

Title	Imaging of lesions in a murine rheumatoid arthritis model with a humanized anti-interleukin-6 receptor antibody
Author(s)	杉本, 幹治
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47432">https://hdl.handle.net/11094/47432</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	すぎもと かんじ 杉本 幹 治
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 20629 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 7 月 20 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	Imaging of lesions in a murine rheumatoid arthritis model with a humanized anti-interleukin-6 receptor antibody (ヒト型化抗インターロイキン-6 受容体抗体によるマウス関節リウマチモデルにおける病巣の画像化)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 吉 崎 和 幸  (副査) 教 授 畑 澤 順 教 授 吉 川 秀 樹

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### [ 目 的 ]

慢性関節リウマチ (RA) は多関節における滑膜の増殖を特徴とし、経時的に関節および骨の変化・破壊が起こる全身性の慢性炎症性疾患である。これらは、多彩な生理活性を有するサイトカイン IL-6 の異常産生によることが明らかにされてきた。従って、IL-6 のシグナルをコントロールできれば RA 治療の可能性が示唆され、ヒト型化抗 IL-6 受容体抗体 (rhPM-1) を用いて、IL-6 の作用を阻害することによる RA 治療の検討が行われている。

RA 病変部では IL-6 受容体が多数発現していると考えられ、抗 IL-6 受容体抗体は生体内 RA 病変部において IL-6 受容体を特異的に認識すると示唆される。放射能標識抗 IL-6 抗体を用いたシンチグラフィを開発すれば、その体内分布から病態の早期発見や治療効果の判定が行える可能性がある。そこで本研究では、抗 IL-6 受容体抗体を放射能標識する方法を確立し、病変部の画像化が可能かどうかの検討を行った。

#### [ 方 法 ]

標識放射の核種には single photon emission computed tomography (SPECT) への適用やキット化を考慮し  $^{99m}\text{Tc}$  を選択した。 $^{99m}\text{Tc}$  で標識するために、 $^{99m}\text{Tc}$  と安定な結合を生成する二官能性標識試薬、hydradinonicotinamide (HYNIC) を抗体に結合させた。 $^{99m}\text{Tc}$  標識は  $^{99m}\text{Tc}$ -tricine 錯体との配位子交換反応により行い、ゲルろ過にて精製した。標識抗体の放射科学的純度はセルロースアセテート膜電気泳動により求め、生理活性は IL-6 受容体を発現する U266 ce11 を用いた Binding Assay にて測定した。RA 患者の滑膜細胞を免疫不全マウスの背面皮下に植え込んだリウマチモデルを作成し、動物用 SPECT にて撮像、並びに各臓器への体内分布の測定、移植滑膜組織切片の autoradiography を行った。対象として同様の方法で標識した非特異的  $^{99m}\text{Tc}$  標識 HYNIC 結合ヒト IgG 抗体を作成した。

#### [ 成 績 ]

ヒドラジド基の定量結果より、抗体 1 分子への HYNIC 平均結合量は 1.11 分子であった。また、電気泳動の結果から放射化学的収率は 63.0%、放射化学的純度は 93.7% であった (泳動条件 ; veronal buffer (1=0.06, pH 8.6)、電流値 0.8 mA/cm、泳動時間 45 分)。HYNIC 未反応抗体と  $^{99m}\text{Tc}$ -tricine 錯体との反応では抗体画分に放射活性が認められず、HYNIC と  $^{99m}\text{Tc}$ -tricine 錯体が特異的に結合していると示唆された。Binding Assay では、標識抗体の

濃度上昇に伴い結合量が増加し、約 1000 倍量の cold 抗体存在下では、その結合量が低下していることから、IL-6 受容体の特異的に認識していることが示唆された。また、結果の Scatchard 解析から  $Kd=2.56 \times 10^{-9}$  M、 $B_{max}=7.92$  ng となり、U266 ce11 の IL-6 受容体発現量は 11200 sites/cell となった。

動物モデルにおける検討では、投与 6 時間後の体内分布において高い血中滞留傾向 ( $20.3 \pm 4.51\%ID/g$ ) が認められたものの、移植組織/筋肉比=2.4 が得られた。また、SPECT 像では、移植組織部への放射能集積が認められた。移植組織切片の autoradiogram においてその放射能集積は滑膜細胞の密度に依存していた。この集積は、同様の方法で標識した  $^{99m}Tc$  標識 HYNIC 結合ヒト IgG 抗体では認められなかった。

[ 総 括 ]

抗 IL-6 抗体は放射能標識後もその生理活性を失っておらず、また移植組織部位への集積も認められた。この集積は、同様の分子サイズを持つヒト IgG 抗体では確認されなかったことから特異的であり、組織表面に発現している IL-6 受容体との相互作用であることが示唆される。即ち、抗 IL-6 受容体抗体を放射能標識する方法が確立できたと考えられる。

RA の病態進行は、まず炎症細胞浸潤が起これ、その後経時的な骨の変形・破壊が起これる。本放射能標識抗 IL-6 抗体による画像化は RA 初期の炎症細胞浸潤にともなう IL-6 受容体の分布を捕らえるため、病状の早期発見や、抗体治療の効果・予後判定への応用も可能と考えられる。さらに、リウマチ病変部の描出が不鮮明であった場合、抗体治療の効果が見込めない可能性が示唆され、治療の方針決定にも応用できると考えられる。動物モデル実験では、肝臓等の臓器にも集積が認められたが、RA の画像診断において必要な部位は第一に関節部位であるため、体幹部臓器への集積や血中への滞留傾向は大きな問題にはならず、実用化は可能であると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

インターロイキン 6 (IL-6) は B 細胞分化因子としてその cDNA がクローニングされたが、その後の研究により、免疫系はもとより、炎症、代謝、造血等の分野で機能する多機能性サイトカインであり、慢性炎症性疾患の関節リウマチ (RA)、キャスルマン病等、様々な疾患の病態に関与することが示されてきている。この IL-6 のシグナル阻害による治療の可能性が示唆され、現在ヒト型化抗 IL-6 受容体抗体 (rhPM-1) を用いた IL-6 作用の阻害治療の検討が行われている。ところで、病変部では IL-6 受容体が多数発現し、治療に用いた rhPM-1 は生体内 RA 病変部において IL-6 受容体を認識していると推測されるが、生体内での IL-6 受容体分布を直接描画する方法は確立されていない。即ち、rhPM-1 による直接的な治療部位は特定されていない。したがって、放射能標識 rhPM-1 を用いたシンチグラフィを開発すれば、その体内分布から炎症部位の早期発見や治療効果の判定が行える可能性がある。

本研究の目的は、rhPM-1 を放射能標識する方法の確立と、病変部の画像化のための基礎的な検討を行うことである。結果的に、生体内においても安定した抗体の標識法を確立した。さらに RA 患者滑膜移植モデルマウスを用いた検討では、移植部位の SPECT による描出に成功した。また ARG 像の結果から、その分布は病変部の IL-6 受容体発現に依存した集積であることも示唆された、炎症性のサイトカインである IL-6 の異常産生に関与する病態は RA 以外にも様々である。その IL-6 受容体の分布をシンチグラフィとして捕らえる本研究の結果は、今後の臨床への応用にはまだ多くの問題点はあるものの、他の炎症性の疾患や、IL-6 受容体発現をする腫瘍等の、発症、程度、分布や、IL-6 シグナル阻害治療の効果判定への応用の可能性を提供するものである。従って本研究は、基礎的で端緒についたばかりではあるが、評価できる。よって、学位の授与に値すると考えられる。