

Title	ヒト型化抗Shiga toxin2モノクローナル抗体の病原性大腸菌感染症治療薬開発に向けての研究
Author(s)	木村, 剛
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45986">https://hdl.handle.net/11094/45986</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	木村 剛
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 18966 号
学位授与年月日	平成 16 年 7 月 6 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	ヒト型化抗 Shiga toxin 2 モノクローナル抗体の病原性大腸菌感染症治療薬開発に向けての研究
論文審査委員	(主査) 教授 土井 健史 (副査) 教授 山元 弘 教授 那須 正夫 教授 本田 武司

### 論文内容の要旨

病原性大腸菌 O-157 をはじめとする Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) 感染症は、主に免疫力の弱い小児や老人に発症し、一部の患者は溶血性尿毒症症候群 (HUS) や脳症を引き起こし、時には死にも至る。Shiga toxin 2 (Stx2) はタンパク質合成阻害活性を有する A サブユニットとターゲット細胞上の受容体 Gb3 に結合する B サブユニットから構成されるタンパク質毒素で、STEC 感染症の主要な病原因子と考えられている。腸内で STEC より産生された Stx2 は腸管上皮を破壊して血中に移行し、腎臓や中枢神経等の標的組織に到達してこれを破壊し、HUS 等を引き起こすと考えられている。現在、STEC 感染症の治療薬としては、発症初期に抗生剤が投与されているが、その有効性を疑う報告もあり、また HUS 発症後は対症療法が行われているだけであり、より有効な治療薬の開発が望まれている。

STEC 感染症治療薬の開発を目的として、Stx2 の毒性を中和するマウス抗体をヒト型化したヒト型化抗 Stx2 モノクローナル抗体 TMA-15 の基本特性および薬効を検討した。まず、TMA-15 の Stx2 親和性を BIACORE により解析した結果、その親和性はオリジナルのマウス抗体とほぼ同等であることが明らかとなった。次に、TMA-15 の *in vitro* における Stx2 中和活性を検討した。TMA-15 で前処理した Stx2 をヒト腎細胞株に添加して培養した後の生細胞率により活性を評価した結果、TMA-15 の *in vitro* Stx2 中和活性はオリジナルのマウス抗体とほぼ同等で、 $\gamma$ -グロブリン製剤の 10,000 倍以上であることが明らかとなった。また、Stx2 には数種の variant が存在するが、TMA-15 は各種 Stx2 variant を中和し、中和スペクトラムは広いことが示唆された。さらに、TMA-15 の認識抗原をウエスタンブロットで解析した結果、その認識抗原は Stx2 の B サブユニットであり、TMA-15 は Stx2 とその受容体 Gb3 との結合を阻害することで作用を発揮することが示唆された。次に、TMA-15 の *in vivo* における薬効を Stx2 投与マウスモデルで検討した。その結果、TMA-15 は抗体前投与の系で、用量依存的にマウスが毒性により死亡することを防ぎ、その薬効はオリジナルのマウス抗体とほぼ同等であることが明らかとなった。また、TMA-15 は Stx2 投与マウスの腎機能および大脳や腎臓の病理所見を正常に保つことが明らかとなった。さらに、STEC 感染マウスモデルで TMA-15 の薬効を検討した結果、TMA-15 は STEC 感染 24 時間後における投与でも、用量依存的にマウスが毒性により死亡することを防ぐことが明らかとなった。

以上の検討より、TMA-15 はオリジナルのマウス抗体とほぼ同等の Stx2 親和性や *in vitro* および *in vivo* における Stx2 中和活性を有すること、STEC 感染モデルで STEC 感染 24 時間後における投与でも薬効を示すこと等が明らかとなり、TMA-15 は STEC 感染症の治療薬として有効性を発揮し得ることが示唆された。

