

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390258

研究課題名(和文) SST-REX技術と細胞免疫療法による新たな免疫制御法の開発

研究課題名(英文) Comprehensive search for the new target to establish immunotherapy using SST-REX analysis

研究代表者

臼井 崇 (Uusi, Takashi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・その他

研究者番号：90362483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円、(間接経費) 3,660,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、膠原病各疾患により特異的な治療法を確立することにより、既存の治療法が有する、感染症・悪性腫瘍のリスク等のデメリットを克服することである。申請者は関節リウマチの線維芽細胞側の責任因子を網羅的に解析しGM-CSFを抽出した。その中和は、別途申請者らが偶然発見したRA間質性肺炎モデルマウスにおいて顕著な治療効果を示すことを証明した。本法は関節リウマチに対する新規治療法として期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to establish a specific treatment for collagen disease, and overcome disadvantages of existing therapies such as infection or malignancy. We comprehensively analyzed the responsible factor in fibroblasts of rheumatoid arthritis, and found GM-CSF. Neutralization of GM-CSF completely blocked the development of mouse RA-related interstitial lung disease model that we found independently. This strategy can be expected as a new treatment for rheumatoid arthritis as well as its interstitial lung disease.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：膠原病学 関節リウマチ 滑膜線維芽細胞 間質性肺炎 CSF2

1. 研究開始当初の背景

近年一部の自己免疫疾患に対し、生物学的製剤を用いた抗 TNF・抗 IL-6・抗 CD28 治療が臨床応用され、その効果の高さに注目が集まっている。しかしこれらの薬剤は従来の薬剤と比較して非常に高価である。またこれらは 1 分子阻害剤ではあるが病態非選択的阻害薬であり、結核・ウイルス・真菌などの重篤な日和見感染症を誘発し、またその長期投与による悪性腫瘍発生のリスクも懸念されている。一方で我々膠原病医師が、日常診療の主力として用いている副腎皮質ステロイド剤や免疫抑制剤は、生物学的製剤以上に非特異的薬剤であり、全身的な副作用は避けられない。従って我々はその病態解析を免疫細胞・非免疫細胞両面から網羅的に行い、次にターゲットとなる分子の修飾効果を in-vitro および病態モデルマウスを駆使して in-vivo で解析し、最後にその解析で得られた知見より臨床応用可能な免疫調節性分子を同定することにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、未だに根本的治療法がない全身性自己免疫疾患に対して、各疾患の病態学的特徴に基づく、特異的な治療法を確立することで、既存の治療法が有する感染症・悪性腫瘍のリスク増大、代謝系への悪影響を減じ、かつコストパフォーマンスの高い新規治療法を確立することである。本目標を達成するため臨床検体(血清・末梢血血球・手術時検体等)を積極的に用いて、その病態を独自のアイデア・技術を用いて網羅的に解析し、また理論的には唯一の疾患特異的免疫制御法である、細胞免疫療法の可能性を追求する。前者は関節リウマチ(RA)、および変形性関節症(OA)症例の滑膜検体を材料とした非リンパ球側からの解析、後者はマウスモデルおよびヒト全身性自己免疫疾患から得られたエフェクターT細胞に、免疫制御性因子を in-vitro で遺伝子導入することで抗原特異的な免疫制御能を獲得させ、それを細胞移入することで治療効果を期待する。当初のターゲットは RA, OA であるが、治療法の進展が乏しい全身性エリテマトーデス(SLE)・強皮症(SSc)・ANCA 関連血管炎等への早期展開を目指した。

3. 研究の方法

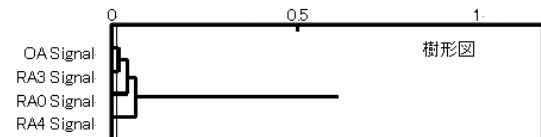
我々は京都大学医の倫理委員会承認の下、RA および OA 症例の手術時検体(滑膜組織)を収集し培養時における血管新生度合い、細胞増殖速度、炎症細胞浸潤程度の評価をスコア化(RA0-4 の 5 段階)し、付着細胞分画を保存した。より炎症活動性の高い RA 滑膜線維芽細胞に特異的な遺伝子を網羅的に検索するため、上記スコア化細胞株を用いて層別化し、アレイ解析に供した。

次に上記解析で抽出された遺伝子産物の効果を実証するため、我々が別途独自に発見・確立した RA 関連間質性肺炎モデルマウスを用いて in-vivo 阻害実験を行った。

4. 研究成果

OA=6 例,RA0=6 例,RA3=3 例,RA4=3 例,計 18 症例由来滑膜線維芽細胞株を選定し、各群の RNA をコンボジットした上で Agilent 社のアレイ解析結果を得たところである。現在その解析中であるが驚くべき事に、OA の遺伝子プロファイルは RA0 よりむしろ RA3 に近く、RA0 の炎症関連遺伝子プロファイルが最も低いことが判明した(図 1)

図 1:すべての群でその遺伝子発現レベルが 100 未満の遺伝子を除いた 24600 遺伝子のクラ



スター解析結果

これは RA0 という群が治療に成功してきた例であり、治療薬も有効であった例を多く含んでいるという臨床的背景を考えればむしろ自然な結果であると考えられた。また最近 OA に対する炎症病態も示唆されており、実際我々も OA 滑膜組織培養で多くの IL-6 産生を検出した(図 2)。つまり OA は RA0 より RA3 に近く、RA0, RA4 がユニークな集団であることを示している。本結果はこれまで行われてきた OA vs over all RA という単純比較解析がナンセンスであり、今回我々が計画した RA 症例内層別化解析の妥当性を支持していると考えられた。

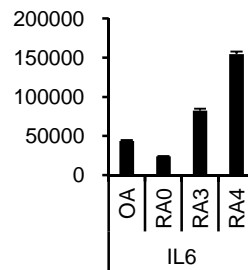


図 2:OA, RA0-4 各群における IL-6 発現量の比較

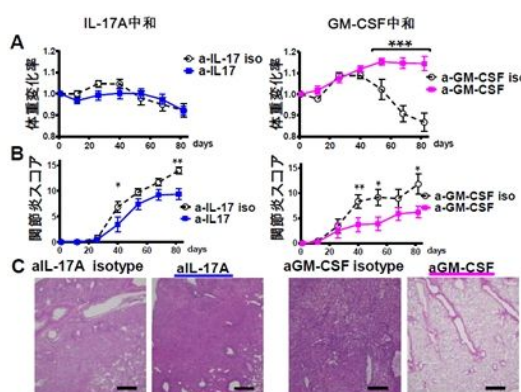
比較

以上の結果より、我々は RA4 vs RA3 比較で発現量の差が大きい遺伝子群を抽出することにした。その中の 1 つとして CSF2 を抽出した。CSF2 はサイトカイン GM-CSF をコードする遺伝子であり、近年その自己免疫疾患における重要な役割が注目されている遺伝子である。

我々は本研究と別個に関節炎モデルマウスの肺病変に関する研究を続けていた。その研究の中で関節炎モデルマウスとして有名な SKG マウスが、実は数ヶ月という極めて長期間に渡り、慢性進行性の間質性肺炎を呈して死に至ること

を見だしていた。RA に合併する間質性肺炎は難治であることが多く、その治療は確立されておらず、その病態が本マウスモデルで明らかとなれば、その治療法開発に資することが大きいと考えられた。そこで我々は、これまで本マウスにおいて大きな役割をしていると考えられてきた IL-17 にくわえ GM-CSF に対する中和抗体による治療介入実験を行った。その結果意外なことに、これまで重要だと考えられてきた IL-17 の中和抗体による介入は全く本マウスの間質性肺炎治療効果を有さないことに加え、抗 GM-CSF 抗体治療が、ほぼ完全に本マウス間質性肺炎を治療するという結果を得た(図 3)。

図 3:GM-CSF の中和は SKG 間質性肺炎の進展を抑制する。



以上の結果は、T 細胞と滑膜線維芽細胞もしくは肺胞マクロファージ等非リンパ球間のクロストークに GM-CSF が深く関与していることを示唆している。これがもしヒト膠原病難治性病態にも当てはまるのであれば、抗 GM-CSF 療法は例え抗関節炎効果が大きくなくても、他のアンメットニーズであるところの難治性間質性肺炎等の病態に大きな治療効果を発揮する可能性があることになる。今後、その可能性について研究を続けていきたい。

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)

(雑誌論文)(計 3 件)

GM-CSF but not IL-17 is critical for the development of severe interstitial lung disease in SKG mice.

Aoi Shiomi, Takashi Usui, Yuki Ishikawa, Masakazu Shimizu, Kosaku Murakami, and Tsuneyo Mimori
J Immunol. 2014 in print.

Significant association between CYP3A5 polymorphism and blood concentration of tacrolimus in patients with connective tissue diseases.

Tanaka K, Terao C, Ohmura K, Takahashi M, Nakashima R, Imura Y, Yoshifuji H, Yukawa N,

Usui T, Fujii T, Mimori T, Matsuda F.
J Hum Genet. 2014 Feb;59(2):107-9.

Three groups in the 28 joints for rheumatoid arthritis synovitis--analysis using more than 17,000 assessments in the KURAMA database.
Terao C, Hashimoto M, Yamamoto K, Murakami K, Ohmura K, Nakashima R, Yamakawa N, Yoshifuji H, Yukawa N, Kawabata D, Usui T, Yoshitomi H, Furu M, Yamada R, Matsuda F, Ito H, Fujii T, Mimori T.
PLoS One. 2013;8(3):e59341

(学会発表)(計 0 件)

(図書)(計 0 件)

(産業財産権)

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

(その他)

ホームページ等

該当無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

臼井 崇(USUI TAKASHI)

京都大学・医学研究科・非常勤講師

研究者番号:90362483

(2)研究分担者

該当無し

(3)連携研究者

三森 経世(MIMORI TSUNEYO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号:10157589