

らに、CIA 誘導マウスの関節炎発症直後に抗 IL-17B 抗体を腹腔内投与し、関節炎の抑制効果を検討した。

(倫理面への配慮)

すべての研究は各施設の遺伝子倫理委員会の審査を受け、承認を受けた研究計画に則って実施された。

C. 研究結果

CIA マウス炎症肢における IL-17A、IL-17B、IL-17C および IL-17F の発現は亢進していた。発現部位として IL-17B は軟骨組織に、IL-17C は CD4 陽性細胞・MHC クラス II 陽性細胞に発現を認めた。IL-17A、IL-17B、IL-17C および IL-17F はマウス腹腔マクロファージの TNF- α 産生を誘導した。また、IL-17B および IL-17C を遺伝子導入したマウス脾臓 CD4 陽性細胞を、関節炎発症前の CIA マウスに移入すると関節炎の増悪を認めた。IL-17B および IL-17C の骨髄キメラマウスは CIA 誘導において関節炎発症は早まらなかったが、発症後関節炎スコアの有意な増悪を示し、血清中の TNF- α 濃度の亢進を認めた。さらに、CIA 誘導マウスの関節炎発症直後に抗 IL-17B 抗体を投与することにより、関節炎スコアおよび組織学的スコアの改善を認めた。

D. 考察

IL-17B および IL-17C は CIA マウスの関節炎局所で発現しており、どちらも生体内で過剰発現させると血清 TNF- α 濃度の亢進を伴う関節炎の増悪を認めた。さらに抗 IL-17B 抗体投与により関節炎の抑制効果が認められたことから、IL-17B は関節炎の病態形成において重要な役割を果たしていると考えられた。

E. 結論

IL-17B および IL-17C が関節炎発症後の病態形成に関与していると推測され、IL-17A のみならず IL-17B および IL-17C

の阻害が関節炎治療の有用なアプローチとなると考えられる。特に IL-17A、IL-17B、IL-17C、および IL-17F で共通したモチーフに対する中和抗体は関節炎の新たな治療薬となりうると考えられた。

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

1) Yamaguchi Y, Fujio K, Shoda H, Okamoto A, Tsuno NH, Takahashi K, Yamamoto K. IL-17B and IL-17C are associated with TNF-alpha production and contribute to the exacerbation of inflammatory arthritis. *J Immunol.* 179:7128-36, 2007.

2. 学会発表

1) 山口優美、藤尾圭志、庄田宏文、岡本明子、津野寛和、高橋孝喜、山本一彦. レトロウイルスによる骨髄前駆細胞への遺伝子導入システムを用いた、IL-17 family のコラーゲン誘発性関節炎 (CIA) に対する影響. 第 33 回日本臨床免疫学会総会(2005.10.28)

2) Yamaguchi Y, Fujio K, Shoda H, Okamoto A, Tsuno NH, Takahashi K, Yamamoto K. IL-17 family members are involved in the progression of collagen-induced arthritis in mice by using the system of in vivo retrovirus-mediated gene delivery into BM precursor cells. 69th Annual scientific meeting, American College of Rheumatology, (2005 in San Diego)

3) 山口優美、藤尾圭志、庄田宏文、岡本明子、津野寛和、高橋孝喜、山本一彦. レトロウイルスによる骨髄前駆細胞への遺伝子導入システムを用いた、IL-17 family のコラーゲン誘発性関節炎に対する影響. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会 (2005.12.12)

4) 山口優美、藤尾圭志、庄田宏文、岡本明子、津野寛和、高橋孝喜、山本一彦. レトロウイルスによる骨髄前駆細胞への遺伝子導入システムを用いた、IL-17 family のコラーゲン誘

発性関節炎（CIA）に対する影響. 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会（2006.4.24）

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

多発性筋炎に対する免疫抑制療法等先端的新規治療法に関する研究

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 准教授
研究協力者 沖山奈緒子 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学 大学院生

研究要旨 【目的】 多発性筋炎 (PM) の新規マウスモデルであるC蛋白誘導性筋炎 (CIM) の特性を解析するとともにPMの新治療法を開発する。昨年の研究で、CIM発症には自己反応性T細胞の存在とCFA皮内投与による筋局所の自然免疫活性化とが必要であることが判明した。CFA処理は、その菌体成分によるTLR刺激が重要なので、TLR刺激により放出されるI型IFNと炎症性サイトカインの筋炎発症における役割を検討する。炎症性サイトカインでは、他の自己免疫疾患で臨床使用中のTNF α 阻害剤はPMや皮膚筋炎 (DM) への治療効果が一定しない。一方で、近々、抗IL-6受容体抗体が自己免疫病臨床に供せられるため、CIMを用いてPM治療標的としてのIL-6の妥当性と作用機序を検討する。さらに、CIMモデルを洗練化するために、細胞傷害性T細胞が認識するMHCクラスIエピトープのマッピングも試みる。【方法】 1) IL-6、IFN受容体ないしIL-17のnull変異マウスに、CIMを誘導し、免疫後21日目の筋組織を観察する。2) 野生型マウスのCIM誘導前ないし筋炎発症後から抗IL-6受容体抗体 (tocilizumab surrogate) を投与して、誘導後21日目の筋組織を観察する。3) C蛋白第2断片のアミノ酸配列のうち、理論的にMHCクラスI (K^bないしD^b) 親和性の高いペプチドを合成し、RMA-S細胞のMHCクラスI分子と結合するものを選別し、このペプチドをパルスしたEL-4標的細胞に対するC蛋白免疫マウス脾細胞またはCIMマウスリンパ節細胞の細胞傷害性を解析する。【結果】 1) IFN受容体nullマウスでは、野生型マウスと同様にCIMを発症したが、IL-6nullマウスでは、CIMの発症は抑制された。一方、IL-17nullマウスでは、野生型マウスと同様にCIMを発症した。2) 抗IL-6受容体抗体投与は、誘導免疫時からでも筋炎発症後からでもCIMを改善させた。3) 合成した24のペプチドのうち、RMA-S細胞のクラスI発現を誘導したのは18個であり、最も強く誘導したK^b拘束性ペプチドをパルスしたEL-4細胞に対して、C蛋白免疫マウス脾細胞は細胞傷害性があった。CIMマウスリンパ節細胞にも弱い細胞傷害性が見られた。【結論】 自己免疫筋炎の発症に必要な自然免疫活性にはI型IFNは関与していなかった。一方、IL-6は、筋炎発症に重要であり、かつ、IL6標的治療は筋炎発症後でもそれを軽快させ、PM治療への臨床応用も期待される。この治療は、筋炎惹起性T細胞分化抑制と局所炎症惹起抑制が関与していると考えられるが、CIM発症にIL-17は必須ではないことから、IL-17産生細胞分化抑制には依存しないと考えられる。即ち、IL-17産生細胞は必ずしも自己免疫病の鍵ではない。また、CIMにおけるクラスIエピトープ候補が見出された。モデルの洗練化には、さらなる検証が必要である。

A. 研究目的

特定疾患の一つである多発性筋炎 (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の開発が望まれる。

我々が新たに開発しえた多発性筋炎 (PM) マウス実験モデルであるCタンパク誘導性筋炎

(CIM) は、ミオシン粗精製物中の骨格筋C蛋白を主要抗原とし、ヒトPMで想定しているのと同様に、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いう特性を持っており、PMに対する新規治療法の開発に寄与するモデルである。CIM発症には、末梢での自己反応性T細胞の存在と筋組織の自然免疫活性化の双方が必要であること、筋炎治療薬として、IL-1受容体

アンタゴニストや抗TNF α 抗体、抗IL-6受容体抗体投与が有望であることを、昨年報告した。

そこで今年度は、局所自然免疫活性化にて放出されるI型IFNと炎症性サイトカインのうち、IL-6やI型IFNの筋炎発症における役割と、それらを治療標的とすることの妥当性を検討する。

さらに、CIMモデルを洗練化するために、筋傷害の主要なeffector細胞である、細胞傷害性T細胞が認識するMHCクラスIエピトープのマッピングも試みる。

B. 研究方法

1) IL-6 ノックアウト (KO) マウス、IFN 受容体 KO マウス、IL-17KO マウスに、CIM を誘導し、免疫後 21 日目の筋組織を観察する。

2) 野生型マウスの CIM 誘導前ないし筋炎発症後から抗 IL-6 受容体抗体 (tocilizumab surrogate) を投与して、誘導後 21 日目の筋組織を観察する。

3) C 蛋白第 2 断片のアミノ酸配列のうち、理論的に MHC クラス I (K^b ないし D^b) 親和性の高いペプチドを 24 個合成し、RMA-S 細胞と反応させて、MHC クラス I 分子と結合して発現を増強させるものを選別し、このペプチドを提示させた EL-4 標的細胞に対する熱処理 C 蛋白を皮下注射した B6 マウスの脾細胞、または CIM マウスの鼠径リンパ節細胞の細胞傷害性を、Cr リリースアッセイにて解析する。

(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なった。

C. 研究結果

1) IFN 受容体 KO マウスでは、野生型マウスと同様に CIM を発症したが、IL-6KO マウスでは、CIM の発症は抑制された。一方、IL-17KO マウスでは、野生型マウスと同様に CIM を発症した。

2) 抗 IL-6 受容体抗体 (100~200mg/kg) 投与は、誘導免疫時からでも筋炎発症後からでも CIM を改善させた。

3) 合成した 24 個のペプチドのうち、RMA-S 細胞のクラス I 発現を誘導したのは 18 個であり、最も強く誘導した K^b 拘束性ペプチドを提示させた EL-4 細胞に対して、C 蛋白フラグメント免疫

マウス脾細胞は細胞傷害性があった。CIM マウスリンパ節細胞にも弱い細胞傷害性が見られた。

D. 考察

1) I 型 IFN が、全身性エリテマトーデス患者の病態に関わっているということが指摘されているが、同じことが皮膚筋炎 (DM) や PM でも言える可能性がある。DM 患者の筋組織、末梢血血球、皮膚病変部位で、I 型 IFN が発現しているという報告が相次いで発表され、DM の筋組織の筋内膜には、I 型 IFN の主な供給源である形質細胞性樹状細胞が、多数浸潤している。他疾患の治療のために IFN- α を投与された患者が DM や PM を発症したという症例報告もあり、I 型 IFN も PM/DM の治療標的となりうると考えられた。CIM 発症に、自然免疫活性化が必須であり、I 型 IFN の関与も考えられたが、必須ではなかった。一方、自然免疫活性化で産生される炎症性サイトカインで、そのうちの一つである IL-6 は CIM 発症に必須であった。昨年報告したように、IL-1 も同様に必須である。

2) 現在、collagen-induced arthritis (CIA) や experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) などの自己免疫疾患モデルマウスの研究から、自己免疫疾患の中心的な役割を果たしていると言われている、Th17 という新しいヘルパー T 細胞がある。この Th17 は、Naïve T 細胞から、tumor growth factor (TGF)- β と IL-6 の作用を受けて誘導され、IL-17 などを産生する細胞群であり、実際、IL-17KO マウスでは、CIA や EAE の発症が抑制されることがすでに報告されている。しかし、CIM は、IL-17KO マウスでも誘導できた。このことは、IL-17 はすべての自己免疫性疾患に必須であるわけではないことを示している。

2) CIM には、抗 IL-6 受容体抗体を使用した治療は効果的であり、IL-6 は PM・DM の治療ターゲットとして期待される。抗 IL-6 受容体抗体は、Th17 の分化誘導を抑制することにより、自己免疫性疾患への治療効果を発現するのであろうと一般的に推察されているが、CIM は、1) で述べたように、Th 17 非依存性のモデルであるため、今回は、Th17 誘導の抑制という経路を介していない。IL-6 は細胞傷害性 T 細胞誘導にもかかわるという報告もあるものの、CIM 発症後からの治療効果もあつたことより、治療ターゲットは、筋炎惹起性 T 細胞の誘導だけではなく、炎症性細胞のリクルートメントを促進する IL-6 の作用もあ

ると考えている。実際、大腸炎モデルマウスに抗IL-6受容体抗体治療をしたところ、血管内皮細胞のintercellular adhesion molecule (ICAM)-1発現が抑制されることも報告されている。

3) CIMにおけるクラスIエピトープ候補が見出された。モデルの洗練化には、さらなる検証が必要である。

E. 結論

自己免疫筋炎の発症に必要な自然免疫活性には、I型IFNは関与していなかった。一方、IL-6は、筋炎発症に重要であり、かつ、IL-6標的治療は筋炎発症後でもそれを軽快させ、PM治療への臨床応用が期待される。この治療は、筋炎惹起性T細胞分化抑制と局所炎症惹起抑制が関与していると考えられるが、少なくともTh17誘導阻止には依存しないと考えられる。即ち、Th17は必ずしも自己免疫病の鍵ではない。また、今回の検討により、このようなTh17非依存的な自己免疫疾患においても、抗IL-6受容体抗体は治療効果を発揮することが出来るということが示され、この生物学的製剤の応用範囲の広さが期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

杉原毅彦、沖山奈緒子、宮坂信之、上阪 等. 新規多発性筋炎モデルマウスにおけるIL-1レセプターアンタゴニストの治療効果の検討. 第51回日本リウマチ学会総会、横浜、2007年4月

沖山奈緒子、杉原毅彦、横関博雄、宮坂信之、上阪 等. 新規モデルマウスが示す多発性筋炎 Interleukine-6 標的治療の有効性. 第51回日本リウマチ学会総会、横浜、2007年4月

沖山奈緒子、杉原毅彦、横関博雄、宮坂信之、上阪 等. 多発性筋炎新規モデルマウスが示す Interleukine-6 の役割とその標的治療の有効性. 第35回日本臨床免疫学会総会、大阪、2007

年 11 月

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

自己免疫誘導性 Th17 細胞の分化制御メカニズムに関する研究

分担研究者 山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 部長
研究協力者 大木 伸司 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

多発性硬化症(Multiple Sclerosis: MS)では Th1 細胞や Th17 細胞の産生する炎症性サイトカインが病態形成に重要な機能を有する。最近、レチノイン酸(RA)と RA 受容体(RAR)を介したシグナルが、Th17 細胞の分化制御に関わる可能性が示されている。Th17 細胞分化に対する種々の合成レチノイドの効果をスクリーニングした結果、APL 治療薬である合成レチノイド Am80 が、*all-trans* レチノイン酸(ATRA)と同程度の Th17 細胞分化抑制活性を有することを新たに見出した。Am80 の経口投与により、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の発症は、IL-17 産生の抑制を伴って有意に抑制された。高い受容体サブタイプ選択性を有する Am80 は、副作用のリスクだけでなく脂溶性や血中半減期など医薬品としての体内動態も ATRA より優れている。すでに APL や乾癬の治療薬として使用されていることから、適用拡大による有望な新規自己免疫性脳脊髄炎治療薬候補である。

A.研究目的

近年、多発性硬化症(Multiple Sclerosis: MS)の病態形成における Th17 細胞の関与が示されている。一方、ビタミン A 代謝産物である ATRA の存在下で Th17 細胞分化が著しく抑制されることが示され、合成レチノイドによる自己免疫性脳性髄炎の治療法が模索されている。本研究では、合成レチノイド Am80 の MS 治療薬としての可能性を、Th17 細胞の分化制御能と EAE に対する抑制効果の 2 点に絞って検討した。

B.研究方法

C57BL/6J(B6)マウス由来脾臓細胞より分離した T 細胞を、種々の合成レチノイド(10 nM-1 μM)存在下に抗 CD3/CD28 抗体で刺激し、培養上清中の IL-17 を測定した。さらに脾臓 T 細胞を Th17 細胞誘導条件下(IL-6; 20 ng/ml) /TGF-β; 5 ng/ml) で合成レチノイドを添加して抗 CD3/CD28 抗体で刺激し、抗 CD3 抗体にて再刺激した後の Th17 細胞分化を、IL-17 産生能を比較した。培養後の細胞から RNA を抽出し、cDNA 合成後に定量 PCR 法を用いて、Th17 細胞分化のマスター遺伝子である RORγt の発現を比較した。B6 マウスに MOG35-55 ペプチドを免疫後、百日咳毒素(PT)を腹腔内投与することで実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を誘導した。CMC に懸濁した各種合

成レチノイドの経口投与による EAE 発症抑制効果を比較した。

(倫理面への配慮)

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

C.研究結果

RAR のナチュラルリガンドである *all-trans* レチノイン酸(ATRA)を Th17 細胞分化誘導時に添加することで、抗 CD3 抗体による再刺激後の IL-17 産生は顕著に抑制された。また急性前骨髄球性白血病(APL)および乾癬の治療薬として用いられている合成レチノイド Am80 (タミバロテン)も、再刺激後の IL-17 産生を ATRA 同様顕著に抑制した。ATRA および Am80 の効果は、用いた全ての濃度(10 nM-1 μM)において認められた。一方、RAR アンタゴニストである合成レチノイド LE540 を Th17 細胞分化時に添加し、内在性レチノイドによる RAR の活性化を阻害すると、顕著な IL-17 産生亢進が認められた。内因性 RAR シグナルの阻害による Th17 細胞分化の亢進の結果と考えているが、メカニズムの詳細は不明であり、今後の検討課題である。一方、ATRA および Am80 の作用点は、Th17 細胞分化誘導時に限られており、IL-6/TGF-β 非存在下の 1 次刺激時および Th17 細胞分化誘導後の 2 次刺激時のみにこれらのレ

チノイドを添加した場合は、IL-17 産生への影響は認められなかった。さらに、EAE 発症に対する各種統制レチノイドの抑制効果を調べた結果、EAE 誘導開始時より Am80 を経口投与 (3 mg/kg ; 隔日投与) すると、未処理群に比べて EAE の発症が有意に抑制された。一方、LE540 の経口投与 (3 mg/kg ; 隔日投与) は、初期の EAE 発症に対して大きな影響を及ぼさなかつたが、発症後期にはむしろ病態を悪化させる経口投与が認められ、Th17 細胞分化の亢進による過剰な IL-17 産生の可能性が示唆された。

D. 考察

MS の病態解明を目的としたマウス EAE モデルの解析から、中枢神経領域に浸潤した Th17 細胞が病原性 T 細胞の本体であることが明らかにされている。よって、Th17 細胞分化の選択的抑制により、病態制御を可能にする新規治療法開発の手がかりが得られると考えられる。RAR のナチュラルリガンドである all-trans retinoic acid (ATRA) は、既報通り Th17 細胞の分化を抑制し、再試激後の IL-17 産生は著しく減少した。しかしながら高い脂溶性を有する ATRA は、脂肪組織などに容易に蓄積し、その一方で血中濃度は速やかに低下する。また受容体選択性がないことが種々の副作用を併せもつ ATRA の臨床応用の可能性を狭めている。一方 RAR α/β に選択的に作用することが知られている RAR アゴニスト Am80 にも同様の Th17 細胞分化抑制効果が認められ、Am80 の経口投与により、EAE の発症が抑制された。今後 Am80 による病態抑制メカニズムを詳細に解析するとともに、受容体特異的な RAR アゴニストの探索により、より有効な治療薬候補が見出される可能性が示された

E. 結論

種々の RAR リガンドを用いることで、Th17 細胞分化を *in vitro* および *in vivo* で制御できることを示した。RAR リガンドを介した自己免疫疾患の新規治療法開発の可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

(国際誌)

Kaieda, S., S. Oki, C. Tomi, T. Yamamura and S. Miyake: Activation of invariant natural killer T cells by synthetic glycolipid ligands suppresses autoantibody-induced arthritis. *Arthr. Rheumat.* 56:1836-1845, 2007

Sato, W., T. Aranami, and T. Yamamura: Cutting Edge. Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5-phenotype. *J.Immunol.* 178:7525-7529, 2007

Satoh, J., Z. Illes, A. Peterfalvi, H. Tabunoki, C. Rozsa, and T. Yamamura: Aberrant transcriptional regulatory network in T cells of multiple sclerosis. *Neurosci. Lett.* 422: 30-33, 2007

Sakuishi, K., S. Oki, M. Araki, S.A. Porcelli, S. Miyake, and T. Yamamura: Invariant NKT cells biased for IL-5 production act as crucial regulators of inflammation. *J.Immunol.* 179:3452-3462, 2007

Yamamura, T.: Interleukin 17-producing T-helper cells and autoimmune diseases: Time for a paradigm shift? *Current Rheumatology Reports* 9:93-95, 2007

(和文雑誌)

佐藤和貴郎、荒浪利昌、山村 隆 : Th17 細胞と自己免疫疾患. *神経免疫学* 15:227-234, 2007

佐藤 和貴郎、荒浪利昌、山村 隆 : 話題. ヒト Th17 細胞におけるケモカインリセプターの発現. *臨床免疫・アレルギー科* 49:89-94, 2008

2. 学会発表

(国際学会)

Aranami T, Miyake S, and Yamamura T: CD11c on NK cells mirrors the temporal disease activity of multiple sclerosis. FOCiS 2007, San Diego, USA, 6.10, 2007

Doi Y, Oki S, Miyake S, and Yamamura T: Functional involvement of NR4A2 in the pathogenesis of multiple sclerosis. FOCiS 2007, San Diego, USA, 6.10, 2007

Doi, Y., S. Oki, S. Miyake, and T. Yamamura:
Functional involvement of NR4A2 in the
pathogenesis of multiple sclerosis. The 20th NAITO
Conference on Innate Immunity in Medicine and
Biology [III], Shonan Village Center, 10.11, 2007

(国内学会)

荒浪利昌、三宅幸子、山村 隆 : MS 寛解期ナチュ
ラルキラー細胞 CD11c は疾患活動性を反映す
る. 第 19 回日本神経免疫学会学術集会, 金沢,
2007. 4. 12

佐藤準一、天竺桂弘子、三澤多真子、山村 隆 :
MS の再発と寛解で発現差異を呈する末梢血 T 細
胞遺伝子群のネットワーク解析. 第 48 回日本神
経学会総会学術集会, 名古屋, 2007. 5. 17

土居芳充、大木伸司、三宅幸子、山村 隆 : 多
発性硬化症における病原性 T 細胞のサイトカイン
産生制御機構. ワークショップ 2, 第 35 回日
本臨床免疫学会, 大阪, 2007. 10. 19

Sato, W., T. Aranami, and T. Yamamura: ヒト
の Th17 細胞は CCR2+CCR5- の表現型を示す. ワー
クショップ 38 ヘルパー T 細胞. 第 37 回日本免
疫学会総会, 東京, 2007. 13. 22

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

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 坂口志文 京都大学再生医科学研究所 教授

研究要旨

免疫制御に不可欠な細胞である制御性T細胞の制御法開発は、免疫疾患に対する免疫抑制療法などの新規治療法開発につながりうる。本研究では、制御性T細胞の分子マーカーの探索とその解析、および制御性T細胞の機能制御を司る転写因子の解析により、分子レベルでの制御性T細胞の機能制御メカニズムの解明をめざした。研究成果として、(1)制御性T細胞特異的な単クローン抗体であるTH6を作製し、TH6の認識分子として4型葉酸受容体を同定した。TH6抗体投与によりマウスに自己免疫病を誘導することができた。(2)制御性T細胞の機能発現にFoxP3-AML1複合体が必要であることを明らかにした。これらの因子は制御性T細胞の機能制御を通じた免疫制御法開発のための候補であると考えられた。

A. 研究目的

正常個体中には、免疫反応を抑制し、自己免疫病の発症を回避させている特殊なCD4⁺T細胞である制御性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。FoxP3の遺伝子異常は制御性T細胞の欠損に至り、自己免疫病の原因となる。一方、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、制御性T細胞の分子マーカーの検索・転写因子FoxP3による制御性T細胞の機能制御メカニズムの解明による新たな制御性T細胞の制御法の開発と、それによる自己免疫反応の制御を目的とする。

B. 研究方法

(1) 制御性T細胞の分子マーカーの検索：マウス、ヒトのCD25⁺CD4⁺制御性T細胞を免疫原として、制御性T細胞特異的マーカーを認識する単クローン抗体、および制御性T細胞の機能を操作できるアゴニスティックあるいはブロック抗体を作製する。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

(2) 転写因子FoxP3の分子メカニズムの解明：FoxP3の結合因子を同定し、その免疫学的な意義を解析することにより、Foxp3が制御性T細胞

の機能を制御するメカニズムを解析し、制御性T細胞のあらたな機能評価の指標および制御法開発の基礎研究を行う。

(倫理面への配慮)

実験動物を用いた実験は、動物愛護の精神に基づき、法的・倫理的に配慮された形で、学内の倫理規定にのっとり行われた。

C. 研究結果

制御性T細胞特異的な単クローン抗体(TH6)を作製した。TH6は活性化制御性T細胞とほかの活性化T細胞を区別できる。TH6の認識する分子は4型葉酸受容体であった。TH6抗体投与により、FR4発現細胞を正常BALB/cマウスから除去すると、自己免疫性胃炎などの臓器特異的自己免疫病を発症した。またNODマウスに投与すると、糖尿病の発症が加速する。さらに、CD25とFR4の発現度を組み合わせることにより、制御性T細胞、メモリーT細胞、エフェクターT細胞を区別できることが分かった。

FoxP3タンパクの結合因子として転写因子AML1/Runx1を同定した。今回新たに、AML1が通常のT細胞でIL-2プロモーターに結合してIL-2転写を活性化している一方で、制御性T細胞においてFoxp3はAML1と結合することを介してIL-2転写を抑制し、周囲のT細胞の増殖・活性化を抑

制することを示した。さらに、FoxP3は転写因子AML1と結合することを介して制御性T細胞の機能を制御することを示した。実際に、AML1制御性T細胞においてノックダウンすると、制御性T細胞の抑制活性は消失した。

D. 考察

(1) 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。

(2) Foxp3とAML1の相互作用に基づくT細胞機能制御の解明は、自己免疫疾患の病態解明および新しい免疫制御方法の開発の基礎となると考えられる。すなわち、AML1の活性化を制御することが、制御性T細胞の機能制御につながる可能性がある。また、AML1による転写制御異常が、ヒトにおいてSLE, RA, 乾癬などの自己免疫・炎症性疾患の原因となりうることを、遺伝学の研究で明らかになっている。これらの疾患におけるAML1のT細胞での役割、特に制御性T細胞における役割の解明は、病態解明のみならず、AML1を介した新しい治療法につながると考えられる。

E. 結論

自己免疫病治療へのひとつのアプローチとして、いかに自己抗原特異的制御性T細胞を増殖・機能活性化をはかり、いかに非制御性T細胞としてのエフェクターT細胞を除去できるかが重要である。この目的にFR4はマーカーとして重要である。また、制御性T細胞による抑制機能の発揮と自己免疫反応の回避のために、AML1の機能が必須であることが明らかになった。AML1複合体による転写制御メカニズムの解明は、制御性T細胞の分化・抑制機能の解明につながることが判明した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, Maeda S, Teradaira S, Sugimoto N, Yamaguchi T, Nomura T,

Ito H, Nakamura T, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Preferential recruitment of arthritogenic Th17 cells to inflamed joints via CCR6/CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J. Exp. Med.* 204:2803-2812, 2007

Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells in brief history and perspective. *Eur. J. Immunol.* 37:s116-123, 2007

Sakaguchi S, Powrie F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science.* 317:627-629, 2007.

Ko, H. J., Kim, Y. J., Kim, Y. S., Chang, W. S., Ko, S. Y., Chang, S. Y., Sakaguchi, S., Kang, C. Y. A combination of chemoimmunotherapies can efficiently break self-tolerance and induce antitumor immunity in a tolerogenic murine tumor model. *Cancer Res.* 67:7477-7486, 2007.

Yamaguchi T, Hirota K, Nagahama K, Ohkawa K, Takahashi T, Nomura T, Sakaguchi S. Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. *Immunity.* 27:145-159, 2007.

Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, Kitabayashi I, Nagamura Y, Nomura T, Miyachi Y, Tsukada T, Sakaguchi S. Foxp3 controls regulatory T cell function via interacting with AML1/Runx1. *Nature.* 446:685-689, 2007.

Nomura T, Sakaguchi S. Foxp3 and Aire in thymus-generated T(reg) cells: a link in self-tolerance. *Nat Immunol.* 8:333-334, 2007.

Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med.* 13:108-116, 2007.

Hirota K, Hashimoto M, Yoshitomi H, Tanaka S, Nomura T, Yamaguchi T, Iwakura Y, Sakaguchi N, Sakaguchi S. T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17⁺ Th cells that cause autoimmune arthritis. *J Exp Med.* 204:41-47, 2007.

Koshiba T, Li Y, Takemura M, Wu Y, Sakaguchi S, Minato N, Wood KJ, Haga H, Ueda M, Uemoto S. Clinical, immunological, and pathological aspects of operational tolerance after pediatric living-donor liver transplantation. *Transpl Immunol.* 17:94-97, 2007.

Bodor J, Fehervari Z, Diamond B, Sakaguchi S. ICER/CREM-mediated transcriptional attenuation of IL-2 and its role in suppression by regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 37:884-895, 2007.

Bodor J, Fehervari Z, Diamond B, Sakaguchi S. Regulatory T cell-mediated suppression: potential role of ICER. *J Leukoc Biol.* 81:161-167, 2007.

2. 学会発表

Masahiro Ono, Hiroko Yaguchi, Naganari Ohkura, Issay Kitabayashi, Takashi Nomura, Toshihiko Tsukada, Shimon Sakaguchi: A mechanism of IL-2 repression by Foxp3 and a Foxp3-interacting protein. JSI-RCAI Workshop 2007 (2007.3.7.横浜)

小野昌弘、矢口浩子、大倉長也、北林一生、塚田俊彦、宮地良樹、坂口志文：転写因子 Foxp3 とその結合因子による制御性 T 細胞の機能制御メカニズムの解明 日本研究皮膚科学会第 32 回年次学術大会・総会 (2007.4.18-20.横浜)

小野昌弘、坂口志文：Foxp3 は AML1/Runx1 と結合して制御性 T 細胞の機能を制御する 第 17 回 Kyoto T Cell Conference (2007,6,15-16.京都)

山口智之、坂口志文：Foxp3⁺regulatory T cells can be induced from any naïve CD4⁺ T cells depending on the dose of TGF-β and IL-2 and the intensity of TCR stimulation Kyoto University 21st Century COE Symposium Integration of Transplantation Therapy and Regenerative Medicine (2007,6,29-30.京都)

Kajsa Wing, Takashi Nomura, Shimon Sakaguchi : The regulatory T cell-specific role of CTLA-4 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 (2007.11.20-22 品川)

山口智之、坂口志文：ナイーブ CD4⁺T 細胞から Foxp3⁺制御性 T 細胞が誘導される条件について 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 (2007.11.20-22 品川)

島友子、野村尚史、斉藤滋、坂口志文：アロ抗原により誘導される制御性 T 細胞の動態解析 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 (2007.11.20-22 品川)

前田伸治、田中聡、廣田圭司、寺平晋、橋本求、

野村尚史、上田龍三、坂口教子、坂口志文： TCR シグナル伝達の補正による SKG マウス自己免疫性関節炎の発症抑制 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 (2007.11.20-22 品川)

寺平晋、廣田圭司、橋本求、前田伸治、山口智之、野村尚史、坂口教子、坂口志文：SKG マウスにおける自己反応性 CD4⁺T 細胞集団の解析 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 (2007.11.20-22 品川)

鬼頭昭彦、小野昌弘、矢口浩子、大倉永成、北林一生、塚田俊彦、野村尚史、宮地良樹、谷内一郎、坂口志文：Foxp3⁺CD4⁺制御性 T 細胞の分化における AML1/Runx1 および CBFβ の役割の解析 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 (2007.11.20-22 品川)

Junko Hori, Mingcong Wang, Hiroko Taniguchi, Yuki Kitahara, Shimon Sakaguchi, Miyuki Azuma: GITR-ligand-induced regulatory T cells as a mechanism of immune privilege of corneal allografts 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 (2007.11.20-22 品川)

Shimon Sakaguchi : Targeting regulatory T cells Academy Colloquium-Translating Immunological tolerance into novel therapies for (pediatric) autoimmune disease(2007 1. 18-19. Amsterdam, Netherlands)

Shimon Sakaguchi : Natural regulation of the immune response The Netherlands Academy for Natural Sciences (2007 1. 20. Amsterdam, Netherlands)

Shimon Sakaguchi: KEYNOTE ADDRESS The Rebirth of Suppressor/Regulatory T Cells KEYSTONE SYMPOSIA(2007 2.1-6. Vancouver, Canada)

Shimon Sakaguchi: Regulatory T cells in Immunological Self-Tolerance Bob Smith Lecture Seminar Series, University of Texas (2007 2.7-8. Houston, USA)

Shimon Sakaguchi: T-Cells in Immunologic Tolerance to Self and Organ Transplants BMT Tandem Meetings (2007.2.8-12. Denver, USA) Masahiro Ono : Control of regulatory T cell function be the interaction of Foxp3 and AML1/Runx1. BSI Congress 2007 (2007.2.20-23. Glasgow, Scotland)

- 坂口志文:制御性T細胞による免疫応答制御 第48回京都肝疾患懇話会 (2007.2.24. 京都)
- 坂口志文:自己免疫病と制御性T細胞 千里ライフサイエンスセミナー 免疫・感染症シリーズ 第一回「自己免疫疾患とその制御」(2007.2.27. 大阪)
- 坂口志文:制御性T細胞の自己免疫、腫瘍免疫における共通基盤について 43th免疫懇話会 (2007.3.6 山口)
- 坂口志文:制御性T細胞の基礎と癌免疫 第7回バイオモジュレーション研究会 (2007.3.10. 東京)
- Shimon Sakaguchi: Induction of tumor immunity by depleting naturally CD25⁺CD4⁺ Regulatory T Cells or attenuating their suppressive activity The Charles Rodolphe Brupbacher Foundation Eight Scientific Symposium in conjunction with the Charles Rodolphe Brupbacher Cancer Research Award 2007 (2007.3.14-16.Zurich,Switzerland)
- 坂口志文:制御性T細胞による免疫応答制御 第27回日本医学会総会(2007.4.6-8 大阪)
- Shimon Sakaguchi: Regulatory T Cells in Immunologic self-tolerance, autoimmune disease and tumor immunity World Immune Regulation Meeting (2007.4.11-15. Davos, Switzerland)
- 廣田圭司、坂口教子、坂口志文:SKGマウスの関節炎惹起性IL-17産生T細胞の分化におけるIL-6の役割 第51回日本リウマチ学会総会 (2007.4.26-29.横浜)
- 坂口志文:制御性T細胞による免疫応答制御 第43回日本肝臓学会総会 (2007.5.31-6.1)
- Keiji Hirota: Contribution of IL-6 to spontaneous differentiation into IL-17-producing arthritogenic T cells in SKG mice EULAR Congress 2007 (2007.6.13-16. Barcelona Spain)
- 坂口志文:新しい免疫抑制剤、免疫制御法の開発について JST 基礎研究シーズン報告会 (2007,6,26.東京)
- 坂口志文:制御性T細胞による自己/非自己の識別と免疫応答制御 神戸バイオメディカル学術交流会第7回定期交流会 (2007,6,27.神戸)
- 坂口志文: Control of immune responses by natural regulatory T cells Kyoto University 21st Century COE Symposium Integration of Transplantation Therapy and Regenerative Medicine (2007,6,29-30. 京都)
- 坂口志文:自己免疫性関節炎を惹起するIL-17産生T細胞の分化機構第72回インターフェロン・サイトカイン学会学術集会(2007,7,5-6.京都)
- 坂口志文: Regulatory T Cells for the control of immune responses 13th International Congress of Mucosal Immunology (2007,7,9-12. 東京)
- Shimon Sakaguchi: Rheumatoid arthritis as a systemic autoimmune disease: insights from an animal model Imperial College London Kennedy Institute of Rheumatology Seminar (2007,7,16 London.UK)
- Shimon Sakaguchi: Regulatory T cells in autoimmune disease Mathilda and Terence Kennedy Lecture, Imperial College London (2007,7,18 London.UK)
- Shimon Sakaguchi: Plenary Session-Hot Topics in immunology: Regulatory T cells for the control of Immune Response 13th International Congress of Immunology (2007.8.21-25 Rio de Janeiro. Brazil)
- Shimon Sakaguchi: Honorary Lecture Regulatory T cells The Baltic Summer School (2007.9.2-13 Lund. Sweden)
- Shimon Sakaguchi: Creating animal models for rheumatoid arthritis (2007.9.2-13 Lund, Sweden)
- Shimon Sakaguchi: Genetic basis of autoimmune disease due to regulatory T cell anomaly FROM THE LABORATORY TO THE CLINIC:FROM IMMUNE RESPONSE GENE TO AUTOIMMUNITY (2007.9.8-11. Oxford UK)
- 坂口志文:制御性T細胞による免疫応答制御 名古屋大学大学院講義 (2007.10.4 名古屋)
- 坂口志文:制御性T細胞による免疫応答制御 第35回日本臨床免疫学会総会 (2007.10.19-20 大阪)
- 坂口志文:制御性T細胞による免疫応答制御 第22回九州免疫血液研究会学術集会(2007.10.20

博多)

なし

Shimon Sakaguchi : The Molecular Basis of the Control of Regulatory T Cell Function : The New Century Health Care Promotion Foundation 11th International Congress (2007.10.26-27 Taipei Taiwan)

3. その他

なし

Shimon Sakaguchi : Control of Immune Responses by Regulatory T Cells : The New Century Health Care Promotion Foundation 11th International Congress (2007.10.26-27 Taipei Taiwan)

Shimon Sakaguchi : Thymus, Treg, Th17, and autoimmunity : insights from an animal model of autoimmune arthritis Immune regulation in clinical disease (2007. 11. 6-7 Pohang Korea)

Shimon Sakaguchi : Thymus, Treg, Th17, and autoimmunity : insights from an animal model of autoimmune arthritis The 55th Fall Conference of The Korean Association of Immunobiologists (2007. 11. 8-9 Seoul Korea)

坂口志文 : 制御性 T 細胞による免疫恒常性の維持 第 1 回年齢軸生体恒常性研究会シンポジウム (2007.11.30. 東京)

坂口志文:制御性 T 細胞による免疫応答制御 免疫難病・感染症等の先進医療技術 第 4 回公開シンポジウム (2007.12.14. 品川)

Shimon Sakaguchi : Regulatory T cells for immune tolerance and homeostasis Annual Symposium in Immunology Dr. Michael Sela Lecture, Weizmann Institute of Science (2007,12,16 Tel Aviv Israel)

Shimon Sakaguchi : Thymus, Treg, Th17, and Autoimmunity : Insights from an Animal Model of Autoimmune Disease Department Seminar Weizmann Institute of Science (2007,12,17 Acre Israel)

Shimon Sakaguchi : Regulatory T cells for immune tolerance and homeostasis The 23rd Annual Richard K. Gershon Memorial Lecture Yale University (2007,12,20 New Haven USA)

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

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 准教授

研究要旨

全身性エリテマトーデス (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、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、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、当班構成員を中心に、SLE を対象に B 細胞抗原 CD20 に対する抗体リツキシマブ (IDEC-C2B8) を用いた新 GCP 準拠第 I / II 相臨床試験を実践し、有効性、副作用、HACA 産生などの問題点の検証を行ってきた。今回、治療抵抗性の重症 SLE 20 症例を対象にリツキシマブを用いたパイロットスタディを実践し、長期有効性、長期安全性と共に、その作用機序に関して検討を行った。その結果、リツキシマブにより 4 週後に 19 例の疾患活動性が改善し、20 例中 13 例で 1~17 ヶ月以内に寛解導入を可能とし、5 例は 2 年以上寛解を維持した。殊に、精神神経 SLE を伴う 13 例は全例で回復し、ループス腎炎を伴う 11 例では 7 例で尿蛋白 (+/-) 以下まで改善した。また、4 例が寛解導入後 7~23 ヶ月後に再燃した。抗 CD20 抗体の作用機序として、CD20 陽性 B 細胞を除去することにより B 細胞分化を初期の段階で制御し、ナイーブ B 細胞の再構築を生じたと考えられる。また、著者らは、共刺激分子を高発現するメモリー B 細胞を優先的に除去して、B-T 細胞間相互作用を抑制した可能性を示唆している。以上、SLE の治療における B 細胞を標的とした生物学的製剤が、病態解明や治療にブレークスルーを齎す可能性が明らかになった。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス (SLE) は、多臓器病変を特徴とする自己免疫疾患であるが、保険収載されている治療はステロイド薬のみである。SLE の病態形成過程で B 細胞 stimulator 及び responder として重要な役割を担う。当班構成員を中心に、SLE を対象に B 細胞抗原 CD20 に対する抗体リツキシマブ (IDEC-C2B8) を用いた新 GCP 準拠第 I / II 相臨床試験を実践し、有効性、副作用、HACA 産生などの問題点の検証を行ってきた。今回、治療抵抗性の重症 SLE 20 症例を対象にリツキシマブを用いたパイロットスタディを実践し、長期有効性、長期安全性と共に、その作用機序に関して検討を行った。

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 20 症例 (BILAG カテゴリー A を 1 項目以上満たす) 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、原則として CD20 抗体リツキシマブ 375mg/m²/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、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。また、DNA マイクロアレイを用い、末梢血 mRNA 発現量の推移を投与前、投与後 2 週間目で比較検討した (阪大西本憲弘教授との共同研究)。

(倫理面への配慮)

臨床検体を使用する場合には、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疾患活動性スコア SLEDAI は 28 日後に有意に改善し、20 例中 13 例で 1~17 ヶ月以内に寛解導入 (SLEDAI=0) を可能とし、寛解は 5 例で 2 年以上維持した。②中枢神経 SLE を伴う 13 例は全例回復し、意識障害、神経症、癲癇は一部の症例では 1 週間以内に回復した。ループス腎炎を伴う 11 例では、8 例で尿蛋白 0.5g/day 以下まで改善した。③3 例で帯状疱疹ヘルペス、肺炎、褥瘡感染症を認め、注射時反応は浮腫や倦怠感等が認められた。④1 例はリツキシマブ投与 7 ヶ月後にくも膜下出血で、1 例は再投与後 6 ヶ月後に皮質下出血で死亡したが、因果関係は認めなかった。⑤5 例が 7~23 ヶ月後に再燃した。2 例はリツキシマブ再投与、2 例は IV-CY で改善したが、1 例はリツキシマブ再投与後著明な HACA 産生 (80 μ g/ml) を齎し、パルス療法を施行した。⑥末梢血 CD20 陽性 B 細胞数は全例で 14 日以内に消失し、3~9 ヶ月間維持された。⑦B 細胞表面抗原の解析では、CD19 陽性細胞上の CD40 と CD80 は投与後速やかに発現分子数が減少し、半年後も減弱が維持された。CD19⁺IgD⁺CD27⁻ナイーブ B 細胞は速やかに消失したが、IgD⁺CD27⁺形質細胞は 4 週間残存した。その後、一部の症例 (再燃例、寛解維持例の双方) でこれらの発現が回復した。また、CD4 陽性細胞上の CD40L と ICOS の発現も低下した。さらに、⑧DNA マイクロアレイによりリツキシマブ投与による末梢血 mRNA の発現変動解析では、RANKL、IL-32、TCP1 などリンパ球や脳に発現する分子などが低下し、B 細胞除去による発現頻度はむしろ軽微だった。

D. 考察

リツキシマブ療法の安全性と有効性が確認された。リツキシマブの作用機序としては、B 細胞分化を制御してナイーブ B 細胞の再構築を生じ、長期寛解導入と免疫複合体が関与する腎障害などが改善したと考えられる (液性免疫の制御)。一方、中枢神経症状の速やかな改善については、共刺激分子を発現するメモリー B 細胞を優先的に除去して B-T 細胞間相互作用を制御し、血管障害

などを改善した (細胞性免疫の制御) 可能性も考えられる。今後、寛解導入や臨床症状改善に伴い減弱する遺伝子に関する DNA マイクロアレイ解析とも併せて、より効率的な疾患制御の可能性を探求する。

E. 結論

SLE の治療における B 細胞を標的とした生物学的製剤が、病態解明や治療にブレークスルーを齎す可能性が明らかになった。リツキシマブにより 20 例中 13 例で 1~17 ヶ月以内に寛解導入を可能とし、5 例は 2 年以上寛解を維持した。殊に、精神神経 SLE を伴う 13 例は全例で回復し、ループス腎炎を伴う 11 例では 7 例で尿蛋白 (+/-) 以下まで改善した。抗 CD20 抗体の作用機序として、CD20 陽性 B 細胞を除去することにより B 細胞分化を初期の段階で制御してナイーブ B 細胞の再構築を生じたと共に、共刺激分子を高発現するメモリー B 細胞を優先的に除去して、B-T 細胞間相互作用を制御した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

1. Tanaka Y, Yamamoto K, Takeuchi T, Nishimoto N, Miyasaka N, Sumida T, Shima Y, Takada K, Matsumoto I, Saito K, Koike T. A multi-center phase I/II trial of rituximab for refractory systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol* (2007) 17, 191-197
2. Tokunaga M, Saito K, Kawabata D, Imura Y, Fujii T, Nakayama S, Tsujimura S, Nawata M, Iwata S, Azuma T, Mimori T, Tanaka Y. Efficacy of rituximab (anti-CD20) for refractory systemic lupus erythematosus involving the central nervous system. *Ann Rheum Dis* (2007) 66, 470-475
3. Nakayama S, Saito K, Nakano K, Tanaka Y. β 1 integrin transduces an activation signal in T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (2007) 56, 1559-1568
4. Sawamukai N, Saito K, Yamaoka K, Nakayama S, Ra C, Tanaka Y. Leflunomide inhibits PDK1/Akt pathway and induces apoptosis of human mast cells. *J Immunol* (2007) 179: 6479-84
5. Tsujimura S, Saito K, Nakayama S, Tanaka Y. Relevance of multidrug resistance 1 and P-glycoprotein to drug resistance in patients with systemic lupus erythematosus *Histol Histopathol*

(2007) 22, 465-468

6. Tsujimura S, Saito K, Nawata M, Nakayamada S, Tanaka Y. Overcoming drug resistance induced by P-glycoprotein on lymphocytes in patients with refractory rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* (in press)
7. Tanaka Y. B cell-targeting therapy using anti-CD20 antibody rituximab in inflammatory autoimmune diseases. *Internal Medicine* (in press)

8. 学会発表

1. Tanaka Y. An emerging strategy for the treatment of SLE: Can B-cell-targeting biologics break through the treatment? The 1st Lupus International Symposium: Clinical Science (シンポジウム), Seoul. 平成 19 年 5 月 21-22 日
2. Tanaka Y, Tokunaga T, Nawata M, Suzuki K, Iwata S, Yamaoka K, Nakayamada S, Saito K. Long-term Benefits of Rituximab (Anti-CD20) for Refractory Systemic Lupus Erythematosus. Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2007, Barcelona. 平成 19 年 6 月 13-17 日
3. Tanaka Y, Tokunaga M, Nawata M, Suzuki K, Iwata S, Yamaoka K, Saito K. Long-term follow up of rituximab (anti-CD20) therapy for refractory systemic lupus erythematosus. The 71st National Meeting of American college of Rheumatology, Boston. 平成 19 年 11 月 6-11 日
4. 田中良哉. SLE の新規治療への挑戦 ～薬物抵抗性の克服と新規生物学的製剤の導入～. 第 51 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 19 年 4 月 26-29 日
5. B 細胞を標的とした炎症性免疫疾患の制御. 第 28 回日本炎症・再生医学会(シンポジウム)東京. 平成 19 年 8 月 2-3 日
6. 田中良哉. B 細胞. 第 35 回日本臨床免疫学会総会(シンポジウム)東京. 平成 19 年 10 月 19-20 日
7. 田中良哉. 抗 CD20 抗体による治療 ～基礎から臨床での新展開まで～. 第 57 回日本アレルギー学会総会(シンポジウム)横浜. 平成 19 年 11 月 1-3 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) Fas 抗原発現増強剤(特許出願番号: 特開 2003-171282)
- 2) Akt シグナル経路の活性化阻害を目的として使

用するレフルノミド(特願 2005-81972)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

難治性自己免疫疾患に対する自己末梢血 CD34 陽性細胞移植に関する研究

分担研究者 原田 実根 九州大学大学院医学研究院 病態修復内科学分野・共同研究員
国立病院機構・大牟田病院・院長
研究協力者 塚本 浩 九州大学病院 免疫・膠原病・感染症内科・助教

研究要旨

全身性硬化症 (SSc) 11例を対象に自己末梢血CD34陽性細胞移植(自己PBSCT)の有効性と安全性を検討すると共に免疫学的再構築の解析を行った。治療関連死は認めず、自己PBSCTを施行したSSc症例において皮膚硬化の改善や自己抗体の低下は3年後も持続していた。CD4陽性T細胞の回復の遅延やTh1/Th2バランスのTh1優位へのシフトが本療法後3年間持続しており、病態の改善に参与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

難治性自己免疫疾患患者に対する自己末梢血CD34陽性細胞移植(自己PBSCT)の安全性と有効性を検討すると共に、最も症例数の多い全身性硬化症 (SSc)における自己PBSCT後の免疫学的再構築の解析を目的とした。

B. 研究方法

対象は自己PBSCTを施行したSSc11例である。末梢血幹細胞の動員にはCY4g/m²に引き続きG-CSFを投与しアフエレーシスによって末梢血幹細胞採取後、CliniMACSを用いてCD34陽性細胞に純化した。移植前治療としてはCY200mg/kgを単独投与し、移植当日に2x10⁶/kg以上のCD34陽性細胞を輸注した。免疫学的再構築の検討のためフローサイトメトリーを用いて自己PBSCT前後のリンパ球サブセット、Th1/Th2バランス (CD4陽性細胞内IFN γ /IL-4比)の解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学大学院医学研究院倫理委員会の承認を得ている。本療法の施行にあたっては全例に対し、説明と同意の取得を行っている。

C. 研究結果

自己PBSCTを施行したSSc11例では合併症としてサイトメガロウイルス抗原血症、アデノウイルス膀胱炎、帯状疱疹等を認めた。移植関

連死は認めなかったが、1例が原疾患に伴う間質性肺炎の進行のため自己PBSCT後20ヶ月で死亡した。原疾患に対する効果では、スキンスコアが12ヶ月後には約70%の改善を示し、36ヶ月後も効果は持続していた。抗Sc1-70抗体価は、自己PBSCT6ヶ月後に治療前の1/4まで低下しその効果は36ヶ月後まで持続した。免疫学的再構築の解析では、CD4陽性T細胞の回復は自己PBSCT後1-6ヶ月は著しく抑制され、36ヶ月後もCD4/CD8比は0.5未満に留まった。CD4CD45RA陽性T細胞の回復は、CD4CD45RO陽性T細胞の回復に比較し著しく遅延した。B細胞は12ヶ月後に治療前値まで回復し、内訳ではCD27陽性B細胞に比しCD27陰性B細胞の割合が増加した。Th1/Th2バランスは自己PBSCT後36ヶ月間Th1優位の状態が持続した。

D. 考察

本研究において、自己PBSCT36ヶ月後でもCD4陽性T細胞の低下が遷延していることが明らかになった。特にナイーブT細胞と考えられるCD4CD45RA陽性T細胞の回復が遅延しており、胸腺を介したCD4陽性T細胞の成熟の遅延が示唆された。一方、CD8陽性T細胞の回復は速やかで、自己PBSCT1ヶ月後には治療前値まで回復した。

SScにおけるB細胞サブセットはCD27陽性すなわちメモリーB細胞の割合の低下が特徴とされているが自己PBSCT後はさらにメモリーB

細胞の割合が低下した。

SScはTh1/Th2バランスではTh2優位の疾患といわれているが、自己PBSCT後はTh1へシフトしており、病態改善と関連している可能性がある。

E. 結論

自己 PBSCT を施行した SSc 症例において皮膚硬化の改善や自己抗体の低下は 3 年後も持続していた。CD4 陽性 T 細胞の減少や Th1/Th2 バランスの変化が本療法後 3 年間持続しており、病態の改善に関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kato,K., Kanda,Y., Eto,T., Muta,T., Gondo,H., Taniguchi,S., Shibuya,T., Utsunomiya,A., Kawase,T., Kato,S., Morishima,Y., Kodera,Y., Harada,M., Japan Marrow Donor Program. Allogeneic bone marrow transplantation from unrelated human T-cell leukemia virus-1-negative donors for adult T-cell leukemia/lymphoma: retrospective analysis of data from the Japan Marrow Donor Program. *Biol Blood Marrow Transplant* 13:90-99, 2007
2. Kunisaki,Y., Tanaka,Y., Sanui,T., Inayoshi,A., Noda,M., Nakayama,T., Harada,M., Taniguchi,M., Sasazuki,T., Fukui Y. DOCK2 is required in T cell precursors for development of Valpha14 NK T cells. *J Immunol* 176: 4640-4645, 2007
3. Sakoda,Y., Hashimoto,D., Asakura,S., Takeuchi, K., Harada,M., Tanimoto,M., Teshima,T. Donor-derived thymic-dependent T cells cause chronic graft-versus-host disease. *Blood* 109:1756-1764, 2007
4. Horiuchi,T., Kiyohara,C., Tsukamoto,H., Sawabe,T., Furugo,I., Yoshizawa,S., Ueda,A., Nakamura,T., Tada,Y., Kimoto,Y., Mitoma,H., Harashima,SI., Yoshizawa ,S., Shimoda,T., Okamura,S., Nagasawa,K., Harada,M. A functional M196R polymorphism of tumor necrosis factor receptor type 2 is associated with systemic lupus erythematosus: A case-control study and a meta-analysis. *Ann Rheum Dis* 66: 320-324, 2007.
5. Kawano, A., Shimoda,S., Kamihira,T., Ishikawa, F., Niuro,H., Soejima,Y., Taketomi,A., Maehara, Y., Nakamura,M., Komori,A., Migita,K., Ishibashi,H., Azuma,M., Gershwin,ME., Harada, M. Peripheral tolerance and the qualitative characteristics of autoreactive T cell clones in primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 179(5):3315-3324, 2007
6. Mitoma,H., Horiuchi,T., Tsukamoto,H., Tamimoto,Y., Kimoto,Y., Uchino,A., To,K. ,Harashima,S., Hatta,N., Harada,M. Mechanism for cytotoxic effects of anti-TNF- α agents on transmembrane TNF-expressing cells: comparison among infliximab, etanercept and adalimumab. *Arthritis Rheum* 2008 (in press)
7. Miyagawa,H., Yamai,M., Kiyohara,C., Tsukamoto,H., Kimoto,Y., Nakamura,T., Lee, J-H., Tsai,C-Y., Chiang,B-L., Shimoda,T., Harada,M., Tahira,T., Hayashi,K., Horiuchi,T., Association of polymorphisms in complement component C3 gene with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2008 (in press)
8. Tamimoto,Y., Horiuchi,T., Tsukamoto,H., Kiyohara,C., Niuro,H., Miyagawa,H., Nakasone,A., Mitoma,H., Kimoto,Y., Uchino,A., Muta,K., Abe, Y., Inoue,Y., Ueda,A., Nakashima,H., Tada,Y., Nagasawa K, Yoshizawa S, Shimoda T, Harada M. A dose-escalation study of rituximab for treatment of systemic lupus erythematosus and Evans' syndrome: Immunological analysis of B cells, T cells and cytokines. *Rheumatology* 2008 (in press)

2. 学会発表

1. Ishikawa F, Harada M: Studying biology of human hematopoietic and leukemic stem cells using a novel xenograft system (Special Lecture). Join meeting of 11th congress of the international society of hematology, Asia-Pacific division and 12th congress of the Asia-Pacific bone marrow transplantation. Beijing, China, September 22, 2007
2. Harada M: Studying human leukemic stem cells in mice (Special Lecture). 1st Chinese hematological medical doctor association forum. Beijing, China, May 19, 2007
3. Takenaka K, Prasolava TK, Wang JC, Mortin-Toth SM, Gan OI, Khalouei D, Dick JE, Danska JS: Identification of a new genetic determinant controlling human hematopoietic stem cell engraftment. Atlanta, USA, December 8-11, 2007
4. Saito N, Ishikawa F, Shimoda K, Yoshida S, Saito Y, Fukata M, Kawano N, Shulz LD, Akashi K, Harada M: Transplantation of primary human CD34+CD38-Hematopoietic stem cells recapitulates idiopathic myelofibrosis in the NOD/scid/IL2rgKO mice. Atlanta, USA, December 8-11, 2007
5. Shide K, Shimoda H, Kumano T, Karube K, Kameda T, Oku S, Takenaka K, Suzuki K, Kubuki Y, Harada M, Shimoda K: Expression of V617F Jak2 in mice leads to MPD mimicking human ET, idiopathic myelofibrosis and PV. Atlanta, USA, December 8-11, 2007

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

自己免疫疾患における RP105 欠損 B 細胞のフェノタイプ解析と治療標的としての可能性

分担研究者 長澤浩平 佐賀大学医学部内科 教授
研究協力者 小荒田秀一 佐賀大学医学部内科 助教

研究要旨

自己免疫疾患における B 細胞異常の中で、自己抗体産生 B 細胞は病態形成の重要な部分を占めている。したがって自己抗体産生 B 細胞を標的とした治療は理論上、最も有用な方法の一つである。しかしながら、自己抗体産生 B 細胞を標的とした治療法は未だ確立されていない。今回、RP105 陰性 B 細胞の維持機構を解明するとともに、同細胞を標的とした新たな治療法の開発を検討した。自己抗体産生 RP105 陰性 B 細胞を標的とすることにより、病的細胞に限定した、より効果的かつ安全な治療法が開発できる可能性が明らかとなった。

A.研究目的

自己免疫疾患における B 細胞異常の中で、自己抗体産生 B 細胞は病態形成の重要な部分を占めている。したがって自己抗体産生 B 細胞を標的とした治療は理論上、最も有用な方法の一つである。しかしながら、自己抗体産生 B 細胞を標的とした治療法は未だ確立されていない。そこで、全身性エリテマトーデス(SLE)をはじめとした難治性自己免疫疾患における自己抗体産生 RP105 陰性 B 細胞を標的とした治療の開発について検討した。

B.研究方法

RP105 は Toll like receptor 関連分子で、成熟 B 細胞上に発現し、TLR-4 とともに lipopolysaccharide (LPS) による B 細胞活性化に関与する。しかしながら、最近、RP105 は TLR-4 のシグナル抑制に働いていることが報告された。RP105 は免疫系の恒常性維持や自己反応性の制御に与っている可能性も指摘されている。したがって、B 細胞で RP105 が欠損すると、B 細胞は常に活性化された状態となり自己免疫病態につながる可能性がある。そこで、SLE などの自己免疫疾患で、RP105 分子の発現や、疾患活動性との関連、自己抗体産生等を検討した。さらに RP105 陰性 B 細胞のフェノタイプ解析を行い B 細胞分化での位置づけを行った。B 細胞活性化や分化に関与する BAFF, APRIL, CD40L の RP105 陰性 B 細胞の生存に対する影響を in vitro において検討した。さらに RP105 陰性 B 細胞を治療標的とするために

DNA Chip を利用して特異的に発現する膜表面分子の同定を試みた。そして、候補分子に特異的な抗体の作成中である。この抗体による RP105 陰性 B 細胞特異的分子の認識と細胞傷害活性について検討を行っている。

(倫理面への配慮) 本研究に関して佐賀大学医学部倫理委員会による承認を得ている。患者より 10-20ml 採血を行うが、安全性に問題ないと考えられる。患者に対して文書にて十分な説明を行い、同意書により意思の確認を行っている。個人情報についても符号匿名化し取り扱っており、遺漏の可能性はない。

C.研究結果

健常者の B 細胞は RP105 を発現していたが、SLE では RP105 陰性 B 細胞が多数出現していた。SLE 患者由来の RP105 陰性 B 細胞は、in vitro において T 細胞存在下で IgG クラスの抗 ds-DNA 抗体を産生した。RP105 陰性 B 細胞は自己抗体産生細胞であると考えられた。また、RP105 陰性 B 細胞は、CD19(+), CD20(-), CD27(+), CD5(-), 表面 IgG(-)、細胞内 IgG(+), CD38(++), CD138(du11) のフェノタイプを示し、最近発見されたマウスの新たな B 細胞サブセットである early pre-plasma cell に対応するヒトの新たな B 細胞サブセットを形成していた(図 1)。