

論文の内容の要旨

論文題目 フコース除去抗体の FcγRIII への結合とその医薬品としての意義の解析

氏名 小 山 真 美

序論

1990年代より癌治療医薬品として認可された抗癌抗体医薬品は既に9品目に達している。抗癌抗体医薬品では、これまで低分子医薬品では得られなかった、延命や病態悪化に至るまでの期間延長といった、明確な臨床効果が認められており、画期的な治療効果に注目が集まっている。抗癌抗体の薬効メカニズムには、中和活性、アポトーシス誘導活性、補体依存性細胞傷害活性、抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC: antibody-dependent cellular cytotoxicity) 等がある。近年、治療効果発現における ADCC 活性の重要性が、様々な臨床データより示唆されてきた。ADCC 活性は、ナチュラルキラー (NK) 細胞が、抗体を介して癌細胞と結合することにより、細胞障害性因子を癌細胞に向かって放出し、細胞膜に穴をあけ、死滅させる活性である。この ADCC 活性は、NK 細胞に発現する FcγRIIIa に、可変領域を介して癌抗原に結合した抗体の Fc 領域が結合することによって引き起こされる。

我々は、抗体に付加する N-結合複合型糖鎖からフコースを除去した抗体 (Fu(-)抗体) が、従来のフコース付加抗体 (Fu(+)) 抗体) に比べ、高い FcγRIIIa 結合活性を示し、約 1000 倍高い ADCC 活性を発揮することを見出した。既に、自社で開発したフコースが全く付加されていない糖鎖を有する抗癌抗体の臨床試験が行われており、現在 Fu(-)抗体の高い薬効が確認され始めている。従って、Fu(-)抗体が生体内でどのような作用を発揮するのか、NK 細胞以外の免疫細胞の機能にも影響を与えるのか調べることは、臨床効果を考える上で非常に有用である。そこで、まず Fu(-)抗体が高い結合活性を示す FcγRIIIa に着目し研究を行った。また好中球は FcγRIIIa と高い相同性を示す FcγRIIIb を高発現しているため、Fu(-)抗体が好中球の抗腫瘍作用を亢進する可能性についても併せて検証した。

1. FcγRIIIa の糖鎖が Fu(-)抗体との結合に及ぼす影響の解析

背景と目的

抗体 Fc 領域の糖鎖からのフコース除去により、ADCC 活性が劇的に向上すること以外にも、抗体糖鎖が抗体分子の安定化や Fc 受容体や補体因子への結合に必要な因子であることが報告され、抗体糖鎖の生物学的機能が明らかとなっている。興味深いことに Fc 受容体である FcγRIIIa も 5 本の糖鎖を有する糖蛋白質であるが、これまで糖鎖の機能は殆ど解析されていない。そこで、本研究では、FcγRIIIa の糖鎖が Fu(-)抗体結合親和性に及ぼす影響を定量的に解析し、FcγRIIIa の糖鎖の生物学的機能を明らかにすることを目的に研究を行った。

本論

5ヶ所の N-結合複合型糖鎖付加部位 (N38(アミノ酸配列で 38 番目のアスパラギン、以下同様に記載)、N45、N74、N162、N169) を有する FcγRIIIa 細胞外ドメインリコンビナント体 (野生型) と、糖鎖付加部位のアスパラギンをグルタミンに置換するよう変異を与えて糖鎖を欠損させた FcγRIIIa 細胞外ドメインリコンビナント体 4 種 (変異型) を作製し、各種リコンビナント体の抗体 (リツキキサン) への結合活性を ELISA 及び BIAcore により解析した。

ELISA を行った結果、5 本の糖鎖を有する野生型は、Fu(-)抗体に対して Fu(+)抗体より高い結合活性を示したが、糖鎖をすべて欠損させると Fu(-)抗体に対する高い結合活性は消失した。一方、N162 の糖鎖のみを付加させたリコンビナント体は、Fu(-)抗体との高い結合活性を示した。これらの結果より、FcγRIIIa の糖鎖は Fu(-)抗体との高結合活性に必要であり、中でも N162 の糖鎖が必要であることが示唆された。一方、FcγRIIIa の糖鎖は Fu(+)抗体への結合活性に大きな影響を及ぼさなかった。

リコンビナント体と抗体との結合活性を BIAcore による解離乗数、 K_D 値を指標に定量した結果、N162 の糖鎖は Fu(-)抗体との親和性を約 10 倍上昇させる糖鎖であることを明らかにした。さらに、N45 の糖鎖のみを欠損させたリコンビナント体では、Fu(-)抗体への親和性が、野生型に比べ約 2 倍上昇することを初めて見出した。よって、N45 の糖鎖は、N162 の糖鎖による FcγRIIIa と Fu(-)抗体との高い親和性を約 2 倍低下させる糖鎖であることを明らかにした。

本研究により、N162 の糖鎖は Fu(-)抗体との高い結合親和性に必要であるのに対し、N45 の糖鎖はその高い結合を阻害することを発見し、FcγRIIIa に付加する N45 と N162 の糖鎖が Fu(-)抗体との結合に対してそれぞれ異なる作用を示すことを明らかにした。これらの結果は、Fu(-)抗体との高い結合親和性獲得メカニズムを解明する上で有用な知見となった。

2. Fu(-)抗体が好中球の機能に及ぼす影響の解析

背景と目的

好中球には、FcγRIIIa と 97.8%の相同性を示す FcγRIIIb が高発現している。FcγRIIIb は、好中球の異物の貪食殺菌作用に関与していることが報告されているが、好中球による癌細胞貪食作用を引き起こすという報告はほとんど無い。好中球は、血中の白血球の約 6 割を占め、NK 細胞の約 10 倍多く存在するので、Fu(-)抗体が好中球の機能を亢進すれば、抗体による抗腫瘍作用に大きく貢献する可能性がある。そこで、まず Fu(-)抗体が高い FcγRIIIb 結合活性を示し、好中球による癌細胞の貪食活性を亢進する可能性に着目し、本研究を行った。

また好中球は抗原提示に関与する MHC class II を発現しない細胞と考えられてきたが、近年サイトカイン刺激により、好中球上に MHC class II が発現誘導されることが報告され、実際に抗原提示能を有することが明らかになってきた。従って、好中球が癌細胞を多く取り込めば、癌細胞特異的抗原を MHC class II を介して提示して、獲得免疫を誘導できる可能性があり、この検証も併せて行った。

本論

初めに FcγRIIIb リコンビナント体を作製し、ELISA を用いて抗体（リツキサン）の FcγRIIIb 結合活性を調べた。その結果、Fu(-)抗体はFu(+)-抗体に比べ高い FcγRIIIb 結合活性を示すことを初めて見出した。BIAcore を用いて FcγRIIIb 結合親和性を定量した結果、Fu(-)抗体はFu(+)-抗体より約 3 倍高い FcγRIIIb 結合親和性を示すことを見出した。

次に、より生体内に近い環境であるヒト末梢血を用いて好中球の貪食活性を解析した。具体的には、膜標識試薬 DiOC₁₈ で蛍光標識した CD20 陽性標的癌細胞株 Raji と抗 CD20 抗体リツキサンとをヒト末梢血に添加し、フローサイトメトリーを用いて好中球画分を解析した。好中球の癌細胞貪食活性は、好中球が癌細胞を貪食すると癌細胞由来の蛍光 DiO で陽性となることを利用して評価した。その結果、抗体添加により高い貪食活性が認められ、さらに Fu(-)抗体は、Fu(+)-抗体よりも高い貪食活性を発揮することを初めて発見した。

そこで、次に癌細胞を貪食した好中球上に抗原提示に関与する MHC class II が発現誘導される可能性を検証した。具体的には、DiO 標識癌細胞株 Raji とリツキサンとを末梢血に加え、好中球画分の MHC class II の発現を調べた。その結果、興味深いことに、抗体添加により好中球上に MHC class II の発現誘導が認められ、Fu(+)-抗体に比べ Fu(-)抗体で処理した場合でより多くの MHC class II 発現誘導好中球が認められた。

末梢血では抗体を介した様々な反応が引き起こされるため、精製好中球を用いて同様に MHC class II 発現誘導を調べた結果、末梢血を用いた場合と同様に、Fu(-)抗体で処理した場合は Fu(+)-抗体より高い MHC class II 発現が認められた。このようにサイトカイン刺激をかけずに、抗体を介して癌細胞を貪食した好中球で MHC class II の発現誘導が認められることを初めて発見した。

本研究により、Fu(-)抗体が Fu(+)-抗体に比べ高い FcγRIIIb 結合活性を示すこと、好中球による貪食活性を亢進することを初めて発見した。また、初めて癌細胞を貪食した好中球で MHC class II の発現が誘導されることを発見し、さらに Fu(+)-抗体より Fu(-)抗体で処理した場合に、MHC class II 発現誘導好中球が多く認められることを明らかにした。

これらの結果より、Fu(-)抗体の臨床効果における新たな作用メカニズムの可能性が考えられた。すなわち、Fu(-)抗体は好中球による癌細胞、又は ADCC 活性によって生じた癌細胞断片の貪食活性を亢進する。多くの癌抗原を貪食した好中球では MHC class II の発現が誘導され、取り込んだ癌抗原を提示する。提示された癌抗原は、癌抗原特異的ヘルパー T 細胞を活性化し、細胞障害性 T 細胞が活性化される可能性が考えられた。以上のことより、Fu(-)抗体は治療患者さんの体内で、効率のよい獲得免疫を誘導できる可能性が示唆された。

結論

本研究で大きく以下の2点を明らかにした。1点目は、FcγRIIIaに付加するN162の糖鎖はFu(-)抗体との高い結合親和性に必要であるのに対し、N45の糖鎖はその高い結合を阻害することを明らかにした。2点目は、Fu(-)抗体が好中球の貪食活性を亢進し、癌細胞を効率よく貪食した好中球上でMHC class IIが発現誘導されることを初めて発見した。本研究は、臨床治療に用いるFu(-)抗体の作用メカニズムを考える上で貴重な知見となると期待される。