

**重症喘息を対象としたCTLA4-Ig (Abatacept、オレンシア®) の適応拡大をめざした  
医師主導治験および非臨床研究**

研究代表者 森 晶夫（独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター先端技術開発研究部長）

研究協力者

神山 智（国立病院機構相模原病院臨床研究センターリサーチレジデント）

山口美也子（同センター研究員）

飯島 葉（同センター研究員）

大友隆之（東京薬科大学総合医療薬学助教）

神沼 修（東京都臨床医学総合研究所主任研究員）

研究要旨

わが国の重症喘息の大部分は非アトピー型喘息であり、高用量吸入ステロイドに加えて経口ステロイド、テオフィリン、抗ロイコトリエン薬、長時間作用型β刺激薬等多種類の治療薬を併用してもなお満足な治療効果が得られていない。重症喘息を特徴付けるT細胞レベルのステロイド抵抗性の克服は、特に重要な課題と考えられる。そこで、森らがこれまでに実施してきた厚生労働科学研究で明らかになった costimulatory signal 抑制によるステロイド抵抗性改善効果を検証する目的に、オレンシア®の重症喘息への適応拡大をめざした医師主導治験を計画した。2年目以降のフェーズ II 試験入りをめざして、まず初年度には、日本アレルギー学会より推薦を受け申請した結果、日本医師会治験推進センターの治験候補薬にリスト掲載された。CROを選定し、PMDA戦略相談を受け、GCP準拠書類の作成を開始した。PMDA事前面談のコメントを踏まえ、プロトコール、治験文書の最終調整中である。加えて、非臨床レベルのエビデンスを確立する目的に、培養細胞系 (*in vitro*) およびT細胞移入喘息モデル (*in vivo*) で、ステロイド抵抗性の解析・治療モデルを樹立し、CTLA4-Ig (abatacept、オレンシア®) によるステロイド感受性回復効果を解析した。T細胞レベルのステロイド感受性に基づくステロイド抵抗性喘息モデルをはじめ樹立するとともに、本モデルを活用し、*in vitro*のみならず *in vivo*においても、CTLA4-Igによってステロイド感受性が回復できることを証明した。

今年度の本研究班の成果によって、1)重症喘息に対する世界初の costimulatory signal をターゲットとする治療介入試験の実施に向け、順調なタイムラインで医師主導治験に向けた環境整備、準備、書類作成が進行中である。2)非臨床研究においては、クローン化T細胞移入によるステロイド抵抗性マウス実験喘息を確立し、CTLA4-Igの効果を *in vivo*で解析できた。オレンシアを用いてステロイド抵抗性病態に介入する前臨床エビデンスが十分に得られた。本研究は、既存の治療薬の効果に限界のある重症・難治症例の治療法開発に向けて、大いに役立つものと期待される。

A. 研究目的

我々は、わが国の重症喘息の大部分が成人発症の非アトピー型喘息で、発症後短期間に重症化し、ステロイド抵抗性を特徴とすることを見出している。T細胞レベルのステロイド抵抗性は、costimulatory signal（共刺激）とサイトカインによって誘導される。本研究では、これらの前臨床研究の成果を受けて、抗リウマチ薬として認可されているオレンシア®の重症喘息を対象とした適応拡大を目指して、医師主導治験を実施する。2年目以降のフェーズ II 試験入りをめざして、まず初年度には、GCP準拠文書を準備する。また、非臨床レベルのエビデンスを確立する目的に、培養細胞系 (*in vitro*) およびT細胞移入喘息モデル (*in vivo*) で、ステロイド抵抗性の解析・治療モデルを樹立し、CTLA4-Ig (abatacept、オレンシア®) によるステロイド感受性回復効果を解析する。

胞系 (*in vitro*) およびT細胞移入喘息モデル (*in vivo*) で、ステロイド抵抗性の解析・治療モデルを樹立し、CTLA4-Ig (abatacept、オレンシア®) によるステロイド感受性回復効果を解析する。

B. 方法

1) 森（研究代表者）らは、日本アレルギー学会より推薦を受け、日本医師会治験促進センター治験候補薬リスト掲載申請手続きを進めた。次いで、独立行政法人医薬基盤研究所創薬支援戦略室の支援機能を活用するため、創薬ナビ申し込みを行った。PMDA事前相談に先立って、戦略相談（個別面談）を受けた。事前

面談での、相談内容整理に向けて、治験プロトコルを研究代表者、分担者で討議し、CRO 委託先を選定し、GCP 準拠書類の作成を開始した。さらに、PMDA 事前面談を受けた。先進医療 B、ICH GCP 準拠の枠組みでの実施も検討し、医政局研究開発振興課に先進医療に係る事前相談を予定している。

2) 非臨床研究としては、既報の如く卵白アルブミン (OVA) 特異的 T 細胞受容体 transgenic マウス (DO11.10) の脾臓 T 細胞に、*in vitro*での抗原刺激、limiting dilution を行って、OVA 特異的 Th clone を樹立した。Irradiated spleen cell を antigen-presenting cell とし、subcloning を行い、さらに expansion し、細胞移入実験に使用した。*in vitro* のステロイド感受性は、 $4 \times 10^4$ 個の Th clone を抗原提示細胞、抗原、各濃度のデキサメサゾン (DEX) とともに 96 well culture plate にて培養し、48 時間後に上清を採取、72 時間後に細胞増殖反応を計測した。 $^3\text{H}$ -thymidine を最後の 16 時間パルスした。*in vivo* のステロイド感受性は、Th clone 受身移入による喘息モデルを用いて解析した。 $5 \times 10^6$ 個の Th clone を無処置マウスに尾静脈より注入し (Day 0)、翌日 OVA を経気道的に抗原チャレンジした。48 hr 後、BUXCO にてメサコリン気道反応性を測定、気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、細胞数、分画を測定した。1, 3 mg/kg の DEX を Day 1, 2 に皮下投与した。CTLA4-Ig は、尾静脈から i.v. 投与または抗原とともに点鼻投与した。

#### (倫理面への配慮)

倫理面の配慮として、患者を対象とする調査、検査において、また、ヒト由来の細胞、組織等の試料を用いる場合には、ヘルシンキ宣言を遵守するとともに、わが国のヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)、疫学研究に関する倫理指針 (平成 19 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号)、臨床研究に関する倫理指針 (平成 20 年厚生労働省告示第 415 号) を遵守した。インフォームドコンセントを徹底するとともに、症例はコード化し、プライバシーの保護に万全を期した。実施に先立って研究者の施設における倫理委員会の承認を得たうえで、倫理規定に従って実施した。実験動物を使用する場合、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 (平成 18 年 6 月 1 日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知) 及び研究者の施設における動物実験に関する倫理規定を遵守した。実験間のばらつきを考慮した上で、統計学的有意性を議論しうる最小例数を算出し、その使用数を決定し、動物を保定、施術および致死させる場合は、最も苦痛を与えない方法を事前に検討した。

#### C. 結果および D. 考察

1) 日本アレルギー学会より推薦を受け申請した結果、オレンシア®が、日本医師会治験促進センター治験候補薬にリスト掲載された。PMDA 個別面談を実施し、医師主導治験に向けた戦略相談を受けた。CRO を選定し、GCP 準拠書類の作成を開始した。PMDA 事前面談においてフェーズ I をスキップ可とのコメントが得られた。その他のコメントに対応すべく、製造販売元のプリストルマイヤーズスクイブ社にコンタクトを取り、対応方針につき協議したが、協力が得られる態勢には到っていない。PMDA コメントに準拠した形で、治験プロトコルおよび治験文書をファイナライズ中である。現段階では、5~6 月 PMDA 事前面談 (再)、その後、治験実施施設 IRB 審査、9 月エントリー開始をスケジュールしている。巻末に現時点における治験実施計画書および各手順書を載せた。

2) *in vitro*での細胞増殖反応と、*in vivo*での BALF 好酸球浸潤のステロイド感受性が一致することから、T 細胞移入喘息モデルにおける個体レベルのステロイド感受性は、移入される Th clone の *in vitro*におけるステロイド感受性によって規定されることが明らかになった。ステロイド抵抗性クローン移入、抗原チャレンジによる、T 細胞依存性喘息モデルを DEX、CTLA4-Ig で治療することによって、ステロイド感受性が costimulatory signal 介入によって、*in vitro*、*in vivo*のいずれにおいても制御可能であることが明らかになった。

まず、96 ウェルマイクロプレートに抗原提示細胞、OVA とともに Th クローンを培養し、各濃度の dexamethasone (Dex) を添加した。72 時間培養の最後 18 時間に  $^3\text{H}$ -thymidine をパルスし、細胞増殖を評価した (*in vitro* ステロイド感受性、図 1)。48 時間培養の上清を回収し、サンドイッチ ELISA 法によりサイトカイン濃度を測定した。*in vivo*におけるステロイド感受性解析は、T 細胞クローンを無処置 BALB/c マウスに移入し、OVA チャレンジ、Dex の皮下投与を行った後、OVA チャレンジの 48 時間後に BALF を回収し、炎症細胞数を計測した。

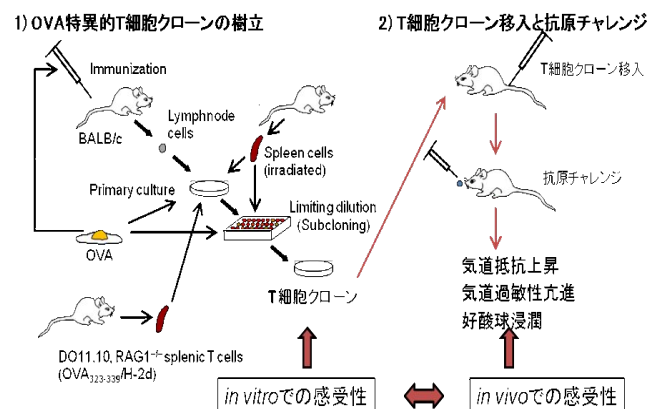


図 1. ステロイド抵抗性喘息モデル—*in vitro* と *in vivo* の T 細胞ステロイド感受性比較

T 細胞クローンの増殖応答 (*in vitro*) に対する Dex の効果については、Th クローン BF7、T6-2、T6-10 の増殖は用量依存的に抑制され(図 2a)、 $IC_{50}$  値はそれぞれ 27.2、34.3、2.4 nM であった(表 1)。これに対して、Th クローン T6-4、T6-7 の増殖は、用いた濃度の Dex では抑制されず、 $IC_{50}$  値は 1000 nM 以上となった(図 2b)。 $I_{max}$  (Dex 0 nM 時の増殖を 100%とした、増殖最大抑制率)はそれぞれ 48%、31%であった。T5-1 の増殖は Dex によりやや抑制されたものの、 $IC_{50}$  値は 664.5 nM、 $I_{max}$  は 67% であった(表 3)。

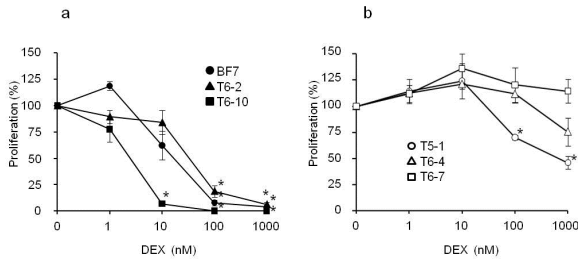


図 2. *in vitro*における T 細胞クローンの増殖 (\*:  $p < 0.05$ )

表 1. T 細胞クローンの細胞増殖とサイトカイン産生に対する Dex の効果

		BF7	T6-2	T6-10	T5-1	T6-4	T6-7
Proliferative responses	$IC_{50}$ (nM) <sup>1</sup>	27.2	32.3	2.4	664.5	>1000	>1000
	$I_{max}$ (%) <sup>2</sup>	92	93	100	67	48	31
IL-4 <sup>3</sup>	$\times 10^3$ pg/ml	12.2	ND	ND	ND	ND	ND
	$IC_{50}$ (nM)	31.9	-	-	-	-	-
	$I_{max}$ (%)	90	-	-	-	-	-
IL-5 <sup>3</sup>	$\times 10^3$ pg/ml	17.3	ND	23.2	ND	ND	ND
	$IC_{50}$ (nM)	28.9	-	5.7	-	-	-
	$I_{max}$ (%)	91	-	96	-	-	-
IL-13 <sup>3</sup>	$\times 10^3$ pg/ml	48.5	3.3	7.2	0.4	0.7	ND
	$IC_{50}$ (nM)	6.3	6.3	3.8	27.3	24.5	-
	$I_{max}$ (%)	98	98	89	79	90	-
IFN- $\gamma$ <sup>3</sup>	$\times 10^3$ pg/ml	ND	86.2	ND	103.2	178.0	137.2
	$IC_{50}$ (nM)	-	13.1	-	20.9	114.6	43.3
	$I_{max}$ (%)	-	98	-	92	73	80

<sup>1</sup>T 細胞クローンを 96 ウェルマイクロプレートに APC、OVA とともに 72 時間培養し、各濃度の Dex を添加した。培養最後の 18 時間に <sup>3</sup>H-thymidine をパルスし、細胞増殖を評価した。 $IC_{50}$  は、Dex 0 nM 時の細胞増殖を 100%とした場合の、細胞増殖が 50%となる Dex 濃度とした。

<sup>2</sup> $I_{max}$  は、Dex 0 nM の時の細胞増殖を 100%とした細胞増殖最大抑制率とした。

<sup>3</sup>細胞培養 48 時間の上清中 IL-4、IL-5、IL-13、IFN- $\gamma$ 濃度をサンドイッチ ELISA 法により測定した。検出限界は、IL-4: 15.6 pg/ml、IL-5: 31.1 pg/ml、IL-13: 39.0 pg/ml、IFN- $\gamma$ : 31.1 pg/ml である。ND; not detectable

以上の結果により、実験に用いた 6 種類の T 細胞クローンのうち、BF7、T6-2、T6-10 の 3 クローンは、Dex により

増殖が抑制されるステロイド感受性クローン、一方、T5-1、T6-4、T6-7 の 3 クローンは、抑制されないステロイド抵抗性クローンとされた。IL-4、IL-5、IL-13、IFN- $\gamma$ の産生は全ての T 細胞クローンで用量依存的に抑制された(表 1)。 $IC_{50}$  値はステロイド抵抗性クローンの方が高い傾向が見られた。

次いで、T 細胞クローン移入喘息モデルを用いて、*in vivo*でのステロイド感受性を評価した。無処置 BALB/c マウスに各 T 細胞クローンを移入し、OVA チャレンジと Dex 皮下投与(0、1、3 mg/kg)を行った。気管支肺胞洗浄(Broncho-alveolar lavage: BAL)は OVA チャレンジの 48 時間後に行い、BAL fluid (BALF)中のマクロファージ、好中球、好酸球、リンパ球数を計測した(図 3、4)。*in vitro* 実験においてステロイド感受性クローンに分類された BF7、T6-2、T6-10 を移入した場合、BALF 中好酸球数、リンパ球数は、Dex の用量依存的に低下した。一方、ステロイド抵抗性クローンの T6-4、T6-7 を移入した場合、BALF 中好酸球数、リンパ球数は有意な低下を認めなかった。T5-1 を移入した場合、3 mg/kg の Dex 投与により BALF 中好酸球数が約 30%低下した。

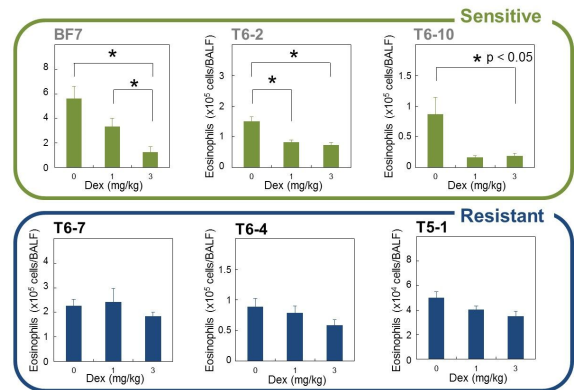


図 3. T 細胞クローン移入喘息モデル BALF 中好酸球数  
T 細胞クローンを無処置 BALB/c マウスに移入し、OVA チャレンジした。各投与量の Dex を皮下投与した。チャレンジ 48 時間後に BALF を回収し、炎症細胞数を計測した。

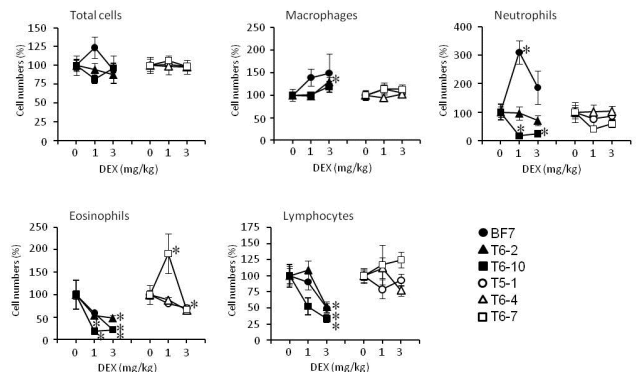


図 4. T 細胞クローン移入喘息モデル BALF 中の炎症細胞数(相対変化)

T 細胞クローンを無処置 BALB/c マウスに移入し、OVA チャレンジした。各投与量の Dex を皮下投与した。チャレ

ンジ 48 時間後に BALF を回収し、炎症細胞数を計測した。用いたマウス数は、BF7 (n=6)、T6-2 (n=7-11)、T6-10 (n=6-9)、T5-1 (n=6)、T6-4 (n=10-12)、T6-7 (n=5-13) であった。\*: p < 0.05、Dex 0 mg/kg の時の細胞数と比較

以上の結果から、培養系 (*in vitro*) での Dex 効果によりステロイド感受性とステロイド抵抗性に分類された T 細胞クローンが、喘息モデル (*in vivo*) における Dex 効果においても、同じステロイド感受性とステロイド抵抗性に分類されることが明らかになった。ステロイド感受性クローンを移入したマウスの喘息はステロイド感受性であり、ステロイド抵抗性のクローンを移入したマウス喘息はステロイド抵抗性であった。すなわち、*in vitro* での T 細胞ステロイド感受性と、*in vivo* における喘息モデルのステロイド感受性とは、一対一で対応した。好酸球は、ステロイドに対して高感受性であることは良く知られているが、好酸球は、*in vivo* においてはサイトカインや様々な接着分子シグナル等の影響を受け、ステロイド感受性/抵抗性 T 細胞クローン移入マウスで、ステロイド反応性が異なるものと考えられる。

ステロイド抵抗性喘息の患者から採取された末梢血 T 細胞は、ステロイド感受性が極めて低く、Dex に対する IC<sub>50</sub> 値は 1000 nM 以上であり、ステロイド感受性の喘息患者の約 100 倍と報告されている。我々の T 細胞クローンのステロイド感受性解析では、ステロイド感受性の T 細胞クローンとステロイド抵抗性の T 細胞クローンの Dex に対する IC<sub>50</sub> 値は、20 倍から 500 倍の差となった。ステロイド感受性が大変低いという点において、本実験で用いたステロイド抵抗性クローンは、ステロイド抵抗性喘息患者の末梢血 T 細胞と類似しており、ステロイド抵抗性喘息の T 細胞の性質を反映していると言える。

次に、*in vitro* で CTLA4-Ig が CD28 シグナルを阻害することで、ステロイド感受性を回復させ、Dex が再び用量依存的に細胞増殖応答を抑制できるようになることを示した。ステロイド抵抗性 T 細胞クローンを用いて、抗原刺激を与えた場合、T 細胞の増殖反応は Dex により抑制されなかった。が、CTLA4-Ig (3 μg/ml) が存在すると、ステロイド感受性を回復させ、Dex が再び用量依存的に細胞増殖応答を抑制した (図 5)。

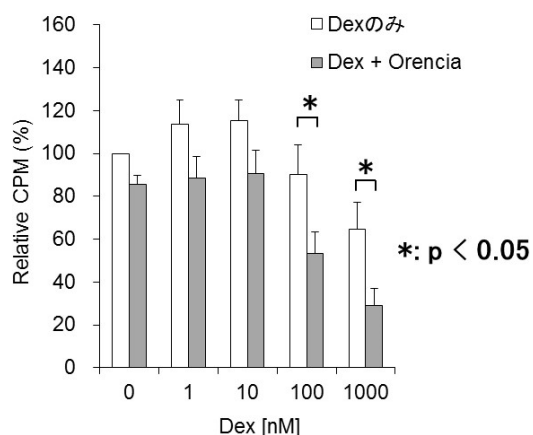
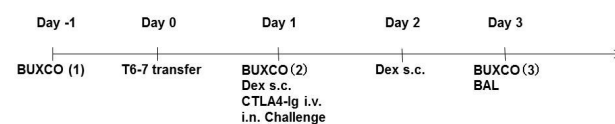


図 5. オレンシア® (アバタセプト、CTLA4-Ig) は CD28 シグナルによるステロイド抵抗性を解除する

さらに、ステロイド抵抗性喘息モデルを用いて、*in vivo* の治療実験を行った。図 6a に、実験スケジュール、図 6b に結果を示す。CTLA4-Ig 単独、Dex 単独では好酸球性炎症に対する治療効果はみられないが (ステロイド抵抗性喘息)、CTLA4-Ig を投与した場合には、同量の Dex で BALF 好酸球数が有意に減少した。すなわち、投与された CTLA4-Ig の効果として、ステロイド抵抗性喘息がステロイド感受性喘息になったことを意味する。

#### a) 実験スケジュール



#### b) BALF 好酸球数

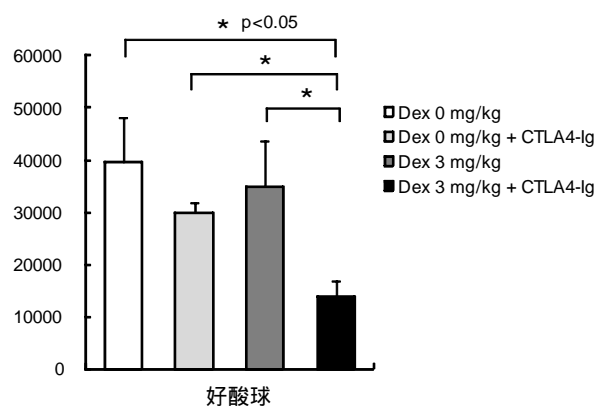


図 6. オレンシア® (アバタセプト、CTLA4-Ig) 投与によるステロイド抵抗性喘息モデル治療 (\* : p < 0.05)

#### E. 結論

オレンシアを用いてステロイド抵抗性病態に介入する前臨床エビデンスが得られた (図 7)。



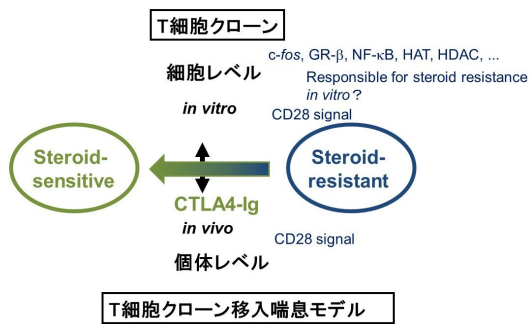


図 7. CTLA4-Ig は、ステロイド抵抗性を *in vitro*, *in vivo*において改善する

重症喘息に対する世界初の costimulatory signal をターゲットとする治療介入試験の実施に向け、順調なタイムラインで医師主導試験に向けた環境整備、準備、書類作成が進行中である。

F. 健康危惧情報  
該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kouyama, S., Ohtomo-Abe, A., Kitamura, N., Kaminuma, O., and Mori, A. 2013. A contraction assay system using primary cultured mouse bronchial smooth muscle cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 161 (Suppl 1):93-97.
2. Nishimura, T., Saeki, M., Kaminuma, O., Matsuoka, K., Yonekawa, H., Mori, A., and Hiroi, T. 2013. Existence of antigen-specific IgE is not sufficient for allergic nasal eosinophil infiltration in mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 161 (Suppl 1):125-128.
3. Saeki, M., Nishimura, T., Kaminuma, O., Mori, A., and Hiroi, T. 2013. Oral immunotherapy for allergic diseases using transgenic rice seeds: current state and future prospects. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 161 (Suppl 1):164-169.
4. Shibahara, K., Nakajima-Adachi, H., Kaminuma, O., Hiroi, T., Mori, A., and Hachimura, S. 2013. Food allergen-induced IgE response mouse model created by injection of *in vitro* differentiated Th2 cell culture and oral antigen intake. *Biosci Microb Food Health* (in press)
5. Nishimura, T., Saeki, M., Motoi, Y., Kitamura, N., Mori, A., Kaminuma, O., Hiroi, T. 2014.

Selective suppression of Th2 cell-mediated lung eosinophilic inflammation by anti-major facilitator super family domain containing 10 monoclonal antibody. *Allergy International.* (in press)

6. Saeki, M., Nishimura, T., Mori, A., Kaminuma, O., Hiroi, T. 2014. Antigen-induced mixed and separated inflammation in murine upper and lower airways. *Allergy International.* (in press)
  7. 森 晶夫: 重症喘息治療についての研究、アレルギー・免疫;20(7):100-109, 2013
  8. 森 晶夫: 米国アレルギー・喘息・免疫学会議 (AAAAI Annual Meeting 2013) アレルギー・免疫;20(8):116-122, 2013
  9. 森 晶夫: 重症喘息(成人)、アレルギーの臨床;33(12):22-27, 2013
  10. 森 晶夫: アナフィラキシー、今日の治療と看護改訂第3版(永井良三、大田健編) 南江堂、東京 p.53-55, 2013
  11. 森 晶夫: 新しい免疫療法、アレルギー診療ゴールデンハンドブック(秋山一男監修、前田裕二、谷口正実編) 南江堂、東京 p.73-77, 2013
  12. 森 晶夫: 細胞性免疫検査、アレルギー診療ゴールデンハンドブック(秋山一男監修、前田裕二、谷口正実編) 南江堂、東京 p.20-23, 2013
  13. 森 晶夫: 抗IgE療法、抗サイトカイン療法など、アレルギー診療ゴールデンハンドブック(秋山一男監修、前田裕二、谷口正実編) 南江堂、東京 p.86-91, 2013
2. 学会発表
1. Mori, A., Kouyama, S., Abe, A., Yamaguchi, M., Iijima, Y., Mitsui, C., Oshikata, C., Tanimoto, H., Fukutomi, Y., Sekiya, K., Taniguchi, M., Maeda, Y., Ohtomo, M., Hasegawa, M., Akiyama, K., Ohtomo, T., and Kaminuma, O. 2013. T cell-induced late phase asthmatic response in mice. 2013 American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology Annual meeting. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131 (2):128 (San Antonio) 2013/2/22-2/26
  2. Kaminuma, O., Kitamura, N., Mori, A., Hiroi T. 2013. Identification of signaling molecules responsible for IL-2-mediated cytokine expression in human T cells. Immunology 2013 AAI Annual Meeting (Honolulu, Hawaii) 2013/5/6
  3. Mori, A., Kouyama, S., Yamaguchi, M., Iijima,

- Y., Itoh, J., Saito, N., Minami, T., Watarai, K., Mitsui, C., Oshikata, C., Tanimoto, H., Fukutomi, Y., Sekiya, K., Tsuburai, T., Taniguchi, M., Maeda, Y., Ohtomo, M., Hasegawa, M., Akiyama, K., Ohtomo, T., and Kaminuma, O. 2013. Adoptive transfer of Th clones confer late-phase asthmatic response in mice. European Academy of Allergy and Clinical Immunology-World Allergy Organization World Allergy & Asthma Congress 2013, Final program p.58 (Milan) 2013/6/22-26
4. Hayashi, H., Taniguchi, M., Mitsui, C., Fukutomi, Y., Watai, K., Minami, T., Tanimoto, H., Oshikata, C., Ito, J., Sekiya, K., Tsuburai, T., Tsurikisawa, N., Otomo, M., Maeda, Y., Mori, A., Hasegawa, M., and Akiyama, K. 2013. Aspirin-intolerance and smoking history in Japanese patients with adult asthma. European Academy of Allergy and Clinical Immunology-World Allergy Organization World Allergy & Asthma Congress 2013, Final program p.184 (Milan) 2013/6/22-26
  5. Minami, T., Fukutomi, Y., Taniguchi, M., Saito, A., Yasueda, H., Nakayama, S., Tanaka, A., Mitsui, C., Hayashi, H., Tsuburai, T., Maeda, Y., Mori, A., Hasegawa, M., and Akiyama, K. 2013. IgE to Der p 1 and 2 as predictors of airway responses to house dust mite. European Academy of Allergy and Clinical Immunology-World Allergy Organization World Allergy & Asthma Congress 2013, Final program p.146 (Milan) 2013/6/22-26
  6. Minami, T., Fukutomi, Y., Taniguchi, M., Saito, A., Yasueda, H., Nakayama, S., Tanaka, A., Mitsui, C., Hayashi, H., Tsuburai, T., Mori, A., Hasegawa, M., and Akiyama, K. 2013. Clinical relevance of sensitization to profiling in Japanese patients with plant food allergy. European Academy of Allergy and Clinical Immunology-World Allergy Organization World Allergy & Asthma Congress 2013, Final program p.150 (Milan) 2013/6/22-26
  7. Itoh, J., Tsuburai, T., Atsuta, R., Watarai, K., Minami, T., Hayashi, H., Sekiya, K., Oshikata, C., Tsurukizawa, N., Higashi, N., Mori, A., Hasegawa, M., Taniguchi, M., Takahashi, K., Akiyama, K. 2013. Comparison of exhaled nitric oxide values measured by two offline methods or NO breath. European Respiratory Society Annual Congress 2013. Final program p.222 (Barcelona) 2013/9/7-11
  8. Mori, A., Kouyama, S., Yamaguchi, M., Iijima, Y., Abe, A., Ohtomo, T., Itoh, J., Hayashi, H., Minami, T., Watarai, K., Mitsui, C., Oshikata, C., Tanimoto, H., Fukutomi, Y., Sekiya, K., Tsuburai, T., Taniguchi, M., Maeda, Y., Ohtomo, M., Hasegawa, M., Akiyama, K., and Kaminuma, O. 2013. Broncho-constriction Mediated by T cells - An Adoptive Transfer Model. 2013 Asia Pacific Congress of Allergy and Clinical Immunology, Allergy 68 (Suppl 98):15 (Taipei) 2013/11/14-17
  9. Kaminuma, O., Kitamura, N., Mori, A., and Hiroi, T. Identification of signaling molecules responsible for IL-2-mediated cytokine expression in human T cells. Immunology 2013 AAI Annual Meeting (Honolulu, Hawaii), 2013.5.6. J Immunol, 190, 184.33:P6343, 2013.
  10. Mori, A., Kouyama, S., Yamaguchi, M., Iijima, Y., Itoh, J., Hayashi, H., Minami, T., Watarai, K., Mitsui, C., Oshikata, C., Tanimoto, H., Fukutomi, Y., Sekiya, K., Tsuburai, T., Taniguchi, M., Maeda, Y., Ohtomo, M., Hasegawa, M., Akiyama, K., and Kaminuma, O. 2014. Establishment and treatment of a steroid resistant asthma model by adoptive transfer of helper T cell clones. 2014 American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology Annual meeting. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131 (2):128 (San Diego) 2014/2/28-3/4
  11. Mori, A., Kouyama, S., Yamaguchi, M., Iijima, Y., Abe, A., Ohtomo, T., Itoh, J., Hayashi, H., Minami, T., Watarai, K., Mitsui, C., Oshikata, C., Tanimoto, H., Fukutomi, Y., Sekiya, K., Tsuburai, T., Taniguchi, M., Maeda, Y., Ohtomo, M., Hasegawa, M., Akiyama, K., and Kaminuma, O. 2014. Broncho-constriction mediated by activated T cells in humans and mice. *Airway Vista* 2014. *Respirology* 19 (Suppl. 1):18 (Seoul) 2014/3/28-29
  12. 谷口正実、福富友馬、粒来崇博、関谷潔史、谷本英則、三井千尋、森 晶夫、長谷川真紀：重症喘息の背景因子と抗 IgE 療法、第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会イブニングシンポジウム 1「重症喘息の病態と治療戦略：抗 IgE 抗体療法 Update」アレルギー 62 (3,4): 308, 2013.5.11 (横浜)

13. 森 晶夫:アレルギー専門医が習得すべき基礎アレルギー免疫学の知識(専門医試験も考慮して) 第7回相模原臨床アレルギーセミナー、2013.8.2(横浜)
14. 森 晶夫:喘息と全身性アレルギー疾患—講演1「喘息予防・管理ガイドライン2012について」第13回愛知成人喘息研究会、2013.9.25(名古屋)
15. 神沼 修、西村友枝、佐伯真弓、松岡邦枝、米川博通、後藤 穰、大久保公裕、森 晶夫、廣井隆親:新しい花粉症モデル:マウスにおけるT細胞依存性鼻粘膜過敏性亢進反応、第63回日本アレルギー学会秋季学術大会イブニングシンポジウム3「東京都花粉症プロジェクト」アレルギー62(9.10):1251、2013.11.28-30(東京)
16. 関谷潔史、谷口正実、渡井健太郎、三井千尋、南崇史、林 浩昭、谷本英則、伊藤 潤、押方智也子、釣木澤尚美、福富友馬、大友 守、前田裕二、粒来崇博、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男:喘息大発作症例の臨床的検討(年齢階級別の検討) 第53回日本呼吸器学会学術講演会プログラム、日本呼吸器学会雑誌 2(増刊号):253、2013.4.19-21(東京)
17. 渡井健太郎、関谷潔史、谷口正実、三井千尋、南崇史、林 浩昭、福富友馬、谷本英則、押方智也子、伊藤 潤、粒来崇博、釣木澤尚美、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男:20歳代発症喘息における短期喫煙が呼吸機能へ及ぼす影響、第53回日本呼吸器学会学術講演会プログラム、日本呼吸器学会雑誌 2(増刊号):275、2013.4.19-21(東京)
18. 林 浩昭、粒来崇博、渡井健太郎、三井千尋、南崇史、谷本英則、福富友馬、押方智也子、関谷潔史、釣木澤尚美、大友 守、前田裕二、森 晶夫、谷口正実、長谷川眞紀、秋山一男:気管支喘息初診時における自覚症状と強制オシレーション法の相関性について、第53回日本呼吸器学会学術講演会プログラム、日本呼吸器学会雑誌 2(増刊号):283、2013.4.19-21(東京)
19. 南 崇史、福富友馬、谷口正実、齋藤明美、安枝浩、中山 哲、田中 昭、渡井健太郎、三井千尋、林 浩昭、谷本英則、押方智也子、伊藤 潤、関谷潔史、釣木澤尚美、粒来崇博、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男:成人喘息のダニアレルギーにおけるDer p 1/2 特異的IgE抗体価測定の有用性、第53回日本呼吸器学会学術講演会プログラム、日本呼吸器学会雑誌 2(増刊号):284、2013.4.19-21(東京)
20. 伊藤 潤、粒来崇博、渡井健太郎、林 浩昭、南崇史、谷本英則、押方智也子、関谷潔史、釣木澤尚美、福富友馬、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、谷口正実、熱田 了、高橋和久、秋山一男:呼気一酸化窒素濃度(FENO)の機種差に関する検討—オフライン法、NO breathの比較—、第53回日本呼吸器学会学術講演会プログラム、日本呼吸器学会雑誌 2(増刊号):285、2013.4.19-21(東京)
21. 伊藤 潤、粒来崇博、渡井健太郎、林 浩昭、南崇史、三井千尋、谷本英則、押方智也子、関谷潔史、釣木澤尚美、福富友馬、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、谷口正実、熱田 了、高橋和久、秋山一男:オフライン法とNO breathを用いた呼気一酸化窒素濃度の機種差検討、第25回日本アレルギー学会春季臨床大会、アレルギー 62(3,4):389、2013.5.11-12(横浜)
22. 渡井健太郎、関谷潔史、谷口正実、三井千尋、南崇史、林 浩昭、伊藤 潤、谷本英則、押方智也子、釣木澤尚美、福富友馬、粒来崇博、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男:20歳代発症喘息における短期喫煙が治療効果へ及ぼす影響、第25回日本アレルギー学会春季臨床大会、アレルギー 62(3,4):394、2013.5.11-12(横浜)
23. 三井千尋、谷口正実、梶原景一、東 憲孝、小野恵美子、渡井健太郎、南 崇史、林 浩昭、福富友馬、谷本英則、押方智也子、伊藤 潤、関谷潔史、釣木澤尚美、粒来崇博、森 晶夫、三田晴久、長谷川眞紀、秋山一男:アスピリン喘息では安定期においても末梢血の血小板が活性化している、第25回日本アレルギー学会春季臨床大会、アレルギー 62(3,4):406、2013.5.11-12(横浜)
24. 林 浩昭、谷口正実、三井千尋、福富友馬、渡井健太郎、南 崇史、谷本英則、押方智也子、伊藤 潤、関谷潔史、粒来崇博、釣木澤尚美、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男:Aspirin Intolerance Asthma(AIA)と喫煙歴は関連するか、第25回日本アレルギー学会春季臨床大会、アレルギー 62(3,4):406、2013.5.11-12(横浜)
25. 南 崇史、福富友馬、谷口正実、中山 哲、田中昭、渡井健太郎、三井千尋、林 浩昭、谷本英則、押方智也子、伊藤 潤、関谷潔史、釣木澤尚美、粒来崇博、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男:多種果物野菜アレルギーにおけるcomponent-resolved diagnostics、第25回日本アレルギー学会春季臨床大会、アレルギー 62(3,4):423、2013.5.11-12(横浜)
26. 佐伯真弓、西村友枝、神沼 修、森 晶夫、廣井隆親:アレルギー性鼻炎における鼻粘膜過敏性亢

- 進に対するT細胞の関与、アレルギー・好酸球研究会 2013、抄録集 p.22、2013.6.15 (東京)
27. 西村友枝、佐伯真弓、本井祐二、北村紀子、形山和史、三好浩之、市川仁、森 晶夫、神沼 修、廣井隆親: アレルギー性好酸球性炎症の発症における major facilitator super family domain containing 10 (Mfsd10) の役割、アレルギー・好酸球研究会 2013、抄録集 p.16、2013.6.15 (東京)
  28. 神山 智、大友暁美、大友隆之、山口美也子、飯島 葉、森 晶夫: 非アトピー型喘息のマウスモデル作成と解析、日本職業・環境アレルギー学会 2013、抄録集 p.41、2013.7.5-6 (相模原)
  29. 林 浩昭、谷口正実、三井千尋、福富友馬、渡井健太郎、南 崇史、谷本英則、押方智也子、伊藤潤、関谷潔史、粒来崇博、釣木澤尚美、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男: アスピリン喘息と喫煙は関連するか、日本職業・環境アレルギー学会 2013、抄録集 p.46、2013.7.5-6 (相模原)
  30. 南 崇史、福富友馬、谷口正実、齋藤明美、安枝浩、関谷潔史、粒来崇博、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男: 成人喘息のダニアレルギーにおける Der p 1/2 特異的 IgE 抗体価測定の有用性、日本職業・環境アレルギー学会 2013、抄録集 p.58、2013.7.5-6 (相模原)
  31. 三井千尋、谷口正実、福富友馬、谷本英則、関谷潔史、齋藤明美、川上裕司、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男: 室内環境中の *A. fumigatus* による慢性過敏性肺臓炎 (Chronic hypersensitivity pneumonia; CHP) の一例、日本職業・環境アレルギー学会 2013、抄録集 p.66、2013.7.5-6 (相模原)
  32. 三井千尋、谷口正実、林 浩昭、伊藤 潤、梶原景一、渡井健太郎、福原正憲、南 崇史、谷本英則、福富友馬、関谷潔史、粒来崇博、三田晴久、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男: アスピリン喘息診断における sCD40L、sCD62P の有用性の検討、第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 62 (9.10): 1295、2013.11.28-30 (東京)
  33. 湯澤 仁、神沼 修、後藤 穰、大久保公裕、森 晶夫、廣井隆親: スギ花粉症に対する舌下免疫療法の治療効果と血中抗体価の関係、第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 62 (9.10): 1304、2013.11.28-30 (東京)
  34. 西村友枝、佐伯真弓、松岡邦枝、米川博通、森 晶夫、後藤 穰、大久保公裕、神沼 修、廣井隆親: マウスアレルギー性鼻炎モデルにおける IgE-マスト細胞系および T 細胞の関与、第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 62 (9.10): 1315、2013.11.28-30 (東京)
  35. 南 崇史、福富友馬、谷口正実、中山 哲、齋藤明美、安枝 浩、渡井健太郎、三井千尋、福原正憲、林 浩昭、谷本英則、押方智也子、伊藤 潤、釣木澤尚美、関谷潔史、粒来崇博、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男: マイクロアレイによる食物由来 PR-10 への IgE 抗体価測定は PFAS 患者の食物アレルギー症状の診断に有用か、第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 62 (9.10): 1322、2013.11.28-30 (東京)
  36. 佐伯真弓、西村友枝、渡辺伸昌、森 晶夫、後藤 穰、神沼 修、廣井隆親: TGF-誘導性 T 細胞サブセットのアレルギー性気道炎症における役割、第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 62 (9.10): 1353、2013.11.28-30 (東京)
  37. 前田裕二、福原正憲、渡井健太郎、林 浩昭、南 崇史、三井千尋、伊藤 潤、福富友馬、押方智也子、釣木澤尚美、関谷潔史、粒来崇博、大友 守、森 晶夫、長谷川眞紀、谷口正実、秋山一男: 喘息発症と IgE の関係、第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 62 (9.10): 1359、2013.11.28-30 (東京)
  38. 渡井健太郎、関谷潔史、谷口正実、三井千尋、福原正憲、南 崇史、林 浩昭、谷本英則、押方智也子、伊藤 潤、釣木澤尚美、福富友馬、粒来崇博、森 晶夫、秋山一男: 20 歳代発症喘息における喫煙歴(pack years)と呼吸機能・気道過敏性の量反応関係、第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 62 (9.10): 1367、2013.11.28-30 (東京)
  39. 関谷潔史、谷口正実、渡井健太郎、南 崇史、福原正憲、林 浩昭、谷本英則、押方智也子、伊藤潤、釣木澤尚美、福富友馬、粒来崇博、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男: 若年成人喘息においてペット飼育が肺機能に与える影響、第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 62 (9.10): 1370、2013.11.28-30 (東京)
  40. 亀崎華子、伊藤 潤、粒来崇博、渡井健太郎、福原正憲、林 浩昭、南 崇史、三井千尋、谷本英則、押方智也子、釣木澤尚美、関谷潔史、福富友馬、原田紀宏、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、熱田 了、谷口正実、高橋和久、秋山一男: アナフィラキシーショックの原因がナウゼリン座薬の基剤(マクロゴール)と判明した 1 例、第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 62 (9.10): 1371、2013.11.28-30 (東京)
  41. 福原正憲、粒来崇博、釣木澤尚美、渡井健太郎、三井千尋、南 崇史、林 浩昭、谷本英則、伊藤潤、押方智也子、関谷潔史、福富友馬、前田裕二、



