

B. 研究方法

RA 患者の人工膝関節手術時に、informed consent を得て、滑膜組織を採取した。7 週齢の SCID マウス (C.B17/Icr-SCID.Jc1) をエーテル麻酔した後、背部に小切開を加え、皮下に約 1 g の活動性滑膜組織を移植し、SCID / RA モデルを作成した。移植 3 週間後に、同一 RA 患者の末梢血より、好中球を分離し、99m Tc で標識した。2 x 10⁷ 個の 99m Tc 標識患者好中球を、同一患者の滑膜を移植した SCID マウスの尾静脈より静脈投与し、滑膜移植部位への RI の集積を放射線測定装置を用いて経時的に測定し、定量化した。一定時間後にマウスを屠殺し、移植組織の重量、RI 集積量、病理組織学的解析などを行った。さらに、移植滑膜組織への好中球浸潤における IL-8 の役割を解明するために、好中球の静脈投与 2 時間前に、ヒト IL-8 への中和活性をもつモノクローナル抗体 (WS-4) 1 mg を腹腔内投与し、好中球浸潤に及ぼす IL-8 の影響を解析した。

C. 研究結果

RA 患者滑膜組織を皮下に移植した SCID / RA モデルでは、移植滑膜組織は生着し、皮下の小血管が移植滑膜組織内へと侵入していた。この SCID マウスに、99m Tc 標識患者好中球を静注すると、標識好中球はすみやかに全身に分布し、最終的には大部分が肝臓に集積した。しかし、99m Tc 標識患者好中球の一部は滑膜移植部位に有意に集積した。この滑膜移植部位への 99m Tc 標識患者好中球の集積は、好中球投与後すみやかに生じ、そのピークは約 5 時間後であった。一方、移植部位以外の皮膚や筋肉組織には標識好中球の集積は全く認められなかった。また、移植滑膜組織を経時的に採取し、病理組織学的

に解析したところ、好中球の静注後すみやかに、移植滑膜組織内の血管内に好中球がみられるようになり、投与 5 時間後には血管周囲への明らかな好中球浸潤が確認された。これらの結果から、SCID / RA モデルは、RA における好中球浸潤の解析に有用なモデルと考えられた。

この SCID / RA モデルに抗ヒト IL-8 中和抗体である WS-4、またはコントロール抗体各 1 mg を腹腔内に前投与し、移植滑膜部位への好中球浸潤に及ぼす抗 IL-8 抗体の影響を解析した。コントロール抗体の投与は、移植滑膜組織への RI 集積に何らの影響も与えなかった。しかし、3 例の RA 患者滑膜組織を用いた実験では、WS-4 の前投与は、移植滑膜組織への 99m Tc 標識患者好中球の浸潤を明らかに抑制し、その阻害率は約 37% であった (図 1)。本年度において、SCID/RA 好中球浸潤モデルを確立することが出来たため、今後、例数をさらに増やし、RA における好中球浸潤の機序を明らかにする予定である。

D. 考察

RA 患者滑膜組織を移植した SCID マウスに、同一患者の RI 標識好中球を静脈投与することにより、RA における好中球浸潤をマウスを用いて解析することが可能となった。この SCID / RA モデルは、好中球のみならず、T 細胞やマクロファージ、樹状細胞などの滑膜組織への浸潤機序を解析するためにも有用であると考えられた。本研究から、RA における好中球浸潤に IL-8 が関与していることが明らかとなった。今後、IL-8 のみならず、RA 関節炎局所で産生されている多くの好中球走化因子が、RA においてそれぞれどのような役割を担っているかを明らかにすることは、RA の病態解明のためにも、また RA の治療戦略を考える上でも極めて重要であると考え

られた。

E. 結論

SCID マウスに RA 患者滑膜組織を移植した、SCID / RA モデルは、RA 関節炎における好中球浸潤機序の解析や、好中球浸潤阻害による RA の新たな治療法の開発に有用なモデルと考えられた。

F. 研究発表

1. JIAJIA LIU, TOHRU AKAHOSHI, TAKESHI, SASAHARA, HIDERO KITASATO, RIE NAMAI, TAKEZI SASAKI, MATSUHISA, INOUE, HIROBUMI KONDO. Inhibition of neutrophil apoptosis by verotoxin 2 derived from Escherichia coli O157:H7. *Infect. Immu.* 67 :6203-6205, 1999
- 2 . 赤星 透、松井俊通. 炎症性疾患とケモカインアレルギー・免疫 6 : 76-80, 1999
- 3 . 赤星 透、劉 佳佳. 好中球とアポトーシス・炎症と免疫 8 : 3-8, 1999

IL-6シグナル阻害による慢性関節リウマチの治療法の確立に関する研究

分担研究者 西本憲弘

大阪大学健康体育部健康医学第一部門 助教授

研究要旨

我々は、ヒト型化抗 IL-6 受容体抗体(MRA)を用いた慢性関節リウマチ(RA)の臨床研究から、RA 病態にインターロイキン6 (IL-6) が関与し、その阻害が新しい RA 治療法となる可能性を示した。この結果を踏まえて、大阪大学を中心に RA 患者に対する MRA 第 I/II 相臨床試験を行っており、優れた忍容性と安全性が明らかになった。また、オープンスタディではあるが RA に対する薬効も明らかになりつつある。一方、IL-6 は TNF_α 刺激によって滑膜線維芽細胞から産生され、可溶性 IL-6 受容体(sIL-6R)の存在下で TNF_α によって生じる滑膜線維芽細胞の増殖を抑制し、TNF_α に対するネガティブフィードバック因子として作用する。また、我々が発見した STATs-induced STATs inhibitor-1 (以下 SSI-1)は、IL-6 の細胞内シグナル伝達において、JAK-STAT 系によって誘導され、JAK の活性を抑えるネガティブフィードバック因子である。この分子には、アミノ酸配列上相同性を有する 8 つのファミリー分子があり、SSI-1, SSI-2, SSI-3 に関してはサイトカインの細胞内シグナルを抑制することがわかっている。滑膜線維芽細胞では SSI-1, SSI-2, SSI-3, SSI-4, SSI-6 はすべて無刺激でも発現が認められたが、IL-6/sIL-6 刺激によって 2 時間をピークとする SSI-1, SSI-3 の強い発現が誘導された。しかも SSI-3 の発現は 24 時間以上持続した。なお SSI-2, SSI-4, SSI-6 は IL-6 刺激で変化しなかった。このことから SSI-1, SSI-3 は、滑膜線維芽細胞の増殖に関与している可能性がある。またこれらの分子の発現を人為的に抑制することにより RA の滑膜増殖を制御できるかもしれない。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ (RA) は関節滑膜の増殖とそれに伴う関節破壊を特徴とする慢性炎症性疾患である。全身の関節が侵され QOL の低下が余儀なくされるため、関節破壊を生ずる前に有効な治療法を選択し治療を開始する必要がある。早期 RA に対するメソトレキサート (MTX) とブシラミンの併用療法の臨床研究はこの目的で開始された。しかし現時点でわが国で承認されている抗リウマチ薬として最強の MTX で

すら治療効果は約 60 %しか期待できない。したがって従来の抗リウマチ薬が無効な症例を見極めかつそのような症例にでも有効な治療を早期に導入する必要がある。さて、RA の病態にサイトカインの量的なバランス異常が関与することが知られ、すでに米国では TNF_α の働きを阻害する可溶性 TNFp75 受容体と免疫グロブリンの Fc 部分の結合蛋白 (Etanercept) やヒト・マウスのキメラ型抗 TNF_α 抗体 (Infliximab) が治療薬として承認された。しかし、TNF_α

阻害の有効性も 70 % を超えずまた長期使用における安全性も確立されていない。そこで本研究の第一の目的はより安全で有効な標的サイトカインを選択し治療法として開発することである。我々は難治性 RA 患者に対し、大阪大学倫理委員会と先進医療審査会の許可のもとにヒト型化抗 IL-6 受容体抗体 (MRA) を用いた治療を行いその有効性を明らかにした。すなわち IL-6 は RA の病態において重要な役割をなす。その結果を踏まえて、現在第 I/II 相試験を行い、MRA 4mg/kg までの安全性と薬物動態に関するデータを得た。

第二の目的は RA 病態における IL-6 の機能とシグナル伝達経路を明らかにし新たな標的分子を見出すことである。TNF_α 刺激によって滑膜線維芽細胞から産生される IL-6 は、可溶性 IL-6 受容体 (sIL-6R) の存在下で TNF_α によって誘導される滑膜線維芽細胞の増殖を抑制し、TNF_α に対するネガティブフィードバック因子として作用する。また我々が発見した SSI-1 は、IL-6 の細胞内シグナル伝達において、JAK-STAT 系によって誘導され、JAK の活性を抑えるネガティブフィードバック因子である。この分子には、アミノ酸配列上相同性を有する 8 つのファミリー分子があり、SSI-1, SSI-2, SSI-3 に関してはサイトカインの細胞内シグナルを抑制することが知られている。これらの分子の発現異常が RA の病態に関与している可能性が考えられる。そこで滑膜線維芽細胞における SSI ファミリー分子の発現ならびに STAT 分子のリン酸化を検討した。

B. 研究方法

1. MRA 第 I/II 相試験

体重 kg あたり 2、4 もしくは 8 mg の MRA を、各群 5 例の ACR 診断基準を満たす活動性 RA 患者に使用するオープンスタディ

ーを行った。点滴静注にて 2 週間隔で 3 回使用し 8 週までの安全性と薬物動態を検討した。同時に RA 活動性の評価を行い、治療効果が認められた場合は長期継続試験に移行した。

2. 滑膜線維芽細胞における SSI ファミリー分子の発現

滑膜線維芽細胞における SSI ファミリー分子の発現を RT-PCR にて解析した。RA 患者関節組織より分離した滑膜線維芽細胞を 10 % FCS 添加 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) にて 3 から 9 代継代培養し使用した。6 well プレートを用いて FCS 無添加の DMEM で 4 時間前培養を行った後、IL-6 と sIL-6R 各 100 ng/ml にて刺激を行い経時的 (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 時間) に細胞を回収した。また、IL-6 阻害実験には MRA (25_μg/ml) あるいはコントロール IgG (25_μg/ml) の存在下で IL-6, sIL-6R 各 100ng/ml 添加後 1 時間培養し解析した。RNA 抽出は TRIzol(r) を用いて行い、DNA の混入を除去するため DNase 処理を行った後、再度 TRIzol(r) で処理し直し、total RNA 1_μg より cDNA 合成を行った。表 1 に PCR に用いた SSI ファミリー分子に特異的なプライマーを示す。コントロールとして GAPDH プライマーを使用した。PCR 産物は 3 % アガロース電気泳動にて展開し解析を行った。また同条件で細胞を回収しウエスタンブロットにより STAT1, STAT3 のチロシンリン酸化を検討した。

C. 研究結果

1. MRA 第 I/II 相試験

MRA は現時点で 4 mg/kg までの短期投与を終了し 8 mg/kg の試験に入った。いずれの用量においても優れた忍容性を示し、MRA に関連した重篤な有害事象は認められていない。2 mg/kg での T_{1/2} は約 74 時間であり AUC は約 2500 mg_h/L であった。

反復投与により 2 mg/kg 群の 4 例と 4 mg/kg 群の 3 例にトラフ値での MRA 蓄積を認めこれらの症例では使用間隔を延長することが可能であると思われた。表 2 に ACR 評価基準による MRA の有効性を示す。症例数は限られており治療効果に用量依存性は認められていないが、3 ヶ月以上の継続使用により改善率が上昇した。

2. 滑膜線維芽細胞における SSI ファミリー分子の発現

IL-6/sIL-6R 添加により STAT1, STAT3 のリン酸化が 30 分から 1 時間をピークとして誘導された (図 1)。今回発現を調べた SSI-1, SSI-2, SSI-3, SSI-4, SSI-6 はすべて無刺激でもわずかに発現が認められた。IL-6/sIL-6R 刺激において SSI-1, SSI-3 は、2 時間をピークに強い発現が誘導された (図 2-1、図 2-2)。しかも SSI-3 の発現は 24 時間以上持続した。これらの発現は抗 IL-6 受容体抗体の添加により抑制され、IL-6 によって誘導されることが確認された (図 2-1)。一方 SSI-2, SSI-4, SSI-6 は、IL-6 刺激で変化しなかった (図 2-2)。

D. 考察

MRA 第 I/II 相試験はオープンスタディであるため RA に対する薬効を厳密に評価することは困難であるが CRP の陰性化など客観的なデータがその有効性を強く示唆する。CRP の完全な陰性化は TNF_α の阻害では殆ど認められず、IL-6 阻害には TNF_α の阻害とは異なる作用が期待される。今後 TNF_α の阻害剤の無効例に対する治療効果について検討する必要がある。

一方、抗サイトカイン療法の新たな標的分子の一つとして SSI-1 を想定した。滑膜線維芽細胞において IL-6 刺激により 30 分をピークとする STAT1, STAT3 のリン酸化が誘導され SSI-1, SSI-3 では、2 時間をピークとする強い発現が認められたことから

SSI-1 及び SSI-3 両分子は滑膜線維芽細胞において IL-6 シグナルのネガティブフィードバック因子として作用している可能性がある。しかも SSI-3 の発現は少なくとも 24 時間以上持続し SSI-1 より効果が持続すると考えられる。IL-6 は滑膜線維芽細胞に対しその増殖を抑えるため、これらの分子の持続的な発現が IL-6 による増殖抑制作用を減弱しているのかもしれない。この分子の発現を抑えることで滑膜の増殖を抑制する治療の可能性もある。他の 3 分子については未だその働きは不明であるが、恒常的に発現しているにもかかわらず IL-6 による STAT1, STAT3 のリン酸化が誘導されていることより、IL-6 シグナルには関与していない可能性が強い。今後さらに、リンパ球や単球、破骨細胞での SSI 分子の発現を検討する必要がある。

E. 結論

RA の治療薬としてヒト型化抗 IL-6R 抗体 (MRA) の優れた忍容性と安全性が明らかになった。また新たな抗サイトカイン療法の標的分子の候補として SSI-1, SSI-3 が示唆された。これらの分子の発現を人為的に抑制することにより RA の滑膜増殖を制御できる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishimoto, N., K. Yoshizaki, and T. Kishimoto. Anticytokine therapy in autoimmune diseases. *Internal. Med.*, 38: 178-182, 1999.
- 2) Nishimoto, N., M. Sasai, Y. Shima, M. Nakagawa, T. Matsumoto, T. Shirai, T. Kishimoto, and K. Yoshizaki. Improvement in Castleman's by humanized anti-Interleukin-6 receptor antibody therapy. *Blood* 95: 56-61, 2000.

- 3) Nishimoto, N., A. Ito, M. Ono, H. Tagoh, T. Matsumoto, T. Tomita, T. Ochi, and K. Yoshizaki. IL-6 inhibits the proliferation of fibroblastic synovial cells from rheumatoid arthritis patients in the presence of soluble IL-6 receptor. *Int. Immunol.* 12: 187-193, 2000.
 - 4) Mori, Y., N. Nishimoto, M. Ono, R. Inagi, P. Dhepakson, K. Amou, K. Yoshizaki, and K. Yamanishi. Human Herpesvirus 8-encoded Interleukin-6 homologue (viral IL-6) induced endogenous human IL-6 secretion. *J. Med. Virol* (in press).
 - 5) 吉崎和幸, 松本智成, 橋本 淳, 松野博明, 富田哲也, 超智隆弘, 西本憲弘. ヒト型化抗インターロイキン6抗体によるインターロイキン6のシグナル阻害による骨粗鬆症の発症予防と治療法の開発. *協栄生命研究助成論文集* 15: 45-49, 1999.
 - 6) 西本憲弘, 松本智成, 吉崎和幸. 抗サイトカイン療法. *カレントセラピー* 17: 150-154, 1999.
 - 7) 西本憲弘, 吉崎和幸. ヒトヘルペスウイルス8感染とBリンパ球増殖性疾患. *最新医学* 9月増刊号 臨床遺伝学'99-免疫研究の最前線-, 平野俊夫 監修(最新医学社) 54: 283-287, 1999.
 - 8) 西本憲弘, 松本智成, 橋本 淳, 松野博明, 富田哲也, 越智隆弘, 吉崎和幸. インターロイキン6のシグナル伝達阻害による骨粗鬆症の治療法の開発. *Osteoporosis Japan* 7: 34-37, 1999.
 - 9) 西本憲弘, 吉崎和幸. IL-6阻害による多発性骨髄腫治療. *細胞* 31: 362-365, 1999.
 - 10) 西本憲弘, 吉崎和幸. 慢性関節リウマチ-抗サイトカイン療法をめぐる. *現代医療* 31: 192-196, 1999.
 - 11) 西本憲弘, 吉崎和幸. Castleman病とMCD -IL-6シグナル阻害による治療-. *医学のあゆみ* 188: 942-948, 1999.
 - 12) 西本憲弘, 吉崎和幸. 抗サイトカイン療法. *Pharma Medica* 17: 95-100, 1999.
 - 13) 松本智成, 西本憲弘, 吉崎和幸. 慢性関節リウマチにおける抗IL-6レセプター療法. *炎症と免疫* 8: 100-103, 2000.
 - 14) 中原英子, 西本憲弘, 松本智成, 吉崎和幸. 感染とIL-6. *臨床と微生物*(in press).
2. 学会発表
- 1) Nishimoto, N., M. Sasai, Y. Shima, K. Yoshizaki, and T. Kishimoto. Fifth International Symposium on the Immunotherapy of the Rheumatic Disease. Improvement Rheumatoid Arthritis by anti-IL-6 receptor antibody therapy. (Cyprus), 1999.
 - 2) 吉崎和幸, 松本智成, 橋本 淳, 松野博明, 富田哲也, 西本憲弘, 越智隆弘: 日本総合健診医学会第28回大会「ヒト型化抗インターロイキン6抗体によるインターロイキン6のシグナル阻害による骨粗鬆症の発症予防と治療法の開発」(埼玉), 2000年1月27日
- G. 知的所有権の取得状況
- 1.特許取得 なし。
 - 2.実用新案登録 なし。
 - 3.その他 なし。

コラーゲン誘発マウス関節炎におけるカルパイン阻害薬の効果の検討

三森経世¹, 野島崇樹¹, 藤井隆夫¹, 諏訪 昭¹, 平形道人¹, 大曾根康夫²,
尾崎孝幸³

慶應義塾大学医学部内科¹, 川崎市立川崎病院内科²,
日本新薬創薬研究所³

研究要旨

我々はこれまでにカルパイン（カルシウム依存性システインプロテアーゼ）の特異阻害蛋白であるカルパスタチンに対する自己抗体が慢性関節リウマチ（RA）をはじめとするリウマチ疾患に検出されることを報告してきた。カルパインは軟骨破壊や炎症の惹起に関与する中性プロテアーゼの一種と考えられるため、その阻害蛋白であるカルパスタチンに対する自己抗体の存在は RA の病態に関与する可能性が示唆される。そこでカルパイン活性の抑制が RA における新たな早期治療となる可能性を想定し、昨年度には種々のカルパイン阻害物質を II 型コラーゲン感作ラットに投与し、関節炎発症に与える影響を検討したところ、カルペプチンにのみ関節炎発症の有意の抑制効果が認められた。そこで、本年度はコラーゲン感作マウスにカルペプチンを投与したが、ラットで見られた関節炎抑制効果は認められなかった。

