



## Inhibition of the nucleoside transporter inhibits disease progression in the rat adjuvant-induced arthritis model

小坂, 英和

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2003-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2741

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002741>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 93 】

氏名・(本籍) 小坂 英和 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学位記番号 博い第1488号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の日付 平成15年3月31日

【 学位論文題目 】

Inhibition of the Nucleoside Transporter Inhibits Disease Progression in the Rat Adjuvant-Induced Arthritis Model  
(ラット・アジュvant関節炎モデルにおいてヌクレオシド・トランスポーターを阻害することにより関節炎の進展が抑制される)

審査委員

主査教授 熊谷 俊一

教授 南 康博

教授 黒坂 昌弘

関節リウマチ(RA)は原因不明の慢性炎症性疾患であるが、病理組織学的には単核細胞の関節への浸潤、滑膜細胞の増殖・活性化によるパンヌス形成および関節破壊を引き起こすことを特徴とする。

メソトレキサート(MTX)は RA の治療において最も効果的かつ広く使用される疾患修飾性抗リウマチ剤(DMARDs)の一つである。MTX の抗炎症効果の少なくとも一部は細胞外アデノシン濃度を上昇させ、もたらされると報告されている。細胞外アデノシンは細胞表面のアデノシン受容体を介し、免疫反応や炎症反応を含む細胞機能および全身機能を制御する。4種類のアデノシン受容体 ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ ,  $A_3$ ) がヒト、ラットを含めた様々な種からクローニングされており、いずれも G 蛋白と共に役する7回膜貫通型の受容体である。ヒトやラット、マウスの好中球、単球・マクロファージ、T 細胞、滑膜細胞においても4種類全ての受容体遺伝子が確認されている。アデノシン受容体シグナルによる効果は主にアデニル酸シクラーゼを制御し、細胞内 cAMP 濃度を調整してその下流のプロテインキナーゼ A 活性を制御することによる考えられている。

一方、細胞外アデノシンはアデノシンデアミナーゼ(ADA)により速やかにイノシンへと分解され、また一部は細胞膜に存在するヌクレオシド・トランスポーターにより速やかに細胞内に取り込まれることが知られている。ヌクレオシド・トランスポーター阻害剤である nitrobenzylmercaptopurine (NBMPR) は選択的に細胞外アデノシンの細胞内輸送を阻害する。我々は NBMPR が細胞外アデノシン濃度を上昇させ、MTX と同様の抗リウマチ効果をもつ可能性を考え、ラット・アジュバント関節炎モデルを用いて、NBMPR の *in vivo* における抗関節炎効果について検討を行ったので報告する。

## 材料と方法

6 週齢 Lewis/crj ラットを 1 週間飼育後、尾根部より *Mycobacterium butyricum* の死菌 (MT) と Freund's incomplete adjuvant (IFA) の混合液 (MT/IFA) を皮下注射し免疫を行った。

免疫を行った日を第 0 病日とし、第 0 病日から第 35 病日（実験終了日）まで連日 NBMPR を腹腔内に投与した。NBMPR は 1 日 2 回にわけて投与し、投与時には生理的食塩水 1.0 ml に溶解した。対照として生理的食塩水のみを腹腔内に投与した。

関節炎の評価は第 0 病日から第 35 病日まで毎日行った。関節炎スコアは 4 関節（両前肢および両後肢の踵関節）について 1 関節 0 ~ 4 点（合計 0 ~ 16 点）とした。体重測定も毎日行った。第 35 病日に全てのラットを屠殺し、踵関節の病理組織標本およびレントゲン写真を作製・評価した。

## 結果

### NBMPR の容量依存性抗関節炎効果

我々が行った予備実験において、NBMPR 20 mg/kg/day の投与では抗関節炎効果はほとんどみられず、一方 NBMPR 60 mg/kg/day の投与では毒性がみられた。よって今回の実験では 30、40 および 50 mg/kg/day の容量で NBMPR を投与した。NBMPR 30 mg/kg/day および 40 mg/kg/day 投与ラットでは関節炎の発症・進展とともに NBMPR 非投与ラットと比し有意な差はみられなかった。しかし、NBMPR 50 mg/kg/day 投与ラットでは関節炎の発症時期は非投与ラットとほぼ同様であったものの（第 10 病日前後）、関節炎の進展は非投与ラットに比し有意かつ著明に抑制された。NBMPR 非投与ラットの関節炎スコアの最大値は  $11.33 \pm 1.95$ （第 23 病日）で NBMPR 50 mg/kg/day 投与ラットの最大値は  $5.75 \pm 2.77$ （第 23 病日）であり、有意の抑制を認めた。

### NBMPR の抗関節炎効果の臨床的検討

NBMPR 50 mg/kg/day 投与による抗関節炎効果について再検討するとともにその全身性副作用を示す体重の変化についても検討した。NBMPR 投与関節炎ラットにおける関節炎の進展は NBMPR 非投与関節炎ラットに比し、再度有意かつ著明に抑制された。有意な体重の変化はみられず、NBMPR 投与の有無にかかわらず関節炎発症とともに一時減少し、その後増加した。非関節炎ラットでは、NBMPR の投与の有無に関わらず体重は増加した。

肉眼的所見において、NBMPR 非投与関節炎ラットでは踵関節の腫脹・発赤が著明で関節の変形もみられるのに対し、NBMPR 投与関節炎ラットではそれらの所見は著明に改善していた。X 線所見は、NBMPR 非投与関節炎ラットにおいて著明な骨破壊・関節裂隙の狭小化などがみられるのに対し、NBMPR 投与関節炎ラットでは軽度の骨破壊などがみられるのみであった。H-E 染色による病理組織学的所見は、NBMPR 非投与関節炎ラットにおいて関節滑膜への著明な細胞浸潤や滑膜組織の増殖がみられるのに対し、NBMPR 投与関節炎ラットでは滑膜組織の増殖はみられるものの、関節滑膜への細胞浸潤は軽度であった。

## 考察

細胞外アデノシン濃度を上昇させる手段としていくつかの方法が考えられる。我々は今回スクレオシド・トランスポーターを阻害する方法を選択した。その理由として次のようなことがあげられる。(1) 細胞外アデノシンを全身性に直接投与してもその血中半減期が極めて短いため効果が得にくい。(2) RA 患者の滑液中におけるアデノシンデアミナーゼ活性は高く、同様に関節炎モデルにおいてもアデノシンを局所に投与してもすぐに分解されてしまう可能性が高い。(3) ラット・コラーゲン誘発関節炎モデルを用いたアデノシンデアミナーゼ阻害剤投与実験では良好な結果が得られていない。(4) たとえアデノシンデアミナーゼ活性が高くとも、スクレオシド・トランスポーターを阻害することによりアデノシン受容体からのシグナルを増強するに足るだけの、局所的な内因性の細胞外アデノシン濃度が維持できる可能性が高い。

我々が行った *in vivo* での検討では、50 mg/kg/day の濃度での NBMPR の投与により関節炎の進展抑制効果が再現性をもって観察された。関節内の NBMPR 濃度を測定する事は困難であるが、この濃度の NBMPR を投与することにより *in vivo* で、細胞外アデノシンの細胞内への取り込みが阻害され細胞外アデノシン濃度が上昇し、その結果アデノシン受容体からのシグナルが増強され、抗関節炎効果がもたらされたものと考えられる。組織学的検討において、NBMPR 非投与関節炎ラットでは関節滑膜への著明な細胞浸潤や滑膜組織の増殖がみられるのに対し、NBMPR 投与関節炎ラットでは滑膜組織の増殖はみられるものの、関節滑膜への細胞浸潤は軽度であった。これらより NBMPR は滑膜細胞には作用しておらず、好中球やリンパ球といった炎症性細胞に主に作用することで抗関節炎効果をもたらしている可能性が考えられる。細胞外アデノシン濃度を増加させると活性化好中球からのフリーラジカル産生や活性化単球の IL-12 産生抑制、あるいはマクロファージからの TNF- $\alpha$  産生を抑制との報告があり、我々の結果を裏付けるものである。一方、滑膜細胞に対する細胞外アデノシンの効果は明確にされていないが、我々はアデノシンが滑膜細胞の接着分子の発現を抑制すること、またアデノシンアナログである 2-クロロアデノシン (2CADO) が滑膜細胞のアポトーシスを誘導することを明らかにしており、滑膜細胞への直接作用の可能性もある。

NBMPR 投与により関節炎の進展が抑制されるという我々の観察は、NBMPR が実際の臨床治療に応用される可能性を示唆した。一方、NBMPR は投与濃度 40 mg/kg/day では効果が少なく 60 mg/kg/day では毒性を認め、その効果域は狭い。しかし、MTX の抗関節炎効果の少なくとも一部はアデノシンを介して発揮されることから、NBMPR を MTX と併用し MTX の必要量を減少させることによって、MTX の副作用を軽減することが期待される。また、NBMPR を関節内に投与することにより関節炎を軽減できる可能性も考えられるので今後検討したい。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1494号	氏名	小坂 英和
論文題目	Inhibition of the Nucleoside Transporter Inhibits Disease Progression in the Rat Adjuvant-Induced Arthritis Model  ラット・アジュバント関節炎モデルにおいて ヌクレオシド・トランスポーターを阻害することにより 関節炎の進展が抑制される		
審査委員	主査 熊谷俊一 副査 南 康博 副査 黒坂昌弘		
審査終了日	平成 15 年 2 月 21 日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

関節リウマチ(RA)は原因不明の慢性炎症性疾患で、病理組織学的には単核細胞の関節への浸潤、滑膜細胞の増殖・活性化によるパンヌス形成および関節破壊を引き起こすことを特徴とする。メソトレキサート(MTX)は RA の治療において最も効果的かつ広く使用される疾患修飾性抗リウマチ剤(DMARDs)の一つである。MTX の抗リウマチ効果の少なくとも一部は、細胞外アデノシン濃度を上昇させることによりもたらされると報告されている。細胞外アデノシンは、細胞表面のアデノシン受容体を介して好中球やリンパ球に作用し、好中球の貪食・遊走・活性酸素産生やリンパ球のサイトカイン産生などを抑制することにより、免疫反応や炎症反応を制御すると考えられる。一方、細胞外アデノシンはアデノシンデアミナーゼ(ADA)により速やかにイノシンへと分解され、また一部は細胞膜に存在するヌクレオシド・トランスポーターにより速やかに細胞内に取り込まれることが知られている。

申請者はこれらの事実から、細胞外アデノシンを効率よく増加させることができれば、新しい抗リウマチ薬の開発に繋がると考えた。細胞外アデノシン濃度を上昇させる手段としていくつかの方法が考えられるが、選択的に細胞外アデノシンの細胞内輸送を阻害すると考えられているヌクレオシド・トランスポーター阻害剤 nitrobenzylmercaptopurin (NBMPR) を用いる方法を選択した。その理由として次のようなことがあげられる。1) アデノシンそのものを全身性に直接投与してもその血中半減期が極めて短いため効果が得にくい。2) RA 患者の滑液中における ADA 活性は高く、同様に関節炎モデルにおいてもアデノシンを局所に投与してもすぐに分解されてしまう可能性が高い。3) ラット・コラーゲン誘発関節炎モデルを用いた ADA 阻害剤投与実験では良好な結果が得られていない。4) 内因性のアデノシンの細胞内への取り込みをするヌクレオシド・トランスポーターを阻害すれば、細胞外アデノシン濃度は上昇し、アデノシン受容体からのシグナルを増強するに足るだけの濃度が維持できる可能性が高い。

以上のことより申請者は、NBMPR が MTX と同様の抗リウマチ効果をもつ可能性を考え、ラット・アジュバント関節炎モデルを用いて、 NBMPR の *in vivo* における

る抗関節炎効果について検討した。実験は7週齢雄 Lewis ラットを用いてアジュバント関節炎モデルを作製し、NBMPR を腹腔内投与した。関節炎の評価は、関節炎スコア、体重測定、踵関節の病理組織標本およびレントゲン写真により行った。

まず、NBMPR 投与による関節炎スコアの変化について検討を行った。すると、NBMPR 50 mg/kg/day を投与したラットでは関節炎の発症時期は非投与ラットとほぼ同様であったものの、関節炎の進展は有意かつ著明に抑制された。この NBMPR による関節炎進展抑制効果は再現性をもつものであった。

レントゲン所見は、NBMPR 非投与関節炎ラットで著明な骨破壊・関節裂隙の狭小化などがみられるのに対し、NBMPR 投与関節炎ラットでは軽度の骨破壊などがみられるのみであった。H-E 染色による病理組織学的所見は、NBMPR 非投与関節炎ラットで関節滑膜への著明な細胞浸潤や滑膜組織の増殖がみられるのに対し、NBMPR 投与関節炎ラットでは滑膜組織の増殖はみられるものの、関節滑膜への細胞浸潤は軽度であった。これらの結果より NBMPR は好中球やリンパ球といった炎症性細胞に主に作用することで抗関節炎効果をもたらしていると考えられた。

NBMPR 投与による関節炎進展抑制効果は、NBMPR により細胞外アデノシンの細胞内への取り込みが阻害され細胞外アデノシン濃度が上昇し、その結果アデノシン受容体からのシグナルが増強された結果もたらされたものと考えられる。細胞外アデノシン濃度を増加させると活性化好中球からのフリーラジカル産生や活性化単球の IL-12 産生抑制、あるいはマクロファージからの TNF- $\alpha$  産生を抑制するとの報告があり、申請者の結果を裏付けるものである。一方、滑膜細胞に対する細胞外アデノシンの効果は明確にされていないが、申請者らはアデノシンが滑膜細胞の接着分子の発現を抑制すること、またアデノシンアナログである 2-クロロアデノシン (2CADO) が滑膜細胞のアポトーシスを誘導することを明らかにしており、滑膜細胞への直接作用の可能性も考えられる。申請者の本研究の結果は、NBMPR などのスクレオシド・トランスポーターの阻害薬が、新しい抗リウマチ薬として臨床応用しうる可能性を強く示唆するものである。

本研究はスクレオシド・トランスポーターである NBMPR 投与により関節炎の進展を抑制しうることを初めて明らかにしたものであるが、NBMPR の抗リウマチ薬としての可能性について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。