

201407026A

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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山村 隆

平成 27 年（2015 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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山村 隆

平成 27 年（2015 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（NMO）の
治療薬開発に関する研究 山村 隆 1

II. 分担研究報告

- バイオマーカー探索に関する研究 三宅幸子 5

- 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 楠 進 9

- MS活動性脳病巣におけるNLRP3インフラマゾームの発現
佐藤準一 11

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 19

IV. 研究成果の刊行物・別刷 21

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 科研費研究員
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、B 細胞亜分画 plasmablast（PB）の産生する抗アクアポリン 4（AQP4）抗体介在性の視神経炎と脊髄炎を反復する難治性自己免疫疾患である。申請者らは、NMO 末梢血 PB の生存、及び抗体産生がサイトカイン IL-6 シグナルに依存することを報告し（Chihara et al. PNAS 2011）、同疾患 8 例を対象とした臨床研究（UMIN000007866）において抗 IL-6 受容体抗体 Tocilizumab（TCZ）治療の有効性を示した（Araki et al. Neurology 2014）。また、追加 7 例における再発抑制と疲労感・疼痛軽減の再現、さらに投与継続による長期治療効果も確認した。患者末梢血解析では、治療効果を説明し得る PB 減少、及び血清抗 AQP4 抗体価低下、さらには複数の制御性免疫細胞群（FOXP3+制御性 T 細胞、CD56 high NK 細胞、及び MAIT 細胞）の増加と機能亢進を認めた。これらの結果は、IL-6 阻害治療の NMO 標準治療としての妥当性を支持する。一方、申請者らは、中枢神経系の主要な自己免疫疾患である多発性硬化症（multiple sclerosis; MS）におけるインターフェロン β 治療抵抗性と末梢血 IL-6 依存性 PB 増加との関連を見出し、この NMO 類似 PB-high MS を対象とした TCZ 投与研究も開始した（UMIN000012705）。治療効果を判定し得た 2 例では、濾胞性ヘルパー T（Tfh）細胞の分化抑制が顕著であったが、逆説的に末梢血 PB 増加を来した例に臨床的改善を認めた。この現象は、Tfh 細胞由来 IL-21 シグナルの減少、及び IL-6 シグナル阻害を介した胚中心 B 細胞分化抑制に伴う濾胞外未熟 PB 産生の代償的亢進と推測された。この PB 分化経路修飾と治療効果との関連、さらには PB-high MS における TCZ 適応基準を検討中である。

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

A. 研究目的

申請者らは、希少難治性疾患である視神経脊髄炎（neuromyelitis optica; NMO）病態における IL-6 依存性 plasmablast（PB）の関与を示し（Chihara et al. PNAS 2011）、同疾患 8 例における抗 IL-6 受容体抗体 Tocilizumab（TCZ）の絶大な治療効果を報告した（Araki

et al. Neurology 2014）。この報告は国内外から注目を集めており、IL-6 阻害治療が NMO 標準治療に発展することが期待される。本年度は、症例数を増やしつつ長期予後を含めた治療効果を評価し、その裏付けとなる免疫学的解析を進めた。一方、類縁疾患である多発性硬化症（multiple sclerosis; MS）にも末梢血 IL-6 依存性 PB 増加を伴い、第 1 選択薬インターフェロン β に対するノンレスポonder が集積する亜群（PB-high MS）を見出し、NMO 病態との類似性を根拠に、この難治性 MS 亜群の新規治療開発として TCZ 投与を試みた。

B. 研究方法

NCNP 病院、及び近畿大学において、難治性 NMO 患者を対象に 4 週毎の TCZ 治療を実施し、その安全性と有効性を評価した。評価尺度は、年間再発率、EDSS、痛み NRS、疲労 NRS とした。また、被検者の血液・髄液のリンパ球亜群定量（フローサイトメーター解析による PB、B 細胞、T 細胞、NK 細胞、FOXP3+制御性 T 細胞、MAIT 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 AQP4 抗体価測定（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 解析を実施した。

NCNP 病院において難治性 PB-high MS 患者に TCZ を投与し、その安全性と有効性を評価した。プロトコール、及び血液・髄液を用いた解析は、NMO 研究に準じて行った。

（倫理面への配慮）

NMO、及び MS 対象両研究において、プロトコールを作成し NCNP 倫理委員会の承認を得た。被検者の選択、及び治療はプロトコールを遵守して行った。患者には文書により研究内容を説明し、参加に際しては書面による同意を得た。

C. 研究結果

NMO 7 例を新たにエントリーし、計 15 例における TCZ 治療による再発抑制と疲労感・疼痛軽減を確認した。1 年以上のフォローアップ期間（最長 3 年 3 ヶ月）においても有効性は持続した。投与例末梢血解析では、PB と抗 AQP4 抗体価の減少に加えて、FOXP3+制御性 T 細胞の増加と機能亢進を認め、炎症制御能を有する CD56 high NK 細胞、または MAIT 細胞の増加を伴っていた。

