

サイクロスポリンD (CSD)の脱顆粒抑制作用

— 他の免疫抑制剤／抗炎症剤との比較 —

浜崎雄平 辻功介 宮崎倫子 人見知洋
早崎理香 在津正文 山本修一 室英理子
小林育子 市丸智浩 宮崎澄雄
佐賀医科大学 小児科

key words : サイクロスポリンD (cyclosporin D, CSD), サイクロスポリンA (cyclosporin A, CSA), 脱顆粒, 免疫抑制剤, 抗炎症剤

要 旨

サイクロスポリンD (CSD)およびCSHが脱顆粒抑制剤として臨床的に使用できる可能性があるかを検討する目的で、これらの薬物の脱顆粒抑制作用を、ラットの肥満細胞腫RBL-2H3細胞をもちいて検討し、臨床的に使用されている免疫抑制剤CSAと比較した。脱顆粒の指標として、IgE レセプターを介した即時型反応により上清中に放出される細胞内酵素のひとつであるbeta-hexosaminidaseの酵素活性を測定した。CSDおよびCSAは濃度依存性に脱顆粒を抑制したが、CSHはまったく抑制作用を示さなかった。CSDのIC₅₀は0.27 μ g/mlであり、CSAの0.15 μ g/mlに比較して脱顆粒抑制作用がやや弱かった。その他に検討をくわえた免疫抑制剤のうちrapamycinは抑制作用を認めなかったが、FK506は強力な阻害作用を示し、そのIC₅₀は0.0064 μ g/mlであった。抗炎症剤であるDSCGおよびdexamethasoneは作用を認めなかった。サイクロスポリンのT細胞機能抑制による免疫抑制作用と、脱顆粒阻害作用とは必ずしもその程度が一致しているわけではなく、その作用機序を明らかにすることにより、アレルギー疾患に有用な薬物の開発につながる可能性がある。

はじめに

サイクロスポリンD (CSD)はサイクロスポリンファミリーのひとつで、免疫抑制剤CSAの類縁物質であるが、CSAに比べてその免疫抑制作用は弱い¹⁾。CSAはT-リンパ球に作用し、interleukin(IL)-2産生を抑制することによりT-リンパ球機能を阻害し、強い免疫抑制作用を示す。CSAは主に移植医療の分野で、臓器移植による拒絶反応を抑制する目的で使用されており、Th₂サイトカインの活性化が病態に関連しているアトピー性皮膚炎や気管支喘息などのアレルギー疾患においても

著明な効果を示すことが報告されている²⁻⁵⁾。また、CSAは肥満細胞や、好塩基球からの即時型反応によるメディエーター放出反応も強力に抑制し、抗アレルギー作用を示すことが知られている^{6,7)}。この即時型反応によるメディエーター放出反応抑制の機序は解明されていないが、サイトカイン産生を抑制することによる免疫抑制作用とは別の機序と考えられる⁸⁾。強力なメディエーター放出抑制作用を有するCSAであるが、その免疫抑制作用が非常に強力であるため、基本的には予後良好な喘息やアトピー性皮膚炎には使用しにくい。一方、CSDやCSHは免疫抑制作用は弱く、免疫抑制剤としては不適であるが^{9,10)}、脱顆粒抑制作用についての報告は少なく検討の余地がある。CSDおよびCSHの薬剤の脱顆粒抑制作用を臨床的に使用されているCSAと比較検討した。また異なったレセプターを介して作用する免疫抑制剤FK506およびRapamycinとも比較した。

Abbreviation : **b-HEX** ; beta-hexosaminidase, **CN** ; calcineurin, **CS** ; cyclosporin, **DMEM** ; Dulbecco's modified Eagle's medium, **DSCG** ; disodium chromoglycate, **FKBP** ; FK-binding protein, **FMLP** ; n-formyl-Met-Leu-Phe, **IL** ; interleukin, **PPIase** ; peptidylprolyl isomerase, **RBL** ; Rat basophilic leukemia

方 法

試薬: Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM (Gibco Oriental, Tokyo), p-nitrophenyl N-acetyl-beta-D-glucosaminide, A23187, dexamethasone 21-acetate (Sigma, USA), ラットミエローマ IgE (Zymed, USA). ヒツジ抗rat IgE抗血清 (Bethyl, USA)はそれぞれカッコ内より購入, CSA, CSD, CSHはサンド薬品 (現ノバルティスファーマー) より, FK506, disodium chromoglycate (DSCG)は藤沢薬品より, RapamycinはWYETH-AYERSTより提供をうけた. その他の試薬は市販の特級品を使用した.