森 晶夫、谷口正実、長谷川眞紀、秋山一男：呼気NO<sub>0</sub>およびモストグラフを用いた気道過敏性の予測、第63回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 62(9.10):1387、2013.11.28-30(東京)

42. 伊藤 潤、谷口正実、粒来崇博、渡井健太郎、福原正憲、林 浩昭、南 崇史、三井千尋、谷本英則、押方智也子、釣木澤尚美、関谷潔史、福富友馬、原田紀宏、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、熱田 了、高橋和久、秋山一男：かつてNO<sub>0</sub>が高値で、かつ一応安定している患者の5-7年後の肺機能などの予後の検討、第63回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 62(9.10):1388、2013.11.28-30(東京)
43. 林 浩昭、粒来崇博、渡井健太郎、三井千尋、福原正憲、南 崇史、谷本英則、福富友馬、押方智

也子、伊藤 潤、関谷潔史、釣木澤尚美、大友 守、前田裕二、森 晶夫、谷口正実、長谷川眞紀、秋山一男：MostGraphとACTの関連について；閉塞性障害のない症例群における検討、第63回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 62(9.10):1403、2013.11.28-30(東京)

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 重症喘息を対象としたオレンシア®の適応拡大をめざした医師主導治験

研究分担者 小林信之（独）国立病院機構東京病院統括診療部長）

### 研究協力者

庄司俊輔（国立病院機構東京病院副院長）

大島信治（国立病院機構東京病院アレルギー科医長）

田下浩之（国立病院機構東京病院呼吸器内科医長）

### 研究要旨

わが国の重症喘息の大部分は非アトピー型喘息であり、高用量吸入ステロイドに加えて経口ステロイド、テオフィリン、抗ロイコトリエン薬、長時間作用型β刺激薬等多種類の治療薬を併用してもなお満足な治療効果が得られていない。T細胞レベルのステロイド抵抗性の克服は、特に重要な課題と考えられる。そこで、森らの研究によって明らかになった CTLA4-Ig (Abatacept、オレンシア®)のステロイド抵抗性改善効果を検証する目的に、重症喘息を対象としたオレンシア®の適応拡大をめざした医師主導治験を計画した。初年度には、日本アレルギー学会より推薦を受け申請した結果、日本医師会治験推進センターの治験候補薬にリスト掲載された。PMDA 戦略相談を受け、GCP 準拠書類の作成を開始した。PMDA 事前面談を受け、コメントに従って、治験プロトコルおよび文書の最終調整中である。現段階では、5~6月 PMDA 事前面談（再）、その後、治験実施施設 IRB 審査、9月エントリー開始をスケジュールしている。

今年度の本研究班の成果によって、1)重症喘息に対する世界初の costimulatory signal をターゲットとする治療介入試験の実施に向け、順調なタイムラインで医師主導治験に向けた環境整備、準備、書類作成が進行中である。

### A. 研究目的

我々は、わが国の重症喘息の大部分が成人発症の非アトピー型喘息で、発症後短期間に重症化し、ステロイド抵抗性を特徴とすることを見出している。T細胞レベルのステロイド抵抗性は、costimulatory signal（共刺激）とサイトカインによって誘導される。本研究では、これらの前臨床研究の成果を受けて、抗リウマチ薬として認可されているオレンシア®の重症喘息を対象とした適応拡大を目指して、医師主導治験を実施する。2年目以降のフェーズ II 試験入りをめざして、まず初年度には、GCP 準拠文書を準備した。

### B. 方法

1) 研究代表者において、日本アレルギー学会より推薦を受け、日本医師会治験促進センター治験候補薬リスト掲載申請手続きを進めた。

2) 班会議に参加し、対象症例、選択基準、投与量、期間、スクリーニング法、主項目、副次項目等治験プロトコルの詳細について討議した。

3) 研究代表者において、独立行政法人医薬基盤研究所創薬支援戦略室の支援機能を活用するため、創薬ナビ申し込みを行った。PMDA 事前相談に先立って、戦略相談（個別面談）を受けた。CRO の選定を受けて、

GCP 準拠書類の準備を開始した。

4) 研究代表者において、PMDA 事前面談を受け、コメントに従って、治験プロトコルおよび治験文書をファイナライズ中である。

### （倫理面への配慮）

倫理面の配慮として、患者を対象とする調査、検査において、また、ヒト由来の細胞、組織等の試料を用いる場合には、ヘルシンキ宣言を遵守するとともに、わが国のヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）、疫学研究に関する倫理指針（平成 19 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号）、臨床研究に関する倫理指針（平成 20 年厚生労働省告示第 415 号）を遵守した。インフォームドコンセントを徹底するとともに、症例はコード化し、プライバシーの保護に万全を期した。実施に先立って研究者の施設における倫理委員会の承認を得たうえで、倫理規定に従って実施した。実験動物を使用する場合、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成 18 年 6 月 1 日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）及び研究者の施設における動物実験に関する倫理規定を遵守した。実験間のばらつきを考慮

した上で、統計学的有意性を議論しうる最小例数を算出し、その使用数を決定し、動物を保定、施術および致死させる場合は、最も苦痛を与えない方法を事前に検討した。

#### C. 結果およびD. 考察

1) 医師主導治験の開始に向け、日本アレルギー学会より推薦を受け、オレンシア®が、日本医師会治験促進センター治験候補薬にリスト掲載された。

2) 班会議に参加し、対象症例、エントリー基準、投与量、期間等につき討議した。院内の治験受け入れ準備を開始した。

3) 研究代表者が PMDA 個別面談を実施し、医師主導治験に向けた戦略相談を受けた。CRO の選定を受け、GCP 準拠書類の作成を開始した。当院では、手順書のうち、効果安全性評価委員会に関する手順書、モニタリングに関する手順書、監査の実施に関する手順書、総括報告書作成に関する手順書、統計解析に関する手順書、データマネジメントに関する手順書に加えて、統一書式の一部を担当した。

4) PMDA 事前面談においてフェーズ I をスキップ可とのコメントが得られた。その他のコメントに対応すべく、製造販売元のプリストルマイヤーズスクイブ社にコンタクトをとり、対応方針につき協議したが、協力が得られる態勢には到っていない。治験プロトコルおよび治験文書をファイナライズ中である。現段階では、5~6月 PMDA 事前面談(再)、その後、治験実施施設 IRB 審査、9月エントリー開始をスケジュールしている。

5) 次年度のフェーズ II エントリー開始を目指して、院内の医師主導治験実施体制の整備状況を確認し、エントリー候補となる症例のピックアップを行った。

#### E. 結論

重症喘息に対する CTLA4-Ig (Abatacept、オレンシア®) の適応拡大をめざした医師主導治験の進行状況として、GCP 準拠書類、文書の作成および院内の実施体制の整備を行った。

#### F. 健康危機情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Iikura M, Yi S, Ichimura Y, Hori A, Izumi S, Sugiyama H, Kudo K, Mizoue T, Kobayashi N. (2013) Effect of Lifestyle on Asthma Control in Japanese Patients: Importance of Periodical Exercise and Raw Vegetable Diet. PLoS ONE 8(7): e68290. doi:10.1371/journal.pone.0068290.

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 重症喘息を対象としたオレンシア®の適応拡大をめざした医師主導治験

研究分担者 谷本 安（独）国立病院機構南岡山医療センター臨床研究部長）

### 研究協力者

宗田 良（独）国立病院機構南岡山医療センター院長） 木村 五郎（同第一診療部長）  
河田典子（同呼吸器・アレルギー内科医長） 平野 淳（同内科医員）  
濱田 昇（同呼吸器・アレルギー内科医員） 小野勝一郎（同呼吸器・アレルギー内科医員）  
宮原信明（岡山大学病院呼吸器・アレルギー内科講師）

### 研究要旨

わが国の重症喘息の大部分は非アトピー型喘息であり、高用量吸入ステロイドに加えて経口ステロイド、テオフィリン、抗ロイコトリエン薬、長時間作用型β刺激薬等多種類の治療薬を併用してもなお満足な治療効果が得られていない。T細胞レベルのステロイド抵抗性の克服は、特に重要な課題と考えられる。そこで、森らの研究によって明らかになったCTLA4-Ig (Abatacept、オレンシア®)のステロイド抵抗性改善効果を検証する目的に、重症喘息を対象としたオレンシア®の適応拡大をめざした医師主導治験を計画した。初年度には、日本アレルギー学会より推薦を受け申請した結果、日本医師会治験推進センターの治験候補薬にリスト掲載された。PMDA 戦略相談を受け、GCP 準拠書類の作成を開始した。PMDA 事前面談を受け、コメントに従って、治験プロトコールおよび文書の最終調整中である。現時点では、5~6月 PMDA 事前面談（再）、その後、治験実施施設 IRB 審査、9月エントリー開始をスケジュールしている。

今年度の本研究班の成果によって、1)重症喘息に対する世界初の costimulatory signal をターゲットとする治療介入試験の実施に向け、順調なタイムラインで医師主導治験に向けた環境整備、準備、書類作成が進行中である。

### A. 研究目的

喘息患者全般の治療水準は大いに向上してきたが、約1割をしめる重症者においては、なお不十分な水準にとどまっている。そこで、われわれは、ステロイド抵抗性を特徴とする重症喘息群に対して、抗リウマチ薬として認可されているオレンシア®の適応拡大を目指した医師主導治験を実施する。2年目以降のフェーズII試験入りをめざして、まず初年度には、PMDAとの事前相談に基づき、プロトコールを決定し、GCP準拠書類を準備した。

### B. 方法

1)研究代表者において、日本アレルギー学会より推薦を受け、日本医師会治験促進センター治験候補薬リスト掲載申請手続きを進めた。

2) 班会議に参加し、対象症例、選択基準、投与量、期間、スクリーニング法、主項目、副次項目等治験プロトコールの詳細について討議した。

3)研究代表者において、独立行政法人医薬基盤研究所創薬支援戦略室の支援機能を活用するため、創薬ナビ申し込みを行った。PMDA事前相談に先立って、戦略相談（個別面談）を受けた。CROの選定を受けて、

GCP準拠書類の準備を開始した。

4)研究代表者において、PMDA事前面談を受け、コメントに従って、治験プロトコールおよび治験文書をファイナライズ中である。

### （倫理面への配慮）

倫理面の配慮として、患者を対象とする調査、検査において、また、ヒト由来の細胞、組織等の試料を用いる場合には、ヘルシンキ宣言を遵守するとともに、わが国のヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）、疫学研究に関する倫理指針（平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号）、臨床研究に関する倫理指針（平成20年厚生労働省告示第415号）を遵守した。インフォームドコンセントを徹底するとともに、症例はコード化し、プライバシーの保護に万全を期した。実施に先立って研究者の施設における倫理委員会の承認を得たうえで、倫理規定に従って実施した。実験動物を使用する場合、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）及び研究者の施設における動物実験に

関する倫理規定を遵守した。実験間のばらつきを考慮した上で、統計学的有意性を議論しうる最小例数を算出し、その使用数を決定し、動物を保定、施術および致死させる場合は、最も苦痛を与えない方法を事前に検討した。

#### C. 結果およびD. 考察

1) 医師主導治験の開始に向け、日本アレルギー学会より推薦を受け、オレンシア®が、日本医師会治験促進センター治験候補薬にリスト掲載された。

2) 班会議に参加し、対象症例、エントリー基準、投与量、期間等につき討議した。院内の治験受け入れ準備を開始した。

3) 研究代表者が PMDA 個別面談を実施し、医師主導治験に向けた戦略相談を受けた。CRO の選定を受け、GCP 準拠書類の作成を開始した。当院では、手順書のうち、効果安全性評価委員会に関する手順書、モニタリングに関する手順書、監査の実施に関する手順書、総括報告書作成に関する手順書、統計解析に関する手順書、データマネジメントに関する手順書に加えて、統一書式の一部を担当した。現段階では、2~3 月の PMDA 事前面談、5~6 月治験実施施設 IRB 審査、9 月エントリー開始をスケジュールしている。

4) PMDA 事前面談においてフェーズ I をスキップ可とのコメントが得られた。その他のコメントに対応すべく、製造販売元のプリストルマイヤーズスクイブ社にコンタクトをとり、対応方針につき協議したが、協力が得られる態勢には到っていない。治験プロトコルおよび治験文書をファイナライズ中である。現段階では、5~6 月 PMDA 事前面談(再)、その後、治験実施施設 IRB 審査、9 月エントリー開始をスケジュールしている。

5) 次年度のフェーズ II エントリー開始を目指して、院内の医師主導治験実施体制の整備状況を確認し、エントリー候補となる症例のピックアップを行った。

#### E. 結論

重症喘息に対する CTLA4-Ig (Abatacept、オレンシア®) の適応拡大をめざした医師主導治験の実施に向けて、順調に GCP 準拠書類、文書の作成および院内での環境整備を進めた。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Ikeda G, Miyahara N, Koga H, Fuchimoto Y, Waseda K, Kurimoto E, Taniguchi A, Tanimoto Y, Kataoka M,

Tanimoto M, Kanehiro A. Effect of a Cysteinyl Leukotriene Receptor Antagonist on Experimental Emphysema and Asthma Combined with Emphysema. Am J Respir Cell Mol Biol 50: 18-29, 2014.

2) Ueno-Iio T, Shibakura M, Iio K, Tanimoto Y, Kanehiro A, Tanimoto M, Kataoka M. Effect of fudosteine, a cysteine derivative, on airway hyperresponsiveness, inflammation, and remodeling in a murine model of asthma. Life Sci 92: 1015-23, 2013.

3) Koga H, Miyahara N, Fuchimoto Y, Ikeda G, Waseda K, Ono K, Tanimoto Y, Kataoka M, Gelfand EW, Tanimoto M, Kanehiro A. Inhibition of neutrophil elastase attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of secondary allergen challenge: neutrophil elastase inhibition attenuates allergic airway responses. Respir Res 14: 8, 2013 (Jan 24).

4) Kurimoto E, Miyahara N, Kanehiro A, Waseda K, Taniguchi A, Ikeda G, Koga H, Nishimori H, Tanimoto Y, Kataoka M, Iwakura Y, Gelfand EW, Tanimoto M. IL-17A is essential to the development of elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema in mice. Respir Res 14: 5, 2013 (Jan 20).

5) Kudo K, Ichihara E, Hisamoto A, Hotta K, Miyahara N, Tanimoto Y, Akagi S, Kato K, Tanimoto M, Kiura K. A definite case of (L)-carbocysteine-induced pneumonia with CATCH22 syndrome. Intern Med 52: 97-100, 2013.

6) 田村朋季, 谷本 安. 特集 II 鼻炎合併喘息 鼻炎合併成人喘息の治療. 臨床免疫・アレルギー科 60: 525-9, 2013.

7) 谷本 安, 宗田 良. 特集 成人気管支喘息の難治化要因とその対策 7. 精神的要因. アレルギー・免疫 20: 70-5, 2013.

##### 2. 学会発表

1) 谷本 安, 早稲田公一, 藤井詩子, 谷口暁彦, 古賀光, 宮原信明, 木浦勝行, 岡野光博, 岡田千春, 片岡幹男, 宗田 良, 谷本光音. 成人喘息における鼻炎と副鼻腔炎の合併に関する臨床的検討 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会(東京), 2013.

2) 谷口暁彦, 宮原信明, 金廣有彦, 早稲田公一, 栗本悦子, 藤井詩子, 谷本 安, 片岡幹男, 木浦勝行, 山本靖彦, 山本 博, 谷本光音. 気道過敏性とアレルギー性気道炎症における終末糖化産物受容体 (RAGE) の重要性 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会(東京), 2013.

3) 谷本 安, 能島大輔, 早稲田公一, 藤井詩子, 谷口暁彦, 栗本悦子, 古賀 光, 宮原信明, 木浦勝行, 岡野光博, 岡田千春, 片岡幹男, 宗田 良, 谷本光音. 成人喘息に合併する副鼻腔炎の臨床的検討 第 25 回日



本アレルギー学会春季臨床大会（横浜），2013.

4) 谷本 安，能島大輔，早稲田公一，藤井詩子，谷口  
暁彦，栗本悦子，古賀 光，宮原信明，木浦勝行，岡  
田千春，片岡幹男，宗田 良，谷本光音. 成人喘息に  
合併する鼻炎の臨床的検討 高齢者と非高齢者との比  
較 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会（東京），2013.

5) 栗本悦子，金廣有彦，宮原信明，古賀 光，池田  
元洋，早稲田公一，谷口暁彦，谷本 安，片岡幹男，谷  
本光音. マウス喘息モデルにおけるトレハロースの  
効果 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会（東京），  
2013.

6) 早稲田公一，宮原信明，金廣有彦，谷口暁彦，栗  
本悦子，古賀 光，池田元洋，能島大輔，谷本 安，片

岡幹男，木浦勝行，山本 博，谷本光音. 肺気腫進展  
における終末糖化産物受容体（RAGE）発現の重要性  
第 53 回日本呼吸器学会学術講演会（東京），2013.

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 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）  
分担研究報告書

重症喘息を対象としたCTLA4-Ig（Abatacept, オレンシアR）の適応拡大を  
めざした医師主導治験および非臨床研究（H25-難治等（免）-一般-006）

研究分担者

松元 幸一郎 九州大学病院呼吸器科 講師

研究協力者

中西 洋一（九州大学大学院医学研究院附属胸部疾患研究施設教授）

福山 聡（同助教）

中野 貴子（同助教）

田尻 友香里（同大学院生）

神尾 敬子（同大学院生）

東 みゆき（東京医科歯科大学分子免疫学講座教授）

大野 建州（同助教）

井上 博雅（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科呼吸器内科学教授）

研究要旨

A. 研究目的:喘息においては樹状細胞と抗原特異的Th2細胞との相互作用が重要なステップであり、その過程では共刺激分子が関与する。樹状細胞に発現するCD86とT細胞に発現するCD28が結合することによってT細胞の活性化を誘導する。CD86-CD28シグナルは抗原感作の成立に必須であることが多くの実験的喘息モデルで明らかにされているが、既に感作が成立した個体が抗原に再曝露されておこる気道炎症・喘息反応におけるCD86-CD28シグナルの意義については明らかでない。診療対象となるのは既に感作の成立した喘息患者であり、CD86-CD28が治療標的として有望であるかどうかを基礎レベルで明らかにする必要がある。そこでRNA干渉（siRNA）を用いたCD86抑制の影響をマウス喘息モデルで検討した。

B. 研究方法:マウス骨髄から分化誘導した樹状細胞を活性化することによってCD86の発現を誘導した。このCD86発現に対するsiRNA前投与の効果を検討した。また、マウスを卵白アルブミンを模擬抗原として感作し、2週間後に抗原を吸入曝露させて喘息様反応を惹起した。抗原曝露の過程でsiRNAを経気道投与し、喘息様反応に対する効果を検討した。

C. 結果:樹状細胞活性化によるCD86発現誘導はsiRNA処置によって抑制された。siRNA処置された樹状細胞は抗原特異的Th2細胞の活性化誘導能が減弱していることが確認された。抗原曝露の過程で経気道的に投与されたsiRNAは気道粘膜に分布する樹状細胞上のCD86発現を有意に抑制することが蛍光顕微鏡による観察で確認された。さらに、siRNA投与は抗原曝露後に生じる好酸球性気道炎症や気道過敏性亢進、および抗原特異的IgEの上昇を有意に抑制することが確認された。

D. 考察:我々の使用したsiRNAはCD86発現を抑制できるものと考えられた。さらに、個体レベルの実験で抗原曝露によって生じる喘息様反応はsiRNAで抑制可能と考えられた。E. 結論:抗原感作が成立した後であっても、CD86発現を抑制することによって喘息様反応が抑制されることから、ヒトの喘息においてもCD86-CD28シグナルの遮断が新たな治療手段として有望である可能性が示された。

## A. 研究目的

喘息においては樹状細胞(抗原提示細胞)と抗原特異的 Th2 細胞との相互作用が重要なステップであり、その過程で B7 ファミリーを代表とする共刺激分子群が関与している(図 1 参照)。すなわち、抗原提示の際に、樹状細胞に発現する CD86 と T 細胞側に発現する CD28 が結合することによって Th2 細胞の誘導と活性化が惹起される(図 2 参照)。この、CD86-CD28 シグナルは、特に抗原感作の成立に必須であることが多くの実験的喘息モデルで明らかにされている(図 3 参照)。しかし、既に感作が成立した個体が抗原に再曝露されておこる気道炎症・喘息反応における CD86-CD28 シグナルの意義については未だ明らかではない。我々が実地診療で対象とするのは既に感作の成立した喘息患者であり、CD86-CD28 が治療標的として有望であるかどうかを基礎実験レベルで明らかにする必要がある。

治療抵抗性の重症喘息機序の解明と新規治療法の開発は喘息研究分野に残された重要課題の一つである。重症喘息の多くはステロイド抵抗性を特徴としている。研究代表者の森、および研究分担者の神沼らは、培養細胞系モデル(in vitro)、および T 細胞移入マウス喘息モデル(in vivo)において、ステロイド抵抗性の解析・治療モデルを樹立し、CTLA4-Ig によるステロイド感受性回復効果を証明した。これら前臨床研究の成果を受けて、抗リウマチ薬として本邦で認可されているアバタセプトの重症喘息を対象とした適応拡大を目指して、本医師主導治験が開始された。本治験で使用予定のアバタセプトは合成融合タンパク製剤であり、高コストであることが、医療経済面での課題である。アバタセプトが標的としている CD80,CD86 を代表とする共刺激分子群を介したシグナルを人為的に制御しうる、より安価で安全な治療薬がのぞまれる。

研究分担者は、感作成立後の喘息病態における共刺激シグナル制御の有効性の検証、低コストで安全性の高い共分子刺激制御薬の探索、およびその問題点の抽出を目的として、RNA 干渉(siRNA)を用いた CD86 抑制の影響をマウス喘息モデルで検討した。

## B. 研究方法

### 1. マウス骨髄由来樹状細胞における CD86 発現に対する siRNA 処置の有効性の検証を目的とした実験

マウス骨髄細胞を GM-CSF 刺激することによって未熟樹状細胞を分化誘導した。未熟樹状細胞では CD86 の発現は軽微であるが、これにリポポリサッカライド(LPS)刺激を加えると 12 時間から 24 時間で CD86 の発現が亢進し、樹状細胞も成熟化することが知られている。そこで、Genlantis 社のトランスフェクション試薬(Gene Silencer)を用いて CD86 をロックダウンする siRNA、あるいはダミーのコントロール siRNA を未熟樹状細胞に取り込ませ、24 時間後に LPS 刺激を加え、さらに 18 時間経過した段階での CD86 発現の程度をフローサイトメトリー法(使用機器:ベクトン・ディキンソン社の FACSCalibur)で検討した。本研究で使用した siRNA は、東みゆき教授(東京医科歯科大学分子免疫学講座)らが開発したものであり共同研究として無償供与されたものである。

### 2. siRNA 処置された樹状細胞が抗原特異的 Th2 細胞を活性化する能力を検討する目的の実験

#### A. 抗原特異的 Th2 細胞の作製

マウス喘息モデルの模擬抗原として卵白アルブミン(ovalbumin, OVA)およびそのペプチド断片(pOVA)が汎用されている。この pOVA に対する T 細胞受容体を強制発現させた遺伝子改変マウス DO11.10(米国ミズーリ州 Washington 大学の K. Murphy 教授から無償供与)の脾臓から磁気ビーズ分離法を用いて CD4 陽性 T 細胞を多量に分離した。この CD4 陽性 T 細胞を抗原である pOVA, IL-4, 抗 IL-12 抗体、刺激用抗 CD28 抗体を添加した条件下で同系マウス脾臓から分離調整した抗原提示細胞と共培養した。T 細胞増殖因子である IL-2 添加下に 8 日間培養し、再度磁気ビーズ分離法で pOVA 抗原特異的 Th2 細胞を分化誘導した。

#### B. siRNA 処置樹状細胞の作製と Th2 細胞との共培養

1 の手順で作成した siRNA 処置未熟樹状細胞に LPS と pOVA を同日に添加して 24 時間培養し、抗原取り込み済みの成熟樹状細胞を作製した。この樹状細胞と A で作製した pOVA 抗原特異的 Th2 細胞を共培養し、24 時間後の培養上清を採取し、Th2 サイトカインである IL-4, IL-5, IL-13 濃度を ELISA 法(Invitrogen 社あるいは R&D System 社製の測定キット)で測定した。

### 3. マウス喘息モデルにおける CD86 発現に対する経気道の siRNA 投与効果を検討する実験

喘息モデル作製に汎用されている BALB/c 系純系マウスを第 1 日および第 14 日の計 2 回、10microgram の OVA を 0.3mg の水酸化アルミニウムを含有する溶液として腹腔内投与し、OVA に対する感作を成立させた。CD86siRNA あるいはコントロール siRNA を 12.5microgram、50microliter の生理食塩水に溶解し、第 26 日から 28 日の 3 日間連日でセボフルレン吸入麻酔下に経気管内投与した。siRNA 投与 1 時間後に 1%の OVA 溶液(生理食塩水で溶解)を超音波ネブライザーでエアロゾル化し、感作マウスを専用の曝露チャンパー内で 30 分間曝露した。第 30 日にマウスを安楽死させ、摘出肺を OCT コンパウンドに包埋後、液体窒素にて凍結保存した。包埋標本から Kawamoto 法を用いて凍結切片プレパラート標本作製し、FITC 標識抗 CD86 抗体(BD Bioscience 社)にて処理後、オリンパス社製の BX61 倒立蛍光顕微鏡にて画像解析した。

### 4. マウス喘息モデルにおける喘息様反応に対する経気道の siRNA 投与効果を検討する実験

3 の手順でマウス喘息モデルを作製し、第 30 日にソムノペンチル麻酔下での吸入アセチルコリンミストによる気道内圧変化を気道収縮の指標とし、気道過敏性を測定した。アセチルコリンは Sigma 社製のアセチルコリン粉末を生理食塩水に段階希釈して作製し、超音波ネブライザー(オムロン社製)でミストとした。気道内圧は日本光電社製の差圧型トランスデューサー(TP-603T)で測定し、AD Instruments 社のオペレーションアンプで増幅したものを Apple 社製の解析ソフトウェアである MacLab で解析した。気道過敏性測定終了後、生理食塩水による気管支肺

胞洗浄をおこない、回収液の一部は血算板を用いて総細胞数を算出した。残りの回収液からサイトスピン切片プレパレートを作製し、Diff-Quik 染色を施し、各細胞分画を検討した。また回収液の遠心上清は凍結保存した。採血し血清の OVA 特異的 IgE を ELISA 法 (Shibayagi 社製キット) にて測定した。上記測定終了後、マウスを安楽死させ、肺および気管を摘出しホルマリン固定標本を作製した。

#### 倫理面への配慮

九州大学動物実験規則第 12 条第 4 項の規に基づき実験プロトコルを作成し、倫理審査委員会の承認を得て実施した。  
承認番号: A25-007-0

### C. 研究結果

#### 1. 樹状細胞における CD86 発現に対する siRNA 処置の有効性の検証

実験手順の概要と実験結果を図 4 に示す。フローサイトメトリーによる CD86 発現をヒストグラムで表示すると、LPS 無刺激と比較して LPS 刺激によってヒストグラムピークの右方シフトがみられ、CD86 発現の増強が示された。この CD86 発現増強は CD86siRNA 処置によって減弱した。これは CD86 発現を平均蛍光強度 (mean fluorescent intensity; MFI) で表示した棒グラフにおいても明らかである。すなわち、我々が使用した CD86siRNA は *in vitro* において樹状細胞の CD86 発現を有意に抑制しうることが示された。

#### 2. siRNA 処置樹状細胞が抗原特異的 Th2 細胞を活性化能力の検討

図 5 に実験手順概要と実験結果を示す。DO11.10 マウス脾臓から分化誘導した pOVA 特異的 Th2 細胞と siRNA 処置および抗原取り込み済み成熟樹状細胞の共培養を 24 時間おこなった後の培養上清には、Th2 活性化の証として IL-4、IL-5、IL-13 などの Th2 サイトカインが検出される。CD86siRNA 処置された樹状細胞を用いた共培養上清のこれらサイトカイン濃度は、干渉能を有さないコントロール siRNA 処置された樹状細胞を用いた共培養上清のそれとくらべて有意に低値であった。これらの結果から、我々が使用した CD86siRNA は *in vitro* において抗原特異的 Th2 の活性化能力が減弱していることが示された。

#### 3. 喘息モデルにおける CD86 発現に対する経気道的 siRNA 投与効果の検討

図 6 に実験手順概要と実験結果を示す。抗原感作・曝露をしていない無処置マウス (naïve) の気道標本では気道上皮層の粘膜組織側に FITC 蛍光を発する CD86 陽性細胞が僅かに散在するのみである。OVA 感作・曝露およびコントロール siRNA 気管内投与をおこなったマウスの気道標本では FITC 蛍光を発する CD86 陽性細胞が明らかに増加している。これは抗原曝露の刺激によって樹状細胞が成熟し CD86 発現が増強していることを示唆する。これに対し、CD86siRNA を気管内投与したマウスの気道標本では CD86 陽性細胞が減少している。CD86 陽性スポットを解析格子単位 (pixel area) で半定量化した棒グラ

フでは、CD86siRNA によって CD86 スポットは半分程度まで減少していることが判る。

#### 4. 喘息モデルにおける喘息様反応に対する経気道的 siRNA 投与効果の検討

図 7 に実験手順概要と実験結果を示す。抗原感作・曝露をしていない無処置マウス (naïve、細点線で表示) においても、吸入アセチルコリン濃度が増加するにつれて気道内圧が上昇しており、気道収縮が生じていることがわかるが、その上昇は緩やかである。OVA 感作・曝露およびコントロール siRNA 気管内投与をおこなったマウス (粗点線で表示) ではこの収縮が急峻化しており、気道過敏性が亢進していることを示している。これに対し、CD86siRNA を気管内投与したマウスでは naïve マウスとコントロール siRNA 気管内投与マウスの中間程度の収縮反応を呈しており、気道過敏性が部分的に抑制されていることを示している。気管支肺胞洗浄液の炎症細胞では好酸球 (Eos と表示) の細胞数が naïve マウスでは殆どゼロであったのが、OVA 感作・曝露およびコントロール siRNA 気管内投与をおこなったマウスでは著明に増加 (白の棒グラフ) しているが、CD86siRNA を気管内投与したマウス (赤の棒グラフ) では 3 分の 1 程度に抑制されていた。さらに血清中の OVA 特異的 IgE 濃度は naïve マウスでは検出されないが、OVA 感作・曝露およびコントロール siRNA 気管内投与をおこなったマウス血清では 500IU/ml 程度まで抗体価上昇がみられる。CD86siRNA 投与マウス血清では半分程度に抑制されていた。

#### D. 考察

本研究において、CD86 を標的とした siRNA は喘息モデルに対して治療の有効性が示された。すなわち、CD86siRNA は *in vitro* で樹状細胞成熟化にともなう CD86 発現の増強を抑制し、CD86siRNA 処置された樹状細胞は抗原特異的 Th2 細胞の抗原刺激後の活性化が減弱しており、CD86siRNA 気管内投与によって抗原曝露後の気道粘膜における CD86 発現が抑制され、さらに、抗原曝露後の気道過敏性の亢進や好酸球性気道炎症、抗原特異的 IgE 上昇などが抑制された。

我々が本研究で使用した CD86siRNA は共同研究者 (東みゆき教授、東京医科歯科大学分子免疫学講座) が独自に作製し、マウス接触性皮膚炎モデルにおいて同 CD86siRNA を含有する軟膏の塗布によって皮膚炎の抑制効果が示されている (Ritprajak et al. Mol Ther 2008;16:1323-1330)。今回我々は *in vitro*, *in vivo* の両面において喘息病態をモデル化し、いずれも CD86siRNA による CD86 発現の低下と機能的抑制が確認できた。最も重要な知見は、既に感作が成立した、すなわち既に喘息を発症した個体においても喘息病態の成立に CD86 が関与しており、その機能的制御が治療に結びつく可能性を提示したことにある。研究代表者 (森ら) が報告しているように、T 細胞レベルでのステロイド抵抗性の成立に CD86-CD28 シグナルが関与していることを考え合わせると、難治性喘息にも CD86 の発現抑制が新たな治療的選択肢となりうることを示唆する。

CTLA4-Ig や抗体製剤はいずれも高分子の合成タンパク製剤であり、その製造と品質管理には多大なコストがか

かり、高価な薬剤となっている。難治性喘息は我が国でも全喘息患者の1割程度を占めており、これらの患者に生物製剤を臨床応用した場合の医療経済的負担が懸念事項となる。それに対し、siRNAを代表とする核酸医薬品は、分子構造の単純性に基づく製造コストの低さが大きな利点といえる。また、本研究ではsiRNAを経気道的に投与し、喘息様反応の抑制効果が得られた。標的臓器である気道・肺に直接薬剤を到達させることができるのは薬効の高さと投与量を節約できるという利点もある。

以上のような研究成果の一方で、本研究には幾つか解決すべき課題が残されている。一つは、siRNAが実際に気道粘膜の樹状細胞に直接的に取り込まれることによってCD86発現の抑制をもたらしたのかが確認できていない点である。siRNAを培養液中に添加するだけでは細胞に取り込ませることが困難であることが一般的見解である。実際、我々が方法及び結果の1,2で示した*in vitro*の実験ではsiRNAをトランスフェクションを容易化する試薬を用いて樹状細胞に取り込ませている。しかし3,4で示した*in vivo*の実験では容易化させる試薬を一切使用せずにsiRNAを生理食塩水に溶解して投与し、気道のCD86発現が低下し、喘息様反応の抑制が得られている。このような単純な投与形式でも効果が得られたことは*in vivo*における気道の樹状細胞の旺盛な貪食能に由来する可能性があるが、何らかの追加実験によってその可能性を検証する必要がある。二つめの課題は、使用したsiRNAが自然免疫反応を惹起した可能性についてである。約30塩基対以上の長さの2本鎖RNAは哺乳類の細胞には元来存在せず、ウイルス由来の遺伝子核酸の中間産物として感染細胞内に一過的に生じうる。これらの2本鎖RNAは細胞レベルで強い自然免疫反応(インターフェロン応答やTNF- $\alpha$ 、IL-6などの炎症性サイトカイン産生など)を誘導することが知られている。我々が本研究で使用したsiRNAは21塩基対と短鎖であるが、予想に反してマウスに自然免疫応答を引き起こし、研究結果の一部がその影響によってもたらされている可能性は完全には否定できない。この可能性を検証するために血清におけるインターフェロンやIL-6の上昇の有無を検証する必要がある。三つめの課題は、CD86siRNAによる気道過敏性の減弱や好酸球性炎症の減弱効果が具体的にどのような液性メディエーターの変動によってもたらされたのかについてである。気道過敏性や好酸球性炎症、IgE産生などにはTh2細胞の活性化とそれによって産生されるIL-5、IL-13などのサイトカインやケモカインが関与する。CD86の発現が抑制されることによって、これら液性メディエーターのいずれが変動するかを詳細に解析する必要がある。最も寄与するメディエーターが特定できれば、CD86シグナルの下流でステロイド抵抗性に寄与する有力な標的分子を絞り込むことに繋がるであろう。

本研究から、siRNAによる共刺激分子の機能的制御を介してステロイド抵抗性を克服する基本的成果が得られたが、さらには他の薬理学的アプローチの開発もすすめる必要がある。我々を含めた研究(Kibe et al. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:50-56)の蓄積から、IL-13によってもたらされる気道過敏性や気道リモデリングはステロイド抵抗性であり、難治性喘息の治療薬として抗IL-13抗体の臨床応用がすすめられている。また、難

治性喘息の急性増悪の多くは気道ウイルス感染によって引き起こされ、この増悪は吸入ステロイド増量による治療が奏功しにくい。我々と研究代表者の森は、活性化T細胞から産生されるIL-13やウイルス関連分子である2本鎖RNAでヒト気道上皮細胞株を刺激すると共刺激分子B7-H1(別名PD-L1)が発現誘導されることを報告した(Tsuda et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;330:263-270)。B7-H1はウイルス特異的細胞傷害性T細胞の機能を強力に抑制することによってウイルス感染細胞の排除を障害し、気道ウイルス感染が遷延化することが動物実験モデルによって示されている。しかも2本鎖RNA刺激によるB7-H1発現はステロイド抵抗性であり、喘息の難治化に関与していることが想定される。最近、我々は2本鎖RNA刺激による培養気道上皮細胞のB7-H1発現誘導にPI3キナーゼデルタと呼ばれる酵素が関与していることを明らかにした(Kan-o et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;435:195-201)。PI3キナーゼデルタは酸化ストレスによって活性化する酵素でありステロイド抵抗性の誘導にも関与することが知られている。実際、PI3キナーゼデルタ阻害薬は2本鎖RNA刺激によるB7-H1発現を抑制する。この阻害薬による難治性喘息、特にステロイド抵抗性の克服をめざして*in vivo*の実験モデルによる検証、およびCD86発現への効果の検証を開始したところである。

## E. 結論

CD86siRNAは*in vitro*で樹状細胞成熟化にともなうCD86発現の増強を抑制し、CD86siRNA処置された樹状細胞は抗原特異的Th2細胞の抗原刺激後の活性化が減弱しており、CD86siRNA気管内投与によって抗原曝露後の気道粘膜におけるCD86発現が抑制され、抗原曝露後の喘息様反応が抑制された。これらの研究結果に基づいて、CD86を標的とするsiRNAは喘息モデルに対して治療的有効性が示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kan-o K, Matsumoto K, Inoue H, Fukuyama S, Asai Y, Watanabe W, Kurokawa M, Araya J, Kuwano K, Nakanishi Y. 2013. Corticosteroids plus long-acting beta2 agonist prevent double-stranded RNA-induced upregulation of B7-H1 on airway epithelium. *Int Arch Allergy Immunol*. 160: 27-36.
2. Kan-o K, Matsumoto K, Asai-Tajiri Y, Fukuyama S, Hamano S, Seki N, Nakanishi Y, Inoue H. 2013. PI3K-delta mediates double-stranded RNA-induced upregulation of B7-H1 in BEAS-2B airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 435: 195-201.



2. 学会発表

平成 26 年度中の学会発表を目指している。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

図1 B7ファミリー共刺激分子群

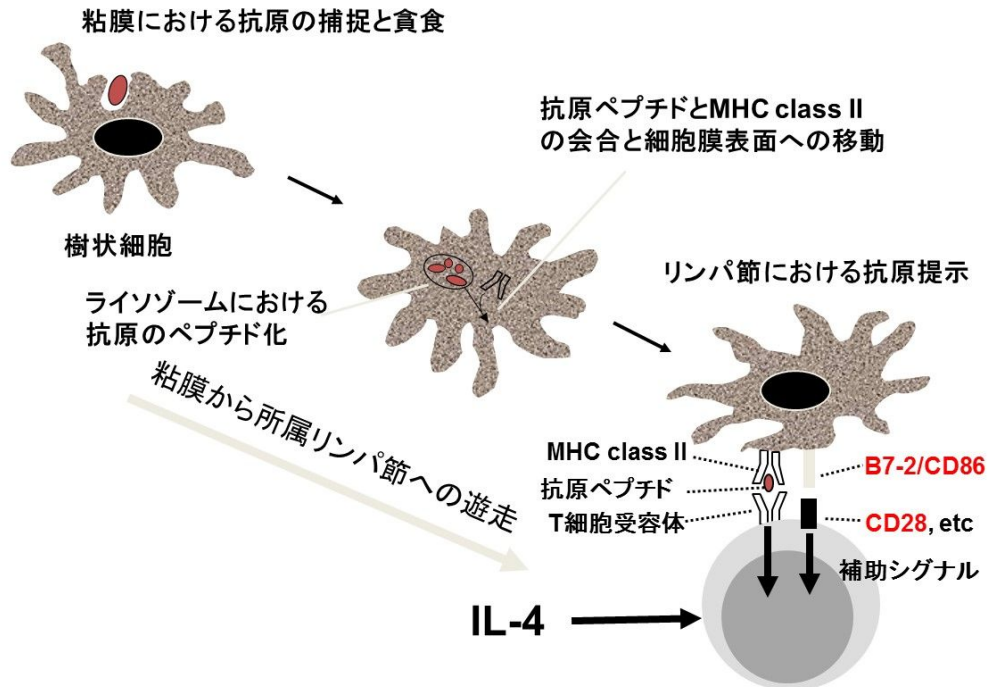
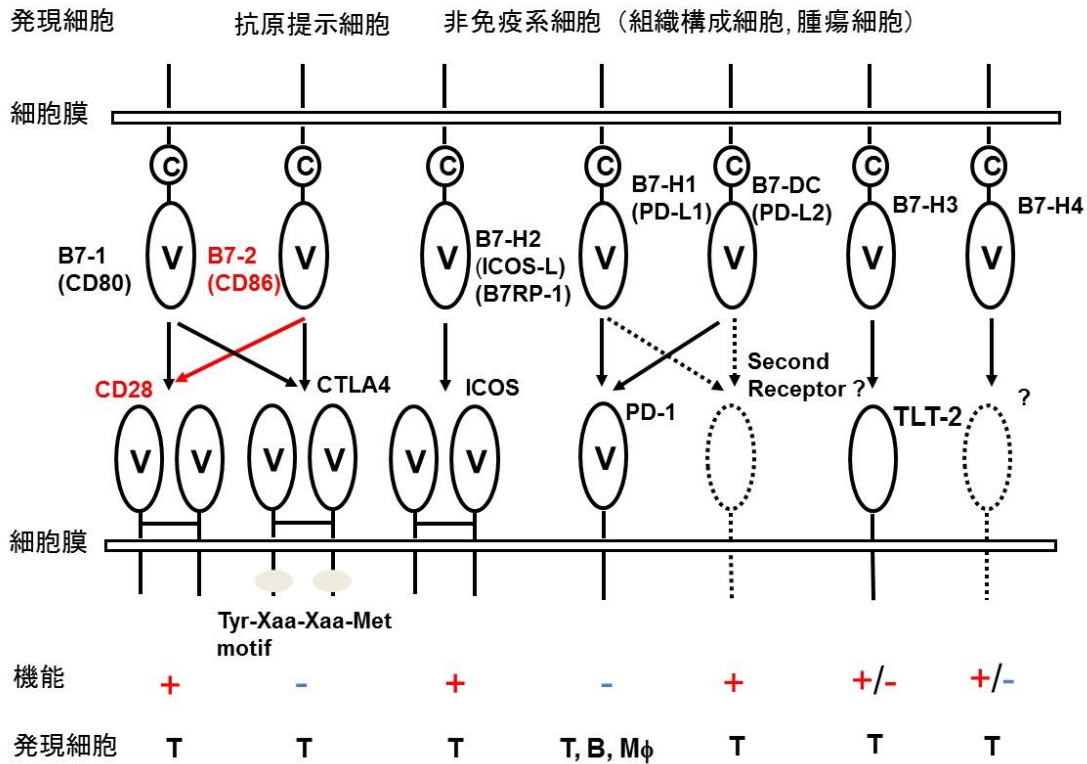


図2 樹状細胞活性化によるアレルギー特異的Th2分化

図3 マウス喘息モデルにおけるB7-2/CD86-CD28/CTLA-4

anti-CD80mAb/anti-CD86mAb	Th2性気道炎症と気道過敏性の減弱 Tsuyuki et al., 1997 Harris et al., 1997 Keane-Myers et al., 1998 Mark et al., 1998 Haczku et al., 1999
CTLA-4-Ig	Th2性気道炎症と気道過敏性の減弱 Tsuyuki et al., 1997 Van Oosterhout et al., 1997 Padrid et al., 1998
CD80/CD86 <sup>-/-</sup> mice	Th2性気道炎症と気道過敏性の減弱 Mark et al., 2000
CD28 <sup>-/-</sup> mice	Th2性気道炎症と気道過敏性の欠失 Mathur et al., 1999 Lambrecht et al., 2000 Burr et al., 2001
CD28 <sup>-/-</sup> /CTLA-4 <sup>-/-</sup> mice	Th2性気道炎症と気道過敏性の欠失 Deurloo et al., 2003

CD86とCD28を介するシグナルはアレルギー特異的Th2の誘導(アレルギー感作)の成立に必須

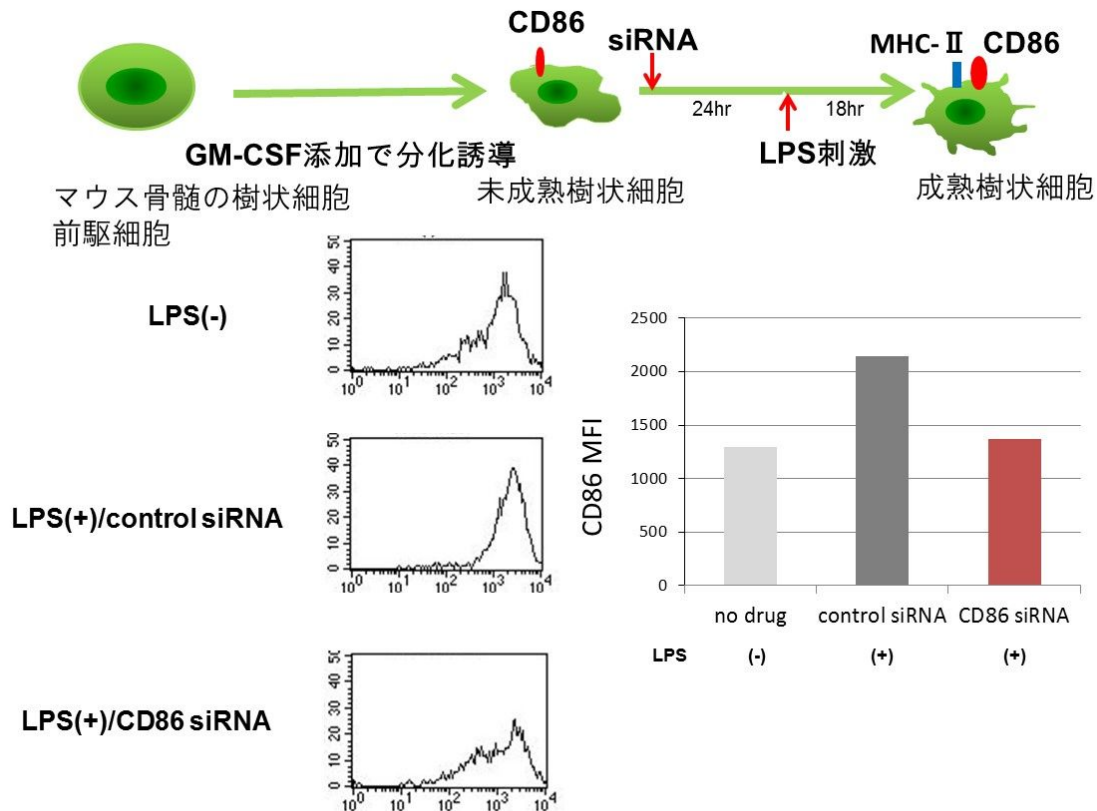


図4 樹状細胞におけるCD86発現に対するsiRNA処置の有効性)

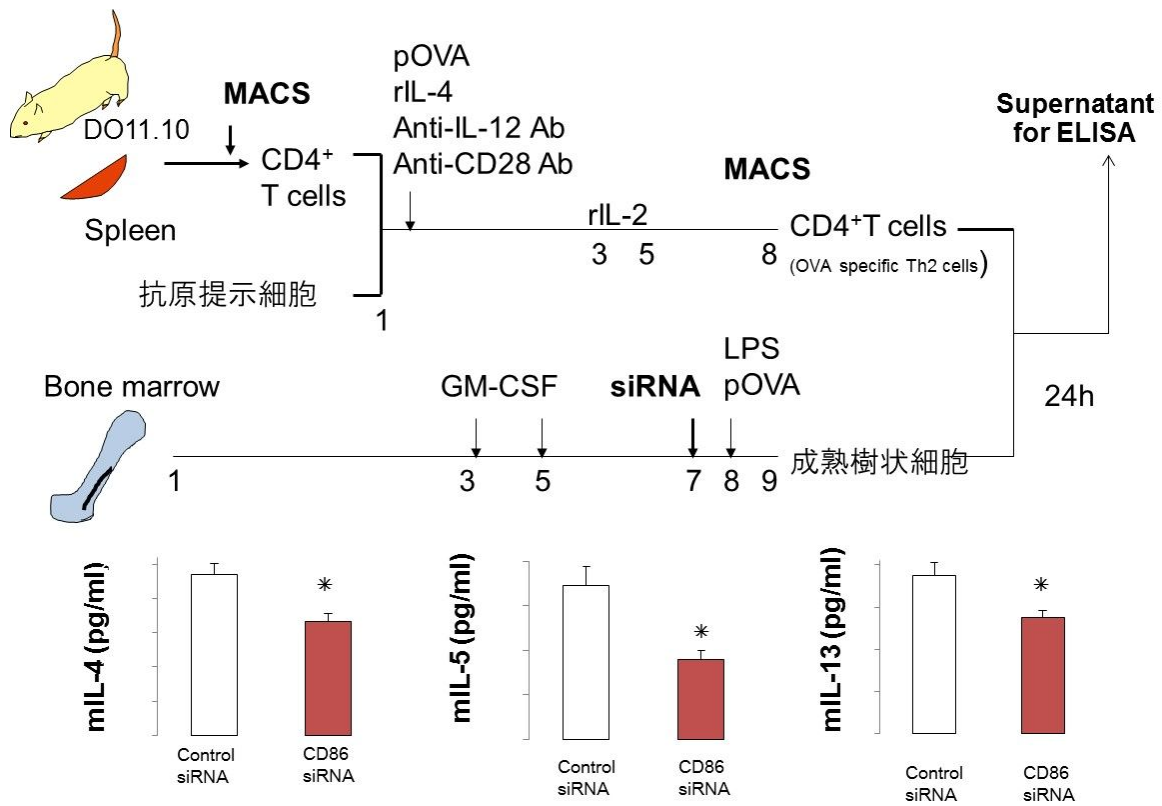


図5 siRNA処置樹状細胞における抗原特異的Th2細胞活性化能力

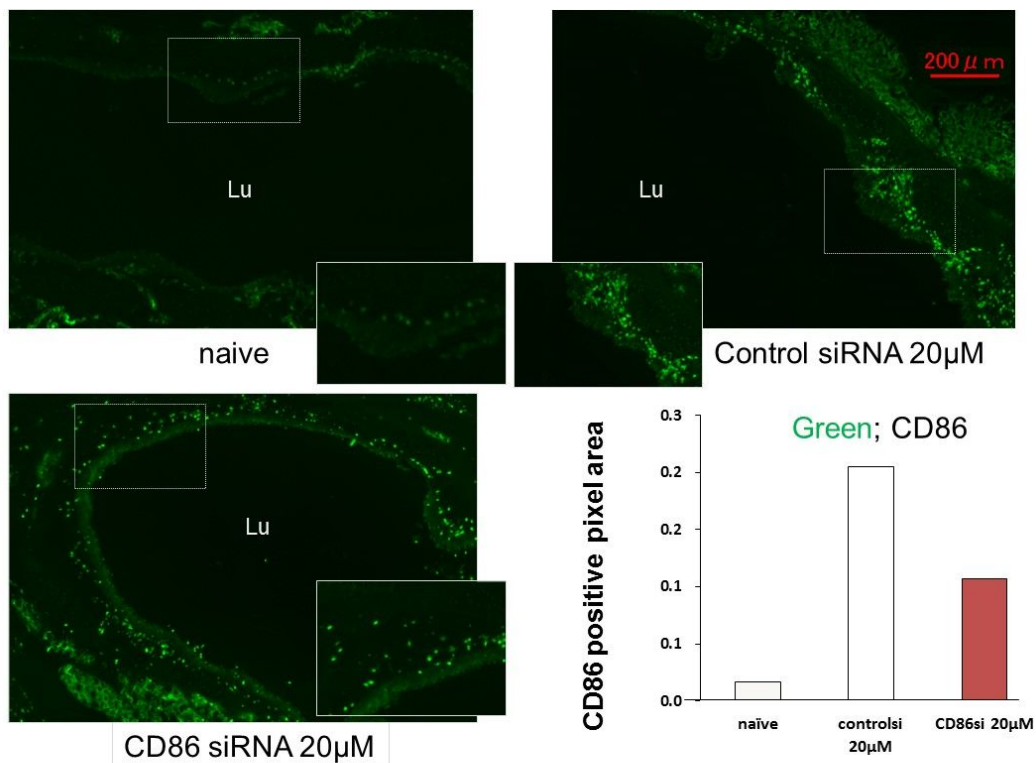


図6 抗原曝露12時間後の気管粘膜におけるCD86陽性細胞

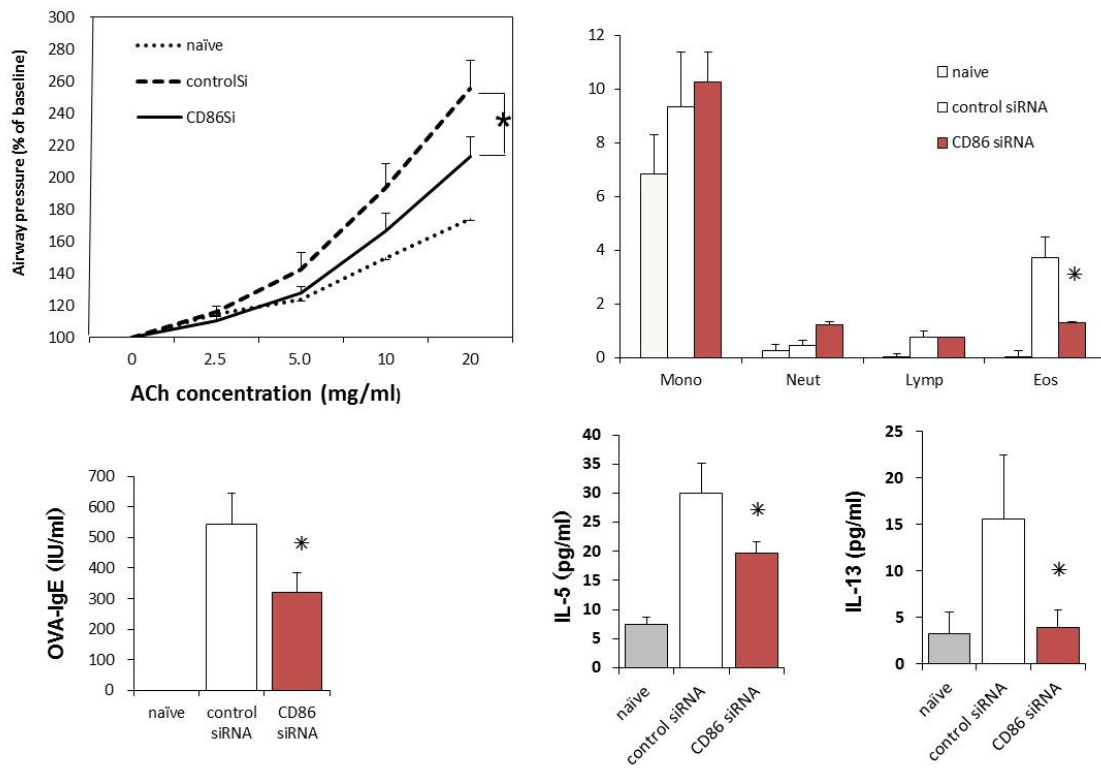


図7 抗原曝露後の喘息様反応に対する経気道的CD86siRNA投与の効果



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）  
分担研究報告書

重症喘息を対象としたCTLA4-Ig (Abatacept、オレンシア®) の適応拡大  
をめざした医師主導治験および非臨床研究

研究分担者 神沼 修 (東京都医学総合研究所主任研究員)

研究協力者

佐伯真弓 (同研究所研究員)

西村友枝 (同研究所研究員)

研究要旨

T 細胞レベルのステロイド抵抗性が難治性喘息の特徴でありメカニズム解明が重要であるが、その解析が可能なモデルはない。さまざまな OVA 特異的 Th クローンを樹立してステロイド感受性について *in vitro* における抗原誘発増殖反応を指標に検討したところ、DEX 添加により増殖抑制されるクローンと抑制されないクローンが見いだされた。それらを正常マウスに移入して抗原誘発好酸球浸潤および気道過敏性亢進に対する DEX の影響を検討したところ、*in vitro* におけるステロイド感受性は *in vivo* にも反映されることが明らかとなった。本モデルは、T 細胞レベルのステロイド抵抗性および、個体レベルでのステロイド抵抗性喘息、感受性喘息モデルのメカニズムの解明や、治療薬の評価を行う上で有用である。

A. 研究目的

T 細胞レベルのステロイド抵抗性が難治性喘息の特徴であることが明らかになっている。ステロイド抵抗性のメカニズム解明は、難治性喘息の治療介入に向けた突破口として重要課題である。転写因子、細胞レベルの知見は比較的豊富であるが、個体レベルでステロイド抵抗性喘息の解析が可能なモデルの報告は未だ世界的にもみられない。そこで、*in vitro*、*in vivo* の両レベルでステロイド感受性・抵抗性を詳細に解析すると同時に、治療介入に向けた評価系として活用することをめざして、ステロイド抵抗性喘息モデルの樹立と解析を試みた。

B. 研究方法

1) 既報の如く Balb/c マウスを OVA で感作し、所属リンパ節より感作リンパ球を回収、*in vitro* での抗原刺激、limiting dilution を行って、OVA 特異的 Th clone を樹立した (Kaminuma O. et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 16:448, 1997)。OVA 特異的 T 細胞受容体の transgenic である DO11.10 マウスからも同様の手法で Th clone を樹立した。Irradiated spleen cell を antigen-presenting cell とし、subcloning を行い、さらに expansion し、細胞移入実験に使用した。*in vitro* のステロイド感受性は、 $4 \times 10^4$  個の Th clone を抗原提示細胞、抗原、各濃度のデキサメサゾン (DEX) とともに 96 well culture plate にて培養し、48 時間後に上清を採取、72 時間後に細胞増殖反応を計測した。

$^3\text{H}$ -thymidine を最後の 16 時間パルスした。*in vivo* のステロイド感受性は、Th clone 受身移入による喘息モデルを用いて解析した。 $5 \times 10^6$  個の Th clone を無処置マウスに尾静脈より注入し (Day 0)、翌日 OVA を経気道的に抗原チャレンジした。48 hr 後、BUXCO にてメサコリン気道反応性を測定、気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、細胞数、分画を測定した。1, 3 mg/kg の DEX を Day 1, 2 に皮下投与した。

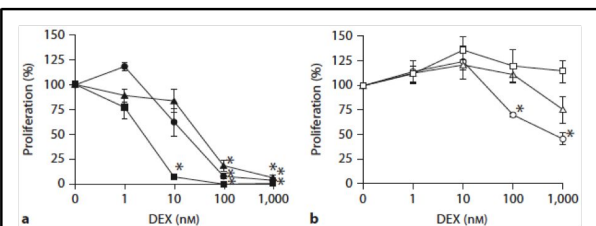


図1. ステロイド感受性および抵抗性クローンの増殖反応に対するデキサメサゾン (DEX) の効果. a ステロイド感受性クローンBF7, T6-2およびT6-10をX線照射した同系マウスの脾臓細胞、OVA (20  $\mu$ g/well)およびDEX (0-1,000 nM)と共に72時間培養し、 $^3\text{H}$ -thymidine (0.5 mCi/well)を18時間パルスした. b ステロイド抵抗性クローンT5-1, T6-4およびT6-7も同様に培養した. クローンBF7 (●), T6-2 (▲), T6-10 (■), T5-1 (○), T6-4 (△)およびT6-7 (□)の増殖反応はDEX非添加のコントロール値に対するパーセンテージで示した (N = 8). \* p < 0.05 (コントロールとの比較)

(倫理面への配慮)

実験は、動物実験に関する倫理規定を遵守して行い、統計学的優位性を議論しうるできるだけ少ない動物数を実験に供した。

### C. 研究結果およびD. 考察

1) *in vitro*のステロイド感受性解析により、6種類のTh cloneは、DEXにより細胞増殖反応が抑制されるsteroid sensitive (SS) clone 3クローン (BF7, T6-2, T6-10) と抑制されない steroid resistant (SR) clone 3クローン (T5-1, T6-4, T6-7) とに分類された。サイトカイン産生は、SR cloneのほうがIC<sub>50</sub>値が高いものの、抑制された(図1)。

2) Th clone 移入、抗原チャレンジによる、T細胞依存性喘息モデルをDEX投与で治療することによって、SS clone を移入されたマウスでは、BALF 好酸球浸潤およびメサコリンに対する気道過敏性亢進が有意に抑制された。SR clone を移入された喘息マウスでは、1個のSR clone, T5-1 移入モデルのみ、好酸球浸潤が30%抑制されたものの、残りの2 clone では全く抑制されなかった(図2)。

なお、移入したクローンの IL-5 産生レベルとBALF 好酸球浸潤、気道過敏性亢進の程度の間には高い相関関係が認められた(図3)。

T細胞移入喘息モデルにおける個体レベルのステロイド感受性は、移入されるTh cloneの*in vitro*におけるステロイド感受性によって規定されることが明らかになった。

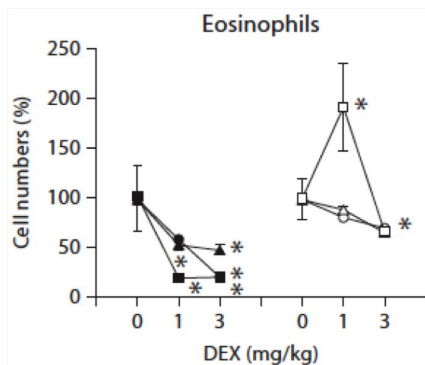


図2. ステロイド感受性および抵抗性クローン移入マウスにおける抗原誘発気道内好酸球浸潤に対するDEXの効果クローンBF7 (●), T6-2 (▲), T6-10 (■), T5-1 (○), T6-4 (△)およびT6-7 (□)をマウスに移入し、24時間後に抗原チャレンジを行った。DEX (0, 1および3 mg/kg)は抗原チャレンジ30分前と24時間後の2回、皮下投与した。抗原チャレンジの48時間後にBALを行い、BALF中の好酸球数を計数した。DEXの効果はDEX非添加のコントロール値に対するパーセンテージで示した (N = 5-13)。\* p < 0.05 (コントロールとの比較)。

### E. 結論

治療抵抗性の重症喘息における有効な治療薬の出現が待たれて久しい。本モデルにより、T細胞レベルのステロイド抵抗性および、個体レベルでのステロイド抵抗性喘息、感受性喘息モデルのメカニズムが解明され、治療薬の評価が可能になる。

### F. 研究発表

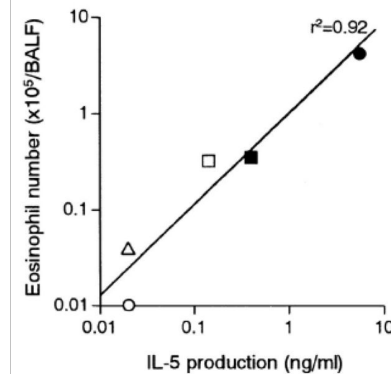


図3. T細胞クローン移入マウスにおけるIL-5産生能と抗原誘発気道内好酸球浸潤反応の相関。さまざまなT細胞クローンを樹立し、図1と同様に刺激培養した。培養上清中のIL-5産生レベルをELISA法により測定した。各クローンをマウスに移入し、図2と同様に抗原チャレンジおよびBALF中の好酸球浸潤を検討した。各クローンにおけるIL-5産生レベルとBALF中好酸球浸潤数の相関を示した (N = 5-13)。

### 1. 論文発表

1. Saeki M, Nishimura T, Mori A, Kaminuma O, Hiroi T. Antigen-induced mixed and separated inflammation in murine upper and lower airways. *Allergol Int*, in press.
2. Nishimura T, Saeki M, Motoi Y, Kitamura N, Mori A, Kaminuma O, Hiroi T. Selective suppression of Th2 cell-mediated lung eosinophilic inflammation by anti-major facilitator super family domain containing 10 monoclonal antibody. *Allergol Int*, in press.
3. Shibahara K, Nakajima-Adachi H, Kaminuma O, Hiroi T, Mori A, Hachimura S. Food allergen-induced IgE response mouse model created by injection of in vitro differentiated Th2 cell culture and oral antigen intake. *Biosci*

*Microb Food Health*, 31:41-46, 2014.

4. Ohtomo T, Nakao C, Sumiya M, Kaminuma O, Abe A, Mori A, Inaba N, Kato T, Yamada J. Identification of Acyl-CoA Thioesterase in Mouse Mesenteric Lymph Nodes. *Biol Pharm Bull*, 36:866-871, 2013.

5. Kouyama S, Otomo-Abe A, Kitamura N, Kaminuma O, Mori A. A contraction assay system using primary cultured mouse bronchial smooth muscle cells. *Int Arch Allergy Immunol*, 161:S93-97, 2013.

6. Nishimura T, Saeki M, Kaminuma O, Matsuoka K, Yonekawa H, Mori A, Hiroi T. Existence of antigen-specific IgE is not sufficient for allergic nasal eosinophil infiltration in mice. *Int Arch Allergy Immunol*, 161:S125-128, 2013.

7. Saeki M, Nishimura T, Kaminuma O, Mori A, Hiroi T. Oral immunotherapy for allergic diseases using transgenic rice seeds: current state and future prospects. *Int Arch Allergy Immunol*, 161:S164-169, 2013.

8. Wakasa Y, Takagi H, Hirose S, Yang L, Saeki M, Nishimura T, Kaminuma O, Hiroi T, Takaiwa F. Oral immunotherapy with transgenic rice seed containing destructed Japanese cedar pollen allergens, Cry j 1 and Cry j 2, against Japanese cedar pollinosis. *Plant Biotech J*, 11:66-76, 2013.

9. 神沼 修, 渡邊 伸昌, 後藤 穰, 中谷 明弘, 廣井 隆親. 特集 スギ・ヒノキ花粉症 X. スギ花粉症免疫療法の治療効果に連動したバイオマーカー. *アレルギー・免疫*. 21: 94-101, 2013.

## 2. 学会発表

1. 平出 恵利華, 足立 はるよ, 北村 紀子, 上滝 隆太郎, 武山 純, 佐伯 真弓, 西村 友枝, 神沼 修, 廣井 隆親, 八村敏志. TCRトランスジェニックマウスを用いた食物アレルギーモデルにおけるTh2型皮膚炎の解析. 日本農芸化学会2014年度大会(東京), 2014.3.27-30.

2. 新しい花粉症モデル: マウスにおけるT細胞依存性鼻粘膜過敏性亢進反応. 神沼 修, 西村 友枝,

佐伯 真弓, 松岡 邦枝, 米川 博通, 後藤 穰, 大久保 公裕, 森 晶夫, 廣井 隆親. 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会, アレルギー 62:1251 (東京), イブニングシンポジウム “東京都花粉症プロジェクト”, 2013.11.28.

3. Watanabe N, Kitamura N, Mori A, Kaminuma O. Antigen-specific iTreg cells augment Th17-mediated inflammatory response in a CTLA-4-dependent fashion. 第42回日本免疫学会学術集会, Proceedings of the Japanese Society for Immunology, 42:154 (幕張), 2013.12.12.

4. 中谷 明弘, 後藤 穰, 大久保 公裕, 神沼 修, 廣井 隆親. 遺伝子のコピー数と発現量の網羅的情報に基づくスギ花粉舌下免疫療法のゲノミックな背景の検討. 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会, アレルギー 62:1252 (東京), イブニングシンポジウム “東京都花粉症プロジェクト”, 2013.11.28.

5. 湯澤 仁, 神沼 修, 後藤 穰, 大久保 公裕, 森 晶夫, 廣井 隆親. スギ花粉症に対する舌下免疫療法の治療効果と血中抗体価の関係. 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会, アレルギー 62:1304 (東京), 2013.11.30.

6. 西村 友枝, 佐伯真弓, 松岡 邦枝, 米川 博通, 森 晶夫, 後藤 穰, 大久保 公裕, 神沼 修, 廣井 隆親. マウスアレルギー性鼻炎モデルにおけるIgE-肥満細胞系およびT細胞の関与. 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会, アレルギー 62:1315 (東京), 2013.11.28.

7. 佐伯 真弓, 西村 友枝, 渡辺 伸昌, 森 晶夫, 神沼 修, 廣井 隆親. TGF-誘導性T細胞サブセットのアレルギー性気道炎症における役割. 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会, アレルギー 62:1353 (東京), 2013.11.28.

8. Kaminuma O, Kitamura N, Nemoto S, Tatsumi H, Mori A, Hiroi T. Differential contribution of calcineurin-binding regions among NFAT family members. 第86回日本生化学会大会, Late-breaking Abstracts: 2LBA-036 (横浜), 2013.9.12.

9. Adoptive transfer of Th clones confer late-phase asthmatic response in mice. Mori A, Kouyama S, Yamaguchi M, Iijima Y, Itoh J, Saito

N, Minami T, Watarai K, Mitsui C, Oshikata C, Tanimoto H, Fukutomi Y, Sekiya K, Tsuburai T, Taniguchi M, Maeda Y, Ohtomo M, Hasegawa M, Akiyama K, Ohtomo T, Kaminuma O. European Academy of Allergy and Clinical Immunology & World Allergy Organization Congress 2013 (Milan, Italy), 2013.6.23.

10. 西村 友枝、佐伯 真弓、本井 祐二、北村 紀子、形山 和史、三好 浩之、市川 仁、森 晶夫、神沼 修、廣井 隆親 . アレルギー性好酸球性炎症の発症におけるmajor facilitator super family domain containing 10 (Mfsd10) の役割 . アレルギー・好酸球研究会 2013, プログラム/抄録 p16 (東京)、2013.6.15.

11. 佐伯 真弓、西村 友枝、神沼 修、森 晶夫、廣井 隆親 . アレルギー性鼻炎における鼻粘膜過敏性亢進に対するT細胞の関与 . アレルギー・好酸球研究会 2013, プログラム/抄録 p22 (東京)、2013.6.15.

12. Kaminuma O, Kitamura N, Mori A, Hiroi T. Identification of signaling molecules responsible for IL-2-mediated cytokine expression in human T cells. Immunology 2013 AAI Annual Meeting (Honolulu, Hawaii), 2013.5.6. J Immunol, 190, 184.33:P6343, 2013.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

G . 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし