

IL-6 阻害剤の研究

保 川 清
 齋 藤 司
 二 木 輔
 鈴 木 浩

A Research on Inhibitor of Interleukin-6

Kiyoshi YASUKAWA
 Takashi SAITO
 Kensuke FUTATSUGI
 Hiroshi SUZUKI

Interleukin-6 (IL-6) is a key molecule in the immune system, acute phase reaction and hematopoiesis. For the patients suffering from rheumatoid arthritis or AIDS, aberrant production of IL-6 has been shown to be pathogenetically related to multiple myeloma and some autoimmune diseases, suggesting possible clinical uses of inhibitors of IL-6 for the treatment of these diseases.

We have conducted the extensive researches on the inhibitors of IL-6; the genetically engineered soluble human IL-6 receptor, modified soluble human IL-6 receptor, antibodies to human IL-6 receptor and genetically engineered soluble human gp 130 have been prepared and their effects to inhibit IL-6 activity evaluated. Some of anti-human IL-6 receptor antibodies have been found to inhibit effectively the IL-6 activity.

1. はじめに

インターフェロン α , β , γ , CSF 類, インターロイキン 1~11, エリスロポイエチン等は生体中に存在するサイトカインと呼ばれる微量タンパク質で, 細胞膜上の受容体 (レセプター) タンパク質に結合することにより, 種々の重要な生理活性 (細胞が増殖する等) を担っている。

遺伝子工学の進歩により, これらサイトカインやレセプターの組み換え体 (リコンビナント) 蛋白質が大量に生産できるようになった。現在, サイトカインやレセプターの, 診断薬や医薬としての開発がさかんに行われている。すでにインターフェロンが B 型肝炎の治療薬として, エリスロポイエチンが造血剤として認可された。

インターロイキン-6 (IL-6)¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾ は生体内で, B リンパ球には抗体の産生⁶⁾, 骨髄細胞には血小板への分化⁷⁾⁸⁾, 肝臓細胞には急性期タンパク質の産生等⁹⁾ を誘導する。医薬への応用としては, 癌の放射線治療の副作用として起こる血小板減少に対して有用であると考えられる。一方, ミエローマ (骨髄性白血病) では IL-6 の過剰産生が病気の原因であること¹⁰⁾, リューマチ等の自己免疫疾患では IL-6 の過剰産生が病状と深く関係している¹¹⁾ ことが示された。したがって IL-6 の作用を阻害する薬剤は, これらの疾患の治療薬として期待される。なお, ミエローマやリューマチは何らかの原因 (例えばウイルス感染) で IL-6 が過剰産生になるのであり, IL-6 を投与しすぎるとミエローマや自己免疫疾患になるというわけではない。また IL-6 は, 上記のような種

々の生理活性を担っているが、これらは他のサイトカインでも代替できると考えられるので、IL-6 阻害剤を投与すると抗体産生ができなくなるというわけではない。

我々は IL-6 阻害剤の研究を行ってきた。これまでに

- 1) 可溶性 IL-6 レセプター,
 - 2) 変異型可溶性 IL-6 レセプター,
 - 3) IL-6 レセプターに対する抗体,
 - 4) 可溶性 gp130
 - 5) gp130 に対する抗体
- をそれぞれ IL-6 阻害剤として適当かどうかを検討してきた結果,

- i) 可溶性 IL-6 レセプターと
- ii) 変異型可溶性 IL-6 レセプターについては不適當であること,
- iii) IL-6 レセプターに対する抗体が適當であることを見いだした。
- iv) 可溶性 gp130 と
- v) gp130 に対する抗体は検討中である。我々の IL-6 阻害剤の研究の流れを以下にまとめてみた。

2. ヒト IL-6 の遺伝子工学的生産

IL-6 の阻害剤を研究するためには、大量のリコンビナントヒト IL-6 が必要である。我々は、ヒト IL-6 を大腸菌で生産することに成功した¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾。

まず IL-6 を大腸菌で発現させるためのプラスミド pGBS-4 を作製した (Fig. 1)。pGBS4 は、trp プロモーターの下流に、開始コドン ATG、及び、hGH ポリペプチド、トロンビン認識配列 (Pro-Arg)、IL-6 をコードする塩基配列が続く。pGBS4 からは IL-6 が hGH (ヒト成長ホルモン) との融合タンパク質として発現され、配列特異的エンドペプチダーゼであるトロンビンにより、hGH 由来のポリペプチドと IL-6 に分離されるようにデザインされている。

次に大量培養を行った。pGBS-4 で形質転換された RB791 株を 15 リットルファーメンターを用いて LB-Amp 培地で培養し、600 nm の吸収が 2~3 に達したところで、IAA (インドールアクリル酸) を加え、6 時間後に大腸菌を集めた。

菌体からの IL-6 の精製、活性の回復は以下のように行った。菌体は、超音波破砕処理後、8 M 尿素で可溶化し、透析で尿素を 1 M まで落としてから、トロンビンで切断した。処理物は 6 M 塩酸グアニジンで変性後、透析で塩酸グアニジンを除き、リフォールディングを行った。さらに硫酸分画を行い、最終的に SDS-PAGE

で均一な IL-6 を得た (Fig. 2)。

精製した IL-6 は天然の IL-6 と同一の生物活性を示

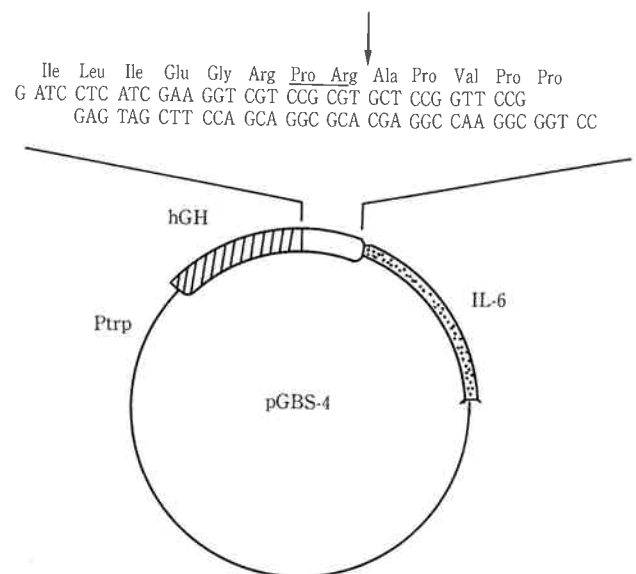


Fig. 1. Structure of pGBS-4

The shaded region represents the *EcoRI*-*BamHI* fragment of pBSF-2.38 (Hirano et al., 1986) containing IL-6 cDNA. The arrow indicates the cleavage site for thrombin, and the underling shows the thrombin site. The open region represents that derived from synthetic oligonucleotide.

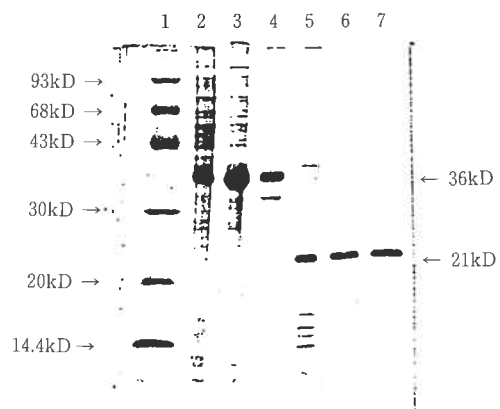


Fig. 2. SDS-PAGE analysis

The protein was analyzed by electrophoresis on a 0.1% SDS/15% polyacrylamide gel under reducing condition. Mw (kDa) of standards are shown to the left. Lane 1, marker; lane 2, total proteins obtained from *E. coli* RB791 transformed with pGBS-4; lane 3, the centrifuged pellet after homogenization; lane 4, refolded extract by urea; lane 5, thrombin treated extract; lane 6, refolded extract by guanidine; lane 7, the purified IL-6 after ammonium sulfate fractionation.

した。

3. 可溶性ヒト IL-6 レセプターの遺伝子工学的生産

IL-6 は、細胞膜上の IL-6 レセプターと結合することにより、シグナルを伝達すると考えられる。したがって細胞膜結合領域及び細胞内領域の欠失した可溶性 IL-6 レセプターは、IL-6 との結合能を保持していれば、細胞膜上の IL-6 レセプターと結合する IL-6 の数を減少させ、最終的に IL-6 作用を阻害することが期待される (Fig. 3)。実際、可溶性レセプターによる阻害が IL-1 や IL-4 で示されている。我々は、可能性ヒト IL-6 レセプターを CHO 細胞で生産することに成功した¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾。

最初に CHO 細胞での可能性ヒト IL-6 レセプター発現用プラスミド pECEdhfr344 を以下の手順で作製した。まず、プラスミド pBSF2R. 236¹⁸⁾ を Sph I により切断して、IL-6 レセプター N 末端側の 402 個のアミノ酸をコードする部分を含む cDNA 断片を得た。これを M13mp18 に挿入した後、オリゴヌクレオチド 5' ATATTCTCTAGAGAGATTCT 3' を用いて、部位特異的インビトロ変異体作製システムにより、345 番目のアミノ酸をコードする DNA を終止コドンに変換し、mp18-344 を作製した。次に、SV40 初期プロモーター及び後期プロモーターを有するプラスミド pECE¹⁹⁾ の PvuII 部位に pSV2-dhfr²⁰⁾ の dhfr 遺伝子を挿入し、pECEdhfr を作製した。これを HindIII 及び Sal I により切断し、mp18-344 2 本鎖 DNA の HindIII-Sal I 断片 (1200 bp) を挿入し、pECEdhfr344 を作製した (Fig. 4)。

次に可溶性ヒト IL-6 レセプター高発現 CHO 細胞株を以下の手順で樹立した。pECEdhfr344 を Chen らの方法²¹⁾ により、dhfr 遺伝子欠損 CHO 細胞株 DXB-

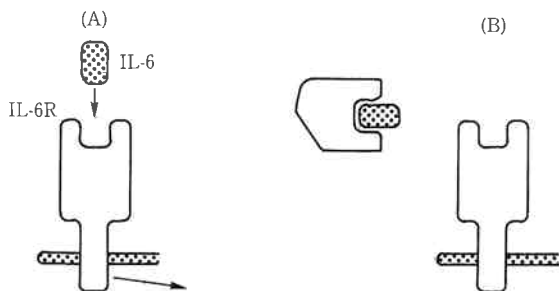


Fig. 3 (A) IL-6 binds to IL-6 receptor and mediates its function.
(B) sIL-6R inhibits the function of IL-6

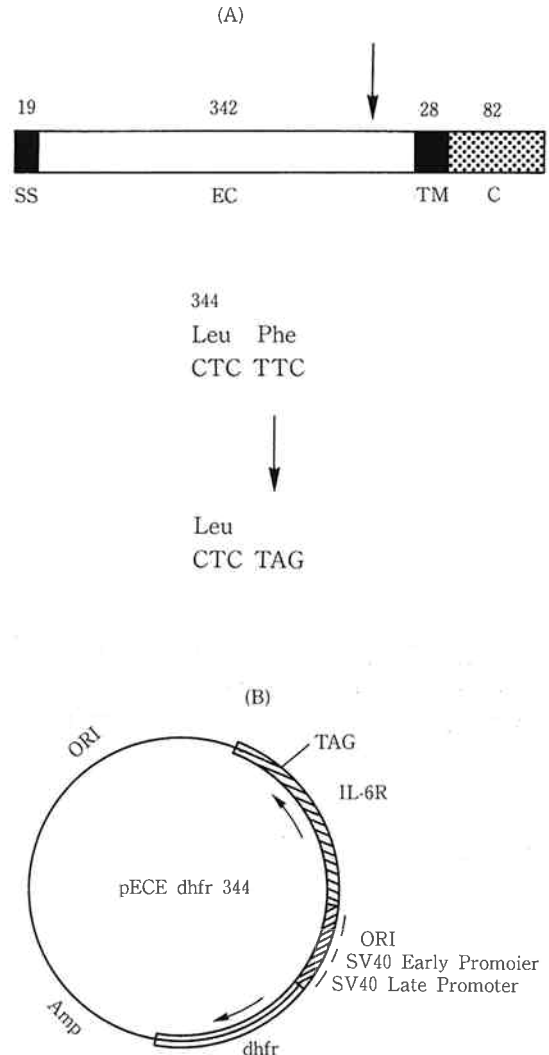


Fig. 4 (A) Insertion of stop codon into human IL-6R cDNA.
(B) Structure of pECEdhfr344.

11²²⁾ に導入し、メソトレキセート (MTX) でスクリーニングをした。培養上清中の可溶性ヒト IL-6 レセプターの検出は、抗ヒト IL-6 レセプターモノクローナル抗体 MT18²³⁾ と ¹²⁵I 標識の IL-6 のサンドイッチ検出法を用いた。最終的に可溶性ヒト IL-6 レセプター高発現 CHO 細胞株 5E27 を樹立した。

現在、可溶性ヒト IL-6 レセプターを下記の方法で大量培養している。5E27 を 10 層式細胞培養装置セルファクトリー (Nunc 社) を用いて、10% 牛胎児血清入 α-MEM 培地 2 リットルで密な状態まで培養後、培地を除き、PBS で洗浄後、MEM non-essential amino acid solution (シグマ社) 及び L-グルタミン (シグマ社) を含むエスロン SF-0 無血清培地 (三光純薬) 2 リットルに置換し培養した。3 日後、培養上清を回収し、新たな 2 リットルの SF-0 培地でさらに 3 日間培養

した。こうして計4リットルの培養上清を得た。

可溶性ヒト IL-6 レセプターの精製は、カラムクロマトグラフィーを用い、以下のように行った。まず、遠心分離機で 6000 rpm, 10分間遠心し沈澱を除き、0.22 μ m のフィルターで濾過した。濾過液を排除分子量1万の中空糸用限外濾過システム (東ソー) を用いて、500 ml まで濃縮した。濃縮液は、TSKgel Blue 5PW (東ソー) にかけて、10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 存在下で、3M KCl, 0M KSCN から 0M KCl, 3M KSCN の塩濃度勾配により溶出した。活性画分を集め、10 mM Tris-HCl に透析した後、TSKgel DEAE 5PW (東ソー) にかけて、10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 存在下で、0M NaCl から 1M NaCl の塩濃度勾配により溶出した。再び活性画分を集め、濃縮及び 10 mM リン酸バッファ (pH 7.0) に透析後、TSKgel G3000SW (東ソー) にかけて。活性画分を集めることにより、可溶性ヒト IL-6 レセプター精製品を得た。Fig. 5 は Blue 5PW カラムクロマトグ

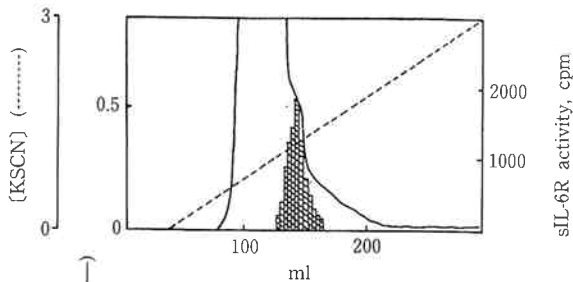
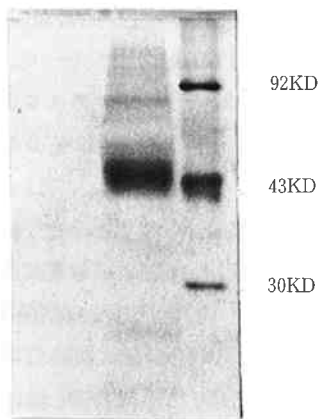


Fig. 5 Affinity HPLC pattern of concentrated serum-free culture medium of 5E27 cells.



20
NH₂-Leu-Ala-
Fig. 6 SDS-PAGE of purified sIL-6R.

ラフィーの溶出パターンを、Fig. 6 は可溶性ヒト IL-6 レセプター精製品の SDS-PAGE のパターンを示す。

4. 可溶性ヒト IL-6 レセプターの IL-6 増強効果、及び第2のレセプター gp130 の発見

IL-6 のシグナル伝達システムのモデルとして Fig. 3 が当時受けいれられており、可溶性ヒト IL-6 レセプターは IL-6 作用を阻害すると予想された。ところが、実際に評価してみると、可溶性ヒト IL-6 レセプターは IL-6 作用を阻害するどころか、IL-6 存在下で逆に IL-6 作用を増強することがわかった。そして可溶性ヒト IL-6 レセプターを用いた種々の研究の結果より、第2のレセプター gp130 (糖タンパク質で見かけ上の分子量が13万という意味) の存在が発見され²⁴⁾²⁵⁾、IL-6 のシグナル伝達システムの新たなモデルとして新たに Fig. 7 が提唱されるようになった。可溶性ヒト IL-6 レセプターが IL-6 作用を増強することは、以下の実験により示された。マウス白血病細胞株 M1²⁶⁾ は、IL-6 により分化が誘導され、増殖が阻害されることが知られている²⁷⁾。M1 細胞 (10⁵ 細胞/ml, 0.2 ml/well) を 20 ng/ml の IL-6 存在下、あるいは非存在下で、種々の

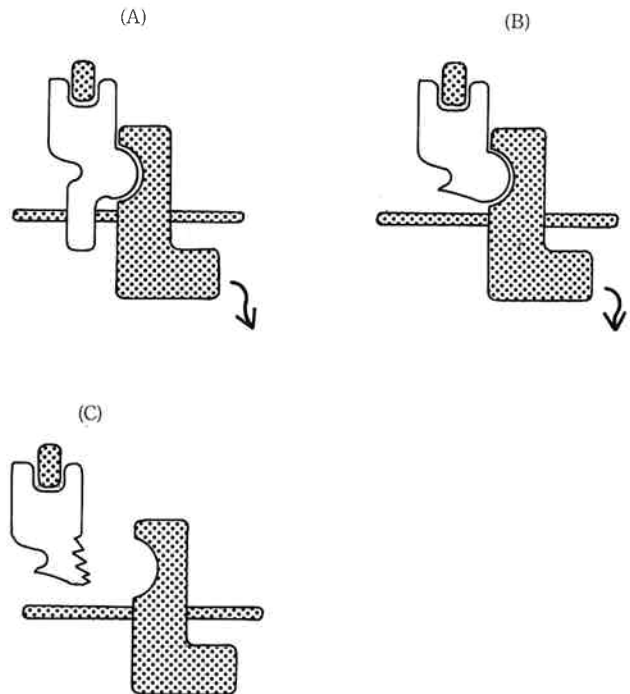


Fig. 7 (A) IL-6-bound-IL-6 receptor associates gp130 and mediates its function.
(B) IL-6-bound-soluble IL-6 receptor associates gp130 and mediates its function.
(C) The mutant of sIL-6R inhibits the function of IL-6.

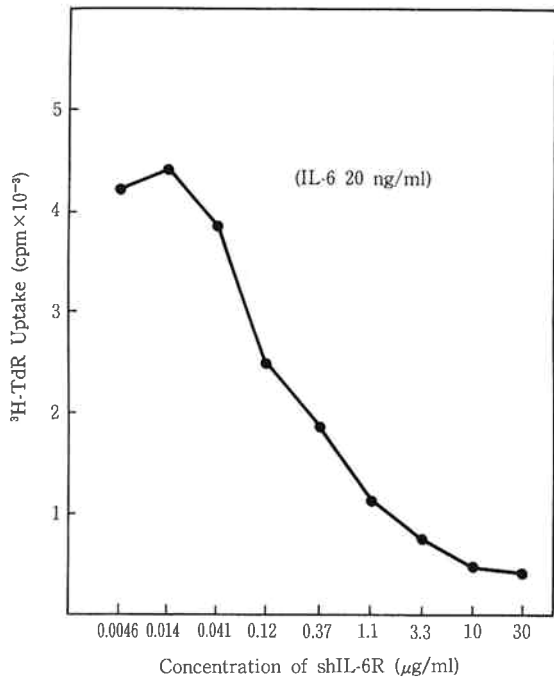


Fig. 8 Agonistic effect of shIL-6R in IL-6-mediated growth inhibition of M1 cells.

濃度の可溶性ヒト IL-6 レセプターを加えて培養した。培養開始60~70時間後にトリチウムチミジン (750 nCi/well) をパルス処理し、その後細胞を集め取り込まれた放射能を測定した。Fig. 8 に示されるように、IL-6 存在下で、可溶性ヒト IL-6 レセプターは、IL-6 作用を増強する (この場合は細胞の増殖を阻害する) ことがわかった。このような可溶性ヒト IL-6 レセプターによる IL-6 増強効果は、抗体産生誘導や骨髄細胞増殖の系でも観察された。

5. IL-6 作用を阻害する変異型可溶性ヒト IL-6 レセプターの作製の試み

可溶性ヒト IL-6 レセプターは IL-6 非存在下では gp130 と結合しない。しかし、Fig. 7 に示すように可溶性ヒト IL-6 レセプターは、IL-6 存在下では IL-6 と結合後、一部構造が変わり、gp130 と結合できるようになる。したがって Fig. 7 に示すように、可能性ヒト IL-6 レセプターに1~数個のアミノ酸残基の変異を導入し、IL-6 との結合能を保持し、IL-6 と結合後 gp130 と結合できないような変異型可溶性ヒト IL-6 レセプターを作製できれば、IL-6 阻害作用を有することが期待できる。我々は、遺伝子レベルで変異を導入し、1~2個のアミノ酸残基の置換した、あるいは一定の部分ペプチドが欠失した変異型可溶性ヒト IL-6 レセプターを52種類作製した。そしてそれを発現させ、IL-6 阻害効果を調べたが、IL-6 阻害効果を有するものはな

Table 1 Summary of soluble IL-6 receptor mutants.

No.	Mutation	Binding to IL-6	Inhibition for IL-6
	d 30, 254	-	-
	d 30, 233	-	-
	d 30, 147	-	-
	d 147, 161	-	-
	d 177, 184	-	-
	d 194, 204	-	-
	d 204, 210	-	-
	d 216, 225	-	-
	d 227, 239	-	-
	d 236, 243	-	-
	d 248, 255	-	-
	d 270, 274	-	-
dex3	d 116, 148	-	-
dex4	d 160, 212	-	-
dex5	d 220, 267	-	-
33	113 V P > G T	+	-
35	125 S P > I S	-	-
14	129 D V > K L	+	-
36	135 G P > S T	+	-
15	145 K A > R P	+	-
16	153 F > L	+	-
17	160 D F > E L	+	-
18	162 Q E > L Q	+	-
39	169 Q E > L Q	+	-
19	174 F > I	+	-
20	185 S S > R P	+	-
21	201 K F > H L	+	-
42	201 K F > E L	+	-
43	204 K T > R S	+	-
22	212 G I > E F	+	-
23	220 A N > V D	+	-
24	232 R > S	+	-
46	240 D P > N A	-	-
47	247 S F > A V	-	-
25	250 R L > S I	-	-
48	254 E L > V H	-	-
26	254 Q > A	+	-
27	260 Q R > A G	+	-
28	263 K T > N A	-	-
29	271 K D > R Y	+	-
49	274 Q H > L Q	-	-
50	278 V I > G H	-	-
51	281 D A > V D	-	-
52	288 H V > Y L	+	-
30	291 Q > K	-	-
54	293 R A > G N	-	-
55	297 E F > A I	-	-
56	301 G E > V D	-	-
31	305 E W > D R	-	-
57	308 P E > L Q	+	-
58	313 T P > K L	-	-
32	321 S P > N S	+	-

く (Table 1), この方法を断念した。

変異型可溶性ヒト IL-6 レセプター遺伝子は以下の手順で作製した。mp18-344 (第3章参照)に、部位特異的インビトロ変異体作製システムにより、種々のアミノ酸残基置換あるいは一定の部分ペプチドの欠失に対応する DNA レベルでの変異をそれぞれ導入した。次に変異型可溶性ヒト IL-6 レセプター遺伝子を動物細胞発現用ベクター pSVL (ファルマシア) に挿入し、変異型可溶性ヒト IL-6 レセプター発現ベクターをそれぞれ作製した。

発現及び評価は以下の手順で行った。まず、上記ベクターを COS1 細胞に導入し、3日後培養上清を集めた。培養上清中の変異型可溶性ヒト IL-6 レセプターの検出は、抗ヒト IL-6 レセプターモノクローナル抗体 MT18²³) を用いた免疫沈降により行った。また、変異型可溶性ヒト IL-6 レセプターの IL-6 との結合能の評価は、MT18 と ¹²⁵I 標識 IL-6 のサンドイッチ検出法により、IL-6 作用の阻害能の評価は、M1 細胞の分化誘導 (第4章参照) に対する阻害効果の検討により、それぞれ行った。

Table 1 に示すように、52種類の変異型可溶性ヒト IL-6 レセプターのうち、30種類について発現が確認され、そのうちの22種類について IL-6 との結合能が確認された。しかしながら、IL-6 阻害効果をもつものはなかった。

IL-6 阻害効果をもつ変異型可溶性ヒト IL-6 レセプターが作製できなかった原因として2つ考えている。ひとつは、IL-6 レセプターの IL-6 結合部位と gp130 結合部位が極めて近く、アミノ酸残基の置換では分離できない場合である。この場合は、この方法では IL-6 阻害効果をもつ変異型可溶性ヒト IL-6 レセプターは作製できないことになる。ふたつめは、IL-6 レセプターの IL-6 結合部位と gp130 結合部位は充分離れており、アミノ酸残基の置換で分離できるが、作製したものの中に IL-6 阻害効果をもつものがなかった場合である。この場合は、さらに多くの変異型を作製することにより IL-6 阻害効果をもつ変異型可溶性ヒト IL-6 レセプターに巡り合えらるゝと考えられる。また現在進行中の IL-6 や IL-6 レセプターの高次構造に関する研究より得られる知見が、IL-6 阻害効果をもつ変異型可能性ヒト IL-6 レセプターの作製に、今後重要になるであろう。

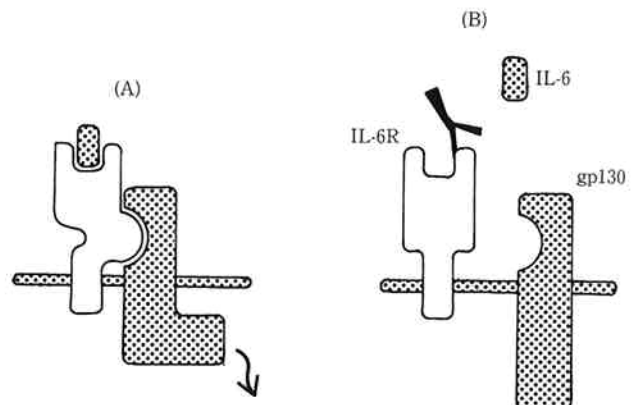


Fig. 9 (A) IL-6-bound-IL-6 receptor associates gp130 and mediates its function.
(B) Anti-IL-6 receptor antibody inhibits the function of IL-6.

6. IL-6 作用を阻害する抗ヒト IL-6 レセプター抗体の作製

可溶性ヒト IL-6 レセプターや変異型可溶性ヒト IL-6 レセプターによる IL-6 作用の阻害が未達成に終わった。次に我々は、Fig. 9 に示されるように、抗ヒト IL-6 レセプター抗体による IL-6 作用の阻害を試みた。

抗体を IL-6 阻害剤として開発する際の問題点として、抗原性と阻害効果が低いことが考えられる。前者は、ヒト由来抗ヒト IL-6 レセプター抗体が原理上作製できず、マウス等の異種動物由来になること、後者は、抗原と抗体の結合定数は、リガンドとレセプターの結合定数より高いことに起因する。また、前者は、V領域がマウスでC領域がヒトのキメラ抗体を作製すること、後者は、多くのモノクローナル抗体をスクリーニングし、IL-6 阻害効果の強い抗体をスクリーニングすることで解決していくしかない。なおリコンビナントヒト IL-6 をマウスに免疫して得られた抗ヒト IL-6 モノクローナル抗体のいくつか²⁸⁾²⁹⁾、及び、細胞膜をマウスに免疫して得られた抗ヒト IL-6 レセプターモノクローナル抗体 PM1²³⁾ が IL-6 作用を *in vitro* で阻害することがすでに知られていた。我々は、可溶性ヒト IL-6 レセプター (第3章参照) をマウスに免疫し、多数のクローンをスクリーニングし、IL-6 阻害効果の強いモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを12株樹立し、5つのグループに分類した。

可溶性 IL-6 レセプターを免疫した Balb/c マウスの脾細胞とミエローマ株 P3U1 を20:1 の割合で融合し、HAT 培地で培養した。まず、培養上清中に抗原である

可溶性 IL-6 レセプターを認識する抗体が産生されているかどうかを調べた結果、2400ウエル中、240ウエルを選抜した。次に、培養上清中の抗可溶性ヒト IL-6 レセプター抗体が IL-6 と IL-6 レセプターの結合を阻害するかどうかを、抗ヒト IL-6 レセプター抗体 MT18 と ^{125}I 標識 IL-6 による可溶性ヒト IL-6 レセプターのサンドイッチの検出に対する阻害効果により調べた結果、240ウエル中、36ウエルを選抜した。続いて、36ウエルをそれぞれ限界希釈した結果、41クローンを樹立した。各クローンの産生する抗体のアイソタイプは、IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM がそれぞれ、36, 2, 1, 2クローンであった。続いて、培養上清中の抗可溶性ヒト IL-6 レセプター抗体の IL-6 作用阻害効果を、B細胞株 CESS に対する抗体産生誘導の阻害効果、及び白血病細胞株 ILKM3 に対する増殖誘導の阻害効果により比較検討結果、41クローン中21クローンを選抜した。この中には、すでに樹立されている抗ヒト IL-6 レセプター抗体産生ハイブリドーマ PM1 を含む。選抜したハイブリドーマは、それぞれマウスに移植して、腹水から抗体を精製した。最後に、精製抗体の IL-6 作用阻害効果を、白血病細胞株 MM-S1 に対する増殖誘導の阻害効果により比較検討結果、21クローン中12クローンを選抜した。選抜した12種からあらゆる2種の組み合わせによるサンドイッチ ELISA で可溶性ヒト IL-6 レセプターが検出できるかどうかをそれぞれ調べた結果、12種の抗体を5つのグループに分類した。(Group I : PM1, 4-16, 5-14, 21-7; Group II : 64-7, 52-4; Group III : 146-15, 169-12, 169-26; Group IV : 12-20, 10-26; Group V : 1-21)

7. 可溶性マウス IL-6 レセプターの遺伝子工学的生産、及び抗マウス IL-6 レセプター抗体の作製

抗ヒト IL-6 レセプター抗体を IL-6 阻害剤として開発していく過程で、ヒトに対するシミュレーションモデルとして、抗マウス IL-6 レセプター抗体を自己免疫疾患マウス等に投与してその効果を調べる研究が重要になる。我々は、可溶性マウス IL-6 レセプターを遺伝子工学的に生産し、それをラットやモルモットに免疫し、抗マウス IL-6 レセプター抗体を作製³⁰⁾³¹⁾した。

最初に CHO 細胞での可溶性マウス IL-6 レセプター発現用プラスミド pdRsmIL6R324 を以下の手順で作製した。まず、プラスミド Lambda P1³²⁾ を EcoR I により切断して、マウス IL-6 レセプターをコードする 1470 pb

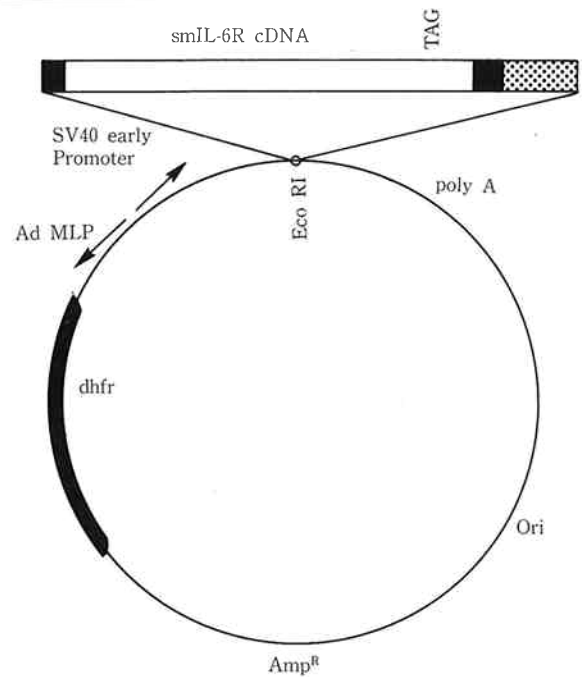


Fig. 10 Structure of pdRsmIL6R324.

の cDNA 断片を得た。これを M13mp18 に挿入した後、オリゴヌクレオチド 5' AATCCTCTAGAACCCCA 3' を用いて、部位特異的インビトロ変異体作製システムにより、325番目のアミノ酸をコードする DNA を終止コドンに変換し、mp18-m324 を作製した。次に pAdD26SVpA 由来の発ベクターである pdR に、mp18-m324 の EcoR I -EcoR I 断片を挿入し、pdRsmIL6R324 を作製した (Fig. 10)。

次に可溶性マウス IL-6 レセプター高発現 CHO 細胞株を以下の手順で樹立した。pdRsmIL6R324 を Chenらの方法²¹⁾により、dhfr 遺伝子欠損 CHO 細胞株 DXB-11²²⁾ に導入し、メソトレキセート (MTX) でスクリーニングをした。培養上清中の可能性マウス IL-6 レセプターの検出は、抗ヒト IL-6 レセプター抗体 MT18 と ^{125}I 標識 IL-6 による可溶性ヒト IL-6 レセプターのサンドイッチの検出に対する阻害効果の検出法を用いた。最終的に可溶性マウス IL-6 レセプター高発現 CHO 細胞株 MR25 を樹立した。

可溶性マウス IL-6 レセプターの大量生産は、可溶性ヒト IL-6 レセプターと同様の方法により行った (第3章参照)。

可溶性マウス IL-6 レセプターの精製は、カラムクロマトグラフィーを用い、以下のように行った。まず、遠心分離機で 6000 rpm, 10分間遠心し沈澱を除き、0.22 μm のフィルターで濾過した。濾過液を排除分子量1万の中空糸用限外濾過システム (東ソー) を用いて、500 ml まで濃縮した。濃縮液は、TSKgel Blue 5PW (東

ソー) にか、10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 存在下で、3M KCl, 0M KSCN から 0M KCl, 3M KSCN の塩濃度勾配により溶出した。活性画分を集め、10 mM Tris-HCl に透析した後、TSKgel DEAE 5PW (東ソー) にか、10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 存在下で、0M NaCl から 1M NaCl の塩濃度勾配により溶出した。再び活性画分を集め、濃縮後、TSKgel G3000SW (東ソー) にかけた。活性画分を集めることにより、可溶性マウス IL-6 レセプター精製品を得た。Fig. 11 は各種カラムクロマトグラフィーの溶出パターンを表わす。精製可溶性マウス IL-6 レセプターは、N末端解析の結果、N末端が22番目のロイシン残基で、見かけ上の分子量が約43000であった。

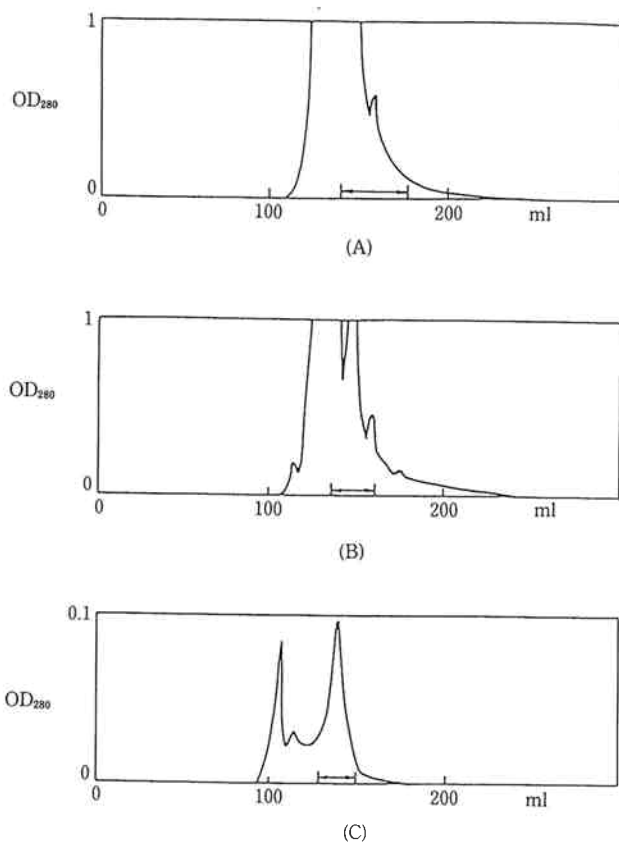


Fig. 11 Purification of smIL-6R. Profiles of absorbance at 280 nm of following column chromatographies are shown. (A) Affinity HPLC pattern of concentrated serum-free culture medium (8 liters) of MR25 cells. (B) Anionic ion exchange HPLC pattern of active fractions from an affinity HPLC. (C) Gel filtration HPLC pattern of active fractions from an anionic ion exchange HPLC. An aliquot of each fraction was assessed, and active fractions are shown by

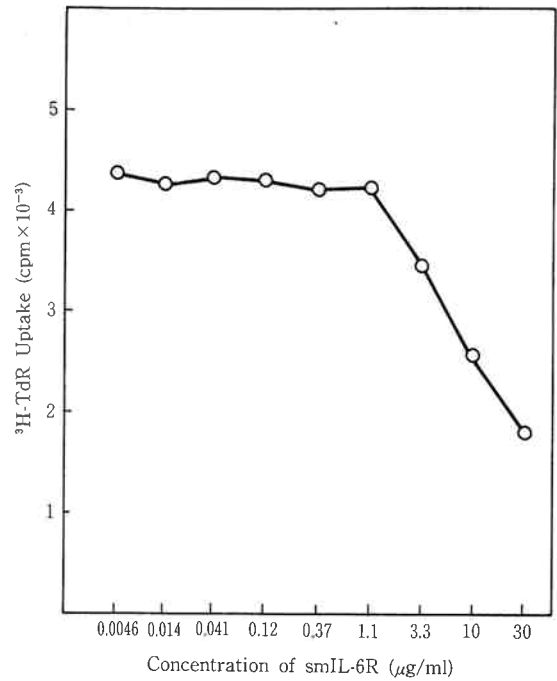


Fig. 12 Agonistic effect of smIL-6R in IL-6-mediated growth inhibition of M1 cells.

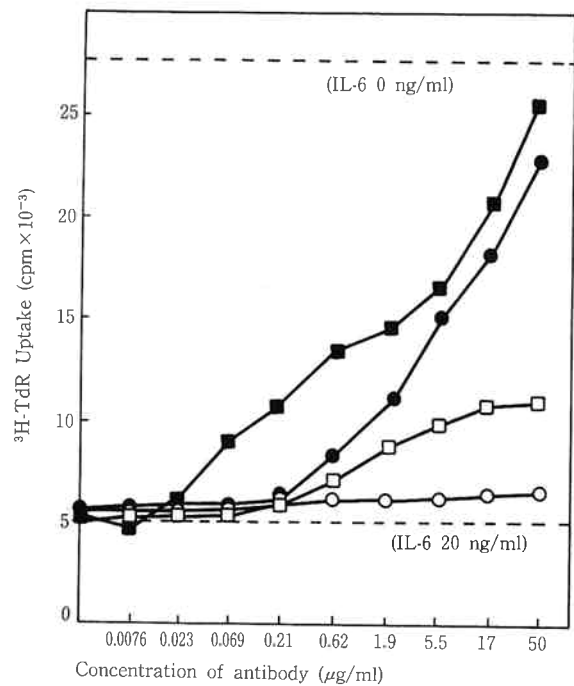


Fig. 13 Effect of anti-mIL-6R antibodies on IL-6 mediated growth inhibition of M1 cells. M1 cells were cultured with indicated concentrations of rat anti-mIL-6R polyclonal antibody (●), control rat IgG (○), RS13 (■), and RS15 (□) in the presence of 20 ng/ml of hIL-6. The average values of the duplicates are shown. Values in the presence or absence of 20 ng/ml IL-6 without any antibodies are indicated as dashed lines.

次に可溶性マウス IL-6 レセプターの IL-6 増強効果を調べた。Fig. 12 に示すように、マウス白血病細胞株 M1 は、20 ng/ml の IL-6 存在下で、可能性マウス IL-6 レセプターに濃度依存的に増殖抑制がかかること、すなわち可溶性マウス IL-6 レセプターの IL-6 増強効果が示された。

抗マウス IL-6 レセプターモノクローナル抗体の作製、及び性状の決定は、以下の手順で行った。可溶性マウス IL-6 レセプターを Wistar ラットに免疫し、ラットミエローマ細胞株 YB2/0 との融合後、スクリーニングを行い、最終的に抗マウス IL-6 レセプターモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを8株 (RS11~18) 樹立した。抗体のアイソタイプは、RS11 が IgG1, RS12~RS18 が IgG2a であった。次に RS11~RS18 のインビトロでの IL-6 阻害効果を IL-6 増殖依存性ハイブリドーマ MH60 に対する増殖誘導の阻害効果、及び白血病細胞株 M1 に対する分化誘導 (増殖阻害) の阻害効果により比較検討結果、どの抗体も IL-6 阻害効果を示し、RS13 が最も IL-6 阻害効果が強いことがわかった。これは、RS11~RS18 が、免疫原として用いたリコンビナント可溶性マウス IL-6 レセプターだけでなく、細胞膜上のマウス IL-6 レセプターをも認識することを示す。Fig. 13 は、RS13, RS15, モルモット由来抗可溶性マウス IL-6 レセプターが M1 細胞に対する IL-6 の分化誘導 (増殖阻害) を阻害するのに対し、コントロールのラット Ig は阻害しないことを示す。

8. 抗マウス IL-6 レセプター抗体による IL-6 作用の阻害

我々は、モルモット由来抗マウス IL-6 レセプターポリクローナル抗体をマウスに投与することにより、IL-6 の血小板増多作用⁷⁾、及び抗体産生増強効果³³⁾ を阻害することを示した³⁴⁾³⁵⁾。これは、抗マウス IL-6 レセプター抗体が、インビトロだけでなくインビボでも IL-6 作用を阻害することを示す。また最近、マウス IL-6cDNA を導入することにより IL-6 依存的に増殖するマウスミエローマ細胞株のマウス体内での増殖が、抗マウス IL-6 レセプター抗体により阻害されることが示された。これらの結果は、抗ヒト IL-6 レセプター抗体が IL-6 阻害剤として開発できることを示唆する最初の例である。

抗マウス IL-6 レセプターポリクローナル抗体による、IL-6 の血小板増多作用の阻害は、以下の手順で行った。C57BL/6 マウス1群5匹、全7群を用いた。PBS 1% BSA に溶解したモルモット由来抗マウス IL-6 レセプターポリクローナル抗体あるいはコントロールモルモット抗体 100 μ l、及び、PBS, 1% BSA に溶解したリコンビナントヒト IL-6 を12時間ごとに5日間連続腹腔内投与をした。6日目に、後大静脈より全採血をし、血小板数をヘモサイトメーター PC-601 (エルマ社製) で数えた。Fig. 14 に示すように抗マウス IL-6 レセプターポリクローナル抗体の、IL-6 の血小板増多作用に対する阻害が観察された。

