

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430167

研究課題名(和文)モガムリズマブによる皮膚障害の病態解明

研究課題名(英文)Elucidation of the pathogenesis of skin disorder by mogamulizumab

研究代表者

伊藤 旭 (ITO, Asahi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00571762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：PBMC解析については、他施設共同臨床試験MIMOGAstudyの検体を用いて行い、grade3以上の皮疹を発症した症例は非発症例と比較して予後良好な傾向が見られたが、PBMC解析ではFoxp3による制御性T細胞の解析、HTLV-1の蛋白Taxに対する特異的な細胞障害性T細胞の解析など何れも皮疹発症例と非発症例で顕著な相違はみとめなかった。皮膚障害モデルマウスについては、皮膚障害を発症した患者検体をNOGマウスに移植したが、皮疹の再現に至らなかった。遺伝子解析についてはアポトーシスに關与するPANX1の発現に差がある傾向がみられたがまだ少数例の検討であり今後多数例での解析を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：As for PBMC analysis, a sample with coexistent clinical trial MIMOGAstudy of other institution was used, and cases with onset of rash of grade 3 or higher showed a favorable prognostic tendency compared with non-onset cases, but in PBMC analysis, control by Foxp 3 Analysis of regulatory T cells, analysis of specific cytotoxic T cells to protein Tax of HTLV - 1, etc. Did not show any significant difference in rash cases and non - onset cases. For skin disorder model mice, patient specimens that developed skin disorder were transplanted to NOG mice but did not reproduce eruption. For genetic analysis, there was a tendency that the expression of PANX1 involved in apoptosis tended to differ but it is still a small number of studies and will be analyzed in many cases in the future.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：モデルマウス 皮膚障害

## 1. 研究開始当初の背景

近年悪性腫瘍に対するモノクローナル抗体治療の進歩が目覚ましい。血液内科の分野ではケモカイン受容体 CCR4 に対するモノクローナル抗体であるモガムリズマブが CCR4 陽性の成人 T 細胞性白血病に投与され、良好な治療効果を上げている。このモガムリズマブを投与された患者に皮疹の出現が観察されており、なかには全身症状を伴う重症薬疹に至るケースもみられる。筆者らは、モガムリズマブ投与後に皮疹を生じた患者の皮膚生検組織を検討し、モガムリズマブのターゲットのひとつである制御性 T 細胞(Treg)のマーカーである Foxp3 が皮膚組織において減少していることを見出した。本研究は、この皮膚障害の病態解明をさらに進めることにより、皮膚障害の予防・治療、ひいてはモガムリズマブの薬効そのものにまで迫ることを目的とする。

## 2. 研究の目的

10 数年前、乳がんに対するトラスツズマブ、悪性リンパ腫に対するリツキシマブに端を発した悪性腫瘍に対するモノクローナル治療抗体の開発・臨床応用はその後めざましい進歩を遂げ、各種の悪性腫瘍に対して抗体治療が従来の抗がん剤とともに標準治療になりつつある。これらの抗体医薬の長所として、従来の抗がん剤でみられた骨髄抑制や粘膜障害といった副作用が軽度、またはほとんどみられないことが挙げられる。その一方でこれらの抗体医薬に特異的な副作用も数多く出現している。共通して挙げられるのは infusion reaction などのアレルギー関連の副作用や腫瘍崩壊症候群などで、重篤なものは致命的となることもあり、今後のがん治療の現場における大きな問題のひとつとなっている。

末梢 T/NK 細胞リンパ腫の一型である成人 T 細胞白血病リンパ腫 (Adult T-cell Leukemia/Lymphoma: ATL) は、レトロウイルス HTLV-1 に感染した CD4 陽性リンパ球のモノクローナルな増殖によって発症する。末梢血中に flower cell と呼ばれる花弁様の核をもつ異常リンパ球が出現し、全身のリンパ節腫脹、高カルシウム血症、易感染性などの臨床症状をきたす。治療成績は良好とは言えず、とくに化学療法のみでの生存期間の中央値は 3~13 ヶ月と予後不良である。この ATL の腫瘍細胞表面に発現しているのが、ケモカインレセプターのひとつである CCR4 である。申請者らのグループはこの CCR4 が末梢性 T 細胞リンパ腫の表面に多く発現していることを見出し、なかでも ATL 細胞の表面には 88.3% という高い頻度で発現していることを明らかにした。また、CCR4 陽性の ATL は陰性の ATL に比べて有意に予後不良であることも見出した。

申請者らのグループが協和発酵キリン(株)との産学共同研究で開発した低フコース型

CCR4 抗体;モガムリズマブ(KW-0761)は、申請者らのグループを中心に 2006 年 7 月から再発性/難治性 CCR4 陽性 T 細胞性腫瘍に対する臨床第 I 相試験を欧米諸国に先駆け、わが国で開始するに至った(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00355472)。2008 年 8 月に本第 I 相臨床試験の全患者登録が終了し、第 II 相臨床試験の推奨用量を 1.0 mg/kg に決定した(J Clin Oncol.28:1591-8.2010)。第 II 相試験は 2009 年 6 月より開始された(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00920790)(J Clin Oncol.30(8):837-42.2012)。その結果 2012 年 3 月に、再発または難治性の ATL に対してモガムリズマブが保険承認された。

この第 II 相試験において被験者の 63% に皮膚障害をみとめた。大半は薬剤中止、ステロイド外用または内服で軽快したが、なかには重症の薬疹(TEN, Stevens-Johnson 症候群)を発症した例もあり死亡例もみられた。そして保険承認され市販された後もモガムリズマブ投与による皮膚障害の報告が相次いでおり、重症例や死亡例も報告されている。同種造血幹細胞移植の対象とならず、全身化学療法しか治療法がなかった高齢の ATL 患者に対して、このモガムリズマブは骨髄抑制や粘膜障害、脱毛などの化学療法の副作用もほとんどみられず、有望な治療手段であった。しかし、時に重症化するモガムリズマブ投与後の皮膚障害は、このような患者と担当医にとって、憂慮すべき問題であり、対策・治療法とともにその病態解析が強く望まれている。申請者らの施設においても臨床試験、そして市販後の実地臨床においてモガムリズマブ投与後の皮膚障害を多数例経験している。また複数施設からの皮膚障害症例の皮膚生検組織を集めて免疫組織学的検討を行った臨床研究において、皮膚障害を起こした皮膚組織では尋常性乾癬や扁平苔癬、アトピー性皮膚炎など、他の皮膚疾患の皮膚組織と比較して、制御性 T 細胞(Treg)の主要遺伝子である Foxp3 が陽性の細胞が有意に減少していることを見出した。また申請者らの施設が中心となり、全国の ATL を診療している 11 施設の協力を得て、モガムリズマブを初めて投与する ATL 患者の末梢血を、投与前、投与開始 3 か月、6 か月、1 年後に採取して、Foxp3 陽性細胞の解析、HTLV-1 ウイルス蛋白である Tax に特異的な細胞障害性 T 細胞(CTL)の解析など、免疫学的なモニタリングを行う臨床試験(MIMOGA study)(UMIN:000008696)も行っている。

申請者らのグループは、難治性成熟 T 細胞性腫瘍の病態解析およびこれに対する分子標的治療の開発研究を行ってきた。これらの難治性成熟 T 細胞性腫瘍に対する新規抗体療法開発のトランスレーショナルリサーチの過程で、申請者らは重度免疫不全マウス、NOD/Shi-scid, IL-2Ry<sup>null</sup>(NOG)マウスを用いて複数の成熟リンパ系腫瘍モデルを作成し、そのモデルマウス体内でヒトの末梢血単

