

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

M3R を分子標的とした自己免疫性唾液腺炎に関する研究

研究分担者 住田 孝之 筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻臨床免疫学 教授
研究協力者 坪井 洋人、中村 友美、飯塚 麻菜、松本 功
筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻臨床免疫学

研究要旨 シェーグレン症候群(SS)患者血清中にムスカリン作働性アセチルコリン受容体 3 (M3R) に対する自己抗体が存在すること、末梢血単核球に M3R 反応性 CD4+T 細胞が存在することが明らかにされてきた。本研究では、M3R 分子に対する免疫応答が自己免疫性唾液腺炎を誘導するか否かを検討する事を目的とした。M3R-/-マウスに M3R ペプチドを免疫しその脾細胞を Rag-1-/-マウスに経静脈的に細胞移入した。その結果、1) M3R-/-マウスにおいて M3R 反応性 T 細胞が IFN- γ および IL-17 を産生した、2) M3R-/- \rightarrow Rag-1-/-マウスにおいて唾液量が減少していた、3) 血清中に抗 M3R 抗体が検出された、4) CD4+T 細胞を中心とした細胞浸潤を伴う唾液腺炎が認められた、5) M3R を免疫した M3R-/-マウス由来の CD3+細胞だけを Rag-1-/-マウスに細胞移入することにより唾液腺炎を誘導した、などを明らかにしてきた。以上の研究成果から、M3R を認識する T 細胞が SS 類似の自己免疫性唾液腺炎発症に重要であることが判明した。今後、M3R の T 細胞エピトープを決定しアナログペプチドによる自己免疫性唾液腺炎の抗原特異的制御法を開発する。

A. 研究目的

免疫難病の一つであるシェーグレン症候群(SS)の発症機序に、唾液腺に浸潤した自己反応性 T 細胞が重要な役割を果たしている。特に、ムスカリン作働性アセチルコリン受容体 M3 (M3R) に対する T 細胞は唾液腺破壊に関わるばかりでなく、サイトカイン産生を介して抗 M3R 自己抗体を誘導している。本研究では、M3R 分子を標的とした免疫応答がシェーグレン症候群様の自己免疫性唾液腺炎を誘導するか否かを検討する事を目的とした。

B. 研究方法

- 1) M3R-/-マウス(B6 バック)に、M3R の各領域をコードした合成アミノ酸、N 領域(67AA) (N1: MTLHNNSTTSPLFPNIISSWIHSPSDAGLP, 2: IHSPSDAGLPPTVT HFGSYNVSRAAGNFS, N3: NVSRAAGNFSSPDGTTDDPLGGHTVWQV)、細胞外第一ドメイン(17AA): FTTYIIMNRWALGNLACDLW、細胞外第二ドメイン(25AA): KRTVPPGECF IQFLSEPTITFGTAL、細胞外第三ドメイン(14AA): VLVNTFCDSICPKTFWNLGY を合成して day0 および day10 に腹腔内に免疫した。初回免疫 20 日後の脾細胞を Rag1-/-マウス(B6 バック)に経静脈的に投与した。M3R に対する T 細胞応答を検討するために、in vitro で、合成 M3R ペプチドと共培養して上清中の IFN- γ 、IL-4 および IL-17 を測定した。
- 2) 唾液分泌量を測定した。
- 3) 血清中の抗 M3R 抗体価を ELISA 法で解析した。

- 4) M3R-/- \rightarrow Rag-1-/-マウスから day45 に唾液腺を取り出し H-E 染色により組織学的解析、さらに、抗体(Thy-1, B220, CD4, CD8, IgG)を用いて免疫組織化学的解析を施行した。
- 5) M3R-/-マウスより採取した脾細胞を flowcytometry で CD3+細胞と CD3-細胞とに分離し、それぞれを Rag-1-/-マウスに細胞移入して唾液腺炎の有無について検討した。

(倫理面への配慮)

ヒトの検体を使用する際には、大学の倫理委員会の承認を得た上で、患者さんにインフォームド・コンセントを施行し、十分に研究内容を理解してもらい、本人の同意を得た上で研究を実行した。マウスの実験においては疼痛を与えないために麻酔科で対処した。

C. 研究結果

- 1) M3R を認識する T 細胞から IFN- γ および IL-17 が有意に産生されていた。
- 2) 唾液分泌量は有意に減少していた。
- 3) 抗 M3R 抗体は有意に増加していた。
- 4) 単核球を主体とした細胞浸潤、唾液腺腺房の破壊が認められた。浸潤細胞の多くは、Thy-1+CD4+T 細胞であり、一部に B 細胞浸潤および IgG の沈着が認められた。
- 5) CD3+細胞を単独移入したマウスにおいて有意な唾液腺炎が認められたが、CD3-細胞のみの細胞移入

マウスでは唾液腺炎は認められなかった。

D. 考察と結論

M3R^{-/-}と Rag-1^{-/-}の二つのノックアウトマウスを使用することにより、強い M3R に対する T 細胞応答および B 細胞応答を誘導することができた。さらに、シェーグレン症候群様の唾液腺炎を惹起する事に成功した。特に M3R 分子に対する T 細胞応答が自己免疫性唾液腺炎発症に関わっている事が明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Iwanami, K., Matsumoto, I., Tanaka, Y., Inoue, A., Minami, R., Hayashi, T., Goto, D., Ito, S., Nishimura, Y., and Sumida, T. Altered peptide ligands inhibit glucose-6-phosphate isomerase (GPI) peptide-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* (in press)

2. Ito, I., Kawasaki, A., Ito, S., Kondo, S., Sugihara, M., Horikoshi, M., Hayashi, T., Goto, D., Matsumoto, I., Tsutsumi, A., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Matsuta, K., Sumida, T., and Tsuchiya, N., Replication of association between FAM167A (C8orf13)-BLK region and rheumatoid arthritis in a Japanese population. *Ann. Rheum. Dis.* (in press).

3. Segawa, S., Goto, D., Yoshiga, Y., Sugihara, M., Hayashi, T., Chino, Y., Matsumoto, I., Ito, S., Ito, S., and Sumida, T. Inhibition of TGF- β signaling attenuates IL-18 plus IL-2-induced interstitial lung disease. *Clin. Exp. Immunol.* (in press)

4. Wang, Y., Ito, S., Chino, Y., Goto, D., Matsumoto, I., Murata, H., Tsutsumi, A., Uchida, K., Usui, J., Yamagata, K., and Sumida, T. Analysis of cytokine balance in lupus nephritis by laser-microdissection. *Clin. Exp. Immunol.* (in press)

5. Inoue, A., Matsumoto, I., Tanaka, Y., Iwanami, K., Goto, D., Ito, S., and Sumida, T. Role of tumor necrosis factor- α -induced adipose-related

protein in autoimmune arthritis. *Arthritis Res. Ther.* (in press)

6. Tanaka-Watanabe, Y., Matsumoto, I., Iwanami, K., Inoue, A., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., and Sumida, T. B cells have crucial role as autoantibody producers in arthritis mediated by glucose-6-phosphate isomerase. *Clin. Exp. Immunol.* 155: 285-294, 2009.

7. Ito, I., Kawasaki, A., Ito, S., Hayashi, T., Goto, D., Matsumoto, I., Tsutsumi, A., Hom, G., Graham, R.R., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Ohashi, J., Behrens, T.W., Sumida, T., and Tsuchiya, N. Replication of the association between C8orf13-BLK region and systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Arthritis Rheum.* 60: 553-558, 2009.

8. Kawaguchi, Y., Wakamatsu, E., Matsumoto, I., Nishimagi, E., Kamatani, N., Satoh, T., Kuwana, M., Sumida, T., and Hara, M. Muscarinic-3 acetylcholine receptor autoantibody in patients with systemic sclerosis: contribution to severe gastrointestinal tract dysmotility. *Ann. Rheum. Dis.* 68: 710-714, 2009.

9. Wakamatsu, E., Matsumoto, I., Yoshiga, Y., Iwanami, K., Tsuboi, H., Hayashi, T., Goto, D., Ito, S., and Sumida, T. Altered peptide ligands regulate type II collagen-induced arthritis in mice. *Mod. Rheumatol.* 19:366-371, 2009.

10. Segawa, S., Goto, D., Yoshiga, Y., Hayashi, T., Matsumoto, I., Ito, S., and Sumida, T. The decrement of soluble CD1d proteins affects the function of NKT cells in patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Med.* 24:481-486, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

申請準備中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記事項なし

M3R反応性T細胞のサイトカイン 産生

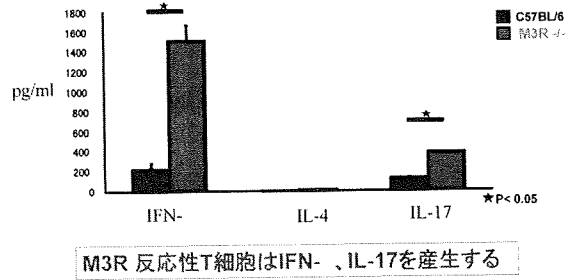


図1 M3R-/-マウスにおけるM3R反応性T細胞のサイトカイン産生

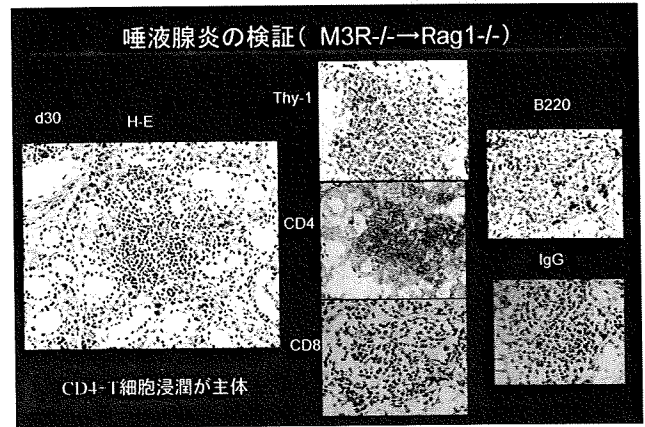


図3 M3R-/- \rightarrow Rag1-/-マウス唾液腺組織の免疫化学染色像

唾液腺組織像(H-E)

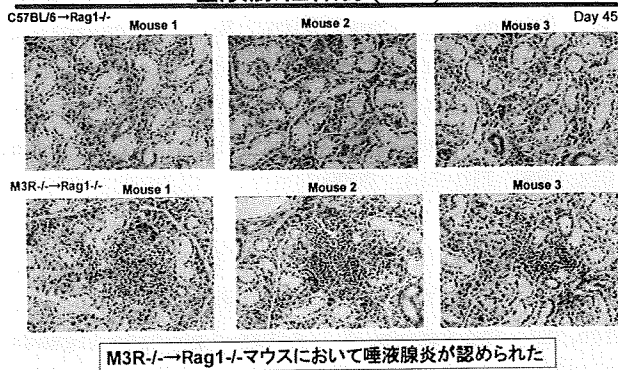


図2 M3R-/- \rightarrow Rag1-/-マウスにおける唾液腺組織(H-E染色)

M3R反応性T細胞が唾液腺炎誘導に必須である

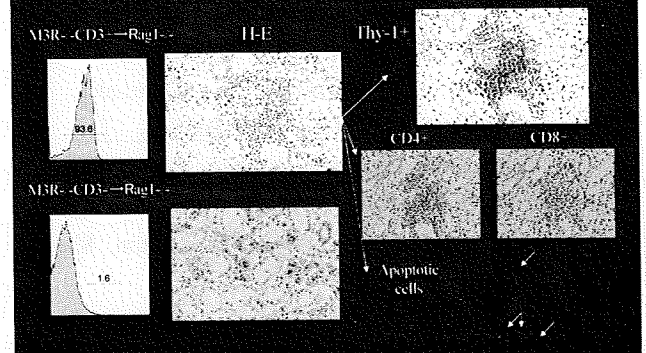


図4 M3R-/-CD3 \rightarrow Rag1-/-マウスにおける唾液腺組織像(H-E染色、免疫化学染色、Tunel染色)

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

リウマチ性疾患に伴う腎障害におけるポドサイト障害に関する研究

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

研究要旨 難治性自己免疫疾患における代表的臓器障害である腎障害に関して、病態解明新規治療法の開発を目的に、近年重要視されている糸球体上皮細胞（ポドサイト）を焦点にして基礎的及び臨床的な検討を行った。腎障害のモデルと考える培養ポドサイトの作成を行い、遺伝子発現変化を網羅的に測定した結果、免疫系細胞との関係を示唆する遺伝子発現変化が見られた。一方患者尿中のポドサイト数およびポドカリクシンの測定を行い、病態との関係を検討した結果、腎障害との相関が示唆された。

A. 研究目的

腎糸球体臓側上皮細胞のポドサイトは、高分子蛋白の漏出を防ぐ篩として働き、その細胞死と係蹄壁からの脱落によるポドサイト数減少は、腎機能低下の危険因子と考えられている。透析による腎不全治療の医療費増加を背景に、腎機能低下を抑制する治療法開発の機運が高まる中で、ポドサイトは、研究対象として、大きく注目されるようになってきている。免疫学的ストレスによる膠原病でのポドサイト障害機序は不明な点が多く、且つ、最近の腎硬化症に関連する MYH9 susceptible allele の一連の研究報告から、免疫学的ストレスによるポドサイト障害機序は高血圧や糖尿病患者で認めるものと異なる可能性が推測される。実際にリウマチ性疾患に合併する腎障害は、発症機序も進行も多彩であるが、多くは糸球体腎炎であり腎不全に陥る可能性のある点では共通している。本研究はリウマチ性疾患において出現する腎障害機序解明のため、in vivo および in vitro においてポドサイト障害を解析するものである。

B. 研究方法

最近我々が樹立したマウスポドサイト細胞株を用いて、障害ポドサイトと正常ポドサイトの病態解析および遺伝子発現解析などを行う。ヒト尿中ポドサイト分離、さらに患者尿中ポドサイト数、尿中ポドサイトマーカーを用いて、基礎的、臨床的にループス腎炎や顕微鏡的多発血管炎のポドサイト障害機序の解明を行う。

（倫理面への配慮）

当院 IRB における承認の下、文書および口頭にて同意を得た患者から尿を採取する。採取した検

体は連結可能匿名化にて管理することで、個人情報保護される。

C. 研究結果

ウイルス蛋白刺激障害培養マウスポドサイトと正常培養マウスポドサイトを比べた cDNA microarray data から、複数の I 型インターフェロン (IFN) 関連分子の発現亢進を認め、ループス腎炎の病態と類似する可能性があり詳細を検討中である。又、培養マウスポドサイトで IL-17 受容体の発現を認めた。患者尿中ポドサイト数の検討では、尿タンパクや eGFR 低下を認めない腎症(-)患者検体では、1 例も尿中にポドサイトを認めなかった。一方、腎症合併症例では全例に尿中ポドサイトを認めた (表)。一方、尿中ポドサイトマーカーは、腎障害の機序によって変化する可能性が示唆された

D. 考察

ウイルス自体によらないウイルス由来蛋白によって障害されたポドサイトにおいては、I 型 IFN signature gene の発現亢進が見られ、さらに IL-17 R 発現も明らかとなり、少なくとも in vitro においては障害ポドサイトと免疫系の関係が存在する可能性が示された。しかし、これは特殊な系であり、実際に免疫疾患関連腎障害における病態に関与するかどうかは今後の検討を要する。一方、リウマチ性疾患における腎障害患者から得られた尿中には、ポドサイトの出現が認められ、症例数は少ないながら腎障害の程度と尿中ポドサイト数には関連がある可能性がある。これらのことから、難治性自己免疫疾患で見られる腎障害において、免

疫系を介するまたは非免疫的な機序による糸球体へのストレスもしくはポドサイトへの直接的刺激や攻撃の可能性が推定された。現在、症例数が少なく十分な評価には届かないが、今後症例数を増やすとともに、尿中ポドサイトの出現時期、治療との関係など、詳細に検討することで、リウマチ性疾患における尿中ポドサイト出現の意義を解明することが可能になると考える。これにより、新たな腎障害治療が進展する可能性がある。

E. 結論

難治性自己免疫疾患における腎障害においてポドサイトの関与が示唆された。また、全身性自己免疫性疾患における非観血的腎障害モニターとして尿中ポドサイト計測が有用な可能性がある。また、ポドサイトが免疫学的腎障害においてターゲットとなるまたは病態に関与する可能性も考えられ、さらなる検討が期待される。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanaka J, Oda H, Mimura T, Honda C, Oohara H, Kawasaki H, Kondo A, Wada Y. Innovative radiographic system to improve the sharpness of radiographs: could a phase-shift effect contribute to improved image-quality for plain computed radiographs for general use? *Jpn J Radiol.* 28(1):79-85, 2010.
- 2) Yokota K, Akiyama Y, Adachi D, Shindo Y, Yoshida Y, Miyoshi F, Arai E, Kuramochi A, Tsuchida T, Mimura T. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma accompanied by Sjögren's syndrome. *Scand J Rheumatol.* 38(6):494-5, 2009.
- 3) Yamamoto A, Sato K, Miyoshi F, Shindo Y, Yoshida Y, Yokota K, Nakajima K, Akiba H, Asanuma Y, Akiyama Y, Mimura T. Analysis of cytokine production patterns of peripheral blood mononuclear cells from a rheumatoid arthritis patient successfully treated with rituximab. *Mod Rheumatol.* 2009 Nov 7. [Epub ahead of print]
- 4) Yokota K, Akiyama Y, Asanuma Y, Miyoshi F,

Sato K, Mimura T. Efficacy of tacrolimus in infliximab-refractory progressive rheumatoid arthritis.: *Rheumatol Int.* 29:459-61, 2009

2. 学会発表

- 1) Y Yoshida, K Sato, M Ota, Y Akiyama, M Yamakawa, T Mimura, et al: A Case Report of Erdheim -Chester Disease Diagnosed by Immunohistochemical Analysis of the Cell Derived from the Ascites. 11th International Workshop on Langerhans Cells, September 6, 2009 (Funchal, Madeira, Portugal)
- 2) Kajiyama H, Nakajima K, Asanuma Y, Sato K, Akiyama Y, Kopp J, Mimura T: The introduction of podocyte research tools to rheumatology -the proposal of an innovative reserch area "nephrorheumatology". 第37回日本臨床免疫学会総会、2009年11月13日(東京ステーションコンファレンス、東京)
- 3) Sato K, Miyoshi F, Mimura T: The role transcription factor c-Maf plays in memory Th17 cells. 第39回日本免疫学会総会・学術集会、2009年12月(大阪国際会議場、大阪)
- 4) Miyoshi F, Sato K, Mimura T: The Th-cytokine production from non-specifically stimulated PBMCs show the mirror image of local inflammation. 第39回日本免疫学会総会・学術集会、2009年12月(大阪国際会議場、大阪)

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

表

	age	gender	Ccr/eGFR	U-Prot/U-Cr	U-podocyte(mL)	U-pod/U-Cr	U-meg/U-Cr
SLE AN(-)1	37	F	136.9	0.09	0		
SLE AN(-)2	14	F	126.2	0.05	0	60	278.1
SLE AN(-)3	16	F	113.7	0.13	0	157	297.5
SLE AN(-)4	19	M	105.4	0.26	0	476	749.5
SLE AN(+)							
SLE AN(+)	1 54	F	49.62	4.3	2.7	345	273
SLE AN(+)	2 24	M	99.38	0.56	0.2	521	119
SLE AN(+)	3 5	F	20	5.32	0	121	47
	4						
SLE AN(+)	4 43	F			0		
MPA	63	M	52.29	1.25	0.5	467	348.4
AN(+)							
MPA	59	M	36.91	1.95	0	87	16
AN(+)							
RA AN(+)	1 64	F	18.8	2.79	0.3	106	22
RA AN(+)	2 78	M	18.43	5.51	1.7		
DM/SLE	59	F	118.3	2.64	0.5		

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 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
—上皮障害に関与する $\alpha E\beta 7$ (CD103) の発現調節機構の解析—

研究分担者 竹内 勤 慶應義塾大学医学部リウマチ内科 教授
研究協力者 吉本桂子 慶應義塾大学医学部リウマチ内科 研究員
飯塚 篤 埼玉医科大学総合医療センターリウマチ・膠原病内科大学院

研究要旨 T細胞の上皮障害機構を明らかにする目的で、上皮細胞 E-カドヘリンに対する接着分子である $\alpha E\beta 7$ (CD103) の発現調節に着目し解析した。末梢血 T細胞に $\alpha E\beta 7$ を発現調節するには、レクチン PHA と TGF- β が必須で PHA は TGF- β 受容体の発現に関わっていた。受容体からのシグナル伝達を阻害するキナーゼ阻害薬によって $\alpha E\beta 7$ の発現が阻止された。これを応用した新たな治療法の開発が期待される。

A. 研究目的

SLE を初めとする自己免疫疾患の上皮障害は難治性病態の一つで、T細胞が病態形成に関与している。上皮障害病変局所に浸潤した T細胞に発現される $\alpha E\beta 7$ (CD103) 分子は、上皮細胞との接着を介してこの過程で重要な役割を果たしている事を明らかにしてきた。その $\alpha E\beta 7$ (CD103) は、レクチン刺激によって健康人に比してより高に発現が SLE 患者末梢血で観察される。その機序や $\alpha E\beta 7$ (CD103) のヒト T細胞における発現調節については不明な点が残されていた。そこで今回は、 $\alpha E\beta 7$ (CD103) 分子の発現調節機構、分子の *in vitro* 細胞機能に及ぼす影響について基礎的な検討を行うことを目的とした。

B. 研究方法

- 1) 対象：健康人末梢血、Jurkat T細胞株。
- 2) $\alpha E\beta 7$ (CD103) の発現： $\alpha E\beta 7$ (CD103) は、フローサイトメーター、免疫プロット法。
- 3) 誘導条件の検討：従来から用いていた PHA に加え、各種サイトカインを添加し、*in vitro* で培養後、フローサイトメーターで $\alpha E\beta 7$ (CD103) 分子の発現を解析。サイトカイン受容体からのシグナル伝達は、チロシンリン酸化を指標として免疫プロットで評価。
- 4) 培養上清中サイトカインの測定：IL-4, IL-6, IL-13, TGF- β_1 は ELISA を用いて測定。
- 5) CD103 発現 Jurkat T細胞株の樹立：Jurkat T細胞株に、 αE 遺伝子、 $\beta 7$ 遺伝子を導入し $\alpha E\beta 7$ (CD103) を細胞膜上に発現する細胞株を樹立。

C. 結果

- 1) 健康人末梢血単核球の CD103 誘導条件：PHA (10 μ l/ml)

ならびに TGF- β (2.5ng/ml) 単独では CD103 の誘導は認められなかったが、両者の併存下にて 3日後より CD103 が発現誘導された。4日では 40-50%の T細胞に発現され、その状態が 7日まで維持された。TGF- β は、0.1ng/ml 以上で CD103 の発現はプラトーに達した。

2) CD103 が発現する細胞サブセット：PHA+ TGF- β によって発現誘導された 103 分子は、CD8+細胞では 44.2 \pm 8.5%に、CD4+T細胞では 20.0 \pm 4.5%に認め CD8+細胞により多く発現されていた。その中でも、CD45RO+メモリー細胞に比し、CD45RA+ナイーブ細胞に選択的に発現されることが明らかとなった。

3) CD103 誘導に関する細胞群：CD45RA+ナイーブ細胞のみに PHA+ TGF- β を添加しても CD103 の誘導は見られず、それには CD14+単球が必須で、トランスウェルを用いた検討から CD14+単球と CD45RA+ナイーブ T細胞の直接的な細胞接着が必要と考えられた。

4) PHA の CD103 誘導に対する役割：TGF- β 以外の各種サイトカインと PHA の共存では CD103 の発現誘導が見られない事から、PHA は TGF- β シグナルを開始させる事に関与している可能性が考えられた。そこで、静止期 T細胞には発現されていない TGF- β 受容体の発現について検討したところ、PHA 添加によって TGF- β 受容体 I が発現される事が明らかとなった。PHA に加えて TGF- β を添加する事によって TGF- β 受容体シグナルに関わる smad-2/3 がチロシンリン酸化され、TGF- β 受容体 I キナーゼ阻害薬である SD208 を添加したところ、TGF- β 受容体 I の発現は保たれたまま smad-2/3 のチロシンリン酸化は阻害され、CD103 の誘導が阻止された。

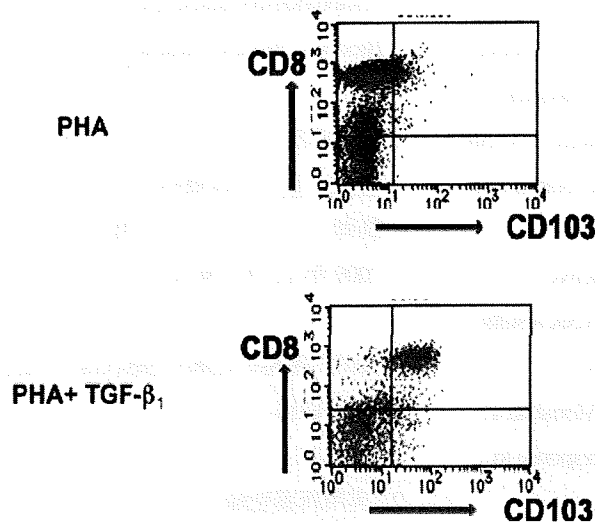
5) CD103 分子の細胞機能に及ぼす影響：Mock 遺伝子導入、 $\beta 7$ 遺伝子導入株をコントロールとして、CD103

分子強制発現 Jurkat T 細胞株を用いて CD103 分子発現による細胞機能への影響を検討した。マイクロアレイ解析によって、IL-2 受容体 α 鎖 (CD25) 遺伝子発現低下、FasL、BAFF 遺伝子発現亢進が示された。一方、蛋白レベルでは、抗 CD3 刺激によって IL-2 産生亢進、BAFF 産生亢進が、抗 CD3+BAFF 添加によって IL-10 産生亢進が観察された。

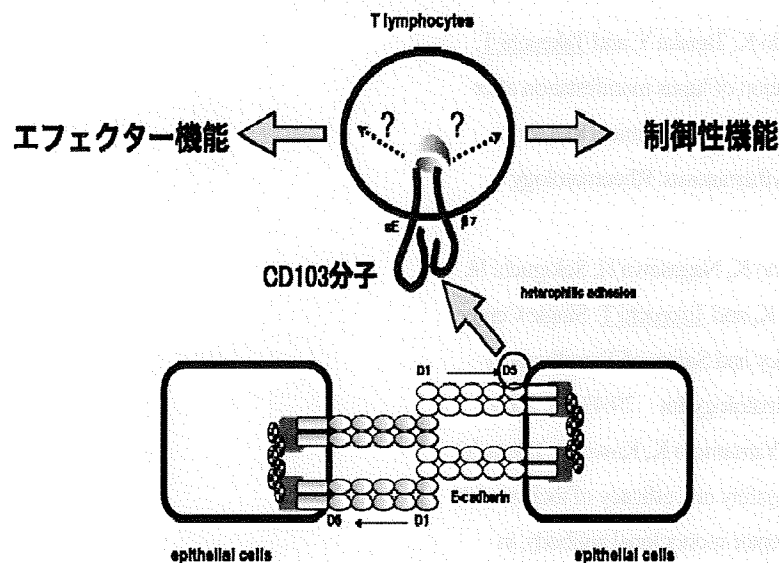
D. 考察と結論 : CD103 の誘導には、TGF- β 受容体発現と、それを介したシグナル伝達が必要で、それによって CD103 が発現され、同時に、細胞増機能が低下、独特の

サイトカイン発現プロフィールを示しことが明らかとなった。正常人 T 細胞における検討を基に、SLE 末梢血 T 細胞での異常を明らかにすることが可能となる。同時に、CD103+細胞群が、免疫制御と、免疫炎症の 2 面性な作用を持ち合わせている事から、それを制御している分子機序に関してさらなる検討が必要である。その制御法が見いだされれば、新たな治療戦略へつながる事が期待される。

CD103発現誘導機構の検討



CD103-上皮細胞相互作用を標的とする戦略の課題



F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1.論文発表

1. Suzuki K, Tamaru J, Okuyama A, Kameda H, Amano K, Nagasawa H, Nishi, E, Yoshimoto K, Setoyama Y, Kaneko K, Osada H, Honda N, Yasaki Y, Itoyama S, Tsuzaka K, and Takeuchi T. IgG4-positive multi-organ lymphoproliferative syndrome manifesting as chronic symmetrical sclerosing dacryo-sialo-adenitis with subsequent secondary portal hypertension and remarkable IgG4-linked IL-4 elevation. *Rheumatology*, in press.
2. Kameda H, Ueki Y, Saito K, Nagaoka S, Hidaka T, Atsumi T, Tsukano M, Kasama T, Shiozawa S, Tanaka Y, Takeuchi T, and Japan Biological Agent Integrated Consortium (J-BASIC). The comparison of efficacy and safety between continuation and discontinuation of methotrexate (MTX) at the commencement of etanercept in patients with active rheumatoid arthritis despite MTX therapy: 24-week results from the JESMR study. *Rheumatology*, in press.
3. Tsuzaka K, Itami Y, Takeuchi T, Shinozaki N, Morishita T. ADAMTSS5 is biomarker for prediction of the response to Infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, in press.
4. Ogawa H, Kameda H, Amano K, and Takeuchi, T. Efficacy and safety of cyclosporine A in patients with refractory systemic lupus erythematosus in a daily clinical practice. *Lupus* 19:162-169, 2010.
5. Suzuki K, Kameda H, Kondo K, Tanaka Y, and Takeuchi T. Two cases of acute exacerbation of lupus manifestation after re-treatment with rituximab in phase I/II clinical trial for refractory systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 48:198-99, 2009.
6. Suzuki K, Kameda H, Amano K, Nagasawa H, Sekiguchi H, Nishi E, Ogawa H, Tsuzaka K, and Takeuchi T. Single Center Prospective Study for Efficacy and Safety of Tacrolimus in Rheumatoid Arthritis. *Rheumatology Int* 29:431-6, 2009.
7. Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, and Azuma J. Long-term safety and efficacy of tocilizumab, an anti-interleukin(IL)-6 receptor monoclonal antibody, in

monotherapy, in patients with rheumatoid arthritis (the STREAM study): evidence of safety and efficacy in a 5-year extension study. *Ann Rheum Dis* 68: 1580-84, 2009.

8. Takeuchi T, Miyasaka N, Inoue K, Abe T, and Koike T. Impact of through serum level on Radiographic and Clinical Response to Infliximab plus Methotrexate in Patients with Rheumatoid Arthritis: results from the RISING Study. *Mod Rheumatology* 19:478-87, 2009.
9. anino M, Matoba R, Nakamura S, Kameda H, Amano K, Okayama T, Nagasawa H, Suzuki K, Matsubara K, and Takeuchi T. Prediction of efficacy of anti-TNF biologic agent, infliximab, for rheumatoid arthritis patients using a comprehensive transcriptome analysis of white blood cells. *Biochem Biophys Research Comm* 387: 261-265, 2009.

2.学会発表

1. 竹内 勤 : 免疫難病における新しいターゲット分子と制御 シンポジウム 第 37 回日本臨床免疫学会総会. 2009年11月、東京.

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

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

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

Random Peptide Display Library を用いた膠原病血清中の自己抗体探索法の開発

研究分担者 三森 明夫 国立国際医療センター 第一病棟部長

研究協力者 高橋 裕子（同・膠原病科 臨床研修指導医）

川田 英明（同・難治疾患研究部 流動研究員）、石坂 幸人（同左・研究部 部長）

研究要旨 膠原病にみられる自己反応性の原因は、不明であるが、血清自己抗体を数多く同定すれば、病勢に関連する抗体群が見つかる可能性がある。大腸菌発現系の 12mer-random peptide display library (RPDL) から、まず膠原病患者、対照健常者各 1 人の血清と反応した配列クローンを 500 ずつ拾い、BLAST 検索でヒットした約 20 万件ずつの相同蛋白名から、ヒット様式が偏ったものをコンピュータで抽出した。抽出した蛋白名のうち、まず CD158 (HLA-classI と相互作用する、NK 細胞上の受容体) が、機能分子として興味を惹く候補だったので、CD158 相同配列を含んだ 4 種類の peptide display clone を標的にして ELISA を行なった。元の RPDL スクリーニングに用いた患者血清、および無関係な SLE 2 人で検討した結果、3 人とも ELISA 陽性、対照健常者 21 人の血清はすべて ELISA 陰性であった。すなわち“RPDL を用いた自己抗体エピトープのスクリーニング”法が、実際に、新規自己抗体とそのエピトープを同時に同定する可能性がある。

A. 研究目的

SLE の病勢をモニターする方法は数少なく、現状では寛解・再燃を予測できない。未知の自己抗体を数多く同定し、臨床意義を統計的に吟味した上で、臨床検査に供する。

B. 研究方法

12mer-random peptide がチオレドキシシンに挟まれて大腸菌鞭毛蛋白フラジェリン中に発現する組み替え蛋白の、display library (RPDL、100 億種類、インビトロジェン社) を用いた。

患者および対照血清 (2 人の MCTD 患者、関節リウマチ 1 人、健常者 1 人) を同組み替え蛋白発現・大腸菌で吸収した後、RPDL 系に作用させ、血清抗体と結合したバクテリアをビーズによる沈殿で回収し (パニング) 一晚増幅させた。パニングを 5 回反復して回収し、クローニングしたバクテリアからプラスミド DNA を抽出した。

各プラスミド DNA を読み、アミノ酸に変換して相同性をもつ候補ヒト蛋白名を BLAST 検索した。この情報から、検討する蛋白候補を決め、そのうち、CD158 相同配列をもつ該当する大腸菌クロー

ンから組み替えフラジェリンを部分精製し、ELISA に供した。

(倫理面への配慮)

本研究は、院内倫理審査会の承認を受けた。血液検体の使用について、患者・本人すべてで書面による説明と同意取得を行なった。

C. 研究結果

超音波破碎 RPDL 大腸菌の膜面分は、殆どが組み替えフラジェリンであることを、SDS-PAGE および抗チオレドキシシン抗体を用いた Western blot で確認した (班会議で呈示した。本稿では略す)。

今回の予備的検討では、RPDL スクリーニングに MCTD 血清を用いた。理由は、我々の検索系が U1snRNP を捉えることを確認するためであり、本研究計画の主題は、SLE 血清・自己抗体の標的検索である (今後は、SLE 血清を用いる)。

1) MCTD 血清との反応クローンの中で、BLAST 検索結果一覧 (=ファイルと呼ぶ) で、異なるファイルに繰り返し出てきた蛋白名を列挙した。

2) 上記の中で、対照健常者のファイルに 0~1 ヶしか出てこない蛋白名を選んだ。

1) 2) を満たすもののうち、免疫関連蛋白名の一部だけを例示すると以下のようである。

CD158、Interleukin-12 receptor beta-2 chain、Lupus brain antigen 1 homolog、U1 small nuclear ribonucleoprotein (70kDa、A、C)、CD44。下線の蛋白名は、500 クロンの解析前に、別の MCTD 1 人から予備的に拾った 65 クロンのファイルにも共通してくり返し現れたものである (U1snRNP は、65 クロン拾った段階では、検索にかからなかった)。

上記の、自己抗原候補名のうち、我々はまず CD158 に注目し、4 つの異なる peptide (CD158 相同配列) を発現した “peptide-thioredoxine-flagellin 組み替え蛋白” を (SDS-PAGE で 1 本のバンドとなる精度に) 部分精製し、患者血清、対照血清による ELISA を行なった。上記 4 つの配列は、CD158 の細胞膜上の部分に位置する。

<図>に示すように、どの血清も “peptide 無発現の thioredoxine-flagellin 組み替え蛋白” とは反応しなかった。4 つの組み替え蛋白は、パニングに用いた患者、および無関係な SLE 2 人の血清と反応し、健常対照 21 人の血清と反応しなかった (図の各 ELISA データでは、そのうち 3 人または 7 人を患者と同時比較した)。すなわち、MCTD 1 人から得られた情報によって、MCTD、SLE、関節リウマチに抗 CD158 抗体が存在する可能性が示唆された。

したがって、RPDL によるスクリーニングを、BLAST 結果のコンピュータ解析と組み合わせた本方法で、自己抗体の新規標的候補を見出せることが示唆された。

D. 考察

どの 12mer ペプチドでも相同性 (≥ 18 bits) を BLAST 検索すれば、候補ヒト蛋白名は 100~500 得られる。任意に人為作成した配列でも同様である (どの任意配列にも相同部分をもつ巨大蛋白もある)。BLAST 結果をファイルして 1 配列 1 ファイルとし、異なる多数のファイルに共通に現れる蛋白名をコンピュータ解析で列挙すると、患者血清との反応配列の中に、免疫関連蛋白名が数多くみられた。血清と実際に反応したものであることは、

ELISA で検定するが、最初に試みた CD158 で、実際の反応が確認できた。

12mer peptide には、実際の反応に関わらないかもしれないアミノ酸配列が共存し、これが BLAST 検索上のノイズとなるが、これはコンピュータ解析によって、ある程度排除できる。

ただし、可能なアミノ酸配列に比べ、本 RPDL の 100 億という peptide レパートリーは、少なすぎる。血清と反応した大腸菌クロンを人力で拾って得られる情報は、さらに少ないので、“網羅的検索法” とはいえない。人力に頼らず、次世代シーケンサーを用いて 2 万クロンを解析した予備実験では、検索ノイズが多すぎる難点があったので、改良を要する。

上記の問題点はあるが、新規自己抗体を認識エピトープと同時に同定できる、という本方法は、自己抗体検索、および診療に使える検査項目を増やしていく上で、役に立つ可能性がある。

さらに、上述 500 クロンからつくったファイル中には、3 つの異なる “ACE2 (angiotensin converting enzyme 2) 相同配列” が現れた。このパニングに用いた患者は、我々が最近見出した “ACE2 活性を阻害し、血管病態特異的に出現する自己抗体” (論文投稿中) の陽性者の一人なので、とくに本実験のために選んだ。このテーマについては、別の機会に報告する。

CD158 については、その膜表面表出部分の cDNA を、すでに発現ベクターに組み込んだ。得られた蛋白を標的とした ELISA を、多数の膠原病患者血清で開始するところである。

E. 結論

未知の自己抗体を探索する実験系を作成した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

海外

1. Kubota K, Ito K, Morooka M, Mitsumoto T, Kurihara K, Yamashita H, Takahashi Y, Mimori A.

Whole-body FDG-PET/CT on rheumatoid arthritis of large joints. Ann Nucl Med. 2009 [Oct 16. Epub ahead of print]

2. Takahashi Y, Mizoue T, Suzuki A, Yamashita H, Kunimatsu J, Itoh K, Mimori A : Time of initial appearance of renal symptoms in the course of systemic lupus erythematosus as a prognostic factor for lupus nephritis. Modern Rheumatol 19:293-301, 2009

国内

1. 高橋裕子、越智久さこ、柳井敦、山下裕之、伊藤健司、三森明夫 : 10 年間持続した活動性が Tocilizumab 治療で寛解した成人発症 Still 病の 1 例. 日内会誌 99(1): 130-132, 2010

2. 学会発表

海外

1. Hiroyuki Yamashita, Kazuo Kubota, Yuko Takahashi, Junwa Kunimatsu, Arisa Shimizu, Toshiki Eri, Kenji Itoh, Akio Mimori: Value of PET/CT in clinical practice in patients with possible spondyloarthropathy. The 77th American College of Rheumatology, Annual Scientific Meeting, Philadelphia, Oct, 2009
2. Yuko Takahashi, Shiori Haga, Hiroyuki Yamashita, Yukihito Ishizaka, Akio Mimori: Autoantibodies to angiotensin converting enzyme 2 in patients with rheumatic diseases. The 77th American College of Rheumatology, Annual Scientific Meeting, Philadelphia, Oct, 2009

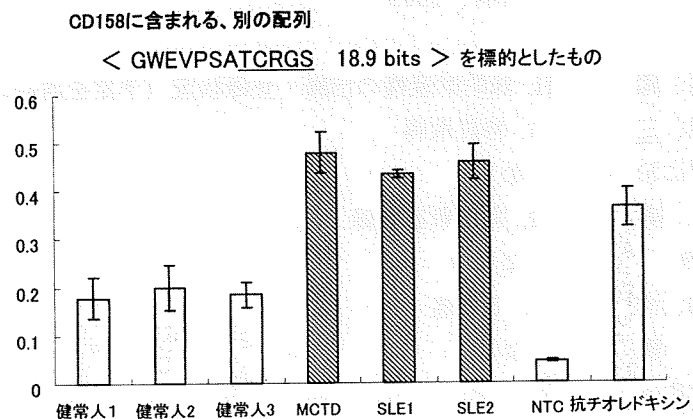
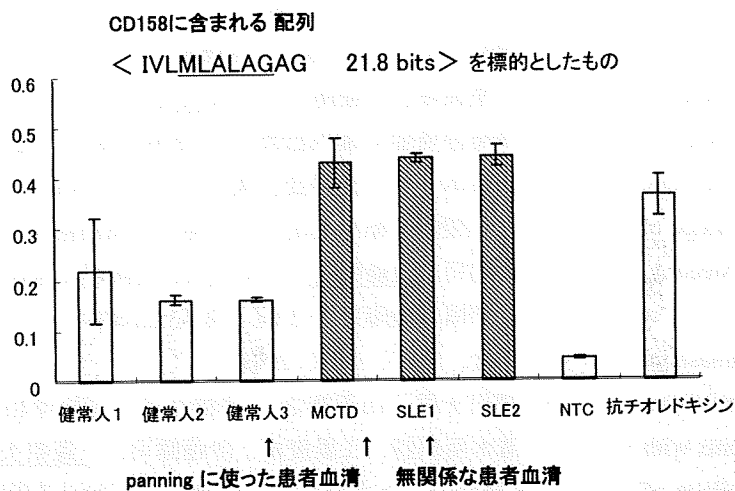
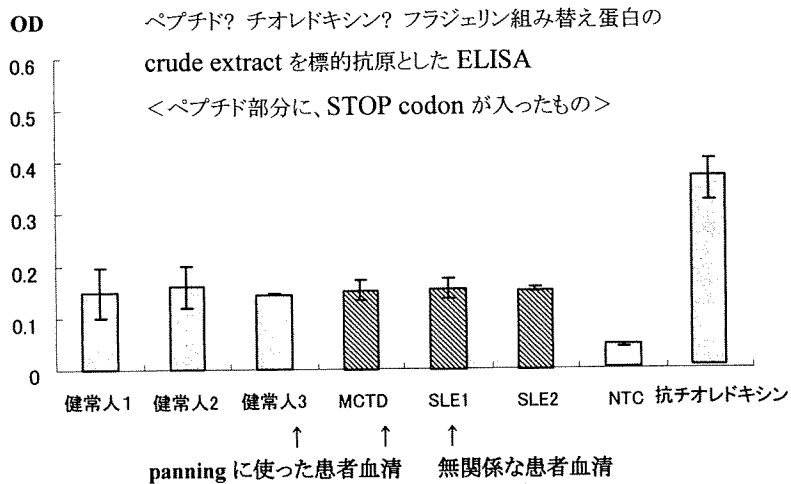
国内

1. 山下裕之、窪田和雄、高橋裕子、鈴木暁岳、國松淳和、清水亜理紗、江里俊樹、伊藤健司、三森明夫 : 血清反応陰性脊椎関節炎の診断における 18-FDG-PET/CT の有用性 (第 2 報) . 第 53 回日本リウマチ学会、東京、4 月、2009
2. 山下裕之、高橋裕子、鈴木暁岳、國松淳和、清水亜理紗、江里俊樹、伊藤健司、三森明夫 : 膠原病科における不明炎症の原因集計; 悪性リンパ腫の重要性第 53 回日本リウマチ学会、東京、4 月、2009

3. 高橋裕子、山下裕之、國松淳和、清水亜理紗、江里俊樹、伊藤健司、三森明夫 : 遅発ループス腎炎に対するシクロホスファミド治療の有効性評価. 第 53 回日本リウマチ学会、東京、4 月、2009
4. 高橋裕子、関谷文男、松平蘭、山路健、田村直人、高崎芳成、三森明夫 : 混合性結合組織病に対する初期ステロイド治療の意義(第 2 報). 第 53 回日本リウマチ学会、東京、4 月、2009
5. 高橋裕子、山下裕之、伊藤健司、杉山温人、三村俊英、三森明夫 : 顕微鏡的多発血管炎と Wegener 肉芽腫症の予後決定因子. 第 53 回日本リウマチ学会、東京、4 月、2009
6. 國松淳和、廣江道昭、山下裕之、高橋裕子、伊藤健司、三森明夫 : SLE に伴う心筋障害 3 例にみられた異なる病態生理. 第 53 回日本リウマチ学会、東京、4 月、2009
7. 國松淳和、山下裕之、高橋裕子、清水亜理紗、江里俊樹、伊藤健司、三森明夫 : リウマチ性多発筋痛症の鑑別診断; 初診例の集計. 第 53 回日本リウマチ学会、東京、4 月、2009
8. 江里俊樹、細川美里、山下裕之、高橋裕子、伊藤健司、三森明夫 : Sjogren 症候群に合併した末梢神経障害の 3 例. 第 53 回日本リウマチ学会、東京、4 月、2009
9. 細川千里、山下裕之、高橋裕子、國松淳和、清水亜理紗、江里俊樹、伊藤健司、三森明夫 : 早期診断した大動脈炎の画像診断における治療成績の検討. 第 53 回日本リウマチ学会、東京、4 月、2009

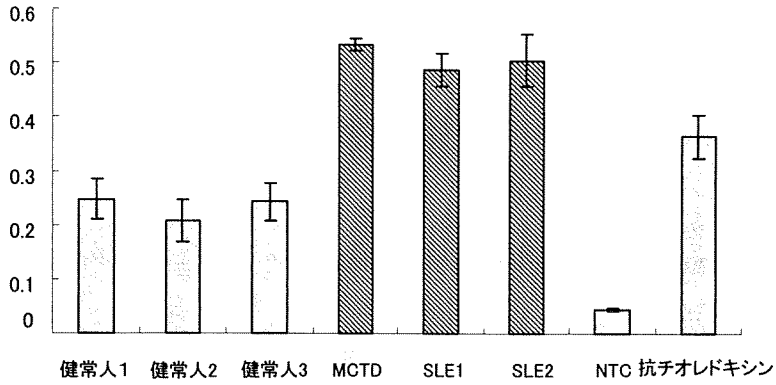
H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし



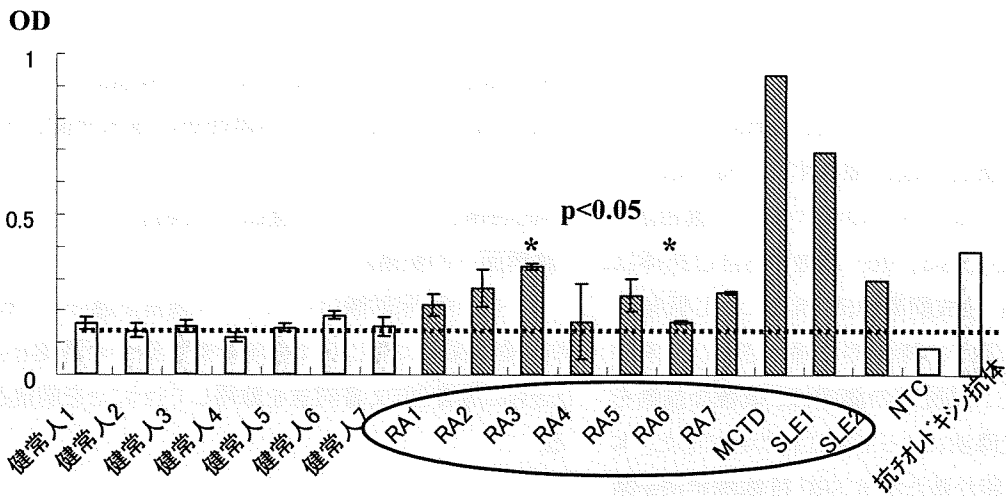
CD158に含まれる、もう一つの配列

< RHQGRGSLQGAW 20.2 bits > を標的としたもの



CD158に含まれる、さらにもう一つの配列

< FDRTVIRTGTAEV (18 bits) > を標的としたもの



新たな抗 SRP 抗体測定法の開発とその臨床的有用性に関する研究

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 【目的】抗 SRP 抗体の測定は、煩雑な技術を要する RNA 免疫沈降法によって主に行われてきた。本研究は、新たな抗 SRP 抗体測定法を開発し、その臨床的有用性を検討することを目的とした。【方法】1) 対象: 膠原病患者 15,000 例、とくに RNA 免疫沈降法で 7SL-RNA と反応した抗 SRP 抗体陽性 18 例。2) 自己抗体: HeLa 細胞抽出物を用いた免疫沈降法により同定。3) リコンビナント SRP-54kDa 蛋白を抗原とした酵素免疫測定法(SRP-Elia)、免疫ブロット法により、抗 SRP 抗体を測定。4) SRP-Elia による抗 SRP 抗体陽性例の臨床特徴、筋組織学的特徴、HLA クラス II 遺伝子を検討。【結果】1) 7SL-RNA を沈降した全 18 血清が、SRP-Elia 法で高力価陽性を示し、免疫ブロット法でも確認された。2) 16 例中 14 例(89%)が筋炎を持ち、14 例中 9 例(64%)がステロイド療法抵抗性筋炎であった。3) 筋組織を詳細に検討し得た全 8 例が炎症性細胞浸潤のない壊死性筋炎の所見を示した。4) 免疫遺伝学的背景の検討では、DR8 (DRB1*0802/*0803)が健常人に比し、高頻度であった。【結語】新たな SRP-Elia は、簡便なスクリーニング検査に適していると考えられた。さらに、ステロイド療法抵抗性の壊死性筋炎サブセットを形成する症例を同定し、その臨床的有用性が示された。

A. 研究目的

シグナル認識粒子(signal recognition particle; SRP)は、粗面小胞体における蛋白合成に関与する、7SL-RNA と 72, 68, 54, 19, 14, 9 kDa の 6 つのサブユニット蛋白から構成されるリボ核蛋白である。SRP に対する自己抗体は、抗アミノアシル tRNA 合成酵素(ARS)抗体に比し低頻度ながら、多発性筋炎(PM)に特異的に検出され、臨床的に有用である。しかし、同抗体の測定は、煩雑な技術を要する RNA 免疫沈降法によって主に行われてきた。本研究は、臨床的に有用な新たな抗 SRP 抗体測定法を開発すること、を目的とした。

B. 研究方法

1) 対象: 膠原病患者 15,000 例、とくに、その血清が RNA 免疫沈降法で 7SL-RNA と反応した抗 SRP 抗体陽性 18 例を対象とした。2) 自己抗体は、HeLa 細胞抽出物を用いた核酸および蛋白の免疫沈降法により同定した。3) Sf9 細胞/baculovirus システムにより発現した、リコンビナント SRP-54kDa 蛋白(Direct AG, Germany)をビオチン化した後、抗原とした酵素免疫測定法(SRP-Elia)、免疫ブロット法により、抗 SRP 抗体陽性血清と対照血清(PM を含む他の膠原病患者血清、健常人血

清)を測定し、従来の免疫沈降法と比較検討した。4)

SRP-Elia による抗 SRP 抗体陽性例の臨床特徴、筋組織

学的特徴、HLA クラス II 遺伝子を検討した。

(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) 全 18 対象例血清が、SRP-54 kDa 蛋白を抗原とした Elia 法で高力価陽性を示し、免疫ブロット法でも確認された。一方、抗 ARS 抗体や抗 U1 RNP 抗体など他の筋炎特異自己抗体陽性血清を含む対照血清は陰性を示した。2) 16 例中 14 例(89%)が筋炎を持ち、14 例中 9 例(64%)がステロイド療法抵抗性筋炎であった。3) 筋組織を詳細に検討し得た全 8 例が炎症性細胞浸潤のない壊死性筋炎の所見を示した。4) 免疫遺伝学的背景の検討では、DR8 (DRB1*0802/*0803)が健常人に比し、高頻度であった(44% vs. 20%)。

D. 考察

抗 SRP 抗体を検出は、煩雑な技術を要する RNA 免疫沈降法における 7SL-RNA との反応性により行われ、その測定は一部の研究施設に限られてきた。しかし、本研究により、SRP-54 kDa 蛋白を抗原とする酵素免疫測定法(SRP-Elia)が、簡便なスクリーニング検査として実用的であることが確認された。また、本法で同定された抗 SRP 抗体陽性例は、ステロイド療法に抵抗性を示す壊死性筋症サブセットと関連し、従来の報告と一致し、その臨床的有用性も明らかとなった。今後、本測定法を用いることにより、多数の膠原病症例のスクリーニング測定とともに、抗 SRP 抗体価の定量的測定が可能となり、同抗体と関連する新たな臨床像や病態の解析に役立つことが期待される。また、本研究では主要エピトープが存在するとされる 54kDa 蛋白を抗原として用いたが、免疫沈降法により高頻度の反応性を示す、他の SRP サブユニット蛋白を抗原とした測定系との比較検討も重要な課題と考えられる。

E. 結論

新たな SRP-Elia は、簡便なスクリーニング検査に適していると考えられた。さらに、ステロイド療法抵抗性の壊死性筋炎サブセットを形成する症例を同定し、その臨床的有用性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kaneko Y, Suwa A, Hirakata M, Ikeda Y, Kuwana M: Clinical associations with autoantibody reactivities to individual components of U1 small nuclear ribonucleoprotein. *Lupus* (in press)
2. Shimane K, Kochi Y, Horita T, Ikari K, Amano H, Hirakata M, Okamoto A, Yamada R, Myouzen K, Suzuki A, Kubo M, Atsumi T, Koike T, Takasaki Y, Momohara S, Yamanaka H, Nakamura Y, Yamamoto K: The association of a nonsynonymous single-nucleotide polymorphism in TNFAIP3 with systemic lupus erythematosus and

rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Arthritis Rheum.* 62:574-579, 2010.

3. 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. *Mod. Rheumatol.* 19: 156-164, 2009.
4. 平形道人: 抗アミノアシル tRNA 合成酵素抗体は筋炎と関連しているか. 分子リウマチ (印刷中).
5. 平形道人: 薬の選び方・使い方のエッセンス/多発性筋炎・皮膚筋炎. 治療,91(4)増刊号:1185-1191, 2009 年
6. 平形道人: 進展する自己免疫疾患の診療と問題点/多発性筋炎・皮膚筋炎. 医学のあゆみ 230(9): 737-745, 2009 年

2. 学会発表

1. Hirakata M, Takada T, Suwa A, Hardin JA: Development of the novel assay system detecting anti-SRP autoantibodies: The clinical, histopathological and immunogenetic features in Japanese patients. 73rd Annual Meeting of American College of Rheumatology, 2009 Oct, Philadelphia.
2. 平形道人, 諏訪昭, 高田哲也, 井上有美子, 金子祐子, 桑名正隆: 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. 第 53 回 日本リウマチ学会総会, 2009 年 4 月, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

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タクロリムスの有用性を検討している。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）、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）、そしてパートAとの比較可能性が担保できる範囲でのパートB選択除外基準緩和により拡大され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および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とういものである。2007年7月の被験者登録開始後、2010年1月22日までで計26例登録され、除外基準抵触の1例を除く25例に治験薬が投与された（皮膚筋炎13例、clinically-amyopathic dermatomyositis (CADM) 5例、多発性筋炎7例）。上記日時時点で14例が治験薬投与完了、4例が投与中、7例が治験薬投与中止であった。同日時までの評価項目達成例数は、主要評価項目（死亡）2例（皮膚筋炎6週、CADM21週）、副次的評価項目（Progression）5例（皮膚筋炎3例、CADM1例、多発性筋炎1例）であった。希少疾患であること、および疾患の性質から、治験実施計画において、治験の科学性および倫理性を維持するために様々な配慮が必要であったが、研究班を中心とした協力により前向き試験は症例集積目標が達成され、このような領域・分野の臨床研究における研究班体制の必要性と有用性が示された。一方、パートB/パートB' 症例集積には限界があり、パートAとの比較解析は、Indication biasの影響を縮小するためのMatching手法などを用いた技術的調整をもってしても不可能であると推測され、その大きな原因は糖質コルチコイドのみによる初期治療が行われた症例数が極めて少ないためであり、それは治療初期より免疫抑制薬が併用されているという実際の臨床現場の現状を反映しているものと考察された。これを踏まえ、パートB' データ収集依頼対象機関の拡大や、全国主要膠原病診療機関における本疾患に対する初期治療現状調査なども含め検討する。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の、取得しうる最善のデータをもつての検討を引き続き行う。

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（プレドニゾロン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）に加え、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）、およびパートAとの比較可能性が担保できる範囲でのパートB選択除外基準緩和により拡大され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および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とういものである。

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20年度厚生労働省

令第24号、平成20年2月29日公布、「改正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、2010年1月22日までで計26例登録され、除外基準抵触の1例を除く25例に治験薬が投与された（皮膚筋炎13例、clinically-amyopathic dermatomyositis (CADM) 5例、多発性筋炎7例）。上記日時時点で14例が治験薬投与完了、4例が投与中、7例が治験薬投与中止であった。同日時点での評価項目達成例数は、主要評価項目（死亡）2例（皮膚筋炎6週、CADM21週）、副次的評価項目（Progression）5例（皮膚筋炎3例（1/4/37週）、CADM1例（16週）、多発性筋炎1例（53週））であった。また重篤な有害事象は9例9件であり、うち8件が感染症であった。

（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最終的に5例にとどまり、パートAとの比較解析は、Indication biasの影響を縮小するためのMatching手法などを用いた技術的調整をもってしても不可能である。

（パートB'）

現在パートB'症例集積を進めているが、適格性を満足する症例は10例を超えないものと推測されており、パートAとの比較解析は、パートBと同じく、技術的調整をもってしても不可能であると予想される。

D. 考察

パートBに続き、パートB'においても症例集積が進まなかった大きな原因は、糖質コルチコイ

ドのみによる初期治療が行われた症例数が極めて少ないためであり、それは治療初期より免疫抑制薬が併用されているという実際の臨床現場の現状を反映しているものと考察される。これを踏まえ、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を支持する資料として、パートB' データ収集依頼対象機関の拡大や、全国主要膠原病診療機関における本疾患に対する初期治療現状調査なども含め、検討を行う。

E. 結論

多発性筋炎・皮膚筋炎合併間質性肺炎におけるタクロリムスの有用性の評価を行うべく GCP 準拠の多施設共同試験を医師主導で実施している。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が、研究班を中心とした協力により前向き試験は症例集積目標が達成され、このような領域・分野の臨床研究における研究班体制の必要性と有用性が示された。一方、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、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り、更に治療初期より免疫抑制薬が併用されているという実際の臨床現場の現状を反映し、データ収集に限界があった。

予後不良で現在限られたエビデンスのもと免疫抑制薬が適切な用法用量設定も行われていないまま適応外使用されている本疾患において、注目されている新規治療法候補の有用性の、取得しうる最善のデータをもつての検討を引き続き行う。

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辺縁帯 B 細胞に関する研究

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) モデルである、BXS^Bマウスは、*Yaa*遺伝子とその発症に重要である。*Yaa*遺伝子を導入したC57BL/6 (B6). *Yaa*マウスにおいて認める、脾臓の辺縁帯 (MZ) B細胞の減少に補体とB細胞抗原受容体 (BCR) がどのように関与しているかを調べる目的でC3ノックアウトマウスに*Yaa*遺伝子を導入したマウス、抗原特異的BCRを有するマウス (QM マウス、Sp6マウス)を用いてB6. *Yaa*マウス、B6マウスと比較した。その結果、C3-/-*Yaa*マウスはややMZ B細胞の比率を上げる作用を及ぼしたものの、B6. *Yaa*マウスと有意な差は認めず、抗原特異的BCRを有する*Yaa*マウスでのMZ B細胞の比率は有意に上昇していた。以上より*Yaa*マウスにおける抗原抗体反応に伴うMZ B細胞の形成には、補体の役割は部分的であり、*Yaa*遺伝子に関わるMZ B細胞の欠損はBCRの刺激に依存性が強いと考えられた。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス (SLE) モデルである、BXS^Bマウスは、*Yaa*遺伝子とその発症に重要である。*Yaa*遺伝子を導入したC57BL/6 (B6) *Yaa*マウスにおいて認める、脾臓の辺縁帯 (MZ) B細胞の減少に補体とB細胞抗原受容体 (BCR) がどのように関与しているかを調べる目的で補体 (C3) を欠損するマウス、C3-/-マウス、nitrophenyl acetyl (NP) ハプテンに対し反応を示すBCRを有するQuasi-monoclonal (QM) マウス、またTNP/DNAに反応を示すBCRを有するSp6マウスを用いて解析を行った。

B. 研究方法

①C3-/-マウス、QMマウス及びSp6マウスとB6 *Yaa*マウスの交配により*Yaa*遺伝子を導入しC3-/-*Yaa*マウス、QM *Yaa*マウス、Sp6 *Yaa*マウスを作製。2-3カ月齢で脾臓のMZB細胞についての解析を行った。
②Sp6 *Yaa*マウスについてNPハプテンあるいはLPSを投与し、抗TNP/DNA抗体の産生についてELISAで測定した。

(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

①C3-/-*Yaa* マウスはやや MZ B 細胞の比率を上げる作用を及ぼしたものの、B6. *Yaa* マウスと有意な差は認めなかった。QM *Yaa* マウス及び Sp6 *Yaa* マウスでの MZ B 細胞の比率は減少を認めず、有意に

上昇していた。②Sp6 マウスでは、NP ハプテンの投与により *Yaa* の存在下においても抗 TNP/DNA 抗体の上昇は認めなかった。LPS の刺激により抗 TNP/DNA 抗体の産生は、Sp6 *Yaa* マウスにおいても上昇していた。

D. 考察

以上より *Yaa* マウスにおける抗原抗体反応に伴う MZ B 細胞の形成には、補体の役割は部分的であり、*Yaa* 遺伝子に関わる MZ B 細胞の欠損は BCR 刺激に依存性が強いと考えられた。Sp6 *Yaa* マウスの抗原刺激の結果により、*Yaa* の存在下では非特異的な抗原刺激に対する B 細胞の反応性は保たれているものの、抗原特異的な反応については低下しており、Sp6 *Yaa* マウスにおける MZB 細胞の増加と関係していると考えられた。

E. 結論

Yaa を有する B 細胞は BCR のシグナルに対して高反応性を有しており、そのために脾臓の MZB 細胞が減少していると考えられた。これらのメカニズムについてより詳細に解析することにより SLE の病態解明および治療戦略につながると思われる。

F. 健康危機情報

該当情報なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Morimoto S, Watanabe T, Lee S, Amano H,