

学位論文題名

Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU)
with a novel inhibitor of nuclear factor- κ B,
dehydroxy methyl epoxyquinomicin

(NF- κ B 阻害薬である dehydroxy methyl epoxyquinomicin による
実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (EAU) の抑制)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

ベーチェット病、サルコイドーシス、Vogt-小柳-原田病などの内因性ぶどう膜炎においてはしばしば重篤な視力低下をきたし、失明に至る例もある。主な治療としてステロイド薬や免疫抑制剤が用いられているが、これらの治療に抵抗する例もみられる。そのため新しい治療標的をもつ薬物の開発が必要となる。

実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (Experimental Autoimmune Uveoretinitis ; EAU) はヒト内因性ぶどう膜炎の動物モデルである。特定のマウスやラットを網膜可溶性抗原や視細胞間光受容器レチノイド結合蛋白質 (interphotoreceptor retinoid-binding protein; IRBP) などの臓器特異的自己抗原を免疫することで発症が誘導される。T helper type 1 (Th1) / Th2 バランスの破綻、特に Th1 優位の免疫応答であることが以前より報告されている。これらの免疫応答に加え、最近では Th1, Th2 以外に新しい lineage である Th17 の関与が報告されている。

NF- κ B (nuclear factor- κ B) は生体内の組織に ubiquitous に存在し、細胞増殖・生存に必要な細胞内情報の伝達に関与する。通常、抑制分子である I κ B (inhibitor of κ B) と結合した状態で細胞質中に存在するが、種々の刺激によってリン酸化され核内へ移行し、サイトカイン産生、細胞増殖、アポトーシス等に関わる遺伝子の転写を活性化する。DHMEQ (Dehydroxy methyl epoxyquinomicin) は微生物の2次代謝産物から弱い抗菌物質として発見されたエポキシキノマイシン (epoxyquinomicin) の骨格を元に分子デザインされた新たな低分子の NF- κ B 阻害薬である。NF- κ B 阻害薬の多くは I κ B のリン酸化を阻害するのに対し、DHMEQ は NF- κ B p65 protein の核内への転送を抑制する。これまでの動物実験において重篤な副作用がみられず、臨床応用が期待される薬剤である。

【目的】

ヒト内因性ぶどう膜炎の動物モデルである EAU を用いて、NF- κ B 阻害薬である DHMEQ が治療薬として有効であるか検討することを目的とした。

【方法】

B10. BR マウスのメス 6~8 週齢を対象とした。K2 ペプチドと完全フロインドアジュバン

ド (Complete Freund' s Adjuvant; CFA) のエマルジョンを作成し皮下に投与した。同時に追加アジュバントとして百日咳菌毒素 (Bordetella pertussis toxin; PTX) を腹腔内投与して免疫応答を増強し EAU を誘導した。

免疫日から連日 DHMEQ 20mg/kg もしくは 40mg/kg を腹腔内投与した。EAU 誘導後 7 日目から 3, 4 日ごとに臨床的重症度を観察した。21 日目に眼球を摘出し、組織学的重症度を検討した。

また、EAU 誘導後 10 日目にマウスの所属リンパ節から T 細胞を回収し、DHMEQ を培養液中に添加して抗原特異的 T 細胞増殖反応に対する効果を検討した。同時に培養上清中のサイトカイン濃度について検討した。

さらに T 細胞、抗原提示細胞それぞれの細胞への DHMEQ の影響を検討するため、あらかじめ DHMEQ で T 細胞、抗原提示細胞を前処理したものを用いて、増殖反応への効果を検討した。同時に培養上清中のサイトカイン濃度について検討した。

DHMEQ 投与による網膜内での NF- κ B p65 蛋白核内転送の抑制効果について、EAU 誘導後 10 日目に眼球を摘出し、NF- κ B p65 と核の免疫染色を行い検討した。

【結果・考察】

EAU の発症日は DHMEQ 投与群で 15.6 ± 3.3 日、対照群の 12.6 ± 3.0 日に比べ遅延した ($P < 0.01$)。組織学的重症度は対照群では 2.3 ± 1.5 、DHMEQ 投与群では 1.1 ± 1.4 と有意に軽症化した ($P < 0.05$)。

抗原特異的 T 細胞増殖反応は、DHMEQ の *in vitro* 添加により抑制された。この T 細胞反応の培養上清中では IFN- γ (interferon- γ)、TNF- α (tumor necrosis factor- α)、GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) の有意な産生低下がみられた。一方、Th2 サイトカインである IL-4、IL-10 産生には差がみられなかった。予め T 細胞、抗原提示細胞のいずれか一方を DHMEQ で前処理した場合においても増殖反応は抑制され、両方とも処理することでさらに強く抑制された。培養上清では IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF さらに IL-17 (interleukin-17) の産生低下もみられた。Th2 サイトカインである IL-4、IL-10 産生には差がみられなかった。これらの結果から DHMEQ は主に抗原特異的な T 細胞の活性化を抑制させること、また Th1 および Th17 サイトカインの産生を低下させることが考えられた。

また網膜の内顆粒層においては、NF- κ B 陽性細胞率は対照群の $9.1 \pm 3.0\%$ に対し DHMEQ 投与群で $3.0 \pm 1.7\%$ と NF- κ B p65 核内転送が有意に抑制された ($P < 0.05$)。網膜の内顆粒層には Muller 細胞が存在し、EAU の感受性は Muller 細胞によって産生される TNF- α と関連していることが報告されている。これらのことから DHMEQ の EAU 抑制機序として、EAU の病態形成に関わる免疫担当細胞の NF- κ B 活性化を抑制すると共に、炎症部位である眼局所での炎症性サイトカイン産生を低下させることが考えられた。

