

## 論 文 要 旨

**Novel Therapy for Atherosclerosis Using Recombinant Immunotoxin Against Folate Receptor  $\beta$ -expressing Macrophages**〔 葉酸レセプター $\beta$ 発現マクロファージを標的とした 〕

新規動脈硬化治療法の研究

古庄 優子

**【序論および目的】** (適宜、項目をたてて、必ず2頁で記載する)

葉酸レセプター $\beta$  (FR $\beta$ ) は、マクロファージの活性化に伴い発現する。慢性関節リウマチなどの炎症性疾患において病変部にFR $\beta$ が発現し、抗FR $\beta$ 抗体に緑膿菌毒素を結合させたリコンビナントイムノトキシン (FR $\beta$  イムノトキシン) が活性化マクロファージを死滅させることが報告されている。動脈硬化形成過程において、活性化マクロファージは重要な役割を担っている。しかしながら、動脈硬化病変におけるFR $\beta$ 発現及び、FR $\beta$ をターゲットとしたイムノトキシン治療の効果については未だ検討されていない。本研究の目的は、マウスの動脈硬化病変におけるFR $\beta$ 発現マクロファージの有無、及び動脈硬化モデルマウスにおけるFR $\beta$ イムノトキシンの動脈硬化への効果を検討することである。

**【材料および方法】**

アポ蛋白 E 欠損マウス (ApoE-KO マウス) 大動脈基部の免疫組織化学染色を行い、FR $\beta$ 発現マクロファージの存在について検討した。次に、FR $\beta$ イムノトキシン 0.1mg/kg を15週齢及び35週齢のApoE-KOマウスの尾静脈より3日おきに5回静脈注射し、4週間の観察後、21週齢、41週齢で動脈硬化病変面積を組織学的に定量解析した。同様に、生理食塩水をコントロール群、緑膿菌毒素を注射したものをトキシン群とした。動脈硬化病変面積、FR $\beta$ 発現マクロファージ数、TNF- $\alpha$ 発現マクロファージ数、CD3陽性細胞数、 $\alpha$ -SMC細胞数、FR $\beta$  mRNA、TNF- $\alpha$  mRNA発現量を比較検討した。また、注射終了1週間目に組織のTUNEL染色により、アポトーシス細胞数を評価、PCNA染色を行い、増殖細胞数を評価した。更に、マウスの腹膜マクロファージを用いて、*in vitro*でのFR $\beta$ イムノトキシン機序を検討した。チオグリコール酸によって誘導した腹膜マクロファージに、FR $\beta$ イムノトキシンまたはトキシンを投与し、72時間あるいは96時間培養した。プロピ

ジウム染色を行い、フローサイトメトリーでアポトーシスの割合を比較検討した。

### 【結 果】

ApoE-KO マウス動脈硬化病変においてFR $\beta$  発現マクロファージが認められた。FR $\beta$  イムノトキシン群はコントロール群、トキシン群と比較し、15週齢、35週齢ともに動脈硬化面積が有意に減少した。また、15週齢、35週齢における免疫組織化学染色評価で、イムノトキシン群はコントロール群、トキシン群と比較し、FR $\beta$  発現マクロファージ数、CD68 発現マクロファージ、TNF- $\alpha$  発現マクロファージ数が有意に低下した。同様に大動脈のFR $\beta$  mRNA、TNF- $\alpha$  mRNA 発現量も有意に減少した。注射終了1週間後の免疫組織化学染色で、15週齢、35週齢においてTUNEL陽性細胞数は増加し、PCNA陽性細胞数は減少していた。腹膜マクロファージにおいては、培養72時間後、96時間後ともにイムノトキシン群で有意にアポトーシス細胞数の増加が認められた。

### 【結論及び考察】

本研究において、動脈硬化病変にFR $\beta$  陽性マクロファージが存在すること、及びFR $\beta$  イムノトキシンを用い、活性化マクロファージを標的として特異的に死滅させることで、早期及び進行した動脈硬化病変を有意に縮小させることが示された。FR $\beta$  陽性マクロファージは活性化マクロファージのみに発現し、正常な組織には発現しない。FR $\beta$  イムノトキシンにより、活性化したマクロファージのみ選択的にターゲットとすることで、炎症に関わっているマクロファージのみを死滅させ、動脈硬化を抑制したと考えられた。

本研究において、FR $\beta$  イムノトキシンが動脈硬化巣を抑制することが示されたが、トキシンによる非特異的な肝毒性や免疫原性の問題もあり、臨床応用に向けて今後さらなる検証が必要である。

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 208 号	学位申請者	古庄 優子
審査委員	主査	橋口 照人	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	小賤 健一郎	副査 西尾 善彦
	副査	谷本 昭英	副査 竹中 俊宏

### Novel Therapy for Atherosclerosis Using Recombinant Immunotoxin Against Folate Receptor $\beta$ -expressing Macrophages

(葉酸レセプター $\beta$  発現マクロファージを標的とした新規動脈硬化治療法の研究)

動脈硬化は慢性炎症性疾患であり、動脈硬化巣の形成において、活性化マクロファージは重要な役割を果たしている。葉酸レセプター $\beta$  (以下 FR $\beta$ ) は、関節リウマチなどの炎症性疾患において活性化マクロファージに高発現しており、抗 FR $\beta$  モノクローナル抗体に緑膿菌外毒素を結合させた抗 FR $\beta$  イムノトキシンが、滑膜活性化マクロファージのアポトーシスを誘導したことが報告されている。そこで学位申請者らは、抗 FR $\beta$  イムノトキシンを動脈硬化動物モデルであるアポリポプロテイン E 欠損マウス (以下 ApoE KO マウス) に投与し、動脈硬化病変に対する抗 FR $\beta$  イムノトキシンの効果を検討した。その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) チオグリコレート投与後、ApoE KO マウス腹膜マクロファージのうち 96% が FR $\beta$  を発現しており、抗 FR $\beta$  イムノトキシン投与により腹膜マクロファージのアポトーシスが誘導された。
- 2) 泡沫細胞における FR $\beta$  発現マクロファージの割合は、21 週齢において 91%、35 週齢において 69% であった。
- 3) 21 週齢の蛍光二重免疫染色において、FR $\beta$  発現細胞はマクロファージと共発現していたが、平滑筋細胞、内皮細胞、T リンパ球との共発現は認められなかった。
- 4) 動脈硬化病変は、FR $\beta$  イムノトキシン投与により、21 週齢で 31%、41 週齢で 22% 減少した。
- 5) FR $\beta$  イムノトキシン投与により、21 週齢、41 週齢の動脈硬化巣の CD68 発現細胞、FR $\beta$  発現細胞、TNF- $\alpha$  発現細胞は有意に減少した。平滑筋細胞、内皮細胞、T リンパ球は減少しなかった。
- 6) FR $\beta$  イムノトキシン投与により、18 週齢、37 週齢ともにアポトーシス細胞が増加、増殖細胞数は減少した。
- 7) FR $\beta$  イムノトキシン投与により、21 週齢群、41 週齢群ともに大動脈の FR $\beta$  mRNA, TNF- $\alpha$  は減少した。

本研究は、動脈硬化病変における FR $\beta$  発現マクロファージの発現と、その選択的除去による効果を検討したものである。抗 FR $\beta$  イムノトキシン投与により、活性化マクロファージにアポトーシスを誘導し、その結果、活性化マクロファージ、炎症性サイトカインの減少を通じて動脈硬化の進展を抑制したことを示した点で非常に興味深い。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	総研第、208号		学位申請者	古庄 優子
審査委員	主査	橋口 照人	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	小賤 健一郎	副査	西尾 善彦
	副査	谷本 昭英	副査	竹中 俊宏

主査および副査の5名は、平成24年8月28日、学位申請者古庄優子君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、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できる回答を得た。

質問1) FR $\beta$ の特異性について、腹膜マクロファージ以外でFR $\beta$ 発現マクロファージの検討はされていますか。

(回答) 免疫組織化学染色では、脾臓のTingible body マクロファージ、肝のKupffer細胞、心臓のマクロファージ、大腸の粘膜固有層のマクロファージにFR $\beta$ 陽性細胞が認められています。

質問2) 抗FR $\beta$ イムノトキシンの肝毒性はKupffer細胞の障害によるものですか。

(回答) 臨床試験で生じた肝毒性は、肝のKupffer細胞による非特異的な障害によるものと考えられています。

質問3) 樹状細胞にFR $\beta$ は発現していますか。

(回答) 樹状細胞にはFR $\beta$ の発現を認めません。

質問4) FR $\beta$ が発現するメカニズムはわかっていますか。

(回答) 活性化マクロファージでFR $\beta$ が発現しますが、メカニズムは分かっていません。

質問5) 抗FR $\beta$ イムノトキシンの大動脈のFR $\beta$ やTNF- $\alpha$  mRNA 減少の理由は、細胞数が減ったからですか。

(回答) 動脈硬化病変巣の細胞数減少による影響であると思われます。

質問6) 動脈硬化病変の解析は、en face 法で大動脈全体を評価したほうが良いのではないですか。

(回答) en face 法は大動脈基部病変とよく相関するという報告があるため、aortic sinus で評価を行いました。

質問7) 免疫組織化学染色でCD68細胞を面積で評価していますが、陽性細胞数による評価が良いのではないですか。

(回答) マクロファージ泡沫化の為、個々のCD68細胞を数えるのが困難であったので、面積による評価を行いました。

質問8) ApoE ノックアウト (ApoE KO) マウスにおける、早期と晩期病変をどう定義しましたか。

(回答) FR $\beta$ 陽性マクロファージが観察される15週齢を早期病変、複雑病変が観察される35週齢を晩期病変としました。

質問9) PCNA 染色において、PCNA 陽性となるのはどのような細胞ですか。

(回答) 動脈硬化病変では主にマクロファージと血管平滑筋細胞がPCNA 陽性となります。

質問10) 活性化マクロファージに葉酸レセプターの発現を認めるのはいつ頃からですか。

(回答) 普通食を与えたApoE KO マウスにおいて、葉酸レセプター発現細胞は15週齢より出現します。

質問11) FR $\beta$ 発現マクロファージと、M1、M2マクロファージとの関係はどうですか。

(回答) FR $\beta$ は、関節リウマチにおいてM1マクロファージに発現し、グリオーマなどの腫瘍関連マクロファージにおいてM2マクロファージに発現していると報告されています。動脈硬化病変においては、週齢により組織の環境が変わるため、FR $\beta$ 発現マクロファージとM1、M2マクロファージとの関係は一定ではないと考えられます。

質問12) 流血中の血球にはFR $\beta$ は発現していますか。

(回答) 抗FR $\beta$ ポリクローナル抗体を用いた研究では、好中球にFR $\beta$ 陽性細胞が認められたという報告がありましたが、今回用いた抗FR $\beta$ モノクローナル抗体では、流血中の血球にFR $\beta$ 陽性細胞は認められませんでした。

## 最終試験の結果の要旨

質問 1 3) 抗 FR $\beta$  イムノトキシンの、内臓脂肪組織への効果はありますか。

(回答) 内臓脂肪組織への効果は検討していません。内臓脂肪組織には M1 マクロファージが豊富であるという報告があり、抗 FR $\beta$  イムノトキシンによる内臓脂肪減少効果が期待できるかもしれません。

質問 1 4) 抗 FR $\beta$  イムノトキシン療法の動脈硬化への効果は進展抑制ですか、退縮ですか。

(回答) 抗 FR $\beta$  イムノトキシン注射前の動脈硬化病変と、注射後の病変面積を比較していないため、退縮かどうかは判断出来ません。このため現時点では進展抑制であると考えています。

質問 1 5) Fig.2 では 21 週齢マウスで動脈硬化病変を評価していますが、41 週齢マウスはどうでしたか。

(回答) 41 週齢マウスにおいても、FR $\beta$  発現マクロファージは、CD68 発現細胞、Oil Red O 陽性細胞とほぼ同じ分布を示しましたが、CD68 発現細胞における FR $\beta$  発現細胞の割合は、21 週齢マウスと比べると少なかったです。

質問 1 6) 週齢が進むと抗 FR $\beta$  イムノトキシンの効果が弱まるのはなぜですか。

(回答) 41 週齢において、FR $\beta$  発現マクロファージの割合は、21 週齢より減少していました。41 週齢では、抗 FR $\beta$  イムノトキシンがターゲットとする FR $\beta$  発現細胞の割合が少ないために、21 週齢と比較し効果が低かったと思われる。

質問 1 7) 更に動脈硬化を抑制するために、別の治療法との併用は効果がありますか。

(回答) 酸化 LDL を抑える脂質低下療法などとの併用は有効であると思われる。

質問 1 8) 抗 FR $\beta$  イムノトキシンは、臨床応用の際はどのような使い方になりますか。

(回答) 1 回の使用では効果が少ないのですが、継続的に使用すると、中和抗体出現の問題があり、今後検討すべき問題であると考えます。FR $\beta$  の抗体を用いて、動脈硬化病変の分子イメージングへの応用が考えられます。

質問 1 9) FR $\beta$  は広く種によって保存されていますか。

(回答) ヒト葉酸レセプター  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  に相当する、葉酸レセプター 1、2、3 がマウス以上の種では存在しています。

質問 2 0) Fig. 7, 8 は論文では後になっていますが、実際の実験の順序はどうだったのですか。

(回答) 論文と同じ順序で、ApoE KO マウスを用いて抗 FR $\beta$  イムノトキシンの効果を観察し、その後 *in vitro* で、抗 FR $\beta$  イムノトキシンが、FR $\beta$  発現マクロファージにアポトーシスを起こす事を確認しました (Fig7.8)。

質問 2 1) 動脈硬化病変におけるアポトーシスの概念は何ですか。また、Aging によるファゴサイトーシスクリアランスの効果はどうなりますか。

(回答) 動脈硬化病変中のマクロファージはアポトーシスが誘導されずに泡沫化マクロファージとなり、その後アポトーシスを起こします。また、加齢により、ファゴサイトーシス機能も低下しているため、ファゴサイトーシスにより除去されなかったアポトーシス細胞が更に動脈硬化病変を進展させる原因となると考えられます。

質問 2 2) 抗 FR $\beta$  イムノトキシンにより動脈硬化巣の平滑筋細胞は減りましたか。

(回答) 有意差は認められませんが、減少傾向は認められました。

質問 2 3) FR $\beta$  活性は転写レベルでも上がっていますか。

(回答) 抗 FR $\beta$  イムノトキシン投与により、FR $\beta$  mRNA が減少していることは確認しましたが、動脈硬化により FR $\beta$  活性が転写レベルで上昇しているかどうかは確認していませんので、今後検討したいと思います。

質問 2 4) PE38 を用いたイムノトキシンの臨床試験の結果はどうなっていますか。

(回答) 悪性中皮腫やリンパ腫、グリオーマ等において、Phase III まで行われています。Phase III の IL-13 をターゲットとしたグリオーマの臨床試験では、治療による有意差は認められなかったようです。Phase II の悪性中皮腫に対する治療は効果が認められましたが、抗原性を低減した新たなイムノトキシンが開発されたため、Phase I に戻って臨床試験が行われています。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。