

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19780232

研究課題名 (和文) イヌの免疫介在性疾患に対する分子標的療法の開発とその臨床応用

研究課題名 (英文) Development and clinical appliance of molecular target therapy for immune-mediated disease in dogs.

研究代表者

水野 拓也 (MIZUNO TAKUYA)

山口大学・農学部・准教授

研究者番号：90398826

研究成果の概要：イヌにおける免疫介在性疾患の新規治療法として使用可能な抗体療法のシステムを確立する基礎的研究を行った。哺乳類細胞株を用いてイヌキメラ抗体を発現可能なイヌキメラ抗体カセットベクターを作製した。また、抗体療法に用いるためのソースとして、B 細胞に特異的に発現するイヌ CD20 に対するモノクローナル抗体を作製した。さらに、T 細胞に特異的に発現するモノクローナル抗体ライブラリーを作製した。これらを用いて臨床応用への実現性について検討中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	0	2,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,300,000	300,000	3,600,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：イヌ、免疫介在性疾患、抗体療法

## 1. 研究開始当初の背景

(1) イヌにおいても免疫介在性疾患の発生は非常に多く、ヒトにおいて多くの自己免疫疾患が難治性疾患に指定されているのと同様、その予後は悪い。イヌにおける免疫介在性疾患の多くは、その病態がヒトのそれらと類似しており、同様の臨床経過をたどるものも少なくない。これらイヌの免疫介在性疾患の診断法については少しずつ進歩してはいるものの、発症メカニズムの解明、効果的な治療法については、残念ながら進歩が遅れている。これまでに免疫介在性疾患の一般的な治療法としては、人医療域で用いられている薬剤を参考に、ステロイドによる免疫抑制に加え

て、種々の免疫抑制剤を組み合わせる盲目的に使用するのが一般的である。しかし、それらにより寛解がえられる症例も存在するものの、その多くは薬剤の減量とともに再発するばかりではなく、再発時には初期に投与された薬剤に対して耐性になる、もしくはより高用量が必要となるのが一般的である。近年、ヒトの自己免疫疾患において自己抗体による自己組織の傷害を抑制することを目的として用いられている免疫グロブリン製剤がイヌの免疫介在性疾患に対しても用いられるようになり、一時的な寛解率は上昇傾向にあるものの、ヒトの製剤であるため、繰り返し投与が不可能であり、結局再発時に使用可

能な有効な治療法は存在しない。このような理由から、イヌの免疫介在性疾患に対して、従来の免疫抑制療法に加えてより強力な簡便に用いることができる治療法の開発が望まれている。

一方、ヒトの免疫介在性疾患においては、これまでの免疫抑制剤を中心とした薬剤療法が第一選択として治療が開始されるが、難治性の症例および再発を繰り返す症例、免疫抑制剤による副作用が顕著な症例に対しては、従来の治療法により対処するのが困難である。このような症例に対して、次世代の治療法として、近年抗体療法が分子標的療法として開発され用いられるようになった (Carter *et al.*, Nature Rev Cancer, 2001)。この抗体療法のターゲットとなる分子としては、各病態の原因となる因子を選択する、もしくは、よりグローバルに自己免疫疾患の原因となりうる自己反応性の T 細胞または B 細胞の増殖・活性化を直接阻害する各細胞表面の分子を選択するか、どちらかの方法が挙げられる。前者としては、関節リウマチの際に増加する TNF $\alpha$  に対する抗 TNF $\alpha$  抗体 (インフリキシマブ) 療法や関節炎において原因となる IL-6 の受容体に対する抗 IL-6R 抗体 (トシリズマブ) 療法などがあり、後者としては、B 細胞の増殖・活性化を抑制する抗 BLyS 抗体 (ベリムマブ)、抗 CD40L 抗体 (IDEC-131)、抗 CD22 抗体 (エブラツズマブ) 療法、活性化 T 細胞の増殖を抑制する抗 CD25 抗体 (ダクリズマブ) 療法などが挙げられる。前者の方がより病態特異的な分子に対して作用するため、個々の疾患に対してより特異的に用いられるのに対し、後者は T 細胞または B 細胞をグローバルに抑制するため、より幅広い疾患に応用可能である。ヒトの自己免疫疾患においては、従来の免疫抑制療法のみではコントロール不可能であった症例に対してこれらの抗体製剤を用いて治療が行われるようになり、より寛解導入率が向上している。

## 2. 研究の目的

イヌにおいて多く発生するが、いまだに有効な治療法がない各種免疫介在性疾患に対して、分子標的療法としての抗体療法のシステムを確立することを目的としている。

(1) これまでにイヌキメラ抗体の作製およびその発現系についての報告はないため、臨床的に効率的に作用するイヌキメラ抗体を産生させるカセットベクターの作製を行い、キメラ抗体カセットベクターに産生させたい抗体

の重鎖 (HC; heavy chain) および軽鎖 (LC; light chain) の V 領域を入れ替えるのみであらゆる抗原に対応可能でイヌに投与可能なベクターを作製する。また、その発現系を確立する。

(2) イヌの抗体療法に使用可能な T 細胞および B 細胞特異的な表面抗原を同定し、それらに対するモノクローナル抗体を作製する。

## 3. 研究の方法

(1) イヌキメラ抗体発現用カセットベクターの作製

① 正常イヌ由来脾臓 cDNA ライブラリーを作製した。Arce らの報告 (Arce *et al.*, Vet. Immunol. Immunopathol., 2002) に基づき、イヌの IgG-A-IgG-D をクローニングするためのプライマーを作製し、脾臓由来 cDNA を鋳型に PCR 反応を行い、イヌの IgG HC を遺伝子クローニングした。

② イヌの LC においては、 $\lambda$  鎖が  $\kappa$  鎖より使用頻度が多いことが報告されているが (Day MJ, Clinical Immunology of the Dog and Cat)  $\lambda$  鎖の塩基配列は報告されていないため、 $\lambda$  鎖をクローニングするためにイヌゲノムデータベースより予想される塩基配列をもとにプライマーを作製し、イヌ脾臓 cDNA を鋳型に PCR を行い、イヌ  $\lambda$  鎖をクローニングし、塩基配列を決定した。また、 $\kappa$  鎖については、cDNA データベースの塩基配列をもとにプライマーを設定し、同様に遺伝子クローニングした。

③ 2 種類の遺伝子を哺乳類由来細胞において同時に発現できる、IRES (Internal Ribosome Entry Site) をもった発現ベクター pCAT7-neo-IRES を作製した。

④ それぞれのサブクラス HC 定常領域 (C 領域) および LC C 領域を PCR により増幅し、pCAT7-neo-IRES に組み込みイヌキメラ抗体発現用カセットベクターを作製した。

⑤ 得られたカセットベクターがキメラ抗体を発現可能であることを確認するため、ヒトおよびイヌの血小板の表面抗原 GPIIb/IIIa に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ 7E3 (Coller BS *et al.*, Blood 1985) よりラット IgG2a の HC および LC の可変領域 (V 領域) を遺伝子クローニングし、③ より得られたカセットベクターに組み込んだ。

⑥ ⑤ でえられたイヌ抗ヒト GPIIb/IIIa キメラ抗体産生ベクターをそれぞれ 293T 細胞に遺伝子導入し、それぞれの上清を回収した。得られた上清は、プロテイン A/G ビーズとともにインキュベートすることにより濃縮し、ウェスタンブロットティングにより検出した。

(2) B 細胞特異的な抗原 CD20 に対するモノクローナル抗体の作製

既に報告があるイヌ CD20 cDNA の塩基配列

(Kano *et al.*, Vet. Immunol. Immunopathol., 2005)をもとにプライマーを作製し、健常イヌ浅頸リンパ節由来cDNAを鋳型にPCR反応を行い、イヌCD20 cDNAを遺伝子クローニングした。

さらに、イヌCD20 cDNAを哺乳類発現ベクター pCAT7-neoに組み込み、ラット腎臓由来NRK細胞に遺伝子導入後、ネオマイシン存在下にて培養し、安定発現細胞株NRK/CD20を得た。

この細胞株をアジュバントであるTiter Max Gold (CytRx) と混合し、SDラット(九動)のフットパッドに投与し、初回免疫10日後にブーストをアジュバントなしで行い、ブースト2日後に膝下リンパ節および単径リンパ節を採取し単核細胞を回収した。常法に従いミエローマ細胞P3U1と融合後、ハイブリドーマを得た。得られたハイブリドーマ由来抗体のスクリーニングは、免疫に用いたイヌCD20安定発現NRK細胞を用いてフローサイトメトリーによって行った。

さらに、イヌのB細胞型リンパ腫細胞株であるGL-1細胞(Nakaiら, J. Vet. Med. Sci., 1996)においても同様にCD20の細胞表面での発現を確認した。

### (3) T細胞特異的抗原に対するモノクローナル抗体の作製

イヌT細胞リンパ腫由来細胞株であるEma細胞を(2)と同様の方法でラットに免疫し、Ema細胞に対するモノクローナル抗体ライブラリーを得た。Ema細胞に、抗体ライブラリーの各抗体をそれぞれ作用させ、PE標識抗ラットIgG抗体で検出することにより、抗体のスクリーニングを行った。

## 4. 研究成果

### (1) イヌキメラ抗体発現用カセットベクターの作製

正常イヌ脾臓由来 cDNA を鋳型にイヌの IgG HCを増幅するPCR反応を行ったところ、IgH-A, IgH-B, IgH-C の3種類は得られたが、IgH-Dは得られなかった。また、λ鎖およびκ鎖については、同様に脾臓由来 cDNA を鋳型にPCR反応を行うことによって増幅できた。一方、ラットモノクローナル抗体のHCおよびLCのV領域については、ハイブリドーマ7E3由来cDNAを鋳型にラットのIgHおよびIgκで比較的保存されている配列を元に作製したプライマーを用いてPCRを行ったところ目的の塩基配列を得た。

これら得られたラットIgHおよびIgκのV領域、イヌIgκまたはIgλ、さらにイヌIgH-A~Cを哺乳類発現ベクターpCAT7-neoに組み込み、イヌキメラ抗体発現ベクターとした。

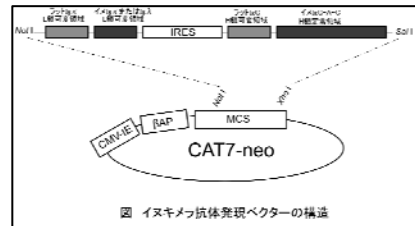
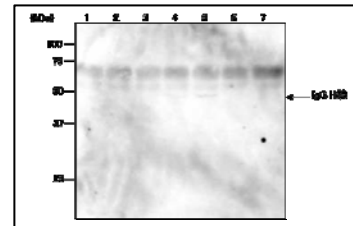


図 イヌキメラ抗体発現ベクターの構築

さらにこれらベクターがイヌキメラ抗体を産生させることが可能かを検討するために、293T細胞に遺伝子導入後、その上清中の蛋白発現をウェスタンブロッティングにより確認した。その結果、図に示すように、検出抗体としてHRP標識抗イヌIgG抗体を用いた場合、pCAT-Bλ-fullおよびpCAT-Bκ-fullを遺伝子導入した細胞の培養上清においてのみ(図、レーン4および5)、IgH鎖と同程度の分子量を有する約50kDaのバンドが認められた。しかし、pCAT-Aλ-full(レーン2)、pCAT-Aκ-full(レーン3)、pCAT-Cλ-full(レーン6)またはpCAT-Cκ-full(レーン7)をそれぞれ導入した細胞の培養上清には、同様の特異的なバンドは認められなかった。また、全てのレーンにおいて、L鎖特異的な約25kDa付近のバンドは全く認められなかった。このことは、今回構築されたベクターのうち



少なくともpCAT-Bλ-fullおよびpCAT-Bκ-fullのみはイヌキメラ抗体を発現することを示しており、これらを用いて抗体依存性細胞傷害活性等を検討することにより、*in vivo*への導入がより近くなると思われる。

### (2) B細胞特異的抗原に対する計画

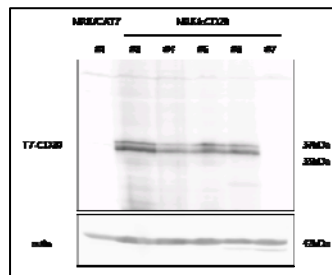
#### ① イヌCD20の遺伝子クローニングおよび塩基配列の決定

本研究において得られたイヌCD20遺伝子の塩基配列をNCBIに登録されているイヌCD20の塩基配列と比較した結果、今回得られたイヌCD20遺伝子の塩基配列は、NCBIに登録されているイヌCD20の塩基配列とは7塩基について異なったが、イヌゲノムデータベース中のCD20に相当する領域の塩基配列とは1塩基も違いは認められなかった。それらの塩基配列から予想されるアミノ酸配列の比較によると、NCBIに登録されているイヌCD20の塩基配列と異なる7塩基のうち3塩基がアミノ酸の置換を伴わない変異であり、4塩基がアミノ酸の置換を伴う変異であった。

#### ② イヌCD20過剰発現細胞株の樹立

NRK細胞株にpCAT7-neoおよびpCAT-cCD20

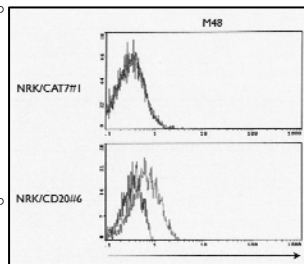
を導入し、ネオマイシン存在下で培養したところ、両者とも多数のネオマイシン耐性コロニーが得られた。そのうち、pCAT7-neo 導入 NRK 細胞については1クローン(NRK/CAT#1)、pCAT-cCD20 導入 NRK 細胞については5クローン (NRK/cCD20#3、#4、#5、#6 および#7) を回収した。各クローンにおけるイヌ CD20 蛋白の発現を確認するために行ったウエスタンブロッティング解析 (図) より NRK/cCD20#3、#4、#5 および#6 がイヌ CD20 蛋白の安定過剰発現細胞であることが確認されたため、以降の実験には NRK/cCD20#6 を、また対照となるイヌ CD20 を発現していない細胞として NRK/CAT7#1 を用いた。



### ③ 抗イヌ CD20 抗体産生ハイブリドーマの作製

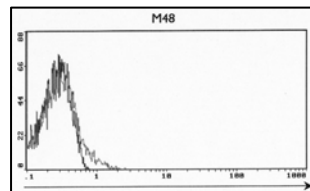
HAT 存在下における選択により、メチルセルロース寒天中にコロニーは 200 以上形成され、そこから顕微鏡下でコロニーをピックアップし、最終的に合計 66 個のコロニーを分離することができた。

次に、得られた各コロニーの培養上清を用いて、ハイブリドーマのスクリーニングをフローサイトメトリーにより行った。その結果、図に示すように、全てのハイブリドーマ由来培養上清のうち、クローン M48 の培養上清のみが NRK/CAT7#1 に対しては全く反応せず、NRK/cCD20#6 に対してのみ中等度の陽性反応を示した。

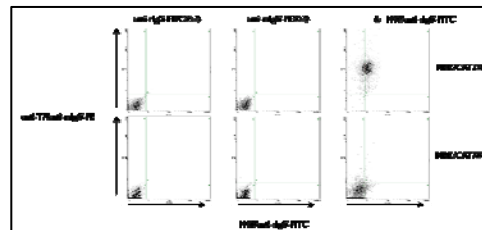


次に、M48 の培養上清が、イヌ B 細胞型リンパ腫由来細胞株である GL-1 に対して陽性反応を示すかを検討した。図に示すように、M48 の培養上清は、NRK/cCD20#6 に比較して非常に弱いですが、GL-1 細胞に対しても陽性反応を示した。

さらに、今回得られた M48 の培養上清が、cCD20 を発現している細胞を染色していることを確認するために、NRK/cCD20#6 を抗 T7 抗体および M48 の培養上清により二重染色を行った。その結果図に示すように、NRK/CAT7#1 は両抗体によって全く染色されないのに対し、NRK/cCD20#6 は、両抗体によって二重に染色されることが示さ



れ、M48 の培養上清は T7-cCD20 を発現している NRK/cCD20#6 に対して特異的に反応していることが示唆された。今回得られたイヌ CD20 抗体は、今後イヌの B 細胞をターゲットとした抗体療法に使用するのに有用であると考えられる。



### (3) T細胞特異的抗原に対するモノクローナル抗体の作製

Ema 細胞株をラットに免疫することによって Ema 細胞に反応するモノクローナル抗体を産生する合計 69 個のハイブリドーマを得ることができた。現在は、これらハイブリドーマ由来抗体が認識する抗原を同定しているところである、これら抗原が T 細胞に特異的に発現することが証明できれば、抗体療法のターゲット分子として有用である。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

①水野拓也、鈴木稜一、奥田優、犬のリンパ腫における転写因子 Foxp3 の発現の解析、第 146 回日本獣医学会、2008 年 9 月 24 日、宮崎

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~vintmed/mizuno/saito/home.html>

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 拓也 (MIZUNO TAKUYA)

山口大学・農学部・准教授

研究者番号：9039882

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし