

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670676

研究課題名(和文) 静脈内鎮静薬ミダゾラムによるIgE抗体クラススイッチ抑制によるアレルギー抑制効果

研究課題名(英文) Midazolam inhibits IgE production in mice via suppression of class switch recombination

研究代表者

下坂 典立 (Shimosaka, Michiharu)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：90297854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ミダゾラム(MDZ)がIgE抗体産生を抑制するか調査した。MDZ投与後、卵白アルブミンとコレラ毒素をマウスの腹腔内に投与し、OVA特異的IgE抗体と総IgE抗体、B細胞表層のIgE抗体をELISAとFlow cytometryによって解析した。さらにIgE関連遺伝子発現をRT-PCRで解析した。結果は、MDZがIgE抗体産生を抑制し、GLTとCTの遺伝子レベルを減少させた。mRNAとタンパク質濃度で、IFN- γ は上昇したが、IL-4のmRNAとタンパク質濃度は減少した。したがって、MDZはIgE抗体のレベルを減少させ、アレルギー疾患に対して安全に使用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined whether MDZ can suppress antigen-specific and total IgE production followed by IgE class switch recombination(CSR). MDZ was administered intraperitoneally to mice prior to ovalbumin(OVA) plus native cholera toxin immunization. Serum OVA-specific and total IgE responses, and surface IgE-positive B cells were analyzed by ELISA and Flow cytometry. Expression levels of CSR associated molecules such as germ-line transcript (GLT), germ-circle transcript (CT), AID, and Id2 in spleen were compared. IFN- γ and IL-4 mRNA and their protein levels were also examined in spleen and serum. MDZ significantly suppressed OVA-specific and total IgE levels in plasma and surface IgE-positive B cells in spleen. MDZ-treated mice had significantly reduced levels of GLT and CT. Furthermore, although IFN- γ mRNA and protein levels were significantly elevated, IL-4 mRNA and protein levels were reduced in MDZ-treated mice. MDZ might be useful for preventing IgE-mediated allergic disease.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：midazolam IgE CSR IgE抗体産生抑制

1. 研究開始当初の背景

IgE はアレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎などの多くのアレルギー疾患の病原性発現において中心的な役割を果たしている。アレルギー患者においては、総 IgE 抗体および抗原特異的 IgE 抗体が高レベルで産生され、肥満細胞や好塩基球上の Fc γ R に結合し、ヒスタミンやロイコトリエン等のケミカルメディエーターの放出に基づく炎症反応を惹起する。従って、IgE 抗体産生の阻害はアレルギー疾患改善の理想的戦略となりうる。既に存在する IgE に対する中和治療は重篤なアレルギー喘息患者に実施されているが、IgE 抗体産生を抑制する治療手段は今日まで臨床的に得られていない。IgE は血中での半減期が比較的短く、IgE クラススイッチ組換え(CSR)を抑制するメカニズムが血中の低レベル IgE を維持しているものと考えられる。CSR は該当する標的 H 鎖定常部における μ および ε 遺伝子スイッチ領域の組換えにより、定常部 C μ 遺伝子と C ε 遺伝子とを置き換えるが、その結果として、CSR は異なる機能を持つアイソタイプ IgE へのクラススイッチを促す。B 細胞における CSR の制御は、H 鎖定常部の生殖細胞系列転写 (GLT) と活性化誘導シチジンデアミナーゼ (AID) 発現とで制御されている。

ベンゾジアゼピン(BZD)系薬剤であるミダゾラム(MDZ)は、麻酔前投薬、麻酔の導入・維持、歯科患者の鎮静などに使用されている。BZD 受容体には、中枢性 BZD 受容体(CBR)と末梢性 BZD 受容体(PBR)が存在し、CBR は神経細胞やリンパ球などに発現し、催眠作用や抗不安作用など GABA α の作用を増強すると言われている。PBR は腎臓、内分泌系器官や単球などに発現し、細胞増殖の制御、免疫変性、ステロイド生成、酸化変性、プログラム細胞死などに関与している。また、MDZ はヒト末梢単核

球における IL-6 mRNA 発現阻害や、ラットミクログリアからの PBR を介した Nitric oxide や TNF- α の放出抑制に働くことも知られている。これらの知見は、MDZ の免疫システム調整作用を示唆しているが、MDZ が IgE 産生に及ぼす影響は報告されていない。

2. 研究の目的

本研究において、MDZ の投与が ovalubmin (OVA) とコレラ毒素(CT) で免疫したマウス血液中及び脾臓細胞中の総 IgE 抗体および抗原特異的 IgE 抗体レベルにどのような影響を与えるかを検討した。さらに、同マウス血清中の IFN- γ 及び IL-4 産生及び脾臓細胞中の CSR 関連因子、IFN- γ 及び IL-4 発現における MDZ の影響を検討した。

3. 研究の方法

使用したマウスは、BALB/c Cr Slc 雌、8 週齢から 12 週齢でした。マウスに MDZ 3mg/kg を腹腔内投与し、その後良好な鎮静状態を確認し、OVA 1mg と CT 1 μ g で免疫した。免疫は、1 週間に 1 度、計 3 回施行し、21 日目に血清および脾臓細胞を採取した。採取したサンプルを ELISA、Flow cytometry、RT-PCR で蛋白レベルおよび遺伝子レベルで解析した。

4. 研究成果

結果、以下のような結論を得た。

1. MDZ は ovalubmin (OVA) とコレラ毒素(CT) で免疫したマウス血液中および脾臓 B 細胞中の総 IgE 抗体および OVA 特異的 IgE 抗体産生レベルを有意に抑制した。
2. MDZ は同マウス脾臓 B 細胞中の ε GLT と ε CT 発現を有意に抑制する一方で、Id2 発現を有意に促進した。
3. MDZ は同マウス血清および脾臓 B 細胞中の IFN- γ 産生および遺伝子発現を

有意に促進する一方で、IL-4 産生および遺伝子発現を有意に抑制した。

本研究では、MDZ は Th1/Th2 バランスを Th1 に優位に傾けることにより、CSR 関連遺伝子を制御し、IgE 産生を抑制している可能性が示唆された。これらの知見は、MDZ が鎮静効果のみならず IgE 産生の抑制を介してアレルギー応答を制御している可能性を示唆するものである。

以下に結果の図を示す。

Fig.1

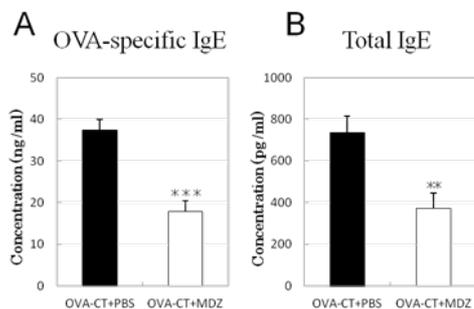


Fig.2

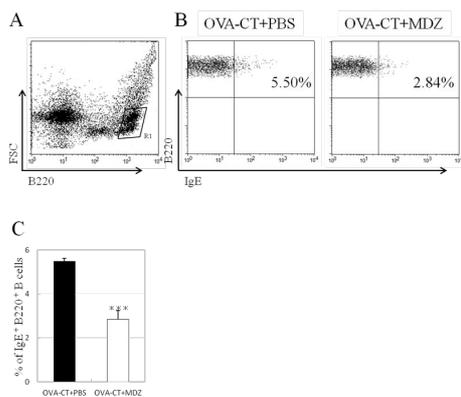


Fig.3

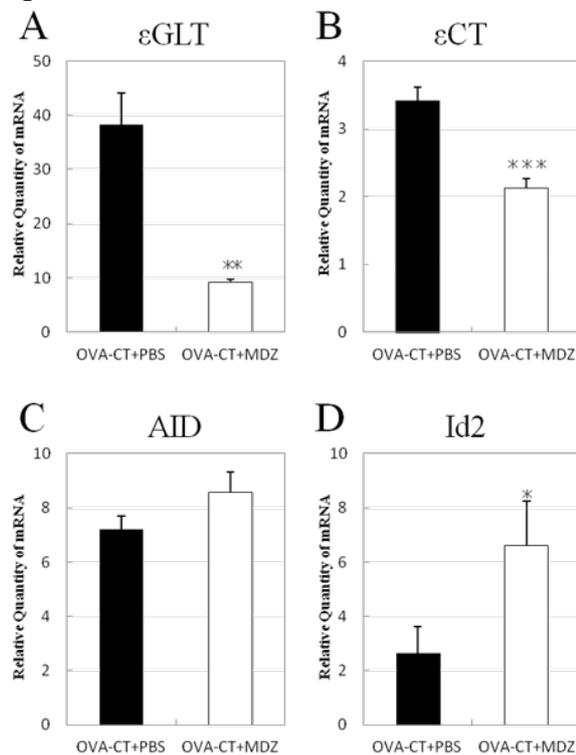


Fig.4

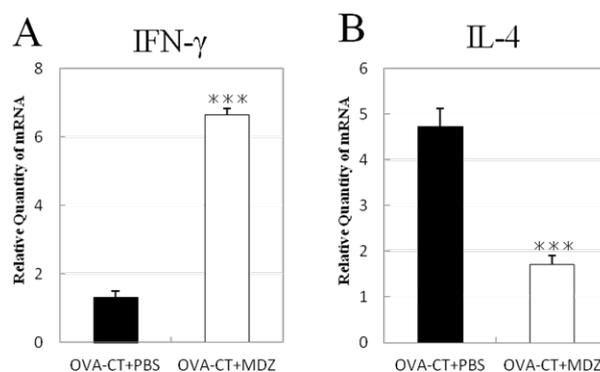
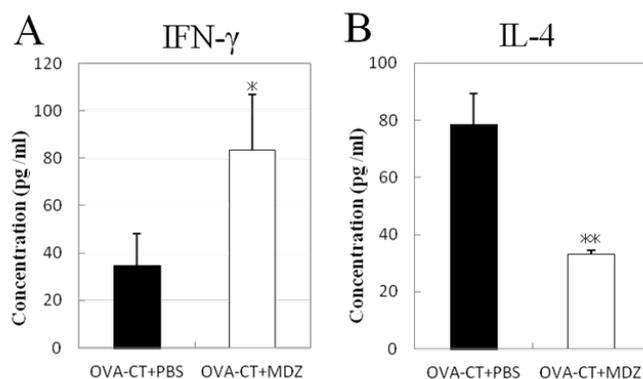


Fig.5



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)

Hiroto Kusama, Ryoki Kobayashi, Tomoko Kurita-Ochiai. Midazolam inhibits IgE production in mice via suppression of class switch recombination. Journal of ORAL SCIENCE 56: 77-83, 2014.

〔学会発表〕(計 1 件)

草間弘朝, 落合智子, 下坂典立, 藤田 裕, 石川 学, 渋谷 鑛. ミダゾラムによる IgE 抗体クラススイッチ組換えの制御, 2014 年 10 月 11 日 第 42 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会, 日本歯科大学新潟生命歯学部 (新潟県・新潟市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下坂典立 (Shimosaka Michiharu)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号: 90297854

(2) 研究分担者

小林良喜 (Kobayashi Ryoki)

日本大学・松戸歯学部・助手 (専任扱)

研究者番号: 10609085