

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590201

研究課題名(和文)リンパ球のステロイド感受性に与えるカルシニューリン阻害薬の影響

研究課題名(英文) Synergistic Effects of Calcineurin Inhibitors and Steroids on Steroid Sensitivity of Peripheral Blood Mononuclear Cells

研究代表者

竹内 裕紀 (Takeuchi, Hironori)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：20439912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：ステロイド受容体複合体(GR)にはカルシニューリン(CNI)結合蛋白のFKBP51、FKBP52、CyP40が存在し、ステロイドのGRに対する核内移行性に影響を与えていることからステロイドとCNI(タクロリムス:TAC、シクロスポリン:CYA)は、GR複合体レベルにおける薬力学的相互作用があると考えられる。そこで末梢血単核球を用いCNIによるステロイド感受性への影響を調べた結果、健常者および移植患者の検討ではTACとCYAともに感受性増強作用を認め、TACで大きい傾向にあった。その作用機序をFKBP51ノックダウンJurkat細胞で検討中であるが再現性をもって確認できた段階には至っていない。

研究成果の概要(英文)：The steroid receptor (SR) complex contains FKBP51 and FKBP52, which bind to tacrolimus (TAC) and cyclophilin 40, which in turn binds to cyclosporine (CYA); these influence the intranuclear mobility of steroid-SR complexes. Pharmacodynamic interactions are thought to exist between steroids and calcineurin inhibitors (CNIs) on the SR complex. We examined the effect of CNIs on steroid sensitivity. We examined the steroid sensitivity of mixed culture with both methylprednisolone (MPSL) and CNIs in 30 healthy subjects, and MPSL and cortisol sensitivity were examined before and after CNI administration in 23 renal transplant recipients. Steroid sensitivity increased with both TAC and CYA. Furthermore, TAC had a greater effect on increasing sensitivity. Thus, concomitant administration of CNIs and steroid can increase steroid sensitivity. However, we could not have demonstrated the action mechanism, though we are resolving the action mechanism, using Jurkat cell knockdown FKBP51 with siRNA.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：ステロイド 感受性 カルシニューリン阻害薬 ファーマコダイナミクス 相互作用 FKBP タクロリムス

1. 研究開始当初の背景

(1) 国内外の研究概要

現在、臓器移植の分野における免疫抑制療法は、カルシニューリン阻害薬(CNI)を中心としてステロイド剤や代謝拮抗薬が併用されているが、各薬剤間の薬力学相互作用については検討されていないのが現状である。その中でCNIとステロイド剤に関して、ステロイド受容体(GR)複合体にはCNI結合蛋白であるイムノフィリンがコシャペロン(分子シャペロン補助因子)として存在し、GRとHSP90の結合の調節やステロイドのGRに対する親和性や核内移行性に影響を与えている。これらのことから、ステロイドとCNIは、GR複合体レベルで相互作用がある可能性が考えられる。

イムノフィリンとしてタクロリムス(TAC)の結合蛋白であるFKBP51およびFKBP52、シクロスポリン(CYA)の結合蛋白であるシクロフィリン(Cyp)40が、ステロイド受容体のコシャペロンを形成している。GRの活性化はFKBP52により促進され、FKBP51により阻害され(Daviesら, *Biochemistry*, 2005)、FKBP51の高発現とFKBP52の低発現は、ステロイドの反応性を低下させると報告されている(Reynoldsら, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1999)。一方、Cyp40はFKBP52と構造的にも非常に類似しており、核内からFKBP52とともに検出されることから、Cyp40とFKBP52はステロイド-GR複合体の核内移行を促進し、反応性が増加させることが考えられる。また、リスザルでは血中遊離型コルチゾール濃度はヒトの50-100倍であるが、GRの発現は他の霊長類と同程度で、GR感受性はヒトやアカゲザルと比べて低く、コルチゾール過剰による症状も見らない(P.D. Reynoldsら, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1997)。これに関して、ヒトとリスザルのBリンパ芽球におけるFKBP51とFKBP52の発現量は大きく異なっており、リスザルのBリンパ芽球におけるFKBP51はヒトの10倍であるが、FKBP52はヒトの半分であることが示されている(Reynoldsら, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1999)。

これらの事実より、CNIはイムノフィリンと結合

することによりステロイド感受性(効果)に変化を与え、また、その変化はTACとCYAでは異なることが予想される。すなわち、TACではFKBP51との結合により、感受性の増大、またFKBP52との結合により感受性が低下することが考えられ、それらのバランスにより最終的にステロイド感受性が増大、または低下することが考えられる。またCYAではCyp40との結合により感受性が低下することが予想される。しかし、これらステロイドの感受性(効果)に及ぼすCNIの影響については、ほとんど調べられていないので現状である。

臨床的には、TACおよびCYA服用患者のステロイド併用における臨床成績の比較において、TACは急性拒絶反応の発症率が低いとする報告が多い(Ekberg 他, *N Engl J Med*, 2007)。またステロイド離脱においては、CYA服用群でのステロイド離脱群は、継続群に比べ拒絶反応が有意に高かったが、TAC服用群でのステロイド離脱群は継続群と有意な差はなかった(*Cochrane database of systematic reviews*; 2009年)これらTACとCYAの臨床的相違のひとつに、TACによるステロイド感受性の増大が関与している可能性が考えられる。

(2) 研究テーマに関する過去の実績

今までにプレドニゾロン(PSL)のリンパ球に対する感受性試験(リンパ球の増殖を50%抑制する薬物濃度(IC₅₀値)で評価)が、急性拒絶反応の発症率(Hiranoら *Transplantation*, 1994年)と有意な関係があることを見出し、臨床における本試験法の有用性を証明した。また各種ステロイド剤のリンパ球に対する抑制効果の力価比を腎移植の対象である慢性腎不全患者134名のIC₅₀値から求め結果、抗炎症作用の力価比とは大きくことなり、臨床で最も多用されているPSLに比べ、メチルプレドニゾロン(MPSL)のリンパ球抑制効果が12倍高いことを見出した(Hiranoら *Transplantation*, 1994年)。そこで実際の臨床効果をレトロスペクティブに解析した結果、MPSL投与群の方がPSL投与群より有意に生着率が高いことを明らかにし、当施設の移植で使用するステロイド剤を全面的にMPSLに変更し、移植に

おけるステロイド薬物療法に大きく貢献してきた (Hiranoら Clin Transplantation,2000年)。近年では、ステロイド離脱への応用を考え、内因性ステロイドであるコルチゾールの感受性が高ければ、服用ステロイドの用量が有効量以下になってもコルチゾールによる十分な免疫抑制効果により、服用ステロイドの代替ができ、より安全に減量・離脱ができる可能性を示してきた(竹内ら 臨床薬理の進歩,2009年)。

2. 研究の目的

背景で示したようにステロイド感受性は臨床成績と関連することを明らかにし、適切なステロイド療法に貢献してきたが、本研究ではステロイド剤とCNIの薬力学的相互作用を明らかにし、更なるステロイド療法の改善を目的とした。

3. 研究の方法

(1)ステロイド剤とCNIの併用添加によるリンパ球感受性試験

健常者から採取したリンパ球にステロイド単独添加およびCNI単独添加とステロイド+CNI(TACまたはCYA)の併用添加を行い、求めた濃度-リンパ球増殖抑制曲線から算出した IC_{50} 値および濃度-抑制曲線面積を比較し、CNIのステロイド感受性への相加・相乗効果または低下作用の程度を数量的に明らかにした。

【対象・方法】健常ボランティア30例に前述したリンパ球感受性試験に準じ以下の方法で実施した。ステロイド剤としては、服用ステロイドであるMPSLを使用し、Well上にリンパ球にステロイド単独添加、CNI(TACまたはCYA)単独添加とステロイド+CNI(TACまたはCYA)の併用添加にて培養を行った。まずはステロイド単独添加の濃度-増殖抑制曲線を求める。次にCNI単独添加における濃度-増殖抑制曲線を求め、ステロイド+CNI(TACまたはCYA)の併用添加時に加えるCNI濃度の抑制率を算出し、ステロイド単独添加の濃度-増殖抑制曲線にCNIの抑制率を加えることにより、それぞれステロイド単独とCNI単独における抑制率を足した濃度-増殖抑制曲線を求めた(単独群)。そして、ステロイド+CNI

