Bucillamine, auranofin, salazosulfapyridine の IgMRF 分泌系に及ぼす影響

江崎一子・和田哲也・神宮政男・延永 正*

The effect of immunomodulators, bucillamine, auranofin, salazosulfapyridine, on the secretion of IgM rheumatoid factor by a human-mouse hetero hybridoma

It has been shown that immunomodulators are effective as a remittive agent in the treatment of rheumatoid arthritis(RA). But their modes of action are not fully understood yet although they are significantly different from the effects of the non-steroidal anti-inflammatory drugs. Most of the immunomodulators have been shown to have *in vitro* and *in vivo* effects on the immune system which are probably related to their therapeutic effectiveness.

In the present study, we investigated *in vitro* effects of immunomodulators, bucillamine (Bc), auranofin (AF), salazosulfapyridine (SASP), on the production and secretion of monoclonal IgM rheumatoid factor (RF) by human-mouse hetero hybridoma (YES8c).

Each drug exerted inhibitory effects on expression of messenger RNA, production and secretion of RF protein. These results suggest that Bc, AF and SASP have immunomodulatory characteristics which may be related to their direct inhibitory effects on B lymphocytes *in vivo*.

Ichiko Ezaki・Tetsuya Wada・
Masao Shingu・Masashi Nobunaga*

key words: rheumatoid factor production,
B cell-hybridoma, bucillamine,
auranofin, salazosulfapyridine

慢性関節リウマチ(RA)の治療薬として、ステロイド剤、免疫抑制剤に加えて免疫調節剤が臨床的に有効であることは、ほぼ確立されているといわれてよい¹⁻³⁾。RAの病態形成に免疫異常が深く関与していることから、免疫調節剤は今後も発展していく治療薬の一つと考えられるが、現在使用されている免疫調節剤の作用機序に関しては不明な点が多く残されており、臨床の有効性を適切に説明できるまでには至っていない。

auranofin(AF)および bucillamine(Bc)などの免疫調節剤は臨床薬理効果の一つとして血中のリウ

マトイド因子(RF)を低下させ^{4,5)}、また、Bcおよび salazosulfapyridine(SASP)は *in vitro* で RF を低下させることが認められている⁶⁾。その作用機序としては、単球機能の抑制⁷⁾、T細胞を介するB細胞機能の抑制⁸⁾、あるいはB細胞機能への直接的抑制などが考えられているが、一定の結論は得られていない。

そこで今回ヒト型 IgMRF を産生するヒトマウスヘテロハイブリドーマ株(YES8c)を用いて Bc, AF, SASP の IgMRF 分泌能に及ぼす影響を解析し、これら薬剤の持つ免疫調節作用の機序について検討した。

材料と方法

(1) ヒト型モノクローナル IgMRF を産生する細胞株(YES8c)の樹立

既報⁹⁾のごとく、RAにマクログロブリン血症を合併した患者リンパ球とマウスミエローマ株(P3/X63-Ag8. UI)をポリエチレングリコール法により細胞融合し、hypoxanthine (1×10^{-4} M), aminopterin (4×10^{-7} M), thymidine (1.6×10^{-5} M)を加えた10% FCS-RPMI 1640 培地(HAT 選択培地)でハイブリドーマ株を選択した。RF 産生株のクローニングは培養上清の RF 活性(後述)を測定して確認し、限界希釈法を2回行ったのち、IgMRF を長期に安定に産生する細胞株(YES8c)を樹立した。

(2) 被検免疫調節剤

bucillamine(Bc)(参天製薬)、auranofin(AF)(スミスクライン、ビーチャム)、salazosulfapyridine(SASP)(生化学工業)の3種を用時、少量の0.1N NaOH またはエチルアルコールに溶解し、0.01M リン酸緩衝液-0.14 M NaCl, pH 7.4 (PBS)で希釈して使用した。

