

図1 抗M3R25抗体はSS特異的抗体

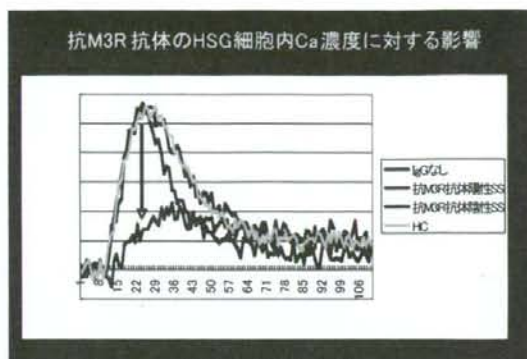


図4 抗M3R25抗体は機能的な抗体

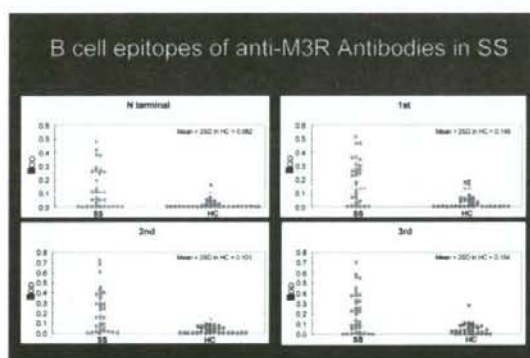


図2 抗M3R抗体のB細胞エピトープ解析

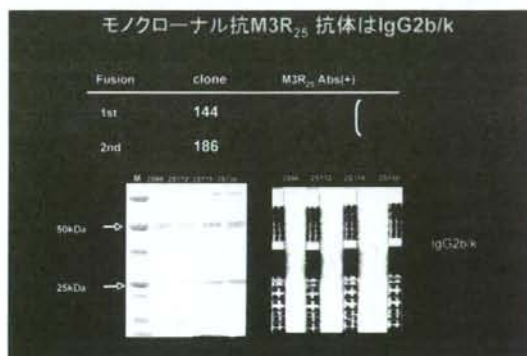


図5 4つのモノクローナル抗M3R25抗体はIgG2b/kである

Epitopes of Anti-M3R Antibodies and Pathology of Salivary Glands

N	1st	2nd	3rd	Cases (N=25)	Greenspan Grading				Not done
					1	2	3	4	
+	-	-	-	2 cases			1 case		1 case
-	+	-	-	1 case				1 case	
-	-	+	-	1 case			1 case		
-	-	-	+	1 case					1 case
+	+	+	-	1 case	1 case				
-	+	+	-	2 cases			1 case		1 case
-	-	+	+	1 case					1 case
+	-	+	+	1 case			1 case		
+	+	+	+	1 case					1 case
+	+	+	+	14 cases	1 case	9 cases	1 case	1 case	3 cases
Total					0 case	2 cases	13 cases	1 case	9 cases

図3 SS患者における多彩なM3R上のB細胞エピトープ

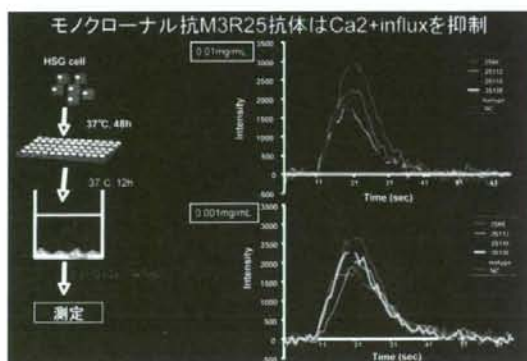


図6 モノクローナル抗M3R25抗体は唾液腺上皮細胞のCa<sup>2+</sup>influxを抑制する

リウマチ性疾患に伴う腎障害に於けるポドサイトの関与の検討

研究分担者 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 梶山 浩 埼玉医科大学 リウマチ膠原病科 医員

研究要旨 全身性エリテマトーデス(SLE)、顕微鏡的多発血管炎(MPA)等のリウマチ性疾患は、腎炎を高頻度に発症し、ステロイドや免疫抑制剤による治療で免疫異常の改善が見られても、腎機能低下、末期腎不全への進行を阻止出来ないことが少なくない。近年、糖尿病性腎症、IgA腎症や高血圧性腎症において、腎糸球体上皮細胞であるポドサイトの機能障害や細胞死、および尿中への脱落によって糸球体硬化症、末期腎不全を引き起こす事が明らかになった。しかし、上記リウマチ性疾患に於ける腎障害でのポドサイトの役割は不明である。これを明らかにするため、ポドサイト研究ツールとして、温度感受性安定化ポドサイト株および腎障害関連ポドサイト株を樹立した。また尿中ポドサイト数と臨床病態に関して予備実験を行い若干の結果を得た。更にそれらを用いたリウマチ性疾患でのポドサイト障害の機序およびその結果としての腎障害進展の病態を基礎的および臨床的解明を進めている。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス(SLE)、顕微鏡的多発血管炎(MPA)等のリウマチ性疾患は、腎炎を高頻度に発症し、ステロイドや免疫抑制剤による治療で免疫異常の改善が見られても、少なからず腎機能低下、末期腎不全へと進行する。腎糸球体上皮細胞であるポドサイトは、その機能障害が病的蛋白尿の原因となり、更なる障害により細胞死、また、尿中へ脱落する事で、糸球体あたりの総数が減り(podocytopenia)、糸球体硬化症、末期腎不全を引き起こす事が近年、糖尿病性腎症、IgA腎症や高血圧性腎症で明らかになった。しかし、上記リウマチ性疾患に於ける腎障害でのポドサイトの役割は不明である。研究分担者は、尿沈渣中に出現する細胞からポドサイト特異的mRNAを検出しポドサイト傷害のマーカーになり得ることを報告した(Kubo K, et al. Eur J Clin Invest 1999)。本研究においては、不明な点の多いポドサイトの機能と性質を検討するとともに、主に免疫学的傷害によって惹起されるリウマチ性疾患に伴う進行性腎機能障害におけるポドサイトの病態への関与とその機序を明らかにするため、基礎的側面と臨床的側面から検討を行う。

B. 研究方法

1) 基礎的研究-ポドサイト機能解析を可能にする細胞株の樹立: 温度感受性変異SV40T(tsA58)が導入されたImmortomouse (Jat et al. PNAS 1991) (I<sup>+/+</sup> mouse) と、Podocin-rtTAを導入したA<sup>+/+</sup>

mouseを掛け合わせて得られたA<sup>+/+</sup>I<sup>+/+</sup> mouse (Shigehara et al. JASN 2003)から、ポドサイトを分離(AI podocyte)。そこへ更に tetracycline response element (TRE)-EGFP/luciferaseを導入した安定株を作成、その機能を解析した。更に、HIV関連腎症の原因分子のひとつで、細胞毒性を持つVprをこの細胞に組み込み(AIVG podocyte)、分化状態でのポドサイトへの影響を解析した。

2) 臨床研究-尿中へのポドサイトの喪失と腎機能低下との関連を調べるため、近年報告されている尿中ポドサイト数(尿中ポドカリクシン陽性細胞)の測定(Hara et al., Am J Nephrol 1998, CJASN 2008)を、患者個人情報の保護に留意しながら、各種リウマチ性疾患で測定した。

C. 研究結果

1) 基礎的研究-まず、上記培養ポドサイトにおいて、温度依存性の増殖制御、また、EGFP、luciferaseのDOX処理による濃度/時間依存性の発現制御を検討した。6-well plateに撒いた細胞をトリプシン処理後、直接wellあたりの総細胞数を測定し比較した結果、33℃では増殖を続け、37℃では増殖をとめ、ポドシン、シナプトポジン等の分化マーカーを発現した。また、DOX濃度(0-3 μg/mL)、時間(0-96時間)依存性に、luciferaseの発現誘導が起こる事を確認した。(Kajiyama et al., Am J Nephrol 2008)。更に、AIVG podocyteにおいて、DOX濃度/時間依存性に、caspase活性化を伴う細胞



死の誘導、In vivo podocyte damageに見られるようなポドサイト分化マーカーの発現低下が起こることを見いだした (Kajiyama et al. abstract The Annual Meeting of the American Society of Nephrology 2008, Philadelphia)。

2) 臨床的研究-preliminary studyにおいて、活動性ループス腎炎1例、活動性顕微鏡的多発血管炎2例、全身性強皮症に軽度活動性ループス腎炎の合併が疑われた1例、非活動性ループス腎炎1例、全身性強皮症腎クリーゼ1例において尿中ポドサイト(ポドカリクシン陽性)細胞測定を行った。非活動性ループス腎炎と全身性強皮症腎クリーゼ症例では尿中ポドサイトは検出されなかった。その他の症例では、全例で、0.2-0.8 cell/mLの頻度で尿中ポドサイトが検出された。その他の尿検査、血液検査の結果との関連では、まだ症例数が少なく有意差は無いものの、糸球体病変時に出現する尿中変形赤血球が、尿中ポドサイト陰性例では認められず、尿中ポドサイト陽性例では4例中3例に認められ、糸球体病変の存在と尿中ポドサイト陽性が関連する可能性が示唆された。一方、尿タンパク/クレアチニン比や尿中顆粒円柱、また、年齢、性別、血清クレアチニン値を用いて、日本人向けMDRD式により推定したGFRとの関連は少ない傾向にあった。

