

サイトカイン放出症候群を 研究するための 新たな方法

著者：James Keck & Brian Soper

翻訳：順天堂大学国際教養学部 久原 孝俊

緒言

免疫系は、人間のからだにおける最も複雑な機能のうちの一つであり、これに匹敵するものは脳のみである。健康な個体においては、多くの分子、細胞、ならびにすべての器官がみごとに協働して、われわれにとって危険な外部の汚染物質、ウイルス、その他の微生物からからだを守っている。

しかし、われわれ自身の免疫系が刺激に対して不適切または過剰に反応すると、われわれを危険に陥れることがある。重篤なアレルギー反応、関節リウマチ、1型糖尿病、紅斑性狼瘡などは、不適切または過剰な免疫反応のよく知られた例である。多くの製薬会社や臨床研究者は、他の異常な免疫応答であるサイトカイン放出症候群（cytokine release syndrome: CRS）とよばれる病態に関心をもっている。

サイトカイン放出症候群（CRS）とは何か？

ときおり、自然免疫系や獲得免疫系は、感染症、がん組織、あるいは治療薬などの刺激に対して過剰に反応することがある。活性化された白血球は、サイトカインとよばれる炎症性シグナル伝達タンパク質を急速に放出する。その結果、さらに多くの白血球や血管内皮細胞がフィードバックループとして活性化され、微熱から致命的な臓器不全にいたるまでさまざまな症状が現れる。

1999年、17歳のJesse Gelsingerは、希少疾患のための実験的な遺伝子治療を受けた後、サイトカインストームを起こして死亡した。このよく知られた悲劇的な症例のため、その後20年ほどの間、遺伝子治療研究の進展は遅滞した。同じように、2006年、TGN1412とよばれるモノクローナル抗体製剤が6人の健康なボランティアにおいて、生死に関わるCRSをひき起こした。すなわち、治療用モノクローナル抗体を投与した後まもなく、高熱や臓器不全をひき起こしたのだ。この臨床結果は、科学者たちに衝撃を与えた。なぜなら、ラット、サル、ならびにヒト細胞を用いた前臨床試験においては、CRSのリスクを示す証拠はまったくみられなかったからである。それ以来、科学者および規制当局ともに、小分子免疫調節療法、抗体製剤、ならびにCRSのリスクを高める可能性のある治療薬については、安全プロファイルに関して特段の注意を払うようになった。

治療薬開発過程におけるリスクを低減させる

驚くべきことに、腫瘍免疫学領域におけるすべての治療薬のうち、97%が臨床試験において失敗している。これらの失敗のうち、50%は安全性や有効性の問題によるものであり、20%は資金不足によるものである（Fogel, 2018）。このような失敗は、時間的および資金的投資において、研究者、製薬会社、ならびに投資家にとって大きな損失である。治療薬開発におけるリスクを低減させるためには、科学者たちは、前臨床試験の段階において、最も有望な治療薬の候補をよりよく選別するためのツールを必要とする。安全性と有効性の理想的な組み合わせを有する治療薬候補のみがリード選別の先へ進む価値がある。

ヒト化マウスモデルにおけるin vivo CRS評価試験によって、治療薬の安全性に関する迅速かつ再現性のあるトランスレーショナルデータが得られる。ヒト化マウスプラットフォームを利用することによって、前臨床試験において、ヒト免疫細胞およびヒト組織が関わる全身性の反応を解析することができる。さらに、ヒト化マウスプラットフォームによって、有効性試験や用量設定も可能になる。複数のドナー由来の細胞を有するヒト化マウスを使うことによって、開発者は多様性のあるデータセットを得ることができる。そのようなデータを用いて、臨床においてどのようなことが起こるかについて、より総合的かつ正確な予測をすることができるようになる。強固で多様性のある前臨床データは、将来の患者を守るのみならず、投資家にとっても治療薬をより魅力的なものにする。

驚くべきことに、腫瘍免疫学領域におけるすべての治療薬のうち、97%が臨床試験において失敗している。これらの失敗のうち、50%は安全性や有効性の問題によるものであり、20%は資金不足によるものである。

