

学位番号甲第 503 号

学位申請者 : きた 北 ぞの 菌 ひさ 久 お 雄

主 論 文 : Irbesartan は実験的自己免疫性神経炎を抑制する

著 者 : 北菌 久雄、萩原 渉、井上 雅史、紺野 晋吾、藤岡 俊樹

公 表 誌 : 神経治療学 31 (1) : 2014

論文内容の要旨 :

【背景・目的】

Guillain-Barré syndrome (GBS) の実験動物モデルである実験的自己免疫性神経炎 (experimental autoimmune neuritis: EAN) は、末梢神経の構成成分、中でもミエリン蛋白によって実験動物を免疫することにより引き起こすことができる。GBS も EAN もともに macrophage を主体とした単核細胞の末梢神経内血管周囲腔への浸潤が特徴である。EAN や GBS の経過中に CC chemokine である CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1; MCP-1) 産生が増加する事が知られているが、EAN 以外の動物モデルにおいて MCP-1 を阻害する事で脱髄や macrophage の末梢神経内浸潤を抑制できる事も報告されている。一方、通常は高血圧治療薬として使用されている angiotensin II receptor blocker (ARB) は、免疫介在性末梢神経疾患の抑制と回復促進を誘導する治療法の探索において炎症性伝達物質 (NF- κ B) 抑制作用や視神経再生促進効果が示されている。さらに angiotensin II 受容体以外の受容体への結合を分子構造的に検討したところ ARB の一つである irbesartan (IRB) はケモカイン受容体である CCR2 への効果も併せもっていることが明らかにされた。したがって、IRB が EAN に対して抑制効果を有することが予想されるが詳細な検討はなされていない。このような効果のみとめられれば GBS などの自己免疫性炎症性末梢神経疾患に対する安全な治療法開発にもつながると思われる。そこで本研究では EAN ラットに対する IRB の効果を検討した。

【方法】

雌 Lewis rat (7 週齢) の足底に、ウシ P2 蛋白の一部 (aa. 53~78) の合成ペプチド 150 μ g を注射し EAN を惹起し免疫後 2 日目から連日 IRB (10mg/kg/日、3mg/kg/日)、対照として amlodipine (AML; 8mg/kg/日)、vehicle (carboxyl methylcellulose のみ) を経口投与した (各群 n=5)。免疫後連日、尾と後肢と前肢の運動障害スコア

の総和 (EAN score 0~9) で運動症状を評価した。臨床症状が改善し EAN score の変動がみられなくなった免疫後 26 日目に馬尾神経を取り出し、ホルマリン固定後パラフィン包埋し S-100 と CD68 に対する組織学的検索を行った。また、新たに EAN ラットを作成し IRB 高用量投与群、対照として AML 投与群とし、馬尾神経を免疫後 7、11、14、21 日目にそれぞれ取り出し (各群 n=5)、real time PCR にて末梢神経内のサイトカイン mRNA バランスの変化を検討した。House keeping gene である GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 発現量と interferon-gamma (IFN- γ)、IL-10 発現量との比を IRB 高用量投与群と AML 投与群とで比較した。

【結果】

各群ともに免疫後 11 日目に EAN を発症し 14 日目付近でピークを迎え軽快した。IRB 高用量投与群の重症度は全経過で他群と比較し軽微で、症状悪化期から極期にかけてと回復期において統計的に有意であった。免疫組織学的検討では、S-100 が陰性で CD68 陽性細胞が浸潤している部分が全ての群において馬尾神経断面内に散在しており、S-100 陰性部分と CD68 陽性細胞の浸潤部位はほぼ一致していた。CD68 陽性細胞が浸潤している S-100 陰性部位が馬尾神経断面積に占める割合は、IRB 高用量投与群では他群と比べ有意に少なかった。末梢神経内サイトカイン mRNA バランスの変化の検討では、IFN- γ mRNA の発現は両群ともに EAN のピークである免疫後 14 日目にむけて徐々に増加したが 14 日目の IRB 高用量投与群では AML 投与群に比べ発現の低下が認められた。また、IL-10 mRNA の発現は両群ともに免疫後 14 日目のみにおいて著明に増加したが、IRB 高用量投与群では AML 投与群に比べ発現の増加が認められた。しかし、IFN- γ mRNA と IL-10 mRNA の発現はともに全ての時期で有意差はみられなかった。

