



Adenosine downregulates cytokine-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 on rheumatoid synovial fibroblasts independently of adenosine receptor signaling

中澤, 隆

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2744

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002744>

※ 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。



【 96 】

氏 名 ・(本 籍) 中澤 隆 (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1491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 】

Adenosine Downregulates Cytokine-induced Expression of
intercellular Adhesion Molecule-1 on Rheumatoid Synovial
Fibroblasts Independently of Adenosine Receptor Signaling
(アデノシンは、リウマチ滑膜線維芽細胞におけるサイトカインによる
ICAM-1分子の発現をアデノシン受容体シグナルを介さず抑制する。)

審 査 委 員

主 査 教 授 熊谷 俊一

 教 授 南 康博

 教 授 黒坂 昌弘

学位論文の内容要旨

Adenosine Downregulates Cytokine-induced Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 on Rheumatoid Synovial Fibroblasts Independently of Adenosine Receptor Signaling

アデノシンは、リウマチ滑膜線維芽細胞におけるサイトカインによる ICAM-1 分子の発現をアデノシン受容体シグナルを介さず抑制する。

関節リウマチ (RA) は慢性炎症性疾患であり、炎症関節の滑膜組織には多くの細胞浸潤、炎症性サイトカインの放出、そして Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) などの接着分子の発現増強を認め、これらが RA の病態に重要な役割をしている。RA の代表的な治療薬であるメトトレキサート (MTX) の抗リウマチ効果の作用機序のひとつとして、炎症局所での細胞外アデノシン濃度の上昇によるものが考えられているが、その詳細は明らかではない。

一方、アデノシンは抗炎症性物質として広く知られており、その効果は主に、好中球やリンパ球などの炎症細胞表面にあるアデノシン受容体 (A_1 、 A_{2A} 、 A_{2B} および A_3) を介するシグナルによるとされている。しかし最近、受容体を介するシグナル以外にヌクレオシドトランスポーターを介する Ado アナログの細胞内への流入が、細胞の増殖抑制やアポトーシス誘導をもたらすという報告がみられる。そこでわれわれは、リウマチ滑膜線維芽細胞の ICAM-1 分子発現に対するアデノシンの効果について、Ado 受容体およびヌクレオシドトランスポーターを介する経路において検討した。

方法

RA 患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞または RA 線維芽細胞様滑膜細胞株 E-11 を使用した。TNF- α および IFN- γ の存在下に細胞を培養すると ICAM-1 分子の発現を増強させることが出来るので、同時にアデノシンおよびアデノシン関連物質を投与して 24 時間培養した。細胞表面の ICAM-1 分子の発現程度は抗 ICAM-1 抗体を用いてフローサイトメトリ法により測定した。また同様に培養した細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて ICAM-1 の mRNA 量を検討した。

結果

Ado のリウマチ滑膜細胞における ICAM-1 発現抑制効果

TNF- α (100 ng/ml) と IFN- γ (100 ng/ml) によりリウマチ滑膜細胞表面の ICAM-1 分子の発現は増強したが、アデノシン (Ado) およびアデノシンデアミナーゼ阻害剤コホマイシン (CF) の同時投与により、この ICAM-1 分子の発現増強効果が抑制された。その抑制効果は Ado の濃度依存性に増強した (5 μ M ~ 500 μ M)。

TNF- α と Ado (500 μ M) および CF を用いた RT-PCR 法による検討でも、フローサイトメトリの結果と同様に、Ado により ICAM-1 mRNA 量の減少を認めた。

Ado 受容体およびヌクレオシドトランスポーターを介する経路の検討

次に、選択的 Ado 受容体アゴニストおよびアンタゴニストを用いて、Ado 受容体を介する Ado の効果を検討した。まず、Ado および CF と同時に Ado 受容体 (A_1 および A_{2A}) アンタゴニスト XAC を用いたが、TNF- α および IFN- γ による ICAM-1 の発現増強を抑制するアデノシンの効果は影響を受けなかった。細胞株 E-11 について他の選択的アンタゴニスト (A_1 アンタゴニスト DPCPX または A_{2A} アンタゴニスト ZM241385) を用いても同様に Ado の効果に影響を与えなかった。また、選択的アゴニスト (A_1 アゴニスト R-PIA、 A_{2A} アゴニスト CGS21680、または A_3 アゴニスト CHB-MECA) を用いた実験でも、これらのアゴニストはサイトカインによる ICAM-1 発現増強を抑制しなかった。これらのことから、リウマチ滑膜細胞における Ado の ICAM-1 発現抑制効果について Ado 受容体を介するシグナルは重要でないと考えられた。

細胞外 Ado は細胞表面にあるヌクレオシドトランスポーターを介して速やかに細胞内へ移動することが知られている。そこで、ヌクレオシドトランスポーター阻害剤 NBMPR を用いて細胞内への Ado の取り込み阻害による影響を検討した。TNF- α および IFN- γ により増強される ICAM-1 の発現は Ado により抑制されたが、その Ado の効果は NBMPR との同時投与により阻害された。NBMPR 単独ではサイトカインによる ICAM-1 の発現増強に影響を与えなかった。このことから、Ado の ICAM-1 発現抑制効果はヌクレオシドトランスポーターを介して Ado が滑膜細胞内に流入することによりもたら

されたと考えられた。

細胞内に流入した Ado は通常 Ado キナーゼによって速やかに代謝される。そこで、Ado キナーゼ抑制剤 ABT702 を用いてその影響を調べた。TNF- α および IFN- γ により増強される ICAM-1 の発現は Ado により抑制されたが、その Ado の効果は ABT-702 との同時投与により阻害された。ABT-702 単独ではサイトカインによる ICAM-1 の発現増強に影響を与えなかった。このことから、細胞内に流入した Ado のリン酸化が ICAM-1 の発現抑制効果に重要であると考えられた。

考察

RA の炎症反応に寄与している接着分子の発現増強は、さまざまな炎症性サイトカインにより増強される。今回、ICAM-1 の発現を増強させるために用いたサイトカイン TNF- α および IFN- γ はいずれもリウマチ関節液において存在し RA の病態に関連すると考えられているものである。

アデノシンの効果は主に、細胞表面に存在する G 蛋白共役型の Ado 受容体を介するシグナルによってもたらされる。Ado 受容体のひとつである A_{2B} 受容体によるシグナルは、リウマチ滑膜細胞におけるコラゲナーゼの産生を抑制するという報告もあるが、アゴニスト・アンタゴニストを用いた我々の実験においては、リウマチ滑膜細胞における ICAM-1 の発現抑制効果には Ado 受容体シグナルは重要でないと考えられた。

ヌクレオシドトランスポーターのなかで、その阻害剤 NBMPR に感受性のあるもの (human equilibrative nucleoside transporter; hENT1) は、リウマチ滑膜細胞において主なヌクレオシドトランスポーターである。今回の我々の検討で、Ado の ICAM-1 抑制効果を NBMPR が阻害したことは、細胞内 Ado が ICAM-1 の発現抑制に関与することを示唆するものである。

ひとたび細胞内に取り込まれた Ado は速やかに Ado キナーゼによりリン酸化される。Ado キナーゼの役割を調べる目的で、汎用されている Ado キナーゼ阻害剤 5-iodotubercidin をはじめに試用した。これは単独でサイトカインによる ICAM-1 の発現増強を強力に阻害したが、同薬剤は Ado キナーゼ以外にも広く蛋白キナーゼを阻害する効果が報告されていたので、より特異的に Ado キナーゼ活性を阻害する ABT-702 を用いた。ABT-702 により Ado の ICAM-1 発現抑制効果の減弱を濃度依存性に認め、

細胞内 Ado がリン酸化されることが、Ado の ICAM-1 発現抑制効果に必要であると結論付けた。

これまでの報告では、Ado 受容体を介するシグナルが MTX の抗リウマチ効果の作用機序として考えられている。また RA の炎症に大きく関与する TNF- α などの炎症性サイトカインの産生が、炎症細胞上の Ado 受容体シグナルにより抑制されることも報告されており、滑膜細胞以外の T 細胞やマクロファージ上の Ado 受容体に作用して炎症性サイトカイン産生を制御することにより抗リウマチ効果を示している可能性も考えられる。

今回われわれは、まず、Ado が炎症性サイトカインによる滑膜細胞上の ICAM-1 分子の発現を抑制する効果を発見し、さらに、Ado 受容体シグナルを介さず細胞内に流入した Ado が直接的に制御することを新たに見出した。Ado 受容体選択的アンタゴニストでは MTX の抗リウマチ効果を減弱できないという報告もあることから、Ado による ICAM-1 発現抑制効果は、受容体を介するシグナルと受容体から独立した直接的な機序によるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1506 号	氏 名	中澤 隆
論文題目	Adenosine Downregulates Cytokine-induced Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 on Rheumatoid Synovial Fibroblasts Independently of Adenosine Receptor Signaling アデノシンは、リウマチ滑膜線維芽細胞におけるサイトカインによる ICAM-1 分子の発現をアデノシン受容体シグナルを介さず抑制する		
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 25 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

