

主論文

A retinoid X receptor partial agonist attenuates pulmonary emphysema and airway inflammation
(レチノイドX受容体部分作動薬は肺気腫と気道炎症を抑制する)

[緒言]

慢性閉塞性肺疾患(COPD)は肺気腫、または、慢性気管支炎により起こる気流閉塞のため呼吸不全をきたす疾患である。現在の治療方法は症状緩和と急性増悪抑制に限られている。症状の完全寛解や肺機能の維持に効果的な新規治療方法の開発が必要である。

核内受容体スーパーファミリーにはレチノイド X 受容体(RXR)、ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 γ (PPAR γ)、肝臓 X 受容体(LXR)などがある。近年の研究では、核内受容体と COPD 発症との関連が報告されている。PPAR γ 作動薬には喫煙による気道炎症と気腫性変化に対する抑制効果が報告されており、また、LXR 遺伝子発現は喫煙患者で増加し、LXR 作動薬は喫煙による気道炎症の抑制効果が報告されている。一方、RXRはホモダイマーのみならず、PPAR γ 、LXRなど他の核内受容体とヘテロダイマーを形成し、遺伝子発現を調整することが可能である。これらの報告より、RXRは COPD の予防、管理の治療標的となる可能性が考えられるが、RXR 作動薬の COPD に対する治療効果については未だ明らかにされていない。

RXR 完全作動薬である Bexarotene はすでに皮膚 T 細胞性リンパ腫の治療薬として実用化されているが、体重増加、肝腫大、高中性脂肪血症などの副作用が問題となっている。

我々は重度の副作用を抑制するため完全作動薬と比較し受容体活性能を 55%に抑制した新規 RXR 部分作動薬(パーシャルアゴニスト)である NEt-4IB を開発した。

今回の研究において、RXR の肺気腫発症に関する役割と、肺気腫発症と気道炎症に対する新規 RXR 部分作動薬 NEt-4IB の治療効果と副作用とについて、肺気腫モデルマウスを作製し詳細に検討した。

[材料と方法]

動物

8週齢 BALB/c マウス、雌を用いた。

実験① タバコ煙抽出液(Cigarette Smoke Extract: CSE)誘導肺気腫モデルにおける NEt-4IB の肺気腫抑制効果

マウスに 400 μ l の CSE を 0、7、14、21 日目に腹腔内投与して肺気腫を惹起し、対照群には 400 μ l の PBS を投与した。治療群には NEt-4IB を 0 日目から 28 日目まで経口投与した。非治療群には通常飼料を投与し、28 日目に肺組織および肺機能を評価した。

実験② 豚膵由来エラスターゼ(Porcine Pancreas Elastase: PPE)誘導肺気腫モデルにおける NEt-4IB の肺気腫抑制効果

マウスに PPE を 0、7 日目に気道内投与して肺気腫を惹起し、対照群には PBS を投与した。治療群には NEt-4IB を 7 日目の PPE 投与後から 21 日目まで経口投与し、非治療群には通常飼料を投与した。7 日目と 21 日目に肺組織と肺機能を評価した。

実験③ PPE 誘導気道炎症モデルにおける NEt-4IB の気道炎症抑制効果

マウスに PPE を 0 日目に気道内投与して気道炎症を惹起し、対照群には PBS を投与した。PPE 投与 4 日前より治療群には NEt-4IB を、非治療群には通常飼料を経口で投与開始し、4 日目に気管支肺胞洗浄(Bronchoalveolar lavage: BAL)液を評価した。

実験④ PPE 誘導気道炎症モデルにおける NEt-4IB のプロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡、抗酸化活性低下の改善効果

マウスに PPE を 0 日目に気道内投与して気道炎症を惹起し、対照群には PBS を投与した。PPE 投与 4

日前より治療群には NEt-4IB を、非治療群には通常飼料を経口で投与開始した。1 日目に BAL 液と血清中の抗酸化活性を、4 日目に BAL 液中のプロテアーゼ・アンチプロテアーゼ比を評価した。

