

201324045A

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

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 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	
■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 医師主導治験の支援に関する研究 鈴木麻衣子	5
■MS の Biomarker 解析-1 三宅幸子	7
■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に関する研究 山村 隆	11
■慢性炎症性脱髄性多発神経炎の病態と治療に関する研究 佐藤和貴郎	14
■中枢神経系自己免疫疾患の病型多様性に関する研究 大木伸司	16
■拡散テンソル解析を用いた EDSS スコアと脳白質微細構造変化の検討 佐藤典子	18
■EBNA1 標的遺伝子群の分子ネットワーク解析:MS 発症における意義 佐藤準一	20
■多発性硬化症患者群の腸内細菌叢に関する研究 服部正平	31
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	37

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 (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

研究要旨

免疫修飾薬 OCH を多発性硬化症の治療薬として実用化するために、本研究では国立精神・神経医療研究センター(NCNP) 病院において医師主導治験を実施し、NCNP 神経研究所では薬効評価とバイオマーカー探索を進めている。既に健常者15名を対象とする STEP1 試験が終了し、平成26年3月より患者対象試験(STEP2)を滞りなく開始した。フローサイトメーターやDNAマイクロアレイ解析結果は、OCH が自己免疫病態を修飾する活性を有することや、経口薬として薬効を発揮することを示唆し、今後の開発促進につながる所見が得られた。

研究分担者：

佐藤 典子
国立精神・神経医療研究センター 部長
立石 智則 (~9.30)
国立精神・神経医療研究センター 室長
三宅 幸子
順天堂大学 教授
大木 伸司
国立精神・神経医療研究センター 室長
佐藤 和貴郎
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 (~11.30)
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
鈴木 麻衣子 (12.1~)
国立精神・神経医療研究センター 室員

A. 研究目的

多発性硬化症(MS)は主として若年者を冒す慢性再発性の中枢神経系炎症疾患である。MSは終生におよぶ医療介入の対象になるが、インターフェロンベータ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がある。当センターNCNP 神経研究所では、MSの新規治療薬シーズとして2001年に糖脂質医薬 OCH を発表し(Nature 2001)、以後、臨床治験の可能性を探って来た。医療スーパー特区の設置以来、さまざまな支援体制が整い、平成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、医師主導による OCH の First-in-Human 試験および早期フェーズ2試験を完遂し、企業と共同のフェーズ2、フェーズ3試験に移行する体制を整えることにある。

B. 研究方法

1) 対象: S2012年11月から2013年6月まで行われた本試験は、非盲検・非対照の用量漸増単回投与試験であり、当初7コホート(A~Gコホート;各3例)を計画していたが、Eコホートの結果に基づき、STEP1試験を終了し、STEP2に移行することとなった。また、STEP1で得られた薬物動態等の結果が

ら、当初の STEP2 の計画を大幅に変更し、その後、PMDA との対面助言及び追加の非臨床試験の結果を基に、STEP2 試験計画の確定を行った。

2) フローサイトメトリー: OCH 投与前後の末梢血中の T 細胞、B 細胞、NKT 細胞などのリンパ球亜分画について、フローサイトメーターを用い解析した。

3) マイクロアレイ解析: 全血サンプルより RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行い、OCH 投与前後での遺伝子発現変化について、解析を行った。

(倫理面への配慮)

本試験は当センター試験審査委員会の承認を受け、被検者より書面にてインフォームドコンセントを得た上で行った。個人情報と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

成人健常者に対する OCH の投与により、2例に軽度の白血球減少を認めたが、自然回復した。その他重大な副作用は認められなかった。

マウスやカニクイザルを用いた前臨床試験に基づく予想とは異なり、初回用量である A コホートにおいて OCH 血中濃度の測定が可能であり、ヒトでは OCH の経口吸収効率がきわめて高い事が示唆された。

またフローサイトメーター解析の結果、A ~E コホートにおいて CD4 陽性メモリー T 細胞および CD8 陽性 T 細胞において、炎症性サイトカインである GM-CSF 産生分画および IFN- γ 産生分画が、投与前値に比べて減少する傾向を認めた。E コホートでは、GM-CSF 産生分画の減少は認められたが、IFN- γ 産生分画の減少は認められなかった。

マイクロアレイ解析を行ったところ、炎症や自己免疫反応に関与すると考えられる遺伝子発現の低下を認めた。

D. 考察

多発性硬化症の動物モデルである、EAE 発症には GM-CSF 産生 T 細胞が重要な役割を果たしていると推測されており、OCH 投与による T 細胞中の GM-CSF 産生分画の減少は、多発性硬化症病態の抑制に関与する可能性がある。

E. 結論

OCH の開発はシーズ開発、前臨床試験、医師主導臨床試験までを一貫して NCNP で実施するという前例のない試みであったが、目的に沿って患者対象試験の開始まで到達するに至った。マウス、カニクイザルなどの前臨床試験の結果や、学界で一般に言われている常識から予想されることとは異なる結果も得られ、薬剤開発における早期ヒト対象研究が重要であることが明らかになった。また早期から PMDA と情報の交換を行うことによって、希少疾患に対する薬剤開発が迅速に進むことが確認された。

F. 健康危険情報

なし。

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 2013 Sep 10. [Epub ahead of print]

2) 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

3) Ota, M., N. Sato, Y. Nakata, K. Ito, K. Kamiya, N. Maikusa, M. Ogawa, T. Okamoto, S. Obu, T. Noda, M. Araki, T. Yamamura, and H. Kunugi: Abnormalities of cerebral blood flow in multiple sclerosis: A pseudocontinuous arterial spin labeling

MRI study. Magn Reson Imaging 31: 990-995, 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) 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

2) 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

3) 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

4) 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

5) 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

6) 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

7) 佐藤和貴郎、荒浪利昌、富田敦子、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

8) 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

9) 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

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：GM-CSF産生T細胞制御剤
出願番号：特願2013-262876
出願日：2013年12月19日
発明者：山村隆、能登大介、三宅幸子

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告

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-NCNP1 医師主導治験の支援に関する研究

研究分担者 鈴木麻衣子 国立精神・神経医療研究センター
トランスレーショナル・メディカルセンター臨床研究支援室研究員
研究協力者 立石智則 国立精神・神経医療研究センター
トランスレーショナル・メディカルセンター臨床研究支援室長*
研究協力者 福田昂一 国立精神・神経医療研究センター
トランスレーショナル・メディカルセンター臨床研究支援室研究員**

*2013年10月以降は独立行政法人 医薬品医療機器総合機構に所属

**2013年12月以降は独立行政法人 医薬品医療機器総合機構に所属

研究要旨

国立精神・神経医療研究センターで実施中の多発性硬化症 (MS) に対する OCH-NCNP1 の医師主導治験 (Phase I) では、平成 24 年度から 25 年度にかけて行われた健康成人を対象とする STEP1 の結果等に基づき再発寛解型 MS 患者を対象とした反復投与試験である STEP2 に関する計画の変更を行った。本研究では、当該医師主導治験の実施支援を目的とし、試験の計画支援、安全性検討委員会の運営、PMDA への対応等を行ったものである。

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 の早期探索的臨床試験」は、国立精神・神経医療研究センターにおいて実施中の、多発性硬化症 (MS) 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 First in Human

(FIH) の医師主導治験 (Phase I) である。本治験は、健康成人を対象とした単回投与試験である STEP1 と再発寛解型 MS 患者を対象とした反復投与試験である STEP2 の 2 段階で構成される。本研究では、当該医師主導治験の実施支援を目的とし、円滑に治験実施が進められるよう、試験の計画支援、安全性検討委員会の運営、PMDA への対応等を行った。

B. 研究方法

IRB で承認された治験計画に沿って

STEP1 試験は 2012 年 11 月から 2013 年 7 月まで行われた。STEP1 は、非盲検・非対照の用量漸増単回投与試験であり、当初 7 コホート (A~G コホート; 各 3 例) を計画していたが、E コホートの結果に基づき、STEP1 試験を終了し、STEP2 に移行することとなった。また、STEP1 で得られた薬物動態等の結果から、当初の STEP2 の計画を大幅に変更し、その後、PMDA との対面助言及び追加の非臨床試験の結果を基に、STEP2 試験計画の確定を行った。

C. 研究結果

本治験は用量漸増デザインであることから、治験を進めるに当たり、治験薬の増量可否の妥当性や被験者に発生した副作用等の評価を安全性検討委員会において行っている。STEP1 (健常成人) において E コホート (OCH-NCNP1 30mg) の被験者の血中濃度を計算した結果、次コホートにおいて、本治験薬を投与した際に非臨床毒性試験で検討さ

れた最高曝露量(AUC_{0-24h} :3460 ng·h/ml, C_{max} : 222 ng/ml) を超える可能性が示唆された。そのため、次コホートへの移行を中止し、STEP1 を終了した。A コホートから E コホートの 15 例のうち、有害事象は 6 例 10 件が報告され、全て Grade1 の事象であった。

また、STEP1 における結果からは、OCH-NCNP1 薬物動態はヒトにおいて吸収や排泄が比較的緩徐であるというデータが得られており、週 1 回投与で薬理効果の維持が期待できると考えられること、また、対象疾患である MS は慢性の経過を示すことから有効性探索のためには比較的長期の評価が必要であること等から、STEP2 (多発性硬化症患者対象) の試験計画を変更し、週 1 回 13 週間反復投与試験を計画した。また、STEP1 の A コホートから C コホート(OCH-NCNP1 0.3 mg~3.0 mg) において、MS の再発予防に寄与することが期待される特定のバイオマーカーの推移が認められたことから、STEP2 では 1 群 3 例、各群 OCH-NCNP1 0.3 mg、1.0 mg 及び 3.0 mg の用量を投与する計画とした。

こうした変更に関し、PMDA 薬事戦略相談を活用し、変更した患者対象コホート試験デザインの適切性、新たな患者対象コホートを実施する上で、必要な非臨床試験等について相談を行った。また、新たな計画に対応した複数の非臨床試験を行った結果、安全性について特段の問題がないことが確認されたため、STEP2 の試験計画を確定した。その後、1 月に NCNP の IRB において、計画書案が承認され、PMDA に対して治験計画変更届を提出した。

D. 考察

STEP1 で認められた有害事象 6 例 10 件のうち、治験薬との関連性について、担当医師により関連性ありとされた事象は、白血球減少の 2 件のみであり、そのいずれも未処置で回復した。その他の事象はすべて関連なしと判断されている。今後、STEP2 の各コホートを実施するに当たっては、反復投与であることも考慮しつつ、白血球減少をはじめとした

有害事象について、安全性検討委員会の意見を聞きながら注意深く安全性の評価を行っていく予定である。

E. 結論

国立精神・神経医療研究センターにおいて行われた OCH の医師主導治験について、STEP1 における安全性検討委員会の運営、STEP1 の結果を受けた STEP2 の試験計画変更にあたっての計画書作成支援、PMDA 対応等を行った。本治験に対して行った支援及び経験した事項は、今後 STEP2 を実施するにあたっても参考とすべきノウハウであり、こうした知識等の蓄積を活かして、引き続き、より円滑な医師主導治験実施に向けた支援等ができるよう、検討を行っていきたい。

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 POC 試験での安全性確保について考える 第34回日本臨床薬理学会学術総会シンポジウム7 東京

