# 業的研究則可能認識。



公益財団法人 難病医学研究財団 Japan Intractable Diseases Research Foundation



## 目 次

巻頭	質の言葉	「難病財	団に思う	事」							
						監	事	鹿毛	雄二	•••••	. 3
1.	平成26	年度医学	研究奨励	助成金	<b>ご受賞</b> 者	音の研究	完報告相	死要 …	•••••		. 4
2.	平成28	年度医学	研究奨励	事業の	)応募壮	犬況にこ	ついて				26
3.	難病相	談支援セ 鹿児島	ンターの			ノター		杉田	郁子		. 26
4.	厚生労	働省の難	病対策に	関する	動向						28
5.	疾病ミ	二解説「	全身性エ	ニリテマ	トーラ	デス」に	こついて	······		•••••	. 29

## ←巻頭の言葉 ←



## 「難病財団に思う事」

公益財団法人難病医学研究財団

監事 鹿毛 雄二

(ブラックストーン・グループ・ジャパン株式会社 特別顧問)

私が難病医学研究財団の監事を仰せつかってから10年以上たつ。主に年金の資産運用の仕事に携わっていた関係で、厚生労働省や財団理事長の吉原さんのご縁でお声をかけて頂いたと思う。評議員会・理事会などで日本を代表する医学界の先生方の貴重なお話を興味深く伺うことが出来、とても有難いことと感じている。

当財団の資金面で特徴的なのは企業だけでなく、一般個人の方から多額の寄付を頂いていることである。こうした寄付について、私には忘れられない思い出がある。長期金融専門の日本長期信用銀行(長銀、現在の新生銀行)に入社してすぐの若いころ、直接の上司で指導を受け、その後長い間公私にわたりお世話になった岡本さんという方がいた。ヘビー・スモーカーのためか、20年前、60歳過ぎて肺気腫のため新宿の鉄道病院に入院された。蒸気機関車時代の国鉄(現在のJR)は、石炭の粉塵多い職場だったからだろうか、鉄道病院は肺気腫の専門家がいるということだった。ほどなく亡くなられた後葬儀の席で奥様が、当時難病とされていた肺気腫の研究のために寄付をしたい、と話されたことがとても印象的だった。欧米ではともかく当時の日本ではあまり聞かない話だったからだ。そこには担当された医師や看護師の献身的な努力への深い感謝の気持と、もう少し医学の進歩があれば救えたかもしれないという、ご本人と奥様の気持ちが滲んでいた。

ところで今春亡くなられた著名なエコノミスト、竹内宏氏は岡本さんとは高校・大学の同級生で 長銀でも職場を共にした親友であった。氏は1995年に肺気腫・余命5年と診断されたと記述している が、実際には医学の進歩と関係者のご努力の結果であろう、その時から20年以上生きられたわけだ。

もちろん肺気腫は、行政上の、患者数およそ総人口の0.1%程度といった「指定難病」の定義には含まれていないが、しかし「難病」の定義に入るかどうかとは関係なく、岡本さんの奥様のように、医師たちへの感謝と、亡き人を偲び、何とか医学の発展のためにと祈る気持ちを込め、財団に寄付される方は後を絶たない。

言うまでもなく一般に財団運営の経費は主として資金運用益で賄われる。多くの財団では投資先を最も信用力の高い国債等に限定して運用リスクを抑えている。問題は最近のマイナス金利政策である。日本や欧州等の多くの国において国債金利がマイナスとなった結果、当財団に限らず世界中の年金や財団の運用収入は激減し、その対応に四苦八苦している。個人にとっても預金利息はほとんどゼロだ。だからと言って高リスクの運用を目指しても高いリターンが保障されるわけでもなく、損失を被る可能性も高まる。多額の損失が出れば、事業が成り立たなくなる恐れすらある。マイナス金利の世界で従来通りの利息収入を期待できるはずもない。ある程度の収入減、事業縮小も覚悟し、少なくとも当面はジタバタせずに耐えるしかない。

こうしたマイナス金利の厳しい環境の下で、難病財団の研究活動が例外的に順調に支えられているのは、一つには前述のような寄付をしてくださる方々のお蔭である。私はこのような財団のお手伝いができることを大変有難く、また光栄に思う。



## 平成26年度医学研究奨励助成事業研究報告概要

#### → 医学研究奨励助成金の概要 ←

#### 1. 趣 旨

めざましい医学の進歩にもかかわらず、なお原因が解明されず治療方法も確立されていないいわゆる 難病の研究を推進するため、昭和51年度から当財団が独自で40才未満の若手研究者を対象とし、一般公 募により研究内容が将来有用と期待される研究について医学研究奨励助成金を交付し、研究の支援を行っ ている。なお、平成23年度より「臨床枠」を新設した。

#### 2. 公募対象

難病の専門分野における40才未満の国内の研究者や現に難病の診療に携わっている40才未満の医師で、厚生労働省難治性疾患政策研究事業の研究代表者、総合大学及び医科大学の医学部長または附属病院長、難治性疾患研究を行っている研究機関の長、難治性疾患の診療を行っている医療機関・研究機関の長のいずれかの推薦を受けた者を対象としている。

#### 3. 公募状況

平成26年度は、一般枠へ38名、臨床枠へ19名の応募があり、7名の専門審査委員による厳正な審査を経て10名の方が受賞することとなった。

#### 4. 助成金

1名につき200万円

#### 5. 研究報告概要等

研究報告概要は後記の通りであり、これらの研究を基に難病に対する医学研究が益々推進され、難病 患者とそのご家族や関係者に有用となることを期待している。

#### 参考 第 **39 回 贈呈式** 平成 27 年1月15日 (木) 11 時~

式次第

 (1) 挨 拶
 会 長
 髙久 史麿

 (2) 趣旨及び審査経過報告
 専務理事
 遠藤 弘良

 (3) 医学研究奨励助成金贈呈
 理事長
 吉原 健二

 (4) 祝 辞
 厚生労働省健康局長
 新村 和哉 殿

上智大学 名誉教授 青木 清 殿

(5) 受賞者代表謝辞 東京大学医学部附属病院皮膚科

助教 吉崎 歩 殿

#### → 医学研究奨励助成金受賞者の研究報告概要 ←

(註)本研究成果報告は、平成26年度(第39回)に当財団が助成した医学研究奨励助成金受賞者の研究報告概要を取り纏めたものです。

#### (一般枠)

- イムノコンプレキソーム解析による中枢神経ループスにおける新規標的分子の解析 〔一瀬 邦弘 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科先進予防医学講座(第一内科) 講師〕 研究対象疾患:全身性エリテマトーデス、中枢神経ループス
- クラス II ARFノックアウトマウスがライソゾーム病の症状を示すメカニズムを解明する 〔定方 哲史 群馬大学テニュアトラック普及推進室 講師〕 研究対象疾患:ライソゾーム病
- ゼブラフィッシュを用いたパーキンソン病のin vivo薬剤スクリーニング 〔松井 秀彰 新潟大学超域学術院 テニュアトラック准教授〕 研究対象疾患:パーキンソン病
- 無痛症における感染性関節炎の病態生理に関する研究〔丸山 健太 大阪大学免疫学フロンティア研究センター 助教〕研究対象疾患: 先天性無痛症
- 孤発性筋萎縮性側索硬化症の薬剤治療法の確立〔山下 雄也 東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター臨床医工学部門 特任研究員〕 研究対象疾患:筋萎縮性側索硬化症
- 強皮症におけるex vivo誘導性制御性B細胞の病態抑制作用と自己反応性に関する検討 〔吉崎 歩 東京大学大学院医学系研究科・医学部皮膚科学 講師〕 研究対象疾患:強皮症

#### (臨床枠)

- γ線照射療法と間葉系幹細胞を使った抗原特異的な免疫抑制療法の確立 〔笠木 伸平 神戸大学医学部附属病院 特定助教〕 研究対象疾患:多発性硬化症
- 日本最大規模患者サンプルネットワーク構築を通じた肺動脈性肺高血圧症における long non-coding RNAの機能の解明 〔片岡 雅晴 慶應義塾大学医学部循環器内科 特任講師〕

研究対象疾患:肺動脈性肺高血圧症

- 不飽和脂肪酸摂取が加齢黄斑変性に与える影響〔兼子 裕規 名古屋大学大学院医学系研究科眼科 助教〕研究対象疾患:加齢黄斑変性
- 先天性魚鱗癬様紅皮症に対する新規治療法の開発〔乃村 俊史 北海道大学病院皮膚科 助教〕研究対象疾患:先天性魚鱗癬様紅皮症

## イムノコンプレキソーム解析による 中枢神経ループスにおける新規標的分子の解析



長崎大学大学院医歯薬学総合研究科先進予防医学講座(第一内科) 講師 一瀬 邦弘

#### 【研究目的】

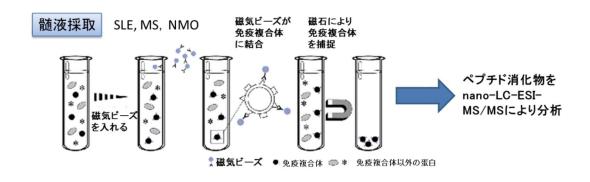
中枢神経ループス(NPSLE)は全身性エリテマトーデス(SLE)の中でも、認知機能障害、精神障害、うつ病、脳血管障害など多様な中枢神経症状を呈するが、これまでその特異的標的分子は明らかにされていない。我々はイムノコンプレキソーム法(特願2010-231935)にて同定した新規自己抗体のNPSLEにおける機能的意義を明らかしたいと考えた。

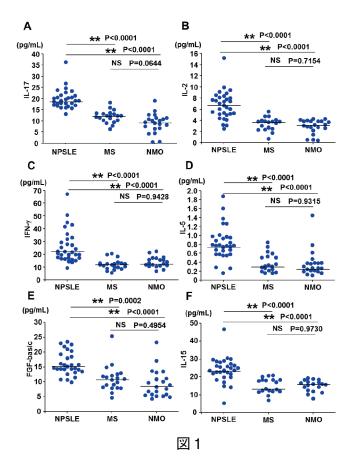
#### 【背景】

中枢神経ループス(NPSLE)の診断は症状、画像診断、髄液中のサイトカイン、抗リボゾームP抗体の検出などを用いて行われてきたが、全身性エリテマトーデス(SLE)の血清学的活動性を示さず、診断が困難な症例も少なくない。古くから髄液中の免疫グロブリン産生が亢進していることから髄液中の特異的自己抗体の存在が示唆されていたが、これまで検出頻度の高い特異性を示す自己抗体は見出されていない。一方、中枢神経系の慢性炎症性脱髄疾患である多発性硬化症(MS)や視神経脊髄炎(NMO)はNPSLEと同様にIL-6やIL-17などの炎症性サイトカインの産生が亢進し、また血液脳関門(BBB)が破壊されることにより、血清由来の免疫複合体が含まれていることが想定される疾患である。大山らは血清中で免疫複合体を形成している抗原を網羅的に解析する "イムノコンプレキソーム解析法"を 新たに開発し(特願2010-231935)、関節リウマチ患者の血清試料へ応用した(Clin Chem. 2011 Jun; 57(6):905-9、)。今回我々は同様の手法を用いてNPSLE患者の髄液から免疫複合体の検出を行った。

#### 【研究結果】

方法としては免疫複合体をProtein G 固定化磁気ビーズで捕集しペプチド消化物をnano- LC-ESI-MS/MSにより分析し、解析ソフト (BioworksTM, v.3.3) とデータベース検索 (International Protein Index, v.3.67) でタンパク質を同定するというものである。今回、我々は同法を用いてNPSLE患者の髄液試料へ応用し、MS群及びNMO群では全く検出されず、NPSLE群でのみ高頻度に検出された抗原タ





ンパク質suprabasin (SBSN) に着目をした。 さらにNPSLE患者における、髄液中のサイトカイ ンプロファイルについて検討を行い、診断に有用 なマーカーを検索した。さらにNPSLE群、MS群、 NMO群患者の髄液をBio-Plex ProAssaysを用い て同時に27種類のサイトカイン、ケモカイン、成 長因子について検討を行った。その結果、IL-17, IL-2, IFN-γ, IL-5, FGF-basic, IL-1511NPSLE 群と他の2群とを判別する有用なマーカーであ ることが明らかとなった(図1)。また抗SBSN 抗体のアッセイ法として、カイアシルシフェ ラーゼ免疫沈降法を利用して、SBSNを認識する 抗体(免疫グロブリンGクラス)の検出法を確 立した。その結果、髄液中/血清中抗SBSN抗体 はNPSLE群において、中枢神経症状を伴わない SLE群、MS群、NMO群と比して有意に高値で あった。現在、サンプル数を増やし、そのアッ セイ系の有用性を確認している。さらに、

NPSLE患者の髄液では抗老化作用を有するKlothoタンパクの発現低下を来していることが明らかとなり、抗SBSN抗体による機能変化の一つとして細胞の老化シグナルがマイクロアレイによる解析で有意に変化していることが分かった。

#### 【成果論文】

- 1. Ichinose K et.al;Distinguishing the cerebrospinal fluid cytokine profile in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus from other autoimmune neurological diseases. Clin Immunol. 2015 Apr; 157(2):114-20. doi: 10.1016/j.clim.2015.01.010.
- 2. Ichinose K et.al; Predictors of clinical outcomes in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. Cytokine. 2016 Mar; 79:31-7. doi: 10.1016/j.cyto.2015.12.010.
- 3. Ushigusa T, Ichinose K et.al; Soluble  $\alpha$ -klotho is a potential biomarker associated with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. Clin Immunol. 2016 Mar 4;165:29-34. doi: 10.1016/j.clim.2016.03.001.

#### 【謝 辞】

本研究を遂行するにあたり多大なご支援を賜りました公益財団法人難病医学研究財団の関係者の 方々に深く御礼申し上げます。

## クラス II ARFノックアウトマウスがライソゾーム病の 症状を示すメカニズムを解明する



定方 哲史 群馬大学テニュアトラック普及推進室 講師

#### 【目 的】

我々が細胞内トラフィッキングに関与する●●●タンパク質のノックアウト(KO)マウスを作製し たところ、中脳網様部特異的に、強い自家蛍光が見られることを見出した。波長特性からこの自家蛍 光はリポフスチンであると考えられた。リポフスチンは、細胞質内の不飽和脂肪酸の過酸化によりラ イソゾーム内に形成される不溶性色素である。ライソゾームによって細胞内消化されたミトコンドリ アの残余物質であり、加齢性色素あるいは消耗性色素とも呼ばれる。リポフスチンが脳内に蓄積する 疾患はセロイドリポフスチノーシスと呼ばれ、ライソゾーム病に分類される。セロイドリポフスチノー シスは発育不全が認められ、急激な筋肉の収縮、けいれん、精神運動発達の障害を示す疾患である。 一方、このマウスも頸部に強い振戦を示し(図1)、ライソゾーム病様の行動形質を示す。

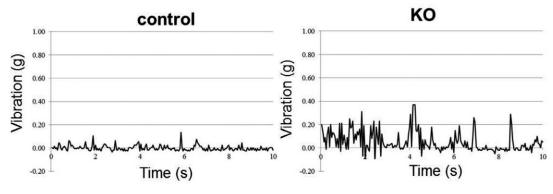


図 1 マウスを尻尾で吊り下げた場合の震度

我々は●●●タンパク質のKOマウスの解析を行い、ライソゾーム病の発症メカニズムの解明と治療 法の検討を試みた。

#### 【結 果】

我々は各種薬剤を用いて、振戦に対する効果を検討してきた。その結果、このKOマウスにβ遮断薬 であるpropranololや抗てんかん薬であるgabapentinを投与すると振戦の軽減が見られた(図2)。

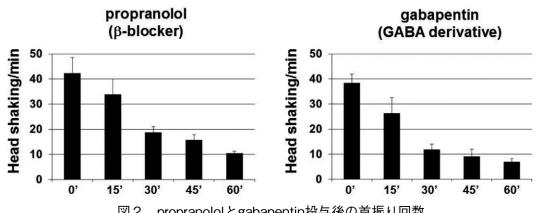


図2 propranololとgabapentin投与後の首振り回数

このマウス覚醒時の脳波(EEG)、筋電図(EMG)を測定したところ、安静時から姿勢を変える際(点線)に著しい振戦と異常脳波が観察された(図3)。

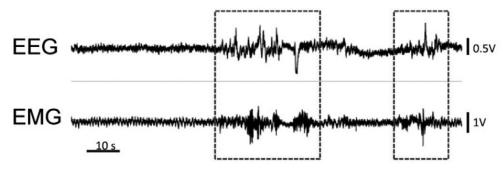


図3 覚醒時の脳波(EEG)、筋電図(EMG)

このKOマウスに関する解剖学的解析を行ったところ、小脳プルキンエ細胞の樹状突起上に野生型では見られないIP3受容体の免疫染色性の大きな塊が見られた(図4)。これを電子顕微鏡にて観察したところ、多層化した小胞体のような異常な構造物が見られた(図5)。

また、小脳プルキンエ細胞の軸索起始部にある特定のNa<sup>+</sup>チャネル(Nav1.6)が消失していた。電気 生理学的な解析を行ったところ、Na<sup>+</sup>チャネルの消失によると思われるプルキンエ細胞の活動性に異常 な低下も見られた。さらに、小脳の体積の減少、プルキンエ細胞の樹状突起上におけるスパイン密度 の増加、小脳登上線維の長さの減少等、解剖学的な異常が小脳において集中してみられた。

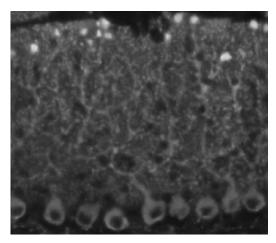


図4 小脳の IP<sub>3</sub>受容体の免疫染色性

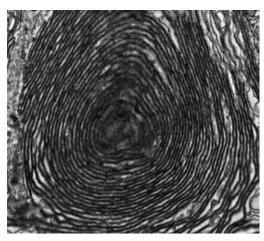


図5 小脳の多層化した小胞状の構造物

我々はアデノ随伴ウイルスにより、プルキンエ細胞特異的に●●●タンパク質を発現させた。その結果、解剖学的には、上記のプルキンエ細胞樹状突起上にあったIP₃受容体の免疫染色性の大きな塊が減少し、軸索起始部のNav1.6チャネルの免疫染色性が回復した。また、震戦の低減も確認された。

#### 【考察】

小脳に関しては、その機能異常は運動失調をもたらすと考えられており、振戦との結びつきに関しては反論する意見もあり、議論の的となっている。しかし、我々の結果から、小脳のプルキンエ細胞の異常が、ライソゾーム病で見られる振戦の主たる原因である可能性が高い。我々はさらなる詳細な解析を行うことで、振戦が起きるメカニズムの解明を試みる予定である。

#### 【論文】

Mayu Hosono, Yo Shinoda, Touko Hirano, Yasuki Ishizaki, Teiichi Furuichi, and Tetsushi Sadakata. *Neurosci Lett.* 617:p232-235 (2016).

## ゼブラフィッシュを用いたパーキンソン病の in vivo薬剤スクリーニング



新潟大学超域学術院 テニュアトラック准教授 松井 秀彰

パーキンソン病はドパミン神経や他の部位の神経の変性を来す神経変性疾患であり治療は未だ症状を緩和する "対症療法" や不足する物質を補う "補充療法" にとどまります。そういった難病に対してよりよい治療方法を見つける場合、少なくとも3つの方法が考えられます。第一は原因をしっかり解明しその原因に対してアプローチする方法であり、パーキンソン病の場合であればなぜ神経細胞が死んでいくかという点の根本原因が分かれば、治療法の開発に向け大きなステップアップとなります。ただし残念ながら疾患の最初の記載から100年が経つ現在でも、細胞死の原因は不明のままです。第二は最近特に日本では注目を集めている再生医療で、iPSやES細胞を用いて失われた細胞を補う方法です。これは広い意味での補充療法であり、予算の面からも国民からもとても大きな期待がかけられていますが、移植した神経細胞もパーキンソン病を発症することが既にわかっています。また再生医療は他の治療との併用も期待され、やはりパーキンソン病そのものの治療を見つけることは変わらず必要とされています。第三はなんらかの疾患の指標を利用して、疾患改善の可能性のある薬剤を網羅的に検索する方法です。効くか効かないかわからない物質を患者さんにむやみに投与することは、これは倫理的に大問題ですし、また仮にマウス等を使ってやるにしてもそういった比較的大型の動物ではせいぜい数種類の薬剤を検討するのが精一杯です。またパーキンソン病の場合はよいモデル動物を作製するという面でも困難が立ちはだかります。

私達は今から10年前にメダカやゼブラフィッシュといった小型魚類の新規疾患モデルとしての可能性にいち早く着目し、これまでパーキンソン病や脊髄小脳変性症の疾患モデル魚類の作製を行ってきました。特に最近では稚魚の段階で顕著な神経変性を来すパーキンソン病モデルと脊髄小脳変性症モデルの作製に成功しています。これらはもちろん当該疾患の病態解明にも役立つものです。しかしさらに小型魚類の有用な点は、治療薬の検索、特に小型魚類の特性を生かして網羅的に多数の化合物・薬剤の効果を探索する事ができる点です。この強みを最大限に活用し、私達は難病医学研究財団の平成26年度医学研究奨励助成金助成金を受け、小型魚類を用いた治療薬検索のシステム確立のため以下の項目に取り組みました。

#### 1:疾患モデル小型魚類の作製と比較

既に私達は複数のパーキンソン病モデルを作製済みですが、近年のTALEN、CRISPRといった遺伝子工学技術の登場により、より自在に遺伝子改変を行うことができるようになりました。そのTALENやCRISPRを用いて家族性パーキンソン病の原因遺伝子であるPINKI、ATP13A2、GBA等の家族性パーキンソン病の原因遺伝子を破壊したゼブラフィッシュを作製いたしました(図1)。

それらのモデルはいずれもドパミン神経 およびノルアドレナリン神経の変性を来た すことを確認しました。

#### PINK1 KO (CRISPR)

CCGGCCGGTACCGCTTCTTCAGGTTGTCTGTCAGCGGGCT	Wild type
CCGGCCGGTACCGCTTC [TTC] AGGTTGTCTGTCAGCGGGCT	$\Delta 3$
CCGGCCGGTACCGCT [TTC→G] TCAGGTTGTCTGTCAGCGGGCT	$\Delta 2$
CCGGCCGGTAC [CGCTTCTTC] AGGTTGTCTGTCAGCGGGCT	$\Delta 9$
ATP13A2 KO (CRISPR)	
CATCCTCCCCTGACACTGAACCCCTCATAAAGGATCCAAGACC	Wild type
CATCCTCCCCTGACACTGAACCCC [TCA] TAAAGGATCCAAGACC	Δ3
CATCCTCCCCTGACACTGAACCCCTC [AT] AAAGGATCCAAGACC	$\Delta 2$

GBA KO (TALEN)

TGCTGCCAGATGCTGGTCAGTTCTTATCATATGTCAGCAATAAAGCTGGCAGCA	Wild type
TGCTGCCAGATGCTGGTCAG [TTCTTATCATATGTCAG] CAATAAAGCTGGCAGCA	Δ17
TGCTGCCAGATGCTGGTCAGTTCTT [ATCATATGTC→GCT] AGCAATAAAGCTGGCA	AGCA Δ7
TGCTGCCAGATGCTGGTCAGTTCT [TATCAT] ATGTCAGCAATAAAGCTGGCAGCA	$\Delta 6$

CATCCTCCTCCCCTGACACTGAACCCCT [CAT→GAACTAAGGATCC] AAAGGATCCAAGACC +10

図1: CRISPRおよびTALENにて作製したパーキンソンモデルの例 赤字はTALENないしはCRISPRによる切断部位を示す。 青字はTALENの認識site。

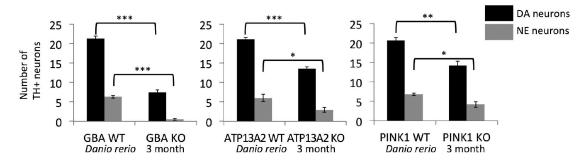


図2: パーキンソンモデルの神経変性 いずれのモデルも3ヶ月でドパミン神経およびノルアドレナリン神経の有意な減少を認める。

今後はこれらのモデルと申請者自身の保持する従来のモデルと比較を行い、稚魚の段階で、パーキンソン病の表現型をより明白に呈するものを選択していきます。またいくつかのモデルを交配することにより、より明白な表現が得られる可能性もあり、そちらも並行して取り組んでいます。

#### 2:疾患評価指標の開発

疾患の状態を評価する指標は神経細胞の蛍光画像取得を用います。既にドパミン神経や小脳Purkinje 細胞の細胞数計測等は申請者が確立しています。しかしドパミン神経の評価は現在では抗体染色やin situ hybridizationによらなければなりません。その実験作業は簡便とは言えず、網羅的な解析には適していません。私達はDopamine transporterというドパミン神経に特異的に発現を示すものの遺伝子にCRISPRを用いてRFPタグをノックインかつ付加する事で、ドパミン神経細胞数の評価を確立することに取り組みました。しかし多数の方法を試しましたが、結局ドパミン神経をきれいに標識できる個体の樹立には至りませんでした。

そのため現在はターゲットの遺伝子をDopamine transporterではなくVMAT2に変更し、そちらによるドパミン神経およびノルアドレナリン神経の標識に取り組んでいます。

#### 今後の課題

今後も引き続き明白な表現型を呈するパーキンソン病モデルを選択すること、ならびにドパミン神経の最適な標識方法を検索することに取り組みます。それらにより小型魚類パーキンソン病モデルの稚魚を薬剤スクリーニングに用い治療薬の探索を行うためのセットアップに取り組みます。さらに同様の方法でいずれも難病である筋萎縮性硬化症や脊髄小脳変性症、アルツハイマー病等の他の神経変性疾患や、より複雑な神経難病・精神疾患への適応拡大を目指していきます。

最後に、本研究の概略を示すとともに(図3)、本研究をご支援いただいた難病医学研究財団ならびに関係者の皆様に深く感謝いたします。

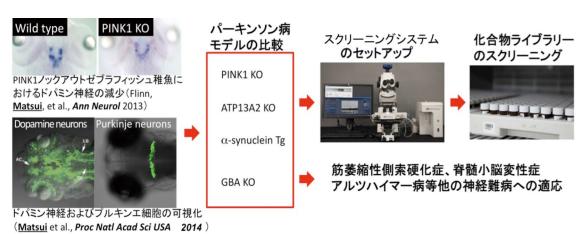


図3:本研究の概略

#### 無痛症における感染性関節炎の病態生理に関する研究



大阪大学免疫学フロンティア研究センター 助教 丸山 健太

#### 目的

先天性無痛症は、NGF  $\beta$  subunit やNuropathic Tyrosine Kinase Receptor Typelの変異によって引き起こされる温痛覚消失を伴った常染色体劣性の遺伝病である。温痛覚を担う後根神経節は有髄のA  $\delta$  繊維と無髄のC繊維からなる自由神経終末を抹消に投射しているが、先天性無痛症ではこれらの神経繊維が選択的に欠損する。また、先天性無痛症患者には火傷、脱臼、重篤な四肢骨折、細菌/真菌性の関節炎、骨髄炎といった障害が多発する。こうした易感染性・易骨関節破壊性は身体に異常な力が加わってもそれを感知できないことが原因であると漠然と考えられているが、それを裏付ける科学的根拠は乏しい。また、現時点において感覚神経系と炎症性骨破壊の関連を調べた研究は存在せず、先天性無痛症患者の易感染・易骨関節破壊性といった病態理解のためには自然免疫—感覚神経—破骨細胞系のクロストーク解明を通じた研究が不可欠である。そこで本研究では痛覚神経を選択的に除去したマウスとカンジダを用いた真菌性炎症性骨関節破壊モデルを駆使することで、感覚神経の骨免疫系における機能の解明を目指した。

#### 結 果

痛覚神経は辛子の受容体であるTRPV1というイオンチャネルを発現しており、この受容体を持続的に活性化させると痛覚神経が死滅することが知られている。そこでResiniferatoxinと呼ばれるTRPV1のアゴニストをマウスに投与し、TRPV1陽性神経を選択的に除去したマウスを作製した。驚くべきことにこのマウスは骨破壊の亢進を伴った重篤な骨粗鬆症を示し、カンジダ細胞壁成分局所投与による関節破壊モデルの炎症と骨破壊が著しく増悪していた。また、カンジダを足底皮下に感染させたところ、激しい炎症と骨破壊が観察され、TRPV1陽性神経は真菌性の炎症と骨破壊を抑制する細胞であることが明らかとなった。黄色ブドウ球菌の感染においても同様に骨髄炎の増悪が観察されたが、その程度はカンジダ細胞壁成分局所投与やカンジダ感染と比較して軽度であったことから、カンジダ細胞壁成分を認識する受容体がTRPV1陽性痛覚神経に分布しているとする仮説をたて検証をおこなった。その結果、カンジダ細胞壁成分を認識する数種類の受容体が後根神経節細胞に発現していることが判明した。これらの受容体はNav1.8と呼ばれる疼痛惹起性イオンチャネルと共発現していることも示唆されたため、次にNav1.8陽性痛覚神経を遺伝学的に除去したマウス(Nav1.8Cre-Rosa26DTAマウス)を作製した。Nav1.8Cre-Rosa26DTAマウスはカンジダ細胞壁成分やカンジダ感染によって生じる痛みが完

全に消失するとともに重篤な骨粗鬆症を呈した。また、このマウスの痛覚神経線維におけるTRPV1ならびにカンジダ細胞壁成分を認識する受容体群の発現は著しく低下しており、カンジダ細胞壁成分やカンジダ感染による骨髄炎も著明に増悪していた。このことは、Nav1.8陽性神経が真菌随伴疼痛の発生ならびに真菌性骨髄炎の抑制を担う細胞であることを示唆している。実際、当該神経細胞をin vitroで培養しカンジダやカンジダ細胞壁成分で刺激すると細胞外からの著明なカルシウム流入が観察され、痛覚神経が直接真菌によって活性化されることが判明した。次に、カンジダ細胞壁成分を足底に投与したNav1.8Cre-Rosa26DTAマウス血清を採取し、痛覚神経において特異的に発現する神経ペプチド5種類の濃度を測定した。その結果、神経ペプチドX(未公開)の著明な血中濃度上昇が野生型マウスで観察された一方、Nav1.8Cre-Rosa26DTAマウスでは消失していた。そこで、神経ペプチドXをカンジダ細胞壁成分とともにNav1.8Cre-Rosa26DTAマウスの足底に投与したところ、炎症と骨破壊は野生型マウスと同等にまで抑制された。また、神経ペプチドXはin vitroにおいて真菌成分に対する単球由来の炎症性サイトカイン産生を強力に抑制し、破骨細胞の融合を障害した。以上より、Nav1.8陽性痛覚神経はカンジダ細胞壁成分を直接認識して痛みを発生させると同時に、神経ペプチドXの放出を介した炎症と骨破壊の抑制を担う「レギュラトリーニューロン」であることが明らかとなった。



図1. Nav1.8陽性感覚神経を遺伝学的に除去したマウスの足底に カンジダ細胞壁成分を投与すると、炎症と骨破壊が増悪する

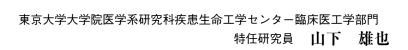
#### 将来展望

今後は神経ペプチドXの抗炎症・破骨細胞融合抑制の分子機序を明らかにするとともに、細胞外マトリクスと高い親和性を持った局所滞留型の神経ペプチドXの人工合成を試みることで、先天性無痛症の炎症性骨破壊治療薬の開発を目指した研究を進める。

#### 謝辞

本研究の遂行にあたり多大なご支援を賜りました難病医学財団関係者の方々に深く御礼申し上げます。

#### 孤発性筋萎縮性側索硬化症の薬剤治療法の確立





#### 【研究背景と目的】

孤発性筋萎縮性側索硬化症(ALS)の分子病態モデルであるRNA編集酵素ADAR2(adenosine deaminase acting on RNA 2)のコンディショナルノックアウト(AR2)マウスの解析から、RNA編

集異常に伴うAMPA受容体からの過剰な Ca<sup>2+</sup>流入がALSの病因と神経細胞死に関 与していることを見出した (図1)。した がって、AMPA受容体のCa<sup>2+</sup>流入を抑え ることが根本治療薬のないALSの治療薬 になり得ると考えられた。そこで、本研究では抗てんかん剤として承認された非 競合性AMPA受容体アンタゴニストXをモデルマウスであるAR2に投与することで治療効果を発揮するか検討を行った。

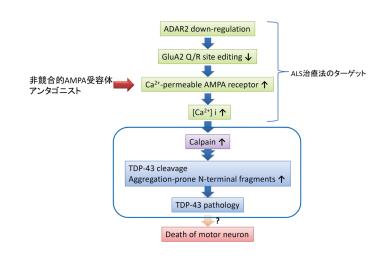


図1. ADAR2 downregulationから細胞死に至るカスケード

#### 【方 法】

AMPA受容体のCa<sup>2+</sup>流入を抑制する非競合性AMPA受容体アンタゴニストXをヘテロ接合体AR2HマウスとAR2マウスに短期投与(2週間)を行い、薬剤容量の検討と短期の治療効果を検討する。短期投与に基づき指摘濃度で、長期投与(90日間)により運動機能(ローターロッドテスト、グリップパワーテスト)、運動ニューロン変性への治療効果(運動ニューロン数、TAR DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43) の免疫組織化学)を検討した。

#### 【結果および考察】

短期のヘテロ接合体AR2Hマウスへの投与では、一過性の無動が用量依存性に観察されたが、次回の投与時期(24時間後)までには正常化し、この一過性の無動も投与回数を重ねるに従い軽減した。投与終了後の組織学的観察で、運動ニューロンにおける細胞数の増加、TDP-43の細胞内局在は濃度依存的に有意に正常化した。AR2Hマウスに投与した最大用量をホモ接合体AR2マウスに投与した結果でもTDP-43の細胞内局在の正常化が観察された(図2;TDP-43消失細胞が減り、核-細胞質にTDP-43が染

色する細胞が増加した)。短期投与の結果を踏まえて、運動機能低下への治療効果を検討するために、AR2マウスを用いて90日間の長期連続経口投与を行った。ローターロッド、グリップパワーテストによる運動機能の調査の結果、投与マウスでは有意に運動機能低下が抑えられた。ALSの臨床症状、運動ニューロン変性の進行の結果は、運動ニューロン数、TDP-43の細胞内局在の分布を定量中である。また、全てのマウスが90日間のAMPA受容体アンタゴニストX投与を完了し、認容性が高いことが示された。

#### 【今後の展望】

長期投与により運動ニューロン数、TDP-43の細胞内局在の分布を定量し、論文投稿を進める。また、今までのADAR2の遺伝子治療法(Yamashita et al., EMBO Mol Med 2013)とAMPA受容体アンタゴニストXの短期投与の結果から、TDP-43の細胞内局在の正常化は、細胞内Ca²+の正常化を反映していると考えられ、ALS病態の評価およびその治療効果に対するバイオマーカーとしても有用であると考えられる。ADAR2の発現低下による細胞死カスケード(図1)が孤発性ALSの病因メカニズムに働くとする我々の仮説が正しければ、AMPA受容体アンタゴニストXによる孤発性ALSの治療は、効果が期待できるものであると考えられ、この高選択的非競合的AMPA受容体アンタゴニストXを筋萎縮性側索硬化症治療薬としての応用を進めていく予定である。

最後に本研究を遂行するにあたり多大なご支援を賜りました公益財団法人難病医学財団の関係者の 方々、ご寄附を頂いた方々に深く御礼申し上げます。またAMPA受容体アンタゴニストXを供与して くださいましたエーザイ株式会社に感謝いたします。

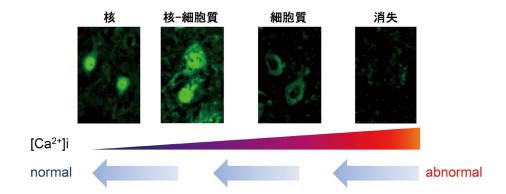


図2. カルシウムイオン濃度におけるTDP-43の細胞内分布. TDP-43は、細胞内カルシウムイオン濃度の増加で局在が変化する。 正常細胞では、TDP-43は核に存在するが、カルシウムイオン濃度の増加に 伴い核から、核と細胞質、細胞質、消失の過程をとる。 AR2マウスの脊髄では、前角細胞の多くでTDP-43が消失する。

## 強皮症におけるex vivo誘導性制御性B細胞の 病態抑制作用と自己反応性に関する検討

東京大学大学院医学系研究科・医学部皮膚科学 講師 吉崎 歩

#### 【研究の目的】

全身性強皮症(systemic sclerosis; SSc)は皮膚硬化と内臓諸臓器の線維化を主徴とする予後不良の自己免疫疾患であり、我が国の特定疾患(いわゆる難病)に指定されている。自己抗体の種類が病型や予後と大きく相関することが報告されており、自己抗原に対する反応性が病態の形成に深く関わることが示唆されているが、その機序は未だ不明瞭である。ステロイドや免疫抑制薬が症状の改善に有効であることも、自己免疫が病因であることを強く疑わせるが、これらの薬剤はSScを治癒するには至らず、また例え症状を改善させることが出来たとしても、患者は副作用のためにQOLを大きく障害されることになる。このため、更なる研究の発展と、新たな治療法の開発が急務である。

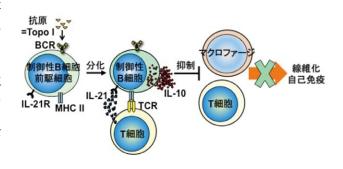
近年、申請者らによってB細胞上のMHC class II (MHC II) とT細胞受容体 (TCR) を介した抗原特異的反応が、抑制性のサイトカインであるインターロイキン (IL) -10を産生する制御性B細胞を誘導し、自己免疫疾患の抑制に大きく関わることが示され、大きな注目を集めている (Yoshizaki A et al, Nature 491: 264-8, 2012)。本研究ではSScモデルマウスを用いて、制御性B細胞の機能解析を行い、SScに対する新たな治療ターゲットの同定と、新規治療法の開発を行った。

#### 【研究結果】

SScマウスモデルを作成し、制御性B細胞の検討を行った。ブレオマイシン(bleomycin; BLM)誘発 SScモデルマウスにおける制御性B細胞の数は、コントロールマウスと比較して有意に減少を認めていた。BLM投与前にコントロールマウスより得られた制御性B細胞を養子移入したところ、有意に皮膚硬化と肺線維化の抑制を認めた。さらに、BLM誘発SScモデルマウスより得られた制御性B細胞は、コントロールマウスの制御性B細胞より有意な皮膚硬化と肺線維化の抑制作用を発揮した。制御性B細胞の養子移入は、皮膚および肺におけるIL-4, IL-6, IL-17のmRNA発現と、血清中における蛋白発現を有意に抑制したが、その抑制効果はBLM誘発SScモデルマウスから得られた制御性B細胞で強く認められた。

SScにおける制御性B細胞の疾患抑制効果に関して、自己抗原特異性がどのように影響しているかを 検討する目的で、topo I誘発SScマウスモデルを用いて検討を行った。Topo I特異的ex vivo誘導性制御

性B細胞は、コントロールマウスより抽出したex vivo誘導性制御性B細胞よりも強く皮膚及び肺の線維化を抑制した。IL-4, IL-6, IL-17のサイトカインについても同様に、topo I特異的ex vivo誘導性制御性B細胞はtopo I非特異的なex vivo誘導性制御性B細胞よりも有意に皮膚および肺のmRNA発現と血清中の蛋白発現を抑制した。



#### 【考察】

B細胞から抑制性のサイトカインであるIL-10が産生されることは古くから知られており、2000年には潰瘍性大腸炎においてB細胞から産生されるIL-10が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。我々の所属するグループではIL-10を産生する新しいB細胞サブセットを同定し、制御性B細胞と名付けられたこの細胞が多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、接触性皮膚炎、糖尿病、関節リウマチの動物モデルに治療効果を示すことを報告してきた(Kalampokis I, Yoshizaki A et al, Arthritis Res Ther 15 Suppl 1: S1 Review, 2013)。しかし、その作用機序は不明確であり、制御性B細胞から産生される微量のIL-10がどのように炎症反応を抑制するのかの解明が課題であった。また、生体から得られる制御性B細胞の数は極めて少なく、これを用いた臨床応用は現実的ではなかった。我々はex vivoで制御性B細胞を誘導する独自の手法を開発し、制御性B細胞の機能発現には、T細胞から産生されるIL-21と、MHC IIを介した抗原特異的な相互作用が重要であることを発見した(Yoshizaki A et al, Nature 491: 264-8、2012)。図に示した通り、今回の結果から、SScにおいても制御性B細胞はSScの主要な病態である皮膚硬化と肺線維化に対して疾患抑制効果を発揮し、しかもその効果は自己抗原特異的な機序で起こっていることが明らかとなった。今後、安全性などのさらなる検討を行い、SScの新たな治療法として、制御性B細胞を用いた細胞療法が確立されることが期待される。

#### 【謝 辞】

本研究は公益財団法人難病医学研究財団平成26年度医学研究奨励助成事業からの支援を頂き、遂行することができました。本研究をさらに発展させ、難病克服の一助となりますよう、今後も精一杯頑張らせて頂きたいと思います。最後になりましたが、財団のご関係の皆様に、この場を借りて深くお礼申し上げます。

#### 【文献】

- 1. <u>Yoshizaki A</u>, Sato S: Abnormal B lymphocyte activation and function in systemic sclerosis. *Ann Dermatol*. 27: 1-9, 2015.
- 2. <u>Yoshizaki A.</u> Blymphocytes in systemic sclerosis: Abnormalities and therapeutic targets. *J Dermatol.* 2016; 43(1): 39-45.
- 3. <u>Yoshizaki A</u>, Taniguchi T, Saigusa R, Fukasawa T, Ebata S, Numajiri H, Nakamura K, Yamashita T, Takahashi T, Toyama T, Asano Y, Tedder TF, Sato S. Nucleosome in patients with systemic sclerosis: possible association with immunological abnormalities via abnormal activation of T and B cells. *Ann Rheum Dis*. 2016, in press.

## γ線照射療法と間葉系幹細胞を使った抗原特異的な 免疫抑制療法の確立

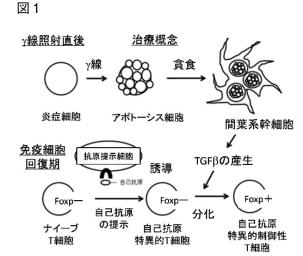


神戸大学医学部附属病院 特定助教 笠木 伸平

#### 背景

間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem cells, 以下MSCs)は将来的に、骨、筋肉、軟骨、脂肪、結合組織(間葉系とよばれる)などに変化する元となる細胞(幹細胞)である。MSCsは、主に、間葉系に分化するが、それ以外の系の細胞にも分化することから、再生医療の一旦を担うことが知られている。多くの難病指定を受けている自己免疫疾患(膠原病)は間葉系が免疫異常により障害される病気であり、MSCsの様々な免疫調整作用の報告が蓄積されていることもあり、MSCsの自己免疫疾患における臨床応用が期待されている。しかし、MSCsを使った治療の研究はいまだ報告が少なく、具体的な利用方法については今後の課題となっている。今回、難病医学研究財団より助成金をいただき、この臨床応用の方法を確立するため、研究に着手した。私のこれまでの研究で、免疫異常の原因となる(増殖能力も高い)活性化リンパ球にγ線で細胞死を誘導すると、リンパ球の死骸を食べるのを専門とする白血

球(マクロファージ)に貪食され、マクロファージが大量のサイトカイン(TGF $\beta$ )を産生し、その後に自己抗原を与えることで、自己免疫異常が改善することを発見し、研究を蓄積してきた。MSCsはマクロファージと比較して、リンパ球の死骸を食べる作用は弱いが、免疫抑制作用や失われた結合組織に分化する作用などの特殊な作用を持つことから、MSCsの利点を最大限いかせる治療法を模索する。本研究では、リンパ球の細胞死を誘導する $\gamma$ 線照射とMSCsを組み合わせた治療法(マクロファージをMSCsに置換する)の臨床効果について検討を行った。(右上:図1)



#### 方法

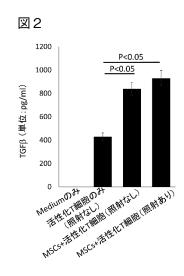
 $In\ vitro$ の実験では、予めPMA+Ionomycinで活性化されたマウスのT細胞に  $\gamma$  線照射を照射した場合と照射しない場合それぞれにおいてMSCsと共培養を行い、培養上清中のTGF  $\beta$  濃度を測定した。 $In\ vivo$ の実験では、C57Bl6マウス(雌)に200Radの  $\gamma$  線照射を行い、引き続いて、マウスの血液内にMSCs(1,000,000個/個体)を投与した。  $\gamma$  線照射による細胞死といった影響からほぼ回復する3週間後(実験開始0日目)に、マウスに実験的自己免疫性脳脊髄炎を誘導し、その後のマウスの脳脊髄炎の重症度を検討した。(1)  $\gamma$  線照射、(2) MSCs単独(3) 併用療法(4) 無治療の4つのグループに分けて検討

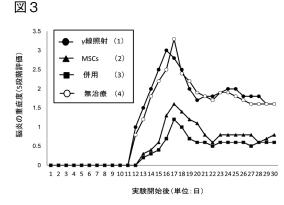
を行った。各群には10匹のマウスを用意し、実験的自己免疫性脳脊髄炎の神経症状に応じて5段階評価を毎日2人の検者で行い、10匹の5段階評価の平均をプロットした。

#### 結 果

まず、 $\gamma$ 線照射とMSCsを組み合わせた治療法が $In\ vitro$ レベルでTGF  $\beta$ を産生するかどうかを検討するため、予めPMA+Ionomycinで活性化されたマウスのT細胞に $\gamma$ 線照射を照射した場合と照射しない場合それぞれにおいてMSCsと共培養を行い、培養上清中のTGF $\beta$ 濃度を測定した。その結果、T細胞に $\gamma$ 線照射を照射するかしないかにかかわらず、MSCsと共培養によってTGF $\beta$ 濃度の上昇を認めた。(右:図2)次に、 $\gamma$ 線照射とMSCsを組み合わせた治療法が実験的自己免疫性脳脊髄炎の発症を抑えるのかどうかを検討するために(1)  $\gamma$ 線照射、(2) MSCs単独(3) 併用療法(4) 無治療の4つのグループに分けて検討を行った。興

味深いことに(1) $\gamma$ 線照射と(4)無治療では脳脊髄炎の重症度においては差がなく、(2)MSCs単独と(3)併用療法では前者よりも脳脊髄炎の重症度は低い傾向にあった。しかしながら、(2)と(3)の両者の間では、脳脊髄炎の重症度は大きな差を認めなかった。(1)と(4)には差を認めなかったことから、 $\gamma$ 線照射により、細胞死することが実験結果に影響した可能性は少ないと考えられた。(2)と(3)には差を認めなかったこともまた、それを補足していると考えられる。一方で(2)と(3)





がともに(1)と(4)よりも重症度が低いということは、機序は不明ではあるが、MSCsを大量に血液中に移入することで、脳脊髄炎の重症度は抑えられ、 $\gamma$ 線照射との組み合わせではその抑制作用は増強されないと考えられた。(右上:図3)

#### 考察

以上のことから、活性化T細胞とMSCsを組み合わせにより、 $In\ vitro$ ではTGF  $\beta$  が産生されることが分かった。予想に反して  $\gamma$  線照射により細胞死させるか否かは実験結果には影響を与えなかった。一方では実験的自己免疫性脳脊髄炎の実験系でも  $\gamma$  線照射とMSCsの組み合わせは、MSCsの単独と比較して、抗炎症作用はほとんど差がなかったことから、  $\gamma$  線照射により細胞死を誘導させるかどうかは影響を与えないと考えられた。この理由としては、MSCsそのものが、活性化T細胞との相互作用を起こすことで、何等かの免疫学的な機序で免疫抑制作用を持つと考えられるが、それは、  $\gamma$  線照射による細胞死の誘導と直接関連がない可能性が示唆された。今後、引き続き、MSCsの臨床応用を目指した研究を継続していく予定である。最後に、本研究を遂行するにあたり、多大なるご支援を賜りました難病医学研究財団の関係者の方々に深く御礼申し上げたい。

## 日本最大規模患者サンプルネットワーク構築を通じた肺動脈性肺高血圧症におけるlong non-coding RNAの機能の解明



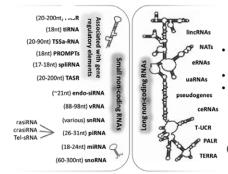
慶應義塾大学医学部循環器內科 特任講師 片岡 雅晴

#### 【研究背景と目的】

肺動脈性肺高血圧症(以下、PAH)は、肺動脈圧の上昇から右心不全を発症しうる生命予後不良の難治性疾患である。肺動脈性肺高血圧症Pulmonary Arterial Hypertension(PAH)は、肺動脈の内膜や中膜の肥厚を原因として肺動脈圧が上昇し、右心不全を起こす生命予後不良の難病疾患である。膠原病や先天性心疾患に伴うPAHに加えて、特発性PAH(idiopathic PAH)や家族性PAH(familial PAH)は比較的若年に発症し極めて予後不良である。原因はいまだ一部の遺伝子異常が明らかになっているものの、それのみでは説明がつかず、他の遺伝子異常の存在、また、epigenetic制御の可能性、何らかの外的因子の重要性、など未だ病態解明には疑問点が残されている。

一方、近年ではepigenetic制御機能を持つlong non-coding RNA (IncRNA)が注目されている。ヒト遺伝子のうち、蛋白質をコードする遺伝子は、全染色体DNAの2%を占めるに過ぎない。しかし、全染色体DNAの半分以上はRNAへと転写されており、蛋白質をコード

#### Small and long non-coding RNAs



Non-coding RNAとは 大規模遺伝子解析技術の発展に よって近年見つかった タンパク質に翻訳されないRNA 約200塩基以上の長さを有する long non-coding RNA (IncRNA)

については、PAHを含めた肺循

環領域での機能について未解明 (Circ Res 2012;111:1349-62より改変引用)

しないRNA(non-coding RNA)が大量に存在する。Non-coding RNAのうち、約30塩基以下のmicroRNAsについては、数年前より研究が活発に行われ、その機能がある程度解明されつつあるが、一方で、約200塩基以上の長さを有するlncRNAについては、その存在や機能について、いまだほとんど解明されていない。特に、循環器領域においては、ES細胞やiPS細胞の心筋細胞への分化誘導過程における特定のlncRNAの機能が、ごく近年に解明されつつあるが、いまだPAHを含めた成体期の肺循環におけるlncRNAの役割は全く解明されていない。

そこで本研究では、lncRNAの肺循環領域における役割の世界初の解明を目的とした。PAH患者検体を用いてlncRNAの発現量の解析、epigenetic制御の可能性の検討、臨床指標との相関解析からlncRNAの非侵襲的指標としての可能性も模索し、臨床への還元とlncRNAによる個別化医療の実現を目指す。

#### 【研究成果と今後の展望】

PAH患者からのRNA検体を 用いて、IncRNA Array解析 を実施した。その結果、健常 者コントロールRNA検体と比 較して、PAH患者RNA検体で は一部のIncRNAの発現量が 大きく異なっていることが明 らかとなった。Heat-map解析・ PCA解析等も施行し、多角的

#### 着目した本研究の概念図 肺小動脈 の狭窄 肺小動脈の狭窄 lincRNAs Epigeneticな 肺動脈圧の 上昇 発症制御 循環 肺動脈圧 不全 Long non-coding RNA の上昇 右心負荷 右室の肥大 全身の T-UCR 血流不足 としての 右心不全 TERRA 有用性

肺高血圧症(PAH)の病態形成と長鎖非コーディングRNA(IncRNA)に

にIncRNA発現量について精査した。発現量がコントロールと比較して大きく異なるIncRNA複数個を 絞りこんだ。定量的RT-PCR法を併用することによって、Array解析結果との相関性を調べ、最終的に PAH病態制御に重要な役割を果たしていることが予想される候補IncRNAを絞り込むことに成功した。

今後は、絞り込んだ候補lncRNAについて、発現量と臨床指標との相関解析を行う。臨床指標としては、 右心カテーテル検査で得られる血行動態指標(右房圧、肺動脈圧、肺血管抵抗値)、PAH患者の予後や 臨床的重症度を反映するとされる血中BNP値、NYHAクラス分類、6分間歩行距離などが挙げられる。 いまだ循環器領域においてほとんど解明されていないlncRNA患者検体発現量と臨床指標が相関するこ とを実証すれば、臨床重症度を反映する非侵襲的指標としてのlncRNAの可能性を世界初で実証するこ とにもつながり、極めて価値が高いと思われる。

さらに、候補となるIncRNAに対してshort hairpin RNAをデザインして、ウイルスベクター等を用いることによって、in vivo動物モデルでのgain- and/or loss-of-function studyや、ヒト肺血管内皮細胞やヒト肺血管平滑筋細胞を用いたin vitro培養系での増殖能やシグナル経路を含めた詳細なメカニズム解析を行い、IncRNAがどのようにPAH病態制御に関与しているかを解明していく。また、将来的には、IncRNA発現量を制御することによる難病疾患PAHの克服と個別化医療実現に繋げていく。

#### 【謝 辞】

本研究の遂行にあたり、多大なご支援を受け賜わりました公益財団法人難病医学研究財団の皆様に厚く御礼を申し上げます。

#### 不飽和脂肪酸摂取が加齢黄斑変性に与える影響



名古屋大学大学院医学系研究科眼科 助教 兼子 裕規

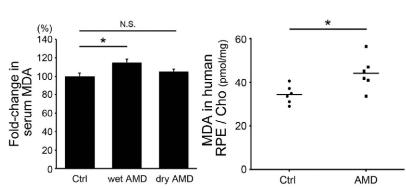
#### 研究背景

加齢黄斑変性(AMD)は、先進国における中途失明の原因疾患としてとても重要な疾患です。米国ではその患者数はがん患者数に匹敵すると報告されています。日本では黄斑変性が失明原因の10%、第4位ですが、その割合は増加傾向にあります。AMDは、脈絡膜新生血管(CNV)という異常血管が網膜の下に増殖する滲出型(wet-AMD)と、網膜色素上皮(RPE)の変性を原因とする萎縮型(dry-AMD)に分かれます。CNVが発生する原因として血管内皮増殖因子(VEGF)の発生が考えられ、現在ではVEGFを標的とした分子標的薬の眼内注射が最も一般的な治療法として行われています。特に日本ではwet-AMD患者が多く治療法として抗VEGF薬が主に使用されますが、度重なる注射にもかかわらず再発する症例も多く、加えて眼球に直接注射をするという患者さんへの負担を考慮すると、抗VEGF療法は決して万能な治療法ではなく、むしろAMDの予防法開発が急務となっています。ところが加齢黄斑変性の原因は一つではなく、遺伝子や生活習慣など、様々な因子があり単純ではありません。AMDの原因の一つとして、先進国で特に摂取量が多いとされるω-6系不飽和脂肪酸の過剰摂取が、加齢黄斑変性の発症に関係あるという報告がされています。

#### 研究目的

そこで本研究課題では、不飽和脂肪酸摂取が加齢黄斑変性の発症にどのように関与しているかを検討するため、以下の項目を検討しました。
①加齢黄斑変性患者の血清及び眼球中にω-6系不飽和脂肪酸もしくはその代謝産物のひとつとされるmalondialdehydeが蓄積しているか②ω-6系不飽和脂肪酸を負荷した動物では眼球組織中のVEGF産生が亢進し脈絡膜新生血管が増大するか

#### 図1



左図:血清中のmalondialdehyde (MDA) 濃度. 滲出型加齢黄斑変性 (wet AMD) 患者血清で有意に高い.

右図:加齢黄斑変性 (AMD) 患者の眼球から採取した網膜色素上皮 (RPE) および脈絡膜 (Cho) 組織中でも、有意に高いmalondialdehydeが検出された.

#### 結 果

①我々は名古屋大学附属病院眼科を受診した加齢黄斑変性患者の血清を採取し、さらにアメリカのアイバンクから加齢黄斑変性患者のドナー眼球を入手し、組織中のmalondialdehyde(不飽和脂肪酸の代謝産物)の濃度を測定しました。その結果、加齢黄斑変性患者では、血清中ならびに眼球組織中の

malondialdehyde濃度が対照群に比べて高いことが確認 されました。(図1)

②次に、代表的な $\omega$ -6系不飽和脂肪酸であるリノール酸をマウスの食事に高濃度(15%)で与え三 $\gamma$ 月間飼育し、眼球組織中のVEGF濃度を測定しました。その結果、高リノール酸(HLA)負荷をしたマウスの眼球組織では高濃度のVEGFが測定されました。さらに、高リノール酸負荷マウスにレーザーを照射し、人工的にCNVを作成したところ、通常食を摂取していたマウスに比べてCNVの体積が有意に増大しました。(図2)

#### 考察

これらの発見から、かつて健康的と考えられていたリノール酸を含む不飽和脂肪酸の一部が、過剰摂取によって血液中、眼球組織中に脂質代謝産物malondialdehydeとして蓄積し、むしろ加齢黄斑変性の悪化に加担していることが示唆されました。

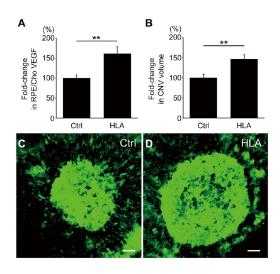


図2(A) 不飽和脂肪酸の一つであるリノール酸を大量に負荷したマウスの網膜色素上皮(RPE) および脈絡膜(Cho) では、血管内皮増殖因子(VEGF)の濃度が有意に上昇する.(B) また高濃度リノール酸(HLA) を投与されたマウスに作成した脈絡膜新生血管(CNV)の体積(D) は、高濃度リノール酸を含まない通常食を摂取したマウスのCNV(C) に比べて有意に増大した.

また逆に言えば、不飽和脂肪酸ならびに脂質代謝産物の蓄積を予防することで、加齢黄斑変性の患者数を減らすことが可能になるかもしれません。その一つの方法として、ω-3系脂肪酸であるエイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA)を摂取することです。今後、高リノール酸負荷によって加齢黄斑変性になりやすくなった実験動物にEPAやDHAを投与し、血液中、眼球組織中のmalondialdehyde濃度やVEGF産生の増加、またCNVの増大が抑制できるか検討したいと考えています。

#### 謝辞

本研究における重要な検討項目の一つに、加齢黄斑変性患者のドナー眼球を入手することがありました。残念ながら現在日本では、角膜移植以外の目的に献眼を用いることができません。おそらくそこには、私の知り得ない深い配慮や様々な事情があるのでしょうが、日本では人眼を用いる実験には多額の研究費が必要です。本研究の遂行にあたり多大なご支援をくださった公益財団法人難病医学研究財団の皆様ならびにご寄付くださった多くの皆様に厚く御礼申し上げます。

#### 参考文献

1. Ye F, Kaneko H, et al. Malondialdehyde induces autophagy dysfunction and VEGF secretion in the retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration.

Free Radic Biol Med. 2016;94:121-134

#### 先天性魚鱗癬様紅皮症に対する新規治療法の開発



乃村 俊史 北海道大学病院皮膚科 助教

先天性魚鱗癬様紅皮症は極めて稀な皮膚病ですが、生まれたときから全身の皮膚が真っ赤(紅斑) でガサガサ(鱗屑)になり、皮膚バリア機能が高度に障害される重篤な病気です。また、外観上の問 題も生じ、患者さんの生活の質を著しく低下させます。この病気の原因は長らく不明でしたが、分子 生物学の進歩に伴い、2000年代から次々に解明され、今では約10個の病因遺伝子(病気の原因となる 遺伝子)が見つかっています。しかし大変残念なことに、治療法の進歩はほとんど見られず、現在も 根治的な治療法は存在しません。すなわち、20年前も現在も同じような治療を行っているという、患 者さんにとっては大変厳しい現状があるのです。

無治療

そこで、今回私は先天性魚鱗癬様紅皮症の病 因に基づいたより根治的な治療法の開発を目指 すことにしました。今回の研究で用いた治療法 は、「リードスルー治療」という方法です。こ の方法は、遺伝子に生じたある特定の変化(ナ ンセンス変異)を「無視」することで正常なタ ンパク質が作られ、症状が改善するというもの で、すでに種々の病気で試されていますが、魚 鱗癬などの角化症(先天的に皮膚が硬くなる病 気の総称)ではその有効性がこれまで検討され

## 【リードスルー治療の概略】 - □ なンパク質(一) □ 疾患を発症 ナンセンス変異(+) リードスルー治療 000 ○ ○ ○ ○ ○ ゲンタマイシンなど リードスルーによるナン 疾患の治癒 タンパク質(+)[

ていませんでした。そこで今回の研究では、リードスルー治療がナンセンス変異を持つ角化症に有効 かどうか検討しました。

ナンセンス変異(+)

今回の研究では、まず角化症患者さんに認められるナンセンス変異が本当にリードスルー治療によ り読み飛ばされて正常なタンパク質ができるかどうかをcDNAという材料を使って検討しました。その 結果、ゲンタマイシンやG418といった抗生物質の一種(アミノグリコシド系抗生物質)の投与により ナンセンス変異を持つcDNAから正常なタンパク質が産生されるようになることを明らかにしました。 一方、海外で複数の遺伝性疾患に対して治験が進められているPTC124 (Ataluren®) という薬剤ではリー

ドスルー効果を認めませんでした。これらの結果は、アミノグリコシド系抗生物質が角化症に有効な可能性を示唆しています。しかし、cDNAというのは実際の患者さんの細胞の状態とは異なりますので、次に、実際の角化症の患者さんから採取した皮膚細胞でも同じように効果が認められるかを検討しました。先ほどの実験と同様、アミノグリコシド系抗生物質であるゲンタマイシンやG418を投与して治療してみたところ、興味深いことに、患者さん由来の皮膚細胞でも正常なタンパク質が作られるようになりました。ゲンタマイシンは、点滴や塗り薬ですでに世界中で利用可能な薬剤ですから、今後さらに研究が進めば角化症に対する新しい治療法として使えるようになるかもしれません。

しかしながら、ゲンタマイシンを用いた治療も完璧な治療法というわけではありません。ゲンタマイシンの点滴には腎障害や聴力障害という副作用がありますし、塗り薬の治療も全身の皮膚に使うと同様の副作用が起きるかもしれません。従って、将来的にはゲンタマイシンよりもさらに安全性が高く有効性が高い「リードスルー薬」の開発が期待されますが、少なくとも今回の研究により、短期間のゲンタマイシンの点滴や、局所的なゲンタマイシンの外用が先天性魚鱗癬様紅皮症などの角化症に有効である可能性が示されました。本研究が患者さんの治療に直接的に役立つ日が来ることを願ってやみません。

#### 【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました難病医学研究財団の関係者の皆様、ならび に同財団へのご寄付を賜りました皆様に厚く御礼申し上げます。





## 平成28年度医学研究奨励助成事業の応募状況について

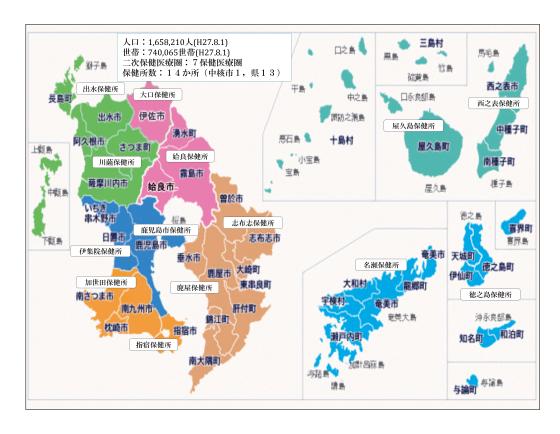
- (1) 一般枠 52件
- (2) 臨床枠 30件(うち臨床研究 26件、疫学研究 4件)
- (3) 採択予定件数 一般枠と臨床枠合わせて10件程度
- (4) 受賞者選考結果は平成28年11月上旬申請者等に通知する。
- (5) 贈呈式 平成29年1月12日(木)



## 難病相談支援センターの活動状況

鹿児島県難病相談・支援センター 杉田 郁子

当県は、南北約600Kmにも及ぶ広大な県土を有しており、この中に種子島、屋久島、奄美群島などの28の有人離島が点在しているといった地理的特性があります。そのためセンター機能を1箇所とせず身近な場所でも相談や支援が受けられる体制が必要であり、県難病相談・支援センター(県の直営で鹿児島市内に設置)と保健所を地域難病相談・支援センターとして位置づけています。



現在の県難病相談・支援センターは、平成23年10月にハートピアかごしまという県の施設の中に開設されました。それまでは県庁の健康増進課の中に設置されていました。この施設の中には障害者自立交流センターと視聴覚障害者情報センター、身体障害者更生相談所、精神保健福祉センターが設置されています。

当センターは管理課と相談課 の二課体制で、管理課には事務 職と保健師、相談課には保健師、

鹿児島県難病相談・支援センターの組織体制 管理課:常 勤3.5 (事務2.5, 保健師1) 副所長 非常勤1(事務1) 所 長 (非常勤医師) (相談課長兼 相談課:常 勤3(保健師2,心理士1) 務保健師) 非常勤2 (保健相談員1, 社会福祉相談員1) 郵便番号:890-0021 住所: 鹿児島市小野1丁目1番1号 電話:099-218-3133 FAX099-228-5544 Eメール: nanbyou@pref.kagoshima.lg.jp 相談日時: 火曜日、年末年始、休日以外の午前9時から午後4時 但し、特定疾患医療受給者証に関する申請等は火曜日(電話218-3134)も対応

心理士、保健相談員、社会福祉相談員が配置され、医療費助成関係事務、相談事業、重症難病患者医療ネットワーク事業、患者会支援、研修・教育事業、地域難病相談・支援センター(保健所)への支援、ボランティア養成等の事業を行っています。

当県独自の取組としては、難病に関する専門医の診療や療養相談等を受けることが難しい離島や遠隔地での巡回医療相談があります。離島の4保健所と鹿児島市から遠隔地にある4保健所で、疾病や治療に関する専門医の講話と参加者の交流会を年8回程度開催しています。対象疾患や開催時期等については、年度初めに各保健所の希望を踏まえて計画し、広報や当日の運営など保健所の協力を得ています。講師は県難病相談・支援センター所長や大学病院等の専門医に依頼しています。会場までは公用車の他、飛行機や高速船を利用しての移動で長時間になり、さらに天候(特に台風接近等)による日程変更を余儀なくされることもありますが、講師の先生方には快く引き受けていただき感謝しています。また、巡回医療相談の機会を利用して保健所主催の支援者連絡会や家庭訪問、事例検討等を行うこともあります。巡回医療相談は、専門医から最新の医療情報が得られる機会となっており、患者・家族の方々が病気や治療についての理解を深め、参加者の療養体験を共有することで不安な気持ちが和らぐ場になっていますし、支援者にとっても研修や連携の場になっていると考えています。

当県の地域特性を踏まえ、県直営の難病相談・支援センターとしての役割を担えるよう地域の保健 所や関係機関と連携しながら今後も活動を続けていきたいと思っています。







## 厚生労働省の難病対策に関する動向

#### 1. 追加の指定難病に関する検討状況

厚生労働省では、昨年7月までに医療費助成の対象となる指定難病として306疾患を指定するとともに難病法に基づく基本方針を制定しました。また、それ以降、開催に向けて準備していた厚生科学審議会難病対策委員会及び指定難病検討委員会における審議を再開しました。

まず、難病対策委員会では、本年7月から委員会を再開し、昨年制定された基本方針で、「国は、難病の各疾病や領域ごとの特性に応じて、また、各地域の実情を踏まえた取組が可能となるよう、既存の施策を発展させつつ、難病の診断及び治療の実態を把握し、医療機関や診療科間及び他分野との連携の在り方について検討を行い、具体的なモデルケースを示す。」とされていることから、これをふまえ、難病に関する医療提供体制の在り方について検討を行っています。難病医療支援ネットワークの活用などによる、できるだけ早期に正しい診断をする機能、専門領域の診断と治療を提供する機能及び身近な医療機関で医療の提供と支援する機能などを盛り込んだ、難病の医療提供体制の在り方についての報告書を取りまとめる予定です。

指定難病検討委員会では、306疾患に追加して指定する候補として、厚生労働科学研究費補助金事業における研究班及び関係学会などが収集・整理した情報を基に、個別疾患について9月30日まで検討を行い、合計24疾患を追加することを了承しました。今後、パブリックコメントの聴取などを経て、疾病対策部会に報告する予定です。疾病対策部会において審議・意見聴取などを行い、来年度から平成29年度実施分指定難病として医療費助成が開始される予定です。

#### 2. 難病対策に関する平成29年度概算要求の概要

(1) 医療費助成の実施【1.197億円】

「難病患者に対する医療等に関する法律」に基づく指定難病の患者に対する医療費助成に必要な経費等を確保し、患者の医療費の負担軽減を図ります。

- ·難病医療費等負担金 1.189億円
- ·特定疾患治療研究事業 7.7億円
- (2) 難病患者の社会参加と難病に対する国民の理解の促進のための施策の充実【22億円】

地域の様々な支援機関と連携した相談支援体制の構築など、難病相談支援センターの実施体制を 充実・強化すること等により、難病患者の長期療養生活上の悩みや不安を和らげ、社会参加への意 欲を高めるとともに、難病についての理解を深める取り組みを推進し、難病患者が社会参加しやす い環境の整備を図ります。

- ・難病相談支援センター事業 5.3億円
- 難病相談支援員を増員し、地域の様々な支援機関と連携した相談支援体制を構築します。
- · 難病医療提供体制整備事業 1.7億円
- 都道府県や難病医療拠点病院に難病医療コーディネーターを配置し、入院施設の確保や医療従 事者向けの研修等を行います。
- · 難病患者地域支援対策推進事業 1.2億円
- 保健所を中心に「難病対策地域協議会」を設置するなど、地域の医療機関、市町村等の関係機関との連携の下に、保健、医療及び福祉の総合的なサービスの提供を要する難病患者を支援します。
- ・難病対策の推進のための患者データ登録整備事業 8.9億円 難病患者データの精度の向上と有効活用を図り、難病の調査研究に役立てるため指定難病患者 データベースを整備します。
- ・難病情報センター事業 29百万円

難治性疾患克服研究事業等の成果、専門医・専門医療機関の所在、公的サービス、最新の認定 基準、治療指針及び症例等の情報を収集・整理し、難病患者、家族及び医療関係者等に対する 情報の提供等を行います。 ・難病相談支援センター間のネットワーク支援事業 8百万円 在宅での医療・介護を必要とする難病患者を支援し、難病患者が安全・安心な生活が営めるようにするため、都道府県難病相談支援センター間のネットワークの構築等を行います。

#### (3) 難病に関する調査・研究などの推進【108億円】

難病研究を総合的・戦略的に実施するため、全国規模のデータベースにより集められた難病患者の情報を活用するなどして、疫学調査、病態解明、新規治療法の開発、再生医療技術を用いた研究を行います。



## 疾病ミニ解説「全身性エリテマトーデス」について

平成28年度上半期、難病情報センターのホームページの中でアクセス数、検索数が多かった疾病を取り上げました。

#### 1. 疾病の概要

全身性エリテマトーデスは、細胞の核成分に対する抗体を中心とした自分の体の成分と反応する抗体が作られてしまうために全身の様々な場所、臓器に多彩な症状を引き起こします。発熱、全身倦怠感などの炎症を思わせる症状と、関節、皮膚、腎臓、肺、中枢神経などの内臓の様々な症状が一度に、あるいは経過とともに起こり、寛解と増悪を繰り返して慢性の経過をたどることが多い病気です。日本全国に約6~10万人程の患者さんがいると考えられています。男女比は平均すると1:9ほどで、圧倒的に女性に多く、子供を産むことのできる年齢、特に20~40歳に多く、子供や老人では、逆に男女の差が少なくなります。

#### 2. 原 因

今のところ原因は分かっていませんが、免疫の異常が病気の成り立ちに重要な役割を果たしています。本来なら、免疫とは細菌やウイルスなどから自分自身を守ってくれる大切な役割をしているのですが、この病気にかかると、免疫系が自分の体を攻撃するようになり全身に様々な炎症を引き起こします。また、何かのきっかけによって、病気が起こったり、病状が悪化したりすることがあります。そのきっかけになるものがいくつか知られています。紫外線(海水浴、日光浴、スキーなど)、風邪などのウイルス感染、怪我、外科手術、妊娠・出産、ある種の薬剤が知られています。

#### 3. 症 状

一般的に、全身症状(発熱、全身倦怠感、易疲労感、食欲不振など)、皮膚(主に頰に出来る赤い発疹で「蝶型紅斑」とも呼ばれています)や関節症状(主に手や指が腫れて痛い関節炎)がほとんどの患者さんに見られます。これに、様々な内臓(特に腎臓、神経精神症状、心病変、肺病変、消化器病変)、血管の病気が加わります。しかし、これらの症状の組み合わせは患者さん毎に異なり、内臓の症状が全くない軽症のタイプもあります。

#### 4. 治療法

自分自身に対する免疫を抑えるため、免疫抑制効果のある薬を使います。中でも、副腎皮質ステロイドは、現在のところ無くてはならない薬として知られています。病気の重症度によって、治療に必要とされる薬の量が異なります。また、副腎皮質ステロイドが効果不十分か、副作用が強い場合には免疫抑制薬を使うことがあります。その他、腎不全のときの透析療法など、その病状に合わせて治療が行われます。また、血行障害が強い方では血管拡張薬などが使われます。

詳しくは、難病情報センターホームページをご参照ください。

(http://www.nanbyou.or.jp/entry/53)

## 賛助会員へのご加入及びご寄付のお願い

当財団は、主に難治性疾患等に関する調査研究及び研究奨励助成並びに関係情報の提供などを行っている公益財団法人であり、事業運営は、主に賛助会員による会費、一般の方々及び法人様からの善意のご寄付並びに国庫補助金及び資産運用益によって賄われております。

円滑な事業運営により、難病で御苦労をされておられる患者さん及びご家族のご期待にお応えする べく極力努力しております。

つきましては、皆様方のご理解とご支援、ご協力をお願い申し上げます。

#### ■ご寄付について

ご寄付はすべて公益事業に使用いたします。

金額は問いませんので、当財団へご連絡をお願いいたします。

また、規程に基づき当財団からの感謝状の贈呈があります。

#### ■寄付等に関する所得税、法人税、相続税の取り扱いについて

当財団は、公益財団法人となっており、寄付金及び賛助会費については、所得税、法人税、相続税の優遇措置が受けられます。なお、個人の所得税に関しては「所得控除」または「税額控除」を選択適用することが出来ます。

※詳しくは、納税地の税務署にお尋ね下さい。

#### ■手続きについて

		寄付等の種類	申込手続き	お振込先
賛助会員	法人(団体)	1口 10万円 (1口以上何口でも結構です)	入会申込書 (ご送付いたします)	【三井住友銀行】 麹町支店 普通預金 No. 0141426 【みずほ銀行】
(年間)	個人	1口 1万円 (1口以上何口でも結構です)	※当財団ホームページから 申込書のダウンロードが できます	神田支店 普通預金 No. 1286266 【三菱東京 UFJ 銀行】 神田駅前支店 普通預金
寄 付 (随 時)		金額は問いません	当財団ホームページ 「ご寄付のお申込連絡」 または寄付申込書 (ご送付いたします) ※当財団ホームページから お申込の連絡や申込書の ダウンロードができます	No. 1125491 【郵便振替口座】 00140-1-261434 《口座名義人》 コウエキザ・イダ・ンホウジ・ソ 公益財団法人 ナンド・ヨウイが・クケンキュウザ・イダ・ソ 難病医学研究財団

◎ご不明の点は、財団事務局までお問い合わせ下さい。

## 発行所 公益財団法人 難病医学研究財団

〒101-0063 東京都千代田区神田淡路町1丁目7番地 ひまわり神田ビル2階

電 話 03-3257-9021

http://www.nanbyou.jp 【難病情報センター】

http://www.nanbyou.or.jp