

# The Generation and Characterization of GAM-2, a New Monoclonal Antibody , and its Effect on Phorbol-Ester-Induced Lung Inflammation in the Rabbit

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 志知, 泉 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/984">http://hdl.handle.net/10271/984</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 131号	学位授与年月日	平成 4年 3月26日
氏名	志知 泉		
論文題目	The Generation and Characterization of GAM-2, a New Monoclonal Antibody, and its Effect on Phorbol-Ester-Induced Lung Inflammation in the Rabbit (単クローン性抗体、GAM-2 の作製と解析、およびフォルボル-エステル誘導家兔肺炎症に与える GAM-2 の影響について)		

医学博士 志知 泉  
論文題目

The Generation and Characterization of GAM-2, a New Monoclonal Antibody, and its Effect on Phorbol-Ester-Induced Lung Inflammation in the Rabbit  
(単クローン性抗体、GAM-2の作製と解析、およびフォルボル-エステル誘導家兔肺炎症に与えるGAM-2の影響について)

論文の内容の要旨

【目的】 好中球、マクロファージ(Mφ)は生体防御反応において重要な役割を果たしている。同時に、肺の線維化、肉芽腫形成にも関与していることが明らかとなってきている。しかし、その機構は十分には解明されていない。肺の線維化、肉芽腫形成における好中球、Mφの役割を明らかにする目的で、家兔の好中球、活性化Mφを認識する単クローン性抗体(mAb)を作製し、その反応性、好中球機能との関連について検討した。

【方法】 1) BCG死菌感作したニュージーランド白色家兔の気管支肺胞洗浄液(BAL)細胞を免疫原として細胞融合法によりmAb、GAM-2を作製した。2) 反応性の解析はEPICS-PROFILEを用いたフローサイトメトリーまたは免疫組織化学的染色により行った。3) 家兔の腹腔浸出性好中球をGAM-2で前処置(4℃、1時間)後、好中球機能を測定し、GAM-2の好中球機能に与える影響(in vitro)を検討した。貪食能は好中球を蛍光標識ビーズと37℃、1時間培養し、EPICS-PROFILEで解析した。活性酸素産生能はルミノール依存性化学発光法によった。オプソニン化ザイモザンにて刺激し、Luminescence Reader BLR-301で測定した。遊走能の測定はBoyden変法によった。走化性物質として10%ザイモザン刺激家兔血清を用い、37℃、2時間遊走させた。4) 家兔にphorbol myristate acetate(PMA)40μg/kgを静注し、PMA肺炎症モデルを作製した。GAM-2または正常マウスIgG 1.5mg/kgをPMA投与の2時間前に静注し、PMA投与20時間後の末梢白血球数、肺重量、BAL好中球数、組織変化を比較した。

【結果】 1) GAM-2の反応性。家兔好中球、活性化Mφ(BCG死菌感作家兔のBALと肺組織中Mφ、チオグリコレート誘導腹腔浸出性Mφ)と反応し、常在性Mφ、単球、リンパ球、赤血球などとは反応しなかった。ヒトおよびラットとの交叉反応は認めなかった。2) 家兔好中球機能に与える影響(in vitro)。GAM-2の前処置は好中球の遊走能を抑制した〔抑制率: 59.4±6.8%、(平均±SE、n=6)〕。貪食能、化学発光には影響を与えなかった。3) PMA肺炎に与える影響。GAM-2の前処置により肺重量の増加、好中球浸潤(BAL、組織)が抑制された。肺重量/体重比(g/kg)、BAL好中球数(×10<sup>6</sup>/ml)は、PMA単独群で、5.74±0.61、2.28±0.26、IgG前処置群、5.70±0.78、2.04±0.35、GAM-2前処置群、4.92±0.43、1.15±0.25、(平均±SD、n=6)であった。GAM-2は末梢白血球数には影響をおよぼさなかった。

【考案】 家兔のMφ/単球の活性化と関連する抗体の報告はみられない。他の種に対するものにおいても活性化と関連し、常在性Mφ/単球とは反応性を示さない抗体の報告は少なく、A1-3、anti-2.28、AcM.1、3F3.5Fが活性化Mφ/単球に特異的であると報告されているのみである。この中で、3F3.5Fはマウスの活性化腹腔浸出性Mφ、腹腔浸出性好中球と反応し、GAM-2と反応性が類似していると考えられた。

