

同種造血幹細胞移植後の慢性 GVHD における末梢血 Treg 細胞および CD26<sup>+</sup>T 細胞、さらには他の免疫担当細胞分画を解析し、健常者と比較した。

## B. 研究方法

### 【患者】

本研究では、健常者 11 名(男女比:7/4、年齢中央値:41、範囲:30~63)、慢性 GVHD 患者 9 名(男女比:4/5、年齢中央値:42、範囲:24~64)を対象とした。慢性 GVHD 患者の移植幹細胞ソースは、血縁者骨髄 4、非血縁者骨髄 2、臍帯血 3 であった。原疾患は急性骨髄性白血病 2、慢性骨髄性白血病 2、骨髄異形成症候群 1、急性リンパ性白血病 2、悪性リンパ腫 1、重症再生不良性貧血 1 であり、移植後日数の平均値は 2314 日であった。カルシニューリン阻害剤やステロイドなどの免疫抑制剤に抵抗性を示す症例を選択した。

### 【方法】

各種免疫担当細胞は、EDTA-2Na 含有採血管に採取した全血 1~2ml を試料として、各種モノクローナル抗体による直接染色後溶血させ、多蛍光フローサイトメトリー法で解析した。また、Treg 細胞の同定には溶血操作後、抗 Foxp3 モノクローナル抗体による細胞内染色を行った。各種免疫担当細胞数の測定は、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以下の計算式にしたがって算出した。  
「免疫担当細胞数/ $\mu$ l = ゲート内細胞数/取り込みビーズ数 x チューブ当りのビーズ数/サンプル容積(50  $\mu$ l) x 希釈倍率」

統計解析はプログラムソフト JMP (SAS Institute)を用いて検定した。

使用したモノクローナル抗体の組み合わせパネルを表 1 に示す。

表 1. 使用したモノクローナル抗体の組み合わせ

|    | FITC     | PE       | PC5  | ECD      |
|----|----------|----------|------|----------|
| 1  | マウス IgG1 | マウス IgG1 |      | マウス IgG1 |
| 2  | CD8      | CD4      | CD45 | CD3      |
| 3  | マウス IgG1 | CD4      | CD45 | CD3      |
| 4  | CD25     | CD4      | CD45 | CD3      |
| 5  | CD25     | CD8      | CD45 | CD3      |
| 6  | CD19     | CD56     | CD45 | CD3      |
| 7  | CD8      | CD26     | CD45 | CD3      |
| 8  | CD4      | CD26     | CD45 | CD3      |
| 9  | CD25     | FoxP3    | EMA  | CD4      |
| 10 | マウス IgG1 | マウス IgG1 | EMA  | CD4      |

### C. 研究結果

まず、各種血球数を健常者と慢性 GVHD 患者間で比較した結果を図 1 に示す。この 2 群において末梢血白血球数に有意差はなく、白血球分画の中では単球数のみ慢性 GVHD 群が健常者より有意に高かった。

T 細胞分画の解析結果では、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。いっぽう、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常者と慢性 GVHD 患者で有意差はなかった (図 2)。

次に CD4+CD26++細胞のフローサイトメトリーによる解析パターンを概説する。まず、CD45+SSC<sup>low</sup>の細胞集団を CD3 と CD26 の発現に基づいて 2 次元に展開し、さらに CD3+細胞集団を CD4+と CD4-(CD8+)の 2 分画に分け、それぞれの CD26 発現レベルを解析した。この場合 CD26 陽性 CD4+細胞は、非常に発現レベルが高い少数の分画 (CD26++) と中等度の発現を示す分画 (CD26+) に識別され、前者が CD26++エフェクター T 細胞と考えられた。いっぽう、CD8+細胞は CD26++に該当する分画が認められなかった。健常者と比較して慢性 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 (図 3)。

### D. 考察

今回の解析対象は、全身型の慢性 GVHD を発症している患者であったが、ほとんどがステロイドやカルシニューリン阻害剤その他の免疫抑制剤の投与を受けており、その影響を考慮すれば、免疫担当細胞の解析結果がそのまま病態を反映していると解釈することは困難である。また、末梢血での解析結果が局所 (皮膚、肝、

腸管など) の病態を反映しているかどうかは不明である。しかしながら、免疫担当細胞のいくつかの分画について有意差が認められたことは興味深く、その意義については更なる検討を要する。研究の主対象である Treg 細胞と CD26++エフェクター T 細胞については、やはり治療の影響のためか有意差が認められなかったが、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。

