

主論文の要旨

**Intravenous immune globulin suppresses  
angiogenesis in mice and humans**

〔マウスとヒトにおける、ヒト免疫グロブリン製剤の抗血管新生作用〕

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻

頭頸部・感覚器外科学講座 眼科学分野

(指導：寺崎 浩子 教授)

安間 玲緒

## 【緒言】

ヒト免疫グロブリン製剤 (ivIg) は血漿分画製剤の一つで千人以上の健常ドナーの血漿から精製した免疫グロブリンであり、60%を IgG1 サブクラスが占める。皮膚疾患、神経疾患、炎症疾患、移植片対宿主病など、免疫に関与する様々な疾患に対して投与されている。ivIg の生物学的作用は完全には解明されておらず、製剤を構成している免疫グロブリン中に疾患を抑制する抗体が含まれているため効果があるという説と、免疫グロブリンの定常領域 (Fc 領域) による作用によるという説があり、両方の機序によって治療効果を発揮していると考えられてきた。

今回我々は、加齢黄斑変性 (AMD) , 角膜血管新生, 大腸癌, 線維肉腫, 末梢動脈疾患の計 5 種類のマウスモデルを用いて ivIg の作用機序を検討した。

## 【対象及び方法】

**実験動物** C57BL/6J, *Fcgr1*<sup>-/-</sup>, *Fcgr2*<sup>-/-</sup>, CD-1 ノードマウスの各マウスを用い、各種血管新生マウスモデルを作製し検討を行った。

**角膜血管新生モデル** ナイロン糸をマウス角膜実質に通糸、結紮し、10 日後に角膜平面標本を作製して血管領域 (CD31<sup>+</sup>Lyve1<sup>-</sup>) の割合を測定した。

**脈絡膜血管新生 (CNV) モデル** レーザー光凝固により網膜色素上皮を障害し、7 日後に眼球平面標本を作製して、誘導された CNV の大きさをレーザー共焦点顕微鏡で測定した。

**下肢虚血性血管新生モデル** 片側の近位大腿動脈を結紮し、7 日後に結紮部位より遠位の筋組織を採取して免疫染色により血管量を測定した。また、カラーレーザードップラーを用いて虚血の程度を分析した。

**腫瘍モデル** 腫瘍異種移植としてヒト大腸癌細胞 (HTC-116) を CD-1 ノードマウスの右側腹に、また、腫瘍同種移植としてマウス線維肉腫細胞を野生型マウス及び *Fcgr1*<sup>-/-</sup>マウスの右側腹に皮下注射した。腫瘍の発育を経時的に観察して体積を計算した。

**薬剤投与** ヒト ivIg を尾静脈注射による全身投与 (0.017-2g/kg 体重/回) と硝子体注射による局所投与により検討した。対照としてリン酸塩緩衝溶液 (PBS) を用いた。角膜血管新生, CNV, 下肢虚血の各モデルにおいては、各手術直後および 3 日後に全身投与した。腫瘍モデルでは週 2 回の全身投与を行った。CNV モデルではレーザー手術直後に ivIg (40 μg, 1 μl) を硝子体注射し局所投与の効果も検討した。

## 【結果】

角膜血管新生モデルと CNV モデルでは、ivIg を全身投与した群は血管新生が抑制された。(図 1a-g) また、腫瘍モデルにおいて ivIg 投与群の腫瘍体積は減少した。(図 1h,i) 下肢虚血モデルで、レーザードップラーイメージにおいて筋血管の環流量は減少し、(図 1j,k) 血管新生に重要な役割を果たす F4/80<sup>+</sup>マクロファージが野生型マウスの虚血下肢へ浸潤することを抑制した。(補足 図 1)

CNVモデルと腫瘍モデルの野生型マウスにおいて、ivIgの抗血管新生作用は臨床用量(0.017-2g/kg)に相当する投与量で観察され、用量依存性であった。(図1e, g, i, l) またCNVモデルでivIgの硝子体注射を行った所、全身投与と同様の抗血管新生作用がみられた。

次にivIgをタンパク分解酵素のパパインで処理し、Fc部分(ivIg-Fc)とFab部分(ivIg-Fab)を作製し、CNVモデルと腫瘍モデルの野生型マウスに全身投与した。ivIg-Fcは抗血管新生作用を示したのに対して、ivIg-Fabは示さなかった。(図2a, b, c)

