



# 抗リウマチ剤によるヒト滑膜線維芽細胞増殖の抑制

薩摩, 真一

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1992-01-08

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1610

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001610>

※ 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。



氏名・(本籍)	さつ ま しん いち 薩 摩 真 一 (大阪府)
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	博ろ第1294号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成4年1月8日
学位論文題目	抗リウマチ剤によるヒト滑膜線維芽細胞増殖の抑制
審査委員	主査 教授 廣畑和志 教授 前田盛 教授 伊東宏

## 論文内容の要旨

### 緒言

慢性関節リウマチ（以下RAと略す）は滑膜に浸潤した単核球やリンパ球などによって繰り広げられる免疫学的異常を背景とした肉芽腫性炎症である。

RA滑膜では、炎症過程で滑膜表層細胞や滑膜線維芽細胞の増殖が生じ、これらは滑膜の線維化の原因となり、ひいては罹患関節の強直をもたらす。慢性滑膜炎では、増殖した新生血管から浸出したマクロファージが線維芽細胞の増殖を促進するとされ、さらにマクロファージによって産生されるインターロイキン1 (IL-1) は滑膜線維芽細胞に対して強力な増殖促進作用を有している。

RAの治療薬として今日広く使用されている金塩やD-ペニシラミンなどの抗リウマチ剤は症状を軽減するのみでなく、RA病期の進行を遅延させることが報告されている。また近年では、経口金剤やブシラミン、ロベシザリット2ナトリウム (CCA)、サラゾピリンなどが抗リウマチ剤としてRA治療に使用され効果を上げている。

そこで本実験において、われわれは培養下のRA滑膜線維芽細胞の増殖に対する、抗リウマチ剤の効果を検討した。

### 材料と方法

滑膜線維芽細胞 (Synovial fibroblastic cell, 以下SFCと略す) は術中摘出されたRA患者の滑膜から分離した。即ち細切した滑膜をコラゲナーゼ処理した後、分離した滑膜細胞を熱処理した10%子牛血清と一定濃度のペニシリン及びストレプトマイシン入り培養液中 (RPMI 1640) で数日間培養

した。コンフルエントになった滑膜細胞は、トリプシン処理の後、継代培養し第3あるいは第4代の細胞を実験に使用した。

SFCのDNA合成は、トリチウムラベルチミジン ( $^3\text{H-TdR}$ ) の培養細胞への取り込みで測定した。即ち、培養プレート内の各穴に  $1 \times 10^4$  個のSFCを含む0.2mlの培養液を加え、 $\text{CO}_2$ インキュベーター内で72時間培養を行った。培養終了の18時間前に、 $1 \mu\text{Ci/ml}$ の $^3\text{H-TdR}$ を添加し、培養終了時、各穴のSFCをリン酸緩衝液で3回洗浄した。その後、トリプシン処理により剥離した細胞を microharvesting device を使用してフィルター上に収集し、細胞内に取り込まれた $^3\text{H-TdR}$ の量を液体シンチレーションカウンターで測定した。

種々の抗リウマチ剤によるSFCの増殖抑制作用を知るために、SFCを1 unit/mlのIL-1の存在下及び非存在下において、さきに述べた方法で培養し、同時に種々の濃度の各種抗リウマチ剤を加え、DNA合成に対する影響を検討した。コントロールとしては、非ステロイド性消炎鎮痛剤を上述の抗リウマチ剤のかわりに添加し、同様にSFCのDNA合成に対する影響につき検討した。

また、それぞれの抗リウマチ剤の作用の時間依存性の抑制効果を測定する実験では、一定濃度の抗リウマチ剤を培養開始時及び培養終了までの一定時間ごとにSFCに加え、DNA合成を前述の様に測定した。

## 結果

種々の濃度の金チオリンゴ酸ナトリウム塩 (GST)、オーラノフィン (AUR) を各培養細胞液に加え、SFCのDNA合成抑制作用を検討したところ、両者ともに濃度依存性の抑制効果が見られた。有意の抑制は $10 \mu\text{g/ml}$ のGSTと $1 \mu\text{g/ml}$ のAURで見られ、IL-1刺激群、非刺激群にかかわらず同様な作用を示した。また、ロベンザリット2ナトリウム (CCA)、サラゾピリンにおいても、同様な抑制効果が認められたが、コントロールとして用いた非ステロイド性消炎鎮痛剤では、SFCのDNA合成抑制効果は見られない。

次に、SH基をもつD-ペニシラミン (DP) とブシラミンによる効果を測定した。これらの薬剤はともに、 $2 \mu\text{g/ml}$ の $\text{CuSO}_4$ の存在下では濃度依存性に $^3\text{H-TdR}$ の取り込みを抑制したが、 $\text{CuSO}_4$ の非存在下では、DNA合成抑制作用を示さなかった。また、 $\text{CuSO}_4$ の存在下でDP、ブシラミンによってみられたDNA合成抑制作用は500units/mlのカタラーゼを同時添加することによりほとんどコントロールレベルにまで回復したが、スーパーオキシドジスミューターゼ (SOD) あるいは、ヒドロキシラジカルのスキャベンジャーであるマニトール、ジメチルスルフォキシド (DMSO) にはこのような効果は見られなかった。

さらに、抗リウマチ剤によるSFCのDNA合成抑制作用の時間依存性について検討したところ、培養開始後24時間以降に各薬剤を添加した場合、その抑制作用はほとんど同様の時間依存性を示した。このことから、各種薬剤により発現する作用が、細胞周期の特異的な段階にかかわっている可能性は少ない。

## 考察

RAでは炎症過程で滑膜組織の過度の増殖が生じ、滑膜の線維化と、ひいては関節強直の大きな要因となる。従って、線維芽細胞増殖の抑制は、これらの病的過程を阻害することになる。

本実験で、SFCのDNA合成を有意に抑制したGST, AUR濃度はそれぞれ $10\mu\text{g/ml}$ ,  $1\mu\text{g/ml}$ であった。これらの濃度はすでに報告されている治療中のRA患者の血中あるいは組織内で到達可能な生理的濃度の範囲内である。したがって生体内でも、これらの薬剤によって同様な作用が発現している可能性が大きい。

また、RA滑膜炎では、マクロファージがIL-1の供給源となっており、SFC増殖の重要な制御細胞と考えられるが、 $5$ あるいは $10\mu\text{g/ml}$ のGSTではマクロファージからのIL-1分泌に有意な変化を与えない事を我々はすでに報告している。したがって、生理的低濃度のGSTによるSFC増殖の抑制作用は、この細胞に対する直接的な作用であり、マクロファージを介した2次的な効果ではないという事が示唆される。

SH化合物であるDPは銅イオンの存在化で、過酸化水素を産生することが報告されている。本実験においては、 $\text{CuSO}_4$ の存在下でDP, プシラミンによりSFCの増殖抑制作用が存在することが明らかになった。さらにこの作用は、カタラーゼにより阻害されることから、DPやプシラミンによって観察される細胞増殖の抑制効果は、 $\text{CuSO}_4$ の存在下でSH基が酸化される時に産生される過酸化水素の作用を介して生じている可能性が大きい。

さて、同様のSFC増殖抑制作用は他の抗リウマチ剤であるCCAやサラゾピリンにも確認されたが、コントロールとして使用した非ステロイド性消炎鎮痛剤には認められなかった。したがって、SFCのDNA合成の抑制作用は抗リウマチ剤に共通した作用であることが示唆される。

## 結語

1. 培養下のRA滑膜線維芽細胞の増殖に対する抗リウマチ剤の効果を検討した。
2. 金剤, SH化合物やCCA, サラゾピリンなどの抗リウマチ剤は、IL-1刺激の有無にかかわらず、濃度依存性に滑膜線維芽細胞のDNA合成を抑制した。
3. すなわち、これら薬剤で代表される抗リウマチ剤は、RA炎症で増殖する滑膜線維芽細胞のDNA合成を直接阻害する結果、RAパンプスの増生や滑膜の線維化を抑制している可能性が大きいと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

慢性関節リウマチ（以下RAと略す）における関節炎では、滑膜表層細胞や滑膜線維芽細胞の過度の増殖による滑膜の線維化と、その結果生ずる罹患関節の強直が特徴である。今日、RAの治療薬として効果をあげている抗リウマチ剤は、症状の寛解のみではなく病変の進行を遅延させることも報告

されているが、その作用機序についてはいまだ不明である。そこで申請者は培養下のRA滑膜線維芽細胞の増殖に対する抗リウマチ剤の効果を検討して、その作用機序の一端を明らかにする目的で次の研究を行った。

#### 材料と方法

滑膜線維芽細胞（以下SFCと略す）は術中摘出したRA患者の滑膜より採取して分離培養を行った。実験には3代目から4代目の継代培養後の細胞を使用した。SFC増殖に対する種々の抗リウマチ剤による効果は、以下の方法で測定した。すなわち、SFCをIL-1の存在下および非存在下で培養し、同時に種々の濃度の金チオリンゴ酸ナトリウム（GST）、オーラノフィン（AUR）、D-ペニシラミン（DP）、ブシラミン、ロベンザリット2ナトリウム（CCA）、サラゾピリンを加え、72時間培養を行った。細胞増殖の指標としてSFCのDNA合成を調べるために、培養終了の18時間前に、 $1 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ のトリチウムラベルチミジン（ $^3\text{H-TdR}$ ）を添加し、培養終了時に細胞内に取り込まれた $^3\text{H-TdR}$ の量を液体シンチレーションカウンターで測定した。コントロールとしては、非ステロイド性消炎鎮痛剤を上述の抗リウマチ剤のかわりに培養下で添加した。また、それぞれの抗リウマチ剤の作用の時間依存性の効果を測定する実験では、一定濃度の抗リウマチ剤を培養開始時、6、12、24、36、48時間後にSFCに加え、DNA合成を前述のように測定した。

#### 結果と考察

SFCのDNA合成に対する効果は、GST、AUR添加ではIL-1刺激群、非刺激群にかかわらず濃度依存性の抑制効果を示した。有意の抑制はそれぞれ $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ で見られ、これらの濃度はすでに報告されている治療中のRA患者の血中あるいは組織内で到達可能な生理的濃度の範囲内であった。このことは、生体内でもこれら薬剤によるSFCの増殖抑制作用が発現する可能性があることを示唆している。同様な抑制効果はCCA、サラゾピリンにおいても認められたが、コントロールとして用いた非ステロイド性消炎鎮痛剤では見られなかった。したがって、SFCの増殖抑制作用は抗リウマチ剤に共通した作用であることが示唆された。次に、SH基をもつDPとブシラミンによる効果を測定したところ、これらの薬剤は $\text{CuSO}_4$ の存在下においてのみ前述の抗リウマチ剤と同様な濃度依存性のDNA合成抑制作用を示した。また、このような抑制効果はカタラーゼにより阻害されることから、観察される細胞増殖の抑制効果は銅イオンの存在下でSH基が酸化される時に産生される過酸化水素の作用を介して生じている可能性が大きいと考えられた。

以上の実験から抗リウマチ剤は、その作用機序の一つとして、RA炎症で増殖する滑膜線維芽細胞のDNA合成を阻害し、RAパニヌスの増生や滑膜の線維化を抑制する作用を有しているのではないかと考えられた。

今回の申請者の行った研究はRAにおいて増殖した滑膜線維芽細胞に対する抗リウマチ剤の作用機序を検討したものである。現在までこのような研究はほとんどなく、抗リウマチ剤によるRA病期の進行の遅延を証明する上で重要な知見を得たものとして価値ある集積であると言える。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。