D-penicillamine のヒト血管内皮細胞および 滑膜線維芽細胞に対する影響

松原 司・薩摩真一・黒田 司・廣畑和志*

The effect of D-penicillamine on the proliferation of human endothelial cells and synovial fibroblastic cells The effect of D-penicillamine (D-P) on proliferation of human endothelial cells (ECs) and synovial fibroblastic cells (SFCs) was examined. D-P inhibited DNA synthesis of both ECs and SFCs in the presence of copper sulfate. Inhibition of DNA synthesis occurred in a dose-dependent fashion and a significant inhibition was attained at 60 μ M D-P, a level which is attained in the serum of treated patients. Similar inhibition was observed by other thiols but not by disulfides. D-P, *in vitro*, produced hydrogen peroxide in the presence of copper sulfate. As the inhibition observed by D-P and copper sulfate was reversed almost to the control level by simultaneous addition of catalase and horseradish peroxidase, it is suggested that inhibition of EC and SFC DNA synthesis is due to the action of hydrogen peroxide produced by D-P and cupric ion.

D-P, therefore, may suppress the growth of pannus and synovial fibrosis by inhibition of synovial vessel growth and SFC proliferation and in this way, may reduce rheumatoid inflammation.

Tsukasa Matsubara • Shinichi Satsuma • Tsukasa Kuroda • Kazushi Hirohata*

* Department of Orthopaedic Surgery, Kobe University School of Medicine

key words: D-penicillamine, endothelial cell, synovial fibroblastic cell, hydrogen peroxide, DNA synthesis

慢性関節リウマチ(RA)の滑膜炎では、免疫学的異常を背景に滑膜の異常な増殖が起こり、隣接する軟骨・骨の破壊が生じる。このような病的過程で滑膜小血管や滑膜線維芽細胞は非常に重要な役割を担う。すなわち、前者は滑膜炎の栄養血管として、また滑膜への細胞浸潤の母床として、滑膜炎の維持に不可欠である。また、後者は免疫応答の過程で産生されるサイトカインに反応して増殖し¹⁾、パンヌスの増生や滑膜の線維化、ひいては罹患関節の強直に深く関与する。したがって、滑膜小血管や滑膜線維芽細胞の増殖を抑制し、RA滑膜炎の進展を阻害することにより抗リウマチ効果を得る可能性がある。

D-penicillamine(D-P)のRA治療における有効性については、ほぼ確立されており²⁻⁵⁾、その作用機序についても種々の報告がみられる⁶⁻¹¹⁾。しかしながら、その臨床の有効性を適確に裏づける作用機構に関しては不明な点も多い。そこで小血管新生に不可欠な血管内皮細胞(EC)の増殖と滑膜線維芽細胞(SFC)の増殖に対するD-Pの影響について解析し、この薬剤の持つ抗リウマチ効果の作用機序について検討した。

材料と方法

(1) ヒト血管内皮細胞と滑膜線維芽細胞の分離と培養

ECは、ヒト臍帯静脈をcollagenaseで処理して得られたものを用いた¹²⁾。初代培養のECは15%の熱処理したウシ胎児血清(FCS)、25 μ g/mlのEC増殖因子(ECGF)、5 U/mlのheparin sodiumと抗生物質入りのRPMI 1640中で継代し、3~4代目のものを実験に用いた。SFCはRA患者の手術的に得られた膝滑膜をcollagenase処理して得たものを用いた¹³⁾。RA患者はいずれも手術前6カ月以内に金剤やD-Pを含む遅効性抗リウマチ剤の投薬を受けていないものを対象とした。初代培養のSFCは、10% FCSと抗生物質入りのRPMI 1640中で継代培養し、3~4代目のものを実験に用いた。

