

12.6. 安全性の結論

安全性解析対象集団はボルテゾミブ群 8 例、プラセボ群 6 例、計 14 例であった。

有害事象発現率は両群ともに 100.0% (ボルテゾミブ群 8/8 例、プラセボ群 6/6 例) であったが、発現件数はボルテゾミブ群 97 件、プラセボ群 15 件で、ボルテゾミブ群が多かった。死亡例はなく、重篤な有害事象発現例数はボルテゾミブ群に 5 例 6 件発現した。発熱が 3 件、肝機能異常、血小板数減少、血栓性微小血管症が各 1 件で血小板数減少、血栓性微小血管症は同一被験者であった。治験薬の投与中止がボルテゾミブ群に 3 例、減量が同群に 6 例みられた。治験薬投与中止の理由は、同意撤回 1 例、有害事象のため治験継続不可能が 2 例であった。後観察期中止例は、ボルテゾミブ群 1 例、プラセボ群 2 例であった。プラセボ群の 2 例は、治験薬の効果期待できず無効と判断された 1 例、および外科的治療または併用禁止薬剤等による治療が必要と判断された 1 例であった。

PT 別で多くみられた有害事象 (50%以上) はボルテゾミブ群では発熱、注射部位反応、悪心、頭痛、食欲減退、血小板数減少、白血球数減少であった。プラセボ群には 50%以上の発現頻度の有害事象はなかった。

ボルテゾミブ群の有害事象のほとんどは治験薬との因果関係ありであった。

程度が高度の事象は血小板数減少の 1 例 (被験者識別コード JBC01-001-11) のみであった。

CTCAE による重症度別では、Grade 4 または Grade 3 がボルテゾミブ群のみに発現した。Grade 4 は血小板数減少、血栓性微小血管症、Grade 3 は血小板数減少、白血球数減少、胃腸障害、発熱、肝機能異常、好中球減少症、汎血球減少症、リンパ球数減少、好中球数減少であった。

サイクル別の有害事象は、1 サイクル目がボルテゾミブ群で 68 件、プラセボ群で 8 件、2 サイクル目がそれぞれ 19 件、2 件であった。後観察期にはボルテゾミブ群で 10 件、プラセボ群で 5 件みられた。

有害事象のほとんどは 1 サイクル目に発現し、群別ではボルテゾミブ群が多かった。

転帰は未回復がボルテゾミブ群に 5 件、プラセボ群に 4 件みられた他はすべて回復または軽快した。

臨床検査値およびバイタルサインではいくつかの項目に増加または減少する傾向がみられたものの被験者数が少なく、標準偏差も大きく、明らかな変動とは考えられない。

以上より、本治験において、ボルテゾミブ群で有害事象の発現頻度、重症度ともにプラセボ群より多く、かつ重度であった。

13. 考察と全般的結論

本治験は、ステロイドホルモン剤に加え免疫抑制剤を使用しても、なお十分な疾患活動性の制御ができず、ステロイドホルモン剤の減量が困難となっている中等度の活動性をもった難治性全身エリテマトーデス患者を対象とし、ボルテゾミブの有効性および安全性を、プラセボを対照として検討した。

本治験参加に文書同意した 19 例の被験者のうち、組み入れ基準に該当しない等の理由により前観察期に脱落した 5 例を除く 14 例をボルテゾミブ群に 8 例、プラセボ群に 6 例無作為に割り付けた。割り付けられた全例を有効性解析対象集団および安全性解析対象集団に採用した。ボルテゾミブの投与量は、 1.3 mg/m^2 （体表面積）を投与 1、4、8、11 日目（1 サイクル目）に皮下注射にて投与し、休薬後、投与 29、32、36、39 日目（2 サイクル目）に同様に投与した。その後、後観察期を設けて、投与 169 日目（投与 24 週）まで観察した。

その結果、有効性は、主要評価項目および副次評価項目のいずれにおいても両群間に有意差は認められず、ボルテゾミブ群の効果は確認されなかった。

有効性副次評価項目に関する追加解析で、ボルテゾミブ群で 12 週の SELENA-SLEDAI スコアが 0 週と比べ有意に低下し、疾患活動性の低下が認められた。

また、SLICC/ACR damage index による臓器障害度は両群間に有意差はみられなかったが、ボルテゾミブ群では投与 24 週で 0 週と比較して低下した。

安全性に関しては、プラセボ群に比しボルテゾミブ群で有害事象の発現件数が多く、重篤な有害事象発現例数も多かった。ほとんどの有害事象はボルテゾミブ製剤（バルケイド[®]注射用 3 mg）でみられる事象であったが、血栓性微小血管症は発現した時点ではボルテゾミブの有害事象としては未知であった。血栓性微小血管症の主な臨床症状は血小板減少症、溶血性貧血、腎機能障害であるとされており、これらの症状はボルテゾミブに発現する事象であることから、血栓性微小血管症の発現は予測可能と思われる。

なお、ヤンセンファーマ株式会社が 2015 年 3 月 10 日、医師・薬剤師宛に報告した「バルケイド[®]注射用 3 mg 副作用発現状況一覧」には血栓性微小血管症（2 件、すべて重篤）が記載されている。

本治験では、有効性の評価を 8、16、24 週または 12、24 週に行っており、それぞれの項目についてその推移をみると、抗 dsDNA 抗体価ではボルテゾミブ群のプラセボ群に対する変化量、変化率はいずれも投与 8 週、16 週までは増加しているが、ボルテゾミブの投与終了からの後観察期間の長かった 24 週では低下した。一方、補体 C3 および補体 C4 では抗 dsDNA 抗体価の低下とは逆に、活動性の低下を示す上昇傾向を示した。治療反応率は、ボルテゾミブ群の有効例がプラセボ群を上回り、また、ボルテゾミブ群では投与 12 週に SELENA-SLEDAI スコアが低下し、疾患活動性の低下しており、抗 DNA 抗体といった血清学的効果だけでなく、臨床症状を改善させる可能性も示している。再燃（SELENA-SLEDAI SLE Flare Index）では、24 週においてプラセボ群で軽度または中等度の再燃例が 2 例（50%）認められたが、ボルテゾミブ群には再燃例はなかった（0/4 例）。

また、主要評価項目（投与 24 週における抗 dsDNA 抗体価の投与前からの変化量および変化率）について補足的に行った LOCF 解析では、24 週の両群間の変化率の差は-35.21%と大きく、ボルテゾミブ群の効果を考えさせるデータである。

このことは中止せざるを得なかった症例で効果がでている可能性があり、主要評価項目（抗 dsDNA 抗体価）の解析では効果不十分例のみを解析している可能性がある。

また、2 サイクル目の有害事象発現件数が 1 サイクル目より著しく減少していることから 2 サイクル目以降の投与が可能であると推察できるが、これは 1 サイクル目で中止に至った症例が除かれた影響も考えられる。