Tfh 細胞は PB 分化に関与するが、PB-high MS には末梢血 Tfh 増加群と非増加群とが存在しており、病態の相違が示唆された。実際に、TCZ 治療効果判定可能な 2 例のうち、有効例は

非増加群に属しており、無効例は Tfh 増加例であった。TCZ 投与に伴い、両症例とも末梢血 IL-21 産生性 Tfh 細胞の減少を示すも、PB の変化は大きく異なっており、無効例では PB 数が不変である一方、有効例では Ki-67、及び HLA-DR を高発現する未熟 PB の高度増加が認められた。

D. 考察

NMO における TCZ 作用機序として、in vitro データより予想し得る自己反応性 PB の抑制を認めたが、さらに複数の制御性細胞種の機能促進も関与することが示唆された。このことは、NMO 発症における IL-6 シグナルによる制御性細胞抑制の重要性を意味している。

PB-high MS の TCZ 有効例では、IL-6 シグナル阻害、及び Tfh 細胞減少に伴う IL-21 シグナル阻害の相乗作用により胚中心反応が抑制され、代償的に濾胞外未熟 PB 産生が促進したものと推測される。これに伴い PB 成熟の抑制、あるいは未熟 PB による IL-10 産生亢進が期待される。PB-high MS 病態における Tfh 細胞の関与は、IL-6 阻害治療効果の決定因子となる可能性がある。

E. 結論

NMO における IL-6 阻害治療の有効性は、自己免疫を誘導し得る複数の因子の是正（PB 抑制、及び制御性細胞の機能促進）に基づいており、NMO 標準治療として妥当と考えられる。一方、PB-high MS においても IL-6 阻害治療有効例が存在することが示され、その適応判断に Tfh 細胞解析が有用である可能性がある。この国産医薬が NMO 関連 MS 亜群においても国際標準治療になるように、迅速かつ本質的な研究が必要になる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Araki M, Matsuoka T, Miyamoto K, Kusunoki S, Okamoto T, Murata M, Miyake S, Aranami T, and Yamamura T. Efficacy of the anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab in neuromyelitis optica: a pilot study. *Neurology* 2014; 82 : 1302- 1306

Nakamura, M. et al. Differential effects of fingolimod on B-cell populations in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis J* 20: 1371-1380, 2014

Yamamura, T.: How do T cells mediate central nervous system inflammation? *Clin Exp Neuroimmunol* 5: 17, 2014

佐藤和貴郎, 山村 隆: 免疫動態. *Clinical Neuroscience* 32: 1218-1221, 2014

2. 学会発表

荒木 学, 松岡貴子, 宮本勝一, 楠 進, 岡本智子, 村田美穂, 三宅幸子, 荒浪利昌, 山村 隆. 視神経脊髄炎に対する抗 IL-6 受容体抗体トシリズマブ治療の有効性の検討. 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡, 日本, 2014 年 5 月 22 日

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, 下地 啓五, 佐藤 典子, 三宅幸子, 荒浪利昌, 山村 隆: 再発寛解型多発性硬化症病態における IL-6 依存性プラズマブラストの関与. 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡, 日本, 2014 年 5 月 24 日

M. Nakamura, T. Matsuoka, M. Araki, W. Sato, Y. Lin, T. Okamoto, M. Murata, S. Miyake, T. Aranami, T. Yamamura: An Increased Proportion of IL-6-dependent Plasmablasts Characterizes Interferon-beta-resistant Patients with Relapsing-remitting Multiple

Sclerosis. FOCIS 2014, シカゴ, アメリカ, 2014 年 6 月 27 日

T. Matsuoka, A. Chiba, T. Aranami, M. Nakamura, W. sato, S. Miyake, T. Yamamura: The increase of CD56 high NK cells and activated Treg-cells in patient with neuromyelitis optica after treatment with anti-IL-6R antibody ticilizumab. 2014 Joint ACTRIMS-ECTRIMS meeting, ボストン, アメリカ, 2014 年 9 月 14 日

中村雅一, 千原典夫, 山村 隆: 中枢神経系の自己免疫疾患におけるプラズマブラスト. 第 42 回日本臨床免疫学会総会, 東京, 日本, 2014 年 9 月 25 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

