

ジエチルジチオカルバメートの新規作用の薬理的解析
- 嫌酒薬ジスルフィラムの適応拡大を目指した基礎研究 -

分子機能薬学専攻 分子機能薬学講座 遺伝子機能応用学分野 松野 嵩

ジスルフィラムは、古くから慢性アルコール中毒の治療薬として使われる嫌酒薬である。本薬剤は、比較的安全性が高いことから、現在では他の疾患への適応拡大を目指した研究が注目されている。近年、興味深いことに、その活性代謝物であるジエチルジチオカルバメート (DDTC) ががん細胞においてプロテアソーム阻害効果を示すことが報告された。プロテアソームは細胞内のタンパク質分解において重要な役割を担っており、その代表的な基質に NF- κ B 経路の抑制因子である I κ B α がある。NF- κ B は、細胞増殖や炎症応答などにおいて中心的な役割を担う転写因子であるが、その活性制御の不良は様々な疾患とも関連することが知られている。そこで、本研究では、プロテアソームの阻害が NF- κ B 経路を抑制できるという知見に鑑み、DDTC のプロテアソーム阻害効果を介した NF- κ B 経路の抑制作用に着目し、疾患治療への応用を目指した種々の基礎的検討を行った。

第 1 に、NF- κ B が細胞生存・増殖を活性化することで病態を促進する疾患として、原発性滲出液リンパ腫 (PEL) に着目した。PEL は、HHV-8 の感染が原因で発症する B 細胞性悪性リンパ腫であり、PEL 患者のほとんどが HIV 感染者であることが報告されている。現在、HIV 感染症は HAART 療法の普及によって治療可能な疾患となりつつあるが、PEL などの AIDS 関連リンパ腫 (ARL) を併発した患者は依然として予後不良である。したがって、PEL を含めた ARL の治療法を確立することは極めて重要である。本検討では、PEL 病態の促進因子である NF- κ B を標的とした新規治療薬の開発を目的に、HHV-8 感染細胞に対する DDTC の細胞死誘導効果について検討を行った。

まず、DDTC の効果を *in vivo* で評価するため、PEL 病態モデルマウスを用いた検討を行った。その結果、DDTC は PEL 病態モデルマウスにおける腹水の貯留や脾腫、体重増加などの病態を改善し、*in vivo* において DDTC が PEL に対して有効であることが示された。

次に、DDTC の作用メカニズムについて、*in vitro* において検討を行った。まず、DDTC によるプロテアソーム阻害効果を検討するために、HHV-8 感染ヒト PEL 細胞株 (BC-3) 及びヒト慢性骨髄性白血病細胞株 (K562) を用いて、プロテアソーム阻害の指標となるユビキチン化タンパク質の蓄積量変化を検出した。その結果、BC-3 細胞、K562 細胞共に、DDTC 処理によりユビキチン化タンパク質の蓄積が認められた。そこで、DDTC が NF- κ B 経路に与える影響を検討した結果、NF- κ B が恒常的に活性化している BC-3 細胞においてのみ NF- κ B の核内移行の抑制が認められ、NF- κ B の標的遺伝子である IL-6 の発現も抑制されていた。以上の結果より、DDTC はプロテアソーム阻害作用を介して HHV-8 感染細胞選択的に NF- κ B 経路を抑制していることが示唆された。

さらに、DDTC による細胞周期停止及び細胞死誘導効果の検討を行った。その結果、BC-3 細胞において、DDTC 処理により、アポトーシスに伴い認められる sub-G1 期細胞の増加が認められた。このとき、BC-3 では DDTC 処理によってアポトーシスのエフェクター酵素である caspase-3 の活性化が認められ、また、その作用を caspase 阻害剤により抑制すると、DDTC 誘導性の細胞死も抑制されることも示された。以上の結果より、DDTC は HHV-8 感染細胞選択的に caspase 依存的なアポトーシスを誘導することが明らかになった。

