

201024053A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

免疫修飾薬による多発性硬化症の  
治療成績向上を実現する探索的研究  
(H21-難治-一般-217)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山 村 隆

平成23年（2011年）3月

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

免疫修飾薬による多発性硬化症の  
治療成績向上を実現する探索的研究  
(H21-難治-一般-217)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山 村 隆

平成23年 (2011年) 3月

# 目 次

<b>I. 総括研究報告</b>	
■ 免疫修飾薬による多発性硬化症の治療成績向上を実現する探索的研究	P1
独) 国立精神・神経医療研究センター 山村 隆	
<b>II. 分担研究報告</b>	
■ OCH臨床試験に有用なバイオマーカー探索	P5
独) 国立精神・神経医療研究センター 三宅 幸子	
■ ヒト T 細胞亜群の機能とバイオマーカーの研究	P9
独) 国立精神・神経医療研究センター 荒浪 利昌	
■ 「多発性硬化症の臨床試験の管理業務」に関する研究	P11
独) 国立精神・神経医療研究センター 中林 哲夫	
■ 多発性硬化症の SPECT による脳血流測定と MRI との相関	P14
独) 国立精神・神経医療研究センター 小川 雅文	
■ 多発性硬化症の MR による定量的解析に関する研究	P16
独) 国立精神・神経医療研究センター 佐藤 典子	
■ 核内転写因子標的医薬の薬効評価研究	P18
独) 国立精神・神経医療研究センター 大木 伸司	
■ 『免疫修飾薬による多発性硬化症の治療成績向上を実現する探索的研究』 -MR1 拘束性 NKT 細胞亜群の抗炎症性機能について；動脈硬化症をモデルとして	P21
北里大学 岩渕 和也	
■ FTY720 によるヒトミクログリアアポトーシスの分子機構の解析	P26
明治薬科大学 佐藤 準一	
<b>III. 研究成果の刊行に関する一覧表</b>	P35
<b>IV. 研究成果の刊行物・別刷</b>	P39

# I .総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総括研究報告書

免疫修飾薬による多発性硬化症の治療成績向上を実現する探索的研究

研究代表者 山村 隆 独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部 部長

**研究要旨**

本研究の目的は、国立精神・神経医療研究センター（NCNP）で開発中の免疫修飾薬（OCH）のMSにおける有効性を証明し、治療法として確立することにある。NKT細胞標的糖脂質医薬OCHはコンプライアンスと安全性に優れた経口薬で、MSにおける有用性を示唆する研究結果が得られている。研究課題が採択されてから、細胞解析機器などの基盤整備、GMP原薬の大量合成、医師主導治験推進体制の確立、前臨床試験（安全性試験）の中核部分を完了した。治療薬効果を反映するバイオマーカーを、マウスおよびカナクイザルで探索している他、ヒトNKT細胞のフローサイトメーター解析技術の確立、疾患活動性に関連する遺伝子発現の研究、MSの治療研究に関する神経放射線学的評価手法の研究なども進めた。海外における特許登録やNCNPにおけるスーパー特区の基盤整備も進んでおり、国内における新薬研究開発を加速する効果をねらった本事業は順調に進展していると言える。

**研究分担者**

小川雅文 独) 国立精神・神経医療研究センター医長  
佐藤典子 独) 国立精神・神経医療研究センター部長  
中林哲夫 独) 国立精神・神経医療研究センター室長  
三宅幸子 独) 国立精神・神経医療研究センター室長  
岩淵和也 北里大学 教授  
大木伸司 独) 国立精神・神経医療研究センター室長  
荒浪利昌 独) 国立精神・神経医療研究センター室長  
佐藤準一 明治薬科大学 教授  
案浦洋一 アスピオファーマ（株）生物医学研究所  
ファカルティ長

**A. 研究目的**

多発性硬化症（MS）は若年で発症する慢性難治疾患であり、数10年以上に及ぶ長期治療が必要になる。治療の選択肢は少なくインターフェロン・ノンレスポonderではステロイドや免疫抑制剤の長期投与を余儀なくされる。新しい分子標的医薬または免疫抑制剤では、重症感染（PMLなど）や癌を発症するリスクが懸念されている。本研究の目的は、医療スーパー特区を活用することによって国産のMS治療薬OCHの医師主導治験を行い、MSの新規経口薬を開発することである。

本開発研究の中核となる薬剤OCHは、申請者らが発見した糖脂質医薬で、NKT細胞の免疫修飾効果を誘導する機序をもった経口薬である（Nature 413:531, 2001; JCI 113:1631, 2004; Curr Med Chem 15:2337, 2008）。平成22年度

の目標は、早期にPOCを確立するために有用なMS病態解析システムの確立（ヒトおよび実験動物）、GMP原薬の大量合成、医師主導治験推進体制の確立、前臨床試験の完了、製剤化検討とした。分担研究者には、免疫学、神経内科学、放射線医学の専門家を選定し、明確な目標をもったプロジェクトの一員として、研究に参画していただいた。

**B. 研究方法**

個々の研究手法は、分担研究報告を参照されたい。

（倫理面への配慮）

動物実験は施設の動物実験指針に基づき倫理審査委員会の承認を受けた上で行った。ヒト血液、髄液検体を用いた解析については、国立精神・神経医療研究センターの倫理委員会の承認を受けて行い、書面による説明と同意を得た上で、採血を行った。

**C. 研究結果**

平成23年度の最終四半期にNCNPスーパー特区においてOCH医師主導治験を行うために以下の事項に関して進展が得られた。

1) GMP原薬の合成:

OCHのGMP原薬として、1.5kgの製造を実施し、分析の結果から規格値に適合していることを確認した。分担研究者案浦洋一博士（アスピオファーマ）が中心となって、合成

実施を可能にする製法関連情報の開示を進め、合成は(株)ナードケミカルズにおいて実施した。医薬基盤研の「保健医療分野における基礎研究推事業(平成14年度—18年度)」におけるOCH研究で、アスピオファーマと共同で獲得した知材、合成化合物原材料、研究ネットワークなどを活用した。

