

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | 加藤千恵(神奈川県) |
| 学位の種類 | 博士(獣医学) |
| 学位記番号 | 乙第427号 |
| 学位授与年月日 | 平成25年7月22日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第3条第3項該当 |
| 学位論文題名 | 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 |
| 論文審査委員 | (主査) 代田欣二 (副査) 浅井史敏 有嶋和義 佐原弘益 |

論文内容の要旨

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、腎糸球体メサンギウム (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。いっぽう、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以上に分布する臓器を除外した組織を生体反応の起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。

論文審査の結果の要旨

抗体医薬は1980年代より活発な開発が始まったが、当初より抗体が異種タンパク質であり抗原性を持つという問題が存在し、この問題をクリアする困難さから一時期において開発が停滞した。しかし、近年の抗体工学の著しい発展により、キメラ抗体、ヒト化抗体あるいはヒト抗体の作成が可能となり、現在、医薬品の中で抗体医薬は最も活発に開発が行われているものの一つとなった。抗体医薬は標的分子に対する高い特異性に基づく治療効果が期待でき、生体内での安定性が高い事などから、標的分子の中和作用、酵素や受容体のブロック作用、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。特に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ないし作用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、また、有効性は認められるものの、生体内での実際の作用機序が明確ではない場合もあり、抗体医薬開発においてその有効性・安全性のより正確な予測が緊急課題となっている。しかし、現状では前臨床試験において標的抗原以外の生体反応を規定する要因の研究は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、抗体医薬の主要な作用機序であり、これが目的とする有効性を発揮するいっぽうで、毒性発現にも関与することが予想される CDC を研究対象とし、従来、寛解型糸球体傷害モデルとして知られている抗Thy-1.1抗体投与ラットモデルが、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かを検討し、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章では、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抗原の全身分布及び抗Thy-1.1抗体投与ラットにおけるCDC誘導病変を検索した。その結果、IHCでは標的抗原Thy-1.1抗原が胸腺及び脾臓リンパ球を含む免疫系や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、RT-PCRおよびWestern blot法によってもこれらの臓器にThy-1.1抗原の遺伝子、タンパク質が発現している事を確認した。このような抗Thy-1.1抗原の全身分布より、抗体投与後には標的抗原を発現

する様々な臓器に組織傷害が起こる事が予測されたが、組織傷害は腎臓のみに認められ、その特徴は、抗体投与後早期に発現するメサンギウム細胞の傷害と同部位におけるC3の沈着で、病変は抗Thy-1.1抗体投与に起因するCDCによるものと判断された。一方、その他の標的抗原発現臓器では、病理組織学的変化やC3の沈着は認められず、本モデルにおいては、全身における標的抗原の分布とCDCにより誘導される生体反応が一致しないことを初めて明らかにし、従来、糸球体傷害モデルとして認識されていたのみであった抗Thy-1.1抗体投与ラットモデルが、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を始めて示した。

第2章では、抗Thy-1.1抗体投与ラットにおいて標的抗原分布と生体反応が不一致であった事の理由として、1) 投与抗体が標的抗原発現部位に到達・結合していないこと、2) 抗体と抗原が結合するも、何らかの因子がCDC誘導を抑制している、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を検索し、さらに、CDCの抑制因子の中で細胞膜上で作用する膜補体制御因子mCRPs (CrryおよびCD55)の正常ラットにおける分布をIHCおよびWestern blot法で解析した。

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、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。また、mCRPsについては、胸腺皮質リンパ球にCrryが中程度に、副腎髄質細胞にはCrryが弱くCD55が高度に発現していた。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法により確認し、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。いっぽう、腎糸球体メサンギウム細胞にはCrryのごく弱い発現のみを認めた。

これらの結果から、著者はIHCにより確認された標的抗原発現臓器を、A) 抗原抗体反応が起き、CDCおよび細胞死が誘導されるもの(腎糸球体メサンギウム細胞)、B) 抗原抗体反応が起きるが、mCRPsの抑制作用によりCDCおよび細胞死が誘導されないもの(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つに分類した。AとBの間にはC3沈着の有無という明確な差を認め、C3沈着を抑制するmCRPsがCDC誘導に深く関わっていることを示唆した。また、糸球体におけるmCRPsの発現状態から、C3沈着抑制にはある一定以上のmCRPsの発現が必要であることを示唆した。

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、投与抗体の抗原部位への到達・結合の有無、そして組織におけるmCRPsの発現が、CDC生体反応を規定する要因となることを明らかにした。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、*in vivo*の実験結果と比較して、これらがCDC誘発の予測要因となるかを考察した。

その結果、Crry及びCD55は正常ラット全身諸臓器に広く分布し、同一臓器においては別々の細胞に発現していることを示した。さらに、本研究によって明らかとなった全身におけるThy-1.1抗原およびmCRPs分布と*in vivo*における投与抗体の分布を合わせ、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。すなわち、Approach 1として標的抗原の分布する組織、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

が中程度以上に分布する臓器を除外した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、Approach 3が実際の生体反応と一致した。このことから、従来の標的抗原分布から予測するApproach 1は最も広く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はより正確に傷害の予測を可能にすることを示した。

以上、本研究において著者は、CDC生体反応規定要因としてのmCRPsの分布解析が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より正確な有効性・安全性予測に寄与する事を示した。またこの事は、抗体医薬の前臨床試験において、ヒト組織パネルのICHやタンパク質発現解析によるmCRPsの発現解析の必要性を提唱する重要な知見と思われた。

抗体医薬のターゲットは自己免疫疾患、腫瘍、心血管系疾患、感染症、神経疾患等その対象は広がりつつあり、投与抗体の生体内での作用機序も多様である。抗体医薬の安全性評価については、げっ歯類やサルを用いた動物実験の有用性が化学合成医薬品の場合と比べきわめて限定されることや、欧州医薬品局からオーファン・ドラッグに指定されていた抗体医薬、TGN1412の初回臨床試験（第I相試験）における予期せぬ重大事故の発生（2006年）などから、一般の医薬品の安全性評価とは異なる多様な評価法が望まれている。このような状況において、本研究成果は抗体医薬品のより正確な有効性・安全性予測に大きく貢献するものであり、博士（獣医学）の学位を授与するのにふさわしい業績であると判定した。

以上。