

20020814

厚生労働科学研究研究費補助金
免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

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14年度 総括・分担研究報告書

平成15年3月

主任研究者 宮 坂 信 之

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. コラーゲン誘導関節炎における抗B7h抗体治療効果の検討・・・ 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. 難治性関節リウマチに対する造血幹細胞移植に関する研究・・・ 9
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
3. T細胞レセプターを利用したリウマチ性疾患の新たな治療法の開発・・・ 16
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
4. 関節リウマチの病態におけるアダプター蛋白の役割に関する研究・・・ 19
埼玉医科大学総合医療センター第2内科 助手 亀田秀人
5. 関節リウマチの病態形成におけるLIGHT-HVEM系の関与に関する研究・・・ 24
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. 関節リウマチの難治性病態に対する新規治療法の開発に関する研究・・・ 28
国立病院長崎医療センター 臨床センター 免疫研究部長 右田清志
7. 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・・・ 30
順天堂大学医学部膠原病内科 教授 橋本博史
8. p21^{cip1} 遺伝子による細胞周期制御療法の抗炎症効果に関する研究・・・ 35
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. 多剤耐性遺伝子を標的とする難治性関節リウマチの新規治療に関する研究
・・・ 38
産業医科大学医学部第一内科学講座 教授 田中良哉
10. 関節リウマチ治療における生物製剤の cost-effectiveness analysis プロトコ
ール開発に関する研究・・・ 41
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・・・ 45

I. 総括研究報告

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生体応答調節学教授

研究要旨 本研究は、難治性関節リウマチ(RA)に対して、有効性が高くても有害事象が少なく、かつ関節破壊を阻止できる治療法を開発することを目的としている。本年度は、白血球除去療法、末梢血幹細胞移植療法の臨床応用、T細胞レセプター標的療法、多剤耐性遺伝子標的療法、細胞内シグナル伝達阻害療法、アポトーシス誘導療法、細胞周期調節療法、抗サイトカイン療法などに関する基礎的検討を行った。

(分担研究者氏名・所属機関・職名)

渥美 達也：北海道大学大学院分子病態制御学講師
亀田 秀人：埼玉医科大学総合医療センター第二内科助手
上阪 等：東京医科歯科大学大学院生体応答調節学助教授
田中 良哉：産業医科大学医学部第一内科学講座教授
津谷喜一郎：東京大学大学院薬学研究科医薬経済学教授
橋本 博史：順天堂大学医学部膠原病内科教授
原 まさ子：東女医大膠原病リウマチ痛風センター教授
右田 清志：長崎医療センター免疫研究部長
宮坂 信之：東京医科歯科大学大学院生体応答調節学教授
山本 一彦：東京大学大学院アレルギーリウマチ学教授

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)の病態形成の分子機構は少しずつ解明されつつあり、治療学の進歩に伴い本症の治療法は改良され、その長期予後は改善しつつある。しかし一方で、患者の生存率の延長に伴って新たに出現した難治性病態や治療薬剤による有害事象によって誘発される難治性病態などは、日常临床上、大いなる問題となっている。さらに、現在の治療法に全く反応せずに日常労作の著しい障害を来す進行性の症例も少なからず存在している。このような現状から、従来の治療法とは異なる新たな理念に基づいたRAの新規治療法を早急に開発することが求められている。本研究においては、難治性RA患者に対して有害事象が少なくかつ関節破壊を防止し、しかも

患者のQOLを高める治療法の開発と実用化を試み、RAに対する新たな治療方針の確立に努めることを目標としている。

B. 研究方法

本年度は、血漿交換療法、白血球除去療法、T細胞レセプター標的療法、多剤耐性遺伝子標的療法、細胞シグナル伝達阻害療法、末梢血幹細胞移植療法、アポトーシス誘導療法、細胞周期調節療法、抗サイトカイン療法などについて、その作用機序、有用性、臨床応用の可能性などを解析するとともに、現在、治験で行われている抗サイトカイン療法の cost-effectiveness analysis(CEA)についても検討を行った。このため、一部の実験は *in vitro* を用いて行うとともに、動物モデルを用いた *in vivo* の実験と比較対照した。

(倫理面への配慮)

患者からの検体採取および新たな治療法の臨床応用に際しては、研究分担者が所属する各施設の倫理審査委員会の承認を受けるとともに患者より文書同意を取得して行うことを前提とし、すべての臨床実験はヘルシンキ宣言を遵守し、各施設における治験審査委員会(IRB)の承認を得たのちに初めて行うこととした。また、実験動物に対する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について検討を行った。アメリカリウマチ学会診断基準を満たす5名のRA患者に対して白血球除去療法を週1回の間隔で5回行い、治療前後に疼痛関節数、腫張関節数、患者による疼痛評価と全般活動性評価(VAS スケール)、患者による運動機能評価(mHAQ)を経時的に測定することにより、ACR コアセット 20%以上の改善を認めたものを効果ありと判定した。その結果、5例中メトトレキサート(MTX)抵抗性の3例において治療効果を認め、その効果は治療終了4週以降も継続した。今後、さらに治療プロトコルの検討、responder の臨床的特徴、本治療法の作用機序についての検索が進められる予定である。また同時に、cost performance の面からの検討も行われる必要がある。

