

20010807

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難治性病態に対する新規治療法の開発研究に関する研究
平成13年度 総括・分担研究報告書
主任研究者 宮坂 信之
平成14年3月

目 次

I. 総括研究報告

- 慢性関節リウマチの難治性病態に対する新規治療法の開発研究・・・ 1
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 教授 宮坂信之

II. 分担研究報告

1. 慢性関節リウマチの遺伝子治療にむけたアデノウイルスベクター改変に関する研究・・・ 5
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 教授 宮坂信之
2. 慢性関節リウマチに対する白血球除去療法の治療効果の検討・・・ 8
順天堂大学医学部膠原病内科 教授 橋本博史
3. 自己免疫疾患に対する自己末梢血幹細胞移植：慢性関節リウマチへの応用に関する研究・・・ 11
北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学講座免疫病態分野 講師 渥美達也
4. 抗原特異性と抑制機能に関する遺伝子導入再構築T細胞による自己免疫病態の抑制・・・ 15
東京大学大学院医学系研究科内科学専攻アレルギーリウマチ学 教授 山本一彦
5. T細胞副刺激因子 LIGHT およびその受容体の慢性関節リウマチ(RA)滑膜組織における発現と炎症性サイトカイン産生への関与に関する研究
・・・ 17
東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 教授 原まさ子
6. 慢性関節リウマチの滑膜組織における NF- κ B の役割—治療の標的として転写因子 NF- κ B を考える—・・・ 21
長崎大学医学部分子統御医学講座免疫内分泌代謝病態制御学 教授 江口勝美
7. 慢性関節リウマチ患者末梢血単核球に発現される mRNA の遺伝子チップを用いたクラスター解析—キメラ型抗 TNF α モノクローナル抗体投与前後の変動に関する研究・・・ 26
埼玉医科大学総合医療センター第2内科 教授 竹内 勤
8. 慢性関節リウマチに対する細胞周期制御療法の分子基盤の研究・・・ 29
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 助教授 上阪 等
9. 慢性関節リウマチにおける経済評価研究の世界的現状に関する研究
・・・ 32
東京大学大学院薬学系研究科医薬経済学 客員教授 津谷喜一郎

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・ 35

I. 総括研究報告

慢性関節リウマチの難治性病態に対する新規治療法の開発研究

主任研究者 宮坂信之 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究要旨 慢性関節リウマチ(RA)の難治性病態に対する新規治療法の開発に関する基礎的及び臨床的研究を多角的に行った。白血球除去療法、自己末梢血幹細胞移植、抗原特異的 T 細胞移入療法、細胞間相互作用制御療法、細胞間シグナル伝達阻害療法、抗サイトカイン療法、遺伝子療法などを対象とし、これら治療法の基礎的検討、作用の分子機構、有用性、臨床上の問題点などを検討するとともに、経済評価についても解析を行った。

分担研究者

1. 橋本博史 順天堂大学膠原病内科 教授
 2. 渥美達也 北海道大学分子病態制御学 講師
 3. 山本一彦 東京大学アレルギーリウマチ学 教授
 4. 原まさ子 東女医大膠原病リウマチ痛風センター教授
 5. 江口勝美 長崎大学免疫内分泌代謝病態制御学 教授
 6. 竹内 勤 埼玉医大総合医療センター第2内科 教授
 7. 上阪 等 東医歯大膠原病・リウマチ内科 助教授
 8. 津谷喜一郎 東大薬学医薬経済学 客員教授
- 0

A. 研究目的

研究目的

慢性関節リウマチ(RA)は我が国では約70万人の患者がいると推測されている。本症の予後は改善されつつあるものの、治療抵抗性の病態も少なからず存在する。また、治療薬剤による有害事象の発生によってさらに難治性となることも少なくない。本研究は、難治性 RA の病態形成に関与する分子を同定を通じて新たな治療法を開発し、これを実用化するのが主たる目的である。同時に、RA 治療薬の適応外使用の実態とその臨床的エビデンスを明らかにし、その経済評価を行うことも目的とする。本研究の遂行により、難治性 RA に対して有効性が高く、しかも有害事象のより少ない治療法が開発されることが期待され、患者の QOL の改善と経済的負担の軽減

が可能になることが期待される。

B. 研究方法

1) 白血球除去療法の開発と有用性の検討、2) 自己末梢血幹細胞移植法の開発と適応の検討、3) 抗原特異的 T 細胞移入療法の開発、4) 細胞間相互作用の制御療法の開発、5) 細胞内シグナル伝達阻害療法の開発、6) 抗サイトカイン療法(抗 TNF α 抗体)の分子機構の解明、7) 遺伝子療法の開発研究、8) RA 治療の経済評価研究、について分担研究者が相互に情報を交換し、有機的な研究体制を構築しつつ研究を進めた。また、年1回の研究発表会を通じて情報の公開を行った。

(倫理面への配慮)

患者よりの検体採取、新たな治療法の臨床応用に関しては、分担研究者の所属施設の倫理審査委員会あるいは治験審査委員会の承認を得るとともに、患者より文書同意を取得して行った。すべての治験は、ヘルシンキ宣言を遵守し、また動物実験に際しては動物愛護の配慮を行った。

C. 研究結果

橋本は、白血球除去療法をアメリカリウマチ学会診断基準を満たす9名の RA 患者に対して週1回の間隔で計3~4回施行し、その治療効果を検討するとともに、治療前後における顆粒球上の接着分子発現について解析を行った。その結果、白血球除去法によって疼痛関節数とランスバリー指数は有意に

低下するとともに、顆粒球上の CD11a, CD18 は有意に減少した。しかし、CRP、赤沈などの変動は少なく、今後の検討課題と思われた。また、臨床上、問題となるような有害事象は認められなかった。

渥美は、自己末梢血純化 CD34 陽性細胞移植併用超大量免疫抑制療法（自己末梢血幹細胞移植；PBSCT）の有用性を検討する目的で、本年度は強皮症患者3名に対して本治療を施行した。その結果、臨床的改善、特に皮膚硬化の改善が全例において認められ、移植後の造血能の回復も速やかであった。ただし、3例中2例において新たな自己免疫現象が出現し、1例でウイルス性の出血性膀胱炎が遷延した。また CD34 非選択移植に比較すると、CD4 細胞減少が長期にわたって認められた。今後、多剤抵抗性 RA に対する PBSCT の適応の有無などについて検討が必要と思われる。

山本は、抗原特異的免疫療法の可能性を検討する目的で、本年度は抗原特異的 T 細胞の人為的な作成法の確立と実験動物を用いた臨床応用の可能性について検討を行った。実際には、高効率レトロウイルスベクター系を用いて NZB/WF1 マウスの CD4 陽性 T 細胞にヌクレオソーム特異的 TCR α/β 鎖遺伝子を導入し、抗原性を再構築。さらに共刺激分子を阻害する CTLA4Ig 遺伝子を導入することにより抑制性細胞を作製し、若年 NZB/WF1 マウスへの移入による治療効果を検討した。その結果、TCR α/β + CTLA4Ig 移入群のみにおいて自己抗体産生及び腎炎発症の抑制を認めた。今後、RA の場合には何を抗原として用いるか、などの検討を要する。

原は、TNF ファミリーに属する新規分子 LIGHT とその受容体の滑膜組織における発現について検討を行った。その結果、RA 滑膜組織では LIGHT 及びその受容体である HVEM が蛋白及び mRNA レベルで過剰発現しており、滑膜浸潤 T 細胞とマクロファージ様滑膜細胞との相互作用を担う分子として働き、炎症性サイトカインの分泌促進を介して RA の病態形成に関与している可能性を明らかにした。今後、LIGHT 及び HVEM 間の相互作用を遮断した場合に治療効果が得られるか否かの検討が必要と思われる。

江口は、RA 滑膜組織における転写因子 NF- κ B に発現について検討し、RA 滑膜細胞の核に NF- κ B が強く発現していること、TNF α と IL-1 β は培養滑膜細胞の NF- κ B の核内移行を増強するのに対して、NF- κ B 阻害剤はこれを阻害してカスパーゼ3活性化とアポトーシスを誘導すること、FK506 はグルココルチコイド(GC)の核内移行を阻害し、炎症刺激による NF- κ B の核内移行を GC と相加的に阻止すること、などを明らかにした。これらの結果は、難治性 RA に対して細胞内シグナル伝達阻害療法が有用である可能性を示唆するものと思われる。

竹内は、キメラ型抗 TNF α 抗体 infliximab 投与前後の患者末梢血単核球における mRNA 発現をマイクロアレイを用いてクラスター解析を行い、臨床的有効例と非有効例において発現パターンに相違があることという興味ある知見を見出した。今後、本方法を用いてキメラ型抗 TNF α 抗体 infliximab の作用機序が明らかになることが期待される。

上阪は、サイクリン依存性キナーゼインヒビター(CDKI)遺伝子導入による滑膜での細胞周期制御療法の分子機構について解析を行う目的で、CDKI 分子の一つである p21Cip1 を滑膜細胞に遺伝子導入した際の遺伝子変化を DNA アレイを用いて解析した。その結果、RA 滑膜細胞に p21Cip1 遺伝子を導入すると、TNF α と IL-1 β 刺激による IL-6, IL-8, macrophage inflammatory protein-3, matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3 の産生が抑制されていること、などが明らかとなり、p21Cip1 細胞周期制御療法は CDK 活性抑制のみならず、炎症や骨軟骨破壊に関与する分子の発現抑制などの機序を介して関節炎治療効果を発揮していることが推測された。

宮坂は、遺伝子治療に用いるアデノウイルスベクター改変について検討を行い、ウイルスファイバーの改変と転写配列の改変などを行うことによって、より少量のウイルス量での遺伝子導入が可能であることを示し、より安全なウイルスベクターの作成が可能であることを明らかにした。

津谷は、NHS-EED(The National Health Service-Economic Evaluation Database)を用いて RA における

臨床経済評価研究の世界的動向を調査した。その結果、介入は薬物療法が主体で、ヘルスアウトカムとして QOL と有害事象が単一の study ないし複数の study が用いられ、経済評価の方法は cost effective analysis (CEA)が主体であることなどが明らかとなった。

D. 考察

RA においてさまざまな新規治療法が臨床応用可能であることが示唆されており、今後、個々の治療法の分子機構を解析することによって治療における標的分子がさらに明らかになることが期待される。また、動物モデルを用いた in vivo 及び in vitro の解析、RA 患者由来末梢血及び滑膜細胞を用いた in vitro の解析を分子生物学的方法などの新技術を駆使することにより、さらに詳細に行うことによって、新たな治療法の開発が可能になると思われる。

E. 結論

RA の難治性病態に対する新規治療法の開発が可能となりつつあり、今後、動物モデルあるいは RA 患者由来細胞を用いた実験系において得られた成果を臨床応用するべく、研究の進展を図りたい。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

・Yamada R, et al. Association between a single-nucleotide polymorphism in the promoter of the human interleukin-3 gene and rheumatoid arthritis in Japanese patients, and maximum likelihood estimation of combinatorial effect that two genetic loci have on susceptibility to the disease. *Am.J.Hum.Genet.*, 68:674, 2001.

・Yamasaki S, et al. Importance of NF- κ B in rheumatoid synovial tissues: in situ NF- κ B expression and in vitro study using cultured synovial cells. *Ann.Rheum.Dis.*, 60:678, 2001.

・Migita K, et al.: Nitric oxide protects cultured rheumatoid synovial cells from Fas-induced apoptosis by inhibiting caspase-3. *Immunology*,

103:362, 2001.

・Honda S, et al.: Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in rheumatoid synovial cells. *Clin.Exp.Immunol*, 126:131, 2001.

・Abe T, Takeuchi T: Rheumatoid arthritis and tumor necrosis factor α . *Autoimmunity* 34:291, 2002.

・Abe T, Takeuchi T: The other side of TNF-targeted therapy of patients with rheumatoid arthritis. *Curr.Rheum.Report*, 3:1, 2001.

・Migita K, et al.: Regulation of rheumatoid synoviocyte proliferation by endogenous p53 induction. *Clin.Exp.Immunol.*, 126:334, 2001.

・Hashimoto Y, et al.: Novel immunosuppressive effect of FK506 by augmentation of T cell apoptosis. *Clin.Exp.Immunol.*, 125:19, 2001.

・Hirai Y, et al.: Effects of nitric oxide on matrix metalloproteinase-2 production by rheumatoid synovial cells. *Life Sci.*, 68:913, 2001.

1. ・Nonomura Y, et al.: Suppression of arthritis by forced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21Cip1 gene into the joints. *Int.Immunol.*, 13:723, 2001.学会発表

H. 知的財産権の出願・登録

特になし

II. 分担研究報告

慢性関節リウマチの遺伝子治療にむけたアデノウイルスベクター改変に関する研究

主任/分担研究者 宮坂信之 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 教授

研究協力者 上阪 等 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 助教授

萩山裕之 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 医員

研究要旨 遺伝子治療用アデノウイルスベクターは、大量のウイルス粒子自体により炎症を惹起し、関節腔内投与では関節炎を起こすことが知られている。少量のウイルス量で効果的に遺伝子導入できれば、この副作用を軽減できると考え、ウイルスファイバーに改変を加えたところ滑膜線維芽細胞への感染効率の増加が可能であった。さらに、転写制御配列の改変により滑膜線維芽細胞における転写活性の向上が可能であった。以上の結果から、より少量のウイルス量で遺伝子導入可能な、関節炎惹起性を軽減した、より安全な遺伝子治療用アデノウイルスベクターの作成が可能であると考えられた。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ (RA) モデル動物の関節局所へのアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入療法により関節炎を阻止する試みは多数行われているものの、大量のウイルス粒子自体が関節炎を惹起しうることも報告されている。しかし、低ウイルス量で滑膜への遺伝子導入を果たすことが出来れば、この副作用を阻止できると考えられる。そこで我々は、慢性関節リウマチ患者の滑膜線維芽細胞 (FLS) がアデノウイルスに対する特異的レセプターを持たないことに着目し、ウイルスファイバーに改変を加え、感染効率を増加させることを試みるとともに、FLS における導入遺伝子の転写活性の向上を目指し、異なった転写制御配列を持つプラスミドを作成しレポーターアッセイを行い FLS での転写活性の変化を検討した。

B. 研究方法

古典的アデノウイルスベクター (5 型) のファイバーの HI ループに細胞表面上のインテグリンと結合する Arg-Gly-Asp (RGD) ペプチドを組み込んだ変異体 (RGD 変異) およびファイバーをアデノウイ

ルス 35 型のファイバーへと改変した変異体につき、green fluorescent protein (GFP) をレポーターとして FLS へ感染させ、その発現量をフローサイトメーターで測定した。転写活性の検討に関しては、CMV プロモーター/エンハンサーを持ったプラスミド (pCMVL1) に、転写活性をあげることが知られているイントロン A を挿入したプラスミド (pCMVL3-1) やさらにポリ A シグナルを置換したプラスミド (pCMVL3-2) を作成し、ホタル・ルシフェラーズをレポーターとして遺伝子発現効率の検討を行った。

(倫理面への配慮)

本実験の遂行にあたってはヒト滑膜線維芽細胞など患者由来の細胞を使用するが、すでに本実験の概要は東京医科歯科大学倫理審査委員会で審議され、承認されたものである。

C. 研究結果

各ウイルスを 1 細胞あたり同じウイルス粒子数 (VP) で FLS に感染させたところ、5 型のものと比べて、RGD 変異および 35 型ファイバーでは高

い感染効率を認めた。特に、35型ファイバーでは感染効率が良好で、1細胞あたり500VPにてほとんどすべての細胞に感染を認めた(図1)。FLSに、前述のプラスミドをトランスフェクションし、48時間後にルシフェラーゼ・アッセイを行ったところ、イントロンやポリAシグナルといった転写制御配列を置換することによってルシフェラーゼ活性の変化を認め(図2)、標的分子の発現効率を変化させることが明らかとなった。

D. 考察

アデノウイルスに対する特異的レセプターを持たないFLSに対する感染効率は、当初の予想通りアデノウイルスベクターのファイバーを改変することにより向上させることが可能であった。FLSにおいて転写制御配列を変化させることにより、遺伝子発現効率を向上させることが明らかとなった。

E. 結論

アデノウイルスベクターファイバーの改変により、FLSへの感染効率は向上し、転写制御配列を変化させることにより、FLSでの遺伝子発現効率は向上した。

以上の組み合わせにより、より少量のウイルス量で

標的分子の発現が可能となり、関節炎惹起性を軽減した、より安全な遺伝子治療用アデノウイルスベクターの作成が可能になると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

・なし

2. 学会発表

・第29回日本臨床免疫学会総会 (大阪) アデノウイルスベクターファイバー改変による滑膜細胞への感染効率の向上

・第31回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪) 慢性関節リウマチの遺伝子治療にむけたアデノウイルスベクター改変の試み

・

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

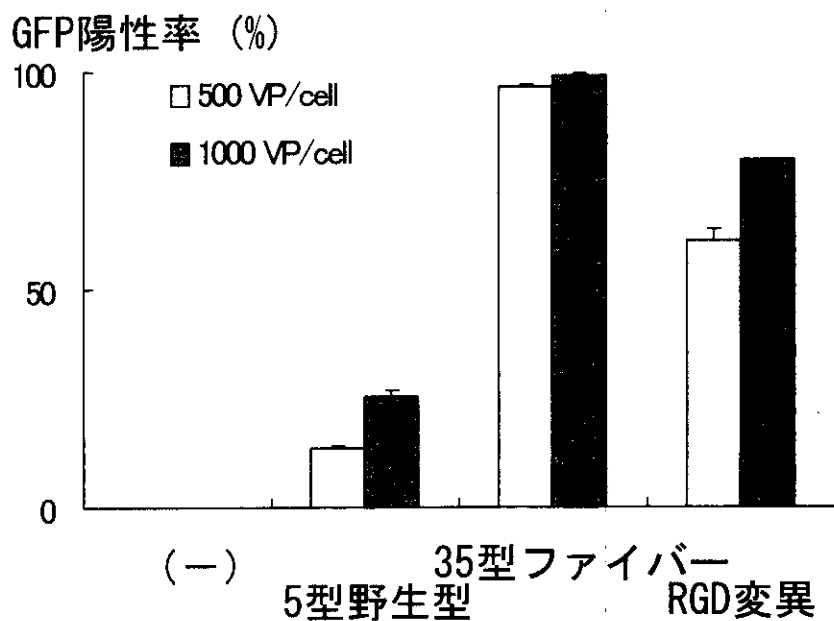


図1. GFPをレポーターとして変異ウイルスを滑膜線維芽細胞に感染させた。GFP陽性細胞の比率を縦軸に示す。

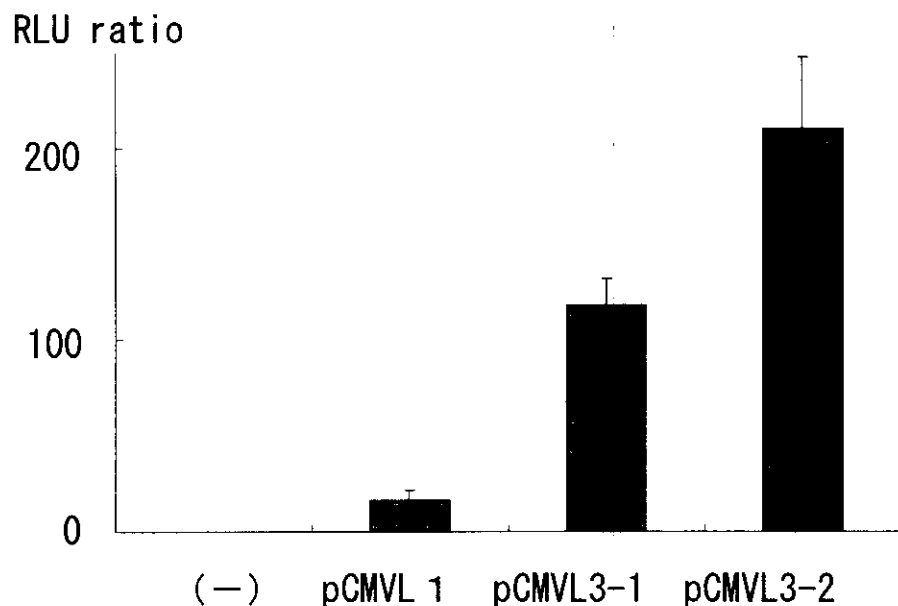


図2. 滑膜線維芽細胞に、前述のプラスミドをトランスフェクションし、48時間後にルシフェラーゼ・アッセイを行った。トランスフェクションの効率をみるためレニーラ・ルシフェラーゼ遺伝子をコトランスフェクションし、それに対する比率を縦軸に表示した。

慢性関節リウマチに対する白血球除去療法の治療効果の検討

分担研究者 橋本 博史 順天堂大学医学部膠原病内科 教授

研究要旨： 慢性関節リウマチの治療の一つに血漿交換療法があり、その治療法の一つである白血球除去療法は疾患の炎症反応に関与する白血球を除去する治療法である。この治療法を慢性関節リウマチ患者に対し施行しその治療効果を検討。治療後には症状の軽減を認め、今回の研究では白血球除去療法の有効性が示唆された。

A. 研究目的

慢性関節リウマチの治療の一つに血漿交換療法が位置し、その中の従来からの治療法である二重膜濾過法や吸着療法は液性免疫能を対象とする方法である。一方で細胞性免疫能の中の白血球は、慢性関節リウマチにおいて重要な役割を占めることが知られおり、その中の顆粒球はリンパ球と並び、炎症反応において重要な役割を果たしており、顆粒球はその細胞上の接着分子を介して血管内から組織内へ移動し、炎症反応に関与する事が知られている。今回我々が注目した白血球除去療法は、血液内の白血球を除去する方法である。この研究の目的は、細胞性免疫能を対象とする白血球除去療法を慢性関節リウマチ患者に施行し、その治療効果を検討し、同時に顆粒球上の接着分子の変化の有無に関して検討することにある。

B. 研究方法

アメリカリウマチ学会の診断基準を満たすリウマチ患者9人(表1)に、週1回の間隔で白血球除去療法を計3~4回施行。治療前後の疼痛関節数、ランスバリー指数を比較し治療効果を検討。また治療前後で顆粒球を分離し、その細胞上の接着分子(CD11a, CD11b, CD18)をモノクローナル抗体で処理後、FACSで分析。

(倫理面への配慮)

患者に対し、治療前に具体的な治療方法、除去膜の作用機序、起こりうる副作用に関して説明を行い、承諾を得た上で治療を行う。また、治療中に患者本人の意思で治療の継続を望まない場合には、患者の希望に従うこととする。

C. 研究結果

治療前後で、疼痛関節数とランスバリー指数は有意に低下。接着分子に関しては、その発現率の変化をそれぞれの、mean intensity の変化で比較したところ、CD11a と CD18 は有意に減少する傾向を認めしたが、CD11b に関しては、有意差は認められず。

D. 考察

今回の研究では白血球除去療法により疼痛関節数とランスバリー指数は改善し、症状の改善を認めたが、血沈、CRP等の急性炎症反応物質の変化は少なかった。また、リウマトイド因子の抗体価の変動も小さく、液性因子への影響は少ないと考えられた。今後、症例数を増やし、経過に伴う接着分子の発現と液性因子の変化の時間的差を含め検討する必要があると考えられた。

E. 結論

現在、白血球除去療法は潰瘍性大腸炎に対し保険適用のある安全性の確立された治療方法であるが、慢性関節リウマチに対しても有効性のあることが示唆された。今後、治療経過による顆粒球上の接着分子の変化と臨床的効果の検討を行う予定である。

F. 健康危険情報

今回の研究においては、治療中と治療後に副作用は認められなかった。一般的に、白血球除去療法での副作用としては、体外循環に基づく一過性の低血圧、発熱、気分不快などがある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 鈴木王洋、松本泰憲、佐川昭、小川洋史、天野国幹、津田裕士、橋本博史、鈴木満、古賀伸彦、山本昭夫、東威：悪性関節リウマチに対するリンパ球除去療法の有用性確認試験、日アフエレシス会誌 15：303-319、1996
- (2) 津田裕士、宮方了、河西利昭、松田幸博、木田一成、山路健、金井美紀、高碕芳成、橋本博史：慢性関節リウマチに対するアフエレシス療法、日アフエレシス会誌 17：173-175、1998
- (3) Y Kanai, M Sugiyama, K Yamaji, T Kawanishi, H Tsuda, H Hashimoto, S Hirose: Changes in viscosities of blood and plasma due to lymphocytapheresis in patients with rheumatoid arthritis, *Jpn J Apheresis* 14: 119-121, 1995
- (4) Tsuda H, Yokoyama M, Sato M, Yamagata J, Hashimoto H, Hirose S, Kato H, Nishimura T, Ide K : New trial of lymphocytapheresis combined with Double-filtration by using of

“Sepacell” (Leukocyte Removal Filter) in the treatment of rheumatoid arthritis, *Therapeutic Plasmapheresis* 5: 919-923, 1985

(5) Kanai Y, Kawanishi T, Fujita S, Toumyo M, Yokoyama M, Tsuda H, Hashimoto H, Hirose S : Prognosis for patients with rheumatoid arthritis treated by Plasmapheresis, *Therapeutic Plasmapheresis* 8: 69-73, 1990

(6) 山形寿太郎、塩沢克史、津田裕士、橋本博史、湯浅晋治、塩川優一：膠原病・リウマチに対する血漿交換療法—matched control study による血漿交換療法の評価の試み、*人工臓器* 11:724-727、1983

(7) 津田裕士、金井美紀、松田幸博、高碕芳成、橋本博史：疾患とアフエレシス（膠原病とアフエレシス）、*臨床透析* 15 (6)：29-33、1999

(8) 津田裕士、金井美紀、高碕芳成、橋本博史：血漿交換療法、免疫吸着法、*日本臨床* 57 (2)：195-198、1999

2. 学会発表

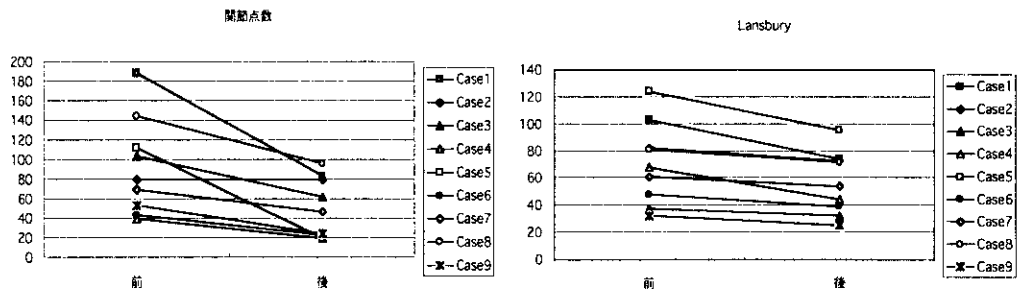
- (1) “慢性関節リウマチに対する白血球除去療法—主に二重膜濾過血漿交換との比較として”
2000年、第20回日本アフエレシス学会学術大会
- (2) “慢性関節リウマチに対する白血球除去療法—接着分子の変化と治療効果の検討”
2001年、第45回日本リウマチ学会総会
- (3) “慢性関節リウマチに対する白血球除去療法—接着分子の変化と治療効果の検討”
2001年、第21回日本アフエレシス学会学術大会

H. 知的財産権の出願・登録

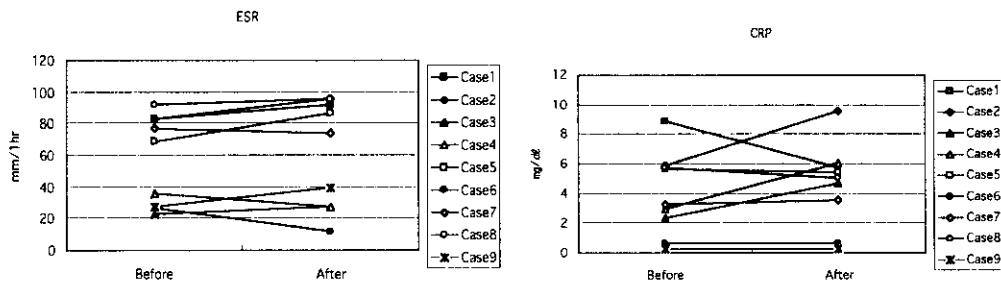
特になし。

表1. <患者プロフィール>

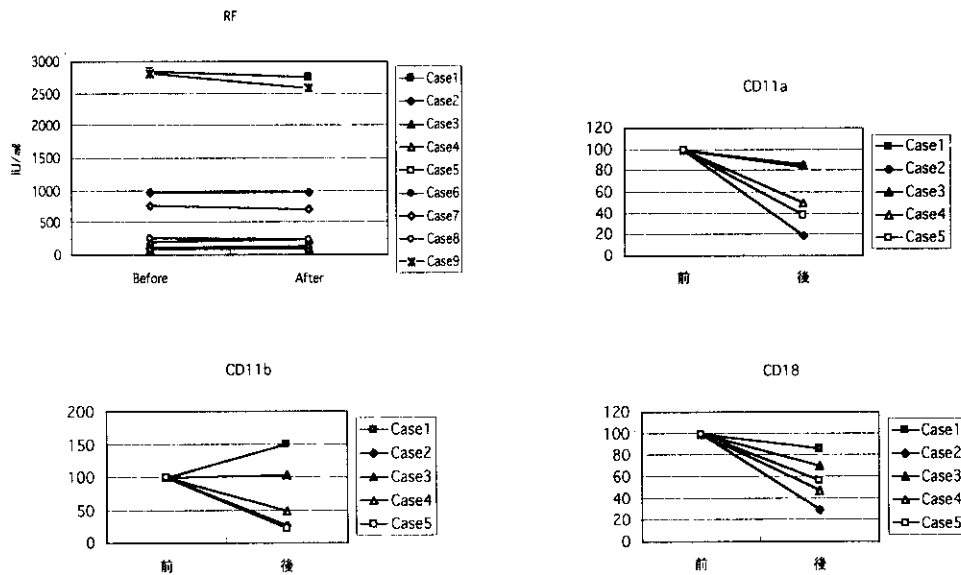
患者	年齢・性別	Stage	Class	合併症
Case1	61 男	Ⅲ	2	間質性肺炎
Case2	55 男	Ⅲ	2	間質性肺炎、DM
Case3	71 男	Ⅲ	3	間質性肺炎
Case4	60 男	Ⅲ	3	
Case5	64 男	Ⅲ	2	間質性肺炎
Case6	69 男	Ⅲ	3	
Case7	45 男	Ⅱ	2	
Case8	56 女	Ⅲ	3	気管支拡張症
Case9	61 男	Ⅲ	2	DM



関節点数：有意な減少を認める $p<0.01$ 、 Lansbury 指数：有意な減少を認める $p<0.01$



ESR,CRP,RF に関しては有意な低下を認めず。($p<0.01$)



顆粒球上の接着分子(CD11a,CD11b,CD18)の発現率の変化(治療前を100%として)：CD11aとCD18は発現率の減少を認めたが、CD18に関しては有意な変化を認めず。

自己免疫疾患に対する自己末梢血幹細胞移植：慢性関節リウマチへの応用に関する研究

分担研究者 渥美達也

北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学講座免疫病態分野 講師

研究要旨

自己末梢血純化 CD34 陽性細胞移植併用超大量免疫抑制療法（自己 CD34 移植）は、新しい慢性関節リウマチ(RA)の治療法となる可能性がある。本研究ではこの治療法の自己免疫に与える影響、合併症を検討するため、強皮症患者 3 例に対して自己 CD34 移植をおこない、臨床経過を観察した。移植後の造血能の回復は速やかで、移植前後で mRodnan TSS は 25%以上の回復を認めた。ただし、3 例中 2 例で新たな自己免疫現象が出現し、1 例で出血性ウイルス性膀胱炎が遷延した。この 3 例を含む 8 例の自己 CD34 移植において、CD4 細胞数の回復を検討したところ、非選択移植 20 例とくらべて長期にわたり CD4 細胞減少がみられ、これが易感染性と関連している可能性が考えられる。

A. 研究目的

自己免疫疾患に対する自己末梢血純化 CD34 陽性細胞移植併用超大量免疫抑制療法(自己 CD34 移植) は、他に有効な治療法の存在しない強皮症に対して、ヨーロッパを中心にすでに 70 例以上がおこなわれている。慢性関節リウマチ(RA)に対する同療法は、革命的治療とされる抗サイトカイン療法の普及で議論が滞っている印象をうけるが、抗 TNF α 療法に不応例に自己 CD34 移植をおこない有効であったとする報告、自己 CD34 移植施行後に抗リウマチ薬に対する感受性が回復して RA のコントロールが容易になったという報告があり、自己 CD34 移植が RA の新しい治療法の選択肢のひとつであることは事実である。

一方、強皮症における自己 CD34 移植は、皮膚所見を明らかに改善させ、QoL を有意に高める有効な治療法であることが次第に確立されつつある。しかしながら、これまでの欧米の施行例を黎明期ものも含めて集計すると、治療

関連死が約 12%と比較的高い。強皮症は肺、腎、心などの重要臓器に重篤な合併症を来す場合は生命予後が不良であるが、通常は慢性ではあるが良性疾患である。したがって強皮症に対する自己 CD34 移植は、悪性リンパ腫などの悪性疾患に対する自己 CD34 移植とは基本的な性質を異にしており、この治療法の安全性確立が現在議論されている。

RA の関節障害による生活制限の重要性については異論がない。また、RA は強皮症に比べて重篤な臓器合併症の頻度は低いが、RA 患者の平均余命は健常人よりも 10-15 年短い。これは、頸椎脱臼など RA 自体の致死性の合併症のほかに、長期薬剤投与による合併症や感染症、とくに最近注目されている持続する炎症による動脈硬化病変の進展に伴う動脈血栓症などが原因となっている。従って、RA のコントロールは関節予後のみでなく生命予後の改善のためにも重要であるといえる。抗サイトカイン療法は RA の治療としては現在最大のトピックである。

なかでも代表的な抗 TNF α 療法は DMARDs 抵抗性 RA 患者に福音をもたらしたが、長期投与となった場合に結核症などの感染症や悪性腫瘍、あるいは莫大な費用が問題となっている。

本研究は、RA の治療として自己 CD34 移植を検討することを目的としている。自己 CD34 移植の効果確認と、より重要なのが安全性をさらに確立していくことが必要で、初年度は強皮症に対して自己 CD34 移植をおこない、その経過を観察して RA への効果を理論的に考察した。また、現在の自己 CD34 移植の最大の問題点である急性感染症の合併を回避する方法を確立するため、強皮症をふくむ自己 CD34 移植施行例のリンパ球サブセットの回復を検討した。

B. 研究方法

重症の強皮症 3 例に対して自己 CD34 移植を施行した。これらの例での強皮症の臨床症状に対する効果、自己抗体価の推移を含む自己免疫現象について検討した。自己 CD34 移植は次のように実施した、すなわち、mobilisation は例 1 では G-SCF のみ、例 2、3 では G-CSF とシクロフォスファミド(CPA) 4g/m² を使用し、アフエレーシスによって十分な CD34 細胞が得られた。Conditioning は CPA 200mg/kg を 5 日にわけて投与した。

この 3 例を含む 17 例の自己 CD34 移植例と、37 例の自己末梢血幹細胞移植 (CD34 を選択しないで移植をおこなった自己末梢血幹細胞移植：以下、非選択移植) 患者 (強皮症 3 例以外はすべて悪性リンパ腫などの悪性血液疾患) において、移植後のサイトメガロ抗原血症の有無を調べた。同時に CD4 および CD8 細胞の回復を経時的に観察した。

(倫理面への配慮)

自己免疫疾患に対する自己 CD34 移植については、当施設の倫理委員会により承認された。強皮症の 3 例からは十分なインフォームドコ

ンセントのもとで同意が得られ、当科外のメンバー 3 名によって構成される適応委員会にそれぞれの患者データを提出し、自己 CD34 移植の適応につき判断をおおぎいずれの例でも承認が得られた。

C. 研究結果

強皮症 3 例とも皮膚硬化所見に明らかな改善が得られた (mRodnan 皮膚スコアで 32-78%改善)。白血球数、血小板数は移植後速やかに回復した。症例 1、2 では感染症の合併はなかったが、症例 3 ではアデノウイルスによる出血性膀胱炎を併発し、その治癒が遷延した。自己抗体 (抗核抗体、抗 Scl-70 抗体) は 3 例いずれも自己 CD34 移植後 3 ヶ月では消失しなかった。移植 7 ヶ月後、症例 2 では自己免疫性血小板減少症を来し、ステロイドにて改善した。症例 3 では移植前は陰性であった IgG 抗カルジオリピン抗体が高値となった。3 例の経過を表 1 にまとめた。

自己 CD34 移植患者 17 例中 13 例 (76%) でサイトメガロウイルス血症となり、これは非選択移植 37 例中 5 例 (14%) に比べて頻度が有意に高かった (P<0.0001)。自己 CD34 移植患者 8 例と非選択移植患者 20 例で CD4 および CD8 陽性細胞数の推移を検討したところ、移植後 2-8 週では CD4 陽性細胞数は自己 CD34 移植群では有意に低く、その後も低値が持続した (図 1a)。同様に CD8 細胞数も CD34 移植群で低値であった (図 1b)。

D. 考察

強皮症に対する自己 CD34 移植は、大量の免疫抑制剤の使用による効果、および免疫担当細胞を「リセット」して免疫系を再構築することによる自己免疫現象の再発予防、の両者を目的にした新しい治療法である。欧米では適切な症例の選択 (すなわち適切な除外基準の設定) と移植プロトコールの改善によって近年は成績が向

上しているものの、CPAによる直接の臓器障害さらに感染合併による治療関連死は最近の症例でも依然として数パーセントに認められる。今回経験した3例では比較的安全に血球が回復したが、1例で遷延するウイルス感染症を合併した。さらに、自己抗体は消失せず、かえって別の自己免疫現象（血小板減少症、抗カルジオリピン抗体高値）が出現した。したがって強皮症に対する自己CD34移植の意義は、当初考えられたようなmyeloablation, lymphablation というよりimmunoregulation であると考えられる。移植後新しく自己免疫が発生した原因は、免疫制御系のリンパ球を抑制したためかもしれない。CD34細胞の移植自体は骨髄のrescueであると考えることができる。

このような立場をとったとき、RAに自己CD34移植を応用する意義は、大量のCPAが使用可能なのでその抗リウマチ作用の恩恵があること、およびimmunoregulationによって長期の寛解および抗リウマチ薬への感受性獲得の両者の可能性がある。

一方、CD34の選択の是非が議論の対象である。移植細胞をCD34のみとした場合、長期にわたってCD4、CD8細胞の低値が得られ、これが抗免疫反応に貢献しているかもしれないが、一方感染症合併においてはこの現象は極めて不利にはたらく。実際、自己CD34移植を当科で施行した17例中8例で何らかの感染症を合併しており、サイトメガロウイルスの不顕性感染の頻度は自己CD34移植が非選択移植にくらべて有意に高かった。

以上のことから、RAに対しての末梢血幹細胞移植は、より安全におこなうために非選択移植のプロトコルを採用し、CPAの投与量についても国際的なプロトコルを参考に、やや低量での使用を考えている。

E. 結論

RAに対する末梢血幹細胞移植は、大量のCPA投与による抗リウマチ効果と、

immunoregulationによるその効果の持続および他の抗リウマチ薬への感受性獲得が期待できる。ただし、より安全に治療をおこなうために、非選択移植さらにCPAの投与量のやや低めの設定が望ましいと考える。

E. 結論

RAに対する末梢血幹細胞移植は、大量のCPA投与による抗リウマチ効果と、immunoregulationによるその効果の持続および他の抗リウマチ薬への感受性獲得が期待できる。ただし、より安全に治療をおこなうために、非選択移植さらにCPAの投与量のやや低めの設定が望ましいと考える。

F. 健康危険情報

本年度の研究からは該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Atsumi T, et al. Endotheliology in antiphospholipid antibodies. In: Shoenfeld Y et al, editors. Atherosclerosis and Autoimmunity. Amsterdam:Elsevier Science; 2001. p.291-298

2). Amengual O, Atsumi T, et al. Antiphospholipid syndrome and atherosclerosis. In: Shoenfeld Y et al, editors. Atherosclerosis and Autoimmunity. Amsterdam:Elsevier Science; 2001. p.281-289

3). Caliz T, Atsumi T, et. HLA class II gene polymorphisms in antiphospholipid syndrome: haplotype analysis in 83 caucasoid patients. Rheumatology 40: 31-36, 2001

4). Bertolaccini ML, Atsumi T, et al. Plasma tumor necrosis factor alpha levels and the -238*A promoter polymorphism in

patients with antiphospholipid syndrome.

Thromb Haemost 85: 198-203, 2001

5) Kobayashi K, Matsuura E, Atsumi T, et al. A specific ligand for β 2-glycoprotein I mediates autoantibody-dependent uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages. J Lipid Res 42: 697-709, 2001

6) Tsutsumi A, Atsumi T, et al. Mannose-binding lectin gene: polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and Sjogren's syndrome. Genes Immun 2: 99-104, 2001

7) Atsumi T, et al. Genetics of antiphospholipid syndrome. Rheum Dis Clin N Am 27: 565-72, 2001

8) Tsutsumi A, Atsumi T, et al. Anti-phosphatidylserine/prothrombin antibodies are not frequently found in patients with unexplained recurrent miscarriages. Am J Reprod Immunol 46: 242-4, 2001

9) Bertolaccini ML, Atsumi T, et al. The value of IgA antiphospholipid testing for diagnosis of antiphospholipid (Hughes) syndrome in systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 28:2637-43, 2001

10) Mukai M, Atsumi T, et al. Multiple thromboses in major arteries in a patient with antiphospholipid syndrome associated with excess of a large multimer of von Willebrand factor. Lupus 10:895-6, 2001

11) Atsumi T, Koike T. Clinical relevance of antiprothrombin antibodies. Autoimmunity Reviews 1:49-53, 2002

2. 学会発表

1) Atsumi T, et al. Semi-quantitate lupus anticoagulant test using phosphatidylserine dependent monoclonal antiprothrombin antibody. 6th International Lupus Conference, Barcelona, Spain, 24-28 March, 2001

2) Atsumi T, et al. Phosphatidylserine dependent monoclonal antiprothrombin antibody as a standard for semi-quantitate lupus anticoagulant test. 18th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Paris, France, 6-12 July, 2001

3) Atsumi T, et al. A novel method to quantify lupus anticoagulant activity using phosphatidylserine dependent monoclonal antiprothrombin antibody. 65th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology, San Francisco, 10-15 November, 2001

H. 知的財産権の出願・登録

該当無し

I. 謝辞

本研究は、北海道大学大学院医学研究科・分子病態制御学・第2内科の大学院生、坊垣暁之先生、遠藤知之先生、助手の西尾充史先生、天崎吉晴先生の御協力および小池隆夫教授の御指導でおこなわれた。各先生に深謝する。

抗原特異性と抑制機能に関する遺伝子導入再構築 T 細胞による自己免疫病態の抑制

分担研究者 山本一彦 東京大学大学院医学系研究科内科学専攻アレルギーリウマチ学 教授

研究要旨 慢性関節リウマチを含む自己免疫疾患に対する理想的な治療法として抗原特異的免疫療法が期待されており、抗原特異的 T 細胞を用いた臓器特異的自己免疫疾患の抑制が報告されている。今回は 1) 抗原特異的 T 細胞の人為的な作成法、2) 全身性自己免疫疾患である膠原病への応用可能性、の 2 点を検討した。ループス腎炎で明確な成果が得られたので、本年はこれを報告する。SLE における標的抗原として近年ヌクレオソームが注目されている。そこで我々は高効率レトロウイルスベクター系を用いて、NZB/W F1 マウスの CD4 陽性 T 細胞にヌクレオソーム特異的 TCR α/β 鎖遺伝子を導入し、抗原特異性を再構築した。さらに共刺激分子を阻害する CTLA4Ig 遺伝子を導入することにより抑制性細胞を作製し、若年 NZB/W F1 マウスへの移入による治療効果を検討した。その結果、CTLA4Ig 導入群、 α/β 鎖導入群、mock 移入群及び無移入群では自己抗体産生及び腎炎発症に差は認められなかったのに対し、 α/β 鎖+CTLA4Ig 移入群では自己抗体産生及び腎炎発症の抑制を認めた。

A. 研究目的

慢性関節リウマチを含む自己免疫疾患に対する治療法として抗原特異的免疫療法が期待されている。昨年、我々の研究室は関節炎モデルでの抗原特異的 T 細胞の治療効果を報告した。本年はループス腎炎モデルでの明確な成果が得られたのでこれを報告する。

SLE における標的抗原としてヌクレオソームが注目されている。これまで抗二本鎖 DNA 抗体が SLE の疾患活動性を反映し、臓器への沈着など病変形成に関与することが分かっているが、抗二本鎖 DNA 抗体産生を誘導する抗原は分かっていた。近年ループス感受性マウスにおいて、B 細胞の抗二本鎖 DNA 抗体産生を誘導する T 細胞クローンはヌクレオソームに特異的であること、若年ループス感受性マウスにヌクレオソームを免疫すると腎炎の発症が促進されること、ループス腎炎組織に抗ヌクレオソーム抗体が沈着していることが報告されている。またループス患者においても抗ヌクレオソーム抗体は抗二本鎖 DNA 抗体よりも疾

患特異性に優れ、より鋭敏に活動性を反映することが報告され、ヌクレオソームの SLE の病態形成における重要性が明らかになってきている。今後ヌクレオソーム特異的 T 細胞の特性の理解、治療応用可能性の検討が必要である。我々は既に高効率パッケージング細胞 PLAT-E 及び、遺伝子導入試薬レトロネクチンを併用したレトロウイルスベクター系を用いて TCR α/β 鎖をリンパ球に移入し、抗原特異的 T 細胞を大量に作製する方法を開発している。今回はその方法の応用により 1) ヌクレオソームに特異的な T 細胞の人為的な作製法、2) 全身性自己免疫疾患である膠原病への応用可能性、の 2 点を検討した。

B. 研究方法

NZB/W F1 マウスの CD4 陽性 T 細胞にヌクレオソーム特異的 TCR α/β 鎖遺伝子を導入し、ヌクレオソーム特異性を再構築した。ヌクレオソーム特異的 TCR は報告されている配列を基に CDR3 領域を

PCRで作製し、それぞれV α 13, V β 4フラグメントと結合させて作製し、レトロウイルスベクターpMXWにサブクローニングした。ベクターをPLAT-Eにトランスフェクションしてウイルスを作製し、レトロネクチンでコーティングしたプレート上でConA+IL-2で48時間培養した脾臓細胞に感染させた。さらに共刺激分子を阻害するCTLA4Ig遺伝子を導入し抑制性細胞を作製し、若年NZB/W F1マウスへの移入による治療効果を検討した。

C. 研究結果 D. 考察

ヌクレオソーム特異的 TCR を TCR を欠損したハイブリドーマに導入すると CD3 発現が回復し、導入した α / β 鎖の細胞内での複合体形成能が確認された。ヌクレオソーム特異的 TCR を導入した CD4 陽性細胞において、抗 V β 4 抗体で確認した β 鎖あたりの導入効率は 60-70%であり、 β 鎖についても同様の効率と推測された。TCR α / β 導入細胞は NZB/W F1 マウスの B 細胞及びヌクレオソームの存在下で増殖した。 α 鎖または β 鎖のみを導入した細胞は増殖を示さず、内因性 TCR と導入した α 鎖または β 鎖がランダムに複合体を形成し、非特異的にヌクレオソームに反応を示す可能性は否定された。この TCR 導入細胞を蛍光物質である CFSE でラベルし、NZB/W F1 マウスに移入すると脾臓で分裂を確認でき、生体内でも抗原刺激を受けて機能的であると推測された。10 週齢の NZB/W F1 マウスに、TCR に加えて CTLA4Ig 遺伝子を導入した抑制性細胞を移入したものを治療群として、コントロール群と比較すると (1)コントロール群の CTLA4Ig 導入群、TCR 導入群、mock 移入群及び無移入群では 24 週より蛋白尿が出現したのに対し、治療群では 30 週まで蛋白尿が出現しなかった (2) 22 週の時点で治療群ではコントロール群に対し抗二本鎖 DNA 抗体価及び抗ヒストン抗体価の著明な抑制を認めた (3) 30 週の時点で治療群では脾腫大・CD8 減少の抑制を認め、腎免疫組織染色ではコントロール群では糸球体係蹄への IgG, IgM, C3 の著明な沈着を認めしたが、治療群ではほとんど沈着を認めなかつ

た (4) 30 週の脾臓からの RT-PCR で移入した TCR 遺伝子及び CTLA4Ig 遺伝子の発現を確認した (5) 10 週で移入後 16 週の時点でトリオボアルブミン (OVA) で免疫すると治療群はコントロール群と同様の抗 OVA 抗体産生を示した。

E. 結論

レトロウイルスベクターを用いてループス感受性マウスリンパ球上にヌクレオソーム特異性を移入することに成功し、ヌクレオソーム特異的 T 細胞はループス感受性マウス生体内で抗原刺激を受けていることを示した。さらにヌクレオソーム特異的 T 細胞に抑制性遺伝子を導入して作製した抑制性細胞による自己抗体産生の抑制及びループス腎炎治療の可能性が示唆された。また複数の遺伝子導入により特定の機能を付与した細胞の治療応用性も示唆された。これと同様の方法論が関節炎モデルにも適応可能か検討中である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Yamamoto K. T cells and autoimmune diseases. *Allergy International*.50:1-4, 2001
- ・ Yamada R. Tanaka T. Unoki K. Nagai T. Sawada T. Ohnishi Y. Tsunoda T. Yukioka M. Maeda A. Suzuki K. Tateishi H. Ochi T. Nakamura Y. and Yamamoto K. Association between a single-nucleotide polymorphism in the promoter of the human interleukin-3 gene and rheumatoid arthritis in Japanese patients, and maximum-likelihood estimation of combinatorial effect that two genetic loci have on susceptibility to the disease. *Am.J.Hum.Genet.* 68: 674-685, 2001
- ・ Yamaguchi M. Chiba A. Yanagawa T. Mato T. Hirai K. Inoue T. Oya Y. Kusunoki S. Ito K. and Yamamoto K. Guillain-Barre syndrome following herpes zoster in a patient with systemic sclerosis. *Mod.Rheumatol.* 11:

T 細胞副刺激因子 LIGHT およびその受容体の慢性関節リウマチ(RA)滑膜組織 における発現と炎症性サイトカイン産生への関与に関する研究

分担研究者 原まさ子 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 教授
針谷正祥 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 講師
中川美紀 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 助手

研究要旨

RA 滑膜組織には活性化 CD4 陽性 T 細胞が浸潤し、炎症の進展・増悪に重要な働きをしている。活性化 CD4 陽性 T 細胞は、さまざまな細胞表面分子を発現する。その一つとして TNF ファミリーに属する LIGHT が近年報告された。本研究では、LIGHT およびその受容体の RA 滑膜における発現と T 細胞-マクロファージ様滑膜細胞間相互作用における機能を明らかにすることを目的とした。RA 滑膜組織では LIGHT および HVEM が蛋白および mRNA レベルで過剰発現し、滑膜浸潤 T 細胞/マクロファージ様滑膜細胞間相互作用を担う分子として働き、炎症性サイトカインの分泌促進を介して RA の病態形成に寄与していることが明らかとなった。

A.研究目的

RA 滑膜組織には活性化 CD4 陽性 T 細胞が浸潤し、炎症の進展・増悪に重要な働きをしている。我々は、すでに滑膜浸潤 T 細胞が CD154 を発現しマクロファージ様滑膜細胞上の CD40 を介して TNF- α 産生を誘導することを報告して来た。活性化 CD4 陽性 T 細胞は CD154 の他にもさまざまな分子を発現する。それらの機能分子を順次解明し病態への関与を明らかにすることにより、RA 治療への新たな戦略を描くことが可能になると考えられる。そのような機能分子の候補の一つとして CD154 と同じ TNF ファミリーに属する LIGHT が近年報告された。LIGHT の名称は Lymphotoxin に相同性を有し、その発現が誘導され(Inducible expression)、単純ヘルペスウイルスの Glycoprotein D と競合的に Herpes virus entry mediator (HVEM)に結合し、ゲノムデータベースでは TNFSF14 と命名されてい

ることに由来する。LIGHT は 239 アミノ酸から構成される分子量約 29kD の蛋白質であり、抗原提示細胞に発現し T 細胞活性化における副刺激分子として作用すると同時に、活性化 T 細胞にも発現することが報告されている。LIGHT の受容体として herpes virus entry mediator (HVEM)、lymphotoxin β receptor (LT β R)および TR6 が知られている。そこで、今回の研究では、LIGHT およびその受容体の RA 滑膜における発現と T 細胞-マクロファージ様滑膜細胞間相互作用における機能を明らかにすることを目的とした。

B.研究方法

抗 LIGHT 抗体は LIGHT のアミノ酸配列を含むペプチドを家兎に免疫して作成した。Recombinant soluble LIGHT (rsLIGHT) は VCAM-1 遺伝子の signal sequence と flag-tag を有する LIGHT 細胞外ドメインを発現する