

関節炎の T 細胞サブセット異常における PI3 キナーゼの関与と阻害薬によるその修復に関する研究

研究分担者 田村直人 順天堂大学医学部膠原病内科 准教授

研究要旨 T 細胞サブセットの異常は、関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) をはじめ多くの自己免疫疾患の病態に関与している。Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) は、細胞の活性化・増殖や生存など多くの基本的な細胞機能に関与する分子であるが、CD4 陽性 T 細胞の増殖や分化にも重要であることが明らかになりつつある。アジュバント関節炎ラットにおいて PI3K 阻害薬が T 細胞を介した抗リウマチ作用を示したことから、本研究ではヒト T 細胞における PI3 阻害薬の作用について検討した。関節リウマチ患者末梢血単核球を刺激し、CD4 陽性 T 細胞における IL-17 および IFN γ の発現を解析したところ、PI3K 阻害薬添加により抑制された。さらに、培養上清中のサイトカイン IL-17、IFN γ 、IL-17、IL-6、TNF α 産生も PI3K 阻害薬により抑制された。これらの作用は、アイソフォーム選択的阻害薬のうち PI3K δ 選択的阻害薬で最も強かった。PI3K、特に PI3K δ は RA 患者における Th1、Th17 サイトカインの発現に関与しており、RA における治療標的となり得ることが示唆された。

A. 研究目的

T 細胞サブセットの異常は、関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) をはじめとする多くの自己免疫疾患の病態に関与している。Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) は、細胞の活性化・増殖や生存をはじめ様々な基本的な細胞機能を誘導する分子であるが、ヘルパー T 細胞における増殖や分化にも重要であることが明らかになりつつある。昨年度の研究で、ヒト自己免疫性疾患での解析の前段階として、アジュバント関節炎 (adjuvant-induced arthritis: AIA) ラットにおける PI3K 阻害効果について検討した。PI3K 阻害薬は AIA ラットにおいて明らかな抗リウマチ作用を示したが、AIA ラットのリンパ節 T 細胞について解析したところ、関節炎の発症に伴う所属リンパ節での T 細胞増加は、PI3 阻害薬投与により抑制されていた。また、リンパ節 T 細胞を *in vitro* にてマイトジェン刺激すると IFN δ 、IL-17 の発現が認められたが、これらは PI3K 阻害薬により濃度依存的に抑制された。以上により、PI3K は RA の病態にも T 細胞を介して関与している可能性が考えられたため、RA 患者末梢血を用いて検討を行った。

B. 研究方法

健常人および RA 患者各 10 名の末梢血を採取した。RA 患者の年齢の中央値は 50.3 歳、罹病期間

は 4.83 ± 3.12 年、DAS28-CRP は平均 4.32 ± 0.72 であった。単核球を分離しアイソフォーム選択的もしくは非選択的 PI3K 阻害薬の存在下・非存在下にて、抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体、あるいは PMA + ionomycin で刺激した。刺激 5 時間後の CD4 陽性 T 細胞の刺激前後におけるサイトカインの発現をフローサイトメトリーにて解析した。さらに、24 時間後の培養上清中サイトカイン濃度をビーズアッセイ法にて測定した。

(倫理面への配慮)

患者検体を用いるにあたっては当施設の倫理委員会の承認を受け、十分なインフォームドコンセントを行った。患者検体は本研究以外の目的では用いていない。また、個人情報の管理に注意を払い、個人の特特定が行われないように配慮した。

C. 研究結果

PMA + ionomycin 刺激後の CD4 陽性 T 細胞において PI3K 阻害薬により TNF α 発現は抑制されたが、IL-17、IL-6、IFN γ などサイトカイン発現の抑制は認められなかった。抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体刺激では、刺激後の RA 患者 CD4 陽性細胞における IFN γ および IL-17 陽性細胞数は、それぞれ健常人に比べてより増加していたが、PI3K 阻害薬により濃度依存的に抑制された(図 1)。アイソフ

フォーム非選択的阻害薬および p110δ 選択的阻害薬では低濃度での抑制が認められた。また、培養上清においては、IFN γ 、IL-17、IL-6、TNF α 濃度は刺激後に RA 患者でより上昇しており、PI3K 阻害薬により抑制された(図2)。細胞内発現、培養上清中濃度のいずれにおいても、アイソフォーム選択的阻害薬のなかでは p110 δ (PI3K δ) 選択的阻害薬の抑制効果が最も強かった。

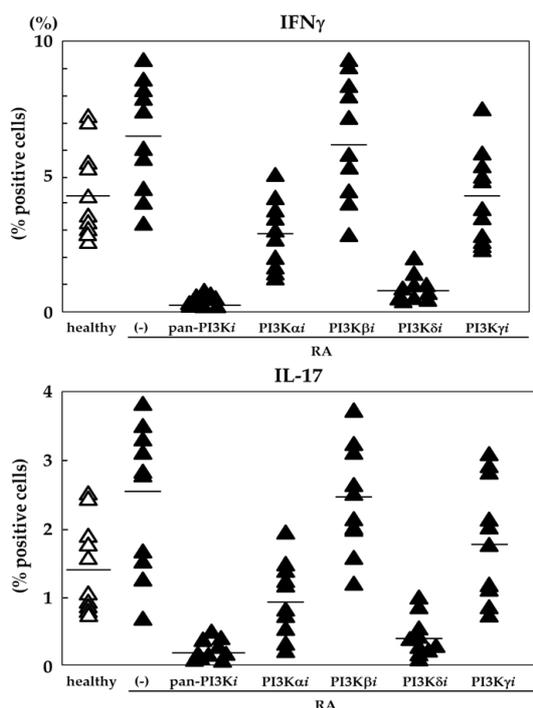


図1. CD4 $^{+}$ T細胞内サイトカインの変化

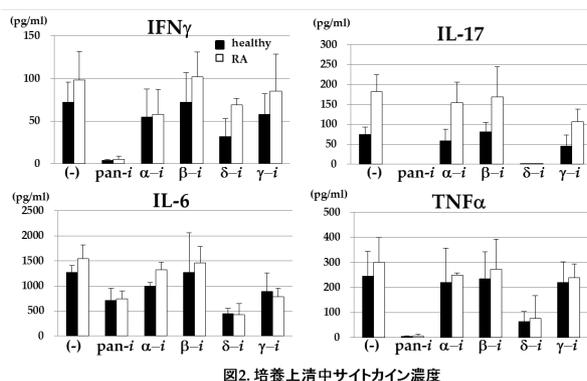


図2. 培養上清中サイトカイン濃度

D. 考察

PI3KはRA患者CD4陽性リンパ球におけるTh1, Th17 サイトカイン産生に関与しており、特にPI3K δ 阻害によりこれらの産生が抑制されることが示唆された。RAにおいてPI3Kは滑膜線維芽細胞増殖や炎症細胞浸潤、破骨細胞形成など複数の

ステップでその病態に関連している可能性が考えられるが、CD4陽性T細胞においてはその阻害によりサイトカイン産生が抑制され、サブセット異常が是正される可能性が示唆された。

E. 結論

PI3KはTh1, Th17 サイトカイン産生に関与するRAの治療標的であり、PI3K阻害薬、特にPI3K δ 選択的阻害薬によるRA治療の可能性が示唆された。

F. 健康危機情報 総括にて報告

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Murayama G, Ogasawara M, Nemoto T, Yamada Y, Ando S, Minowa K, Kon T, Tada K, Matsushita M, Yamaji K, Tamura N, Takasaki Y. Clinical miscount of involved joints denotes the need for ultrasound complementation in usual practice for patients with rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol. 31:506-14, 2013.
- 2) Nemoto T, Ogasawara M, Matsuki Y, Murayama G, Yamada Y, Sugisaki N, Ando S, Minowa K, Kon T, Tada K, Matsushita M, Yamaji K, Tamura N, Takasaki Y. Can routine clinical measures predict ultrasound-determined synovitis and remission in rheumatoid arthritis patients?. Clin Exp Rheumatol. 2013 Oct 17. [Epub ahead of print]
- 3) 田村直人. 抗炎症療法における unmet needs. PI3 キナーゼ阻害薬. 炎症と免疫. 21;234-238, 2013.

2. 学会発表

- Ishiyama K, Tamura N, Yashiro T, Okumura K, Takasaki Y. Role of a transcription factor PU.1 in TGF-beta signaling-mediated osteoclast differentiation. Ann Rheum Dis;72 (Suppl3):380, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし