

厚生労働科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)

総合研究報告書

[1] 新規関節炎治療法開発を目指した TREM-1 及び TREM-1 リガンド相互作用解析

[2] 関節リウマチ治療における細胞周期制御・抗炎症併用療法の有効性の検討

研究分担者 上阪 等 東京医科歯科大学 膠原病・リウマチ内科 教授

研究協力者 岩井秀之 東京医科歯科大学 膠原病・リウマチ内科 特任講師

細矢 匡 東京医科歯科大学 膠原病・リウマチ内科 大学院生

研究要旨

[1] TREM-1 阻害療法は既存の生物学的製剤とは異なり、結核や重症感染症といった副作用の少ない関節炎治療法となることが期待されている。我々はこれまでに、マウス関節炎モデルに TREM-1-Ig を投与し関節炎の改善を認めた。また、マウス TREM-1 リガンドの同定に成功し、同リガンドに対する抗体投与でも関節炎改善及び骨破壊、関節破壊抑制を確認した。本研究では、抗 TREM-1 リガンド抗体の作用機序解析を行うとともに、B 細胞上のヒト TREM-1 リガンドを同定した。TREM-1 阻害療法を感染のリスクが少なく関節破壊ゼロを目指した新規関節炎治療法として開発していく

[2] CDK4/6 阻害による滑膜細胞の細胞周期制御療法が関節炎の動物モデルに著効することを示してきた。臨床的に安全性が証明された CDK4/6 阻害薬 palbociclib でも関節炎治療効果があることを証明するとともに、RA を特徴づける 2 つの病態に対する治療である、抗サイトカイン療法と細胞周期制御療法を併用することで、関節炎の治療効果を高め、副作用を軽減できるかを検討した。高用量の CDKI は血球減少をきたしたが、減量により副作用なく、関節炎抑制効果を得ることができると考えられた。また、低用量の細胞周期制御療法と抗炎症療法との併用は協調的に関節炎の抑制効果を得ることができ、かつ獲得免疫能のさらなる抑制はきたさない安全な治療法になると考えられた。

A. 研究目的

[1] Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-1 は、マクロファージや好中球に発現し、その刺激は Toll 様受容体刺激による炎症性サイトカインの分泌を増幅させる。一方、マウス敗血症モデルの TREM-1 細胞外ドメイン Ig 融合蛋白(mTREM-1-Ig)による TREM-1 阻害療法は生存率を改善させた。これは TREM-1 阻害では感染防御に必要な炎症性サイトカインを温存しつつ炎症を抑制することを示唆する。我々はこれまでに、TREM-1 の関節リウマチ患者滑膜細胞での発現、及び TREM-1 阻害のコラーゲン誘導関節炎(CIA)マウスでの治療効果を報告した。さらに、B 細胞に発現するマウス TREM-1 リガンド (mTREM-1-L-B)を同定し、抗 mTREM-1-L-B 抗体投与による、CIA での関節炎治療効果及び骨、関節破壊抑制

効果を検討してきた。しかし、同抗体が刺激性あるいは拮抗性か作用機序は不明であった。また、B 細胞に発現するヒト TREM-1-L は未知であり、TREM-1 阻害療法を臨床応用するために、その同定が必要とされていた。本研究では抗マウス TREM-1-L 抗体の CIA での作用機序解明及び、B 細胞上のヒト TREM-1-L の同定を目的とした。

[2] 関節リウマチ(RA)における滑膜炎には、免疫細胞の浸潤とサイトカイン産生を主体とする炎症相と、滑膜細胞の増殖によるパンヌス形成に代表される増殖相の 2 つの病態がある。近年出現した炎症性サイトカインやリンパ球を標的とした分子標的療法は、炎症相に注目した治療戦略であり、実臨床でも高い有効性を示した。その一方で、それぞれ異なる治療標的をもつにもかかわらず、その有効