【考察】

EAN の馬尾神経内では浸潤した活性化 Th1 細胞が IFN- γ を産生し、IFN- γ は macrophage を活性化し、最終的に脱髄が生じる。その後に Th2 細胞優位へ転換することにより Th1 細胞や macrophage の浸潤が抑制され脱髄の回復が始まると考えられており、極期の IL-10 mRNA の発現の増加が脱髄の回復に関連していると考えられている。今回の結果では IRB 投与によって臨床症状は悪化初期から有意差が認められており、EAN の改善に IL-10 の発現増加、つまり Th1/Th2 バランスの Th2 への偏位だけが関連しているとは考えにくい。今回の検討では、症状発現前から IRB が有する多くの機能 ; NF- κ B 抑制作用などを経由した Th1 細胞の抑制、Vitamin-D receptor (VDR) を介した神経保護作用、CCR2b 阻害作用による macrophage の神経内浸潤の抑制が作用していたものと考えられる。

【結論】

IRB は EAN ラットの症状を全経過にわたり抑制し、組織学的所見も抑制した。これらは、IRB が EAN ラットの馬尾神経内の IFN- γ mRNA 発現の抑制の他に、CCR2b 阻害作用による macrophage の神経内浸潤の抑制にも強く関与していることが示唆された。今後は、IL-10 以外の Th2 サイトカインや transforming growth factor β (TGF- β) のような Th3 サイトカインが IRB によって増強し全体的に抑制的に働いた可能性も含めさらなる検討が必要である。また、EAN の改善に CCR2b 阻害作用が強く影響していることを確かめるために、IRB 以外の CCR2b 阻害作用のない ARB や特異的な CCR2b 阻害薬を用いた同様の検討を行っていく必要があると考えられる。

1. 論文審査の要旨および担当者

学位番号甲第 503 号	氏 名	北 菌 久 雄
論文審査担当者	主 査	高 橋 啓
	副 査	岩 淵 聡
	副 査	岩 崎 泰 雄
	副 査	周 郷 延 雄
	副 査	黒 田 優
<p>論文審査の結果の要旨 :</p> <p>Guillain-Barré syndrome (GBS) の疾患モデルである実験的自己免疫性神経炎 (experimental autoimmune neuritis : EAN) は、末梢神経構成成分、特にミエリン蛋白で免疫することにより誘導可能である。GBS も EAN もマクロファージを主体とした単核細胞の末梢神経内血管周囲腔への浸潤が特徴的で、EAN や GBS の経過中に CC chemokine である CCL2(monocyte chemoattractant protein-1; MCP-1)産生が増加する。一方、高血圧治療薬として現在使用されている angiotensin II receptor blocker (ARB)は、免疫介在性炎症性末梢神経疾患の炎症抑制ならびに再生促進作用を有することが近年明らかにされた。なかでも irbesartan (IRB)はケモカイン受容体である CCR2 阻害作用を併せもつことが報告され、IRB が EAN の発症・進展を抑制する可能性があり、GBS などの自己免疫性炎症性末梢神経疾患に対する安全な治療法の開発にもつながることが期待される。本研究は、EAN ラットに対する IRB の症状抑制効果を明らかにすることを目的として遂行された。</p> <p>Lewis ラット、雌(7 週齢) の足底にウシ P2 蛋白の一部の合成ペプチド 150 μg を接種し EAN を惹起した。IRB 群では接種後 2 日目から連日 IRB (10mg/kg/日、3mg/kg/日)を投与した。対照として amlodipine (AML ; 8mg/kg/日)、vehicle (carboxyl methylcellulose のみ)を経口投与する群を設けた(各群 n=5)。接種後連日、尾と後肢と前肢の運動障害の程度をスコア化し、その総和(EAN score 0~9)で運動症状を評価した。次いで、症状が改善し EAN score の変動がみられなくなった接種後 26 日目に馬尾神経を取り出し、S-100 と CD68 を用いた免疫組織学的検索を行った。また、新たに EAN ラットを作製し IRB 投与群、AML 投与群の馬尾神経を接種後 7、11、14、21 日目にそれぞれ取り出し(各群 n=5)、real time PCR 法にて末梢神経組織内の interferon-gamma (IFN-γ)ならびに IL-10 の mRNA 発現量を測定し両群間で比較した。</p> <p>その結果、いずれの群も免疫後 11 日目に EAN を発症し、14 日目に症状のピークを迎えた後に回復した。IRB 高用量投与群の重症度は全経過を通して他群よりも軽度で、症状悪化から極期に相当する 12-14 日目と回復期の 22 日目で EAN score が有意差を示した。免疫組織学的検討では、全ての馬尾神経断面内に脱髄を示す S-100 陰性巣が散在し、同部に一致して CD68 陽性マクロファージの浸潤がみられた。この脱髄病変が馬尾神経断面積に占</p>		

める割合は IRB 高用量投与群で他群よりも有意に低かった。末梢神経内の IFN- γ mRNA 発現は IRB 投与群、AML 投与群ともに接種後 14 日目にかけて増加したが、14 日目の IRB 投与群の発現は AML 投与群よりも低下していた。一方、IL-10 mRNA の発現は、両群ともに免疫後 14 日目に著増し、その発現量は IRB 投与群で AML 投与群よりも増加していた。

本実験モデルにおける EAN の発生には Th1 細胞が、回復には Th1/Th2 バランスが Th2 優位へと変換することが重要であると考えられている。対照群と比較した時、IRB は神経症状が最も顕著な 14 日目において EAN ラット馬尾神経内の Th1 サイトカインである IFN- γ 発現を抑制する一方、Th2 サイトカインである IL-10 発現を増強させていた。しかしながら、IRB 投与による EAN の軽症化は発症初期から回復期までほぼ全経過を通して観察されたことから、本モデルにおける IRB の ENA 抑制は、Th1/Th2 バランス変換だけでなく NF- κ B 活性化抑制、CCR2b 阻害によるマクロファージの神経内浸潤抑制、Vitamin-D receptor を介した神経保護作用など、IRB が有する他の作用因子も関与した結果としてもたらされたと推測された。

公開審査は、平成 26 年 1 月 27 日(月)午後 7 時から、第 2 セミナー室(医学部 3 号館 2 階)において審査担当者 5 名全員の出席のもと開催された。申請者による論文内容説明が行われた後、質疑応答が行われ申請者はすべての質問に的確に回答していた。その概要は以下の如くである。性差、ラット系統差と EAN 発症との関連についての質問に対し、発症には明らかな性差があり雌に頻発すること、系統差についての検討はなされていないが Th2 優位の環境下では発症が抑制されることを示した。また、他の ARB 製剤と IRB における本モデル炎症抑制効果の差について、予備的な検討では IRB 以外の複数の ARB においても発症抑制作用を認めたものの効果はいずれも軽微で、IRB が最も強い抑制効果を示した。これは IRB が有する CCR2b 阻害作用が関与している可能性が大きい、本研究ではこの点についての解析を行っておらず、今後検証する必要がある。

審議の結果、angiotensin II receptor blocker である irbesartan が実験的自己免疫性神経炎における免疫応答是正、神経症状緩和作用を有することを明らかにし、本剤の GBS に対する治療応用への可能性を示唆した優れた論文であり、学位に値すると判断した。