

SLE や慢性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。

E. 結論

今年度の血液中可溶性 CD26 分子および免疫染色による粘膜内 CD26 陽性細胞の検討より、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、今後、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。

F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記入

G. 研究発表

1. 論文発表

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 differer 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

2. 学会発表

Hisamatsu T, Hibi T et al.: L-histidine ameliorates IL-10 deficient cells transfer murine colitis model by inhibition of pro-inflammatory cytokine production from mononuclear cells. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo Japan, July 11, 2007.

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.

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

【慢性骨髄性白血病—細胞遺伝学的寛解例の免疫学的解析】

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

インターフェロン(IFN)またはイマチニブ(STI)治療中の慢性骨髄性白血病(CML)患者ならびに健常者の3群(いずれも14名)を対象として免疫学的解析を行った。患者はいずれも細胞遺伝学的完全寛解(CCyR)またはそれに準じる反応良好例である。白血球数は両患者群、赤血球数・Hb値はSTI群が他の群より、血小板数はIFN群がSTI群に比してそれぞれ有意な減少を認めた($p < 0.05$)。リンパ球分画ではNK細胞数に有意差なく、T細胞数は両患者群($p < 0.01$)、単球ならびにB細胞数はSTI群($p < 0.05$)においてそれぞれ他の群より有意に低下していた。また、IFN群はSTI群と比較してCD4/8比が有意に低く($p < 0.01$)、STI群はIFN群よりIgGとIgA値が有意に低かった($p < 0.005$)。以上より、正常造血を回復したCMLでは治療によって免疫学的状態が異なり、STI群では免疫抑制傾向が示唆された。

A. 研究目的

Dipeptidyl peptidase IV 活性を有する細胞表面抗原 CD26 は、免疫担当細胞においては主としてT細胞に発現しており、その発現レベルは抗原刺激によるT細胞の活性化によって増強する。特に CD26^{high}CD4⁺T細胞は専らエフェクターメモリーT細胞分画に属し、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細胞とも言われている。昨年度の研究報告で、われわれは同種造血幹細胞移植後に慢性GVHD(一種の自己免疫疾患)を発症している患者では健常者に比べてこの細胞分画の比率が高い傾向にあることを示した。

慢性骨髄性白血病(CML)の治療薬であるインターフェロン(IFN)とイマチニブ(STI)は、頻度に差はあれ、細胞遺伝学的完全寛解(CCyR)をもたらすことが知られている。現在STIはCMLの第一選択薬として使用されているが、最近、STIがレクチンや抗原刺激に

対するヒトT細胞の増殖応答を抑制し、動物実験において遅延型過敏反応を抑制することが報告された。さらに、STIは抗原提示細胞の機能や分化に影響を及ぼし、T細胞のエフェクター作用を阻害すること、STI治療中のCML患者ではIFN治療中の患者と比較して特異的細胞障害性T細胞が誘導されにくいことが報告されており、STIが免疫応答を抑制する可能性が示唆されている。これとは別に、c-Kit変異のない消化管間葉系腫瘍(GIST)に対するSTIの抗腫瘍効果の解析から、STIが樹状細胞を介してNK細胞を活性化する経路が発見され、マウスでこの経路の主要な役割を演じているのがB220⁺NK1.1⁺のIFN産生キラー樹状細胞(IKDC)であることが明らかになった。IKDCは細胞障害活性と抗腫瘍活性を示す樹状細胞であり、IFNを産生し抗原提示能を発揮するなど、NK細胞と樹状細胞の性質を併せ持つ新たなサブセットであるが、ヒトでは未だ同定されていない。したがって、STIの投与は免疫担当細胞の種類に

よって異なる作用を及ぼす可能性があるため、免疫系全体への影響は決して単純ではないと思われる。他方 IFN は抗ウイルス活性を初めとして多彩な生物活性を発揮するが、抗腫瘍効果の作用機序には不明な点が多い。Ph クローンに対する直接的な増殖抑制作用だけでなく、免疫担当細胞を介して間接的に Ph クローンを傷害している可能性が示唆されている。そこで今回、CML 患者 (IFN 群、STI 群) に健常者群を加えた 3 群 (各群 14 名ずつ) を対象として、CD26^{high}CD4⁺T 細胞を含む各種免疫担当細胞の比較解析を実施した。