#### D. 考察

1) 基礎的研究-tet-on systemを組み込んだ、新しいmouse podocyte cell lineを樹立した。その有用性を、ドキシサイクリン添加時のみに、Vprの発現が分化状態のポドサイトに起こり、細胞死が引き起こされる事で確認した。今後このin vitroポドサイト培養システムを用いて、リウマチ性疾患に於けるポドサイト障害の機序を明らかにする為に、TNF $\alpha$ 、IL17、IL12等のサイトカインによる刺激実験や、Th17、Treg、dendritic cells等との共培養実験を行うとともに、target moleculesをAI podocyteに導入し、DOXにてその発現を誘導し、病態への関与を検討する。更に発展的なプロジェクトとして、AI podocyte、AIVG podocyteを用いた、cell-based assayにより、ポドサイト保護活性のある化合物の探索を行う。

2) 臨床的研究-尿中ポドサイト数の測定では、糸球体糸球体壁局所で脱落せずに起こるポドサイトの細胞死は検出できないが、上記preliminary studyにおいて、活動性糸球体病変の存在する症例で、尿中にポドサイトが検出される事が確認できた。従って、

非免疫学的腎障害時に惹起されるとされるポドサイトの尿中への脱落が、リウマチ性疾患に於ける腎障害においても起こっていると推定された。尿中ポドサイトを複数回測定する事で、腎糸球体におけるpodocytopeniaの程度を推定する事が出来る可能性があり、尿中ポドサイト数は良好に活動性糸球体病変と関連しうると予想される。以上のことより、多症例、長期間の本研究のプロトコルを立案し、現在進めている。

今後、本研究を進めることで、リウマチ性疾患での腎機能低下とpodocytopeniaとの関連をより明らかにし、以前我々が報告した(Kanda H, Lupus. 2005)、ポドサイト保護活性を持つARB等の薬剤の、リウマチ性疾患での長期腎機能予後改善効果の研究に繋げたい。また、ゲノムサンプルを可能な限り収集し、将来的には、podocytopeniaに関連する遺伝子群の探索を行い、治療前に、患者個人の腎機能悪化に対する危険度を予見しつつ治療方針を決定するpersonalized medicineを行っていきたいと考えている。

#### E. 結論

ポドサイト研究ツールとしてtet-on mouse podocyte cell lineを樹立し、その有用性を確認した。また、尿中ポドサイト(ポドカリクシン陽性細胞)が、リウマチ性疾患に伴う糸球体病変時に検出される事を確認し、更に長期に多症例で検討する本研究を開始した。

#### F. 健康危機情報

特に無し。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yokota K, Akiyama Y, Asanuma Y, Miyoshi F, Sato K, Mimura T. Efficacy of tacrolimus in infliximab-refractory progressive rheumatoid arthritis. Rheumatol Int. Rheumatol Int. 29:459-61, 2009.
- 2) Kajiyama H, Titus S, Austin CP, Chiotos K, Matsumoto T, Sakairi T, Kopp JB. Tetracycline-Inducible Gene Expression in Conditionally Immortalized Mouse Podocytes. Am J Nephrol. 28:29:153-163, 2008.

- 3) Kopp JB, Smith MW, Nelson GW, Johnson RC, Freedman BI, Bowden DW, Oleksyk T, McKenzie LM, Kajiyama H, Ahuja TS, Berns JS, Briggs W, Cho ME, Dart RA, Kimmel PL, Korbet SM, Michel DM, Mokrzycki MH, Schelling JR, Simon E, Trachtman H, Vlahov D, Winkler CA. MYH9 is a major-effect risk gene for focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet.*;40:1175-84, 2008.
- 4) Yokota K, Akiyama Y, Sato K, Shindo Y, Yoshida Y, Miyoshi F, Akiba H, Nakajima K, Asanuma Y, Mimura T. Vasculo-Behçet's disease with non-traumatic subcapsular hematoma of the kidney and aneurysmal dilatations of the celiac and superior mesenteric arteries. : *Mod Rheumatol.* 18:615-8, 2008.
- 5) Yokota, K., Miyoshi, F., Miyazaki, T., Sato, K., Yoshida, Y., Asanuma, Y., Akiyama, Y., and Mimura, T.: High Concentration Simvastatin Induces Apoptosis in Fibroblast-Like Synoviocytes from Patients with Rheumatoid Arthritis. *J. Rheumatol.* 35: 193-200, 2008.
- profile before and after administration of infliximab. Annual European Congress of Rheumatology, Paris, 2008
- 4) Asanuma Y, Sato K, Yokota K, Shindo Y, Yoshida Y, Akiba A, Nakajima K, Akiyama Y, Mimura T. Increased Concentration of Pentraxin 3 in patients with systemic lupus erythematosus: Relationship to disease activity. 72<sup>nd</sup> Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, San Francisco, 2008
- 5) Kajiyama H, Sakairi T, Kopp J. HIV-1 Vpr expression induces apoptosis in mouse podocytes via Caspase 3. 41<sup>st</sup> Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2008

#### H. 知的財産権の出願登録状況

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

## 2. 学会発表

- 1) Sato K, Miyoshi F, Aburatani H, Mimura T. Transcriptome analysis during Th1/2/17 differentiation with an aim to understand the Th17 differentiation transcription factor network. Annual European Congress of Rheumatology, Paris, 2008
- 2) Yokota K, Ishibashi T, Asanuma Y, Shindo Y, Yoshida Y, Akiba A, Nakajima K, Sato K, Akiyama Y, Mimura T. Simvastatin inhibits production of pentraxin 3 and monocyte chemoattractant protein-1 in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. Annual European Congress of Rheumatology, Paris, 2008
- 3) Miyoshi F, Sato K, Mimura T. A novel approach to the classification of collagen diseases utilizing Th1/Th2/Th17 cytokine profile in the peripheral blood mononuclear cells and analysis of the



SLE 難治性病態に対する新規治療法の臨床開発・評価に関する研究  
—TCR ゼータ鎖発現低下に影響を及ぼす 3'-UTR 領域の解析と薬剤による発現修飾—

研究分担者：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

研究協力者：津坂 憲政\*、鈴木 勝也\*\*、近藤 恒夫\*\*

\* 埼玉医科大学総合医療センター リウマチ・膠原病内科 講師

埼玉医科大学ゲノム医学研究センター

\*\*同リウマチ・膠原病内科 助教

研究要旨 SLE 患者 T 細胞で観察される TCR ゼータ鎖の発現低下の分子機序を明らかにするため、TCR ゼータ鎖 mRNA 安定性に関与している 3'非翻訳領域に着目し、ゼータ鎖蛋白発現調節に関与する部位の解析を試みた。その結果、種で保存された CS-1、CS-2 の 2 領域が主要な調節部位であることが明らかとなった。同時に、低下した TCR ゼータ鎖を回復させる可能性のある薬剤を検索したところ、カルシニューリン阻害薬によってゼータ鎖発現が修飾される例があることが判明した。

#### A. 研究目的：

SLE の病態には T 細胞機能異常が関与し、その分子機序としてゼータ鎖発現低下を報告してきた。最近、T 細胞近位部のシグナル伝達分子の機能喪失変異が関節炎自然発症モデルの原因とされ、さらには機能喪失変異導入によって自己免疫病が発症することが示され、我々が報告してきた異常が単なる現象論に留まらない事が確認された。ヒト SLE で観察される T 細胞機能異常は、これらモデルとは異なり、2 種類のスプライス・ヴァリエントが観察される。特に、short 3'-UTR 型のヴァリエントでは、mRNA 安定性が低下してゼータ蛋白発現の低下を来すが、3'-UTR 領域のどの部位が安定性に寄与しているか不明であった。本研究では、これを明らかにする事を目的とする。また、最近、発現低下したゼータ鎖が、薬剤によって修飾される症例が存在する可能性が浮上してきた。今回、カルシニューリン阻害薬に着目し、in vivo の TCR ゼータ鎖発現に及ぼす影響を、同時に検証する。

#### B. 研究方法

- 1) 患者：全身性エリテマトーデスを対象。
- 2) 3'-UTR 部位特異的欠失変異細胞株：野生型 3'-UTR を有する TCR ゼータ鎖を 3'側より 100bp 程度短い 7 変異株を作成。同時に、保存領域 CS-1 および CS-2 を欠失させた変異株を作成。SLE 患

者から樹立された short-3'-UTR とともに、ゼータ欠損マウス T 細胞ハイブリドーマ 2B4 にトランスフェクとして、そのゼータ鎖発現、サイトカイン産生能などを検討。

3) In vivo 免疫学的解析：カルシニューリン阻害薬としてシクロスポリン A、タクロリムスが投与される直前、そして投与後の患者末梢血を対象として、FACS 免疫プロットによって蛋白発現を検討。

4) 臨床的検討：投与前、投与後の臨床的活動性を評価し、同時に、薬物血中濃度を測定。

#### C. 研究結果

1) ゼータ鎖蛋白発現に影響を及ぼす 3'非翻訳領域 (3'-UTR)：3'UTR の欠失変異株 7 クローンでの解析から、+871~+950 および +950~+1070 の領域でゼータ蛋白発現の低下が見られ、この間に蛋白発現に関与する重要な領域が存在する可能性が考えられた (図 1)。この領域は、種で保存された CS-1、CS-2 に相当している事から、CS-1、CS-2 の欠失変異株を作成して、これを検証した。その結果、CS-1、CS-2 共に、ゼータ蛋白発現が著明に低下し、この 2 領域が中心的な役割を担っている事が判明した。この 2 つの欠失変異株のゼータ鎖 mRNA 安定性は低下し、IL-2 産生能も低下する事から、CS-1、CS-2 は mRNA 安定性を介してゼー