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 の Biomarker 解析-1

研究分担者

三宅 幸子 順天堂大学医学部 免疫学講座 教授

研究協力者

能登 大介	国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 免疫研究部 科研費研究員
荒木 学	国立精神・神経医療研究センター病院 多発性硬化症センター 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
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
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 細胞の合成糖脂質リガンドである OCH は、マウス NKT 細胞の活性化に際して、IL-4 の選択的な産生を誘導し、多発性硬化症 (MS) の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を抑制する。我々は OCH の多発性硬化症治療薬としての実用化を目指し、2012 年 11 月より OCH First in Human 試験 (OCH の経口単回投与試験) を医師主導試験として開始した。成人健常者を対象とした STEP1 試験において、ヒトでは OCH の経口吸収効率がきわめて高い事が示唆された。また、多発性硬化症病態に関与すると考えられている GM-CSF 産生 T 細胞の抑制や、自己免疫反応に関与すると考えられる遺伝子群の発現変化が認められた。

A. 研究目的

NKT 細胞の合成糖脂質リガンドである OCH は、マウス NKT 細胞の活性化に際して、IL-4 産生の選択的な産生を誘導する。その結果、OCH をマウスに経口投与すると、NKT 細胞の選択的 IL-4 産生を介した Th1 細胞免疫応答の抑制が起こり、多発性硬化症 (MS) の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) は抑制される。また関節リウマチのモデルであるコラーゲン誘導関節炎、I 型糖尿病のモデルである NOD (non obese diabetes) マウス糖尿病、炎症性腸疾患のモデルである DDS 誘導腸炎などに対しても、OCH 経口投与は有効で、Th1 細胞の抑制と臨床症状の改善が確認されている。

さらにヒト NKT 細胞に対して Th2 サイトカインの優先的産生誘導が証明されたことからヒト MS の治療薬となることが期待されてきた。我々は OCH の物質特許を確保した上で、

OCH 実用化をめざした臨床試験に必要な前臨床研究を進め、2012 年 11 月より OCH First in Human 試験 (OCH の経口単回投与試験) を医師主導試験として開始した。

B. 研究方法

1) **対象**: STEP1 試験においては、成人健常者を A~E の 5 コホートに各 3 例ずつ割り付け、計 15 例を対象とした。

2) **フローサイトメトリー**: OCH 投与前後の末梢血中の T 細胞、B 細胞、NKT 細胞などのリンパ球亜分画について、フローサイトメーターを用い解析した。

3) **マイクロアレイ解析**: 全血サンプルより RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行い、OCH 投与前後での遺伝子発現変化について、解析を行った。

(倫理面への配慮)

本試験は当センター試験審査委員会の承認を受け、被検者より書面にてインフォームドコンセントを得た上で行った。個人情報とは連

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

成人健常者に対する OCH の投与により、2例に軽度の白血球減少を認めたが、自然回復した。その他重大な副作用は認められなかった。

マウスやカニクイザルを用いた前臨床試験に基づく予想とは異なり、初回用量である A コホートにおいて OCH 血中濃度の測定が可能であり、ヒトでは OCH の経口吸収効率がきわめて高い事が示唆された。

またフローサイトメーター解析の結果、A ~E コホートにおいて CD4 陽性メモリー T 細胞および CD8 陽性 T 細胞において、炎症性サイトカインである GM-CSF 産生分画および IFN- γ 産生分画が、投与前値に比べて減少する傾向を認めた。E コホートでは、GM-CSF 産生分画の減少は認められたが、IFN- γ 産生分画の減少は認められなかった。

マイクロアレイ解析を行ったところ、炎症や自己免疫反応に関与すると考えられる遺伝子発現の低下を認めた。

D. 考察

成人健常人に対する OCH 投与により、末梢血 T 細胞中の、GM-CSF 産生分画が減少する傾向を認めた。多発性硬化症の動物モデルである、EAE 発症には GM-CSF 産生 T 細胞が重要な役割を果たしていると推測されており、OCH 投与による T 細胞中の GM-CSF 産生分画の減少は、多発性硬化症病態の抑制に関与する可能性がある。また、マイクロアレイ解析による遺伝子発現の結果も OCH 投与の多発性硬化症治療薬としての、期待されるものであった。

E. 結論

UCH 投与によって、多発性硬化症病態に関与すると考えられている、GM-CSF 産生 T 細胞の抑制や、自己免疫反応に関与すると考えられる遺伝子群の発現変化が認められた。

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* 2013 Sep 10. [Epub ahead of print]

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: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、富田敦子、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, Kitaura 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

発明の名称：GM-CSF 産生 T 細胞制御剤

出願番号：特願 2013-262876

出願日：2013 年 12 月 19 日

発明者：山村隆、能登大介、三宅幸子

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

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

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onder) 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 に分類したところ, PB-high MS に IFN-b ノンレスポonder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, PB における遺伝子発現プロファイルにより両 RR-MS 亜群は免疫学的に異なる病態群であることが示唆された. これらの結果から, IFN-b ノンレスポonder予測における末梢血 PB 頻度測定の有用性が期待される.

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onder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onder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) であることを報告した (Chihara et al. 2011). そこで, RR-MS 病態における 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 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, または血清抗アクアポリン 4 抗体陽性) を有する症例は除外した. 対象の末梢血 PB 頻度 (B 細胞に占める PB の割合, %) をフローサイトメトリーにより測定した. 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, 両群での臨床所見を比較した. 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.

(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 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、レスポンド 19 例全例 (100.0%) が PB-low MS であり、ノンレスポンド 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%) がレスポンドであり、PB-high MS 13 例全例 (100.0%) がノンレスポンドであった ($p < 0.0001$)。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 ノンレスポンド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の反映と推測された。PB における遺伝子発現プロファイルにより両 RR-MS 亜群は免疫学的に規定し得る病態群であることが示唆された。

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 ノンレスポンド予測における末梢血 PB 頻度測定の有用性が期待される。

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, 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: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

発明の名称：GM-CSF 産生 T 細胞制御剤

出願番号：特願 2013-262876

出願日：2013 年 12 月 19 日

発明者：山村隆、能登大介、三宅幸子

2. 実用新案登録

なし

その他

特記事項なし

慢性炎症性脱髄性多発神経炎の病態と治療に関する研究

研究分担者 佐藤和貴郎 (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(室長)

研究要旨

慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP)は、自己免疫機序が想定される神経難病である。T細胞のケモカイン受容体の発現に着目し、ヘルパーT細胞サブセットの病態への関与を調べた。CCR5+CCR6+CD4+T細胞の末梢血での増加、髄液への集積が認められた。機能および遺伝子解析の結果は同細胞がマウスの病原性Th17細胞にあたる細胞であることを示唆した。Mucosal associated invariant T(MAIT)細胞などの自然リンパ球の末梢血における頻度を調べた結果、他の自己免疫疾患でも報告されているようにMAIT細胞などの減少傾向を認めた。

A. 研究目的

慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP)は、運動、感覚障害を呈する末梢神経の炎症性脱髄疾患であり、末梢神経髄鞘を標的としたCD4陽性T細胞の関与が示唆されるなど、自己免疫機序が想定されている。病原性T細胞として、Th1細胞および、近年ではTh17細胞の関与が指摘されているが、詳細は明らかではない。

1) 各Th細胞はそれぞれ特徴的なケモカイン受容体を発現することが知られ、CCR5はTh1細胞の、CCR6はTh17細胞に高発現する。これらケモカイン受容体の発現からCIDPにおけるTh細胞の役割を解明することを目的とする。

2) 近年自然免疫と獲得免疫の橋渡しの細胞として、両者の特徴を兼ね備えるinnate lymphocyte(自然リンパ球)に注目が集まっている。その一つであるMucosal associated invariant T(MAIT)細胞は、多発性硬化症の病変部位で検出されるほか、CIDPの末梢神経生検病理においても10例中8例でその存在が確認されたと報告されており(Zilles et al. International Immunology 2003)、CIDPにおける関与が疑われる。近年、ヒトV α 7.2T細胞受容体を認識する抗体が作成され解析に用いることが可能になった。MAIT細胞などの自然リンパ球のCIDP患者における意義を明らかにする目的で、まず各自然リンパ球のCIDP患

者における頻度について調べた。

B. 研究方法

対象は、年齢と性別をマッチさせた健常者8名とCIDP患者9名。1) 患者末梢血から末梢血単核球細胞を分離し、フローサイトメトリーを用い、CD4陽性T細胞について、メモリー(CD45RA)、CCR5、CCR6、Foxp3の発現を調べた。メモリーCD4陽性T細胞中のCCR5+CCR6+細胞をセル・ソーターにて分離、刺激培養し産生サイトカインの定量・遺伝子発現解析を行った。患者血清中のサイトカイン・ケモカイン濃度をBio-Plex®を用いて解析した。

2) 以下のマーカーを用いて、各自然リンパ球細胞のリンパ球全体における頻度を得た。マーカー: MAIT細胞(CD3+ γ δ TCR- CD1d tetramer- V α 7.2TCR+ CD161high)、iNKT細胞(CD3+ γ δ TCR- CD1d tetramer+)、CD56highNK細胞(CD3- CD56high)、NK細胞(CD3- CD56+)、 γ δ T細胞(CD3+ γ δ TCR+)、 α β T細胞(TCR α β) (MAIT以外のCD3+ γ δ TCR-)。

(倫理面への配慮)

本研究は、NCNP倫理委員会にて承認を得て行われ、被験者にはインフォームド・コンセントを得ている。

C. 研究結果

1) CCR5+CCR6+メモリーCD4陽性T細胞がCIDP患者末梢血で増加し、髄液中に集積していた。CCR5+CCT6+T細胞はサイトカインIFN γ 、IL-17、GM-CSF、IL-21の高い産生能、転写因子T-bet、RORCの高発現、c-mafの低発現を認めた。血清中のサイトカイン・ケモカイン定量では、健常者と比較してIFN γ やIL-17は増加傾向を示さなかったが、GM-CSFについては有意に高値を示した。2)寛解期CIDP患者において、MAIT細胞、iNKT細胞、CD56^{high}NK細胞の頻度が健常コントロールに比べ、低い傾向を認めた。NK細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、 $\alpha\beta$ T細胞については一定の傾向を認めなかった。

D. 考察

CCR5+CCR6+T細胞のサイトカイン産生・転写因子発現パターンは、Th17細胞の中でもマウスの系で病原性の高い細胞集団の特徴と一致した。MAIT細胞やiNKT細胞の減少傾向は他の自己免疫疾患でも報告され、共通するメカニズムが想定された。

E. 結論

CIDPでは、病原性Th17細胞の関与が示唆された。また、MAIT細胞などの自然リンパ球の減少傾向がみられた。今後さらなる検討が必要である。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
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

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

中枢神経系自己免疫疾患の病型多様性に関する研究

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 同免疫研究部・研究員

研究要旨

本研究事業では、再発寛解型多発性硬化症 (RR-MS) を対象とした免疫修飾薬 OCH による治験が進行中である。多様な病態を示す MS には、RR-MS の他に進行型の病型が知られており、これらの病型の特徴を詳細に解析することは、効果的な MS 治療戦略を選択する上で極めて重要である。本研究では、MS の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を用いて、多様な MS 病型の理解に有用な動物モデルを構築し、それぞれの発症メカニズムの解明を目指した。RR-MS 患者由来サンプルの解析を通じて私たちが同定した核内受容体 NR4A2 は、病原性 Th17 細胞の中心的な制御因子であり、新たな MS 治療標的分子となりうるということが分かっている。新規に樹立した NR4A2 欠損マウスの EAE 病態においては、Th17 細胞依存性の急性期病態がほぼ完全に消失した。その一方で、EAE 発症後期には Th17 細胞非依存性の病態が出現することが明らかとなり、この後期の病態が進行型 MS を反映する可能性を示した。本動物モデルを用いて進行型 MS の病態形成メカニズムを詳細に解析し、RR-MS 病態との共通点および相違点明らかにすることで、治療戦略の最適化が期待できるものと考えられた。

A. 研究目的

本研究事業では、再発寛解型多発性硬化症 (RR-MS) を対象とした免疫修飾薬 OCH による治験が進行中である。MS の病態には多様性があり、RR-MS の他に寛解を経ることなく徐々に病状が進行する MS 病態があるが、進行型 MS の発症機構については、RR-MS との異同を含めてほとんど分かっていない。進行型 MS に対する有効な治療法がほとんどない現状に加え、進行型の病態と RR-MS とを明確に識別する手段を得ることは、適切な治療方針の選択を可能にするという点で極めて意義深いと考えられる。そのためには、各病型を反映する動物モデルを確立し、これを用いて発症機構を詳細に解析することが必須である。本研究では、MS の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を活用して、RR-MS と進行型 MS の各病型の発症機構を理解するための基礎研究を行った。

B. 研究方法

C57BL/6J (B6) マウスおよびヘルパー T 細胞特異的 NR4A2 欠損 (NR4A2cKO) マウスに、MOG35-55 ペプチドを免疫して、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導した。中枢神経系 (CNS) 浸潤 T 細胞、所属リンパ節 T 細胞および脾臓 T 細胞を分離し、それぞれ刺激後のサイトカイン産生と各種遺伝子発現レベルを比較解析した。ナイーブ T 細胞を Th17 細胞分化条件下で培養し、NR4A2 特異的 siRNA の導入による分化阻害を解析した。コラーゲンマトリクスに封入した siRNA を、EAE マウスに静脈投与し、病態抑制効果を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究に含まれるすべての動物実験は、当研究所の動

物実験規定に則って作成した動物実験計画書に基づき、動物実験委員会の承認を受けて行った。

C. 研究結果

末梢血 T 細胞を用いたマイクロアレイ解析から、寛解期 RR-MS 患者で有意な発現亢進を認めた核内受容体分子 NR4A2 は、EAE マウスの中枢神経系 (CNS) に浸潤した T 細胞でも発現が増加しており、とくにその発現は病態との強い連関が知られている Th17 細胞に限局していた。In vitro で分化させた Th17 細胞の IL-17 産生は、NR4A2 特異的 siRNA 処理によりほぼ完全に消失した。同時に、Th17 細胞分化に関与することが知られている分子群 (c-maf、IL-21、IL-23 受容体) の発現は、siRNA 処理によりいずれも著減しており、Th17 細胞分化へと至る一連のプロセスが、NR4A2 によって制御されて売ることが明らかとなった。NR4A2 特異的 siRNA を EAE 誘導マウスに単回静脈投与することにより、Th17 細胞の機能抑制をとまなう病態の有意な軽快が認められ、NR4A2 が新たな MS 治療標的分子となりうる可能性が示された。新規に樹立した NR4A2cKO マウスの EAE では、初期病態がほぼ完全に抑制され、同時に Th17 細胞の機能も有意に低下していた。ところが、EAE 病態が抑制された状態の NR4A2cKO マウスをそのまま観察し続けると、誘導 25~30 日目を境として、新たな病態形成が認められた。この時点に置いて、Th17 細胞の活動亢進は認められず、また対象マウスとも顕著な差異が見られないことから、EAE を誘導した NR4A2cKO マウスで認められる NR4A2 非依存性の後期病態は、Th17 細胞依存性の初期病態とは異なる病態であると考えられた。このマウス EAE モデルを用いて、後期病態に関わる T 細胞依存性の自己免