B. 研究方法

【患者】

対象は、健常者 14 名 (男女比:10/4、年齢中央値:41、範囲:30~63)、CML-IFN 治療例 14 名 (男女比:12/2、年齢中央値:50、範囲:39~73)、STI 治療例 14 名 (男女比:9/5、年齢中央値:54、範囲 29~65)。患者の治療期間中央値は IFN 群 174 ヶ月 (61~235) に対し STI 群 54 ヶ月 (7~61)、投与量中央値は IFN 群 6×10^6 IU/週 (3~18) に対し、STI 群 400mg/日 (300~400)。細胞遺伝学的効果は STI 群全例 CCyR で、IFN 群は 4 例が部分寛解 (PCyR) で 10 例が CCyR であった。

(倫理面への配慮) 本研究は、当施設 IRB の承認を得たプロトコールにしたがって実施され、書面を用いて健常者および患者に対する説明した後文書による同意を取得した。

【方法】

(1) 血球数は自動測定装置 (Sysmex XE2100) にて測定した。
(2) T 細胞 (CD3⁺)、B 細胞 (CD19⁺)、NK 細胞 (CD3-CD56⁺)、単球 (CD14⁺) など免疫担当細胞の各分画は、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に溶血操作を行い、多蛍光フローサイトメトリー法で解析した。

(3) Treg 細胞の同定には溶血操作後、抗 Foxp3 モノクローナル抗体 (eBioscience 社) を用いた細胞内染色を実施した。

(4) 各免疫担当細胞の絶対数測定は、Internal Beads (TruCOUNT チューブ、BD Biosciences 社) 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/ μ 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 μ l) x 希釈倍率」

(5) 免疫グロブリン値は免疫比濁法を用いて測定した。

(6) 統計解析はプログラムソフト JMP (SAS Institute) を用いて student-t 検定および Turkey-Kramer' s HSD 検定にて行った。

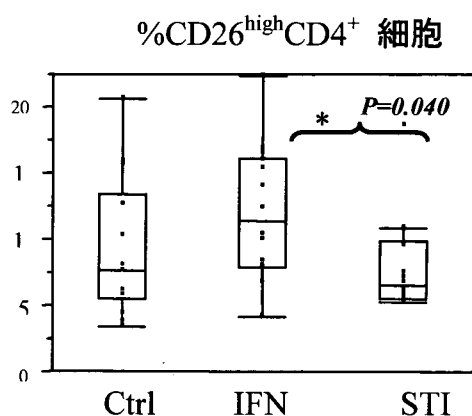
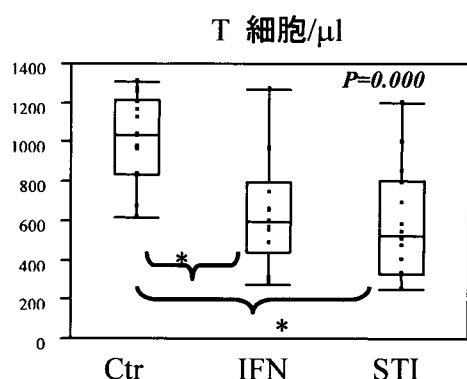
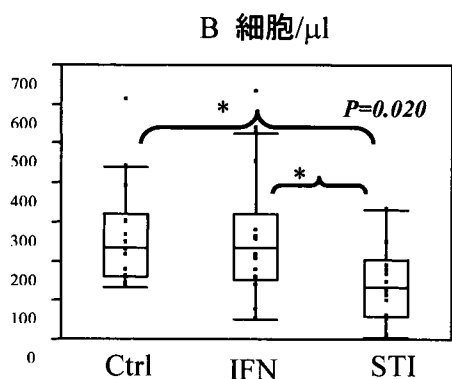
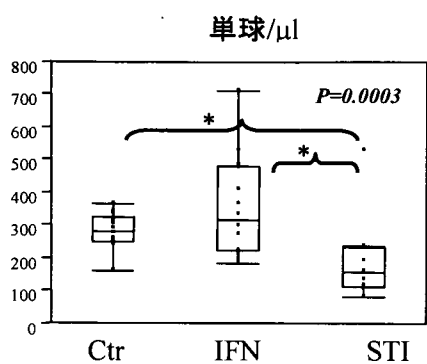
C. 研究結果

(1) 白血球数は両患者群、赤血球・ヘモグロビン値は 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。

(2) 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。

(3) 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。

(4) IgG と IgA 値は STI 群が IFN 群より、IgM 値は IFN 群が STI 群より有意に低下していた。



D. 考 察

同じ細胞遺伝学的寛解に到達していて IFN 群と STI 群では免疫学的状態が異なり、後者では免疫抑制傾向が示唆された。STI による Abl や Lck の阻害がそれぞれ B 細胞、T 細胞の分化増殖を抑制すると報告されており、STI 長期投与が免疫系に及ぼす影響について留意する必要がある。従来 IFN が一部の CML 患者において著効を示す作用機序については十分解明されておらず、以下の断片的な報告が根拠となっている。

1. p210^{Bcr-Abl} の融合部位を含むペプチドが、特定の HLA クラス I/II 分子に比較的高い親和性で結合しうる。

2. これらの Bcr-Abl ペプチドをパルスすることによって HLA クラス I/II 拘束性の Ph クローン特異的細胞障害性 T 細胞クローン (CTL) が樹立できる。

3. 骨髄系細胞に発現する Proteinase3 由来のペプチド (PR1) を認識する HLA0201 拘束性 CTL が IFN に対する細胞遺伝学的反応良好な患者で高頻度に検出されるが、反応不良例や健常者では検出されない。

4. IFN に対する細胞遺伝学的反応が良好な患者血清中には、PYK2 や RBP-J κ に対する自己抗体が検出されるが、反応不良な患者では検出されない。

5. IFN 治療に対する細胞遺伝学的反応は患者の HLA 表現型と相関がある。

6. 抗原受容体からのシグナルで制御される転写因子 IRF4 の T 細胞における発現レベルは、未治療 CML では健常者に比べ著しく低下しているが、IFN に対する細胞遺伝学的反応良好例では健常者と同等レベルまで増加している。

今回の研究において 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。

E. 結論

正常造血を回復した CML 患者でも投与された治療薬によって免疫学的状態が明らかに異なることが判明し、現在の標準的治療である STI 治療群では免疫抑制傾向が示された。

また、IFN 治療の効果を媒介する T 細胞集団の存在が示唆された。

F. 健康危険情報

総括研究報告書に記載

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.* 80:251-257, 2008.
2. Nakayama S, Nagamura-Inoue T, Yokoyama K, Ohno N, Ooi J, Takahashi S, Uchimar K, Iseki T, Tojo A. Cytogenetic remissions induced by interferon alpha and imatinib mesylate are immunologically distinct in chronic myeloid leukemia. *Int J Hematol.* 86:208-11, 2007
3. 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.* 111:21-5, 2007
4. 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* 35: 407-415, 2007
5. 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.* 34:2048-56, 2007
6. 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.* 41:371-376, 2007
7. 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.* 9:727-8, 2007
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.* 40:523-8, 2007
9. 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. 85:364-6, 2007

10. 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. 48:630-2, 2007
11. Takahashi S, Ooi J, Tomonari A, Konuma T, Tsukada N, Oiwa-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. 109:1322-30, 2007

2. 学会発表

1. Takaaki Konuma, Satoshi Takahashi, Jun Ooi, Akira Tomonari, Nobuhiro Tsukada, Seiko Kato, Maki Oiwa-Monna, Kaoru Uchimar, 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
2. Hsui-Jen Thai, Seiichiro Kobayashi, Kiyoko Itoh, Takaomi Ishida, Kazuo Umezawa, Arinobu Tojo. Microenvironmental up-regulation of NF-kB 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

3. 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—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

【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】

分担研究者 加藤伸朗 ワイズセラピューティックス株式会社 代表取締役副社長

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 GLP 準拠による前臨床毒性試験及び GMP グレードのヒト化 CD26 抗体の作製を行った。

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 GLP 準拠による YS110 の 5 週反復投与毒性試験を行った。YS110 の 3mg/kg、10mg/kg、30mg/kg の用量で、各群雌、雄 3 匹ずつの静脈内投与で、1 日、8 日、15 日、22 日、29 日に渡って反復投与し、全例 32 日目に剖検を施行した。さらに対照群及び 30mg/kg 群では雌、雄 2 匹ずつ追加して 56 日間の観察を行い 57 日目に剖検を行った。臨床症状、体重変化、血液、血清生化学に全く異常は認められず、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異常は認められなかった。さらに NOAEL (no observed adverse effect level) は 30mg/kg であった。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。さらに 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 (YS110) は GLP 準拠のカニクイザルへの 5 週反復投与試験において毒性は認められず、カニクイザルとヒトとの組織交差反応でもほぼ同等に染色され、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。

共同研究者

森本 幾夫

(東京大学医科学研究所・教授)

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、血液悪性腫瘍の治療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- 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。

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 GLP 準拠でのヒト化 CD26 抗体のヒト及びカニクイザルの組織交差反応性などを含む前臨床試験を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1. GLP 準拠前臨床試験に用いる動物について

YS110 の 5 週間反復投与と毒性試験のため体重 1.5kg~2.5kg のカニクイザル雄、雌各 3 匹ずつのおのおの投与群 (YS110、0、3、10、30mg/kg) 及び 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。

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. GLP に準拠した YS110 の正常ヒト及びカニクイザルの組織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 µg/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 µg/ml、カニクイザルでは 0-50 µg/ml、アカゲザルでは 0-50 µg/ml の範囲で決定した。

(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。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)

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 匹ずつ追加して、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 日目に病理学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-1β 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。さらに全例について 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

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。図 1 に示すように、YS110 の結合を Mean Fluorescence Intensity (MFI) で表したが、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

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。例えば多くの組織での血管及び平滑筋組織や血管の内皮は幅広く染まっていた。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。表 1 にこれらの結果のサマリーを表したが、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。ヒト化 CD26 抗体の毒性及び耐受性の研究にカニクイザルを用いたが、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

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、15 分間という短時間で抗体投与を行った。その結果 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すすめている。

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. YS110 の製造について

GMP グレードの製造は米国 AppTec 社に委託製造を行い、すでに第一相臨床試験の必要量は確保し、さらに製剤のフォームレーションについて 18 ヶ月、 -20°C の保存下で安定であった。さらに 5°C 、 25°C 、 40°C の状態で 1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、9 ヶ月、12 ヶ月、18 ヶ月後の時点で外観、pH、粒子形成、蛋白濃度、SDSPAGE、CD26 抗体への結合性、無菌性などについて解析したが、一部で温度上昇により変化するものも認められたが、少なくとも -20°C の保存下で 18 ヶ月は安定であることが明らかになった。

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。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 (Framework) 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。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 \sim 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 抗体の毒性及び耐受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。

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、国外でのPhase Iの動向をみて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

GLP準拠のヒト化CD26抗体(YS110)のヒト及びカニクイザル組織の組織交差反応性についてほぼ同様の反応性を示し、カニクイザルを

用いる前臨床毒性試験の妥当性が示された。さらにYS110の複数回反復投与でも特記すべき副作用は認められず、また米国FDAへのIND申請も認められ、本邦でも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できるだけ早期に施行したい。

F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記入。

G. 研究発表

1. 論文発表 : なし
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

图 1 YS110 Binding to PBMCs from Human, Rhesus and Cynomolgus Monkeys

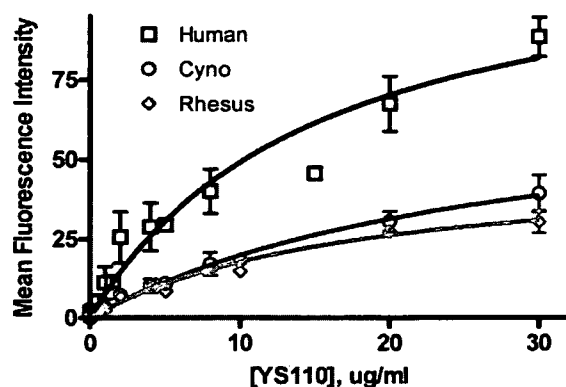


表 1 Comparison of Specific Staining on Human and Cynomolgus Monkey Tissues

Tissue	Human	Cynomolgus Monkey
Adrenal	Moderate diffuse granular cytoplasmic staining in zona fascicularis	Diffuse membranous granular staining in zona fascicularis
Brain	Minimal to mild staining of vascular and tissue smooth muscle and endothelium of blood vessels ^a	Cerebellum- mild staining in endothelium in some blood vessels 1/3 donors ^b Cortex- mild peri-nuclear cytoplasmic staining of neurons in cerebrum 1/3 donors
Breast	Minimal to mild staining of vascular and tissue smooth muscle and endothelium of blood vessels ^a	Mild to moderate diffuse staining in basal lamina beneath glandular epithelium 1/3 donors
Fallopian Tube	Multi-focal cytoplasmic to membranous staining of epithelial cells in mucosa.	None
Gastric antrum	Variable cytoplasmic to membranous granular staining in gastric glands	None
Gastric body	Variable cytoplasmic to membranous granular staining in gastric glands	Variable granular cytoplasmic staining in gastric glands.
Duodenum	Luminal surface of epithelial cells in the mucosa demonstrating membranous staining	Multifocal cytoplasmic to membranous staining in the epithelium. 1/3 donors
Ileum	Variable cytoplasmic to membranous granular staining in ileum crypts. Luminal surface of epithelial cells in the mucosa demonstrating membranous staining.	Moderate granular cytoplasmic staining of ileum crypts 2/3 donors
Kidney	Granular cytoplasmic to membranous staining of tubular epithelium.	Granular cytoplasmic to membranous staining of tubular epithelium.
Liver	Granular cytoplasmic staining of hepatocytes	Minimal to mild granular cytoplasmic staining of hepatocytes
Lymph node	Occasional lymphocytes demonstrating granular cytoplasmic staining 1/3 donors	None
Ovary	Multifocal granular membranous staining in the lining of a number of follicles	None
Pancreas	Granular cytoplasmic staining of individual cells in the islets of the pancreas	None
Parotid	Multifocal cytoplasmic staining in glandular epithelium.	None
Placenta	Placental villi demonstrating granular cytoplasmic staining	None
Prostate	Granular membranous to cytoplasmic staining in the epithelium of the prostate ducts.	None
Skin	Minimal to mild staining in connective tissues of sweat glands	None
Thymus	Mild multifocal non-cellular staining of Hassals Corpuscles. Occasional lymphocytes demonstrating granular cytoplasmic staining	Mild to moderate multifocal non-cellular staining of Hassals Corpuscles.
Thyroid	Heavy staining of in vascular and tissue muscle 1/3 donors	Mild to moderate granular cytoplasmic to membranous staining of follicular cells.
Tonsil	Occasional lymphocytes demonstrating granular cytoplasmic staining	None
Ureter	Moderate to heavy diffuse staining of vascular and tissue smooth muscle 1/3 donors	None
Uterus	Luminal surface of epithelium demonstrates granular membranous staining 1/3 donors	Luminal surface of epithelium demonstrates granular membranous staining 1/3 donors

【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

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、免疫抑制の調節には困難を伴う。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、これまでに開発してきた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、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。この治療効果の病理学的検討では、YS110投与によりGVHD病変部位においてCD3+細胞（特にCD4+細胞>CD8+細胞）の浸潤が軽微となること、予防的YS110投与ではTリンパ球のみならずBリンパ球、NK細胞、単球の浸潤も抑制された。この結果は、YS110がGVHDの治療薬のみならず予防薬としても期待できることを示す。

共同研究者

森本 幾夫

（東京大学医科学研究所 教授）

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-/- (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 7×10^6 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。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) の測定を行う。

また今年度は、インフォームドコンセントが得られた骨髄移植症例患者の急性 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。

(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 7×10^6 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。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。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。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、ヒト型抗 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 7x10⁶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、ヒト型抗 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。

「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 (図 1 参照)。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 (図 2 参照)。

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 (図 3 参照)。

D. 考察

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、ヒト型抗 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、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。

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、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、ヒト型抗 CD26 モノクローナル抗体 (YS110) が、GVHD の治療薬さらに予防薬として有用であることを示している。

F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記入。

G. 研究発表

1. 論文発表

New highly potent and specific E6 and E7 siRNAs for treatment of HPV16 positive cervical cancer.

Yamato K, Yamada T, Kizaki M, Ui-Tei K, Natori Y, Fujino M, Nishihara T, Ikeda Y, Nasu Y, Saigo K, Yoshinouchi M

Cancer Gene Therapy 15(3):140-53, 2008

Mutated D4-guanine diphosphate-dissociation inhibitor (D4-GDI), is found in human leukemic cells, promotes leukemic cell invasion.

Nakata Y, Kondoh K, Fukushima S, Hashiguchi A, Du W, Hayashi M, Fujimoto J, Hata J, Yamada T
Exp Hematol . 36(1):37-50, 2008

Polybrominated diphenyl ethers and persistent organochlorines in Japanese human adipose tissues.

Kunisue T, Takayanagi N, Isobe T, Takahashi S,

Nose M, Yamada T, Komori H, Arita N, Ueda N, Tanabe S

Environmental Int 33:1048-1056, 2007

Humanized Anti-CD26 monoclonal antibody as a treatment for malignant mesothelioma tumors.

Inamoto T, Yamada T, Ohnuma K, Kina S, Takahashi N, Yamochi T, Inamoto S, Katsuoka Y, Hosono O, Tanaka H, Dang NH, Morimoto C

Clin Cancer Res 13(14):4191-4200, 2007

Role of Peyer's patches in the induction of Helicobacter pylori-induced gastritis.

Nagai S, Mimuro H, Yamada T, Baba Y, Moro K, Nochi T, Kiyono H, Suzuki T, Sasakawa C, Koyasu S

Proc Natl Acad Sci U S A. 104(21):8971-6. 2007

Specific Expression of Hepatocyte Nuclear Factor-1b in the Ovarian Clear Cell Adenocarcinoma and its Application to Cytological Diagnosis.

Higashiguchi A, Yamada T, Suzuki A, Mori T, Susumu N, Aoki D, Sakamoto M

Cancer Sci. 98(3):387-91, 2007

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.

Hayashi M, Kondoh K, Nakata Y, Kinoshita A, Mori T, Takahashi T, Sakamoto MI, Yamada T.

Br J Haematol. 137(3):221-32, 2007

NK4, an Antagonist of Hepatocyte Growth Factor (HGF), Inhibits Growth of Multiple Myeloma

Cells in Vivo; Molecular Targeting of Angiogenic Growth Factor.

Du W, Hattori Y, Yamada T, Matsumoto K, Nakamura T, Sagawa M, Otsuki T, Niikura T, Nukiwa T and Ikeda Y

Blood 109 (7):3042-3049, 2007

2. 学会発表

.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

図1 異種 GVHD 病変部位（食道）における YS110 投与によるヒト CD4+細胞、CD8+細胞の浸潤の減少

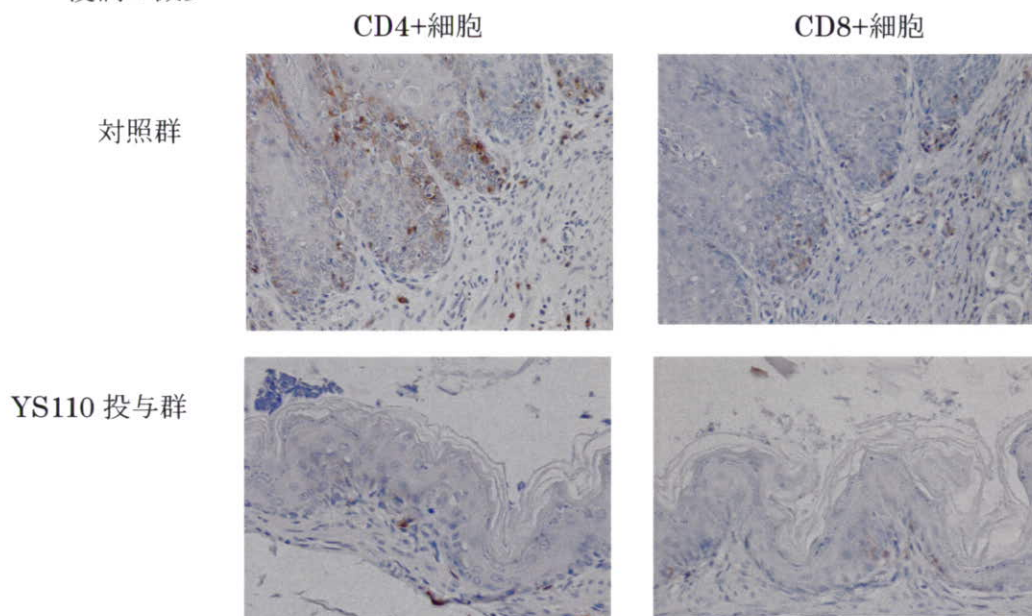


図2 YS110 投与による異種 GVHD 病変部位（肝）での CD26+細胞浸潤の減少

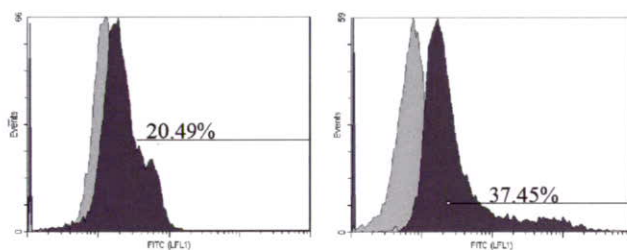


図3 ヒト急性 GVHD 症例の病変（十二指腸）における CD26+リンパ球

