

厚生省科学研究費補助金（特定疾患研究事業）

分担研究報告書

ベーチェット病による難治性ぶどう膜炎のあたらしい治療に関する研究

分担研究者 中村聡 横浜市立大学医学部 講師

研究要旨

ベーチェット病の眼症状である網膜ぶどう膜炎発作は繰り返すと黄斑変性、網脈絡膜萎縮、視神経萎縮などを起こして失明する患者も多い。この視力予後不良なベーチェット病によるぶどう膜炎の新しい治療としてヒトーマウスキメラ型抗 TNF-alpha モノクローナル抗体の効果を検討した。対象は従来の免疫抑制療法などに抵抗性の症例であったが、短期投与、長期投与いずれもぶどう膜炎の明らかな寛解をみた。長期的な副作用の問題は不明だが本抗体は従来の治療が奏効しないベーチェット病によるぶどう膜炎の重症例への効果が期待される。

A. 研究目的

ベーチェット病は口腔粘膜のアフタ性潰瘍、外陰部潰瘍、眼症状、皮膚症状の4つを主症状とし、神経、腸管、血管などに多彩な急性炎症を反復しつつ慢性の経過をたどる難治性疾患である。眼症状は約70%にみられ、虹彩毛様体炎型と網膜ぶどう膜炎型に大別され、後者の割合が多い。90%の症例は両眼性である。典型的には慢性の炎症に加えて発作性に炎症の増悪があり、2-3週間で徐々に軽快す

る。網膜ぶどう膜炎型発作の際には眼底に血管炎による出血、虚血性変化とリンパ球浸潤による白色滲出斑がみられる。治療が奏効せずこの発作を繰り返すと黄斑変性、網脈絡膜萎縮、視神経萎縮などを起こして失明する患者も多い。

ベーチェット病における TNF-alpha の関与については1990年 Akoglu¹⁾, Hamzaoui²⁾らが報告して以来、いくつかの研究がなされてきた。疾患の活動性と TNF-alpha の相関については、活動性の解釈により見解が分かれ、Sayinalp³⁾は主症状の発現数で分けて違いがみられなかったと報告している。我々はぶどう膜炎の活動性で分けて解析し、活動性ぶどう膜炎を有する患者の TNF-alpha 産生能は、非活動性ぶどう膜炎を有する患者や正常対照と比べて有意に亢進していたと報告した⁴⁾。少なくとも眼症状の活動性と TNF-alpha は相関を有するものと考えられる。

一方ヒトのぶどう膜炎のモデルである自己免疫性網膜ぶどう膜炎(EAU)でも、ぶどう膜炎の重症化には TNF-alpha 産生能の違いが関与すること⁵⁾、また通常ラットのモデルでは網膜由来抗原による免疫後10日頃より炎症が出現するが、この発症に一致して TNF-alpha の上昇がみられることが明らかになった⁶⁾。

これらの結果からぶどう膜炎にたいする抗 TNF-alpha 抗体の有効性が期待されたため、ラットのぶどう膜炎モデルに抗体を免疫 7 日後より 14 日まで連続投与し、治療実験を行った。その結果炎症の発症時期に抗 TNF-alpha 抗体を投与することでぶどう膜炎の明らかな軽減がみられた 6)。

このようなヒト、および動物モデルの研究結果より、ぶどう膜炎の活動性が高く TNF-alpha 産生の亢進しているベーチェット病の治療に抗 TNF-alpha 抗体が有用である可能性が想定された。

B. 研究方法

以上の背景をもとにベーチェット病の抗 TNF-alpha 抗体治療の臨床試験が計画され、1999 年から 2002 年にかけて行われた。使用した抗体はヒト-マウスキメラ型モノクローナル抗体 infliximab である。これは Remicade の名でセントコア社から発売されているが、これまでに慢性関節リウマチやクローン病の治療に用いられ、慢性関節リウマチでは腫脹関節数の減少、クローン病では CDAI の低下や内視鏡所見の改善などがみられ、良好な効果を有することが報告され 7), 8), 米国では既存の治療法に抵抗性の患者に対する治療薬として認可されている。日本でも既に慢性関節リウマチとクローン病について治験が行われているが、ベーチェット病に対して正規の治験は国内外を通じて行われていなかった。

昨年おこなった前期第 II 相臨床試験では網膜ぶどう膜炎を有するベーチェット病患者で

シクロスポリン治療の効果が不十分、あるいは副作用により投与が不可能になった症例を対象とした。投与量は 1 回あたり 5mg/kg もしくは 10mg/kg の 2 用量を 0 週, 2 週, 6 週, 10 週の 4 回点滴静注し、臨床症状により判定する有効性と副作用について検討した。当施設で導入された症例は 4 例で、全例 5mg/kg が割りつけられた。

また前期第 II 相臨床試験参加患者のうち希望者を対象として図 1 に示すプロトコールで長期投与試験をおこなった。

倫理面への配慮

治験の計画段階で横浜市大医学部倫理委員会に当該薬物投与の可否につき審査を受けて承認された。また実際の治験にあたっては説明文書を用いた上で文書による同意を得ている。

C. 研究結果

まず前期第 II 相臨床試験の投与前後の発作回数の変化を図 2 に示す。ぶどう膜炎の発作は投与により軽快し、霧視などの眼科的自覚症状、あるいは口内炎などの全身症状も著しく改善した。一方副作用については投与を中止する必要のあった重篤な例はなかった。

一方この前期第 II 相臨床試験後 2 か月ほどで全例ぶどう膜炎の発作を再発するようになった。すなわち投与中の臨床症状の改善は単に病勢を抑制するのみで治癒せしめているものではないことが明らかになったため、前期第 II 相臨床試験に続けて長期投与試験を行い、

図3に示す結果を得た。長期試験中軽度の発作が見られた症例があるが、炎症の活動性は概ね抑えられており、本薬物を今後実際に臨床の場で投与する際の方法について示唆が得られた。現在治験は終了しその後の再燃の有無につき経過をみている。副作用については前期第II相試験同様重篤なものはみられなかったが抗核抗体の持続的上昇があり(図4)、追跡調査中である。

D. 考察

現在他施設の結果とともに詳細を解析中であるが本薬物のベーチェット病のぶどう膜炎に対する有効性は強く期待できる。しかしぶどう膜炎の炎症を抑えるだけでなく、抗核抗体の上昇など、免疫系に与える影響の広がりについては十分確認されていない。また本薬物の作用機序は基本的には免疫抑制であり、他の免疫抑制薬同様悪性腫瘍の発現や感染症の誘発などの可能性があり、特にベーチェット病に対する投与実績がないため今後の注意深い経過観察が必要と思われる。

また共同研究者の萩原らは投与中のIFN-gammaの産生上昇を観察している。このため特定のサイトカインを抑制する本療法が長期間にわたるとサイトカインネットワークの均衡を偏倚させ、新たな病態を誘導する可能性があり、将来的にはより抜本的な治療法の開発が望まれる。

E. 結論

ベーチェット病は多くは青壮年に発症し、

頻発するぶどう膜炎発作により失明に至ることの多い難治性疾患である。今回我々の使用した抗TNF-alpha抗体は効果の持続、長期投与時の副作用の問題など今後慎重に検討していく必要があると考えられるが、従来の治療が奏効しない重症例への効果が期待される。

引用文献

- 1) Akoglu, T.F. et al.: TNF, soluble IL-2R and soluble CD-8 in Behcet's disease [letter]. *J Rheumatol* 17:1107-8, 1990
- 2) Hamzaoui, K. et al.: Production of TNF-alpha and IL-1 in active Behcet's disease [letter]. *J Rheumatol* 17:1428-9, 1990
- 3) Sayinalp, N. et al.: Cytokines in Behcet's disease. *J Rheumatol* 23:321-2, 1996
- 4) 中村聡, 他: ベーチェット病患者における末梢血単球の *in vitro* tumor necrosis factor-alpha 産生能. *日本眼科学会雑誌* 96:1282-5, 1992
- 5) Nakamura, S. et al.: The role of tumor necrosis factor-alpha in the induction of experimental autoimmune uveoretinitis in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:3884-9, 1994
- 6) 中村聡: ぶどう膜炎の細胞生物学. *日本眼科学会雑誌* 101:975-986, 1997
- 7) Elliott, M.J. et al.: Repeated therapy with monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) in patients with rheumatoid arthritis. *Lancet* 344:1125-7, 1994
- 8) Present, D.H. et al.: Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med* 340:1398-405, 1999

F.研究発表

1.論文発表

総説

中村聡, 大野重昭: ベーチェット病の眼病変
に対する抗 TNF- α モノクローナル抗体療法.
炎症と免疫 9: 205-209, 2001

中村 聡, 石原 麻美: ぶどう膜炎免疫抑制
薬治療の EBM. 臨眼 55: 164-171, 2001

中村聡, 大野重昭: 抗 TNF-alpha キメラ抗体
による Behcet 病の治療. 最新医学 (印刷
中)

著書

中村聡: ベーチェット病 (大野重昭編) 難
治性ぶどう膜炎. 難治白内障手術のレスキュー
ー メジカルビュー社 (東京) 70-71, 2001

2.学会発表

なし

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

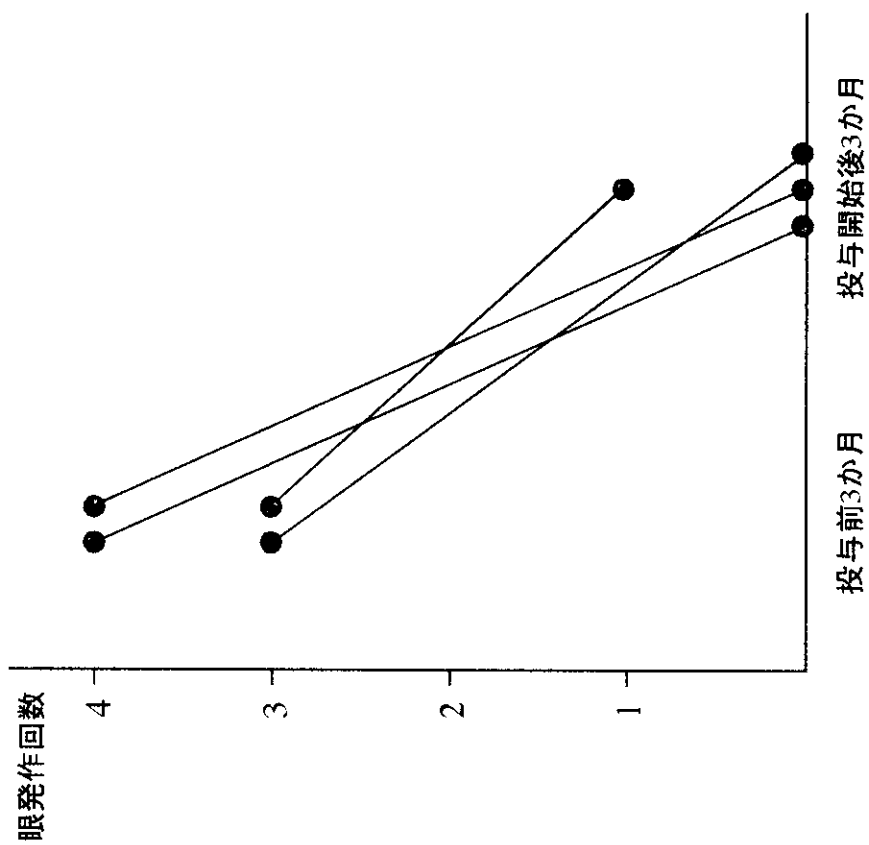


図1 抗TNF-alpha抗体投与前後の眼発作回数

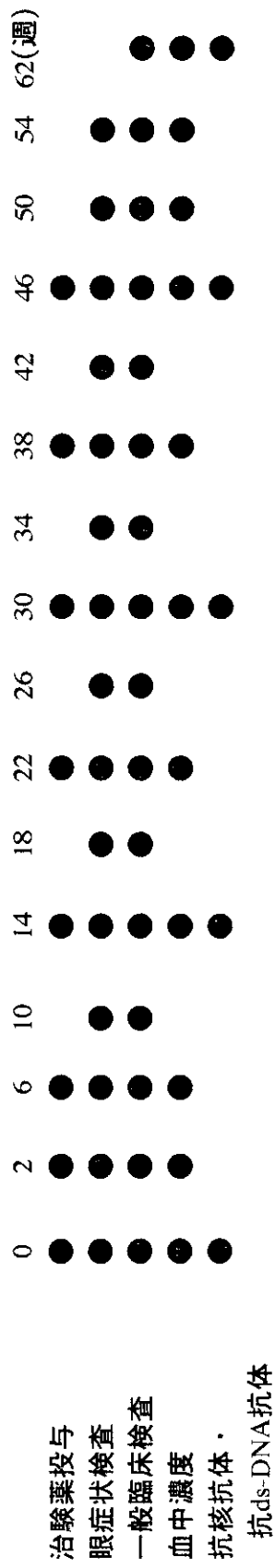


図2 長期投与試験スケジュール

前期第II相

長期投与

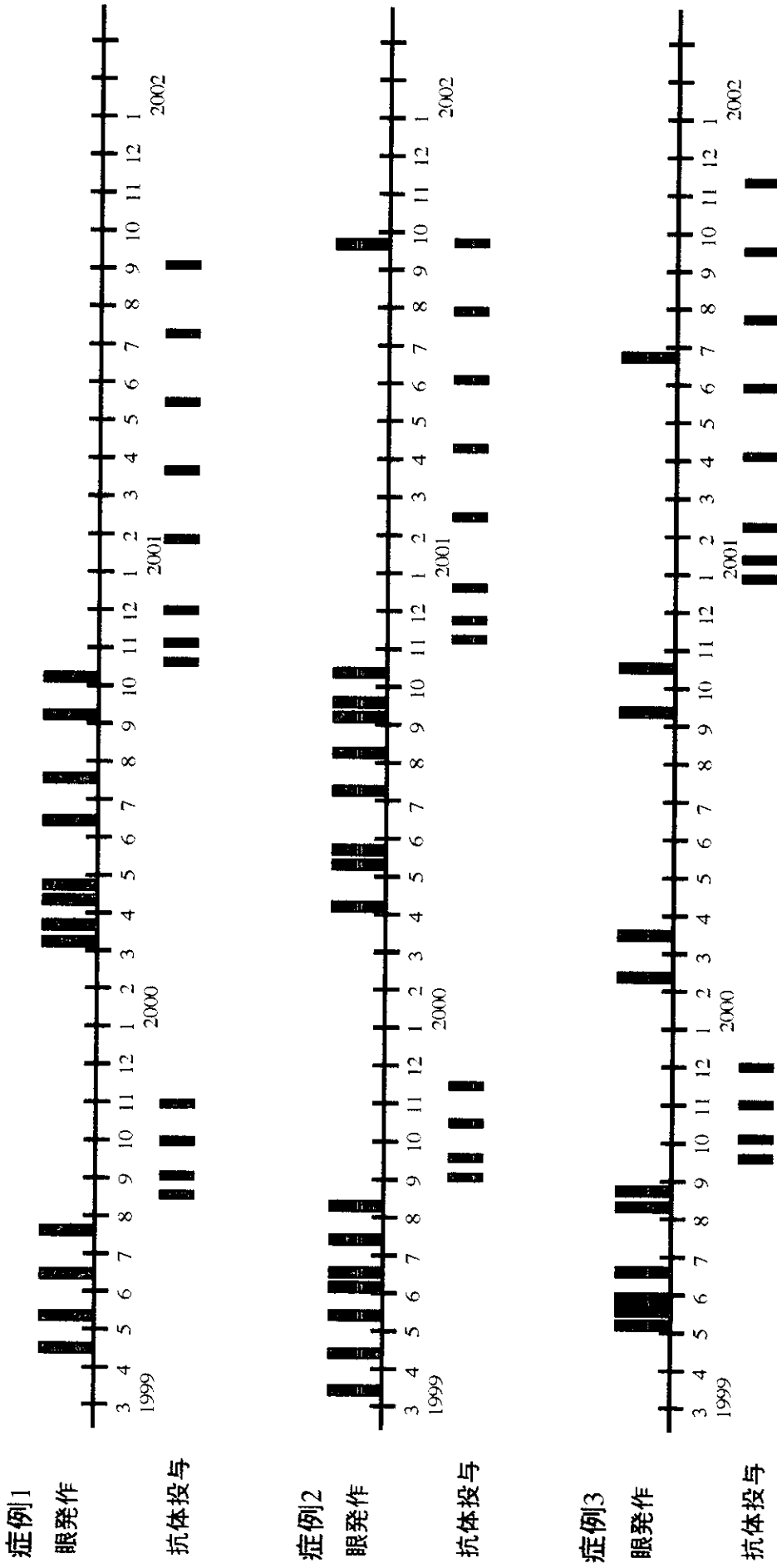


図3 抗体投与と眼発作

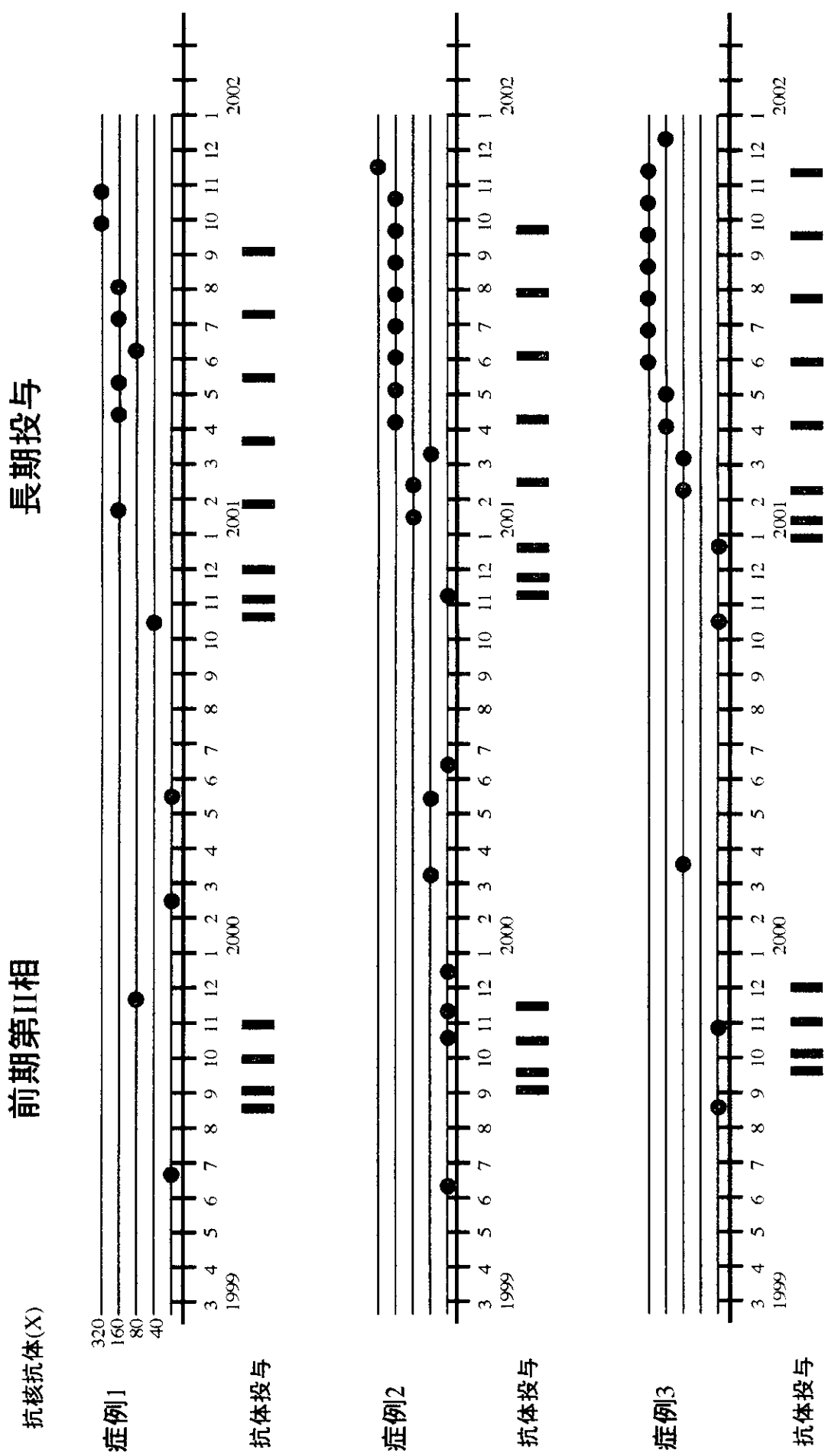


図4 抗体投与と抗核抗体

ELISPOT法によるベーチェット病患者末梢血のサイトカイン動態の解析
—抗TNF- α 抗体療法前後のサイトカイン産生細胞の動態

分担研究者 石ヶ坪良明 横浜市立大学医学部内科学第一講座
萩原恵里 同上
三角 緑 同上
中村 聡 同眼科
大野重昭 北海道大学医学研究科視覚器病学分野

研究要旨 これまで我々は、ベーチェット病(BD)患者の末梢血においてサイトカインTh1:Th2バランスはTh1に傾いていることを報告してきた。今回我々は、眼症状の活動性の高いBD患者3例について長期抗TNF- α 抗体療法を施行し、サイトカインELISPOT法を用いて末梢血中のサイトカイン産生細胞を経時的に測定した。検出したサイトカインはTh1サイトカインの代表であるIFN- γ 、炎症性サイトカインのTNF- α である。その結果、IFN- γ 産生細胞は投与一日後に一時増加するが次の投与時には前回レベル近くまで戻っており、長期的には増加していく傾向にあった。TNF- α 産生細胞は投与一日後に減少し、投与回数を重ねることに減少していく傾向がみられた。治療期間中に軽い発作を認めた一例ではIFN- γ ・TNF- α 両者の産生細胞が増加していた。また産生量と相関するとされるスポットの総面積も同時に測定したが、産生細胞数と同様の傾向であった。

さらにTh1型免疫応答に重要な役割を果たすIL-12受容体(IL-12R)陽性細胞の頻度をフローサイトメトリー法を用いて、抗TNF- α 療法を受けたBD患者末梢血において検討した。その結果CD3陽性細胞およびCD14陽性細胞においてIL-12Rの発現は治療後増加する傾向が認められた。現在治療終了後の観察期間を解析中であるが、臨床所見との相関および今後の病状の変化などを含め、さらに詳細な検討が必要であると思われる。

A. 研究目的

ベーチェット病(BD)患者末梢血単核球(PBMC)のサイトカイン産生バランスはTh1に傾いていると報告されている¹⁻³⁾。これまで我々は、細胞を刺激することなく高感度にin vivoでのサイトカイン産生細胞を直接検出・定量しうるサイトカインELISPOT法⁴⁾を用いて、in vivoに最も近い無刺激下でのBD病患者のPBMCのサイトカイン産生プロファイルを検討し、Th1優位の結果を報告してきた。また、短期抗TNF- α 抗体療法を受けた眼症状の活動性の高いBD病患者4例のサイトカイン産生細胞プロファイルを経時的に観察し、IFN- γ 産生細胞数は抗TNF- α 抗体療法により増加する傾向を示すことを報告した。今回我々は、長期抗TNF- α 抗体療法を受けた眼症状の活動性の高いBD患者3例について、末梢血中のサイトカイン産生細胞をサイトカインELISPOT法を用いて経時的に測定し、本療法によりサイトカイン産生異常がいかにか修飾されるかを検討した。またIL-12Rの発現を上記のBD患者3例を対称として、治療によりIL-12R陽性細胞の頻度がどのように変化するか調べた。

B. 方法

眼症状の活動性が高く抗TNF- α 療法を受けたBD患者3例に対し同意を得、46週の治療期間のうち14週までは投与前と投与一日後に、それ以降は投与前のみ採血を行った。PBMCを分離し、解析に使用するまで-196°Cで保存した。長期抗TNF- α 抗体療法のプロトコールは、当院眼科学教室の中村らによる本報告書の通りである。サイトカインELISPOT法は以下の方法で行った。すなわち、抗サイトカイン抗体をニトロセルロース96穴プレートに一晩コートし、翌日PBMCを一定の濃度でまく。18時間後細胞を洗い去り、ビオチン化抗サイトカイン2次抗体を加える。アビジンアルカリフォスファターゼの後発色基質を加えると、サイトカインを産生した細胞の局在に一致して青色のスポットが現れる。乾燥の後、画像処理機能の持つKS ELISPOTにてスポットの個数と面積を自動測定し、10⁶個あたりの無刺激下でのIFN- γ 、TNF- α サイトカイン産生細胞数を測定し、さらにスポットの大きさの分布も検討した。

またPBMCのIL-12R発現は、PE標識抗IL-12R抗体とFITC標識抗CD3抗体あるいはFITC標識抗CD14抗体を用いて二重染色し、フローサイトメトリー法にて陽性細胞の頻度を解析した。ソフトウェアはCell Questを用いた。

C. 研究結果

抗TNF- α 抗体投与前と投与一日後の患者PBMC中のサイトカイン産生細胞数をELISPOT法にて測定した。図1は治療前後のIFN- γ 産生細胞数を示すが(1例につき数回の投与が含まれる)、全回とも投与一日後に前値よりも増加していた。一方、図2に示すTNF- α 産生細胞数は全回とも投与一日後に前値よりも減少していた。

長期抗TNF- α 抗体療法によるサイトカイン産生細胞数の変化を各症例別に検討したものを示す。症例1、症例2では治療回数を重ねるごとにIFN- γ は増加していくものの、TNF- α は減少傾向を示した。図3にその代表例として症例1の結果を示した。一方、症例3では治療中に軽い眼発作を認め、発作時期に一致してIFN- γ 、TNF- α の両者が増加していた(図4)。この傾向はスポットの総面積、すなわち総産生量においても同様であった。図5・6に症例1のIFN- γ ・TNF- α 産生細胞スポットの総面積を示す。IFN- γ (図5)では投与回数を重ねる毎に細胞数は増加し、スポットの面積は大きい方に偏位した。TNF- α (図6)では、治療により細胞数・スポット面積とも低下傾向がみられた。

また、T細胞上のIL-12R陽性細胞を抗CD3抗体と抗IL-12R抗体にて、単球上のIL-12R陽性細胞を抗CD14抗体と抗IL-12R抗体を用いて二重染色し、フローサイトメトリーにて解析した。その結果、T細胞・単球の両者とも治療後、IL-12R陽性細胞の頻度の増加が認められた(図7、図8)。

D. 考察

BD患者PBMC中のIFN- γ ・TNF- α 産生細胞は健常人に比して増加していることが報告されているが¹⁻³⁾、我々のこれまでの研究でも同様の結果を示していた。今回、長期抗TNF- α 抗体療法によりTNF- α 産生細胞は減少し、IFN- γ 産生細胞数はさらに増加す

る傾向を示したが、これは前回我々が報告した短期抗TNF- α 抗体療法での結果と一致していた。IFN- γ の増加は、TNF- α が抗体投与により減少したことによるfeedback機構による可能性もある。しかし、IFN- γ 産生細胞数が増加していても治療中はサイクロスポリン内服を中断していたにもかかわらず臨床像の改善を認めており、IFN- γ 産生細胞数増加の意義についてはさらに今後の検討を要する。また、IL-12RはIFN- γ により発現が亢進するが⁵⁾、本療法においてもIL-12受容体陽性細胞の頻度の増加が認められており、本療法によるIFN- γ の増加が関与している可能性が予想される。IL-12はTh1サイトカインを増強する上位調節因子であり、IFN- γ 産生を促進する。BD患者において血清IL-12の上昇を認め、病勢と相関するという報告もある⁶⁾。また、抗TNF- α 抗体療法を受けたRA患者に代表的なTh1病である多発性硬化症が併発したという報告があることから^{7,8)}、本療法によりTh1サイトカインが増強される可能性がある。抗TNF- α 抗体療法は従来の治療が奏功しない重症例への効果が期待されているが、今回の我々の研究から、今後本療法の効果の持続・副作用の問題等、慎重に検討していく必要があると考えられる。

E. 参考文献

- 1) Alpsy, E et al. J.Dermatol.1998;25:513-6
- 2) Ohno, S et al. Ophthalmol.Vis.Sci.1982;18:5:187-92
- 3) Sugi-Ikai, N et al. Ophthalmol.Vis.Sci.1998;39:996-1004
- 4) 萩原恵里, 他. 臨床免疫.1997;29[suppl.17]:271-77
- 5) Taoufik Y. et al. Eur J Immunol. 2001;31:3228-39
- 6) Frassanito, MA et al. Arthritis Rheum. 1999;42:1967-7
- 7) William, HR et al. Arthritis Rheum.2001;44:1977-83
- 8) Niveditha, M et al. Arthritis Rheum.2001;44:2862-9

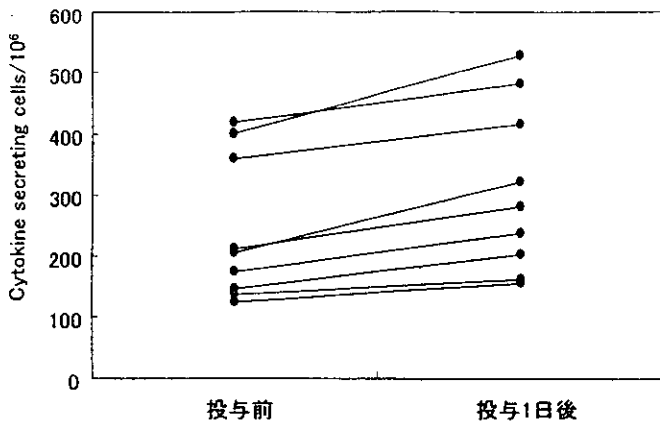


図1. 治療前後のIFN- γ 産生細胞数

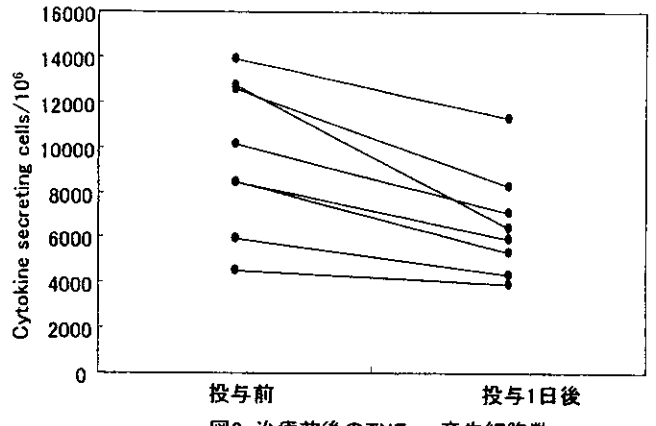


図2. 治療前後のTNF- α 産生細胞数

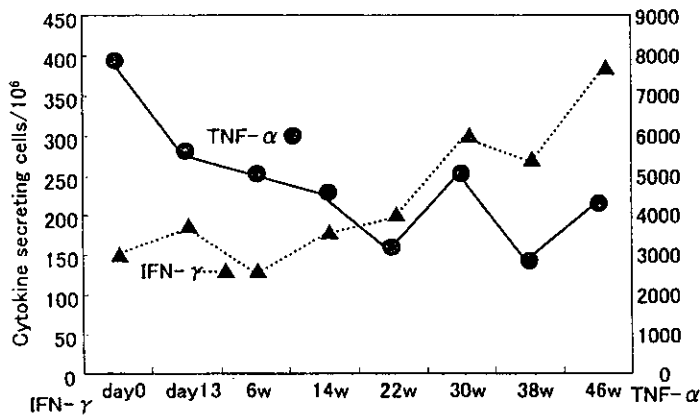


図3. 症例1のサイトカイン産生細胞数の変化

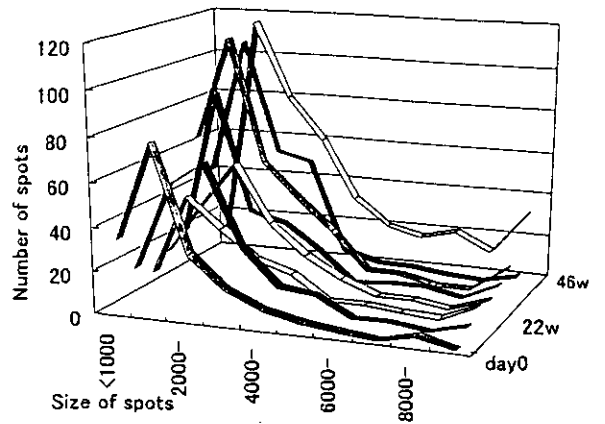


図5. 症例1のIFN- γ 産生細胞スポットの総面積

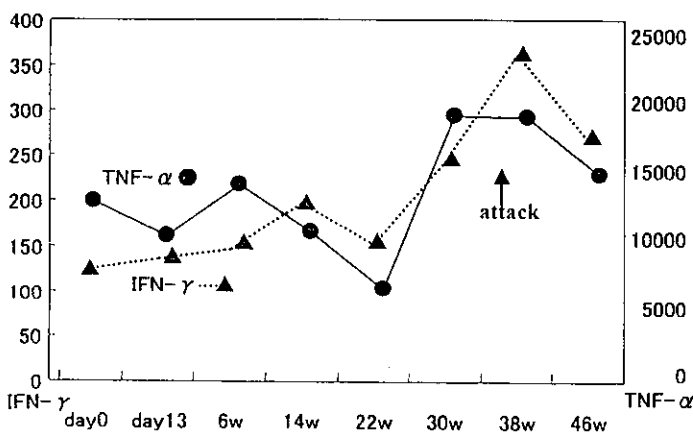


図4. 症例3のサイトカイン産生細胞数の変化

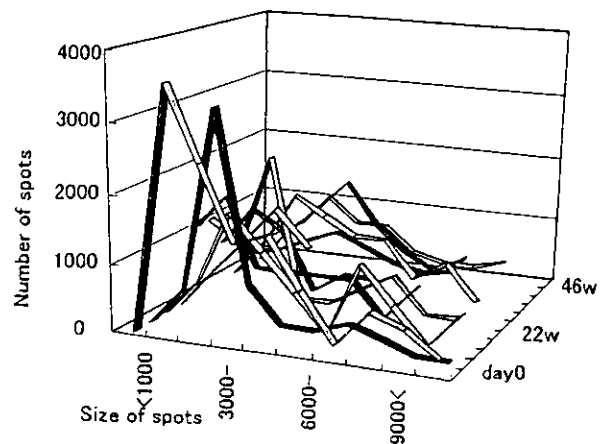


図6. 症例1のTNF- α 産生細胞スポットの総面積

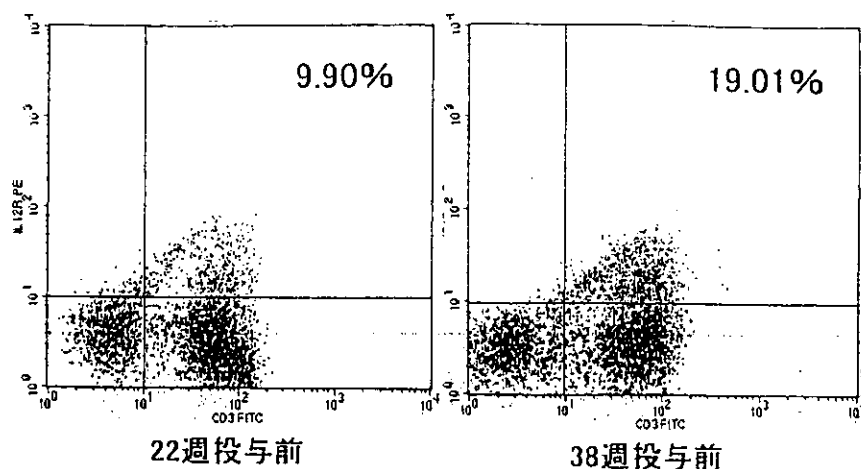
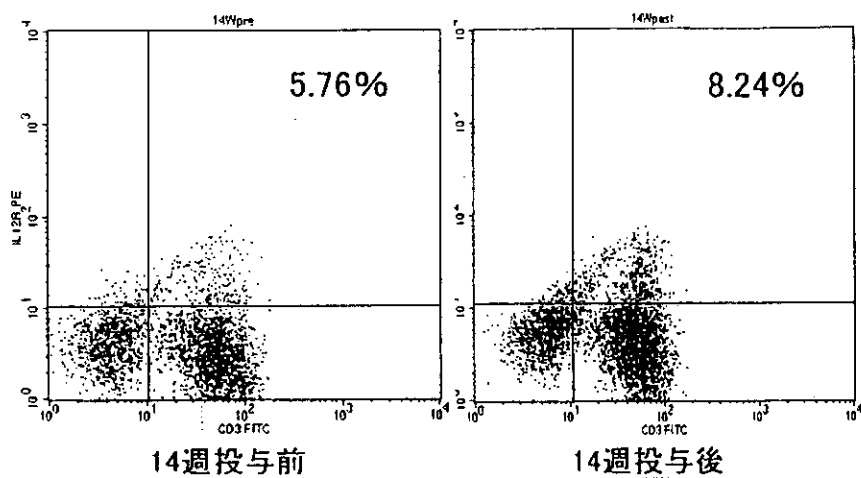


図7. 症例2におけるCD3陽性細胞上のIL-12R発現

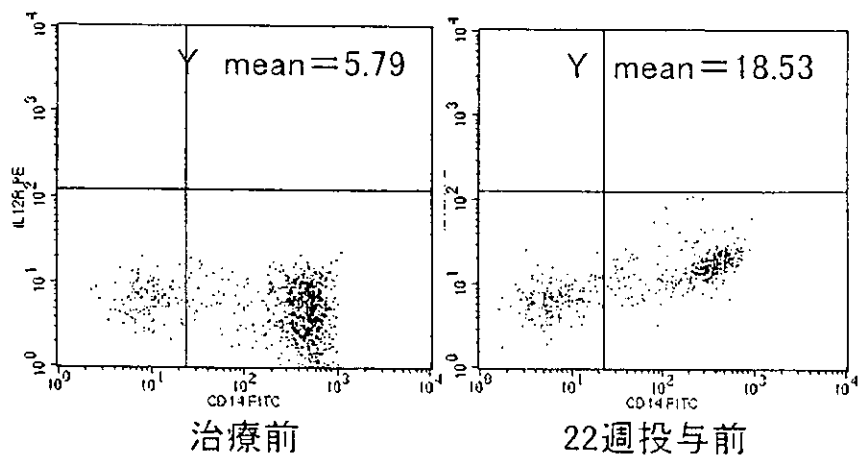


図8. 症例3におけるCD14陽性細胞上のIL-12R発現

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

ベーチェット病に関する調査研究
—ファージクローンによるIL-6阻害分子の開発—
分担研究者 吉崎 和幸 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 教授

ベーチェット病の分子的病態に着目し、平成5年以来その新規治療法の開発を目指している。本疾患ではTNF α の高値が認められる。また、特種型である神経ベーチェットに於いてはIL-6がその病態に関与する事が示唆されている。そこで、これらのサイトカインの機能阻害による病態の治癒が期待される。抗TNF α 抗体や抗IL-6受容体抗体を用いた治療はこのような知見から非常に有効な治療手段と言える。しかし、これらの抗体は高分子であるため投与方法に制限が生じる。そこで、我々はより利便性の高い阻害剤の開発を目指している。まず、7アミノ酸から成る低分子ペプチドを発現するM13ファージライブラリーを用いたファージディスプレイ法により、抗IL-6抗体に特異的結合能を持ちIL-6依存性増殖ヒトT細胞株であるKT-3細胞の増殖を抑制するクローンを数種得た。得られたクローンの発現するペプチドはXWWKHIWQという基本アミノ酸配列を持つ疎水性の高い1kD以下の低分子ペプチドである。ペプチドのみによる阻害能の有無を検討するために合成ペプチドを作成し、これらについてもKT-3細胞のIL-6依存的細胞増殖を阻害するか否かを検討した。その結果、今回合成したペプチドではリガンド特異性は確認されなかった。次に、ヒト抗体を用いたサイトカイン阻害剤としてsingle chain fragment variant (scFv：H鎖とL鎖の可変部のみの遺伝子を結合させた異型抗体)を導入した抗体ファージライブラリーを用いてIL-6に結合するscFvの発現クローンを得る方法を確立した。これらのscFvからKT-3細胞のIL-6依存的細胞増殖阻害能を持つクローンを選別した。今後、これらの細胞増殖阻害のIL-6の特異性について更なる検討を重ねたい。

A. 研究目的

我々は平成5（1997）年よりベーチェット病の病態にサイトカインの異常産生が関与している事を示している。現在までにベーチェット病においては病態の基礎にTNF- α の産生亢進が認められる事が報告されており、大野班長を中心とした抗TNF- α 抗体を用いた治療によってその病態の改善が期待できる状態にある。また、ベーチェット病の中には

特殊型として神経ベーチェットがある。この治療については現在大変難行している。ところで、神経ベーチェットの場合には橋本先生らによって髄液中におけるIL-6の亢進が観られる事が報告されている。従って、神経ベーチェットの病態にIL-6が関与している事が考えられる。そこで、この高値を示すIL-6の働きを抑える事によってこれらの病態の軽減が望まれる事が考えられる。我々は、IL-6高値により引き起こされると考えられる慢性関節リウマチやCastleman病などの疾患においてヒト型化抗IL-6受容体抗体(MRA)を用いた臨床治療により、非常に良好な病態改善が観られる事を確認している。

このヒト型化抗IL-6受容体抗体を治療に用いる事が望まれるが、イムノグロブリンは高分子(約

150kD)であり血管脳関門を通過する事ができないため、これらの投与方法が血中ではなく髄腔への直接投入という形に限られる。

そこで、我々はより安価で経口可能かつ安全性の高い低分子製剤を得る事を目的とし、7アミノ酸からなるペプチドを発現するファージライブラリーを用いphage display法を用いるIL-6結合阻害剤を探索する研究を行ってきた。現在は、前回までに得た、IL-6特異結合能を持つファージクローンの発現するペプチドと同様の配列を持つ合成ペプチドを作成し、これらの生体に与える影響について検討を行っている。

B. 研究方法

1. 抗ヒトIL-6モノクローナル抗体特異的結合能を持つ合成ペプチドの作成

現在までに、抗IL-6抗体をリガンドとしたランダム7merのペプチド融合ファージを用いたファージディスプレイ法により、IL-6依存性増殖を示すヒトT細胞、KT-3のIL-6依存的細胞増殖を特異的に阻害する6つのファージクローンを得ている。そこで、これらのファージクローンの発現しているペプ

チド配列を基にし、同様のアミノ酸配列を持つ5種の合成ペプチドを作成した。合成ペプチドのアミノ酸配列について以下に示す。(表1)

表1：新規合成ペプチドのアミノ酸配列

Pep tide No.	CXXXXXXXXC
No. 1	SACPWNKSNQCGRR-NH ₂ (15mer)
No. 7	SACSWNKQWQCGRR-NH ₂ (15mer)
No. 14	SACDWRKRRQCGRR-NH ₂ (15mer)
No. 37	SACPWNKMWQCGRR-NH ₂ (15mer)
No. 37-Ser	SASPWNKMWQSGRR-NH ₂ (15mer)

2. 合成ペプチドによるIL-6依存性増殖阻害

上記合成ペプチドのIL-6依存性細胞増殖に与える影響について調べた。

1) IL-6依存性ヒトKT-3細胞増殖阻害

IL-6依存的増殖性ヒトT細胞株であるKT-3細胞に合成ペプチドを25μM、50μM、100μM、200μM、400μMの濃度で加えその後80pg/ml又は250pg/mlのrhIL-6を加えて4日間培養し、WST-8アッセイを行い増殖抑制の有無を検討した。完全阻害のコントロールとして10μg/mlのヒト型化抗IL-6受容体抗体(MRA)を用いた。

また、以下の2種の実験を行った。KT-3細胞の増殖がIL-2にも依存性を持つことから、IL-6の場合と同様の濃度のペプチドを加え、KT-3細胞のIL-2依存性増殖に対するペプチドの機能を調べた。加えたIL-2の濃度は10ng/mlである。IL-5依存的細胞増殖を示すヒト赤白血病細胞であるTF-1細胞を用い、同様に実験を行った。加えたIL-5の濃度は500pg/mlである。

3. 抗体ファージライブラリーの作成

ヒト末梢Bリンパ球から免疫グロブリンのH鎖及びL鎖可変部遺伝子(V_H、V_L)をPCR法を用いて増幅し、それをファージ蛋白発現ベクター、pCANTAB 5Eに無差別に挿入結合し抗体ファージライブラリーを作成した。

各ファージクローンはそれぞれのV_HとV_Lの組み合わせの蛋白としてファージの表面に発現させた。

4. 抗体ファージライブラリーを用いたIL-6結合ファージクローンの選別

rhIL-6をコートしたプラスチックプレートにM13ファージライブラリーと同様の方法でIL-6結合クローンを得た。IL-6への結合クローンを得た。IL-6への結合特異性はIL-6以外に、ヒトアルブミ

ン、AB血清、MCP-1、MIP-1α、ヒトIgG、ゼラチン、スキムミルク等をコートしたマイクロプレートを用い、抗E-Tag抗体(全てのV_H+V_LにE-Tag遺伝子を結合させた)で特異結合を検出した。

5. IL-6特異的結合能を持つscFvによるIL-6依存性増殖細胞の増殖阻害の検討

ファージを用いたアッセイで得られたIL-6結合能を持つG3-2及びMLB-11というscFvをヒトIL-6依存性増殖細胞であるKT-3細胞にかけ、80pg/mlの濃度のrhIL-6を加えて4日間培養し、³H-thymidineアッセイを行い増殖抑制の有無を検討した。コントロールとしてIL-6結合を示さないscFvのTRG67を用いた。

6. 倫理面への配慮

本研究を行うにあたり、ファージライブラリーの作成、プラスミドの作成は鹿児島大学工学部・遺伝子組み換え実験許可施設で行われ、杉村和久先生による申請が許可されている。大阪大学健康体育部においては、すでに作成されたクローンをを用いて増殖阻害実験が行われ、特に規制は受けない。その他、現在のところすべてin vitroの研究で、倫理上問題となることはないと考えられる。

C. 研究結果

1. 合成ペプチドによるIL-6依存性細胞増殖抑制の検討

1) ヒトKT-3細胞(IL-6及びIL-2依存増殖)

250pg/mlのrhIL-6存在下で25μM、50μM、100μM、200μM、400μMの濃度の合成ペプチドを添加し、ペプチドのKT-3細胞増殖に与える影響について検討した。図1上に示すように合成ペプチド#1、#37はKT-3のIL-6依存性細胞増殖を抑制する。

一方、10ng/mlのrhIL-2存在下で合成ペプチドのKT-3細胞増殖に与える影響について検討した。図1下に示すように、合成ペプチド#1、#7、#37はKT-3のIL-2依存性増殖を抑制することが示された。これらのことから、今回合成したペプチドがKT-3のIL-6依存性増殖(上図)、IL-2依存性増殖(下図)において、ほぼ同様に細胞増殖を阻害する事が示された。

2) ヒトKT-3細胞(ヒトIL-6受容体を表現)

KT-3細胞のIL-6依存性増殖を阻害するファージクローンが発現するペプチドの配列を基に合成した5つのペプチドによる80pg/mlのrhIL-6存在下でのKT-3細胞増殖阻害能を検討したところ、図2右に示すように、100μMの濃度のペプチド#37について細胞増殖阻害が観られ、図1の結果が再現された。

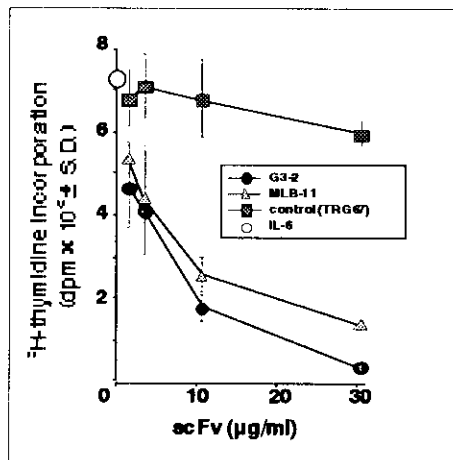
3) ヒトTF-1細胞(IL-5依存増殖)

500pg/ml の IL-5 存在下で合成ペプチドの TF-1 細胞の増殖に与える影響について検討したところ、図 2 左に示すように 100 μ M の濃度では #37 に IL-5 依存的細胞増殖阻害能がない事が示されたが、200 μ M の高濃度では増殖阻害能が示された。

2. IL-6 特異的結合能を持つ scFv による IL-6 依存性増殖細胞の増殖抑制の検討

80pg/ml の rhIL-6 存在下で scFv の KT-3 細胞の増殖に与える影響について検討した。結果を図 3 に示す。この結果から、IL-6 特異的結合能を持つ G3-2、MLB-11 という scFv には KT-3 の IL-6 依存的細胞増殖抑制能がある事が示された。

図3：IL6特異的結合性scFvによるIL-6依存性KT-3細胞の細胞増殖阻害



D. 考察

ファージディスプレイ法を用いて得た IL-6 特異的結合能を持つファージの示すペプチドと同様の配列を持つ合成ペプチドを用いた IL-6、IL-2 依存性ヒト T 細胞株 KT-3 の細胞増殖阻害実験により、合成ペプチドの IL-6 依存性細胞増殖阻害能についても検討した。その結果、rhIL-6 添加時の KT-3 細胞ではペプチド #1、#7、#37 においてペプチドの濃度依存的細胞増殖阻害が観られた。ペプチド #37 の阻害活性は 80pg/ml の rhIL-6 存在下で 100 μ M 以上の濃度のペプチドを加えた場合に観られる。しかし、KT-3 細胞の IL-2 による細胞増殖阻害実験においても IL-6 添加時と同様にその細胞増殖阻害を示すことが明らかとなった。また、ペプチドの機能のリガンド特異性を示す事を目的とし、IL-5 依存性細胞増殖能を持つヒト赤白血球細胞株である TF-1 の IL-5 依存性細胞増殖阻害能について検討した。TF-1 に 500pg/ml の IL-5 を加えた実験では、ペプチド #37 において 100 μ M の濃度のペプチドを加えた場合に細

胞増殖の阻害は観られなかったが、200 μ M の濃度のペプチドを加えた場合にはその細胞増殖阻害が観られた。ファージが発現しているペプチドが疎水性の高いアミノ酸配列を持つことから、その疎水性の性質の緩和による水溶液中でのペプチドの安定性のため、合成したペプチドには 5 から 6 残基の親水性アミノ酸が付加されている。今回細胞増殖阻害の見られなかったペプチド #14 には 5 残基のアミノ酸の付加が行われており、増殖阻害の見られた #1、#7、#37 には 6 残基のアミノ酸が付加されている。また、我々は以前に 5 残基のアミノ酸の付加が行われているペプチド #1 が緩やかに IL-6 依存的 KT-3 細胞の増殖阻害をかけるのに対し、6 残基のアミノ酸の付加が行われているペプチド #1 は IL-6 依存的 KT-3 細胞に強い増殖阻害をかける事を確認している。ファージを用いた実験においてはヒト IL-6 依存性細胞である KT-3 においては細胞増殖阻害が見られたが、マウス IL-6 依存性細胞である MH-60 においては細胞増殖阻害は見られなかった。これらのことから、ペプチド発現ファージにはヒト IL-6 特異的阻害能がある可能性が考えられるが、これらを合成ペプチドにした時点で何らかの細胞毒性が生じたことが考えられる。これらの結果から、今回合成したペプチドの細胞増殖阻害活性の IL-6 に対するリガンド特異性についてはその疎水性の性質の緩和による水溶液中でのペプチドの安定性のため付加されている 6 残基の親水性アミノ酸の配列の検討を含め、今後、更なる検討を重ねる必要があると思われる。IL-6 特異的結合能を持つ scFv の KT-3 細胞の IL-6 依存的増殖阻害活性については、今回得た G3-2、MLB-11 というクローンについて濃度依存的な細胞増殖阻害能が認められる事が示された。今後、この細胞増殖阻害活性のリガンド特異性について、IL-6 非依存的細胞増殖に対するこれらの scFv の阻害活性を検討する事により確認したい。なおすでにヒト scFv を用いた治療としては TNF α に対する阻害剤 (D₂E₆) が開発されている。ベーチェット病の病態の中心的因子として TNF α の異常産生が関与すると考えられている。従って、本法による低分子サイトカイン結合阻害剤の開発はより簡便で広く利用価値の有る治療法の開発に繋がるものと期待する。また、IL-6 の低分子阻害剤の開発により、神経ベーチェットのように IL-6 がその成因として考えられている疾患に対する新しい治療法の提供が可能になるものと期待する。

E. 結論

抗 IL-6 抗体に特異的結合能を有するペプ

チド発現ファージの示す低分子ペプチドを基にして合成した15残基から成るペプチドには細胞増殖阻害能があることが明らかとなった。そのリガンド特異性については安定化のため付加したアミノ酸の配列を含め更なる検討を重ねたい。

IL-6 特異的結合能を有する scFv については、今回その IL-6 依存性増殖細胞の細胞増殖阻害能について確認された。今後、そのリガンド特異性や安全性、安定性についての検討を重ねたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 吉崎和幸. ポストゲノム創薬・治療への方向. *BIO INDUSTRY* 18:49-55, 2001.
- 2) 杉本正道, 西本憲弘, 吉崎和幸. IL-6 を標的とした分子治療. *Molecular Medicine* 38:410-417, 2001.
- 3) 奥畑聡子, 吉崎和幸. 第3章:増殖因子/サイトカイン:インターロイキン-6. *Vascular Biology ナビゲーター* (丸山征郎, 安藤譲二, 佐藤靖史編). 東京: メディカル・レビュー p120-121, 2001.
- 4) 菅又泰博, 西本憲弘, 伊藤裕章, 吉崎和幸. サイトカイン療法. 先端医療シリーズ 11「消化器疾患の最新医療」(幕内雅敏, 川野淳, 千葉勉, 中村仁信, 森正樹編). 東京: 先端医療技術研究所. p20-26, 2001.

2. 学会発表

- 1) Nishimoto N, Nakahara H, Shirai T, Yoshizaki K. Angiostatic effect of anti-IL-6 receptor antibody therapy via reduced VEGF production from plasma cells in Castelman's disease. *Keystone Symposia*. April 24-29, 2001. Keystone, USA.
- 2) Sugimura K, Gejima R, Nakasima T, Hashiguchi S, Ito Y, Okuhata S, Nishimoto N, Yoshizaki K. IL-6-binding motif peptides inhibiting the signaling of human IL-6 to human IL-6 receptor but not murine IL-6 receptor. 11th International Congress for Immunology. July 22-27, Stockholm, Sweden.
- 3) Sugamata Y, Nakahara H, Katsume A, Sugimoto M, Yoshizaki K, Nishimoto N. Anti-IL-6 receptor antibody treatment improves interstitial lung diseases in IL-6 transgenic mice. *The Cytokine Odyssey 2001*. November 8-11. Hawaii, USA.
- 4) Nishimoto N, Maeda K, Deguchi H, Imai N, Kuritani T,

Kakchi T, Sato B, Suemura M, Kishimoto T, Yoshizaki K. Safety and Efficacy of repetitive treatment with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody (MRA) in rheumatoid arthritis (RA). 65th National Scientific Meeting of American College of Rheumatology. November 11-15, 2001. San Francisco, USA.

5) Iwamoto M, Nara H, Hirata D, Okazaki H, Kano S, Minoto S, Nishimoto N, Yoshizaki K. Dramatic improvement of intractable adult-onset Still's disease by intravenous humanized anti-interleukin 6 receptor antibody (MRA). 65th National Scientific Meeting of American College of Rheumatology. November 11-15, 2001. San Francisco, USA.

6) Yokota S, Miyamae T, Imagawa T, Nishimoto N, Yoshizaki K, Mori M. Therapeutic efficacy of humanized anti-IL-6-receptor antibody in systemic juvenile idiopathic arthritis. 65th National Scientific Meeting of American College of Rheumatology. November 11-15, 2001. San Francisco, USA.

7) 吉崎和幸. 抗 IL-6 レセプター抗体による RA の治療. 第45回日本リウマチ学会. 2001.5.14-16. 東京.

8) 吉崎和幸. IL-6 阻害療法における抗体阻害薬から低分子阻害薬への展開. 第17回日本 DDS 学会. 2001.7.12. 大阪.

9) 吉崎和幸. IL-6 と免疫疾患. 第29回日本臨床免疫学会. 2001.12.10. 大阪.

10) 源島龍, 田中孝一, 橋口周平, 伊東祐二, 奥畑聡子, 吉崎和幸, 杉村和久. ペプチドあるいはヒト一本鎖抗体ファージライブラリーを用いた IL-6 シグナルリング阻害分子の検索. 第31回日本免疫学会. 2001.12.11-13. 大阪.

11) 吉崎和幸, 西本憲弘, 奥畑聡子, 源島龍, 伊東祐二, 杉村和久. 厚生省特定疾患対策研究事業「ベーチェット病調査研究班」平成13年度第1回研究会. 2002.1.9-10. 札幌.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

吉崎和幸, 杉村和久. IL-6 シグナル伝達拮抗ペプチド. 出願中.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究要旨：ペーチェット病患者の口腔内から分離された *S.sanguis* KTH-1 株より同定された Bes-1 抗原は、網膜関連抗原 Brn3b との相同性領域を有する。我々は、結節性紅斑様皮疹を中心とした皮膚病変部における Bes-1DNA の検出を PCR により検討し、さらに組織学的な検出を試みた。ペーチェット病患者 3 例、非ペーチェット病患者 1 例の皮膚病変部組織より Bes-1DNA が検出された。同様の組織上では、in situ PCR により、真皮血管壁に Bes-1DNA 陽性細胞を検出した。Bes-1 抗原の DNA 断片が一部のペーチェット病患者の皮膚病変部において検出されたことは、口腔内に常在する *Streptococcus sanguis* が網膜以外の皮膚病変部の形成にも深く関与している事が示唆された。今後、Bes-1DNA 陽性細胞のさらに詳細な解析が必要と思われる。

分担研究者：金子史男（福島医大皮膚科学教室）

共同研究者：東條理子 鄭学毅 秋葉均 山口重紀 尾山徳孝 佐藤正隆 中村兎一郎（福島医大皮膚科学） 磯貝恵美子（北海道医療大学歯学部口腔衛生学）

A.背景：ペーチェット病の病態形成における溶連菌関連抗原の関与についての報告は多く、我々は以前、溶連菌抽出抗原を用いた皮膚テストで、ペーチェット病患者が強陽性を示すことと同時に、皮膚病変部に溶連菌抗原を蛍光抗体により検出した¹⁾。その後、ペーチェット病患者に特有の *S.sanguis* 株が報告され²⁾、これをもとにペーチェット病患者由来の *S.sanguis* から、新たな抗原蛋白が同定された³⁾。ペーチェット病患者の口腔内から分離された *S.sanguis* KTH-1 株より同定された Bes-1 抗原は、網膜関連抗原 Brn3b との相同性領域を有する³⁾。

B.研究目的：Bes-1 抗原のペーチェット病皮膚病変部形成への関与について、分子生物学的、免疫組織学的に検討をする。

C.方法：ペーチェット病患者 9 例、非ペーチェット病患者 10 例の皮膚病変部組織より抽出した

DNA を用いて、Brn3b 相同領域を含んだ Bes-1DNA 断片を PCR により検出する。同様に患者 PBMC、血清中における Bes-1DNA の検出を行う。さらに、Brn3b 相同領域ペプチドに対する抗血清を用いて、同組織上での Bes-1 抗原を免疫組織学的に検索する。また、in situ PCR を用いて、Bes-1DNA の局在を組織上で同定する。

D.結果：ペーチェット病患者 3 例と、非ペーチェット病患者 1 例において、皮膚病変部組織中に Bes-1DNA が検出された。これらは同患者末血中、及び血清中には認められず、また、抗血清を用いた検討においても、組織上での Bes-1 抗原は検出されなかった。しかし、in situ PCR により、真皮血管壁に Bes-1DNA 陽性細胞を検出した。

E.考察：Bes-1 抗原の DNA 断片が一部のペーチェット病患者の皮膚病変部において検出されたことは、口腔内に常在する *Streptococcus sanguis* が網膜以外の皮膚病変部の形成にも深く関与している事が示唆される。

F.研究発表：

ペーチェット病に関する調査研究：平成 13 年度第 2 回研究会（H14.1.10、札幌）

文献

- 1) Kaneko F, Takahashi Y, Muramatsu Y, Miura Y. Immunological studies on aphthous ulcer and erythema nodosum-like eruptions in Behcet's disease. *Br J Dermatol* 1985; 113: 303-12.
- 2) Isogai E, Ohno S, Takeshi K, et al. Close association of *Streptococcus sanguis* uncommon serotypes with Behcet's disease. *Bifidobacteria Microflora* 1990; 9: 27-41.
- 3) Yoshikawa K, Kotake S, Kubota T, Kimura K, Isogai E, Nobuhiro F. Cloning and sequencing of Bes-1 gene encoding the immunogenic antigen of *Streptococcus sanguis* KTH-1 isolated from the patients with Behcet's disease. *Zent bl Bakteriologie* 1998; 287: 449-60.

図の説明

図1. *Streptococcus sanguis* と分子相同性を示す網膜抗原同定へのアプローチ

Behcet 病患者由来の *Streptococcus sanguis* (KTH-1 株) から菌体 DNA を抽出し、EcoRI で切断後 λ gt11 に挿入し DNA ライブラリーを作製。これを感染させた大腸菌プレートに IPTG により蛋白発現誘導後、眼症状を有する Behcet 病患者血清を 1 次抗体としてイムノスクリーニングを行い、シークエンスにより同定された抗原蛋白を Bes-1 と命名した。

図2. Bes-1 とヒト網膜関連抗原 Brn3b とのアミノ酸配列相同性。

Bes-1 のアミノ酸配列からヒト網膜関連抗原である Brn-3b との相同性が示され、相同性の高い 2 箇所のアミノ酸配列から 4 つのペプチドを合成し、それらの抗血清を皮膚病変部における免疫組織学的検討に供した。

図3. 対象患者

ベーチェット病患者 9 例と、非ベーチェット患者 10 例の皮膚病変部組織より DNA を抽出した。

図4. 方法

用いた PCR プライマーは Brn3b 相同領域を含み、nested PCR を施行した。シークエンスの確認は Pst-1 消化による PCR-RFLP により行った。

図5. PCR 結果

ベーチェット病患者 3 例(完全型 1 例、不全型 1 例、疑い例 1 例)と非ベーチェット病患者 1 例(蜂か織炎)の皮膚病変部において Bes1DNA を検出した。

図6. PCR 及び PCR-RFLP 結果

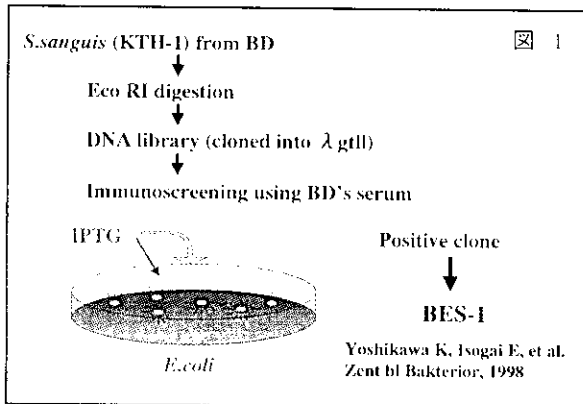
S.sanguis の表皮からの混入を考慮して、表皮を Micro-dissection により除去した組織を用いて PCR を施行したが、同様に Bes1DNA を検出し、いずれも Pst-1 消化による PCR-RFLP でシークエンスの確認を行った。

図7. RT-PCR 及び免疫組織の結果

凍結標本保存のある組織については全ての患者で mRNA より cDNA を合成し、同様のプライマーを用いて RT-PCR を施行したが全て陰性であった。また、Brn3b 相同領域に対する抗血清を用いた免疫組織においてもいずれも皮膚病変部組織上明らかなシグナルは認めなかった。

図8. Bes-1 in situ PCR 結果

皮膚病変部組織上にて同様のプライマーを用いた in situ PCR を施行したところ、結節性紅斑様皮膚疹の真皮上層から下層の血管壁及び浸潤細胞の一部に Bes-1DNA 陽性細胞を検出した。



Amino acid sequence similarity of BES-1 to Brn-3b ☒ 2

Identities=9/15(60%), Positives=10/15(66%)

BES-1	229	AFIVPHGGHFHYIPK	243
		** * * * *	
Brn-3b	11	AFSMPHGGSLHVEPK	25

Identities=6/13(46%), Positives=7/13(53%)

BES-1	373	HGDHHHFIPYDKL	385
		* * * * * + *	
Brn-3b	177	HHHHHHHQP HQAL	189

Patients ☒ 3

Behcet's disease (BD) : 9 cases

- Erythema nodosum-like eruption : 5 cases
- Oral aphtha : 2 cases
- Genital ulcer : 3 cases
- Folliculitis : 3 cases

Non-Behcet's disease (non BD) : 10 cases

- Erythema nodosum : 5 cases
- Sweet's disease : 3 cases
- Phlegmone : 1 cases
- Kaposi's varicelliform eruption : 1 cases

Methods ☒ 4

PCR primers


BES-1-1 F: AAA GGA TAA AAG ACA ATC ATG
R: GAG ACG GCA GAA GCG GAT TAG
※Brn-3b homologous lesion 1を含む。

BES-1-2 F: TAA TAA CCC TGA CCA AGC CTA
R: CCC TTT CAA AAG TCA TAA ATC

RFLP Pst-1 digestion

Results (1) ☒ 5

M 4 7 8 9 26 Bes1



No.4 (29y.M): Genital ulcer (BD-incomplete)
Necrotizing lymphadenitis を合併。

No.7 (47y.F): Erythema nodosum-like eruption (BD-suspected)


No.8 (47y.F): Oral aphtha

No.9 (23y.F): Phlegmone (non-BD)

No.26(49y.F): Erythema nodosum-like eruption (BD-complete)

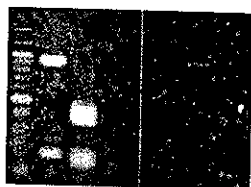
Results (2) ☒ 6

M 4 4' 7 7'



4, 7 : epidermis (+)
4', 7' : epidermis (-)

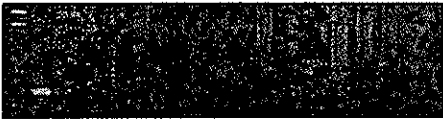
M Bes1 No.7



RFLP (Pst-1 digestion)

Results (3) ☒ 7

RT-PCR
M Bes1



Immunohistochemistry
No positive signals

Results (4) ☒ 8

In situ PCR