性には大きな差がなく、MTX 効果不十分患者に対しての ACR70 response rate はいずれも 5 割に満たない。またこれらの分子標的療法を併用した報告では、有効性を増強することなく重症感染症を増加させる結果となったため、炎症相の過度の抑制は有効性と安全性のバランスを欠く可能性がある。われわれは非免疫抑制的な治療戦略を目指して滑膜細胞に注目した。RA 患者の滑膜細胞はパンヌス形成を通じて骨破壊に直接関与し、炎症性サイトカインやケモカインの分泌を介して罹患関節局所の炎症を増強させる。この過度の増殖をきたした滑膜細胞では p16^{INK4a} といった内因性の細胞周期制御分子の発現が抑制されていることを見出した。さらに、CDK4/6 阻害による滑膜細胞の細胞周期制御療法が関節炎の動物モデルに著効することを示してきた。CDK 阻害薬は抗癌剤として開発されてきた歴史があるが、きわめて特異的が高い CDK4/6 阻害薬 palbociclib (CDKI) とアロマターゼ阻害薬である letrozole の併用療法が、進行性の乳癌に対して高い有効性を示したことから臨床応用が進んでいる。臨床試験において治療継続性が高く、重篤な副作用も少なかったことから、CDK4/6 阻害による細胞周期制御療法はヒトの臨床においても副作用の少ない治療であることが示された。臨床的に安全性が証明された CDKI でも関節炎治療効果があることを証明するとともに、RA を特徴づける 2 つの病態に対しての治療である、抗サイトカイン療法と細胞周期制御療法を併用することで、関節炎の治療効果を高め、副作用を軽減できるかを検討することを目的とした。

B. 研究方法

[1] 抗 TREM-1-L-B 抗体の CIA 治療における作用機序を解明するために、TREM-1-Ig を TREM-1-L-B 強制発現細胞に架橋した。TREM-1-L は細胞質内に ITIM モチーフを含むが、TREM-1-L-Ig 架橋による Tyrosine のリン酸化の有無を免疫沈降により確認した。また、マクロファージと B 細胞の共培養系では TNF- α が産生されるが、抗 TREM-1-L 抗体添加による TNF- α 産生への影響を確認した。B 細胞上のヒト TREM-1-L を同定するために、ヒト

TREM-1 細胞外ドメイン 6 x Histidine 融合蛋白 (TREM-1-His) を用いて、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) の cDNA ライブラリーを用いた発現クローニングを行った。同分子の発現様式を明らかにした。

[2] DBA1/J マウスをウシ 型コラーゲン (C_{II}) と complete Freund's adjuvant で 2 回免疫し、コラーゲン誘導関節炎 (CIA) を発症させ、関節炎スコアと骨破壊像で評価した。CDKI の関節炎への作用を評価し、末梢血球数への影響を計測した。また、抗サイトカイン療法として etanercept (ETN) と抗マウス IL-6 受容体抗体 (抗 IL-6R Ab) を用い、それぞれの単独療法と CDKI との併用療法の関節炎への作用を評価した。獲得免疫系への影響を評価するために血清中の抗 C_{II} 抗体価とリンパ節由来細胞の C_{II} 特異的 T 細胞応答を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は東京医科歯科大学動物実験ガイドラインに従い、必要最低限の数で動物福祉に十分配慮する。本動物実験計画書を東京医科歯科大学動物実験委員会に提出し認可を得ている。ヒト検体を扱う研究はインフォームドコンセントを得て検体を採取し、個人情報の取り扱いに注意して行う。倫理審査実施計画書を東京医科歯科大学倫理審査委員会に提出し認可済みである。

C. 研究結果

[1] TREM-1-L-Ig 架橋により TREM-1-L 強制発現細胞での tyrosine のリン酸化はほとんど認められなかった。一方、マクロファージと TREM-1-L-B を発現している B 細胞の共培養系での抗 TREM-1-L 抗体の添加では、抗 IgM 抗体存在下で、TNF- α 産生は減少した。この増加は抗 mTREM-1-L-B 抗体投与で抑制され、primary 細胞でも TREM-1 特異的な相互作用が確認された。これらより抗 TREM-1-L 抗体による CIA 治療効果は TREM-1 に対する拮抗作用によるものと考えられた。

ヒト PBMC cDNA ライブラリー及びヒト TREM-1-His を用い

た発現クローニングにより、B 細胞に発現するヒト TREM-1-L を同定した。

[2] CDKI は用量依存性の関節炎抑制効果を示したが、100mg/kg の連日投与では末梢血の赤血球数の減少を認め、20mg/kg の CDKI は血球減少や消化管障害などの副作用なく、関節炎抑制効果を示した。

ETN 単独療法の関節炎抑制効果は 20mg/kg の CDKI 単独療法と同程度の効果を示したが、10mg/kg と 3mg/kg で用量反応性は認めなかった。しかし、3mg/kg の ETN と 20mg/kg の CDKI の併用療法は、速やかかつ強力な関節炎抑制効果を示した。骨破壊の抑制は ETN 単独療法でも観察されたが、併用療法ではより強力な骨破壊抑制傾向を示した。それぞれの単独療法、併用療法ともに抗 C 抗体価と C 特異的 T 細胞応答の抑制はきたさなかった。抗 IL-6 R Ab 単独療法の関節炎抑制効果も 20mg/kg の CDKI 単独療法と同程度だったが、抗 IL-6R-Ab と CDKI の併用療法も、それぞれの単独療法より高い有効性を示した。骨破壊抑制効果は各々の単独療法では観察されず、併用療法でのみ観察された。抗 IL-6R Ab 単独療法と併用療法は抗 C 抗体価の低下をきたしたが、CDKI の併用による更なる抗体価の低下は見られなかった。また各群とも C 特異的 T 細胞応答の抑制はきたさなかった。

D. 考察

[1] マウス CIA における抗 TREM-1-L 抗体の作用機序が明らかとなった。また、B 細胞上のヒト TREM-1-L も明らかとなり、マウス抗 TREM-1-L 抗体により確認された関節炎改善効果を関節リウマチ治療に応用できる可能性がでてきた。この治療法は骨破壊抑制も確認されており、関節破壊ゼロを目指した臨床応用に向けてヒト TREM-1-L の機能解析を行っていく。

[2] 臨床的に安全性が証明された CDKI でも関節炎治療効果を示すことができた。高用量の CDKI は血球減少をきたしたが、減量により副作用なく、関節炎抑制効果を得るこ

とができると考えられた。また、低用量の細胞周期制御療法と抗炎症療法との併用は協調的に関節炎の抑制効果を得ることができ、かつ獲得免疫能のさらなる抑制はきたさない安全な治療法になると考えられた。

E. 結論

[1] B 細胞上のヒト TREM-1 リガンドが同定され、抗 TREM-1-L 抗体による TREM-1 阻害が、マウス TREM-1 阻害同様、感染リスクが少なく、かつ関節破壊を抑制する新規関節炎治療法として開発されることが期待される。

[2] 二つの異なる分子標的治療の協調的効果を初めて示すものであり、細胞周期制御・抗炎症併用療法は副作用を抑えた、高い治療効果を協調的に示す新たな RA 治療法としての開発が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 学会発表

1. Hideyuki Iwai, Tadashi Hosoya, Yousuke Murakami, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. Identification of the TREM-1 ligand as a therapeutic target of arthritis. Keystone symposium 2012.1
2. Hideyuki Iwai, Tadashi Hosoya, Kenchi Takenaka, Yousuke Murakami, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. Functional analysis of mouse TREM-1 ligand and identification of human TREM-1 ligand 第 41 回日本免疫学会 2012.12,
3. Tadashi Hosoya, Yousuke Murakami1, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. Identification of the TREM-1 ligand as a therapeutic target of arthritis Hideyuki Iwai 第 4 回 EAGOR 2011.10
4. Hideyuki Iwai, Tadashi Hosoya, Yousuke Murakami1, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. Identification of the TREM-1 ligand on B lymphocytes as a

therapeutic target of arthritis 第40回日本免疫学会 2011.11

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし