

学位論文題名

A Novel Fully Human Anti-CD40 Monoclonal Antibody,
4D11, for Kidney Transplantation in Cynomolgus Monkeys

(新規完全ヒト抗 CD40 抗体 (4 D11) のカニクイザル腎移植実験)

学位論文内容の要旨

背景と目的

臓器移植の生存延長に対し副刺激シグナルの遮断、特に CD40-CD154 経路の遮断は強力な免疫抑制効果を有し、さらにドナー特異的免疫寛容を誘導する。ヒト化抗 CD154 抗体は霊長類実験にて長期生存が得られたが、同時に血栓症が重篤な副作用として出現したため臨床開発は結局中止された。一方、抗 CD40 抗体も霊長類実験においてグラフト生着延長が認められているがその免疫抑制効果は十分ではない。今回我々は完全ヒト化型 antagonistic 抗 CD40 抗体である 4D11 を用い、カニクイザル腎移植にてその効果と副作用を検討した。

対象と方法

カニクイザルの腎移植実験を 13 頭作成し、血液型一致、MLR stimulation index が 3 以上の組み合わせで 4D11 の投与量は 10、20、40mg/kg とし、また投与間隔は手術日に術前、術後に 1 回、その後 2 週間は隔日投与、さらにその後 6 週まで週に 1 回投与し、その後術後 10 週まで 2 週間に一回投与を施行した 10 週投与群と手術日より 4 週までは同様に投与し、4 週以降は月に一回の 4 週投与群を作成した。4D11 非投与群を group 1 (n=3)、10 週投与群の 10、20、40 mg/kg 投与をそれぞれ group 2 (n=3)、group 3 (n=3)、group 4 (n=1) とした。4 週投与群は group 5 (n=3) とし、それぞれ 10、20、40mg/kg を No.1 (n=1)、No.2 (n=1)、No.3 (n=1) と設定した。血液検査は末梢血血液検査、生化学、リンパ球分画を測定、血中濃度の測定は 4D11 の投与前、投与 10 分後に採血し ELISA 法にて測定した。MLR は術前と、group 5 のみ術後 56 日目に測定した。抗ドナー抗体、抗 4D11 抗体を 10 頭全頭にフローサイトメトリー法を用いて測定した。腎生検は月に一回施行し、Banff 分類によって拒絶反応を判定した。免疫染色は CD3、CD4、CD8、CD20、IgG、IgM 染色を施行し、腎グラフトへの浸潤細胞を評価した。

結果

生存日数 無治療群はいずれも急性拒絶にて 5、6、7 日で死亡。4D11 投与群はいずれも生存日数は 100 日以上と延長した。グループ 2 はいずれも拒絶反応にて、グループ 3 では 1 頭 379 日と生存したが慢性拒絶、1 頭は術後 109 日目に脳梗塞、1 頭は術後 85 日目で水腎症にて犠牲死となったが、この両者では拒絶反応は認めなかった。グループ 4 は術後 147 日目に拒絶反応にて犠牲死、グループ 5 では 102 日目 (20mg/kg)、112 日目 (40mg/kg)、147 日目 (10mg/kg) に拒絶反応にて犠牲死となった。

採血結果 無治療群では術後 3 日目に Cr が急激に上昇したが、治療群は 2 ヶ月間 Cr の上昇は認めなかった。しかしグループ 2 と 4 において 4D11 休薬後 2~3 週間でクレアチニンは上昇したがグループ 3 は休薬後も Cr は上昇せず。グループ 5 では 28 日目に投与終了 1 ヶ月間後に Cr の上昇を認めた。腎機能以外の生化学所見も評価したが、

いずれも異常は認めなかった。血小板減少を認めなかった。リンパ球分画では CD20 については 10 週投与群で手術日から犠牲死まで術前値の半分に減少した。

血中濃度 隔日投与の最初の 2 週間は 10、20、40mg/kg 投与群にてそれぞれ血中濃度のトラフ値は 457 ± 270.5 、 584.9 ± 448.1 、 $8990.4 \mu\text{g/ml}$ であった。投与期間中に急激な血中濃度の減少は認めなかった。レスキュー治療中の血中濃度であるが速やかに上昇し、40mg/kg 隔日投与と比較しても同様の血中濃度レベルであった。

免疫学的検査 グループ 5 において術後 56 日目に MLR を施行した。全体として術前 MLR index より低くなったが、third party に比べてドナーの方が低い傾向にあった。

抗体検査

全例において抗ドナー IgG、IgM 抗体を測定した。生存日数のもっとも長い Group3 の 1 頭に術後 168 日目に IgG 抗体を認め、group2 と group4 の 1 頭に犠牲死の際に IgM 抗体を認めた。中和抗体に関しては Group3 の 1 頭に術後 168 日目に検出されたが、すぐに消失した。

病理学的検査 10 週投与群では薬の投薬期間は間質へのリンパ球の浸潤は認めるものの糸球体病変や血管病変は認めず、borderline change であった。4D11 の休薬後 1 から 2 週後で急性拒絶反応が認められた。4 週間投与群は 4 週間投与した後、1 ヶ月は拒絶反応は認めないがその後出現した。また検死の時点では chronic allograft nephropathy (CAN) の所見も認めた。免疫染色は術後 30 日目に間質への CD8 陽性細胞が主体のリンパ球浸潤を認めた。腎臓以外の臓器に異常は認めなかった。

考察

T cell の活性化には TCR と APC 上の MHC を介する経路 (signal 1) と副刺激シグナルが必要である。副刺激シグナルなしで signal 1 のみの刺激では T cell アナジーを誘導し、さらに特異性の免疫抑制もしくは免疫寛容を誘導することがいくつかの実験から証明されている。多種の副刺激シグナルのうち我々は CD40-CD154 経路に着目してカニクイザルの腎移植実験にて完全ヒト antagonistic 抗 CD40 抗体である 4D11 の効果を検討した。4D11 を使用した理由として CD28-B7 経路より CD40-CD154 経路の方が上位にあること、2 番目として抗 CD154 抗体を使用したげっ歯類や霊長類の実験では長期生存が得られているが、抗 CD154 抗体では血栓症が大きな問題であり、臨床応用が難しいこと、3 番目として 4D11 が IgG4 タイプの抗体であり、ADCC や CDC を起こしにくいこと、4 番目としてヒト化型抗体であれば中和抗体を誘導する可能性があるからである。

CD40 と CD154 はそれぞれ細胞性免疫に非常に重要な役割を担っている。我々の実験では 100 日以上生存が得られ、他の CD40 抗体より成績は延長したが、薬の投薬期間でも間質への細胞浸潤は認め、borderline change や軽度の急性拒絶反応を認めた。そのような変化はその後自然に消失したり、継続したりしたが、最終的に間質の繊維化が認められた。この理由については不明であるが、おそらく他の抗 CD40 抗体や抗 CD154 抗体でも認められる CD8 を主体としたリンパ球の間質への細胞浸潤が繰り返されることが関係しているのかもしれない。また CD40 は液性免疫にも関与しており、B cell の活性化、クラススイッチ、胚中心の形成に大きく関わっている。抗ドナー抗体の形成は高度の急性拒絶反応や慢性拒絶反応に大きく関わっているといわれ、他の抗 CD40 抗体、抗 CD154 抗体で問題となっている抗ドナー抗体の形成、中和抗体の形成を 4D11 は抑制した。

抗 CD154 抗体では大きな障害である血栓症の問題であるが、今回の実験では 1 頭、脳梗塞にて術後 108 日目に犠牲死したが、一ヶ月以上経過した小さな陳旧性の脳梗塞であり、他の動物では認めず、因果関係はつかめなかった。

結論

4D11 は副作用なく移植臓器の生存を延長した。そのため今後インダクション治療や他の免疫抑制剤との複合治療として臨床応用が期待される薬剤である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野々村 克 也
副 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 藤 堂 省

学位論文題名

A Novel Fully Human Anti-CD40 Monoclonal Antibody, 4D11, for Kidney Transplantation in Cynomolgus Monkeys

(新規完全ヒト抗 CD40抗体 (4 D11)のカニクイザル腎移植実験)

副刺激シグナルの遮断、特に CD40-CD154 経路の遮断は強力な免疫抑制効果を有し、さらにドナー特異的免疫寛容を誘導する。ヒト化抗 CD154 抗体はアカゲザルの腎移植実験において 300 日以上生存が得たが、同時に血栓症という重篤な副作用が出現したため臨床開発は結局中止された。一方、抗 CD40 抗体も霊長類実験においてグラフト生着延長が認められたが、マウス等とのキメラ抗体しかなく、中和抗体、サイトメガロウイルス感染などが問題となった。4D11 は完全ヒト抗体であり、IgG4 のサブユニットを有する antagonistic 抗 CD40 抗体であり、基礎実験にて細胞性免疫抑制、抗体産生抑制効果を有し、高投与量においても急性毒性は認めなかった。本研究では 4 D11 を用い、MLR stimulation index が 3 以上の組み合わせでカニクイザル腎移植実験を行い、その効果と副作用を検討した。4D11 の投与量は 10、20、40mg/kg とし、投与期間を 10 週投与と 4 週投与といくつかのグループに設定し、さらにレスキュー投与として血中クレアチニン濃度が 2 mg/dl 以上の場合、50mg/kg の 4D11 を隔日投与にて合計 3 回投与した。末消血血液検査、生化学、リンパ球分画、血中濃度、MLR、抗ドナー抗体、抗 4D11 抗体、病理所見にて検討した。

無治療群はいずれも急性拒絶にて 5、6、7 日で死亡したのに対し、4D11 投与群はいずれも生存日数は 100 日以上と延長した。4D11 投与期間中はクレアチニンの上昇、病理所見上急性拒絶反応を抑制するものの、休薬後 2~3 週間でクレアチニンの上昇、急性拒絶反応が出現し、最終的には慢性拒絶の所見を有した。腎機能以外の生化学所見、および多臓器組織所見ではいずれも異常は認めなかった。リンパ球分画では CD20 について術前値の半分に減少した。血中濃度は投与量依存性に上昇し、観察期間中に急激な血中濃度の低下などは認めなかった。MLR はドナー特異的に低下する傾向にあった。抗ドナー抗体は投与期間中、全頭に認めなかったが、休薬後 5 頭に出現した。中和抗体に関しては検出されなかった。これらの結果から 4D11 は重篤な副作用なく移植臓器の生存を延長した。そのため今後インダクション治療や他の免疫抑制剤との複合治療として臨床応用が期待される薬剤であることが示唆された。

公開発表後、まず副査の上出教授より①薬の血中濃度を予想して投与間隔を設定したのか②IgG4の isotype は今まであるのものなのか、また IgG4 にすることで半減期が短くなったのか?③今後 4D11 を使用するとしてどのようなコンビネーションを考えるかと質問があった。以上に対し① 4D11 のまず効果を知りたかったため、抗 CD154 抗体である hu5C8 のプロトコルを参考にして投与間隔、投与量を設定したこと。②抗 CD40 抗体である ch5D12 も IgG4 のアイソタイプでこれに関しては半減期が 10 日であり、isotype による違いはわからない。③ 1) 腎移植でカルシニューリンインヒビター (CI) の腎毒性が問題となることから CI の投与量を減らす目的での使用、2) 他の抗 CD40 抗体での CI コンビネーション治療にて生存が延長していることから CI とのコンビネーション、また抗 CD154 抗体では MMF とのコンビネーション 3) 他の副刺激シグナルである B7 経路を遮断する CTLA4Ig とのコンビネーションも魅力的と回答した。次に主査の野々村教授から①コンビネーション治療に対して自分なりの設定、②血液型不適合移植に使用するリツキシマブのような使用が可能かどうかとの質問があった。これらに対し①間質への CD8 陽性細胞の浸潤が問題となるためこれを抑える治療として CI は効果的と考え、また MMF との併用も効果的と考える。②リツキシマブのように 4D11 にも抗体産生抑制能力を有し、投与後の B cell のリバウンドは気になるところであるが、その際にも抗ドナー抗体の産生を抑制していたことから有効だと考えると返答した。最後に副査の藤堂教授より 4D11 の今回の実験以降の成績について説明を求められたため、今回の実験より投与量が少なく、投与間隔の短いメンテナンスでも成績は延長し、抗体産生は完全に抑えられたこと、FK506 との併用療法では間質への細胞浸潤も減少したことを説明した。いずれの質問に対しても、申請者は概ね妥当に回答した。

新規完全ヒト抗 CD40 抗体 (4D11) は現状では主だった副作用を認めず、免疫抑制効果はカニクイザル腎移植実験において認められたことから、当薬剤の臨床での応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。