渥美は自家末梢血幹細胞移植療法(APBST)について強皮症患者3例での治験経験を報告し、CD34 陽性細胞を選択的に移入することによって速やかな造血能の回復とともに皮膚硬化の改善がみられ、それとともにサイトカイン関連遺伝子のダイナミックな変化が起こることをcDNA アレイを用いて明らかにした。今後、薬剤抵抗性RAに対してAPBST治療を行うことを検討しているが、cost performanceの問題に加えて移植後の強い免疫抑制の問題に対してどのように対処するかが課題として残されている。

右田は新規抗リウマチ薬レフルノミドの薬理作用について検討を行った。レフルノミドはピリミジン合成阻害を介してDNA合成を抑制することが知られているが、抗リウマチ作用機序については不明の点が少ない。本研究では、レフルノミドはIL-1 β 刺激で誘導されるRA滑膜細胞からのMMP-13の産生を阻害した。また、本剤はIL-1 β 刺激で誘導されるRA滑膜細胞のERK1/2, p38の活性化には影響しなかったが、JNK1/2の活性化を阻害した。以上より、レフルノミドは細胞内シグナルに影響を及ぼし、MAPキナーゼの一つであるJNKの阻害によるMMP-13産生低下を介して抗リウマチ作用を発揮している可能性が示唆された。本剤はすでに欧米では認可されその有効性が指摘されており、我が国で

も近日中に認可される運びである。今後、難治性RAに対して新たな細胞内シグナル伝達阻害薬が開発されることが期待される。

田中は治療抵抗性となる一つのメカニズムとして多剤耐性遺伝子が関与している可能性を推測した。まず、25例のRA患者について多剤耐性遺伝子MDR-1がコードする細胞膜上P糖蛋白質の発現、及びMDR-1の特異的転写因子であるYB-1の細胞内発現を検討したところ、両分子の発現がともに亢進しており、しかも罹患年数及び投与された抗リウマチ薬数と正の相関を示すことが明らかとなった。さらに、P糖蛋白質発現亢進がみられる患者での細胞内ステロイド濃度は低下しているが、*in vitro*におけるシクロスポリンとの共存下で回復した。これまでRAにおける薬剤抵抗性及びエスケープ現象の分子機構は不明であったが、本研究によって、RAにおける難治性となる機序に多剤耐性遺伝子MDR-1が関与していること、そしてP糖蛋白質阻害薬は治療抵抗性を回復させる可能性があることが初めて明らかとなった。

山本は以前より抗原特異的免疫療法の可能性について提唱しているが、これは、生体内の情報を利用したT細胞レセプター遺伝子のクローニングから、遺伝子導入による抗原特異性の再構築、さらに機能遺伝子の導入を含めた抗原特異的T細胞の試験管内再構築とその疾患への応用からなっている。本年度は昨年引き続き、ループス腎炎モデルを用いて解析を行った。彼らは高効率レトロウイルスベクターを用いて、NZB/WF1マウスのCD4陽性T細胞にヌクレオソーム特異的T細胞レセプター α/β 鎖遺伝子を導入することによって抗原特異性を再構築し、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マウスに移入した。その結果、自己抗体産生および腎炎発症抑制を認めたことから、現在、コラーゲン誘発関節炎モデルにおいて病変局所に浸潤しているT細胞からのT細胞レセプタークローニングを行っており、この抗原特異的療法がRA治療に応用可能か否かを検証する予定である。

宮坂は T 細胞活性化に関与する新規細胞表面分子 B7h を標的とする新規治療法の開発研究を行った。B7h は活性化 T 細胞に発現されている ICOS のレセプターであり、T 細胞活性化の共刺激分子として知られている。今回の研究では、マウスコラーゲン関節炎(CIA)の発症、病態の進展における抗 B7h 抗体の効果解析した。その結果、抗 B7h 抗体の関節炎発症前投与は関節炎の程度を軽減させたのみならず、発症後の投与においても十分な治療効果を有していた。さらに本抗体投与により、関節内における TNF α 、IL-1 β 、IL-6 などの炎症性サイトカインの発現は抑制され、しかも血清抗 II 型コラーゲン抗体価、IgG2a 及び IgG2b 抗体価も減少したことから、抗 B7h 抗体には抗炎症作用のみならず Th1 及び Th2 両反応の阻害作用があることが推測された。CIA モデルにおいては、本抗体投与により特に問題となる有害事象はみられなかったことから、B7h 標的療法は難治性 RA に対する新規治療法の一つとなりうる可能性が推測された。

原は、RA 滑膜において TNF ファミリーに属する LIGHT が RA 滑膜浸潤 T 細胞上に発現され、さらにその受容体である herpes virus entry mediator(HVM)が滑膜細胞上に発現していることを自ら発見し、その意義について検討を行った。リコンビナント可溶性 LIGHT と IFN γ を用いて CD14 陽性滑膜細胞を刺激すると、TNF α 及び IL-12 の産生が用量依存的に増強され、さらに ERK1/2 及び p38 のリン酸化が認められた。以上の結果は、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に LIGHT およびその受容体が重要な役割を果たしていることを示唆しており、両分子の相互作用を阻害することが難治性 RA の新規治療法となりうる可能性を示すものと考えられる。

上阪は、細胞周期調節分子群として知られるサイクリン依存性キナーゼインヒビター(CDKI) p16^{INK4}、p21^{Cip1} の遺伝子導入によって CIA などの動物モデルにおける関節炎発症を抑制できることをすでに明らかにしており、その作用機序について DNA マイクロアレイなどを用いてさらに詳細に検討を行った。