### E. 結論

CD4+CD26++ T 細胞は慢性 GVHD におけるエフェクター T 細胞として機能している可能性がある。

### F. 次年度以降の計画

- (1) 慢性 GVHD 病変局所 (皮膚、腸管粘膜、肝臓、肺など) の生検標本を用いて、局所浸潤 T 細胞における Cd26 発現の有無を免疫組織染色法にて調べる。この場合可能であれば、CD4 または CD8 との二重染色を試みる。得られたデータを臨床症状ならびに他の検査所見と照合して疾患活動性との相関の有無について検討する。
- (2) ヒト混合リンパ球培養反応 (MLR) に及ぼす CD26 陽性 T 細胞除去の影響を解析する。健常ヒト末梢血単核球を用いた MLR において、抗 CD26 抗体添加の影響を CFSE などの蛍光色素標識によるセルトラッキング法にて解析する。
- (3) 免疫不全マウス (NOG) にヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を移植してリンパ造血系の再構築モデルを作成し、抗ヒト CD26 抗体の投与によって、ヒト免疫担当細胞の動態変化を *in vivo* で解析する。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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: 1385-1392.

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.

### 2. 学会発表

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.

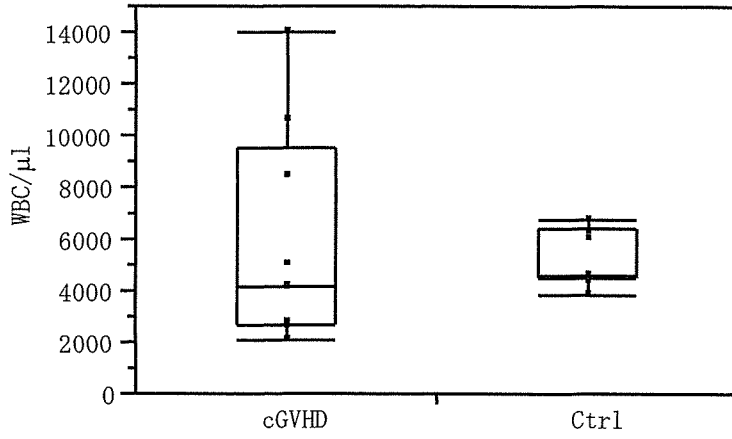
Nagamura T, Kodo H, Takahashi TA, Mugishima H, Tojo A, Asano S, Tokyo Cord Blood Bank. Four cases of donor cell-derived acute myeloid leukemia following unrelated cord blood transplantation for adult patients; Tokyo cord blood bank experiences American Society of Hematology 2006, Orlando, FL.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

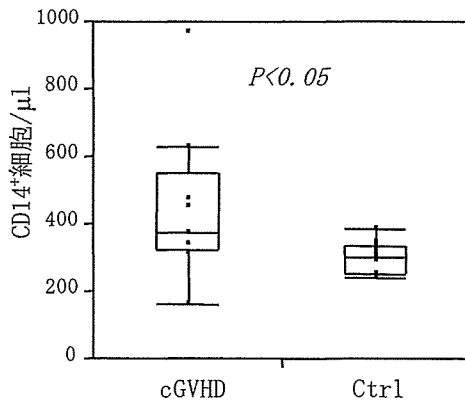
1. 特許取得 : なし
2. 実用新案登録 : なし
3. その他 : なし

図1

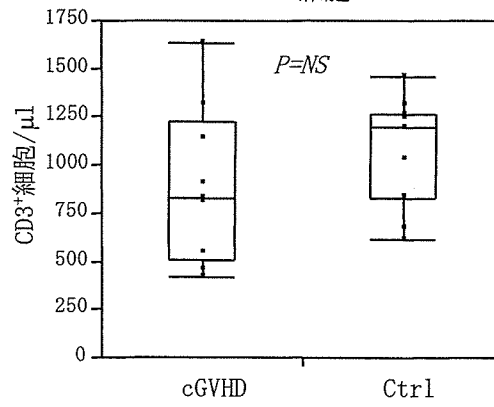
末梢血白血球数



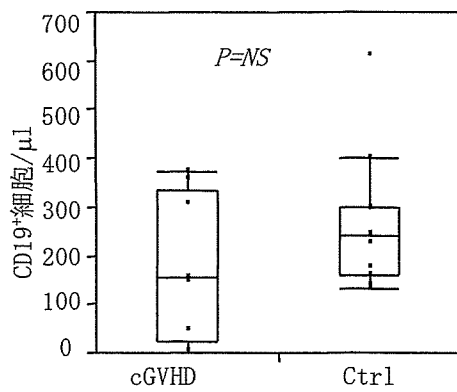
単球



T細胞



B細胞



NK細胞

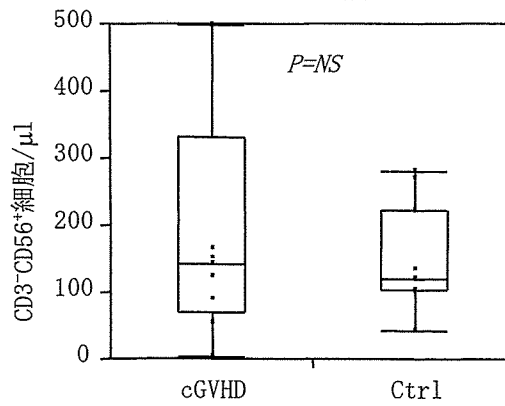
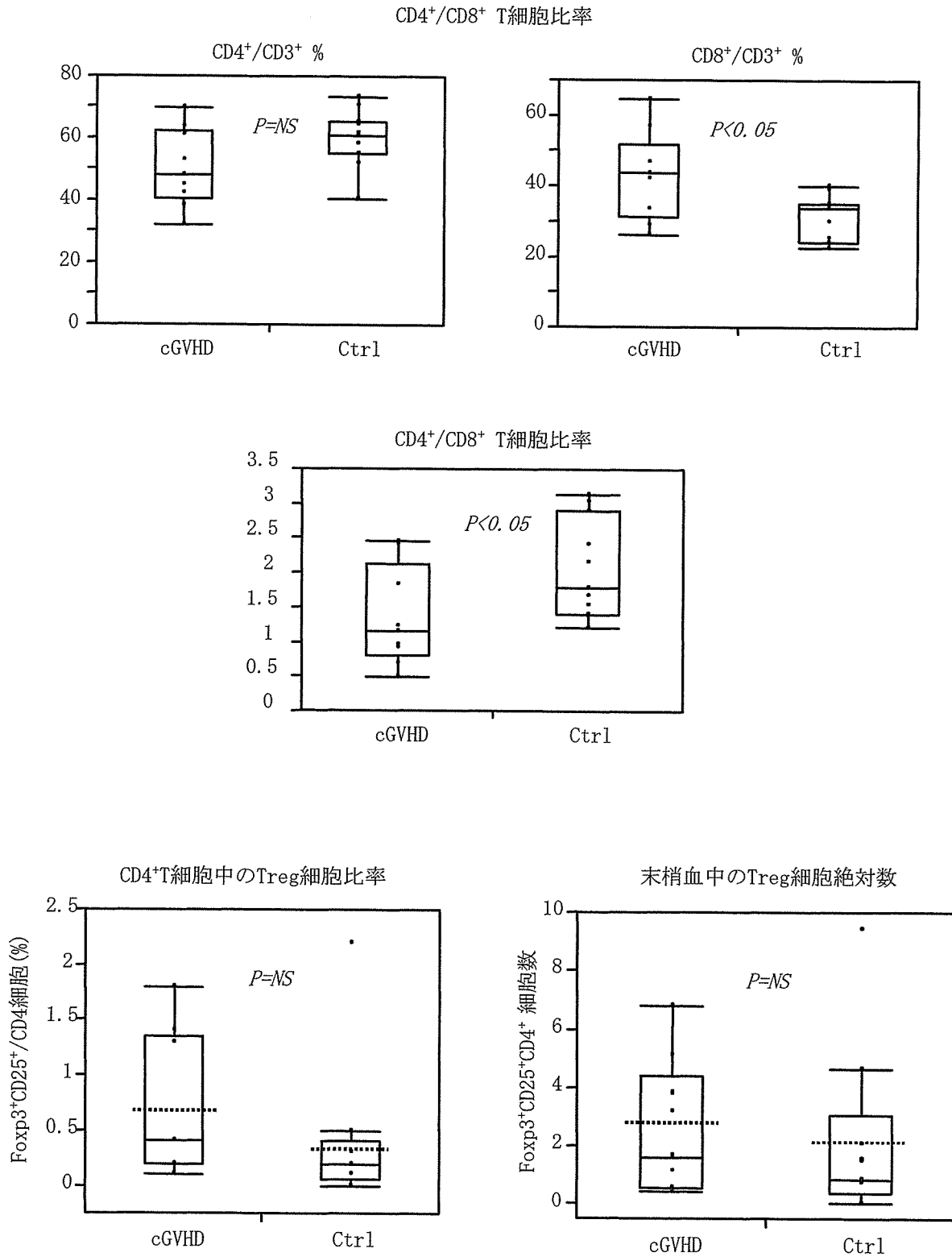
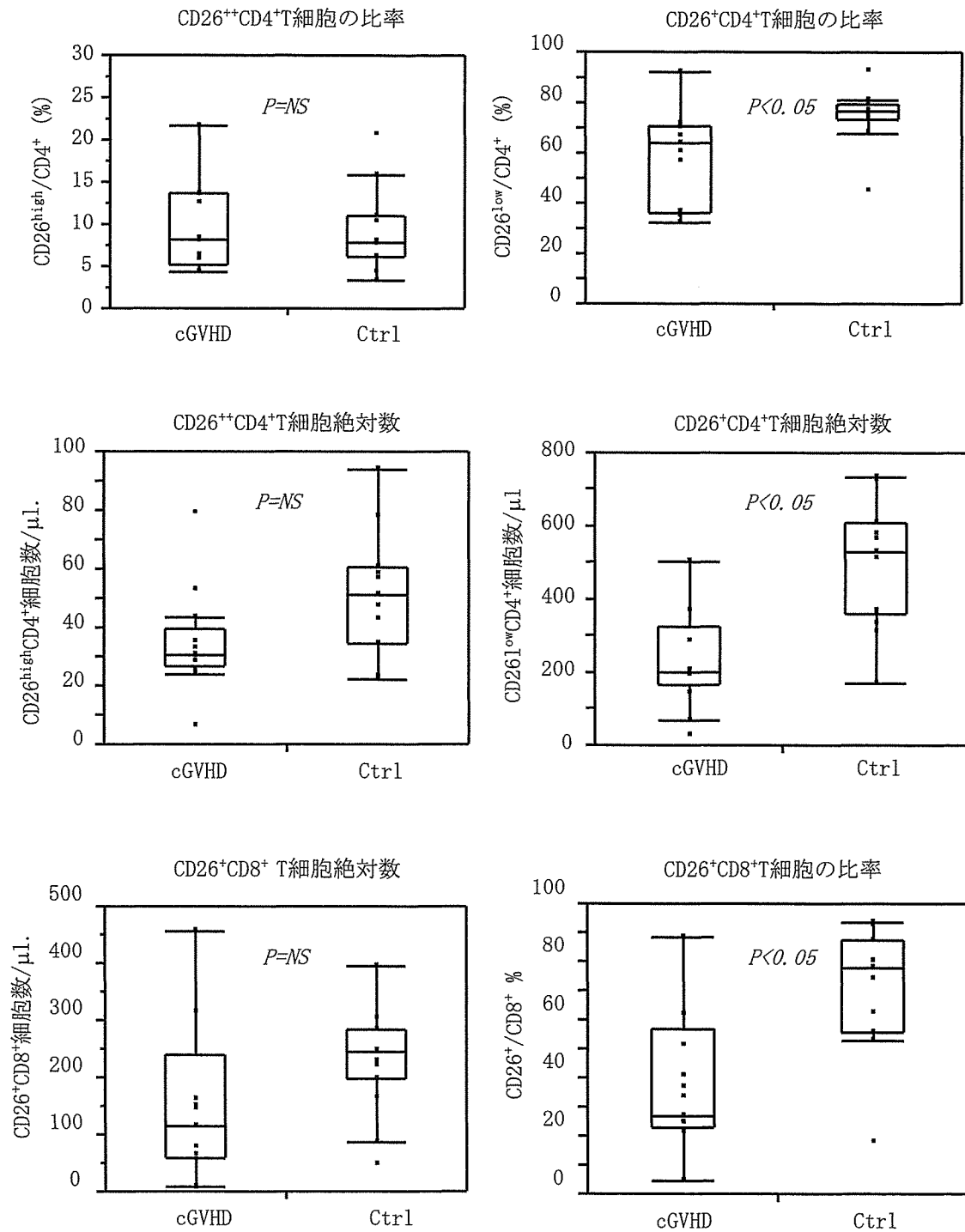


図2



CD26陽性T細胞の解析



【ヒト化 CD26 抗体 (YS110) の前臨床毒性試験について】

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 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- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$  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。

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

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)。

YS110 の 4 週間反復投与毒性試験のため体重 1.5kg~2.5kg のカニクイザル雄、雌各 3 匹ずつおのおのの投与群 (YS110、0、3、10、30mg/kg) 及び 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。

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)

1µg 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 µl) 及び YS110 濃度の標準濃度測定のため、100µl (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 100µl 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。さらに YS110 を用いたヒト組織の交差反応性についても同様に検討した。

#### 5. FACS 解析

投与後のカニクイザル血液のリンパ球を 7 種類の抗体 (CD3、CD4、CD8、CD20、CD25、CD26、CD16) を用いて FACS で解析した。

(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ー、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. 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 ( $T_{1/2}$ ) 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、他の治療用ヒト化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. 4 週間反復投与毒性試験について

単回投与による安全性を確認したので、次に YS110 の 4 週間反復投与毒性試験をカニクイザルを用いて行った (週 1 回、total 5 回投与、day1、8、15、22、29)。YS110 を 0 (溶媒対照)、3、10、30mg/kg の用量で各群雌、雄各 3 匹ずつに 1 時間かけて静脈投与を行い、さらに対照群 (0) と高濃度群 (30mg/kg) については雌、雄 2 匹ずつ追加して、56 日間経過観察を行った。表 1 にあるように、血中薬物半減期 ( $T_{1/2}$ ) は単回投与時とほぼ同様で、10mg/kg 群で初回投与時 78 時間、最終投与時 52 時間で、30 mg/kg 群で初回投与時 105 時間、最終投与時 152 時間で、この血中半減期は単回投与毒性試験とほぼ同様の傾向であった。分布容積は 3mg/kg 群で 49 (ml/kg)、10mg/kg で 61 (ml/kg)、30mg/kg で 104 (ml/kg) であった。また血中からの薬物消失速度 (CL) は 3mg/kg 群で 0.86ml/h.kg、10mg/kg 群で 0.48 ml/h.kg、30 mg/kg 群で 0.57 ml/h.kg であった。

投与期間中及び投与後 56 日間の観察期間中

において特記すべき異常臨床所見、注射部位の異常所見もなく、体重、食事摂取等にも変化はなかった。また全例について MAHA (monkey anti-human antibody) は検出せず、血液所見、血清化学及び凝固検査で異常は認められなかった。YS110 投与後の血清中の TNF- $\alpha$ 、IL-6 及び IL-1 $\beta$  レベルについては投与後 1 時間、6 時間、24 時間測定したが、すべての群において正常検出限度以下であった。さらに剖検において肉眼的にも病理組織学的にも本剤投与に起因すると思われる病理学的変化は認められなかった。

### 3. 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。

さらに 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。

### 4. 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。

### 5. 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。

小腸、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。さらに YS110 を用いて種々のヒト正常組織 (パラフィン切片) を用いてその組織交差性について検討した。

小腸、胃、卵巣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の発現で、市販の抗 CD26 抗体 (マウス型) を用いた結果とほぼ同様であった。

### 6. YS110 投与後のリンパ球サブセットの変化

CD3、CD4、CD8 陽性 T 細胞はいずれの群でも投与期間中及び投与後 56 日間は特に変化は認められなかった。更に CD25、CD26 陽性 T 細胞についても同様に変化はなかった。しかし CD3-/CD16+リンパ球については図 1 に示すようにいずれの群でも投与後 2 日後に減少したが投与 8 日目にはもとのレベルにほぼ回復した。

### 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。通常は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、我々は非常に良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(Frame work)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、良質のヒト化抗体を作製し、高親和性、高生物学的活性をもつヒト化抗体が得られた。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 non-GMP グレードのヒト化 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、特記すべき副作用は出現せず、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。さらにカニクイザルを用いて YS110 の 3mg/kg~30mg/kg の静脈内点滴投与での 1 日、8 日、15 日、22 日、29 日の反復投与及びコントロール群 (溶媒群)、高濃度群 (30mg/kg) での 56 日間観察を行った。特記すべき副作用は認められず、剖検においても肉眼的および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。YS110 を投与 2 日後に CD3-CD16+リンパ球の減少が認められた (8 日目にはほぼもとに回復したが)。YS110 は CD3-CD16+リンパ球とは反応しないことから、これは YS110 の Fc 部分が CD16+リンパ球の Fc receptor に結合し、そのため、末梢血中から網内系にとり込まれ、一過性に末梢血中から減少したように見えたのではという可能性が最も考えられる。

昨年 3 月英国において superagonistic の作用をもつ CD28 抗体 TGN1412 抗体投与による第

一相臨床試験において投与直後サイトカインストームが生じて 6 名の健康人が多臓器不全に陥り入院したが、YS110 投与におけるカニクイザルを用いた高濃度反復投与においても、血清中の IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$  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。この TG1412 抗体は CD28 抗体中でも superagonistic としてデザインされている。通常は CD3 抗体の存在がないと CD28 抗体を含む共刺激分子への抗体は T 細胞を活性化できないが、この抗体は (CD3 なしでも) small population の CD25+ Treg 細胞だけを活性化するということであったが、すべての T 細胞 (CD28 陽性 T 細胞) を活性化してしまった。

抗体療法は現在、癌、免疫疾患などで先端医療として popular になりつつあるが、従来までの臨床に用いられている抗体はすべて antagonist のものであるがこの抗体のみ”agonist”である。彼らの特許出願でサルを用いた前臨床試験でも全身的副作用は認められない範囲の T 細胞活性化が認められていると記述してある (Science 313:308, 2006)。ヒト化 CD26 抗体 (YS110) は antagonist を狙ったもので、in vitro で T 細胞を活性化せず、またサルでの前臨床試験で高濃度 (100mg/kg) でも全く T 細胞活性化は認められていないので安全と思われるが、ヒトでは初めての投与であるので慎重であるべきと思われ、低濃度から時間をゆっくりかけて投与すべきと考えている。

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。さらにヒト化抗体を用いてヒト正常組織で 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るが、腎細胞癌、前立腺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多く示唆された。

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。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い、その安全性、有効性を確認する予定である。

#### 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及び複数回反復投与でも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べき体制がとれつつある。

#### F 次年度以降の計画

第一相臨床試験のために、GMP 下での YS110 の製剤化、安定性試験を行い、ヒト化 CD26 抗体 (YS110) を用いたクローン病、急性 GVHD 患者での探索的臨床研究の施行を行う。

#### 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 投与後の末梢血中の CD3-/CD16+ リンパ球の比較パーセント

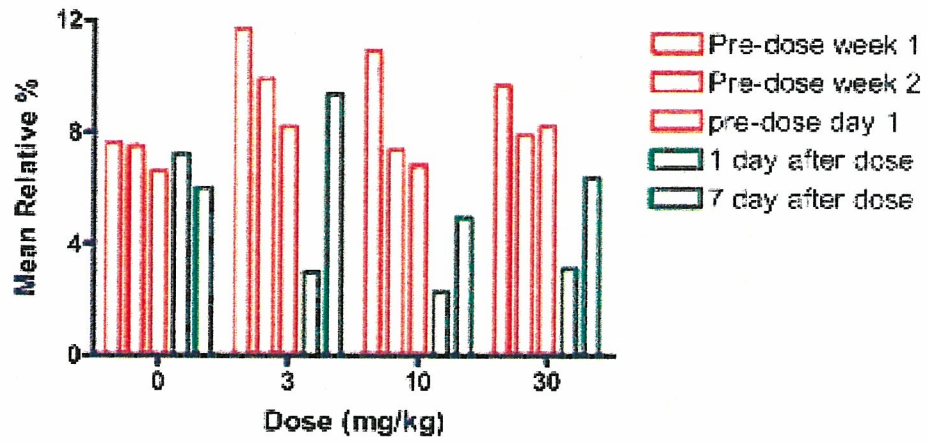


表1 YS110 の Toxicokinetics

| Dose (mg/kg) | 3mg/kg<br>(初回) | 3mg/kg<br>(最終回) | 10mg/kg<br>(初回) | 10mg/kg<br>(最終回) | 30mg/kg<br>(初回) | 30mg/kg<br>(最終回) |
|--------------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|
| T (1/2) (時間) | 53             | 49              | 78              | 52               | 105             | 152              |

厚生科学研究費補助金（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、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認められる。本疾患は骨髄移植の後に最もよくみられるものであるが、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、ヒト GVHD の小動物疾患モデルの開発を通じ、ヒト化抗 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、トリパンプルーにより生細胞 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。ヒト化抗 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。今年度は、YS110 投与方法を「予防的投与」と「治療的投与」の 2 種類行った。すなわち「予防的投与」では、ヒト PBL をマウスへ移植翌日より YS110 を投与開始した。一方、「治療的投与」では、ヒト PBL をマウスへ移植後、GVHD が発症して 2 週間後から (6 週目) 投与した。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。

(倫理面への配慮)

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 文部科学省・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

### 「YS110 予防的投与」実験

ヒト PBL  $7 \times 10^6$  個/匹を腹腔内投与後、翌日より YS110 を投与開始した (計 10 回、総量 2mg)。その後、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、ヒト化抗 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、ヒト化抗 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。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、ヒト化抗 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、ヒト化抗 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 1 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、ヒト化抗 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。その他に肝、肺、唾液腺などにおいて対照群では、高度のヒトリンパ球浸潤と高度な組織破壊が観察されたが、ヒト化抗 CD26 モノクローナル抗体 (YS110) 投与群では、これらの細胞浸潤と組織破壊は軽度であった。

#### 「YS110 治療的投与」実験

ヒト PBL  $7 \times 10^6$  個/匹を腹腔内投与後、GVHD 発症後 2 週目に当たる 6 週目より、YS110 を投与開始した (計 10 回、総量 2mg)。その後、順次、マウス体重および皮膚・毛並みを観察し、10 週にて、末梢血を採取し、剖検した。YS110 投与後 10 日以降で、対照群に比べて、毛並みに差異が現れた。また投与後 2 週目より体重が漸増しはじめ、背部・腹部の皮膚での発毛が明らかになってきた (図 2)。対照群の一部は 9 週より死亡するマウスが出現し、順次死亡し、13 週で全て死亡したが、ヒト化抗 CD26 モノクローナル抗体 (YS110) 投与群では、15 週まで死亡するマウスはなかった。

#### D. 考察

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、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。

#### E. 結論

NOD/SCID マウスへのヒト PBL 移植により発症する異種 GVHD モデルを用いて、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、特に治療効果も期待できることが明らかとなった。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。

#### F. 次年度以降の計画

これまでの異種移植系での GVHD モデルを用いた実験系で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 投与後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や免疫染色で解析し、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で、YS110 の作用機序を解析する。また本異種移植 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 モデルともいふべきものであった。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

### 1. 論文発表

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.

Awaya N, Adachi A, Mori T, Kamata H, Nakahara J, Yokoyama K, Yamada T, Kizaki M, Sakamoto M, Ikeda Y, Okamoto S.

Leuk Res. 30(8):1059-62, 2006

Synergistic pathogenic effects of combined mouse monoclonal anti-desmoglein 3 IgG antibodies on pemphigus vulgaris blister formation.

Kawasaki H, Tsunoda K, Hata T, Ishii K, Yamada T, Amagai M.

J Invest Dermatol. 126(12):2621-30, 2006

Essential roles of DC-derived IL-15 as a mediator of inflammatory responses in vivo.

Ohteki T, Tada H, Ishida K, Sato T, Maki C, Yamada T, Hamuro J, Koyasu S.

J Exp Med 203(10):2329-38, 2006

Human Blood Monitoring Program in Japan: Contamination and Bioaccumulation of Persistent Organochlorines in Japanese Residents.

T. B. Minh, M. Watanabe, N. Kajiwara, H. Iwata, S. Takahashi, A. Subramanian, S. Tanabe, S. Watanabe, T. Yamada, J. Hata

Archives of Environmental Contamination and Toxicology 51(2):296-313, 2006

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 12(8):2419-2426, 2006

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

Kiuchi S, Yamada T, Kiyokawa N, Saito T, Fujimoto J, Yasue H

Cytogenetic and Genome Research 115(1):51-61, 2006

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 73(4):404-9. 2006

Induction of cell death in human papillomavirus  
18-positive cervical cancer cells by E6 siRNA.

Yamato K, Fen J, Kobuchi H, Nasu Y, Yamada T,  
Nishihara T, Ikeda Y, Kizaki M, Yoshinouchi M.

Cancer Gene Ther. 13(3):234-41, 2006

2. 学会発表 : なし

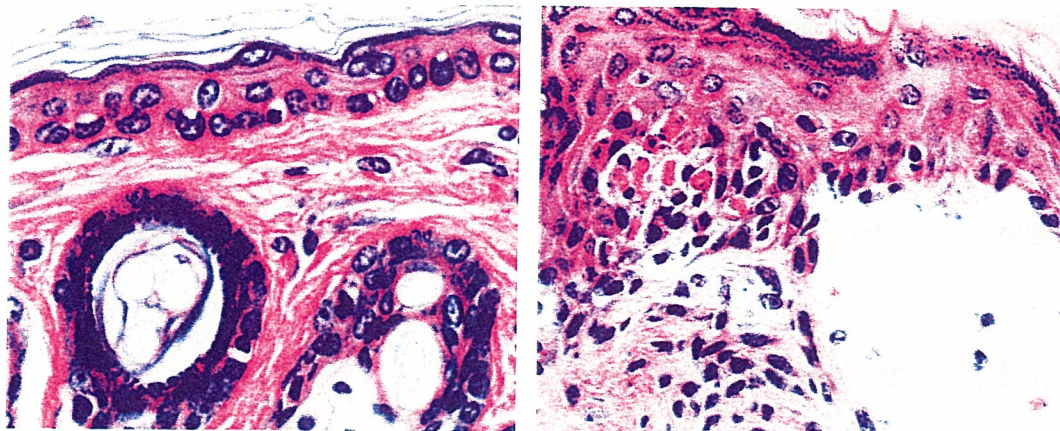
#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得 : なし

2. 実用新案登録 : なし

3. その他 : なし

図1 GVHD モデルマウス皮膚病変へのYS110の効果



対照群では、表皮・真皮へのリンパ球浸潤と扁平上皮細胞の壊死が見られるが、YS110投与群では、ごく軽度である。

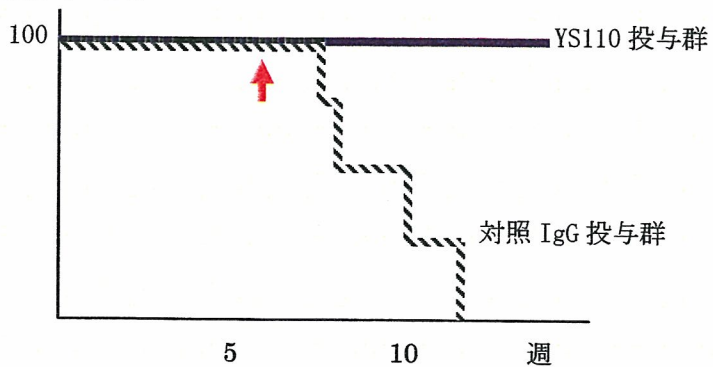
図2 YS110投与によるGVHD皮膚病変の抑制



GVHD発症後にYS110投与することで、GVHDによる脱毛が改善されている。

図3 YS110によるGVHD治療効果

生存率 (%)



GVHD発症後にYS110投与(2mg/10回)により、  
顕著な延命効果が得られた。

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

【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】

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

**研究要旨**

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。

**A. 研究目的**

移植後の急性 GVHD の重症度と、T 細胞における CD26 分子発現強度について関連があるのか、同種骨髄移植と臍帯血移植の T 細胞サブセットの比較の結果で推察する。

**B. 研究方法**

東京大学医科学研究所附属病院で、臍帯血移植または骨髄移植を受けた患者を対象にした。採血後、Ficoll で単核球を単離して染色、Aria で解析した。

(倫理面への配慮について)

文書でインフォームドコンセントを得た。

**C. 研究結果**

臍帯血移植後の CD26 分子の発現は、骨髄移植後および健常人コントロールにおける T 細胞での CD26 発現と比較して、明らかに低い頻度であった。

臍帯血移植後の CD26 分子の発現は、CD25 分子の発現と一部重なるものの、完全に一致することはなかった。

**D. 考察**

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 細胞が低いことから、骨髄移植における CD26 高発現細胞が 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 による抗体療法のターゲットになりうることが考えられた。

**E. 結論**

臍帯血移植後に重症の急性 GVHD の発症が少ないのは、GVHD のエフェクター細胞である CD26 陽性メモリー細胞の頻度が低いことと関連があると思われる。

**F. 次年度以降の計画**

骨髄移植症例をさらに増やして解析し、骨髄移植後の CD26 発現細胞と、Treg、CMV 特異的免疫細胞との関連を明らかにしたい。

**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