

氏名（本籍）	楠 夏子	（神奈川県）
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	乙第157号	
学位授与年月日	平成18年9月6日	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当者	
学位論文の題名	Research of apoptosis inducing effect on synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis by celecoxib, its derivative, and triptolide	
論文審査委員	主査	教授 吉田 正
	副査	教授 辻 勉
	副査	教授 鈴木 勉

論文内容の要旨

【背景と目的】関節リウマチ(Rheumatoid arthritis; RA)は、関節滑膜組織を主病変とする全身性炎症性疾患である。関節の病変が進行すると関節が破壊され、歩行困難などの身体的障害がもたらされることもある。RA の病因として、遺伝的要素や各種環境因子などが加わり、免疫異常を呈し、慢性炎症につながるものが考えられているが、いまだ完全には解明されておらず、これらの疾患を予防することは現在のところ不可能である。RA の関節病変に関わる病態形成機序の1つに滑膜組織の炎症があり、この炎症には急性の炎症形成そのものと、慢性の変化である滑膜組織の増殖およびそれに伴う血管新生とがある。滑膜組織は、関節が正常に働くために必要な組織であるが、RA ではこの滑膜組織が異常に増殖し、免疫担当細胞と共に、肉芽組織(パンプス)を形成している。パンプスの形成は、各種サイトカインなどの増殖性刺激と、プログラムされた細胞死であるアポトーシスの誘導といった増殖抑制刺激との間のアンバランスからもたらされると考えられている。活性化したパンプスが、インターロイキン(interleukin:IL)-1 β 、腫瘍壊死因子 α といった炎症性サイトカインなどの種々のメディエーターを介し、やがては骨・軟骨組織の破壊をもたらすとされる。そのため、物理的・生化学的に関節破壊の起点となる滑膜組織の異常な増殖を抑制することは、RA の根本的な治療において1つの有効な手段であろう。そこで本研究では、種々の RA 治療薬について、滑膜組織を形成する滑膜

繊維芽細胞(滑膜細胞)に対するアポトーシス誘導作用について検討することを目的とした。

【方法】滑膜細胞は、RA または OA 患者の人工関節置換術時に無菌的に採取された滑膜組織より分離した。本研究で使用した滑膜組織は、聖マリアンナ医科大学整形外科で採取され、同大学の倫理委員会において承認された実験計画にもとづき、患者の同意を得た上で実験に用いた。採取した滑膜組織を細切し、バクテリア由来コラゲナーゼを加えて 2 時間インキュベートした。その後細胞を 10 % (v/v) FBS 含有 RPMI1640 培地にて 2 回洗浄した。洗浄後、細胞は 10 % (v/v) FBS 含有 RPMI1640 培地に懸濁して培養用フラスコに移し、37 °C、5 % CO₂ の条件下で培養後、接着している細胞を滑膜細胞とした。実験には 1~2 回継代した細胞を使用した。U937 細胞は、北里大学医療衛生学部微生物学教室北里英郎教授より享受したものを使用した。滑膜細胞によるプロスタグランジン (prostaglandin; PG)E₂ 産生に対する被験薬の影響を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法にて検討した。すなわち、滑膜細胞は IL-1 β を含むまたは含まない培地で 24 時間培養し、その後被験薬の存在または非存在下、1 時間培養した。培養後、細胞培養液にアラキドン酸を加え、さらに 30 分間培養した。この細胞培養液について、市販のキットを用いて、ELISA 法にて PGE₂ 量を測定した。薬物未処置の細胞における PGE₂ 産生量に対する、被験薬処置の細胞における産生量の割合を求めた。細胞増殖能に対する被験薬の影響は、細胞増殖時に取り込まれる 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)量を測定することで検討した。細胞をプレートに播種し、定着後、被験薬を含むまたは含まない細胞培養液にて 24 時間培養した。その後、細胞培養液に BrdU を添加し、さらに 18 時間培養した。培養後、細胞をプレートに固定し、細胞内に取り込まれた BrdU 量の検出は市販のキットを用いて添付の操作手順に従って実施した。薬物未添加の細胞における BrdU 取り込み量に対する割合を求め、細胞増殖能に対する影響とした。細胞生存率は、WST-1 試薬を用いて、ミトコンドリアの NADH 依存脱水素酵素活性を測定することにより求めた。細胞をプレートに播種し、定着後、被験薬を含むまたは含まない細胞培養液にて 24 時間培養した。培養後 WST-1 試薬を添加し、それぞれの薬物濃度条件について、薬物未添加の細胞における酵素活性に対する割合を求めた。被験薬のアポトーシス誘導作用は、細胞の断片化 DNA 量を指標に検討した。細胞をプレートに播種し、定着後、被験薬を含むまたは含まない細胞培養液にて 24 時間培養し、細胞内の断片化した DNA を市販のキットを用いて添付の

操作手順に従って実施した。また、チャンバースライドにて同様に培養した細胞について、中性緩衝ホルマリン溶液にて固定後、Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling 法にてアポトーシス細胞を染色した。細胞の peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ 転写活性に対する被験薬の影響は、PPAR 応答配列を含むレポーター遺伝子プラスミドおよび PPAR γ 発現プラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイにより検討した。RA 滑膜細胞に市販の試薬を用いてこれらの遺伝子を導入後、被験薬の存在下で 18 時間培養した。培養後の細胞を溶解し、そのルシフェラーゼ活性を測定した。被験薬による caspase-3 活性化作用は、細胞抽出液を酵素源として、添加した caspase-3 の基質に対する反応の程度から測定した。アポトーシス関連タンパク質発現に対する被験薬の影響は、セミドライ法によるウエスタンブロットにて検討した。

【結果と考察】セレコキシブ、エトドラク、メロキシカム、ニメスリド、NS-398、およびロフェコキシブはいずれも、RA 滑膜細胞による PGE₂ 産生を抑制したが、これらの薬物のうち、セレコキシブのみが RA 滑膜細胞にアポトーシスを誘導し、その増殖を抑制した。このことから、セレコキシブによるアポトーシス誘導作用はシクロオキシゲナーゼ(cyclooxygenase; COX)-2 阻害作用に依存しない作用であることが示された。このアポトーシス誘導作用は caspase-3、-8、または-3/7 に対する阻害剤によって抑制され、caspase カスケードが関与していることが示された。セレコキシブには RA 滑膜細胞における PPAR γ 活性化作用が認められなかったため、セレコキシブによるアポトーシス誘導作用は、PPAR γ 転写活性にも依存していないことが示唆された。次にセレコキシブ誘導体である TT101、TT201、および SC-236 について検討したところ、いずれの薬物も RA 滑膜細胞にアポトーシスを誘導し、その増殖を抑制した。そのうち TT101 のアポトーシス誘導作用は非常に強く、セレコキシブよりも強力であった。しかし、TT101 による PGE₂ 産生抑制作用は、検討した薬物のうち最も弱く、50 %抑制濃度によって比較するとセレコキシブの 1/70 であった。このことから、TT101 によるアポトーシス誘導作用は、セレコキシブ同様、COX-2 阻害作用を介していないことが示唆された。TT101 処置によって、RA 滑膜細胞の caspase-3 は活性化され、その活性は caspase-8 または-9 に対する阻害剤の添加によって抑制された。また、TT101 による RA 滑膜細胞の DNA 断片化は、caspase-3、-8、または-9 に対する阻害剤を加える事で抑制された。よって、TT101 によるアポトーシス誘導には caspase カスケードが関

与していることが考えられるが、詳細については未だ不明である。TT101 によって、RA 滑膜細胞の Bcl-2 発現量および BID 分解に変化は認められなかった。あらかじめ細胞培養液にロフェコキシブを加え、COX-2 の影響を除いた条件において、TT101 のアポトーシス誘導能は減弱しなかったことから、TT101 と COX-2 分子そのものが、何らかのアポトーシスシグナルにはなっていないことが示された。しかし TT101 は OA 滑膜細胞および U937 細胞においても細胞死誘導作用を示したため、TT101 によるアポトーシス誘導作用を臨床応用するためには、何らかの製剤上の工夫が必要と考えられる。中国で使用されている生薬の雷公藤の成分である triptolide について、RA 滑膜細胞に対するアポトーシス誘導能を検討した。その結果、triptolide はアポトーシス誘導を介して、RA 滑膜細胞の増殖を抑制した。triptolide 処置によって、細胞の caspase-3 が活性化され、caspase-3、-8、または-9 に対する阻害剤の添加によって、DNA 断片化は抑制された。このことから、triptolide 誘導アポトーシスでも caspase カスケードの活性化が示された。triptolide は、細胞の PPAR γ 転写活性を誘導しなかった。また、雷公藤抽出物である GTW も、RA 滑膜細胞にアポトーシスを誘導した。このような triptolide の作用が示されたことで、雷公藤の抗リウマチ作用に新たなエビデンスが加わったと思われる。このように、種々の薬物による RA 滑膜細胞に対するアポトーシス誘導作用が示されたことは、これらの薬物の臨床応用や、この作用を目的とした新たな薬物の開発につながるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

関節リウマチ (RA:rheumatoid arthritis) は、関節滑膜組織を主病変とする全身性炎症性疾患である。RAでは微小血管の内皮細胞活性化が起こり、血管周囲に抗原提示能を有する樹状細胞が出現し好中球が浸潤する。滑膜組織(細胞)は、マクロファージ類似滑膜細胞と線維芽細胞細胞から成っているが、RAでは滑膜細胞が増殖・多層化し、滑膜下にはリンパ球 (CD4 陽性 T 細胞) 浸潤やリンパ濾胞が形成され、免疫グロブリン、リウマトイド因子や種々のサイトカインが産生される。インターロイキン (IL) -1や腫瘍壊死因子 (TNF- α) は、滑膜細胞の増殖や骨破壊を起こし、T細胞を活性化させる。IL-6は、B細胞の分化を促進し、リウマチ因子などの抗体産生を高める。また、免疫複合体を貪食した好中球からは、プロテオグリカンやカテプシン D などの蛋白分解酵素やスーパーオキシドや過酸化水素が放出され、滑膜や軟骨が傷害される。

滑膜細胞の増殖は、肉芽組織 (パンヌス) を形成し、骨・軟骨組織を破壊するが、この滑膜細胞の増殖やパンヌスの形成には、サイトカインなどによる増殖刺激とプログラムされた細胞死であるアポトーシスによる増殖抑制のアンバランスにより生じると考えられている。

一方、RA による関節痛に対しては、非ステロイド抗炎症薬 (NSAIDs) やステロイド薬が用いられ、免疫異常の是正のためには、特異的抗リウマチ作用を有する抗リウマチ薬もしくは免疫抑制薬、生物学的製剤が用いられる。RAの薬物治療の目標の一つは、異常な滑膜細胞 (特に滑膜線維芽細胞) の増殖を抑え、骨・軟骨破壊を抑制することにあるが、RAの骨破壊は発症後 1-2 年の早期に進行することから、RAの初期より使用されるリウマチ治療薬の関節破壊の抑制における役割が重要である。

本論文では、RA 治療薬である NSAIDs、特にシクロオキシゲナーゼ (COX) -2阻害薬であるセレコキシブおよび免疫調節作用を有する生薬雷公藤の成分トリプトライドの滑膜細胞の増殖に対する作用およびアポトーシス誘導作用およびその機序について検討した。

COX-2阻害作用を有するセレコキシブおよびその新規誘導体である TT101は、プロスタグランジン (PG) E2 産生を抑制するとともに、他の COX-2 阻害薬とは異なり滑膜細胞のアポトーシスを誘導し、増殖を抑制することを見出した。このアポトーシス誘導作用は、COX-2阻害による PGE2産生抑制作用や PPAR γ 転写活性作用に非依存적であり、カスパーゼカスケード (カスパーゼ-3、8、9) を

介したものであることが明らかとなった。さらに、抗アポトーシス蛋白であるBcl-2やBIDの発現や分解には変動がみられず、アポトーシスが誘導されることが示された。

また、中医学において関節炎などに使用されている雷公藤の成分であるトリプタリドにもセレコキシブと同様に滑膜細胞のアポトーシス誘導作用が認められた。トリプタリドのアポトーシス誘導作用においてもカスパーゼカスケードが関与していることが明らかとなり、抗リウマチ作用の少なくとも一部が滑膜細胞のアポトーシスを介していることが示された。

COX-2阻害薬であるセレコキシブのアポトーシス誘導作用の用量反応性やカスパーゼカスケードにおける詳細な分子機構が明らかでないことや滑膜細胞に対するアポトーシス誘導作用におけるRA疾患特異性や臓器特異性などが明らかではないこと、*in vivo*における細胞増殖抑制作用との相関、セレコキシブ誘導体の構造活性相関の検討など明らかにすべき点は残されているが、リウマチ薬の標的として滑膜細胞増殖の抑制、アポトーシス誘導を明らかにした点で斬新な研究であり、新たな治療薬の開発にも展開できるものと評価された。

また、本論文内容は、英文で正確に記載されている。

以上のように、本論文は関節リウマチに対する新規治療薬の滑膜増殖に対する抑制作用を細胞生物学的および生化学的手法を用いて解明し、その作用を評価する非臨床実験系の確立したことは、博士（薬学）論文として十分価値あるものであり、博士（薬学）に相応しいものと判断された。