

氏名(本籍)	なか やま じゅん いち 中山 淳 一 (千葉県)		
学位の種類	博 士 (農 学)		
学位記番号	博 乙 第 2428 号		
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	<b>Studies on Cell Selectivity and Its Mechanism of Cell Death by Anti-Human Fas Antibody</b> (抗ヒト Fas 抗体による細胞死の細胞選択性とそのメカニズムに関する研究)		
主 査	筑波大学教授	農学博士	深 水 昭 吉
副 査	筑波大学教授	博士(薬学)	柳 澤 純
副 査	筑波大学准教授	博士(薬学)	木 村 圭 志
副 査	筑波大学准教授	博士(農学)	谷 本 啓 司

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

アポトーシスは発生や恒常性の維持など種々の生体反応において重要な役割を果たしている自発的な細胞死である。アポトーシスは Fas-Fas リガンド系について特に詳細な解析がなされている。Fas は活性化リンパ球のみならず肝細胞など種々の細胞に発現しており、抗 Fas 抗体を医薬開発するためには細胞選択的なアポトーシス誘導能を持つ抗体を取得する必要がある。

まず、抗ヒト Fas 抗体のスクリーニングから見出された抗体をヒト化した R-125224 を用いて、種々の細胞における R-125224 誘導性アポトーシスの選択性とそのメカニズムについて検討した。R-125224 はヒト活性化リンパ球及び RA 患者由来滑膜浸潤リンパ球に対してアポトーシスを誘導した。一方、ヒト肝細胞へのアポトーシスは誘導しなかった。次に、ヒトリンパ腫細胞株を用いて細胞選択性を検討したところ、H9 細胞と SKW6.4 細胞はアポトーシスが誘導されたが、HPB-ALL 細胞と Jurkat 細胞にはアポトーシスは誘導されなかった。Fas 感受性細胞株のシグナルは Fas リガンド刺激により Death-inducing signaling complex (DISC) というカスパーゼ 8 を含む複合体が形成される type I 細胞と、DISC があまり形成されない type II 細胞に分かれる。DISC 解析により、R-125224 に感受性の細胞は type I 細胞、非感受性の細胞は type II 細胞であることが示された。一方、type I 細胞は Fas 発現が type II 細胞よりも高く、Fas のクラスター形成能も高かった。以上より、R-125224 の type I/II 選択性が、Fas 発現量や Fas のクラスター形成によることが示唆された。更に、*in vivo* での R-125224 の細胞選択性も各種実験より示唆した。

Fas を介したアポトーシスはカスパーゼ阻害剤である zVAD-fmk によって阻害される。次に、ヒトリンパ腫細胞株を用いて抗ヒト Fas 抗体 CH-11 によるアポトーシスの zVAD-fmk による阻害能を別途検討したところ、胸腺細胞由来である HPB-ALL 細胞でのみ細胞死が半分程度しか阻害されなかった。マウス、ラット胸腺細胞でも zVAD-fmk により細胞死が同様に抑制されなかったことから、このカスパーゼ非依存性の細胞死は胸腺細胞に選択的であることが示唆された。HPB-ALL 細胞でのカスパーゼ非依存性の細胞死においてアポトーシスの特徴である DNA 断片化は阻害されていた。また、RIP キナーゼの阻害剤である

geldanamycin 前処置により抑制されたことから、RIP キナーゼがこの経路に関与していることが示唆された。胸腺では免疫応答に関与するリンパ球が適切に排除される仕組みとして Fas を介したアポトーシス経路が阻害されたとしても、カスパーゼ非依存性の細胞死によって恒常性が保たれる可能性が考えられる。

抗ヒト Fas 抗体を用いた本研究から、医薬開発において Fas を介したアポトーシスを選択的に調節できる可能性を見出した。また、HPB-ALL 細胞をモデルとした組織特異的な細胞の恒常性維持の一端を示唆した。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

Fas を介したアポトーシスは生体内で重要な働きをしている。それだけでなく、抗 Fas 抗体を用いたアポトーシスの調整により、自己免疫疾患を調節できる可能性があった。R-125224 という抗体を用いて、R-125224 はヒト活性化リンパ球及び RA 患者由来滑膜浸潤リンパ球に対してアポトーシスを誘導することを示した。一方、ヒト肝細胞へのアポトーシスは誘導しないという細胞選択性を有していた。またこの細胞選択性は、DISC という細胞内アポトーシス誘導蛋白複合体の形成に多少により決定された。このように、細胞選択性のある抗体は非常にユニークであり、今後の医薬開発にも応用可能なことが期待される。また、そのシグナルの解析においても、二つのタイプに分かれる原因を細かく解析しており評価が高い。また同時に、胸腺細胞由来である HPB-ALL 細胞でのみカスパーゼ阻害剤である zVAD-fmk 添加で細胞死が半程度しか阻害されず、この細胞死はカスパーゼ非依存性であることを示した。この細胞死は HPB-ALL 細胞だけでなく、マウス、ラットの胸腺細胞でも認められたことから、胸腺では免疫応答に関与するリンパ球が適切に排除される仕組みとして、カスパーゼ非依存性の細胞死によって恒常性が保たれる可能性が考えられた。

本論文では、抗 Fas 抗体 R-125224 を用いたアポトーシスの細胞選択性と、Fas を介したカスパーゼ非依存性の細胞死が HPB-ALL 細胞選択的であることを示した。これらの研究は、Fas に関するシグナルだけではなく、医薬開発の視点からも興味深く重要な知見を示した。よって本論文は非常に高く評価できる。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。