

令和元年6月19日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08982

研究課題名(和文) 原発性胆汁性肝硬変B細胞除去療法併用制御性形質細胞移植の有効性の検討

研究課題名(英文) Exploring therapeutic efficacy of B cell depletion-combined regulatory plasma cell transfer in PBC

研究代表者

守時 由起 (MORITOKI, Yuki)

秋田大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：90585522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：新規バイオロジクス製剤抗ヒトCD20ヒト化抗体(TKM-011)を用いた原発性胆汁性胆管炎(肝硬変、以下PBC)患者におけるB細胞除去療法の臨床開発に平行して作成されたHuman CD20 (hCD20)、Human Fc R (hFc R)ファミリーを発現するPBCモデルマウス(以下モデルマウス)において、TKM-011抗体の薬効試験を兼ねたB細胞除去療法を行い、B細胞低減によって病態が改善する結果を得た。また、治療薬に対する抗体(抗治療薬抗体)が出現した群ではB細胞除去およびPBCの病態改善が減弱したことから、抗治療薬抗体の発現可能性が低い抗体医薬による治療が望ましいことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PBC治療において、国内承認薬はウルソデオキシコール酸のみであり、効果不十分例ではベザフィブレートが追加投与される場合があるが、それでも効果不十分の場合には門脈圧亢進症、肝不全への進行を抑える有効な治療法はなく、肝移植が唯一の治療手段となることから、胆管炎を軽減し肝硬変への進行抑制可能な新規治療法が求められている。数年前より欧米ではオベチコール酸が新規承認となっているが、痒み等の有害事象報告や治療継続困難例も見られ、国内臨床開発は見送られている。本研究では、TKM-011によるPBC治療有効性が示唆されており、B細胞除去療法の臨床開発が更に進展することを期待したい。

研究成果の概要(英文)：A novel biologics drug, anti-human CD20 humanized monoclonal antibody coined TKM-011 has been considered to be used in a clinical development for B cell depletion therapy in patients with primary biliary cholangitis (PBC). In parallel, human CD20 and Fc R expressing PBC model mice has been developed to examine therapeutic efficacy of B cell depletion using TKM-011. Human CD20 and Fc R hemi-expressing PBC model mice treated with TKM-011 exhibited B cell depletion as well as improvement of PBC pathological condition. In addition, development of anti-drug antibodies (ADA) against TKM-011 impaired B cell depletion as well as improvement of PBC liver pathology, suggesting lower possibility of ADA development would be preferred in PBC treatment using biologics.

研究分野：自己免疫性肝疾患、原発性胆汁性胆管炎、B細胞

キーワード：原発性胆汁性胆管炎 B細胞除去療法 抗治療薬抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

原発性胆汁性胆管炎(肝硬変)は厚生労働省の「難治性肝疾患」に指定された自己免疫性慢性肝臓疾患であり、有効な治療法は確立されていない。Ursodeoxycholic acid (UDCA)内服治療にて疾患進行を遅延させるが、肝硬変進展は抑制できない。胆汁酸アナログ(FXR agonist)の臨床開発が行われているものの、肝硬変への伸展抑制効果については未知である。末期症例での有効な治療は肝移植のみであり、肝移植後の5年生存率は80%と良好なものの、免疫抑制剤長期服用が必要となり、移植後5年間に30%程度のケースで再発が見られる。それ故、新規療法開発を最終目標として原発性胆汁性胆管炎(肝硬変)の病因、病態に関する活発な研究が世界的に進められている。

原発性胆汁性胆管炎(肝硬変)症例の90-95%に抗ミトコンドリア抗体が認められ、B細胞免疫異常が病態に関与するため、研究代表者らは自然発症原発性胆汁性胆管炎(肝硬変)モデルマウス(dnTGF- RII マウス)において遺伝子的 B細胞欠損 dnTGF- RII マウスを解析し、B細胞による制御性T細胞を介した肝臓炎症抑制機序、腹腔内B細胞による制御性T細胞を介さない肝臓炎症機序を明らかにし、B細胞による肝臓炎症抑制機能を世界で初めて報告した(Moritoki Y, et al. *Gastroenterology* 2009)。

一方、治療的B細胞除去療法の可能性を検討するため、dnTGF- RII マウスに抗 mouse CD20 抗体投与を行ったところ、若年マウスでは抗ミトコンドリア抗体の低下と肝臓炎症の低減を認めたが、成体マウスでは肝臓炎症に有意な変化を認めなかったことより、当モデルマウスにおける抗 mouse CD20 抗体療法の早期施行の有効性を報告した(Moritoki Y, et al. *Hepatology* 2009)。また、標準治療である UDCA 投与に不応性のヒト原発性胆汁性胆管炎(肝硬変)患者に対して Rituximab(抗 human CD20 抗体)投与した Open-label phase 1 & 2 study においては、B細胞除去により CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞増加、Foxp3, TGF- の mRNA 発現レベル増加、Alkaline phosphatase (ALP)低下を認め、B細胞除去療法の有効性が示唆されたことを報告した(Tsuda M, Moritoki Y, et al. *Hepatology* 2012)。

### 2. 研究の目的

上記報告(Tsuda M, Moritoki Y, et al. *Hepatology* 2012)に関心を寄せた特殊免疫研究所(<http://www.tokumen.co.jp>)から、原発性胆汁性胆管炎(肝硬変)患者に対して Rituximab とは異なる抗ヒト CD20 ヒト化抗体(TKM-011, 以前の名称は BM-ca)を用いた B細胞除去療法の臨床開発について提案を受け、現在、国内外での臨床開発実現に向けて検討を進めることとなった。

また、制御性B細胞関連の報告によると、脾臓の形質細胞がB細胞に比して IL-10 産生能に秀でており、制御性形質細胞という概念が提唱されている。他方、ヒト原発性胆汁性胆管炎(肝硬変)患者における制御性B細胞および制御性形質細胞の存在は確認されておらず検討を進めている、本研究の最終目標は、「肝臓炎症に促進的なB細胞除去に、炎症抑制的なB細胞系列細胞移植を併用して、B細胞標的新規療法による病態制御向上について検討すること」である。

### 3. 研究の方法

hCD20-hFCgR-IL-10GFP-dnTGF- RII モデルマウスを作成し、完全ヒト化抗 CD20 抗体(TKM-011)を用いた B細胞除去を行った。

肝臓炎症および自己抗体、免疫グロブリン、サイトカイン、ケモカインへの影響を検討した。治療薬である TKM-011 に対する中和抗体(抗 TKM-011 抗体)の出現の有無を検討した。

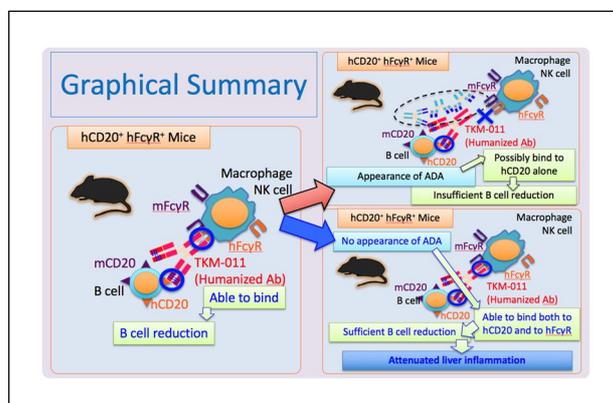
同モデルマウスにおいて、B細胞除去率の向上を目指し、hCD20 homo 発現、mCD20 除去を行った。

#### 4. 研究成果

新規バイオロジクス製剤抗ヒト CD20 ヒト化抗体(TKM-011)を用いた原発性胆汁性胆管炎(肝硬変、以下 PBC)患者における B 細胞除去療法の臨床開発に平行して、Human CD20 (hCD20)、Human FcγR (hFcγR)ファミリーを発現する PBC モデルマウス(以下モデルマウス)作成し、TKM-011 抗体の薬効試験を兼ねた B 細胞除去療法の治療有効性を確認する。併せて、モデルマウスにおける制御性形質細胞の病態への寄与を解析し、B 細胞除去療法に制御性形質細胞移植を併用することによる病態制御向上の可能性を検討する目的で研究を行っている。

hCD20 および hFcγR ファミリーを hemi で発現するモデルマウスにて TKM-011 を投与した結果、B 細胞低減によって病態が改善する可能性が示唆される結果を得て、追加検討を行い同論文の再投稿準備を進め、H30 年度(2018 年 11 月)に *Frontiers in Immunology* に以下の内容を論文発表した。

