

20123/105A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

多発性硬化症の新規免疫修飾薬を  
検証する医師主導治験  
(H24-難治等（難）—一般—007)

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山 村 隆

平成25年（2013年）3月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

多発性硬化症の新規免疫修飾薬を検証する医師主導治験

(H24-難治等（難）一般-007)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山村 隆

平成 25 年（2013 年）3 月

# 目 次

I. 総括研究報告	
■ 多発性硬化症の新規免疫修飾薬を検証する医師主導治験 山村 隆	1
II. 分担研究報告	
■ OCH-NCNP1 医師主導治験に関する研究 立石智則	5
■ OCH 医師主導治験 STEP-1 試験の実施経過について（臨床サイドから） 三宅幸子	7
■ OCH 医師主導治験 STEP-1 試験の免疫学的解析結果について 荒浪利昌	10
■ 核内受容体を標的とする治療物質の探索 大木伸司	12
■ 視神経脊髄炎の脳血流 多発性硬化症との比較 小川雅文	16
■ 多発性硬化症における MRI 拡散強調画像を利用した中枢温度に 関する探索的研究 佐藤典子	18
■ ビタミン D 応答遺伝子群のゲノムワイドレベルの解析： MS 発症における意義 佐藤準一	20
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷	35

# 総括研究報告

## 多発性硬化症の新規免疫修飾薬を検証する医師主導治験

研究代表者 山村 隆 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

NKT細胞を標的とする経口免疫修飾薬OCHを実用化するために、本研究ではMS患者を対象とした臨床試験(First in Human試験, POC試験)を医師主導治験として実施している。国立精神・神経医療研究センター(NCNP)病院において、健常者被験者を対象とするSTEP1試験を進め、OCHの安全性および薬物動態の評価が進んでいる。またNCNP神経研究所や共同研究施設では、リンパ球亜分画数・機能測定、分子発現プロファイル、分子間ネットワーク解析、リンパ球増殖試験などによって、OCH薬効に関するPOCを早期に獲得するための研究を推進した。平成25年度に多発性硬化症患者を対象とするSTEP2試験を行うための準備も順調に進んでいる。

### 研究分担者：

小川雅文  
国立精神・神経医療研究センター 医長  
佐藤典子  
国立精神・神経医療研究センター 部長  
立石智則  
国立精神・神経医療研究センター 室長  
三宅幸子  
国立精神・神経医療研究センター 室長  
大木伸司  
国立精神・神経医療研究センター 室長  
荒浪利昌  
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) 化学ファカルティ長  
木村円  
国立精神・神経医療研究センター 室長  
福田昂一  
国立精神・神経医療研究センター 室員  
米本直裕  
国立精神・神経医療研究センター 室長  
服部正平  
東京大学大学院 教授  
村田美穂  
国立精神・神経医療研究センター 部長

### A. 研究目的

多発性硬化症(MS)は主に若年者に発症する慢性の中枢神経系炎症疾患である。MSは終生に及ぶ医療介入の対象になるが、インターフェロンβなどの従来薬の効果は限定的であり、分子標的医薬には長期投与を躊躇させる重大な副作用(PMLなど)がある。当センター(NCNP)では平成21年度より医療スーパー特区制度の支援を受けて、NKT細胞標的糖脂質OCH(Nature 2001)をMSの安全な治療薬として実用化する準備を進めて来た。OCHはNCNPの保有する物質特許が内外で成立し、コンプライアンスに優れる経口薬で、動物モデルで顕著な有効性が確認されている。21年度より非臨床試験、GMP原薬合成、バイオマーカー探索、臨床試験実施体制の整備等を進めてきた。本研究の目的は、医師主導治験を実施してOCH薬効のPOCを獲得し、速やかに企業共同の早期フェーズ2試験に移行する体制を整えて、OCHの医薬品開発を実現することにある。

### B. 研究方法

医薬品機構(PMDA)との協議を経て、24年度には治験プロトコルを策定し、NCNP病院の関連部局との協議の上、治験実施体制を整えた。安全性検討委員会、緊急時医

療体制の構築、患者試料の保管・取り扱いに関するSOPや医師勤務体制の構築に関しては、NCNPのTranslational Medical Center (TMC) 立石室長と病院村田部長を中心とした関連部局の大きな貢献があった。その他の支援業務はCROが担当し、研究所ではフローサイトメーター、マイクロアレイ等により、OCHの薬効に関連する免疫系の変化を捉えるとともに、臨床治験実施に有用なバイオマーカーの探索を進めた。

(倫理面への配慮)

＜研究対象者に対する人権擁護上の配慮、不利益・危険性の排除や説明と同意（インフォームド・コンセント）への対応状況＞

臨床試験は「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（GCP）」に沿って実施している。臨床試験計画はヘルシンキ宣言に準拠して立案し、その概要については、医薬品医療機器総合機構（PMDA）との対面助言において合意を得た。試験計画及び試験説明文書は国立精神・神経医療研究センター 治験審査委員会（NCNP IRB）の審査を受け、NCNP IRBの承認後に試験を開始している。

