

補体依存性細胞傷害を作用機序とするラット抗 Thy-1 抗体投
与モデルを用いた抗体医薬の薬効及び毒性発現予測要因
に関する病理学的研究

加藤 千恵

2013

緒言.....	1
図表.....	6
第1章 正常ラットにおける Thy-1.1 抗原の分布及び抗 Thy-1.1 抗体投与ラットに おける CDC の誘導.....	11
1-1 はじめに.....	11
1-2 実験方法.....	12
1-3 結果.....	16
1-4 考察.....	18
図表.....	20
第2章 抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおける投与抗体分布と膜補体制御因子....	32
2-1 はじめに.....	32
2-2 実験方法.....	34
2-3 結果.....	36
2-4 考察.....	38
図表.....	40
第3章 CDC を作用機序とする抗体医薬品の標的臓器予測における補体制御 因子解析の有用性.....	47
3-1 はじめに.....	47
3-2 実験方法.....	48
3-3 結果.....	49
3-4 考察.....	51
図表.....	54
第4章 総合考察.....	60
第5章 結論.....	65
謝辞.....	66
引用文献.....	67
要旨.....	79
Abstract.....	84

緒言

抗体医薬品は、1)標的分子(抗原)に対する高い特異性と親和性に基づく高い効果と少ない副作用が期待できる、2)標的分子の多様性ならびに抗体の有する作用メカニズムの多様性からさまざまな薬剤標的に作用できる、3)遺伝子工学的手法の改変・改良、組み換え体製造技術の確立により工業生産が可能であるなどの特徴から、ゲノム研究で見出された標的分子に対していち早く治療法の提供を検討できる医薬品として注目されている。

最初の抗体医薬品は 1986 年に臓器移植の際の免疫抑制剤としてマウス抗体が上市された(Figure 1 A、Table 1)¹⁻³。しかし、マウス抗体はヒトにおいて免疫原性を発現し、アレルギー反応や anti-drug antibodies を誘導するなどの問題があり、その後約 10 年間抗体医薬品の上市はなかった。その間、抗体工学の技術開発が活発に行われ、ヒト抗体により近い抗体を作る研究が行われてきた。その結果、抗原特異的な可変領域はマウスに、定常領域はヒトに由来するキメラ抗体の作製技術が確立された(Figure 1 B)。キメラ抗体では約 35%がマウス由来の分子であることより^{4,5}、可変領域のマウス抗体部分を最小限とし、約 5%がマウス由来、残りの 95%がヒトに由来するヒト化抗体の作製技術が開発された(Figure 1 C)⁶。さらに、ヒト抗体ファージライブラリーやヒト抗体産生マウスの活用などによる、完全ヒト抗体取得技術も確立された(Figure 1 D)⁷⁻¹⁵。ヒト化抗体と完全ヒト抗体では免疫原性が顕著に減少し、ヒト内因性 IgG と同様の性質を示すようになった¹⁶。このような抗体工学の発展を背景として、抗体医薬品の開発が活発になり、現在では、約 30 の抗体医薬品が米国、欧州、日本において上市され、臨床の場で活用されている (Table 1)。

抗体医薬品は、抗体に種々の機能を付加することで医薬品としての薬理作用を発現する(Figure 2、Table 1)。上市されている抗体医薬品の多くは、標的分子への中和作用により標的分子の生理作用を阻害することで、薬理作用を発揮している (Table 1)^{1-3,17-55}。また、標的分子に結合した抗体への C1q の結合が引き金となり補体系が活性化される complement-dependent cytotoxicity (CDC)⁵⁶⁻⁵⁹ や、抗体と

免疫細胞の Fc γ 受容体が結合することで誘導される antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)⁵⁸⁻⁶² など、生体内の免疫機構を利用して標的分子発現細胞を傷害する薬理作用を発揮する抗体や、drug delivery carrier (antibody drug conjugate)として標的分子発現細胞を傷害することで薬理作用を発揮する抗体も、がんを適応疾患とする抗がん剤など標的細胞を傷害する抗体医薬品として上市されている(Table 1)^{1,63}。

抗体医薬品を含むバイオテクノロジー応用医薬品の開発には、近年の科学の進歩及び経験を踏まえて、日米 EU 医薬品規制調和国際会議(ICH)での合意に基づくガイドラインが定められている。ICH ガイドライン S6「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」では、非臨床試験における安全性評価の主な目的を、1)ヒトに適用する際の安全な初回投与量とその後の増量計画を設定すること、2)毒性の標的となる恐れのある臓器を特定し、その毒性が可逆的なものであるかどうかの検討を行うこと、3)臨床でのモニタリングを実施する際の安全性の評価項目を見出すこととし、安全性薬理試験、暴露評価(薬物動態・トキシコキネティクス、代謝)、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、免疫毒性試験、生殖発生毒性試験、遺伝毒性試験などを遂行することを定めている。

モノクローナル抗体を医薬品の本体とする抗体医薬では、さらに、その抗原特異性、補体結合性及び標的組織以外のヒト組織に対する意図されない反応を詳細に検討するために、開発候補抗体医薬品を用いた組織交差反応性試験の実施が求められている。組織交差反応性試験では、ヒト組織パネルを用い、免疫組織化学染色法(IHC)によりモノクローナル抗体と組織中の抗原との結合を評価する。組織交差反応性試験はヒト初回投与臨床試験における安全性を担保するとともに、臨床試験におけるデータの解釈、抗体医薬品の標的抗原のヒトでの生物学的意義を理解するためにも有用とされている^{64,65}。

組織交差反応性試験において抗体医薬品と組織標本上の抗原との結合は直ちに *in vivo* での生物活性を示すものではない。その理由の一つとして、組織交差反応性試験では血液脳関門、血液精巣関門などにより *in vivo* で通常抗体が到

達できない領域においても試験系の特徴から抗体の結合が検出されることが挙げられる⁶⁴。従って、組織交差反応性試験の成績は *in vivo* 試験を含む薬効薬理試験及び安全性試験全体を踏まえて解釈すべきとされている。しかし、抗体医薬品が標的とする分子の抗原決定基は種間でそのアミノ酸配列が異なる場合があるため、抗体が交差する動物種が限定され、実験動物を用いた非臨床安全性試験から十分な情報を得られないことも多い。組織交差反応性試験は、ヒト組織を用いた安全性評価試験であることより、ヒトへの初回投与以前に標的臓器を予測する重要な試験と位置付けられている(ICH ガイドライン S6)。細胞傷害を誘発することで有効性を発揮する抗体医薬品では、抗原の分布と傷害臓器が一致すると考えられており、その評価が重要と考えられている。従って、CDC や ADCC を作用機序とする抗体医薬の有効性・安全性をより正確に予測するために、交差反応性試験に関する知見を積み重ね、新たな評価法を検討確立していくことは、抗体医薬品研究開発の進展に極めて重要である。

CD20 を標的抗原とし、B 細胞性非ホジキンリンパ腫を適応疾患とするリツキシマブは、臨床的有用性の非常に高い抗体医薬品として臨床で広く使われている¹⁷⁻¹⁹。リツキシマブを始めとして近年上市されたオファツムマブを含め、がんを適用疾患とする細胞傷害型の抗体医薬品の作用機序として CDC の重要性は高い (Table 1)^{30,58,59,66}。CDC は補体系の反応に基づく生体反応である。補体系は元来細菌感染などの外的侵襲への最初の生体防御として備わっており、素早くそれらを除去する^{57,67}。補体系の反応には、古典経路、レクチン経路、第二経路の 3 つの活性化経路があり、抗体が介在する CDC は古典経路により誘導される^{56-58,67-69}。古典経路は、標的抗原に結合した抗体の Fc 部に C1q が結合することから始まり、C3 の活性化を経た後に、膜侵襲複合体(membrane attack complex: MAC)が形成され、細胞膜に孔が形成され、細胞死が誘導される(Figure 3)^{57,67,69-71}。

リツキシマブは CD20 発現細胞を標的とするが、抗原発現細胞すべてを傷害するものではないことが報告されている^{72,73}。その要因として抗原発現量が考えられており、一定量以上の抗原発現細胞のみに細胞死を誘導するという成績が *in*

vitro 系で報告されている⁷⁴。一方、抗原発現量が同一レベルの細胞であっても、細胞死が誘導されるものと誘導されないものがあることも報告されており^{72,73}、CDC 誘導が必ずしも抗原発現量に依存するものではないとの知見も示されている。このように、CDC 誘導に関して抗原発現量に注目した研究がなされているが、抗原発現量とその抗原に対する抗体を投与した際に生体反応が一致しない理由は明確にされていない。従って、CDC 誘導における抗原発現量以外の生体反応を規定する要因を明らかにすることは、抗体医薬の有効性・安全性をより正確に予測するために重要である。

CDC 誘導における抗原発現量以外の生体反応を規定する要因を明らかにし、組織交差反応性試験による抗原分布解析結果からの生体反応の予測性を高めるためには、IHC による抗原分布解析と抗体投与時の *in vivo* 生体反応を比較解析する必要がある。実験的解析のためには、1) 外来的に投与される抗体による CDC を作用機序とする病変が惹起されること、2) 抗原の分布と CDC により誘導される生体反応が一致しないこと、の条件をみたす動物モデルが必要である。このような視点から、CDC を作用機序とする動物実験モデルを調査した。

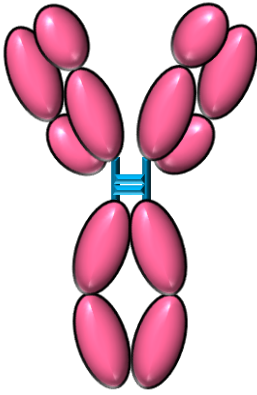
CDC により誘導される組織傷害を病変の発端とする実験動物病態モデルとしては、現在、ラット抗 Thy-1 腎炎モデル(抗 Thy-1.1 抗体投与ラット)と虚血後再還流モデルが報告されている⁷⁵⁻⁷⁷。この 2 つのモデルの中で、外来的に抗体を投与するモデルとしては、抗 Thy-1.1 抗体投与ラットがあてはまり^{75,76}、本モデルでは、腎系球体メサンギウム細胞に CDC による細胞死が誘導されることが報告されている^{75,76,78}。一方、Thy-1 抗原は、T 細胞に発現するリンパ球分化マーカーとしてマウスで発見され、リンパ球系、神経系組織などでの発現が報告されている⁷⁹⁻⁸⁵。Thy-1 抗原が腎系球体メサンギウム細胞以外に発現しているにもかかわらず、抗 Thy-1.1 抗体投与ラットでは、腎系球体メサンギウム細胞の細胞死が議論され、腎炎モデルとしての有用性のみが注目されてきたが、著者は本モデルが抗原発現と CDC により誘導される生体反応が一致しないという本研究に適した実験動物病態モデルとなる得る可能性を考え着目した。

そこで、本研究では、このモデルを選択し、CDC 誘導における抗原発現量以外の生体反応を規定する要因を明らかにする研究を進め、CDC を作用機序とする抗体医薬の有効性・安全性をより正確に予測するための新たな評価法の検討・確立をした。

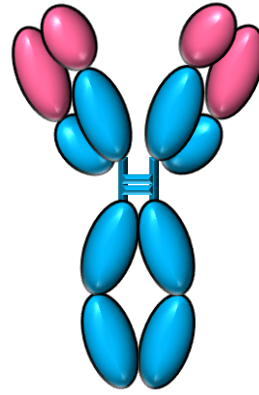
図表

Fig. 1 Monoclonal antibody types

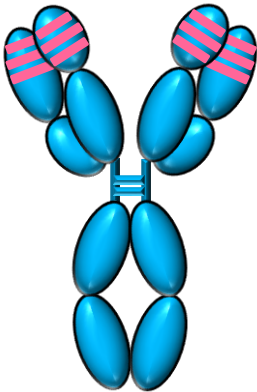
A. Murine



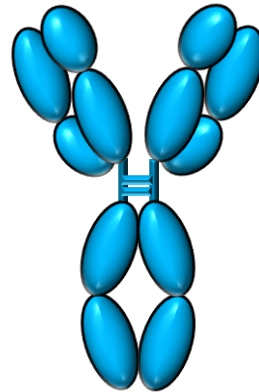
B. Chimeric



C. Humanized



D. Human



Monoclonal antibody (mAb) types. A) Murine mAb is 100% murine origin. B) Chimeric mAb is consisted with the entire variable domain of a murine antibody and the constant domains of a human antibody. 35% of this mAb is murine origin. C) Humanized mAb is grafted just the murine hypervariable regions onto a human Ab frame work. Approximately 5% of this mAb is murine origin and 95% is human origin. D) Human mAb is 100% human origin. Pink and blue indicate murine and human origin.

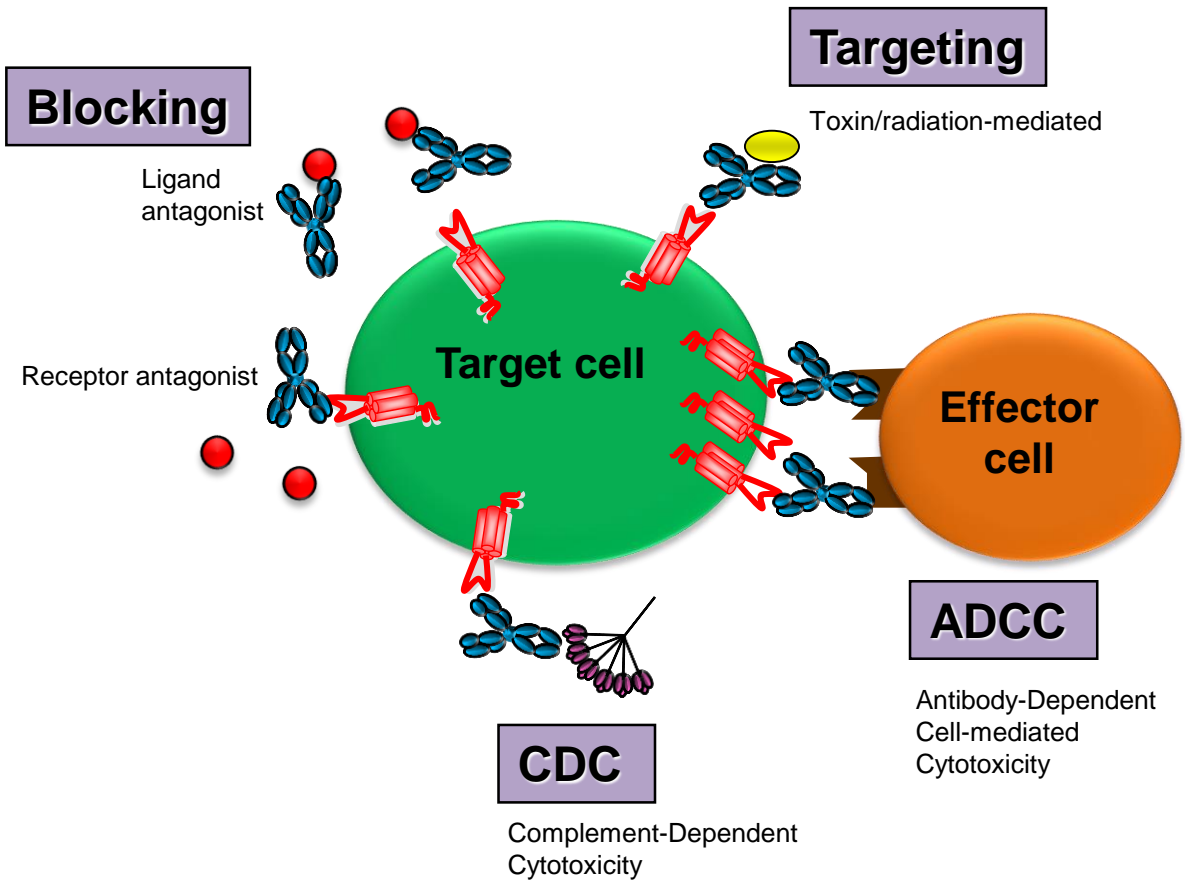
Table 1 Licensed therapeutic monoclonal antibody

Field	Scientific name	Trade name	Approval	Origin and isotype	Target	MoA*	Licensed indication
Cancer	Rituximab	Rituxan, MabThera	1997	Chimeric IgG1	CD20	ADCC, CDC	B cell non-Hodgkin lymphoma
	Trastuzumab	Herceptin	1998	Humanized IgG1	HER-2	ADCC, CDC, Blocking	HER-2 positive breast cancer
	Gemtuzumab ozogamcin	Mylotarg	2000	Humanized IgG4	CD33 ADC	Targeting	Leukemia
	Alemtuzumab	Campath, MabCampath	2001	Humanized IgG1	CD52	ADCC, CDC	B-CLL
	Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	2002	Murine IgG1	CD20 RIT	Targeting	NHL
	Tositumomab iodine 131	Bexxar	2003	Murine IgG2	CD20 RIT	Targeting	NHL
	Cetuximab	Erbix	2004	Chimeric IgG1	EGFR	ADCC, CDC, Blocking	Colorectal, head and neck cancer
	Bevacizumab	Avastin	2004	Humanized IgG1	VEGF	Blocking	Colorectal, lung, breast cancer
	Panitumumab	Vectibix	2007	Human IgG2	EGFR	ADCC, CDC, Blocking	Colorectal cancer
	Catumaxomab	Removab	2009	Chimeric IgG2a/b**	CD3, EpCAM	ADCC, CDC	Malignant ascites
	Denosumab	Prolia, Xgeva	2009	Human IgG2	RANKL	Blocking	Osteoporosis, bone metastasis
	Ofatumumab	Arzerra	2009	Human IgG1	CD20	CDC	CLL
	Brentuximab vedotin	Adcetris	2011	Chimeric IgG1	CD30 ADC	Targeting	ALCL and Hodgkin lymphoma
	Ipilimumab	Yervoy	2011	Human IgG1	CTLA4	Blocking	Advanced melanoma
Pertuzumab	Perjeta	2012	Humanized IgG1	HER-2	Blocking	HER-2 positive breast cancer	
Inflammation	Infliximab	Remicade	1998	Chimeric IgG1	TNF	Blocking	RA, ankylosing spondylitis, Crohn's disease, ulcerative colitis
	Adalimumab	Humira	2002	Human IgG1	TNF	Blocking	RA, Crohn's disease, plaque psoriasis
	Tocilizumab	Actemra, Roactemra	2005	Humanized IgG1	IL-6R	Blocking	Castleman's syndrome, RA
	Certolizumab pegol	Cimzia	2008	Humanized Fab	TNF	Blocking	rheumatoid arthritis, Crohn's disease
	Canakinumab	Ilaris	2009	Human IgG1	IL-1 β	Blocking	Muckle-Wells syndrome
	Golimumab	Simponi	2009	Human IgG1	TNF	Blocking	RA, psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis
	Belimumab	Benlysta	2011	Human IgG1	Blys	Blocking	Systemic lupus erythematosus
Transplant	Muromonab-CD3	Orthoclone OKT3	1986	Murine IgG2a	CD3	Blocking	Transplant rejection
	Daclizumab	Zenapax	1997	Humanized IgG1	CD25	Blocking	Prophylaxis for transplant rejection
	Basiliximab	Simulect	1998	Chimeric IgG1	CD25	Blocking	Prophylaxis for transplant rejection
Others	Abciximab	ReoPro	1994	Chimera Fab	GPIIb/IIIa	Blocking	prevention of cardiac ischemic complications
	Capromab pendetide	Prostascint	1996	Murine IgG1	PSA	Diagnosis	Diagnostic imaging
	Palivizumab	Synagis	1998	Humanized IgG1	RSV F protein	Blocking	Prevention of RSV infection in neonates
	Omalizumab	Xolair	2003	Humanized IgG1	IgE	Blocking	Severe asthma
	Efalizumab	Raptiva	2003	Humanized IgG1	CD11a	Blocking	Psoriasis
	Natalizumab	Tysabri	2004	Humanized IgG4	α 4 β 1 integrin	Blocking	Multiple sclerosis
	Ranibizumab	Lucentis	2006	Humanized Fab	VEGF	Blocking	Macular degeneration
	Eculizumab	Soliris	2007	Humanized IgG2/4	Complement 5	Blocking	Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria, atypical haemolytic-uremic syndrome
Ustekinumab	Stelara	2009	Human IgG1	IL-12p40	Blocking	Plaque psoriasis	

*MOA, mode of action; **bi-specific antibody.