安全性や有効性の問題のために臨床試験が失敗する確率は、コイントスの確率と同じではない。CRS評価試験によって、臨床試験の成功率を飛躍的に上昇させることができる。治療薬開発過程のかなり早い段階におけるCRS評価試験によって得られるデータは、患者の総合的な反応をより臨床的に示す。

In vivo CRS 評価試験と他の方法の比較

薬剤試験のレパートリーに他の方法を追加することの正当性を証明することはむずかしいと思われる。しかし、in vivo CRS 評価試験に投資することによって、前臨床試験の段階において得られる情報量は飛躍的に増大する。

In vitro 試験の限界を超える

In vitro サイトカイン放出試験は、T 細胞、B 細胞、ならびにナチュラルキラー細胞を含むヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を被験物質とともに培養することによっておこなう。科学者は、この試験によって、細胞毒性、サイトカイン産生、がん細胞に対する標的効果などのアウトカムを測定することができる。このタイプの試験は、比較的費用がかからず、また効果的である。In vitro サイトカイン放出試験は、治療薬開発のための候補薬評価段階においてとくに有用である。

しかし、CRS は本質的にはカスケード反応であり、最初の原因物質に直接接触した末梢血をはるかに超えた影響を及ぼす。したがって、in vitro の閉鎖系において、総合的に CRS をモデル化することは不可能である。さらに、これまでの研究によると、in vitro 試験の結果は薬剤の作用機序に大きく依存しており、偽陰性や偽陽性を示す可能性があることが示されている。たとえば、TGN1412 モノクローナル抗体の in vitro 試験においては、偽陰性の結果が得られており、臨床試験の参加者を危険に陥れた強い CRS 反応を予測することができなかった (Grimaldi, 2016)。

CRS 評価試験によって、臨床試験の成功率を飛躍的に上昇させることができる。治療薬開発過程のかなり早い段階における CRS 評価試験によって得られるデータは、患者の総合的な反応をより臨床的に示す。

In vivo CRS 評価試験はどのようなしくみのだろうか？

科学者は、現在では、放射線照射した免疫不全マウスに成人の PBMC を移植することによって、「ヒト化された」免疫系をもつマウスを作製することができるようになった。このヒト化マウスは、新しい治療薬にヒトの免疫系がどのように反応するかを研究するために、最適なプラットフォームを提供する。わずか 6 日間で、移植された免疫系が確立し、研究者は被験物質を注射することができる。

被験物質の注射をした後数時間の間、科学者はマウスにおいて CRS をモニターすることができる。その後さらに 1 ~ 7 日間、体重および体温を測定し、定期的にヒトサイトカインを定量し、フローサイトメトリーやその他の測定をおこなう。また、ヒト化マウスに腫瘍を移植することによって、CRS の評価とともに、がん細胞に対する標的効果も同時に調べることができる。さらに、血清分析や組織検査により、器官に浸潤している細胞や器官毒性といったアウトカムについても併せて調べることができる。このような身体的尺度や客観的尺度を総合的な累積臨床スコアや生存曲線と併用することによって、個体全体の健康や安全性を理解することができる。このようにして、in vivo CRS 評価試験は、生理学的状態の全体像を提供する。すなわち、この試験においては、ヒトの免疫細胞がマウス体内を循環しながら、マウスの血管系や器官と相互作用をしているのである。

はるかに再現性のあるトランスレーショナルデータが得られることに加えて、in vivo CRS 評価試験は、in vitro の評価試験にくらべて、より高品質のデータを提供する。これらの評価試験を直接比較すると、薬剤の作用機序にかかわらず、in vivo CRS 評価試験は、より再現性のある、臨床に直結した結果を提供した (Ye, 2020)。

また、in vitro の評価試験においては、安全性に関する重要な現象（たとえば、移植片対宿主病 (GVHD) と下流の器官への影響の区別）についてのデータを得ることができない。このような重要な現象を調べるためには、器官全体ならびに複数の器官系のあいだにおける相互作用を観察しなければならない。ヒト化マウスプラットフォームにおいては、このような全身性の影響を正確にモデル化することができる。

	JAX in vivo 評価試験	他の in vitro 評価試験
毒性	✓	✓
有効性	✓	✓
最適用量設定	✓	—
二重特異性抗体の影響	✓	—
下流器官への影響	✓	—
GVHD の区別	✓	—
臨床に直結した明確な集団応答	✓	—

ヒト以外の霊長類を用いた試験への依存度を減少させる

ヒト以外の霊長類を用いた試験は、しばしば、前臨床の安全性試験および有効性試験のゴールドスタンダードとして支持されている。歴史的には、ヒト以外の霊長類は、ヒトにおける生理機能や疾病の進展を緊密に模倣する動物モデルであった。ヒト以外の霊長類を用いた試験は貴重な情報をもたらすものの、きわめて費用と時間のかかる試験であり、また深刻な倫理的懸念をひき起こす。

ヒト化マウスを作出できるようになったので、もはやヒト以外の霊長類がヒト免疫系機能を完全に模倣することができる最も忠実なモデルであると想定することはできなくなった。TGN1412 を用いたその後の研究によって、観察された CRS 反応は、ヒト CD4+ エフェクター記憶 T 細胞におけるユニークな種特異的 CD28 発現と明確に関連していることが結論づけられた。このレセプターは、これまで前臨床試験において使用されたいかなる種の同等の免疫細胞においても発現していなかった。そのため、CRS のリスクを検出することができなかったのだ (Eastwood, 2010)。ヒト化マウスを使うことによって、治療薬を臨床に応用する前に、ヒトに特異的な免疫学的な不測のできごとが起こる可能性を評価することができるようになるだろう。したがって、薬剤開発におけるリスクが取り除かれ、薬剤開発の過程において、将来への投資が有効に使われることを確信することができる。

In vivo CRS 評価試験を最適化する

ヒト化マウスという新たなプラットフォームを自由に使うことができるようになったので、これまでの in vitro 評価試験やヒト以外の霊長類モデルを使って得られたデータのみにこだわる必要はなくなる。臨床試験の早期の段階において、さまざまな評価方法の可能性を探索することによって、さらに安全で有効な治療薬を患者に提供することができるようになるだろう。

有望なリード候補薬を早期に同定し最適化する

臨床試験は、一連の相が進展するにしたがって、より大規模、より複雑になり、費用もさらに必要になる。In vivo CRS 評価試験を利用すれば、許容しがたい CRS のリスクをひき起こす薬剤は「早く除外する」ことができ、したがって、臨床試験に参加している人たちの危険を避けたり、資源を無駄に使うことを避けたりすることができる。同時に、同じヒト化マウスプラットフォームに腫瘍を移植することによって、薬剤の有効性を比較することができる。したがって、ひとりのドナー由来の PMBC を使うことによって、腫瘍の退縮のみならず、どのような薬剤がどの程度の用量において最小の毒性を示すかということを最適化することができる。このようにして、戦略的に最も有望なリード候補薬に投資することができるようになるであろう。また、用量設定により大きな確信をもって、候補薬を臨床試験に使うことができるであろう（図 1）。

