

2014/50/6A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）

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

難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）

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 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	
■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 中村治雅・鈴木麻衣子	5
■免疫修飾薬 OCH 医師主導治験におけるバイオマーカー解析 三宅幸子	7
■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	11
■多発性硬化症と那須ハコラ病:脱髄分子メカニズムの相違点 佐藤準一	13
■MRI を用いた視神経脊髄炎関連疾患と多発性硬化症に関する研究 佐藤典子	20
■動物モデルを用いた MS 病態の多様性に関する基礎研究 大木伸司	22
■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	25
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	27
IV. 研究成果の刊行物・別刷	29

総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)
総括研究報告書

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、2 名の患者に OCH の週 1 回 13 週投与を完了した。バイオマーカー解析から、OCH の経口投与により全身の免疫系を修飾する採用があることが示唆され、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
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)
研究開発企画ファカルティ長
木村 円
国立精神・神経医療研究センター 室長
米本直裕 (～H26. 6. 11)
国立精神・神経医療研究センター 客員研究員
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
中村治雅
国立精神・神経医療研究センター 室長
鈴木麻衣子
国立精神・神経医療研究センター 室員
岩渕和也 (H26. 6. 12～)
北里大学 教授

A. 研究目的

多発性硬化症 (MS) は若年で発症する中枢神経系炎症疾患である。MS は終生に及ぶ医療介入の対象になるが、インターフェロンβ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副作用 (PML など) 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 NKT 細胞標的糖脂質 OCH を発表した (Nature 2001)。OCH は NCNP の保有する物質特許が内外で成立し、コンプライアンスに優れる経口薬である。平成 21 年度より医療スーパー特区制度の支援を受けて、OCH を MS の安全な治療薬として実用化するべく、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、企業との共同フェーズ 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:平成 26 年 3 月より開始した MS 患者対象の STEP2 試験では、STEP1 で得られた薬物動態等の結果から、当初の予定を大幅に変更し、PMDA との対面助言、及び追加の非臨床試験の結果を基にプロトコルを確定し、OCH

の週 1 回 13 週間投与を行った。

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。

(倫理面への配慮)

本治験は国立精神・神経医療研究センター治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。個人情報に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

平成 26 年 3 月より、MS 患者対象の STEP2 試験を開始し、これまでに 6 名の患者に対し OCH を投与した。このうち 2 名の患者について週 1 回 13 週の投与を完了した。

バイオマーカー解析においては、健常者を対象とした STEP1 試験では、末梢血 CD4 陽性メモリー T 細胞および CD8 陽性 T 細胞中の 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が、MS 患者における OCH 投与でも個人差はあるものの、同様の傾向を認めた。また、投与 6 時間後において、末梢血中の NK 細胞の増加や、樹状細胞上の HLA-DR の発現低下といった所見が認められた。

D. 考察

成人健常人及び、MS 患者における OCH 投与により、最小用量コホートから、末梢血 T 細胞中の GM-CSF 産生分画および IFN- γ 産生分画が減少する傾向を認めた。このことから、OCH は非常に低用量の経口投与においても、全身の免疫系に修飾効果をもたらすことが示唆された。また、末梢血中の樹状細胞や NK 細胞の変化も認められたことから、低用量の OCH 投与により、NKT 細胞が刺激され、樹状細胞や NK 細胞とのクロストークが起こった可能性が示唆された。

E. 結論

OCH の開発はシーズ開発、前臨床試験、医師

主導治験までを一貫して NCNP で実施するという前例のない試みであったが、実際に患者を対象に OCH を投与するまでに至った。バイオマーカー解析の結果から、ヒトにおいても、NKT 細胞リガンドの投与により、全身の免疫系に修飾を与えることが示唆され、非常に有意義な結果と考えられる。薬剤開発における早期ヒト対象試験が重要であることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

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*. 2014;82:1302-6.

2) 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*. 2014;20:1371-80.

3) Niino M, Mifune N, Kohriyama T, Mori M, Ohashi T, Kawachi I, Shimizu Y, Fukaura H, Nakashima I, Kusunoki S, Miyamoto K, Yoshida K, Kanda T, Nomura K, Yamamura T, Yoshii F, Kira J, Nakane S, Yokoyama K, Matsui M, Miyazaki Y, Kikuchi S. Apathy/depression, but not subjective fatigue, is related with cognitive dysfunction in patients with multiple sclerosis. *BMC Neurol*. 2014;14:3.

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) Raveney BJ, Oki S, Yamamura T. NR4A2 cotnrols pathogenic 'switched' Th17 cells in the CNS during autoimmune inflammation. 12th International Congress of Neuroimmunology, Mainz, Germany, 11.12, 2014
- 8) 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
- 9) Sato W, Aranami T, Chihara N, Ikeguchi R, Okamoto T, Yamamura T. Chemokine receptor expressions on T cells in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. 12th International Congress of Neuroimmunology, Mainz, Germany, 11.12, 2014
- 10) 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55回日本神経学会学術集会 福岡 5月22日、2014
- 11) 山村隆, 吉良潤一, 齊田孝彦, 岸田修二, 岩本和也, Lucas, Nisha, Subramanyam, Meena. One year extension study of natalizumab (NAT) in Japanese MS patients. 第55回日本神経学会学術集会 福岡 5月22日、2014
- 12) 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集会 福岡 5月22日、2014
- 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集会 福岡 5月23日、2014
- 14) 池口亮太郎、佐藤和貴郎、岡本智子、村田美穂、山村隆. 慢性炎症性脱髄性多発神経炎におけるCCR5+CCR6+ヘルパーT細胞に関する研究. 第55回日本神経学会学術集会 福岡 5月23日、2014
- 15) 林幼偉、岡本智子、村田美穂、山村隆. 二次進行型多発性硬化症(SP-MS)に対するfingolimodの臨床的効果と免疫学的活動性指標との関連. 第55回日本神経学会学術集会 福岡 5月24日、2014
- 16) 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集会 福岡 5月24日、2014
- 17) 岡本智子, 林幼偉, 荒木学, 佐藤和貴郎, 村田美穂, 山村隆. 多発性硬化症患者に

- おけるフィンドリモド投与に関する検討. 第55回日本神経学会学術集会 福岡 5月21日、2014
- 18) 山村隆. 免疫性神経疾患における分子標的医薬開発. シンポジウム1. 分子標的治療の最前線. 第35回日本炎症・再生医学会 沖縄 名護 7月2日、2014
- 19) 山村隆. NKT cell ligands and gut mucosal lipids. 第26回日本神経免疫学会学術集会 金沢 9月4日、2014
- 20) 林幼偉、村田美穂、山村隆. 二次進行型多発性硬化症 (SP-MS) に対する fingolimod の効果 (続報): 免疫抑制剤の併用. 第26回日本神経免疫学会学術集会 金沢 9月4日、2014
- 21) 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能脊髄炎 (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月4日、2014
- 22) 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月5日、2014
- 23) 岡本智子、林幼偉、荒木学、佐藤和貴郎、村田美穂、山村隆. 多発性硬化症患者に対するフィンゴリモド投与に関する検討 (第二報). 第26回日本神経免疫学会学術集会 金沢 9月5日、2014
- 24) 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・新宿 9月25日、2014
- 25) 山村隆、能登大介. 多発性硬化症に対する免疫介入試験におけるヒト免疫応答解析. 第42回日本臨床免疫学会総会 東京・新宿 9月25日、2014
- 26) 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 東京・新宿 9月26日、2014
- 27) 山村隆. 免疫性神経疾患と Precision Medicine. 6学会合同シンポジウム 免疫疾患のB細胞と自己抗体: 病態解明から新規治療応用まで. 第42回日本臨床免疫学会総会 東京・新宿 9月26日、2014
- 28) Iwabuchi K, Shimano K, Satoh M, Gifillan S, Miyake S, VanKaer L, Yamamura T. Atherosclerotic lesion development in CD1d/MRI/apolipoprotein E-deficient mice. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 京都 12月10日、2014
- 29) Raveney BJ, Oki S, Yamamura T. NR4A2 controls pathogenic "switched" Th17 cells in the CNS during autoimmune inflammation. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 京都 12月10日、2014
- 30) Kadowaki A, Miyake S, Chiba A, Saga R, Yamamura T. Regulation of organ specific autoimmunity by gut resident T cells. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 京都 12月10日、2014
- 31) Lin Y, Miyake S, Yamamura T. Inverse vaccination for autoimmune diseases by sensitization of superior dominant peptide through efficient induction of functionally stable regulatory T cells possessing high antigen-specificity. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 京都 12月10日、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

分担研究報告

OCH-NCNP1 医師主導治験の支援に関する研究

研究分担者 中村治雅 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 室長
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 室員

研究要旨

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 25 年度に MS 患者を対象とする反復投与試験を開始した。当該医師主導治験の実施支援として、有害事象の対応のための安全性検討委員会の運営、試験計画の変更の支援、PMDA への対応等を行った。また、試験の早期終了に向けた検討や次相試験の準備等、開発促進に向けた取り組みの支援も行った。

A. 研究目的

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) を国立精神・神経医療研究センターにおいて実施中である。本研究では、当該医師主導治験の実施における支援を目的とし、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 との面談対応等を行った。

B. 研究方法

本医師主導治験は、STEP1 (健康成人を対象とした単回投与試験) と STEP2 (再発寛解型 MS 患者を対象とした反復投与試験) の 2 試験から構成される。平成 25 年 7 月に STEP1 が終了し、その結果を基に、STEP2 の計画を再検討、平成 26 年 3 月に投与開始した。STEP2 は、13 週間の単施設で行う非盲検用量漸増試験であり 1 群 3 例、3 コホートから構成されている。治験薬増量の妥当性や被験者に発生した有害事象等の評価のため、安全性検討委員会を設置し実施している。
(倫理面への配慮)

本治験は、当センターの臨床試験審査委員会における承認を得て実施している。

C. 研究結果

STEP2 においては、これまでに 6 例の被験者に対し、OCH-NCNP1 0.3mg の投与を行った。そのうち 2 例の被験者については、13 週間の投与を完了、4 例については治験が中止された。中止例のうち、3 例が重篤な有害事象により、1 例が治験責任医師の判断により中止された。

重篤な有害事象は 3 例 4 件が発生し、うち 2 例 3 件については、治験薬との因果関係は否定できないとされた。いずれの有害事象も回復又は軽快している。

各事象発生時は速やかに安全性検討委員会を開催し、有害事象の状況、治療等の対応を評価、助言・勧告を行うとともに、今後の治験実施に当たって変更する対応等についても評価を行った。

安全性検討委員会において、重篤な有害事象が発生した 3 例及び同時期に投与を受けていた 1 例については、投与中止の判断がなされたものの、治験全体の継続を行うことは承認されている。また、当該事象については、

当センターの臨床試験審査委員会における審議及びPMDAへの当局報告を行った。うち1例2件の有害事象については、PMDAより有害事象に対する対応について示唆を受け、対応を行った。

D. 考察

発生した有害事象は、いずれも未知の事象であったが、非臨床試験、STEP1試験で得られた安全性情報も含め、現在のところ一定の傾向は認められていない。今後の症例データの蓄積を待って、詳細な解析を行う予定である。

OCH-NCNP1の開発をより加速する観点から、STEP2を迅速に進めるために試験計画の変更を予定している。現在、プロトコール検討会を開催し、これまでに得られたデータを基に、検討を行っているところである。

また、より長期の投与を行う予定である次相試験に向けて、必要な非臨床試験を特定し、着手をするとともに、製薬企業による今後の開発着手の可能性も含めて検討を続けている。

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、STEP2における安全性検討委員会の運営、STEP2の試験計画変更に当たっての計画書作成支援、PMDA対応等を行った。行政対応等も含め、円滑に治験は進んでいる。

引き続き、STEP2の実施支援を行うとともに、効率的な開発のため、試験計画の最適化に向けた支援を行う予定である。

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

免疫修飾薬 OCH 医師主導治験におけるバイオマーカー解析

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
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
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
林 幼偉 国立精神・神経医療研究センター病院 神経内科
岡本 智子 国立精神・神経医療研究センター病院 神経内科
村田 美穂 国立精神・神経医療研究センター病院 神経内科
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

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する。我々は OCH の多発性硬化症 (MS) 治療薬としての実用化を目指し、平成 24 年 11 月より OCH First in Human 試験を医師主導試験として開始し、平成 26 年 3 月から MS 患者を対象とした STEP2 試験を開始した。バイオマーカー解析の結果、OCH の経口投与によって、IFN- γ 、GM-CSF 産生 T 細胞の減少や、NK 細胞の増加といった所見を認め、MS 患者において、OCH の経口投与により、全身の免疫系に影響を及ぼしうることが明らかとなった。

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。我々は平成 24 年 11 月より OCH First in Human 試験 (STEP1 試験：健常者対象 OCH 経口単回投与) を医師主導試験として開始し、さらに、平成 26 年 3 月より、MS 患者を対象とした STEP2 試験を開始した。本研究では OCH 経口投与時の、薬効に関するバイオマーカーに関する解析を行った。

B. 研究方法

1) 対象:本年度施行した STEP2 試験では、本治験組み入れ基準に合致した NCNP 病院通院中の MS 患者を対象とし、OCH の週 1 回 13 週間投与を行った。

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。

(倫理面への配慮)

本治験は当センター治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
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

フローサイトメーター解析の結果、健常人
を対象としたSTEP1試験ではCD4陽性メモ
リーT細胞およびCD8陽性T細胞中の、炎症
性サイトカイン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
る傾向を認めたが、MS患者でも個人差は
あるものの、同様の傾向を認めた。

また、OCH投与6時間後に、末梢血NK
細胞の増加や、樹状細胞上のHLA-DR発
現の低下を認めた。これらの所見は、健常
人、MS患者ともに認められたが、特にMS
患者に顕著であった。

D. 考察

成人健常人に対するOCH投与では、最小
用量であるAコホートより、末梢血T細胞
中の、炎症性サイトカインIFN- γ 産生分
画、GM-CSF産生分画が減少する傾向を
認めたことから、OCHは非常に低用量の
経口投与においても、全身の免疫系に修飾
効果をもたらすことが示唆されたが、MS
患者においてもそれが再現され、OCHの
実用化に向け、有意義な結果と考えられ
た。また、末梢血中のNK細胞の増加とい
った所見が認められたことから、低用量
のOCH投与により、NKT細胞が刺激され
、NK細胞とのクロストークが起こった
可能性が示唆された。

E. 結論

MS患者対象STEP2試験においても、STEP
1と同様、IFN- γ 、GM-CSF産生T細胞
の減少、NK細胞の増加といった所見を
認めた。OCH経口投与が全身の免疫系に
影響を与えうることも、MS患者におい
ても確認された。

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, NANNON 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

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。前年度は、CCR5+CCR6+CD4+T 細胞が疾患と関連し、また病原性 Th17 細胞の特徴をもつことを報告した。解析を進めた結果、細胞表面の CCR5 の発現が低下し、これは活性化による細胞内への内在化や病変組織への移行を反映している可能性があること、また同細胞は、薬剤抵抗性因子 P 糖蛋白質を発現しやすい細胞であることが判明した。Mucosal associated invariant T (MAIT) 細胞などの自然リンパ球について解析を行い、MAIT 細胞および iNKT 細胞の末梢血における頻度が、疾患や活動性により減少する傾向を認めることが示された。

A. 研究目的

慢性炎症性脱髄性多発神経炎 (CIDP) は、運動や感覚神経を障害する末梢神経系の神経難病である。ヘルパーCD4 陽性 T 細胞 (Th 細胞) の関与について、ケモカイン受容体発現 CCR5+CCR6+ の分画が病原性 Th17 細胞の機能・遺伝子発現パターンをもつことを前年度に報告した。他のケモカイン受容体発現との関連、薬剤抵抗性などの機能的意義について解析を行った。2) MAIT 細胞や iNKT 細胞は、CIDP 患者の末梢神経に存在しており (Zilles 2003)、これら自然リンパ球の CIDP への関わりが示唆される。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ことを目的とする。

B. 研究方法

フローサイトメトリーにて、年齢性別をマッチさせた健常者 18 名と CIDP 患者 18 名、また多発性硬化症 (MS) 患者 14 名の末梢血を用い、1) 代表的な炎症性ケモカイン受容体 (CXCR3、CCR4、CCR5、CCR6) の共発現パターン、薬剤

抵抗性と関連する P 糖蛋白質の発現、2) MAIT 細胞などの自然リンパ球の頻度を調べた。

(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) CIDP 患者では健常者と比べ、末梢血中の CCR5+CCR6+ (以下 5+6+) および CCR5+CXCR3+ (以下 5+3+) Th 細胞の頻度が有意に ($p < 0.05$) 低下していた。P 糖蛋白質発現が 5+6+Th 細胞で亢進していた。2) CIDP 患者において、MAIT 細胞の頻度が健常者と比べ有意に低下 ($p < 0.05$) し、iNKT 細胞と MAIT 細胞が活動性を有する患者で低い傾向を認めた。

D. 考察

CIDP 患者末梢血における 5+6+ および 5+3+Th 細胞減少は活性化による CCR5 の細胞内への移行や病変部への移行を反映している可能性がある。5+6+Th 細胞の一部が免疫抑制剤治療に抵抗性である可能性がある。MAIT 細胞や iNKT 細胞の疾患や活動性との関連は他の自己免疫

疾患でも報告され共通する機序が想定される。

E. 結論

CIDP における CCR5+CCR6+および
CCR5+CXCR3+Th 細胞、また MAIT 細胞、iNKT
細胞の重要性が示された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 佐藤和貴郎 慢性炎症性脱髄性神経炎
(CIDP)における T 細胞ケモカイン受容体
の解析 *Peripheral Nerve* 25(2), 238-242,
2014
2. 佐藤和貴郎 多発性硬化症における脳脊
髄液 T 細胞ケモカイン受容体解析
Jpn. J. Clin. Immunol 37(2), 83-89, 2014
3. Wakiro Sato Chemokine receptors on T
cells in multiple sclerosis. *Clinical
and Experimental Neuroimmunology* 5(2),
162-174, 2014

2. 学会発表

1. 佐藤和貴郎 CIDP における T 細胞ケモカ
イン受容体の解析 シンポジウム 4「免疫
介在性末梢神経障害の診断と治療」第 25
回日本末梢神経学会, 京都, 8.30, 2014
2. Wakiro Sato et al chemokine receptor
expressions on T cells in chronic
inflammatory demyelinating
polyneuropathy Mainz, 11,12,2014

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

多発性硬化症と那須ハコラ病:脱髄分子メカニズムの相違点

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(multiple sclerosis; 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。MS では髄鞘自己抗原反応性ヘルパーT 細胞(Th1, Th17)が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し、エフェクター細胞が産生する炎症性サイトカインが脱髄(demyelination)と軸索傷害(axonal damage)を惹起すると考えられている。一方那須ハコラ病(Nasu-Hakola disease; NHD)は、20-30 歳代に多発性骨嚢胞と白質脳症で発症する DAP12 遺伝子または TREM2 遺伝子の機能喪失変異による常染色体劣性遺伝性疾患である。脳では脱髄とグリオーシスを認めるが炎症細胞浸潤は乏しい。TREM2 と DAP12 は破骨細胞・樹状細胞・マクロファージ・ミクログリアの細胞表面上で受容体・アダプター複合体を形成し、脳ミクログリアの機能障害により白質脳症が惹起されると考えられている。TREM2 はアポトーシスに陥った死細胞の phagocytic receptor として働く。しかしながら両者において脱髄の分子メカニズムの相違は明らかではない。本研究では、死細胞除去において重要な役割を果たしているオートファジー(autophagy)に注目して、MS 脳と NHD 脳におけるオートファジーマーカー LC3 の発現を免疫組織化学的に比較解析した。その結果、LC3 は MS 脳では脱髄のエフェクター細胞である Iba1 陽性マクロファージ・ミクログリアが高発現し、NHD 脳では脱髄の標的となる残存 Nogo-A 陽性オリゴデンドロサイトが高発現していた。以上より MS と NHD ではオートファジーの観点から、脱髄の分子メカニズムが大きく異なることがわかった。

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。近年日本では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し、エフェクター細胞が産生する炎症性サイトカイン(TNF)と活性酸素(reactive oxygen species; ROS)が脱髄(demyelination)と軸索傷害(axonal damage)を早期から惹起する。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。

那須ハコラ病(Nasu-Hakola disease; NHD)は、1970 年代初頭に那須毅博士と Hakola 博士により同時期に発見された稀少疾患であり、日本とフィンランドに集積し、DAP12 遺伝子または TREM2 遺伝子の機能喪失変異による常染色体劣性遺伝形式を呈する。TREM2 と DAP12 は、破骨細胞・樹状細胞・マクロファージ・ミクログリアの細胞表面上に発現し、受容体・アダプター複合体を形成し、下流に位置する非受容体型チロシンキナーゼ Syk リン酸化を介してシグナルを伝達する。TREM2 はアポトーシスに陥った神経細胞の phagocytic receptor として働くが、内在性リガンドは未だ同定されていない。NHD は 20-30 歳代に多発性骨嚢胞と白質脳症で発症し、40-50 歳代に寝たきり状態で死亡する治療法がない難病である。患者脳では広汎な脱髄、軸索腫大とスフェロイド形成、アストログリオーシスとミクログリアの活性化を認めるが、白質脳症(sclerosing leukoencephalopathy)の発症機序は明らかでない(Satoh et al. *Neuropathology* 31: 363-375, 2011; 32: 149-157, 2012; *Clin Exp Neuroimmunol* 4(Suppl 1) 17-26, 2013)。

MS と NHD には広汎な脱髄という共通項があるが、その分子機構の相違は明らかでは

ない。本研究では、死細胞除去において重要な役割を果たしているオートファジーに注目して、MS 脳と NHD 脳におけるオートファジーマーカー microtubule-associated protein 1 light chain 3(LC3)の発現を免疫組織化学的に比較解析し、分子機構の相違を調べた。

本研究の成果は MS, NHD 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), normal control(NC; n =4), myotonic dystrophy(n = 4), NHD(n = 5, among them, 3 with 141delG in exon 3 of DAP12)の 大脳皮質・海馬・基底核のホルマリン固定パラフィン切片を用いて、抗 LC3, BECN1, NBR1, HDAC6, p62, ubiquitin, UBQLN1 抗体で免疫組織化学的に解析した。細胞特異的マーカーとして Nogo-A, MBP, CNPase(オリゴデンドロサイト), GFAP(アストロサイト), Iba1(マクロファージ・ミクログリア)を用いた。LC3 の特異性は、autophagy inducer である rapamycin を投与したマウス oligodendrocyte-type2 astrocyte(O-2A) progenitor 細胞株 OS3 のウエスタンブロットで確認した。

(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 脱髄巣マクロファージ・ミクログリアにおける LC3 の高発現

MS 活動性脱髄巣辺縁部に集積している Iba1 陽性マクロファージ・ミクログリアが LC3 を高発現していたが、反応性アストロサイトは発現していなかった(図 1)。脱髄巣に残存するオリゴデンドロサイトおよび正常様白質(normal appearing white matter; NAWM)のオリゴデンドロサイトも LC3 を発現していなかった。

2. NHD 脱髄巣残存オリゴデンドロサイトにおける LC3 の高発現

NHD では脱髄巣に残存している多数の Nogo-A 陽性オリゴデンドロサイトが LC3 を高発現していたが、アストロサイトは発現していなかった(図 2)。少数の Iba1 陽性ミクログリアでも LC3 の発現を認めた。一方大多数の神経細胞では LC3 の構成的な発現を認めた。NHD 白質に散見されるスフェロイドは抗 LC3 抗体で染色された。LC3 陽性オリゴデンドロサイトは、BECN1, p62, cleaved caspae-3 陰性、NBR1 弱

陽性、HDAC6 陽性を示した。

D. 考察

オートファジーマーカー LC3 は、MS 脳では脱髄のエフェクター細胞である Iba1 陽性マクロファージ・ミクログリアが高発現し、NHD 脳では脱髄の標的となる残存 Nogo-A 陽性オリゴデンドロサイトが高発現していた。このことは両者の脱髄の分子メカニズムが大きく異なることを示唆している。MS では脱髄巣は境界が比較的明瞭で、脳室周囲白質に好発し、大脳皮質(灰白質)にも脱髄巣が見られる。活動性病巣では血管周囲性に CD4 陽性または CD8 陽性 T 細胞・マクロファージの浸潤を認める。また shadow plaque と呼ばれる髄鞘再生(remyelination)の所見も認められる。一方 NHD では脱髄巣は境界不鮮明で、アストログリオシスは高度だがリンパ球系細胞浸潤に乏しく、大脳皮質(灰白質)には脱髄は見られない。われわれは TREM2 (c.482+2T>C) splicing mutation の剖検脳で、オートファジー抑制分子 RAPGEF4 の発現上昇を報告している(Numasawa et al. Eur J Neurol 18: 1179-1183, 2011)。すなわち脱髄の分子機序としては、MS は autoimmune-mediated inflammatory demyelination であり、NHD は deregulated autophagy-mediated degenerative demyelination と呼べる可能性がある(Satoh et al. Orphanet J Rare Dis 9: e68, 2014)。