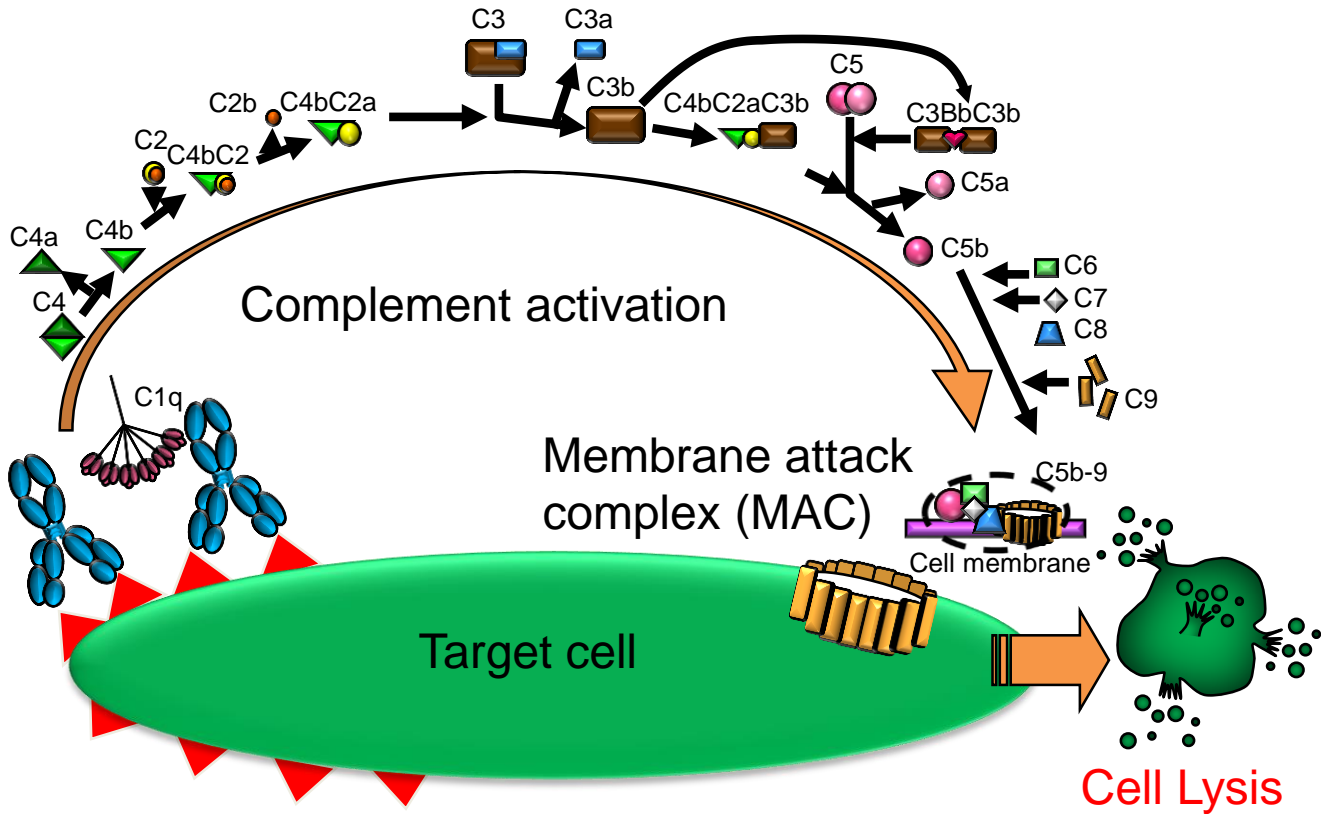
CD, cluster of differentiation; CDC, complement-dependent cytotoxicity; ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; HER-2, human epidermal growth factor receptor 2; ADC, antibody drug conjugate; B-CLL, B-cell chronic lymphocytic leukemia; RIT, Radioimmunotherapy; EGFR, epidermal growth factor receptor; VEGF, vascular endothelial growth factor; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; RANKL, receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; ALCL, anaplastic large cell lymphoma; CTLA4, cytotoxic T-lymphocyte antigen 4; TNF, tumour necrosis factor; RA, rheumatoid arthritis; IL-6R, interleukin 6 receptor; IL-1 β , interleukin 1 β ; BLys, B lymphocyte stimulator; PSA, prostate antigen; RSV, respiratory syncytial virus; IL-12p40, interleukin 12 p40 subunit.

Fig. 2 Mode of action of monoclonal antibody



Mode of action of therapeutic antibodies. Antibody blocks physiological function of target antigen by neutralization as ligand or receptor antagonist. Antibody induce complement-dependent cytotoxicity (CDC) or antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). Antibody act as drug delivery carriers (toxin/radiation) and lead cell death on the cell which express target antigen.

Fig. 3 Cascade of complement dependent cytotoxicity



Cascade of complement activation through classical pathway. Antibody-antigen binding activate the classical pathway. C1q activate complement cascade and lead C3 activation. The deposition of C3b induce formation of membrane attack complex (C5b-9) and lead cell lysis.

第1章 正常ラットにおける Thy-1.1 抗原の分布及び抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおける CDC の誘導

1-1 はじめに

抗体医薬の開発において CDC 誘導における抗原発現量以外の生体反応を規定する要因を明らかにすることは、抗体医薬の有効性・安全性をより正確に予測するために重要である。その規定要因の研究のために、IHC による抗原分布解析と抗体投与による *in vivo* での生体反応を比較解析することのできる動物モデルが必要とされている。解析のためには、1) 外来的に投与される抗体による CDC を作用機序とする病変が惹起されること、2) 抗原の分布と CDC により誘導される生体反応が一致しないこと、という 2 つの条件をみたす必要がある。

抗 Thy-1.1 抗体投与ラットは抗 Thy-1.1 抗体投与により腎糸球体メサンギウム細胞に傷害が引き起こされるモデルである。Thy-1 (CD90) は 25-35 kDa、GPI-anchor 型細胞表面タンパクである⁸⁶⁻⁸⁸。Thy-1 には Thy-1.1 (CD90.1) と Thy-1.2 (CD90.2) があり、この 2 分子は 1 つのアミノ酸が異なる⁸⁸。Thy-1.1 はリンパ球から発見された抗原であり、腎臓以外にもリンパ球系、神経系組織での発現が報告されているのにもかかわらず⁷⁹⁻⁸⁴、抗 Thy-1.1 抗体投与による組織傷害は腎糸球体メサンギウム細胞でのみ議論されている。

そこで著者は CDC 誘導における抗原発現量以外の生体反応を規定する要因を研究するため、抗 Thy-1.1 抗体投与ラットが上記 2 つの条件を満たすよい動物病態モデルとなる可能性に着目し、正常ラットでの Thy-1.1 抗原の全身分布を検索すると共に、抗 Thy-1.1 抗体投与ラットでの誘発病変が CDC に起因することを確認し、さらに CDC による生体反応がおこる臓器を特定し、抗原分布と生体反応とを比較解析した。

1-2 実験方法

1) 動物及び飼育環境

24 匹のオス Wistar ラット(日本 SLC 株式会社、静岡、日本)を 6 週齢で購入し、7 週齢にて実験に使用した。動物は、ワイヤーケージに収容し、温度($23 \pm 3^{\circ}\text{C}$)、湿度($55 \pm 20\%$)、換気(1 時間当たり 10-16 回)、及び照明サイクル(12 時間/12 時間 light/dark)で制御した動物室にて飼育した。餌(CE-2; 日本クレア株式会社、東京、日本)及び水は自由摂取とした。全動物について毎日一般状態観察を行った。動物は麻酔下で放血により安楽死させた後、剖検し、病理学的検査に供した。全ての動物実験は、Ethical Committee for Treatment of Laboratory Animals at Chugai Pharmaceutical Co., Ltd. により承認された。

2) 無処置及び抗 Thy-1.1 抗体投与ラットモデル

無処置動物は 7 週齢にて 3 匹剖検した。これらの動物は Thy-1.1 抗原分布の検索に用いた。

抗 Thy-1.1 抗体投与ラットモデルは、7 週齢にて抗 Thy-1.1 抗体(OX-7、mouse、Cedarlane Laboratories Ltd.、Burlington、ON、Canada)を 1 mg/kg の用量にて静脈内投与した。抗 Thy-1.1 抗体は phosphate-buffered saline (PBS) で希釈した^{89,90}。動物は抗 Thy-1.1 抗体投与後、0.5、1、8、24 及び 48 時間後に剖検した。本モデルは、抗体投与後 24 時間以内に腎糸球体メサンギウム細胞の Karyolysis、メサンギウム細胞の減少及び糸球体毛細血管の拡張などが認められ、その数日後メサンギウム細胞の増殖が認められることが知られている⁷⁸。今回の実験では、抗体投与後早期の変化を検索することを目的としたため、剖検を抗体投与後 0.5~48 時間の間に行った。コントロール群として、溶媒である PBS 投与群を投与後 0.5 及び 48 時間で剖検した。抗体投与群及びコントロール群共に、各タイムポイント 3 匹ずつ剖検した。抗体及び PBS 投与動物は投与後、0.5、1、8、24 及び 48 時間後において一般状態を観察し、投与前日、投与日、投与後 48 時間において体重測定を

実施した。

3) 固定及び包埋

リンパ系組織、腎臓、神経系組織は Thy-1 を高発現することが知られている⁷⁹⁻⁸⁴。よって、胸腺、脾臓、腸間膜リンパ節、腎臓、副腎、下垂体、大脳、坐骨神経を剖検時に採取・固定した。加えて、肺、肝臓、眼球、胃、小腸、大腸、皮膚・乳腺、大腿骨・骨髄、気管、心臓、舌、食道、膵臓、ハーダー腺、大動脈、骨格筋、甲状腺・上皮小体及び膀胱を採取・固定した。採取臓器は PLP-AMeX 法⁹¹にて固定・包埋し、3-5 μm にて薄切し、HE 染色並びに免疫組織化学染色に使用した。

4) 光学顕微鏡所見

抗 Thy-1.1 抗体投与ラットモデルの、胸腺、脾臓、腸間膜リンパ節、腎臓、膀胱、副腎、下垂体、大脳、坐骨神経、肺、心臓、舌、胃、小腸、大腸、肝臓、眼球、ハーダー腺、大動脈について、PLP-AMeX 包埋組織から薄切した HE 染色標本にて検索した。

5) 免疫組織化学的所見

無処置動物において、Thy-1.1 抗原の分布を免疫組織化学的に、採取したすべての臓器・組織において検索した。PLP-AMeX 包埋組織に、抗 Thy-1.1 抗体(CD90、OX-7、Cedarlane Laboratories Ltd.、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を一次抗体として使用し、ネガティブコントロールとして、Isotype と動物種の一致した抗体を使用した。免疫組織化学染色は Dako LSAB kit (Dako Denmark A/S、Glostrup、Denmark)を用い、labeled streptavidin-biotin (LSAB) 法にて実施した。抗原の賦活化は、一次抗体処置前に、0.01 M citrate buffer (pH 6.0)を用い、98°C にて microwave oven (H2800; Energy Beam Sciences、East Granby、CT、USA)で加熱処理した。peroxidase-diaminobenzidine reaction にて可視化し、ヘマトキシリン染色を施した。

抗 Thy-1.1 抗体投与ラットモデルにおいて、C3 の沈着を胸腺、脾臓、腸間膜リンパ節、腎臓、膀胱、副腎、坐骨神経、肺、心臓、小腸、肝臓、眼球及

びハーダー腺において検索した。PLP-AMeX 包埋組織に、抗 C3 抗体 (Cappel, Aurora, OH, USA, 10 μ g/mL)を一次抗体として使用し、ネガティブコントロールとして、Isotype と動物種の一一致した抗体を使用した。免疫組織化学染色及び可視化方法、ヘマトキシリン染色の実施については Thy-1.1 抗原染色の手法と同様である。

6) Real time PCR

無処置動物の、胸腺、副腎、大脳について、Real time PCR 法により Thy-1 mRNA の発現を検索した。組織は液体窒素で凍結後、粉碎し、QIAzol Lysis Reagent (Qiagen N.V., Venlo, Netherlands)にて組織を溶解後、クロロホルムを加え遠心、水層を採取し、カラム(RNeasy column、Qiagen N.V.)を通し、total RNA を抽出した。Total RNA より、ReverTra Ace qPCR RT Kit (東洋紡株式会社、大阪、日本)を用いて cDNA library を作製した。Thy-1 についての Real time PCR は試薬:FastStart Universal Probe Master (ROX) (Roche applied science、Penzberg、Germany)、Universal ProbeLibrary (#40、Roche Applied Science)及びプライマー (Left: ccacaagctccaataaaactatcaa、Right: agcagccaggaagtgtttg)を使用した。Ribosomal protein S18 (Rps18)については、TaqMan Universal Master Mix II, with UNG 5mL (applied biosystems by life technologies corporation、Carlsbad, CA, USA)、及び TaqMan® Gene Expression Assay x20 Rps18 (applied biosystems by life technologies corporation)を使用した。Real time PCR を StepOnePlus™ Real Time PCR system (Life technologies corporation)により、95°Cにて 10 分処理した後、95°C15 秒及び 60°C60 秒を 40 サイクル実施した。臓器ごとに Rps18 に対する相対値を示した。

7) Western blot

無処置動物の、胸腺、副腎、大脳について、Western blot により Thy-1 タンパクの発現を検索した。組織は液体窒素で凍結後、粉碎した。粉碎組織に Lysis buffer (1% NP-40(w/v)、10mM EDTA、Halt™ Protease Inhibitor Cocktail in PBS、Thermo Fisher Scientific Inc.、Waltham, MA, USA) を加

え、氷冷にて30分静置後、遠心分離(14000rpm、4°C、10分)し、タンパク質を含む上清を回収した。タンパク質濃度は Bradford 法(Quick Start プロテインアッセイ、Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA、USA)により測定した。タンパク質濃度を0.331 mg/mLに調整し、2 x sample buffer (Novex Tris-Glycine SDS Sample buffer、Life technologies corporation)を加え、ボイル(5分間、95°C)後、氷冷し、ゲル(ミニプロティアン TGX ゲル、Bio-Rad Laboratories)にて電気泳動(200V、30分、ミニプロティアン Tetra セル、Bio-Rad Laboratories)した。PVDF membrane (Trans-Blot Turbo、Bio-Rad Laboratories)に転写(2.5 A、3分、Trans-BlotboratoriesDS Sample bufferion Su、Bio-Rad Laboratories)した。Membrane は、ブロッキング(4°C、over night、PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal、東洋紡株式会社)後、一次抗体として抗 Thy-1 抗体(室温、1時間、OX7、sc-53116、Santa Cruz Biotechnology, Inc.、Santa Cruz、CA、USA、1 µg/mL)を、二次抗体(4°C、1時間、anti-mouse IgG-HRP、Cell signaling technology, Inc.、Boston、MA、USA)を使用し、発色(SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate、Thermo Fisher Scientific Inc.)した。

副腎については、タンパク質濃度を 5.80 mg/mL に調整し、同様の方法にて、再測定した。その際、大脳(0.331 mg/mL)をリファレンスとした。

1-3 結果

1) 無処置ラットにおける Thy-1.1 抗原の免疫組織学的所見

Thy-1.1 抗原はラット全身諸臓器に広く分布していた(Figure 1-1、Table 1-1)。胸腺や脾臓においてリンパ球に多く認められ、*moderate* な陽性反応を示した(Figure 1-2)。脾臓では巨核球にも、*weak* ながら陽性反応が認められた(Figure 1-2)。腎糸球体メサンギウム細胞では *strong* の陽性反応がみとめられた(Figure 1-2)。神経内分泌系である副腎髄質細胞は *strong-weak* まで様々な染色性を示した(Figure 1-1、Figure 1-2)。その他神経内分泌系では下垂体前葉に *moderate* に、大脳(神経細胞体、樹状突起、軸索)に *weak* に、坐骨神経軸索に *moderate* に、眼球網膜視神経線維層に *weak* に発現していた(Figure 1-1、Figure 1-2)。これらに加え、Thy-1.1 抗原は、腸間膜リンパ節、腎臓、肺、肝臓、胃、小腸、大腸、皮膚における間質細胞、乳腺における筋上皮細胞、骨における骨膜など、間葉系細胞に発現していた(Figure 1-1)。その他の臓器、気管、心臓、舌、食道、膵臓、ハーダー腺、大動脈、骨格筋、甲状腺、上皮小体、膀胱、骨髄において、陽性反応は認められなかった(Table 1-1、Figure 1-2)。また、3 個体において、染色結果は同等であった(Table 1-1)。

2) Real time PCR 及び Western blot

Real time PCR により胸腺、副腎、大脳で、Thy-1 mRNA の発現が認められた(Figure 1-3 A)。副腎で mRNA は低いものの発現が認められた。Western blot により胸腺及び大脳から抽出した細胞溶解液において、25-35kDa の位置に明瞭な Band が認められた(Figure 1-3 B)。副腎では mRNA の発現量に合わせた高濃度の副腎細胞溶解液において、同様の位置に Band が認められた(Figure 1-3 C)。これにより、Thy-1 タンパク質の各臓器における存在が確認された。これらの結果は各臓器における免疫組織化学染色により検出された Thy-1 タンパク質発現と一致するものであった。

3) 抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおける一般症状及び体重

抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおいて一般症状(投与後 2 日まで)に変化は認められなかった(Table 1-2)。また体重についても(投与後 2 日まで)に変化は認められなかった(Table 1-3)。

4) 抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおける腎臓の変化

抗 Thy-1.1 抗体投与ラットの腎臓を検索した結果、投与後 0.5 時間より病理組織学的変化が認められた(Table 1-4)。また、PBS 投与群において変化は認められなかった(Table 1-4)。CDC 誘導の要となる因子である C3 の沈着を検索すると、腎臓に沈着が認められた(Table 1-5)。また、PBS 投与群において変化は認められなかった(Table 1-5)。腎臓では、糸球体において、メサンギウム細胞の Karyolysis 及び好中球の浸潤が抗体投与後 0.5 時間より、メサンギウム細胞の減少及び糸球体毛細血管の拡張が抗体投与後 8 時間より、メサンギウム領域の減少が抗体投与後 24 時間より認められた(Table 1-4、Figure 1-4)。腎臓のその他の細胞には変化は認められなかった(Table 1-4)。糸球体において、メサンギウム細胞に抗体投与後 0.5 時間より C3 の沈着が認められ、抗体投与後 48 時間まで認められた(Table 1-5、Figure 1-4)。

5) 抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおける全身諸臓器の変化

抗 Thy-1.1 抗体投与ラットの全身臓器(胸腺、脾臓、腸間膜リンパ節、膀胱、副腎、下垂体、大脳、坐骨神経、肺、心臓、舌、胃、小腸、大腸、肝臓、眼球、ハーダー腺、大動脈)を検索した結果、抗原臓器を含む検索臓器に病理組織学的変化は認められなかった(Table 1-6)。また、PBS 投与群においても変化は認められなかった(Table 1-6)。CDC 誘導の要となる因子である C3 の沈着を検索すると、抗原臓器を含む検索臓器、胸腺、脾臓、腸間膜リンパ節、膀胱、副腎、坐骨神経、肺、心臓、小腸、肝臓、眼球及びハーダー腺について変化は認められなかった(Table 1-7)。

1-4 考察

本章では、正常ラットにおいて Thy-1.1 抗原の全身分布を検索し、抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおいて誘発病変が CDC に起因することを確認し、さらに CDC による生体反応がおこる臓器を特定し抗原分布臓器と比較することで、本研究の目的に適した動物モデルであることを検討した。

Thy-1.1 抗原は免疫組織化学的に免疫系、泌尿器系、神経内分泌系、間葉系の細胞など、正常ラットの全身に広く分布していた。Acton *et al.*、Paul *et al.*、Reif、Watanabe *et al.*、Yuasa *et al.*らは、すでに同様の Thy-1.1 抗原の全身分布を詳細に報告しているが、今回、新たに脾臓巨核球、下垂体前葉、及び骨における骨膜にも分布していることが確認された。抗原分布の結果から、ラットへの抗 Thy-1.1 抗体投与による組織傷害は様々な臓器に起こる可能性があると考えられた。

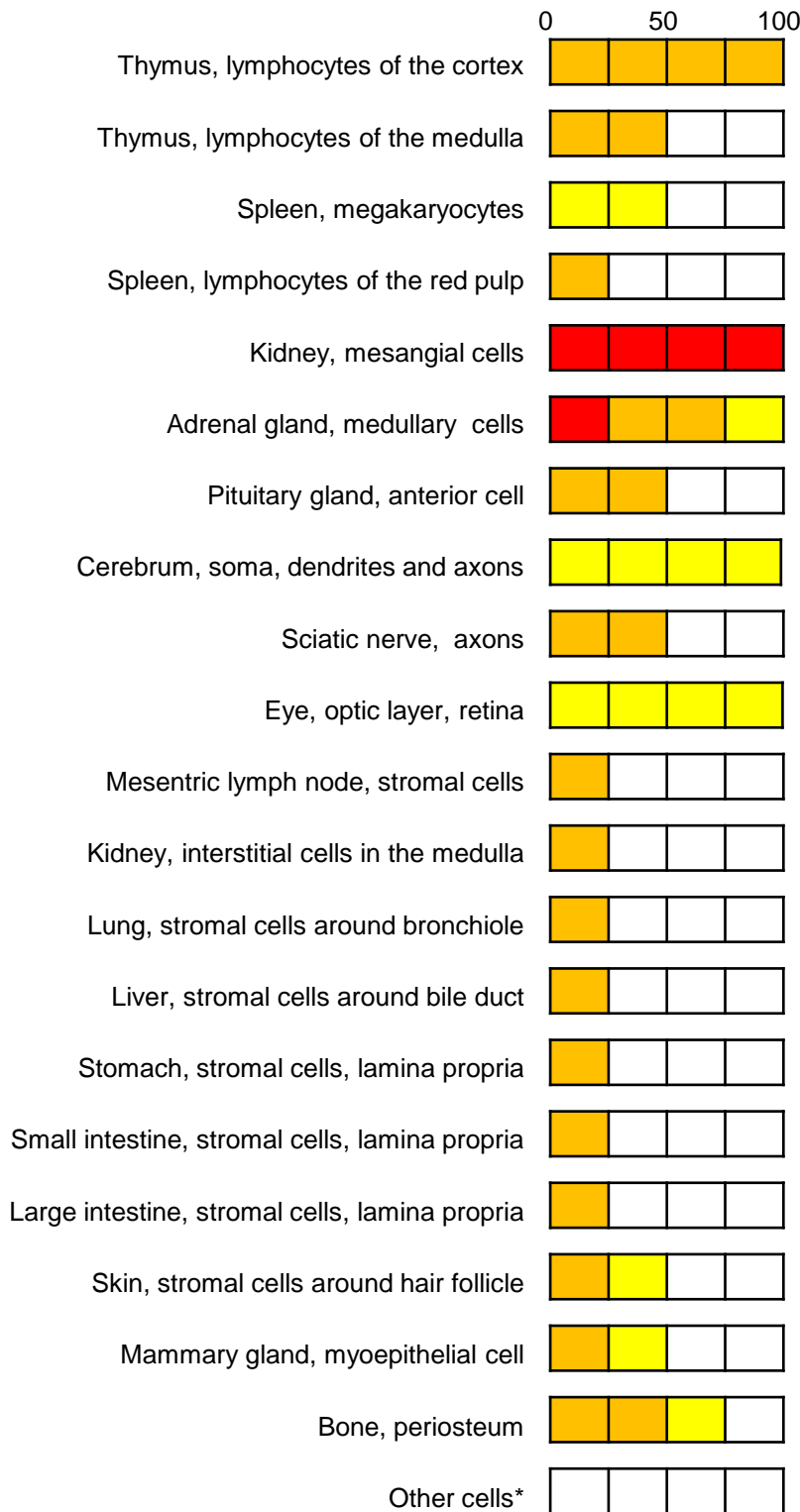
そこで、抗 Thy-1.1 抗体投与ラットの全身臓器を観察したところ、腎臓のみで変化が認められた。腎臓においては、抗体投与後 0.5 時間より糸球体メサンギウム領域における Karyolysis 及び好中球の浸潤、続いてメサンギウム細胞の減少及び糸球体毛細血管の拡張、さらにメサンギウム領域の減少が認められた。また、腎糸球体メサンギウム領域における C3 沈着は抗体投与後 0.5 時間より認められ、これらの腎臓における変化は、抗 Thy-1.1 抗体投与による CDC による変化として報告されている所見と一致していた^{75,76,78}。従って、今回実施した実験条件において、外来的に投与された抗 Thy-1.1 抗体に起因する CDC が誘導されているものと判断された。

以上の様に、正常ラットにおいて、Thy-1.1 抗原はラットの全身諸臓器に広く分布し、抗 Thy-1.1 抗体投与により CDC 誘導組織傷害が様々な臓器に起こる可能性があると予測された。しかし、抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおいては、CDC 誘導組織傷害は腎糸球体メサンギウム細胞のみに限定され、その他の抗原発現臓器を含む検索臓器に病理組織学的変化並びに C3 沈着は認められなかった。従って、本モデルでは抗原の分布と CDC により誘導される生体反応が一致しないことが明らかとなった。

以上、本章では、本抗 Thy-1.1 抗体投与ラットが、1)外来的に投与される抗体による CDC を作用機序とする病変が惹起されること、2)抗原の分布と CDC により誘導される生体反応が一致しないこと、という2つの条件をみたし、CDC 誘導の抗原発現量以外の生体反応を規定する要因を研究する有用なモデルと結論した。

図表

Fig.1-1 Distribution of Thy-1.1 antigen in normal rats



Distribution of Thy-1.1 antigen in normal rats. The distribution of the Thy-1.1 antigen is shown by the intensity and frequency of positive staining. Red, orange, yellow and white indicate strong, moderate, weak and negative staining intensity, respectively. The frequency of staining is shown as the number of colored columns. Each column stands for 25%. *Other organs and tissue elements.

Table 1-1 Individual distribution of Thy-1.1 antigen in normal rats

Organ, tissue elements	Staining intensity ¹ /frequency ²		
	1 ³	2	3
Thymus, lymphocytes of the cortex	2/c	2/c	2/c
Thymus, lymphocyte of the medulla	2/o	2/o	2/o
Spleen, megakaryocytes	1/o	1/r	1/o
Spleen, lymphocytes of the red pulp	2/r	2/r	2/r
Kidney, mesangial cells	3/c	3/c	3/c
Adrenal gland, medullary cells	1-3/c	1-3/c	1-3/c
Pituitary gland, anterior cell	2/o	2/o	2/o
Cerebrum, somas, dendrites and axons	1/c	1/c	1/c
Sciatic nerve, axons	2/o	2/o	2/o
Eye, optic layer, retina	1/c	1/c	1/c
Mesentric lymph node, stromal cells	2/r	2/r	2/r
Kidney, interstitial cells in the medulla	2/r	2/r	2/r
Lung, stromal cells around bronchiole	2/r	2/r	2/r
Liver, stromal cells around bile duct	2/r	2/r	2/r
Stomach, stromal cells, lamina propria	2/o	2/r	2/r
Small intestine, stromal cells, lamina propria	2/o	1/r	2/r
Large intestine, stromal cells, lamina propria	2/o	2/r	2/r
Skin, stromal cells around hair follicle	1-2/o	1-2/o	1-2/o
Mammary gland, myoepithelial cell	1-2/o	1-2/o	1-2/o
Bone, periosteum	1-2/c	1-2/f	1-2/f
Trachea	-	-	-
Heart	-	-	-
Tounge	-	-	-
Esophagus	-	-	-
Pancreas	-	-	-
Harderlian gland	-	-	-
Aorta	-	-	-
Skeletal muscle	-	-	-
Thyroid gland	-	-	-
Parathyroid gland	-	-	-
Bladder	-	-	-
Bone marrow	-	-	-

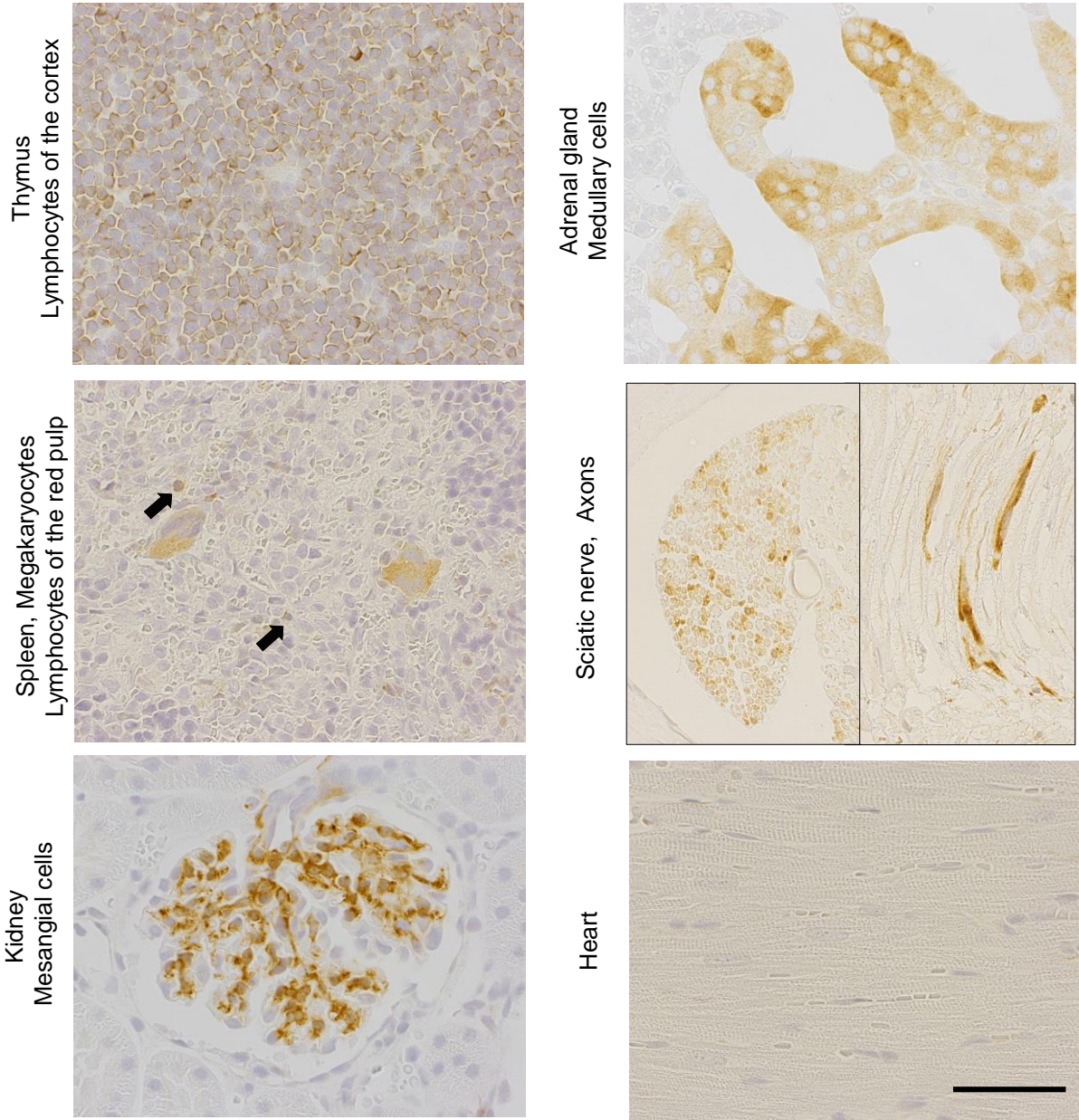
-, negative.

¹ staining intensity ratings are weak (1), moderate (2) and strong (3).

² staining frequency ratings are rare (r; 0-25%), occasional (o; 26-50%), frequent (f; 51-75%) and constant (c; 76-100%).

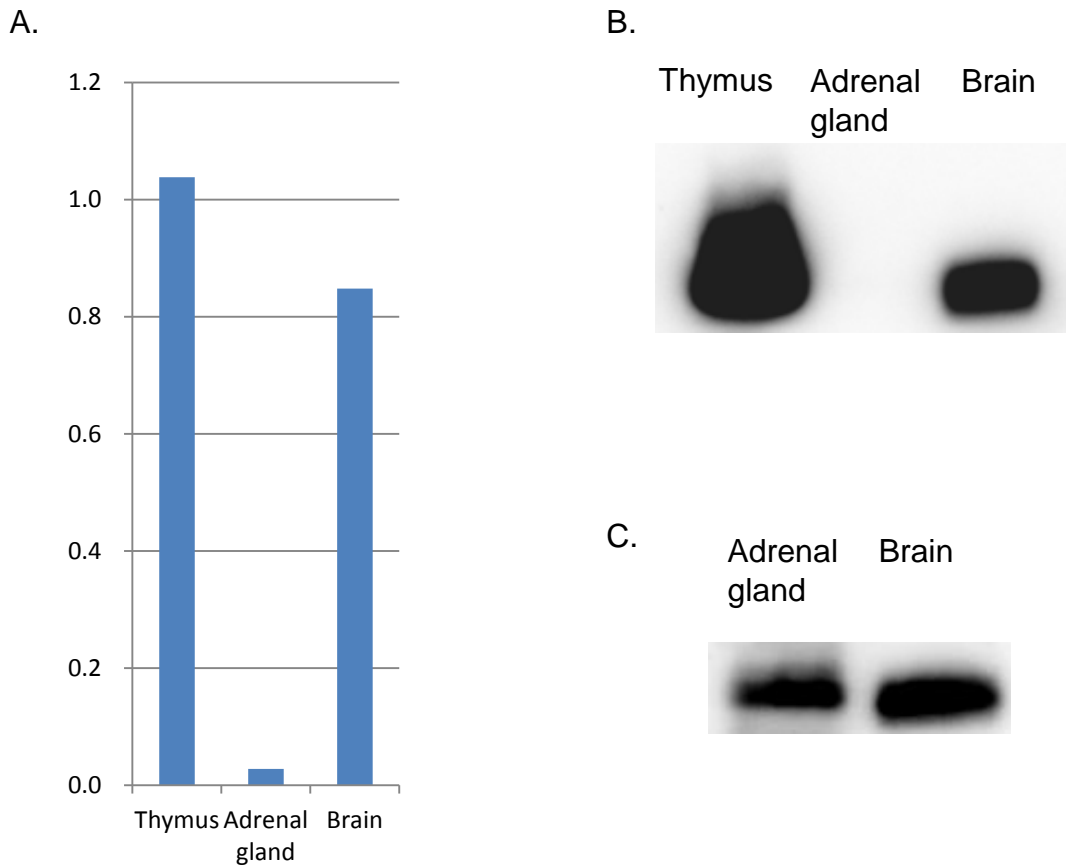
³ sample numbers indicate mere sequence of the 3 rats.

Fig.1-2 Immunohistochemistry of Thy-1.1 in the thymus, spleen, kidney, adrenal gland, sciatic nerve and heart of normal rat



Distribution of Thy-1.1 antigen in normal rats. Immunohistochemistry of Thy-1.1 in the thymus, spleen, kidney, adrenal gland, sciatic nerve and heart. Positive reactions can be seen in lymphocytes of the cortex in the thymus, megakaryocytes and lymphocytes (arrows) of the red pulp in the spleen, mesangial cells of the kidney, medullary cells of the adrenal gland and axons in the sciatic nerve. No positive reaction can be seen in the heart. Bar = 50 μ m.

Fig.1-3 Expression of Thy-1 in the thymus, adrenal gland and brain of normal rat



Real time PCR and Western blot analysis of Thy-1 expression in the thymus, adrenal gland and brain of normal rat. A) The Thy-1 mRNA content was analyzed by real time PCR in the thymus, adrenal gland and brain. The values were normalized to the expression of Rps18 in the same organs. B) Strong expression was observed in the thymus and brain. Loading per lane of 1.7 μ g protein from each organs. C) Expression was seen in adrenal gland with in high concentration of protein. Loading per lane of 29.0 μ g protein from adrenal gland and 1.7 μ g protein from brain.

Table 1-2 General condition in the PBS- or anti-Thy-1.1 antibody injected rat

Groups ¹	Hours after treatment					
	Pre	0.5	1	8	24	48
PBS	N (6) ²	N (6)	N (3)	N (3)	N (3)	N (3)
Anti-Thy-1.1 antibody	N (15)	N (15)	N (12)	N (9)	N (6)	N (3)

Pre, pretreatment.

N, no abnormality.

¹PBS- or anti-Thy-1.1 antibody-injected rats. PBS, rats were given an intravenous injection of PBS as a control; Anti-Thy-1.1 antibody, rats were given intravenous injections of a monoclonal anti-Thy-1.1 antibody solution diluted with PBS at 1 mg/kg body weight.

²number of animals examined.

Table 1-3 Body weight in the PBS- or anti-Thy-1.1 antibody injected rat

Groups ¹	Hours after treatment		
	-24*	0 (Pre)	48
PBS	183.6 ± 7.3 ²	187.6 ± 7.7	195.5 ± 8.2
Anti-Thy-1.1 antibody	183.4 ± 7.5	190.7 ± 5.9	196.0 ± 5.9

*The day of grouping.

Pre, pretreatment.

¹PBS- or anti-Thy-1.1 antibody-injected rats. PBS, rats were given an intravenous injection of PBS as a control; Anti-Thy-1.1 antibody, rats were given intravenous injections of a monoclonal anti-Thy-1.1 antibody solution diluted with PBS at 1 mg/kg body weight.

²The result of three animals were shown in each group.

Table 1-4 Histopathological changes in the kidney of the anti-Thy-1.1 antibody injected rat

Tissue elements in kidney	Groups ¹	PBS		Anti-Thy-1.1 antibody				
		Hours after treatment	0.5	48	0.5	1	8	24
Findings	Number of animal examined	3	3	3	3	3	3	3
Glomeruli								
Karyolysis in mesangial cell		-	-	+	+	±	-	-
Infiltration of neutrophil		-	-	±	±	+	+	+
Decreasement of number of mesangial cell		-	-	-	-	+	+	+
Capillary dilatation of glomerulus		-	-	-	-	±	+	+
Decreasement of mesangial area		-	-	-	-	-	+	+
Other elements								
		-	-	-	-	-	-	-

¹PBS- or anti-Thy-1.1 antibody-injected rats. PBS, rats were given an intravenous injection of PBS as a control; Anti-Thy-1.1 antibody, rats were given intravenous injections of a monoclonal anti-Thy-1.1 antibody solution diluted with PBS at 1 mg/kg body weight.

Severity of lesion:±, very slight; +, slight; -, no lesion.

Findings were consistent between animals.

Table 1-5 C3 deposition in the kidney of the anti-Thy-1.1 antibody injected rat

Tissue elements in kidney	Groups ¹	PBS		Anti-Thy-1.1 antibody				
		Hours after treatment	0.5	48	0.5	1	8	24
	Number of animal examined	3	3	3	3	3	3	3
Mesangial cell in glomeruli		-	-	3/c ²	3/c	2/o-f	2/o	1/o
Other elements		-	-	-	-	-	-	-

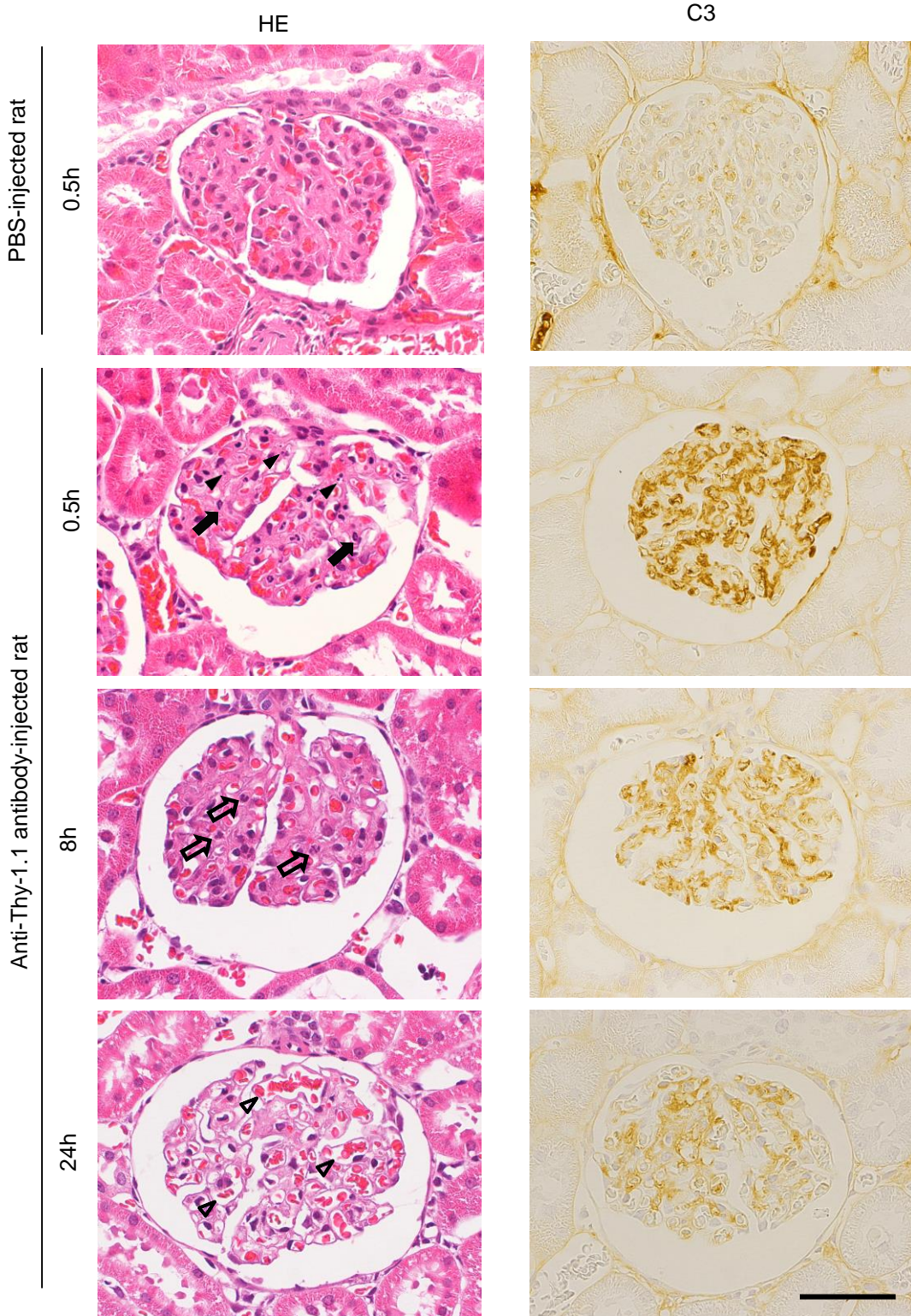
¹PBS- or anti-Thy-1.1 antibody-injected rats. PBS, rats were given an intravenous injection of PBS as a control; Anti-Thy-1.1 antibody, rats were given intravenous injections of a monoclonal anti-Thy-1.1 antibody solution diluted with PBS at 1 mg/kg body weight.

²Staining intensity/frequency, staining intensity ratings are weak (1), moderate (2) and strong (3) and staining frequency ratings are occasional (o; 26-50%), frequent (f; 51-75%) and constant (c; 76-100%).

-, negative,

Findings were consistent between animals.

Fig.1-4 Histopathological changes and immunohistochemistry for C3 in the kidney of the PBS- or anti-Thy-1.1 antibody injected rat



Histopathological and immunohistochemical findings in the PBS- or anti-Thy-1.1 antibody-injected rats. HE staining and immunohistochemistry for C3 of the kidney are shown. Changes at 0.5, 8 and 24 hours after injection are shown. Mesangial cell death can be seen in the kidney of the rat injected with anti-Thy-1.1 antibody. In the animal sacrificed at 0.5 hours after injection, karyolysis in the mesangial cell (closed arrowheads) and infiltrations of a small number of neutrophils (closed arrows) can be seen. In the animal sacrificed at 8 hours after injection, the number of mesangial cells is decreased with reduced karyolysis and increased neutrophil infiltration (open arrows). In the animal sacrificed at 24 hours after injection, the mesangial area is decreased and is accompanied by capillary dilatation of the glomerulus (open arrowheads). C3 deposition in the mesangial cells of the kidney can be seen in the antibody-treated animal but cannot be seen in the PBS-treated animal. Bar = 50 μ m.

