

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591708

研究課題名（和文） ミダゾラムの樹状細胞に対する抑制作用の分子機序の解明

研究課題名（英文） The analysis of molecular mechanism of immuno-suppressive activity of midazolam on dendritic cell

研究代表者

後藤 幸子 (GOTO YUKIKO)

大阪大学大学院・医学系研究科・助教

研究者番号：20276710

研究成果の概要（和文）：集中治療、麻酔で広く使用される鎮静薬であるミダゾラムの樹状細胞への作用を解析した。ミダゾラムは樹状細胞の成熟分化に対して抑制的に作用し、樹状細胞の副刺激分子の発現を低下させ IL-12 の産生を低下させアロリンパ球の Th1 への分化を低下させた。またミダゾラムで処理した樹状細胞は、典型的な Th1 型免疫応答によって生じる遅延型過敏反応の発症を抑制した。さらにこれらの樹状細胞への作用は末梢性ベンゾジアゼピン受容体への作用を介することが示唆する結果を得た。

研究成果の概要（英文）：Midazolam is a widely-used sedative drug in critical care and anesthesia. We analyzed the effect of midazolam on the function of dendritic cells. Midazolam suppressed the functional maturation of dendritic cells by lipopolysaccharide in terms of the expression of costimulatory molecules and IL-12. Midazolam-treated dendritic cells inhibited the allostimulatory activity of dendritic cells. Midazolam-treated dendritic cells have reduced activity inducing contact hypersensitivity response, one of typical cell-mediated immune responses. It was suggested that these inhibitory effects of midazolam is mediated by the effect on peripheral benzodiazepine receptor (PBR) by the study using PBR-specific ligand.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：麻酔学

科研費の分科・細目：周術期管理医学

キーワード：樹状細胞、リンパ球、インターロイキン 12、インターフェロン γ 、副刺激分子、接触過敏症

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞は免疫系で最も強力な抗原提示細胞として知られている。また樹状細胞の持つ強力な免疫制御作用のためにこの細胞を免疫制御の為に利用とする試みや、樹状細胞

の機能の解明のための研究が非常に精力的になされている。しかしながら集中治療、麻酔といった急性期医療の領域における樹状細胞の果たす役割を検討した研究は今までに皆無であった。

鎮静薬は集中治療の患者管理において患者を安楽にかつ安全に管理するためには必要不可欠な要素である。また近年は鎮静薬の集中治療現場における運用法によって患者予後が変わるといった報告も散見される。ただこのような患者予後に対する鎮静薬の影響が何に起因するものかは未だ解明されていない。集中治療現場における最も大きな問題点の一つは感染症に対する生体防御であり、これを担う免疫系の作用の集中治療の状況における解明は、鎮静薬が患者予後に与える影響の解明上、非常に重要な因子と考えられる。そこで本研究では今まで手付かずであった樹状細胞に対する鎮静薬の影響を調べることとした。中でも最も頻用される鎮静薬であるミダゾラムの樹状細胞に対する影響を詳細に解析することを本研究の第一の目的とした。

2. 研究の目的

ミダゾラムを初めとする鎮静薬や麻酔薬の免疫細胞に対する作用に関する研究は今まで多数なされてきたが、試験管内で免疫細胞に対するのみの結果であって生体個体レベルの免疫系では実際には大きな影響はないと考えられていた。ミダゾラムの免疫系への影響で評価されてきたのはマクロファージ、リンパ球、NK細胞がほとんど全てであり、強力な免疫制御作用を持つ樹状細胞に対する検討は今までになかった。またいままでの鎮静薬の免疫系に対する影響の研究は細胞そのものに対する影響にとどまり、免疫細胞間の相互作用として生じる本研究では今までになかった樹状細胞に対する鎮静薬の影響を解析するとともに、樹状細胞を基点として始まる免疫応答に対する影響を解析する。さらに進めて樹状細胞によって個体レベルでの免疫応答への影響も評価する。

ミダゾラムは鎮静薬として作用するときには中枢神経系の GABA 受容体が関与する中枢性ベンゾジアゼピン受容体を介して作用を発揮する。一方でベンゾジアゼピンの作用は他に末梢性ベンゾジアゼピン受容体を介する作用がある。ミダゾラムの樹状細胞に対する作用がこのいずれへの作用を介するのかを本研究の最後に検討しミダゾラムの作用機序の分子的に対する検討を加える。

3. 研究の方法

(1)マウスの脛骨、腓骨を採取し骨髓細胞を調整し GM-CSF の存在下で7日間培養して骨髓由来の樹状細胞を誘導し、これを未熟樹状細胞として使用する。この樹状細胞の誘導過程の最後にミダゾラムを加える群とミダゾラムの担体のみを加える群を作成する。その後培養8日目にLPSを加えて培養し樹状細胞を最終分化させ成熟樹状細胞とする。

(2)樹状細胞上に発現される副刺激分子(CD80, CD86)、組織適合抗原複合体、CD40をフローサイトメトリーによって測定した。培養上清中に検出される IL-12p40 を ELISA 法によって測定定量した。樹状細胞の貪食能を蛍光ラベルデキストランの貪食能をフローサイトメトリーによって評価した。これらのフェノタイプから樹状細胞の分化度に対するミダゾラムの与える影響を評価した。

(3)樹状細胞のアロリンパ球の刺激能への影響。樹状細胞の機能を解析するために樹状細胞によるアロのリンパ球の増殖と Th1 への分化刺激能を解析することで比較した。C57BL/6 マウスより誘導した樹状細胞と Balb/C マウスより調整した CD3 陽性のリンパ球を混合して培養し(混合細胞培養法)リンパ球の増殖刺激能を放射性ラベルチミジンによる細胞増殖アッセイによって、Th1 への分化を培養上清に検出されるインターフェロンのレベルを ELISA 法で測定し評価した。この実験で樹状細胞によって生じる免疫応答を試験管内でモデル化することで評価することができる

(4)次にミダゾラムの個体レベルでの免疫応答への影響を解析する。この目的で接触過敏症モデルを用いた解析を導入する。このモデルは典型的な Th1 型の免疫応答によって生じる遅延型過敏反応の動物疾患モデルである。このモデルの原型はマウスを用い以下のごとくである。Day0 で

2,4-dinitro-1-fluorobenzene (DNFB)を剃毛した腹部に塗布し感作する(感作相)、5日後 DNFB を耳介に塗布する(誘発相)と24時間後に耳介は腫脹し、この腫脹の程度を測定する。ここでは感作相を2,4-dinitrobenzene sulfonic acid(DNBS) (DNFB と抗原性が同じで DNFB の水溶性アナログ)を取り込ませた樹状細胞の移植によって置き換えたモデルをもちいた解析を行う。すなわち DNBS を取り込んだ樹状細胞を移植してマウスを感作し、5日後に原型のモデルと同様に耳介に DNFB を塗布して耳介の腫脹を測定する。感作に使用する樹状細胞をミダゾラム処理と未処理の樹状細胞の2群を作成する。

(5)樹状細胞に対するミダゾラムの作用がどの受容体を介するかを決定する。ベンゾジアゼピン系薬物は GABA 受容体と関わる中枢性ベンゾジアゼピン受容体を介して作用するか、末梢性ベンゾジアゼピン受容体を介して作用するかに分類できる。骨髓から誘導した樹状細胞に対して中枢性ベンゾジアゼピン受容体リガンド(Clonazepam)、末梢性ベンゾジアゼピン受容体リガンド(Ro5-4864, PK11195)のどちらがミダゾラムと同様の作

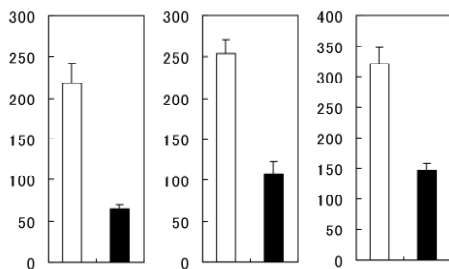
用を發揮するのかを解析する。

(6) 樹状細胞でのベンゾジアゼピン受容体の存在証明。骨髓から誘導した樹状細胞をマイクロビーズ結合 CD11c 抗体を用いて磁気ソーティングによってさらに精製する。精製した CD11c 陽性の樹状細胞からメッセンジャー RNA を分離し cDNA を作成する。末梢性ベンゾジアゼピン受容体に特異的なプライマーを用いて mRNA レベルで末梢性ベンゾジアゼピン受容体の存在を証明する。

4. 研究成果

(1) 樹状細胞は lipopolysaccharide (LPS) の刺激によって副刺激分子 (CD80, CD86)、組織適合抗原複合体 (MHC) の発現を上昇させる。上清中の IL-12 の産生量は増加する。さらに樹状細胞の貪食能は LPS 刺激によって低下する。これらの変化は LPS によって樹状細胞が成熟分化したことを示す。ミダゾラムが存在すると副刺激分子、MHC の発現は低下し (図 1)、IL-12 の分泌は低下し、樹状細胞の貪食能は増加した。これはミダゾラムによって樹状細胞の成熟が抑制されたことを示す。樹状細胞の貪食能が増加したことからこれらの変化はミダゾラムが樹状細胞の機能を全体に抑制したのではないことを示している。

