

学位論文題名

Long-term hepatic allograft acceptance based on CD40 blockade by ASKP1240 in nonhuman primates

(サル肝移植におけるCD40シグナル遮断薬ASKP1240によるグラフトの長期生着)

学位論文内容の要旨

【背景】副刺激経路遮断治療は動物移植モデルの拒絶反応を防ぐのに有効な手段である。小動物において CD40-CD154 シグナル遮断は免疫寛容を誘導し、抗 CD154 モノクローナル抗体 (mAbs) の投与はサル腎移植で著明にグラフト生着期間を延長させた。しかし抗 CD154mAb の臨床応用は、血栓症を誘導し断念された。代替薬剤として CD154 のパートナー分子である CD40 に注目した。抗 CD40 キメラ mAb はサル腎移植でグラフト生着期間を延長したが、抗 CD154mAb と比して劣っていた。新規完全ヒト抗 CD40mAb (ASKP1240) を今実験で使用しが、前試験において 2 週間の導入療法 (Induction treatment: IT)、6 ヶ月の維持療法 (Maintenance treatment: MT) で明らかな副作用なく、サル腎グラフト生着期間を著明に延長した。特に ASKP1240 を 10mg/kg の MT で使用すると、抗ドナー抗体 (Donor-specific antibody: DSA) と抗薬物抗体 (Anti-Drug antibody: ADA) の産生を抑制した。ASKP1240 はグラフトに対する免疫応答を軽減させ、腎移植でグラフト生着期間を延長させたが、免疫寛容を誘導する事は出来ず、慢性拒絶 (Chronic rejection: CR) を防ぐ事は出来なかった。またラット心・肝移植実験において、CD40-CD154 副刺激経路を CD40Ig 遺伝子導入し遮断すると、両方のモデルで長期グラフト生着を得た。病理学的には、心グラフトは CR を呈したが、肝グラフトは正常であった。移植後 100 日以上の時点でのドナー特異的な免疫寛容誘導の有無を確認する皮膚移植において、肝臓のみ免疫寛容誘導が確認された。

【目的】ASKP1240 を用いてサル肝移植でグラフトに対する効果を検証した。

【対象と方法】49 頭オスのカニクイザルを使用した。年齢は 49 ヶ月から 75 ヶ月、体重は 3.8kg から 6.7kg であった。無肝期に上腸間膜動脈をクランプするが、静脈バイパスを用いない同所性肝移植を、ABO 血液型一致・HLA DR β 不一致・MLR stimulation index が 5 以上のペアで施行した。無治療 (Control) 群 (n=3)、IT 群 (n=4)、MT 群 (n=7) の三群作成した。IT 群では移植日 (移植前後の 2 回)・4 日目・7 日目・11 日目・14 日目に ASKP1240 (10mg/kg) を計 6 回投与、MT 群はそれに加え術後 6 か月目まで週 1 回 ASKP1240 (5mg/kg) を投与した。他の免疫抑制剤は使用しなかった。術後 48 時間以内に死亡した動物は実験群から除外した。グラフトの生存期間・組織像・免疫染色を検討した。末梢血を用いて、血算・生化学・ASKP1240 濃度・DSA・ADA・IFN- γ ELISPOT アッセイ・CD4⁺CD154⁺ T cell・制御性 T 細胞 (Regulatory T cell: T_{reg})・エフェクターメモリー T 細胞 (Effector memory T cell: T_{em}) を検討した。グラフトと末梢血において、mRNA (Foxp3・IL-10・TGF- β ・IL-15・IFN- γ ・Perforin・Granzyme B) の発現を RT-PCR で評価した。

【結果】Control 群の肝グラフトは移植後、一週間以内に急性拒絶 (Acute rejection: AR) で拒絶された。IT 群では、胆管リークで移植後 11 日目に失った以外、90 日・188 日・209 日と生存期間を延長させたが、全例を CR で失った。ASKP1240 濃度は投薬中止後、徐々に低下し移植後 2 カ月で測定不能となった。MT 群では、生存期間を 272 日・278 日・1035 日と著明に延長し、拒絶反応の所見も無かった。前 2 頭は臨床経過から判断した繰り返す胆管炎で失い、1 頭は 1035 日に安楽死させた。MT 群で 2 頭は虚血再灌流障害 (Ischemia reperfusion injury: IRI)、2 頭は肝膿瘍で失ったが、拒絶反応の所見は存在しなかった。ASKP1240 濃度は移植後 200 日まで維持された。ASKP1240 治療により血栓症を含む明ら

かな副作用は認めなかった。ASKP1240 投与中に CD4⁺・CD8⁺・non-CD4⁺CD8⁺T 細胞の絶対数は減少したが、有意なリンパ球数減少は存在しなかった。肝臓以外の臓器において明らかな異常所見は存在しなかった。免疫学的検討において、ASKP1240 投与中は直接・間接 IFN- γ ELISpot アッセイでドナー刺激に対する反応は完全に抑制された。IT 群では投与終了後は反応を抑制出来なかったが、MT 群において抑制は投与終了後も継続した。長期生存例において、ドナー抗原特異的に抑制されていた (3rd party や PHA に対する免疫反応は保存)。CD4⁺ T_{em} は IT 群において安楽死直前に有意に増加していたが、MT 群においては増加していなかった。CD8⁺ T_{em} においても同様の傾向が見られた。CD4⁺CD154⁺T 細胞の発現は Control 群のみで増加していた。DSA 産生は ASKP1240 投与期間中において完全に抑制したが、投与終了後は上昇する傾向にあった。ADA 産生は一時的に指摘された 1 例を除いて全例で抑制された。C4d 及び IgG は拒絶の有無に関係なく陽性とはならなかった。グラフト内 T_{reg} は長期生存例と拒絶例を比較しても変化は無かった。末梢血中 T_{reg} は長期生存例で誘導される事は無く、むしろ AR 例で増加していた。グラフトでの Granzyme B mRNA の発現は ASKP1240 投与により有意に抑制されていたが、Foxp3・TGF- β ・IL-10・Perforin・IL-15・IFN- γ の発現と拒絶反応の有無に関係は無かった。

【考察】新規ヒト完全抗 CD40 モノクローナル抗体 (ASKP1240) はサル肝移植グラフトの生存を著明に延長した。腎移植実験と異なり、MT 群では治療期間中は拒絶反応を防ぎ、一例にグラフト長期生着を認めたが、IT 群では治療終了後 CR を呈した。MT 群で拒絶反応を抑制したのは、IFN- γ ELISpot アッセイで評価される直接・間接のアロ細胞性反応を抑制に関係していた。長期生存例において直接・間接の細胞性反応は 3rd party や PHA の刺激に対して正常に反応した。薬剤投与終了後にアロ細胞性反応の抑制が見られなかった IT 群とは異なる結果であった。免疫寛容の誘導を阻害する因子として T_{em} が知られているが、IT 群では T_{em} は治療終了と共に増加したが、MT 群では治療終了した後も完全に抑制されたままであった。直接・間接の細胞性アロ反応を抑制した事に加え、T_{em} を増加させなかった事が、拒絶反応を回避できた事に寄与したと考えられる。CD40-CD154 副刺激経路遮断は T_{reg} を誘導し、T_{reg} の高発現は臨床肝移植で免疫寛容の誘導に関与しているとの報告があるが、ASKP1240 による T_{reg} 誘導は存在しなかった。T_{reg} の増加は明らかでなかったが、ASKP1240 治療による IFN- γ 産生細胞・抗原特異的 CD4⁺CD154⁺T 細胞の発現・T_{em} の抑制がグラフトに対して反応する T 細胞を抑制し結果として免疫寛容的なバランスに傾けた可能性はある。3 例の長期生存例において、治療終了後 2 例は DSA が出現したが C4d や IgG で確認される抗体関連拒絶の所見は存在しなかった。これは腎移植実験で CR を呈したグラフトで C4d や IgG が陽性となった所見とは異なる。ASKP1240 による治療がヘルパー T 細胞の機能を完全に抑制していない事で DSA 産生を許したかもしれない事は否定できないが、グラフトに抗体拒絶の所見は存在しなかった。肝移植において HLA の一致は必要なく、クロスマッチ陽性も拒絶反応のリスクにならないのはよく知られており、これらの肝臓免疫特異性が腎移植とは異なる結果をもたらしたのかもしれない。しかし DSA 産生等を考慮すると、ASKP1240 治療によりドナー特異的免疫寛容が得られとは言えない。門脈領域の線維化は移植後 1 ヶ月目の定期的な肝生検で全例に認められた。不十分な免疫抑制はグラフトの線維化や慢性拒絶のリスク因子であるが、これは今回の線維化の説明には当てはまらない。なぜなら、種々の検査で細胞性・液性免疫応答を抑制している期間に既に線維化は出現している。むしろこの門脈領域の線維化は肝臓や他の臓器でも報告されている IRI の指標である。繰り返す胆管炎で肝膿瘍や硬変様変化を起こしたが、特に MT 群において過免疫抑制状態であった可能性を完全に否定する事は出来ない。しかし感染症は胆管炎等のみで、これは胆道再建方法に由来する合併症と考えている。

【結語】完全ヒト抗 CD40 モノクローナル抗体である ASKP1240 はサル肝移植モデルで強力な免疫抑制効果を明らかな副作用を伴わずに示した。特に ASKP1240 を MT で用いると、細胞性・液性免疫応答を軽減し、治療期間中は拒絶反応を認めず、1 例においては長期のグラフト生着を認めた。今実験の結果は臨床肝移植において ASKP1240 が免疫抑制剤として有用であることを示唆している。

学位論文審査の要旨

主査	教授	清野 研一郎
副査	教授	松野 吉宏
副査	教授	武富 紹信
副査	准教授	神山 俊哉

学位論文題名

Long-term hepatic allograft acceptance based on CD40 blockade by ASKP1240 in nonhuman primates

(サル肝移植におけるCD40シグナル遮断薬ASKP1240によるグラフトの長期生着)

申請者らは完全ヒト抗 CD40 モノクローナル抗体 (ASKP1240) を用いてサル肝移植でグラフトに対する効果を検証した。無治療群の肝グラフトは移植後、一週間以内に急性拒絶で拒絶された。導入療法群では、胆管リークで移植後 11 日目に失った以外、90 日・188 日・209 日と生存期間を延長させたが、全例を慢性拒絶で失った。維持療法群では、生存期間を 272 日・278 日・1035 日と著明に延長し、拒絶反応の所見も無かった。前 2 頭は臨床経過から判断した繰り返す胆管炎で失い、1 頭は安楽死させた。維持療法群で 2 頭は虚血再灌流障害、2 頭は肝膿瘍で失ったが、拒絶反応の所見は存在しなかった。ASKP1240 治療により血栓症を含む明らかな副作用は認めなかった。免疫学的検討において、ASKP1240 投与中は直接・間接 IFN- γ ELISpot アッセイでドナー刺激に対する反応は完全に抑制された。導入療法群では投与終了後は反応を抑制出来なかったが、維持療法群において抑制は投与終了後も継続した。CD4⁺ T_{em} は導入療法群において安楽死直前に有意に増加していたが、維持療法群においては増加していなかった。CD8⁺ T_{em} においても同様の傾向が見られた。抗ドナー抗体産生は ASKP1240 投与期間中において完全に抑制したが、投与終了後は上昇する傾向にあった。グラフト内制御性 T 細胞は長期生存例と拒絶例を比較しても変化はなかった。グラフトでの Granzyme B mRNA の発現は ASKP1240 投与により有意に抑制されていたが、Foxp3 の発現と拒絶反応の有無に関係は無かった。本研究において、完全ヒト抗 CD40 モノクローナル抗体である ASKP1240 はサル肝移植モデルで強力な免疫抑制効果を明らかな副作用を伴わずに示した。特に ASKP1240 を維持療法で用いると、細胞性・液性免疫応答を軽減し、治療期間中は拒絶反応を認めず、1 例においては長期のグラフト生着を認めた。今実験の結果は臨床肝移植において ASKP1240 が免疫抑制剤として有用であることを示唆している。

公開発表後、副査の松野教授から①サルの実験で完全ヒト型の抗体を使用しているがサル型である必要はないのか、②ヒト型をサルに持ち込む事に問題はないか、③CD40 は広範な細胞に発現しているがそれをブロックする事による他臓器への変化についての知見はあるか、④長期生着には B cell への効果が影響しているのではないだろうかについて質問があった。それらに対し、①人との相同性が 75% 程度あるのでヒト型を使用している。②文献的にもサルの実験で抗ヒト抗体を使用している報告は多数あり問題ないと考えている。③胚中心については治療中消失しているが治療終了後徐々に回復している。その他の臓器は剖検時でのチェックでは特に異常なかった。④抗体産生を抑制する事が長期生着に寄与する可能性は存在すると回答した。

また副査の武富教授から、①CD40、CD154 の抗体各々効果が違うようだがその原因は何かあるだろうか、②臨床ではどういう使い方を考えているのか、③胆管炎、肝膿瘍は過免

疫抑制によるものかどうかについての質問があった。これらに対し申請者は、①CD154 は血小板にも発現しているので血栓症はその activate によると考え、CD40 は種々の免疫短頭細胞に発現していることが長期生着につながっているのではないかと考えている。②臨床での使用方法については考慮する必要がある。今回の実験では他の免疫抑制剤との併用はしていないが、腎移植では単剤で慢性拒絶が起こっており、何らかの併用が必要と考える。しかし具体的な投与のタイミングや併用薬剤については更なる検討が必要である。③その可能性を完全には否定出来ないが、胆道系のトラブルのみであり、その他の臓器への感染はない。今回の実験系では胆管十二指腸吻合を用いており、それによるトラブルと考える方が妥当と考えたと回答した。

副査の神山准教授からは、①カルシニューリンインヒビター等との併用は必要か、②SMA のクランプはヒトではあまりしない手技だが、どの程度の時間クランプしていてそれによる手技的な違いはあるのか、③カニクイザルを使用している実験だが、臨床応用に向けて現時点ではどのくらいの段階と考えているのかについての質問があった。これらに対し申請者は、①腎移植モデルにおいては単剤では慢性拒絶を抑えられず、何らかの併用が必要と思うが、カルシニューリンとの併用については諸説あり、タイミング等についての検討が必要と考える。②その通りヒトではしないが大動物のブタでは報告があり、本実験では 45 分程度クランプし手技的には変わらない。③前臨床試験の段階と考えており、次はヒトでの臨床応用が期待されると回答した。

最後に主査の清野教授から、①この抗体は細胞を depletion するものか、②エフェクター成分が抑制されたのか、③ELIspot の direct と indirect は暴露時間の違いだけか、④HLA ではないのではないか、⑤IFN- γ ・TGF- β が文字化けしているのではないかと質問があった。これに対し申請者は、①depletion しない。②制御性 T 細胞は誘導されておらず、維持療法群では投与終了後にもエフェクター成分を抑制している。③Indirect では抗原細胞を破碎しライセート化し、時間は調整した。④指摘の通り HLA ではなく MHC である。⑤指摘通りであると返答した。

本論文は完全ヒト抗 CD40 モノクローナル抗体 (ASKP1240) がサル肝移植実験で有用であることを示し、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と判定した。