A. 研究目的

我々はこれまでにカルパイン（カルシウム依存性システインプロテアーゼ）の特異阻害蛋白であるカルパスタチンに対する自己抗体が慢性関節リウマチ（RA）をはじめとするリウマチ疾患に検出されることを報告してきた。カルパインは軟骨破壊や炎症の惹起に関与する中性プロテアーゼの一種と考えられるため、その阻害蛋白であるカルパスタチンに対する自己抗体の存在は RA の病態に関与する可能性が示唆されている。事実、RA 患者の滑膜や関節液中にはカルパインが増加しているとの報告もある。昨年度、我々は RA モデルとされるコラーゲン誘発関節炎ラットに種々のカルパイン阻害薬を投与したところ、その一つであるカルペプチンによってラットの関節炎発症が抑制されることを報告した。本年度はこのカルペプチンの効果をさらに追求するために、コラーゲン誘発関節炎マウスを用い、定量的に検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. 材料

カルペプチン（N-benzyloxycarbonyl-L-leucyl-

norleucinal, 和光純薬）、および対照薬剤としてデキサメサゾン（0.5%メチルセルロース生食液に懸濁し、10ml/kg を腹腔内投与した。対照群には 0.5%メチルセルロース生食液を投与した。

2. II 型コラーゲンによるマウス関節炎の作成

DBA/1JNCrj 系マウス（8 週齢雄）にウシ II 型コラーゲン（0.1M 酢酸生食液に 2mg/ml に溶解）と完全フロイントアジュバンドの等量超音波エマルジョン 0.1ml を皮下注射（1 群 10 匹）、21 日目に追加免疫した。経時的に四肢の関節炎を肉眼的にスコアリングし四肢の合計を関節炎指数とした。カルペプチンは追加免疫日より 21 日目まで 3mg/kg または 10mg/kg を 1 日 1 回腹腔内投与し、デキサメサゾンは 0.1mg/kg を同様に毎日腹腔内投与した。

3. コラーゲン誘発関節炎マウスにおける抗コラーゲン抗体および抗カルパスタチン抗体の測定

実験最終日（42 日目）にエーテル麻酔下で心臓穿刺により採血した。血清中の抗 II 型コラーゲン抗体はウシ II 型コラーゲンを抗原、およびペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体を第二抗体に用いた ELISA 法で測定した。抗カルパスタチン抗体はヒトカルパスタチンの C 末端 176 ア

ミノ酸ををコードする部分 cDNA (RA-6) より大腸菌に発現させた β -ガラクトシダーゼとの融合蛋白を抗原に用いた免疫プロット法で測定した。

C. 研究結果

1. コラーゲン誘発マウス関節炎に対するカルペプチンの効果

II 型コラーゲン免疫マウスは初回免疫日から 25-27 日目より関節炎を発症し、35 日目にはほぼ全例で関節炎が認められた。デキサメサゾン投与マウスでは関節炎の発症はほぼ完全に抑制されたが、カルペプチンを毎日投与したマウスでは 3mg/kg と 10mg/kg いずれの投与量においても、非投与対照群に比べて関節炎の抑制効果は認められなかった (図 1)。

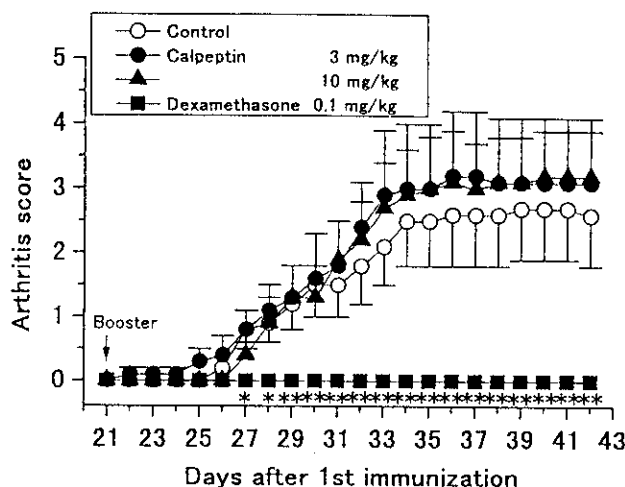


図 1. II 型コラーゲン誘発マウス関節炎に対するカルペプチンの影響

2. コラーゲン誘発関節炎マウスにおける抗コラーゲン抗体および抗カルパスタチン抗体の測定

デキサメサゾン投与マウスでは対照群に比して抗コラーゲン抗体価を有意に低下させたが、カルペプチン投与マウスでは抗体価の低下は認められなかった (図 2)。抗カルペプチン抗体は健常マウス、対照関節炎発症マウス、カルペプチン投与マウス、デキサメサゾン投与マウスのいずれの群においても検出されなかった。

D. 考察

我々は RA に出現する新たな自己抗体を見だし、その対応抗原遺伝子のクローニングにより、カルシウム依存性中性プロテアーゼ (カルパイ

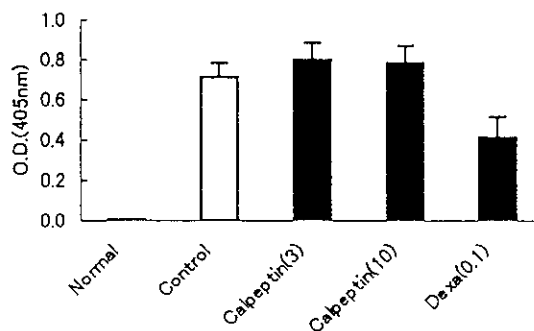


図 2. II 型コラーゲン誘発マウス関節炎における抗コラーゲン抗体産生

ン) に特異的な内在性阻害蛋白であるカルパスタチンであることを報告してきた。カルパスタチンは L, I ~ IV の 5 つのドメインから構成され、ドメイン I ~ IV に共通の領域 (TIPPXYR) がカルパイン結合部位と考えられており、それぞれがカルパイン阻害活性を持つ。

カルパインは RA 患者の滑膜や関節液中に増加し、RA の関節破壊に関与するという証拠がある。カルパインは、IL-1 α の活性化と分泌、白血球遊走活性の誘導、プロテインキナーゼ C 活性化などを通じて炎症の惹起に関与する可能性があり、また軟骨基質プロテオグリカンを分解すると報告されている。したがって、RA 患者血清中の抗カルパスタチン抗体がカルパスタチン活性を抑制するならば、カルパインを相対的に上昇させ、RA の発症や進展に関与する可能性がある。我々は、抗カルパスタチン抗体陽性 RA 患者 IgG がカルパスタチン活性を抑制してカルパイン活性を上昇させることを見だし、カルパスタチンに対する自己抗体の産生が RA の病態と深く関与する可能性を示唆した。

このような背景から、我々はカルパイン活性の抑制が RA における新たな早期治療となる可能性を想定し、RA モデル動物関節炎のカルパイン阻害薬による治療を試みた。昨年度の II 型コラーゲン感作ラットを用いた予備的検討では、種々のカルパイン阻害物質の中でカルペプチンのみに有意の関節炎抑制効果が認められた。今回はラットの代わりにマウスを用い、用量も昨年度より高用量を投与したが、明らかなカルペプチンの関節炎抑制効果を見出すことができなかった。この理由として実験動物の違いが大きいものと考えられる。II 型コラーゲンで誘発される関節炎でもラッ

トとマウスではカルパインの関与が異なるのかもしれないし、カルペプチンの体内代謝が異なる可能性もある。コラーゲン誘発関節炎マウスでは抗II型コラーゲン抗体は見いだされるが、抗カルパスタチン抗体は産生されないという事実は、マウス関節炎においてはヒトRAと異なりカルパインが病態形成に関与しない可能性が示唆される。

実験動物モデルにおけるカルパインの役割とカルパインインヒビターの効果を追求するには、適切な動物の選定と関節腔内への直接投与が重要と考えられた。

E. 結 論

II型コラーゲン誘発関節炎ラットで認められたカルペプチンの関節炎抑制効果は、コラーゲン感作マウスでは確認することができなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mimori T: Autoantibodies in connective tissue diseases. Intern Med 38(7):523-532, 1999.7.
- 2) 三森経世：抗カルパスタチン抗体。竹原和彦

ほか編集「Key Word 2000-2001 膠原病」, pp56-57, 先端医学社, 1999.8.

- 3) Kanazawa Y, Mimori T, et al: Domain reactivity of autoantibodies to calpastatin in patients with systemic rheumatic diseases. Mod Rheumatol (in press)

2. 学会発表

- 1) Mimori T, et al: Clinical significance and possible pathogenicity of autoantibodies to calpastatin (endogenous inhibitor of calcium-dependent cysteine proteinase, calpain) in systemic rheumatic diseases. The 3rd Korea-Japan Combined Meeting of Rheumatology, Cheju, 1999.5.
- 2) Mimori T, et al: Effect of calpain inhibitors on type II collagen-induced rat arthritis. The 3rd Korea-Japan Combined Meeting of Rheumatology. Cheju, 1999.5.
- 3) Mimori T, et al: Autoantibodies to tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP) and their possible pathogenicity in systemic rheumatic diseases. The 6th International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity, Oslo, 1999.6.

サイクリックAMPシグナル伝達系を利用したRAの新しい治療戦略に関する研究

分担研究者 山田 秀裕

聖マリアンナ医科大学内科学（リウマチ・膠原病・アレルギー）助教授

研究要旨

我々は、慢性関節リウマチ(RA)の関節炎局所で産生される PGE が、パンプス形成と関節破壊を制御する生体防御因子であるという仮説を立証してきた。さらに PGE の抗リウマチ作用は、滑膜組織の PGE 受容体活性化による細胞内 cAMP 上昇反応を介したものであり、ペントキシフィリンなどのホスホジエステラーゼ阻害薬により相乗的に増強されることを明らかにした。そこで、関節炎局所に集積する lipo-PGE1(アルプロスタジル)とペントキシフィリン併用療法の RA に対する有用性を臨床的に検討した。活動性 RA 患者計 10 症例に対し、4 週間、アルプロスタジル 10_g/日を点滴静注し、ペントキシフィリン 300mg/日を経口投与した。10 例中 6 例で ACR20% 改善基準を満たした。副作用はみられなかった。有効であった 6 例は、ペントキシフィリン内服を継続してアルプロスタジルの中止したところ、2 週以内に関節所見の再燃と CRP の再上昇がみられた。lipo-PGE1 とペントキシフィリン併用のような、滑膜炎組織における細胞内 cAMP シグナル伝達経路の増幅を図ることは、新しい RA の治療戦略として期待される。さらに、PGE 産生を特異的に抑制する Cox 阻害薬は RA 滑膜炎と関節破壊を助長する可能性が考えられる。

A. 研究目的

ヒト滑膜細胞によるパンプス形成を再現する in vitro および in vivo 病態モデルを用いた研究により、滑膜組織で産生されるプロスタグランジン E(PGE)の抗炎症・抗リウマチ作用を明らかにしてきた。PGE1 の抗リウマチ作用は細胞内 cyclic AMP 産生を介しており、cAMP 代謝阻害薬のペントキシフィリンにより約 100 倍増強された。さらに、lipo-PGE1(アルプロスタジル)は、II 型コラーゲンマウス関節炎のパンプス形成と関節破壊を抑制した。したがって、関節炎局所で産生される PGE は、パンプス形成と関節破壊を制御する生体防御因子であ

り、滑膜炎組織における細胞内 cAMP シグナル伝達の増幅を図ることは、RA の新しい治療戦略になると考えられた。そこで本年度は、昨年度に引き続き、RA に対するアルプロスタジルとペントキシフィリン併用療法の有用性を検討するための前向き臨床試験を行った。

B. 研究方法

米国リウマチ協会(ACR)の診断基準を満たし、発症後 6 か月以上を経過している患者で、試験開始時に以下の 3 項目の条件を満たす患者を対象とした。(1)血沈値 31mmHg/h 以上、(2)疼痛関節数; 6 個以上、

(3)腫脹関節数; 3個以上。投与方法は、アルプロスタジル 10_g を 100ml 生理食塩水に溶き連日点滴静注し、ペントキシフィリン 300mg/日を経口投与した。投与期間は4週間とした。希望する患者には4週以降も薬剤の投与を継続して評価した。評価は、ACR コアセットを用い、20%改善基準を満たしたものを有効と判定した。本臨床試験は、本学倫理委員会の承認の元、患者からインフォームドコンセントを得て行われた。in vitro 滑膜炎モデルは RA 患者滑膜組織由来炎症細胞を混合培養してパンプス様組織形成を観察した。

C. 研究結果

臨床試験は計 10 症例に行われた。平均年齢 55 歳、7 例はリウマトイド因子高値であった。10 例中 6 例が治療 4 週後に ACR20%改善基準を満たした。効果発現は投与開始 2 週目から認められた。副作用はみられなかった。有効であった 4 例は、ペントキシフィリン内服を継続してアルプロスタジルを中止したところ、1 週以内に関節所見の再燃がみられた。

In vitro ヒト滑膜炎モデルによるパンプス形成は、PGE₂ 受容体 EP₄ アゴニストにより用量依存的に抑制されたが、EP₁, EP₂, EP₃ アゴニストでは抑制されなかった。

D. 考察

PGE は、ブラジキニンの疼痛閾値を下げて関節痛の発現に関与し、血流量の増加や血管透過性の亢進による関節周囲の浮腫に関与することから、炎症メディエーターと考えられてきた。しかし、PGE には種々の抗炎症、抗免疫作用が知られている。マクロファージからの TNF-a 等の炎症性サイトカイン産生抑制、T細胞の Th-1 反応抑制、線維芽細胞からの MMP 産生抑制、好中球からの活性酸素産生抑制などが報告

されている。in vivo においてもアジュバント関節炎の抑制効果が報告されている。昨年までの研究で、滑膜細胞による TNF-a 産生やパンプス様組織形成が、COX 阻害薬で増強され、PGE 添加により抑制されること、さらに、PGE₁ の抑制作用が細胞内 cAMP を介することを明らかにした。また、アルプロスタジル 25mg/kg の投与がマウス II 型コラーゲン関節炎におけるパンプス形成や関節破壊を抑制することを証明した。しかし、臨床で用いられる量の約 50 倍を必要とした。一方、ペントキシフィリンは、ホスフォジエステラーゼ(PDE)阻害作用により細胞内 cAMP の半減期を延長する作用があり、PGE と同様の抗炎症、抗免疫作用を発揮することが知られている。欧州では、ペントキシフィリン 1200-1600mg の経口投与により難治性 RA の 50%が改善した。しかし、かかる投与量では消化器症状などの副作用のため臨床応用には至らなかった。本研究により、臨床的に安全性が確立されている少量のアルプロスタジルとペントキシフィリンの併用により RA 関節炎を抑制しうることが明らかとなった。さらに PGE の抗リウマチ作用が EP₄ 受容体を介したものであることから、より特異性の高い EP₄ アゴニストと PDE 阻害薬を用いることが新しい治療戦略となる可能性が高い。一方、関節炎局所で産生される PGE が、滑膜炎を制御する生体防御因子の一つであることから、RA 患者に COX 阻害薬である非ステロイド抗炎症薬を連用することは滑膜炎を遷延化して関節破壊を助長する危険性が考えられた。

E. 結論

PGE₁ 製剤とペントキシフィリン併用のような、滑膜炎組織における細胞内 cAMP シグナル伝達経路の増幅を図ることは、新

しい RA の治療戦略として期待される。

血管新生抑制因子TSP-1の制御による慢性関節リウマチの新しい治療戦略

分担研究者氏名 山中 寿

東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター・助教授

【研究要旨】

慢性関節リウマチ(RA)の滑膜組織において早期から認められ、滑膜増殖に重要な役割を演じている血管新生を制御することによる早期RAの新たな治療戦略の可能性を検討した。免疫組織学的検討とmRNA発現量を検討することにより、活動性の高いRA滑膜では血管新生促進因子vascular endothelial growth factor (VEGF)の発現に比して主要な血管新生抑制因子であるthrombospondin-1 (TSP-1)の発現は少なく、TSP-1 mRNAの発現量は血管新生の程度と有意に逆相関した。すなわち、RA滑膜においては血管新生促進因子と抑制因子のバランスの不均衡が生じていることが示され、血管新生を制御することがRA、特に発病早期のRA例における新たな治療戦略の標的となる可能性が示された。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ(RA)の滑膜組織においては早期から血管新生が認められ、滑膜増殖に重要な役割を演じていると考えられている。血管新生は、血管新生促進因子と抑制的因子のバランスの上で促進、抑制されることが明かになってきたが、このことは、血管新生に関与する分子の制御により血管新生を抑制し、滑膜増殖を抑制することが、特に早期のRAにおける新たな治療戦略となる可能性を示している。今回我々は、RAの滑膜組織における血管新生の病態を明かにするために、代表的な血管新生促進因子としてvascular endothelial growth factor (VEGF)、hepatocyte growth factor、fibroblast growth factor、platelet derived growth factor、tumor necrosis factor α 、angiopoietin-1、主要な血管新生抑制因子であるthrombospondin-1 (TSP-1)の滑膜における発現を検討した。

B. 方法

1) 関節鏡下滑膜切除術および人工関節置換術を施行したRA患者から得られた滑膜を、血管新生やリンパ球浸潤の程度によりその活動性を評価し、各々の滑膜における各因子の発現を、免疫組織化学染色により病理学的に検討した。

2) RA患者から得られた滑膜組織からmRNAを抽出し、cDNAを合成してRT-PCR法にてTSP-1の発現を β -actinを対照として検討した。次いで、TSP-1 mRNAの発現量を定量化するために、TSP-1のcompetiterを作成し、competitive PCR法による定量を行った。そして、関節滑膜の病理像からみた滑膜炎の活動性との相関を検討した。滑膜の光顕所見のうち、Papillary proliferation、Lymphoplasmacytic infiltration、Lymph follicle formation、Angiogenesisの4項目について、各々、noneを0点、slightを1点、moderateを2点、markedを3点とし、合計点数で滑膜炎の活動性をスコア化し、検討した。

C. 結果

1) 免疫組織学的検討では、血管新生促進因子として作用するvascular endothelial growth factor (VEGF)、hepatocyte growth factor (HGF)、fibroblast growth factor (bFGF)、platelet derived growth factor (PDGF)、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、angiopoietin-1は、活動性の高い滑膜炎で多く発現し、活動性の低い滑膜炎ではほとんど発現していなかった。これに対して、血管新生抑制因子であるTSP-1は、活動性の高い滑膜炎では発現

D. 考察

一般に、血管新生の制御は、促進因子と抑制因子のバランスにより成立し、定常状態では抑制因子優位で血管新生が起こらず、創傷治癒過程や炎症が起こると促進因子優位になって血管新生が起こるとされる。RA滑膜においては慢性炎症が起こっており、著しい血管新生が起こっている。この機序の一つとして、血管新生促進因子であるVEGFやその受容体の発現が増加していることは既に報告されてきた。しかし、血管新生を抑制する因子の動態については現在までほとんど報告されていない。

そこで、今回、我々は主要な血管新生抑制因子であるTSP-1のRA滑膜における発現を検討した。そして、免疫組織学的検討とcompetitive PCRを用いた定量的RT-PCRにより、活動性の高いRA滑膜ではTSP-1の発現量が少ないことが示された。

TSP-1は血管新生抑制因子の中でも主要な役割をはたしていると考えられており、VEGFの過剰発現に比してTSP-1が十分に発現していないことが滑膜増殖に関与している可能性が示唆される。

このRA滑膜における血管新生促進因子と抑制因子のバランスの不均衡は血管新生の制御による滑膜炎抑制の可能性を示唆するものである。

今後、TSP-1のcDNAを関節炎モデル動物に導入し、過剰発現させることによる滑膜増殖の抑制効果を実験的に検討する予定である。

E. 結論

RA滑膜炎の強度には血管新生促進因子と抑制因子の不均衡が関与することが示され、血管新生促進因子の抑制のみならず、血管新生抑制因子の発現増強が新たな治療のターゲットになる可能性が示された。

F. 研究発表

1. 学会発表抄録

中島 洋、谷口敦夫、山中 寿、桃原茂樹、
齊藤聖二、井上和彦、鎌谷直之：慢性関節リ
ウマチ滑膜における血管新生抑制因子TSP-1
の発現 リウマチ 39(2):314, 1999