

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究

血管炎治療のための
人工ポリクローナルグロブリン製剤の開発と
安全性確保に関する研究

(H18-創薬-一般-020)

平成 18 年度～平成 20 年度 総合研究報告書

研究代表者

鈴木 和 男

平成 21 (2009) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

創業基盤推進研究事業：政策創業総合研究

血管炎治療のための
人工ポリクローナルグロブリン製剤の開発と
安全性確保に関する研究

(H18-創業-一般-020)

平成 18 年度～平成 20 年度 総合研究報告書

研究代表者

鈴木 和 男

平成 21 (2009) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告	
血管炎治療のための人工ポリクローナルグロブリン製剤の開発と安全性確保に関する研究 鈴木和男	1
II. 分担研究報告	
1. 基礎班：人工グロブリン合成と in vitro 評価系	
1-1. ガンマグロブリン治療のための動物モデルの開発と人工ガンマグロブリン in vitro 評価系の検討 大野尚仁	12
1-2. 免疫グロブリンの in vitro での評価法の検討—活性化血管内皮細胞への作用— 鈴木和男、長尾朋和、山本健二、河内正治、大島正道	18
1-3. ポリクローナル人工ガンマグロブリンを構成するクローンの多様性の検討 亀岡洋祐、大島正道、鈴木和男	23
1-4. 自己免疫疾患患者の血液細胞に特異的な遺伝子群の包括的単離と機能解析 野島 博	29
1-5. IVIg 療法の作用機序解明の為の基礎的研究：インターフェロン・サイトカインシステムからみた MPO-ANCA 血管炎患者の特性 宇野賀津子	34
1-6. CAWS 誘発マウス血管炎モデルにおける薬剤投与による血管炎抑制効果 高橋 啓	39
1-7. 炎症性疾患発症における好中球機能異常の影響に関する研究 荒谷康昭	44
2. 臨床班	
2-1. MPO-ANCA 陽性顕微鏡的多発血管炎 (MPA) に伴う急速進行性糸球体腎炎 (RPGN) への IVIg 治療の有効性の確立にむけて 武曾恵理	49
2-2. 急性期川崎病に対する超大量単回免疫グロブリン療法 (IVIg) 単回投与の使用に関わる大規模市販後使用成績調査と酸化ストレス抑制効果—特に carbon monoxide への影響について— 佐地 勉	57
2-3. ガンマグロブリン製剤大量療法：これまでの有害事象の検討と皮膚型多発性動脈炎 (CPN) への治療の可能性および欧州・米国リウマチ学会の血管炎の基準改訂のための国際会議 小林茂人	62
2-4. 自己免疫性心筋炎における免疫グロブリンおよび融合蛋白治療の有効性に関する研究 相澤義房	66
2-5. 1) 糸球体腎炎と無菌性心内膜炎を合併する PR3-ANCA 関連血管炎 2) 血管炎・腎炎の免疫グロブリンの治療に関する研究 (免疫グロブリン大量療法の臨床的試み) 今井圓裕	73
2-6. 症例から考える MPO-ANCA 関連血管炎の病態と再燃と感染の実態 湯村和子	78
2-7. ANCA 関連血管炎における大量 γ グロブリン療法の適応と効果について 山縣邦弘	82
2-8. 抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連腎血管炎の本邦・欧州間での臨床疫学調査に関する研究 藤元昭一、布井博幸	86
2-9. 好中球機能制御による血管炎治療法の開発 平橋淳一	92
III. 公開シンポジウム、班会議、メディア資料	97
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	117

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究）

平成 18-20 年度 総合研究報告

血管炎治療のための人工ポリクローナルグロブリン製剤の開発と 安全性確保に関する研究

研究代表者：鈴木 和 男 千葉大学大学院医学研究院 特任教授

研究分担者

大島正道：国立感染症研究所 室長
武曾恵理：(財) 田附興風会医学研究所北野病院 副所長
相澤義房：新潟大学 教授
佐地 勉：東邦大学 教授
小林茂人：順天堂大学附属順天堂越谷病院 准教授
今井圓裕：大阪大学 准教授
湯村和子：自治医科大学 教授
山縣邦弘：筑波大学 教授
布井博幸：宮崎大学 教授
藤元昭一：宮崎大学 准教授
河内正治：国立国際医療センター 部長
大野尚仁：東京薬科大学 教授
高橋 啓：東邦大学 教授
荒谷康昭：横浜市立大学 教授
山本健二：国立国際医療センター研究所 国際臨床センター センター長
宇野賀津子：(財)ルイ・バストゥール医学研究センター 室長
亀岡洋介：(独)医薬基盤研究所 主任研究員
野島 博：大阪大学 教授
平橋淳一：東京大学医学部付属病院 助教
長尾朋和：千葉大学 特任講師

研究協力者：

小野孝彦（静岡県立大学、教授）、深津教司（京都大学医学部附属病院・腎臓内科、講師）、山崎 力（東京大学大学院医学研究科、教授）、有村義宏（杏林大学医学部、教授）、胡麻田学（長門総合病院内科、部長）、山西祐二（広島市立市民病院・膠原病科、部長）、赤松 明（愛媛県立新居浜病院、副院長）、稲葉裕（順天堂大医学部・衛生学、教授）、高崎芳成（順天堂大学医学部・膠原病内科、教授）、佐々木毅（東北大学名誉教授）、堀田修（仙台社会保険病院・腎臓疾患臨床研究センター、センター長）、井関邦敏（琉球大学・医学部付属病院、助教）、原淵保明（旭川医科大学・耳鼻咽喉科、教授）、城謙輔（国立病院機構千葉東病院・臨床研究センター免疫病理研究部、部長）、杉山隆夫（国立病院機構下志津病院・内科、病棟部長）、松本俊治（順天堂大学・病理学第一講座、助教）、新井孝夫（東京理科大学、教授）、佐々木次雄（国立感染症・血液・安全性研究部、室長）、古谷昌弘（積水化学・開発研究所、主任研究員）、鈴木章一（佐賀大学・医学研究科、助教）、猪原登志子（財、田附興風会医学研究所北野病院、研究員）

アドバイザー：

仁保喜之（九州大学医学部名誉教授、千早病院長）、直江史郎（東邦大学医学部名誉教授）、岡崎富男（呉共済病院看護専門学校長）、橋本博史（順天堂大学・名誉教授）、中山俊憲（千葉大学・院医・免疫発生学教授）、David Jayne（英国ケンブリッジ大学・腎ユニット顧問）

研究要旨：大量免疫グロブリン製剤 (IVIg) による治療法は、重症感染症や川崎病の治療として使用されている。また、高齢者に発症し、近年増加している自己免疫疾患に、より有効な免疫補助療法としてその適応拡大が検討されはじめている。IVIg の適応拡大や需要の増加に加え、血液製剤の安全性や医療経済の点からも、人工化することが今日的急務となっている。そこで、本研究では、免疫グロブリンを人工化することを目的とし、18-20 年度において、マウス型の完成とヒト型を構築した。20 年度までの研究で、ヒト型の臨床応用化に向け、プロトタイプクローンの構成を検討し、*in vitro* での体外評価法の検討と治療法の検討も行った。具体的には、1) ヒト型人工ガンマグロブリンの開発、2) モデルマウスによる力価判定をした。3) 体外診断法の開発を免疫系と血管内皮細胞にて検討した。そして、4) 臨床治験をみすえた臨床研究：臨床応用の準備を開始し、人工免疫グロブリンの安全性の向上についても臨床サイドからの動物実験の評価と治療法のバックアップをした。以上から、ヒト型人工免疫グロブリンの *in vitro* での評価法ができた。一方、IVIg 治療の効果判定の有効性のパラメーターの選択は、欧州血管炎協会 (EUVAS) でも採用され、国際評価会議に当班からも運営委員 2 名、オブザーバとして 1 名が参加して討論に加わった。今後に残った課題は、1) 生産系の確立：大量調整法、精製の技術、2) 体外評価系の確立、3) 作用機序の解明である。今後も、本研究事業の成果を臨床に生かし、国民の保健・医療ならびに効率的な医療経済に伝えるようにしたい。

A. 研究目的

高度高齢社会に入ったわが国においては、加齢によって増加する重症感染症、自己免疫疾患、血管炎、リウマチなどの難治性疾患への初期治療として、ステロイドパルス治療は、高齢者には危険性が高いことから、免疫グロブリン製剤大量療法 (IVIg) の必要性が増している。このように、IVIg 治療への関心が高まっているが、感染症リスク・安全性確保や高額治療のため、免疫グロブリンの人工化が望まれている。

本研究では、1) ヒト型人工ガンマグロブリンの開発：マウス脾臓細胞の mRNA のライブラリーからマウス型人工 Fv 抗体を作製する系で人工型を開発し、これを基にヒト型プロトタイプを完成させることを目的とした。また、2) 力価判定モデルマウスの開発：血管炎 IVIg 治療法の開発のためのモデルマウスおよび、致死性の劇症型心筋炎の疾患モデルを作製し、3) モデルマウスにより力価判定する。4) 体外診断法の開発：ヒト型の臨床応用に向けて、血管炎、腎炎、急性期川崎病における IVIg の *in vitro* での体外評価法の開発をめざす。さらに、5) 臨床治験をみすえた臨床研究：急性期川崎病およびそれと同じプロトコルによる、血管炎・腎炎の臨床研究の成果 (Nephron Clin Pract. 102:c35-c42, 2005) を基にしたヒト型に特化した治療効果判定や臨床治験に向けた動物モデルでの治療

評価を支援する。

18-20 年度には、これらの目的にフォーカスを絞り、1) ヒト型人工ガンマグロブリンの開発：ヒト型の完成を目標として、発現ベクターライブラリーを検定する。2) モデルマウスによる力価判定、3) 体外診断法の開発：臨床応用に向けて、*in vitro* での体外診断法の開発を進める。そして、4) 臨床治験をみすえた臨床研究：臨床探索試験も含め臨床応用の準備を開始し、人工免疫グロブリンの安全性の向上についても臨床サイドからの動物実験の評価と治療法のバックアップを目指した。

B. 研究方法

詳細は、研究分担者の項参照。

1. 基礎分科会

1) ヒト型人工免疫グロブリンのクローンの選択と安定性・安全性の評価

・人工ガンマグロブリン作製とヒト型 scFv 発現クローンライブラリーライブラリー調整

・改良型ライブラリーの任意のクローンと TNF α との結合活性

2) *in vitro* 評価系の開発：*In vitro* 評価系では、ヒト末梢血リンパ球、単球、好中球および血管内皮細胞を用いた。

- 2-1) 免疫細胞への作用 : a) IgG のプレートへの吸着量の測定、b) IVIg 希釈溶媒の検討
2-2) ヒト末梢血単核球(PBMC)の固相化 IVIg によるサイトカイン産生の至適条件の検討。
2-3) Bio-Plex を用いた PBMC からのサイトカイン・ケモカインの網羅的解析
2-4) 単球の抗原提示能に対する IVIg の影響 : CD4⁺T 細胞に抗 CD3 抗体を混合し、IVIg を添加して IFN- γ 産生への影響により評価した。
2-5) MPO-ANCA 腎炎患者のサイトカイン動態の特性の検討
2-6) 活性化血管内皮細胞の抑制作用による IVIg の評価

a) TNF- α によって誘導される adhesion molecules の発現の解析

b) IgG 作用 : TNF- α により誘導される adhesion molecules、サイトカイン、ケモカインの発現抑制 c) IgG 作用 : H₂O₂ により誘導される adhesion molecules、サイトカイン、ケモカインの発現への作用

d) IgG 作用 : TNF- α によって誘導・産生されるサイトカイン、ケモカインへの抑制

3) QD-MPO 法による好中球の MPO 細胞膜移行測定による好中球活性化指標の確立。

IVIg 治療による効果を好中球の MPO の細胞表面移行を QD-MPO および anti-CD11b 抗体で染色・蛍光顕微鏡により判定した。

4) モデルマウスおよび評価系の検討

4-1) CAWS 誘導冠動脈炎への治療薬による作用を病理組織学的に検討した。

4-2) ヒト免疫グロブリンによる血管炎抑制効果

4-3) 人工ポリクローナルグロブリンによる血管炎抑制効果

4-4) TNF- α 阻害剤による CAWS 血管炎への抑制効果

4-5) RPGN モデルマウス(SCG/Kj)での治療法の検討 : a) 生存延長、b) 脂質解析、c) 血漿 MPO-ANCA 値、d) 遺伝子発現

4-6) 劇症型心筋炎への IVIg 治療評価 : 抗 CD11bc 抗体、抗 $\alpha\beta$ TCR 抗体、マグネットビーズ抗体により心筋細胞、CD11bc⁺細胞、T 細胞、非心筋非炎症細胞(NCNI)細胞を精製し、発現するサイトカイン/ケモカインおよびその受容体の発現量を定量的 RT-PCR にて測定した。

5) 新たな評価系の開発と発症機構の検討

5-1) 多段差引法および DNA マイクロアレイ解析 : 性能比較のために別途作製した「感染体チップ」の試作品の検出下限濃度の決定と、

測定誤差の詳細な検証を進めた。

5-2) 好中球の機能 : 野性型と CGD マウスにザイモザンを経鼻投与して肺炎を誘発させ、投与後 1、3、6、および 30 日目のマウスの肺組織切片を H&E 染色後、検鏡した。また、クリプトコッカス真菌 (*Cryptococcus neoformans*, ATCC 24067) 感染実験を施行した。

6) 安定性と毒性試験 :

6-1) 安定性 : 宿主株の遺伝子安定性、発現ベクターにおける有害遺伝子配列の否定、組み換えグロブリン製剤の安定性を検討した。

6-2) 毒性試験 : 組み換えグロブリン製剤の毒性 : 急性、亜急性、生殖発生の毒性試験、抗原性、変異原性、局所刺激性、発熱性、不純物の毒性、加速試験を検討した。

2. 臨床分科会

1) IVIg および関連の治療評価

MPO-ANCA 陽性急速進行性糸球体腎炎(RPGN)、急性期川崎病、難治性血管炎、SLE などの疾患に対する IVIg 療法を検討し、治療効果を検討した。(臨床報告は、各分担者報告書の「方法」を参照)

4) 国際評価関連

国際会議に鈴木和男、小林茂人、藤元昭一の3名が招聘され、2008年3月3-4日と12月1-2日にスイス、チューリッヒの EULAR House で行われ(主任研究者:Richard Watts, Raashid Luqmani)、各国から33名の研究者が参加した。メールによるアンケート、Evidence の検索、会議にて問題点を確認および多数決で議案を採択した。また、国内での疫学調査も宮崎大学を中心として実施した。今回の調査でも倫理面では患者名が特定できないよう配慮した。

(倫理面への配慮) 患者の血液・血清の使用に当たっては、各施設の倫理委員会(以下「委員会」)規定に従い実施した。具体的には、患者の検体が派生することが予想される場合には、1) 研究計画を含む具体的な研究計画書、2) 主治医を含む共同研究者との合意文書、患者とのインフォームドコンセントに関する実施計画概要を記載した書式を予め「委員会」に提出し、「委員会」の許可を得て実施することとし、個人情報情報はコード化し、ネットワークでの個人情報交換はしないなど、プライバシー情報の漏洩がないよう万事を期した。さらに、動物実験に関しては、動物実験計画書を所属機関の動物委員会の許可を得て、動物愛護のもとに行った。

C. 研究結果

本事業計画を綿密に討議し、主な結果を記載した。尚、詳細な「結果」については、各分担研究者報告の「結果」の項を参照。

1. 基礎分科会

1) ヒト型人工免疫グロブリンのクローンの選択と安定性・安全性の評価：セカンドバッチの115クローンの中から任意の60クローンを選抜し結合活性を検討した。18-19年度までの個々のクローンの配列解析より重鎖可変領域のアミノ酸配列と抗体アミノ酸配列データベースとの比較解析から、TNF α 結合クローンと85%程度の相同性を示すものが5%と比較的多く含まれていた。抗体データベースと完全一致する配列をもつクローンは含まれていなかったが、生体内で炎症反応を制御している分子としてTNF α は重要な分子であり、それとの結合活性を評価することは、ポリクローナル人工ガンマグロブリンの有効性を評価するための良い指標となると考えられる。60クローンの中2種類のクローンにおいてTNF α との結合を示すと思われるScFvのバンドを検出し(図1)、結合することを示したことは製剤としての人工ガンマグロブリンの効果を裏付ける結果である。

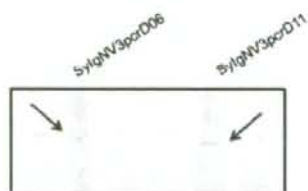


図1. TNF- α binding positive clones

(亀岡洋祐[医薬基盤研]、大島正道[国立感染症研]、主任研究者、分担研究者、研究協力者)

2) IVIgの *in vitro* 評価系の検討

本剤開発のためのツールとしての *in vivo*, *in vitro* 評価系の開発を検討した。*In vitro* 評価系では、ヒト末梢血リンパ球、単球、好中球および血管内皮細胞を用いて、評価系を構築した。

2-1) 免疫細胞への作用：

a) ヒト末梢血単核球(PBMC)の固相化IVIgによるサイトカイン産生測定のための至適条件の検討：IVIgによる全血培養上清へのIL-8、TNF- α 産生の経時変化：全血培養にIVIgを添加し、さらにfinal 1ng/mlのLPSで刺激し上清中のIL-8、TNF- α の産生量を経

時的に観察した。その結果、ヒトPBMCを固相化IVIg(Solid phase)あるいはIVIgの添加(Liquid phase)で刺激し、IL-8、TNF- α 産生を観察した。その結果、LPSの刺激の有無に関わらずIVIgの添加でのIL-8の産生誘導はほとんど観察されなかった。TNF- α 産生も、IVIgの添加ではLPS刺激の高濃度添加でのみ観察された。一方で、固相化したIVIgはIL-8、TNF- α ともにIVIgの容量依存的に著しく産生量が上昇した。LPSを添加するとそれらの産生量はさらに増加した。

b) 固相化AlbuminによるPBMCからのIL-8、TNF- α 産生：固相化IVIgのIL-8、TNF- α 産生誘導がIVIgによるものであることを確認するため、albuminをIVIgと同様にプレートに吸着させて固相化albuminを作成し、PBMCからのIL-8、TNF- α 産生誘導を検討した。その結果、albuminもIVIgと同様にプレートに吸着したが、PBMCを添加してもIL-8、TNF- α の産生は観察されなかった。Bio-Plexを用いて17種のサイトカインを測定したところ、固相化IVIgにより産生が誘導されないもの(IL-2、IL-4など)、固相化IVIgの容量依存的に産生が観察されるもの(IL-1 β 、IL-6など)、検出限度を超えるほど著しい産生が観察されるもの(IL-8、MIP-1 β など)の3群に分けることができた。さらにLPSを添加したところ、ほとんどのサイトカインの産生量は上昇し、固相化IVIg容量依存的であったが、IL-10、MCP-1の産生は固相化IVIgによって抑制された。これらの結果から、固相化IVIgはPBMCからのサイトカイン産生に変化を与えることが明らかとなった。

(大野尚仁[東京薬科大学薬学部]、長尾朋和[千葉大学大学院・医学研究院]、主任研究者、研究協力者)

2-2) 全血法によるサイトカイン産生能へのIVIgの効果：PHA 20時間刺激により多くの場合GM-CSFの産生は、わずかし認められなかったが、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-12p70、IL-13、TNF- α 、IFN- γ の産生が認められた。Th1サイトカインであるIL-2、IL-12p70、TNF- α 、IFN- γ の産生に対し、0.05、0.5mg/mlのIVIg添加では、Th1サイトカイン産生はむしろ亢進するケースも認められたが、5mg/mlのIVIgの添加では、無添加の場合と比較して、各サイトカインの産生は抑制された。また、IL-5、IL-10についてもTh1サイトカインと同様、0.05、0.5mg/mlのIVIg添加では無添加時よりサイトカイン産生が亢進するケース

もが認められたが、5mg/ml の IVIg では、全員のサイトカイン産生の抑制が認められた。特に、IL-10 の産生抑制は顕著であった。また、0.05mg/ml の IVIg 添加で各サイトカインの産生が抑制される人と、より高濃度でないと抑制されない人がいることが明らかになった。また、4倍に希釈した LPS 2 μ g/ml 刺激サイトカイン産生についても同様に、IVIg の影響について検討した。LPS 刺激については 5mg/ml の IVIg 添加でも産生抑制の認められないサイトカインも数多くあったが、IL-10 産生については 5mg/ml の IVIg 添加で、IL-10 産生の抑制が認められた(図2)。

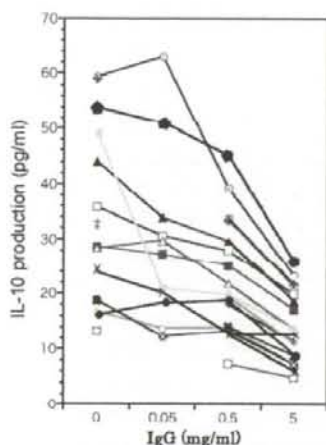


図2. PHA刺激IL-10産生へのIVIgの影響

(宇野賀津子[ルイ・パストゥール医学研究センター 基礎研究部]、武曾恵理[北野病院]、主任研究者、分担研究者、協力研究者)

2-3) 単球の抗原提示能に対するIVIgの影響: MPO-ANCA腎炎患者の単球と健常人CD4⁺T細胞、抗CD3抗体を用いIVIgの影響を検討した。その結果、Fc部分には特に抑制効果は認められなかったが、10mg/mlのIVIg添加でIFN- γ 産生の抑制が認められた。さらに、評価系にこの系を適用することを考え、単球に代えて単球系細胞株であるThp-1, U937細胞でも、IVIgの影響を認めた。

(宇野賀津子[ルイ・パストゥール医学研究センター 基礎研究部]、武曾恵理[北野病院]、主任研究者、分担研究者、協力研究者)

2-4) MPO-ANCA腎炎患者のサイトカイン動態の特性の検討: 高サイトカイン・ケモカイン血症が病状と関連していると考えられるMPO-ANCA腎炎において、27plex arrayのうち、RANTESを除き、26項目のサイトカイン・ケモカインを測定した。健常人に比較してMPO-ANCA腎炎患者で、IL-1 β , IL-1Ra, IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-bb, VEGFが有意に上昇していた。一方、IgA腎症

では、IL-9, IL-17, PDGFが上昇し、IL-8, IL-15はむしろ低下していた。即ち、IL-9, IL-17, PDGF-bbは両腎炎に共通して上昇していたが、他のサイトカイン・ケモカインは、MPO-ANCA腎炎で特異的に上昇していた。

(宇野賀津子[ルイ・パストゥール医学研究センター 基礎研究部]、武曾恵理[北野病院]、主任研究者、分担研究者、協力研究者)

2-5) 免疫グロブリンの血管内皮細胞への作用解析法の検討

a) TNF- α およびH₂O₂により誘導されるadhesion molecules、サイトカイン、ケモカインのmRNA発現へのIgGの作用の解析: TNF- α で血管内皮細胞を刺激したときの接着分子、サイトカイン、ケモカインの発現を解析した結果、GM-CSF、MIP-1 β 、MIP-2、KC、MCP-1、IFN β 、IL-6の発現が上昇した。また、IgG処理により、発現が抑制されたサイトカイン・ケモカインは、とりわけ、GM-CSF、MIP-1 β 、MIP-2、KC、IFN β 、IL-6は、IgG濃度依存的に強く抑制された。H₂O₂添加にて血管内皮細胞を刺激し、VCAM-1、E-selectin、ICAM-1の発現およびIgGによるその発現への作用を解析した。その結果、いずれのadhesion moleculesもIgGにより抑制された。また、MIP-1 β 、MIP-2、KC、MCP-1、IFN β 、IL-6の発現が上昇した。また、IgG処理により、発現が抑制されたサイトカイン・ケモカインは、MIP-1 β 、MIP-2、KC、MCP-1、IFN β 、IL-6において顕著であった。Bio-Plexで顕著に影響が見られたサイトカイン・ケモカインのうち、KC、MCP-1、TNF α をELISAにて確認した。MCP-1は、高濃度のIgGでは上昇したものの、これらのサイトカイン・ケモカインは、IgG処理により培養上清中の濃度は、減少した。

b) QD-MPO法による好中球のMPO細胞膜移行測定による好中球活性化指標を確立できた。

以上の結果から、TNF- α あるいはH₂O₂によって活性化される血管内皮細胞を抑制するIgGの作用が認められた。

(長尾朋和[千葉大学大学院・医学研究院]、主任研究者、山本健二[国立国際医療センター]、河内正治[国立国際医療センター]、荒谷康昭[横浜市立大学]、主任研究者、研究協力者)

3) モデル動物による治療効果の評価

3-1) ヒト免疫グロブリンによる血管炎抑制効果: 対照(未治療)群における汎血管炎の発生頻度は86%であったが、h-Ig投与では発生

頻度は40%に減少した。

3-2) 人工ポリクローナルグロブリンによる血管炎抑制効果: 汎血管炎を認めたマウスの発生頻度は、m-SyIG および h-SyIG 群と対照群との間で有意差を認めなかった。そこで、心基部を無・左・右冠尖および左・右冠状動脈の5つの区域に分け、汎血管炎が観察されたセグメント数を比較した。その結果、高容量のFv画分が投与されたSyIG群において汎血管炎を有するセグメント数が減少する、つまり、汎血管炎の範囲が限局化される傾向を示した。

3-3) CAWS 誘導冠状動脈炎の抗体医薬による治療: CAWS 誘導冠状動脈炎への抗体医薬のインフリキシマブ、エタネルセプト投与群共に、対照群と比較して血管炎発生頻度は抑制傾向を示した。両薬剤共に投与による心筋障害は観察されなかった。

(高橋啓[東邦大学医療センター大橋病院病理]、協力者)

3-4) 好中球分子欠損マウス: Mac-1 KO マウスは、血栓性糸球体腎炎に抵抗性であった。糸球体内血栓形成、急速進行性腎不全は、ほぼ完全に抑制され、血尿、蛋白尿、血小板減少、糸球体への好中球の浸潤も優位に抑制された。また、好中球エラスターゼ (NE) KO マウスは、血栓性糸球体腎炎に対して抵抗性で Mac-1 KO マウスとほぼ同じ表現型を呈した。

3-5) RPGN モデルマウス(SCG/Kj)での治療法の検討: SCG/Kj マウスへの EPA 投与群は著明な生存延長を認めた。EPA 含量は EPA 投与群で高値を示したことから完全に食餌依存性であり、半月体形成性腎炎や腎不全は認めなかった。遺伝子発現の有意差は、腎臓における Foxp3 と CTLA-4 であった。

(平橋淳一 [東京大学医学部府付属病院腎臓内分内分泌内科]、長尾朋和 [千葉大学大学院・医学研究院]、主任研究者、研究協力者)

3-6) 劇症型心筋炎への IL-1RII-Ig の治療評価: EAM の心臓中の T 細胞は、IL-2、IFN- γ 、IL-17 が発現し、CD11bc⁺細胞からは、IL-1 α および β 、TNF- α が発現していた。心筋炎の組織から得られた培養細胞に、IL-1 や IL-17 を添加すると、IL-6、MCP-1 の発現誘導が認められた。ま IL-1 の阻害薬の検討では、IL-1RII-Ig のホモダイマー、IL-1RAcP-Ig のホモダイマーに比べ、それらのヘテロダイマーが、IL-1R アンタゴニスト(anakinra)に比し、約 10000 倍強力な効果であった。

(相澤義房 [新潟大学大学院医歯薬大学院]、研究協力者)

