

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 17 年度～平成 19 年度
総合研究報告書

主任研究者 森本 幾夫

平成 20 (2008) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告	1
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 先端医療研究センター 免疫病態分野・教授	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	29
III. 研究成果の刊行物・別刷	43

I. 総合研究報告

【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。

この中で、(1)作製したヒト化CD26抗体（YS110）はin vivoモデルでの有効性を確認でき、カニクイザルを用いた単回予備投与及びGLP準拠5週間複数回投与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、病理組織学的にも異常所見は認められなかった。さらにGLP準拠のヒト及びカニクイザル組織交差反応においてヒトの方が染色強度は高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。(2)クローン病において手術標本からの腸管粘膜固有層のCD26陽性T細胞の比率は炎症性腸疾患（クローン病、潰瘍性大腸炎）と対照症例で有意差は認められなかったが、CD4+CD26強陽性T細胞に絞った解析では炎症性腸疾患に高い傾向が認められた。さらにクローン病の腸管炎症粘膜生検においてCD26陽性T細胞は非炎症部分と比して多く滲潤しており、CD26強陽性T細胞がこれら疾患の炎症の部で働いていることが強く示唆された。(3)SCIDマウスへのヒトPBL移植により発生する異種GVHDモデルを用いてヒト化CD26抗体（YS110）投与により、異種GVHDの臨床症状及び病理学的変化の顕著な抑制及び治療効果が期待できることが明らかとなった。さらに急性白血病で骨髄移植後発生したヒト急性GVHD患者の胃腸粘膜の組織標本を検討したところ重症例ほど多数のCD26陽性T細胞の滲潤が認められ、CD26陽性T細胞がGVHDのエフェクターT細胞として働いている可能性を強く示唆した。(4)抗CD26抗体を1µg～100µg/mlまで固相化してヒトリンパ球を刺激したが、増殖及びIL-2などサイトカイン産生は全くみられなかった。(5)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-20℃18ヶ月の安定性を確認した。米国FDAに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）の申請を本年1月14日に行い、2月14日に承認された。本邦においてもできるだけ早期にプロトコルを作製し、GVHDやクローン病などの難治性免疫病への探索的臨床試験を実施する予定である。

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

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、現在認可されているが、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。我々はマウス型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。

そこで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CD26抗体を作製した。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的とする。この中で

(1) 加藤、森本は、動物モデルでのin vivoの有効性、GLP準拠でのカニクイザルを用いてのヒト化CD26抗体の薬物動態や毒性試験などの前臨床試験、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の試験、GMPレベルでのヒト化抗体の作製、製剤安定性試験などを行うことを目的とした。

(2) 日比は、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、つぎに腸管粘膜中のCD26陽性リンパ球の局在および患者血清中の可溶性CD26分子の検討を行い、T細胞上に発現するCD26分子の病態への関与を明らかにすることを目的とした。

(3) 東條は、同種骨髄移植後の慢性GVHD合併症例および治療にて細胞遺伝学的寛解を得ている慢性骨髄性白血病(CML)(IFN群、イマチニブ(STI)群)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(GVHD)および治療効果との関連性について健常者を対照として検討することを目的とした。

(4) 山田、森本は、マウスを用いたヒトPBL移植による異種GVHDモデルを開発しこの異種GVHDモデルを用いた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、その病理組織学的評価などを行うことを目的とした。

(5) 渡辺は、ヒト化CD26抗体を用いた急性GVHDの治療に際し、制御性T細胞およびCMV特異的T細胞を傷害する可能性がないか、あるいは骨髄移植後のこれらの細胞におけるCD26発現レベルを解析することを目的とした。

B. 研究方法

<1> 加藤・森本

1. 前臨床試験に用いる動物について

YS110 の単回予備投与の忍容性、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 5 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 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。

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る。その後被験血清(100µl) 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。その後 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-GloTM プロ

テアーズアッセイキット (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) を陽性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。

5. 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 にて染色した。

6. 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。

7. FACS 解析

YS110 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。

<2> 日比

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酵素法、比重遠沈法により粘膜固有層リンパ球、上皮間リンパ球、末梢血リンパ球を分離し、Flow Cytometry を用いて CD26 分子の発現を解析した。同時に CD4, CD26, CD45RA, CD45RO, CD62L の発現についても検討した。コントロールとして、大腸癌手術例の手術検体の非癌部組織より分離した粘膜固有層リンパ球を用いた。

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。

3. 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。

<3> 東條

患者 GVHD 例の解析では、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。

CML 例の解析については、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 6x10⁶IU/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。

<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。

<4> 山田

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。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。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。ヒト化 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。YS110 の投与方法としては、「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。

さらに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。

<5> 渡辺

東京大学医科学研究所附属病院で骨髄移植を受けた患者、および健常人ボランティアを対象にした。採血後、Ficoll で単核細胞を分離して蛍光標識抗体で染色し、FACS Aria (Becton-Dickinson 社) で解析した。

<倫理面への配慮について>

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

ヒト血液、組織については、すべてドナー及び患者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英国コバンス社の Standard Operating Procedures (SOP) に基づいて行われた。

C. 研究結果

<1> 加藤・森本

1. in vivo での YS110 の有効性について

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 5×10^6 を腹腔内に注射し (23 日前)、腫瘍サイズが約 100 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。

2. カニクイザル及びラットを用いたYS110の単回投与による予備毒性試験

YS110 をカニクイザルに単回投与した場合の忍容性を検討するため、YS110 を 0(溶媒対照)、10、25、50 及び 100mg/kg の用量で各群雌雄各 1 匹に単回静脈内点滴投与した。その結果、YS110 の血中濃度及び血中濃度一時間曲線下面積 (AUC) は投与用量に依存して増加を示した。最高血中濃度は、投与後一時間に認められた。血中薬物半減期 (T1/2) は他の治療用ヒト化抗体と同様の薬物動態を示した。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病理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。

3. YS110 の DPPIV 酵素活性への影響

CD26 は DPPIV enzyme を含み、血清中にも可溶性 CD26 として存在している。そこで 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少ないことが示唆された。

4. CD26 のヒト正常及び癌組織での発現について

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

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が

ら、YS110 は免疫病以外に癌にも用いる可能性があり、治療ウィンドウが幅広いことも示唆された。

5. 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 GLP 準拠にて行った (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 (T1/2) 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。

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。

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。またすべての群のカニクイザルの剖検を行ったが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。

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。

7. 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。YS110 の結合を Mean Fluorescence Intensity (MFI) で表したところ、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。

8. 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。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 抗体の毒性及び耐容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。

9. 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、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 μ g/ml~100 μ 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。

10. 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。

<2> 日比

1a. 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

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 CD26highT 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 CD26highCD4T 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+CD26highT 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。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。

1b. 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。メモリー T リンパ球を含む CD4 陽性 CD26high 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。

2. 粘膜内 CD26 陽性リンパ球の局在の検討

3 例のクローン病症例とともに、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。

3. 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 ± 4.15 µg/ml）において、有意に健常人（9.47 ± 2.69 µg/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 ± 4.42 µg/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 ± 5.18 µmol/min/l）、クローン病（12.95 ± 5.11 µmol/min/l）とも有意に健常人（17.2 ± 3.1 µmol/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。

<3> 東條

1. GVHD 例の解析結果

- 1) 健常者と慢性 GVHD 患者の 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。
- 2) 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。

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+SSClow 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。

2. CML 例の解析結果

- 1) 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。

- 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。

<4> 山田・森本

1. 異種 GVHD モデルマウスの作成

ヒト PBL 7×10^6 個/匹を腹腔内投与後、経時的に、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、脱毛、体重減少、下痢、運動機能低下、耳の厚さの減少が順次現れ、7 週より死亡するマウスが出現した。組織学的な検索では、皮膚において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。また腸管では粘膜上皮の脱落とリンパ球浸潤が見られた。その他には肝、肺、唾液腺において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。

2. 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、ヒト化 CD26 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。

3. 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。

4. 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。

5. 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。

<5> 渡辺

臍帯血移植後の CD26 発現は、骨髄移植後および健常人の T 細胞におけるそれと比較して、

明らかに低頻度であった。

また、Treg と CMV 特異的 T 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～陰性であった。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

<1> 加藤・森本

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、非常に良質のヒト化抗体を作製できた。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。すでに前臨床試験に必要な non-GMP グレードのヒト化 CD26 抗体 (YS110) も確保した。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。

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。さらにマウス型抗体を用いてヒト組織で 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強く示唆された。

YS110 投与で単回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、検査データ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た。

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 にて解析したところ、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。

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被検者にサイトカインストームが生じた。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。

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。米国 FDA に 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) の申請を本年 1 月 14 日に行い、2 月 14 日に承認された。でき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本邦で施行したい。

<2> 日比

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。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。末梢血中可溶性 CD26 濃度もクローン病患者において有意に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も認められ、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。これまでにメモリー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関節リウマチなどで臨床応用に際しては失敗しているが、今後、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た。

<3> 東條

今回の GVHD 解析対象例は、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。

CML については、同じ細胞遺伝学的寛解に到達していても 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。今回の研究においてCD26++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。

<4> 山田・森本

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も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。

<5> 渡辺

骨髄移植では、CD26高発現T細胞とGVHDの頻度は臍帯血移植と比べて高く、CD26高発現細胞がGVHDのエフェクターであることが示唆された。骨髄移植でのTregとCMV特異的T細胞の大部分は、CD26高発現細胞ではなかったが、投与したCD26抗体がCD26中程度発現細胞にまで作用する場合、TregおよびCMV特異的T細胞の過半数に影響する可能性がある。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った。

E. 結論

ヒト化 CD26 抗体 (YS110) は *in vivo* モデルでの有効性を確認でき、カニクイザルを用いた単回予備投与及び 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 準拠のヒト及びカニクイザル組織交差反応においても、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。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 CD26 抗体 (YS110) 投与により異種 GVHD の臨床症状、病理学的変化の顕著な抑制効果が明らかになり、特に治療効果も期待できることから、ヒト化 CD26 抗体が GVHD の治療薬として有望であることが示唆された。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、FACS、免疫染色によるクローン病の腸管炎症粘膜内 CD26 陽性 T 細胞の解析により 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) の新しい治療法を確立したい。

F. 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, Isoe 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

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

Iwata S, Souta-Kuribara A, Yamakawa A, Sasaki T, Shimizu T, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Dang NH, Watanabe T, Arima N, Morimoto C. HTLV-I Tax induces and associates with Crk-associated substrate lymphocyte type (Cas-L). *Oncogene.* 2005; 24: 1262-71

Yamochi T, Yamochi T, Aytac U, Sato T, Sato K, Ohnuma K, McKee KS, Morimoto C, Dang NH. Regulation of p38 phosphorylation and topoisomerase IIalpha expression in the B-cell lymphoma line Jiyoye by CD26/dipeptidyl peptidase IV is associated with enhanced in vitro and in vivo sensitivity to doxorubicin. *Cancer Res.* 2005; 65: 1973-83

Ohnuma K, Yamochi T, Hosono O, Morimoto C. CD26 T cells in the pathogenesis of asthma. *Clin Exp Immunol.* 2005; 139: 13-6

Yoshikawa N, Yamamoto K, Shimizu N, Yamada S, Morimoto C, Tanaka H. The distinct agonistic properties of the phenylpyrazolosteroid cortivazol reveal interdomain communication within the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol.* 2005; 19: 1110-24

Sato K, Nakaoka T, Yamashita N, Yagita H, Kawasaki H, Morimoto C, Baba M, Matsuyama T. TRAIL-transduced dendritic cells protect mice from acute graft-versus-host disease and leukemia relapse. *J Immunol.* 2005; 174: 4025-33

Nakamura H, Makino Y, Okamoto K, Poellinger L, Ohnuma K, Morimoto C, Tanaka H. TCR engagement increases hypoxia-inducible factor-1alpha protein synthesis via rapamycin-sensitive pathway under hypoxic conditions in human

- peripheral T cells. *J Immunol.* 2005; 174: 7592-9
- Shimizu N, Ouchida R, Yoshikawa N, Hisada T, Watanabe H, Okamoto K, Kusuhara M, Handa H, Morimoto C, Tanaka H. HEXIM1 forms a transcriptionally abortive complex with glucocorticoid receptor without involving 7SK RNA and positive transcription elongation factor b. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 8555-60
- Sato T, Yamochi T, Yamochi T, Aytac U, Ohnuma K, McKee KS, Morimoto C, Dang NH. CD26 regulates p38 mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of integrin beta1, adhesion to extracellular matrix, and tumorigenicity of T-anaplastic large cell lymphoma Karpas 299. *Cancer Res.* 2005; 65: 6950-6
- Ohnuma K, Yamochi T, Uchiyama M, Nishibashi K, Iwata S, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Dang NH, Morimoto C. CD26 mediates dissociation of Tollip and IRAK-1 from caveolin-1 and induces upregulation of CD86 on antigen-presenting cells. *Mol Cell Biol.* 2005; 25: 7743-57
- Sasaki T, Iwata S, Okano HJ, Urasaki Y, Hamada J, Tanaka H, Dang NH, Okano H, Morimoto C. Nedd9 protein, a Cas-L homologue, is upregulated after transient global ischemia in rats: possible involvement of Nedd9 in the differentiation of neurons after ischemia. *Stroke.* 2005; 36: 2457-62
- Urasaki Y, Nori M, Iwata S, Sasaki T, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Dang NH, Ikeda E, Morimoto C. Roxithromycin specifically inhibits development of collagen induced arthritis and production of proinflammatory cytokines by human T cells and macrophages. *J Rheumatol.* 2005; 32: 1765-74
- <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 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
- Hisamatsu T, Inoue N, Yajima T, Izumiya M, Ichikawa H, Hibi T. Psychological aspects of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.*

2007; 42: 34-40

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

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

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

Kamada N, Inoue N, Hisamatsu T, Okamoto S, Matsuoka K, Sato T, Chinen H, Su Hong K, Yamada T, Suzuki Y, Suzuki T, Watanabe N, Tsuchimoto K, Hibi T. Nonpathogenic *Escherichia coli* Strain Nissle 1917 Prevents Murine Acute and Chronic Colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2005; 11: 455-463

Tahara T, Inoue N, Hisamatsu T, Kashiwagi K, Takaishi H, Kanai T, Watanabe M, Ishii H, Hibi T. Clinical significance of microsatellite instability in the inflamed mucosa for the prediction of colonic neoplasms in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005; 20: 710-715

Sawada K, Kusugami K, Suzuki Y, Bamba T, Munakata A, Hibi T, Shimoyama T. Leucocytapheresis in ulcerative colitis: results of a multicenter double-blind prospective case-control study with sham apheresis as placebo treatment.

Am J Gastroenterol. 2005; 100: 1362-1369

Hitotsumatsu O, Hamada H, Naganuma M, Inoue N, Ishii H, Hibi T, Ishikawa H. Identification and characterization of novel gut-associated lymphoid tissues in rat small intestine. *J Gastroenterol.* 2005; 40: 956-963

Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Sato T, Matsuoka K, Arai K, Nakai T, Hasegawa A, Inoue N, Watanabe N, Akagawa K, Hibi T. Abnormally Differentiated Subsets of Intestinal Macrophage Play a Key Role in Th1-Dominant Chronic Colitis through Excess Production of IL-12 and IL-23 in Response to Bacteria. *J of Immunol.* 2005; 6900-6908

Matsumoto T, Iida M, Kohgo Y, Imamura A, Kusugami K, Nakano H, Fujiyama Y, Matsui T, Hibi T. Therapeutic efficacy of infliximab on active Crohn's disease under nutritional therapy. *Scand J Gastroenterol.* 2005; 40:1423-1430

Hibi T and Sakuraba A. Is there a role for apheresis in gastrointestinal disorders? *Nat Clin Pract Gastroenterol & Hepatol.* 2005; 2: 200-202

久松理一、鎌田信彦、小林拓、知念寛、日比紀文 炎症性腸疾患の病態と粘膜免疫-最近の動向- 細胞 2006; 38: 7-10

日比紀文、芳沢茂雄 抗 TNF- α 抗体療法 *Mebio* 2005; 22: 108-113

緒方晴彦、日比紀文 クロウン病に対する抗サイトカイン療法の今後の見通しは? 分子消化器病 2005; 2: 6-12

岩上祐子、久松理一、日比紀文 インフリキシ