

抗DNA抗体の産生機序に関する研究

分担研究者 平林 泰彦 東北大学大学院医学系研究科 講師

分担研究者 佐々木 毅 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨 本研究はループス腎炎に直接関与している抗DNA抗体の産生機序を追求することにより全身性エリテマトーデス(SLE)の発症機序の解明を目指すものである。腎障害性抗DNA抗体を惹起する自己抗原である小胞体ストレス応答蛋白HerpのSLEにおける発現の特徴および抗原性について検討を加え、活動期SLEの末梢血単核球においてHerp蛋白が長時間強発現していること、Herp蛋白が抗DNA抗体産生クローンを刺激増殖できることを明らかにした。これにより様々な細胞ストレスと抗DNA抗体産生との関連を分子レベルで解明する端緒を得た。

A. 研究目的

抗DNA抗体はSLEに特徴的でループス腎炎の成立に直接的に関与していると理解されている。したがって、抗DNA抗体の産生機序を明らかにする事はSLEの発症機序の解明につながると考えられる。免疫グロブリン遺伝子の解析から、ヒト腎障害性抗DNA抗体は抗原刺激による親和性成熟により形成されたと考えられるが、DNAそのものには免疫原性がほとんど無い。抗DNA抗体の産生の「引き金となる抗原」をまず明らかにし、それを踏まえて全身性エリテマトーデス(SLE)発症に至る特異的機序を解明することを最終目的とする。

我々はこれまでヒトモノクロナル腎障害性抗DNA抗体O-81が小胞体ストレス応答性蛋白Herpに結合する事、HerpをBALB/c マウスに免疫すると抗DNA抗体が産生され、腎糸球体にIgGが沈着する事を報告した。

今回の目的は、SLE患者におけるHerpの免疫原性を明らかにする事である。

B. 研究方法

(1) SLE患者血清よりプロテインA/Gカラムを用いてIgGを精製した。このIgGよりdsDNAセファロースカラムを用いて抗DNA抗体を精製した。また、同様にリコンビナントHerp蛋白固相化カラムを用いて抗Herp抗体を精製した。Herp蛋白あるいはS1ヌクレアーゼ処理牛胸腺dsDNAを抗原とし、上記精製抗DNA抗体および抗Herp抗体の結合性を競合阻害ELISA法で検証した。

(2) 活動期SLE患者、非活動期SLE患者、および健康人の末梢血単核球(PBMC)におけるHerpの発現様式

を、我々が確立したマウスモノクロナル抗Herp抗体を用いた間接免疫蛍光染色法にて検討した。

(3) 活動期SLE患者、非活動期SLE患者、および健康人のPBMCにHerp蛋白を添加して6日間培養し、抗DNA抗体産生細胞が出現あるいは増加するかどうかdsDNAを抗原としたELISPOT法で検討した。

本研究はヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)に基づき実施し、当大学の倫理委員会の承認を受け、ヒト由来の生体試料を用いる際には本人に説明し承諾を得た。

C. 研究結果

(1) SLE患者より精製したIgG抗DNA抗体の一部はHerp蛋白に結合し、その結合はHerp蛋白およびdsDNAで競合阻害された。また、IgG抗Herp抗体はdsDNAに結合し、その結合はHerpおよびdsDNAによって競合阻害された。

(2) モノクロナル抗Herp抗体による間接免疫蛍光染色において、活動期SLE患者PBMCではHerp蛋白の発現が強く見られるものを多く認めた。非活動期SLE患者や健康人のPBMCではHerp蛋白の発現は弱いかほとんど見られなかった。また、タプシガーゲン処理にて小胞体ストレスを加えると、Herp健康人PBMCでもHerp蛋白が発現するが72時間後には発現は低下した。しかし、Herp蛋白を強く発現した活動期SLE患者PBMCでは、無処理で72時間培養してもHerp蛋白を強く発現している細胞を多く認めた。

(3) 活動期SLE患者PBMCにHerp蛋白を加えて抗原

刺激したところ、抗dsDNA抗体を産生するB細胞クローンの出現あるいはクローン数の増加が認められた。dsDNAや鶏卵リゾチームの添加ではこのような変化は認められなかった。また、血清抗DNA抗体が陰性化している非活動期SLE患者のPBMCや健常人のPBMCではHerpを添加しても抗dsDNA抗体産生クローンは検出されなかった。

以上より、Herp蛋白上にはDNAと免疫学的に分子相同性を持つエピトープが存在すると考えられた。また、自己蛋白であるHerpはヒトSLE患者において免疫原性を持ち抗原認識されると考えられた。

D. 考察

Herp蛋白は定常状態ではほとんど発現しておらず、小胞体ストレス時のみ発現が誘導されるので、Herp上のいくつかのエピトープに対しては免疫寛容の成立が不十分である可能性がある。細胞がストレスを受けてHerpを高発現し、最終的にネクロシスやアポトーシスに至った際にDNAと分子相同性を持つエピトープが抗原提示され認識されれば産生された抗体はDNA結合性を示すと推測される。

今後、細胞内自己抗原であるHerpが抗原認識される機序、および、活動期SLE患者におけるHerp蛋白の発現亢進の機序を追求することによりSLEの発症機序の解明に寄与できると思われる。

E. 結論

SLE患者血清中に抗Herp/DNA交叉抗体が存在し、Herpが抗DNA抗体産生クローンを抗原刺激できる事を明らかにした。この結果から、ウイルス感染、紫外線、薬物などにより生じる小胞体ストレスがHerp蛋白の産生を亢進させ、過剰産生されたHerpがDNAとの分子相同性を介して抗DNA抗体の産生誘導抗原となる可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohguchi H, Hirabayashi Y, Koder T, Ishii T, Munakata Y, Sasaki T. Q fever with clinical features resembling systemic lupus erythematosus. Internal Medicine (2006) 45, 3232-326.
- 2) Munakata Y, Kato I, Saito T, Koder T, Ishii KK,

Sasaki T. Human parvovirus B19 infection of monocytic cell line U937 and antibody-dependent enhancement. Virology (2006) 345, 251-257.

- 3) Hirabayashi Y, Oka Y, Tada M, Takahashi R, Ishii T. A potential trigger of nephritogenic anti-DNA antibodies in lupus nephritis. Annals of the New York Academy of Sciences (2007) in press.
- 4) 平林泰彦. 自己抗体と細胞ストレス: 抗DNA抗体産生における小胞体ストレス応答性蛋白の役割. 日本臨床免疫学会会誌 (2006) 29, 65-72.
- 5) 平林泰彦. 抗DNA抗体産生における小胞体蛋白の意義. 臨床免疫 (2006) 45, 650-655.

2. 学会発表

- 1) Oka Y, Hirabayashi Y, Takasawa N, Takahashi R, Ishii T, Sasaki T. Can viral infection be a trigger of anti-DNA antibody production through endoplasmic reticulum stress? 70th Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology, Washington DC, USA, Nov 10-15.
- 2) Hirabayashi Y, Oka Y, Takahashi R, Ishii T, Sasaki T. A potential trigger of nephritogenic anti-DNA antibodies in lupus nephritis. 5th International Congress on Autoimmunity, Sorrento, Italy, Nov. 29 - Dec. 3 (Autoimmunity Reviews p87-88, 2006)
- 3) 平林泰彦、岡友美子、高橋令子、石井智徳、佐々木毅. ウイルス感染による小胞体ストレスと抗DNA抗体産生との関連について. 日本リウマチ学会総会
- 4) 岡友美子、石井恵子、高橋令子、石井智徳、平林泰彦、佐々木毅. 関節リウマチ発症時におけるヒトパルボB19感染の有無による臨床病態への影響. 日本リウマチ学会
- 5) 岡友美子、平林泰彦、高橋令子、石井智徳、佐々木毅. 腎障害性抗DNA抗体に結合する小胞体ストレス蛋白Herpはヒト抗DNA抗体産生の trigger となるか? 日本免疫学会

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

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

脂質関連物質の免疫抑制作用の解析

分担研究者 簗田 清次 自治医科大学内科学講座アレルギー膠原病学講座 教授

研究要旨 FTY720 (Sphingosine 1-phosphate receptor modulators) は培養関節リウマチ由来滑膜細胞に対してアポトーシスを誘導した。FTY720 にみられる抗リウマチ作用機序の1つとして、増殖滑膜細胞への直接作用の存在が示唆された。今後は全身性エリテマトーデス等の自己免疫疾患への臨床応用を検討する予定である。

A. 研究目的

我々はスタチン類の免疫抑制作用の機序をアポトーシス誘導作用の観点から研究を進め、脂溶性スタチンのフルバスタチンは活性化 T 細胞に対して *in vitro* だけでなく *in vivo* でもアポトーシス誘導能を有し、その機序として protein farnesylation 阻害に基づくことを見出した。またスタチン類 (Arthritis Rheum 2006; 54:579-86) や骨粗鬆症治療薬である bisphosphonates にも *in vitro* で培養 RA 由来滑膜細胞に対してアポトーシス誘導作用を有することを明らかにした。

今回は新しい免疫調節薬 FTY720 (Sphingosine 1-phosphate receptor modulators) の培養 RA 由来滑膜細胞に対するアポトーシス誘導能の有無を細胞内シグナル伝達系を含めて検討することを目的とした。

B. 研究方法

アポトーシスは Annexin V を用いた染色法と propidium iodode を用いた DNA loss の定量をフローサイトメーターにて解析した。ルミノメータで各 caspase の酵素活性を、ウェスタンブロットで MAPK に属する蛋白のリン酸化量を測定した。

(倫理面への配慮)

当大学の規定に沿ってきちんと行った。

C. 研究結果

FTY720 は濃度、時間依存性に培養 RA 由来滑膜細胞に対してアポトーシスを誘導した。一方、培養 OA 由来滑膜細胞に対しては明らかでなかった。そのアポトーシスはミトコンドリア経路を介し、caspase 依存性であった。FTY720 は、MAPK ファミリーの中で JNK 経路と p38 経路中の蛋白リン酸化を促進した。さらに JNK 抑制薬や p38 抑制薬は FTY720 誘導性アポトーシスを抑制した。

D. 考察

FTY720 は RA 由来滑膜細胞に対してアポトーシスを誘導し、JNK や p38 経路の活性化に基づくことが推定された。

FTY720 現在、臓器移植領域で臨床治験が行われており、動物実験ではアジュバント関節炎やループスモデルマウス (J Rheumatol 2002; 29:707-16) に対して治療

効果を示すことが報告されている。FTY720 の RA 由来滑膜細胞に対するアポトーシスを誘導作用の解析により、FTY720 を関節リウマチなどの自己免疫疾患に対する補助的な治療薬として使用を試みる根拠となりうる。

E. 結論

FTY720 (Sphingosine 1-phosphate receptor modulators) は培養 RA 由来滑膜細胞に対してアポトーシスを誘導した。FTY720 にみられる抗リウマチ作用機序の1つとして、増殖滑膜細胞への直接作用の存在が示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべきことはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagashima, T, Okazaki, H, Yudoh, K, Matsuno, H, Minota, S. Apoptosis of rheumatoid synovial cells by statins through blocking of protein geranylgeranylation. A potential therapeutic approach to rheumatoid arthritis. Arthritis. Rheum. 54:579-586, 2006.
2. Yoshio, T., Onda, K., Nara, H., Minota, S. Association of IgG Anti-NR2 glutamate receptor antibodies in cerebrospinal fluid with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 54(2): 675-678, 2006
3. Yokota, S., Minota, S., Fujii, N. Anti-HSP auto-antibodies enhance HSP-induced pro-inflammatory cytokine production in human monocytic cells via Toll-like receptors. Int Immunol 18(4): 573-580, 2006
4. Nara, H., Okamoto, H., Minota, S., Yoshio, T. Mouse monoclonal anti-human thrombomodulin antibodies bind to and activate endothelial cells through NF- κ B activation In vitro. Arthritis Rheum 54(5): 1629-1637, 2006
5. Nagashima, T., Iwamoto, M., Minota, S. Semiquantitative assessment of the intestinal motility in chronic intestinal pseudo-obstruction in systemic sclerosis and mixed connective tissue disease by

2. 学会発表

1. 西佐知子, 長嶋孝夫, 奈良浩之, 釜田康行, 上村健, 岩本雅弘, 吉尾卓, 岡崎仁昭, 高屋敷典生, 釜田清次: 高齢男性に認めた好酸球性血管浮腫の一例. 第 21 回 栃木リウマチ研究会, 栃木, 2006 年 9 月 8 日
釜田康行, 岩本雅弘, 吉尾卓, 岡崎仁昭, 釜田清次: 膠原病に伴うレイノー現象に対するシルデナフィルの有効性の検討. 第 34 回日本臨床免疫学会総会, 東京, 2006 年 10 月 2 日
2. 釜田康行, 岩本雅弘, 高橋裕子, 星野東明, 室井一男, 吉尾卓, 岡崎仁昭, 釜田清次: 膠原病に伴う阻血指趾に対する血管新生療法. 第17回日本リウマチ学会関東支部学術集会, 東京, 2006 年 12 月 9 日

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得
特記すべきことはない。
2. 実用新案登録
特記すべきことはない。
3. その他
特記すべきことはない。

Laser-microdissection(LMD)法による MRL/lpr マウス腎浸潤 T 細胞の解析に関する研究

分担研究者 伊藤 聡 筑波大学大学院人間総合科学研究科 先端応用医学専攻臨床免疫学 講師

研究要旨 ループスモデルマウスである MRL/lpr マウスの腎で、LMD 法と RT-PCR 法を用いてサイトカインバランスを解析した。MRL/lpr マウスでの糸球体内ならびに糸球体周囲の浸潤 T 細胞は、主に Th1 タイプ、血管周囲病変は Th1、Th2 タイプの免疫反応が関与している可能性が示唆された。LMD 法と RT-PCR 法を用いた解析は、ループス腎炎のサイトカインバランスを明らかにする上で有用であると考えられた。

A. 研究目的

ループスモデルマウスである MRL/lpr マウスの腎炎において、LMD 法と RT-PCR 法を用いてサイトカインバランスを解析し、それぞれの病態を明らかにする。

B. 研究方法

糸球体腎炎、血管炎を発症した 10 匹の雌 MRL/lpr マウスの腎標本を作成した。まず、Thy1、B220、Mac1、CD4、CD8 について、免疫組織染色で局在を確認した。次に、LMD 法で糸球体、血管周囲に浸潤した細胞群を採取し（図 1）、プールした検体より total RNA を抽出し cDNA を合成した。その内 4 匹では、糸球体周囲の浸潤細胞群も採取した（図 2）。その後 RT-PCR 法で β -actin、TCR-C β 、Thy1、B220、CD4、CD8 およびサイトカイン（INF γ 、IL-2、IL-4、IL-10）遺伝子発現を行った。

C. 研究結果

1) 免疫組織染色では、Thy1、B220、Mac-1 は糸球体、糸球体周囲、血管周囲すべてに存在していたが、Thy1 陽性細胞、Mac-1 陽性細胞は主に糸球体周囲に存在し、B220 陽性細胞は主に糸球体内に存在していた。CD4、CD8 陽性細胞は糸球体、糸球体周囲、血管周囲すべてに認められたが、特に糸球体周囲に多かった。

2) RT-PCR で、 β -actin は単細胞レベルで確認できたが、それ以上の解析は不可能であり、以後は糸球体 5 ケから 10 ケ、その周囲の浸潤細胞、あるいはそれに相当する範囲の血管周囲浸潤細胞のプールを使用した。糸球体では、Thy1+細胞：100%、B220+細胞：92.5%、CD4+細胞：22.5%、CD8+細胞：35%であり、糸球体周囲では、Thy1+細胞：91.7%、B220+細胞：41.7%、

CD4+細胞：12.5%、CD8+細胞：25%であった。血管周囲では、Thy1+細胞：100%、B220+細胞：100%、CD4+細胞：65%、CD8+細胞：42.5%であった（図 3）。

3) 糸球体におけるサイトカイン遺伝子発現は、INF γ ：75%、IL-2：12.5%、IL-4 陰性、IL-10：7.5%であり、糸球体周囲では INF γ ：75%、IL-2：25%、IL-4 と IL-10 は陰性であった。一方、血管周囲では、INF γ ：62.5%、IL-2：5%、IL-4：2.5%、IL-10：60%であった（図 4）。

D. 考察

RT-PCR の結果からは、MRL/lpr マウスの糸球体内浸潤 T 細胞、糸球体周囲の浸潤細胞は、double negative (CD4 陰性 CD8 陰性) T 細胞が多く、Th1 タイプとして機能している。一方、血管周囲では CD4 陽性あるいは CD8 陽性 T 細胞が多く、Th1、Th2 タイプ両方のサイトカインを産生し病態形成に関与している可能性が示唆された（図 5）。細胞の局在については、免疫組織染色法と RT-PCR 法で若干の解離があったが、定量的な解析という点では、RT-PCR 法による解析の方が有用である可能性も考えられた。

E. 結論

サイトカインバランスからは、MRL/lpr マウスの糸球体腎炎と血管炎の発症機序は異なる可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakano M, Hasegawa H, Takada T, Ito S, et al. Pulmonary diffusion capacity in patients with systemic lupus erythematosus. *Respiratology* 7:45-49, 2002
2. Kobayashi T, Ito S, et al. Risk of Periodontitis in Systemic Lupus Erythematosus is Associated with Fc γ Receptor Polymorphisms. *J Periodontology* 74:378-384, 2003
3. Ito S, et al. Patient with diffuse mesangial and endocapillary proliferative glomerulonephritis with hypocplementemia and elevated anti-streptolysin O treated with prednisolone, angiotensin-converting enzyme inhibitor, and angiotensin II receptor antagonist. *Clin Exp Nephrol* 7:290-295, 2003
4. 伊藤 聡. 難治性病態の治療戦略. ループス腎炎 内科 93:283-287, 2004
5. Takahashi R, Tsutsumi A, Ohtani K, Goto D, Matsumoto I, Ito S, et al. Anti-mannose binding lectin antibodies in sera of Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 136:585-590, 2004
6. Yoko W, Ito S, et al. Renal outcome and predictors of clinical renal involvement in patients with silent lupus nephritis. *Nephron* 98:105-111, 2004
7. Miyahara S, Ito S, et al. Two cases of systemic lupus erythematosus complicated with colonic ulcers. *Intern Med* 44: 1298-1306, 2005
8. Suzuki E, Hayashi T, Ito S, et al. A Case of Pulmonary Hypertension Associated with Systemic Lupus Erythematosus without Anti-ribonucleoprotein Antibodies. *Acta Med Biol* 53: 87-93, 2005
9. Ito S, et al. Rheumatology in Japan, Germany, and Egypt: Comparison of Medical Practices. *Acta Med Biol* 54:51-58, 2006
10. Tsutsumi A, Hayashi T, Chino Y, Goto D, Matsumoto I, Ito S, et al. Significance of antiprothrombin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus: clinical evaluation of the antiprothrombin assay and the antiphosphatidylserine/prothrombin assay, and

comparison with other phospholipids antibody assays. *Mod.Rheumatol* 16:158-164, 2006

11. Kobayashi T, Ito S, et al. The Combined Genotypes of Stimulatory and Inhibitory Fc γ Receptor Associated with Systemic Lupus Erythematosus and Periodontitis in Japanese. *J Periodontology* (in press)

2. 学会発表

1. 村田秀行、他 ループス腎炎患者内浸潤 T 細胞サイトカインの単細胞レベルでの解析 第 47 回日本リウマチ学会、2003 年
2. 千野 裕介、伊藤 聡、他 Laser-microdissection(LMD)法によるループス腎炎モデルマウス (MRL/lpr マウス) の腎浸潤 T 細胞の解析 第 34 回日本免疫学会、2004 年
3. 千野 裕介、伊藤 聡、他 Laser-microdissection(LMD)法によるループス腎炎モデルマウス (MRL-lpr マウス) の腎浸潤 T 細胞の解析 第 49 回日本リウマチ学会、2005 年
4. Chino Y, Ito S, et al. Analysis of T cells infiltrating in the kidney of MRL-lpr mouse by Lasermicro dissection. The First East Asian Group of Rheumatology (EAGOR) meeting、2005
5. 千野 裕介、伊藤 聡、他 Laser-microdissection(LMD)法による MRL/lpr マウスの腎浸潤 T 細胞の解析 第 35 回日本免疫学会、2005
6. 千野 裕介、伊藤 聡、他 Laser-microdissection(LMD)法を用いた MRL/lpr マウスの腎浸潤 T 細胞の解析 第 50 回日本リウマチ学会、2006 年
7. 王 英歌、伊藤 聡、他 Analysis of T Cells Infiltrated in Kidneys of MRL/lpr Mouse by Laser-Microdissection (LMD) Method 第 36 回日本免疫学会、2006 年

