

氏名	まがり 鉤	かつ 克	え 江
学位(専攻分野)	博士(薬学)		
学位記番号	論薬博第716号		
学位授与の日付	平成16年9月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
学位論文題目	関節リウマチモデル動物における病態と炎症性サイトカインに関する研究		
論文調査委員	(主査) 教授 川 寄 敏 祐	教授 河 合 明 彦	教授 赤 池 昭 紀

論 文 内 容 の 要 旨

関節リウマチ(Rheumatoid Arthritis: RA)は関節滑膜を病変の首座とする難治性の慢性炎症性疾患であり、病変が進行すれば、疼痛ならびに骨・軟骨の破壊により患者のQOLは著しく低下する。RAの病因は解明されていないが、T細胞がその発症に関与することが示唆されている。また、最近、抗TNF療法を中心とする生物学的製剤の臨床成績からTNF- α 、IL-1 β 及びIL-6などの炎症性サイトカインが深く関与することが明らかとなってきた。RAの動物モデルであるラットアジュバント関節炎及びラットタイプIIコラーゲン関節炎は、病態にヒトのRAとの類似点が多く、慢性炎症の基礎的研究や治療薬の薬効薬理学的研究における疾患モデルとして広く用いられている。ヒトRA同様、これらの関節炎の発症にはT細胞が関与することが報告されている。本研究は、カルシニューリンを阻害することに上りT細胞の活性化を阻害することが知られているタクロリムス(FK506)及びシクロスポリン(CsA)などの薬剤を用いて、これらRAモデル動物における病態と炎症性サイトカインとの関係を明らかにすることを目的として行い、以下に述べる新知見を得た。

第一章 ラットアジュバント関節炎における足腫脹と足組織中炎症性サイトカインレベルとの関係

ラットの右後肢足蹠皮下に結核死菌を注射してアジュバント関節炎を誘発し、生じた足腫脹を関節炎の指標とした。FK506及び葉酸拮抗薬であるメトトレキサート(MTX)を予防的投与では感作の翌日から17日間、治療的投与では感作の15日目から3日間又は6日間、それぞれ経口投与し、投与終了翌日の足組織ホモジェネート中のTNF- α 、IL-1 β 及びIL-6レベルを測定した。その結果、著しい足腫脹が認められた感作後18日及び21日目において、いずれのサイトカインレベルも上昇が認められた。両薬剤とも、予防的投与により足腫脹を強く抑制し、増加した炎症性サイトカインレベルをいずれも正常値付近まで低下させた。治療的投与においては、FK506は、3日間の投与で足腫脹を抑制し、増加したTNF- α 及びIL-1 β を減少させ、また、6日間投与では足腫脹及びすべてのサイトカインを抑制した。一方、MTXは、6日間投与におけるIL-1 β を抑制したのみであった。以上より、ラットアジュバント関節炎の病態の発症に伴い、足組織中のTNF- α 、IL-1 β 及びIL-6レベルがいずれも上昇すること、また、これら炎症性サイトカインの産生はT細胞の活性化を介する機序によることが示された。

第二章 ラットコラーゲン関節炎における関節病変と足組織中炎症性サイトカインレベルとの関係

ウシ由来タイプIIコラーゲンをラットに免疫し、初回免疫後2度の追加免疫を行ってコラーゲン関節炎を誘発した。足腫脹と足組織中炎症性サイトカインレベルについて経時的に検討した結果、足腫脹の増大とともに足組織中のIL-1 β 及びIL-6レベルの上昇が認められたが、TNF- α レベルの変化は認められなかった。FK506は関節炎発症後の治療的投与により足腫脹及び軟骨破壊を抑制し、また、IL-6レベルを低下させたが、IL-1 β レベルに対する明らかな作用は認められなかった。従って、コラーゲン関節炎の病態発症には、炎症性サイトカインのうち、IL-1 β 及びIL-6の関与が大きいこと、さらに、その両者についても産生の機序は異なり、IL-6はT細胞の活性化を介して産生されていることが示唆された。

第三章 ラットアジュバント関節炎における炎症性疼痛と足組織中炎症性メディエーターとの関係

アジュバント関節炎モデルにおいて、足腫脹の増大に伴い、痛覚過敏(炎症性疼痛)状態が観察されたので、痛覚過敏と

炎症性メディエーターとの関係を調べた。痛覚過敏の確立された感作後17日目に FK506 及び CsA を投与したところ、投与後24時間をピークとする鎮痛効果を示した。このとき、足腫脹及び組織学的変化に対しては効果が見られなかった。従って、両薬剤による鎮痛効果は炎症抑制による二次の効果ではないことが示唆された。両薬剤の足組織中 TNF- α レベルに対する効果を測定したところ、TNF- α レベルと鎮痛効果との間には相関はみられず、また、抗 TNF- α 抗体により足組織中の TNF- α 活性を低下させた状態においても、明らかな鎮痛効果はみられなかった。一方、両薬剤は、鎮痛効果を示す投与後24時間において、足組織中の IL-1 β レベルをほぼ正常レベルにまで低下させた。Cyclooxygenase (COX)-2 は IL-1 β により誘導されることが知られているが、FK506 は、投与後24時間における足組織中の IL-1 β 及び COX-2 の mRNA レベル、さらに、足組織中の PGE₂ レベルも低下させた。これらの研究は、アジュバント関節炎モデルにおいては、炎症が持続しているにもかかわらず、T細胞の活性化を阻害することにより、即効的に痛覚過敏を抑制できること、また、痛覚過敏の発現には、TNF- α ではなく、IL-1 β が中心的な役割を果たし、T細胞を介する刺激により産生された IL-1 β が PGE₂ などの誘導により疼痛を惹起することを示している。

以上、本研究は、動物モデルにより、RA の病態形成に炎症性サイトカインが密接に関与していること、その産生の機序はサイトカインにより異なる可能性があることを明らかにし、また、T細胞の活性化の抑制を介する炎症性サイトカインの産生抑制が RA の治療に有効であることを示唆する新知見を得たものである。

論文審査の結果の要旨

関節リウマチの薬物療法においては、従来、鎮痛・消炎・解熱効果を有する非ステロイド性抗炎症薬が第一選択薬剤として用いられてきたが、近年、TNF などのサイトカインをターゲットとする生物学的製剤も開発され、その優れた効果から注目を浴びている。しかしながら、これらのサイトカインが病態の形成及び進展にどう関わっているのか、また、T細胞の活性化との関連など、解明すべき点が多く残されている。

本研究は、関節リウマチモデル動物における炎症局所でのサイトカインレベルの定量的な測定法を確立したうえで、病態発症過程におけるそれらの変動について明らかにすること、また、カルシニューリン阻害により T細胞の活性化を阻害することが知られているタクロリムス (FK506) 及びシクロスポリン (CsA) などの薬剤を用いて、これら関節リウマチモデル動物における病態と炎症性サイトカインとの関係察明らかにすることを目的として行われた。

本研究ではまず、ラットアジュバント関節炎において、病態の発症に伴い足組織中の TNF- α 、IL-1 β 及び IL-6 レベルが上昇することを明らかにした。また、作用機序の異なる2つの抗リウマチ薬である FK506 及びメトトレキサート (MTX) を予防的あるいは治療的に経口投与したところ、FK506 は MTX と異なり関節炎の発症後投与においても足腫脹を抑制し、炎症性サイトカインを低下させることが示された。このことから、ラットアジュバント関節炎における TNF- α 、IL-1 β 及び IL-6 の産生は T細胞の活性化を介する機序によるものと考えられ、関節炎の発症後においても T細胞活性化の阻害によりこれらの炎症性サイトカインを抑制することで、病態の改善が可能であると推定された。

さらに、ラットコラーゲン関節炎において、足腫脹の増大に伴い足組織中の IL-1 β 及び IL-6 レベルが上昇するのに対し、TNF- α レベルは変化しないことを明らかにした。FK506 は予防的投与により関節炎における炎症及び骨・軟骨破壊を完全に抑制し、さらに、関節炎発症後の治療的投与によっても足腫脹及び軟骨破壊を抑制した。また、治療的に投与した FK506 は IL-6 レベルを低下させるが、IL-1 β レベルに対しては明らかな作用を持たなかった。これらのことから、ラットコラーゲン関節炎では、炎症性サイトカインのうち、病態の発症には IL-1 β 及び IL-6 の関与が大きいこと、さらに、その両者についても産生の機序は異なり、IL-6 は T細胞の活性化を介して産生されており、関節炎の確立後でも IL-6 レベルを低下させることで病態の改善が可能であることが示唆された。

また、ラットアジュバント関節炎モデルにおける炎症性疼痛に対し、FK506 及び CsA が単回投与により炎症の抑制を介さずとも速やかに鎮痛作用を示すことを明らかにした。また、両薬剤の足組織中 TNF- α レベルに対する作用と鎮痛作用との間には相関はなく、両薬剤は鎮痛作用出現時の IL-1 β レベルをほぼ正常レベルにまで低下させ、また、足組織中の IL-1 β 及び COX-2 の mRNA レベルや足組織中の PGE₂ レベルに対しても抑制作用があることを示した。これらのことから、ラットアジュバント関節炎においては、T細胞の活性化を阻害することにより、炎症が持続しているにもかかわらず即効

的に炎症性疼痛を抑制できること、また、炎症性疼痛の出現には、TNF- α ではなく、IL-1 β が中心的な役割を果たし、T細胞を介する刺激により産生されたIL-1 β がPGE₂などの誘導により疼痛を惹起すると推定された。

以上、本研究は関節リウマチの病態に炎症性サイトカインが密接に関与していること、そしてその産生の機序は異なる可能性があることを明らかにした。さらに、T細胞の活性化阻害を介する炎症性サイトカインの制御が関節リウマチの治療に有効であることを示す新知見を得たものである。よって本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成16年7月13日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。