

厚生労働科学研究費補助金
(免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)

免疫疾患に対する免疫抑制療法等先端的新規治療法に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山本一彦

平成15年3月

目 次

I. 平成14年度総括研究報告書 -----	3
免疫疾患に対する免疫抑制療法等先端的新規治療法に関する研究 東京大学大学院医学系研究科内科学専攻 主任研究者 山本 一彦	
II. 平成14年度分担研究報告	
T細胞レセプター遺伝子移入による自己免疫疾患の新規治療法の開発 -----	9
東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 山本 一彦	
難治性自己免疫疾患に対する造血幹細胞移植に関する研究 -----	13
北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学 小池 隆夫	
変異ペプチドを用いた免疫難病の治療アプローチに関する研究 -----	21
筑波大学臨床医学系内科 住田 孝之	
自己免疫疾患のNKT細胞糖脂質リガンド療法開発に関する研究 -----	24
国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 山村 隆	
抗原特異的CD8T細胞の細胞増殖とその制御に関する研究 -----	27
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科生体応答調節学 上阪 等	
制御性T細胞に関する研究 -----	31
京都大学再生医科学研究所 坂口 志文	
SLEに対する抗体療法、拮抗薬療法に関する研究 -----	34
産業医科大学医学部第一内科学講座 田中 良哉	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	37
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	45

I. 平成14年度総括研究報告

免疫疾患に対する免疫抑制療法等先端的新規治療法に関する研究

主任研究者 山本 一彦 東京大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨 欧米に比べ我が国で研究が遅れている全身性自己免疫疾患を中心とした免疫難病に対する新規治療法の確立・開発を推進した。我が国では免疫の治療法開発という領域独自の専門家がまだ十分でないことから、本研究では我が国のこの領域に近い代表的な基礎免疫学者と臨床免疫学者の比較的少人数で研究班を構成し、動物モデルから実際の患者への治療までの種々の段階の現状と基礎的技術を応用することの問題点を議論しながら、技術的な交流を進めつつ、それぞれが研究している新規治療法の確立と臨床応用を推進した。具体的には我が国から基礎免疫的にオリジナルな新規治療概念としてすでに報告され研究が始められている T 細胞レセプター遺伝子導入、CD25 陽性 CD4 陽性制御性 T 細胞、改変リガンドによる NKT 細胞刺激、細胞周期遺伝子導入などとともに、欧米でも同様な報告はあるが我が国で特に解析が進んでいる T 細胞認識抗原の同定とその改変ペプチドによる病因 T 細胞へのトレランス誘導、細胞表面分子やケモカインに対する抗体や拮抗薬療法、さらに欧米でも実際に治療が開始されているが我が国独自の改良法を目指す末梢血幹細胞移植について、それぞれが近未来的に実際の治療応用に到達することを目標に、その研究・開発を推進した。

分担研究者

小池隆夫 北海道大学大学院 教授
住田孝之 筑波大学臨床医学系内科 教授
山村 隆 国立精神神経センター神経研究所 部長
上阪 等 東京医科歯科大学大学院 助教授
坂口志文 京都大学再生医科学研究所 教授
田中良哉 産業医科大学医学部 教授

A. 研究目的

全身性自己免疫疾患を中心とした免疫難病についての現在の治療法は、副腎ステロイドや免疫抑制薬が中心であり、一定の効果はあるものの、免疫系全体に対する抑制作用などの副作用が患者にとって不利に働くことが少なくない。したがって、より選択的、特異的で副作用の少ない治療法を開発することは緊急の課題となってい

る。しかし、我が国ではベンチャー企業の立ち後れ、基礎免疫と臨床免疫の相互交流の少なさなどから、この方面の研究が進んでいないのが現状である。そこで、本研究は、我が国で確立されつつあるオリジナルな概念を中心に、近未来的に実際の患者に応用可能な先端的新規治療法について、ヒト及びモデル動物での治療法を確立する事を目的とした。

B. 研究方法

山本は、全身性エリテマトーデスなどの動物モデルについて、病変臓器に浸潤している T 細胞クローンの動きを、独自に開発したクローン解析法で解析し、種々のパラメーターから病変特異的であると判定出来るクローンについて、その一つの細胞に

発現している T 細胞レセプターの 2 つの鎖の全長 cDNA をクローニングする技術の完成を目指した。さらに複数の遺伝子を効率よくリンパ球に導入出来るベクターの開発を進め、自己のリンパ球に 2 つの T 細胞レセプター遺伝子に加えて 3 つ目の機能遺伝子を導入することで、人工改変による抗原特異的機能的 T 細胞を作成する技術の完成を目指した。これにより全身性自己免疫疾患をはじめとする種々の免疫疾患に対する免疫細胞療法の技術が可能であることを示すことを目指した。

坂口はマウスの系で、自身が発見した CD25 陽性 CD4 陽性の制御性 T 細胞自体を制御する分子の検索と同定を行った。モノクローナル抗体の作成などと同時に、Foxp3 遺伝子に注目して、レトロウイルスベクターにて正常マウスのナイーブ T 細胞に遺伝子導入してその機能を調べた。山村は、すでに発表している OCH と同様に NKT 細胞を刺激する新規糖脂質を合成し、種々の免疫疾患を抑制できるものをスクリーニングした。これにより NKT 細胞が産生するサイトカインのバランスを調節することで、免疫疾患を制御する方法の確立を目指した。

住田はヒトや動物モデルで既に同定してきた病因 T 細胞が認識するエピトープについて、その配列を一部改変することで病因 T 細胞の機能を修飾する方法を検討した。具体的にはコラーゲンタイプ II のエピトープの検索とそれを改変したアナログペプチドを作成し、T 細胞株の反応を検討した。また α -アミラーゼなどの T 細胞エピトープをリコンビナント蛋白や合成ペプチドで決定した。

上阪は病態形成に関わる CD8 陽性 T 細胞に注目し、その増殖の速さの原因を追及した。DNA アレイ法、ウエスタンブロット法、フローサイトメトリ法などを用いて

CD4 陽性 T 細胞との差異を検討した。

田中は、B 細胞に注目し、フローサイトメトリ法にて細胞表面抗原、細胞内分子の同定を行うとともに、既に欧米では癌や一部の自己免疫疾患の治療に用いられている抗 CD20 抗体の全身性自己免疫疾患治療への適応を検討した。小池は、既に自らが確立している自家末梢血純化 CD34 陽性細胞移植による免疫疾患の治療法のさらなる改良を目指し、治療前後の免疫学的変化を自己抗体価、末梢血リンパ球表面マーカー、細胞内サイトカインの発現、DNA マイクロアレイによる種々の遺伝子変化などで解析した。

C. 研究結果

山本は難治性ループスモデルの NZBW F1 マウスの脾細胞に、ヌクレオソームに対する T 細胞レセプター遺伝子と抑制性の CTLA4Ig 分子をコードする遺伝子の 3 つを導入することで、抗原特異的抑制性 T 細胞を作成し、それを 1 回少数 NZBW F1 マウスに細胞導入することで腎炎の発症を抑制できることを始めて示した。このような制御性 T 細胞による治療法が可能であることが判明した。坂口は Foxp3 遺伝子を導入することにより、自らが発見し世界的に注目されている CD25 陽性 CD4 陽性制御性 T 細胞の発生、分化を司るマスター遺伝子の可能性を見いだした。山村は自己免疫疾患の制御で注目されている NKT 細胞を刺激する変異ペプチドについて、Nature に昨年発表したスフィンゴシン鎖の異なる OCH が、IL-4 を誘導するとともに、ヒト NKT 細胞にも効果があることを見いだした。

住田はコラーゲンタイプ II の T 細胞エピトープを決定し、アナログペプチドを作成し T 細胞株の反応を検討している。また Glucose-6-phosphate isomerase、 α -アミラー

ぜ、ムスカリン作動性アセチルコリン受容体のアピトープの決定を進めた。上阪は増殖の速い CD8 陽性 T 細胞を細胞増殖を制御するサイクリン依存性キナーゼ阻害因子の p27^{Kip1} の発現低下が認められることを明らかにし、さらに IL-10 受容体の発現低下がその原因の一部であることが推定された。

田中は SLE 患者 B 細胞が Th2 サイトカインと CD40-CD40L を解する経路で活性化され細胞死を免れていることを示した。また CD20 抗体を用いて重症 SLE 患者を治療した例を報告し、その有用性を示した。小池は強皮症 3 例の自己末梢血 CD34 陽性細胞移植について、特に皮膚硬化所見の明らかな改善が見られたが、自己抗体などは消失せず、むしろ高値になったり新たに出現したりするものもあり、移植後新たに自己免疫が発生する可能性を示した。

D. 考察

欧米では、免疫担当の細胞や分子に対するモノクローナル抗体療法、小分子の阻害薬、遺伝子療法、細胞療法など、多くの分野の技術・資源を動員して、免疫疾患に対する種々の治療法の開発が進められている。本研究にも含まれる骨髄幹細胞移植も数年前から実際の患者で治療研究が進められている。しかし、実際には少数の抗体療法を除いて未だに世界的に認められたものは多くないことから、さらに研究を進める必要性が提言されている。

一方、我が国では基礎免疫学は世界的なレベルにあるが、基礎免疫学と臨床免疫学を結びいわゆる応用免疫学の領域の発展が種々の理由で十分ではない。従来個々の研究室レベルからは、それぞれ新しい治療法の可能性についての検討の報告は散見されているが、研究者の組織または領域として新規治療法開発を推進するような土

壌がほとんどなかったのが現状である。そこで、本研究は我が国で独自の新規治療法の開発に積極的な一流の基礎免疫学者と一定のレベル以上の基礎的な研究を行いつつ疾患研究を進めている臨床免疫学者を比較的少数集め、近未来的に応用可能であることに焦点を絞り、お互いに情報・技術を交換しながら、それぞれが独自の治療法を目指した。一年目の成果としては、かなりの達成度であると思える。

E. 結論

これまで我が国から発したオリジナルな概念である、CD25 陽性 CD4 陽性制御性 T 細胞、NKT 細胞の制御法、T 細胞レセプター遺伝子導入、細胞周期遺伝子導入をはじめとして、欧米でホットに研究開発が展開されている末梢血幹細胞移植、抗体療法、変異ペプチドなどについて、それぞれの第一人者を集め、世界的に高いレベル研究を推進できた。また臨床への応用に関してはすでにヒトでの治療を始めているものから、マウスでの治療法の開発の段階までの種々の段階のものがあり、近未来的に応用可能なことを目指して、各段階での実際的な問題点を明らかにして、各プロジェクトがスムーズに開発に向けられるようにする必要がある。

F. 健康危険情報

分担研究者・小池隆夫の分担研究報告書に記載。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kawahata K, Misaki Y, Yamaguchi M, Tsunekawa S, Setoguchi K, Miyazaki J, and Yamamoto K. Peripheral tolerance to a nuclear autoantigen : dendritic cells expressing a nuclear autoantigen lead to

persistent anergic state of CD4⁺ autoreactive T cells after proliferation. *J Immunol.* 168: 1103-1112, 2002.

2) Kawahata K, Misaki Y, Yamauchi M, Tsunekawa S, Setoguchi K, Miyazaki J, and Yamamoto K. Generation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in the thymus and from nonautoreactive T cells by endogenous TCR expression. *J Immunol.* 168: 4399-4405, 2002.

3) Horita T, Tsutsumi A, Takeda T, Yasuda S, Takeuti R, Amasaki Y, Ichikawa K, Atsumi T, Koike T. Significance of magnetic resonance imaging in diagnosis of nodular regenerative hyperplasia of the liver complicated with systemic lupus erythematosus: a case report and review of the literature. *Lupus.* 11: 193-196, 2002.

4) Matsuura E, Kobayashi K, Kasahara J, Yasuda T, Makino H, Koike T. Shoenfeld Y. Anti-β2-glycoprotein I antibodies and atherosclerosis. *Int. Rev. Immunol.* 21: 51-66, 2002.

5) Shimizudani N, Murata H, Keino H, Kojo S, Nakamura H, Morishima Y, Sakamoto T, Ohtsuka M, Sekisawa K, Sumida M, Sumida T. and Matsuoka K. Conserved CDR3 region of TCR BV gene in bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin. Exp. Immunol.* 129:140-149, 2002.

6) Murata H, Matsumura R, Koyama A, Sugiyama T, Sueishi M, Shibuya K, Tsutsumi A, and Sumida T. T cell receptor repertoire of T cells in the kidney from patients with lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 46:2141-2147, 2002.

7) Araki M, Kondo T, Gumperz JE, Brenner MB, Miyake S and Yamamura T. Th2 bias of CD4⁺ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int. Immunol.*

15:279-288, 2003.

8) Sakaguchi S. Control of immune responses by naturally arising CD4⁺ regulatory T cells that express T_H1-like receptors. *J. Exp. Med.* 197:397-401, 2003.

9) Hori S, Nomura T, and Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor FOXP3. *Science.* 299:1057-1061, 2003.

10) Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, and Sakaguchi S. Stimulation of CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nature Immunol.* 3:135-142, 2002.

11) Toda Y, Tsukada J, Misago M, Kominato Y, Auron PE, Tanaka Y. Autocrine induction of the human prointerleukin 1β gene promoter by interleukin 1β in monocytes. *J Immunol.* 168:1984-1991, 2002.

12) Tanaka Y. Nakayamada S, Fujimoto H, Okada Y, Umehara H, Kataoka T, Minami Y. H-Ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibits integrin-mediated adhesion and induces apoptosis in osteoblasts. *J Biol Chem* 27:21446-21452, 2002.

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

分担研究者・坂口志文

Foxp3 発現リンパ球による免疫病の治療法（特許出願中）

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

Ⅱ. 平成14年度分担研究報告

T細胞レセプター遺伝子移入による自己免疫疾患の新規治療法の開発

主任研究者 山本 一彦 東京大学大学院医学系研究科アレルギー・リウマチ学 教授

研究協力者 藤尾圭志, 荒木靖人, 定形綾香, Yu Long 東京大学医学部アレルギー・リウマチ内科

研究要旨 自己免疫疾患患者の生体内で活性化し集積している抗原特異的 T 細胞の免疫応答をリアルタイムでとらえ、その T 細胞レセプターの遺伝子情報を獲得し、効率良くリンパ球に遺伝子導入し、さらに機能遺伝子も付加する技術を中心とした、抗原特異的 T 細胞再構築システムによる新たな治療法の開発のための基礎研究を行った。本年度は T 細胞レセプターおよび抑制性の機能遺伝子の 3 つの遺伝子導入により構築したヌクレオソーム特異的抑制性 T 細胞が、ループス腎炎モデルマウスを抑制可能であることを検証する実験を行った。

A. 研究目的

自己免疫疾患など免疫難病患者の生体内で活性化し集積している抗原特異的 T 細胞の免疫応答をリアルタイムでとらえ、その 1 つのクローンで発現している 2 つの T 細胞レセプターの遺伝子情報を獲得し、効率良くリンパ球に遺伝子導入する技術を中心とした、抗原特異的 T 細胞再構築システムを構築することによる新たな治療法の開発を目的とした。

すなわち我々がすでに確立している T 細胞クロナイプ検出法を用いて、自己免疫疾患患者の病変局所やモデル動物の脾細胞、病変などに集積している抗原特異的 T 細胞クローンの状況を、そこから採取した少量の RNA から把握した上で、重要と考えられるクローンについて、その一つの細胞で使われている T 細胞レセプターの α 鎖、 β 鎖の両方の塩基配列の全情報を得る技術と、それらを自らのリンパ球に遺伝子導入し抗原特異性を再構築すると同時に、サイトカインなど期待される機能遺伝子も導入できるベクターを確立することで

ある。

本研究で確立を目指している技術が可能になれば、今までと全く異なったリンパ球改変技術となり、自己免疫疾患だけでなく多くの免疫が関与する疾患での抗原特異的治療法に応用可能な、極めて有用な基盤技術になると考える。

B. 研究方法

目標とする全体のシステムは、以下の通りである。自己免疫疾患やそのモデル動物の生体内で活性化され病変局所や脾臓に集積している T 細胞クローンを検出し、その細胞で使われている T 細胞レセプターの α 、 β 鎖の全長 cDNA 情報を獲得し、レトロウイルスベクターに組み込む。これには RT-PCR/SSCP 法によるクロナイプ分析と単一細胞分離法を用いる。これらの T 細胞レセプター遺伝子を発現する感染性レトロウイルスベクターを作成し、マウスの脾細胞に遺伝子移入することで、抗原特異的 T 細胞レセプターを再構築し、さらにこの T 細胞に抑制性のサイトカインなど

の分子を規定する遺伝子を導入し、抗原特異的抑制性 T 細胞を構築する。次にこの細胞を生体内に移入することで、抗原特異的抑制機能を発揮し、自己免疫疾患に対して治療効果を発揮出来ることを確かめる。生体内の一つの細胞から 2 つの異なる遺伝子情報を獲得する方法は、過去に我々の研究室で試行が繰り返され、単一細胞分離法を中心として複数技術を確立しつつある。一方、レトロウイルスを用いた T 細胞レセプターの遺伝子導入に関しては、我々のチームは既に、2 つのベクターに別々に組み込んだ cDNA を用いて、通常のマウス脾細胞に遺伝子導入し、内因性の T 細胞レセプターの発現にうち勝ち 40% 以上の高率で両遺伝子を発現させ、さらに試験管内および生体内で機能を発現させることに成功している。

そこで本年は全体のシステムの後半の部分である、遺伝子導入により作成した抗原特異的機能性 T 細胞が、生体に投与され実際の疾患モデルを抑制できるかを検証した。

C. 研究結果

本年度は T 細胞レセプター遺伝子導入による自己免疫疾患治療が可能か否かを検証するために、モデル実験を行った。全身性エリテマトーデスは自己免疫疾患の代表的な存在であり、特に腎炎（ループス腎炎）は生命予後にも関わる難治性病態の一つとされている。このマウスモデルである NZB/W F1 マウスを用いた。ループス腎炎の病因として抗 DNA 抗体が最も重要とされているが、これを生じるための自己抗原として DNA と結合しているヌクレオソームが同定されている。そこで既に報告されているヌクレオソームに特異的な T 細胞レセプターの α 鎖、 β 鎖をその配列にしたがってクローニングし、別々のレトロウ

イルスベクターに組み込んだ。さらに抑制性分子として副刺激分子をブロックする CTLA4 を可溶化した CTLA4Ig を用いることとして同様にベクターに組み込んだ。これらの 3 つの遺伝子を NZB/W F1 の脾臓細胞に導入し、約 10% の CD4 陽性細胞が 3 つの遺伝子をすべて発現していることを確かめた。このようにして機能構築した細胞を 10 週齢の NZB/W F1 マウスの細胞移入して観察したところ、コントロールマウスでは 20 週齢より顕著になる蛋白尿が抑制され、30 週齢までそれが続いた。抗 DNA 抗体は抑制されたが、関連のない抗原の免疫に対しての応答には変化なかった。

D. 考察

従来 T 細胞の研究では、T 細胞クローンや T 細胞ハイブリドーマを樹立する方法が行われてきたが、クローン樹立までに大きな労力を要し、試験管の中での人為的バイアスがあり、実際の治療には不向きなことなどの問題点がある。

リンパ球集団で発現している T 細胞レセプター遺伝子の検出で現在用いられているのは、CDR3 領域の核酸の長さを分析する方法（CDR3 length analysis）が欧米を中心に行われている。これは、我々の SSCP 法を用いるクロノタイプ分析法と似ているが、一つ一つの T 細胞クローンの区別をすることは出来ず、従って本研究のような方向に向かって進展することは難しい。従って、本研究は今までの研究成果に立脚した独自の方法論の確立であり、極めて独創的なものである。

生体内の一つの細胞から 2 つの異なる遺伝子情報を獲得する方法は、過去に我々の研究室で試行が繰り返され、単一細胞分離法が一番安定してクローニング可能な方法であることが判明しつつある。レトロウイルスを用いた T 細胞レセプターの遺

伝子導入に関しても、我々のチームのシステムは現在のところ最も効率の良い方法とされている。本年度の研究により、T細胞レセプターの遺伝子移入のより人為的に作成された抗原特異的 T 細胞が実際の自己免疫疾患で抑制機能を果たしうることが示された。さらにこのような抗原特異的治療は全身の免疫機能に影響を与えないことが示された。以上の点から、本研究の目標である「T細胞レセプター遺伝子移入による自己免疫疾患の新規治療法」は大筋実現可能であると考えられる。

欧州でのレトロウイルスベクターを用いた、血液幹細胞への遺伝子導入によりリンパ腫の報告がなされている。我々が確立しつつある方法もレトロウイルスを用いるものであり、今後慎重に推移を見守る必要はあるが、末梢血への遺伝子導入ではこのような報告はないことと、将来的には自殺遺伝子をはじめ数種の安全システムを内蔵させておくことで安全性を高めることが可能であることから、研究の継続は問題ないと判断する。

E. 結論

T細胞レセプターおよび抑制性の機能遺伝子の3つの遺伝子導入により構築したヌクレオソーム特異的抑制性T細胞が、ループス腎炎モデルマウスを抑制可能であるかを示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kawahata K, Misaki Y, Yamaguchi M, Tsunekawa S, Setoguchi K, Miyazaki J, and Yamamoto K. Peripheral tolerance to a nuclear autoantigen : dendritic cells expressing a

nuclear autoantigen lead to persistent anergic state of CD4⁺ autoreactive T cells after proliferation. *J Immunol.* 168: 1103-1112, 2002.

2) Kawahata K, Misaki Y, Yamauchi M, Tsunekawa S, Setoguchi K, Miyazaki J, and Yamamoto K. Generation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in the thymus and from nonautoreactive T cells by endogenous TCR expression. *J Immunol.* 168: 4399-4405, 2002.

3) Kono H, Suzuki T, Yamamoto K, Okada M, Yamamoto T, and Honda Z. Spatial raft coalescence represents an initial step in FcγβR signaling. *J Immunol.* 169:193-203, 2002.

4) Takahama H, Masuko-hongo K, Tanaka A, Kawa Y, Ohta N, Yamamoto K, Mizoguchi M, Nishioka K, and Kato T. T-cell clonotypes specific for dermatophagoides pteronyssinus in the skin lesions of patients with atopic dermatitis. *Human Immunol.* 63:558-566, 2002.

5) Iikura M, Yamaguchi M, Hirai K, Suenaga A, Fujiwara T, Fujii T, Taketani Y, and Yamamoto K. Streptomycin-induced anaphylactic shock during oocyte retrieval procedures for in vitro fertilization. *J Allergy Clin Immunol.* 109:571-572, 2002.

6) Sekiya T, Yamada H, Yamaguchi M, Yamamoto K, Ishii A, Yoshie O, Sano Y, Morita A, Matsushima K, and Hirai K. Increased levels of a TH-type CC chemokine thymus and activation-regulated chemokine (TARC) in serum and induced sputum of asthmatics. *Allergy.* 57:173-178, 2002.

7) Nagase H, Miyamasu M, Yamaguchi M, Imanishi M, Tsuno NH, Matsushima K, Yamamoto K, Morita Y, and Hirai K. Cytokine-mediated regulation of CXCR4

expression in human neutrophils. J Leukocyte Biol. 71:711-717, 2002.

8) Yoshimura C, Yamaguchi M, Iikura M, Izumi S, Kudo K, Nagase H, Ishii A, Wall AF, Ra C, Iwata T, Igarashi T, Yamamoto K, and Hirai K. Activation makers of human basophils : CD69 expression is strongly and preferentially induced by IL-3. J Allergy Clin Immunol. 109:817-823, 2002.

9) Isobe H, Yamamoto K, and Cyong JC. Components of hachimi-jio-gan (ba-wei-di huang-wan) and changes in blood flow in the human central retinal artery. J Trad Med. 19:105-113, 2002.

10) Ohsima N, Nagase H, Koshino T, Miyamasu M, Yamaguchi M, Hirai K, Yamamoto K, Fujisawa T, Nakagawa N, and Morita Y. A functional study on CysLT1 receptors in human eosinophils. Int Arch Allergy Immunol. 129:67-75, 2002.

11) Desaki M, Sugawara I, Iwakura Y, Yamamoto K, and Takizawa H. Role of interferon-g in the development of murine bronchus-associated lymphoid tissues unduced by silica in vivo. Toxicol Appl Pharmacol. 185:1-7, 2002.

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

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

難治性自己免疫疾患に対する造血幹細胞移植に関する研究

分担研究者 小池 隆夫 北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学・第二内科 教授
研究協力者 天崎 吉晴 北海道大学医学部附属病院第二内科 助手

研究要旨 既存の治療に抵抗を示す難治性自己免疫疾患(全身性エリテマトーデス、全身性硬化症(強皮症))患者を対象として磁気細胞分離システム(AM9802)により純化した自家末梢血純化 CD34 陽性細胞移植を超大量免疫抑制療法(conditioning)に継いで行うことで、従来の治療法に抵抗性の症例に対する本治療法の有効性ならびに安全性を検討し、本邦におけるその標準的方法を確立することを目的とした。同時に免疫学的な解析を行うことにより難治性自己免疫疾患の病態への本治療法の作用機序の解明を試みた。現在までに全身性强皮症患者 3 例に対して自家末梢血純化 CD34 陽性細胞移植併用超大量免疫抑制療法を施行した。移植後、比較的早期より皮膚症状の改善が確認された。一方で、感染症、出血性膀胱炎等の治療合併症を認め、何らかの治療を要した。皮膚症状の改善と血清学的検査所見の推移に一定の傾向は認められず、本療法は単純な免疫系のリセットではなく複雑な病態修飾を介して作用することが示唆された。今後、症例の蓄積による治療の標準化が望まれるとともに、病態への影響および長期予後の更なる評価が必要である。

A. 研究目的

自己免疫疾患は、自己組織に反応してこれを傷害する自己反応性リンパ球クローンや自己抗体によって発症する自己免疫疾患と考えられ、その臨床像は多彩であり、現時点において根治的治療法は確立されていない。これまでのところ副腎皮質ステロイド剤や免疫抑制剤による免疫抑制療法が治療の主体となっており予後の改善が認められている。しかしながら、これらの治療法に抵抗を示す難治性症例も少なからず存在し、このような例は生命予後ならびに社会的予後が極めて不良である。こうした難治性症例の病態改善のため自己反応性リンパ球クローンの除去が有効であると考えられている。その 1 つの方法として造血幹細胞移植併用超大量免疫抑

制療法について、近年欧米の一部の施設でその有効性が評価されつつあるが、その作用機序や標準的実施法は未確立であり、また本邦における系統的な研究はなされていない。そこで本研究では、難治性自己免疫疾患に対する自家末梢血純化 CD34 陽性細胞移植併用超大量免疫抑制療法の治療法確立のため、その有効性、安全性を検討するとともに、免疫学的解析を行うことにより難治性自己免疫疾患への本治療法の作用機序の解明を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1.対象症例(表 1)

副腎皮質ステロイド剤、免疫抑制剤を含む既存の治療法に抵抗を示す全身性エリ

テマトーデス、強皮症等の自己免疫疾患患者を対象とする。治療実施に際しては、60歳以上、高度の心不全、コントロール不能な不整脈、高度の腎障害等を有する症例は除外例とする。また、事前に本人および家族へインフォームドコンセントを行い、文書による同意を得る。さらに当院医の倫理委員会判定委員会の承認した症例に限るものとする。

当科で適応症例となった3例の概要を示した(表1)。いずれも発症3年以内で高度の皮膚硬化を認め、さまざまな治療歴を有していた。

2. 治療法

Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF)単独もしくは、Cyclophosphamide (CPA) 2 g/m² x 2日間投与後 G-CSF併用で末梢血中へ血液幹細胞を動員(mobilization)、採取を行う。採取した末梢血幹細胞を磁気細胞分離システムを用いて CD34 positive selection を行い純化し凍結保存する。同時に CD34 純化を行わない末梢血幹細胞を back up 用として凍結保存する。CPA 200 mg/kg を4日間に分けて投与し移植前処置を行う。この際、出血性膀胱炎予防のため Mesna を併用する。前処置後、純化凍結保存しておいた自己末梢血 CD34 陽性細胞を輸注し、その後、G-CSF 投与を行い造血能の回復を促す。

3. 免疫学的検討

治療前後における末梢血リンパ球サブセットおよびサイトカイン産生能の変化を評価する。

C. 研究結果

1. 臨床症状

移植前後の理学所見および血清学的変化を含めた経過を示した(表2、図1、図2)。いずれの症例も造血能の回復は速やかであった。抗核抗体および抗 Scl-70 抗体(図

3)については、症例間に一定の傾向は認められなかった。皮膚所見については、3症例ともに modified Rodnan total thickness skin score (mRodnan TSS)で 25%以上の改善を認め、modified Health Assessment Questionnaire (mHAQ)についても症例3を除いて著明な改善を認めた。症例3については、移植後、全身状態の悪化のため、mHAQ の悪化を認めた。腎機能(図4)、呼吸機能より診た臓器障害に対する効果は、移植後、一過性に検査上低値を示すものの約1年で移植前値に復し、以降、安定して推移している。皮膚所見の改善と血清学的変化は必ずしも平行しないことが示唆された。

2. 安全性に関する検討

前述のプロトコールで mobilization を施行し、3症例ともに十分量の CD34 陽性細胞が採取され、移植後の造血能回復は速やかであった。移植後、全症例でサイトメガロウイルス抗原血症を認め、ガンシクロビルによる加療を行った。症例2については、移植後に血球貪食症候群の合併を認め、移植後7ヶ月後には自己免疫機序によると考えられる血小板減少を来した。症例3については、移植後、貧血を伴う出血性膀胱炎、心膜炎、心嚢液貯留による心機能低下、骨髄抑制を認め、最終的に自己末梢血幹細胞非選択移植を必要とし、長期入院による経過観察を要した。現在はいずれの症例も外来通院中であり、定期的全身精査で重篤な異常を認めていない。

D. 考察

膠原病をはじめとした自己免疫疾患に対する根治的治療は現時点では存在せず、副腎皮質ステロイド剤、免疫抑制剤等による免疫抑制療法により病態の改善が得られている。しかしながら、これらの治療に抵抗し生命的、社会的予後が不良な症例も

多く存在する。近年、このような難治性自己免疫疾患に対して造血幹細胞移植併用超大量免疫抑制療法が有効であることが報告されている。これまで、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、強皮症、成人発症ステイル病、筋炎等への治療成績が報告されており程度の差はあれ病態の改善が得られたとの報告が多い。強皮症に対する適応症例は1997年のTyndall A, et alによる報告が最初であり、2000年のEBMT/EULAR (European League Against Rheumatism and European Group for Blood and Marrow Transplantation)の報告によれば、約70%の症例でskin scoreで25%以上の改善が認められている。皮膚病変の著明な改善に比して臓器合併症への治療効果は確立しておらず、長期経過観察が必要である。また、強皮症においては、17%と報告されている高い治療関連死が問題として挙げられ、適応除外基準、移植前処置も含めて更なる検討が必要である。病態改善の機序は現時点では不明である。当初、超大量免疫抑制療法により異常な免疫システムを“破壊”し、自己反応性リンパ球クローンを除去した純化CD34陽性細胞を輸注することにより免疫システムの再構築を惹起するものと説明されたが、最近では有効性の機序は免疫システムの“調節”にあるものと推測されている。

自己免疫疾患に対する本治療法の現時点の問題点として、

1. 治療関連死が約10%存在すること。
2. 全症例に有効であるわけではないこと。
3. 有効と判断された症例においてもその長期予後および長期的合併症が不明なこと。
4. 日本人における至適薬剤の投与方法、投与量は確立していないこと。

等が挙げられる。今回本治療法を施行した強皮症3症例においても、治療期間内に特に移植後の免疫能の低下に関連した様々

な合併症がみられ、対策を必要とした。また、これらの症例の長期的予後については引き続き評価が必要である。しかしながら従来難治性とされる強皮症について、今回の3例では比較的短期間の集中的治療で顕著な改善効果が得られた点は、本疾患の自然予後を考慮すると注目すべきと考えられる。以上のことを踏まえて本疾患を含め自己免疫疾患の病態解明を進めるとともに、本治療法の有効性ならびに安全性を検討し、本邦における難治性自己免疫疾患に対する造血幹細胞移植療法の標準的治療の確立が望まれる。

E. 結論

全身性強皮症3症例に自家末梢血純化CD34陽性細胞移植併用超大量免疫抑制療法を施行した。いずれの症例も短期的には皮膚所見の改善を認めているが、臓器合併症への効果および長期予後については不明である。うち1症例で貧血を伴う出血性膀胱炎、心膜炎、骨髄抑制等、重篤な治療合併症を認め、自己末梢血幹細胞非選択移植を施行した。自己免疫疾患に対する本療法は慎重に検討されるべきであり、今後、症例の蓄積による適応除外基準、移植前処置の標準化および病態解明が望まれる。

F. 健康危険情報

治療期間中、感染性と思われる発熱、ウイルス感染によると思われる出血性膀胱炎、血球貪食症候群、心膜炎、骨髄抑制等を認めた。抗生剤、抗ウイルス剤等の使用により加療可能であったが、1症例で自己末梢血幹細胞非選択移植を必要とした。いずれの症状も造血能回復とともに軽快傾向を示した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Horita T, Tsutsumi A, Takeda T, Yasuda S, Takeuti R, Amasaki Y, Ichikawa K, Atsumi T, Koike T. Significance of magnetic resonance imaging in diagnosis of nodular regenerative hyperplasia of the liver complicated with systemic lupus erythematosus: a case report and review of the literature. *Lupus*. 11: 193-196. 2002.
- 2) Okamoto T, Tanaka S, Stan C A, Koike T, Kas M, Makita Z, Sawa Hirofumi Nagashima K. Advanced glycation end products induce angiogenesis in vivo. *Mol Res* 3:186-195.2002.
- 3) Atsumi T, Koike T. Clinical relevance of antiprothrombin antibodies. *Autoimmunity Reviews*. 1: 49-53. 2002.
- 4) Ieko M, Nakabayashi T, Takeda T, Naitoh S, Atsumi T, Koike T. The inhibition of protein C anticoagulant activity by anti- β 2-glycoprotein I(β 2GPI)antibodies isolated from patients with antiphospholipid syndrome by chromatography methods. *Mod Rheumatol*. 12: 44-49. 2002.
- 5) Matsuura E, Kobayashi K, Kasahara J, Yasuda T, Makino H, Koike T, Shoenfeld Y. Anti- β 2-glycoprotein I antibodies and atherosclerosis. *Int.Rev. Immunol*. 21. 51-66. 2002.
- 6) Yasuda S, Tsutsumi A, Atsumi T, Bertolaccini M L, Ichikawa K, Khamashta M A, Hughes R V, Koike T. Gene polymorphisms of tissue plasminogen activator and plasminogenactivator inhibitor-1patients with antiphospholipid antibodies. *J.Rheumatol*. 29: 6. 1192-1197. 2002.
- 7) Koizumi K, Haseyama Y, Machino R, Sato Y, Sawada K, Koike T. The hemophagocytic syndrome in prostate cancer revealed by disseminated carcinomatosis of the bone marrow. *J.Urology*. 168, 1101-1102. 2002.
- 8) Yamaguchi M, Hirayama F, Murahashi H, Azuma H, Sato N, Miyazaki H, Fukazawa K, Sawada K, Koike T, Ikeda H, Ikebuchi K. Ex vivo expansion of human UC blood primitive hematopoietic progenitors and transplantable stem cells using human primary BM stromal cells and human AB serum. *Cytotherapy*. 4: 2. 109-118. 2002.
- 9) Tyndall A, Koike T. High-dose immunoablative therapy with hematopoietic stem cell support in the treatment of severe autoimmune disease: current status and future direction. *Int.Med*. 41: 8.608-612. 2002.
- 10) Miyoshi H, Taguchi T, Sugiura M, Takeuchi M, Yanagisawa K, Watanabe Y, Miwa I, Makita Z, Koike T. Aminoguanidine pyridoxal adduct is superior to aminoguanidine for preventing diabetic nephropathy in mice. *Horm Metab Res*. 34. 371- 377. 2002.
- 11) Takeuchi R, Atsumi T, Ieko M, Amasaki Y, Ichikawa K, Koike T. Suppressed intrinsic fibrinolytic activity by monoclonal anti-beta2 glycoprotein I aut antibodies: possible mechanism for thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome. *Brit J hematol*.119, 781-788. 2002.
- 12) Ambrozic A, Avicin T, Ichikawa K, Kvedar T, Matsuura E, Hojnik M, Atsumi T, Rozman B, Koike T. Anti- β 2-glycoprotein I antibodies in children with atopic dermatitis. *Int Immunol*. 14. 823-830. 2002.

2. 学会発表

① 国外発表

- 1) Koike, T.:" Anticardiolipin and anti- β 2-glycoprotein I antibodies:application in the clinic" 3rd International Congress on Autoimmunity, Geneva, Switzerland, February, 20~24, 2002.
- 2) Koike, T. : " Antiphospholipid antibodies in arterial thrombosis." 1st Tuzing Antiphospholipid, Conference, Tuzing, Germany, April, 22~25, 2002.
- 3) Koike, T. : " Anti-prothronbin antibodies; pathogenesis and specificity." 6th Dresden

symposium on Autoantibodies, Dresden, Germany, September, 4~7, 2002.

②国内発表

- 1) 小池隆夫：「抗リン脂質抗体症候群：最近の話題」第166回日本内科学会東北地方会生涯教育講演会、仙台市、2002年2月9日
- 2) 小池隆夫：「膠原病と幹細胞移植」厚生労働省ヒトゲノム・再生医療等研究事業五班合同公開シンポジウム会、東京都、2002年2月16日
- 3) 小池 隆夫：「1型糖尿病と研究の流れと問題点」第45回日本糖尿病学会、東京都、2002年5月16-19日
- 4) 小池 隆夫：「抗リン脂質抗体症候群：自己抗体による血栓症と動脈硬化」国立国際医療センター研究所第9回箱根山セミナー、東京都、2002年6月10日
- 5) 小池 隆夫：「抗リン脂質抗体症候群」第32回日本臨床免疫学会学術総会、東京都、2002年12月4~6日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

	症例 1	症例 2	症例 3
性別／年齢	男性／57 歳	女性／19 歳	女性／53 歳
診断	SSc	SSc	SSc
臓器合併症	腎障害、高血圧 (腎クリーゼの既往あり)	皮膚潰瘍 逆流性食道炎	間質性肺炎
罹病期間	1.5 年	3 年	1 年
治療歴	PGE1、ACEI	PSL、D-P、PGE1	PSL、D-P、PGE1
mRodnan TSS	38／51	26／51	25／51

PG : prostaglanin、ACEI : angiotensin converting enzyme inhibitor、
D-P : D-penicillamine

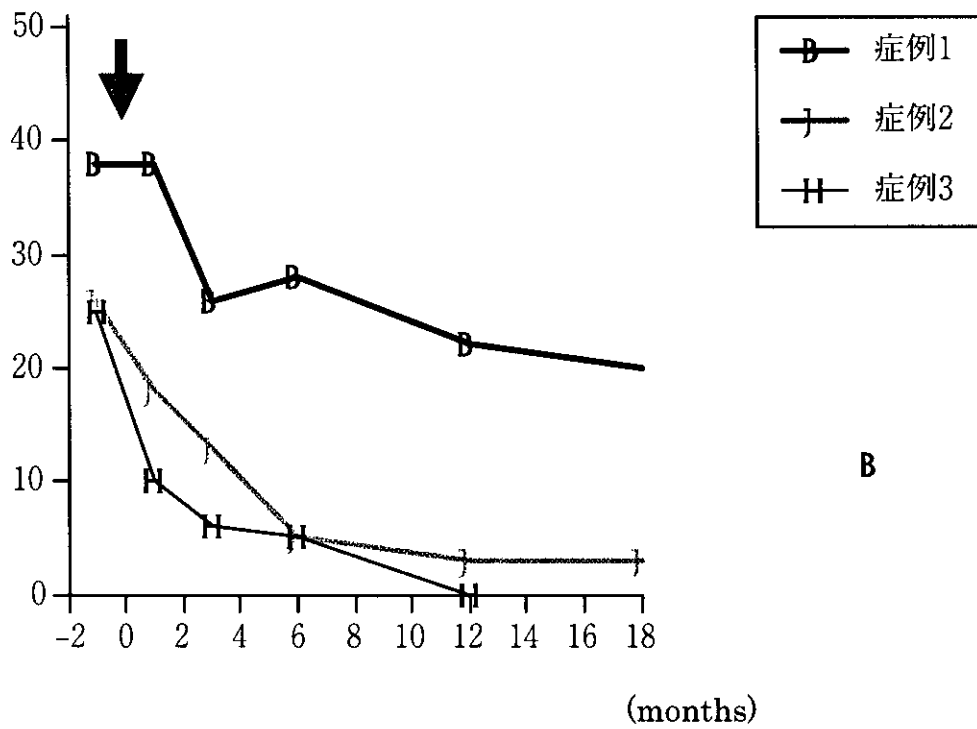
<表 1> 治療適応時の概略

	症例 1	症例 2	症例 3
造血幹細胞動員	G	CPA+G	CPA+G
移植前処置	CPA	CPA	CPA
CD34 陽性細胞純度	95%	96%	90%
移植 CD34 陽性細胞数*	2.96	5.21	2.75
白血球数 500/ μ l 以上	11 日	9 日	11 日
血小板数 5×10^4 / μ l 以上	15 日	21 日	16 日
抗核抗体(IF)**	1:160→1:320	1:1280→1:1280	1:1280→1:160
抗 Scl-70 抗体**	7.9→6.9	92.3→196.5	151.2→40.3

G : G-CSF、* : $\times 10^6$ /kg、** : 移植前→移植後 3 ヶ月

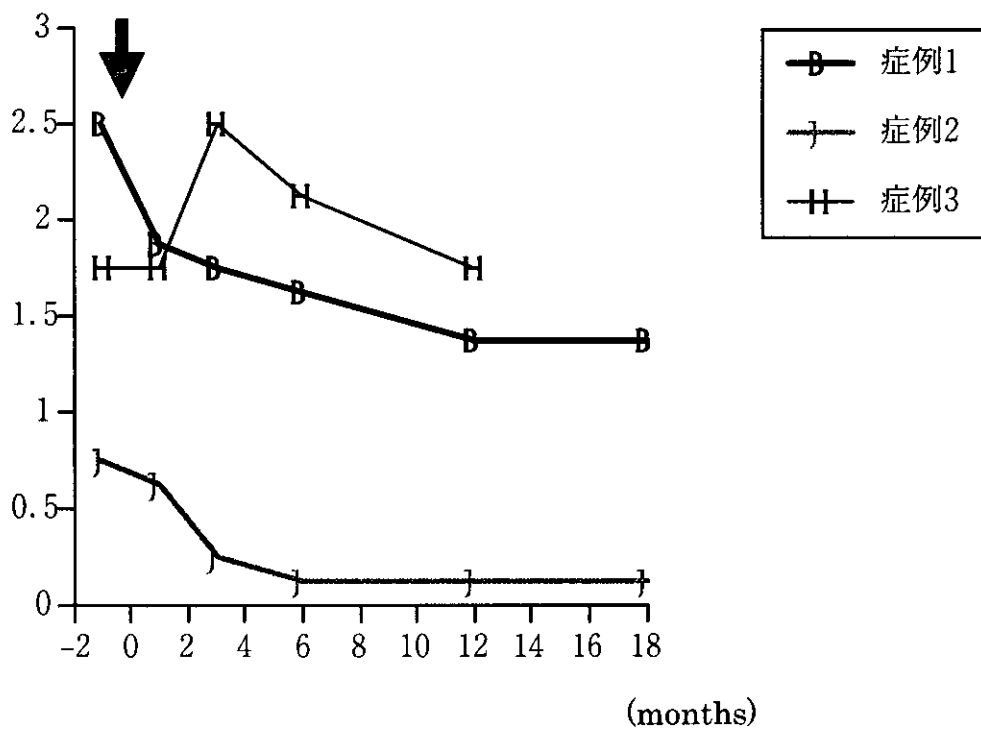
<表 2> 造血能の回復と血清学的変化

自家末梢血純化 CD34 陽性細胞移植



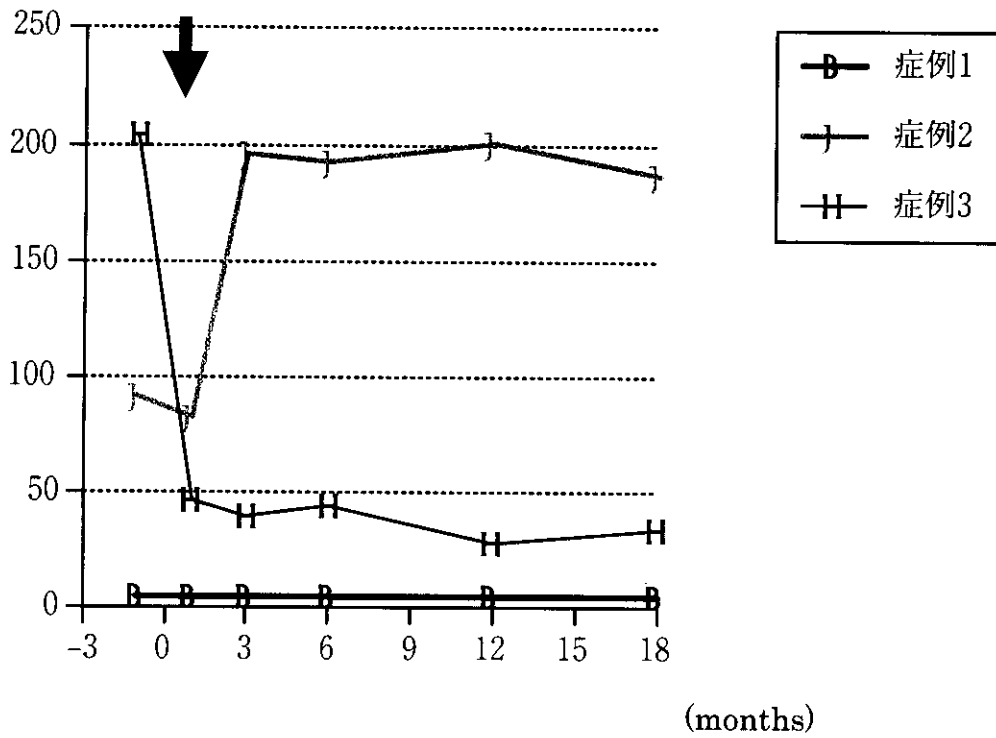
<図 1> mRodnan TSS の推移

自家末梢血純化 CD34 陽性細胞移植



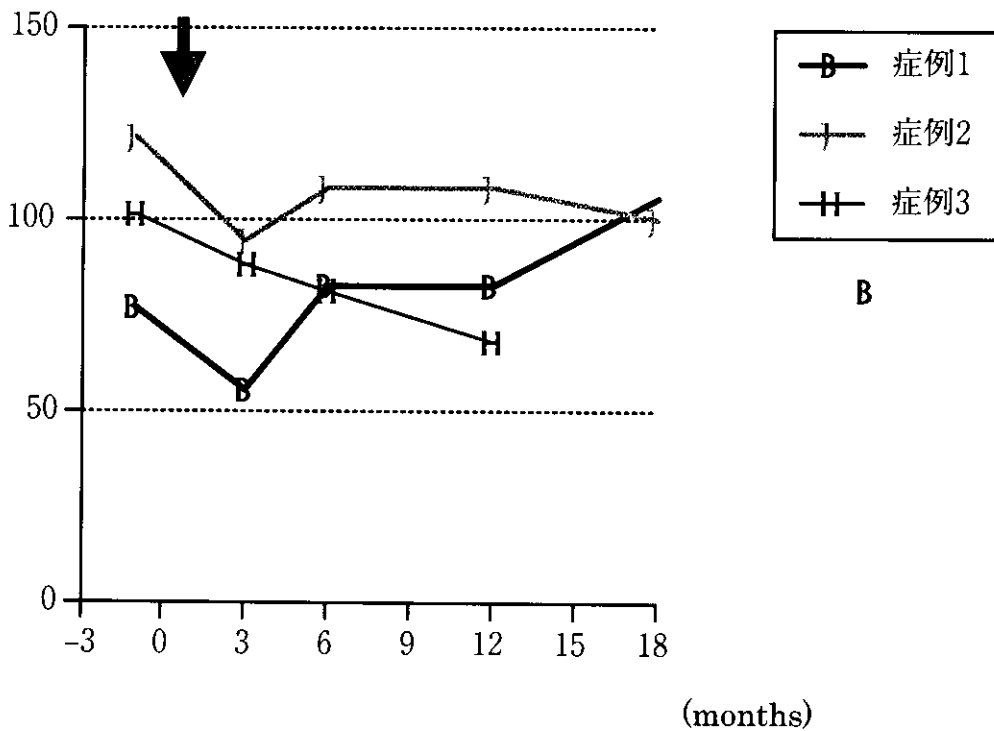
<図 2> mHAQ の推移

自家末梢血純化 CD34 陽性細胞移植



<図 3> 抗 Scl-70 抗体の推移

自家末梢血純化 CD34 陽性細胞移植



<図 4> GFR の推移