TKM-011 抗体投与群において、16 週間の治療後には肝臓門脈域の炎症減弱、肝臓内単核球数の減少( $1.582 \pm 0.7486$  vs  $2.465 \pm 1.457 \times 10^6/\text{g liver}$ ,  $p=0.0359$ )および  $\text{CD8}^+$  T 細胞数の減少( $1.577 \pm 0.858$  vs  $2.418 \pm 1.254 \times 10^5/\text{g liver}$ ,  $p=0.0494$ )を認めた。肝臓内 B 細胞数は、肝臓内単核球数( $r=0.7426$ ,  $p=0.0006$ )およびメモリー  $\text{CD8}^+$  T 細胞数( $r=0.6423$ ,  $p=0.0054$ )との正の相関をそれぞれ認めた。TKM-011 抗体投与群の治療 8 週時点において、AMA 低下( $1.353 \pm 0.481$  vs  $2.041 \pm 0.872$  OD,  $p=0.0110$ )および炎症抑制性ケモカイン CXCL1/KC 上昇( $176.7 \pm 95.98$  vs  $125.9 \pm 85.03$  pg/mL,  $p=0.0330$ )を認め、16 週時点では炎症性サイトカイン IL-12p40( $531.7 \pm 440.5$  vs  $683.0 \pm 393.6$  pg/mL,  $p=0.0494$ )および B 細胞・好酸球刺激性サイトカイン IL-5( $41.57 \pm 39.74$  vs  $142.8 \pm 195.4$  pg/mL,  $p=0.0073$ )の低下を認めた。また、抗治療薬抗体(mouse anti-humanized antibodies, MAHA)が出現したマウスにおいては治療効果が減弱した。



以上の結果から、B 細胞標的療法は PBC 病態を幅広く抑制することが確認され、また、治療薬である TKM-011 に対する抗体(抗治療薬抗体)が出現した群では B 細胞除去および PBC の病態改善が減弱したことから、抗治療薬抗体の発現可能性が低い抗体医薬での治療が望ましいことが示唆された。

B 細胞除去率をさらに向上するため hCD20 を homo 発現するマウス、mouse CD20 (mCD20) を除去したマウスの作成を進めたものの、hCD20 の発現は限定的で B 細胞の完全除去を達成できる環境が得られていない。今後も検討を進める方針である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Moritoki Y, Tsuneyama K, Nakamura Y, Kikuchi K, Shiota A, Ohsugi Y, Lian ZX, Zhang W, Yang GX, Ueki S, Takeda M, Omokawa A, Saga T, Saga A, Watanabe D, Miura M, Ueno Y, Leung PSC, Tanaka A, Gershwin ME, Hirokawa M. Anti-drug Antibodies Against a Novel Humanized Anti-CD20 Antibody Impair Its Therapeutic Effect on Primary Biliary Cholangitis in Human CD20- and FcγR-Expressing Mice. *Frontiers in Immunology* (査読あり) 2018;9:2534. doi: 10.3389/fimmu.2018.02534

[学会発表](計 5 件)

Moritoki Y. B cell immunity in PBC. 2018 SCUT Liver Symposium of Liver Immunology, Guangzhou, China, 2018.

Moritoki Y, et al. Efficacy of humanized anti-human CD20 on Early Stage Murine

Autoimmune Cholangitis using human CD20 and FcγR expressing dnTGFβRII Mice. **The Liver Meeting 2018**, San Francisco, USA, 2018.

Moritoki Y. B cell targeting immunotherapy in Primary Biliary Cholangitis. **2019 SCUT Liver Symposium of Liver Immunology**, Guangzhou, China, 2019.

Moritoki Y. et al. Efficacy of humanized anti-human CD20 on early stage autoimmune cholangitis is impaired by anti-drug antibodies in human CD20 and FcγR expressing dnTGFβRII mice. **APASL STC Tokyo 2019**, Tokyo, Japan, 2019.

守時 由起, 他. 原発性胆汁性胆管炎モデルマウスにおける B 細胞標的療法の治療有効性は抗治療薬抗体の出現により制限される. **第 55 回日本肝臓学会総会 パネルディスカッション 10 「自己免疫性肝疾患：病態解明と治療法の進歩」**, 2019.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：ヒト特定分子およびヒト Fc 受容体ファミリーを発現するトランスジェニック非ヒト動物

発明者：塩田 明、溝呂木達也、守時由起

権利者：株式会社特殊免疫研究所、秋田大学

種類：特許

番号：PCT/JP2016/063356

出願年：2016 年

国内外の別：外国

取得状況(計 1 件)

名称：ヒト特定分子およびヒト Fc 受容体ファミリーを発現するトランスジェニック非ヒト動物

発明者：塩田 明、溝呂木達也、守時由起

権利者：株式会社特殊免疫研究所、秋田大学

種類：特許

番号：6309166

取得年：2018 年

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：常山 幸一

ローマ字氏名：(TSUNYAMA, koichi)

研究協力者氏名：菊池 健太郎

ローマ字氏名：(KIKUCHI, kentaro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。