

201307041A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

ドラッグ・リポジショニングによる視神経脊髄炎（NMO）

の治療薬開発に関する研究（H25-創薬-一般-004）

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山村 隆

平成 26 年（2014 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

ドラッグ・リポジショニングによる視神経脊髄炎（NMO）

の治療薬開発に関する研究（H25-創薬-一般-004）

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山村 隆

平成 26 年（2014 年）3 月

目 次

I. 総括研究報告

- ドラッグ・リポジショニングによる視神経脊髄炎（NM0）の
治療薬開発に関する研究 山村 隆 1

II. 分担研究報告

- 多発性硬化症病態におけるインターロイキン6依存性
プラズマブラストに関する研究 山村 隆 5
- バイオマーカー探索に関する研究 三宅幸子 8
- ドラッグ・リポジショニングによる視神経脊髄炎（NM0）の
治療薬開発に関する研究 楠 進 11
- MS活動性脳病巣の反応性アストロサイトにおけるKir4.1の高発現
佐藤準一 13

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 23

IV. 研究成果の刊行物・別刷 25

総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業
総括研究報告書

ドラッグ・リポジショニングによる視神経脊髄炎（NMO）の治療薬開発に関する研究

研究代表者 山村 隆 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 部長
研究協力者 中村 雅一 同 流動研究員
松岡貴子 同 研究生
佐藤和貴郎 同 室長
荒木 学 独) 国立精神・神経医療研究センター病院神経内科 医療専門職

研究要旨

視神経脊髄炎（neuromyelitis optica; NMO）は、抗アクアポリン4（AQP4）抗体が関与し、再発性の視神経炎と脊髄炎を来す疾患である。重症例では、高度の視力低下、神経痛様疼痛などを後遺症として残し死亡例も経験される。申請者らはNMO患者末梢血で、抗AQP4抗体を産生するplasmablast (PB)が有意に増加していること、PBの機能や生存がサイトカインIL-6に依存し、IL-6シグナル標的治療がNMOの根本的治療になる可能性を提唱した（Chihara et al. PNAS 2011）。そこで倫理委員会承認のもとに、関節リウマチの治療薬抗IL-6受容体抗体（Tocilizumab）のNMOに対する適応外使用に関する臨床研究を開始した。第1例ではTocilizumab投与後、PB数減少、AQP4抗体価低下、再発抑制、疼痛の改善を認め、関連する多施設共同研究（UMIN000007866）に対する薬剤供与を開始した。また、申請者らは、PB増加を認め、NMOと類似病態が想像されるMS（PB high MS）の存在を明らかにし、この亜群に対するIL-6シグナル阻害療法を開発する研究を開始した。本研究では抗IL-6受容体抗体のリポジショニングによるNMOおよびNMO関連病態の治療法の確立を目指している。初年度には、既にNMO 8例に対するTocilizumab治療1年間の治療成果がまとまり（米国神経学会誌に印刷中）、抗IL-6受容体抗体のNMO治療における圧倒的有用性を証明できた。

研究分担者：

三宅幸子	順天堂大学医学部	教授
楠 進	近畿大学医学部	教授
佐藤準一	明治薬科大学薬学部	教授

におけるIL-6上昇などから見て、TCZはNMO病態に即した理想的治療と思われる。

本研究では早期にTCZのNMOにおける有効性を証明することを目指したが、初年度にはNMO 8例に対する1年間の治療成績がまとまり（Neurology印刷中）、この学術的成果は内外で活用されている。また、我々はMS患者の中にもplasmablast (PB)上昇例（PB high MS）が存在することを重視してきたが、初年度の研究によりPB high MSはインターフェロン β に反応せず、NMO類似病態を示し、TCZ治療の対象になり得ることを明らかにした（論文準備中）。

A. 研究目的

NMOは機能予後の不良な希少難治性疾患であり、有効性の高い治療薬開発の必要性は論を待たない。現在、申請者らによるIL-6受容体抗体によるNMO治療には世界中の研究が注目している。NMOにおけるIL-6シグナル阻害療法の有用性を示唆した最初の論文（Chihara et al. PNAS 2011）が出版されたあと、NMOに対するTocilizumab (TCZ) 治療の有効性は、申請者ら（Mod. Rheumatol 2012；Neurology 2014 (in press)）、およびドイツ2施設（JAMA Neurol 2013）から報告された。NMO

B. 研究方法

NCNP病院および近畿大学において、難治性

NMOに対するTocilizumab (TCZ) 治療を実施し、TCZの有効性と安全性を評価する（尺度は、年間再発率、EDSS、痛みNRS、疲労NRS）。また被験者の血液・髄液のリンパ球亜群の定量（フローサイトメーター解析によるplasmablast, B細胞、T細胞、NK細胞、foxp3+制御性T細胞の測定；細胞内サイトカイン染色によるTh1/Th2/Th17細胞定量）、血清抗アクアポリン4抗体測定（cell-based assay）、血清・髄液サイトカイン・ケモカイン定量、DNAマイクロアレイ解析・RT-PCR、pathway解析を実施。

NCNP通院MS症例について、血中PB数を測定し、MSとNMOの中間型が存在する可能性を検証する。

（倫理面への配慮）

本研究の実施に先立って、臨床研究プロトコルを作製しNCNP 倫理委員会の承認を得た。被験者の選択および治療はプロトコルを遵守し、患者には文書により説明。研究への参加については文書による同意を得た。

C. 研究結果

TCZ治療のPOCを得るための臨床研究は予定通りに進捗し、学会および論文発表の成果として結実した。すなわち、NMO被験者より定期的に採取した血液・髄液サンプルに対する解析は、予定通りに実施された。現在詳細な解析を進めているが、TCZ治療による血清抗アクアポリン4抗体の低下、活性化制御性T細胞の増加、CD56 high NK細胞の増加などを確認した。また1年間以上治療を受けた8名の被験者に対する臨床神経学的評価、副作用評価、MRI画像評価の解析結果については、米国神経学会誌NEUROLOGYに掲載された。

MS におけるPB解析の結果、MSはPBが少ないグループ (PB low) と高いグループ (PB high) に分かれ、PB highにインターフェ

ロンノンレスポonderの多くが含まれることが明らかになった。IL-6刺激による自己抗体産生能の評価、IL-6受容体阻害抗体の生存抑制効果の評価、それぞれの分子発現プロファイルを比較する研究が進み、PB high MSとNMOの類似性が明らかになった（論文準備中；日本臨床免疫学会および日本神経免疫学会で受賞）。一連の結果から、PB high MSは、AQP4抗体以外の自己抗体産生で特徴づけられるNMO類似疾患であることが明らかになり、この病態に対して、TCZなどのIL-6シグナル阻害療法が有効である可能性が示された。この結果をもとに、TCZをPB high MSに投与する臨床研究を倫理委員会に申請し承認を得た。

D. 考察

今回の研究でNMO に対する IL-6 シグナル阻害治療の妥当性が明らかになったと思われるが、同時に MS のなかに NMO に類似した病態を示すもの (PB high MS) があり、PB high はインターフェロンβに反応せず、TCZ 治療の対象になり得ることが示された。NMO に対する TCZ 治療の経験を重ねるとともに、正解的に見ると患者数の多い、PB high MS に対する TCZ の適用について検討を進める必要がある。

E. 結論

IL-6受容体抗体はNMO に対して有効である。次年度以降は、その作用メカニズムを解明するとともに、NMO 関連病態 (PB high MS) に対する治療的介入研究を開始する。国産医薬が NMO および NMO 関連病態 (既存薬に反応しない MS) の治療薬として国際標準薬になるように研究を効率的に進める必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Araki, M., T. Matsuoka, K. Miyamoto, S. Kusunoki, T. Okamoto, M. Murata, S. Miyake, T. Aranami, T. Yamamura: Efficacy of the anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab in neuromyelitis optica: A pilot study. NEUROLOGY (in press)

Chihara, N., T. Aranami, S. Oki, T. Matsuoka, M. Nakamura, H. Kishida, K. Yokoyama, Y. Kuroiwa, N. Hattori, T. Okamoto, M. Murata, T. Toda, S. Miyake, T. Yamamura: Plasmablasts as migratory IgG-producing cells in the pathogenesis of neuromyelitis optica. PLOS One DOI: 10.1371/journal.pone.0083036

Ayzeberg, I., I. Kleiter, A. Schroder, K. Hellwig, A. Chan, T. Yamamura, and R. Gold: Interleukin-6 receptor blockade in neuromyelitis optica patients non-responsive to anti-CD20 therapy. JAMA Neurol 70: 394-397, 2013

2. 学会発表

1. M. Araki, T. Matsuoka T. Aranami, M. Nakamura, T. Okamoto, M. Murata, S. Miyake, T. Yamamura Exploring anti-IL6 receptor monoclonal antibody tocilizumab in neuromyelitis optica ECTRIMS 2013 デンマーク、コペンハーゲン 2013年10月4日
2. T. Matsuoka, A. Chiba, T. Aranami, M. Araki M. Nakamura, S. Miyake, T. Yamamura Immunomodulatory effect of anti-IL6 receptor monoclonal Antibody tocilizumab in patients with neuromyeli ECTRIMS 2013 デンマーク、コペンハーゲン 2013年10月
3. Araki M, Matsuoka T, Aranami T, Nakamura M, Okamoto T, Murata M, Miyake S, Yamamura T Clinical Efficacy of

Anti-IL-6 Receptor Monoclonal Antibody Tocilizumab in Patients with Neuromyelitis Optica. PACTRIMS 2013 Kyoto, Japan 2013年11月7日

4. Nakamura M, Matsuoka T, Araki M, Lin Y, Sato W, Okamoto T, Murata M, Miyake S, Aranami T. Yamamura T IL-6 Signaling As a Potential Therapeutic Target In Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis with An Increased Plasmablast Frequency. PACTRIMS 2013 Kyoto, Japan 2013年11月6日
5. Araki M, Matsuoka T, Aranami T, Nakamura M, Okamoto T, Murata M, Miyake S, Yamamura T Clinical efficacy of anti-IL-6 receptor monoclonal antibody tocilizumab for the treatment of neuromyelitis optica. PACTRIMS 2013 Kyoto, Japan 2013年11月6日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願中：

再発寛解型多発性硬化症（RRMS）患者の治療予後予測方法、及び新規治療適応判断方法
特願2013-122845

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告

多発性硬化症病態におけるインターロイキン 6 依存性プラズマブラストに関する研究

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

研究協力者

中村雅一 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
松岡貴子 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 免疫研究部 研究生
荒木 学 国立精神・神経医療研究センター 病院専門職
佐藤和貴郎 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
林 幼偉 国立精神・神経医療研究センター病院 神経内科 医員
岡本智子 国立精神・神経医療研究センター病院 神経内科 医長
村田美穂 国立精神・神経医療研究センター病院 神経内科 部長
三宅幸子 順天堂大学医学部 免疫学講座 教授
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 客員研究員

研究要旨

再発寛解型多発性硬化症 (RR-MS) における第一選択薬インターフェロン・ベータ (IFN-b) に対する抵抗性例 (ノンレスポnder) は, IFN-b による悪化を特徴とする視神経脊髄炎 (NMO) と同様にインターロイキン 6 (IL-6) 依存性プラズマブラスト (PB) 介在性病態を有する可能性が疑われる. そこで, RR-MS 患者を末梢血 PB 頻度に基づき PB-low MS と PB-high MS とに分類したところ, PB-high MS に IFN-b ノンレスポnderが集積しており, NMO との類似性より同亜群病態における PB の関与が示唆された. さらに, in vitro の培養実験では同亜群における PB の IL-6 依存性の生存が示された. これらの結果から, IFN-b ノンレスポnder予測における末梢血 PB 頻度測定の有用性と IFN-b ノンレスポnderを含む PB-high MS における抗 IL-6 受容体抗体治療の有効性が期待される.

