

- 19 名和田雅夫、齋藤和義、藤井幸一、徳永美貴子、塚田順一、田中良哉 抗 CD20 抗体療法 内科 (2004) 93, 319-325
- 20 田中良哉 免疫学的生物製剤をいかに膠原病に適用するか *Molecular Medicine* (2004) 41, 204-209
- 21 田中良哉 CD20 を標的とした SLE 等の自己免疫疾患の分子治療 医学のあゆみ (2004) 208, 349-354
- 22 辻村静代、田中良哉 多剤耐性遺伝子を標的とする新規治療 リウマチ科 (2004) 31, 55-61
- 2 学会発表
- 1 田中良哉 リウマチ 膠原病 ー治療の新展開ー 第 26 回日本医学会総会 (教育講演) 福岡, 平成 15 年 4 月
- 2 田中良哉 ステロイド抵抗性疾患に対するノクロスホリン療法の戦略 第 46 回日本腎臓学会学術総会 (ランチョンセミナー) 東京, 平成 15 年 5 月
- 3 田中良哉 生物製剤 第 18 回日本臨床リウマチ学会総会 (ノンポンウム) 札幌, 平成 15 年 10 月 2-3 日
- 4 田中良哉 ステロイド性骨粗鬆症の薬物療法 第 5 回日本骨粗鬆症学会総会 (シンポジウム) 福岡, 平成 15 年 10 月
- 5 田中良哉 免疫学的ソールの臨床応用 第 31 回日本臨床免疫学会総会 (ノンポンウム) 東京, 平成 15 年 10 月
- 6 田中良哉 免疫シグナルと続発性骨粗鬆症の病態機構 第 18 回日本整形外科学会基礎学術集会 (教育研修講演) 北九州, 平成 15 年 10 月
- 7 田中良哉 Targeting cell surface molecules in autoimmune diseases 第 33 回日本免疫学会総会学術集会 (ノンポンウム) 福岡, 平成 15 年 12 月
- 8 田中良哉 関節リウマチの新しい考え方ー抗サイトカイン療法によりブレークスルーできるかー 第 2 回大阪 RA フォーラム (特別講演) 大阪, 平成 16 年 2 月
- 9 田中良哉 抗リウマチ薬が効かなくなる原因とは? 厚生労働省「厚生科学研究公開ノンポンウム」 東京, 平成 16 年 2 月
- 10 田中良哉 抗リウマチ薬 平成 15 年度厚生労働省免疫アレルギー疾患予防 治療研究推進事業リウマチ アレルギーノンポンウム Part 2 (ノンポンウム) 東京, 平成 16 年 2 月

H.知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

- 1 特許取得
該当なし。
- 2 実用新案登録
該当なし。
- 3 その他
該当なし。

関節炎病変集積 T 細胞の抗原特異性の再構築による抗原解析 治療応用の検討

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 関節炎病変局所や所属リンパ節に集積している T 細胞クローンに焦点をあて、その単一細胞から細胞内で発現している 2 つの T 細胞レセプター (TCR) 遺伝子 α 鎖、 β 鎖の両方を同定、分離する手法を完成させた。これらの TCR を脾臓細胞に遺伝子導入することで TCR の機能再構築を行ったところ、関節炎で強く発現する自己抗原に特異性を有することが判明した。さらにこれら 2 つの TCR 遺伝子に加えて、抑制性機能分子として IL-10 遺伝子を導入して、抗原特異的抑制性 T 細胞を作成したところ、この T 細胞はコラーゲン誘発性関節炎を抑制することが明らかとなった。

A 研究目的

これまでに関節炎病変部位から培養により得られたクローンの解析がなされているが、これらの培養細胞が生体内で集積していたクローンなのか またこれらの細胞は生体内で関節に集積し、遺伝子治療やトラノグデリバリーシステムとして応用可能なものかどうかは明らかでなかった。我々はマウスコラーゲン誘発性関節炎 (CIA) において炎症部位に浸潤・増殖している T 細胞の TCR α/β 鎖を同定し、炎症部位に集積している TCR が関節への浸潤を規定しているかどうか、これらの TCR の治療への応用が可能かどうかを検討した。

B 研究方法

CIA 炎症肢から CD4 陽性 V β 8 1/8 2 陽性 T 細胞をシングルセルソーティングにより回収した。並行して CD4 陽性 V β 8 1/8 2 陽性 T 細胞分画における TCR/SSCP 法で炎症局所に集積している β 鎖を同定した。集積クローンが発現している β 鎖をもつ単一細胞の cDNA から V α 1-22 までの α 鎖について PCR によるスクリーニングを行い α 鎖を同定した。このようにしてクローニングした α 鎖、 β 鎖の全長 cDNA を遺伝子操作で作成し、レトロウイルスヘクター-pMX に挿入した。これを DBA/1 マウスの脾臓細胞に遺伝子導入した。さらに治療実験には、2 つの TCR 遺伝子に

加えて抑制性の IL-10 cDNA を追加導入した抗原特異的抑制細胞を作成し、CIA マウスに細胞導入した。(倫理面への配慮)

マウスの研究であり、実験指針に則って研究を行った。

C 研究結果

CIA 炎症肢に集積している β 鎖を使用するクローン 20B47 を同定した。20B47 TCR は α 鎖は AV2 サブファミリー、 β 鎖は BV8S2 サブファミリーに属していた。20B47 TCR α/β 鎖をレトロウイルスヘクターにより導入した CD4 陽性 T 細胞は、鼠径リンパ節由来樹状細胞に特異的な自己反応性を示し、II 型コラーゲン免疫前の鼠径リンパ節由来樹状細胞よりも II 型コラーゲン免疫後の鼠径リンパ節由来樹状細胞に対して強い増殖反応を示した。この増殖反応は II 型コラーゲン添加によっても増強されず、20B47 TCR は II 型コラーゲン以外の関節内自己抗原を認識していると考えられた。20B47 導入 T 細胞の生体内での動態を CFSE ラベルで検討すると、無処置の DBA1 マウスと比較して炎症発症マウスの鼠径リンパ節・炎症部位で強い分裂細胞の集積を認めた。さらに 20B47TCR に加え抑制性分子 IL-10 を共導入した細胞を II 型コラーゲン免疫後に移入することにより、関節炎の抑制が認められた。これは陽性コントロー

ルとして既に報告しているコラーゲン特異的 T 細胞より強い抑制能を示した。

D 考察

CIA の病態形成にII型コラーゲン以外の自己抗原が関与していることが示唆され、これを認識する T 細胞クローンが関節病変内に集積していることが判明した。これを利用することで関節特異抗原の同定と関節特異的 T 細胞クローンの人工的作成が可能であると思われる。

E 結論

我々の手法により関節抗原に特異的で、関節炎発症時に所属リンパ節、炎症部位に集積する TCR の同定と、その遺伝子導入による CD4 陽性 T 細胞上の抗原特異性の再構築が可能であることが判明した。この TCR に加え抑制性分子を導入した細胞の移入により CIA の関節炎を抑制することが可能であった。今後この手法を用いてさらに炎症関連抗原の同定や細胞治療等に広く応用が可能と考えられた。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

- 1) Tokuhuro S, Yamada R, Chang X, Suzuki A, Kochi Y, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Ohtsuki M, Ono M, Furukawa H, Nagashima M, Yoshino S, Mabuchi A, Sekine A, Saito S, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K. An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis *Nat Genet* 35 341-348, 2003
- 2) Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhuro S, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Nakayama-Hamada M, Kawada R, Ono M, Ohtsuki M, Furukawa H, Yoshino S, Yukioka M, Tohma S, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Nishioka Y, Sekine A, Iida A, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K. Functional haplotypes of

PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis *Nat Genet* 34 395-402, 2003

