

201108003B

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むけた
評価系の確立

(H21-政策創薬-一般-004)

平成21～23年度 総合研究報告書

研究代表者

鈴木 和 男

平成 24 年 (2012) 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 21～23 年度総合研究年度終了報告書

研究代表者

鈴木 和 男

平成 24 年（2012）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：千葉大学大学院医学研究院 特任教授
鈴木 和男

研究分担者

大野 尚仁：東京薬科大学薬学部 教授
荒谷 康昭：横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科 教授
亀岡 洋祐：(独)医薬基盤研究所 主任研究員
宇野賀津子：(財)ルイ・パストゥール医学研究センター基礎研究部
インターフェロン・生体防御研究室 室長
高橋 啓：東邦大学医療センター大橋病院 教授
野島 博：大阪大学微生物病研究所 教授
平橋 淳一：東京大学医学部附属病院 助教
山本 健二：国立国際医療研究センター研究所国際臨床センター センター長
長尾 朋和：千葉大学大学院医学研究院 特任講師
武曾 恵理：(財)田附興風会医学研究所北野病院 副院長・部長
佐地 勉：東邦大学医療センター大森病院 教授
有村 義宏：杏林大学医学部第一内科学教室 教授
小林 茂人：順天堂大学附属順天堂越谷病院 臨床教授
今井 圓裕：名古屋大学大学院 特任教授
湯村 和子：自治医科大学 教授
藤元 昭一：宮崎大学 教授
相澤 義房：新潟大学大学院医歯学総合研究科 教授
埜 晴雄：新潟大学大学院医歯学総合研究科 講師
山縣 邦弘：筑波大学大学院 教授
布井 博幸：宮崎大学医学部 教授
河内 正治：国立国際医療研究センター手術部 部長

【研究協力者・アドバイザー】

研究協力者：大島正道（国立感染症研究所室長）、本間栄（東邦大大学医療センター大森病院教授）、中島裕史（千葉大学大学院医学研究院教授）、王 碧昭（筑波大学教授）、山崎力（東京大学教授）、新井孝夫（東京理科大学教授）、小野孝彦（市立島田市民病院部長）、三浦典子（東京薬科大講師）、猪原登志子（京都大学医学部附属病院探索医療センター研究員）、濱野慶朋（自治医科大准教授）、吉原堅（杏林大学医学部講師）、池田啓（千葉大学医学研究院助教）、鈴木章一（佐賀大学医学部助教）、大原関利章（東邦大医療センター大橋病院助教）、古谷昌弘（積水化学開発研究所 主任研究員）
アドバイザー：直江史郎（桐蔭横浜大、教授）、岡崎富男（呉共済病院看護専門学校校長）、橋本博史（順天堂大学医学部名誉教授）、中山俊憲（千葉大学大学院医学研究院教授）、David Jayne（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	
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、河内正治、小浦美奈子、大島正道、松田純一郎、鈴木和男	13
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) 人工ガンマグロブリン開発のための <i>in vitro</i> 評価法の確立と <i>in vivo</i> 評価のための血管炎モデルマウスの開発 大野尚仁	20
2-2) 人工 γ グロブリンの評価法測定系の確立 宇野賀津子、武曾恵理、猪原登志子、亀岡洋祐、大野尚仁、鈴木和男	27
2-3) IVIG 治療における川崎病末梢血の遺伝子プロファイリング 野島 博	36
3) モデルマウスによる <i>in vivo</i> の評価法に関する研究	
3-1) 川崎病類似マウス血管炎モデルを用いた人工ガンマグロブリン製剤の 病理組織学的評価 高橋啓、大原関利章、横内幸、山田仁美、佐治勉、三浦典子、大野尚仁、亀岡洋祐、 長尾朋和、鈴木和男	39
3-2) 臓器炎における炎症促進蛋白の産生とその阻害による治療の検討 相澤義房、埴晴雄、小玉誠	44
3-3) 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	49
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 MPA の急性期におけるサイトカイン・ケモカインストームへの IVIg の抑 制効果の解析 武曾恵理、宇野賀津子、立石悠、古宮俊幸、岩崎由加子、猪原登志子、鈴木和男	57
1-2) 急性期川崎病に対する超大量単回免疫グロブリン療法 (IVIG) 単回投与の効果を バイオマーカー、酸化ストレス、アディポサイトカインから考察する 佐地勉、高月晋一、監物靖、直井和之、嶋田博光、池原聡、中山智孝、松裏裕行、 高橋啓、小林徹、盛田俊介、寺田江里、川合眞一	66
1-3) ANCA 関連腎炎の臨床的検討 今井圓裕、尾崎武徳、丸山彰一、松尾清一	77
1-4) ANCA 関連血管炎における大量 γ グロブリン療法の適応と効果について 山縣邦弘、樋渡昭、萩原正大、甲斐平康、臼井丈一、森戸直記、斎藤知栄、 楊景堯、鶴岡秀一	83

1-5) 血管炎の病態・検査所見に対する免疫グロブリン製剤の有用性の検討 湯村和子,濱野慶朋	93
2) 臨床研究および疫学	
2-1) 血管炎の臨床研究および筋炎に対するガンマグロブリン大量療法 (IVIG) について 小林茂人	98
2-2) 抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎の疫学 ～日本・英国間比較～ 藤元昭一、布井博幸	102
2-3) ANCA 関連血管炎の臨床と大量 γ グロブリン療法に関する研究 有村義宏、吉原堅、松田朝子、駒形嘉紀、要伸也、山田明	107
2-4) エイコサペンタエン酸による ANCA 血管炎治療法の開発 平橋淳一、川畑 仁人、有田 誠、鈴木 和男	111
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	117

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、急性期川崎病の標準治療法として使用されている。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ている。このように需要の増加に加え、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。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選択：H-CH1-hinge-6xHisの構成による人工ガンマグロブリン重鎖の Fab の単鎖として構築した。主要な1,000クローンライブラリーの構築とその解析より204クローンを得て、178クローンから精製品0.3mg/1Lを実現した。エンドトキシン混入を最小限とした。2）モデルマウスによる力価判定法と評価マーカの検討、ANCA 関連血管炎モデルマウスに投与し、グロブリン製剤の1/10以下の濃度で同等の成績を得た。3）体外診断法の開発の検討、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。5）国際疫学評価にまた、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、運営委員、オブザーバとして参加・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。人工ガンマグロブリンとしての現実の製剤化に向け、前臨床試験用に大規模バッチの人工ガンマグロブリンの作成を可能とすることができた。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。本研究では、1）ヒト型人工ガンマグロブリンのクローンの絞込み：これまでの検討から、抗体分子内の可変領域 scFv が治療効果を示し、Fc 領域を用いても効果がみられないことから、VH-CH1-h フラグメントを再構築した

ライブラリーから再度クローニングして選択し、塩基配列を決定すると共に、個々のクローンでのタンパク発現を解析し、エンドトキシンを治療範囲に最小限する方法で精製する。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治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する。

B. 研究方法：詳細は、各分担報告を参照

1) 人工ガンマグロブリンの構築、クローンの解析、培養と精製：VH-CH1-hinge-6xHis の構成による人工ガンマグロブリン重鎖 Fab の単鎖フラグメントとして設計した。totalRNA より VH-CH1-hinge 領域 cDNA を RT-PCR により増幅し、pBAD ベクターにクローニングし、2 万クローンを含むライブラリーを作成し、その中からランダムに 1,000 クローンを抽出した。塩基配列解析により正しく発現できるクローンを選択しアミノ酸配列を用いてクラスター解析した。人工ガンマグロブリン重鎖 Fab の単鎖フラグメントとして設計し図 1 のようにプライマー、ベクター組み込みを設定した。

