

GVHD 発症における CD26 陽性 T 細胞および制御性 T 細胞の役割に関する研究

分担研究者 東條 有伸 東京大学医科学研究所教授

研究要旨：健常人ならびに同種移植後の慢性 GVHD 患者を対象として末梢血中の Treg 細胞数と Foxp3 の発現レベルを測定し、それぞれの相関性ならびに病態との関連性について解析した。その結果、健常人では Treg 数/白血球数と Foxp3 発現量の間には正の相関を認めた。一方、慢性 GVHD 患者の Treg 数は、健常人平均(45/ $\mu$ l)と比較して低い傾向(29/ $\mu$ l)を認めた ( $p=0.07$ )。また、Treg における CD26 の発現レベルを少数例で調べたが、絶対的細胞数が少ないため評価可能な結果は得られなかった。

#### A. 研究目的

制御性 T 細胞(Treg)は、胸腺で産生され、CD4+CD25+の表面形質を示す特殊な T 細胞系譜であり、その発生・分化には転写因子 FoxP3 の発現が不可欠であることが証明された。FoxP3 遺伝子は、転写因子 Fork-head box protein 3 (FoxP3 タンパク質)をコードする。FoxP3 遺伝子は、Treg には恒常的に発現しているが、CD4+CD25<sup>-</sup>ナイーブ T 細胞には発現していない。FoxP3 遺伝子欠損マウスでは Treg 細胞の分化が見られないことが報告されている。Treg 細胞の減少あるいは機能異常が自己免疫疾患の発症原因となることが知られており、Treg 細胞の量的・質的制御は自己免疫疾患やアレルギー疾患だけでなく移植免疫・腫瘍免疫における新たな治療法の開発につながることを期待されている。移植片対宿主病(GVHD: Graft versus Host Disease)には、同種免疫反応に属する急性 GVHD と自己免疫的要素の強い慢性 GVHD の 2 種類があるが、Treg 細胞の動態がこの両者の発症や重症化あるいは終結

にどのように関与しているのか、また Treg 細胞における CD26 の発現に関してはほとんど知られていない。さらに、GVHD のエフェクター細胞の帰属やエフェクター細胞における CD26 発現についてもまだ解析が進んでいないのが現状である。そこで、まず GVHD における Treg 細胞と CD26 陽性細胞の動態解析を試みるための実験系の構築を試みた。

#### B. 研究方法

健常者 22 名(年齢：21~50)、移植後患者 5 名の末梢血を 5 ml EDTA-2K チューブに採血した。このうち 4 ml の末梢血を使用して FoxP3 発現の解析を行った。まず、末梢血を溶血した後全有核細胞から RNA を抽出し、6mer のランダムプライマー及び Mo-MLV 逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。次に、これを鋳型としてリアルタイム・ポリメラーゼ連鎖反応(PCR;polymerase chain reaction)を行い、FoxP3 遺伝子発現の定量化を試みた。なお、増幅した FoxP3 転写産物

コピー数は同時に増幅した glyceraldehyde-3-phosphate (GAPDH) 転写産物コピー数によって補正した。一方、Treg 細胞の絶対数測定には末梢血 450/ $\mu$ l を使用し、Internal Beads (TruCount チューブ、BD Biosciences)を用いたフローサイトメトリー法により CD45+細胞中の CD3+CD4+CD25+細胞数を解析することにより算出した。すなわち、取り込んだ CD3+CD4+CD25+細胞数とビーズ数を下記計算式に代入することで算出した。

「Treg細胞数 (個数/ $\mu$ l) =ゲート内細胞数/取り込みビーズ数 x 試験管ビーズ数/実際に解析に用いた血液量(50/ $\mu$ l) x 希釈倍率」

上記方法によって得られた FoxP3 遺伝子発現量(GAPDH 補正)と CD4+CD25+ (Treg)細胞数/全白血球数の相関図を作成して相関係数を求め、さらにプログラムソフト JMP (SAS Institute)を用いて相関について検定した。また、健常者と患者の間での各平均値を比較した。

### C. 研究結果

#### 1) 健常者と移植 GVHD 患者の Treg 細胞数ならびに FoxP3 遺伝子発現

健常者 17 名の Treg 細胞数の平均値( $\pm$ 1SD)および、移植後 GVHD 患者の Treg 細胞数を表 1 に示す。

#### 2) 健常者における Treg 細胞数と FoxP3mRNA コピー数の相関関係の評価

健常者 17 名の Treg 細胞数と FoxP3mRNA 遺伝子発現の相関関係を解析したグラフを図 1 に示す。X 軸に Treg 細胞数/全白血球数をとり、Y 軸に FoxP3 遺伝子発現量(GAPDH 補正)をとったものを示す。両者の相関係数は 0.67 であった( $p < 0.05$ )。

なお、Treg 細胞における CD26 発現レベルを少数例で調べたが、絶対細胞数が少ないため評価可能な結果は得られなかった。今後健常人や臍帯血を対象として解析を進める予定

である。

### D. 考察

#### 1) 健常者における Treg 細胞数と FoxP3 遺伝子発現の相関関係

健常者においては、Treg 細胞数/全白血球数と FoxP3 遺伝子発現量(GAPDH 補正)の間に有意な相関が認められた(相関係数 0.67)。したがって、感染症やアレルギー、自己免疫疾患などの活動性病変を有しない場合には、CD4+CD25+細胞数の測定が Treg 細胞数を反映することの妥当性が検証された。

#### 2) 健常者と移植後 GVHD 患者の Treg 細胞数ならびに FoxP3 遺伝子発現

移植後 GVHD 患者の末梢血 Treg 細胞数の平均値は、健常者平均値 (44.6/ $\mu$ l) と比較して低い傾向(29/ $\mu$ l)を認めた( $p = 0.07$ )ものの、患者サンプル数が少ないこともあり有意差はなかった。また、5 例中 1 例の患者は GVHD にもとづく肺病変を合併しており、Treg 細胞数が著明に減少していた。これまでの数少ない報告でも、慢性 GVHD の患者では、Treg 細胞数および FoxP3 遺伝子発現量が減少することが示唆されている。現在、より多くの急性ならびに慢性 GVHD 発症例からサンプルを収集して解析中である。

なお、(1)生体において炎症その他の刺激によって CD25 発現が誘導される場合必ずしも CD4+CD25+細胞が Treg 細胞を反映するとは限らないこと、(2)Foxp3 遺伝子発現の定量的測定はやや煩雑な操作を要し、顆粒球・単球由来の RNA の混入もあることから、より簡便かつ正確な方法が望まれる。そこで、新たな Treg 細胞の直接測定法としてマルチカラーフローサイトメトリーによる CD4+CD25+FoxP3+細胞の検出を試みていたが、最近この方法を確立することができたので、今後応用していきたい。

## E. 結論

健常人ではTreg数/白血球数とFoxp3発現量の間には正の相関を認めた。一方、慢性GVHD患者のTreg数は、健常人平均(45/ $\mu$ l)と比較して低い傾向(29/ $\mu$ l)を認めた(p=0.07)。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Inoue Y, **Tojo A**, Sekine R, Soda Y, Kobayashi S, Nomura A, Izawa K, Kitamura T, Okubo T, Ohtomo K. In vitro validation of bioluminescent monitoring of disease progression and therapeutic response in leukaemia model animals.. Eur J Nucl Med Mol Imaging, in press.

Tomonari A, Takahashi S, Ooi J, Takasugi K, Konuma T, Iseki T, Shirafuji N, **Tojo A**, Asano S. Human herpesvirus 6 variant A infection with fever, skin rash, and liver dysfunction in a patient after unrelated cord blood transplantation.. Bone Marrow Transplant. 36, 1109-10, 2005.

Ooi J, Iseki T, Takahashi S, Tomonari A, Takasugi K, Uchiyama M, Konuma T, Fukuno K, Soda Y, Ohno N, Nagamura F, Uchimaruru K, **Tojo A**, Asano S. Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning for adult

patients with refractory anemia. Int J Hematol. 81: 424-7, 2005.

Tomonari A, Takahashi S, Shimohakamada Y, Ooi J, Takasugi K, Ohno N, Konuma T, Uchimaruru K, **Tojo A**, Odawara T, Nakamura T, Iwamoto A, Asano S. Unrelated cord blood transplantation for a human immunodeficiency virus-1-seropositive patient with acute lymphoblastic leukemia. Bone Marrow Transplant. 36: 261-2, 2005.

Tomonari A, Takahashi S, Ooi J, Iseki T, Takasugi K, Uchiyama M, Konuma T, Futami M, Ohno N, Uchimaruru K, **Tojo A**, Asano S. Human herpes virus 6 variant B infection in adult patients after unrelated cord blood transplantation.. Int J Hematol. 81: 352-5, 2005.

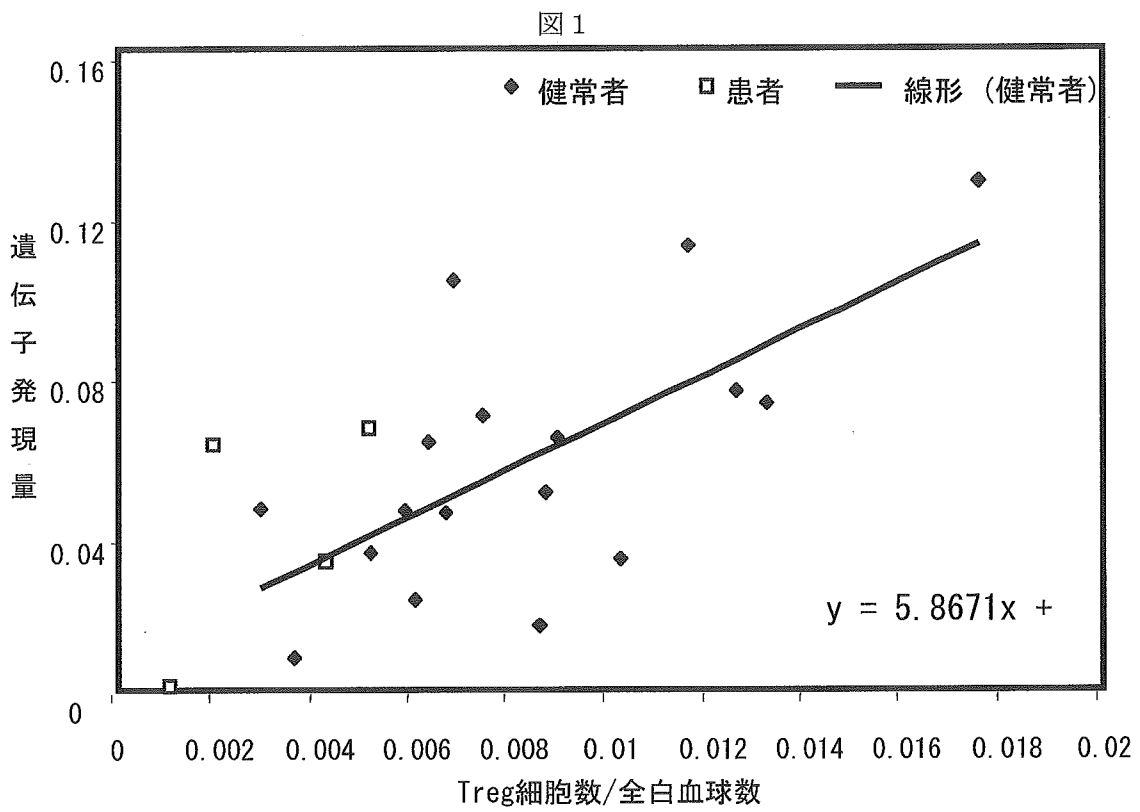
### 2. 学会発表 該当なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表 1

	健常者	GVHD 患者
Treg 細胞数(/ $\mu$ l)	44.6 $\pm$ 18.3	29.1 $\pm$ 14.1
CD4 /CD8 細胞比	2.1 $\pm$ 0.6	13.0 $\pm$ 25.1



厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）  
分担研究報告書

ヒト化 CD26 抗体 (YS110) の前臨床予備試験について

分担研究者 青柳 貞吉 ワイズセラピューティックス株式会社 研究・開発部長

研究要旨：ヒト化 CD26 抗体 (YS110) のクローン病、重症 GVHD などの難治性免疫病への新規治療法開発を目指し、第一相臨床試験のための前臨床予備テスト及び YS110 の in vivo での有効性試験を施行した。CD26 陽性 T 細胞株の karpass299 を移植したマウスの Xenograft モデルでは YS110 投与により腫瘍の縮小及び長期生存を得ることができた。YS110 をカニクイザルに 10~100mg/kg の量で単回投与して、29 日間観察したところ、特に特記すべき有毒事象は観察されず、さらに剖検においても肉眼的及び組織学的にも、YS110 投与に起因する病理学的異常所見は認められなかった。YS110 の薬物動態は他の治療用ヒト化抗体と同様であった。また YS110 は DPPIV 酵素活性も抑制せず、またマウス型 CD26 抗体でヒト正常組織及び癌組織を免疫染色したところ、ほとんどのヒト正常組織は陰性から低レベルでの発現で、胃癌、乳癌、腎癌、前立腺癌などに強発現していた。このようにヒト化 CD26 抗体はカニクイザル単回投与ではその毒性が認められず、Xenograft モデルでもその in vivo の有効性が確認された。

A. 研究目的

クローン病は、原因不明の炎症性腸疾患で生産年齢層に患者の大部分が含まれることが特徴であり、QOL の低下を来すことから、社会的問題となっている。

同種幹細胞移植は、血液悪性腫瘍の治癒を目指す唯一の治療手段であるが、Graft Versus Host Disease (GVHD) や重症感染症の合併がその成功のための重いハードルとなっている。重症急性 GVHD の出現頻度の低い臍帯血幹細胞移植が普及しつつあるが、依然として、骨髄および末梢血幹細胞移植が主体であり、十分な免疫抑制剤の予防投与にも関わらず、特に HLA 不適合移植ではステロイド抵抗性重症 GVHD が一定の比率で発症する。クローン病、GVHD とともに T 細胞を中心とする異常な活性化状態、特に TH1 型細胞の活性化が生じて、TNF- $\alpha$  等の炎症性サイトカインを分泌して、炎症をさらに増悪させている。キ

メラ型 TNF- $\alpha$  抗体が登場し、難治性クローン病に効果ありとされ、認可されているが、その約 3 割の症例に対して無効とされる。

重症 GVHD も大量ステロイドや FK506 などで治療効果が認められるものの、1 割程度の患者で無効とされている。従ってこれら難治性免疫疾患に対して、より選択的かつ有効な治療法の開発が望まれる。

CD26 はヒトメモリー T 細胞に選択的に発現し、炎症のエフェクター T 細胞として重要な役割を果たし、TH1 型 T 細胞の信頼できるマーカーである。我々は CD26 抗体は、T 細胞クローンや CD26 陽性 T 細胞株の増殖を抑制し、細胞周期を止め、CD26 陽性細胞株移植マウスを用いた生体投与実験で、劇的な治療効果があることを見いだした。

我々は、インシリコ法により CD26 との結合に必要な CDR (Complimentary determining region) と FR (Frame works) のアミノ酸配列をコンピュ

ータ上で予測して抗体エンジニアリングによって、高親和性で高い生物学的活性を示すヒト化抗体を作製し、さらに交差反応性（特に毒性試験の対照動物であるカニクイザル CD26 との交差反応性）及び良好な生産細胞株の構築などの観点から抗体産生クローンを選択した。前臨床試験用としてロンザ社と共同して non-GMP 用のヒト化 CD26 抗体 (YS110) を数十グラム得た。

クローン病、造血幹細胞移植後に合併する GVHD などの難治性免疫疾患を対象として、世界に発信できるヒト化 CD26 抗体治療法を開発し、これらの患者の生命予後の改善や quality of life の質的改善に寄与することを目指す。本研究では動物モデルへの *in vivo* の有効性、カニクイザルでのヒト化 CD26 抗体の薬物動態や毒性試験、組織交差反応性などの試験を行うことを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 前臨床に用いる動物について

YS110 の単回投与の予備の忍容性、毒性の検討のため、体重 1.5Kg~2.5Kg のカニクイザル雄、雌各 1 匹ずつおのおのの投与群について準備 (YS110、0、10、25、50 及び 100mg/kg の静脈投与群)。

CD26 陽性株である Karpas-299 T 細胞移植マウスとして、Balb/c nu/nu マウス (5 週令) を購入 (チャールズリバー)。

YS110 のラットでの薬物動態、毒性の解析のため、約 180g の Sprague Dawley 雌ラットを用いる。

### 2. YS110 の血中濃度の測定 (ELISA 法)

1 $\mu$ g 組み換えヒト可溶性 CD26 (R&D システム) を 2-8°C 下で Nunc プレートに一昼夜 coat して、PBS-0.25% Tween でプレートを洗浄する。その後、Superblock ブロッキングバッファー (Pierce) をそれぞれウェルに加え、2 時間室温

に震盪しながら置く。その後被験血清 (100  $\mu$ l) 及び YS110 濃度の標準濃度測定のため、100 $\mu$ l (150ng/ml から 2.34ng/ml) をプレートにまく。3 時間室温に放置し、PBL-0.25% Tween で洗浄して、10,000 倍希釈の HRP-結合ラビット抗ヒト IgG Fc ポリクローナル抗体 (Pierce) を加え、室温で 2 時間震盪する。プレートを洗浄後に 100 $\mu$ l の HRP chemiluminescent 基質 (Pierce) をそれぞれのウェルに加え、暗室で 5 分室温にて放置した後、ELISA reader で測定する。

### 3. DPPIV 酵素アッセイ

DPPIV 酵素アッセイは、DPPIV-Glo™ プロテアーゼアッセイキット (Cat#-G8351, Promega) を用いてアッセイは、製造元のプロトコールに添って行った。Diprotin A (Cat#-416200, Calbiochem) 及び、抗 CD26 ポリクローナル抗体 (Cat#-SC9153, Santa Cruz Biotechnology) をポジティブコントロールとして用いた。

### 4. ヒト組織における CD26 の発現

種々のヒトの正常及び癌組織 (パラフィン切片) を市販の抗 CD26 抗体で免疫染色し、CD26 発現の頻度及び強度を検討した。評価スコアは以下の 5 段階として、0:negative, 1:Blush, 2:Faint, 3:Moderate, 4:Strong で評価スコア 2 以上を陽性とした。

(倫理面への配慮について)

動物実験は、大学内実験動物委員会及びチャールズリバーラボラトリ、ワイズセラピューティクス社内の実験動物委員会の承認の下、動物実験ガイドラインに遵守して行われた。

ヒト組織については、ドナーのインフォームドコンセントを得た後に使用した。

## C. 研究結果

1. カニクイザル及びラットを用いた YS110 (ヒト化 CD26 抗体) の単回静脈内点滴投与による予

## 備毒性試験

YS110 をカニクイザルに単回投与した場合の忍容性を検討するため、YS110 を 0(溶媒対照)、10、25、50 及び 100mg/kg の用量で各群雌雄各 1 匹に単回静脈内点滴投与した。その結果、YS110 の血中濃度及び血中濃度一時間曲線下面積 (AUC) は投与用量に依存して増加を示した。最高血中濃度は、投与後一時間に認められた。血中薬物半減期 (T1/2) は 10mg/kg 群で 60.4 時間、25-100mg/kg 群では、127-143 時間を示した。この血中半減期は、他の治療用ヒト抗体と同様の薬物動態を示した。分布容積は群間で差は認められず、52.4-69.3ml/h.kg であった。また血中からの薬物消失速度 (CL) は、0.306-0.597ml/h.kg であった。投与中及び投与後 29 日の観察期間中においてカニクイザルに特記すべき変化は認められず、剖検においても肉眼的及び組織学的に本剤の投与に起因すると考えられる異常所見は認められなかった。

ラットに YS110 を 10mg/kg の用量で単回静脈内投与したところ、血中薬物濃度の半減期は、一時間程度であったことから、ラットを用いて毒性試験を行うことは難しいと結論した。

## 2. in vivo での YS110 の有効性について

我々はマウス型 CD26 抗体 (1F7) をヒト CD26 陽性細胞株 (Karpas299) 移植マウスに投与したところ、細胞株は壊死に陥り、マウスは長期生存したが、対照群 (CD45 抗体投与) は 40 日以内に死亡した。そこで YS110 の in vivo での有効性を検討するため、ヒト CD26 陽性細胞株 Karpas299  $5 \times 10^6$  を腹腔内に注射し (23 日前)、腫瘍サイズが約 100  $\text{mm}^3$  に達した頃に、YS110 あるいはヒト IgG を週 2 回静注し、28 日間投与したところ、77 日の状態で 9 匹中 6 匹 YS110 投与マウスは腫瘍フリーの状態、YS110 の投与はマウス移植腫瘍モデルで有効性を示した (図 1)。さらに図 2 に示すように、YS110 投与により

Karpas 移植マウスの生存を大幅に延長させ、YS110 の Xenograft マウスモデルでの有効性を確認した。

## 3. YS110 の DPPIV 酵素活性への影響

CD26 は DPPIV enzyme を含み、血清中にも可溶性 CD26 として存在している。また、DPPIV inhibitor は現在糖尿病の新しい治療薬として米国で第三相試験に入っているが、YS110 が DPPIV 酵素活性を抑制するかどうか検討した。DPPIV enzyme inhibitor の diprotin A やポリクローナル抗 CD26 抗体は容量依存症に DPPIV 酵素活性を抑制するが、YS110 は酵素活性を全く抑制せず、YS110 療法の結果、血清中の DPPIV 酵素活性が抑制され糖代謝に影響を及ぼす可能性はないことが示唆された。

## 4. CD26 のヒト正常及び癌組織での発現について

種々のヒト正常及び癌組織 (パラフィン切片) を市販の抗 CD26 抗体 (SC-9153) で免疫染色して CD26 の発現を検討した。

大腸、すい臓組織以外はほとんどすべての正常組織は陰性から低レベルでの発現で、胃癌、腎癌、前立腺癌、乳癌などで強発現したことから、治療ウィンドウが幅広いことも示唆された。

## D. 考察

我々は、オリジナルのマウス型 CD26 抗体よりも高親和性で、生物学的活性も高いヒト化 CD26 抗体の開発に成功した。ヒト化の過程でオリジナルのマウス型抗体よりも親和性や生物学的活性が低下するのが普通であるが、今回、非常に高い質のヒト化抗体を作製できた。通常ヒト化の場合、CDR (Complimentary determining region) をヒト抗体のフレームワークに移植して、ヒト化抗体を作製する。このために親和性や生物活性が低下するが、我々はインシリコ法で CDR の

みならず FR 部分についても親和性に関与する特定のアミノ酸を置換することで、ヒト化抗体を作製した。この方法により、質の高いヒト化抗体が得られた可能性が高い。ロンザ社を通じて、高生産株も樹立し、前臨床試験に必要なヒト化 CD26 抗体 (YS110) も既に確保した。カニクイザルを用いた YS110 の単回投与の予備毒性試験では、100mg/kg 投与まで忍容性を示し、29 日間観察した限りでは、特記すべき副作用など出現しなかった。さらに剖検においても肉眼的及び組織学的にも病理学的異常変化は認められなかった。また、薬物動態では、他の治療用ヒト化抗体と同様の薬物動態を示した。

CD26 陽性 T 細胞株移植マウスモデルを用いた *in vivo* の YS110 の有効性については、オリジナルマウス型抗体同様にその有効性を示すことができた。さらにヒト正常及び癌組織での CD26 の発現を検討したところ、ほとんどの正常組織では陰性か、低レベルの発現であったが、腎癌、前立腺癌、乳癌などでは高発現しており、GVHD、クローン病などの難治性免疫病以外に YS110 は上記の癌における新規治療薬となりうる可能性が示唆された。

現在第一相試験のために GMP 下での YS110 抗体産生株も完成し、生産に取りかかっているが、次年度はクローン病や、急性 GVHD 患者へのヒト化 CD26 抗体の探索的臨床研究を行うべく、カニクイザルを用いての反復投与試験を行い、ヒト化抗体の更なる安全性、薬物動態の解析や YS110 の組織交差反応性などの研究を行う予定である。

#### E. 結論

ヒト化 CD26 抗体 (YS110) は Xenograft モデルでの *in vivo* の有効性が確認され、さらにカニクイザルを用いた単回投与では特記すべき毒性も認められず、GVHD やクローン病などの難治性免疫病への新しい治療法開発を目指した第一相臨床試験を行うための反復投与試験を進めら

れることが明らかになった。

#### F 次年度以降の計画

カニクイザルを用いて 4 週反復投与毒性試験を行い、トキシコキネティクス及び薬物動態の解析を行い、YS110 のヒト、カニクイザルの正常組織を用いた交差反応性試験を行う予定である。さらに第一相臨床試験のために、GMP 下での YS110 の製剤化、製剤の規格、試験方法設定、安定性試験も行う。

#### G 研究発表

1. 論文発表：なし、
2. 学会発表：なし
3. その他：なし

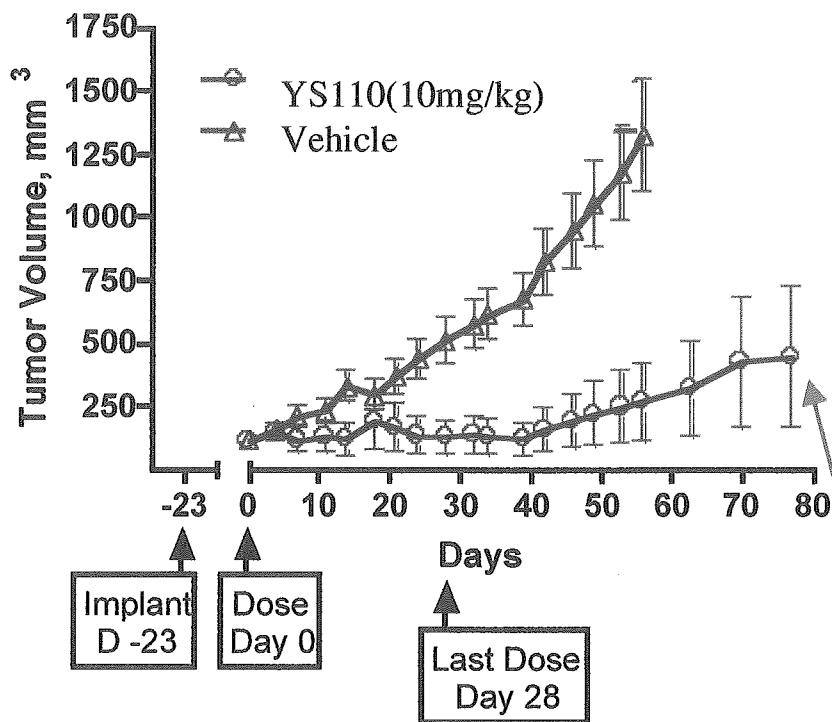
#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



図1

YS110はXenograftモデルマウスで  
Karpas299腫瘍サイズの減少あるいは消失をもたらす

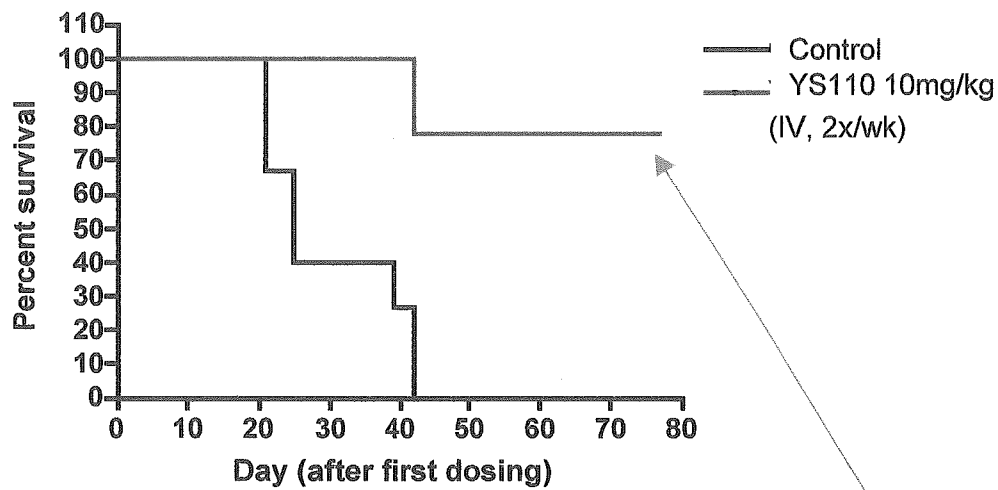


- $5 \times 10^6$  cells were implanted at Day -23
- IV dosing of YS110 or h IgG at 2x/wk starting at day 0 when average tumor size reaches  $\sim 100 \text{ mm}^3$

6/9 YS110-treated animals remain tumor free (non-palpable) at day 77 !

図2

## YS110治療はKarpas299移植マウスの生存も延長させる



- $5 \times 10^6$  cells were implanted
- IV dosing of YS110 or for 28 days at 2x/wk starting at day 0 with average tumor size  $\sim 100 \text{ mm}^3$

**YS110 treatment enhances survival in Karpas-299 model.**

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）  
分担研究報告書

CD26 を分子標的とした対宿主性移植片病（GVHD）の治療法の開発

研究協力者 山田 健人 慶應義塾大学医学部病理学教室 専任講師

研究要旨 これまで対宿主性移植片病GVHDの治療として、免疫抑制剤が開発されてきたが、その作用機序が免疫の抑制であることから副作用が強く、またその免疫抑制の調節にも困難を伴っている。このGVHDの新たな治療法を考案するにあたり、重要な点は、その作用機序が狭いことであり、免疫応答全体を抑制せずに拒絶反応を押さえることが出来ることと、その抑制が調節可能であることと考えられる。本研究で開発しているヒト型抗CD26モノクローナル抗体（YS110）は、このGVHD発症において鍵となるCD26分子のシグナル系を阻害することで特異的にGVHD反応を抑制することが期待されている。そこで本研究では、このYS110抗体によるGVHD治療の基礎的検討として、マウスを用いたGVHDモデルの開発とYS110抗体によるGVHD発症抑制効果や安全性の評価を行った。その結果、NOD/SCIDマウスへのヒトPBL移植により異種GVHDモデルが可能となった。本モデルへのヒト型抗CD26モノクローナル抗体（YS110）投与により、異種GVHDの臨床症状および病理学的変化の顕著な抑制効果が明らかとなった。この結果は、ヒト型抗CD26モノクローナル抗体（YS110）が、GVHDの治療薬として有用であることを示している。

#### A.研究目的

対宿主性移植片病は、免疫能の低下した被移植者（宿主）が、被移植者がもつ1つ以上の抗原を欠いた提供者の免疫能の高い免疫組織を移植された後に起こるもので、急性のものは移植後 5-40 日後、慢性のものは数週間から数か月後にみられる。骨髄移植の後に最もよくみられる疾患であるが、病巣としては主に胃腸管、肝臓および皮膚に症状が出現する疾患であり、致死率も高い。これまで GVHD の治療として、免疫抑制剤が開発されてきたが、その作用機序が免疫の抑制であることから副作用が強く、またその免疫抑制の調節にも困難を伴っている。この GVHD の新たな治

療法を考案するにあたり、重要な点は、その作用機序が狭い（絞られている）ことであり、免疫応答全体を抑制せずに拒絶反応を押さえることが出来ることと、その抑制が調節可能であることと考えられる。本研究で開発しているヒト型抗 CD26 モノクローナル抗体（YS110）は、この GVHD 発症において鍵となる CD26 分子のシグナル系を阻害することで特異的に GVHD 反応を抑制することが期待されている。そこで本研究では、ヒト GVHD の小動物疾患モデルの開発を通じ、ヒト型抗 CD26 モノクローナル抗体（YS110）の GVHD の治療効果と安全性について *in vivo* において評価することを目的とする。