細胞培養: ラット好塩基性白血病細胞(RBL-2H3)は penicillin G (1000 U/ml), streptomycin (1000 μ g/ml), amphotericin B (0.25 μ g/ml) および10% 牛胎児血清を加えたDMEM中で37°C 5% CO₂ の条件下に培養した. 培養したRBL-2H3を回収し, 24-穴培養皿に10⁶ cells/mlになるように分配し, ラットミエローマ IgE (0.1 μ l) を各皿に加えて1時間培養したのち細胞を洗浄し, 新鮮なDMEMをもちいて10⁶ cells/0.3mlとなるようにresuspensionした. 各種の薬剤を, 検討する濃度になるように加えて10分後にヒツジ抗rat IgE抗血清を各2 μ lづつ加えて37°C で30分間刺激したあと上清を採取し, 検体として-30°C で測定時まで保存した. (検討した薬剤はDSCGをのぞいてエタノールに溶解した. エタノールは最終濃度0.1%以下になるように設定した. DSCGはバッファー溶解液を使用した.) また, CSDについては, 細胞をA23187で刺激した時の脱顆粒抑制作用についても検討を加えた.

beta-hexosaminidase (b-HEX) 活性の測定: 検体 (細胞培養上清) 50 μ lを試験管にとり, 基質溶液(p-nitrophenyl-n-acetyl-beta-D-glucosaminide (100 mg) を135 mlの蒸留水に溶解し, 90 mlのクエン酸バッファー (0.2MのNa₂PO₄と0.4Mのクエン酸の混合液をpH 4.5に調整)と混合したもの)400 μ lを加えて37°Cで30分間反応させた後, 停止液 (0.2M glycineをNaOHでpH10.7になるように調整した液) 1.5mlを加えて酵素反応を停止させた. 反応産物の吸光度を410 nmの波長で分光光度計(Shimadzu R-5000, Tokyo, Japan)をもちいて測定し, 上清中のb-HEX活性を測定した.

統計解析: 結果は平均値±標準誤差で表した. 有意差の検定はone way analysis of variancesで解析した. 有意差を認めた場合, 群間の有意差はScheffe's multiple comparison testを用いて検定した. p 値<0.05を有意差

