慢性関節リウマチ患者単核球に対する T-614 およびその誘導体の影響

神宮政男・橋本 通・和田哲也・江崎一子・延永 正*

Effects of T-614, a new antirheumatic drugs, on mononuclear cell function

T-614 is a chemical compound which has been shown to have clinical efficacy as an antirheumatic drug in patients with rheumatoid arthritis(RA). In the present study, we investigated the effects of T-614 and its derivatives M1 and M2 on mononuclear cell (MNC) function.

MNC obtained from the peripheral blood of RA patients were cultured with varying concentrations of T-614 for 24 h or 7 days. and the supernatants were measured for substances produced from monocytes and T and B lymphocytes. T-614 inhibited IL-1 β , IL-6 and TNF- α production in MNC.

These results suggest that T-614 exerts immunosuppressive effects on monocytes and these effects may be one of the mechanisms by which T-614 shows therapeutic effects in patients with RA.

Rec. 7/7/1994, Acc. 10/31/1994, pp 55~59

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

**key words : T-614, IL-1 β , soluble IL-2 receptor, rheumatoid
arthritis, antirheumatic drugs**

慢性関節リウマチ(RA)では単球・マクロファージ、リンパ球などの炎症細胞をはじめ、滑膜細胞、軟骨細胞および血管内皮細胞などの組織細胞においても各種の細胞免疫異常が起こり、これらの細胞からはインターロイキン1(IL-1)が産生され、このIL-1はRAの滑膜炎の慢性化と引き続き起こる軟骨破壊に重要な役割を演じる^{1~3)}。さらに、IL-1から始まるサイトカインカスケードの異常が起こり、IL-2, IL-6, IL-8, および腫瘍壊死因子(TNF- α)の産生異常がもたらされる。

一方、リウマトイド因子(RF)はRA患者血中で高く検出され、RAの病態に関与するとされる⁴⁾。このようなRF高値は、B細胞そのものの

図1 Structure of T-614

産生異常のみでなく、マクロファージないしはT細胞の機能異常によっても惹起される。

これらの細胞免疫異常を修飾する薬剤として、疾患修飾剤(DMARDs)が重要である。多くのDMARDsは*in vitro*において単核球(MNC)によるIL-1, TNF- α およびIL-6などのサイトカインやIgG-RF, IgM-RF産生を抑制する^{5~7)}。

T-614(3-formylamino-7-methylsulfonylamino-6-phenoxy-4H-1-benzopyran-4-

* Department of Clinical Immunology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University 九州大学生体防御医学研究所臨床免疫学部門
Offprint requests to : Masao Shingu, Department of Clinical Immunology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University 69, 4546 Tsurumihara, Beppu 874, Japan

図2 Effects of T-614 on IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IL-8 production by MNC

MNC obtained from the peripheral blood of each patient with RA were cultured with T614 for 24 h, and supernatants were measured for IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IL-8 by ELISA. Data are expressed as mean $\pm$ SD of % control(% inhibition or % enhancement). *P<0.05, **P<0.01 calculated by Mann-Whitney U test.

one)(富山化学)は、クロモン骨格にメチルスルフォニルアミノ基を導入した新規な構造を有する抗炎症剤であり(図1), IL-1産生をも抑制することから, DMARDsの部類に属する合成薬としてRA患者でもその有用性が確認されつつある。

今回, T-614の作用機序を明らかにする目的で, *in vitro*にてT-614およびその誘導体(3-acetylamino-7-methylsulfonylamino-6-phenoxy-4H-1-benzopyran=M1, 3-acetylamino-7-methylsulfonylamino-6-phenoxy-4H-1-benzopyran-4-one=M2)のRA患者MNCに対する影響を検討した。

材料と方法

① MNC: MNCは6例のRA患者ヘパリン化末梢血より比重遠心法にて分離し, 抗生物質を含む10%ウシ胎児血清添加RPMI 1640に1×

10⁶/mlの濃度に浮遊した¹⁾。

② 薬剤: T-614, M1, およびM2各100mgに0.1N NaOH水溶液3mlを加え, ボルテックスにて混和することにより溶解し, 水を加え最終濃度100mg/10ml(10mg/ml)とした。

③ 培養: MNC 1mlにT-614, M1, およびM2各0.02mlを加え, PHA(最終濃度10 μ g/ml)存在下または非存在下にて24時間または7日間(IgG-RFおよびIgM-RF測定用サンプル)培養, 遠心により得られた上清を-70°Cに保存し, サンプルとした。

④ サイトカインの測定: IL-1 β ・TNF- α (大塚製薬), IL-6(イムノテック)およびIL-8(アマーシャム)は各ELISAキットにて測定した。

⑤ 可溶性IL-2レセプター, 可溶性CD23および可溶性ICAM-1の測定: 可溶性IL-2レセプター(sIL-2R)および可溶性CD23(sCD23)および可溶性ICAM-1(sICAM-1)はELISAキット(sIL-2R・sCD23はイムノテック, sICAM-1はベンダーメドシステム)にて測定した。

⑥ 細胞傷害の測定: 細胞傷害は各培養上清サンプル, 細胞無添加の培養液(ブランク)および3回凍結・融解を繰り返したMNC浮遊液(1 $\times$ 10⁶/ml, 1ml)を遠心し, 得られた上清(最大サンプル)につき, cytotox 96 nonradioactive cytotoxicity assayキット(Promega)を用い, LDH濃度を測定し, 次式により%細胞傷害率を計算した²⁾。

$$\%細胞傷害率 = \frac{(\text{サンプル}) - (\text{ブランク})}{(\text{最大サンプル}) - (\text{ブランク})} \times 100$$

⑦ IgG-RFおよびIgM-RFの測定: 7日間培養MNC上清をサンプルとし, IgG-RFおよびIgM-RFを既報のごとく⁶⁾, ELISA法にて測定した。

結果

① MNCによるIL-1 β , TNF- α , IL-6およびIL-8産生に対するT-614, M1およびM2の影響: MNCによるIL-1 β およびIL-6産生に対し, T-614はその濃度依存性に抑制し, 最終濃度30 μ g/mlの濃度で有意に(P<0.01)抑制したが, その他の濃度では有意な影響はみられなかった。TNF- α 産生はT-614の濃度依存性に抑制され,

図3 Effects of T-614 on sIL-2R, sCD23, sICAM-1 and IgG-RF production by MNC

The effects of T-614 on MNC function were studied as in figure 2. MNC cultured for 7 days were used for IgG-RF.

図4 Effects of T-614M1 on sIL-2R, sCD23, sICAM-1 and IgG-RF production by MNC

The effects of T-614M1 on MNC function were studied as in figures 2 and 3. * $P < 0.05$

10 および 30 $\mu\text{g/ml}$ により有意に ($P < 0.05$) 抑制された。IL-8 産生に対し、T-614 は、いずれの濃度でもなら影響を示さなかった。T-614 は IL-1 β 産生に対しては 3.3 $\mu\text{g/ml}$ でむしろ増強する傾向を示し、個々の患者別にみると特に 2 例においてその傾向が強く、その作用は二相性であることが示唆された(図 2)。

一方、T-614 の誘導体である T-614 M1 および T-614 M2 いずれも MNC の IL-1 β , TNF- α , IL-6 および IL-8 産生に対し有意な影響を示さなかった。

② MNC による sIL-2R, sCD 23, sICAM-1 および IgG-RF 産生に対する T-614, M1 および M2 の影響: MNC の sIL-2R, sCD 23, sICAM-1 および IgG-RF 産生に対する T-614, M1 および M2 の影響を検討したが、T-614, M1, および M2 いずれも MNC の sIL-2R, sCD 23, sICAM-1 および IgG-RF 産生に対し、有意な抑制作用を示さ

なかった(図 3, 4, 5)。

③ MNC により産生される各種パラメーターを 50% 抑制する薬剤濃度: TNF- α および IL-6 を 50% 抑制する T-614 濃度 (IC-50 値) はそれぞれ 2.4, 10.1 $\mu\text{g/ml}$ であり、同様に計算した M1 (それぞれ 2.4 および 30 $\mu\text{g/ml}$) および M2 (それぞれ >30 , >30 $\mu\text{g/ml}$) の IC 50 値にくらべ比較的低濃度で抑制することが示された。

④ 薬剤による MNC 傷害作用: ELISA 法にて培養上清中の LDH を測定することにより、MNC 傷害を検討したところ、薬剤添加、無添加にかかわらず、24 時間培養 MNC にくらべ 7 日間培養 MNC において有意に高い細胞傷害性が認められた。しかしながら、いずれの培養時間およびいずれの薬剤でも、薬剤無添加 MNC と薬剤添加 MNC との間における細胞傷害率の差は認められなかった(図 6)。

図5 Effects of T-614M2 on sCD23, sICAM-1 and IgG-RF production by MNC
The effects of T-614M2 on MNC function were studied as in figures 2 and 3.

考 察

用いた MNC には単球およびリンパ球(TおよびBリンパ球)が混在する。得られた成績から T-614 は単球ないしはマクロファージに作用し、そのおもなサイトカインである IL-1 β , TNF α および IL-6 産生を抑制したことから、T-614 は単球/マクロファージの活性化を抑制することが考えられる。IL-1 β 産生に対し T-614 は高濃度では抑制したのに対し、3.3 μ g/ml の低濃度では逆に増強する傾向がみられた。in vitro におけるこのような T-614 の薬理作用はすでに DMARDs の一種として市販されているオーラノフィンのそれに類似している^{7,8)}。炎症細胞の活性化は、炎症細胞浸潤、接着分子発現および滑膜細胞増殖などを介し、滑膜炎を惹起または増強する。また、IL-1 β は滑膜細胞や軟骨細胞を活性化し⁹⁾、各種マトリックス破壊酵素(コラゲナーゼなど)産生を増強することにより、軟骨破壊を惹起し^{2,10)}、ひいては骨吸収因子でもある^{11,12)}。したがって、T-614 による MNC IL-1 β 産生抑制作用は RA 患者において、

図6 Effects of T-614 on MNC cytotoxicity
The supernatants of MNC cultured for 24 h (□) or 7d (●) with or without T-614 were measured for LDH contents by ELISA and % cytotoxicity was calculated as in material and method. Data are expressed as mean $\pm$ SD of each patient.

有効性を示す作用機序の一つと考えられる。

一方、B細胞が産生すると考えられる IgG-RF およびB細胞活性化マーカーと考えられる sCD 23 いずれも T-614 およびその誘導体(M1, M2)により有意な影響は受けなかった。B細胞による IgG-RF 産生は、T細胞により影響を受けることが考えられ、DMARDs がT細胞活性化を抑制することにより間接的にB細胞の RF 産生を制御する機序とともに、B細胞自体に対する DMARDs の抑制作用も否定できないが¹³⁾、得られた成績からみる限りでは T-614 およびその誘導体はいずれの機序においても IgG-RF 産生には影響を示さないものと考えられた。

今回の成績から、T-614 はおもに単球・マクロ

ファージに作用し、これらの細胞の免疫機能を修飾(特に抑制)することにより、RA 患者において、臨床的効果を発揮することが示唆された。T-614 の誘導体である M1 および M2 についても類似の作用がみられたが、T-614 ほど顕著ではなかった。体内では T-614 とその誘導体が協同的に作用して薬効を発揮することも否定できない。

T-614 は MNC の sICAM-1 産生にはなんら影響を示さなかった。筆者らは、sICAM-1 はおもに血管内皮細胞から産生される¹⁴⁾が、滑膜細胞¹⁵⁾や MNC¹⁶⁾ も産生することを示し、これらの細胞培養上清の sICAM-1 産生は経時的にみると細胞膜 ICAM-1 発現とほぼ平行して変動することを示した¹⁶⁾。したがって、今回 ICAM-1 発現に対する影響については検討していないので断定できないが、T-614 が MNC の sICAM-1 産生に影響を示さなかったことから、MNC の ICAM-1 発現にも作用を及ぼさないことが推定される。