A. 研究目的

再発寛解型多発性硬化症 (RR-MS) の約 30% の症例は, 第一選択薬インターフェロン・ベータ (IFN-b) 抵抗性のノンレスポnderである. かつて視神経脊髄型多発性硬化症 (OS-MS) と分類されていた視神経脊髄炎 (NMO) は IFN-b 投与により悪化することが知られており, RR-MS での IFN-b ノンレスポnderと病態を共有する可能性が疑われる. 我々は, 視神経脊髄炎 (NMO) 病態形成に重要な抗アクアポリン 4 (AQP4) 抗体産生細胞が末梢血中で増加している B 細胞亜群プラズマブラスト (PB) であり, その生存, 及び抗体産生にインターロイキン 6 (IL-6) シグナルが必須であることを報告し (Chihara et al. 2011), NMO における抗 IL-6 受容体抗体トシリズマブの有効性も確認した (Araki et al. 2013). そこで, RR-MS 病態における IL-6 依存性 PB の関与について検討することを目的とした.

B. 研究方法

McDonald 診断基準 (Polman et al. 2011) を満たす RR-MS 65 例を対象とした. NMO としての臨床的特徴 (長大脊髄病変, 及び両側視神経炎の既往, または血清抗 AQP4 抗体陽性) を有する症例は除外した. 対象の寛解期末梢血を採取して, PB の B 細胞に占める割合 (PB 頻度, %), 及び in vitro での IL-6 存在下における PB 生存率と抗 IL-6 受容体抗体存在下における PB 頻度の変化をフローサイトメトリーにより測定した. nCounter® (NanoString Technologies 社) を用いて RR-MS 6 例の末梢血より分離した PB における遺伝子発現プロファイリングを行った. 健常人 15 例における平均 PB 頻度+2SD をカットオフ値として RR-MS 症例を PB-low MS と PB-high MS とに分類し, 両群での臨床所見と実験結果を比較した.

(倫理面への配慮)

本研究計画は当センター倫理委員会の承認を受けており、被検者より書面にてインフォームドコンセントを得た。個人情報には連結可能匿名化された後厳重に保管され、データ発表の際は、個人を特定されないよう細心の注意を払った。

C. 研究結果

RR-MS 65 例は、PB-low MS 42 例、PB-high MS 23 例に分類された。PB-high MS では PB-low MS に比して、脳 MRI における側脳室周囲 ovoid lesion の保有率が有意に低く (76.5% vs 100%, $p = 0.0213$)、PB-high MS でのみ罹病期間と Expanded Disability Status Scale (EDSS) により評価した障害度が相関していた ($r = 0.4955$, $p = 0.0162$)。IFN- β 治療歴のある 36 例においては、レスポナー 19 例全例

(100.0%) が PB-low MS であり、ノンレスポナー 17 例中 13 例 (76.5%) が PB-high MS に該当した。逆に、PB-low MS 23 例中 19 例 (82.6%) がレスポナーであり、PB-high MS 13 例全例 (100.0%) がノンレスポナーであった ($p < 0.0001$)。末梢血由来 PB の生存率は PB-high MS でのみ IL-6 存在下における有意な改善を示した ($p = 0.0078$)。末梢血単核球を各患者血清中で培養したところ、両 RR-MS 亜群において抗 IL-6 受容体抗体存在下での PB 頻度の有意な減少を認めるも ($p < 0.05$)、PB-high MS でのみ B 細胞生存促進に重要な BAFF, APRIL, または IFN- β に対する抗体よりも PB 頻度減少作用が有意に高かった ($p < 0.05$)。nCounter[®]解析では、PB-low, 及び PB-high MS 由来 PB における免疫関連遺伝子 (CDKN1A, TNFAIP3 など) 発現プロファイルの相違を認めた。

D. 考察

RR-MS において、末梢血 PB 増加を伴う亜群 (PB-high MS) が存在しており、IFN- β ノンレスポナーが集積することが明らかとなった。NMO との類似性から PB 介在性病態を有する亜群と推測され、広範な MRI 脳病巣も PB 産生性

自己抗体による高度の組織破壊性に由来する所見として矛盾しないと考えられた。罹病期間と障害度との相関は、IFN- β を含む既存治療に対する抵抗性を反映している可能性があり、改めて新規治療の必要性が示唆された。

PB-high MS 由来 PB は IL-6 依存性の生存を示し、遺伝子発現プロファイルにより in vivo における IL-6 シグナルの亢進も示唆され、同亜群における抗 IL-6 受容体抗体治療の有効性が期待される。

E. 結論

RR-MS における PB 介在性病態は IFN- β 抵抗性に関与している可能性があり、IFN- β ノンレスポナー予測における末梢血 PB 頻度測定の有効性とこれらの症例における抗 IL-6 受容体抗体の有効性が期待される

