

## 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 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659276

研究課題名（和文）ATPase 阻害による新たな関節リウマチ治療法の開発  
- 破骨細胞を標的として -研究課題名（英文）Development of a novel therapy for rheumatoid arthritis utilizing  
ATPase inhibitor

研究代表者

酒井 亮 (SAKAI RYO)

京都府立医科大学・医学研究科・研修員

研究者番号：50543542

研究成果の概要（和文）：

Lansoprazole (LPZ) は、H<sup>+</sup>-ATPase 阻害剤として胃腸疾患などに対する日常診療で用いられている。近年、LPZ に H<sup>+</sup>-ATPase の阻害とは別の薬理作用が存在する可能性が報告されてきた。本研究では、LPZ が活性化されたマウスのマクロファージ(RAW264.7)における誘導型 Nitric Oxide Synthase と Cyclooxygenase2 の発現を抑制することで、炎症性メディエーターである nitrite (NO) や Prostaglandin E2 (PGE2) を制御した。また、LPZ は滑膜線維芽細胞において炎症性サイトカインである tumor necrosis factor- $\alpha$  の発現を抑制した。これらの結果は、関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) 病態の中心であるマクロファージや滑膜線維芽細胞において LPZ が抗炎症作用を有する可能性を示唆している。次に、LPZ による抗炎症作用のメカニズムを解析した。RAW264.7 に H<sup>+</sup>-ATPase は発現していないため、H<sup>+</sup>-ATPase 阻害以外のメカニズムによる抗炎症効果が LPZ には存在することが明らかになった。そのメカニズムの一つとして、LPZ が reactive oxygen species (ROS) の中でも nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase 活性を抑制することで NO 産生を抑制していることを明らかにした。さらに、LPZ の安全性を確認した。本研究では、50  $\mu$ M の LPZ の濃度が NO や PGE2 の抑制に必要であった。投与方法の違いにもよるが、ヒトにおいて H<sup>+</sup>-ATPase 阻害剤を内服した際の血中濃度と大きな差異はなかった。RA の動物モデルなどを用いて治療効果を検討することが課題であるものの、LPZ はすでに臨床応用されている胃腸疾患にとどまらず、RA をはじめとする炎症性疾患に対する安全な薬物療法となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

Aberrantly activated macrophages, which overproduce inflammatory mediators, are involved in the pathogenesis of many inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis. We analyzed the anti-inflammatory activity of lansoprazole (LPZ), a typical proton pump (P-ATPase) inhibitor, on RAW264.7 murine macrophages. Treatment of lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 cells with LPZ inhibited the production of nitric oxide (NO) and prostaglandin E2 (PGE2). Since P-ATPase expression was not observed in RAW264.7 cells, the anti-inflammatory effect of LPZ was independent of ATPase. In contrast, diphenylene iodonium (DPI), an inhibitor of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, decreased NO but not PGE2 levels. LPZ suppressed the LPS-stimulated production by RAW264.7 cells of reactive oxygen species (ROS), which plays an important role in inflammatory responses. ROS elevation in these cells was associated with NO but not PGE2 production, suggesting that LPZ inhibits NO production by suppressing NADPH oxidase activity. These findings suggest that LPZ may be useful in the treatment of many inflammatory diseases associated with activated macrophages.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	0	1,300,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	2,400,000	330,000	2,730,000

研究分野：脊椎外科・関節リウマチ

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：ATPase 阻害, proton pump inhibitor, 抗炎症作用, 関節リウマチ, 関節疾患

### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis; RA) は、生物学的製剤の登場により一定の寛解率を得た。しかし、薬剤耐性や感染症などの問題があり、生物学的製剤の使用が困難な RA 患者も存在する。このような RA 患者には、抗サイトカイン療法とは異なる機序から RA 病態にアプローチする必要がある。

