

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

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

研究分担者 佐谷 秀行 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所 遺伝子制御部門 教授
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 細胞情報部門 教授
研究分担者 小川 葉子 慶應義塾大学医学部眼科 特任准教授

研究要旨：慢性移植片対宿主病はGraft-versus-host disease (GVHD)は、強い免疫反応を介した重篤な線維化により多臓器不全をきたし生活の質の著しい低下をきたす。我々は、これまでに慢性GVHDにおける線維化と組織障害に上皮間葉転換（EMT）が関与することを報告した。トラニラストはすでに抗炎症作用と抗線維化作用により、癬癩性ケロイドとアレルギー性結膜炎に使用されている。一方で我々は、トラニラストは *in vitro* で強いEMT抑制効果をもつことを見出している。さらに、予備的な臨床試験で、トラニラスト点眼が眼慢性GVHDの進行を予防することを示した。そこで、本研究では、トラニラストの全身投与による慢性GVHDによって生じる炎症、線維化について前臨床試験と臨床試験とで検証し可能な限り早期に臨床応用へ道を開くことを目的とする。本研究では、慢性GVHDによって生じる炎症・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。またその際、薬剤効果の指標となるマーカーを非臨床試験において明確にし、ヒトでの臨床試験時にそれらマーカーの測定を行うことで、POCを得る。

A．研究目的

慢性移植片対宿主病はGraft-versus-host disease (GVHD)は、強い免疫反応を介した重篤な線維化により多臓器不全をきたし生活の質の著しい低下をきたす。我々は、これまでに慢性GVHDにおける線維化と組織障害に上皮間葉転換(EMT)が関与することを報告した。(Ogawa Y, Kawakami Y, et al. Am J Pathol 2009)トラニラストはすでに抗炎症作用と抗線維化作用により、癬癩性ケロイドとアレルギー性結膜炎に使用されている。一方で、我々は、トラニラストは *in vitro* で強いEMT抑制効果をもつことを見出している。(Takahashi E, Saya H, et al. J Biol Chem, 2010)。さらに、予備的な臨床試験で、トラニラスト点眼が眼慢性GVHDの進行を予防することを示した。(Ogawa Y, Tsubota K, et al. Bone Marrow Transplant, 2010)。そこで、本研究では、トラニラストの全身投与による慢性GVHDによって生じる炎症、線維化、前臨床試験と臨床試験とで検証し臨床応用へ繋げることを目的とする。本研究では、慢性GVHDによって生じる炎症・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。またその際、薬剤効果の指標となるマーカー（身体的所見を含む）を非臨床試験において明確にし、ヒトでの臨床試験時にそれらマーカーの測定を行うことで、POCを得る。

B．研究方法

マウス慢性GVHDモデルを用いて、既存薬スクリーニングによって取得した薬剤（トラニラスト）の抗炎症・抗線維化効果を検証する非臨床試験を実施した。GVHD動物モデルを用いて、薬物動態（PK）や薬効（PD）や副作用について検討を行った。慢性GVHDマウスモデルでは8週齢B10.D2（H-2d）マウスの全骨髄細胞を採取し、放射線照射後のBALB/c(H-2d)マウスに移植した。移植後3週後と8週後のレシピエントにおける涙液産生能、涙腺組織における病理組織像、線維化マーカーの発現を検討し、さらに超微形態を含めた組織学的解析にて、コントロールと比較して評価した。トラニラストの *in vivo* での抗炎症効果、線維化抑制効果、抗EMT効果および適切な投与量と投与期間、投与方法の検討をした。投与方法は腹腔内投与に加えて、臨床応用のために経口投与の検討を加えた。投与期間は移植後造血細胞が生着する10日目から慢性GVHD発症21日目までの12日間の予防的投与と発症21日目から35日目までの治療的投与を検証した。トラニラストによるGVHD標的臓器の炎症・線維化抑制効果の検討では、炎症の指標には免疫細胞浸潤やサイトカイン等の評価、線維化の指標には組織切片における単位面積あたりの線維化部位（Ruzek, Arthritis Rheumatism, 2004）を用いた。臨床試験ブ

ロトコールの作成について内科と連携のため討論を重ねプロトコール作成に着手し作成をすすめた。

(倫理面への配慮)

慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインの諸規定に従い動物福祉の精神に沿った、科学的な動物実験が行われるよう配慮する。動物実験のプロトコールを作成して、学内の動物実験委員会の承認を得ている。(承認番号 09152) 人涙腺・結膜・血液の解析が必要となる場合には、慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を得ている。(承認番号 20090277) 課題名「ドライアイにおける涙腺、角結膜および涙液、血液の病態の解析」

C. 研究結果

25年度：マウス慢性 GVHD モデルを用いて、既存薬スクリーニングによって取得した薬剤(トラニラスト)の抗炎症・抗線維化効果を検証する非臨床試験を継続し、投与期間、投与方法や副作用について検討に加えて投与量、投与時期の検討を行った。特に投与時期に関しては慢性 GVHD 発症前の予防的投与、発症後の治療的投与を行った。投与方法は腹腔内投与に加えて、臨床応用のために経口投与の検討を加えた。投与期間は移植後造血細胞が生着する 10 日目から慢性 GVHD 発症 21 日までの 12 日間の予防的投与と発症 21 日目から 35 日目までの治療的投与を検証した。アレルギー性疾患やケロイド治療薬として既存薬であるトラニラストの遺伝毒性、生殖発生毒性、皮膚感受性毒性等については、すでに検討されて安全性が確認されている。

トラニラストによる GVHD 標的臓器の炎症・線維化抑制効果の検討では、炎症の指標として免疫細胞浸潤やサイトカイン等の評価、線維化の指標として組織切片における単位面積あたりの線維化部位の評価を行い、トラニラストの投与期間は発症後の治療的投与より予防的投与で投与方法は腹腔内投与に比して経口投与で炎症・線維化が減少していることを病理組織学的検討および電子顕微鏡を用いた超微形態観察により確認した。これらの結果を見据えて臨床試験においては投与方法を、慢性 GVHD が発症する全例予防的に経口投与を開始する臨床試験プロトコールの作成を内科と連携し着手した。

D. 考察

前臨床試験におけるトラニラストの投与方法の検証では、腹腔内投与より臨床に近い経口投与が優れた結果を示した臨床応用へつながらと考えられる。投与時期の検証では、慢性 GVHD 発症前の予防的投与において発症後の治療的投与よりも病理組織学的に

炎症性細胞浸潤と線維化形成の抑制が認められ、トラニラストのもつ抗炎症効果と抗線維化効果、さらに抗 EMT 効果が有用であると考えられた。前臨床試験では予防的経口投与が有効である結果が得られたことから臨床プロトコール作成では予防的投与を視野にいれて検討する必要があると考えられる。

前臨床試験の結果からトラニラストが GVHD 抑制に有用であり、臨床試験への早期実現にむけたプロトコール作成、PMDA 機構相談、倫理委員会申請が必要と考える。

E. 結論

マウス慢性 GVHD モデルによる非臨床試験に着手した結果、トラニラストの予防的経口投与で病理組織学的に炎症性細胞浸潤と線維化の形成を抑制が確認された。臨床試験では一日 3 回 経口予防的投与のためのプロトコール作成が進行中である。

F. 健康危険情報

特記すべきものなし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okabe H, Ishimoto T, Mima K, Nakagawa S, Hayashi H, Kuroki H, Imai K, Nitta H, Saito S, Hashimoto D, Chikamoto A, Ishiko T, Watanabe M, Nagano O, Beppu T, Saya H, Baba H: CD44s signals the acquisition of the mesenchymal phenotype required for anchorage-independent cell survival in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2014 Feb 18;110(4):958-66.
- 2) Yaguchi S, Ogawa Y, Shimmura S, Kawakita T, Hatou S, Satofuka S, Nakamura S, Imada T, Miyashita H, Yoshida S, Yaguchi T, Ozawa Y, Mori T, Okamoto S, Kawakami Y, Ishida S, Tsubota K. Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonist Attenuates Lacrimal Gland, Lung, and Liver Fibrosis in a Murine Model of Chronic Graft-Versus-Host Disease. *PLOS ONE*. 8(6):e64724,2013
- 3) Kawai M, Ogawa Y, Shimmura S, Ohta S, Suzuki T, Kawamura N, Kuwana M, Kawakami Y, Tsubota K. Expression and localization of aging markers in lacrimal gland of chronic graft-versus-host disease. *Sci. Rep.* 3:2455,2013.

2.学会発表

- 1) Ogawa Y., Shimmura S, Morikawa S, Mabuchi Y, Sato Y, Suzuki S, Yaguchi T, Inaba, T, Yaguchi S, Okamoto S, Kawakami Y., Okano H, Maztsuzaki Y, Tsubota K. Donor mesenchymal stem cells induce immune response in lacrimal gland chronic graft versus host disease in an animal model. The 12th International Symposium on Sjogren's Syndrome ; Kyoyo , Japan ; 9-12 Oct 2013
- 2) **佐谷秀行** : Therapeutic strategies for targeting cancer stem cells. 特別シンポジウム「がんの基礎研究から臨床開発へ」第 72 回日本癌学会学術総会 横浜 10/03/2013
- 3) **小川 葉子**, 森川暁, 岡野栄之, 馬淵 洋, 鈴木禎史, 谷口智恵, 佐藤幸男, 谷口紗織, 稲葉隆明, 岡本真一郎, **河上 裕**, 坪田一男, 松崎有未, 榛村重人. ドナー間葉系幹細胞による慢性移植片対宿主病の発症機構の解明. 第34回日本炎症・再生医学会 京都 2013/7/3
- 4) **小川 葉子**, 榛村重人, 森川暁, 佐藤幸男, 馬淵洋, 谷口智恵, 谷口紗織, 稲葉隆明, 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におけるドナー間葉系幹細胞の抗原提示能の検討. 第117回日本眼科学会総会 東京 2013/4/4
- 5) 谷口紗織, **小川 葉子**, 榛村重人, 羽藤 晋, 中村滋, 稲葉隆明, 今田敏博, 小沢洋子, **河上 裕**, 石田晋, 坪田一男. 慢性移植片対宿主病モデルマウス涙腺の線維化病態の検討. 第117回日本眼科学会総会 東京 2013/4/4

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
特記すべきものなし
2. 実用新案登録
特記すべきものなし
3. その他
特記すべきものなし