

— 総説 —

レチノイド誘導体の免疫薬理学的研究

丹羽学^{a)}*, 永井博式^{b)}

要約: レチノイドは細胞内の特異的レセプターと結合し、各種遺伝子の発現を調節することにより、細胞の分化、増殖および抗炎症作用など、種々の生理活性を示すことが多数報告されている。本研究では、これらの欠点を補うべく新しく合成されたレチノイド誘導体である、4-[(5, 6, 7, 8-tetrahydro-5, 5, 8, 8-tetramethyl-2-naphthyl) carbamoyl] benzoic acid (Am-80) の免疫薬理学的作用について検討し、次いでその作用機序についても合わせて検討した。Am-80 は、マウスの2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) 誘発接触性皮膚炎およびハプテン特異的 IgE 産生が強く見られる DNFB 反復塗布によるマウス接触性皮膚炎において、耳介の腫脹を用量依存的に強く抑制した。また、Am-80 は *in vitro* での単核球からの抗原による interleukin-6 (IL-6) ならびに interferon- γ (IFN- γ) 産生を抑制し、その抑制は転写レベルにおいて観察された。Am-80 は、マウスの type II コラーゲン誘発関節炎の発症を抑制し、*C. Parvum* 前処置マウスの Lipopolysaccharide (LPS) による IL-6 産生を抑制したが、Concanavarin A (Con A) 刺激した T 細胞からの IFN- γ および inteleukin-4 (IL-4) 産生には影響を及ぼさなかった。さらに Am-80 は、ラットの実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) の臨床症状および脊髄への細胞浸潤を用量依存的に抑制したが、投与中止により EAE の再発が観察された。また、脊髄における IL-6 mRNA の発現レベルにおいても同様に、投与中止後の IL-6 mRNA の発現上昇が観察された。以上の結果から、Am-80 は、リンパ球以外の細胞からの IL-6 および IFN- γ の産生を選択的に抑制することにより、マウスおよびラットの接触性皮膚炎ならびに自己免疫疾患発症を抑制することが示唆された。これらの知見は、免疫性疾患における炎症性サイトカインの重要性ならびにレチノイド誘導体の治療薬としての有用性を示唆するものである。

索引用語: レチノイド、接触性皮膚炎、実験的アレルギー性脳脊髄炎、Am-80、サイトカイン、IL-6、IFN- γ 、

Immunopharmacological study of Retinoid Derivatives

Satoru NIWA^{a)}*, Hiroichi NAGAI^{b)}

Abstract: Retinoids have been reported to elicit a variety of biological activities such as cell differentiation, cell growth and anti-inflammatory effect, through the binding with specific intracellular receptors. In this study, we examined immunopharmacological effects of 4-[(5, 6, 7, 8-tetrahydro-5, 5, 8, 8-tetramethyl-2-naphthyl) carbamoyl] benzoic acid (Am-80), a new retinoid-derivative, and its mechanism of actions. Am-80 inhibited ear swelling in a dose-dependent manner on 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)-induced contact dermatitis and on contact dermatitis by the repeated applications of DNFB in mice. In addition, Am-80 inhibited production of inteleukin-6 (IL-6) and interferon- γ (IFN- γ) on mononuclear cells *in vitro*, and its inhibition was observed on a transcriptional level. Am-80 inhibited the elicitation of type II collagen-induced arthritis in mice. Am-80 inhibited lipopolysaccharide (LPS)-induced IL-6 production in *C. Parvum*-pretreated mice, but not the production of IFN- γ or IL-4 in T cells stimulated with concanavarin A (Con A) *in vitro*. Am-80 diminished clinical symptoms and infiltration of inflammatory cells into the spinal code on experimental allergic encephalomyelitis (EAE)-induced rats. However, after stopping administration, EAE recurred in DA rats treated with AM-80. Furthermore, the expressional level of IL-6 mRNA was diminished during the administration of Am-80, but provoked as soon as it was stopped. Therefore, Am-80 cured mice contact dermatitis, arthritis and rat EAE through the selective inhibition of IL-6 and IFN- γ secreted from inflammatory cells except for T cells. This evidence may suggest the importance of inflammatory cytokines and the usefulness of retinoid derivatives in immune disorders.

Keyphrases: retinoid, contact dermatitis, EAE, Am-80, cytokine, IL-6, IFN- γ

a) ノバルティス・ファーマ株式会社筑波研究所 創薬生物グループ (〒300-2611 つくば市大久保8番地)
Discovery Biology Group, Research Division, Tsukuba Research Institute, Novartis Pharma K. K.
(8, Ohkubo, Tsukuba 300-2611, JAPAN)

b) 岐阜薬科大学薬理学教室 (〒502-8585 岐阜県岐阜市三田洞東5丁目6-1)
Laboratory of Pharmacology, Gifu Pharmaceutical University (5-6-1, Mitahora-higashi, Gifu 502-8585, JAPAN)

緒言

レチノイドとは、ビタミン A の生体内活性分子である all-trans-レチノイン酸および類似の作用を示す化合物の総称である。ビタミン A は、夜盲症の抑制因子として発見された脂溶性ビタミンで、天然にはレチノール (ビタミン A₁) とその誘導体が存在し、視覚、聴覚および生殖系の機能維持、成長促進、皮膚や粘膜の機能保持、制がん複合糖質の合成などに関与することが知られている。しかし、ビタミン A の研究は、他の脂溶性ビタミンと同様、栄養学的見地からのものが多く、その詳細な作用機序は不明な点が多い。

レチノイン酸は、レチノールからアルコールデヒドロゲナーゼおよびレチナルオキシダーゼにより合成され、ビタミン A₁ 酸と呼ばれる。視覚、聴覚および生殖系におけるビタミン A 様の作用はレチノールに劣るが、他の作用は、レチノールと同等あるいはそれ以上の生理活性を示す¹⁾。レチノイン酸は、ステロイドーチロイドホルモンレセプタースーパーファミリーに属するレチノイン酸レセプター (RAR) に結合する²⁾。RAR には、 α 、 β および γ の三種類のレセプターが同定されている³⁾。レチノイン酸-RAR 複合体は、細胞の分化⁴⁾や増殖制御⁵⁾、および抗脈管形成作用⁶⁾など、多岐にわたる生理活性を示す。これらの生理作用は、AP-1 との拮抗作用により誘導される遺伝子の発現を抑制すること⁷⁾、あるいはプロモーター領域に RAR-responsible element (RARE) を含む遺伝子の発現を活性化することにより誘導される⁸⁾。最近、レチノイドが、液性免疫および細胞性免疫を調節すること⁹⁾⁻¹¹⁾、関節リウマチ患者由来の滑膜細胞によるコラゲナーゼ産生抑制作用を有すること^{12)、13)}などの報告から、リウマチ関節炎などの自己免疫疾患および骨粗しょう症などの治療薬としても注目されている。しかし、多くのレチノイドは、催奇形性、過剰症および薬剤耐性などの副作用^{14)、15)}のために、治療薬としての応用には多くの難題を抱えている。

近年、首藤らにより合成された新規レチノイド誘導体である 4-[(5, 6, 7, 8-tetrahydro-5, 5, 8, 8-tetramethyl-2-naphthyl) carbamoyl] benzoic acid (Am-80) は、RAR γ には結合せずに、RAR α および RAR β に強く結合し、all-trans-レチノイン酸より十数倍強い生理活性を示す^{16) 19)}。さらに、光、熱および酸化などの物理化学的特性に対する安定性、毒性および耐性においても all-trans-レチノイン酸よりも優れている⁶⁾。

そこで著者らは、Am-80 の免疫薬理学的作用について、マウスの 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) 誘発接触性皮膚炎およびマウスの DNFB 反復塗布による皮膚炎の 2 種の皮膚炎モデルを用いて、さらにマウスの type

II コラーゲン誘発関節炎およびラットの実験的アレルギー性脳脊髄炎の自己免疫疾患モデルを用いて検討した。さらに、作用機序、特に炎症性サイトカインの産生に対する作用についても検討した。その結果得られた新知見に関して以下に総括する。

1. マウスの DNFB 誘発接触性皮膚炎に及ぼす Am-80 の作用について: 接触性皮膚炎は、picryl chloride (PC) や DNFB などの化学物質が局所に反復して皮膚に接触することにより惹起されるアレルギー性皮膚疾患である²⁰⁾。この疾患では、皮膚組織への好中球、リンパ球および単球などの炎症細胞の浸潤ならびに重篤な浮腫および表皮の肥厚が観察される。接触性皮膚炎の発症機序に関しては多くの報告がなされており、マウスモデルを用いた研究では、発症は即時相ならびに遅発相の二相よりなることが知られている²¹⁾。即時相では肥満細胞が中心的な役割を演じ、抗原抗体反応により Fc ϵ レセプターを介して活性化され、脱顆粒によってヒスタミン、セロトニンおよびロイコトリエンなどの種々のケミカルメディエーターを遊離して発症する²²⁾。一方、遅発相では、interleukin-1 (IL-1)、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-6 (IL-6)、interferon- γ (IFN- γ) および interleukin-4 (IL-4) などの種々のサイトカインが複雑なネットワークを介して皮膚組織への細胞浸潤および炎症反応を引き起こす²³⁾。

近年、レチノイドが IL-6²⁴⁾、IL-4²⁵⁾ および IFN- γ ²⁶⁾ などのサイトカインの産生を転写レベルで制御することが多くの研究者により報告されている。レチノイドは、レチノイン酸レセプター (RAR) と強固な複合体を形成し、RAR-responsive element (RARE) の活性化あるいは AP-1 との拮抗作用により、種々のサイトカイン遺伝子の転写を制御するものと思われる。そこで本項では、レチノイド誘導体である Am-80 の種々のサイトカインの関与が知られているマウスの DNFB 誘発接触性皮膚炎に対する作用について検討した。

DNFB 塗布マウスでは、抗原塗布後 3 時間および 24 時間にピークを示す二相性の皮膚反応が観察された (Fig. 1A)。Am-80 は、経口投与により用量依存的に皮膚反応の遅発相のみを抑制し、即時相には影響を及ぼさなかった (Fig. 1B)。

本反応における即時相では、肥満細胞が重要な役割を演じていることが知られている。すなわち、抗原刺激により活性化された肥満細胞は、脱顆粒反応によりヒスタミン、セロトニンおよびロイコトリエンなどのケミカルメディエーターおよび monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) および interleukin-8 (IL-8) などの走化性因子を遊離し、血管透過性亢進および炎症性細胞の集積などを誘発する。しかし、Am-80 は、即時相に影

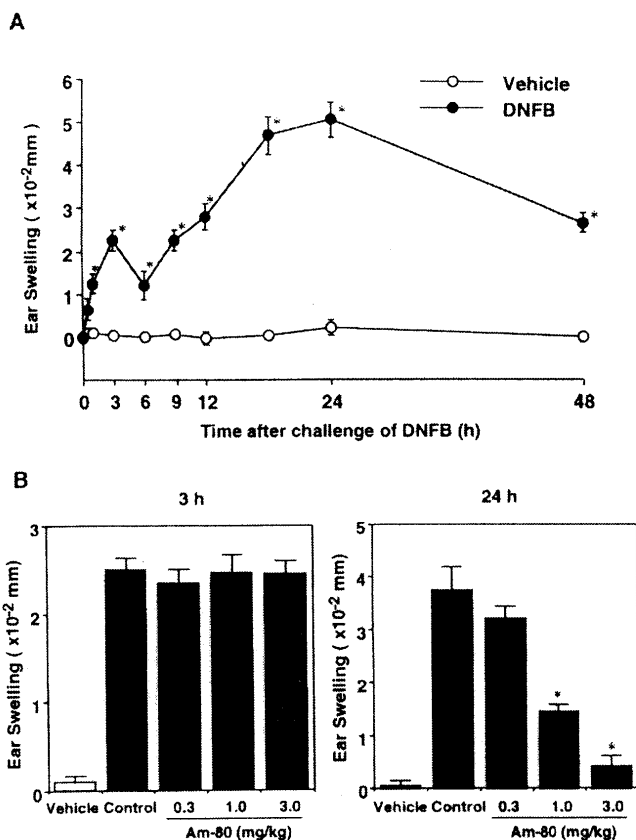


Fig.1 Time course study for DNFB-induced contact dermatitis (A) and the effect of Am-80 (B) on the dermatitis model in mice. Am-80 was orally dosed just before painting DNFB to ears of mice. Each value was represented as mean \pm SE of 8 to 9 animals. *: $P < 0.05$ was considered as the statistical significance from vehicle group (A) and control group (B).

響を及ぼさないことから、肥満細胞に対する直接的な作用はないものと考えられた。

一方、遅発相では、サイトカイン、特に炎症性サイトカインの一つである IFN- γ が、複雑なネットワークを介して重要な役割を演じている。Carroll ら²⁷⁾は、IFN- γ -transgenic マウスが、wild-type マウスに比して、重篤な DNFB 誘発接触性皮膚炎を誘発することを報告している。さらに、Saulnier ら²⁸⁾は、接触性皮膚炎において単核細胞の浸潤および微小膿瘍が、IFN- γ -knock out マウスにおいて明らかに抑制されることを報告している。今回の実験では、Am-80 は、DNFB 誘発接触性皮膚炎マウスの耳介における IFN- γ および IL-6 mRNA の発現を、用量依存的に抑制した (Fig. 2)。

IFN- γ プロモーターの負の制御により IFN- γ 遺伝子の転写をレチノイン酸が阻害するとの Cipitelli ら²⁹⁾の報告ならびに、レチノイン酸がヒト培養繊維芽細胞による IL-1 誘発 IL-6 産生を抑制するとの Zitnik ら³⁰⁾の報告からも、今回の実験結果は裏付けられる。TNF- α も IFN- γ と同様に接触性皮膚炎の発症に重要な役割を演じる炎症性サイトカインの一つである。今回の実験では、Am-80 は、マウス耳介における TNF- α mRNA の

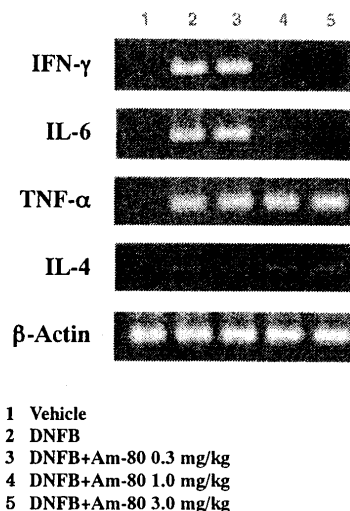


Fig.2 Effect of Am-80 on the expressions of mRNAs for IFN- γ , IL-6, TNF- α and IL-4 in the ears of mice. Ears of mice were isolated 4 h after application of DNFB. Am-80 was administered just before painting DNFB to ears of mice.

発現に影響をおよぼさなかった。これらの結果から、接触性皮膚炎の発症に複雑に関与するサイトカインネットワークにおいて、TNF- α は、IFN- γ および IL-6 よりも上流において作用する可能性が示唆された。

病理組織学的解析において Am-80 は、明らかに好中球、リンパ球および単球などの炎症細胞の皮膚組織への浸潤を抑制した (Fig.3)。IFN- γ は、Intercellular-adhesion molecule-1 (ICAM-1) および Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) などの接着因子の発現を増加させる作用があること³¹⁾から、Am-80 のこの作用は、マウス耳介の IFN- γ mRNA の発現抑制に伴う間接的な作用と考えられた。

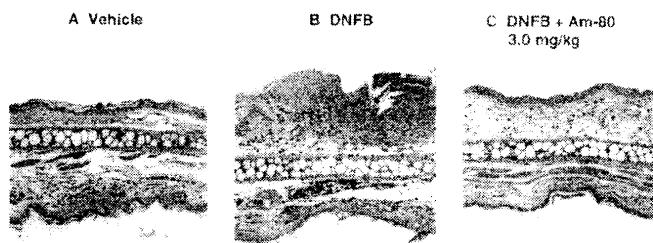


Fig.3 Histopathological feature of the effect of Am-80 on contact dermatitis in mice. At 24 hr after applying DNFB, ears of mice were isolated, fixed and stained with hematoxylin and eosin. Magnification is 200. Am-80 was administered just before painting DNFB to ears of mice.

Am-80 による マウス耳介の IFN- γ 遺伝子の発現抑制が、直接的あるいは間接的抑制によるものなのかを明らかにする目的で、*in vitro* 培養単核細胞による抗原特異的サイトカイン産生に及ぼす Am-80 の作用について検討した。

Am-80 は、濃度依存的に IFN- γ および IL-6 の産生を抑制し (Fig. 4)、その抑制作用は転写レベルによるも

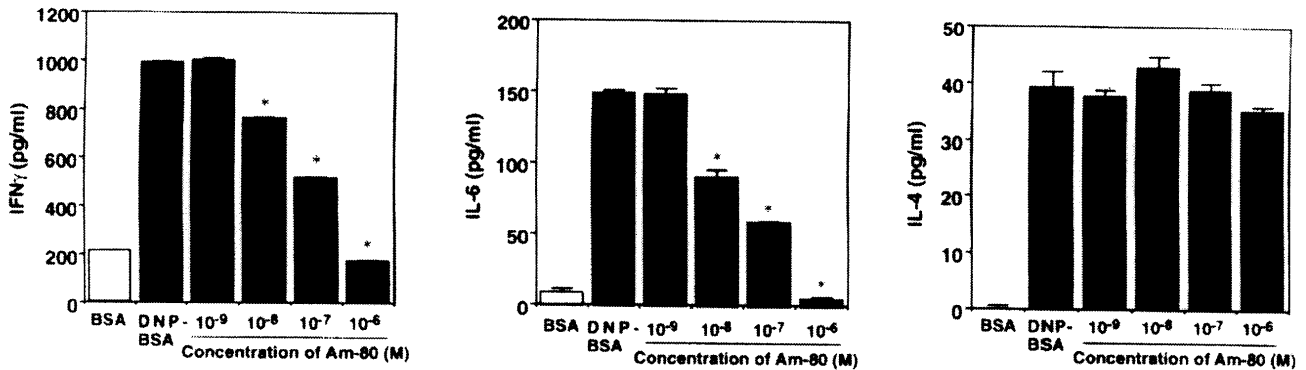
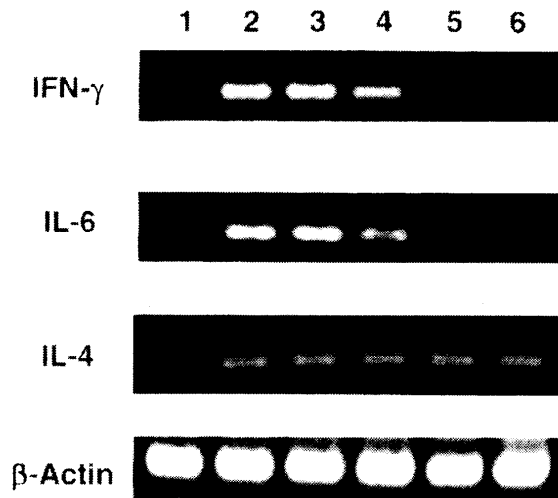


Fig.4 Effect of Am-80 on the production of cytokines including IFN- γ , IL-6 and IL-4 in mononuclear cells by the hapten-specific stimulation in vitro. Mononuclear cells were cultured for 24 h with DNP-BSA or BSA in the presence or absence of various concentrations of Am-80 dissolved in DMSO.

* : $P < 0.05$ was considered as the statistical significance from control (DNP-BSA) group.

のであった (Fig. 5)。これらの結果から、マウス耳介の IFN- γ および IL-6 mRNA の発現抑制を含めた Am-80 のサイトカイン抑制作用は、耳介局所への細胞浸潤抑制作用に伴う間接的な効果ではなく、転写レベルでの直接



- 1 BSA
- 2 DNP-BSA
- 3 DNP-BSA + Am-80 10^{-9} M
- 4 DNP-BSA + Am-80 10^{-8} M
- 5 DNP-BSA + Am-80 10^{-7} M
- 6 DNP-BSA + Am-80 10^{-6} M

Fig.5 Effect of Am-80 on the expressions of mRNAs for IFN- γ , IL-6 and IL-4 on cultured mononuclear cells. Mononuclear cells were cultured for 4 h with DNP-BSA or BSA in the presence or absence of various concentrations of Am-80 dissolved in DMSO.

的な抑制作用によるものと考えられた。

以上の実験成績から、Am-80 は、マウスの DNFB 誘

発接触性皮膚炎を抑制し、その作用機序として、IFN- γ および IL-6 などの炎症性サイトカイン産生の抑制作用が考えられた。

2. 抗原反復塗布によるマウス接触性過敏症に及ぼす Am-80 の作用について：近年 Nagai らは、ハプテン抗原である DNFB をマウスの耳介に反復塗布することによりヒトのアトピー性皮膚炎に観られる高 IgE 血症を伴ったマウスモデルを確立した³²⁾。このマウスモデルでは、ハプテン塗布の回数を重ねるにつれ、マウス耳介の肥厚度は増大し、一般的な接触性皮膚炎モデルで観られるリンパ球、単球および好中球に加えて好酸球の耳介への浸潤が観察される。さらに、血中 total IgE およびハプテン特異的 IgE 上昇が観察される。前章では、マウスの DNFB 誘発接触性皮膚炎に対する Am-80 の作用について述べた。Am-80 は、即時相および遅発相の二相からなる皮膚反応の遅発相を特異的に抑制し、その作用機序として IFN- γ および IL-6 などの炎症性サイトカインの産生抑制作用が考えられた。そこで本項では、マウスの DNFB 反復塗布による接触性皮膚炎に対する Am-80 の作用およびその作用機序について抗原特異的 IgE の産生ならびに炎症性サイトカインの産生に対する作用を中心に検討し、その結果について総括する。

本接触性皮膚炎モデルでは、DNFB を反復塗布することにより、重篤な耳介の腫脹が観察され、溶媒のみを塗布したマウスに比して、DNFB を塗布したマウスの耳介の腫脹は、ハプテンの塗布回数に比例して増加し、ハプテン塗布 1 時間後より耳介の腫脹が増加し始め、24 時間後に最大値を示した (Fig.6 A)。これに対し Am-80 は、用量依存的に有意に 5 回塗布 1 時間および 24 時間後の耳介の腫脹を抑制した (Fig.6 B)。また本モデルでは、耳介の腫脹の増加と共に、血中の抗 DNP-IgE 抗体

価の上昇が観察されたが、Am-80 は、血中の抗 DNP-IgE 抗体価の上昇ならびに頸部リンパ節の productive Cε mRNA の発現に対しては影響を及ぼさなかった (Fig.7)。

生抑制など多くの生理活性を示すことが知られている。本研究において、Am-80 は、頸部リンパ節の IFN-γ mRNA の発現を抑制した (Fig.8) 。一方、IL-1 および

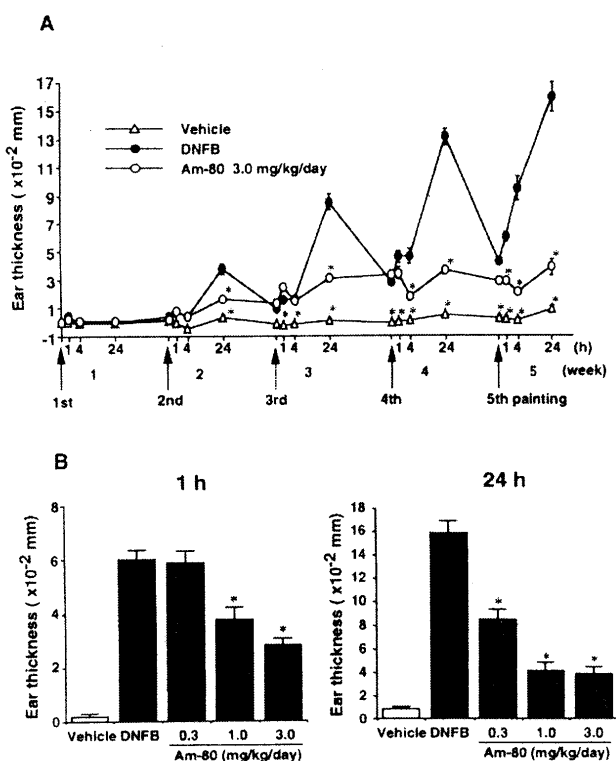
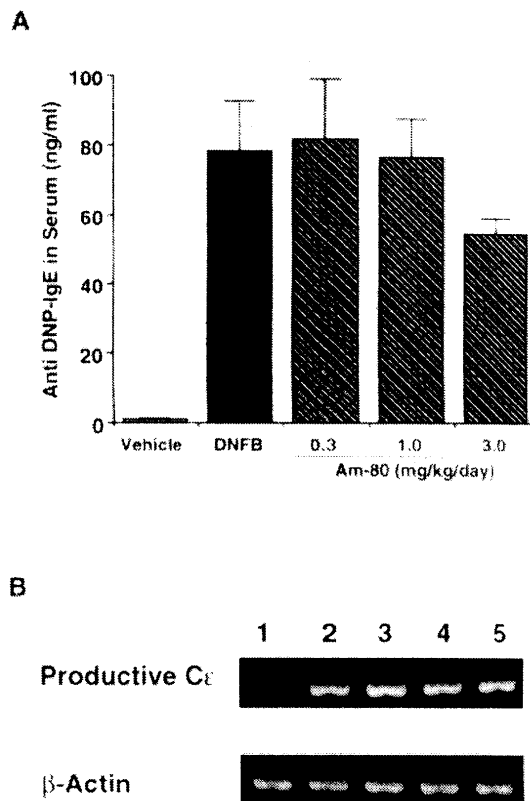


Fig.6 Time course study for DNFB-induced contact dermatitis (A) and the effect of Am-80 (B) on the contact dermatitis elicited by repeated applications of DNFB in mice. *: P < 0.05 was considered as the statistical significance from control (DNFB) group.

IgE は、肥満細胞上の Fc レセプターに結合し、抗原により架橋され、肥満細胞を活性化する。活性化された肥満細胞は、脱顆粒反応を引き起こし、ヒスタミン、セロトニンおよびロイコトリエンなどのケミカルメディエーターを遊離することにより血管透過性を亢進し、炎症反応の誘発期に深く関与している。今回の実験において Am-80 は、血中の抗 DNP-IgE 抗体産生を抑制しなかったにもかかわらず、DNFB 塗布 1 時間後の耳介の腫脹を抑制した。この結果から Am-80 は、IgE 産生以後の肥満細胞の活性化、あるいは脱顆粒反応を抑制する可能性が示唆された。さらに Geba らが、接触性皮膚炎の即時相において、血小板に多く含まれるセロトニンの関与について報告していること³³⁾を考慮合わせると、肥満細胞以外の細胞の関与も考えられることから、Am-80 の IgE 産生以外の作用機序について更なる詳細な検討が必要であると思われる。

前章の接触性皮膚炎において、Am-80 が、IFN-γ の産生を転写レベルで抑制することを示した。IFN-γ は、主に Th1 細胞により産生され、接着分子発現の亢進、皮膚の角化細胞増殖および Th2-type サイトカインの産

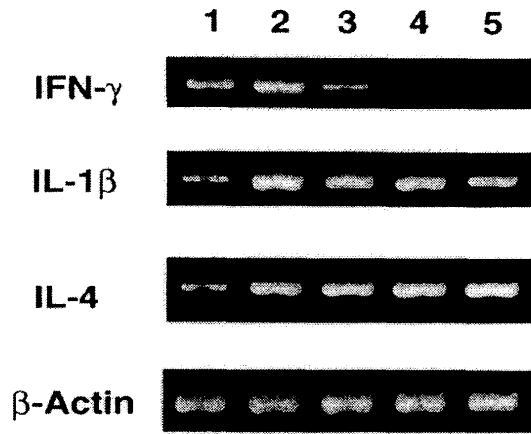


1 Vehicle
2 DNFB
3 DNFB + Am-80 0.3 mg/kg/day
4 DNFB + Am-80 1.0 mg/kg/day
5 DNFB + Am-80 3.0 mg/kg/day

Fig.7 Effect of Am-80 on the serum levels of anti-DNP-IgE (left) and the expressional level of productive Cε mRNA (right) in a cervical lymph node.

IL-4 mRNA の発現には影響を及ぼさなかったことから、前章と同様に Am-80 は、炎症性サイトカイン、特に IFN-γ の産生を抑制することにより、DNFB 反復塗布による接触性皮膚炎反応を抑制するものと考えられた。さらに、病理組織学的解析において、Am-80 投与群では、炎症細胞浸潤の顕著な抑制が観られた (データ示さず)。この抑制作用も、同様に IFN-γ 産生抑制を介する ICAM-1 および VCAM-1 などの接着分子の発現抑制によるものと考えられる。

以上の成績から、Am-80 がマウスの DNFB 反復塗布による接触性皮膚炎を強く抑制し、その作用機序の一つとして転写レベルでの IFN-γ 産生の抑制が関与するものと思われた。

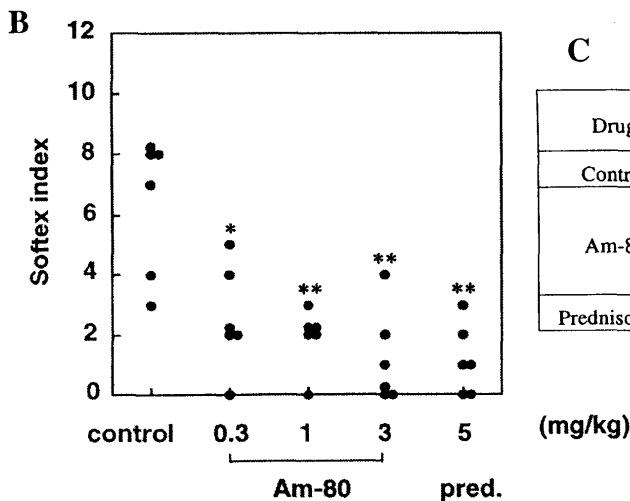
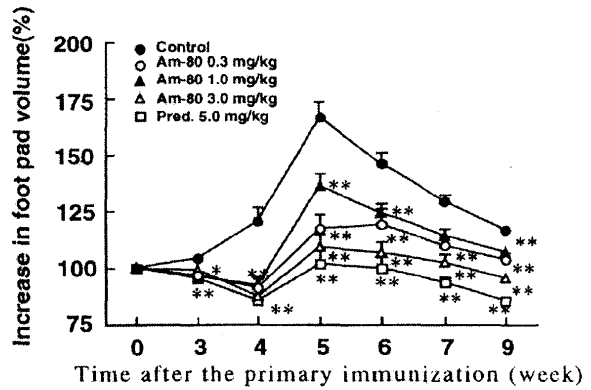
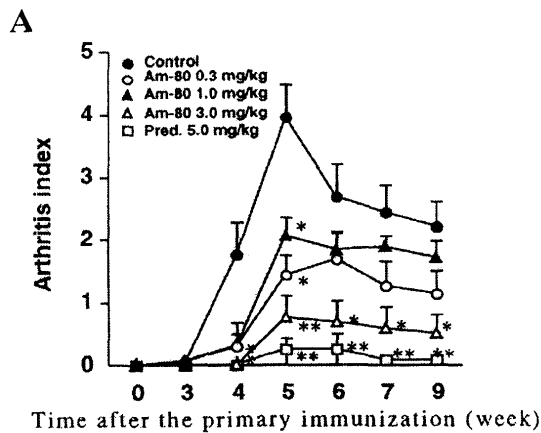


- 1 Vehicle
- 2 DNFB
- 3 DNFB + Am-80 0.3 mg/kg/day
- 4 DNFB + Am-80 1.0 mg/kg/day
- 5 DNFB + Am-80 3.0 mg/kg/day

Fig.8 Effect of Am-80 on the expressions of mRNA for IFN- γ , IL-1 and IL-4 in cervical lymph nodes of mice. Lymph nodes were isolated 4 h after fifth application of DNFB.

3. マウスの実験的関節炎に及ぼす Am-80 の作用について：関節炎リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) は、重篤な関節破壊を伴う代表的な自己免疫疾患である。関節局所では、単球、好中球およびリンパ球などの炎症性細胞浸潤、滑膜細胞増殖、パンヌス形成など重篤な炎症像が観られ、さらに疾患が進行すると、滑膜および軟骨の侵食ならびに骨破壊を引き起こす³⁴⁾。RA の発症およびその進行には、複雑なネットワークを介して TNF- α 、IL-6、IL-1 および IFN- γ などの多くの炎症性サイトカインが関与しているとの報告がある³⁵⁾。これらのサイトカインは、滑膜細胞の増殖およびプロスタグランジン E₂ などのケミカルメディエーターの遊離、マトロプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼなどの誘導および破骨細胞の活性化など、関節炎において種々の病理学的活性を示す^{36) ,37)}。

第1項および第2項では、Am-80 が、炎症性サイトカイン、特に IFN- γ および IL-6 の産生を転写レベルで抑制することにより、接触性皮膚炎の遅発相および DNFB 反復塗布による接触性皮膚炎を抑制することを示した。本項では、接触性皮膚炎と同様にその発症にサイトカインネットワークの関与が示唆されるマウスの



C

Drug	Dose (mg/kg)	N	Synovial Proliferation	Formation of pannus
Control		6	2.3 ± 0.459	1.83 ± 0.527
Am-80	0.3	6	0.50 ± 0.341**	0.50 ± 0.500*
	1.0	6	1.75 ± 0.442	1.33 ± 0.440
	3.0	6	0.83 ± 0.494*	0.17 ± 0.166**
Prednisolone	5.0	6	1.00 ± 0.645*	1.00 ± 0.645

Fig.9 Effects of Am-80 and prednisolone (Pred) on CIA in DBA/1J mice as measured by arthritis index (left, A) and foot pad volume (right, A), softex index (B), and histologic index (C). Significant difference from the control response at: * P<0.05, ** P<0.01

type II コラーゲン誘発関節炎に対する Am-80 の作用について検討した。

関節炎に対する作用の評価に足蹠の腫脹 (Footpad Volume)、臨床スコア (Arthritis Index)、骨破壊の程度 (Softex Index)、血中抗 CII IgG 抗体価および CII に対する delayed type hypersensitivity (DTH) 反応を用いた。Am-80 は、明らかに関節炎誘発マウスにおいて血中抗 CII IgG 抗体価および CII に対する DTH 反応を除くすべての関節炎の臨床症状を抑制した (Fig.9, Table.1)。2 章の DNFB 反復塗布による接触性皮膚炎に

Table1 Effects of Am-80 and prednisolone (Pred) on collagen-induced DTH and anti-type II collagen antibody in DBA/1J mice.

Drug	Dose (mg/kg)	N	Swelling X μm	Anti-type II collagen antibody, U/ml
Control		6	21.417 ± 2.052	5.150 ± 1.65
Am-80	0.3	6	22.100 ± 2.255	3.282 ± 1.126
	1.0	6	20.833 ± 1.438	2.276 ± 0.356
	3.0	6	21.083 ± 1.026	2.147 ± 0.470
Prednisolone	5.0	6	13.667 ± 1.309*	1.597 ± 0.550*

Significant difference from the control at: * P<0.05

においても同様に、Am-80 が抗原特異的 IgE 産生に対し、影響を及ぼさなかった結果を考え合わせると、Am-80 は、液性免疫ではなく、細胞性免疫を特異的に阻害することにより、CII 誘発関節炎の発症を抑制するものと考えられた。さらに Am-80 は、CII に対する DTH 反応に

対しても影響を及ぼさないことから、CII に対するトレランスを誘導するのではなく、細胞性免疫の誘導時に何らかの阻害作用を示していることが推測される。

そこで、Am-80 のマウス CII 誘発関節炎におけるその抑制作用に対する作用機序を明らかにする目的で、C. Parvum 前処置マウスにおける LPS 刺激 IL-1β, TNF-α および IL-6 産生に対する Am-80 の作用について検討した (Fig.10)。

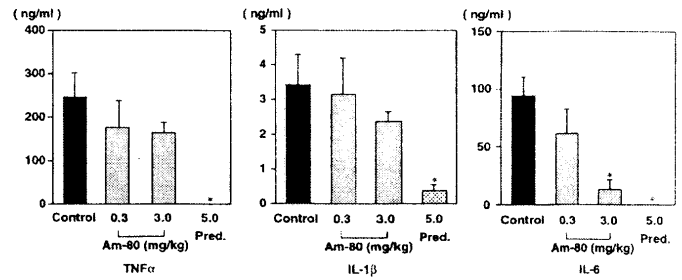


Fig.10 Effects of Am-80 and prednisolone (Pred) on *C. parvum*-LPS-induced TNF-α, IL-1β and IL-6 production. Each value represents mean ± SE of 8 mice. Significant difference from the control at: * P<0.01

ヒトのリウマチ関節炎などの自己免疫疾患において、サイトカインが疾患の発症および進行に重要な役割を演じているとの文献がある。炎症反応を惹起する IL-1β, TNF-α, IL-6 および PGE₂ などの炎症性メディエータ

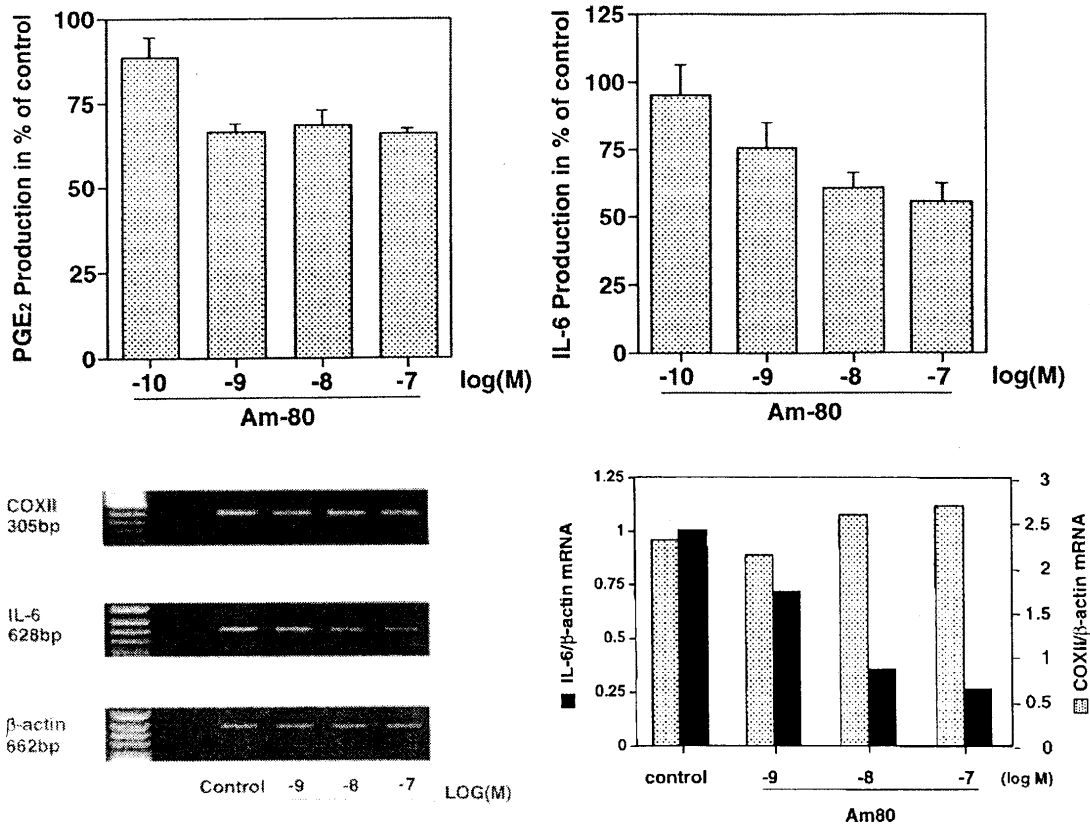


Fig.11 Effects of Am-80 on the production of IL-6 and PGE₂ (upper), and on the expression of COX II and IL-6 mRNA (lower) in MG-63 cells stimulated with 0.5 ng/ml human IL-1β. Significant difference from the control group responses at: * P<0.05

一は、活性化された滑膜細胞、マクロファージ、好中球などから遊離される。

遊離された炎症性メディエーターは、滑膜細胞増殖の亢進および活性化破骨細胞からのメタロプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼなどのプロテアーゼの遊離などを介して、滑膜の侵食および骨破壊を引き起こす。*in vivo*でのLPSによるサイトカイン産生の実験成績に示すように、Am-80は、用量依存的にIL-6産生を抑制したが、TNF- α およびIL-1 β の産生にはまったく影響をおよぼさなかった。さらに、Am-80は、IL-1 β 刺激によるMG-63細胞からのIL-6産生も濃度依存的に強く抑制した。このAm-80によるIL-6産生抑制作用は、RT-PCR法によるIL-6 mRNAの発現解析から転写レベルでの抑制であった (Fig. 11)。

Am-80がマウスの骨芽細胞系、MC3T3-E1細胞からのIL-1 β によるIL-6産生抑制作用を示すことを首藤らは報告している¹⁸⁾。彼らの成績と今回の成績を考慮するとAm-80は、IL-6の産生を特異的に抑制することにより、マウスのCII誘発関節炎を抑制することが考えられた。また1章で述べたように、Am-80はIFN- γ の産生を抑制することから皮膚炎ではIFN- γ の抑制も考えられるが、関節炎においてはIL-6産生の抑制が主体であると思われる。すなわち、IL-6は、B細胞、T細胞、単球および繊維芽細胞などから産生される多機能サイトカインである。IL-6は、免疫系のみならず造血系および神経系においても広く生理活性を示し、特に、活動期のリウマチ関節炎患者の滑液中に多く産生されることが報告されている³⁹⁾。臨床では、一過性ではあるがIL-6に対する中和抗体が、リウマチ関節炎患者の臨床症状を改善するとの報告⁴⁰⁾がある。さらに、動物モデルにおいては、マウスのCII誘発関節炎の発症が、IL-6欠損マウスにおいて完全に抑制されることが報告されている⁴¹⁾。したがって、Am-80が、IL-6産生を特異的に抑制することは、マウスのCII誘発関節炎の臨床症状を抑制する作用に深く関わっている可能性が示唆される。

以上の実験成績から、Am-80が、DBA/1JマウスにおけるCII誘発関節炎を用量依存的に抑制し、その作用機序の一つとして転写レベルでのIL-6産生抑制が関与するものと思われた。

4. ラットの実験的アレルギー性脳脊髄炎に及ぼすAm-80の作用について：実験的アレルギー性脳脊髄炎 (experimental allergic encephalomyelitis, EAE) は、主に major histocompatibility complex (MHC) class II-拘束性CD4⁺T細胞により誘発される自己免疫疾患の一つである⁴²⁾。急性および慢性のEAEモデルは、アジュバントとともに myelin basic protein (MBP), proteolipid protein

(PLP) あるいは encephalitogenic peptide (EP) などのミエリンたんぱく質を用いて能動免疫するか⁴³⁾、あるいはMBP-特異的MHC class II-拘束性CD4⁺T細胞を用いて受動免疫することにより⁴⁴⁾、惹起することができる。EAEの臨床経過は、活動期と制時期を繰り返し、中枢神経系における炎症細胞浸潤および脱髄などの病態を特徴とする。したがって、EAEは、CD4⁺T細胞により誘発される自己免疫疾患、特にヒトの多発性硬化症の発症機序ならびに治療法の確立に非常に有用な動物モデルの一つである⁴⁵⁾。

これまでにEAEモデルを用いてステロイド、cyclosporin Aなどの免疫抑制剤およびレチノイドの有効性を検討した多くの報告がある⁴⁶⁾、⁴⁷⁾。中でもレチノイドに関しては、Massacesiら⁴⁶⁾が、13-cis-レチノイン酸が抗原特異的T細胞免疫を抑制することにより能動免疫あるいは受動免疫によるEAEを抑制することを報告している。さらに、Rackeら⁴⁷⁾は、all-trans-レチノイン酸が、T細胞のTh2細胞への分化を促進することによりMBP-特異的T細胞の受動免疫による慢性EAEを抑制することを報告している。

前項までに、Am-80が、炎症性サイトカイン、特にIFN- γ およびIL-6の産性を転写レベルで制御することにより、接触性皮膚炎ならびに自己免疫疾患モデルの一つであるマウスのCIAを抑制することを述べた。本項では、これらの結果をもとに、最近IL-6の関与が注目

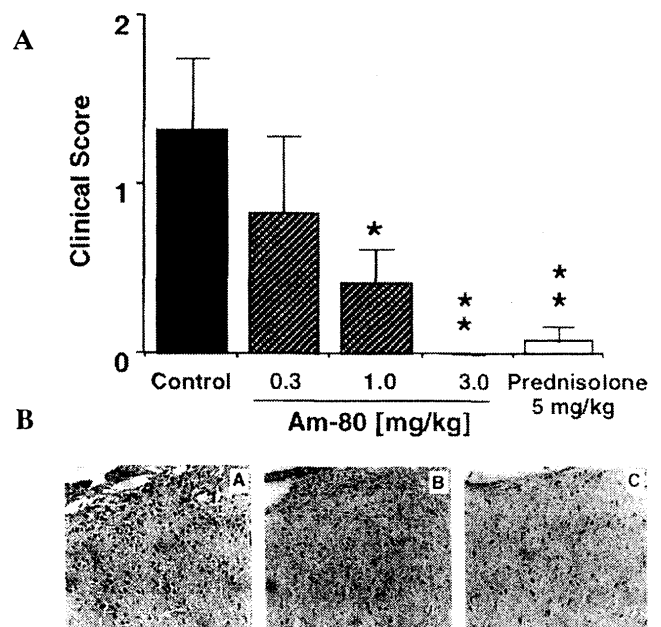


Fig.12 The effect of Am-80 on EAE in DA rats in terms of clinical symptom and histopathological analysis. The clinical symptom (Fig.12a) and histopathological feature of the rat spinal cords (Fig.12b) at day 12 after immunization were examined. In the histopathological study, the spinal cords of rats treated with vehicle (A), Am-80 at 3.0 mg/kg/day (B) and prednisolone at 5.0 mg/kg/day (C) were stained with hematoxylin and eosin. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

されているラットの実験的アレルギー性脳脊髄炎に及ぼす Am-80 の作用およびその作用機序を検討し、その結果について総括する。

実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) は、MHC class II 拘束性 CD4⁺ T 細胞により誘発される自己免疫疾患の代表的なものであり、その臨床症状は、中枢神経系における炎症および脱髄を伴うヒトの多発性硬化症に類似している。本モデルにおいて、新規合成レチノイド、Am-80 は、用量依存的に DA ラットにおける MBP 誘発 EAE を抑制した (Fig.12)。しかし、Am-80 の投与を中止すると、EAE は再発した。一方、prednisolone (Pred) 投与ラットでは、投与中止後の EAE の再発は観察されなかった (Fig.13)。

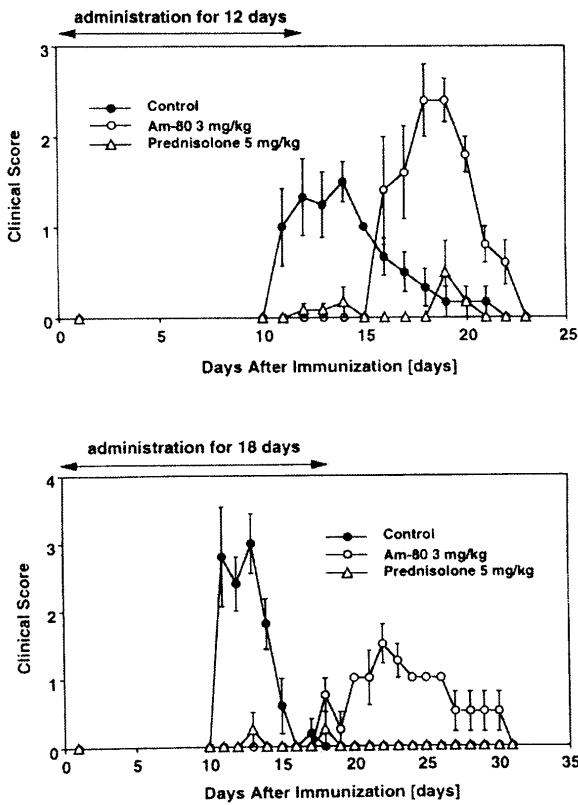


Fig.13 The recurrence of EAE in Am-80 treated rats. Am-80 at 3.0 mg/kg/day and prednisolone at 5.0 mg/kg/day were orally dosed for 12 days (upper) and 18 days (lower) after immunization.

さらに、Am-80 および Pred は共に MBP に対する DTH 反応を抑制することから、MBP に対する T 細胞トランスの関与は低いものと考えられた (Fig.14)。

前項では、Am-80 が、マウスの type II コラーゲン誘発関節炎を炎症性サイトカイン、特に IL-6 の産生を転写レベルで阻害することにより抑制することを示した。IL-6 は、T 細胞、B 細胞、単球および繊維芽細胞などの細胞から産生される炎症性サイトカインの一つである。さらに、IL-6 は、B 細胞、神経細胞および細胞傷害性 T 細胞の分化、B 細胞の抗体産生、T 細胞増殖お

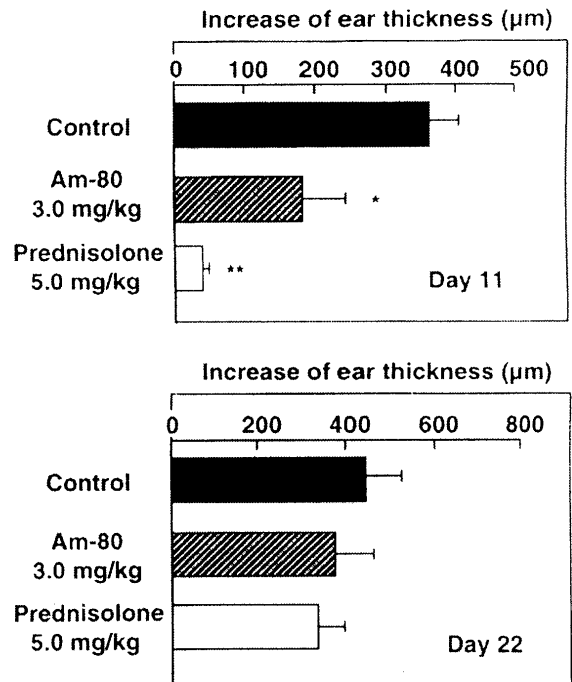


Fig.14 Effects of Am-80 and prednisolone on DTH response against MBP. DTH response against MBP was provoked at day 11 (upper) and day 22 (lower) by the intradermal injection of MBP or vehicle into the left or the right ear, respectively. Each of Am-80 and prednisolone was administered orally for 12 days after immunization of MBP. *: P<0.05, **: P<0.01

よび急性期タンパクの遊離など、多岐にわたる生理活性を有する。

EAE と IL-6 の関係については、ヒトの多発性硬化症患者において IL-6 の血中レベルが高いとの報告^{48), 49)}や IL-6 に対する中和抗体が EAE の臨床症状を改善するとの報告⁵⁰⁾、さらに IL-6 欠損マウスに EAE が誘発されないなどの報告がある⁵¹⁾。これらの報告から、IL-6 が、EAE の発症および進行に重要な役割を演じることが考えられる。本研究では、MBP 免疫ラットの脊髄に IL-6 mRNA が強く発現し、その発現が Am-80 の投与により減少することを示した (Fig. 15)。しかし、Am-80 投与を中止すると EAE の臨床症状の発現とほぼ平行して、IL-6 mRNA 発現の上昇がみられた。すなわち、EAE の臨床症状の抑制は、IL-6 産生の抑制にリンクしているものと思われた。

さらに、Am-80 投与ラットの脊髄では、他の炎症性サイトカインである TNF- α および IFN- γ mRNA の発現が、IL-6 mRNA の発現レベルと同様に減少していたが、Am-80 投与中止後、IL-6 mRNA が、早期にかつ強力に発現した (Fig. 16)。

したがって、これらの結果から、IL-6 が EAE 発症の始動的な因子としての役割を演じ、病状の進行に深く関与している可能性が示唆された

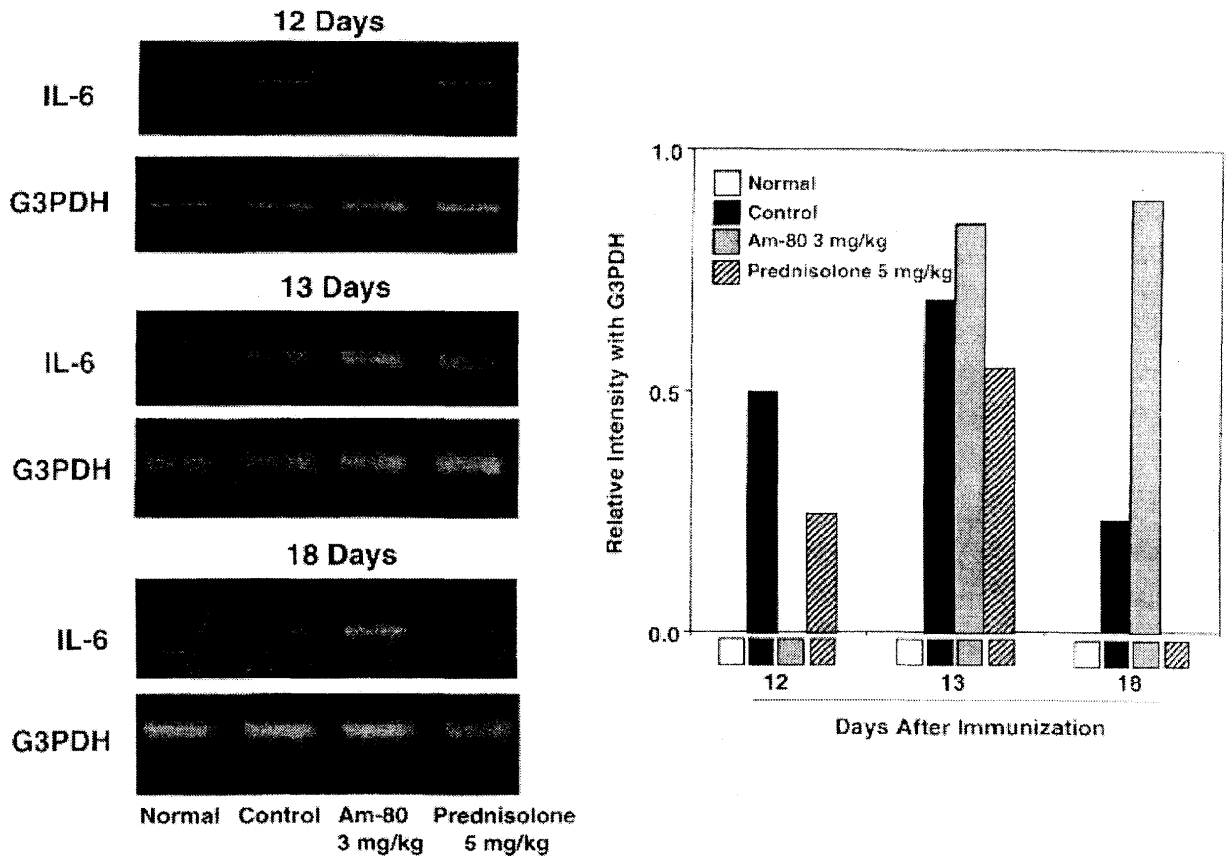


Fig.15 The expressional level of IL-6 mRNA in rats spinal cords. The PCR products were resolved using electrophoresis and visualized with ethidium bromide to reveal the amplified cDNA (left) and its expressional level was normalized using G3PDH mRNA and were semi-quantified using densitometrically scanning (right).

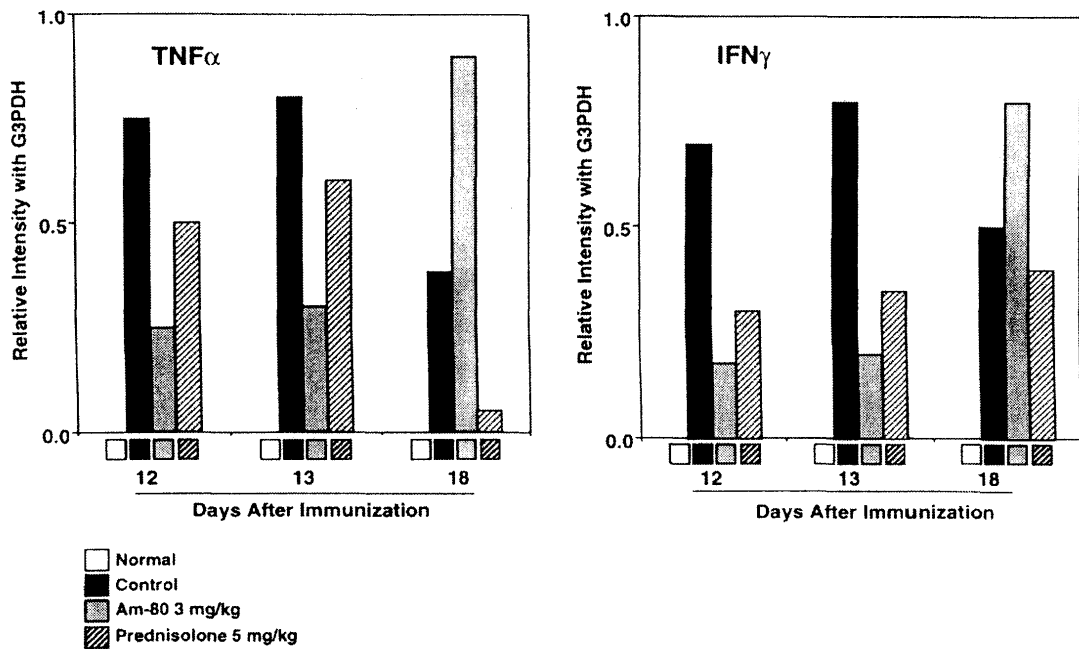


Fig.16 The expressional level of IFN-γ and TNF-α mRNA in rats spinal cords. The PCR products were resolved using electrophoresis and visualized with ethidium bromide to reveal the amplified cDNA (left) and its expressional level was normalized using G3PDH mRNA and were semi-quantified using densitometrically scanning (right).

総括

以上、Am-80 は、リンパ球以外の細胞からの IL-6 および IFN- γ の産生を転写レベルにおいて、選択的に抑制することにより、マウスおよびラットの接触性皮膚炎ならびに type II コラーゲン誘発関節炎および実験的アレルギー性脳脊髄炎などの自己免疫疾患発症を抑制することが示唆された。これらの知見は、免疫性疾患における炎症性サイトカインの重要性ならびにレチノイド誘導体の治療薬としての有用性を示唆するものである。

引用文献

- 1) H. Kagechika, *Yakugaku Zasshi*, **114**, 847 (1994)
- 2) M. Petkovich, N.J. Brand, A. Krust and P. Chambon, *Nature*, **330**, 444 (1987)
- 3) D.J. Mangelsdorf, E.S. Ong, J.A. Dyck and R.M. Evans, *Nature*, **345**, 224 (1990)
- 4) M.B. Sporn and A.B. Roberts, *Cancer Res.*, **43**, 3034 (1983)
- 5) D.S. Goodman, *N. Engl. J. Med.*, **310**, 1023 (1984)
- 6) T. Oikawa, I. Okayasu, H. Ashino, I. Morita, S. Murota and K. Shudo, *Eur. J. Pharmacol.*, **249**, 113 (1993)
- 7) G. Salbert, A. Fanjul, F.J. Piedrafita, X.P. Lu, S.J. Kim, P. Tran and M. Pfahl, *Mol. Endocrinol.*, **7**, 1347 (1993)
- 8) D.J. Mangelsdorf, S.A. Kliewer, A. Kakizuka, K. Umesono and R.M. Evans, *Recent. Prog. Horm. Res.*, **48**, 99 (1993)
- 9) A. Garbe, J. Buck and U. Hammerling, *J. Exp. Med.*, **176**, 109 (1992)
- 10) G. Dennert and R. Lotan, *Eur. J. Immunol.*, **8**, 23 (1978)
- 11) H.K. Blomhoff, E.B. Smeland, B. Erikstein, A.M. Rasmussen, B. Skrede, C. Skjfnberg and R. Blomfohh, *J. Biol. Chem.*, **267**, 23988 (1992)
- 12) C.E. Brinckerhoff, R.M. McMillan, J.M. Dayer and E.D. Harris, *N. Engl. J. Med.*, **303**, 432 (1980)
- 13) Y. Zhou, S. Mohan, T.A. Linkhart, D.J. Baylink and D.D. Strong, *Endocrinology*, **137**, 975 (1996)
- 14) A.K. Silverman, C.N. Ellis and J.J. Voorhees, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **16**, 1027 (1987)
- 15) K. Kitamura, H. Kiyoi, H. Yoshida, T. Tobita, A. Takeshita, R. Ohno R and T Naoe, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **40**, S36 (1997)
- 16) T. Tobita, A. Takeshita, K. Kitamura, K. Ohnishi, M. Yanagi, A. Hiraoka, T. Karasuno, M. Takeuchi, S. Miyawaki, R. Ueda, T. Naoe and R. Ohno, *Blood*, **90**, 967 (1997)
- 17) Y. Hashimoto, H. Kagechika, E. Kawachi and K. Shudo, *Jpn. J. Cancer. Res.*, **79**, 473 (1988)
- 18) H. Kagechika, E. Kawachi, H. Fukasawa, G. Saito, N. Iwanami, H. Umemiya, Y. Hashimoto and K. Shudo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **231**, 243 (1997)
- 19) Kuwabara K, Shudo K and Hori Y, *FEBS Lett.*, **378**: 153 (1996)
- 20) T. Hopkins and R.A.F. Clark, In: Callen JP (ed.) *Current Practice of Medicine, Dermatology. Current Medicine*, Philadelphia, PA, 1, 68 (1995)
- 21) H. Van Loveren, K. Kato, R. Meade, D.R. Green, M. Horowitz, W. Ptak and P.W. Askenase, *J. immunol.*, **133**, 2402 (1984)
- 22) H. Van Loveren, S. Kraeuter-Kops and P.W. Askenase, *Eur. J. Immunol.*, **14**, 40 (1984)
- 23) D.N. Sander, *J. Invest. Dermatol.*, **95**, 27s (1991)
- 24) J.C. Hope, R.J. Dearman, R.J. Debicki, I. Kimber and S.J. Hopkins, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **103**, 378 (1994)
- 25) H. Asada, J. Linton and S.I. Katz, *J. Invest. Dermatol.*, **108**, 406 (1997)
- 26) M. Abe, T. Kondo, H. Xu and R.L. Fairchild, *J. Invest. Dermatol.*, **107**, 360 (1996)
- 27) J.M. Carroll, T. Crompton, J.P. Seery and F.M. Watt, *J. Invest. Dermatol.*, **108**, 412 (1997)
- 28) M. Saulnier, S. Huang, M. Aguet and B. Ryffel, *Toxicology*, **102**, 301 (1995)
- 29) M. Cippitelli, J. Ye, V. Viggiano, A. Sica, P. Ghosh, A. Gulino, A. Santoni and H.A. Young, *J. Biol. Chem.*, **271**, 26783 (1996)
- 30) R.J. Zitnik, R.M. Kotloff, J. Latifpour, T. Zheng, N.L. Whiting, J. Schwalb and J.A. Elias, *J. Immunol.*, **152**, 1419 (1994)
- 31) H. Li, M.I. Cybulsky, M.A. Jr Gimbrone and P. Libby, *Arterioscler. Thromb.*, **13**, 197 (1993)
- 32) H. Nagai, A. Matsuo, H. Hiyama, N. Inagaki and K. Kawada, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **100**, S39 (1997)
- 33) G.P. Geba, W. Ptak, G.M. Anderson, V. Paliwal, R.E. Ratzlaff, J. Levin and P.W. Askenase, *J. Immunol.*, **157**, 557 (1996)
- 34) G.K. Kumkumian, R. Lafyatis, E.F. Remmers, J.P. Case, S.J. Kim and R.L. Wilder, *J. Immunol.*, **143**, 833 (1989)
- 35) D.M. Mitchell and J.F., *Arthritis Rheum.*, **25**, 481 (1982)
- 36) M. Feldmann, F.M. Brennan and R.N. Maini, *Cell*, **85**, 307 (1996)
- 37) R.B. Gerd, B. Stuhlmuller, G. Keyszer and W. Kinne, *Arthritis Rheum.*, **40**, 5 (1997)

- 38) F.A. Houssiau, J.P. Devogelaer, J. Van Damme, C.N. de Deuxchaisnes and J. Van Snick, *Arthritis Rheum.*, **31**, 784, (1988)
- 39) D. Wendling, E. Racadot and J. Wijdenes, *J. Rheumatol.*, **20**, 259 (1993)
- 40) T. Alonzi, E. Fattori, D. Lazzaro, P. Costa, L. Probert, G. Kollias, F. De Benedetti, V. Poli and G. Ciliberto, *J. Exp. Med.*, **187**, 461 (1998)
- 41) S. Levine, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **45**, 247 (1986)
- 42) J. Sedgwick, S. Brostoff and D. Mason, *J. Exp. Med.*, **165**, 1058 (1987)
- 43) C.B. Pettinelli and D.E. McFarlin, *J. Immunol.*, **127**, 1420 (1981)
- 44) E.C. Alvord, M.W. Kies and A.J. Suckling, Alan R. Liss, Inc. New York (1984)
- 45) H. Nagai H, M. Goto, H. Kamada, K. Boda, K. Kitagaki and Y. Takaoka, *Gen. Pharmacol.*, **30**, 161 (1998)
- 46) L. Massacesi, E. Castigli, M. Vergelli, J. Olivotto, A.L. Abbamondi, F. Sarlo and L. Amaducci, *J. Clin. Invest.*, **88**, 1331 (1991)
- 47) M.K. Racke, D. Burnett, S.H. Pak, P.S. Albert, B. Cannella, C.S. Raine, D.E. McFarlin and D.E. Scott, *J. Immunol.*, **154**, 450 (1995)
- 48) N. Nishimoto, K. Yoshizaki, N. Eiraku, K. Machigashira, H. Tagoh, A. Ogata, T. Kuritani, M. Osame and T. Kishimoto, *J. Neurol. Sci.*, **97**, 183 (1990)
- 49) K. Frei, S. Fredrikson, A. Fontana and H. Link, *J. Neuroimmunol.*, **31**, 147 (1991)
- 50) K. Gijbels, S. Brocke, J.S. Abrams and L. Steinman, *Mol. Med.*, **1**, 795 (1995)
- 51) Y. Okuda, S. Sakoda, C.C. Bernard, H. Fujimura, Y. Saeki, T. Kishimoto and T. Yanagihara, *Int. Immunol.*, **10**, 703 (1998)

本総説は岐阜薬科大学博士論文（乙第 247 号）の内容を中心にとまとめたものである。