

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09387

研究課題名(和文) 向精神薬による酸化ストレスの制御を介した免疫コントロール

研究課題名(英文) The regulation of immune response by anti-psychotics via oxidative stress

研究代表者

大田 典之(Ohta, Noriyuki)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：60379162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：樹状細胞(DC)は適応免疫応答の制御に重要な役割を担っている。TSPOは免疫細胞に影響を与えるが、TSPOリガンドがDCに及ぼす影響については明らかにされていない。DCを介した免疫応答に対するTSPOの免疫調節特性を検討した。

TSPOリガンドは、マウスDCから副刺激分子の発現を抑制した。エチフォキシンで処理されたDCは、インターロイキン12の分泌量も減少した。T細胞との混合細胞培養でマウスのT細胞のTh1への分化を抑制した。TSPOリガンド処理したDCは、接触過敏反応を阻害した。これはTSPOシグナルへの介入による炎症性疾患の制御の可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らは、Translocator protein (TSPO)を介したベンゾジアゼピン系薬物によるシグナル伝達が、単一の細胞に対する作用を超えて動物個体レベルの免疫系に影響することを今までの研究で示してきた。本研究では実際に臨床的に用いられるTSPOに対する低分子リガンドを用いてこの経路に介入することによる免疫疾患モデルを抑制制御する可能性を示した。この結果はこのアプローチが実現可能な治療の選択肢になる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Dendritic cells (DCs) play an important role in the regulation of adaptive immune responses; TSPO affects immune cells, but the effects of TSPO ligands on DCs are not known; the immunomodulatory properties of TSPO on DC-mediated immune responses were investigated. The TSPO ligand suppressed the expression of paracrine molecules from mouse DCs. Ethifoxin-treated DCs also decreased secretion of interleukin-12, inhibited differentiation of mouse T cells to Th1 in mixed cell culture with T cells, and inhibited contact hypersensitivity responses in TSPO ligand-treated DCs. This suggests the possibility of controlling inflammatory diseases by intervening in TSPO signaling.

研究分野：麻酔科学

キーワード：樹状細胞 Translocator protein 接触過敏症 IL-12 副刺激分子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

麻酔薬と免疫系との関係は古くからある研究分野であり、様々な形で麻酔薬が免疫系に与える影響は追求されてきた。従来行われてきた研究は試験管内での研究が多数を占めているために、麻酔薬の生体個体レベルへの影響は疑問視する意見も多かった。申請者らは近年、麻酔薬と免疫系の関係を樹状細胞という細胞の観点から見直して研究してきた。特にミダゾラムの樹状細胞に対する影響に関しては非常に詳細な解析を行い、ミダゾラムが樹状細胞によって惹起される個体レベルの免疫応答に影響を与えること、さらにこの作用が末梢性ベンゾジアゼピン受容体への作用をかいしていることを示唆する結果を得た。しかしながらベンゾジアゼピン系薬物の中枢神経系への作用機序に関しては詳細に研究されてきたが、免疫細胞に対してどのように作用するのかは詳細には研究されておらず、中枢神経系と同様に GABA 受容体を介した作用が中心ではないかと考えられてきた。ベンゾジアゼピンの作用分子として TSPO(Translocator protein) (以前は末梢組織に存在するベンゾジアゼピンの受容体ということで末梢性ベンゾジアゼピン受容体と呼ばれた) が知られてきたが免疫細胞での作用メカニズムにおいてこの分子の関与を報告した研究は無かった。

### 2. 研究の目的

申請者らは近年、麻酔薬と免疫系の関係を樹状細胞という細胞の観点から見直して研究してきた。特にミダゾラムの樹状細胞に対する影響に関しては非常に詳細な解析を行い、ミダゾラムが樹状細胞によって惹起される個体レベルの免疫応答に影響を与えること、さらにこの作用が末梢性ベンゾジアゼピン受容体への作用をかいしていることを示唆する結果を得た。すなわち樹状細胞の LPS による成熟分化の抑制は GABA 受容体リガンドでは起こらないのに対して、末梢性ベンゾジアゼピン受容体リガンドを作用させると再現されることが今までの申請者らの研究で示されてきた。本研究ではここから進めて抹消性ベンゾジアゼピン受容体を介したシグナルによって免疫疾患モデルを制御できるのか否かという仮説を検証することとした。