【結論】

DHMEQ は主に T 細胞に作用して抗原特異的 T 細胞増殖反応を抑制した。眼局所では網膜の内顆粒層で炎症性転写因子 NF- κ B 核内転送が抑制することが判明した。その結果、DHMEQ 投与により EAU の発症遅延および病態の軽症化が得られるものと考えられた。

さらにこれらの結果から DHMEQ のような NF- κ B の抑制を標的にした薬物は、ヒト内因性ぶどう膜炎の治療戦略の一つとして考慮すべきであると考えられた。現在まで重篤な副作用の報告もみられないことから、今後個々の疾患における DHMEQ の効果がより詳細に明らかにされれば、炎症性疾患および自己免疫疾患に対し広く臨床応用されることが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 石 田 晋

副 査 教 授 藤 堂 省

副 査 准教授 岩 渕 和 也

学 位 論 文 題 名

Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) with a novel inhibitor of nuclear factor- κ B, dehydroxy methyl epoxyquinomicin

(NF- κ B 阻害薬である dehydroxy methyl epoxyquinomicin による
実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (EAU) の抑制)

NF- κ B (nuclear factor- κ B) は生体内の組織に ubiquitous に存在し、サイトカイン産生、細胞増殖、アポトーシス等の細胞内情報の伝達に関わる重要な転写因子である。

DHMEQ (Dehydroxy methyl epoxyquinomicin) は弱い抗菌物質である epoxyquinomicin を元に分子デザインされた新たな低分子の NF- κ B 阻害薬である。これまでの動物実験において重篤な副作用がみられず、臨床応用が期待される薬剤である。

本研究では DHMEQ がヒト内眼炎の治療薬となり得るかを検討するために、動物実験モデルである実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (Experimental autoimmune uveoretinitis; EAU) における治療効果と抑制機序の解析を行った。

DHMEQ 投与により EAU の軽症化および発症遅延が認められた。DHMEQ を *in vitro* で加えたところ抗原特異的 T 細胞の増殖反応の抑制と Th1 サイトカイン産生が減少した。また予め T 細胞もしくは抗原提示細胞を DHMEQ で前処理した場合も抗原特異的 T 細胞の増殖反応と Th1/Th17 サイトカインの産生が抑制された。EAU を誘導したマウスの網膜では DHMEQ 投与により NF- κ B p65 の核内移行が抑制された。これらの結果から DHMEQ の EAU 抑制機序として、主に T 細胞に作用して抗原特異的 T 細胞増殖反応を抑制し、眼局所では網膜の内顆粒層で炎症性転写因子 NF- κ B 核内移行を抑制することが判明した。

DHMEQ のような NF- κ B 阻害薬は、ヒト内眼炎の治療戦略の一つとして考慮すべきである。

審査にあたっては、副査の岩渕和也准教授から(1)EAU を誘導した網膜内顆粒層の細胞で NF- κ B が核内移行したが、どのような細胞が関与しているのかについて質問があり、EAU の感受性に影響を及ぼす Müller 細胞が関与することを回答した。(2)DHMEQ を EAU 発症後に投与した場合も有効かについて質問があり、DHMEQ の EAU 抑制作用機序として、一度誘導されたエフェクター T 細胞、抗原提示細胞の活性を抑えること、眼局所で NF- κ B の活性化を抑制することから効果が期待できることを回答した。(3) NF- κ B と IL-17 のシグナルは関連があるかについて質問があり、IL-17 と IL-17R のシグナルから NF- κ B が活性化されるが、一方

で NF- κ B が直接 IL-17 の重要な転写因子というわけではなく、NF- κ B の活性化が抑制され炎症性サイトカインが抑制されると、IL-6、TGF- β などの priming cytokines も抑制され、それに伴って IL-17 の産生が減少する可能性がある」と回答した。

一方、副査の藤堂省教授からは (1) 内眼炎の治療で、網膜内顆粒層に標的となる細胞は存在するのか質問があり、網膜のグリア細胞である Müller 細胞の存在を回答した。(2) EAU を誘導した網膜内顆粒層の NF- κ B の活性化が確認された細胞は Müller 細胞であると考えてよいのか質問があり、過去の文献で EAU に対して NF- κ B 阻害薬 Pyrrolidine dithiocarbamate の投与により、Müller 細胞で NF- κ B の核内移行の抑制が確認されていること、今回の結果では細胞の特定まで至らなかったが Müller 細胞の核は内顆粒層の中央に存在することから Müller 細胞であることが推定されると回答した。

また、主査の石田晋教授から (1) DHMEQ の感受性は細胞によって異なるかについて質問があり、今回の結果で抗原特異的 T 細胞と抗原提示細胞に対する作用に差があることから、他の細胞に対しても違いがあることが考えられると回答した。(2) DHMEQ を臨床応用する場合の投与量とどのような副作用が想定されるかについて質問があった。マウスのリウマチ性関節炎のモデルで 2mg/kg を週 3 回の投与が有効であったことから、実際のヒトへの投与は 1～5mg/kg が想定されること、副作用としては免疫抑制作用に伴う感染症の可能性が考えられることを回答した。(3) DHMEQ を臨床応用する場合、その投与はどのように行われるのかについて、血液から非常に早く標的細胞に吸収され、不可逆的に NF- κ B を抑制するということから静脈内投与が想定され、DHMEQ の水溶化製剤の開発により眼局所投与も将来的に考えられると回答した。

この論文は、EAU に対する DHMEQ の治療効果と抑制機序を解析した点で高く評価され、今後の DHMEQ を用いた治療も、早期に臨床応用されることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。