



## Digoxin attenuates murine experimental colitis by downregulating Th17-related cytokines

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2017-06-06 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 谷, 伸也 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/3187">http://hdl.handle.net/10271/3187</a>

博士(医学) 谷 伸也

## 論文題目

Digoxin attenuates murine experimental colitis by downregulating Th17-related cytokines

(ジゴキシンは Th17 細胞に関連したサイトカインを抑制することにより、マウス実験腸炎を改善させる)

## 論文の内容の要旨

[はじめに]

炎症性腸疾患(IBD)の病態はこれまで Th1 細胞、Th2 細胞のバランスの破綻によって説明されてきたが、近年 Th17 細胞、regulatory T 細胞(Treg)といった新たな CD4T 細胞が発見され、病態に深く関与していると考えられている。Th17 細胞は IBD においても病態に深く関与していると考えられているが、IBD 領域での Th17 細胞の役割は明らかになっていない。

2011 年に、ジゴキシンが Th17 細胞の master regulator である ROR $\gamma$ t の活性を抑制することにより、多発性硬化症モデルマウスの神経障害を改善させることが報告された。今回我々はジゴキシンによる Th17 細胞抑制効果が実験腸炎マウスに対する影響を検討するとともに、Th17 細胞の IBD における役割、ROR $\gamma$ t の阻害が治療の選択肢になりえるか検討した。

[材料ならびに方法]

8 週齢、雌の BALB/c マウスの脾臓より CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD45RB<sup>hi</sup> (naïve CD4T 細胞)を Magnetic Activated Cell Separation (MACS)、フローサイトメトリを用いて分取し、そのうち  $2 \times 10^5$  個を同じく 8 週齢、雌の C.B-17/SCID(severe combined immunodeficiency) マウス(成熟 T, B 細胞欠損マウス)に腹腔内投与し腸炎を誘導した。

細胞移入後 3 日目よりジゴキシン群、vehicle 群に分け、ジゴキシン群は 5mg/kg/body を週 3 回腹腔内投与し、投与の度に体重を測定した。移入後 6 週から 8 週後に安楽死させ大腸を採取し、腸管壁肥厚、組織学的な腸炎の評価、粘膜固有層の CD4T 細胞(LP CD4T 細胞)のサブセット、大腸組織の逆転写ポリメラーゼ連鎖反応を行った。

本実験は浜松医科大学の動物実験委員会、組み換え DNA 実験委員会の承認を得て行った。

[結果]

vehicle 投与群と比べ、ジゴキシン投与群は有意に体重減少が抑制された。また、直腸の壁肥厚に関しても、vehicle 群と比べジゴキシン群は有意に改善し、組織学的にも大腸の炎症所見は改善し、粘膜固有層への T 細胞の浸潤は抑制されていた。

LP CD4T 細胞のサブセットをフローサイトメトリで検討したところ、IL-17A<sup>+</sup>CD4T 細胞(Th17 細胞)の比率はジゴキシン群で有意に減少した。IL-17F<sup>+</sup>CD4T 細胞は比率

が非常に小さいためか、同定困難であった。IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4T 細胞の比率には有意差を認めなかった。また、Foxp3<sup>+</sup>CD4T 細胞(Treg)の比率はジゴキシン投与群で有意に上昇していた。

大腸組織の逆転写ポリメラーゼ連鎖反応では、IL-17A の発現はジゴキシン投与群で有意に抑制され、IL-17F の発現も、有意差はないものの抑制される傾向にあった。また、Th17 細胞の表面マーカーである IL-23R の発現はジゴキシン群で有意に抑制されていた。その他のサイトカインにおいては、ジゴキシン投与により IFN- $\gamma$ の発現は有意に抑制され、IL-10 の発現は有意に亢進していた。TNF- $\alpha$ の発現には有意差を認めなかった。

#### [考察]

今回我々はジゴキシンの Th17 細胞抑制効果が、実験腸炎を改善させることを確認した。

大腸組織の逆転写ポリメラーゼ連鎖反応では、IL-17A の発現はジゴキシン投与により有意に抑制され、IL-17F の発現も有意差はつかなかったものの、抑制される傾向にあった。また、Th17 細胞の分化、維持に重要とされる IL-23R の発現も抑制されていた。

クローン病患者を対象とした臨床試験において、IL-17A 抗体療法は病状を改善できなかった。炎症性腸疾患においては IL-17A 単独の阻害ではなく、IL-17A、IL-17F 両方の阻害が腸炎抑制に重要とされており、本実験では両サイトカインが抑制されたことが腸炎改善に寄与したと考えられた。IL-23R も腸炎発症に重要であるとされており、こちらの阻害が腸炎を改善させた可能性も考えられた。ジゴキシンによる ROR $\gamma$ t の阻害はこのように Th17 細胞に関連したサイトカイン、表面マーカーを幅広く抑制することで、治療効果を発揮したのと考えられる。

また、ジゴキシン投与群において大腸粘膜の Treg 細胞の比率が上昇し、組織逆転写ポリメラーゼ連鎖反応でも IL-10 の発現が有意に亢進していた。Th17 細胞と Treg 細胞は抑制しあう関係であることが知られており、ジゴキシン投与群において 2 次的に Treg 細胞が亢進し、IL-10 を介して腸炎を改善させた可能性も示唆された。しかし、直接的な Treg 細胞の IL-10 産生は今回未確認であるため、今後検討を要する。

#### [結論]

ジゴキシンによる Th17 細胞抑制効果は実験腸炎を改善させ、ROR $\gamma$ t 阻害は治療の選択肢として有用である。ジゴキシンそのものは細胞毒性のため使用は困難な可能性があり、同一構造を有した類似化合物の合成などで治療薬への応用が期待される。