

氏 名、 さ く ま し ょ う ぞ う
佐 久 間 庄 三
学位(専攻分野) 博 士 (薬 学)
学位記番号 論 薬 博 第 667 号
学位授与の日付 平 成 14 年 3 月 25 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 免 疫 抑 制 剤 タ ク ロ リ ム ス の 慢 性 関 節 リ ウ マ チ 治 療 に お け る 薬 理 学 的 作 用 に 関 す る 研 究

論文調査委員 (主 査)
教 授 小 堤 保 則 教 授 川 寄 敏 祐 教 授 市 川 厚

論 文 内 容 の 要 旨

免疫抑制剤タクロリムスはFK506のコード名で開発され、移植片拒絶反応の抑制剤として、日本のみならず世界各国において広く用いられている。タクロリムスの強力な免疫抑制作用は、移植領域のみならずアレルギー性疾患および自己免疫疾患の治療にも応用が期待され、すでに皮膚科領域において、アトピー性皮膚炎治療薬プロトピック軟膏が本ならびに米国にて承認販売されている。さらに、慢性関節リウマチ・ループス腎炎・潰瘍性大腸炎等の治験が現在進行中である。慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis : RA) は進行性破壊性関節炎で、T細胞活性化を主体とする自己免疫機序によると考えられる関節滑膜炎の炎症が主な病態で、時に多彩な全身症状を伴う疾患である。RAについての研究は、疫学、病因、病態、治療の各分野において盛んに行われてきたが、依然として関節破壊機序、特に免疫異常と関節破壊との関連については不明の点が多い。本研究は、タクロリムスの慢性関節リウマチ治療における薬理学的作用を、*in vitro*の試験ならびに関節炎モデル動物を用いて明らかにすることを目的に実施した。

第一章 ヒト末梢血単核球 (PBMC) からの炎症性サイトカイン TNF- α および IL-1 β 産生に対する抑制作用

炎症性のサイトカイン産生に対する薬剤の評価を実施するにあたり、RAにおける病態の主体がT細胞活性化による自己免疫機序によるとの報告をもとに、ヒト末梢血単核球 (PBMC) をT細胞抗原受容体であるCD3と共刺激分子であるCD28に対する抗体を用いて刺激することによる、サイトカイン産生の*in vitro*試験系を用いた。抗CD3/CD28抗体刺激によるPBMCからのTNF- α 、IL-1 β といった炎症性サイトカインの産生をタクロリムスは1 ng/ml以下の濃度で抑制した。フローサイトメトリー解析により、本試験系におけるTNF- α 産生細胞は、T細胞およびCD14陽性細胞(マクロファージ)であり、IL-1 β 産生細胞はCD14陽性細胞であった。このようなT細胞の刺激を介した炎症性サイトカインの産生は、タクロリムスにより抑制されたが、感染時に生体防御機構として働く時に必要な、LPSのようなマクロファージを直接刺激した場合の炎症性サイトカインの産生に対しては、タクロリムスは影響を与えないことを示した。RA治療に用いられている免疫抑制剤リウマチ薬として、シクロスポリン、デキサメサゾン、メトトレキセートも同条件下で評価したところ、シクロスポリンはタクロリムスと同様に抗CD3/CD28抗体刺激による炎症性サイトカイン産生を特異的に抑制したが、その作用はタクロリムスに比べて弱かった。デキサメサゾンは、抗CD3/CD28抗体刺激およびLPS刺激による炎症性サイトカインの産生をともに抑制した。メトトレキセートは、いずれの条件においても炎症性サイトカインの産生を抑制しなかった。さらに、タクロリムスは炎症性のサイトカイン産生の抑制を介して、炎症性細胞の細胞浸潤に必要な血管内皮細胞の接着分子発現を抑制することを明らかにした。これらのことから、タクロリムスはT細胞活性化に基づく炎症性サイトカイン産生を抑制することにより直接及び間接的に抗リウマチ薬としての作用を発揮していると考えられた。また、副作用と考えられる細胞傷害活性を骨髓細胞中造血幹細胞の培養コロニー形成を指標として各種薬剤で比較検討したところ、タクロリムスは比較した薬剤の中で最も細胞に対する毒性が少ないことが明らかとなった。

第二章 IL-6産生ならびにIL-6依存性抗体産生に対する抑制作用

タクロリムスは抗CD3/CD28抗体刺激によるPBMCからのIL-6産生も抑制した。同時に比較した、シクロスポリンも

IL-6 産生抑制作用を示したが、タクロリムスに比べて約100倍作用は弱かった。デキサメサゾン抗 CD3/CD28 抗体刺激および LPS による IL-6 産生を抑制したが、メトトレキセートは IL-6 産生には影響を与えなかった。タクロリムスおよびシクロスポリンは IL-6 産生抑制を介して、B 細胞株である SKW6.4 細胞からの IgM 抗体産生を抑制することを確認した。一方、デキサメサゾンは IL-6 産生を抑制するにもかかわらず SKW6.4 細胞の IgM 抗体産生を促進した。また、メトトレキセートは IL-6 産生には影響を与えないにもかかわらず、SKW6.4 細胞の IgM 抗体産生を抑制した。デキサメサゾンは、SKW6.4 細胞を刺激して IgM 抗体産生を促進させる作用があり、一方メトトレキセートは SKW6.4 細胞に対する増殖抑制も含めた細胞傷害性により作用を発揮している可能性が考えられた。これらの結果から、慢性関節リウマチ治療におけるタクロリムスの作用として、IL-6 産生抑制を介したリウマチ因子をはじめとする自己抗体の産生抑制による効果も期待できると考えられた。

第三章 ラットアジュバント関節炎における治療的効果

慢性関節リウマチの動物モデルとしてラットアジュバント関節炎を用い、タクロリムスの治療的効果を検討したところ、足容積の増加を指標とした関節炎の抑制ならびに痛覚過敏の抑制が認められた。また、病理組織学的評価においてもタクロリムス投与群では、骨破壊・浮腫・炎症性細胞浸潤の抑制が明らかであった。メトトレキセートにおいても高用量で関節炎の抑制効果が認められたが、明らかな副作用と思われる末梢血白血球数の減少や胸腺の萎縮が認められた。タクロリムスは有効性を示す投与量において、これらの副作用は認められなかった。さらに、関節の機能的状態の指標としてアジュバント関節炎ラットの握力を測定したところ、タクロリムスの投与により低下していた握力は回復し、炎症状態の改善のみならず、骨破壊の抑制や握力の回復といった関節機能の改善をもたらすことが明らかとなった。

以上の *in vitro* および動物モデルにおける試験結果より、タクロリムスの慢性関節リウマチにおける薬理作用の一部が明らかにできたと考えられた。

論文審査の結果の要旨

免疫抑制剤タクロリムスは FK506 のコード名で開発され、移植片拒絶反応の抑制剤として、広く用いられている。さらにタクロリムスの強力な免疫抑制作用は、移植領域のみならずアレルギー性疾患および自己免疫疾患の治療にも応用が期待されている。一方慢性関節リウマチは、T 細胞活性化を主体とする自己免疫機序によると考えられる関節滑膜の炎症が主な病態で、時に多彩な全身症状を伴う疾患である。慢性関節リウマチについての研究は、疫学、病因、病態、治療の各分野において盛んに行われてきたが、依然として関節破壊機序、特に免疫異常と関節破壊との関連については不明の点が多い。このような背景のもとで本論文はタクロリムスの慢性関節リウマチ治療における薬理学的作用を、*in vitro* の試験ならびに関節炎モデル動物を用いて明らかにしたものである。

著者はまず、ヒト末梢血単核球からの炎症性サイトカイン TNF- α および IL-1 β 産生に対する抑制作用について検討した。その結果、抗 CD3/CD28 抗体刺激によるヒト末梢血単核球からの TNF- α 、IL-1 β といった炎症性サイトカインの産生をタクロリムスは 1ng/ml 以下の濃度で抑制した。このように T 細胞の刺激を介した炎症性サイトカインの産生は、タクロリムスにより抑制されたが、感染時に生体防御機構として働く時に必要な、LPS のようなマクロファージを直接刺激した場合の炎症性サイトカインの産生に対しては、影響を与えないことを示した。さらに、タクロリムスは炎症性のサイトカイン産生の抑制を介して、炎症性細胞の細胞浸潤に必要な血管内皮細胞の接着分子発現を抑制することを明らかにした。これらのことから、タクロリムスは T 細胞活性化に基づく炎症性サイトカイン産生を抑制することにより直接及び間接的に抗リウマチ薬としての作用を発揮することが期待された。

さらに、IL-6 産生および IL-6 依存性抗体産生に対する抑制作用について検討を加えところ、タクロリムスは抗 CD3/CD28 抗体刺激によるヒト末梢血単核球からの IL-6 産生も抑制した。これらの結果から、慢性関節リウマチ治療におけるタクロリムスの作用として、IL-6 産生抑制を介したリウマチ因子をはじめとする自己抗体の産生抑制による効果も期待できることを示した。

次に著者は、慢性関節リウマチの動物モデルとしてラットアジュバント関節炎を用い、タクロリムスの治療的効果を検討したところ、足容積の増加を指標とした関節炎の抑制ならびに痛覚過敏の抑制が認められた。また、病理組織学的評価に

においてもタクロリムス投与群では、骨破壊・浮腫・炎症性細胞浸潤の抑制が明らかであった。さらに、関節の機能的状態の指標としてアジュバント関節炎ラットの握力を測定したところ、タクロリムスの投与により低下していた握力は回復し、炎症状態の改善のみならず、骨破壊の抑制や握力の回復といった関節機能の改善をもたらすことが示された。

以上、本研究は *in vitro* 実験系および動物モデル系を用いた研究により、慢性関節リウマチ治療におけるタクロリムスの作用機序の一端を明らかにしたものであり、慢性関節リウマチの発症機構解明、ならびにその治療に基礎的指針を与えるものと評価される。

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14年1月24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。