

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08081

研究課題名(和文) 免疫抑制薬のヒト末梢Tリンパ球増殖抑制作用に及ぼすインスリンの影響

研究課題名(英文) Effects of insulin on pharmacodynamics of immunosuppressive drugs in human peripheral T lymphocytes

研究代表者

平野 俊彦 (Hirano, Toshihiko)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90173252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：腎移植患者の原疾患の多くは糖尿病性腎症である。末期糖尿病の治療にはインスリンが用いられることから、申請者は患者末梢血単核細胞(PBMC)の免疫抑制薬感受性に及ぼすインスリンの影響を検討した。慢性腎不全患者のPBMCのT細胞マイトゲン応答性増殖に対する免疫抑制薬の阻害効果は、インスリンにより低下した。一方インスリン受容体拮抗薬は本インスリンの作用を軽減させた。インスリン受容体は、PBMC中の単球に多く発現していた。インスリンが単球に作用し、PBMCの免疫抑制薬感受性を低下させる可能性を示した。これらの知見は、インスリン使用患者に対する免疫抑制薬の個別療法に重要な示唆を与えるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Diabetes mellitus is one of the most common causes of chronic renal failure. Clinical efficacies of immunosuppressive drugs are possibly affected by insulin after renal transplantation. We investigated the effects of insulin on responses of mitogen-activated human peripheral-blood mononuclear cells (PBMCs) to several immunosuppressive drugs. The IC50 values of immunosuppressive drugs against the mitogen-activated PBMCs in the presence of insulin were significantly higher than those of the drug without insulin ($P < 0.05$). Insulin receptors were detected on the mitogen-activated CD4+/CD14+ cells in PBMCs. Insulin-receptor antagonist recovered the effect of immunosuppressive drugs. These results indicate that insulin attenuates suppressive efficacies of immunosuppressive drugs against mitogen-activated proliferation of human PBMCs, possibly via insulin receptors. Insulin used in patients accompanying diabetes mellitus is suggested to attenuate efficacies of immunosuppressive drugs.

研究分野：臨床薬理学

キーワード：腎移植 インスリン 末梢血単核細胞(PBMC) 免疫抑制薬 慢性腎不全患者 薬物耐性 個別医療

1. 研究開始当初の背景

腎移植における維持免疫抑制療法や自己免疫疾患の治療に、副腎皮質ステロイド薬 (GC) が広く用いられているが、これらの患者の中にはGC療法に抵抗性を示す症例も散見される。我々はこれまで、科学研究費助成の元、患者末梢血単核細胞 (PBMC) のGC感受性が同薬の治療効果と相関することを明らかとし、学術誌等に発表してきた。一方、PBMCのGC耐性発現の分子機序には不明な点が多かった。

腎移植患者の多くは、糖尿病性腎症により慢性腎不全となりその後腎移植を施行されている。また慢性腎不全患者のPBMCは、GC耐性を示す傾向にある。末期糖尿病の治療にはインスリンが用いられることから、患者PBMCのGC感受性にインスリンが影響を及ぼす可能性がある。

また、免疫抑制薬は自己免疫疾患や臓器移植の治療に繁用されるが、GC同様その治療効果に耐性を示す症例も少なくない。免疫抑制薬耐性成因の解明は、耐性患者に有効な治療法の考案を可能にする。免疫抑制薬の薬効やその個体差は、患者末梢血リンパ球を用いた増殖抑制試験により判定可能である。腎移植の対象となる慢性腎不全患者には、各種免疫抑制薬に対しても耐性を示す症例が多発するという自験結果、および慢性腎不全の多くは糖尿病性腎症に起因するという統計値から、本研究ではインスリンがGCやその他の免疫抑制薬の薬効に影響を及ぼす可能性に着目した。

2. 研究の目的

腎移植患者の原疾患の多くは糖尿病性腎症である。末期糖尿病の治療にはインスリンが用いられることから、本研究では患者末梢血単核細胞 (PBMC) の免疫抑制薬感受性に及ぼすインスリンの影響を検討した。本研究では、ヒト末梢血リンパ球の各種免疫抑制薬感受性

に及ぼすインスリンの影響を、健常者および糖尿病性腎症患者由来PBMCを用いて精査し、その結果を個別免疫抑制薬物療法に応用する基盤を構築することを目的とした。またインスリンがPBMCに対して免疫抑制薬感受性の低下をもたらす分子機序についても、合わせて検討することとした。

3. 研究の方法

健常者および慢性腎不全患者のPBMCを用い、GCおよび各種免疫抑制薬のリンパ球増殖抑制作用に対するインスリンの効果とその背景にある分子機序を、以下の項目に従って検討した。なお本研究は、東京薬科大学ヒト組織等を研究活用するための倫理委員会の承認を経て行った。

(1) T細胞マイトゲンや抗CD3抗体等で刺激した健常者PBMCの増殖に対するプレドニゾロン、シクロスポリン、タクロリムス、あるいはミコフェノール酸の抑制効果に及ぼすインスリンの影響を、申請者が確立したヒトPBMCの薬物感受性試験法を用いて、in vitroで検討した。