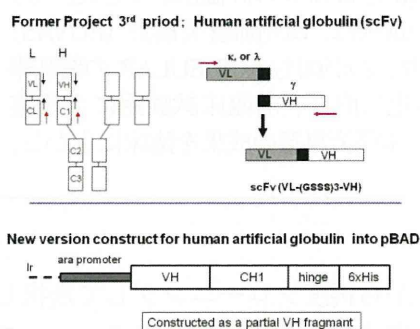


図 1. Fab の単鎖フラグメント設計

クラスター解析を行い (特許申請のためクローン名は非表示)、これらのクローンについて、菌体抽出液を抗ヒト Fab 抗体にてウェスタンブロットすることでグロブリンペプチドの発現を確認した。ガンマグロブリン VH-CH1-hinge のポリクローンミックスバッチの大量培養を行い、組み換えタンパクを精製した。精製したタンパクからのエンドトキシン除去は、アルカリ変性法を処理条件を変え、エンドトキシン吸着除去剤 ET クリーンによる吸着法、エンドトキシン除去用フィルター Posidyne ELD フィルターによるキャプチャー法の 3 種類の方法を検討した。

さらに、効果が比較的高いアルカリ変性法とエンドクリーンによる吸着除去法の組み合わせによりと除去した。

2) モデルマウスおよび評価系の検討

2-1) SCG/Kj 半月体形成腎炎モデルマウスでの力価判定：SCG/kj マウスへの投与実験：10 週齢メスマウスに対して、腹腔内投与を 3dose で行い、対照としてヒトグロブリン製剤の適用量に従った 400mg/kg/day を 5 日間連続投与した。3 週間の経過観察の後、麻酔下で血液、腎臓、肺、心臓、脾臓を採材し、重量測定、血液成分を解析した。ウロペーパー (栄研化学) を用いて尿蛋白、尿潜血 (ヘモグロビン・赤血球)、白血球を測定した。血清採取：ネ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°C で 15 分間遠心後、上清を回収した。

2-2) CAWS 誘導冠状動脈炎による他の治療法：C57BL/6N マウス (4 週齢、雄) に対し *Candida albicans* water soluble fraction (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 (I 群) およびエタネルセプト (E 群) 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、血管炎の広がりや炎症の程度を病理組織学的に検討した。屠殺時に採取した血漿を用い、Bio-Plex、ELISA 法にて炎症性サイトカインを測定した。

2-3) その他の治療モデル、発症機序の解析：

ANCA 血管炎/腎炎の自然発症モデル SCG/Kj マウスに血管炎発症前 (7 週令) から EPA (5% 混餌) を長期投与し生存率を観察した。コントロールとして魚粉抜き正常餌 (魚粉抜き) 群とコーンオイル (5% 混餌) 群を設けた。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。また、12 週令における血漿中 MPO-ANCA 抗体価を測定した。

2-4) MPO 関与のモデル；市販ザイモザンの懸濁液をマウスに経鼻投与した。一方、カンジダ死菌体を 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。菌体投与後の肺の組織切片を HE 染色して、肺の炎症像を組織学的に解析するとともに、肺胞洗浄によって回収

された細胞数を計測した。さらに、回収した細胞の細胞種をフローサイトメトリーで同定した。抗 MIP-2 抗体を投与する際は、ザイモザン投与 30 分前に経鼻的に投与した。

3) *in vitro* 評価系による力価判定: 健常人および、寛解期にある血管炎である MPO-ANCA 腎炎患者から静脈血をヘパリン採血し、採取した血液をイーグル MEM にて 4 倍に希釈した。その後、25 μ g/ml の PHA を添加。96 well plate には、事前に 0.008, 0.04, 0.2 mg/ml モノバレント hScFv を蒸留水にて希釈し、一晚固相化した。CO₂ インキュベーターにて培養、20 時間後上清を回収した。上清中のサイトカイン濃度は、Bio-plex Th1/Th2 array (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-13, TNF- α , GM-CSF, IFN- γ) を用いて測定した。

3-1) γ グロブリン製剤評価のための実験系

健常人および患者から採取した全血に、25 μ g/ml の PHA を添加し、96 穴皿に 200 μ l ずつ入れた。96 well plate には、事前に 0.008, 0.04, 0.2 mg/ml モノバレント hScFv を蒸留水にて希釈し一晚固相化した。

3-2) ヒト PBMC 培養による評価: 1×10^6 cells / ml に調整した ヒト PBMC を固相化し、IVIG、F(ab')₂ を添加し、37°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 培養後上清を回収した。

3-3) その他の評価系: 心臓在住培養細胞、各種初代培養細胞および細胞株を得て、20 μ M のヘミンを加え細胞採集した。細胞内の ROS の測定は、心臓在住培養細胞と CM-H2DCFDA 色素液を用い hemin (20 μ M) を添加後 60 分間インキュベーターフローサイトメトリーにて解析した。培養上清を採集し、その上清中の IL-1 β と TNF- α の値を ELISA Kit を用いて測定した。TLR4KO マウス腹腔マクロファージのヘムによる IL-1 の誘導、マクロファージ細胞株のミオグロビン、ヘモグロビンによる IL-1 の誘導を検索した。

3-4) MPO-ANCA 標的分子 Moesin の同定: ウエスタンブロット法及び PMF 解析により確定した。好中球、単球、リンパ球と moesin 抗体の反応を FACS 解析した。

4) 遺伝子解析: 川崎病の発症が疑われる患者より少量の末梢血液を IVIG 治療前後に採取、保

管した。末梢血液より RNA 抽出後、マイクロアレイ解析を行った。今回は 10 検体 (RNA 調整の段階で 9 検体) について解析を進め、共通して各検体で治療前後に発現が亢進・抑制される遺伝子群、及び IVIG 治療への応答性に依存して変動する遺伝子群の抽出を行った。

尚、基礎研究の「方法」は、当該報告を参照。

2. 臨床分科会

1) 血管炎の病態と IVIG 治療

1-1) 21 例の MPO-ANCA 陽性高齢 MPA 患者の IVIG 治療: 症例: 28 例の MPO-ANCA 陽性高齢 MPA 患者と、対象として正常人 53 例を比較した。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。IVIG は献血グロブリン 400mg/kg/日 x 5 日で 17 例、に施行した。一方、少量 IVIG (5000mg/日 x 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。臨床パラメーターとして、尿所見、末梢血像、CRP、補体系、ANCA を含む自己抗体、さらに病理所見として、従来当研究室で提唱している各種パラメーターを用いた。

1-2) Bioplex 法による解析: PDGF-bb, IL-1 b, 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- α 2, IL-1 α , IL-2Ra, IL-3, IL-12p40, IL-18, CTACK HGF, M-CSF, MIF, MIG, SCF, TNF- β の 39 種類の測定を急性期と IVIG 療法前後で解析した。

1-3) 糸球体障害を認めない MPO-ANCA 関連血管炎: 名古屋大学医学部附属病院腎臓内科に平成 21 から 23 年度に入院した ANCA 関連患者中、肺胞出血を伴った 2 症例と、尿細管間質腎炎の病理型を示す 2 症例を提示して考察する。

1-4) 本邦における MPO-ANCA 陽性の MPA の病態: 平成 21 年度報告による「MPO-ANCA 関連血管炎に対する低容量免疫グロブリン静注療法」、平成 22 年度報告による「CSS における免疫グロブリン大量静注療法の評価」の症例から、血管炎の病態で免疫グロブリン投与により、改善しうる病態などがあるかを抽出する。

1-5) 寛解時期に末梢神経障害のある CSS への IVIG 治療: 1) CSS において MPO-ANCA 陽性 14 例と陰性 18 例の 32 臨床像の相違につき、後ろ向きに比較検討した。2) 寛解期の末梢神経障害に対する IVIG 療法の有効性、安全性の検討、3) ANCA 関連血管炎 158 例の臨床像と予後の推移。

