

博士(医学) 青柳 武史

学位論文題名

A Human Anti-CD40 Monoclonal Antibody, 4D11,  
for Kidney Transplantation in  
Cynomolgus Monkeys: Induction and Maintenance Therapy

(カニクイザルを用いた腎移植実験における新規完全ヒト抗 CD40  
モノクローナル抗体4D11の導入療法および維持療法の効果に関する研究)

学位論文内容の要旨

**【背景と目的】**現在臓器移植医療は、安全性・治療成績が目覚ましく向上し、臓器不全に対する治療手段として確固たる地位を確立した。しかし術後早期の治療成績の向上に比して、長期成績の向上は十分とはいせず、これには移植臓器の慢性拒絶を完全に抑制できていないことが原因の一つとされている。また免疫抑制剤の長期投与による臓器障害や医療コストの増大も問題となっており、さらに効果的な免疫抑制法の開発が急務となっている。

免疫反応の開始には、T細胞とマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞とのシグナル伝達が必要とされる。このシグナルの一つである副刺激経路 CD40-CD154 経路のモノクローナル抗体を用いた遮断は、臓器移植における免疫抑制さらには寛容の誘導に対し、魅力的な治療戦略の一つとして注目されている。抗 CD154 モノクローナル抗体は、その強力な免疫抑制効果から臨床応用が期待されたが、血栓形成という重篤な合併症のために現在臨床への応用は頓挫している。一方、これまで開発され靈長類での実験が報告されている抗 CD40 モノクローナル抗体は、すべてキメラ抗体でありその免疫抑制効果は抗 CD154 抗体と比するとやや劣っている。これまで我々は新規完全ヒト抗 CD40 モノクローナル抗体 4D11 の免疫抑制効果を検討してきた。カニクイザル腎移植モデルにおいて、4D11 の投与により (10mg/kg~40mg/kg、10 週間)、著明なグラフト生存期間の延長を確認した。さらに血栓症などの明らかな副作用を認めなかった。今回の実験は、①4D11 の至適投与量および濃度の検証、②細胞性免疫および液性免疫へ及ぼす影響、③さらなる安全性の確認を目的として、低用量から高用量の 4D11 を導入療法および維持療法に用い、その効果を検討した。

**【材料と方法】**カニクイザル腎移植モデルを用いた。レシピエントを導入療法群 (A 群)、維持療法群 (B 群)、非投与群の 3 群に分け、A 群は 4D11 を 2 週間のみ (手術前、手術後、第 4、第 7、第 11、第 14 病日の計 6 回) の投与、B 群は術後 2 週間 A 群と同様の投与を行い、その後は第 180 病日まで週一回初期投与量の半量を投与した。さらに A・B 群をそれぞれ 4 群に分け、初期投与量を 1、5、10、20 mg/kg とした。各群とも n=3 とし計 9 群 27 頭を作成した。観察項目は、グラフト生存期間、血中 4D11 濃度、リンパ球混和反応、抗ドナーアンチ体および抗 4D11 抗体産生、生検および剖検時に採取したグラフトの病理所見、剖検時に採取した他臓器の病理所見、グラフト組織の免疫染色病理所見、さらにレシピエントの体重や尿量、循環動態、異常行動の有無などの観察、血液生化学検査所見等とした。

【結果】

- 1) グラフト生存期間: 4D11 非投与群の平均グラフト生存期間 (mean survival time: MST)

は 6.0 日であった。A 群では 1, 5, 10, 20 mg/kg の投与で MST はそれぞれ 54.7, 137.0, 167.7, 121.3 日で、さらに B 群では初期投与量 1, 5, 10, 20 mg/kg の各群で MST はそれぞれ 56.3, 120.3, 218.0, 179.8 日と非投与群に比してそれぞれ有意差をもって MST の延長が認められた。維持療法群で導入療法群より MST の延長が認められる症例が多かったが、それぞれ有意差は認められなかった。B 群 10mg/kg 投与群の一例が腎孟腎炎により第 27 病日に安楽死となつたが、その他の症例は安楽死の後、病理学的に拒絶が確認された。

- 2) 血清 4D11 濃度：すべての群で投与 14 日目に最高値を示し、以後漸減した。10, 20 mg/kg 投与の維持療法群では、4D11 投与期間中はそれぞれ 50, 100  $\mu$ g/ml で維持された。
- 3) リンパ球混和試験：4D11 投与によりすべての群でリンパ球の増生が抑制されたが、投与法や投与量により、その反応に有意差は認めなかった。
- 4) 抗ドナー抗体産生：導入療法群では、4D11 投与中に抗ドナー抗体 (DSA) の産生は認めなかつたが、投与終了後ほとんどの症例で DSA の産生を認めた。維持療法群では、4D11 投与中にも関わらず 1 および 5 mg/kg 投与群では DSA 産生が認められた。一方、10 および 20 mg/kg 投与群では、すべての症例で DSA 産生を認めなかつた。
- 5) 抗 4D11 抗体産生：4D11 投与の 24 症例中 8 例で抗 4D11 抗体産生を認めたが、10 および 20 mg/kg の維持療法群では同抗体の産生を認めなかつた。
- 6) 血液生化学検査：10 mg/kg の維持投与群の 1 例で一過性の貧血を認めたが、特に処置なく正常に復した。末梢血 B 細胞は、術直後すべての症例で術前値の 1/3 から 2/3 に低下したが、10 および 20 mg/kg の維持療法群以外の症例では、術後 90 日までに前値に復した。他、末梢血球分画や生化学検査で明らかな異常は認めなかつた。
- 7) 病理組織所見：4D11 投与症例では、投与量および投与方法にかかわらず術後 1 カ月のグラフトに CD3 および CD8 陽性細胞の間質浸潤が軽度から中等度に認められたが、ほとんどの症例で急性拒絶の所見は認められなかつた。導入療法群では、術後 2~3 か月で中等度から高度の間質細胞浸潤と尿細管炎を認め、5 か月までに IIA から IIB の拒絶反応を呈した。これは 1 および 5 mg/kg 投与の維持療法群でも同様の所見であった。一方、10 および 20 mg/kg の維持療法群では、術後 2~3 か月で間質細胞浸潤が一時軽減する傾向にあつた。しかし長期間生存した症例では、中等度から高度の間質の線維化と尿細管委縮を認めた。剖検時のグラフトの C4d 染色では、導入療法群の多くの症例で陽性となつたが、10 および 20 mg/kg 投与の維持療法群ではすべての症例で陰性であった。剖検時、すべての症例で血栓症を含め明らかな異常所見は認めなかつたが、10 症例で脾臓での胚中心の消失を認めた。

【考察】CD40-CD154 経路は、T 細胞および B 細胞の活性化および増生、イムノグロブリンのクラススイッチ、抗体産生や胚中心形成など、急性および慢性拒絶反応の成立に深く関与している。4D11 は完全ヒト抗 CD40 抗体で、細胞毒性ではなくマスキングにより CD40 経路を遮断する。今回サル腎移植実験において、導入療法および維持療法、いずれにおいても免疫寛容は得られなかつたが、単剤の低用量からの使用でも著明な免疫抑制効果を示した。さらに 5 および 10 mg/kg を反復投与では抗 4D11 抗体の産生なく、血中濃度を維持することが可能で、抗ドナー抗体の産生も抑制することができた。4D11 による CD40 経路遮断は、抗体関連型拒絶反応の抑制や既存抗体陽性症例の治療にもその効果が期待される。また細胞性拒絶反応の抑制にも効果を示したが、高用量の維持療法においても完全な免疫抑制は得られなかつた。安全性に関して、懸念された血栓症に関しては一切認められなかつた。これは血栓形成が、CD40-CD154 経路に関与するものではなく、CD154 のインテグリングライコプロテイン IIb/IIIa を介した経路によるとする諸家の報告とも一致する結果である。

【結論】新規完全ヒト抗 CD40 モノクローナル抗体 4D11 は、導入療法および維持療法において明らかな副作用の発現なく強力な免疫抑制効果を示し、今後の臨床応用が期待される。既存の免疫抑制剤や免疫抑制性抗体との併用療法など、本剤を用いたさらなる研究の積み重ねが必要である。

# 学位論文審査の要旨

主査教授 上出利光  
副査教授 野々村克也  
副査教授 藤堂省

## 学位論文題名

### A Human Anti-CD40 Monoclonal Antibody, 4D11, for Kidney Transplantation in Cynomolgus Monkeys: Induction and Maintenance Therapy

(カニクイザルを用いた腎移植実験における新規完全ヒト抗 CD40  
モノクローナル抗体4D11の導入療法および維持療法の効果に関する研究)

移植免疫において副刺激経路、なかでも CD40-CD154 経路が注目されている。抗 CD154 モノクローナル抗体は、その強力な免疫抑制効果から臨床応用が期待されたが、血栓形成という重篤な合併症のために現在臨床への応用は頓挫している。一方、靈長類での実験が報告されている既存の抗 CD40 モノクローナル抗体は、すべてキメラ抗体でありその免疫抑制効果は抗 CD154 抗体と比するとやや劣っていた。

本研究では、申請者らは、カニクイザル腎移植モデルを用いて、新規完全ヒト抗 CD40 抗体 4D11 の至適投与量および濃度の検証、細胞性免疫および液性免疫へ及ぼす影響、さらなる安全性の確認を目的として、低用量から高用量の 4D11 を導入療法および維持療法に用い、その効果を検討した。

その結果、1) 4D11 非投与群の平均グラフト生存期間 (MST) は 6 日であったのに対し、導入療法群では 1, 5, 10, 20 mg/kg の投与で MST はそれぞれ 54.7, 137.0, 167.7, 121.3 日で、さらに維持療法群では初期投与量 1, 5, 10, 20 mg/kg の各群で MST はそれぞれ 56.3, 120.3, 218.0, 179.8 日と非投与群に比してそれぞれ有意差をもって MST の延長が認められた。2) 血清 4D11 濃度については、すべての群で投与 14 日目に最高値を示し、以後漸減した。10, 20 mg/kg 投与の維持療法群では、4D11 投与期間中はそれぞれ 50, 100  $\mu$  g/ml で維持された。3) リンパ球混和試験では、4D11 投与によりすべての群でリンパ球の増殖が抑制された。4) 一方、抗ドナー抗体産生では、4D11 投与中に抗ドナー抗体

(DSA) の産生は認めなかったが、投与終了後ほとんどの症例で DSA の産生を認めた。維持療法群では、4D11 投与中にも関わらず 1 および 5 mg/kg 投与群では DSA 産生が認められた。一方、10 および 20 mg/kg 投与群では、すべての症例で DSA 産生を認めなかった。

5) さらに抗 4D11 抗体産生を検討したところ、10 および 20 mg/kg の維持療法群では同抗体産生を認めなかった。6) 血液生化学検査では、10 mg/kg の維持投与群の 1 例で一過性の貧血、末梢血 B 細胞の減少以外明らかな異常は認めなかった。7) 投与量および投与方法にかかわらず術後 1 カ月のグラフトに CD3 および CD8 陽性細胞の間質浸潤が軽度から中等度に認められたが、ほとんどの症例で急性拒絶の所見は認められなかった。導入療法群では、術後 2~3 カ月で中等度から高度の間質細胞浸潤と尿細管炎を認め、5 カ月までに IIA から IIB の拒絶反応を呈した。これは 1 及び 5 mg/kg 投与の維持療法群でも同様の所

見であった。一方、10 および 20 mg/kg の維持療法群では、術後 2~3 か月で間質細胞浸潤が一時軽減する傾向にあった。しかし長期間生存した症例では、中等度から高度の間質の線維化と尿細管委縮を認めた。剖検時のグラフトの C4d 染色では、導入療法群の多くの症例で陽性となつたが、10 および 20 mg/kg 投与の維持療法群ではすべての症例で陰性であった。 8) すべての症例で血栓症は認めなかつた。

発表後、主査の上出教授から、1) 本剤の T 細胞および B 細胞に及ぼす影響について、2) 間質の線維化をきたす拒絶の機序について、3) 既存の抗 CD40 抗体との有効性の差異についての質問があつた。申請者は、1) 細胞性免疫および液性免疫の両者を抑制しているが、抗体産生や補体活性などの抑制作用が強く、後者を抑制していることが重要であること、2) CD40-CD154 経路を回避する CD8 陽性細胞と移植初期からの自然免疫反応の関与があること、3) 完全ヒト抗体であることと IgG4 抗体であることが重要である、と回答した。続いて副査の野々村教授から、本剤の人への最も効果的な使用法についての質問があり、申請者は、既存抗体陽性症例や自己免疫疾患者への維持療法での効果が期待されると述べるなど、いずれの質問にも妥当な回答をなしえた。副査の藤堂教授から、グラフトの終末像として線維化をきたしているものの血管病変がないことから、単なる慢性拒絶とは異なる先天性免疫反応などを含めた組織反応ではないかとのコメントがなされた。

本研究により、新規完全ヒト抗 CD40 抗体 4D11 が、導入療法および維持療法において明らかな副作用の発現なく強力な免疫抑制効果を示すことが確認された。本論文は、血栓症等により一時頓挫した同経路の遮断による免疫抑制の臨床的意義を再び示唆したことで高く評価され、今後の臨床応用が期待される。

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取得単位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。