

9) アニオントランスポーター発現を指標とした関節リウマチ (RA) 治療効果予測法の確立

研究代表者 小村 景司

【研究目的】

RA は増殖性滑膜炎を主徴とする難治性慢性炎症性疾患である。増殖滑膜の軟骨・骨組織への侵蝕による関節破壊は進行性かつ非可逆的であり、患者の quality of life の低下に直結することから深刻な社会問題にもなっている。したがって、滑膜増殖の制御と関節破壊の抑制は RA 治療の最も重要な課題である。疾患修飾性抗リウマチ薬 (DMARDs) の中でも、メトトレキサート (MTX) は滑膜増殖制御に最も有効性の高い RA の標準治療薬として位置づけられている。さらに国内のコホート研究 (IORRA, REAL, Ninja) の解析結果をもとに、平成 23 年 2 月より承認用量の上限が従来の 8mg/週から 16mg/週まで増量されることとなり、合わせて第一選択薬としての使用も可能となったことから、アンカードラッグとしての重要性は増しており、その一方で増量による副作用出現リスクの管理にもより注意深く対処することが求められている (Mod Rheumatol 2007;17:283-9, Mod Rheumatol 2011;21:444-8, Expert Rev Clin Immunol 2012;8:455-65)。また、近年爆発的展開を見せている生物学的製剤による RA 治療においても、極めて有用な併用薬としての評価が確立されつつある。一方、MTX による RA 治療においては、responder と non-responder が存在する。Non-responder における薬剤投与量の増加は、し

ばしば関節外臓器の重篤な副作用の出現を招来することから治療上の深刻な問題点となっている。しかしながら、これまで関節滑膜における MTX の薬物動態・炎症制御機構は不明な点が多く、MTX への反応性予測は極めて困難であった。近年、ヒト肝臓特異的な MTX 細胞内取り込み装置として、有機アニオンのトランスポーターである Liver-specific anion transporter (LST) -1 が同定された (J Biol Chem 1992;267:13361-8, Gastroenterology 2001;120:1689-99)。さらに、LST-1 と相同性を有する LST-2 は、固形消化器癌細胞における MTX のトランスポーターであり、がん化学療法への感受性と密接にかかわることが示されている (Gastroenterology 2001;120:1689-9)。我々は、培養 RA 滑膜細胞の一部に LST-2 が発現している証左を得、RA 滑膜における MTX 取込み・作用機構を解明する鍵として注目し、本研究では RA 患者由来滑膜細胞における LST-2 発現様相と MTX への反応性との関連を明らかにし、LST-2 発現を指標とした MTX 治療効果予測法開発の基盤を確立することを目的とした。

【実験方法】

- 1) RA 患者由来培養滑膜細胞における LST 発現解析
JCRB ヒト組織バンクより供与された RA 患者由来滑膜細胞 (9 症例) 及び変形性関節症 (OA) 由来患者滑膜細胞 (2 症例) を用い、LPS、PMA による刺激の存在・非存在下において、LST-1、-2 mRNA の発現解析をリアルタイム PCR 法と通常の RT-PCR 法の両者によって検討した。
- 2) 末梢血単核細胞分画 (PBMC) における LST 発現解析
RA 患者からの滑膜組織入手は困難なことが少なくない。一方、RA の病態形成には患者血液中の T 細胞、B 細胞、単球・マクロファージが重要な役割を果たしていることが既に明らかとなっており、MTX の治療効果に密接に関与していると考えられている。従って、健常者ボランティアより提供された PBMC を用いて 1) と同様の検討を行った。Ficoll-paque 法にて PBMC を分離・培養後、PMA による刺激の存在・非存在下において、LST-1、-2 mRNA の発現解析をリアルタイム PCR 法と通常の RT-PCR 法の両者によって検討した。

【結果と考察】

滑膜細胞を低血清培地で12時間培養後、さらにLPS 100 ng/ml、PMA 50 ng/mlの存在・非存在下でそれぞれ6時間、12時間培養した後に、各細胞から全RNAを調整し、mRNA発現解析を行ったが、リアルタイムPCR法ではLST-1、2 mRNAの発現は認められないか、極めて微弱なものであった。同様に健常者ボランティア由来PBMCにおける解析においてもLST-1、2 mRNAの発現は認められなかった。リアルタイムPCR法で使用していたPCRプライマー (Taq-Man Gene Expression Assays, Applied biosystems) の検出感度に原因があると判断し、以後の滑膜細胞における検討を通常のRT-PCR法による解析へ変更した。その結果、LST-2 mRNAの発現を確認、LPSでは一部の症例のみ時間依存性の発現増強が認められたが、PMAでは検討したすべての症例で時間依存性の発現増強が確認された。一方、肝臓特異的とされているLST-1 mRNAの発現は認められなかった。今後は、健常者、MTX有効症例、MTX無効症例、およびMTXによる副作用の出現が認められたRA患者のPBMCにおけるLST-2 mRNAの発現様相についてさらなる検討を進めていく予定である。