## C. 研究結果

本年は修正版治験プロトコルを24年9月20日PMDAに提出し(受付番号24-2687)、30日調査に伴う試験計画書等変更を経て10月末にIRB承認を受けた。11月5日には被験者スクリーニングを開始し、第一回安全性検討委員会、第一回モニタリングを経て、11月23日は臨床試験登録を完了した（ID: UMIN000009382）。11月27日には健常者を対象としたSTEP 1を開始し、これまでにコホートAおよびコホートB（各々3例）に対する投薬が終了している（平成25年2月）。想定範囲内の遅れはあるが、すべて計画通りに進捗し、臨床評価、MRI解析、サンプル収集・調製も問題なく機能した。また整備したフローサイトメーター等の解析機器はフル稼働している。病院および研究室のOCH対応スタッフ（部長、医長、室長、技術員）の指揮系統や連絡体制の構築にも成功して

おり、NCNPとして2番目の医師主導治験（国産医薬としては初めて）は想定された以上のスピードで進んでいる。

OCH医師主導治験に関連する直接の論文業績はまだないが、フローサイトメーターによる血液プラズマブラスト測定がMSの関連疾患NMOの疾患活動性バイオマーカーとして有用であること等を報告した（PNAS 2011）。なおスタンフォード大学やメイヨークリニックで追試に成功し、NMO臨床評価の標準的検査になる可能性が出ている。

## D. 考察

近年、マウスとヒト免疫系の相違点に関する認識が深まり、マウスで得られた研究成果に甘んじることなく、ヒトで確証を得ることが求められる時代になって来た。例えば抗CD25（IL-2受容体 $\alpha$ 鎖）抗体は、マウスでは自己免疫を誘導することが報告されているが、ヒト多発性硬化症に対する有効な治療法であることが明らかになりつつある。本研究で実施中のOCHのFirst in Human試験は、OCH開発を促進するだけでなく、ヒトNKT細胞の機能に関する、きわめて重要な知見をもたらしてくれることを確信しており、次年度以降の研究の発展が大いに期待できる。

## E. 結論

OCHの開発は、シーズ発見、前臨床試験、医師主導治験までを一貫してNCNPで実施するという例のない試みであるが、予期された以上の成果をもたらしつつある。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Toba, T., K. Murata, J. Futamura, K. Nakanishi, B. Takahashi, N. Takemoto, M. Tomino, T. Nakatsuka, S. Imajo, M. Goto, T. Yamamura, S. Miyake, and H. Annoura. Synthesis and biological evaluation of

- truncated  $\alpha$ -galactosylceramide derivatives focusing on cytokine induction profile. *Bioorganic & Med Chem* 20: 2850-2859, 2012
2. Araki, M., T. Aranami, T. Matsuoka, M. Nakamura, S. Miyake, and T. Yamamura: Clinical improvement in a patient with neuromyelitis optica following therapy with anti-I-6 receptor monoclonal antibody tocilizumab. *Mod Rheum* [epub ahead of print]
  3. Kawazoe, T., M. Araki, Y. Lin, M. Ogawa, T. Okamoto, T. Yamamura, M. Wakakura, and M. Murata: new-onset type 1 diabetes mellitus and anti-aquaporin-4 antibody positive optic neuritis associated with type 1 interferon therapy for chronic hepatitis C. *Intern Med* 51: 2625-2629, 2012
  4. Sato, W., A. Tomita, D. Ichikawa, Y. Lin, H. Kishida, S. Miyake, M. Ogawa, T. Okamoto, M. Murata, Y. Kuroiwa, T. Aranami, and T. Yamamura: CCR2+CCR5+ T cells produce matrix metalloproteinase-9 and osteopontin in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J. Immunol.* 189: 5057-5065, 2012
  5. Ayzeberg, I., I. Kleiter, A. Schroder, K. Hellwig, A. Chan, T. Yamamura, and R. Gold: Interleukin-6 receptor blockade in patients with neuromyelitis optica non-responsive to anti-CD20 therapy. *JAMA Neurol* online first doi:10:1001/jamaneurol.2013.1246.
  6. Raveney Ben JE, Shinji Oki, Takashi Yamamura: Nuclear receptor NR4A2 orchestrates Th17 cell-mediated autoimmune inflammation via IL-21 signaling. PLoS ONE; published 21 Feb 2013, 10.1371/journal.pone.0056595
2. 学会発表
    1. Yamamura, T.: IL-6 signaling as therapeutic target in CNS autoimmunity. Member Society Symposium: Understanding Pathways of Immune-mediated Injury. Sponsored by JSI. *FOCiS 2012*, Vancouver, Canada, 6.20, 2012
    2. Yamamura, T.: Sendai Lecture. Translational research for neuromyelitis optica. Sendai Conference 2012. Sendai, 7.15, 2012
    3. Yamamura, T.: Efficacy of Tocilizumab for neuromyelitis optica (NMO). 2012 Neuromyelitis optica roundtable conference. A rare approach to a rare disease. Hilton LA Airport. Los Angeles, CA, 10.23, 2012
    4. Yamamura, T.: Identifying therapeutic target in the CNS autoimmune disease: The case of neuromyelitis optica (NMO). 2012 International Conference of Inflammation, Cancer, and Metabolic Syndrome, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, 11.3, 2012
    5. Yamamura T.: Interrogating innate immunity and key environmental interactions. Keystone Symposium, *Multiple Sclerosis*, Jan 11 - 16, 2013, at the Big Sky Resort in Big Sky, Montana
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
詳細は R&D パイプライン管理システムに登録済み。
  2. 実用新案登録  
該当なし
  3. その他  
該当なし