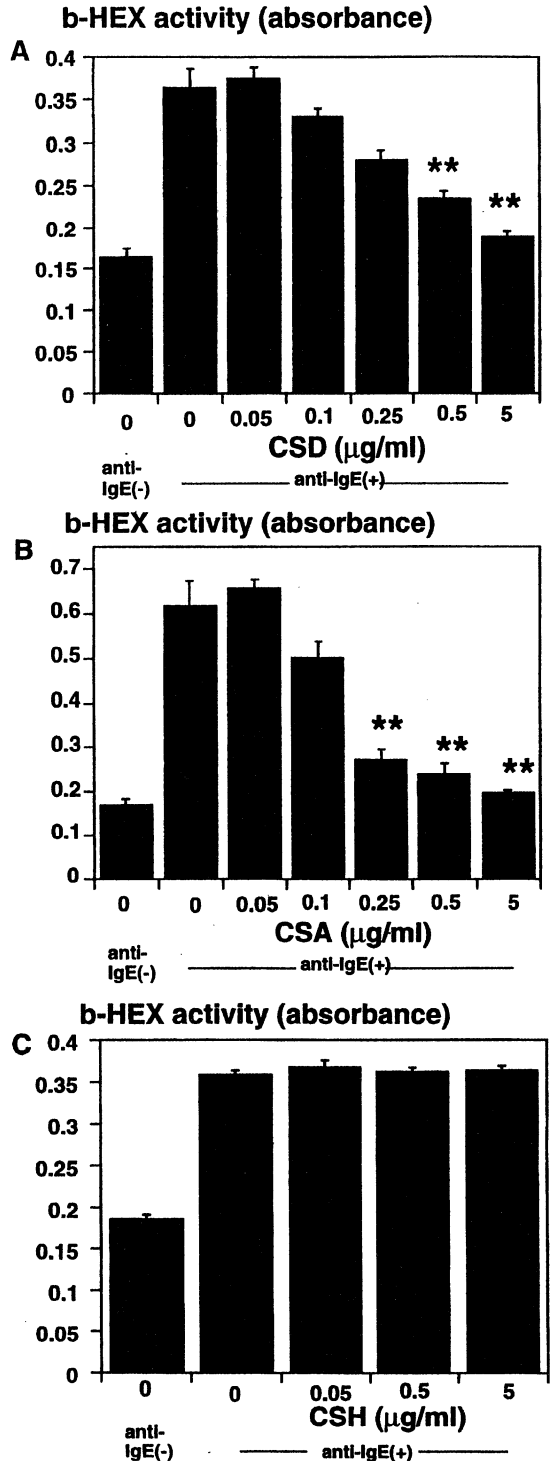


図1. IgEを介した刺激によるbeta-hexosaminidase (b-HEX) の放出反応に対するサイクロスポリンファミリーの作用 (A) CSD (B) CSA (C) CSH

ありとした。

結 果

ラットIgEで受動感作したRBL-2H3細胞を抗ラットIgEヒツジ血清で刺激すると、図1Aに示すように410 nmの吸光度で測定したb-HEX活性は 0.163 ± 0.011 から 0.364 ± 0.021 へと有意に上昇し、細胞内に貯蔵されていたb-HEXは即時型反応による脱顆粒反応に伴い上清中に放出されることが示された。CSDによりb-HEX活性は $0.5 \mu\text{g/ml}$ の濃度で 0.234 ± 0.005 (65%抑制)、 $5 \mu\text{g/ml}$ で 0.188 ± 0.006 (88%抑制)と用量依存性に有意に抑制された(図1A)。この抑制作用を強力な免疫抑制剤であるCSAと比較するために同じプロトコルでCSAの作用を検討した(図1B)。抗ラットIgEヒツジ血清刺激でb-HEX活性はコントロール値 0.168 ± 0.017 から 0.616 ± 0.056 と有意に上昇した。CSAは用量依存性にb-HEXの放出を抑制し、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ で 0.240 ± 0.024 (84%抑制)、 $5 \mu\text{g/ml}$ で 0.196 ± 0.008 (94%抑制)と有意の抑制をみとめた。CSAの誘導体で免疫抑制作用をもたないCSHについての検討では、図1Cに示すように抑

制効果をまったく認めなかった。用量反応曲線より求めたCSDおよびCSAの50%抑制濃度はそれぞれ $0.27 \mu\text{g}$ および $0.15 \mu\text{g/ml}$ であった。CSDについては細胞をA23187で刺激したときのb-HEX放出に対する作用についても検討を加えた。図2に示すように、A23187刺激によりコントロール値 0.135 ± 0.006 から 0.560 ± 0.043 へと有意に上昇し、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ の濃度で 0.514 ± 0.065 (11%抑制)、 $1 \mu\text{g/ml}$ で 0.312 ± 0.061 (58%抑制)、 $5 \mu\text{g/ml}$ で 0.238 ± 0.011 (76%抑制)と用量依存性の抑制を認めた。50%抑制濃度は $0.8 \mu\text{g/ml}$ であった。つぎに細胞内でのレセプターは異なるものの、類似した機序で免疫抑制剤として作用すると考えられているFK506およびrapamycinとについてもIgEを介した刺激での抑制作用を検討した(図3A,B)。FK506は 0.001 から $0.1 \mu\text{g/ml}$ の範囲で用量依存性にb-HEXの放出を強力に抑制した。一方rapamycinは 10^{-7} - 10^{-5}M の濃度で有意の抑制作用を認めなかった。抗炎症剤であるdexamethasoneとDSCGについても同様に検討を加えたが、図3C, Dに示すようにいずれも有意の抑制作用を認めなかった。

