



Specific increase in enzymatic activity of adenosine deaminase 1 in rheumatoid synovial fibroblasts

中町, 祐司

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-05-14

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2694

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002694>

※ 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。



【 170 】

氏 名 ・ (本 籍) 中 町 祐 司 (兵 庫 県)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博ろ第1878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15年5月14日

【 学位論文題目 】

Specific Increase in Enzymatic Activity of Adenosine
Deaminase 1 in Rheumatoid Synovial Fibroblasts
(リウマチ様滑膜線維芽細胞中にはアデノシン
デアミナーゼ1活性が特異に増加している)

審 査 委 員

主 査 教 授 熊 谷 俊 一

教 授 南 康 博

教 授 千 原 和 夫

目的

Adenosine deaminase (ADA; EC 3.5.4.4) はアデノシンおよび2'-デオキシアデノシンを不活性のイノシンおよび2'-デオキシイノシンに不可逆的に分解する酵素である。ADAにはアデノシンとの親和性の強いADA1 ($K_m = 52 \mu M$) と親和性の弱いADA2 ($K_m = 2,000 \mu M$)、2種類のアイソザイムが存在する。関節リウマチ(RA)の関節液(SF)中の総ADA活性は変形性関節症(OA)の関節液に比べて増加していることは知られているが、その意義は不明である。

一方、強力な抗リウマチ薬であるmethotrexate (MTX) が炎症局所の細胞外アデノシン濃度を上昇させ浸潤細胞数を減少させること、またラットアジュバント関節炎では、アデノシン受容体アンタゴニストであるテオフィリンやカフェインがMTXによる抗炎症作用を抑制することが知られている。これらから、細胞外アデノシンのアデノシン受容体を介するシグナルは抗炎症作用をもつと考えられ、アデノシンシグナルを制御するADAは重要な酵素である。

われわれは、RA SF中のADAアイソザイム活性およびその産生細胞について解析し、RAの病態形成におけるADAの関与について検討を行った。

方法

- 1) RA SF中のアデノシン濃度をRIA法で測定した。
- 2) RA SF、OA SF、RA 血清のADAアイソザイム活性およびRA 血清のCRP濃度を測定した。総ADA活性は、アデノシン10mMを基質としレート法で測定し、ADA2活性はADA1阻害剤erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenineを

添加し測定した。ADA1活性は総ADA活性からADA2活性を差し引き求めた。CRP濃度は市販のキットを用いて測定した。

- 3) RA SFの多核球(PMNs)、単核球(MNCs)、RA 末梢血液(PB)中のPMNs、MNCsとRAおよびOAの滑膜線維芽細胞(FLS)中のADAアイソザイム活性を測定した。
- 4) RA FLS、OA FLSのADA mRNA発現量をリアルタイムPCR法で測定した。なお、ADA mRNA発現量はGAPDH mRNA発現量で補正した。
- 5) RA FLS、OA FLSを炎症性サイトカイン(IL-1 β , IL-6, IFN γ , TNF α)で刺激し、ADA1活性、ADA mRNA発現量を測定した。

結果

- 1) RA SF中のアデノシン濃度は0.027 μM から 0.508 μM (mean \pm SD 0.156 $\mu M \pm$ 0.132 μM)であった。
- 2) RA SFのADA1活性(mean \pm SD 14.4 \pm 8.5 IU/liter)は OA SF (3.0 \pm 1.1 IU/ liter) や RA 血清 (3.0 \pm 0.6 IU/ liter)と比較して有意に高値であった。
- 3) RAの細胞群全てにおいてADA1活性はADA2活性より有意に高値であった。RA FLSのADA1 活性は、RAの細胞群と比較して10倍以上高値であり、OA FLSと比較して5倍以上高値であった。また、RA FLSのADA mRNAはOA FLSに比較して有意に高値であった。
- 4) RA SFのADA1活性はRA 血清のCRP濃度と有意な相関性を示した。
- 5) 炎症性サイトカインはRA FLSおよびOA FLSのADA1活性やADA mRNA発現量に影響を与えなかった。

考察

細胞外アデノシンは細胞表面のアデノシンレセプターを介するシグナルにより様々な系を制御している。免疫系においても、T細胞のアデノシンレセプターを介するシグナルがTCRのシグナルに拮抗してT細胞の機能を抑制することが知られている。RAの病因にはT細胞が重要であることが知られており、MTXは細胞外アデノシン濃度を上昇させT細胞の機能を抑制することにより抗関節炎作用を示すと考えられる。さらに、アデノシンレセプターアンタゴニストであるテオフィリンやカフェインはラットアジュバンド関節炎においてMTXの効果を抑制することが知られており、ADAによる細胞外アデノシンの減少はRAの病因に関与していると考えられる。

RA SF中のアデノシン濃度は $0.508 \mu\text{M}$ 以下であった。アデノシンの半減期は短いことが知られているが、採取時のアデノシンの分解を考慮に入れてもRA SF中のアデノシン濃度は 1mM 以下であると考えられた。この濃度ではADAアイソザイムのうち、アデノシンとの親和性が高いADA1 ($K_m = 52 \mu\text{M}$) が主にRA SF中のアデノシンを分解すると考えられた。

RA SF中のADA1活性はOA SFおよびRA 血清と比較して有意に高値であり、RA SFの高ADA1活性は全身性の反映でなく、炎症局所の病態を反映していると考えられた。

RA SF中のADA1活性はRAから得られた他の細胞と比較して10倍以上、OA FLSと比較して5倍以上高活性でありかつ、RA FLSのADA mRNA発現量はOA FLSより有意に上昇しており、RAの特徴である異常増殖するFLSがRA SFの高ADA1活性の主な由来と考えられた。

