

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591089

研究課題名（和文） アデノシンデアミナーゼ阻害剤による関節リウマチの新規治療開発

研究課題名（英文） Development of novel therapeutics for rheumatoid arthritis utilizing the adenosine deaminase inhibitor

研究代表者

小柴 賢洋 (KOSHIBA MASAHIRO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：70301827

研究成果の概要（和文）：最も強力な関節炎誘導作用をもつとされる 抗 II 型コラーゲン抗体カクテルによって市販の ADA ノックアウトマウスにおいて関節炎の誘導を試みたところ、ADA ノックアウトマウスでも野生型マウスでも関節炎は誘導されなかった。その理由として遺伝的背景に問題がある可能性が考えられたため、研究課題遂行のために、既に抗体カクテルに対する感受性が明らかとされている遺伝子背景に変更すべく、当初に予定していた研究期間（3年）はほぼ戻し交配に費やせざるをえないこととなった。

研究成果の概要（英文）：We tried to induce the arthritis on commercially available adenosine deaminase knock-out mice (ADAKO) with the anti-type II collagen antibody cocktail which is considered to be the strongest inducer of arthritis. To our surprise, however, the antibody cocktail failed to induce arthritis not only on ADAKO but even on the wild-type littermates. This failure of the induction of arthritis was considered due to the genetic background of these mice. Thus it was necessary to change the genetic background of the mice. To achieve this genetic change, we have been performing the back-crossing to make these mice susceptible for the antibody cocktail, which needs all the 3-year period. As of March, 2013, the 8th generation mice are available, thus it is expected that these mice have the genetic background which is sensitive with the arthritis induction by the antibody cocktail. Now it is the time to perform the arthritis induction experiments to dissect the role of adenosine and adenosine deaminase on their roles toward the joint inflammation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：リウマチ学

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)は我が国において約70万人以上が罹患している。中・壮年層に好発し、長期間の関節痛・関節変形によるADL・QOLの低下は、経済的損失とも相俟って医学的にも社会的にも、高齢化社会における最も重要な問題の一つである。従来からの抗リウマチ薬は発症早期からの投与であっても関節炎の進行を完全に抑制することができず、またその作用機序も明確でなく間質性肺炎などの重篤な副作用を示す場合もある。近年開発された生物学的製剤(抗体療法)においても、無効例や効果減弱例が少なからず認められること、高額な治療費を要することなど問題点が多く、さらにRAの病変は全身の関節にとどまらず進行すれば血管炎など全身性病変をきたすことから、新たな治療法の開発が急務である。メトトレキサート(MTX)はRA治療のアンカー・ドラッグであり、生物学的製剤にも併用される。MTXは細胞外アデノシンを増やすことにより抗リウマチ作用を示すが、その作用機序の詳細は明らかではない。アデノシンが主に細胞表面A_{2A}アデノシン受容体を介して、細胞障害性T細胞やヘルパーT細胞、マクロファージの機能やサイトカイン産生を抑制することにより、免疫・炎症反応を負に制驭することを報告してきた。そこでアデノシンがRAに及ぼす影響を調べた結果、アデノシン・アナログが濃度依存性にRA滑膜細胞のアポトーシスを誘導すること、トランスポーター阻害薬によるアデノシンの細胞内取り込み阻害を介した細胞外アデノシン濃度増加が関節炎モデル動物で抗リウマチ効果を示すこと、RAでは酸化ストレスが病体形成に関与しておりアデノシンは内因性抗酸化物質であることを見出した。一方、RAではアデノシン分解酵素であるアデノシンデアミナーゼ(ADA)が関節液中で高活性であることが知られていたが、その病的意義は不明であった。RA関節滑膜細胞が一次的にADAを大量に産生し、このADAにより内因性抗リウマチ分子であるアデノシンが分解されることがRA病態に関連することを明らかにした。以上の結果から、全身あるいは関節局所のアデノシン濃度の制御が新たなRAの治療となると期待される。

2. 研究の目的

(1)本研究では、関節リウマチ(RA)の病態におけるアデノシンデアミナーゼ(ADA)の全身的な関与を *in vivo* で明らかにし、ADA 阻害による新しい RA 治療法の可能性を明らかにす

る。平成17年~18年の科学研究費補助金を受けた研究等において、ラットの関節炎モデルに対しADA阻害薬を関節内に投与し、関節炎の有意な抑制を誘導できることを確認した。薬物の関節内投与は臨床的にも行われているが、膝などの大関節以外には投与困難であること、また感染性骨髄炎を引き起こす危険があることから経口投与が望ましい。一方、ヒト遺伝性疾患であるADA欠損症は、典型例では重症複合免疫不全症をきたすことが広く知られており、全身性の過度あるいは長期にわたるADA阻害は、全身性の免疫調節によってRA治療に有利に作用することも期待される反面、副作用として医原性の免疫不全症を引き起こす可能性も考えられる。そこで、まずADAノックアウトマウスにおいて関節炎が誘導されるか否か、さらに誘導される場合にはその程度を野生型マウスと比較検討し、RAの病態におけるADAの意義を明らかにする。次にADA阻害薬を関節炎モデルに全身投与(腹腔内および経口投与)して、関節炎の発症や程度、全身性変化を検討し、ADA阻害薬のRA治療薬としての可能性を *in vivo* で明らかにする。

