

学位論文題名

Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice by an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor- γ

(ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体ガンマの特異的リガンドによる実験的自己免疫性脳脊髄炎抑制)

学位論文内容の要旨

核内受容体の一つである、peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) は脂肪代謝や糖代謝において重要な働きを示し、そのリガンドのいくつかはインスリン非依存性糖尿病の治療に用いられてきた。一方で、この受容体を介した免疫系の調節作用も最近報告されている。即ち、PPAR- γ は活性化 macrophage で発現が認められ、AP-1 や NF- κ B などの transcription factor を抑制することにより、proinflammatory cytokine や iNOS の発現を抑制することが示された。今回、これらの PPAR- γ を介した働きに注目し、PPAR- γ 特異的リガンドの一つである troglitazone の投与による多発性硬化症 (MS) の動物モデル、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の発症、進展への効果を検討した。

EAE は myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 35-55 ペプチドを用いて 8~10 週齢の C57BL/6 マウス (メス) に誘導した。troglitazone は 0.5% の carboxymethyl cellulose (CMC) 液に溶解し、1 日 1 回金属ゾンデにて強制経口投与した。コントロール群には、CMC 液のみを投与した。臨床症状は連日観察し、以下の clinical score に従って記録した。no detectable signs of EAE, 0; complete loss of tail tonicity, 1; flaccid tail and abnormal gait (ataxia and/or paresis of hind limbs), 2; hind limbs paralysis, 3; hind limbs paralysis with hind body paresis, 4; hind and forelimbs paralysis, 5; death, 6。

まず、はじめに、troglitazone の濃度を 0、50、そして、100mg/kg/day の濃度に分け、MOG 初回免疫前日より、一日一回投与し、clinical score が 0 になるまで投与した時の経過を追跡した。その結果、troglitazone 投与群では、一日あたりの量が 50mg/kg、100mg/kg のいずれでも maximum clinical score は control 群より有意に改善していた。一方、発症するまでの日数においては、50mg/kg 投与群は control 群と差がなく、100mg/kg 投与群は control 群より有意に発症が遅くなった。このことから、以後の実験は、一日あたりの投与量をすべて 100mg/kg とした。

次に、troglitazone の臨床上的効果を検証するため、病理学的を検討をおこなった。MOG 投与 25-30 日目に、下位腰髄を取り出し、H&E 染色を行い、炎症部位を比較検討した。その結果、troglitazone 投与群で著明に炎症が抑制された。

次に、troglitazone の効果の機序を検討するため、まず、T cell proliferation を control 及び

troglitazone 投与群で行った。troglitazone 投与群と control 群で、それぞれ、MOG 投与 10 日目のマウスの所属リンパ節から T 細胞を取り出し、in vitro において MOG を再刺激し、増殖能をみた。その結果、T 細胞の増殖能には差は認められなかった。また、この実験の際の培養上清液を ELISA にて IFN- γ と IL-4 を調べたが、IFN- γ の濃度は troglitazone 投与群と control 群で差はなく、IL-4 は両者とも検出感度以下であった。

次に、troglitazone の治療効果の機序に関して、最近 PPAR- γ の抗炎症作用として注目されている、マクロファージにおける各種サイトカインなどの発現抑制効果について検討するため、初回の MOG 投与から 25 日前後に、全脊髄を取り出し、RT-PCR を行った。その結果、脂肪組織に特異的に発現しているとされる PPAR- γ 2 は発現がみられなかったが、マクロファージなどに発現している PPAR- γ 1 は troglitazone 投与群で発現が増強していた。さらに、IL-1 β や TNF- α の発現は troglitazone 投与群で抑制されていた。以上の結果を EF-1 との比較により、半定量的に評価したところ、proinflammatory cytokine、特に TNF- α の発現が有意に troglitazone 投与群で抑制されていた。一方、troglitazone で発現が抑制されるといわれている iNOS は troglitazone 投与群と control 群で差はなかった。

以上のことから、核内レセプターの一つである PPAR- γ の特異的リガンド、troglitazone は MS の動物実験モデルである EAE において、proinflammatory cytokine の発現を抑制することにより、EAE 抑制効果を示すことが考えられた。これらのことから、PPAR- γ アゴニストの MS 治療への応用が推奨される。しかし、troglitazone は糖尿病治療薬として、臨床的に使用されたものの、重篤な肝障害を惹起することがあるとの理由で使用中止となったため、臨床応用という点から現時点では困難である。しかし、PPAR- γ の ligand はこれまでいくつか開発されてきており、今後、より副作用が少なく、抗炎症作用が強い薬剤が開発されれば、多発性硬化症への臨床応用の可能性が出てくるものと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 田 代 邦 雄
副 査 教 授 小 野 江 和 則

学 位 論 文 題 名

Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice by an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor- γ

(ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体ガンマの特異的リガンドによる実験的自己免疫性脳脊髄炎抑制)

核内受容体の一つである、peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) は脂肪代謝や糖代謝において重要な働きを示し、そのリガンドのいくつかはインスリン非依存性糖尿病の治療に用いられてきた。一方で、PPAR- γ は活性化 macrophage で発現が認められ、一部には AP-1 や NF- κ B などの転写因子を抑制することにより、proinflammatory cytokine や iNOS の発現を抑制するとされている。今回、これらの PPAR- γ を介した働きに注目し、PPAR- γ 特異的リガンドの一つである troglitazone の投与による多発性硬化症 (MS) の動物モデル、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の発症、進展への効果を検討した。

EAE は myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 35-55 ペプチドを用いて 8~10 週齢の C57BL/6 マウス (メス) に誘導した。

まず、はじめに、troglitazone の濃度を 0、50、そして、100mg/kg/day に分け、MOG 初回免疫前日より、1 日 1 回金属ゾンデにて強制経口投与した。その結果、troglitazone 投与群では、一日あたりの量が 50mg/kg、100mg/kg のいずれでも maximum clinical score は control 群より有意に改善していた。一方、発症までの日数においては、50mg/kg/day 投与群は control 群と差がなく、100mg/kg/day 投与群は control 群より有意に発症が遅くなっていた。このことから、以後の実験は、投与量を 100mg/kg/day とした。

次に、troglitazone の臨床上的効果を検証するため、下位腰髄を取り出し、病理学的検討

を行ったところ troglitazone 投与群で著明な炎症抑制が確認された。

次に、troglitazone の効果の機序を検討するため、まず、T cell proliferation を行った。その結果、troglitazone 投与群と control 群で、T 細胞の増殖能には差は認められなかった。

次に、troglitazone の治療効果の機序に関して、マクロファージにおける各種サイトカインなどの発現抑制効果について検討するため、MOG 投与から 25 日前後に、全脊髄を取り出し、RT-PCR を行った。その結果、IL-1 β や TNF- α の発現は troglitazone 投与群で抑制されていた。

以上のことから、核内レセプターの一つである PPAR- γ の特異的リガンド、troglitazone は MS の動物実験モデルである EAE において、proinflammatory cytokine の発現を抑制することにより、EAE 抑制効果を示すことが考えられた。

公開発表にあたって、副査の田代教授から、脊髄に認められる炎症細胞の種類について質問があったが、申請者は文献等を引用し、また、申請者自身が行った免疫染色の結果を併せ、半分強が macrophage で、半分弱が T cell と回答した。次に、PPAR- γ の特異的リガンドの MS への治療応用の可能性についての質問があった。申請者は、現在すぐに使用できるものはないが、今後、より副作用が少なく、抗炎症作用が強い薬剤が開発されれば、MS への臨床応用の可能性が期待されると回答した。次いで、副査の小野江教授から troglitazone は肝障害のために臨床的に使用中止となったが、今回の実験では、肝臓に影響があったかについて質問があった。申請者は、肝臓を調べたところ、troglitazone 投与群において肝炎の所見が認められたと回答した。最後に主査の長嶋教授から、糖尿病に MS を合併した症例に投与した例があるのかについて質問があった。申請者は、これまでそのような報告はないと回答した。次に、他の PPAR- γ の特異的リガンドによる EAE に対する効果について質問があった。申請者は、最近論文に、他の系統の EAE に PPAR- γ の natural ligand を投与することにより、T cell proliferation も抑制されることを紹介し、その違いは、EAE の違いやリガンドの違いが影響するのではないかと回答した。

この論文は、PPAR- γ の特異的合成リガンド、troglitazone が、MS の動物モデルである EAE に効果があることを世界で初めて報告したもので、高く評価されるものである。今後、より副作用が少なく、抗炎症作用が強い薬剤が開発されれば、多発性硬化症への臨床応用の可能性が期待される。

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。