ランソプラゾール (Lansoprazole; LPZ) をはじめとする H<sup>+</sup>-ATPase (プロトンポンプ) 阻害剤は、酸分泌酵素である H<sup>+</sup>-ATPase の活性を特異的に阻害することで、胃酸分泌を抑制する。LPZ は、胃潰瘍や逆流性食道炎などに対する胃酸分泌抑制剤として、日常的に使用されている。LPZ の薬理作用は、単に H<sup>+</sup>-ATPase 阻害による酸分泌抑制のみと考えられてきた。しかし、LPZ には酸分泌抑制作用とは別に胃粘膜を保護する作用があることが明らかとなった。さらに、胃粘膜に対する抗アポトーシス効果や活性酸素種に対する抑制効果も報告され、LPZ が多面的な作用を有する可能性が示唆された。

マクロファージは、様々な組織に存在している骨髄単球由来の細胞である。バクテリアなどから宿主を守る感染防御機構を有し、抗原提示による抗体産生の初期シグナルとして働くなど、ホメオスタシスを維持するための重要な機能を有する。一方で、マクロファージの機能異常は、多くの炎症性疾患の病態に関与している。腸管では、マクロファージの免疫異常により腸管炎症が慢性持続化してクローン病になる。LPZ は、クローン病の臨床症状を改善させることが知られている。LPZ は、マクロファージに対する抗炎症効果を有する可能性がある。活性化されたマクロファージは nitrite や Prostaglandin E2 (PGE2) などの炎症性メディエーターを過剰産生することで、RA やクローン病など多数の炎症性疾患の病態に関与している。これらの炎症性メディエーターをターゲットにした治療法が報告されている。しかし、炎症性疾患は複数の因子が交絡した複雑な病態であるため、単一の炎症性メディエーターを制

御するより、炎症性メディエーターを分泌している細胞そのものを制御するほうが合理的な新規治療戦略となりうる。LPZ の作用により、活性化されたマクロファージから産生される複数の炎症性メディエーターを同時に抑制することができれば、RA をはじめとする炎症性疾患の発症や進行を抑制できる可能性がある。LPZ は、炎症部位のマクロファージに取り込まれ、細胞間の接着分子を抑制していることが近年報告された。しかし、マクロファージにおける LPZ の抗炎症効果を示した報告はない。

### 2. 研究の目的

LPZ が、活性化したマクロファージの産生する複数の炎症性メディエーターを抑制するか検討し、そのメカニズムを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) LPZ による抗炎症効果の検討

マウスのマクロファージセルラインである RAW264.7 を用いた。まず、LPZ の細胞障害性を確認した。RAW264.7 に、0-400  $\mu$ M の濃度で LPZ を導入し、24 時間後の細胞生存率を MTS assay で評価した。次に、LPZ の抗炎症効果を検討した。LPZ の pretreatment を行った 2 時間後に lipopolysaccharide (LPS) (1  $\mu$ g/ml) による炎症性刺激を行い、培養上清中の炎症性メディエーターである nitrite と PGE2 を Griess reagent system および ELISA で測定した。さらに、nitrite および PGE2 産生に対する LPZ の抑制効果が、誘導型 Nitric Oxide Synthase (iNOS) と Cyclooxygenase2 (COX-2) のタンパク発現に与える影響を Western Blotting 法で検討した。

また RA における滑膜炎の主体である滑膜線維芽細胞においても抗炎症効果の検証を行った。LPZ が LPS 刺激により増強する TNF- $\alpha$  の遺伝子発現に与える影響を real time RT-PCR で評価した。

## 2) 抗炎症作用のメカニズムを解析

マクロファージに対する抗炎症効果のメカニズムを解明するため、RAW264.7でのH<sup>+</sup>-ATPaseの発現をRT-PCR法で解析した。次に、胃粘膜細胞や好中球において、H<sup>+</sup>-ATPase阻害剤はreactive oxygen species (ROS)を抑制することで抗炎症作用を有することから、LPZがRAW264.7におけるROS量に影響しているか検討した。さらに、LPS刺激によるROSの役割を明らかにするため、LPSによって上昇するROSをさまざまな抗酸化剤で抑制し、nitriteおよびPGE<sub>2</sub>量への影響を検討した。最後に、LPZのnicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase活性に対する影響を評価した。NADPH oxidaseはROSであるsuperoxideの産生に關与する酵素であるため、X/XOによるsuperoxideによって誘導されるnitriteに対する抑制効果をLPZが有するか検証した。