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。活性化制御性 T 細胞の数は、投与前は患者群で健康コントロール群に比較して少なく ($p = 0.0297$)、投与後 1 年では有意に増加していた ($p = 0.0313$)。CD56^{high} NK 細胞投与前には患者群では少ない傾向であったが有意差に至らず ($p = 0.2204$)、投与後は半年で有意な増加を認め ($p = 0.0156$)、1 年後にもその数は保たれていた ($p = 0.0313$)。活性化制御性 T 細胞、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 NM0 患者 5 名、抗 AQP4 抗体陽性の NM0 関連疾患 (NMOSD) 患者 2 名の 7 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 TCRV α 7.2⁺CD161⁺) のリンパ球における頻度および 1 μ l 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、活性化制御性 T 細胞の数は、

投与前は患者群で健康コントロール群に比較して少なく ($p = 0.0297$)、投与後 1 年では有意に増加していた ($p = 0.0313$)。CD56^{high} NK 細胞投与前には患者群では少ない傾向であったが有意差に至らず ($p = 0.2204$)、投与後は半年で有意な増加を認め ($p = 0.0156$)、1 年後にもその数は保たれていた ($p = 0.0313$)。MAIT 細胞、iNKT 細胞は有意な差がみられなかった。

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 抗体のに治療により、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)、iNKT 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。逆相関することを見出し報告している。これらの細胞の中で、活性化制御性 T 細胞、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。

E. 結論

TCZ 投与により、活性化制御性 T 細胞と 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) 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*, 82(15):1302-1306, 2014

2) Kamachi F, Harada N, Usui Y, Sakanishi T, Ishii N, Okumura K, Miyake S, Akiba H. OX40 ligand regulates splenic CD8(-) dendritic cell-induced Th2 responses in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 444(2):235-40, 2014

3) Nakamura M, Matsuoka T, Chihara N, Miyake S, Sato W, Araki M, Okamoto T, Lin Y, Ogawa M, Murata M, Aranami T, Yamamura T. Differential effects of fingolimod on B-cell populations in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 20(10):1371-80, 2014

2. 学会発表

1) Kadowaki A, Miyake S, Chiba A, Yamamura T. Myelin Reactive T cells in the Gut Regulate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). FOCIS 2014, Chicago, USA, 6.26, 2014

2) Noto D, Araki M, Sato W, Okamoto T, Murata M, Miyake S, Yamamura T. First-in-Human Phase 1 Study of Invariant NKT Cell Ligand

OCH. FOCIS 2014, Chicago, USA, 6.26, 2014

3) Nakamura T, Matsuoka T, Araki M, Sato W, Lin Y, Okamoto T, Murata M, Miyake S, Aranami T, Yamamura T. An Increased Proportion of IL-6-dependent Plasmablasts Characterizes Interferon beta-resistant Patients with Relapsing-remitting Multiple Sclerosis. FOCIS 2014, Chicago, USA, 6.26, 2014

4) Noto D, Araki M, Sato W, Okamoto T, Murata M, Miyake S, Yamamura T. First-in-Human Phase 1 Study of Invariant NKT Cell Ligand OCH. MSBOSTON2014, Boston, USA, 9.11, 2014

5) Matsuoka T, Chiba A, Aranami T, Nakamura M, Sato W, Miyake S, Yamamura T. The increase of CD56 high NK cells and activate Treg-cells in patient with neuromyelitis optica after treatment with anti-IL-6R antibody tocilizumab. MSBOSTON2014, Boston, USA, 9.12, 2014

6) Chihara N, Aranami T, Oki S, Matsuoka T, Murata M, Toda T, Miyake S, Yamamura T. Plasmablasts as AQP4-Ab producers in the pathogenesis of neuromyelitis optica. MSBOSTON2014, Boston, USA, 9.12, 2014

7) Kadowaki A, Miyake S, Chiba A, Yamamura T. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by gut resident T cells. 12th International Congress of Neuroimmunology, Mainz, Germany, 11.12, 2014

8) 三宅幸子、千葉麻子. NKT 細胞による自己免疫疾患の制御. 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会 東京 4.25.2014

9) 林絵利、千葉麻子、多田久里守、山路健、

- 田村直人、高崎芳成、三宅幸子. 強直性脊椎炎患者における免疫細胞の解析. 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会 東京 4. 26. 2014
- 10) 荒木学、佐藤和貴郎、岡本智子、村田美穂、三宅幸子、山村隆. 多発性硬化症を対象とした免疫修飾薬 OCH の医師主導治験. 第 55 回日本神経学会学術大会 福岡 5. 22. 2014
- 11) 荒木学、松岡貴子、宮本勝一、楠進、岡本智子、村田美穂、三宅幸子、荒浪利昌、山村隆. 視神経脊髄炎に対する抗 IL-6 受容体抗体トシリズマブ治療の有効性の検討. 第 55 回日本神経学会学術大会 福岡 5. 22. 2014
- 12) 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 細胞は実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を制御する. 第 55 回日本神経学会学術大会 福岡 5. 23. 2014
- 13) 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、下地啓五、佐藤典子、三宅幸子、荒浪利昌、山村隆. 再発寛解型多発性硬化症病態における IL-6 依存性プラズマブラストの関与. 第 55 回日本神経学会学術大会 福岡 5. 24. 2014
- 14) 門脇淳、三宅幸子、千葉麻子、山村隆. 腸管ミエリン反応性 T 細胞は実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を LAG-3 によって制御する. 第 26 回日本神経免疫学会学術集会 金沢 9. 4. 2014
- 15) 能登大介、荒木学、佐藤和貴郎、岡本智子、村田美穂、三宅幸子、山村隆. 多発性硬化症を対象とした免疫修飾薬 OCH の医師主導治験. 第 26 回日本神経免疫学会学術集会 金沢 9. 5. 2014
- 16) 門脇淳、三宅幸子、千葉麻子、佐賀亮子、山村隆. 腸管 T 細胞による自己免疫制御. 第 42 回日本臨床免疫学会総会 新宿 9. 26. 2014
- 17) 北垣内みえ、千葉麻子、林絵利、中嶋志穂子、多田久里守、田村直人、山路健、高崎芳成、三宅幸子. 関節リウマチ患者における自然リンパ球の解析. 第 42 回日本臨床免疫学会総会 新宿 9. 25. 2014
- 18) IWABUSHI Kazutya, SHIMANO Kentaro, SATOH Masashi, GILFILLAN Susan, Miyake Sachiko, VAN KAER Luc, YAMAMURA Takashi: Atherosclerotic lesion development in CD1d/MR1/apolipoprotein E-deficient mice. The 43rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2014. Kyoto, Japan, 12. 10, 2014
- 19) CHIBA Asako, TAMURA Naoto, TAKASAKI Yoshinari, Miyake Sachiko: Involvement of MAIT cells in human autoimmune diseases. The 43rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2014. Kyoto, Japan, 12. 10, 2014
- 20) NAKAJIMA Akihito, NEGISHI Naoko, TSURUI Hiromichi, NANNÔ Masanobu, YAGITA Hideo, OKUMURA Ko, Miyake Sachiko, HABU Sonoko: Commensal bacteria regulate thymic Aire expression. The 43rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2014. Kyoto, Japan, 12. 10, 2014
- 21) KADOWAKI Atushi, MIYAKE Sachiko, CHIBA Asako, SAGA Ryoko, YAMAMURA Takashi: Regulation of organ specific autoimmunity by gut resident T cells. The 43rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2014. Kyoto, Japan, 12. 10, 2014
- 22) LIN Youwei, MIYAKE Sachiko, YAMAMURA Takashi: Inverse vaccination for autoimmune diseases by sensitization of

superior dominant peptide through efficient induction of functionally stable regulatory T cells possessing high antigen-specificity. The 43rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2014. Kyoto, Japan, 12.10, 2014

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

- 1) GM-CSF 産生 T 細胞抑制剤、及び Th1/Th2 免疫バランス調整剤 (特願 2014-99587)
- 2) NKT 細胞活性化に伴う選択的 IL-4 産生誘導活性の評価方法 (特願 2014-104272)

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
研究協力者 宮本勝一

近畿大学医学部神経内科
近畿大学医学部神経内科

研究要旨

経口ステロイド薬や免疫抑制薬併用でも再発が抑制できない難治性視神経脊髄炎（NMO）に対して、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。症例は昨年度に報告した 56 歳女性（症例 1）と 63 歳女性（症例 2）の 2 症例である。症例 1 は、38 歳から視神経炎と脊髄炎を繰り返し、トシリズマブ開始前は平均 3 回／年の割合で再発していたが、開始後は 1 回の軽い再発のみである（年間再発率 0.5 回／年）。症例 2 も、60 歳から視神経炎と脊髄炎を繰り返し、トシリズマブ開始前は年間再発率 3 回／年であったが、開始後の再発は無い。両症例とも治療開始から 2 年以上経過しているが、疼痛抑制効果は継続している。また、明らかな有害事象もなく、安全に継続できている。

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）に対する抗 IL-6 抗体トシリズマブ（tocilizumab: TCZ）の治療効果を検討した。

抗 AQP4 抗体は、NMO の病態に深く関与しているが、IL-6 はプラズマブラスト活性化を介して、抗 AQP4 抗体産生を促進することが知られている。その IL-6 を抑制する働きをもつ TCZ は、NMO に対する治療効果が期待されている。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 による疼痛抑制効果も期待される。

B. 研究方法

当施設では昨年に報告した難治性 2 症例に対して TCZ の継続投与を行った。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。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）

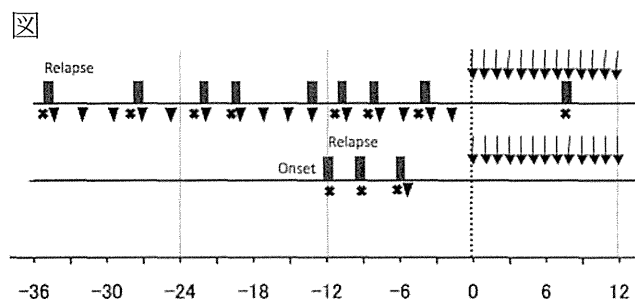
本研究は近畿大学倫理委員会に諮り、承認を得て実施した。

C. 研究結果

2 症例とも 2 年以上、治療を継続している。症例 1 は、56 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、および各種免疫抑制薬（アザチオプリン、メソトレキセート、シクロスポリン）との併用、血漿交換の定期的施行などを行ってきたが、年間平均再発率 3 回／年であった（EDSS: 6.5）。TCZ 開始後は、最初の 1 年で軽症の再発を 1 度生じたが、その後は再発していない（年間再発率 0.5 回／年）。

症例 2 は 63 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併用でも脊髄炎を再発し、歩行困難になったため TCZ を開始した（EDSS: 6.5）。TCZ 開始

後は再発しておらず、また疼痛の劇的な軽減を認めた。いずれの症例も明らかな有害事象は認めていない。



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、治療開始後 2 年以上経過しているが、TCZ による再発抑制効果が続いている。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。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

治療開始から 2 年経過したが、難治性 NMO に対する TCZ の十分な治療効果が継続している。明らかな有害事象も認めていない。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Miyamoto K, Tanaka N, Moriguchi K, Ueno R, Kadomatsu K, Kitagawa H, Kusunoki S. Chondroitin 6-O-sulfate ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. Glycobiology. 2014; 24: 469-75.

2) 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. 2014; 82: 1302-6.

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活動性脳病巣におけるNLRP3インフラマゾームの発現

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(MS)は中枢神経系白質に炎症性脱髄巣が多発し、様々な神経症状が再発を繰り返して進行する難病である。現在臨床では IFN β , FTY720 などの免疫調節薬が投与されているが難治例も多く、新規標的分子に対する画期的な創薬が待望されている。NLRP3 インフラマゾーム(inflammasome)は NLRP3, ASC, pro-CASP1 で構成され、様々な病原体が保有する pathogen-associated molecular patterns(PAMPs)や宿主因子・環境因子に由来する danger-associated molecular patterns(DAMPs)を認識して、迅速に IL-1 β の産生を誘導する細胞内センサーとして働く複合体である。Nlrp3 欠損マウスでは、MS モデルである自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の発症が抑制される。本研究では MS における NLRP3 インフラマゾームの役割を解明するため、MS および健常者、視神経脊髄炎(NMO)、脳梗塞(CI)の脳病巣における NLRP3, ASC, CASP1, IL-1 β の発現を免疫組織化学的に解析した。その結果、NLRP3, ASC, CASP1, IL-1 β は、MS, NMO 活動性病巣と CI 急性壊死性病巣で、reactive AS, perivascular MPH における発現を認めたが、MCG では NLRP3, ASC の発現を認めなかった。LPS で刺激したヒト MPH 細胞株 THP-1 に nigericin を投与すると、迅速に NLRP3 inflammasome が活性化され、NR4A ファミリー、EGR ファミリー、IkappaB ファミリーの迅速な発現上昇を認めた。以上より MS 活動性病巣に集積する AS と MPH は、髄鞘崩壊産物を danger signal として認識し、NLRP3 インフラマゾームが活性化されている可能性が示唆された。NLRP3 インフラマゾームコンポーネントは MS のにおける新規抗炎症薬創製のための分子標的に成る可能性がある。

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は、10 万人対 50-100 人であるが、近年日本でも患者数

は増加傾向にある。MS は遺伝因子・感染因子・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・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 は多様な病態を呈し、現在臨床では IFN β , FTY720 などの免疫調節薬が投与されているが難治例も多く、新規標的分子に対する画期的な創薬が待望されている。

NLRP3 インフラマゾーム (inflammasome) は、それぞれダイマーを形成している 3 分子 NLRP3, ASC, pro-CASP1 で構成され、迅速に炎症性サイトカインである IL-1 β , IL-18 の産生を誘導する細胞内センサーとして働く炎症増強複合体で、最も詳細に研究されているインフラマゾームである。様々な病原体が保有する pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) や宿主因子・環境因子に由来する danger-associated molecular patterns (DAMPs) を認識する。通常インフラマゾームは 2 段階のシグナルで活性化する。シグナル 1 (S1) は lipopolysaccharide (LPS) などに暴露して TLR4 を介して NF κ B を活性化し、インフラマゾームコンポーネントの発現量を上昇させる。シグナル 2 (S2) は PAMPs, DAMPs の暴露により、活性酸素 (reactive oxygen species; ROS) の産生、ライソゾーム (lysosome) の破綻、K⁺ イオン流出 (potassium efflux) などの刺激が誘導されて、インフラマゾームコンポーネントの会合 (assembly) が促進される (Walsh et al. Nat Rev Neurosci 15:84-97, 2014)。その結果、

