

## 主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

遠藤 渉

専攻分野：疾患プロテオーム・分子病態治療学

コース：

指導教授：加藤 智啓

主論文の題目：

Effects of Sulfasalazine and Tofacitinib on the Protein Profile of Articular Chondrocytes

(関節軟骨細胞の蛋白質プロファイルに対する sulfasalazine と tofacitinib の影響)

共著者：Mitsumi Arito, Toshiyuki Sato, Manae S. Kurokawa, Kazuki Omoteyama, Nobuko Iizuka, Kazuki Okamoto, Naoya Suematsu, Hiroshi Nakamura, Moroe Beppu, Tomohiro Kato

緒言

sulfasalazine (SSZ) は、methotrexate (MTX) と並んで頻用されている経口抗リウマチ薬である。MTX の第一義的な作用機序が、テトラヒドロ葉酸合成阻害であることがはっきりとしているのに比べ、SSZ の作用機序は、明らかではない。特に軟骨細胞に対する作用は、ほとんど理解されていない。また、tofacitinib は、ごく最近その使用が認可された抗リウマチ薬であり、Janus kinase (JAK) 1-3 を阻害剤し抗炎症作用を示すことがよく知られているが、SSZ 同様、軟骨細胞に対する作用は、ほとんど検討されていない。そこで、本研究では、ヒト関節軟骨細胞に対する SSZ と tofacitinib の作用を、両薬剤のヒト関節軟骨細胞の蛋白

質プロファイルに対する影響という観点からプロテオミクスの手法により検討した。また、関節リウマチや変形性関節症では、炎症性サイトカインの1つである IL-1 $\beta$ により軟骨破壊が進行することが報告されているので、IL-1 $\beta$ 刺激によるヒト関節軟骨細胞の蛋白質プロファイル変化に対する両薬剤の影響も検討した。

## 方法・対象

ヒト関節軟骨は、膝関節置換術の際に、変形性関節症患者から採取された (n=5)。関節軟骨より単離した軟骨細胞を培養し、コントロール (薬剤無し) と共に、tofacitinib、SSZ、IL-1 $\beta$ 、IL-1 $\beta$ +tofacitinib および IL-1 $\beta$ +SSZ を添加した計 6 群を作製した。48 時間培養後、各群の細胞を回収し、蛋白質を抽出し、蛍光標識 2 次元電気泳動に供し、蛋白質を網羅的かつ定量的に検出した。IL-1 $\beta$ により増加もしくは減少する蛋白質に対して、SSZ または tofacitinib により、IL-1 $\beta$ の影響が抑制される蛋白質を検出し、MALDI-TOF/TOF 型質量分析により同定した。

統計学的有意差は、Student の t 検定を用いて検討した。

なお、本研究は、聖マリアンナ医科大学の生命倫理委員会の承認を得ている (承認番号第 1315 号)。

## 結果

蛍光標識 2 次元電気泳動の結果、892 の蛋白質スポットが検出された。IL-1 $\beta$ 刺激で有意に強度が変化したスポットは 90 個であった。90 個の内、強度が 1.3 倍以上増加したスポットが 23 個、1/1.3 倍以下減少したものが 20 個であった。上記 23 個のスポットのうち、14 スポットの変化は、SSZ により抑制され、さらにその内の 4 個の変化は tofacitinib によっても抑制された。また、IL-1 $\beta$ 刺激により強度の低下した 20 個のスポットのうち、2 スポットの変化は SSZ により抑制されたが、tofacitinib では、いずれのスポットの変化も抑制しなかった。

本研究では、特に IL-1 $\beta$ 刺激で有意に変化しその変化が各薬剤で抑制された 16 個の蛋白質スポットを質量分析にて測定し、11 個の蛋白質を同定した。その 16 個のうち 4 つの蛋白質スポットは、IL-1 $\beta$ 刺激刺激で変化し、SSZ でも tofacitinib でもその変化が抑制された。蛋白質としては、3 個が Procollagen-lysine 2-oxoglutarate 5-dioxygenase (PLOD2)、1 個が AMP deaminase 2 (AMPD2)であった。その他の 12 個は、IL-1 $\beta$ 刺激での変化が、SSZ により抑制されるが、tofacitinib では抑制されないスポットであった。Acyl-coenzyme A synthetase (ACSL) 3 などが含まれていた。

## 考察

本研究では、IL-1 $\beta$ 刺激もしくは無刺激の軟骨細胞に対する SSZ と tofacitinib の影響をプロテオミクス的手法を用いて調べた。SSZ は、tofacitinib より多く IL-1 $\beta$ 刺激による蛋白質変化を抑制した。単独処理でも SSZ の方がより多くの蛋白質に影響を与えた。興味深いことに、両薬剤とも IL-1 $\beta$ 刺激による変化を助長するような蛋白質スポットは認められず、両薬剤とも関節リウマチ治療において軟骨破壊の進行を助長する可能性の少ない薬剤と考えられた。

本研究で見出された蛋白質の中には、ヒト関節軟骨細胞における両薬剤の作用機序理解の助けになると期待される蛋白質が複数あった。PLOD2 や AMPD2 がその例である。両蛋白質とも、IL-1 $\beta$ 刺激により増加し、SSZ 及び tofacitinib により抑制されるスポットから同定された。PLOD2 は、コラーゲンのリジン残基をヒドロキシリジン残基に変換する酵素である。このヒドロキシリジン残基は一部グリコシル化されるが、過剰なグリコシル化は変形性関節症の進行に関与するとの報告がある。SSZ と tofacitinib は、IL-1 $\beta$ 刺激により増加する PLOD2 を低下させることにより、過剰なグリコシル化からコラーゲン線維を保護する可能性が考えられ、その詳細は今後の検討課題である。

また、AMPD2 は、AMP を IMP に変換する酵素である。IL-1 $\beta$ 刺激による AMPD2 の増加は AMP を減少させ、AMP から合成されるアデノシンを減少させる可能性がある。そのため、SSZ と tofacitinib は、AMPD2 を低下させ、抗炎症作用をもつとされるアデノシンの量を回復する可能性が考えられる。また、tofacitinib 単独添加により AMPD2 の低下も認められているため、tofacitinib は、IL-1 $\beta$ 経路と独立してアデノシン量を増加させ、抗炎症効果を示す可能性もある。その詳細も今後の検討課題である。

## 結論

本研究は、関節リウマチ治療において使われる SSZ と tofacitinib の軟骨細胞に対する影響を理解する一助となる。