

学 位 論 文 題 名

Anti-IL-6 receptor antibody increases blood IL-6 level via
the blockade of IL-6 clearance,
but not via the induction of IL-6 production

(抗 IL-6 レセプター抗体投与後の血中 IL-6 濃度の上昇は
IL-6 産生誘導ではなく IL-6 のクリアランス阻害を介する)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 IL-6 は免疫バランスの制御に関わるキーとなるサイトカインであり、様々な免疫細胞の分化、活性化過程において重要な役割を果たしている。IL-6 レセプターには、膜結合型と可溶型の 2 種類が存在するが、ともに IL-6 と結合後、細胞膜に存在する gp130 分子と複合体を形成し、IL-6 のシグナルを伝達する。トシリズマブは、可溶型および膜結合型の両方の IL-6 レセプターに結合して IL-6 のシグナルを特異的に阻害するヒト化抗 IL-6 レセプター抗体であり、関節リウマチ、クローン病などの IL-6 産生が亢進している疾患に対する有効性が確認されている。一般に、生体の可溶性蛋白抗原を標的とした抗体製剤では、投与後に抗原と抗体の複合体が形成されるために、対応抗原のクリアランスが遅延し、抗原の血中濃度が増加することが報告されている。しかし、トシリズマブ投与後においては、可溶型 IL-6 レセプターのみならず、IL-6 の血中濃度の上昇が観察される。この IL-6 濃度の上昇機序の詳細は不明であるが、IL-6 のシグナル伝達が阻害されるために代償性に IL-6 産生が誘導される可能性、血中に大量に存在する IL-6/可溶型 IL-6 レセプターの複合体から IL-6 が遊離する可能性あるいは血中からの IL-6 のクリアランスが阻害される可能性が考えられる。本研究では、抗 IL-6 レセプター抗体投与後の血中 IL-6 濃度の上昇機序を明らかにするために、これらの 3 つの可能性について、サルコラーゲン関節炎モデルおよびヒト IL-6 を持続注入した IL-6 遺伝子欠損マウスを用いて検討した。

【材料と方法】 1) サルコラーゲン関節炎モデルを用いた解析：サルコラーゲン関節炎はカニクイザルにウシⅡ型コラーゲンを 3 週間間隔で 2 回免疫し誘導した。関節炎発症後にトシリズマブ 30 mg/kg あるいは PBS を静脈内投与し、投与後 1、3 および 7 日目に血中の IL-6 濃度、可溶型 IL-6 レセプター濃度および CRP 濃度を測定した。投与後 1、3 および 7 日目に肝臓、脾臓、リンパ節、血液細胞および滑膜を採取し total RNA を抽出した後、リアルタイム PCR 法で各組織中の IL-6 および IL-6 レセプターの mRNA の発現量を測定した。また、関節炎サル血漿にトシリズマブ 200 µg/mL を添加し、室温で 1 時間放置後の IL-6 濃度を測定し、処置前後の値を比較することによって、IL-6/可溶型 IL-6 レセプターの複合体に及ぼす影響を検討した。 2) ヒト IL-6 持続注入 IL-6 遺伝子欠損マウスを用いた解析：IL-6 遺伝子欠損 C57BL/6 マウスの背部皮下に Alzet ミニ浸透圧ポンプを移植し、ヒト IL-6 を持続注入 (3 µg/日) したマウスモデルを作製した。本モデルは、ヒト IL-6 の血中濃度が一定量に保たれ、かつ内因性 IL-6 産生が認められない特徴を有する。ヒト IL-6 はマウス IL-6 レセプターに結合し IL-6 シグナルを伝達できることが確認されていることから、本マウスに抗マウス IL-6 レセプター抗体を投与し、血

中のヒト IL-6 濃度の推移を経時的に測定することにより血中からの IL-6 のクリアランスに及ぼす影響の評価が可能となる。なお、対照群には PBS を投与した。

【結果】 1) 血中の IL-6 濃度と可溶型 IL-6 レセプター濃度に及ぼす影響 (サル関節炎) : トシリズマブ投与群では、投与後 1、3 および 7 日目のいずれの時期においても血中 IL-6 濃度および可溶型 IL-6 レセプターの上昇が認められた。一方、炎症マーカーの血中 CRP 濃度はトシリズマブ投与群の全例で低下した。また、トシリズマブ投与群では関節腫脹の減少が観察された。2) IL-6 mRNA および可溶型 IL-6 レセプター mRNA の発現量に及ぼす影響 (サル関節炎) : 肝臓、脾臓、リンパ節、全血液細胞および滑膜のいずれの組織においてもトシリズマブ投与による IL-6 mRNA の発現量の増加は認められなかった。IL-6 レセプター mRNA においても発現の増加は観察されなかった。3) 血中の IL-6/可溶型 IL-6 レセプター複合体に及ぼす影響 (サル関節炎) : 関節炎サル血漿にトシリズマブ 200 $\mu\text{g/mL}$ を添加し、室温で 1 時間処理したが、処置前後で IL-6 濃度の変化は認められなかった。4) 血中から IL-6 のクリアランスに及ぼす影響 (ヒト IL-6 持続注入マウスモデル) : ヒト IL-6 を持続注入した IL-6 遺伝子欠損マウスでは、抗マウス IL-6 レセプター抗体投与後に IL-6 の血中濃度の上昇が認められた。一方、PBS 投与群では変化は認められなかった。

【考察】 一般に、血中半減期が短い生体の可溶性蛋白抗原を標的とした抗体の場合、投与後に抗原と抗体の複合体が形成され、対応抗原のクリアランスが遅延するために、抗原の血中濃度が増加することが報告されている。今回のサル関節炎モデルでは、IL-6 レセプターの mRNA の増加は認められていないことから、トシリズマブにおいても、他の抗体と同様の機序を介して、可溶型 IL-6 レセプターの血中濃度の増加が観察されると考えられた。一方、トシリズマブにおいては、可溶型 IL-6 レセプターのみならず、IL-6 の血中濃度の増加が観察される。その機序として、まず、IL-6 のシグナル伝達が阻害されるために代償性に IL-6 産生が誘導される可能性が考えられた。しかし、関節炎サルを用いた検討では、いずれの IL-6 産生組織においてもトシリズマブ投与による IL-6 mRNA の発現誘導は認められていないことから、この可能性は否定的である。また、関節炎サル血漿を用いた検討より、血中に大量に存在する IL-6/可溶型 IL-6 レセプターの複合体から IL-6 を遊離させる可能性も否定された。一方、ヒト IL-6 持続注入 IL-6 遺伝子欠損マウスにおいて、抗 IL-6 レセプター抗体の投与後に IL-6 の血中濃度の上昇が認められたことから、IL-6 上昇の主因は、血中の IL-6 のクリアランスの遅延であることが強く示唆された。クリアランスの遅延の機序は、IL-6 レセプターに抗 IL-6 レセプター抗体が結合することにより、IL-6 の利用率が低下し、血中に IL-6 が蓄積されるためと考えられる。また、今回のサルコラーゲン関節炎モデルでの結果から、このように血中の IL-6 と可溶型 IL-6 レセプターが増加している状態においても、トシリズマブは強力に IL-6 活性を阻害し、CRP を低下させ、関節腫脹を減少させていることが確認された。臨床においても同様と考えられる。

【結論】 抗 IL-6 レセプター抗体投与後の血中 IL-6 濃度の上昇は、IL-6 産生誘導あるいは IL-6/可溶型 IL-6 レセプター複合体からの IL-6 の遊離によるものではなく、IL-6 のクリアランス阻害を介すると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 岩 永 敏 彦

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

副 査 教 授 西 村 孝 司

学 位 論 文 題 名

Anti-IL-6 receptor antibody increases blood IL-6 level via
the blockade of IL-6 clearance,
but not via the induction of IL-6 production

(抗 IL-6 レセプター抗体投与後の血中 IL-6 濃度の上昇は
IL-6 産生誘導ではなく IL-6 のクリアランス阻害を介する)

本研究では、抗 IL-6 レセプター抗体投与後の血中 IL-6 濃度の上昇機序を明らかにするために、サルコラーゲン関節炎モデルおよびヒト IL-6 を持続注入した IL-6 遺伝子欠損マウスを用いて検討した。その結果、サル関節炎モデルにおいて、抗 IL-6 レセプター抗体投与群では、血中 IL-6 濃度および可溶性 IL-6 レセプターの上昇が認められた。一方、炎症マーカーの血中 CRP 濃度は抗 IL-6 レセプター抗体投与群の全例で低下するとともに、関節腫脹の減少が観察された。ここで肝臓、脾臓、リンパ節、全血液細胞および滑膜組織における抗 IL-6 レセプター抗体投与後の IL-6 mRNA レベルを解析した結果、IL-6 および IL-6 レセプター mRNA の発現量の増加は認められなかった。さらに関節炎サル血漿に抗 IL-6 レセプター抗体 200ng/mL を添加し、室温で 1 時間処理したが、処置前後で血漿中の IL-6 濃度の変化は認められなかった。最後に、ヒト IL-6 持続注入マウスモデルを構築して、血中から IL-6 のクリアランスに及ぼす影響について検討したところ、ヒト IL-6 を持続注入した IL-6 遺伝子欠損マウスでは、抗マウス IL-6 レセプター抗体投与後に IL-6 の血中濃度の上昇が認められた。以上の結果により抗 IL-6 レセプター抗体投与後の血中 IL-6 濃度の上昇は、IL-6 産生誘導あるいは IL-6/可溶性 IL-6 レセプター複合体からの IL-6 の遊離によるものではなく、IL-6 のクリアランス阻害を介することが示唆された。

学位論文発表後、主査の岩永敏彦教授から、抗 IL-6 レセプター抗体の生体内投与による血中 IL-6 レベルの上昇機構解明の作業仮説について質問があった。この点に関して、実際に抗 IL-6 レセプター抗体の生体内投与により炎症が軽減される事から、まずはじめに IL-6 の mRNA レベルによる新たな発現増強の可能性は低い事を予測し、次いで抗 IL-6 レセプター抗体と IL-6 免疫複合体からの乖離、さらに IL-6 の生体内におけるクリアランスの遅延によって IL-6 レベルの上昇がおこる事を想定し、本研究においてこれらの仮説についてサルあるいはマウスモデルを用いて証明するに至ったことを回答した。また、実際の生体内での抗 IL-6 レセプター抗体の結合様式に関する質問があった。これに対して IL-6 と可溶性あるいは膜結合型 IL-6 レセプターとの結合様式、さらに可溶性 gp130 分子を含む結合様式が存在する事を回答した。

次に副査の秋田弘俊教授から、本研究で示された各種臓器以外の組織における抗 IL-6 レセプター抗体投与後の IL-6 の mRNA 発現レベルの増減についての質問があった。この点に対

して、今回示された組織以外では IL-6 の mRNA レベルの確認してはいないが、本研究では IL-6 の産生が知られている代表的な組織において検討した旨を述べた。また、IL-6 の生体内からの排除機構に関する質問があった。この点に関して、蛋白分解酵素による分解と尿からの排出機構がある旨を回答した。さらに抗 IL-6 レセプター抗体投与後に生ずる IL-6 レベルの上昇により、何らかの副作用が生体内において発生する可能性について質問があった。この点に関して、これまで抗 IL-6 レセプター投与による重篤な副作用は報告されていない事、また抗 IL-6 レセプター抗体により増加した IL-6 の生物学的活性もまた、抗 IL-6 レセプター抗体により中和されており、副作用は極めて少ないものと考察できると回答した。

また、副査である西村孝司教授から、抗 IL-6 レセプター抗体を用いた臨床応用について、今後の展望についての質問があった。これに対して、実際にヒト自己免疫疾患に対しての抗 IL-6 レセプター抗体が臨床応用され、それらの疾患の軽減効果が示されていることを例に挙げ、特に関節リウマチ患者では一過性に IL-6 レベルの上昇は認められるものの、病態の軽減により IL-6 レベルが減少する事から、今後、自己免疫疾患の改善効果のみならず、抗 IL-6 レセプター抗体を用いた治療後の離脱も期待できるとの見解を述べた。

この論文は、生体モデルによる抗 IL-6 レセプター抗体投与後の血中 IL-6 濃度の上昇メカニズムが、IL-6 産生誘導あるいは IL-6/可溶型 IL-6 レセプター複合体からの IL-6 の遊離によるものではなく、IL-6 のクリアランス阻害を介することを証明した点で高く評価され、今後、抗 IL-6 レセプター抗体投与によるヒト自己免疫疾患の改善を目指した新規治療法の開発に貢献することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、これまでの研究活動における研鑽なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。