- 3) Yamamoto K. Pathogenesis of Sjögren's syndrome *Autoimmun Rev* 2 13-18, 2003
- 4) Yamada R, Suzuki A, Chang X, Yamamoto K. Peptidylarginine deiminase type4 identification of a rheumatoid arthritis-susceptible gene *Trends Mol Med* 9 503-508, 2003
- 5) Sekiya T, Tsunemi Y, Miyamasu M, Ohta K, Morita A, Sacki H, Matsushima K, Yoshie O, Tsuchiya N, Yamaguchi M, Yamamoto K, Tamaki K and Hurai K. Variations in the human Th2-specific chemokine TARC gene *Immunogenetics* 54 742-745, 2003
- 6) Tahara H, Fujio K, Araki Y, Setoguchi K, Misaki Y, Kitamura T, Yamamoto K. Reconstitution of CD8⁺ T cells by retroviral transfer of the TCR αβ-chain genes isolated from a clonally expanded P815-infiltrating lymphocyte¹ *J Immunol* 171 2154-2160, 2003
- 7) Suzuki K, Sawada T, Murakami A, Matsui T, Tohma S, Nakazono K, Takemura M, Takasaki Y, Mimori T, Yamamoto K. High diagnostic performance of ELISA detection of antibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis *Scand J Rheumatol* 32 197-204, 2003

2 学会発表

- 1) 山本一彦 ゲノム解析理解のための基礎知識 第47回日本リウマチ学会 (2003 4 24-26 東京都)
- 2) 荒木靖人, 藤尾圭志, 中川洋子, 高橋秀実, 山本一彦 第33回日本免疫学会 (2003 12 8-10 福岡市)

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

タクロリムスの抗リウマチ作用に関する研究

分担研究者 右田清志 国立長崎医療センター 臨床研究センター 免疫研究部長

研究要旨 免疫抑制剤タクロリムスは、難治性自己免疫疾患に対する有効性が示されているか、多剤抵抗性 RA 患者の治療薬としての可能性も示唆されている。今回タクロリムスの抗リウマチ作用を解明する目的で、RA 滑膜細胞に対する薬理作用を検討した。RA 滑膜細胞を炎症性サイトカイン IL-1 β で刺激すると、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 2、3、13 の産生が誘導された。タクロリムスはこの IL-1 β で滑膜細胞に誘導される MMP-2 と MMP-13 の産生に対して抑制的に作用したが、MMP-13 の産生を強く抑制した。さらにタクロリムスは IL-1 β 刺激で滑膜細胞に誘導される、mitogen-activated protein kinase (MAPK)の活性化に対し、ERK1/2、p38 のリン酸化には影響しなかったが、JNK1/2 のリン酸化を抑制した。タクロリムスは、T 細胞の機能不全だけではなく、RA 滑膜細胞に働き軟骨破壊に重要な MMP-13 の産生を阻害する作用を有していることが判った。

A 研究目的

タクロリムスは、T 細胞のシグナル伝達を阻害しサイトカイン産生を抑制し免疫抑制作用を有する薬剤で、移植後の拒絶反応などの治療に広く用いられている。近年、自己免疫疾患に対するタクロリムスの有効性が報告され、関節リウマチへの臨床応用が考えられている。本邦でも、メトトレキサート、レフルノミドなどの有効性の高い抗リウマチ薬が導入される一方、薬剤による間質性肺炎などの重篤な副作用が問題提起されており、関節外症状を有す RA 患者の治療法は、依然として限られている。タクロリムスは、ステロイド抵抗性の間質性肺炎の治療に用いられることもあり、関節外症状を有する症例において RA の治療薬としての可能性が考えられている。今回、タクロリムスの抗リウマチ作用について、RA 滑膜細胞を用い検討した。

B 研究方法

インフォームドコンセントの得られた RA 患者

から、治療目的で施行した滑膜切除術で採取した滑膜組織より RA 滑膜細胞を分離した。これら滑膜細胞を IL-1 β で刺激し、マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinases MMPs) を誘導した。IL-1 β 刺激で誘導される MMPs 産生に対するタクロリムスの影響について検討した。MMPs の産生は、RA 滑膜細胞培養上清をゲラチンゼイモグラフィ、特異抗体を用いたイムノプロットで測定し検討した。さらに細胞内情報伝達系を解析する目的で、RA 滑膜細胞を IL-1 β で刺激し、mitogen-activated protein kinase (MAPK)の活性化を、抗リン酸化 MAPK 抗体を用いたイムノプロットで検討した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、患者組織由来の培養細胞を使用したが、患者より書面にてインフォームドコンセントを得た。

C 研究結果

RA 滑膜細胞を IL-1 β で刺激すると、MMP-2、MMP-3、MMP-13 の産生が誘導された。タクロリムスは、IL-1 β で誘導される RA 滑膜細胞の MMP-2、13 産生に対して抑制的に作用したか、MMP-13 の産生を濃度依存性に強く阻害した(図 1)。さらにタクロリムスは IL-1 β 刺激で RA 滑膜細胞誘導される ER1/2、p38 の活性化には影響しなかったが、c-Jun N-terminal kinase (JNK)の活性化を阻害した(図 2)。またタクロリムスは IL-1 β で誘導される RA 滑膜細胞の MMP-13 mRNA の発現を阻害した。

D 考察

免疫抑制剤タクロリムスは、脱リン酸化酵素であるカルシニューリンを阻害することで、転写因子 NF-AT の核内移行をブロックし、サイトカイン産生を抑制し免疫抑制効果を発揮するとされている。その作用機序から、タクロリムスは T 細胞などの免疫担当細胞を抑制することで、抗リウマチ作用を示すことが考えられている。一方、RA の発症機序には、T 細胞の活性化に加え、滑膜細胞の増殖や、滑膜細胞からの骨吸収因子の放出が重要な役割を果たしていることか示唆されている。タクロリムスの薬理作用として、カルシニューリン阻害以外の機序が考えられており、今回 RA 滑膜細胞に対する作用について検討した。その結果、タクロリムスは RA の軟骨破壊に必要とされている MMP-13 のサイトカインによる誘導を阻害することが明らかになった。またタクロリムスは IL-1 β 刺激で誘導される JNK の活性化を阻害した。このことは、タクロリムスが、JNK の活性化を阻害し、MMP-13 遺伝子発現に必要な転写因子 AP-1 に抑制的に働くことで、MMP-13 の産生を阻害することを示唆している。以上の結果より タクロリムスは T 細胞の活性化を抑制す

るだけでなく、RA の病変の主座である滑膜細胞に働き、軟骨破壊に中心的役割を果たしている MMP-13 の産生を抑制することで、抗リウマチ作用を示すことが示唆された。

E 結論

タクロリムスは、IL-1 β 刺激で RA 滑膜細胞に誘導される JNK の活性化を阻害し、MMP-13 の産生を抑制した。タクロリムスは、滑膜細胞への直接作用し、軟骨破壊を誘導する MMP-13 を抑制することで、抗リウマチ効果を示すことが示唆された。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

- 1) Tanaka F, Migita K, Kawabe Y, Aoyagi T, Ida H, Kawakami A, Eguchi K. Interleukin-18 induces serum amyloid A (SAA) protein production from rheumatoid synovial fibroblasts *Life Sci* 74 1671-9, 2004
- 2) Migita K, Eguchi K. FK506 Anti-inflammatory properties *Curr Med Chem* 2 260-264, 2003
- 3) Migita K, Tanaka F, Abiru S, Ida H, Izumi Y, Kawakami A, Eguchi K. The role of mitochondria in nitric oxide-mediated thymocyte apoptosis *Immunol Lett* 90 87-91, 2003
- 4) Tanaka F, Migita K, Honda S, Fukuda T, Mine M, Nakamura T, Yamasaki S, Ida H, Kawakami A, Origuchi T, Eguchi K. Clinical outcome and survival of secondary (AA)

amyloidosis Clin Exp Rheumatol 21 343-6,
2003

5) 右田清志 江口勝美 二次性アミロイドーシスの早期診断と治療 リウマチ科 29 2
66—269、2003

6) 右田清志 江口勝美 p53 発現による細胞増殖制御 臨床免疫 38 621—624、
2002

7) 右田清志 二次性アミロイドーシス —原因と対策— 九州リウマチ23 11—16、2003

8) 右田清志 江口勝美 抗 TNF α 阻害療法アレルギー リウマチ 膠原病の最新医療 寺田国際事務所/先端医療技術研究所 395—398、2003

2 学会発表
特になし

H 知的財産権の出願・登録
特になし



図2 RA 滑膜細胞の JNK の活性化に対する FK506 の作用

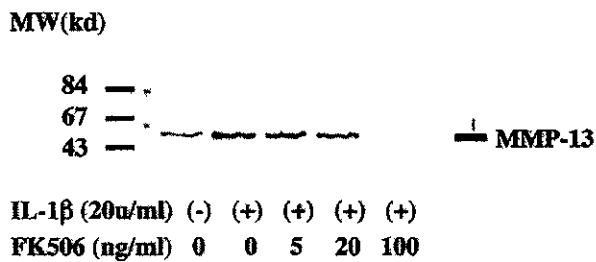


図1 IL-1 β で誘導される RA 滑膜細胞の MMP-13 産生に対する FK506 の作用

関節リウマチにおけるマクロファージ系滑膜細胞—T細胞間相互作用とその新規治療への応用に関する研究

分担研究者 原まさ子 東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター 教授

研究要旨 私達はこれまで RA 滑膜組織における T 細胞とマクロファージ系滑膜細胞との細胞間相互作用を検討し、滑膜 T 細胞が CD154 や LIGHT などの TNF superfamily を発現し、滑膜マクロファージに発現した各分子に対する受容体に結合して炎症性サイトカイン産生を誘導することを示してきた。これらの結果から、RA 新規治療法として、TNF superfamily - TNF receptor family システムの可溶性受容体による人為的制御が有効であることが期待できる。しかし、TNF superfamily は一般に単分子では受容体との結合が弱いので、単分子の可溶性受容体による治療効果は不十分と予測される。そこで、私達は 5 量体形成蛋白である cartilage oligomeric matrix protein (COMP) と CD40 の細胞外部分との融合蛋白(CD40-COMP)を作製し、その関節炎発症抑制効果を抗コラーゲン抗体誘導関節炎モデルマウスで検討した。その結果 CD40-COMP による関節炎発症抑制効果が確認された。COMP 融合可溶性受容体は TNF superfamily - TNF receptor family システムの人為的制御に有用と考えられる。

A 研究目的

関節リウマチ(RA)の滑膜組織では、tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1, IL-6 などの炎症性サイトカインの過剰産生が病態形成に関与している。この RA 滑膜組織でのサイトカイン産生誘導の分子機構は明らかではなく、RA の新規治療法を検討する上でこの分子機構を明らかにすることは非常に重要であると考えられる。そのため私達はこれまで、RA 滑膜組織に多数浸潤する T 細胞とマクロファージ系滑膜細胞に着目し、それらの TNF superfamily - TNF receptor family システムを介する細胞間相互作用がサイトカイン産生誘導の中核を担っていると考え、その検討を行ってきた。そして、RA 滑膜組織では、滑膜 T 細胞が CD154 や LIGHT を、マクロファージ系滑膜細胞がそれらの受容体である CD40 や Herpes virus entry mediator (HVEM)を発現し、それらの相互作用により、炎症性サイトカインの産生が誘導されることを報告してきた。これらの結果から、CD40-CD154, LIGHT-HVEM システムの人為的制御が RA の新規治療として有効である可能性が

示唆された。これら TNF superfamily は、一般に 3 量体を形成して同様に 3 量体を形成した受容体に結合して作用する。そのため単量体または二量体の可溶性受容体などでは十分に阻害機能を発揮しない場合も知られている。そこで今回、私達は 5 量体形成蛋白である cartilage oligomeric matrix protein (COMP) と CD40 の細胞外部分との融合蛋白(CD40-COMP)を作製し、その関節炎発症抑制効果を RA の関節炎モデルのひとつである抗 II 型コラーゲン抗体誘導関節炎モデルマウスを用いて検討した。

B 研究方法

CD40-COMP は baculovirus を用いて作製した。ヒト CD40 cDNA の細胞外部分を PCR で増幅し、ヒト COMP cDNA の 5'末端側に接続して作成した融合遺伝子を baculovirus 発現ヘクターにサブクローニングした。Sf9 細胞にこの発現ヘクターを遺伝子導入し baculovirus を作成し、3 次ウイルスを用いて recombinant CD40-COMP 蛋白を作成した。

5 週齢、雄の DBA/J1 マウス 15 匹に、抗 II 型コ

ラーケンモノクローナル抗体 (2 mg/匹) を尾静注し、24 時間後に lipopolysaccharide (LPS) (25 µg/匹) を腹腔内投与して実験的関節炎を誘導した 15 匹中の 7 匹に、1 回 1 匹あたり 100 µg の CD40-COMP 蛋白を抗体投与の前日、LPS 投与日、その 2 日後、4 日後の合計 4 回腹腔内投与した (CD40-COMP 投与群) 他の 8 匹にはコントロールとして生理食塩水を、同様に投与した (生理食塩水群) 関節炎は関節炎スコアで評価し、統計学的解析には Wilcoxon's rank sum test を用いた 組織学的所見は、関節炎が最も重症化したと判断された抗体投与後 8 日目に作製したパラフィン標本を Hematoxylin-Eosin 染色により評価した

(倫理面への配慮)

大学内の動物実験倫理審査委員会に実験計画書を提出し、実験許可を得た。実験中は動物に過度のストレスを与えないように配慮し、実験を実施した。

C 研究結果

Recombinant CD40-COMP 蛋白は非還元条件下では約 150 kD の分子量を、還元条件下では約 30kD の分子量を示した。この解析結果から、非還元条件下では、五量体を形成していると考えられた。

本モデルマウスの関節炎発症率は 100% で、両側上下肢に LPS 投与 2 日目から明らかな関節炎を発症した。関節炎スコアは、LPS 投与 2 日目以降、全経過を通して生理食塩水投与群に比較し、CD40-COMP 投与群で有意な低下が認められた (図 1) 病理組織所見は、CD40-COMP 投与マウスでは滑膜の肥厚と軽度の炎症性細胞浸潤が認められたか、関節軟骨や関節構造の破壊は認められなかった 一方、生理食塩水投与マウスでは著明な炎症細胞の浸潤が滑膜のみならず周囲の結合組織にも認められ、パネラスにより骨 軟骨が顕著に破壊されていた

D 考察

TNF superfamily 分子、TNF receptor family 分子は、一般に 3 量体を形成して作用するという特徴を有している TNF 受容体は Fc 融合蛋白が TNF- α または

TNF- β と TNF 受容体の結合を阻害することが示されているか、CD154 で報告されているように受容体と Fc との融合蛋白 (二量体の可溶性受容体) では十分に CD40-CD154 相互作用を阻害できない場合も知られている 今回の研究結果から、5 量体形成性可溶性受容体による CD40-CD154 システムの阻害が、関節炎発症抑制効果を有することが確認できた この手法を、CD154 以外の TNF superfamily と TNF receptor family 分子に応用することにより、RA の新規治療の開発が期待できる それらの候補分子として、私達がこれまでに検討してきた LIGHT-HEVIM システムが挙げられる。

E 結論

RA 滑膜 T 細胞とマクロファージ系滑膜細胞間において、RA の病態形成に関与すると考えられる、TNF superfamily 分子と TNF receptor family 分子の相互作用を、COMP 融合蛋白による 5 量体形成可溶性受容体で制御する手法が、RA の新規治療法としての可能性を有している

F 健康危険情報

特記事項なし。

G 研究発表

1 論文発表

The Ligation of CD40 on CD14⁺ synovial cells from rheumatoid arthritis patients amplifies the synovial inflammatory response through activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB
Arthritis Rheum In press

2 学会発表

なし

H 知的財産権の出願・登録

なし

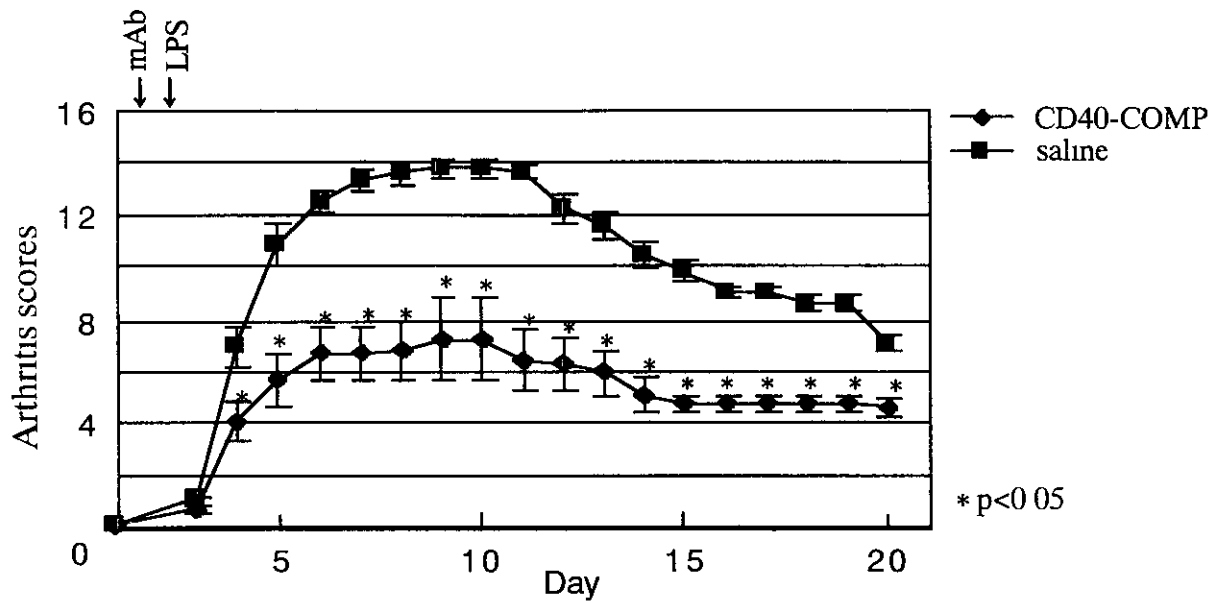


図1 CD40-COMP 融合蛋白による抗II型コラーゲン抗体誘導関節炎モデルマウスに対する発症予防効果

5週齢, 雄のDBA/J1マウスに, 抗II型コラーゲンモノクローナル抗体 (2 mg/匹) および lipopolysaccharide (LPS) (25 μg/匹) を投与して実験的関節炎を誘導した。CD40-COMP または生理食塩水を4回 (LPS投与前日、LPS投与当日、LPS投与2日後、4日後) 投与し、関節炎を経時的に観察した。縦軸には関節炎スコアを示した。

関節リウマチの滑膜細胞におけるアダプター蛋白の発現とチロシンキナーゼ阻害薬による増殖制御に関する研究

分担研究者 亀田 秀人 埼玉医科大学総合医療センター第二内科 講師

研究要旨 RA の滑膜細胞は腫瘍様の増殖異常を示す特徴を有する。この分子機構の解明と制御を目的として、滑膜細胞の主要な増殖因子 PDGF の刺激伝達におけるアダプター蛋白の関与を検討した。RA の滑膜細胞には Gab1 などが発現しており、PDGF 刺激でリン酸化された。慢性骨髄性白血病治療薬 STI571 が PDGF によるリン酸化と細胞増殖を抑制し、RA の新規治療薬ともなる可能性が考えられた。

A 研究目的

関節リウマチ (RA) では滑膜細胞が腫瘍様の異常増殖を示すことが大きな特徴であり、このことが RA の骨関節破壊に大きく関与すると考えられる。この滑膜細胞の異常増殖を生じる分子機構として、増殖因子の過剰産生の他、増殖因子受容体あるいはその下流のシグナル伝達分子の量的 質的発現異常の可能性が考えられる。近年、それ自体は酵素活性や転写因子活性を持たないが 2 つ以上の結合領域を有することで多分子会合を可能にしてシグナル伝達効率を飛躍的に高めるアダプター蛋白が次々と同定されている。そこで本研究では滑膜細胞におけるアダプター蛋白の発現や機能を調べることで、RA 滑膜細胞が増殖異常を生じている分子メカニズムを解明し、ひいては滑膜細胞の増殖制御による新規 RA 治療を開発することを目的とした。

B 研究方法

RA 患者より膝関節手術時に滑膜を採取し、ハサミで細分後 0.025% の trypsin/EDTA + RPMI1640 で 37 °C で 15 分振盪、さらに 10 mg/ml collagenase + RPMI1640 中で 37 °C、

2 時間振盪した。細胞浮遊液を滅菌ガーゼで濾過し、1500 rpm、7 分の遠心後えられた滑膜細胞を 100 mm あるいは 150 mm プレートで培養した。アダプター蛋白の発現を RA と変形性関節症 (OA) とて比較する際は初代培養細胞で行い、その他の実験系には passage 2-5 の滑膜細胞 (synovial fibroblast-like cells, SFL) を用いた。SFL の anchorage 依存性増殖は 96 穴プレートにおける増殖を MTT アッセイで検討、一方 anchorage 非依存性増殖は 0.3% の軟寒天中での 60 μ m 以上のコロニー形成率で調べた。

(倫理面への配慮)

患者からの検体採取に際して、個人情報の保護を含めた不利益や危険性がないことを十分に説明して文書により同意を得ている。

C 研究結果

まず血小板由来増殖因子 (PDGF) のシグナル分子について検討したところ、RA 滑膜細胞には Gab1、Gab2、Nck、Shc のアダプター蛋白の発現が見られた。いずれも PDGF-BB 10

ng/ml 刺激後 1 分以内にチロシンリン酸化され、この反応は抗 PDGF-BB 抗体あるいは STI571(imatinib) 1 μ M の前投与によりほぼ完全に抑制された (図 1)。次に SFL の anchorage 依存性増殖および非依存性増殖をそれぞれ検討したところ、いずれも PDGF 10 ng/ml 刺激により促進され、やはり STI571 1 μ M の前投与で抑制された (図 2)。アダプター蛋白のリン酸化ならびに増殖促進効果ともに PDGF は上皮増殖因子 (EGF) より強い作用を示した。

D 考察

これまでに検討したアダプター蛋白に関しては OA と比較しても RA 滑膜細胞に特異的なアダプター蛋白の質的あるいは量的発現異常は見出されていない。しかし線維芽細胞の *in vitro* transformation の系で、Gab1 の質的発現異常が RA 滑膜細胞に酷似した増殖因子依存性の腫瘍様増殖を生じることを既に見出しており、RA の病態にアダプター蛋白の発現異常が関与している可能性は十分に考えられる。STI571 は慢性骨髄性白血病 (CML) の画期的治療薬であり、染色体転座により生じた異常蛋白 Bcr-Abl チロシンキナーゼの恒常的な Ras 活性化により生じる異常増殖を IC₅₀ 0.025 μ M での特異的な Bcr-Abl 酵素活性阻害により抑制することかその作用機序である。チロシンキナーゼ自己リン酸化に対しても STI571 は p210 Bcr-Abl を IC₅₀ 0.25 μ M で抑制するが、PDGF 受容体も IC₅₀ 0.12-0.15 μ M で抑制するとされ、PDGF 受容体が関与する CML 以外の疾患への治療応用の可能性が考えられた。そこで今回、滑膜細胞のチロシンリン酸化反応や増殖に対する STI571 の抑制効果を検討したところ、臨床応用が期待できる成績であった。近年の RA 治療は MTX などの免疫抑制薬や抗 TNF α などの生物製剤が主流となっているが、免疫 炎症を全般的に抑制するため感染症や悪

性リンパ腫の併発をはじめとした重篤な副作用が問題であり、より関節炎に特異性の高い治療の開発が望まれている。今後は関節炎モデルを用いた *in vitro* での STI571 の有用性の検討が必要である。

E 結論

滑膜細胞の主要な増殖因子である PDGF の刺激伝達に複数のアダプター蛋白が関与しており、CML 治療薬である STI571 が RA 治療にも有用である可能性が示唆された。

F 健康危険情報

なし。

G 研究発表

1 論文発表

亀田秀人 線維芽細胞の transformation におけるアダプター蛋白の役割 臨床免疫, 40(2) 165-171, 2003

2 学会発表

Kameda H, Ishigami H, Abe T, Takeuchi T Expression of adapter proteins in rheumatoid synovial fibroblast-like cells and their involvements in the signaling from growth factor receptors 第 67 回米国リウマチ学会, 2003 年 10 月, オランダ

H 知的財産権の出願・登録

なし。

図1 PDGF 刺激による Gab1、 Gab2 のチロシンリン酸化と STI571 による抑制

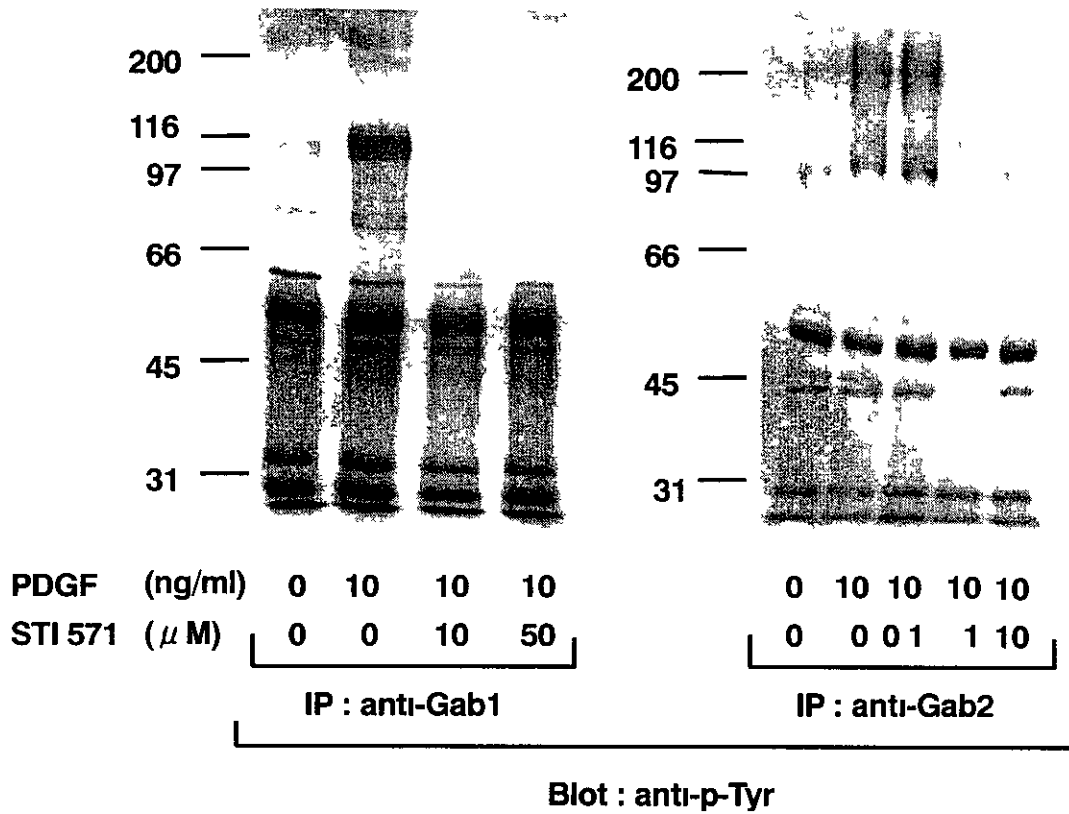
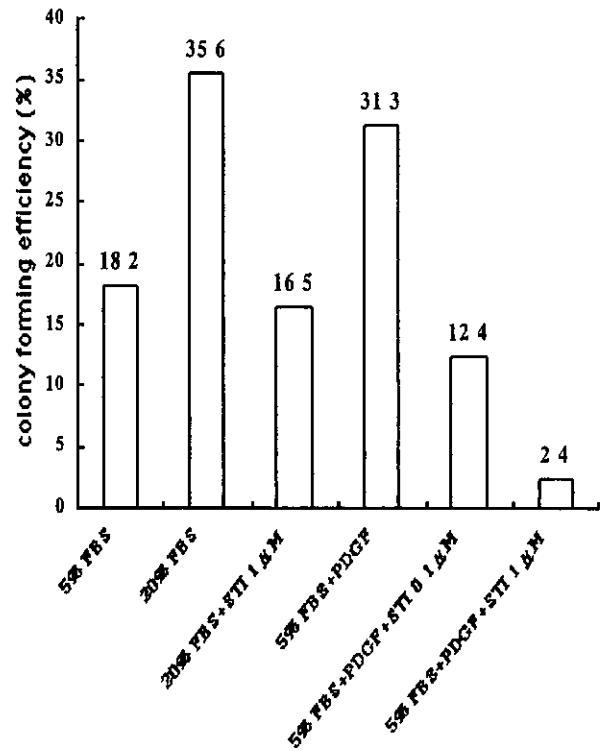
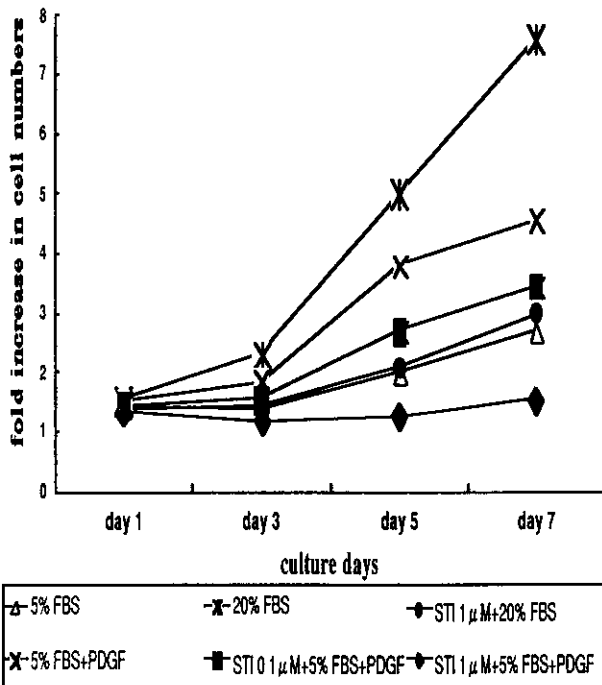


図2 RA 滑膜細胞の anchorage 依存性および非依存性増殖と STI571 による抑制

anchorage-dependent growth

anchorage-independent growth



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

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
研究協力者 萩山裕之 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 助手

研究要旨 アデノウイルスベクターの副作用として免疫反応を引き起こすことがあげられ、これにより関節への局所投与で関節炎が惹起され、また頻回投与時にベクターが除去され遺伝子導入効果が減弱する。少量のベクター量で効果的に遺伝子導入できれば、この副作用の軽減が期待される。そこでウイルスファイバーに改変を加えたところ滑膜細胞への感染効率の増加が可能であった。さらに、発現カセットの改変により滑膜線維芽細胞における遺伝子発現効率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、より安全な関節リウマチ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

A 研究目的

アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療は関節リウマチ (RA) の新規治療法として期待され、モデル動物を用いてアデノウイルスベクターによる遺伝子導入療法により関節炎を阻止する試みが多数行われている。しかしその問題点として、アデノウイルスベクターに対する免疫反応が惹起され、ベクターの排除が起こったり、関節局所投与時に関節炎が引き起こされたりすることが知られている。ベクターの改変によってより少ないベクター量で効果的に滑膜組織に遺伝子導入が可能になれば、これらの問題点の解消が期待される。

我々は滑膜組織には通常ベクターとして用いられるアデノウイルス (Ad5) に対する特異的レセプターがほとんど発現していないことに着目し、ウイルスファイバーに改変を加えたところ、RA 患者の滑膜線維芽細胞 (FLS) に対する感染効率が増加することを以前確認した。そこで、初代滑膜細胞におけるウイルスファイバー改変の効果を検討した。また、アデノウイルスベクターの転写制御配列の改変、および RNA の核外輸送を促進することによりアデノウイルスベクターの遺伝子発現効率を高めることが

最近水口博士らにより報告された Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulation element(WPRE)の導入による FLS での発現効率の変化を検討した。

B 研究方法

Ad5 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)、およびヒトのほとんどの細胞に発現する CD46 を受容体とするのが最近確認されたアデノウイルス 35 型のファイバーを Ad5 のファイバーへと改変した変異体 (Ad5/35) につき、green fluorescent protein (GFP) をレポーターとして初代滑膜細胞へ感染させ、その発現量をレーザースキャニングサイトメーターで測定した。この際細胞種類の同定のため、線維芽細胞のマーカである Prolyl 4-Hydroxylase (P4P)や、マクロファージのマーカである CD68 を認識する抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、それぞれの陽性細胞における GFP の陽性率を検討した。

また、種々の発現カセットを持つアデノウイルスベクターについてルシフェラーゼをレポーターとし

て FLS に感染させ、その発現効率を検討した。転写制御に関しては通常の CMV プロモーター、CMV のイントロン配列を組み込んだ改良型 CMV プロモーター (iCMVp)、 β -actin プロモーターと CMV エンハンサーを組み込んだ CAG プロモーターを使用し、さらに転写後プロセスの制御に関しては mRNA の核外輸送を促進するとの報告がある WPRE を使用して、その効果を検討した。

(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にて審議され、承認されたものである。

C 研究結果

各ウイルスを 1 細胞あたり同しウイルス粒子数

(VP) で初代滑膜細胞に感染させたところ、P4P 陽性細胞、CD68 陽性細胞どちらにおいても、Ad5 と比べて、RGD変異および Ad5/35 では高い感染効率を認めた。特に、Ad5/35 では感染効率が良好であった (図 1)。また、FLS に前述のアデノウイルスベクターを感染させ、48 時間後にルシフェラーズ (Luc) アッセイを行ったところ、iCMVp の転写活性が高く、WPRE の導入により luc 発現量はさらに増加した。通常の CMV プロモーターに対し両者を組み合わせたものでは 50-100 倍も転写活性が高かった (図 2)。

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初代滑膜細胞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。また、アデノウイルスベクターの発現カセットを改変することにより、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のファイバーの改変により滑膜細胞への感染効率は向上し、発現カセット改変することにより 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 RA 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 31 回日本臨床免疫学会 (東京) アデノウイルスベクター発現カセット改変による滑膜線維芽細胞における導入遺伝子の発現効率の向上

・第 33 回日本免疫学会 (福岡) 関節リウマチの遺伝子治療にむけた発現カセットの改変

H 知的財産権の出願 登録状況

なし。

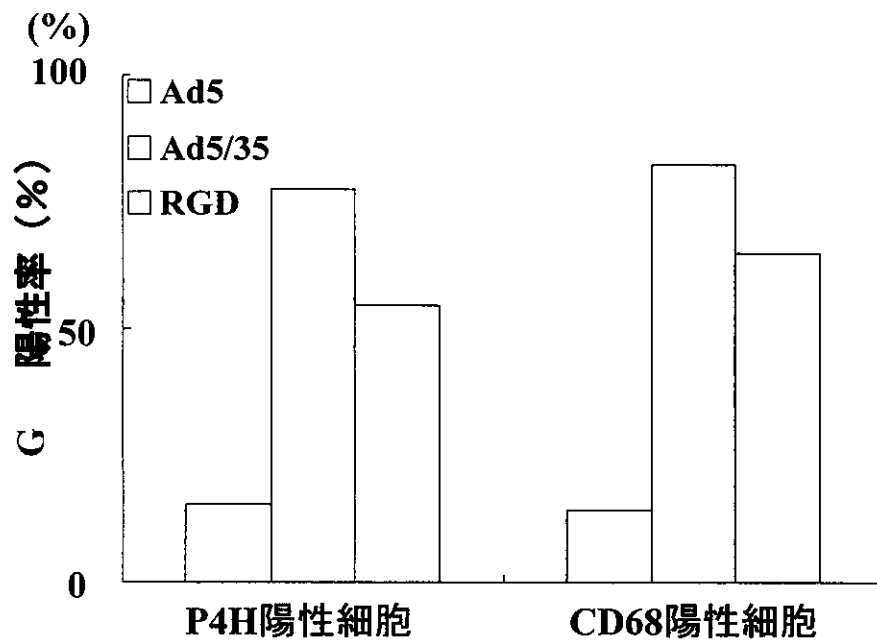


図1 GFPをレポーターとして変異ウイルスを初代滑膜細胞に感染させた。GFP陽性細胞の比率を縦軸に示す。代表的な図を示す。

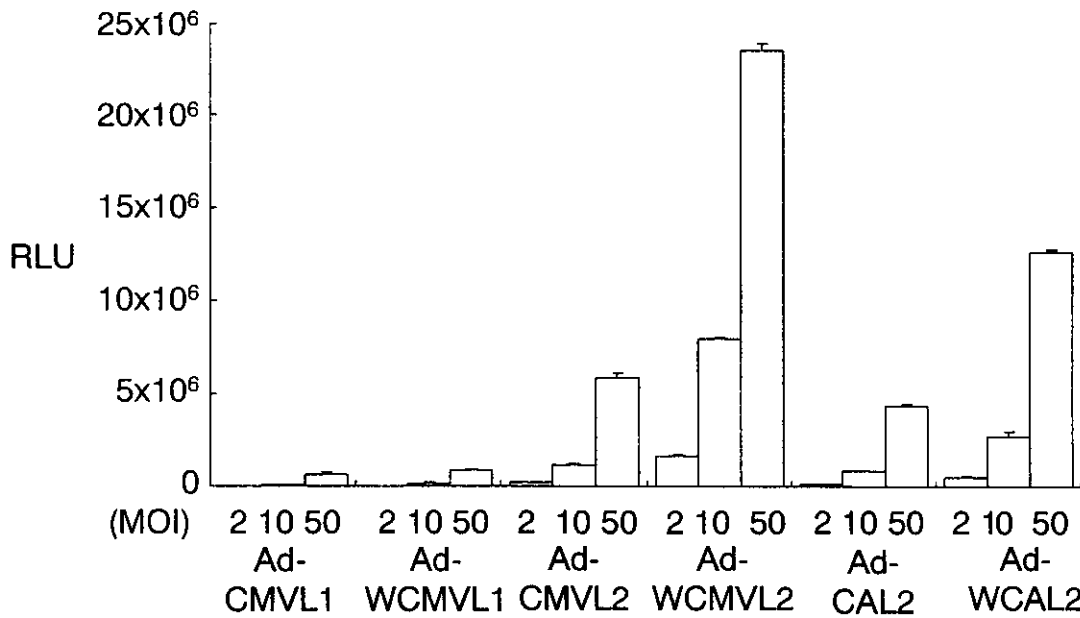


図2 Lucをレポーターとして各種ウイルスをFLSに感染させた。Luc活性を縦軸に示す。FLSにおいては、改良型CMVプロモーターの転写活性が高く、WPREの導入によりLuc発現量はさらに増加した。

関節リウマチ滑膜由来滑膜線維芽細胞における
サイクリン依存性キナーゼインヒビター-p21^{Cip1} 強制発現による p16^{INK4a} 発現誘導機構の研究

上阪 等 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 助教授

研究要旨 関節リウマチ(RA)のモデル動物において p16^{INK4a}(p16)関節内遺伝子治療は関節炎に著効し、滑膜組織における p16 発現誘導は RA の治療の一つの鍵と考えられる。RA 滑膜由来滑膜線維芽細胞(RSF)においては p16 が発現誘導されやすいが、その機構は不明である。そこで、RSF における p16 の発現機構を解析した。【方法】RSF に p21^{Cip1}(p21)もしくはコントロールアデノウイルスを感染させ、経時的にサンプル調製し、RT-PCR, ウェスタンブロット、蛍光ディファレンシャルディスプレイ(FDD)、GeneChip (アフィメトリクス社)などを行った。【結果】RSF に p21 を強制発現させると、p16 の発現誘導を認めた。この p21 による p16 発現誘導は変形性関節症由来滑膜線維芽細胞や WI-38 などの培養線維芽細胞株では認めなかった。この p16 発現誘導においては、活性型 Ras の強制発現や細胞老化などによる p16 発現に関与することが既に知られている ERK, Ets-1, Ets-2, Id-1, Sp-1 などの細胞内シグナル伝達分子/転写因子や p16 プロモーターのメチル化などの関与は認められなかった。そこで、p16 の発現誘導に関与する未知の遺伝子を探索するため、FDD 法や GeneChip 解析を行うと、p16 が誘導された RSF 特異的に発現が変化した遺伝子群を認めた。【結語】これらの遺伝子が p21 による RSF 特異的な p16 発現誘導に関与している可能性があり、RA 治療の新しい標的遺伝子となりうる。

A 研究目的

関節リウマチ(RA)のモデル動物においてサイクリン依存性キナーゼインヒビター(CDKI) p16^{INK4a}(p16)関節内遺伝子治療は関節炎に著効し、滑膜組織における p16 発現誘導は RA の治療の一つの鍵になりうると思われる。RA 滑膜由来滑膜線維芽細胞(RSF)においては放射線照射、高密度培養、低血清培地などの細胞増殖を抑制するような条件におくと p16 が発現誘導されやすいが、その機構は不明である。同じ条件においては、CDKI の p21^{Cip1}(p21)も発現誘導されたが、RSF 以外の線維芽細胞においても発現誘導された。そこで、RSF における p16 の発現機構を解析した。

B 研究方法

RSF に p21 アデノウイルスもしくは挿入遺伝子のないコントロールアデノウイルスを感染させた。その後、経時的にサンプル調製し、RT-PCR, western blot, 蛍光ディファレンシャルディスプレイ(FDD)、Gene Chip(Affimetrix 社)などを行った。

(倫理面への配慮)

本研究においては、患者組織由来の培養細胞を使用するが、各患者より書面にてインフォームドコンセントを得た。また、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

以前報告したように、RSFを細胞増殖を抑制する条件におくと、CDKIのp16, p21の発現が誘導される。両者の関係を調べるため、RSFにp21アデノウイルスもしくはコントロールアデノウイルスを感染させ、経時的に解析した。すると、3日目以降、ウェスタンプロットもしくはRT-PCRにて内因性のp16発現誘導を認めた。この発現誘導は継代が若く、増殖の活発なRSFではおこったが、継代を重ねたRSFではおこらなくなった。逆にp16の強制発現ではp21の発現誘導はおこらなかった。また、RSFにp21を強制発現した時の他のCDKIの発現変化を調べた。p16とおなじ遺伝子座から発現するといわれるp14^{ARF}を始め、p15^{INK4d}, p19^{INK4c}, p57^{Kip2}などの他のCDKIの発現誘導は認めなかった。p27^{Kip1}は経時的に発現が上昇しているが、コントロールとp21強制発現の間に差はなかった。p27^{Kip1}は高密度培養において発現して細胞増殖を停止させることが報告されており、コンタクトインヒビションによると考えられた。

同様の実験を皮膚線維芽細胞、胎児肺線維芽細胞株であるWI-38や変型性関節症(OA)滑膜由来滑膜線維芽細胞において行ったが、p21によるp16発現誘導はおこらなかった。

以上より、p21によるp16発現誘導はRSF特異的におこった。滑膜細胞に内因性のp16発現を誘導するRAの新しい治療法を開発する上で、この経路を明らかにすることが重要と考えられた (図1)。

p16の発現調節機構はいくつか知られている。継代を重ねた時の分裂寿命による細胞老化においては、Ets-1の発現上昇とEtsの転写阻害因子であるId-1の発現低下によりp16が発現する。活性化Rasの強制発現によるpremature senescenceにおいては、MEK/ERKを経て転写因子のetsを介してp16発現が誘導される。また、転写因子のSp1の関与を示唆する報告もある。逆に、bmi-1などのポリコム遺伝子群はp16の発現を抑制することが知られる。さらに腫瘍細胞株では、p16プロモーターのメチル化やヒストンアセチル化によってp16の発現が調節されているものがある。

そこで、RSFにおけるp21によるp16発現誘導に関与

しているかを調べた。まずウェスタンプロットにより、p21によるERKリン酸化への影響を調べた。p21もしくはコントロールアデノウイルス後に著しいリン酸化を認めた。すでにアデノウイルス感染によりERKがリン酸化されることが知られており、感染に伴うものと考えられる。両者ともにこれだけ強いERKのリン酸化がおこっているにもかかわらず、p21強制発現時のみにp16発現誘導を認めた。さらに、ERKの下流においてp16を発現させる、Ets-1, Ets-2などの転写因子、etsの転写阻害因子であるId-1のウェスタンプロットを行なったが、p21を強制発現させても明らかな発現変化は認めなかった。

また、p16のプロモーター領域には転写因子のSp1の結合部位があるが、p21によってはSp1のDNA結合活性は上昇しなかった。

腫瘍細胞株などではp16 promoter領域のメチル化やヒストンアセチル化などがp16発現を調節しており、メチル化阻害剤の5-aza-CやHDAC inhibitorのトリコスタチンA(TSA)で処理するとp16発現誘導を認めたという報告がある。そこで、RSFにこれらの薬剤を加え、RT-PCRでp16の発現誘導を調べた。これらによるp16の発現はPCRでやっとdetectできる程度であった。さらにウェスタンプロットを行なった。Id-1はAza-Cにより発現が上昇することが報告されており、aza-Cによるメチル化抑制はかかっていると考えられた。しかしながら、aza-Cによるp16の発現誘導は全く認めなかった。TSAについてはポジコンをおけなかったが、p16の強い誘導は認められなかった。以上より、p21によるp16発現誘導は既知のp16発現機構以外が関与していると考えられた (図2)。

これまで、p21によるp16発現誘導を認めたのはRSFのみであり、p21発現からp16発現に至る間にRSF特有の経路が存在すると考えられる。そこで、蛍光ディスプレイ(FDD)にて包括的な遺伝子発現プロファイルの変化を検討した。まず、p21によりp16発現誘導されたRSFの、p21又はコントロールアデノウイルス感染後のmRNAを用いて240 primesでFDDを行い、発現変化のある断片を検索した。次に別のRSFで再現性を確認した。この段階ではまだ100個以

上の断片で発現変化を認め、さらにスクリーニングを行った。p21によるp16発現誘導は継代を重ねると誘導がかからなくなる。この時、p21とp16をつなぐ経路の一部が阻害され、p21の下流でp16の発現誘導に関与する遺伝子発現変化がおこらなくなっていると考えられる。そこで、p21によるp16発現誘導のかからなくなったRSFと比較し、発現変化の消失した断片を同定した。これらは約30断片程度だった。これらを配列予測、シークエンスを行い、遺伝子を同定した。

さらに、アフィメトリクス社のGene Chipにて検討もした。FDDと同様、p21によりp16が発現誘導されたRSFでは発現変化したが、継代を重ねてp16が発現誘導されなくなったRSFではp21による発現変化がなくなった遺伝子を検討した。約33000遺伝子中、現在のところ発現上昇がp16発現誘導に関与していることが示唆される遺伝子は8個、発現減少が関与していることが示唆される遺伝子を4個認めた (図 3)。

D 考察

RSFにp21を強制発現させると、p16の発現誘導を認めた。p21によるp16発現誘導は線維芽細胞株やOA由来滑膜線維芽細胞では認めなかった。

このp16発現誘導は、ERK, Ets-1, Ets-2, Sp-1などの分子やプロモーターのメチル化、ヒストンアセチル化などが制御しているとは考えられなかった。FDD法やGeneChip解析を行うと、p16^{INK4a}が誘導されたRSF特異的に発現が変化した遺伝子群を認めた。これらの遺伝子群がp21^{Cp1}によるRSF特異的なp16^{INK4a}発現誘導に関与している可能性がある。今後、RSFにおいてこれらの遺伝子の強制発現やノックダウンをしてp16の発現誘導の有無を検討する。

E 結語

RSFにp21を強制発現させると、p16の発現誘導を認めた。FDD法やGeneChip法によりこの発現誘導において特異的に発現変化する遺伝子群を認めた。これらの遺伝子がp21によるRSF特異的なp16発現誘導に関与している可能性があり、RA治療の新しい標的遺伝子となりうる。

F 健康危険情報

なし。

G 研究発表

1 論文発表

1) Yoshinori Nonomura, Hitoshi Kohsaka, Kenji Nagasaka, and Nobuyuki Miyasaka Gene transfer of a cell cycle modulator exerts anti-inflammatory effects in the treatment of arthritis **J Immunol**, 171 (9), 4913-4919, 2003

2 学会発表

1) Yoshinori Nonomura, Hitoshi Kohsaka, Kenji Nagasaka and Nobuyuki Miyasaka p21^{Cp1} gene therapy for arthritis exerts anti-inflammatory effects by type I interleukin-1 receptor dependent and independent pathways 第47回日本リウマチ学会総会、東京、2003年4月 (国際ワークショップ)

H 知的財産権の出願・登録

なし。

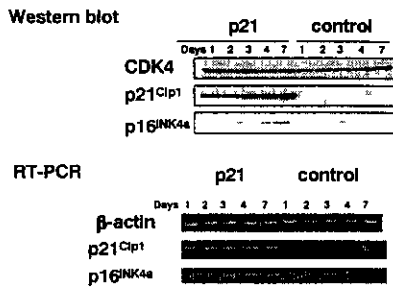


図1 RSFにおけるp21強制発現によるp16発現誘導。
ウェスタンブロットもしくはRT-PCRにて内因性のp16発現誘導を認めた。この発現誘導は継代が若く、増殖の活発なRSFではおこったが、継代を重ねたRSFではおこらなくなかった。また、変型関節症由来滑膜繊維芽細胞やWI-38のような繊維芽細胞株でもおこらなかった。

(1) 1st screening
RSFにコントロールもしくはp21アデノウイルス感染後0, 1, 2, 3日目に発現変化のある遺伝子を検索
(2) 2nd screening
p21によりp16が発現誘導されなくなったRSFで同様の解析
発現変化のなくなった遺伝子を同定した。

発現上昇がp16^{INK4a}発現誘導に関与? 8遺伝子/33000遺伝子
発現減少がp16^{INK4a}発現誘導に関与? 4遺伝子

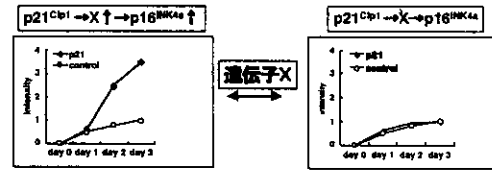


図3 Gene Chip (affimetrix 社)によるp21によるp16発現誘導に関与する遺伝子群の検索。二段階のスクリーニングを行い、絞り込んだ。

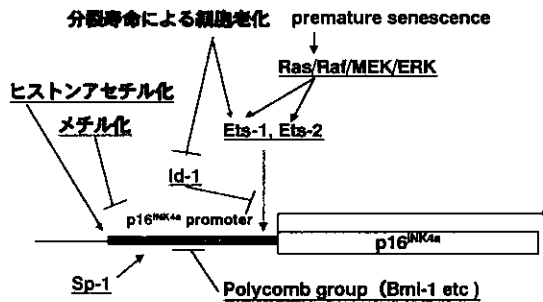


図2 既知のp16発現調節機構。これらについて検討したが、ERK, Ets-1, Ets-2, Id-1, Sp-1、ヒストンアセチル化、メチル化などの明らかな関与は認められなかった。これまでp21によるp16発現誘導を認めたのはRSFのみであり、p21発現からp16発現に至る間にRSF特有の経路が存在すると考えられた。

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)
分担研究報告書

RA 治療に用いられる生物製剤の医薬経済学的評価に関する研究

分担研究者	津谷喜一郎	東京大学大学院薬学系研究科・医薬経済学	客員教授
研究協力者	五十嵐 中	東京大学大学院薬学系研究科・医薬経済学	大学院生
研究協力者	福田 敬	東京大学大学院薬学系研究科・医薬経済学	客員助教授

研究要旨 RA 生物学的製剤 etanercept に関して、臨床的アウトカムを同等と仮定したうえで自己注射と通院治療の cost minimization analysis を実行した。通院に伴う直接非医療費 通院に伴う間接費用を考慮した場合、通院から自己注射へ変更することで患者 1 人当たり年間約 60 万円の費用削減効果があった。感度分析でも自己注射の優位性は不変で、自己注射投与法の臨床経済的有用性が明らかになった。

A 研究目的

RA 生物学的製剤の etanercept (Enbrel) に関して自己注射と通院治療の cost-effectiveness analysis (CEA)を行う。

B 研究方法

平成 14 年度に開発したプロトコールに従い、生物学的製剤 etanercept (Enbrel) に関して自己注射と通院治療の CEA を実行した。

1) 有効性・安全性データについては、現在日本で進行中の継続長期投与試験と、海外の臨床試験・市販後調査の結果を用いた。2) コストデータについては、薬剤費以外の治療コストも両群で異なっていると予想されたため、direct cost (初診料 再診料、処方費 注射費 検査費、通院費、さらにアンケート調査によって算出する自己注射の教育コスト)、indirect cost (介護者を含めた労働損失) とともに、そのデータソースを確定し、分析を行った。

(倫理面への配慮)

臨床試験での個々の患者のデータを直接利用することはなく、またコスト算出に関してもレセプトは参照しないため、配慮する必要はない。

C 研究結果

自己注射群と通院治療群とで有効性に差はなく、自己注射に起因する有害事象の発生もなかったため、2 群のアウトカムは同等と判断して費用最小化分析 (Cost minimization analysis CMA)を適用した。

直接費用のみを算入した場合、自己注射群の患者一人当たりの年間コストは 259 万 2886 円、通院治療群では 292 万 7621 円となった。(差額 33 万 4735 円)

間接費用を算入した場合は、自己注射群で 267 万 4758 円、通院治療群で 325 万 5110 円と、差額はさらに増えた。(差額 58 万 352 円)

感度分析においても、自己注射群の優位性は変わらなかった。自己注射群の有害事象発現率が 20%まで上昇し、1 件当たりの治療コストが 300 万円と仮定しても、依然自己注射群が有利である。

D 考察

etanercept の自己注射と通院治療の CEA を行った。有効性が同等である限り、通院治療を自