

論文内容の要旨

論文題目 アレルギー性鼻炎におけるスタチンの抑制効果に関する
実験的研究

指導教員 山本一彦教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 松本 拓

アレルギー性鼻炎は発作性反復性のくしゃみ・鼻閉・水性鼻漏を 3 主徴とする鼻粘膜の I 型アレルギー性疾患であり、近年、増加傾向を認めている。また、最近ではアレルギー性鼻炎と気管支喘息との密接な関連が言われており、「Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma(ARIA)」という国際的なガイドラインが発表され、広く認知されるようになった。

一方で、高脂血症も common disease として知られており、増加傾向にある疾患である。シンバスタチンはコレステロール合成経路における 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-コエンザイム A(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A: HMG-CoA)還元酵素阻害剤であるスタチンの一種である。高脂血症の治療薬としてスタチンは臨床的に広く用いられ、また、血中コレステロール降下作用以外にも種々の免疫修飾作用をもつことが注目を集めている。スタチンの免疫修飾作用に注目し、様々な疾患モデルマウスを用いた研究がこれまでに行

われており、Th1 型免疫応答が関わる疾患モデルマウス(近年では Th17 型免疫応答と考えられている)での有効性が多く報告されている。しかし、その一方で、アレルギー性鼻炎モデルマウスと同様の Th2 疾患モデルである喘息モデルマウスを用いた研究でも有効性が報告されている。本研究で用いたシンバスタチンによる喘息モデルマウスの研究では、抗原チャレンジ期にシンバスタチン 40mg/kg/day が腹腔内投与され、下気道における好酸球性気道炎症が抑制されたと報告されている。気管支喘息とアレルギー性鼻炎の共通性・類似性を考慮すると、スタチンの鼻腔・上気道における Th2 型免疫応答に対する抑制効果が期待されるが、鼻腔・上気道における抗原誘発性免疫応答に対するスタチンの効果を調べた研究はこれまでに行われていない。そこで、本研究では鼻腔・上気道における抗原誘発性免疫応答に対するスタチンの効果を調べることにした。

一方、コラーゲン反応性関節炎モデルマウス(DBA/1 マウス)において、シンバスタチン 40mg/kg/day の腹腔内投与により重篤な腹膜炎を来し、死亡率も高値であったという報告がある。先述した喘息モデルマウスにおいては、同量のシンバスタチンを用いているが腹膜炎を来したという毒性に関する記載はない。しかし、下気道における好酸球性炎症抑制効果について、この毒性の影響がなかったとは言い切れない。そこで、本研究では腹膜炎を来さない量でのシンバスタチンを用いて、その効果を検討することとした。

さらに本研究では、アレルギー性鼻炎モデルマウスにおける薬剤治療効果の生理学的評価法として、以前、我々の教室が耳鼻咽喉科学教室との共同研究で確立した Enhanced Pause(Penh)値を用いた急性期における鼻過敏性変化の評価法を採用した。先述したアレルギー性鼻炎の三主徴の一つである鼻閉症状に関して、これまでアレルギー性鼻炎モデルマウスにおける他覚的な評価法は確立していなかった。しかし、Penh 値を用いることにより、

鼻閉による鼻腔の気流制限を非侵襲的に非拘束下・自発呼吸下に測定することが可能となった。アレルギー性鼻炎モデルマウスにおいて、点鼻投与直後からの Penh 値上昇が認められ、この Penh 値上昇に関しては、下気道の好酸球性炎症によらず(気管支肺胞洗浄液中の好酸球数増加なし)、侵襲的に測定した下気道抵抗値(Raw)の上昇を伴わず、そして、従来のアレルギー性鼻炎モデルマウスにおける評価法による疾患活動性と Penh 値の上昇が相関するということが明らかになっている。しかし、この新しい評価法をアレルギー性鼻炎モデルマウスに対する薬剤治療効果判定として用いた報告はまだない。そこで、本研究では、この Penh 値を用いた鼻過敏性変化評価法が、アレルギー性鼻炎モデルマウスにおける薬剤治療効果の生理学的評価法として有用であるかどうかについても検討することとした。

本研究では、まず、脾細胞を用いた *ex vivo* における検討を行った。BALB/c マウスを用い、day0 に卵白アルブミン(ovalbumin: OVA) /水酸化アルミニウムゲル(alum)を腹腔内投与し、day12 で脾細胞を採取した。培地中に脾細胞と OVA を混合し再刺激を行った。培養後、day3 で細胞増殖反応を調べ、day4 で培養上清中の IL-4、IL-5、IFN- γ 濃度を測定した。治療群としてシンバスタチン 20mg/kg/day 腹腔内投与を day0～day11 まで行い、治療対照群として溶媒のみの Control stock を day0～day11 まで連日腹腔内投与した。結果として、シンバスタチン投与により、細胞増殖反応抑制を伴わない Th2 サイトカインである IL-4、IL-5 の強い産生抑制と Th1 サイトカインである IFN- γ の産生抑制を認めた。シンバスタチンは脾細胞における抗原誘発性 Th2 サイトカイン産生と Th1 サイトカイン産生を共に抑制する効果があることが示された。さらには、これらのサイトカイン産生が抗原誘発性細胞増殖反応抑制によらないことが示された。

次に、アレルギー性鼻炎モデルマウスを用いた *in vivo* での検討を行った。BALB/c マウ

スを用い、day0、11にOVA/alumを腹腔内投与し、day18～day25まで連日3%OVA片鼻2μlずつ点鼻投与を行うことで、アレルギー鼻炎モデルマウスを作製した。対照群にはday0、11に生理食塩水を腹腔内投与し、day18～day25まで連日生理食塩水片鼻2μlずつ点鼻投与を行った。治療群としてシンバスタチン20mg/kg/day腹腔内投与をday0～day17まで行い、治療対照群としてControl stockをday0～day17まで連日腹腔内投与した。治療効果判定として、day18、22、24における点鼻投与直後から10分間のくしゃみ回数・鼻かき回数、血清総IgE値、血清OVA特異的IgE値、組織学的変化(鼻中隔下部鼻粘膜固有層単位面積(2500μm²)当たりの炎症性細胞数)という従来のアレルギー性鼻炎モデルマウスに用いられている評価法に加え、先述したPenh値による新たな評価法を用いた。さらに、day25で頸部リンパ節を採取し、頸部リンパ節細胞を用いた局所における抗原誘発性免疫応答を検討した。

まず、シンバスタチン投与はくしゃみ回数・鼻かき回数を強く抑制した。また、血清OVA特異的IgE値は有意差を認めなかったが、血清総IgE値を強く抑制した。このことから、シンバスタチンはアレルギー性鼻炎における即時相の典型的な症状であるくしゃみ・鼻かきを抑制する効果があることが示された。また、IgE依存性の疾患であるアレルギー性鼻炎の基礎となるIgE産生を抑制する効果があることが示された。組織学的変化に関しては、鼻中隔下部鼻粘膜固有層単位面積当たりの炎症性細胞数を強く抑制した。

次に、day25のPenh値測定後において、気管支肺胞洗浄液中の好酸球数増加が無いことを確認した。この結果から、今回認められたPenh値の上昇に下気道の好酸球性炎症の影響がないこと、また、それに伴う下気道抵抗値の上昇の影響がないことを示すことができた。そして、day19、23、25において点鼻投与直前5分間の平均Penh値と点鼻投与直後から15

分間における 3 分毎の平均 Penh 値を測定した。OVA 点鼻投与を反復することにより点鼻投与直後から生じる Penh 値上昇を 15 分間持続して認めた。そして、シンバスタチン投与は、この点鼻投与直後から持続する Penh 上昇を著明に抑制した。この Penh 値上昇は鼻腔における気流制限の影響を示していると考えられ、遅発相反応としての鼻閉+即時相反応としての鼻閉が混合した抗原誘発性鼻反応性変化を示しているものと考えられる。このことから、本研究はシンバスタチンが抗原誘発性鼻反応性変化を抑制する効果があることを示したものであると考えられた。また、先述した従来用いられているアレルギー性鼻炎モデルマウスの種々の評価法による抑制効果と矛盾しない結果が得られたことから、この Penh 値を用いた鼻反応性変化を検出する評価法を新たなパラメーターとして、アレルギー性鼻炎モデルマウスに対する薬剤治療効果判定に用いることが可能であることを示すことができた。

さらに、day25 で頸部リンパ節を採取後、培地中に頸部リンパ節細胞と OVA を混合し再刺激を行った。培養後、day2 で細胞増殖反応を調べ、day3 で培養上清中の IL-4、IL-5、IFN- γ 濃度を測定した。ex vivo における脾細胞を用いた検討と同様に、アレルギー性鼻炎モデルマウスにおける頸部リンパ節細胞においても、シンバスタチン投与により、細胞増殖反応抑制を伴わない、Th2 サイトカインである IL-4、IL-5 の強い産生抑制と Th1 サイトカインである IFN- γ の産生抑制を認めた。

最後に、day25 で血清総コレステロール値を測定したところ、シンバスタチン投与による血清総コレステロール値の低下を認めず、本研究における免疫修飾作用がシンバスタチンの血中コレステロール降下作用に関わらないものであることを示した。

以前報告されたシンバスタチンの毒性に関しては、本研究における 20mg/kg/day 腹腔内

投与では、死亡例がなく、腹膜炎の症状である腹膜癒着や投与後の体重減少も認めなかった。

以上より、本研究は、高脂血症治療薬として臨床的に広く用いられているシンバスタチンが、腹膜炎を来たさない投与量で鼻腔・上気道における抗原誘発性免疫応答を抑制する効果があることを示し、シンバスタチンが高脂血症のみならず、アレルギー性鼻炎に対しても有効である可能性を初めて示した。また、Penh 値を用いた鼻反応性変化を検出する評価法が、アレルギー性鼻炎モデルマウスにおける薬剤治療効果判定に有用であることを初めて示した。一方、本研究では、作用機序に関する検討ができておらず、さらなる研究が必要であると考えられる。本研究においては、ヒトとマウスにおけるシンバスタチン投与経路・投与量の違いがあることから、実際に今回の結果を臨床研究へと直接的に応用することは困難であると考えられる。しかし、本研究の結果は今後の臨床研究の可能性を示したものであり、今後、本研究におけるスタチンの作用機序に関する検討を加えていくことで、アレルギー性鼻炎に対する新たな治療ターゲットを示すことが可能となる結果であったと考えられる。