

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791002

研究課題名(和文) リウマチ関節炎の休止型制御性T細胞2ステップ誘導法による抑制法の開発

研究課題名(英文) Novel therapy for rheumatoid arthritis using T cell signaling agents.

## 研究代表者

前田 伸治 (MAEDA, Shinji)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80381854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞のシグナルに関与する様々な薬剤が、関節炎病態でのTregに与える影響を解析した。マウスにおいて、mTOR阻害剤(Everolimus)をマウス(BALB/c)に投与すると末梢血Tregが増加した(4.9～6.3%)。またIL2サイトカイン(IL-2 cytokine/mIL-2 antibody(JES6-1) complexes)投与ではTregは著増し、関節炎誘導(CAIA)を強力に抑制した。ヒトリウマチ患者にて、Abatacept(CTLA4-Ig)投与前後で、CD25、Foxp3の発現が低下しresting Treg(CD45RA<sup>high</sup> CD25<sup>low</sup>)の割合が増加した。

研究成果の概要(英文)：Regulatory T cells (Tregs) play an important role in self-tolerance, whereas various inflammatory conditions, such as rheumatoid arthritis (RA), attenuate the suppressive function. The purpose of this study is to clarify the modulation of Tregs by agents affecting T cell signaling, providing a basis for novel therapeutic approach for immunological remission. We have examined the change of phenotypes and the amount of circulating Tregs in human (RA) and mice (BALB/c, Collagen antibody induced arthritis, CAIA) in vivo. In mice, Tregs are increased by mTOR inhibitor (Everolimus) and IL-2Cac (IL-2 cytokine/mIL-2 antibody (JES6-1) complexes). Furthermore, maximum arthritis severity are significantly attenuated by IL-2Cac. In humans with RA, after 4wks CTLA-4-Ig (Abatacept) therapy, the ratio of resting Tregs in CD4 + T cells significantly increased, whereas activated Tregs decreased. Altering T cell signaling using various agents can control Tregs.

研究分野：リウマチ学

キーワード：関節リウマチ 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

近年飛躍的な進展をみた関節リウマチへの抗サイトカイン生物学製剤による治療は、疾患活動性のタイトなコントロール(臨床的、構造的寛解)を実現した。しかし、生物製剤や抗リウマチ薬を中止することで再燃する率が高く、長期におよぶ治療継続は未だ必要とされる。感染症のリスクや製剤への抗体出現に加え、長期の生物製剤使用は医療経済的にも問題である。Drug freeでの関節リウマチの維持療法の開発は社会的に緊急課題である。

一方、近年発見された CD4+CD25high Foxp3+制御性 T 細胞(以下 Treg)は、その免疫制御機構など基礎免疫学において飛躍的な発展をみるも、関節リウマチをはじめとする膠原病リウマチ疾患への臨床実用の用途は全くたっていない。これまで自己免疫疾患治療において Treg 細胞療法が期待されている方法は、自己免疫疾患患者から採取した Treg を in vitro で増加させ、再移入することで、免疫寛容を誘導することである。しかしながら、モデルマウスを使用したさまざまな報告においても、リウマチ様関節炎を抑制するためには Treg は多数(non-Treg と同等数)必要である。また、こういったマウス実験でさえ関節炎発症の予防(発症前 Treg 投与による予防)は可能であるが、疾患(関節炎)発症後 Treg 投与による疾患抑制はきわめて困難である。それゆえ、とりわけ全身性自己免疫疾患(膠原病)における Treg 細胞療法の臨床実用性に異論のある臨床研究者は多い。しかしながらこの予防と抑制の違いを臨床実用の視点で重要視すれば、寛解状態における関節炎の再燃予防にこそ、Treg 療法は最も効率的な治療法となりうる。抗サイトカイン療法による疾患活動性の寛解が期待できる現在こそ、Treg 療法を再検討すべき時である。