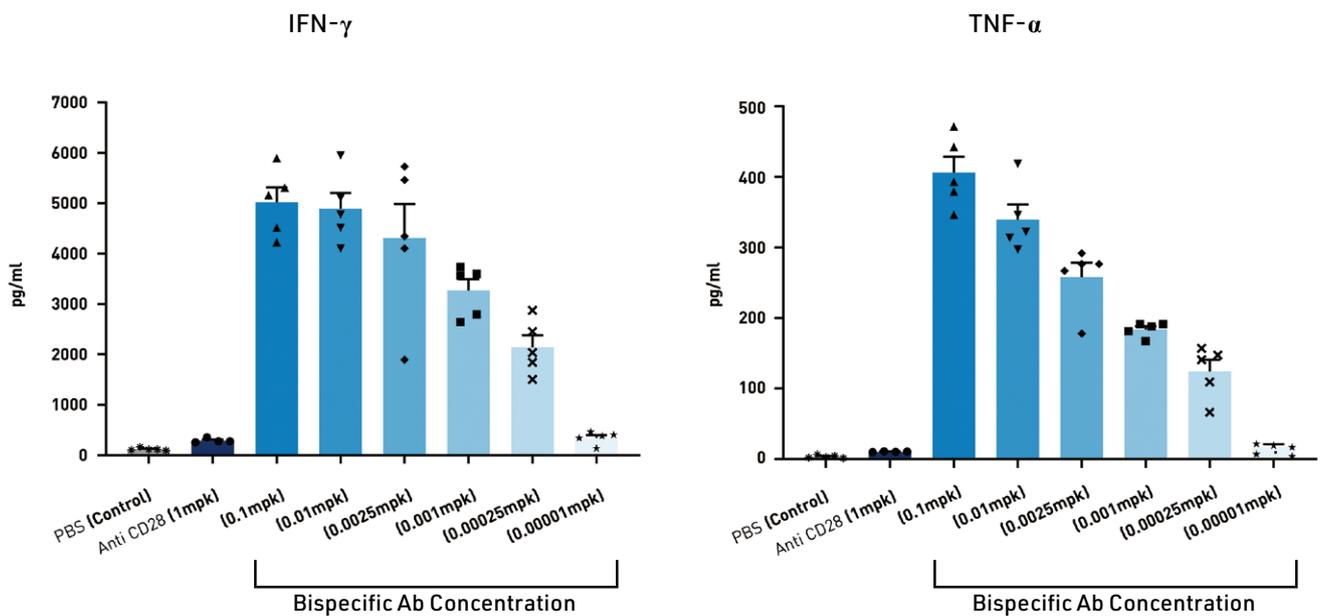


図 1

図は、マウスを使用した二重特異性抗体薬の用量設定試験を示す。すべてのマウスは、同一の PMBC ドナーの細胞を用いてヒト化された。マウスには、Raji パーキットリンパ腫細胞も移植された。本試験においては、それぞれ異なる用量において、処置後 6 時間におけるサイトカイン（IFN- γ および TNF- α ）産生量を測定した。PBS は陰性対照である。抗 CD28 抗体はモノクローナル抗体である。

多様な臨床ポピュレーションにおける安全性と有効性を予測する

臨床試験を実施する多くの会社は、多様性をとても重視している。それは、もっともなことである。ある治療を公正に利用するための唯一の方法は、一般集団の代表を包括する研究コホートにおいて試験を実施することを保証することである。個体が異なれば、同じ薬剤を同じ用量で投与しても、きわめて異なる反応を示すことがある。それは、CRS においてもまったく同様である。

In vivo CRS 評価試験の有効性確認研究において、PBMC ドナー特異的サイトカイン放出の有意な相違が再現性をもって示された (図 2) (Ye, 2020)。ふたりの PBMC ドナーが根本的に異なるサイトカイン放出反応を示す場合は、このふたりのドナーの生物学的プロファイルと比較することにより、CRS のリスクを高める可能性のある要因を同定することができる。このような研究により、たとえば、CRS の高リスク患者を臨床試験に参加させないための指針を得ることができる。

より総合的な臨床試験データが得られるのみならず、in vivo CRS 評価試験は、将来、治療法の選択のための精密医療を支えることになるであろう。医師は、ある患者の治療をおこなう前に、当該患者の PBMC を用いて in vivo CRS 評価試験をおこなうことによって、ある薬剤 (または複数の薬剤の組み合わせ) がその患者において安全であるか、あるいは有効であるかを個別に予測することができる。

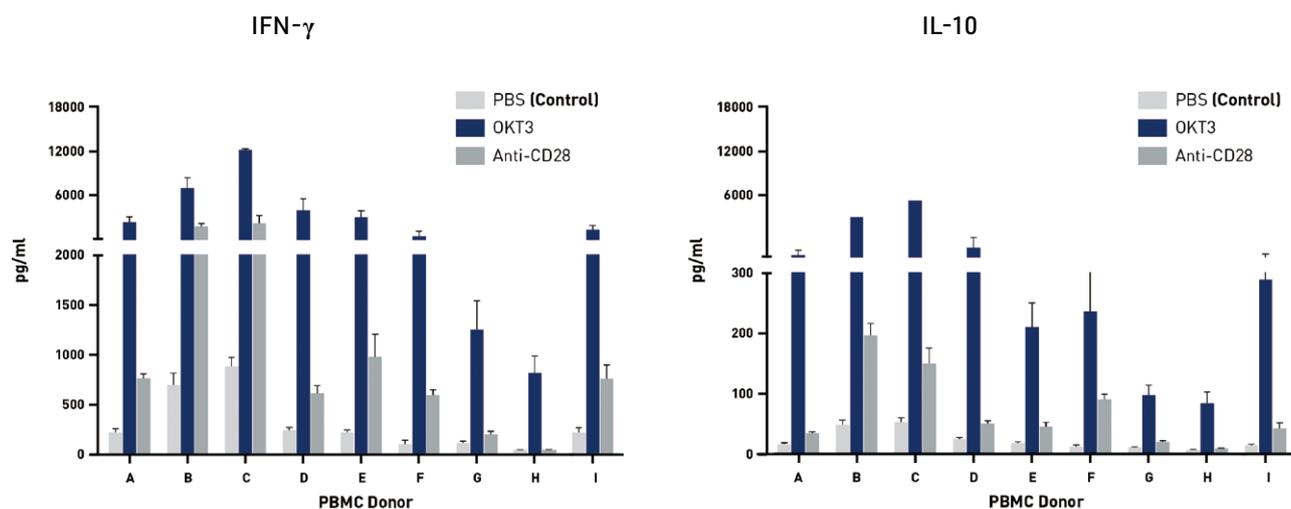


図 2

図は、異なる PBMC ドナー (A-I) 由来のヒト化マウスにおけるサイトカイン放出レベルを示す。PBS は陰性対照である。OKT3 (抗 CD3) および抗 CD28 は、モノクローナル抗体薬である。測定したすべてのサイトカイン (IFN- γ 、IL10、IL6、IL2、IL4、および TNF- α) において、ドナー特異的サイトカイン濃度の相違がみられた。詳細なデータについては、文献 (Ye et al., 2020) を参照されたい。

現在 in vivo CRS 評価試験によって最も大きな恩恵を受けているのはどのようなモダリティであろうか？

多種類の薬剤が CRS を引き起こすことがあるが、なかでも、直接に免疫系に影響を及ぼす薬剤が明らかにこの危険な現象（CRS）に関連している。研究者やバイオ医薬品業界の専門家は、基本的に、一般的なモノクローナル抗体が安全であることを十分に理解している。それとは対照的に、二重特異性抗体や細胞療法といった新たなモダリティの安全性を予測するのは、現時点においては、よりむずかしい。その結果、患者はより高いリスクにさらされることになるので、規制当局によるより厳しい検査が必要になる。In vivo CRS 評価試験によって、このような新たなモダリティを臨床に応用したときの薬剤の挙動をより深く理解することができるようになる。また、用量設定を微調整することができるようになるので、最終的には、規制当局への提出書類をより強固なものにすることができる。

二重特異性抗体

二重特異性モノクローナル抗体（単に二重特異性抗体とよばれることが多い）は、2つの特異抗原または1つの抗原の異なる2つのエピトープ（抗原決定基）に同時に結合するように設計されている。この二股療法は、安全性および有効性という観点から、福音にもなり得るし、あるいは災いにもなり得る。このタンパク質（二重特異性抗体）は、二重のレセプターをもつことにより、さまざまな方法で免疫系ががん闘争を可能にする。他方、二重特異性抗体は、標的以外に結合する可能性も2倍になるので、健康な組織に傷害を与える可能性がある。この事実、生体内分布、器官系の相互作用、ならびにサイトカイン放出刺激—このような事象は、in vitro においては一度に調べることはできない—に関して、二重特異性抗体の安全性プロファイルをより複雑なものにする。

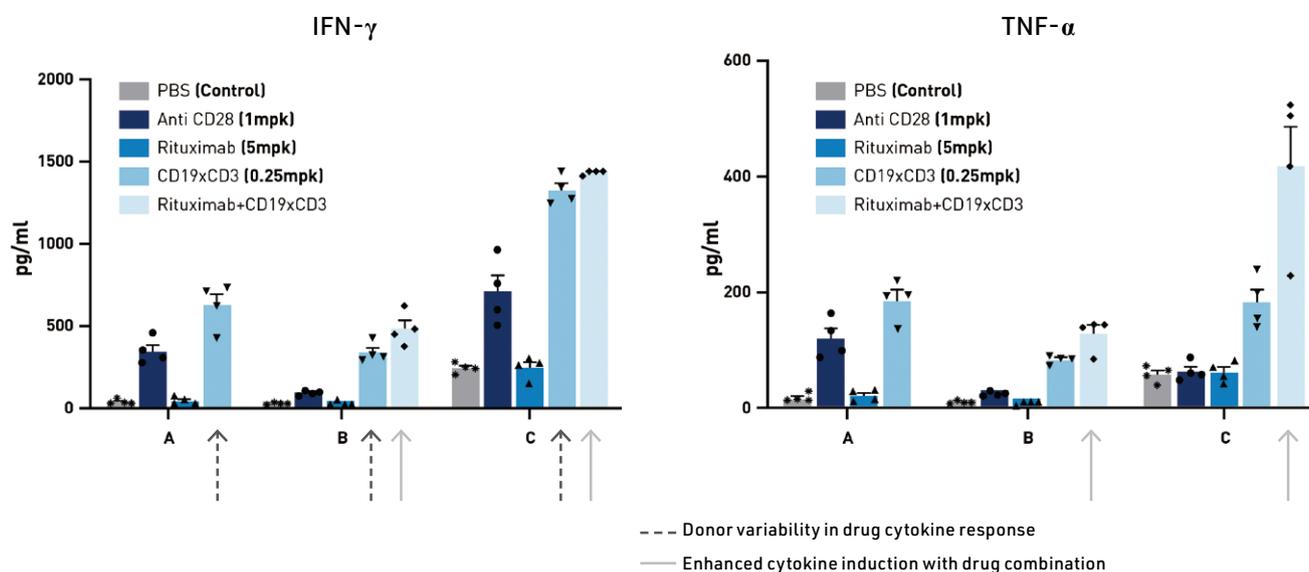


図3

図は、3人の異なるPBMCドナー（A、B、& C）由来のヒト化マウスにおけるサイトカイン放出の程度を示す。マウスには、Rajiバーキットリンパ腫細胞も移植された。PBSは陰性対照である。抗CD28およびRituximabはモノクローナル抗体薬である。CD19xCD3は二重特異性抗体薬である。ドナー特異的サイトカイン濃度における有意な相違がみられた（破線矢印）。また、Rituximabと二重特異性抗体薬を組み合わせると、IFN- γ およびTNF- α の濃度が上昇することも示された（実線矢印）。

また、in vivo CRS 評価試験を利用することによって、二重特異性抗体薬が引き起こすサイトカイン反応に関するドナーによる相違を、前臨床試験において調べることが可能になる。このような評価は、ヒトを用いた試験以外において予測することはむずかしいであろう。同様に、研究者は、複数の薬剤を組み合わせることによってサイトカイン反応が増強するか減弱するかに焦点を合わせて、薬剤の相互作用を調べることもできる（図3）。前述したように、このような複数の薬剤を用いた研究によって、従来の動物実験にくらべて、はるかに再現性のあるトランスレーショナルデータが得られる。なぜなら、ヒト化マウスプラットフォームを利用することにより、ヒト免疫細胞—サイトカイン誘導に影響を及ぼすと考えられる—の多くのユニークな特性を正確にモデル化することができるからである。

CAR T 細胞療法

自己 CAR T 細胞療法においては、患者から T 細胞を採取し、ウイルスベクターを使って遺伝子操作をおこない、その T 細胞にキメラ抗原レセプター（CAR）タンパク質を発現させる。作製された CAR T 細胞を患者に注射すると、CAR T 細胞は、がん細胞を見つけて破壊する。この免疫療法は、さまざまな種類のがん（急性白血病、リンパ腫、いくつかの固形腫瘍などを含む）の治療において、大いに期待できる治療法である。

しかし、CAR T 細胞療法においては、直接患者自身の免疫細胞が改変され、そして改変された CAR T 細胞は、きわめて効率よく多くの抗原発現標的細胞を殺滅するため、当初から、CAR T 細胞療法にはとくに CRS 発症の懸念があった。リンパ腫患者の 37～93 パーセント、そして白血病患者の 77～93 パーセントが CAR T 細胞療法後に CRS を発症している。CAR T 細胞療法の初期の治験に参加した患者のうち、およそ 50 パーセントの患者が ICU（集中治療室）での治療を必要とした（Santomasso, 2019）。In vivo CRS 評価試験を利用すれば、改変したヒト CAR T 細胞、その標的細胞、産生されるサイトカインの量の全身性の関連を観察することができるので、総合的な毒性をより深く理解することができる。得られた結果は、CAR T 細胞療法の治験における CRS のリスクを最小化するために必要な情報を与える。またさらに、このような研究によって CRS に関する理解が深まり、患者に毒性がみられた場合に、医療専門家がより適切に CRS に介入することができるようになるであろう。

結論

In vivo CRS 評価試験は、有効な治療を最も必要とする患者に、当該治療のリスクを取り除いて、迅速に提供することを可能にするであろう。薬剤開発企業が臨床に危険な薬物を持ち込むことを防ぐのみならず、ボトルネックを回避したり、最終製品を最適化したり、上市したりするために、資源を有望な候補薬に有効に投入することができる。

In vivo CRS 評価試験は、当初、免疫調節療法を試験するために最もよく利用されていたが、このヒト化マウスプラットフォームは、きわめて広範囲にわたる応用の可能性をもっている。たとえば、ある種の感染症に罹患した後の CRS の発症のしやすさについての基本的な生物学的相違に関する知識をもたらす。今日の研究者は、CRS の評価プラスアルファに関する明日の可能性を解明するための不可欠な要素となっている。ヒト化マウスプラットフォームを自由に使うことができるようになった今、ともに向上していこうではないか。

参考文献

- Eastwood, D., Findlay, L., Poole, S., Bird, C., Wadhwa, M., Moore, M., Burns, C., Thorpe, R., & Stebbings, R. (2010, October). *Monoclonal antibody TGN1412 trial failure explained by species differences in CD28 expression on CD4+ effector memory T-cells*. *British Journal of Pharmacology*, 161(3), 512–526. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2990151/>
- Fogel, D. B. (2018, August 7). *Factors associated with clinical trials that fail and opportunities for improving the likelihood of success: A review*. *Contemporary clinical trials communications*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6092479/>.
- Grimaldi, C., Finco, D., Fort, M. M., Gliddon, D., Harper, K., Helms, W. S., Mitchell, J. A., O'Lone, R., Parish, S. T., Piche, M.-S., Reed, D. M., Reichmann, G., Ryan, P. C., Stebbings, R., & Walker, M. (2016, September). *Cytokine release: A workshop proceedings on the state-of-the-science, current challenges and Future Directions*. *Cytokine*, 85, 101–108. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S104346661630134X>
- Santomasso, B., Bachier, C., Westin, J., Rezvani, K., & Shpall, E. J. (2019, May 17). *The other side of CAR T-cell therapy: Cytokine release syndrome, neurologic toxicity, and financial burden*. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, (39), 433–444. https://ascopubs.org/doi/full/10.1200/EDBK_238691
- Ye, C., Yang, H., Cheng, M., Shultz, L. D., Greiner, D. L., Brehm, M. A., & Keck, J. G. (2020, August 9). *A rapid, sensitive, and reproducible in vivo PBMC humanized murine model for determining therapeutic-related cytokine release syndrome*. *The FASEB Journal*, 34(9), 12963–12975. <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fj.202001203R>

JAX® Mice, Clinical & Research Services

The Jackson Laboratory

Maine | Connecticut | California | Japan | China

ask@jax.or.jp

www.jax.or.jp

WPJ21-01A

