

201140005A

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

免疫難病に対する先駆的治療薬開発—生物製剤を中心とした
早期臨床試験拠点の医・薬集学的整備によるFIMの実施とPOCの確立

平成23年度 研究報告書

研究代表者 日比 紀文

平成24年(2012年)5月

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

免疫難病に対する先駆的治療薬開発—生物製剤を中心とした
早期臨床試験拠点の医・薬集学的整備によるFIMの実施とPOCの確立

平成23年度 研究報告書

研究代表者 日比 紀文

平成24年(2012年)5月

目次

研究組織

総括研究報告

分担研究報告

消化器領域

リウマチ領域

化合物の探索及び評価

研究成果に関する一覧

論文一覧

学会発表一覧

研究組織

平成23年度 厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

免疫難病に対する先駆的治療薬開発—生物製剤を中心とした早期臨床試験拠点の
医・薬集学的整備によるFIMの実施とPOCの確立

研究組織

氏名	分担する 研究項目	所属研究機関 現在の専門	職名
日比 紀文	消化器内科領域の研究統括	慶應義塾大学医学部 消化器病学	教授・免疫統括医療 センター長
竹内 勤	リウマチ内科領域の研究統括	慶應義塾大学医学部 リウマチ内科学	教授・医学部長補 佐・免疫統括医療セ ンター副センター 長
岡本真一郎	病院における臨床試験病 棟体制の統括	慶應義塾大学医学部 血液内科学	教授・副院長・薬剤 部長
河上 裕	免疫難病の新規化合物探 索及び評価	慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所 腫瘍免疫学	教授
佐谷 秀行	免疫難病の新規化合物探 索及び評価	慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所 腫瘍生物学	教授
佐藤 裕史	臨床試験の全般的運営と 産学連携	慶應義塾大学医学部ク リニカルリサーチセン ター 臨床研究方法論、臨床 薬物動態学、精神医学、 製薬医学	クリニカルリサー チセンター長・教授
金井 隆典	消化器内科領域の試験担 当	慶應義塾大学医学部 消化器病学	准教授
亀田 秀人	リウマチ内科領域の試験 担当	慶應義塾大学医学部 リウマチ内科学	講師
光永 明弘	経理事務担当	慶應義塾大学信濃町研 究支援センター	

総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金特定疾患対策研究事業
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業
総括報告書

タイトル 免疫難病に対する先駆的治療薬開発—生物製剤を中心とした早期臨床試験拠点の医・薬集学的整備によるFIMの実施とPOCの確立

研究代表者 日比紀文 慶應義塾大学医学部消化器内科 教授

研究要旨：生物学的製剤（Biologics）の登場で悪性腫瘍，関節リウマチの予後は改善したが，奏効の期待される他の免疫難病に対する新薬開発は困難を極める。慶應では免疫統括医療センターを設立し免疫難病の集学的診療・研究体制を固め，クリニカルリサーチセンターによる臨床試験支援体制も確立している。本事業では，免疫難病に特化した早期臨床試験専用病棟を整え first in human 試験を含む先駆的免疫治療薬開発の国内実施スタンダードを確立するという整備事業に加えて，ここに報告する研究事業として，学内外の候補化合物を用いて，医師主導型のFIMないしPOC試験を計画するものである。平成23年度には，炎症性腸疾患に対する2種のseedsの臨床試験導入の準備，リウマチ内科領域における候補3製剤の関連企業との交渉とPOC試験準備着手，ならびに移植片対宿主病（graft versus host disease; GVHD）に対する新規化合物の同定と非臨床試験着手を行なった。

A. 研究目的

悪性腫瘍や幾つかの自己免疫性疾患に著効を示してきた生物学的製剤は，他の免疫難病に対しては臨床開発が困難である。我々は消化器内科領域，リウマチ内科領域において既存あるいは新規化合物のPOC/FIM試験を行いこうした状況を改善することを本事業の目的としており，平成23年度には体制整備ならびに候補化合物の絞込み・非臨床試験・関連企業との交渉並びに臨床試験の準備着手を行なった。

B. 研究方法

(1)消化器内科領域(2)リウマチ内科領域(3)先端医科学研究所の3グループでそれぞれ研究方法が異なっており要約が困難であるため，分担研究報告書を参照のこと。

C. 研究結果

(1)消化器内科領域(2)リウマチ内科領域(3)先端医科学研究所の3グループでそれぞれ異なっており詳細は各分担研究報告を参照されたいが，各領域で関連企業との交渉，候補化合物の決定，非臨床試験の協力，臨床試験の計画着手をそれぞれ行なった。

D. 考察

何れの対象疾患においても，候補化合物は概ね生物学的製剤であり，性質上その薬効の非臨床試験における予測が技術的に複雑であり，こうした面での評価と絞込みが，関連企業との交渉の上での難点の