タ鎖蛋白発現を制御する重要な領域である事が明らかとなった。

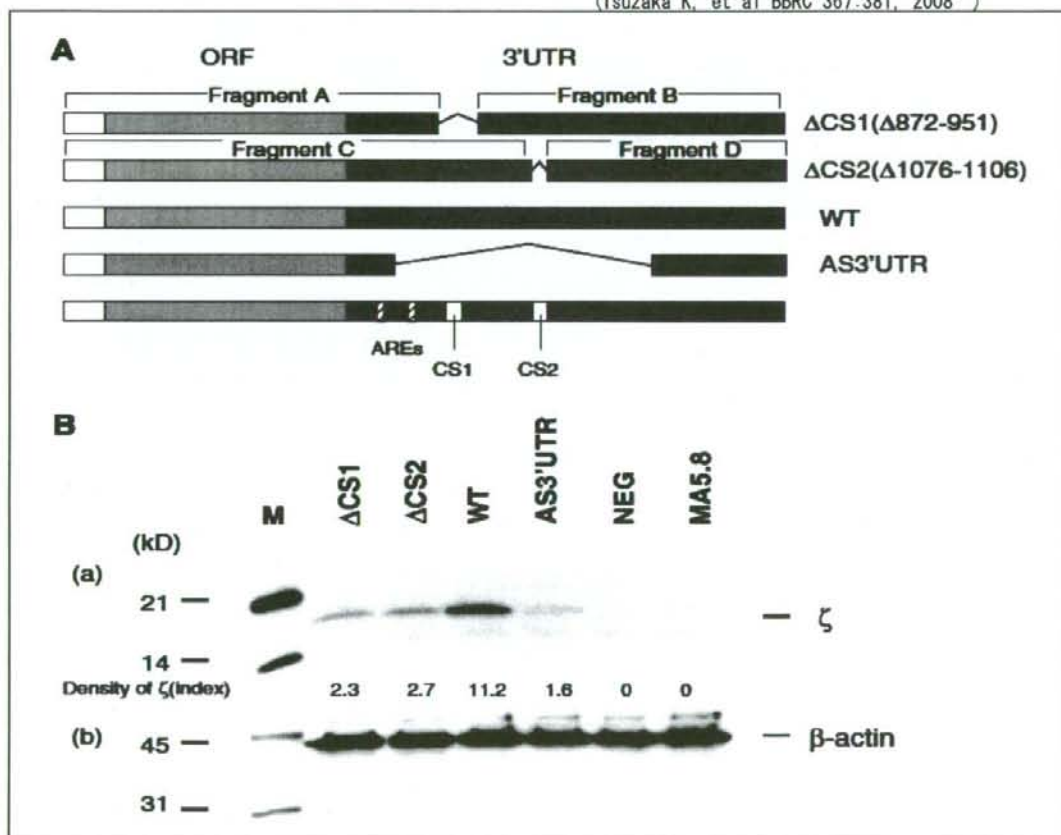
2) TCR ゼータ鎖の発現が低下した SLE 患者における治療後の変化：シクロスポリン A、タクロリムスが投与された症例の投与前末梢血 T 細胞では、健常人コントロールに比して有意な TCR ゼータ鎖発現低下が認められ、以前からの報告が再度、確認された。投与、4-12 週間後の末梢血 T 細胞では、一部の症例で低下していたゼータ発現が回復していた。この発現回復は、一部の細胞サブセットのみならず T 細胞全体として観察された。以上より、カルシニューリン阻害薬は、一部の SLE 症例の高度に発現低下した TCR ゼータ鎖の蛋白発現を正常化させる作用を有する事が明らかとなった。

#### D. 考察と結論

TCR ゼータ鎖蛋白の発現低下に関わる mRNA の不安定性の分子機序を解析し、安定性制御に重要な CS-1、CS-2 領域を明らかにした。今後、この領域が、蛋白結合などの修飾を受けて機能している可能性、また患者におけるその制御機構の異常などに関して検討する必要がある。一方、シクロスポリン A およびタクロリムス D. 考察と結論：TCR ゼータ鎖蛋白の発現低下に関わる mRNA の不安定性の分子機序を解析し、安定性制御に重要な CS-1、CS-2 領域を明らかにした。今後、この領域が、蛋白結合などの修飾をの両者において高度に発現低下した TCR ゼータ鎖の蛋白発現回復が、実際の患者末梢血 T 細胞で観察された。この結果は、それぞれに特有の結合蛋白あるいは、複

図 1 TCR ゼータ鎖 3' -UTR の欠失変異株と、そのゼータ鎖発現

(Tsuizaka K, et al BBRC 367:381, 2008')



合体による作用よりも、両者に共通したカルシニユーリン阻害を介した機構をより強く想定させる。その分子機構を追求することによって、新たな治療標的を見いだせる可能性がある。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Suzuki K, Kameda H, Kondo K, Tanaka Y, and Takeuchi T. Sever acute thrombotic exacerbation in two cases with of anti-phospholipid syndrome after retreatment with rituximab in phase I/II clinical trial for refractory systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 48:198-199,2009.
2. Tsuzaka K, Itami Y, Kumazawa C, Suzuki M, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, and Takeuchi T. The conservative sequences in 3'UTR of TCR $\zeta$  mRNA regulate the production of TCR $\zeta$  and TCR/CD3 complex in SLE T cells. *Biochemical Biophysical Research Communications* 367: 311-317, 2008.
3. Suzuki K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T: Effect of Interleukin 2 on synthesis of B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family (BAFF) in human peripheral blood mononuclear cells, *Cytokine*, 44:44-8, 2008.

##### 2. 学会発表

1. Y. Tanaka, K. Yamamoto, T. Takeuchi, N. Nishimoto, N. Miyasaka, T. Sumida, T. Sawada, H. Kohsaka, I. Matsumoto, K. Saito, T. Koike. A 2 year-extended follow-up of the phase I/II trial of Rituximab for treatment of refractory systemic lupus erythematosus. 9th annual meeting for European League Against Rheumatism, 2008.
2. K. Yoshimoto, C. Kumazawa, K. Tsuzaka, T. Abe,

T. Takeuchi. The expression of an integrin  $\alpha\text{E}\beta 7$  may induce abnormal T cell activation. 9th annual meeting for European League Against Rheumatism, 2008

3. Tsutomu Takeuchi. Tacrolimus in lupus nephritis. Hong Kong Society for Nephrology. Special lecture, 2008
4. Katsuya Suzuki, Yumiko Setoyama, Miyuki Suzuki, Keiko Yoshimoto, Hideto Kameda, Kensei Tsuzaka, Koichi Amano, Tsutomu Takeuchi. Tacrolimus has pleiotropic molecular effects on human regulatory T cells. 72th Annual Meeting of American College of Rheumatology, 2008.
5. Keiko Yoshimoto, Maiko Tanaka, Sayaka Komatsu, Yumiko Setoyama, Katsuya Suuzuki, Kensei Tsuzaka, Tohru Abe, Tsutomu Takeuchi. A regulatory mechanism of the productions of BAFF and IL-4 may be impaired in monocytes of the patients with Sjogren's syndrome. 72th Annual Meeting of American College of Rheumatology, 2008
6. Suzuki K, Setoyama Y, Suzuki M, Yoshimoto K, Kameda H, Tsuzaka K, Amano K, Takeuchi T: Molecular Effects to Human Regulatory T cells by Treatment with T Cell Activation Inhibitor and TNF Blockade: The American Association of Immunologist 95<sup>th</sup> annual meeting: APR 8.2008, San Diego, USA, Poster presentation.
7. Yoshimoto K, Takahashi Y, Setoyama Y, Suzuki K, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T: Possible mechanism of shedding of BAFF: The American Association of Immunologist 95<sup>th</sup> annual meeting: APR 5.2008, San Diego, USA, Oral presentation.
8. Yoshimoto K, Tanaka M, Setoyama Y, Suzuki K, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T: Impaired regulation of BAFF production in monocytes of patients with Sjogren's syndrome: The American Association of Immunologist 95<sup>th</sup> annual meeting: APR 6.2008,



San Diego, USA, Poster presentation.

