抗 ICAM-1 抗体—発現ベクター複合体を用いた 慢性関節リウマチ滑膜細胞への遺伝子導入

齋藤 和義・藤井 幸一

栗津 雄一郎・中山田 真吾・中野 和久

麻生 めぐみ・大田 俊行^{1*}・田中 良哉

Jpn. J. Clin. Immun., 23 (6) : 533~537, 2000.

Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) mediated gene delivery to rheumatoid synovial cells using the Fab fragments of anti-ICAM-1 monoclonal antibody

Kazuyoshi Saito, Koichi Fujii,

Yuichiro Awazu, Shingo Nakayamada, Kazuhisa Nakano,

Megumi Aso, Toshiyuki Ota^{1*} and Yoshiya Tanaka

First Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Japan

^{1*}*Clinical Laboratory, University Hospital of Occupational and Environmental Health, Japan*

I. はじめに

慢性関節リウマチ (RA) は、進行性の慢性炎症性疾患で、罹患者にしばしば著しい日常生活制限をもたらす。近年、Disease modifying anti-rheumatic drug (DMARD) を駆使することにより、治療効果は向上しつつある。しかしながら、escape 現象により治療効果が減弱したり薬剤不応性の症例も多く存在しており、新たな治療法が模索されている。罹患関節における主たる病態は、炎症性細胞の浸潤と滑膜線維芽細胞の増殖である。

我々は、RA 炎症滑膜において、リンパ球、単球、滑膜細胞、骨芽細胞などの細胞間接着が細胞相互の活性化をもたらす、炎症病態形成に関与することを見出し、この事実を裏づけるように、

ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1) などに対する抗接着分子抗体の *in vivo* 投与が、RA 動物モデルにおき有効であることが報告されている⁴⁻⁶⁾。一方、ウイルスベクターを用いた遺伝子治療も試みられており、動物モデルにおいては効果が認められている。最近、抗体をキャリアとして、DNA を抗原特異的に delivery する手法 (Antifection, Immunogene therapy) が開発され、この手法により *in vivo* に stable な遺伝子発現が可能であることが報告されている。

我々はこの手法に着目し、抗 ICAM-1 抗体の細胞接着阻害による抗炎症作用を維持したまま、この抗体をキャリアとして過剰に ICAM-1 を発現している滑膜炎症局所で、抗炎症性サイトカインが効果的に発現するような RA に対する遺伝子療法を確立することを目的とし、以下の検討を行った。

II. 抗 ICAM-1 抗体-DNA 複合体による遺伝子導入

1. 抗 ICAM-1 抗体-DNA 複合体の作成

清水らの報告をもとに抗体-DNA 複合体を作成した⁷⁾。2価架橋剤 N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP) を用いて抗ヒト ICAM-1 抗体 (84 H 10) と poly (L-lysine) を架橋し poly (L-lysine) 修飾抗体を作成する。この poly (L-lysine) 修飾抗体と発現ベクター DNA をインキュベートして抗体-DNA 複合体を作成する。発現ベクターとしてルシフェラーゼ発現ベクター pGL 3, ヒト IL-10 発現ベクターをもちいた。

2. ICAM-1-COS 細胞をもちいた抗体-DNA 複合体による遺伝子導入

ICAM-1-COS 細胞 (ヒト ICAM-1 発現ベクターを stable transfect した COS 細胞) に抗 ICAM-1 抗体-pGL 3 複合体を添加し、48 時間培養後の細胞内ルシフェラーゼ活性を測定したところ、4 μ g 添加にて有意なルシフェラーゼ活性を認めた。さらに抗体-DNA 複合体作成の過程での ① 抗体の性状 (intact IgG あるいは Fab fragment) ② 複合体形成の際の抗体:DNA 混合最適比につき検討を行った。まず、抗 ICAM-1 抗体をペプシンにて消化し Fab フラグメントとして、これと pGL 3 との複合体を作成し同様の

検討を行ったところ、intact の IgG との複合体添加時の約 50 倍の遺伝子導入効率を得られた。抗体-DNA 複合体添加後、少なくとも 72 時間までルシフェラーゼ活性は増強していくことがわかった (図 1)。

また、抗体-DNA 複合体を作成するときの poly (L-lysine) 修飾抗体と発現ベクター DNA の混合比について検討を加えたところ、修飾抗体:DNA 比が 1:8 でインキュベートしたときの複合体が、最も高い遺伝子導入効率を示した。

次に、本法による遺伝子導入が ICAM-1 分子を介して細胞内遺伝子導入が行われているかを確認するために、2つの検討を加えた。まず、ICAM-1 分子を発現していない COS 細胞に抗 ICAM-1 抗体-pGL 3 複合体を添加したが、細胞内ルシフェラーゼ活性は認められなかった。次に、抗 ICAM-1 抗体-pGL 3 複合体による遺伝子導入を非修飾抗 ICAM-1 抗体が阻害するかを検討した。その結果、共存させた抗 ICAM-1 抗体の容量依存性にルシフェラーゼ活性は低下しており、非修飾抗体により遺伝子導入は競合阻害されることが確認された。

3. RA 患者由来滑膜細胞株への遺伝子導入

次に、遺伝子導入する細胞として、細胞上に ICAM-1 分子を強く発現していることが確認されている RA 患者由来の滑膜細胞株 E 11 をもちいて遺伝子導入を試みた。抗 ICAM-1 抗体と結合させる

図 1 抗 ICAM-1 抗体-ルシフェラーゼ発現ベクター pGL 3 複合体による遺伝子導入
抗 ICAM-1 抗体-ルシフェラーゼ発現ベクター pGL 3 複合体を ICAM-1 COS 細胞に添加し培養した。経時的に細胞内ルシフェラーゼ活性を測定し、Relative Light Unit として示した。

図2 抗 ICAM-1 抗体 (Fab)-hIL-10 発現ベクター複合体による遺伝子導入

抗 ICAM-1 抗体 (Fab)-hIL-10 発現ベクター複合体を COS, ICAM-1 COS, 慢性関節リウマチ滑膜細胞株 E11 細胞に添加し 72 時間培養した。培養上清中の IL-10 を ELISA 法にて測定した。

DNA として、抗炎症性サイトカインのひとつである IL-10 の発現遺伝子をもちいた。複合体添加後、72 時間の細胞上清中の IL-10 を ELISA 法にて測定した。遺伝子導入前の E11 細胞培養上清中には IL-10 は検出されないが、抗体-DNA 複合体添加 48 時間後より細胞上清には有意な IL-10 が認められることを確認した (図2)。この IL-10 産生は ICAM-1-COS 細胞への遺伝子導入時と比べるとかなり弱いものではあったが、その産生は少なくとも 96 時間後まで経時的に上昇していた。以上の検討により、抗体-DNA 複合体は、細胞膜上の ICAM-1 との結合を介して細胞内に入り、遺伝子発現をもたらすことが明らかとなった。最後に、作成した抗 ICAM-1 抗体-DNA 複合体が、非修飾抗体同様の細胞接着阻止能を維持しているかにつき検討した。RA 滑膜細胞に ^{51}Cr にラベルした PMA 刺激末梢血リンパ球を添加し、細胞接着率を測定した。抗体-DNA 複合体は、両細胞間の細胞接着を非修飾の抗 ICAM-1 抗体とほぼ同程度に抑制し得た。この結果より、抗 ICAM-1 抗体-DNA 複合体は、抗 ICAM-1 抗体を *in vivo* で投与したときに認める抗炎症作用を維持していることが推測された。

III. 抗体-DNA 複合体による 遺伝子導入の特徴

本法による遺伝子導入法の大きな特徴は、1) 抗原特異的に遺伝子導入が可能 2) 生理的に生じる endocytosis により、遺伝子が細胞内に導入されることより、細胞障害性が低い 3) 遺伝子導入する核酸に

関して長さなどの制限が少ないなどである。特に抗原特異的に遺伝子導入できる点は大きな長所であり、特定の分子を発現している細胞のみに遺伝子導入し得る。発現ベクターに組織特異的プロモーターをもちいると、さらに細胞特異的に遺伝子を発現させうものと考えられる。RA 滑膜の炎症部位に存在する血管内皮細胞や滑膜細胞には、変形性関節症の滑膜組織には認められない ICAM-1 分子の過剰発現が認められる。したがって、本法による遺伝子導入法では、ICAM-1 の過剰に発現している炎症部位の細胞に、より特異的に遺伝子を delivery できる。今後、RA 血管内皮細胞にのみ、あるいは、RA 滑膜細胞のみに発現している分子が同定され、それに対する抗体が作成されるようになると、さらにこの抗体をキャリアーとして、RA 滑膜炎部位特異的にベクターを導入し得る可能性がある。

今回の検討では、抗炎症性サイトカインの一つである IL-10 の発現を観察したが、IL-1 receptor antagonist, 可溶性 TNF α 受容体, ヒト型抗 TNF α 抗体などの生物学的抗炎症物質や、細胞周期阻害・アポトーシス誘導に関与する蛋白を炎症局所の滑膜細胞などに発現させ、滑膜の増殖・炎症の進展を阻止し得る可能性を秘める。発現ベクターと抗体さえあれば、これらの抗リウマチ作用を担う機能蛋白を単独ではなく、幾つかの蛋白をカクテルとして発現させることも容易であり、極めて応用性・汎用性に富む治療法である。

一方、問題点としては、本法による遺伝子導入の効率はアデノウイルスではほぼ 100%、レトロウイルス

でも数10%の導入効率があるのに対して、5%以下であり導入効率が低い点が短所として挙げられる。また、抗体-DNA複合体作成時、抗体をポリリジンにて修飾する際、両者の量比の至適範囲が狭いなど、予備実験を詳細にする必要がある。また、*in vivo*投与したとき、キャリアーとしての抗体もしくはDNAを抗原として抗体が出現する可能性も考慮に入れる必要がある。

IV. おわりに

近年、抗接着分子抗体による治療、遺伝子治療はそ

れぞれ独立した治療法として有効性が報告されている。抗体-DNA複合体による治療は、双方の長所を維持したまま相乗的效果が期待される治療である。さらに、キャリアーとして抗体を用いるためウイルスを用いたときに生じるベクターの増殖などの危険性は問題とならない。既に、Ferkolらは、本法によりマウスを用いて遺伝子発現が長期にわたり観察されることを報告している¹¹⁾。今後、我々も遺伝子導入効率をさらに向上させ、Type II collagen誘発関節炎マウスやRA滑膜移植ヌードマウスなどのRA実験モデルをもちいての治療効果検討を行いたいと考える。

文 献

- 1) Tanaka, Y., Morimoto, I., Nakano, Y., Okada, Y., Hirota, S., Nomura, S., Nakamura, T., Eto, S.: Osteoblasts are regulated by the cellular adhesion through ICAM-1 and VCAM-1. *J. Bone. Miner. Res.*, 10: 1462~1469, 1995.
- 2) Koyama, Y., Tanaka, Y., Saito, K., Abe, M., Nakatsuka, K., Morimoto, I., Auron, P.E., Eto, S.: Cross-linking of intercellular adhesion molecule 1 (CD 54) induces AP-1 activation and IL-1 beta transcription. *J. Immunol.*, 157: 5097~5103, 1996.
- 3) Nakatsuka, K., Tanaka, Y., Hubscher, S., Abe, M., Wake, A., Saito, K., Morimoto, I., Eto, S.: Rheumatoid synovial fibroblasts are stimulated by the cellular adhesion to T cells through lymphocyte function associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1. *J. Rheumatol.*, 24: 458~264, 1997.
- 4) Kavanaugh, A.F., Davis, L.S., Nichols, L.A., Norris, S.H., Rothlein, R., Scharschmidt, L. A., Lipsky, P.E.: Treatment of refractory rheumatoid arthritis with a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule 1. *Arthritis. Rheum.*, 37: 992~999, 1994.
- 5) Kavanaugh, A.F., Davis, L.S., Jain, R.I., Nichols, L.A., Norris, S.H., Lipsky, P.E.: Phase I/II open label study of the safety and efficacy of an anti-ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1; CD 54) monoclonal antibody in early rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, 23: 1338~1344, 1996.
- 6) Kavanaugh, A.F., Schulze, Koops, H., Davis, L.S., Lipsky, P.E.: Repeat treatment of rheumatoid arthritis patients with a murine anti-intercellular adhesion molecule 1 monoclonal antibody. *Arthritis. Rheum.*, 40: 849~853, 1997.
- 7) Chen, J., Gamou, S., Takayanagi, A., Shimizu, N.: A novel gene delivery system using EGF receptor-mediated endocytosis. *FEBS. Lett.*, 338: 167~169, 1994.
- 8) Shimizu, N., Chen, J., Gamou, S., Takayanagi, A.: Immunogene approach toward cancer therapy using erythrocyte growth factor receptor-mediated gene delivery. *Cancer. Gene. Ther.*, 3: 113~120, 1996.
- 9) Chen, J., Gamou, S., Takayanagi, A., Ohtake, Y., Ohtsubo, M., Shimizu, N.: Targeted *in vivo* delivery of therapeutic gene into experimental squamous cell carcinomas using anti-epidermal growth factor receptor antibody: immunogene approach. *Hum. Gene. Ther.*, 9: 2673~2681, 1998.
- 10) Chen, J., Gamou, S., Takayanagi, A., Ohtake, Y., Ohtsubo, M., Shimizu, N.: Receptor-mediated gene delivery using the Fab fragments of anti-epidermal growth factor receptor antibodies: improved immunogene approach. *Cancer. Gene. Ther.*, 5: 357~364,

- 1998.
- 11) Ferkol, T., Perales, J.C., Eckman, E., Kaetzel, C.S., Hanson, R.W., Davis, P.B. : Gene transfer into the airway epithelium of animals by targeting the polymeric immunoglobulin receptor. *J. Clin. Invest.*, 95 : 493~502, 1995.
-