Table 1-6 Organs with histopathological changes in the PBS- or anti-Thy-1.1 antibody injected rat

Organ	Groups ¹	PBS		Anti-Thy-1.1 antibody				
		Hours after treatment	0.5	48	0.5	1	8	24
	Number of animal examined	3	3	3	3	3	3	3
Thymus		0*	0	0	0	0	0	0
Spleen		0	0	0	0	0	0	0
Mesenteric lymphonode		0	0	0	0	0	0	0
Kidney		0	0	3	3	3	3	3
Bladder		0	0	0	0	0	0	0
Adrenal gland		0	0	0	0	0	0	0
Pituitary gland		0	0	0	0	0	0	0
Cerebrum		0	0	0	0	0	0	0
Sciatic nerve		0	0	0	0	0	0	0
Lung		0	0	0	0	0	0	0
Heart		0	0	0	0	0	0	0
Toung		0	0	0	0	0	0	0
Stomach		0	0	0	0	0	0	0
Small intestine		0	0	0	0	0	0	0
Large intestine		0	0	0	0	0	0	0
Liver		0	0	0	0	0	0	0
Eye		0	0	0	0	0	0	0
Hardalian gland		0	0	0	0	0	0	0
Aorta		0	0	0	0	0	0	0

* Number of animals with lesion

¹PBS- or anti-Thy-1.1 antibody-injected rats. PBS, rats were given an intravenous injection of PBS as a control; Anti-Thy-1.1 antibody, rats were given intravenous injections of a monoclonal anti-Thy-1.1 antibody solution diluted with PBS at 1 mg/kg body weight.

Findings were consistent between animals.

Table 1-7 Organs with C3 deposition in the PBS- or anti-Thy-1.1 antibody injected rat

Organ	Groups ¹ Hours after treatment Number of animal examined	PBS		Anti-Thy-1.1 antibody				
		0.5	48	0.5	1	8	24	48
		3	3	3	3	3	3	3
Thymus		0*	0	0	0	0	0	0
Spleen		0	0	0	0	0	0	0
Mesenteric lymphonode		0	0	0	0	0	0	0
Kidney		0	0	3	3	3	3	3
Bladder		0	0	0	0	0	0	0
Adrenal gland		0	0	0	0	0	0	0
Sciatic nerve		0	0	0	0	0	0	0
Lung		0	0	0	0	0	0	0
Heart		0	0	0	0	0	0	0
Small intestine		0	0	0	0	0	0	0
Liver		0	0	0	0	0	0	0
Eye		0	0	0	0	0	0	0
Hardalian gland		0	0	0	0	0	0	0

* Number of animals with C3 deposition.

¹PBS- or anti-Thy-1.1 antibody-injected rats. PBS, rats were given an intravenous injection of PBS as a control; Anti-Thy-1.1 antibody, rats were given intravenous injections of a monoclonal anti-Thy-1.1 antibody solution diluted with PBS at 1 mg/kg body weight.

Following organs were not examined because of no histopathological changes nor no distribution of injected anti-Thy-1.1 antibody; cerebrum, tongue, stomach, large intestine, aorta and pituitary gland.

Findings were consistent between animals.

第2章 抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおける投与抗体分布と膜補体制御因子

2-1 はじめに

第1章において、抗 Thy-1.1 抗体投与ラットでは、正常ラットの抗原分布と CDC により誘導される生体反応が一致しなかった。抗 Thy-1.1 抗体投与ラットが CDC 誘導の抗原発現量以外の生体反応を規定する要因を研究する有用なモデルとなると結論した。抗原分布と生体反応が一致しない理由として、1)投与抗体が抗原部位に到達・結合していない、2)抗体と抗原が結合した後、補体制御因子など、CDC に抑制的に作用する機構が働いている、という2つの要因を想定した。

投与された抗体は血液脳関門や血液精巣関門などにより、*in vivo* において抗体が抗原に到達できない領域があると考えられる⁶⁴。組織交差反応性試験ではその試験系の特性から通常抗体が到達できない領域においても抗体の結合が検出されるため、生体反応の予測には生体に投与した抗体が実際に抗原に到達・結合したかを確認する必要があると考えた。

補体活性化古典経路では多くの補体制御系が作用していることが報告されている。補体制御因子は膜性因子と液性因子に分けられる。膜補体制御因子 (membrane complement regulatory: mCRPs) としては、complement receptor 1-related gene/protein Y (Crry)、complement receptor 1 (CD35)、membrane cofactor protein (CD46)、decay-accelerating factor (CD55)、及び CD59 が挙げられる⁹²⁻⁹⁸。また、液性因子としては C1 inhibitor、factor I、factor H、及び C4-binding protein などが知られている⁹⁹⁻¹⁰³。これらの制御因子の主な作用点は、1) C1 活性化の抑制(C1 inhibitor)、2) C3 活性化の抑制(Crry、CD35、CD46、CD55、factor I、factor H、C4-binding protein)、3) C3 活性化後の C5 活性化の抑制(CD35、CD46、CD55、factor I)、4) CDC の最終過程である MAC の形成の抑制(CD59)、に分類される^{93,99}。これらのうち、膜性因子は組織分布解析が可能である。膜性の mCRPs が抗体介在性 CDC の誘導の初期過程である C3 の活性化に関わることから、C3 活性化抑制分子に注目した。一方、C3 活性化抑制に関わる mCRPs にはヒトと動物種の間で種差があることが知られている^{92,93,104-107}。げっ

歯類では CD46 は精巢にのみ発現し、CD35 は発現していない⁹³。ラットでは Crry と CD55 が全身に分布し、かつ C3 沈着に抑制的に働くことが知られている。

本章では、mCRPsとして、この2つの因子に焦点を絞り、抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおける投与抗体の分布並びに正常ラットにおける mCRPs (Crry と CD55)の分布を解析した。

2-2 実験方法

1) 動物及び飼育環境

第 1 章で実施した実験の動物を使用した。

2) 無処置及び抗 Thy-1.1 抗体投与ラットモデル

第 1 章で実施した実験の動物を使用した。

3) 固定及び包埋

第 1 章において PLP-AMeX 法にて固定・包埋した臓器に加え、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、腸間膜リンパ節、大脳、坐骨神経、肺、心臓、肝臓を採取し、OCT コンパウンドに包埋し新鮮凍結した。組織は、PLP-AMeX 包埋組織及び凍結組織共に、3-5 μm にて薄切し、HE 染色並びに免疫組織化学染色に使用した。

4) 免疫組織化学的所見

抗 Thy-1.1 抗体投与ラットモデルにおいて、投与抗 Thy-1.1 抗体の分布を検索するため、抗マウス免疫グロブリン抗体(Dako LSAB kit、Dako)を一次抗体として、新鮮凍結標本に供した。C3 染色手法は第 1 章と同様である。

無処置動物の PLP-AMeX 包埋した腎臓、胸腺及び副腎において、Crry 及び CD55 に対する免疫組織化学染色を行った。一次抗体として、抗 Crry 抗体 (512、BD PharMingen、San Jose、CA、USA、0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及び抗 CD55 抗体 (I-19、Santa Cruz Biotechnology, Inc.、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を使用した。抗原賦活化方法は、第 1 章の Thy-1.1 抗原と同様である。

ネガティブコントロールとして、Isotype と動物種の一一致した抗体を使用した。免疫組織化学染色及び可視化方法、ヘマトキシリン染色の実施については第 1 章の手法と同様である。

5) Western blot

無処置動物の、胸腺及び副腎について、Western blot により Crry 及び CD55 タンパクの発現を検索した。一次抗体はそれぞれ、抗 Crry 抗体(室温、1 時間、512、BD PharMingen、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及び抗 CD55 抗体(4°C、over

night, I-19、Santa Cruz Biotechnology, Inc.、1 μ g/mL)を使用した。二次抗体は anti-mouse IgG-HRP (Cell signaling technology, Inc.)もしくは anti-goat IgG-HRP (Life technologies corporation)を使用した。その他の手法は第 1 章と同様である。

6) 抗原発現臓器の生体反応による分類

抗原発現臓器について CDC 誘導の段階を、抗体の分布、mCRPs の発現、C3 の沈着、及び病変の発現をもとに 3 つに分類した。

2-3 結果

1) Thy-1.1 抗原発現臓器における投与抗 Thy-1.1 抗体の分布と C3 沈着

抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおいて、投与した抗 Thy-1.1 抗体は抗原発現臓器の内、一部である、腎糸球体メサンギウム細胞、胸腺皮質リンパ球、脾臓赤脾髄リンパ球、副腎髄質細胞のみに分布が確認された。抗体は投与後 0.5 時間より分布し、その後 48 時間まで増加しなかった。また、腎糸球体メサンギウム細胞ではほぼすべての細胞に抗体が分布していたものの、胸腺皮質リンパ球、脾臓赤脾髄リンパ球、副腎髄質細胞については抗原発現細胞の一部にのみ抗体の分布が認められた(Table 2-1、Figure 2-1)。胸腺皮質リンパ球については血管周囲に、副腎髄質細胞については皮髄境界部に、それぞれ投与抗体の分布が認められた(Figure 2-1)。その他の臓器、腸間膜リンパ節、大脳、坐骨神経、肺、心臓、肝臓など抗原発現細胞を含む臓器には抗体は分布しなかった(Table 2-1)。

抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおいて、投与後 0.5 時間で、腎臓では、糸球体メサンギウム細胞に投与抗体が分布し、第 1 章で報告したように C3 が沈着し、細胞死が認められた。それに対して、胸腺では、リンパ球において、一部に投与抗体が分布し、C3 が沈着せず、細胞死は認められなかった。副腎では、髄質細胞において、一部に投与抗体が分布し、C3 が沈着せず、細胞死は認められなかった。PBS 投与群においては、抗体の分布、C3 沈着、細胞死のいずれもみとめられなかった(Figure 2-1)。なお、各群 3 個体において染色結果は同等であった。

2) 抗体分布臓器における mCRPs の発現

C3 の沈着に関わる因子である Crry 及び CD55 を、抗体が分布した腎糸球体メサンギウム細胞、胸腺リンパ球及び副腎髄質細胞について検索した。その結果、腎糸球体メサンギウム細胞に Crry が weak に、胸腺リンパ球に Crry が moderate に、副腎髄質細胞に Crry が weak 及び CD55 が strong に発現していた(Table 2-2)。3 個体においても染色結果は同等であった(Table 2-2)。また、

Western blot により胸腺及び副腎から抽出した細胞溶解液において、Crry は 55 及び 65 kDa の位置に、胸腺では明瞭な、副腎では弱い Band が認められた (Figure 2-2 A)。CD55 はおよそ 60-65 kDa の間に、副腎で明瞭な Band が認められた (Figure 2-2 B)。この分子量は既報のものと同様であった^{104,106}。これにより、Crry 及び CD55 タンパク質が胸腺及び副腎で発現していることが確認され、免疫組織化学染色の成績と一致した。

3) 抗原発現臓器の生体反応による分類

これまでの結果より、抗原発現臓器を抗体の分布、mCRPs の発現、C3 の沈着、及び病変の発現をもとに比較した (Table 2-3)。抗原発現臓器は、投与抗体が分布する臓器、しない臓器にまず分けられた。さらに、投与抗体が分布した臓器には mCRPs が発現していた。これらの臓器の内、C3 沈着及び組織学的変化が認められたのは腎系球体メサンギウム細胞のみであった。これらの結果より、抗原発現臓器を 3 つに分類した (Figure 2-3)。すなわち腎系球体メサンギウム細胞が、A) 抗原抗体反応が起き、CDC が誘導され、細胞死が認められるもの、胸腺リンパ球及び副腎髄質細胞が、B) 抗原抗体反応が起きるが、mCRPs の CDC 抑制作用により CDC が誘導されず、細胞死も誘導されないもの、その他の抗原発現臓器が、C) 抗原抗体反応も起きず、よって CDC も細胞死も誘導されないもの、となった。

2-4 考察

第 1 章において、抗 Thy-1.1 抗体投与ラットで抗原分布と生体反応が一致しなかった理由として、1)投与抗体が抗原部位に到達・結合していない、2)抗体と抗原が結合した後、補体制御因子など、CDC を抑制的に作用する機構が働いている、という 2 つの要因を想定し、抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおける投与抗体の分布並びに正常ラットにおける mCRPs (Crry と CD55)の分布を解析した。

投与抗体は腎系球体メサングウム細胞、胸腺皮質リンパ球、脾臓赤脾髄リンパ球、副腎髄質細胞のみに分布した。胸腺皮質リンパ球及び副腎髄質細胞については抗原発現細胞のごく一部にのみ投与抗体は分布した。これらの臓器には抗体投与後 0.5 時間より迅速に分布し、抗体投与後 48 時間まで増加しなかった。その他の抗原発現臓器には分布しなかった。マウスにラット抗 Thy-1 抗体を投与すると、胸腺において皮質毛細血管周囲に限局して抗体分布が認められることが報告されている¹⁰⁸。よって、抗 Thy-1.1 抗体投与ラットでは抗原発現臓器のすべてに抗 Thy-1.1 抗体が分布するわけではなく、一部の抗原発現細胞に限られていると言える。プレリミナリーな試験において、5 mg/kg の抗 Thy-1.1 抗体を投与したが、投与抗体の分布は胸腺及び副腎において、今回用いた投与量である 1 mg/kg のそれよりやや広範であるものの、分布した臓器に差は認められなかった。Thy-1.1 抗原発現臓器において、投与抗 Thy-1.1 抗体が限局的に分布する理由は明らかではないが、血管構造など各臓器の構造が投与抗体の分布に影響しているものと考えられた¹⁰⁹。これらより、抗 Thy-1.1 抗体投与ラットで抗原発現臓器における投与抗体の分布が CDC 生体反応を規定する要因の一つであると考えられた。

投与抗体が分布しても、第 1 章にて述べたとおり胸腺皮質リンパ球及び副腎髄質細胞において C3 沈着は認められず、細胞死も認められなかった。抗体が抗原に結合した後の C3 沈着における制御の可能性として、mCRPs (Crry 及び CD55) の関与を検討した。その結果、免疫組織化学的に、胸腺皮質リンパ球に Crry が moderate に、副腎髄質細胞には主に CD55 が strong に陽性反応を示した。これらの臓器においては、mCRPs が抗 Thy-1.1 抗体投与による C3 沈着に抑制的に働

いているものと考えられた。なお、腎糸球体メサンギウム細胞においても Crry が weak に発現していたが、抗 Thy-1.1 抗体投与による細胞死が認められた。この結果の理由は明らかではないが、抗 Crry 抗体と抗 Thy-1.1 抗体の両方を投与した場合、抗 Thy-1.1 抗体のみの投与と比較して、より重篤なメサンジオライシスと炎症細胞浸潤が認められることが報告されている¹¹⁰。このことより、Crry は低レベルの発現でも生物学的に重要な意味があるが、CDC を完全に抑制するには十分ではないと考えられる。一方で、Crry と CD55 の高いレベル(moderate 以上)の発現が認められた細胞では、抗原抗体結合は認められたが細胞死は認められなかった。従って、抗 Thy-1.1 抗体投与ラットでは、mCRPs が CDC の抑制に関与しているものと考えられ、抗原発現臓器における一定以上の mCRPs の発現は、CDC 生体反応を規定する要因の一つであると考えられた。

以上、抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおいて抗体の分布、補体の分布、並びに mCRPs の分布を解析した結果、CDC の誘導には、これらの要因が複合的に関与している可能性が示された。そこで、抗原発現臓器について CDC 誘導の段階を抗体の分布、mCRPs の発現、C3 の沈着、及び病変の発現をもとに 3 つに分類した。すなわち、抗原発現臓器は、A)抗原抗体反応が起き、細胞死が認められるもの(腎糸球体メサンギウム細胞)、B)抗原抗体反応が起きるが、細胞死も誘導されないもの(胸腺皮質リンパ球及び副腎髄質細胞)、C)抗原抗体反応も起きず、細胞死も誘導されないもの(その他の抗原発現臓器)、に分類された。タイプ A と B の間には C3 沈着の有無という明確な差が認められる。C3 沈着の認められた腎糸球体メサンギウム細胞では細胞死が認められ、C3 沈着の認められなかった胸腺皮質リンパ球及び副腎髄質細胞では細胞死も認められなかった。これらの結果より、C3 活性化を抑制する mCRPs が CDC 誘導に深く関わっていることが、本章により示唆され、これらの事より、抗 Thy-1.1 抗体投与ラットでは、抗原分布のみではなく、1) 投与抗体の抗原部位への到達・結合の有無、2) 抗体と抗原が結合した後 CDC を制御する mCRPs の発現が、CDC 生体反応を規定する要因となることが明らかとなった。

图表

Table 2-1 Distribution of the injected anti-Thy-1.1 antibody in the PBS- or anti-Thy-1.1 antibody injected rat

Organ	Groups ¹ Hours after injection Number of animal	PBS		Anti-Thy-1.1 antibody				
		0.5	48	0.5	1	8	24	48
Cell		3	3	3	3	3	3	3
Kidney								
mesangial cells		- 0*	- 0	C 3	C 3	C 3	C 3	F 3
Thymus								
lymphocytes, cortex ²		- 0	- 0	R 3	R 3	- 0	- 0	- 0
Spleen								
lymphocytes, red pulp		- 0	- 0	O 3	O 3	R 3	R 3	- 0
Adrenal gland								
medullary cells ³		- 0	- 0	O 2 (2)**	O 1 (1)	O 3	O 3	O 3
Mesenteric lymphonode								
stromal cells		- 0	- 0	- 0	- 0	- 0	- 0	- 0
Cerebrum								
somas, dendrites and axons		- 0	- 0	- 0	- 0	- 0	- 0	- 0
Sciatic nerve								
axons		- 0	- 0	- 0	- 0	- 0	- 0	- 0
Lung								
stromal cells around bronchiole		- 0	- 0	- 0	- 0	- 0	- 0	- 0
Heart								
all component		- 0	- 0	- 0	- 0	- 0	- 0	- 0
Liver								
stromal cells around bile duct		- 0	- 0	- 0	- 0	- 0	- 0	- 0

-, negative.

Staining frequency ratings are rare (R; 0-25%), occasional (O; 26-50%), frequent (F; 51-75%) and constant (C; 76-100%).

* number of animal with anti-Thy-1.1 antibody distribution.

** number of animal examined.

¹PBS- or anti-Thy-1.1 antibody-injected rats. PBS, rats were given an intravenous injection of PBS as a control; Anti-Thy-1.1 antibody, rats were given intravenous injections of a monoclonal anti-Thy-1.1 antibody solution diluted with PBS at 1 mg/kg body weight.

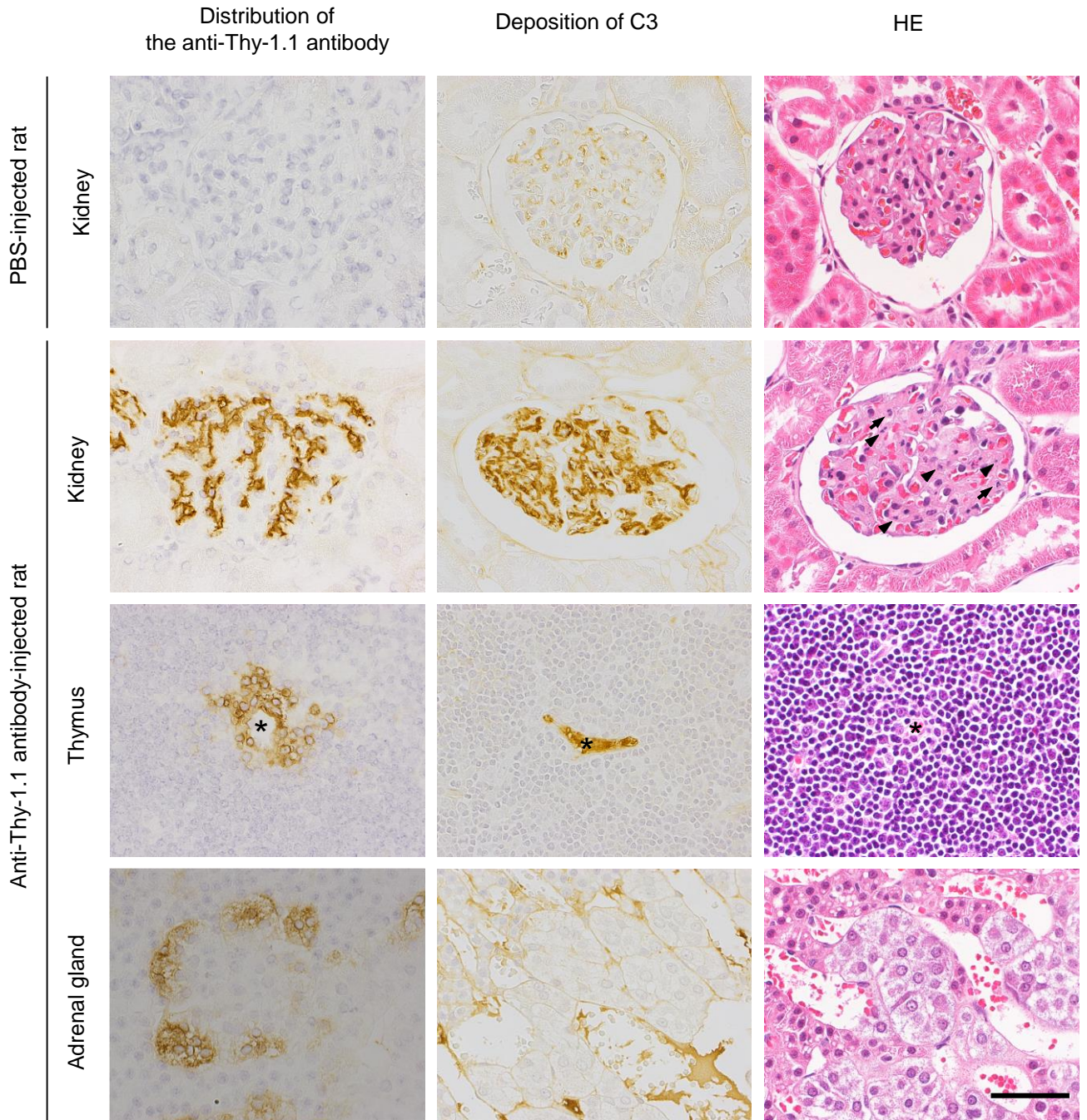
²Antibody distribution was limited in the perivascular area of the cortex in the thymus.

³Antibody distribution was limited to the medullary cells located near the corticomedullary junction of the adrenal gland.

Non-specific distribution of the anti-Thy-1.1 antibody was observed in Kupffer cells of the liver, macrophages and endothelial cells.

Findings were consistent between animals.

Fig.2-1 Distribution of the injected anti-Thy-1.1 antibody, deposition of C3 and histopathological changes in the kidney, adrenal gland and thymus of the PBS- or anti-Thy-1.1 antibody injected rat



Immunohistochemical and histopathological findings in the PBS- or anti-Thy-1.1 antibody-injected rats. Immunohistochemistry for the anti-Thy-1.1 antibody and C3 and HE staining are shown. Distribution of the injected anti-Thy-1.1 antibody can be seen in the kidney, adrenal gland and thymus of the antibody-treated rat but not in the PBS-treated animal. C3 deposition in the mesangial cells of the kidney can be seen in the antibody-treated animal but cannot be seen in the PBS-treated animal. There is no positive staining in the adrenal gland or thymus of the rat injected with anti-Thy-1.1 antibody. Mesangial cell death can be seen even though cell death cannot be seen in the adrenal gland and thymus of the rat injected with anti-Thy-1.1 antibody. Karyolysis in the mesangial cell (arrowheads) and infiltrations of a small number of neutrophils (arrows) in anti-Thy-1.1 antibody-injected rat are also shown. The asterisks indicate the blood vessel in the thymus. All images are from animals at 0.5 hours after injection of PBS or the antibody. Bar = 50 μ m.

Table 2-2 Distribution of mCRPs in the kidney, thymus and adrenal gland of normal rats

Organ, tissue elements	Staining intensity ¹ /frequency ²					
	Crry			CD55		
	1 ³	2	3	1	2	3
Kidney, mesangial cells	1/c	1/c	1/c	-	-	-
Thymus, lymphocytes in cortex	2/c	2/c	2/c	-	-	-
Adrenal gland, medullary cells	1/o	NA	1/o	3/c	3/c	3/c

¹ staining intensity ratings are weak (1), moderate (2) and strong (3).

² staining frequency ratings are rare (r; 0-25%), occasional (o; 26-50%), frequent (f; 51-75%) and constant (c; 76-100%).

³ sample numbers indicate mere sequence of the 3 rats.

-, negative; NA, not available.

Fig.2-2 Expression of Crry and CD55 in the thymus and adrenal gland of normal rat



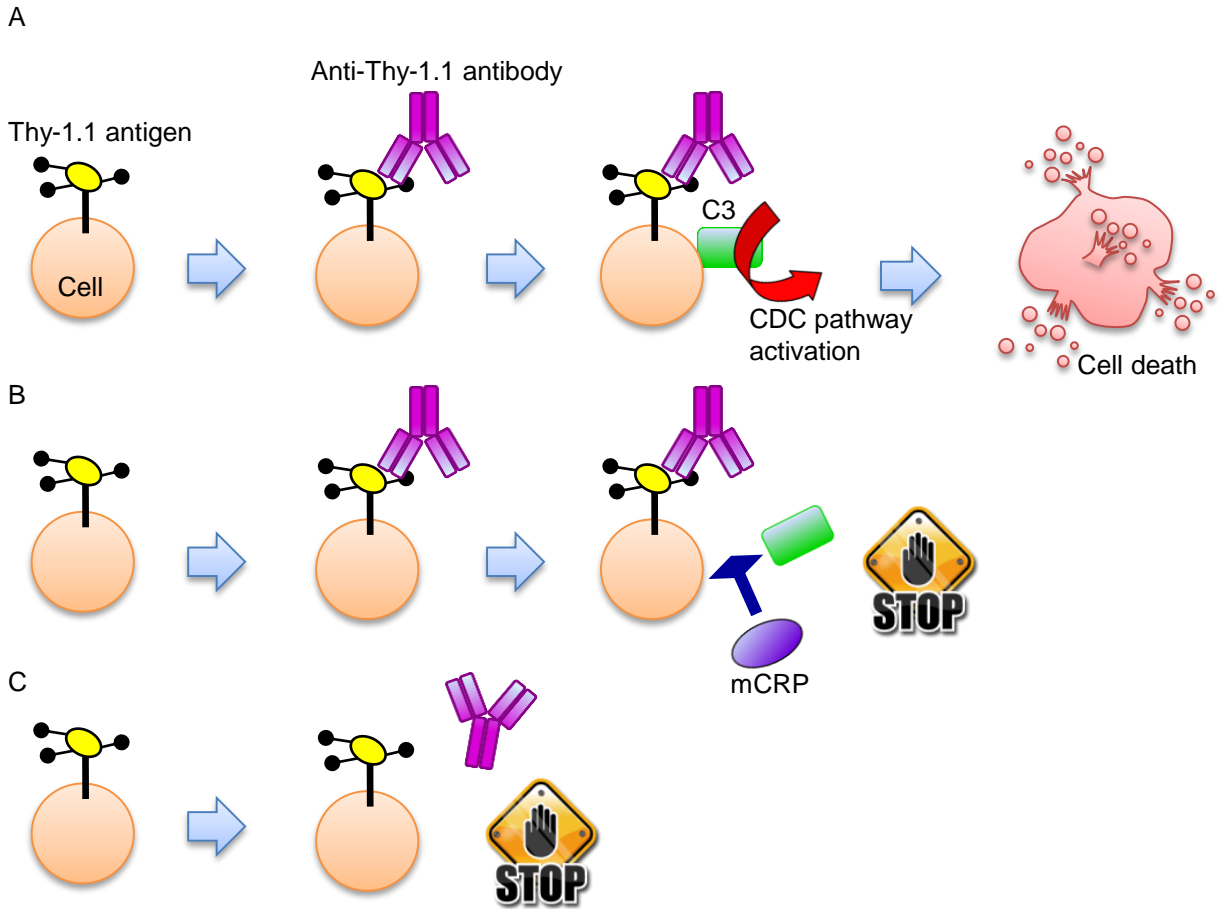
Western blot analysis of Crry and CD55 expression in the thymus and adrenal gland of normal rat. A) Strong expression of Crry was observed in the thymus and weak expression was seen in the adrenal gland. Loading per lane of 1.7 μg protein from each organs. B) Expression of CD55 was seen in adrenal gland. No clear expression was observed in the thymus. Loading per lane of 1.7 μg protein from each organs.

Table 2-3 Distribution of the Thy-1.1 antigen, injected anti-Thy-1.1 antibody and mCRPs (Crry and CD55) and deposition of C3 and histopathological changes

Organ, cell	Distribution/deposition of molecule					Histopathological changes
	Thy-1.1 antigen	Anti-Thy-1.1 antibody	Crry	CD55	Deposition of C3	
Kidney, mesangial cells	+	+	±	-	+	+
Thymus, lymphocytes in perivascular area of the cortex	+	+	+	-	-	-
Adrenal gland, medullary cells located near corticomedullary junction	+	+	-	+	-	-
Thymus, the other lymphocytes	+	-	+	-	-	-
Adrenal gland, the other medullary cells	+	-	-	+	-	-

+, positive; ±, weakly positive; -, negative.

Fig.2-3 Categories of CDC activation in Thy-1.1 antigen-expressing cells



Categories of CDC activation in Thy-1.1 antigen-expressing cells. A) The antibody binds to the antigen, which leads to activation of the CDC pathway and then to cell death. B) The antibody binds to the antigen, but the CDC pathway is not activated because of mCRP expression. Cell death is not induced. C) The antibody does not bind to antigen, and the CDC pathway is not activated; thus, and there is no cell death.

第3章 CDCを作用機序とする抗体医薬品の標的臓器予測における補体制御因子解析の有用性

3-1 はじめに

第1章、第2章において、抗原分布と抗体投与に誘導されたCDCによる生体反応が一致せず、抗原分布のみではCDCによる生体反応が正確に予測できなかった。その理由として、抗原発現に加え、投与抗体の抗原への結合・到達の有無や、抗体と抗原が結合した場合でも、mCRPsがCDCに抑制的に作用し、CDCが誘導されないことが示された。CDC誘導に関わる抗原の分布以外の要因が見出されたことから、抗原分布解析に、投与抗体の分布、mCRPsの分布解析を加えることが、CDCを作用機序とする抗体投与による生体反応の予測を向上させるものと考えた。

ラットに投与した抗Thy-1.1抗体の分布については、第2章で解析した。ラットにおけるmCRPsの分布については、一部の組織で凍結標本を用いて実施されている^{105,106}。これらの報告では個々の細胞の詳細な結果が示されておらず、本章の目的である生体反応予測のための解析データとするには、新たに形態並びに抗原性が良好に保持されている組織標本での解析が必要と判断した。本研究では、形態並びに抗原性の保持が良好なPLP-AMeX法⁹¹により作製した組織標本を用い、Crry及びCD55の詳細な分布解析を行った。これらの成績を用い、Thy-1.1抗原の分布、投与抗Thy-1.1抗体の分布、mCRPsの分布による生体反応の予測と、実際の生体反応とを比較し、その予測性を評価した。

本章では、CrryとCD55という二つのmCRPsの正常ラットにおける全身分布を解析し、抗原の分布解析に、抗体分布及びmCRPsの分布解析を加えた生体反応を予測した。

3-2 実験方法

1) 動物及び飼育環境

第 1 章で実施した実験の動物を使用した。

2) 固定及び包埋

第 1 章において使用した無処置動物の臓器の内、腎臓、膀胱、胸腺、腸間膜リンパ節、脾臓、副腎、小腸、大腸、肺、膵臓及び肝臓を PLP-AMeX 法にて固定・包埋した。

3) 免疫組織化学的所見

Crry 及び CD55 に対する免疫組織化学染色を第 2 章と同様の手法で行った。

4) 抗 Thy-1.1 抗体投与に起因する生体反応予測解析

Thy-1.1 抗原の分布、投与抗 Thy-1.1 抗体の分布及び mCRPs の全身分布をもとに、抗体投与に起因する CDC 誘導を 3 つの方法で予測した。Approach 1 として抗原の分布する組織を生体反応の起こり得る組織とし、Approach 2 として Approach 1 に加え、投与抗体の分布した組織を生体反応の起こり得る組織とした。Approach 3 として Approach 2 に加え mCRPs が moderate 未満に分布する組織を、生体反応の起こり得る組織とした。それぞれの予測結果を抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおいて生体反応の認められた組織と比較した。

3-3 結果

1) Crry 及び CD55 の全身諸臓器における分布

Crry 及び CD55 は泌尿器系、免疫系、神経内分泌系、呼吸器系、循環器系、及び消化器系など全身に広く認められたが、各細胞において二つの分子の共発現はほとんど認められなかった(Figure 3-1、Table 3-1)。

Crry はほとんどの臓器で発現していた。泌尿器系では、腎臓の糸球体メサンギウム細胞、尿細管、集合管、及び腎盂移行上皮に、膀胱では基底及び中間細胞に発現していた。免疫系では胸腺、腸間膜リンパ節、及び GALT のリンパ球、脾臓の巨核球、及び脾臓、腸間膜リンパ節、GALT の濾胞間質細胞に発現していた。神経内分泌系では副腎髄質細胞及び副腎皮質細胞に発現していた。呼吸器系では肺気管支上皮細胞に、循環器系では諸臓器の血管内皮細胞に発現していた。消化器系では、腸管吸収上皮及び goblet 細胞、腸管粘膜固有層間質細胞、膵臓外分泌腺細胞で発現していた(Figure 3-1、Table 3-1、Figure 3-2、Figure 3-3)。CD55 は泌尿器系、神経内分泌系、及び消化器系で発現していた。泌尿器系では、腎臓の足細胞及び膀胱の被蓋上皮細胞に発現していた。神経内分泌系では副腎髄質細胞と腸管の基底果粒細胞に発現していた。消化器系では肝細胞で CD55 が発現していた(Figure 3-1、Table 3-1、Figure 3-2)。副腎髄質細胞では Crry と CD55 の両者が発現していたが、Crry は weak に、CD55 は strong に陽性反応を示した(Figure 3-1、Figure 3-2)。心臓、骨格筋、及び坐骨神経は血管内皮細胞を除いて陽性反応は認められなかった(Table 3-1)。

Crry と CD55 は同一臓器に発現していたが、二つの分子はそれぞれ別々の細胞に発現していた。腎臓において糸球体メサンギウム細胞は Crry を、足細胞は CD55 を発現し、膀胱において基底及び中間細胞は Crry を、被蓋上皮細胞は CD55 を発現し、腸管において腸管吸収上皮及び goblet 細胞が Crry を、基底果粒細胞が CD55 を発現していた(Figure 3-2)。3 個体において染色結果は同等であった(Table 3-1)。

2) 抗原分布、抗体分布及び mCRPs 分布からの生体反応予測

Thy-1.1 抗原の分布、投与抗 Thy-1.1 抗体の分布、今回得られた mCRPs の分布を合わせ、複数の観点から生体反応を予測し、実際の結果と比較した(Table 3-2)。Approach 1 では抗原の分布する組織を生体反応の起こり得る組織として最も広範に取り上げた。すなわち腎糸球体メサンギウム細胞、胸腺皮質及び髓質のリンパ球、脾臓巨核球、副腎髓質細胞、坐骨神経軸索、大脳神経細胞体、樹状突起及び軸索、腸間膜リンパ節、腎臓髓質、肺気管支周囲及び肝臓胆管周囲における間質細胞が生体反応の起こり得る組織と予測された。Approach 2 では Approach 1 に加え、投与抗体の分布した組織を生体反応の起こり得る組織として取り上げ、腎糸球体メサンギウム細胞、胸腺皮質リンパ球、副腎髓質細胞が、生体反応の起こり得る組織と予測された。Approach 3 では Approach 2 に加え mCRPs が moderate 未満に分布する組織を、生体反応の起こり得る組織として取り上げ、腎糸球体メサンギウム細胞のみが生体反応の起こり得る組織と予測された。

以上の結果、抗原の分布に加え、投与抗体の分布、mCRPs の分布を鑑みた Approach 3 が、腎糸球体メサンギウム細胞のみに傷害の認められた実際の生体反応と一致し、抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおける細胞傷害組織を最も正確に予測していた。

3-4 考察

第1章、第2章では抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおいて、抗原分布と CDC による病変が一致せず、抗体投与に起因する生体反応が抗原分布のみで正確に予測できなかった。その理由として、抗原発現に加え、投与抗体の抗原への結合・到達の有無や、抗体と抗原が結合した場合でも、mCRPs が CDC に抑制的に作用し、CDC が誘導されないことが示された。CDC 誘導に関わる抗原の分布以外の要因が見出されたことから、抗原分布解析に、投与抗体の分布、mCRPs の分布解析を加えることが、CDC を作用機序とする抗体投与による生体反応の予測向上に寄与するかについて考察した。

Crry と CD55 はラット全身諸臓器に広く分布していた。特に Crry は排泄、吸収、消化に関わる、泌尿器、呼吸器、消化器系など外部からの病原体などにさらされる可能性のある臓器に主座していた。補体系は病原体に対して有効だが⁵⁷、一方で感染などに起因する偶発的な補体活性化は組織傷害を引き起こす可能性がある。従って mCRPs は、定常状態において、非特異的な補体活性化を制御しているものと考えられた。

また、Crry と CD55 は同一臓器においても別々の細胞に発現していた。これは非常に特徴的で興味深い所見であり、生物学的な意義があるものと考えられる。Crry と CD55 の両者は C3 活性化を制御することが知られている。Crry は 1) C3 転換酵素の形成を抑制することと、その分離を促進する(decay-accelerating activity)、2)活性化 C3 の分離をコントロールする、という2つの制御メカニズムをもつ^{93,94,111}。CD55 は新たな C3 及び C5 転換酵素の形成を阻害することにより C3 と C5 の活性化を抑制し、また新しい転換酵素の分離を促進する(decay-accelerating activity)^{93,97,107}。Crry と CD55 は C3 沈着を抑制するという共通の機能を持っているが、今回の同一臓器においても別々の細胞に発現しているという結果は、それぞれの分子が CDC 制御において特定の役割を持っていることを示唆している。

今回、Thy-1.1 抗原分布、投与抗 Thy-1.1 抗体の分布、mCRPs 分布を合わせ、

複数の観点から生体反応を予測し、実際に抗 Thy-1.1 抗体投与ラットで起きた生物反応を比較した。Approach 1として抗原の分布する組織を、Approach 2として抗原分布に加え投与抗体の分布した組織を、Approach 3として Approach 2の条件に加えて mCRPs が moderate 未満に分布する組織を、生体反応の起こり得る組織として取り上げ、抗 Thy-1.1 抗体投与による生体反応の結果と比較した。その結果、抗原分布に、投与抗体の分布、mCRPs の発現を加えた Approach 3 が、腎糸球体メサンギウム細胞のみに細胞傷害の認められた実際の生体反応と一致した。よって、抗体投与による CDC 誘導は、抗原発現に加え、投与抗体の分布、mCRPs の発現を合わせて評価することで、より正確な抗 Thy-1.1 抗体投与による生体反応を予測することが可能となった。

本研究成果から、以下の評価を行うことで、新規開発抗体医薬品のヒト初回投与以前の標的臓器の評価が可能と考えられる。1) ICH ガイドラインに基づき、開発抗体医薬品の交差反応性試験を実施し、標的となる可能性のある臓器を最も広く予測する。2)ヒトでの抗体分布については、開発抗体医薬品をヒトに投与するまで分布成績は得られないが、抗体分布に関するこれまでの知見(血液脳関門や血液精巣関門を通過しないなど)と、非臨床での実験動物を用いた分布試験成績を活用し、ヒトでの抗体分布臓器を予測する。3)抗体の生体反応規定要因、CDC の場合は mCRPs の発現分布をヒト組織の IHC により解析し、1) 2)と併せて標的臓器を予測する。このような解析を加えることで、開発抗体医薬品のヒトでの有効性・安全性の予測性を向上させることができると考えられる。

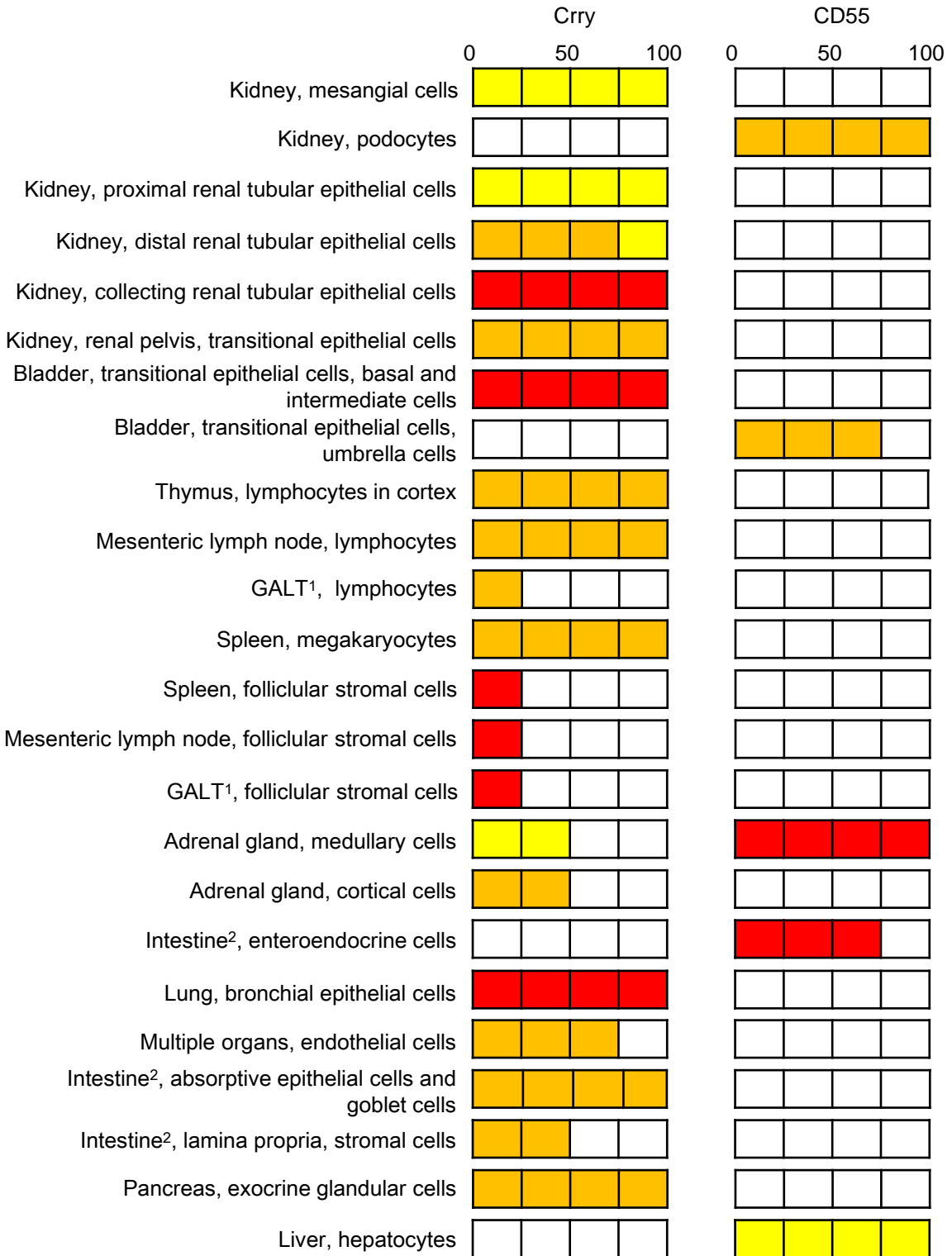
mCRPs の解析を進める場合、ヒトを含む動物種における分子種の相違を考慮する必要がある。CD55 はヒト、ラット、マウスに存在し、機能していることが報告されている^{93,106,107}。一方、C3 活性化を制御する mCRPs には種差があり、ラット及びマウスでは Crry が、ヒトでは CD55 と CD46 が主に機能すると報告されている^{92-94,96,97,111,112}。なお、ラット及びマウスに認められる Crry はヒトには存在しない^{93,94,104,105,111}。ヒト組織を用いた mCRPs の解析では、CD55 と CD46 に加え、げっ歯類には存在しないが、ヒトで C3 活性化制御に関わる CD35 も併せて評価すべき

と考えられる⁹⁵。

以上、本章では従来の抗原分布から予測する Approach 1 は最も広範に生体反応の起こる可能性を見積るが、抗原に加え抗体分布並びに mCRPs を合わせた Approach 3 が、より正確に生体反応を予測できることを示した。CDC 生体反応規定要因としての mCRPs の分布解析は生体反応予測に有用であり、CDC を作用機序とする抗体医薬の有効性・安全性をより正確に予測することが可能となった。

図表

Fig.3-1 Distribution of Crry and CD55 in normal rats



Distribution of Crry and CD55 in normal rats. The distribution of two molecules is shown by the intensity and frequency of positive staining. Red, orange, yellow and white indicate strong, moderate, weak and negative staining intensity, respectively. The frequency of staining is shown as the number of colored columns. Each column stands for 25%. ¹ gut-associated lymphoid tissue, ² small and large intestine.

Table 3-1 Individual distribution of Crry and CD55 in normal rats

System Organ, tissue elements	Staining intensity ¹ /frequency ²					
	Crry			CD55		
	1 ³	2	3	1	2	3
Urinary						
Kidney, mesangial cells	1/c	1/c	1/c	-	-	-
Kidney, podocytes	-	-	-	2/c	2/c	2/c
Kidney, proximal renal tubular epithelial cells	1/c	1/c	1/c	-	-	-
Kidney, distal renal tubular epithelial cells	1-2/c	1-2/c	1-2/c	-	-	-
Kidney, collecting renal tubular epithelial cells	3/c	3/c	3/c	-	-	-
Kidney, renal pelvis, transitional epithelial cells	2/c	2/c	2/c	-	-	-
Bladder, transitional epithelial cells, basal and intermediate cells	3/c	3/c	3/c	-	-	-
Bladder, transitional epithelial cells, umbrella cells	-	-	-	2/f	2/f	2/f
Immunohepatopoietic						
Thymus, lymphocytes in cortex	2/c	2/c	2/c	-	-	-
Mesenteric lymph node, lymphocytes	2/c	2/c	2/c	-	-	-
GALT ⁴ , lymphocytes	2/r	2/r	NA	-	NA	NA
Spleen, megakaryocytes	2/c	2/c	2/c	-	-	-
Spleen, follicular stromal cells	3/r	3/r	3/r	-	-	-
Mesenteric lymph node, follicular stromal cells	3/r	3/r	3/r	-	-	-
GALT ⁴ , follicular stromal cells	3/r	3/r	NA	-	-	NA
Neuroendocrine						
Adrenal gland, medullary cells	1/o	NA	1/o	3/c	3/c	3/c
Adrenal gland, cortical cells	1/r	-	2/o	-	-	-
Intestine ⁵ , enteroendocrine cells	-	-	-	3/f	3/f	3/f
Respiratory						
Lung, bronchial epithelial cells	3/c	3/c	3/c	-	-	-
Circulatory						
Multiple organs, endothelial cells	2/f	2/f	2/f	-	-	-
Digestive						
Intestine ⁵ , absorptive epithelial cells and goblet cells	2/c	2/c	2/c	-	-	-
Intestine ⁵ , lamina propria, stromal cells	2/o	2/o	2/o	-	-	-
Pancreas, exocrine glandular cells	2/c	NA	2/c	-	NA	-
Liver, hepatocytes	-	-	-	1/c	1/c	1/c

¹ staining intensity ratings are weak (1), moderate (2) and strong (3).

² staining frequency ratings are rare (r; 0-25%), occasional (o; 26-50%), frequent (f; 51-75%) and constant (c; 76-100%).

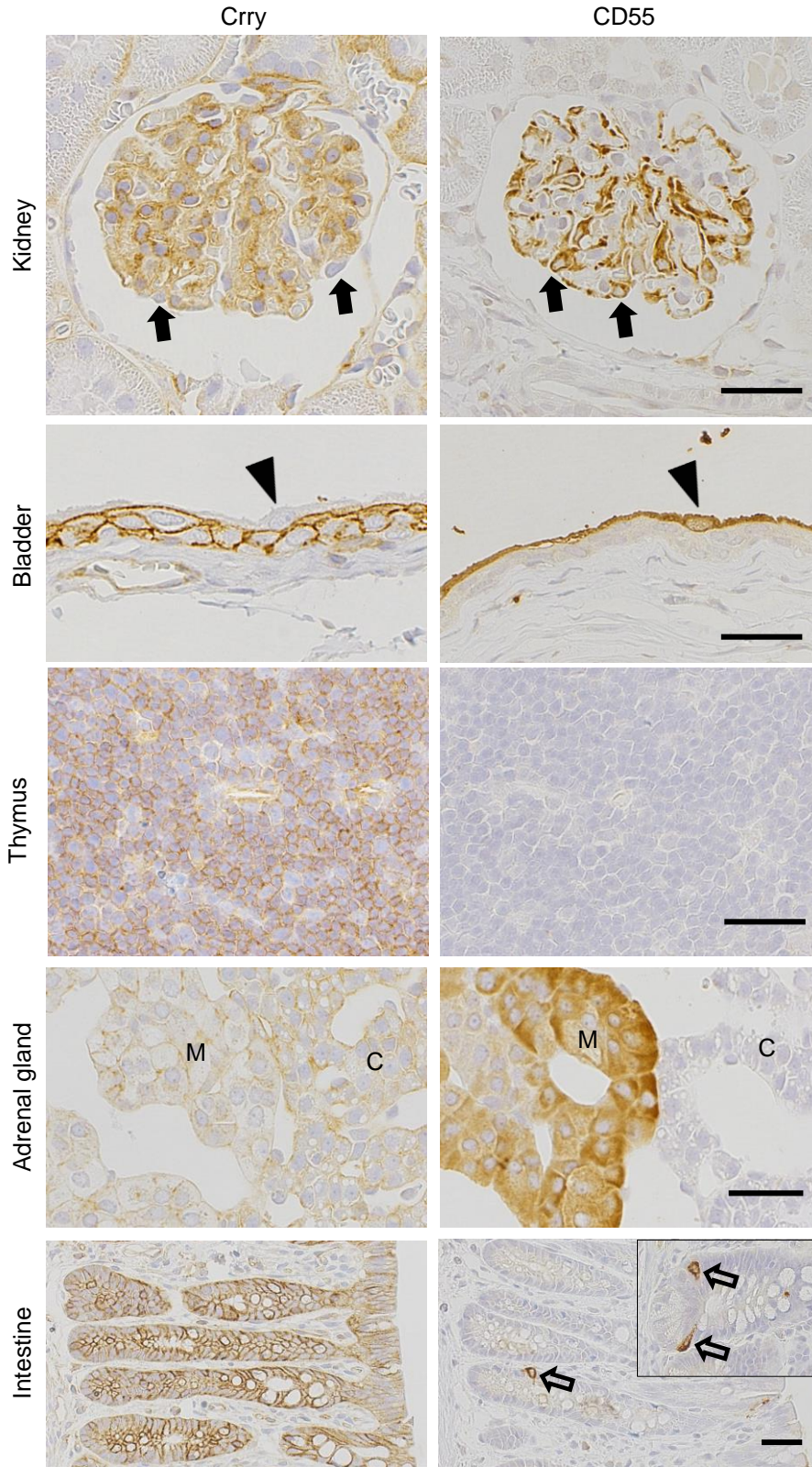
³ sample numbers indicate mere sequence of the 3 rats.

⁴ gut-associated lymphoid tissue, ⁵ small and large intestine.

-, negative; NA, not available.

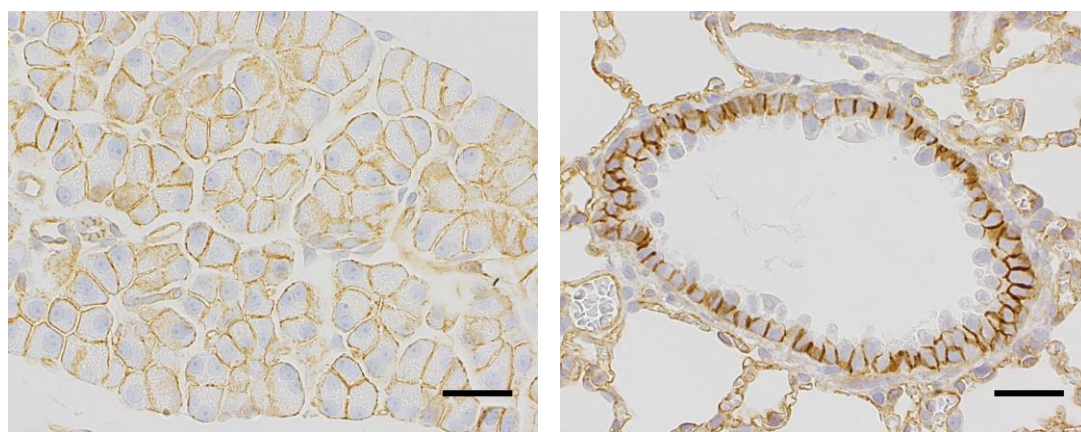
No positive reaction was seen in the heart, skeletal muscle and sciatic nerve.

Fig.3-2 Immunohistochemistry of Crry and CD55 in the kidney, bladder, thymus, adrenal gland and intestine of normal rats



Immunohistochemistry of Crry and CD55 in the kidney, bladder, thymus, adrenal gland and intestine of normal rat. In the kidney, mesangial cells are positive for Crry and podocytes are positive for CD55 but negative for Crry (closed arrows). In the bladder, transitional cells are positive for Crry and umbrella cells are positive for CD55 but negative for Crry (arrowheads). In the thymus, lymphocytes are positive for Crry. In the adrenal gland, both molecules are expressed: medullary cells are strongly positive for CD55 and weakly positive for Crry, and cortical cells express Crry weakly. In the large intestine, absorptive epithelial cells and goblet cells are positive for Crry and enteroendocrine cells are positive for CD55 (open arrow). CD55-positive enteroendocrine cells are also observed in the small intestine (insert, open arrows). M, medulla; C, cortex. Bar = 30 μ m.

Fig.3-3 Immunohistochemistry of Crry in the pancreas and lung in normal rats



Pancreas

Lung

Immunohistochemistry of Crry in the pancreas and lung in normal rat. Positive reaction is observed in exocrine glandular cells in the pancreas and bronchial epithelial cells of the lung. In addition, endothelial cells in the alveoli are also positive. Bar = 30 μ m.

Table 3-2 Approach to predict the occurrence of lesions caused by anti-Thy-1.1 antibody injection

Organ, tissue elements	Staining intensity ¹ /frequency ²				Approach ³			Lesion
	Thy-1.1	Anti-Thy-1.1 antibody	mCRPs		1	2	3	
			Crry	CD55				
Kidney, mesangial cells	3/c	3/c	1/c	-	+	+	+	+
Thymus, lymphocytes of the cortex	2/c	3/r	2/c	-	+	+	-	-
Thymus, lymphocyte of the medulla	2/o	-	-	-	+	-	-	-
Spleen, megakaryocytes	1/r-o	-	2/c	-	+	-	-	-
Adrenal gland, medullary cells	1-3/c	2/o	1/o	3/c	+	+	-	-
Sciatic nerve, axons	2/o	-	-	-	+	-	-	-
Cerebrum, somas, dendrites and axons	1/c	-	NE	NE	+	-	-	-
Mesentric lymph node, stromal cells	2/r	-	-	-	+	-	-	-
Kidney, interstitial cells in the medulla	2/r	-	-	-	+	-	-	-
Lung, stromal cells around bronchiole	2/r	-	-	-	+	-	-	-
Liver, stromal cells around bile duct	2/r	-	-	-	+	-	-	-

-, negative; +, positive.

¹ staining intensity ratings are weak (1), moderate (2) and strong (3).

² staining frequency ratings are rare (r; 0-25%), occasional (o; 26-50%), frequent (f; 51-75%) and constant (c; 76-100%).

³ Approach to predict the occurrence of lesions caused by Thy-1.1 antibody injection. 1; tissues with antigen expression, 2; tissues with distribution of the injected antibody, 3; tissues with less than moderate expressions of mCRPs in addition to distribution of the antigen and the injected antibody.

第4章 総合考察

抗体医薬は標的分子に対していち早く治療法を提供できることや、抗体工学の発展を背景として、近年開発が活発に行われている。現在、約30もの抗体医薬品が米国、欧州、日本において上市され、臨床の場で活用されている。抗体医薬品は、標的分子への中和作用、生体内の免疫機構を利用した CDC や ADCC などにより標的分子発現細胞を傷害する作用、drug delivery carrier として標的分子発現細胞を傷害する作用などによりその薬理作用を発揮する。抗体医薬品を含むバイオテクノロジー応用医薬品の開発については、近年の科学の進歩及び経験を踏まえて、ICH における合意に基づくガイドラインが定められ、それに基づき非臨床試験における安全性評価を遂行することが定められている。その中でも、モノクローナル抗体を本体とする抗体医薬では、ヒト組織パネルを用いた組織交差反応性試験により、抗体と組織中の抗原との結合を評価することが求められている。抗体医薬品では抗原の分布と抗体による傷害臓器が一致すると考えられており、本試験はヒト初回投与臨床試験以前に標的臓器を予測し、安全性を担保する重要な試験と位置付けられている。しかし、抗原の分布や発現量と抗体に誘導される傷害臓器が一致しないとの報告もあり、抗体医薬の有効性・安全性をより正確に予測することが、抗体医薬の開発において課題となっている。これにより、抗原以外の生体反応を規定する要因の研究のために、IHC による抗原分布解析と抗体投与による *in vivo* での生体反応を比較解析することのできる動物モデルが必要とされている。本論文では、CDC を作用機序とする抗 Thy-1.1 抗体投与ラットモデルを使用し、抗原分布と抗体投与による生体反応とその予測要因について研究を進め、投与抗体の分布や mCRPs の評価を加えた新たな抗体医薬の有効性・安全性予測方法について新しい知見を提示するものである。

正常ラットにおける Thy-1.1 抗原の分布及び抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおける CDC の誘導

CDC 誘導における抗原以外の生体反応を規定する要因の研究のために、IHC

による抗原分布解析と抗体投与による *in vivo* での生体反応を比較解析することのできる動物モデルが必要とされている。第1章では、抗 Thy-1.1 抗体投与ラットが研究目的に適していることを評価・確認する目的で、1)外来的に投与される抗体による CDC を作用機序とする病変が惹起されること、2)抗原の分布と CDC により誘導される生体反応が一致しないこと、という 2 つの条件を満たすことを確認し、本モデルが有用であることを示した。

Thy-1.1 抗原は免疫組織化学的に、胸腺及び脾臓リンパ球を含む免疫系、腎糸球体メサンギウム細胞を含む泌尿器系、副腎髄質細胞を含む神経内分泌系、間葉系の細胞など全身に広く分布していた。これらの結果より、ラットへ抗 Thy-1.1 抗体を投与すると、Thy-1.1 抗原を発現する様々な臓器に組織傷害が起こると予測された。抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおいて全身臓器を観察したところ、組織傷害は腎臓のみに認められた。病理組織学的変化として、腎臓糸球体において抗体投与後 0.5 時間及び 1 時間より、メサンギウム領域における Karyolysis 及び好中球の浸潤が認められ、続いて抗体投与後 8 時間よりメサンギウム細胞の減少及び糸球体毛細血管の拡張が、抗体投与後 24 時間及び 48 時間ではメサンギウム領域の減少が認められた。免疫組織化学的に、CDC の補体反応カスケードの要である C3 の沈着も腎糸球体メサンギウム領域でのみ認められた。これら腎臓における病理組織学的所見及び免疫組織化学的に認められた C3 沈着は、抗 Thy-1.1 抗体投与に起因する CDC による変化として報告されている所見と一致しており、腎糸球体メサンギウム細胞の細胞死は抗 Thy-1.1 抗体投与に起因する CDC により誘導されたものと判断された。その他の抗原発現臓器では、病理組織学的変化並びに C3 沈着は認められず、抗原の分布と CDC により誘導される生体反応が一致しないことが明らかとなった。

抗 Thy-1.1 抗体投与ラットでは、1)外来的に投与される抗 Thy-1.1 抗体投与による CDC により誘導された病変が腎臓に認められ、2) Thy-1.1 抗原は全身に広く分布するが、抗体投与に起因する組織傷害臓器は腎臓のみに限局され、抗原分布臓器と生体反応臓器は一致しなかった。これより抗 Thy-1.1 抗体投与ラットが

CDC 誘導の抗原発現量以外の生体反応を規定する要因を解析する有用なモデルとなることが示された。

抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおける投与抗体分布と膜補体制御因子

第 1 章では、正常ラットの抗原分布と抗 Thy-1.1 抗体投与ラットの CDC により誘導される生体反応は一致せず、抗 Thy-1.1 抗体投与ラットが CDC 誘導の抗原発現量以外の生体反応を規定する要因を研究する有用なモデルとなることが示された。第 2 章では、抗原分布と生体反応が一致しない理由として、1)投与抗体が抗原部位に到達・結合していないということ、2)抗体と抗原が結合した後、mCRPs が CDC に抑制的作用をしていること、という 2 つの要因を想定し、抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおける投与抗体の分布並びに正常ラットにおける mCRPs (Crry と CD55)の分布を解析した。

投与抗体は腎系球体メサンギウム細胞、胸腺皮質リンパ球、脾臓赤脾髄リンパ球、副腎髄質細胞のみに分布した。胸腺皮質リンパ球及び副腎髄質細胞については、胸腺の血管周囲や、副腎の皮髄境界部など、抗原発現細胞のごく一部にのみ投与抗体は分布した。それ以外の抗原発現臓器には投与抗体は分布しなかった。mCRPs については、腎系球体メサンギウム細胞に Crry が weak に、胸腺皮質リンパ球に Crry が moderate に、副腎髄質細胞には Crry が weak 及び CD55 が strong に発現していた。これらの臓器においては、投与抗体が分布したが、mCRPs が抗 Thy-1.1 抗体投与による C3 沈着に抑制的に働き、補体活性化がおきないものと考えられた。よって、抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおいては、投与抗体の分布、及び moderate 以上発現した mCRPs による C3 沈着抑制が、CDC 生体反応を規定する要因となると考えられた。

抗原発現臓器について CDC 誘導の段階を抗体の分布、mCRPs の発現、C3 の沈着、及び組織傷害の発現をもとに、A)抗原抗体反応が起き、CDC が誘導され、細胞死が認められるもの(腎系球体メサンギウム細胞)、B)抗原抗体反応が起きるが、mCRPs の CDC 抑制作用により CDC が誘導されず、細胞死も誘導されな

いもの(胸腺皮質リンパ球及び副腎髄質細胞)、C)抗原抗体反応も起きず、よって CDC 及び細胞死も誘導されないもの(その他の抗原発現臓器)、の3つに分類した。タイプ A と B の間には C3 沈着の有無という明確な差が認められ、C3 沈着の認められた腎糸球体メサンギウム細胞では細胞死が認められ、C3 沈着の認められなかった胸腺皮質リンパ球及び副腎髄質細胞では細胞死も認められなかった。これらの結果より、C3 沈着を抑制する mCRPs が CDC 誘導に深く関わっていることが示唆された。

抗 Thy-1.1 抗体投与ラットでは、抗原分布のみではなく、1)投与抗体の抗原部位への到達・結合の有無、2)抗体と抗原が結合した後 CDC を制御する mCRPs の発現が、CDC 生体反応を規定する要因となることが明らかとなった。

CDC を作用機序とする抗体医薬品の標的臓器予測における補体制御因子解析の有用性

第 1 章、第 2 章において、抗 Thy-1.1 抗体投与ラットでは、抗原分布と抗体投与に誘導された CDC による生体反応が一致せず、抗原分布のみでは CDC による生体反応が正確に予測できなかった。その理由として、抗原発現に加え、投与抗体の抗原への結合・到達の有無や、抗体と抗原が結合した場合でも、mCRPs が CDC に抑制的に作用し、CDC が誘導されないことが示された。投与抗体の分布については第 2 章で解析した。そこで第 3 章では、mCRPs (Crry 及び CD55)のラット全身諸臓器における分布を検索し、CDC の予測要因となるか考察した。CDC 誘導に関わる抗原の分布以外の要因が見出されたことから、抗原分布解析に、投与抗体の分布、mCRPs の分布解析を加え、CDC を作用機序とする抗体投与による生体反応の予測向上への寄与を考察した。

Crry 及び CD55 は正常ラット全身諸臓器に広く分布しており、mCRPs は定常状態においても感染などに起因する非特異的な補体活性化を制御しているものと考えられた。また、Crry と CD55 は同一臓器においても別々の細胞に発現しており、両者は C3 沈着を抑制するという共通の機能を持っているものの、それぞれの分子

が特定の役割をもっていることを示唆した。

Thy-1.1 抗原分布、投与抗 Thy-1.1 抗体の分布、mCRPs 分布を合わせ、複数の観点から生体反応を予測した。Approach 1 として抗原の分布する組織を、Approach 2 として抗原分布に加え投与抗体の分布した組織を、Approach 3 として Approach 2 の条件に加えて mCRPs が moderate 未満に分布する組織を、生体反応の起こり得る組織として取り上げ、抗 Thy-1.1 抗体投与による生体反応の結果と比較した。その結果、抗原分布に加え、投与抗体の分布、mCRPs の発現を加えた Approach 3 が、腎糸球体メサンギウム細胞のみに細胞傷害の認められた実際の生体反応と一致した。よって、抗体投与による CDC 誘導の予測は、従来の抗原分布から予測する Approach 1 は最も広範に生体反応の起こる可能性を見積るが、抗原に加え抗体分布並びに mCRPs を合わせた Approach 3 はより正確に生体反応を予測できることが示された。CDC 生体反応規定要因としての mCRPs の分布解析は生体反応予測に有用であり、CDC を作用機序とする抗体医薬の有効性・安全性をより正確に予測することが可能となった。

ガイドラインに定められる組織交差反応性試験による結果は、抗体投与によるヒトにおける標的臓器を予測するが、必ずしも生体反応の起こる臓器とは一致せず、抗原の分布のみから抗体医薬のヒトでの有効性・安全性の予測は困難であった。本研究の意義は、抗体に起因する CDC 生体反応が、これまでの抗原の分布のみからの予測に比べ、抗原分布、投与抗体の分布、mCRPs 分布を合わせた評価がより正確に有効性・安全性の予測することを示したことにある。

第5章 結論

抗 Thy-1.1 抗体投与ラットを用いた、CDC を作用機序とする抗体投与に起因する生体反応予測要因の検索を行った結果、以下に示す結果が得られた。

- 1) 抗 Thy-1.1 抗体投与ラットは 1. 外来的に投与される抗体による CDC を作用機序とする病変が惹起されること、2. 抗原の分布と CDC により誘導される生体反応が一致しないこと、という 2 つの条件をみたし、抗体投与に起因する CDC 誘導への抗原発現量以外の生体反応を規定する要因を調べるためのモデルとして有用である。
- 2) 本モデルでは、Thy-1.1 抗原分布のみではなく、1. 投与抗体の抗原部位への到達・結合の有無、2. 抗体と抗原が結合した後 CDC を制御する mCRPs の発現が、CDC 生体反応を規定する要因となる。
- 3) 本モデルを用いた抗体投与に起因する生物学的反応予測は、抗原分布が最も広く生体反応の起こる可能性を見積もるが、抗原分布に加え、抗体分布や mCRPs の分布を考慮することで、より正確に生体反応の起こる組織を予測することが可能である。

本論文の一部は以下に公表した。

- Kato C, Kato A, Adachi K, Fujii E, Isobe, K, Matsushita T, Watanabe T, and Suzuki M. Anti-Thy-1 antibody-mediated complement-dependent cytotoxicity is regulated by the distribution of antigen, antibody and membrane complement regulatory proteins in rats. *J Toxicol Pathol.* 26:41-9. 2013.
- Kato C, Kato A, Adachi K, Fujii E, Isobe, K, Watanabe T, Ito T and Suzuki M. Expression of membrane complement regulatory proteins Crry and CD55 in normal rats. *J Toxicol Pathol.* 26: 223-226. 2013.

謝辞

本研究を遂行と論文作成にあたり、終始ご指導、ご鞭撻をいただき、ご高閲を賜りました麻布大学附置生物科学総合研究所所長並びに病理学研究室 代田欣二教授、同大学解剖学第二研究室 有嶋和義教授、同大学薬理学研究室 浅井史敏教授、同大学基礎教育研究室 佐原弘益教授に、深甚なる感謝の意を表します。同様に種々のご指導・ご支援をいただいた中外製薬株式会社 鈴木雅実博士に謹んで深謝いたします。また、本研究を遂行する機会と継続的かつ厚いご支援をいただいた、中外製薬株式会社 千葉修一博士、加藤淳彦博士、足立健児博士、藤井悦子氏に心から感謝いたします。加えて、同社 照屋志乃氏、荒田義之氏には本研究の遂行に不可欠であった、技術的ご支援をいただきましたことに、感謝と敬意を表します。また、様々なご協力・ご支援を賜りました中外製薬株式会社 富士御殿場研究所並びに鎌倉研究所の皆様に御礼申し上げます。

今回、学位申請にあたりご推薦を賜りました、東京大学名誉教授 土井邦雄博士に深く御礼申し上げます。

引用文献

1. Buss NA, Henderson SJ, McFarlane M, Shenton JM, and de Haan L. Monoclonal antibody therapeutics: history and future. *Curr Opin Pharmacol.* 12: 615-622. 2012.
2. Emmons C, and Hunsicker LG. Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3): the first monoclonal antibody approved for therapeutic use. *Iowa Med.* 77: 78-82. 1987.
3. Goldstein G. Overview of the development of Orthoclone OKT3: monoclonal antibody for therapeutic use in transplantation. *Transplant Proc.* 19 (2 Suppl 1): 1-6. 1987.
4. Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, and Oi VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81: 6851-6855. 1984.
5. Presta LG. Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function. *Adv Drug Deliv Rev.* 58: 640-656. 2006.
6. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, and Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature.* 321: 522-525. 1986.
7. Boulianne GL, Hozumi N, and Shulman MJ. Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature.* 312: 643-646. 1984.
8. Green LL, Hardy MC, Maynard-Currie CE, Tsuda H, Louie DM, Mendez MJ, Abderrahim H, Noguchi M, Smith DH, Zeng Y, David NE, Sasai H, Garza D, Brenner DG, Hales JF, McGuinness RP, Capon DJ, Klapholz S, and Jakobovits A. Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat Genet.* 7: 13-21. 1994.
9. Hoet RM, Cohen EH, Kent RB, Rookey K, Schoonbroodt S, Hogan S, Rem L, Frans N, Daukandt M, Pieters H, van Hegelsom R, Neer NC, Nastri HG,

- Rondon IJ, Leeds JA, Hufton SE, Huang L, Kashin I, Devlin M, Kuang G, Steukers M, Viswanathan M, Nixon AE, Sexton DJ, Hoogenboom HR, and Ladner RC. Generation of high-affinity human antibodies by combining donor-derived and synthetic complementarity-determining-region diversity. *Nat Biotechnol.* 23: 344-348. 2005.
10. Jostock T, Vanhove M, Brepoels E, Van Gool R, Daukandt M, Wehnert A, Van Hegelsom R, Dransfield D, Sexton D, Devlin M, Ley A, Hoogenboom H, and Müllberg J. Rapid generation of functional human IgG antibodies derived from Fab-on-phage display libraries. *J Immunol Methods.* 289: 65-80. 2004.
 11. Lonberg N, Taylor LD, Harding FA, Trounstine M, Higgins KM, Schramm SR, Kuo CC, Mashayekh R, Wymore K, McCabe JG, Munoz-O'regan D, O'Donnell SL, Lapachet ESG, Bengoechea T, Fishwild DM, Carmack CE, Kay RM and Huszar D. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature.* 368: 856-859. 1994.
 12. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, and Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature.* 348: 552-554. 1990.
 13. Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, McCafferty J, Hodits RA, Wilton J, and Johnson KS. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat Biotechnol.* 14: 309-314. 1996.
 14. Vaughan TJ, Osbourn JK, and Tempest PR. Human antibodies by design. *Nat Biotechnol.* 16: 535-539. 1998.
 15. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, and Hoogenboom HR. Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol.* 12: 433-455. 1994.
 16. Baker KP, Edwards BM, Main SH, Choi GH, Wager RE, Halpern WG, Lappin

- PB, Riccobene T, Abramian D, Sekut L, Sturm B, Poortman C, Minter RR, Dobson CL, Williams E, Carmen S, Smith R, Roschke V, Hilbert DM, Vaughan TJ, and Albert VR. Generation and characterization of LymphoStat-B, a human monoclonal antibody that antagonizes the bioactivities of B lymphocyte stimulator. *Arthritis Rheum.* 48: 3253-3265. 2003.
17. Cerny T, Borisch B, Introna M, Johnson P, and Rose AL. Mechanism of action of rituximab. *Anticancer Drugs.* 13 Suppl 2: S3-10. 2002.
 18. Leget GA, and Czuczman MS. Use of rituximab, the new FDA-approved antibody. *Curr Opin Oncol.* 10: 548-551. 1998.
 19. Plosker GL, and Figgitt DP. Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs.* 63: 803-843. 2003.
 20. Goldenberg MM. Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer. *Clin Ther.* 21: 309-318. 1999.
 21. Bross PF, Beitz J, Chen G, Chen XH, Duffy E, Kieffer L, Roy S, Sridhara R, Rahman A, Williams G, and Pazdur R. Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* 7: 1490-1496. 2001.
 22. Moreton P, and Hillmen P. Alemtuzumab therapy in B-cell lymphoproliferative disorders. *Semin Oncol.* 30: 493-501. 2003.
 23. Hendrix CS, de Leon C, and Dillman RO. Radioimmunotherapy for non-Hodgkin's lymphoma with yttrium 90 ibritumomab tiuxetan. *Clin J Oncol Nurs.* 6: 144-148. 2002.
 24. Zelenetz AD. A clinical and scientific overview of tositumomab and iodine I 131 tositumomab. *Semin Oncol.* 30 (2 Suppl 4): 22-30. 2003.
 25. Blick SK, and Scott LJ. Cetuximab: a review of its use in squamous cell carcinoma of the head and neck and metastatic colorectal cancer. *Drugs.* 67:

- 2585-2607. 2007.
26. Lyseng-Williamson KA, and Robinson DM. Spotlight on bevacizumab in advanced colorectal cancer, breast cancer, and non-small cell lung cancer. *BioDrugs*. 20: 193-195. 2006.
 27. Wainberg ZA, and Hecht JR. Panitumumab in colorectal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 7: 967-973. 2007.
 28. Sebastian M, Kuemmel A, Schmidt M, and Schmittel A. Catumaxomab: a bispecific trifunctional antibody. *Drugs Today (Barc)*. 45: 589-597. 2009.
 29. Dempster DW, Laming CL, Kostenuik PJ, and Grauer A. Role of RANK ligand and denosumab, a targeted RANK ligand inhibitor, in bone health and osteoporosis: a review of preclinical and clinical data. *Clin Ther*. 34: 521-536. 2012.
 30. Baig NA, Taylor RP, Lindorfer MA, Church AK, Laplant BR, Pavey ES, Nowakowski GS, and Zent CS. Complement dependent cytotoxicity in chronic lymphocytic leukemia: ofatumumab enhances alemtuzumab complement dependent cytotoxicity and reveals cells resistant to activated complement. *Leuk Lymphoma*. 53: 2218-2227. 2012.
 31. Bradley AM, Devine M, and Deremer D. Brentuximab vedotin: An anti-CD30 antibody-drug conjugate. *Am J Health Syst Pharm*. 70: 589-597. 2013.
 32. Specenier P. Ipilimumab in melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 12: 1511-1521. 2012.
 33. Dizon DS, and Makhija S. HER dimerization inhibitors: developing pertuzumab as an anticancer agent in women's oncology. *Expert Opin Drug Discov*. 11: 1363-1369. 2008.
 34. Bell SJ, and Kamm MA. Review article: the clinical role of anti-TNFalpha antibody treatment in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 14: 501-514. 2000.

35. Smolen JS, and Emery P. Infliximab: 12 years of experience. *Arthritis Res Ther.* 25; 13 Suppl 1: S2. 2011.
36. Machold KP, and Smolen JS. Adalimumab - a new TNF-alpha antibody for treatment of inflammatory joint disease. *Expert Opin Biol Ther.* 3: 351-360. 2003.
37. Plosker GL, and Lyseng-Williamson KA. Adalimumab: in Crohn's disease. *BioDrugs.* 21: 125-132. 2007.
38. Venkiteshwaran A. Tocilizumab. *MAbs.* 1: 432-438. 2009.
39. Goel N, and Stephens S. Certolizumab pegol. *MAbs.* 2: 137-147. 2010.
40. Dhimolea E. Canakinumab. *MAbs.* 2: 3-13. 2010.
41. Voulgari PV. Golimumab: a new anti-TNF-alpha agent for rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and ankylosing spondylitis. *Expert Rev Clin Immunol.* 6: 721-733. 2010.
42. Baker KP, Edwards BM, Main SH, Choi GH, Wager RE, Halpern WG, Lappin PB, Riccobene T, Abramian D, Sekut L, Sturm B, Poortman C, Minter RR, Dobson CL, Williams E, Carmen S, Smith R, Roschke V, Hilbert DM, Vaughan TJ, and Albert VR. Generation and characterization of LymphoStat-B, a human monoclonal antibody that antagonizes the bioactivities of B lymphocyte stimulator. *Arthritis Rheum.* 48: 3253-3265. 2003.
43. Carswell CI, Plosker GL, and Wagstaff AJ. Daclizumab: a review of its use in the management of organ transplantation. *BioDrugs.* 15: 745-773. 2001.
44. Berard JL, Velez RL, Freeman RB, and Tsunoda SM. A review of interleukin-2 receptor antagonists in solid organ transplantation. *Pharmacotherapy.* 19: 1127-1137. 1999.
45. Onrust SV, and Wiseman LR. Basiliximab. *Drugs.* 57: 207-213. 1999.
46. Faulds D, and Sorkin EM. Abciximab (c7E3 Fab). A review of its pharmacology and therapeutic potential in ischaemic heart disease. *Drugs.* 48:

- 583-598. 1994.
47. Haseman MK, Rosenthal SA, and Polascik TJ. Capromab Pendetide imaging of prostate cancer. *Cancer Biother Radiopharm.* 15: 131-140. 2000.
 48. Scott LJ, and Lamb HM. Palivizumab. *Drugs.* 58: 305-311. 1999.
 49. Chung KF. Anti-IgE monoclonal antibody, omalizumab: a new treatment for allergic asthma. *Expert Opin Pharmacother.* 5: 439-446. 2004.
 50. Leonardi CL. Efalizumab in the treatment of psoriasis. *Dermatol Ther.* 17: 393-400. 2004.
 51. Steinman L. Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab. *Nat Rev Drug Discov.* 4: 510-518. 2005.
 52. Pieramici DJ, and Avery RL. Ranibizumab: treatment in patients with neovascular age-related macular degeneration. *Expert Opin Biol Ther.* 6: 1237-1245. 2006.
 53. McKeage K. Eculizumab: a review of its use in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Drugs.* 71: 2327-2345. 2011.
 54. Schmidtko J, Peine S, El-Housseini Y, Pascual M, and Meier P. Treatment of atypical hemolytic uremic syndrome and thrombotic microangiopathies: a focus on eculizumab. *Am J Kidney Dis.* 61: 289-299. 2013.
 55. Chien AL, Elder JT, and Ellis CN. Ustekinumab: a new option in psoriasis therapy. *Drugs.* 69: 1141-1152. 2009.
 56. Cooper NR. The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Adv Immunol.* 37: 151-216. 1985.
 57. Ehrnthaller C, Ignatius A, Gebhard F, and Huber-Lang M. New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system. *Mol Med.* 17: 317-329. 2011.
 58. Gelderman KA, Tomlinson S, Ross GD, and Gorter A. Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. *Trends Immunol.* 25: 158-164. 2004.

59. Shuptrine CW, Surana R, and Weiner LM. Monoclonal antibodies for the treatment of cancer. *Semin Cancer Biol.* 22: 3-13. 2012.
60. Djeu JY. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and natural killer-cell phenomenon. *J Am Vet Med Assoc.* 181: 1043-1048. 1982.
61. Moeller E. Contact-induced cytotoxicity by lymphoid cells containing foreign isoantigens. *Science.* 147: 873-879. 1965.
62. Perlmann P, and Holm G. Cytotoxic effects of lymphoid cells in vitro. *Adv Immunol.* 11: 117-193. 1969.
63. Scott AM, Wolchok JD, and Old LJ. Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer.* 12: 278-287. 2012.
64. Hall W, Price-Schiavi S, Wicks J and Rojko J. Tissue cross-reactivity studies for monoclonal antibodies: predictive value and use for selection of relevant animal species for toxicity testing. In: *Preclinical Safety Evaluation of Biopharmaceuticals: A Science-Based Approach to Facilitating Clinical Trials.* Cavagnaro JA (eds). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. 2008.
65. Kato A, Watanabe T, Yamazaki M, Deki T, and Suzuki M. IL-6R distribution in normal human and cynomolgus monkey tissues. *Regul Toxicol Pharmacol.* 53: 46-51. 2009.
66. Cang S, Mukhi N, Wang K, and Liu D. Novel CD20 monoclonal antibodies for lymphoma therapy. *J Hematol Oncol.* 5: 64. 2012.
67. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, and Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol.* 11: 785-797. 2010.
68. Daha NA, Banda NK, Roos A, Beurskens FJ, Bakker JM, Daha MR, and Trouw LA. Complement activation by (auto-) antibodies. *Mol Immunol.* 48: 1656-1665. 2011.
69. Davies KA. Complement. *Baillieres Clin Haematol.* 4: 927-955. 1991.

70. Kondos SC, Hatfaludi T, Voskoboinik I, Trapani JA, Law RH, Whisstock JC, and Dunstone MA. The structure and function of mammalian membrane-attack complex/perforin-like proteins. *Tissue Antigens*. 76: 341-351. 2010.
71. Müller-Eberhard HJ. The killer molecule of complement. *J Invest Dermatol*. 85 (1 Suppl): 47s-52s. 1985.
72. Horvat M, Kloboves Prevodnik V, Lavrencak J, and Jezersek Novakovic B. Predictive significance of the cut-off value of CD20 expression in patients with B-cell lymphoma. *Oncol Rep*. 24: 1101-1107. 2010.
73. Perz J, Topaly J, Fruehauf S, Hensel M, and Ho AD. Level of CD 20-expression and efficacy of rituximab treatment in patients with resistant or relapsing B-cell prolymphocytic leukemia and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 43: 149-151. 2002.
74. van Meerten T, van Rijn RS, Hol S, Hagenbeek A, and Ebeling SB. Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin Cancer Res*. 12: 4027-4035. 2006.
75. Brandt J, Pippin J, Schulze M, Hänsch GM, Alpers CE, Johnson RJ, Gordon K, and Couser WG. Role of the complement membrane attack complex (C5b-9) in mediating experimental mesangioproliferative glomerulonephritis. *Kidney Int*. 49: 335-343. 1996.
76. Yamamoto T, and Wilson CB. Complement dependence of antibody-induced mesangial cell injury in the rat. *J Immunol*. 138: 3758-3765. 1987.
77. Diepenhorst GM, van Gulik TM, and Hack CE. Complement-mediated ischemia-reperfusion injury: lessons learned from animal and clinical studies. *Ann Surg*. 249: 889-899. 2009.
78. Ishizaki M, Masuda Y, Fukuda Y, Sugisaki Y, Yamanaka N, and Masugi Y.

- Experimental mesangioproliferative glomerulonephritis in rats induced by intravenous administration of anti-thymocyte serum. *Acta Pathol Jpn.* 36: 1191-1203. 1986.
79. Acton RT, Morris RJ, and Williams AF. Estimation of the amount and tissue distribution of rat Thy-1.1 antigen. *Eur J Immunol.* 4: 598-602. 1974.
80. Paul LC, Rennke HG, Milford EL, and Carpenter CB. Thy-1.1 in glomeruli of rat kidneys. *Kidney Int.* 25: 771-777. 1984.
81. Reif AE. The discovery of Thy-1 and its development. In: Cell surface antigen Thy-1. Reif AE, and Schlesinger M (eds). Marcel Dekker, Inc., New York. 3-45. 1989.
82. Vitetta ES, Boyse EA, and Uhr JW. Isolation and characterization of a molecular complex containing Thy-1 antigen from the surface of murine thymocytes and T cells. *Eur J Immunol.* 3: 446-453. 1973.
83. Watanabe M, Noguchi T, and Tsukada Y. Regional, cellular, and subcellular distribution of Thy-1 antigen in rat nervous tissues. *Neurochem Res.* 6: 507-519. 1981.
84. Walker JR, Su AI, Self DW, Hogenesch JB, Lapp H, Maier R, Hoyer D, and Bilbe G. Applications of a rat multiple tissue gene expression data set. *Genome Res.* 14: 742-749. 2004.
85. Yuasa T, Izawa T, Kuwamura M, and Yamate J. Thy-1 expressing mesenchymal cells in rat nephrogenesis in correlation with cells immunoreactive for α -smooth muscle actin and vimentin. *J Toxicol Pathol.* 23: 1-10. 2010.
86. Craig W, Kay R, Cutler RL, and Lansdorp PM. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med.* 177: 1331-1342. 1993.
87. Seki T, Spurr N, Obata F, Goyert S, Goodfellow P, and Silver J. The human Thy-1 gene: structure and chromosomal location. *Proc Natl Acad Sci U S A.*

- 82: 6657-6661. 1985.
88. Williams AF, and Gagnon J. Neuronal cell Thy-1 glycoprotein: homology with immunoglobulin. *Science*. 216: 696-703. 1982.
 89. Sunamoto M, Kuze K, Tsuji H, Ohishi N, Yagi K, Nagata K, Kita T, and Doi T. Antisense oligonucleotides against collagen-binding stress protein HSP47 suppress collagen accumulation in experimental glomerulonephritis. *Lab Invest*. 78: 967-972. 1998.
 90. Makibayashi K, Tatematsu M, Hirata M, Fukushima N, Kusano K, Ohashi S, Abe H, Kuze K, Fukatsu A, Kita T, and Doi T. A vitamin D analog ameliorates glomerular injury on rat glomerulonephritis. *Am J Pathol*. 158: 1733-1741. 2001.
 91. Suzuki M, Katsuyama K, Adachi K, Ogawa Y, Yoroze K, Fujii E, Misawa Y, and Sugimoto T. Combination of fixation using PLP fixative and embedding in paraffin by the AMeX method is useful for histochemical studies in assessment of immunotoxicity. *J Toxicol Sci*. 27: 165-172. 2002.
 92. Kim DD, and Song WC. Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol*. 118: 127-136. 2006.
 93. Miwa T, and Song WC. Membrane complement regulatory proteins: insight from animal studies and relevance to human diseases. *Int Immunopharmacol*. 1: 445-459. 2001.
 94. Molina H. The murine complement regulator Crry: new insights into the immunobiology of complement regulation. *Cell Mol Life Sci*. 59: 220-229. 2002.
 95. Ahearn JM, and Fearon DT. Structure and function of the complement receptors, CR1 (CD35) and CR2 (CD21). *Adv Immunol*. 46: 183-219. 1989.
 96. Liszewski MK, Post TW, and Atkinson JP. Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of the complement activation gene

- cluster. *Annu Rev Immunol.* 9: 431-455. 1991.
97. Lublin DM, and Atkinson JP. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annu Rev Immunol.* 7: 35-58. 1989.
98. Meri S, Morgan BP, Davies A, Daniels RH, Olavesen MG, Waldmann H, and Lachmann PJ. Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. *Immunology.* 71: 1-9. 1990.
99. Fraczek LA, and Martin BK. Transcriptional control of genes for soluble complement cascade regulatory proteins. *Mol Immunol.* 48: 9-13. 2010.
100. Vinci G, Lynch NJ, Duponchel C, Lebastard TM, Milon G, Stover C, Schwaeble W, and Tosi M. In vivo biosynthesis of endogenous and of human C1 inhibitor in transgenic mice: tissue distribution and colocalization of their expression. *J Immunol.* 169: 5948-5954. 2002.
101. Nakamura S, and Abe K. Genetic polymorphism of human factor I (C3b inactivator). *Hum Genet.* 71: 45-48. 1985.
102. Pangburn MK. Host recognition and target differentiation by factor H, a regulator of the alternative pathway of complement. *Immunopharmacology.* 49: 149-157. 2000.
103. van de Poel RH, Meijers JC, and Bouma BN. The interaction between anticoagulant protein S and complement regulatory C4b-binding protein (C4BP). *Trends Cardiovasc Med.* 10: 71-76. 2000.
104. Takizawa H, Okada N, and Okada H. Complement inhibitor of rat cell membrane resembling mouse Crry/p65. *J Immunol.* 152: 3032-3038. 1994.
105. Funabashi K, Okada N, Matsuo S, Yamamoto T, Morgan BP, and Okada H. Tissue distribution of complement regulatory membrane proteins in rats. *Immunology.* 81: 444-451. 1994.
106. Spiller OB, Hanna SM, and Morgan BP. Tissue distribution of the rat

- analogue of decay-accelerating factor. *Immunology*. 97: 374-384. 1999.
107. Hinchliffe SJ, Spiller OB, Rushmere NK, and Morgan BP. Molecular cloning and functional characterization of the rat analogue of human decay-accelerating factor (CD55). *J Immunol*. 161: 5695-5703. 1998.
108. Hoffmann-Fezer G, Antica M, Schuh R, and Thierfelder S. Distribution of injected anti-Thy-1 monoclonal antibodies in mouse lymphatic organs: evidence for penetration of the cortical blood-thymus barrier, and for intravascular antibody-binding onto lymphocytes. *Hybridoma*. 8: 517-527. 1989.
109. Houston LL, Nowinski RC, and Bernstein ID. Specific in vivo localization of monoclonal antibodies directed against the Thy 1.1 antigen. *J Immunol*. 125: 837-843. 1980.
110. Nishikage H, Baranyi L, Okada H, Okada N, Isobe K, Nomura A, Yoshida F, and Matsuo S. The role of a complement regulatory protein in rat mesangial glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 6: 234-241. 1995.
111. Kim YU, Kinoshita T, Molina H, Hourcade D, Seya T, Wagner LM, and Holers VM. Mouse complement regulatory protein Crry/p65 uses the specific mechanism of both human decay-accelerating factor and membrane cofactor protein. *J Exp Med*. 181: 151-159. 1995.
112. Turnberg D, and Botto M. The regulation of the complement system: insights from genetically-engineered mice. *Mol Immunol*. 40: 145-153. 2003.

要旨

抗体医薬は標的分子に対して高い特異性に基づく治療効果が期待できることや、抗体工学の発展を背景として、近年開発が活発に行われている。抗体医薬品は、標的分子の中和作用、生体内の免疫機構を利用した complement-dependent cytotoxicity (CDC) や antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) などによる標的分子発現細胞傷害作用、drug delivery carrier として標的分子発現細胞を傷害する作用などにより、その薬理作用を発揮する。

抗体医薬品を含むバイオテクノロジー応用医薬品の開発については、日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) における合意に基づくガイドラインが定められ、それに基づき非臨床試験における安全性評価を遂行することが定められている。その中でも、モノクローナル抗体を本体とする抗体医薬では、ヒト組織パネルを用いた免疫組織化学的染色 (IHC) による組織交差反応性試験によって、抗体と組織中の標的抗原の結合を評価することが求められている。抗体医薬品では標的抗原の生体内分布と投与抗体による傷害臓器が一致すると考えられており、組織交差反応性試験はヒト初回投与臨床試験以前に標的臓器を予測し、安全性を担保する重要な試験と位置付けられている。しかし、抗原の分布や発現量と抗体に誘導される傷害臓器が一致しないとの報告もあり、抗体医薬の有効性・安全性をより正確に予測することが、抗体医薬の開発において緊急課題となっている。標的抗原以外の生体反応を規定する要因の研究は現在までほとんど行われておらず、また、IHC による抗原分布解析と抗体投与による *in vivo* での生体反応を比較解析することのできる動物モデルの探索も行われていない。

そこで本研究では、CDC を作用機序とする抗 Thy-1.1 抗体投与ラットモデルに着目し、この実験モデルが CDC 誘導において標的抗原発現以外の生体反応を規定する要因を解析するために有用である事を示し、投与抗体の分布や膜補体制御因子 (mCRPs) の評価を加えた新たな抗体医薬の有効性・安全性予測方法について新しい知見を提示した。

第1章 正常ラットにおける Thy-1.1 抗原の分布及び抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおける CDC の誘導

抗 Thy-1.1 抗体投与ラットが本研究目的に適していることを評価する目的で、正常ラットにおける Thy-1.1 抗原の分布及び抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおける CDC 誘導臓器を検索した。

今モデルにおける標的抗原である Thy-1.1 抗原は、IHC によって胸腺及び脾臓リンパ球を含む免疫系、腎系球体メサンギウム(Mes)細胞を含む泌尿器系、副腎髄質細胞を含む神経内分泌系、間葉系の細胞など全身に広く分布していることが確認された。また、胸腺、副腎、脳組織を用いた RT-PCR および Western blot においても、Thy-1.1 抗原の発現を確認した。これらの結果より、ラットへ抗 Thy-1.1 抗体を投与すると、Thy-1.1 抗原を発現する様々な臓器に組織傷害が起こると予測されたが、実際には組織傷害は腎臓のみに認められた。病理組織学的には、腎臓において抗体投与後 0.5h 及び 1h より、Mes 領域における Karyolysis(核融解)及び好中球の浸潤が認められ、続いて抗体投与後 8h より Mes 細胞の減数及び糸球体毛細血管の拡張が、抗体投与後 24h 及び 48h では Mes 領域の減少が認められた。IHC では、CDC の補体反応カスケードの要である C3 の沈着も腎臓メサンギウム領域でのみ認められた。これら腎臓における病理組織学的所見及び C3 沈着は、抗 Thy-1.1 抗体投与に起因する CDC による変化として報告されている所見と一致しており、Mes 細胞の細胞死は抗 Thy-1.1 抗体投与に起因する CDC により誘導されたものと判断された。一方、その他の抗原発現臓器では、病理組織学的変化並びに C3 沈着は認められず、標的抗原の分布と CDC により誘導される生体反応が一致しないことが明らかとなり、抗 Thy-1.1 抗体投与ラットが CDC 誘導における生体反応を規定する抗原発現量以外の要因を解析する有用なモデルとなることが明らかにした。

第2章 抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおける投与抗体分布と膜補体制御因子

抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおける標的抗原分布と生体反応の不一致の理由として、1) 投与抗体が標的抗原発現部位に到達・結合していない、2) 抗体と抗原が結合した後、mCRPs が CDC 誘導を抑制していること、という 2 つの要因を想定し、抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおける投与抗体の分布並びに正常ラットにおける mCRPs (Crry および CD55) の分布を免疫組織学的に解析した。

その結果、投与抗体は標的抗原の分布と必ずしも一致せず、腎糸球体 Mes 細胞、胸腺皮質リンパ球、脾臓赤脾髄リンパ球、副腎髄質細胞のみに分布していた。胸腺皮質リンパ球及び副腎髄質細胞については、胸腺の血管周囲や、副腎の皮髄境界部など、抗原発現細胞のごく一部にのみ投与抗体が限局して分布していた。それ以外の標的抗原発現臓器には投与抗体は分布していなかった。mCRPs については、胸腺皮質リンパ球に Crry が moderate に、副腎髄質細胞には Crry が weak 及び CD55 が strong に発現していた。副腎および胸腺についてはこれら mCRPs のタンパク質発現を Western blot により確認し、相対的な発現量も免疫組織学的な染色性と一致する事を確認した。これらの臓器においては、投与抗体は到達したが、mCRPs が抗 Thy-1.1 抗体投与による C3 沈着に抑制的に働き、補体活性化が起こらないものと考えられた。一方、腎糸球体 Mes 細胞には Crry が weak に認められた。これらの結果から、抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおいては、投与抗体の分布、及び一定以上発現した mCRPs による C3 沈着抑制が、CDC 生体反応を規定する要因となると考えられた。

以上の結果から、標的抗原発現臓器について CDC 誘導の段階を抗体の分布、mCRPs の発現、C3 の沈着、及び組織傷害の発現をもとに 3 つに分類した。すなわち、抗 Thy-1.1 抗体投与ラットにおいて、標的抗原発現臓器は、A) 抗原抗体反応が起き、CDC 活性化が起き、細胞死が誘導されるもの (腎糸球体 Mes 細胞)、B) 抗原抗体反応が起きるが、mCRPs の抑制作用により CDC が活性化せず、細胞死も誘導されないもの (胸腺皮質リンパ球及び副腎髄質細胞)、C) 抗原抗体反応が起こらず、CDC 活性化も細胞死も誘導されないもの (その他の抗原発現臓器)、の 3 つに分類された。A と B の間には C3 沈着の有無という明確な差が認

められ、C3 沈着を抑制する mCRPs が CDC 誘導に深く関わっていることが示唆された。

第3章 CDCを作用機序とする抗体医薬品の標的臓器予測における補体制御因子解析の有用性

第1章, 2章において、抗 Thy-1.1 抗体投与ラットでは、抗原分布のみではなく、1) 投与抗体の抗原部位への到達・結合の有無、2) 抗体と抗原が結合した後 CDC を制御する mCRPs の発現が、CDC 生体反応を規定する要因となることが明らかとなった。そこで本章では、mCRPs (Crry 及び CD55) のラット全身諸臓器における分布を検索し、CDC の予測要因となるか考察した

その結果、Crry 及び CD55 は正常ラット全身諸臓器に広く分布するものの、同一臓器においても別々の細胞に発現しており、両者は C3 沈着抑制という共通の機能を持っているが、それぞれの分子が特定の役割を持っていることが示唆された。さらに、Thy-1.1 抗原分布、投与抗体の分布、mCRPs 分布を合わせ、本ラットモデルにおける抗体投与後の生体反応を予測した。Approach 1 として標的抗原の分布する組織を、Approach 2 として標的抗原分布に加え投与抗体の分布した組織を、Approach 3 として Approach 2 の条件に加えて mCRPs が moderate 未満に分布する組織を生体反応の起こり得る組織として取り上げ、抗 Thy-1.1 抗体投与による生体反応の実際の結果と比較した。その結果、抗原分布に加え、投与抗体の分布、mCRPs の発現を加えた Approach 3 により生体反応が予測された腎糸球体 Mes 細胞のみに細胞傷害を認めた実際の生体反応と一致した。

本研究によって、従来の抗原分布から予測する Approach 1 は最も生体反応の起こる可能性を見積るが、抗原に加え抗体分布並びに mCRPs を合わせた Approach 3 はより正確に予測ができることが示された。CDC 生体反応規定要因としての mCRPs の分布解析は生体反応予測に有用であり、CDC を作用機序とする抗体医薬の有効性・安全性をより正確に予測することが可能となった。

以上、本研究は抗体に起因する CDC 生体反応が、これまでの抗原の分布のみ

からの予測に比べ、抗原分布、投与抗体の分布、mCRPs 分布を合わせた評価がより正確に有効性・安全性を予測することを示唆しており、今後、分子標的医薬である抗体医薬品のより正確な有効性・安全性予測に寄与し、今後の研究開発に貢献するものである。

Abstract

Pathological study of factors that can predict efficacy and toxicity of therapeutic antibody using rats treated with anti-Thy-1 antibody to induce complement-dependent cytotoxicity

Disease-related molecules that have been discovered through genomic research can be targeted therapeutically by antibodies. Thanks to the advance of antibody and genetic engineering techniques, research and development of therapeutic antibodies has progressed, and over 30 therapeutic monoclonal antibodies are now on the market in the United States, Europe, and Japan. These monoclonal antibodies exert efficacy as anticancer agents on many kinds of molecules through various natural functions, namely, neutralization to block the physiological function of the target antigens, complement-dependent cytotoxicity (CDC), antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), or by acting as drug delivery carriers. These recent scientific advances and the shared experience of preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals have been incorporated in a guideline by the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (the ICH S6 R1 guideline), and compliance to this guideline is required for preclinical safety testing. One requirement of the guideline is that, because tissue injury induced by antibody treatment is thought to be consistent with antigen distribution, the binding of therapeutic monoclonal antibodies to antigens within tissues be evaluated in tissue cross-reactivity (TCR) studies using a panel of human tissues. This TCR study with a panel of human tissues can predict target organs of toxicity prior to the initial clinical dosing of these products and is a recommended

component of the safety assessment package. On the other hand, because some reports show that the tissue distribution or expression level of the antigen is not consistent with tissue injury, the issue remains of how to exactly predict efficacy and toxicity when developing therapeutic antibodies, and a model suited for studying the factors that predict the biological response of therapeutic antibodies is necessary to address these matters. The anti-Thy-1.1 antibody-treated rat (rat anti-Thy-1 model) is known as an animal model for the involvement of antibody-mediated CDC in the induction of tissue injury. In the present study, we examine how the antigen and membrane complement regulatory proteins (mCRPs) are distributed, what effect an antibody has on the biological response and the factors that predict that effect, and we present novel information on, and methods for predicting, efficacy and toxicity of a therapeutic antibody.

In Chapter 1, we examined the distribution of Thy-1.1 antigen in normal rats and the tissue injury induced by CDC in the rat anti-Thy-1 model to evaluate and confirm that the model would be suited for investigating what other factors than antigen expression can predict the activation of CDC. We demonstrated that Thy-1.1 antigen is broadly distributed across several organs and cells, including lymphocytes of the thymus and spleen, mesangial cells of the kidney, medullary cells of the adrenal gland, and stromal cells in several organs. We expected that injecting anti-Thy-1.1 antibody would result in tissue injury in all these Thy-1.1-expressing cells, but when the rat anti-Thy-1 model was histopathologically evaluated in detail, cell death induced by the anti-Thy-1.1 antibody was observed only in mesangial cells. Morphologically, at 0.5 and 1 hour after treatment karyolysis in the mesangial cells and infiltration of neutrophils were found; at 8 hours after injection, the number of mesangial cells had decreased and the capillaries of the glomerulus were dilated; and at 24 and 48 hours after injection, the mesangial area had decreased. Deposition of C3, the key molecule of

the CDC cascade, was detected by immunohistochemistry only in the mesangial area from 0.5 hours after treatment. Judging from these results of the histopathological examination and C3 deposition, cell death of mesangial cells was induced by CDC mechanisms, as previously reported, but the other organs and tissues that express Thy-1.1 did not show cell death in this model. This result indicates that the antigen distribution data was not consistent with the organs in which antibody-mediated CDC was induced.

This chapter concludes that the rat anti-Thy-1 model is thought to be a suitable model for analyzing the factors other than the expression levels of the target antigen that predict the induction of CDC, based on the following reasons: 1) mesangial cell death due to CDC was induced by external administration of the antibody, 2) although Thy-1.1 antigen was distributed broadly, it was not consistent with cell death induced by treatment with anti-Thy-1.1 antibody.

In Chapter 2, to clarify the reason why the Thy-1.1 antigen distribution was not consistent with cell death we next considered two possible causes: 1) the injected antibody was not distributed in organs and tissues expressing Thy-1.1 and 2) mCRPs inhibited complement activation in the CDC reaction after the antigen bound to the antibody. Thus to elucidate the probable cause, the distribution of injected anti-Thy-1 antibody in the rat anti-Thy-1 model and the expression of Crry and CD55 in normal rats were evaluated. The injected anti-Thy-1.1 antibody was distributed in the mesangial cells of the kidney, in the lymphocytes in the perivascular areas of the cortex in the thymus and the red pulp of the spleen, and in medullary cells in the cortico-medullary junction of the adrenal gland. These results indicate that the injected anti-Thy-1.1 antibody did not bind to all of the cells that expressed the antigen but only to those cells that expressed more than a certain level of antigen. The expression of mCRPs was found in glomerular cells of the kidney, lymphocytes of the thymus, and medullary cells of the adrenal gland.

In the kidney, weak expression of Crry and no expression of CD55 were observed in the mesangial cell. In the thymus, moderate, diffuse expression of Crry and no expression of CD55 were seen in the lymphocytes. In the adrenal gland, weak expression of Crry and strong expression of CD55 were observed in medullary cells. Thus, Crry or CD55, which inhibit C3 activation, are more than moderately expressed in cells that have a level of antigen-antibody binding that does not induce C3 deposition and cell death.

Through our results concerning antigen expression, antibody distribution, and cell death, the relationship between antigen-antibody binding and CDC activation was categorized into the following three types: A) antigen-antibody binding that causes cell death (mesangial cells of the kidney); B) antigen-antibody binding that does not induce cell death (lymphocytes of the thymus and medullary cells in the adrenal gland); C) no antigen-antibody binding and no cell death (the other antigen-expressing cells). There were definite differences in C3 deposition between type A and type B cells. In other words, C3 deposition was observed in mesangial cells, which showed cell death, but was not seen in lymphocytes of the thymus and medullary cells in the adrenal gland, which did not show cell death. These results suggest that mCRPs are related to CDC induction.

As a conclusion of this chapter, the factors regulating CDC reaction in the rat anti-Thy-1 model were not only the distribution of antigen but also 1) distribution of the injected antibody and 2) expression of mCRPs that inhibit complement activation after antigen-antibody binding.

In Chapters 1 and 2, distribution of the Thy-1.1 antigen was not consistent with cell death induced by treating the rat anti-Thy-1 model with anti-Thy-1.1 antibody; thus, the antigen distribution data alone is not sufficient to predict the induction of antibody-mediated CDC. This conclusion was supported by the following two

findings: 1) regulation through the distribution of the injected antibody and 2) inhibition of complement activation after antigen-antibody binding by the expression of mCRPs. Having analyzed the distribution of the injected antibody in Chapter 2, in Chapter 3 the distributions of mCRPs (Crry and CD55) in normal rat were examined and we considered the possibility that mCRPs could be used to predict CDC reaction. Because there were 2 factors other than distribution of antigen that were related to CDC induction, we analyzed the distribution of the injected antibody and expression of mCRPs and discussed how analyzing these factors would contribute to better prediction of the biological reaction induced by treatment with a CDC-type antibody.

Crry and CD55 were detected widely in rat organs and tissues. The complement system can be effective in destroying external pathogens but unintended activation of complements can cause unnecessary injury. Thus the distribution of mCRPs may be involved in tight regulation of nonspecific activation in these tissues. Crry and CD55 were co-expressed in the same organs but they were expressed distinctly differently between cells. The two molecules have a common function in inhibiting C3 deposition, but the present results show that they have a separate expression pattern, a fact that indicates specific roles in CDC regulation.

We predicted the occurrence of lesion caused by a Thy-1.1 antibody injection according to 3 approaches, in which different tissues were selected as potential targets of biological reaction and were compared with the tissues that actually were affected in the rat anti-Thy-1 model: tissues in which antigen was expressed (Approach 1), tissues in which both the antigen and the injected antibody were distributed (Approach 2), and tissues in which both the antigen and the injected antibody were distributed and which had less than moderate expression of mCRPs (Approach 3). As a result, Approach 3, the approach that considers the distribution of antigen, the distribution of the injected antibody, and the expression of mCRPs,

was consistent with the tissues that were actually affected, namely, the mesangial cell in the kidney.

In conclusion, combining the analysis of antigen distribution, distribution of the injected antibody and the expression of mCRPs enabled us to predict the efficacy and toxicity of a CDC-type antibody more precisely.

The results of TCR studies designated in the Guideline predict the target organs of therapeutic antibodies in human to a certain extent but are not necessarily consistent with the biological response caused by therapeutic antibodies in target organs, because it is difficult to predict efficacy and toxicity of therapeutic antibody in human only from the distribution of the antigen. The main achievement of this study was the discovery that analyzing the distribution of antigen, the distribution of the injected antibody, and the expression of mCRPs makes it possible to predict the efficacy and toxicity of a CDC-type antibody more precisely. These results will contribute to greatly improved prediction of efficacy and toxicity of therapeutic antibodies and will also contribute to the enhanced research and development of novel therapeutic antibodies.