

氏名	よしだ ゆうや 吉田 侑矢
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	薬博乙 第32号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当者
学位授与の年月日	平成28年9月30日
学位論文題目	自己免疫疾患に完全寛解を効果的に導入できる 新規治療戦略の構築
論文審査委員	(主査) 教授 奈邊 健 (副査) 教授 河野 武幸 (副査) 准教授 吉岡 靖啓 (副査) 准教授 辻 琢己

論文内容の要旨

自己免疫疾患は、本来、自己に対して攻撃しないように制御されている免疫機構が何らかの要因で破綻し、自己の分子・細胞・組織を異物として認識、破壊することで発症する。一般に、タクロリムス水和物やシクロスポリン等の免疫抑制薬により一時的な寛解（症状が消失あるいは軽快した状態）を導入できるが、休薬すると再燃する症例が多い。従って、効果的に寛解を導入し、かつ、ドラッグフリーの状態でもその寛解を長期間維持（完全寛解）できる新規治療戦略の開発が望まれている。本研究では、自己免疫疾患一般に完全寛解を導入できる新規治療戦略を開発するため、多発性硬化症および関節リウマチのモデル動物に対するフィンゴリモド塩酸塩（FTY720）および病因抗原の併用療法を開発し、その有用性および作用機序について調べた。

なお、FTY720は、他の免疫抑制薬とは全く異なる作用機序をもつ医薬品で、多発性硬化症の再発予防および身体的障害の進行抑制を適応として日本で2011年9月に製造承認されている。FTY720は、生体内でスフィンゴシンキナーゼ2によってリン酸化され、活性体のFTY720リン酸となり、リンパ球上のスフィンゴシン 1-リン酸（S1P）1受容体の内在化および分解を促す機能的アンタゴニストとして働く。その結果、胸腺や二次リンパ組織からのリンパ球の移出を制御し（ホーミング促進）、免疫応答を抑制する。以下、本研究で得られた成果を論述する。

多発性硬化症:

多発性硬化症は、髄鞘を構成するミエリンに対する自己免疫応答を病因とする中枢神経系の炎症性脱髄疾患である。異なる病巣に由来する様々な臨床症状（空間的多発性）および寛解／再燃の繰り返し（時間的多発性）を特徴とする。再燃を防止するためには、長期間に渡る薬物治療が不可欠である。本研究では、多発性硬化症モデル動物として、C57BL/6Jマウスを髄鞘構成タンパク質（myelin oligodendrocyte glycoprotein; MOG）の部分ペプチドであるMOG₃₅₋₅₅で感作、作製した実験的自己免疫性脳脊髄炎（experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE）を用いた。

[EAEに対するFTY720単独療法の治療予後]

FTY720でEAEに完全寛解を導入できるか否かを明らかにするために、治療予後について調べた。FTY720は、極めて優れた治療効果を示したが、休薬約1週間後に重篤な再燃が確認された(図1)。再燃要因を明らかにするために、治療完了時の鼠径リンパ節中のT細胞サブセットを調べた。その結果、エフェクターメモリーT細胞(CD4⁺CD44⁺CD62L⁻T cells)とセントラルメモリーT細胞(CD4⁺CD44⁻CD62L⁺T cells)が増加していた。次に、発症時、治療完了時および休薬9日後に脾臓からCD4⁺T細胞を分取し、MOG₃₅₋₅₅ 100 µg/ml存在下で培養してサイトカイン産生能を調べた。その結果、発症時および休薬9日後で炎症性サイトカイン(interleukin (IL)-17Aおよびinterferon (IFN)-γ)の高産生が確認された(図2AおよびB)。これらのことから、二次リンパ組織に隔離されていた病因リンパ球が脊髄に移出し、重篤な再燃が生じたと考えられた。以上の結果から、FTY720単独では、完全寛解の導入は困難であることが示された。

[FTY720休薬後の再燃に対するMOG₃₅₋₅₅の併用療法の有用性]

FTY720休薬後の再燃を抑制するには、単に免疫応答を一時的に抑制するだけでなく、病因リンパ球の活性化を制御する必要がある。病因リンパ球特異的な免疫不応答(アナジー: 病因抗原に対して反応できない状態)の誘導を企図し、FTY720投与下、病因抗原のMOG₃₅₋₅₅を静脈内投与する併用療法の有用性を調べた。その結果、病因リンパ球の二次リンパ器官から脊髄への移行が顕著に抑制され、FTY720単独時にみられた休薬後の再燃が有意に制御された(図1)。

FTY720と病因抗原の併用療法は、単に休薬後の再燃を抑制するだけでなく、効果的に免疫寛容を誘導し、寛解を導入している可能性が考えられた。次に、この療法の一般化を企図して、他の自己免疫疾患である関節リウマチのモデル動物を用いて有用性を確認した。

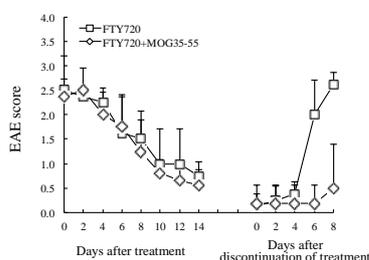


図1 休薬後の病勢の推移

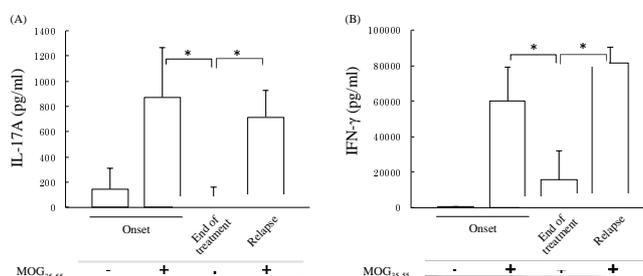


図2 MOG₃₅₋₅₅に対するCD4⁺T細胞のサイトカイン産生

関節リウマチ:

関節リウマチは、慢性、対称性、多発性およびびらん性の滑膜炎による関節構造変化および運動機能障害を主症状とする全身性の自己免疫疾患である。関節リウマチに寛解を導入することは困難で、病勢の進行で、患者の生活の質(quality of life; QOL)が著しく低下していた。最近になって、早期治療に重きを置いた診断基準の改訂、アンカードラッグであるメトトレキサートの用量上限の変更、生物学的製剤の開発等により、関節リウマチの治療予後は格段に改善した。先進的な試みとして、ドラッグフリー寛解に向けたトライアルがいくつかの生物学的製剤を用いて実施されたが、十分な完全寛解導入率を達成するには至っていない。このような背景で、高いドラッグフリー寛解を導入できる新規治療戦略の開発には強い臨床的要請がある。本研究では、DBA/1Jマウスをglucose-6-phosphate

isomerase (GPI) の部分ペプチドであるGPI₃₂₅₋₃₃₉で感作，作製した関節リウマチモデルのGPI₃₂₅₋₃₃₉誘導性関節炎を用いてFTY720と病因抗原の併用療法の有用性およびその作用機序について調べた。

[GPI₃₂₅₋₃₃₉誘導性関節炎に対するFTY720とGPI₃₂₅₋₃₃₉の併用療法の有用性]

GPI₃₂₅₋₃₃₉誘導性関節炎に対する，FTY720投与下，病因抗原のGPI₃₂₅₋₃₃₉を静脈内投与する併用療法の有用性を調べた。その結果，本併用療法はそれらの単独療法と比較して病勢の進行を有意に抑制した (図3)。

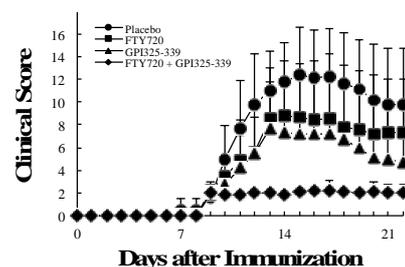


図3 FTY720と病因抗原の併用療法の有用性

[FTY720とGPI₃₂₅₋₃₃₉併用療法による免疫不応答 (アナジー) の誘導メカニズム]

本併用療法の作用メカニズムを明らかとするため，1) 病因T細胞の細胞死 (クローン消失) の程度を，propidium Iodide (PI) およびannexin Vを用いて調べた。その結果，治療完了時の鼠径リンパ節由来CD4⁺ PI⁻ annexin V⁺ T細胞 (早期アポトーシス細胞) の割合が増加していた。2) 病因T細胞の反応性を明らかとするために，CD4⁺ Foxp3⁻ T細胞 (非制御性T細胞) の内，アナジー下で発現し，免疫応答を負に制御する機能分子であるcytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) およびprogrammed death-1 (PD-1) 陽性細胞の割合を調べた。その結果，両者を発現する細胞の割合が増加し，IFN- γ やIL-17Aの産生レベルも低下していた。3) 免疫応答を抑制し，その抑制機能の発現に重要な役割を担う分子であるCTLA-4, glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-family-related gene/protein (GITR) やCD39を発現したCD4⁺ Foxp3⁺ T細胞 (制御性T細胞) の割合が増加しているか否かを調べた。その結果，三者を発現する制御性T細胞の割合が増加していた。これらのことから，本併用療法は，1) 病因T細胞の細胞死 (クローン消失) および2) 病因T細胞のアナジーの誘導ならびに3) 制御性T細胞の効果的な増殖を介して，優れた治療効果を発揮したと考えられた。

[FTY720とGPI₃₂₅₋₃₃₉併用療法が完全寛解に及ぼす効果]

上記の様に誘導した寛解状態を長期間維持できるか否かを明らかとするために，GPI₃₂₅₋₃₃₉ 誘導性関節炎を治療後，追加免疫した。placebo 群，FTY720 単独群あるいはGPI₃₂₅₋₃₃₉ 単独群では，全個体で重度あるいは中程度の再燃が確認された。一方，FTY720 と GPI₃₂₅₋₃₃₉ 併用群では，全個体で臨床症状が軽度であり，再燃が顕著に抑制されていた。このことは，組織化学的所見でも裏付けられた。本併用療法で長期間寛解が維持できる要因を明らかとするため，本併用療法で治療した個体でのみ変動がみられる細胞集団について調べた。その結果，治療完了時の鼠径リンパ節由来 Foxp3⁺ CD4⁺ T 細胞中のGITR⁺ 細胞 (GITR⁺ 非制御性 T 細胞) の割合が，本併用療法治療個体でのみ増加していた (図4)。増加していた GITR⁺ 非制御性 T 細胞の特性を明らかとするために，GITR⁺ 非制御性 T 細胞と GITR⁻ CD25⁻ CD4⁺ T 細胞 (レスポンドーT細胞) を共培養し，レスポンドーT細胞の増殖に対する抑制能を調べた。なお，対照には GITR⁺ 制御性 T 細胞 (GITR⁺ CD25⁺ CD4⁺ T 細胞) を用いた。その結果，GITR⁺ 非制御性 T 細胞は，GITR⁺ 制御性 T 細胞にはやや劣るが，有意な T 細胞増殖抑制効果を有することが示された。次に，炎症惹起時を想定し，GITR⁺ 非制御性 T 細胞と GITR⁺ 制御性 T 細胞を抗 CD3/抗 CD28 ビーズおよび IL-2 で刺激後，抑制性サイトカイン (IL-10) の産生を調べた。その結果，GITR⁺ 非制御性 T 細胞は，GITR⁺ 制御性 T 細胞と比較して顕著に IL-10 を高産生する細胞集団であることが

明らかとなった (図 5). 更に, GITR⁺制御性 T 細胞と同等レベルの CTLA-4 発現も確認された. GITR⁺非制御性 T 細胞は, FTY720 単独あるいは GPI₃₂₅₋₃₃₉ 単独で誘導できなかったことから, 誘導するためには, FTY720 による細胞が密になった状況および高用量の病因抗原による刺激の両方の要素が必要と考えられた. この GITR⁺非制御性 T 細胞が, 本併用療法によって増加し, 免疫寛容の誘導による寛解導入およびその維持に重要な役割を担っている可能性が考えられた (図 6).

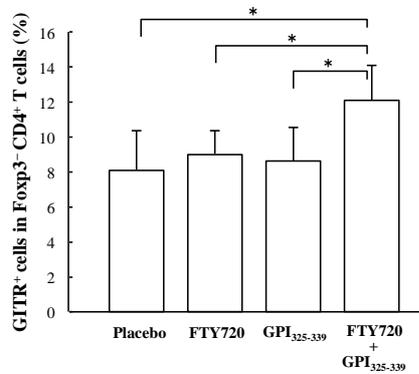


図 4 GITR⁺非制御性 T 細胞の割合

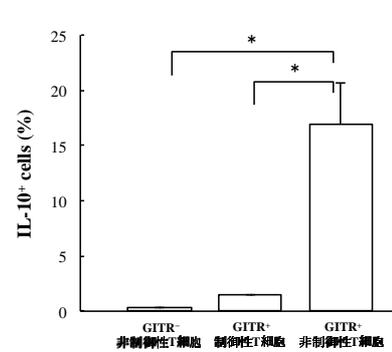


図 5 GITR⁺非制御性 T 細胞の IL-10 産生

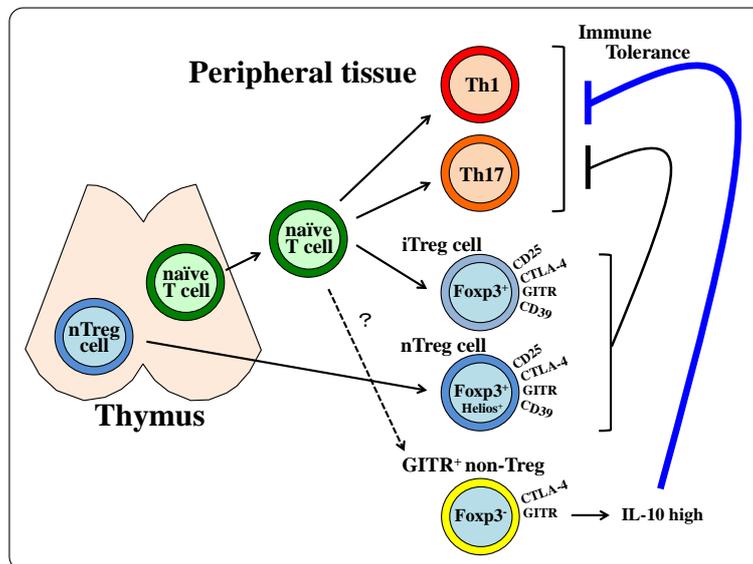


図 6 FTY720 と病因抗原の併用療法の免疫寛容の誘導および維持

最後に, 本研究の新規性および医療や薬学における位置づけについて記述する. タクロリムス水和物やシクロスポリン等の免疫抑制薬は, 病因リンパ球だけでなく, 生体防御を担うリンパ球の増殖や分化に必要な IL-2 産生を阻害し, 免疫機能全般を低下させる. そのため, 日和見感染等の有害事象の危険性が高くなる. 一方, 本併用療法に用いた FTY720 は, T 細胞の増殖・活性化には影響を及ぼさない. また, 病因抗原を用いることで, 病因リンパ球のみを特異的に抑制できるため, 日和見感染等の副作用リスクが大幅に軽減できる. さらに, FTY720 と病因抗原を併用することで, 細胞が密な状態で, 高濃度の抗原を暴露できる環境が生み出される. その結果, それら単独では誘導できない抑制系の細胞集団 (GITR⁺非制御性 T 細胞) が増加し, 新たなアナジーを誘導できる可能性がある.

本併用療法による新たなアナジーの仕組みを今後より詳細に解明できれば、多発性硬化症や関節リウマチだけでなく、自己免疫疾患一般を対象とした画期的な治療戦略構築の足がかりとなる。これによる臨床的意義は極めて大きい。