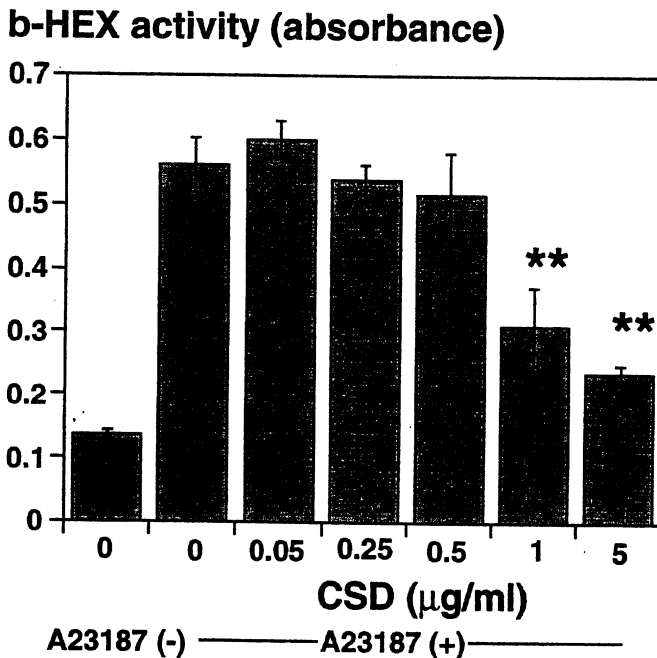


図2. A23187刺激によるbeta-hexosaminidase (b-HEX)の放出反応に対するサイクロスポリンD (CSD)の作用

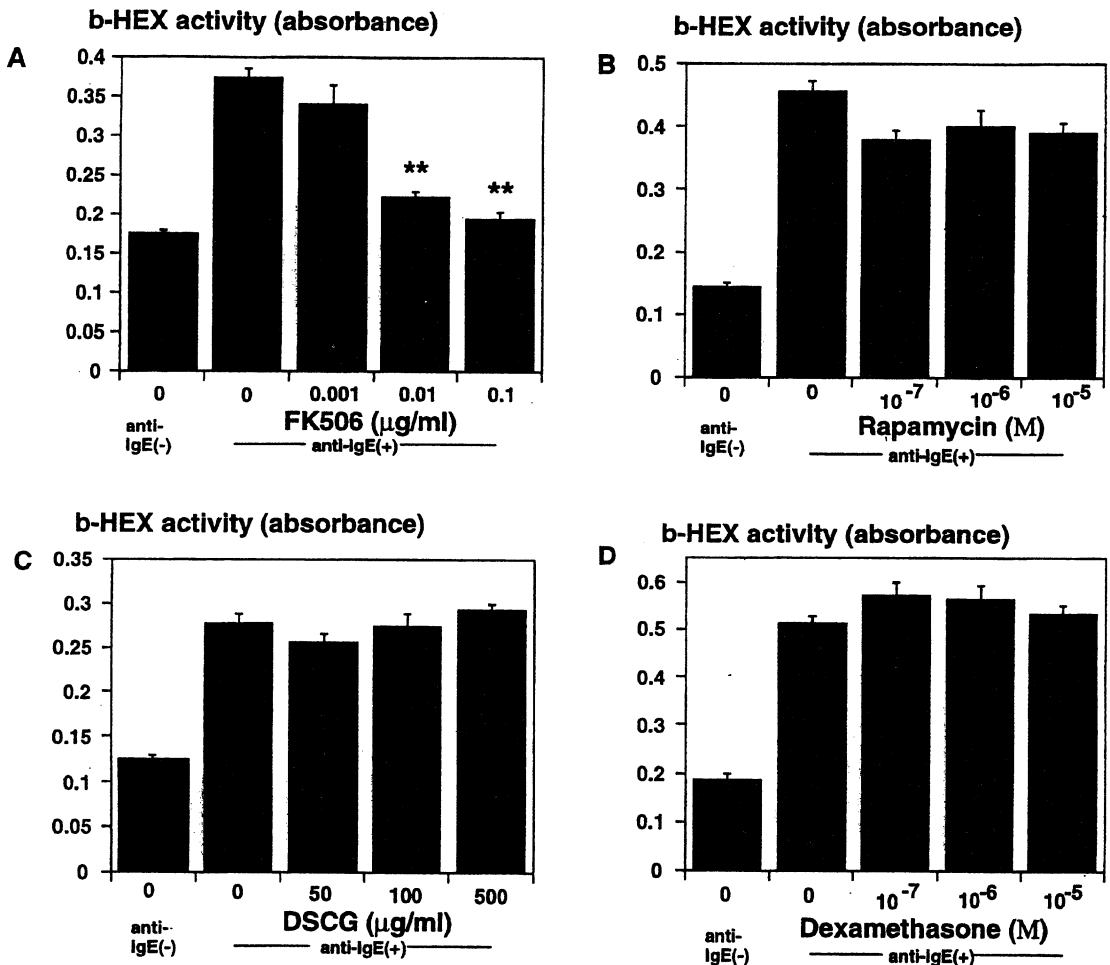


図3. IgEを介した刺激によるbeta-hexosaminidase (b-HEX) の放出反応に対する免疫抑制剤および抗炎症剤の作用

考 察

サイクロスポリンファミリーのなかで移植時の免疫抑制剤として広く使用されているCSAはその作用機序が詳細に研究されている。CSAはT-リンパ球の細胞膜を通過して、細胞内に存在する蛋白質の折り畳みを促進する酵素peptidylprolyl isomerase (PPIase)のひとつであるシクロフィリンと複合体を形成する。CSAとの結合により、シクロフィリンのPPIase活性は阻害される^{11,12)}。過去においてPPIase活性の阻害がサイトカイン産生の抑制に関与していると考えられた時期もあったが現在では否定されている。CSAとシクロフィリンの複合体は更に脱リン酸化酵素のひとつカルシ

ニューリン (CN)と結合し複合体を形成する¹³⁾。T-リンパ球の活性化に伴いIL-2の産生が亢進するが、そのためには細胞質内に存在する転写因子のひとつであるNFATが細胞質内のCNにより脱リン酸化されて核内に移動し、DNA上に存在するIL-2プロモーター領域のNFAT応答配列に結合し、その結果IL-2 mRNAの転写促進がおこるという機序が必要である。通常CNはカルモジュリンにより活性化されるが、CSAとシクロフィリン複合体がCNと結合するとCNの脱リン酸化酵素としての機能が阻害され、IL-2遺伝子の転写が阻害される。これが移植医療で使用されているCSAの免疫抑制剤としての作用機序である¹⁴⁻¹⁶⁾。CSDも同様の機序により弱い免疫抑制作用を示すものと考えられる。CSAは