核球(PBMC)が抗体依存性細胞障害活性(ADCC)のエフェクターとして機能することも証明した。

これらの業績を背景として、モガムリズマブ投与後に皮膚障害を起こした症例の免疫学的・遺伝子学的解析を行い、さらに免疫不全マウスを用いてヒトのATL細胞・エフェクター細胞、そしてモガムリズマブを投与して皮膚障害モデルマウスを作製し、詳細に解析・検討することにより、未だ明らかになっていないその病態を解明することを本研究の目的とする。

### 3. 研究の方法

(1)皮膚障害発症例と非発症例のPBMCを解析する。

本研究の第一段階はモガムリズマブによる治療を受けたATL患者のうち、皮膚障害を発症した症例としなかった症例において、それぞれ末梢血の単核球(PBMC)を採取し、免疫学的な手法のほか遺伝子学的にも検討し、皮膚障害を発症した症例に共通してみられる免疫学的、あるいは遺伝子異常を検索することである。免疫学的な手法についてはMIMOGA studyで行っているフローサイトメトリーによる解析が中心である。PBMCにおいてヒト白血球共通抗原であるCD45でゲートしたものを、リンパ球系、骨髄球系、単球系などの代表的な表面マーカーで染色してプロファイリングを行う。また、CD4、CD25、CCR4などのATL特異的な表面マーカーのセットや、Foxp3による制御性T細胞(Treg)の解析、そしてHTLV-1の蛋白Taxに対する特異的な細胞障害性T細胞(CTL)の検出などを行う。これにより、皮膚障害をきたした患者の末梢血中にどのような細胞がどのくらいの比率で存在しているか、という基本的な情報から、ATL細胞の残存の有無、そして抗CCR4抗体の投与により減少すると考えられている制御性T細胞の状態まで解析することができる。この手法で、皮膚障害をきたした患者に特徴的な免疫学的状態、フローサイトメトリーで解析可能な共通点を検索する。また、皮膚障害をきたした患者ときたさなかった患者のPBMCから抽出したDNAを用いて、それらのgeneticな相違をcDNA micro array、SNP arrayで比較・解析する。

(2)皮膚障害モデルマウスを作製する。

平成26年度に行う第二段階としては、皮膚障害モデルマウスの作製と解析である。申請者は以前から免疫不全マウスを用いた血液悪性腫瘍のモデルマウス、あるいはそれに対する抗体治療モデルマウスを作製してきたが、申請者らの研究計画の特徴はあくまでも患者由来の腫瘍細胞やエフェクター細胞を用い、『細胞株』を用いた実験を行わないことである。従来までの免疫不全マウス(SCIDマウス、NOD/SCIDマウス)では、患者由来の悪性リンパ腫細胞を生着させ、そのモデルを作製するのは極めて困難であった。ま

た、同様に患者PBMCに含まれるリンパ球や単球などがマウス体内で免疫担当細胞として機能するのを観察することも困難であった。今回モガムリズマブ投与による皮膚障害をマウス体内で観察する際に、その免疫反応を起こしている細胞がマウス由来のものであっては、それをヒトの事象にそのまま置き換えて考えることはできない。したがって、モデルマウス体内においては、マウス由来の免疫担当細胞は機能せず、かつ患者由来の免疫担当細胞が生着し、機能できる状態を作り出さなければならない。この要求に適しているのが、より免疫不全の強いNOD/Shi-scid, IL-2R<sup>null</sup>マウス(NOGマウス)である。NOGマウスは、従来までの免疫不全マウスと比較して、多様なヒト細胞が分化・増殖することが可能である。申請者らは既に複数の患者由来の悪性リンパ腫細胞と、NOGマウスを用いて、NOG/患者由来悪性リンパ腫モデルマウスやそれに対する抗体治療モデルマウスを作製してきた(研究業績3)。申請者らはこれらのモデルマウスが、悪性リンパ腫細胞を提供下さった患者の臨床像をほぼ忠実に再現することを確認している。したがって皮膚障害モデルマウスの作製に際しては、皮膚障害をきたした患者とそうでない患者のATL発症時のPBMC(このなかにはATL細胞とともにリンパ球や単球などの免疫担当細胞が含まれている)をNOGマウスにまるごと移植し、モガムリズマブを投与して皮膚障害の発症の有無を観察する。そこでマウスに皮膚障害が再現されたものについて、皮膚組織、リンパ節、骨髄、末梢血、その他の臓器など各臓器から抽出した細胞を1)に述べた免疫学的、遺伝子学的な手法で、皮膚障害を発症しなかったマウスの細胞と比較・解析する。

