The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒト血清 IgG 由来還元アルキル化 Fc フラグメント (CM-Fc) の免疫薬理学的研究
Author(s)	伊藤, 正明
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38718
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【7】

氏　　名	伊　藤　正　明（いとう まさあき）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　11145　号
学位授与年月日	平成6年3月　1　日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学　位　論　文　名	**ヒト血清 IgG 由来還元アルキル化 Fc フラグメント（CM-Fc）の免疫薬理学的研究**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　三村　　務 （副査） 教　授　近藤　雅臣　　教　授　眞弓　忠範　　教　授　田中　慶一

論　文　内　容　の　要　旨

三村らは，生体内由来機能性蛋白質の化学修飾による新規薬理活性の発現を目的として，二次免疫応答に主要な役割を担い，多様な生理活性を有する免疫グロブリンG（IgG）を取り上げ，種々の検討を行なった結果，IgG の鎖間ジスフィド結合を還元カルボキサミドメチル化することにより得られたサブフラグメントが元の IgG には認められない新たな薬理活性が発現することを見い出し，報告している。

本研究では，ヒト血清 IgG 由来還元アルキル化 Fc フラグメント（CM-Fc）が，元の Fc フラグメント（Fc）には認められない抗アレルギー作用を発現することに基づき，CM-Fc の免疫調節活性とその活性発現の機序について検討を加えた。

市販ヒト血清 IgG を Papain 消化後，消化物を Sephadex G-100で分画して得たFabおよびFcを含む画分を Protein A-Sepharose CL-4B にてアフィニティクロマトグラフィーを行い Fc を得た。この鎖間 disulfide 結合を還元，carboxamidemethyl 化し，SDS-PAGE によるアルキル化の確認後，CM-Fc として実験に供した。

自己免疫疾患モデルである DBA1／J マウスにおける type ll collagen（CII）誘発関節炎（CLA）の発症と進展に対して CM-Fc は抑制作用を示した。また，CII 誘発遅延型反応に対しても抑制作用を示し，この作用は元の Fc には認められなかったことから，活性の発現には Fc の鎖間ジスフィド結合の還元アルキル化が必要であると考えられた。さらに，CM-Fc 投与により血清中抗 CII 抗体価上昇抑制，CII 特異的脾細胞増殖抑制，リンパ球サブセット中の B 細胞構成比及び $CD4^+$／$CD8^+$T 細胞比の上昇抑制が認められた。

CM-Fc 作用機序を解明する目的で，抗炎症作用の有無について *in vivo* 及び *in vitro* における各種実験的炎症モデルを用いて検討した。その結果，CM-Fc はいずれのモデルにおいても何ら抑制作用を示さなかったことから，抗炎症作用は有さないことが明らかとなった。さらに，CM-Fc はリンパ球の増殖反応やマクロファージ（Mφ）の機能に対しても何ら抑制作用を示さなかったことから，免疫担当細胞に対する直接的な抑制作用をも有さないことが明らかとなり，従来の自己免疫疾患治療薬とは異なる作用機序によるものであることが示唆された。

CM-Fc は DTH を抑制することから，遅延型反応（DTH）を用いて作用機序の解析を行った。CM-Fc は羊血球誘発遅延型足蹠浮腫反応（SRBC-DTH）を抑制したが，Fc は抑制作用を示さなかった。CM-Fc の抑制作用は炎症反応が始まる以前の DTH の初期段階における投与時のみに認められた。この DTH 抑制作用は Ts が抑制されている CY 前処置マウスでは認められなかった。そして，CM-Fc を投与したマウスの脾細胞を移入することにより抑制作用が

回復することが認められたことから，CM-Fcの作用はサプレッサーT細胞（Ts）を介しているものと考えられた。

次いで，CM-Fcの作用機序の解析を，生体内での免疫系に近似した反応を再現しうる実験系である混合リンパ球反応（MLR）を用いて行った。CM-Fcは培養開始時に添加した際にはMLRを促進したが，培養開始48時間後の添加では逆に反応の抑制作用が認められた。培養開始時にCM-Fcを添加した場合の培養上清中では，対照群に比較してTNFおよびIL-1レベルの上昇が認められた。一方，培養開始48時間後にCM-Fcを添加した場合の培養上清中では，著しいTNFおよびIL-1レベルの上昇が認められたものの，IL-2レベルは逆に低下していた。TNFやIL-1はMLR中では主にMφより産生されていると考えられるが，過剰産生されたTNFやIL-1によりMφはautocrineにPGEを産生する。PGEは，直接T細胞増殖反応を抑制するのみならず，Tsを介して間接的にT細胞増殖を抑制する。一方，MLRでは培養2日目にはTsが誘導されることも報告されている。そこで，CM-FcによるMLR抑制時のPGE_2レベルを測定したところ，IL-1およびTNFレベルと相関して上昇していた。さらに，この抑制作用はcyclooxygenase inhibitorであるindomethacinの同時添加により解除されたことから，PCE_2を介するメカニズムが示唆された。PGEは炎症反応を悪化させるとされているが，いくつかの実験的自己免疫疾患モデルにおいて，PGE投与により病態の改善が見られることが報告されている。

以上の結果より，CM-FcはMφが産生するPGEを介して生体が本来有する免疫調節機構により作用を発現するものと思われる。

論文審査の結果の要旨

本研究は生体由来の機能性蛋白質の化学修飾による新しい薬理活性の導入を目的とした免疫グロブリンGについての研究の一環として行なわれたものである。即ち人血清IgG由来還元アルキル化Fcフラグメント（CM-Fc）が元のFcフラグメント（Fc）には認められない抗アレルギー作用を発現することに基づき，CM-Fcの免疫調節活性とその活性発現の機序について検討し，以下の知見を得ている。

(1) CM-Fcは自己免疫疾患であるCIAに対して抑制作用を示した。また，元のFcには認められなかったCII誘発遅延型反応に対しても抑制作用を示した。

(2) CM-Fcは各種の実験的炎症モデルに対しても，さらにリンパ球の増殖反応やマクロファージの機能にも何ら抑制作用を示さなかった。

(3) CM-FcはSRBC-DTHを抑制し，この作用は反応の初期段階に於ける投与の時にのみ認められた。この抑制作用はTsが抑制されている時には認められなかったが，CM-Fc処置マウスの脾細胞の移入により回復した。

(4) CM-FcをMLRの開始時に添加すると促進し，対照に比べてTNFおよびILレベルの上昇が認められ，さらに，PGE_2レベルはIL-1，TNFレベルと相関して上昇しており，この作用がindomethacinの添加で消滅することから，PGE_2を介するメカニズムが示唆された。

以上のように本論文は新しい医薬の開発に大きな貢献をするものであり博士論文として価値あるものと認める。