関節リウマチ (RA) は慢性炎症性疾患であり、炎症関節の滑膜組織には多くの細胞浸潤、炎症性サイトカインの放出、そして Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) などの接着分子の発現増強を認め、これらが RA の病態に重要な役割をしている。RA の代表的な治療薬であるメトトレキサート (MTX) の抗リウマチ効果の作用機序のひとつとして、細胞外アデノシン濃度の上昇作用が示唆されている。細胞外アデノシンは、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。アデノシンは抗炎症性物質として広く知られており、その作用機作は主に、好中球やリンパ球などの炎症細胞表面にあるアデノシン受容体 (A_1 、 A_{2A} 、 A_{2B} および A_3) を介するシグナルによるとされている。しかしながら最近、受容体を介するシグナル以外にヌクレオシドトランスポーターを介した細胞内へのアデノシン取り込みによるとの報告もみられる。そこで申請者は、リウマチ滑膜線維芽細胞の ICAM-1 分子発現に対するアデノシンの効果とその作用機序について検討した。

実験には、RA 患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞または RA 線維芽細胞様滑膜細胞株 E-11 を使用した。TNF- α および IFN- γ の投与により ICAM-1 分子の発現を増強させ、同時にアデノシンおよびアデノシン関連物質を投与して、ICAM-1 分子の発現程度を細胞表面 (フローサイトメトリ法) および mRNA (RT-PCR 法) について検討した。

TNF- α と IFN- γ によりリウマチ滑膜細胞表面の ICAM-1 分子の発現は増強したが、アデノシン (Ado) およびアデノシンデアミナーゼ阻害剤コホマイシン (CF) の同時投与により、その発現増強効果は濃度依存性に (5 μ M - 500 μ M) 抑制された。TNF- α と Ado (500 μ M) および CF を用いた RT-PCR 法による検討でも、Ado により ICAM-1 の mRNA 量は有意に減少した。

次に、Ado および CF と同時に、種々の Ado 受容体アンタゴニスト (A_1 および A_{2A} アンタゴニスト XAC、 A_1 アンタゴニスト DPCPX、 A_{2A} アンタゴニスト ZM241385) を用いたが Ado の効果に影響を与えなかった。選択的アゴニスト (A_1 アゴニスト R-PIA、 A_{2A} アゴニスト CGS21680、または A_3 アゴニスト CI-IB-MECA) を用いた実験でも、これら

のアゴニストは ICAM-1 の発現を抑制しなかった。

細胞外 Ado は細胞表面にあるヌクレオシドトランスポーターを介して速やかに細胞内へ移動しリン酸化されることが知られている。そこで、ヌクレオシドトランスポーター阻害剤 NBMPR、Ado キナーゼ抑制剤 ABT702 を用いて細胞内への Ado の取り込み阻害による影響を検討した。Ado の ICAM-1 発現抑制効果は NBMPR との同時投与により阻害されたが、NBMPR 単独では ICAM-1 の発現増強に影響を与えなかった。また、Ado の ICAM-1 発現抑制効果は ABT-702 との同時投与により阻害されたが、ABT-702 単独では ICAM-1 の発現増強に影響を与えなかった。

以上の結果をまとめると、RA の関節滑膜細胞における接着分子の発現は TNF- α および IFN- γ などの炎症性サイトカインにより増強されるが、この ICAM-1 の発現増強は Ado により抑制された。アゴニストやアンタゴニストを用いた実験から、この抑制効果は Ado 受容体シグナルではなく、ヌクレオシドトランスポーターを介する Ado の細胞内への流入が重要であると結論付けた。さらにキナーゼ抑制剤の実験などより、細胞内 Ado がリン酸化されることが、この抑制効果に必須であると推察された。

従来 Ado の作用は、主に細胞表面に存在する G 蛋白共役型の Ado 受容体を介するシグナルによってもたらされると考えられていたが、今回の実験より、トランスポーターによる細胞外 Ado の細胞内取り込みなど、Ado 受容体を介さない直接的な機序も考えられ、新しい抗リウマチ薬開発への道を開くものである。

本研究は、滑膜細胞における ICAM-1 分子の発現を Ado が抑制することを始めて明らかにし、その機序として、細胞表面 Ado 受容体よりむしろヌクレオシドトランスポーターを介する細胞内 Ado の増加とそのリン酸化が重要であることを始めて明らかにしたものである。これらは、関節リウマチの病態と治療における Ado の役割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、医学博士の学位を得る資格があると認める。