T-614, M1 および M2 による MNC 傷害率を検討したところ、検討したこれらの薬剤各濃度の範囲内では、MNC に対する細胞傷害作用は認められなかったことから、これらの薬剤の MNC に対する作用は細胞傷害(細胞死)を介する作用ではないものと思われる。

本研究の遂行に当り、終始携わった河野江利子、伊藤真由美、朝倉真理子、弥野美佐子の各氏に感謝致します。

文 献

- 1) Fujii, I., Shingu, M., Nobunaga, M.: Monocyte activation in early onset rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 49: 497-503, 1990.
- 2) Shingu, M., Nagai, Y., Isayama, T., Naono, T., Nobunaga, M., Naga, Y.: The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production by synovial cells and endothelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 94: 145-149, 1993.
- 3) 神宮政男, 延永 正: IL-1, IL-1 レセプターと IL-1 レセプターアンタゴニスト. *感染・炎症・免疫* 23: 243-253, 1993.
- 4) 神宮政男, 藤井郁夫, 大塚栄治, 野中史郎, 江崎一子, 延永 正: 寛解導入剤に反応した RA 患者血中の各クラス別リウマトイド因子の変動. *リウマチ科* 2: 135-138, 1991.
- 5) 和田哲也, 神宮政男, 江崎一子, 延永 正: 単球・単核球の IL-1 および TNF 産生に対する免疫調節剤の影響. *炎症* 10: 139-140, 1990.
- 6) 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.
- 7) 神宮政男, 和田哲也, 延永 正: オーラノフィンの慢性関節リウマチ患者単核球リウマトイド因子およびサイトカイン産生抑制作用. *炎症* 14: 21-23, 1994.
- 8) 神宮政男, 和田哲也, 江崎一子, 延永 正: 慢性関節リウマチ患者末梢血単核球による soluble IL-2 receptor, IL-4 および IL-6 産生に対するオーラノフィンの抑制作用. *炎症*. (印刷中).
- 9) Tawara, T., Shingu, M., Nobunaga, M., Naono, T.: Effects of recombinant human IL-1 β production of prostaglandin E2, leukotriene B4, NAG, and superoxide by human synovial cells and chondrocytes. *Inflammation* 15: 145-157, 1991.
- 10) Ahmadzadeh, N., Shingu, M., Nobunaga, M.: The effects of recombinant tumor necrosis factor- α on superoxide and metalloproteinase production by synovial cells and chondrocytes. *Clin. Exp. Rheumatol.* 8: 101-105, 1990.
- 11) Kuroki, T., Shingu, M., Koshihara, Y., Nobunaga, M.: Effects of cytokines on alkaline phosphatase and osteocalcin production, calcification and calcium release by human osteoblastic cells. *Brit. J. Rheumatol.* 33: 224-230, 1994.
- 12) 神宮政男, 橋本 通, 諫山哲郎, 腰原康子, 黒木健文, 直野 敬, 延永 正: 骨芽細胞と破骨細胞における接着分子発現と細胞間相互作用. 慢性関節リウマチの骨破壊における関与. *炎症*. (印刷中).
- 13) 江崎一子, 和田哲也, 神宮政男, 延永 正: Bucilamine, auranofin, salazosulfapyridine の IgMRF 分泌系に及ぼす影響. *炎症* 12: 537-540, 1992.
- 14) Hashimoto, M., Shingu, M., Ezaki, I., Nobunaga, M.: Production of soluble ICAM-1 from human endothelial cells by IL-1 β and TNF- α . *Inflammation* 18: 163-173, 1994.
- 15) Shingu, M., Hashimoto, M., Ezaki, I., Nobunaga, M.: Effects of cytokine-induced soluble ICAM-1 from human synovial cells on synovial cell-lymphocyte adhesion. *Clin. Exp. Immunol.* (in press).
- 16) Shingu, M., Hashimoto, M., Nobunaga, M., Isayama, T., Yasutake, C., Naono, T.: Production of soluble ICAM-1 by mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis. *Inflammation* 18: 23-32, 1994.