

201024067A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

多発性硬化症に対する新規分子標的治療法の開発

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 山下 俊英

平成 23 (2011) 年 3 月

## 多発性硬化症に対する新規分子標的治療法の開発

研究代表者 山下 俊英 大阪大学 大学院医学系研究科 分子神経科学 教授

### 【研究要旨】

本研究の最終目標は、多発性硬化症(MS)の発症および病態形成を制御する分子標的治療薬を開発し、臨床応用を実現することである。MSは複数の神経症候が再発と寛解を繰り返し、比較的強い障害が残る例が少なくなく、根本的治療法が確立していないのが現状である。我々は、抗RGM抗体治療薬が、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の発症を抑制し、さらに修復過程を促進することを見いだした。したがってRGM阻害剤は多発性硬化症の各病期に対する症状緩和に寄与するのみならず、根本的治療薬として有望である。我々は、脊髄損傷治療薬としてヒト型抗RGMモノクローナル抗体を製薬企業との共同開発で進めている。本研究では、RGMモノクローナル抗体のMSの急性増悪期および再発寛解型に対する薬剤としてのfeasibility studyを実施している。複数の実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルを用いて、各病期における薬効・薬理試験を行い、薬剤治療の最適条件を決定することが本研究の到達目標である。今年度の研究によって、実験的自己免疫性脳脊髄炎の発症および寛解過程に、RGMがキーとなる役割を担っていることを明らかにした。すなわち樹状細胞の活性化に伴い誘導されるRGMの発現がT cellsの活性化に必須であり、抗RGM中和抗体の投与によってMSの発症が抑制されることを見いだした（参考図1：Nature Medicine, 2011；特許出願済み）。さらに当該抗体治療は、神経症状を発症した群においてもその後の修復過程を加速し、神経症状の改善を促し、また神経症状の再発も抑制した。樹状細胞に発現しているRGMがT細胞の活性化を促進し、RGM中和抗体は抗原提示細胞によるT細胞の活性化および炎症性サイトカインの分泌を抑制することで、脳脊髄炎の発症および再発を抑制することが、RGM中和抗体の作用メカニズムである。本研究終了後、速やかに前臨床試験へ移行し、問題のないことを確認したうえで臨床治験に進む。本薬剤は多発性硬化症の根本的治療薬となりうる点で医学的に貢献するのみならず、特に「要介護状態」からの回復が可能になるという観点で、医学経済面での大きな貢献も望める。

### 研究分担者

なし

#### A. 研究目的

本研究の最終目標は、多発性硬化症(MS)の発症および病態形成を制御する分子標的治療薬を開発し、臨床応用を実現することである。MSは複数の神経症候が再発と寛解を繰り返し、比較的強い障害が残る例が少なくなく、根本的治療法が確立していないのが現状である。我々はこれまで中枢神経系の再生阻害の分子機構の解明を行い、軸索再生阻害因子としてrepulsive guidance molecule (RGM)を同定し、様々な中枢神経疾患による神経症状を緩和する

分子標的となることを見いだした(Neuron, Nature Neurosci., J Cell Biol 3報, EMBO J, J Neurosci 6報など)。我々はexpression analysisを行い、RGMaが免疫系細胞である樹状細胞に発現していることを突き止めた。これにより、免疫制御におけるRGMaの役割の解析へと進んだ。抗RGM抗体治療薬が、実験的自己免疫性脳脊髄炎の発症を抑制し、さらに修復過程を促進することを見いだした。したがってRGM阻害剤は多発性硬化症の各病期に対する症状緩和に寄与するのみならず、根本的治療薬として有望である。我々は、脊髄損傷治療薬と

してヒト型抗RGMモノクローナル抗体を製薬企業との共同開発で進めている。本研究では、RGMモノクローナル抗体のMSの急性増悪期および再発寛解型に対する薬剤としてのfeasibility studyを実施する。複数の実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルを用いて、各病期における薬効・薬理試験を行い、薬剤治療の最適条件を決定することを本研究の到達目標とする。本研究終了後、速やかに前臨床試験へ移行し、問題のないことを確認したうえで臨床試験に進む。本薬剤は多発性硬化症の根本的治療薬となりうる点で医学的に貢献するのみならず、特に「要介護状態」からの回復が可能になるという観点で、医学経済面での大きな貢献も望める。

## B. 研究方法

具体的な実施項目は以下のとおりである。

1. RGMによるT cellの活性化の分子メカニズムの解析を行った。
2. マウスのEAEモデルを作成し、RGM中和抗体の投与による、その後の症状の改善の有無を評価した。さらに抗体の作用のメカニズムをin vivoで明らかにした。

具体的な方法は以下の通りである。

- マウス：C57BL/6, SJL/J, CAG-EGFP mice, CD11b-DTR mice (age: 8-10 weeks)を用いた。
- EAEの作成：C57BL/6 マウスに対してはMOG、SJL/J マウスに対してはPLPで免疫し、慢性あるいは再発性のEAEを誘導した。RGM中和抗体を全身投与した。詳細は論文内容(論文1)を参照。
- Adoptive transfer 実験：bone marrow dendritic cellsを採取し、RGM siRNAあるいはcontrol siRNAをtransfectionすることで、RGMをノックダウンした。この細胞をrecipient miceに移入した。またEAEマウスにRGM治療

を施したものの、施さなかったものから、脾細胞を採取し、再刺激を行った後に、CD4<sup>+</sup> T細胞を分離し、recipient miceに移入した。

- CD4<sup>+</sup> T cellsの増殖およびサイトカイン産生の解析：EAEマウスから脾臓を取り出し、BrdUの取り込みおよび炎症性サイトカインの産生を解析した。詳細は論文内容(論文1)を参照。
- 他の様々な方法については、論文内容(論文1)を参照。

## (倫理面への配慮)

予定している特殊実験は組換えDNA実験と動物実験であるが、当該実験のための設備・体制は完備されている。組換えDNA実験については、関係法令を遵守して行った。また、動物の取扱いについては文部科学省および所属機関の指針に基づいて、所属機関の承認を得たうえで行われた。

## C. 研究結果

平成22年度においては、当初の計画に沿って、in vitroおよびin vivoでのRGM抗体の効果の科学的基盤を確立することを目的として、研究を進めた。

まず樹状細胞でのRGMの役割について検証した。Bone marrow derived dendritic cellsをLPSで刺激して活性化させると、RGMの発現が高まった(Figure 1a, b)。一方で、CD4<sup>+</sup> T細胞にはRGMに対する受容体が発現していた(Figure 1c)。CD4<sup>+</sup> T細胞をRGMで刺激すると、細胞内でRap1の活性化がおこり(Figure 1d)、それに伴ってICAM1への接着が強まった(Figure 1e; 参考図2)。これらの結果から、樹状細胞に発現するRGMがCD4<sup>+</sup> T細胞を活性化し、免疫シナプスを強化することによって、CD4<sup>+</sup> T細胞の活性化を促進することが示唆される。

次にin vivoでのRGMおよびその受容体neogeninの発現を検討した。EAEを発症し

たマウスの脊髄、リンパ節、脾臓で検証した。すると CD11c-positive な myeloid dendritic cells (DC) では、EAE発症によって RGMの発現上昇が起こった(Figure 2a)。一方で、mPDCA-positiveなplasmacytoid DCでは、RGMの発現は認められたが、正常な状態とEAE発症後では、その発現レベルに変化はなかった(Figure 2b)。さらにCD4<sup>+</sup>T細胞では、定常的にneogeninが発現していた(Figure 2c)。これらのCD4<sup>+</sup>T細胞では、EAE発症後においてRap1の活性が上昇していた(Figure 2d)。

RGMの機能をin vivoで抑制するために、MOGによってEAEを惹起したマウスに、RGM中和抗体を全身投与すると、神経症状(EAEスコア)の軽快が得られた(Figure 3 a-e)。脳脊髄への炎症性細胞の浸潤は、RGM抗体投与によって有意に抑えられていた(Figure 3f-h)。それに伴い、脱髄も抑制され(Figure 3i)、神経軸索の損傷も軽快した(Figure 3j)。

以上のRGM中和抗体の効果は、樹状細胞に発現するRGMを中和抗体がブロックしたためと考えられる。このことを以下の実験で証明した。RGMの発現をノックダウンさせたBone marrow derived dendritic cellsを活性化し、recipient miceに移入した。そうするとコントロール群ではEAEが発症するが、RGMノックダウン群では、EAE症状が軽減した(Figure 4a)。さらにEAEマウスから採取したT細胞を他のマウスに移入すると、EAEが発症するが、RGM抗体投与を受けたEAEマウスから採取したT細胞を他のマウスに移入すると、EAEの発症が抑えられた(Figure 4b)。これらの結果より樹状細胞のRGMがEAEの増悪を促進しているというメカニズムを明らかにした。

活性化を受けたCD4<sup>+</sup>T細胞は、blood brain barrierを足場として、脳脊髄内に侵入する。RGM抗体が脳脊髄内への侵入を抑制しているかどうかを検証するために、in vitroおよびin vivoの系を確立し、実験を行

ったが、結論はRGM抗体がCD4<sup>+</sup>T細胞の脳脊髄内への侵入をブロックするものではないというものであった(Figure 4c-f)。詳細は論文内容(論文1)を参照。

さらに当初の計画より前進し、再発寛解を繰り返す実験的自己免疫性脳脊髄炎マウスモデル(PLP-SJL)を用いて、RGM中和抗体がEAE症状の再発を抑制すること、また症状の寛解にも効果を発揮することを明らかにした(Figure 4g; 参考図3)。

In vitroでは、EAEマウスより採取したsplenocytesをMOGで刺激すると、T細胞の活性化による増殖およびサイトカインの産生の亢進がおこるが、この反応をRGM抗体は顕著に抑制した(Figure 5a)。抗体はTh1およびTh17サイトカインを抑制したが、IL10は増加させたことから、EAEを増悪させるT細胞特異的に、抗体が抑制効果を有すると考えられた。

また再発時および寛解期のMS患者のPBMCを用いて、PMAとionomycinによりT細胞の増殖、サイトカイン産生を亢進させた時、RGM抗体を作用させると、T細胞の増殖およびサイトカイン産生を抑制することが明らかになった(Figure 5b; 当該研究は千葉大学神経内科桑原聡教授グループにて施行。千葉大は本研究に参加していないため、研究協力者と位置づけられる。したがってこの成果は、厳密には本研究による成果ではない。千葉大学神経内科桑原聡教授グループは、次年度より研究分担者として参加予定)。

#### D. 考察

今年度の研究により、EAEおよび多発性硬化症におけるRGMの詳細なメカニズムが明らかとなった。すなわち、抗原提示細胞に発現しているRGMは、末梢と脳脊髄内でT細胞に働きかけて、抗原提示細胞によるT細胞の活性化およびサイトカインの産生を促進する。RGM中和抗体は、RGMの機能を阻止することにより、一連の反応をブロックし、脳脊髄炎

症状を緩和する（参考図4）。RGM 中和抗体は多発性硬化症の各病期に対する症状緩和に寄与するのみならず、根本的治療薬として有望であることが、これらの知見より明らかになった。特に Figure 5 の結果は、当初の期待を上回る成果であり、今後の開発研究を加速させるものである。なお、以上の研究は、我々が開発した抗体を用いて行ったものである。

本研究課題において、抗 RGM モノクローナル抗体について、「多発性硬化症に対する根本的分子標的治療薬」としての feasibility study を実施し、薬剤治療の最適条件を見いだすことを到達目標としている。本研究終了後、前臨床試験へ移行し、問題のないことを確認したうえで臨床試験に進み、迅速に実用化を進めていく。中枢神経疾患による神経症状については現時点で有効な治療法が存在しないため、WHO は中枢神経疾患を「クオリティ・オブ・ライフを脅かす最大の要因である」と位置づけている。本薬剤は、中枢神経機能障害をもたらす多くの疾患をターゲットとする点で医学的に貢献するのみならず、「要介護状態」からの回復が可能になるという観点で、医学経済面での大きな貢献も望める。中枢神経疾患の医療費は2000年時点で、全世界で340億ドルと心疾患領域に次いで2番目に大きい市場であり、さらに医療費の伸び率の高い領域（16%）である。

#### E. 結論

今年度の研究によって、RGM 中和抗体の作用メカニズム、ならびに RGM の EAE および多発性硬化症における役割を明らかにすることができ、科学的な基盤を強固なものとした。次年度以降における研究開発の加速化が図られる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Muramatsu, R., Kubo, T., Mori, M., Nakamura, Y., Fujita, Y., Akutsu, T., Okuno, T., Taniguchi, J., Kumanogoh, A., Yoshida, M., Mochizuki, H., Kuwabara, S. and Yamashita, T. (2011) RGMa modulates T cell responses and is involved in autoimmune encephalomyelitis. Nature Medicine, Advance Online Publication (DOI [10.1038/nm.2321](https://doi.org/10.1038/nm.2321)).

##### 2. 学会発表

1. 山下俊英 (2010) 中枢神経損傷後の機能回復と神経回路の修復、第540回北里医学会招待学術講演会、神奈川 (2010. 4. 12)
2. 山下俊英 (2010) 中枢神経損傷後の機能回復と神経回路の修復機構、九州大学統合生命科学特別セミナー、福岡 (2010. 6. 4)
3. 山下俊英 (2010) 中枢神経回路の修復と再生、神奈川科学技術アカデミー教育講座、東京 (2010. 6. 9)
4. 山下俊英 (2010) 脳・脊髄損傷後の神経回路修復のメカニズム、第1回Stroke Science Academy特別講演、福岡 (2010. 6. 18)
5. 山下俊英 (2010) 脳・脊髄損傷後の神経回路修復のメカニズム、宮崎大学大学院特別セミナー、宮崎 (2010. 7. 9)
6. 山下俊英 (2010) 脳・脊髄損傷後の神経回路修復のメカニズム、Neuro2010、神戸 (2010. 9. 2-4)
7. 山下俊英 (2010) 中枢神経損傷後の機能回復と神経回路の再生、九州大学大学院歯学研究院特別セミナー、福岡 (2010. 10. 1)
8. 山下俊英 (2010) 脳・脊髄損傷後の神経回路修復を制御する分子とそのシグナル伝達機構、名古屋大学グローバルCOE系統講義ニューロサイエンスコース、名古屋 (2010. 12. 2)
9. 山下俊英 (2010) Cell signaling

cascades regulating restoration of neuronal network following injury to the central nervous system、

BMB2010 (第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会合同大会)、神戸(2010.12.7-10)

10. 山下俊英(2010) 中枢神経障害後の神経回路再編成と機能回復のメカニズムの解明、CREST「脳神経回路の形成・動作原理の解明と制御技術の創出」研究領域 平成22年度ミーティング、東京(2010.12.24)
11. 山下俊英(2011) 中枢神経回路の修

復機能と再生治療法の可能性、JPLA 医薬ライセンシング協会 第229回月例会 招待講演、東京(2011.1.19)

