

氏名(本籍)	あかしなおつぐ 明石直嗣(大阪府)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第5810号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	Comparative suppressive effect in models of autoimmune arthritis by tyrosine kinase inhibitors imatinib and nilotinib (チロシンキナーゼ阻害剤イマチニブ、ニロチニブの自己免疫性関節炎モデルへの抑制効果の検討)
主査	筑波大学教授 医学博士 落合直之
副査	筑波大学准教授 博士(医学) 澁谷和子
副査	筑波大学講師 博士(医学) 古田淳一
副査	筑波大学講師 博士(医学) 前野貴美

論文の内容の要旨

(背景及び目的)

近年、関節リウマチ(RA)の治療に抗体製剤が導入され、画期的な効果が示された。しかし、約40%の患者では American College of Rheumatology 70% improvement criteria (ACR70) を達成せず、更なる治療薬の開発が待たれ、高分子分子標的治療薬の抗体製剤の他に経口の低分子分子標的薬の開発が進められている。イマチニブはBCR-ABLチロシンキナーゼを特異的に阻害する慢性骨髄性白血病(CML)に対する低分子分子標的薬で、近年、RAに関わるキナーゼ阻害作用が示された。RAでは、T細胞とマクロファージの関節浸潤が炎症の開始とされ、これらの細胞に強く依存するマウスRAモデルの一つに glucose-6-phosphate isomerase (GPI) 誘導性関節炎(GIA)がある。合成GPI蛋白をDBA/1マウスに免疫することで関節炎が惹起でき、関節炎発症後に抗CD4抗体、抗インターロイキン-17(IL-17)抗体投与で病態が抑制される。本研究ではイマチニブならびにその後継品であるニロチニブのGIAでの抑制効果とその作用機序を解析し、両者のRA治療薬としての位置付けを試みた。

(対象及び方法)

1) 合成GPIをDBA/1マウスに免疫後0、7、14日目から26日目まで、イマチニブ100mg/kgを1日2回、またはニロチニブ100mg/kgを1日1回、各群10匹に経口投与した。対照群は、0日目から其々のビークル投与群(n=10、18)とした。既存の基準に従い手及び足の関節症状を、視診で経時的に点数評価した。2) 上記マウスを26日目に麻酔下に開腹し、腹部大静脈から採血、遠心後血清を採取し酵素抗体法で血清中抗GPI抗体価を測定した。3) GPI免疫したマウス3、7、14日目(各n=2)の脾臓を摘出し 2×10^6 細胞/mlの脾細胞を、抗原GPI 5 μ g/mlとイマチニブ、ニロチニブの各1、3、10 μ M条件下(各群n=6、1匹のマウスから3群)で3日間培養した。対照群はGPI単独投与群(n=6)とし、細胞上清中の種々のサイトカインをサイトメトリックビーズアレイまたは酵素抗体法で測定した。4) GPI免疫後10日目のマウス(n=4)より単径リンパ節を採取し色素CFSEで染色後それぞれ 2×10^6 細胞/mlに染色細胞を調整し、GPIおよびイマ

チニブ、ニロチニブ各 1、3、10 μ M の条件下で 4 日間培養した。対照群は GPI 単独投与群 (n=4) とした。回収細胞を抗 CD4 抗体で染色し、CD4 陽性 T 細胞の増殖を測定した。5) GPI 免疫後 0、7、14 日目の関節で IL-17 遺伝子発現量をリアルタイム PCR で解析した。

(結果)

1) イマチニブ各投与群で関節炎は有意に抑制された。ニロチニブは、0 日からの投与群で有意に抑え、7 日目からの投与群では 12 日目のみ有意に抑えた。2) イマチニブは血清中抗 GPI 抗体価を各投与群で有意に抑制したがニロチニブは抑制しなかった。3) イマチニブは *in vitro* の抗原刺激下で脾臓細胞の TNF- α 、IL-6、IL-17 及び IFN- γ 産生を抑制したが、ニロチニブは IL-17、IFN- γ 産生のみ抑制した。4) イマチニブ、ニロチニブは、CD4 陽性 T 細胞の増殖を抑制し、ニロチニブがより強く抑制した。5) GIA の関節局所での IL-17 遺伝子発現量は、対照群では免疫後 0 日目より 7 日目で有意に高く、14 日目では 7 日目よりも低い傾向であった。

(考察)

イマチニブは、マウスコラーゲン誘導性関節炎等で抑制効果が報告されたが、GIA でも同様の効果があった。ニロチニブは、今回初めて関節炎モデルへ投与され、0 日目からの投与群でイマチニブより強い抑制効果が確認されたが、免疫後 14 日目からの投与では効果がなかった。*in vitro* では、ニロチニブは IL-17 産生や自己反応性 T 細胞増殖でイマチニブより強い抑制作用を示した。関節局所での IL-17 遺伝子発現は 7 日目より 14 日目で低下しており、先行研究の 14 日目からの抗 IL-17 抗体投与では治療効果が無いことに符合した。イマチニブの 0 日目からの投与群が GIA を抑制したのは、3、7、14 日目に採取した脾臓細胞いずれも TNF- α と IL-6 産生が抑制されていたことと矛盾しない。また、イマチニブは投与開始時期に関わらず抗体価を抑制した。これはマクロファージへの作用の結果、B 細胞の抗体産生を促す IL-6 の発現を抑制する間接効果と考えられた。臨床的に少数ではあるが、イマチニブは RA 患者に有効であったと報告されている。ニロチニブは日本で 2009 年に上梓されたばかりで、まだ臨床でのエビデンスは少ない。本実験をもとに 2 つの低分子化合物の臨床応用を考えると、イマチニブは T 細胞、マクロファージへの効果が確認されており早期 RA 治療への可能性が、ニロチニブは T 細胞サイトカイン、特に IL-17 産生を抑制するので IL-17 依存的な RA 治療への可能性が示唆された。

(結語)

イマチニブは炎症性サイトカイン、T 細胞サイトカイン両者への産生抑制を介して、またニロチニブは IL-17 優位なフェーズで GIA へ抑制効果を示したことより、イマチニブは早期 RA 治療への可能性が、ニロチニブは IL-17 依存的な RA 治療への可能性が示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

関節リウマチの治療は、生物製剤が導入され治療体系が激変したが、医療経済面から廉価な経口の低分子分子標的薬の開発も進められている。本研究では関節リウマチのマウスモデルの一つ glucose-6-phosphate isomerase (GPI) 誘導性関節炎を用い関節リウマチに関わるキナーゼ阻害作用を示すイマチニブならびにその後継品であるニロチニブの作用機序を解析し、両者は異なる作用機序を持つことを明らかにした点意義のある研究である。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。