(TACまたはC単独群および併用群、それぞれの曲線から算出した IC_{50} 値および濃度-反応曲線面積を比較し、CNIのステロイド感受性への相加・相乗効果または低下作用の程度を数量的に求めた。健常者の結果により相互作用が認められた場合にのみ、実際の腎移植患者10例で同様な試験を行った(健常と患者で異なる場合があるため)。

(2)CYA服用患者およびTAC服用患者におけるリンパ球のステロイド感受性の比較

服用ステロイドであるメチルプレドニゾロン(MPSL)および内因性ステロイドであるコルチゾール(COR)のリンパ球感受性(IC_{50} 値)を移植後患者でレトロスペクティブにTAC服用患者とCYA服用患者で比較した。さらにプロスペクティブにTAC服用患者とCYA服用患者で同一患者における移植前(免疫抑制薬服用前)および移植(免疫抑制薬服用開始)後2ヶ月目で実施し、TAC併用患者とCYA併用患者の IC_{50} 値の変化を比較することで、臨床におけるTACとCYAのステロイド感受性への影響の違いを調べた。

【対象・方法】東京医科大学八王子医療センターで、ステロイド剤とCNIを併用する腎移植患者を対象とし、初めにTAC服用患者20例、CYA服用患者24名の移植後CORおよびMPSLの IC_{50} 値をレトロスペクティブに調査した。また、TAC服用患者11例、CYA服用患者12例で同一患者におけるCNI服用前後におけるCORおよびMPSLの IC_{50} 値の変化を調べた。

<リンパ球感受性試験>

ステロイド(COR、MPSL)感受性はリンパ球の増殖を50%抑制するステロイド濃度(IC_{50})で評価する。対象患者から約20mLの血液を採取し、リンパ球を分離し、コンカナバリンAで増殖させたリンパ球に5段階の濃度のCOR、服用ステロイド(MPSL)のいずれかを添加培養後、さらに72時間後に 3H チミジンを添加し、96時間後にリンパ球に取り込まれた 3H 量を測定し、各濃度における増殖率を求め、濃度-リンパ球増殖抑制曲線を描き、リンパ球の増殖を50%抑制するステロイド濃度(IC_{50})値を求めた。そして、TACとCYA服

用患者間および免疫抑制薬服用前後のTAC服用患者とCYA服用患者のステロイド(CORとMPSL)のIC₅₀値を統計学的に比較した。

(3) siRNA導入イムノフィリンの遺伝子ノックダウンによるステロイドのリンパ球 (Jurkat細胞) 感受性

RNA干渉による遺伝子ノックダウンにより、FKBP51、FKBP52およびCyp40のそれぞれの機能発現をブロックし、ステロイドのリンパ球感受性がどのように変化するかを確認した。

【対象・方法】

1. western blot法によるsiRNA導入の確認

基礎的検討として、Jurkat細胞を用いて、siRNA導入によりFKBP51の蛋白発現が抑制または増強されるか、western blot法にて確認した。

2. siRNA導入におけるステロイド感受性の変化

Jurkat細胞を用いてFKBP51のsiRNA導入した場合とsiRNAを導入しない場合(negative control)のステロイド(メチルプレドニゾン)のIC₅₀値を比較し、それぞれのイムノフィリンがステロイド感受性にどのような変化を与えているかを調べた。

4. 研究成果

(1) ステロイド剤とCNIの併用添加によるリンパ球感受性試験

MPSLのIC₅₀とCPS-AUCは相加群に比べ、併用培養群で有意に小さく、ステロイド感受性への増強作用が認められた(表1.2)。またTACのCPS-AUCはCYAに比べ、有意に小さく、TACの増強効果は大きい傾向にあった(表3)。

表1

CNI	濃度 (ng/mL)	相加群		併用群		p値
		中央値 (範囲)	中央値 (範囲)			
TAC	0.1	9.05 (0.71 - 53.77)	4.69 (2.94 - 8.51)	<0.05		
	0.175	9.25 (0.10 - 51.03)	0.74 (0.10 - 4.53)	<0.05		
	0.25	6.15 (0.10 - 35.69)	0.10 (0.10 - 2.51)	<0.05		
CYA	5	34.49 (5.35 - 77.73)	8.58 (5.53 - 32.75)	<0.05		
	10	7.86 (0.34 - 48.99)	3.78 (0.59 - 5.65)	<0.05		
	25	2.63 (0.10 - 19.23)	0.13 (0.10 - 0.78)	<0.05		

表2

CNI	濃度 (ng/mL)	相加群		併用群		p値
		中央値 (範囲)	中央値 (範囲)			
TAC	0.1	7235 (1996 - 26894)	1551 (789 - 5275)	<0.05		
	0.175	3814 (1561 - 27287)	428 (193 - 1106)	<0.05		
	0.25	2868 (1315 - 18451)	271 (104 - 678)	<0.05		
CYA	5	20042 (3556 - 37928)	5005 (3255 - 9609)	<0.05		
	10	3929 (840 - 22343)	1193 (651 - 3145)	<0.05		
	25	3106 (383 - 7095)	477 (25 - 808)	<0.05		

表3

MPSLのTACとCYAの相乗効果の比較

IC₅₀ 値比による比較

濃度 (ng/mL)	濃度比 (TAC:CYA)	IC ₅₀ 比 (相乗/相加)		p値	
		TAC	CYA		
		中央値 (範囲)	中央値 (範囲)		
0.25	5	1:20	0.171 (0.036 - 1.000)	0.548 (0.161 - 1.254)	N.S.

濃度-増殖抑制曲線下面積比による比較

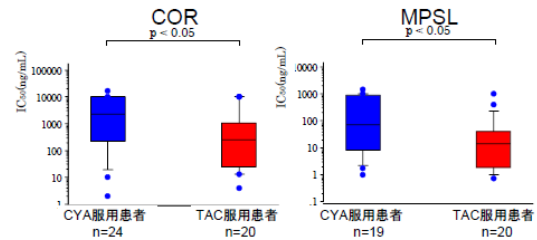
濃度 (ng/mL)	濃度比 (TAC:CYA)	面積比 (相乗/相加)		p値	
		TAC	CYA		
		中央値 (範囲)	中央値 (範囲)		
0.25	5	1:20	0.080 (0.026 - 0.303)	0.360 (0.233 - 0.863)	<0.05

(2) CYA服用患者およびTAC服用患者におけるリンパ球のステロイド感受性の比較

CORおよびMPSLのIC₅₀値はCYA服用患者に比べTAC服用患者で有意に低値を示し、TAC服用患者でステロイドの感受性がた高かった(図1)。

図1

移植後CYA服用患者とTAC服用患者のPBMCにおけるステロイドのIC₅₀値



次に腎移植患者の移植前後(カルシニューリン阻害薬服用前後)のMPSLおよびCORのIC₅₀値の検討の結果においてもすべて移植後で低い傾向にあった。その中でTAC投与患者のCOR IC₅₀は移植後に有意に低下していた(図2、3)。

図2

同一患者の移植前後におけるCOR IC₅₀ 値のTAC投与患者とCYA投与患者間の比較

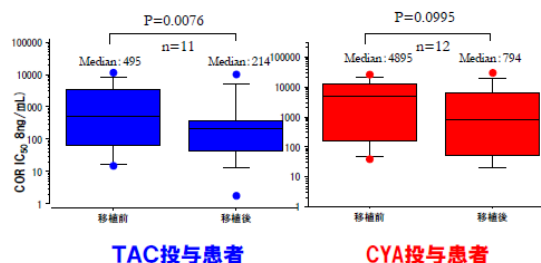
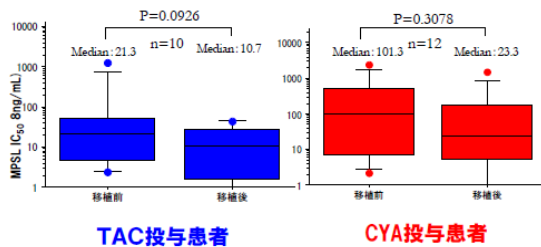


