

自己免疫性疾患に対する 新しい生物製剤の開発の研究

研究期間 平成18年度～平成22年度(予定)

研究体制

総括 清水 宏[北海道大学]

※平成21年度における研究体制

自己免疫疾患に対する疾患特異的治療法開発

Project
KeyWord

自己免疫疾患

人間は免疫という生体防御システムにより、病原微生物など生体にとって有害な物質による侵襲から守られています。この免疫システムに破綻が生じ、自分自身に対して異常な反応が生じると自己免疫疾患が生じます。

モノクローナル抗体

免疫反応では、抗体とよばれる蛋白が中心になって働きます。抗体には多様な病原体を認識できるよう、様々な種類がありますが、特定の分子だけに反応する人工的に作成した1種類の抗体をモノクローナル抗体と呼びます。

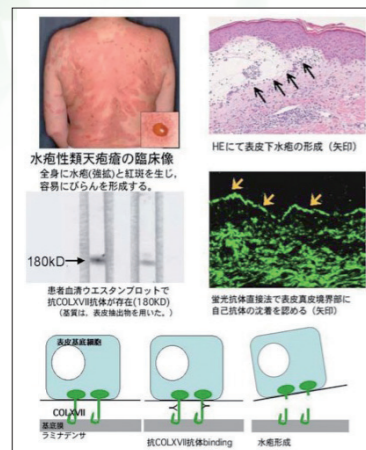
Fab抗体

抗体のなかで中心的な役割を果たしているIgG抗体は、蛋白分解酵素で処理すると、病原体などの抗原と呼ばれる標的部位に結合するFab領域と、IgG受容体に結合するFc領域とに分けることができます。

1 研究の背景・意義

自己免疫性皮膚疾患の克服に向けて

自己免疫疾患は、様々な遺伝的要因や環境因子の影響下で、自分自身に対して異常な免疫反応が生じることによって発症すると考えられています。水疱性類天疱瘡は、最も頻度が高く患者数の多い自己免疫性皮膚疾患で、適切な治療が施されないと死に至る可能性のある重篤な疾患です。水疱性類天疱瘡の治療法としては、副腎皮質ステロイドの全身投与が第一選択として用いられますが、長期間にわたる治療により高血圧や糖尿病の発症など様々な合併症が生じるため、治療に難渋するケースも数多くみられます。一方で、これまでの研究により、水疱性類天疱瘡の発症メカニズムが明らかにされつつあります。水疱性類天疱瘡では、皮膚に存在する17型コラーゲンという分子を標的とした自己抗体が患者に生じ、この自己抗体によって補体とよばれる分子の活性化が生じることにより、水疱形成が起こると考えられています。そこで、本研究では総括研究代表者のグループが新たに開発した水疱性類天疱瘡モデルマウスを治療効果の判定に用いることにより、自己抗体の沈着と補体の活性化を特異的に抑制する疾患特異的治療法を開発を行いました。

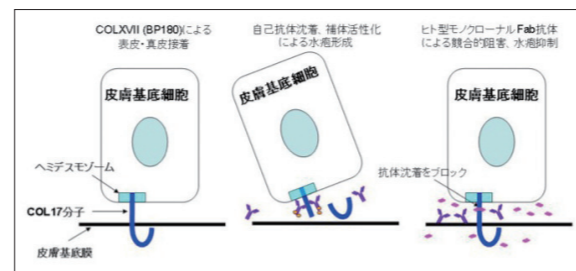


▲水疱性類天疱瘡の臨床、検査所見と、想定される発症メカニズム

2 研究プロジェクトの目標

水疱性類天疱瘡に対する特異的治療法の開発

本研究では最も頻度の高い自己免疫性皮膚疾患である水疱性類天疱瘡をターゲット疾患として、ファージディスプレイ法と、EBウイルスによる自己抗体産生B細胞のクローン化の2つの異なる手法を平行して用い、水疱性類天疱瘡患者末梢血より17型コラーゲンに対するモノクローナルFab抗体を作成します。Fab抗体は補体活性化能を持たないため、患者にモノクローナルFab抗体を投与することで、病的な自己抗体と17型コラーゲン分子との結合を競合的に阻害し、水疱性類天疱瘡の発症を抑制することが可能と考えられます。モノクローナルFab抗体の治療効果と安全性は、水疱性類天疱瘡モデルマウスを用いて判定し、具体的な投与方法、投与量の設定を行うことで、より副作用が少なく、高い治療効果を有するモノクローナルFab抗体の開発を行い、臨床応用の早期実現につなげます。

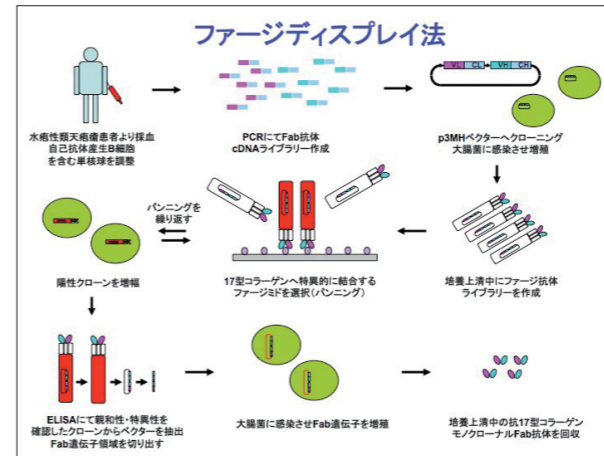


▲抗17型コラーゲンモノクローナルFab抗体による治療メカニズム

3 研究プロジェクトの成果

モノクローナルFab抗体の樹立

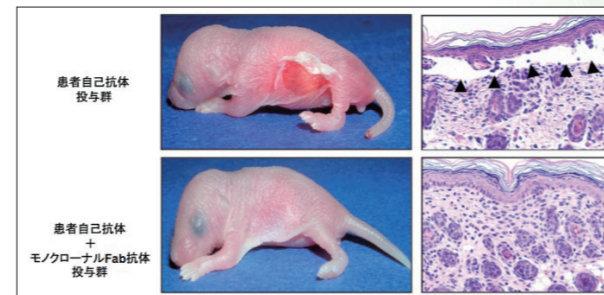
高力価の自己抗体を有することが確認された水疱性類天疱瘡患者2名から血液を採取し、単核球分画からRT-PCR法にて抗体Fab領域遺伝子cDNAを調整し、ファージ抗体ライブラリーを作成しました。作成したファージ抗体ライブラリーから17型コラーゲンを認識するファージ抗体をリコンビナント蛋白を用いたELISA法にてスクリーニングし、17型コラーゲンを特異的に認識する3種類のモノクローナルFab抗体を樹立しました。3種類のモノクローナルFab抗体についてヒト17型コラーゲンに対する特異性を蛍光抗体法、ウェスタンブロット法にて検討したところ、いずれの抗体もヒト17型コラーゲンに対して特異的に結合しましたが、コントロールであるマウス17型コラーゲン、GSTタンパクには結合しなかったことから、これら3種類のモノクローナルFab抗体はヒト17型コラーゲンに高い特異性を有することが明らかになりました。



▲ファージディスプレイ法による抗17型コラーゲンFab抗体の樹立

水疱性類天疱瘡に対する有効性を確認

3種類のモノクローナルFab抗体について患者自己抗体に対する阻害効果をリコンビナント蛋白を用いたELISA法にて検討したところ、2種類のFab抗体で濃度依存的に患者自己抗体に対する阻害効果が確認されました。一方1種類の抗体は特異的に17型コラーゲンに結合しましたが、患者自己抗体に対する明らかな阻害効果を示しませんでした。次に、皮膚にヒト17型コラーゲン蛋白を発現する、水疱性類天疱瘡モデルマウスを用いたin vivoの実験系で各モノクローナルFab抗体の効果について検討しました。水疱性類天疱瘡モデルマウスでは、患者自己抗体を投与することにより、水疱病変を生じますが、in vitroの実験系で阻害効果が認められた2種類のモノクローナルFab抗体を投与したところ、患者自己抗体による水疱形成が著明に抑制されました。in vitroの実験系で阻害効果が認められなかったFab抗体は水疱性類天疱瘡モデルマウスに対しても有意な効果を示しませんでした。

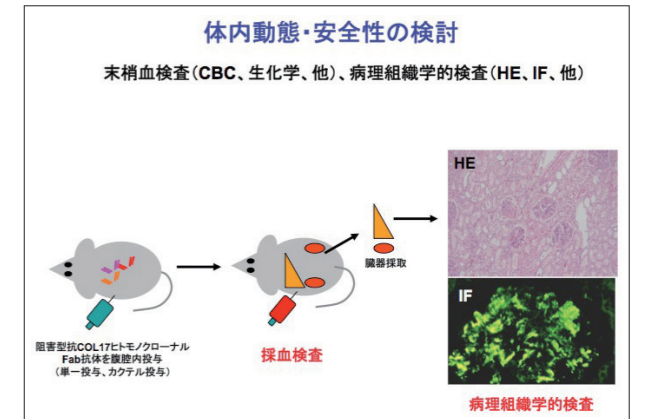


▲水疱性類天疱瘡モデルマウスを用いた評価系にて、モノクローナルFab抗体の有効性が確認された

4 実用化にあたっての今後の課題及び研究方針

モノクローナルFab抗体の安全性試験

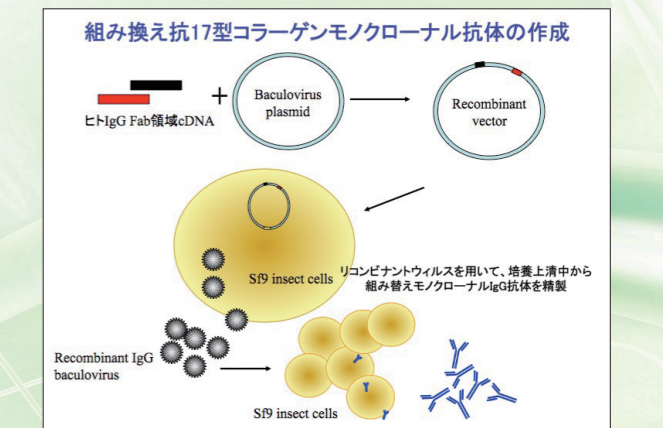
これまでの研究により、水疱性類天疱瘡患者血液からヒト17型コラーゲンを特異的に認識する3種類のモノクローナルFab抗体を作成し、in vitroとin vivoの両実験系で水疱性類天疱瘡患者自己抗体に対する阻害効果が確認できた2種類の抗17型コラーゲンモノクローナルFab抗体を樹立しました。今後これら抗17型コラーゲンモノクローナルFab抗体を臨床応用していくにあたって、モノクローナルFab抗体の生体内における安定性、安全性について検証していくことが必要になります。そのため、現在Fab抗体の大量生産に向けて、大腸菌ではなく哺乳類の細胞(CHO細胞)を用いた発現系への変更を行っています。また、非齧歯類を用いた安全性試験に先立って、マウスを用いたモノクローナルFab抗体の体内動態、安全性についての検証を行っています。



▲マウスを用いたモノクローナルFab抗体の体内動態、安全性の検討

より安定性の高い抗体製剤の作成にむけて

本研究では患者から高親和性の抗17型コラーゲンモノクローナルFab抗体を樹立し、水疱性類天疱瘡患者自己抗体に対する競合的阻害作用による新規治療法を開発をおこなっていますが、モノクローナルFab抗体の問題点として生体内における安定性が挙げられます。モノクローナルFab抗体は標的抗原である17型コラーゲン分子と結合した際に、その生体内における安定性が高まると考えられますが、実際に臨床応用を目指すにあたりより安定性の高い製剤を開発することが望ましいと考えられます。そこで、これまでに樹立した2種類のモノクローナルFab抗体の遺伝子をクローニングし、さらに遺伝子変異を導入した組み換えIgGタンパクの作成を行っています。遺伝子変異を導入することで治療効果と抗体の安定性を両立させた抗体の作成および解析を行っています。



▲作成したモノクローナルFab抗体遺伝子を用いて組み換え抗17型コラーゲンモノクローナル抗体を作成する

参考文献

Nishie W, et al: Humanization of autoantigen, Nat Med, 13: 378-383, 2007.
Yancey KB: The pathophysiology of autoimmune blistering diseases, J Clin Invest, 115: 825-828, 2005.