

論文要旨

Effectiveness of Anti-Folate Receptor β Antibody Conjugated With Truncated *Pseudomonas* Exotoxin in the Targeting of Rheumatoid Arthritis Synovial Macrophages

(関節リウマチ滑膜マクロファージを標的とした抗葉酸リセプター β 抗体遺伝子改変緑膿菌外毒素の有効性)

永吉隆作

[背景]

関節リウマチ (RA) は人口の 1%前後が罹患する難治の慢性炎症性疾患である。その病因は不明であるが、近年抗 TNF- α 抗体や可溶性 TNF- α 受容体が著明な治療効果を示すことより、主な TNF- α 産生細胞である滑膜マクロファージが病態の中心であることがわかってきた。本研究者はこれまで炎症性マクロファージに葉酸リセプター β が特異的に発現していることや関節リウマチ治療のゴールドスタンダードであるメトトレキサートは葉酸リセプター β を介して RA 滑膜マクロファージに作用すること、葉酸リセプターを介して細胞内に取り込まれる葉酸拮抗剤 LY309887 は関節炎モデルマウスの治療に有効なことを報告してきた。本研究では、RA 滑膜マクロファージ特異的な細胞傷害を誘導する薬剤として葉酸リセプター β に特異的な単クローン抗体に緑膿菌外毒素を結合させたイムノトキシンを作成し、このイムノトキシンの RA 滑膜マクロファージへの作用効果について検討した。

[材料と方法]

抗葉酸リセプター β 単クローン抗体の作成：ヒト葉酸リセプター β 遺伝子を導入したマウス BALB/C B細胞株を抗原としてマウス BALB/Cに免疫し、その脾臓B細胞と NS-1細胞の融合をおこなった。葉酸リセプター β 発現B細胞株と融合細胞上清を反応させることにより、抗体産生細胞をスクリーニングした。

葉酸リセプター β 発現細胞の組織局在の検討：RA滑膜、肝臓、腎臓、肺臓、皮膚、小腸、リンパ節の凍結切片を作成し、抗CD163抗体と抗葉酸リセプター β 抗体を用いた2重染色により発現細胞の分布を検討した。

葉酸リセプター β 発現マクロファージの作成：アデノウイルス由来のコスミドベクターにヒト葉酸リセプター β 遺伝子を組み込み、DNA-TPとL293細胞に遺伝子導入して組換えアデノウイルスをえた。このアデノウイルスを健常人から得た単球・マクロファージに感染させ、葉酸リセプター β 発現細胞を得た。

遺伝子改変緑膿菌外毒素 (PE) の作成：細胞表面結合ドメインを欠如させた緑膿菌遺伝子を BL21 (DE3) 大腸菌にトランスフェクトし、ペリプラスム分画から PE を得た。

イムノトキシンの作成：プロテインGで精製した抗葉酸リセプター β 抗体とサクシニミジルトランス-4-マレイミジルメチシクロヘキサン1-カルボキシレート (SMCC) とのカップリング、PEとサクシニミジル3-2-ピリジルジチオプロピオナート (SPDP) とのカップリングをおこなった後、抗体-SMCCとPE-SPDPの化学的結合をおこなった。さらに、陰イオン交換樹脂 (POROS HQ) と分子サイズ排除クロマトグラフィ (TSK3000SW) をもちいてイムノトキシンを精製した。

イムノトキシンの効果：遺伝子導入B細胞株、遺伝子導入マクロファージ、RA患者の膝関節置換術時に得られたマクロファージ、肺癌患者の肺切除時得られた正常肺組織のマクロファージをもちいた培養系において、イムノトキシン添加時のアポトーシス細胞数やTNF- α 産生を測定した。

[結果]

- 1 2種の抗ヒト葉酸リセプター β 単クローン抗体(IgG1, IgG2a)が得られた。これらの抗体は葉酸リセプター α には反応せず、葉酸リセプター β 特異的抗体であることが示された。
- 2 葉酸リセプター β 発現細胞は末梢血には存在しなかった。組織において、葉酸リセプター β 発現細胞の多くは組織マクロファージ特異的マーカーであるCD163を発現していた。
- 3 作成したイムノトキシンは遺伝子導入B細胞株、遺伝子導入マクロファージ、RA滑膜マクロファージ、肺組織のマクロファージのアポトーシスを誘導した。RA滑膜マクロファージは肺組織のマクロファージに比較して、イムノトキシンへの感受性が高かった。
- 4 イムノトキシンはRA滑膜マクロファージが産生するTNF- α を著明に抑制した。

[考察]

抗ヒト葉酸リセプター β 単クローン抗体を用いた免疫組織学的検討により、各種臓器における葉酸リセプター β 発現細胞の同定が可能であったので、この抗体は各種疾患における炎症性マクロファージの同定に役立つと考えられる。

現在承認されている生物学的製剤は、多量な投与を必要とするため高価である点や個々のサイトカインの中和能が主で、多彩なサイトカインを産生する活性化マクロファージの除去能については不十分である等の問題点がある。本イムノトキシンを使用する治療法が既存の生物学的製剤に比べて優れた点として、低濃度で作用するため少量の投与で効果が得られることや葉酸リセプター β 発現細胞は末梢血には存在せず組織炎症マクロファージのみに存在することから、炎症性マクロファージに特異的な傷害能が期待できることが挙げられる。

(Arthritis & Rheumatism 2005年掲載)

論文審査の要旨

報告番号	医研第 606 号	氏名	永吉 隆作
審査委員	主査	宮田 篤郎	
	副査	河野 嘉文	鄭 忠和

Effectiveness of Anti-Folate Receptor β Antibody Conjugated With Truncated *Pseudomonas* Exotoxin in the Targeting of Rheumatoid Arthritis Synovial Macrophages

(関節リウマチ滑膜マクロファージを標的とした抗葉酸リセプター β 抗体
遺伝子改変緑膿菌外毒素の有効性)

関節リウマチ(RA)は難治性の慢性炎症性疾患でその原因は不明であるが、滑膜マクロファージはその病態の中心であると考えられている。近年、RA 滑膜マクロファージに葉酸リセプターベータ (FR β) が高発現していることが遺伝子レベルで報告された。今回の研究では、作製した FR β に対するモノクローナル抗体にて RA 滑膜を含む各組織での FR β の発現を検索し、さらにその抗体に緑膿菌外毒素を結合させたイムノトキシンの RA 滑膜マクロファージに対する作用効果を確認することを目的としている。

本研究では、ヒト FR β 遺伝子導入マウス B 細胞株を抗原としてマウスを免疫し、FR β に対するモノクローナル抗体産生細胞を得た。得られた抗 FR β モノクローナル抗体と抗 CD163 抗体を用いて、RA 滑膜、肝臓、腎臓、肺臓、皮膚、小腸、リンパ節における FR β の発現を免疫組織化学的に検討した。

さらに抗 FR β モノクローナル抗体と遺伝子改変緑膿菌外毒素を化学的に結合させたイムノトキシンを作製し、このイムノトキシンによる遺伝子導入マウス B 細胞株、遺伝子導入マクロファージ、RA 患者より採取した滑膜マクロファージに対する効果を、アポトーシス細胞数や TNF- α 産生などを測定し評価した。

本研究で得られた新知見は次の 3 点である。

1. FR β に特異的なモノクローナル抗体を作製した。
2. 組織における FR β 発現細胞の多くは、CD163 陽性細胞であった。
3. 作製された抗 FR β イムノトキシンは、遺伝子導入マウス B 細胞株、遺伝子導入マクロファージ、RA 患者より採取した滑膜マクロファージに対してアポトーシスを誘導し、また TNF- α 産生を抑制した。

以上により、RA 滑膜マクロファージに高発現している FR β を標的とした抗体療法の RA 治療法としての有用性が証明された。

本研究は、RA 滑膜マクロファージに FR β が高発現していることを明らかにし、さらに本分子を標的とした抗体療法が、RA の新たな治療薬としての可能性を有していることを示した。

よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 606 号	氏名	永吉 隆作
審査委員	主査	宮田 篤郎	
	副査	河野 嘉文	鄭 忠和

主査および副査の3名は、平成17年12月5日、学位請求者 永吉隆作に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

【質問1】 関節リウマチ（以下 RA）では症状の比較的軽い早期 RA のものから、非常に活動性の高いものまで多岐にわたるが、早期 RA 患者での検討は行ったか？

【回答】 今回の研究に使用した RA 滑膜組織は、人工膝関節置換術の手術時に採取した滑膜組織であるため、病期としては比較的進行期にある患者を対象にしている。早期 RA 患者での検討は行っていない。

【質問2】 組織マクロファージ（以下 M ϕ ）は分裂能を有しているのか？

【回答】 分裂能は有していない。

【質問3】 抗葉酸レセプターベータ（以下 FR β ）抗体毒素による、RA の M ϕ に対する細胞傷害作用はどのような機序によるものか？

【回答】 RA 滑膜 M ϕ の細胞膜表面に発現している FR β に抗 FR β 抗体毒素が結合すると、endocytosis の形で細胞内に取り込まれる。取り込まれた抗 FR β 抗体毒素は、細胞質内において抗体と毒素とに分かれる。毒素は ribosome におけるペプチド伸長過程で、elongation factor 2 を ADP リボシル化することによって不活化シタンパク合成を阻害する。これによりアポトーシスが誘導されると考えられる。

【質問4】 実際に抗 FR β 抗体毒素が臨床に応用された際、どのような投与方法が適切と考えるか？

【回答】 皮下注射や静脈注射などのように、実際の臨床においてはできるだけ簡単に投与できる方法が望ましいと考えるが、全身に対する副作用の危険性を考慮すると、最初は関節腔内投与といった局所への投与で生体への影響を調べる必要があると考える。

【質問5】 抗 FR β 抗体毒素の副作用としてはどのようなものが考えられるか？

【回答】 現在使用されている抗 TNF- α 抗体などの生物学的製剤と同様に、発熱やほてりなどのような症状の発現が予想される。また作製した抗 FR β 抗体毒素はマウス由来の異種タンパクを含むことから、これらに対する中和抗体の発現の可能性と効果の減弱なども懸念される。

【質問6】 RA 以外で抗 FR β 抗体毒素が有用であると考えられる疾患にはどのようなものがあるか？

【回答】 急性骨髄性白血病の中には、FR β を強く発現しているタイプがあることが知られている。このような白血病にも有用ではないかと考え、現在研究を行っている。

【質問7】 一度の手術で得られる滑膜組織から研究を行うに足りる十分な量の細胞は得られるのか？

【回答】 RA では滑膜組織の増生が特徴的であるため、一度の手術でも十分な量の滑膜細胞が得られる。

【質問8】 滑膜組織から M ϕ を分離する際の操作などによって、M ϕ の形質に変化が生じてしまう可能性はないか？

【回答】 M ϕ を分離する過程の種々の操作によって、M ϕ が活性化される可能性は完全に否定はできないが、われわれは最も標準的な protocol にしたがって M ϕ を分離しているため、結果を大きく左右するほどの影響は受けないと考えている。

【質問9】 monocyte を M-CSF で刺激する際の M-CSF の濃度は 10ng/ml で問題ないか？

【回答】 問題ないと考えている。

【質問10】 RA 滑膜 M ϕ における FR β の発現は、臨床症状と相関するのか？

【回答】その検討は行っていない。しかし免疫組織染色の結果、FR β を発現している細胞は滑膜に浸潤した急性期の炎症性M ϕ であったことから、RAの活動性とFR β の発現には相関がみられるのではないかと考えている。

【質問 11】M ϕ のマーカーであるCD14とCD163の違いは何か？

【回答】CD14は末梢血のmonocyteも含んだすべてのM ϕ のマーカーである。一方、CD163は組織マクロファージのマーカーである。

【質問 12】Figure 6で、抗FR β 抗体毒素はRA滑膜細胞に対して約25%しかアポトーシスを誘導していないが、これは臨床的効果を有するに十分な値であると考えるか？

【回答】RA滑膜組織におけるM ϕ の割合は約40%程度である。またそのM ϕ の約半数弱には、TNF- α の刺激などによってすでにアポトーシスが誘導されている。本研究における25%という数値は、これらの細胞を除いた残りのほぼすべてのM ϕ である。よって臨床的にも十分な効果が期待できると考える。

【質問 13】2種類の抗FR β モノクローナル抗体が得られているが、抗体毒素の作製は1種類しか行わなかったのか？

【回答】当初IgG1型のモノクローナル抗体を用いて抗体毒素作製を行ったが、毒素を結合させることによって抗原との反応性が失われてしまった。このためIgG2a型のモノクローナル抗体で作製した。

【質問 14】recombinant immunotoxinはなぜ低濃度でも効果を有するのか？

【回答】マウス由来のタンパク質成分をできるだけ除去しており分子量が小さいことから、組織や細胞への浸透性が高いことが考えられる。また抗FR β 抗体毒素では、毒素成分が抗体のFv部分にも結合するため、抗原との反応性が失われてしまう可能性があるが、recombinant immunotoxinの場合にはその可能性が全くないために、低濃度でも効果を有していると考えられる。

【質問 15】抗FR β 抗体毒素の作製に際し、*Pseudomonas*を選択した理由は何か？

【回答】共同研究者による毒素の入手が容易であったため、*Pseudomonas*を選択した。

【質問 16】RA滑膜組織からM ϕ を得る際に、fibroblast系の細胞の割合が多くなっているが、M ϕ のpurityを高めるためのセレクションは行わなかったのか？

【回答】fibroblast系の細胞を排除するためのnegative selectionの方法が、まだ確立されていないため行わなかった。

【質問 17】肺や肝臓などのRA滑膜組織以外の組織におけるFR β の発現は低いということであるが、実際にはどの程度のものであったのか？

【回答】免疫組織学的検討で、CD163陽性細胞に比して、陽性細胞が少ないことや染色性が弱い結果が得られた。実際、論文で示したように肺組織M ϕ はRA滑膜M ϕ に比べて抗体毒素に抵抗性があった。

【質問 18】Figure 5のアデノウイルスでFR β を発現させたM ϕ に対する抗FR β 抗体毒素の効果を調べる実験において、抗体毒素の濃度が1.0 μ g/mlのほうが5.0 μ g/mlよりもアポトーシス誘導が高かったのはなぜか？

【回答】高濃度の抗体毒素を投与することによって非特異的な細胞内取り込みがみられたために、コントロール群との差が少なくなったものと考えられる。

【質問 19】Figure 6でも上と同様の結果が得られているが、これはなぜか？

【回答】RA滑膜M ϕ においても、高濃度投与することによって非特異的な細胞内取り込みが起こったため、コントロール群との差が少なくなったものと考えられる。

【質問 20】Figure 6のTNF- α 産生を調べた実験においては、何を対照群としたのか？

【回答】結合させていない状態の抗FR β モノクローナル抗体と毒素を等量だけ混ぜたものを対照群とした。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力と識見を十分に具備しているものと判断し、博士（医学）の学位を与えるに足る資格をもつものと認めた。