9. Suzuki K, Amano K, Kameda H, Sekiguchi N, Abe H, Nagasawa H, Takei H, Nishi E, Okuyama A, Tsuzaka K, Takeuchi T: Risk factors and therapeutic outcome of aspergillosis in patients with collagen vascular diseases. The EULAR annual congress of rheumatology. June. 2008, Paris, France, Abstract presentation.
  10. Suzuki K, Setoyama Y, Suzuki M, Yoshimoto K, Kameda H, Tsuzaka K, Amano K, and Takeuchi T: Regulatory T cells and FOXP3 isoform expression in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. The EULAR annual congress of rheumatology. June. 2008, Paris, France, Abstract presentation.
  11. Nish E, Suzuki K, Kameda H, Okuyama A, Sekiguchi N, Takei H, Nagasawa H, Abe H, Tsuzaka K, Amano K, Takeuchi T: Familial aggregation survey for autoimmune diseases in one thousand Japanese collagen vascular disease patients s. The EULAR annual congress of rheumatology. June. 2008, Paris, France, Abstract presentation.
  12. Tsuzaka K, Itami Y, Kumazawa C, Tanak M, Setoyama Y, Yoshimoto K, Suzuki K, Abe T, Takeuchi T: 14-kD Protein binds to the conservative region in TCR zeta mRNA 3'UTR and regulates the production of TCR zeta and TCR/CD3 complex. The EULAR annual congress of rheumatology. June. 2008, Paris, France, Abstract presentation.
  13. Yoshimoto K, Tanaka M, Komatsu S, Setoyama Y, Suzuki K, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T : Regulatory mechanism of BAFF expression in monocytes of patients with Sjogren syndrome The EULAR annual congress of rheumatology. June. 2008, Paris, France, Abstract presentation.
  14. Kondoh T, Suzuki K, Kameda H, Nagasawa H, Nishimura K, Kurasawa T, Okuyama A, Nishi E, Sekiguchi N, Takei H, Abe H, Tsuzaka K, Amano K, Takeuchi T: Safety and efficacy of oral pulse cyclophosphamide (OPCY) for systemic rheumatic diseases. APLAR, Sep 26, 2008, Poster presentation
  15. Suzuki K, Setoyama Y, Suzuki M, Yoshimoto K, Kameda H, Tsuzaka K, Amano K, Takeuchi T: Tacrolimus has Pleiotropic Molecular Effects on Human Regulatory T Cells, Oct 28, 2008 San Francisco, Poster presentation,
  16. Yoshimoto K, Tanaka M, Komatsu S, Setoyama Y, Suzuki K, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T: A Regulatory Mechanism of The Production of BAFF and IL-6 May Be Impaired in Monocytes of The Patients with Sjögren's Syndrome, , Oct 29, 2008 San Francisco, Oral presentation,
- 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



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
研究分担報告書

ループス腎炎の治療標準化に関する研究：治療効果の新規評価法

研究分担者 三森 明夫 国立国際医療センター膠原病科第一病棟 部長

研究協力者 高橋 裕子 同上 臨床指導医

**研究要旨** これまでに調査した自施設・患者団体・班10施設のループス腎炎（計380人）について、予後パラメータを探索し、「初期発症腎炎」の予後良好、「遅発腎炎」の予後不良を見出したが、治療薬の効果は分析していなかった。今回、シクロホスファミド反復静注（IVCY）の有効性を、これらの調査集団で改めて検討した。有効性は、最終観察時の不可逆腎障害者の比率で判定した。初期発症腎炎では、IV型においても、ステロイド治療のみの群で予後良好であり、IVCY併用群と差がなかった。遅発腎炎群では、IVCY併用群がステロイド単独群に比べ、有意に予後良好であった。しかもIVCY併用例の殆どが、再発を反復した後の再発治療であったが、治療に反応していた。有意差は、症例数が少なかつたにも関わらず得られた。したがって、治療法の効果判定に際しては、従来行われている腎病理の分類だけでなく、「初期発症腎炎」「遅発腎炎」を区分し、同一区分の中で比較評価することが、有意義な方法であると考えられた。

A. 研究目的

SLEの治療方針は統一化されていないため、調査研究によって合理的な方針を求める。

**背景、SLE治療の現状**：予後上最も重要なループス腎炎に対し、シクロホスファミドの適応、適正ステロイド用量、腎生検の予測値が不明確である。

B. 研究方法

これまでに調査した自施設・患者団体・班10施設のループス腎炎（計380人）について、予後パラメータを探索し、「初期発症腎炎」の予後良好、「遅発腎炎」の予後不良を見出したが、治療薬の効果は分析しなかった。今回、シクロホスファミド反復静注（IVCY）の有効性を検討した。

I) 班10施設では、腎炎の初回治療でIVCYが併用された例が多かったため、初回IVCY治療の長期予後成績を「初期発症腎炎」「遅発腎炎」それぞれでステロイド単独治療（一部の症例にタクロリムス、シクロスポリン、ミゾリピン併用あり）と比較した。

II) 自施設病歴および患者団体集計では、IVCY併用は初期発症腎炎での使用例が稀で、おもに遅発腎炎に使われ、しかも初回治療でなく、再燃を反復した状況での使用がほとんどであった。その理由は、これらの集団ではIVCY使用が近年になって行われ、初期発症腎炎の初回治療という比較的古い時期には使用されていないためである。

そこで重症腎炎に対し、IVCY併用がステロイド単独に優れたかどうか、下記の症例群を選定し比較し

た：

「遅発腎炎」かつ「ネフローゼ、RPGN、腎組織III、IV、Vのいずれか」を呈したものとし、さらに「治療介入されないまま腎障害が固定した例を除外」した。48例がこれに該当した。

（倫理的配慮）

患者アンケート調査、他施設情報収集の方法が、自施設倫理審査会で承認された、後ろ向き調査研究である。

C. 研究結果

I) ループス腎炎の初回治療において、IVCYが使用されたのは、殆どがIV型症例であった。

最終観察時に不可逆腎障害（慢性腎不全または持続ネフローゼ）に至った率は；

「初期発症腎炎」IV型において、

IVCYなし群 4/29 (14%)、IVCY併用群 3/18 (17%)と同程度であり、IVCY併用の利点が見出せなかった。

「遅発腎炎」では、IV型において、

IVCYなし群 5/7 (71%)、IVCY併用群 1/4 (25%)

( $p=0.18$ )、腎組織・生検有無によらない集計で、IVCYなし群 10/25 (40%)、IVCY併用群 1/11 (9%)

( $p=0.06$ )であり、有意差はないが、IVCY併用群で低い傾向がみられた。

II) 自施設病歴および患者団体集計の、「遅発腎炎」かつ「ネフローゼ、RPGN、腎組織III、IV、Vのいずれか」が治療された群で、不可逆腎障害に至った率は、

IVCYなし群 21/37 (58%)、IVCY併用群 2/11 (18%)

( $p=0.023$ )と、IVCY併用群で有意に低かった。

IVCY なし群のうち、寛解または軽度尿蛋白を示した群では、経過中の腎炎再発が、患者の4/16 (25%; 平均観察期間 21.8±8.5年) にみられ、不可逆腎障害に至った群では19/21 (90%; 平均観察期間 24.5±9.4年) にみられた、という当然予想される差を示した。両群の平均観察期間に差はなく、不可逆腎障害に至った時期は、最終観察時よりも平均9.8±6.8年前(すなわちSLE発症から平均14.7年後)であった。

IVCY は、前述のようにほとんどが再発を回復した後の最終腎炎再発時に併用されていたが、改善群において、IVCY 使用から最終観察時まで1~7年(平均3.8±1.9年)の時点で、腎寛解4例+軽度尿蛋白5例、改善比率9/11 (82%)と良好な成績が示唆された。

IVCY 併用群の(SLE発症から測った)観察平均期間は16.5±8.0年であり、併用なし群の23.3±9.0年より短かったが、これはIVCY 使用例が近年増したためである。IVCY なし群で、不可逆腎障害に至るまでの平均期間が、上記14.7年であったことと比べると、IVCY 併用群に不可逆腎障害が少なかった理由が、観察期間の短さのためではないことも示唆される。

#### D. 考察

本調査は、IVCY 併用効果を、腎炎初発および様々な回数の再発前歴を含む不均一な症例群において、後ろ向きに調べた、という極めて限定された条件での予備的なものであるが、「初期発症腎炎」「遅発腎炎」を区分して検討した結果、新たな知見が得られた。本調査の前提を下記に要約する。

今回の調査の前提となったこれまでの研究(本研究班17~19年度総合報告書; 自施設+患者団体+班10施設の結果、およびG項の論文1; 自施設+患者団体の結果) :

過去3年間に班多施設を含む380例を調査し、ループス腎炎がSLE発症時に存在した「初期発症腎炎」であるか、一旦軽快したSLEの再発時に初めてループス腎炎を生じた「遅発腎炎」であるかの違いが、ループス腎炎の予後を強く規定する、すなわち下記のことを明らかにし、レプリケーション調査を2度行なって再確認した。

- 1) 「初期発症腎炎」は、初回治療での寛解率が高く、
- 2) 再発時にも再び治療反応率がよく、
- 3) IV型でも平均予後が良好だった。
- 4) 不可逆腎障害に至った率は、初期発症腎炎6~8%、遅発腎炎27~51%、という著しい差が示された。(なお、遅発腎炎で27%と相対的に低い値を示した調査集団では、腎炎初回治療におけるIVCY 併用例が相対的に多かった)

したがって、ある治療薬の効果を判定しようとする場合、「IV型」という病理区分を均一な病態とみなさず、初期発症腎炎か遅発腎炎かで異なると考えねばならない。この腎炎区分のそれぞれで、腎炎初発時のIV型の頻度に差はなく、ともにIVc低頻度、IVd無し、という調査結果であった。再生検された例で硬化性病変の頻度は、遅発腎炎の再発時IVc 3/9、IVd 4/9。初期発症腎炎では、再発時IVc 2/4、IVd 0/4、IVc 2例は腎不全に至らなかった。

さらに「再燃」治療と「初回」治療に関しても、通常予想と異なり、遅発型の初回治療成績は、初期発症型の再燃治療成績よりも悪いことも明らかになった。

両群において、平均ステロイド用量、ステロイドパルス併用例の比率に有意な差はなかった。

従来の文献で、IV型ループス腎炎に対する、シクロホスファミド反復静注(IVCY)の有効性が確立した根拠は、ステロイド単独治療では腎不全が高率だが、IVCY 併用によって腎不全率を減らせる、ということであった。しかし現在までのところ、IVCY を含むどの治療試験でも、ループス腎炎の発症時期は考慮されず、病理型分類のみに注目されてきた。諸報告の患者背景をみると、SLE発症と腎炎発症の時間間隔は幅広く、初期発症型と遅発型が混合されていると考えられる。さらに殆どの場合、初回治療か再発時治療かの区別も明示されていないのが、ループス腎炎治療の文献の現状である。

#### 今回得られたIVCY 併用の適応に関する知見

1) 初期発症腎炎は、IV型でも予後がよく、IVCY 併用あり・無しで長期予後の差は無かった。これまでの調査でステロイド単独治療での寛解例が十分に多いので、今後症例数を増やして検討しても、併用あり・無しの間で有意差は出ないと予想される。

ただしRPGN例については、症例数が少なく検討できず、IVCY 併用に利点がある可能性が残る。これまでの調査の一集団; 初期発症腎炎90例で、腎不全に至った6例中、RPGNで初発しステロイド治療に十分な反応がなく、以後の治療介入がなかった例が3例あった。したがって、RPGN例には、臨床実地上IVCY 併用が望ましく、比較検討する対象病態ではないと思われる。

逆に、現行治療よりも弱い治療プロトコールでも効果は十分得られるかもしれない、ということを検討するには、「初期発症腎炎」群が適切な対象であると示唆される。

2) 遅発腎炎の予後不良は、これまでの本調査で確



認されていたが、今回その中でとくに重症の群（ネフローゼ、RPGN、または IV、V 型）において、IVCY 併用あり群が、無し群より有意に予後がよいことが示された。IVCY 併用例のほとんどが、再発反復後の再発例だったにも関わらず、予後が良かったことが注目された。

少ない症例数で有意差が出たことは、IVCY 併用など治療強化プロトコルの効果を判定する場合に、「遅発腎炎の中の重症腎炎群」を対象として検討するのが適切であることを示唆する。

#### 本調査研究班で実行しうる今後の研究

SLE では、ループス腎炎対策が大きな課題である。しかし病態が細分類される不均一な疾患である上に、諸施設ですでに経験的に確立された治療方針について、改めて対照をおいて比較検討することは実際的でない。これらの難問を解決するために、次のような方法が考えられる。

どの病態にどの治療法が適するかを評価する上で、情報の質を一定にして結果の信頼性を高めるために、前向き研究が望ましいが、実行し易いのは、介入試験でなく、治療前に各施設がループス腎炎の患者を登録し、各医師が最善と信じ各施設ですでに承認されている現行治療を行ない、治療法の違いによる治療効果の差を比較する、という観察研究であろうと思われる。

\* 登録時の患者区分を；

1. 初期発症腎炎の初回治療、2. 初期発症腎炎の再発治療、3. 遅発腎炎の初回治療、4. 遅発腎炎の再発治療、とする（再発回数は問わないこととする）。

上記の区分は、本調査研究に基づいた新規の考え方である。これに既知の区分である、腎組織分類を加える。すでに不可逆的腎障害を呈している症例への治療は、効果判定の対象としないと決めておく。

\* 現行の治療状況で想定される、治療の違いは；

a. 中等量経口ステロイド、b. 高用量経口ステロイド、c. ステロイドパルス、d. IVCY、e. タクロリムス、f. ミゾリピンその他。これらの組み合わせである。

\* 治療の結果は；半年後、1年後、さらに長期で判定し、腎病態の反応は、ACR 委員会の腎改善判定基準など既存のものを使うことが考えられる。

これまでの本調査研究から予測される、難治性の順は、軽度から重度に向かって 1, 2, 3, 4 である。

4 の IV 型は最も予後不良と推定され、強化治療による追加効果が、半年～1年で判定できる可能性が高い。この群の悪化速度が早いことが、本病歴調査上わかっているからである。

一方、1, 2 の区分では、治療効果の差の判定に数

年を要する可能性がある。しかし、この観察研究のために新たに行なうのは、患者を登録することのみなので、一定期間内に有意な結果を得られなかった場合も、患者・医師に不利益は生じないと考えられる。

#### E. 結論

腎病理によって治療法を決定する、という従来の考え方に加え、「初期発症腎炎」「遅発腎炎」を区分して同一区分の中で、異なる治療法を比較検討するのが、有意義な治療試験の方法であると考えられた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yuko Takahashi, Tetsuya Mizoue, Akitake Suzuki, Hiroyuki Yamashita, Junwa Kunimatsu, Kenji Itoh, Aki Mimori: The time of the initial appearance of renal symptoms in the course of systemic lupus erythematosus as a prognostic factor for lupus nephritis. *Modern Rheumatol*, 2009 (in press)

##### 2. 学会発表

###### 国内

1. 山下裕之、鈴木暁岳、高橋裕子、國松淳和、柳井敦、清水亜里紗、伊東健司、窪田和雄、三森明夫：血清反応陰性脊椎関節炎の診断における 18FFDG-PET の有用性の検討。第 52 回日本リウマチ学会、札幌、4 月、2008
2. 山下裕之、鈴木暁岳、高橋裕子、國松淳和、柳井敦、清水亜里紗、伊東健司、三森明夫：気管支内腫瘍と多彩な症状を呈し、生検で確定診断した IgG4 関連疾患の 1 例。第 52 回日本リウマチ学会、札幌、4 月、2008
3. 高橋裕子、溝上哲也、鈴木暁岳、山下裕之、柳井敦、國松淳和、清水亜里紗、伊東健司、三森明夫：ループス腎炎の予後規定因子：腎所見の発症時期（第 2 報）。第 52 回日本リウマチ学会、札幌、4 月、2008
4. 高橋裕子、鈴木暁岳、山下裕之、國松淳和、柳井敦、清水亜里紗、伊東健司、三森明夫：TNF 遮断治療中の関節リウマチ患者における非結核性抗酸菌症（第 2 報）。第 52 回日本リウマチ学会、札幌、4 月、2008
5. 高橋裕子、柳井敦、清水亜里紗、國松淳和、山下裕之、鈴木暁岳、伊東健司、三森明夫：難治性皮膚潰瘍に対する温水浴治療の良好な効果。第 52



回日本リウマチ学会、札幌、4月、2008

6. 高橋裕子、溝上哲也、高木香恵、伊東健司、三村俊英、原まさ子、三森明夫：MCTDのステロイド治療適応：レトロスペクティブ調査。第52回日本リウマチ学会、札幌、4月、2008
7. 國松淳和、鈴木暁岳、高橋裕子、柳井敦、清水亜里紗、伊東健司、三森明夫：リウマチ性多発筋痛症患者における脳血流の検討（第3報）。第52回日本リウマチ学会、札幌、4月、2008
8. 柳井敦、秋山陽一郎、清水亜里紗、國松淳和、高橋裕子、山下裕之、鈴木暁岳、伊東健司、三森明夫：メトトレキサート抵抗性関節リウマチに対する低用量タクロリムスの併用効果の検討。第52回日本リウマチ学会、札幌、4月、2008
9. 柳井敦、鈴木暁岳、山下裕之、高橋裕子、國松淳和、清水亜里紗、伊東健司、三森明夫：治療抵抗性の多発性筋炎/皮膚筋炎に対する外来でのタクロリムス使用例。第52回日本リウマチ学会、札幌、4月、2008
10. 清水亜里紗、高橋裕子、鈴木暁岳、山下裕之、國松淳和、柳井敦、伊東健司、三森明夫：TNF阻害薬とビスホスホネート製剤の併用療法による画像的な関節破壊抑制効果についての検討。第52回日本リウマチ学会、札幌、4月、2008
11. 窪田和雄、三森明夫：全身FDG-PET/CTによるリウマチ性大関節炎の評価。第52回日本リウマチ学会、札幌、4月、2008
12. 下垣保恵、河野厚、高橋裕子、野田光彦、三森明夫：ステロイド長期服用リウマチ性疾患患者における内臓肥満。第52回日本リウマチ学会、札幌、4月、2008

#### 海外

1. Junwa Kunimatsu, Kenji Itoh, Atsushi Yanai, Arisa Shimizu, Yuko Takahashi, Akitake Suzuki, Hiroyuki Ymashita, Akio Mimori: Quantitative assessment of cerebral blood flow in patients with polymyalgia rheumatica with mood disorder. Annual European Congress of Rheumatology, EULAR 2008, Paris, Jun, 2008
2. Arisa Shimizu, Kenji Itoh, Junwa Kunimatsu, Yuko

Takahashi, Akitake Suzuki, Hiroyuki Ymashita, Akio Mimori: Efficacy of combination therapy of TNF inhibitors and bisphosphonates on radiographic progression of rheumatoid arthritis. APLAR, Scientific Meeting, Yokohama, Sept, 2008

3. Yuko Takahashi, Haruhito Sugiyama, Junwa Kunimatsu, Arisa Shimizu, Eri Toshiki, Kenji Itoh, Akio Mimori: A risk assessment of nontuberculous mycobacteriosis during TNF blocking therapy for rheumatoid arthritis. The 76<sup>th</sup> American College of Rheumatology, Annual Scientific Meeting, San-Francisco, Oct, 2008

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
研究分担報告書

抗アミノアシル tRNA 合成酵素(ARS)抗体陽性例における  
臨床像と免疫遺伝学的背景との関連に関する研究

研究分担者 平形 道人 慶應義塾大学医学部医学教育統轄センター 准教授

研究要旨 抗ARS抗体が同定された48例(HisRS(Jo-1):10, AsnRS(KS):9, AlaRS(PL-12):8, GlyRS(EJ):13, ThrRS(PL-7):4, IleRS(OJ):4例)を対象とし、かかる症例の臨床像と免疫遺伝学的背景との関連を検討した。抗ARS抗体陽性全48例がILD, 22例が筋炎を持っていた。筋炎併発22例中15(Jo-1:8, EJ:5, PL-7:1, PL-12:1)例(68%)がDRB1\*0405-DQA1\*0303-DQB1\*0401を持ち、健康人コントロール22%に比べ、高頻度であった(odds ratio (OR) = 7.7, P=0.003)。筋炎非併発26例中16(KS:8, PL-12:5, PL-7:2, EJ:1)例(62%)がDR2 (DRB1\*1501/1502)を持ち、健康人コントロール33%に比べ、高頻度であった(OR=3.3, P=0.01)。本研究により、抗ARS抗体陽性例において、筋炎併発ILD例とDR4、筋炎非併発ILD例とDR2、との関連が明らかとなった。抗ARS抗体関連臨床像の発症に対し、抗体特異性ではなく、免疫遺伝学的背景の関与が示された。

A. 研究目的

多発性筋炎 / 皮膚筋炎 (polymyositis/dermatomyositis; PM/DM)患者血清には、多種類の細胞成分に対する自己抗体が検出される。その中で本疾患に特異的な自己抗体(myositis specific autoantibodies; MSA)が見出され、それぞれ特徴的臨床像と密接に関連し、診断、病型分類、臨床経過の予測など臨床的有用性が報告されている。代表的な筋炎特異自己抗体である、抗アミノアシル tRNA 合成酵素(ARS)抗体は筋炎、間質性肺炎、関節炎と密接に関連することが明らかとなっているが、その病態形成機序は不明である。本研究は抗ARS抗体陽性例における臨床像と免疫遺伝学的背景との関連を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 対象: 当院・共同研究施設で自己抗体を検索した膠原病患者16,000例中、抗アミノアシル tRNA 合成酵素(ARS) (Jo-1=10; PL-7=4; PL-12=8; EJ=13; OJ=4; KS=9)抗体陽性48例を対象とした。2) 自己抗体はアイソトープ標識 HeLa 細胞抽出物を用いた免疫沈降により検索した。3) HLAクラスII遺伝子は患者末梢白血球より抽出した genomic DNA を用い、PCR-RFLP法などにより同定した。

(倫理面への配慮)

すべての臨床試験はヘルシンキ宣言を遵守し、患者よりの検体採取に際しては倫理審査委員会の承認を

得るとともに患者より文書同意を取得して行うことを前提とする。

C. 研究結果

1) 抗ARS抗体陽性全48例がILD, 22例が筋炎を持っていた。2) 筋炎併発22例中15(Jo-1:8, EJ:5, PL-7:1, PL-12:1)例(68%)がDRB1\*0405-DQA1\*0303-DQB1\*0401を持ち、健康人コントロール22%に比べ、高頻度であった(odds ratio (OR) = 7.7, P=0.003)。3) 筋炎非併発26例中16(KS:8, PL-12:5, PL-7:2, EJ:1)例(62%)がDR2 (DRB1\*1501/1502)を持ち、健康人コントロール33%に比べ、高頻度であった(OR=3.3, P=0.01)。さらに、抗EJ抗体陽性7例中4例(57%)がDRB1\*0901-DQA1\*0302-DQB1\*03031ハプロタイプを持ち、健康人コントロール28%に比べ、高頻度であった。

D. 考察

抗ARS抗体がILDを合併する筋炎という均質な病像と関連することが報告されてきた。しかし、我々は抗PL-12抗体、抗KS抗体が抗Jo-1抗体などより筋炎のないILDとより密接に関連するなど、各抗ARS抗体の関連臨床像の多様性について明らかにしてきた。本研究により、抗ARS抗体陽性例において、筋炎併発ILD例とDR4、筋炎非併発ILD例とDR2、との関連が明らかとなった。これまで、抗Jo-1抗体とDR4、抗SRP抗体とDR8との相関など、筋炎特異自己抗体とHLAとの関連が示されてきたが、抗ARS抗体関連

臨床像の発症に対し、抗体特異性より、むしろ免疫遺伝学的背景の関与が示された。

#### E. 結論

抗 ARS 抗体の主要な関連病態である、筋炎を ILD の発症が免疫遺伝学的背景により規定される可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Takada T, Hirakata M, Suwa A, Kaneko Y, Kuwana K, Ishihara T, Ikeda Y: Clinical and histopathological features of myopathies in Japanese patients with anti-SRP autoantibodies. *Modern Rheumatol.* (in press)
2. Suwa A, Hirakata M, Kaneko M, Sato M, Suzuki Y, Kuwana M: Successful treatment of refractory polymyositis with the immunosuppressant mizoribine: Case report. *Clinical Rheumatology* 28:227-229, 2009.
3. Tokuda H, Sakai F, Yamada H, Johkoh T, Imamura A, Dohi M, Hirakata M, Yamada T, Kamatani N, Kikuchi Y, Sugii S, Takeuchi T, Tateda K, Goto H: Clinical and radiological features of pneumocystis pneumonia in patients with rheumatoid arthritis, in comparison with methotrexate pneumonitis and pneumocystis pneumonia in acquired immunodeficiency syndrome: a multicenter study. *Intern Med.* 47:915-23, 2008.
4. Takizawa Y, Inokuma S, Tanaka Y, Saito K, Atsumi T, Hirakata M, Kameda H, Hirohata S, Kondo H, Kumagai S, Tanaka Y: Clinical characteristics of cytomegalovirus infection in rheumatic diseases: Multicenter survey in a large patient population. *Rheumatology* 47:1373-1378, 2008.
5. 平形道人: 処方計画法「多発性筋炎・皮膚筋炎」総合臨床(増刊), 57:1299-1304, 2008.
6. 平形道人: 膠原病における自己抗体. 臨床検査

52:504-510, 2008.

7. 平形道人: 抗アミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS)抗体とその臨床的意義-抗 ARS 抗体関連肺病変など-. *日本胸部臨床* 67:359-369, 2008.

#### 2. 学会発表

1. Hirakata M, Takada T, Kaneko Y, Kuwana M. Clinical features are governed by immunogenetic background in Japanese patients with anti-aminoacyl tRNA synthetase autoantibodies. 72<sup>nd</sup> Annual Meeting of American College of Rheumatology, 2008 Oct, San Francisco.
  2. Sato S, Hoshino K, Satoh T, Suwa A, Hirakata M, Inada S, Kuwana M. MDA5 (Melanoma-Differentiation-Associated Gene 5) as an autoantigen recognized by anti-CADM-140 antibody in patients with clinically amyopathic dermatomyositis. 72<sup>nd</sup> Annual Meeting of American College of Rheumatology, 2008 Oct, San Francisco.
  3. 平形道人, 諏訪昭, 高田哲也, 香月有美子, 金子祐子, 佐藤慎二, 桑名正隆: 抗 KS (asparaginyl tRNA 合成酵素: AsnRS) 抗体の臨床・免疫遺伝学的特徴に関する研究. 第 52 回 日本リウマチ学会総会, 2008 年 4 月, 札幌.
- #### H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
特になし
  2. 実用新案登録  
特になし
  3. その他  
特になし



## 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

研究分担者 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 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糖質コルチコイドの有効性は極めて低い一方、初期治療開始後早期よりの免疫抑制薬併用が生命予後を改善しうることが示唆されている。本疾患罹患部肺胞・間質に浸潤しており、病態への関与が示唆されている T リンパ球に対する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つつあり、新規治療薬候補として期待されている。不採算性などのため製薬会社主導開発の可能性はなく、従って我々は研究者主導にて PM・DM に合併する IP に対するタクロリムスの有効性及び安全性を検討している。本研究班に属する分担研究者所属医療機関を中心とした全 11 施設の協力のもと効能追加申請のためのデータ取得を目的とした GCP 準拠の多施設共同第 II/III 相臨床試験を継続した。本試験は多発性筋炎・皮膚筋炎合併間質性肺炎の初発または安定化後の再発のために治療を必要とする症例を対象とし、生存率を主要評価項目としたタクロリムスおよび糖質コルチコイド併用の単群によるオープンラベル臨床試験（パート A）、および糖質コルチコイドのみによる初期治療が行われた症例よりなる歴史的比較対照群（パート B）のデータ抽出を行い、パート A と B データを比較解析し、タクロリムスの本疾患における治療的位置づけを検討するものである。またタクロリムスおよび糖質コルチコイド併用治療の有用性に関するエビデンス提示および効能追加申請のために必要な治験以外のデータ収集についてもその必要性及び方法につき検討した。2007 年 7 月の被験者登録開始後、2009 年 1 月 15 日現在 19 例登録であり、解析対象症例 18 例において平均 33.5 週の観察期間における評価項目達成例数は、主要評価項目（死亡）1 例（皮膚筋炎 4 週）、副次的評価項目（Progression）4 例（皮膚筋炎 3 例（1/4/35 週）、多発性筋炎 1 例（52 週））であった。一方治験実施計画書で規定される適格性を満足する症例は合計 5-6 例程度にとどまると推測されている。パート A 症例集積状況は予定を若干下回っているが着実に進んでおり、治験期間を延長し目標解析対象症例数確保に努めている。一方パート B 症例集積状況は種々の要因により悪く、両群間の比較解析は技術的調整をもってしても極めて難しく、パート A との比較可能性が担保できる範囲での選択除外基準の緩和により拡大されるパート B コホート（パート B'）に関するデータ収集を追加で行いパート A・B' 比較解析を行い、更にパート B が治療開始後の治療反応性にもとづき決まる要素によりグループ定義がされているという問題点を考慮しパート A との比較可能性担保における重要な因子である疾患活動性など最低限の基準により定義され治療開始前の段階から追える Consecutive patients によるコホートを単一医療機関にて作成し（パート C）パート A・C 比較解析も行うことを検討している。希少疾患であること、および疾患の性質から、治験計画・実施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り、その観点からも医師主導による新規治療法開発は本研究班のような組織の協力なくしては実現不可能であることが強く認識された。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ている本治験の完遂が待たれる。

## 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糖質コルチコイド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、糖質コルチコイドによる初期

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糖質コ

ルチコイド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

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本研究班に属する分担研究者所属医療機関を中心とした全11施設の協力のもと効能追加申請のためのデータ取得を目的としたGCP準拠の多施設共同第II/III相臨床試験を既に2007年7月より症例登録開始にて施行しており、それを継続した。

### 治験の概要：

本疾患の初発または安定化後の再発のために治療を必要とする症例を対象とし、生存率を主要評価項目としたタクロリムス（基準開始用量として0.075mg/kg/日、血中濃度5~10ng/mLの範囲で投与量調節可）および糖質コルチコイド（プレドニゾン1mg/kg/日で開始後漸減）併用の単群によるオープンラベル臨床試験（目標解析対象例20例、評価観察期間52週）（パートA）、および糖質コルチコイドのみによる初期治療が行われた症例よりなるHistorical control群のデータ抽出（パートB）し、両パートのデータを比較することにより、タクロリムスの本疾患における治療的位置づけを検討するというものである。

またタクロリムスおよび糖質コルチコイド併用治療の有用性に関するエビデンス提示および効能追加申請のために必要な治験以外のデータ収集についてもその必要性及び方法につき検討した。

### （倫理面への配慮）

「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令の一部を改正する省令」（平成18年3月31日公布、厚生労働省令第72号、「GCP省令」）に準拠し、治験に参加することによって生じる被験者への不利益を最

小限にとどめ、被験者の得る利益を最大限にするよう治験計画において配慮し、また被験者には倫理審査委員会の承認を得た同意文書及びその他の説明文書を使用して十分説明した後、自由意志による試験参加の同意を本人から文書で得ることとした。

## C. 研究結果

（パートA）2007年7月より被験者登録を開始し、2009年1月15日までで計19例登録された（皮膚筋炎10例、clinically-amyopathic dermatomyositis（CADM）4例、多発性筋炎5例）。本治験においては登録期間18ヶ月において予定解析対象症例計20例の登録を計画しており、順調な症例集積が続いたものの登録期間内の達成が難しいと判断し13か月の治験期間延長手続きを行った。19例中解析対象症例数は18であり、上記日時時点までで平均33.5週の観察期間における評価項目達成例数は、主要評価項目（死亡）1例（皮膚筋炎4週）、副次的評価項目（Progression）4例（皮膚筋炎3例（1/4/35週）、多発性筋炎1例（52週））であった。

### （パートB）

パートAとの比較においてはIndication biasが存在するためPropensity scoreを用いたマッチングを行うべく計画しており、その観点からパートB群症例数はパートA群の2倍以上が適切と考えられているが、治験実施計画書で規定される適格性を満足する症例は合計5~6例程度にとどまると推測されている。データ収集時期の関係から現時点で両群データの比較解析を行うことは不可能である。

## D. 考察

特にパートBにおける症例集積状況が悪いが、これまで不適格となった症例の原因を解析すると主な原因は以下のようになっている。

- ・糖質コルチコイド投与量が、併用禁止量である「プレドニゾン換算で1mg/kg/day超」に抵触する。（実際の臨床では例えば「体重53kgの方に53mg投与する場合よりもまとめて55mg投与する」場合が多いため）
- ・肺機能検査やKL-6、肺CTなどの治療開始前測定がパートAのとおり開始前14日以内としているが、それより以前である。
- ・Indication biasが存在するため、できる限り他の差をなくすべくパートAの選択・除外基準をほ



ばすべて同様にパートBに応用したが、特にタクロリムスの安全性の観点から設けられた除外基準に抵触している。

これらの点を踏まえまして、統計アドバイザーとの協議を行い、パートBについて以下の対処を行う予定でいる。

- ・複雑な解析を可能にせしめる症例数が集積される見込みが低く、従って比較解析は技術的調整をもってしても極めて難しく、止むを得ない。
- ・現選択除外基準により規定されるパートBコホートデータとパートAとの比較解析は可能な範囲で計画にしたがって行うが、それに加えて、パートAとの比較可能性が担保できる範囲での選択除外基準の緩和(上述した(ア)～(ウ)などを考慮)により拡大されるパートBコホート(暫定的に「パートB」と称する)に関するデータ収集を追加で行い、パートBデータとパートAデータとの比較解析結果を参考資料として承認申請の際に提出することを検討すべきである。

更に、タクロリムスおよび糖質コルチコイド併用治療の有用性に関するエビデンス提示および効能追加申請という観点から、本治験の他に以下のデータ収集を行うことも検討している。

(パートCデータ収集)

- ・パートAとBとの比較を制限する要因として、Indication biasの存在のみならず、パートBが治療開始後の治療反応性にもとづき決まる要素(「初発時に14日以上糖質コルチコイドが単独で投与された症例」)にもとづくグループ定義がされているという点があり、このためPropensity scoreを用いた比較解析にも限界がある。したがって、パートBとは別に、パートAとの比較可能性担保における重要な因子である疾患活動性など最低限の基準(治療開始後の反応にもとづく基準は含まない)により定義され、治療開始前の段階から追えるConsecutive patientsによるコホートを東京医科歯科大学医学部付属病院において作成し(暫定的に「パートC」と称する)、それとパートAデータとの比較解析を行う。パートCコホートは様々な治療介入を受けた症例よりなるコホートのため治療介入要素は不均一となるが、症例数はある程度保てることが期待され、したがって適切な症例数が集まれば治療介入や背景因子を独立変数としたパ

ートAとの比較解析ができる可能性がある。

## 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・実施している。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。特に、並行前向き無作為割り付け比較対照群の設置は疾患特性(高い短期死亡率)の考慮の上不適切と判断され歴史的対照群の設置となったがその症例集積および前向き介入群データとの比較におけるバイアスの存在による限界により、治験の計画・実施において様々な配慮が必要であった。また、その観点からも医師主導による新規治療法開発は本研究班のような組織の協力なくしては実現不可能であることが強く認識された。

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ている本治験の完遂が待たれる。

## F. 健康危機情報

治験中の重篤な有害事象に関しては関連法規に基づき厚生労働大臣に報告されている。

## G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
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  
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（難治性疾患克服研究事業）  
研究分担報告書

SLE モデルマウスにおける末梢血単球サブセットの変化における Fc $\gamma$  レセプターの役割に関する研究

研究分担者 天野 浩文 順天堂大学医学部膠原病内科 准教授

研究協力者 高崎 芳成 順天堂大学医学部膠原病内科 教授

仲野 総一郎、安藤 誠一郎、箕輪 健太郎 順天堂大学医学部膠原病内科

研究要旨 全身性エリテマトーデス(SLE)の疾患モデルのひとつである BXS $\beta$  マウスは、疾患の進展とともに末梢血で単球増加が生じる。この際、“inflammatory”と呼ばれる CD11b $^{+}$ Gr-1 $^{-}$ 分画に比較し“resident”と呼ばれる CD11b $^{+}$ Gr-1 $^{+}$ 分画が選択的に増加する。SLE のモデルマウスでは、免疫複合体(IC)との会合により活性型 Fc レセプター(FcR)である Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIII、Fc $\gamma$ RIV 及び抑制型 FcR である Fc $\gamma$ RIIB が病気の進展に影響を与えることが知られている。我々はこれらの活性型と抑制型の FcR と SLE モデルマウスでの末梢血の単球増加及びサブセットの変化の関係について BXS $\beta$  マウス、FcR 共通  $\gamma$  鎖を欠損した BXS $\beta$  マウス(BXS $\beta$  $\gamma^{-/-}$ )での末梢血単球について解析を行った。BXS $\beta$  $\gamma^{-/-}$  マウスでは活性型である Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIII、Fc $\gamma$ RIV すべての機能が欠如しているが、このマウスでは、単球増加も Gr-1 $^{-}$ 単球の増加も認めなかった。また、FcR $\gamma^{-/-}$  B6 マウスの末梢血では、CD11b $^{+}$ Gr-1 $^{-}$ の単球で FcRIIB の発現が弱く、FcRIV の発現が強かった。34-3C 抗赤血球抗体の投与後では、B6 マウスでは主に Gr-1 $^{low}$  の単球が血中に認められ、この分画で Fc $\gamma$ RIV の発現が強かったが、FcR $\gamma^{-/-}$  B6 マウスでは変化を認めなかった。以上より、SLE のモデルマウスにおいて活性型 Fc $\gamma$ R は単球増加だけでなく、単球分画の成熟にも重要な役割を果たしていると考えられた。更に、IC に反応して活性化を受けやすい単球の増加が誘導されることが示唆された。SLE のモデルマウスにおいて、IC による刺激が活性型と抑制型の FcR に依存して単球の分化成熟を促している可能性が示された。

#### A. 研究目的

BXS $\beta$  マウスは全身性エリテマトーデス(SLE)に類似した自己免疫疾患の進展とともに末梢血で単球増加が生じる。この際、“inflammatory”と呼ばれる CD11b $^{+}$ Gr-1 $^{-}$ 分画に比較し“resident”と呼ばれる CD11b $^{+}$ Gr-1 $^{+}$ 分画が選択的に増加する。SLE のモデルマウスでは、免疫複合体(IC)との会合により活性型 Fc レセプター(FcR)である Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIII、Fc $\gamma$ RIV 及び抑制型 FcR である Fc $\gamma$ RIIB が病気の進展に影響を与えることが知られている。我々はこれらの活性型と抑制型 FcR と SLE モデルマウスでの末梢血の単球増加及びサブセットの変化の関係について解析を行った。

#### B. 研究方法

BXS $\beta$  マウス、FcR 共通  $\gamma$  鎖を欠損した BXS $\beta$  マウス(BXS $\beta$  $\gamma^{-/-}$ ) 及び(NZB x NZW) F1 マウスでの末梢血単球について F4/80, CD11b, Gr-1(Ly6C/G), 2.4G2(Fc $\gamma$ R II & III), CD115 (M-CSFR) 及び 9E9

(Fc $\gamma$ RIV)を用いてフローサイトメトリーで解析した。血中の IC による刺激が Fc $\gamma$ R を介して Gr-1 $^{+}$ 単球の成熟を促すかを調べるため、我々は 34-3C IgG2a-抗赤血球抗体を B6 マウスと FcR $\gamma^{-/-}$  B6 マウスに投与し、単球のフェノタイプを解析した。

#### (倫理面への配慮)

マウスの実験は、本研究施設の定める動物実験指針に基づいて行った。

#### C. 研究結果

1)8月齢の(NZB x NZW) F1 マウスでは、BXS $\beta$  マウスと比較すると軽度であったが、有意な単球の増加を示し、BXS $\beta$  マウスと同様に Gr-1 $^{-}$ の単球が選択的に増加していた。BXS $\beta$  $\gamma^{-/-}$ マウスでは活性型である Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIII、Fc $\gamma$ RIV すべての機能が欠如しているが、このマウスでは8か月齢まで経過を追ったところ、単球増加も Gr-1 $^{-}$ 単球の増加もみとめられなかった。FcR $\gamma^{-/-}$  B6 マウスの末梢血では、

CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>の単球でFcRIIBの発現が弱く、FcRIVの発現が強かった。2) 34-3C 抗赤血球抗体の投与 24 時間後では、B6 マウスにおいては主に Gr-1<sup>low</sup> 単球の増加が認められ、この分画でFcγRIVの発現が亢進していたが、FcRγ<sup>+</sup>B6 マウスではこのような単球分画の変化は認めなかった。

#### D. 考察

今回の結果より、SLE のモデルマウスにおいて活性化型 FcγR は単球増加だけでなく、単球分画の成熟にも重要な役割を果たしていると考えられた。更に、IgG IC に反応して活性化を受けやすい単球サブセットの増加が誘導されることが示された。

#### E. 結論

SLE のモデルマウスにおいて IC による刺激が活性化型と抑制型の FcR に依存して単球の分化成熟を促している可能性が示された。

#### F. 健康危機情報

該当情報なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Amano H, Furuhashi N, Tamura N, Tokano Y, Takasaki Y. Hypocomplementemic Urticarial Vasculitis with Jaccoud's Arthropathy and Valvular Heart Disease (case report and review of the literature). *Lupus* 17:837-41, 2008.
2. Nakano S, Morimoto S, Suzuki J, Nozawa K, Amano H, Tokano Y, Takasaki Y. Role of pathogenic auto-antibody production by Toll-like receptor 9 of B cells in active systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 47:145-9, 2008.
3. Katagiri A, Morimoto S, Nakiri Y, Nakano S, Mitsuo A, Suzuki J, Amano H, Nozawa K, Asano M, Tokano Y, Hashimoto H, Takasaki Y. Decrease in CD4(+)CD25 (+) and CD8 (+)CD28 (+) T cells in interstitial pneumonitis associated with rheumatic disease. *Mod Rheumatol*. 18:562-9, 2008.
4. Watanabe T, Suzuki J, Mitsuo A, Nakano S,

Tamayama Y, Katagiri A, Amano H, Morimoto S, Tokano Y, Takasaki Y. Striking alteration of some populations of T/B cells in systemic lupus erythematosus: relationship to expression of CD62L or some chemokine receptors. *Lupus*. 17:26-33, 2008.

##### 2. 学会発表

1. 天野浩文, 天野恵理, 安藤誠一郎, 仲野総一郎, 森本真司, 戸叶嘉明, 林青順, 西村裕之, 広瀬幸子, 高崎芳成. BXSb マウスの末梢血単球増加における Fcγレセプターの役割. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 札幌 2008.4.20-23.
2. 林青順, 天野浩文, 天野恵理, 白井俊一, 広瀬幸子. 抑制型 IgG レセプターによる B 細胞分化の制御. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 札幌 2008.4.20-23.
3. 仲野総一郎, 森本真司, 鈴木淳, 野沢和久, 天野浩文, 戸叶嘉明, 高崎芳成. 活動期 SLE の B 細胞の TLR9 は抗 DNA 抗体産生に関与する. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 札幌 2008.4.20-23.
4. 箕輪健太郎, 鈴木絢子, 石山健太郎, 鈴木淳, 松下雅和, 小笠原倫大, 天野浩文, 森本真司, 戸叶嘉明, 高崎芳成. ステロイドパルス療法中に多発性骨格筋膿瘍及び多発性皮膚膿瘍が顕在化した SLE 患者の 1 例. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 札幌 2008.4.20-23.
5. 安藤誠一郎, 天野浩文, 天野恵理, 仲野総一郎, 名切裕, 森本真司, 戸叶嘉明, 広瀬幸子, 高崎芳成. BXSb マウスに対する FTY720 の免疫抑制効果. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 札幌 2008.4.20-23.
6. Inoue H, Matsudaira R, Nawata M, Ogasawara M, Amano H, Ikeda M, Tamura N, Takasaki Y. Case positive for anti-centromere antibody with vascular involvement in patients with systemic sclerosis. 13<sup>th</sup> Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (APLAR 2008) Yokohama. 2008.



9. 23-27

7. Amano H, Ando S, Amano E, Nakano S, Minowa K, Watanabe T, Morimoto S, Tokano Y, Takasaki Y. Increased CD14<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup> CD16<sup>high</sup> “resident” monocyte subset in systemic lupus erythematosus. 13<sup>th</sup> Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (APLAR 2008) Yokohama. 2008. 9. 23-27

8. Suzuki A, Minowa K, Matushita M, Amano H, Tamura N, Tokano Y, Takasaki Y. Two cases of pneumatosis cystoides intestinalis associated with Sjogren syndrome. 13<sup>th</sup> Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (APLAR 2008) Yokohama. 2008. 9. 23-27

9. 箕輪健太郎, 天野浩文, 安藤誠一郎, 渡辺崇, 仲野総一郎, 名切裕, 森本真司, 戸叶嘉明, 高崎芳成. 膠原病患者におけるステロイド及び免疫抑制剤, 生物製剤治療による DECTIN-1 の発現の変化についての検討. 第 36 回日本臨床免疫学会. 東京 2008.10.17-18

10. 森本真司, 戸叶嘉明, 天野浩文, 高崎芳成. SLE のステロイドの維持量についての検討. 第 36 回日本臨床免疫学会. 東京 2008.10.17-18

11. Amano H, Ando S, Amano E, Minowa K, Watanabe T, Morimoto S, Tokano Y, Takasaki Y. Increased CD14<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup> “resident” monocyte subset in systemic lupus erythematosus. The 72<sup>nd</sup> National Meeting of American College of Rheumatology. San Francisco 2008. 10.24-28.

12. Amano H, Amano E, Lin Q, Ando S, Nishimura H, Morimoto S, Hirose S, Takasaki Y. FcγR-dependent expansion of Gr-1<sup>+</sup> monocyte subset in lupus prone mice. 第 38 回日本免疫学会. 京都 2008.12.1-3

13. Lin Q, Tsurui H, Ohtsuji M, Amano H, Nishimura H, Shirai T, Hirose S. (NZWxBXSB)F1 マウスにおける *Fcgr2b* プロモーター領域の多型性の影響/The role of *Fcgr2b* promoter region polymorphism in

(NZWxBXSB)F1 mice. 第 38 回日本免疫学会. 京都 2008.12.1-3

14. Ikeda K, Pauley K, Satoh M, Amano H, Fretzler M, Takasaki Y. RNA 干渉関連蛋白複合体に対する自己免疫応答の検討/Autoimmunity targeting RNAi related multiple protein complexes associated with GW/P bodies. 第 38 回日本免疫学会. 京都 2008.12.1-3

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし