

令和 3 年 5 月 22 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09016

研究課題名(和文) 光免疫療法を利用した関節リウマチに対する生物学的製剤治療効果の増強

研究課題名(英文) The effect of photoimmunotherapy and biologics on rheumatoid arthritis

研究代表者

米本 由木夫 (Yonemoto, Yukio)

群馬大学・大学院医学系研究科・研究員

研究者番号：50400734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：In vivoでRAW264のcell lineを用いた。蛍光顕微鏡の実験でMR16-1がRAW264の細胞膜上に発現しているIL-6受容体に結合するか確認した。抗体は1時間のincubationで細胞膜上へ結合を認め、6時間で細胞質内へのinternalizationを認めた。さらにフローサイトメトリーではMR16-1/IR700が結合していた。しかし抗体を6時間incubationした細胞に段階的に20Jまで照射したが効果は認められなかった。In vitroでは足関節と脾臓に照射した。コラーゲン関節炎モデルマウスで抗IL-6抗体を用いた光免疫療法を行ったが、関節炎の改善は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチ(RA)は、免疫学的機序により引き起こされた滑膜炎により関節軟骨や関節近傍の骨が破壊されることにより関節機能の障害、臓器の障害が進んでいく疾患である。本研究の目的はRA治療に用いられる生物学的製剤とがん治療に用いられる光免疫療法を掛け合わせてRA治療の増強をはかることである。生物学的製剤の欠点として免疫低下による感染症を中心とした有害事象の多さと高額な薬価にある。本研究では光免疫療法を用いることで従来の生物学的製剤の使用量よりも少ない量で治療効果を最大にするとともに、有害事象の軽減と医療費の削減を見込めることが学術的および社会的意義になると考えた。が、予想した結果は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：In vivo, we used a cell line of RAW264, a mouse-derived macrophage. Using fluorescence microscopy, we confirmed whether MR16-1, an anti-IL-6 receptor antibody, binds to the IL-6 receptor expressed on the cell membrane of RAW264. The antibody bound to the cell membrane after 1 hour of incubation and showed internalization into the cytoplasm after 6 hours of incubation. In addition, MR16-1/IR700 bound to the cells by flow cytometry. In vitro, Biodistribution study showed that antibody was most abundantly distributed in spleen, and we decided to irradiate spleen as well as ankle joint as target organ. A collagen arthritis model was created in DBA/1J mice and photoimmunotherapy with anti-IL-6 antibody was performed, but no improvement in arthritis was observed.

研究分野：整形外科学

キーワード：関節リウマチ 光免疫療法 生物学的製剤 インターロイキン6 FDG-PET

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)は、免疫学的機序により引き起こされた滑膜炎により関節軟骨や関節近傍の骨が破壊されることにより関節機能の障害、臓器の障害が進んでいく疾患である。RA ではTNF- $\alpha$  やIL-6などの炎症性サイトカインが病態に強く関与しているとされ、臨床ではRAの治療にTNF阻害薬とともにIL-6の信号伝達を抑制するIL-6受容体抗体tocilizumab(TCZ)が世界的に広く用いられている。RAではIL-6を介した病態機序により滑膜炎を生じ、滑膜組織の増殖によるパンヌス形成や骨びらの形成・軟骨変性・血管新生などを起こすと考えられるため、TCZはRA治療における重要な治療薬となっている。一方で、特に生物学的製剤では免疫低下による感染症を中心とした有害事象が多く(TCZ使用3987例中37.9%・中外製薬2009年)十分な治療をできない事もしばしば経験する。IL-6受容体は好中球のような炎症細胞だけでなく、肝細胞などの全身の細胞にも発現しているため、全身の副作用についても注意が必要といった問題点も存在している。

### 2. 研究の目的

本研究は従来、癌の治療法として研究されてきた光免疫療法(Photoimmunotherapy: PIT)の手法を用いてRAの分野に応用することで、抗IL-6受容体抗体の作用をさらに強化し、炎症の早期改善や抗体の使用回数の低減を目指すことを目的とする。IL-6とIL-6受容体との間の反応は、RAにおける炎症の鍵を握っており、この領域に対して治療を行うことはIL-6受容体を介するカスケード全体を無効にする可能性がある。また、PITは抗原の発現している細胞のみを選択的に壊死させるという特徴があり、炎症のある滑膜領域に存在するIL-6受容体発現細胞のみを選択的に治療標的にすることができる。このことにより炎症を引き起こしているカスケードやフィードバックを断ち切ることが可能である。

### 3. 研究の方法

7~8週齢のオスDBA/1Jマウスの尾根部皮下に2型コラーゲンを皮下注射することで関節炎を惹起させる。具体的なCIAマウスモデル作成の手順としては、完全フロイントアジュバント(Complete Freund's adjuvant: CFA)1mLとウシ血清2型コラーゲン1mLのエマルジョンを作成し、尾根部の皮下に100 $\mu$ L皮下注射する。3週間後に不完全フロイントアジュバント(Incomplete Freund's adjuvant: IFA)を尾根部の皮下に100 $\mu$ L皮下注射する(Boosting)ことで、確実に関節炎を惹起したCIAマウスを作成する。(図1)

PITによる関節炎の治療の手順としては、MR16-1とIR700の結合体溶液を関節炎マウスに投与した24時間後に近赤外線を50~100J/cm<sup>2</sup>照射するのを標準治療とする。対象とする関節は、左右の手関節と足関節の4関節とする。抗体(結合体)の関節への集積については、IR700自体が蛍光物質であることから、蛍光イメージ装置(Maestro, Li-COR)を用いて蛍光画像からその集積を投与後24時間後に確認する。PITによる治療とMR16-1単回投与、2回投与との治療効果に差があるのかどうか検討を行う。

### 4. 研究成果

Biodistribution studyでは、MR16-1は脾臓に最も多く分布しており(図2)、照射する標的臓器は足関節に照射する方法に加えて、脾臓にも照射をすることとした。治療プロトコールはBoostingから24時間後にMR16-1/IR700を尾静脈から100 $\mu$ gすることとした。経過観察期間は飼育開始から8週間として、飼育開始から2週間、4週間、5週間、6週間の時点でFDG-PETを計4回撮影して関節炎評価を行った。また週に2回足関節の腫脹をノギスにて計測し、両手関節と両足関節の主観的評価として腫脹度を各0~4の5段階評価にて行い、両手足関節の合計スコアを関節炎スコアとした。

初回の実験ではMR16-1/IR700を尾静脈投与から24時間後に100J/cm<sup>2</sup>を足関節に照射したものの、関節炎はコントロールと比較して有意差はみられなかった。

2回目の実験では脾臓へ照射することとして、MR16-1/IR700を100 $\mu$ g投与後、24時間、48時間、72時間に各々50J/cm<sup>2</sup>を脾臓に照射した。経過観察期間と関節炎評価は1回目と同様の方法で行った。FDG-PETでは4週目から両群とも関節炎が増強して、5週目でピークに達した。(図3)関節炎スコアでも4週目から腫脹が見られて、5週目以降に関節炎はピークに達した。(図4)しかし、2回目の実験でも関節炎の改善は見られなかった。

In vitro の実験では RIKEN より購入した RAW264 cell line を用いて実施した。まず 35mm dish に  $1 \times 10^6$  cell を passage して 24 時間培養後、MR16-1/IR700 を  $8 \mu\text{g}$  投与して 6 時間 incubation した。6 時間 incubation 後、蛍光顕微鏡で抗体が細胞に結合していることを確認した。(図 5) さらにフローサイトメトリーを用いて抗体の結合割合を確認したところ、1 時間 incubation では約 34% の細胞に、6 時間 incubation では約 77% の細胞に抗体が結合していることがわかった。(図 6)

光免疫療法として蛍光顕微鏡と同様の方法で MR16-1/IR700 を  $8 \mu\text{g}/\text{ml}$  投与後 6 時間 incubation してから照射量を 0J、0.2J、0.5J、2J、5J として近赤外線照射を行いフローサイトメトリーで細胞死の割合を計測した。(図 7) しかし、5J の照射をしても細胞死の有意な増加は認められなかった。さらに照射量を 20J まで増やしたが、細胞死はコントロールと比較して変化は見られなかった。

以上の結果から、in vitro でも RAW264 細胞の MR16-1/IR700 の PIT の効果は確認できなかった。

図 1

## Collagen-induced arthritis model mouse

### Week 1

#### Emulsion Preparation

Type II collagen + complete Freund's Adjuvant (2mg/ml)

DBA/1J mouse

⇒ Subcutaneous injection of emulsion ( $100 \mu\text{g}$ )

### Week 3

Type II collagen + incomplete Freund's Adjuvant

⇒ Subcutaneous injection of emulsion ( $100 \mu\text{g}$ )  
(Booster injection)

(Chondrex社 protocol 2017)

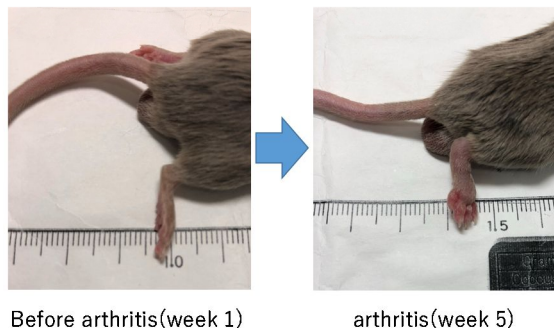


図 2

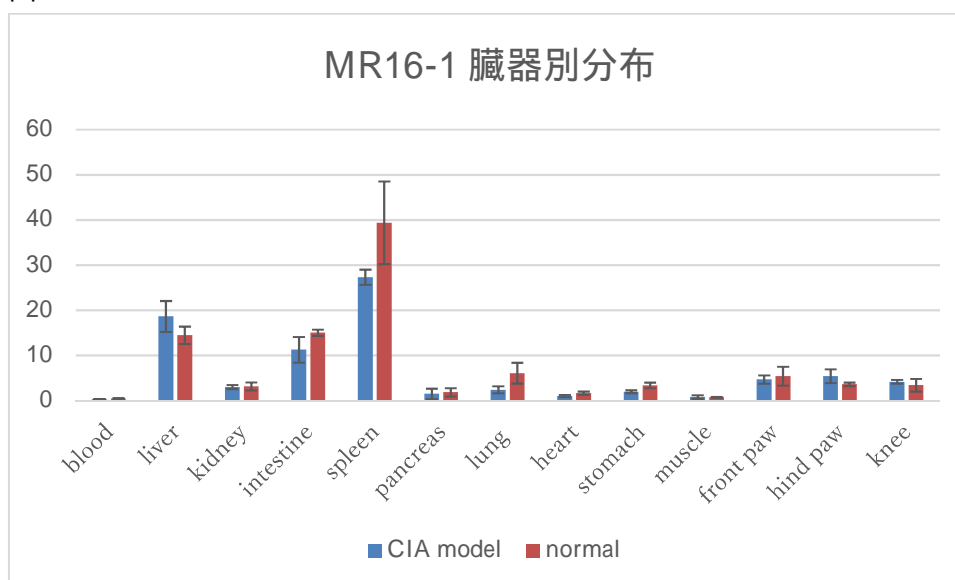


図 3

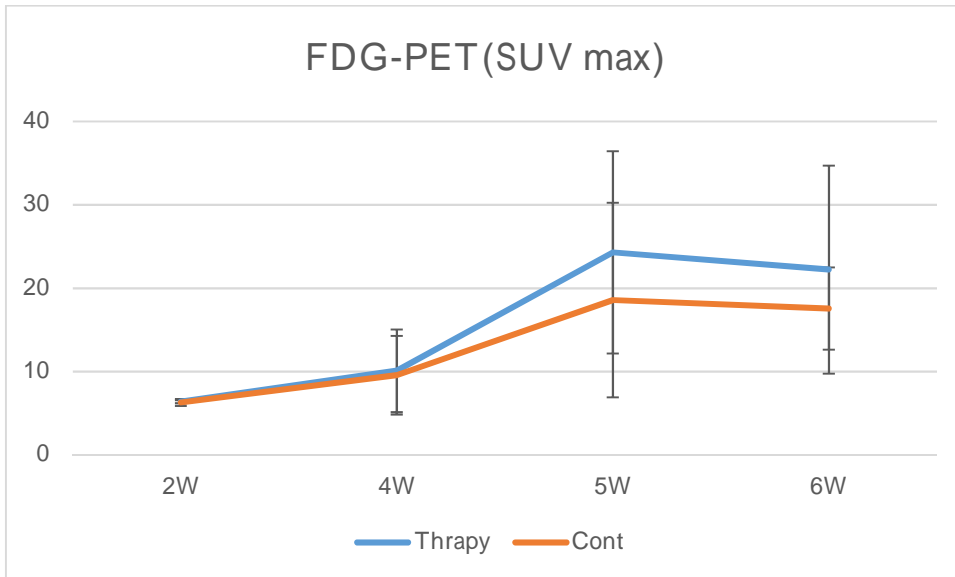


図 4

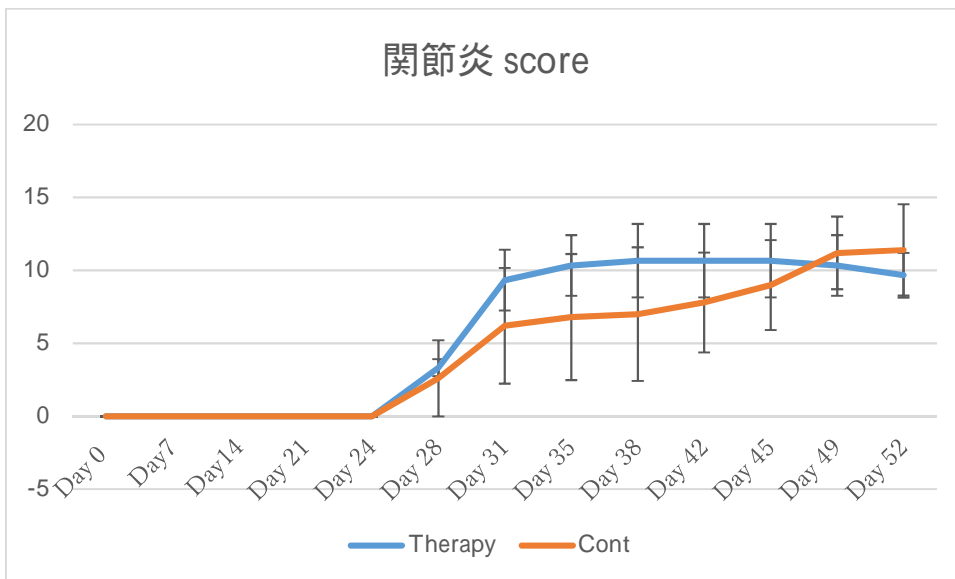
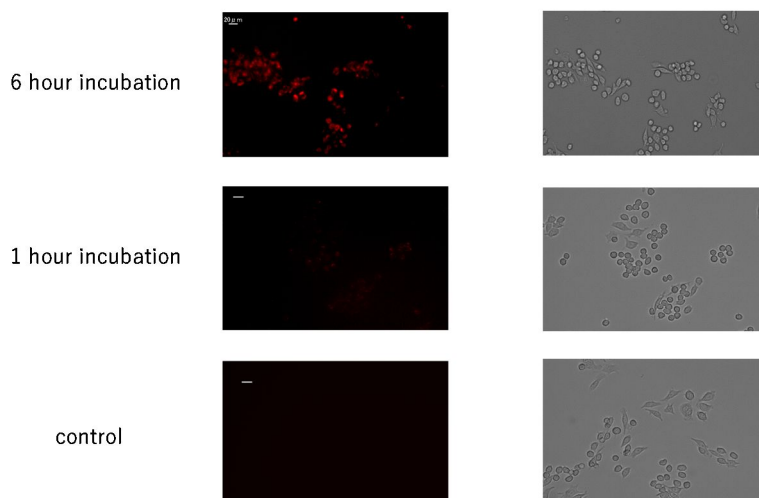


図 5

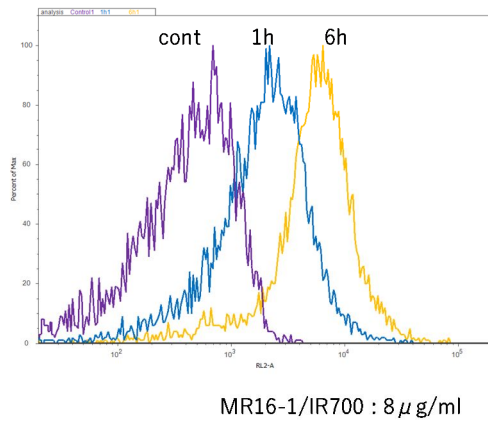
## Fluorescence microscope



RAW264 : mouse macrophage cell line (RIKEN)

図 6

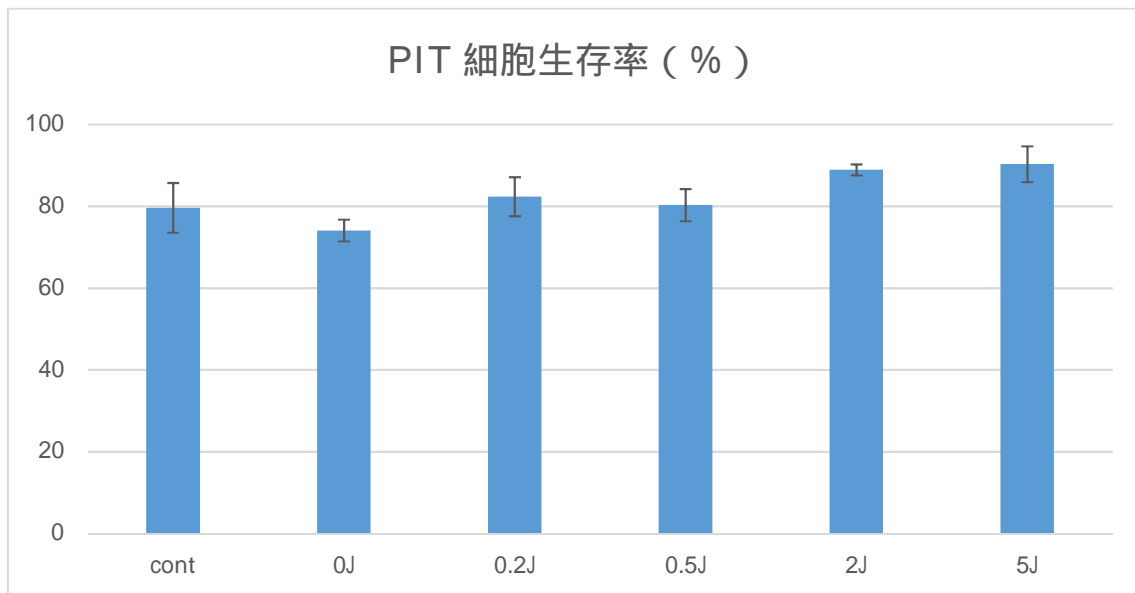
# Flowcytometry



1 hour incubation	Binding cell	Not binding cell	binding/tot al cell (%)
Well 1	3119	6880	
Well 2	3185	6808	
Well 3	3991	6007	
Total	10295	19695	34.3%

6 hour incubation	Binding cell	Not binding cell	binding/tot al cell (%)
Well 1	8504	1489	
Well 2	8389	1594	
Well 3	6288	3707	
Total	23181	6790	77.3%

図 7



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	須藤 貴仁  (Suto Takahito)  (00769036)	群馬大学・医学部附属病院・医員   (12301)	
研究分担者	中島 崇仁  (Nakajima Takahito)  (70375559)	群馬大学・医学部附属病院・准教授   (12301)	
研究分担者	岡邨 興一  (Okamura Koichi)  (90527722)	群馬大学・医学部附属病院・助教   (12301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関