

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

ヒト化CD26抗体の難治性免疫疾患(クローン病、GVHDなど)への治療法開発

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 森本 幾夫

平成19(2007)年3月

目 次

I. 総括研究報告	
ヒト化 CD26 抗体の難治性免疫疾患（クローン病、GVHD など）への治療法開発	1
主任研究者 森本 幾夫 東京大学医科学研究所先端医療研究センター免疫病態分野・教授	
II. 分担研究報告	
1. CD26 分子陽性 T 細胞を標的とした炎症性腸疾患における治療法の開発	11
分担研究者 日比 紀文 慶應義塾大学医学部内科・教授	
2. 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	17
分担研究者 東條 有伸 東京大学医科学研究所血液腫瘍内科・教授	
3. ヒト化 CD26 抗体（YS110）の前臨床予備試験について	25
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	
4. 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	33
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	
5. 臍帯血移植後の末梢血 T 細胞における CD26 分子発現の解析に関する研究	39
研究協力者 渡辺 信和 東京大学医科学研究所 FACS コアラボトリー・助手	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	41
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

I. 総括研究報告

【ヒト化CD26抗体の難治性免疫疾患（クローン病、GVHDなど）への治療法開発】

主任研究者 森本幾夫 東京大学医科学研究所 免疫病態分野 教授

研究要旨

本研究は、炎症性腸疾患のクローン病および同種幹細胞移植時に発生する重症GVHDなどの難治性免疫疾患の新しい治療法としてヒト化CD26抗体療法を確立し、その実用化を目指す。

本年度は昨年度に引き続いてYS110（ヒト化CD26抗体）の前臨床試験およびマウスモデルを用いてのin vivoでの有効性、クローン病、GVHD患者の免疫病態を解析した。カニクイザルを用いたYS110の複数回反復静脈投与で、特記すべき副作用は観察されず、さらに剖検において肉眼的および組織学的にも本剤投与に起因する病理学的異常所見は認められなかった。さらにヒトPBLをSCIDマウスに投与して発生させた異種GVHDモデルにおいてGVHD症状が発現した時点からYS110を投与したところ、そのin vivoでの治療有効性が明らかになった。GVHD患者ではその末梢血中のCD4+CD26強陽性T細胞が高い傾向が認められ、またクローン病においてCD26陽性T細胞は、粘膜固有層に局在が強く、炎症性腸疾患の治療ターゲットになりうる可能性が強く示唆された。

分担研究者

日比紀文：慶応義塾大学内科学教室・教授
東條有伸：東京大学医科学研究所・教授
青柳貞吉：Y's Therapeutics 株式会社・
研究・開発部長

研究協力者

山田健人：慶応義塾大学医学部病理学教室・
講師
渡辺信和：東京大学医科学研究所・助手

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。東大発バイオベンチャー、Y's Therapeutics 社との共同研究で、ヒト化CD26 抗体を開発し、現在ロンザ社（本社：スイス、バーゼル）にてすでに non-GMP のヒト化抗体を作製し、前臨床のための必要量を確保し、現在第一相試験用の GMP ヒト化抗体の生産に取り掛かっている。

同種幹細胞移植は、血液悪性腫瘍の治療を目指す唯一の治療手段であるが、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 Graft versus Host Disease (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

A. 研究目的

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。森本らは 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、

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。幹細胞移植が必要であるにも関わらず、HLA適合ドナーがおらず待機するケースは年間4000例以上に上る。ドナー不足を解消するためにもHLA不適合でも移植ができ、GVHDを克服できる選択的治療法が望まれる。クローン病、GVHD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- α 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- α 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。

現在癌治療分野における抗体療法としてリツキサン（抗CD20抗体、B細胞リンパ腫）、ハーセプチン（抗HER2/neu抗体：乳がん）が、本邦でも認可され、その有効性が報告されている。免疫病では、難治性クローン病、関節リウマチで抗サイトカイン療法として抗TNF- α 抗体が認可され、従来の治療薬とは異なる作用メカニズムとしてその有効性が報告されている。難治性免疫疾患では現在その炎症誘導に中心的な役割を果たしているT細胞等をターゲットにした第二世代の抗体療法の開発に焦点が絞られている。CD26はメモリーT細胞の中でも炎症のエフェクターT細胞およびTH1型細胞のマーカーであることから、CD26陽性T細胞機能制御を目指したCD26抗体療法の開発は、ステロイドやその免疫抑制剤と比してより選択的かつ根本的療法であり、安全かつ有効

な治療法となる事が期待される。

そこで、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ヒト化CD26抗体治療法を開発し、これらの疾患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的とする。

具体的には、ヒト化CD26抗体(YS110)の動物モデルでのin vivoの有効性の検討、カニクイザルを用いての薬物動態や安全性の確立など前臨床試験および上記患者の免疫病態の解析を行い、平成19年度の最終年度に、クローン病やGVHD患者などの難治性免疫疾患を対照とする安全性および有効性への評価を行うことを目的とする。

B. 研究方法

1. 前臨床試験およびin vivo有効性解析に用いる動物について

YS110の単回投与の忍容性、毒性の検討のため0,10,25,50および100mg/kgのYS110を一時間で静脈投与のため、体重1.5kg~2.5kgのカニクイザル雌、雄、各1匹ずつ投与群として準備。またYS110の4週反復毒性試験のため、1.5kg~2.5kgのカニクイザル雄、雌各3匹ずつ、各々の投与群(YS110、0、3、10、30mg/kg)として準備し、さらに8週間回復観察群0及び30mg/kgについては2頭性群をそれぞれ追加した。

ヒトCD26陽性株のkarpas299 T細胞株移植マウスとして、Balb/c nu/nuマウス(5週令)を購入(チャールズリバー)。

異種GVHDモデルに用いるマウスとして、Jackson研究所より供与されたNOD/LtSz-Scid(NOD/Scid)マウスおよびNOD/Shi-Scidを用いた。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

組み換えヒト可溶性 CD26 (R&D システム) を一晚 Nunc プレートに coat して、その後洗浄し、被験血清 (100 μ l) および YS110 濃度の標準濃度測定のため、100 μ l (150ng/ml から 2.34ng/ml) をプレートにまく。その後、PBS-0.25% Tween で洗浄し、HRP-結合ラビット抗ヒト IgGFc ポリクローナル抗体を加え、室温で震盪して放置後、洗浄し、HRP Chemiluminescent 基質を加え、暗室で5分放置後、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) を使い、アッセイは製造元のプロトコールに沿って行った。

4. ヒト組織における CD26 の発現

インフォームドコンセントを得た種々のヒト正常および癌組織 (パラフィン切片) を市販のマウス型抗 CD26 抗体で免疫染色し、CD26 の発現頻度および強度を検討した。

5. 異種 GVHD マウスの作製および YS110 (ヒト化 CD26 抗体) 投与

インフォームドコンセントを得た健常人ドナーから分離したヒト PBL を NOD/SCID マウスあるいは NOG マウス (6-9 週令 雄マウス) へ PBL 7×10^6 個/匹を腹腔内投与した。ヒト抗 CD26 抗体 (YS110) 投与は 200 μ g/回 \times 3 回/W で計 2mg 投与を腹腔内投与した。対照には、精製ヒト・免疫グロブリンを同量投与した群を用いた。

6. 健常人および同種骨髄移植後患者末梢血のリンパ球の Treg および CD26 発現の解析

FOX P3 は末梢血全核細胞から RNA を抽出し、PCR で Fox P3 遺伝子発現の定量化を行った。Treg (CD3+CD4+CD25+)細胞は、末梢血を使用し、Internal Beads(BD Bioscience)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+細胞数を解析し、さらにこの細胞での CD26 の発現解析も試みた。

7. 炎症性腸疾患患者の末梢血お世簿 IL-2 腸管局所の T 細胞における CD26 分子の発現解析

文書により同意を得た炎症性腸疾患患者の末梢血および手術検体より得られた粘膜固有層リンパ球、上皮間リンパ球の CD26 分子の発現を Flow Cytometry を用いて解析する。

<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ッ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. YS110 の前臨床毒性試験について (青柳、森本)

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 YS110 の前臨床毒性試験及び in vivo 有効性試験を施行した。

カニクイザルを用いて YS110 の単回静脈内点滴投与予備試験において特記すべき副作用は認められず、剖検においても肉眼的および病理組織学的変化は認められなかった。さらに

YS110 を用いての 4 週反復投与毒性試験を行った。このため YS110 の 3mg/kg~30mg/kg の 1 時間の静脈内点滴投与での 1 日、8 日、15 日、22 日、29 日に渡っての反復投与及びコントロール群、30mg/kg の高濃度群ではさらに 56 日間経過観察を行った。特記すべき副作用は認められず、剖検においても肉眼的にも病理組織学的にも本剤投与に起因する異常変化は認められなかった。また本剤反復投与においてカニクイザル血清中の IL-6、TNF- α 、IL-1 α などの炎症性サイトカイン濃度は正常検出値以下であった。マウス型及び YS110 でヒト正常組織の交差反応性を免疫染色により検討したところ、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あった。また CD26 陽性 T 細胞株をマウスに移植した xenograft モデルで YS110 投与群では長期生存および細胞株の腫瘍の消失が認められた。

このようにヒト化 CD26 抗体 (YS110) はカニクイザルへの単回及び 4 週反復複数回投与においてもその毒性は認められず、xenograft モデルでもその *in vivo* の有効性が確認された。

2. 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 (山田、森本)

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 の治療での重要な点は、その作用機序が限局していること、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、その抑制が調節可能であること、である。本研究で開発するヒト化抗 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、昨年度開発した NOD/SCID マウスへのヒト PBL 移植による異種 GVHD モデルを用いて、YS110 抗体による GVHD 発症抑制および治療効果や安全性の評価を行った。その結果、ヒト化抗 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り、さらに予防効果のみならず治療効果も認められた。この結果は、ヒト化抗 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。

3. CD26 分子陽性 T 細胞を標的とした炎症性腸疾患における治療法の開発 (日比)

炎症性腸疾患は原因不明の慢性炎症性腸疾患でその病態には T リンパ球とくにメモリー T 細胞の関与が示唆されている。そこで我々はメモリー T 細胞に特異的に発現している CD26 分子の炎症性腸疾患における病態への関与を明らかにするとともに、同分子を標的とした新たな治療法の開発に取り組んでいる。炎症性腸疾患患者の腸管局所粘膜固有層リンパ球および上皮間リンパ球サブセットの解析の結果 CD26 陽性 T 細胞は末梢血中の T 細胞に比して粘膜固有層リンパ球に局在し、CD4+CD26 low と CD4+CD26 high の二つの細胞集団を形成していることが判明した。今後粘膜固有層 CD26 陽性 T 細胞 (CD4+CD26 low と CD4+CD26 high) の機能解析を行い、抗 CD26 抗体を用いた治療法の確立を目指す。

4. 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 (東條)