(2) PBMC中のT細胞やその他の各種免疫細胞におけるインスリン受容体数と、上記インスリンの効果との関連を検討した。抗インスリン抗体および各種免疫系細胞表面抗原に対する抗体で標識したPBMCをフローサイトメトリーにより解析し、その結果からインスリン受容体発現量や受容体陽性細胞率を算出した。

(3) 免疫抑制薬の効果に対するインスリンの作用機序を明らかとするため、上記(1)の方法により、インスリンの作用をインスリン受容体アゴニスト/アンタゴニスト(S961)の存在下で調べた。また、活性化PBMCからの各種サイトカイン産生に及ぼすインスリンの影響について、ビーズアレイ/サイトメトリー法で7種のサイトカインを定量することにより検討した。

(4) 免疫抑制薬とインスリン存在下または非存在下にT細胞マイトゲンで刺激した

PBMCの各種MAPK活性(ERK、JNK、およびP38)を比較検討した。各種MAPK活性は、市販のキットを用いて測定した。

(5) T細胞マイトゲンで刺激した健常者PBMC中の制御性T細胞(CD4+CD25+FoxP3+T細胞)率に及ぼすインスリンの効果を検討した。制御性T細胞は、各種特異抗体で染色したPBMCのフローサイトメトリー解析により算出した。

4. 研究成果

腎移植の対象となる慢性腎不全患者のPBMCを用いて、まずGCの増殖抑制作用を詳細に検討した。その結果、糖尿病を合併しインスリンを使用していた慢性腎不全患者において、GCや各種免疫抑制薬の増殖抑制作用に対するPBMC応答性が減弱している可能性を示唆した。次に、健常者および慢性腎不全患者のPBMCを用い、プレドニゾロン、シクロスポリン、タクロリムス、およびミコフェノール酸のT細胞マイトゲン応答性PBMC増殖に対する抑制作用と、それに及ぼすインスリンの影響を検討した。その結果、いずれの免疫抑制薬の効果に対しても、5または50 μ U/mLのインスリンは有意に減弱作用を示した。

続いて、健常者PBMCを用いたインスリンの作用機序に関する解析を行った。まず、PBMC中のT細胞におけるインスリン受容体数と、上記インスリンの効果との関連を調べた。インスリン受容体発現量や受容体陽性細胞率を、抗インスリン抗体で標識した細胞のフローサイトメトリー解析により算出した。その結果インスリン受容体はCD4/CD14陽性の単球・マクロファージ様細胞に存在することを示した。以上の検討結果より、インスリンは、PBMC中のマクロファージ様細胞上のインスリン受容体を介して、免疫抑制薬の作用を修飾している可能性を示唆した。

さらに、インスリン受容体阻害薬のS961存在

下に、上記インスリンの効果を検討した。その結果、S961存在下にPBMCをインスリンおよびGCと培養すると、PBMCのGC感受性が回復した。このことから、インスリンが単球・マクロファージ様細胞上にあるインスリン受容体を介してこれらの細胞を刺激し、単球・マクロファージ様細胞から産生されるサイトカイン等の因子が、T細胞のGC感受性を減弱させている可能性を示した。またインスリンは、MAPKを活性化し、さらにGCによるMAPKの抑制を解除させた。これらの結果から、インスリンの作用にはMAPK活性化が関与するものと考えられた。以上の結果の一部を英論文化し、発表した(*Immunopharmacol Immunotoxicol* 38(5): 372-378; 2016)。

さらに本研究では、PBMCのGC感受性に及ぼす天然化合物の作用も検討した。中国の防已に含まれるテランドリンは、炎症性疾患の治療に用いられている。そこで、PBMCのGC感受性に及ぼすテランドリンの効果を検討した。テランドリンは、健常者および慢性腎不全患者PBMCのGC感受性を回復させた。このことから、テランドリンがインスリンの作用を抑えてGCの効果を回復させる可能性について、今後合わせて検討したい。

まとめ

健常者および慢性腎不全患者のPBMCのT細胞マイトゲン応答性増殖に対する免疫抑制薬の阻害効果は、インスリンにより低下した。一方インスリン受容体拮抗薬は本インスリンの作用を軽減させた。インスリン受容体は、PBMC中の単球・マクロファージ系細胞に多く発現していた。またインスリンは、MAPKを活性化し、さらにGCによるMAPKの抑制を解除させることを示唆した。

以上本研究において申請者は、インスリンがPBMC中の単球・マクロファージ系細胞に作用し、GCをはじめとする各種免疫抑制薬の効果

を減弱させることを示唆した。これらの成果は、免疫抑制薬の個別療法を行う上で、臨床にきわめて重要な知見と考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Chen S, Sugiyama K, Inamura M, Tanaka S, Onda K, Huijun Y, Hirano T. Effects of insulin on pharmacodynamics of immunosuppressive drugs against mitogen-activated human peripheral-blood mononuclear cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 38(5):372-378; 2016

[学会発表](計 1 件)

Chen Shuiling, Kentaro Sugiyama, Mariko Inamura, Sachiko Tanaka, Kenji Onda, Toshihiko Hirano
Effects of insulin on pharmacodynamics of immunosuppressive drugs in human peripheral blood mononuclear cells.

日本薬学会第 135 年会 2015 年 3 月神戸

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

平野 俊彦(Hirano Tohsihiko)東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号:90173252

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

杉山 健太郎(東京薬科大学・薬学部・准教授)