図3

同一患者の移植前後におけるMPSL IC₅₀値のTAC投与患者とCYA投与患者間の比較



(3) siRNA導入イムノフィリンの遺伝子ノックダウンによるステロイドのリンパ球(Jurkat細胞)感受性

Jurkat細胞を使用し、SiRNAによりFKBP51の発現抑制をウエスタン確認できた。FKBP51ノックダウンJurkat細胞のステロイド感受性は9例中5例でIC₅₀低下(感受性増加)の傾向を示した。しかし、これらの結果のリポフェクタミン法ではSiRNAの導入効率が低いため、エレクトロポレーション法にてSiRNAの導入を試み、培養時間を96時間簡に延長することで、ノックダウンがより確実に実施できることを確認した段階であり、今後は、エレクトロポレーション法にてSiRNAの導入を試み、感受性試験を実施する必要がある。

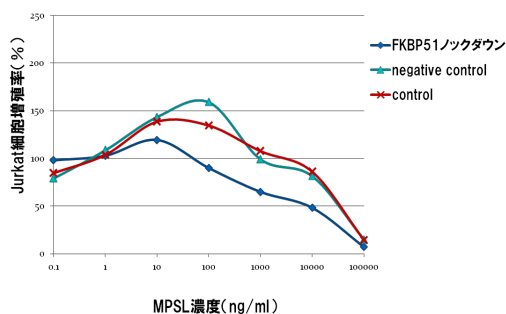


図4. SiRNAによるFKBP51ノックダウンJurkat細胞の増殖抑制効果を示した1例

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2件)

- Hironori Takeuchi, Hitoshi Iwamoto, Yuki Nakamura, Toshihiko Hirano, Osamu Kon

no, Yu Kihara, Naokazu Chiba, Takayoshi Yokoyama, Kiminori Takano, Tatsunori Toraiishi, Kiyoshi Okuyama, Chie Ikeda, Sachiko Tanaka, Kenji Onda, Akiko Soga, Yukiko Kikuchi, Takashi Kawaguchi, Shigeyuki Kawachi, Sakae Unezaki, Motohide Shimazu. Synergistic Effects of Calcineurin Inhibitors and Steroids on Steroid Sensitivity of Peripheral Blood Mononuclear Cells. Cell Medicine (accepted), 2014

- Gulimire Muhetaer, Hironori Takeuchi, Sogo Akizuki, Hitoshi Iwamoto, Motohide Shimazu, Sakae Unezaki, Toshihiko Hirano. Higher sensitivity of peripheral blood lymphocytes to endogenous glucocorticoid in renal transplant recipients treated with tacrolimus, as compared to those treated with cyclosporine. Cell Medicine, 3:75-80(2012)

(学会発表)(計11件)

- 竹内裕紀, 平野俊彦, 田中祥子, 岩本整, 中村有紀, 今野理, 木原優, 横山卓剛, 千葉斉一, 高野公德, 虎石竜典, 川口崇, 奥山清, 河地茂行, 島津元秀, 畝崎榮. 末梢血単核球のステロイド感受性に基づく至適免疫抑制療法. 第3回医薬工3大学包括連携シンポジウム. 2013.12.14. 東京.
- 竹内裕紀, 平野俊彦, 岩本整, 中村有紀, 河地茂行, 畝崎榮, 島津元秀, 末梢血単核球感受性に基づくステロイド薬のテーラーメイド医療の可能性. 第40回臓器保存生物医学会学術集会(シンポジウム). 2013.1.09. 東京.
- 竹内裕紀, 岩本整, 中村有紀, 今野理, 木原優, 横山卓剛, 千葉 斉一, 高野 公德, 虎石竜典, 奥山清, 菊池祐紀子, 川口崇, 河地茂行, 平野俊彦, 畝崎榮, 島津元秀. 腎移植の短期ステロイド減量・離脱における末梢血単核細胞のステロイド感受性の有用性. 第172回東京医科大学医学会総