# 分担研究報告



## OCH-NCNP1 医師主導治験に関する研究

研究分担者 立石 智則 国立精神・神経医療研究センター 臨床研究支援室長

### 研究要旨

OCH-NCNP1 の First in human 試験を医師主導治験として開始した。現在までに単回投与試験である STEP1 の A 及び B コホートを終了したが、Grade1 の有害事象を 5 件観察した。うち 2 件は白血球減少であり、治験薬との関連性ありと担当医師により判定された。いずれも処置なく経過観察のみで回復している。血中薬物濃度は B コホートより全例で検出限界以上となったが、非臨床試験において安全性の確認された暴露量には十分な余地があった。

### A. 研究目的

通常の治験では健常成人を対象とする Phase I で治験薬の安全性や薬物動態を確認することから始めることが一般的であるが、本薬開発では First in human 試験として単回及び反復投与ともに多発性硬化症患者を対象とした早期探索的臨床試験として実施することを計画した。PMDA との対面助言では初回投与量について議論となり、単回投与では当初の設定よりも低用量からの開始とすることが安全な実施に寄与すること及び低用量からの開始に伴い対象は患者ではなく健常被験者への変更も検討することを助言された。この PMDA の助言に従い、安全性を確認しつつ OCH-NCNP1 に対する反応性と薬物動態を、健常者を対象とした単回投与及び患者を対象とした反復投与において検討することが本研究の目的である。

### B. 研究方法

本治験を開始するにあたり、初回治験届を平成 24 年 9 月 20 日に PMDA へ提出し 10 月 16 日に調査終了の連絡を受けた。本治験は医師主導治験であることから、初回治験届の調査に伴うプロトコール等の変更がセンター IRB で承認された後に治験を開始した。STEP1 は 7 コホートからなる非盲検・単群の用量漸増単回投与試験であり、健常被験者を対象とした。

### C. 研究結果

プロトコール等の変更は 10 月 26 日にセンター IRB で承認され、その後被験者の募集・スクリーニングを開始した。平成 25 年 2 月 8 日現在 2 コホートが終了したが、A コホートでは OCH-NCNP1 0.3mg を、B コホートでは OCH-NCNP1 1.0mg をそれぞれ 3 名の健

常被験者に投与した。A コホートでは 1 例に 3 件(ヘモグロビン・ヘマトクリットの低下、白血球数の低下及び総ビリルビン値上昇(いずれも Grade1))、B コホートでは 2 例に 2 件(白血球数の低下及び血小板数の低下(いずれも Grade1))の有害事象を認めた。血中薬物濃度測定では A コホート(0.3mg 投与)においても 1 例で、また B コホート(1.0mg 投与)では全例で検出限界(0.3ng/mL)以上を示し、B コホートでの Cmax 及び AUC はそれぞれ  $1.49 \pm 0.83 \text{ ng/mL}$  及び  $87.1 \pm 21.5 \text{ ng} \cdot \text{h/mL}$  であった。

### D. 考察

これまでに認められた有害事象と治験薬との関連性について、白血球数減少のみ関連性ありとの担当医師の判断であり、他 3 件について関連性は不明と判断された。今後高用量でのコホートではこれらの有害事象について注意深く安全性の評価を行う予定である。血中薬物濃度測定では本治験の最小用量でありながら検出限界を超えた血中濃度を呈したことから、ヒトにおいては本薬の吸収は比較的安定している可能性もあり、非臨床試験において安全性の確認された暴露量(Cmax 222 ng/mL 及び AUC<sub>0-24h</sub> 3640ng・h/mL)に留意しながら増量する必要がある。現在の所、PK と有害事象発現の関連性は明らかではない。

### E. 結論

本治験の A 及び B コホートでは Grade1 の有害事象を 5 件認めたものの、安全性における問題点はないと考えた。

### F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

立石智則 NCNP における創薬の経験－医師  
主導治験として早期探索的臨床試験を企画し  
て－ シンポジウム 12 (これからの臨床試験  
のスタイル－from bench to bedside－) 第 22  
回日本臨床精神神経薬理学会第 42 回日本神  
経精神薬理学会合同年会 2012 年 10 月 宇  
都宮

## 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等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)  
分担研究報告書

OCH 医師主導治験 STEP-1 試験の実施経過について (臨床サイドから)

研究分担者 三宅 幸子 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  
研究協力者 荒木 学 国立精神・神経医療研究センター病院 病院専門職

**研究要旨**

「健康成人及び多発性硬化症患者を対象とした免疫修飾薬 OCH-NCNP1 の早期探索的臨床研究」は、多発性硬化症に対する免疫修飾薬 OCH-NCNP1 の安全性の検討、薬効に関連するマーカーの探索及び薬物動態学的検討を行うことを目的とする。平成 24 年 11 月より健康成人を対象とした単回投与、用量漸増単一施設非盲検試験 (STEP-1) を開始した。被験者スクリーニングでクオンティフェロン陽性 1 名と肝機能障害 2 名を不適格と判断した。コホート A (OCH-NCNP1 0.3 mg) 3 名終了時点で、重篤な有害事象の発現はなかったが、ヘモグロビン・ヘマトクリット低下 (Grade 1)、白血球低下 (Grade 1)、総ビリルビン高値 (Grade 1) の検査データ異常を認めた。現時点での治験薬との因果関係は不明であるが、ベースライン値への回復を経過観察すると共に、更なる症例の累積が必要であると思われる。

**A. 研究目的**

「健康成人及び多発性硬化症患者を対象とした免疫修飾薬 OCH-NCNP1 の早期探索的臨床研究」は、多発性硬化症に対する免疫修飾薬 OCH-NCNP1 の安全性の検討、薬効に関連するマーカーの探索及び薬物動態学的検討を行うことを目的とする。

**B. 研究方法**

健康成人 21 名 (男性 17 名, 女性 4 名) を対象とし, OCH-NCNP1 は 単回投与で 0.3mg, から開始し (コホート A), 安全性を検討しながら 1mg (コホート B), 3mg (コホート C), 10mg (コホート D), 30mg (コホート E), 100mg (コホート F), 300mg (コホート G) の順に漸増する。各コホートは 3 名で, コホート D 以降は女性 1 名を組み入れる。

評価項目は, 1) 主要評価項目として, 有害事象発現の有無, 有の場合その程度。2) 副次的評価項目は, 1) 薬効に関する免疫学的マーカーの探索, 2) 薬物動態, 3) 総合障害度評価尺度 (EDSS) 及び機能別障害度 (FS), 4) MRI 画像。  
(倫理面への配慮)

本治験は, 補治験実施計画書, 薬事法第 14 条第 3 項および第 80 条の 2 に規定する基準, 平成 9 年 3 月 27 日付厚生省令第 28 号「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」及び当該省令関連通知, ヘルシンキ宣言を遵守して実施される。

**C. 研究結果**

2012 年 11 月 5 日から被験者のスクリーニングを開始し, これまで 12 名のスクリーニングを施行した。すべて男性で, 平均年齢は  $33.5 \pm 7.5$  歳 (23~48 歳)。3 名はスクリーニングで不適格と判断した。その理由は, クオンティフェロン陽性 (1 名) と肝機能障害 (2 名) であった。

スクリーニング検査で適格と判断した 4 名 (予備被験者 1 名を含む) をコホート A の被験者として, 2012 年 11 月 27 日にコホート A を開始した。被験者の EDSS と FS は全て 0 であった。頭部 MRI 画像は, 1 名に大脳白質の T2/FLAIR 高信号域を認めたが, 同年齢の健康成人でも認められる非特異的な所見と判断した。被験者 A-1 は OCH-NCNP1 0.3mg 単回内服後の明らかな有害事象の発現なく退院した。被験者 A-2 は入院日 (内服前日, ベースライン)

の肝酵素の上昇を認め内服不適格と判断し、同日入院の予備被験者 A-4 への投与に変更した。

コホート A における有害事象の発生については、3 名とも自覚症状を伴う事象は発生しなかった。被験者 A-4 について、OCH-NCNP1 内服後の Day 2 にヘモグロビンの低下 (13.4 g/dL) と白血球減少 (ベースライン 6570 / $\mu$ L, Day 2 3590 / $\mu$ L) を認め、Day 3 に白血球減少を認めた (3480 / $\mu$ L)。無治療で経過観察し、ヘモグロビンは Day 3、白血球数は Day 6 に施設基準値内に回復した。また、同被験者は総ビリルビンがスクリーニング時より高値であり (1.49 mg/dL)、ベースラインの 1.29 mg/dL に対し、退院日 Day7 に 1.65 mg/dL と上昇傾向にあったため、Day17 に再検したところ、施設基準値内に低下した。

その他、2 名の被験者が OCH-NCNP1 内服後の 48 時間の持続心電図モニターで脈拍数 50 /分未満を記録した。共に就寝中の午前 3~6 時の時間帯で、自覚症状なく医療処置は行わなかった。

コホート A 終了後の安全性検討委員会の承認を得て、2013 年 1 月 15 日からコホート B を開始した。

#### D. 考察

治験薬内服後の検査データ異常の治験薬との因果関係は現時点では不明だが、ベースライン値への回復を経過観察すると共に、更なる症例の累積が必要であると思われる。

2 名で記録された徐脈については、スクリーニングやベースラインの脈拍が 50 /分台であり、超音波検査で心機能は正常であることから、夜間就寝による生理的変動の範囲内と可能性と考えられる。

#### E. 結論

OCH-NCNP1 内服による重篤な有害事象の発現は認めなかった。有害事象は 1 名の被験者で 3 項目の発現があったが、いずれも無治療の経過観察で回復傾向にある。2 名で記録された徐脈については、夜間就寝による生理的

変動の範囲内と可能性と考えられるが、薬剤による影響の可能性も考慮し、コホート B 以降も慎重に対応する方針である。

また、スクリーニング開始当初は、血液検査のデータ異常による不適格者が相次いだことから、被験者のスクリーニング検査において、可能な範囲で血液検査を先行し、血液検査で明らかな不適格項目がない被験者のみ、MRI、腹部 CT や心臓超音波検査を行う方針としている。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Toba T, Murata K, Futamura J, Nakanishi K, Takahashi B, Takemoto N, Tomino M, Nakatsuka T, Imajo S, Goto M, Yamamura T, Miyake S, Annoura H. Synthesis and biological evaluation of truncated a-galactosylceramide derivatives focusing on cytokine induction profile. *Bloorg Med Cehm* 20:2850-2859, 2012

2) Sato W, Tomita A, Ichikawa D, Lin Y, Kishida H, Miyake S, Ogawa M, Okamoto T, Murata M, Kuroiwa Y, Aranami T, Yamamura T. CCR2+CCR5+ T cells producing matrix metalloproteinase-9 and osteopontin in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Immunol* 189:5057-5065, 2012

##### 2. 学会発表

1) Miyake S. Innate lymphocytes in autoimmune diseases. 8th International Congress on Autoimmunity, Granada, Spain, 10 May, 2012

2) Miyake S. MAIT cells in autoimmune diseases. FOCIS (Federation of Clinical Immunology Societies) 12th Annual Meeting, Vancouver, Canada, 20 June, 2012

3) Miyake S. Regulation of autoimmune responses in multiple sclerosis. Joint Symposium MPI of Psychiatry and NCNP (Japan), Munich, Germany, 4 October, 2012

4) 三宅幸子 : 自然リンパ球と自己免疫. 第 56 回日本リウマチ学会, 東京、4 月 27 日、2012

5) 三宅幸子 : MAIT 細胞と自己免疫. 第 40 回日本臨床免疫学会シンポジウム, 東京、9 月 27 日、2012

6) 三宅幸子 : 自己免疫と腸管免疫・腸内免疫. 第 27 回日本臨床リウマチ学会シンポジウム, 神戸、11 月 24 日、2012

7) Chiba A, Naoto T, Hayashi E, Matsudaira R, Toyama S, Takasaki Y, Miyake S : Mucosal associated invariant T cells in patients with autoimmune diseases. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会、東京、4. 26, 2012

8) 千葉麻子、田村直人、松平蘭、高碕芳成、山村隆、三宅幸子 : Mucosal-associated invariant T 細胞の抗原非特異的活性化機序の解析、第 40 回日本臨床免疫学会、東京、9. 27, 2012

9) CHIBA Asako, YAMAMURA Takashi, MIYAKE Sachiko : Cytokine mediated activation of Mucosal-associated invariant T cells. 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会、神戸、12. 7, 2012

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

詳細は R&D パイプライン管理システムに登録済み。

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

## OCH 医師主導治験 STEP-1 試験の免疫学的解析結果について

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 組織培養研究室長

### 研究要旨

生体に投与された OCH を NKT 細胞が認識すると、NKT 細胞は活性化され、サイトカイン産生などを介して、周囲の免疫系細胞の機能に影響を与える。そこで本研究においては、OCH 投与前後に被験者より採取した末梢血リンパ球における、各種リンパ球分画の割合やサイトカイン産生能の変化を解析し、OCH の薬効評価に有用な免疫学的バイオマーカーを探索する。被験者より、投与前日および投与後数ポイントにおいて採血し、マイクロアレイ解析、血清サイトカイン解析用に検体を保存した。また、末梢血単核細胞のフローサイトメトリー解析を行った。その結果、3 人の被験者からそれぞれ、フローサイトメトリー解析に十分量の末梢血リンパ球が分離でき、フローサイトメトリー解析を実施できた。以上より、本 OCH 治験におけるバイオマーカー探索研究は、SOP に従い実施可能である。

### A. 研究目的

生体に投与された OCH を NKT 細胞が認識すると、NKT 細胞は活性化され、サイトカイン産生などを介して、周囲の免疫系細胞の機能に影響を与えることが動物実験において示唆されている。そこで本研究においては、末梢血リンパ球を用いて、各種リンパ球分画の割合やサイトカイン産生能の、OCH 投与前後での変化を解析し、OCH の薬効評価に有用な免疫学的バイオマーカーを探索する。

### B. 研究方法

1) OCH 治験 STEP1 デザイン: 1 コホートに付き、健常被験者 3 名に対して、OCH を単回経口投与する。

2) マイクロアレイ解析および血清サイトカイン解析

被験者より、投与前日および投与後数ポイントにおいて採血し、マイクロアレイ解析、血清サイトカイン解析用に検体を保存した。マイクロアレイ解析用には、Paxgene RNA 採血管に採血し、血清サイトカイン解析用には、血清採取用採血管を用いた。マイクロアレイ

用検体及び血清検体は、センター治験管理室において-80 度にて保管されている。

3) フローサイトメトリー解析

被験者より、投与前日、投与 6 時間後、1 日、2 日、6 日に採血し、比重遠心分離法により、末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) を分離した。PBMC を各種蛍光色素標識モノクローナル抗体により染色した。また、PBMC を PMA とイオノマイシン存在下で 4 時間刺激し、細胞表面蛋白を染色後、細胞を固定かつ細胞膜透過処理を行い、細胞内に固定したサイトカインの染色を行った。染色後の細胞は、8 カラーフローサイトメーターによって解析した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、全ての被験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、センター病院において採血を行った。また、被験者から得られた検体は、検体の全ての個人情報削除され、連結可能匿名化の後、当研究部に移送されている。検体には符号のみが振られている。連結表は、国立精神神経セ

ンター病院治験管理室において嚴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

マイクロアレイ解析および血清サイトカイン解析検体については、全ての検体を各採血ポイントにおいて採取でき、-80度にて保管できている。フローサイトメトリー解析については、染色方法は9パターンあり、それに伴い $1.6 \times 10^7$ のPBMCが必要となるが、3人の被験者からそれぞれ、それ以上のPBMCが分離でき、NKT細胞、各種T細胞、NK細胞、その他のリンパ球分画の割合の測定を含め、全ての染色パターンを実施出来ている。その他の点についても、SOPに従って実施可能であった。

### D. 考察

本報告書作成の時点で、治験は第2番目のコホートまで進行しており、フローサイトメトリー解析データについては、データも蓄積されています。しかし、今後特許申請の予定があり、詳細については、現時点では本報告書への記載を控えさせて頂いております。

### E. 結論

本OCH治験におけるバイオマーカー探索研究は、SOPに従い実施可能である。

### F. 健康危険情報

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Sato W et al: CCR2(+)CCR5(+) T cells produce matrix metalloproteinase-9 and osteopontin in the pathogenesis of multiple sclerosis. J. Immunol. Vol.189, No.10: 5057-65, 2012.

2. Araki M et al: Clinical improvement in a patient with neuromyelitis optica following therapy with the anti-IL-6 receptor monoclonal antibody tocilizumab.

Mod Rheumatol. Epub ahead of print, 2012

### 2. 学会発表

1. Araki M, et al: Clinical efficacy of anti-IL-6 receptor monoclonal antibody tocilizumab in three patients with neuromyelitis optica. 28<sup>th</sup> Congress of the European Committee for treatment and research in multiple sclerosis. Lyon, France. 2012

2. 荒木学、他: Tocilizumabが著効した Neuromyelitis Opticaの1例. 第24回日本神経免疫学会学術集会, 軽井沢, 2012

### H. 知的財産権の出願・登録状況

#### 1. 特許取得

詳細はR&Dパイプライン管理システムに登録済み。

#### 2. 実用新案登録

該当なし

#### 3. その他

該当なし

## 核内受容体を標的とする治療物質の探索

研究分担者 大木 伸司

(独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第六部 (室長)

研究協力者 ベン・レイバニー

(独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所 免疫研究部 (流動研究員)

### 研究要旨

多発性硬化症 (Multiple Sclerosis: MS) は、中枢神経系に分布するミエリン分子などの自己抗原に対する過剰な免疫応答を起因とする自己免疫疾患の一種である。MS の病態形成には、Th17 細胞を主体とする炎症性 T 細胞が関わることから、この自己反応性 Th17 細胞の機能を選択的かつ効率的に制御する方法の確立が喫緊の課題となっている。核内受容体であるレチノイン酸受容体を標的とした Th17 細胞制御と並行して、我々はマイクロアレイ解析から MS 患者末梢血 T 細胞で選択的に高発現することを見出したオーファン核内受容体 NR4A2 が、MS の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) でも病態とよく関連した挙動を示し、その発現亢進が病態形成に関わる自己反応性 Th17 細胞に限局することを明らかにした。さらに siRNA を用いた *in vitro* での選択的発現制御により、NR4A2 が Th17 細胞分化に必須の因子群の発現に深く関わることを示した。さらに同 siRNA を EAE マウスに *in vivo* 投与すると、病原性 Th17 細胞の IL-17 産生抑制を伴って、EAE 病態が有意に軽快することを明らかにした。NR4A2 コンディショナル欠損 (NR4A2cKO) マウスに EAE を誘導すると、初期の病態が有意に軽症化し、Th17 細胞機能が低下した。NR4A2cKO マウス病態後期には慢性病態が出現し、IL-17 産生細胞が認められた。以上より NR4A2 は、自己免疫病態を反映する疾患マーカーとして利用可能であるのみならず、新規 MS 制御法の直接の標的ともなりうる、極めて魅力的な分子であると考えられた。また NR4A2 依存性の異なる 2 種の IL-17 産生細胞が、多様な病態形成に関わる可能性が示された。

### A. 研究目的

多発性硬化症 (Multiple Sclerosis: MS) は、中枢神経系に分布するミエリン分子などの自己抗原に対する過剰な免疫応答を起因とする自己免疫疾患である。MS の病態形成には、Th17 細胞を中心とした炎症性 T 細胞が関わることから、この自己反応性 Th17 細胞の機能を選択的かつ効率的に制御する方法の確立が喫緊の課題となっている。我々は、マイクロアレイ解析から MS 患者末梢血 T 細胞で選択的に高発現するオーファン核内受容体 NR4A2 を見出し、MS の動物モデルである EAE でも病態と関連した挙動を示すことを明らかにした。そこで、病態形成に関わる自己反応性 Th17 細胞に

おける NR4A2 の機能を明らかにし、NR4A2 を標的とした新規 MS 制御法の確立を目的として、以下の研究を行った。

### B. 研究方法

ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG) 由来ペプチド (MOG35-55) あるいはヒトインターフォート受容体結合タンパク質 (hIRBP) 由来ペプチド (hIRBP1-20) をフロイント完全アジュバントと混合して得たエマルジョンを、C57BL/6J (B6) マウス皮下に免疫することで、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) あるいは実験的自己免疫性ぶどう膜炎 (EAU) を誘導した。病態マウスから末梢血、リンパ



節と脾臓を回収し、分散後フローサイトメーターを用いてヘルパーT細胞をソーティングした。標的臓器からコラゲナーゼ・DNase I 処理後にパーコール密度勾配遠心法で単核球を分離し、ヘルパーT細胞をソーティングした。IL-17 産生と IFN- $\gamma$  産生を指標に4分画したT細胞からRNAを抽出し、各画分のNR4A2発現を定量RT-PCR法を用いて解析した。マウス脾臓から分離したナイーブT細胞

(CD4+CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>CD62L<sup>high</sup>)に、Nucleofector (Amaxa社)を用いてNR4A2特異的siRNAを導入し、*in vitro*のTh17細胞誘導条件(IL-6+TGF- $\beta$ )下に固相化抗CD3抗体で刺激培養した後の上清中のIL-17産生を、ELISA法あるいは細胞内サイトカイン染色法を用いて定量した。さらに同条件で培養したT細胞における各種遺伝子群の発現を、それぞれ定量PCR法を用いて経時的に比較した。コラーゲンマトリクスに封入して安定化させたNR4A2特異的siRNAを、EAE誘導マウスに静脈投与して、病態抑制効果を検討した。NR4A2cKOマウスを作製し、同様にEAEを誘導した。脳・脊髄およびリンパ節からT細胞を分離し、刺激後のサイトカイン産生を定量した。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験にあたっては、あらかじめ当研究所の動物実験規定に沿って作成した実験計画書を提出し、実験動物委員会の承認を受けた方法に従って、実験を行った。

### C. 研究結果

MOG誘導性EAEを発症したマウスの中樞神経系(CNS)に浸潤したT細胞および末梢血T細胞中には、相当数のIL-17産生細胞、IFN- $\gamma$ 産生細胞と、IL-17/IFN- $\gamma$ 産生細胞を確認した。IL-17とIFN- $\gamma$ の産生を指標とした4群のT細胞から抽出したRNAを用いて、NR4A2発現を定量PCR解析したところ、IFN- $\gamma$ 産生の有無に関わらず、IL-17産生細胞選択的なNR4A2の発現亢進が認められ、標的臓器浸潤T細胞のIL-17産生とNR4A2発現が強く相関することが明らかとなった。また*in vitro*分化

時にNR4A2特異的siRNAを導入したTh17細胞では、NR4A2発現とIL-17産生が消失した。この時、Th17細胞のROR $\gamma$ t発現と、Th1細胞のIFN- $\gamma$ 産生はほとんど影響を受けなかった。NR4A2特異的siRNA処理により、Th17細胞分化に必須の因子であるT細胞のIL-21産生とc-maf発現、およびそれに引き続くIL-23受容体発現が強く抑制された。siRNA処理によるIL-23受容体とIL-17の産生抑制は、IL-21の添加により回復したことから、NR4A2特異的siRNAによるIL-17産生抑制は、IL-21産生に始まるサイトカイン産生カスケードの抑制によるものと考えられた。MOGペプチド免疫時に、コラーゲンマトリクスに封入したNR4A2特異的siRNAをマウスに静脈投与すると、EAE病態が顕著に軽快した。この時、末梢血T細胞のNR4A2発現は、siRNA処理群で有意に抑制されていた。さらに、CNS浸潤細胞のIL-17産生と、所属リンパ節由来T細胞の、抗原特異的IL-17産生は、いずれもsiRNA処理群で有意に抑制されていることが示された。NR4A2cKOMausにEAEを誘導すると、初期の病態が有意に軽症化し、CNS浸潤細胞のTh17細胞機能が低下した。NR4A2cKOMausを病態後期まで観察したところ、慢性病態が出現するようになり、このときCNS浸潤細胞中にIL-17産生細胞が認められた。

### D. 考察

病原性T細胞における炎症性サイトカイン産生の制御因子である可能性を有するNR4A2分子について、病態形成に深く関与することが知られているTh17細胞のサイトカイン産生と病態誘導能との機能的な相関を詳細に解析した。T細胞のNR4A2発現上昇はIL-17産生細胞に限局して認められ、IFN- $\gamma$ 産生能とは相関しなかった。*in vitro*で分化させたTh17細胞のIL-17産生がNR4A2特異的siRNA処理によりほぼ完全に消失したことから、NR4A2がエフェクターT細胞のIL-17産生に至るT細胞分化過程に重要な役割を果たすと考えられた。さらにNR4A2は、Th17細胞分化に必要なIL-21産生・c-maf発現と、引き続くIL-23受容体発現を制

御することが示され、とくに NR4A2 の機能には IL-21 の産生制御が重要な役割を果たす可能性が示された。コラーゲンマトリクス封入 siRNA の投与により、EAE 病態と、これに 관련된 Th17 細胞応答が有意に抑制されたことから、T 細胞の NR4A2 発現を人為的に抑制することで、病態の改善が期待できることが示された。NR4A2cKO マウスを用いた解析においても、NR4A2 が EAE 病態発症と Th17 細胞機能に極めて密接に関わることが確認された。以上より、NR4A2 が自己反応性 T 細胞の IL-17 産生および Th17 細胞機能に極めて強く相関する重要な免疫応答制御因子であることが示された。NR4A2 阻害効果を有する低分子化合物を探索することで、全く新しいクラスの自己免疫疾患治療薬候補が得られる可能性が高まった。また NR4A2 非依存性の IL-17 産生細胞の存在が明らかとなったことは、多様な MS 病態を理解する上で、極めて重要な知見であると考えられた。

## E. 結論

NR4A2 は、自己応答反応時に出現する IL-17 産生性 T 細胞の機能に密接に関連する、重要な免疫制御因子であることが明らかとなり、新規自己免疫疾患治療法の開発に向けて、極めて魅力的な標的分子の候補と考えられた。

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Ben JE Raveney, Shinji Oki, Takashi Yamamura

Nuclear receptor NR4A2 orchestrates Th17 cell-mediated autoimmune inflammation via IL-21 signaling

PLoS ONE; published 21 Feb 2013, 10.1371/journal.pone.0056595

Shinji Oki, Benjamin JE Raveney, Yoshimitsu Doi, Takashi Yamamura

Versatile Orphan Nuclear Receptor NR4A2 as

a Promising Molecular Target for Multiple Sclerosis and Other Autoimmune Diseases. 193-200, 2012, In; Chembiomolecular Science - At the Frontier of Chemistry and Biology - Springer, Ed. Masakatsu Shibasaki et al.

## 2. 学会発表

[国際学会]

Raveney B., S. Oki, T. Yamamura: NR4A2 controls Th17-mediated autoimmunity 12th Annual Conference of FOCIS (FOCIS2012), Vancouver, Jun. 20th--23rd, 2012

Chihara N., S. Oki, T. Matsuoka, W. Sato, Y. Lin, T. Okamoto, M. Ogawa, T. Toda, S. Miyake, T. Aranami, T. Yamamura: Activated Plasmablasts Migrate to the Central Nervous System 12th Annual Conference of FOCIS (FOCIS2012), Vancouver, Jun. 20th--23rd, 2012

Raveney B., S. Oki, T. Yamamura: Acute autoimmune inflammation of the central nervous system by IL-17-secreting T cells is controlled by NR4A2 The 10th International Congress of Neuroimmunology, Boston, Nov. 4th- 8th, 2012

[国内学会]

大木 伸司、ベン・レイバニー、山村 隆: 中枢神経系の炎症性自己免疫病態形成に関わる IL-17 産生性 T 細胞群の解析 第 24 回日本神経免疫学会学術集会、Sep, 20th-21st, 2012

S. Oki, Raveney B., T. Yamamura: Acute autoimmune inflammation of the central nervous system by IL-17-secreting T cells is controlled by NR4A2 International Symposium on Glyco-minded Biology of Diseases as a Basis of Pharmaceutical Sciences, Nov.30th-Dec.1st, 2012

Raveney B., S. Oki, T. Yamamura : NR4A2  
controls Th17-mediated autoimmunity 第41  
回 日本免疫学会総会・学術集会、Dec. 5th-7th,  
2012

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

発明の名称：siRNA、この siRNA を発現する組  
換えベクター、NR4A2 遺伝子発現抑制剤、IL-17  
遺伝子発現抑制剤、および、CD4 陽性 T 細胞増  
殖抑制剤

出願番号：特願 2009-501299

出願日：2008年2月28日

登録番号：特許第 5098033 号

登録日：2012年10月05日

発明・考案・創作者名：大木伸司、北條浩彦、  
三宅幸子、山村隆

権利者名：財団法人ヒューマンサイエンス振  
興財団

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 視神経脊髄炎の脳血流 多発性硬化症との比較

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  
研究協力者 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長

### 研究要旨

当施設にて ECD-SPECT を用い平均大脳血流量を Patlak 法で測定した多発性硬化症 (MS) 20 例、視神経脊髄炎 (NMO) 10 例について検討した。NMO については視神経炎と脊髄炎があり抗 AQP4 抗体が陽性か 3 椎体長以上の脊髄病変を認めるものを選択した。NMO は全例女性、年齢  $54 \pm 10.9$  歳、罹病期間  $10.5 \pm 9.5$  年、MS 症例は男性 7 例女性 13 例、年齢  $44 \pm 16.3$  歳、罹病期間  $6.9 \pm 6.3$  年で NMO 症例がより高齢で罹病期間も長かったが統計的には有意差はなかった。EDSS は NMO 例で  $4.6 \pm 2.5$  MS 例では  $3.6 \pm 2.3$ 、MMSE は NMO 例で  $26.6 \pm 2.5$  MS 例では  $25.0 \pm 4.5$  とともに有意差はなかった。脳血流は NMO 例で  $38.7 \pm 2.9$  MS 例では  $41.7 \pm 4.1$  (単位 ml/100g/分) で有意に NMO 例が低かった。NMO 例では 5 例に大脳に脱髄性の病変があり残り 5 例は病変がないか非特異的な白質病変のみであったが病変の有無では脳血流に差はなかった。NMO では平均脳血流量と MMSE が相関したが年齢や罹病期間、EDSS とは相関しなかった。NMO でも脳病変の有無にかかわらず脳血流低下があることは間違いなく大脳の機能低下を示し病態の指標になりうると思われた。

#### A. 研究目的

これまでの検討で多発性硬化症 (MS) 患者では脳血流が低下し大脳萎縮や高次脳機能スケール (MMSE) とは相関するが MRI で描出される白質病変容積や日常生活能力とは相関せず、MRI による病巣容積とは別種の病勢の指標になることを示した。一方視神経脊髄炎 (NMO) では以前から高次脳機能の低下が報告され最近になり皮質病変あるいは皮質機能低下の報告がなされている。そこで今回は NMO の脳血流について MS 症例と比較検討した。

#### B. 研究方法

当院に受診し NMO あるいは MS と臨床診断され ECD-SPECT で脳血流を測定した症

例を選択した。抗 AQP4 抗体未測定例や MRI で MS・NMO 以外の病変を認めたもの、EDSS や MMSE が記載されていないものは除外した。NMO については視神経炎と脊髄炎があり抗 AQP4 抗体が陽性か 3 椎体長以上の脊髄病変を認めるものを選択した。脳血流は通常の 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。統計は群間差には分散分析を用い危険率 5%以下を有意とした。

#### C. 研究結果

今回検討できたのは 30 例、NMO 10 例 MS 20 例だった。NMO は全例女性、年齢  $54 \pm 10.9$  歳、罹病期間  $10.5 \pm 9.5$  年、MS 症例は男性 7 例女性 13 例、年齢  $44 \pm 16.3$  歳、罹