そらく類似した機序によりTh₂リンパ球が産生するその他の炎症性サイトカインの産生を抑制し、アレルギー性炎症を抑制することによってアトピーや喘息に有効であると考えられている⁵⁾。CSAは肥満細胞や好塩基球にも作用し、IgEを介した即時型反応によるメディエーターの遊離抑制作用も有する^{6,7,17)}。すなわち、Th₂リンパ球をターゲットとした炎症性サイトカインの合成抑制作用のみならず、肥満細胞や好塩基球をターゲットとしたメディエーターの遊離抑制作用によってもアレルギー疾患の治療薬としての可能性はあると考えられる⁸⁾。実際にステロイド治療に抵抗するアトピー性皮膚炎や難治性気管支喘息で著効を示したとの報告が見られる²⁻⁵⁾。しかしながらCSAは、その強力な免疫抑制作用による易感染、腎臓や神経細胞をはじめとする臓器に対する毒性の強さのため、一般の臨床ではアレルギー疾患に対する第一選択薬とはなりがたい。メディエーターの遊離抑制作用はCSA/CSDを加えたのち数分内にその効果が出現することより、遺伝子-蛋白合成を介した上記免疫抑制の機序とは異なったものであることが予想される⁸⁾。まったくサイトカインの合成阻害作用をもたないCSHが多核白血球においてはFMLP刺激によるsuper oxideの産生を強力に抑制し、その作用がCSAよりもはるかに強力であるとの報告や¹⁰⁾、phorbolによりひきおこされたマウスの皮膚炎がCSHにより強く抑制されとの報告はサイクロスポリンファミリーに属する薬物の別の作用機序の存在を示唆するものと考えられる⁹⁾。すなわち、免疫抑制作用の強さとメディエーター遊離抑制は必ずしも平行しない可能性がある。我々はメディエーターの遊離抑制作用に注目し、より免疫抑制作用の弱い誘導体CSDおよび免疫抑制作用を認めない誘導体CSHについてpreformed mediatorの脱顆粒の指標としてIgEを介した刺激によるb-HEXの細胞からの放出を測定した。CSHは脱顆粒をまったく抑制しなかったが、弱い免疫抑制作用を有するCSDは有意の脱顆粒阻害作用を示した。しかし、残念ながらその作用はCSAよりも50%抑制濃度で比較すると弱く、CSHがシクロフィリンとの結合力が極めて弱いことを考慮すると、脱顆粒の抑制は少なくともシクロフィリンとの結合性とは関連していることが考えられる。FK506はCSAに比べても更に強力な脱顆粒抑制作用を示した。rapamycinには脱顆粒の抑制作用は認められなかった。rapamycinとFK506はシクロフィリンとは別種のPPIaseであるFKBP12蛋白と結合して複合体を形成しPPIaseの機能を阻害する。