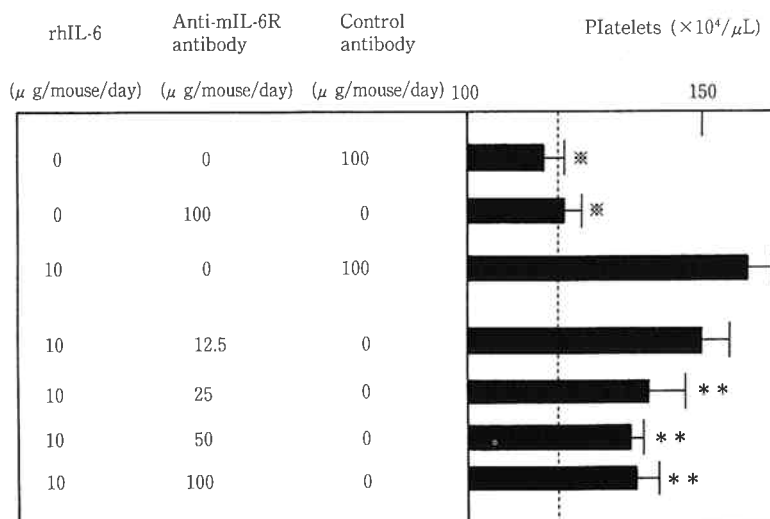


Fig. 14 *In vivo* effects of anti-mIL-6R antibody on platelet counts. Data are expressed as the mean of five mice. Bars, mean SD value; the broken line, platelet count of untreated mice; ※, not significantly different from mice without treatment; **, significantly different from rhIL-6 and control antibody-treated mice ($p < 0.01$ by Student's t test).

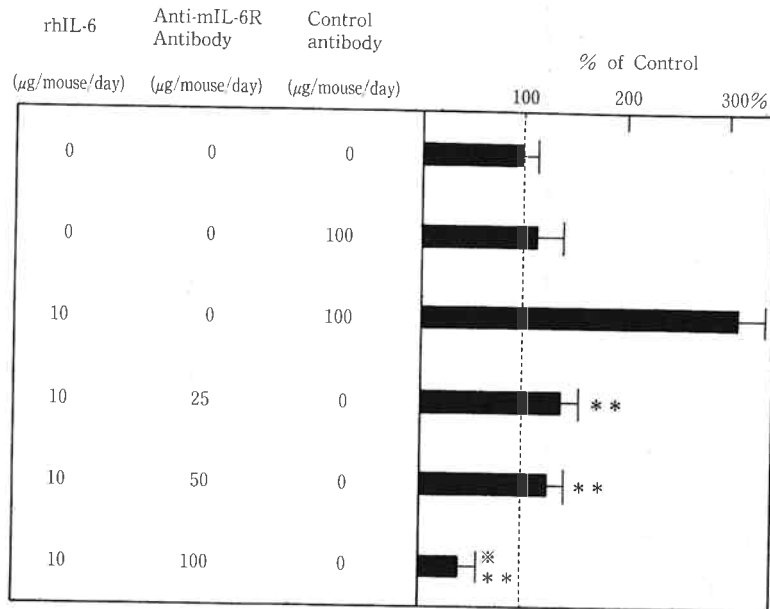


Fig. 15 *In vivo* effects of anti-mIL-6R antibody on the level of anti-DNP antibody. Anti-DNP antibody in control and treated mice was measured. Data represent the mean value of five mice and are expressed as % of control (non-treated mice). Bars, mean SD value; the broken line, control value; **, significantly different from rhIL-6 with control antibody-treated mice ($p < 0.01$ by χ^2 analysis). ※, significantly below the level of control mice ($p < 0.05$ by χ^2 analysis).

抗マウス IL-6 レセプターポリクローナル抗体による、IL-6 の抗体産生増強効果の阻害は、以下の手順で行った。Balb/c マウス 1 群 5 匹、全 6 群を用いた。マウスに 1 mg の DNP/BSA (シグマ社製) を皮下投与し、翌日から、PBS, 1% BSA に溶解したモルモット由来抗マウス IL-6 レセプターポリクローナル抗体あるいはコントロールモルモット抗体 100 μl , 及び、PBS, 1% BSA に溶解したリコンビナントヒト IL-6 を 24 時間ごとに 6 日間連続腹腔内投与をした。7 日目に、後大動脈より全採血をし、血清分離をし、抗 DNP/BSA 抗体価を通常の ELISA 法で測定した。Fig. 15 に示すように抗マウス IL-6 レセプターポリクローナル抗体の、IL-6 の抗体産生増強効果に対する阻害が観察された。特に、100 $\mu\text{g}/\text{日}$ の抗マウス IL-6 レセプター抗体投与では、IL-6 未投与のレベル以下に下がった。これは、抗マウス IL-6 レセプター抗体が投与した IL-6 だけでなく、内在性の IL-6 の効果をも阻害したことを示唆する。

9. 可溶性 gp130 の遺伝子工学的生産

第 2 のレセプター gp130 が発見された結果、IL-6 のシグナル伝達システムの新たなモデルとして Fig. 7 が提唱された。細胞膜結合領域及び細胞内領域の欠失した可溶性 gp130, あるいは gp130 に対する抗体は、IL-6 と IL-6 レセプターとの複合体との結合能を保持してい

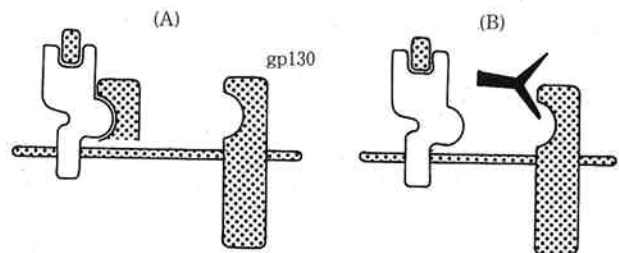


Fig. 16 (A) Soluble gp130 inhibits the function of IL-6.
(B) Anti-gp130 antibody inhibits the function of IL-6.

れば、細胞膜上の gp130 と結合する IL-6 と IL-6 レセプターの複合体の数を減少させ、最終的に IL-6 作用を阻害することが期待される (Fig. 16)。我々は、現在可溶性ヒト gp130 を CHO 細胞で生産することに取り組んでいる。また可溶性 gp130 の検出法を確立し、発現させた可溶性 gp130 が、IL-6 と IL-6 レセプターとの複合体に結合することを示した。可溶性ヒト gp130 あるいは抗ヒト gp130 抗体による IL-6 阻害効果の検討は、今後の課題である。

CHO 細胞での可溶性 gp130 発現用プラスミド pECEdhfrgp620 を以下の手順で作製した。まず、ヒト gp130 cDNA の³⁶⁾ コーディング領域を完全に含む約 3000 bp の EcoR I -EcoR I 断片を得た。これを M13mp18 に挿入した後、オリゴヌクレオチド