

博士(医学) 張 昉

## 論文題目

Statin directly suppresses cytokine production in murine intraepithelial lymphocytes

(スタチンはマウスの腸管上皮間リンパ球のサイトカイン産生を直接的に抑制する)

## 論文の内容の要旨

HMG-CoA 還元酵素阻害剤スタチンは、高脂血症治療薬として臨床現場で広く使用されているが、高脂血症のみならず、その抗炎症作用などの新たな作用が注目されている。近年の報告では、関節リウマチなどの自己免疫性疾患や動脈硬化の病態において炎症の抑制作用を介した有用性が報告され、末梢血、血管内皮細胞、マクロファージなどで免疫調節作用も報告されている。消化管疾患においてもマウスを用いた実験腸炎モデルでの研究が報告され、炎症性腸疾患等の免疫系を介した消化器疾患における新たな薬剤としても期待されるが、消化管粘膜免疫におけるスタチンの直接的な作用は検討されていない。小腸上皮間リンパ球 (Intraepithelial lymphocytes: IELs) は、消化管関連リンパ組織 (Gut associated lymphoid tissue: GALT) の最前線に位置する効果装置であり、T 細胞が大部分を占めることや、その機能面において、末梢血や脾細胞のリンパ球と異なる特性を有する独自のリンパ組織である。本研究では、単離した IELs を用いて、スタチンの直接的なサイトカイン制御機構について検討し、腸管粘膜免疫制御機構の一端を明らかにすることを目的とした。

[材料ならびに方法]

週齢 8~10 の C57BL/6 雄性マウスの小腸より、IELs および比較対象として脾細胞を単離した。IELs と脾細胞のサブタイプは、各種表面マーカーを用いて行い比較解析した。サイトカイン (IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-4、IL-5) 産生は、抗 CD3/CD28 抗体による刺激下で 48 時間培養し、培養液上清の濃度を Cytometric bead array kit を用いて測定し評価した。スタチン投与の影響は  $5 \times 10^{-7}$  ~  $5 \times 10^{-5}$  M の濃度の simvastatin および lovastatin を用いて検討した。サイトカイン制御機序における HMG-CoA 還元酵素阻害による mevalonate 経路の関与について、下流基質である mevalonate、farnesyl pyrophosphate (FPP)、geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) をスタチン存在下で投与し検討した。

[結果]

IELs は、抗 CD3/CD28 抗体刺激下で IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-4 を有意に産生し、脾細胞ではこれらに加えて IL-5 も有意に産生した。Simvastatin および lovastatin は、活性化した IELs の産生する IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2 および IL-4 を有意に抑制した。この抑制は、50  $\mu$ M までの濃度において用量依存的に認められた。この濃度までのスタチンは、細胞数で評価したリンパ球の cell viability に変化を及ぼさなかった。脾細胞では、simvastatin および lovastatin 投与により、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-4、IL-5 の有意な抑制を認めた。Simvastatin による IELs の IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2 産生の抑制は、mevalonate 経路の下流基質である mevalonate、FPP、GGPP の投与により、部分的ではある

が有意な回復を示した。

#### [考察]

スタチンはマウスの単離 IELs に直接的に作用して、そのサイトカイン産生を抑制することが明らかとなった。これは比較対象として用いた脾細胞においても、産生サイトカインレベルの違いに起因する差異はあるものの、類似して認められる免疫制御機構と考えられた。過去の *in vivo* の報告からは、スタチンの免疫調節機構として Th1 から Th2 へのシフトの報告がある。本研究の条件設定は、*ex vivo* の実験で単離した IELs に対する単独の直接作用を評価しており、Th1 系サイトカインに加え、IL-4 の抑制効果も認められる結果となった。本研究では、スタチンの作用機序として HMG-CoA 還元酵素阻害による mevalonate 経路抑制の関与の有無を検討した。Mevalonate 経路の下流基質による有意な抑制回復効果が認められたことから、その関与が明らかとなったが、回復効果は完全ではなかった。本研究の限界として、HMG-CoA 還元酵素阻害作用以外の作用経路に関する詳細な検討が含まれないことから、mevalonate 経路以外の機序が部分的に関与している可能性は否定できないと考察された。

#### [結論]

スタチンは、マウスの IELs に直接作用してサイトカイン産生を抑制した。スタチンの直接的な腸管粘膜免疫制御の一端が明らかとなり、今後の消化管疾患における新たな治療薬としての可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

HMG-CoA 還元酵素阻害薬スタチンは脂質低下作用のほか多面的な効果を有し、そのうち免疫調節作用も注目されており、消化管においても炎症性疾患に対し有用性が報告されている。

申請者は、消化管粘膜免疫におけるスタチンの直接的な作用を明らかにするため、単離した小腸上皮間リンパ球 (IELs) 用い、スタチンの IELs に対する直接的なサイトカイン制御機構について検討した。

C57BL/6 マウスの小腸より IELs を単離し脾細胞を比較対象として、抗 CD3/CD28 抗体刺激下に産生サイトカイン (IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、IL-2、IL-4、IL-5) 濃度を Cytometric bead array kit を用いて測定した。スタチンは脂溶性の simvastatin、lovastatin を用い、 $5 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-5} \text{M}$  の濃度で添加しサイトカイン産生に対する影響を測定した。さらにスタチン存在下に、メバロン酸系路の下流基質 mevalonate、farnesyl pyrophosphate (FPP)、geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) を添加し、そのサイトカイン産生に対する影響を検討した。

IELs は大半が CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T 細胞で対象とした脾細胞とは異なるサブセットから成り立っていた。スタチンは IELs による IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、IL-2、IL-4 産生を用量依存的に有意に抑制し、この抑制は mevalonate、FPP、GGPP により一部解除された。本研究は、スタチンが IELs の Th1 系サイトカインに加え、IL-4 産生の抑制効果も有する事を示し、その作用機序としてはメバロン酸経路が一部関与する事を明らかにした。

審査委員会は、本研究がスタチンの直接的な腸管粘膜免疫制御の一端を明らかにし、スタチンの今後の消化管疾患における新たな治療薬としての可能性を示した意義を高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 大西 一功  
副査 戸倉 新樹 副査 加藤 明彦