

氏 名 やま した けん じ
山 下 憲 司
学位(専攻分野) 博 士 (農 学)
学 位 記 番 号 論 農 博 第 2264 号
学位授与の日付 平 成 11 年 11 月 24 日
学位授与の要件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目 Studies on Potential of Soluble Sheep LFA-3 as an Immunotherapeutic Agent
(可溶化型ヒッジ LFA-3 分子の免疫抑制剤としての開発研究)

論文調査委員 (主 査)
教 授 木 村 光 教 授 井 上 國 世 教 授 熊 谷 英 彦

論 文 内 容 の 要 旨

リウマチ, I 型糖尿病等自己免疫疾患は自己の組織, 臓器が自己の免疫系細胞, 特に T 細胞によって認識, 破壊されることにより引き起こされる疾患である。著者は T 細胞表面上に特異的に発現している CD 2 分子に対し強い親和性を有するヒッジ由来 LFA-3 分子を T 細胞選択的な自己免疫疾患治療薬として開発することを目的に研究を行った。その結果, 誘導体二量体分子に強い免疫抑制活性を見出した。さらにその抑制は誘導された抑制性細胞により起こるというユニークなメカニズムを明らかにした。これらは同二量体分子の自己免疫疾患治療薬としての可能性, さらに副作用のない新しい治療法である体外治療システム開発への応用の可能性を強く示唆する。本論文の主な内容は以下のとおりである。

第 1 章 ヒッジ LFA-3 cDNA のクローニングと構造解析

組み換え型ヒッジ LFA-3 分子を作製するために, 同 cDNA のクローニングを試みた。クローニングは既に報告されていたヒッジ LFA-3 の部分アミノ酸配列を利用して行った。得られたクローンの構造解析の結果, 既に報告されているヒト LFA-3 に対し, DNA レベルで 65%, アミノ酸レベルで 46% の相同性を有し, ヒトと同じく二つの細胞外領域 (D1, D2), 膜結合領域, 細胞質領域から成るタンパク質をコードしていた。さらにクローニングされたクローンの中には, 膜結合領域を欠失した可溶化型のヒッジ LFA-3 をコードする cDNA も存在していた。

第 2 章 可溶化型ヒッジ LFA-3 多量体分子の免疫抑制活性

可溶化型ヒッジ LFA-3 分子の免疫抑制剤としての可能性を検討するため, 大腸菌を宿主として発現させ, その組み換えタンパク質の *in vitro* での生物活性の評価を行った。LFA-3 と CD 2 との結合の阻害をロゼット形成反応で検討した。その結果, 組み換え型可溶化型 LFA-3 の濃度依存的な阻害活性を確認した。しかし, 同分子の阻害能は $IC_{50} = 25 \mu\text{g/ml}$ と極めて弱いものであった。そこで次に, 親和性の増強を目的として, 多量体化した可溶化型 LFA-3 分子を作製した。外来抗原 (結核菌および破傷風抗原) によるヒト T 細胞増殖反応系での評価結果, 単量体では IC_{50} が $100 \mu\text{g/ml}$ 以上であったのに対し, 多量体分子では $1 \sim 1.5 \mu\text{g/ml}$ の IC_{50} 値を示し, 多量体化による有意な抑制活性の増強が認められた。

第 3 章 可溶化型ヒッジ LFA-3 二量体分子の免疫抑制活性

より優れた免疫抑制剤候補を得ることを目的として, 二量体分子を作製し, T 細胞増殖反応抑制能を検討した。二量体分子は, LFA-3 分子の細胞外部分の D1 領域部のみに CD 2 との結合活性があることより, C 末端に人工的にシステイン残基を付加し, D1 領域部を分子間で S-S 結合を介して結合させることにより作製した。抑制能評価の結果, IC_{50} が約 30 ng/ml で, 単量体に比べ著しい抑制能の増強を確認した。また, 同二量体分子による抑制は, T 細胞によることを見出した。

第 4 章 可溶化型ヒッジ LFA-3 二量体分子の免疫抑制機構の解析

二量体分子の免疫抑制メカニズムについてより詳細な検討を加えた結果, 以下のことを明らかにした。1) 二量体処理で誘導された抑制能を有する細胞画分は, 強い $\text{IFN-}\gamma$ 産生を示した。2) 抑制には標的細胞と抑制性細胞の直接接触が必要である。3) 誘導された抑制性細胞は, IL-2 処理で, その抑制能を低下させることなく増幅させることができる。4) 抑制を

引き起こす直接の因子は抑制性細胞から分泌された IFN- γ である。以上の知見は、薬剤（この場合二量体分子）を体内に投与することによる抗原性等種々のリスクを回避でき、より安全で、高い治療効果が期待できる体外治療への応用の可能性を強く示唆している。

論文審査の結果の要旨

自己免疫疾患の治療において、疾患の原因となる T 細胞のみに選択的に作用し、副作用がなく根本治療を可能にする薬剤の開発が切望されている。

本論文では、T 細胞表面上に特異的に発現している CD 2 分子に対し強い親和性を有するヒツジ由来 LFA-3 分子の誘導体に強い免疫抑制活性を見だし、T 細胞を選択的に抑制する自己免疫疾患治療薬としての開発の可能性を示した。また、同誘導体分子の免疫抑制が、同分子により誘導された抑制性細胞によることを明らかにすることにより、体外治療という副作用のない全く新しい治療法の可能性を示した。評価すべき点は以下のとおりである。

1. ヒツジ LFA-3 cDNA のクローニングに成功し、その構造を明らかにすることにより、ヒツジ LFA-3 がヒト LFA-3 と類似の構造を有していることを示した。またクローニングされたヒツジ LFA-3 cDNA の中には膜結合型、可溶化型を含む 3 つの分子種が存在することを示した。
2. 大腸菌で作製した可溶化型ヒツジ LFA-3 の生物活性（ロゼット形成阻害活性、ヒト T 細胞増殖の抑制活性）を確認した。また同 LFA-3 分子はヒト T 細胞に選択的に結合することを確認した。
3. 可溶化型ヒツジ LFA-3 誘導体（二量体、多量体）を作製し、これらが同単量体よりも優れたヒト T 細胞増殖抑制能を有することを確認した。特に、二量体分子で 1000 倍を超える著しい抑制能の増強を見出した。
4. 同抑制性細胞の抑制には細胞の直接接触が必要であることを示した。
5. 同抑制性細胞のサイトカイン産生パターンを持ち、その抑制が抑制細胞が分泌した IFN- γ によることを示した。
6. 同抑制性細胞を IL-2、あるいは固定化抗 CD 3 抗体で処理することにより、抑制能を低下させずに細胞数を増加させることができることを示し、同二量体分子を、体外治療という副作用がない新しい治療法の実現に利用できる可能性を示した。

以上のように、本論文はヒツジ LFA-3 cDNA の構造を明らかにするとともに、組み換え体の生物活性の解析および自己免疫性疾患の治療薬としての可能性を示したものであり、免疫学、細胞生理学などの発展に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 11 年 9 月 24 日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が充分あるものと認めた。