

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
(H17-トランス-一般-007)

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 森本 幾夫

平成20(2008)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 ---- 3
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. 炎症性腸疾患の病態における CD26 分子陽性 T 細胞の関与の検討 ----- 19
分担研究者 日比 紀文
慶應義塾大学医学部内科・教授
2. 慢性骨髄性白血病—細胞遺伝学的寛解例の免疫学的解析 ----- 23
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. GLP 準拠によるヒト化 CD26 抗体（YS110）の前臨床毒性試験について ----- 29
分担研究者 加藤伸朗
ワイスセラピューティクス 株式会社・代表取締役副社長
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 ----- 37
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. 骨髄移植後の制御性 T 細胞および CMV 特異的 T 細胞における
CD26 発現の解析 ----- 43
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・助教

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 45

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 53

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、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。平成19年度はYS110（ヒト化CD26抗体）のGLP準拠の前臨床試験、GVHDマウスモデルを用いたin vivoの有効性の分子機序、クローン病、GVHD患者の免疫病態の解析を主に検討した。GLP準拠のYS110の5週間複数回反復投与で特記すべき副作用も観察されず、剖検においても肉眼的、病理組織学的にも異常所見は認められなかった。昨年度にYS110の異種GVHDモデルでの有効性を報告したが、GVHDモデル肝臓組織からのリンパ球をFACSで解析したところ、コントロール群はCD26強陽性T細胞が顕著に増加していたがYS110投与群ではCD26強陽性T細胞は消失していた。さらにGVHDモデルの皮膚組織ではCD4細胞のみならずCD8細胞の浸潤は、YS110投与群では軽度であったが、コントロール群では著明な浸潤が認められた。またヒト急性GVHD患者の胃腸管粘膜では重症例ほど多数のCD26陽性T細胞の浸潤が認められた。クローン病の腸管炎症粘膜生検においてもCD26陽性T細胞は非炎症部に比して著しく浸潤しており、CD26強陽性T細胞がGVHD、クローン病ともにエフェクターT細胞として働いている可能性が示唆された。

YS110を用いたヒト及びカニクイザル組織のGLPに準拠した組織交差反応では、腎尿細管、小腸、前立腺、肝臓など細胞質を中心に一部膜も染色され、ヒトの方が染色強度は強いものの、ほぼ同等に染色されており、前臨床毒性試験としてカニクイザルを用いる妥当性が示された。GMPグレードのヒト化CD26抗体もすでに作製を終わり、製剤安定化試験でも-20℃18ヶ月の安定性を確認した。このようにヒト化CD26抗体はクローン病、GVHDなどの難治性免疫疾患の新しい治療法として期待され、出来るだけ早くプロトコルを作製してこれらの病気をターゲットとする探索的臨床試験を施行したい。

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

加藤信朗：Y's Therapeutics 株式会社・
代表取締役副社長

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・助教

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抗体が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。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、ロンザ社（本社：スイス、

バーゼル)にて既に 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、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- 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。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。

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、ステロイドやその他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GVHD動物モデルでのin vivoの有効性機序の検討、カニクイザルを用いての薬物動態や安全性の確立などの前臨床試験、YS110のGLP準拠でのヒト及びカニクイザルの組織交差反応性及び上記疾患患者の免疫病態の解析を行い、クローン病やGVHDなどの難治性免疫疾患への新しい治療法を確立することを目的とする。

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5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56日間回復観察群0及び30mg/kgについては2頭性群をそれぞれ追加した。

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)を一晩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. 可溶性 CD26 のアッセイ

血清中の可溶性 CD26 の測定は CD26 抗体の 5F8 を平底プレートに固相化し、別のエピトープと反応する Biotin ラベルした 1F7 抗体のサンドイッチ法にて Avidin-AL-phosphatase 及び p-nitrophenyl phosphate で発色させて測定した。

4. GLP に準拠した YS110 の正常ヒト及びカニクイザルの交差反応性について

Biotinylated YS110 のヒト及びカニクイザルからの種々の組織の凍結切片の組織交差反応性を検討した (Covance Laboratories Ltd. England に依頼)。ヒトの前立腺、腎臓、肝臓及び胎盤は CD26 を発現していることが報告されているので陽性コントロールにヒト心臓、筋肉は CD26 を発現していないので陰性コントロールとした。ヒト及びカニクイザルからのこれら組織の凍結切片はアセトンで固定され、YS110-Bio 及びアイソタイプマッチの陰性コントロールの最適濃度を検討の結果 YS110-Bio:7.5 μ g/ml が最適濃度と決定された。

5. YS110 のヒト、カニクイザル、アカゲザルからのリンパ球への結合

YS110 のヒト、カニクイザル、アカゲザルの全血中のリンパ球への YS110 の結合は flow cytometry で解析した。YS110 の最適濃度はヒトでは 0-15 μ g/ml、カニクイザルでは 0-50 μ g/ml、アカゲザルでは 0-50 μ g/ml の範囲で決定した。

6. 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。インフォームドコンセントが得られた骨髄移植症例で急性 GVHD 発症後の上部消化管生検材料を用いて病変部位での CD26+リンパ球の浸潤について解析した。

7. 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。

8. 炎症性腸疾患患者の末梢血中可溶性 CD26 分子の検討

炎症性腸疾患患者および健常人の末梢血より血清を分離し、抗 CD26 抗体でコートしたプレートを用いた ELISA 法にて可溶性 CD26 の濃度を測定した。また、同時に基質を加えて血清中の sCD26/DPPIV の特異的酵素活性を解析した。

9. 粘膜内 CD26 陽性リンパ球の局在の検討

クローン病患者 3 症例の小腸切除標本について、ラビット抗 CD26 ポリクローナル抗体を用いて免疫染色を行った。切除材料は、OCT コンパウンドにて凍結後、4 μ m 厚切片を作成、

冷アセトンで 5 分固定し、一次抗体で室温 30 分、洗浄後、peroxidase 標識あるいは FITC 標識抗ラビット IgG 抗体にて室温 30 分反応させた。

<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。

ヒト血液、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。さらにヒト及びカニクイザル、ラット組織パネルの準備はコバンス社、英国の Standard Operating Procedures (SOP) に基づいて行われた。

C. 研究結果

1. 5 週間反復投与毒性試験について (GLP 準拠 (加藤、森本))

カニクイザルへの単回投与による YS110 の安全性を確認したので、次に YS110 の 5 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、56 日間経過観察を行った。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。

対照群及び 30mg/kg 群の雌、雄 1 匹ずつのカニクイザルについては投与終了後 56 日間の回復観察を行い 57 日目に病理解析のため剖検を行った。残りのカニクイザルについては全例 32 日目 (最終投与後 3 日後) に剖検を施行した。

すべてのカニクイザルについて投与後の臨床症状、食物消費、注射部位反応、体重、心電図、心拍数、血圧、眼科的所見、尿所見、血液、凝固、血清化学 (血糖値を含む)、各臓器重量について検討を行ったが全例死亡例もなく、さらに臨床症状検査所見を含めて上記の点について全く異常は認められなかった。

さらに YS110 投与後の血清中の TNF- α 、IL-6 及び IL-1 β レベルについて投与後 1、6 及び 24 時間に測定を行ったが、すべての群において正常検出限度以下であった。さらにすべての群のカニクイザルの剖検について肉眼的にも病理組織学的にも本抗体投与に起因すると思われる異常変化は認められなかった。また全例について MAHA (monkey anti-human antibody) は検出しなかった。

本前臨床研究により、抗体投与の副作用が存在しなかったことに基づき、NOAEL (no observed adverse effect level) は 30mg/kg と結論づけられた。

2. YS110 のヒト、カニクイザル及びアカゲザルリンパ球への結合について (加藤、森本)

YS110 のヒト、カニクイザル、アカゲザルリンパ球への結合は flow cytometry にて解析した。YS110 の結合を Mean Fluorescence Intensity (MFI) で表すと、カニクイザル及びアカゲザルリンパ球への YS110 の結合はほぼ同等であったが、ヒトリンパ球では YS110 はカニクイザル及びアカゲザルの結合のおよそ 2 倍の結合強度であった。

3. YS110 の GLP 準拠に基づいたヒト、カニクイザル及びラットパネルの組織交差反応性について (加藤、森本)

YS110 のヒト及びカニクイザルからの選択したパネルの凍結切片の組織交差反応性を検討した。

従来 CD26 陽性といわれているヒト前立腺、腎臓、肝臓、胎盤を陽性コントロールに、ヒト心臓、筋肉組織を CD26 陰性コントロールとして用いた。上記の CD26 陽性コントロールである組織は YS110 で有意な顆粒状細胞質染色を示した。さらに YS110 は血管平滑筋組織とも反応し、血管においては細胞質内皮染色が認められた。

カニクイザルでは YS110 で数は少ないが種々の組織で特異的陽性染色が認められた。染色は内皮組織に少数であるが染まり、一部組織では上皮にも認められた。ラット組織ではまったく染色は認められなかった。

オリジナルのマウス型抗体で報告されたのと同様の染色結果であったが、重要臓器の小腸、腎臓及び肝臓などについて、染色強度はヒト組織の方がカニクイザル組織より強かった。さらにカニクイザルでは認められないがヒト組織についてのみ染色が認められたものも存在した。この差はヒト及びカニクイザルリンパ球の YS110 の結合でも示されているように、一部には YS110 がヒト組織でより強い染色強度で染まるためであると推測できる。ヒト組織の方が染色強度は高いもののヒト及びカニクイザルにおいて YS110 の組織交差反応性については特に有意な差は認められなかった。組織交差反応性の結果からもカニクイザルは YS110 の前臨床毒性試験に適切な種であると考えられた。

4. TGN1412 事件から学んだこと (加藤、森本)

2006 年 3 月英国で superagonistic 作用をも

つ CD28 抗体 TGN1412 投与による健常人を用いた第一相臨床試験において、TNF- α 、IL-6 などのサイトカインが大量に放出されサイトカインストームに陥った。この点について Poole らは J.Immunol (2007;179:3325-3331) にて、前もって同類の抗体について上記の事件を未然に防ぐために以下の検討を進めている。

In vitro で可溶性の TGN1412 はヒトリンパ球を刺激せずサイトカインも産生させない。しかし TGN1412 抗体を平底プレートに固相化してヒトリンパ球を刺激すると TGN1412 抗体刺激のみでヒトリンパ球を増殖させ、IL-2、TNF- α などのサイトカイン産生を誘導した。この系を利用して CD26 抗体について同様の検討を行ったところ、可溶性 CD26 抗体刺激では全く刺激は入らず、さらに固相化 CD26 抗体においても $1\mu\text{g/ml}$ ~ $100\mu\text{g/ml}$ に至る量についてすべての濃度で全く増殖及びサイトカイン産生の誘導も認められなかった。さらにカニクイザルで単回投与の 100mg/kg という高濃度においてもサイトカインの誘導を生じなかった。以上の結果より、YS110 に関してヒト投与にあたり慎重であらねばならないが、サイトカインストームの可能性は低いと予測される。

5. 炎症性腸疾患患者の末梢血中可溶性 CD26 (日比)

a. 血清中の可溶性 CD26 およびその DPPIV 活性について

健常人、潰瘍性大腸炎、クローン病患者で検討したところ、クローン病患者 ($7.5\pm 4.15\mu\text{g/ml}$) において、有意に健常人 ($9.47\pm 2.69\mu\text{g/ml}$) に比して可溶性 CD26 が低下していた。また、潰瘍性大腸炎患者 ($9.11\pm 4.42\mu\text{g/ml}$) では、健常人と有意差を認めなかった。sCD26/DPPIV 酵素活性については、潰瘍性大腸炎 ($14.33\pm 5.18\mu\text{mol/min/l}$)、クローン病

($12.95 \pm 5.11 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{l}$) とも有意に健常人 ($17.2 \pm 3.1 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{l}$) に比して低下していた。

炎症性腸疾患の活動性と血清中の可溶性 CD26 濃度を検討したところ、潰瘍性大腸炎、クローン病ともに活動期患者において非活動期の患者に比して有意に可溶性 CD26 濃度が低下していた。

b. 粘膜内 CD26 陽性リンパ球の局在の検討

3 症例ともに、同一症例の非炎症部位からの生検材料では、CD26⁺リンパ球は 10 個以下 /mm² であったが、炎症部位からの生検材料では、50-200 個/mm² の浸潤を認めた。また CD26⁺リンパ球は、間質内にとどまらず、陰窩の上皮間にも浸潤していた。

6. 慢性骨髄性白血病—細胞遺伝学的寛解例の免疫学的解析 (東條)

a. 白血球数は両患者群、赤血球・ヘモグロビンは STI 群が他の群より、血小板は IFN 群が健常群に比べ有意に低下していた。

b. T 細胞数は両患者群が、単球および B 細胞数は STI 群がそれぞれ他の群より有意に低下していた。なお、IFN 群の CD4/8 比は STI 群と比較して有意に低かった。NK 細胞数は各群で有意差がなかった。

c. CD4⁺細胞に占める CD26^{high}CD4⁺T 細胞の比率は IFN 群が STI 群より有意に高値であったが、いっぽう、Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ (制御性 T 細胞) については各群で有意差がなかった。

7. CD26 を分子標的とした GVHD の治療法の開発 (山田、森本)

a. YS110 の予防的投与

ヒト PBL 7×10^6 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 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 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 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。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 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 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。

b. 「YS110 治療的投与」実験

ヒト PBL 7×10^6 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。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 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。

c. 「YS110 予防的および治療的投与」実験における病理学的検討

YS110 予防的および治療的投与実験において、対照マウスと YS110 投与マウスで皮膚、腸管、肝、肺、唾液腺に浸潤するヒト免疫担当細胞の検討を行った。その結果、「YS110 治療的投与」実験群では、対照に比較して、CD3+細胞 (特に CD4+細胞>CD8+細胞) の浸潤が軽度であったが、CD56+NK 細胞、CD68+単球系細胞や CD20+, CD79alpha+B 細胞の浸潤には有意な変化は認められなかった。一方、「YS110 予防的投与」実験群では、対照に比較して、CD3+細胞の浸潤は劇的に減少しており、その中でも CD4+細胞だけでなく CD8+細胞も同等に浸潤が抑制されていた。さらに、CD56+NK 細胞、CD68+単球系細胞や CD20+, CD79alpha+B 細胞の浸潤も有意な減少が見られた。また肝臓病変より単核細胞を分離し、フローサイトメーターにて CD26+細胞について定量的に解析したところ、YS110 投与群では、CD26+細胞が約 45%減少していた。

d. GVHD 症例の病変における CD26+リンパ球について

急性骨髄性白血病に対する骨髄移植施行後、急性 GVHD を発症した症例について、その上部消化管生検材料を用いて、病変部位での CD26+リンパ球の浸潤について解析した。その結果、CD26+リンパ球の浸潤は、GVHD 軽症の症例では、主に粘膜上皮間に認められ、GVHD の重症度が増すと伴にその浸潤細胞数

は増加し、さらに間質への浸潤も認められた。

8. 骨髄移植後の制御性 T 細胞および CMV 特異的 T 細胞における CD26 発現の解析 (渡辺)

Treg (CD25高発現細胞、Foxp3陽性細胞)、およびCMV特異的T細胞 (テトラマー陽性細胞、CMV抗原刺激後サイトカイン産生細胞) の一部は、CD26を高発現するものの、大部分は中程度発現一陰性であった。しかしながら、Treg およびCMV特異的T細胞におけるCD26発現は、症例および移植後の時間により異なった。

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。

YS110 の投与の単回投与予備毒性試験での安全性をふまえて、GLP 準拠での 5 週反復投与毒性試験を行った。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。臨床症状、血液、血糖値を含む血清化学など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 の投与 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、YS110 の Fc 部分が CD16+リンパ球の Fc receptor に結合し、そのため、末梢血液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。

YS110 のヒト、カニクイザル及びアカゲザルリンパ球への結合について flow cytometry にて解析した結果として、カニクイザル及びアカゲザルへの結合はほぼ同等であったが、ヒトリンパ球では YS110 はカニクイザル及びアカゲザルの結合のおよそ 2 倍の結合強度であった。

GLP に準拠した YS110 のヒト及びカニクイザル組織交差反応を検討した。CD26 陽性といわれているヒト前立腺、腎臓、肝臓、胎盤を陽性コントロールに、ヒト心臓、筋肉組織を CD26 陰性コントロールとして用いた。上記の CD26 陽性組織については YS110 で有意な顆粒状細胞質染色を示した。さらに YS110 は血管平滑筋組織とも反応し、血管においては内皮の細胞質染色が認められた。カニクイザルの同じ組織についても、ヒト組織の方が染色強度は高いものの、ヒト及びカニクイザルにおいて YS110 の組織交差反応性について特に有意な差は認められなかった。ヒト化 CD26 抗体の毒性及び耐容性の研究にカニクイザルを使用した、組織交差反応性の結果からもカニクイザルは YS110 の前臨床毒性試験に適切な種であると考えられた。

実際の GVHD 症例における GVHD 病変部位において CD26+リンパ球浸潤が粘膜上皮に接するように浸潤していることが証明され、さらに重症度と浸潤度が相関しているように見られたことは、CD26+リンパ球の GVHD 病変部位での直接的な機能を示唆するものである。またこの細胞集団が治療の標的細胞の一部であることが推測され、CD26 の分子標的療法の理論的根拠となりうる所見と考える。

また本研究での実験系である異種 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 GVH 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 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、臨床症状は軽微となり、病理学的にも、ヒト免疫担当細胞の諸臓器への浸潤が高度に抑制され、その浸潤細胞の分画においては、CD4+T 細胞のみならず、CD8+細胞、CD56+NK 細胞、CD68+単球系細胞や CD20+, CD79alpha+B 細胞の有意な減少が見られた。このことは、異種移植の際のヒト免疫担当細胞の生着において CD26+細胞に重要な働きがあることを示唆するものである。YS110 投与は、それらの細胞の生着あるいは抗異種反応が抑制した可能性があると考えられた。また YS110 投与マウスにおいては、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。この場合には、浸潤細胞の分画において、CD4+T 細胞のみの有意な減少が見られ、CD8+細胞、CD56+NK 細胞、CD68+単球系細胞や CD20+, CD79alpha+B 細胞の減少傾向は明らかでなかった。本モデルは、GVHD 発症メカニズムとして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。

末梢血中可溶性 CD26 分子の検討においては、クローン病患者において、健常人、潰瘍性大腸炎患者に比して有意に可溶性 CD26 濃度が低下しているのみならず、sCD26/DPPiV 酵素活性も低下しており、さらに活動性との関連性を検討すると、非活動期患者よりも活動期患者において有意に低下していた。自己免疫疾患である SLE や関節リウマチにおいても同様に低下しており、その程度も活動性と相関していることより、炎症性腸疾患、とくにクローン病において CD26 陽性リンパ球が病態に関与している可能性が示唆された。消化管においては小腸粘膜上皮にも CD26 が発現しているが、上皮細胞の管腔側に発現していることより、血液中の CD26 の産生源はおもに粘膜内に浸潤したリンパ球であると考えられる。

前年度までの研究において、FACS による解析で炎症性腸疾患腸粘膜において CD26^{high} のメモリー T リンパ球の割合が高かったが、免疫染色による粘膜内での局在の検討においても、活動期粘膜において CD26 陽性リンパ球の浸潤が顕著であった。

これらの結果より、炎症性腸疾患、とくにクローン病において CD26 陽性リンパ球が病態に密接に関与していることが示唆された。

CML 患者について CD26^{high}CD4⁺T 細胞の占める割合が IFN 治療群で有意に高く、また CD4/8 比も両治療群で差が認められたことは興味深い。IFN の抗 Ph クローン選択性を媒介する細胞集団である可能性もあり、今後腫瘍抗原候補の HLA テトラマー等を用いたさらなる解析が必要である。

Treg および CMV 特異的 T 細胞の大部分は、ヒト化 CD26 抗体による治療で最も影響を受けると予想される CD26 高発現細胞ではなかった。しかし、生体に投与した CD26 抗体が、CD26 中程度発現細胞にまで作用するとすれば、Treg および CMV 特異的 T 細胞の過半数

は影響を受ける可能性がある。また、Treg および CMV 特異的 T 細胞における CD26 発現は、症例と移植後の時間により異なるので、重症 GVHD を発症した患者ではこれらの細胞が CD26 を高発現する可能性もある。

2006 年 3 月英国において、CD28 抗体で superagonistic 作用をもつ TGN1412 抗体投与による第一相臨床試験において 6 人の被検者にサイトカインストームが生じ多臓器不全に陥り入院した。カニクイザルを用いた YS110 の単回予備投与試験においては 100mg/kg まで、さらに 5 週間反復投与毒性試験については 30mg/kg まで投与しても血清中の IL-2、TNF- α 、IL-6 などのサイトカインは検出値以下であった。Poole らは前もって試験管での抗体のサイトカイン産生をチェックすることで生体での反応予測をすすめている。TGN1412 抗体は固相化すると *in vitro* でサイトカイン産生を誘導するが、抗 CD26 抗体では 100 μ g/ml の高濃度を固相化してもヒトリンパ球の増殖及びサイトカイン産生を全く誘導しなかった。これらのことから実際の臨床試験にあたりヒトへの投与においては YS110 を低濃度からスタートし、しかもゆっくり時間をかけて静脈投与し、慎重に臨床症状の観察が必要と思われるが、サイトカインストームの可能性は低いと予測される。

YS110 の製造についてすでに GMP グレードのヒト化抗体は作製済みで、製剤のフォームレーションについても 18 ヶ月、-20°C の保存下で安定であることを確認した。CD26 陽性 T 細胞リンパ腫を含む CD26 陽性悪性腫瘍をターゲットとする Investigational New Drug (IND) の FDA への申請を 1 月 14 日に行い、2 月 14 日に承認された。本邦においても、出来るだけ早期にプロトコルを作製し、GVHD、クローン病などの難治性免疫病への第一相臨床試験を施行したい。

E. 結論

ヒト化 CD26 抗体 (YS110) はカニクイザルへの 5 週間複数回投与では特記すべき副作用も認められなかった。さらに GLP 準抛のヒト及びカニクイザル組織交差反応でも、ヒトの方が染色強度は強いものの、ほぼ同等に染色され、前臨床試験としてカニクイザルを用いる妥当性が示された。さらにヒト急性 GVHD 患者生検組織所見で重症例ほど CD26 陽性 T 細胞の浸潤が認められ、クローン病の腸管炎症粘膜生検においても CD26 陽性 T 細胞の浸潤が多数認められ、CD26 陽性 T 細胞が GVHD、クローン病ともエフェクター T 細胞として働いている可能性が示唆された。GMP グレードのヒト化 CD26 抗体も作製済で本邦から世界に発信できる難治性免疫病 (クローン病、GVHD など) の新しい治療法が確立できるものと思われる。

F. 健康危険情報

現時点では、特記すべき健康危険情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

<森本>

Ohnuma K, Takahashi N, Yamochi T, Hosono O, Dang NH, Morimoto C. Role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in human T cell activation and function. *Front Biosci.* 2008; 13: 2299-2310

Havre PA, Abe M, Urasaki Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dang NH. The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer. *Front Biosci.* 2008; 13: 1634-1645

Kayo H, Yamazaki H, Nishida H, Dang NH, Morimoto C. Stem cell properties and the side population cells as a target for interferon-alpha in

adult T-cell leukemia/lymphoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 364:808-814

Kanai Y, Akatsu H, Iizuka H, Morimoto C. Could serum antibody to poly(ADP-ribose) and/or histone H1 be marker for senile dementia of Alzheimer type? *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1109: 338-344

Tanaka H, Yoshikawa N, Shimizu N, Morimoto C. Strategic targeting of the glucocorticoid receptor for anti-inflammation. *Inflammation and Regeneration.* 2007; 27: 486-493

Inamoto T, Yamada T, Ohnuma K, Kina S, Takahashi N, Yamochi T, Inamoto S, Katsuoka Y, Hosono O, Tanaka H, Dang NH, Morimoto C. Humanized Anti-CD26 monoclonal antibody as a treatment for malignant mesothelioma tumors. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 4191-4200

Makino Y, Uenishi R, Okamoto K, Ise T, Hosono O, Tanaka H, Kanopka A, Poellinger L, Haneda M, Morimoto C. Transcriptional upregulation of ipas gene expression by HIF-1: A negative feedback regulatory circuit in HIF-1-mediated signaling in hypoxic cells. *J Biol Chem.* 2007; 282: 14073-82

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.* 2007; 282: 10117-31

<日比>

Kamada N, Hibi T et al.: Non-pathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 inhibits signal transduction in intestinal epithelial cells. *Infect*

Immun 2008; 76: 214-220

Nanno M, Hibi T et al. Exacerbating role of gammadelta T cells in chronic colitis of T-cell receptor alpha mutant mice. *Gastroenterology* 2008; 134: 481-490

Ishikawa H, Hibi T et al. Curriculum vitae of intestinal intraepithelial T cells: their developmental and behavioral characteristics. *Immunol Rev* 2007; 215: 154-165

Chinen H, Hibi T et al. Lamina propria c-kit+immune precursors reside in human adult intestine and differ into natural killer cells. *Gastroenterology*. 2007; 133: 559-573

Yoshizawa S, Hibi T et al. Clinical significance of serum p53 antibodies in patients with ulcerative colitis and its carcinogenesis. *Inflamm Bowel Dis*. 2007; 13: 865-873

Kobayashi T, Hibi T et al. Exclusive increase of CX3CR1+CD28-CD4+T cell in inflammatory bowel disease and their recruitment as intraepithelial lymphocytes. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 837-846

<東條>

Tomonari A, Takahashi S, Ooi J, Tsukada N, Konuma T, Kato S, Kasahara S, Iseki T, Yamaguchi T, Tojo A, Asano S. Impact of cytomegalovirus serostatus on outcome of unrelated cord blood transplantation for adults: a single-institute experience in Japan. *Eur J Haematol*. 2008; 80: 251-257

Nakayama S, Nagamura-Inoue T, Yokoyama K,

Ohno N, Ooi J, Takahashi S, Uchimaru K, Iseki T, Tojo A. Cytogenetic remissions induced by interferon alpha and imatinib mesylate are immunologically distinct in chronic myeloid leukemia. *Int J Hematol*. 2007; 86: 208-11

Sekine R, Kitamura T, Tsuji T, Tojo A. Identification and comparative analysis of Pax5 C-terminal isoforms expressed in human cord blood-derived B cell progenitors. *Immunol Lett*. 2007; 111: 21-5

Inoue Y, Izawa K, Tojo A, Nomura Y, Sekine R, Oyaizu N, Ohtomo K. Monitoring of disease progression by bioluminescence imaging and magnetic resonance imaging in animal model of hematologic malignancy. *Exp Hematol*. 2007; 35: 407-415

Inoue Y, Izawa K, Yoshikawa K, Yamada H, Tojo A, Ohtomo K. In vivo fluorescence imaging of the reticuloendothelial system using quantum dots in combination with bioluminescent tumour monitoring. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2007; 34: 2048-56

Tomonari A, Takahashi S, Ooi J, Tsukada N, Konuma T, Kobayashi T, Takasugi K, Iseki T, Tojo A, Asano S. Preemptive therapy with ganciclovir 5 mg/kg once daily for cytomegalovirus infection after unrelated cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2007; 41: 371-376

Nagamura-Inoue T, Kodo H, Takahashi T, Mugishima H, Tojo A, Asano S. Four cases of donor cell-derived AML following unrelated cord blood transplantation for adult patients:

experiences of the Tokyo Cord Blood Bank. *Cytotherapy*. 2007; 9: 727-8

Tomonari A, Takahashi S, Ooi J, Tsukada N, Konuma T, Kobayashi T, Sato A, Iseki T, Yamaguchi T, Tojo A, Asano S. Impact of ABO incompatibility on engraftment and transfusion requirement after unrelated cord blood transplantation: a single institute experience in Japan. *Bone Marrow Transplant*. 2007; 40: 523-8

Tomonari A, Tsukada N, Takahashi S, Ooi J, Konuma T, Kobayashi T, Fukuno K, Takasugi K, Fujii T, Endo T, Iwamoto A, Oyaizu N, Tojo A, Asano S. Early-onset pulmonary complication showing organizing pneumonia pattern following cord blood transplantation in adults. *Int J Hematol*. 2007; 85: 364-6

Konuma T, Ooi J, Takahashi S, Tomonari A, Tsukada N, Kobayashi T, Sato A, Tojo A, Asano S. Allogeneic stem cell transplantation for hepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2007; 48: 630-2

Takahashi S, Ooi J, Tomonari A, Konuma T, Tsukada N, Ooiwa-Monna M, Fukuno K, Uchiyama M, Takasugi K, Iseki T, Tojo A, Yamaguchi T, Asano S. Comparative single-institute analysis of cord blood transplantation from unrelated donors with bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation from related donors in adult patients with hematological malignancies after myeloablative conditioning regimen. *Blood*. 2007; 109: 1322-30

<山田>

Yamato K, Yamada T, Kizaki M, Ui-Tei K, Natori

Y, Fujino M, Nishihara T; Ikeda Y, Nasu Y, Saigo K, Yoshinouchi M. New highly potent and specific E6 and E7 siRNAs for treatment of HPV16 positive cervical cancer. *Cancer Gene Therapy*. 2008; 15: 140-53

Nakata Y, Kondoh K, Fukushima S, Hashiguchi A, Du W, Hayashi M, Fujimoto J, Hata J, Yamada T. Mutated D4-guanine diphosphate-dissociation inhibitor (D4-GDI), is found in human leukemic cells, promotes leukemic cell invasion. *Exp Hematol*. 2008; 36: 37-50

Kunisue T, Takayanagi N, Isobe T, Takahashi S, Nose M, Yamada T, Komori H, Arita N, Ueda N, Tanabe S. Polybrominated diphenyl ethers and persistent organochlorines in Japanese human adipose tissues. *Environmental Int*. 2007; 33: 1048-1056

Inamoto T, Yamada T, Ohnuma K, Kina S, Takahashi N, Yamochi T, Inamoto S, Katsuoka Y, Hosono O, Tanaka H, Dang NH, Morimoto C. Humanized Anti-CD26 monoclonal antibody as a treatment for malignant mesothelioma tumors. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4191-4200

Nagai S, Mimuro H, Yamada T, Baba Y, Moro K, Nochi T, Kiyono H, Suzuki T, Sasakawa C, Koyasu S. Role of Peyer's patches in the induction of Helicobacter pylori-induced gastritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104: 8971-6

Higashiguchi A, Yamada T, Suzuki A, Mori T, Susumu N, Aoki D, Sakamoto M. Specific Expression of Hepatocyte Nuclear Factor-1b in the Ovarian Clear Cell Adenocarcinoma and its Application to Cytological Diagnosis. *Cancer Sci*.

2007; 98: 387-91

Hayashi M, Kondoh K, Nakata Y, Kinoshita A, Mori T, Takahashi T, Sakamoto MI, Yamada T. Establishment of a novel childhood acute myeloid leukaemia cell line, KOPM-88, containing partial tandem duplication of the MLL gene and an in vivo model for childhood acute myeloid leukaemia using NOD/SCID mice. *Br J Haematol.* 2007; 137: 221-32

Du W, Hattori Y, Yamada T, Matsumoto K, Nakamura T, Sagawa M, Otsuki T, Niikura T, Nukiwa T and Ikeda Y. NK4, an Antagonist of Hepatocyte Growth Factor (HGF), Inhibits Growth of Multiple Myeloma Cells in Vivo; Molecular Targeting of Angiogenic Growth Factor. *Blood* 2007; 109: 3042-3049

2. 学会発表

<森本>

Hashizume Y, Iwata S, You K, Ohnuma k, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Morimoto C. Cas-L associates with adaptor protein nck, role of cas-l/nck interaction in $\beta 1$ integrin- and tcr-mediated cells signaling and migration. American College of Rheumatology. Arthritis & Rheumatism Abstract pS584-585, Boston MA, Nov 6-11, 2007.

<日比>

Kobayashi T, Hibi T et al. Exclusive increase of CX3CR1+CD28-CD4+T cells in inflammatory bowel disease and their recruitment as intraepithelial lymphocytes. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo Japan, July 11, 2007.

Chinen H, Hibi T et al.: In situ natural killer cell differentiation from lamina propria c-kit+ immune precursor cells in human adult intestine. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo Japan, July 11, 2007.

Kamada N, Hibi T et al. Intestinal macrophages in human Crohn's disease produce excess IL-23 in response to commensal bacteria. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo Japan, July 10, 2007.

Kobayashi T, Hibi T et al. Abnormally differentiated intestinal macrophage causes both Th1 and Th17 induction in IL-10 deficient mice. 108th Annual Meeting of the AGA, Washington DC, May 21, 2007.

Ogata H, Hibi T et al.: Effect of rabamipide on disruption of tight junctional protein, claudin-1, and trans-epithelial electrical resistance induced by oxidative stress in intestinal inflammation. 108th Annual Meeting of the AGA, Washington DC, May 20, 2007.

Kamada N, Hibi T et al. Abnormally differentiated intestinal macrophages in human Crohn's disease produce excess IL-23 in response to the enteric bacteria. 108th Annual Meeting of the AGA, Washington DC, May 21, 2007.

Inoue N, Hibi T et al. Clinical significance of serum p53 antibodies in patients with ulcerative colitis and its carcinogenesis. 108th Annual Meeting of the AGA, Washington DC,

May 20, 2007.

Kobayashi T, Hibi T et al. Abnormal innate immune response and Th1/Th17 induction in murine colitis and human inflammatory bowel disease. 94th Annual Meeting of American Association of Immunologists, Miami, May 18-23, 2007.

<東條>

Takaaki Konuma, Satoshi Takahashi, Jun Ooi, Akira Tomonari, Nobuhiro Tsukada, Seiko Kato, Maki Oiwa-Monna, Kaoru Uchimaru, Arinobu Tojo, Takuhiro Yamaguchi, Shigetaka Asano. Unrelated Cord Blood Transplantation Using Myeloablative Regimen for Acute Leukemia Patients Aged between 50 and 55 Years: Single Institutional Retrospective Comparison with Patients Less Than 50 Years of Age. 49th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, USA 2007 Dec

Hsui-Jen Thai, Seiichiro Kobayashi, Kiyoko Itoh, Takaomi Ishida, Kazuo Umezawa, Arinobu Tojo. Microenvironmental up-regulation of NF- κ B activity via p65-dependent and independent pathways in a bioimaging model of Ph chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. 49th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, USA 2007 Dec

中山 紳、長村登紀子、横山和明、尾上和夫、石下郁夫、大野伸広、大井 淳、高橋 聡、内丸 薫、東條有伸. 慢性骨髄性白血病一細胞遺伝学的寛解例の免疫学的解析:インターフェロン群とイマチニブ群の比較. 第69回日本血液学会総会 横浜、2007年10月

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

【炎症性腸疾患の病態における CD26 分子陽性 T 細胞の関与の検討】

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し、同分子を標的とした新たな治療法の開発に取り組んできた。血液中の可溶性CD26およびそのDPPIV活性について、健常人、潰瘍性大腸炎、クローン病患者で検討した。クローン病患者において、健常人に比して有意に可溶性CD26が低下していた。DPPIV活性については、潰瘍性大腸炎、クローン病とも有意に健常人に比して低下していた。また、免疫組織化学法により腸管粘膜内のCD26陽性リンパ球について検討したところ、クローン病、とくに炎症部においてCD26陽性リンパ球の浸潤が顕著であった。これらの結果より、炎症性腸疾患、とくにクローン病においてCD26陽性リンパ球が病態に密接に関与していることが示唆され、CD26分子を標的とした新たな治療法の可能性が考えられた。

共同研究者

知念 寛、高山哲朗、久松理一、岡本 晋、
井上 詠（慶應義塾大学医学部消化器内科）
山田健人（慶應義塾大学医学部病理学）
細野 治（東京大学医科学研究所附属病院
アレルギー免疫科）

A. 研究目的

炎症性腸疾患はこれまでの幾多の研究にもかかわらず、いまだ原因不明であるが、これまでにその病態形成に種々の免疫異常が関わっていることが報告されている。特に粘膜固有層のCD4陽性ヘルパーT細胞の機能異常は1990年代に報告され、クローン病においては典型的Th1優位、潰瘍性大腸炎ではTh2-likeや混合型であると考えられてきた。

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。

本研究ではこれまでに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の発現解析を行ってきたが、本年度は患者血清中の可溶性CD26分子の検討、および大腸粘膜中のCD26陽性リンパ球の局在を検討した。

B. 研究方法

1) 炎症性腸疾患患者の末梢血中可溶性CD26分子の検討

炎症性腸疾患患者および健常人の末梢血より血清を分離し、抗CD26抗体でコートしたプレートを用いたELISA法にて可溶性CD26の濃度を測定した。また、同時に基質を加えて血清中のsCD26/DPPIVの特異的酵素活性を解析した。

2) 粘膜内CD26陽性リンパ球の局在の検討

クローン病患者3症例の小腸切除標本について、ラビット抗CD26ポリクローナル抗体を

用いて免疫染色を行った。切除材料は、OCTコンパウンドにて凍結後、4 μ m厚切片を作成、冷アセトンで5分固定し、一次抗体で室温30分、洗浄後、peroxidase標識あるいはFITC標識抗ラビットIgG抗体にて室温30分反応させた。

C. 研究結果

1) 炎症性腸疾患患者の末梢血中可溶性 CD26 分子の検討

血清中の可溶性 CD26 およびその DPPIV 活性について、健常人、潰瘍性大腸炎、クローン病患者で検討したところ、クローン病患者 (7.5 \pm 4.15 μ g/ml) において、有意に健常人 (9.47 \pm 2.69 μ g/ml) に比して可溶性 CD26 が低下していた。また、潰瘍性大腸炎患者 (9.11 \pm 4.42 μ g/ml) では、健常人と有意差を認めなかった (図 1)。

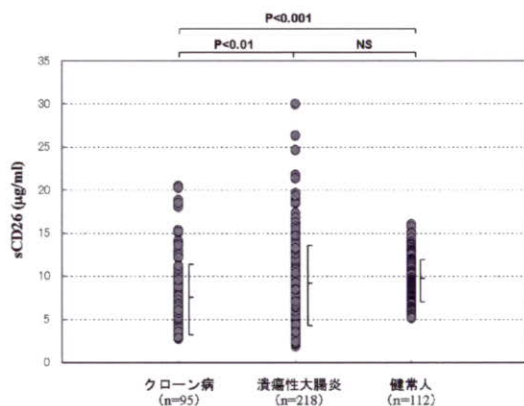


図 1: 炎症性腸疾患における血清中可溶性 CD26 濃度

sCD26/DPPIV 酵素活性については、潰瘍性大腸炎 (14.33 \pm 5.18 μ mol/min/l)、クローン病 (12.95 \pm 5.11 μ mol/min/l) とも有意に健常人 (17.2 \pm 3.1 μ mol/min/l) に比して低下していた。

炎症性腸疾患の活動性と血清中の可溶性 CD26 濃度を検討したところ、潰瘍性大腸炎、クローン病ともに活動期患者において非活動期の患者に比して有意に可溶性 CD26 濃度が低下していた (図 2)。

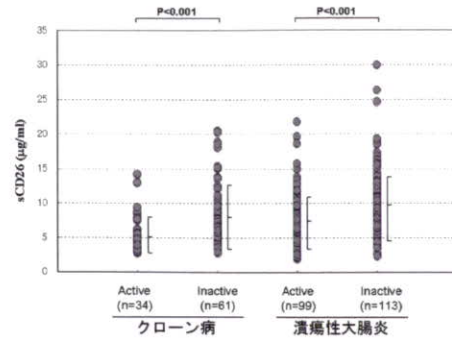


図 2: 炎症性腸疾患における活動性と可溶性 CD26 濃度

sCD26/DPPIV 酵素活性についても、潰瘍性大腸炎、クローン病ともに活動期患者において非活動期の患者に比して有意に酵素活性が低下していた。

2) 粘膜内 CD26 陽性リンパ球の局在の検討

3 症例ともに、同一症例の非炎症部位からの生検材料では、CD26⁺リンパ球は 10 個以下/mm²であったが、炎症部位からの生検材料では、50-200 個/mm²の浸潤を認めた。(図 3)。また CD26⁺リンパ球は、間質内にとどまらず、陰窩の上皮間にも浸潤していた。

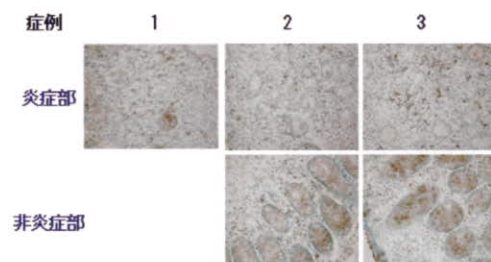


図 3: 炎症性腸疾患における CD26 陽性リンパ球の局在

D. 考察

末梢血中可溶性 CD26 分子の検討においては、クローン病患者において、健常人、潰瘍性大腸炎患者に比して有意に可溶性 CD26 濃度が低下しているのみならず、sCD26/DPPIV 酵素活性も低下しており、さらに活動性との関連性を検討すると、非活動期患者よりも活動期患者において有意に低下していた。自己免疫疾患である