(2) DNA合成の測定

2×10⁴個のECあるいは1×10⁴個のSFCを96穴のmicrotiter well(平底)上で、それぞれ48時間または72時間時間培養し、培養終了の18時間前に1 μ Ciのtritiated thymidine(³H-TdR)を添加した。培養終了後、trypsinで細胞をはがし遊離細胞をcell harvesterを用いて採取した。

つぎに、細胞内へ取り込まれた³H-TdRの総量を液体シンチレーションカウンターを使用して測定し、DNA合成の指標とした。

(3) D-Pと銅イオンによる過酸化水素合成

過酸化水素(H₂O₂)の合成はhorseradish peroxidase(HRPO)に依存した蛍光色素scopoletinの酸化を蛍光

* 神戸大学医学部整形外科教室

図1 EC と SFC の DNA 合成に対する D-P と硫酸銅の影響

ECGF 刺激の EC または IL-1 刺激の SFC に 100 μ M の D-P 単独あるいは D-P と 8 μ M の CuSO_4 を添加し、 ^3H -TdR の取り込みを測定した。各点は平均値を示す。

図2 D-P と硫酸銅による EC または SFC の DNA 合成の阻害

50 μ g の ECGF 刺激の EC または 1 U/ml の IL-1 刺激の SFC に 8 μ M の CuSO_4 の存在下と非存在下で D-P を加え、 ^3H -TdR の取り込みを測定した。コントロール(100%, EC: $48,780 \pm 5,200$ cpm, SFC: $58,800 \pm 7,200$ cpm)、各点は平均値の % of control で示し、Student's t test はコントロール(100%)との対比で行った。

*: $p < 0.05$, †: $p < 0.01$

光度計を用いて測定した¹⁴⁾。すなわち、D-P と D-P disulfide に硫酸銅を添加し、scopoletin 蛍光の減少をもつて H_2O_2 合成とした。

結果

(1) EC と SFC の DNA 合成に対する D-P と硫酸銅の影響

EC を ECGF の存在下で培養すると、濃度依存性に ^3H -TdR の細胞内への取り込みが増加する(図1)。治療 RA 患者の血中濃度である 100 μ M の D-P を単独で加えても、DNA 合成にはほとんど影響はないが、D-P と 8 μ M の硫酸銅を同時添加するといちじるしい ^3H -TdR の取り込みの抑制がみられた。同様の抑制効果は、interleukin 1(IL-1)で刺激した SFC の場合にも認められる(図1)。

DNA 合成の抑制作用は、ECGF あるいは IL-1 の濃度を変化させてもほとんど影響を受けないことより、D-P と硫酸銅が ECGF や IL-1 のそれぞれ EC や SFC への結合を阻害している可能性は少ない。つぎに、抑制作用の D-P 濃度依存性について検討した(図2)。EC および SFC の DNA 合成は、硫酸銅の存在下で D-P の濃度依存性に抑制され、有意な抑制効果は 60 μ M でみられた。

(2) SH compound および disulfide の EC と SFC の DNA 合成に対する影響

D-P は、cysteine の誘導体である。そこで種々の cysteine および他の thiol の DNA 合成に対する作用についても検討した(表1)。Thiol は、いずれも銅イオンの存在下で EC と SFC への ^3H -TdR の取り込みを抑制し、これは SH compound に共通した作用と考えられる。

表2は、D-P と glutathione の SH 型と -s-s- 型的作用を比較したものである。SH 型の glutathione は、D-P と同様に銅イオンの存在下で両細胞の DNA 合成をいちじるしく阻害した。一方、-s-s- 型の D-P と glutathione には銅イオンの存在下・非存在下にかかわらず、DNA 合成の阻害作用はみられない。すなわち、D-P や他の thiol による DNA 合成の抑制作用は、これらの化合物の SH 基が銅イオンの存在下で酸化され、-s-s- 結合に変換されるときに発現するものと考えられる。

(3) D-P と硫酸銅による過酸化水素の合成

近年、D-P が銅イオンの存在下で H_2O_2 を合成することが示唆されている¹⁵⁾。そこで、D-P と D-P disulfide を用い、硫酸銅の存在下で H_2O_2 合成を測定した(図3)。

scopoletin は、D-P あるいは D-P disulfide は単独では scopoletin の酸化作用はなく、蛍光の減少はみられないが、D-P に硫酸銅を添加することによりいちじるしく蛍光が減弱する。一方、D-P disulfide では硫酸銅の存在下・非存在下にかかわらず scopoletin の酸化は認められない。さらに、硫酸銅単独でも蛍光の減弱はみられ

表 1 SH compound による EC と SFC の DNA 合成の抑制

SH compound (150 μ M)	^3H -TdR incorporation (cpm $\times 10^{-3}$)			
	EC		SFC	
	CuSO ₄ (+)	CuSO ₄ (-)	CuSO ₄ (+)	CuSO ₄ (-)
D-cysteine	3.2 $\pm$ 0.3	4.5 $\pm$ 0.5	3.5 $\pm$ 0.4	5.8 $\pm$ 0.6
L-cysteine	2.8 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.3	3.7 $\pm$ 0.4	5.2 $\pm$ 0.7
DL-cysteine	2.2 $\pm$ 0.4	4.7 $\pm$ 0.6	3.9 $\pm$ 0.2	5.5 $\pm$ 0.5
thiomalic acid	3.3 $\pm$ 0.3	4.1 $\pm$ 0.4	4.8 $\pm$ 0.5	6.1 $\pm$ 0.3
2-mercaptoethanol	0.9 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.3	6.2 $\pm$ 0.6
dithiothreitol	0.5 $\pm$ 0.2	3.9 $\pm$ 0.6	1.3 $\pm$ 0.1	5.6 $\pm$ 0.3

50 $\mu\text{g/ml}$ の ECG で刺激した EC と 1 U/ml の IL-1 で刺激した SFC に、150 μM の SH compound を 8 μM の CuSO₄ の存在下または非存在下で加え、 ^3H -TdR の取り込みに対する影響をみた。各数値は平均値 $\pm$ SEM をあらわす。

表 2 DNA 合成に対する SH compound と disulfide の作用の比較

SH compound or disulfide (150 μ M)	^3H -dTR incorporation (cpm $\times 10^{-3}$)			
	EC		SFC	
	CuSO ₄ (+)	CuSO ₄ (-)	CuSO ₄ (+)	CuSO ₄ (-)
D-P	2.1 $\pm$ 0.3	5.3 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 0.2	5.5 $\pm$ 0.3
D-P disulfide	4.6 $\pm$ 0.5	4.8 $\pm$ 0.3	5.6 $\pm$ 0.5	6.0 $\pm$ 0.5
reduced glutathione	0.6 $\pm$ 0.3	4.7 $\pm$ 0.4	0.7 $\pm$ 0.2	5.4 $\pm$ 0.5
oxidized glutathione	4.9 $\pm$ 0.1	5.1 $\pm$ 0.3	5.3 $\pm$ 0.5	5.8 $\pm$ 0.7

50 $\mu\text{g/ml}$ の ECGF 刺激の EC と 1 U/ml と IL-1 刺激の SFC に 150 μM の SH compound または disulfide を 8 μM の CuSO₄ の存在下・非存在下で加え、 ^3H -TdR の細胞への取り込みを測定した。各数値は平均値 $\pm$ SEM をあらわす。

ない。したがって、D-P は銅イオンの存在下で酸化され、このときに H₂O₂ を合成し、この H₂O₂ が HRPO の存在下で scopoletin を酸化し、蛍光が減弱するものと考えられる。

