

厚生科学研究研究費補助金

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』

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 市川 陽一

平成13年3月

【目 次】

I. 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	1
聖マリアンナ医科大学 リウマチ・膠原病・アレルギー-内科	主任研究者 市川 陽一
II. 分担研究報告	
1. 慢性関節リウマチにおけるケモカインの発現と ケモカイン制御による関節炎治療	5
北里大学医学部 内科	分担研究者 赤星 透
2. 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	9
大阪大学健康体育部 健康医学第一部門	分担研究者 西本 憲弘
3. 破骨細胞活性におけるカルパインの役割と リウマチ疾患患者抗カルパスタチン抗体の関与	13
京都大学大学院 臨床免疫学	分担研究者 三森 経世
4. 非メチル化オリゴDNAが持つ immunostimulatory sequence (CpG motif)が関節炎に及ぼす影響に関する研究	16
福島県立医科大学 第二内科	分担研究者 宮田 昌之
5. PGE受容体/cAMP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	19
聖マリアンナ医科大学 リウマチ・膠原病・アレルギー-内科	分担研究者 山田 秀裕
6. RA滑膜の血管新生とその制御の試み	22
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
7. リウマチの早期治療について (Cochrane Library と Best Evidence の検索から)	26
聖マリアンナ医科大学 予防医学	分担研究者 吉田 勝美
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	30
IV. 研究成果の刊行物・別刷（原本に1部別添え）	

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（リウマチ・膠原病・アレルギー内科）教授

研究要旨

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することおよび2年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（primary endpoint）と考え、メトトレキサート（MTX）、ブシラミン（BUC）、及び両者の併用（MTX+BUC）のいずれが優れているか、そして薬物療法以外の予後因子が何かを明らかにするため、多施設協同二重盲検対照試験を行っている。途中キーオープンした症例の分析では、効果不十分例10例すべてがMTXあるいはBUC単独群で併用群はなく、併用の有用性を示唆した。

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、血管新生抑制因子 TSP-1 の遺伝子療法、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、PGの滑膜増殖阻害機序の分析等が研究された。また、抗 IL-6R 抗体療法および lipo-PGE 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

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
赤星 透	北里大内科講師
西本憲弘	大阪大健康体育部助教授
三森経世	京都大臨床免疫教授
山田秀裕	聖マリアンナ医大・内科助教授
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

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。そこで、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、併用療法を見出すことを研究目的とした。なお、臨床研究には当然のことながら evidence based medicine (EBM)が重視されなくてはならない。しかし、EBMに最も有用とされる多施設協同二重盲検比較試験は、新薬承認のための製薬会社が主体となって行う研究を別にすれば、わが国にはほとんどない。今回は、多施設協同二重盲検比較試験によって信頼性の高い成績を得ることを目的とした。

A. 研究目的

現在、我が国に約70万人のRA患者が存在し、全身関節の疼痛、変形のために苦しみ、また、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

B. 研究方法

1) 早期治療法の確立のための臨床試験

発症2年以内で、メトトレキサート (MTX) 及びブシラミン (BUC) 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、MTX単独、BUC単独、あるいはこれら2者の併用の効果、副作用を、二重盲検比較対照試験で検討している。分担研究者と研究協力者の計26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ている。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。

倫理面への配慮としては、担当医師が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。本試験が無作為割付による比較試験であることから、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い、患者のプライバシーには十分な注意を払うこととした。

2) 次世代の早期治療薬開発のための研究

ヒト型化抗IL-6レセプター (IL-6R) 抗体は患者を対象にオープン試験を行い、臨床効果および副作用を検討する。

動物実験、in vitroの研究では、滑膜細胞培養系のin vitro RAモデル、マウスおよびラット2型コラーゲン誘導関節炎、RA滑膜細胞移行SCIDマウスなどを用いた。遺伝子治療の研究にはIL-10産生プラスミド、TSP-1発現プラスミドを用いた。また、破骨細胞の骨吸収活性を指標とした。培養細胞上清中あるいは血清中のサイトカインなどの活性物質の測定は

主としてELISAによって行った。一方、倫理面への配慮としては実験動物に与える苦痛は出来るだけ少なくし、また、RA滑膜組織を用いる場合は各施設の倫理委員会と患者の許可を得て行った。

C. 研究結果

1) 早期治療法の確立のための臨床試験

平成10年6月に第1回班会議で臨床試験計画の検討を開始して以来、製薬会社からの実薬およびプラセボの供給、各施設倫理委員会の手続き、コントローラーによる薬剤割付け、医師賠償責任保険の手続きを終了し、平成11年2月より臨床試験を開始した。さらに10月には6国立病院および1私立病院から研究協力者が新たに参加し、平成12年3月末までに76例のエントリーを終了し、現在、2年間の観察を行いつつある。平成13年2月現在で、治療効果がなくACR20%改善に到達しないためキーオープンした症例は10例であったが、4例はBUC単独、6例はMTX単独で、併用例は1例もなかった。また、副作用でキーオープンした2例もBUC単独群であった。

2) 次世代の早期治療薬の開発のための研究

(1)ヒト型化抗IL-6レセプター (IL-6R) 抗体によるRA治療では、ACR20%改善が6週目で60%、24週目で80%、ACR50%は各々13%と40%であった。さらに、無効例も使用量を増量することで改善基準を満たした。作用機序の検討では、抗IL-6R抗体はMMPの産生をTNF α 、IL-1との相互作用によって間接的に抑制し、骨破壊を予防すると考えられた。

(2)昨年度はRAに対するアルプロスタジール (lipo-PGE1)とペントキシフィリン併用療法の有用性を前向き臨床試験により示した。今回、RA患者滑膜細胞に発現するPGE受容体サブタイプとPDEアイソタイプをRT-PCRにより分析したところ、PGE2受容体はEP4、PDE活性ではPDE4が重要であり、PDE4特異的阻害薬とEP4アゴニストの併用が新しいRAの治療戦略として期待される。

(3)Th1タイプのアレルギーであるRAに対し、IL-10産生プラスミド (p-IL-10) を移入したと

ころ、タイプ II コラーゲン関節炎が抑制された。しかし、p-IL-10 の用量を増加させると炎症が逆に増強し、これがプラスミド DNA に含まれる CpG motif のよることが判明した。そこで、pCMV ベクターを pKCB ベクターに変え、抗炎症作用は増強できたが、ベクター自体の炎症惹起作用は依然残存した。今後、炎症惹起作用の無い、またはそれを抑制するような sequence を有するプラスミドの開発が必要である。

(4)血管新生を抑制し、滑膜増殖を抑制することが、特に早期の RA における新たな治療戦略となり得る。そこで、主要な血管新生抑制因子である TSP-1 を過剰発現による実験的関節炎の抑制を検討した。ヒト TSP-1cDNA をクローニングした後、pcDNA3.1(+)(Invitrogen 製)を用いて発現プラスミドを作成した。II 型コラーゲン関節炎マウスに対し、TSP-1 発現プラスミドの予防的並びに治療的投与を行い、その効果を関節炎のスコア、関節軟 X 線写真および病理所見から明らかにする。

(5)RA 滑膜組織を SCID マウスに移植したモデルを用いることにより、IL-8 が RA における好中球浸潤に関与する主要な因子であることが判明した。また、MIP-3 α 発現も亢進し、CCR6 陽性の未熟樹状細胞やメモリー T 細胞の浸潤に関与している可能性が推測された。IL-8 および MIP-3 α の特異的制御法の開発とその治療への応用が将来の課題である。

(6)カルパイン阻害物質であるカルペプチンがラット II 型コラーゲン誘発関節炎を抑制することを見出したが、カルパインが骨破壊に関与する成績は報告されていない。この点を検討したところ、ウサギ破骨細胞の骨吸収活性は抗カルパスタチン抗体添加で上昇し、カルパスタチン活性ペプチド添加で減少した。カルパインは破骨細胞の活性化により RA の関節破壊機序に関与し、その阻害物質が関節破壊をも抑制する可能性が示唆された。

(7)日本における RA 患者は全人口の 0.33% と言われ、男女比約 1:5 で女性に多い。Cochrane library では、RA 治療に関する meta-analysis が 11 件あり、少量ステロイド治療 (corticosteroids $\leq 15\text{mg/day}$) に関する 2 つの meta-analysis が

あり、抗リウマチ薬による治療の 9 件があった。運動療法、温泉療法に関する文献は、デザインや解析の信憑性が低く、現時点での評価は困難としている。

D. 考察

RA 早期治療指針確立のために必要なものとして、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) 長期間にわたり、副作用なく疾患活動性を抑制する早期治療法を見出す、4) 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、をあげることが出来る。これらの問題を解明するため、臨床研究と次世代の早期治療薬の開発のための基礎的研究に分けて研究を進めることとした。

臨床的研究に関しては、当然のことながら evidence based medicine (EBM) が重視されなくてはならない。しかし、EBM に最も有用とされる多施設協同二重盲検比較試験は、新薬承認のための製薬会社が主体となって行う研究を別にすれば、わが国にはほとんどない。今回、我が国で開発された比較的強力な抗リウマチ薬である BUC 及びこれからの RA 治療の中心となる MTX を取り上げ、2 者併用の継続性、関節炎に対する有効性、関節破壊の抑制効果及び副作用を多施設協同二重盲検比較試験によって各単剤と比較した。昨年までに 76 例をエントリーし、すべての症例で 1 年以上の観察を行っている。キーオープン例の分析では併用例の有効性が単独より明らかに高く、重篤な副作用のないことを示唆している。今後、1 年間の観察とその後のデータ解析から、RA 早期治療指針の確立に役立てたい。

一方、次世代の早期治療薬の開発のための基礎的研究がいくつか平行して行われた。ヒト化抗 IL-6R 抗体は臨床に応用され、ACR 改善率でも著明な臨床効果を示した。in vitro の検討では、MMP の産生を TNF α 、IL-1 との相互作用によって抑制し、骨破壊を予防する可能性を示した。RA 患者に対するリポ化 PGE1 の有用性を増強するため、関与する PG 受容体サブタイプと PDE アイソタイプを明らかにした。これにより、より有効な、副作用の少な

いアゴニストを見出す手がかりが得られたことより、臨床応用に一步前進したと言えよう。

IL-10 産生プラスミドによる遺伝子治療ではプラスミド自体が炎症惹起作用があることから、そのような作用のないプラスミドの開発が今後の課題である。一方、主要な血管新生抑制因子である TSP-1 を過剰発現するプラスミドも作成され、実験的関節炎モデルに対して試みられる。

SCID/RA モデルで標識患者好中球が滑膜移植部位に集積し、抗 IL-8 抗体 (WS-4) によって明らかに抑制され、CCR6 陽性の未熟樹状細胞やメモリー T 細胞の浸潤に関与する MIP-3 α の産生も増加していることから、両者の特異的制御法の開発が期待される。

カルパイン阻害物質は現在まで知られていなかった作用機序に基づいた治療法として注目されるが、これによる破骨細胞の骨吸収活性抑制は、今までの関節炎抑制に加え、関節破壊の抑制をも期待させる成績であった。

E. 結論

慢性関節リウマチ早期治療指針確立のための臨床研究として、メトトレキサート単独、ブシラミン単独、両者併用の3群について二重盲検比較試験は、現在エントリーを終わり、2年間の観察を行っている。キーオープン例の分析は併用療法の有効性を示唆するものであった。次世代の早期治療薬開発についても、ヒト型化抗 IL-6R 抗体の著明な臨床的効果が示され、また、臨床的有効性が報告された PGE 療法も、関与する PGE 受容体サブタイプ、PDE アイソザイムが明らかにされた。一方、IL-10 及び TSP-1 産生プラスミドによる遺伝子治療が開発されつつある。遊走因子、IL-8 および MIP-3 α の特異的制御は抗リウマチ作用につながることを期待される。さらに、カルパイン阻害物質による関節炎抑制とともに骨吸収抑制が示され、将来の治療法として注目された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 市川陽一：全身性エリテマトーデスの臓器障害と治療：日本内科学会雑誌 89:514-519,2000

2. Ichikawa Y: Editorial: Single nucleotide polymorphism to disclose severe side-effect or proper dosage for each patient: Internal Medicine 39(7):523-524,2000

3. 市川陽一、鈴木康夫、松田隆秀、山田秀裕、浜信昭：DMARD のコンビネーション療法。リウマチ科 23(6):515-521,2000

H. 知的財産権の出願・登録情報（予定を含む）

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

慢性関節リウマチにおけるケモカインの発現とケモカイン制御による関節炎治療

分担研究者 赤星 透 北里大学医学部内科 講師

研究要旨

慢性関節リウマチ（RA）の関節炎局所では著明な白血球浸潤が認められる。これらの浸潤細胞は活性化され、RA における滑膜炎の形成と関節破壊に中心的な役割を担っている。RA における細胞浸潤の機序を明らかにするために、RA における IL-8 と MIP-3 α の発現とその作用を解析した。RA の関節炎局所では IL-8 の発現が亢進しているが、IL-8 が好中球浸潤にどの程度関与しているのかは不明である。そこで、RA 患者の滑膜組織を SCID マウスに移植し、好中球浸潤に及ぼす IL-8 の役割を検討した。抗 IL-8 中和抗体の投与はヒト好中球の移植滑膜組織への浸潤を有意に抑制したことから、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ることが実証された。また、RA 滑膜組織において、MIP-3 α の発現が亢進していたことから、未熟樹状細胞やメモリー T 細胞などの浸潤に MIP-3 α が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ（RA）の関節炎局所に認められる白血球浸潤は、RA の炎症病態の根幹を形成する重要な炎症反応である。関節炎局所に浸潤した白血球は活性化され、それぞれの機能を発現することにより関節炎を増強し、関節破壊を誘導する。したがって、RA における炎症性細胞浸潤の機序を解析することは、RA の病態解明のみならず RA の治療指針の確立のためにも重要である。関節炎組織への白血球浸潤は炎症局所で産生された走化性因子により惹起される。RA の関節炎局所では、ロイコトリエンや補体活性化産物などの走化因子の産生が亢進していることが知られていた。私どもは、RA 滑膜炎局所において白血球走化性サイトカインであるケモカインの発現が著明に亢進していることを報告してきた。好中球は RA の浸潤細胞のなかで最も数が多く、さまざまな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。私どもは RA の関節炎局所において、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）の発現が亢進してい

ること、また家兎の急性ならびに慢性関節炎モデルにおける好中球浸潤に IL-8 が中心的な役割を担っていることを報告してきた。これらの結果は、IL-8 が関節炎における好中球浸潤を惹起する重要な因子である可能性を示唆している。しかし、RA 関節炎における好中球浸潤に IL-8 がどの程度関与しているかについては不明である。そこで、昨年度に引き続き RA 患者滑膜組織を SCID マウスに移植した SCID/RA モデルを作成し、症例数を増やすことにより、RA 関節炎局所への好中球浸潤に及ぼす IL-8 の役割をさらに検討した。

RA における浸潤細胞の多様性は走化因子の多彩な作用に起因していると考えられている。近年、リンパ球のホーミングに関わる一群の CC ケモカインが新たに見出された。macrophage inflammatory protein-3 α （MIP-3 α ）はこのグループに属し、未熟樹状細胞やメモリー T 細胞などの浸潤に関与することが明らかにされている。RA の滑膜炎局所では、樹状細胞は濾胞内を中心に浸潤している。RA における樹状細胞の役割の詳

細胞は不明であるが、樹状細胞は抗原提示細胞として何らかの役割を担っているものと推測されている。しかし、RA における樹状細胞の浸潤機序については全く報告がなく不明である。そこで、本研究では RA 関節炎局所における MIP-3 α の発現とその特異的受容体である CCR6 を発現した浸潤細胞を同定することにより、RA における樹状細胞の浸潤機序を検討した。

B. 研究方法

① SCID/RA モデルの作成と好中球浸潤機序の解析

10 名の RA 患者よりインホームドコンセントを得たうえで、人工膝関節置換術施行時に滑膜組織を採取した。7 週齢の SCID マウスをエーテル麻酔した後に、背部の皮膚に小切開を加え、皮下に約 1 g の活動性滑膜組織を移植し、SCID/RA モデルを作成した。同一滑膜組織より 2 個の滑膜組織検体を作成し、2 匹の SCID マウスに移植して比較検討した。移植 3 週間後に、同一 RA 患者末梢血より好中球を分離し、セレブロテックキットを用いて ^{99m}Tc で標識した。2 \times 10⁷ 個の標識患者好中球を SCID マウスの尾静脈より静脈投与し、移植滑膜組織への RI 集積を放射線測定装置を用いて経時的に測定した。さらに、エーテル麻酔下にてマウスを屠殺し、移植組織の重量、RI 集積量、病理組織学的解析などを行った。また、好中球の投与 2 時間前に、抗 IL-8 中和抗体 (WS-4) 又はコントロール抗体各 1 mg を SCID マウスに腹腔内投与し、好中球浸潤に及ぼす影響を検討した。

② RA における MIP-3 α と CCR6 発現の解析

6 名の RA 患者と 4 名の変形性骨関節症 (OA) 患者より、人工関節置換術施行時に、インフォームドコンセントを得た上で滑膜組織を得た。また、同様にして 20 例の RA 患者と 18 例の OA 患者より関節液を得、遠心

分離後使用した。滑膜組織における MIP-3 α と CCR6 発現は抗 MIP-3 α 抗体と抗 CCR6 抗体を用いた免疫染色法と RNA プローブを用いた in situ hybridization 法により解析した。また、培養滑膜線維芽細胞における MIP-3 α の発現は RT-PCR と southern hybridization にて検討し、MIP-3 α の測定は ELISA 法により行った。

C. 研究結果

① SCID/RA モデルにおける好中球浸潤機序

昨年度の本研究により、RA 患者滑膜組織を皮下に移植した SCID マウスに標識患者好中球を静脈内投与すると、移植滑膜組織へのすみやかな好中球浸潤が誘導され、集積のピークは好中球投与の約 5 時間後であることが明らかとなった。そこで、10 例の RA 患者より得た滑膜組織をそれぞれ 2 匹の SCID マウスに移植し、抗 IL-8 抗体とコントロール抗体投与が好中球浸潤に及ぼす影響を比較検討した。移植組織 1 g 当たりの標識好中球集積率は、コントロール抗体投与群 1.28 \pm 0.051%、抗 IL-8 抗体投与群 0.91 \pm 0.47% で、抗 IL-8 抗体は有意 (p=0.016) に移植滑膜組織への好中球浸潤を抑制した (図 1)。また、標識好中球投与 5 時間後の移植滑膜組織を病理組織学的に検討したところ、抗 IL-8 抗体はコントロール群に比べ好中球浸潤を明らかに抑制していた。

② RA における MIP-3 α と CCR6 発現の解析

6 名の RA 患者と 4 名の OA 患者の滑膜組織を用いて、MIP-3 α と CCR6 の発現を免疫染色法および in situ hybridization 法により解析したところ、RA 滑膜組織において MIP-3 α と CCR6 の発現は有意に亢進していた。また、RA 並びに OA 患者関節液中の MIP-3 α を ELISA 法にて測定したところ、RA 12.2 \pm 12.1 ng/ml、OA 3.2 \pm 5.0 ng/ml

と RA 関節液において MIP-3 α 濃度は有意に高値であった(図2)。さらに、IL-1や TNF α は培養滑膜線維芽細胞の MIP-3 α 産生を用量・時間依存的に誘導することが明らかとなった。免疫組織学的解析から、CCR6 発現細胞の少なくとも一部は樹状細胞のマーカーである S100 β や fusin 陽性であった。

D. 考察

RA 患者の滑膜組織を移植した SCID マウスに、同一患者の標識末梢血好中球を静脈投与することにより、RA 関節炎における好中球浸潤を *in vivo* において解析することが可能となった。10 名の RA 患者の了解(インフォームド Consent)を得たうえで、患者滑膜組織を用いて SCID/RA モデルを作成し、好中球浸潤機序を解析したところ、移植滑膜組織内で産生された IL-8 が好中球浸潤を実際に惹起することが確認された。これは RA における好中球浸潤に IL-8 が関与していることを実証したはじめての報告である。この結果は、RA において IL-8 を制御することにより、好中球浸潤を抑制し得ることを示唆している。

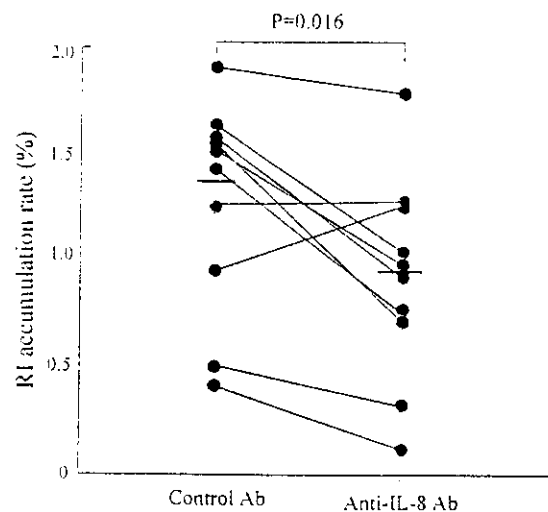
また、本研究では RA 関節炎局所において MIP-3 α の産生が亢進し、滑膜組織内には MIP-3 α の受容体である CCR6 を発現した浸潤細胞が確認された。MIP-3 α を発現しているマクロファージや線維芽細胞の周辺部位には樹状細胞や CD45RO 陽性 T 細胞が集積し、少なくともその一部には CCR6 の発現が確認された。したがって、MIP-3 α は RA におけるメモリー T 細胞や樹状細胞の浸潤に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

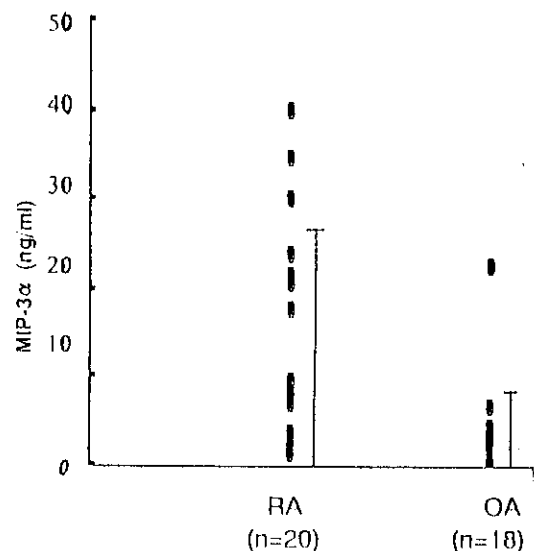
SCID マウスに RA 患者滑膜組織を移植した SCID/RA モデルは、RA における炎症性細胞浸潤の機序を解析するための有用なモデルと考えられた。このモデルを用いた解析に

より、IL-8 が RA 滑膜炎組織への好中球浸潤に主要な役割を担っていることが明らかとなった。好中球は RA の炎症病態形成に重要な役割を担っている。したがって、IL-8 の特異的な制御法が開発されれば、好中球浸潤抑制を介した新たな RA 治療が可能となるものと期待される。また、本研究では RA における MIP-3 α の産生亢進と CCR6 発現細胞の浸潤をはじめて示した。この結果は RA における樹状細胞の浸潤機序と樹状細胞の役割の解明に道を開くものと期待される。

(図1)



(図2)



F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1)Liu,J., Akahoshi,T., Jiang,S., Namai,R., Kitasato,H., Endo,H., Kameya,T., Kondo,H. Induction of neutrophil death resembling neither apoptosis nor necrosis by ONO-AE-248, a selective agonist for PGE2 receptor subtype 3. J. Leuko. Biol., 68:187-193, 2000.

2)Liu,J., Akahoshi,T., Namai,R., Matsui,T., Kondo,H. Effect of auranofin, an antirheumatic drug, on neutrophil apoptosis. Inflamm. Res., 49:445-451, 2000.

3)Matsui,T., Akahoshi,T., Namai,R., Hashimoto,A., Kurihara,Y., Rana,M., Nishimura,A., Kitasato,H., Endo,H., Kondo,H. Selective recruitment of CCR6 expressing cells by increased production of MIP-3 α in rheumatoid arthritis. Clin. Exp. Immunol. In press

4)Uchiyama,M., Akahoshi,T., Matsui,T., Watabe,H., Koredo,K., Tanaka,S., Matsuo,T., Tatsumi,H., Kamata,K., Kobayashi,Y., Kondo,H. Crescentic glomerulonephritis with anti-myeloperoxidase antibodies developing the course of IgA nephropathy in a patient with rheumatoid arthritis. Modern Rheumatol. In press

5)Kitasato,H., Noda,M., Akahoshi,T., Okamoto R., Koshino,T., Murakami,Y., Inoue,M., Kawai,S. Activated Ras modifies the proliferative response of rheumatoid synovial cells to TNF- α and TGF- β . Submitted for publication.

6)Nishimura,A., Akahoshi,T., Morohoshi,Y., Itomann,M., Kondo, H. Essential involvement of interleukin-8 in neutrophil infiltration to RA synovial tissue transplanted in SCID mouse. Submitted

for publication.

7)赤星 透、ケモカインに焦点をあてた治療戦略。ケモカインと疾患：その基礎と臨床、荏原順一 編 医薬ジャーナル社、227-233、2000

2. 学会発表

1)Matsui,T., Akahoshi,T., Kudo,Y., Kurihara,Y., Rana,M., Nishimura,A., Kitasato,H., Endo,H., Kondo,H. Selective recruitment of CCR6 expressing cells by macrophage inflammatory protein-3 α in rheumatoid arthritis., American College of Rheumatology 64th National Scientific Meeting. Arthritis Rheum., 43(9); S77, 2000.

2)Nishimura,A., Akahoshi,T., Morohoshi,Y., Kondo,H., Itoman,M.: Essential involvement of interleukin-8 in neutrophil infiltration to RA synovial tissue transplanted in SCID mouse. American College of Rheumatology 64th National Scientific Meeting. Arthritis Rheum., 43(9); S84, 2000.

3)松井俊通、赤星 透、栗原夕子、ラナ 美代子、西村明人、遠藤平仁、近藤啓文：慢性関節リウマチにおける MIP-3 α の発現と CCR6 陽性細胞の浸潤。第 44 回日本リウマチ学会総会、リウマチ、40(2); 433, 2000.

4)西村明人、赤星 透、諸星康雄、近藤啓文：SCID マウス RA 滑膜移植モデルにおける好中球浸潤の検討。第 44 回日本リウマチ学会総会、リウマチ、40(2); 526, 2000.

慢性関節リウマチの早期治療指針の確立に関する研究
－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、
同・大学院医学系研究科分子病態医学専攻生理病態学 助教授

ヒト型化抗 IL-6R 抗体 (MRA) を用いた慢性関節リウマチ (RA) の先進医療ならびに大阪大学を中心として実施した MRA 第 I/II 相臨床試験を通し、IL-6 阻害治療の DMARDs としての有効性と安全性が明らかになった。ヒト型化抗 IL-6R 抗体が血中 MMP-1、MMP-3 を低下させたことから IL-6 の阻害治療は破骨細胞の活性化の抑制以外に、マトリックス分解酵素の産生抑制を介し関節破壊を予防する可能性がある。In vitro での実験から IL-6 が単独では MMP-1、MMP-3 産生は促さず、TNF α 、IL-1 による滑膜細胞からの MMP-1、MMP-3 産生を増強することがわかった。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ (RA) は、我が国では約 70 万人が罹患している。しかもその約 10% は従来から用いられている抗リウマチ薬や免疫抑制剤に抵抗性を示し、関節破壊が進行すると、身体障害のみならず精神的負担や社会活動の低下を余儀なくされる。したがって、関節破壊が生じる前の早期に、しかも有効な治療法を選択し開始する必要がある。インターロイキン 6 (IL-6) は炎症反応の惹起や破骨細胞の活性化のみならず、T 細胞の活性化や自己抗体産生など自己免疫反応の成立という比較的早いステージにもかかわっているサイトカインであることから、IL-6 の阻害により自己免疫反応の成立を妨げ、骨破壊も予防できる可能性がある。我々はすでに、ヒト型化抗 IL-6 レセプター (IL-6R) 抗体、MRA、による IL-6 シグナルの阻害が難治性 RA の新しい治療法になり得ることを、大阪大学で先進医療として行った臨床研究で明らかにした。しかし、IL-6 の阻害が関節組織や免疫系にどのような変化を与えているのかすべてが明らかになったわけではない。また、欧米では TNF α の阻害剤がすでに治療薬として承認されているが、生体内では複数のサイトカインがネットワークを形成し相互に調節を行っていると考えられる。今回、大阪大学を中心として開発中のヒト型化抗 IL-6R 抗体、MRA、の臨床 I/II 相試験で得られた MRA の薬物動態と治療効果、免疫系への影響について検討を加える。また、骨・軟骨破壊にかかわる細胞外マトリックスを分解するメタロプロテアーゼ (MMPs) 産生に対する IL-6、TNF α 、IL-1 の単独ならびに相互作用を検討する。

B. 研究方法

1. IL-6 阻害治療の臨床研究

1) ヒト型化抗 IL-6R 抗体、MRA の臨床 I/II 相オープン試験に参加された 15 人の患者の血中薬物動態、治療効果と免疫機能との関連について

検討した。1987 年の ACR 診断基準により RA と診断され、かつ 1 剤以上の DMARDs で効果が不十分であったか、副作用のため継続使用ができなかった罹病歴 6 ヶ月以上の患者で、活動性を有する患者を対象とした。2mg/ml、4mg/ml、8mg/ml の 3 用量を各群 3 回使用し、6 週で評価を行った。また、2mg/ml、4mg/ml の 2 群は 24 週間の継続使用をした。この間の薬物動態を検討するとともに、CRP、ESR の値、ACR 改善度と比較検討を行った。また、血中 IL-6、可溶性 IL-6R (sIL-6R)、TNF α 、IL-1 に加え、免疫複合体、補体価、リンパ球分画、リンパ球混合刺激試験、ツベルクリン反応に対する影響を検討した。

2) インフォームドコンセントを得られ、かつ大阪大学の先進医療審査会で許可の得られた難治性 RA 患者に対し、ヒト型化抗 IL-6R 抗体治療を行った。治療前後における患者の血中 MMP-1、-2、-3、-7、-8、-13、TIMP-1、-2 を酵素免疫定量法で測定し、IL-6 阻害による血中 MMPs への影響を検討した。

2. 滑膜細胞からの MMPs 産生に対するサイトカインの作用

インフォームドコンセントを得られた RA 患者の手術時に採取した滑膜組織より滑膜繊維芽細胞を分離した。この細胞を用い、MMP-1、MMP-3、TIMP-1 産生に対する IL-6、TNF α 、IL-1 の作用ならびにこれらの相互作用を検討した。また、ヒト型化抗 IL-6R 抗体の MMP-1、MMP-3、TIMP-1 産生に対する影響を in vitro で検討した。

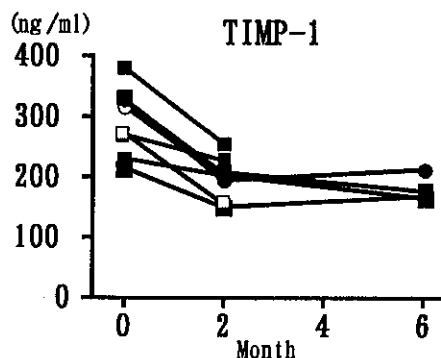
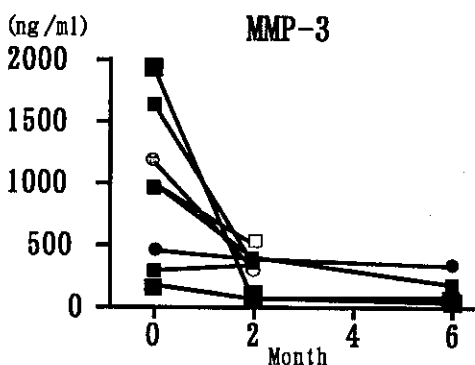
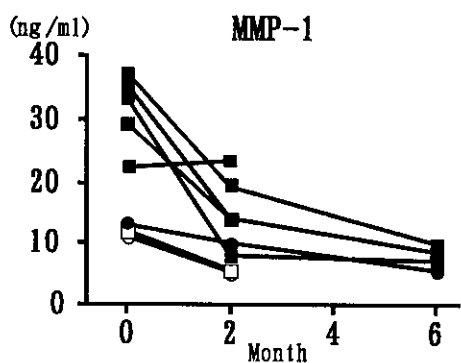
C. 研究結果

1. IL-6 阻害治療の臨床研究

ヒト型化抗 IL-6R 抗体はいずれの用量においても高い忍容性を示し、重篤な有害事象は認められなかった。因果関係を否定できない有害事象で高頻度に認められたものは総コレステロール、LDL、トリグリセライドの増加であり、総コレステロール値の増加は 15 例中 10 例に、LDL の増加は 7 例に認められ、いずれも軽度または中等度

であった。体内薬物動態は 2 mg/ml、4 mg/ml、8 mg/ml の 3 群ともに非線形の動態を示し、2 mg/ml、4 mg/ml、8 mg/ml 使用群の Cmax はそれぞれ 43.6、49.0、82.5 $\mu\text{g/ml}$ 、AUC は 3440、4663、10660 $\mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$ 、T1/2 は 74.4、96.9、160.2 hr で高用量使用群で半減期が延長した。6 週目でのトラフ値が測定できたのは 15 例中 12 例で、全例で CRP が陰性化した。一方トラフ値でヒト型化抗 IL-6R 抗体が検出できなかつた 3 症例では CRP が完全には正常化しなかつた。この 3 例はいずれも高い RA 活動性を有した男性患者で治療前の RF ならびに免疫複合体が高値であった。ただし、これらの患者においてもヒト型化抗 IL-6R 抗体を増量することで、CRP は陰性化した。CRP の陰性化した症例では血中の sIL-6R が増加し、その殆どが抗 IL-6R 抗体との複合体で存在した。すなわち IL-6R は完全に飽和されたと考えられる。これに伴い血中の補体価が軽度低下した。IL-6 は治療開始後一過性の増加を示したが、次第に減少した。治療前に血中 TNF α が検出された症例はなかつたが、3 例で一過性に TNF α が検出され治療継続中に消失した。抗体治療により T 細胞、B 細胞マーカーを含め、免疫系の低下を示唆する所見は認めなかつた。ツ反は 7 例で陽転したが結核の発症は認めなかつた。ACR 改善基準による治療効果は、ACR20%改善例は 6 週目で 60%、6 ヶ月目で 87%、ACR50%は同じく 13%と 53%、ACR70%は 0%と 20%であった。

図 1. 抗 IL-6R 抗体治療による血中 MMP-1, -3, TIMP-1 の推移

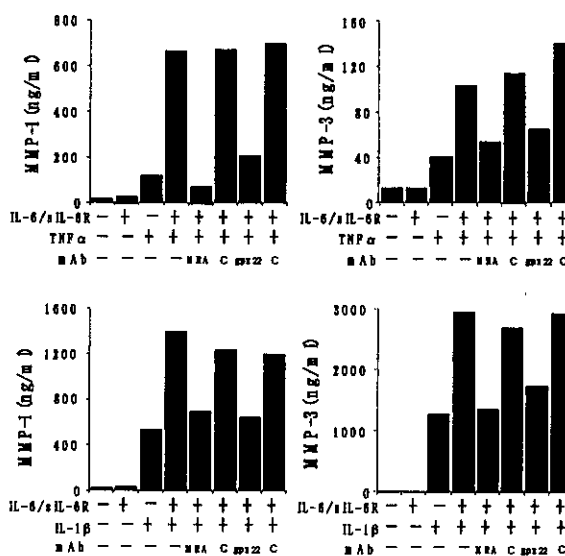


治験とは別に先進医療で行ったヒト型化抗 IL-6R 抗体治療において、殆どの難治性 RA 患者の血中 MMP-1、MMP-3、TIMP-1 は治療前に有意に高値を示し、抗体治療により低下した (図 1)。特に MMP-3 が治療により大きく改善した。MMP-2、-7、-8、-13、TIMP-2 に関しては一部の患者で MMP-8、TIMP-2 が高値を示したのみで、しかもヒト型化抗 IL-6R 抗体治療による一定の変化を認めなかつた。

2) 滑膜細胞からの MMPs 産生に対するサイトカインの作用

TNF α 、IL-1 は滑膜繊維芽細胞からの MMP-1 と MMP-3 産生を促進した。IL-6 は単独では MMP-1、MMP-3 産生を誘導することはなかつたが、TNF α 、IL-1 による MMP-1、MMP-3 産生を増幅し、抗 IL-6R 抗体はこれを阻害した (図 2)。TIMP-1 に関しては、いずれのサイトカインも産生に直接影響はしなかつた。

図 2. MMPs 産生に対する IL-6、IL-1、TNF α の相互作用



D. 考察

抗 IL-6R 抗体の血中からの消失が早かつた症例は 3 例とも重症の男性患者であり治療前の RF 値、免疫複合体の値がともに高い傾向にあった。

また、抗体投与により免疫複合体の濃度も上昇した。このことからヒト免疫グロブリンに対する自己抗体がヒト型化抗 IL-6R 抗体の半減期を短縮している可能性が考えられる。しかしこれらの患者でも用量を増量することにより、全例血中濃度を維持することが可能になり治療効果が認められた。今後ヒト型化抗 IL-6R 抗体の必要量を治療開始前に予測できるか否か症例数を増やし検討したい。一方 TNF α の阻害での有効率は 60 から 70%と報告されているが、TNF α 阻害剤の無効例がその血中濃度を維持できても無効なのかどうかは報告されていない。IL-6 の阻害治療との相違を知る上で興味深い。

マトリックス分解酵素のなかで MMP-3 は RA の活動性を良く反映した。IL-6 阻害により血中 MMP-1、MMP-3、TIMP-1 が低下したことから、IL-6 がこれらの産生を増加させると考えられたが、実際には IL-6 は単独ではいずれの産生も促すことはない。しかし、TNF α 、IL-1 による滑膜細胞からの MMP-1、MMP-3 産生を IL-6 は増強し、抗 IL-6R 抗体はこれらの相互作用による MMP-1、MMP-3 産生を抑制したことから、IL-6 の阻害も骨破壊の予防に有効であると思われる。

E. 結論

ヒト型化抗 IL-6R 抗体による IL-6 の阻害を RA の治療早期に用いることにより RA の症状のみならず骨関節破壊を予防する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishimoto N, Sasai M, Shima Y, Nakagawa M, Matsumoto T, Shirai T, Kishimoto T, Yoshizaki K. Improvement in Castleman's disease by humanized anti-Interleukin-6 receptor antibody therapy. *Blood* 95:56-61, 2000.
2. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Mülberg J, Jostock T, Wirtz S, Schütz M, Holtmann M, Schlaak JF, Lehr HA, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against inflammation: evidence in Crohn disease apoptosis in chronic intestinal and experimental colitis in vivo. *Nature Medicine* 6:583-588, 2000.
3. Nishimoto N, Ito A, Ono M, Tagoh H, Matsumoto T, Tomita T, Ochi T, Yoshizaki K. 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.
4. Mori Y, Nishimoto N, Ohno M, Inagi R, Dhepakson P, Amou K, Yoshizaki K, Yamanishi K. Human Herpesvirus 8-encoded interleukin-6 homologue (viral IL-6) induces endogenous human IL-6 secretion. *J. Med. Virol.* 61:332-335, 2000.
5. Nishimoto N, Kishimoto T, Yoshizaki K. Anti-interleukin-6 receptor antibody treatment in rheumatic disease. *Ann. Rheum. Dis.* 59:121-127, 2000.
6. Mihara M, Kotoh M, Oda Y, Kumagai E, Takagi N, Tsunemi K, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Ohsugi Y, Takeda Y. Humanized antibody to human interleukin-6 receptor inhibits the development of collagen arthritis in monkeys. *Clin. Immunol.*, 2000 (in press)
7. 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* 27:17-23, 2000.
8. 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* 8:195-198, 2000.
9. 西本憲弘, 吉崎和幸. ウィルス感染とサイトカイン. 新臨床科医のための分子医学シリーズ. 疾患とのかかわりを探るサイトカインの最前線 (平野俊夫編). 東京; 羊土社:p146-159, 2000.
10. 西本憲弘, 吉崎和幸. 抗 IL-6 レセプター抗体. *リウマチ科* 23:558-562, 2000.
11. 西本憲弘. 抗サイトカイン療法. 膠原病診療; 専門医によるベストアドバイス; 困ったときにどう考えるか (竹原和彦, 近藤啓文, 桑名正隆, 宮地良樹編). 東京: 診断と治療社:p155, 2000.
12. 西本憲弘, 吉崎和幸. 生物学的製剤 (モノクローナル抗体). 免疫抑制薬の選び方と使い方 (三森経世編). 東京; 南江堂:p64-72, 2000.
13. 松本智成, 西本憲弘, 吉崎和幸. SSI-1/SOCS/JAB. *Surgery Frontier* 7:59-61, 2000.

14. 西本憲弘, 王鞍孝子, 宋健, 稲城玲子, 森康子, 山西弘一, 吉崎和幸. HIV 感染病態における IL-6 を介した KSHV と HHV-8 のウィルス間クロストーク. *日本臨床免疫学会誌* 23:586-590, 2000.
 15. 西本憲弘. リンパ腫と反応性病変との境界; Castleman 病の新たな知見. *血液フロンティア* 11:197-204, 2001.
 16. 西本憲弘, 中原英子, 吉崎和幸. ヒト型化抗 IL-6 レセプター抗体による Castleman 病の治療. *Annual Review 血液* 2001 (高久史麿, 溝口秀昭, 小宮山淳, 坂田洋一, 金倉譲編). 東京:中外医学社:p158-164, 2001.
 17. 菅又泰博, 西本憲弘, 吉崎和幸. ヒト型化抗 IL-6 レセプター抗体による Castleman 病治療. *血液・治療科* 42, 2001 (in press).
 18. 西本憲弘. 近未来の治療法: 抗サイトカイン療法を中心に. *Medicina* 38, 2001 (in press)
 19. 西本憲弘. RA のサイトカイン療法. *現代医療* 33, 2001 (in press).
 20. 杉本正道, 西本憲弘, 吉崎和幸. IL-6 と分子治療 (自己免疫疾患). *Molecular Medicine* 38, 2001 (in press).
 21. 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-. 悪性リンパ腫-疾患単位の確立と層別化治療- (平井久丸編). 東京: 医歯薬出版, 2001 (in press).
 22. 西本憲弘. 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. 中富健康科学振興財団第 11 回研究助成業績集. 東京: 中富健康科学振興財団, 2001 (in press).
 23. 吉崎和幸, 松本智成, 西本憲弘. モノクローナル抗体. *膠原病・リウマチ学* (宮坂信之編). 東京: 朝倉書店, 2001 (in press).
2. 学会発表
 1. 王鞍孝子, 西本憲弘, 松本智成, 山西弘一, 吉崎和幸. KSHV/HHV-8 由来 vIL-6 による HIV 複製の増強. 第 14 回近畿エイズ研究会学術集会. 2000 年 5 月 (大阪).
 2. 西本憲弘, 松本智成, 吉崎和幸. 抗 IL-6R 抗体療法. 第 21 回日本炎症学会. 2000 年 7 月 (東京).
 3. 中原英子, 西本憲弘, 松本智成, 吉崎和幸. 慢性炎症病態におけるサイトカイン依存性血管新生 IL-6 は VEGF を介し Castleman 病の血管新生を引き起こす?. 第 21 回日本炎症学会. 2000 年 7 月 (東京).
 4. 吉崎和幸, 松本智成, 西本憲弘. ヒト型化抗 IL-6 受容体抗体の生物学的製剤としての意義. 第 28 回日本臨床免疫学会. 2000 年 9 月 (東京).
 5. 西本憲弘, 王鞍孝子, 宋健, 稲城玲子, 森康子, 山西弘一, 吉崎和幸. HIV 感染病態における IL-6 を介した KSHV/HHV-8 とのウィルス間クロストーク. 第 28 回日本臨床免疫学会. 2000 年 9 月 (東京)
 6. 松本智成, 西本憲弘, 吉崎和幸. IL-6/soluble IL-6 receptor induce SOCS-1 and SOCS-3 messenger RNA expression in synovial cell. 第 64 回米国リウマチ学会. 2000 年 10 月 (フィラデルフィア).
 7. 西本憲弘, 岡田泰典, 小幡賢一, 松本智成, 中原英子, 岸本忠三, 吉崎和幸. Reduction of serum matrix metalloproteinase-3 in rheumatoid arthritis patients following anti-IL-6 receptor antibody therapy. 第 64 回米国リウマチ学会. 2000 年 10 月 (フィラデルフィア).
 8. 中原英子, 吉崎和幸, 松本智成, 西本憲弘. Interleukin-6 may cause angiogenesis through VEGF induction in Castleman's disease. 第 42 回米国血液学会. 2000 年 12 月 (サンフランシスコ).
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得

IL-6 アンタゴニストを有効成分として含有する血中MMP濃度低下剤
 2. 実用新案登録

なし
 3. その他

なし

破骨細胞活性におけるカルパインの役割とリウマチ疾患患者 抗カルパスタチン抗体の関与

三森経世¹，野島崇樹²

京都大学大学院医学研究科臨床生体統御医学講座臨床免疫学¹
慶応義塾大学医学部内科²

研究要旨 新生児ウサギ大腿骨から分離した破骨細胞を象牙切片上で培養し、カルパイン阻害物質、モノクローナル抗カルパスタチン抗体、および抗カルパスタチン抗体陽性RA患者IgGを添加して破骨細胞の骨吸収活性に与える影響を検討した。ヒトカルパイン・ドメインI蛋白またはカルパイン阻害ペプチドを添加すると、象牙切片上の吸収窩面積は容量依存的に最大50%まで減少した。マウスモノクローナル抗カルパスタチン抗体では骨吸収活性は37-45%増加し抗カルパスタチン自己抗体陽性患者から分画したIgGの一部も骨吸収活性を最大で32%増加させた。カルパイン/カルパスタチン系は破骨細胞活性に影響を与えることが明らかとなり、RAの関節破壊機序に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

これまでに我々はカルパイン(カルシウム依存性システインプロテアーゼ)の特異阻害蛋白であるカルパスタチンに対する自己抗体が慢性関節リウマチ(RA)をはじめとするリウマチ疾患に検出されることを報告してきた。カルパインは炎症の惹起や軟骨破壊に関与する中性プロテアーゼの一種と考えられるため、その阻害蛋白であるカルパスタチンに対する自己抗体の存在はRAの病態に関与する可能性が示唆される。我々は、これまでにRA患者血清とともに関節液中にカルパスタチンに対する自己抗体が検出されること、かかる抗カルパスタチン抗体が*in vitro*でカルパスタチン活性を抑制してカルパインの蛋白分解活性を亢進させること、RAの実験モデルであるコラーゲン感作ラット関節炎がカルパイン阻害剤であるカルペプチンによって抑制されるこ

とを報告してきた。しかし、これまでカルパインが骨破壊に関与する証拠は報告されていなかった。本研究では骨破壊を司る破骨細胞活性におけるカルパインの役割と、RA患者抗カルパスタチン自己抗体の破骨細胞活性に与える影響を検討した。

B. 研究方法

1)破骨細胞の分離と骨吸収活性の測定 (Pit assay)

破骨細胞は新生児ウサギ(1週齢)の大腿骨を破砕し、アガロースゲル培地で培養することにより分離した。分離された破骨細胞を象牙切片上で培養し、骨吸収窩の面積を算定して、破骨細胞の骨吸収活性を測定した。

2)破骨細胞活性に対するカルパイン阻害剤および患者抗体の影響

上記の破骨細胞培養系にカルパイン阻

害物質（ヒトカルパスタチン・ドメインI蛋白（宝酒造），合成カルパスタチンペプチド：ヒトカルパスタチン・ドメインIVのカルpain結合部位を含む27アミノ酸（宝酒造），マウスモノクローナル抗カルパスタチン抗体（宝酒造），および抗カルパスタチン抗体陽性RA患者IgGを添加し，破骨細胞の骨吸収活性に与える影響を検討した。

（倫理面への配慮）

実験に用いた動物については，動物の保護および管理に関する法律（昭和58年12月12日法律第80号）および実験動物の飼育および保管等に関する基準（昭和55年3月27日総理府告示第6号）に留意し，いかなる場合においても実験動物に苦痛・恐怖を与えることのないように配慮した。

C. 研究結果

1)破骨細胞活性に対するカルpain阻害物質の影響

破骨細胞培養系にヒトカルパスタチン・ドメインI蛋白またはカルpain阻害ペプチドを添加すると，象牙切片上の吸収窩面積は容量依存的に減少した（図1）。カルパスタチンペプチド1μg/ml添加破骨細胞では骨吸収窩面積が49%に減少し，カルパスタチンペプチド200ng/ml添加では54%に減少していた。これらの破骨細胞抑制率はカルシトニン10⁻⁷Mの効果（54%）にほぼ匹敵した。

2)破骨細胞活性に対する抗カルパスタチン抗体の影響

破骨細胞培養系にマウスモノクローナル抗カルパスタチン抗体10μg/mlを添加すると，ドメインII(CSL5-10)およびドメインIII特異的抗体(CSL1-5)には吸収抑制効果は見られなかったが，ドメインI(CSL1-2およびCSL2-2)およびドメインIV特異的抗体(CSL3-3)では骨吸収窩面積

は37-45%増加した（図2）。また，8例の抗カルパスタチン自己抗体陽性患者から分画したIgG(0.5mg/ml)を添加した場合は，骨吸収窩面積は最大で32%増加した（平均112±9%）（図3）。

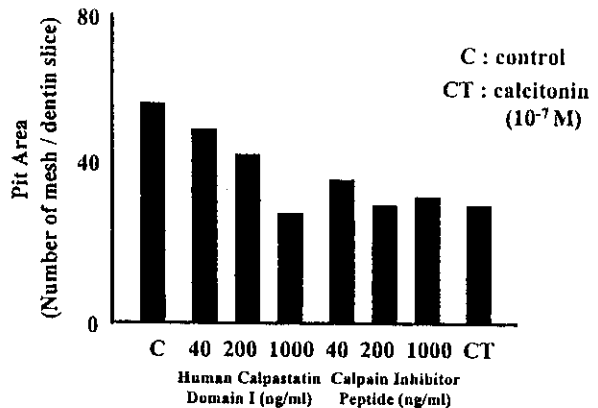


図1. 破骨細胞活性に対するヒトカルパスタチンの影響

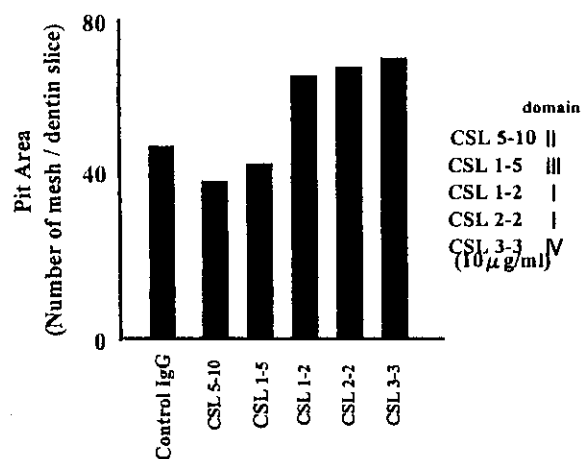


図2. 破骨細胞活性に対するモノクローナル抗カルパスタチン抗体の影響

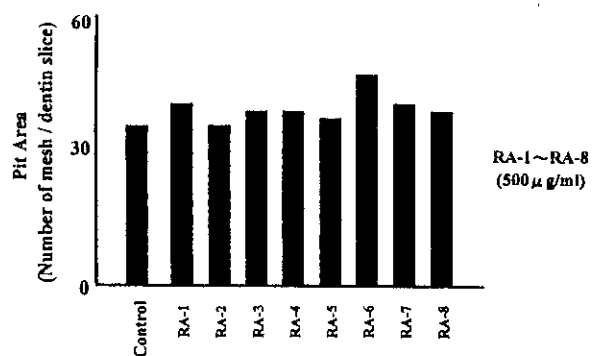


図3. 破骨細胞活性に対するRA患者抗カルパスタチン抗体の影響

D. 考 察

破骨細胞の骨吸収活性はカルパインインヒビターであるカルパスタチンによって減少し、またモノクローナル抗カルパスタチン抗体によってカルパスタチン活性を阻害すると骨吸収活性が上昇することから、カルパイン/カルパスタチン系は破骨細胞活性に影響を与えることが明らかとなった。さらに、抗カルパスタチン抗体陽性RA患者IgGにも一部で破骨細胞の骨吸収活性を上昇させる場合があると考えられ、同抗体がRAの病態、特にRAにおける骨破壊を促進している可能性が示唆された。

破骨細胞の活性は様々な因子によって規定されており、PTH、活性化ビタミンD、プロスタグランジンE2、M-CSF、ODF、IL-1、IL-11、TNF α などは破骨細胞の活性を上昇させ、カルシトニン、女性ホルモン、OPG、TGF β 、IL-4、IL-13、INF γ などは破骨細胞の活性を抑制することが既に明らかにされている。これまでカルパイン/カルパスタチン系の破骨細胞における役割は不明であったが、カルパインが破骨細胞活性を上昇させ、カルパスタチンがおそらくカルパインの阻害を通じて破骨細胞活性を抑制する新たな因子として同定された。しかし、カルパインが破骨細胞を促進する機序はなお不明である。今回用いた骨吸収アッセイ系は骨由来のすべての細胞成分 (unfractionated bone cell) を含むため、破骨細胞にカルパインが直接働いているとは限らず、破骨細胞の分化過程や他の破骨細胞活性化因子または抑制因子を介しての作用である可能性もありうる。

カルパイン・カルパスタチン系の破骨細胞に対する作用機序は不明のまま残されたが、これらの成績によりカルパインの制御がRAの骨破壊に対する新たな治療戦略となる可能性が示唆された。

E. 結 論

破骨細胞の骨吸収活性がモノクローナル抗カルパスタチン抗体添加で上昇し、カルパスタチン添加で減少することが見いだされた。カルパインは破骨細胞を活性化させRAの関節破壊機序に関与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kanazawa Y, Mimori T, et al: Domain reactivity of autoantibodies to calpastatin in patients with systemic rheumatic diseases. *Mod Rheumatol* 10(1):38-44, 2000

2) 三森経世：自己免疫発症のメカニズム. *日本医師会雑誌* 123:1747-1757, 2000

2. 学会発表

1) Mimori T, et al: Clinical significance and pathogenic role of autoantibodies to calpastatin in patients with rheumatoid arthritis. The 9th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress, Beijing, May 2000

2) Mimori T, et al: Mechanism of autoantibody production. The 13rd Naito Conference on "Molecular Biological Approaches for Intractable Diseases", Kanagawa, November 2000

3) 三森経世ほか：プロテアーゼインヒビターに対する自己抗体の意義. 第28回日本臨床免疫学会, 2000年9月

非メチル化オリゴ DNA が持つ immunostimulatory sequence (CpG motif) が関節炎に及ぼす影響に関する研究

分担研究者 宮田 昌之 福島県立医科大学第2内科 講師

研究要旨：CpG motif をもつ非メチル化オリゴ DNA が、マウスタイプ II コラーゲン関節炎モデル (CIA) に与える影響を検討した。CpG motif をもつ非メチル化オリゴ DNA は CIA の関節炎を増悪させ、また、タイプ II コラーゲンで刺激した脾細胞が産生するインターフェロンガンマの産生を亢進させた。このことから、遺伝子治療に用いられるベクターは遺伝子治療の妨げになる作用を持っている可能性がある。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ (RA) は治療に対してしばしば抵抗性であり、特に早期 RA に対してどのような治療を施すかはその患者の予後を左右すると言っても過言ではない。このため、私達は動物実験でタイプ II コラーゲン関節炎 (CIA) に対する遺伝子治療の可能性について探ってきた。その結果、IL-10 をコードする pCMV ベクター (p-IL-10) を皮内投与することで CIA を抑制できることが分かった。しかし、導入する遺伝子の量を増やすことによって期待されるような容量依存的な効果が得られず、むしろ関節炎が増悪することがあることが分かった。このため、遺伝子が持つ immunostimulatory sequence (CpG motif) が関節炎に及ぼす影響に関して研究を行った。

B. 研究方法

RA 動物モデルのマウスの CIA に CpG motif をもつ非メチル化オリゴ DNA を投与することで関節炎が悪化するかどうか

を検討した。関節炎の指標として関節点数と組織学的検索を行った。CpG motif をもつ非メチル化オリゴ DNA が免疫に及ぼす影響を検討するため、タイプ II コラーゲンで刺激した脾細胞が産生するインターフェロンガンマの産生を検討した。CpG motif の代わりに CpC motif をもつ oligo-DNA、CpG motif の C (cytosine) をメチル化したメチル化 CpG motif をもつ oligo-DNA をコントロールに用いた。マウスの取り扱いについては苦痛のないようにすべて麻酔下で行った。

C. 研究結果

CpG motif をもつ非メチル化オリゴ DNA を投与することで関節炎が悪化した。また、タイプ II コラーゲンで刺激した脾細胞が産生するインターフェロンガンマの産生を検討したところ、CpG motif をもつ非メチル化オリゴ DNA を投与したマウスの脾細胞が産生するインターフェロンガンマの産生が亢進していることが分かった。一方、コン

トロールに用いた、オリゴ DNA では関節炎の増悪は認められず、また、脾細胞のインターフェロンガンマの産生には影響が認められなかった。

D. 考察

遺伝子治療は将来の RA 治療において期待される治療法である。しかしベクターに含まれる CpG motif が免疫賦活作用を持ち、特に Th1 免疫反応を増強するため、より有効な遺伝子治療を達成するため、炎症惹起作用の無い、またはこれを抑制するような sequence を加えもつプラスミドの開発が必要である。予備的な実験結果であるが今回用いた pCMV ベクターを GpC motif 数が比較的少ない pKCB ベクターに組換え、pKCB-IL-10 とし CIA に投与したところ、CIA の抑制作用を増強できた。しかし、ベクター自体の炎症惹起作用は完全は無くならなかった。

E. 結論

遺伝子治療は今後期待される治療法である。しかし、ベクターの選択を含めて基礎的な検討が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 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.*, 27(7):1601-1605, 2000.

(2) Miyata M, Ohira H, Sasajima T, Suzuki S, Ito M, Sato Y, Kasukawa R.

Significance of low mRNA levels of interleukin-4 and -10 in mononuclear cells of the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.*, 19:365-370, 2000.

(3) Miyata M, Yoshida M, Saka M, Kasukawa R. Protein-losing gastroenteropathy in systemic lupus erythematosus: diagnosis with 99mtechnetium-human serum albumin scintigraphy. *Arthritis Rheum.*, 43(8), 1990, 2000.

(4) Saito H, Miyata M, Katakura K, Shishido H, Orikasa H, Munakata O, Saka M, Nishimaki T, Uchiyama T, Kasukawa R. Rhabdomyolysis and aggravation of arthritis in a rheumatoid arthritis patient as a result of sepsis due to Staphylococcus aureus infection of a rheumatoid nodule; a catastrophic outcome., *Fukushima J. Med. Sci.*, 45(2):125-133, 1999.

(5) Miyata M, Kobayashi H, Sasajima T, Sato Y, Kasukawa R. Unmethylated oligo-DNA containing CpG motifs aggravates collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum.*, 43(11):2578-2582, 2000.

(6) Miyata M, Ito O, Kobayashi H, Ohira H, S Suzuki, Kasukawa R. CpG-DNA from sera in systemic lupus erythematosus enhances ICAM-1 expression on endothelial cells. *Ann Rheum Dis.*, (in press)

(7) 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.

(8) 宮田 昌之、小林 浩子、佐藤 由紀夫. リウマチ 2000---慢性関節リウマチ病因. 病態解明と治療の最前線--- 遺伝子治療、最新医学社（別

冊）,183-190,2000.

(9) 宮田 昌之、小林 浩子、佐藤 由紀夫. 膠原病--- 21世紀にのぞむより有効な治療の実際--- 遺伝子治療の展望、Medical practice, 17(10), 1719-1921, 2000.