ひとつであった。免疫難病もその内実は多様な病態を含んでおりさまざまな専門性が要求されるため，関連部門を横断した適切なproject managementが求められた。

E. 結論

平成24年度以降に向けて，実施可能性，費用，知財の状況，対象患者の組入れ予想，臨床試験専用病床や人材確保といった整備事業の進捗と併せて更に厳密な検討を要するものと思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
一覧の通り

2. 学会発表
一覧の通り

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. シーズBについては特許取得：開発企業にて特許取得済み
2. 実用新案登録：未定

分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金特定疾患対策研究事業
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業
分担研究報告書

タイトル 免疫難病に対する先駆的治療薬開発—生物製剤を中心とした早期臨床試験拠点の医・薬集学的整備によるFIMの実施とPOCの確立

分担研究者 金井隆典, 日比紀文 所属施設 慶應義塾大学医学部 消化器内科 職名 教授

研究要旨:

消化器免疫難病である Crohn 病, 潰瘍性大腸炎に対する First In Human 試験を含む早期臨床試験の施行を目指している。従来の既に消化管粘膜に浸潤した炎症細胞を標的とした治療とは異なる, 炎症細胞の消化管粘膜への遊走阻止を目標とした新しい治療薬に焦点を絞った。平成 24 年度の試験開始に備えた体制整備を進め, 候補化合物を有する企業と連携し, その候補化合物について評価し, 早期臨床試験計画を立案・推進している。

A. 研究目的

消化器免疫難病である Crohn 病, 潰瘍性大腸炎への新薬に関する早期臨床試験 (First In Human (FIH) 試験含む) を計画・施行し, 免疫難病の早期臨床試験の安全で迅速な実施を目指す。

B. 研究方法

炎症細胞遊走の阻止を目指した候補化合物として, E 社の新規モノクローナル抗体 (シーズ A) と T 社の新規化合物 (シーズ B) の早期臨床試験を計画した。いずれのシーズも我々がこれまでに報告してきた炎症性腸疾患においてキーとなる細胞接着, ケモカインシステムであると非臨床試験で見出した候補分子を, 独立して日本企業が開発したものであり, 我が国における産学共同のプロジェクトとして最適なものである (Inflamm Bowel Dis. 2007. 13: 837-46. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2006. 291: G267-74.)。重要性をシーズ A・B の非臨床試験として, 薬効薬理試験, 薬物動態試験, 安全性薬理試験, 安全性試験を施行した。シーズ A・B の健康成人対象第 1 相 SAD (Single Ascending Dose) 試験および, 炎症性腸疾患患者を対象とした第 1 相 MAD (Multiple Ascending Dose) 試験を計画した。

291: G267-74.)。重要性をシーズ A・B の非臨床試験として, 薬効薬理試験, 薬物動態試験, 安全性薬理試験, 安全性試験を施行した。シーズ A・B の健康成人対象第 1 相 SAD (Single Ascending Dose) 試験および, 炎症性腸疾患患者を対象とした第 1 相 MAD (Multiple Ascending Dose) 試験を計画した。

C. 研究結果

シーズ A, B ともに非臨床試験成績では, 薬効薬理試験, 薬物動態試験, 安全性薬理試験, 安全性試験が実施され, 特に問題となる点は認められなかった。

シーズ A については健康成人対象第 1 相 SAD を平成 24 年 8 月開始予定とし, クローン病患者を対象とした第 1 相 MAD (Multiple Ascending Dose) 試験の平成 25 年 9 月施行に向け, 対象患者数の予備調査を実施した。

シーズ B に関しては, 外国人での FIH (SAD および MAD) を終了し, その結果から本化合物の安全性・容認性は確認された。薬物動態パラメータからも, 第二相臨床試験 (POC 試験) の実施は可能と判断した。(倫理面への配慮)

海外および国内での臨床試験は, 治験として「医薬品の臨床試験の実施の基準」に関する省令を遵守して実施された。

D. 考察

シーズ A, B は従来の炎症性腸疾患に対する治療薬とは異なる作用点を持ち, 現在の治療薬に対して抵抗性を示す難治性炎症疾患患者に対する, 日本発の新規治療薬となることが期待される。非臨床試験成績, シーズ B の海外で実施された第一相試験成績から, 安全性・容認性が確認されており, 現在, 日本人での FIH 試験が計画されている。

E. 結論

日本発の難治性炎症性腸疾患に対する新規治療薬, シーズ A, シーズ B の早期臨床試験が計画され, 非臨床試験が終了した。シーズ A は日本での FIH 試験を計画し, 平成 25 年にはクローン病に対する世界で初めての腸管粘膜遊走分子に対する分子標的治療薬の投与が行われる予定である。シーズ B に関しては外国人での FIH (SAD および MAD) を終了し, 炎症性腸疾患患者での臨床試験実施は可能と判断した。また, 平成 24 年度に得られる日本人第一相試験成績, 炎症性腸疾患患者の薬物動態試験の成績, 新たに実施された非臨床試験成績を総合的に判断し, 平成 24 年度中に臨床第二相試験 (POC) の試験デザイン着手まで実施する。プロトコルについては医薬品医療機器総合機構との相談を通じて最終化する。

F. 健康危険情報

シーズBにおいて非臨床試験成績より心拍数低下, 血圧上昇, 肝酵素上昇, 黄斑浮腫などが考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kanai T, Matsuoka K, Hisamatsu T, Iwao Y, Ogata H, Hibi T. Mechanism and therapeutic strategy of second failure of infliximab treatment for Crohn's disease. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi*. 2012; 109(3): 364-9.

2.

Kanai T, Mikami Y, Sujino T, Hisamatsu T, Hibi T. ROR γ t-dependent IL-17A-producing cells in the pathogenesis of intestinal inflammation. *Mucosal Immunol*. 2012 May; 5(3): 240-7.

3.

Hisamatsu T, Okamoto S, Hashimoto M, Muramatsu T, Andou A, Uo M, Kitazume MT, Matsuoka K, Yajima T, Inoue N, Kanai T, Ogata H, Iwao Y, Yamakado M, Sakai R, Ono N, Ando T, Suzuki M, Hibi T. Novel, objective, multivariate biomarkers composed of plasma amino acid profiles for the diagnosis and assessment of inflammatory bowel disease. *PLoS One*. 2012;7(1):e31131.

4.

Saeki K, Kanai T, Nakano M, Nakamura Y, Miyata N, Sujino T, Yamagishi Y, Ebinuma H, Takaishi H, Ono Y, Takeda K, Hozawa S, Yoshimura A, Hibi T. CCL2-Induced Migration and SOCS3-Mediated Activation of Macrophages Are Involved in Cerulein-Induced Pancreatitis in Mice. *Gastroenterology*. 2012 Apr;142(4):1010-1020.

5.

Ichikawa R, Takayama T, Yoneno K, Kamada N, Kitazume MT, Higuchi H, Matsuoka K, Watanabe M, Itoh H, Kanai T, Hisamatsu T, Hibi T.

Bile acids induce monocyte differentiation toward IL-12 hypo-producing dendritic cells via a TGR5-dependent pathway. *Immunology*. 2012 (in press).

6.

Takayama T, Ebinuma H, Tada S, Yamagishi Y, Wakabayashi K, Ojiro K, Kanai T, Saito H, Hibi T; Keio Association for the Study of Liver Diseases. Prediction of effect of pegylated interferon alpha-2b plus ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C infection. *PLoS One*. 2011;6(12):e27223.

7.

Nakamoto N, Ebinuma H, Kanai T, Chu PS, Ono Y, Mikami Y, Ojiro K, Lipp M, Love PE, Saito H, Hibi T. CCR9+ macrophages are required for acute liver inflammation in mouse models of hepatitis. *Gastroenterology*. 2012 Feb;142(2):366-76.

8.

Hosoe N, Rey JF, Imaeda H, Bessho R, Ichikawa R, Ida Y, Naganuma M, Kanai T, Hibi T, Ogata H. Evaluations of capsule endoscopy software in reducing the reading time and the rate of false negatives by inexperienced endoscopists. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2012 Feb;36(1):66-71.

9.

Ebinuma H, Saito H, Tada S, Nakamoto N, Ohishi T, Tsunematsu S, Kumagai N, Tsuchimoto K, Tsukada N, Inagaki Y, Horie Y, Takahashi M, Atsukawa K, Okamura Y, Kanai T, Hibi T.

- Disadvantages of peginterferon and ribavirin treatment in older patients with chronic hepatitis C: an analysis using the propensity score. *Hepatol Int.* 2011 (in press)
10. Teratani T, Tomita K, Suzuki T, Oshikawa T, Yokoyama H, Shimamura K, Tominaga S, Hiroi S, Irie R, Okada Y, Kurihara C, Ebinuma H, Saito H, Hokari R, Sugiyama K, Kanai T, Miura S, Hibi T. A high-cholesterol diet exacerbates liver fibrosis in mice via accumulation of free cholesterol in hepatic stellate cells. *Gastroenterology.* 2012 Jan;142(1):152-164.
11. Hosoe N, Imaeda H, Okamoto S, Bessho R, Saito R, Ida Y, Kobayashi S, Kanai T, Hibi T, Ogata H. A case of beef tapeworm (*Taenia saginata*) infection observed by using video capsule endoscopy and radiography (with videos). *Gastrointest Endosc.* 2011 Sep;74(3):690-1.
12. Bessho R, Kanai T, Hosoe N, Kobayashi T, Takayama T, Inoue N, Mukai M, Ogata H, Hibi T. Correlation between endocytoscopy and conventional histopathology in microstructural features of ulcerative colitis. *J Gastroenterol.* 2011 Oct;46(10):1197-202.
13. Ebinuma H, Saito H, Komuta M, Ojio K, Wakabayashi K, Usui S, Chu PS, Umeda R, Ishibashi Y, Takayama T, Kikuchi M, Nakamoto N, Yamagishi Y, Kanai T, Ohkuma K, Sakamoto M, Hibi T. Evaluation of liver fibrosis by transient elastography using acoustic radiation force impulse: comparison with Fibroscan®. *J Gastroenterol.* 2011 Oct;46(10):1238-48.
14. Miyoshi J, Yajima T, Okamoto S, Matsuoka K, Inoue N, Hisamatsu T, Shimamura K, Nakazawa A, Kanai T, Ogata H, Iwao Y, Mukai M, Hibi T. Ectopic expression of blood type antigens in inflamed mucosa with higher incidence of FUT2 secretor status in colonic Crohn's disease. *J Gastroenterol.* 2011 Sep;46(9):1056-63.
15. Sujino T, Kanai T, Ono Y, Mikami Y, Hayashi A, Doi T, Matsuoka K, Hisamatsu T, Takaishi H, Ogata H, Yoshimura A, Littman DR, Hibi T. Regulatory T cells suppress development of colitis, blocking differentiation of T-helper 17 into alternative T-helper 1 cells. *Gastroenterology.* 2011 Sep;141(3):1014-23.
16. Ichikawa R, Hosoe N, Imaeda H, Takabayashi K, Bessho R, Ida Y, Naganuma M, Hisamatsu T, Inoue N, Kanai T, Iwao Y, Mukai M, Hibi T, Ogata H. Evaluation of small-intestinal abnormalities in adult patients with Henoch-Schönlein purpura using video capsule. *Endoscopy.* 2011;43 Suppl 2 UCTN:E162-3.
17. Naruse H, Hisamatsu T, Yamauchi Y, Chang JE, Matsuoka K, Kitazume MT, Arai K, Ando S, Kanai T, Kamada N, Hibi T. Intracellular bacteria recognition contributes to maximal interleukin (IL)-12 production by IL-10-deficient macrophages. *Clin Exp Immunol.* 2011 Apr;164(1):137-44.
- 2.学会発表
 1. 久松理一、金井隆典、日比紀文. 炎症性腸疾患の病態解明 —ヒト病変粘膜の解析からのアプローチ—. 第 97

- 回日本消化器病学会総会. 2011年5月13日. 東京.
2. 金井隆典. わが国の炎症性腸疾患の疫学、病因、病態の最新情報. 第140回日本医学会シンポジウム. 2011年6月9日. 東京.
 3. 金井隆典. 腸管慢性炎症性疾患における Treg、Th17、Th17/Th1、Th1 細胞の産生誘導、競合性、可塑性に関する総括的検討. 第39回日本臨床免疫学会総会合同シンポジウム. 2011年9月16日. 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. シーズ B については特許取得：開発企業にて特許取得済み
2. 実用新案登録：未定

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
分担研究報告書

免疫難病に対する先駆的治療薬開発—生物製剤を中心とした早期臨床試験拠点の医・薬集学的整備による FIM の実施と POC の確立に関する研究

研究分担者 竹内 勤 慶應義塾大学医学部リウマチ内科 教授
研究協力者 亀田秀人 慶應義塾大学医学部リウマチ内科 専任講師
研究協力者 鈴木勝也 慶應義塾大学医学部リウマチ内科 助教

研究要旨

リウマチ内科領域では、生物学的製剤の登場による関節リウマチ治療の劇的な進歩を受け、全身性エリテマトーデス等の稀少免疫難病についても先駆的な治療薬開発が強く期待されている。本研究事業では、欧米に比して大幅に遅れている早期臨床試験の拠点を整備することにより、FIM の実施および POC の確立を行う。初年度はこの体制の確立に注力するとともに、候補 3 製剤について POC 試験の準備、患者試料からの新規シーズ開発研究を進めた。

A. 研究目的

リウマチ内科領域では、生物学的製剤の登場により、関節リウマチを中心にその予後が大きく改善した。しかしながら、全身性エリテマトーデス (SLE) 等の稀少免疫難病については、新規生物学的製剤の恩恵に浴し難く、行政による強力な推進が切望されている分野である。厚生労働省の特定疾患に属する SLE、成人 Still 病 (AOSD) 等のリウマチ内科領域の免疫難病に対する新薬の開発、橋渡しならびに早期臨床試験を計画、施行することにより、希少な免疫難病の先駆的治療を強力に推進する。

B. 研究方法

慶應義塾大学病院における免疫治療の拠点として整備された免疫統括医療センターを全面的に活用して、早期臨床試験体制を確立するために必要な準備を進める。

(倫理面への配慮)

①薬事法、臨床研究の倫理指針の遵守、臨床試験登録、学内 IRB・倫理委員会承認確保し、②学内 QC/QA 担当者を設けて手順、文書管理などの水準の向上に努める。

C. 研究結果

① 抗インターロイキン-6 受容体モノクローナル抗体について C 社との基本的合意に達し、SLE に対する POC 試験の計画に着手をするとともに、AOSD に対する臨床開発計画も併せて検討を始めた。

② 抗 BAFF 抗体よりもさらに有望視されている新規開発製剤である抗 BAFF 受容体抗体について D 社との開発協議に着手した。

③ 抗インターロイキン 17 モノクローナル抗体については、E 社との交渉準備段階に留まった。

④免疫難病の患者試料から標的分子の同定を行う計画について、F 社との共同特許出願の手続きに入り、知財に関する交渉を進めた。

D. 考察

本年度は、本研究事業の初年度であり、また年度途中からの予算執行であったため、早期臨床試験体制を確立することに注力した。

候補の生物製剤の臨床試験 (POC) については、3 製剤について準備を進めることができ、来年度の実施に向けての順調な滑り出しとなったと考えている。また、免疫難病の患者試料から標的分子の同定に関しては、分子生物学、生化学的な検討により、来年度にはさらに研究の発展を見込んでいる。

本年度進めてきた計画については、来年度も引き続き着実に実施をしていくとともに、新たな早期臨床試験および標的分子同定の計画についても積極的に推進していくことを考えている。

E. 結論

早期臨床試験(3 生物学的製剤)および患者試料から標的分子の同定の準備を目的達成のために進めた。

F. 健康危険情報

特記なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka Y, Yamanaka H, Saito K, Iwata S, Miyagawa I, Seto Y, Momohara S, Nagasawa H, Kameda H, Kaneko Y, Izumi K, Amano K, and Takeuchi T. Structural damages disturb functional improvement in patients with rheumatoid arthritis treated with etanercept. *Mod Rheumatology*, in press.
2. Koike T, Harigai M, Inokuma S, Ishiguro N, Ryu J, Takeuchi T, Takei S, Tanaka Y, Ito K, and Yamanaka H. Concise report: Postmarketing surveillance of tocilizumab for rheumatoid arthritis in Japan: interim analysis of 3881 patients. *Ann Rheum Dis*, 70: 2148-2151,2011.
3. Koike T, Harigai M, Inokuma S, Ishiguro N, Ryu J, Takeuchi T, Tanaka Y, Yamanaka H, Fujii K, Fruendlich B, and Suzukawa M. Postmarketing surveillance of safety and effectiveness of etanercept in Japanese patients with Rheumatoid Arthritis. *Mod Rheum*. 21:343-351,2011
4. Takeuchi T, Tanaka Y, Kaneko Y, Tanaka E, Hirata S, Kurasawa T, Kubo S, Shidara K, Kimura N, Nagasawa H, Kameda H, Amano K, and Yamanaka H. Effectiveness and safety of adalimumab in Japanese patients with rheumatoid arthritis: Retrospective analyses of data collected during the first year of adalimumab treatment in routine clinical practice (HARMONY study). *Mod Rheumatology*, Online 6,Sep.2011
5. Takeuchi T. Revolutionary change in rheumatoid arthritis management with biological therapy. *Keio J Med*, 60:75-81,2011
6. Kameda H, Kanbe K, Sato E, Ueki Y, Saito K, Nagaoka S, Hidaka T, Atsumi T, Tsukano M, Kasama T, Shiozawa S, Tanaka Y, Yamanaka H, and Takeuchi T. Continuation of Methotrexate resulted in better clinical and radiographic outcomes than discontinuation upon starting etanercept in patients with Rheumatoid Arthritis: 52-Week results from the JESMR Study. *J Rheum*, 38:1585-1592, 2011.
7. Kaneko Y, Kuwana M, Kameda H, and Takeuchi T. Sensitivity and Specificity of 2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria. *Rheumatology*, 50:1268-74, 2011.
8. Komano Y, Tanaka M, Nanki T, Koike R, Sakai R, Kameda H, Nakajima A, Saito K, Takeno M, Atsumi T, Tohma S, Ito S, Tamura N, Fujii T, Sawada T, Ida H, Hashiramoto A, Koike T, Ishigatsubo Y, Eguchi K, Tanaka Y, Takeuchi T, Miyasana N, and , Harigai M. Incidence and risk factors for serious infection in rheumatoid arthritis patients treated with tumor necrosis factor (TNF) inhibitors: a report from the registry of Japanese Rheumatoid Arthritis Patients for Long-Term Safety. *J Rheum*, 38:1258-64, 2011.
9. Suzuki K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Tsuzaka K, Abe T, and Takeuchi T. Decreased mRNA expression of two Foxp3 isoforms in peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Int J Immunopathol and Pharmacology*, 24:7-14, 2011.

