

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 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 はこのアポトーシスの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 を介して起こる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 リガンドや抗 Fas 抗体はこれらの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しているため、投与した際の毒性が懸念される。本研究では、自己反応性リンパ球や RA 滑膜細胞などに対してはアポトーシスを誘導しようが、肝細胞に対する毒性は低い、という性質をもつ抗ヒト Fas 抗体を新規に取得することを目的として検討を行っている。

第一章では、抗ヒト Fas 抗体の取得とその性質について述べている。Fas ノックアウトマウスをヒト Fas-AIC2 融合タンパク質で免疫し、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 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、さらに全身性免疫不全マウスである MRL-*gld/gld* のリンパ節腫脹と異常 T 細胞の蓄積を改善した。RA 患者の関節においてアポトーシス不全のために異常増殖している滑膜細胞に対しては *in vitro* で細胞死を誘導した。一方、これらの動物実験では HFE7A 投与による肝毒性の兆候は認められず、また HFE7A がヒト初代肝細胞に細胞死を誘導することもなかった。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た。興味深いことに HFE7A は、抗マウス Fas 抗体のひとつである 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おり、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。

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、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。そこで第二章では、ヒト化を前提とした HFE7A の遺伝子クローニングの結果およびその発現確認について述べている。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い、DNA 塩基配列を決定した。さらに発現プラスミドを構築し、それを COS-1 細胞に導入して発現させた重鎖および軽鎖タンパク質の複合体、すなわちリコンビナント HFE7A について、マウスおよびヒト 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たところ、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が確認された。

第三章では、第一章で見出された HFE7A による Jo2 誘導肝傷害抑制のメカニズムについて検討を行っている。Jo2 の投与によりマウスの血中では、肝傷害マーカー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。また、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。さらに、Jo2 による肝細胞のアポトーシスと HFE7A によるその抑制現象を *in vitro* 実験系でも再現することにも成功した。しかしながら、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、HFE7A がマウス Fas に対する Jo2 の結合を阻害するとは考えにくい。HFE7A の Jo2 誘導肝傷害抑制機構は Fas 分子を巡る単純な競合阻害でないと思われた。Fas ノックアウトマウスを用いて検討を行ったところ、HFE7A は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みだされたことから、Jo2 誘導肝傷害に対する HFE7A の抑制機構には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。

以上本研究は、RA に代表される難治性自己免疫疾患など、Fas リガンドの不全に起因する疾患の治療法開発を目指して作成した抗 Fas 抗体 HFE7A が、マウスリンパ節腫脹に対して治療効果をもつことを明らかにするとともに、マウス劇症肝炎に対するその抑制メカニズムについても解析を行ったもので、学術的・応用的に貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。