

## 論文の内容の要旨

論文題目 新規 p38 MAP キナーゼ阻害剤の関節疾患に対する薬理作用の検討

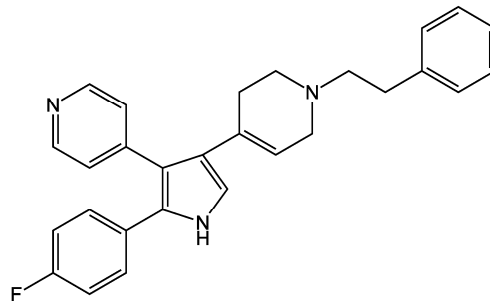
氏名 和田 吉弘

### 1 緒言

関節リウマチは関節軟骨及び骨組織の破壊を特徴とする慢性の全身性疾患である。また、変形性関節症は関節軟骨の局所的な変性を特徴とする関節疾患である。関節リウマチの国内患者数は 60 万人、変形性関節症は膝関節部位の発症患者だけでも毎年約 90 万人に上り、両疾患は医療福祉上の重大な問題となっている。いずれも病因は不明であるが、プロスタグランジンやサイトカインなどの炎症性メディエーターが病態形成に関与することが示唆されている。特に、インターロイキン (IL) -1 は関節組織におけるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の産生を誘導し、軟骨組織の破壊を亢進することが示唆される。

マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAP キナーゼ) は細胞増殖因子やストレス刺激などの細胞外からの刺激に応答して活性化されるキナーゼ群である。そのひとつ p38 はストレス応答性 MAP キナーゼと呼ばれ、炎症反応のシグナル伝達に関与することが報告されている。

本研究の目的は (1) p38 が関節リウマチ及び変形性関節症の病態形成において、どのような機能を果たしているか、及び (2) p38 の阻害がこれら関節疾患に対する新規の治療法となりうるか、の 2 点を検討することである。実験には新規に合成された低分子化合物 R-130823 {2-(4-fluorophenyl)-4-(1-phenethyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-yl)-3-(pyridin-4-yl)-1H-pyrrole} を用い、両関節疾患を想定した *in vitro* 及び *in vivo* モデルにおいて p38 の特異的な阻害を試みた。



R-130823 の構造式

## 2 新規 p38 MAP キナーゼ阻害剤 R-130823 の抗炎症作用

R-130823 は p38 MAP キナーゼの $\alpha$ アイソフォームに対して選択的な阻害活性を示した ( $IC_{50}$  値 22 nM)。Lipopolysaccharide により刺激したヒト全血において、R-130823 は tumor necrosis factor (TNF)  $-\alpha$  及び IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 の産生を抑制した ( $IC_{50}$  値はそれぞれ 0.089, 0.066, 0.95, 0.16  $\mu$ M)。

ラットアジュバント関節炎モデルの関節浮腫に対して、R-130823 (1~30 mg/kg/day) は用量に依存した治療効果を示した。その効果は、同一投与量のレフルノミド (疾患修飾性抗リウマチ薬; 1, 3 mg/kg/day) と同程度であった。一方、メトトレキサート (疾患修飾性抗リウマチ薬; 0.20 mg/kg) はほとんど効果を示さなかった。

また、同関節炎モデルにおいて R-130823 (1~30 mg/kg) は用量に依存した鎮痛作用を示した。その鎮痛作用は投与 1 時間以内に速やかに発現し、30 mg/kg の用量では非ステロイド性鎮痛抗炎症薬であるセレコキシブと同様に投与 24 時間後まで作用が持続した。

マウスコラーゲン誘導関節炎モデルにおいて R-130823 (3~30 mg/kg/day) は関節組織破壊の進展を抑制した。罹患膝関節を病理組織学的に評価したところ、R-130823 は繊維芽細胞・滑膜細胞の増殖、好中球の浸潤などを抑制した。

## 3 ヒト軟骨細胞におけるプロスタグランジン E<sub>2</sub> 及び MMP 産生抑制効果

変形性関節症における p38 MAP キナーゼの関与を調べるため、ヒト軟骨細胞及びウシ軟骨組織における R-130823 の薬理作用を検討した。ヒト軟骨初代培養細胞では、IL-1 $\beta$  刺激により MMP-13, MMP-1 及びプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) の産生が誘導された。R-130823 はこれらの産生をそれぞれ  $IC_{50}$  値 20, 230, 3.9 nM で抑制した。同様に、MMP-13 産生に対する抑制効果はヒト軟骨肉腫細胞株 SW 1353 においても認められた ( $IC_{50}$  値 17 nM)。