(3)患者検体およびマウス検体の遺伝子学的解析

平成26年度の患者検体、マウスの各臓器から得た細胞での解析の結果得られた、皮膚障害患者に特異的に過剰発現または低下している遺伝子の候補について、shRNAまたはsiRNAで比較、解析する。薬剤による皮膚障害と遺伝子との関係においては、例えば、尿酸降下剤であるアロプリノールや抗てんかん薬であるカルバマゼピンを投与した後の重症薬疹において、それぞれ特定のHLA型との関連が報告されている。モガムリズマブ投与後の皮膚障害において、このような特定のHLA型との関連が存在するか否かは不明である。このようなHLA検査も含めた前年の遺伝子学的検索からいくつか同定された、モガムリズマブ投与後の皮膚障害を規定する遺伝子候補について、shRNAまたはsiRNAによる遺伝子ノックアウト、またはレトロウイルスなどによる遺伝子ノックインにより、それらの遺伝子の機能を詳細に解析し、モガムリズマブ投与後の皮膚障害と関連する遺伝子異常を解明する。

#### 4. 研究成果

本研究の主要な目的であるモガムリズマブ皮膚障害の病態解明について、研究の手順を(1)皮膚障害発症例と非発症例の PBMC 解析(2)皮膚障害モデルマウス作製(3)患者検体およびマウス検体の遺伝子的な解析の3段階と定めて研究を開始した。まず PBMC の解析については、他施設共同臨床試験である「成人T細胞白血病リンパ腫に対するモガムリズマブ治療中の免疫モニタリング」MIMOGA study の検体を用いて解析を行った。臨床試験登録開始から平成29年3月までに96例の登録を得た。そのうちCRFが得られて解析可能な70例でのデータでは、grade3以上の皮疹を発症した症例が15例あり、皮疹を発症しなかった症例と比較して予後良好な傾向が見られた。PBMCの解析ではCD4、CD25、CCR4等のATL特異的な表面マーカーや、Foxp3による制御性T細胞(Treg)の解析、そしてHTLV-1の蛋白Taxに対する特異的な細胞障害性T細胞(CTL)の検出などを行ったが、皮疹発症例と非発症例で顕著な相違はみとめなかった。しかし今後grade1-2の皮疹症例についてもCRFを新たに追加する予定であり、比較的軽症例も含めた皮疹発症例での免疫学的特徴を探索する予定である。また、皮膚障害モデルマウスについては、皮膚障害を発症した複数の患者検体を免疫不全マウスであるNOGマウスに移植したが、皮疹の再現に至らず、モデルマウス作製に至らなかった。原因としてヒトとマウスの免疫系の相違、モガムリズマブ皮疹発症に関わる免疫担当細胞がNOGマウスで欠損している可能性などが考えられた。また遺伝子的な解析についてはモデルマウスが作製できておらず患者検体でのみ行ったが、アポトーシスに関与する分子PANX1の発現に差がある傾向がみられたがまだ少数例での検討であり、今後軽症例も含めた多数例での解析を行う予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計1件)

伊藤旭、崔日承、宇都宮與、今泉芳孝、野坂生郷、宮崎泰彦、城達郎、石塚賢治、森内幸美、日高道弘、楠本茂、上田龍三、石田高司  
「成人T細胞白血病リンパ腫に対するモガムリズマブ治療中の免疫モニタリング 中間報告」

2015年10月17日

第77回日本血液学会学術総会・ホテル金沢(石川県・金沢市)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 旭 (ITO, Asahi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・特任助教