

---

平成10年度  
厚生科学研究費補助金

感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業  
『慢性関節リウマチの早期治療指針の確立に関する研究』

研 究 班

研 究 報 告 書

---

厚 生 省

---

平成10年度  
厚生科学研究費補助金

感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業  
『慢性関節リウマチの早期治療指針の確立に関する研究』研究班

研 究 報 告 書

---

厚生省

『慢性関節リウマチの早期治療指針の確立に関する研究』研究報告書

目 次

班員名簿

慢性関節リウマチの早期治療指針の確立に関する研究総括研究報告書 .....	1
聖マリアンナ医科大学 内科学・臨床検査医学	班 長 市川 陽一
インターリウキン10プラスミド遺伝子導入による関節炎の抑制に関する研究 .....	13
福島県立医科大学 第2内科	分担研究者 宮田 昌之
IL-6シグナル伝達阻害による慢性関節リウマチの治療法の確立に関する研究 .....	16
大阪大学 健康体育部	分担研究者 西本 憲弘
カルパイン阻害薬によるラットコラーゲン誘発関節炎の治療の試み .....	20
慶應義塾大学 医学部 内科	分担研究者 三森 経世
MCP-1持続注入による実験関節炎の誘導とその制御 .....	23
北里大学 医学部 内科	分担研究者 近藤 啓文
サイクリックAMPシグナル伝達系を利用したRAの新しい治療戦略 .....	26
聖マリアンナ医科大学 内科学・臨床検査医学	分担研究者 山田 秀裕
RAの予後予測因子としての血清MMP-3の有用性 －Prospective studyにおける検討－ .....	29
東京女子医科大学 附属膠原病リウマチ痛風センター	分担研究者 山中 寿
慢性関節リウマチ早期治療指針のEBM導入に関する研究 .....	32
聖マリアンナ医科大学 予防医学	分担研究者 吉田 勝美
共同臨床試験実施計画書, 他 .....	35

平成10年度『慢性関節リウマチの早期治療指針の確立に関する研究』研究班名簿

	班員名	所 属	役 職	〒	所 属 住 所	TEL & FAX	
班 長	市川 陽一	聖マリアンナ医科大学内科学・臨床検査医学	教 授	216-8512	川崎市宮前区菅生2-16-1	TEL 044-977-8111	FAX 044-977-2696
分担研究者	山中 寿	東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター	助教授	162-0054	新宿区河田町10-22	TEL 03-5269-1725	FAX 03-5269-1726
	西本 憲弘	大阪大学健康体育部健康医学第一部門	助教授	565-0871	吹田市山田丘2-1	TEL 06-6879-8960	FAX 06-6879-8971
	宮田 昌之	福島県立医科大学第2内科	講 師	960-1295	福島市光ヶ丘1番地	TEL 0245-48-2111	FAX 024-547-2055
	三森 経世	慶應義塾大学医学部内科	講 師	160-8582	新宿区信濃町35	TEL 03-3353-1211	FAX 03-5379-5037
	吉田 勝美	聖マリアンナ医科大学予防医学	教 授	216-8511	川崎市宮前区菅生2-16-1	TEL 044-977-8111	FAX 044-977-4350
	山田 秀裕	聖マリアンナ医科大学内科学・臨床検査医学	助教授	216-8512	川崎市宮前区菅生2-16-1	TEL 044-977-8111	FAX 044-976-7112
	近藤 啓文	北里大学医学部内科	教 授	228-8555	相模原市北里1-15-1	TEL 0427-78-8111	FAX 0427-78-8441
研究協力者	天野 宏一	埼玉医科大学総合医療センター第2内科	講 師	350-8550	川越市大字鴨田字辻道町1981	TEL 0492-28-3569	FAX 0492-28-3574
	秋月 正史	横浜市立市民病院	内科部長	240-8555	横浜市保土ヶ谷区岡沢町56	TEL 045-331-1961	FAX 045-331-1960
	斉藤 輝信	東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター	教 授	162-0054	新宿区河田町10-22	TEL 03-5269-1725	FAX 03-5269-1726
	鈴木 康夫	聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター	助教授	216-8512	川崎市宮前区菅生2-16-1	TEL 044-977-8111	FAX 044-977-2686
	澤田 滋正	日本大学医学部附属練馬光が丘病院内科	教 授	179-0072	練馬区光が丘2-11-1	TEL 03-3979-3611	FAX 03-3979-3810
	小林 茂人	順天堂大学膠原病内科	講 師	113-8421	文京区本郷2-1-1	TEL 03-5802-1067	FAX 03-5800-4893
	高杉 潔	道後温泉病院リウマチセンター内科	理事長	790-0858	松山市道後姫塚乙21-21	TEL 089-933-5131	FAX 089-933-5137
	大島 久二	藤田保健衛生大学内科	講 師	470-1192	豊明市沓掛町田楽ヶ窪1-98	TEL 0562-93-9244	FAX 0562-95-0081
	内田 詔爾	都立墨東病院リウマチ科	部 長	130-8575	墨田区江東橋4-23-15	TEL 03-3633-6151	FAX 03-3633-6173
	松岡 康夫	川崎市立川崎病院内科	副院長	210-0013	川崎市川崎区新川通12-1	TEL 044-233-5521	FAX 044-245-9600
	山本 純己	松山赤十字病院リウマチセンター	部 長	790-8524	松山市文京町1	TEL 089-924-1111	FAX 089-926-9518
	斉藤 栄造	東邦大学大橋病院第4内科	教 授	153-8515	目黒区大橋2-17-6	TEL 03-3468-1251	
	川合 真一	聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター	教 授	216-8512	川崎市宮前区菅生2-16-1	TEL 044-977-8111	FAX 044-977-4061
事務局長	浜 信昭	聖マリアンナ医科大学内科学・臨床検査医学	講 師	216-8512	川崎市宮前区菅生2-16-1	TEL 044-977-8111	FAX 044-976-7112

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業）  
総括研究報告書

慢性関節リウマチの早期治療指針の確立に関する研究

主任研究者 市川陽一 聖マリアンナ医科大学 内科学臨床検査医学教授

研究要旨

早期治療指針を確立するための臨床研究として、outcome measure は x 線写真上の関節破壊進行の抑制および長期間にわたり副作用なく疾患活動性を十分抑制することとし、これに影響する治療開始時期、開始時および経過中の病態、および薬物療法の種類を明らかにすることを目的とした。対象症例は発症 2 年以内の 1987 年 ACR 分類基準を満たす 300 症例とし、メトトレキサート単独、ブシラミン単独、あるいはこれら 2 者併用の各群を二重盲検比較試験で検討する。治療開始時の病態としては罹病期間、炎症関節数、HLA-DR 遺伝子座、リウマトイド因子力価、血清 MMP3、さらに治療期間中の臨床症状、炎症反応の推移の予測因子としての有用性を明らかにする。これらの分析により、関節破壊の予後因子の解明とその対策、また長期間疾患活動性を抑制し、患者の QOL を改善する方法を確立することとした。初年度は 3 回の班会議での討論により臨床試験実施計画を作成するのと平行して、試験薬剤（実薬およびプラセボ）の準備、割付け、各施設の倫理委員会等への臨床試験許可の申請を行った。2 施設を除き、全施設ですでに倫理委員会等の許可を得ており、試験薬剤、臨床試験実施計画書、調査用紙等の配布も終了した。1999 年 2 月より準備の出来た施設から臨床試験を開始することとなった。この研究を行う際には、人権擁護上の配慮、各施設の倫理委員会などの許可、文書による患者の同意を得ることなどに配慮した。

一方、将来の早期治療につながる先進治療として、いくつかの新しい観点に立った治療法の開発を進めた。IL-10 プラスミドを CIA マウスの皮下に注射することにより Th1 タイプの免疫反応抑制を介して関節炎を抑制する IL-10 遺伝子治療の有効性を確認した。IL-6 には SSI-1 と呼ばれる内因性のネガティブフィードバック因子が存在することを見出し、この分子の機能異常が RA の病因に結びつく可能性と共に、この分子導入による遺伝子治療の可能性が示唆された。慢性関節リウマチ患者にカルパスタチンに対する自己抗体が存在することに端を発し、カルペプチンが CIA 関節炎の抑制効果を示したことは酵素活性抑制という新しい作用機序をもった抗リウマチ薬への発展が期待される。また、マクロファージの走化、活性化因子である MCP-1 を家兎の関節腔内に持続注入したところ、滑膜増殖を伴う関節炎が発症し、MCP-1 は RA 治療の標的となりうることが判明した。in vitro モデル及び動物実験の成績に基づき、RA 患者にアルプロスタジル (lipo-PGE1) 及びそれと相乗効果を有するペントキシフィリンを併用し、臨床的効果が示された。一方、MMP-3 の血中濃度を測定したところ、その後 6 ないし 12 ヶ月間の骨破壊の進行とよく相関することが判明し、RA 早期治療の指標となりうる可能性が示された。

#### 分担研究者

吉田勝美	聖マリアンナ医大 予防医学 教授
近藤啓文	北里大内科 教授
西本憲弘	大阪大健康体育部 助教授
三森経世	慶應大内科 講師
宮田昌之	福島医大第二内科 講師
山田秀裕	聖マリアンナ医大・内科学 臨床検査医学 助教授
山中 寿	東京女子医大・膠原病リウ マチ痛風センター 助教授

#### A. 研究目的

現在、我が国に約 40 万人の RA 患者が存在し、関節の疼痛、変形のため、多くの治療費を要している。早期治療方針が確立されれば、これらの治療費が減少するのみならず、患者の QOL を改善し、社会での活動が可能となる。しかし、抗リウマチ薬は時に重篤な副作用を伴うため、関節破壊の速やかな症例を特定して、より強力な治療を行う必要がある。このためには、早期治療指針を確立する必要がある。また、現在用い得る抗リウマチ薬では関節破壊を完全に防止することは出来ないため、併用療法に関する基礎的検討、および RA の病態に基づいた新薬につながる研究を行う必要がある。このために次の 3 つを研究目的とした。すなわち、1) 早期治療を必要とする症例を選択する、2) 関節破壊を防ぐ早期治療法を明らかにする、3) 将来的により強力に関節破壊を防ぐ早期治療のための新薬、併用療法を見出す、である。

早期治療指針を確立するための臨床研究としては、outcome measure は X 線写真上の関節破壊進行の抑制および長期間にわたり副作用なく疾患活動性を十分抑制することとし、これに影響する治療開始時期、開始時および経過中の病態、および薬物療法の種類を明らかにすることを目的とした。このため、RA の

300 症例を対象とし、メトトレキサート単独、ブシラミン単独、あるいはこれら 2 者併用の各群を二重盲検比較試験で検討する。この場合、治療法の比較のみならず、関節破壊進行の危険因子として罹病期間、炎症関節数、HLA-DR 遺伝子座、リウマトイド因子力価、血清 MMP3、さらに治療期間中の臨床症状、炎症反応の推移の予測因子としての有用性を明らかにする。これらの分析により、関節破壊の予後因子の解明とその対策、また長期間疾患活動性を抑制し、患者の QOL を改善する方法を確立することとした。

さらに現在の治療法の限界に対し、将来の早期治療につながる先進治療として、IL-10 遺伝子治療として、IL-10 プラスミドを CIA マウスの皮下に注射することにより、コラーゲン誘導関節炎の抑制が可能であるかを検討する。プラスミドの安全性が確立していることから慢性関節リウマチの治療への応用が期待される。IL-6R モノクローナル抗体の RA 治療における有効性から、IL-6 シグナル阻害が RA 治療法として期待されることが判明した。IL-6 のシグナルトランスダクションに関与する分子とその機能を明らかにし、RA の病因における意義および遺伝子治療への応用の可能性を追求する。また、慢性関節リウマチにカルパスタチンに対する自己抗体が存在し、カルパインが関節破壊、関節炎症に関与している可能性が推定されたため、いくつかのカルパイン阻害物質をコラーゲン誘発関節炎ラットに投与し、カルパイン阻害薬が酵素活性抑制という新しい作用機序をもった抗リウマチ薬として発展する可能性を検討する。RA の病態形成に重要な役割を果たしているマクロファージの走化、活性化因子である MCP-1 の関節炎発症における意義を明らかにするため、家兎の関節腔内に持続注入する。このケモカイン注入で滑膜増殖を伴う関節炎が発症するかを検討し、MCP-1 が RA 治療の

標的となるかを検討する。一方、RA の関節炎局所で産生される PGE がパンス形成と関節破壊の抑制作用を有することを動物実験で明らかにしたことから、RA 患者にアルプロスタジル (lipo-PGE1) 及びそれと相乗効果を有するペントキシフィリンを併用し、臨床的效果を明らかにする。また、RA 早期治療指針を確立するためには、将来関節破壊が速やかに進行する症例と関節破壊の少ない症例を予測することが重要である。早期 RA の血中 MMP-3 濃度が、その後 6-12 ヶ月の骨破壊の進行 (Larsen スコアにて評価) と相関するとの予備的成績が得られた。このことは、早期治療指針決定に極めて有用であると考えられ、さらに症例数を増やして確認する。

## B: 研究方法

慢性関節リウマチ早期治療指針の確立のための臨床試験としては、発症 2 年以内で、18 歳から 70 歳までの ACR1987 年診断基準を満たす早期 RA 患者 300 例を対象とし、メトトレキサート単独、ブシラミン単独、あるいはこれら 2 者の併用の効果、副作用を、二重盲検比較試験で検討する。吉田分担研究者は研究計画の妥当性、統計学的分析を担当し、川合研究協力者はコントローラーとなった。他の分担研究者と研究協力者 19 名が施設責任者となって、各施設 3 名までの臨床研究分担医師を選び、その協力を得て臨床試験を行う。副作用防止のため、何れの薬剤も漸増し、ブシラミンは 2 ヶ月以降 200mg/日、メトトレキサートは 4 ヶ月以降 8mg/日とする。調査項目としては医師による全般評価、患者による関節痛評価、及び患者による全般評価を VAS(visual analogue scale)により評価した。その他、身体機能評価 (mHAQ)、握力、疼痛関節数、腫脹関節数、赤沈値、CRP、RF、HLA-DRB1、両手、両足正面の X 線写真、末梢血、肝機能、クレアチニン、尿所見などを測定する。HLA-DRB1 は試験開始時、X 線写真は 1 年間隔、他は 1 ないし 3 ヶ月毎に評価

する。3 つの治療法間の有効率の差を 20 %、検出力 80 %、有意水準 5 %とした場合必要症例数は 73 例で、脱落を考慮すれば 100 例、全体で 300 例となり、これを目標症例数とした。観察期間は 2 年間とした。

IL-10 遺伝子治療の開発は、CMV のエンハンサー/プロモーターを有する pCMV ベクターに IL-10 の cDNA を組み込んだ IL-10 プラスミドを作成し、これを II 型コラーゲン (CII) 誘導関節炎 (CIA) マウスの皮下に注射して、関節炎に及ぼす効果を検討した。また、関節炎抑制の機序を明らかにするため、血清抗 CII 抗体を IgG サブクラス別に、また CII 刺激による脾細胞のサイトカイン産生を測定した。IL-6 シグナル伝達阻害による RA 治療法確立に関する研究では、RA 滑膜細胞の増殖に対する sIL-6R および TNF  $\alpha$  の影響と相互作用をみるため、3H-TdR アップテイクにより検討した。ネガチブフィードバック関連分子である SSI-1/JAB/SOCS-1 の発現を IL-6 による誘導の有無を検討し、その他の関連分子である SOCS/CIS/SSI ファミリー遺伝子についても同様な検討を行った。カルパイン阻害物質の関節炎抑制作用に関する研究では、Lewis 系ラットにウシ CII と完全フロイントアジュバントのエマルジョンを 10 日の間隔をおいて皮下注射し、1 群 5 匹としてカルパイン阻害物質であるカルバスタチン部分ペプチド、ロイペプチン、カルペプチン、E-64-d を 0 日目より 12 日目まで 1 日 1 回腹腔内に投与した。経時的に後肢の足容積をプレシスモメータで測定し、関節炎の指標とした。MCP-1 持続注入による実験関節炎の誘導とその制御に関する研究では、リコンビナント家兎 MCP-1 5  $\mu$ g を mini-osmotic pump 内に充填し、日本白色家兎の大腿内側に装着する。このポンプよりポリエチレンチューブを膝関節腔内に連結固定し、MCP-1 を 2 週間にわたって関節腔内に持続注入した。MCP-1 持続注入 1 週間後と 2 週間後に家兎を屠殺し、関節腫脹、関節腔内浸潤細胞数と細胞分画、滑膜組織の病理学的

検討、滑膜組織における IL-8 の発現について解析した。また、MCP-1 と抗家兎 IL-8 中和抗体を同時に膝関節内に持続注入し、MCP-1 投与による IL-8 産生の有無を検討した。cyclic AMP シグナル伝達系を利用した RA の新しい治療法に関する研究では、ACR の RA 分類基準を満たし、疾患活動性として赤沈 31 mm/h 以上、疼痛関節数 6、腫脹関節数 3 以上の 7 症例を対象とした。これらの患者に 4 週間にわたり lipo-PGE1 (アルプロスタジル) 10  $\mu$ g を連日点滴静注し、同時にペントキシフィリン 300 mg/日を経口投与した。疾患活動性の指標としては ACR のコアセットを用い、ACR 20%改善基準による効果判定を行った。なお、この研究に当たっては、施設の倫理委員会の許可と患者の文書による同意を得た後に行った。RA の予後予測因子としての血清 MMP-3 の有用性に関する検討では、健常者 267 名、RA を中心としたリウマチ性疾患 88 例で、血中 MMP-3 濃度をサンドイッチエライザ法で測定した。同時に RA については MMP-3 測定時の関節 X 線写真と 6 ヶ月後および 1 2 ヶ月後の X 線写真を比較し、Larsen 指数で表した関節破壊の進行と血中 MMP-3 濃度の相関を検討した。

### C. 研究結果

慢性関節リウマチ早期治療指針確立のための臨床試験としては、primary endpoints として (1) 疾患活動性の 50% 改善 (ACR) を 2 年間持続し、かつ副作用のないこと、および (2) 1 年後、および 2 年後の手と足の X 線写真上の骨破壊の進行、の 2 つをあげ、additional measures として (1) 疾患活動性の 20% 改善 (ACR) を 2 年間持続し、かつ副作用のないこと、(2) 骨破壊の進行を規定する諸因子の分析、(3) 疾患活動性、QOL (ACR コアセット) に関する予後因子の分析を行うこととした。なお、予後因子としては治療開始時期、HLA DB1、CRP 積分、血清 MMP3 値、性差、治療法等の検討を行うこととした。

臨床試験のデザインは、2 年間の投与期間で多施設共同無作為化二重盲検比較対照試験であり、1 群はメトトレキサート、2 群はブシラミン、3 群はメトトレキサート及びブシラミン併用群とした。なお、1 施設あたり 1 8 症例が割り当てられたが、長期間投与であるため、キーオープンする症例があっても影響のない様に、電話法で無作為に 1 例を選択する。なお、電話法により症例の登録と症例選択基準のチェックも行うこととした。解析に必要とされる症例数を各治療群間での有効率の差を 20%とし、検出力 80%、有意水準 5%とした場合に必要とされる症例数を算出したところ、73 例であり、脱落例を考慮して初期必要例を 100 症例とした。

具体的な臨床研究の進行は、平成 10 年 5 月 研究費交付内定があり、製薬会社とプラセボ供給について交渉を開始した。6 月 20 日 第 1 回班会議でプロトコルの概要検討した。この時、万一の医療事故に備える保険の必要性が指摘されたため、7 月には保険会社と交渉し、医師賠償責任保険の内容を決定した。8 月 29 日 第 2 回班会議を行い、プロトコルの最終検討を行った。但し、最初対象薬として考えていたスルファサラジンは薬剤供給が遅れるため 10 月末に断念、メトトレキサート、ブシラミンを用いた併用療法とすることとした。11 月にはそれに基づいた臨床試験実施計画書、調査用紙等を作成し、各施設の倫理委員会に提出した。12 月 19 日 第 3 回班会議では臨床試験の打ち合わせを行った。12 月 21 日には薬剤割付けがコントローラーによって行われた。1 月 5 日より倫理委員会の許可が得られた施設への薬剤の搬入開始し、2 月末には 2 施設を除くすべての施設に試験薬剤の搬入を終了した。

インターリウキン 10 プラスミド (p-IL-10) 遺伝子導入による関節炎抑制に関する研究では、マウスタイプ II コラーゲン (CII) 誘導関節炎 (CIA) において、CII を免役する前に p-IL-10 を尾根部皮内に注射しておくこと関



節炎が発症しなかった。抗 CII 抗体を Th1 タイプの免疫反応を反映する IgG2 サブクラスと Th2 タイプの反応を反映する IgG1 サブクラスに分けて測定したところ、IgG2a/IgG1 (Th1/Th2) は p-IL-10 投与マウスでは低下していた。すなわち、p-IL-10 投与マウスでは Th1 タイプの免疫反応が抑制されたため CIA の発症が抑制されたと考えられる。p-IL-10 を後肢足背に注射しておく、導入した部位の関節炎のみが抑制された。

IL-6 シグナル伝達障害による慢性関節リウマチの治療法の確立に関する研究では、滑膜細胞は gp130 を発現していたが、IL-6R は検出できなかった。したがって、IL-6 は sIL-6R の存在下でのみ滑膜細胞の増殖を濃度依存的に抑制し、TNF  $\alpha$  による増殖刺激作用と拮抗した。さらに TNF  $\alpha$  は IL-6 の産生を誘導し、この IL-6 は sIL-6R の存在下で TNF  $\alpha$  による滑膜増殖を抑制した。SCID マウス背筋内に RA 患者滑膜組織を移植し、この動物に対し、抗 IL-6R 抗体を投与したところ、単核球を中心とする炎症性細胞の浸潤は消失した。また、週 1 回づつ 4 週間の投与では滑膜組織の重量は約 1/2 に減少した。さらに破骨細胞と思われる TRAP 陽性細胞、MMP-1 及び MMP-9 の陽性細胞も減少していた。サイトカインシグナル伝達分子である STAT family から SSI-1 分子をクローニングした。SSI-1 およびファミリー分子である SSI-3 は IL-6 の刺激により STAT3 の磷酸化を介して誘導され、JAK と結合することにより IL-6 シグナル伝達を抑制するネガティブフィードバック分子であることが判明した。

カルパイン阻害薬によるラットコラーゲン誘発関節炎 (CIA) の治療に関する研究では、CIA ラットにカルバスタチンペプチド、ロイペプチン、カルペプチン、E-64-d を投与した。その結果、カルペプチンを毎日投与したラットでは、後肢浮腫が (13 日目 64%、17 日目 50%、21 日目 30%) と有意に減少していた。これに対し、それ以外のプロテアーゼインヒ

ビターでは関節炎の抑制効果は認められなかった。一方、組織像においてもカルペプチン投与ラットでは炎症細胞浸潤や骨軟骨破壊の程度が対照ラットに比して軽度であった。

MCP-1 持続注入による実験関節炎の誘導とその制御に関する研究では、MCP-1 5  $\mu$ g を 2 週間にわたり家兎膝関節内に持続注入した後に、関節腔内を生理的食塩水で洗浄し浸潤細胞を回収した。浸潤細胞数は持続注入 1 週間後で  $3.2 \pm 1.8 \times 10^5$  /関節 (m  $\pm$  SD)、2 週間後で  $7.6 \pm 3.1 \times 10^4$  /関節であり、生理的食塩水を注入した対照群と比べ有意に増加していた。浸潤細胞の分画は 1 週間後でマクロファージが約 60%、好中球が約 40%であったが、2 週間後ではマクロファージが 95%以上であった。滑膜組織像をみたところ、注入 1 週間後では軽度のマクロファージ浸潤が認められたのみであったが、2 週間後では滑膜組織への顕著なマクロファージ浸潤と滑膜細胞の重層化、さらに滑膜表層下に血管の増生が明らかに認められた。対照群では滑膜細胞のわずかな重層化が認められたのみであった。持続注入 1 週間後に好中球の浸潤が認められたことから IL-8 の関与を滑膜組織における IL-8 RNA の発現と MCP-1 と抗 IL-8 抗体の同時投与の効果から検討したところ、好中球浸潤のかなりの部分が MCP-1 による IL-8 産生亢進によることが判明した。

サイクリック AMP シグナル伝達系を利用した RA の治療戦略に関する研究では、現在までに 7 例に臨床試験が行われた。これらの患者に 4 週間にわたり lipo-PGE1 (アルプロスタジル) 10  $\mu$ g を連日点滴静注し、同時にペントキシフィリン 300 mg/日を経口投与したところ、7 例中 4 例で ACR 20%改善基準を満たした。4 週後の平均改善率は、腫脹関節数 48%、疼痛関節数 23%、ADL スコア 16%、CRP 8%であった。副作用は認められなかった。

RA の予後予測因子としての血清 MMP-3 濃度の有用性に関する研究では、血清 MMP-3

濃度 (ng/ml) は健常者  $42.2 \pm 27.2$ 、OA  $49.0 \pm 12.7$  に比して RA 群 (n=55)  $224.5 \pm 237.3$ 、早期 RA 群 (n=19)  $295.2 \pm 304.4$  と何れも高値であった。早期 RA 患者の検討では血清 MMP-3 濃度は CRP (R=0.393)、赤沈 (R=0.356) と弱い相関を認めた。早期 RA の骨破壊を Larsen's score で評価し、骨破壊進行度との相関を検討した。その結果、血清 MMP-3 濃度は検査後 6 ヶ月間および 12 ヶ月間の骨破壊進行と相関を示した。これに対し、赤沈値は明らかな相関がなく、CRP は相関を示したものの MMP-3 よりは低かった。これらの成績は血清 MMP-3 濃度が早期 RA の関節破壊を予測しうる因子として臨床的に有用であることを示している。

#### D. 考察

抗リウマチ薬は時に重篤な副作用を伴うため、関節破壊の速やかな症例を特定して、より強力な治療を行う必要がある。このためには、早期治療指針を確立する必要がある。早期治療指針を確立するための臨床研究としては、outcome measure は x 線写真上の関節破壊進行の抑制および長期間にわたり副作用なく疾患活動性を十分抑制することとし、これに影響する治療開始時期、開始時および経過中の病態、および薬物療法の種類を明らかにすることとした。このような目的を持つ臨床研究を行うに当たって科学的に信頼の出来るデータが得られることが重要である。すなわち、最近 evidence-based medicine (EBM) が強調されているが、EBM に情報を提供できる様な実験計画を作成することが必要である。このため、今回の研究は無作為割付による多施設協同二重盲検比較試験の形をとることとした。さらに、試験途中におけるキーオープンによっても他の症例に影響を受けないようにするため、電話法を組み合わせることにした。

薬剤の選択に当たっては現在わが国で最もよく用いられている抗リウマチ薬であるブシラミンと諸外国では最も高頻度にまた第一選

択で用いられているメトトレキサートを選び、各々の単独投与と両者の併用療法を比較して、併用療法の意義を効果と副作用の面から分析する事とした。治療効果をみる primary end-points として、疾患活動性の改善を 2 年間持続し、かつ副作用のないこと、および 1 年後、および 2 年後の手と足の X 線写真上の骨破壊の進行、の 2 つを取り上げた。なお、解析に必要とされる症例数を各治療群間での有効率の差を 20% とし、検出力 80%、有意水準 5% とした場合に必要とされる症例数を算出したところ、73 例であり、脱落例を考慮して初期必要例を 100 症例とした。一方、これら 3 群間の比較を行うと共に、骨破壊の進行を規定する諸因子の分析、疾患活動性、QOL (ACR コアセット) に関する予後因子の分析を行うこととした。この分析により、早期 RA 患者の中で骨破壊の急速に進行する患者、長期にわたる疾患活動性の持続する患者、を予め予測し、治療法を計画することを可能にしたい。なお、予後因子としては治療開始時期、HLA DB1、CRP 積分、血清 MMP3 値、性差、治療法等の検討を行うこととした。

平成 10 年 5 月 研究費交付内定以来、製薬会社とのプラセボ及び実薬作成のための交渉、プロトコルの検討、医師賠償責任保険加入、臨床試験実施計画書、調査用紙等の作成、倫理委員会への申請、コントローラーによる薬剤割付け等の準備を行い、2 月末には 2 施設を除くすべての施設に試験薬剤の搬入を終了して試験を開始した。ここまでの経過では製薬会社の協力が不可欠であったほか、医師賠償責任保険加入など予想外の作業が必要であり、約 9 ヶ月の準備期間を要した。今後、なるべく早期に必要な症例数をエントリーして、臨床データの集積に勤めたい。

将来的により強力に関節破壊を防ぐ早期治療薬開発のための研究として、IL-10 遺伝子療法、IL-6 シグナル伝達阻害による治療法、プロテアーゼ阻害薬による治療法、ケモカイン持続注入による実験的関節炎誘導とその制

御、サイクリック AMP シグナル伝達系を利用した治療法が検討された。

関節炎の遺伝子療法に関してはアデノウイルス、レトロウイルスをベクターにした方法が主として試みられているが、レトロウイルスベクターはランダムに遺伝子に組み込まれるため、変異を来す可能性を否定できない。特に悪性腫瘍の発生である。アデノウイルスベクターはそれ自体が炎症を惹起する点に問題があるほか、ベクターが抗原性を有していることも臨床応用上の問題点であろう。これに対して、プラスミド DNA をそのまま投与方法は細胞に取り込まれる割合は低いと考えられるが、変異の誘導、ベクター自体の炎症惹起性、あるいはその抗原性などの副作用を考慮する必要がないことは大きな利点であり、将来の臨床応用も十分に考えられよう。

抗 IL-6R 抗体の RA に対する治療効果はすでに報告されているが、その作用機序については必ずしも明らかでない。今回の研究でも IL-6 シグナル伝達阻害による治療効果は滑膜細胞に対する直接的な増殖抑制ではなく、むしろ TNF  $\alpha$  による滑膜増殖を抑制することが判明した。したがって、単核球を中心とする炎症性細胞の浸潤阻止、破骨細胞分化の阻害、マトリックスメタルプロテアーゼ産生の抑制などによると考えられる。滑膜細胞の培養系においては TNF  $\alpha$  が IL-6 産生を促進し、その IL-6 は sIL-6R の存在下で TNF  $\alpha$  による滑膜増殖を抑制した。すなわち、IL-6 は TNF  $\alpha$  による滑膜増殖に対するネガティブフィードバック因子として働いている可能性が考えられる。また、IL-6 シグナル伝達機構におけるネガティブフィードバック因子である SSI-1 および SSI-3 が見いだされたことから、その機能異常が RA の病態形成に関与している可能性があり、さらに SSI 分子の遺伝子導入は新たな遺伝子療法の標的となる可能性が考えられる。

RA に出現する自己抗体の分析から、その対応抗原がカルシウム依存性中性プロテアー

ゼ（カルパイン）に特異的な内在性阻害蛋白であるカルパスタチンであることを見いだした。RA において、カルパスタチンが自己抗体と結合すればカルパインの酵素活性が亢進すると考えられるが、カルパインは RA の滑膜、関節液中に増加しており、RA の関節破壊に関与している可能性が考えられた。したがって、カルパイン阻害薬が RA の治療薬として用いられる可能性があることから、今回の実験ではコラーゲン誘発関節炎に種々のカルパイン阻害薬を投与して、その効果を検討した。その結果、*in vitro* で最も強い活性を有するカルペプチンが動物実験でも明らかな効果を示した。本研究はカルパイン阻害薬が関節炎の治療に用いられうる可能性を示した初めての成績である。今後、用量設定、毒性試験、他の阻害薬の検討を進める予定である。

MCP-1 持続注入による関節炎誘導に関する研究では、関節炎の病態形成におけるケモカインの意義を明らかにするため、マクロファージ走化性ケモカインである MCP-1 を家兎の膝関節内に持続注入して、その効果を解析した。MCP-1 は関節内のマクロファージ浸潤を惹起するのみならず、IL-8 産生を介した好中球浸潤や滑膜表層細胞の重層化、血管新生など関節炎の諸病態を引き起こした。MCP-1 を始めとする CC ケモカインに対する中和抗体、受容体に対するアンタゴニストが将来 RA の治療薬の一つになりうる可能性が示された。

PGE はブラジキニンの疼痛閾値を下げて関節痛の発現に関与し、血流量の増加や血管透過性の亢進による関節周囲の浮腫に関与することから、炎症のメディエーターと考えられてきた。一方で PGE には種々の抗炎症作用、抗免疫作用が知られている。マクロファージからの TNF  $\alpha$  等炎症性サイトカイン産生抑制、T 細胞の Th-1 反応抑制、線維芽細胞からの MMP 産生抑制、好中球の活性酸素産生抑制などが知られている。滑膜細胞の *in vitro* 培養系で、PGE が TNF  $\alpha$  産生抑制やパンヌ

ス様組織形成の抑制を来すことを認め、この様な PGE1 のこれらの抑制作用が cAMP を介することを明らかにした。また、アルプロスタジル 20  $\mu$  g/kg の投与がマウス II 型コラーゲン関節炎におけるパンヌス形成を抑制した。そこで、今回は lipo-PGE1 単独投与では十分な効果の得られないことを考え、ホスフォジエステラーゼ阻害薬であるペントキシフィリンを併用した。ペントキシフィリンは細胞内ホスフォジエステラーゼ阻害作用を有し、cAMP の半減期を延長するため、相乗効果を呈するものと考えられた。その結果、7 例中 4 例で ACR 20% 改善が認められた。以上の成績はまた、RA の治療に用いられている NSAID の使用が滑膜増殖に関して、一部促進的に働く可能性を示しているものと考えられる。

MMP-3 は軟骨基質を分解するマトリックスメタロプロテアーゼの一つで、滑膜細胞、軟骨細胞、血管内皮細胞から産生され、RA に認められる関節破壊の一因であると考えられている。今回の検討では、血清 MMP-1 濃度は進行した RA のみならず早期 RA 患者でも高値を示していた。このことは MMP-1 濃度上昇が軟骨細胞の破壊によるもののみでなく、早期の病態である滑膜表層細胞および著明な血管内皮細胞の増殖を反映しているものと考えられる。また、MMP-3 が高値を持続する症例は関節破壊が進行する傾向が認められた。また、血清 MMP-3 は採血時から 6 ヶ月及び 12 ヶ月間の関節破壊の進行、すなわち、Larsen score の増加と相関した。また、関節破壊進行との相関は赤沈値あるいは CRP 値より高く、関節破壊の予測因子としても有用であると考えられた。今回の臨床研究でも開始時の血清を保存しているが、血清 MMP-1 濃度を測定し、X 線所見との相関を検討する予定である。

#### E. 結論

慢性関節リウマチの早期治療指針の確立す

るための臨床研究として、x 線写真上の関節破壊進行の抑制および長期間にわたり副作用なく疾患活動性を十分抑制することを治療目的と考え、これに影響する治療開始時期、開始時および経過中の病態、および薬物療法の種類を明らかにすることを目的として、多施設協同二重盲検対照試験を計画し、スタートした。一方、将来の早期治療につながる先進治療として、いくつかの新しい観点に立った治療法の開発を進めた。IL-10 遺伝子治療、内因性のネガティブフィードバック因子である SSI-1 の治療法への応用、酵素活性抑制という新しい作用機序をもったカルパイン阻害薬、マクロファージの走化、活性化因子である MCP-1 の関節炎発症における意義、lipo-PGE とペントキシフィリン併用の臨床応用が試みられた。

臨床研究としての無作為対照比較試験および将来的により強力に関節破壊を防ぐ早期治療薬開発のための研究を遂行することによって、慢性関節リウマチの早期治療指針の確立する。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nishimura A, Akahoshi T, Takahashi M, Takagishi K, Itoman M, Kondo H, Takahashi Y, Yokoi K, Mukaida N, Matsushima K : Attenuation of monosodium urate crystal-induced arthritis in rabbits by a neutralizing antibody against interleukin-8. *J. Leukoc. Biol* 1997,62(444-449)
2. Kondoh H, Yoshizaki K, Nishimoto N, T, Nakamura H, Nishimura T : Bone marrow uptake of Ga-67 on Castleman's disease and correlation with high level of interleukin-6. *J. Nucl. Med*, 1999 in press
3. Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T : Anticytokine therapy in autoimmune diseases.

- Internal Medicine, 1999 in press
4. 西本憲弘、松本智成、吉崎和幸：  
抗サイトカイン療法．カレントセラピー  
17:150-154,1999
  5. Takagi N, M. Mihara, Y. Moriya, N.  
Nishimoto, K. Yoshizaki, T. Kishimoto, Y.  
Takeda, Ohsugi Y : Blockage of Interleukin-6  
receptor ameliorates joint disease in murine  
collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*  
41:2117-2121, 1998
  6. Matsuno H, Sawai T, Nezuka T, Uzuki M,  
Tsuji H, Nishimoto N, Yoshizaki K : Treatment  
of rheumatoid synovitis with antireshaping  
human interleukin-6 receptor monoclonal  
antibody-use of Rheumatoid Arthritis tissues  
implants in the SCID mouse model. *Arthritis  
Rheum* 41:2014-2021,1998
  7. Johkoh T, N. L. Müller, K. Ichikado, N.  
Nishimoto, K. Yoshizaki, O. Honda, N. Tomiyama  
H. Naitoh, H. Nakamura, Yamamoto S :  
Intrathoracic multicentric castleman disease: CT  
findings in 12 patient. *Radiology* 209:477-481,  
1998
  8. Isumi Y, N. Minamino, A. Kubo,  
N. Nishimoto, K. Yoshizaki, M. Yoshioka, K.  
Kangawa, Matsuso H: Adrenomedullin stimulates  
IL-6 production in Swiss 3T3 cells. *Biochem.  
Bioph. Res. Co.* 244:325-331, 1998
  9. Yoshizaki K, Nishimoto N, Mihara M,  
Kishimoto T: Therapy of RA by blocking IL-6  
signal transduction with humanized IL-6 receptor  
antibody. *Springer Seminars in immunopathology*  
20:247-259,1998
  10. 西本憲弘、吉崎和幸、岸本忠三：抗 IL  
-6 抗体による骨髓腫細胞の増殖制御。  
*臨床検査* 42:86-89,1998
  11. 西本憲弘、吉崎和幸：慢性関節リウマ  
チの抗 IL-6 レセプター抗体療法．リウ  
マチ科 19:399-402,1998
  12. 西本憲弘、吉崎和幸：サイトカインと  
サイトカインレセプター．*臨床免疫* 30:  
1370-1375,1998
  13. 吉崎和幸、西本憲弘：骨融解像。  
*Molecular Medicin 臨時増刊号 症候・病  
態のメカニズム* 35:263-264,1998
  14. 吉崎和幸、西本憲弘、田合ひろみ、松  
本智成：ヒト型化抗 IL-6 レセプター抗  
体を用いた IL-6 シグナル伝達阻害によ  
るキャスルマン病の治療への応用。  
*炎症* 18:319-326,1998
  15. 西本憲弘、松本智成、吉崎和幸：抗サ  
イトカイン療法．カレントセラピー  
17:150-154,1998
  16. 西本憲弘、吉崎和幸、岸本忠三：サイ  
トカインシグナル伝達阻害による自己免  
疫疾患の治療．*日本内科学会雑誌*  
87:1745-1750,1998
  17. 西本憲弘、吉崎和幸：抗サイトカイン  
療法とその有用性．*Medical Practice* 15:  
2105-2108,1998
  18. 伊藤愛、田合ひろみ、西本憲弘、吉崎  
和幸：RA の先進医療～ IL-6 レセプター  
を阻害する治療法～．*RA &セラピー* 4  
42-51,1998
  19. 伊藤愛、西本憲弘、團野典行、大野美  
夏、吉崎和幸：インターロイキン6の病

態における役割と治療への応用.

Cardiologist 3:113-119,1998

20. 吉崎和幸、西本憲弘：ヒト型化抗 IL-6 レセプター抗体によるキャッスルマン氏病の治療. 感染・炎症・免疫 28:42-43,1998

21. 西本憲弘、吉崎和幸：抗サイトカイン療法とその有用性. Medical Practice 15(12): 2105-2108,1999

22. Mimori T et al : Autoantibodies to calpastatin (an endogenous inhibitor for calcium-dependent neutral protease, calpain) in systemic rheumatic diseases. Proc Natl Acad Sci USA 92 : 7267-7271, 1995

23. 安岡秀剛、三森経世ほか：リウマチ疾患における抗カルパスタチン抗体の認識する自己抗原エピトープとその臨床的意義に関する研究. リウマチ 37:458-466,1997

24. 三森経世：抗カルパスタチン抗体. 臨床検査 41:584-585, 1997

25. 高田理絵、三森経世ほか：加熱処理 HeLa 細胞抽出物を抗原とした、免疫ブロット法によるリウマチ疾患患者血清中の免疫グロブリンクラス別抗カルパスタチン抗体の検出. 日本免疫学会雑誌 21:150-158, 1998

26. Kanazawa Y, Mimori T et al : Domain reactivity of autoantibodies to calpastatin in patients with systemic rheumatic diseases. Arthritis Rheum (投稿中)

27. Miyata Masayuki, Takase Yuko, Kobayashi Hiroko, Kokubun Masaki, Yoshimura Akiko, Katsura Yutaka, Nishimaki Tomoe, Kasukawa Reiji: Primary Sjögren's syndrome complicated

by sarcoidosis. Int Med 37(2), 174-178, 1998

28. Miyata Masayuki, Sekine Hideharu, Sato Yukio, Watanabe Kazuo, Endo Yuichi, Kato H, Uchiyama Takehiko, Kasukawa Reiji: Selective expansion of large lymphoblasts expressing V  $\beta$  6. 1-3 or 7 in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. Jpn J Rheumatol 8(4), 369-384, 1998

29. Miyata Masayuki, Fukaya Etsuko, Takagi Tadayuki, Watanabe Kenya, Saito Hiroyuki, Ito Masahiko, Yoshioka Ryoji, Kazuta Yoshihiro, Yusa Yukie, Irisawa Atsushi, Sato Yukio, Nishimaki Tomoe, Kasukawa Reiji: Two patients with polymyositis or dermatomyositis complicated with massive pleural effusion. Int Med 37(12), 1058-1063, 1998

30. Miyata Masayuki, Sato Yukio, Kasukawa Reiji : Gene therapy in inflammatory diseases. (edited by Prof. C.H.Evans and Dr. P.Rpbbins) Naked DNA. 1999 in press

31. Sakuma Fumitaka, Miyata Masayuki, Kasukawa Reiji : Suppressive effect of prostaglandin E1 on pulmonary hypertension induced by monocrotaline in rats. Lung 177(2), 77-88, 1999

32. Yoshihiro Sato, Masayuki Miyata, Yukio Sato, Tomoe Nishimaki, Hideo Kochi and Reiji Kasukawa : CpG motif-containing DNA fragments form sera of patients with systemic lupus erythematosus proliferate in vitro mononuclear cells. J Rheumatol 1999, 26(2), 294-301.

33. Miyata Masayuki, Takeda Junko, Sato Yukio, Sato Hiroshi, Saito Ayako, Irisawa Atsushi, Nishimaki Tomoe, Kasukawa Reiji: Suppression of murine collagen-induced arthritis by topical

- Innoculation of plasmid DNA encoding inter-leukin-10. *Arthritis Rheum* 40: S100,1998
34. Miyata Masayuki, Sato Yukio, Kasukawa Reiji: IgG1 subclass specificity for IgG rheumatoid factors in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* in press
35. Masayuki Miyata, Hiroaki Sato, Hiroshi Sato, Yukio Sato, Eiichi Kodama, and Reiji Kasukawa: significance of endogenous heat shock protein in adjuvant arthritis. *J Rheumatol.* in press
36. Mawayuki Miyata, Yoichi Sakata, Seiji Madoiwa, Koaru Sato, Osamu Munakata, Ryoji Yoshioka, Akira Hirotsuka, Keiji Iwatsuki, Yukio Sato and Reiji Kasukawa: Recurrent multiple thrombosis in a patient with abnormal plasminogenemia and Behçet's disease. *Thrombosis Res.* in press
37. E Moriuchi, H Yamada, M Yamasaki, C Kase, O Ishii, N Ohya, Y Ichikawa. Synergistic inhibition of pannus tissue development in vitro by PGE1 plus phosphodiesterase 4 inhibitors. *Arthritis Rheum.* 41:S101, 1998
38. Ishii O, M Yamasaki, C Tanaka, E Moriuchi, C Kase, N Ohya, T Matsuda, Y Ichikawa, H Yamada. Lipo-PGE1 plus pentoxifylline for the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 41:S60, 1998
39. 柏崎禎夫、山中 寿、松田祐子：慢性関節リウマチの今日の治療戦略 リウマチ 36:791-802, 1996
40. 柏崎禎夫、山中 寿、松田祐子：慢性関節リウマチの早期診断・早期治療の必要性和その実際 最新内科学体系 プロGRESS 4 : 330-344, 1997 中山書店
41. Yuko Matsuda, Hisashi Yamanaka, Kenshi Higami, Sadao Kashiwazaki: Time lag between active joint inflammation and radiological progression in patients with early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 24:427-32, 1998
42. H Yamanaka, et al: Serum metalloproteinase -3 as a predictor of joint destruction during the next six months in patients with early rheumatoid arthritis. (in preparation)
2. 学会発表
1. 西村 明人、赤星 透、高岸 憲二、糸満 盛憲、近藤 啓文  
mcp-1 持続注入による家兎実験関節炎の誘導、第42回日本リウマチ学会総会・学術集会、1998
2. Nishimura A, Akahoshi T, Ohtaka F, Nasuno S, Takagishi K, Kondo H, Itoman M: Experimental arthritis induced by continuous infusion of MCP-1 in rabbit knee joint. 62nd National Scientific Meeting of American College of Rheumatology, 1998
3. N. Nishimoto, A. Ito, M. Ono, H. Tagoh, H. Matsuno, T. Tomita, T. Ochi, T. Kishimoto, K. Yoshizaki: Anti-interleukin-6 receptor therapy of rheumatoid arthritis.  
第28回日本免疫学会総会. 12/2-4,1998 (神戸)
4. 伊藤 愛、西本 憲弘、大野 美夏、田合 ひろみ、冨田 哲也、越智 隆弘、吉崎 和幸：IL-6 / sIL-6R 複合体によるRA 由来滑膜細胞の増殖抑制作用。  
第28回日本免疫学会総会. 12/2-4,1998 (神戸)
5. 伊藤 愛、西本 憲弘、團野 典行、大野 美夏、冨田 哲也、越智 隆弘、

吉崎 和幸：RA 滑膜細胞増殖に対する  
TNF  $\alpha$  と IL-6 の相反する作用。  
第 4 2 回日本リウマチ学会総会  
5/7-9,1998（東京）

6. Kaneshiro Y, Mimori T et al: Molecular  
cloning of full-length cDNA encoding human  
calpastatin and analysis of epitopes recognized  
by anti-calpastatin autoantibodies in patients with  
rheumatoid arthritis.  
Arthritis Rheum 39:S38,1996

7. Matsumoto M, Mimori T et al: Inhibition of  
calpastatin function by autoantibodies in patients  
with rheumatoid arthritis.  
Arthritis Rheum 40:S277,1997

8. 宮田 昌之、佐藤 由紀夫、佐藤  
宏、西間木 友衛、粕川 禮司、インタ

ーリウキン 1 0 (IL-10)産生プラスミド皮  
内移入によるタイプ II コラーゲン関節炎  
(CIA)抑制。  
第 4 2 回日本リウマチ学会

9. Masayuki Miyata, Junko Takeda, Yukio Sato,  
Hiroshi Sato, Ayako Saito, Atsushi Irisawa,  
Tomoe Nishimaki and Reiji Kasukawa  
SUPPRESSION OF MURINE. COLLAGEN  
-INDUCED ARTHRITIS(CIA) BY TOPICAL  
INOCULATION OF PLASMID DNA  
ENCODING INTERLEUKIN(IL)-10.  
第 6 2 回米国リウマチ学会

10. 山中 寿、松田 祐子、仙道 和子、  
他：早期 RA の骨破壊を予測する指標と  
しての血清 MMP-3 の有用性  
第 4 3 回日本リウマチ学会総会発表予定  
(1999 年 6 月、札幌)



# インターリウキン10プラスミド遺伝子導入による関節炎の抑制に関する研究

分担研究者 宮田 昌之 福島県立医科大学第二内科講師

## 研究要旨

本研究に用いたプラスミドの安全性は確立されており IL-10 プラスミドを皮内に導入することにより慢性関節リウマチの関節炎を制御できる可能性があることが示唆された。しかし、プラスミドに存在する immunostimulatory sequence が本治療において障害になる可能性があるため今後、改善しなければならない。

## A.研究目的

抗 TNF 抗体が慢性関節リウマチ(RA)の治療に著しい効果を上げていることから炎症性サイトカインを抑制することで RA の関節炎を制御できると考えられる。しかし、抗体を用いた治療は抗体を頻繁に投与しなければならない煩雑さがあり、また、抗体に対する抗体の産生による抗 TNF 抗体の作用の減弱、副作用の発現などの問題点がある。

RA の病因抗原は未だ不明であるがサイトカインの産生パターンより Th1 タイプのアレルギー反応であると考えられている。Th1 アレルギー反応を誘導するサイトカインはインターフェロンガンマ(IFN $\gamma$ ) であると考えられており、一方 Th2 アレルギー反応を誘導するサイトカインはインターリウキン(IL)-4、IL-10 であると考えられている。また、これらのサイトカインはそれぞれ Th2 アレルギー反応、Th1 アレルギー反応を抑制する。IL-10 は NF- $\kappa$  B を抑制することにより炎症性サイトカインの産生を抑制する事が知られている。このため、IL-10 は RA の Th1 よりのアレルギー反応を是正しさらに RA で病態を形成している炎症性サイトカインを抑制することで治療薬として期待されている。しかし、このようなサイトカインを用いた治療は慢性肝炎患者に対して IFN を用いた経験から頻繁にサイトカインを投与しなければならないことが予想される。また、コストの面からも困難が予想される。

プラスミドを皮内注射し皮内に IL-10 産生プラスミドを導入すると導入されたプラスミドはそのコードする蛋白を一年以上局所で産生し続ける。

今回、IL-10 プラスミド(p-IL-10)を皮内に一回導入することでマウスタイプ II コラーゲン関節炎(CIA)を抑制出来るか否かを検討した。

## B.研究方法

CIA は常法に従って作成した。

CMV のエンハンサー/プロモーターと SV40 の poly(A)tail をもつ pCMV ベクターに IL-10 の cDNA を組み込んだものを大腸菌で増幅し Qiagen megaprep キットで精製した。精製したプラスミドは Triton X-114 抽出でエンドトキシンが 0.5-5ng/mg まで減少した状態で用いた (p-IL-10)。

p-IL-10 を皮内注射し皮内に導入した。タイプ II コラーゲン(CII)を免疫する前に 20 マイクログラム、または 100 マイクログラムの p-IL-10 を皮内に導入して関節炎の抑制が可能か否かを検討した。マウスより、血清を採取して抗 CII 抗体をサブクラス別に測定した。また、脾細胞を採取してこれを CII で刺激後、上清中に産生された IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  を測定した。

## C.研究結果

CII を免疫する前に 20 マイクログラムの p-IL-10 を尾根部皮内に導入しておくこと CIA が強く抑制されることが分かった。しかし、100 マイクログラムの p-IL-10 を皮内に導入した場合にはむしろ関節炎が増強されることが判った。抗 CII 抗体 Th1 タイプの免疫反応を反映する IgG2 サブクラスと Th 2 タイプの免疫反応を反映する IgG 1 サブクラス別に測定し

IgG2a/IgG1(Th1/Th2)を計測したところ CIA での IgG2a/IgG1 に比して p-IL-10 を皮内に導入した CIA マウスの IgG2a/IgG1 では有意に低下していることが分かった。さらに、それぞれの IgG2a, IgG1 サブクラス別の抗体価を比較してみると CIA の IgG2a に比して p-IL-10 を皮内に導入した CIA マウスの IgG2a が有意に低下していることが分かった。このことから、p-IL-10 を皮内に導入した CIA マウスで Th1 タイプの免疫反応が抑制され、CIA の発症が抑制されたと考えられた。

IL-4, IL-10 は脾細胞上清中において測定感度以下であったが、IFN- $\gamma$  は測定可能であり p-IL-10 を尾根部皮内に移入した場合には CIA マウスに比して抑制された。

#### D. 考察

p-IL-10 を皮内に導入することにより Th1 タイプの免疫反応を抑制して関節炎を制御することが可能である事が示された。しかし、本プラスミドの DNA の sequence には immunostimulatory sequence (ISS) が存在し ISS は Th1 タイプの免疫反応を誘導するため 100 マイクログラムの p-IL-10 を皮内に導入した場合にはむしろ関節炎が増強されることが判った。従って ISS が本治療において障害になる可能性がある (文献 6 参照)。ISS の作用を抑制する immunoinhibitory sequence (IIS) の存在も同定されており (Krieg AM et al. Sequence motif in adoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motif. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95; 12631-6)、また、ISS を持たないベクターも存在する (Sato Y et al. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. Science 1996, 273;352-4)。このため今後、ベクターを改善しなければならない可能性も考えられる。

#### E. 結論

プラスミドの安全性は確立されており p-IL-10 を皮

内に導入することにより慢性関節リウマチの関節炎を制御することが可能であることが示唆された。しかし、プラスミドを改善するのが理想的であることが判った。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Miyata Masayuki, Takase Yuko, Kobayashi Hiroko, Kokubun Masaki, Yoshimura Akiko, Katsuura Yutaka, Nishimaki Tomoe, Kasukawa Reiji: Primary Sjögren's syndrome complicated by sarcoidosis. *Int Med* 37(2), 174-178, 1998.
2. Miyata Masayuki, Sekine Hideharu, Sato Yukio, Watanabe Kazuo, Endo Yuichi, Kato H, Uchiyama Takehiko, Kasukawa Reiji: Selective expansion of large lymphoblasts expressing V $\beta$  6.1-3 or 7 in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Jpn J Rheumatol* 8(4), 369-384, 1998.
3. Miyata Masayuki, Fukaya Etsuko, Takagi Tadayuki, Watanabe Kenya, Saito Hiroyuki, Ito Masahiko, Yoshioka Ryoji, Kazuta Yoshihiro, Yusa Yukie, Iisawa Atsushi, Sato Yukio, Nishimaki Tomoe, Kasukawa Reiji: Two patients with polymyositis or dermatomyositis complicated with massive pleural effusion. *Int Med* 37(12), 1058-1063, 1998
4. Miyata Masayuki, Sato Yukio, Kasukawa Reiji: Gene therapy in inflammatory diseases. (*edited by Prof. C.H. Evans and Dr. P. Robbins*)---Naked DNA.---1999 in press
5. Sakuma Fumitaka, Miyata Masayuki, Kasakawa Reiji: Suppressive effect of prostaglandin E1 on pulmonary hypertension induced by monocrotaline in rats. *Lung* 177(2), 77-88, 1999.
6. Yoshihiro Sato, Masayuki Miyata, Yukio Sato, Tomoe Nishimaki, Hideo Kochi and Reiji Kasukawa: CpG motif-containing DNA fragments

from sera of patients with systemic lupus erythematosus proliferate in vitro mononuclear cells. *J Rheumatol* 1999, 26 (2),294-301.

7. Miyata Masayuki, Takeda Junko, Sato Yukio, Sato Hiroshi, Saito Ayako, Irsawa Atsushi, Nishimaki Tomoe, Kasukawa Reiji: Suppression of murine collagen-induced arthritis by topical inoculation of plasmid DNA encoding interleukin-10. *Arthritis Rheum* 40: S100, 1998

8. Miyata Masayuki, Sato Yukio, Kasukawa Reiji: IgG 1 subclass specificity for IgG rheumatoid factors in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* in press

9. Masayuki Miyata, Hiroaki Sato, Hiroshi Sato, Yukio Sato, Eichi Kodama, and Reiji Kasukawa: Significance of endogenous heat shock protein in adjuvant arthritis. *J. Rheumatol.* in press

10. Masayuki Miyata, Yoichi Sakata, Seiji Madoiwa, Kaoru Sato, Osamu Munakata, Ryoji Yoshioka, Akira Hirosaka, Keiji Iwatsuki, Yukio Sato and Reiji Kasukawa: Recurrent multiple thrombosis in a patient with abnormal plasminogenemia and Behçet's disease. *Thrombosis Res.* in press.

2.学会発表

1. 宮田 昌之、佐藤 由紀夫、佐藤 宏、西間木 友衛、粕川 禮司.インターリウキン10(IL-10)産生プラスミド皮内移入によるタイプIIコラーゲン関節炎(CIA)抑制.第42回日本リウマチ学会

2. Masayuki Miyata, Junko Takeda, Yukio Sato, Hiroshi Sato, Ayako Saito, Atsushi Irsawa, Tomoe Nishimaki and Reiji Kasukawa SUPPRESSION OF MURINE. COLLAGEN-INDUCED ARTHRITIS (CIA) BY TOPICAL INOCULATION OF PLASMID DNA ENCODING INTERLEUKIN (IL)-10. 第62回米国リウマチ学会

## IL-6シグナル伝達阻害による慢性関節リウマチの治療法の確立に関する研究

分担研究者 西本憲弘

大阪大学 健康体育部・健康医学第一部門 助教授

RAに認められる関節内及び関節外症状から多様な生理活性を有するインターロイキン6 (IL-6) がRAの病態形成に関与すると考えられる。我々はIL-6シグナル阻害が難治性RAに有効であることを明らかにし、IL-6がRA病態形成の重要なサイトカインの一つであることを立証するとともに、IL-6シグナル阻害がRAの新しい治療法となりうることを示した。さらに、RAに対するIL-6阻害の治療効果は滑膜増殖に対する直接的な作用ではなく、単核球を中心とする炎症性細胞の浸潤の阻止、破骨細胞の活性化や血管新生の阻害によることを明らかにした。一方、IL-6にはSSI-1/JAB/SOCS-1と呼ばれる内因性のネガティブフィードバック因子が存在することを見出した。RAの炎症にはこの分子の機能異常の可能性が考えられる。あるいはこの分子の導入による分子・遺伝子治療の可能性がある。

### A. 研究目的

RAは世界人口の約1%、我が国では70万人が罹患している。しかもその10%は従来のDMARDや免疫抑制に抵抗性を示し、関節破壊が進行しQOLの低下を余儀なくされている。そこで関節破壊を生じる前の早期にしかも有効な治療法を選択し開始する必要がある。同時に従来の治療が無効な症例を早期に見極め、且つ、そのような症例でも有効な治療法を開発し、早期に導入しなくてはならない。IL-6はRAの病態において慢性炎症病態、骨破壊のみならず、T細胞活性化や自己抗体産生を促し、自己免疫反応の成立という比較的早いステージにも関与すると考えられることから、IL-6阻害は早期であるほど奏効すると考えられる。しかし、IL-6は他のサイトカイン同様生体にとって重要な役割を担っており、しかも他のサイトカインとの相互作用も有する。そこでIL-6の標的を明らかにし、IL-6のRA病態における役割をより明確にし、より特異的IL-6の作用の阻害法を開発する必要がある。今回、in vitroならびにin vivoの実験系によりIL-6シグナル阻害治療の標的細胞を明らかにするとともにIL-6及びTNF $\alpha$ の相互作用について検討した。

### B. 研究方法

#### 1 滑膜細胞の増殖におけるサイトカインの相互

### 作用の解析

RA滑膜細胞(3~6継代)の増殖に対するIL-6、可溶性IL-6レセプター(sIL-6R)及びTNF $\alpha$ の影響とその相互作用について<sup>3</sup>H-TdR uptakeにより検討した。またIL-6Rおよびgp130分子の発現をRT-PCR、フローサイトメトリーにより解析した。

2 RAのSCID-Huマウスモデルを用いた実験 患者関節組織をSCIDマウス背筋内に移植しSCID-HuRAを作成。このモデルを用いて抗IL-6R抗体、抗TNF $\alpha$ 抗体による治療実験を行い、組織学的検討を加えた。また破骨細胞に対する影響を検討した。

3 ネガティブフィードバック関連分子によるサイトカインの阻害

(1) 滑膜細胞(3~6継代)でのSSI-1/JAB/SOCS-1の発現とIL-6による誘導の有無を解析した。

(2) 他のSOCS/CIS/SSIファミリー遺伝子について(1)と同様に検討した。

ヒトのサンプルはすべてインフォームドコンセントを得たうえで採取した。動物の使用にあたっては当大学の動物使用の規定に基づき、動物愛護に配慮して行った。

### C. 研究結果

#### 1 滑膜細胞によるIL-6Rおよびgp130の発現