2) 調査・解析

2-1) RPGN 調査厚労省難治性班での解析: 2001 年以降の筑波大学において IVIG 療法 (0.2-0.4 g/kg/day、4-5 日) を施行した ANCA 関連血管炎症例 8 例について、IVIG を施行した理由、IVIG 施行時の他の治療内容、IVIG 後の治療反応性と経過などについて、レトロスペクティブに検討した。

2-2) 大型血管炎の解析: 高安動脈炎に関しては、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 名の臨床症状を解析した。Granulomatosis with polyangiitis (GPA、ウェゲナー肉芽腫症) に関しては、1992 年から 2006 年まで、順天堂医院にて診断・入院治療を受けた 20 症例の病歴を解析した。皮膚筋炎/多発性筋炎 (PM/DM) に関しては、国内外の文献を検索して考案した。

2-3) AAV の調査: European Systemic Vasculitis Study Group (EUVAS) の診断基準に従った。症例は、腎臓病あるいは膠原病の専門病棟・外来を持つ宮崎県下の全ての病院で前向きに調査を行った。情報収集内容は年齢、性、疾患名、ANCA 内容、臓器障害の有無に限定した。なお、人口統計は県庁ウェブサイトから得た。一方、英国 Norfolk 地区では以前より前向き調査が継続されており、同じ診断基準、同じ期間の症例登録を行い (Richard Watts ら)、比較の資料とした。

2) 川崎病の IVIG 治療; 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。血管炎マーカー (高感度 CRP: HsCRP)、血栓マーカー (D-dimer)、心筋細胞質マーカー

(CK、CK-MB、H-FABP)、心筋構造蛋白マーカー (Troponin T; TnT, Troponin I; TnI)、心筋不全・心筋ストレスマーカー (ANP, BNP, NT-proBNP)、酸化ストレスマーカー (Bil) を IVIG 投与前、投与後 2 日目、7 日目で血清および血漿にて評価した。

3. 安定性と毒性試験

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。

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、平橋淳一の 4 名が招聘され、各国から専門の研究者が参加した。会議にて問題点を確認および多数決で議案を採択し、論文化した。具体的な各国の調査は、倫理委員会の松陰を得て、情報を収集しており、日本でも登録が開始された。本件に関連して、欧米の会議 (伊国・パルマ、米国・フィラデルフィア、チャペルヒル) に出席した。

(倫理面での配慮【全般】)

具体的には分担者報告書を参照

患者の血液・血清・尿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。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。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ことは該当しない場合でも、必要に応じて「ヒトゲノム研究審査」を申請して許可を得た。

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。必要最小限のマウスを使用することに努め、必要に応じて安楽死させた。ノックアウトマウスは、「遺伝子組換え生物等

の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に準じて、組換え体として飼育した。

C. 研究結果

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：作製したガンマグロブリン VH-CH1-hinge 組み換え体クローンライブラリーよりランダムに抽出した 1,000 クローン中、約 4 分の 1 の 245 クローンが His タグが付加されたタンパクを発現できるものであり、その内の 224 クローンがガンマグロブリン VH-CH1-hinge をコードしていた。最終的に 204 クローンを得た。得られた内、178 クローンをミックスバッチ培養しタンパクを抽出・精製した。染色及び抗体による検出のパターンが一致した (図 2)。

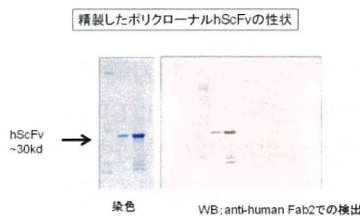


図 2. 精製した hScFv の性状

エンドトキシン除去は 6 M グアニジン溶液を 20mM 水酸化ナトリウムで pH12 に調整したバッファーに、組換えタンパク溶液を置換後の処理時間による効果を検討した。エンドトキシン吸着除去剤 ET クリーンによる吸着法は製品操作書に従って除去した。アルカリ処理による加水分解とその後のエンドトキシン吸着除去剤 ET クリーンによる吸着の組み合わせでは最終的に 21 ユニット/タンパク 1mg と除去できた。

2) in vitro での評価

2-1) 人工ヒト化ガンマグロブリンの患者全血での評価：ScFv が PHA 刺激により全血から産生されるサイトカインを抑制する効果が認められた。Th1 サイトカインである IL-2 の産生に対し

ては、モノバレント hScFv、 γ グロブリン製剤共に、固相化条件、浮遊添加条件共に、産生抑制が認められた。IFN- γ の産生に対しては、モノバレント hScFv においては固相化条件では亢進、浮遊添加条件では、高濃度では抑制が認められ、また個人差が認められた。hScFv は、固相化条件、浮遊添加条件共に TNF- α 産生亢進が認められた。また GM-CSF 産生については抑制するケースと亢進する症例が認められた。Th2 サイトカイン：IL-4、IL-5、IL-13 の産生に対しては、hScFv、 γ グロブリン製剤共に、固相化条件、浮遊添加条件共に、産生の抑制が認められた。特に MPO-ANCA 腎炎の一症例においては抑制が顕著であった。またグロブリン製剤に比べて、ScFv では、より低い濃度でより強い抑制が認められた。抑制性サイトカイン IL-10 の産生に対しては、いずれの条件でも亢進する傾向が認められた。特に MPO-ANCA 腎炎寛解期の症例では亢進傾向は顕著であった。

2-2) ヒト PBMC in vitro 培養系での固相化 IVIG によるサイトカイン産生誘導：固相化 IVIG と IVIG の液相添加での PBMC からのサイトカイン誘導能を比較した、IVIG の液相での添加と比較して固相化 IVIG は PBMC からの IL-8 産生を著しく増加させた。TNF- α は、PBMC への IVIG 液相添加では誘導されなかったが、固相化 IVIG では強く誘導された。しかし、固相化 F(ab')₂ はどちらの産生も誘導しなかった。

2-3) 心臓在住培養細胞の評価系：心臓在住培養細胞はヘミン刺激によって、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-2、CINC-1、CINC-2、CCL5、G-CSF、GM-CSF、Cox-2、PGES、iNOS および HO-1、Lipocalin-2/NGAL の急激で著明な遺伝子発現の上昇がみられ、培養上清中に IL-1 β 、TNF- α 蛋白の産生上昇もみられた。また、ヘミン刺激 1 時間後、心臓在住培養細胞内の ROS の産生は明らかに増加し、Tiron によって ROS 産生はほぼ完全に抑えられた。炎症促進蛋白の上昇は NF- κ B を介していることを強く示唆していた。さらに、TLR4KO マウスの腹腔マクロファージはヘムによる IL-1 誘導がほとんどみられないことから TLR4 を介すると考えられた。

3) モデルマウスでの人工ヒト化ガンマグロブリンの in vivo での評価：

3-1) 血管炎モデルマウス：精製人工ガンマグロ

ブリンを用いて ANCA 関連血管炎モデルマウス SCG/Kj に投与しその生物活性を検討した。その結果、投与量に準じて脾臓の腫脹抑制傾向がみられ製剤グロブリンの20分の1量でも同様の効果を示している。白血球および末梢血リンパ球数の変化を図3にまた、MPO-ANCA 抗体価の変化を図4にしめした。hScFv 投入量に比例して減少している傾向がみられ、炎症抑制効果を示しており、製剤グロブリンの硬化に比べて20分の1から40分の1量で製剤ガンマグロブリンと同等の効果を示した。