FK506-FKBP12複合体はCSAとシクロフィリンの複合体と同じようにCNに結合しCNの脱リン酸酵素としての機能を抑制し転写因子NFATの核内への移行を阻害する^{18,19)}。一方rapamycin-FKBP12複合体はさらにrapamycin会合蛋白と結合しFK506とは異なった機序により免疫抑制作用を示すと考えられている^{18,19)}。免疫抑制剤のうちrapamycinが脱顆粒を抑制しないということはその機序にCNが深く関与していることを示す。すなわち、CSDの脱顆粒抑制作用はシクロフィリンの結合性と関連しているが、シクロフィリンのPPIaseとしての機能を阻害するためではなくCNとの結合が非常に重要であることがわかる。ここで重要なことは免疫抑制作用発現にはNFATを介したサイトカインmRNAの合成それにひきつづく蛋白の合成阻害が必要であるため、効果発現まで数時間必要であるのに対し、脱顆粒抑制はただちに効果が発現する点である。したがってシクロスポリン-シクロフィリン複合体がCNと結合後に生ずる脱顆粒阻害と本来の免疫抑制の機序はあきらかに異なっていると思われる。本実験で示したようにCSDは脱顆粒阻害作用についてもCSAよりやや弱い。したがってCSDには過剰な免疫抑制作用がないという利点はあるが、脱顆粒抑制剤としての臨床応用が可能かどうか疑問は残る。しかし、前述したように、最終的なエフェクターのレベルでは免疫抑制作用と脱顆粒抑制作用は作用機序が異なっている可能性があるため、この種の薬剤の詳細な作用機序を解明することは、より効果的な喘息治療薬の開発につながっていく可能性があると考えられる。

今回b-HEXの放出反応を測定することにより、IgEレセプターを介した脱顆粒に対する各種薬剤の抑制作用を検討した。問題点として、各セットの実験においてb-HEXの基本的な放出量が異なっていることがあげられる。個々の薬物の作用の検討には問題はないと考えられるが、薬物間での比較の解釈には注意が必要である。今後、培養細胞以外の細胞においても検討する必要があると考えられる。

文 献

- 1) Aadege, N., Pham-Huy, C., Rucay, P., Righenzi, S., Halle-pannenko, O., Claude, J. R., Bismuth, H. and Duc, H.T.: Invitro and in vivo comparative studies on immunosuppressive properties of cyclosporin A, C, D and metabolites M1, M17 and M21. Immuno-