## 4. 研究成果

### 1) LPZの抗炎症作用

LPZの濃度が100 μMまで細胞生存率に影響を与えなかった。(図1)

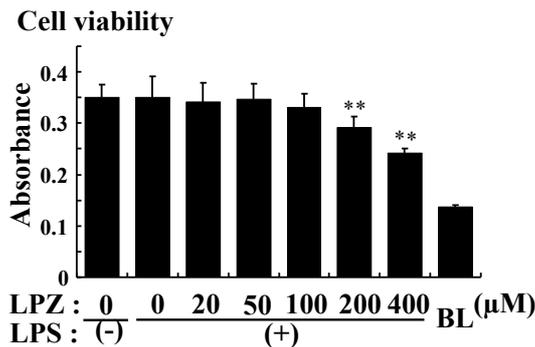


図1 LPZの細胞生存率に与える影響

LPZは濃度依存性にLPS誘導性のnitrite, PGE<sub>2</sub>産生を抑制した。特に100 μMの濃度のLPZはnitrite産生をcontrolと同程度まで抑制した。(図2A, B)

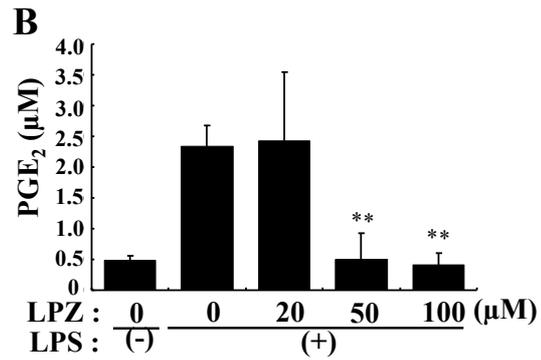
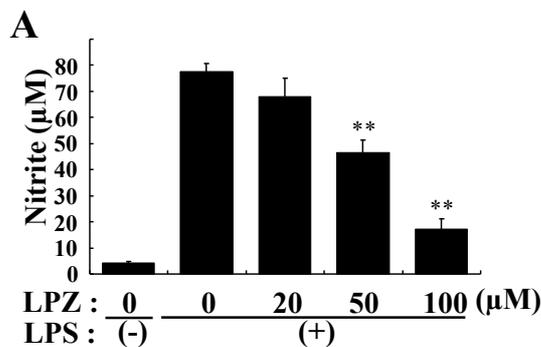


図2 LPZの抗炎症効果

iNOSとCOX-2の発現はLPZによって抑制された。(図3)

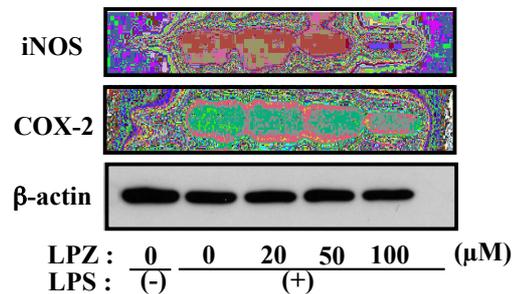


図3 LPZのiNOSとCOX-2に対する影響

炎症性サイトカインであるTNF-αの遺伝子発現はLPZにより有意に抑制された。

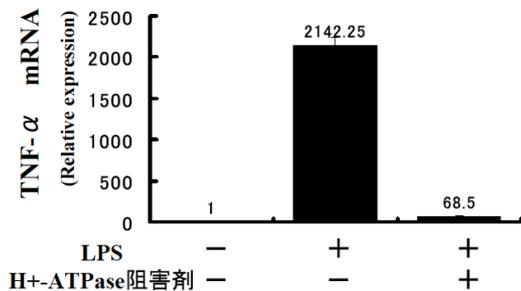


図4 LPZのTNF-αに対する影響

これらの結果から、マクロファージにおけるLPZによるiNOSとCOX-2の発現抑制は、培養上清中のnitriteおよびPGE<sub>2</sub>量の減少に關与していることを明らかにした。また、滑膜線維芽細胞において、LPZはTNF-αの発現を抑制した。LPZはRA病態の中心となる細胞であるマクロファージと滑膜線維芽細胞において、複数の炎症性因子を抑制できる可能性が示唆された。

