

# 急性移植片対宿主病の予知診断キットと分子標的療法の開発

研究期間 平成19年度～平成23年度(予定)

研究体制

総括

渋谷 彰[筑波大学]

坂巻 壽[東京都立駒込病院]

※平成21年度における研究体制

## 骨髄移植の合併症の克服に大きく前進

Project Keyword

造血幹細胞移植

白血病や再生不良性貧血などの正常な血液を作ることができなくなる患者に対して、提供者(ドナー)の造血幹細胞を移植して正常な血液を作ることができるようする治療。骨髄、末梢血、臍帯血などからの造血幹細胞移植がある。

急性移植片対宿主病

造血幹細胞移植後に、移植されたドナー由来のTリンパ球が患者の組織を「非自己(異物)」として攻撃する合併症。主な障害臓器は皮膚、消化管、肝臓である。同種造血幹細胞移植症例のおよそ2/3に発症する。

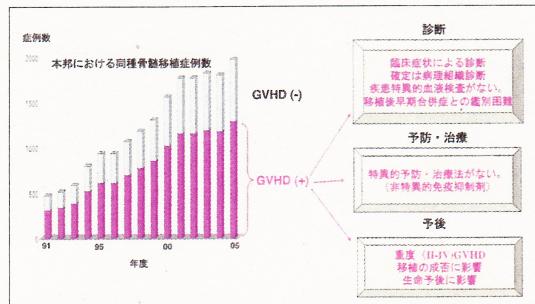
DNAM-1

T細胞やNK細胞などのキラーリンパ球の細胞膜上に発現する分子であり、標的細胞と結合してキラーリンパ球の細胞傷害活性に重要な役割をなう。細胞膜上に存在する膜型と細胞から分泌された可溶型がある。

1

### 研究の背景・意義

1991-2004年の本邦における白血病などに対する同種造血幹細胞移植実施例は、計15,888例に上り、2004年度においては1,609例を数えました(日本造血幹細胞移植学会全国調査による)。急性移植片対宿主病(GVHD)は同種造血幹細胞移植における最も重篤な合併症であり、移植の成否を左右するばかりでなく、生命予後にも直接影響します。HLA適合ドナーからの移植においては、およそ半数に、HLA不適合ドナーからの移植においてはおよそ2/3に急性GVHDが合併します(同全国調査による)。急性GVHDは移植されたドナーのリンパ球がレシピエントである患者の組織を自分とは異なる「異物」として攻撃することにあります。しかし、その病態は様々な炎症反応により修飾されており、必ずしも充分にその詳細は明らかになっていません。そのため、その診断を確定する客観的な特異マーカーがなく、移植後早期の感染症合併症との鑑別診断も必ずしも容易ではありません。また予防や治療においても副腎皮質ホルモン剤などの非特異的な免疫抑制剤が主体であり、急性GVHDに対する特異的な予防法や治療法の開発が望まれています。



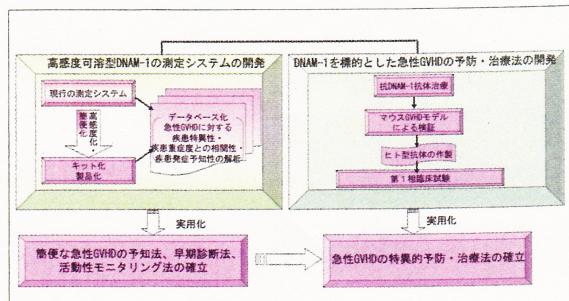
▲1991-2004年の本邦における白血病などに対する同種造血幹細胞移植実施例数と合併した急性移植片対宿主病の問題点

