

200908015A

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

人工ガンマグロブリンの製剤化への
安全性と臨床試験に向けた
評価系の確立

(H21-政策創薬-一般-004)

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

鈴木 和 男

平成 22 年 (2010) 年 3 月

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

人工ガンマグロブリンの製剤化への
安全性と臨床試験に向けた
評価系の確立

(H21-政策創薬-一般-004)

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

鈴木 和 男

平成 22 年 (2010) 年 3 月

人工ガンマグロブリンの製剤化への安全性と
臨床試験にむけた評価系の確立

研究代表者：所属施設：千葉大学大学院医学研究院 特任教授
氏名：鈴木 和男

研究分担者

亀岡 洋祐：(独)医薬基盤研究所 主任研究員
大野 尚仁：東京薬科大学 教授
高橋 啓：東邦大学医療センター 教授
荒谷 康昭：横浜市立大学大学院 教授
宇野賀津子：(財)ルイ・パストゥール医学研究センター 室長
野島 博：大阪大学 教授
平橋 淳一：東京大学医学部附属病院 助教
長尾 朋和：千葉大学 特任講師
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
武曾 恵理：(財)田附興風会医学研究所北野病院 副所長
佐地 勉：東邦大学医療センター 教授
相澤 義房：新潟大学大学院 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：名古屋大学大学院 特任准教授
湯村 和子：自治医科大学 教授
山縣 邦弘：筑波大学大学院 教授
有村 義宏：杏林大学 教授
藤元 昭一：宮崎大学 准教授
布井 博幸：宮崎大学 教授
河内 正治：国立国際医療センター 部長

【研究協力者・アドバイザー】

研究協力者：新井孝夫（東京理科大、教授）、古谷昌弘（積水化学・開発研、主任研究員）、
本間栄（東邦大・医療センター大森病院、教授）、小野孝彦（市立島田市民病院、部長）、
猪原登志子（財.田附興風会医学研究所北野病院、研究員）、鈴木章一（佐賀大学・医、助教）、
大原関利章（東邦大・医療センター大橋病院、助教）、三浦典子（東京薬科大、講師）、
中島裕史（千葉大院医、教授）、池田啓（千葉大院医、助教）、山崎力（東京大学、教授）、
濱野慶朋（自治医科大学、准教授）、王 碧昭（筑波大学・院、教授）

アドバイザー：直江史郎（桐蔭横浜大、教授）、岡崎富男（呉共済病院、校長）、
橋本博史（順天堂大・医、名誉教授）、中山俊憲（千葉大院医・免疫発生、教授）、
金子健二（日本製薬（株）、取締役）、David Jayne（英国 ケンブリッジ大学、教授）

目 次

I. 総括研究報告	
人工ヒト化ガンマグロブリンの製剤化にむけて	
鈴木和男	1
II. 分担研究報告	
1. 基礎分科会	
1) 人工ヒト化ガンマグロブリンの合成に関する研究	
人工免疫グロブリン合成に関する研究 VH-CH1-h 型人工ガンマグロブリンの構築と	
クローンの多様性の検討	
亀岡洋祐、鈴木和男	12
2) 人工ヒト化ガンマグロブリンの評価法に関する研究	
2-1) 免疫グロブリン製剤によるヒト白血球 PBMC のサイトカイン産生への影響	
大野尚仁	18
2-2) MPO-ANCA 腎炎患者のインターフェロンシステム：健常人、IgA 腎症との比較から	
宇野賀津子	22
2-3) 難治性血管炎の遺伝子解析	
野島 博	27
3) モデルマウスによる in vivo の評価法に関する研究	
3-1) CAWS 誘発血管炎モデルにおける TNF- α 製剤の血管炎抑制効果	
高橋 啓	31
3-2) 免疫グロブリンの評価法としてのモデルマウスの検討	
長尾朋和、鈴木和男、山本健二、河内正治、	34
3-3) フリーのヘムによる自然炎症の検討	
相澤義房	41
3-4) 菌体成分誘発性肺炎における食細胞機能異常の影響	
荒谷康昭	45
2. 臨床分科会	
1) 人工ヒト化ガンマグロブリンの臨床試験にむけた IVIg 治療に関する研究	
1-1) MPO-ANCA 陽性血管炎への IVIg による急性期治療の可能性	
- サイトカインストーム抑制効果のエビデンス	
武曾恵理	48
1-2) 大量免疫グロブリン療法は急性期川崎病血管炎において心筋ストレスマーカー	
- BNP/NTproBNP 値-を低下させる	
佐地 勉	55
1-3) 肺胞出血をきたした ANCA 関連血管炎に対する大量 γ グロブリン療法	
今井圓裕	59
1-4) MPO-ANCA 関連腎炎の寛解導入療法中の急性心不全に対する大量免疫グロブリン静注	
療法の有用性	
山縣邦弘	63
1-5) MPO-ANCA 関連血管炎に対する低用量免疫グロブリン静注療法	
湯村和子	67
2) 臨床研究および疫学	
2-1) 高安動脈炎と大型動脈罹患型巨細胞血管炎について	
小林茂人	71
2-2) 抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎の疫学 ～国際間の比較に向けて～	
藤元昭一、布井博幸	77
2-3) MPO-ANCA 陽性 Churg-Strauss 症候群の臨床的検討	
有村義宏	81
2-4) 魚油による ANCA 関連血管炎治療法の開発	
平橋淳一	86
III. 公開シンポジウム、班会議資料	89
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	99
V. 研究成果の刊行物・別刷 (主要のみ)	109

人工ガンマグロブリンの製剤化への安全性と臨床試験に向けた評価系の確立

— 人工ヒト化ガンマグロブリンの製剤化にむけて —

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。2010年1月に Churg-Strauss 症候群(CSS)への適応拡大が認可されるなど需要の増加に加え、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の急務となっている。そこで、本研究では、免疫グロブリンの人工化を目的とし、これまでにマウス型の完成を基にヒト型を構築した。本年度は、ヒト型の臨床試験に向けてプロトタイプクローンの構成を絞り込み、モデルマウスでの評価に加え、*in vitro*での体外評価法も検討した。具体的には、1) ヒト型人工ガンマグロブリンのクローンの絞り込み、2) モデルマウスによる力価判定法と評価マーカの検討、3) 体外診断法の開発の検討：免疫系と血管内皮細胞、4) 臨床治験をみすえた臨床研究：血管炎の治療成績の新知見と状況準備、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、を中心に研究した。以上のように、ヒト型人工免疫グロブリンの *in vivo* と *in vitro* 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）でも採用されており、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り、わが国もACR/EULARの新基準策定メンバーとなった。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応えるようにしたい。

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。また、2010年1月に Churg-Strauss 症候群(CSS)への適応拡大が認可されるなど需要の増加に加え、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の急務となっている。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。

本年度は、1) ヒト型人工ガンマグロブリンのクローンの絞り込み：これまでに得られているプロトタイプのヒト型クローンを絞り込むことを目的とした。また、2) モデルマウスによる力価判定法と評価マーカの検討：血管炎IVIg治療法の開発のためのモデルマウスに種々の治療法の検討と、上記モデルマウスによる力価と治療マーカを選定する。3) 体外診断法の開発の

検討：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。特に、anti-MPO抗体の糸球体血管内皮細胞への作用の利用、Bio-Plexによる多項目のサイトカイン・ケモカインの網羅的解析、免疫細胞の機能評価法を検討する。さらに、4) 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）を基にヒト型に特化した治療効果判定や臨床試験に向けた動物モデルでの治療を評価・支援する。

これらの目的にフォーカスを絞り、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する。

B. 研究方法

詳細は、各分担報告を参照

1. 基礎分科会

1) VH-CH1-hinge 型人工ガンマグロブリンの構築とクローンの解析：人工ガンマグロブリンの回収量をさらに増やすために、VH-CH1-hinge-6xHis のタンパク発現を可能とする組換え体を作成し、プレーティングからコロニーピク整列ライブラリー作成を行い、今年度はパイロットとして 1000 クローン選択し塩基配列解析を行った。配列解析からタンパク発現有効クローンを選択し、アラビノース添加により組換えタンパクを誘導培養し、集菌、8M 尿素により封入体を可溶化して、Ni キレートカラムにより組換えタンパクの精製を行った。

2) *in vitro* 評価系の開発

2-1) 免疫グロブリン製剤の固相化：IVIg を希釈し、プレート (96well Multi Well Plate 96FII) に各 125 μ l 添加後、1 晩 4 $^{\circ}$ C で incubate した。注射用水 200 μ l を用いて 6 回洗い流した後、プレートに吸着されているものを固相化 IVIg とした。

2-2) ヒト PBMC の培養： 1×10^6 cells/ml に調整したヒト PBMC を、固相化 IVIg に添加、または PBMC を入れた well に IVIg, F(ab')₂ を添加し、37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ インキュベーターで 8h-72h 培養後、上清を回収した。PAMPs を用いる系では 30 分 preincubate した PBMC に PAMPs を添加し、さらに 8h 培養した後、上清を回収した。