ヒト軟骨初代培養細胞において、R-130823 は IL-1 $\beta$  刺激により誘導される MMP-13, MMP-1 及びシクロオキシゲナーゼ-2 (PGE<sub>2</sub> 産生の律速酵素の一つ) の mRNA レベルを抑制し ( $IC_{50}$  値はそれぞれ 4.2, 79, 21 nM), R-130823 は上記因子を mRNA レベルで抑制していることが示唆された。

軟骨はコラーゲンとプロテオグリカン (ムコ多糖類グリコサミノグリカンがタンパク質に結合した糖タンパク質) からなる線維性組織である。ウシ鼻中隔軟骨の器官培養において、R-130823 は IL-1 $\alpha$  と oncostatin M により誘導されるコラーゲン分解を抑制した ( $IC_{50}$  値 510 nM)。一方、R-130823 は IL-1 $\beta$  により誘導されるグリコサミノグリカン遊離を抑制しなかった。

## 4 ヒト滑膜細胞における炎症性サイトカイン及び MMP 産生抑制効果

パヌス (滑膜が変性した肉芽様組織) は関節リウマチの主徴であり、罹患関節において骨・軟骨組織を浸食する。パヌス内部の滑膜細胞は形質転換細胞に類似した形質を示し、炎症性サイトカイン、PGE<sub>2</sub> 及び MMP を産生する。この形質がパヌス内部の微小環境により誘導さ

れることを仮定し、スフェロイド（細胞塊）培養系によるパンスのシミュレーションを試みた。また、スフェロイド状態の滑膜細胞における p38 MAP キナーゼの機能を検討した。

ヒト滑膜肉腫細胞株 SW 982 は非接着性培養プレートにおいてスフェロイドを形成した。SW 982 細胞のスフェロイドは IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, PGE<sub>2</sub> 及び MMP-2, MMP-13 を産生した。スフェロイド内の細胞接着によるシグナル伝達を検討するため、インテグリン阻害オリゴペプチド（GRGDSP）並びにビトロネクチン受容体阻害剤 SB-265123 を添加したが、これらの産生は抑制されなかった。

スフェロイド状態の SW 982 細胞において、p38 MAP キナーゼのリン酸化が認められた。R-130823 は IL-6, IL-8 及び MMP-13 の産生を抑制したが（IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 51, 86, 30 nM）, IL-1 $\beta$  及び MMP-2 の産生を抑制しなかった。リアルタイム RT-PCR 測定により、IL-6, IL-8 及び MMP-13 の産生は mRNA レベルで抑制されていることが確認された。

スフェロイド状態の SW 982 細胞において、R-130823 は PGE<sub>2</sub> 産生を抑制しなかった。一方、SW 982 細胞を単層培養したとき、R-130823 は IL-1 $\beta$  刺激で誘導される PGE<sub>2</sub> 産生を抑制した。両培養系において R-130823 の PGE<sub>2</sub> 産生抑制効果に差が認められ、スフェロイド培養系は滑膜細胞における p38 MAP キナーゼのシグナル伝達経路を検討するにあたり、従来の単層培養系を補完する実験系となりうることを示された。

## 5 結論

R-130823 は p38 $\alpha$  アイソフォームに対し高い特異性を示す阻害剤である。ヒト全血を用いたサイトカイン産生抑制試験では強い抑制効果を示し、アジュバント関節炎モデルでは現在臨床で用いられるセレコキシブ、メトトレキサート及びレフルノミドに比して同程度以上の治療・鎮痛効果を示した。関節リウマチの動物モデルであるマウスコラーゲン誘導関節炎では、関節組織破壊に対する進展抑制効果が認められた。

R-130823 は軟骨細胞における MMP-13 や MMP-1 の産生を抑制し、ウシ鼻中隔軟骨の器官培養ではコラーゲンの遊離量を減少させた。R-130823 はさらに PGE<sub>2</sub> の産生も抑制することから、変形性関節症において p38 阻害剤が軟骨破壊抑制と疼痛緩和の作用を併せ持つことが期待される。

滑膜細胞のスフェロイドにおいて p38 MAP キナーゼのリン酸化が観察され、R-130823 の添加により IL-6, IL-8 及び MMP-13 の産生が抑制された。よって、関節リウマチのパンスでは、p38 MAP キナーゼが滑膜細胞における上記因子の産生に関与することが示唆される。

以上から、関節疾患においては p38 MAP キナーゼが炎症性メディエーター及び MMP の産生制御に関与することが示され、p38 阻害剤は関節リウマチ及び変形性関節症に対して既存薬にはない治療効果をもたらすことが期待される。