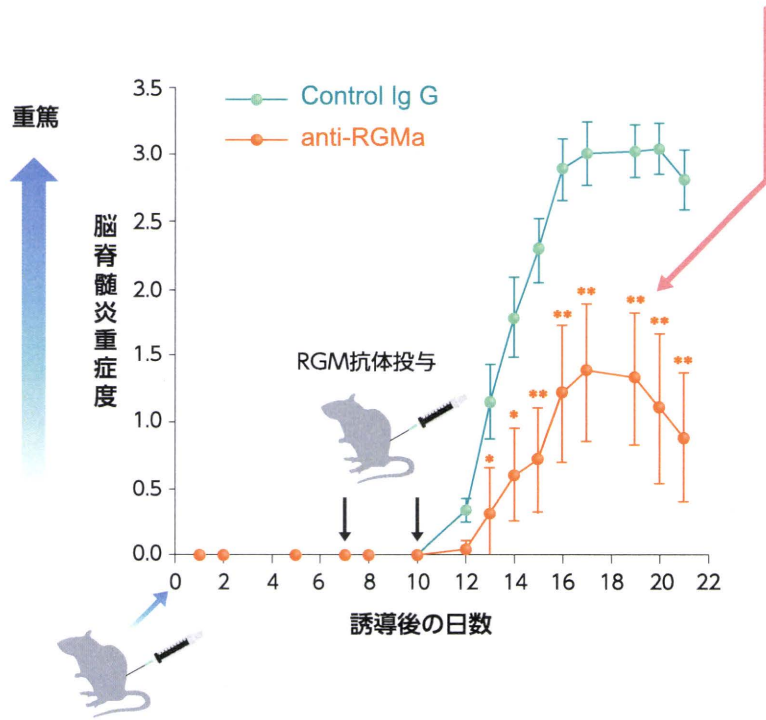
#### H. 知的財産権の出願・登録状況

発明の名称：T細胞活性化阻害剤、これを含む医薬組成物およびT細胞活性化阻害物質のスクリーニング法 ①発明者：山下俊英、久保武一 ②出願日：平成21年12月9日（特願 2009-279189） ③出願人：国立大学法人大阪大学、国立大学法人千葉大学



(参考図)

### RGM中和抗体投与は脳脊髄炎の発症を抑制した



脳脊髄炎の誘導

図1：自己免疫性脳脊髄炎を発症させたマウスに RGM 中和抗体を投与すると、発症が抑えられ、神経症状も軽快した。

### RGMは抗原提示細胞によるT細胞の活性化を強める

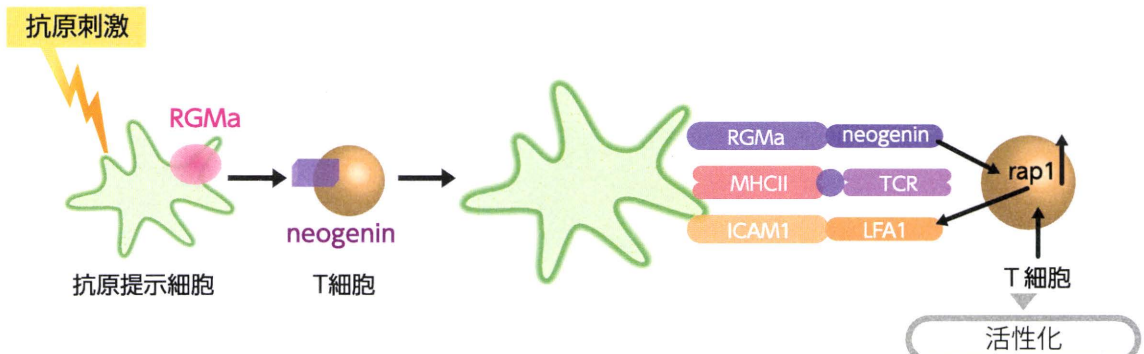


図2：抗原提示細胞は、抗原刺激を受けて、T細胞を活性化する。RGMは抗原提示細胞に発現しており、RGMの受容体であるneogeninはT細胞に発現している。RGMは、抗原提示細胞によるT細胞の活性化を促進する。その作用はT細胞の中でRap1が活性化されることによる。