中止例でみると、治療中の有害事象の発現のため投与期間中に中止した症例がボルテゾミブ群で多い一方で、後観察期間においては中止例がプラセボ群で 6 例中 2 例と多く、疾患コントロール不十分による治療強化を目的で中止になっているのに対し、ボルテゾミブ群では疾患コントロール不十分での中止例はいなかった。

以上、ステロイドホルモン剤に加え免疫抑制剤を使用しても、なお十分な疾患活動性の制御ができず、ステロイドホルモン剤の減量が困難となっている中等度の活動性をもった難治性 SLE に対し、ボルテゾミブの投与期間をサイクル間に 3 週間の休薬を含む 1 サイクル 4 回（4 日に 1 回）投与を 2 サイクル投与し、投与終了後、投与開始から 169 日目（24 週）まで観察した。対照にプラセボを投与して各種検査項目を比較した結果、ボルテゾミブにはプラセボに対し有意な効果が認められなかったが、評価項目ごとにみると、LOCF 解析による抗 dsDNA 抗体価の低下、補体 C3 および C4 の上昇、治療反応率がプラセボ群より高い等、いくつかの項目で効果がみられた。

有害事象の発現に関しては、ボルテゾミブ製剤（ベルケイド[®]注射用 3 mg）で報告されている事象に含まれるものであった。

14. 引用文献の一覧表

- 1) 熊谷俊一, 林伸英. 膠原病の診断法の進歩. 医学のあゆみ. 2001;199(5):305-12.
- 2) 湯村和子. 膠原病・ループス腎炎における腎障害. 小山哲夫編. 腎疾患治療薬マニュアル. 腎と透析. 2002;53(臨時増刊号):172-6.
- 3) 特定疾患医療受給者証交付件数. 難病情報センター. <http://www.nanbyou.or.jp/entry/1356>
- 4) 堀田正一. 全身性エリテマトーデス. 医薬ジャーナル. 1998;34(5):91-6.
- 5) Hochberg MC. Updating the American college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40(9):1725.
- 6) 湯村和子. ループス腎炎—腎不全への阻止のために. 浅野泰 他編. 別冊 医学のあゆみ 腎疾患 state of arts 2003-2005. 医歯薬出版. 2003;328-31.
- 7) 野島美久. <<二次性ネフローゼ症候群の治療>>ループス腎炎. 内科. 2004;94(1):107-10.
- 8) Rabbani MA, Habib HB, Islam M, Ahmad B, Majid S, Saeed W, et al. Survival analysis and prognostic indicators of systemic lupus erythematosus in Pakistani patients. *Lupus.* 2009;18(9):848-55.
- 9) Kasitanon N, Magder LS, Petri M. Predictors of survival in systemic lupus erythematosus. *Medicine (Baltimore).* 2006;85(3):147-56.
- 10) 山本一彦, 渥美達也, 小野栄夫, 石井智徳, 岡崎仁昭, 住田孝之, 他. 自己免疫疾患に関する調査研究, 厚生労働科学研究費補助金 疾病・障害対策研究分野 難治性疾患克服研究 2010 年度報告, 2011.
- 11) 市川陽一. 全身性エリテマトーデスの予後因子と治療. 日本医事新報 1987;3322:3-14.
- 12) Hoyer BF, Moser K, Hauser AE, Peddinghaus A, Voigt C, Eilat D, et al. Short-lived plasmablasts and long-lived plasma cells contribute to chronic humoral autoimmunity in NZB/W mice. *J Exp Med.* 2004;199(11):1577-84
- 13) Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, Inamine A, Smith KG, Dörner T, et al. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(10):741-50.
- 14) Meister S, Schubert U, Neubert K, Herrmann K, Burger R, Gramatzki M, et al. Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer Res.* 2007;67(4):1783-92.
- 15) Cenci S, Mezghrani A, Cascio P, Bianchi G, Cerruti F, Fra A, et al. Progressively impaired proteasomal capacity during terminal plasma cell differentiation. *Embo J.* 2006;25(5):1104-13.
- 16) Neubert K, Meister S, Moser K, Weisel F, Maseda D, Amann K, et al. The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and protects mice with lupus-like disease from nephritis. *Nat Med.* 2008;14(7):748-55.

- 17) Everly MJ, Everly JJ, Susskind B, Brailey P, Arend LJ, Alloway RR, et al. Bortezomib provides effective therapy for antibody- and cell-mediated acute rejection. *Transplantation*. 2008; 86(12):1754-61.
- 18) Idica A, Kaneku H, Everly MJ, Trivedi HL, Feroz A, Vanikar AV, et al. Elimination of post-transplant donor-specific HLA antibodies with bortezomib. *Clin Transpl*. 2008:229-39.
- 19) Perry DK, Burns JM, Pollinger HS, Amiot BP, Gloor JM, Gores GJ, et al. Proteasome inhibition causes apoptosis of normal human plasma cells preventing alloantibody production. *Am J Transplant*. 2009;9(1):201-9.
- 20) Trivedi HL, Terasaki PI, Feroz A, Everly MJ, Vanikar AV, Shankar V, et al. Abrogation of anti-HLA antibodies via proteasome inhibition. *Transplantation*. 2009;87(10):1555-61.
- 21) Walsh RC, Everly JJ, Brailey P, Rike AH, Arend LJ, Mogilishetty G, et al. Proteasome inhibitor-based primary therapy for antibody-mediated renal allograft rejection. *Transplantation*. 2010;89(3):277-84.
- 22) Fröhlich K , Holle JU, Aries PM, Gross WL, Moosig F. Successful use of bortezomib in a patient with systemic lupus erythematosus and multiple myeloma. *Ann Rheum Dis*. 70(7):1344-45.

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合事業（臨床研究・治験推進研究事業）

分担研究報告書

難治性 SLE に対するボルテゾミブ療法の有効性・安全性検証試験

B 細胞を標的とした全身性エリテマトーデスの治療の開発に関する研究

研究分担者 田中良哉 産業医科大学医学部第一内科学講座 教授

研究協力者 齋藤和義 同 准教授

研究協力者 中山田真吾 同 講師

研究協力者 久保智史 同 助教

研究要旨：全身性エリテマトーデス（SLE）の発症過程には、B 細胞の自己抗体産生による多臓器障害が生ずる。しかし、病態を形成する B 細胞の分化と機能の詳細は不明である。平成 25 年度は、SLE 患者末梢血における活性化 B 細胞サブセット、形質細胞の質的異常を解析した。SLE 患者の末梢血では、B 細胞は Tfh 細胞からの刺激を受容し、CXCR5 の減弱と CXCR3 の増強を介してリンパ組織から標的臓器へ遊出して、エフェクター機能を発揮するとともに、形質細胞への分化が亢進している可能性が示された。一方、SLE に対する抗 CD20 抗体リツキシマブ治療により、B 細胞は速やかに除去されたが、IgD⁺CD27^{high}形質細胞は治療後少なくとも 4 週間残存した。また、再燃時には、消失したメモリー B 細胞と形質細胞が再出現した。平成 26 年度には、これらの結果を基に、形質細胞を主要な標的としたボルテゾミブの難治性 SLE に対する治験が実施された。疾患活動性の高い SLE 患者に対してボルテゾミブが投与された。3 回皮下注射後から発熱、胸膜炎、クレアチニン上昇を認め（因果関係は否定できない）、本薬剤の投与は中止となった。しかし、ステロイド大量療法等にて疾患活動性が制御された治療半年後に、memory B cells は変化がなかったが、CD19⁺CD20⁻CD38⁺ plasmablasts は 43%から 7%へと著明に低下した。memory B 細胞が変化しないのにも関わらず、plasmablasts が低下したのはボルテゾミブの影響の可能性が示唆された。これらの結果より、形質細胞を主要な標的としたボルテゾミブの難治性 SLE に対する検証試験、及び、安全性を検証するための臨床試験の速やかな実施が期待される。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス (SLE) は代表的な膠原病で、20~30 歳代の女性に好発し、本邦でも約 10 万人の患者数が推定される。SLE の発症過程には、B 細胞の自己抗体産生による多臓器障害が生ずる。しかし、治療は副腎皮質ステロイドと免疫抑制薬の併用療法等の非特異的な治療が中心で、生物学的製剤についても SLE に対する CD20 抗体の治療をはじめとして悉く失敗し、新たな治療標的が急務である。平成 24 年度は、SLE 患者の末梢血リンパ球を解析し、抗 CD20 抗体リツキシマブによる B 細胞標的治療の問題点を明らかにすることを目的とした。平成 25 年度は、SLE における活性化 B 細胞サブセット、形質細胞の質的異常を明らかにすることを目的とし、B 細胞のサブセット分類を試みた。平成 26 年度は、ボルテゾミブで治療した患者の末梢血のリンパ球サブセットの推移を解析し、病的意義を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

健常人、RA 患者、SLE 患者より末梢血を採取し、8 カラーフローサイトメトリー (FACSVerse) を用いて、T 細胞、B 細胞のケモカイン受容体などによる細分類を試み、各サブセット間および患者背景との相関を検討した。ボルテゾミブ 1.3 mg/m² または、プラセボを 1、4、8、11 日に投与するサイクルを 1 サイクルとして、4 週目に第 2 サイクルをいずれも皮下注射にて計 8 回の投与が実施された。

(倫理面への配慮)

臨床検体を使用する場合には、所属機関の倫理委員会、或は、IRB で承認を得た研究に限定

し、患者からインフォームドコンセントを得た上で、倫理委員会の規約を遵守し、所属機関の現有設備を用いて行う。患者の個人情報が入属機関外に漏洩せぬよう、試料や解析データは万全の安全システムをもって厳重に管理し、人権擁護に努めると共に、患者は、経済的負担を始め如何なる不利益や危険性も被らない事を明確にする。

C. 研究結果

1. SLE 患者末梢血リンパ球のフェノタイプの特徴

(1) 疾患活動性の高い SLE 患者末梢血では、IgM memory B 細胞の割合が減少し、CD19⁺IgD⁻CD27⁺ effector memory B 細胞と CD19⁺CD27⁺CD38⁺ plasmablast の割合が増加した。

(2) SLE 患者 B 細胞では、健常人と比し CXCR5 の発現が有意に減少した。また、CXCR5 陰性 CXCR3 陽性の effector memory B 細胞が有意に増加し、疾患活動性と相関した。

(3) SLE 患者 T 細胞では CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁻ effector T 細胞と CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺ follicular helper T 細胞の割合が増加した。また、CXCR5 陰性 CXCR3 陽性の effector memory B 細胞の割合は、末梢血活性化 Tfh 細胞の割合と正の相関を認めた。

(4) SLE 患者の末梢血では、CD3⁺CD19⁺CD27⁺CD38⁺ の形質細胞の割合が 42.3% と、健常者の 5-6 倍も著増していた。

2. 抗 CD20 抗体療法とリンパ球のフェノタイプ

(1) SLE 患者に CD20 抗体リツキシマブ 375mg/m²/週を 2 回投与した結果、疾患活動性スコア SLEDAI は 28 日後に有意に改善し、末梢血 CD20⁺ B 細胞数は全例で 2 週間以内に消失し、3~9 ヶ月間維持された。

(2) リツキシマブにより、 $CD19^+IgD^+CD27^-$ ナイブ B 細胞、 IgD^-CD27^+ メモリー B 細胞は速やかに消失したが、 IgD^-CD27^{high} 形質細胞は 4 週間残存した。また、 $CD19$ 陽性細胞上の $CD40$ と $CD80$ は投与後速やかに発現分子数が減少し、半年後も減弱が維持された。

(3) 2 年後に寛解を維持した症例では、ナイブ B 細胞は回復したが、メモリー B 細胞と IgD^-CD27^{high} 形質細胞の消失が持続した。また、B 細胞上の $CD40$ と $CD80$ の発現量、発現 B 細胞数も低下したが、2 年間に亘って低値を維持した。寛解維持症例では、メモリー T 細胞も減少し、特に、 $CD4^+$ T 細胞上の $CD69$ 、 $CD40L$ と $ICOS$ の発現も低下し、2 年間低発現を維持した。

(4) 再燃例では、 $CD40$ と $CD80$ を発現したメモリー B 細胞が再燃に先立ち増加し、また、 IgD^-CD27^{high} 形質細胞も再燃とともに末梢血中に検出された。

3. ボルテゾミブ治療とリンパ球のフェノタイプ

(1) 症例は 35 歳女性。2011 年に紅斑、尿蛋白、ds-DNA 抗体上昇などから SLE と診断。腎生検にてループス腎炎 IV/S と診断され、ステロイド大量療法 + IV-CY 15mg/kg で治療された。2014 年 1 月、PSL 10mg にて発疹、尿蛋白、dsDNA 抗体高値などが持続し、前治験期間としてボルテゾミブ（プラセボ）が投与された。2014 年 7 月、下肢浮腫、尿蛋白を認め、SLEDAI=12 点と高疾患活動性であり、本研究期間としてボルテゾミブ（実薬）が投与された。しかし、3 回皮下注射後から発熱、胸膜炎、クレアチニン上昇を認めて（因果関係は否定できない）本薬剤中止となり、ステロイド大量療法を施行した。

(2) 治療前、 $CD19^+IgD^+CD27^-$ naive B cells は 16%、 $CD19^+IgD^-CD27^+$ central memory B

cells は 75%、 $CD19^+IgD^-CD27^-$ effector memory B cells は 4%、 $CD19^+CD20^-CD38^+$ plasmablasts は 43% と plasmablasts の増加が顕著であった。また、 $CD3^+CD4^+CXCR5^+ICOS^+$ の follicular helper T 細胞が 1.8% と増加していた。

(3) ボルテゾミブ治療後、疾患活動性は制御され、SLEDAI=0 となり、末梢血リンパ球では $CD19^+IgD^+CD27^-$ naive B cells は 9%、 $CD19^+IgD^-CD27^+$ central memory B cells は 69%、 $CD19^+IgD^-CD27^-$ effector memory B cells は 9% と顕著な変化を認めなかったが、 $CD19^+CD20^-CD38^+$ plasmablasts は 43% から 7% へと著明に低下した。なお、 $CD3^+CD4^+CXCR5^+ICOS^+$ の follicular helper T 細胞も 1.8% から 0.5% へ減少していた。

D. 考察

SLE 患者 B 細胞では、memory B 細胞の増加が特徴的であるが、その機能と分化の機序は不明であった。今回の検討により、活動期の SLE では $CXCR5$ 陰性 $CXCR3$ 陽性の effector memory B 細胞が疾患特異的に出現すること、このサブセットの割合が B 細胞を刺激する Tfh 細胞の活性化と相関することが示された。また、そのメカニズムとして、Tfh 細胞が産生する $IL-21$ と $IFN-\gamma$ の刺激が B 細胞の分化誘導とエフェクター機能を強力に誘導する可能性が考えられた。即ち、B 細胞は Tfh 細胞からの刺激を受容し、 $CXCR5$ の減弱と $CXCR3$ の増強を介してリンパ組織から標的臓器へ遊出して、エフェクター機能を発揮するものと考えられる。その結果、 $CD3^-CD19^+CD27^+CD38^+$ 形質細胞への分化がさらに亢進し、自己抗体の過剰産生を齎している可能性が示された。

一方、リツキシマブ投与により SLE 患者の末梢血 $CD20^+$ B 細胞数は全例で 2 週間以内

に消失し、3～9 ヶ月間維持された。しかし、IgD⁺CD27^{high} 形質細胞はリツキシマブ治療後少なくとも4週間残存し、自己抗体産生の存在を主病態とするような症例では、リツキシマブの早期治療効果は十分に望めない可能性が示された。実際、本邦の治験でもリツキシマブ不応性の症例が1/3に認められ、また、Explorer 試験などではプラセボ群と有意差が認められずに失敗に終わった。また、リツキシマブ治療による長期寛解後の SLE 再燃症例では、再燃とともに IgD⁺CD27⁺メモリーB細胞や IgD⁺CD27^{high} 形質細胞の再出現が認められ、長期寛解維持には限界を有する症例が存在する。さらに、B細胞除去療法による長期間のメモリーB細胞や形質細胞の末梢血からの消失により、日和見感染症の発症等が危惧される。

今回、ボルテゾミブ投与前後で治療反応性とともにリンパ球のフェノタイプを解析した。本症例では、3回皮下注射後から発熱、胸膜炎、クレアチニン上昇を認め（因果関係は否定できない）、本薬剤の投与は中止となった。また、別の症例でも有害事象のために初回投与のみで中止となった。本薬剤の安全性については十分に検討していく必要がある。しかし、ボルテゾミブを使用し、ステロイド大量療法等にて疾患活動性が制御された治療半年後に、CD19⁺IgD⁺CD27⁻ naive B cells、CD19⁺IgD⁺CD27⁺ central memory B cells、CD19⁺IgD⁺CD27⁺ effector memory B cells は治療により変化がなかったが、CD19⁺CD20⁻CD38⁺ plasmablasts は43%から7%へと著明に低下していた。memory B細胞が変化しないのにも関わらず、plasmablasts が低下したのはボルテゾミブの影響の可能性が示唆された。

以上、SLEのような自己反応性B細胞の活性化、長期生存形質細胞の増加、自己抗体産生の増加を病態の基本とする疾患の制御では、形質細胞の制御が重要な鍵を握る可能性が示唆される。ボルテゾミブは、形質細胞を主要標的とし、既に多発性骨髄腫に対して承認されている経口薬剤であり、難治性 SLE に対する応用が期待される。難治性 SLE に対するボルテゾミブ療法の有効性・安全性検証試験の可及的速やかな実施が期待される。

E. 結論

SLE患者の末梢血では、B細胞はTfh細胞からの刺激を受容し、CXCR5の減弱とCXCR3の増強を介してリンパ組織から標的臓器へ遊出して、エフェクター機能を発揮するとともに、形質細胞への分化が亢進している可能性が示された。一方、SLEに対するツキシマブ治療により、B細胞は速やかに除去されたが、IgD⁺CD27^{high} 形質細胞は治療後少なくとも4週間残存した。また、再燃時には、消失したメモリーB細胞と形質細胞が再出現した。これらの結果を基に、今回、形質細胞を主要な標的としたボルテゾミブの難治性 SLE に対する治験が実施された。ボルテゾミブを3回皮下注射後から発熱、胸膜炎、クレアチニン上昇を認め（因果関係は否定できない）、本薬剤の投与は中止となった。しかし、ステロイド大量療法等にて疾患活動性が制御された治療半年後に、memory B cells は変化がなかったが、CD19⁺CD20⁻CD38⁺ plasmablasts は43%から7%へと著明に低下した。memory B細胞が変化しないのにも関わらず、plasmablasts が低下したのはボルテゾミブの影響の可能性が示唆された。これらの結果より、形質細胞を主要な標的としたボルテゾミブの難治性 SLE に対する安全性と有効性の検証治験の速やかな実施が期待さ

