

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

小泉英樹

専攻分野：整形外科学

コース：疾患プロテオーム・分子病態治療学

指導教授：加藤智啓

主論文の題目：

Effects of Tofacitinib on Nucleic Acid Metabolism in Human Articular Chondrocytes

(ヒト関節軟骨細胞の核酸代謝に対するトファシティニブの効果)

共著者：

Mitsumi Arito, Wataru Endo, Manae S. Kurokawa,  
Kazuki Okamoto, Kazuki Omoteyama, Naoya Suematsu,  
Moroe Beppu, Tomohiro Kato

緒言

トファシティニブ (以下、tofacitinib, Tof) は、最近認可された経口抗リウマチ薬で、janus kinase 1-3 を阻害することにより抗炎症作用を示す。当研究室の蛍光二次元電気泳動法による研究で、Tof がヒト関節軟骨細胞の蛋白質プロファイルを変化させることを示した。本研究では、上記電気泳動上 Tof により減弱した蛋白質スポットから同定されたアデノシンーリン酸デアミナーゼ (AMP deaminase, AMPD) 2 に着目し、Tof の AMPD2 発現に対する影響について検討した。また、AMPD2 は AMP をイノシンーリン酸 (IMP) に変換する核酸代謝関連酵素であるため、Tof の作用を核酸代謝の観点から検討した。その結果、Tof は軟骨細胞の AMPD2 の発現を抑制しアデノシンを増加させることが判明した。Tof

のこれまで知られていなかった薬理作用として報告する。

#### 方法・対象

変形性膝関節症 (n=9) の人工関節置換術時に採取された関節軟骨から軟骨細胞を単離した。軟骨細胞から RNA を抽出し、RT-PCR による AMPD1-3 の発現の検索に供した。また、軟骨細胞 (n=6) を培養し、Tof (10  $\mu$ M) で 48 時間刺激後、蛋白質を抽出し、ウエスタンブロット (WB) により、AMPD2 および 3、アデノシンキナーゼ (adenosine kinase, ADK)、5' -ヌクレオチダーゼ (5' -nucleotidase, 5' -NT)、アデノシンデアミナーゼ (adenosine deaminase, ADA) を検出した。さらに、ヒト軟骨肉腫細胞である OUMS-27 で、同様の検討をすると共に、定量的 PCR により AMPD2 mRNA 量を測定した。加えて、OUMS-27 を用いて、Tof (10 および 100  $\mu$ M) で刺激した後、質量分析により細胞内アデノシンと AMP 量を測定した。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 1315 号)。

#### 結果

ヒトでは、AMPD ファミリーとして AMPD1-3 が報告されているため、まず、軟骨細胞 (n=3) で AMPD1-3 の発現を調べた。その結果、AMPD2 及び 3 が発現していることが明らかとなった。次に、軟骨細胞 (n=6) で Tof の AMPD2 及び 3 の発現に対する影響を WB で調べた。その結果、Tof により AMPD2 は有意に減少したが ( $p=0.025$ )、AMPD3 では明らかな変化が見られなかった ( $p=0.282$ )。OUMS-27 でも同様の結果が得られた。また、定量的 PCR の結果、Tof により AMPD2 の mRNA が減少したことから ( $p=0.012$ )、AMPD2 の減少は mRNA の減少によると結論した。

AMPD2 は、AMP を IMP に変換する酵素である。AMPD2 の減少は AMP から IMP への変換の抑制につながるため、AMP さらには AMP から作られるアデノシンを増加させる可能性が考えられた。そこで、OUMS-27 で Tof

の AMP およびアデノシン量に対する影響を調べた。その結果、Tof (100  $\mu$ M) により AMP は増加傾向を示し、(p=0.066)、アデノシンは有意に増加した (p=0.014)。

次に Tof による AMP 及びアデノシン代謝関連酵素の発現への影響を調べた。その結果、Tof によりアデノシンを AMP に変換する酵素 ADK と AMP をアデノシンに変換する酵素 5' -NT は減少傾向を示したが (それぞれ p=0.067、p=0.074)、アデノシンをイノシンに分解する酵素 ADA の明らかな変化は認められなかった (p=0.222)。また、OUMS-27 でも同様の結果が得られた。

### 考察

本研究により、Tof が軟骨細胞のアデノシン量を増加させることが明らかになった。細胞内アデノシンはトランスポーターを介して細胞外へ放出され、その受容体 (adenosine receptor, AR) を発現している細胞に作用する。AR には、A1R, A2AR, A2BR, および A3R があるが、軟骨細胞では A2AR の発現が報告されている。アデノシンは A2AR を介して炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  や IL-6 の合成を抑制することや抗炎症性サイトカインである IL-10 の合成を促進することが報告されている。また、アデノシンは、炎症反応を惹起する NF- $\kappa$ B を不活性化することやプロスタグランジン E2 の産生を抑制することも報告されている。これらを考え合わせると、Tof にはアデノシン増加を介して抗炎症作用を示すという作用機序も持つ可能性が考えられた。

### 結論

Tof は、ヒト関節軟骨細胞で AMPD2 の発現を抑制し、細胞内アデノシンを増加させることで、抗炎症作用を示す作用機序も持つ可能性が示された。