(3) D-P と硫酸銅による DNA 合成抑制作用の catalase と horseradish peroxidase による阻害

EC と SFC の DNA 合成の抑制が、D-P と銅イオンによって合成される H₂O₂ の作用を介して生じているかどうかを検討した(図 4)。D-P と硫酸銅は、両細胞への ^3H -TdR の取り込みを著明に抑制するが、catalase (CAT) を同時添加することにより、 ^3H -TdR の取り込みはほぼコントロールにまで回復する。同様の抑制作用の阻害は HRPO でも認められる。これに反し、煮沸により酸素活性を消失させた CAT や superoxide dismutase (SOD) は、D-P と硫酸銅の作用に対してまったく拮抗しない。

合成された H₂O₂ は、Fenton 反応や Harber-Weiss 反応により hydroxyl radical に変換される可能性がある。そこで D-P と硫酸銅による抑制作用が、H₂O₂ より

図 3 D-P と硫酸銅による過酸化水素の合成 scopoletin (6.1 μM), HRPO (61 U/ml), 9.1 mM D-P (SH) または D-P (-s-s-) の反応液中に 1.2 mM の CuSO₄ を添加し、scopoletin 蛍光の減少を測定した。intensity の減少: 0.1 = 10 μM H₂O₂

図4 Catalase と horseradish peroxidase による D-P 作用の阻害効果

100 μ M の D-P と 8 μ M の CuSO₄ の存在下に CAT(500 U/ml), HRPO(280 U/ml), boiled CAT(500 U/ml), SOD(50 μ g/ml), DMSO(10 mM) または MAN(10 mM)を加え、EC または SFC への ³H-TdR の取り込みを測定した。バーは平均値±SEM を示す。

変換される hydroxyl radical の作用を介して生じているという可能性を否定するために、hydroxyl radical の scavenger である dimethylsulfoxide(DMSO)や mannitol (MAN)を培養下で同時添加した。DMSO や MAN によっても D-P と銅イオンによって誘導される DNA 合成の抑制は阻害されず、これらから EC と SFC の DNA 合成の D-P と硫酸銅による抑制効果は、H₂O₂ の直接的な作用を介して生じていることが強く示唆される。

考 察

D-P は、RA あるいは強皮症の治療においてその臨床的有効性が確立されている²⁻⁵⁾。その有効性を裏づける作用機序として、消炎作用⁶⁾、macroglobulin の解離作用^{7,8)}、多核白血球の走化の阻害⁹⁾、T リンパ球機能の抑制¹⁰⁾、あるいは collagen の架橋形成の阻害¹¹⁾などが報告されている。

筆者らも、D-P が血管新生を抑制すること¹⁶⁾や線維芽細胞の増殖を阻害すること¹⁷⁾を報告し、これらの作用が抗リウマチ効果の発現に重要であることを強調した。

今回の実験で、D-P は血管内皮細胞(EC)や滑膜線維芽細胞(SFC)の増殖を銅イオンの存在下で濃度依存性に抑制することが明らかとなった。有意な抑制作用は、両

細胞において 60 μ M の D-P 濃度で認められる。RA 患者に D-P を経口投与した時に得られる血中濃度は、約 130 μ M と報告されており^{18,19)}、したがって、EC や SFC の増殖を抑制した D-P の濃度は十分生理的濃度といえよう。

また、本実験で使用した硫酸銅の濃度は 8 μ M であり、これは RA 患者の血清あるいは関節液中で得られる銅濃度よりもはるかに低い濃度である²⁰⁻²²⁾。

D-P と同様の抑制作用は、銅イオンの存在下で他の thiol にも認められた。D-P は動物実験あるいは実際の RA 患者の治療に用いられた場合、他の thiol よりもより有効であることが確認されている^{23,24)}。これは D-P が他とくらべ、amino acid oxidase や cysteine disulfhydrylase などにより分解を受にくいこと²⁵⁾や、D-P の autoxidation が他よりも緩徐に生じる²⁶⁾ためであろう。

近年、D-P が銅イオンの存在下で H₂O₂ を合成することが示唆されており¹⁵⁾、また、D-P による T リンパ球の機能抑制が、H₂O₂ の作用を介して生じることが報告されている¹⁰⁾。

本実験においても、D-P は銅イオンの存在下で scopoletin を酸化し、また、DNA 合成の抑制も CAT や HRPO によりコントロールレベルにまで回復することから、D-P による EC や SFC の増殖抑制は、H₂O₂ の作用を介して生じていることが強く示唆される。さらに、両細胞においてアッセイ開始直後の 1 時間に D-P と硫酸銅が培養液中に存在すると、以後培養液中からこれらを除去しても最大の抑制効果が得られ、したがって、H₂O₂ の作用は非常に短時間で発現している可能性が大きい。

RA 滑膜炎では、浸潤するマクロファージにより産生される線維芽細胞増殖因子(FGF)や、IL-1 が血管新生や滑膜細胞の増殖を促進させる。D-P は、このマクロファージからの IL-1 の放出を阻害せず¹⁶⁾、また、免疫応答における accessory cell としての機能をも抑制しないこと²⁷⁾が報告されている。これはマクロファージには CAT 活性が高く、D-P と銅イオンによって産生される H₂O₂ の作用を受けにくいと推測される。したがって、滑膜炎で D-P は、直接的に EC や SFC の増殖を阻害しているものと考えられる。D-P はこれらの細胞の増殖を抑制する結果、滑膜小血管やパンスの増生を阻害し、抗リウマチ効果を発現している可能性が大きい。

結 語

D-P は銅イオンの存在下で H₂O₂ を合成し、この H₂O₂ の作用を介して血管内皮細胞や滑膜線維芽細胞の増殖を抑制した。D-P は、これらの抑制作用を介して滑膜小血管や RA パンスの増生を阻害し、抗リウマチ効果を発現している可能性が大きい。