2-3) 免疫細胞への作用

2-3-1) MPO-ANCA 血管炎患者の IFN- α 産生能と測定：健康人、IgA 腎症、MPO-ANCA 血管炎患者の末梢血をヘパリン採血し、全血のままセンダイウイルス (HVJ) 500HA/ml にて刺激、20 時間後に遠心、上清中の IFN 活性をバイオアッセイにて測定した。

2-3-2) プラズマサイトイド樹状細胞 (pDC) 数の測定：全血を用いて pDC 数および mDC 数を測定した。pDC は BDCA-2⁺, Lin⁻(CD3⁻, CD19⁻, CD14⁻), HLA-DR⁺, mDC は CD11c⁺, Lin⁻(CD3⁻, CD19⁻, CD14⁻), HLA-DR^{high+} と定義した。pDC の染色はヘパリン加採血した末梢血全血を lysing solution にて lysis し、その後、BDCA-2⁺, HLA-DR⁺, Lin⁻ 細胞を染色した。mDC の染色には、CD11c は全血のまま染色し、その後 lysing solution にて lysis しその後、HLA-DR⁺, Lin⁻ 細胞を染色した。1ml あたりの細胞数は以下の式で求めた。No. of pDC (mDC)/ml = No. of WBC/ml \times pDC (mDC)%/100

2-3-3) 血中 IFN- α , β の検討：MPO-ANCA 腎炎、および IgA 腎症患者の、血漿中の IFN- α および β を測定した。IFN- α の幅広いサブタイプの測定

が可能な VeriKineTM Human IFN Alpha Serum Sample ELISA Kit (PBL 社) にて、IFN- β は ProcarartaTM Cytokine Human IFN- β ビーズアレイにて測定した。

3) モデルマウスおよび評価系の検討

3-1) CAWS 誘導冠状動脈炎の治療法：治療薬による血管炎の有無を病理組織学的に検討した。C57BL/6N マウス (4 週齢、雄) に対し CAWS 4mg を連続 5 日間腹腔内接種した。次いで、インフリキシマブおよびエタネルセプトを複数回、腹腔あるいは皮下投与した。実験 5 週目に屠殺、大動脈起始部および冠状動脈のステップ標本作製し、汎血管炎の発生頻度、血管炎の広がり、炎症の程度を病理組織学的に検討した。

3-2) 免疫グロブリンの評価法としてのモデルマウスの検討：SCG/Kj マウス (日本化薬、雌) initial phase 群：6~7 週齢、active phase 群：14~15 週齢、また薬剤投与群：8~10 週齢、Control 用マウス：C57BL/6 (日本クレア、雌 9~10 週齢) を SPF 環境下にて千葉大学医学部動物室で飼育・投与実験に使用した。CAWS 誘導マウス：C57BL/6 (日本クレア、雄、4-5 週齢) を SPF 環境下で国立感染症研究所にて飼育した。マウスの飼育・処置は、千葉大学および国立感染症研究所の動物実験ガイドラインに基づいて行った。

3-2-1) 投与実験：抗 IL-6R 抗体投与：投与初回は、抗 IL-6R 抗体 (中外製薬、2 mg/mouse) を iv した。1 週間後、抗 IL-6R 抗体を週 1 回 500 μ g/mouse、3 週間連続 ip 投与した。

・ミゾリビンの投与：ミゾリビン (旭化成ファーマ) は、CAWS 誘導マウスに投与した。

・DSG の投与：DSG (日本化薬、0.1 mg/mouse, 0.02 mg/mouse) 30 日間連続 ip 投与した。

3-2-2) CAWS 投与による冠状動脈炎誘導：C. albicans IFO 1385 を完全合成培地の培養上清より水溶性画分 CAWS を精製し、PBS で 20 mg/ml に調整しオートクレーブした。マウスに腹腔内投与 (4 mg/マウス) 5 日間連日 ip 投与した。CAWS 投与開始 3 日目からミゾリビン (30 mg/kg/day) を 6 日間連日 ip 投与した。27 日後に屠殺し採血し、心臓、腎臓をホルマリン固定し、組織を観察した。

3-2-3) 血清採取：血清採取：ネンブタールで安楽殺したマウスから心採血し、30 分間室温で静置し、5000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心後、上清を回収した。

3-2-4) 血清中の MPO-ANCA 値の測定：MPO を 0.2 μ g/well でコーティングし、2 次抗体 alkaline phosphatase-labeled anti-mouse IgG

antibody (Jackson Lab.)で反応させ、Substrate bufferを加え、1時間室温でインキュベートし、マイクロプレートリーダーで吸光度(405 nm)を測定した。MPO-ANCAは、rabbitのstandard serumを用いて算出し、単位を $\mu\text{g/ml}$ と表示した。

3-2-5)サイトカイン・ケモカインの測定:各投与実験で得られたマウスの血清中のサイトカイン・ケモカインを、Bio-Plex™ Suspension Array System (BIO-RAD)を使用し、網羅的に解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては、千葉大学動物委員会および国立感染症研究所実験動物計画委員会の承認を得て、動物愛護の指針にもとづいて行った。

3-3)フリーのヘムによる自然炎症の検討

心臓在住培養細胞と培養法:ラットの両心室からMACS マグネット細胞ソーティングシステムを用いて、CD11bc陽性細胞を除去して精製した後に、培養した。初代培養細胞、細胞株および培養法:初代正常ラット心臓線維芽細胞はラット線維芽細胞成長培地で、NR8383ラットマクロファージ細胞株は、Ham's F12K mediumで培養した。ヘム刺激およびROS、プロテアーゼ阻害薬による抑制:心臓在住培養細胞、各種初代培養細胞および細胞株に、 $20\ \mu\text{M}$ のヘミンを加えた。またtironをhemin付加、プロテアーゼ阻害薬は、hemin付加の1時間前から $25\ \mu\text{M}$ TPCKあるいは $300\ \mu\text{M}$ TLCKを培養し、フローサイトメトリー(FACSscan; BD Pharmingen)にて解析した。ROSは、心臓在住培養細胞とCM-H2DCFDA色素液を用いて、hemin ($20\ \mu\text{M}$)を添加後60分間インキュベートし、フローサイトメトリーにて解析した。

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: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。この技術では白血球のみを捕獲できるフィルターを複数枚セットした、リュウーコキャッチ(LeukoCatch)と命名した注射器を用い(特許を申請中)、白血球全タンパク質抽出液をフィルターから溶出・回収し、ELISAやウエスタン解析に使用した。

(倫理面への配慮)

部局で倫理委員会の承認を受けるとともに、健常人および患者の血液採取は全て書面によるインフォームド・コンセントをとることで倫理面に配慮した。本研究計画では遺伝子の発現量を検索するだけで塩基配列の違いを比較する訳で

はないので、いわゆるゲノム倫理面の問題はないと考えられ、実際にゲノム倫理委員会でもそのような判断がなされたが、念のため規則に準じた扱いをした。また、これとは別に阪大の「ヒトゲノム研究審査」を申請して許可を得た。

4-2)菌体成分誘発性肺炎における食細胞機能異常の影響:野生型C57BL/6マウス(日本SLCから購入)およびCGDマウスは、8-10週令の雌マウスを使用した。飼育管理は、公立大学法人横浜市立大学動物実験指針に準じた。市販のザイモザンおよびリポポリサッカライド(LPS)をLPSフリーのPBSに懸濁し、各マウスに麻酔下で経鼻的に肺に投与した。投与後6日目の肺症状を病理学的に解析し、比較検討した。

(倫理面への配慮)

実験動物は動物の保護及び管理に関する法律に準じて扱い、必要最小限の動物を使用した。やむを得ず動物を殺す際には、頸椎脱臼法で安楽死させた。

2. 臨床分科会

1) 人工ヒト化ガンマグロブリンの臨床試験にむけたIVIg治療に関する研究

1-1)MPO-ANCA陽性血管炎へのIVIgによる急性期治療の可能性 - サイトカインストーム抑制効果のエビデンス:1)症例:28例のMPO-ANCA陽性高齢MPA患者(原則として、治療前)と、対象として正常人53例を比較した。2)IVIg療法:23症例(52-83歳)のMPA患者に、急性期にIVIg療法を行った。治療はIVIg単独で行った症例を解析対象とした。大量IVIg療法(IVIg)は献血グロブリン $400\text{mg/kg/日}\times 5$ 日で17例、に施行した。一方、少量IVIg($5000\text{mg/日}\times 3$ 日間:重症感染症を伴った症例に対する保険適応量)療法を6例に行った。これらについては、尿所見、CRP、腎機能、などの疾患活動性所見もIVIg前後で検討した。3)サイトカイン測定:Bioplex法によりPDGF-bb, IL-1b, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, FGFbasic, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, TNF α , VEGF, IFN- $\alpha 2$, IL-1 α , IL-2Ra, IL-3, IL-12p40, IL-18, CTACK HGF, M-CSF, MIF, MIG, SCF, TNF- β の39種類の測定を病態急性期とIVIg療法前後に行った。一方、PDGF-bb, IL-1b, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, FGFbasic, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, TNF α , VEGFの27種類は、正常人と比較した。

1-2)大量免疫グロブリン療法は急性期川崎病血管炎において心筋ストレスマーカー-BNP/NTproBNP 値:31例(男16例、女15例、年齢;中央値;1歳、3ヶ月~148ヶ月)のaKDの典型例を対象とした。大量IVIg療法前後に血漿BNP(CLEIA法)と血清NTproBNP(ECLIA法)を測定し炎症性マーカー、心エコー上の左室駆出率との相関を検討した。また、IVIg反応例と不応例で、治療前値を検討した。IVIg投与量:2g/kg/day不応例への追加療法: Steroid Pulse:10例、Infliximab:3例、炎症性マーカーとして、WBC、CRP,% neutrophilを測定し比較した。

1-3)肺出血をきたしたANCA関連血管炎に対する大量γグロブリン療法: ANCA関連血管炎にて、肺出血を起こした症例に対して、大量γグロブリン(0.4g/kg/日×5日間)による治療を行った。

1-4)MPO-ANCA関連腎炎の寛解導入療法中の急性心不全に対する大量免疫グロブリン静注療法の有用性: 75歳女性。2008年2月頃より両耳難聴を自覚。2008年10月下旬より38℃台の発熱出現、CRP10.1mg/dlと高値を認め前前医入院。急速に腎機能悪化認め、10月末Cre0.52mg/dl→11月21日Cre1.36mg/dlに達した。全身検索中にMPO-ANCA陽性指摘、急速進行性糸球体腎炎精査・加療目的に11月21日当院腎臓内科転入院となり、精査のため腎生検施行した。大量免疫グロブリン静注療法(IVIg:0.4g/kg×5日)を併用した。

1-5)MPO-ANCA関連血管炎に対する低用量免疫グロブリン静注療法: 高齢発症のANCA関連血管炎2症例に対して、免疫グロブリンIVIg低用量(0.05g/kg/dayまたは0.07~0.14g/kg/day)を5日間投与した。全身状態の変化、CRPやANCAの値、腎所見に関しては血清クレアチニン(sCr)の経過もみた。

1-6)MPO-ANCA陽性Churg-Strauss症候群の臨床的検討: 対象は1977年から2009年7月までに杏林大学第一内科にて入院加療を行い、ANCAを測定したCSSの32症例。男性12例、女性20例、診断時平均年齢は54.0±13.9歳であった。平均観察期間は72.7ヶ月。病歴から検査所見、臨床像などを解析した。CSSの診断には、厚生労働省の診断基準を用いた。疾患活動性の評価にはBVAS(Birmingham Vasculitis Activity Score)を用い、BVAS0が6ヶ月以上持続している場合を寛解とした。再燃は、喘息症状を除くCSSの臨床症状が新たに、あるいは初期症状が再び出現した場合とした。MPO-ANCAの検出にはニプロ社製の測定試薬を用いた。

2) 臨床研究および疫学

2-1)高安動脈炎と大型動脈罹患型巨細胞血管炎について: 1952~1998年に順天堂医院(膠原病内科・循環器内科)にて大動脈造影にて診断・入院治療されたTAKの患者62名について(約半数が循環器内科、半数が膠原病内科での主科であった)、発症年齢、性別、動脈造影によるTAKの分類、治療法、予後などについて検討した。本研究で発症時の年齢について記載した。

2-2)抗好中球細胞質抗体(ANCA)関連血管炎の疫学(国際間の比較): PSVの調査対象疾患はEuropean Systemic Vasculitis Study Group(EUVAS)で行われている疫学調査と同様に、中小血管炎を引き起こすMPA,WG,CSSの3疾患群とし、これらの疾患の診断基準はEUVASで用いられてきたものと同じとした。調査は2005~2009年の毎年度末に、膠原病内科、腎臓内科、耳鼻咽喉科の専門病棟・外来を有する病院において行った。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

2-3)魚油によるANCA関連血管炎治療法の開発: SCG/Kjマウスモデルにおいて、制御性T細胞の誘導を解析し、そのバランスがEPAによりどのような修飾を受けるかを検討することにより、EPAの自己免疫制御薬としての可能性を探求した。SCG/Kjマウスを正常餌(魚粉抜き)群とEPA(5%混餌)群の2群に分け、12週令において脾臓、腎臓リンパ節、肺リンパ節を摘出し、FACS解析により免疫細胞の解析を行った。

3) 安定性と毒性試験

3-1)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。

3-2)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。

4) 国際評価関連—新基準に関する国際会議

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、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、2009年10月の欧米の会議(米国・フィラデルフィア)に出席した。

(倫理面での配慮【全般】)

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、個人情報にはコード化し、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(分担研究者においては当該機関の同等委員会)の許可を得て、動物愛護のもとに行った。

C. 研究結果

本年度の事業計画を綿密に討議し、主な結果を記載した。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) 人工ヒト化ガンマグロブリンの合成に関する研究

・人工免疫グロブリン合成に関する研究

VH-CH1-h型人工ガンマグロブリンの構築とクローンの多様性の検討: 前期までの開発研究の結果を踏まえ VH フラグメントの存在が人工ガンマグロブリンにおいて重要と考えられ、今期は VH-CH1-hinge-6xHis の構成による人工ガンマグロブリン重鎖 Fab で構築した。有効クローン率、多様性の保持、タンパク回収精製についても現実的な結果を得ることができ、ライブラリー構成も現実的な品質を備え、数千クローンのセット構築の可能性が示された。精製回収においても約 30mg/L の収量が期待でき、製剤への現実的なパイロット試行ができたものと考えられる。パイロットで有効であった全クローンについて、タンパク回収を試みている。来年度は、この班の評価を担当する研究分担者に vivo および vitro の評価に向け迅速に提供するためのシステム構築が重要であると考えられた。

(亀岡洋祐[医薬基盤研]、鈴木和男[千葉大医]、大島正道[国立感染研]、研究分担者、研究協力者)

2) 人工ヒト化ガンマグロブリンの評価法に関する研究

2-1) 免疫グロブリン製剤によるヒト白血球 PBMC のサイトカイン産生への影響: 臨床において有用性の高い免疫グロブリン製剤 (IVIg) は、その需要や安全性を確保するためにも人工化が望まれている。人工ガンマグロブリンの開発と臨床応用には、in vitro での評価法の確立と作用機序の解明が必要である。そこで本研究では、IVIg を用いて in vitro での評価法の確立を目指し、固相化 IVIg

によるヒト末梢血単核球 (Peripheral Blood Mononuclear Cell: PBMC) のサイトカイン産生への影響を検討し、さらに IVIg の完全分子型、不完全分子型の活性の比較、そして各種 PAMPs (pathogen-associated microbial patterns) 刺激による PBMC からのサイトカイン誘導に対する IVIg の作用について検討した。その結果、固相化 IVIg は、in vitro で PBMC からの IL-8、TNF- α 産生を誘導した。さらに、完全分子型 (IVIg)、不完全分子型 (F(ab')₂) を固相化して活性を比較したところ、F(ab')₂ は IVIg と比較して PBMC に対する IL-8、TNF- α 産生誘導が著しく低かった。一方、PBMC からの PAMPs 誘導サイトカイン産生に対する IVIg の作用を、完全分子型と不完全分子型で比較すると、どちらの IVIg の PAMPs によって誘導される IL-8、TNF- α 産生を抑制することが明らかになった。(大野尚仁[東京薬科大学薬学部]、長尾朋和、鈴木和男[千葉大学大学院・医学研究院]、研究協力者)

2-2) MPO-ANCA 腎炎患者のインターフェロンシステム: 健常人、IgA 腎症との比較から: MPO-ANCA 腎炎患者のインターフェロンシステムの特徴を明らかにするために、MPO-ANCA 腎炎患者(急性期)、IgA 腎症(慢性期、急性期)、健常人の IFN- α 産生能 (HVJ 刺激)、pDC 数、血漿中 IFN 値について比較検討した。IFN- α 産生能は、健常人; 8219 \pm 655, IgA 腎症; 8231 \pm 1215, MPO-ANCA 腎炎; 4432 \pm 740 IU/ml と、MPO-ANCA 腎炎患者の IFN- α 産生能は健常人と比較しても有為に低値であり、全体の 60%以上が 4000 IU/ml 以下と低値を示した (vs 健常人: 13%、IgA 腎症: 27%)。さらに pDC 数は一部の MPO-ANCA 腎炎患者で極端に低下していたが、IgA 腎症患者では健常人と有意な差は認められなかった。また MPO-ANCA 腎炎患者の血漿中 IFN- α および β を測定したところ、IFN- α は IFN- α 産生能低値群の一部に、IFN- β は低値および高値群の一部に検出された。このように MPO-ANCA 腎炎患者では、インターフェロンシステム不全が認められ、このことがその後の高サイトカイン血症の進展と関連する可能性が考えられた。(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]、鈴木和男[千葉大学大学院・医学研究院]、研究分担者、協力研究者)

2-3) 難治性血管炎の遺伝子解析: 高用量ヒト免疫グロブリン静注療法 (IVIg) が何故、川崎病などの自己免疫疾患に対する有効な治療のひとつであるかについての仕組みを理解する手段のひ

とつとして、難治性血管炎をはじめとした、自己免疫疾患患者の末梢血液細胞すなわち末梢血単核球 (PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell) で転写誘導 (抑制) されている多種類の遺伝子を単離し、そのうちのいくつかは各自己免疫疾患特有の転写誘導 (抑制) を示すことを見出してきた。これら遺伝子は良い診断マーカーになりうるが、実際にベッドサイドで実用化するには、壊れやすい RNA の扱いが容易でないこともあって、敷居が高いのが実情である。この問題を克服するため、本年度では簡便かつ迅速に PBMC (主として白血球) からタンパク質を回収できる新規な技術を開発したので報告する。(野島 博[大阪大学微生物病研究所])

3) モデルマウスによる *in vivo* の評価法に関する研究

3-1) CAWS 誘発血管炎モデルにおける TNF- α 製剤の血管炎抑制効果: CAWS 誘発マウス血管炎モデルに対して免疫グロブリンを投与した場合血管炎発生は抑制されることをこれまでに示した。本研究では近年川崎病などの血管炎疾患に対する新たな治療戦略として試みられつつある TNF- α 製剤に注目し、血管炎抑制効果について検討した。その結果、TNF- α 製剤投与により血管炎は著明に抑制され、本実験モデル血管炎発生に TNF- α が関与していることが示唆された。(高橋啓[東邦大学医療センター大橋病院病理]、協力者)

3-2) 免疫グロブリンの評価法としてのモデルマウスの検討: 人工ガンマグロブリンによる血管炎発症の治療効果を判定する目的で、「RPGN モデル」SCG/Kj マウスに、抗 IL-6R 抗体投与による IL-6 の RPGN 発症への関与、ミゾリビン、15-deoxyspergualin (DSG) を投与・比較した。その結果、抗 IL-6R 抗体により MPO-ANCA の低下が認められた。また、ミゾリビンの投与では緩和傾向が認められ、DSG の投与では尿所見、腎臓の病理組織所見、血清中の MPO-ANCA 値、脾臓中の CD3+B220+細胞のパラメーターで、有意な治療効果が認められた。さらに、DSG 投与によって IL-2, IL-12(p40), MIP-1 β の有意な低下が認められた。以上より、IL-6 が初期の自己抗体産生への関与が示唆され、新たな発症因子として IL-2, IL-12(p40), MIP-1 β が挙げられた。また、免疫グロブリンと同様に DSG の寛解導入薬としての有用性が認められた。緩解導入後に、副作用の少ないミゾリビンによる維持療法薬として併用することで、奏功を

得られる可能性が推察された。一方、CAWS 誘導の「冠状動脈炎モデル」に、ミゾリビン投与することで、冠状動脈炎の減少、上昇した炎症性サイトカインの低下が認められた。これらのモデルマウスの治療の成績から、モデルマウスの有用性と、人工ガンマグロブリンによる血管炎発症の治療効果の判定マーカーとして有用であることが示された。

(長尾朋和、鈴木和男[千葉大学大学院・医学研究院]、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] 高橋 啓 [東邦大・大橋病院]、研究協力者)

3-3) フリーのヘムによる自然炎症の検討: 人工グロブリンによる血管炎や臓器炎に対する治療の有効性を検討する上で、その炎症の機序を明らかにすることが重要である。近年、これらの炎症の進展に、細胞死によって放出される内因性の物質が、自然免疫を活性化し、炎症をさらに進展する機序があることがわかってきた。たとえば、熱ショック蛋白、ヒアルロン酸、ファイブロネクチン断片、尿酸などは danger signal として、炎症のカスケードをトリガーし、炎症を進展させることが報告されている。一方最近我々は、ラット自己免疫性心筋炎の心筋細胞を分離し、正常の心筋細胞と DNA microarray で遺伝子発現を検討した結果、いくつかの鉄代謝に関連する蛋白 (Lipocalin-2/NGAL, Hepsidin, HO-1) が著明に増加することを明らかにした。この蛋白の臓器障害における役割は不明な点が多いが、この現象は、鉄を含有するある物質が、炎症を促進させる”danger signal”になるのではないかと仮説を想定させる。我々は、この仮説に基づき、フリーのヘムが心臓の在住細胞に対して、炎症誘発蛋白、活性酸素種 (ROS) を産生するのではないかと考え、正常心臓から培養した細胞を用いて、定量的 RT-PCR、ELISA、Flow cytometry にて検討した。その結果、フリーのヘムは、炎症性サイトカイン、ケモカイン、プロスタグランジンおよび細胞内 ROS をこれらの細胞に対して強力に誘導することが明らかになった。フリーのヘムは主に心臓在住マクロファージに作用し、さらにこのマクロファージが平滑筋細胞や線維芽細胞などとクロストークしてこれらの蛋白を強力に誘導すると考えられた。さらにフリーのヘムの細胞内シグナルに NF- κ B が重要な役割をしていることが示唆された。(相澤義房[新潟大学大学院医歯薬大学院]、研究協力者)

3-4) 菌体成分誘発性肺炎における食細胞機能

異常の影響：炎症誘発における食細胞由来の活性酸素の影響を個体レベルで知るために、gp91^{phox} ノックアウトマウス (CGD マウス) における、菌体成分による誘発性肺炎の病態を解析した。まず、野生型および CGD マウスにザイモザンを経鼻投与すると、CGD マウスは野性型マウスよりも好中球性の肺炎が顕著に重篤化した。一方、リポポリサッカライド投与では両マウス間の肺炎の重篤度に有意な差は認められなかった。(荒谷康昭[横浜市立大学大学生命ナノ])

2. 臨床分科会

1) 人工ヒト化ガンマグロブリンの臨床試験にむけた IVIg 治療に関する研究

1-1) MPO-ANCA 陽性血管炎への IVIg による急性期治療の可能性 - サイトカインストームエ抑制効果のエビデンス：MPO-ANCA 陽性全身血管炎である顕微鏡的多発血管炎は我が国の RPGN の多くを占め、欧米と異なり、微小血管炎の多くがこの疾患であり、対応が急務である。急性期のこの病態に対する治療において、免疫抑制剤の多用による副作用を和らげ、さらに免疫補助療法としての、 γ グロブリン大量療法 (IVIg) の有用性は、すでにこの班から世界に発信しているところである。H21 年度は急性期患者の治療前後の血漿のサイトカイン、ケモカイン測定をおこない、そのエビデンスを検討した。結果として、多くの急性期に異常に上昇した血中サイトカイン、ケモカインは IVIg の大量療法で低下を示したが、とくに、炎症性所見と相関の深い M-CSF、IL18 と、同時に発現する組織修復性サイトカイン SCF は有意な低下をきたした。今後の人工グロブリン開発時の血管炎治療の効果発現パラメーターとして、これらのサイトカイン類を追跡することの有用性が示唆された。(武曾恵理[北野病院]、臨床班分科会員および協力研究者)

1-2) 大量免疫グロブリン療法は急性期川崎病血管炎において心筋ストレスマーカー-BNP/NTproBNP 値-を低下させる：免疫グロブリン (IVIg) 大量療法の心筋ストレスマーカーに対する効果を血中 BNP/NTproBNP にて評価した。その結果、両者とも正常域の時は IVIg 単回投与に反応することが多いが、約 2/3 にみられる両者の上昇例では IVIg 単回では効果が少なく、追加治療を必要とすることが多かった。結論として BNP/NTproBNP は IVIg の心筋ストレスマーカーへの影響を判定するのに有効である。(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)

1-3) 肺胞出血をきたした ANCA 関連血管炎に

対する大量 γ グロブリン療法：ANCA 関連血管炎は難治性であり、全身の血管の炎症を伴うが、中でも肺胞出血を合併する場合は特に予後が悪い。肺胞出血を伴う 2 症例にステロイド・パルス療法に加えて γ グロブリン大量療法を行い、軽快した症例を経験したので報告する。肺胞出血を伴う症例には、ANCA 血管炎を改善するだけでなく、感染症の予防にもなり、高齢者においては、免疫抑制剤による治療以外の方法として考慮できる可能性がある。(今井圓裕[名古屋大学大学院医学系研究科・腎臓内科]、研究協力者)

1-4) MPO-ANCA 関連腎炎の寛解導入療法中の急性心不全に対する大量免疫グロブリン静注療法の有用性【症例報告】：75 歳女性。平成 20 年 10 月、発熱と全身倦怠感を認め近医入院。高度の炎症反応 (CRP12.8mg/dl)、MPO-ANCA 33U/ml、血蛋白尿を伴う進行性腎機能低下 (血清 Cre 0.5mg/dl \rightarrow 0.96mg/dl) より、MPO-ANCA 関連腎炎が疑われた。寛解導入療法として、副腎皮質ステロイド薬単独投与 (PSL30mg : 0.8mg/kg) を開始し、腎機能は改善したが、PSL 投与 18 日目に突然の呼吸困難が出現し、心臓超音波検査でびまん性左室収縮能低下を認め、急性左心不全を併発した。ウイルス感染症の関与が否定できず免疫抑制療法の強化に躊躇し、大量免疫グロブリン静注療法 (IVIg : 0.4kg/kg \times 5 日) を併用したところ、左心不全は徐々に改善した。その後、副腎皮質ステロイド薬を減量するも、心不全、腎機能障害の再燃は認めず経過している。(山縣邦弘[筑波大学院医学研究科]、研究協力者)

1-5) MPO-ANCA 関連血管炎に対する低用量免疫グロブリン静注療法：大量免疫グロブリン静注 (IVIg) 療法は、血管炎の治療として感染予防の点でも、immunomodulatory therapy としても有用な治療と考える。MPO-ANCA 関連血管炎患者は高齢者に好発し、特に、感染契機での発症、合併する場合も多い。しかし、現実には、保険認可の面から、大量 IVIg 療法を行うことは日常診療では困難である。重症感染症には低用量免疫グロブリン療法の使用は認められている。低用量の IVIg 投与でも、発熱や CRP 上昇などの非特異的炎症反応も抑制することが出来る症例もあり、免疫抑制療法を行う前には、高齢者や感染などが否定できない血管炎症例においては、試みるべき治療法と考える。(湯村和子[自治医科大学腎臓内科]、研究協力者)

1-6) MPO-ANCA 陽性 Churg-Strauss 症候群の臨床的検討：Churg-Strauss 症候群(CSS)における MPO-ANCA 陽性 14 例と陰性 18 例の 32 臨床像の相違につき、比較検討した。CSS における ANCA 陽性率は 44%で、全例 MPO-ANCA であった。ANCA 陽性 CSS は、平均年齢 55.1 ± 13.0 歳で年齢は ANCA 陰性例 (平均 53.1 ± 14.8 歳) と差はなく、性別では男女比 1 : 0.75 と ANCA 陰性例の 1:3.5 に比べ男性に多く ($p < 0.05$)、腎症の合併頻度は 57.1%と有意に高かった (ANCA 陰性例 : 17%, $p < 0.01$)。また、ANCA 陽性例では急速進行性腎炎、肺出血といった重篤な血管炎症候を伴う例がみられた。CSS では ANCA 陽性の有無にかかわらず、初期治療に対する反応性は良好で寛解導入率は 100%であった。しかし、再燃率は 28%と高率で、特に ANCA 陽性例では再燃率は 50%におよび、ANCA 陰性例(11%)より有意に高率であった($p < 0.05$)。MPO-ANCA 陽性 CSS は、男性に多く、腎症の合併頻度が高く、重篤な症例がみられ、再燃率も高率である事が明らかとなった。(有村義宏 [杏林大学医学部腎臓内科]、研究協力者)

2) 臨床研究および疫学

2-1) 高安動脈炎と大型動脈罹患型巨細胞血管炎について：大型血管炎に関して日本と欧米間での大きな差異が認められる。我々は、1952～1998 年に順天堂医院 (膠原病内科・循環器内科) にて大動脈造影にて診断された高安動脈炎 (TAK) 62 名の 22.2%の症例で発症時年齢が 50 歳以上であることを報告した (ACR, 2000)。その前後に巨細胞動脈炎 (GCA) の概念が拡大され、GCA では高頻度に大動脈やその分枝に病変を合併することが報告され (Large-vessel GCA: LV-GCA)、生検にて側頭動脈に病変のない症例も、LV-GCA と考えられるようになった。このような症例は、日本では「大動脈炎症候群」と呼ばれたと推定される。日本では典型的な GCA (側頭動脈炎) は稀であるが、LV-GCA は散見されること、このために、日本の GCA は、側頭動脈炎の罹患が少ない LV-GCA が多いのかと推定される。最近、Takayasu arteritis and giant cell arteritis: a spectrum with in the same disease? (Medicine ;200988(4):221-6) との報告が発表され、大型血管炎の日・アジア地域の疫学を調査が必要であると考えられる。(小林茂人 [順天堂大学医学部付属越谷病院]、研究協力者)

2-2) 抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎の

疫学 ～国際間の比較に向けて～：宮崎県下での ANCA 関連血管炎 (ANCA-associated primary systemic vasculitis ; PSV) の 2005～2009 年の 5 年間の疫学調査を行なった。今回の調査は、膠原病内科、腎臓内科、耳鼻咽喉科の専門病棟・外来を有する病院において、毎年 12 月末に行った。この 5 年間の PSV の発症率は、15 歳以上の成人で 22.6 ± 4.1 (95% C.I 19.2-26.0) /100 万人・年、65 歳以上では 57.9 ± 15.8 (95% C.I 44.6-71.1) /100 万人・年}であった。全 86 例中、MPA (microscopic polyarteritis) / RLV (renal limited vasculitis) 69 例、WG (Wegener granulomatosis) 8 例、CSS (Churg-Strauss syndrome) 9 例が確認された。障害臓器としては、腎・肺病変が各々 80.0%、44.2%と多く、ANCA に関しては MPO-ANCA 陽性例が 84.9%、PR3-ANCA 陽性例が 7.0%であった。今回の結果は、以前に我々が行った宮崎地区における PRV (ANCA-associated primary renal vasculitis) の疫学調査と同様に、PSV の多くは MPA (microscopic polyarteritis) / RLV (renal limited vasculitis) で、しかも多くは MPO-ANCA 陽性であることが確認された。以上のように、今までの英国の報告と比べると、本邦の PSV の疾患・障害臓器の内訳、MPO-/PR3-ANCA 比は明らかに異なることが示唆された。(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)

2-3) 魚油による ANCA 関連血管炎治療法の開発：我々は EPA が心血管系のみならず自己免疫疾患の発症を抑制する可能性について検証した。ANCA 血管炎の自然発症型モデルである SCG/Kj マウスに血管炎発症前から EPA (5% 混餌) を長期投与したところ、急速進行性腎炎が抑制され生命予後が著明に改善されることが判明した。さらに EPA 投与は MPO-ANCA 産生を明らかに抑制し、自己免疫制御効果を示唆した。また自己免疫を調節するとされる制御性 T 細胞が炎症臓器である腎臓において誘導され、自己免疫性疾患において病原性が示唆される CD4/CD8 ダブルネガティブ T 細胞は顕著に抑制されていた。このことから EPA は炎症を抑えるのみならず自己免疫調節機能を有していることが確認された。(平橋淳一 [東京大学医学部府付属病院腎臓内分泌内科]、研究代表者、研究協力者)

3) 新基準に関する国際会議

これまでの日欧間の調査と議論から浮かび上がった臨床症状・ANCA 型別の頻度など相違点をふ

まえて、2008年3月と12月にチューリッヒでのEULAR/ACRの分類基準の見直し討論に参加した。アンケートで論議すべき問題点が集計され、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。疾患名の変更に関する提案が行われた。しかし、結論は、現行の疾患名の変更は行わないこと、Wegenerについては事実の調査を継続すること、コメントを記載することとなった。

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。1)症候群やサブグループに対しては、可能な限り病態生理学的の観点からの階層制で表現する。2)症候群と一次性/二次性血管炎との間でのオーバーラップについては、症候群が一次性か二次性血管炎か、関連性の深い選択肢に分類される。3)診断の信頼性をその状態においてDefinite, Probable, Passibleの段階に定義する。個々の症例では診断の信頼性がより確実な方向に変化する。4)小児の血管炎、血管炎の類似疾患、非炎症性血管障害も分類上考慮する。これらの基本方針に基づいて、この議論のまとめは、論文として受理された。現在、この議論から抽出された提案は、欧州・米国・日本の3地域からの関連施設の登録により検証されることになり、日本からも血管炎関連の班を中心として登録することが、EULAR/ACR新診断基準会議事務局にて了承された。また、14th Vasculitis Meeting and Workshop (Lund)の関連会議でも話題になった。

本ワークショップに関連して、2012年3月、東京にて「The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012」の開催が、厚生省科研費「血管炎」関連の研究班の協力を得て開催することが決まった。(最終ページ参照)

4) 安全試験

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)

D. 考察

これまで作製してきたヒト型のプロトタイプ遺伝子クローンを絞込みができた。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マーカが具体的に挙げることができた。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のデータの蓄積および他の治療法などの検討を継続的に新しい新知見が得られている。免疫グロブリンの需要増加やリスク軽減から免疫グロブリンの人工化を推進し、ヒト型人工免疫グロブリンのクローンの絞込みができたことは、次年度の治療法の確立に向けて向けて前進した。

1. 基礎分科会：人工ヒト化ガンマグロブリンの合成に関する研究—人工免疫グロブリン合成に関する研究VH-CH1-h型人工ガンマグロブリンの構築とクローンの多様性の検討：有効クローン率、多様性の保持、タンパク回収精製についても現実的な結果を得ることができ、ライブラリー構成も現実的な品質を備え、数千クローンのセット構築の可能性が示された。また、人工ヒト化ガンマグロブリンの評価法に関する研究では、IVIgを用いて*in vitro*での評価法の確立を目指し、固相化IVIgによるヒト末梢血単核球PBMCのサイトカイン産生への影響を検討し、さらにIVIgの完全分子型、不完全分子型の活性の比較、そして各種PAMPs (pathogen-associated microbial patterns) 刺激によるPBMCからのサイトカイン誘導に対するIVIgの作用について検討し、固相化IVIgは、*in vitro*でPBMCからのIL-8, TNF- α 産生を誘導した。さらに、完全分子型 (IVIg), 不完全分子型(F(ab')₂)を固相化して活性を比較したところ、F(ab')₂はIVIgと比較してPBMCに対するIL-8, TNF- α 産生誘導が著しく低かった。一方、PBMCからのPAMPs誘導サイトカイン産生に対するIVIgの作用を、完全分子型と不完全分子型で比較すると、どちらのIVIgのPAMPsによって誘導されるIL-8, TNF- α 産生を抑制することが明らかになった。これらは、人工グロブリンの作用機序を解明する上で貴重なデータとなった。

一方、新たなマーカとしてIFN- α 産生能が浮かび上がった。MPO-ANCA腎炎患者のIFN- α 産生能は健常人と比較しても有為に低値であり、pDC数は一部のMPO-ANCA腎炎患者で極端に低下していた。またMPO-ANCA腎炎患者の血漿中IFN- α および β を測定したところ、IFN- α はIFN- α 産生能低値群の一部に、IFN- β は低値および高値群の一部に検出された。このようにMPO-ANCA腎炎患者では、インターフェロンシステム不全が認められ、このことがその後の高サイトカイン血症の進展と関連する可能性が考えられた。

さらに、難治性血管炎の遺伝子解析のツールが整ってきた。実際にベッドサイドで実用化するには、壊れやすいRNAの扱いが容易でない

こともあって、敷居が高いのが実情である。この問題を克服するため、本年度では簡便かつ迅速に PBMC（主として白血球）からタンパク質を回収できる新規な技術を開発できたことは、臨床試験に向けて大きく前進した。

モデルマウスによる *in vivo* の評価法に関する研究としては、人工ガンマグロブリンに含まれる TNF- α 抗体などがあり、CAWS 誘発血管炎モデルにおける TNF- α 製剤の血管炎抑制効果を検討した。その結果、TNF- α 製剤投与により血管炎は著明に抑制され、本実験モデル血管炎発症に TNF- α が関与していることが示唆された。そして、ミゾリビン投与することで、冠状動脈炎の減少、上昇した炎症性サイトカインの低下が認められた。また、「RPGN モデル」SCG/Kj マウスに、抗 IL-6R 抗体により MPO-ANCA の低下が認められ、ミゾリビンの投与では緩和傾向が認められ、DSG の投与では尿所見、腎臓の病理組織所見、血清中の MPO-ANCA 値、脾臓中の CD3+B220+細胞のパラメーターで、有意な治療効果が認められた。新たな発症因子として IL-2, IL-12(p40), MIP-1 β が挙げられた。これらのモデルマウスの治療の成績から、モデルマウスの有用性と、人工ガンマグロブリンによる血管炎発症の治療効果の判定マーカーとして有用であることが示された。

2. 臨床分科会：人工ヒト化ガンマグロブリンの臨床試験にむけたIVIg治療に関する研究：サイトカインストーム抑制効果のエビデンス：急性期患者の治療前後の血漿のサイトカイン、ケモカイン測定をおこない、そのエビデンスを検討し、多くの急性期に異常に上昇した血中サイトカイン、ケモカインはIVIgの大量療法で低下を示したが、とくに、炎症性所見と相関の深いM-CSF、IL18と、同時に発現する組織修復性サイトカイン SCFは有意な低下した。今後の人工グロブリン開発時の血管炎治療の効果発現パラメーターとして、これらのサイトカイン類を追跡することの有用性が示唆された。

また、急性期川崎病血管炎での大量免疫グロブリン療法はにおいて心筋ストレスマーカー-BNP/NTproBNP 値が低下した。結論としてBNP/NTproBNP はIVIgの心筋ストレスマーカーへの影響を判定するのに有効である。

その他、IVIg療法の臨床データ有効例について報告した。また、最近IVIgの治療の適応拡大が認可された **Churg-Strauss 症候群** についてのまとめをした。CSSにおけるANCA陽性率は44%で、全例MPO-ANCAであった。CSSではANCA陽性の有無にかかわらず、初期治療に対

する反応性は良好で寛解導入率は100%であった。しかし、再燃率は28%と高率で、特にANCA陽性例では再燃率は50%におよび、ANCA陰性例(11%)より有意に高率であった($p<0.05$)。MPO-ANCA陽性CSSは、男性に多く、腎症の合併頻度が高く、重篤な症例がみられ、再燃率も高率である事が明らかとなった。今後のIVIg治療の成績が期待される。

一方、臨床研究および疫学においては、まず、高安動脈炎と大型動脈罹患型巨細胞血管炎について：大型血管炎に関して日本と欧米間での大きな差異が認められる。日本では典型的なGCA(側頭動脈炎)は稀であるが、LV-GCAは散見されること、このために、日本のGCAは、側頭動脈炎の罹患が少ないLV-GCAが多いのかと推定される。最近の報告も考えると、大型血管炎の日・アジア地域の疫学を調査が必要であると考えられる。加えて、抗好中球細胞質抗体(ANCA)関連血管炎の疫学(国際間の比較)では、宮崎県下2005~2009年の5年間の疫学調査結果から、 22.6 ± 4.1 (95% C.I 19.2-26.0) /100万人・年、65歳以上では 57.9 ± 15.8 (95% C.I 44.6-71.1) /100万人・年であった。障害臓器としては、腎・肺病変が各々80.0%、44.2%と多く、ANCAに関してはMPO-ANCA陽性例が84.9%、PR3-ANCA陽性例が7.0%であった。今回の結果は、以前に我々が行った宮崎地区でのPRVの疫学調査と同様、PSVの多くはMPA/RLVで、多くはMPO-ANCA陽性であることが確認された。以上のように、今までの英国の報告と比べると、本邦のPSVの疾患・障害臓器の内訳、MPO-/PR3-ANCA比は明らかに異なることが示唆された。

最後に、国際評価(新基準)会議へ、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り、わが国からのACR/EULARの新基準策定メンバーとなり参画することになった。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応えるようにしたい。

E. 結論

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。2010年1月にChurg-Strauss症候群(CSS)への適応拡大が認可されるなど需要の増加に加え、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の急務となっている。そこで、本研究では、免疫グロブリンの

人工化を目的とした。本年度は、ヒト型の臨床試験に向けてプロタイプクローンの構成を絞り込み、モデルマウスでの評価に加え、*in vitro*での体外評価法も検討した。1) ヒト型人工ガンマグロブリンのクローンの絞込み、2) モデルマウスによる力価判定法と評価マーカの検討、3) 体外診断法の開発の検討：免疫系と血管内皮細胞、4) 臨床治験をみすえた臨床研究を中心に研究し、ヒト型人工免疫グロブリンの *in vivo* と *in vitro* 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) でも採用されており、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り、わが国も ACR/EULAR の新基準策定メンバーとなった。本研究事業での臨床分科会および基礎分科会で成果を、国民の保健・医療ならびに効率的な医療経済に応えるようにしたい。

参考資料 (最終ページ)

本ワークショップに関連して、2012年3月、東京にて「The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012」の開催が、厚労省科研費「血管炎」関連の研究班の協力を得て開催することが決まった。

会長：鈴木和男(千葉大院医、当班代表研究者)、副会長：榎野博史(岡山大学院医)、尾崎承一(聖マリアンナ医大)、実行委員長：有村義宏(杏林大学医)、プログラム委員長：石津明洋(北大・院医)の国内組織から成っている。

(最終ページ参照)

F. 健康危険情報

今年度は、特になし。

G. 研究発表：(分担者の項の記載を参照)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 特許第439275号

(人工ポリクローナル免疫グロブリンの製造方法、並びに、免疫グロブリン製剤の製造方法(鈴木和男、他))

2) 11.11.2009 Bulletin 2009/46 EP 1 707 628 B1 (欧州特許)「Methods for producing recombinant polyclonal Immunoglobulins」Suzuki et al.

3)「白血球タンパク質の回収方法および回収装置(特願2009-245168)【発明者】野島博、藪田紀一、奥崎大介【出願者】大阪大学知的財産本部(管理番号K2009-0042)【出願日】2009

年(平成21年)10月26日

付属資料-1 第一回班会議プログラム
(公開シンポジウム併催)

付属資料-2 第二回班会議プログラム
(公開シンポジウム併催)

The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012

Date: March 28 (Wed) - 31(Sat), 2012
Venue: Shinagawa, Tokyo, Japan

President:
Kazuo Suzuki, Chiba University Graduate School of Medicine

Vice President:
Hirofumi Makino, Okayama University Graduate School of Medicine
Shoichi Ozaki, St. Marianna University School of Medicine

Secretariat:
Chiba University Graduate School of Medicine
International Division of Project of Intractable Diseases

International Faculty members:

Asian-Pacific

Japan : Kazuo Suzuki (Chiba University Graduate School of Medicine)

Australia : Judith Anne Savage (Melborne),
Chen Ai Feh (Vasculitis co-ordinator),
Paul A Galenby AM (ANU)

China : Ming-hui Zhao (Peking University, Nephrology)

Hong Kong : TM Chan (University of Hong Kong)

Korea : Yeong-Wook Song (Seoul National University College of Medicine)

New Zealand : Michael Lam, Janak de Zoysa, Martin Searle, Janie Kendrick-Jones,
Jim O'Donnell

India : Paul Bacon

Turkey : Seza Ozen (Hacettepe University)

Vietnam : Pham Huu Hoa (National Hospital of Pediatrics)

Mexico : Flores-Suarez, Luis, Felipe

Canada :

US : Peter Merkel (Boston, U.S Vasculitis Clinical Research Network-Peter Merkel),
Ulrich Specks (Mayo),
Ronald Falk and Charles Jennette (Chapel Hill),
David Jayne (UK), Niels Rasmussen (Denmark),
Cees Kallenberg (The Netherlands),
Wolfgang Gross (Germany), Loic Guillevin (France),
David Scott (UK), Richard Watts (UK),
Kerstin Westman (Sweden)

EUVAS

人工免疫グロブリン合成に関する研究
VH-CH1-h 型人工ガンマグロブリンの構築とクローンの多様性の検討

研究分担者 亀岡洋祐（独）医薬基盤研究所・生物資源研究部 主任研究員

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

研究協力者 大島正道 国立感染症研究所・免疫部 室長

研究要旨： 前期までの開発研究の結果を踏まえ VH フラグメントの存在が人工ガンマグロブリンにおいて重要と考えられ、今期は VH-CH1-hinge-6xHis の構成による人工ガンマグロブリン重鎖 Fab で構築した。有効クローン率、多様性の保持、タンパク回収精製についても現実的な結果を得ることができ、ライブラリー構成も現実的な品質を備え、数千クローンのセット構築の可能性が示された。精製回収においても約 30mg/L の収量が期待でき、製剤への現実的なパイロット試行ができたものと考えられる。パイロットで有効であった全クローンについて、タンパク回収を試みている。来年度は、この班の評価を担当する分担研究者に *in vivo* および *in vitro* の評価に向け迅速に提供するためのシステムを構築し、治験にむけた大量に精製することが重要であると考えられた。

A. 研究目的

前期までの研究の蓄積によって健常者の生体内で保持されている IgG 分子種からクローニングされた VH, VL フラグメントのランダムな組み合わせにより構築された人工ガンマグロブリンがマウスモデル系において血管炎における治療効果が本研究班の高橋らの分担研究により確認され、また本分担研究においても炎症性サイトカインであるヒト TNF α を用いた western 解析により TNF α 結合能を持つクローンを再構成できていることを示した。また、ライブラリーに含まれるクローンの核酸配列から予想したアミノ酸配列によるクラスター解析とデータベースとの比較解析から、抗ヒト TNF α 抗体と 85% 以上の類似性を持つ抗体クローンを数パーセント（2%程度）と単一の抗原に対するものとしては高い割合で含まれていることを示し、生体内での恒常性維持に重要なクローンを含んでいることが示された。10の10乗ともいわれる抗体種の中から VL, VH のランダムな組み合わせで結合能を持たせることができたことは、VH フラグメントの機能が強く寄与していることが示唆された。

これら前期で得られた知見をもとに今期における分担研究では VH フラグメントの機能に注目し VH-CH1-hinge で構成される Fab フラグメントの重鎖部分による人工ガンマグロブリンを構築し、その機能を検証するために新たなライブラリー作成を行った。VH フラグメントのみではタンパクの安

定化と作用保持の機能に不十分となることが予想され、また、天然の抗体ではhinge部分でのSS結合により二量体となることにより抗体としての機能を果たしていることから、hinge部分での二量体化を可能とするよう考案して健常者に保持される抗体ライブラリーの構築を行い、本年度においてはパイロット的に1000クローンの配列解析を行いライブラリーの評価を行いフルサイズでVH-CH1-hingeフラグメントを発現できる有効クローンの選別を行い、数百クローンからなるポリクローナル人工ガンマグロブリンを構成する。今回の試行では3'末端にヒスチジンタグを付加し、機能性クローンの大量培養・精製を視野に入れた構成を行い実際の製剤化を意識した構成とした。このパイロット構築による人工ガンマグロブリンを早い段階で*in vivo*および*in vitro*での評価を共同の分担研究者に迅速に提供するシステム構築も本分担研究の目標の重要な部分として掲げる。

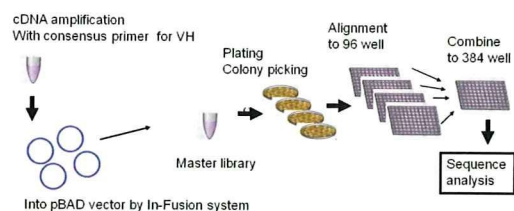
B. 研究方法

VH-CH1-hinge 型人工ガンマグロブリンの構築とクローンの解析

前期に作成した VL-VH 複合体による人工ガンマグロブリンでは pET ベクターを用いたが、今期では人工ガンマグロブリンの回収量をさらに増やすためにアラビノースプロモーターによる発現制御ができる pBAD ベクターを用いた。前期までの経験からクローン構築、スクリーニング時に極めて高い変異体出現率が観察されたことから、ガンマグロブリンの導入タンパク発現が菌の生存にとって toxic に働く可能性が示唆されたため、クローンのスクリーニングまで

はタンパク発現を抑制しておく必要があり、このためにもアラビノースプロモーターによる制御は有利であると考えられる。下段に示す VH-CH1-hinge の cDNA フラグメントを得るために、VH 領域 5' 末端および hinge 領域 3' 末端のコンセンサス配列からプライマーを設計し、健常者末梢血単核球のトータル RNA より reverse transcription PCR により cDNA フラグメントを得て、任意の配列で組み込みが可能な InFusion システムを用いて pBAD ベクターのアラビノースプロモーター直下に、また 3' 末端に 6 個のヒスチジンタグが付加されるように組み込みを行い VH-CH1-hinge-6xHis のタンパク発現を可能とする組換え体を作成し、図 1 に示すように、プレーティングからコロニーピック整列ライブラリー作成を行い、今年度はパイロットとして 1000 クローン選択し塩基配列解析を行った。配列解析からタンパク発現有効クローンを選択し、アラビノース添加により組換えタンパクを誘導培養し、集菌、8M 尿素により封入体を可溶化して、Ni キレートカラムにより組換えタンパクの精製を行った。

【図 1】



Master library was made from a VH cDNA fragment by using pBAD vector
1000 clones were picked up from the library and analyzed the sequence.

C. 研究結果

パイロット試行による末梢血単球トータル RNA10 μ g から調整した VH-CH1-hinge フラグメント挿入 pBAD ライブラリーの形質転換体の含有量は 9700 クローンと計算され、その内の 1000 クローンをランダム抽出し塩基配列解析を行った。その結果、245 クローンがガンマグロブリン重鎖の構造を持つタンパクを発現できることが分かった。この 245 クローンのうち VH-CH1-hinge-6xHis の構造が一部壊れているクローンは 21 クローンあり、正しく構造が保たれているクローンは 224 クローンであった (図 2)。さらに、クラスター解析により重複する (全く同一の配列を持つ) クローンを検索したところ 46 クローンが重複クローンであることが分かり、最終的に正しいタンパクを発現できるクローンは 178 クローンであった (図 2)。

これらのクローンがヒトガンマグロブリン重鎖の構造を正しくとるかどうかを、10 個のクローンをランダムに選抜しウエスタンブロットを用いて、抗ヒト IgG 抗体および抗ヒト IgG Fab2 抗体を用いて検出を行ったところ、10 クローンのすべてが両方の抗体で検出され、構築したタンパクの理論分子量 30kDa にバンドが確認された (図 3)。これらのクローンを独立して培養を行い図 4 に示す方法によって菌体内の封入体を 8M 尿素、0.5M NaCl, 20mM リン酸 pH7.4 のバッファーに溶解し、Ni キレートカラム (HisTrap) により精製を行った。カラムクロマトグラフィーは、結合バッファー 8M 尿素、0.5M NaCl, 20mM リン酸 pH7.4、5mM imidazol、溶出バッファー 8M 尿素、0.5M NaCl, 20mM リン酸 pH7.4、500mM imidazol、

を用いて直線勾配により溶出させた (図 5)。狭雑タンパクがやや多いものの画分、6, 7, 8 (imidazol 140mM から 200mM) に目的の組換え VH-CH1-hinge-6xHis タンパクが精製されてきていることが確認された。図 6 に選抜 10 クローンの 200ml 培養からのタンパク回収量を示す。平均では 200ml 培養から 5.3mg が回収され、1L の培養を行えば 25 ~30mg のタンパク回収が可能であることが示された。

【図 2】

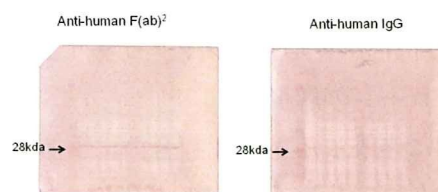
Summary of cluster analysis

- 245 clones were coded peptide with 6xHis tag in 1000 clones
- 224 clones have correct structure of VH-CH1-hinge-6xHis (21 clones have broken structure)
- 46 clones were redundant in 224

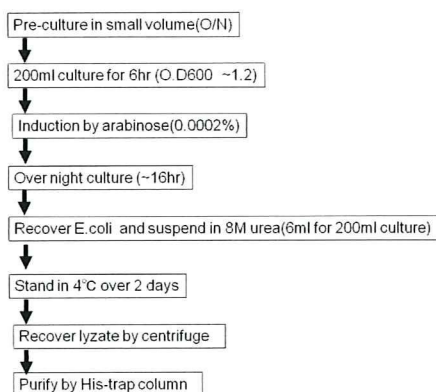
178 unique clones could be obtained from one thousand

【図 3】

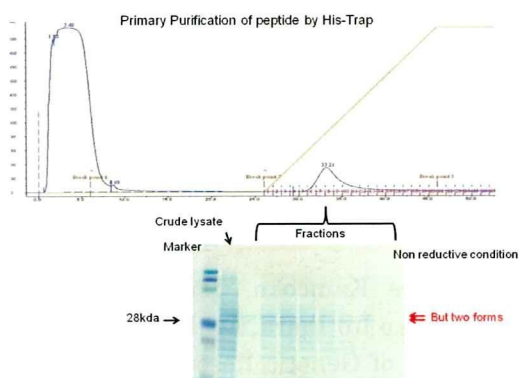
Western blot analysis of putative ten clones
(Run on reduction condition)



【図 4】

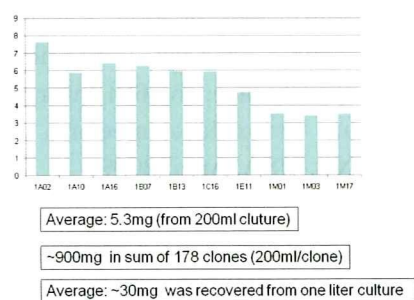


【図 5】



【図 6】

Recovery of protein from representative ten clones



D. 考案

これまでの人工ガンマグロブリン研究班の成果を踏まえて迅速な組み替え体作成とライブラリー評価、クローン解析を行うことを可能とした。ライブラリーの品質に関しても末梢血 10ml 換算で 1 万クローン (1 万種類) の組み替え体作成が可能であること

が示され製剤化に現実的なレベルに迫ってきたものと評価できる。しかしながら、パイロット 1000 クローンの解析では、有効クローン率が 17.8% (重複クローン含みで 22%) とまだ 2 割弱の結果である。このことは大腸菌での発現系では、微生物に対する抗体クローンが組み込まれた場合に菌の生存を阻害してしまうことにより、形質転換体はスクリーニングできるが極めて高い率で変異が見られることから、組換タンパク合成が阻害されたものが生残してきていることが考えられる。アラビノースプロモーター制御下に組換えタンパクを挿入してはいるものの、タンパク発現の on/off は完全なものではないためにこのような結果になったことが考えられる。タンパク発現の制御の強いベクター系を用いることにより、有効クローン率の改善が図られる可能性がある。

配列解析による有効クローンとクラスター解析の結果から、前期に構成された人工ガンマグロブリンに比較して数パーセントの有効率が改善され、クラスター解析の結果から、前期の構成では 4 から 5 個のクラスター (抗体群) に分類されていたが、今回は 10 群以上の広い範囲でクローニングされてきており、多様性の保持に関しても改善してきているものと考えられる。

有効クローンのうち選抜 10 クローンでのウエスタンブロットの解析結果から抗ヒト IgG 抗体および抗ヒト IgG Fab2 抗体の両方で検出できたことから組換えタンパクはヒトガンマグロブリン重鎖の Fab フラグメントの構造を保っていることが確認された。

作成された VH-CH1-hinge-6xHis を持つ有効クローン培養からのタンパク抽出と Ni

キレートカラムによる精製では目的タンパクが高純度とはいえないまでも精製され回収量は平均で1L当たり30mgと製剤を目指す上において現実的な回収量を実現することができた。

E. 結論

前期までの開発研究の結果を踏まえ VH フラグメントの存在が人工ガンマグロブリンにおいて重要と考えられた事から、今期は新たに VH-CH1-hinge-6xHis の構成によるガンマグロブリン重鎖の Fab フラグメント部分でのポリクローナル人工ガンマグロブリンを構成した。前期に比較して有効クローン率、多様性の保持、タンパク回収精製についても現実的な結果を得ることができた。またライブラリー構成も現実的な品質を備えることができた。精製回収においても約30mg/Lの収量が期待でき、製剤への現実的なパイロット試行ができたものと考えられる。パイロットで有効であった全クローンについて、タンパク回収を試みている。来年度では、*in vivo* および *in vitro* での評価分担研究へ迅速に提供するためのシステム構築が重要であると考え治験に向けた大量培養精製のシステム化が望まれる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Osada N, Hirata M, Tanuma R, Suzuki Y, Sugano S, Terao K, Kusuda J, Kameoka Y, Hashimoto K, Takahashi I. Collection of Macaca fascicularis cDNAs derived from bone

marrow, kidney, liver, pancreas, spleen, and thymus. BMC Res Notes. 2009 Sep 29;2:199.

2. Miura NN, Komai M, Adachi Y, Osada N, Kameoka Y, Suzuki K, Ohno N. IL-10 is a negative regulatory factor of CAWS-vasculitis in CBA/J mice as assessed by comparison with Bruton's tyrosine kinase-deficient CBA/N mice. J Immunol. 2009 Sep 1;183(5):3417-24. Epub 2009 Aug 12.
3. Higashino A, Osada N, Suto Y, Hirata M, Kameoka Y, Takahashi I, Terao K. Development of an integrative database with 499 novel microsatellite markers for Macaca fascicularis. BMC Genet. 2009 Jun 5;10:24.

2. 学会発表

国際会議

1. Yosuke Kameoka, Tsuyoshi Kasama, Toshiko Ito-Ihara, Eri Muso and Kazuo I. Lab. of Genetic Resources, Nat'l Inst of Biomed. Innov., Showa University, Sch. of Med. Kyoto Univ. Sch. of Med., Dept. of Nephrol., Kitano Hsp., Chiba University, Sch. of Med. Possible role for the leader peptide of myeloperoxidase. the 6th International Human Peroxidase meeting, Chapel Hill, NC, USA, April 2009

国内会議

1. 亀岡洋祐、内田敬子、田中早苗、平田誠、田沼玲子、竹内昌男、竹内喜久子、長田直樹、高橋一朗、三浦典子、大野尚仁、鈴木和男 モノバレント VH-CH1-h 型人工ガンマグロブリンの多様性と結合性の検討 第15回MPO研究会、2009年11月、(下野市 自治医大)
2. 亀岡洋祐、内田敬子、田中早苗、平田誠1、田沼玲子、竹内昌男、竹内喜久子、長田直樹、高橋一朗、三浦典子、大野尚仁、鈴木和男 改良型人工ガンマグロブリンの多様性と結合性の検討 第32回日本分子生物学会年会 2009年12月(横浜)
3. 竹内昌男、竹内喜久子、亀岡洋祐、小原