

慢性関節リウマチの早期治療指針の
確立に関する研究

目次

リウマチ膠原病部門

慢性関節リウマチの早期治療指針の確立に関する研究	聖マリアンナ医科大学内科学 教授	市川 陽一	(317)
タイプ2コラーゲン関節炎の遺伝子治療に用いるプラスミド内のCpGモチーフの作用についての研究	福島県立医科大学第二内科 講師	宮田 昌之	(329)
臨床治療の早期打ち切りに関する臨床疫学的評価に関する研究	聖マリアンナ医科大学予防医学 教授	吉田 勝美	(332)
好中球湿潤阻害による慢性関節リウマチの治療法の開発に関する研究	北里大学医学部内科学 教授	近藤 啓文	(334)
IL-6シグナル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	大阪大学健康体育部健康医学第一部門 助教授	西本 憲弘	(337)
コラーゲン誘発マウス関節炎におけるカルパイン阻害薬の効果の検討	慶應義塾大学医学部内科 講師	三森 経世	(341)
サイクリックAMPシグナル伝達系を利用したRAの新しい治療戦略に関する研究	聖マリアンナ医科大学内科学 助教授	山田 秀裕	(344)
血管新生抑制因子TSP-1の制御による慢性関節リウマチの新しい治療戦略	東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 助教授	山中 寿	(347)

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教授

研究要旨

慢性関節リウマチの早期治療指針を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すること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行っている。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、等であり、抗 IL-6R 抗体療法および lipo-PGE とペントキシフィリン併用療法はの臨床応用が試みられ、期待される結果が得られた。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設における職名

宮田昌之（福島県立医大第二内科講師）
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（慶応大内科講師）
山田秀裕（聖マリアンナ医大・内科学助教授）
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、全身関節の疼痛、変形のために苦しむのみならず、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。

このためには、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新薬、併用療法を見出す、の各点を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 早期治療法確立のための臨床試験

早期治療指針を確立するための臨床研究として、primary endpoints 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分析することとした。発症2年以内で、DMARDを未投与の18から70歳までのACR1987年診断基準を満たす早期RA患者を対象とし、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る。他の分担研究者と研究協力者25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。調査項目としては患者の関節痛評価、患者による全般評価、身体機能評価(mHAQ)、握力、疼痛関節数、腫脹関節数、医師の全般評価、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、尿所見などである。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。観察期間は2年間とした。

なお、臨床試験に関し、担当医師は被験者に本試験が研究であること及びその目的、方法、参加予定期間、2種類の薬剤及び併用療法の有効性、副作用、などについて十分説明したのち、文書により、自由意志による同意を得る。本研究がDMARD併用療法を含む無作為割付によることから、各参加施設の倫理委員会あるいはIRBでの許可を得てから行うこととした。

2) 次世代の早期治療薬の開発のための研究

(1) マウス2型コラーゲン誘導関節炎に

IL-10産生プラスミドを皮下注射しておく、発症が抑制されたが、プラスミドがもつ免疫賦活作用が問題となった。この点を明らかにするため、CpGモチーフをもつODNとCpGモチーフのCをメチル化したmCpG-ODNのCIAに対する作用を検討した。

(2) RAの80%にはカルパスタチンに対する自己抗体が存在し、それによるカルパイン活性の亢進が関節炎増悪をもたらす可能性を考え、カルパイン阻害物質であるカルペプチンをラットII型コラーゲン誘発関節炎に投与したところ有効であった。カルペプチンの用量依存性、血中の抗カルパスタチン抗体値との関連をみるため、DBA/1JNCrj系マウス(8週齢雄)にウシII型コラーゲンと完全フロイントアジュバンドを皮下注射(1群10匹)、21日目に追加免疫し、マウス関節炎を作成した。カルペプチンは追加免疫日より21日目まで3mg/kgまたは10mg/kgを1日1回腹腔内投与し、対照薬剤としてデキサメタゾンを腹腔内投与した。また、マウスの抗コラーゲン抗体はELISA法、抗カルパスタチン抗体は免疫ブロット法で測定した。

(3) IL-6シグナル阻害による慢性関節リウマチの治療法に関する研究

1. 体重kgあたり2、4もしくは8mgの抗IL-6R抗体を、各群5例の活動性RA患者に点滴静注にて2週間隔で3回使用し8週までの安全性と薬物動態を検討した。同時にRA活動性の評価を行い、治療効果が認められた場合は長期継続試験に移行した。

2. 継代培養した滑膜線維芽細胞におけるSSIファミリー分子の発現をRT-PCRにて解析した。PCR産物は3%アガロース電気泳動にて展開し、また同条件で細胞を回収しウエスタンブロットによりSTAT1, STAT3のチロシンリン酸化を検討した。

この培養系において、IL-6とsIL-6Rおよ

び抗 IL-6R 抗体を添加し、その影響を分析した。

(4)サイクリック AMP シグナル伝達系を利用した新しい治療戦略に関しては、(1)血沈値 31mm/h 以上、(2)疼痛関節数 6 個以上、(3)腫脹関節数 3 個以上の RA 患者を対象に、アルプロスタジル 10mg を 100ml 生理食塩水に溶き連日点滴静注し、ペントキシフィリン 300mg/日を経口投与した。投与期間は 4 週間とした。評価は、ACR コアセットを用い、20%改善基準を満たしたものを有効と判定した。なお、本臨床試験は本学倫理委員会の承認、患者からのインフォームドコンセントを得て行われた。in vitro 滑膜炎モデルは RA 患者滑膜組織由来炎症細胞を混合培養してパヌス様組織形成を観察した。

(5)滑膜組織から mRNA を抽出し、cDNA を合成して RT-PCR 法にて血管新生抑制因子である thrombospondin-1 (TSP-1) の発現を β -actin を対照として検討した。ついで、competitive PCR 法により TSP-1 mRNA の定量を行った。

(6)RA 患者の膝関節手術時に切除した滑膜組織を SCID マウス皮下に移植し、RA モデルを作成した。同一 RA 患者の好中球を ^{99m}Tc で標識、尾静脈より静脈投与し、滑膜移植部位への RI の集積を放射線測定装置を用いて経時的に測定し、定量化した。さらに、IL-8 の役割を解明するために、好中球の静脈投与 2 時間前に、抗ヒト IL-8 モノクローナル抗体 (WS-4) を腹腔内投与し、好中球浸潤に及ぼす IL-8 の影響を解析した。

C. 研究結果

1) 早期治療法の確立のための臨床試験

発症 2 年以内で、18 から 70 歳までの ACR1987 年診断基準を満たす早期 RA 患者を対象とし、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る。他の分担研究者と研究協力者 25 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の協力を得て臨床試験を行った。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/日とした。調査項目としては患者の関節痛評価、患者による全般評価、身体機能評価 (mHAQ)、握力、疼痛関節数、腫脹関節数、医師の全般評価、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、尿所見などである。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。観察期間は 2 年間とした。治療法の評価には primary end-points として、疾患活動性の改善 (ACR 50) 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。

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と平行して、試験薬剤の準備、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い、平成 11 年 2 月には多施設共同二重盲検比較試験を開始した。また、平成 11 年 9 月には症例数を増加させる目的で 6 国立病院および 1 リウマチ専門病院の研究協力者が新たに参加した。平成 12 年 3 月末日で 76 例がエントリーし、2 年間にわたる臨床研究を施行中である。

2) 次世代の早期治療薬の開発のための研究

(1)マウス 2 型コラーゲン誘導関節炎に

IL-10 産生プラスミッドを皮下注射しておく、発症が抑制された。しかし、この実験においてプラスミッドがもつ免疫賦活作用が問題となった。この点を明らかにするため、CpG モチーフをもつ ODN と CpG モチーフの C をメチル化した mCpG-ODN の CIA に対する作用を検討した。その結果、関節点数では CpG-ODN 群が生食対照群より高く、両群間に有意差を認めた。また、組織学的な検索でも CpG-ODN 群と生食対照群間に差があった。さらに CpG-ODN 群とくらべ mCpG-ODN 群では細胞浸潤、線維化、これらを総合した関節炎の程度において有意に抑制され、両群間に有意差を認めた。さらに、脾細胞が産生したインターフェロン γ 値でも CpG-ODN 群が saline 群および mCpG-ODN 群より有意に高値であった。しかし、関節点数、組織学的な所見、タイプ 2 コラーゲン刺激により脾細胞が産生したインターフェロン γ 値のいずれにおいても CpG-ODN 群の値が GpC-ODN 群に比して高い傾向が伺えたが両群間に有意差は認められなかった。

(2)RA の 80%にはカルパスタチンに対する自己抗体が存在し、それによるカルパイン活性の亢進が関節炎増悪をもたらす可能性を考え、カルパイン阻害物質であるカルペプチンをラット II 型コラーゲン誘発関節炎に投与したところ有効であり、カルパイン阻害物質が RA の治療に用いられる可能性を示唆した。

一方、II 型コラーゲン免疫マウスは初回免疫日から 25-27 日目より関節炎を発症し、35 日目にはほぼ全例で関節炎が認められ、デキサメサゾン投与マウスでは関節炎の発症はほぼ完全に抑制された。しかし、カルペプチンを毎日投与したマウスでは 3mg/kg と 10mg/kg いずれの投与量においても非投与対照群に比べて関節炎の抑制効果は認められなかった。また、デキサメサ

ゾン投与マウスでは対照群に比して抗コラーゲン抗体価を有意に低下させたが、カルペプチン投与マウスでは抗体価の低下は認められなかった。抗カルペプチン抗体は健康マウス、対照関節炎発症マウス、カルペプチン投与マウス、デキサメサゾン投与マウスのいずれの群においても検出されなかった。

(3)抗 IL-6R 抗体は 4 mg/kg までの短期投与を終了し 8 mg/kg の試験に入った。いずれの用量においても優れた忍容性を示し、重篤な有害事象は認められていない。2 mg/kg での T1/2 は約 74 時間であり AUC は約 2500 mgh/L であった。反復投与により 2 mg/kg 群の 4 例と 4 mg/kg 群の 3 例にトラフ値での抗 IL-6R 抗体蓄積を認めこれらの症例では使用間隔を延長することが可能であると思われた。症例数は限られているが治療効果に用量依存性は認められていないが、3 ヶ月以上の継続使用により改善率が上昇した。

滑膜線維芽細胞における SSI ファミリー分子の発現をみたところ、IL-6/sIL-6R 添加により STAT1, STAT3 のリン酸化が 30 分から 1 時間をピークとして誘導された。今回発現を調べた SSI-1, SSI-2, SSI-3, SSI-4, SSI-6 はすべて無刺激でもわずかに発現が認められた。IL-6/sIL-6R 刺激において SSI-1, SSI-3 は、2 時間をピークに強い発現が誘導された。しかも SSI-3 の発現は 24 時間以上持続した。これらの発現は抗 IL-6 受容体抗体の添加により抑制され、IL-6 によって誘導されることが確認された。これに対し、SSI-2, SSI-4, SSI-6 は、IL-6 刺激で変化しなかった。

(4)in vitro RA モデルを用いた検討で PGE1 が組織増殖と TNF α 、IL-6、IL-8 などのサイトカイン分泌を抑制した。また、パンナス形成は、PGE2 受容体 EP4 アゴニストにより用量依存的に抑制されたが、EP1,

EP2, EP3 アゴニストでは抑制されなかった。マウス 2 型コラーゲン誘発関節炎に対してもリポ化 PGE1 は抑制作用を呈し、その効果は phosphodiesterase 阻害薬によって増大した。

臨床試験は計 10 症例に行われた。平均年齢 55 歳、7 例はリウマトイド因子高値であった。10 例中 6 例が治療 4 週後に ACR20%改善基準を満たした。効果発現は投与開始 2 週目から認められた。副作用はみられなかった。有効であった 4 例は、ペンキシフィリン内服を継続してアルプロスタジルを中止したところ、1 週以内に関節所見の再燃がみられた。

(5)RA 患者滑膜組織の免疫組織学的検討では、血管新生促進因子として作用する vascular endothelial growth factor(VEGF)、hepatocyte growth factor (HGF)、platelet derived growth factor (PDGF)、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、angiopoietin-1 は活動性の高い滑膜炎で多く発現していた。これに対し、血管新生抑制物質である TSP-1 は、活動性の高い滑膜炎では発現量は少なく、活動性の低い滑膜炎では発現量が高いという結果が得られた。また、TSP-1 mRNA の発現を定量し、組織学的な血管新生との関係を見ると、両者は有意に逆相関した。

(6)RA 患者滑膜組織を皮下に移植した SCID / RA モデルでは、移植滑膜組織は生着し、皮下の小血管が移植滑膜組織内へと侵入していた。この SCID マウスに、^{99m}Tc 標識患者好中球を静注すると、標識好中球はすみやかに全身に分布し、最終的には大部分が肝臓に集積した。しかし、^{99m}Tc 標識患者好中球の一部は滑膜移植部位に有意に集積した。この滑膜移植部位への ^{99m}Tc 標識患者好中球の集積は、好中球投与後すみやかに生じ、そのピークは約 5 時間後であった。一方、移植部位以外の

皮膚や筋肉組織には標識好中球の集積は全く認められなかった。また、移植滑膜組織を経時的に採取し、病理組織学的に解析したところ、好中球の静注後すみやかに、移植滑膜組織内の血管内に好中球がみられるようになり、投与 5 時間後には血管周囲への明らかな好中球浸潤が確認された。これらの結果から、SCID/RA モデルは、RA における好中球浸潤の解析に有用なモデルと考えられた。この SCID/RA モデルに抗ヒト IL-8 中和抗体である WS-4、またはコントロール抗体各 1 mg を腹腔内に前投与し、移植滑膜部位への好中球浸潤に及ぼす抗 IL-8 抗体の影響を解析した。コントロール抗体の投与は、移植滑膜組織への RI 集積に何らの影響も与えなかった。しかし、3 例の RA 患者滑膜組織を用いた実験では、WS-4 の前投与は、移植滑膜組織への ^{99m}Tc 標識患者好中球の浸潤を明らかに抑制し、その阻害率は約 37%であった。

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、Primary endpointsとしては 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持続的に十分 (ACR 50%改善) 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が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開発され、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。

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 積分値、血清 MMP3 値、リウマトイド因子、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。平成12年3月末日のエントリー終了時までには75例が登録された。当初期待し

ていた症例数に達しなかったが、発症2年以内でリマチル、あるいはメトトレキサートを使用していない症例はかなり限られ適応例を見出すのは必ずしも容易ではなかった。

わが国においては、現在までに製薬会社の行う新薬の治験以外に研究者が自主的に行う臨床研究で、前向き、無作為割付、二重盲検比較試験はほとんどない。また、厚生科学研究費によった臨床研究においても本研究が始めてのものと考えられる。このため、実際に開始してみると様々な問題点があった。われわれの臨床研究がヘルシンキ宣言に基づいたものであるため、十分な文書によるインフォームドコンセントと、各施設の倫理委員会による許可が必要であった。また、各施設の責任医師となった班員および研究協力者からは万一の時の患者および担当医師の保障をどうするかと心配する意見が出され、相談の上、結局、責任医師および各施設の協力医の全員が本臨床研究に関して医師賠償保険に加入することとなった。また、2種類の薬剤のプラセボおよび実薬を二つの製薬会社にお問い合わせしたが、財政的な負担は別としても、販売あるいは治験を目的としない薬剤およびプラセボの生産は前例がないため、様々な困難があった。今回の自主的な医学研究者による対照試験の経験が今後の臨床研究に役立つことを期待したい。

次世代の早期治療薬の開発のための研究として、マウス2型コラーゲン誘導関節炎に IL-10 産生プラスミドを皮下注射しておくと、発症が抑制されたが、プラスミドがもつ免疫賦活作用が問題となった。この点を明らかにするため、CpG モチーフをもつ ODN と CpG モチーフの C をメチル化した mCpG-ODN の CIA に対する作用を検討した。その結果より、免疫活性化作用をもつ CpG モチーフを含む DNA は CIA を増

悪させることが分かった。CpG-ODN 群で脾細胞より産生されるのインターフェロング値が上昇していたことより Th1 有意の免疫反応が活性化されたためと考えられる。このため、免疫賦活作用をもつ CpG モチーフを有するベクターは慢性関節リウマチの遺伝子治療に悪影響を及ぼす可能性が考えられる。よって、免疫賦活作用をもつ CpG モチーフが可及的に少ないベクターまたは、免疫活性作用をもつ CpG モチーフの作用を抑制する免疫抑制的な CpG モチーフ(2)を導入したベクターの開発、Th2 免疫を誘導すると報告されている遺伝子ガン(3)を用いるなどの遺伝子導入の方法自体の改良が必要と考えられた。

三森らは RA に出現する新たな自己抗体を見だし、その対応抗原遺伝子のクローニングにより、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報告してきた。カルパスタチンは I, II ~ IV の5つのドメインから構成され、ドメイン I ~ IV に共通の領域(TIPPXYR)がカルパイン結合部位と考えられており、それぞれがカルパイン阻害活性を持つ。

カルパインは RA 患者の滑膜や関節液中に増加し、RA の関節破壊に関与するという証拠がある。カルパインは、IL-1 α の活性化と分泌、白血球遊走活性の誘導、プロテインキナーゼ C 活性化などを通じて炎症の惹起に関与する可能性があり、また軟骨基質プロテオグリカンを分解すると報告されている。したがって、RA 患者血清中の抗カルパスタチン抗体がカルパスタチン活性を抑制するならば、カルパインを相対的に上昇させ、RA の発症や進展に関与する可能性がある。さらに抗カルパスタチン抗体陽性 RA 患者 IgG がカルパスタチン活性を抑制してカルパイン活性を上昇させることを見だし、カルパスタチンに対する

自己抗体の産生が RA の病態と深く関与する可能性を示唆した。

このような背景から、カルパイン活性の抑制が RA における新たな早期治療となる可能性を想定し、RA モデル動物関節炎のカルパイン阻害薬による治療を試みた。昨年度の II 型コラーゲン感作ラットを用いた予備的検討では、種々のカルパイン阻害物質の中でカルペプチンのみ有意の関節炎抑制効果が認められた。今回はラットの代わりにマウスを用い、用量も昨年度より高用量を投与したが、明らかなカルペプチンの関節炎抑制効果を見いだすことができなかった。この理由として実験動物の違いが大きいものと考えられる。II 型コラーゲンで誘発される関節炎でもラットとマウスではカルパインの関与が異なるのかもしれないし、カルペプチンの体内代謝が異なる可能性もある。コラーゲン誘発関節炎マウスでは抗 II 型コラーゲン抗体は見いだされるが、抗カルパスタチン抗体は産生されないという事実は、マウス関節炎においてはヒト RA と異なりカルパインが病態形成に関与しない可能性を示唆される。実験動物モデルにおけるカルパインの役割とカルパインインヒビターの効果を追求するには、適切な動物の選定と関節腔内への直接投与が重要と考えられた。

抗 IL-6R 抗体の第 I/II 相試験はオープンスタディであるため RA に対する薬効を厳密に評価することは困難であるが CRP の陰性化など客観的なデータがその有効性を強く示唆する。CRP の完全な陰性化は TNF α の阻害では殆ど認められず、IL-6 阻害には TNF α の阻害とは異なる作用が期待される。今後 TNF α の阻害剤の無効例に対する治療効果について検討する必要がある。一方、抗サイトカイン療法の新たな標的分子の一つとして SSI-1 を想定した。滑膜線維芽細胞において IL-6 刺激により 30

分をピークとする STAT1, STAT3 のリン酸化が誘導され SSI-1、SSI-3 では、2 時間をピークとする強い発現が認められたことから SSI-1 及び SSI-3 両分子は滑膜線維芽細胞において IL-6 シグナルのネガティブフィードバック因子として作用している可能性がある。しかも SSI-3 の発現は少なくとも 24 時間以上持続し SSI-1 より効果が持続すると考えられる。IL-6 は滑膜線維芽細胞に対しその増殖を抑えるため、これらの分子の持続的な発現が IL-6 による増殖抑制作用を減弱しているのかもしれない。この分子の発現を抑えることで滑膜の増殖を抑制する治療の可能性もある。他の 3 分子については未だその働きは不明であるが、恒常的に発現しているにもかかわらず IL-6 による STAT1, STAT3 のリン酸化が誘導されていることより、IL-6 シグナルには関与していない可能性が強い。今後さらに、リンパ球や単球、破骨細胞での SSI 分子の発現を検討する必要がある。

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、炎症メディエーターと考えられてきた。しかし、PGE には種々の抗炎症、抗免疫作用が知られている。マクロファージからの TNF- α 等の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、好中球からの活性酸素産生抑制などが報告されている。in vivo においてもアジュバント関節炎の抑制効果が報告されている。昨年までの研究で、滑膜細胞による TNF- α 産生やパンヌス様組織形成が、COX 阻害薬で増強され、PGE 添加により抑制されること、さらに、PGE1 の抑制作用が細胞内 cAMP を介することを明らかにした。また、アルプロスタジール 25mg/kg の投与がマウス II 型コラーゲン関節炎における

パンヌス形成や関節破壊を抑制することを証明した。しかし、臨床で用いられる量の約 50 倍を必要とした。一方、ペントキシフィリンは、ホスフォジエステラーゼ(PDE)阻害作用により細胞内 cAMP の半減期を延長する作用があり、PGE と同様の抗炎症、抗免疫作用を発揮することが知られている。欧州では、ペントキシフィリン 1200-1600mg の経口投与により難治性 RA の 50%が改善した。しかし、かかる投与量では消化器症状などの副作用のため臨床応用には至らなかった。本研究により、臨床的に安全性が確立されている少量のアルプロスタジールとペントキシフィリンの併用により RA 関節炎を抑制しうることが明らかとなった。さらに PGE の抗リウマチ作用が EP4 受容体を介したものであることから、より特異性の高い EP4 アゴニストと PDE 阻害薬を用いることが新しい治療戦略となる可能性が高い。一方、関節炎局所で産生される PGE が、滑膜炎を制御する生体防御因子の一つであることから、RA 患者に COX 阻害薬である非ステロイド抗炎症薬を連用することは滑膜炎を遷延化して関節破壊を助長する危険性が考えられた。

一般に、血管新生の制御は、促進因子と抑制因子のバランスにより成立し、定常状態では抑制因子優位で血管新生が起こらず、創傷治癒過程や炎症発現時には促進因子が優位となって血管新生が起こるとされている。今回の滑膜の検討では活動性の高い RA では TSP-1 の発現が少ないことが明らかになった。このことは TSP-1 を遺伝子治療によって関節内に過剰に発現させることによって滑膜炎及び滑膜増殖を抑制できる可能性を示すものである。

RA 患者滑膜組織を移植した SCID マウスに、同一患者の RI 標識好中球を静脈投与することにより、RA における好中球浸

潤をマウスを用いて解析することが可能となった。この SCID / RA モデルは、好中球のみならず、T 細胞やマクロファージ、樹状細胞などの滑膜組織への浸潤機序を解析するためにも有用であると考えられた。本研究から、RA における好中球浸潤に IL-8 が関与していることが明らかとなった。今後、IL-8 のみならず、RA 関節炎局所で産生されている多くの好中球走化因子が、RA においてそれぞれどのような役割を担っているかを明らかにすることは、RA の病態解明のためにも、また RA の治療戦略を考える上でも極めて重要であると考えられた。

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行いつつある。平成12年3月でエントリーを終了し、今後2年間の観察を行うことになった。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 遺伝子治療におけるプラスミドがもつ免疫賦活作用、IL-6R 抗体の慢性関節リウマチ患者に対するパイロット試験を施行し、さらに内因性のネガティブフィードバック因子である SSI-1、SSI-3 の治療法への応用を推進している。滑膜炎組織における細胞内 cAMP シグナル伝達経路の増幅を図ることは、新しい RA の治療戦略として期待される。また、血管増殖抑制因子および好中球遊走因子の検討から、これら因子の発現制御が

新たな治療法の目標となることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Suzuki Y, Uehara R, Tajima C, Noguchi A, Ide M, Ichikawa Y, Mizushima Y: Elevation of serum hepatic aminotransferases during treatment of rheumatoid arthritis with low-dose methotrexate. *Scand J Rheumatol* 28:273-281,1999.
- (2) 浜信昭、市川陽一：特集「単純X線写真による関節破壊の評価法」Sharp 法による評価法。リウマチ科 22(5):431-436,1999.11.
- (3) Nishimaki T, Watanabe K, Sato Y, Okubo M, Kaise S, Miyata M, Kasukawa R. Viral, fungal and mycobacterial infections in patients with systemic lupus erythematosus., *Jpn. J. Rheumatol.*, 9, 45-54, 1999.
- (4) Sato Y, Shishido H, Kobayashi H, Takeda J, Irisawa A, Miyata M, Nishimaki T, Fujita T, Kasukawa R. Adjuvant effect of a 14-member macrolide antibiotic on DNA vaccine., *Cell. Immunol.*, 197, 145-150, 1999.
- (5) Fukaya E, Miyata M, Takahashi A, Takano M, Sato H, Orikasa H, Irisawa A, Sato Y, Kumakawa H, Funabashi H, Kasukawa R. Takayasu's arteritis in a 69-year-old woman., *Intern. Med.*, *Intern Med.*, 39, 69-72, 2000.
- (6) Ito M, Kaise S, Suzuki S, Kazuta Y, Sato Y, Miyata M, Nishimaki T, Nakamura N, Kasukawa R. Clinico-laboratory characteristics of patients with dermatomyositis accompanied by rapidly progressive interstitial lung disease., *Clinical Rheum.*, *Clin Rheumatol*, 18, 462-467, 1999.
- (7) Sato Y, Saito A, Ito M, Irisawa A, Miyata M, Obara K, Fujita T, Suzuki T, Kasukawa R. Injection of plasmid DNA into gastric mucosa induces mucosal and systemic immune

- response. , Cell. Immunol., 199, 58-63, 2000.
- (8) Miyata M, Sato N, Watanabe H, Kumakawa H, Saito A, Funabashi H, Iwatsuki K, Hashimoto Y, Sato Y, Kasukawa R. MRI findings in primary amyloidosis-associated arthropathy., Intern. Med., (in press)
- (9) Wakatsuki T, Miyata M, Shishido S, Suzuki T, Ohira H, Kokubun M, Sato Y, Yamamoto T, Kasukawa R. Sjogren's syndrome with primary biliary cirrhosis, complicated by transverse myelitis and malignant lymphoma., Intern. Med., (in press)
- (10) Miyata M, Ito M, Sasajima T, Ohira H, Sato Y, Kasukawa R. Development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension is attenuated by a serotonin receptor antagonist., Lung, (in press)
- (11) Miyata M, Sakuma F, Ito M, Ohira H, Sato Y, Kasukawa R. Athymic nude rats developed more advanced pulmonary hypertension following monocrotaline administration., Int. Arch. Allergy Immunol., (in press)
- (12) Ohira H, Sekine H, Kuroda M, Shinzawa J, Suzuki T, Tojo J, Miyata M, Kasukawa R. T-cell clonality of peripheral blood from patients with chronic hepatitis C before and after treatment with interferon alpha. Hepatology Research, (in press)
- (13) Miyata M, Sasajima T, Sato H, Saito A, Irisawa A, Sato Y, Kasukawa R. Suppression of collagen-induced arthritis in mice utilizing plasmid DNA encoding interleukin-10., J. Rheumatol., (in press)
- (14) Miyata M, Sato Y, Kasukawa R. Naked DNA as a gene delivery vehicle in therapy in inflammatory diseases., Gene Therapy in Inflammatory Diseases., edited by Evans CH, Robbins PD, Birkhauser Publishing LTD, Basel Switzerland, 231-239, 2000.
- (15) Mimori T: Autoantibodies in connective tissue diseases. Intern Med 38(7):523-532, 1999.7.
- (16) 三森経世：抗カルパスタチン抗体. 竹原和彦ほか編集「Key Word 2000-2001 膠原病」, pp56-57, 先端医学社, 1999.8.
- (17) Kanazawa Y, Mimori T, et al: Domain reactivity of autoantibodies to calpastatin in patients with systemic rheumatic diseases. Mod Rheumatol (in press)
- (18) Nishimoto, N., K. Yoshizaki, and T. Kishimoto. Anticytokine therapy in autoimmune diseases. Internal. Med., 38: 178-182, 1999.
- (19) Nishimoto, N., M. Sasai, Y. Shima, M. Nakagawa, T. Matsumoto, T. Shirai, T. Kishimoto, and K. Yoshizaki. Improvement in Castleman's by humanized anti-Interleukin-6 receptor antibody therapy. Blood 95: 56-61, 2000.
- (20) Nishimoto, N., A. Ito, M. Ono, H. Tagoh, T. Matsumoto, T. Tomita, T. Ochi, and K. Yoshizaki. IL-6 inhibits the proliferation of fibroblastic synovial cells from rheumatoid arthritis patients in the presence of soluble IL-6 receptor. Int. Immunol. 12: 187-193, 2000.
- (21) Mori, Y., N. Nishimoto, M. Ono, R. Inagi, P. Dhepakson, K. Amou, K. Yoshizaki, and K. Yamanishi. Human Herpesvirus 8-encoded Interleukin-6 homologue (viral IL-6) induced endogeneous human IL-6 secretion. J. Med. Virol (in press).
- (22) 吉崎和幸, 松本智成, 橋本 淳, 松野博明, 富田哲也, 超智隆弘, 西本憲弘. ヒト型化抗インターロイキン6抗体によるインターロイキン6のシグナル阻害による骨粗鬆症の発症予防と治療法の開発. 協栄生命研究助成論文集 15: 45-49, 1999.

- (23) 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.
- (24) 西本憲弘, 吉崎和幸. ヒトヘルペスウイルス 8 感染とBリンパ球増殖性疾患. 最新医学 9 月増刊号 臨床遺伝学'99-免疫研究の最前線-, 平野俊夫 監修(最新医学社) 54: 283-287, 1999.
- (25) 西本憲弘, 松本智成, 橋本 淳, 松野博明, 富田哲也, 越智隆弘, 吉崎和幸. インターロイキン6 のシグナル伝達阻害による骨粗鬆症の治療法の開発. Osteoporosis Japan 7: 34-37, 1999.
- (26) 西本憲弘, 吉崎和幸. IL-6 阻害による多発性骨髄腫治療. 細胞 31: 362-365, 1999.
- (27) 西本憲弘, 吉崎和幸. 慢性関節リウマチ-抗サイトカイン療法をめぐって. 現代医療 31: 192-196, 1999.
- (28) 西本憲弘, 吉崎和幸. Castleman 病と MCD -IL-6 シグナル阻害による治療-. 医学のあゆみ 188: 942-948, 1999.
- (29) 西本憲弘, 吉崎和幸. 抗サイトカイン療法. Pharma Medica 17: 95-100, 1999.
- (30) 松本智成, 西本憲弘, 吉崎和幸. 慢性関節リウマチにおける抗 IL-6 レセプター療法. 炎症と免疫 8: 100-103, 2000.
- (31) 中原英子, 西本憲弘, 松本智成, 吉崎和幸. 感染と IL-6. 臨床と微生物(in press).
- (32) JIAJIA LIU, TOHRU AKAHOSHI, TAKESHI , SASAHARA, HIDERO KITASATO, RIE NAMAI, TAKEZI SASAKI, MATSUHISA, INOUE, HIROBUMI KONDO. Inhibition of neutrophil apoptosis by verotoxin 2 derived from Escherichia coli O157:H7. Infect. Immu. 67 :6203-6205, 1999
- (33) 赤星 透, 松井俊通. 炎症性疾患とケモカイン. アレルギー・免疫 6 : 76-80, 1999
- (34) 赤星 透, 劉 佳佳. 好中球とアポト
- ーシス. 炎症と免疫 8 : 3-8, 1999

2. 学会発表

(1) 鈴木康夫, 上原立子, 野口淳, 田島千秋, 市川陽一, 水島裕: RA におけるメトトレキサート治療中にみられる肝機能異常に対する葉酸投与の効果と RA 活動性への影響. 第 96 回日本内科学会総会, 1999

(2) 近藤啓文, 小林茂人, 市川陽一, 竹内勤, 立石博臣, 広畑俊成, 藤井克之, 星恵子, 田中清介(日本リウマチ学会調査研究委員会): 日本リウマチ学会の作成した早期慢性関節リウマチの診断基準の検証. 第 43 回日本リウマチ学会総会, 1999

(3) 大矢直子, 山田秀裕, 菊川忠裕, 市川陽一: RA 患者滑膜細胞に対するメトトレキサートの特異的インターロイキン6 抑制作用の解析. 第 43 回日本リウマチ学会総会, 1999

(4) 宮田 昌之, 佐藤 由紀夫, 伊藤 昌幸, 鈴木 修三, 佐々島 朋美, 粕川 禮司. 慢性関節リウマチ関節液単核球の Th1, Th2 サイトカイン mRNA の定量とその臨床的な意義. 第 43 回日本リウマチ学会 1999.4.

(5) Mimori T, et al: Clinical significance and possible pathogenicity of autoantibodies to calpastatin (endogenous inhibitor of calcium-dependent cysteine proteinase, calpain) in systemic rheumatic diseases. The 3rd Korea-Japan Combined Meeting of Rheumatology, Cheju, 1999.5.

(6) Mimori T, et al: Effect of calpain inhibitors on type II collagen-induced rat arthritis. The 3rd Korea-Japan Combined Meeting of Rheumatology. Cheju, 1999.5.

(7) Mimori T, et al: Autoantibodies to tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP) and their possible pathogenicity in systemic rheumatic diseases. The 6th International

Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity, Oslo, 1999.6.

(8) Nishimoto, N., M. Sasai, Y. Shima, K. Yoshizaki, and T. Kishimoto. Fifth International Symposium on the Immunotherapy of the Rheumatic Disease. Improvement Rheumatoid Arthritis by anti-IL-6 receptor antibody therapy. (Cyprus), 1999.

(9) 吉崎和幸、松本智成、橋本 淳、松野博明、富田哲也、西本憲弘、越智隆弘：日本総合健診医学会第28回大会「ヒト型化抗インターロイキン6抗体によるインターロイキン6のシグナル阻害による骨粗鬆症の発症予防と治療法の開発」(埼玉), 2000年1月27日

(10)中島洋、谷口敦夫、山中寿ほか：慢性関節リウマチ滑膜における血管新生抑制因子TSP-1の発現。リウマチ 39(2):314,1999

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし。
2. 実用新案登録 なし。
3. その他 なし。

タイプ2コラーゲン関節炎の遺伝子治療に用いるプラスミド内のCpGモチーフの作用についての研究

分担研究者 宮田 昌之

福島県立医科大学医学部第二内科 講師

研究要旨

IL-10 プラスミドはタイプ2コラーゲン関節炎モデルの関節炎を抑制する。しかし、naked DNA として遺伝子治療に用いられるプラスミド自体には免疫賦活作用を持つ CpG モチーフがあり今回の検討で関節炎を増悪させることが分かった。今後、より有効な遺伝子治療を行うためにプラスミドの開発や、遺伝子導入の方法の改良が必要である。

A. 研究目的

ウイルス、細菌の DNA には免疫賦活作用を持つ CpG モチーフ（1）といわれる配列が認められる。この配列を持つ DNA は主に、マクロファージ、B 細胞などに作用し Th1 優位の免疫賦活作用を持つ。この配列は遺伝子治療に用いられるウイルス、細菌ベクターにも認められる。CpG モチーフの C と G を入れ替えたり C をメチル化するとその活性が失われる。慢性関節リウマチの遺伝子治療にベクターを用いる場合、CpG モチーフがどのように作用するかを検討するため、今年度は CpG モチーフをもつオリゴヌクレオチド(ODN)のタイプ2コラーゲン関節炎(CIA)に対する作用を検討した。

B. 研究方法

以下に示す CpG モチーフをもつ 20bp の ODN(CpG-ODN)とこれの CpG モチーフの G と C を入れ替えた 20bp の GpC-ODN さらに CpG モチーフの C をメチル化(m)した

20bp の CpG-ODN(mCpG-ODN)の CIA に対する作用を検討した。20mg の ODN を関節炎を誘発する1週間前に尾根部に皮内投与しその1週間後より尾根部にタイプ2コラーゲンを免疫した。陽性コントロールとして ODN の代わりに生理食塩水を投与し作成した CIA を saline 群とした。それぞれ 8 匹ずつの群とした。

CpG-ODN (1668); 5' -TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT-3'

GpC-ODN (1720); 5' -TCC ATG AGC TTC CTG ATG CT-3'

mCpG-ODN; 5' -TCC ATG AmCG TTC CTG ATG CT-3'

タイプ2コラーゲンの免疫終了後、8週目まで毎週関節点数を計測した。組織学的な検索は滑膜細胞増殖、細胞浸潤、線維化、総合的な関節炎の程度を 0=なし、1=軽度、2=中等度、3=高度と grading して表わした。

マウス脾細胞 1X10⁷/ml を 30 mg/ml のタイプ2コラーゲン存在下、または非存在下

で3日間培養しその上清中に含まれるインターフェロン g を ENDOGEN の ELISA キットにて測定した。抗原非存在下でのインターフェロン g 値を抗原存在下でのインターフェロン g 値より差し引いて抗原刺激によって脾細胞が産生したインターフェロン g 値を求めた。

C. 研究結果

関節点数では CpG-ODN 群と saline 群間に有意の差を認めた。また、組織学的な検索では CpG-ODN 群と saline 群間、CpG-ODN 群と mCpG-ODN 群間に細胞浸潤、線維化、これらを総合した関節炎の程度において有意の差を認めた。さらに、脾細胞が産生したインターフェロン g 値でも CpG-ODN 群と saline 群間、CpG-ODN 群と mCpG-ODN 群間に有意な差異が認められた。しかし、関節点数、組織学的な所見、タイプ2コラーゲン刺激により脾細胞が産生したインターフェロン g 値のいずれにおいても CpG-ODN 群の値が CpC-ODN 群に比して高い傾向が伺えたが両群間に有意差は認められなかった。

D. 考察

これらの結果より、免疫活性作用をもつ CpG モチーフを含む DNA は CIA を増悪させることが分かった。CpG-ODN 群で脾細胞より産生されるのインターフェロン g 値が上昇していたことより Th1 有意の免疫反応が活性化されたためと考えられる。このため、免疫賦活作用をもつ CpG モチーフを有するベクターは慢性関節リウマチの遺伝子治療に悪影響を及ぼす可能性が考えられる。よって、免疫賦活作用をもつ CpG モチーフが可及的に少ないベクターまたは、免疫活性作用をもつ CpG モチーフの作用を抑制する免疫抑制的な CpG モチーフ(2)を導入したベクターの開発、Th2

免疫を誘導すると報告されている遺伝子ガン(3)を用いるなどの遺伝子導入の方法自体の改良が必要と考えられる。

E. 結論

遺伝子治療は慢性関節リウマチの将来の治療法として限らない可能性を秘めている。私達を用いた IL-10 プラスミドはタイプ2コラーゲン関節炎モデルにおいて関節炎を抑制する作用が認められる(4、5)。しかし、今回示した如く、より有効な IL-10 プラスミドによる治療を実現させるためにプラスミドがもつ免疫賦活作用を抑制する工夫を加える必要がある。

(文献)

- (1) Krieg AM, Ae-Kyung Y, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; 374:546-9.
- (2) Krieg AM, Wu T, Weeratna R, Efler SM, Love-Homan L, Yang L, Yi AK, Short D, Davis HL. Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:12631-6.
- (3) Feltquate DM, Heaney S, Webster RG, Robinson HL. Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *J Immunol* 1997; 158:2278-84.
- (4) Miyata M, Sato Y, Kasukawa R. Naked DNA as a gene delivery vehicle in therapy in inflammatory diseases., *Gene Therapy in Inflammatory Diseases.*, edited by Evans CH, Robbins PD, Birkhauser Publishing LTD, Basel Switzerland, 231-239, 2000.
- (5) Miyata M, Sasajima T, Sato H, Saito A, Irisawa A, Sato Y, Kasukawa R. Suppression of collagen-induced arthritis in mice utilizing plasmid DNA encoding interleukin-10., *J.*

Rheumatol., (in press)

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Nishimaki T, Watanabe K, Sato Y, Okubo M, Kaise S, Miyata M, Kasukawa R. Viral, fungal and mycobacterial infections in patients with systemic lupus erythematosus., *Jpn. J. Rheumatol.*, 9, 45-54, 1999.

(2) Sato Y, Shishido H, Kobayashi H, Takeda J, Irisawa A, Miyata M, Nishimaki T, Fujita T, Kasukawa R. Adjuvant effect of a 14-member macrolide antibiotic on DNA vaccine., *Cell. Immunol.*, 197, 145-150, 1999.

(3) Fukaya E, Miyata M, Takahashi A, Takano M, Sato H, Orikasa H, Irisawa A, Sato Y, Kumakawa H, Funabashi H, Kasukawa R. Takayasu's arteritis in a 69-year-old woman., *Intern. Med.*, *Intern Med.*, 39, 69-72, 2000.

(4) Ito M, Kaise S, Suzuki S, Kazuta Y, Sato Y, Miyata M, Nishimaki T, Nakamura N, Kasukawa R. Clinicco-laboratory characteristics of patients with dermatomyositis accompanied by rapidly progressive interstitial lung disease., *Clinical Rheum.*, *Clin Rheumatol*, 18, 462-467, 1999.

(5) Sato Y, Saito A, Ito M, Irisawa A, Miyata M, Obara K, Fujita T, Suzuki T, Kasukawa R. Injection of plasmid DNA into gastric mucosa induces mucosal and systemic immune response. , *Cell. Immunol.*, 199, 58-63, 2000.

(6) Miyata M, Sato N, Watanabe H, Kumakawa H, Saito A, Funabashi H, Iwatsuki K, Hashimoto Y, Sato Y, Kasukawa R. MRI findings in primary amyloidosis-associated arthropathy., *Intern. Med.*, (in press)

(7) Wakatsuki T, Miyata M, Shishido S, Suzuki T, Ohira H, Kokubun M, Sato Y, Yamamoto T, Kasukawa R. Sjogren's syndrome with primary biliary cirrhosis,

complicated by transverse myelitis and malignant lymphoma., *Intern. Med.*, (in press)

(8) Miyata M, Ito M, Sasajima T, Ohira H, Sato Y, Kasukawa R. Development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension is attenuated by a serotonin receptor antagonist., *Lung*, (in press)

(9) Miyata M, Sakuma F, Ito M, Ohira H, Sato Y, Kasukawa R. Athymic nude rats developed more advanced pulmonary hypertension following monocrotaline administration., *Int. Arch. Allergy Immunol.*, (in press)

(10) Ohira H, Sekine H, Kuroda M, Shinzawa J, Suzuki T, Tojo J, Miyata M, Kasukawa R. T-cell clonality of peripheral blood from patients with chronic hepatitis C before and after treatment with interferon alpha. *Hepatology Research*, (in press)

(11) Miyata M, Sasajima T, Sato H, Saito A, Irisawa A, Sato Y, Kasukawa R. Suppression of collagen-induced arthritis in mice utilizing plasmid DNA encoding interleukin-10., *J. Rheumatol.*, (in press)

2. 学会発表

宮田 昌之、佐藤 由紀夫、伊藤 昌幸、鈴木 修三、佐々島 朋美、粕川 禮司.

慢性関節リウマチ関節液単核球の Th1、Th2 サイトカイン mRNA の定量とその臨床的な意義.

第 43 回日本リウマチ学会

臨床治験の早期打ち切りに関する臨床疫学的評価に関する研究

分担研究者 吉田 勝美

聖マリアンナ医科大学予防医学教授

研究要旨

臨床治験を遂行する際、有効性をモニターして治験の継続の有無を判断することが望まれる。治験を中止する理由として、positive stopping（新規の治療が有意に優れている）と negative stopping（新規の治療が安全上の問題がある、または、効果を認めない）の二つのタイプがある。これらの判断には統計学的な基準が提案されており、本研究ではこれらの中止基準を比較検討すると共に、現在の研究における中間評価の必要性を検討した。現状の参加症例数では、中間解析を実施する必要性はないものと判断された。

研究協力者

杉森 裕樹（聖マリアンナ医科大学
助手）
伊津野 孝（東邦大学医学部 講師）

立データモニタリング委員会の役割についてまとめた。

従来の臨床治験で行われた中止作業について文献調査を行った。

A. 研究目的

臨床研究を効果的に遂行するためには、経過中のモニタリングが重要である。その際、治験の効果を確認しながら、研究を継続または中止をするかの判断を迫られる場合がある。本研究では、臨床治験継続の可否を決定するために必要なプロセスをまとめるとともに、本研究班で遂行中にシミュレーションした場合の基準を検討することにある。

B. 研究方法

臨床研究において、中止基準の一つである検出力別に必要と症例数を計算した。

臨床試験における中止継続を審議する独

C. 結果

Cohen(1977)の方法を用いて、2群間の期待される率および検出力別に必要症例数を表1にまとめた。

文献調査では、慢性関節リウマチに関する臨床治験を中止した論文は検索できなかったが、循環器疾患に関しては、中止した論文（Biggerら(1998)他）が幾つか検索され、検出力による理由が多かった。

中途打ち切りの理由として、

1 中間解析において

a. 介入による利益あるいは損害が明らかに証明された場合

b. 不足の事態や副作用が生じた場合

c. 介入による利益を証明する傾向や合理性が得られない場合

2 進行上の問題

- a. 患者数が不十分な場合
- b. 患者の多くから同意承諾が得られない場合
- c. 資金が不十分な場合

3 その他

- a. 別の治験により利益や損害が証明された場合
- b. 臨床上容認し得ない副作用が生じた場合
- c. 対象とする治療法よりも優れたものが開発された場合
- d. 市場から撤退されるような治療法の場合

D. 考察

臨床治験の中止理由としては、倫理的側面と検出力の二つが基本である。

モニタリングについては、試験の質を確保することと中間解析を行うことの二つの目的を有している。前者の目的では、治験依頼者が治験の開始から遂行中、計画書の遵守、データの受け入れ可能性、集積目標の達成度、計画時の仮説妥当性を確認する目的で行われ、解析の第一種過誤に影響を与えないものである。一方、中間解析は予め実施計画書に記載されているべきものであり、割付グループの同定など解析自体に影響を与える。このため、独立データモニタリング委員会を設置して、情報の漏洩防止管理、試験の完全性を確保する必要がある。逐次群解析手法では、割付を行う前に中間解析による継続中止の判断が行われるべきで、試験の完全性を確保する必要がある。

「統計的に治験を中止する基準」としては、

- a. 十分に小さい検定値(p value)を採用する
- b. 中間解析を繰り返すため、通常の検定値の0.05よりも小さい値を採用する
- d. 当初の解析計画にある中間解析を徐々に蓄積するデータに対して連続的に実施す

る

早期中止基準の不利益として

- a. 信頼の欠如（確信できない小規模調査）
 - b. 現実の欠如（予期しない治療成績の差）
 - c. 正確さの欠如（広い信頼区間）
 - d. バイアス（偶然の差）
 - e. 拙速（判断に不十分な時間と情報）
 - f. 外圧（過度に確信した推薦）
 - g. 誤判断（偽陽性の危険性）
- が考えられる。

望ましい中間解析の体制としてが考えられる。

本臨床治験においては、現在の収集数が到達目標に至っておらず、この段階で中間解析を行う必然性は少なく、調査全体の完全性を崩すことが懸念される。

早期中止にはバイアスの評価が重要であり、Shen ら(1999)は調整方法について発表している。また、中止を決断する際の Bayes 法が Fayers ら(1997)が発表されている。調査打ち切りについては、臨床治験に限らず疫学解析においてもその基準が提案されている(Sternberg(1997))。

E. 結論

本臨床治験では、データ収集状況から、当初のサンプル数に到達しておらず、また倫理的に検討すべき問題点が提起されていない段階で、中間解析を実施して調査の継続中止を審議する必然性は無いものと判断された。

好中球浸潤阻害による慢性関節リウマチの治療法の開発に関する研究

分担研究者 近藤 啓文

北里大学医学部内科学教授

研究要旨

慢性関節リウマチ（RA）患者の関節炎局所では、走化因子の産生亢進により著明な好中球浸潤が惹起される。これらの浸潤好中球は関節組織の破壊に深く関与している。しかし、RAにおける好中球浸潤機序の詳細にはいまだ不明の点が多い。そこで、本研究ではRAにおける好中球浸潤の機序を明らかにするために、RA患者滑膜組織を移植したSCID/RAモデルを作成し、好中球走化性ケモカインであるインターロイキン8（IL-8）の好中球浸潤における意義を解析した。このモデルにおいて、抗IL-8抗体によるIL-8の中和は、滑膜組織への好中球浸潤を抑制した。これらの結果は、走化因子の制御による好中球浸潤阻害が、RAの新たな治療法として有用である可能性を示唆している。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ（RA）の関節炎局所で認められる白血球浸潤は、RAの病態形成に中心的な役割を担っていることが明らかにされている。なかでも、好中球は量的にも質的にもRAにおける白血球浸潤の中核を占める細胞である。滑膜内の血管から関節液中へと速やかに浸潤した好中球は活性化され、活性酸素や蛋白分解酵素、サイトカイン、プロスタグランジンなどのメディエーターを放出することにより、関節組織障害に直接的に関与している。RAにおける好中球浸潤は、従来、補体成分やロイコトリエンなどのアラキドン酸代謝産物によると考えられてきた。しかし、私どもはRA関節炎局所に好中球走化性ケモカインであるインターロイキン8（IL-8）が多量に存在すること、並びに、インターロイキン1（IL-1）や尿酸結晶、さらには異種タ

ンパク（ウシアルブミン）などの投与により誘発される家兎実験関節炎モデルにおいて、IL-8の中和が関節炎局所への好中球浸潤を有意に抑制することを明らかにしてきた。これらの研究結果は、IL-8がRAにおける好中球浸潤を惹起する主要な因子であり、IL-8の制御がRAの治療法として有用である可能性を示唆している。しかし、RA関節炎におけるIL-8制御の治療的意義は未だ不明である。そこで、まずSCIDマウスにRA患者滑膜組織を移植し、好中球浸潤機序を解析するためのSCID/RAモデルを作成することをめざした。さらに本研究は、SCID/RAモデルを用いて、RA関節炎局所への好中球浸潤におけるIL-8の病態生理学的意義を明らかにし、好中球浸潤阻害によるRA治療の可能性をめざすものである。