

氏名(本籍)	たなかとしゆき 田中稔之
学位の種類	薬学博士
学位記番号	薬博第 178 号
学位授与年月日	平成元年 3月24日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科専門課程	東北大学大学院薬学研究科 (博士課程)薬学専攻
学位論文題目	モノクローナル抗体のリンパ球活性化機構 の解析および癌化学療法への応用

(主査)
論文審査委員 教授 橋本嘉幸 教授 鈴木康男
教授 南原利夫

論文内容要旨

細胞の分化・増殖において細胞表面形質は決定的な役割をはたす。即ち、可溶性因子の受容体となりまた細胞接着を媒介し細胞間情報を形成する。免疫反応においてT細胞は重要な役割をはたすが、非自己認識を行うT細胞表面上の抗原レセプター（T細胞レセプター）はCD 3 抗原系（CD ; cluster of differentiation）との複合体から形成されることが明かとなっている。また、腫瘍細胞には正常細胞とは異なった表面形質の存在がモノクローナル抗体(mAb)を用いた解析から示唆されている。

本研究は、正常および腫瘍細胞の分化・増殖機構の一端を明かとする目的で主としてリンパ球を解析の場とし、

1) ラットおよびヒトの系において細胞増殖関連抗原として同定された分子量125Kdの糖タンパク質 (gp125) の発現に関与する細胞内刺激伝達機構を種々の刺激剤を用いて解析した。また、活性化T細胞の静止期への移行に伴うgp125の発現の変化を解析した。

2) ラットT細胞レセプター複合体を形成すると考えられる分子量25Kdのタンパク質を認識する1F4 mAbを作製し対応抗原の生化学的性状および免疫学的な機能解析を行った。

さらに、抗原特異的な癌化学療法モデルの確立を目的とし、

3) 細胞増殖関連抗原 (gp125) に対するmAbを用い抗体修飾リポソームを作製しin vitroにおける抗腫瘍効果発現に要する条件を検討した。

(方法および結果)

1-1) 細胞増殖関連抗原発現における刺激要求性; ナイロンウール非附着性ラット脾細胞 (ラットT細胞) をprotein kinase C活性化剤であるphorbol myristate acetate (PMA), calcium ionophore A23187 あるいはその両方で刺激後、蛍光抗体法により染色し、ラットgp125 (B3抗原) 発現をFACS (fluorescence activated cell sorter) により測定した。また、あわせて [³H]TdR取り込みも測定した。B3抗原発現においてPMA単独はほとんど無効であり、A23187単独も弱い効果しか示さなかったが、両者を共存させることにより強い相乗効果を示しほぼすべての細胞上に顕著なB3抗原の発現が認められた。この結果は、 [³H]TdR取り込みの結果と一致した。さらに、この系にEGTAを加えることにより、B3抗原の発現はDNA合成とともに強く阻害されたが、これらはCaCl₂の添加により完全に回復した。PMAとA23187は、ヒトgp125 (HBJ127抗原) の発現においても同様な相乗効果を示した。1-2) サイクリックヌクレオチドの関与; ラットT細胞ConA反応中およびPMA+A23187 刺激時にdibutyryl cyclic AMP (dbc AMP), dbc GMP, あるいはadenylate cyclase 活性化剤であるforskolinを共存させ、B3抗原発現および [³H]TdR取り込みに対する影響を検討した。その結果、dbc AMPおよびforskolin

はConAおよびPMA+A23187 刺激によるB3抗原の発現および [^3H]TdR取り込みを抑制した。一方, dbc GMPは抗原発現には影響を示さないが, [^3H]TdR取り込みを若干促進することが認められた。dbc AMP, forskolin およびdbc GMPはそれぞれ単独ではB3抗原発現および [^3H]TdR取り込みに対し無効であった。1-3) 抗原発現のkineticsの検討; PMA+A23187 刺激によるヒトおよびラットgp125抗原発現のタイミングをtransferrin receptor (TrfR) と比較検討した。その結果, ヒトおよびラットgp125抗原は刺激開始6時間後より, TrfRに先行して細胞表面上に検出された。1-4) 活性化リンパ球の静止期への移行に伴うgp125抗原の発現変化; 細胞T細胞をConAにより2日間刺激後ConAを除去し培養を続けると, T細胞は分裂後, 新たな刺激が加えられなければ, 徐々に静止期の小型細胞へと移行する。この際のIL-2反応性およびgp125抗原, IL-2RおよびTrfRの発現変化を検討した。その結果, T細胞のIL-2に対する反応性は細胞分裂後速やかに消失した。またこの時TrfRは速やかに細胞表面から消失したが, gp125抗原およびIL-2Rは比較的長期間にわたり検出できた。

2-1) 1F4 mAbの作製と対応抗原の分布; Balb/cマウスを, PMA+A23187 で6時間刺激したラットT細胞で免疫し, 常法により抗体産生ハイブリドーマを作製した。ラットT細胞との反応性およびラット脾細胞に対するPMAとのco-stimulation assayにより1F4 mAb(IgM) を選択した。ラットリンパ系細胞との反応性をFACSを用いて解析した。また, 対応抗原の分布は, 凍結組織切片を用いABC (avidin biotinylated-peroxidase complex) 法により染色し検討した。1F4抗原の既知のラットT細胞抗原との異同は, 1F4抗原が1F4 mAbによりmodulateされることから, modulation後の細胞を抗ラットCD5 mAb(R1-3 B3), 抗ラットCD2 mAb(MRC OX-34) およびMRC OX-52mAbにより染色しFACSを用いて解析した。その結果, 1F4 mAbは末梢のラットT細胞と反応することが示された。胸腺細胞は, 約20%が陽性, 約80%が弱陽性であったが, 骨髄細胞との反応性は認められなかった。また, 二重染色を用いたFACS解析により脾細胞における1F4抗原の発現はCD5陽性群にほぼ一致し, surface-immunoglobulin陽性B細胞には認められなかった。胸腺細胞における1F4抗原の発現はCD5の発現と相関性を示した。組織切片をもちいた検索においても, 1F4抗原の分布はCD5の分布とよく一致した。一方, 胸腺においては, 髄質の細胞がより強い反応性を示した。さらに, 1F4抗原をmodulateさせた後も, CD5, CD2, およびOX-52抗原の発現は変化しないことから, 1F4抗原は既知の抗原とは異なった分子であることが示された。2-2) 1F4抗原の生化学的性状; 細胞T細胞を ^{125}I にて標識後, NP-40により可溶化し, 1F4 mAb結合Affigel-10を用いて免疫沈降し, SDS-PAGEにより解析した。また, 抗原分子近傍の構造を ^{125}I 標識後dithiobis (succinimidyl propionate) (DSP) により架橋し同様に解析した。その結果, 1F4 mAbは分子量25Kdの抗原を認識することが示された。また, DSPを用いた架橋実験において, 分子量52Kdと分子量43Kdの2種の分子

が共沈することが認められた。2-3) 1F4 mAbによるラットT細胞の活性化阻止；ラットT細胞のConA反応, IL-2反応およびallo MLRに対する1F4 mAbの作用を [^3H]TdR取り込みを指標にして解析した。その結果, 1F4 mAbは, ラットT細胞のConA反応を強く阻害した。これは早期活性化抗原としてのB3抗原, IL-2RおよびTrfRの発現抑制およびIL-2産生の抑制によるものであることが示された。また, allo MLRも同様に阻害された。2-4) 1F4 mAbによるラットT細胞の増殖誘導；可溶性およびwellに吸着させることにより固相化した1F4 mAbのラットT細胞増殖誘導を [^3H]TdR取り込みを指標にして検討した。その結果, 可溶性1F4 mAbは, mitomycin C処理脾細胞とPMAの存在下に, T細胞に顕著な [^3H]TdR取り込みを誘導した。一方, 固相化した1F4 mAbは, PMA非存在下でラットT細胞に強い増殖を誘導した。

3-1) 細胞増殖関連抗原 (gp125) に対するadriamycin (ADM) 含有抗体修飾リポソーム (chemoimmunoliposome : CIL) の作製；B3 (抗ラットgp125) およびHBJ127 (抗ヒトgp125) mAbはsuccinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionateによりSH基を導入しマレイミド基を有するリポソームと結合させた。これを精製した後, リポソーム内外に作製したイオン勾配を利用し, ADMを封入しCILとした。3-2) *in vitro*におけるCILの結合特異性； ^{14}C 標識したCILのラットおよびヒト由来の膀胱癌 (BC47, T24) およびT lymphoma (FTL-13, Molt-4) に対する結合特異性を検討した。その結果, B3-CILはBC47およびFTL-13に, HBJ127-CILはT24およびMolt-4に対し各々抗原特異的な結合性を示した。また, B3-CILの標的細胞との結合はB3 mAbにより, HBJ127-CILの標的細胞との結合はHBJ127 mAbにより各々阻止されることから, 標的細胞とCILの結合は特異的な抗原抗体反応によるものであることが示された。3-3) *in vitro*におけるCILの標的細胞傷害性；標的細胞をCILと反応後洗浄し, [^3H]TdR取り込みまたは生細胞数を指標として検討した。その結果, B3-CILおよびHBJ127-CILは各々対応する膀胱癌に対して抗原特異的な増殖抑制効果を示したが, T lymphomaに対する作用は弱かった。またB3-CILの細胞傷害性はB3 mAbにより, HBJ127-CILの細胞傷害性はHBJ127 mAbにより阻害されることから, CILの細胞傷害性は特異的な抗原抗体反応を介するものであることが示された。

3-4) 抗gp125 mAbのScatchard plot analysis； ^{125}I 標識したB3 およびHBJ127 mAbを用い, mAbの標的細胞に対するaffinityおよび標的細胞上の結合部位数を算定した。その結果, 細胞あたりのB3 mAbの結合部位数は, FTL-13(1.1×10^5) に比してBC47(3.3×10^5) に多かった。同様に細胞あたりのHBJ127 mAbの結合部位数は, Molt-4(4.3×10^5) に比してT24(8.3×10^5) に多かった。標的細胞に対する mAbのaffinityはB3 mAb ($1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) が, HBJ127 mAb ($0.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) よりも高値を示した。また, 抗原陽性細胞の間に相違は認められなかった。

(考察および結論)

1) 細胞増殖関連抗原 (gp125) のリンパ球上への発現にはprotein kinase Cの活性化およびカルシウムイオンの動員の両者が重要な役割を果たすことが示された。さらにこれらに対しcAMPを介する経路は抑制的に作用することが示された。またgp125抗原は発現kineticsの解析から、ラットおよびヒトの系において、TrfRに先行して細胞表面に検出され、リンパ球活性化の初期過程に密接に関与すると考えられた。

2) 1F4 mAbはラットT細胞上の分子量25Kdの抗原を認識することが示された。さらに、その近傍には分子量52Kdと分子量43Kdの2種のタンパク質が同定された。これはヒトおよびマウスにおけるT細胞レセプター α 鎖および β 鎖と分子量的にはほぼ一致した。機能的解析からも1F4抗原はT細胞の刺激伝達に関与することが示された。これらを総合すると1F4 mAbはラットCD3を認識すると考えられる。ラットにおいてはT細胞レセプターについての報告はなく、1F4 mAbはきわめて有用なmarkerとなると期待される。

3) 細胞増殖関連抗原に対するCILはヒトおよびラットの系において、膀胱癌およびT lymphomaに対し抗原特異的な結合性を示した。しかし、今回用いた条件では、CILは膀胱癌に対しては抗原特異的な細胞傷害性を示したが、T lymphomaに対する作用は弱かった。Scatchard plot analysisの結果よりこのCILの細胞傷害性の差異は用いた mAbの標的細胞上結合部位数に依存するものであることが示された。この系で mAbのaffinityの関与は認められなかった。

以上のように mAbを用いた細胞の活性化機構の解析やリンパ球上の機能分子の同定が可能となっている。さらに mAbを特異的ligandとした癌化学療法の可能性が示され、この際 mAbの標的細胞あたりの結合部位数が重要となることが示された。

審査結果の要旨

細胞の分化、増殖においては増殖因子受容体などの細胞表面機能分子が大きな役割を果たす。本研究ではモノクローナル抗体を応用してリンパ球における増殖関連抗原の性状を明らかにし、またがん細胞表面に発現されている増殖関連抗原を標的としてのいわゆるターゲティング療法の可能性について検討した。

先の研究でラットおよびヒトの系において新しい増殖関連抗原として同定された糖タンパク質 gp125につき、リンパ球を用いて、その出現に関する生化学的機構を解析した。その結果、gp125 抗原はフォルボールエステルとカルシウムイオンフォアの両者の刺激により効率よく誘導されること、すなわち、その出現にはプロテインキナーゼCの活性化とカルシウム・イオンの蓄積が必要であることが明らかとなった。また、この場合におけるgp125抗原出現の動態について精査した結果、本抗原はこれまでに知られているIL-2受容体やトランスフェリン受容体などの増殖関連細胞表面物質よりも細胞回転のより早期に出現し、細胞増殖の初期過程を支配する重要な細胞表面物質であることが判明した（第2章）。

リンパ球に表現されるCD 3分子複合体は、T細胞受容体との協同のもとに、抗原刺激によるTリンパ球の分化、増殖を支配する重要な細胞表面物質であるが、その機能解析や機能調節のためには対応するモノクローナル抗体の利用が有益である。本研究ではラットのCD 3分子に対するモノクローナル抗体の作成に初めて成功し、この抗体を用いてラットにおけるCD 3分子の機能を検索した。その結果、この抗体そのものはCD 3分子をブロックすることにより、レクチンの刺激によるリンパ球の分裂を阻害するが、固相化によりアレンジした場合にはフォルボールエステルの補助なしにリンパ球の分裂を促進した。すなわち細胞表面のCD 3分子を架橋した場合には、この分子からの刺激情報が細胞内に伝達されることが示唆された（第3章）。

gp125抗原はがん細胞に広く分布することが明らかにされている。そこで抗がん剤としてのアドリアマイシンを封入したリボソーム表面にこの抗原に対するモノクローナル抗体を結合させ、そのがん細胞傷害効果を試験管内で検索した。その結果、このリボソームは選択的にがん細胞に結合し、がん細胞を傷害すること、またその効果はがん細胞表面のgp125抗原の量と相関することが明らかとなった（第4章）。

以上の成果は基礎免疫学的にも、また新しいがん治療法の開発にも多大の貢献をするものと思われる、本研究は博士論文として評価される。