健康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免疫担当細胞、特に CD26 陽性 T 細胞ならびに制御性(Treg)T 細胞を解析し、病態との関連性について検討した。その結果、慢性 GVHD 群で CD3+(T)細胞中の CD8+細胞の比率が高く、CD4/CD8 比率は有意に低かったが、Treg 細胞については、CD4+T 細胞に占める比率ならびに末梢血中の絶対数ともに健康者と慢性 GVHD 患者で有意差はなかった。いっぽう、健康者と比較して慢性 GVHD 患者では、末梢血液中の CD26+/-CD4+細胞ならびに CD26+CD8+細胞の比率、絶対数ともに有意に低かった。いっぽう、CD26++CD4+細胞については GVHD 患者群で高い傾向が認められたものの有意差はなかった。

5. 臍帯血移植後の末梢血 T 細胞における CD26 分子発現の解析に関する研究 (渡辺、森本)

臍帯血移植後の T 細胞における CD26 分子の発現を解析したところ、同種骨髄移植後と比較して CD26 陽性メモリー細胞の頻度が低く、この細胞が急性 GVHD のエフェクターであることを示唆した。

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。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、血清中の薬物動態では、他の治療用ヒト化抗体と同様の薬物動態を示した。

さらに YS110 を用いての 4 週反復投与毒性試験を行った。このため YS110 の 3mg/kg~30mg/kg の 1 時間の静脈内点滴投与での 1 日、8 日、15 日、22 日、29 日に渡っての反復投与及びコントロール群、30mg/kg の高濃度群ではさらに 56 日間経過観察を行った。特記すべき副作用は認められず、剖検においても肉眼的にも病理組織学的にも本剤投与に起因する異常変化は認められなかった。また本剤反復投与においてカニクイザル血清中の IL-6、TNF- α 、IL-1 α などの炎症性サイトカイン濃度は正常検出値以下であった。

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。さらにヒト化 CD26 抗体 (YS110) を用いて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。

異種 GVHD 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、4週以降に症状が現れてくるものと推測される。まず「YS110 予防的投与」においては、ヒト化抗CD26モノクローナル抗体(YS110)による異種GVHD抑制効果は極めて顕著であり、組織学的には、ヒトリンパ球の諸臓器への浸潤を認めるものの、臨床症状は、軽微であった。またYS110投与マウスにおいて、上記のごく軽度のGVHD反応以外に病理学的変化はなく、YS110の毒性は明らかでなかった。一方、「YS110 治療的投与」では、GVHD症状が出現した後にYS110投与を行ったが、皮膚、体重などの臨床症状が約10日間で改善が認められ、最終的には、著明な延命効果が確認された。本モデルでは、いわゆるGVHDメカニズムは、急性型と考えられるが、その中でも移植後すぐに発症してくる症状だけでなく、遷延化した全身の高度な拒絶反応に対してもYS110投与が有用であることは、腹腔内投与されたYS110が、拒絶反応において機能するメモリーT細胞の機能あるいは細胞そのものの排除を通じてGVHDの抑制に寄与することを伺わせるものである。

炎症性腸疾患のクローン病に関して、CD26陽性T細胞は主に腸管粘膜固有層CD4陽性細胞に認められ、CD26highとCD26lowの二つの細胞集団として確認された。メモリーTリンパ球と考えられるCD26high細胞の割合は炎症性腸疾患患者で高い傾向が認められた。CD26陽性メモリーTリンパ球を標的とした治療は新たな炎症性腸疾患の治療ターゲットになりうると考えられる

GVHD患者において、研究の対象であるTreg細胞とCD26++エフェクターT細胞については、患者は免疫抑制剤などの治療の影響のためか有意差が認められなかったが、CD4+

CD26強陽性T細胞は高い傾向があった。この点をもう少し明確にするためには経過を追跡してそれらの変動と臨床所見の推移を追う必要があるであろう。

同種骨髄移植患者では、GVHDの頻度は臍帯血移植と比して非常に高く、臍帯血移植患者では炎症のエフェクターT細胞と考えられているCD26高発現T細胞が低かったが、同種骨髄移植患者ではGVHDの頻度は臍帯血移植と比して非常に高いことから、同種骨髄移植におけるCD26高発現T細胞がGVHDのエフェクター細胞であることが示唆され、この細胞がCD26による抗体療法ターゲットになりうることを示唆された。

E. 結論

ヒト化CD26抗体(YS110)はカニクイザルへの4週間複数回反復静脈投与では特記すべき副作用も認められず、また、本剤に起因する肉眼的および組織学的病理学的変化は認められなかった。さらにin vivoでのT細胞株移植マウスおよび異種GVHDモデルマウスにおいても予防的のみならず治療的投与においてもその有効性が確認された。

F. 健康危険情報

現時点では、特記すべき健康危険情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohnuma K, Uchiyama M, Yamochi T, Nishibashi K, Hosono O, Takahashi N, Kina S, Tanaka H, Lin X, Dang NH, Morimoto C. Caveolin-1 triggers T-cell activation via CD26 in association with CARMA1. J Biol Chem. in press 2007

- Thompson MA, Ohnuma K, Abe M, Morimoto C, Dang NH. CD26/Dipeptidyl Peptidase IV as a Novel Therapeutic Target for Cancer and Immune Disorders. *Medicinal Chemistry*. 2007; 7:253-273.
- Ohnuma-Ishikawa K, Morio T, Yamada T, Sugawara Y, Ono M, Nagasawa M, Yasuda A, Morimoto C, Ohnuma K, Dang NH, Hosoi H, Verdin E, Mizutani S. Knockdown of XAB2 enhances all-trans retinoic acid-induced cellular differentiation in all-trans retinoic acid-sensitive and -resistant cancer cells. *Cancer Res*. 2007; 67: 1019-1029.
- Inamoto S, Iwata S, Inamoto T, Nomura S, Sasaki T, Urasaki Y, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Dang NH, Morimoto C. Crk-associated substrate lymphocyte type regulates transforming growth factor-beta signaling by inhibiting Smad6 and Smad7. *Oncogene*. 2007; 26: 893-904.
- 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 retinoblastoma substrate dephosphorylation, cyclin-dependent kinase 2 reduction, p27(kip1) enhancement, and disruption of binding to the extracellular matrix. *Clin Cancer Res*. 2006; 12: 3470-3477.
- Ohnuma 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*. 2006;16:3-13.
- Mosohoshi Y, Matsuoka K, Chinen H, Kamada N, Sato T, Hisamatsu T, Okamoto S, Inoue N, Takaishi H, Ogata H, Iwao Y, Hibi T. Inhibition of neutrophil elastase prevents the development of murine dextran sulfate sodium-induced colitis. *J Gastroenterol*. 2006; 41: 318-324.
- Hibi T, Ogata H. Novel pathophysiological concepts of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. 2006; 41: 10-16.
- Kanai T, Hibi T, Watanabe M. The logics of leukocytapheresis as a natural biological therapy for inflammatory bowel disease. *Expert Opin Biol Ther*. 2006; 6: 453-466.
- Hisamatsu T, Inoue N, Yajima T, Izumiya M, Ichikawa H, Hibi T. Psychological aspects of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. 2007; 42: 34-40.
- Uesato N, Fukui K, Maruhashi J, Tajima N, Tojo A, Watanabe Y. JTE-607, a multiple cytokine production inhibitor, ameliorates disease in a SCID mouse xenograft acute myeloid leukemia model. *Exp Hematol*. 2006; 34: 1386-1392.
- Tomonari A, Takahashi S, Ooi J, Nakaoka T, Takasugi K, Uchiyama M, Tsukada N, Konuma T, Iseki T, Tojo A, Asano S. Cord blood transplantation for acute myelogenous leukemia using a conditioning regimen consisting of granulocyte colony-stimulating factor-combined high-dose cytarabine, fludarabine, and total body irradiation. *European Journal of Haematology*.

2006; 77: 46-50.

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. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2006; 33: 557-65.

Konuma T, Tomonari A, Takahashi S, Ooi J, Tsukada N, Yamada T, Sato H, Nagayama H, Iseki T, Tojo A, Asano S. Early-onset thyrotoxicosis after unrelated cord blood transplantation for acute myelogenous leukemia. *International Journal of Hematology*. 2006; 83: 348-50.

Inoue Y, Izawa K, Tojo A, Sekine R, Okubo T, Ohtomo K. Light emission requires exposure to the atmosphere in ex vivo bioluminescence imaging. *Molecular Imaging*. 2006; 5: 53-6.

Awaya N, Adachi A, Mori T, Kamata H, Nakahara J, Yokoyama K, Yamada T, Kizaki M, Sakamoto M, Ikeda Y, Okamoto S. Fulminant Epstein-Barr virus (EBV)-associated T-cell lymphoproliferative disorder with hemophagocytosis following autologous peripheral blood stem cell transplantation for relapsed angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Leuk Res*. 2006; 30: 1059-62.

Kawasaki H, Tsunoda K, Hata T, Ishii K, Yamada T, Amagai M. Synergistic pathogenic effects of combined mouse monoclonal anti-desmoglein 3 IgG antibodies on pemphigus vulgaris blister formation. *J Invest Dermatol*. 2006; 126: 2621-30.

Ohteki T, Tada H, Ishida K, Sato T, Maki C, Yamada T, Hamuro J, Koyasu S. Essential roles of DC-derived IL-15 as a mediator of inflammatory responses in vivo. *J Exp Med*. 2006; 203: 2329-38.

Minh TB, Watanabe M, Kajiwara N, Iwata H, Takahashi S, Subramanian A, Tanabe S, Watanabe S, Yamada T, Hata J. Human Blood Monitoring Program in Japan: Contamination and Bioaccumulation of Persistent Organochlorines in Japanese Residents. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2006; 51: 296-313.

Koide N, Yamada T, Shibata R, Mori T, Fukuma M, Yamazaki K, Aiura K, Shimazu M, Hirohashi S, Nimura Y, Sakamoto M. 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. *Clin Cancer Res*. 2006; 12: 2419-2426.

Kiuchi S, Yamada T, Kiyokawa N, Saito T, Fujimoto J, Yasue H. Genomic structure of swine taste receptor family 1 member 3, TAS1R3, and its expression in tissues. *Cytogenetic and Genome Research*. 2006; 115: 51-61.

Oishi M, Gohma H, Hshizume K, Taniguchi Y, Yasue H, Takahashi S, Yamada T, Sasaki Y. Early embryonic death-associated changes in genome-wide gene expression profiles in the fetal placenta of the cow carrying somatic nuclear-derived cloned embryo.

Molecular Reproduction and Development. 2006; 73: 404-9.

Yamato K, Fen J, Kobuchi H, Nasu Y, Yamada T, Nishihara T, Ikeda Y, Kizaki M, Yoshinouchi M. Induction of cell death in human papillomavirus 18-positive cervical cancer cells by E6 siRNA. *Cancer Gene Ther.* 2006; 13: 234-41.

2. 学会発表

Makino Y, Uenishi R, Hosono O, Morimoto C. Negative Regulation of the Hypoxia-inducible Transcription Factors and Angiogenesis by IPAS. *ASCI/APP Joint Meeting Poster Abstract p37-38*, 2006, Chicago, IL.

Inoue N, Yoshizawa S, Matsuoka K, Takaishi H, Ogata H, Iwao Y, Mukai M, Fujita T, Kawakami Y, Hibi T: Serum p53 antibodies (Abs) in patients with ulcerative colitis (UC) are associated with the development of colorectal cancer and screening of p53 Abs by ELISA is useful in cancer surveillance program for UC patients. *Digestive Disease Week 2006*, Los Angeles, 2006.5.21~25.

Nakazawa A, Takada T, Matsui T, Kado S, Asahara T, Nomoto K, Tanaka R, Sakuraba A, Yajima T, Inoue N, Ogata H, Iwao Y, Takaishi H, Hibi T: The constitution and distribution of intestinal bacterial flora in patients with inflammatory bowel disease: genus or species specific analysis based on 16s rRNA gene sequences of intestinal bacterial flora in human feces and Colonic mucosa. *Digestive Disease Week 2006*, Los Angeles, 2006.5.21~25.

Sakuraba A, Sato T, Iwakami Y, Takada Y, Inoue N, Takaishi H, Ogata H, Iwao Y, Hibi T: An open-labeled trial of granulocyte and monocyte adsorption apheresis for pouchitis. *Digestive Disease Week 2006*, Los Angeles, 2006.5.21~25.

Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Akagawa KS, Hibi T: Abnormally differentiated subsets of intestinal macrophage induce IL-12 hyperproduction in response to bacteria-etiologic of Th1 dominant colitis in IL-10 deficient mice. *Digestive Disease Week 2006*, Los Angeles, 2006.5.21~25.

Hisamatsu T, Arai K, Kamada N, Chinen H, Okamoto S, Umezawa K, Hibi T: The effect of novel NF- κ B inhibitor, dehydroxymethyllepoxyquinomichin in DSS colitis model mice. *Digestive Disease Week 2006*, Los Angeles, 2006.5.21~25.

Kobayashi T, Okamoto S, Iwakami Y, Nakazawa A, Hisamatsu T, Imai T, Hibi T: Fractalkine and its receptor CXCR3 are upregulated in inflammatory bowel disease. *Digestive Disease Week 2006*, Los Angeles, 2006.5.21~25.

Ando A, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kamada N, Hashimoto M, Kihara H, Hibi T: Histidine inhibits LPS-induced pro-inflammatory cytokine secretion from macrophages via suppression of NF- κ B activation. *Digestive Disease Week 2006*, Los Angeles, 2006.5.21~25.

Iwasaki E, Suzuki H, Sugino Y, Nishizawa T, Masaoka T, Hibi T: Enhanced levels of insulin resistance in patients with gastro-esophageal reflux evaluated by flat-panel detector assisted videoesophagography. *The American College of Gastroenterology 2007 Annual Scientific Meeting*, Las Vegas, 2006.10.22.

Higuchi H, Iizuka H, Izumiya M, Takaishi H, Hibi T: Mcl-1 depletion enhances anti-cancer drug-induced apoptosis in gastroenteric cancer cells. The American College of Gastroenterology 2007 Annual Scientific Meeting, Las Vegas, 2006.10.22.

Nishizawa T, Suzuki H, Takahashi A, Masaoka T, Muraoka H, Takahashi T, Iwasaki E, Kobayashi I, Hibi T. Gastifloxacin based triple therapy in third-line H. pylori eradication regimen: A randomized controlled trial. The American College of Gastroenterology 2007 Annual Scientific Meeting, Las Vegas, 2006.10.22.

Izumiya M, Yamagishi Y, Higuchi H, Takaishi H, Hibi T: Gemcitabin in elderly patients with unresectable pancreatic carcinoma. The American College of Gastroenterology 2007 Annual Scientific Meeting, Las Vegas, 2006.10.22.

Inoue N, Yoshizawa S, Matsuoka K, Sakuraba A, Takaishi H, Ogata h, Iwao Y, Mukai M, Fujita T, Kawakami Y, Hibi T : Serum p53 antibodies in patients with ulcerative colitis are associated with the development of colorectal cancer and its screening by elisa is complementary to cancer surveillance program. 14th United European Gastroenterology Week, Berlin Germany, 2006.10.23.

Ogata H, Kamada N, Inoue N, Matsui T, Hibi T : A randomized multicentre pilot study comparing mesalazine enemas and rebamipide enemas for active ulcerative colitis. 14th United European Gastroenterology Week, Berlin Germany,

2006.10.25.

Izawa K, Sekine R, Nagamura T, Kobayashi S, and Tojo A. Development of a unique in vitro and in vivo model system of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph-ALL) with emphasis on cell to cell interaction. American Society of Hematology 2006, Orlando, FL.

Nagamura T, Kodo H, Takahashi TA, Mugishima H, Tojo A, Asano S, Tokyo Cord Blood Bank. Four cases of donor cell-derived acute myeloid leukemia following unrelated cord blood transplantation for adult patients; Tokyo cord blood bank experiences American Society of Hematology 2006, Orlando, FL.

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

II. 分担研究報告

【CD26 分子陽性 T 細胞を標的とした炎症性腸疾患における治療法の開発】

分担研究者 日比紀文 慶應義塾大学医学部内科教授

研究要旨

炎症性腸疾患は原因不明の慢性炎症性腸疾患でその病態には T リンパ球とくにメモリー T 細胞の関与が示唆されている。そこで我々はメモリー T 細胞に特異的に発現している CD26 分子の炎症性腸疾患における病態への関与を明らかにするとともに、同分子を標的とした新たな治療法の開発に取り組んでいる。炎症性腸疾患患者の腸管局所粘膜固有層リンパ球および上皮間リンパ球サブセットの解析の結果 CD26 陽性 T 細胞は末梢血中の T 細胞に比して粘膜固有層リンパ球に局在し、CD4+CD26low と CD4+CD26high の二つの細胞集団を形成していることが判明した。今後粘膜固有層 CD26 陽性 T 細胞（CD4+CD26low と CD4+CD26high）の機能解析を行い、抗 CD26 抗体を用いた治療法の確立を目指す。

共同研究者

知念 寛、久松 里一、岡本 晋、井上 詠
（慶應義塾大学消化器内科）

A. 研究目的

炎症性腸疾患は原因不明の慢性炎症性腸疾患でわが国では潰瘍性大腸炎で 7 万人、クローン病で 2 万人を超え増加の一途をたどっている。その病態には活性化したメモリー T 細胞の関与が示唆されている。たとえば AIDS を合併し CD4 陽性 T 細胞が減少したクローン病患者では症状が軽快し、また既に臨床応用されている抗 TNF α 抗体（Infliximab）の作用機序として膜型 TNF を有した T 細胞のアポトーシス誘導などが明らかとなっている。このように CD4 陽性 T 細胞は炎症性腸疾患の治療標的であるが、一方で非特異的な CD4 陽性 T 細胞の除去は過去の抗 CD4 抗体のように重篤な免疫不全を合併するため臨床応用は困難である。すなわちいかに活性化した局所の T 細胞を選択的に排除でき

るかがポイントとなる。CD26 分子はこれまでの森本らの研究で活性化メモリー T 細胞に選択的に発現する表面マーカーであることが報告されており、我々は本分子を標的とすることで選択的活性化メモリー T 細胞を標的とした新たな炎症性腸疾患に対する治療法の確立が可能ではないかと考えるに至った。

本研究では第一段階として炎症性腸疾患患者の末梢血および腸管局所リンパ球（粘膜固有層リンパ球と上皮間リンパ球）における CD26 の発現解析を行い、病態への関与を明らかにする。さらに最終目標として抗 CD26 抗体を用いた治療法の臨床応用を目指す。

B. 研究方法

1) 炎症性腸疾患患者の末梢血および腸管局所の T 細胞における CD26 分子の発現解析

文書により同意を得た炎症性腸疾患患者の末梢血、および手術検体より得られた粘膜固有層リンパ球、上皮間リンパ球の CD26 分子の発

現を Flow Cytometry を用いて解析する。

2) 粘膜固有層 CD4+CD26low および CD4+CD26high T 細胞の機能解析

これまでの検討で粘膜固有層 CD4+T 細胞には CD26 の発現が高い細胞集団と低い細胞集団、そして発現を認めない細胞群の 3 群が存在することが確認された。我々は CD26high の細胞集団がおそらくは活性化メモリー T 細胞として治療標的になりうると考え、sorting を行いそれぞれの細胞集団におけるサイトカイン産生能などについて比較検討する (予定)。

C. 研究結果

1) 末梢血および腸管局所の T 細胞における CD26 分子の発現解析

図 1 : LPL (粘膜固有層内リンパ球) と PBL (末梢血リンパ球) における CD26 の発現

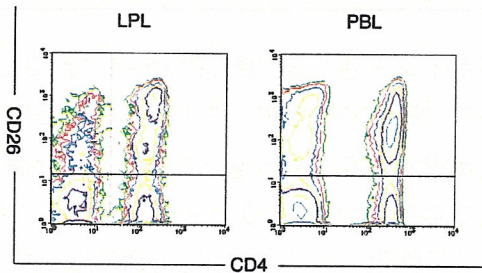
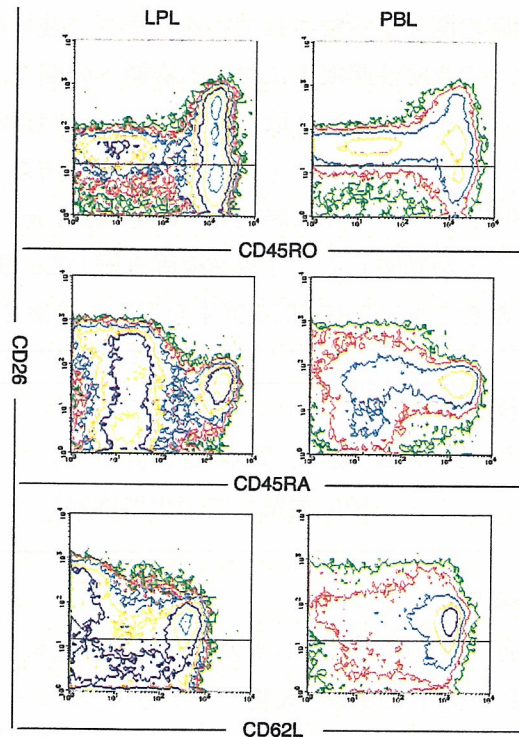


図 1 に示すように、コントロール症例 (提示例は大腸癌手術例の非癌部組織) の手術検体より得られた粘膜固有層リンパ球の解析 (CD3 でゲート) では CD26 の発現は CD4 陽性細胞および CD4 陰性細胞 (CD8 陽性細胞と考えられる) の両者に認められたが特に CD4 陽性細胞で優位であった。CD4 陽性細胞中の CD26 陽性細胞は単一の細胞集団ではなく CD26high と CD26low の 2 群を形成していた。この CD26high T 細胞は特に粘膜固有層 CD4 陽性リンパ球に多く、末梢血リンパ球では腸管局所に比べて CD26high CD4 T 細胞は少ないことが明らかとなった。

CD26high の細胞集団は腸管粘膜固有層 CD4

陽性細胞に多く分布しており、CD45RA、CD45RO との相関を調べたところ、この CD4+CD26high T 細胞は CD45RO 陽性のメモリー T リンパ球であると考えられた (図 2)。CD26low の細胞群には CD45RA 陽性細胞と CD45RO 陽性細胞が混在しておりナイーブとメモリー両者の T リンパ球が含まれると考えられる。

図 2 : CD26high CD4 T リンパ球は CD45RO 陽性のメモリー T リンパ球である。



2) 大腸癌患者非癌部大腸と炎症性腸疾患患者大腸粘膜における腸管粘膜固有層 CD26 陽性 T 細胞の比率の違いについて

腸管粘膜固有層 CD26 陽性 T リンパ球が炎症性腸疾患の病態に関与しているか否かについて、まずこの細胞群の比率が炎症性腸疾患患者で増加しているかどうかについて大腸癌患者非癌部大腸粘膜をコントロールとして検討した。この結果、腸管粘膜固有層 CD26 陽性 T リンパ球の腸管粘膜固有層 T リンパ球中に占める比率についてはコントロールと炎症性腸疾患患者で特に有意差を認めなかった (図 3)。

メモリーTリンパ球を含むCD4陽性CD26^{high}に絞った解析では特に炎症性腸疾患患者に高い傾向を認めた(図4)。

図3：炎症性腸疾患患者およびコントロールのLPLにおけるCD26陽性Tリンパ球の比率

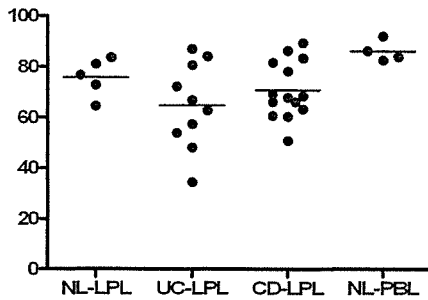
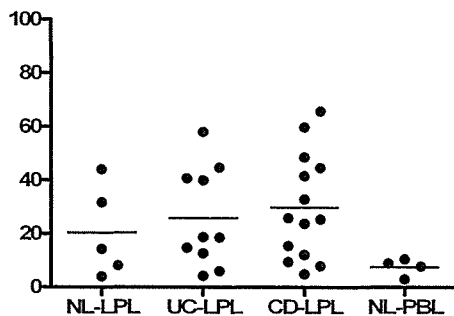


図4：炎症性腸疾患患者およびコントロールのLPLにおけるCD26^{high}メモリーTリンパ球の比率



D. 考察

これまでメモリーTリンパ球を標的とした抗CD4抗体や抗CD3抗体が炎症性腸疾患あるいは慢性関節リウマチなどで有効性が報告されているのと同様に、CD26分子を標的とした治療法も有効な新規治療法になりうると考えられる。ただし、この細胞群は健常人大腸粘膜や末梢血中にも存在することから副作用の有無について検討する必要がある。

E. 結論

CD26陽性T細胞は主に腸管粘膜固有層CD4陽性細胞に認められ、CD26^{high}とCD26^{low}の二つの細胞集団として確認された。メモリーT

リンパ球と考えられるCD26^{high}細胞の割合は炎症性腸疾患患者で高い傾向が認められた。CD26陽性メモリーTリンパ球を標的とした治療は新たな炎症性腸疾患の治療ターゲットになりうると考えられるが、副作用などについて今後のさらなる検討が必要である。

F. 次年度以降の計画

今後粘膜固有層CD26陽性T細胞(CD4+CD26^{low}とCD4+CD26^{high})の機能解析を行い、さらに、免疫組織化学にて粘膜内でのCD26陽性T細胞の局在の検討、血清中の可溶性CD26のELISAによる検討などを行い、抗CD26抗体を用いた治療法の確立を目指す。

G. 研究発表

1. 論文発表

Mosohoshi Y, Matsuoka K, Chinen H, Kamada N, Sato T, Hisamatsu T, Okamoto S, Inoue N, Takaishi H, Ogata H, Iwao Y, Hibi T. Inhibition of neutrophil elastase prevents the development of murine dextran sulfate sodium-induced colitis. *J Gastroenterol.* 41 (4): 318-324, 2006.

Hibi T, Ogata H. Novel pathophysiological concepts of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 41 (1): 10-16, 2006.

Kanai T, Hibi T, Watanabe M. The logics of leukocytapheresis as a natural biological therapy for inflammatory bowel disease. *Expert Opin Biol Ther.* 6 (5): 453-466, 2006.

Hisamatsu T, Inoue N, Yajima T, Izumiya M, Ichikawa H, Hibi T. Psychological aspects of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 42 (17): 34-40, 2007.

2. 学会発表

Inoue N, Yoshizawa S, Matsuoka K, Takaishi H, Ogata H, Iwao Y, Mukai M, Fujita T, Kawakami Y, Hibi T: Serum p53 antibodies (Abs) in patients with ulcerative colitis (UC) are associated with the development of colorectal cancer and screening of p53 Abs by ELISA is useful in cancer surveillance program for UC patients. Digestive Disease Week 2006, Los Angeles, 2006.5.21~25.

Nakazawa A, Takada T, Matsui T, Kado S, Asahara T, Nomoto K, Tanaka R, Sakuraba A, Yajima T, Inoue N, Ogata H, Iwao Y, Takaishi H, Hibi T: The constitution and distribution of intestinal bacterial flora in patients with inflammatory bowel disease: genus or species specific analysis based on 16s rRNA gene sequences of intestinal bacterial flora in human feces and Colonic mucosa. Digestive Disease Week 2006, Los Angeles, 2006.5.21~25.

Sakuraba A, Sato T, Iwakami Y, Takada Y, Inoue N, Takaishi H, Ogata H, Iwao Y, Hibi T: An open-labeled trial of granulocyte and monocyte adsorption apheresis for pouchitis. Digestive Disease Week 2006, Los Angeles, 2006.5.21~25.

Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Akagawa KS, Hibi T: Abnormally differentiated subsets of intestinal macrophage induce IL-12 hyperproduction in response to bacteria.-etiology of Th1 dominant colitis in IL-10 deficient mice. Digestive Disease Week 2006, Los Angeles, 2006.5.21~25.

Hisamatsu T, Arai K, Kamada N, Chinen H, Okamoto S, Umezawa K, Hibi T: The effect of novel NF- κ B inhibitor, dehydroxymethyllepoxyquinomichin in DSS colitis

model mice. Digestive Disease Week 2006, Los Angeles, 2006.5.21~25.

Kobayashi T, Okamoto S, Iwakami Y, Nakazawa A, Hisamatsu T, Imai T, Hibi T: Fractalkine and its receptor CXCR3 are upregulated in inflammatory bowel disease. Digestive Disease Week 2006, Los Angeles, 2006.5.21~25.

Ando A, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kamada N, Hashimoto M, Kihara H, Hibi T: Histidine inhibits LPS-induced pro-inflammatory cytokine secretion from macrophages via suppression of NF- κ B activation. Digestive Disease Week 2006, Los Angeles, 2006.5.21~25.

Iwasaki E, Suzuki H, Sugino Y, Nishizawa T, Masaoka T, Hibi T: Enhanced levels of insulin resistance in patients with gastro-esophageal reflux evaluated by flat-panel detector assisted videoesophagography. The American College of Gastroenterology 2007 Annual Scientific Meeting, Las Vegas, 2006.10.22.

Higuchi H, Iizuka H, Izumiya M, Takaishi H, Hibi T: Mcl-1 depletion enhances anti-cancer drug-induced apoptosis in gastroenteric cancer cells. The American College of Gastroenterology 2007 Annual Scientific Meeting, Las Vegas, 2006.10.22.

Nishizawa T, Suzuki H, Takahashi A, Masaoka T, Muraoka H, Takahashi T, Iwasaki E, Kobayashi I, Hibi T. Gastifloxacin based triple therapy in third-line H. pylori eradication regimen: A randomized controlled trial. The American College of Gastroenterology 2007 Annual Scientific Meeting, Las Vegas, 2006.10.22.

Izumiya M, Yamagishi Y, Higuchi H, Takaishi H, Hibi T: Gemcitabin in elderly patients with unresectable pancreatic carcinoma. The American College of Gastroenterology 2007 Annual Scientific Meeting, Las Vegas, 2006.10.22.

Inoue N, Yoshizawa S, Matsuoka K, Sakuraba A, Takaishi H, Ogata h, Iwao Y, Mukai M, Fujita T, Kawakami Y, Hibi T: Serum p53 antibodies in patients with ulcerative colitis are associated with the development of colorectal cancer and its screening by elisa is complementary to cancer surveillance program. 14th United European Gastroenterology Week, Berlin Germany, 2006.10.23.

Ogata H, Kamada N, Inoue N, Matsui T, Hibi T : A randomized multicentre pilot study comparing mesalazine enemas and rebamipide enemas for active ulcerative colitis. 14th United European Gastroenterology Week, Berlin Germany, 2006.10.25.

H. 知的財産権の出願

なし

【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血液腫瘍内科教授

研究要旨

健康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免疫担当細胞、特に CD26 陽性 T 細胞ならびに制御性 (Treg) T 細胞を解析し、病態との関連性について検討した。その結果、慢性 GVHD 群で CD3+(T) 細胞中の CD8+細胞の比率が高く、CD4/CD8 比率は有意に低かったが、Treg 細胞については、CD4+T 細胞に占める比率ならびに末梢血中の絶対数ともに健康者と慢性 GVHD 患者で有意差はなかった。いっぽう、健康者と比較して慢性 GVHD 患者では、末梢血液中の CD26+/-CD4+細胞ならびに CD26+CD8+細胞の比率、絶対数ともに有意に低かった。いっぽう、CD26++CD4+細胞については GVHD 患者群で高い傾向が認められたものの有意差はなかった。

A. 研究目的

免疫担当細胞における CD26 の発現は主として T 細胞に認められ、その発現レベルは刺激による T 細胞の活性化によって増強する。CD26 強陽性(++)T 細胞は関節リウマチ等の自己免疫疾患における炎症局所での集積が報告されており、炎症部位に遊走しやすいことから炎症のエフェクター T 細胞と言われている。また、近年多発性硬化症 (MS) 活動期において CD26++CD4+細胞がエフェクター細胞となっている可能性が示唆されている。

いっぽう、制御性 T (Treg)細胞は、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 細胞には恒常的に発現しているが、CD4+CD25-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。また、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、本年度は、血液疾患における CD26 強陽性 T 細胞の病態への関与を検討する目的で、