

論文の内容の要旨

論文題目 アレルギー性気道炎症に対するアレンドロン酸の効果に関する実験的検討

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19年4月入学

医学博士課程

内科学専攻 佐々木 欧

気管支喘息(Bronchial asthma ; BA)は、気道過敏性の亢進と、可逆性の気流制限を特徴とする慢性気道炎症疾患であるが、炎症を反復する過程で、気道障害とそれに引き続く気管支平滑筋や気道上皮の肥厚 (気道リモデリング)を惹起し、気流制限が非可逆性となり、重症化、難治化する。

老人における喘息患者は増加しており、喘息関連死の大部分は 65 歳以上で見られる。老人における喘息は、慢性閉塞性肺疾患(COPD)や慢性心不全の合併がしばしばみられる。症状も、典型的な喘鳴よりも慢性咳嗽や労作時の息切れなど、非特異的なものが目立つ。気道リモデリングや COPD の合併などにより可逆性が失われているなど、診断自体も困難であり、標準治療への反応の悪さもしばしばみうけられる。

ビスフォスフォネートは、骨粗鬆症の予防と治療に広く用いられており、メバロン酸/コレステロール生合成経路上のファルネシル 2 リン酸(FPP)シンターゼを阻害することにより薬効を発揮する。その作用機序は、スタチン(HMG-CoA 還元酵素阻害剤)と類似している。スタチンは、近年免疫修飾作用について様々な報告がなされており、アレルギー性気道炎症についても抑制的な効果について報告がある。一方でビスフォスフォネートの免疫修飾作用については、十分検証されていない。

ビスフォスフォネートは経口投与後、主に骨に分布がみられる。気管支や肺への分布についてはほとんど報告されていない。アレンドロネート(ALD)については、経口投与後、24 時間にわたって気管への分布が見られることが報告されている。

以上の知見をもとに、本論文では「アレンドロネートはアレルギー性気道炎症を抑制する」との仮説を立て、マウスアレルギー性気道炎症モデルを用いて検証した。

(I) BALB/c マウスに対して卵白アルブミンで2回感作後、3回吸入チャレンジを行い、好酸球性気道炎症モデルを作成した。卵白アルブミン吸入のそれぞれ60分前に、経口胃管を用いてアレンドロネートを投与し、効果期におけるアレンドロネートの効果を検証した。

アレンドロネートはBALF中の総細胞数、好酸球数を抑制したが(図1A)、血清総IgE濃度には影響を与えなかった(図1B)。肺組織所見では、気道周囲の炎症細胞浸潤は、アレンドロネート群で抑制傾向を示した(図2)。

次に、肺抽出液を作製してサイトカイン産生を計測したところ、アレンドロネート群において、IL-4(図3A)、IL-5(図3B)、IL-13(図3C)といったTh2系サイトカインの抑制と、好酸球遊走作用をもつケモカインであるEotaxin-2(図3E)の抑制がみられた。一方、Th1系サイトカインであるIFN- γ (図3D)は有為な変化を認めなかった。また、IL-17についてもアレンドロネート群において抑制傾向がみられた(図3F)。

さらに、胸腔内リンパ節細胞をOVA再刺激し、上清中のサイトカイン濃度を計測し、アレンドロネートの免疫修飾作用について検証したところ、肺抽出液と同様の結果がみられた。即ち、アレンドロネート群において、IL-4(図4A)、IL-5(図4B)、IL-13(図4C)、といったTh2系サイトカインの抑制がみられた。IFN- γ (図4D)は有為な変化を認めなかった。IL-17についても、アレンドロネート群において抑制がみられた(図4E)。

以上の通り、抗原吸入期のアレンドロネート経口投与により、アレルギー性気道炎症と、肺および胸腔リンパ節でのTh2系免疫応答を抑制することが確認された。アレンドロネートはさらに、肺中のEotaxin-2濃度、胸腔リンパ節でのIL-17濃度を減少させ、肺中のIL-17濃度に減少傾向を示した。

(II) アレンドロネートの免疫修飾作用の機序解明のため、肺局所における抗原提示細胞の中で、CD11c⁺細胞(主に樹状細胞と考えられる)に対する効果を検討した。In vivoでのアレンドロネート投与は肺のCD11c⁺細胞の抗原提示能を変化させなかった(図5)。

次に、アレンドロネートの全身性炎症に対する効果を、脾細胞を用いて検証した。BALB/cマウスをOVAで感作後にアレンドロネートを経口投与し、脾細胞を取り出してOVAで再刺激するex vivoの系で、上清中サイトカイン濃度を計測した。IL-4、IL-5、IFN- γ 、IL-17いずれもアレンドロネート群とコントロール

ール群とで差異がみられなかった。

さらに、BALB/c マウスを OVA で感作後に脾細胞を取り出し、OVA で再刺激すると共にアレンドロネート 0-10 μ mol/l 加えて培養した in vitro の系で、上清中サイトカイン濃度を計測した。IL-4、IL-5、IFN- γ 、IL-17 いずれもアレンドロネート群とコントロール群とで差異がみられなかった。

以上の通り、ex vivo および in vitro で脾細胞を用いた系では、アレンドロネートの Th2 系免疫応答抑制作用はみられなかった。アレンドロネートの Th2 系免疫応答抑制作用は、in vivo での肺での効果に限局されると考えられたが、CD11c⁺細胞の抗原提示能に影響をおよぼさなかった。

(III) アレンドロネートのアレルギー性気道炎症抑制効果の作用機序解明のため、以下のとおり様々な検証を行った。

アレンドロネート群で肺での Eotaxin-2 産生が抑制されていた(図 3E)ことから、気道上皮細胞からの Eotaxin-2 分泌が抑制されている可能性を考え、肺での Eotaxin-2 に対する免疫組織化学標本を作製した。アレンドロネート群とコントロール群とに明らかな差異を認めなかった。肺での Eotaxin-2 の mRNA 転写について RT-PCR を用いて評価したが、アレンドロネート群とコントロール群とに明らかな差異を認めなかった。

アレンドロネートをはじめとする、窒素含有ビスフォスフォネートはメバロン酸/コレステロール生合成経路上のファルネシル 2 リン酸(FPP)シンターゼを阻害し、Rho や Ras といった低分子量 G 蛋白のプレニル化を阻害することで薬効を発揮するとされている。一方、低分子量 G 蛋白の阻害により、VCAM-1 や ICAM-1 といった細胞接着因子の発現抑制をきたすとの報告もみられる。アレンドロネート投与により、気道上皮や血管内皮での細胞接着因子の発現が抑制されると仮定し、肺組織での ICAM-1 や VCAM-1 の免疫組織化学標本を作製したが、アレンドロネート群とコントロール群とに明らかな差異を認めなかった。肺での ICAM-1 の mRNA 転写について RT-PCR を用いて評価したが、アレンドロネート群とコントロール群とに明らかな差異を認めなかった。

以上の通り、アレンドロネートの作用機序は本研究では明らかにされなかったため、機序解明に向けてさらなる研究が望まれる。

アレンドロネートの免疫修飾作用が肺局所に限局していることに対する重要な要素として、薬物動態の観点から気道への親和性がみられる点があげられる。アレンドロネートは経口投与後、24 時間にわたって気管への分布することが報告されている。一方、肝臓、脾臓、腎臓やリンパ節への分布は低い。気道への組織親和性が、肺に特異的な効果に寄与していると考えられる。

本研究から、アレンドロネートは、肺において、吸入抗原によって引き起こされる Th2 系免疫応答を抑制することが示された。本研究は、老人喘息の治療において、骨粗鬆症の標準治療薬であるビスフォスフォネートが、アレルギー性気道炎症の抑制作用を兼ね備えている可能性を示している。この点については、臨床研究も含め、さらに検証される必要がある。

图1

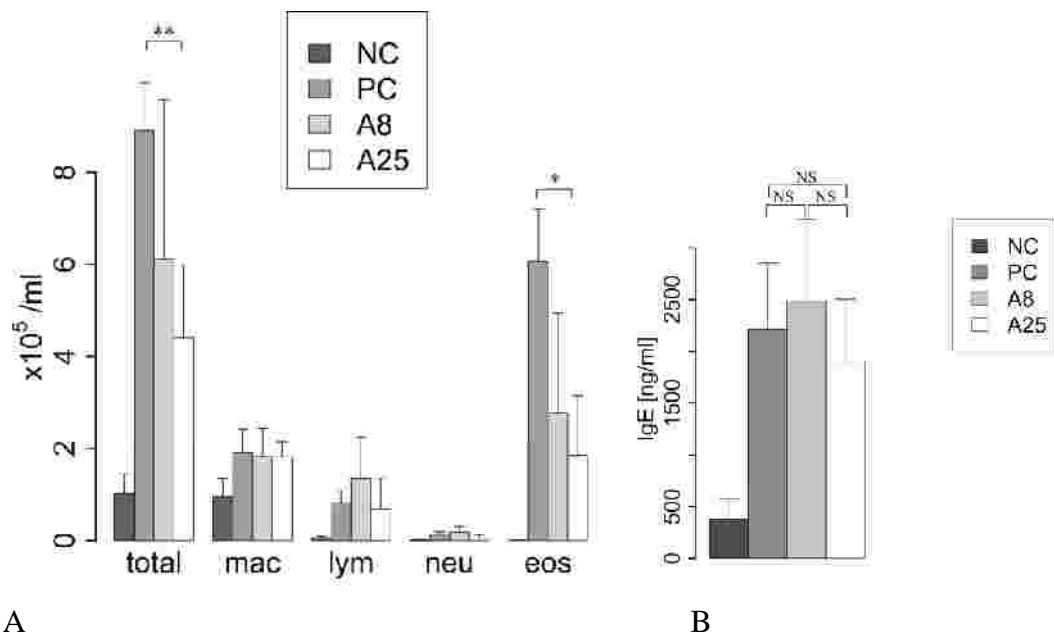
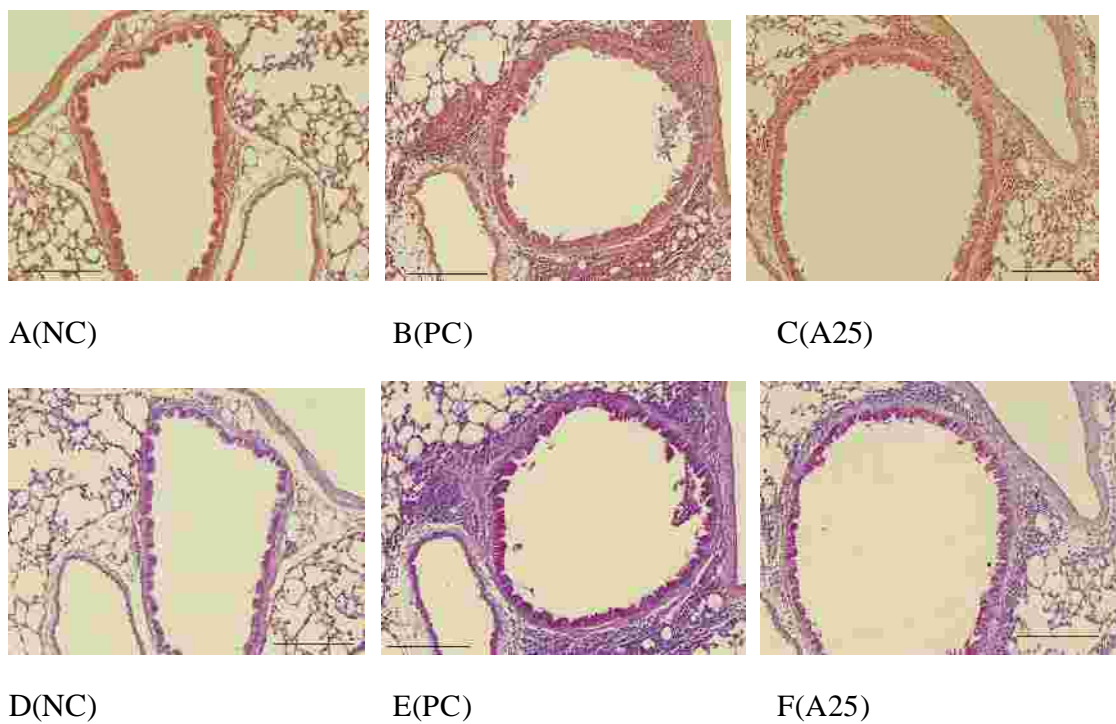
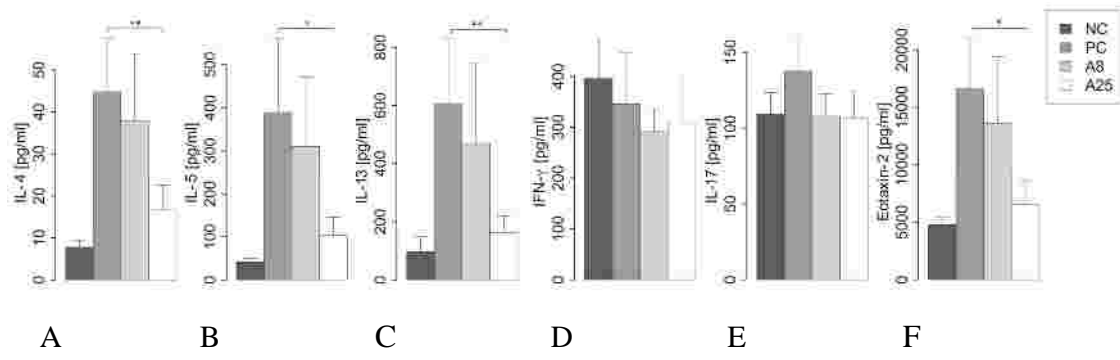


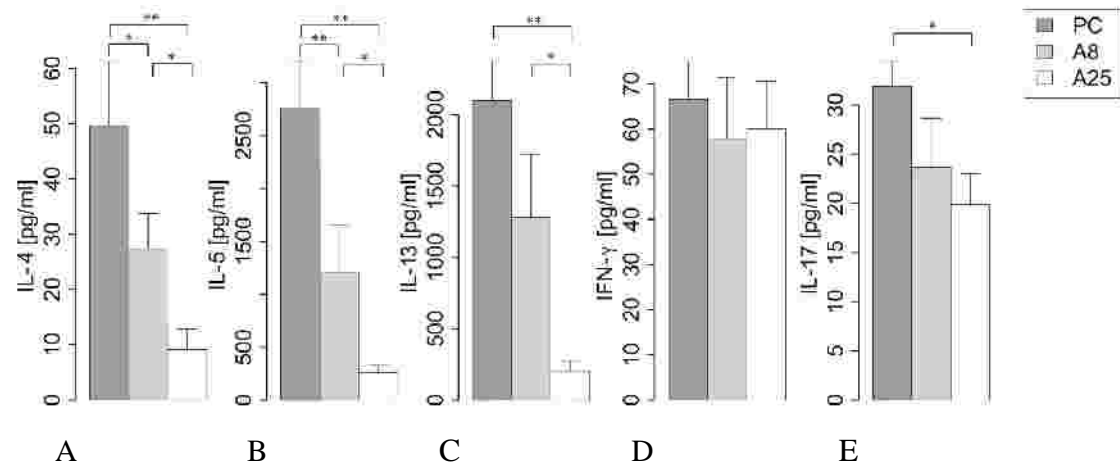
图2



☒ 3



☒ 4



☒ 5