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Chihara N, Aranami T, Oki S, Matsuoka T, Nakamura M, Kishida H, Yokoyama K, Kuroiwa Y, Hattori N, Okamaoto T, Murata M, Toda T, Miyake S, Yamamura T. Plasmablasts as migratory IgG-producing cells in the pathogenesis of neuromyelitis optica. *PLoS One* 8:e83036, 2013

Nakamura, M., T. Matsuoka, N. Chihara, S. Miyake, W. Sato, M. Araki, T. Okamoto, Y. Lin, M. Ogawa, M. Murata, T. Aranami, and T. Yamamura: Differential effects of fingolimod on B-cell populations in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis J* 2014 Feb 13 [epub ahead of print]

2. 学会発表

末梢血プラズマブラスト頻度の高い多発性硬化症の臨床的特徴, 第 54 回日本神経学会学術集会, 東京, 平成 25 年 5 月

Clinical Features of Multiple Sclerosis
with High Plasmablast Frequency in
Peripheral Blood, FOCIS, Boston, Jun 2013

再発寛解型多発性硬化症における抗 IL-6 受容
体抗体治療の可能性, 第 25 回日本神経免疫学
会学術集会, 下関, 平成 25 年 11 月

再発寛解型多発性硬化症病態におけるプラズ
マブラスト, 第 41 回日本臨床免疫学会総会,
下関, 平成 25 年 11 月

Multiple sclerosis patients with an
increased plasmablast frequency may
respond to IL-6R blocking therapy, 第 42
回日本免疫学会総会, 千葉, 2013 年 12 月

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

出願中: 再発寛解型多発性硬化症 (RRMS)
患者の治療予後予測方法、及び新規治療適
応判断方法 特願2013-122845

2. 実用新案登録

なし

その他

特記事項なし

バイオマーカー探索に関する研究

研究分担者 三宅 幸子

順天堂大学医学部免疫学 教授

研究要旨

ヒト化抗 IL-6 受容体モノクローナル抗体トシリズマブ (Tocilizumab, TCZ) は、免疫疾患である関節リウマチの治療薬として効果をあげている。しかしながら、TCZ による効果を期待できるバイオマーカーはいまだに存在しない。そこで、TCZ を視神経脊髄炎に投与した症例について、末梢血免疫担当細胞を解析し、バイオマーカーの探索を行った。CD56^{high} NK 細胞の数が漸増した。MAIT 細胞は 3 例で、活性化 Treg 細胞は一例で増加しており、CD56^{high} NK 細胞の頻度の上昇はバイオマーカーの候補になると考えられた。

A. 研究目的

ヒト化抗 IL-6 受容体モノクローナル抗体トシリズマブ (Tocilizumab, TCZ) は、関節リウマチの治療薬として効果をあげている。しかしながら、TCZ による効果を期待できるバイオマーカーはいまだに存在しない。そこで、TCZ 投与により末梢血免疫担当細胞を解析し、バイオマーカーの探索を行う。

B. 研究方法

2006 年の Neurology vol. 66 の診断基準を満たす NMO 患者 4 名、抗 AQP4 抗体陽性の NMO 関連疾患 (NMOSD) 患者 1 名の 5 名について、8mg/kg の TCZ を毎月一回点滴静注投与し、各回投与前の血液検体を採取。フローサイトメトリーを用いて活性化 Treg 細胞 (activated Treg : CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺FoxP3⁺)、CD56^{high} NK 細胞 (CD3⁺CD56^{high})、MAIT 細胞 (CD3⁺ γ δ TCR⁺V α 7.2⁺CD161⁺) のリンパ球における頻度および 1ul 中の数を算出し、TCZ 治療開始後の経時変化を解析した。

(倫理面への配慮)

対象より血液サンプル採取は、文書を用いて説明し、同意を得た上で行った。

C. 研究結果

TCZ 投与により、CD56^{high} NK 細胞の数が漸増した。活性化 Treg 細胞は一例で上昇、他の 4 例でも上昇傾向を認めた。5 名の NMO/NMOSD 患者のうち 3 名で、統計学的有意差には至らなかったが、MAIT 細胞が増加していた。

D. 考察

多発性硬化症 (multiple sclerosis, MS) 患者においては、制御性 T 細胞 (regulatory T cells, Treg) は末梢血での頻度が減少することに加え、制御機能が低下していることが報告されている。また、MS 患者へのヒト化抗 CD25 抗体の投与により、効果のあった症例では、CD56^{high} ナチュラルキラー細胞 (CD56^{high} regulatory NK cells, CD56^{high} NK) が増加したことが報告され、その重要性が注目された。粘膜関連インバリアント T 細胞 (mucosal-associated invariant T cells, MAIT 細胞) は自然免疫と獲得免疫の橋渡しをする自然免疫様リンパ球である。我々は末梢血中 MAIT 細胞の頻度は MS 患者では健常者コントロール群と比較し低下しており、再発期にはさらに減少し、疾患活動性と逆相関することを見出し報告している。これらのことから、TCZ の投与は多くの免疫細胞に影響を与えて、病態に関与すると想定される細胞の変化を正常化すると考えられる。その中でも NK 細胞は有意差をもって変化し、バイオマーカーの候補になると考えられた。

E. 結論

TCZ 投与により、CD56^{high} ナチュラルキラー細胞の上昇がみられた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Noto D, Sakuma H, Takahashi K, Yamada M, Yamamura T, Miyake S. Development of a culture system to induce microglia-like cells from hematopoietic cells. **Neuropathol Appl Neurobiol** (Epub ahead), 2013

2) Chihara N, Aranami T, Oki S, Matsuoka T, Nakamura M, Kishida H, Yokoyama K, Kuroiwa Y, Hattori N, Okamoto T, Murata M, Toda T, Miyake S, Yamamura T. Plasmablasts as migratory IgG-producing cells in the pathogenesis of neuromyelitis optica. **PLOS one** 8(12):e83036, 2013

3) Di Penta A, Chiba A, Alloza I, Wyssenbach A, Yamamura T, Villoslada P, Miyake S, Vandenbroeck K. A trifluoromethyl analogue of celecoxib exerts beneficial effects in neuroinflammation. **PLOS one** 8(12):e83119, 2013

4) Araki M, Matsuoka T, Miyamoto K, Kusunoki S, Okamoto T, Murata M, Miyake S, Aranami T, Yamamura T. Efficacy of the anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab in neuromyelitis optica: A pilot study. **Neurology**, in press

2. 学会発表

1) Miyake S. Gut regulates autoimmunity. Autoimmunity Congress Asia, Hong Kong, 21 October, 2013

2) Araki M, Matsuoka T, Aranami T, Nakamura M, Okamoto T, Murata M, Miyake S, Yamamura T. Clinical Efficacy of Anti-IL-6 Receptor Monoclonal Antibody Tocilizumab in Patients with Neuromyelitis Optica. PACTRIMS 2013, Kyoto, Japan, 11.7, 2013

3) Nakamura M, Matsuoka T, Araki M, Lin Y, Sato W, Okamoto T, Murata M, Miyake S, Aranami T, Yamamura T. IL-6 Signaling As a Potential Therapeutic Target In Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis with

An Increased Plasmablast Frequency. PACTRIMS 2013, Kyoto, Japan, 11.6, 2013

4) Kadowaki A, Miyake S, Chiba A, Yamamura T. Myelin Specific T Cells in the Gut Regulate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). PACTRIMS 2013, Kyoto, Japan, 11.6, 2013

5) 三宅幸子: 腸管免疫による自己免疫調節. 第41回日本臨床免疫学会シンポジウム, 下関, 11月28日, 2013

6) 松岡貴子、千葉麻子、荒浪利昌、荒木学、中村雅一、三宅幸子、山村隆。視神経脊髄炎におけるヒト化抗IL-6受容体モノクローナル抗体トシリズマブの免疫調節効果について. 第41回日本臨床免疫学会総会, 下関, 11月28日, 2013

7) 中村雅一, 松岡貴子, 荒木学, 林幼偉, 佐藤和貴郎, 岡本智子, 村田美穂, 三宅幸子, 荒浪利昌, 山村隆. 再発寛解型多発性硬化症の病態におけるIL-6依存性プラズマブラスト. 第41回日本臨床免疫学会総会, 下関11月28日, 2013

8) 荒木学, 松岡貴子, 中村雅一, 三宅幸子, 岡本智子, 村田美穂, 荒浪利昌, 山村隆. 視神経脊髄炎に対するTocilizumab療法. 第41回日本臨床免疫学会総会 下関 11月27日, 2013

9) 門脇淳, 三宅幸子, 千葉麻子, 山村隆. 腸管の自己反応性T細胞は自己免疫を制御する. 第41回日本臨床免疫学会総会 下関 11月27日, 2013

10) 林幼偉, 三宅幸子, 山村隆. 実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の寛解維持を担う'armoured Treg'の誘導: dominant epitopeによるペプチドワクチンへの可能性. 第41回日本臨床免疫学会総会 下関 11月27

日、2013

- 11) 中村雅一, 松岡貴子, 荒木 学, 林 幼偉, 佐藤和貴郎, 岡本智子, 村田美穂, 三宅幸子, 荒浪利昌, 山村 隆. 再発寛解型多発性硬化症における抗 IL-6 受容体抗体治療の可能性. 第 25 回日本神経免疫学会学術集会、下関 11 月 27 日、2013
 - 12) 佐藤和貴郎、荒浪利昌、冨田敦子、千原典夫、岡本智子、林幼偉、村田美穂、三宅幸子、山村隆. 多発性硬化症における脳脊髄炎 T 細胞のケモカイン受容体解析. 第 41 回日本臨床免疫学会総会 下関 11 月 27 日、2013
 - 13) 門脇淳、三宅幸子、千葉麻子、山村隆. 腸管のミエリン反応性 T 細胞は EAE を制御する第 25 回日本神経免疫学会総会 下関 11 月 27 日、2013
 - 14) 荒木学、松岡貴子、荒浪利昌、中村雅一、岡本智子、村田美穂、三宅幸子、山村隆. 難治性 Neuromyelitis Optica に対する抗 IL-6 受容体抗体 tocilizumab の臨床効果の検討. 第 25 回日本神経免疫学会総会 下関 11 月 27 日、2013
 - 15) Nakamura M, Araki M, Lin Y, Sato W, Miyake S, Aranami T, Yamamura T: Multiple sclerosis patients with an increased plasmablast frequency may respond to IL-6R blocking therapy. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013. Chiba, Japan, 12.11, 2013
 - 16) Chiba A, Tamura N, Yamamura T, Takasaki Y, Miyake S: Reduced cell proliferation and enhanced cell death of MAIT cells in systemic lupus erythematosus. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013. Chiba, Japan, 12.11, 2013
 - 17) Kadowaki A, Miyake S, Chiba A, Yamamura T: Auto-reactive T cells in the gut regulate autoimmunity. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013. Chiba, Japan, 12.12, 2013
 - 18) Saika R, Sakuma H, Noto D, Yamamura T, Miyake S: IL-34 induces differentiation of microglia-like cells from bone marrow lineage-negative cells and monocytes. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013. Chiba, Japan, 12.11, 2013
 - 19) Shimano K, Satoh M, Okuno H, Suzan G, Miyake S, Yamamura T, Ogura H, Iwabuchi K: Atherosclerotic lesion development in MR1/apolipoprotein E-deficient mice. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013. Chiba, Japan, 12.11, 2013
 - 20) Lin Y, Miyake S, Yamamura T: Dominancy of encephalitogenic peptide itself directs sustainable regulation of a model of multiple sclerosis: autoimmune vaccination. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013. Chiba, Japan, 12.12, 2013
 - 21) Kamachi F, Harada N, Nishiyama C, Izawa K, Kitauro J, Okumura K, Miyake S, Akiba H. Soluble form of tiM-4 regulates mast cell activation by binding to LMIR5 and TIM-3. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013. Chiba, Japan, 12.12, 2013
- 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.

ドラッグ・リポジショニングによる視神経脊髄炎（NMO）の治療薬開発に関する研究

研究分担者 楠 進

近畿大学医学部神経内科 教授

研究協力者 宮本勝一

近畿大学医学部神経内科 講師

研究要旨

難治性視神経脊髄炎（NMO）2 症例に対する抗 IL-6 受容体抗体であるトシリズマブの治療効果を検討した。症例 1 は 55 歳女性。38 歳から視神経炎と脊髄炎を繰り返している。経口ステロイド薬と各種免疫抑制薬を併用するも再発（平均 3 回／年）を抑制することができないため定期的に血漿交換を繰り返していたがトシリズマブを開始したところ、再発回数は 1 回／年に減少した。症例 2 は 62 歳女性、60 歳から視神経炎と脊髄炎を繰り返している（平均 3 回／年）。経口ステロイド薬と免疫抑制薬に加えてトシリズマブを開始したところ、再発は無くなり、加えて下肢の痛みが消失したため歩行機能も回復した。2 症例とも有害事象が認めず安全に使用できた。トシリズマブは難治性 NMO の再発抑制に有効であり、NMO による疼痛に対しても有効であることが示唆された。

A. 研究目的

経口ステロイド薬や免疫抑制薬の併用にて再発を抑制することができない難治性の視神経脊髄炎（neuromyelitis optica: NMO）に対して、NMO の病態に深く関与している抗 AQP4 抗体の産生に関わる IL-6 を抑制するトシリズマブ（tocilizumab: TCZ）の治療効果を検討した。TCZ は IL-6 受容体に対するモノクローナル抗体であり、抗 AQP4 抗体産生に関与するプラズマブラストの活性化に必要な IL-6 を抑制することで、NMO の病態を抑制することが期待されている。また、IL-6 は疼痛に関与するサイトカインとして知られており、TCZ による抗疼痛効果についても期待される。

B. 研究方法

当施設では難治性 2 症例に対して TCZ 投与を行った。いずれも従来の治療法を用いても再発回数が年 3 回以上の難治例である。治療方法は、現在の治療薬に TCZ を追加投薬して行った。投薬方法は 4 週間毎に 8mg/kg を点滴静注した。血液検査は毎回実施し、副作用の有無確認を行うと同時に、一部検体は国立

精神・神経センターに送付し、抗 AQP4 抗体価や IL-6 をはじめとするサイトカインの測定などを行った。MRI 検査、視機能検査、電気生理検査、そして、髄液検査なども定められた計画通りに定期的に施行した。

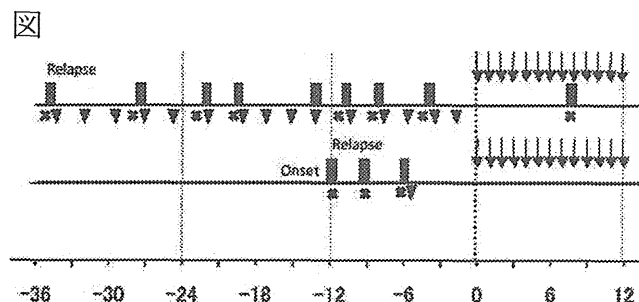
（倫理面への配慮）

本研究は近畿大学倫理委員会に諮り、承認を得て実施した。

C. 研究結果

症例 1 は、55 歳女性。38 歳から視神経炎と脊髄炎を繰り返している。経口ステロイド薬と各種免疫抑制薬（アザチオプリン、メソトレキセート、シクロスポリン）を併用するも再発を抑制することができないため、約 2 ヶ月毎に血漿交換を繰り返していた。それでも年間平均 3 回の再発があり、ADL は徐々に低下した（EDSS: 6.5）。TCZ を開始したところ、再発回数は激減し、最初の 1 年で軽症の再発を 1 度のみ生じたが、血漿交換は不要であった。その後も再発はしていない（図）。

症例 2 は 62 歳女性、60 歳から視神経炎と脊髄炎を平均年 3 回繰り返し、片眼は失明している。経口ステロイド薬とシクロスポリンを併用しているが、脊髄炎を再発し、歩行が困難になったため TCZ を開始した。TCZ 開始後は再発しておらず、開始時 EDSS: 6.5 であったが、現在 EDSS: 5.5 に改善している(図)。



上段：症例 1、下段：症例 2

横軸：月（0：TCZ 開始月）

■：再発、×：ステロイドパルス、

▼：血漿交換、↓：TCZ

D. 考察

2 症例とも、TCZ によって再発が抑制され、ADL の改善をもたらした。特に症例 2 は、筋力の改善は軽度であったが、TCZ 開始後に下肢疼痛が消失したため、歩行訓練が可能となったことが ADL 改善の大きな要因であったと思われる。TCZ は NMO 再発抑制が最も重要な効果であるが、NMO 後遺症の大きな問題となっている疼痛に対しても有効である可能性が示されたのは大変意義がある。また現時点で 2 症例とも有害事象は発生しておらず、TCZ は比較的安全に使用できることも確認できた。今後は、難治性 NMO だけではなく、疼痛コントロールに難渋する NMO も治療適用として検討してもよいと思われる。

E. 結論

難治性 NMO に対して TCZ は十分な再発抑制効果を示したのみならず、NMO による疼痛に対しても有効であった。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Moriguchi K, Miyamoto K, Tanaka N, Yoshie O, Kusunoki S. The importance of CCR4 and CCR6 in experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neuroimmunol. 257: 53-58, 2013

2) Moriguchi K, Miyamoto K, Ichihashi J, Kusunoki S. Autoantibodies against myelin antigens in patients with neuromyelitis optica. Open Journal of Immunology. 13: 41-46, 2013

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

MS活動性脳病巣の反応性アストロサイトにおけるKir4.1の高発現

研究分担者 佐藤 準一 明治薬科大学薬学部バイオインフォマティクス教授

研究要旨 多発性硬化症(multiple sclerosis: MS)は、中枢神経系白質に炎症性脱髄巣が多発して再発を繰り返す難病で、遺伝的要因(遺伝因子)と環境的要因(感染因子と環境因子)の複雑な相互作用により発症が規定されている。MS では、髄鞘自己抗原反応性ヘルパーT 細胞(Th1, Th17)が出現し、血液脳関門を通過して脳や脊髄に浸潤し、マクロファージやミクログリアを活性化。エフェクター細胞が産生する炎症性サイトカインは脱髄と軸索傷害を惹起する。最近 MS 患者の約半数で病型によらず、血清抗カリウムチャンネル Kir4.1 IgG 抗体が検出されると報告された。Kir4.1 は主として腎臓尿細管上皮細胞・内耳細胞・アストロサイト(AS)で発現しており、細胞外 K 濃度を調節している ATP-dependent, inwardly rectifying potassium channel である。Kir4.1 は AS 足突起では AQP4, dystrophin, alpha-syntrophin と共発現している。抗 AQP4 抗体が出現する視神経脊髄炎(neuromyelitis optica; NMO)では、病巣における AQP4 の発現は顕著に低下している。しかし現在まで MS 活動性脳病巣における Kir4.1 の発現レベルは明らかではない。本研究では MS と NMO の大脳皮質における Kir4.1 の発現を免疫組織化学的に解析した。その結果、MS 活動性脳病巣に集積している反応性 AS は Kir4.1 を高発現しており、抗 Kir4.1 IgG 抗体は AS に対して直接的細胞傷害性を示さないことが示唆された。

A. 研究目的

多発性硬化症(multiple sclerosis: MS)は、中枢神経系白質に炎症性脱髄巣が多発して再発を繰り返す難病で、若年成人に好発する。北欧などの高頻度地域では有病率(prevalence)は、10 万人対 50-100 人である。MS では、遺伝的要因(遺伝因子)と環境的要因(感染因子と環境因子)の複雑な相互作用に

より発症が規定されている。MS では、髄鞘自己抗原反応性ヘルパーT 細胞(Th1, Th17)が出現し、血液脳関門を通過して脳や脊髄に浸潤し、マクロファージやミクログリアを活性化する。エフェクター細胞が産生する炎症性サイトカインは脱髄と軸索傷害を惹起する。MS は臨床経過から、再発寛解型(relapsing-remitting MS; RRMS), 2 次進行型

(secondary-progressive MS; SPMS), 1 次進行型(primary-progressive MS; PPMS)に分類される。病理学的には T 細胞浸潤、抗体沈着、オリゴデンドロサイトアポトーシスの所見に基づき、4 病型に分類されている。このように MS は多様な病態を呈するが、その背景となる分子機序は明らかではない。

最近 MS 患者の約半数で病型によらず、血清抗カリウムチャンネル Kir4.1 IgG 抗体が検出されると報告された(Srivastava et al. N Engl J Med. 367: 115-123, 2012)。Kir4.1 は主として腎臓尿細管上皮細胞・内耳細胞・アストロサイト(AS)で発現しており、細胞外 K 濃度を調節している ATP-dependent, inwardly rectifying potassium channel である (Olsen et al. J Neurochem 207: 589-601, 2008)。AS 特異的 Kir4.1 knockout mouse では、細胞膜の過剰な脱分極と細胞外グルタメートの取り込み低下を認める (Djukic et al. J Neurosci 27: 11354-11356, 2007)。Kir4.1 は AS 足突起では AQP4, dystrophin, alpha-syntrophin と共発現している (Guadagno et al. Glia 47: 138-149, 2004)。抗 AQP4 抗体が出現する視神経脊髄炎(neuromyelitis optica; NMO)では、病巣における AQP4 の発現は顕著に低下している。抗 Kir4.1 IgG をマウス髄腔内に投与するとアストロサイトの Kir4.1 発現低下を来す (Srivastava et al. N Engl J Med. 367: 115-123, 2012)。しかし現在まで MS 活動性脳病巣にお

ける Kir4.1 の発現レベルは明らかではない。

本研究では抗 Kir4.1 特異的抗体を用いて、健常者(normal control; NC), MS, NMO, 脳梗塞 (cerebral infarction; CI), Alzheimer 病 (Alzheimer's disease; AD)の脳皮質における Kir4.1 の発現を免疫組織化学的に解析した。本研究の成果は、MS の病態解明に貢献し、厚生労働行政を主導とする患者の QOL 向上につながる。