## B.研究方法

マウスは、Jackson 研究所 L.D.Schultz 博士より供与された NOD/LtSz-scid(NOD/SCID)マウスおよび NOD/Shi-scid, common gamma  $\gamma$ -/(NOG)マウス（実験動物中央研究所）を用いた。飼育は特異的病原体陰性環境下で行われ、全ての実験は慶應義塾大学医学部・実験動物委員会の承認のもとに、同医学部・実験動物マニュアルに沿って行われた。インフォームドコンセントを得たヒト末梢血より Ficoll により単核球分画（PBL）を採取した。細胞をカウントし、トリパンブルーにより生細胞 90%以上の条件下で、NOD/SCID マウスあるいは NOG マウス（6-9 週齢、雄マウス、各実験群あたり 4 匹ずつ）へ、PBL  $7 \times 10^6$  個/匹を腹腔内投与した。ヒト型抗 CD26 モノクローナル抗体（YS110）投与は、200ug/回 x3 回/週で計 2mg 投与を腹腔内投与した。対照には、リン酸緩衝液のみ投与群と精製ヒト・イムノグロブリンを同量投与した群を用いた。ヒト PBL 移植後より、マウスについて以下の項目について観察し、GVHD の評価を行った。観察項目は、体重、便の性状、姿勢・運動機能、耳の厚さ（電子ノギスによる）、皮膚症状（耳、頭部、体幹の紅斑・浮腫、毛並み）、血清中ヒト・免疫グロブリン（ELISA 法による）である。6-9 週まで観察した後、安楽死させ、皮膚（耳、体幹）、舌、消化管、肝臓について病理学的に評価する。また腹水におけるヒト・サイトカイン（INF  $\gamma$ , IL10）の測定を行う。

（倫理変への配慮）

動物実験は、慶應義塾大学医学部実験動物委員会の承認のもと、動物実験ガイドラインに遵守して行われた。またヒトゲノム・遺伝子解析研究については、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 13 年 3 月 29 日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）を遵守した。

## C.研究結果

ヒト PBL  $7 \times 10^6$  個/匹を腹腔内投与後、順次、マウス体重および皮膚・毛並みを観察し、9 週にて、末梢血を採取し、剖検した。移植後 6 週以降で、対照群に比べて、体重、便の性状、姿勢・運動機能、耳の厚さ（電子ノギスによる）で、順次差異が現れ、対照群の一部は 7 週より死亡するマウスが出現したが、ヒト型抗 CD26 モノクローナル抗体（YS110）投与群では、1 匹も死亡はなかった。また対照群および精製ヒト・イムノグロブリン投与群では、脱毛が軽度見られ、毛並みの悪化が徐々に進行してきたのに対して、ヒト型抗 CD26 モノクローナル抗体（YS110）投与群では、毛並みの変化は軽度であった（図 1 参照）。9 週目では、マウス体重は、対照群では、投与前の約 30%までの体重減少が認められたのに対して、ヒト型抗 CD26 モノクローナル抗体（YS110）投与群では、減少は 10%以下であった。組織学的な検索では、皮膚および腸管において、高度な差異が認められ、対照群皮膚では、真皮浅層から表皮基底層へのリンパ球浸潤と扁平上皮細胞の個細胞壊死さらに真皮における毛嚢の高度な減少が認められたのに対して、ヒト型抗 CD26 モノクローナル抗体（YS110）投与群ではこれらの変化はごく軽度であった（図 2 参照）。また腸管でも、対照群では、粘膜上皮の脱落とリンパ球浸潤が見られ、便の減少が認められたのに対して、ヒト型抗 CD26 モノクローナル抗体（YS110）投与群では、便に異常はなく、腸管の組織学的変化も軽度であった。

## D.考察

本モデルでのヒト型抗 CD26 モノクローナル抗体（YS110）による異種 GVHD 抑制効果は、移植後 10 回（約 3 週以内）の抗体投与によるものであった。この系では、異種移植された

ヒト PBL の T, B リンパ球などが、異種抗原刺激を受けてマウス体内で増殖するとともに、マウス NK 細胞やマクロファージによるヒト細胞への反応が加わり、サイトカインストリーム状態を惹起し、それが経時的にヒト PBL の GVHD 効果が優性となり、6 週以降に症状が現れてくるものと推測される。今回、ヒト PBL 移植直後よりヒト型抗 CD26 モノクローナル抗体 (YS110) を投与したため、その抗 GVHD 効果が顕著に発揮されたと推測される。

#### E. 結論

NOD/SCID マウスへのヒト PBL 移植により異種 GVHD モデルが可能となった。本モデルへのヒト型抗 CD26 モノクローナル抗体 (YS110) 投与により、異種 GVHD の臨床症状および病理学的変化の顕著な抑制効果が明らかとなった。この結果は、ヒト型抗 CD26 モノクローナル抗体 (YS110) が、GVHD の治療薬として有用であることを示している。

#### F 次年度以降の計画

初年度に開始した異種移植系での GVHD モデルを用いた実験系では、治療効果の評価をさらに進める一方で、YS110 の投与方法（腹腔内および静注、量、期間）による治療効果の評価を行う。また *in vivo* での GVHD における YS110 の作用機序を詳細にする目的で、各タイプの T 細胞や各種エフェクター細胞を磁気ビーズ法で取り除いた移植実験を行い、その条件下で、YS110 の GVHD 抑制効果とその変化を観察する。また YS110 投与群と非投与群におけるマウス末梢血、脾臓、腹腔内ヒト血球の性状をフローサイトメーターで行い、さらに移植するヒト PBL 各細胞分画を CFMDA(5-chloromethylfluorescein diacetate)、CMTMR(4-chloromethyl bezoyl amino tetramethyl rhodamine)、CFSE (carboxyfluoresceindiacetate succinimidyl

ester, Molecular Probe) で標識後に移植し、GVHD 病態での各種免疫担当細胞の消長と増殖についてモニターすることから、YS110 の作用機序を解析する。また初年度から開始した異種移植 GVHD モデルは、これまでも用いられてきたヒト→マウスの安定した GVHD モデルであるが、これは組織適合抗原の **super-mismatched** モデルともいべきものであった。そこで、ヒト GVHD 病態により近いヒト・アロ移植 GVHD モデル (ヒト→ヒト) の開発を行うことで、前臨床試験に準ずる評価を行う。具体的には、インフォームドコンセントを得たヒト皮膚を、これらの免疫不全マウス皮膚へあらかじめ移植しておき、インフォームドコンセントを得た第 3 者のヒト PBL をマウスへ移植することでヒト GVHD モデルを作成するものである。

#### G 研究発表

##### 論文発表

Establishment of Perineural Invasion Models and Analysis of Gene Expression Revealed an Invariant Chain (CD74) as a Possible Molecule involved in Perineural Invasion in Pancreatic Cancer

Koide N, Yamada T, Shibata R, Mori T, Fukuma M, Yamazaki K, Aiura K, Shimazu M, Hirohashi S, Nimura Y, Sakamoto M

Clin Cancer Res (in press)

Genomic structure of swine taste receptor family 1 member 3, TAS1R3, and its expression in tissues

Kiuchi S, Yamada T, Yasue H

Cytogenetic and Genome Research (in press)

Early embryonic death-associated changes in genome-wide gene expression profiles in the fetal placenta of the cow carrying somatic

nuclear-derived cloned embryo.

Oishi M, Gohma H, Hshizume K, Taniguchi Y, Yasue H, Takahashi S, Yamada T, Sasaki Y  
Molecular Reproduction and Development (in press)

Primary bone carcinosarcoma: Chondrosarcoma and squamous cell carcinoma with keratin pearl formation.

Shiraishi J, Mukai M, Yabe H, Shibata R, Yamada T, Miura K, Anazawa U, Morioka H, Sakamoto M.  
Pathol Int. 55(8):504-9, 2005 Aug;

1'-acetoxychavicol acetate is a novel nuclear factor- $\kappa$ B inhibitor with significant activity against multiple myeloma in vitro and in vivo.

Ito K, Nakazato T, Xian MJ, Yamada T, Hozumi N, Murakami A, Ohigashi H, Ikeda Y, Kizaki M  
Cancer Res 65(10):4417-4424, 2005 May 15

Expression of Cre recombinase in the mouse developing chondrocytes driven by the mouse  $\alpha$ 2(XI) collagen promoter.

Fujimaki R, Hayashi K, Watanabe N, Yamada T, Toyama Y, Tezuka K, Hozumi N  
J Bone Miner Metab. 23(3):270-273, 2005

Catechin, a green tea component, rapidly induces apoptosis of myeloid leukemic cells via modulation of reactive oxygen species (ROS) production in vitro and inhibits tumor growth in vivo.

Nakazato T, Ito K, Miyakawa Y, Kinjo K, Yamada T, Hozumi N, Ikeda Y, Kizaki M  
Hematologica 90(3), 317-325, 2005

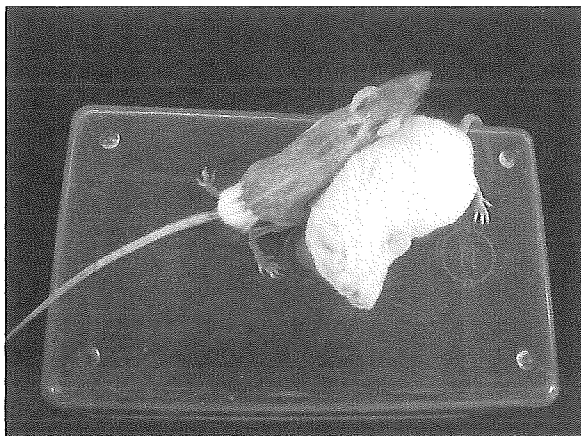
II 知的所有権取得

1. 特許取得：なし、
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

図 1 ヒトPBL移植後のマウス脱毛とYS110によるその抑制

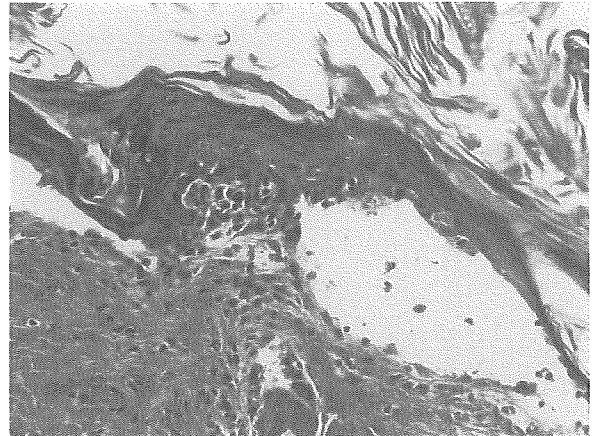


ヒトPBL移植 7 週：右の 2 匹が対照群、左の 2 匹がYS110 投与群

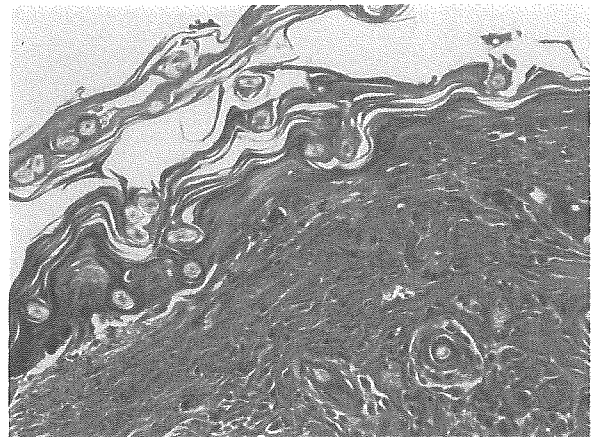


ヒトPBL移植 9 週：左が対照マウスでほとんど毛が残っていない。右がYS110 投与マウスで毛並みの軽度の悪化のみである。

図 2 皮膚GVHDにおけるYS110の効果



対照群：真皮浅層から表皮基底層へのリンパ球浸潤と扁平上皮細胞の個細胞壊死が認められ、表皮剥離を伴っている。



YS110 投与群：真皮浅層への軽度のリンパ球浸潤を認めるが、毛嚢は残っており表皮の変化は軽度である。

## 研究成果の刊行に関する一覧表



## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Inamoto T, Yamochi T, Ohnuma K, Iwata S, Kina S, Inamoto S, Tachibana M, Katsuoka Y, Dang NH, Morimoto C	Anti-CD26 monoclonal antibody-mediated G1/S arrest of human renal clear cell carcinoma Caki-2 is associated with Rd dephosphorylation, CDK2 reduction, p27 <sup>kip1</sup> enhancement, and disruption to the extracellular matrix.	Clin. Cancer Res., in press			
Ohumura k, Inoue H, Uchiyama M, Yamochi T, Hosono O, Dang NH, Morimoto C	T-cell activation via CD26 and caveolin-1 in rheumatoid synovium.	Mod Rheumatol	16	3-13	2006
Iwata S, Souta- Kuribara A, Yamakawa A, Sasaki T, Shimizu T, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Dang NH, Watanabe T, Arima N, Morimoto C	HTLV-I Tax induces and associates with Crk- associated substrate lymphocyte type (Cas-L).	Oncogene	24	1262-71	2005
Yamochi T, Yamochi T, Aytac U, Sato T, Sato K, Ohnuma K, McKee KS, Morimoto C, Dang NH	Regulation of p38 phosphorylation and topoisomerase IIalpha expression in the B-cell lymphoma line Jiyoye by CD26/dipeptidyl peptidase IV is associated with enhanced in vitro and in vivo sensitivity to doxorubicin.	Cancer Res.	65	1973-83	2005
Ohnuma K, Yamochi T, Hosono O, Morimoto C	CD26 T cells in the pathogenesis of asthma.	Clin Exp Immunol	139	13-16	2005

Yoshikawa N, Yamamoto K, Shimizu N, Yamada S, Morimoto C, Tanaka H	The distinct agonistic properties of the phenylpyrazolosteroid cortivazol reveal interdomain communication within the glucocorticoid receptor.	Mol Endocrinol	19	1110-24	2005
Sato K, Nakaoka T, Yamashita N, Yagita H, Kawasaki H, Morimoto C, Baba M, Matsuyama T	TRAIL-transduced dendritic cells protect mice from acute graft-versus-host disease and leukemia relapse.	J Immunol	174	4025-33	2005
Nakamura H, Makino Y, Okamoto K, Poellinger L, Ohnuma K, Morimoto C, Tanaka H.	TCR engagement increases hypoxia-inducible factor-1alpha protein synthesis via rapamycin-sensitive pathway under hypoxic conditions in human peripheral T cells	J Immunol	174	7592-9	2005
Shimizu N, Ouchida R, Yoshikawa N, Hisada T, Watanabe H, Okamoto K, Kusuhara M, Handa H, Morimoto C, Tanaka H	HEXIM1 forms a transcriptionally abortive complex with glucocorticoid receptor without involving 7SK RNA and positive transcription elongation factor b.	Proc Natl Acad Sci U S A	102	8555-60	2005
Sato T, Yamochi T, Yamochi T, Aytac U, Ohnuma K, McKee KS, Morimoto C, Dang NH	CD26 regulates p38 mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of integrin beta1, adhesion to extracellular matrix, and tumorigenicity of T-anaplastic large cell lymphoma Karpas 299.	Cancer Res.	65	6950-6	2005
Ohnuma K, Yamochi T, Uchiyama M, Nishibashi K, Iwata S, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Dang NH, Morimoto C.	CD26 mediates dissociation of Tollip and IRAK-1 from caveolin-1 and induces upregulation of CD86 on antigen-presenting cells.	Mol Cell Biol.	25	7743-57	2005

Sasaki T, Iwata S, Okano HJ, Urasaki Y, Hamada J, Tanaka H, Dang NH, Okano H, Morimoto C.	Nedd9 protein, a Cas-L homologue, is upregulated after transient global ischemia in rats: possible involvement of Nedd9 in the differentiation of neurons after ischemia.	Stroke	36	2457-62	2005
Urasaki Y, Nori M, Iwata S, Sasaki T, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Dang NH, Ikeda E, Morimoto C.	Roxithromycin specifically inhibits development of collagen induced arthritis and production of proinflammatory cytokines by human T cells and macrophages.	J Rheumatol.	32	1765-74	2005
Kamada N, Inoue N, Hisamatsu T, Okamoto S, Matsuoka K, Sato T, Chinen H, Su Hong K, Yamada T, Suzuki Y, Suzuki T, Watanabe N, Tsuchimoto K, Hibi T	Nonpathogenic Escherichia coli Strain Nissle 1917 Prevents Murine Acute and Chronic Colitis.	Inflamm Bowel Dis	11(5)	455-463	2005
Tahara T, Inoue N, Hisamatsu T, Kashiwagi K, Takaishi H, Kanai T, Watanabe M, Ishii H, Hibi T	Clinical significance of microsatellite instability in the inflamed mucosa for the prediction of colonic neoplasms in patients with ulcerative colitis.	J Gastroenterol Hepatol	20(5)	710-715	2005
Sawada K, Kusugami K, Suzuki Y, Bamba T, Munakata A, Hibi T, Shimoyama T	Leudocytapheresis in ulcerative colitis: results of a multicenter double-blind prospective case-control study with sham apheresis as placebo treatment.	Am J Gastroenterol	100(6)	1362-1369	2005
Hitotsumatsu O, Hamada H, Naganuma M, Inoue N, Ishii H, Hibi T, Ishikawa H	Identification and characterization of novel gut-associated lymphoid tissues in rat small intestine.	J Gastroenterol	40	956-963	2005
Hibi T and Sakuraba A	Is there a role for apheresis in gastrointestinal disorders?	Nat Clin Pract Gastroenterol & Hepatol	2(5)	200-202	2005

Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Sato T, Matsuoka K, Arai K, Nakai T, Hasegawa A, Inoue N, Watanabe N, Akagawa K, Hibi T	Abnormally Differentiated Subsets of Intestinal Macrophage Play a Key Role in Th1-Dominant Chronic Colitis through Excess Production of IL-12 and IL-23 in Response to Bacteria.	J of Immunol		6900-6908	2005
Matsumoto T, Iida M, Kohgo Y, Imamura A, Kusugami K, Nakano H, Fujiyama Y, Matsui T, Hibi T	Therapeutic efficacy of infliximab on active Crohn 's disease under nutritional therapy.	Scand J Gastroenterol	40	1423-1430	2005
岩上祐子、久松理 一、日比紀文	インフリキシマブ抗TN F $\alpha$ 抗体療法	G.I.Research	13	17-23	2005
緒方晴彦、日比紀 文	クローン病に対する抗サ イトカイン療法の今後の 見通しは？	分子消化器病	2(1)	6-12	2005
日比紀文、芳沢茂 雄	抗 TNF- $\alpha$ 抗体療法	Mebio	22	108-113	2005
久松理一、鎌田信 彦、小林拓、知念 寛、日比紀文	炎症性腸疾患の病態と粘 膜免疫－最近の動向－	細胞	38(1)	7-10	2006
Inoue Y, Tojo A, Sekine R, Soda Y, Kobayashi S, Nomura A, Izawa K, Kitamura T, Okubo T, Ohtomo K	In vitro validation of bioluminescent monitoring of disease progression and therapeutic response in leukaemia model animals.	Eur J Nucl Med Mol Imaging	in press		
Tomonari A, Takahashi S, Ooi J, Takasugi K, Konuma T, Iseki T, Shirafuji N, Tojo A, Asano S.	Human herpesvirus 6 variant A infection with fever, skin rash, and liver dysfunction in a patient after unrelated cord blood transplantation.	Bone Marrow Transplant.	36	1109-10	2005
Ooi J, Iseki T, Takahashi S, Tomonari A, Takasugi K, Uchiyama M, Konuma T, Fukuno K, Soda Y, Ohno N, Nagamura F, Uchimaruk, Tojo A, Asano S.	Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning for adult patients with refractory anemia.	Int J Hematol.	81	424-7	2005