RGM抗体は脳脊髄炎の再発を抑制した

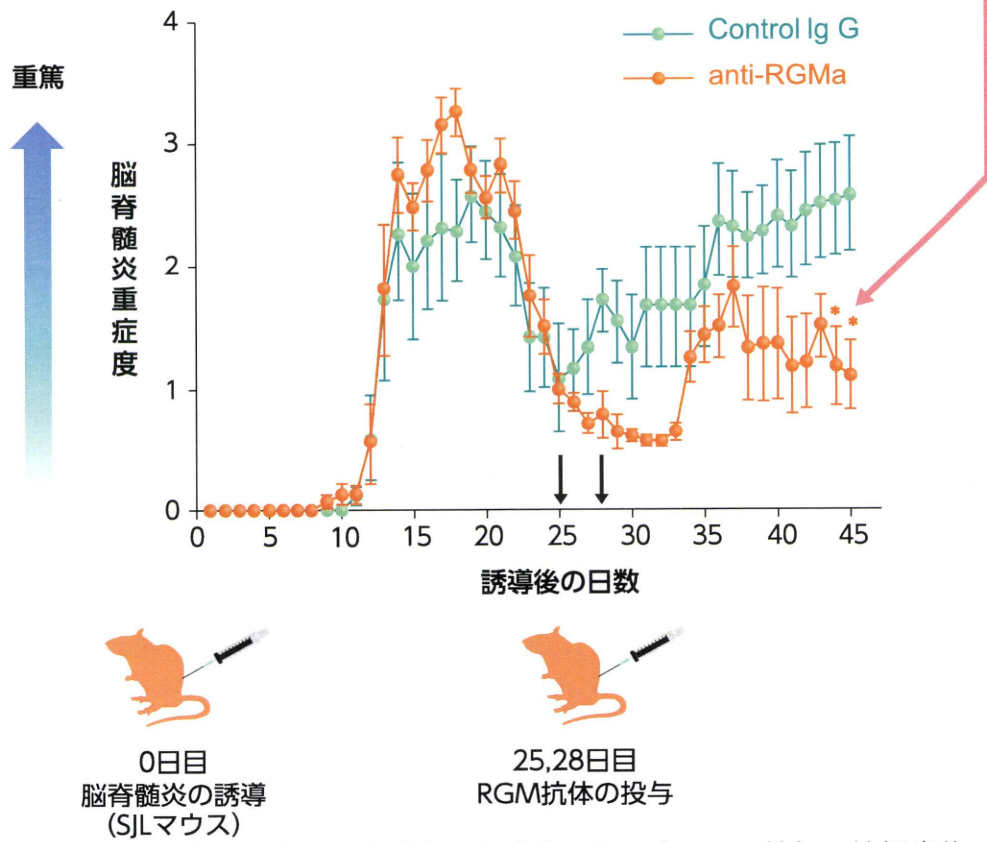


図3：再発性の自己免疫性脳脊髄炎を発症させたマウスに、最初の神経症状の発症がおさまった頃に RGM 中和抗体を投与すると、その後の再発を予防することができた。



## RGMはT細胞の活性化を促進し、脳脊髄炎を増悪させる

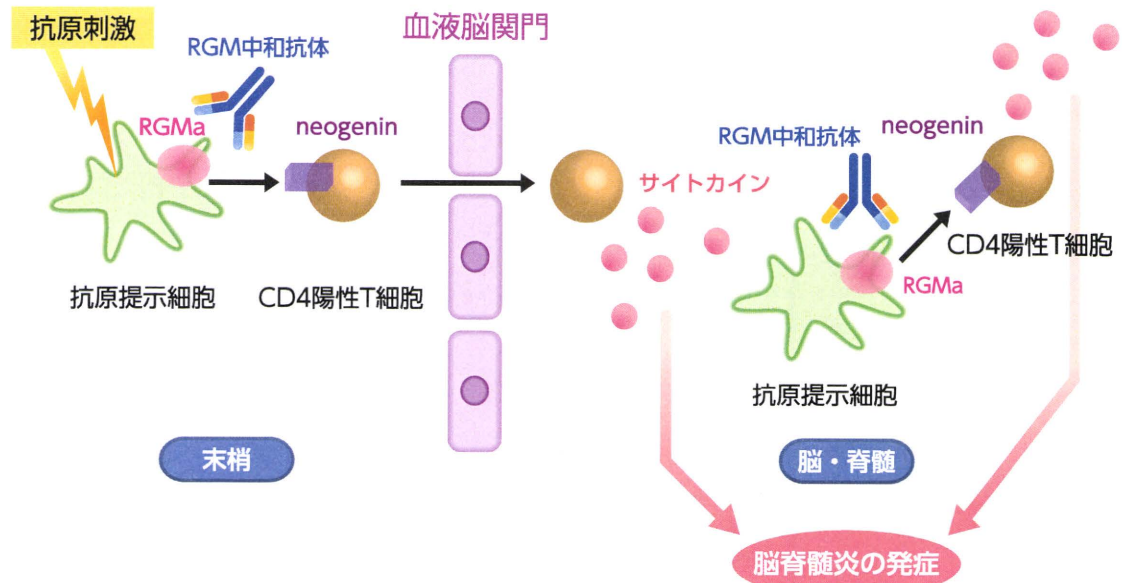
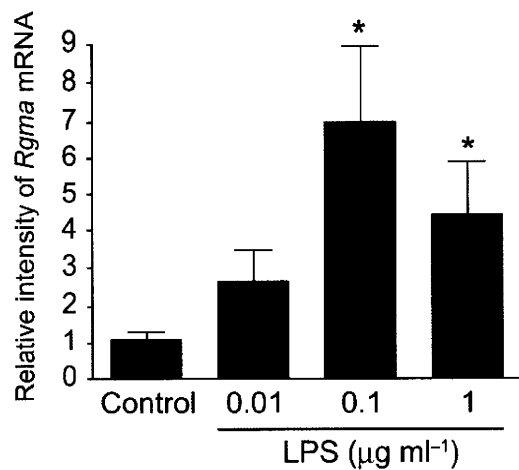


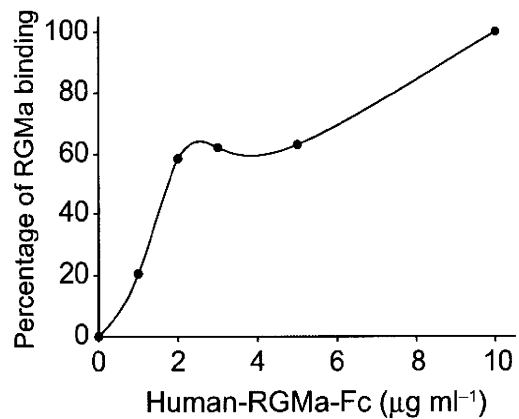
図4 : 抗原提示細胞に発現している RGM は、末梢と脳脊髄内で T 細胞に働きかけて、抗原提示細胞による T 細胞の活性化およびサイトカインの産生を促進する。RGM 中和抗体は、RGM の機能を阻止することにより、一連の反応をブロックし、脳脊髄炎症状を緩和する。

Figure 1

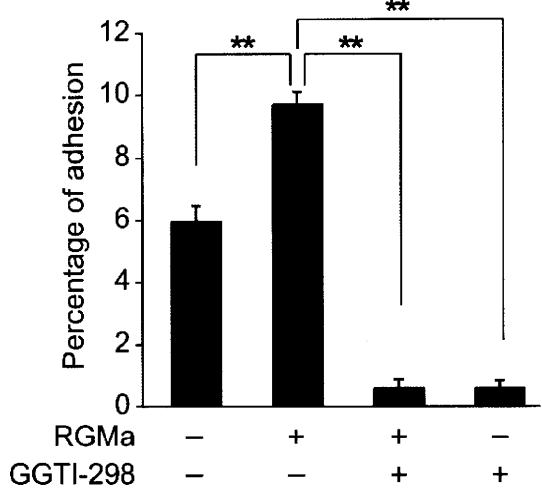
**a**



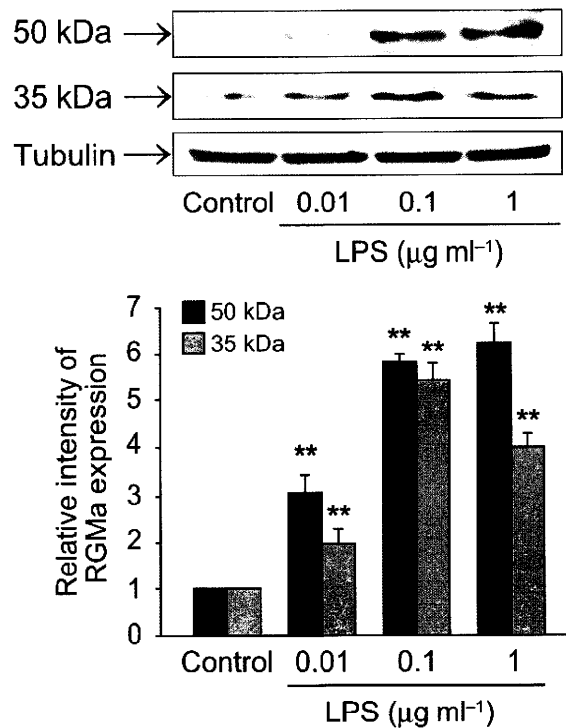
**c**



**d**



**b**



**d**

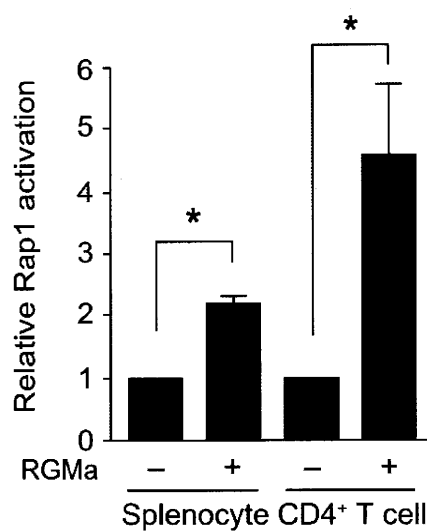
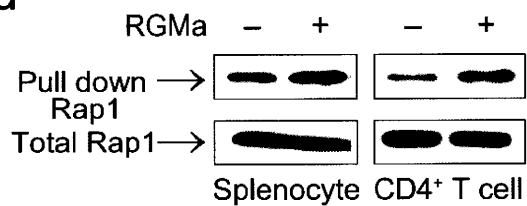


Figure 2

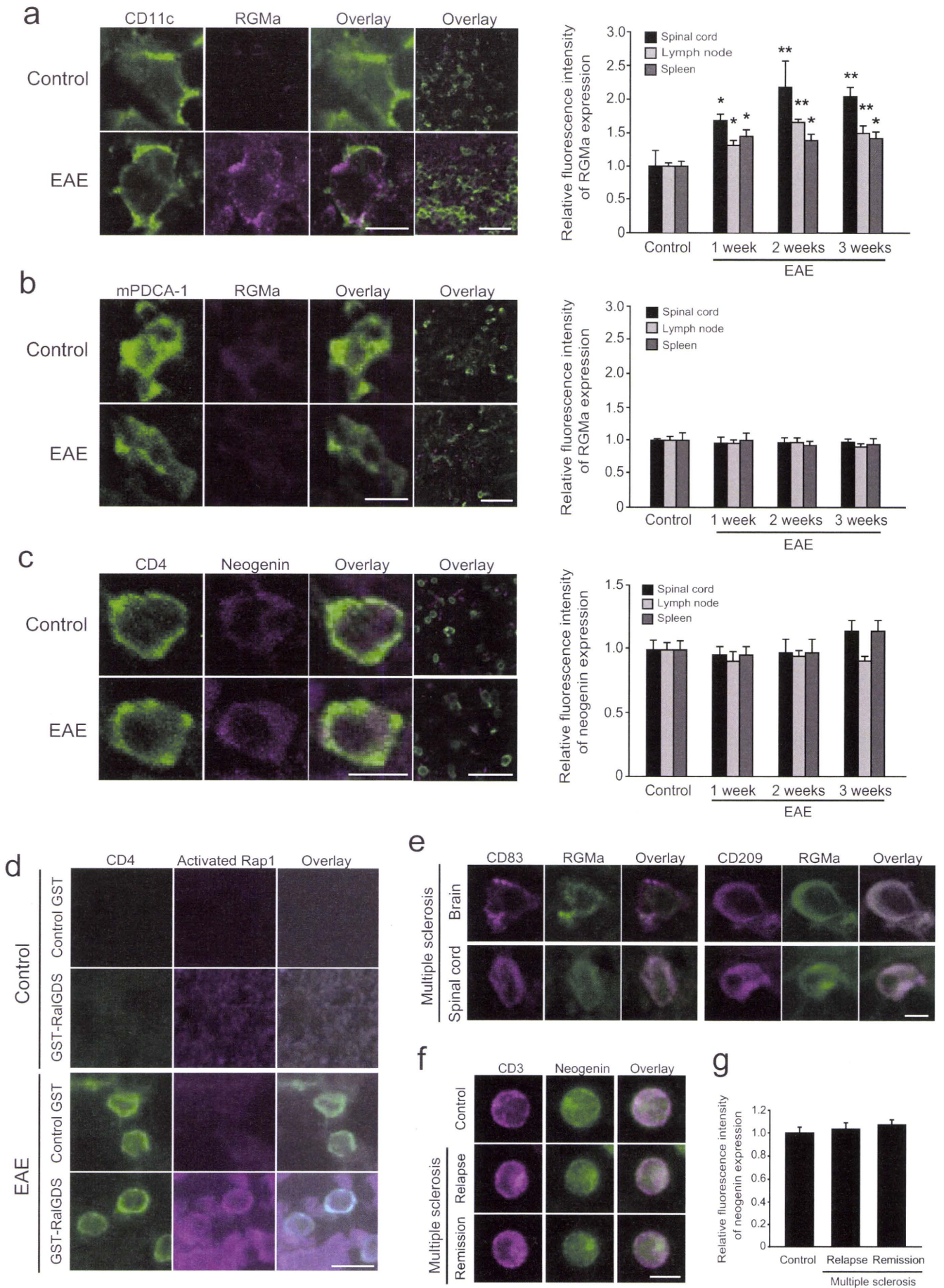




Figure 3

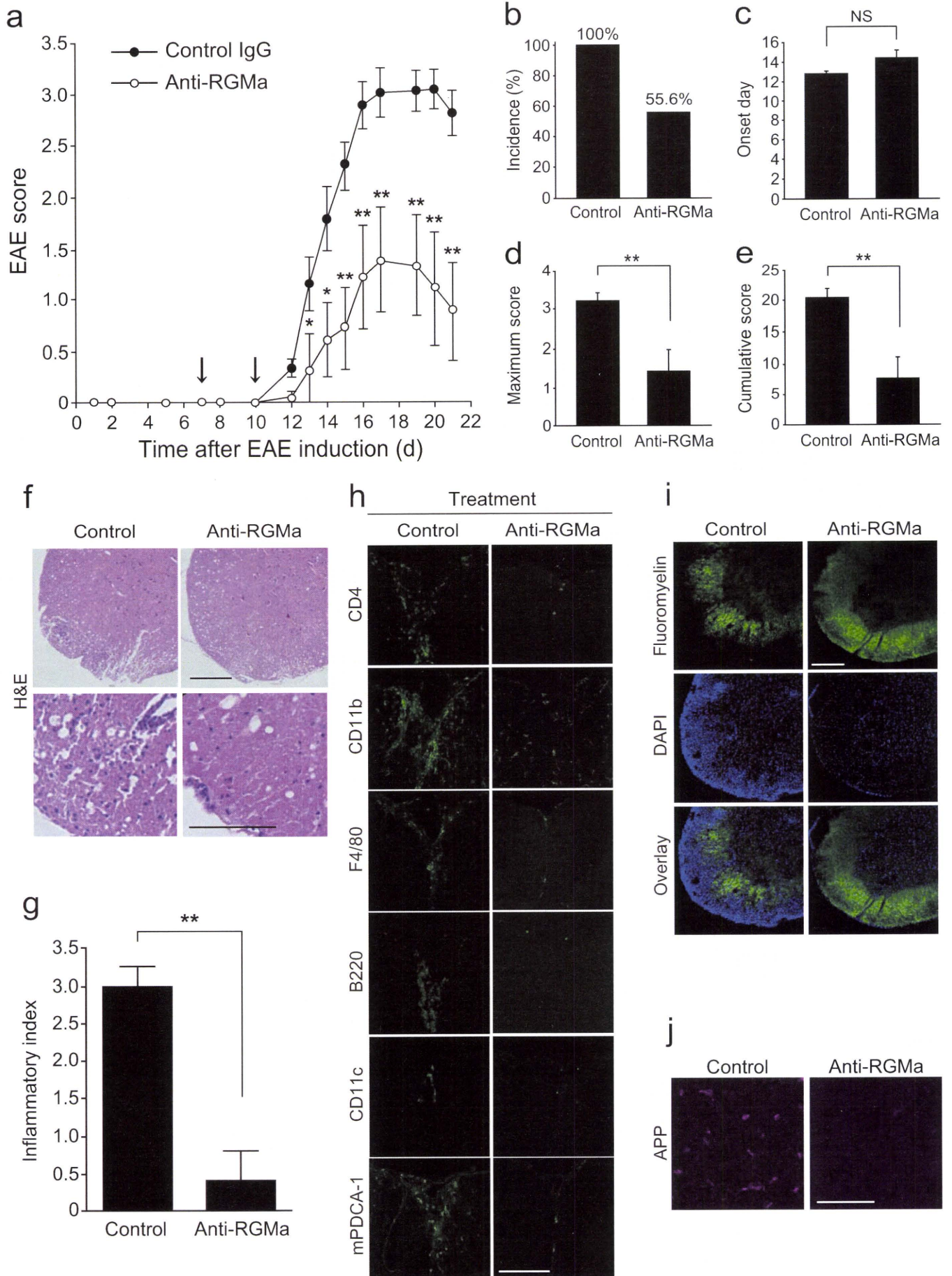


Figure 4

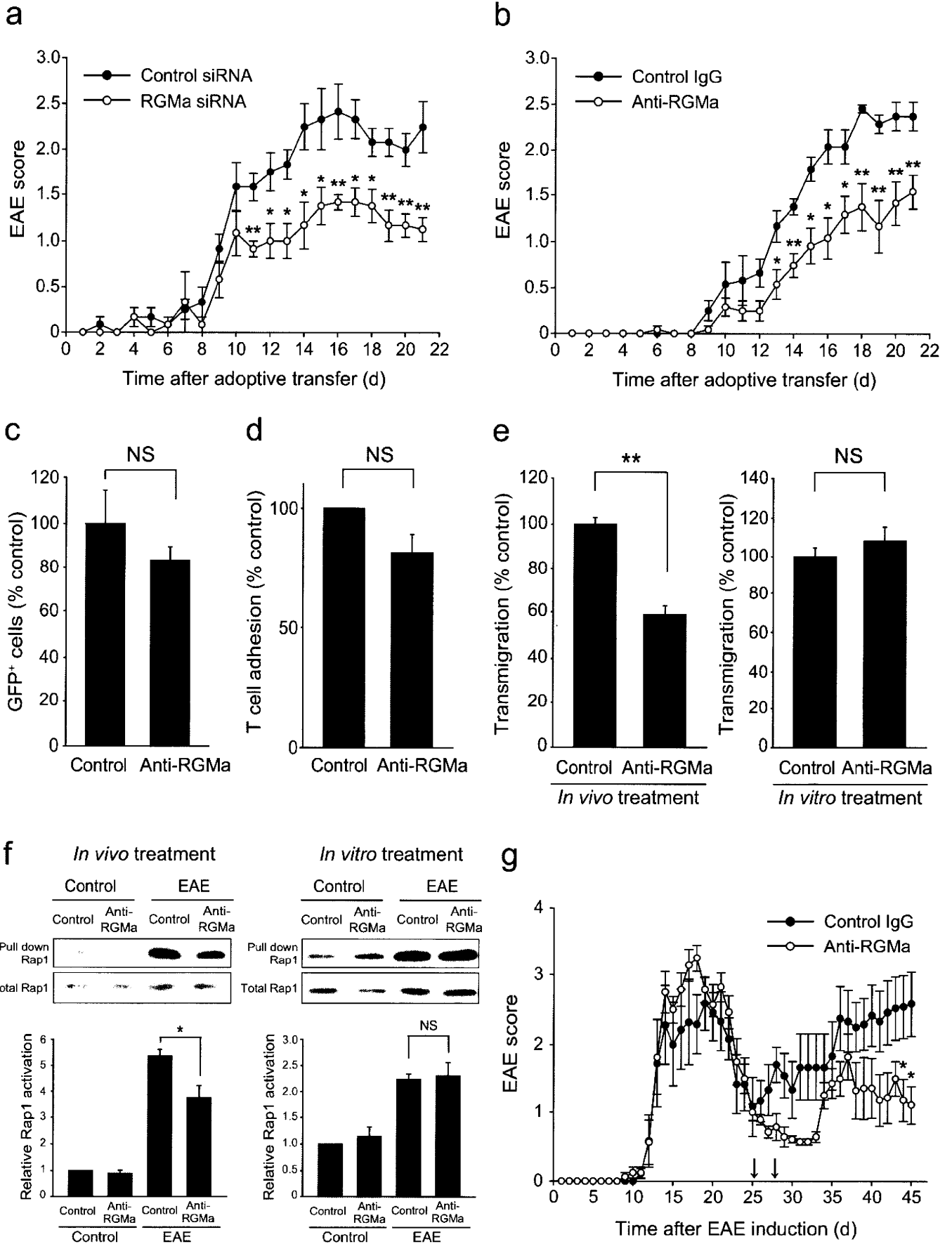
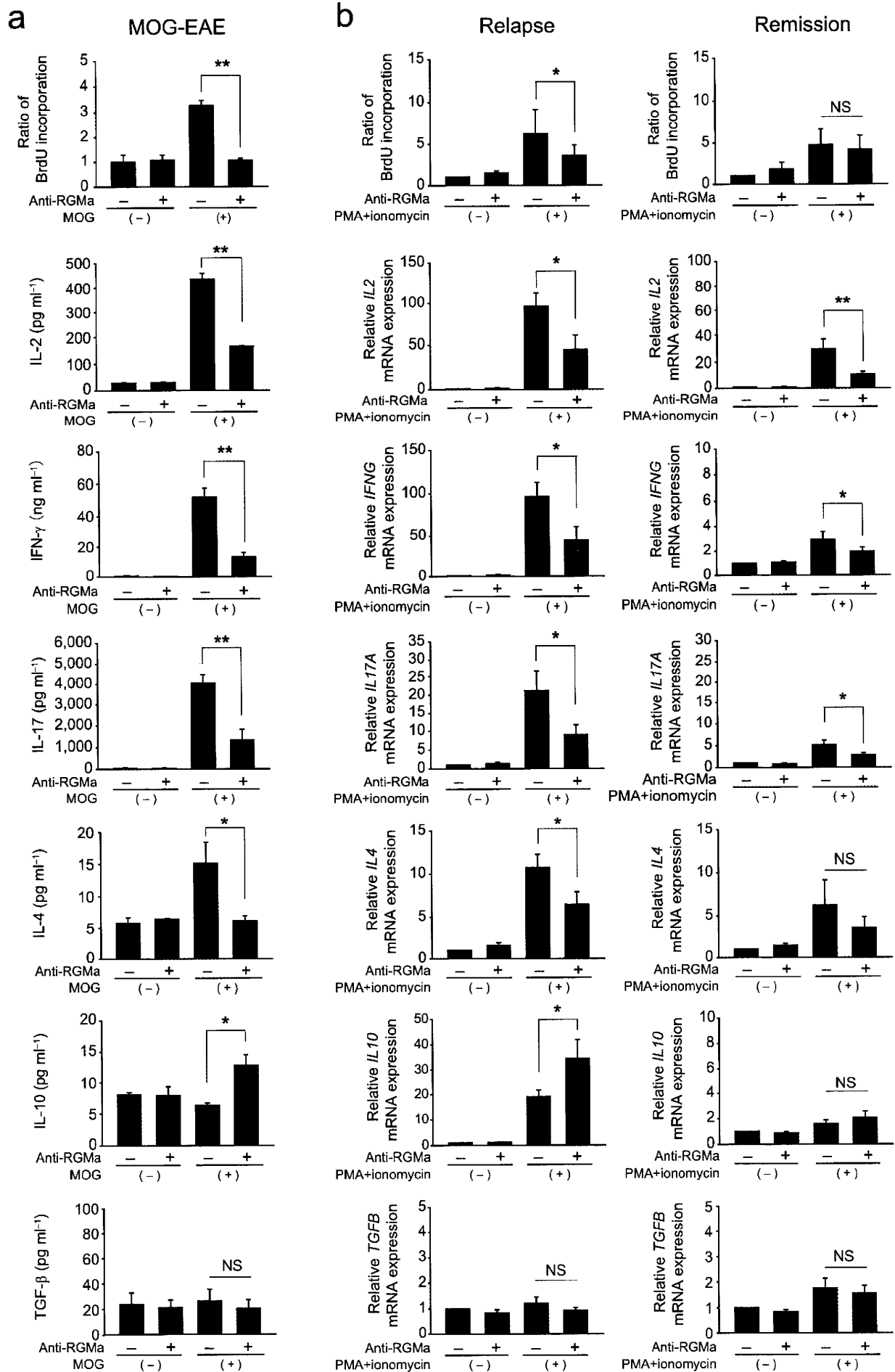


Figure 5





厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
「多発性硬化症に対する新規分子標的治療法の開発」班  
分担研究報告書

## 多発性硬化症に対する新規分子標的治療法の開発

研究代表者 山下 俊英 大阪大学 分子神経科学 教授

### 【研究要旨】

本研究の最終目標は、多発性硬化症(MS)の発症および病態形成を制御する分子標的治療薬を開発し、臨床応用を実現することである。MSは複数の神経症候が再発と寛解を繰り返す、比較的強い障害が残る例が少なくなく、根本的治療法が確立していないのが現状である。我々は、抗RGM抗体治療薬が、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の発症を抑制し、さらに修復過程を促進することを見いだした。したがってRGM阻害剤は多発性硬化症の各病期に対する症状緩和に寄与するのみならず、根本的治療薬として有望である。我々は、脊髄損傷治療薬としてヒト型抗RGMモノクローナル抗体を製薬企業との共同開発で進めている。本研究では、RGMモノクローナル抗体のMSの急性増悪期および再発寛解型に対する薬剤としてのfeasibility studyを実施している。複数の実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルを用いて、各病期における薬効・薬理試験を行い、薬剤治療の最適条件を決定することが本研究の到達目標である。今年度の研究によって、実験的自己免疫性脳脊髄炎の発症および寛解過程に、RGMがキーとなる役割を担っていることを明らかにした。すなわち樹状細胞の活性化に伴い誘導されるRGMの発現がT cellsの活性化に必須であり、抗RGM中和抗体の投与によってMSの発症が抑制されることを見いだした（参考図1：Nature Medicine, 2011；特許出願済み）。さらに当該抗体治療は、神経症状を発症した群においてもその後の修復過程を加速し、神経症状の改善を促し、また神経症状の再発も抑制した。樹状細胞に発現しているRGMがT細胞の活性化を促進し、RGM中和抗体は抗原提示細胞によるT細胞の活性化および炎症性サイトカインの分泌を抑制することで、脳脊髄炎の発症および再発を抑制することが、RGM中和抗体の作用メカニズムである。本研究終了後、速やかに前臨床試験へ移行し、問題のないことを確認したうえで臨床治験に進む。本薬剤は多発性硬化症の根本的治療薬となりうる点で医学的に貢献するのみならず、特に「要介護状態」からの回復が可能になるという観点で、医学経済面での大きな貢献も望める。

### A. 研究目的

本研究の最終目標は、多発性硬化症(MS)の発症および病態形成を制御する分子標的治療薬を開発し、臨床応用を実現することである。MSは複数の神経症候が再発と寛解を繰り返す、比較的強い障害が残る例が少なくなく、根本的治療法が確立していないのが現状である。我々はこれまで中枢神経系の再生阻害の分子機構の解明を行い、軸索再生阻害因子としてrepulsive guidance molecule (RGM)を同定し、様々な中枢神経疾患による神経症状を緩和する

分子標的となることを見いだした(Neuron, Nature Neurosci., J Cell Biol 3報, EMBO J, J Neurosci 6報など)。我々はexpression analysisを行い、RGMaが免疫系細胞である樹状細胞に発現していることを突き止めた。これにより、免疫制御におけるRGMaの役割の解析へと進んだ。抗RGM抗体治療薬が、実験的自己免疫性脳脊髄炎の発症を抑制し、さらに修復過程を促進することを見いだした。したがってRGM阻害剤は多発性硬化症の各病期に対する症状緩和に寄与するのみならず、根本的治療薬とし

て有望である。我々は、脊髄損傷治療薬としてヒト型抗RGMモノクローナル抗体を製薬企業との共同開発で進めている。本研究では、RGMモノクローナル抗体のMSの急性増悪期および再発寛解型に対する薬剤としてのfeasibility studyを実施する。複数の実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルを用いて、各病期における薬効・薬理試験を行い、薬剤治療の最適条件を決定することを本研究の到達目標とする。本研究終了後、速やかに前臨床試験へ移行し、問題のないことを確認したうえで臨床治験に進む。本薬剤は多発性硬化症の根本的治療薬となりうる点で医学的に貢献するのみならず、特に「要介護状態」からの回復が可能になるという観点で、医学経済面での大きな貢献も望める。

## B. 研究方法

具体的な実施項目は以下のとおりである。

3. RGMによるT cellの活性化の分子メカニズムの解析を行った。
4. マウスのEAEモデルを作成し、RGM中和抗体の投与による、その後の症状の改善の有無を評価した。さらに抗体の作用のメカニズムをin vivoで明らかにした。

具体的な方法は以下の通りである。

- マウス：C57BL/6, SJL/J, CAG-EGFP mice, CD11b-DTR mice (age: 8-10 weeks)を用いた。
- EAEの作成：C57BL/6 マウスに対してはMOG、SJL/J マウスに対してはPLPで免疫し、慢性あるいは再発性のEAEを誘導した。RGM中和抗体を全身投与した。詳細は論文内容(論文1)を参照。
- Adoptive transfer 実験：bone marrow dendritic cellsを採取し、RGM siRNAあるいはcontrol siRNAをtransfectionすることで、RGMをノックダウンした。この細胞をrecipient miceに移入

した。またEAEマウスにRGM治療を施したものの、施さなかったものから、脾細胞を採取し、再刺激を行った後に、CD4<sup>+</sup>T細胞を分離し、recipient miceに移入した。

- CD4<sup>+</sup>T cellsの増殖およびサイトカイン産生の解析：EAEマウスから脾臓を取り出し、BrdUの取り込みおよび炎症性サイトカインの産生を解析した。詳細は論文内容(論文1)を参照。
- 他の様々な方法については、論文内容(論文1)を参照。

## (倫理面への配慮)

予定している特殊実験は組換えDNA実験と動物実験であるが、当該実験のための設備・体制は完備されている。組換えDNA実験については、関係法令を遵守して行った。また、動物の取扱いについては文部科学省および所属機関の指針に基づいて、所属機関の承認を得たうえで行われた。

## C. 研究結果

平成22年度においては、当初の計画に沿って、in vitroおよびin vivoでのRGM抗体の効果の科学的基盤を確立することを目的として、研究を進めた。

まず樹状細胞でのRGMの役割について検証した。Bone marrow derived dendritic cellsをLPSで刺激して活性化させると、RGMの発現が高まった(Figure 1a, b)。一方で、CD4<sup>+</sup>T細胞にはRGMに対する受容体が発現していた(Figure 1c)。CD4<sup>+</sup>T細胞をRGMで刺激すると、細胞内でRap1の活性化がおこり(Figure 1d)、それに伴ってICAM1への接着が強まった(Figure 1e; 参考図2)。これらの結果から、樹状細胞に発現するRGMがCD4<sup>+</sup>T細胞を活性化し、免疫シナプスを強化することによって、CD4<sup>+</sup>T細胞の活性化を促進することが示唆される。

次にin vivoでのRGMおよびその受容体

neogeninの発現を検討した。EAEを発症したマウスの脊髄、リンパ節、脾臓で検証した。するとCD11c-positiveなmyeloid dendritic cells (DC)では、EAE発症によってRGMの発現上昇が起こった(Figure 2a)。一方で、mPDCA-positiveなplasmacytoid DCでは、RGMの発現は認められたが、正常な状態とEAE発症後では、その発現レベルに変化はなかった(Figure 2b)。さらにCD4<sup>+</sup>T細胞では、定常的にneogeninが発現していた(Figure 2c)。これらのCD4<sup>+</sup>T細胞では、EAE発症後においてRap1の活性が上昇していた(Figure 2d)。

RGMの機能をin vivoで抑制するために、MOGによってEAEを惹起したマウスに、RGM中和抗体を全身投与すると、神経症状(EAEスコア)の軽快が得られた(Figure 3 a-e)。脳脊髄への炎症性細胞の浸潤は、RGM抗体投与によって有意に抑えられていた(Figure 3f-h)。それに伴い、脱髄も抑制され(Figure 3i)、神経軸索の損傷も軽快した(Figure 3j)。

以上のRGM中和抗体の効果は、樹状細胞に発現するRGMを中和抗体がブロックしたためと考えられる。このことを以下の実験で証明した。RGMの発現をノックダウンさせたBone marrow derived dendritic cellsを活性化し、recipient miceに移入した。そうするとコントロール群ではEAEが発症するが、RGMノックダウン群では、EAE症状が軽減した(Figure 4a)。さらにEAEマウスから採取したT細胞を他のマウスに移入すると、EAEが発症するが、RGM抗体投与を受けたEAEマウスから採取したT細胞を他のマウスに移入すると、EAEの発症が抑えられた(Figure 4b)。これらの結果より樹状細胞のRGMがEAEの増悪を促進しているというメカニズムを明らかにした。

活性化を受けたCD4<sup>+</sup>T細胞は、blood brain barrierを足場として、脳脊髄内に侵入する。RGM抗体が脳脊髄内への侵入を抑制しているかどうかを検証するために、in

vitroおよびin vivoの系を確立し、実験を行ったが、結論はRGM抗体がCD4<sup>+</sup>T細胞の脳脊髄内への侵入をブロックするものではないというものであった(Figure 4c-f)。詳細は論文内容(論文1)を参照。

さらに当初の計画より前進し、再発寛解を繰り返す実験的自己免疫性脳脊髄炎マウスモデル (PLP-SJL) を用いて、RGM中和抗体がEAE症状の再発を抑制すること、また症状の寛解にも効果を発揮することを明らかにした(Figure 4g; 参考図3)。

In vitroでは、EAEマウスより採取したsplenocytesをMOGで刺激すると、T細胞の活性化による増殖およびサイトカインの産生の亢進がおこるが、この反応をRGM抗体は顕著に抑制した(Figure 5a)。抗体はTh1およびTh17サイトカインを抑制したが、IL10は増加させたことから、EAEを増悪させるT細胞特異的に、抗体が抑制効果を有すると考えられた。

また再発時および寛解期のMS患者のPBMCを用いて、PMAとionomycinによりT細胞の増殖、サイトカイン産生を亢進させた時、RGM抗体を作用させると、T細胞の増殖およびサイトカイン産生を抑制することが明らかになった(Figure 5b; 当該研究は千葉大学神経内科桑原聡教授グループにて施行。千葉大は本研究に参加していないため、研究協力者と位置づけられる。したがってこの成果は、厳密には本研究による成果ではない。千葉大学神経内科桑原聡教授グループは、次年度より研究分担者として参加予定)。

#### D. 考察

今年度の研究により、EAEおよび多発性硬化症におけるRGMの詳細なメカニズムが明らかとなった。すなわち、抗原提示細胞に発現しているRGMは、末梢と脳脊髄内でT細胞に働きかけて、抗原提示細胞によるT細胞の活性化およびサイトカインの産生を促進する。RGM中和抗体は、RGMの機能を阻止することによ

り、一連の反応をブロックし、脳脊髄炎症状を緩和する（参考図4）。RGM 中和抗体は多発性硬化症の各病期に対する症状緩和に寄与するのみならず、根本的治療薬として有望であることが、これらの知見より明らかになった。特に Figure 5 の結果は、当初の期待を上回る成果であり、今後の開発研究を加速させるものである。なお、以上の研究は、我々が開発した抗体を用いて行ったものである。

本研究課題において、抗 RGM モノクローナル抗体について、「多発性硬化症に対する根本的分子標的治療薬」としての feasibility study を実施し、薬剤治療の最適条件を見いだすことを到達目標としている。本研究終了後、前臨床試験へ移行し、問題のないことを確認したうえで臨床治療に進み、迅速に実用化を進めていく。中枢神経疾患による神経症状については現時点で有効な治療法が存在しないため、WHO は中枢神経疾患を「クオリティ・オブ・ライフを脅かす最大の要因である」と位置づけている。本薬剤は、中枢神経機能障害をもたらす多くの疾患をターゲットとする点で医学的に貢献するのみならず、「要介護状態」からの回復が可能になるという観点で、医学経済面で大きな貢献も望める。中枢神経疾患の医療費は2000年時点で、全世界で340億ドルと心疾患領域に次いで2番目に大きい市場であり、さらに医療費の伸び率の高い領域（16%）である。

#### E. 結論

今年度の研究によって、RGM 中和抗体の作用メカニズム、ならびに RGM の EAE および多発性硬化症における役割を明らかにすることができ、科学的な基盤を強固なものとした。次年度以降における研究開発の加速化が図られる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Muramatsu, R., Kubo, T., Mori, M., Nakamura, Y., Fujita, Y., Akutsu, T., Okuno, T., Taniguchi, J., Kumanogoh, A., Yoshida, M., Mochizuki, H., Kuwabara, S. and Yamashita, T. (2011) RGMa modulates T cell responses and is involved in autoimmune encephalomyelitis. Nature Medicine, Advance Online Publication (DOI 10.1038/nm.2321).

##### 2. 学会発表

1. 山下俊英(2010) 中枢神経損傷後の機能回復と神経回路の修復、第540回北里医学会招待学術講演会、神奈川(2010. 4. 12)
2. 山下俊英(2010) 中枢神経損傷後の機能回復と神経回路の修復機構、九州大学統合生命科学特別セミナー、福岡(2010. 6. 4)
3. 山下俊英(2010) 中枢神経回路の修復と再生、神奈川科学技術アカデミー教育講座、東京(2010. 6. 9)
4. 山下俊英(2010) 脳・脊髄損傷後の神経回路修復のメカニズム、第1回Stroke Science Academy特別講演、福岡(2010. 6. 18)
5. 山下俊英(2010) 脳・脊髄損傷後の神経回路修復のメカニズム、宮崎大学大学院特別セミナー、宮崎(2010. 7. 9)
6. 山下俊英(2010) 脳・脊髄損傷後の神経回路修復のメカニズム、Neuro2010、神戸(2010. 9. 2-4)
7. 山下俊英(2010) 中枢神経損傷後の機能回復と神経回路の再生、九州大学大学院歯学研究院特別セミナー、福岡(2010. 10. 1)
8. 山下俊英(2010) 脳・脊髄損傷後の神経回路修復を制御する分子とそのシグナル伝達機構、名古屋大学グローバルCOE系統講義ニューロサイエンスコース、名古屋(2010. 12. 2)

9. 山下俊英(2010) Cell signaling cascades regulating restoration of neuronal network following injury to the central nervous system、BMB2010 (第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会合同大会)、神戸(2010.12.7-10)
10. 山下俊英(2010) 中枢神経障害後の神経回路再編成と機能回復のメカニズムの解明、CREST「脳神経回路の形成・動作原理の解明と制御技術の創出」研究領域 平成22年度ミーティング、東京(2010.12.24)
11. 山下俊英(2011) 中枢神経回路の修

復機能と再生治療法の可能性、JPLA 医薬ライセンス協会 第229回月例会 招待講演、東京(2011.1.19)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

発明の名称：T細胞活性化阻害剤、これを含む医薬組成物およびT細胞活性化阻害物質のスクリーニング法 ①発明者：山下俊英、久保武一 ②出願日：平成21年12月9日（特願2009-279189） ③出願人：国立大学法人大阪大学、国立大学法人千葉大学

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍：該当なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Muramatsu, R., Kubo, T., Mori, M., Nakamura, Y., Fujita, Y., Akutsu, T., Okuno, T., Taniguchi, J., Kumanogoh, A., Yoshida, M., Mochizuki, H., Kuwabara, S. and <u>Yamashita, T.</u>	RGMa modulates T cell responses and is involved in autoimmune encephalomyelitis.	Nature Medicine		Advance Online Publication (DOI <b>10.1038/nm.2321</b> )	2011