文 献

- 1) Schmidt, J.A., Steven, B.M., Cohen, D., Green, I.: Interleukin 1, a potential regulator of fibroblast proliferation. *J. Immunol.* 128: 2177-2182, 1982.
- 2) Multicenter Trial Group: Controlled trial of (D)-penicillamine in severe rheumatoid arthritis. *Lancet* 1: 275-280, 1973.
- 3) Dixon, A.S.J., Davis, J., Dormandy, T.L., Hamilton, E.B.D., Holt, P.J.L., Mason, R.M., Thompson, M., Weber, J.C.P., Zutshi, D.W.: Synthetic D-penicillamine in rheumatoid arthritis: double blind controlled study of high and low dosage regimens. *Ann. Rheum. Dis.* 34: 416-421, 1975.
- 4) Berry, H., Liyanage, S.P., Durance, R.A., Barnes, C.G., Berger L.A., Evans, S.: Azathioprine and penicillamine in treatment of rheumatoid arthritis: a controlled trial. *Br. Med. J.* 1: 1052-1054, 1976.
- 5) Shiokawa, Y., Horiuchi, Y., Honma, M., Kageyama, T., Okada T., Azuma, T.: Clinical evaluation of D-penicillamine by multicentric double-blind comparative study in chronic rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 20: 1464-1472, 1977.
- 6) Sorenson, J.R.J.: Copper chelates as possible active form of the antiarthritic agents. *J. Med. Chem.* 19: 135-148, 1976.
- 7) Ritzmann, S.E., Coleman, S.L., Levin, W.C.: The effect of some mercaptanes upon a macrocyogelglobulin: modification induced by cysteamine, penicillamine, and penicillin. *J. Clin. Invest.* 39: 1320-1329, 1960.
- 8) Jaffe, I.A.: Intra-articular dissociation of rheumatoid factor. *J. Lab. Clin. Med.* 60: 409-421, 1962.
- 9) Chwalinska-Sadowska, H., Baum, J.: The effect of D-penicillamine on polymorphonuclear leukocyte function. *J. Clin. Invest.* 58: 871-879, 1976.
- 10) Lipsky, P.F., Ziff, M.: Immunosuppression by D-penicillamine *in vitro*: inhibition of human T lymphocyte proliferation by copper- or ceruloplasmin-dependent generation of hydrogen peroxide and protection by monocytes. *J. Clin. Invest.* 73: 53-65, 1984.
- 11) Siegel, R.C.: Collagen crosslinking: effect of D-penicillamine on crosslinking *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 252: 254-259, 1977.
- 12) Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G., Minick, C.R.: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J. Clin. Invest.* 52: 2745-2756, 1973.
- 13) Dayer, J.M., Krane, S.M., Russell, R.G.G., Robinson, D.R.: Production of collagenase and prostaglandins by isolated adherent rheumatoid synovial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 945-949, 1976.
- 14) Root, R.K., Metcalf, J., Oshino, N., Chance, B.: H_2O_2 release from human granulocytes during phagocytosis. I. Documentation, quantitation, and some regulating factors. *J. Clin. Invest.* 53: 945-955, 1975.
- 15) Starkebaum, G., Root, R.K.: D-penicillamine: analysis of the mechanism of copper-catalyzed hydrogen peroxide generation. *J. Immunol.* 134: 3371-3378, 1985.
- 16) Matsubara, T., Saura, R., Hirohata, K., Ziff, M.: Inhibition of human endothelial cell proliferation *in vitro* and neovascularization *in vivo* by D-penicillamine. *J. Clin. Invest.* 83: 158-167, 1989.
- 17) Matsubara, T., Hirohata, K.: Suppression of human fibroblast proliferation by D-penicillamine and copper sulfate *in vitro*. *Arthritis Rheum.* 31: 964-972, 1988.
- 18) Muijsers, A.O., van de Stadt, R.J., Henrichs, A.M.A., van de Korst, J.: Determination of D-penicillamine in serum and urine of patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Chim. Acta.* 94: 173-180, 1979.
- 19) Van de Stadt R.J.: Muijsers, A.O., Henrichs, A.M.A., van de Korst, J.K.: D-penicillamine: biochemical, metabolic, and pharmacologic aspects. *Scan. J. Rheumatol. (Supp.)* 29: 13-20, 1979.
- 20) Scudder, P.R., Al-Timini, D., McMurphy, W., White, A.G., Zoob, B.C., Dormandy, T.L.: Serum copper and related variables in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 37: 67-70, 1978.
- 21) Aaseth, J., Munthe, E., Forre, O., Steiners, E.: Trace elements in serum and urine of patients with rheumatoid arthritis. *Scan. J. Rheumatol.* 7: 237-340, 1978.
- 22) Scudder, P.R., McMurphy, W., White, A.G., Dormandy, T.L.: Synovial fluid copper and related variables in rheumatoid and degenerative arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 37: 71-72, 1978.
- 23) Klammer, B., Kimura, E.T., Maksteinieks, M.: Effects of oral cysteine, penicillamine and N-acetyl-penicillamine on adjuvant arthritis in rats. *Pharmacol. Clin.* 1: 283-288, 1968.
- 24) Jaffe, J.A., Merryman, P.: Effect of increased serum sulfhydryl content on titre of rheumatoid factor. *Ann. Rheum. Dis.* 27: 14-18, 1968.
- 25) Aphosian, H.V., Bradham, L.S.: Metabolism *in vitro* of the sulfhydryl amino acids, L- and D-penicillamine. *Biochem. Pharmacol.* 3: 37-47, 1959.
- 26) Jellum, E., Skrede, S.: Biological aspects of thiol-disulfide reactions during treatment with penicillamine. *Penicillamine Research in Rheumatoid Disease.* (ed. Munthe, E.), Oslo, Fabritius and Sonner, 1976.
- 27) Lipsky, P.E., Ziff, M.: The effect of D-penicillamine on mitogen-induced human lymphocyte proliferation: synergistic inhibition by D-penicillamine and copper salts. *J. Immunol.* 120: 1006-1013, 1978.