ヒト血中には *in vitro* で Stx2 を中和する抗体以外の因子が存在すること、またその活性はヒト特異的であることが報告されている。STEC 感染症の病態を理解する上で本因子の解析は重要であるため、本因子の同定および STEC 感染症における機能解析を行った。ヒト血漿より *in vitro* Stx2 中和活性を指標に ConA-Sepharose、DEAE-Sepharose、Hydroxyapatite、ゲルろ過 HPLC により本因子を精製し、因子がヒト血清アミロイド P コンポーネント (HuSAP) であることを同定した。また、HuSAP は *in vitro* において濃度依存的な Stx2 特異的結合活性と Stx2 中和活性を示したが、その Stx2 親和性は TMA-15 に比べて弱いことが明らかとなった。次に、HuSAP の STEC 感染症における生体内の機能に関して 2 つの可能性を考えた。1 つの可能性は、HuSAP が生体内でも Stx2 中和因子として機能するというものであり、もう 1 つの可能性は、統計学的に STEC 感染症の重篤度と患者に感染した STEC の Stx2 遺伝子保有率に相関があることから HuSAP が STEC 感染症の増悪因子として機能するというものである。これらを検証するため、まず HuSAP の *in vivo* Stx2 中和活性を Stx2 投与マウスモデルで検討した。その結果、ヒト血中濃度に相当する HuSAP は、マウスが毒性により死亡することを防ぐことはできず、HuSAP はヒト生体内では Stx2 中和因子として機能していない可能性が明らかとなった。一方、HuSAP は *in vitro* において TMA-15 の Stx2 への結合を競合し、TMA-15 の Stx2 結合部位すなわち Stx2 の中和に重要なエピトープ、あるいはその周辺に HuSAP が結合することが示唆された。血清アミロイド P コンポーネントはクロマチンや DNA に結合してそれらに対する免疫反応性を減弱させ、自己抗体の産生を抑制している可能性が報告されており、STEC 感染者から Stx2 中和抗体が検出できないという報告もあることから、HuSAP はヒト生体内で Stx2 の中和に重要なエピトープを覆い隠して免疫反応性を減弱させ、Stx2 中和抗体の産生を抑制している可能性が考えられた。さらに、*in vivo* においても Stx2 投与マウスモデルで HuSAP は低用量の TMA-15 の薬効を減弱させ、HuSAP は標的組織への Stx2 のキャリアとして機能している可能性が考えられた。一方、一定用量以上の TMA-15 はヒト血中濃度に相当する HuSAP の存在下においても *in vivo* で Stx2 中和活性を示し、STEC 感染症治療において Stx2 中和抗体の受動免疫は有効であることが明らかとなった。

以上の検討より、ヒト特異的に血中に存在し、*in vitro* で Stx2 を中和する因子が HuSAP であることを同定した。さらに、HuSAP は生体内では Stx2 中和因子として機能せず、Stx2 の中和に重要なエピトープを覆い隠して免疫反応性を減弱させる可能性や、標的組織への Stx2 のキャリアとして機能する可能性が明らかとなった。一方、たとえ HuSAP の存在下であっても、TMA-15 のような Stx2 中和抗体の受動免疫は STEC 感染症の治療において有効であることが明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

木村君は、本論文において、ヒト型化抗 Shiga toxin 2 (Stx2) モノクローナル抗体の病原性大腸菌感染症治療薬への応用に関する研究を行った。

まず、ヒト型化抗 Stx2 モノクローナル抗体の基本特性および薬効の検討を行った。このヒト型化モノクローナル抗体 TMA-15 の Stx2 に対する親和性は、 $KD=3.3 \times 10^{-9} M$  であり、*in vitro* における Stx2 中和活性は、 $\gamma$ -グロブリン製剤の 10,000 倍以上であることを明らかにした。ウエスタンブロットでの解析の結果、TMA-15 の認識する抗原は、Stx2 の B サブユニットであることを示し、さらに TMA-15 の *in vivo* における中和活性を Stx2 投与マウスモデルで確認した。また、STEC 感染マウスモデルで TMA-15 の薬効を検討し、STEC 感染 24 時間後の投与でマウスの死亡を防ぐことを明らかにした (ただし、血中 Stx2 濃度が一定以上量に達すると防ぐことができなかった)。

次に、ヒトの血中に存在する Stx2 中和因子について、その同定、機能の解析を試みた。ヒトの血漿から種々のカラムによる精製を経て、Stx2 中和因子の精製に成功した。アミノ酸配列を決定した結果、ヒト血清アミロイド P コンポーネント (HuSAP) であることを明らかにした。HuSAP の機能について調べた結果、Stx2 投与マウスモデルにおけるマウスの死亡を防ぐことはできなかった。このことから、HuSAP はヒト生体内においては、Stx2 中和因子として機能しておらず、Stx2 のエピトープを覆い隠して免疫反応性を減弱させている可能性が示唆された。さらに、このような HuSAP が存在する条件下においても、TMA-15 は *in vivo* で Stx2 中和活性を有することを示し、STEC 感染症治療における Stx2 中和抗体による受動免疫が有効であることを明らかにした。

以上の結果は、博士 (薬学) の学位論文に値するものと認める。