4) 新たな評価系の開発と発症機構の検討

4-1) 多段差引法および DNA マイクロアレイ解析: 合計 16 回の測定データについて誤差解析を進めた結果、測定繰り返し誤差は 1% 以下、アレイ間の誤差は 3% 以下という驚異的な正確さで測定されることが判明した。健康人の血液細胞の mRNA から作製したプローブを用いて、不明熱・膠原病診断チップをスクリーニングした場合でも誤差はきわめて低値で、不明熱・膠原病診断チップの品質が極めて優れている事を示している。次に、搭載した 216 個の遺伝子のうち 28 遺伝子について高安病血管炎の患者での発現亢進が検出された。

(野島 博 [大阪大学微生物病研究所])

4-2) 好中球の役割の解析: 血管炎に関与する好中球機能を解析した。CGD マウスにザイモザンを経鼻投与して肺炎を誘発させ、CGD マウス肺の炎症の程度は、投与後 1 日目に、野性型マウスよりも重篤になり、少なくとも 30 日目まで沈静化は見られなかった。CGD マウスへのザイモザン投与後 1 日目には、すでに野性型マウスの約 1.8 倍の細胞が肺に集積し、最も顕著な増加は好中球であった。ザイモザン投与後 6 時間目には、野性型マウスではほとんどがマクロファージであったのに対して、CGD マウスでは好中球が集積していた。CGD マウスにザイモザンを経鼻投与すると好中球性の肺炎が誘発され、肺炎が重篤になることが明らかとなった。

一方、感染誘発による肺傷害機構についても解析した。クリプトコッカスを肺感染させることにより、MPO-KO マウスの生存率の低下、肺の高い残存菌数、重篤な肺炎が発症した。感染後しばらく日数を経てから現れる MPO-KO マウスの易感染性の理由は、Th1 の応答異常が易感染性の一因である可能性が示唆された。また、感染 34 日目の MPO-KO マウスでは、IL-1 α と IL-1 β 量が増加したが、肺における KC 量は野生型と MPO-KO マウス間で差はなかった。

(荒谷康昭 [横浜市立大学大学院国際総合科学研究科])

4-3) 血管炎発症に関与する *C. albicans* 細胞壁由来 mannan 分子: 培地 (YPD medium、C-limiting medium) と培養温度 (27 °C、37 °C) を変えて培養した *C. albicans* 菌体から調整した mannan の 2D-TOCSY スペクト

ルを測定した。その結果、M-Y27にのみ特徴的に現れるシグナルが数多く見られ、それはβ-mannosyl 残基であった。Y27由来細胞壁抽出物のみが、これらの生理活性を有していないことが明らかとなった。

2. 臨床班

1) IVIgの前期第Ⅱ相探索に関して本分科会員による協力

我が国の急速進行性糸球体腎炎診療指針作成合同委員会作成の診療指針で、決定された確定診断方法によりRPGNと確定診断された患者を対象とする。本治療への参加に対する文書同意が得られた対象患者で、次の1)~4)の基準を全て満たす患者(1) MPO-ANCA陽性、2) 臨床学的重症度がGrade I又はII、3) 治療参加の同意取得時点において、年齢が20歳以上、4) 治療薬投与期に入院が可能)。ステロイド療法など、急速進行性腎炎症候群の診療指針を基準とした治療を行うと同時に、治療薬を5日間連日投与し、その後6箇月間観察実施した。有効性評価項目:・Cre, 1 / Cre, BUN, BVAS, CRP, MPO-ANCA, 透析に至るまでの日数等
安全性評価項目:治療薬投与後の有害事象
治療実施医療機関:20施設、目標症例数:被験薬投与群(16例)、対照薬投与群(8例)計24例。すべての施設での倫理委員会を通過した上で、患者にはインフォームドコンセントを文書でとっておこなわれた。

(武曾恵理[北野病院]、臨床班分科会員および協力研究者)

2) MPAの治療評価にむけての腎機能のパラメータの検討

IgA腎症では正常人に比してIL-6, IL-15, IL-17, PDGFが上昇していたが、MPAでは多種のサイトカイン、ケモカインが正常人やIgA腎症者に比して上昇しており、サイトカインストームの実態を示した。サイトカイン・ケモカインと、各種臨床パラメーターとの関係性について、血尿、タンパク尿:IL-15, IL-18, MCP-1, MCSFが血尿の程度と正の相関を示した。蛋白尿とIL-12p40の程度が正の相関を示した。さらに腎機能については、IL-8が正の相関を示した。活動性、半月体形成病変との相関性は再現性がなかった。

IL12p40は病変のある糸球体および血管病変と連動していることが確認された。また、多くのサイトカインが発現している一方、全血のサイトカイン産生能の検討では、IFNα産生能は健常人に比較して有意に低下していたが、IVIg前後の産生能の変化では大量療法3症例はすべて、治療後にIFNα産生能の上昇をみた(図3)。ただ、小量群では4例中2例でしか、上昇しなかった。

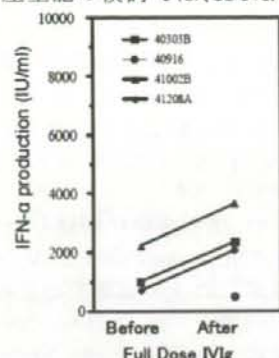


図3. IVIg治療によるIFNα産生への影響

(武曾恵理[北野病院]、臨床班分科会員および協力研究者)

3) 川崎病—CO-1

IVIg療法前後のCRP値は、反応例前 3.02 ± 1.65 mg/dl (n=49)、反応例後 0.53 ± 0.38 mg/dl (n=49)、 $p=0.0007$ 、不応例前 7.85 ± 4.01 mg/dl (n=31)、不応例後 3.58 ± 2.87 mg/dl (n=31)、 $p=0.0367$ であり、ともにIVIg療法により有意に低下したが、不応例の後値は反応例の前値より高値を呈していた。一方、CO濃度は、反応例前 309 ± 21 ppm (n=49)、反応例後 247 ± 19 ppm (n=49)であり、反応例ではIVIg療法後のCO濃度に有意($p=0.0158$)な低下を認めた。しかし不応例では、IVIg療法前 352 ± 38 ppm (n=31)、IVIg療法後 411 ± 53 ppm (n=31)となり、CO濃度は有意な低下は認められず、むしろ増加傾向を示した。

(佐地 勉[東邦大学医療センター大森病院小児科]、研究協力者)

4) 血管炎の治療

血管炎の治療について記載があった。分担報告参照(今井圓裕[大阪大学医学系研究科老年・腎臓内科]、研究協力者)、(湯村和子[自治医科大学腎臓内科]、研究協力者)、(山縣邦弘[筑波大学院医学研究科]、研究協力者)

6) 国際評価・疫学関連

6-1) 国際会議

第一回の会議(2008年3月、チェリッヒ)の前にアンケートが行われ、論議すべき問題点が集計された。2)ACR分類・CHCC基準のよい点・悪い点について、各疾患について改訂の必要性についてアンケートが行われた。結果

は、ACR および CHCC 両者とも大型血管炎の基準に対する改訂必要の希望者は多くなかったが、中小血管炎の基準に対する改訂希望が多かった。4)疾患名の変更に関する提案が行われた。第二回(2008年12月、チュリッヒ)では、第1回の会議で議論されたさまざまな問題点について、血管炎の分類方法に関して重要な概念が確認された。

(小林茂人[順天堂大学医学部附属越谷病院]、研究協力者)

6-2) 国際疫学に関連した国内調査

ANCA-associated PRV として登録された数は前回の4年間調査での総数50例に対し、今回の調査では2005年、2006年、2007年、2008年にそれぞれ11例、17例、16例、17例の総数61例で、男女比は前回の22:28に対し、33:28であった(1,2)。2004年までの4年間調査での平均年齢は70.4±11.1歳、今回の4年間の調査では71.3±11.8歳と同等であり、65歳以上が47%、発症のピークは75~80歳であった。

(藤元昭一[宮崎大学医学部]、布井博幸[宮崎大学医学部]、研究協力者)

3. 安定性

1) 人工型の安定性と毒性試験

現在施工中の動物実験に使用している人工免疫グロブリンの安全性について、感染性因子、内因性・外因性毒素、炎症惹起分子の特定など、感染研の安全研究ガイドラインを基に安全性を検討し、臨床に向けた原案を協議した。(全員)

2) IVIgの安全性

RPGN および川崎病治療において解析され、安全性が確認された。特に川崎病では以下のデータが報告された。合併症あり：1708(23.5%)、なし：5546、不明：3、安全性調査対象：副作用：484例(6.7%)、697件、重篤な副作用：68例78件。副作用(件数)：搔痒感・発疹78、肝機能障害69、肝機能関連検査値異常：40、低体温50、無菌性髄膜炎19、低血圧19、蒼白15、チアノーゼ14、末梢冷感13、ショック13、心不全13、溶血性貧血4、その他408。IVIgの有効性：初回治療時無効率：平均13.52%(12.5~15.2%)、追加治療時無効率：平均17.74%(15.0~20.1%) (4製品間で有意差なし)。心断層エコー所見：初回のみ異常：平均1.69%(0.63~2.49) (但し3社の報告)、Total異常率：2.84(0.932~4.2%) (但し3社のみ、3製品間で有意差なし)。

(武曾恵理[北野病院]、臨床班分科会員および協力研究者)、(佐地 勉[東邦大学医療センター大森病院小児科]、研究協力者)