炎症性サイトカインはRAの病因の重要な因子と考えられているが、IL-6などの炎症性サイトカインではRA FLS、OA FLSのADA1活性およびADA mRNA発現量を誘導できなかった。しかし、RA SF中のADA1活性とRA 血清のCRP濃度とは相関性を示すことから、RA FLSの高ADA1活性、高ADA mRNA発現量は炎症による2次的な変化でなく、RA FLS固有の現象と考えられた。

結論

RA FLSの高ADA1活性はRA特有現象であり、RA関節局所では、増殖したFLSから放出された基質親和性の高いADA1が細胞外アデノシンを分解し、内因性アデノシンによる抗関節炎作用が減弱し、関節炎に対して促進的に作用する。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第 1882号	氏 名	中町 祐司
論文題目	Specific Increase in Enzymatic Activity of Adenosine Deaminase 1 in Rheumatoid Synovial Fibroblasts リウマチ様滑膜線維芽細胞中にはアデノシンデアミナーゼ 1 活性が特異に増加している		
審査委員	主 査 熊谷 俊一 副 査 南 康博 副 査 千原和夫		
審査終了日	平成 15 年 4 月 22 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

Adenosine deaminase (ADA; EC 3.5.4.4) はアデノシンを不活性のイノシンに不可逆的に分解する酵素である。ADA にはアデノシンとの親和性の強い ADA1 と親和性の弱い ADA2、2 種類のアイソザイムが存在する。関節リウマチ (RA) の関節液 (SF) 中の総 ADA 活性は変形性関節症 (OA) の SF に比べて増加していることは知られているが、その意義は不明である。一方、強力な抗リウマチ薬である methotrexate (MTX) が炎症局所の細胞外アデノシン濃度を上昇させ浸潤細胞数を減少させること、またラットアジュバンド関節炎では、アデノシン受容体アンタゴニストであるテオフィリンやカフェインが MTX による抗炎症作用を抑制することが知られている。これらのことから、細胞外アデノシンのアデノシン受容体を介するシグナルは抗炎症作用をもつと考えられ、アデノシンシグナルを制御する ADA は重要な酵素である。そこで申請者は、RA SF 中の ADA アイソザイム活性およびその産生細胞について解析し、RA の病態形成における ADA の関与について検討を行った。

実験には RA SF、OA SF、RA 血清、RA SF 中の多核球・単核球、RA 末梢血液 (PB) 中の多核球・単核球と RA および OA の滑膜線維芽細胞 (FLS) を用いた。アデノシン濃度は RIA 法で、ADA アイソザイム活性はレート法で、ADA mRNA はリアルタイム PCR 法で測定した。

RA SF 中のアデノシン濃度は $0.027 \mu\text{M}$ から $0.508 \mu\text{M}$ であった。アデノシンの半減期は短いことが知られているが、採取時のアデノシンの分解を考慮に入れても RA SF 中のアデノシン濃度は 1mM 以下であると考えられ、この濃度でアデノシンを分解するのは ADA アイソザイムのうち、アデノシンとの親和性が強い ADA1 が主と考えられた。RA SF の ADA1 活性 (mean \pm SD : $14.4 \pm 8.5 \text{ IU/liter}$) は OA SF ($3.0 \pm 1.1 \text{ IU/liter}$) や RA 血清 ($3.0 \pm 0.6 \text{ IU/liter}$) と比較して有意に高値であった。

次に、RA SF 中および RA PB 中の細胞、RA FLS に含まれる ADA アイソザイム活性を検討した。全ての細胞群で ADA1 活性は ADA2 活性より有意に高値であり、RA FLS の ADA1 活性は、RA の他の細胞群と比較して 10 倍以上高値であった。さらに、RA FLS は OA FLS と比較しても ADA1 活性や ADA mRNA は有意に高値であった。

また、RA SF の ADA1 活性と炎症のマーカーである血清 CRP との相関を検討した結果、RA SF の ADA1 活性は RA 血清の CRP と有意に相関していた。そこで、IL-6 などの炎症性サイトカインが、FLS の ADA1 活性を誘導するか否かを検討した。炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6, IFN γ , TNF α) は RA および OA の FLS の ADA1 活性や ADA mRNA を誘導できなかった。

RA SF の ADA1 活性は OA SF および RA 血清と比較して有意に高値であり、RA SF の高 ADA1 活性は全身性の反映でなく、炎症局所の病態を反映していると考えられた。また、RA SF 中の高 ADA1 活性は RA の特徴である異常増殖する FLS が主な由来と考えられた。炎症性サイトカインは RA の病因の重要な因子であるが、IL-6 などの炎症性サイトカインでは RA FLS の ADA1 活性および ADA mRNA 発現量を誘導できなかった。しかし、RA SF 中の ADA1 活性と RA 血清の CRP 濃度とが相関したことから、RA FLS の高 ADA1 活性、高 ADA mRNA は炎症による 2 次的な変化でなく、RA FLS 固有の現象と考えられた。

以上より、RA FLS の高 ADA1 活性は RA に特有の現象と考えられ、RA 関節局所では、増殖した FLS から放出された基質親和性の強い ADA1 が細胞外アデノシンを分解し、内因性アデノシンによる抗関節炎作用が減弱し、関節炎に対して促進的に作用することを明らかにした。

本研究は、RA 患者関節液の高 ADA 活性の病態形成における役割およびその主な由来が滑膜細胞であることをはじ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解明と ADA を標的とした新たな抗リウマチ薬の開発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。