- 会. 2013.11.02. 東京.
4. 秋山晋一、竹内裕紀、田中祥子、平野俊彦、虎石竜典、岩本整、中村有紀、今野理、木原優、千葉斉一、横山卓剛、高野公德、川口崇、奥山清、河地茂行、島津元秀、畝崎榮. エベロリムスの末梢血単核球細胞(PBMC)抑制効果におけるカルシニューリン阻害薬の薬力学的相互作用の検討. 第23回医療薬学会年会. 2013.09.21. 仙台
 5. 竹内裕紀、菊池祐紀子、岩本整、中村有紀、今野理、木原優、千葉 斉一、横山卓剛、高野 公德、虎石竜典、奥山清、河地茂行、平野俊彦、畝崎榮、島津元秀. 腎移植患者の末梢血単核細胞のステロイド感受性とステロイド短期減量・離脱成績との関係. 第49回日本移植学会. 2013.09.06. 京都
 6. Hironori Takeuchi, Hitoshi Iwamoto, Yuki Nakamura, Osamu Konno, Yu Kihara, N aokazu Chiba, Takayoshi Yokoyama, Kimi nori Takano, Tatsunori Toraisi, Kiyoshi Okuyama, Sakae Unezaki, Toshihiko Hirano, Shigeyuki Kawachi, Motohide Shimazu. Synergistic Effect of Steroid Sensitivity to Peripheral Blood Mononuclear Cells on Calcineurin Inhibitors. The 13 th Congress of Asian Society of Transplantation. 2013.09.03. Kyoto.
 7. グリミル・ムヒタル、竹内 裕紀、畝崎榮、平野俊彦、島津元秀. 腎移植患者における末梢血リンパ球の cortisol 高感受性に基づく至適カルシニューリン阻害薬の選択. 第33回日本臨床薬理学会. 2012.11.29. 沖縄.
 8. グリミル・ムヒタル、竹内裕紀、岩本整、中村有紀、畝崎榮、平野俊彦、島津元秀. 腎移植患者末梢血リンパ球の ステロイド感受性に及ぼすカルシニューリン阻害剤の影響. 第170回東京医科大学医学会総会. 2012.11.17. 東京.
 9. 竹内裕紀、菊池祐紀子、平野俊彦、岩本

- 整、中村有紀、今野理、城島嘉磨、木原優、横山卓剛、虎石竜典、川口崇、河地茂行、奥山清、畝崎榮、島津元秀. カルシニューリン阻害薬によるステロイド感受性増強作用 移植前後におけるIC50値の比較およびinvitro実験結果より -. 第48回日本移植学会. 2012.09.22.名古屋
10. 竹内裕紀、曾我朗子、岩本整、片山宏章、平野俊彦、中村有紀、濱耕一郎、今野理、横山卓剛、木原優、虎石竜典、川口崇、奥山清、畝崎榮、島津元秀. カルシニューリン阻害薬によるステロイド感受性増強作用. 第2回医薬工3大学包括連携推進シンポジウム. 2012.3.10. 東京
 11. 竹内裕紀、曾我 朗子、片山宏章、平野俊彦、岩本整、中村有紀、濱耕一郎、今野理、横山卓剛、木原優、虎石竜典、川口崇、奥山清、畝崎榮、島津元秀. カルシニューリン阻害薬のリンパ球ステロイド感受性に対する増強効果. 第38回臓器保存生物医学学会学術集会2011.11.25. 仙台

[図書] (計0件)

[産業財産権]

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹内裕紀 (49)

研究者番号: 20439912

(2)研究分担者

平野俊彦 (57)

研究者番号: 90173252

(3)連携研究者

島津元秀 (65)

研究者番号: 70124948