

論文内容の要旨

氏名	緒方(小原)京子		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	医第1017号		
学位授与の日付	平成22年3月23日		
学位授与の要件	学位規程第4条第2項該当		
学位論文題目	Improvement of catalytic antibody activity by protease processing (酵素消化による抗体酵素活性の上昇)		
論文審査委員(主査)	教授	宗 像	浩
	(副主査)	教授	金丸 昭久
	(副主査)	教授	松尾 理

【目的】

近年、抗原を加水分解する能力のある抗体(抗体酵素)について記述した論文が、多く見られる。例えば、VIP やサイログロブリン、DNA などは、それらの自己抗体によって加水分解されることがあり、この抗体酵素活性(以下、活性と示す)は、完全抗体のみならず、L 鎖や H 鎖のような抗体断片によっても認められている。

抗体の L 鎖とセリンプロテアーゼの配列の比較により、L 鎖がプロテアーゼ活性を示す可能性が提唱されていたが、セリンプロテアーゼに見られる触媒三つ組残基が、いくつかの抗体や L 鎖においても認められることが発見された。

生体内での抗体酵素の役割が徐々に認識され、治療薬としての抗体酵素のアプローチが、タンパク質やペプチドを抗原として検討されている。例えば、HIV の外膜タンパクを分解するモノクローナル抗体や L 鎖が作製されている。しかしながら、抗体酵素の活性は、天然酵素と比べ非常に低いため、治療薬実用化の障害となっている。

本論文では、モノクローナル抗体 L 鎖である Bence Jones Protein (BJP) の断片化による酵素活性の上昇につき、報告する。我々は、酵素消化した抗体断片の活性が、消化前と比べて増強していることを見つけた。この現象は、高い活性獲得の方法として期待される。

【方法と結果】

骨髓腫患者の尿中から単離した BJP (HIR) (以下、HIR と示す) は、Superose12 によるゲルろ過単一のピークを示した。HIR をリシルエンドペプチダーゼで処理し、ゲルろ過カラムで分離すると、複数のピークが観察された。これらについて、合成基質を用いて活性を測定したところ、断片化した HIR の Fr.14 (以下、Le-HIR14 と示す) にも活性が確認できた。さらに、パラメータの解析により、処理前に比べて、約 80 倍の高い活性を認めることができた。

SDS-PAGE により、HIR は分子量約 44kDa、Le-HIR14 は分子量約 11kDa の単一バンドを示した。これらのバンドは、抗ヒト L 鎖 $\kappa$ 抗体と反応した。

アミノ酸配列分析と SDS-PAGE の結果から、Le-HIR14 の活性は、HIR の VL 断片によるものと考えられた。

その他の種類の BJP についても、HIR と同様のリシルエンドペプチダーゼ処理後の活性を測定すると、5 例中 3 例の BJP において、活性の上昇または出現を確認することができた。

【考察】

抗原を切断するために産生された抗体酵素は、親和性が強いが、抗原分解活性は弱い。今回、我々が発見した方法によって、抗原分解活性上昇の可能性が示唆された。

また、In vivo において、酵素活性がない、または、活性の弱い抗体や L 鎖でも、生体内でプロセッシングを受けることにより活性化され、抗体酵素活性が出現または上昇し、病態生理に何らかの影響を与える可能性がある。

【結論】

抗体酵素の活性を向上させ得る本方法は、抗体酵素による疾病の治療法開発に有用である可能性がある。

抗体の中には酵素活性を有するものが知られており、対応する抗原の加水分解を促進する。それらの抗体は抗体酵素と呼ばれる。例えば、VIP、チログロブリン、およびDNAがそれらに対する自己抗体で加水分解される場合が知られている。また、抗体酵素の治療への応用に関しても研究が進んでおり、インフルエンザウイルスのヘマグルチンに対する抗体酵素、エイズウイルス外膜タンパク gp41 や gp120 を分解する抗 gp41、抗 gp120 モノクローナル抗体 L 鎖による抗原の分解などについて興味ある知見が報告されている。また、自己抗体が関与する疾患においてその抗体が酵素活性を有し、その分解活性により種々病態と関係する報告もなされている。

これらの酵素活性は完全な抗体に検出されるだけではなく、L 鎖などの抗体フラグメントにも検出され、抗体酵素の中には抗体自体よりもその一部分である Fab、さらには L 鎖のほうが高い酵素活性を示すことがあると報告されている。抗体酵素は酵素の触媒能、抗体の特異性を併せ持ち、治療薬、予防薬としての期待が大きくもたれている。しかし既知の抗体酵素の活性は天然酵素と比べ非常に低いことが治療薬実用化への障害となっており、抗体酵素の活性を上昇させる方法の開発が望まれている。本研究ではそのような観点から、タンパク質分解活性を有するベンス・ジョーンズタンパク質 BJP の低分子化の酵素活性に対する影響を調べた。

多発性骨髄腫患者の尿中 BJP には酵素活性を有するものがあることが報告されている。多発性骨髄腫患者尿

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2004年3月 日 公 表	出版物名 Biochemical and Biophysical Research Communications Vol. 315 No. 3 612~616頁
	公 表 内 容	
	全 文 と 要 約	2004年3月 日 発 行

から塩析、ゲルろ過などの手法でBJPを精製した。タンパク質分解酵素活性はセリンプロテアーゼ用の合成基質である Chromozym TRY をもちいて調べた。また、低分子化による酵素活性の変化を調べるために、BJP をリシルエンドペプチダーゼで処理し、ゲルろ過で分画した。BJP の variable region は比較的長い断片に、constant region は小さな断片になることがアミノ酸配列より予想されたが、リシルエンドペプチダーゼ処理後、Superose 12 によるゲルろ過で分画すると、溶出時間の異なるいくつかの画分に分かれた。それぞれの画分の酵素活性を測定し、また、それぞれの画分に含まれるペプチドのアミノ酸配列を決定した結果、切断前に比べて高い酵素活性を示す画分はBJP の light chain variable domain (VL) と同定された。さらに、それらの画分を SDS-PAGE で分析すると、BJP は非還元条件下で分子量約 44kDa の単一バンドとして、上述の高い酵素活性を示す画分は還元条件下において分子量約 11kD のバンドとして泳動され、VL の分子量と一致した。これら 44kDa と 11kDa のバンドは、共にイムノブロッティングで抗ヒト L 鎖  $\kappa$  抗体と反応した。セリンプロテアーゼの特異的阻害剤である diisopropyl fluorophosphates (DFP) 処理により失活することからこの VL 断片はセリンプロテアーゼ活性を有する酵素であると推測された。この仮定はさらに、他の種々タンパク質分解酵素阻害剤による阻害はほとんど起こらないことも確認された。本断片の動力学的パラメータを測定した結果、この VL 断片のプロテ

アーゼとしての  $K_m$  値は未処理 BJP に比べ、約 5 倍、 $k_{cat}$  値は約 80 倍に上昇した。

他の多発性骨髄腫患者尿から精製した BJP についてもリシルエンドペプチダーゼ処理によるプロテアーゼ活性の変化につき検討を加えた。リシルエンドペプチダーゼ処理前後で比較すると 5 例中 3 例で活性上昇が観察された。

前述のように、抗体酵素がある種の病態と関係しているという報告が見られ、多発性骨髄腫患者の半数以上に腎障害が認められる。腎障害を合併する多発性骨髄腫患者の 90% にベンス・ジョーンズ蛋白尿が認められ、また、腎細胞に対して傷害性を示す BJP の存在も示されているので、今回、近位尿細管上皮細胞由来の培養細胞に対する傷害性とタンパク質分解酵素の活性との相関について調べた。その結果、細胞傷害性のないベンス・ジョーンズタンパク質が断片化により高い抗体酵素活性を獲得し、細胞傷害性を示すようになったが、その酵素活性を DFP により抑制すると、細胞傷害性が消失した。

この研究は、酵素活性のない抗体、または、酵素活性が弱い抗体酵素でも、酵素処理による断片化または VL を用いることにより、高い酵素活性が得られる可能性を示す。また、抗体酵素および BJP などは、生体中の酵素により切断されて活性化され、病原性を獲得することが考えられる点を明らかにしたものであり、種々病態の診断、治療などへの応用も期待できると評価される。