実験⑤ PPE 誘導気肺気腫モデルにおける NEt-4IB の血管内皮増殖因子(VEGF)発現の抑制効果

マウスに PPE を 0 日目に気道内投与して気道炎症を惹起し、対照群には PBS を投与した。PPE 投与 4 日前より治療群には NEt-4IB を、非治療群には通常飼料を経口で投与開始し、2、14 日目に BAL 液中の VEGF を評価した。

実験⑥ PPE 誘導気道炎症モデルにおける RXR 部分作動薬 NEt-4IB と RXR 完全作動薬 Bexarotene の肺気腫抑制効果の比較

マウスに PPE を 0 日目に気道内投与して肺気腫を惹起し、対照群には PBS を投与した。PPE 投与 4 日前より治療群には NEt-4IB、または Bexarotene を、非治療群には通常飼料を経口で投与開始し、14 日目に肺気腫抑制効果の評価として肺組織、肺機能を評価(実験⑥-1)し、副作用評価として肝臓・体重比、血清を評価(実験⑥-2)した。

肺機能評価

静肺コンプライアンス(Cst)を測定した。

気管支肺胞洗浄(BAL)液の評価

BAL 液中の細胞数、細胞分画を評価した。

肺組織の評価

左肺をホルマリン固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色したのち、平均肺胞壁間距離(Mean liner intercept: Lm)、肺胞破壊係数(Destructive Index: DI)を評価した。

ELISA による BAL 液中、および、肺組織中のサイトカイン、ケモカインの測定

BAL 液中の KC、CXCL5、IL-6、IL-1 β 、VEGF、MMP-9、TIMP-1 の定量、および、肺ホモジネイト液上清中の Perforin、IFN γ 、IL-17、TNF α の定量を行った。

抗酸化活性の評価

BAL 液中、および、血清中の抗酸化活性を評価した。

血清の評価

血清中の Glucose、TG、AST、ALT、ALP、AMY、LAP の測定を行った。

統計学的解析

データは、平均値±標準誤差で表示し、ANOVA で分析後、Turkey-Kramer 検定にて解析した。2 群間の解析は Student T 検定、Mann-Whitney U 検定で評価した。統計学的有意差は $p < 0.05$ とした。

[結果]

実験① NEt-4IB は CSE 誘導肺気腫を抑制する

CSE 投与群(CSE/vehicle)では、PBS 投与群(PBS/vehicle)に比較して、Cst、Lm、DIは有意に上昇し、気腫性変化を認めた。NEt-4IB による治療群(CSE/NEt-4IB)では、非治療群(CSE/vehicle)と比較して、CSE 投与による Cst、Lm、DI の上昇を有意に抑制した。

実験② NEt-4IB は PPE 誘導肺気腫の進行を抑制する

PPE 投与後 7 日目において、Lm、DI は有意に上昇し、気腫性変化を認めた(PPE/vehicle on day 7)。7 日目に PPE を追加することにより、21 日目の Cst、Lm、DI は、PPE/vehicle on day 7 と比較して有意に上昇し気腫性変化の進行を認めた(PPE/vehicle on day 21)。NEt-4IB による治療群(PPE/NEt-4IB on day 21)では、非治療群(PPE/vehicle on day 21)と比較して、PPE 追加投与による Cst、Lm、DI の上昇の進行を有意に抑制した。

実験③ NEt-4IB は PPE 誘導気道炎症を抑制する

PPE/vehicle では、PBS/vehicle と比較して BAL 液中の総細胞数、マクロファージ数、リンパ球数、好中球数は有意に上昇した。PPE/NEt-4IB では、PPE/vehicle と比較して総細胞数、マクロファージ数、好中球数は有意に低下した。PPE/vehicle では、PBS/vehicle と比較して BAL 液中の KC、CXCL5、肺組織中の IFN- γ は有意に上昇したが、PPE/NEt-4IB では、PPE/vehicle と比較して BAL 液中 KC、CXCL5、肺組織中の IFN- γ 、IL-17 を有意に減少させた。

実験④ NEt-4IB は PPE 誘導気道炎症によるプロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡、抗酸化活性低下を改善する

PPE/vehicle では、PBS/vehicle と比較して BAL 液中 MMP-9/TIMP-1 比は有意な上昇を認めたが、PPE/NEt-4IB では、PPE/vehicle と比較して MMP-9/TIMP-1 比上昇を有意に改善した。また、PPE/vehicle では、PBS/vehicle と比較して BAL 液中の抗酸化活性は有意に低下し、血清中抗酸化活性は変化を認めなかった。PPE/NEt-4IB では、PPE/vehicle と比較して BAL 液中抗酸化活性の低下を有意に改善し、かつ、血清中抗酸化活性の有意な上昇を認めた。

実験⑤ NEt-4IB は PPE 誘導気道炎症による VEGF 発現を抑制する

PPE/vehicle では、PBS/vehicle と比較して 2、14 日目の BAL 液中の VEGF は有意に上昇した。PPE/NEt-4IB では、PPE/vehicle と比較して 2、14 日目の BAL 液中の VEGF 上昇を有意に抑制した。

実験⑥-1 Bexarotene は NEt-4IB と同様に PPE 誘導肺気腫の進行を抑制する

PPE/Bexarotene では、PPE 投与による Cst、Lm、DI の上昇を、PPE/NEt-4IB と同程度に有意に抑制した。PPE/Bexarotene と PPE/NEt-4IB との間に有意差は認めなかった。

実験⑥-2 NEt-4IB は Bexarotene と比較して重篤な副作用は認めない

肝臓/体重比について、PPE/NEt-4IB では、PBS/vehicle と比較して有意差は認めなかった。一方、PPE/Bexarotene では、PBS/vehicle、PPE/vehicle、PPE/NEt-4IB と比較して有意な上昇を認めた。

血清 TG について、PPE/vehicle では、PBS/vehicle と比較して有意な減少を認めた。PPE/NEt-4IB では PPE/vehicle と比較して PPE 投与による TG 減少を改善させ、PBS/vehicle と PPE/NEt-4IB の間に有意差は認めなかった。一方、PPE/Bexarotene では、PBS/vehicle、PPE/vehicle、PPE/NEt-4IB と比較して有意な上昇を認めた。PPE/NEt-4IB では血清中 Glucose、AST、ALT、LAP、ALP、AMY に影響は認められなかったが、PPE/Bexarotene では PPE/vehicle と比較して血清 ALP、AMY の有意な上昇が認められた。

[考察]

RAR と RXR は肺胞構造の発達、維持に重要である。RAR 作動薬を用いた COPD 動物モデルへの治療効果が報告されているが、ヒトにおける検討では十分な効果は示されていない。

今回の研究結果では、NEt-4IB を用いた治療は、好中球性気道炎症と好中球走化因子の抑制効果、プロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡と抗酸化活性低下の改善効果、また、組織学的気腫性変化と静肺コンプライアンスの上昇を有意に抑制した。さらに、NEt-4IB は肺気腫モデルマウスにおいて気道リモデリングに重要な役割を示す VEGF の発現を抑制し、完成した肺気腫の進行も抑制した。これらの結果から、NEt-4IB は肺気腫の発症・進行を抑制する効果を持つと考えられた。

NEt-4IB は RXR/PPAR γ 、RXR/LXR を活性化することが可能であり、これらヘテロダイマーを活性化することで抗炎症作用を示している可能性が考えられた。Bexarotene は NEt-4IB と同程度の肺気腫抑制効果を認めたが、肝腫大、高 TG 血症、血清 ALP と AMY の上昇を認めた。一方、NEt-4IB ではこれらの副作用は認められなかった。以上のデータより、NEt-4IB は Bexarotene に誘導される重篤な治療関連有害事象を認めることなく肺気腫の治療効果を示すと考えられた。

我々が開発した新規 RXR 部分作動薬 NEt-4IB は、RXR 完全作動薬と比較して、受容体活性化能力を 55% に減弱している。この部分活性化能が適切な治療効果を発揮しつつ、かつ、受容体過剰刺激を抑制することで副作用を軽減することに寄与していると考えられた。

[結論]

本研究において、新規 RXR パーシャルアゴニストである NEt-41B は肺気腫発症に対する治療効果を持つ可能性が示された。その効果は、好中球性気道炎症の抑制、プロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡の改善、抗酸化活性低下の改善によると考えられた。