B. 研究方法

1. 免疫組織化学的解析

MS(n =4), NMO(n =1), normal control (NC; n =4), cerebral infarction (CI; n = 4), Alzheimer's disease (AD; n = 5)の脳皮質ホルマリン固定パラフィン切片における Kir4.1 の発現を抗体(1:2000; APC-035, Alomone Labs)を用いて免疫組織化学的に解析した。抗体の特異性は、リコンビナントタンパクを強制発現させた HEK293 細胞のライセートの western blot で検証した。

2. 培養ヒトアストロサイト(AS)における発現解析

培養ヒトアストロサイト(AS)(Cambrex, Walkersville, MD, USA)に 50 ng/ml TNF α , IL-1 β , TGF β 1 を投与し、Kir4.1 発現レベルを real-time RT-PCR と western blot で解析した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いた全ての脳組織は Research Resource Network(RRN: 責任者国立精神・神経医療研究センター副院長有馬邦正)を介して提供された、文書で研究使用に関するインフォームドコンセントを取得したものであり、倫理的な問題はない。本研究は国立精神・神経医療研究センターと明治薬科大学倫理委員会で承認されている。

C. 研究結果

1. MS 脳活動性病巣反応性 AS における Kir4.1 の高発現

Recombinant human Kir4.1 を発現させた HEK293 細胞ライセートの western blot で抗体の特異性を確認した。Kir4.1 は健常脳では血管壁、脈絡叢、脳質上衣、軟膜で発現を認めた。MS 活動性脱髄病巣・NMO 壊死性病巣周辺部・CI 虚血性病巣周辺部・AD 神経変性脱落病巣に集積している反応性 AS は Kir4.1 を高発現していた(図 1)。一方、マクローファージ・ミクログリア・オリゴデンドロサイトは Kir4.1 を発現していなかった。MS 病巣に集積する反応性 AS では Kir4.1 と AQP4 の共発現を認めた。また AD 脳の一部の amyloid plaque で Kir4.1 の高発現を認めた。

2. 培養ヒト AS における Kir4.1 の発現

培養ヒト AS では Kir4.1 の発現レベル、TNF α , IL-1 β 投与では変化せず、TGF β 1 投与によりタンパクレベルで 1.5 倍増加した(図 2)。

D. 考察

Kir4.1 は主として腎臓尿細管上皮細胞・内耳細胞・AS で発現しており、細胞外 K 濃度を調節 (the spatial buffering of extracellular potassium)し、神経細胞の興奮性を制御している。最近 MS 患者の約半数で病型によらず、血清抗 Kir4.1 IgG 抗体が検出され、抗体は Kir4.1 の細胞外ループドメインと反応すると報告された(Srivastava et al. N Engl J Med. 367: 115-123, 2012)。しかしながらこの自己抗体の病理学意義は明らかではない。

本研究では MS 活動性脳病巣や NMO 壊死性病巣周辺部に集積している反応性 AS が Kir4.1 を高発現していること、AQP4 と共発現していることを明らかにした。事実 Kir4.1 は AS の足突起では水輸送の制御にも関与している(Dibaj et al. J Neurochem 103: 2620-2628, 2007)。また培養ヒト AS では、グリオーシスを誘導することが知られている TGF の投与により、タンパクレベルでの発現上昇を認めた。一方培養ヒト AS では IL-1 β は Kir4.1 発現を抑制するとの報告もある(Zurolo et al. J Neuroinflammation 9: 280, 2012)。

NMO 急性壊死性病巣と異なり、MS 活動性

脳病巣では AS の数は減少しないので、血清抗 Kir4.1 IgG 自己抗体は、AS に対して直接的細胞傷害性を示さないと思われる。

E. 結論

MS 活動性脳病巣に集積している反応性 AS は Kir4.1 を高発現しており、抗 Kir4.1 IgG 抗体は AS に対して直接的細胞傷害性を示さないことが示唆された(Satoh et al. Clin Exp Neuroimmunol 5: 1-10, 2013)。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Saito Y, Arima K. Accumulation of a repulsive axonal guidance molecule RGMa in amyloid plaques: a possible hallmark of regenerative failure in Alzheimer's disease brains. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 39(2): 109-120, 2013.
2. Satoh J, Tabunoki H. Molecular network of ChIP-Seq-based vitamin D receptor target genes. *Multiple Sclerosis* 19(8): 1035-1045, 2013.
3. Satoh J, Tabunoki H. A comprehensive profile of ChIP-Seq-based STAT1 target genes suggests the complexity of STAT1-mediated gene regulatory mechanisms. *Gene Regulation and Systems Biology* 7: 41-56, 2013.
4. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Saito Y, Arima K. Ubiquilin-1 immunoreactivity is concentrated on Hirano bodies and dystrophic neurites in Alzheimer's disease brains. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 39(7): 817-830, 2013.
5. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Saito Y, Konno H, Arima K. Reactive astrocytes express the potassium channel Kir4.1 in active multiple sclerosis lesions. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 4(1): 19-28, 2013.
6. Satoh J. Molecular network of ChIP-Seq-based NF-κB p65 target genes involves diverse immune functions relevant to the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 3(1): 94-106, 2013.
7. Satoh J, Kawana N, Yamamoto Y, Ishida T, Saito Y, Arima K. A survey of TREM2 antibodies reveals neuronal but not microglial staining in formalin-fixed paraffin-embedded postmortem Alzheimer's brain tissues. *Alzheimer's Research and Therapy* 5(5): e30, 2013.
8. Tabunoki H, Ono H, Ode H, Ishikawa K,