WBC & Lymphocytes

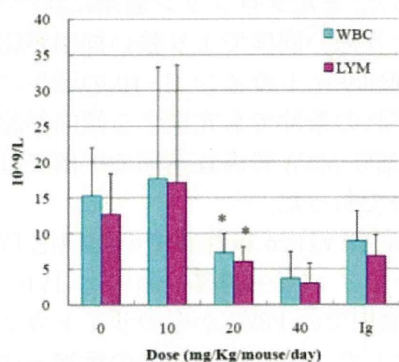


図3. 白血球およびリンパ球

MPO-ANCA titer

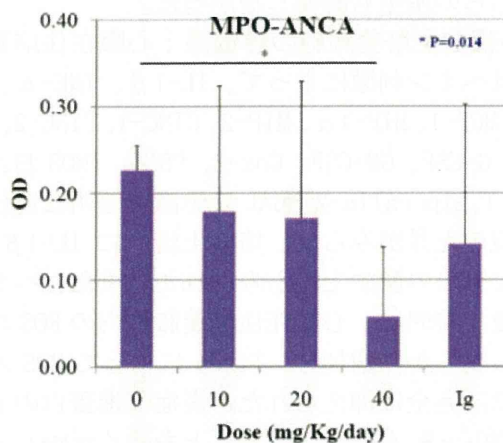


図4. MPO-ANCA 抗体価の変化

人工ガンマグロブリンとしての現実の製剤化に近づいたと思われる。

3-2) 川崎病様モデルマウス=CAWS 誘発マウスでの治療: hScFv 中用量投与群では対照と比較して汎血管炎の発生頻度、炎症範囲、炎症程度が抑制される傾向にあった。しかし、低用量群では抑制効果は得られず、高用量群では経過中に死亡する個体が発生した。抗 TNF- α 製剤、特にエタネルセプトを投与した場合、血管炎発生頻度、炎症範囲、程度はいずれも顕著に軽減化された。humanIgG 投与群では、未治療群(対照)と比較して汎血管炎の発生頻度は有意に低下し、さらに炎症範囲、炎症の強さも有意に軽減化された。また C5 欠損マウスに CAWS 血管炎を誘発し、大動脈起始部周辺の臓器切片を作成し、HE または EVG 染色して、DBA/2 の CAWS 血管炎と比較した、いずれの系統のマウスも大動脈組織へ炎症性細胞浸潤や血管壁肥厚を伴う血管炎を発症した。また EVG 染色より、3 系統ともに大動脈弁周辺に線維化が生じていることが確認された。これらのことから A/J および AKR は DBA/2 と同様、CAWS 血管炎を発症することが明らかとなった。その一因として C5 が関与している可能性が示唆された。

3-3) モデルマウスでの病態・病因解析:

3-3-1) 血管炎の治療モデル-1: 1. EPA の長期経口投与は SCG/Kj マウスの生存を顕著に延長した。コーンオイルは生存曲線を変化させなかった。2. EPA は SCG/Kj マウスの MPO-ANCA 産生を強く抑制したが、コーンオイルは影響を与えなかった。この抑制効果は顕著であり EPA の自己免疫調節作用を強く支持するものである。3. EPA 投与群においては脾臓、腎臓リンパ節、肺リンパ節において Foxp3 陽性制御性 T 細胞が増加し、自己免疫疾患に関与する B220 陽性 T 細胞および CD4/CD8 ダブルネガティブ T 細胞が減少した。

3-3-2) 血管炎の治療モデル-2: 野生型マウスにザイモザンを経鼻投与すると、投与後6日目までほぼ同程度の軽度の肺炎しか観察されなかったが、MPO-KO マウスの炎症は、投与後1日目ですでに野生型マウスよりも進行し、6日目には重篤な炎症が発症した。MPO-KO マウスの方が野生型マウスより、ザイモザンで誘発される好中球性肺炎が早期に重篤になることが明らかとなった。ザイモザン投与後6時間の肺組織中の MIP-2 量は、MPO-KO マウスの方が野生型マウス

ウスよりも3倍高値を示した。肺胞マクロファージと好中球がMIP-2を産生していることが判明した。培養前後の細胞のミトコンドリア呼吸量に相違は認められなかったことから、MIP-2産生量の違いが細胞死によるものではなかった。以上の結果から、好中球からの活性酸素異常は、単に殺菌能の低下による炎症の誘発を導くだけでなく、菌体成分による炎症の誘発も助長することが示された。

3-3-3)血管炎の病因に関与する分子 moesin：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、2つのモデルマウス：1急速進行性糸球体腎炎(RPGN)を自然発症するSCG/Kj「RPGNモデルマウス」および、CAWS誘発の「冠状動脈炎モデルマウス」を用いて、病因分子の1つを新たに明らかにした。本分子をmGECから単離しPMF解析した結果、moesinと同定した。Moesinには、MPO-ANCAのリスクエピトープ部位のMPOのN末端部分と相同な構造が含まれていた。これらマウスから得られたMPO-ANCAの標的分子moesinが人工ガンマグロブリンによる治療評価に使えかを明らかにするには、まず、moesin抗体価の定量のELISA測定系を確立した。

3) 病因にかかわる遺伝子：9検体のうち、IVIG治療に応答した3検体と非応答の6検体間で抽出された遺伝子群は現在のところ100~200遺伝子を抽出することができた。これらの群の中には炎症反応に関わるものなど抹消血液中の免疫反応を示す遺伝子も含まれていた。

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治療と病態—血管炎

1-1) 血管炎病態とガンマグロブリン治療—1

MPO-ANCA陽性全身血管炎であるMPAは、我が国のRPGNの多くを占め、この疾患の初期には、各種炎症性サイトカインやケモカインが血中でストームとなって多く発現するが、臨床的炎症所見と逆相関を呈するサイトカイン類の発現が確認された。その一部であるSCFは組織学的には硬化病変と相関を示した、組織修復に関与することが示唆された。これらのサイトカイン類へのIVIG治療の影響を検討したが、他の炎症性サイトカイン類に比し、上昇する症例が半数以上を占め、IVIGによる組織修復の

促進が示唆された。IVIG療法を行った17症例では有意な炎症所見、および尿所見の改善を認めた(図5)。

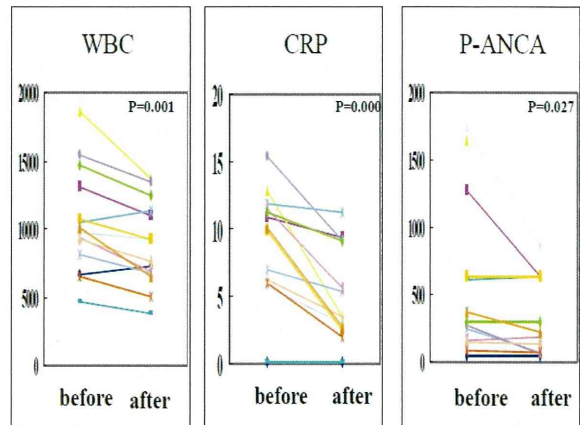


図5. IVIG療法による臨床データの改善

6) サイトカイン・ケモカインのIVIG前後の比較では、uFGFbasic, IL-1 α , IL-2R α , IL3, IL18, M-CSF, MIG, SCF, TNF- β の有意な低下をみとめたがminiIVIGでは、CTACKとSCFの低下を見たのみであった。とくに、以前の検討で組織学的活動度と有意な相関を認めたが、M-CSF、IL8、と、組織修復性(硬化病変)に相関の高かったSCFはともに有意に低下した。