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

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

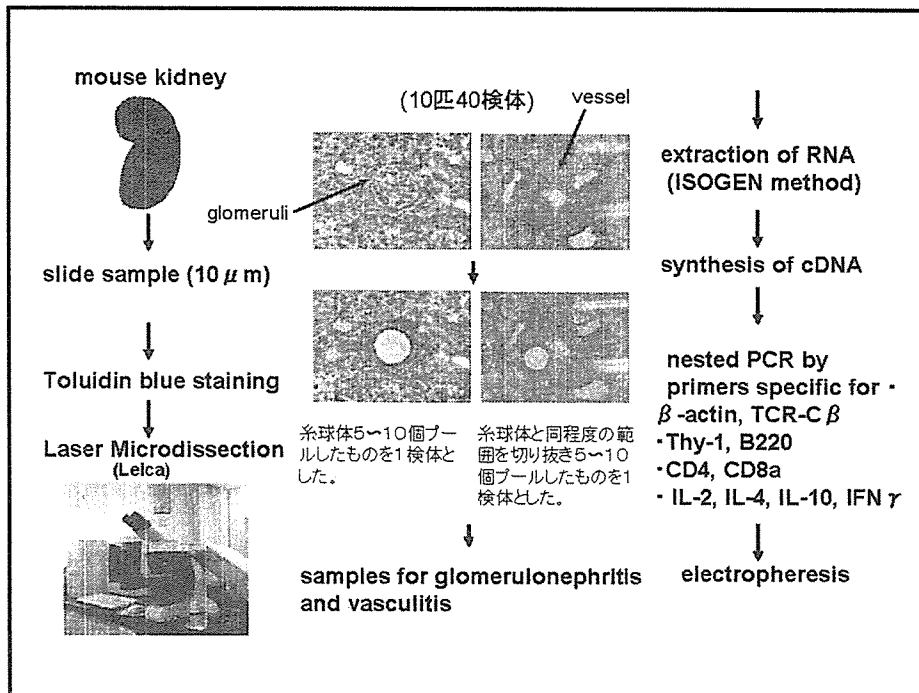


図 1. 実験方法

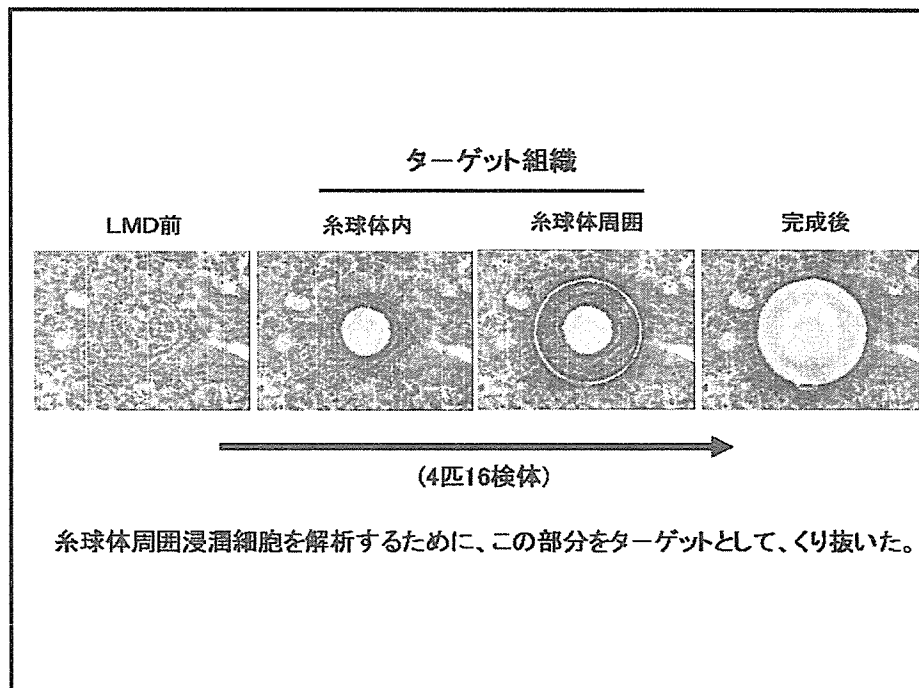


図 2. 糸球体周囲浸潤細胞の LMD による採取

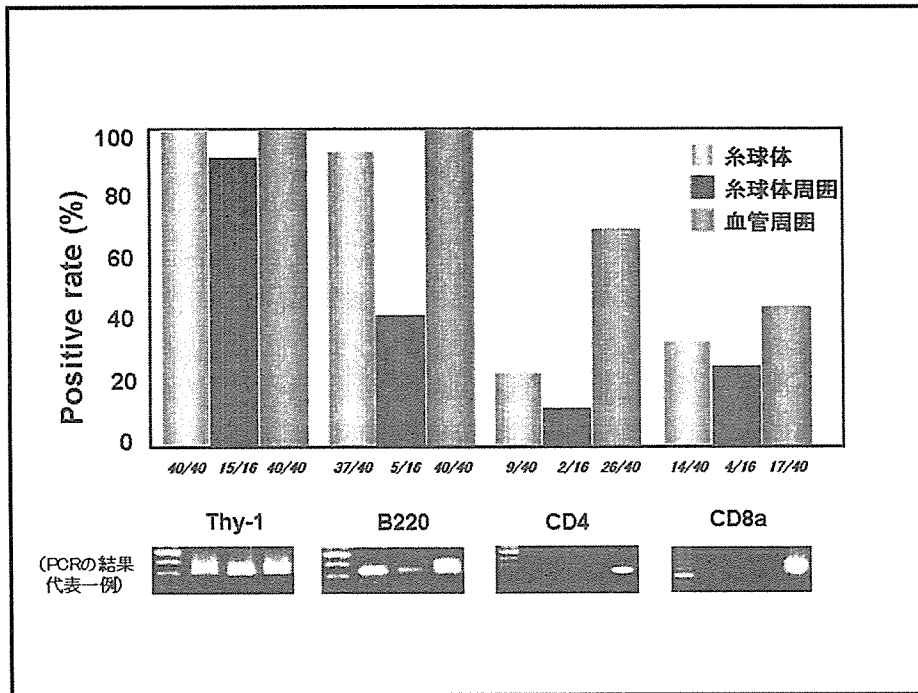


図 3. T 細胞 phenotype

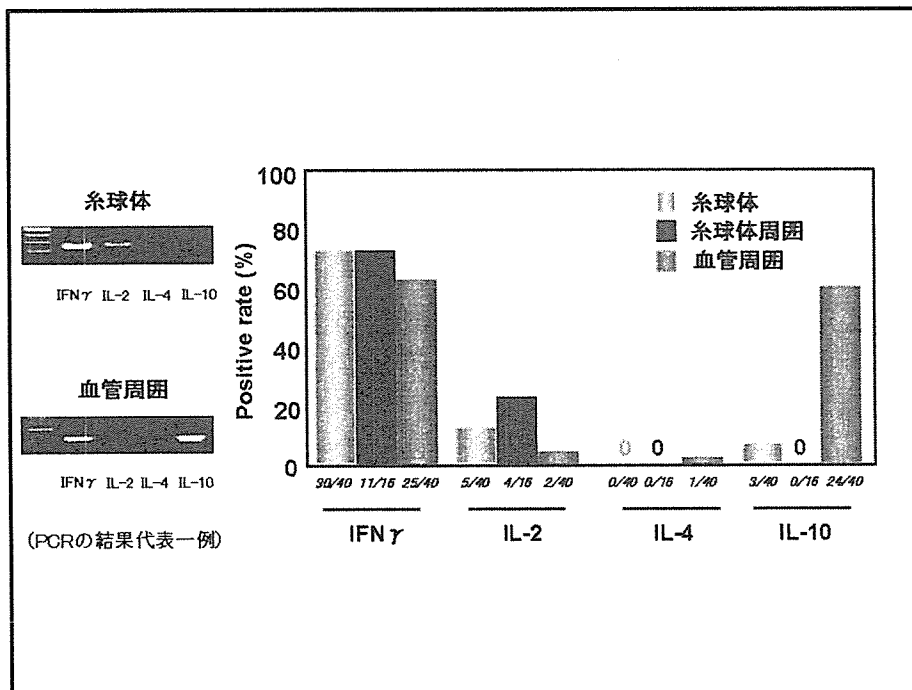


図 4. サイトカイン mRNA expression

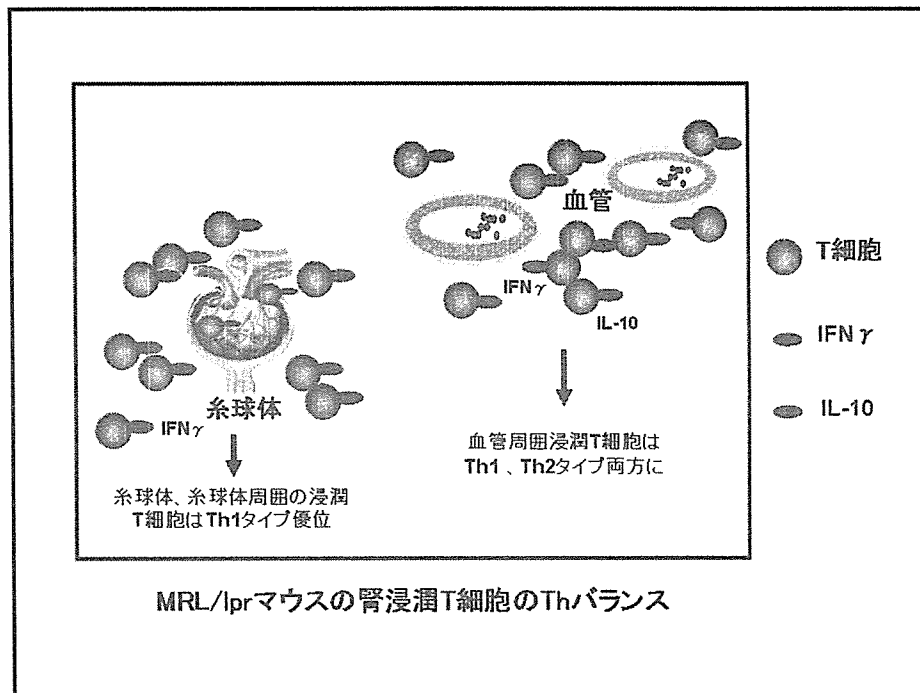


図 5. 結果のシエーマ

SLE 患者末梢血由来 T 細胞における Th17 サブセットに関する研究

分担研究者 三村 俊英 埼玉医科大学 リウマチ膠原病科 教授
研究協力者 佐藤浩二郎 埼玉医科大学 リウマチ膠原病科 講師
三由 文彦 埼玉医科大学 リウマチ膠原病科

研究要旨 IL-17 を多量に産生する独立した新規 T ヘルパーサブセット (Th17) の全身性エリテマトーデス (SLE) における病態への関与を検討した。IL-17 産生は患者末梢血単核細胞分画に認められ、これは Th17 由来と考えられた。SLE 臓器障害など病態形成に Th17 細胞が関与する可能性が高い。

A. 研究目的

IFN- γ を殆ど産生せず、IL-17 を多量に産生する独立した新規 T ヘルパーサブセット (Th17) が、明らかになった。IL-17 産生細胞が組織障害に関わることは以前から知られていたが、これに関与する T 細胞は Th1 から分化するとされていた。実際は、Th17 という独立したサブセットが存在することから、関節リウマチや全身性自己免疫疾患における Th17 の関与が予想されるが、極めて新規知見であるため未だにこれに関しては報告が無い。そこで、本研究においては、Th17 の全身性エリテマトーデス (SLE) の病態への関与を検討することを目的とし、SLE 患者末梢血における Th17 サブセットの比率・意義を検討した。

B. 研究方法

未加療新規 SLE 患者、対照群として加療中で活動性のある関節リウマチ (RA) 患者および健常者から末梢血を採取し、分離した単核細胞 (PBMCs) を用いて、刺激前および PMA+ionomycin で 24 時間刺激後に total RNA を採取した。RNA は real time-PCR にて IFN- γ 、IL-4、IL-17 などの mRNA 発現レベルを定量した。これらを基に IFN- γ と IL-4、IFN- γ と IL-17 の発現量を比較し、臨床的データとの関連を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、埼玉医科大学病院 IRB にて承認を受けており、患者および健常者に対して、口頭および文書にてインフォームドコンセントを取得した

者に対して行った。

C. 研究結果

SLE、RA および健常者の PBMCs における上記 cytokines の mRNA 発現量を求めた。その結果、SLE においては IL-4 と IL-17 の発現量が多く、IFN- γ の発現は低下していた。RA においては IFN- γ の発現量が多いが、同時に IL-17 発現も上昇していた。IFN- γ と IL-4、IFN- γ と IL-17 をプロットしたものを示す (図 1, 2)。

D. 考察

SLE においては、刺激後の PBMCs では mRNA において IFN- γ の発現はほとんど見られず、Th2 優位の状態であるが、Th17 も病態によっては発現亢進している可能性がある。特に、今回 Th17 が上昇傾向にあるサンプルは、中枢神経病変および腎障害患者からのもので、病態により Th17 の末梢血における増減が変化する可能性もあると考えられる。従来、膠原病においては、Th1/Th2 型のいずれかに偏った疾患であるという見方が成されてきたが、実際には膠原病の病態を説明する上で不都合が多かった。新たに、Th17 サブセットの概念が明らかにされたことで、Th1/Th2/Th17 という 3 つの Th サブセットのバランスの破綻によって膠原病の病態を詳細に説明することが可能かも知れない。特に、Th17 は臓器障害や実際の病態との関係において重要で、この点からさらに検討を行って行く。一方、RA に

おいては、IFN- γ と IL-17 の発現が増加しているが、IL-4 の発現は低下しており、RA の PBMCs において Th1 とともに Th17 が優位な状態の可能性がある。Th17 細胞は IFN- γ を殆ど産生せず、IL-17 を多量に産生する。既に RA 患者関節液中に IL-17 が検出されることが報告されており、さらに、当科の佐藤らは Th17 細胞が破骨細胞の分化を試験管内で促進することを報告しており、RA が以前から考えられていたように Th1 優位な疾患ではなく、Th17 の関与が大きい疾患である可能性がある。

E. 結論

新規ヘルパーサブセットである Th17 が SLE や RA 末梢血において増加していた。従来の Th1/Th2 偏位ではなく、異なる病態に関与すると考えられる 3 つの異なる Th サブセットを理解し、Th1, Th2, Th17 の内のどのサブセットが優位な病態であるかという観点から疾患を検討する視点も必要であると考えられる。特に、臓器障害や骨破壊・骨粗鬆症などにおける Th17 の関与が重要であると考えられることから、今後、さらに検討を行って行く必要がある。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yokota, K., Miyazaki, T., Hirano, M., Akiyama, Y., Mimura, T. Simvastatin Inhibits Production of IL-6 and IL-8 and Cell Proliferation Induced by TNF- α in the Fibroblast-Like Synoviocytes from Rheumatoid Arthritis Patients. *J. Rheumatol.* 33:463-71, 2006
- 2) Sato K, Tateishi S, Kubo K, Mimura T, Yamamoto K, Kanda H. Downregulation of IL-12 and a Novel Negative Feedback System Mediated by CD25⁺CD4⁺ T cells *Biochem Biophys Res Commun.* 330; 226-232, 2005
- 3) Kanda, H., Kubo, K., Tateishi, S., Sato, K., Yonezumi, A., Yamamoto, K., and Mimura, T. Antiproteinuric effect of ARB in lupus nephritis patients with persistent proteinuria despite immunosuppressive therapy. *Lupus*14; 288-292, 2005
- 4) Satoh, K., Satoh, U., Tateishi, S., Kubo, K., Horikawa, R., Mimura, T., Yamamoto, K., and Kanda, H. Aire downregulates multiple molecules that have contradicting immune-enhancing and immune-suppressive functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318, 935-940, 2004

2. 学会発表

- 1) 秋山雄次、竹石美智雄、阿達大介、吉田佳弘、横田和浩、平野資晴、上川哲平、秋葉春彦、浅岡俊之、大野修嗣、今井史彦、三村俊英、関節リウマチ (RA) に対する infliximab の臨床的検討 (第 II 報)、第 50 回日本リウマチ学会総会 (*Modern Rheumatol.* 16:161, 2006)
- 2) 横田和浩、石橋俊子、平野資晴、吉田佳弘、上川哲平、秋葉春彦、竹石美智雄、秋山雄次、金潤沢、三村俊英、シンバスタチンによる関節リウマチ滑膜線維芽細胞の細胞増殖抑制、およびアポトーシス誘導作用、第 50 回日本リウマチ学会総会 (*Modern Rheumatol.* 16:163, 2006)
- 3) Kazuhiro Yokota, Toshiko Ishibashi, Motoharu Hirano, Yoshihiro Yoshida, Tepei Kamikawa, Daisuke Adachi, Haruhiko Akiba, Michio Takeishi, yuji Akiyama, Toshihide Mimura. Simvastatin Inhibits Production of Interleukin-6 and Interleukin-8 and Cell Proliferation Promoted by Tumor Necrosis Factor-Alpha or Induces Apoptosis in Fibroblast-Like Synoviocytes From Patients With Rheumatoid Arthritis ACR/ARHP Annual Scientific Meeting 2006

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
検討中。
2. 実用新案登録
該当せず。
3. その他
該当せず。

図 1 . 末梢血単核細胞における IFN γ と IL-4 mRNA 量の比較

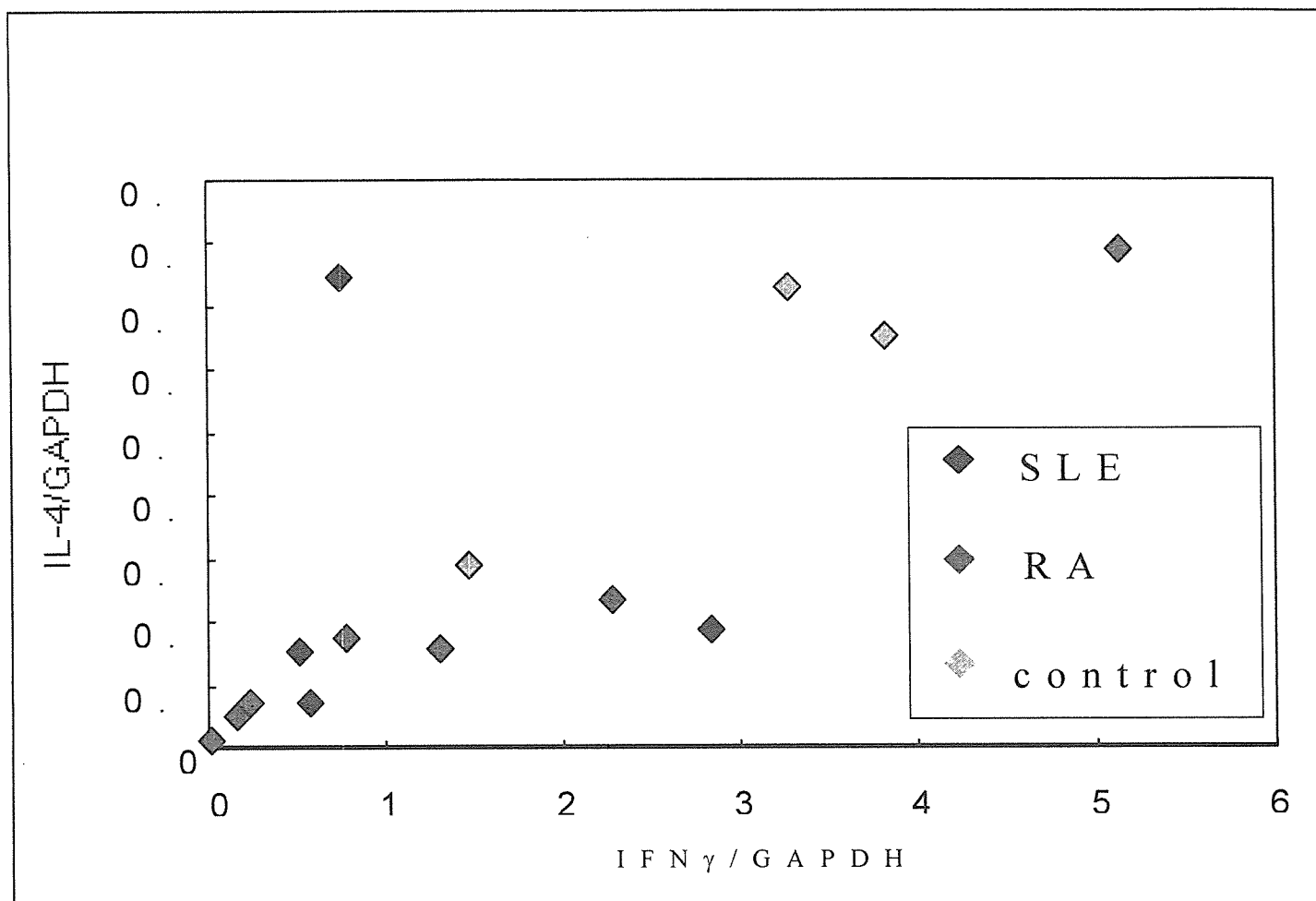
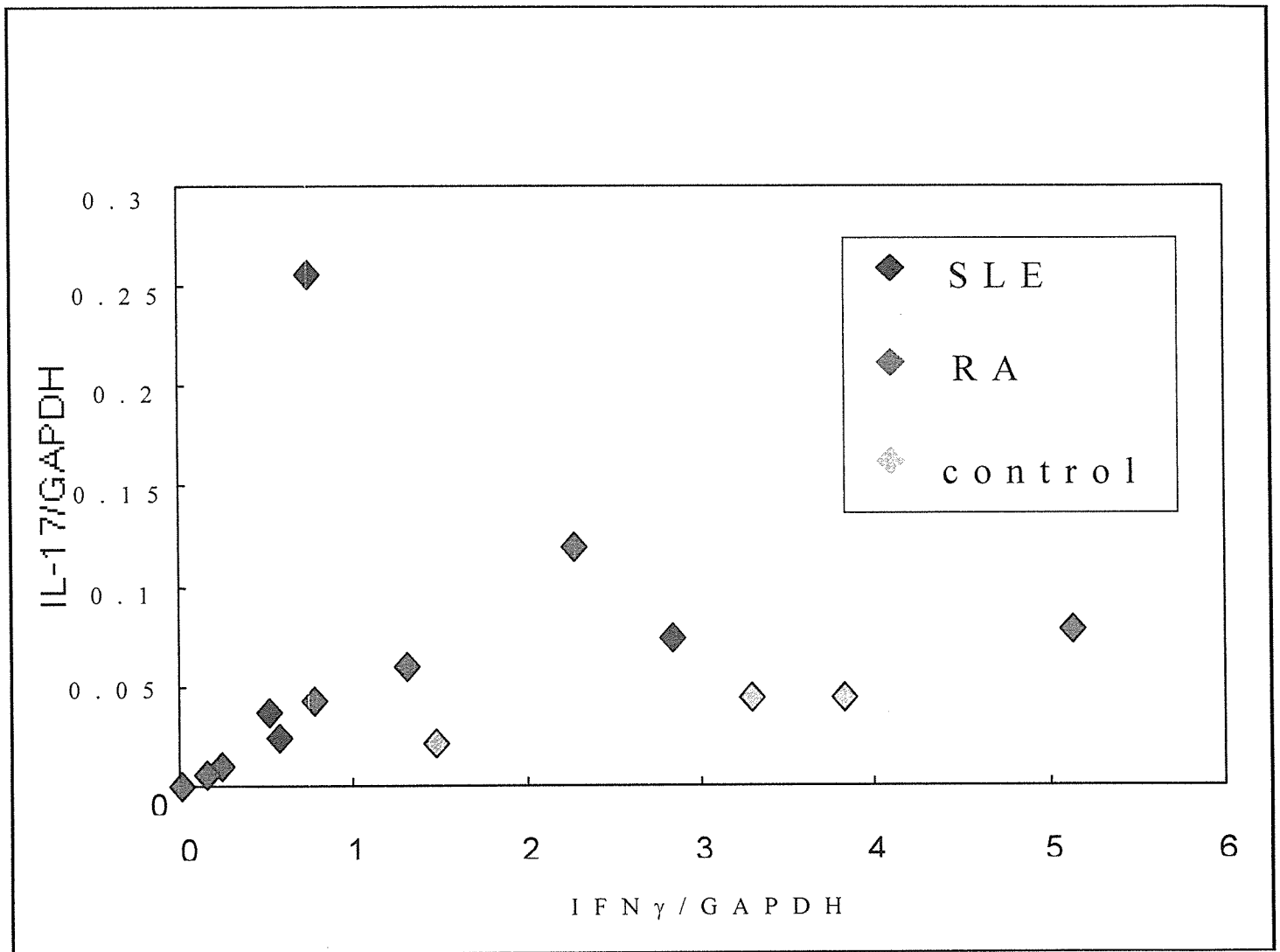


図 2 . 末梢血単核細胞における IFN γ と IL-17 mRNA 量の比較



自己免疫疾患の病態形成に関わる分子機序の解析 —T細胞-上皮細胞ヘテロ接着による組織障害の基礎的検討—

分担研究者 竹内 勤 埼玉医科大学総合医療センターリウマチ・膠原病内科 教授

研究要旨 自己免疫疾患の上皮細胞障害に関する分子機序を明らかにするため、T細胞-上皮細胞間の接着機構に着目して解析した。このヘテロ接着には、他のヘテロ接着にはみられない特異接着分子ペアであるT細胞上のaEb7インテグリン(CD103)と、上皮細胞上のE-カドヘリンが関与している。そこで、インテグリンaE鎖とb7鎖をK562細胞にダブルトランスフェクトしたクローン、およびE-カドヘリンをトランスフェクトしたL細胞を用いて接着実験を行ない、チロシンリン酸化を指標として細胞内シグナル伝達を解析した。その結果、接着特異的に、チロシンリン酸化される分子として、ephrin受容体およびSHIPが明らかとなった。ヘテロ接着後のシグナル伝達機構が明らかになれば、それを標的とした上皮障害治療の可能性も期待される。

A.研究目的

インテグリン aEb7 は腸管の上皮間と粘膜固有層に局在するT細胞に高発現し、腸管免疫に関与することが知られている。一方で aEb7⁺ T細胞が自己免疫疾患患者の皮膚や肺、涙腺、唾液腺に浸潤し、病態形成への関与が注目されてきた。aEb7 とリガンドの E-カドヘリンとの接着は、炎症上皮組織における aEb7⁺ T細胞の局在と保持に重要な役割を担っていると考えられるが、その分子機構は不明である。同じ b7 サブファミリーに属する他のインテグリンと異なり、粘膜上皮へのホーミングには関与しないとされている。そこで、aEb7 と E カドヘリンの接着により誘導されるシグナル伝達機構を明らかにするため、タンパク質のチロシンリン酸化を指標として以下の解析を行なった。

B.研究方法

1)細胞: E-cadherin cDNA はマウス L細胞にトランスフェクション。K562-aEb7細胞は Dr.Erle より譲渡。aEb7⁺K562細胞と E-cadherin⁺L細胞は2価金属存在下に旋回培養し接着。細胞の TritonX-100 可溶分画を回収し実験に使用。

2)免疫プロット: E カドヘリン抗体、抗チロシンリン酸化抗体による免疫沈降物は SDS-PAGE で分離し PVDF 膜に転写。抗チロシンリン酸化抗体で、チロシンリン酸化タンパク質を検出。

3)チロシンリン酸化蛋白の同定: 銀染色でバンドを可視化、接着で発現変化のバンドを PMF 解析-質量分析で同定。

C.研究結果

1)ヘテロ接着: E カドヘリン⁺L細胞と aEb7⁺K562細胞は 2:1 で混合し旋回培養、E カドヘリン⁺L細胞と aEb7⁺K562細胞は接着し aggregate を形成。このヘテロ接着は抗 aEb7mAb により著しく阻害。一方、上皮細胞同士の

ホモ接着は阻害を受けなかった。そこで E カドヘリン⁺L

細胞と aEb7⁺K562細胞を 4 時間混合培養したものを接着サンプル、分離培養したものを非接着サンプルとし、両者を比較することでヘテロ接着に特異的な反応を解析。

2)チロシンリン酸化: 抗 Eカドヘリン抗体で免疫沈降を行い、沈降物のリン酸化について調べたところ、接着サンプルにおいて E カドヘリンのリン酸化が著しく低下した。逆に E カドヘリンの細胞内結合タンパク質である β カテニンと、未同定の結合タンパク質のリン酸化は亢進。次に抗チロシンリン酸化抗体で免疫沈降を行い、同抗体で免疫プロットを行ったところ、接着 24 時間で亢進する複数のバンドが存在した。

3)チロシンリン酸化タンパク質のプロテオーム解析: 抗 Eカドヘリン抗体及び抗チロシンリン酸化抗体による免疫沈降物を、SDA-PAGE で展開し銀染色したところ、イムノプロットで認められた複数のバンドを検出。これらのバンドを切り出し、PMF 解析を行った。抗チロシンリン酸化抗体沈降物のうち、2 つのタンパク質が ephrin 受容体及び SHIP と同定された。

D.E考察と結論

Eカドヘリンと aEb7 の接着により誘導されるチロシンリン酸化タンパク質が、抗 Eカドヘリン抗体と抗チロシンリン酸化抗体の免疫沈降法により複数確認された。これらのタンパク質について PMF 解析による質量分析を行った結果、ephrin 受容体と SHIP を同定することができた。これらのタンパク質は、EGF で誘導される細胞増殖と生存のシグナルを、ダウンレギュレーションすることが知られている。今回の実験では制御の証拠は得られなかったが、接着後の経時的な Eカドヘリン発現の増加は、ephrin の結合性を高めると推察される。上皮障害を呈する自己免疫疾患患者での解析が待たれる。

F.健康危険情報

特になし。

G.研究発表

1. 論文発表

1. Tsuzaka K, Nozaki K, Kumazawa C, Shiraishi K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, and Takeuchi T. DNA microarray gene expression profile of T cells with splice variants of TCRz mRNA observed in SLE. *J Immunol* 176:949–56, 2006.
 2. Abe T, Takeuchi T, Miyasaka N, et al. A multi-center, double-blind, placebo-controlled trial of infliximab combined with low dose methotrexate in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *J Rheum* 33:37–44, 2006.
 3. Miyasaka M, Takeuchi T, and Eguchi K. Guidelines for the proper use of etanercept in Japan. *Mod Rheum* 16:63–7, 2006.
 4. Kameda H, Ishigami H, Suzuki M, Abe T, and Takeuchi T. Imatinib mesylate inhibits proliferation of rheumatoid synovial fibroblast-like cells and phosphorylation of Gab adaptor proteins activated by platelet-derived growth factor. *Clin Exp Immunol* 144: 335–41, 2006.
 5. Sekiguchi N, Kameda H, Amano K, and Takeuchi T. Efficacy and safety of busillamine, a D-Penicillamine analogue, in patients with active Rheumatoid Arthritis. *Mod Rheum* 16:85–91, 2006.
 6. Yoshimoto K, Takahashi Y, Ogasawara M, Setoyama Y, Suzuki K, Tsuzaka K, Abe T, and Takeuchi T. Aberrant expression of BAFF in T cells of systemic lupus erythematosus, which is recapitulated by a human T cell line, Loucy. *Int Immunol* 18: 1189–96, 2006.
 7. Takeuchi T, Amano K, and Kameda H. Impact of TNF inhibitors on Rheumatoid Arthritis. *Inflammation & Regeneration* 26: 148–159, 2006.
 8. Kameda H, and Takeuchi T. Recent advances in the treatment of interstitial lung disease in patients with polymyositis/dermatomyositis. *Endocrine, metabolic & Immune disorders– Drug Targets*. In press, 2006.
 9. Kameda H, Sekiguchi N, Nagasawa H, Amano K, Takei H, Suzuki K, Nishi E, Ogawa H, and Takeuchi T. Development and validation of handy rheumatoid activity score with 38 joints (HRAS38) in rheumatoid arthritis patients receiving infliximab. *Mod Rheum* 16:381–388, 2006.
 10. Tsuzaka K, Nozaki K, Kumazawa C, Shiraishi K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Abe T, and Takeuchi T. TCRz mRNA splice variant forms observed in peripheral blood T cells from systemic lupus erythematosus patients. *Springer Seminars in Immunopathology* 28:185–93, 2006.
 11. Kameda H, Okuyama A, Tamaru J, Itoyama S, Iizuka A, and Takeuchi T. Lymphomatoid granulomatosis and diffuse alveolar damage associated with methotrexate in a patient with rheumatoid arthritis. *Clin Rheum* in press.
 12. Yamanaka H, Tanaka Y, Sekiguchi N, Inoue E, Saitao K, Kameda H, Iikuni N, Nawata M, Amano K, Shinozaki M, and Takeuchi T. Retrospective clinical study on the notable efficacy and related factors of infliximab therapy in rheumatoid arthritis management group in Japan (RECONFIRM) *Mod Rheum* 17:28–32, 2007.
 13. Ogawa H, Kameda H, Nagasawa H, Sekiguchi N, Takei H, Tsuzaka K, Amano K, and Takeuchi T. Prospective study of low dose cyclosporine A in patients with refractory lupus nephritis. *Mod Rheum* in press.
- ### 2. 学会発表
1. Takeuchi Tsutomu. Post-marketing Surveillance of Infliximab in Japanese Patients with Rheumatoid Arthritis –Five Thousand Patients– 第15回国際シンポジウム 長崎 2006.4.24
 2. Takeuchi Tsutomu. Lessons we learn from Japanese anticytokine treatment. DUTCH/JAPANESE RHEMATOLOGY WORKSHOP TOKYO, JAPAN 2006.6.9
 3. Takeuchi Tutomu. Transcriptional analysis of autoimmune diseases.

4. MMF の免疫抑制作用ー新しい知見 Renal transplantation forum 2006 東京(六本木) 2006.5.13
5. 膠原病治療における生物学的製剤ー光と影ー 第 18 回日本アレルギー学会春季臨床大会 招請講演 東京 2006.5.30
6. 生物学的製剤の最近の知見 日本リウマチ学会全国中央教育研修会 大阪 2006.8.20

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

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。

多発性筋炎・皮膚筋炎に合併する間質性肺炎に対するタクロリムスの有用性の検討

分担研究者 高田 和生 東京医科歯科大学膠原病・リウマチ内科 講師

研究要旨 皮膚筋炎・多発性筋炎には間質性肺炎が高頻度に合併するが、唯一適応承認を持つ副腎皮質ステロイド薬の有効性は極めて低く、臨床の現場では免疫抑制薬が限られたエビデンスに基づき適切な用法用量設定もされないまま適応外で治療開始時より併用されているのが現状である。本疾患の病態には肺胞・間質に多数浸潤しているTリンパ球の強い関与が示唆されており、Tリンパ球特異的免疫抑制薬であるタクロリムスが新規治療薬候補として注目されている。しかし不採算性などのため製薬会社主導開発の可能性はなく、我々は研究者主導でその開発を進めており、この度効能追加申請のためのデータ取得を目的としたGCP準拠多施設共同治験を計画した。希少疾患であること、および疾患の性質から、治験実施計画において、比較対照群を設けずタクロリムスと副腎皮質ステロイド薬の併用投与群単群のみによる臨床試験とするしかなく、また効能追加承認申請において既承認治療法である副腎皮質ステロイド薬単独療法に比しての有用性の評価を行うためのデータとして、副腎皮質ステロイド薬のみによる初期治療が行われた症例よりなるHistorical control群のデータを収集することとするなど、治験の科学性および倫理性を維持するために様々な配慮が必要であった。予後不良で現在限られたエビデンスのもと免疫抑制薬が適切な用法用量設定も行われていないまま適応外使用されている本疾患において、注目されている新規治療法候補の有用性とそれを裏付ける質の高いエビデンスの提供が期待される。

A. 研究目的

多発性筋炎・皮膚筋炎には間質性肺炎が高頻度に合併するが、唯一適応承認を持つ副腎皮質ステロイド薬の有効性は極めて低く、短期死亡率が極めて高く予後不良である。一方、副腎皮質ステロイド薬による初期治療開始後早期に免疫抑制薬を併用した場合には短期死亡率が改善されることが示唆されており、臨床の現場ではシクロスポリンやシクロホスファミドなどの免疫抑制薬が、限られたエビデンスに基づき適切な用法用量設定もされないまま適応外で副腎皮質ステロイド薬開始時より併用されているのが現状である。本疾患の病態には、肺胞・間質に多数浸潤している活性化Tリンパ球の強い関与が示唆されており、Tリンパ球特異的免疫抑制薬であるタクロリムスの本疾患における有効性を示唆する報告が蓄積されてきており、新規治療薬候補として期待されている。しかし不採算性などのため製薬会社主導開発の可能性はなく、従って我々は多発性筋炎・皮膚筋炎に合併する間質性肺炎に対するタクロリムスの有効性及び安全性を検討することを目的とし、研究者主導でその開発を進めている。

B. 研究方法

効能追加申請のためのデータ取得を目的としたGCP準拠の多施設共同臨床試験を行うべく、日本医師会治験促進センター（治験推進研究事業採択課題）のサポートを受けながら計画を進めた。

（1）治験実施計画の骨子作成

2006年3月末に行われた医薬品医療機器総合機構における対面助言での議論にもとづき、治験実施計画の骨子を再考察し、一部変更を行い、2006年8月の追加事前面談において更なる指導を得た。

（2）実施医療機関選定

日本医師会治験促進センターによる大規模治験ネットワークを利用しての実施医療機関公募を行った。公募期間中の2006年11月8日に実施医療機関選定前説明会を行い、最終的に12月5日付けで施設を選定した。

（3）治験実施計画の骨子確定

2007年1月17日に治験実施計画に関する検討会を開催し、その後の考察を経て2007年2月末に確定した。

（4）治験関連資料作成

治験実施計画の骨子確定に平行し、治験薬概要書、説明文書同意文書、症例報告書、その他GCPにて規定される各種手順書などを含む書類の作成を行った。

（5）治験審査委員会審査

2007年3月より、各実施医療機関における治験審査委員会にての審査が開始された。

C. 研究結果

治験審査委員会提出版として確定した治験実施計画の要約を添付資料1に記した。

本治験の目的は、「タクロリムスの、副腎皮質ステロイド薬との併用による、多発性筋炎・皮膚筋炎（皮膚限局型皮膚筋炎を含む）に合併する間質

性肺炎に対する有効性及び安全性を検討することである。本治験では、(1) 対象疾患が希少疾患であること、(2) 唯一適応承認を得ている副腎皮質ステロイド薬投与のみでは高い短期死亡率が予想されること、(3) 他に対照となりうる確立された治療薬がないこと等から、比較対照群を設けずタクロリムスと副腎皮質ステロイド薬の併用投与群単群のみによる臨床試験とした (パート A)。また、本治験の一部として、副腎皮質ステロイド薬のみによる初期治療が行われた症例よりなる Historical control 群のデータを収集し (パート B)、パート A の主要評価項目および副次的評価項目に関し両群間で比較し、タクロリムスと副腎皮質ステロイド薬併用療法の、本疾患における治療的位置づけを検討することとした。

なお、実施医療機関としては、本「自己免疫疾患に関する調査研究班」分担研究者の属する医療機関を中心とした 11 医療機関を選定した。

今後は各実施医療機関の治験審査委員会での審査の終了後の 2007 年 5 月に治験届けを提出し、2007 年 6 月よりの被験者登録開始を目標に計画を進めていく。

D. 考察

タクロリムスと副腎皮質ステロイド薬の併用療法という新規治療法候補の臨床開発においては、対象疾患の性質上、治験としては同治療候補を用いた単群のみによる臨床試験とすることは止むを得ないことと考察された。その一方、効能追加承認申請を行うにおいては、既承認治療法である副腎皮質ステロイド薬単独療法に対して有用性において優れているか否かを検討するためのデータを入手する必要があると考察されたため、副腎皮質ステロイド薬のみによる初期治療が行われた症例よりなる Historical control 群のデータを収集することとし、またその際得られるデータはいずれ効能追加承認申請に用いられる可能性があることから、品質保証の必要があり、したがって本臨床研究の一部として行われることとした。

Historical control 群データ入手においては、本治験の主要評価項目が生存率であることから、死者に関するデータ入手が不完全な場合、該当症例の完全網羅が達成できず、Historical control 群設立に selection bias が不可避となってしまう、結果として本新規治療法候補の既承認治療法に対する有用性の検討に著しい障害が生じる可能性が高いと考えられ、配慮が必要であった。

E. 結論

不採算性などのため製薬会社主導開発の可能性のない希少疾患における新規治療法候補の臨床開発を研究者主導で進め、GCP 準拠多施設共同治験を計画した。希少疾患であること、および疾患の

性質から、治験実施計画において、治験の科学性および倫理性を維持するために様々な配慮が必要であった。予後不良で現在限られたエビデンスのもと免疫抑制薬が適切な用法用量設定も行われていないまま適応外使用されている本疾患において、注目されている新規治療法候補の有用性とそれを裏付ける質の高いエビデンスの提供が期待される。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takada, K., J. Kishi, N. Miyasaka, “Step-up versus primary intensive approach to the treatment of interstitial pneumonia associated with dermatomyositis/polymyositis: a retrospective study”. Modern Rheumatol, in press.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

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

添付資料

「パートA: オープンラベル治療群データ収集」実施計画の要約

項目	内容
開 発 の 相 目 的	第Ⅱ/Ⅲ相 タクロリムスの、副腎皮質ステロイド薬との併用による、多発性筋炎 (polymyositis; PM)・皮膚筋炎 (dermatomyositis; DM) (皮膚限局型皮膚筋炎 (clinically-amyopathic dermatomyositis) を含む) に合併する間質性肺炎 (interstitial pneumonitis; IP) に対する有効性および安全性を検討する。
対 象	PM・DMに合併する IP の初発、または寛解・安定化後の再発のために治療を必要とする患者
選 択 基 準	<p>(1) Bohan and Peter による診断基準^{1,2}において、PMまたはDMの「probable」または「definite」の基準を満たす、または Sontheimer により提案された定義 (Sontheimer, 2002 85 /id) により CADM と分類される (ただし発病からの期間は問わない)</p> <p>(2) 肺高分解能 CT (治験薬投与開始前6週 (42日) 以内に得られたもの) が、以下にあげた特徴的な所見をとり (すべての所見を持つ必要はない)、放射線科医により IP の診断に合致するとされる。ただし、肺高分解能 CT 所見として均等影 (コンソリデーション) のみを呈する症例は、既に肺生検により BOOP 以外の IP 病理組織型が認められた場合を除いて除外する。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 両側性で中下肺野を中心とした胸膜直下の陰影分布 ・ 網状線状影 ・ 蜂巣肺 ・ 牽引性気管支炎・細気管支拡張 ・ すりガラス陰影 ・ 均等影 (コンソリデーション) <p>(3) 以下の (ア) を満たし、更に (イ)、(ウ)、(エ) または (オ) の少なくとも一つを満たす ((ア)、(イ)、(ウ) および (エ) は治験薬投与開始前2週 (14日) 以内に得られた所見より判断する)</p> <p>(ア) 血清 KL-6 値が基準範囲上限を超える</p> <p>(イ) Mahler Baseline Dyspnea Index の「問2」で「2」以下の労作時呼吸苦の存在</p> <p>(ウ) 動脈血ガス分析における PaCO₂ 上昇を伴わない PaO₂ の低下 (<80mmHg)</p> <p>(エ) 呼吸機能検査において %VC<80 または %DLCO<65</p> <p>(オ) 治験薬投与開始前12週 (84日) 以内に、以下のいずれかを認める</p> <ol style="list-style-type: none"> ① 吸機能検査において、%VC または %DLCO の 1 割以上の増悪 ② 胸部 CT における間質性肺炎所見の明らかな増悪 (放射線科医による) <p>(4) 満16歳以上満75歳未満 (同意取得時)</p>
除 外 基 準	<p>(6) ~ (9) の下線部に該当する基準の確認については、治験薬投与開始前2週 (14日) 以内に実施された臨床検査結果より判断する。</p> <p>(1) 治験薬投与開始前4週 (28日) 以内にプレドニゾン換算で 0.6mg/kg/日以上の副腎皮質ステロイド薬が8日以上投与された</p> <p>(2) 治験薬投与開始前12週 (84日) 以内に副腎皮質ステロイド薬以外の免疫抑制薬が投与された</p> <p>(3) 薬剤性間質性肺炎 (抗生剤、漢方薬、抗癌剤、メトトレキサートなど)、塵肺 (アスベスト、珪肺など)、過敏性肺炎 (夏型、鳥飼病など)、放射性肺炎を、臨床的に否定・除外できない</p> <p>(4) %VC<45、%DLCO<30、または肺高分解能 CT において蜂巣肺のみを呈する</p> <p>(5) 肺炎を合併する</p> <p>(6) 糖尿病を合併する (ただし、その原因が副腎皮質ステロイド薬によると考察され、コントロール良好 (HbA1c が 6.5%未満) である場合を除く)</p> <p>(7) <u>血清クレアチニン値が 1.5mg/dL 以上</u></p> <p>(8) <u>肝機能障害 (AST(GOT) または ALT(GPT) が測定機関の基準範囲上限の 2.5 倍以上) を有する (ただし、その原因が筋炎によると考察され、筋逸脱酵素値の上昇も認められる場合を除く)</u></p> <p>(9) <u>高カリウム血症 (血清カリウム値が測定機関の基準範囲上限を超える) を有する</u></p> <p>(10) 虚血性心疾患、加療を要する不整脈、心不全の合併およびその既往、加療を要する肺高血圧症を有する</p> <p>(11) 悪性腫瘍の合併およびその既往を有する (ただし、5年以上治療が行われず、再発が認められない症例を除く)</p> <p>(12) 重篤な感染症を有する</p> <p>(13) 治験薬投与開始前4週 (28日) 以内の検査で抗 HIV 抗体、HBs 抗原または抗 HCV 抗体が陽性となった</p> <p>(14) 重篤な薬剤過敏症の既往を有する</p> <p>(15) 妊娠あるいは授乳中である、治験期間中に妊娠を希望する、または治験期間中に配偶者の妊娠を希望する</p> <p>(16) 過去26週 (182日) 以内に治験または製造販売後臨床試験に参加した経験がある</p> <p>(17) その他、治験責任医師または治験分担医師が本治験に組入れることを、医学的根拠から不適当と判断する</p>
治 験 デ ザ イ ン	タクロリムスと副腎皮質ステロイド薬の併用投与群単群による多施設共同オープン試験

項目	内容
治 験 薬	タクロリムス水和物 カプセル 0.5mg : タクロリムスとして 0.5mg 含有する淡黄色硬カプセル タクロリムス水和物 カプセル 1mg : タクロリムスとして 1mg 含有する白色硬カプセル
用 法 ・ 用 量	基準開始用量として 0.075mg/kg/日 を 1 日 2 回に分けて投与することとし、定期的に全血トラフ濃度の測定を行い、臨床反応・忍容性に応じて最大投与量 0.3mg/kg/日、全血トラフ濃度 5~10ng/mL の範囲で、投与量調節を可とする。
併 用 薬 剤	<ul style="list-style-type: none"> 副腎皮質ステロイド薬を、プレドニゾン換算で 0.6mg/kg/日以上 1.0mg/kg/日以下で臨床的に可能である最大量を初期投与量とし、治験薬投与開始後 4 週間にはできる限り同量を維持し、理学的所見、検査所見の改善または安定が認められれば、その後 4 週間に 10%の割合を目安に漸減する。 初期投与量に対して反応が悪い場合には、治験薬投与開始 4 週間後までであれば、副腎皮質ステロイド・パルス療法を 2 回以内で使用可能とする。 治験期間中臨床的に必要であると考えられれば、投与量がプレドニゾン換算で 1mg/kg/day を超えない範囲で増量可能とした。
投 与 期 間	52 週間
目 標 症 例 数	20 例
評 価 項 目	<p>1) 有効性評価</p> <p>(1) 主要評価項目： ・ Overall survival</p> <p>(2) 副次的評価項目： ・ Progression-free survival 複合 Endpoint である「増悪 (" Progression")」を以下のように定義し、「Progression-free survival」を評価する。</p> <ol style="list-style-type: none"> 死亡 または 増悪：以下の①、②、③の全てを満たす症例、または①を満たさないが②および③を満たし「IP の増悪」の判断のもと併用禁止薬²⁾ が使用された症例で Endpoint 評価委員会が①と同等以上の増悪であると判定する場合 <ol style="list-style-type: none"> 次のいずれかまたは両方を満たす <ol style="list-style-type: none"> %FVC における治験薬投与開始前値からの 10%以上の低下 安静時 P[A-a]O₂ における治験薬投与開始前値からの 15mmHg 以上の上昇 胸部 CT における間質性肺炎所見の明らかな増悪（直近のものとの比較）（放射線科医による） ニューモシスチス肺炎、サイトメガロウイルス肺炎などの感染症を臨床的に除外・否定できる <p>注）以下のうちいずれかが使用された場合は該当する。</p> <ul style="list-style-type: none"> 副腎皮質ステロイド薬以外の免疫抑制薬 ステロイド大量療法 <ul style="list-style-type: none"> パルス療法：治験薬投与開始後 29 日目以降 プレドニゾン換算で 1mg/kg/day 超の副腎皮質ステロイド薬の投与（パルス療法に関しては 7.3(1)-④に定める通りである） 大量免疫グロブリン療法 血漿交換療法 <p>・ Overall survival に関しての、以下の亜群間における比較（サブグループ解析）による、治療効果予測因子の解析</p> <ul style="list-style-type: none"> 肺高分解能 CT 所見より類推される肺病理組織型（肺病理組織標本が得られている被験者においては各実施医療施設における病理診断結果）による亜群 抗 Jo-1 抗体の有無による亜群 VC (% of predicted)、DLCO (% of predicted) それぞれの治験薬投与開始前値で分けられる治療開始前疾患重症度による亜群 <p>・ 呼吸機能検査値および動脈血ガス分析値の変動</p> <p>・ 呼吸症状の変化</p> <p>・ ADL および QOL 指標の変動</p> <p>・ 胸部 CT 所見の変化</p> <p>・ 副腎皮質ステロイド薬用量</p> <p>2) 安全性評価 有害事象および臨床検査値異常</p>