10. Hashimoto J, Garnero P, van der Heijde, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, and Yoshikawa H, and Nishimoto N. Humanized anti-interleukin 6 receptor antibody (tocilizumab) monotherapy is more effective in slowing radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis at high baseline risk for structural damage evaluated with levels of biomarkers, radiography, and BMI: data from the SAMURAI study. *Modern Rheum* 21:10-15, 2011.
 11. Takeuchi T, Tanaka Y, Amano K, Hoshi D, Nawata M, Nagasawa H, Satoh E, Saitao K, Kaneko Y, Fukuyo S, Kurasawa T, Hanami K, Kameda H, and Yamanaka H. Clinical, radiographic, and functional effectiveness of tocilizumab for rheumatoid arthritis patients - REACTION-52 weeks study. *Rheumatology*, on line July 13, 2011.
 12. Haraoui B, Smolen JS, Aletaha D, Breedveld FC, Burmester G, Codreanu C, Da Silva JP, de Wit M, Dougados M, Durez P, Emery P, Fonseca JE, Gibfsky A, Gomez-Reino J, Graninger W, Hamuryudan V, Jannaut Peya MJ, Kalden J, Kvien TK, Laurindo I, Martin-Mola E, Montecucco C, Moreno PS, Pavelka K, Poor G, Cardiel MH, Stanislawska-Biernat E, Takeuchi T, van der Heijde D, and the Treat to Target Taskforce. Treating Rheumatoid Arthritis to Target: multinational recommendatios assessment questionnaire. *Ann Rheum Dis*, on line July 29, 2011.
 13. Suzuki K, Kameda H, Amano K, Nagasawa H, Takeii H, Nishi E, Okuyama A, Tsuzaka K, and Takeuchi T. Single center prospective study of tacrolimus efficacy and safety in the treatment of various manifestations in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology Int*, 31:757-63, 2011.
 14. Yamanaka H, Tanaka Y, Inoue E, Hoshi D, Momohara S, Hanami K, Yunoue N, Saito K, Amano K, Kameda H, and Takeuchi T. Efficacy of tocilizumab for rheumatoid arthritis patients in daily practice in Japan –message from REACTION study. *Modern Rheum*, 21:122-33, 2011.
 15. Okuyama A, Nagasawa H, Suzuki K, Kameda H, Kondo H, Amano K, and Takeuchi T. Fc gamma receptor IIIb polymorphism and usage of glucocorticoids at baseline are associated with infusion reactions to infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 70:299-304, 2011.
 16. Takeuchi T, Miyasaka N, Tatsuki Y, Yano T, Yoshinari T, Abe T, and Koike T. Baseline tumor necrosis factor alpha levels predict the necessity for dose escalation of infliximab therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 70:1208-15, 2011.
2. 学会発表
なし
(発表誌名 巻号・頁・発行年等も記入)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)
1. 特許取得
特記なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

免疫難病の新規化合物探索及び評価

研究分担者

河上裕 慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所 腫瘍免疫学・細胞情報研究部門 教授
佐谷秀行 慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所 遺伝子制御研究部門 教授

研究要旨

同種骨髄移植では、移植片対宿主病(graft versus host disease; GVHD)が生じ、多くの臓器に、炎症・線維化を中心とした様々な障害が生じる。特に慢性 GVHD によって誘導される線維化では、ドナー由来免疫細胞により生じる、宿主細胞の上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition; EMT)が一つの主要原因となっている。私たちは、既存薬ライブラリーをスクリーニングすることによって、EMT を抑制できる既存薬を取得することができたので、確立したマウス慢性 GVHD モデルを用いて、同定した既存薬の *in vivo* 非臨床試験を実施し、その早期臨床応用を目指す。

A.研究目的

同種骨髄移植を受けた患者では、ドナー由来免疫細胞が同種抗原に対して反応して、移植片対宿主病(graft versus host disease; GVHD)を起こすことにより、炎症・線維化を主体とした、さまざまな障害が生じる。特に慢性 GVHD における線維化は様々な臓器に組織障害を起こし、患者の QOL を著しく低下させる。私たちは、慢性 GVHD では、宿主上皮細胞が間葉系細胞に転換する(epithelial-mesenchymal transition; EMT)ことが線維化の一つの主要原因であることを見出している。(Ogawa, Y, Kawakami Y, et al. Am J Pathol; 2009) そこで、本研究では、既存薬のスクリーニングによって取得した抗 EMT 活性をもつ薬剤を用いて、慢性 GVHD によって生じる線維化病態を抑制し、同種骨髄移植による臓器障害を改善する治療法を開発することを目的とする。

B.研究方法

1. *In vitro* EMT アッセイを用いた既存薬のスクリーニングと三次元培養を用いた抗 EMT 化合物の同定

ヒト網膜色素細胞 ARPE19 細胞を TNF- α と TGF- β で処理することで、EMT 依存性の細胞集塊(フォーカス)を形成するが、この性質を定量化することで、EMT 抑制化合物のスクリーニングを実施した。具体的にはフォーカスの面積をコンテンツアナライザーで計測し、その面積が 15%以下に減少する薬剤および濃度を検定した。この一次アッセイで陽性となった薬剤については、マトリゲル内における EMT 依存性の突起形成阻害効果を指標にして二次スクリーニングを行った。

2.慢性 GVHD 動物モデルの構築とその炎症・線維化病態評価法の確立

B10.D2 (H-2d)マウス male の骨髄細胞と脾臓細胞

を、放射線照射後の BALB/c(H-2d)レシピエントマウス female に移植する慢性 GVHD マウスモデル(Zhang Y, *J Immunol.* 2002)を作成し、組織の線維化は、組織切片の mallory 染色にて評価し(Ruzek, M.C, *Arthritis Rheum.* 2004)、免疫炎症反応は、各種免疫細胞の測定やその反応性の検討や血中サイトカインの測定などで行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は、文部科学省「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に基づき、大学の動物実験ガイドラインに従って行った。実験計画を動物実験委員会に申請し承認を受け、実験従事者は講習を受けて従事者登録の後、実験を行った。

C.研究結果

1. *In vitro* EMT アッセイを用いた既存薬のスクリーニングと三次元培養を用いた抗 EMT 化合物の同定

EMT を阻害する既存薬を探索する目的で *in vitro* スクリーニングを行った。具体的には、TNF- α と TGF- β を上皮系細胞に作用させることによって EMT 誘導転写因子の活性化が生じ、そのシグナルに依存して細胞集塊が形成される性質を指標として(Takahashi et al., *J Biol Chem* 285: 4060-4073, 2010)薬剤のスクリーニングを行った。約 2000 種類の既存薬をスクリーニングし、細胞毒性が生じない濃度で EMT が抑制できたものを 22 種類同定した。

次に、マトリゲル中で間葉系細胞の性質が強いグリオーマ細胞を培養し、その細胞が形成する細胞突起の伸長を評価することで、二次スクリーニングを行ったところ、5 種類の薬剤を同定することができた。その中には、抗炎症作用が示唆されている薬剤も存在していた。

2.慢性 GVHD 動物モデルの構築とその炎症・線維化病態評価法の確立

作成した慢性 GVHD マウスモデルでは、線維化に関わる TGF- β , IL-6, IL-17 が上昇し、免疫抑制性 T 細胞である制御性 T 細胞の低下とともに、同種抗原に対する T 細胞応答が認められた。GVHD 標的臓器(涙腺、結膜、唾液腺、肺、皮膚、小腸、肝臓)には、今までに私たちが報告してきた慢性 GVHD 病変(Ogawa, Y, Kawakami Y, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 2003, 2005, 2007, *Am J Pathol*, 2009)である、過剰な線維化、炎症性細胞浸潤、ドナー由来線維芽細胞の存在とその活性化、宿主細胞の上皮間葉転換などが起こっていることが確認され、本研究で探索する各種薬剤の治療効果を検討するのに適切であると考えられた。

また、GVHD に対する薬剤の *in vivo* 非臨床試験において、薬剤投与後の *in vivo* での免疫応答・炎症反応を、マウスをサクリファイすることなく経時的に測定するために、高感度発光・蛍光イメージング装置を購入し、その実験システムの構築を行った。

D.考察

EMT を阻害することのできる候補薬剤を、独自に開発した *in vitro* スクリーニング法により、既存薬ライブラリーの中から見出すことができた。その中には抗炎症作用をもつことが示唆されている薬剤があることが判明した。また、ヒトの慢性 GVHD で強い臓器障害を起こす炎症・線維化と類似の病態を示す慢性 GVHD マウスモデルを確立し、病態の経時的変化を測定する実験システムの構築を行った。今後、この慢性 GVHD マウスモデルを用いて、本研究で同定した薬剤の線維化抑制効果、炎症抑制効果、臓器障害抑制効果を検討する予定である。

これらの薬剤は既に他の疾患の治療に長期に使用されていることから、薬物動態や有害事象に関するデータが豊富であり、臨床に応用するための障壁は、新規化合物に比べて低いと考えられる。今後、上記マウス実験と並行して、本研究で同定した EMT 阻害剤の血中濃度と *in vitro* アッセイで EMT 阻害効果が得られた濃度の比較、有害事象の記録などを調査し、臨床応用に適した薬剤の選択を行なう予定である。

E.結論

EMT を抑制することができる薬剤を、*in vitro* スクリーニング法により、既存薬ライブラリーから同定することができた。また、ヒト慢性 GVHD の炎症・線維化と類似の病態を示す慢性 GVHD マウスモデルを確立した。今後、同定した薬剤の薬物動態調査とマウスモデルを用いた *in vivo* 効果を検討し、その結果により、臨床試験を計画する予定である。

F.研究発表

1.論文発表

1)Arima Y, Hayashi H, Sasaki M, Hosonaga M, Goto TM, Chiyoda T, Kuninaka S, Shibata T, Ohata H, Nakagama H, Taya Y and Saya H: Induction of ZEB by inactivation of RB is a key determinant of the mesenchymal phenotype of breast cancer. *J Biol Chem* 287: 7896-7906, 2012

2)Tatematsu Y, Ogawa Y, Shimmura S, Dogru M, Yaguchi S, Nagai T, Yamazaki K, Kameyama K, Okamoto S, Kawakami Y, and Tsubota K: Mucosal microvilli in dry eye patients with chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant*, 47: 416-425,

2.学会発表

1)佐谷 秀行: 新薬開発のために基礎研究者がなすべき使命。会長シンポジウム「わが国における新薬開発の諸問題:産官学連携をどう進めるべきか」。第9回日本臨床腫瘍学会学術集会。7/21/2011、パシフィック横浜、横浜

2)Ogawa Y, Shimmura S, Morikawa S, Mabuchi Y, Yaguchi T, Inaba T, Kawakami Y, Okano H, Matsuzaki Y, Tsubota K. A Significant Role of Mesenchymal Stem Cells in Immune Processes and Pathogenic Fibrosis In Ocular Chronic Graft Versus Host Disease. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Annual meeting, 2011/5/4/2011 Florida, USA.

3)Tatematsu Y, Ogawa Y, Shimmura S, Dogru M, Nagai T, Yaguchi S, Yamazaki K, Kameyama K, Kawakami Y, Tsubota K. Mucosal Microvilli In Dry Eye Patients With Chronic Graft-versus-host Disease. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Annual meeting, 5/3/2011, Florida, USA.

4)Ogawa Y, Shimmura S, Morikawa S, Mabuchi Y, Yaguchi T, Inaba T, Suzuki S, Yaguchi S, Kawakami Y, Okano H, Tsubota K, Matsuzaki Y. ドナー間葉系幹細胞と慢性移植片対宿主病の発症機構/Donor mesenchymal stem cells trigger chronic graft-versus-host disease following minor antigen-mismatched bone marrow transplantation. 第40回日本免疫学会学術集会 11/28/2011, 幕張メッセ国際会議場、千葉

5)小川 葉子、榛村 重人、森川 暁、馬淵 洋、谷口 智憲、鈴木 禎史、河上 裕、岡野 英之、松崎 有未、坪田 一男。眼慢性移植片対宿主病の発症機構におけるドナー間葉系幹細胞の役割 第115回日本眼科学会総会 2011/5/13 東京国際フォーラム、東京

G.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1.特許取得

特になし。

2.実用新案登録

特になし。

3.その他

特になし。

研究成果に関する一覧

論文一覧

	執筆者氏名	論文タイトル	雑誌名	巻号	項数	出版年
1	<u>Kanai T</u> Matsuoka K Hisamatsu T Iwao Y Ogata H <u>Hibi T</u>	Mechanism and therapeutic strategy of second failure of infliximab treatment for Crohn's disease	Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi	109(3)	364-9	2012
2	<u>Kanai T</u> Mikami Y Sujino T Hisamatsu T <u>Hibi T</u>	RORγt-dependent IL-17A-producing cells in the pathogenesis of intestinal inflammation.	Mucosal Immunol.	5(3)	240-7	2012
3	Hisamatsu T Okamoto S Hashimoto M Muramatsu T Andou A Uo M Kitazume MT Matsuoka K Yajima T Inoue N Kanai T Ogata H Iwao Y Yamakado M Sakai R Ono N Ando T Suzuki M <u>Hibi T</u>	Novel, objective, multivariate biomarkers composed of plasma amino acid profiles for the diagnosis and assessment of inflammatory bowel disease.	PLoS One	7(1)	e31131	2012
4	Saeki K <u>Kanai T</u> Nakano M Nakamura Y Miyata N Sujino T Yamagishi Y Ebinuma H Takaishi H Ono Y Takeda K Hozawa S Yoshimura A <u>Hibi T</u>	CCL2-Induced Migration and SOCS3-Mediated Activation of Macrophages Are Involved in Cerulein-Induced Pancreatitis in Mice	Gastroenterology	142(4)	1010-1020.	2012
5	Ichikawa R Takayama T Yoneno K Kamada N Kitazume MT Higuchi H Matsuoka K Watanabe M Itoh H Kanai T Hisamatsu T <u>Hibi T</u>	Bile acids induce monocyte differentiation toward IL-12 hypo-producing dendritic cells via a TGR5-dependent pathway	Immunology	in press	in press	2012