れる。

F. 研究発表

1.論文発表

1. Iwata S, Nakayamada S, Fukuyo S, Kubo S, Yunoue N, Wang S-P, Yoshikawa M, Saito K, Tanaka Y. Activation of Syk in peripheral blood B cells in patients with rheumatoid arthritis: A potential target for abatacept therapy. *Arthritis Rheum* [Epub ahead of print]
2. Iwata S, Yamaoka K, Niuro H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Wang S-P, Kondo M, Yoshikawa M, Akashi K, Tanaka Y. Increased Syk phosphorylation leads to overexpression of TRAF6 in peripheral B cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* (in press)
3. Kondo M, Yamaoka K, Sakata K, Sonomoto K, Lin L, Nakano K, Tanaka Y. IL-6/STAT3 signaling pathway contributes to chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum* [Epub ahead of print]
4. Tanaka Y, Hirata S, Kubo S, Fukuyo S, Hanami K, Sawamukai N, Nakano K, Nakayamada S, Yamaoka K, Sawamura F, Saito K. Discontinuation of adalimumab after achieving remission in patients with established rheumatoid arthritis: 1-year outcome of the HONOR study. *Ann Rheum Dis* [Epub ahead of print]
5. Ishizaki J, Saito K, Nawata M, Mizuno Y, Tokunaga M, Sawamukai N, Tamura M, Hirata S, Yamaoka K, Hasegawa H, Tanaka Y. Low complements and high titer of anti-Sm antibody as predictors of histopathologically proven silent lupus nephritis without abnormal urinalysis in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* [Epub ahead of print]
6. Tanaka Y, Martin Mola E. IL-6 targeting compared to TNF targeting in rheumatoid arthritis: studies of olokizumab, sarilumab and sirukumab. *Ann Rheum Dis* (2014) 73, 1395-1397
7. Kubo S, Yamaoka K, Kondo M, Yamagata K, Zhao J, Iwata S, Tanaka Y. The JAK inhibitor tofacitinib reduces the T cell stimulatory capacity of human monocyte-derived dendritic cells. *Ann Rheum Dis* (2014) 73, 2192-2198
8. Fukuyo S, Yamaoka K, Sonomoto K, Oshita K, Okada Y, Saito K, Yoshida Y, Kanazawa T, Minami Y, Tanaka Y. IL-6-accelerated calcification by induction of ROR2 in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells is STAT3-dependent. *Rheumatology* (2014) 53:1282-90
9. Wang S-P, Iwata S, Nakayamada S, Sakata K, Yamaoka K, Tanaka Y. Tofacitinib, a Jak inhibitor, inhibits human B cell activation in vitro. *Ann Rheum Dis* (2014) 73, 2213-2215
10. Tanaka Y. Next stage of RA treatment: TNF-inhibitor-free remission will be a possible treatment goal? *Ann Rheum Dis* (2013) 72, ii124-ii127
11. O'Shea JJ, Kontzias A, Yamaoka K, Tanaka Y, Laurence A. Janus kinase inhibitors in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* (2013) 72, ii111-
12. Tanaka Y, Hirata S, Saleem B, Emery P. Discontinuation of biologics in patients

- with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* (2013) 31 (Suppl. 78): S22-S27
13. Kameda H, Kanbe K, Sato e, Ueki Y, Saito K, Nagaoka S, Hidaka T, Atsumi T, Tsukano M, Kasama T, Shiozawa S, Tanaka Y, Yamanaka H, Takeuchi T. A merged presentation of clinical and radiographic data using probability plots in a clinical trial, the JESMR study. *Ann Rheum Dis* (2013) 72, 310-312
 14. van der Heijde D, Tanaka Y, Fleischmann R, Keystone E, Kremer J, Zerbini C, Cardiel MH, Cohen S, Nash P, Song YW, Tegzová D, Wyman BT, Gruben D, Benda B, Wallenstein G, Krishnaswami S, Zwillich SH, Bradley JD, Connell CA and the ORAL Scan investigators. Tofacitinib (CP-690,550) in patients with rheumatoid arthritis on methotrexate: 12 month data from a 24 month Phase 3 randomized radiographic study. *Arthritis Rheum* (2013) 65: 559-570
 15. Iwata S, Saito K, Tokunaga M, Tanaka Y. Persistent memory B cell down-regulation after 6-year remission induced by rituximab therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* (2013) 22, 538-540
 16. Iwata S, Yamaoka K, Niuro H, Nakano K, Wang S-P, Akashi K, Tanaka Y. Amplification of toll-like receptor-mediated signaling through Syk in human B cell activation. *J Allergy Clin Immunol* (2012) 129, 1594-1601
 17. Iwata S, Saito K, Tokunaga M, Tanaka Y. B-cell or T-cell-dominant recurrence after rituximab therapy in patients with SLE. *Ann Rheum Dis* (2012) 71, 1749-1750
 18. Sawamukai N, Satake A, Schmidt AM, Lamborn IT, Tanaka Y, Kambayashi T. Cell autonomous role of TGF β and IL-2 receptor in CD4+ and CD8+ inducible regulatory T cell generation during graft-versus-host disease. *Blood* (2012) 119: 5575-83
 19. Tanaka Y, Maeshima Y, Yamaoaka K. In vitro and in vivo analysis of a Jak inhibitor in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* (2012) 71, i70-i74
 20. Iwata S, Saito K, Hirata S, Tanaka Y. Phenotypic changes of lymphocyte in a patients with IgG4-related disease after corticosteroid therapy. *Ann Rheum Dis* (2012) 71, 2058-2059
 21. Sonomoto K, Yamaoka K, Oshita K, Fukuyo S, Zhang X, Nakano K, Okada Y, Tanaka Y. IL-1 β induces differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts via the Wnt5a/Ror2 pathway. *Arthritis Rheum* (2012) 64, 3355-3363
 22. Maeshima K, Yamaoaka K Kubo s, Nakano K, Iwata S, Saito K, Ohishi M, Miyahara H, Tanaka S, Ishi K, Yoshimatsu H, Tanaka Y. A JAK inhibitor tofacitinib regulates synovitis through inhibition of IFN- γ and IL-17 production by human CD4+ T cells. *Arthritis Rheum* (2012) 64, 1790-1798
 23. Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Yamamoto K, Mitasaka N, Koike T, Kanazawa M, Oba T, Baker D & the GO-FORTH study group. Golimumab, a human anti-TNF- α monoclonal antibody, injected subcutaneously every 4 weeks in Japanese patients with active rheumatoid arthritis in combination with methotrexate:

results of the Phase 2/3, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled GO-FORTH study through 24 weeks. Ann Rheum Dis (2012) 71, 817-824

24. Tak PP, Mease PJ, Genovese MC, Kremer J, Haraoui B, Tanaka Y, Bingham III CO, Ashrafzadeh A, Travers H, Safa-Leathers S, Kumar S, Dummer W. Efficacy and safety of ocrelizumab in patients with active rheumatoid arthritis with an inadequate response to at least one TNF inhibitor: results from the phase III SCRIPT trial. Arthritis Rheum (2012) 64, 360-370

2.学会発表

1. 田中良哉. 全身性自己免疫疾患に於けるリンパ球サブセット研究とテイラーメイド分子標的治療. 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会(シンポジウム) 東京, 平成26年4月24-27日
2. Y. Tanaka, H. Yamanaka, N. Ishiguro, N. Miyasaka, K. Kawana, T. Kubo, A. Kuroki, T. Takeuchi. Initial adalimumab plus methotrexate treatment prevents joint destruction irrespective of treatment duration in Japanese patients with early rheumatoid arthritis: post-hoc analysis of Hopeful 1 and 2 studies. The Annual European Congress of Rheumatology 2014, Paris, France, 平成26年6月10-14日
3. Tanaka Y. Current concepts in the management of rheumatoid arthritis. 32nd World Congress of Internal Medicine 2014 (教育講演) Seoul, South Korea, 平成26年10月24日~10月28日
4. Tanaka Y. The Development of Anti-TNF

Agents in Rheumatoid Arthritis. EAGOR2013, The 5th East Asian Group of Rheumatology (symposium). Seoul, Korea. 平成25年5月

5. Tanaka Y. A potential of human mesenchymal stem cells for the treatment of Rheumatoid Arthritis. The First ARISE WITH APLAR. Seoul, Korea. 平成25年9月
6. Tanaka Y, Emoto K, Tsujimoto M, Schlichting DE, Macias W. 12-week results of a phase 2b dose-ranging study of baricitinib, an oral JAK1/ JAK2 inhibitor in Japanese patients with rheumatoid arthritis on background methotrexate therapy. ACR 2013. San Diego, USA. 平成25年10月
7. Tanaka Y, Yamanaka Y, Ishiguro N, Miyasaka N, Kawana K, Kubo T, Kuroki A, Takeuchi T. Clinical remission after 52 weeks of treatment is a predictor of adalimumab-free disease control in patients with early rheumatoid arthritis: Hopeful 2 Study. ACR 2013. San Diego, USA. 平成25年10月

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
該当無し
2. 実用新案登録
該当無し
3. その他
該当無し

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業（臨床研究・治験推進研究事業）

分担研究報告書

難治性 SLE に対するボルテゾミブ療法の有効性・安全性検証試験

SLE における治療抵抗性における P 糖蛋白質発現リンパ球の関与および早期診断のための Silent lupus nephritis 検出に関する研究

研究分担者 齋藤和義 産業医科大学医学部第 1 内科学講座 准教授

研究要旨：SLE に対する良好な治療のアウトカムを得るには、早期診断と治療抵抗性の克服が重要である。また、既存治療に抵抗性の場合には今回のボルテゾミブなどによる新規 mode of action による薬物療法の導入が必要となる。SLE に対する薬物療法に於いて、薬剤抵抗性は重要な問題点である。これまで、SLE 患者リンパ球に於ける多剤抵抗性遺伝子産物 P-糖蛋白質の発現と薬剤抵抗性との関連性を検討し、P 糖蛋白質は、活動期 SLE の疾患活動性上昇に伴ってリンパ球上に発現すること、難治性増殖性腎炎症例では腎間質への P-gp⁺CD4⁺cell 集簇を認めた。P 糖蛋白質高発現する症例に Rituximab 投与（500mg/body を1週間間隔で反復 4 回点滴静注）を行い、Rituximab 投与開始後、尿蛋白は速やかに消失して疾患活動性は低下しはじめ、末梢血中 B cell が消失したのみならず、CD4⁺ T cell における P 糖蛋白質高発現サブグループは消失しており薬剤抵抗性の解除ももたらされたと考えられた。以上から、SLE 患者における B 細胞標的療法は多剤治療抵抗性の側面からも有用であると考えられ、形質細胞を主要な標的としたボルテゾミブも難治性 SLE における治療抵抗性の解除をもたらす可能性が示唆される。

一方、早期診断の側面から SLE 分類基準(1997年改訂)で診断された SLE 症例のうち、腎生検施行、尿沈渣異常なし、尿蛋白 0.3g/day \geq 、24時間 Ccr 70ml/min/1.73m² \leq を満たした症例37例を対象とし、光学顕微鏡、蛍光抗体法、電子顕微鏡で腎病理診断(ISN/RPS 分類を使用)でループス腎炎ありを Silent lupus nephritis 群、なしを非 LN 群とした検討では、Silent lupus nephritis (SLN)の検出のためには、CH50 30U/ml 以下、抗 Sm 抗体高値の症例では Silent lupus nephritis の存在が示唆されるため、腎生検を考慮するべきであると考えられた。

A. 研究目的

SLE に対する良好な治療のアウトカムを得るには、早期診断と治療抵抗性の克服が重要である。また、既存治療に抵抗性の場合には今回のボルテゾミブなどによる薬物療法の導入が必要となる。薬剤抵抗性は、長期間の薬剤投与による薬剤耐性（二次無効）、疾患活動性が高いため薬剤に反応しない薬剤不応性に大別される。これまで、SLE 患者リンパ球に於ける多剤抵抗性遺伝子産物 P-糖蛋白質の発現と薬剤抵抗性との関連性を検討した。薬剤の細胞外排出によって治療抵抗性を齎す P 糖蛋白質(P-gp)は、活動期 SLE の疾患活動性上昇に伴ってリンパ球上に発現する。しかし、B リンパ球を標的とした治療の抵抗性解除への有用性および P 糖蛋白質発現細胞の組織での病態形成への関与は不明である。今回、リツキシマブによる治療抵抗性の克服および P-gp 発現細胞の組織における役割を検討した。

一方、SLE の発症初期に診断して治療介入するかも非常に重要な点である。全身性エリテマトーデス(SLE)の 31-65%が、ループス腎炎(Lupus nephritis, 以下 LN)を発症、特に ISN/RPS class III/IV の早期診断、治療が重要である。尿異常や腎機能障害を伴わない SLE において、腎生検で LN と診断される = “Silent lupus nephritis”(SLN)が 1976 年以降に報告され、より高確率な LN の存在が指摘されている。LN の診断には腎生検が gold standard であるが、SLN の存在もあり、SLE における腎生検の適応基準は定かでない。

今回、当院で診断した SLN の臨床的特徴を解析、特に非 LN 例との臨床的相違を検証する。また、尿異常のない SLE に

おける SLN の存在予測、治療方針検討のための腎生検の推奨症例を明らかにする。

B. 研究方法

SLE 患者末梢血リンパ球上の P 糖蛋白質、細胞機能分子の発現はフローサイトメーターで、残りのリンパ球でそのステロイド排泄能を指標とした薬剤排出能を評価した。(リンパ球に *in vitro* で dexamethasone を添加して細胞内外に均一に拡散する ¹⁴C label Butanol をバックグラウンドとして細胞内に残留する ³H label dexamethasone の medium に対する比を算出した。) また、組織浸潤リンパ球は免疫組織染色で評価した。

また、SLE 分類基準(1997 年改訂)で診断された SLE 症例のうち、腎生検施行、尿沈渣異常なし、尿蛋白 0.3g/day \geq 、24 時間 Ccr 70ml/min/1.73m² \leq を満たした症例 37 例を対象とした。光学顕微鏡、蛍光抗体法、電子顕微鏡で腎病理診断(ISN/RPS 分類を使用)し、ループス腎炎ありを Silent lupus nephritis 群、なしを非 LN 群として比較検討した。

(倫理面への配慮)

臨床検体を使用する場合には、所属機関の倫理委員会、或は、IRB で承認を得た研究に限定し、患者からインフォームドコンセントを得た上で、倫理委員会の規約を遵守し、所属機関の現有設備を用いて行う。患者の個人情報が入所機関外に漏洩せぬよう、試料や解析データは万全の安全システムをもって厳重に管理し、人権擁護に努めると共に、患者は、経済的負担を始め如何なる不利益や危険性も被らない事を明確にする。

C. 研究結果

健常人に比してSLEではP-gp, CD69は有意に発現増強した。P-gpはCD69+CD4+cellに有意に高発現した。P-gp+CD69+CD4+cellは疾患活動性に従って増加し、ステロイド(CS)不応例、増殖性腎炎、NPSLE合併例で増加を認めた。難治性増殖性腎炎症例では腎間質へのP-gp+CD4+cell集簇を認めた。ステロイドに免疫抑制剤併用を行っても多臓器病変が進行し、リンパ球上P糖蛋白質発現量が1000molecules/cell以上かつP糖蛋白質高発現する症例にRituximab投与(500mg/bodyを1週間間隔で反復4回点滴静注)を行い、P糖蛋白質発現に及ぼす効果を評価した。ステロイド増量とIVCYを併用したが、疾患活動性改善乏しく、1.0g/日を超える高度な蛋白尿持続、BILAG A1/B2項目(15 points)と多臓器病変合併、B cell上P糖蛋白質発現量は低下しても依然1000 molecules/cellを超えたままで、かつ、P糖蛋白質高発現リンパ球が消失せず、リンパ球からのステロイド排出は亢進して細胞内残留ステロイド濃度は低下していた。

Rituximab投与開始後、尿蛋白は速やかに消失して疾患活動性は低下しはじめ、末梢血中B cellが消失したのみならず、CD4+ T cellにおけるP糖蛋白質高発現サブグループは消失した。

SLNでは補体価CH50が有意に低値であった。CH50のカットオフ値30U/mlで、SLNの存在は感度74%、特異度90%であった。年齢/罹病期間、SLE主要症状や活動性の指標であるSLEDAI、抗ds-DNA抗体に関して2群間に相違はなかったが、SLNでは抗Sm抗体高値であ

った。検討した31例において、腎生検後5年間で尿異常を呈した症例は6例ですべてSLN群であった。主にLN class III, IV, Vの症例に尿異常が出現した。5年の経過で両群ともに腎機能低下は認めなかった。

D. 考察

P-gp+CD69+CD4+cellは薬剤抵抗性かつ臓器侵襲を齎しうるサブセットと考えられ、その制御が治療抵抗性克服に重要である。末梢血リンパ球上P-gp発現は治療抵抗性とリンパ球の臓器浸潤を反映し、治療選択において有用な指標となり得る。また、多剤抵抗性症例にRituximab投与が奏効する場合、B細胞の消失に伴いT細胞活性化も抑制され、かつ治療抵抗性がリセットされる可能性が示唆された。

Rituximabは難治性病態の改善のみならず、治療反応性の回復を齎し、長期寛解維持を可能としうる。

E. 結論

以上から、SLE患者におけるB細胞標的療法は多剤治療抵抗性の側面からも有用であると考えられた。SLEにおいては形質細胞への分化が亢進している可能性が示されており、形質細胞を主要な標的としたボルテゾミブも難治性SLEにおける治療抵抗性の解除をもたらす可能性が示唆される。一方、早期治療介入という点では、CH50 30U/ml以下の症例、抗Sm抗体高値症例ではSilent lupus nephritisの存在が示唆されるため、腎生検を考慮すべきである。今後、上記をもとに更に多くの症例で検討を行い、SLNの治療指針、長期経過での腎予後の解析を進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Iwata S, Saito K, Tokunaga M, Tanaka Y. Persistent memory B cell down-regulation after 6-year remission induced by rituximab therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 22(5):538-540, 2013

2. Ishizaki J, Saito K, Nawata M, Mizuno Y, Tokunaga M, Sawamukai N, Tamura M, Hirata S, Yamaoka K, Hasegawa H, Tanaka Y. Low complements and high titre of anti-Sm antibody as predictors of histopathologically proven silent lupus nephritis without abnormal urinalysis in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 54(3):405-412, 2015

2. 学会発表

1. Saito K, Hanami K, Hirata S, Kubo S, Nawata M, Yamaoka K, Nakayamada S, Nakano K, Tanaka Y. Comparison of lipid profile including high molecular weight adiponectin (HMW-AN) after treatment with three different biologics in the patients with bio-naïve rheumatoid arthritis (RA) The 14th Annual European Congress of Rheumatology(EULAR) 2013年6月 Madrid, Spain

2. Saito K.

Best use of infliximab in autoimmune disease
12th International Symposium on Sjogren's syndrome (Morning Seminar)

2013年10月 Kyoto, Japan

3. Tsujimura S, Saito K, Tanaka Y. The expression of P-glycoprotein on CD4+CXCR3+ cells and its relevance to tissue damage in patients with SLE
第42回 日本免疫学会
2013年12月 千葉

4. Nakayamada S, Kubo S, Yunoue N, Yoshikawa M, Sheau-Pey Wang, Saito K, Tanaka Y. Involvement of transitional T follicular like helper cells bearing triple phenotypes of Tfh/Th1/Th17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis
第42回 日本免疫学会
2013年12月 千葉

5. Yunoue N, Nakayamada S, Kubo S, Yamaoka K, Saito K, Tanaka Y. Phenotypic heterogeneity between Tfh cells and Th1 cells induced by interleukin-12- and interferon- γ -mediated signaling in human T cells
第42回 日本免疫学会
2013年12月 千葉

6. 辻村静代、齋藤和義、田中良哉
SLEにおけるP糖蛋白質発現 CD69+CD4+eIIの治療抵抗性および増殖性腎炎への関与
第58回 日本リウマチ学会
2014年4月 東京

7. 湯之上直樹、中山田真吾、久保智史、好川真以子、齋藤和義、田中良哉
濾胞性ヘルパーT細胞の可塑性と全身性エリテマトーデスにおける病因

的役割

第 58 回 日本リウマチ学会

2014 年 4 月 東京

8. Saito K, Miyagawa I, Yamaoka K, Nakayamada S, Nakano K, Hirata S, Fukuyo S, Kubo S, Hanami K, Sawamukai N, Tanaka Y

The three-year outcome of Infliximab (IFX), an anti-TNF- α antibody, in patients with refractory intestinal-Beçet's disease (BD)

The 15th Annual European Congress of Rheumatology(EULAR)

2014 年 6 月 Paris, France

9. 辻村静代、齋藤和義、田中良哉
RA 患者 CD4+ cell のケモカイン受容体解析と P 糖蛋白 (P-gp) 発現 CXCR5+CD4+cell の病態での役割
第 42 回日本臨床免疫学会
2014 年 9 月 東京

10. 辻村静代、齋藤和義、田中良哉

The expression of P-glycoprotein on CD4+CD69+cells and its relevance to proliferative lupus nephritis and treatment-resistance in systemic lupus erythematosus.

第 43 回 日本免疫学会

2014 年 12 月 京都

- G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得
該当無し
2. 実用新案登録
該当無し
3. その他
該当無し

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業（臨床研究・治験推進研究事業）

分担研究報告書

難治性 SLE に対するボルテゾミブ療法の有効性・安全性検証試験

ループス腎炎のポドサイトにおける CD86 分子を介した蛋白尿発現メカニズムに関する研究

研究分担者 川上 純 長崎大学病院第一内科 教授

研究協力者 (一瀬邦弘 長崎大学病院第一内科 講師)

研究要旨：ループス腎炎におけるポドサイトは糸球体基底膜の上に存在し、蛋白尿のバリア機能を有している。以前、プロテアーゼ阻害薬であるボルテゾミブのループス腎炎抑制効果が報告された(Nature Medicine 14, 748 - 755 (2008))が、形質細胞制御が主なメカニズムであり、ポドサイトへの影響については明らかにされていない。そこで今回、我々は健常人およびループス腎炎患者から分離した IgG を用いて、ヒトのポドサイトと免疫担当細胞の関与について検討した。健常人およびループス腎炎 IgG とポドサイトとをインキュベートし、その機能変化を調べた。Microarray による Gene Ontology 解析ではポドサイトのアクチンフィラメント再構成や CD86, CD80 などの免疫細胞の活性化に関与する signal pathway の亢進がループス腎炎 IgG でみられた。ボルテゾミブの SLE、ループス腎炎の病態制御には形質細胞だけでなく、多彩な細胞をターゲットとする multiple pathway を介した抑制効果が期待される。

A. 研究目的

SLE 患者の中で、腎障害は症例の約 40～75%に認められ、重要な予後規定因子である。しかし、これまでのところループス腎炎における蛋白尿発現のメカニズムについては明らかにされていない。ループス腎炎におけるポドサイトはバリア機能を有し、その足突起の構造変化と蛋白尿発現との関連が示唆されている。最近、生物学的製剤アバタセプト(CTLA-Ig 製剤)が T 細胞のみならず、ポドサイトにも直接的な効果を示すことが報告されている(N Engl J Med. 2013 Dec 19;369(25):2416-23.)。一方で、プロテアーゼ阻害薬であるボルテゾミブのループス腎炎抑制効果が報告された

(Nature Medicine 14, 748 - 755 (2008))が、形質細胞制御が主なメカニズムであり、ポドサイトへの影響については明らかにされていない。

B. 研究方法

健常人およびループス腎炎患者から分離した IgG を用いて、ヒトのポドサイトの cell line (AB8/13)における影響について検討した。健常人およびループス腎炎患者の血清から IgG purification kit を用いて IgG を分離し、IgG をポドサイト とともに 24-48 時間インキュベートした。<研究 1> 健常人およびループス腎炎患者由来の IgG のポドサイトにおける局在を調べた。<研究 2>

Microarray による網羅的遺伝子解析を行った。

<研究 3>

SLE のモデルマウスである MRL/*lpr* マウスの腎組織を用いて、ポドサイトにおける CD86 発現を *in situ* hybridization にて検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は「全身性エリテマトーデスの病態を多角的に解析する臨床研究」、「自己免疫疾患における T 細胞分化シグナル制御機構の解明」および「難治性全身性エリテマトーデスに対するボルテゾミブの有効性・安全性探索試験に対する追加クロスオーバー試験」というテーマで長崎大学病院倫理委員会および長崎大学先端生命科学研究支援センター動物実験施設より承認を得て、十分にインフォームドコンセントを行い検体採取している。匿名化された検体を用い、情報管理を厳重に行っているため倫理面での問題はない。

C. 研究結果

<研究 1>

蛍光抗体法にて健常人およびループス腎炎患者由来の IgG は neonatal Fc receptor (FcRn) を介してポドサイトの細胞質に局在することが確認された。

<研究 2>

Microarray による Gene Ontology 解析ではポドサイトのアクチンフィラメント再構成や CD86, CD80 などの免疫細胞の活性化に関与する signal pathway の亢進がループス腎炎 IgG でみられた。また real-time PCR でも CD86 mRNA はループス腎炎患者由来 IgG は健常人由来 IgG に比して、24 時間および 48 時間のインキュベーションで有意

に発現が亢進していた。

<研究 3>

SLE のモデルマウスである MRL/*lpr* マウスの腎組織ではコントロールである MRL/*MPJ* マウスに比して、ポドサイトマーカーである nephrin mRNA 中の CD86 mRNA の発現の増強を認めた。

D. 考察

ループス腎炎由来の IgG はポドサイトにおけるアクチンフィラメントの再構成をもたらし、細胞骨格変化に関与し、病的状態にみられる足突起の癒合などをもたらす可能性がある。また、ループス腎炎におけるポドサイトでは抗原提示細胞と同様に CD86 分子の発現増強がみられ、co-stimulatory pathway を介した免疫活性を有し、ボルテゾミブが形質細胞だけではなく、ポドサイトにも直接、機能変化をもたらす可能性が示唆された。

E. 結論

ボルテゾミブの SLE、ループス腎炎の病態制御には形質細胞だけでなく、多彩な細胞をターゲットとする multiple pathway を介した抑制効果が期待される。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ichinose K, Arima K, Ushigusa T, Nishino A, Nakashima Y, Suzuki T, Horai Y, Nakajima H, Kawashiri SY, Iwamoto N, Tamai M, Nakamura H, Origuchi T, Motomura M, **Kawakami A.**