



# 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 [全文の要約]                                                                                                                            |
| Author(s)           | 露木, 貴浩                                                                                                                                                                |
| Description         | この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。<br><a href="https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/">https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/</a> |
| 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             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/95275">https://hdl.handle.net/2115/95275</a>                                                                                     |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                                                       |
| File Information    | Takahiro_Tsuyuki_summary.pdf                                                                                                                                          |



# 学 位 論 文 の 要 約

博士の専攻分野の名称 博士(臨床薬学) 氏 名 露木 貴浩

## 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

成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia; ATL) は、ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (human T-cell leukemia virus type I; HTLV-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。近年では ATL の治療成績を改善させることが期待される新たな治療薬や、モダリティの開発がいくつか進められており、その一つに抗体療法が挙げられる。抗体療法は、がん細胞で高発現している抗原を標的化することで、がん細胞に対する特異性を高め、正常細胞へのダメージを最小化した治療法である。ATL 細胞の細胞表面では (clusters of differentiation; CD) 2、CD25、CD30、CD52、CC chemokine receptor 4 (CCR4) などが高発現しており、これらの分子に対する抗体の効果が検討されてきた。抗 CCR4 抗体モガムリズマブは、抗体依存性細胞傷害 (antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC) 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 細胞をラットに免疫することで、ATL 細胞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で、興味深いことに c19 には、NK 細胞などの免疫学的なエフェクター細胞に存在せずに、ATL 細胞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 細胞株に単独で細胞死を誘導した 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。そこで本研究では ATL 細胞に特異的に結合し、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実験を行った。

本実験ではまず、ATL 細胞に特異的な結合を示す c19 と c33 の標的分子の探索を行い、いずれの抗体も ATL 細胞表面のヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen; HLA)-DR $\beta$  鎖を標的分子として認識することを同定した。c19 および c33 の標的分子として同定された HLA-DR $\beta$  鎖は、 $\alpha$  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、免疫応答の活性化において T 細胞に対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  $\alpha$  鎖と、分子量 29 kDa の  $\beta$  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すると、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 $\beta$  鎖を標的分子としているのにも関わらず、ATL 細胞に対する機能は異なっていたことから、c19 と c33 は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。c19 と c33 の認識領域の違いを検証するために、HLA-DR $\beta$  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 $\beta$  鎖上の異なる領域を認識することを明らかにした。ATL 細胞に殺細胞活性を示した c19 の更なる分子認識機序の解明を目指し、c19 の認識に関わる C 末端領域を決定することを目的に 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(surface plasmon resonance; SPR) 法により解析した結果、c19 の認識に重要な配列は HLA-DR $\beta$  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が明らかとなった。

さらに c19 が HLA-DR $\beta$  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 線結晶構造解析と HLA-DR $\beta$  鎖の変異体解析を行った結果、c19 との相互作用に関与する HLA-DR $\beta$  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、HLA-DR の安定なヘテロ 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 $\beta$  鎖の内部に埋もれた位置に存在していたことから、ATL 細胞表面で c19 が認識している HLA-DR $\beta$  鎖は、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、ATL 細胞表面に発現する HLA-DR $\beta$  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結果、c19 と c33 は ATL 細胞表面で競合したことから、c19 と c33 が ATL 細胞表面で認識している HLA-DR $\beta$  鎖は、これら 2 つ抗体のエピトープ領域が、HLA-DR $\beta$  鎖上で近接した位置関係になるような特殊な折りたたみ構造を形成することが示唆された。

これまでに、ATL 細胞表面の HLA-DR $\beta$  鎖を認識することで、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い。したがって、本研究の成果は、HLA-DR $\beta$  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る。HLA-DR と本モノクローナル抗体の更なる結合様式の解析によって、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を開発できる可能性もある。