

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461481

研究課題名(和文) IL-6阻害とT細胞抑制による関節リウマチ患者の免疫機能に対する修飾の相違点

研究課題名(英文) The difference of immune modification in rheumatoid arthritis patients between IL-6 blockade with tocilizumab and T cell inactivation with abatacept

研究代表者

村上 美帆 (MURAKAMI, Miho)

東京医科大学・医学部・助教(特任)

研究者番号：30595591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：IL-6の作用を特異的に阻害するヒト化抗IL-6受容体抗体であるトシリズマブ(TCZ)は、関節リウマチ(RA)の疾患活動性を低下させたが、RA患者の活性化T細胞の割合を減少させなかった。これは、T細胞阻害剤であるアバタセプトとは異なる。さらには、TCZでは、制御性T細胞の割合も変化しなかった。以上より、TCZの効果は、T細胞活性化抑制以外のメカニズムが関与すると考えられ、現在、他のT細胞の分画やB細胞の分画を解析している。また、RA患者の血中のサイトカインの値も解析中である。

研究成果の概要(英文)：Tocilizumab (TCZ) is a humanized anti-human IL-6 receptor antibody. We investigated whether IL-6 blockade with TCZ decreases the proportion of CD25+CD4+ T cells in ACPA positive rheumatoid arthritis (RA) patients. DAS28-ESR and SDAI were significantly reduced at 24 and 48 weeks of TCZ treatment compared with those at baseline. The proportion of CD4+ cells was significantly increased at 24 and 48 weeks compared with that at baseline. However, the proportion of CD25+CD4+ cells and that of regulatory T (Treg) cells in CD4+ cells were not significantly changed during TCZ treatment. Meanwhile, abatacept, a biologic blocking T cell co-stimulation, decreased the proportion of CD25+CD4+ T cells but not that of Treg cells in CD4+ cells in ACPA positive RA patients. In conclusions, IL-6 blockade has therapeutic effects on RA patients. Some other mechanisms, besides a decrease in CD4+ activation or an increase in Treg cell proportion, contribute the therapeutic effect of IL-6 blockade.

研究分野：免疫学

キーワード：関節リウマチ interleukin-6 トシリズマブ T細胞 B細胞 サイトカイン CD4 CD25

### 1. 研究開始当初の背景

近年、関節リウマチ(RA)に対する治療は長足の進歩を遂げた。それは、生物学的製剤による関節破壊の進行抑制や寛解導入率の向上によるところが大きい。トシリズマブ(TCZ)は、代表的な炎症性サイトカインであるインターロイキン 6(IL-6)の作用を特異的に阻害するヒト化抗 IL-6 受容体抗体であり、国内外の臨床試験ならびに市販後全例調査の中で RA 患者に対する有効性と安全性が証明された。しかしながら、全ての患者に TCZ が有効であるわけではなく、なぜ個々の患者で有効性の程度に差異が生じるのかは明らかでない。

IL-6は抗原刺激により活性化されたB細胞を抗体産生細胞に分化させる因子である。一方、T細胞の分化に対しても重要な役割を担っている。特に興味深いのは、自己免疫応答や炎症反応において重要な役割を果たし、関節炎の発症や病態形成に深く関わるヘルパーT細胞である Th17 細胞の分化にとって、IL-6が鍵となっていることである。すなわち IL-6 と TGF- $\beta$  の存在下ではナイーブな T細胞は Th17 細胞に分化するが、IL-6 非存在下では TGF- $\beta$  刺激により逆に自己免疫を抑制する制御性 T細胞(Treg)に分化する。したがって、IL-6の過剰産生は、B細胞とT細胞の分化を介して自己免疫反応(自己抗原に対する獲得免疫の異常)に関わっていると考えられる。しかし、これらのメカニズムに関する一連の研究は、主にマウスモデルでの報告であり、ヒトでの研究、特に RA 患者での研究は端緒に就いたばかりである。

さて、実臨床では、TCZが炎症性サイトカインとしての IL-6 の作用を阻害することから、まず CRP が陰性化し、引き続いて関節炎が鎮静化される。その中で、自己抗体であるリウマトイド因子(RF)や抗 CCP 抗体(ACPA)の値が低下しない RA 患者を経験してきた。しかし、T細胞の活性化を抑制するアバタセプト(ABA)へスイッチすると、RF や ACPA の低下がみられる。ABA は CD28 からの共刺激シグナルを遮断し、T細胞の活性化を抑制する。すなわち、そのような患者では、TCZ による治療効果は、IL-6の炎症性サイトカインとしての作用を阻害しているにすぎず、その上流にあると考えられる自己免疫現象(自己抗原に対する獲得免疫)は抑制できていない可能性がある。自己抗体の低下しない患者では、TCZ の減量あるいは中止により再燃するかもしれないが、TCZ あるいは ABA により自己抗体が低下する症例は、減量あるいは中止が可能かもしれない。このメカニズムを明らかにするために、TCZ による治療効果に加え、T細胞およびB細胞サブセットの変化と自己抗体の量的変化との関連を検討する。また、TCZ と ABA の作用を比較することにより、生物学的製剤の効果発現機序の違いを明らかにする。そして、最終的に、IL-6 阻害治療と T細胞の活性化抑制治療の使い分けを目指す。

申請者らは、「生物学的製剤未治療の RA 患者に対するアバタセプトの有効性と安全性の検討試験(ABROAD STUDY)」に参加し、ABA が CD25 の発現を抑制するとともに、Th17 細胞数を減らすことを見出した。この研究により、両者のデータを比較することが出来る。

### 2. 研究の目的

TCZ は、RA 患者に有効といえども、治療効果には差があり、そのメカニズムはすべてが明らかになっていないわけではない。TCZ は、炎症性サイトカインとしての IL-6 の作用を阻害することに加え、T細胞とB細胞の分化を制御し、自己免疫現象を抑制する可能性が考えられる。本研究では、バイオロジクスナイーブの RA 患者において、TCZ 治療による T・B細胞サブセットへの影響を検証するとともに、作用機序の違う ABA と比較することで、TCZ による効果発現機序を明らかにする。そして最終的には、IL-6 阻害治療と T細胞の活性化抑制治療の使い分けを目指す。

### 3. 研究の方法

当初予定していた近畿地区の関節リウマチ診療ネットワーク(KIZUNA GROUP)で実施する他施設共同研究が中止となった。KIZUNA GROUP とは、近畿地区での多数の大学および医療機関が協力し行う GROUP で、この研究は、平成 25 年から開始される「生物学的製剤未治療の RA 患者に対するトシリズマブの有効性と安全性の検討試験(Team Study)」のプロジェクトの一つとして実施するはずであった。しかし、そのプロジェクトが中止となったため、患者リクルートは大阪リウマチ・膠原病クリニックのみで行い、実験・解析は当初の予定通り、東京医科大学で行っている。東京医科大学において倫理審査委員会の承認を経た後に、同意が得られた生物学的製剤未使用の登録患者から TCZ 治療前、治療開始より 6 カ月後および 12 カ月後に各 20 mL の末梢血を採取する。採血された末梢血から、リンパ球サブセットとサイトカインの解析が実施される。マイクロアレイ解析については、TCZ から ABA へスイッチングが必要な患者で同意が得られた登録患者から、スイッチング前とスイッチング 6 カ月後に各 5 mL の末梢血を採取する。また、健常人群と治療前 RA 患者群との比較解析は、すでに他施設共同研究として行った ABROAD STUDY で行っている。

バイオロジクスナイーブな RA 患者の T・B細胞サブセットとサイトカインプロファイルの違いを明らかにするため、入手した治療前患者の末梢血から FicoII 密度勾配遠心分離により末梢血単核球を単離する。同時に、血漿は凍結保存し、サイトカイン測定に供される。また、同意を得た健常人より同様にして末梢血単核球を分離する。

FITC、PE および PEcy5 標識抗ヒト CD 抗体

を用いて表面染色し、FACSによりT細胞表面マーカー(CD3, CD4, CD8) B細胞表面マーカー(CD19, CD20, CD80, sIgD,) 活性化マーカー(CD25, CD69, CD62L)を調べる。さらにB細胞の生存・分化・抗体産生に重要な役割を果たすBAFFの受容体であるBAFF-R、BCMA、TAC1の発現も調べる。同時に、プラズマ細胞マーカー(CD138等)の発現も調べる。また、Foxp3細胞内染色を行い、制御性T細胞(CD4+CD25+Foxp3+)の頻度を明らかにする。さらに、末梢血単核球をin vitroにおいてPMA/イオノマイシンにより4時間刺激した後、細胞内サイトカイン染色を行って、Th1(CD4+IFN $\gamma$ )、Th2(CD4+IL-4)およびTh17(CD4+IL-17)のT細胞サブセットを明らかにする。

RA患者血漿中のサイトカインプロファイルを明らかにするため、BD CBA Th1/Th2/Th17キットを用いてIL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN $\gamma$ , およびIL17Aを定量する。サイトカインの定量に関し、血漿中サイトカイン定量に十分な検出感度が得られなかった場合の対応として、市販のELISA Kit(R&D Systems社 Quantikine ELISA Kit等)に変更して実施する。

定期的な診療時の疼痛・膨張関節評価、DAS28-ESR、患者総合VAS、医師総合VAS、HAQ-DI、MMP-3、脂質検査値、関節X線評価、免疫グロブリン、ACPA、RF、安全性の評価などの臨床データを集積する。これら臨床評価指標からRA疾患活動性および治療反応性との関連を探る。各T・B細胞サブセットあるいはサイトカイン値について、TCZ治療前において異常値を示した患者と他の患者に分類し、治療反応性について統計学的有意差検定を行う。また、治療前後におけるT・B細胞サブセットあるいはサイトカインの変動とRA疾患活動性や治療反応性との間で、統計学的な相関解析を実施する。特にACPA、RFの陽性患者と陰性患者との比較、治療による自己抗体の変化量との相関を検討する。治療反応性は、投与開始後6か月、12か月のEULAR基準における反応性、治療前後のRA活動性指標であるDAS28-ESRの変化、あるいはRA活動性指標であるCDAI、SDAIの変化によっても多面的な評価を検討する。同時に、特定のT・B細胞サブセットやサイトカインと関連する臨床指標の検索を試みる。得られた様々な細胞マーカーについて、治療反応性との相関解析あるいは関連解析を実施し、効果予測マーカーとしての評価も行う。

TCZからABAにスイッチングを行う予定のRA患者のスイッチング前とスイッチング6か月後の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイを用い解析する。

#### <研究の統括>

以上の研究から、得られた実験解析データおよび臨床データを統合し、さらにはABROAD STUDYの結果と比較、考察することでTCZがヒトにおいてRA治療効果を発揮する真の作

用機序を解明する。

#### 4. 研究成果

同意が得られた登録患者から、TCZ治療前、治療開始より6か月後および12か月後と血漿を分離し、リンパ球サブセットとサイトカインの解析を実施している。当初予定していた近畿地区の関節リウマチ診療ネットワーク(KIZUNA STUDY)で実施する他施設共同研究が中止となったため、患者リクルートは大阪リウマチ・膠原病クリニックのみで実施した。そのため、検体の収集が当初の予定50例に達しておらず、現在、登録患者数は33例となっている。そのうち、12か月まで到達した症例が15例で、うち13例までリンパ球サブセットの解析が終了している。

まず、ABA治療により、ACPA陽性患者のCD25+CD4+活性化T細胞は減少し、また、血中IL-6値も低下したことから、IL-6阻害剤であるTCZ治療によりCD25+CD4+活性化T細胞が減少するか否かを、13例で解析を行った。

DAS28-ESRは治療前の平均値が $4.87 \pm 1.25$ 、6か月後が $1.99 \pm 1.13$ ,  $p < 0.0001$ 、12か月後が $1.61 \pm 0.70$ ,  $p < 0.0001$ 、またSDAIの平均値は、治療前が $20.75 \pm 9.56$ 、6か月後が $6.30 \pm 7.0$   $p = 0.0008$ 、12か月後が $3.20 \pm 2.86$ ,  $p < 0.0001$ と、TCZにより疾患活動性は低下した。また、血中のMMP-3も治療前と比べ、12か月後には有意に低下した(治療前 $250.5 \pm 311.0$  ng/mL、6か月後 $85.1 \pm 81.8$  ng/mL,  $p = 0.07$ 、12か月後 $54.9 \pm 27.2$  ng/mL,  $p = 0.04$ )。

CD4+T細胞の割合は治療前と比べ、6か月および12か月で増加傾向にあった(治療前 $29.7 \pm 18.2\%$ 、6か月 $37.3 \pm 12.9\%$   $p = 0.0094$ 、12か月 $37.7 \pm 14.1\%$ ,  $p = 0.025$ )。CD25+CD4+活性化T細胞の割合は治療前と比べ、6か月および12か月ともに低下は見られなかった(治療前 $5.7 \pm 4.2\%$ 、6か月 $6.1 \pm 3.4\%$ ,  $p = 0.795$ 、12か月 $7.1 \pm 2.1\%$ ,  $p = 0.247$ )。このように、IL-6阻害治療によりRAの疾患活動性は低下したが、CD25+CD4+活性化T細胞の割合は減少せず、ABA治療とは異なった結果が得られた。これらの結果を踏まえて、CD25+CD4+T活性化細胞の分画には制御性T細胞(CD4+CD25+Foxp3+)が含まれているので、制御性T細胞が治療効果発現に関与する可能性があると考え、制御性T細胞の割合も解析をしたが、末梢血中の制御性T細胞の割合は低く、かつ、TCZ治療により、有意な変化は示されなかった。また、PMA刺激後に細胞内サイトカイン染色し測定をするTh1、Th2、Th17細胞の分画の解析は、登録開始直後の6例のTCZ治療前のデータがとれておらず、他の登録患者が24週、48週に到達次第、順次解析する予定である。

また、T細胞は、抗原特異的なT細胞受容体からのシグナルと補助刺激分子のCD28からの共刺激シグナルによって活性化される。そこで、CD28の発現も比較した。CD4+T細胞

における CD28 の発現は ABA 治療でも TCZ 治療でも治療前後で有意な差はなかった。現在、CD28 のリガンドである CD80 と CD86 の発現や、それらリガンドの発現を増加させたり、B 細胞の抗体産生のクラススイッチを促す CD154 (CD40L) や CD40 の発現を解析している。

また、B 細胞サブセットについては、データは取得済みで、現在解析中である。

全ての登録患者の評価ポイントの血漿も凍結しており、症例数が集まり次第、血漿中のサイトカインプロファイルも測定予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 5 件)

Miho Murakami、IL-6 blockade with tocilizumab does not suppress CD4+T cell activation at 48 weeks of the treatment, EULAR 2016、2016. 6.8-11, London, UK

村上美帆、IL-6 阻害治療による関節リウマチ患者の CD25+CD4+活性化 T 細胞の割合の変化、第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2016. 4. 21 - 2、パシフィコ横浜、神奈川。

Miho Murakami、T cell CD80/CD86 co-stimulatory blockade effectively suppresses CD25 (+) in CD4 (+) T cell subpopulation but not the ACPA titers in the course of 48-week treatment of patients with rheumatoid arthritis, EULAR 2014、2014.6.11-14、Paris, France.

Miho Murakami、T cell CD80/CD86 co-stimulatory blockade does not suppress CD8 (+) subpopulation in the course of 48-week treatment of patients with rheumatoid arthritis, EULAR 2014、2014.6.11-14、Paris, France.

村上美帆、RA 患者に対する T 細胞共刺激シグナル抑制治療は抗感情シトルリン化ペプチド抗体価を下げない、第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014. 4. 24 - 26、グランドプリンスホテル新高輪、東京

[図書](計 2 件)

西本憲弘、村上美帆、他、羊土社、骨ペディア 骨疾患・骨代謝キーワード事典、2015、294、295

西本憲弘、村上美帆、他、永井書店、生物学的製剤使用時の WBC 減少。リウマチ病セミナーXXIV、2013、217、222

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

村上 美帆 (MURAKAMI, Miho)  
東京医科大学・医学部・助教(特任)  
研究者番号: 30595591

##### (2) 研究分担者

西本 憲弘 (NISHIMOTO, Norihiro)  
東京医科大学・医学部・兼任教授  
研究者番号: 80273663