

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

柳橋 優より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 518 号

学位申請者 : やなぎ 柳 はし 橋 まさる 優

学位審査論文: Ibudilast inhibits Th17 cell differentiation from naïve human T cells

(Ibudilast のヒト naïve T cell から Th17 細胞への分化抑制作用について)

著 者 : Masaru Yanagihashi, Kiyokazu Kawabe, Ken Ikeda

公 表 誌 : Toho Journal of Medicine 1(1):2-6, 2015

論文内容の要旨 :

【背景】

多発性硬化症では中枢神経へ T 細胞の浸潤を認めることが多く、T 細胞の活動が病態に関連していると考えられている。Th17 細胞はヘルパー T 細胞の一種で主にインターロイキン (IL)-17 を産生し多発性硬化症 (MS) など自己免疫疾患の病態に重要な役割を担っている。また、脳梗塞の二次的な炎症や動脈硬化にも関連があると報告されている。非選択的ホスホジエステラーゼ (PDE) 阻害薬の ibudilast は本邦で脳梗塞後遺症と気管支喘息に保険適応がみとめられており脳梗塞や多発性硬化症患者の炎症や神経変性を改善させる作用があることが知られている。また、tumor necrosis factor- α , IL-1 β , IL-6, and interferon- γ の産生を抑制し、ヘルパー T 細胞 (Th1) の分化を抑制することが報告されている。さらに多発性硬化症に対する再発抑制効果も知られている。しかし Th17 細胞の分化や IL-17 産生を抑制しているかはあまり知られていない。今回我々は Ibudilast が Th17 細胞の分化を抑制しているかを検討した。

【方法】

- ・末梢血単核球細胞の分離、培養

健康人から末梢血単核球細胞 (PBMC) をフィコール・ハイパー密度勾配遠心分離法で分離した。

- ・naïve helper T 細胞の分離、培養と Th17 細胞の分化

naïve helper T 細胞 (CD4+CD45RA+CD45RO-CD25-) は MACS naïve T 細胞分離キットを使用し PBMC から分離した。分離した naïve

helper T 細胞は XViVO-10 (Lonza) 細胞培養液中 に 7 日間培養した。このとき Th17 細胞へ分化させるため培養液中に抗 CD3 と CD28 抗体でコートしたビーズ、IL-1 beta (25 ng/ml)、IL-6 (10 ng/ml)、IL-23 (25 ng/ml) transforming growth factor (TGF)-beta (5 ng/ml)、IL-21 (25 ng/ml)を加え、各種濃度の ibudilast (0 μM、0.1 μM、1 μM、10 μM)を加えた。培養後、Th17 細胞をフォルボールミリスレートアセテート、イオノマイシンと Golgi stop によって 5 時間再度刺激し抗 CD4-Cy5.5、IL-17A-PE で染色し FACS Caliber を用いて CD4 陽性細胞中の IL-17A 陽性細胞の割合を測定した。

- ・ Ibudilast による STAT3 の活性抑制

naïve helper T 細胞から Th17 細胞への分化を調節している STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) の活性が ibudilast により抑制されるか実験を行った。naïve helper T 細胞分離後、Th17 細胞へ分化するためのサイトカイン刺激を 30 分行った後に細胞内リン酸化 STAT3 を PathScan® Phospho-Stat3 (Tyr705) Sandwich ELISA Kit を用いて測定した。

- ・ 統計学的分析として Dunnett' s test を使って評価した。

【結果】

- ・ Ibudilast による Th17 細胞への分化抑制

CD4 陽性細胞中の IL-17A 陽性細胞の割合は ibudilast の添加によって有意に減少した。(Fig 1)

- ・ Ibudilast による STAT3 の活性抑制

Ibudilast 投与により naïve T 細胞内の活性化 STAT3 は非投与群に対して有意に減少した。(Fig 2)

【考察】

今回の研究では ibudilast は naïve T 細胞から Th17 細胞の分化を抑制し、Th17 分化に関わる STAT3 の活性を抑制していた。いくつかの動物実験では Ibudilast は TNF-alpha、IFN-gamma、IL-1 beta、IL-6、13、14 のサイトカインを抑制することが報告されている。ヒトにおける報告では、Ibudilast 投与 4 週間後で IFN-gamma、TNF-alpha などの Th1 細胞からのサイトカインを減少させ、IL-4、10 のような Th2 細胞からのサイトカインを上昇させる。他のいくつかの研究では Ibudilast は MS の有効な治療法であると報告されている。特に活動性の MS の患者の進行率を減少させている。さらに MS の患者に対する第 2 相試験では進行や新たな活動性病変の発現率に対する効果を示している。MS に対する MRI 画像の評価を行った研究では ibudilast は脳保護的な効果を示した。IL-17 は neurotoxic な効果をもち、MS 患者の神経変性を誘導していると考えられている。PDE type3, 4 は主に免疫細胞に発現し、PDE type3, 4 阻害薬は MS の患者における Th1 サイトカイン産生を減少させる報告がある。Ibudilast の薬理作用も PDE type4 や他の PDE の抑制に関わっている。PDE type4 阻害薬であるシロミラストはシェーグレン症候群モデル動物において IL-6, 23, 17 の発現を抑制し、リンパ節における IL-17, 23 の発現を抑制する。STAT3 は IL-6, 23 の刺激によって活性化され、Th17 細胞の分化に重要である。今回の研究で ibudilast が STAT3 活性を抑制し Th17 細胞の抑制をもたらしたと考えられた。

【結語】

Ibudilast によって Th17 細胞への分化は有意に抑制された。Ibudilast は非特異的ホスホジエステラーゼ阻害作用を有し、細胞内シグナル伝達を抑制することで Th17 細胞の分化が抑制されたと考えられた。Ibudilast は内服可能な安価な薬剤で MS 患者に対して忍容性も良いと考える。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 518 号	氏 名	柳 橋 優
学位審査担当者	主 査	藤 岡 俊 樹
	副 査	瓜 田 純 久
	副 査	周 郷 延 雄
	副 査	近 藤 元 就
	副 査	中 野 裕 康
<p>学位審査論文の審査結果の要旨 :</p> <p>多発性硬化症 (MS) はヒトの後天性脱髄性疾患代表であり、何らかの免疫学的機序により自己タンパクを攻撃する能力を持ったリンパ球やマクロファージが中枢神経の髄鞘を攻撃することで発症する。その際、ヘルパーT 細胞の一種でインターロイキン (IL) -17 を主に分泌する Th17 細胞が重要である。MS の再発抑制効果が知られている ibudilast は IL-1 beta、IL-6、interferon gamma、tumor necrosis factor-alpha などの炎症起因性サイトカイン分泌を抑制することが知られているが IL-17 に対する効果はあまり知られていなかったため、成人ボランティアから得た naïve T 細胞から Th17 細胞を誘導する際に ibudilast を添加して Th17 細胞の誘導に対する影響を in vitro で検証した。その結果 ibudilast が Th17 細胞の誘導を抑制することが認められ、Th17 細胞誘導を促進する STAT3 も ibudilast の添加によって抑制されることが明らかになった。Ibudilast は気管支喘息や脳梗塞後遺症の治療薬として認可されており長期間にわたり臨床的に使用されてきたため安全性に大きな問題はないと考えられ、本論文は今これからの MS 治療において有用な情報を提供したと考えられる。</p> <p>公開審査会は 2015 年 2 月 23 日午後 1 時より、全審査委員の出席の下に開催された。学位申請者による、論文の研究内容の背景と審査論文の内容について説明がなされ、質疑応答が行われた。その際、ibudilast が STAT3 を阻害する機序、実験の過程で他のサイトカインを検討する可能性、MS のモデル動物である EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) を IL17 やその特異的受容体のノックアウト動物を作成したときに予想される結果、人体に用いる換算用量、ibudilast の入手法とボランティアの募り方などについての質問がなされ、申請者は、現時点で得られている知見の限界、本研究の倫理的側面、ロイコトリエンを介する経路を想定していることなどを的確に返答した。本論文の成果は、限定的な範囲ではあるものの ibudilast が STAT3 の抑制と Th17 の分化抑制をすることを in vitro で示したことは今後の MS 治療を考える上で貴重な報告であり、さらに申請者の今後の発展も見込まれることから、学位に値すると審査委員全員の意見が一致した。</p>		