直純 准教授)

福井 保太

【緒言】

侵襲性肺アスペルギルス症 (IPA) は重症の日和見感染症の一つであり、近年世界中で増加している。IPA の治療では抗真菌薬の Voriconazole や Amphotericin B が第一選択とされているが奏効率はそれぞれ 52.8%、31.6%と十分ではなく、新規の治療法が期待されている。殺真菌作用の抗真菌薬に加えて、新規の抗真菌薬を開発する候補として病原性因子を標的とする薬剤が注目されている。

我々は肺アスペルギルス症の患者から分離した *Aspergillus fumigatus* の臨床分離株が強いエラスターゼ活性を持つことから、エラスターゼと病原性の関連について注目した。この *A. fumigatus* 由来 elastase (AFUE) を阻害すれば肺組織傷害が軽減され、肺アスペルギルス症の治療に役立つ事が期待される。共同研究者の奥村らは *A. fumigatus* の培養上清液から elastase inhibitor を発見し、*Aspergillus fumigatus* elastase inhibitor (AFUEI) と命名した。Native-AFUEI (N-AFUEI) の収量は微量であり、治療に応用するために Synthetic-AFUEI (S-AFUEI) の試作を行った。

今回 S-AFUEI の各種生理学的検討を行った。*Aspergillus* はヒト肺に感染すると組織破壊性病変を作るが、エラスチンに加えコラーゲン、フィブリノゲンが標的の一つとなっていると考えられており、AFUE のヒトコラーゲン、ヒトフィブリノゲン水解活性を S-AFUEI が阻害するかを検討した。さらにヒト肺アスペルギルス症への臨床応用を探るため、S-AFUEI が AFUE の正常ヒト微小気管支上皮細胞・正常ヒト肺動脈血管内皮細胞・正常ヒト肺胞上皮細胞傷害性を阻害するか検討した。

【対象及び方法】

肺アスペルギルス症患者由来の *A. fumigatus* 株を YCB -エラスチン培地で 3 日間培養し、DE52 cellulose および Sephadex G-75 のカラムクロマトグラフィーによって AFUE を精製した。ウェスタンブロットは N-AFUEI の一次構造全体の C-E-K-E-A-Q-F-V-K-Q-E-I-G-Q-P-Y-T (5~22 残基) でウサギを免疫することによって生成した抗 AFUEI 抗体を使用した。エラスターゼ活性は基質として GAAPLNA (Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA) を用いて測定した。熱安定性は S-AFUEI を 37℃、50℃、60℃、および 80℃ で 10 分間加熱した後、4℃まで急速に冷却し、GAAPLNA に対するエラスターゼ阻害活性を測定した。AFUE の基質特性を調べるためにヒトコラーゲン (Type IV)、ヒトフィブリノゲン水解活性を測定した。ヒト細胞傷害性試験は培養したヒト細胞 (正常ヒト微小気管支上皮細胞・正常ヒト肺動脈血管内皮細胞・正常ヒト肺胞上皮細胞) をトリプシン処理し、培地に再懸濁し、96 マルチウェルプレートに播種した。AFUE を細胞に添加し、37℃ で 24 時間インキュベートした。テトラゾリウム塩/ホルマザンシステムに基づいた細胞計数キットを使用して、生細胞数を比色定量した。これらの活性を S-AFUEI が阻害するか検討した。

【結果】

S-AFUEI の生理学的検討

ウェスタンブロットでは S-AFUEI (7525.1 Da) の分子質量に対応する均一なバンドが観察された。エラスターゼ阻害活性試験では、S-AFUEI は N-AFUEI と同等のエラスターゼ阻害活性を示し、ジスルフィド結合のない AFUEI および部分的に合成された AFUE よりも強い阻害活性を示した。熱安定性試験では S-AFUEI の残留活性は、37 °C で 100±0.5%、50 °C で 98.6±1.0%、60 °C で 95.1±1.6%、80 °C で 53.9±4.3% であり、耐熱性が確認された。

S-AFUEI のヒトコラーゲン (Type IV) 及びヒトフィブリノゲン水解阻害活性

S-AFUEI (3.75 µg) のヒトコラーゲン (Type IV) 水解阻害活性を調べた。AFUE はヒトコラーゲンを 30 分後から水解し始め 180 分後にほぼ水解したのに対し、S-AFUEI は AFUE のヒトコラーゲン水解活性を強く阻害し 180 分後でも水解されなかった。

S-AFUEI (3.75 µg) のヒトフィブリノゲン水解活性を調べた。AFUE はヒトフィブリノゲンを 10 分後から水解を始め 30 分後にほぼ水解したのに対し、S-AFUEI は AFUE のヒトフィブリノゲン水解活性を強く阻害し 30 分後でも水解されなかった。