- pharmacol. immuno-toxicol. 15, 163-177, 1993.
- 2) Nizankowska, E., Soja, J., Pinis, G., Bochenek, G., Sradek, K., Domagala, B., Pajak, A. and Szczeklik, A.: Treatment of steroid-dependent bronchial asthma with cyclosporin. *Eur. Respir. J.* 8, 1091-1099, 1995.
 - 3) Alexander, A.G., Barnes, N.C., and Key, A. B.: Trial of cyclosporin in corticosteroid-dependent chronic severe asthma. *Lancet* 339, 324-328, 1992.
 - 4) Sowden, J.M., Berth-Jones, J., Ross, J.S., Motley, R.J., Marks, R., Finlay, A.Y., Salek, M.S., Graham-Brown, R.A.C., Allen, B.R. and Camp, R.D.R.: Double-blind, uncontrolled, crossover study of cyclosporin in adults with severe refractory atopic dermatitis. *Lancet* 338, 173-140, 1991.
 - 5) Ishii, E., Yamamoto, S., Sakai, R., Hamasaki, Y. and Miyazaki, S.: Production of interleukin-5 and suppressive effect of cyclosporin A in childhood severe atopic dermatitis. *J. Pediatr.* 128, 152-155, 1996.
 - 6) Cirillo, R., Triggiani, M., Siri, L., Ciccarelli, A., Pettit, G.R., Condorelli, M. and Marone, G.: Cyclosporin A rapidly inhibits mediator release from human basophils presumably by interacting with cyclophilin. *J. Immunol.* 144, 3891-3897, 1990.
 - 7) Hultsh, T., Rodrigues, J.L., Kaliner, M.A., and Hohman, R.J.: Cyclosporin A inhibits degranulation of rat basophilic leukemia cells and human basophils. *J. Immunol.* 144, 2659-2664, 1990.
 - 8) Hamasaki, Y., Matsumoto, I., Kobayashi, M., Zaitu, E., Muro, T., Ichimaru, T. and Miyazaki, S.: Cyclosporin A inhibits leukotriene production in intact RBL-1 cells without inhibiting leukotriene biosynthetic enzymes. *Prostaglandin Leukotriene Essen. Fatty Acid* 52: 365-371, 1995.
 - 9) Gschwendt, M., Kittstein, W. and Marks, F.: The weak immunosuppressant cyclosporin D as well as the immunologically inactive cyclosporin D as well as inhibitors in vivo of phorbol ester TPA-induced biological effects in mouse skin and of Ca^{2+} /calmodulin dependent EF-2 phosphorylation in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 150, 545-551, 1988.
 - 10) Wenzel-Seifert, K., Grunbaum, L. and Seifert, R.: Differential inhibition of human neutrophil activation by cyclosporin A, D and H. cyclosporin H is a potent and effective inhibitor of formyl peptide-induced superoxide formation. *J. Immunol.* 147, 1940-1946, 1991.
 - 11) Handschumacher, R.E., Harding, M.W., Rice, J., Drugge, R.J. and Speicher, D.W.: Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226, 544-547, 1984.
 - 12) Takahashi, N., Hayano, T. and Suzuki, M.: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* 337, 473-475, 1989.
 - 13) Liu, J., Farmer, Jr. J.D., Jane, W.S., Friedman, J., Weissman, I. and Schreiber, S.L.: Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66, 807-815, 1991.
 - 14) Flanagan, W.M., Corthesy, B., Bram, R.J. and Crabtree, G.: Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* 352, 803-807, 1991.
 - 15) O'keefe, S.J., Tamura, J., Kincaid, R.L., Tocci, M.J. and O'neil, E.A.: Fk506- and CSA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* 357, 692-694, 1992.
 - 16) Clipstone, N.A., and Crabtree, G.R.: Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 357, 695-697, 1992.
 - 17) Hultsch, T., Albers, M.W., Schreiber, S.L. and Hohman, R.J.: Immunophilin ligands demonstrate common features of signal transduction leading to exocytosis or transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6229-6233, 1991.
 - 18) Dumont, F.J., Struch, M.J., Koprak, S.L., Melino, M.R. and Sigal, N.H.: Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK506 and rapamycin. *J. Immunol.* 144, 251-258, 1990.
 - 19) Bierer, B.E., Mattila, P.S., Standaert, R.F., Herzenberg, L.A., Burakoff, S.J., Crabtree, G. and Schreiber, S.L.: Two distinct signal transduction pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 9231-9235, 1990.

INHIBITORY ACTION OF CYCLOSPORIN D (CSD) ON IgE-MEDIATED
DEGRANULATION IN RAT BASOPHILIC LEUKEMIA 2H3 CELLS;
COMPARISON WITH OTHER IMMUNOSUPPRESSANTS AND ANTI-ALLERGY DRUGS

Yuhei Hamasaki
Saga Medical School

In order to determine the possibility whether cyclosporin D (CSD) and CSA can be used for allergic disorders as an anti-degranulation drug, inhibitory effects of CSD and CSA on IgE-mediated degranulation in rat basophilic leukemia 2H3 cells were examined and compared with that of CSA. Degranulation was assessed by measuring the activity of beta-hexosaminidase released into culture medium after IgE receptor-mediated stimulation. Although CSD and CSA dose-dependently inhibited the degranulation, CSA showed no inhibitory effect. The IC₅₀ values of CSD and CSA were 0.27 μ g/ml and 0.15 μ g/ml, respectively. We also examined inhibitory effects of rapamycin and FK506, other class of immunosuppressive drugs, and anti-inflammatory drugs, dexamethasone and DSCG, on IgE-mediated degranulation. Rapamycin, DSCG and dexamethasone showed no inhibitory action. Among the tested substances, FK506 showed the most potent inhibitory action, IC₅₀ of which was 0.0064 μ g/ml. Immunosuppressive action of cyclosporins mediated by the inhibition of T-lymphocyte function is not completely correlated with other pharmacological effects including inhibition of degranulation. To clarify the precise inhibitory mechanisms of immunosuppressive substances might lead to exploration of more useful therapeutic drugs for allergic diseases.