

学位論文題名

血小板インテグリン α IIb β 3 に対するモノクローナル抗体の作成とヒト化に関する研究

学位論文内容の要旨

本研究では、血栓症治療薬の創製を目的とし、抗血小板作用が強く、かつ安全性の高い抗血小板薬を得るべく、血小板をマウスに免疫し、血小板凝集抑制活性の強いクローンをスクリーニングすることにより、血小板に特異的に反応するユニークなモノクローナル抗体 C4G1 を取得した。C4G1 を CDR-grafting に改良を加えた方法でヒト化し、ヒト化 C4G1 の薬理活性を検討した。ヒト化 C4G1 の F(ab')₂ フラグメントはアカゲザルのある個体に投与したとき血小板減少を引き起こしたのでその原因を究明した。さらに、ヒト化 C4G1 Fab フラグメントの薬理活性を先行薬との比較で検討した。この過程で、以下の事実を明らかにした。

(1) 血小板インテグリン α IIb β 3 複合体を認識するマウスモノクローナル抗体 C4G1 の取得

血小板を免疫して、血小板凝集 (ADP 凝集、collagen 凝集、thrombin 凝集) を完全に抑制し IgG₁ に属するモノクローナル抗体 C4G1 を取得した。C4G1 の血小板に対する親和性は天然リガンドの fibrinogen に比較して 100 倍強かった。免疫沈降および Western blotting による解析より、C4G1 は Ca²⁺依存性のコンフォーメーションナルエピトープを認識すると考えられる。結合の競合阻害実験から、C4G1 は直接 α IIb β 3 の fibrinogen 結合部位を認識しているのではなく、結合部位近傍に結合することによる立体障害によって fibrinogen の α IIb β 3 への結合を妨げているのであろうと考えられた。C4G1 は α v β 3 に対して反応せず、 α IIb β 3 に特異的に反応したことから、血小板機能のみを阻害する極めて特異性の高い阻害剤となりうると期待される。

(2) モノクローナル抗体 C4G1 の CDR-grafting によるヒト化

C4G1 をヒト化することによって、抗体の抗原性の問題の解決を図った。C4G1 の可変領域の cDNA を anchored PCR 法でクローニングし、Queen らの方法に従い抗体をデザインした。デザインされたヒト化 C4G1 の可変領域をコードする遺伝子を合成し、H 鎖は全分子、F(ab')₂、及び Fab 発現ベクターに挿入し、L 鎖発現ベクターとともに Sp2/0 細胞に co-transfection し、安定なクローンを選び、大量培養し、精製した。ヒト化の過程で血小板への親和性、特異性は 100%維持されていた。

アカゲザルに hC4G1 の全分子を投与すると、激しい血小板減少が起こった。F(ab')₂ および Fab フラグメントを投与したとき用量依存性の ex vivo 血小板凝集抑制活性が認められ、F(ab')₂ フラグメント投与では活性が 12 時間以上持続したが、Fab フラグメント投与では投与 6 時間以内に活性が消失した。

(3) F(ab')₂ フラグメントを認識する自然抗体の発見

hC4G1 の F(ab')₂ フラグメント (F(ab')₂ hC4G1) をカニクイザルに静脈内投与したところ、18 匹のうち 5 匹が血小板減少を引き起こした。この血小板減少に用量依存性は特に認められず、この血小板減少は投与された F(ab')₂ hC4G1 を直接介して惹起された可能性が高いと考えられる。

血小板減少の程度と抗 F(ab')₂ hC4G1 抗体 ELISA 値の間に有意 ($r=0.84$) の相関関係が認められた。これらサル抗 F(ab')₂ hC4G1 抗体は抗イディオタイプ抗体ではなく、エピトープはヒト F(ab')₂ フラグメントの C 末端領域に局在しており、ヒト IgG 抗体の pepsin 消化によって露出される F(ab')₂ の C 末端部分近傍を認識していることが強く示唆される。

ヒト血清中の抗 F(ab')₂ hC4G1 抗体価は、40 名の健常人ボランティアの中 15 例 (38%) で血清 ELISA 値が 1.0 を越えていた。この抗体の特異性はサル血中抗体と殆ど同じであった。

抗 F(ab')₂ homo-reactive 抗体は 10 μ g/ml 以上の添加で単球による F(ab')₂ hC4G1 負荷血小板貪食を促進し、抗 F(ab')₂ homo-reactive 抗体価の高いヒトに F(ab')₂ hC4G1 を投与した際に血小板減少が惹起される可能性が高いことが示唆される。血小板減少を示したサルの血漿を抗 F(ab')₂ 自然抗体の ELISA 値が base line 値を示すサルに輸注したところ、F(ab')₂ hC4G1 依存性の一過性の血小板減少が惹起された。これらの結果から、抗 F(ab')₂ 自然抗体は血小板表面に結合した F(ab')₂ hC4G1 に結合することによって網内系による貪食を誘導し血小板減少を惹起する可能性が示唆される。

これは細胞表面抗原に対する抗体をヒト化し、そのフラグメントを動物に投与して初めて明らかになったことである。

(4) hC4G1 の Fab フラグメント (Fab hC4G1) の抗血小板薬としての特性の解析

hC4G1 の Fab フラグメント Fab hC4G1 においては血小板凝集が 80% 阻害されたときの血中濃度と出血時間が 20 分以上に延長したときの血中濃度に 33 倍の乖離が認められたのに対し、先行薬 chimera7E3 abciximab では血小板凝集抑制作用と出血時間延長の間の乖離は 6.8 倍と小さく、乖離そのものも明確ではなかった。Fab hC4G1 は abciximab と比較して therapeutic window の広いはるかに安全な薬剤になりうると予測される。すなわち臨床において出血の副作用も少ないだろうと予想される。さらに、安全性の観点から考えると、Fab hC4G1の方が abciximab と比較して投与を中止した際の効果の元値までの回復が短いという特性もより有効に働くと考えられる。万が一出血が起こったとしても、投与を中止すれば速やかに活性は消失する、臨床的にコントロールしやすい薬剤となりうると期待される。

この血小板凝集抑制作用と出血時間延長の間の大きな乖離を説明できる仮説を立てるために、Fab hC4G1 と abciximab とを in vitro の諸性質について比較検討したところ、血小板凝集抑制活性、血小板粘着能については両者に顕著な差は認められなかったが、Fab hC4G1 は abciximab に比べて in vitro での血小板からの解離が速く、その反映として in vivo でも持続時間が bciximab に比べて短かった。この解離速度の差が主作用と副作用の乖離として反映されている可能性が考えられる。また、abciximab は血管内皮細胞 $\alpha_v \beta_3$ に結合し、hC4G1 は結合しなかった。この特異性の差も部分的には Fab hC4G1 と abciximab の間の主作用と副作用の乖離の程度の差に反映されている可能性が考えられる。

これまでの研究で明らかになった Fab hC4G1 の安全なプロファイル、及び病的血栓の抑制効果が臨床的に意味を持つ結果として反映されるかどうか、今後の研究が待たれる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 澤 滋 治

副 査 教 授 有 賀 寛 芳

副 査 助 教 授 加 藤 宏 幸

副 査 助 教 授 高 橋 和 彦

学 位 論 文 題 名

血小板インテグリン α IIb β 3 に対するモノクローナル 抗体の作成とヒト化に関する研究

血栓症は欧米及び近年の日本における主要な死因の一つであり、心筋梗塞、脳梗塞などの動脈血栓性疾患を合計すると、癌を越えて死因の第一位である。この血栓症の発生要因は様々であるが、動脈硬化などの血管の病変が基盤となることが多い。血栓症を制することは、救命のみならず、緊急治療によって命が救われた後の生活の質(Quality of life:QOL)の向上にも寄与するであろうことには疑いの余地がない。

血小板凝集に関係する因子としてインテグリンファミリーに属するIIb β 3という膜蛋白質が知られている。この蛋白質は血小板活性化の最終段階で高次構造変化を起こし、フィブリノーゲンなどのリガンドとの結合活性を強めることが知られている。したがって、このインテグリン特異的な単クローン抗体が調製できれば、血栓予防薬としての臨床応用が可能と考えられる。

医薬品創製の観点から、異種動物で作製した単クローン抗体をそのままヒトに投与することはアナフィラキシーを誘起する危険性があり、安全な形態に変換することが不可欠とされる。その目的には、抗体の基本部分をヒト抗体とし、その特異性部位のみを単クローン抗体から導入したヒト型抗体を作製する必要がある。このヒト型抗体のデザインには、高度の遺伝子工学とコンピューターグラフィックスの技術が必要とされるもので、最先端

的な研究領域の属する。

本論文は、

- 1) このインテグリン分子に対する単クローン抗体の作製、
- 2) 治療薬への適応を目的としたヒト化抗体の作製、
- 3) ヒト血中に抗体切断部位に対する自然抗体の存在の発見、の3部分から構成されている。

以下に、各項目の成果を概説する。

1) 抗血小板作用が強く、かつ安全性の高い抗血小板薬を得るべく血小板をマウスに免疫し、血小板凝集抑制活性の強いクローンをスクリーニングした。その結果、血小板凝集を完全に抑制し、しかも血小板インテグリン α IIb β 3 複合体を認識する、すなわち高度に血小板に特異的に反応するユニークなモノクローナル抗体C4G1を分離することに成功した。この抗体は α IIb β 3 に特有な高次構造を認識する点で特異的なものである。この特性ゆえに、他のインテグリンファミリーに対しては全く結合しないことから、例えば出血時間の延長などの副作用を示さないという特性を有す。

2) マウス抗体を医療に使用することは、異種動物に対する抗体が産生されるため、再度の投与でアナフィラキシーショックを惹起する危険性がある。この問題を解決する方法は、ヒト抗体の骨格を用いて、結合特異せい部位だけマウス抗体の部分と入れ替えることである。ここの段階は米国のベンチャー企業との共同研究により、マウス抗体の活性を100%維持した状態で、ヒト型抗体を作製することにも成功した。このヒト化抗体は血小板凝集を完全に抑制する一方、出血時間の延長という副作用は少ないという有望な抗体であることを明らかにした。現在、このヒト型抗体は血栓症に対する安全性の高い医薬品として現在臨床試験を進めつつある。

3) 抗体の形で投与した場合、血小板に結合した抗体のFc領域に食細胞が応答して、II型アレルギー反応が惹起される危険性もある。したがって、ヒト化抗体を安全に医薬品として使用するために、Fc領域を削除したF(ab)₂フラグメントを調製し、その医薬品としての有効性の検討も進めた。その結果、ヒトの血液中には、抗体F(ab)₂の切断部に対する自然抗体が存在すること

を発見した。これは、F(ab)₂形の抗体フラグメントを医薬品として使用することの危険性を提議する重要な知見である。切断方法を変えてFabフラグメントにすると、自然抗体との反応性の危険性もないことも明らかにし、ヒト化抗体の医薬品創製の難題を解決することができた。

以上の研究成果からなる本論文は博士(薬学)の学位を受けるに値する業績と評価した。