現在までに、白血球の機能と関連する抗原/mAbはいくつか報告されている。この中で、TM2、CD18複合体が好中球遊走と関連する。しかし、GAM-2は好中球の遊走能を選択的に抑制しているように考えられ、報告にあるTM2、抗CD18複合体抗体の作用とは異なると思われた。

家兔へのGAM-2の前投与はPMA静注による肺への好中球浸潤を抑制した。GAM-2は末梢白血球数に影響を与えなかったことより、GAM-2による肺炎症の抑制は白血球減少によるのではなく、好中球遊走の抑制によると考えられた。また、in vitroにおける反応性、作用を考えるとCD18複合体とは別の好中球遊走-肺障害の経路を抑制したものと思われた。

【結語】 GAM-2 は非常にユニークな特徴を有しており、肺障害、線維化、肉芽腫形成などにおける好中球、M $\phi$ の役割を解明する上で有用な抗体と考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

肺の急性炎症や慢性の線維化、肉芽腫形成において、炎症性細胞、とくに好中球やマクロファージ(M $\phi$ )がその病態の進展と消長に密接に関与していることは広く知られているが、その機構は十分に解明されていない。

そこで本申請者は、その機構を明らかにするため家兔の好中球とM $\phi$ を特異的に認識する単クローン抗体(mAb)GAM-2を作成することに成功し、それをを用いてin vivo及びin vitro系において好中球及びM $\phi$ に対する効果を解析するとともに、phorbol myristate acetate(PMA)誘導肺炎症家兔に与える影響を検索した。

審査委員会において、申請者によりなされた口頭発表と論文内容について審査した結果、本論文の特徴として次の点が評価された。

1. BCG死菌感作家兔の気管支肺胞洗浄液(BAL)細胞を免疫原として細胞融合法によりGAM-2を作製し、その各種の性状を検索しているが、材料、方法、再現性、精度いづれの点においてもほぼ適切であると判断された。
2. 得られたGAM-2は、家兔の好中球及び活性化M $\phi$ (肺組織内及びBAL中M $\phi$ 、チオグリコレート誘導腹腔渗出性M $\phi$ )と反応するが、常在性M $\phi$ 、血液単球、リンパ球、赤血球等とは反応せず、現在までに家兔では同様のmAbの報告はみられず、これまでにない新しいmAbであると評価された。
3. GAM-2で好中球を前処置すると、in vitroでの遊走能が有意に抑制された。しかし、蛍光標識ビーズの貪食能、活性酸素産生能を示すルミノール依存性化学発光には変化は見られなかった。すなわち、GAM-2は好中球の遊走能を選択的に抑制することから、好中球の機能分子を認識するmAbであるとして注目された。
4. PMA一回静注により誘導した肺炎症家兔に2時間前に前もってGAM-2を一定量投与すると、肺重量の増加、肺及びBAL中の好中球浸潤の抑制、炎症巣の減弱、末梢血白血球数の不変などが観察された。これらの所見から、GAM-2は生体内においても好中球遊走を抑制する作用を発揮することを証明した。

以上により、申請者はGAM-2による肺炎症の抑制は、血液中白血球の減少によるのではなく、好中球の肺組織内への遊走の抑制によると主張した。審査委員会では、このような性状を示すGAM-2は肺炎症、線維化、肉芽腫形成などにおける好中球やM $\phi$ の役割を解明する上できわめて有益なものであると判断され、高く評価された。

また、審査の過程において、申請者の発表と関連して次の点に対し質疑がなされた。

1. GAM-2産生クローンをいかにしてスクリーニングしたか
2. 血液単球や肝クッパー細胞は活性化によりGAM-2対応抗原分子を発現するか
3. 各種の骨髄細胞のGAM-2との反応生を検索したか
4. GAM-2対応抗原分子の分子量が好中球と活性化M $\phi$ で異なる理由は何か
5. ARDS(acute respiratory distress syndrome)のモデルとしてPMA誘導肺炎症の妥当性について
6. PMA誘導肺炎症実験において、GAM-2の投与時期、投与量などの検討を行なったか
7. GAM-2の好中球遊走能抑制実験において、C5aとの結合競合試験を行なったか

以上の質問に対する申請者の回答はほぼ適切であり、博士(医学)の学位授与に相応しいものと審査委員会は全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	山下	昭			
	副査	教授	白澤	春之	副査	教授	吉田孝人
	副査	教授	吉見	輝也	副査	講師	鈴木一也