## 2) OCH 製剤化の検討:

OCHの溶解度を至適化するために、製剤化の検討を進めた。分担研究者中林哲夫室長が、外部の専門家との共同研究で進め大きな進展があった(詳細は記載不可)。

## 3) 臨床試験体制整備:

プロジェクトマネージャー(PM)、治験担当専門医師の人事を進め、中林室長がPMの業務を開始した。治験担当医師の選定も終えた(平成23年4月着任予定)。

## 4) 非臨床試験: 本年度は理化学試験、安全性薬理試験、毒性試験、薬効薬理試験、薬物動態試験、バリデーション試験など、計32試験を実施(23年度前半にすべて完了する予定)。

## 5) 霊長類モデルにおける薬効試験:

OCH投与量、投与プロトコールと、免疫パラメーターの関連について、カニクイザルを用いた検討を開始した。

## 6) OCH 臨床試験に有用なバイオマーカー探索:

分担研究者三宅幸子室長は、マウス、カニクイザルでの検討を進めた(分担研究報告参照)。分担研究者大木伸司室長は、患者末梢血T細胞の発現する転写因子NR4A2がMSの活動性の指標になる可能性を検討した(分担研究報告)。

## 7) ヒトNKT細胞解析システムの確立:

NKT細胞及びNK細胞は、OCH投与によって変動する可能性の高いリンパ球である。末梢血における変動を明らかにするために、初年度には高速フローサイトメーターを導入した。本年度はマルチカラー解析によってヒトNKT細胞数や亜分類に関する基礎的な情報を収集するとともに、4種類のケモカイン

受容体の発現プロファイルによってNKT細胞を分類し、それらの機能を解析した(分担研究者: 荒浪利昌室長)。

## 8) 多発性硬化症病態の神経放射線学的アプローチによる評価法の確立:

NCNP病院のMS症例におけるSPECTによる脳血流測定、MRI画像との対比研究(分担研究者小川雅文医長)、MSの脳容積等の変化の定量的解析手法の検討(佐藤典子部長)を進め、医師主導治験において、患者病態評価に貢献する研究を行った。

## D. 考察

近年の研究結果によれば、多発性硬化症(MS)は個体差が大きく、病態もTh1細胞優位またはTh17優位のタイプがあり、それぞれが治療に対して異なる反応性を示す可能性が指摘されている

(Steinman Lら. Nature Medicine 2010)。また、活動性もさまざまであり、すべての患者に副作用の懸念される強力な分子標的医薬を投与することは考えられない。ファーストラインの薬剤としては、副作用が少なくコンプライアンスの良い経口薬が望まれている。OCHはNKT細胞産生サイトカイン産生パターン<sup>1)</sup>の修飾効果を示すとともに、生体のサイトカインバランス、免疫調節ネットワークを自己免疫病抑制の方向に導く可能性がある。また、これまでの非臨床試験の結果は、安全性に優れる薬剤であることを示唆している。

平成23年度に医師主導臨床試験を開始すれば、実用化に向けて大きく前進させることは確実であり、プロジェクト関係者の士気は高い。

## E. 結論

OCHの医師主導臨床試験の実行に向けて、当初の予定に沿って研究を進めた。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Chang, Y.-J., H. Y. Kim, L. A. Albacker, H.-H. Lee, N. Baumgarth, S. Akira, P. Savage, S. Endo, T. Yamamura, J. Maaskant, N. Kitano, A. Singh, A. Bhatt, G. Besra, P. van den Elzen, B. Appelmek, R. W. Franck, G. Chen, R. DeKruyff, M. Shimamura,

P. Illarionov, and D. Umetsu. Influenza A infection in suckling mice expands a population of NKT cells that protects mice as adults from airway hyperreactivity. *J. Clin. Invest.* 2010 Dec 13. pii: 44845. doi: 10.1172/JCI44845. [Epub ahead of print]

Chihara, N., T. Aranami, W. Sato, Y. Miyazaki, S. Miyake, T. Okamoto, M. Ogawa, T. Toda, and T. Yamamura: Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *PNAS* early edition online, 2011

能登大介, 山村 隆: <Special Article> 免疫性神経疾患の免疫学. 内科 105:756-761, 2010

三宅幸子, 山村 隆: NKT細胞と多発性硬化症. *Mebio* 27: 94-101, 2010

荒浪利昌, 山村 隆: Th17細胞のケモカインレセプターの発現. *Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology* 4: 156-160, 2010

千原典夫, 山村 隆: 神経疾患と炎症 -多発性硬化症を中心に- *最新医学* 65: 2390-2395, 2010

## 2. 学会発表

1. Yamamura T : Invariant T cells as sensors and regulators of commensal flora. 14th International Congress of Immunology (ICI), Kobe, Japan, 8. 24, 2010
2. Yamamura T : Asian type MS versus Western type MS: immunological background. Neuroimmunology Kyoto Conference 2010 (Satellite Symposium in conjunction with ICI 2010). Kyoto, Japan, 8.21, 2010
3. Yamamura, T. : Immunological basis of multiple

sclerosis and neuromyelitis optica in Japan. Max Planck Institute & National Center of Neurology and Psychiatry. Joint Symposium. Front Line of the Research on Psychiatry & Neurology. Tokyo 10.13, 2010

4. Yamamura, T.: Keynote lecture. Immunology of NK and NKT cells in MS. Multiple Sclerosis Immunology: A foundation for Current and Future Treatments. Nottingham, UK, 10.31, 2010
5. Yamamura, T.: IL-6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica (NMO). 2010 Neuromyelitis optica roundtable conference. A rare approach to a rare disease. The Biverly Hilton. Los Angeles, CA, 11.8, 2010
6. Yamamura, T. : Progress in pathophysiology in NMO and clinical implications. The 5th Bochum-Dusseldorf MS symposium. Bochum, Germany, 2.19, 2011

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

OCH 関連特許に関する本年度の動きは以下：  
発明の名称：糖脂質誘導体及びその製造法並びにそれらの合成中間体及びその製造法  
発明者：案浦洋一、村田健司、山村隆  
出願人：国立精神・神経センター  
各国内移行国審査・登録状況：  
CN（分割出願）登録完了（2010年10月20日）  
US（原出願）登録完了（2010年6月8日）  
JP（原出願）登録予定（2011年3月）

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

特になし

## Ⅱ. 分担研究報告



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

○CH臨床試験に有用なバイオマーカー探索

分担研究者 三宅 幸子 独) 国立精神・神経医療センター神経研究所免疫研究部 室長

研究要旨

OCHの臨床応用に際し、投与による効果が推定できるバイオマーカーの存在は、非常に有効である。そこで、マウス、ならびにサルを用いて、OCH投与により特異的に変動する遺伝子についての検索を行った。マウスにおいては、C57BL6JならびにSJLマウスにおいて、OCH投与後に末梢血単核球の遺伝子発現の網羅的解析を行ったところ、IL-4、IFN- $\gamma$ に関する遺伝子発現上昇がみられた。サルにおいては、経口隔日投与により遅延型過敏反応が抑制されることが明らかとなった。今後は、経口隔日投与後に末梢血全血の遺伝子発現解析を行い、バイオマーカーの検索を行う。

A. 研究目的

OCHの臨床応用に際し、投与による効果が推定できるバイオマーカーの存在は、非常に有効である。そこで、マウス、ならびにサルを用いて、OCH投与により特異的に変動する遺伝子について網羅的解析を行い、バイオマーカーの候補遺伝子を検索する。

B. 研究方法

マウスについては、実験的自己免疫性脳脊髄炎において、OCHによる抑制効果がみられたB57BL6JならびにSJLマウスにおいて、OCH投与後に末梢血単核球の遺伝子発現の網羅的解析を行った。末梢血単核球は、0.5mg/kg OCH経口投与後、1群あたり7-10個体相当の末梢血を合計し、密度勾配法により調整した。分離した単核球は、Isogen(ニッポンゼン)に溶解させ、Total RNAを精製した。RNeasy mini(キアゲン)にてTotal RNAを再精製後Dnase処理を行った。Total RNAのQuality checkは2100bioanalyzer (Agilent Technologies) RNA6000nanoを使用して行った。DNAマイクロアレイは、

Agilent社のプロトコールに準拠し、マウス全ゲノム搭載DNAアレイ(41174probe)により解析した。統計解析は、有意差検定(t-test)、階層型クラスタリング(ピアソン相関係数)、QT-クラスタリングはGeneSpring7.3を使用し、遺伝子ネットワーク解析ではIngenuity Pathway Analysis(IPA)を使用した。

雄カニクイザル(3匹/群)に破傷風トキソイド(Tetanus toxoid:TTx)を感作し、21日後に遅延型過敏症を誘導させた。OCH(100 mg/kg)を単回あるいは3回(1回/週)経口投与し、一般状態、体重、血算、遅延型過敏症反応、T細胞、B細胞、NK細胞の表面抗原を含めたOCHの免疫学的パラメータへの影響について調べた。また、血清中サイトカイン(IL-2, IL-4, IL-5, TNF, IFN- $\gamma$ )をELISA法にて測定した。

(倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

マウスの末梢血単核球の網羅的遺伝子解析では、C57BL/6 並びに SJL マウスに共通して発現上昇がみられた遺伝子は 36 であった。ネットワーク解析を行ったところ、これらの遺伝子は、IFN- $\gamma$ 、IL-4 などのサイトカインを中心とした遺伝子を多く含んでいた。

サルにおいては、OCH 投与によって一般状態、体重の推移、血液検査 (WBC, RBC, Hb, Hct, Plt, Ret, MCV, MHC)、分画好酸球、好塩基球、好中球、単球、リンパ球、大型非染色細胞、NKT 細胞以外の免疫フェノタイプング (CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>CD20<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>) に変化はみられなかった。また、血清中サイトカイン (IL-2, IL-4, IL-5, TNF, IFN- $\gamma$ ) に変化はみられなかった。遅延型過敏反応については、OCH の経口隔日投与群では、有意に抑制された。

## D. 考察

マウスにおける全血の網羅的遺伝子解析では、IFN- $\gamma$ 、IL-4 などのサイトカインを中心とした遺伝子に変化がみられた。これらはバイオマーカーとしての候補とはなるが、フローサイトメトリーなどで検出できる表面分子の発現に変化があれば、より臨床的には使用しやすい。NKT 細胞の頻度がヒトに近いサルにおいても、OCH の経口投与により遅延型過敏反応が抑制されることから、OCH 投与の Th1 反応抑制効果が期待される。そこで、サル末梢血を用いたバイオマーカーの検索が今後重要であると考えられる。

## E. 結論

OCH 投与後のマウス全血では、IFN- $\gamma$ 、IL-4 などのサイトカインを中心とした遺伝子に変化した。今後は、サル全血についてのバイオマーカー検索を行う。

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### I 論文発表

原著

- 1) Noto D, Takahashi K, Miyake S, Yamada M. In vitro differentiation of lineage-negative bone marrow cells into microglia-like cells. *Eur J Neurosci* 31:1155-63, 2010
- 2) Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Toda T, Yamamura T. Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *Proc Natl Acad Sci USA* in press.

総説

- 1) Sakuishi K, Miyake S, Yamamura T: Role of NKT cells in multiple sclerosis: In a quest to understand and overcome their highly efficient double edged swords. *Molecular Basis of Multiple Sclerosis. The Immune System Series "Results and Problems in Cell Differentiation"* Gramm U, ed, Springer-Verlag, Heidelberg, 51:127-147, 2010
- 2) 三宅幸子: 腸管免疫と神経免疫のクロストーク. *Clinical Neuroscience* 28(2):154-155, 2010
- 3) 三宅幸子: NKT 細胞と疾患. *臨床リウマチ* 22(2):154-160, 2010
- 4) 三宅幸子: MAIT 細胞と自己免疫疾患. *リウマチ*

44(3):361-364, 2010

- 5) 三宅幸子, 山村隆 : NKT 細胞と多発性硬化症. Mebio. 27(6):95-101, 2010

## II 学会発表

### 国際学会

- 1) Miyake S. MAIT cells in autoimmunity  
Neuroimmunology Kyoto Conference 2010, Kyoto,  
August 18, 2010
- 2) Chiba A, Tajima R, Miyazaki Y, Ichikawa D,  
Yamamura T, Miyake S: The role of MR1-restricted  
MAIT cells in the pathogenesis of murine models  
of arthritis. 10<sup>th</sup> Annual Conference of FOCIS,  
Boston, June 24, 2010 (Clinical Immunology,  
135S:S52, 2010)
- 3) Chiba A, Tajima R, Miyazaki Y, Ichikawa D,  
Yamamura T, Miyake S: The role of MR1-restricted  
MAIT cells in the pathogenesis of arthritis. 14<sup>th</sup>  
International Congress of Immunology, Kobe, Aug  
24, 2010
- 4) Ogura H, Satoh M, Gilfillan S, Miyake S, Onoe  
K, Iwabuchi K: MR1-restricted NKT cells exhibit  
beneficial role for the development of  
atherosclerosis. 14<sup>th</sup> International Congress of  
Immunology, Kobe, Aug 23, 2010
- 5) Lin Y, Miyake S, Yamamura T: Dominancy of  
encephalitogenic peptide itself directs  
sustainable regulation of a model of multiple  
sclerosis, through induction of "armoured"  
regulatory T cells. 14<sup>th</sup> International Congress  
of Immunology, Kobe, Aug 23, 2010
- 6) Chihara N, Sato W, Aranami T, Miyazaki Y, Miyake  
S, Okamoto T, Ogawa M, Yamamura T: Auto-reactive  
anti-aquaporin 4 antibodies are secreted from  
peripheral plasma cell-like B cells in  
neuromyelitis optica. 14<sup>th</sup> International  
Congress of Immunology, Kobe, Aug 23, 2010
- 7) Noto D, Kazuya T, Yamamura T, Masahito Y, Miyake  
S: In vitro differentiation of lineage-negative  
bone marrow cells and monocyte into  
microglia-like cells. 10<sup>th</sup> International  
Congress of Neuroimmunology, Barcelona, Nov15,  
2010
- 8) Chiba A, Miyazaki Y, Ryohsuke T, Miho M, Tomi  
C, , Ichikawa D, Iraide A, Yamamura T,  
Vandenbroeck K, Miyake S: Celecoxib analogue  
lacking COX-2 inhibitory activity suppresses  
inflammatory disorders by inhibiting  
inflammatory cytokines. 10<sup>th</sup> International  
Congress of Neuroimmunology, Barcelona, Nov15,  
2010
- 9) Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake  
S, Okamoto T, Ogawa M, Toda T, Yamamura T: Plasma  
cell-like B cells produce aquaporin 4  
autoantibody in neuromyelitis optica. 10<sup>th</sup>  
International Congress of Neuroimmunology,  
Barcelona, Nov15, 2010
- 10) Lin Y, Miyake S, Yamamura T: Dominancy of  
encephalitogenic peptide itself directs  
sustainable regulation of a model of multiple  
sclerosis, by induction of "armoured" Tregs.  
10<sup>th</sup> International Congress of Neuroimmunology,  
Barcelona, Nov15, 2010

11) Chiba A, Ryohsuke T, Miho M, Tomi C, , Ichikawa D, Iraide A, Yamamura T, Vandebroek K, Miyake S: Celecoxib analogue lacking COX-2 inhibitory activity inhibits arthritis by suppressing IL-23 and inflammatory cytokines. American College of Rheumatology 73<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting, Atlanta, Georgia, November 7, 2010 (Arthritis Rheum. 62:S371, 2010)

12) Chiba A, Tajima R, Miyazaki Y, Ichikawa D, Yamamura T, Miyake S: Mucosal associated invariant T cells contribute to the pathogenesis of arthritis. American College of Rheumatology 73<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting, Atlanta, Georgia, November 11, 2010 (Arthritis Rheum. 62:S938, 2010)

#### 国内学会

- 1) 三宅幸子 : NKT 細胞と自己免疫. 第 53 回日本リウマチ学会, 横浜, 4 月 23 日, 2010 (第 54 回日本リウマチ学会総会抄録集 p243)
- 2) 千原典夫, 佐藤和貴郎, 荒浪利昌, 宮崎雄生, 三宅幸子, 岡本智子, 小川雅文, 山村隆: 視神経脊髄炎 (NMO) における B 細胞の役割について. 第 22 回日本神経免疫学会学術集会, 東京, 3. 18, 2010
- 3) 宮崎雄生, 三宅幸子, Olivier Lantz, 山村 隆: 多発性硬化症における Mucosal Associated Invariant T 細胞に関する研究. 第 22 回日本神経免疫学会学術集会, 東京, 3. 18, 2010
- 4) 能登大介, 高橋和也, 山村隆, 三宅幸子 : 末梢血単球からミクログリアへの分化誘導法に関する検討. 第 22 回日本神経免疫学会学術集会, 東京, 3. 19, 2010
- 5) 千葉麻子, 三宅幸子 : 関節リウマチなど関節炎における MR1 拘束性 MAIT 細胞の役割, 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 神戸, 4. 22, 2010 (第 54 回日本リウマチ学会総会抄録集 p500)

#### 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

ヒト T 細胞亜群の機能とバイオマーカーの研究

研究分担者 荒浪利昌 国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部 室長

研究要旨 ヒト NKT 細胞には、CD4 陽性および陰性のサブセットが存在するが、それ以外の機能的に独特なサブセットの存在は明らかではない。我々はケモカイン受容体を細胞マーカーとして T 細胞サブセットを同定する手法を報告している (J. Immunol. 2007)。本研究ではこの手法を用いて、MS の NKT 細胞のケモカイン受容体プロフィールとサイトカイン産生能の関連を解析した。その結果、4 種類のケモカイン受容体によって同定された 16 種類のサブセットの頻度に、健常者と MS 患者の間に有意差は認められなかった。しかし、クラスター解析により、MS 患者群を 2 群に分けられる可能性が示唆された。これら 2 群の NKT 細胞の OCH 刺激に対するサイトカイン発現パターンは異なる可能性が示唆され、ケモカイン受容体プロフィールを用いた NKT 細胞のフェノタイプ解析が、OCH 投与患者選定に有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒト NKT 細胞には、CD4 陽性および陰性のサブセットが存在するが、それ以外の、機能的に独特なサブセットの存在は明らかではない。我々はケモカイン受容体を細胞マーカーとして T 細胞サブセットを同定する手法を報告している (J. Immunol. 2007)。本研究ではこの手法を用いて、MS の NKT 細胞のケモカイン受容体プロフィールとサイトカイン産生能の関連を解析し、OCH 投与に対するサイトカイン反応性の予測方法を探索した。

B. 研究方法

- (1) 対象：未治療 MS 患者 11 名および健常者 9 名の末梢血単核球細胞 (PBMC) を分離し、CCR2、CCR4、CCR5、CCR6 の 4 種類のケモカイン受容体および CD3、CD4、invariant TCR に結合する CD1d-tetramer で同時染色し、フローサイトメトリーで NKT 細胞亜分画の頻度の測定を行った。
- (2) クラスター解析：4 種類のケモカイン受容体発現パターンによって同定される 16 種類の NKT 細胞亜分画の頻度のデータと、健常者及び MS 患者検体の関連を調べる目的で Hierarchical clustering 解析を行った。
- (3) OCH 反応性サイトカイン発現の解析：PBMC  $1 \times 10^7$  を OCH 存在化で 1.5~5 時間培養し、CD3-CD1d tetramer で染色し、NKT 細胞をソーティング、定量的 RT-PCR により ifng, il4, il17 mRNA 発現を測定。

(倫理面への配慮)

本研究においては、全ての患者から書面によるインフォームドコンセントを得た上で採血を行った。また、患者から得られた情報は、連結可能匿名化の後、国立精神神経センター病院にて厳重に保管されている。以上から、本研究は、倫理面への十分な配慮がなされている研究であると考えられる。

C. 研究結果

- (1) ケモカイン受容体プロフィールに基づく NKT 細胞サブセットの解析においては、HS と MS の間で有意差のあるサブセットは認められなかった。
- (2) NKT サブセットのクラスタリング解析により、MS をグループ分けできる可能性がある。
- (3) group1 は、CD4<sup>-</sup> CCR2<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>CCR4<sup>-</sup> NKT が最大の NKT サブセットであり、group2 は、CD4<sup>+</sup> CCR2<sup>-</sup>CCR5<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup>CCR4<sup>-</sup> NKT サブセットが優位である。
- (4) 少数例の解析ではあるが、OCH 刺激の際のサイトカイン発現パターンでは、group1 は IFN- $\gamma$  と IL-4 の両方を発現したのに対し、group2 の NKT 細胞では、IFN- $\gamma$  発現のみが認められ、IL-4 は認められなかった。

D. 考察

今回 4 種類のケモカイン受容体を用いて、NKT 細胞サブセットを同定することを試みた。CD4 陰

性 NKT 細胞においては、“ケモカイン受容体“陽性の優位なサブセットが同定されたが、CD4 陽性分画においては、“ケモカイン受容体“陰性サブセットがかなり優位なサブセットになっており、このサブセットに発現する新たなケモカイン受容体を同定することも重要であると考えられる。

#### E. 結論

NKT 細胞のケモカイン受容体発現パターン解析により、OCH 投与に対するサイトカイン産生反応の予測、或は経過観察に有用である可能性がある。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Norio Chihara, Toshimasa Aranami, Wakiro Sato, Yusei Miyazaki, Sachiko Miyake, Tomoko Okamoto, Masafumi Ogawa, Tatsushi Toda and Takashi Yamamura. 2011. Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. in press.

##### 2. 和文総説

1. 富田敦子、荒浪利昌、山村隆. 2010 年、MS の免疫病態のトピックス. Brain Medical 22 : 25-30.
2. 荒浪利昌、山村隆. 2010 年、Th17 細胞のケモカインレセプターの発現. Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology 4 : 28-32.
3. 荒浪利昌、山村隆. 2010 年、炎症と T 細胞サブセット. 治療学 : 11-13.

##### 2. 学会発表

##### 1. 国際学会

1. Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Yamamura T: Plasma cell-like B cells produce aquaporin 4 autoantibody in neuromyelitis optica. Kyoto: Neuroimmunology Kyoto Conference 2010, P-9
2. Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Yamamura T: Auto-reactive anti-aquaporin 4 antibodies are secreted from peripheral plasma cell-like B

cells in neuromyelitis optica. Kobe: 14th International Congress of Immunology 2010, PP-038-38

3. Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Yamamura T: Auto-reactive anti-aquaporin 4 antibodies are secreted from peripheral plasma cell-like B cells in neuromyelitis optica. Kobe: 14th International Congress of Immunology 2010, August 23.

4. Wakiro Sato, Atsuko Tomita, Youwei Lin, Masafumi Ogawa, Tomoko Okamoto, Miho Murata, Toshimasa Aranami and Takashi Yamamura: CCR2+ CCR5+ CD4+ T cells enriched in cerebrospinal fluid of relapsing multiple sclerosis patients strongly express matrix metalloproteinase-9 and osteopontin. Kobe: 14th International Congress of Immunology 2010, August 23.

5. Aranami T, Sato, Yamamura T: T cell subsets identified with chemokine receptors in MS. MS Immunology Seminar. Nottingham, England. October 31 2010.

6. Aranami T, Sato, Yamamura T: T cell subsets identified with chemokine receptors in MS. MS Immunology Seminar. Nottingham, England. October 31 2010.

##### 2. 国内学会

1. 千原典夫、佐藤和貴郎、荒浪利昌、宮崎雄生、三宅幸子、岡本智子、小川雅文、山村隆：視神経脊髄炎 (NMO) における B 細胞の重要性. 第 22 回日本神経免疫学会学術集会, 東京, 2010 年 3 月 18 日.

2. 佐藤和貴郎、荒浪利昌、富田敦子、岡本智子、小川雅文、山村隆：MMP9 を高発現する CCR2 陽性 CCR5 陽性細胞の多発性硬化症における重要性. 第 22 回日本神経免疫学会学術集会, 東京, 2010 年 3 月 18 日.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

平成22年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
免疫修飾薬による多発性硬化症の治療成績向上を実現する探索的臨床研究

H21-難治一般-217

分担研究報告書

「多発性硬化症の臨床試験の管理業務」に関する研究

分担研究者 中林哲夫 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター  
トランスレーショナル・メディカルセンター 臨床研究支援室

研究要旨：国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部において開発された免疫修飾薬の候補化合物である OCH について、臨床試験への移行のための準備及び体制整備を行っており、現在の進捗を説明する。

#### A. 研究目的

多発性硬化症の国内推定患者数は約12000例である希少疾患<sup>1)</sup>であることから、臨床試験の実施は簡単ではない疾患領域である。しかし、従来から治療法確立の必要性が認められており、近年では新たな治療薬の臨床開発も積極的に行われている<sup>2)</sup>。しかし、多発性硬化症にして効能及び効果をもつ国内既承認薬は限定的で、今後も新たな治療薬開発が望まれる。

国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部では、多発性硬化症の治療薬候補化合物として OCH を開発した。現在は、臨床試験の開始に向け準備を行っており、OCH は開発段階にあるため、守秘の観点から詳細を説明できない点も多いが、その進捗状況について説明する。

#### B. 組織体制

開発ストラテジーについては OCH の臨

床的位置づけを考慮し、代表研究者及び臨床研究支援室により検討した。平成22年度から、臨床試験開始のためのプロジェクト・マネージメントは臨床研究支援室が担当し、「C. 臨床試験開始の準備状況」で説明する内容を計画、依頼そして管理した。

#### C. 臨床試験開始の準備状況

臨床試験開始の準備として、平成22年度は、非臨床試験の計画と実施、原薬製造工場の調査、製剤設計、治験薬概要書の作成、そして臨床試験の標準業務手順書の整備を行った。

##### (1) 非臨床試験の計画と実施

非臨床試験は、ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) の S7A ガイドライン<sup>3)</sup> や M3 ガイドライン<sup>4)</sup> に従い、パッケージ内容を構成した。試験自体は、

CRO (Contract Research Organization) に委託し実施した。平成 22 年度に行った非臨床試験の概要は以下 32 試験である。

- ・ 理化学試験 (安定性試験等) : 7 試験
- ・ 安全性薬理試験 : 3 試験
- ・ 毒性試験 : 8 試験
- ・ 薬効薬理試験 : 1 試験
- ・ 薬物動態試験 : 7 試験
- ・ バリデーション試験 : 3 試験
- ・ in vitro 試験 : 3 試験

#### (2) 原薬製造工場の調査

平成 22 年 9 月に原薬製造工場を訪問し、OCH 原薬に関して、以下の調査を行った。

- ・ 組織構成
- ・ 構造及び設備
- ・ 文書類
- ・ 視察 (保管、作業、試験場所等)

#### (3) 製剤設計

これまでに得られている非臨床薬物動態試験の成績をもとに、他研究機関に委託し製剤設計を行った。委託した研究機関と設計方針を平成 22 年 10 月に検討した。また、複数の製剤処方に対して溶解性等を検討し、平成 23 年 2 月の段階で、製剤候補についても概ね検討が終了した。

#### (4) 治験薬概要書の作成

上記 (1) ~ (3) で得られている成績及び平成 21 年度までに得られている非臨床試験成績を精査し、治験薬概要書の作成を開始した。作成方針を検討した後に、作成を CRO に委託した。

治験薬概要書の作成過程でも内容の検討のために、委託した CRO と平成 22 年 8 月、11 月及び平成 23 年 1 月に検討を行った。

#### (5) 臨床試験の標準業務手順書の整備

初回の臨床試験は医師主導治験で行う予

定で体制整備を行っている。試験の目的に関わらず、医師、看護師、臨床検査、放射線検査、治験管理室、医事等の具体的体制について整備を行った。これらの体制整備は、標準業務手順書 (SOP: Standard Operating Procedure) として整備し、平成 22 年度には、以下の SOP を作成した。

- ・ 治験等に係る標準業務手順書
- ・ 治験審査委員会標準業務手順書
- ・ 直接閲覧を伴うモニタリング及び監査の受入れに係る標準業務手順書
- ・ 自ら治験を実施しようとする者による治験実施の準備に係る標準業務手順書

#### D. 考察

近年、多発性硬化症を対象とした医薬品開発は活発<sup>2)</sup>であり、OCH の開発においても、医薬品承認後の治療薬としての位置付けを考慮し、その化合物のコンセプトを明確にする必要がある。また、臨床試験は、他化合物の開発状況や審査状況についても把握した上で計画<sup>5)</sup>し、有効性及び安全性プロファイルを示す必要がある。現在、OCH の初回の臨床試験についても、全般的な開発ストラテジーを考慮し、計画を進めている。平成 22 年度は、OCH の初回の臨床試験の計画と実施、そして規制要件を充足するのに必要な非臨床試験を実施し、製剤設計、治験薬概要書の作成、臨床試験の SOP 整備そして原薬製造工場の調査を行った。初回の臨床試験の実施予定時期までの準備としては、計画通り進行している。

現在の進捗状況から、臨床試験開始までに必要な準備としては以下等があげられ、平成 23 年度は必要事項について順次行っ



ていく。

- ・ 非臨床試験成績を精査した後に、必要な追加試験の検討
- ・ 治験薬製造方法の確立
- ・ 治験実施計画書、症例報告書及び同意説明文書の作成
- ・ 臨床試験の実施医療機関内の体制整備と SOP 作成
- ・ 臨床試験開始前に医薬品医療機器総合機構との治験相談
- ・ 臨床試験の統計解析、モニタリング、データマネージメント及び GCP 監査に関する CRO 選定と委託
- ・ 安全性評価委員会の組織
- ・ 治験届の作成と提出
- ・ 30 日調査への対応

#### E. 結論

多発性硬化症の治療薬候補である OCH について、初回の臨床試験を開始するための準備として、非臨床試験を実施し、製剤設計、治験薬概要書の作成、臨床試験の SOP 整備そして原薬製造工場の調査を行った。平成 23 年度も、臨床試験の開始に向けて準備と体制整備を引き続き行う。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

1. 中林哲夫: 向精神薬の臨床試験. in press
2. 中林哲夫: プラセボ効果. in press
3. 中林哲夫: 向精神薬の治験の進め方 -抗うつ薬の臨床試験を中心に-.樋口輝彦・不安・抑うつ臨床研究会編. 向精神薬開発の現状と課題. 東京. 41-52,

2010

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

#### 【引用文献】

- 1) 難病情報センター.  
<http://www.nanbyou.or.jp/sikkan/068.htm>
- 2) Huynh T: The multiple sclerosis market. Nat Rev Drug Discov. 2010 Oct;9(10):759-60.
- 3) 厚生労働省医薬局審査管理課長: 安全性薬理試験ガイドラインについて. 医薬審発第 9 0 2 号
- 4) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長: 「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」について. 薬食審査発 0 2 1 9 第 4 号
- 5) European Medicines Agency: GUIDELINE ON CLINICAL INVESTIGATION OF MEDICINAL PRODUCTS FOR THE TREATMENT OF MULTIPLE SCLEROSIS. Doc. Ref. CPMP/EWP/561/98 Rev. 1, London, 16 November 2006

多発性硬化症の SPECT による脳血流測定と MRI との相関

研究分担者 小川 雅文 国立精神・神経医療研究センター病院神経内科医長

研究要旨

当院にて多発性硬化症と臨床診断された患者 22 人を対象に ECD-SPECT を撮影し Patlak 法により平均脳血流量を測定し、年齢、罹病期間、重症度(EDSS)、Mini Mental Scale(MMSE)の臨床データと MRI 像から自動解析ソフト Qbrain にて算出した頭蓋内容積、脳脊髄液、脳容積、T2 高信号病巣容積との相関を検討した。平均脳血流量と有意に相関したものは年齢、MMSE、脳脊髄液のみで、罹病期間や EDSS、頭蓋内容積、脳容積、T2 高信号病巣容積とは相関しなかった。年齢は加齢による脳血流低下の影響もあると思われる。T2 高信号病巣と相関しないことより白質病変だけでなく MRI では描出されにくいとされる大脳皮質病変が脳血流低下に影響している可能性もある。MMSE が脳血流と相関していることも同様の機序が考えられる。MS の病状評価、再発予防効果の検討には MRI による定量的な評価とともに脳血流測定も有効な一手段であると思われる。

A. 研究目的

現在多発性硬化症(MS)の病変・再発状況の評価には MRI が一般に使用されている。MRI は特に白質病変の描出にすぐれ造影剤を用いることにより新出病変を特定することも可能で多発性硬化症の臨床研究・治療研究には臨床症状の評価とともに MRI による検討が必須になっている。

MRI の検討には視覚的な評価以外に計算用ソフトなどを使用し客観的に評価する方法もある。当院では Qbrain という軸位断の FLAIR と T2 強調画像から、自動的に MS 病変等の容積を測定できるソフトを使用開始しその結果は別項で報告した。さらに同一症例で脳血流量を SPECT により定量し相関を検討したので報告する。

B. 研究方法

1. 対象

対象は当院で多発性硬化症と臨床診断された 22 人(男性 9 人、女性 13 人)。視神経脊髄炎と診断された例は除外、全例で抗アクアポリン 4 抗体を測定し陰性であることを確認した。MRI で MS 以外の病変を認めた症例も除外した。年齢  $46.2 \pm 16.3$  歳(19~74 歳)、罹病期間  $8.8 \pm 8.0$  年(1~30 年)重症度(EDSS)、Mini Mental Scale(MMSE)  $25.9 \pm 4.1$  点(30 点満点)EDSS  $3.7 \pm 2.3$  であった。

2. SPECT 撮影

通常の診療目的で ECD-SPECT を撮影し、Patlak 法により採血することなく平均大脳血流量を算出した。なお今回は局所の脳血流量については検討しなかった。

3. MR 撮影

MRI は通常診療時に撮影、1T MR 装置(Siemens, Harmony, Erlangen, Germany)にて、頭部用コイルを用いて撮影した。

4. MR 解析

Qbrain にて頭蓋内容積、脳脊髄液、脳容積、T2 高信号病巣容積を自動算出した。これら进行评估するために軸位断像の T2 強調、FLAIR 画像を用いた。それぞれの部位を自動抽出した後目視で確認し、実際とずれている場合は手動で訂正した。

5. 統計

平均脳血流量と各臨床データ及び MR データとの相関には回帰分析をおこなった。その後、ステップ・ワイズ回帰も用いた。すべて危険率 5% 以下を有意とした。

なお今回の検討は後ろ向きの調査であり、介入は一切なく、疫学的な調査である。

C. 研究結果

平均脳血流量は  $41.62 \pm 4.04$ (ml/100g/min)であった。頭蓋内容積は  $1392.9 \pm 108.1$ (ml)、脳脊髄液  $257.4 \pm 102.0$ (ml)、脳容積  $1135.5 \pm 112.7$ (ml)、T2 高信

号病巣  $11.56 \pm 11.5(\text{ml})$  だった。平均脳血流量と有意に相関したものは年齢、MMSE、脳脊髄液のみでそれ以外のものは相関しなかった。ステップ・ワイズ回帰分析では平均脳血流量を独立変数として検討したが採用された変数はなかった。

#### D. 考察

平均脳血流量と相関したものは年齢、MMSE、脳脊髄液のみであった。年齢は加齢による脳血流低下が関与している可能性もある。MMSEと脳血流が有意に相関していることからMSの脳血流は脳全体の機能のある程度表しているといえる。また脳脊髄液との相関については脳の萎縮により脳脊髄液が増加すると考えれば脳萎縮との相関を示唆しているかもしれない。

一方T2高信号域の容積とは相関しなかった。MSの脳血流の低下は白質病変のみが原因でなく大脳皮質病変や脳萎縮も原因となっている可能性がある。日常生活能力であるEDSSと相関していなかったのは脊髄や視神経炎によってもEDSSが悪化するので大脳の機能障害のみでEDSSが影響されるわけではないことを反映しているかもしれない。

以上の検討によりMSの脳血流量はMRでは描出しにくいといわれる大脳皮質病変も含め大脳の機能のある程度表していると思われる。MSの進行度や大脳病変の程度を評価するにあたってMRIだけでなく脳血流測定も有用であると考えられた。

#### E. 結論

MSの評価にはMRIによる評価とともにSPECTによる脳血流測定も有力な一手段であると考えられる。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

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

特記すべきことなし

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

多発性硬化症のMRによる定量的解析に関する研究

研究分担者 佐藤 典子 国立精神・神経医療研究センター病院放射線診療部 部長

研究要旨

当院にて多発性硬化症と臨床診断された患者 22 人を対象に、年齢、罹病期間、重症度(EDSS)、Mini Mental Scale(MMSE)の臨床データと、頭蓋内容積、脳脊髄液、脳容積、T2 高信号病巣容積をMRI 自動解析ソフトQbrain にて算出した。これらの容積を測定するために5mm 厚の軸位断像の T2 強調と FLAIR 画像を用いた。結果は EDSS は T2 高信号病変と、一方 MMSE は脳容積が相関を認め、MS 病変と重症度が、また認知症の度合いと脳萎縮とに 関連が見られた。Qbrain は完全自動でなく手動の作業が多少必要になるものの、比較的容易にかつ客観的に脳 容積や病変部位等を日常診療の撮像で測定することが可能であり、今後新薬などの介入による、MS 再発予防効 果をみる方法としてはこのソフトを使用した MRI の定量的解析がひとつの有力な手段であると思われる。

A. 研究目的

現在多発性硬化症(MS)の病変評価には客観的な MRI 画像が使用されている。MRI 画像の評価方法には、T1 強調画像での造影効果の数や容積計測、脳 全体や白質、皮質の容積の変化、T2 強調像高信号 の容積による脱髄病巣、T1 強調画像低信号の Black Hole の数や容積計測など様々な画像評価がある。そ の中でも T2 強調像高信号の容積による脱髄病巣の 評価方法は汎用されているが、それは労力を要し時 間がかかる作業である。最近 Qbrain という軸位断の FLAIRとT2強調画像があれば、自動的にMS病変等 を測定できるソフトを入手したので、当施設にてMSと 診断されMRIを撮影された患者を対象に、Qbrain に て脳容積、脳脊髄液の容積、T2 高信号域の容積を 定量的に求めた。またそれらと患者の罹病期間や重 症度などとの臨床情報に相関があるか検討した。そし て今後導入される治験薬の評価薬の効果判定に使用 可能かの

B. 研究方法

1. 対象

対象は当院で多発性硬化症と臨床診断された 22 人 (男性 9 人、女性 13 人)で、年齢、罹病期間、重症度 (EDSS)、Mini Mental Scale(MMSE)の平均は以下 である。

- ◆ 症例 22 人(男性 9 人 女性 13 人)
- ◆ 年齢 46.2 ± 16.3 歳(19~74 歳)

- ◆ 罹病期間 8.8 ± 8.0 年(1-30 年)

- ◆ EDSS 3.7 ± 2.3

- ◆ MMSE 25.9 ± 4.1

なお組み込み患者はMR以外の頭部の病変がないこ とが条件である。

2. MR 撮影

MRI は通常診療のため依頼され、1T MR 装置 (Siemens, Harmony, Erlangen, Germany)にて、頭部 用コイルを持って撮影された。当院の1T MR 装置で のMSの非造影の頭部プロトコールは、軸位断像 T1 強調、T2強調、FLAIR画像、矢状断像FLAIR画像で ある。枚数は20枚で、厚さは5mm、ギャップ0.6mmで ある。いずれもMR以外の病変がないことが確認され た。

3. MR 解析

Qbrainにて頭蓋内容積、脳脊髄液、脳容積、T2高信 号病巣容積を自動算出した。これらの評価するため に軸位断像のT2強調、FLAIR画像を用いた。それぞ れの部位を自動抽出した後目視で確認し、実際とず れている場合は手動で訂正した。

4. 統計

各臨床データとMRデータとの相関には回帰分析を おこなった。また多数の相関についてはステップ・ワイ ズ回帰を用いた。危険率を5%以下を有意とした。

なお今回の検討は後ろ向きの調査であり、介入は一切 なく、疫学的な調査である。