その結果、培養滑膜細胞に p21^{Cip1} アデノウイルスを感染させると、細胞殖が阻害されるのみならず、IL-1 依存的及び一部の系では IL-1 非依存的に IL-8、MCP-1、MMP-1、-3、cathepsin K などの炎症性メディエーターの発現が低下した。さらに p21^{Cip1} 遺伝子導入によって細胞内の AP-1 や NF κ B 活性の阻害もみられたことから、細胞周期抑制療法は細胞殖のみならず、滑膜細胞からの炎症性メディエーターの発現を抑制することによってその治療効果がもたらされていることが示唆された。今後、この細胞周期調節療法が難治性 RA に対して応用可能か否かについての検討が継続される予定である。

亀田は、RA における滑膜増殖において滑膜細胞内のアダプター蛋白の関与を推測し、新たな分子標的療法の可能性を追究している。今回の研究では線維芽細胞の *in vitro* transformation モデルを用いた系においてアダプター蛋白 Gab1 の発現と機能を検討し、次いで正常及び変異 Gab1 遺伝子導入による transformation を解析した。その結果、Gab1 の発現異常が線維芽細胞の transformation を引き起こすことが明らかにされたことから、現在、RA 滑膜細胞においてもこのような Gab1 の発現異常が起こっているのかについて検討を行っている。

津谷は、RA において高い有効性が認められている生物製剤の cost-effective analysis(CEA)を行うことを計画している。すなわち、本年度内に承認が予定されている etanercept が、海外では自己注射で承認されているのに対して日本では通院治療の承認となる可能性が高いことに注目し、etanercept の自己注射・通院治療の CEA を行うプロトコルを作成した。治療費は、direct cost (初診料・再診料、処方費、注射費、検査費、通院費、自己注射の教育コスト) と indirect cost (介護者を含めた労働損失) とに大別されるが、本分析は諸外国でもなされておらず、来年度に出る結果が期待される。将来的には、生物製剤と既存の抗リウマチ薬との長期アウトカムを用いた CEA を行い、生物製剤の有用性と問題点を経済性の面から明らかにする予定である。

D. 考察及び結論

今回の検討により、RA の難治性病態に対して有効性が期待される新規治療法の開発が可能であることを示唆する結果が得られつつある。これらの中にはすぐに臨床応用が可能なものと、今後の検討が必要なものとに大別されるが、来年度もこれらの検討をさらに継続することによって、各種の新規治療法の分子機序を解明するとともに、有害事象が少なくかつ臨床的に有効な新規治療法の開発を目指したい。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

・論文発表

1. Nanki T, et al Migration of CX3CR1+T cells producing Th1-or-Tc1-type cytokines and cytotoxic molecules, into the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 46:2878-2883,2002
2. Sakashita C, et al Cloning and characterization of the human BAZF gene, a homologue of the BCL6 oncogene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291:567-573,2002
3. Yamamoto K, et al The human perforin gene is a direct target of STAT4 activated by IL-12 in NK cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297:1245-1252,2002
4. Kohsaka H, et al Complete cDNA coding sequence of the HLA-DRB1*1405 allele. *DNA Sequence* 13:359-361,2002
5. Kawahata K, et al Generation of CD4+CD25+ regulatory Tcells from autoreactive Tcells simultaneously with their negative selection in the thymus and from nonautoreactive Tcells by endogeneous TCR expression. *J. Immunol.* 168:4339-4405,2002
6. Kawahata K, et al 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
7. Kono H, et al Spatial raft coalescence represents an initial step in Fc γ R signaling. *J. Immunol.* 169:193-203,2002
8. Sugiura T, et al Association between adult-onset Still's disease and interleukin-18 gene polymorphisms. *Genes Immun* 3:394-399,2002
9. Migita K, et al The role of peroxynitrite in cyclooxygenase-2 expression of rheumatoid synovium *Clin Exp Rheum* 20:59-62,2002
10. Yamasaki S, et al Functional changes in rheumatoid fibroblast-like synovial cells through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated signalling pathway *Clin Exp Immunol* 129:379-384,2002
11. Tanaka F, et al Clinical outcome of secondary amyloidosis patients with rheumatic diseases depends on cardiac involvement *Clin Exp Rheum* in press
12. Yamaji K, et al Fluctuations in the Peripheral Blood Leukocyte and Platelet Counts in Leukocytapheresis in Healthy Volunteers. *Therapeutic Apheresis* 6:402-412,2002
13. Kawasaki A, et al Analysis on the association of human BLYS (BAFF, TNFS13B) polymorphisms with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Genes Immunity* 3:424-429,2002

G. 知的財産権の出願・登録

なし

II. 分担研究報告

コラーゲン誘導関節炎における抗 B7h 抗体治療効果の検討

分担研究者 宮坂信之 東京医科歯科大学大学医歯学総合研究科生体応答調節学分野 教授

研究要旨 マウスコラーゲン (CII) 誘導関節炎 (CIA) における新規共刺激分子 ICOS-B7h 経路の関与を B7h に対するモノクローナル抗体を作製し検討した。CIA における抗 B7h 抗体投与による ICOS 経路阻害により、関節炎発症抑制効果が認められ、CII に対する Th1 および Th2 の両反応の抑制に加え、抗炎症効果も認められた。本結果から、ICOS 共刺激シグナル阻害による関節リウマチ治療の可能性が示唆された。

A. 研究目的

自己免疫疾患における CD28, CTLA-4, CD80, CD86 といった CD28-B7 ファミリー分子をはじめとする共刺激分子の重要性はこれまで多くのモデルマウスおよびヒトにおいて報告されてきた。Inducible costimulator (ICOS)は活性化 T 細胞に発現される CD28 ファミリー分子のひとつであり、そのリガンドとして B7 homologous protein (B7h)が同定されている。マウスコラーゲン (CII) 誘導関節炎 (CIA) における ICOS-B7h 経路の関与を B7h に対するモノクローナル抗体を作製、*in vivo* 投与し検討することにより、ICOS 共刺激シグナル阻害による関節リウマチ治療の可能性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

抗マウス B7h 抗体をコラーゲン (CII) 誘導関節炎 (CIA) モデルに投与し、ICOS-B7h 共刺激シグナル経路を阻害することによる関節炎発症抑制効果を検討すると共に、その効果発現機構を滑膜と所属リンパ節における ICOS 及び炎症性サイトカインの発現、CII に対する T 細胞機能評価および血中抗 CII 抗体価の測定を行い検討した。

C. 研究結果

発症前あるいは発症後に抗 B7h 抗体投与を行いその効果を検討した。発症前投与では、対照抗体投与

群で高度の関節腫脹を認めたのに対し、抗 B7h 抗体投与群で、用量依存性に臨床関節点数の低下が認められ、病理組織および X 線像においても関節炎の進行抑制が確認された(図 1)。しかしながら、抗 B7h 抗体投与は、発症率には影響を与えなかった。発症後投与においても、抗 B7h 抗体投与により同様に関節炎の改善が認められた。次に、関節および所属リンパ節における ICOS および B7h 発現を検討したところ、各陽性細胞は、腫脹関節滑膜組織に認められ、関節炎発症マウスリンパ節において ICOS 陽性 T 細胞の増加が認められた。この増加は、抗 B7h 抗体投与により抑制された。対照抗体投与群の滑膜組織では、TNF- α , IL-1 β , IL-6 の強い mRNA 発現が認められたが、抗 B7h 抗体投与により有意に抑制されていた。免疫原として用いた CII に対する *in vitro* における T 細胞増殖反応およびサイトカイン産生を検討したところ、対照抗体投与群からの脾細胞およびリンパ節細胞においては、CII に対する高い T 細胞増殖反応と IFN- γ および IL-10 の産生が認められたが、抗 B7h 抗体投与群では、これらの反応は有意に抑制されていた(図 2)。さらに、血中 CII 特異的 IgG1, IgG2a, IgG2b 抗体価を経時的に測定したところ、一次免疫を行っていないマウス群と比較し、関節炎誘導対照抗体投与群ですべての抗体価は顕著に上昇したが、抗 B7h 抗体投与群では有意に抑制されていた(図 3)。

D. 考察

本研究において、CIA の病態発症に ICOS-B7h 共刺激が関与していることが明らかにされた。抗 B7h 抗体投与による ICOS-B7h 経路阻害は、CIA モデルにおける関節炎発症を臨床的および組織学的に抑制した。また、この抑制効果は関節炎発症後の遅延投与においても認められた。抗 B7h 抗体投与による関節炎の抑制は、関節局所における炎症性サイトカインの発現を抑制すると共に、CII に対する細胞性および液性免疫反応を効果的に抑制した結果であると考えられた。

ナイーブ T 細胞に恒常的な発現が認められる CD28 と異なり、ICOS は活性化 T 細胞に誘導される。また、刺激により誘導される CD80 や CD86 と異なり、B7h には B 細胞における恒常的な発現が認められる。本研究においても、腫脹関節およびリンパ節 T 細胞における ICOS 発現また B 細胞、マクロファージおよび樹状細胞上に B7h 発現が確認されたことより、これらの細胞上の ICOS と B7h の相互反応が CIA の発症に関与していると考えられた。CIA モデルにおける CD28 あるいは CD134 共刺激阻害は発症前投与において発症率を低下させたにもかかわらず、発症後投与ではそれほどの効果が得られなかったという報告があるが、本 ICOS 阻害では、発症前投与で発症率を低下させることができなかつたにもかかわらず、発症後投与においてその有効性が十分認められた。この事実、ICOS 阻害が、一次反応よりむしろ二次反応において有効であるという実験的脳脊髄炎やアレルギー性気道炎症モデルにおける報告と矛盾しない。当初、ICOS 阻害は Th2 介在性免疫反応を選択的に抑制することが報告されていたが、最近では、急性同種移植片拒絶反応や実験的脳脊髄炎モデルなどの Th1 介在性免疫反応に対しても有効であることが報告されている。本研究結果では、IFN- γ および IL-10 の産生抑制、さらに CII 特異的 IgG1, IgG2a, および IgG2b 抗体価の低下から、ICOS 阻害が Th1 および Th2 両反応を抑制したことが示された。このことは ICOS 阻害効果における新たな見知

を加えるものである。上記の Th1 および Th2 反応の阻害に加え、ICOS 阻害では、関節局所の TNF- α , IL-1 β , IL-6 といった炎症性サイトカインの発現抑制も認められた。TNF- α は線維芽細胞や非リンパ組織細胞上に B7h 発現を誘導する一方、ICOS 共刺激は T 細胞からの TNF- α の産生を促進することが報告されている。従って、TNF- α による B7h 発現誘導と ICOS 刺激による TNF- α 産生が、局所炎症反応を相互に増幅しあっている可能性が推察される。ICOS 経路は T 細胞サイトカインの制御のみならず、局所の炎症反応に関わる様々なケモカインやサイトカインの制御にも関与している可能性が示唆された。

E. 結論

抗 B7h 抗体投与による ICOS-B7h 経路阻害は、抗炎症作用と Th1 および Th2 介在性の両免疫反応の抑制により CIA を改善させた。ICOS-B7h 共刺激が、CIA の病態発症に重要な役割を果たしていることが示された。ICOS 共刺激経路の阻害によるヒト RA 治療の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

Iwai H, Kozono Y, Hirose S, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Kohsaka H, Miyasaka N, Azuma M. Amelioration of collagen-induced arthritis by blockade of inducible costimulator-B7 homologous protein costimulation. *J Immunol.* 2002 15; 169: 4332-9.

2. 学会発表

Hideyuki Iwai, Kozono Yuko, Masaaki Abe, Sachiko Hirose, Hisaya Akiba, Hideo Yagita, Ko Okumura, Hitoshi Kosaka, Nobuyuki Miyasaka and Azuma Miyuki: Blockade of ICOS-B7h Pathway Ameliorates Murine Collagen-Induced Arthritis, 89th American association of

immunologists annual meeting, New Orleans, LA, april,
2002

岩井秀之, 阿部雅明, 八木田秀雄, 奥村康, 広瀬幸
子, 上阪等, 宮坂信之, 東みゆき: 慢性関節リウマ
チ及び SLE モデルマウスを用いた ICOS-B7h 経路関
与の検討 第 46 回日本リウマチ学会総会, 神戸,
2002 年 4 月

H. 知的財産権の出願・登録

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

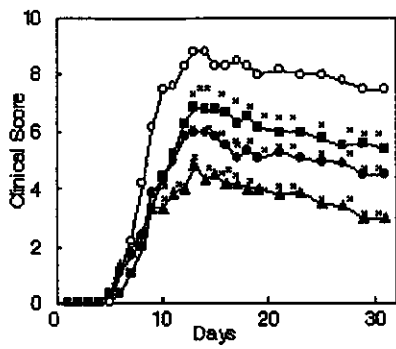


図1. CIAモデルにおける抗B7a抗体投与効果
Bovine type II collagen及びCFAで2回免疫後、隔日に4回対照抗体(○)あるいは抗マウスB7a抗体(-■-300, -●-100, -▲-50 μg/body)を腹腔内投与後の臨床的関節スコア

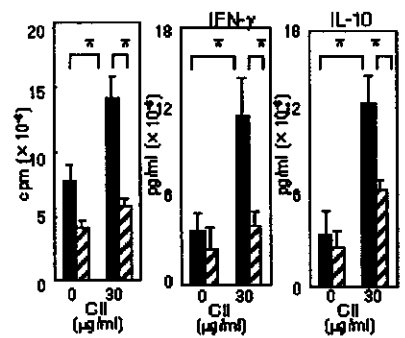


図2 抗B7a抗体投与によるCIIに対するT細胞増殖反応, IFN- γ IL-10産生の抑制

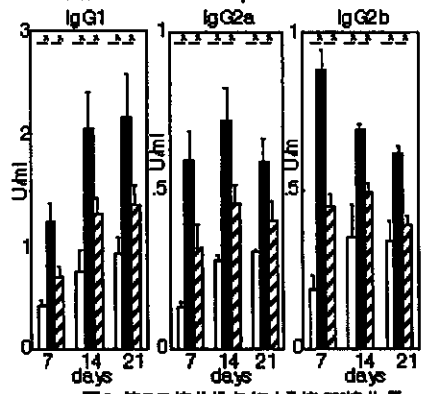


図3 抗B7a抗体投与による抗CII抗体価の抑制

難治性関節リウマチに対する造血幹細胞移植に関する研究

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

関節リウマチは、関節滑膜の炎症を病変の主座とし、メソトレキセート、ブシラミン、スルファサラゾピリジン、金製剤等、さまざまな疾患修飾性抗リウマチ剤(DMARDs)が治療薬として用いられている。多くの症例においては、これら DMARDs の使用により関節リウマチの病勢を調節することが可能であるが、一次無効、二次無効症例もしばしば経験される。従来の DMARDs に抵抗性を示す関節リウマチへの抗 TNF α 製剤の適応が考えられるものの十分な治療効果を示さない症例も報告されている。このような難治性関節リウマチにおいて、自家末梢血幹細胞移植併用超大量免疫抑制療法の有効性が報告されてきている。この中には抗 TNF α 製剤無効例に対する反応例や、再燃後の易治療性の獲得も認められている。本研究ではインフォームドコンセントが得られた強皮症 3 例を対象とした。前後における各種検査所見に加え、免疫学的変化について PBMC を用い、FACS、cDNA アレイで解析を行った。移植後の造血能の回復は速やかであり、皮膚硬化の著明な改善を認めた。血清学的には、自己抗体価等に著変を認めなかった。cDNA アレイを用いた PBMC の検討では、移植後に IL-1 β 、IL-10、IL-15 等で遺伝子発現量の低下を認め、移植前後における強皮症の病態を反映するものと推測された。強皮症におけるサイトカイン関連遺伝子発現のダイナミクスは関節リウマチへの応用の可能性を示唆する。

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。関節リウマチにおいても、メソトレキセートを含む種々の疾患修飾性抗リウマチ剤(DMARDs)に抵

抗性を示す症例が経験される。このような症例に対して、今後、抗 TNF α 製剤の適応による治療効果の改善が期待されるが、同治療法の有効率は約 70%である。すなわち残りの 30%の患者には現時点では有効な治療法が存在しないことになる。このような難治性関節リウマチにおいて、治療法の 1 つとして超大量免疫抑制療法が挙げられ有効性が認められつつある。この際、超大量免疫抑制療法による骨髄不全回避のため造血幹細胞移植による支持療法が不可欠である。そこで、難治性関節リウマチに対する自家末梢血幹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、安全性を検討することを本研究の目的とした。

造血器疾患に対して自己末梢血純化 CD34 陽性細胞移植を施行した際は、昨年までの検討でリンパ球、特に CD4 細胞の回復が遅延することが明らかとなった。当科では自己免疫疾患に対する自己末梢血純化 CD34 陽性細胞移植を検討中であるが、強皮症 3 例に対してこの治療をおこない、臨床的な有用性を確認したが、重篤なウイルス感染症を合併した症例もあった。関節リウマチに本治療法を応用するにあたり、強皮症の経験例において詳細な炎症・免疫学的検討をおこなった。

B. 研究方法

これまでのところ、関節リウマチに対する本治療の適応例はない。これまで、当科では、強皮症 3 症例に対する自家末梢血 CD34 陽性細胞移植併用超大量免疫抑制療法を経験し、その経過の概略を述べるとともに難治性関節リウマチへの適応について考察する。

1) 対象症例(強皮症)(表 1)

現時点での当科の自己末梢血純化 CD34 陽性細胞移植の対象は、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である。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) $2 \text{ g/m}^2 \times 2$ 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) 炎症・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、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、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思わ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。何れの症例も、現在、外来通院中であり、定期的全身精査で異常を認めていない。

3) 免疫学的検討

造血器疾患に対して自己末梢血純化CD34陽性細胞移植を施行した際は、一般にリンパ球の回復が遅延することが知られており、当科症例も同様の経過を示した。特にCD4陽性細胞の回復は遅延し、1年を経過しても正常化しなかった。上述の如く血清学的変化は、症例によりさまざまであったが自己抗体は消失しなかった。

末梢血単核球における炎症、免疫関連遺伝子の発現状況についてcDNAアレイ法を用いて観察したところ、移植前後において、IL-1 β 、IL-12p35、IL-13、IL-15等、種々のサイトカインのmRNAレベルでの発現量低下を認めた。

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ている。

関節リウマチにおいては、約70%でACRコアセット20%以上の改善が認められ、移植関連死亡率も約2%と低値であることが報告されている一方、移植後の再燃率が約50-70%あるとされる点が問題として挙げられる。しかし、これら再燃例の多くで、移植前に無効であったDMARDsへの反応性の獲得が報告されている。この中には、抗TNF α 製剤無効例も含まれている。現時点における、当科の難治性関節リウマチに対する適応の概略を図3に示した。難治性関節リウマチにおいては、超大量免疫抑制療法後の移植片を純化CD34細胞ではなく、抗CD34抗体による純化を行わない自家末梢血幹細胞を用いることで、移植後のウイルス感染をはじめとした種々の感染症発症の軽減が期待される。今後、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。

以上のことを踏まえて関節リウマチ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関節リウマチ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

難治性関節リウマチに対する本療法は慎重に検討されるべきであるが、強皮症に対する本治療の経験から関節リウマチへの応用が十分に考えられ、従来DMARDsに加

えて抗TNF α 製剤無効例への適応が考えられる。

F. 健康危険情報

難治性関節リウマチへの同療法の施行例はないものの、当科において経験した強皮症症例において、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. Atsumi T, Koike T. Clinical relevance of antiprothrombin antibodies. *Autoimmunity Reviews* 1:49-53, 2002
2. Ieko M, Nakabayashi T, Takeda M, Naitoh S, Atsumi T, Koike T. The inhibition of protein C anticoagulant activity by anti- β 2-glycoprotein I antibodies isolated from patients with antiphospholipid syndrome by chromatography methods. *Mod Rheumatol* 12:44-9, 2002
3. Horita T, Tsutsumi A, Takeda T, Yasuda S, Takeuchi R, Amasaki Y, Ichikawa K, Atsumi T, Koike T. Significance of magnetic resonance imaging in the diagnosis of nodular regenerative hyperplasia of the liver complicated with systemic lupus erythematosus: a case report and review of the literature. *Lupus* 11:193-6, 2002
4. Yasuda S, Tsutsumi A, Atsumi T, Bertolaccini ML, Ichikawa K, Khamashta MA, Hughes GRV, Koike T. Gene polymorphisms of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in patients with antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 29:1192-7, 2002
5. Ambrozic A, Avicin T, Ichikawa K, Kveder 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: 823-30, 2002
6. Takeuchi R, Atsumi T, Ieko M, Amasaki Y, Ichikawa K, Koike T. Suppressed intrinsic fibrinolytic activity by monoclonal anti- β 2 glycoprotein I autoantibodies: possible mechanism for thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 119: 781-8, 2002
7. Oku K, Atsumi T, Furukawa S, Horita T, Sakai Y, Jodo S, Amasaki Y, Ichikawa K, Amengual O,

Koike T. Cerebral imaging by magnetic resonance imaging and single photon emission computed tomography in systemic lupus erythematosus with central nervous system involvement. *Rheumatol (in press)*

8. Amengual O, Atsumi T, Koike T. Specificities, properties and clinical significance of antiprothrombin antibodies. *Arthritis Rheum (in press)*
9. Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA. Tissue factor in antiphospholipid syndrome: Shifting the focus from coagulation to endothelium. *Rheumatol (in press)*
10. Kobayashi K, Kishi M, Atsumi T, Bertolaccini M, Makino H, Sakairi N, Yamamoto I, Yasuda T, Khamashta MA, Hughes GR, Koike T, Voelker DR, Matsuura E. Circulating oxidized LDL forms complexes with beta 2-glycoprotein I: implication as an atherogenic autoantigen. *J Lipid Res (in press)*
11. Sakai Y, Atsumi T, Itoh T, Koike T. Uveitis, pancarditis, haemophagocytosis, and abdominal masses. *Lancet (in press)*

2. 学会発表

1. Atsumi T: Properties of cleaved β 2-glycoprotein I. 3rd International Congress on Autoimmunity. Geneva, Switzerland, 20-22 February 2002
2. Furukawa S, Atsumi T, Bohgaki T, Fukae J, Amasaki Y, Ichikawa K, Koike T. Clinical significance of serum KL-6 as a marker of interstitial pneumonitis complicated with connective tissue diseases. 26th International Congress of Internal Medicine. Kyoto, Japan, 26-30 May 2002
3. Oku K, Atsumi T, Furukawa S, Sakai Y, Furusaki A, Horita T, Jodo S, Amasaki Y, Ichikawa K, Koike T. Significance of brain imaging in patients with systemic lupus erythematosus complicated with central nerve system manifestations. 26th International Congress of Internal Medicine. Kyoto, Japan, 26-30 May 2002
4. Amengual O, Atsumi T, Komano Y, Jodo S, Amasaki Y, Ichikawa K, Koike T. Glycoprotein IIIA polymorphism HPA6Wa/b and aPL are independent risks for thrombocytopenia in patients with SLE. 10th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. Taormina, Italy, 29 September - 3 October, 2002
5. Sakai Y, Atsumi T, Furukawa S, Ieko M, Jodo S, Amasaki Y, Ichikawa K, Koike T. Association of aPL and valvular heart diseases in Japanese patients with autoimmune diseases. 10th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. Taormina, Italy, 29 September - 3 October, 2002

6. Atsumi T, Koike T. What is Lupus Anticoagulant? 10th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. Taormina, Italy, 29 September - 3 October, 2002
7. Furukawa S, Atsumi T, Ieko M, Sakai Y, Jodo S, Amasaki Y, Ichikawa K, Koike T. Antiphospholipid associated thrombocytopenia: As a risk for thrombosis and pregnancy morbidity. 10th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. Taormina, Italy, 29 September - 3 October, 2002
8. Atsumi T, Ieko M, Ichikawa K, Horita T, Jodo S, Amasaki Y, Koike T. A simple semi-quantitative method for lupus anticoagulant activity using phosphatidylserine dependent monoclonal antiprothrombin antibody. 10th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. Taormina, Italy, 29 September - 3 October, 2002
9. Ichikawa K, Horita T, Atsumi T, Jodo S, Amasaki Y, Koike T. Monoclonal antibodies against the complex of phosphatidylserine and prothrombin from patients with APS. 10th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. Taormina, Italy, 29 September - 3 October, 2002
10. Atsumi T, Ieko M, Ichikawa K, Horita T, Jodo S, Amasaki Y, Koike T. High prevalence of lupus anticoagulant detected by a novel semi-quantitative assay using phosphatidylserine dependent monoclonal antiprothrombin antibody in patients with antiphospholipid syndrome. American College of Rheumatology 66th National Scientific Meeting, New Orleans, USA. 24-29 October 2002
11. Bertolaccini ML, Atsumi T, Khamashta MA, Koike T, Hughes GRV. Antiprothrombin antibodies: Detection, immunological characteristics and clinical significance in patients with systemic lupus erythematosus. American College of Rheumatology 66th National Scientific Meeting, New Orleans, USA. 24-29 October 2002
12. Amengual O, Atsumi T, Komano Y, Jodo S, Amasaki Y, Ichikawa K, Koike T. The human platelet antigen 6Wb represents a risk factor for thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. American College of Rheumatology 66th National Scientific Meeting, New Orleans, USA. 24-29 October 2002

天崎吉晴助手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。

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・分子病態制御学の大学院生、坊垣暁之先生、

<表 1> 治療適応時の概略

	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

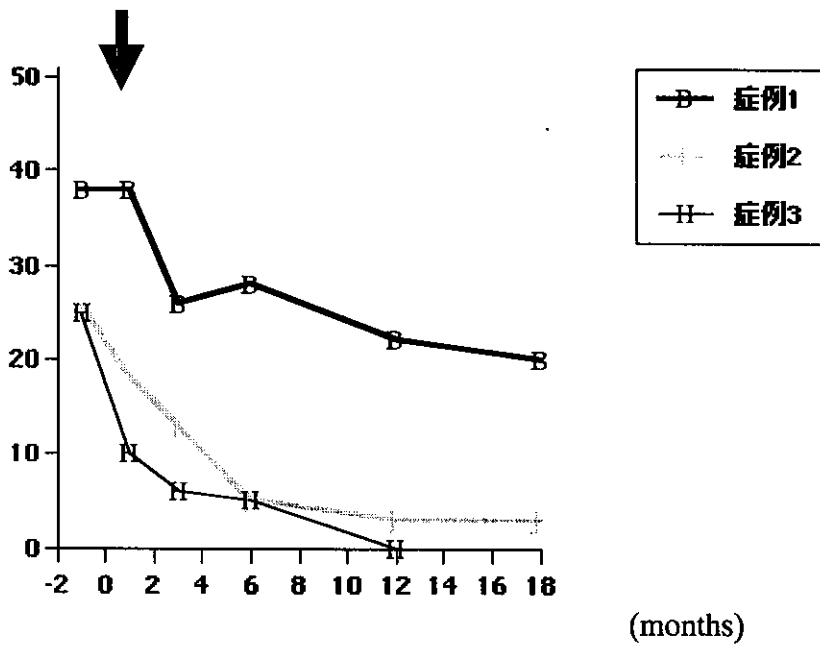
PG : prostaglanin、ACEI : angiotensin converting enzyme inhibitor、
D-P : D-penicillamine

<表 2> 造血能の回復と血清学的変化

	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

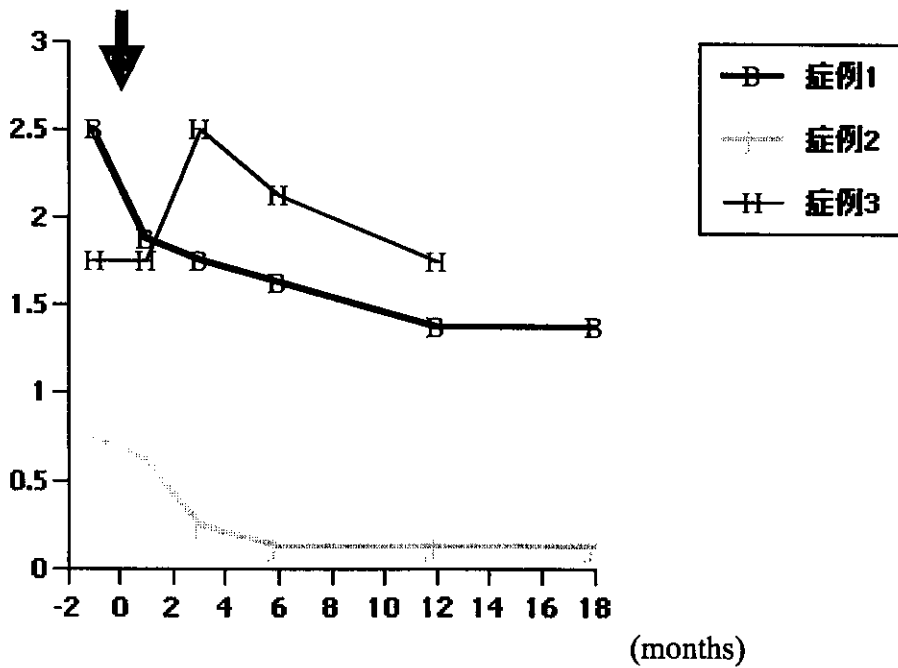
G : G-CSF、* : $\times 10^6$ /kg、** : 移植前→移植後 3 ヶ月

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

T 細胞レセプターを利用したリウマチ性疾患の新たな治療法の開発

分担研究者 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

研究要旨 リウマチ性疾患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。昨年度はループス腎炎モデルでの治療実験の可能性を示したので、本年度は II 型コラーゲン誘発関節炎で同様の治療実験が可能であるかを検証した。既に発表されている II 型コラーゲンに対する T 細胞レセプター遺伝子とその情報にしたがってクローニングしたのち、DBA/1 マウスの脾臓細胞に遺伝子移入することで II 型コラーゲンに対する抗原特異性を構築し、さらに抑制性のサイトカインであるインターロイキン (IL-10) を第 3 の遺伝子として導入することで抗原特異的抑制性の T 細胞を作成した。これを II 型コラーゲン誘発関節炎モデルマウスに細胞導入することで、関節炎の抑制が可能であることが判明した。

A. 研究目的

本研究の目的は、我々がすでに確立している T 細胞クロノタイプ検出法を用いて、リウマチ性疾患患者やモデル動物の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、免疫が関与する多くの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。

昨年度はヌクレオソーム特異的な T 細胞レセプターと抑制性の機能を持つ CTLA-4Ig 遺伝子を導入した脾臓細胞を用いて、ループス腎炎が抑制出来る

ことを示した。本年度は関節炎モデルで同様の抑制効果が見られるかを検証した。

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。関節リウマチモデルマウス (II 型コラーゲン誘発関節炎など) の生体内で活性化され関節炎病巣に集積している 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 法によるクロノタ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、マウスの脾臓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、リウマチ性疾