

# 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

萩原 渉より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 602 号

学位申請者 : はぎ 萩                      わら 原                      わたる 渉

学位審査論文 : Effect of phosphodiesterase-3 inhibition on experimental autoimmune neuritis

(実験的自己免疫性神経炎におけるホスホジエステラーゼ-3 阻害薬の効果)

著 者 : Wataru Hagiwara, Shingo Konno, Hideo Kihara, Masashi Inoue, Toshiki Fujioka

公 表 誌 : Toho Journal of Medicine DOI: 10.14994/tohojmed.2017-016

論文内容の要旨 :

Phosphodiesterase (PDE)-3 阻害薬の cilostazol (CLZ) を実験的自己免疫性神経炎 (experimental autoimmune neuritis: EAN) ラットに投与し、効果を検討した。雌 Lewis rat (7 週齢) の足底にウシ P2 蛋白の一部の合成ペプチド (SP26) 150  $\mu$ g を皮内注射することで EAN を誘導した。CLZ は carboxymethyl cellulose sodium salt (CMC) 0.5% 水溶液に懸濁させ、胃管を用い経口投与した。実験 1 では CLZ を異なる用量や開始時期で検討した。免疫後より CLZ10mg/kg/日 を投与する群 (low 群, n=6)、30mg/kg/日 を投与する群 (high 群, n=6)、CLZ を用いず CMC のみ投与する群 (vehicle 群, n=11) に分けた。さらに vehicle 群の中から発症後より CLZ30mg/kg/日 を投与する群 (delay 群, n=5) をランダムに選択した。臨床症状は免疫後より連日、尾、前肢、後肢の運動障害スコアの総和で評価した。組織学的評価は、免疫後 14、21 日に馬尾神経を取り出し、ホルマリン固定後にパラフィン包埋し、抗 CD68 モノクローナル抗体と抗 S-100 モノクローナル抗体を用いた。CD68 陽性細胞が占める S-100 陰性領域が神経根に占める割合を Image J (National Institutes of Health) を用いて評価した。実験 2 では免疫後より CLZ を high 群 (n=25)、vehicle 群 (n=25) に分け、臨床症状を実験 1 と同様に評価した。組織学的評価は免疫後 7、11、14、21、28 日に馬尾神経を取り出し、実験 1 と同様に評価した。また、馬尾神経内のサイトカイン・細胞接着因子などの mRNA の経時的評価のために馬尾神経を 7、11、14、21、28 日後に取り出し real time PCR を用いて神経内サイトカインや細胞接着分子の mRNA 発現を検討した。臨床症状は実験 1、実験 2 のいずれにおいても各群において免疫後 11 日目に発症し 15 日前後で最大となり徐々に軽快した。high 群の臨床症状、組織学的所見は全経過で他の群と比べ、軽度であった。実験 1 で delay 群においても臨床症状が軽症化する傾向

がみられた。組織学的検討では、実験1、実験2いずれ群においても、S-100 陰性領域を認め、連続切片においてCD68 陽性細胞を認めた。Vehicle 群に比べ、high 群ではその領域が有意に小さかったが、実験1のdelay 群はvehicle 群との有意な差は得られなかった。神経内サイトカインのmRNA の検討では、Th1 サイトカインである interferon(IFN)- $\gamma$  の発現量比が vehicle 群において免疫7 日後から上昇し始め免疫14 日後まで高値を維持しその後減少したが、high 群では免疫後11 日後でIFN- $\gamma$  が上昇し始めた。CLZ 投与によって発症前のIFN- $\gamma$  の発現量比は低下する傾向があった。Th2 サイトカインである Interleukin-10 の発現量比は vehicle 群に比し high 群で高値となり、発症前の免疫後7 日後では有意に high 群で高かった。細胞接着因子である e-selectin の発現量比は、発症前の免疫7 日後においてCLZ 投与で有意に低下した。以上より、CLZ がEAN ラットの馬尾神経内サイトカインをTh1 からTh2 へ促し、細胞接着因子の発現を抑制し、神経内の炎症細胞浸潤を抑制することでEAN を抑制することが示唆された。また、EAN 発症後からCLZ を投与しても効果がみられ、PDE 阻害薬を免疫性末梢神経疾患の臨床に応用できる可能性が示唆された。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 602 号	氏 名	萩 原 渉
学位審査担当者	主 査	澁 谷 和 俊
	副 査	岩 崎 泰 雄
	副 査	榊 原 隆 次
	副 査	近 藤 元 就
	副 査	佐 藤 二 美

学位審査論文の審査結果の要旨 :

平成 30 年 1 月 24 日 (火) 18:00-19:00 医学部第 2 セミナー室にて、5 名の審査委員の出席の下で (2 名の書類による事前審査を含む) 学位審査が行われた。

研究概要: Phosphodiesterase-3 阻害薬 cilostazol (CLZ) の実験的自己免疫性神経炎 (experimental autoimmune neuritis: EAN) への効果を運動麻痺、馬尾組織の組織学的所見、炎症関連性サイトカインや接着因子 mRNA の影響について検討した。雌 Lewis rat を EAN に誘導し low 群 (10mg/kg/日)、high 群 (30mg/kg/日)、vehicle 群に分け CLZ を経口投与した。また発症後より 30mg/kg/日を投与する delay 群を vehicle 群からランダムに選択した。組織学的評価は免疫染色を行い馬尾神経内の炎症細胞浸潤について評価した。馬尾神経内のサイトカイン・接着因子の mRNA を RT-PCR を用いて相対的発現量を評価した。臨床症状は免疫後 11 日目に発症し 15~17 日で最大となり徐々に軽快した。CLZ 投与で用量依存性に軽症化し、delay 群でも臨床症状が軽症化する傾向がみられた。組織学的検討では high 群では炎症細胞浸潤の範囲が有意に小さかった。vehicle 群は回復期に Th1 から Th2 に偏倚するが、high 群では Interferon- $\gamma$  が発症前に抑制され Interleukin-10 が有意に増加した。e-selectin は発症前の免疫 7 日後において CLZ 投与で有意に低下した。以上より CLZ が EAN を Th1 から Th2 へ促し、接着因子の発現を抑制し神経内の炎症細胞浸潤を抑制することで EAN を抑制することが示唆された。発症後投与でも効果があることから、PDE 阻害薬を免疫性末梢神経疾患の臨床に応用できる可能性が示唆された。

質疑応答: 主な質問は次の通り: メモリー T 細胞の活性化の時期、サイトカインと EAN の重症度との相関性、組織学的な脱髓の程度と臨床症状との相関、EAN に対する治療薬、実験経過中における尾前後肢の症状の変化経過、実験系で用いた薬剤の臨床応用の可能性など。申請者は、全ての質問に対して、研究デザインの限界にも触れながら、明確に回答した。また、関連する推論についても適切に言及した。

審議: 本研究は、Phosphodiesterase-3 阻害薬である cilostazol (CLZ) の実験的自己免疫性神経炎 (experimental autoimmune neuritis: EAN) への効果とその作用機序を解明した極めて有意義なものであり、学位授与に相当するものと審査委員全員一致で認定した。