

氏名(本籍)	渡部 一人(愛媛県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第399号
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	薬物誘発性の自己免疫性溶血性貧血に関する研究： カニクイザルにおけるヒト型化抗HM1.24モノクローナル抗体による溶 血性貧血の誘発機序
論文審査委員	(主査) 赤堀 文昭 (副査) 木内 明男 山田 隆紹

論文内容の要旨

緒言

抗HM1.24モノクローナル抗体(以下Anti-HM1.24)は骨髄腫細胞に高頻度に発現しているヒトHM1.24抗原を認識するヒト型化抗体(IgG1)であり、多発性骨髄腫の治療薬としての開発が期待されている。Anti-HM1.24は主に骨髄腫細胞に対してナチュラルキラー細胞を介した抗体依存性細胞傷害作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC)を有しており、補体依存性細胞傷害活性は殆どないとされている。しかし、ヒトではHM1.24抗原は骨髄腫細胞に限らず正常なBリンパ球またはTリンパ球を含む全身の組織に分布しており、標的以外の組織に対する影響が懸念される。

マウス、ラット、モルモット、ウサギおよびイヌではAnti-HM1.24に対して殆ど交差反応性を示さないが、カニクイザルはヒト組織と類似した交差反応性を有する動物種である。よって、Anti-HM1.24のヒトにおける毒性を予測するためには、カニクイザルが前臨床試験に用いる唯一の動物種として位置付けられる。本研究は前臨床安全性試験を通して、多発性骨髄腫患者における発現メカニズムを解明することを目的とした。カニクイザルを用いた試験は全て中外製薬(株)動物実験指針に則り、動物福祉に対する倫理的配慮をもって遂行した。

第1章 Anti-HM1.24のカニクイザルにおける前臨床安全性評価

1. カニクイザルにおける単回投与毒性試験

Anti-HM1.24を0、2、20、200mg/kg(各群雌雄各1例)の用量で静脈内単回投与した。

高用量の200mg/kgはヒトでの予想最高用量の約40倍に相当した。単回投与試験では200mg/kgの用量まで何ら急性毒性は認められず、また遅発性の毒性も認められなかった。

2. カニクイザルにおける1ヶ月間反復投与毒性試験

Anti-HM1.24を0、2、20、200mg/kg（各群雌雄各4例）の用量で1ヶ月間（週2回間欠）静脈内反復投与した。1ヶ月間の反復投与では2mg/kgは無毒性量であったが、20mg/kg以上で免疫反応性の変化として、好塩基球、単球および血清グロブリンの増加や脾臓、リンパ節、扁桃、消化管付属リンパ組織および胸腺におけるリンパ球の増減を伴う増殖性または萎縮性の病理学的変化が観察された。最高用量の200mg/kgでは雄4例中1例でAnti-HM1.24に交差反応性を示す臓器に一致して、限局性または巣状壊死が認められ、ADCC作用の過大発現によるものと推察された。また、200mg/kgの雌4例中2例では貧血が認められ、1例では投与開始後3週以降に赤血球の減少、網赤血球および小型・球形赤血球の増加を示し、脾臓の腫大・ヘモジデリン沈着の増加および骨髓赤芽球の増加が認められた。従って、この貧血は主に網内系における血管外溶血の亢進による溶血性貧血であると考えられた。もう1例は最終投与後10日（休薬開始後6日）に極度の貧血を呈し、乳酸脱水素酵素および間接ビリルビンの上昇並びにハプトグロビンの減少を伴い瀕死状態となったため切迫と殺した。本切迫と殺例は投与開始後21日まで末梢血CD20陽性リンパ球（B細胞）比率の増加がみられた以外に血液学的な異常は認められなかったことから、急激な赤血球減少が生じたと推察され、血管外溶血に加え血管内溶血が起こった可能性が高いと考えられた。また、同例では剖検時に胸腺中のT細胞（細胞性免疫）の分化異常および脾臓中リンパ球のB細胞（体液性免疫）の活性化亢進が認められた。このことから、Anti-HM1.24がリンパ球に結合することによって、リンパ球の分化・増殖に影響を及ぼしたため、機能異常が発現して体液性免疫優位となり、全身性自己免疫疾患が発症しやすい状態に陥ったことが示唆された。さらに、抗Anti-HM1.24抗体（Feb'に対するIgG抗体）が単回および1ヶ月間反復投与ともに2mg/kg以上で検出され、産生量に用量依存性はないものの単回投与においても投与後9ヶ月以上にわたり高濃度に検出された。このことから、Anti-HM1.24はカニクイザルに対して強い免疫原性を有することが明らかとなり、産生された抗Anti-HM1.24抗体は種々の免疫反応性の毒性変化に影響を及ぼしていることが推察された。なお、持続的な免疫複合体の形成に伴うと考えられる明らかな炎症性変化や組織沈着による腎障害などは認められなかった。

第2章 Anti-HM1.24に誘発されたカニクイザルの溶血性貧血の機序に関する検討

カニクイザルにおける前臨床安全性評価において見出された溶血性貧血の病態はヒトにおける自己免疫性溶血性貧血（autoimmune hemolytic anemia：AIHA）に酷似していたことから、ヒトにおいて最も懸念される毒性であると考えられた。この溶血性貧血は通常の臨床検査では発症の兆候を把握することが困難であったこと、発症後に急激な病態の増悪を示したことから、別途溶血性貧血の誘発機序を解明することが、本薬の臨床試験における副作用発現の有無を予測し、患者のリスクを回避する手段を講じる上で重要な課題となった。

すなわち、Anti-HM1.24が直接的に赤血球に作用して溶血性貧血を誘発した可能性を検証するために、標識Anti-HM1.24を用いて赤血球に対する結合性およびAnti-HM1.24添加による赤血球凝集反応の有無

を調べた。また、AIHAを発症したことを検証するために、1ヵ月投与試験の被験動物血清または血漿を用いて、抗赤血球抗体の有無を間接Coombs試験で調べ、また抗赤血球抗体が血管内溶血を引き起こした可能性を調べるために、補体依存性の溶血性試験を実施した。また、自己抗体産生の有無を調べるために、抗 Single stranded DNA 抗体（抗 ssDNA 抗体）の測定を行った。

その結果、fluorescein isothiocyanate (FITC) あるいは 125I 標識した Anti-HM1.24 はカニクイザルおよびヒトの赤血球膜に対して、特異的な結合は認められなかった。

また、これらの標識 Anti-HM1.24 にカニクイザル抗イディオタイプ Anti-HM1.24 抗体を共存させた条件下でも特異的な結合は認められなかった。従って、Anti-HM1.24 が赤血球に特異的に結合して、溶血性貧血の初期要因となった可能性は否定され、ヒトにおいてもその危険性はないと推察された。カニクイザルおよびヒト赤血球浮遊液（生理食塩液）に高濃度（713 μ g/mL）の Anti-HM1.24 を添加すると、in vitro で直接的に赤血球を凝集させた。しかし、2次抗体として抗ヒト IgG を添加しても、この赤血球凝集は増強されなかった。Anti-HM1.24 は赤血球に対して特異的に結合しないことから、直接的な赤血球凝集の成因は不明であるが、Anti-HM1.24 溶液中に混在（3%）する多量体や電荷の異なる異性体が関与している可能性も考えられた。一方、生理食塩液の代わりに自己血清を用いて作製した赤血球浮遊液ではカニクイザルおよびヒトとも Anti-HM1.24 添加による赤血球凝集は認められなかったことから、血清成分が直接的な赤血球凝集を回避させ得ることが示唆された。

間接 Coombs 試験において、200mg/kg で溶血性貧血を発症した雌2例に加え、発症はみられなかった20および200mg/kg の雌各1例に陽性反応が認められ、赤血球に特異的に結合する IgG 抗体の存在が確認された。また、切迫と殺例では補体の活性化による in vitro 溶血反応も認められ、産生された抗赤血球抗体によって血管内溶血が生じた可能性が示唆された。さらに、間接 Coombs 陽性例では抗 ssDNA 抗体が投与後に経時的に増加していた。抗 ssDNA 抗体の測定は自己に対する免疫寛容の破綻により産生される汎自己抗体を検出しているため、直接的に抗赤血球抗体の増加を示すものではないが、抗 ssDNA 抗体が増加した個体が全例とも間接 Coombs で陽性反応が認められたことから、自己免疫性の抗赤血球抗体が産生されていると判断した。

論文審査の結果の要旨

本研究は多発性骨髄腫の治療薬として期待されている抗 HM1.24 モノクローナル抗体（以下 Anti-HM1.24）の毒性およびその毒性発現メカニズムを解明すること、加えて、多発性骨髄腫患者に投与された時の副作用発現の予測を目的として実施された。Anti-HM1.24 は骨髄腫細胞に高頻度に発現しているヒト HM1.24 抗原を認識するヒト型化抗体であり、主に骨髄腫細胞に対してナチュラルキラー細胞を介した抗体依存性細胞傷害作用（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity : ADCC）を有しているものである。

しかし、補体依存性細胞傷害活性は殆どないとされている。ヒトでの HM1.24 抗原は骨髄腫細胞に限らず正常な B リンパ球または T リンパ球を含む全身の組織に分布しており、Anti-HM1.24 はヒトに投

与された場合、標的細胞以外の組織に対してもその影響が懸念される。

まず、前臨床安全性（毒性）評価に使用する動物種の選択について検討した結果、マウス、ラット、モルモット、ウサギおよびイヌではAnti-HM1.24に対して殆ど交差反応性を示さなかったが、カニクイザルはヒト組織と類似した交差反応性を有する動物種であったことから、カニクイザルがAnti-HM1.24のヒトにおける毒性予測をするために用いられる唯一の動物種であることを確認した。そこで、サルを用いるにあたっては、中外製薬（株）動物実験指針に則って、動物福祉に対する倫理的配慮をもって研究が遂行された。

第1章の第1実験として、カニクイザルにAnti-HM1.24を単回投与（0、2、20、200mg/kgの各用量に雌雄各1例）した。

その結果、200mg/kg（予想臨床量の約40倍）の用量まで何ら急性毒性および遅発性の毒性も認められなかった。

第1章の第2実験として、1ヵ月間（週2回間欠）の反復投与（0、2、20、200mg/kgの各用量に雌雄各4例）を行った。

その結果、20mg/kg以上で、種々の免疫反応性の毒性（好塩基球、単球、血清グロブリンの増加、脾臓、胸腺、リンパ節などに増殖性または萎縮性の病理学的変化など）が認められた。全身のリンパ系組織にみられたこれらの免疫反応性の変化は、一般的な異種蛋白に対する反応の範疇を超えた毒性変化として観察された。すなわち、主要なリンパ組織である胸腺でのT細胞分化・増殖異常および脾臓におけるB細胞活性化の亢進・T細胞の活性化抑制などが認められた。これらの毒性変化は、Anti-HM1.24が正常でも全身に分布しているHM1.24抗原に結合することでリンパ組織における機能異常を引き起こし、その結果として、体液性免疫優位となり、自己免疫反応性の細胞（B-1細胞）が活性化され、全身性自己免疫疾患が発症しやすい状態に陥ったと推察している。第1章第2実験で得られたカニクイザルの成績は、ヒトにおける自己免疫性疾患の発症要因とされている知見と酷似しており、この種の研究（免疫学的な研究）において、ヒトへの外挿性の極めて高いことを示した貴重なデータであり、評価されるものである。また、Anti-HM1.24のリンパ球への結合により、リンパ球の機能異常をきたし、Th₂の優位な状況下で、赤血球抗原によるB細胞の活性化を亢進することが主因であろうと推察している。

一方、溶血性貧血が200mg/kg群で発症し、致死性の重篤な徴候を示す個体がみられ、この溶血性貧血の病態がヒトにおける自己免疫性溶血性貧血（autoimmune hemolytic anemia：AIHA）に酷似していたことから、著者はこの貧血がヒトにおいて最も懸念されるAnti-HM1.24の毒性であると考え、第2章で溶血性貧血の誘発機序を解明することにした。

第2章ではカニクイザルにおけるAnti-HM1.24誘発溶血性貧血の発症機序を追究するため以下の実験系を計画した。

1) Anti-HM1.24が直接的に赤血球に作用して溶血性貧血を誘発した可能性を検証するために、標識Anti-HM1.24を用いて赤血球に対する結合性およびAnti-HM1.24添加による赤血球凝集反応の有無

を調べた。

- 2) AIHAを発症したことを検証するために、1ヵ月投与試験の被験動物血清または血漿を用いて、抗赤血球抗体の有無を間接Coombs試験で調べた。
- 3) 抗赤血球抗体が血管内溶血を引き起こした可能性を調べるために、補体依存性の溶血性試験を実施した。
- 4) 自己抗体産生の有無を調べるために、抗Single stranded DNA抗体（抗ssDNA抗体）の測定を行った。これらの検討項目は、限られた試料（血清・血漿）を用いてAIHAの誘発機序を追究するために最も効果的であったと考えられる。

その結果、

- 1) Anti-HM1.24はカニクイザルおよびヒトの赤血球膜と特異的に結合する実証は得られなかったことから、Anti-HM1.24が赤血球に特異的に結合して、溶血性貧血の初期要因となった可能性を否定している。一方、高濃度（713 μ g/mL）のAnti-HM1.24は、*in vitro*で直接的に赤血球浮遊液（生理食塩液）を凝集させることを確認し、この赤血球凝集の成因は不明であるが、溶血性貧血の初期要因となった可能性の高いことを示唆した。
- 2) AIHA発症の検証を目的として行った間接Coombs試験において、200mg/kgで溶血性貧血を発症した雌2例に加え、AIHA発症のみられなかった20および200mg/kgの雌各1例にも陽性反応が認められ、赤血球に特異的に結合するIgGの存在が確認された。
- 3) 切迫と殺例では補体の活性化による*in vitro*溶血反応も認められたことから、産生された抗赤血球抗体によって血管内溶血が生じた可能性を示唆している。
- 4) 間接Coombs陽性例では抗ssDNA抗体が投与開始後に経時的に増加していたことから、自己免疫性の抗赤血球抗体が産生されていると判断している。

これらの成績は、Anti-HM1.24により誘発された溶血性貧血が用量反応性のある薬物依存性の毒性変化であることを証明し、同時にヒト赤血球を用いた検討から、ヒト赤血球でもカニクイザルとほぼ同様の反応性を示したことから、ヒトでの安全性確保のために適切な予防措置を講じる必要があることを明確にした。

また、著者はAnti-HM1.24のカニクイザルにおけるAIHAの誘発機序を、Anti-HM1.24がリンパ球のHM1.24抗原に結合することにより、B細胞（体液性免疫）の活性化亢進を引き起こし、さらにT細胞（細胞性免疫）の分化異常を誘発し、体液性免疫優位の状態に陥らせ、自己反応性のB細胞の活性化を亢進させる。その様な状況下では①何らかの原因によるAnti-HM1.24の赤血球への非特異的な結合または接着が起り、②赤血球上のAnti-HM1.24に対して自己産生された抗Anti-HM1.24抗体が結合し、③これらの免疫グロブリンに修飾された赤血球は網内系において抑留され、破壊・溶血するか、④抗Anti-HM1.24抗体に対する貪食細胞のFcレセプタを介した赤血球の抑留・貪食により、溶血される。⑤これらの血管外溶血の過程が繰り返し起り、赤血球は変形能を失ったり、一部を貪食されることによって異型（球形・小型）赤血球として末梢血で増加するとともに、血管外溶血した赤血球の膜抗原

が遊離する。⑥遊離した赤血球膜抗原が抗原提示細胞や活性化された自己反応性のB細胞により認識され、自己免疫応答が惹起される。⑦抗赤血球自己抗体が産生され、網内系での血管外溶血の亢進と補体結合による血管内溶血が誘発され、急激な病態の悪化に陥ると推察している。

この推論は一部には科学的な実証データ（体液性免疫優位の状態、自己反応性B細胞の活性化）が不明確ではあるものの、多くの文献的な考察からも、現時点では妥当なものと考えられる。

本研究の学位申請論文としての意義は、本薬が根治困難な難病である多発性骨髄腫に対して、前臨床の薬効薬理試験において明確な有効性を示しており、新規の治療薬として患者の貢献度が期待されているが、本研究の成果によって、ヒトにおける安全性確保には細心の注意を払う必要性のあることを明らかにし、また、臨床試験においては、患者の不利益なリスクを回避するために適切な予防手段を講じることが出来た点である。

これらの成果は、動物実験の重要性、動物実験の有用性の拡大、動物実験の医薬品開発における社会への貢献をトキシコロジーおよび獣医学の観点から改めて立証したものと高く評価でき、博士（獣医学）の学位を授与するにふさわしい業績と判定した。