AFUE のヒト細胞傷害と S-AFUEI の細胞傷害阻害活性

正常ヒト肺動脈血管内皮細胞、正常ヒト微小気管支上皮細胞、正常ヒト肺胞上皮細胞に対する AFUE の細胞傷害性を確認した後に、AFUE 1 mol に対し S-AFUEI を各モル比で反応させ、AFUE の細胞傷害性を阻害するか検討した。肺動脈血管内皮細胞では AFUE 単独では細胞生存率 41 % に対し、S-AFUEI 0.25 mol で 54 %、0.50 mol で 84 %、0.75 mol で 100 % と生存率が向上した。微小気管支上皮細胞では AFUE 単独では細胞生存率 22 % に対し、S-AFUEI 0.25 mol で 61 %、0.50 mol で 80 %、0.75 mol で 95 % と生存率が向上した。肺胞上皮細胞では AFUE 単独では細胞生存率 55 % に対し、S-AFUEI 0.25 mol で 67 %、0.50 mol で 82 %、0.75 mol で 95 % と生存率が向上した。S-AFUEI は濃度依存性に AFUE のヒト細胞傷害性を阻害し、AFUE 1 mol に対し S-AFUEI 0.75 mol を加える事により、ほぼ 100 % 細胞傷害性を阻害した。

【考察】

肺アスペルギルス症は、血管浸潤を伴う組織破壊を引き起こすことが知られている。エラスチンは肺の約 20% を占め、肺組織を構成する重要な成分であると考えられている。さらに、エラスチンは動脈の中膜の弾性線維に豊富に分布しており、IV 型コラーゲンは基底膜を含む動脈の内膜に豊富に存在している。AFUE はエラスチンに加えてコラーゲンを水解することにより血管侵襲を引き起こしている可能性があり、S-AFUEI はそれらを抑制する事で血管侵襲を抑制出来る可能性がある。フィブリノゲンは血液凝固に重要な成分であり、AFUE によるフィブリノゲン水解作用を S-AFUEI が阻害する事により出血傾向を抑制する可能性が示唆された。

奥村らは肺アスペルギルス症病態モデルマウスで、N-AFUEI と Amphotericin B の併用による効果を調べたところ、Amphotericin B 単独よりも生存率が高くなる傾向がみ

られると報告している。AFUE はラット肺に出血を起こさせ、肺胞内ならびに細気管支内出血がみられ、好中球などの浸潤、フィブリン様物質の滲出が認められたことから、肺組織傷害に本酵素が関わっていることが推定されたが、N-AFUEI はこれを阻害することで肺組織傷害を抑制した。今回 N-AFUEI と S-AFUEI が同等のエラスターゼ阻害活性、ヒトコラーゲン水解活性、ヒトフィブリノゲン水解活性を示した事から、肺アスペルギルス症病態モデルで S-AFUEI と Amphotericin B の併用は効果がある可能性が示唆された。

今回新たに S-AFUEI のヒトアスペルギルス症への臨床応用を探るため、最も頻度の高い菌種である *A. fumigatus* 由来 elastase(AFUE)の正常ヒト微小気管支上皮細胞・正常ヒト肺動脈血管内皮細胞・正常ヒト肺胞上皮細胞への傷害性と、それらを S-AFUEI が阻害するか検討した。まず AFUE による細胞傷害性を調べたところ何れの細胞に対しても傷害性を認めた。肺動脈血管内皮細胞への傷害性は肺アスペルギルス症における咯血の原因となり得ると考えられた。微小気管支上皮細胞ならびに肺胞上皮細胞への傷害性は組織侵襲の原因となり得ると考えられた。次に AFUE の細胞傷害性を S-AFUEI が阻害するかを検討した。AFUE に対し S-AFUEI は濃度依存的に生細胞数を増加させ、AFUE の細胞傷害性を S-AFUEI が阻害する事が判明した。S-AFUEI が AFUE のヒト細胞傷害性を阻害した事からヒト肺アスペルギルス症における咯血、気管支及び肺胞組織侵襲を S-AFUEI が軽減する可能性が示唆された。

【結語】

今回 N-AFUEI と同じアミノ酸配列かつ 3 次元構造を持つ S-AFUEI を合成した。S-AFUEI は AFUE のヒトコラーゲン、ヒトフィブリノゲン水解活性を N-AFUEI と同等に阻害する事を確認した。高収量で得られる S-AFUEI は AFUE のヒト由来細胞（肺動脈血管内皮細胞、微小気管支上皮細胞、肺胞上皮細胞）に対する傷害作用を阻害したことから、ヒト肺アスペルギルス症でも既存の抗真菌薬との併用で治療効果が期待できる。