TNF-αは滑膜組織において破骨細胞の分化を促進する重要な炎症性サイトカインであるため、検証課題は残っているものの、LPZによりTNF-α発現を抑制することで、破骨細胞分化を制御できる可能性がある。

## 2) LPZ による抗炎症作用のメカニズム

positive control であるマウス胃粘膜組織では H<sup>+</sup>-ATPase の発現を確認できたが, RAW264.7 での発現は認めなかった. LPZ および LPS の添加を行っても同様に H<sup>+</sup>-ATPase の発現を認めなかった. (図 5)

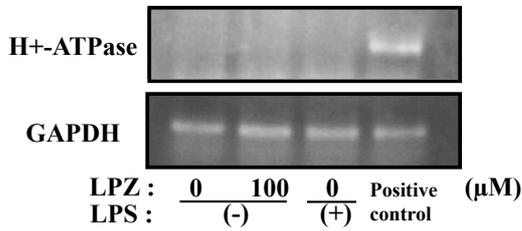


図 5 RAW264.7 における H<sup>+</sup>-ATPase の発現

LPZ のみを添加した群では ROS 量に影響を及ぼさなかった. LPS 刺激によって細胞内 ROS 量は約 40 倍に増加したが, その増加量は LPZ を添加することによって有意に低下した. (図 6)

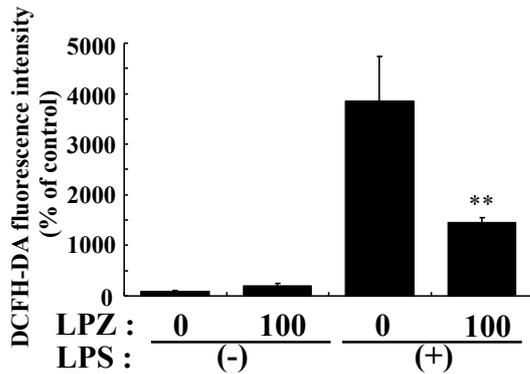


図 6 LPZ の LPS で誘導される ROS に対する影響

nitrite 量は NAC で抑制されなかったが NADPH oxidase の抑制剤である DPI では著明に抑制された. (図 7 A) しかし, PGE<sub>2</sub> 量は NAC および DPI のいずれも抑制されなかった. (図 7 B) これらの結果から, LPS 刺激による nitrite 産生において, NADPH oxidase が関係している可能性が示唆された.

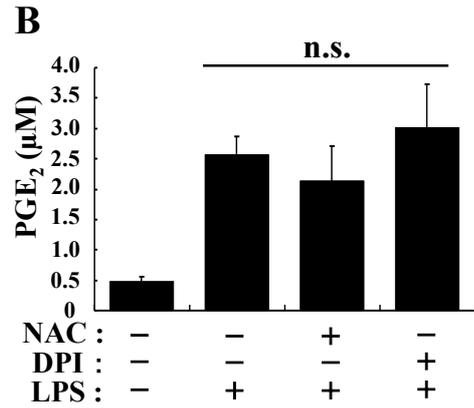
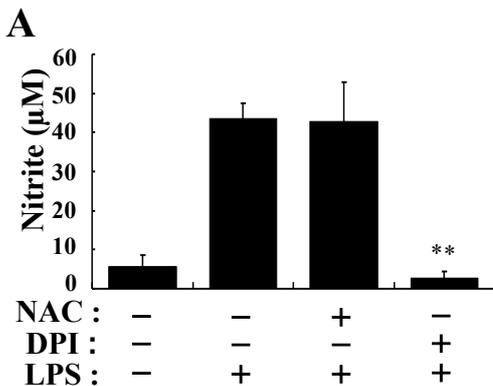


図 7 炎症性メディエーターに対する NAC および NADPH oxidase の影響

LPS 刺激で NADPH 活性が約 2 倍に上昇したが, LPZ の添加によって活性は低下した. (図 8 A) X/XO 刺激に対して上清中の nitrite 量は上昇したが, LPZ は nitrite 産生に対して抑制効果がなかった. (図 8 B) これらの結果から LPS 刺激における nitrite 産生は NADPH oxidase 依存性であり, LPZ は NADPH oxidase 活性を抑制することで nitrite 産生を抑制することが明らかになった. (図 8 C)

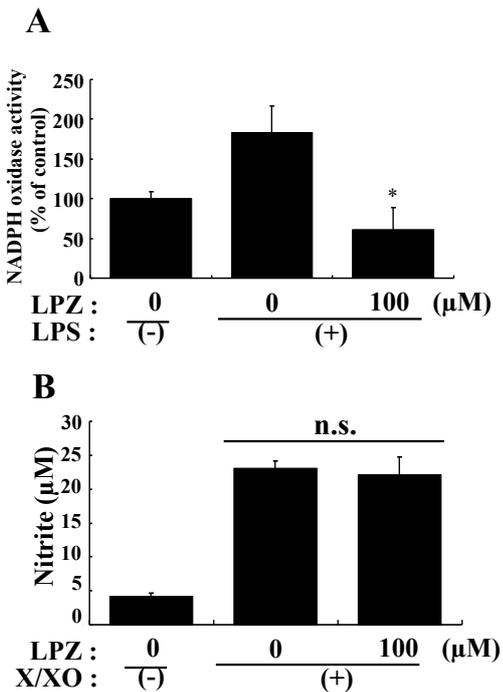


図 8 LPZ による抗炎症効果のメカニズム

LPZはProton pump inhibitorであり,本来H<sup>+</sup>-ATPaseを介した作用をもつ.しかし,本研究からLPZの抗炎症効果は,マクロファージにおいてH<sup>+</sup>-ATPase阻害とは異なるメカニズムによって抗炎症効果を有することが明らかとなった.以上から,LPZには,これまで臨床応用されてきた胃腸疾患のみならず,他の炎症性疾患へ適応が広がる可能性がある.また,本研究結果では,nitrite,PGE2およびTNF- $\alpha$ を抑制するには,50 $\mu$ MのLPZが必要であった.投与方法の違いにもよるが,ヒトにおいてLPZを内服した際の血中濃度は2-3 $\times 10^{-6}$ Mから1-2 $\times 10^{-5}$ Mと報告されており,これは本研究で用いた薬物濃度と差異はなかった.LPZは,すでに臨床応用されている胃腸疾患にとどまらず,RAをはじめとする炎症性疾患に対する安全な薬物療法となる可能性がある.

#### 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1件)

- ① Shuji Nakagawa, Yuji Arai, Tsunao Kishida, Nobuyuki Hiraoka, Shinji Tsuchida, Hiroaki Inoue, Ryo Sakai, Osam Mazda, Toshikazu Kubo, Lansoprazole Inhibits Nitric Oxide and Prostaglandin E2 Production in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells, Inflammation, 査読有, Vol.35, 2012, p1062-1068, DOI 10.1007/s10753-011-9412-7

[学会発表] (計2件)

- ① Hiroaki Inoue, Yuji Arai, Shuji Nakagawa, Ryu Terauchi, Nobuyuki Hiraoka, Shinji Tsuchida, Ryo Sakai, Osam Mazda, Toshikazu Kubo, Analysis of anti-inflammatory effects of lansoprazole on macrophages, 14th World Congress of the Osteoarthritis Research Society International (OARSI), 2011.9.15-18, Hilton San Diego Bayfront (San Diego, CA, USA)
- ② 井上裕章, 新井祐志, 中川周士, 寺内竜, 平岡延之, 土田真嗣, 酒井亮, 松田修, 久保俊一, ランソプラゾールのマクロファージに対する抗炎症効果の解析 関節リウマチへの応用を目指して, 第26回日本整形外科学会基礎学術集会, 2011.10.20, ペイシア文化ホール(群馬県)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

酒井 亮 (SAKAI RYO)

京都府立医科大学・医学研究科・研修員

研究者番号: 50543542

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし