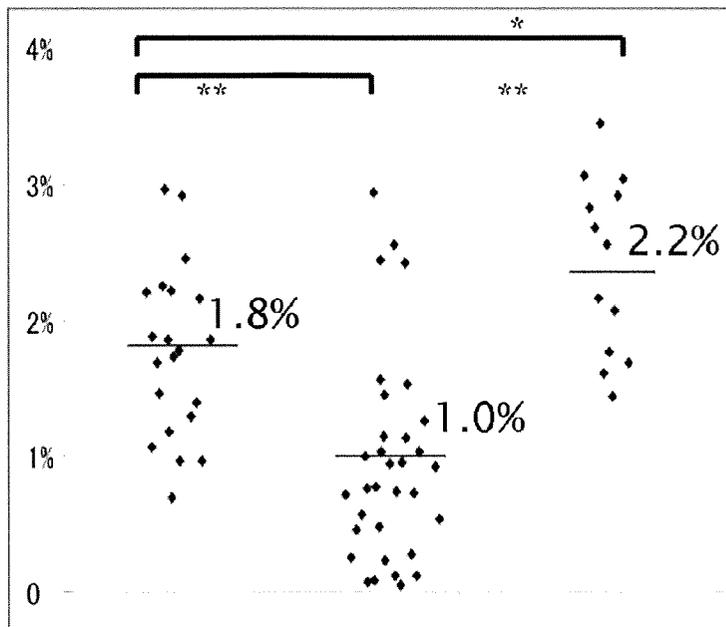


図2:

免疫寛容患者における CD4+CD25high+ cells の増加



健康人 免疫抑制剤
 使用 免疫寛容

*p<0.05

**p<0.01

図3:

免疫寛容患者におけるCD4⁺CD25^{high+} cells による ドナー抗原に特異的な免疫制御

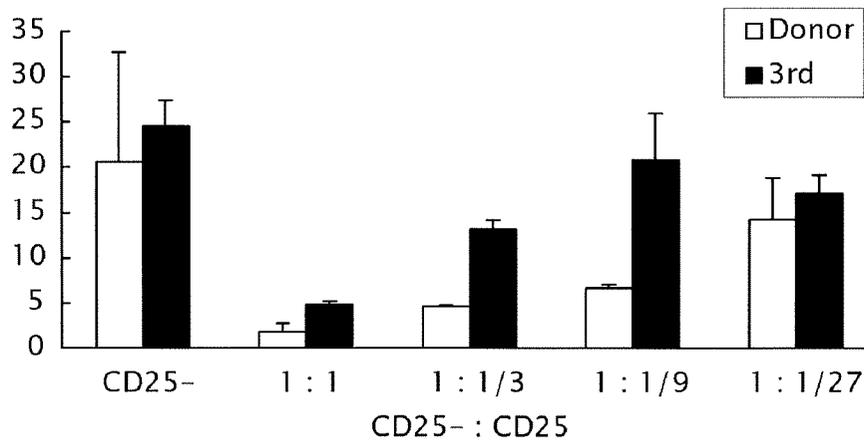
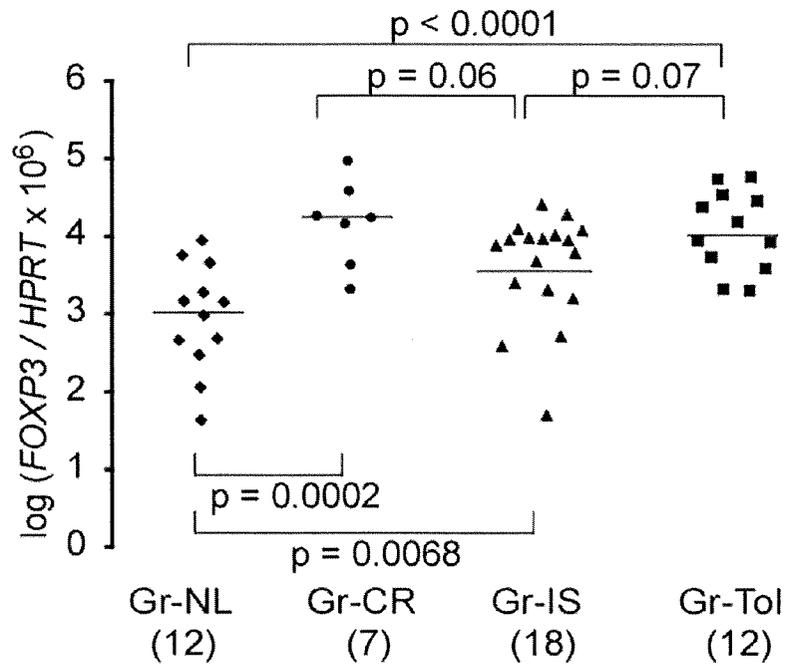


図4:

移植肝内の FOXP3mRNA の発現



Gr-NL; 正常肝

Gr-CR; 慢性拒絶

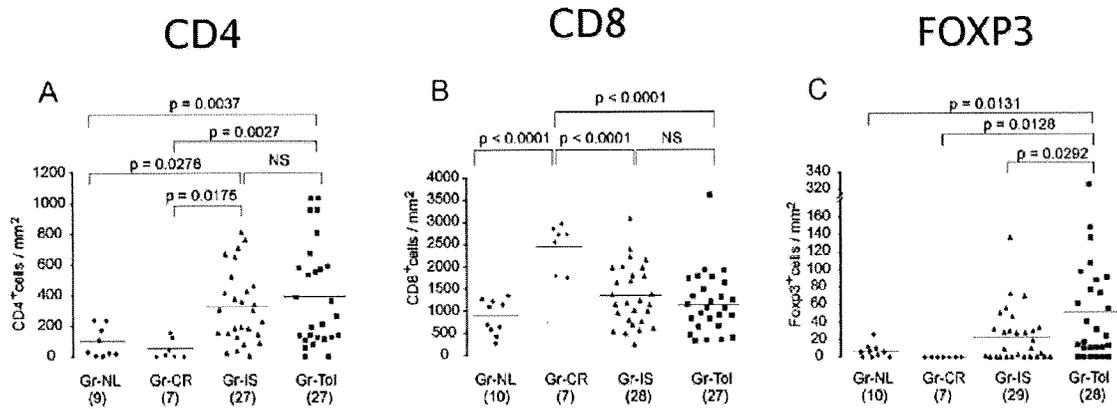
Gr-IS; 免疫抑制剤使用中(減量前)

Gr-Tol; 免疫寛容

—は各群の mean value を示す。

図5 :

移植肝内の CD4+,CD8+,FOXP3+ 細胞の数



Gr-NL; 正常肝

Gr-CR; 慢性拒絶

Gr-IS; 免疫抑制剤使用中(減量前)

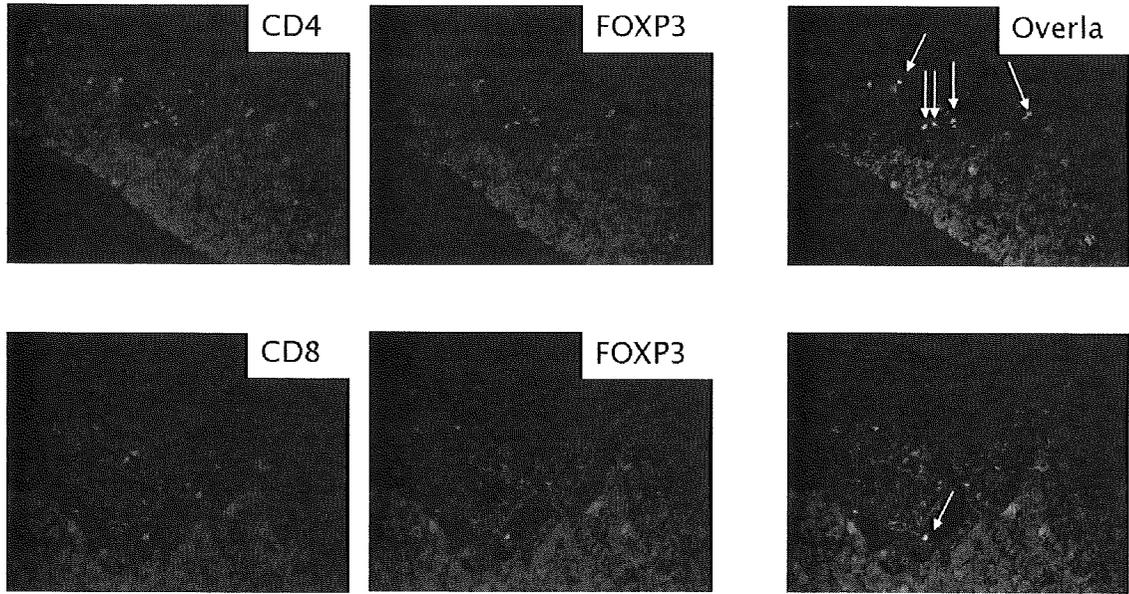
Gr-Tol; 免疫寛容

—は各群の mean value を示す。

参考資料6

図6:

CD4,FOXP3及び CD8,FOXP3の 二重蛍光染色



左上;赤CD4+細胞 中央上;緑 FOXP3+細胞 右上;矢印の黄緑 CD4+ FOXP3+細胞

左下;赤CD8+細胞 中央下;緑 FOXP3+細胞 右下;矢印の黄緑 CD8+ FOXP3+細胞

免疫寛容患者の移植前内に存在する FOXP3+細胞のうち、92%はCD4+, 8%はCD8+であった。

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）
分担研究報告書

イマチニブ耐性 CML に対する新規 Bcr-Abl/Lyn チロシンキナーゼ阻害剤の開発に関する研究
研究分担者 前川 平 京都大学医学部附属病院 輸血部 教授

研究要旨

Abl 特異的チロシンキナーゼ阻害剤メシル酸イマチニブ（グリベック®、IM）は、臨床導入後わずか数年で慢性骨髄性白血病治療の第1選択薬となった。しかし、このきわめて優れた分子標的薬においてすら、耐性の出現などいくつかの問題が明らかとなってきた。われわれは IM より有効な薬剤となりうる新規チロシンキナーゼ阻害剤の開発に取り組み、ユニークな作用を示して IM 耐性を克服できる INNO-406 (NS-187) という Bcr-Abl/Lyn 同時阻害剤を見出し、2006 年 7 月より米国で臨床試験を開始した。臨床開発のゴールは、より有効で、より安全なあたらしい薬剤を患者さんの手元に一刻も早く届けることにあり、国内、国外を問わない。開発のスピードも重要な要素である。INNO-406 (NS-187) の開発経緯について概説するとともに、わが国における抗悪性腫瘍薬開発の隘路についても言及したい。

A. 研究目的

フィラデルフィア (Ph) 染色体は 9 番染色体と 22 番染色体の相互転座 t(9;22)(q34;q21) により生じる。この Ph 染色体として観察される特異的再構成遺伝子 Bcr-Abl から転写、翻訳されるキメラ蛋白のもつチロシンキナーゼの異常な活性化が慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia: CML) の発症原因とされている。

歴史的に見れば CML の治療薬はブスルファンとハイドロオキシウレアに始まるが、これらは白血病細胞の数を減らすものの生存期間の延長は見られず、数年の慢性期、その後数ヶ月の移行期、急性転化期を経て死の転帰をとるのが通例であった。1980 年代インターフェロン・アルファ (IFN- α) が用いられ、血液学的のみならず細胞遺伝学的寛解も導入可能とされ、従前の治療と比較し生存期間を延長した。しかし、IFN- α 治療で Ph 染色体が消失する症例はたかだか 5% 程度で効果は十分ではなかった。一方、慢性期に HLA 一致同胞ドナーから骨髄移植を受けた症例では治癒が期待されるものの、移植に伴う毒性とドナーの希少性により適応症例が限られている。したがって、Ph 陽性クローンの特異的に排除できるあらたな薬剤の開発が長年望まれてきた。

1990 年代はじめ、スイスの製薬会社ノバルティスは多くのチロシンキナーゼ阻害剤を合成していたが、米国オレゴン大学のドラッカーはその中から CML 細胞の増殖を抑制する分子を見出した。彼はノバルティス社と共同で、その分子をリード化合物として Abl 特異的阻害剤メシル酸イマチニブ (imatinib mesylate; IM, グリベック R) を合成し、臨床開発に乗り出した。IM は臨床導入後わずか 2-3 年で CML の第1選択薬となったことは周知である。しかし、CML の治療パラダイムシフトをもたらしたこの分子標的薬においてすら、少なからぬ症例で耐性が獲得されるなど多くの問題が明らかとなってきた 1)。われわれは IM 耐性を克服し、より有効な薬剤となりうる新規チロシンキナーゼ阻害剤の開発に日本新薬と共同で取り組み、Bcr-Abl/Lyn 同時阻害剤 NS-187 (INNO-406) を見出した 2)。本稿では、この研究開発経緯について国際共同治験の必要性を念頭に置きながら、わが国における抗悪性腫瘍薬開発の隘路についても言及したい。

・メシル酸イマチニブ (IM) と NS-187 (INNO-406) Bcr-Abl キメラ蛋白が活性化するためには、Abl にアデノシン 3 リン酸 (ATP) が結合することが必要である。IM(図1a)は、この ATP 結合部位に結合することにより競合的に Abl チロシンキナーゼを特異的に阻害する。IM は慢性期の CML に対し優れた効果を示すが、病勢の悪化した移行期や急性期の CML、それに Ph+ALL に対しては効果が劣る。IM 耐性の原因として IM 結合部位である Abl キナーゼドメインの ATP 結合領域の変異、Bcr-Abl 遺伝子の増幅や mRNA コピー数の増加、多剤耐性遺伝子の出現、Lyn の活性化などが報告されている。これらの中でも Abl キナーゼドメインの変異が最も重要な問題と考えられている。この部位の変異により ATP 結合領域の構造が変化してしまうため、IM が結合できなくなり耐性が生じる。ATP 自体はこの変異があってもこの結合領域に結合でき、Bcr-Abl キメラ蛋白を活性化する。また、IM は Abl 以上に platelet-derived growth factor 受容体 (PDGFR) や c-Kit の活性をつよく阻害し、骨髄抑制、浮腫などの副作用の出現に関与している可能性があり、Bcr-Abl への特異性が高い 薬効がより安全性が高いと考えられる。加えて、IM と同程度の Bcr-Abl 特異性をもちつつ、IM 耐性に関与すると考えられる Lyn など他のキナーゼを同時に抑制する薬効も、つよい効果を示す可能性があると考えられる。したがって、経口投与可能で Abl への特異性が高く、ATP 結合領域に変異のある Bcr-Abl にも効果を示し、かつ安全性の高い新規 Abl チロシンキナーゼ阻害剤の開発が俟たれていた。われわれは、既知の IM 結合 Abl キナーゼドメインの結晶構造を詳細に検討する過程で、IM のフェニル環周囲にアミノ酸残基 Ile-293、Leu-298、Leu-354、Val-379 によって作られた疎水性ポケットを見出した (図2)。検討の結果、このスペースを利用して Abl キナーゼドメインとの親和性が IM より強い化合物が合成できれば、突然変異を持つ CML 細胞の増殖を抑えることができるのではないかと考えた。

そこで、この疎水性ポケット内にさまざまな疎水性置換基を持つ化合物を合成し、試行錯誤を重ねた結果、この疎水性ポケットにフルオロメチル基を導入することで *in vitro* で IM より 25-55 倍、*in vivo* でも少なくとも 10 倍以上強力な Bcr-Abl /Lyn 同時阻害剤である NS-187 を同定し、その合成に成功した (図1c)。NS-187 は、キナーゼドメイン内に変異を持つ Bcr-Abl 蛋白 13 個中 12 個に抑制効果を認めたが、T315I には無効であった。また Src、Blk、Yes のリン酸化に影響を与えずに Lyn を抑制した。In vivo の検討では、野生型 Bcr-Abl あるいは T315I を除く M244V、G250E、Q252H、Y253F、E255K、M351T、H396P の変異 Bcr-Abl を発現する Ba/F3 を移植したマウスで、NS-187 は生存期間を延長した。さらに、マウス中枢神経白血病モデルにおいて用量依存性に生存期間を著明に延長した 3)。NS-187 は Bcr-Abl と Lyn キナーゼを特異的にターゲットとするため、後述するような Sfk/Abl 阻害剤のような複数のキナーゼをターゲットにする薬剤よりも副作用は少ないと期待される。NS-187 (臨床開発コード INNO-406) は米国 FDA から IND (Investigational New Drug) としての承認を受け、臨床第 1 相試験が 2006 年 7 月より米国 MD アンダーソンがんセンターおよび 9 月からドイツのフランクフルト大学でも開始されている。

B. 研究方法 C. 研究結果 D. 考察

新規の Abl チロシンキナーゼ阻害剤は、ATP 競合型と非競合型阻害剤の大きく 2 つに分けられる。さらに ATP 競合型阻害剤は、もともと Src family kinases (Sfk) 阻害剤として開発され Abl への効果を強めるよう修飾された Sfk/Abl 阻害剤と、IM の基本構造である 2-phenylaminopyrimidine 骨格をもつ化合物の二つに大別される。BMS-354825 (Dasatinib, ダサチニブ)、AP23464、SKI-606、PD166326 は前者に、AMN107 (Nilotinib, ニロチニブ)、NS-187 (INNO-406) は後者に分類される。

一般的にSfk/Abl阻害剤はBcr/Ablチロシンキナーゼの自己リン酸化をIMより100-300倍強力に阻害し、Bcr/Ablのほとんどの突然変異に有効である。しかし、IMが不活性型のAblのみと結合するのにに対し、Sfk/Abl阻害剤は活性型にも結合し、またSrc family proteinを含むその他多くのプロテインキナーゼも阻害するため特異性に乏しい。一方、2-phenylaminopyrimidine骨格の化合物に関しては、Bcr/Ablチロシンキナーゼの自己リン酸化抑制能はIMの10-100倍ことどもるが、Bcr/Ablに高い特異性を持つ。しかし、これらATP競合型阻害剤で現在、T315I変異をもつBcr/Ablに有効なものはない。Ablキナーゼドメインの315番目のアミノ酸(スレオニン)は、IMがAblと直接結合する部位のなかでも最も重要な部位にあるため、ゲートキーパーと呼ばれる。同部位がスレオニンより大きなイソロイシンに変異すると、IMやNS-187(INNO-406)を含めてその他の新規のATP競合型ABLキナーゼ阻害剤が結合しようとしても、イソロイシンが障壁となって結合できなくなると考えられている。現在、すでに米国FDAにより承認されたダサチニブ(商品名スプライセル)や試験中のニロチニブの臨床成績に関しては他の報告を参照されたい(4) (5)。この他にも、非ATP競合型阻害剤であるON012380、オーロラキナーゼ阻害剤であるVX-680、p38MAPK阻害剤のBIRB-796、さらにT315Iにも有効であるとされるSGX-70430などが開発中である。

わが国における臨床開発とその隘路
臨床開発の原則は、より効果的で、より安全なあたらしい治療薬を、より早く患者さんの手元に届けることにある。われわれが開発したNS-187(INNO-406)も臨床試験は海外で先行することになった。IM耐性克服をめざす新規CML治療薬の開発競争は凌ぎを削っている。開発のスピードはきわめて重要な要素である。新規薬剤が承認されれば、その後開発される薬剤が対象とするのは先行する新規薬剤に耐性あるいは不耐用の症例になる。このあたりは学

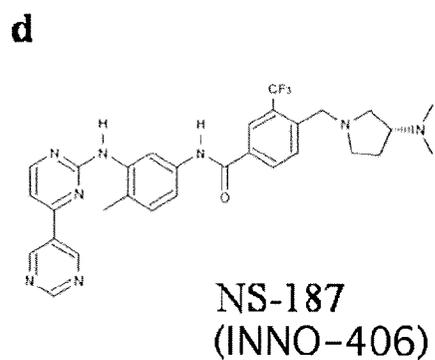
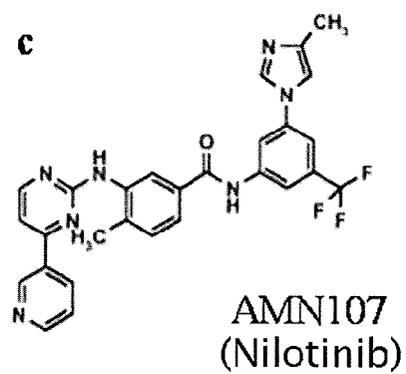
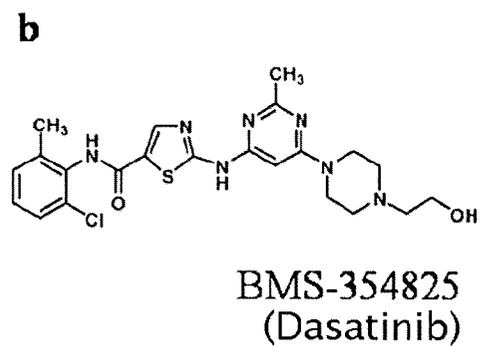
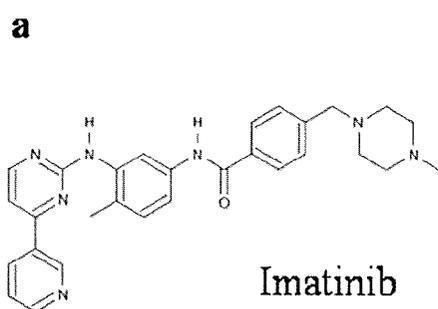
問的な興味だけでは如何ともし難い開発戦略が優先する。日本のみならず世界中のCML患者が新規治療薬の開発を今や遅しと待っている。米国で開発が先行してもbridging phase 1 studyを早く開始できれば、わが国での承認は遅れなくて済むであろう(図3)。

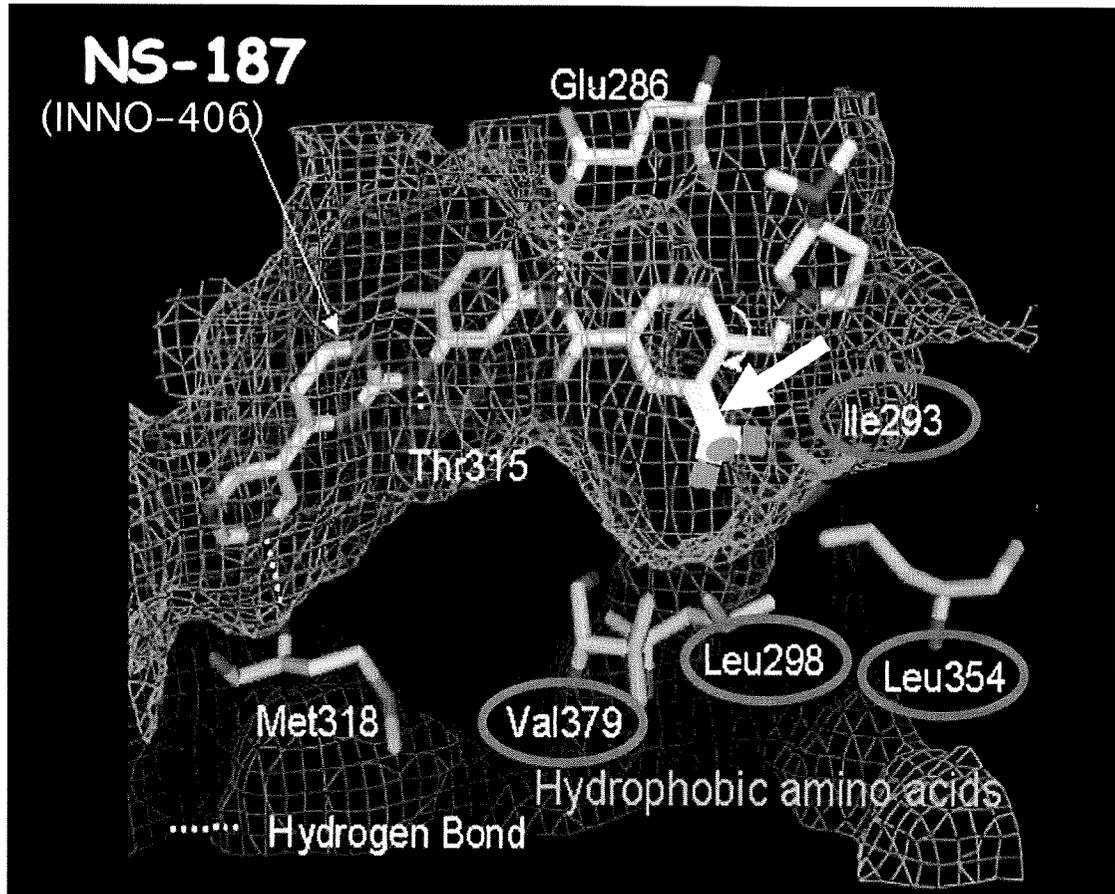
E. 結論

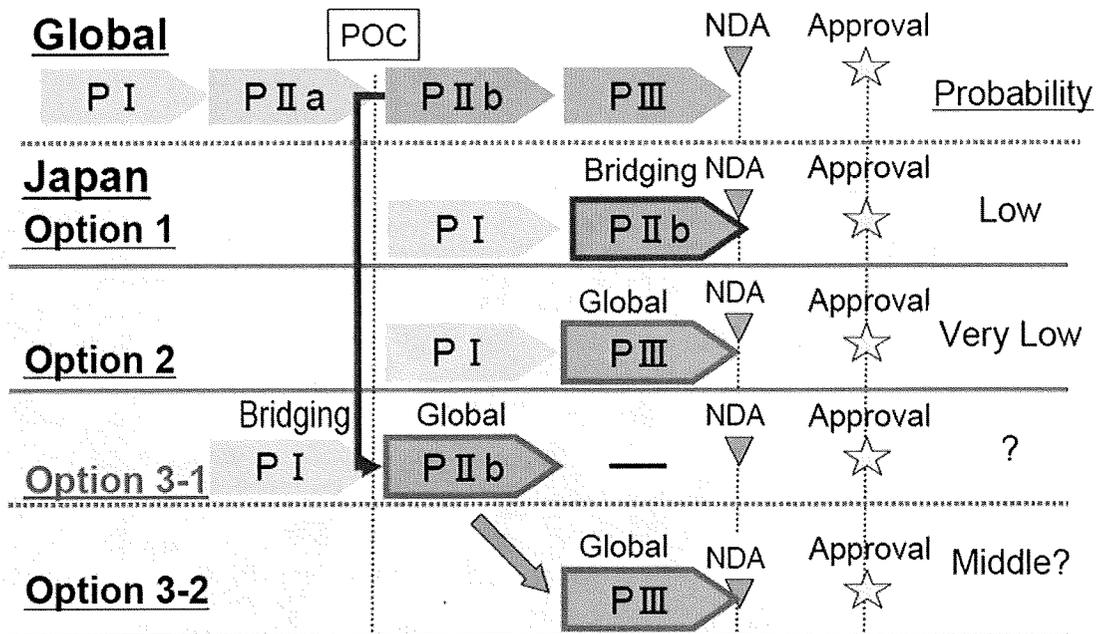
わが国において「試験の空洞化」が指摘されるようになって久しい。その原因は試験費用の高騰、審査期間の問題、症例登録のスピード、試験を支える人的インフラの不備、トランスレーショナルリサーチないし医師主導型の試験を推進させるためのGMP準拠の試験薬製造システムの不備など種々あるが(図4)、試験を担当する医師(かみの場合には臨床腫瘍医)の絶対数の不足とGCPを遵守することに対する理解、それに試験に参加する意義を、被験者となる国民に十分理解できるように説明して啓蒙する努力も不足しているのではなかろうか。医師、行政、製薬会社(ベンチャー的な要素を持つ会社あるいは組織が必要)、それに被験者が一致協力してオールジャパンの体制を一刻も早く立ち上げることが喫緊の課題である。でなければ、日米欧の3極ではなく、アメリカ、ヨーロッパ、それにROW(Rest of World)のなかの日本としての評価しかなくなることが大いに危惧される。

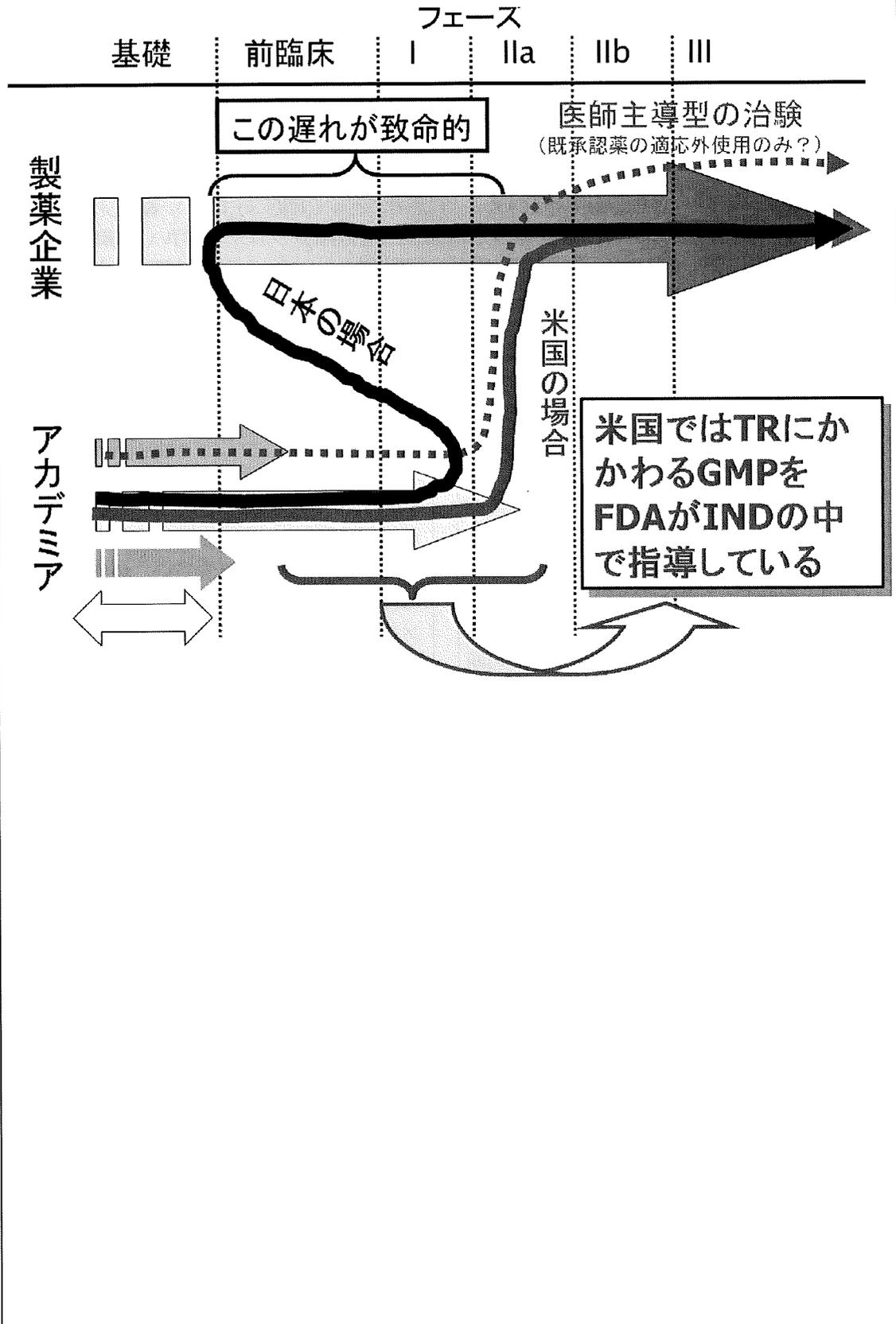
参考資料1 ; イマチニブ構造

図1









厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）
分担研究報告書

臨床臓器移植、免疫寛容（tolerance）のメカニズムに関する研究
に関する研究

研究分担者 湊 長博 京都大学大学院・医学研究科 感染・免疫 教授

研究要旨

免疫抑制剤の弊害により患者が死亡したり、患者の Quality of Life (QOL) が低下することが多い臓器移植の現状で免疫寛容が成立することは患者にとって大変に好ましい。著者らは、肝移植や小腸移植の後に自然に免疫寛容となった症例に免疫学的アプローチを行い、制御性 T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、PD-1 が、免疫寛容の成立に重要な働きをしている可能性が高いことを見出した。免疫寛容のメカニズムを明確にすることは自然に免疫寛容の成立しない患者を、免疫寛容へと導くための次世代の治療法を開発する重要な手がかりになると期待される。

A. 研究目的

1980 年代のシクロスポリン、1990 年代のタクロリムスなどのすぐれた免疫抑制剤の登場により、臨床臓器移植の急性拒絶反応は著しく減少し、その成績は向上した¹⁾。しかし、免疫抑制剤の弊害（感染症、移植後リンパ腫PTLD、薬剤毒性）により患者の Quality of Life (QOL) が低下する場合が多い。また、現在使用されている免疫抑制剤は慢性拒絶には無効である場合が多い。事実、各種臓器移植の短期死亡例は感染症によるものが最も多い²⁻⁵⁾。一方、長期的には、慢性拒絶における移植臓器の喪失が最大の問題である。従って、免疫寛容=tolerance（用語説明あり）（免疫抑制剤を中止しても移植臓器が十分に機能する状態⁶⁾）が成立することは患者にとって大変に好ましい。これまで、臨床臓器移植で免疫寛容が成立することは極めて例外的であるとの考えが一般的であった。臨床での免疫寛容は‘Holy grail’とまで言われることもあった。しかし、京都大学では既存の概念をくつがえし、小児生体肝移植を受けた患者のうち 15%の症例で自然に免疫寛容の成立を認めた⁷⁾。また、小腸はかつて‘forbidden organ to transplant’と呼ばれたほど拒絶の起きやすい臓器である⁸⁾。国際小腸移植レジストリーは、小腸移植後1年以内に80-90%の症例で拒絶が起こると報告している⁹⁾。ところが、共同研究を行ってきたベルギールーベンカトリック大学では4例の小腸移植が行われ、長期間、拒絶がまったく起きなかった¹⁰⁾。これら

の小腸移植の患者では現在 QOL の障害されない程度の極めてわずかの免疫抑制剤の内服で移植臓器が機能しており、prope (almost) tolerance（用語説明あり）の状態である。著者らは、これらの、極めて貴重な症例に対し免疫学的なアプローチを行い、免疫寛容=tolerance およびprope (almost) toleranceのメカニズムを追求してきた。免疫寛容=tolerance および prope (almost) toleranceのメカニズムを明確にすることは自然に免疫寛容の成立しない患者を、免疫寛容へと導くための次世代の治療法を開発する重要な手がかりになると期待される。

B. 研究方法

著者らは、制御性T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、PD-1の三つに着目して免疫寛容のメカニズムへのアプローチを行ってきた。制御性T細胞は動物実験のレベルでは移植後の免疫寛容に重要な役割をはたしているとの知見が集積されつつある。著者らは、京都大学で生体肝移植を受けた患者のうち免疫寛容の成立を認めた患者の末梢血で、制御性T細胞の本体とされるCD4陽性CD25強陽性細胞の割合が増加していることを見出した¹¹⁾。また、同細胞はドナーに対するリンパ球の増殖を特異的に抑制していることも分かった¹²⁾。 $\gamma\delta$ T細胞はその受容体のタイプによりいくつかのサブクラスに分類される。サブクラスのひとつであ

るV δ 1 γ δ T細胞は母月間の免疫寛容の成立に重要な働きをしているとされてきた(13, 14)。V δ 1 γ δ T細胞は末梢血には少なく、小腸などの上皮組織に多い。一方、エフェクター機能をもつV δ 2 γ δ T細胞は末梢血に多い。従って、V δ 1 γ δ T細胞/V δ 2 γ δ T細胞比 (V δ 1/V δ 2比) は、健康人の末梢血では低い (<1)。ところが、肝移植、免疫寛容の患者の末梢血ではV δ 1/V δ 2比は逆転していることが分かった (>1)(11)。PD-1は舌性化リンパ球の表面に出現している副刺激因子である。そのリガンド(PD-L1, PD-L2)と結合した場合、抑制性のシグナルをリンパ球の細胞内に送り、免疫を制御している(15)。肝移植、小腸移植後の免疫寛容における移植臓器内の免疫細胞遺伝子発現

京都大学で生体肝移植を受けた後に免疫寛容となった患者にエコーガイド下に生検を行い移植肝を採取した。ルーベンカトリック大学で脳死小腸移植を受けた患者で prope (almost) tolerance の患者の移植小腸を内視鏡下に採取した。肝移植のコントロールは移植時のドナー肝(非移植正常肝)を使用した。小腸移植のコントロールは移植小腸の患者自身の残存小腸を使用した。表に各群のプロフィールを示す。小腸移植に関しては症例が少ないため、4例中、3例の患者について1年の期間をあけて2回の内視鏡を施行して移植小腸、残存小腸を採取した。生検材料から total RNA を抽出して cDNA を合成した。リアルタイム PCR にて、FOXP3 (用語説明あり)(制御性T細胞特異的遺伝子)、V δ 1 γ δ T細胞、V δ 2 γ δ T細胞、PD-1、PD-L1、PD-L2、CD4、CD8、CD25(活性化マーカー)、CD19(B細胞マーカー)、CD56(NK細胞マーカー)、V α 24 (NKT細胞マーカー) の発現レベルを定量した。内因性コントロールに HPRT を用いた。データは各パラメータと HPRT の比率に106をかけlogで表した。2群間の比較はスチューデントのt testを用いた。

C. 研究結果

FOXP3の発現は、肝移植ではコントロール群と比較して、免疫寛容群で有意に高かった (p<

0.01)。小腸移植では、FOXP3の発現は、コントロール群と比較して、免疫寛容群で高い傾向を認めた (p=0.067)。V δ 1 γ δ T細胞/V δ 2 γ δ T細胞比 (V δ 1/V δ 2比)は、肝移植ではコントロール群と比較して、免疫寛容群で高い傾向にあった (p=0.1)。しかし、小腸移植では(V δ 1/V δ 2比)は2群間に差を認めなかった(NS)。PD-1、PD-L1、PD-L2、の発現は肝移植では2群間に差を認めなかった(NS)。小腸移植においては、PD-1、PD-L2、の発現はコントロール群と比較して、免疫寛容群で高い傾向にあった (p=0.09, p=0.077)。ところが、PD-L1はコントロール群と比較して、免疫寛容群で有意に低かった (p<0.05)。肝移植、小腸移植の両者でCD4、CD8、CD25、CD56、V α 24はいずれも2群間に差を認めなかった(NS)。CD19は肝移植、小腸移植の両者でコントロール群と比較して、免疫寛容群で高かった (p=0.055, p<0.01)。

D. 考察

本研究では免疫寛容のメカニズムを探るため移植臓器を用いた。末梢の血液よりも、抗原に直接接触する移植臓器の免疫細胞の遺伝子発現を調べるほうが多くの情報が得られると期待したからである。これまでに明らかとなった、肝移植免疫寛容患者の末梢血でのCD4陽性CD25強陽性細胞の増加と一致して(11)、FOXP3の発現は、肝臓、小腸ともに移植臓器で高いことより、制御性T細胞は両方の移植臓器内に存在することが示唆され、両臓器の免疫寛容の成立に寄与している可能性が高い。ところが、V δ 1/V δ 2比については、肝移植と、小腸移植で異なる結果となり、肝移植においてのみ増加が認められた。先に述べたように、V δ 1は妊娠の維持や、すなわち母にとって allo-graft というべき児に対する免疫寛容である。通常、拒絶されるはずの allo-graft が自然に受け入れられる現象は、免疫学的特権 (immuno-privilege) と言われる。肝移植もまた immuno-privilege の臓器の移植である。腎臓、心臓、肺、小腸の移植を行って自然に免疫寛

容が成立することは動物実験、臨床どちらにおいてもほとんどない。しかし、肝移植については主要組織適合性抗原(MHC)の違いを乗り越えて、自然に免疫寛容が成立することがある(16)。V δ 1は母児間免疫寛容と肝移植免疫寛容の共通点、すなわち immunoprivilege を可能とする重要な免疫細胞なのではないか?一方、PD-1,PD-L2 は小腸の免疫寛容においては発現が上昇していたが、肝臓では上昇が認められなかった。肝臓、小腸両者において、自然免疫、獲得免疫のエフェクターのマーカーである、CD4,CD8,CD25,CD56,V α 24 の上昇がないことから、これら拒絶に関わるエフェクターは、制御性T細胞 γ δ T細胞、PD-1 のシステムで抑制されている可能性が強く示唆された。ところが、immunoprivilege の肝移植と highly immunogenic (拒絶の極めて起きやすい) 小腸移植とで免疫寛容に寄与するメカニズムが異なる可能性があり、前者では、制御性T細胞 γ δ T細胞が後者では、制御性T細胞、PD-1 のシステムが寄与していると想定される。自然免疫、獲得免疫のエフェクターのマーカーのなかで、B cell のマーカーであるCD19が肝移植、小腸移植両方の移植臓器内で増加していた。これまでの肝移植の免疫寛容における移植肝内のサイトカインの検出から、免疫寛容の移植肝では IL-2, γ -IFN などの Th1 サイトカインは発現しておらず、IL-4,IL-10 などの Th2 サイトカインが発現していることが分かっている (Th2 immuno-deviation)(17)。Th2 サイトカインは細胞性免疫を抑制するが、液性免疫を活性化(18)。従って、肝臓、小腸両者で認めた CD19 の増加は Th2 immuno-deviation により招かれた結果であるのかもしれない。

E. 結論

肝移植、小腸移植の移植肝内の免疫関連の遺伝子を詳細に調べることで、免疫寛容のメカニズムについて重要な手がかりを得た。

患者プロフィール

肝移植 (京都)

●免疫寛容群(免疫抑制剤完全中止)

15名(男3,女12) 年齢:10±4才 移植後:8±3年

現疾患 胆道閉鎖症13名、その他2名

●コントロール群(非移植正常肝)

12名

ドナー年齢 33±7才

小腸移植 (ルーベン)

●免疫寛容群 (prope tolerance)

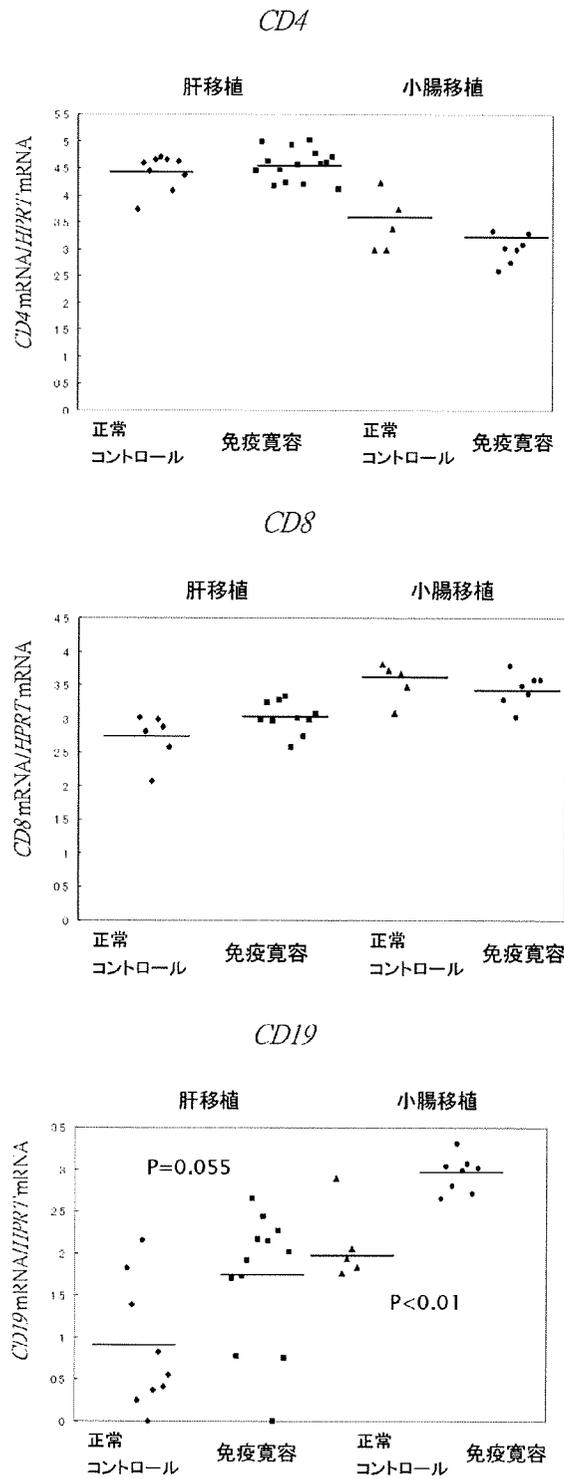
4名(男1,女3) 年齢:55,57,2,26才 移植後:6, 5, 2, 2 年

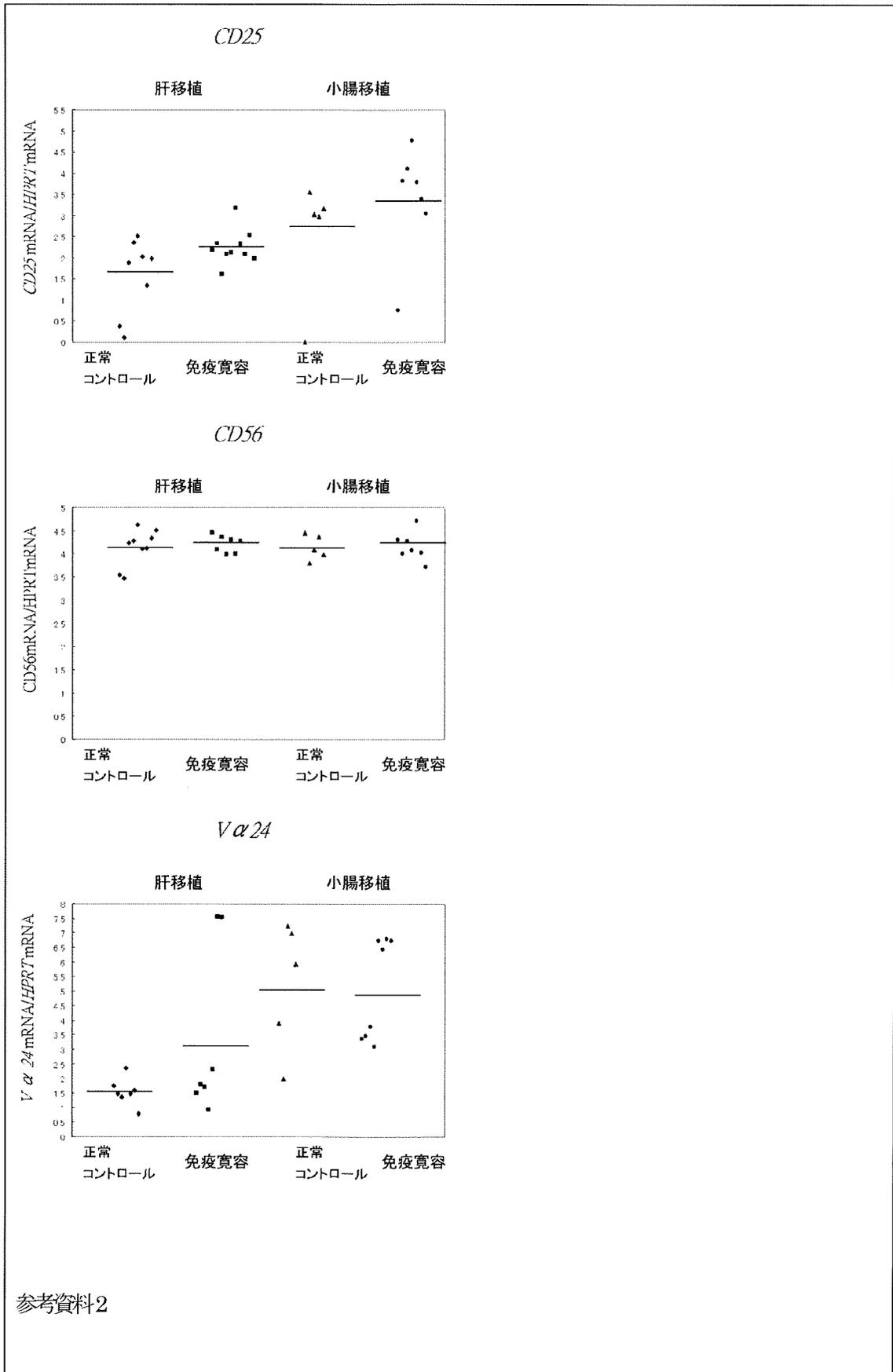
現疾患 上腸間膜動脈血栓、回旋異常、慢性偽腸閉塞

●コントロール群(非移植正常小腸)

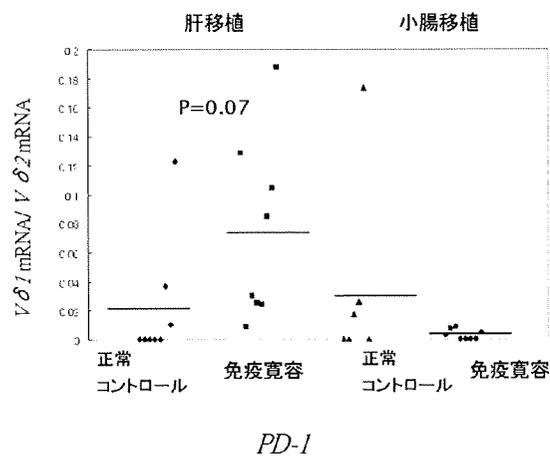
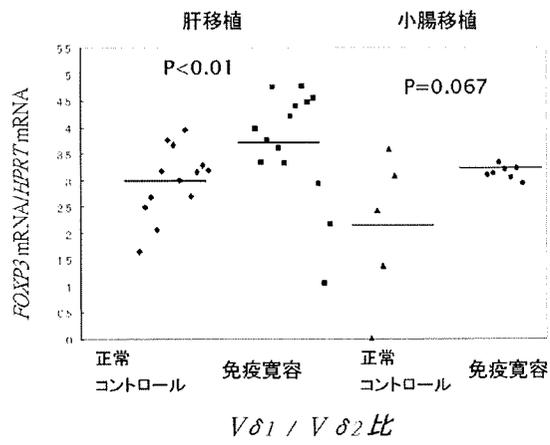
3名

参考資料2





FOXP3



PD-1