### 3. 研究の方法

#### DC の培養

マウスの骨髄細胞から GM-CSF の存在下に骨髄由来樹状細胞を分化誘導させ、誘導された DC に対して DC をエチフォキシンの存在下および非存在下で 24 時間培養した後、LPS (100ng/ml) で 24 時間刺激した。LPS で刺激した後、表面分子の発現量をフローサイトメトリーで評価し、培養上清を回収して後述のように IL-12 p40 測定した。培養細胞の生存率は、トリパンブルー排除により評価した。本研究で使用したすべての実験培養における細胞生存率は 90%以上であった。

#### 表面分子のフローサイトメトリー分析

フローサイトメトリー分析は、BD FACSVerser フローサイトメーターおよび BD FACS Suite ソフトウェア (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) を用いて実施した。データは FlowJo (FlowJo LLC., Ashland, OR, USA) を用いて解析した。それぞれの mAb によって同定された細胞表面分子の発現は、フローサイトメトリーを用いて、任意単位あたりの平均蛍光強度 (MFI) として評価された。

#### IL-12 p40 の酵素結合免疫吸着測定法

LPS 刺激により培養上清に放出された IL-12 p40 は、酵素結合免疫吸着測定キットを用いて、製造者の指示に従い測定した (R&D Systems, Minneapolis MI, USA)。

#### 核因子カッパ B (NF- $\kappa$ B) 活性化の解析

NF- $\kappa$ B の活性化に対するエチフォキシンの効果は、Active Motif 社 (Carlsbad, CA) の TransAM 法を用いた ELISA ベースのキットで分析した。成熟した DC から核抽出物を調製するために、Nuclea Extract Kit (Active Motif, Carlsbad, CA) をメーカーのプロトコルにしたがって使用した。NF- $\kappa$ B p65 の検出には、TransAM NF- $\kappa$ B p65 kit を使用し、製造者の指示に従って DC の核抽出液から p65 上のエピトープを認識する NF- $\kappa$ B を検出しました。

#### 同種混合細胞培養反応 MLR

サンプル中の CD4+および CD8 + T 細胞を濃縮するために、雌の 4~6 週齢の Balb/C マウス (ハプロタイプ I-Ad) から脾臓細胞を分離し、磁気細胞ソーティングで精製した。C57BL/6 マウス (ハプロタイプ I-Ad) から単離した DC を、10  $\mu$ M エチフォキシシととともに、またはなしでインキュベートし、その後 LPS (100ng/mL) で 24 時間刺激した後、マイトマイシン C (50  $\mu$ g/mL) で 20 分処理した。C57BL/6 マウス (ハプロタイプ -Ab) のマイトマイシン C 処理 DC を Balb/C マウス (ハプロタイプ -Ad) の同種 T 細胞とインキュベートして、Balb/C T 細胞の増殖と Th1 型 T 細胞への分化を誘導した。その後、これらの混合サンプルを 96 ウェル平底プレート (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) において、10% ウシ胎児血清を添加した RPMI-1640 中、37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> で 4 日間培養を行った。細胞の増殖は、Alamar Blue アッセイを用いて測定した。簡単に説明すると、培養した細胞を、培養期間の最後の 12 時間、Alamar Blue でパルスし、その後、マイクロプレートリーダー (SH9000; コロナ電子株式会社、日本、茨城) を用いて、細胞培養物の 570nm および 600nm における吸光度を測定した。増殖の指標は、570nm の光学密度から 600nm の光学密度を差し引くことによって決定した。培養上清を採取し、ELISA キット (R&D Systems 社製) を用いて IFN- $\gamma$  の濃度を測定した。

#### ハプテン特異的リンパ球増殖アッセイ

DNBS 依存性の *in vivo* T 細胞増殖については、10  $\mu$ M エチフォキシシの存在下または非存在下で培養した  $5 \times 10^5$  個の DC (100  $\mu$ L 生理食塩水) を皮下注射し、100  $\mu$ g/mL DNBS でパルスした 5 日後のマウスの腋窩および鼠径リンパ節から細胞を準備した。細胞 (96 ウェルプレートで  $4 \times 10^5$ /ウェル) は、10% ウシ胎児血清を補充した RPMI-1640 中で、37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> で DNFB と共に 3 日間培養した。T 細胞増殖は、上記のように Alamar Blue アッセイで評価した。ハプテン特異的リンパ球増殖アッセイと同時に、アッセイ培養の上清を採取し、IFN- $\gamma$  特異的 ELISA (R&D システムズ社) により分析した。

#### 養子縁組した DC を用いた接触過敏症モデル

接触過敏症 (CHS) は、DNFB を接触感作剤として使用することができる、細胞媒介免疫機能の簡単な *in vivo* アッセイである。簡単に説明すると、0.5% の DNFB を 4:1 のアセトン/オリーブオイルに溶かし、0 日目に C57BL/6 マウスの剃毛した腹部に適用した。5 日目に、マウスは DNFB を右耳に皮下塗布することでチャレンジした。24 時間後、パネ式マイクロメーター (株式会社ミツトヨ、川崎市、日本) を用いて、右耳 (チャレンジ済み) および左耳 (未チャレンジ) の厚さを測定した。耳の厚みの増加は、チャレンジした耳の厚み-チャレンジしていない耳の厚みという単純な引き算で評価された。DC の養子移入による CHS の評価のために、DC は、上記の DC の単離および培養のセクションに記載されているように調製された。CHS モデルは、抗原を負荷した DC を *in vivo* で接種することで誘導した [23,24]。15  $\mu$ g/mL エチフォキシシの存在下または非存在下で培養後、 $5 \times 10^5$  個の DC (100  $\mu$ L 生理食塩水) を 100  $\mu$ g/mL DNBS でパルス化し、0 日目に皮下注射をした。5 日後、左右の耳の厚さを測定し、マウスの右耳の各側を、4:1 のアセトン/オリーブオイルで希釈した 0.2% DNFB 10  $\mu$ L で表皮処理した。左耳にはビビクルを単独で投与した。24 時間後、パネ付きマイクロメーターを用いて、左右の耳の厚さを測定した。耳の腫れは以下のように計算された: (T-右耳の T<sub>0</sub>) - (T-左耳の T<sub>0</sub>)、ここで T<sub>0</sub> と T はそれぞれチャレンジ前とチャレンジ後の耳の厚みの値を表す。

#### TSPO 特異的メッセンジャーRNA (mRNA) の逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応による解析

5 日間培養後、磁気活性化カラムソーティングカラムと抗 CD11c 抗体 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) でコーティングしたビーズを用いて磁気選別することにより、BM-DC を精製した。BMDC からの全 RNA は、RNeasy mini kit (QUIAGEN, Hilden, Germany) を用いて調製した。ゲノム DNA は DNase で処理することで除去した。PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (TAKARA BIO INC.) を用いて、Total RNA から相補的 DNA を合成した。TSPO の相補的 DNA を増幅するために、以下のプライマーを使用した: Mm00437828\_m1. 95  $^{\circ}$ C で 10 分間加熱した後、95  $^{\circ}$ C で 15 秒間、60  $^{\circ}$ C で 60 秒間を 1 サイクルとして、40 サイクルで相補的 DNA を増幅した。

## 4. 研究成果

### エチフォキシシはマウス DC の成熟を阻害する

最初の実験では、エチフォキシシがネズミの DC の成熟に影響を与えるかどうかを決定した。未熟なマウス DC を 8 日間培養し、最後の 2 日間はエチフォキシシ (15  $\mu$ g/mL) を添加または無添加でパルスした。LPS で 24 時間刺激した後、フローサイトメトリーにより DC 上の MHC クラス II、コストミュレイトリー分子 (CD80、CD86) の発現を測定した。その結果、エチフォキシシが CD80、CD86、MHC クラス II の発現を抑制することを測定した。これらの DC の表現型の変化は、エチフォキシシが DC の成熟を抑制していることを示唆した。CD80 および MHC class II

に対するエチフォキシシの効果は CD86 と同様であったため、濃度依存性の観点から、CD86 発現に対するエチフォキシシの効果を他の表面分子に対する効果の代表とした。Etifoxine は用量依存的に CD86 の発現を抑制した。

エチフォキシンは IL-12 p40 の産生を減少させる

成熟した DC の主要な機能は、T 細胞の機能と分化を調節するサイトカインの合成である。IL-12 の産生は DC 成熟の重要なマーカーでもあり、Th1 優位のアジュバントを選択する方法として使用することができる。その結果、DC を LPS で刺激すると IL-12 p40 の放出が誘導され、エチフォキシンは LPS による DC からの IL-12 p40 合成を抑制する効果があることがわかった。

エチフォキシンは LPS による NF- $\kappa$ B の活性化および MAPK のリン酸化を抑制した

転写因子 NF- $\kappa$ B は、炎症性メディエーター（サイトカインとケモカイン）およびコスティミュレイトリー表面分子をコードする遺伝子の発現に関連する変化を含む、免疫細胞における炎症性変化のマスターレギュレーターである。LPS に TLR4 が結合するなど、様々な病原体関連分子による Toll 様受容体の活性化は、NF- $\kappa$ B の転写活性を高め、DC の様々な炎症性変化をもたらす。そこで、LPS による DC の NF- $\kappa$ B 活性化に対するエチフォキシンの影響を解析した。エチフォキシンはこの活性化を抑制した。したがって、エチフォキシンは、NF- $\kappa$ B に関連する核への LPS-TLR4 シグナルの伝達を抑制し、それによって NF- $\kappa$ B プロモーターを持つ遺伝子（CD80、CD86、MHC クラス II、および IL-12 をコードするものを含む）の発現を低下させることによって、少なくとも部分的には炎症カスケードを抑制する。

エチフォキシンは T 細胞の増殖と Th1 型免疫反応を抑制する

エチフォキシンの存在が DC の機能変化が免疫機能に与える影響を明らかにするため、リンパ球と DC の混合細胞培養反応に対するエチフォキシンの影響を調べた。エチフォキシンの存在下または非存在下で 2 日間インキュベートした 8 日間の培養液から、LPS で成熟させた DC の同種 T 細胞刺激能力を調べた。エチフォキシンの存在下で培養した DC と比較して、T 細胞と共培養したエチフォキシンの存在下 DC は、アラマブルーを用いて評価したところ、同種 T 細胞による増殖反応を抑制していた。エチフォキシンの存在下 DC を共培養すると、増殖反応が効果的に増強された。一方、エチフォキシンの存在下 DC では、同種 T 細胞はあまり反応を示さなかった。さらに、エチフォキシンの有無にかかわらず共培養したサンプルの上清を採取し、ELISA を用いて IFN- $\gamma$  の産生について解析した。その結果、DC をエチフォキシンの存在下で共培養すると、IFN- $\gamma$  の産生が効果的に抑制されることがわかった。

次に、DNBS 依存性 T 細胞増殖を *in vivo* で検討した。エチフォキシンの存在下または非存在下で培養し、DNFB でパルス化した DC を皮下注射した。リンパ節から採取した細胞は、DNFB で培養した。エチフォキシンの存在下 DC を注射したマウスの細胞は増殖反応を示さなかったが、エチフォキシンの存在下で培養した DC は細胞増殖が促進された。IFN- $\gamma$  も同様の傾向を示し、非エチフォキシンの存在下群の上清は IFN- $\gamma$  の産生を誘導し、エチフォキシンの存在下群は抑制した。

エチフォキシンの存在下 DC は正常な細胞介在性免疫反応を惹起しない

CHS 反応は、細胞介在性免疫の *in vivo* モデルの原型であり、Th1 型 T 細胞によって誘導される。エチフォキシンの存在下によって誘導される表現型の変化が DC に及ぼす *in vivo* での影響を分析するために、DC の養子移入を伴う修正 CHS モデルを使用した。CHS モデルでは、DNFB のような強力なハプテンを脇腹に塗布した後（感作期）、同じハプテンを耳に塗布し（誘発期）、耳の腫れを生じさせることで過敏症を誘発することが知られている。CHS はまた、DNBS を負荷した DC を *in vivo* で接種し、その後 DNFB を皮下投与することによっても誘導することができる。我々は、DC をマウスに養子移入した後者の CHS モデルを用いて、DC 誘導性の Th1 型免疫反応に対するエチフォキシンの *in vivo* 効果を解析した。その結果、エチフォキシンの存在下 DC を用いた免疫では、ピヒクル処理した DC を用いた免疫よりも低い CHS 応答を誘導することがわかった。

エチフォキシンの存在下 DC は遅延型過敏反応を抑制した

次に、遅延型過敏反応に対するエチフォキシンの *in vivo* 効果を解析するために、オリジナルの CHS 実験を行った。DNFB で感作した後、0 日目から 4 日目に vehicle または etifoxin (50 mg/kg) をマウスに腹腔内注射した。エチフォキシンの存在下 DC は 10ml/kg の生理食塩水で希釈して投与した。その後、耳を DNFB で処理し、上記のように測定した。エチフォキシンの存在下 DC を投与したマウスは、対照マウスに比べて耳腫れに対する反応が少なかった。

## 結論

我々は、エチフォキシンの存在下 DC が LPS によって誘導される DC の機能的成熟を阻害し、MHC クラス II およびコスティミュレイトリー分子の発現を低下させ、IL-12 の分泌を減少させることを実証した。LPS シグナルは、CD80 や CD86 の発現や IL-12 の分泌といった炎症反応のマスターレギュレーターである NF- $\kappa$ B や MAPK を独立して活性化することが示されている [25-28]。その結果、エチフォキシンの存在下 DC は NF- $\kappa$ B と MAPK の両経路の活性化を抑制することを見出した。同様に、エチフォキシンの存在下 DC は、マウス全体の Th-1 型過敏反応の免疫反応を抑制した。今回の結果から、エチフォキシンの存在下 DC は中枢神経系の GABA<sub>A</sub> 受容体シグナルに関連した抗不安作用を有するだけでなく、TSPO シグナルを介して免疫系にも影響を及ぼすことが示された。

GABAA シグナルが免疫細胞の活性を調節するかどうかについては、議論が分かれるところである。今回、エチフォキシンが DC の IL-12 産生を抑制したことから、エチフォキシンが T 細胞の Th1 T 細胞への分化に対する DC の作用に影響を与えることが明らかになった。リンパ球混合培養では、エチフォキシンで処理した DC は、同種 T 細胞の刺激能をアップレギュレートする能力が低下していることがわかった。我々は、動物全体において、エチフォキシンが、Th1 T 細胞を介した免疫応答を開始する DC の効果を阻害していると推測している。この仮説を検証するために、Th1 型免疫反応によって引き起こされる遅延型過敏症を検証するための確立されたモデルであるハプテン特異的反応と CHS を使用しました。その結果、エチフォキシンで処理した DC は、ハプテン特異的な反応と CHS を誘発しないことがわかった。さらに、エチフォキシンは CHS を直接抑制した。この結果は、エチフォキシンが、全動物において、DC を介した Th1 型免疫応答の誘導を抑制することを示す証拠となる。この変化は、免疫抑制をもたらし、重症患者の転帰を悪化させることが知られている。過去の研究では、GABAA 受容体や TSPO のリガンドであるベンゾジアゼピンの一つである Midazolam が、敗血症患者の臨床転帰の悪化に関与していることが示された[42,43]。このメカニズムは不明であったが、本研究の結果は、エチフォキシンの DC に対する免疫抑制作用がこれらの結果を説明できることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 大田典之	4. 巻 7
2. 論文標題 Predictors of post-extubation stridor in patients on mechanical ventilation: a prospective observational study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep .	6. 最初と最後の頁 99501-99508
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-99501-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大田典之
2. 発表標題 ベンゾジアゼピン系薬物の集中治療における位置付け
3. 学会等名 日本静脈麻酔学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大田典之
2. 発表標題 進行性の肺がんへの免疫チェックポイント阻害剤投与による免疫関連有害事象としての間質性肺炎に対し集中治療を行った一症例
3. 学会等名 日本呼吸療法学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大田典之
2. 発表標題 敗血症は粘膜免疫応答を抑制する
3. 学会等名 日本麻酔科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大田典之
2. 発表標題 遺伝子組み換えトロンボモジュリンは樹状細胞によるTh1型免疫応答を抑制する
3. 学会等名 日本集中治療医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大田 典之
2. 発表標題 重症急性膵炎後の被包化壊死に伴う敗血症に対して、4ヶ月間の集中治療によって治癒に至った1症例
3. 学会等名 日本集中治療医学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	中尾 慎一  (Nakao shin-ichi)  (10207714)	近畿大学・医学部・教授    (34419)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------