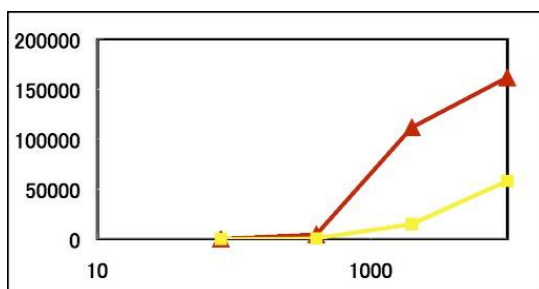
(図 1)



左より MHC II、CD80、CD86 の順。黒塗りがミダゾラム群、白抜きが対照群。
ミダゾラム群 vs 対照群 $p < 0.05$

(図 2)

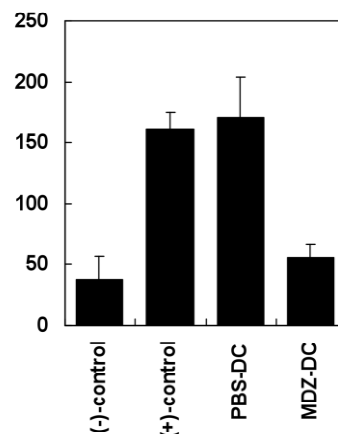
縦軸は放射性ラベルトリチウムの取り込み
横軸は樹状細胞の添加数。黄色がミダゾラム群、赤線が対照群。 $P < 0.05$ ミダゾラム群 vs 対照群



(2) C57Bl/6 由来の樹状細胞をマイトマイシン C で処理して増殖能を奪い、Balb/c マウス由来の CD3 陽性のリンパ球と混合培養すると Balb/C 由来のリンパ球は増殖し、放射性ラベルトリチウムの取り込みは亢進し (図 2)、上清中には典型的な Th1 型サイトカインであるインターフェロンの産生が亢進した。これに対して樹状細胞をミダゾラムで処理した上でリンパ球を刺激するとリンパ球の増殖は低下し、インターフェロンの産生量は低下した。これらの結果はミダゾラムが樹状細胞によって誘導されるリンパ球の Th1 への分化を抑制したことを示している

(3) 個体レベルでの免疫応答へのミダゾラムの影響。樹状細胞に DNBS を取り込ませて通常マウスに移植し 5 日後に耳介に DNFB を塗布してチャレンジするとマウスの耳介は 24 時間後には腫脹する。ミダゾラムで処理した樹状細胞に DNBS を取り込ませて移植したマウスに誘発を行ったマウスでは対照群と比べ耳介の腫脹は減弱した。(図 3)

(図 3) 接触過敏症モデルの結果



縦軸は耳介の腫脹 (μm) を示している

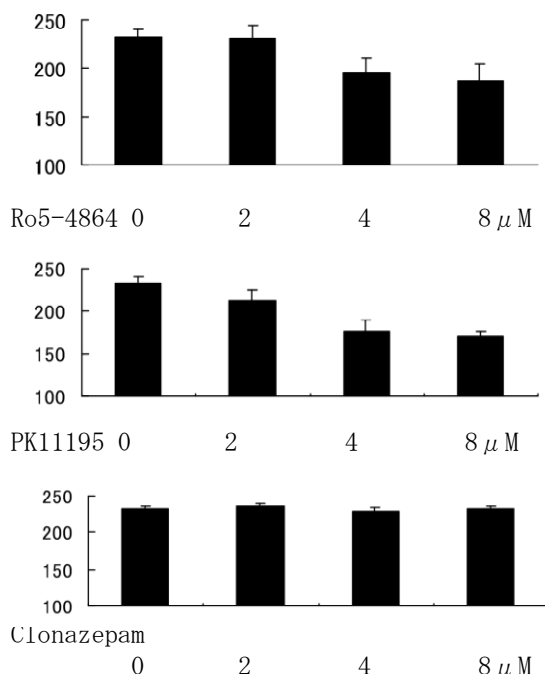
左より (-) control 群は感作相は担体のみ塗布し誘発相のみ DNFB をチャレンジした群。(+) control は感作相、誘発相とも DNFB を塗布した群。PBS-DC は DNBS を取り込ませた DC を移植し感作し、誘発を通常通り行った群、MDZ-DC は感作相の DC をミダゾラムによる処理を行った群である。PBS-DC vs MDZ-DC の間で有意な差を認めた ($p < 0.05$)

この接触過敏症モデルを用いた解析よりミダゾラムは樹状細胞に影響して個体レベルで発生する Th1 型の免疫応答を抑制することが示された。

(4) 樹状細胞における末梢性ベンゾジアゼピン受容体リガンド特異的 mRNA の存在の証明

RT-PCR 解析により少なくともメッセンジャーRNA レベルでは樹状細胞中に末梢性ベンゾジアゼピン受容体が発現されていることが示された。これは3回の独立した実験によって確認済みである。

(5)最後に樹状細胞に対するミダゾラムの作用メカニズムの解析を中枢性ベンゾジアゼピン受容体と末梢性ベンゾジアゼピン受容体に対する特異的リガンドを用いた実験によって追求した。末梢性ベンゾジアゼピン受容体リガンドである Ro5-4864, PK11195 は樹状細胞に作用させると用量依存的に LPS による CD86 の増加を抑制した。この変化はミダゾラムの効果と類似していた。一方で中枢性ベンゾジアゼピン受容体リガンドである clonazepam を作用させても CD86 の LPS による発現上昇を抑制することは出来なかった(図4)。



(図4) 縦軸は CD86 の発現量(mean fluorescence intensity)を示す Ro5-4864, PK11195 は 0 μM のに対して 4, 8 μM の濃度で有意に低下している。一方で clonazepam では濃度の変化に対して有意な変化はない。

(4), (5)の結果はミダゾラムは末梢性ベンゾジアゼピン受容体を介して作用していることを強く示唆する結果であった

(6)現在は末梢性ベンゾジアゼピン受容体リガンドの mRNA に対する siRNA を樹状細胞に導入してミダゾラムないしは末梢性ベンゾジアゼピン受容体リガンドの効果を抑制することができるのかを追求している。

5. 主な発表論文等 (計 4 件)

1. Yoshida T, Uchiyama A, Matsuura N, Mashimo T, Fujino Y.

The comparison of spontaneous breathing and muscle paralysis in two different severities of experimental lung injury. Crit Care Med. 査読有り 2013 Feb;41(2):536-45.

2. Yoshida T, Uchiyama A, Matsuura N, Mashimo T, Fujino Y.

Spontaneous breathing during lung-protective ventilation in an experimental acute lung injury model: high transpulmonary pressure associated with strong spontaneous breathing effort may worsen lung injury. Crit Care Med. 査読有り 2012 May;40(5):1578-85.

3. Ohta N, Ohashi Y, Takayama C, Mashimo T, Fujino Y.

Midazolam suppresses maturation of murine dendritic cells and priming of lipopolysaccharide-induced t helper 1-type immune response. Anesthesiology. 査読有り 2011 Feb;114(2):355-62.

4. Yoshida T, Uchiyama A, Mashimo T, Fujino Y.

The effect of ventilator performance on airway pressure release ventilation: a model lung study. Anesth Analg. 査読有り 2011 Sep;113(3):529-33

[学会発表] (計 6 件)

1. 大田典之、ご
ミダゾラムは自己非自己の認識能を低下させる

第 60 回日本麻酔科学会学術集会
201, 5, 23 札幌

2. 大田典之
ミダゾラムは樹状細胞による抗原特異的な免疫応答を抑制する

第 40 回日本集中治療医学会総会
2013, 3, 2 松本

3. 大田典之
プロポフォールは樹状細胞によって誘導される Th1 型免疫応答を促進する

第 59 回日本麻酔科学会学術集会
2012, 6, 8 神戸

4 大田典之
敗血症は粘膜免疫応答を低下させる
第 39 回日本集中治療医学会総会
2012, 3, 1, 千葉

5 大田典之
樹状細胞の機能に対する鎮静薬の機能の多
様性
第 38 回日本集中治療医学会総会
2011, 2, 26, 横浜

6 大田典之
ミダゾラムは樹状細胞によって惹起される
Th1 型の免疫応答を抑制する
第 57 回日本麻酔科学会学術集会
2010, 6, 3, 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 幸子 (GOTO YUKIKO)
大阪大学大学院 医学系研究科
助教
研究者番号 : 20276710

(2) 研究分担者

藤野 裕士 (FUJINO YUJI)
大阪大学大学院 医学系研究科
教授
研究者番号 : 50252672

大田 典之 (OHTA NORIYUKI)
大阪大学医学部附属病院 集中治療部
助教
研究者番号 : 20276710