procaspase-1 (Pro-CASP1) が活性化され、IL-1 β , IL-18 前駆体が切断されて成熟型 IL-1 β , IL-18 が産生される。すなわち NLRP3 インフラマゾームは細胞内炎症増強複合体である。Nlrp3 欠損マウスでは、MS モデルである自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の発症が抑制される (Gris et al. J Immunol 185: 974-981, 2010)。

本研究では、MS における NLRP3 インフラマゾームの役割を解明するため、MS および健康者、視神経脊髄炎 (NMO)、脳梗塞 (CI) の脳病巣における NLRP3, ASC, CASP1, IL-1 β 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) の大脳皮質ホルマリン固定パラフィン切片における NLRP3, ASC, CASP1, IL-1 β の発現に関して特異抗体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ウエスタンブロットで検証した。

2. 培養ヒト単球細胞 THP-1 における NLRP3 インフラマゾームの活性化

培養ヒト単球細胞 THP-1 を 0.2 microgram/ml LPS で 3 時間刺激(S1)後に PBS で洗浄、さらに 10 microM nigericin(NIG)で 2 時間刺激(S2)後に RNA を抽出し、Human Gene 1.0 ST array(Affymetrix; 28,869 genes) で発現プロファイルを解析し、発現変動遺伝子群に関しては Ingenuity Pathways Analysis(IPA)と KeyMolnet を用いて、分子ネットワークを解析した。細胞のライセートと培養上清はウェスタンブロットで解析した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いた全ての脳組織は脳バンク Research Resource Network(RRN)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の倫理委員会で承認されている。

C. 研究結果

1. MS 脳病巣反応性 AS, MPH における NLRP3 インフラマゾームの発現

Recombinant human NLRP3, ASC 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。NLRP3, ASC, CASP1, IL-1B は、MS, NMO 活動性病巣と CI 急性壊死性病巣で、reactive AS, perivascular MPH における発現を認めた(図 1)。一方、

MCG においては NLRP3, ASC の発現を認めなかった。

2. THP-1 における NLRP3 インフラマゾームの活性化

LPS(S1)で刺激後、NIG(S2)で 30 分または 2 時間刺激した細胞のライセートで cleaved CASP1(p10), 培養上清で成熟型 IL1-B(17-kDa)を検出した。マイクロアレイ解析で NLRP3 活性化依存的に発現上昇した 83 遺伝子を同定した(表 1)。この中には NR4A ファミリー(NR4A1, NR4A2, NR4A3), EGR ファミリー(EGR1, EGR2, EGR3), IkappaB ファミリー(NFKBIZ, NFKBID, NFKBIA)が含まれていた。定量的 RT-PCR 解析で、NR4A1, NR4A2, NR4A3 の NLRP3 活性化依存的発現上昇を確認した。分子ネットワーク解析では、発生・細胞死・免疫・炎症制御に関するネットワークと関連性を認め(図 2)、転写因子 AP-1, NR4A, EGR が中心分子 hub として働いていることがわかった。

D. 考察

NLRP3, ASC, CASP1, IL-1B は、MS, NMO 活動性病巣と CI 急性壊死性病巣では reactive AS, perivascular MPH における発現を認めたが、MCG においては NLRP3, ASC の発現を認めなかった(Kawana et al. Clin Exp Neuroimmunol 4: 296-304, 2013)。Alzheimer's

disease(AD)モデルマウスでは、NLRP3 インフラマゾームは主として MCG で発現していると報告されている(Heneka et al. Nature 493: 674-678, 2013)。LPS で刺激したヒト MPH 細胞株 THP-1 に nigericin を投与すると、迅速に NLRP3 inflammasome が活性化され、NR4A ファミリー、EGR ファミリー、IkappaB ファミリーの迅速な発現上昇を認めた(Kawana et al. Austin J Clin Immunol 1: e10, 2014; GSE58959)。NR4A ファミリー、EGR ファミリー、IkappaB ファミリー遺伝子群は NLRP3 インフラマゾームによる炎症を終結させるための negative feedback 経路として働いている可能性がある。以上より MS 活動性病巣に集積する AS と MPH は、髄鞘崩壊産物を danger signal として認識し、NLRP3 インフラマゾームが活性化されている可能性が示唆された。

E. 結論

NLRP3 インフラマゾームコンポーネントは MS における慢性炎症を遮断するための新規抗炎症薬創製において分子標的に成る可能性がある。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Choi SS, Lee HJ, Lim I, Satoh J, Kim SU. Human astrocytes: Secretome profiles of

cytokines and chemokines. PLoS One 9(4): e92325, 2014.

2. Satoh J, Kino Y, Kawana N, Yamamoto Y, Ishida T, Saito Y, Arima K. TMEM106B expression is reduced in Alzheimer's disease brains. Alzheimer's Research and Therapy 6(2): e17, 2014.
3. Satoh J, Motohashi N, Kino Y, Ishida T, Yagishita S, Jinnai K, Arai N, Nakamagoe K, Tamaoka A, Saito Y, Arima K. LC3, an autophagosome marker, is expressed on oligodendrocytes in Nasu-Hakola disease brains. Orphanet Journal of Rare Diseases 9: e68, 2014.
4. Kawana N, Yamamoto Y, Kino Y, Satoh J. Molecular network of NLRP3 inflammasome activation-responsive genes in a human monocyte cell line. Austin Journal of Clinical Immunology 1(4): e1071, 2014.
5. Ohtani R, Shibuya K, Satoh J, Kuwabara S. A piece of X-ray revealed Nasu-Hakola disease. Internal Medicine 53(20): 2407, 2014.
6. Satoh J. Molecular network of ChIP-Seq-based NF- κ B p65 target genes involves diverse immune functions relevant to the immunopathogenesis of multiple sclerosis. Multiple Sclerosis and Related Disorders 3(1): 94-106, 2014.
7. Satoh J, Yamamoto Y, Kitano S, Takitani M, Asahina N, Kino Y. Molecular network analysis suggests a logical hypothesis for

the pathological role of C9orf72 in amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia. *Journal of Central Nervous System Disease* 6: 69-78, 2014.

8. Satoh J, Kino Y, Yamamoto Y, Kawana N, Ishida T, Saito Y, Arima K. PLD3 is accumulated on neuritic plaques in Alzheimer's disease brains. *Alzheimer's Research and Therapy* 6: e70, 2014.
9. Satoh J, Asahina N, Kitano S, Kino Y. A comprehensive profile of ChIP-Seq-based PU.1/Spi1 target genes in microglia. *Gene Regulation and Systems Biology* 8: 127-139, 2014.
10. Satoh J, Yamamoto Y, Asahina N, Kitano S, Kino Y. RNA-Seq data mining: Downregulation of NeuroD6 serves as a possible biomarker for Alzheimer's disease brains. *Disease Markers* 2014: ID123156, 2014.
11. 佐藤準一. 神経症候群(第2版)III. 那須ハコラ病. *日本臨牀 新領域別症候群シリーズ* 28: 694-697, 2014.

2. 学会発表

国際学会

1. Satoh J, Kino Y: Molecular network of ChIP-Seq-based EBNA1-target cellular genes supports biological implications of EBV persistence in multiple sclerosis. 66th Annual Meeting of American Academy of Neurology. Philadelphia,

USA, 2014. 5.1.

国内学会

1. 佐藤準一、川名夏生、山本洋司、紀嘉浩. 次世代シーケンサーChIP-SeqデータによるゲノムワイドNF-kappaB p65 標的遺伝子群の解析. 第55回日本神経学会総会福岡、2014. 5.24.
2. 佐藤準一、紀嘉浩、川名夏生、山本洋司、石田剛、齊藤祐子、有馬邦正. Alzheimer病脳のIba1陽性microgliaはTREM2を発現しない. 第55回日本神経病理学会総会. 東京、2014. 6.26.
3. 佐藤 準一. 脳の病気の遺伝子を調べてみよう. 文部科学省・研究成果の社会還元・普及事業. ひらめきときめきサイエンス. ようこそ大学の研究室へ. 東京、2014. 7.27.
4. 檜垣小百合、村松昌、松田明生、松本健治、佐藤準一、道川誠、新飯田俊平. アルツハイマー病モデルマウス脳におけるmiR-200ファミリーの機能解析. 第6回日本RNAi研究会. 広島、2014. 8.28.
5. 佐藤準一. MSのバイオマーカー抗KIR4.1抗体. 第26回日本神経免疫学会学術集会. シンポジウムIII. Autoimmune channelopathies –update-. 金沢、2014. 9.5.
6. 佐藤準一、川名夏生、山本洋司、朝比奈直弘、北野翔大、紀嘉浩. MS活動性脳病巣におけるNLRP3 inflammasomeの発現. 第26回日本神経免疫学会学術集会.

金沢、2014. 9.5.

7. 佐藤準一、山本洋司、川名夏生、朝比奈直弘、北野翔大、紀嘉浩. アルツハイマー病脳における TMEM106B の発現低下. 第 37 回日本神経科学大会. Neuro2014. 横浜、2014. 9.13.

8. Jun-ichi Satoh, Yoshihiro Kino. Remarkable differences in NRSF/REST target genes between human ESC and

ESC-derived neurons. 生命医薬情報学連合大会. 仙台、2014. 10.2.

H. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|------|
| 1. 特許取得 | 該当なし |
| 2. 実用新案登録 | 該当なし |
| 3. その他 | なし |

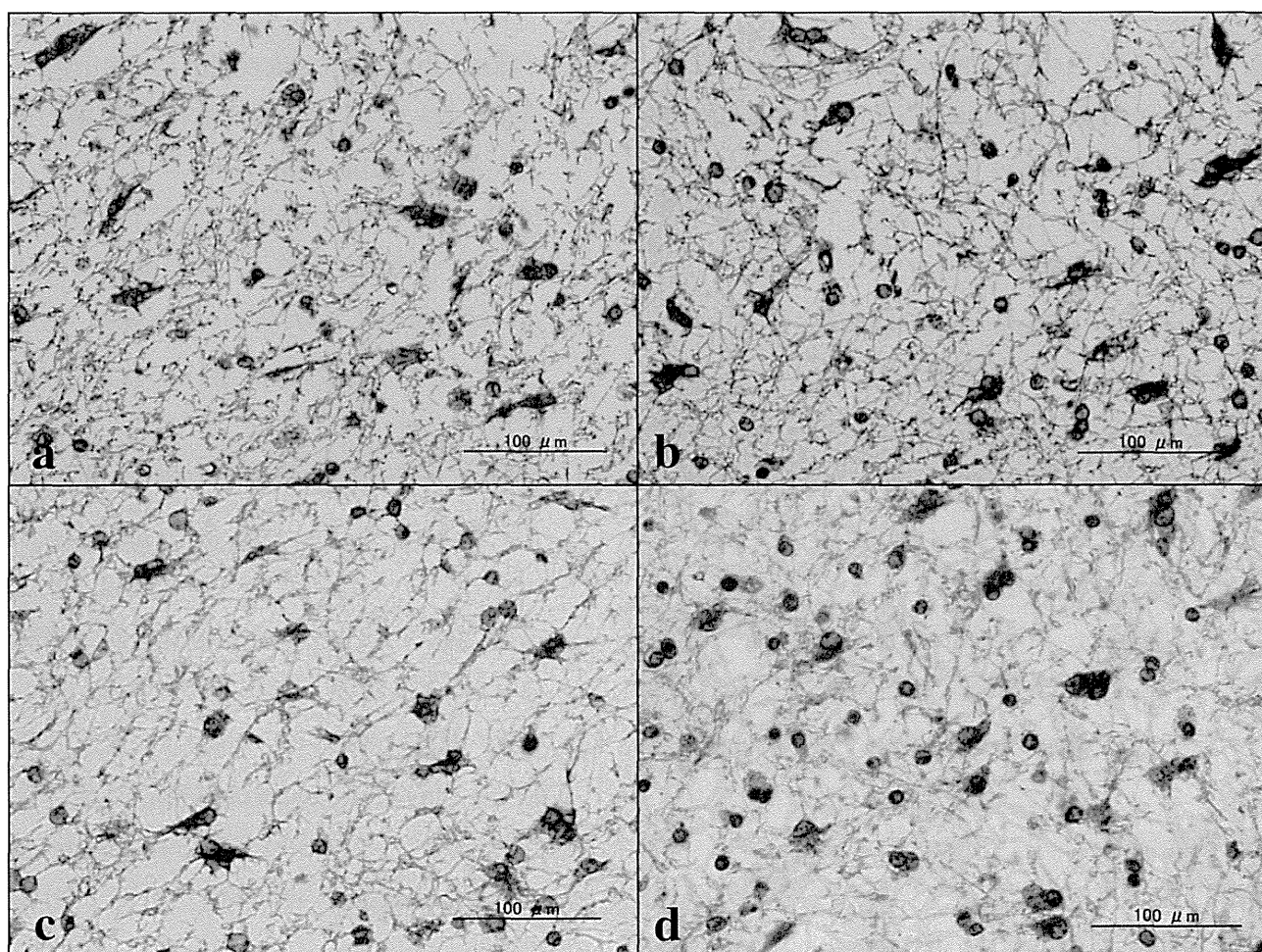


図 1. MS 活動性病巣反応性 AS における NLRP3 インフラマゾームの発現.

The expression of (a) NLRP3, (b) ASC, (c) CASP1, and (d) IL-1B was studied in the serial sections of chronic active lesions of MS by immunohistochemistry. Reactive astrocytes (AS) intensely expressed all three components and IL-1B with the location of the cytoplasm.