

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462433

研究課題名(和文)ハロペリドールによる樹状細胞のレドックス平衡を介した免疫制御

研究課題名(英文)The regulation of immune response by haloperidol via the effects on the redox equilibrium in dendritic cells

研究代表者

柏 庸三(Kashiwa, Yozo)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90647471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：まず樹状細胞と樹状細胞によっておこる免疫応答に対するハロペリドールの作用を解析した。ハロペリドールはLPSによっておこる樹状細胞の分化成熟を抑制した。動物個体レベルでの免疫応答への影響を調べるために接触過敏相モデルを用いて評価を行った。ハロペリドールで処理された樹状細胞によって生じる接触過敏症の反応は低下していた。以上からハロペリドールは樹状細胞の分化成熟を抑制しTh1型免疫応答を低下させる可能性が示唆された。ハロペリドールの作用のメカニズム的考察を加えた。この解析からハロペリドールはドーパミンD2様受容体を介してNF- κ Bの活性化の抑制をへて作用を発揮することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the effects of haloperidol on dendritic cell (DC) and DC-mediated immune response. haloperidol suppressed the maturation of immature DCs induced by LPS. Furthermore, we analyzed the effect of haloperidol on DC-mediated immune response by the use of contact hypersensitivity model of mouse. Haloperidol-treated DC suppressed the development of contact hypersensitivity in mouse. This model is assumed to be developed by typical Th1 immune response. Our results strongly suggest that haloperidol suppress the maturation of immature DCs and the development of Th1 type immune response. In addition, the inhibitory effect was mediated by dopamine D2-like receptor via the inhibition of NF- κ B in immune cells such as macrophages and DCs.

研究分野：周術期管理医学

キーワード：樹状細胞 ハロペリドール ドーパミン D2様受容体 インターロイキン12

1. 研究開始当初の背景

集中治療の臨床現場では重症患者を安全に管理するために様々な鎮静薬が用いられる。集中治療の臨床現場は病原体に対する免疫防御が重要であるため、麻酔薬と鎮静薬が免疫系に対して影響を与えることは以前から様々に追求されてきた。しかし従来の麻酔薬の免疫系への影響の研究は、主として試験管内での実験に基づいており、生体個体レベルでの免疫系への影響は疑問視する意見も強かった。申請者の研究室では近年、ミダゾラム、ケタミン、プロポフォールといった主要な麻酔薬が免疫系に対する影響を解析するにあたり、最も強力な抗原提示細胞として認知されてきた樹状細胞に焦点をあてて検討して相当の成果を得てきた。一方で集中治療の臨床現場で頻用されるもう一つの範疇の鎮静薬である向精神薬(anti-psychotic drug)も、免疫系に対して影響を与えられられているが、その影響の詳細な解析はなされておらず、況や樹状細胞を対象とした研究は皆無である。そこで本研究では向精神薬の免疫系に及ぼす影響について、樹状細胞と樹状細胞が引き起こす免疫応答に対する影響に焦点をあてて検討することを一つの目標とする。またすでに私たちはハロペリドールが樹状細胞機能に影響することと、ハロペリドールが樹状細胞のレドックス平衡に影響をあたえる可能性を見出しており、他の鎮静薬、麻酔薬と異なるメカニズムによる樹状細胞機能の制御という観点からハロペリドールが樹状細胞のレドックス平衡に与える影響とその生体防御への意義の一端を本研究によって明らかにする。

2. 研究の目的

獲得免疫応答は、抗原が抗原提示細胞で処理され、T細胞受容体を介してTリンパ球に抗原が提示される時に始まる。抗原提示細胞には樹状細胞、マクロファージ、B細胞、さらに一部の上皮細胞が含まれる。これら抗原提示細胞のなかで樹状細胞は体内では数が少ないにも拘らず最も強力な抗原提示細胞である。樹状細胞は病原体の構成要素に対する受容体である Toll like receptor を多種類発現し病原体認識の最前線を担うとともに、各種のリンパ球刺激分子、サイトカインを発現しリンパ球機能を制御できる。これらの特徴のために、樹状細胞は抗原提示にとどまらず、免疫系の初動から免疫系の制御に中心的な役割を果たすと考えられており、ワクチン開発、免疫疾患の制御などへの応用が期待されている。

私達は麻酔薬と免疫系の関係を解析するに際して、早くから樹状細胞に焦点をあてて研究し報告してきた。

1. Ketamine inhibits maturation of bone marrow-derived dendritic cells and priming of the Th1-type immune response Ohta N, Ohashi Y, Fujino Y. **Anesth**

Analg. 2009 Vol 109

2. Midazolam suppresses maturation of murine dendritic cells and priming of lipopolysaccharide-induced T helper 1-type immune response.

Ohta N, Ohashi Y, Takayama C, Mashimo T, Fujino Y. **Anesthesiology.** 2011 Vol 114

なかでも後者の研究ではミダゾラム、樹状細胞、免疫系の関係を詳細に追求した。この研究の中で抗原を取り込ませた樹状細胞をマウス個体に移植することで接触過敏症を誘導する実験系を確立し、ミダゾラムで処理した樹状細胞は接触過敏症の発生を抑制することを示した。この結果は麻酔薬が動物個体レベルの免疫応答に明確に関与することを実験的に初めて示したものである。

樹状細胞と樹状細胞に起因する免疫応答に対してハロペリドールがいかに関与するかに関してはなんらかの知見が極めて少なく、さらにその作用メカニズムにいたっては皆無である。ハロペリドールが個体レベルでの免疫応答に影響するのかが明らかにし、さらに他の鎮静薬と異なったメカニズムであるレドックス平衡を介して作用することに着目して解明することを目標とする

3. 研究の方法

1. ハロペリドールの樹状細胞に対する影響

1-1. マウスの骨髄細胞を GM-CSF の存在下に培養して未熟な骨髄由来樹状細胞を誘導する。誘導した未熟樹状細胞に対して LPS を作用させると成熟分化する。成熟分化によって樹状細胞上の CD80, CD86 といった副刺激分子の発現が上昇し、TH1 を誘導するサイトカインであるインターロイキン 12(IL-12)の発現が上昇する。この成熟過程にハロペリドールを並存させておいて、樹状細胞の成熟分化による形質変化への影響を解析する。副刺激分子の発現に関してはフローサイトメトリーでサイトカインの産生に関しては ELISA で評価を行う。

1-2. ハロペリドールによる成熟分化への影響が細胞レベルでの免疫応答にどう影響するのかを評価する。この目的で mixed cell culture 法を行う。ハプロタイプでアロの組み合わせの樹状細胞とリンパ球を混合して培養する。リンパ球は増殖刺激をうけさらに Th1 への分化が促進される。

ハロペリドールの存在化と非存在下に成熟分化させた樹状細胞とリンパ球を混合培養する。リンパ球の増殖を Alamar blue を用いた細胞増殖アッセイによって評価し、培養上清に分泌される IL-12 を ELISA 法にて定量する

1-3 次にハロペリドールの樹状細胞に対する影響が動物個体レベルでの免疫応答にどのように影響するのかを解析する。この目的で接触過敏症モデルを用いる。接触過敏症モ

デルは人の接触アレルギーの動物実験モデルである。原型はハプテン(dinitro-fluorobenzene:DNFB)をマウスの腹部に塗布し(感作相)その5日後に同じDNFBをマウス耳介に塗布すると耳介は腫脹する(誘発相)という実験系である。

この感作の部分を DNFB と抗原性の同じ dinitro-fluorobenzene sulfonic acid (DNBS)を樹状細胞に作用させたものを動物に腹腔内投与することに変える。誘発相は元の接触過敏症モデルと同様に行うこととする。

動物に投与する樹状細胞をハロペリドールの存在下と非存在下に分化成熟させたものを作成しておく

マウスの耳介への DNFB の塗布によって誘発された耳介の腫脹はマイクロメーターで正確に測定して比較検討する

1-4 樹状細胞に対するハロペリドールの作用機序の追求

ハロペリドールは薬理的にはドーパミン受容体に作用して主たる中枢神経作用を発揮すると考えられている。ドーパミン受容体は D1 様受容体と D2 様受容体の 2 種類に分類される。これら 2 種類の受容体に対するリガンドを用いてどちらの受容体への関与が考えられるのかを解析する。D1 様受容体リガンド、D2 様受容体リガンドとして各々 SCH23390 と L750667 を用いる。

未熟樹状細胞から成熟樹状細胞への分化過程でハロペリドールに変えてこれらのリガンドを並存させておきどちらのリガンドがハロペリドールの作用を再現できるのかを解析する

2. ハロペリドールの免疫細胞への作用機序の解明

2-1. マウスのマクロファージ細胞株である RAW264 を対象に用いる。RAW264 を LPS(リポ多糖)で刺激すると CD80, CD86 といった副刺激分子の発現が上昇する。さらにインターロイキン 6, 12(IL-6, IL-12)といった炎症性サイトカインの発現分泌も亢進する。

まずハロペリドールを添加する。ハロペリドールによって副刺激分子の発現の上昇が抑制されるのかを評価する。また IL-6, IL-12 といった炎症性サイトカインの発現増加が抑制されるのかを解析する。

2-2. 次に RAW264 の LPS の活性化過程における細胞内シグナル伝達で重要な役割を果たしている NF- κ B の活性化の状況の評価する。この目的で NF- κ B のプロモーター活性を測定する。NF- κ B のプロモーターに発色色素の酵素をつけた遺伝子を RAW264 にトランスフェクションし発現するようにしたレポーター細胞をこの解析に用いる(RAW264-blue)。LPS を作用させると NF- κ B のプロモーター酵素が転写されるため発色基質をくわえると

発色しプロモーターの活性化が検出されるという検出系である。

まずこの系で RAW264 の活性化がおこるときに NF- κ B の活性化のおこることを確認する。次にハロペリドールによる RAW264 の活性化の抑制過程にハロペリドールによる NF- κ B の活性化への影響がどのように関係しているのかを解析する。

2-3. ハロペリドールは薬理的にはドーパミン受容体に作用して主たる中枢神経作用を発揮すると考えられている。ドーパミン受容体は D1 様受容体と D2 様受容体の 2 種類に分類される。これら 2 種類の受容体に対するリガンドを用いてどちらの受容体への関与が考えられるのかを解析する。D1 様受容体リガンド、D2 様受容体リガンドとして各々 SCH23390 と L750667 を用いる。

これらを LPS の活性化過程にくわえて副刺激分子の発現上昇、炎症性サイトカイン(IL-6, IL-12)の発現上昇、の変化を解析する

4. 研究成果

(1-1) ハロペリドールの樹状細胞への作用
未熟樹状細胞を LPS によって分化させると副刺激分子である CD80, CD86 の発現が上昇し、Th1 を誘導するサイトカインである IL-12p40 の産生が上昇する。この過程にハロペリドールが存在していると CD80, CD86 とも発現が増強した。また同様に IL-12 の分泌も促進された。またこれらの変化は容量依存性であった。これらの結果はハロペリドールが樹状細胞の成熟分化過程を抑制し、リンパ球の Th1 への分化を抑制する環境を作る可能性がある結果である。

(1-2) 次にこのような樹状細胞の性質の変化がリンパ球の活性化と分化過程への影響を調べた。方法でのべたように Mixed cell culture 法によってこれを評価した。Alamar Blue による増殖アッセイではハロペリドールの存在はリンパ球の増殖を抑制した。またリンパ球からのサイトカイン産生は Th1 への分化のマーカーである IFN- γ の産生も抑制された。これはハロペリドールによって樹状細胞の成熟分化が促進されて Th1 にリンパ球を誘導する活性が抑制されたと考えられることができる。

(1-3) ハロペリドールの樹状細胞への影響が動物個体レベルでの免疫応答に与える影響を接触過敏症モデルで評価した。樹状細胞にハプテンである DNFB を取り込ませて通常マウスに移入して免疫後 5 日に耳介にハプテンを塗布すると耳介は腫脹した。次にハロペリドールの存在下で分化させた樹状細胞は接触過敏症反応を亢進させた。接触型過敏症モデルは典型的な Th1 型の免疫応答により引き起こされる疾患モデルであることが知られている。よってハロペリドールで処理し

た樹状細胞で接触過敏症が亢進したのは樹状細胞がハロペリドールにより Th 1 を誘導しやすい状態に分化したからだと考えられた。

これは(1-2)で示した in vitro の実験結果でハロペリドールの存在下で成熟した樹状細胞が T 細胞を Th 1 型への分化を抑制した実験結果と一致している。これらからハロペリドールは樹状細胞の細胞レベルのみならず、個体レベルの免疫応答に影響を与えることを強く示すデータが得られたと考えている。

(1-4) ハロペリドールは薬理学的にはドーパミン受容体に作用して主たる中枢神経作用を発揮すると考えられている。ドーパミン受容体は D1 様受容体と D2 様受容体の 2 種類に分類される。これら 2 種類の受容体に対するリガンドを用いてどちらの受容体への関与が考えられるのかを解析する。

未熟樹状細胞から成熟樹状細胞への分化過程でハロペリドールに変えて D2 様受容体リガンドを並存させておくとハロペリドールと同様の作用の発現を再現することができた。一方で D1 様受容体を存在させても変化は認められなかった。

2.

2-1. RAW264 を LPS で刺激すると CD80, CD86 といった副刺激分子の発現は増加した。LPS に対して濃度依存性の増加を観察できた。さらに LPS で刺激すると培養液中の IL-6, IL-12 の発現も上昇した。

この系にハロペリドールを添加すると CD80, CD86 の発現増加は抑制された。さらに IL-6, IL-12 の発現も抑制された

またハロペリドールによって引き起こされる RAW264 に対する副刺激分子と炎症性サイトカインの発現抑制はどちらも容量依存性を示していた。

これらの事実からハロペリドールはマクロファージにおける LPS の活性化を抑制することがわかった。

B. 先ず RAW264 の LPS による活性化の過程を NF- κ B プロモーター活性のリポーター細胞を用いて NF- κ B の活性化の評価をおこなった。LPS で刺激した RAW264 細胞は上述のように副刺激分子と炎症性サイトカインの発現上昇をおこなっていた。同時に測定された NF- κ B のプロモーター活性は活性化がなされていた。これは今までの知見と同じ結果である。

この活性化過程にハロペリドールを作用させると NF- κ B のプロモーター活性の活性は低下していた

ハロペリドールのマクロファージの活性化抑制は NF- κ B の活性化の抑制を介していることが示唆された。

(2-1) D1 様受容体リガンド、D2 様受容体リ

ガンドのいずれかを RAW264 の活性化過程に併存させた。D1 様受容体リガンドの存在下では RAW264 の活性化は影響されず表面分子、IL-6 の産生とも変化を認めなかった。一方で D2 様受容体リガンドを併存させておくとミダゾラムの時と同様に CD80 の発現は低下し、IL-6 の分泌も低下した。この結果は、ミダゾラムは中枢神経系における中心的な作用分子である D1 様受容体ではなく、D2 様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る。

さらに NF- κ B の活性化に関しても同じ実験系で検討した。こちらも D2 様受容体リガンドが NF- κ B の活性化抑制を示しており、D1 様受容体リガンドでは作用を認めなかった。

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)

1. Haloperidol suppresses murine dendritic cell maturation and priming of the T helper 1-type immune response. Matsumoto A, Ohta N, Goto Y, Kashiwa Y, Yamamoto S, Fujino Y. Anesth Analg. 2015 ;120:895-902.

2. Haloperidol Suppresses NF-kappaB to Inhibit Lipopolysaccharide-Induced Pro-Inflammatory Response in RAW 264 Cells. Yamamoto S, Ohta N, Matsumoto A, Horiguchi Y, Koide M, Fujino Y. Med Sci Monit. 2016 4;22:367-72.

[学会発表](計 3 件)

1. ミダゾラムは TSP0 を介してマクロファージに作用する
日本麻酔科学会 第 6 2 回学術集会
2015 年 5 月 29 日
大田典之

2. 麻酔科医がコマンダーとして活躍するために
日本麻酔科学会 第 6 2 回学術集会
2015 年 5 月 30 日
大田典之

3. n3/n6 不飽和脂肪酸を主成分とする脂肪製剤の樹状細胞を介する免疫応答に与える影響
第 41 回日本集中治療医学会学術集会
2014 年 2 月 27 日
大田典之

6. 研究組織

(1)研究代表者

柏 庸三 (KASHIWA YOZO)
大阪大学大学院 医学系研究科
助教
研究者番号 : 90647471

(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
助教
研究者番号 : 20276710