

論文の内容の要旨

論文題目 新規マウス抗ヒト Fas モノクローナル抗体 HFE7A の
 自己免疫疾患様症状治療効果および劇症肝炎抑制機作に関する
 研究

氏 名 好田 宏子

アポトーシスとよばれる細胞死は個体の生命維持における様々な過程に関与している。Fas はアポトーシス誘導シグナルを細胞内に伝達する細胞表面タンパク質であり、Fas 依存性アポトーシスの不全は慢性関節リウマチ (RA) などの自己免疫疾患発症に関わっていると考えられる。Fas リガンドやアゴニスティック作用を有する抗 Fas 抗体は Fas 依存性アポトーシス不全に起因する各種疾患の治療薬として期待されるが、Fas は広く正常組織にも発現が確認されており、それらをヒトに投与した際の毒性が懸念される。実際に、抗マウス Fas 抗体のひとつである Jo2 を投与したマウスは劇症肝炎を発症し死亡することが報告されている。別の抗マウス Fas 抗体である RK-8 は、RA モデル動物における関節腫脹に治療効果を有する一方で肝毒性は軽微であり、アポトーシス誘導パターンは Fas 結合親和性やエピトープの違いによって抗体ごとに異なっていると考えられる。そこで我々は、自己反応性リンパ球や RA 滑膜細胞など、異常増殖が病態の本質であると考えられる細胞群にアポトーシスを誘導しうるが、その一方で肝毒性の低い抗ヒト Fas 抗体をマウスで新規に取得することを目的として検討を行った。

1. 肝毒性を示すことなくマウスリンパ節腫脹に対し治療効果を有する新規マウス抗ヒト Fas モノクローナル抗体 HFE7A

我々は Fas ノックアウトマウスにヒト Fas-AIC2 融合タンパク質を免疫し、ヒト Fas およびマウス Fas の双方に対する結合活性を指標に抗体をスクリーニングすることで、ユニークな性質を有する新規抗ヒト Fas モノクローナル抗体 HFE7A

を取得した。HFE7A はヒトのみならずチンパンジー、マーモセット、マウスなどの Fas に広い交差反応性を示し、ヒト Fas もしくはマウス Fas を介してこれらの分子を発現する細胞にアポトーシスを誘導した。BALB/c マウスに HFE7A を投与すると胸腺細胞にアポトーシスが誘導されるが、肝毒性の兆候は認められなかった。HFE7A をマーモセットに投与した場合でも明らかな肝毒性は認められず、ヒト初代肝細胞に *in vitro* で細胞死を誘導することもなかった。さらに HFE7A は MRL-gld/gld マウスのリンパ節腫脹と異常 T 細胞の蓄積を改善した。RA 患者の関節ではアポトーシス不全により滑膜細胞が異常に増殖することが知られているが、HFE7A は RA 患者関節由来の滑膜細胞にも *in vitro* で細胞死を誘導した。興味深いことに HFE7A は Jo2 投与によりマウスに引き起こされる劇症肝炎を抑制する活性も有していた。以上の結果より、HFE7A は RA などの自己免疫疾患に対する治療効果を有することが期待され、加えて劇症肝炎に対しても治療効果を示す可能性が示唆された。

2. マウス抗ヒト Fas モノクローナル抗体 HFE7A の遺伝子クローニングおよび発現確認

我々の取得した新規マウス抗ヒト Fas モノクローナル抗体 HFE7A には、RA などの自己免疫疾患だけでなく劇症肝炎に対する治療効果も期待されることが第一章にて示唆された。マウスなどの動物で作製したモノクローナル抗体を臨床応用する際には、免疫原性の低減を目的としてヒト化などの遺伝子工学的操作を施すことがほぼ必須となっている。

HFE7A のヒト化を前提に HFE7A 産生ハイブリドーマから mRNA を抽出して重鎖および軽鎖をコードする遺伝子のクローニングを行った。クローニングした遺伝子の DNA 塩基配列を決定し、重鎖および軽鎖の発現プラスミドを独立に構築した。それらの発現プラスミドを COS-1 細胞に導入して重鎖および軽鎖タンパク質を発現させた。COS-1 細胞の培養上清中に分泌された重鎖および軽鎖タンパク質複合体すなわちリコンビナント HFE7A について、マウス Fas およびヒト Fas に対する結合活性とヒト Fas 発現細胞に対する細胞死誘導活性を測定し、いずれもハイブリドーマ由来の HFE7A と同等の活性を有していることを確認した。

3. 抗マウス Fas モノクローナル抗体 Jo2 により誘導される急性致死性劇症肝炎に対するマウス抗ヒト Fas モノクローナル抗体 HFE7A の抑制効果

第一章で述べたように、我々の取得したマウス抗ヒト Fas モノクローナル抗体 HFE7A には、ハムスター抗マウス Fas モノクローナル抗体 Jo2 の投与によりマウスに誘導される急性致死性劇症肝炎を抑制する効果がある。この抑制作用は Jo2 投与の 60 分後に HFE7A を追加投与した場合にも認められ、HFE7A の劇症

肝炎治療薬としての可能性を示唆するものではあるが、その機構は明らかでない。第三章では HFE7A による Jo2 誘導肝傷害抑制のメカニズムについてマウスを用いて解明を試みた。

Jo2 の投与によりマウスの血中では、肝傷害のマーカーであるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼおよびアラニンアミノトランスフェラーゼの血中濃度が急激に上昇するが、HFE7A を Jo2 と共に投与することでそれらの上昇は顕著に抑制された。Jo2 誘導肝傷害は肝細胞のアポトーシスが原因のひとつであると考えられるが、Jo2 を投与したマウスの肝細胞で認められるカスパーゼ活性化とミトコンドリアの脱分極を HFE7A は抑制した。また、我々は Jo2 による肝細胞のアポトーシスと HFE7A によるその抑制を *in vitro* において再現することに成功した。すなわち、BALB/c マウスより採取した肝細胞を *in vitro* において Jo2 と共に一定時間培養することで細胞死の指標である乳酸脱水素酵素の培養上清への漏出とカスパーゼ活性化を認め、培養中に HFE7A を添加することでこれらの現象が抑制されることを示した。マウス Fas に対する HFE7A の親和性は Jo2 の親和性と比較して有意に低く、マウス Fas に対する Jo2 の結合を HFE7A が阻害し得ないことを明らかとした。さらに HFE7A は BALB/c マウスより採取した肝細胞に対する Jo2 の結合も阻害しなかった。HFE7A の Jo2 誘導肝傷害抑制機構が Fas 分子を巡る単純な競合阻害でないことが示唆され、Fas 以外の細胞表面分子が関与している可能性が考えられた。Fas ノックアウトマウスを用いた検討を行ったところ、興味深いことに HFE7A は Fas ノックアウトマウスの胸腺細胞には結合しないが肝細胞には結合することが示された。以上の結果より、Jo2 誘導肝傷害に対する HFE7A の抑制効果は肝細胞上の Fas 分子を巡る単純な競合阻害によるものではないことが示され、抑制機構に肝細胞上に発現する Fas 以外の分子が関与する可能性が考えられた。

本研究において、HFE7A の特性、マウスリンパ節腫脹に対する治療効果ならびにマウス劇症肝炎に対する抑制メカニズムについて解析を行い、HFE7A の自己免疫疾患および肝炎の治療薬としての可能性を提示した。さらに HFE7A の臨床応用を視野に入れ、HFE7A 遺伝子のクローニングを行って全塩基配列を解読し、リコンビナント HFE7A を作製した。本研究の成果は、RA に代表される難治性自己免疫疾患など、Fas/Fas リガンドの不全に起因する疾患の治療法開発に貢献できるものと期待される。