(3) ハイブリドーマの培養および免疫調節剤の処理

無血清培地(エスロン:三光純薬)で 5×10^5

* Department of Clinical Immunology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, 69 Beppu, Oita, 874 Japan 九州大学生体防御医学研究所臨床免疫学部門

個/ml に調製した YES8c 細胞に Bc(終濃度 28.8, 75 $\mu\text{g/ml}$), AF (5.4, 16 $\mu\text{g/ml}$), SASP (72.2, 216 $\mu\text{g/ml}$) または薬剤希釈液のみを加え, CO_2 インキュベーター中, 37°C , 4 時間培養後, PBS で 2 回洗浄した. もとの細胞濃度になるよう無血清培地に再浮遊させて経時的に培養上清および細胞を分取し, 細胞はさらに PBS で洗浄したのち, それぞれの測定に供した.

(4) RF の測定

RF 活性は既報¹⁰⁾ のサンドイッチ酵素免疫抗体法(ELISA)に準じて測定した.

すなわち, ウサギ IgG(Miles Co. USA)(10 $\mu\text{g/ml}$) を室温 3 時間被覆し, 1% ウシ血清アルブミンで後被覆したマイクロタイタープレート(Flow Inc. USA)に培養上清または細胞破砕液を 100 $\mu\text{l/well}$ になるよう加え, 37°C , 1 夜放置後洗浄して, ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgM 抗体 F(ab')_2 分画(Cappel Co. USA)を 100 $\mu\text{l/well}$ で反応させた. 結合した標識抗体に TMB 基質(Vector Inc. USA)を反応させ, OD 450 nm で比色定量した.

(5) RNA 調製とノーザンブロット解析

5×10^6 個の細胞に 0.25 M sucrose-0.1 M Tris-0.1 M NaCl およびヘパリン(500 $\mu\text{g/ml}$)を加え, 遠心分離して上清からフェノール/m-クレゾール(V/V: 9/1)および 1% SDS で RNA を抽出した. 10 μg の RNA を 6%ホルムアルデヒド存在下, 0.75%アガロースゲル電気泳動後, ナイロン膜(Zeta-Probe, Bio Rad. Co.)にブロットして, UV 照射により固定した. RF のメッセンジャー RNA(mRNA)の発現は YES8c 細胞よりクローニングした $\text{V}\kappa\text{DNA}$ の coding region を含む 351 bp を ^{32}P で標識して検出プローブとし, 50°C , 16 時間ハイブリダイゼーションを行った. ナイロン膜は $1.5 \times \text{SSC}$ -0.1% SDS で洗浄後, オートラジオグラフィーを行った.

(6) 細胞破砕液の調製

2.5×10^6 個の細胞を PBS で 2 回洗浄し, PBS に再浮遊させて超音波破碎(30W, 20秒)を行い, 遠心分離して上清を細胞内可溶性分画として測定に供した.

結 果

(1) ハイブリドーマ培養上清の RF 量の経時的変動と免疫調節剤による影響

図 1 YES8c 細胞の培養上清中に分泌される IgMRF 量—免疫調節剤処理の影響

—: 対照(PBS). $\triangle$ — $\triangle$: auranofin
■—■: bucillamine. $\circ$ — $\circ$: salazosulfapyridine

免疫調節剤がハイブリドーマ(YES8c 細胞)の RF 分泌に影響を及ぼすかどうかを検討するために, 細胞に Bc(終濃度 28.8, 75 $\mu\text{g/ml}$), AF(5.4, 16 $\mu\text{g/ml}$), SASP (72.2, 216 $\mu\text{g/ml}$), または薬剤を含まない希釈液のみを加え, CO_2 インキュベーター中, 37°C , 4 時間培養後, 薬剤を除去したのち, さらに 6.5 時間または 17 時間培養後の上清中に分泌される IgMRF の量を ELISA 法で測定した. 17 時間培養後の生細胞は, AF を 16 $\mu\text{g/ml}$ で処理した群のみ 60% に減少していたが, 他の群は対照群と同様ほとんど減少しないことが確認された.

図 1 に示すように, 対照群は 6.5 時間に 5×10^5 個/ml 当たり 270 ng/ml, 17 時間に 700 ng/ml の IgMRF を培養液中に分泌したが, 免疫調節剤処理群は対照群に比し, いずれも用量依存性に分泌量が減少した. また, 同濃度の薬剤を試験管内で直接, 培養上清に添加して 17 時間後の IgMRF 活性を添加前と比較したが, 変化は認められなかった.

(2) 細胞内の RF 量に及ぼす免疫調節剤の影響

① RF 蛋白質量の変化

免疫調節剤処理により細胞内の RF 量に変化が

図2 YES8c 細胞内の IgMRF 量—免疫調節剤除去直後の比較

AF: auranofin. Bc: bucillamine
SASP: salazosulfapyridine

生じるか否かを検討するために、薬剤除去後の培養細胞について超音波破碎を行い、可溶性分画の IgMRF の定量を ELISA 法で行った。

図2は薬剤除去直後の結果を示しているが、対照群に比し薬剤処理群では細胞内の RF 量も用量依存性に減少していた。また、図には示していないが、κ 鎖蛋白の定量も抗ヒト κ 鎖抗体を被覆したマイクロプレートを用いて ELISA 法で行ったところ、RF 量の変化と同じような結果が得られた。

② RF の mRNA 発現量の変化

免疫調節剤処理後、RF の mRNA の発現量に変化が生じるか否かを検討するために、薬剤除去直後の細胞から RNA を抽出して、ノーザンブロット解析を行った。対照群にくらべ薬剤処理群では、RF の mRNA 発現量も用量依存性に抑制されていた(図3)。

考 察

免疫調節剤は、自己免疫病の自然発症モデル

図3 YES8c 細胞内の IgMRF—メッセンジャー RNA の発現—免疫調節剤除去直後のノーザンブロット解析

lane 1 : 対照(PBS)
lane 2 : auranofin(5.4 μg/ml)
lane 3 : auranofin(16 μg/ml)
lane 4 : bucillamine(28.8 μg/ml)
lane 5 : bucillamine(86.6 μg/ml)
lane 6 : salazosulfapyridine(72.2 μg/ml)
lane 7 : salazosulfapyridine(216 μg/ml)

(MRL/1 マウス)の脾臓細胞の免疫グロブリンを低下させる¹¹⁾のみでなく、RA 患者への *in vivo* 投与で血中の RF 濃度を低下させることが示されている³⁾。また、免疫調節剤を投与した RA 患者から分離した単核球は、IgM, IgA, および IgMRF の産生が有意に低下していることが示されている¹²⁾。それら免疫調節剤の免疫グロブリンを低下させる作用機序としては、T細胞系の是正やB細胞系への直接的な抑制、あるいは単球系の抑制を介した機序¹³⁾などが考えられている。

in vitro の系において健康者末梢血単核球を用い、poke weed mitogen (PWM) の存在下、免疫グロブリンおよび RF 産生に及ぼす免疫調節剤の影響をみたところ、薬剤添加群では IgG, IgM, IgGRF, IgMRF が有意に低下した¹⁴⁾。

今回、さらに *in vitro* でB細胞系の自立増殖性 RF 分泌株における免疫調節剤の影響を検討した結果、これら薬剤により RF 分泌が抑制されることを認めた。さらに、細胞内の RF 量とその mRNA の発現量も免疫調節剤の用量に依存して減少していた。なお、今回は自立増殖性の細胞を用いたことから、doubling time の影響をできるだけ抑えるために検討の時間を短くした。薬剤の

処理濃度は臨床的な使用量を幾分上回っているが、4時間の添加時間と除去後の17時間の培養中に死細胞の増加が認められたのは、AF(16 $\mu\text{g/ml}$)のみであった。

以上の結果から、これら薬剤の作用点についてはさらに詳細な検討が必要であるが、少なくとも使用した薬剤ではRFのmRNAの発現が抑えられた結果、合成され細胞外に分泌されるRF量が減少したと推察される。したがって今回検討した免疫調節剤は*in vivo*においてもB細胞に直接作用して抗体の産生と分泌を抑制している可能性が十分に考えられ、これら薬剤の持つ免疫調節作用の一部を説明できるのではないかとと思われる。

加えて本細胞株を用いた抗体産生および分泌能の測定系は、免疫調節剤の作用機序を検討するうえで簡便で有用な方法の一つと考えられた。

稿を終わるにあたり、本実験にご協力いただいた当科研究室の伊藤真由美氏、弥野美佐子氏、松浜典子氏に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は、第12回日本炎症学会(1991年7月、東京)において報告した。

文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 塩川優一, 小川暢也, 安倍千之, 小坂志朗, 本間光男, 秋月正史, 影山孝正, 水島 裕, 菅原幸子, 七川敏次, 大藤 真: SA 96 の慢性関節リウマチに対する薬効検定—他施設共同二重盲検比較試験—. *医学のあゆみ* 135: 1116-1133, 1985.
- 4) 小松原良雄: 封筒法による金注射剤との比較試験. *Auranofin RA の寛解導入剤最近の進歩*. *Medical Tribune*: 57-68, 1987.
- 5) 石川浩一郎, 松原三郎, 大平 卓, 益田郁子, 鶴田敬朗, 西 寿二, 緒方博司, 北川敏夫: 慢性関節リウマチに対するブシラミン(リマチル)の長期投与試験成績. *炎症* 8: 169-180, 1988.
- 6) Comer, S.S., Jasin, H.E.: *In vitro* Immunomodulatory effects of sulfasalazine and its metabolites. *J. Rheumatol.* 15: 580-586, 1988.
- 7) Lipsky, P.E., Ugai, K., Ziff, M.: Alterations in human monocyte structure and function induced by incubation with gold sodium thiomalate. *J. Rheumatol.* 5 (suppl.): 130-136, 1979.
- 8) Lipsky, P.E., Ziff, M.: Inhibition of human helper T cell function *in vitro* by D-penicillamine and CuSO_4 . *J. Clin. Invest.* 65: 1069-1706, 1980.
- 9) Ezaki, I., Kanda, H., Sakai, K., Fukui, N., Shingu, M., Nobunaga, M., Watanabe, T.: Restricted diversity of the variable region nucleotide sequences of the heavy and light chains of a human rheumatoid factor. *Arthritis Rheum.* 34: 343-350, 1991.
- 10) Ezaki, I., Shingu, M., Nobunaga, M., Ohtsuka, E.: Detection of low molecular weight IgM by immunoblot analysis in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 14: 674-679, 1987.
- 11) 中野利昭, 上野晃子, 大杉義征: MRL/Mp-lpr/lpr マウスの免疫異常に対するロベンザリットの調節作用. *臨床免疫* 18: 387-394, 1986.
- 12) Hanley, J.G., Hassan, J., Whelan, A., Feighery, C., Bresnihan, B.: Effects of gold therapy on the synthesis and quantity of serum and synovial fluid IgM and IgA rheumatoid factors in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 29: 480-486, 1986.
- 13) 越智隆弘, 青木康彰, 小野 哲郎: Remission-inducing drug による *in vitro* ヒトヘルパーマクロファージ機能抑制作用. *炎症* 8: 147-151, 1988.
- 14) 和田哲也, 神宮政男, 吉岡和則, 江崎一子, 延永正: 健康者単核球の免疫グロブリンおよびリウマトイド因子産生に対する免疫調節剤の影響. *炎症* 11: 561-566, 1991.