2

### 研究プロジェクトの目標

#### 予知診断キットと分子標的療法の開発

我々はリンパ球接着分子DNAM-1(CD226)を世界に先駆けて発見しました。さらに同種造血幹細胞移植後の患者で急性GVHDの発症の直前から可溶性DNAM-1が血清中に増加することを見いだしました。またGVHDマウスモデルにおいて、DNAM-1ノックアウトマウスをドナーとした場合、また抗DNAM-1モノクローナル抗体を投与したマウスをレシピエントとした場合に、それぞれ急性GVHDの発症が著明に抑制されることを見いだしました。これらの結果から、可溶性DNAM-1は急性GVHDの特異的診断に有用であること、また急性GVHDの予防および治療にDNAM-1が標的分子となりうることが強く示唆されました。本研究は、1) 高感度可溶性DNAM-1の測定システムの開発とそれを用いた急性GVHDの発症予知診断法、2) DNAM-1を標的とした急性GVHDの予防および治療法の開発を目的とします。



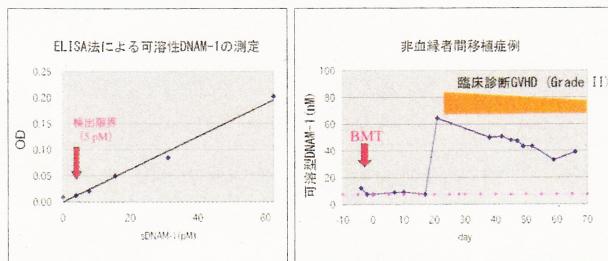
▲可溶性DNAM-1をマーカーとした急性片対宿主病の予知診断法の開発とDNAM-1中和抗体を用いた予防・治療法の開発

### 3

## 研究プロジェクトの成果

### 急性移植片対宿主病の予知診断法の開発

高感度可溶型DNAM-1の測定システムを開発し、これを用いた急性GVHDの発症予知診断法の開発を行いました。まずDNAM-1に対するエピトープの異なる複数のモノクローナル抗体を作製し、サンドイッチELISA法(検出限界は約7.5pM)を確立しました。さらにこれまで100例を越える同種造血幹細胞移植患者症例の血清を移植後経時に収集し、開発したELISAシステムを用いて可溶型DNAM-1の定量を行いました。その結果、臨床的に急性GVHDの診断がなされるよりも早期に可溶型DNAM-1の上昇が確認される傾向があり、急性GVHDの緩解にしたがって可溶型DNAM-1の値も低下してくる傾向が認められました。これらの結果から、可溶型DNAM-1の測定により、急性GVHDの予知診断が可能であることが期待されました。

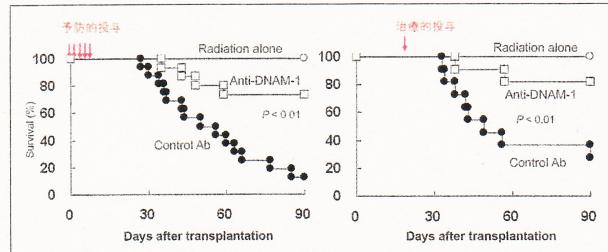


▲ELISA法による可溶型DNAM-1の高感度測定法の開発と急性移植片対宿主病を合併した症例の可溶型DNAM-1の推移

### 急性移植片対宿主病の予防・治療法の開発

急性GVHDに対するDNAM-1中和抗体の効果を検討するために、C57BL6とC3HのF1をレシピエントとして、放射線照射後、C57BL6をドナーする移植の系を樹立しました。すでに樹立してある複数の抗マウスDNAM-1モノクローナル抗体の中から、in vitroでリガンド結合を阻止するモノクローナル抗体を選択しました。これを用いて、移植前、移植直後に5回にわたって抗DNAM-1中和抗体をそれぞれ100ug投与すると、コントロール抗体を投与したマウスに比較し、有意に生存期間が亢進しました。肝障害や小腸粘膜障害などの急性GVHD症状も有意に軽微でした。のことから、抗DNAM-1中和抗体により急性GVHDの予防が可能であることが示されました。

また、すでに急性GVHDが出現したマウスに抗DNAM-1中和抗体を投与することによって症状の改善がみられるかを検討しました。肝障害などの急性GVHDの症状が明らかとなつた移植後2週間に抗DNAM-1中和抗体を一回投与したところ、肝障害が急激に改善し、生存期間も有意に亢進しました。のことから、抗DNAM-1中和抗体により急性GVHDの予防ばかりでなく、一回の投与でも治療が可能であることが示されました。



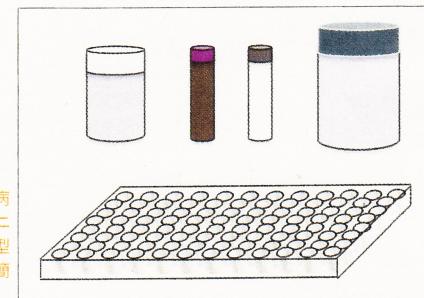
▲DNAM-1中和抗体を予防的または治療的に投与した群は、コントロール抗体を投与した群と比較し、生存期間が有意に延長した。

### 4

## 実用化にあたっての今後の課題及び研究方針

### 可溶型DNAM-1の測定キットの作製

構築した高感度可溶型DNAM-1を測定するSandwich ELISAシステムの測定キットを作製する。そのため、一次抗体の固相化及び一次抗体プレートの凍結乾燥化、二次抗体の検出システムの検討を行い簡便な測定キットを完成させます。これまで集積してきた200例におよぶ造血幹細胞移植症例の血清を対象に、作製した測定キットを用いて可溶型DNAM-1の経時的变化を解析し、可溶型DNAM-1の急性GVHDに対する疾患特異性・重症度との相関性・疾患発症予知性を検証します。急性GVHDからの血清を用いてELISAキットの有効性を証明し、診断薬としての保険適応の申請を行います。また開発段階では発見できなかった問題点や適正使用情報などの収集を行い、改良を加えます。可溶型DNAM-1を測定するELISAシステムをキット化することにより、簡便に大量のサンプルを測定することが出来ます。更に可溶型DNAM-1の値と急性GVHDの発症との関連が明らかとなれば、本キットを用いて急性GVHDの発症予知、モニタリングが可能となり、治療戦略上有効な指標を提示する事が可能になります。本邦では同種幹細胞移植症例が年間2,000例を越えており、欧米を含めるとその市場は莫大です。



▲急性移植片対宿主病の発症予知、病勢のモニタリングのための可溶型DNAM-1の高感度、簡易測定キット

### ヒト型抗DNAM-1中和抗体

得られた複数の抗DNAM-1モノクローナル抗体の中からリガンド結合を阻止する抗体を選別します。これらの中から抗DNAM-1モノクローナル抗体の可変領域をハイブリドーマよりクローニングし、ヒト型抗DNAM-1モノクローナル抗体を作製するとともに、急性移植片対宿主病マウスマルクスモデルを用いて、発症抑制および治療効果の検討を行います。さらにヒト型抗DNAM-1モノクローナル抗体の安全性の検討を行います。これまで、急性移植片対宿主病の予防や治療においては、副腎皮質ホルモン剤などの非特異的な免疫抑制剤が主体であり、特異的な予防法や治療法の開発が望まれていました。DNAM-1を分子標的とした抗体治療による急性移植片対宿主病の特異的予防法ならびに治療法が確立されれば、移植成績の著明な向上が期待できるとともに、HLA不適合ドナーからなどの移植適応が拡大される可能性があります。



▲ヒト型抗DNAM-1中和抗体は、急性移植片対宿主病の予防、治療に有効

### 参考文献

Nabekura T, Shibuya K, Takenaka E, Kai H, Shibata K, Yamashita Y, Harada K, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Shibuya A. A critical role of DNAM-1 in the development of acute graft-versus-host disease in mice. Proc Natl Acad Sci USA. 2010

Iguchi-Manaka A, Kai H, Yamashita Y, Shibata K, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Yasui Y, Kikutani H, Shibuya K, Shibuya A. Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor. J. Exp. Med. 205, 2959-2964, 2008

Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Kai H, Miyamoto A, Morikawa Y, Ohkochi N, Honda S, Shibuya A. Tumor rejection by the poliovirus receptor family ligands of the DNAM-1 (CD226) receptor. Blood. 107:1491-1496, 2006