(2)一般にアデノシンは *in vivo* の実験系において、アデノシン受容体を介して免疫反応ならびに炎症を抑制することが、複数の研究室から報告されている。しかし、RA病態におけるアデノシン受容体を介したアデノシンの作用については不明な点が多く、アデノシン代謝への介入によるRA治療へのアプローチは動物モデルを含めて見られない。また、アデノシン代謝の重要な分子であるADAの *in vivo* での作用や病因・病態への関与についても不明な点が多く、ヒト遺伝性重症複合型免疫不全症であるADA欠損症を除いては、ADAを治療に応用する研究は知られていない。一方、既にADA欠損症患者ではポリエチレングリコール(PEG)化ADAが投与可能であることから、本研究の成果に基づいた新規創薬は比較的容易に行えるものと期待される。

3. 研究の方法

(1)ADAノックアウトマウスにおける実験関節炎発症実験を行うにあたり、ADAノックアウトマウス(ADA^{-/-}マウス)は致死的で、生後すぐからのポリエチレングリコール化ADA(PEG-ADA)の投与が必要である。逆に、PEG-ADAの投与量によりADA活性の度をコントロールすることが可能であり、低ADA活性・高アデノシン濃度のマウスを作成するこ

とができる。このADA^{-/-}マウス、ADA^{+/-}マウスおよび野生型マウスにおいて抗コラーゲン抗体カクテルを腹腔内投与することにより関節炎の誘導を試み、関節炎発症の有無、発症すればその程度を関節スコア・体重・レントゲン像・病理組織像により評価する。

(2)ADAノックアウトマウスにおける実験関節炎でのアデノシン代謝の解析として、野生型マウスにおいて関節炎が誘導できれば、ADA^{-/-}マウス、ADA^{+/-}マウスにおいても同様の関節炎誘導を試みると同時に、血中および関節組織におけるアデノシン濃度、ADA活性を測定する。ADA^{-/-}マウスにおいては生後1, 5, 9, 13, 17日目にそれぞれ0.625, 1.25, 2.5, 2.5, 2.5UのPEG-ADAを筋肉内投与し高アデノシンマウスを作成する。ADA^{-/-}マウスおよびADA^{+/-}マウスに、それぞれ生後20日目に抗コラーゲン抗体カクテルを投与し関節炎の誘導を試みる。関節炎群では発症後1日目、5日目、10日目にADA阻害剤、アデノシン取り込み阻害剤およびヘパリン存在下で大静脈血を採取する。血漿中アデノシン濃度を測定はSep-pak Cartridge (Waters) を用いて検体を濃縮しHPLC法で行う。血漿中ADA活性測定は比色法で行う。それぞれのマウスにおける関節炎非誘導群を対照に用いる。

(3)ADAノックアウトマウスにおける実験関節炎抑制効果の機序の解析としては、関節組織におけるアデノシン濃度、ADA活性およびアデノシン受容体発現量を測定する。またT細胞分画および炎症性サイトカインを測定し、ADA^{-/-}マウスでの関節炎抑制効果の機序を明らかにする。ADA^{-/-}マウス、ADA^{+/-}マウスおよび野生型マウス関節炎誘導群において関節炎発症後1日目、5日目、10日目にADA阻害剤、アデノシン取り込み阻害剤およびヘパリン存在下で大静脈血を採取し、血漿中サイトカインTNF α 、IL-6、IL-1 β 、IFN γ 、IL-12をELISA法で測定する。対照には関節炎非誘導群を用いる。ADA^{-/-}マウス関節炎誘導群・非誘導群、野生型マウス関節炎誘導群・非誘導群において関節炎発症後1日目、5日目、10日目の関節組織を-80 $^{\circ}$ Cに凍結保存する。凍結組織をホモジネート後、関節組織中のアデノシン濃度をHPLC法で測定する。またホモジネートよりRNAを抽出し、ADAならびに各アデノシン受容体(A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃)のmRNA発現量をリアルタイムPCR法で評価する。ADA^{-/-}マウス、ADA^{+/-}マウスおよび野生型マウスの関節炎誘導群・非誘導群において関節炎発症後1日目、5日目、10日目の脾細胞を調整し、ADAおよび各アデノシン受容体(A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃)のmRNA発現量をリアルタイムPCR法で、またT細胞分画をフローサイトメトリーにて評価する。ま

た磁気ビーズ法によりCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞を分離し、in vitroにて非分画細胞、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞におけるサイトカイン産生能をフローサイトメトリーおよびELISA法で評価する。

4. 研究成果

最も強力な関節炎誘導作用をもつとされる抗 II 型コラーゲン抗体カクテルによって市販の ADA ノックアウトマウスにおいて関節炎の誘導を試みたところ、ADA ノックアウトマウスでも野生型マウスでも関節炎は誘導されなかった。野生型において関節炎が誘導されないという報告は従来なされておらず予想外の結果であった。その理由として遺伝的背景に問題がある可能性が考えられたため、研究課題遂行のために、既に抗体カクテルに対する感受性が明らかとされている遺伝子背景に変更すべく、戻し交配を実施した。そのため当初に予定していた研究期間(3年)はほぼ戻し交配に費やせざるをえないこととなったが、平成25年3月の時点で8世代の戻し交配が完了し、今後本格的に研究課題に取り組む環境が整いつつある状況となった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小柴 賢洋 (KOSHIBA MASAHIRO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：70301827

(2) 研究分担者

藤森 廣幸 (FUZIMORI HIROYUKI)
摂南大学・薬学部・教授
研究者番号：00181404

正木 充 (MASAKI MITSURU)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：30587217

中町 祐司 (NAKAMACHI YUZI)
神戸大学・医学部附属病院・臨床検査技師
研究者番号：80379429

(3) 連携研究者

()

研究者番号：