



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | ハイブリッドハイブリドーマ法による抗フィブリン-抗u-PA二重特異性モノクローナル抗体の開発と血栓溶解療法への応用に関する研究                                                                                 |
| Author(s)    | 黒川, 智文                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 1997, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/40467">https://hdl.handle.net/11094/40467</a>                                                             |
| 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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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

|               |                                                                   |
|---------------|-------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | 黒 川 智 文                                                           |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (薬 学)                                                         |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 2 7 7 8 号                                                     |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 9 年 1 月 16 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     | ハイブリッドハイブリドーマ法による抗フィブリン-抗 u-PA 二重特異性モノクローナル抗体の開発と血栓溶解療法への応用に関する研究 |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 溝 口 正<br>(副査)<br>教 授 真 弓 忠 範 教 授 田 中 慶 一 教 授 東 純 一    |

## 論 文 内 容 の 要 旨

血栓は心筋梗塞や脳梗塞などの虚血性疾患の主因であり、これら疾患の治療には形成された血栓の除去（血栓溶解療法）および血栓形成の防止（抗血小板療法，抗凝固療法）が施される。血栓溶解療法には組織プラスミノゲンアクチベーター（t-PA）やウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター（u-PA）などが用いられている。これらの PA はプラスミノゲンを活性化し、生じたプラスミンが血栓の構成要素であるフィブリンを分解して血栓を溶解する。通常、血中で生じたプラスミンはそのインヒビターである  $\alpha_2$ -アンチプラスミン ( $\alpha_2$ -AP) により速やかに不活性化されるが、PA の投与によりプラスミンが過剰に生成すると  $\alpha_2$ -AP が枯渇し、遊離のプラスミンがフィブリンノーゲン、血液凝固第 5 因子、第 8 因子等の生理的止血に重要な血漿成分を分解して出血の危険性を増す。特に脳内での出血は重篤な障害を引き起こすため、血栓溶解療法においては血栓近傍にあるプラスミノゲンだけを選択的に活性化する PA が求められている。

一本鎖 u-PA (scu-PA：プロウロキナーゼ) は 411 アミノ酸残基からなる酵素前駆体で、Lys<sup>158</sup>-Ile<sup>159</sup> 間でプラスミンの限定分解を受けて活性型の二本鎖 u-PA (tcu-PA：ウロキナーゼ) となる。scu-PA は肝クリアランスが速く ( $t_{1/2} = 4$  分) また血中で tcu-PA となった後 PA インヒビター-1 (PAI-1) により速やかに不活性化される。このため臨床では高用量を持続投与することが必要とされるが、scu-PA は血栓に対する親和性が無いため血栓部位だけでなく血流中にも多量のプラスミンを生成させ、その結果生じる出血傾向が問題となっている。これを克服するため、血栓溶解能がより強く、血栓特異性の高い scu-PA の作出が試みられた。その方策としては(1)血中消失速度を遅くする、(2) PAI-1 による不活性化に対する抵抗性を高める、(3)血栓の構成要素であるフィブリンに対する親和性を付与する、の 3 点があげられる。scu-PA にフィブリン親和性を付与するために、(1) scu-PA と抗フィブリン抗体との化学的複合体、(2) 化学的結合法により作製された、フィブリンと scu-PA とを同時に結合する二重特異性抗体と scu-PA との免疫複合体、等が作製された。しかし化学的結合法は抗体および scu-PA の活性を損ない、標品が不均一なものとなった。

本研究ではハイブリッドハイブリドーマ法を用いて、抗体と scu-PA の活性を損なわない均一な抗フィブリン-抗 u-PA 二重特異性モノクローナル抗体 (MA-FU1-74) を開発し、scu-PA による血栓溶解療法における本抗体の有用性

を実験動物血栓モデルにおいて検討した。また, scu-PA の(1)フィブリン親和性, (2)血中消失速度, (3) PAI-1による不活性化に対する抵抗性, がその血栓溶解能と出血傾向にどのように関与するかを明らかにした。

抗フィブリン-抗 u-PA bs mAb (MA-FU1-74) は scu-PA と免疫複合体を形成し, フィブリン親和性により scu-PA を血栓に標的化し, 血栓近傍のプラスミノゲンを選択的に活性化して効率よくフィブリンを分解する。MA-FU1-74は *in vitro* ヒトプラズマ塊溶解試験において scu-PA および tcu-PA のプラズマ塊溶解能を最大20倍および5倍増強した。これに対し, 親抗フィブリン mAb (MA-FIB1-11) および親抗 u-PA mAb (MA-UK1-3) はこれら u-PA のプラズマ塊溶解能を増強しなかった。この結果は u-PA のプラズマ塊溶解能増強が抗体の二重特異性に起因することを示唆している。ハムスター肺塞栓モデルの持続投与実験において MA-FU1-74は scu-PA のプラズマ塊溶解能を13倍増強したが, MA-UK1-3によるプラズマ塊溶解能増強は2倍に過ぎなかった。一方, scu-PA/MA-FU1-74投与群と scu-PA/MA-UK1-3投与群における u-PA 抗原のプラズマクリアランス ( $Cl_p$ ) はいずれも scu-PA 投与群の約10分の1と低下したが, 両複合体投与群間に有意差は見られなかった。また, scu-PA/MA-FU1-74投与時に MA-FU1-74のエピトープを含むヒトフィブリン分解産物を抗体に対し過剰量同時投与するとプラズマ塊溶解能は半減した。以上の結果から, *in vivo* における MA-FU1-74による scu-PA のプラズマ塊溶解能増強は, 抗体との複合体形成による scu-PA の血中消失速度の低下が主因ではなく, フィブリン親和性付与による標的化効果によるものであることが明らかとなった。

MA-FU1-74は自家全血血栓を用いたウサギ頸静脈血栓モデルおよびヒトに近いヒヒの大腿静脈自家血血栓モデルにおいても scu-PA の血栓溶解能をそれぞれ4倍, 5倍増強した。本抗体はヒトでも同様の作用を示すことが期待される。

血栓溶解療法においては PA の血栓溶解能を増強することと同時に副作用である出血傾向を軽減することが重要である。ハムスター肺塞栓モデルの単回投与実験において MA-FU1-74は scu-PA のプラズマ塊溶解能を18倍増強したが, フィブリンノーゲン分解と  $\alpha_2$ -AP 消費の促進はそれぞれ3.7倍, 6.5倍に留まった。一方 MA-FU1-74F(ab')<sub>2</sub> は scu-PA のプラズマ塊溶解能を23倍増強したにもかかわらず, フィブリンノーゲン分解と  $\alpha_2$ -AP 消費は scu-PA のわずか1.2倍および1.8倍に過ぎなかった。これは scu-PA/MA-FU1-74F(ab')<sub>2</sub> が scu-PA に比べ薬効と出血傾向の13~19倍乖離した, scu-PA/MA-FU1-74よりさらに安全な薬物であることを意味している。

MA-FU1-74の F(ab')<sub>2</sub> 化により scu-PA/MA-FU1-74の出血傾向は著しく改善されたが, ハムスターにおける scu-PA/MA-FU1-74投与群と scu-PA/MA-FU1-74F(ab')<sub>2</sub> 投与群における u-PA 抗原の  $Cl_p$  は予想に反し同等であった。一方, ヒト正常プラズマと PAI-1欠損プラズマにおける両複合体のフィブリンノーゲン分解活性の比較により, MA-FU1-74が立体障害により PAI-1による u-PA の不活性化を妨げフィブリンノーゲン分解を促進すること, また MA-FU1-74を F(ab')<sub>2</sub> 化することにより PAI-1抵抗性が低下してフィブリンノーゲン分解の促進が抑制される事を示唆する結果が得られた。

以上の結果から, scu-PA を血栓溶解能と出血傾向の乖離した安全な薬物とするにはフィブリン親和性の付与が有効であること, また scu-PA の血中消失速度低下および PAI-1抵抗性の向上は無効であることが明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

血栓溶解療法は重篤な脳梗塞や心筋梗塞にとって欠くことの出来ない大切な治療法の一つである。そのために適量のプラスミノゲンアクチベーターを用いることによって出血の危険性をもたらす過剰のプラスミンの生成を抑制しつつかつプラスミンによる血栓溶解を期待した方法が模索されている。本研究ではプラスミノゲンアクチベーターならびにフィブリンにそれぞれ極めて高い親和性をもつ抗体についてその調製法と血栓溶解療法への応用が検討された。すなわち, ハイブリッドハイブリドーマ法を用いてプラスミノゲンアクチベーターの活性を損なわない均一な抗フィブリン-抗プラスミノゲンアクチベーター二重特異性モノクローナル抗体 (MA-FU1-74) を開発し, 血栓性

のフィブリンに親和性を持たせることによりプラスミノゲンアクチベーターの血栓への標的化に成功した。この MA-FU1-74 はハムスター肺塞栓モデルにおける持続投与においてプラスミノゲンアクチベーター単独投与に比べて13倍もの強いプラズマ塊溶解能を示すなど有効性が証明された。一方、プラスミノゲンアクチベーターの副作用である出血傾向も、ハムスター肺塞栓モデルにおける単回投与において軽減される事が明らかになった。特に抗体のFc部分を除去した MA-FU1-74-F(ab')<sub>2</sub> は血栓溶解能が強力であるにも拘わらず出血傾向を著しく低下した。したがって本抗体はヒトでも同様の効果が期待され、本研究の成果は薬学の博士論文として価値あるものと認める。