

氏名 小山 真美

抗癌抗体医薬品は、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等の明確な臨床効果が認められており、画期的な治療薬として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 活性) 等が考えられるが、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放出し、癌細胞の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。

小山は、これまでに、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ていた。さらに、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、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。そこで小山は、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。さらに、好中球が FcγRIIIa と高い相同性を示す FcγRIIIb を高発現している事に着目し、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解析を行った。

#### 1. FcγRIIIa の糖鎖が Fu(-) 抗体との結合に及ぼす影響

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。小山は、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した。

まず、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。その結果、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、小山は、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を明らかにした。さらに、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、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。また、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。

以上の研究により、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

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かった。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。そこで小山は、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。

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。また、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明らかにした。

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。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。また、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にはFu(+)抗体より高いMHC class II発現が認められた。このように小山は、サイトカイン刺激無しで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。

このように、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。

以上のように、小山は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、博士(薬学)に充分値するものと判断した。