最後に、種々の HHV-8 感染ヒト PEL 細胞株 (BCBL-1, BC-1, BC-3) を用いて DDTC のアポトーシス誘導効果を検討した。その結果、すべての PEL 細胞株において、DDTC による細胞増殖の抑制及び細胞表面アポトーシスマーカーであるホスファチジルセリンの増加が認められた。

第 2 に、NF- κ B 経路を介した炎症が病態悪化に関与する疾患として、気道の炎症性疾患である慢性閉塞性肺疾患 (COPD) に着目した。COPD は慢性的な気道炎症や過剰な粘液貯留、及びこれらの症状に伴う気道閉塞を主徴とする難治性の呼吸器疾患である。治療薬としては、抗コリン薬などの気管支拡張薬が汎用されているが、臨床的な満足度は高くなく、重篤化に寄与する炎症や粘液貯留を抑制する治療薬が強く求められている。気道粘液の主成分である MUC5AC の産生は NF- κ B によって制御されること、また、COPD 患者において、NF- κ B が活性化していることなどの報告から、DDTC による NF- κ B 経路の抑制は、COPD 治療におけるアンメットメディカルニーズを満たす薬剤となり得る可能性が高い。そこで、本検討では、本研究室で近年作成した気道上皮特異的 β -ENaC (Epithelial Sodium Channel) 過剰発現肺閉塞性疾患モデルマウス (C57/BL6- β ENaC-Tg マウス) を用いて、DDTC の COPD モデルに対する有効性の検討を行った。

まず、*in vivo* における効果を明らかにするため、C57/BL6- β ENaC-Tg マウスに DDTC を投与し、その有効性を検討した。その結果、予想に反し、DDTC の投与は、マウス肺組織における炎症性サイトカイン及び Mucin の mRNA 発現をむしろ増加させる傾向にあった。このとき、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中における好中球数の増加傾向も認められたことから、DDTC はマウス肺病態を悪化させていることが示唆された。

そこで、DDTC が気道上皮細胞に直接影響を与えるか否かについて検討するため、正常ヒト気管支上皮細胞 16HBE14o- 細胞及び β/γ -ENaC 安定発現 16HBE14o- 細胞 (16HBE14o- β/γ) を用いた *in vitro* の検討を行った。その結果、DDTC は、ENaC を過剰発現する ENaC-16HBE 細胞選択的に、 β -ENaC 及び γ -ENaC のタンパク質発現を誘導することが明らかになった。また、DDTC は ENaC-16HBE におけるアミロライド感受性 ENaC 電流を増加させ、さらに、粘液の主成分 MUC5AC タンパク質の細胞外分泌も促進した。したがって、DDTC による ENaC 発現誘導は、そのチャンネル機能を上昇させ、その結果、粘液産生を促進することが示唆された。

最後に、DDTC による ENaC 発現誘導メカニズムを明らかにするために、MAPK 阻害剤を用いた検討を行った。その結果、p38 及び JNK 阻害薬により ENaC 発現誘導作用が消失したことから、p38 及び JNK シグナルがその発現誘導に関与することが示唆された。

以上の結果より、DDTC は、ENaC の発現を誘導し、その機能を亢進させることで、病態を悪化させる可能性が示唆された。

以上、本研究では、嫌酒薬ジスルフィラムの活性代謝物 DDTC が、未だ治療法が確立されていない PEL に対して有効な新規治療薬になり得る可能性を示し、その機序にプロテアソーム阻害作用が関わることを示唆した。一方で、DDTC は、ENaC 過剰発現 COPD 病態モデルにおいては、ENaC 発現・機能を促進することで肺病態を悪化させる可能性が示されたが、今後、他の COPD 病態モデルに対する検討が必要である。以上、本研究は、嫌酒薬ジスルフィラムの適応拡大を目指し、DDTC の有する病態モデルに対する作用を明らかにする基礎的情報を提起するものである。