さらに、ivIgの主要な受容体であると考えられるFcγRIをノックアウトした*FcγRI*<sup>-/-</sup>マウスと、FcγRを活性化するシグナル伝達が欠損している*FcγRI*<sup>-/-</sup>マウスにおいて、ivIgおよびivIg-Fcは血管新生を抑制しなかった。(図2g, h) また、*FcγRI*<sup>-/-</sup>マウスにおいて、腫瘍の発育は抑制されなかった。(図2f)

ivIgを全身投与後、ELISA法により角膜、網膜、脈絡膜組織のヒトIgG量を測定したところ、マウスFcγRIに結合する高親和性IgGである内在性マウスIgG2cと比べて組織内のヒトIgGははるかに高濃度で存在しており、投与したivIgの組織移行が確認された。(図3a)

野生型マウスの角膜血管新生モデルで、ivIgの全身投与後に、角膜組織内でivIgがFcγRIと結合しているのをプルダウンアッセイによって確認した。(図3d) 以上から、ivIgはFcγRIを介して血管新生を抑制することが示唆された。

マウスFcγRの代わりにヒトFcγRを発現しているFcγRヒト化マウスを用いて実験を行った。野生型マウスにおいてみられたのと同程度にCNVと角膜血管新生を抑制した。(図4a, b) 次に、ヒトFcγRIをコードする遺伝子である*FCGR1A*を標的とするsiRNAの硝子体注射に付随してivIgを投与した。ivIgはFcγRヒト化マウスにおいて抗血管新生作用を示さなかった。(図4c) またFcγRヒト化マウスの角膜と白血球において、ivIgはFcγRIのリン酸化を誘導した。(図4d, e)

ivIg治療前後の腎移植患者の腎と炎症性筋疾患患者の筋組織の生検標本を検討したところ、ivIg治療後の患者では血管密度の減少がみられた。一方で、ivIgの代替治療である血漿交換治療を受けた患者の腎の血管密度に減少はみられなかった。(図4f-i)

これらのデータは、遺伝的に多様な異なる国の患者から得られたものであり、ヒトにおける治療容量のivIgが、血管密度に影響を与え得ることを示している。

## 【考察】

我々は他の報告で(Human IgG1 antibodies suppress angiogenesis in a target-independent manner), 臨床で用いられている様々なヒトIgG1抗体製剤が、IgG1の高親和性レセプター受容体であるFcγRIを介して、血管新生を抑制する事を示した。

我々は今回、5種類のマウスモデルにおいて、IgG1抗体製剤と同様に、ivIgのFc

部分が **FcγRI** を介して眼，筋，腫瘍における血管新生を抑制することを示した．これは，様々なタイプの血管と組織の環境下で，広域の抗血管新生作用を持つことを示していると考えられた．さらに，腎移植患者と炎症性筋疾患患者のデータは，治療用量の **ivIg** によってヒトにおいても抗血管新生作用があることを示唆している．

**ivIg** は動物モデルでもヒトにおいても腫瘍の転移を抑制すると報告されてきた．我々は最近，ヒト **IgG1** が，血管新生部位へのマクロファージの遊走と浸潤を **FcγRI** を介して減少させることを示した．今回我々は，虚血モデルマウスの筋組織において **ivIg** の投与によりマクロファージの遊走が抑制されることを示した．腫瘍関連マクロファージの腫瘍への浸潤は，癌血管と癌の進行度と関連しているため，その様な **ivIg** の作用メカニズムが，我々が観察した腫瘍体積の減少に寄与しているのかもしれない．

先進国における高齢者の主な失明原因となっている **AMD** に対して，現在の所，ベバシズマブ，ラニズマブ，アフリベルセプト等の抗 **VEGF** 製剤を毎月眼内注射する治療法が標準で，治療費が高価である上に効果がない場合もある．**ivIg** は抗 **VEGF** 製剤とは異なる機序で血管新生を抑制するようであり，より多くの患者を救える可能性を示した．

#### **【結語】**

今回我々は **ivIg** の抗血管新生作用を見出した，これは，加齢黄斑変性，増殖糖尿病網膜症，未熟児網膜症などの，失明を引き起こす新生血管疾患の眼内治療薬として応用できる可能性を示唆した．