



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	成人T細胞白血病細胞に細胞死を誘導するモノクローナル抗体に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	露木, 貴浩
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第16304号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95273
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Takahiro_Tsuyuki_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（臨床薬学）

氏 名 露木 貴浩

審査担当者	主査	教 授	前 仲 勝 実
	副査	教 授	黒 木 喜 美 子
	副査	講 師	米 田 宏
	副査	客員教授	前 田 直 良（北海道医療大学薬学部）

学 位 論 文 題 名

成人 T 細胞白血病細胞に細胞死を誘導するモノクローナル抗体に関する研究

博士学位論文審査等の結果について（報告）

成人 T 細胞白血病 ATL (adult T-cell leukemia) は、ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 HTLV-I (human T-cell leukemia virus type I) への感染によって引き起こされる CD4 陽性 T 細胞の悪性腫瘍である。従来から行われている ATL の代表的な治療法として、化学療法や同種造血幹細胞移植などが挙げられるが、依然として患者の予後は不良であることから、新たな治療法や治療薬の開発が急務とされている。また、抗 CCR4 抗体モガムリズマブは、抗体依存性細胞傷害 ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) 活性により細胞増殖抑制効果を示す ATL 治療薬として唯一臨床の場で使用されている抗体であるが、リンパ節や臓器に浸潤した ATL 細胞に対する有効性が乏しいことや、モガムリズマブへの耐性を獲得した ATL 腫瘍の再発例などが報告されていることから、新たな標的や作用機序を伴った抗体の開発が必要とされている。

当研究室では、ATL 細胞株をラットに免疫することで、ATL 細胞株を特異的に認識する 2 つのモノクローナル抗体 c19 および c33 を樹立した。ATL 細胞株に対する殺細胞活性を検証したところ、c33 には殺細胞活性が認められなかった。一方、興味深いことに、c19 は NK 細胞などの免疫学的なエフェクター細胞に依存せずに、ATL 細胞株に対して抗体単独で細胞死を誘導する活性を持つことが示された。また、ATL 細胞株に細胞死を誘導した c19 は、免疫不全マウス (NOG マウス) を用いた ATL 腫瘍移植モデルマウスにおいても腫瘍の増殖抑制効果を示すことがこれまでの研究で明らかとなっている。抗 CCR4 抗体モガムリズマブは、ADCC 活性により細胞増殖抑制効果を示すことから、我々の樹立した c19 は、それとは全く異なる作用機序をもった新規抗体治療薬として開発できる可能性がある。そこで著者は ATL 細胞株に特異的に結合し、抗体単独で細胞死を誘導する c19 の抗原認識機構を明らかにすることを目的に本研究を実施した。

本研究にて、著者はまず ATL 細胞株に特異的な結合を示す c19 と c33 の標的分子の探索実験を行い、ATL 細胞株表面のヒト白血球抗原 HLA (human leukocyte antigen)-DR β 鎖を標的分子として同定した。c19 および c33 の標的分子として同定された HLA-DR β 鎖は、 α 鎖とヘテロ 2 量体を形成して、通常マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞表面に発現し、T 細胞の活性化を誘導する抗原提示分子として機能している。HLA-DR は主要組織適合性遺伝子複合体 MHC (major histocompatibility complex) クラス II 分子に分類される分子で、分子量 34 kDa の α 鎖と分子量 29 kDa の β 鎖からなるヘテロ 2 量体に、約 13-17 個のアミノ酸で構成される特異的な抗原ペプチドが結合し、安定なヘテロ 3 量体構造を形成することが知られている。また、ATL 細胞株表面ではこの HLA-DR が異所的に高発現していることが報告されていることから、ATL 治療を可能にする魅力的な標的抗原の一つとしても考えられている。

c19 および c33 はいずれも HLA-DR β 鎖を標的分子としているのにも関わらず、ATL 細胞株に対する機能は異なっていたことから、著者は c19 と c33 が同一分子上の異なる領域を認識するという仮説を立てた。そこで次に著者は c19 と c33 の認識領域の違いを検証するために、HLA-DR β 鎖の N 末端欠損変異体を用いたエピトープマッピングを行い、c19 と c33 は HLA-DR β 鎖上の異なる領域を認識することを明らかにした。さらに、c19 の認識に関わる C 末端領域を決定するために c19 のエピトープ領域を含む長さの異なるペプチドを複数合成した。合成したペプチドと c19 の結合親和性を表面プラズモン共鳴 SPR (surface plasmon resonance) 法により解析した結果、c19 の認識に重要な配列は HLA-DR β 鎖上の 35-46 番目のアミノ酸残基の間に位置していることを明らかにした。

続いて著者は、c19 が HLA-DR β 鎖上の抗原認識領域とどの様に相互作用しているのかを検証するために、c19 と 35-46peptide の複合体 X 線結晶構造解析を試みた。本研究にて c19 と 35-46peptide の複合体結晶は得られなかったが、X 線結晶構造解析により、著者は c19 の立体構造を明らかにし、抗原の認識に重要な相補性決定領域 CDR (complementarity determining region) の構造が、柔軟な構造を取りうるループ構造を形成していることを明らかにした。さらに構造決定した c19 の CDR 表面には、全体的に正の電荷を帯びた領域が見られ、その中心には負の電荷を帯びた小さな溝が見られた一方で、抗原ペプチドとして同定した 35-46 peptide は負の電荷を帯びたアミノ酸を含み、その中央にアルギニンがあることから、c19 と 35-46 peptide の間で相補的に結合する可能性が考えられた。次に、著者は HLA-DR β 鎖の変異体解析を行い、c19 との相互作用に関与する HLA-DR β 鎖上の 7 つのアミノ酸残基を同定した。また、これらのアミノ酸残基のうち V38、F40、D41、G45 は、通常の HLA-DR が形成する安定なヘテロ 3 量体構造では抗体が直接アクセスすることが不可能な HLA-DR β 鎖の内部に埋もれた位置に存在していたことから、ATL 細胞株表面で c19 が認識している HLA-DR β 鎖は、通常の安定なヘテロ 3 量体構造とは異なる構造を形成している可能性が示唆された。

最後に著者は、ATL 細胞株表面に発現する HLA-DR β 鎖上の c19 および c33 のエピトープ領域の位置関係を推定するために c19 と c33 の競合実験を行った。その結果、c19 と c33 のエピトープ領域は HLA-DR β 鎖の一次配列上離れた位置関係にあるのにも関わらず、ATL 細胞株表面で競合した。したがって、c19 と c33 が ATL 細胞株表面で認識している HLA-DR β 鎖は、これら 2 つ抗体のエピトープ領域が、HLA-DR β 鎖上で近接した位置関係になる特殊な折りたたみ構造を形成することが示唆された。

このように著者は、ATL 細胞株に単独で細胞死を誘導する c19 の抗原認識機構の解明を目指し、標的抗原分子の探索実験から、SPR 法や X 線結晶構造解析など様々な物理化学的手法を用いた広範な実験を行い、ATL 細胞株表面で c19 が認識する HLA-DR β 鎖が、通常の安定なヘテロ 3 量体構造とは異なる特殊な折りたたみ構造を形成する可能性を見出した。これまでに、ATL 細胞株表面の HLA-DR β を認識することで、標的細胞へ細胞死を誘導するモノクローナル抗体の報告例はあるが、分子レベルでの抗原認識機構については詳細に検討されていなかった。したがって、本論文の成果は、HLA-DR β 鎖を標的としたモノクローナル抗体の抗原認識機構を詳細に解析した先駆的な結果であり、新たな細胞傷害作用機序をともなった新規モノクローナル抗体の、今後の開発に大きな知見を与えることが予想される。

よって著者は、北海道大学博士（臨床薬学）の学位を授与される資格あるものと認める。