

図 1 : TGF-β拮抗阻害薬

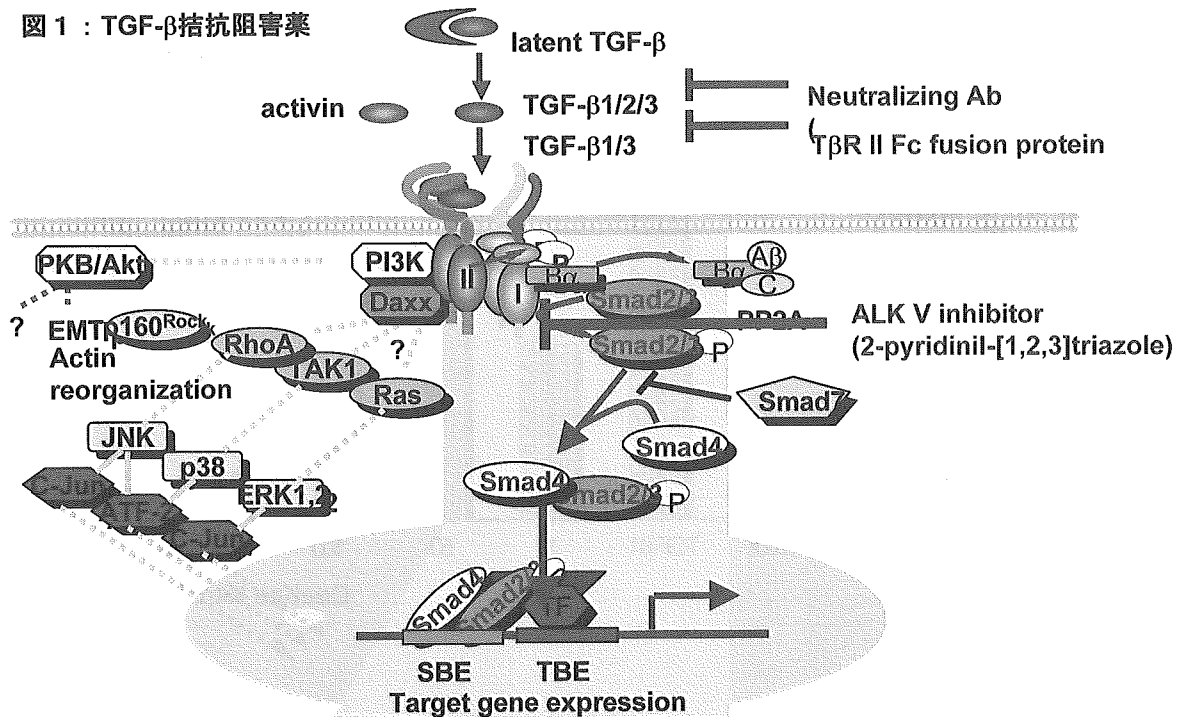


図 2 : 可溶性 II型TGF-β 受容体融合タンパクトランスジェニックマウス(SR2Fマウス)の表現型  
第 1 報 Yang Y. et al, *JCI*, 2002, unpublished data

| 血算                       | コントロール    | トランスジェニック |
|--------------------------|-----------|-----------|
| 白血球 (/μl)                | 6433±1193 | 6800±848  |
| 赤血球(10 <sup>6</sup> /μl) | 7.86±0.45 | 7.64±0.11 |
| 血小板(10 <sup>5</sup> /μl) | 12.6±0.18 | 11.7±0.08 |

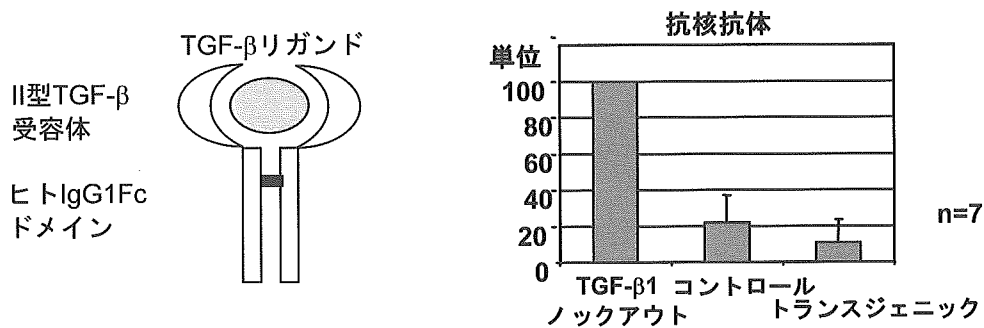


図3: ALK V inhibitorによるTGF- $\beta$ シグナル伝達抑制効果

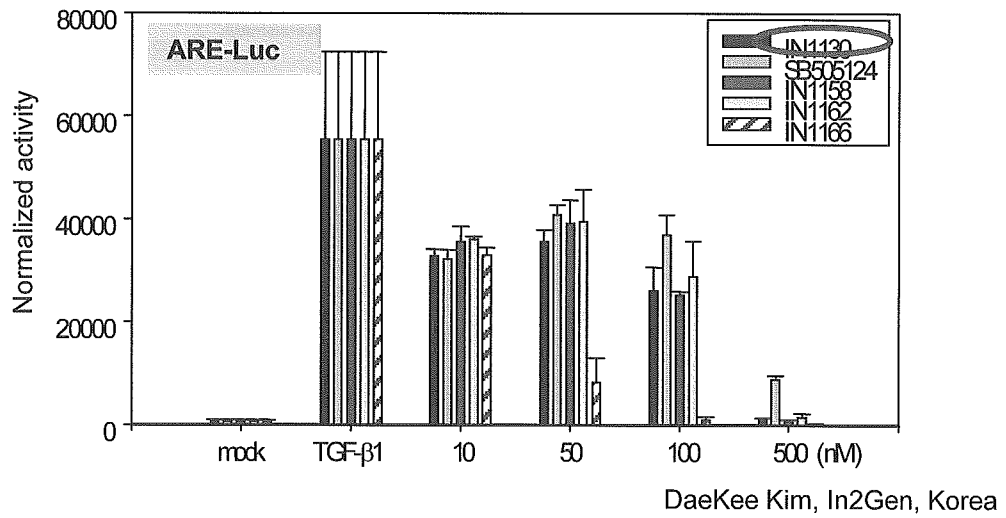
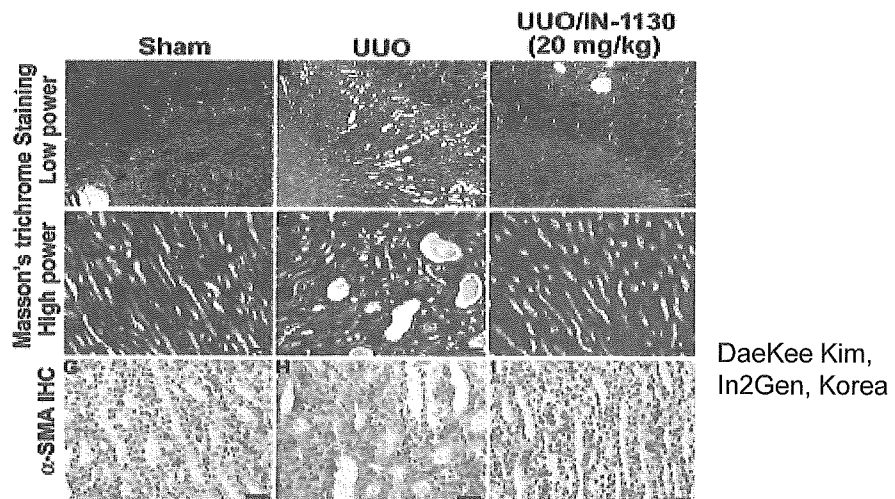
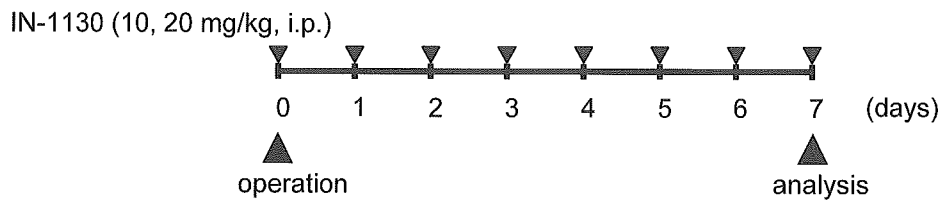


図4: ALK V inhibitor (IN-1130) のUnilateral Ureteral Obstruction (UUO)による腎線維化に対する治療効果



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

新規サイトカイン Interleukin-32 による炎症性関節炎の病態への関与に関する研究

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  
研究協力者 藤尾 圭志、庄田 宏文 東京大学医学部アレルギーリウマチ内科 医員

研究要旨

新規サイトカイン Interleukin-32 (IL-32)の炎症及び炎症性関節炎に対する関与をヒト及びマウスモデルで検討し、病態形成の重要なメディエーターであることを明らかにした。

A.研究目的

新規サイトカイン Interleukin-32 (IL-32)はマウスマクロファージ及びヒト単球に対して TNF- $\alpha$ 産生を誘導するヒトサイトカインとして報告された (Kim SH et al, Immunity (22); 131-142, 2005)。4つの splice variants が知られているが、発現量が多いものは IL-32 $\alpha$ , IL-32 $\beta$ であり、IL-32 $\alpha$ は細胞内に存在し、IL-32 $\beta$ は分泌型であると報告されている。関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) の病態形成に強く TNF- $\alpha$ が関与していることから、IL-32 も炎症性関節炎の重要なメディエーターであることが予想され、IL-32 による炎症性関節炎の病態形成への関与を明らかにすることを目的とした。

B.研究方法

ヒト末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell; PBMC) を Con A,  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 Abs で刺激し、MACS により CD3, CD14, CD20 陽性細胞に分離したあと RT-PCR により各細胞群における IL-32 発現をみた。更に同様の実験を刺激前に CD3 陽性 T 細胞を除去した上で行った。末梢血 CD4, CD8 陽性 T 細胞を IL-23, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ の存在下で培養し、IL-32 の発現を調べた。RA 患者の滑膜組織における IL-32 発現を RT-PCR, *in situ* hybridization で調べた。IL-32 $\alpha$ , IL-32 $\beta$ を、レトロウイルスを用いてマ

ウス CD4 陽性 T 細胞に導入し、コラーゲン誘発関節炎 (collagen-induced arthritis; CIA) マウスの発症直前に移入し、関節炎の増悪効果を調べた。IL-32 $\beta$ をマウス骨髄細胞に導入し、骨髄移植により IL-32 $\beta$  大量発現モデルを作成した。

(倫理面への配慮) 研究対象者には人権擁護上の配慮を行った上で、研究方法による不利益、危険性とそれらを排除する方法等について十分なインフォームドコンセントを行った。実験動物に対しては過度の苦痛を与えないなど、動物愛護上の十分な配慮を行った。

C.研究結果

末梢血 CD3 陽性 T 細胞では未刺激下でも IL-32 発現がみられ、Con A,  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 Abs 刺激により発現増強がみられた。CD14 陽性細胞, CD20 陽性細胞は未刺激では IL-32 を発現せず、刺激により発現がみられた。しかし CD3 陽性細胞非存在下では IL-32 発現が著しく減少した。CD8 陽性 T 細胞はサイトカイン刺激に対して有意な IL-32 発現増加を示さなかったが、CD4 陽性細胞は、IL-23, IL-12+IL-18, TNF- $\alpha$ の刺激により IL-32 発現が増加した。RA 患者の滑膜組織では OA 患者と比較して RT-PCR で IL-32 発現が著しく亢進していた。In situ hybridization では RA 患者の滑膜に浸潤するリンパ球に IL-32 の発現亢進がみられた。

CIA マウスにおいて、IL-32β導入 CD4 陽性 T 細胞の移入により、関節炎の発症が早まり、関節炎スコアも有意に上昇した。IL-32β骨髄移植マウスでは、脾臓において TNF-α, IL-1β の発現が亢進していた。

#### D. 考察

IL-32 は T 細胞, B 細胞, 単球で、特に刺激下に発現していた。CD3 陽性 T 細胞除去により B 細胞, 単球で発現が減少することより、これらの細胞における IL-32 発現には T 細胞の関与が考えられた。また関節炎に関与することが知られている各種サイトカインの刺激により CD4 陽性 T 細胞で IL-32 発現が亢進することから、CD4 陽性 T 細胞は関節炎の病態において、IL-32 の重要な産生元であると考えられた。RA 患者の滑膜組織で IL-32 発現が亢進し、*in situ* hybridization では主に滑膜に浸潤するリンパ球で IL-32 発現が亢進していたこともこれを支持する。

IL-32βを導入した CD4 陽性細胞はマウス関節炎モデルを有意に増悪させたことより、IL-32βの関節炎増悪効果が考えられ、骨髄移植による IL-32β大量発現モデルでのサイトカイン発現の検討より、TNF-α, IL-1β誘導が関節炎増悪の機序であると考えられた。

#### E. 結論

IL-32 は炎症性関節炎の重要なメディエーターのひとつであり、RA の病態形成に関与していると考えられた。IL-32 は RA 治療の新たなターゲットとなりうる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Kochi Y, Yamada R, Suzuki A, Harley JB, Shirasawa S, Sawada T, Bae SC, Tokuhira S, Chang X, Sekine A, Takahashi A, Tsunoda T, Ohnishi Y, Kaufman KM, Kang CP, Kang C,

Otsubo S, Yumura W, Mimori A, Koike T, Nakamura Y, Sasazuki T, Yamamoto K. A functional variant in FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. *Nature Genet.* 37:478-478, 2005.

2) Chang X, Yamada R, Suzuki A, Sawada T, Yoshino S, Tokuhira S, Yamamoto K. Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 44: 40-50, 2005.

3) Kawaida R, Yamada R, Kobayashi K, Tokuhira S, Suzuki A, Kochi Y, Chang X, Sekine A, Tsunoda T, Sawada T, Furukawa H, Nakamura Y, Yamamoto K. CUL1, a component of E3 ubiquitin ligase, alters lymphocyte signal transduction with possible effect on rheumatoid arthritis. *Genes Immun.* 6:194-202, 2005.

4) Sagawa K, Nagatani K, Komagata Y, Yamamoto K. Angiotensin receptor blockers suppress antigen-specific T cell responses and ameliorate collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 52:1920-1928, 2005.

5) Suzuki A, Yamada R, Ohtake-Yamanaka M, Okazaki Y, Sawada T, Yamamoto K. Anti-citrullinated collagen type I antibody is a target of autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun.* 333:418-426, 2005.

##### 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

多発性筋炎の新規モデルマウスの確立に関する研究

分担研究者 上阪 等 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科学 助 教授  
研究協力者 杉原 毅彦 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科学 大学院生

研究要旨

【目的】我々の研究の目的は、特定疾患の一つ多発性筋炎(PM)のモデルマウスを作成して、副作用が少なく効果的な治療法を開発することである。そこで、筋線維が自然壊死する SJL/J でのみ作成される従来の PM マウスモデルに代え、純化抗原として組換えヒト C 蛋白を用いて遺伝学的研究の容易な C57BL/6(B6)マウスで新規モデルを確立し、PM の病態を解明する。【方法】組換えヒト骨格筋 C 蛋白を作成し、CFA ないし百日咳毒素(PT)と共に B6 マウスないし遺伝子改変 B6 マウスに 1 回免疫した。筋炎について組織学的な評価を行い、Rotarod test により筋力低下を評価した。また、高用量ガンマグロブリン療法の治療効果を評価した。【結果】C 蛋白誘導筋炎(CIM)の筋炎像は骨格筋に認められ、臨床的に筋力低下を示した。CD8 とパーフォリン陽性細胞が筋炎部位に浸潤しており、CD8T 細胞を抗体で除去したマウスでは CIM の発症が抑制された。従って、ヒト PM 同様、CD8 T 細胞が筋炎発症に重要である。血清中には抗 C 蛋白抗体を認めたが、B 細胞欠損マウスで筋炎の発症が抑制されなかったことから、B 細胞や抗体は CIM 発症に必須ではない。また、IL-1 $\alpha$ / $\beta$  欠損マウスで筋炎の発症が抑制されたが、TNF- $\alpha$  欠損マウスでは抑制されなかったことから、TNF- $\alpha$  と異なり IL-1 は筋炎発症に必須であった。最後に、ヒト PM で治療効果を示す $\gamma$  グロブリン大量療法で治療を試みたところ、筋炎が軽減された。【結論】B6 マウスで PM に近い動物モデルが作成できた。また遺伝学的解析では、CIM は液性免疫の関与なく発症しうることと、IL-1 が CIM 発症に重要であることが示された。さらに、PM 同様 $\gamma$  グロブリン大量療法が奏功した。以上より、新規 PM モデルマウスが、筋炎の病態解析と新規治療法の開発に有用なモデルであることが示され、今後、モデルマウスで病態を解明することにより、筋炎病態の理解や治療法開発に役立つものと期待される。

A.研究目的

特定疾患の一つ多発性筋炎(PM)は原因不明の炎症性筋疾患で、非特異的な免疫抑制療法が行われてきた。しかし、副作用顕在化や治療抵抗性の症例も認められ、PM の病態に合わせたより選択的な治療法が開発が望まれる。過去のヒト PM についての筋肉の免疫組織学的検索や末梢血中の T 細胞クローン解析などにより、CD8 T 細胞が PM の病態に重要な役割を果たしている

ことが報告されてきた。しかし、今まで適切な筋炎モデルマウスが存在しなかった為、関節リウマチ、多発性硬化症、I 型糖尿病などと比較して、病態の解析や治療法が開発が遅れてきた。

既存の筋炎のモデルマウスの大部分は、SJL/J マウスにミオシン粗精製物や精製ミオシンを免疫して作成されてきた。しかし、SJL/J マウスは、ヒト筋ジストロフィーの責任遺伝子である dysferlin 遺伝子を欠損しており、6 ヶ月程度から

筋線維が自然に変性、壊死し、二次性に単核球浸潤を伴った筋線維の壊死像が出現する。またヒト PM と異なり CD4 T 細胞の浸潤が主体で CD8 T 細胞の浸潤は少数のみである。そこで、ラット実験筋炎ではミオシン粗精製物中の骨格筋 C 蛋白が主要抗原であることが示唆されていることに注目し、骨格筋 C 蛋白の免疫原性を明確にするため組換えヒト骨格筋 C 蛋白を作成し、遺伝学的解析が容易なマウスで、全く新しい PM モデルマウス (C 蛋白誘導筋炎: CIM) を確立し、この病態解析を行うとともに新規治療法の開発に役立てることを目的とした。

## B. 研究方法

ヒト骨格筋から RNA を抽出して、RT-PCR により骨格筋 C 蛋白 cDNA をクローニングした。骨格筋 C 蛋白は分子量が大きいため、4 分割して大腸菌に発現させ、フラグメント 1-4 の組換え C 蛋白を作成した。アミノ酸配列はフラグメント 1: 1-290, フラグメント 2: 284-580, フラグメント 3: 567-877, フラグメント 4: 864-1142。これらのフラグメントを、CFA と共に、C57BL/6 マウスに 1 回免疫した。同時に百日咳毒素(PT)の腹腔内投与も行った。筋炎発症の評価は、大腿四頭筋と大腿屈筋について組織学的検索を行った。筋炎の評価は、筋炎を発症したマウスの頻度、筋炎が確認されたブロックの頻度、組織学的スコアでおこなった。組織学的スコアは、Grade1 1-4 の筋線維に炎症が存在、Grade2 5-30 の筋線維に炎症が存在、Grade3 筋束全体に炎症が存在、複数の病変がある場合+0.5。筋力低下は Rotarod test により評価した。また、免疫染色により CD8, CD4, CD11b, B220, パーフォリン, IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  陽性細胞の検討を行った。さらに、CD8 に対するモノクローナル抗体で CD8T 細胞を除去したマウス、Ig 欠損 B6 マウス、IL-1 欠損 B6 マウス、TNF- $\alpha$  欠損 B6 マウスに CIM を誘導した。最後に、高用量のガンマグロブリン (400mg/kg) を、免疫して 3 日目から 5 日間投与し、その治療効果を判定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト検体は用いなかった。動物実験に関しては、研究機関の動物実験基本指針に従い、動物福祉の観点からも適切な処置を行った。

## C. 研究結果

フラグメント1-4を別々に免疫し、21日目に、CIM発症の程度をHE染色で組織学的に評価したところ、フラグメント2が最も筋炎惹起性が高く、以後フラグメント2でCIMを誘導した。筋炎部位では、筋束周囲の結合織であるperimysium、perivascular areaに比較して、筋束内の結合織であるendomysium優位に単核球の浸潤を認めた。また、PM同様、未壊死筋線維への単核球のinvasionの像が認められ、その大部分はCD8陽性であった。さらに、Rotarod testで有意に走行時間の短縮を認めた。経時的な組織学的解析では、7日目から筋組織への単核球浸潤を認め、14-21日目をピークに軽快し、49日目には筋炎はほぼ治癒した。

次に、免疫組織学的解析で、CD4、CD8 陽性細胞、マクロファージ、B 細胞の局在を検討した。CD4 陽性細胞は筋肉全体に局在していたのに対して、CD8 陽性細胞は endomysium に相対的に多く浸潤していた。マクロファージは各部位で最も多く浸潤しており、B 細胞は少数のみ浸潤していた。また、大部分のパーフォリン陽性細胞は、CD8 陽性細胞同様、endomysium の未壊死筋線維周囲に浸潤していた。

さらに、CD8T 細胞の CIM 発症への関与を明確にするため、モノクローナル抗体により CD8 T 細胞を除去したマウスで CIM を誘導したところ、コントロールの Rat IgG 投与群に比較して筋炎の発症が抑制された。

CIM マウスの血清中に抗 C 蛋白抗体を認めたが、これらの筋炎発症への関与は不明であった。今回 CIM を B6 で確立できたことより、遺伝子欠損 B6 マウスを用いて筋炎の病態解析を行った。Ig $\mu$  欠損 B6 マウスは wild type (WT) マウス同程度に筋炎を発症し、B 細胞と抗体は筋炎発症に必須ではないことが示された。さらに、ヒ

ト PM 筋肉中で発現が報告されている IL-1 と TNF- $\alpha$  の関与について検討した。CIM 筋肉中にも両者の発現が認められ、IL-1 $\alpha/\beta$  欠損マウスでは WT と比較して筋炎の発症率が低く、組織学的スコアは有意に低下した。また Rotarod test では WT と比較して有意に長時間走ることができた。一方 TNF- $\alpha$  ノックアウトマウスでは、WT と比較して、筋炎の発症率、組織学的スコアに有意差は認められなかった。

最後に、ヒト PM で治療効果を示す高用量  $\gamma$ -グロブリン静注療法 (IVIG) の CIM への治療効果を検討した。治療群ではコントロールの生食投与群と比較して、筋炎の発症が抑制され、組織学的スコアが有意に低下した。

#### D. 考察

今回、C57BL/6 マウスで、1 回の免疫で速やかに発症させることができる新規モデルマウス CIM を確立することができた。筋炎病変部位の endomysium に CD8 T 細胞の浸潤を認め、これらはパーフォリンを発現していた。また、CD8T 細胞を除去すると筋炎の発症が抑制された。これらより本モデルは、既存のモデルマウスと異なり、ヒト PM で想定しているように、細胞障害性 CD8T 細胞による筋傷害が筋炎の病態に重要であると考えられた。

遺伝子欠損マウスによる病態解析により TNF- $\alpha$  ではなく IL-1 が筋炎発症に必須であることが示された。ヒト PM 筋肉中では IL-1 $\alpha$  陽性細胞の浸潤と同時に筋線維での MHC class I の発現や血管内皮細胞における接着分子の発現が高まっていることが報告されている。そこで、筋炎発症早期の活性化マクロファージによる IL-1 の発現により、筋線維での MHC class I の発現や血管内皮細胞での接着分子やケモカインの発現が高まり、その後細胞傷害性 CD8T 細胞により筋線維が傷害されることが示唆される。

IL-1 同様、TNF- $\alpha$  は、*in vitro* で、myoblast 細胞の MHC class I の発現や血管内皮細胞での接着分子やケモカインの発現が高めることが報告されている。また、ヒト PM 筋肉中では TNF-

$\alpha$  陽性細胞の浸潤が報告されており、CD8 T 細胞による TNF- $\alpha$  の発現が筋傷害に重要であることが示唆された。しかし、我々の知見では、TNF- $\alpha$  欠損マウスで筋炎の発症が認められ、CD8 T 細胞は TNF- $\alpha$  の関与無くヒト PM に近い筋炎を誘導できると考えられた。

今回、TNF- $\alpha$  ではなく IL-1 が筋炎発症に必須であることを示したが、TNF- $\alpha$  を発症後治療の標的とすることを必ずしも否定するものではない。今後 CIM において IL-1 と TNF- $\alpha$  を標的とした抗サイトカイン療法の治療効果を検討したい。

CIM でヒト PM 同様 IVIG 療法が効果を示したことから、CIM が治療への反応性という観点からも臨床的にヒトに近いことが示された。治療効果のメカニズムはまだ十分に解明されていない。血小板減少性紫斑病のモデルマウスにおいては、FcRIIb が治療効果を示すのに必須であることが示されている。他に B 細胞や T 細胞の抑制、自己抗体の中和作用、補体を介する組織傷害の抑制、サイトカイン発現の抑制など様々なメカニズムが想定される。CIM では B 細胞、抗体の関与無く発症するが IVIG が治療効果を示すことから、治療効果のメカニズムに B 細胞や抗体の抑制は必須ではないと考えられた。

#### E. 結論

組換え骨格筋 C 蛋白フラグメント 2 を C57BL/6 マウスに免疫して、新たな多発性筋炎のモデルマウスを確立し得た。この筋炎モデルは、簡便な手技で、速やかに発症させることが出来、しかも遺伝子改変マウスを使用した解析が可能であると。また、組織学的、臨床的にヒト PM に類似しており、ヒト PM 同様 CD8 T 細胞が筋炎発症に重要な役割を果たしていた。今回、IL-1 が、筋炎の発症に関与しており、筋炎治療における新たな標的と成り得ることを示した。また、IVIG 療法が、ヒト PM 同様、筋炎に対して治療効果を示すことから、IVIG 療法がヒト PM に治療効果を示すメカニズムの解析が進むことが期待される。今後、このモデルを用い



て筋炎病態の理解や治療法開発が飛躍的に進むことが期待される。

## F.健康危険情報

なし

## G.研究発表

### 1.論文発表

1) T Sugihara, C Sekine, T Nakae, K Kohyama, M Harigai, Y Iwakura, Y Matsumoto, N Miyasaka, and H Kohsaka. A new murine model defines critical mediators in the pathology and treatment of polymyositis (submitted for publication).

### 2.学会発表

1) 杉原 毅彦、関根 知世子、針谷 正祥、神山邦子、松本 陽、宮坂 信之、上阪 等；新規多発性筋炎モデルマウスの確立、第49回日本リウマチ学会総会、横浜、2005年4月

2) 杉原 毅彦、関根 知世子、針谷 正祥、神山邦子、松本 陽、宮坂 信之、上阪 等；A New Murine Model of Polymyositis Revealed Differential Requirement of Inflammatory Cytokines for Autoimmune Myositis. ACR 69th Annual Scientific Meeting、アメリカ サンディエゴ、2005年11月

3) 杉原 毅彦、関根 知世子、針谷 正祥、神山邦子、松本 陽、宮坂 信之、上阪 等；多発性筋炎の新規モデルマウスにおける炎症性サイトカインの関与についての検討 第35回日本免疫学会総会、横浜、2005年12月

## H.知的財産権の出願・取得状況

なし。

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

NKT 細胞を標的とした治療法の開発に関する研究

分担研究者 山村 隆 国立精神神経センター神経研究所・疾病研究第六部 部長  
研究協力者 三宅 幸子 国立精神神経センター神経研究所・免疫研究部 室長

研究要旨

iV $\alpha$ 14、iV $\alpha$ 19 インバリアント T 細胞受容体 (TCR) を発現する 2 種の NKT 細胞は、自己免疫制御に重要な細胞である。本研究では、iV $\alpha$ 14 細胞を介して抗体誘導性関節炎を抑制する合成糖脂質を見だし、NKT 細胞の機能調節が自己免疫疾患病態の抑制につながる事が明らかになった。

A.研究目的

iV $\alpha$ 14、iV $\alpha$ 19 インバリアント TCR を発現する 2 種の NKT 細胞について、自己免疫疾患における機能を検討するとともに、これらの細胞を特異的に刺激し、疾患抑制に有効な機能を選択的に引き出せるリガンドを合成糖脂質中から探索する。これまで、合成糖脂質 OCH が、iV $\alpha$ 14 細胞を刺激して Th2 サイトカインを選択的に産生させることによって、Th1 細胞が病態悪化に関与する臓器特異的自己免疫疾患モデルの病態を抑制することを報告してきた。今年度は、OCH 投与では無効であった抗体誘導性関節炎を抑制する糖脂質を発見したので報告する。

B.研究方法

K/BxN 血清移入関節炎は KRN TCR トランスジェニックマウスを NOD マウスと交配し、関節炎を発症したマウスから、8 週令で血清を採取。C57BL/6 マウスにプールした血清から、150  $\mu$ l を腹腔内投与した。関節炎の評価は、臨床的観察と、病理学的解析を行った。合成糖脂質を血清投与日から週 2 回、100  $\mu$ g/kg 腹腔内投与を行い、関節炎を阻害する糖脂質をスクリーニングした。サイトカイン中和抗体は糖脂質投与 2 時間前に腹腔内投与した。サイトカイン産生は

CBA kit、もしくは ELISA 法を用い測定した。  
(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、当研究所動物実験の規定に従い、実験計画書の承認を受けて行った。

C.研究結果

血清移入関節炎において関節炎の臨床所見、病理所見ともに強く抑制する合成糖脂質(SGL)を見出した。SGL は、関節炎誘導前日、または、すでに関節炎症状が発症後に投与しても関節炎を抑制した。NKT 細胞を欠く、J $\alpha$ 18 ノックアウトマウスに血清誘導性関節炎を惹起した場合には SGL は関節炎を抑制しないことから、その効果は NKT 細胞依存性であることが示された。血清移入関節炎における SGL の病態抑制効果は、IL-10、TGF $\beta$  に対する中和抗体の同時投与により減弱しなかった。SGL は NKT 細胞の増殖、サイトカイン産生をわずかに誘導するのみだったが、前投与すると  $\alpha$ -GC による NKT 細胞の刺激を抑制した。

D.考察

NKT 細胞を介して抗体誘導性関節炎を強く抑制する合成糖脂質 SGL を見出した。抗体誘導性関節炎は、ノックアウトマウスや CD1d のプロ

ッキング抗体を用いた実験から、NKT 細胞非存在下でその病態が軽減することが報告されている。SGL は投与後に NKT 細胞の応答性を惹起することから、その作用機序のひとつとして NKT 細胞の活性抑制が考えられる。しかしながら、SGL 投与による関節炎の抑制は、NKT 細胞非存在下での病態軽症化と比較するとはるかに強いことから、SGL による活性化によって関節炎を強く抑制する因子が産生されている可能性である。今後の検討が必要と考えられる。また、抗体誘導性関節炎は、リンパ球の存在を必要とせず、主に自己抗体によって引き起こされる炎症反応である。SGL は、この炎症を抑制するが、T 細胞の反応は抑制しない。自己免疫疾患制御にとっては、自己応答性 T 細胞、B 細胞の鎮静化が重要であることから、今後はそのような作用を有する糖脂質の探索が望まれる。

#### E. 結論

SGL は、NKT 細胞を介した機序により、抗体誘導性関節炎モデルである K/BxN 血清移入関節炎を抑制した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Ueno, Y., S. Tanaka, M. Sumii, S. Miyake, S. Tazuma, M. Taniguchi, T. Yamamura and K. Chayama: Single dose of OCH improves mucosal Th1/Th2 cytokine balance and prevents experimental colitis in the presence of V $\alpha$  14 NKT cells in mice. *Inflamm. Bowel Disease* 11(1): 35-41, 2005

2) Hashimoto D, Asakura S, Miyake S, Yamamura T, van Kaer L, Liu C, Tanimoto M and Teshima T. Stimulation of host natural killer T cells by synthetic glycolipid regulates acute graft-versus-host disease by inducing Th2 polarization of donor T cells. *J.Immunol.* 174(1): 551-6, 2005

3) Murata K, Toba T, Nakanishi K, Takahashi B, Yamamura T, Miyake S and Annoura H. Total synthesis of an immunosuppressive glycolipid, (2S,3S,4R)-1-O-( $\alpha$ -D-galactosyl)-2-tetracosanoylamino-1,3,4-nonanetriol. *J.Org.Chem.* 70(6): 2398-401, 2005

4) Yu KO, Im JS, Molano A, Dutronc Y, Illarionov PA, Forestier C, Fjiwara N, Arias I, Miyake S, Yamamura T, Chang YT, Besra GS, and Porcellini SA. Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acylvariants of  $\alpha$ -galactosylceramides. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 102(9): 3383-8, 2005

5) Ota T, Takeda K, Akiba H, Hayakawa Y, Ogasawara K, Ikarashi Y, Miyake S, Wakasugi H, Yamamura T, Kronenberg M, Raulet DH, Kinoshita K, Yagita H, Smyth MJ, Okumura K. IFN- $\gamma$ -mediated negative feedback regulation of NKT cell function by CD94/NKG2. *Blood*, 106(1): 184-92, 2005

6) Chiba A, Kaieda S, Oki S, Yamamura T and Miyake S. The involvement of V $\alpha$  14 NKT cells in the pathogenesis of arthritis in murine models. *Arthritis Rheum.* 52:1941-8, 2005

7) Toba T, Murata K, Yamamura T, Miyake S and Annoura H. A concise synthesis of (3S,4S,5R)-1-( $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-3-tetracosanoylamino-4, 5-decanediol, a C-glycoside analogue of immunomodulating-galactosylceramide OCH. *Tetrahedron Letters* 46: 5043-7, 2005

8) Ronet C, Darche S, de Moraes ML, Miyake S, Yamamura T, Louis JA, Kasper LH, Buzoni-Gatel D. NKT Cells Are Critical for the Initiation of an Inflammatory Bowel Response against *Toxoplasma gondii*. *J.Immunol.* 175(2): 899-908, 2005

9) Oki S, Tomi C, Yamamura T and Miyake S.

Preferential Th2 polarization by OCH is supported by incompetent NKT cell induction of CD40L and following production inflammatory cytokines by bystander cells in vivo. *Int.Immunol.* 17(12): 1619-29, 2005

10) Miyake S and Yamamura T. Therapeutic potential of glycolipid ligands for natural killer (NK) T cells in the suppression of autoimmune diseases. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 5 (3): 315-22, 2005

## 2. 学会発表

1) Kaieda S, Chiba A, Oki S, Yamamura T, Miyake S. The involvement of CD1-restricted NKT cells in the pathogenesis of collagen-induced and antibody-induced arthritis. 5<sup>th</sup> Annual Conference of FOCIS, Boston, May 13, 2005

2) Sakuishi K, Miyake S, Yamamura T. Exogenous IL-2 promotes IL-5 production by human CD4+ NKT cell clones: The role of IL-2 in the immune regulation. 5<sup>th</sup> Annual Conference of FOCIS, Boston, May 13, 2005

3) Kaieda S, Oki S, Yamamura T, Miyake S. A new synthetic glycolipid suppresses murine models of arthritis by blocking of natural killer T cell activation. *American College of Rheumatology 69<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting, Orlando, Florida. October 25, 2004 (Arthritis Rheum. 52:S445, 2005)*

4) 中原とも子、阿部香織、千葉麻子、山村隆、橋本博史、三宅幸子：膠原病患者における CD1d 拘束性 NKT 細胞の糖脂質抗原に対する反応性の検討、第 49 回日本リウマチ学会、横浜、4 月 20 日、2005

5) 海江田信二郎、千葉麻子、Ludovic Croxford, 大木伸司、山村隆、三宅幸子：マウス関節炎モデルにおける  $V\alpha 14$ NKT 細胞ならびに  $V\alpha$

19NKT 細胞の機能解析 第 49 回日本リウマチ学会、横浜、4 月 19 日、2005

6) 水野美歩、大木伸司、海江田信二郎、任海千春、山村隆、三宅幸子：新規糖脂質リガンドによる NKT 細胞を介した病態制御。第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005

7) 塚本和行、林青順、大辻季樹、鶴井博三、三宅幸子、山村隆、広瀬幸子：SLE における NKT 細胞の役割。第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005

8) 任海千春、大木伸司、山村隆、三宅幸子：OCH による NKT 細胞依存性 Th2 誘導における免疫ネットワークの関与、第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005

9) 作石かおり、荒波利昌、大木伸司、三宅幸子、山村隆：Exogenous IL-2 promotes IL-5 production by human CD4+ NKT cell clones: The role of IL-2 in the immune regulation. 第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005

10) Croxford Ludovic, Miyake Sachiko, Shimamura Michio, Yamamura Takashi:  $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$  invariant NKT cells regulated experimental autoimmune encephalomyelitis. 第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005

11) 大木伸司、海江田信二郎、山村隆、三宅幸子：新規糖脂質リガンドによる NKT 細胞を介した病態制御—マウス気道アレルギーも出るにおける抑制効果—第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005

12) 海江田信二郎、大木伸司、山村隆、三宅幸子：NKT 再オブ活性制御作用を介した新規合成糖脂質によるマウスモデル関節炎の抑制：第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005

H.知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生省労働研究補助金（免疫・アレルギー疾患予防・治療研究事業）  
分担研究報告書

制御性 T 細胞を用いた自己免疫の抑制に関する研究

分担研究者氏名 坂口 志文 京都大学再生医科学研究所 教授

研究要旨

マウスを用いて、CD25+CD4+制御性 T 細胞による制御に関与する分子、およびその遺伝子を探索・同定する目的で、そのような分子に対する単クローン抗体の作製を試みた。その結果、4 型葉酸受容体は、マウスの制御性 T 細胞に高発現しており、同分子に対する単クローン抗体による制御性 T 細胞の操作、その結果として免疫応答操作が可能であった。

A. 研究目的

正常個体中には、CD4+T 細胞の約 10%を占める制御性 T 細胞が存在する。この T 細胞群は、CD25 分子および転写因子 Foxp3 を恒常的に発現する。その異常は自己免疫病の原因となる。一方、この内在性制御性 T 細胞の強化により自己免疫病の治療・予防が可能である。本分担研究では、内在性制御性 T 細胞の分子マーカーの検索と、それを用いた自己免疫反応の制御を目的とする。

B. 研究方法

マウス、ヒトの CD25+CD4+制御性 T 細胞を、それぞれラット、マウスの免疫し、制御性 T 細胞特異的のマーカーを認識する単クローン抗体、および制御性 T 細胞機能を操作できるアゴニステイクあるいはブロッキング抗体を作製する。試験管内での制御性 T 細胞機能の解析、および得られた単クローン抗体をマウスに投与し、免疫応答におよぼす効果を検定する。

C. 研究結果

マウス CD25+CD4+T 細胞を、ラットに免疫し、興味深い抗原特異性を示すいくつかの単クローン抗体を得た。そのひとつ (TH6) は、活性化制御性 T 細胞と他の活性化 T 細胞を区

別できる。例えば、試験管内混合リンパ球反応において、CD25+CD4+Foxp3+T 細胞は、活性化の後、他の活性化 T 細胞に比較して、TH6 を高発現する。従って、TH6 高発現リンパ球を選択的に採取すると、アロ抗原特異的活性化制御性 T 細胞を得ることができる。実際、この細胞群の投与により、皮膚移植片の拒絶を抑えることができた。一方、この抗体を担癌マウスに投与すると、エフェクター T 細胞を減らさずに制御性 T 細胞を選択的に減らすことにより、有効な腫瘍免疫を惹起できた。また、正常マウスに、生後 1 週、2 週の 2 回投与するだけで自己免疫性胃炎などの臓器特異的自己免疫病を惹起できた。現在ヒトの葉酸受容体のヒト制御性 T 細胞における発現を検討中である。

D. 考察

活性化 T 細胞と制御性 T 細胞を弁別できる抗体を作製した。この抗体の認識する分子をマーカーとして、進行中の生理的、病的免疫応答を操作できる。この分子マーカーは、自己免疫病における制御性 T 細胞の役割を解析するのに有用である。また、この分子を発現する T 細胞を選択的に採取、増殖させれば、自己免疫病の治療に適用できる。

E. 結論

マウス内在性制御性 T 細胞に 4 型葉酸受容体が

高発現しており、同分子に対する単クローン抗体により病的、生理的免疫応答の操作が可能である。

## F.健康危険情報

該当せず。

## G.研究発表

### 1.論文発表

1) Sakaguchi, S.: Naturally arising Foxp3-expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* 6: 345-352, 2005.

2) Bach, J. F., Sakaguchi, S. Autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 17: 567-569, 2005.

3) Sakaguchi, S., Sakaguchi, N.: Animal models of arthritis caused by systemic alteration of the immune system. *Curr Opin Immunol.* 17: 589-594, 2005.

4) Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S.: Homeostatic maintenance of natural Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization *J. Exp. Med.* 201:723-735, 2005.

5) Yoshitomi, H., Sakaguchi, N., Brown, G., Tagami, T., Sakihama, T., Nomura, T., Akira, S., Gordon, S., Nakamura, T., and Sakaguchi, S. A role for fungal  $\beta$ -glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice *J. Exp. Med.* 201: 949-960, 2005.

6) Ko, K., Yamazaki, S., Nakamura, K., Nishioka, T., Hirota, K., Yamaguchi, T., Shimizu, J., Nomura, T., Chiba, T., and Sakaguchi, S. Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb

and its effects on tumor-infiltrating Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 202: 885-891, 2005.

7) Nishikawa, H., Kato, T., Tawara, I., Saito, K., Ikeda, H., Kuribayashi, K., Allen, P. M., Schreiber, R. D., Sakaguchi, S., Old, L. J., Shiku, H. Definition of target antigens for naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 201: 681-686, 2005.

8) Chai, J-G, Xue, S., Coe, D., Addey, C., Bartok, I., Scott, D., Simpson, E., Stauss, H. J., Hori, S., Sakaguchi, S., and Dyson, J. P. Regulatory T cells, derived from naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells by in vitro Foxp3 gene transfer, can induce transplantation tolerance. *Transplantation.* 79:1310-1316, 2005.

9) Yoshizawa, A., Ito, A., Li, Y., Koshiba, T., Sakaguchi, S., Wood, K. J., and Tanaka, K. The roles of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in operational tolerance after living donor liver transplantation. *Transplant. Proc.* 37:37-39, 2005.

10) Quezada SA, Bennett K, Blazar BR, Rudensky AY, Sakaguchi S, Noelle RJ: Analysis of the underlying cellular mechanisms of anti-CD154-induced graft tolerance: the interplay of clonal anergy and immune regulation. *J. Immunol.* 175:771-779, 2005.

11) Sakaguchi, S., and Sakaguchi, N.: History of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. In *Regulatory T cells in inflammation, Progress in Inflammation Research*. Eds. L. S. Taams, A. N. Akbar, and M. H. M. Wauben, Birkhaeuser Verlag, Basel, p3-17, 2005.

12) Nomura, T., and Sakaguchi, S.: Regulatory T cells in tumor immunity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 293:287-302, 2005.

13) Sakaguchi, S.: Preface: Regulatory T cells in autoimmune diseases. *Int. Rev. Immunol.* 24: 157-158, 2005.

- 14) Sakaguchi, S. and Sakaguchi, N.: Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune diseases. *Int. Rev. Immunol.* 24:211-226, 2005.
- 15) Fehervari Z, Sakaguchi S.: CD4<sup>+</sup> regulatory cells as a potential immunotherapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 360:1647-1661, 2005.
- 16) Kuroda N, Mitani T, Takeda N, Ishimaru N, Arakaki R, Hayashi Y, Bando Y, Izumi K, Takahashi T, Nomura T, Sakaguchi S, Ueno T, Takahama Y, Uchida D, Sun S, Kajiura F, Mouri Y, Han H, Matsushima A, Yamada G, Matsumoto M. Development of Autoimmunity against Transcriptionally Unrepressed Target Antigen in the Thymus of Aire-Deficient Mice. *J. Immunol.* 174:1862-1870, 2005.
- 17) Matsubara, Y., Hori, T., Morita, R., Sakaguchi, S., and Uchiyama, T.: Phenotypic and functional relationship between adult T cell leukemia and regulatory T cells. *Leukemia* 19:482-483, 2005.
- 18) Fehervari, Z., and Sakaguchi, S.: Regulatory T cells. In *Measuring Immunity*, eds. M. T. Lotze and A. W. Thompson, Elsevier. p322-335, 2005.
- 19) Gondek, D. C., Lu, L-F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S., and Noelle, R. J. Cutting Edge: Contact-mediated suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol.* 174: 1783-1786, 2005.
- 2) 小野昌弘 : GITR<sup>high</sup>T 細胞の除去による致死的自己免疫性心筋炎および多臓器の自己免疫病の誘導 第1回免疫コロキウム (2005. 2. 21-22 兵庫)
- 3) Keiji Hirota, Hiroyuki Yoshitomi, Satoshi Tanaka, Takashi Nomura, Noriko Sakaguchi and Shimon Sakaguchi : Generation of autoaggressive CD4<sup>+</sup> T cells due to a ZAP-70 point mutation in SKG mice that spontaneously develop autoimmune arthritis Keystone Symposia Cellular Senescence and Cell Death (2005 3.3-8. Colorado,USA)
- 4) Ruka Setoguchi, Shohei Hori, Takeshi Takahashi and Shimon Sakaguchi: IL-2 and autoimmunity : homeostatic maintenance of CD25<sup>+</sup>4<sup>+</sup> regulatory T cells via IL-2 secreted by other T cells and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. Keystone Symposia Cellular Senescence and Cell Death (2005 3.3-8. Colorado,USA)
- 5) Tomoyuki Yamaguchi, Takeshi Takahashi and Shimon Sakaguchi : Separation of natural CD25+CD4+ regulatory T cells from activated T cells by a novel specific monoclonal antibody : Application to tumor immunology. Keystone Symposia Basic Aspect of Tumor Immunology (2005 3.19-23. Colorado,USA)
- 6) 山口智之 : 葉酸受容体を介する制御性 T 細胞の機能操作 第五回 COE 若手研究者発表会(2005. 12. 1.)
- 7) 山口智之、坂口志文 : 葉酸受容体を標的とする CD25+CD4+制御性 T 細胞の分子的制御 第35回日本免疫学会総会(2005. 12.13-15 横浜)
- 8) 田中聡、橋本求、廣田圭司、吉富啓之、野村尚史、坂口教子、坂口志文: CD25+CD4+制御性 T 細胞による SKG マウス関節炎の治療 第35回日本免疫学会総会(2005. 12.13-15 横浜)

## 2.学会発表

1) 廣田圭司:CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T cells 制御性 T 細胞に対する新規モノクローナル抗体の作製と移植免疫、腫瘍免疫への応用 第二回 COE 若手研究者発表会(2005. 1. 7.)



9) 廣田圭司、吉富啓之、橋本求、田中聡、野村尚史、坂口教子、坂口志文:自己免疫性関節炎を自然発症する SKG マウスにおける CD4 +T 細胞の自己反応性 第 35 回日本免疫学会総会(2005. 12.13-15 横浜)

10) 橋本求、吉富啓之、田中聡、廣田圭司、野村尚史、坂口教子、三森経世、坂口志文: 関節炎を自然発症する SKG マウスにおける抗シトルリン化蛋白抗体産生の検討 第 35 回日本免疫学会総会(2005. 12.13-15 横浜)

11) 久保香織、西岡朋尚、増永太郎、田村康一、坂口志文: GITR-GITRL 経路遮断による制御性 T 細胞の移植片生着延長効果維持増強 第 35 回日本免疫学会総会(2005.12.13-15 横浜)

#### H.知的財産権の出願・登録状況

現在特許出願中

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

SLE に対する抗 CD20 抗体療法の開発に関する研究

分担研究者 田中 良哉 産業医科大学医学部第一内科学講座 教授  
研究協力者 齋藤 和義 産業医科大学医学部第一内科学講座 助教授

研究要旨

全身性エリテマトーデス（SLE）を始めとする全身性自己免疫疾患の発症過程には、自己反応性 T 細胞の活性化、B 細胞活性化と自己抗体による組織障害が関与する。したがって、リンパの細胞表面機能分子は、免疫是正の最適の標的となる。ステロイド薬や免疫抑制薬に抵抗性の重症 SLE 患者 8 症例を対象に、SLE の病態形成過程で中心的な役割を担う B 細胞に特異的に発現する CD20 抗原を標的とした CD20 抗体リツキシマブ療法を施行した。治療抵抗性の SLE に対して、CD20 抗体療法は、重篤な副作用を認めずに、臨床的寛解の導入、長期的寛解状態の維持に成功した。さらに、CD20 抗体により末梢血 B 細胞数のみならず、CD19 陽性細胞上の CD40 と CD80、並びに、CD4 陽性細胞上の CD40L の発現が減弱し、B 細胞数や IgG 値が回復した後にも、ds-DNA 抗体消失と尿蛋白陰性が長期的に継続した。即ち、多様な膠原病でリツキシマブが奏功する基礎的背景として、CD20 抗体は、共刺激分子を発現するメモリー B 細胞の選択的減衰を介して、B 細胞-T 細胞間相互作用を制御し、自己免疫を一時的にリセットしている可能性が示唆された。一方、長期寛解後再燃症例、再投与による HACA 産生の問題など、今後の課題も挙げられたが、B 細胞制御を介した自己免疫異常のリセットは、次世代の生物学的製剤が目指すものと考え、当該班の構成員を中心に第 I / II 相臨床試験を開始した。

A.研究目的

SLE は、多臓器障害を伴う代表的な自己免疫疾患であるが、急性期治療に関しては明確な指標はなく、ステロイド薬と免疫抑制薬の併用による非特異的治療が中心を成す。しかし、多くの免疫抑制薬は保険未収載で、臨床試験を経た薬剤の開発が必至である。SLE は、自己反応性 T 細胞活性化、それによる活性化 B 細胞による過剰な自己抗体産生により齎される免疫複合体病であり、CD20 等の B 細胞特異的表面抗原は治療標的として重要である。リツキシマブを用いた CD20 抗体療法は、B 細胞リンパ腫を対象に保険収載されるが、申請者らは、これまで既存の治療に抵抗性の重症 SLE 5 症例を対象に、B 細胞を

標的とした CD20 モノクローナル抗体リツキシマブを用いたパイロットスタディを実践し、高い臨床効果を得てきた。今回、パイロットスタディの継続、副作用や HACA 産生などの問題点の検証、さらに、新 GCP 準拠第 I / II 相臨床試験の実践を目的として研究を行ってきた。

B.研究方法

ステロイドや免疫抑制剤などの既存の治療に抵抗性を示した重症 SLE の 8 症例に対し、本学倫理委員会承認後に、インフォームドコンセント取得の上、CD20 抗体リツキシマブ 375mg/m<sup>2</sup>/週を 2 回投与し、臨床症候、検査成績、画像所見などを検討した。また、治療抵抗性の SLE に対して新 GCP 準拠第 I / II 相臨床試験を実践した。

また、末梢血リンパ球の表面抗原をフローサイトメトリーで検出した。

(倫理面への配慮)

臨床研究を実践する場合には、所属機関の倫理委員会、或は、IRB で承認を得た研究に限定し、患者及び家族からインフォームドコンセントを得た上で、倫理委員会の規約を遵守し、所属機関の現有設備を用いて行う。患者の個人情報が入属機関外に漏洩せぬよう、試料や解析データは万全の安全システムをもって厳重に管理し、人権擁護に努めると共に、患者は、経済的負担を始め如何なる不利益や危険性も被らない事を明確にする。

### C. 研究結果

(1) 治療抵抗性の SLE 5 症例に対するリツキシマブのパイロットスタディの結果から、中枢神経病変を伴う精神神経 SLE (NPSLE) に対する効果が特に顕著であったため、NPSLE を中心として 3 症例を加えて計 8 症例に関してパイロットスタディを行った。経過中、3 例で帯状疱疹、細菌性肺炎、褥瘡部感染を併発した。精神神経 SLE (NPSLE)、ループス腎炎、血管内赤血球溶血・凝集、心筋症などを併発していたが、リツキシマブ 375 mg/m<sup>2</sup>/週 1 回を 2 回投与し、臨床症候や検査成績の改善が得られた。SLE 疾患活動性指数 SLEDAI は、4 週間には 8 症例とも改善し、7 症例は 2 週～6 月以内に 0 点となり、6 例は 1 年以上の長期的寛解状態を得た。NPSLE に対しては、速やかな意識回復を認めた 2 症例を含め多彩な臨床症候に対して、8 症例全てに於いて著明な改善が得られた。また、一部の症例では、MRI、SPECT 所見や脊髄液中 IL-6 濃度が改善した。

(2) 8 例中 4 例が約 2 年後に再燃した。22 ヶ月後に再燃した 1 例は、リツキシマブを再投与するも無効で、投与後、血清 HACA 74 μg/ml と高値、血清リツキシマブは検出感度以下で HACA 産生による効果喪失と考えられた。18 ヶ月後に再燃した 1 例は、リツキシマブ再投与にステロイド大量静注を併用し、HACA の検出なく奏効

し、再寛解導入が可能であった。

(3) リツキシマブ投与前後に於いて、患者末梢血リンパ球の表面抗原をフローサイトメトリーで検出した。B 細胞の特異抗原である CD20 は投与後 1 週間以内に速やかに検出不能となり、それに続き CD19 陽性細胞は数日後から 2 週間以内に減少した。CD19 陽性細胞上の CD40 および CD80 は、リツキシマブ投与翌日より急速に発現分子数が減少し、2 回目投与後にはほとんど検出されなくなった。CD19 陽性細胞上の CD40 と CD80 の発現は、CD19 陽性細胞が再び増加し始める半年後にも減弱が維持された。再燃した 3 症例では、再燃前に CD19 陽性細胞上の CD40 と CD80 の発現が増強し、1 例ではリツキシマブの再投与にて速やかに発現が低下した。一部の症例では、CD4 陽性細胞上の CD40L と ICOS、早期活性化抗原 CD69 の発現がリツキシマブの投与により減少した。

(4) SLE を対象としてリツキシマブ (IDEC-C2B8) 投与する用量・用法の忍容性を検討し、次相の検証的試験における推奨用量としての妥当性を評価することを目的として全国 7 施設で新 GCP 準拠 (全薬工業主導) の第 I/II 相臨床試験を開始した。主要評価項目は安全性で、副次的評価として臨床的有用性を挙げ、ACR の 1997 年改訂基準により SLE と診断された症例で、プレドニゾン 0.4mg/kg 以上による治療にも拘らず中等度～重度の疾患活動性を呈している症例を対象に実践した。現在、全ての投与を終了し、経過観察期間に入っている。

### D. 考察

治療抵抗性の SLE に対して、リツキシマブを用いたパイロットスタディに於いて、CD20 抗体療法は、重篤な副作用を認めずに、臨床的寛解の導入、長期的寛解状態の維持に成功した。さらに、CD20 抗体により末梢血 B 細胞数のみならず、CD19 陽性細胞上の CD40 と CD80、並びに、CD4 陽性細胞上の CD40L の発現が減弱し、B 細胞数や IgG 値が回復した後にも、ds-DNA 抗体消失と尿蛋白陰性が長期的に継続した。即ち、多

様な膠原病でリツキシマブが奏功する基礎的背景として、CD20 抗体は、共刺激分子を発現するメモリーB 細胞の選択的減衰を介して、B 細胞-T 細胞間相互作用を制御し、自己免疫を一時的にリセットしている可能性が示唆された。一方、長期寛解後再燃症例、再投与による HACA 産生の問題など、今後の課題も挙げられたが、B 細胞制御を介した自己免疫異常のリセットは、次世代の生物学的製剤が目指すものと考え、当該班の構成員を中心に第 I / II 相臨床試験を開始した。

## E. 結論

SLE の病態形成過程で、B 細胞は T 細胞に対する抗原提示細胞、並びに、自己抗体産生細胞として中心的な役割を担う。B 細胞に特異的に発現する CD20 抗原を標的とする CD20 抗体リツキシマブは、従来の治療に抵抗性の難治性 SLE に奏効し、寛解導入を齎した。今後、難治性 SLE に対して CD20 を標的とした新規治療がブレークスルーを齎せばと期待され、多施設間での臨床試験を開始した。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Tokunaga M, Fujii K, Saito K, Nakayamada S, Tsujimura S, Nawata M, Tanaka Y. Down-regulation of CD40 and CD80 on B cells in patients with life-threatening systemic lupus erythematosus after successful treatment with rituximab. *Rheumatology* (2005) 44: 176-182

2) Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Nakano K, Tanaka Y. Clinical relevance of expression of P-glycoprotein on peripheral lymphocytes to steroid-resistance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (2005) 52, 1676-1683

3) Tanaka Y, Tokunaga M. Rituximab reduces both quantity and quality of B cells in SLE. *Rheumatology* (2006) 45: 122-123

4) Saito K, Nawata M, Iwata S, Tokunaga M, Tanaka Y. Extremely high titre of antihuman chimeric antibody following re-treatment with rituximab in a patient with active systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* (2005) 44, 1462-1464

5) 田中良哉. 生物学的製剤と膠原病の臨床 — 治療のブレークスルーを目指して —. *日本内科学会雑誌* (2005) 94, 1908-1914

6) 田中良哉. 全身性エリテマトーデスの新しい治療. *日本内科学会雑誌* (2005) 94, 2146-2151

### 2. 学会発表

1) 田中良哉. 生物学的製剤と膠原病の臨床：治療のブレークスルーを目指して. 第 102 回日本内科学会総会（教育講演）大阪. 平成 17 年 4 月 7-9 日

2) 田中良哉. B 細胞を標的とした SLE の治療. 第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会（シンポジウム）横浜, 平成 17 年 4 月 17-20 日

3) 田中良哉. リウマチ膠原病治療のパラダイムシフト — 生物学的製剤が果たす役割 —. 日本内科学会関東支部第 32 回生涯教育講演会（教育講演）東京, 平成 17 年 7 月 9 日

4) 田中良哉. 膠原病における免疫抑制 — 生物学的製剤によるパラダイムシフト —. 第 26 回日本炎症・再生医学会総会（シンポジウム）東京, 平成 17 年 7 月 12 日—13 日

5) 田中良哉. SLE に対する抗 CD20 抗体療法. 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会（シンポジウム）盛岡, 平成 17 年 10 月 20-22 日