

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第	400号	学位申請者	久保田 真吾
審査委員	主査	橋口 照人	学位	博士 (医学)・歯学・学術
	副査	武田 泰生	副査	原 博満
	副査	久保田 龍二	副査	畑中 一仁

主査および副査の5名は、平成29年1月13日、学位申請者 久保田真吾 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) タバコ煙曝露モデル、エラストーゼモデルなどLPSモデル以外でも好中球性気道炎症は起きるのか。

(回答) マウスの単回タバコ煙曝露モデルにおいては、気管支肺胞洗浄液中の好中球は24時間後に増加する。エラストーゼ気道内投与モデルでは6時間後に好中球の集簇がおこり3日後にマクロファージが増加する。

質問2) 気道平滑筋では $\beta_2$ 刺激薬でcAMPは上昇し弛緩するが、PDE4阻害薬でも同様の作用があるのか。

(回答)  $\beta_2$ 刺激薬と同様に、PDE4阻害薬においても気道平滑筋弛緩作用のあることが報告されている。

質問3) Lactoseをコントロールに選択したのはなぜか。

(回答) E6005の原末は少量のため、気管内投与する際にlactoseで10倍散、100倍散にした。よってlactoseをコントロールに選択した。

質問4) E6005は経口投与しても、他の薬剤と同様な有害事象が生じるのか。

(回答) 経口では小腸のカルボキシルエステラーゼで容易に加水分解されて失活するため、経口投与は選択できない。仮に経口投与しても有害事象は出現しない。

質問5) 他のPDE4阻害薬との比較はしたのか。

(回答) E6005は提供製薬メーカーであるエーザイの社内データでroflumilastと比較し、ヒト末梢血単核細胞でのTNF- $\alpha$ 産生はより低い濃度で抑えることが分かっている。

質問6) 他のPDE4阻害薬との構造式や選択性の違いは何か。

(回答) Roflumilastと比較してE6005はメチルエステルを持ちこの部位が容易に加水分解を受けて失活する。

質問7) PDE4は気道を構成するどの細胞に発現しているのか。

(回答) 気道上皮細胞、気道平滑筋細胞、血管内皮細胞での発現が報告されている。

質問8) E6005の気道での代謝経路を説明せよ。他の臓器では代謝経路が違うのか。

(回答) 肺においてはI型、II型肺胞上皮細胞が産生するカルボキシルエステラーゼにより代謝を受ける。血漿中でもカルボキシルエステラーゼで代謝される。肝臓のミクロソームではE6005のアミド結合部位が加水分解を受ける。

質問9) LPS気管内投与の病理像はどのような所見を認めるのか。

(回答) LPS気管内投与では肺胞、末梢気道、一部は中枢気道にかけて好中球浸潤と肺水腫を認める。

質問10) LPS気管内投与後に肺組織に集簇するのは好中球だけなのか。

(回答) 肺にはLPS刺激前からマクロファージが常在している。LPSの単回気管内投与後の肺組織では、好中球が2時間後から増加を認める。8週間のLPS吸入投与では、好中球、マクロファージ、単球、樹状細胞、CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞、B細胞の増加が報告されている。

質問11) LPS投与で肺胞マクロファージは増えないがMIP-1などのサイトカインが増えるのはなぜか。数とは関係ないのか。時間の経過とともに肺胞マクロファージは増えるのか。

(回答) Fig. 2. で示した通りLPS投与6時間後までは肺胞マクロファージはほとんど増加しない。よって、サイトカインを測定したLPS投与2時間後も肺胞マクロファージの数は増加しないが、活性化されることによりサイトカインの産生が増えたと考えられる。また、肺胞マクロファージはLPS投与後24時間では増加しないが、72時間後には増加するとの報告がある。

質問12) E6005のターゲットはマクロファージなのか。

(回答) LPS刺激により炎症性サイトカインを産生するマクロファージをターゲットとしている。

質問13) E6005によりLTB<sub>4</sub>のレベルは変わらないがcysteinyl leukotriene (cysLT)は減っているのはなぜか。

(回答) LPS気管内投与モデルでは、LTB<sub>4</sub>は主に好中球が産生し、cysLTは主にマクロファージが産生することが報告されている。E6005のターゲットはマクロファージであるため、cysLTの産生のみを抑制したと推測している。

質問 1 4) LPS 刺激で肺胞マクロファージの PDE4 の発現は増えるのか。

(回答) 我々が検索した限り、LPS 刺激後のマウス肺胞マクロファージの PDE4 の発現を検討した報告はないが、ヒト肺胞マクロファージの PDE4 の発現が増加したとの報告はある。

質問 1 5) Fig. 2. について、BAL の細胞数は実際の細胞の何%を示しているのか。

(回答) LPS 気管内投与後のマウスの BAL 中の細胞数を検討した報告はあるが、実際の細胞の何%を回収できるかを検討した報告は無く不明である。

質問 1 6) Fig. 5. について、E6005 を 1 時間後にしたのはなぜか。

(回答) 臨床での投与のタイミングと同じく好中性性気道炎症発症後の E6005 投与の効果を検討するために、LPS と同時投与、LPS 投与後 1 時間後投与とした。

質問 1 7) E6005 の抗炎症作用は cAMP/PKA/CREB 経路で全て説明できるのか。

(回答) E6005 の抗炎症作用は cAMP/PKA/CREB 経路を介したサイトカインの産生抑制が主であると推測している。他には cAMP/EPAC/PI3K/AKT 経路が関与している報告もあるが、今回は詳細な検討は行っていない。

質問 1 8) PDE4 阻害薬は TLR4 経路には関与しないのか。

(回答) PDE4 阻害により cAMP 濃度が上昇して cAMP/PKA/CREB 経路が活性化することにより dynein light chain が転写されて p38 のリン酸化を阻害する。TLR4 経路の下流にも p38 は存在するため、PDE4 阻害薬は間接的に TLR4 経路に関与する可能性がある。

質問 1 9) COPD でステロイドが効かない理由は何か。

(回答) COPD では酸化ストレスによるヒストン脱アセチル化酵素活性低下をきたし、これが炎症性遺伝子の発現増強やステロイドの抗炎症作用の抑制に関連していることが報告されている。

質問 2 0) これまで吸入 PDE4 阻害薬が臨床的に効いていないのはなぜか。経口による全身投与の方が良いのか。

(回答) 吸入 PDE4 阻害薬の臨床試験では、短期間投与 (2 週間) で効果を示しているが、長期投与になると効果が減弱する傾向にある。その理由として局所に高濃度の薬剤が留まることによるタキフィラキシーの可能性が指摘されている。同一の PDE4 阻害薬で異なる投与経路 (経口、吸入) による効果を比較した報告は無いため、全身投与の方が効果的かは不明である。

質問 2 1) 一般的に PDE4 阻害薬で有害事象を生じる機序は何か。

(回答) 嘔吐中枢である最後野や孤束核に高発現している PDE4D に作用して悪心嘔吐を生じる。

質問 2 2) これまで開発された PDE4 阻害薬で、中枢への有害事象を減らすために PDE4 サブタイプの特異性を上げる試みがなされたのはあるか。

(回答) 悪心に関連する PDE4D への選択性を低くして、PDE4B への選択性を高めた GS-5759 は、roflumilast と比較してフェレット悪心誘発モデルにおいて有害事象を抑制したとの報告がある。

質問 2 3) PDE4 の中枢神経における機能は何か。

(回答) PD4A は皮質や海馬で発現し、記憶に関与する。PDE4B は線条体、扁桃核、視床および視床下部に発現し学習と記憶に関与する。

質問 2 4) E6005 の皮下投与は行っているが静脈投与をするとどうなるのか。

(回答) E6005 は血中に入ると速やかにカルボキシルエステラーゼで加水分解を受けて失活する。

質問 2 5) Fig. 1. 皮下投与後の BALF 中の E6005 濃度について、1 時間後のピーク後の 7 時間後に再上昇しているのはなぜか。

(回答) BALF を採集する際にマウスを屠殺する必要があるため 1 時間後と 7 時間後は異なるマウス群を使用している。よって結果に誤差が生じたと考えている。

質問 2 6) Fig. 7. *ex vivo* で LPS 10  $\mu$ g/ml は濃度が高すぎるのではないか。

(回答) *in vivo* と異なり *ex vivo* 実験では、低い LPS 濃度では TNF- $\alpha$  は産生されなかったため、高濃度の LPS を用いた。

質問 2 7) LPS 気管内投与により標的となる細胞は何か。

(回答) TLR4 と CD14、MD2 を発現しているマクロファージが主体である。気道上皮にも TLR4 は発現しているが、CD14 と MD2 が無いが、発現しているも低レベルのため LPS に対する反応は弱い。

質問 2 8) 気道で TLR4 を発現している細胞は何か。

(回答) 気道上皮細胞と肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージ/単球、好中球が TLR4 を発現している。

質問 2 9) 今回の E6005 は cGMP には作用しないのか。

(回答) E6005 は PDE4 のみを阻害するため cAMP のみを基質とする。よって cGMP には作用しない。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。