2. 研究の目的

制御性 T 細胞(Treg)ワクチン療法は、適切な自己抗原ペプチドワクチンと everolimus により自己抗原特異的 Treg を誘導する新手法で、自己免疫病の寛解が期待される。しかし、関節リウマチなど自己抗原が未解明の炎症疾患への応用は可能であろうか。我々は、CTLA4-Ig(abatacept)治療が、ヒト Treg の抑制性・持続機能性を向上させる(resting-Treg へ誘導できる)という独自の新知見と、関節炎局所に自己反応性 T 細胞が集積・活性化するマウス研究から得た知見を基盤に、関節炎局所で everolimus による関節抗原特異的 Treg 誘導 abatacept での resting-Treg 誘導、の 2Step 療法を提案する。Drug free の新しい関節リウマチ寛解維持療法の開発が目的である。

3. 研究の方法

本研究では、主にマウス研究により、1)関

節炎モデルマウスを用いた vivo での Everolimus 投与による関節炎集積 Tcell から Treg への conversion と 2)関節炎モデルマウスにおける活性化 Treg の CTLA4-Ig(Abatacept)による resting への誘導、および Treg の抑制能(および持続性)増強 という 2 Step 療法の各 Step を、主に vivo でのマウス解析や、SKG マウスの T 細胞養子移入と誘導 Treg の共移入により確認し、Drug free での関節炎寛解維持療法の臨床実用への基盤とする。さらに 3)ヒト関節リウマチ患者における抗リウマチ薬使用前後における Treg の phenotype 解析を並行して行い、既存の治療で Treg に与える影響を探索し、Treg 数の機能増強や Treg 休止型への移行を誘導する薬剤を見つけ、1) 2)へフィードバックする。Treg はヒトとマウスで異なることが知られ、ヒト免疫研究とマウス研究の利点、デメリットを補えるよう研究計画を立て臨床実用化を視野にいれる

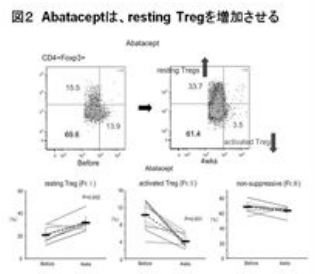
4. 研究成果

1) CTLA4-Ig による " 休止型 Treg " への誘導

ヒト Treg は Foxp3 の有無のみでなく、そのサブセットも重要である。一般的に Foxp3 陽性 Treg はそのサブセットによって、免疫抑制機能は大きく異なる。活性型、休止型、サイトカイン分泌型に主に分類されるが(図 1)、その中で、最大の抑制能を持ち、かつ長期間 Treg 細胞が生存し抑制能を發揮できるものは " 休止型 (resting Treg) " である (Miyara M, Sakaguchi



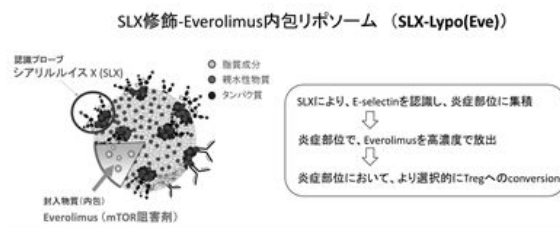
S.et al. Immunity. 2009 Jun 19;30(6):899-911.)。自己免疫の治療において、効率よく休止型 Treg を誘導できる事が重要である。申請者は、ヒトリウマチ患者の末梢血リンパ球を多色フローサイトメトリー法を組み合わせた詳細な phenotype 解析により、このような因子となる薬剤(抗リウマチ薬(MTX 含む 4 種) 生物製剤(インフリキシマブ、アケテムラ、アバタセプト)の探索を続けてきた。その結果、アバタセプト(CTLA4-Ig)が非常に短期間に、この休止型 Treg を増加させることを発見した(図 2 Unpublished data)。



炎症局所の Treg 誘導のため、炎症部位へ集積する性質をもつリポソムの表面に、さらに炎症局所への移行を強めるため SLX (シアリルルイス X) を付着し、リポソム内に mTOR 阻害剤である Everolimus (エベロリムス) を抱合した、“SLX-Lypo(Eve)” を片山化学技術者平井氏 (研究協力者) のご協力のもとに作成し、その vivo 使用の最適化に成功している。これを用いて、以下の事を明らかにしてきた。

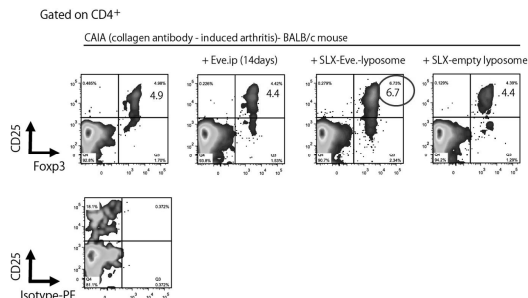
Everolimus 投与の SLX-Lypo(Eve) による関節炎局所投与は、全身性投与 (腹腔内投与) より有効であること。

IL-2/IL-2 抗体 (JES6-1) complex は、関節炎発症を著明に抑制すること。



関節炎モデルマウスにおいて、通常の Everolimus 投与より、関節炎局所に Everolimus を集積させることで、Treg の誘導が効率的に行われる

a) まず、Everolimus を関節炎局所部位に集積させる手法として、片山化学と提携し、SLX-everolimus 抱合-GlycoLiposome を作成した。この SLX (シアリルルイス X) を表面に結合させることで、everolimus を抱合した GlycoLiposome は関節炎局所部位に集積する。  
b) 次に通常の Everolimus (60 μg/mouse/day (3mg/kg) i.p. x14days) と比較し、SLX-everolimus 抱合 GlycoLiposome を投与した群の方が、everolimus の総投与量が 1/4 にも関わらず、Treg の誘導が効率的に行われたことを確認した (下図)。すなわち、Everolimus を全身投与と比較し、局所投与でのみ Treg の増加 (約 50% 増) を認めた。

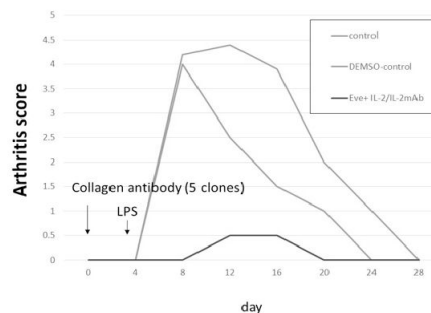
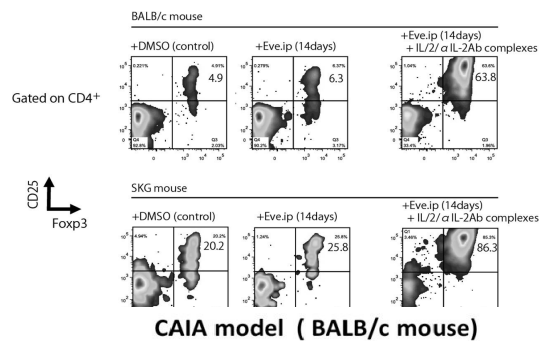


IL-2/IL-2Antibody complex の投与により関節炎モデルマウスの関節炎発症が著明に抑制される

a) IL-2/IL-2Ab complex 投与により、正常マウス (BALB/c) 関節炎モデルマウス (SKG マウス)

ス) において、末梢での Treg (CD4+CD25+ Foxp3+) が著増する。下図のようにこの治療で Treg は正常マウスで 60% 以上に、関節炎モデルマウス (SKG) では 80% 以上にまで著増する。

b) Everolimus と IL-2/IL-2Ab complex の投与による Treg 増加は、関節炎発症モデルにおいて関節炎の発症を著明に抑制した (下図参照)。BALB/c マウスにおいて CAIA (コラーゲン抗体誘導性関節炎) の発症を抑制し、SKG マウスにおいて Zymosan 刺激による関節炎発症を著明に抑制する)



以上の知見から、関節炎局所への everolimus 投与により、関節炎局所において関節炎抗原特異性の高い Treg が誘導され、次に Abatacept などの介入により、抗原特異的 Treg を含む Treg の休止化 (resting Treg の誘導)、により、Drug free でも長期にわたる関節炎発症抑制を目指して、研究を継続している。

## 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)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Maeda, S., Maeda, T., Kobayashi, A., Naniwa, T., & Tamechika, S.. The Various Roles of Th17 cells and Th17-related Cytokines in Pathophysiology of Autoimmune Arthritis and Allied Conditions. J Clin Cell Immunol S, 2013, 10: 2. 査読あり

<http://omicsonline.org/2155-9899/2155-9899-S10-008.php>

Naniwa T, Ito R, Watanabe M, Hayami Y,

Maeda S, Sasaki K, Iwagaitu S. Case report: successful use of short-term add-on tocilizumab for multirefractory systemic flare of adult-onset Still's disease. Clin Rheumatol. 2013;32 Suppl 1:S103-6. 査読あり  
<http://link.springer.com/article/10.1007/s10067-010-1562-8>

Naniwa T, Tamechika S, Iwagaitu S, Maeda S, Togawa H. Successful Use of Higher-Dose Etanercept for Multirefractory Systemic Flare of Adult-Onset Still's Disease with Liver Failure with No Response to Tocilizumab Therapy. Case Rep Rheumatol. 2013;2013:923497. 査読あり  
<http://www.hindawi.com/journals/crirh/2013/923497/abs/>

前田伸治. "ZAP70 の変異と自己免疫疾患 (特集 自己免疫疾患の発症関与要因)." 臨床免疫・アレルギー科 60.3 (2013): 263-269. 査読なし  
<http://ci.nii.ac.jp/naid/40019807769/>

Maeda S, Tanaka S, Ueda R, Sakaguchi S. Rescue of autoimmune arthritis in SKG mice by correction of T-cell repertoire in developing thymocytes. Nagoya Medical Journal. 2012; 52:77-88. 査読あり  
<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/igak.dir/P077-088maeda.pdf>

Maeda S, Hayami Y, Naniwa T, Ueda R. The Th17/IL-23 Axis and Natural Immunity in Psoriatic Arthritis. Int J Rheumatol. 2012;2012:539683. 査読あり  
<http://www.hindawi.com/journals/ijr/2012/539683/abs/>

〔学会発表〕(計 7 件)

前田伸治. Abatacept 治療により Treg の減少を認め Lupus 腸炎を発症した SLE の一例. 日本臨床免疫学会. 2014 年 9 月 25 ~ 27 日 京王プラザホテル(東京都新宿区)

前田智代, 前田伸治, 難波 大夫, 爲近 真也. IL2 サイトカインと mTOR 阻害による Treg 増加と自己免疫性関節炎の抑制. 日本リウマチ学会総会. 2014 年 4 月 24 ~ 26 日 グランドプリンスホテル新高輪(東京都品川区)

Tanaka Atsushi, Maeda Shinji, Nomura Takashi, Akizuki Shuji, Standley Daron, Sakaguchi Noriko, Sakaguchi Shimon, Breakdown of immune tolerance by quantitative and qualitative alterations of TCR signaling through ZAP-70. 第 42 回 日本免疫学会学術集会 2013 年 12 月 11 ~ 13 日 幕張メッセ(千葉県千葉市)

前田伸治, 前田智代, 難波 大夫, 速水 芳仁. Abatacept 治療によるリウマチ患者末梢血 Treg phenotype および Treg/Th17 バ

ランスの変化. 日本臨床免疫学総会. 2012 年 9 月 27 ~ 29 日 京王プラザホテル(東京都新宿区)

前田伸治, 前田智代, 速水芳仁, 難波大夫, 爲近真也, 岩垣津志穂, 小林彩子. Abatacept 治療によるリウマチ患者末梢血 Treg/Th17 バランスの変化. 日本リウマチ学会地方会. 2012 年 9 月 1 日 ウィンク愛知(愛知県名古屋市)

前田伸治, 速水芳仁, 難波大夫, 爲近真也, 小林彩子, 岩井敦子. 関節リウマチにおける Abatacept の使用経験. 日本リウマチ学会地方会. 2012 年 9 月 1 日 ウィンク愛知(愛知県名古屋市)

前田伸治, 前田智代, 速水芳仁, 難波大夫. Abatacept 治療による末梢血制御性 T 細胞 (Treg) phenotype の変化. 日本リウマチ学会総会. 2012 年 4 月 26 ~ 29 日 グランドプリンスホテル新高輪(東京都品川区)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前田 伸治 (MAEDA Shinji)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 80381854