1-2) 血管炎病態とガンマグロブリン治療—2

症例の報告4例：1＝腎生検施行。腎生検組織では弓状動脈レベルに壊死性血管炎を認めたものの、糸球体に半月体形成は認めず、壊死性小動脈炎＋尿細管周囲毛細血管炎を伴う尿細管間質性腎炎と診断した。CD34は幼若血管内皮細胞のマーカーとされるが、PTCでは陰性であった。症例2：腎生検組織上は、症例1と同様、糸球体に半月体形成を認めず、間質の繊維化と炎症細胞の浸潤、尿細管萎縮が主病変であった。症例3：胸Xp上胸水や肺胞出血像を認めた。そのため、CHDFを開始し血管炎に対してメチルプレドニンパルス療法(0.5g \times 3日間)・後療法PSL30mg/日を施行した。クモ膜下出血術後の血管攣縮期であるため意識の動揺があり、除水には難渋した。貧血に対して輸血を行った。第10

病日には胸 Xp 上改善を認めたが、第 13 病日に肺胞出血の再発があり再度ステロイドパルス療法を施行した。第 17 病日には肺胞出血の更なる悪化を認め、免疫抑制状態を考慮し大量γグロブリン療法(0.4g/kg/日×5 日間)を施行し、徐々に呼吸状態や全身状態の改善を認め、胸 Xp 上肺胞出血像も消失した。残念ながら腎機能は改善せず維持透析となったが ANCA 値は低下し、肺胞出血の再発や感染の合併もなく順調に経過した。経口プレドニゾン服用量も減量可能であった。症例 4 :L-CAP を計 5 回施行した。MPO - ANCA 値はやや改善したが腎機能はほぼ横ばいであった。結局ステロイドの内服を納得されたためプレドニゾン 20mg/日で第 51 病日退院となった。その、第 86 病日に再度血痰を認め呼吸不全に陥ったため人工呼吸管理となった。胸 Xp 上両側に新たな肺胞出血像を認め、大量γグロブリン療法を施行した。ANCA 値は低下し、肺胞出血の再発もなく呼吸状態は改善し、人工呼吸から離脱できた。その際、ANCA の再発は認めなかった。

1-3) 血管炎病態とガンマグロブリン治療- 3 : 低容量の感染症に対するヒト免疫グロブリンの使用でも、非特異的炎症反応の CRP の減少や MPO-ANCA の低下なども、副腎皮質ステロイドを増量することなく、可能な症例もあった。食欲などの増加も認められていた。大量免疫グロブリンの投与した CSS では、多発性単神経炎による末梢神経障害に対して、免疫グロブリン大量投与し、改善を認めた。また、同一症例で再燃と思われる検査異常の好酸球の増多や CRP の上昇に関して副腎皮質ステロイド増量なく、大量免疫グロブリン投与で改善していた。

1-4) 血管炎病態とガンマグロブリン治療- 4 : CSS の寛解時期に持続する末梢神経障害に対し、IVIg 療法を行った。1) CSS における MPO-ANCA 陽性群と陰性群の臨床像の相違における比較検討 : 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。また、ANCA 陽性例では RPGN、肺胞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。2) ANCA 関連血管炎のひとつである CSS に対する大量γグロブリン (IVIg) 療法 : 自覚症状 (VAS) は 83% (5 例/6 例) で改善し、感覚神経の改善は 83% (5 例/6 例) に認められた。運動神経障害 (MMT スコア) は 67% (4 例/6 例) で改善した。また IVIg 投与時期に生じた副作用は、頭痛が 1 例のみで投与中断例はなかった。結論 : IVIg 療法は CSS の寛解期で長期経過した末梢神経障害に対しても有用で、安全性の高い治療法であると思われた。また MPA の末梢神経障害においても、今後 IVIg 治療を検討する必要があると思われた。3) ANCA 関連血管炎 (AAV) 158 例の臨床検討 : AAV はやや女性に多く (男女比 1:1.7)、平均年齢 67.7 歳と高齢で、AAV の原疾患は、MPA が 80% (127 例) と最も多かった (多発血管炎性肉芽腫症 ; granulomatosis with polyangiitis:GPA [Wegener 肉芽腫症]) 11%:17 例)、CSS 8%:12 例、分類不能 1%: 2 例)。3) ANCA サブタイプでは MPO-ANCA 単独陽性例が 91% (143 例) と大多数であった (PR3-ANCA 単独陽性例 8%:12 例、両者陽性症例 2%:3 例)。また PR3-ANCA 単独陽性例は全例 GPA であった。4) MPO-ANCA 関連血管炎 (MPO-AAV) は 83% (119 例) に腎症候を認め、その内 RPGN は 66% (78 例) であった。肺出血は 21%、間質性肺炎は 41%に認められた。

1-5) 血管炎病態とガンマグロブリン治療- 5 : 初期治療から IVIg 開始までの期間は 0.4 か月から 30 カ月。IVIg は 0.2~0.4g/kg/day で、4-5 日間投与した。IVIg 開始時症状は感染症と完全に鑑別することは不可能で、抗生物質を併用しつつ、ANCA titer の増加も認められることから、血管炎再燃と判断し、IVIg を施行した。IVIg 施行の理由は、6 例が再燃に対して施行され、そのうちの 3 例は初期治療から 2-3 カ月後で血管炎所見コントロールのため、中等量のス

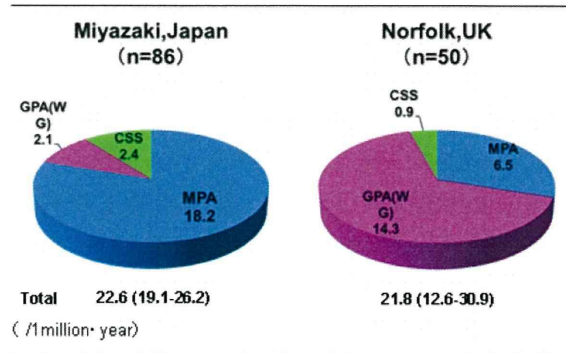
ステロイド薬を内服下にあるにもかかわらず、消化器症状で再燃した症例であった。1例は30か月間寛解を維持していたが間質性肺炎にて再燃した症例再燃例以外では、1例は初期治療にて改善傾向であったが、心筋炎から心不全を併発、2例は、高齢で糖尿病と脳血管障害を併発しており、ステロイド薬等の免疫抑制薬の使用を可能な限り避けるべきと考えられ、治療初期に施行した症例であった。1例は、初期治療後、ステロイド漸減中に、発熱、CRP 上昇をきたし、ステロイドパルス療法、抗生剤治療がなされたが、空洞陰影を伴う肺真菌症から多臓器不全となり、IVIg 施行した。PR3ANCA 陽性、SLE 合併例では、ステロイドパルス、シクロフォスファミドパルスなどを施行したが3か月後に痙攣をきたし、脳炎も考えられ、感染症量のγグロブリン投与が行われたが ANCA titer の再上昇も見られ、血管炎再燃に対し、IVIg 施行した。治療効果としては、多臓器不全の1例を除き全例血管炎のコントロールは良好となり退院となった。MPO-ANCA 陽性例 8 例について検討したところ、IVIg 開始時の血管炎治療薬は、5例が PSL 30-40 mg/day の単独、1例は PSL 25 mg/day と CPA 50mg/day の併用、1例は PSL 7.5 mg/day と CPA 50 mg 隔日の併用であった。1例は血糖コントロール不良でありステロイドは中止されていた。IVIg 開始時の MPO-ANCA 値は平均 159 EU/l (11-455)、CRP は平均 2.99mg/dl (0.6-9.48) であった。CRP 陰性化までの期間は平均 13.5 日 (5-47 日) であり、消化器症状にて再燃した3症例については、速やかに炎症所見は改善し5日から10日間で CRP は陰性化、ステロイド薬の投与が困難であった IVIg 単独例も 17 日間の経過で陰性化した。75 歳の MPO-ANCA 陽性血管炎の症例ではステロイド、シクロフォスファミド投与にて CRP は完全に陰性化せず、初期治療から3か月後に CRP の再上昇、下血を認め、CRP の上昇を認めた。大腸内視鏡で潰瘍性病変を認めるも病理組織学的にも血管炎かステロイド性のかは鑑別できなかったが、IVIg にて CRP が陰性化し、プレドニンの減量とシクロフォスファミドの中止が可能となった。一方、間質性肺炎増悪症例は IVIg 後にステロイドパルス療法も施行し、47 日間の経過にて CRP が陰性化した。MPO-ANCA 値も

IVIg 単独例を除き 5 例において、一ヶ月後には陰性化もしくは半減した。

2) 血管炎の調査

2-1) 大型血管炎: 高安動脈炎の研究では、22.2% の症例で発症時年齢が 50 歳以上であった。GPA の研究では、腎症の存在する GPA は、1988 年の当研究班で 63% (146 症例中、初発時: 3.5%)、1998 年の報告では 39% (26 例中、初発時 14.3%) であった。耳鼻科 2 施設からの報告では 40% (15 症例中; 2002 年、北大)、12% (16 症例中; 2004 年、旭川医大) であった。外国では全経過中に 77% (158 例中、初発時 15%, Hoffman, 1992 年)、また 77% (70 例中、Gross, 2000 年) の報告 (表) があった。PM/DM の研究では、IVIg は、1993 年 Dalakas MC らによる double-blind, placebo-control trials によって、その有効性が証明され、平成 22 年 10 月に日本で保険適用が承認された。

2-2) AAV の疫学調査: 宮崎県において AAV として登録された数は 2005 年—2009 年に調査し、男女比は 42:44 であった。平均年齢は 3 年間の調査では 69.7 ± 11.0 歳で、発症のピークは 70~74 歳であった。また、各疾患別の成人人口 100 万人当りの発症頻度は、MPA 18.2 (95% CI 14.3-22.0)、GPA 2.1 (95% CI 0.6-3.7)、CSS 2.4 (95% CI 0.3-4.4) と計算された (図 6)。AAV の内訳では MPA 69 例、GPA 8 例、CSS 9 例であり、ANCA は MPO 陽性 72 例 (84%)、PR3 陽性 6 例 (7%) であった。GPA 症例は、5 症例のみが PR3 陽性で、残り 3 症例は MPO 陽性であった。CSS の 9 症例中では 7 症例で MPO-ANCA 陽性であった。臓器障害では、MPA では腎臓に 93% の症例でみられたのに対し、GPA では 38%、CSS では 11% のみであった。同時期に英国 Norfolk で行われた前向き調査 (主任研究者 Richard



Watts) と比較検討した。

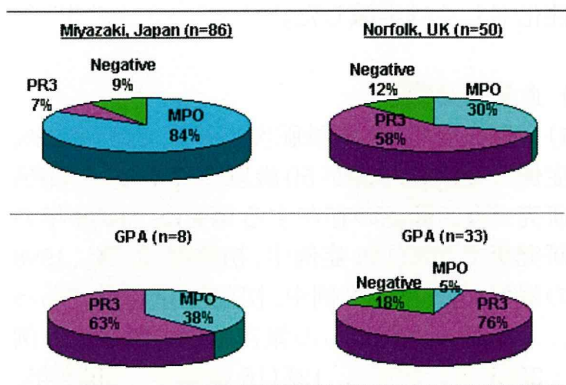


図6. AAVの疫学調査日英比較(2005-2009)

3) 人工ヒト化ガンマグロブリンの臨床試験にむけた治療と病態—川崎病: BNP平均値は、34.5、NTproBNPは581pg/mlであった。BNPもNTproBNPもIVIG後には有意に($p < 0.05$)低下していた。BNP、NTproBNPの正常例と、異常高値例における追加療法を要した症例の比較では、BNP高値例20中16例、NTproBNP高値例27例中8例では追加療法を必要とする症例があり、正常値より多い傾向があった。IVIG不応例でステロイドパルス療法を施行されたのは3例であった。冠動脈瘤を症例はなかった。反応例と不応例では、治療開始病日には差がなかった(4.1vs3.7病日)。治療開始前の各マーカーでは、D-ダイマー(2.6 vs 6.0)、BNP(24.7 vs 72.0)、NTproBNP(374 vs 1286)、T-Bil(0.54 vs 1.0)値が、反応例に比して不応例で高い傾向を認めた。しかし、治療前、治療後3日目における変化率では、CRPのみ不応例で減少率が少ない傾向にあった(-39%vs-25%)。また、7日目においては、反応例に比して不応例では、NTproBNP(89 vs 159)、HS-CRP(0.2 vs 0.32)が高い傾向を示した。軽症例の検討では、T-Bil(0.6 +/- 0.3から0.3 +/- 0.1へ($p < 0.001$) vs 0.9 +/- 0.7から0.4 +/- 0.2 へと低下した($p < 0.05$)。CRPはIVIG7日目で、反応群0.6 +/- 0.7で不応例: 2.5 +/- 5.1($p = 0.05$)と有意に低下していなかった。Resistinは急性期で増加し、熱性疾患よりも高値であった。Resistin levelはKD群で、HC、FC群より有意に高値でIVIG後に有意に低下した。HMW adiponectinは熱性疾患でKDと低下した。

5) 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

合成ヒト型免疫グロブリンのクローンを選定することができた。また、体外診断法にむけた *in vitro* での評価法をほぼ確立した。さらに、疾患モデル動物での評価法もほぼ確立することができた。一方、臨床班では、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行い新知見を得た。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へ向けて準備が整った。最終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

1) 人工免疫グロブリン合成: ミックスバッチ培養より精製 hScFv を 0.8~0.9mg/L を実現した。ANCA 関連血管炎モデルマウス SCG/Kj に投与し、末梢血血液像および脾臓の腫大抑制において現在臨床で使用されているグロブリン製剤の1/20 から 1/40 以下の濃度で同等の成績を得、現実の製剤化に近づいたと思われる。他の方法との組み合わせを変えるなどの改良でさらにエンドトキシンの混入を下げるのが可能となった。

2) *in vitro* での評価系: ヒトの免疫機能評価による Th1/Th2 サイトカイン産生能を測定することで、Th1 傾向、Th2 傾向に分けることができ、個人の免疫特性を明らかに出来た。hScFv はより低い濃度で効果を示した。固相化 IVIG はヒト PBMC からの IL-8 と TNF- α 産生を強く誘導した。固相化 IVIG はヒト PBMC からのサイトカイン産生を誘導する活性があり、その活性は IgG の Fc 部分に依存している可能性が示唆された。自己免疫疾患には使用されていない F(ab')₂ も IVIG 同等の活性がある可能性が示唆された。一方、C5a は強力な炎症メディエータであるが、C5 欠損マウスでも血管炎は増悪傾向を示した。これらのことから、本モデルにおいて C5 欠損は増悪因子であることが更に強く示唆された。

3) モデル動物による評価: CAWS 誘発マウス

血管炎モデルでは冠状動脈、大動脈起始部や腎動脈などに高頻度に血管炎が惹起され、その組織像は単球/マクロファージを主とする増殖性炎症であるなど、川崎病と類似する点が多い。本研究では、クローンのセット VH-CH1-hinge は、脾臓腫脹抑制、末梢血白血球、リンパ球の減少、MPO-ANCA 抗体産生抑制、サイトカインの産生抑制を示すことなどを報告している。本モデルにおいても hScFv が血管炎抑制的に作用していることが示された。

治療の作用機序－1：本研究により EPA 投与は従来から報告されてきた抗炎症作用のみならず、自己免疫制御作用により自己抗体である MPO-ANCA 産生を抑制し病勢を制御する可能性が示された。現在進めている ω 3 脂肪酸由来の脂質性メディエーターの代謝と網羅的解析の結果も待たれる。

治療の作用機序－2：ヘミンと炎症との関わりで、我々の検討で得られた新たな知見の一つは、正常心臓の在住細胞の培養細胞でも、ヘミンによる遺伝子発現が誘導されることが明らかになったことである。また、心臓在住培養細胞に対する、プロテアーゼ阻害薬による発現誘導抑制効果は、NF- κ BNF- κ B を介していることを強く示唆している。また、TLR4 は重要な DAMPS 受容体であるが、ヘムもこれを介した反応であると考えられる結果であった。

3) 遺伝子発現：現在まで想定する 20 検体のうち約半分の数値化解析まで進めることできた。残り約 10 検体を順次解析を進め、予測システムの制度を高めると共に、リアルタイム PCR で再確認などを進める。

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治療と病態－血管炎：IVIG 大量療法は多種類のサイトカインを同時に抑制して鎮静化をもたらすことが確認された。これらの変化は、単独の IVIG 療法で確認され、末梢血中のサイトカインそのものの回収にも働いていると考えられる。一方、それと同時に、M-CSF、IL8 など、ケモカインの抑制を通して、新たなマクロファージや好中球のリクルートを抑制することが考えられ、これらからもたらされるサイトカインの放出を抑えていることも重要と考えられた。SCF の誘導は壊死性病変を誘導する各種

炎症性サイトカインの発現と同期し、IVIG の炎症抑制作用に同期して誘発が増強されるものがある事が示唆された。また、少量の重症感染症抑制に用いられる量の IVIG も、感染症が明らかな時の最初の治療としては推奨されると思われた。これらは人工グロブリン開発後の治療効果確認のパラメーターとして、どのサイトカインをターゲットにするかという課題に重要な示唆を与える知見であり、本疾患の病態の背景を検討するうえでも重要な情報とおもわれた。

予後不良例への IVIG 治療：肺胞出血を合併した ANCA 関連血管炎に関しては予後が悪いことが報告されている。ANCA 関連腎炎は高齢発症が多く、特に肺病変がある場合には肺炎をはじめとする感染症には十分に留意する必要がある。ANCA 関連腎炎に伴う肺胞出血に対して、血漿交換や大量 γ グロブリン療法が有効であったという症例報告は存在する。本研究の結果から、大量 γ グロブリン療法は、肺出血を伴う ANCA 関連腎炎患者において感染症予防に有効であるのみならずステロイド等免疫抑制剤の減量にも有用であると期待される。RPGN を呈することが多い血管炎初期の腎障害の対応が腎機能改善、保持には重要である。

再燃の IVIG 治療：IVIG については、ヨーロッパを中心に、難治性病態や、再発再燃例での前向きランダム化検討やケースシリーズにより、その有効性が示されている。日本の ANCA 関連血管炎の特徴は、高齢者に多く MPO-ANCA が多い。その治療中に、日和見感染を来す頻度が高く、ステロイド薬の増量や免疫抑制薬の追加が困難な症例において、有効であったと考えられた。

CSS への IVIG 治療：MPA の発症年齢(平均 65.3 歳)と比べると、MPO-ANCA 陽性 CSS は 55.1 歳と若く、また RPGN の頻度も低い。同じ MPO-ANCA 陽性でも MPO-ANCA 陽性 CSS と MPA では、ANCA の関連する病態に違いのあることも推測される。また、CSS の末梢神経障害に対する IVIG 療法は、従来報告されていた疾患活動期にある末梢神経障害だけでなく、寛解期であっても高率に運動障害・感覚障害の改善を認めた。CSS に対する IVIG 療法の効果機序は、寛解期の CSS においても有用で、副作用の出現頻度も少なく、安全性の高い治療法であり、高齢者や腎機能障害者においても安全に行

える IVIG などの免疫抑制療法の開発が必要と考えられた。

2) 血管炎の調査：

2-1)大型血管炎＝高安動脈炎と巨細胞動脈炎の大動脈やその分枝に病変を合併する病型 (Large-vessel GCA:LV-GCA)は同一の疾患で、発症年齢が異なる可能性が考えられた。わが国では、いわゆる「限局型(localized・limited form)」GPA (WG)が多いことが考えられた。PM/DM に対して IVIG が有効であることが確認された。

2-2)AAV 疫学調査：腎症を合併していないものも含む、AAV を前方視的に調査し、二国間の比較検討を行なった。宮崎県は人口 100 万人の県であり、人口の変動も少なく (5% 以下)、特に 65 歳以上の老人人口で考えると 0.8% とほとんど人口移動は認められず、疫学調査には適切な地区だと考えられる。今回の 5 年間の調査では、宮崎地区での AAV の発症頻度は年間成人人口 100 万人当たり 22.6 名であった。この数値は、英国 Norfolk の 21.8 名とほぼ同率の発症頻度であった。しかし、宮崎地区では AAV の多くは MPO-ANCA 陽性 MPA 患者であるのに対し、英国では PR3-ANCA 陽性の GPA 患者が多かった。なお、宮崎地区における GPA の症例数は少なかったが、英国と比べると、我が国の GPA 症例は腎症を伴わない軽症例が多く、PR3-ANCA 陽性の頻度も低い可能性が考えられた。しかし全体としてみると、この 10 年間の調査から AAV 患者全体の腎症合併頻度は大差ないと考えられた。今まで予想されていた国際間の疾患頻度や内容の違いが確認されたことは、わが国特有の治療法などの検討が今後必要であることを裏付けるかもしれない。

3) 人工ヒト化ガンマグロブリンの臨床試験にむけた治療と病態—川崎病：急性期の特有な心筋炎様の低心機能状態が見られる。IVIG はこの急性期の心筋ストレスマーカーである、BNP, NTproBNP を有意に減少させた。症例の 60% 程度で異常高値を示す症例では追加療法を必要とする傾向があり、これらの心筋ストレスマーカーは重症度の新たな指標となる可能性がある。心筋ストレスマーカーは重症度の新たな指標となる可能性がある。IVIG の有効性の判定には、解熱傾向、WBC や顆粒球の低下、CRP 低下、等が一般診療上用いられてきたが、今回の検討

で血管炎を主症状とする KD では、血管炎の炎症マーカーでもある HsCRP、血栓マーカー心筋ストレスマーカー、酸化ストレスマーカーも IVIG 前後で変動し、効果の指標となり得ると考えられた。血管炎を主症状とする aKD では血管障害のマーカーと考えられる

炎症マーカー (CRP)、血栓マーカー (D-dimer)、心筋ストレスマーカー (BNP, NTproBNP)、酸化ストレスマーカー (T-Bil)が IVIG 前後で変動し、効果の指標となり得ると考えられた。また、軽症例でも炎症マーカー (CRP)、酸化ストレスマーカー (T-Bil)は IVIG 不応例で改善不良であった。また、Adipocytokine の中で Resistin は HMW Adiponectin などの他のアディポサイトカインと異なり、IVIG 療法の効果を判定できる有意なマーカーと考えられる。

4) 血管炎の新基準に関する国際会議

これまでの日英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 月に討論に参加したチューリッヒでの EULAR/ACR の分類基準の見直しことをきっかけに、Wegener については、Granulomatous with polyangiitis (GPA)に確定した (Ronald J. Falk *et al.* ARTHRITIS & RHEUMATISM 2011; 63: 863-864)。それに基づき、現在、DCVAS Study (ACR/EULAR endorsed study to develop new classification and diagnostic criteria for primary systemic vasculitis)により欧州・米国・日本をはじめ、世界各国の関連施設の登録により検証が進められている。日本からも血管炎関連の班を中心として施設から登録が開始させている。本件と関連して、2012 年 3 月末、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した。

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

申請中：新規血管炎の検査方法および検査用試薬

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

分担研究者 亀岡洋祐 (独)医薬基盤研究所 難病資源研究室 主任研究員

分担研究者 大島正道 国立感染症研究所・免疫部 室長

協力研究者 小浦美奈子²、長尾朋和³、内田敬子¹、竹内喜久子¹、
松田潤一郎²、鈴木和男³

1. 独立行政法人医薬基盤研究所・難病資源研究室
2. 独立行政法人医薬基盤研究所・疾患モデル小動物研究室
3. 千葉大学院医学研究院・免疫発生学・炎症制御学

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の Fab の単鎖として構築した。1000 クローンの解析より 178 クローンの完全タンパク発現クローンを得、ポリクローン混合培養より組み換えタンパク精製し、0.3mg 精製票品/1L を実現した。エンドトキシン混入を最小限とし、力価判定用モデルマウスへの接種が可能なレベルまで精製した標品を得、本標品を用いて ANCA 関連血管炎モデルマウス SCG/Kj に投与しその生物活性を検討した。その結果、末梢血血液像および脾臓の腫大抑制において現在臨床で使用されているグロブリン製剤の 1/10 以下の濃度で同等の成績を得ており、人工ガンマグロブリンとしての現実の製剤化に近づいたと思われる。最終年度は製剤として実現するために、精製票品からのエンドトキシンの除去について検討を行った。

三年間の研究により、前臨床試験に向けた安全な大規模バッチの人工ガンマグロブリンの作成を可能とすることができた。

A. 研究目的

第1期及び第2期人工ガンマグロブリン研究班の研究により開発された人工ポリクローナルガンマグロブリンはマウス型およびヒト型人工ポリクローナルガンマグロブリンにおいて、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ている。これまで

の検討から、抗体分子内の可変領域である scFv を用いると治療効果があり、Fc 領域を用いても効果がみられないことから、scFv における多様性が治療効果を上げるために重要であることが推察されている。昨年度までの分担研究で、主要な結合活性を担う VH と CH1 および hinge を含む VH-CH1-h フラグメントを再構築しライブラリーを作成、

再度クローニングを行い、その構成クローンからランダムに1000クローンを選択し塩基配列を決定すると共に、個々のクローンでのタンパク発現を抗ヒトFab抗体を用いたウエスタンブロット法によりヒトScFvタンパク発現を解析した。クローンの配列解析をもとにクラスター解析により有効クローンの選択を行った。

選択された有効クローンの混合バッチを作成し、大量培養を行って、精製h ScFvの作成を試み、エンドトキシンの除去方法について検討を行った。

また、得られた精製h ScFvを用いてANCA関連血管炎モデルマウスSCG/Kjに投与し生物学的活性の評価を行った。

これらの投与実験において、微量ではあるがエンドトキシン混入の影響は否定できない。最終年度には安全な組換えタンパク精製票品を得る目的から、エンドトキシンの除去方法について検討を行った。

B. 研究方法

VH-CH1-hinge-6xHis の構成による人工ガンマグロブリン重鎖 Fab の単鎖フラグメントとして設計し図-1 のようにプライマー、ベクター組み込みを設定した。

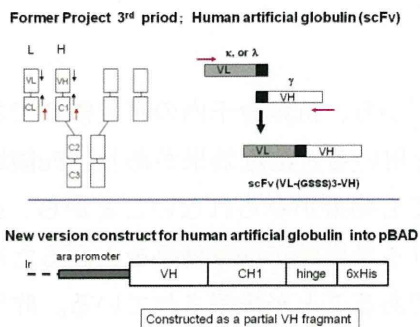


図-1

健康人末梢血単球画分より得られた

totalRNA より VH-CH1-hinge 領域 c DNA を RT-PCR により増幅し pBAD ベクターにクローニングし、2 万クローンを含むライブラリーを作成し、その中からランダムに 1000 クローンを抽出した。塩基配列解析によりガンマグロブリン VH-CH1-hinge を正しく 発現できるクローンを選択しアミノ酸配列を用いて図-2 に示すようにクラスター解析を行った (特許申請のためクローン名は非表示)。これらのクローンについて、菌体抽出液をウエスタンブロットし抗ヒト Fab 抗体によりグロブリンペプチドの発現を確認した。

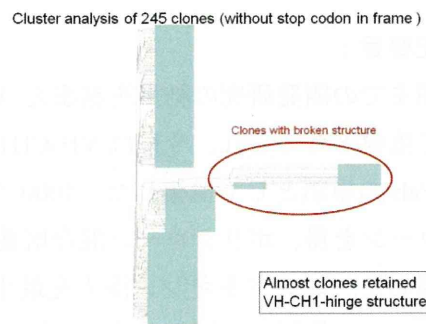


図-2 アミノ酸配列クラスター解析

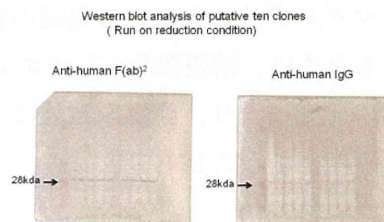


図-3 抗ヒト Fab 抗体による検出例

ガンマグロブリン VH-CH1-hinge のポリックローンミックスバッチの大量培養を行い、組み換えタンパク抽出精製を図-4 に示す方法で行った。

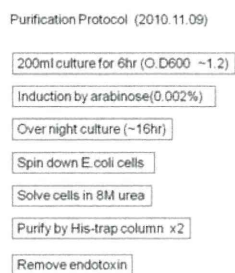


図-4 タンパク精製ステップ

SCG/kj マウスへの投与実験は図-5 に示すように、10 週齢メスマウスに対して、腹腔内投与を 3dose で行い、対照としてヒトグロブリン製剤の適用量に従った 400mg/kg/day を 5 日間連続投与した。3 週間の経過観察の後、麻酔下で血液、腎臓、肺、心臓、脾臓を採材し、重量測定、血液成分分析を行った。

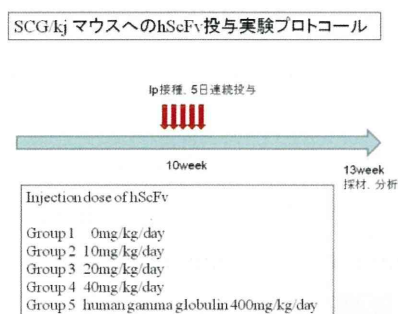


図-5 投与実験プロトコール

精製した組み換えタンパクからのエンドトキシン除去は、アルカリ変性法を処理条件を変えて行い、エンドトキシン吸着除去剤ETクリーンによる吸着法による除去、エンドトキシン除去用フィルター PosidyneELD フィルターによるキャプチャー法の 3 種類の方法を検討した。また効果

が比較的高いアルカリ変性法とエンドクリーンによる吸着除去法の組み合わせによる除去を試みた。

C. 研究結果

本年度作成したガンマグロブリン VH-CH1-hinge 組み換え体クローンライブラリーよりランダムに抽出した 1000 クローンの解析結果は図-6 に示すように、1000 クローン中、約 4 分の 1 の 245 クローンが His タグが付加されたタンパクを発現できるものであり、その内の 224 クローンがガンマグロブリン VH-CH1-hinge をコードしていた。さらに 46 クローンが重複していたので、ユニーククローンとしては最終的に 178 クローンのガンマグロブリン VH-CH1-hinge クローンを得た。

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 brokenstructure)
- 46 clones were redundant in 224

178 unique clones could be obtained from one thousand

図-5 クローンの配列解析結果

得られた 178 クローンのミックスバッチ培養を行い菌体タンパクを抽出して、図-4 に示す方法でタンパク精製を行った。精製した hScFv の SDS PAGE 染色とウエスタンブロットによる性状解析結果を示す。