D. 考察

これまで作製してきたマウス型人工グロブリンは、血管炎モデルマウスに有効であり、あらたな治療法としてヒト型のプロトタイプを作製できた。また、体外診断法にむけた *in vitro* での評価法を検討し、疾患モデル動物での評価も推進した。さらに、小児に多発する血管炎である川崎病や、高齢者に多いMPO-ANCA 関連血管炎の治療法としてのIVIgのデータの蓄積や、他の治療法などの検討を継続的に行った。

基礎班：ヒト型人工免疫グロブリン作製と評価法

1) ヒト型人工免疫グロブリン作製とその品質

1、2年度目で作成されたポリクローナル人工ガンマグロブリンのバッチに多様性が保持され、生体内調節因子に結合するクローンが含まれていることを実証できたことは、ポリクローナル人工ガンマグロブリンの製剤化へのゴールに近づけられたと確信できる。次期のプロジェクトにおいて生体内でのイデオタイプ多様性を考えたときに数百倍程度の整列化クローンバッチを整備することは可能であり、その作成が強く望まれる。

2) *in vitro* 評価系の開発

人工γグロブリンの有効性を検証する測定系を検討した。第一の測定系は、希釈全血をPHAで刺激し、IVIgを添加、Th1/Th2サイトカインの産生抑制を検証した。とりわけ、IL-10の産生抑制は顕著であった。この測定系は0.5cc程度の血液があれば測定可能なことから、実用性は高いと思われる。また、単球のT細胞刺激能へのIVIgの影響についても検証し、その有用性が明らかになった。IVIgの作用機作解明のために、対象疾患であるMPO-ANCA腎炎患者の血漿中サイトカイン・ケモカインレベルを健康人、IgA腎症患者と比較しつつ調べたところ、測定出来た26項目中17項目が、健康人、IgA腎症患者と比較して有意に上昇していた。このように、多項目サイトカイン・ケモカイン動態の網羅的解析は、病態、病因の理解に有用であることが示唆された。

さらに、*in vitro* で利用できる血管内皮細胞

による体外評価法を検討した。TNF- α やH₂O₂によって活性化された血管内皮細胞で産生されるサイトカイン、ケモカインもIgGによって抑制できることから、免疫グロブリンの血管内皮細胞への活性化抑制作用の分子解析により、*in vitro*での評価系を確立する方向が示された。

以上の評価法は、血管炎治療効果の判定に向けた開発につながる事が期待できる。

3) モデル動物での評価系

C. *albicans* 由来の菌体成分を用いたマウス系統的血管炎誘発モデルの検討を続けている。これまでに本実験系にヒトあるいはマウス免疫グロブリンを腹腔内投与すると血管炎発生は抑制されること、本実験系の血管炎発生と血清 MPO-ANCA 値とは密接に関連することなどが判明している。そこで、これまでの方法に改良を加えた CAWS によるマウス血管炎誘発モデルに対し、ヒト免疫グロブリン(*h*-IG)を投与した際の血管炎抑制効果を検討した。その結果、汎血管炎は*h*-IGを投与することで有意に抑制されたが、汎血管炎が抑制された群においても、内膜あるいは内膜と外膜に炎症が生じており、炎症が完全に抑制された個体は見出せなかった。本血管炎モデルにおいて、*h*-IGは炎症の発生を制御するのではなく、血管炎の進展を抑制している可能性がある。

次いで、マウスおよびヒトリンパ球から製造した人工ポリクローナル免疫グロブリン(SyIG)が血管炎発生に及ぼす影響を検討した。この結果、m-SyIG、h-SyIG共に汎血管炎の広がり、ならびに炎症の程度を軽減化させる作用を示した。

さらに、近年川崎病などの血管炎疾患に対する新たな治療として抗サイトカイン療法が試みられており、CAWS投与後血清TNF- α が上昇することが示されている。そこで、TNF- α 阻害剤投与による血管炎抑制効果を検討したところ、血管炎の発生や炎症の進展が抑制できた。本抗体は、IVIgや人工クローン中にも含まれている。

一方、劇症型心筋炎へのIL-1R_{II}-Igの治療評価については、線維芽細胞、平滑筋細胞では、積極的に炎症に関わっていないのではないかと考えられていたが、最近、筋線維芽細胞が、他の臓器でも様々なサイトカイン/ケモカイン/成長因子を産生し、またそれらの受容体を持つことが明らかになってきた。またDNA microarrayによって網羅的な遺伝子発現

の検討が可能になったため、今まで注目されなかった蛋白の重要性が、様々な分野で明らかになってきている。IL-1の阻害薬の検討では、驚くほど強力なIL-1阻害作用が、IL-1R-Igヘテロダイマーでみられた。IL-1は、他の炎症でも中心的な役割を果たすサイトカインである。この生物学的製剤は、今後血管炎でも有用になる可能性があると思われる。

さらに、感染や自己免疫疾患において白血球接着因子Mac-1は好中球の糸球体への浸潤と蛋白分解酵素である好中球エラスターゼの活性を制御することにより、糸球体血管整合性の破壊をもたらすことを示し、炎症と血栓を結ぶ決定的分子であることを証明した。今後、Mac-1とその下流シグナル(outside-in signaling)を標的とした薬剤が血管炎による血栓および出血および臓器障害を抑制する新しい治療の標的となりうると思われる。

EPA投与は従来から知られている炎症抑制効果のみならず、制御性T細胞を誘導することにより自己免疫制御効果をもたらすことを示唆した。MPO-ANCA産生を抑制することから、ANCA関連血管炎の新しい治療法となりうることを示唆した。

2. 臨床班: IVIg治療の評価

1) RPGNと血管炎

本研究分科会で協力したプラセボを対象とする二重盲検により、IVIgのステロイド治療との同時投与の形で、プラセボとの比較をおこなうRTCをおこなった。また、症例はRPGNを伴う形ながら、Grade I-IIと比較的軽症症例に限った。これは、当局からの指令で、プラセボのみでの治療期間は、倫理上不可能であること、また同様の理由で、軽症症例に限ったことが、特徴である。結果的に、腎機能改善をエンドポイントに置いた系では、有意なIVIgのステロイドへの上乗せ効果は検証できなかった。一方、BVASは疾患活動性を表すが、この指標では、実薬群の有意な低下を一か月で検証できた。また、今回の解析で薬剤投与の安全性が確認された。

このことから、今回のプロトコルの立て方の工夫として、1)対象症例:MPA全症例(肺、消化管など全臓器を巻き込んだ血管炎症例も対象とする) 2)プロトコル案 1:発症期症例、案

2:ステロイド治療抵抗症例、案3:再燃例のみ

また、我が国の RPGN の多くを占める MPO-ANCA 陽性症例は全身性疾患としての MPA に発症する。この疾患の病理学的パラメーターを特定し、それらの所見が、生検時の臨床的パラメーターのどの所見と相関しているかを統計学的に解析し、治療指針の一助となる可能性や IVIg 治療の効果判定の有効性を推測できた。これらのパラメーターの選択には、欧州血管炎協会 (EUVAS) で採択されており、国際評価会議からも要請があり、当班からも運営委員として2名、オブザーバとして1名が参加し、討論に加わった。

2) 川崎病の IVIg 治療評価

IVIg の副作用の頻度は、HIV 感染、ITP (特発性血小板減少性紫斑病)、ギランバレー症候群等と比較すると、明らかに KD では副作用が少ないと考えられた。しかし、副作用は多彩であり、予測因子に乏しく充分注意する必要がある。第一に血漿浸透圧の上昇、その他、凝固能亢進、容量負荷による心不全の悪化、Coomb 試験陽性の溶血性貧血、無菌性髄膜炎、血球貪食症候群、敏性症候群、アナフィラキシーなどに関連する報告があった。

E. 結論

IVIg による治療法は、重症感染症や川崎病の治療や自己免疫疾患により有効な免疫補助療法として利用され、また、適応拡大が検討されはじめている。安全性や医療経済の点からも、人工化することが今日的急務であり、これまでに血管炎モデルマウス (川崎病、腎炎) に有効なマウス型人工免疫グロブリンを完成させ、それに基づいて、ヒト型に特化した人工型ガンマグロブリンのプロトタイプを作製することにも成功した。本研究班で作成された人工ガンマグロブリンライブラリーを構成するクローンの多様性が保持されていることを検証した。班研究の中から、製剤化を現実のものとする限られたクローンの集合によるセミポリクローナルという考え方が示されたことは大きな前進であったと考えられる。また、生体内のイディオタイプに自己の調節因子に対する抗体が比較的高い頻度で含まれることを示し、人工ポリクローナルガンマグ

ロブリンに含まれるクローンが実際の生体分子と結合できることを TNF α を指標として実証することができた。このような生体調節因子に対するイディオタイプが生体反応調節に重要な役割を果たしていると思われる。本研究班で開発された人工ガンマグロブリンを製剤化するためには、さらに高効率でクローニングできる発現系の開発とさらに規模の大きなクローンライブラリーを作成する必要がある。今期の成果によって、前臨床試験に向けた大規模バッチのライブラリー作成が望まれる。

また、ヒト型人工免疫グロブリン作製とその品質と体外評価法の開発にむけ検討し、免疫細胞への作用 (ヒト末梢血単核球 (PBMC) の固相化 IVIg によるサイトカイン産生測定、Bio-Plex を用いた PBMC からのサイトカイン・ケモカインの網羅的解析)、全血法によるサイトカイン産生能の検討、単球の抗原提示能に対する IVIg の影響、免疫グロブリンの血管内皮細胞への作用解析法の検討 (TNF- α によって誘導される adhesion molecules の発現の解析、IgG 作用: TNF- α により誘導される adhesion molecules、サイトカイン、ケモカインの mRNA 発現への IgG の作用の解析、H₂O₂ により誘導される adhesion molecules、サイトカイン、ケモカインの発現への IgG の作用、TNF- α により誘導される adhesion molecules、サイトカイン、ケモカインの発現への IgG の作用の解析) があげられる。そして、モデル動物によるヒト型人工免疫グロブリンの治療効果については、CAWS 誘導冠状動脈炎、RPGN モデルマウス (SCG/Kj) での治療法の検討を中心に行った。

一方、本研究分科会で協力したプラセボを対象とする二重盲検により、IVIg のステロイド治療との同時投与の形で、プラセボとの比較をおこなう RTC をおこなった。腎機能改善をエンドポイントに置いた系では、有意な IVIg のステロイドへの上乘せ効果は検証できなかった。一方、BVAS は疾患活動性を表す指標では、実薬群の有意な低下を一か月で検証できた。また、今回の解析で薬剤投与の安全性が確認された。このことから、次回のプロトコールの立て方を検討できた。また、我が国の RPGN の多くを占める MPO-ANCA 陽性症例は全身性疾患としての MPA に発症する。この疾患の病理学的パラメーターを特

定し、それらの所見が、生検時の臨床的パラメーターのどの所見と相関しているかを統計学的に解析し、治療指針の一助となる可能性やIVIg治療の効果判定の有効性も推測できた。これらのパラメーターの選択は、欧州血管炎協会(EUVAS)で採択されており、国際評価会議からも要請があり、当班からも運営委員として2名、オブザーバとして1名が参加し、討論に加わった。

川崎病のIVIg治療評価:IVIgの副作用の頻度は、HIV感染、ITP(特発性血小板減少性紫斑病)、ギランバレー症候群等と比較すると、明らかにKDでは副作用が少ないと考えられた。しかし、副作用は多彩であり、予測因子に乏しく充分注意する必要がある。第一に血漿浸透圧の上昇、その他、凝固能亢進、容量負荷による心不全の悪化、Coomb試験陽性の溶血性貧血、無菌性髄膜炎、血球貪食症候群、敏性症候群、アナフィラキシーなどに関連する報告があった。

以上から、ヒト型人工免疫グロブリンのプロトタイプの完成と、その*in vitro*での評価法の準備ができたので、今後は具体的に臨床応用をめざしたヒト型人工免疫グロブリンの完成と、体外評価法として発展させる。本研究事業での臨床班および基礎班で成果を、国民の保健・医療ならびに効率的な医療経済にできるようにしたい。

参考資料(別紙)

臨床応用に向けて人工免疫グロブリン開発、安全性において大きな前進があった(公開成果発表会、班会議)。また、わが国とヨーロッパでのIVIg治療の安全性の確保や日英での血管炎の相違の検討:日英一血管炎の疫学調査研究の会議および班会議を年2回開催した(班会議、国際会議)。また、国際評価委員会(スイス・チューリッヒ)に3名が招聘された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

分担者の個別記載を参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

(1)血管炎(angitis)患者の血液細胞特異的遺伝子群(特願2005-161681)【発明者】野

島博、恩田弘明、橋本博史、小林茂人、鈴木和男【出願者】科学技術振興機構、大阪大学知財部【出願日】平成17年6月1日

(2)自己免疫性血小板減少性紫斑病(ITP)患者の血液細胞特異的遺伝子群

(特願2005-306409)【発明者】野島博、恩田弘明、富山佳昭【出願者】科学技術振興機構、大阪大学知財部【出願日】平成17年9月30日

(3)微量mRNAの増幅方法およびその利用

(特願2006-246053)【発明者】野島博、東岸任弘、奥崎大介【出願者】大阪大学知的財産本部【出願日】2006年(平成18年)9月11日

【国際特許出願番号】PCT/JP2007-066808、【国際特許公開番号】WO2008/032574、

【国際特許出願日】2007年(平成19年)8月29日

(4)慢性関節リウマチに罹患したヒト由来の骨髄又は末梢血細胞で特異的に発現亢進している遺伝子群(特願2006-274629)【発明者】野島博、越智隆弘

【出願者】大阪大学知的財産本部

【出願日】2006年(平成18年)10月6日

(5)平橋淳一他、ANCA関連血管炎治療薬(出願日2008.8.22)

ガンマグロブリン治療のための川崎病動物モデルの開発と 人工ガンマグロブリン *in vitro* 評価系の検討

研究分担者 大野尚仁 東京薬科大学 教授

研究要旨：我々は、*Candida albicans* IFO 1385 を完全合成培地で培養し、その培養上清中から得られる可溶性多糖画分 (CAWS) をマウスに腹腔内投与すると川崎病類似の血管炎を発症させることを報告してきた。本研究では、CAWS 血管炎の発症機構について、CAWS 血管炎に抵抗性を示した CBA/J とその近種である CBA/N を用いて、PAMPs に対する応答性を比較することで CAWS 血管炎発症機構を解析した。その結果、CBA/J マウスにおける血管炎発症の抵抗性には IL-10 産生が密接に関わっていることを明らかにした。さらに、*Candida* 細胞壁の構造と活性について検討し、その構造中の β -mannan が、血管炎やアナフィラキシー様ショック誘発に対して負に作用していることを示唆した。一方で、IVIg の *in vitro* 評価法について検討し、IVIg の固相化法を開発した。

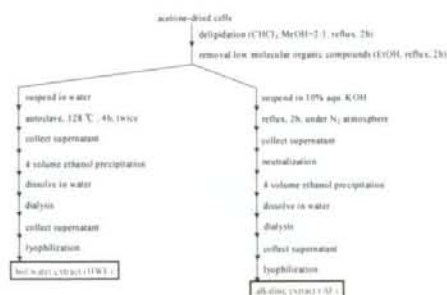
A. 研究目的

川崎病は、主として 4 歳以下の乳幼児に多く見られる原因不明の病気であるが、最近では年間一万人以上の患者が発生しており、年々増加傾向にある。川崎病では全身の血管に炎症が起こり、特に心臓の血管に動脈瘤ができやすくなる。IVIg はこの冠動脈瘤の発生率を減少させる効果的な治療法である。

CAWS 血管炎は川崎病に類似し、冠動脈周辺に炎症が観察される。本研究では、CAWS 血管炎を川崎病モデルマウスとして有用性を高めるために、その発症機構について検討した。さらに CAWS の構造と血管炎誘発活性について検討した。一方で、人工 IVIg がヒトに用いられるには、*in vitro* での評価が必須である。そこで、IVIg の *in vitro* 評価系について検討した。

B. 研究方法

1. 構造の異なる *Candida* 細胞壁多糖の調整



Scheme 1 Scheme of extractions of cell wall extract from *C. albicans* cultured by various culture conditions

C. 研究結果

1. CBA 系マウスを用いた CAWS 血管炎発症機構の解析

1) CAWS 4mg/mouse を 5 日間連続腹腔内投与し、28 日後にそのマウスの心臓を摘

出、冠状動脈起始部の組織切片を作成し、EVG により染色した。その結果、CAWS 血管炎を発症する CBA/N マウスにおいて弾性繊維の損傷が認められたが、CAWS 血管炎抵抗性の CBA/J マウスにおいては弾性繊維の損傷は認められなかった(Fig. 1)。

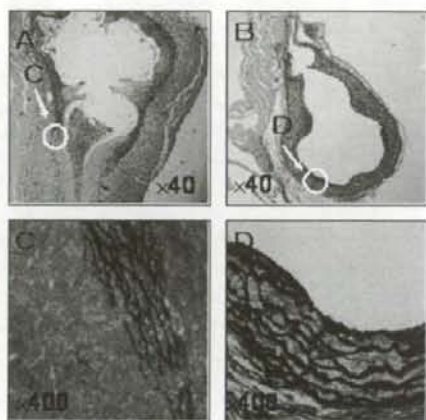


Fig. 1 Histopathological findings of coronary arteries and aorta

CAWS (4mg/mouse) was i.p. administered to CBA/N (A, C) and CBA/J (B, D) mice for five consecutive days. At 28days after CAWS injections, mice were sacrificed and stained by Elastica-van-Gieson.

2) CAWS 血管炎抵抗性の CBA/J マウスとその Btk 欠損ミュータントである CAWS 血管炎感受性の CBA/N マウス脾臓細胞の PAMPs (Pathogen associated molecular patterns) 刺激による IL-6、IFN- γ 、IL-10 産生について検討した。PAMPs として、LPS (TLR4)、PAM3 (TLR2)、CpG-ODN (TLR9) を用いた。その結果、LPS の刺激により CAWS 血管炎に抵抗性を示す CBA/J マウス脾臓細胞からは多量の IL-10 が産生されることが明らかになった。しかし、IL-6、IFN- γ 産生は殆ど観察されなかった。一方、CAWS 血管炎を発症する CBA/N マウス脾臓細胞からは IL-10 は殆ど産生されず、多

量の炎症性サイトカインが産生されていることがわかった (Fig. 2)。PAM3、CpG-ODN についても同様の傾向であった(data not shown)。

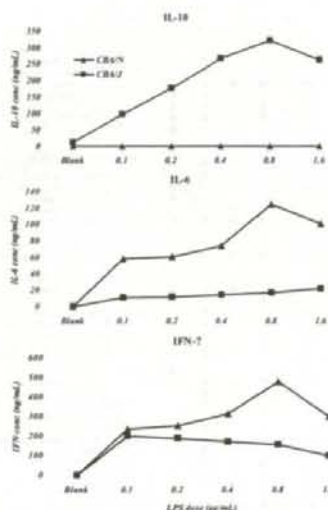


Fig. 2 Cytokine production in culture supernatants of splenocytes from CBA/J and CBA/N mice stimulated with LPS

Splenocytes collected from CBA/J and CBA/N mice. Prepared splenocytes were cultured with LPS (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 $\mu\text{g/mL}$) for 48 hours at density of 5×10^6 cells/mL. The culture supernatants were collected and measured IL-10, IL-6 and IFN- γ by ELISA.

2. 異なる培地や培養温度で培養した *C. albicans* 細胞壁由来 mannan の構造と活性

培地(YPD medium、C-limiting medium)ならびに培養温度(27 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$)を変えて *C. albicans* を培養し(Scheme 1)、菌体から調整した mannan の 2D-TOCSY スペクトルを測定した。その結果、M-Y27 にのみ特徴的に現れるシグナルが数多く見られ、それは β -mannosyl 残基であった(Table 1)。さらに、*Candida* 細胞壁熱水抽出物は、マウスに対して急性のアナフィラキシー様ショックおよび血管炎を惹起したが、Y27 由来細胞壁抽出物のみが、これらの生理活性を有してい

ないことが明らかとなった(data not shown)。

Table 1 Assignments of the NMR spectra of *Candida* cell wall mannan prepared by various culture conditions

M (ppm)	Y (ppm)	Coupling Constant				Residue
		L2'	L3'	S2'	S3'	
1.536	94.7			●	Mann1 → 2Mann1 - phosphate	
1.534	94.5			●	Mann1 → 2Mann1, 2Mann1 - phosphate	
1.530	100.9	●	●	●	31 → 2Mann1 → 3Mann1 → 2	
1.530	100.9	●	●	●	31 → 2Mann1 → 3Mann1 → 2	
1.530	100.9	●	●	●	Mann1 → 2Mann1 → 2	
1.529	100.9	●	●	●	31 → 2Mann1 → 2Mann1 → 2	
1.525	100.9	●	●	●	31 → 2Mann1 → 2Mann1 → 2	
1.517	100.3		●	●	Mann1	
1.517	100.3		●	●	Mann1 → 2Mann1 → 2	
1.513	102.9		●	●	Mann1 → 2Mann1, 2Mann1 → 2	
1.514	102.9		●	●	Mann1 → 2	
1.513	98.4	●	●	●	Mann1 → 3	
1.511	98.5	●	●	●	31 → 4Mann1 → 6Mann1 → 6Mann1 → 6	
1.509	98.5	●	●	●	Mann1 → 2Mann1, 2Mann1 → 2, 2Mann1 → 2	
1.503	102.9	●	●	●	31 → 3Mann1 → 2	
1.504	102.4	●	●	●	31 → 3Mann1 → 2	
1.497	101.3		●	●	Mann1 → 2Mann1 → 2Mann1 → 2Mann1 → 2Mann1 → 2	
1.493	101.3		●	●	Mann1 → 2Mann1, 2Mann1 → 2	
1.491	101.5		●	●	Mann1 → 2Mann1, 2Mann1 → 2	
1.492	101.7		●	●	Mann1 → 2Mann1, 2Mann1 → 2	
1.493	99.4		●	●	Mann1 → 6	
1.491	99.7		●	●	Mann1 → 6	
1.492	99.9	●	●	●	Mann1 → 6	
1.490	99.9	●	●	●	Mann1 → 6Mann1, 6Mann1 → 6	
1.492	99.2	●	●	●	Mann1 → 2Mann1 → 2Mann1 → 2Mann1 → 2	
1.487	99.2	●	●	●	Mann1 → 2Mann1 → 2Mann1 → 2	
1.488	99.4	●	●	●	Mann1 → 2Mann1 → 2Mann1 - phosphate	
1.486	101.2	●	●	●	Mann1 → 2Mann1 → 2Mann1 → 2	
1.484	101.2	●	●	●	Mann1 → 2Mann1 → 2Mann1 → 2	
1.479	98.0		●	●	Mann1 → 2Mann1 → 2	
1.478	102.9		●	●		
1.474	103.2		●	●		
1.466	103.1		●	●		
1.451	103.1		●	●		

3. IVIg の in vitro 評価系の検討

1) Bio-Plex を用いたヒト PBMC からのサイトカイン・ケモカインの網羅的解析

Bio-Plex を用いて 17 種のサイトカインを測定したところ、固相化 IVIg により産生が誘導されないもの (IL-2, IL-4 など)、固相化 IVIg の容量依存的に産生が観察されるもの (IL-1 β , IL-6 など)、検出限度を超えるほど著しい産生が観察されるもの (IL-8, MIP-1 β など) の 3 群に分けることができた。さらに LPS を添加したところ、ほとんどのサイトカインの産生量は上昇し、固相化 IVIg 容量依存的であったが、IL-10, MCP-1 の産生は固相化 IVIg によって抑制された。これらの結果から、固相化 IVIg は PBMC からのサイトカイン産生に変化を与えることが明らかとなった。

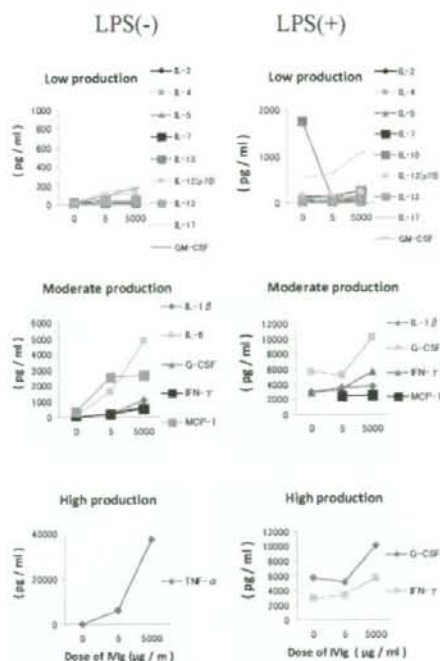


Fig. 3 Cytokine production in culture supernatants of human PBMC stimulated with solid phase IVIg

PBMC collected from healthy donor. PBMC were cultured with LPS (0 or 1 ng/mL) in IVIg plate for 8 hours. The culture supernatants were collected and cytokines and chemokines were measured by bio-plex.

D. 考案

CBA/J マウスにおける CAWS 血管炎の抑制因子を検討した。PAMPs 刺激による *in vitro* spleen cell culture の結果、CBA/J マウス脾臓細胞からは多量の IL-10 の産生が見られた。一方、CBA/N マウス脾臓細胞から IL-10 はほとんど産生されず炎症性サイトカインである IL-6 及び IFN- γ の産生が観察された。このようなサイトカインレスポンスが CBA/J マウスにおける CAWS 血管炎の抑制に作用していると考えられた。

また、*Candida* の培養方法を変えて作成した多糖化画分の解析により、活性のある抽

出物と活性のない抽出物の間には、 α -mannan 構造に相違は見られず、両者の違いが α -mannose 残基の非還元末端に結合した β -1,2-mannose 残基にあることが明らかとなった。非還元末端に対して β -1,2-mannose 残基が付加することにより、mannan lectin による認識が出来なくなる、すなわち、 β -1,2-mannose 残基によりマスクされ、活性を消失していると推察された。

一方で、IVIg の *in vitro* 評価法の検討では、IVIg を固相化する事で、その活性を観察できることが明らかとなり、この方法で人工IVIgの活性を比較検討することは有用であると考えられる。

E. 結論

CAWS 血管炎の抑制機構の解析と CAWS の構造と活性についての相関について検討した。これらの結果が明らかになったことにより、CAWS 血管炎の川崎病モデルマウスとしての有用性も高まったと考えられる。一方で、IVIg の評価方法を検討し、その活性を評価できる固相化法を開発した。今後、人工IVIg との比較を行いたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Ohno N., Models of Kawasaki Disease, Drug Discovery Today: Disease Models, 3, 83-89, (2006)
- (2) Nagi-Miura N., Harada T., Shinohara H., Kurihara K., Adachi Y., Ishida-Okawara A., Oharaseki T., Takahashi K., Naoe S., Suzuki K., and Ohno N., Lethal and Severe Coronary Arteritis in DBA/2 Mice Induced by Fungal Pathogen, CAWS, *Candida albicans* Water-Soluble Fraction, *Atherosclerosis*, 186, 310-320 (2006)

- (3) Shinohara H, Nagi-Miura N., Ishibashi K., Adachi Y., Ishida-Okawara A., Oharaseki T., Takahashi K., Naoe S., Suzuki K., and Ohno N., Beta-Mannosyl Linkages Negatively Regulate Anaphylaxis and Vasculitis in Mice, Induced by CAWS, Fungal PAMPs Composed of Mannoprotein-Beta-Glucan Complex Secreted by *Candida albicans*, *Biol. Pharm. Bull.*, 29, 1854-1861 (2006)

- (4) Tada R, Nagi-Miura N, Adachi Y, Ohno N, An unambiguous assignment and structural analysis using solution NMR experiments of O-antigen from *Escherichia coli* ATCC23505 (Serotype O9), *Chem Pharm Bull*, 55, 992-995, (2007).

- (5) Tada R, Harada T, Nagi-Miura N, Adachi Y, Nakajima M, Yadomae T, Ohno N, NMR characterization of the structure of a beta-(1 \rightarrow 3)-D-glucan isolate from cultured fruit bodies of *Sparassis crispa*, *Carbohydr Res*, 342, 2611-2618 (2007).

- (6) Nagi-Miura N, Shingo Y, Kurihara K, Adachi Y, Suzuki K, Ohno N, Involvement of platelet activating factor, histamine and serotonin in acute lethal shock induced by *Candida albicans* water-soluble extracellular polysaccharide fraction (CAWS) in mice, *Biol Pharm Bull*, 30, 1354-1357 (2007).

- (7) Hoshino A, Nagao T, Ito-Ihara T, Ishida-Okawara A, Uno K, Muso E, Nagi-Miura N, Ohno N, Tokunaka K, Naoe S, Hashimoto H, Yasuhara M, Yamamoto K, Suzuki K, Trafficking of QD-conjugated MPO-ANCA in murine systemic vasculitis and glomerulonephritis model mice, *Microbiol Immunol*, 51, 551-566 (2007).

- (8) Ishida-Okawara A, Nagi-Miura N, Oharaseki T, Takahashi K, Okumura A, Tachikawa H, Kashiwamura S, Okamura H, Ohno N, Okada H, Ward PA, Suzuki K, Neutrophil activation and arteritis induced by *C. albicans* water-soluble mannoprotein-beta-glucan complex (CAWS), *Exp Mol Pathol*, 82, 220-226 (2007).

- (9) Okada N, Asai S, Hotta A, Miura N, Ohno N, Farkas I, Hau L, Okada H, Increased Inhibitory Capacity of an Anti-C5a Complementary Peptide Following Acetylation of N-terminal Alanine, *Microbiol Immunol*, 51, 439-443 (2007).

- (10) Ohno N, A murine model of vasculitis induced by fungal polysaccharide, *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 6, 44-52 (2008).

- (11) Tada R, Nagi-Miura N, Adachi Y, Ohno N, The influence of culture conditions on vasculitis and anaphylactoid shock induced by fungal pathogen *Candida albicans* cell wall extract in mice, *Microb Pathog*, 44, 379-88 (2008).

- (12) Nagi-Miura N, Adachi Y, Ohno N., Coronary

arteritis induced by CAWS (*Candida albicans* water-soluble fraction) in various strains of mice, *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.*, 49, 287-92 (2008).

(13) Harada T, Miura NN, Adachi Y, Nakajima M, Yadamae T, Ohno N., Highly expressed dectin-1 on bone marrow-derived dendritic cells regulates the sensitivity to beta-glucan in DBA/2 mice, *J Interferon Cytokine Res.*, 28, 477-86 (2008).

2. 学会発表

国際会議

- (1) N. Ohno, H. Shinohara, N. N. Miura, K. Ishibashi, and Y. Adachi, Beta-mannosyl linkages negatively regulate immunotoxicity of CAWS, fungal PAMPs composed of mannoprotein-beta-glucan complex secreted by *Candida albicans*, The 16th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, Paris, France, 2006
- (2) N. N. Miura, H. Shinohara, M. Komai, Y. Adachi, T. Oharaseki, K. Takahashi, A. I. Okawara, K. Suzuki, and N. Ohno, Analysis of coronary arteritis induced by *C. albicans* extracellular mannoprotein in various strains of mice, 1st International Fungal/Plant Cell Wall Meeting, Anglet, France, 2007
- (3) Ohno N., influence of culture conditions on vasculitis and anaphylactoid shock induced by cell wall extracts of *Candida albicans* in mice, International Conference Regulation of Inflammatory Diseases -Vasculitis and Asthema- 2008 in Chiba, Chiba, 2008
- (4) Ohno N., Miura N., Nagao T., Uno K., Suzuki K., Analysis of synthetic immunoglobulin in vivo and in vitro cell culture, International Conference Regulation of Inflammatory Diseases -Vasculitis and Asthema- 2008 in Chiba, Chiba, 2008

国内会議

- (1) 三浦典子, 安達禎之, 大野尚仁, 病原性真菌 *Candida albicans* 培養上清由来多糖画分 CAWS の急性致死活性と血管炎誘発活性, 第 27 回関東医真菌懇話会, 東京, 2006
- (3) 三浦典子, 安達禎之, 大原関利章, 高橋 啓, 大川原明子, 鈴木和男, 大野尚仁, 各種マウス系統を用いた CAWS 血管炎発症に関わる遺伝的素因の解析, 第 12 回 MPO 研究会, 大阪, 2006
- (4) 原田敏江, 三浦典子, 安達禎之, K. Ozato, 鈴木和男, 大野尚仁, CAWS 血管炎における IRF-8 の役割, 第 12 回 MPO 研究会, 大阪, 2006
- (5) 駒井元彦, 高野雄介, 三浦典子, 安達禎之, 鈴木和男, 大野尚仁, CBA/J, CBA/N マウスにおける CAWS 血管炎の検討, 第 12 回 MPO 研究会, 大阪, 2006
- (6) 多田 聖, 三浦典子, 安達禎之, 大野尚仁, An unambiguous assignment and structural analysis using solution NMR experiments of O-antigen from

Escherichia coli ATCC23505 (serotype O9), 第 45 回 NMR 討論会, 京都, 2006

- (7) 多田 聖, 三浦典子, 安達禎之, 大野尚仁, 病原性真菌 *Candida albicans* 細胞壁多糖の血管炎形成と急性致死活性の検討, 第 5 回 ファーマ・バイオフォーラム 2006, 東京, 2006
- (8) 原田敏江, 三浦典子, 安達禎之, K. Ozato, 鈴木和男, 大野尚仁, IRF-8 欠損マウスにおける CAWS 血管炎の解析, 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 2006
- (9) 三浦典子, 安達禎之, 大原関利章, 高橋 啓, 大川原明子, 鈴木和男, 大野尚仁, CAWS 血管炎の発症と重篤化に関わる遺伝的素因の各種マウス系統を用いた解析, 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 2006
- (10) 駒井元彦, 鈴木和男, 大野尚仁, 安達禎之, 三浦典子, CBA/J, CBA/N マウスにおける CAWS 血管炎誘発活性の検討, 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 2006
- (12) 三浦典子, 安達禎之, 大野尚仁, 遺伝的素因の異なるマウスを用いた CAWS 血管炎の検討, 第 80 回 日本細菌学会総会, 大阪, 2007
- (13) 駒井元彦, 高野雄介, 三浦典子, 安達禎之, 大野尚仁, CAWS 血管炎への Bruton's tyrosine kinase の関与に関する検討, 第 80 回 日本細菌学会総会, 大阪, 2007
- (14) 多田聖, 三浦典子, 安達禎之, 大野尚仁, 培養環境変化による病原性真菌 *Candida albicans* 細胞壁多糖の血管炎形成および急性致死活性への影響, 第 27 回日本糖質学会年会, 福岡, 2007
- (15) 高野雄介, 駒井元彦, 新井美紀, 三浦典子, 安達禎之, 大野尚仁, Bruton's tyrosine kinase 欠損マウスにおける CAWS 血管炎感受性の検討, 第 77 回東京医科大学・東京薬科大学・免疫アレルギー研究会, 東京, 2007
- (16) 高野雄介, 新井美紀, 三浦典子, 安達禎之, 鈴木和男, 大野尚仁, *Candida* spp. 由来水溶性画分の調製と免疫毒性の検討, 第 13 回 MPO 研究会, 広島, 2007
- (17) 三浦典子, 安達禎之, 大野尚仁, CAWS 血管炎惹起の分子メカニズム, 第 51 回日本医真菌学会総会, 岐阜, 2007
- (18) 三浦典子, 駒井元彦, 高野雄介, 安達禎之, 鈴木和男, 大野尚仁, CAWS 血管炎発症制御機構の検討, 第 37 回日本免疫学会総会, 東京, 2007
- (19) 高野雄介, 河内美徳, 三浦典子, 安達禎之, 塙晴雄, 相澤義房, 鈴木和男, 大野尚仁, IL-10 遺伝子導入による CAWS 血管炎の治療, 第 14 回 MPO 研究会, 東京, 2008
- (20) 石橋健一, 三浦典子, 安達禎之, 大野尚仁, *Candida* 細胞壁多糖活性化ヒト白血球における遺伝子発現解析, 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 2008
- (21) 高野雄介, 三浦典子, 安達禎之, 塙晴雄, 相

澤義房, 鈴木和男, 大野尚仁, CAWS 血管炎に対する IL-10 の影響, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学大会合同大会, 神戸, 2008

(22) 山本 歩, 三浦維子, 三浦典子, 石橋健一, 安達禎之, 大野尚仁, 免疫グロブリン製剤による PBMC からのサイトカイン産生の解析, 第 80 回東京医科大学・東京薬科大学・免疫アレルギー研究会, 東京, 2008

(23) 山本 歩, 三浦 維子, 三浦 典子, 石橋健一, 安達禎之, 長尾朋和, 別府正敏, 鈴木和男, 大野尚仁, 固相化免疫グロブリン製剤による PBMC からのサイトカイン産生の解析, 日本薬学会第 129 年会, 京都, 2009

(24) 三浦典子, 駒井元彦, 高野雄介, 三川浩輝, 安達禎之, 亀岡洋祐, 鈴木和男, 大野尚仁, CAWS 血管炎発症制御因子の検討, 日本薬学会第 129 年会, 京都, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし