

総 説

抗 CD20 抗体が B 細胞を除去する分子機構について

濱口 儒人

Molecular mechanisms of B lymphocyte depletion by CD20 immunotherapy

Yasuhito HAMAGUCHI

Department of Dermatology, Kanazawa University Graduate School of Medical Science

(Received December 13, 2008)

summary

Anti-CD20 antibody immunotherapy effectively treats non-Hodgkin's lymphoma and autoimmune disease. However, the cellular and molecular pathways for B cell depletion remain undefined and the in vivo effect of immunotherapy on tissue B cells and their subsets is generally unknown. To identify the mechanisms for B cell depletion in vivo, a new mouse model for anti-CD20 immunotherapy was developed using a panel of twelve mouse anti-mouse CD20 monoclonal antibodies. Anti-CD20 antibodies rapidly depleted the vast majority of circulating and tissue B cells in an isotype-restricted manner that was completely dependent on effector cell Fc receptor expression. B cell depletion utilized Fc γ RI-, Fc γ RIII- and Fc γ RIV-dependent pathways, while B cells were not eliminated in FcR common γ chain-deficient mice. Monocytes were the dominant effector cells for B cell depletion, with no demonstrable role for T or NK cells. Although most anti-CD20 antibodies activated complement in vitro, B cell depletion was completely effective in mice with genetic deficiencies in C3 complement components. The considerable factors that determine the effectiveness of anti-CD20 immunotherapy are following: the expression level of CD20 on B cell surface; the dosage of anti-CD20 mAb; the association of Fc γ receptor with the isotype of the antibodies; B cell subpopulations within different tissues. These findings have important clinical implications for anti-CD20 and other antibody-based therapies.

Key words—CD20; B cell; Immunotherapy; Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC); Fc γ receptor

抄 録

CD20 は B 細胞に特異的に発現している膜表面分子であり、抗ヒト CD20 ヒト・マウスキメラ抗体（リツキシマブ）は B 細胞由来悪性リンパ腫に有効性が示されている。また、近年 B 細胞の自己免疫疾患、炎症性疾患への関与を示唆する報告が相次ぎ、B 細胞が治療ターゲットとして注目を集めていることから、CD20 抗体療法はこれらの疾患へも応用が試みられている。しかしながら、抗 CD20 抗体が生体内で B 細胞を除去する分子機構は十分に解明されていなかった。このため、筆者らはマウス抗マウス CD20 モノクローナル抗体を作成し検討を重ねてきた。その結果、抗 CD20 抗体が B 細胞を除去する分子機構は、マクロファージをエフェクター細胞とし、Fc γ レセプターを介した抗体依存性細胞障害活性が主要な経路であることが明らかとなった。また、CD20 抗体療法の効果を規定する因子として、①細胞表面に発現している CD20 の発現量、②投与する抗体量、③抗体のアイソタイプ（サブクラス）、④B 細胞亜集団、⑤解剖学的部位などが重要であると考えられた。さらに、治療抵抗性の B 細胞に対し、局所にマクロファージを動員することで除去の効率を上げることができた。これらの知見は、CD20 抗体療法の治療効果を高める上で重要と考えられた。

はじめに

B 細胞は高度に分化した免疫システムである獲得免疫を担う免疫担当細胞である。CD20 は B 細胞に特異的に発現している表面分子の 1 つで、プレ B 細胞から活性化 B 細胞まで発現がみられるが、形

質細胞に分化するとその発現は失われる。

抗ヒト CD20 ヒト・マウスキメラ抗体（リツキシマブ）は、マウス抗ヒト CD20 モノクローナル抗体の Fc 部位をヒト IgG1 で置換したキメラ型抗体である。B 細胞除去機能を有することからヒトの B 細胞由来悪性リンパ腫に有効性が示され、世界的に普及している代表的な抗体療法の一つである。また、本薬剤は腫瘍性疾患のみならず、関節リウマ

チ、全身性エリテマトーデスおよび自己免疫性水疱症などの種々の自己免疫疾患においてもその有用性が報告されている¹⁾。しかし、B細胞由来悪性リンパ腫の中にはCD20を高発現しているにも関わらずCD20抗体療法に抵抗性を示すこともあり、抗体療法の効果を規定する因子を解明することは、治療抵抗性の患者における効果の改善や新たな抗体療法を開発する上で不可欠である。従来、抗CD20抗体がB細胞を除去する分子機構として、抗体依存性細胞障害活性 (Antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC)、補体依存性細胞障害活性 complement-dependent cytotoxicity: CDC) およびアポトーシスの誘導などが考えられてきたが、明らかではなかった。そこで、筆者らはマウス抗マウスCD20モノクローナル抗体 (anti-mCD20 mAb) を作成し、抗CD20抗体が生体内でB細胞を除去する分子機構について検討を重ねてきた。本稿では、筆者らがこれまでに得た知見を報告する。

I. Anti-mCD20 mAb の作成

CD20の発現を欠損したCD20欠損マウスを用いてanti-mCD20 mAbを作成した²⁾。3種類のIgG1クラスの抗体 (MB20-1, MB20-2, MB20-14), 3種類のIgG2a/cクラスの抗体 (MB20-6, MB20-11, MB20-16), 4種類のIgG2bクラスの抗体 (MB20-7, MB20-8, MB20-10, MB20-18), 3種類のIgG3クラスの抗体 (MB20-3, MB20-13) の計12種類の抗体が得られた。これらの抗体は、マウスCD20と特異的に結合した³⁾。

II. anti-mCD20 mAb は CD20 特異的およびアイソタイプ依存的に B 細胞を除去する

野生型マウスに250 μgのMB20-11 (IgG2a/cクラス) を系静脈的に投与し、投与7日後に末梢血と脾臓におけるB細胞を評価した (以下特に断りのない限り、マウスには250 μgの抗体を系静脈的に投与した)。MB20-11を投与したマウスでは、コントロール抗体を投与したマウスに比べ、いずれの組織でもB細胞は著明に減少していた (図1A)。一方、CD20の発現を欠損したマウス (CD20^{-/-}) では、MB20-11を投与してもB細胞は減少しなかった。したがって、MB20-11はマウスのCD20に特異的に結合してB細胞を除去することが確かめられた。次に、抗体のアイソタイプ間でB細胞除去能に相違があるか検討するため、野生型マウスに

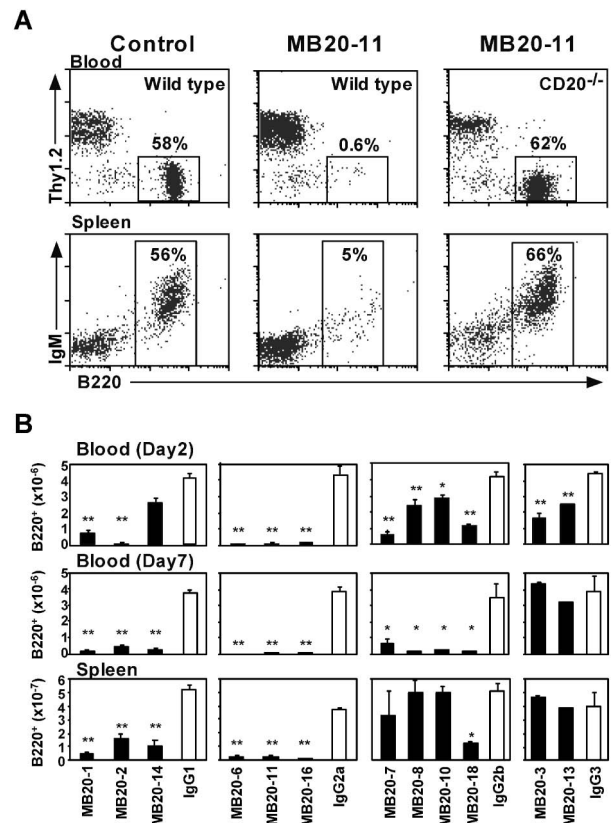


図1 野生型マウス (Wild type) および CD20 欠損マウス (CD20^{-/-}) における抗 CD20 抗体による B 細胞除去および抗体のアイソタイプによる B 細胞除去の比較。A) 野生型マウスおよび CD20 欠損マウスに 250 μg の MB20-11 を尾静脈から投与し、投与 7 日後に末梢血と脾臓における B 細胞の割合を検討した。B) 12 種類のマウス抗マウス CD20 モノクローナル抗体 250 μg をマウスに投与し、末梢血と脾臓の B 細胞数を検討した (文献 3 より引用改変)。

12種類全ての抗体を投与し末梢血と脾臓のB細胞数を比較した (図1B)。IgG1, IgG2a/c, IgG2bクラスの抗体はいずれもB細胞を除去したが、その除去能はIgG2a/c > IgG1 > IgG2bの順に強かった。一方、IgG3クラスの抗体は末梢血のB細胞は除去したものの、脾臓のB細胞は除去しなかった。したがって、抗体のアイソタイプはanti-mCD20 mAbによるB細胞除去能を決定する因子の一つと考えられた。

III. anti-mCD20 mAb が B 細胞を除去する分子機構は、Fcγ レセプター依存的で、補体非依存的である

ADCCはエフェクター細胞上に発現しているFcレセプターに抗体のFc部位が結合することにより生じる。FcR共通γ鎖の発現を欠損したマウス (FcRγ^{-/-}) では、MB20-11によるB細胞除去は阻

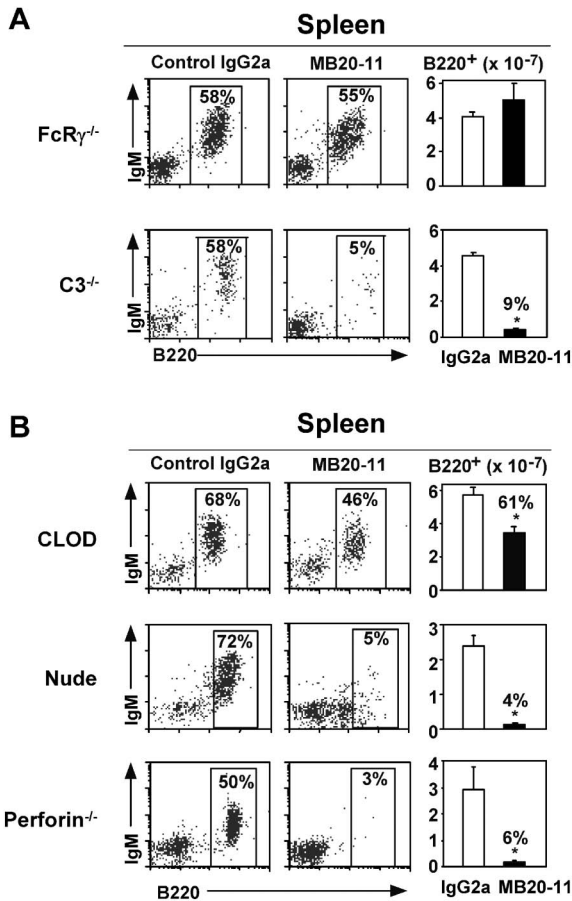


図2 B細胞除去は Fc γ レセプター依存性, 補体非依存性で, エフェクター細胞としてマクロファージが重要である. A) Fc レセプター共通 γ 鎖の発現を欠損したマウス (Fc γ R $^{-/-}$) と C3 を欠損したマウス (C3 $^{-/-}$) に 250 μ g の MB20-11 を投与し, 投与 7 日後に脾臓における B 細胞数を検討した. B) マクロファージを除去するためにクロドロネートを事前に投与したマウス (CLOD), Nude マウスおよび Perforin を欠損したマウス (Perforin $^{-/-}$) に 250 μ g の MB20-11 を投与し, 投与 7 日後に脾臓における B 細胞数を検討した (文献 3 より引用改変).

害されていた (図 2A). Fc γ レセプター (Fc γ R) には, 刺激性受容体である Fc γ RI, Fc γ RIII, Fc γ RIV と, 抑制性受容体である Fc γ RIIB がある⁴⁾. これらのレセプターの単独欠損マウスでは, MB20-11 による B 細胞除去は抑制されていなかった³⁾. このことから, 1 つの Fc γ R が欠損しても, 残りのレセプターが機能を補っていると考えられた.

一方, 補体成分の 1 つである C3 を欠損したマウス (C3 $^{-/-}$) では, MB20-11 は B 細胞を除去した (図 2A). また, IgG1, IgG2b クラスの抗体も C3 $^{-/-}$ マウスで B 細胞を除去した³⁾. これまで, ヒトにおける抗 CD20 抗体による B 細胞除去は, CDC が主な経路であると考えられてきた⁵⁾. 筆者らが作成した 12 種類の anti-mCD20 mAb も, *in vitro* の実験系では補体依存性の細胞障害活性を示

した³⁾. しかし, *in vitro* の実験系で細胞障害活性を示した IgG3 クラスの抗体は, 野生型マウスの B 細胞を除去できなかった (図 1B). これらの結果から, *in vivo* における B 細胞除去に補体が関与している可能性は低いと考えられた. したがって, anti-mCD20 mAb が B 細胞を除去する分子機構は, Fc γ R を介した ADCC が主な経路であると考えられた.

IV. anti-mCD20 mAb による B 細胞除去における エフェクター細胞はマクロファージである

Fc γ R を発現している白血球の中で, どの細胞がエフェクター細胞として重要かを検討した. マウスにリポソーム化したクロドロネートを投与すると, 主として肺と脾臓におけるマクロファージを除去することができる⁶⁾. この処理をした野生型マウス (CLOD) に MB20-11 を投与したところ, B 細胞除去は阻害されていた (図 2B). 一方, T 細胞を欠損したマウス (Nude) では, MB20-11 による B 細胞除去は阻害されていなかった (図 2B). NK 細胞は, 細胞障害活性を示す代表的なエフェクター細胞である. しかし, NK 細胞に機能異常があるマウス (Perforin $^{-/-}$) でも, MB20-11 は B 細胞を除去した (図 2B). これらの結果から, anti-mCD20 mAb による B 細胞除去におけるエフェクター細胞はマクロファージであり, T 細胞, NK 細胞が関与している可能性は低いと考えられた.

V. anti-mCD20 mAb による各臓器における B 細胞除去

B 細胞は不均一な集団であり, 発現している表面抗原が違うことはもとより, その分布や機能も異なっている. そこで, B 細胞亜集団の中で CD20 抗体療法に対し感受性に相違があるかについて検討した.

1. 骨髄における B 細胞除去

CD20 の発現は, マウスではヒトと同じく pre B 細胞から immature B 細胞に分化する段階で発現し, 成熟するに従って発現量は増加し, 形質細胞に分化するとその発現は失われる²⁾. 野生型マウスに MB20-11 を投与し, 投与 7 日後に骨髄の B 細胞数を検討したところ, 約 70% の B220⁺ B 細胞が残存していた (図 3A). 残存していた B 細胞は CD20 発現のないあるいは低い pre/pro B 細胞か immature B 細胞であり, CD20 を十分に発現している

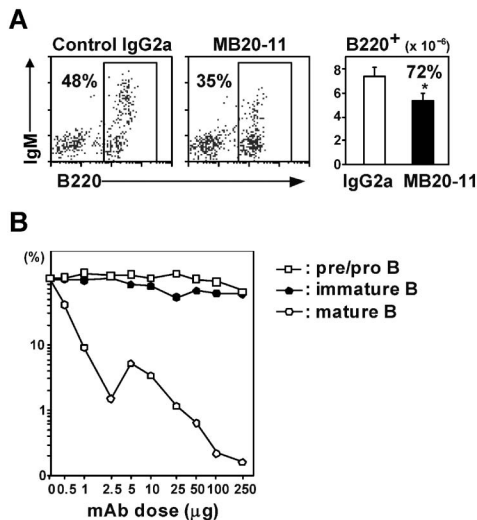


図3 骨髄におけるB細胞除去. A) 野生型マウスに250 µgのMB20-11を投与し、投与7日後にB220⁺B細胞数を検討した. B) 野生型マウスに0.5~250 µgのMB20-11を投与し、投与7日後にpre/pro B細胞, immature B細胞, mature B細胞数を検討した(文献7より引用改変).

mature B細胞はほとんど除去されていた(図3B).

したがって、CD20の発現量はCD20抗体療法の効果を規定する因子の一つと考えられた.

2. 脾臓におけるB細胞除去

脾臓には、mature B細胞の他に、Transitional 1 (T1) B細胞, T2 B細胞, Marginal zone (MZ) B細胞, 数は非常に少ないもののB1細胞などが存在する. 野生型マウスにMB20-11を投与したところ、B細胞はほぼ除去されていたが、残存しているB細胞の亜集団は骨髄で見られるB細胞と類似していた(図4A). これは、B細胞が除去された脾臓には、十分に分化していない未成熟なB細胞が骨髄から移入してきている可能性があると考えられた.

MZ B細胞, T1 B細胞, T2 B細胞およびmature B細胞は、CD20抗体療法により除去された(図4Bと4C). しかし、脾臓内に少数ながら存在しているB1細胞はMB20-11を投与しても約30%が残存しており、他のB細胞亜集団に比べCD20抗体療法に抵抗的なB細胞亜集団であると考えられた⁷⁾.

3. 腹腔内におけるB細胞除去

腹腔内には、conventionalなB細胞(B2細胞)以外に、抗原刺激を伴わずにIgMを産生するB細胞であるB1細胞が存在する. B1細胞にはB1a細胞とB1b細胞の2つの亜集団が知られているが、いずれもCD20は十分量発現している⁷⁾. 野生型マ

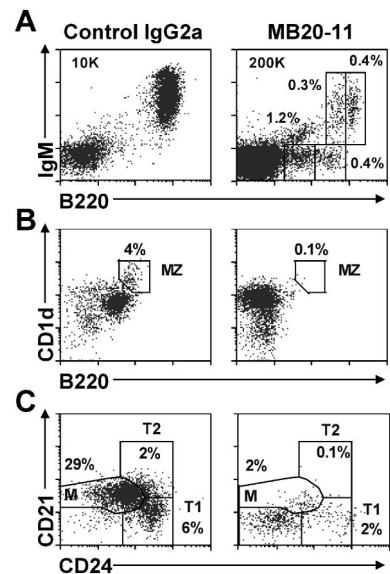


図4 脾臓におけるB細胞除去. A-C) 野生型マウスに250 µgのMB20-11を投与し、投与7日後にIgM⁺B220⁺B細胞(A), Marginal zone (MZ) B細胞(B), Transitional1 (T1) B細胞, Transitional2 (T2) B細胞, Mature B細胞(M)(C)を検討した(文献7より引用改変).

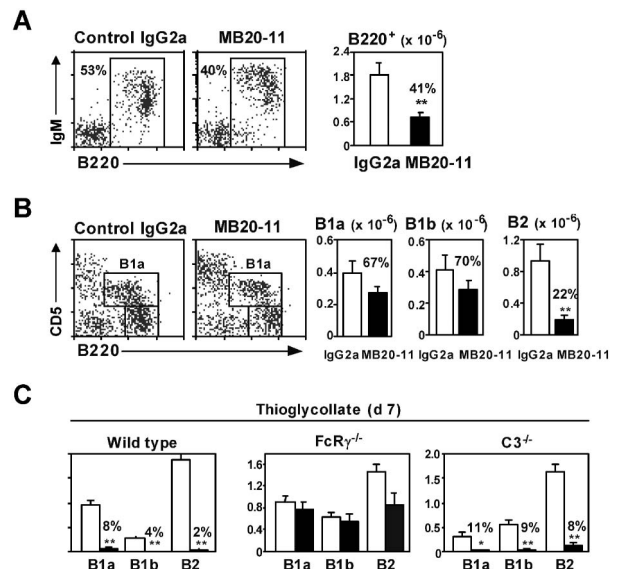


図5 腹腔内におけるB細胞除去. A-B) 野生型マウスに250 µgのMB20-11を投与し、投与7日後に亜集団別にB細胞数を検討した(B220⁺IgM⁺B細胞(A), B1a, B1b, B2細胞(B)). C) 野生型マウス, Fcレセプター共通γ鎖の発現を欠損したマウス(FcRγ^{-/-}) およびC3を欠損したマウス(C3^{-/-}) にチオグリコレートを事前に投与した. その後250 mgのMB20-11を投与し、投与7日後に腹腔内のB細胞数を亜集団別に検討した(文献7より引用改変).

ウスにMB20-11を投与すると、約60%のB220⁺B細胞が除去された(図5A). しかし、B1a細胞, B1b細胞ともCD20抗体療法に抵抗性を示し、B2細胞も約20%が残存していた(図5B). 脾臓のB1細胞もCD20抗体療法に抵抗性を示したことから、B1細胞自体がCD20抗体療法に抵抗性を示すB細胞

胞亜集団であると考えられた。さらに、他の臓器であれば容易に除去された B2 細胞が腹腔内では除去されにくかったことから、腹腔内は解剖学的に CD20 抗体療法に抵抗性を示す部位であると考えられた。そこで、腹腔内にチオグリコレートを投与し、腹膜炎を起こすことでマクロファージを腹腔内に誘導し、MB20-11 により B 細胞が除去されるかを検討した (図 5C)。すると、チオグリコレートを投与した野生型マウスでは、MB20-11 によりほとんどの B1 細胞、B2 細胞は除去された。C3^{-/-} マウスでも B 細胞は除去されたが、FcR γ ^{-/-} マウスでは B1 細胞、B2 細胞とも除去されなかった。このことから、治療抵抗性の B 細胞亜集団や CD20 抗体療法が効きにくい環境であっても、局所にマクロファージを誘導することで B 細胞を除去できる可能性があること、腹腔内における B 細胞除去も Fc γ R 依存的で補体非依存的であると考えられた⁷⁾。

VI. Fc γ レセプターの発現と抗体のアイソタイプの関係は、B 細胞除去の程度を決める上で重要である

抗体のアイソタイプと各々の Fc γ R との親和性は、その組み合わせにより大きく異なっている⁸⁾。そこで、CD20 抗体療法における抗体のアイソタイプと Fc γ R の関係について詳しく検討した。IgG1 クラスは Fc γ RIII と一対一に対応しており、IgG2a/c クラスと IgG2b クラスによる B 細胞除去には Fc γ RI と Fc γ RIV が重要であることが明らかにされた⁹⁾。一方、抑制性受容体である Fc γ RIIB を欠損したマウスでは、野生型マウスと比較し同量の抗体を投与したときの B 細胞除去は亢進していた。これらの結果から、CD20 抗体療法を開発する上で、抗体のアイソタイプとエフェクター細胞上の Fc γ R の関係を考慮に入れることが重要であると考えられた。

おわりに

CD20 抗体療法が生体内で B 細胞を除去する分子機構は、マクロファージをエフェクター細胞とする ADCC が主な経路であると考えられた。今回紹介した知見は、マウスの正常 B 細胞除去についてであるが、筆者らはマウスの悪性リンパ腫由来 B 細胞も、同様の分子機構で除去されることを報告している¹⁰⁾。ヒトにおいても、治療抵抗性の B 細胞由来リンパ腫において、顆粒球・マクロファージ刺激因子とリツキシマブを同時に投与することで治療反

応性が向上したことが報告されている¹¹⁾。したがって、ヒトにおいてもマウスと同様、ADCC が重要な経路であると考えられる。しかし、ヒトでは ADCC に加え CDC やアポトーシスの誘導も CD20 抗体療法による B 細胞除去に関与しているとする報告も少なくない¹²⁻¹⁴⁾。今後、ヒトにおいても、CD20 抗体療法による B 細胞除去の詳細な分子機構について、さらなる検討が望まれる。

文 献

- 1) Martin F, Chan AC. : B cell immunobiology in disease : evolving concepts from the clinic. *Ann Rev Immunol.* **24** : 467-496, 2006.
- 2) Uchida J, Lee Y, Hasegawa M et al. Mouse CD20 expression and function. *Int. Immunol.* **16** : 119-129, 2004.
- 3) Uchida J, Hamaguchi Y, Oliver JA et al. : The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. *J. Exp. Med.* **199** : 1659-1669, 2004.
- 4) Nimmerjahn F, Ravetch JV. : Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv Immunol.* **96** : 179-204, 2007.
- 5) Reff ME, Carner K, Chambers KS et al. : Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* **83** : 435-445, 1994.
- 6) Van Rooijen N, Sanders A. : Liposome mediated depletion of macrophages : mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J. Immunol. Methods* **174** : 83-93, 1994.
- 7) Hamaguchi Y, Uchida J, Cain DW et al. The peritoneal cavity provides a protective niche for B1 and conventional B lymphocytes during anti-CD20 immunotherapy in mice. *J. Immunol.* **7** : 4389-4399, 2005.
- 8) Takai T. : Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2** : 580-592, 2002.
- 9) Hamaguchi Y, Xiu Y, Komura K et al. : Antibody isotype-specific engagement of Fc γ receptors regulates B lymphocyte depletion during CD20 immunotherapy. *J. Exp. Med.* **203** : 743-753, 2006.
- 10) Minard-Colin V, Xiu Y, Poe JC et al. : Lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice is mediated by macrophage Fc γ RI, Fc γ RIII, and Fc γ RIV. *Blood* **112** : 1205-1213,

- 2008.
- 11) Cartron G, Zhao-Yang L, Baudard M et al. : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor potentiates rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma : results of a phase II study. *J. Clin. Oncol.* **26** : 2725–2731, 2008.
 - 12) Wang SY, Racila E, Taylor RP et al. : NK-cell activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity induced by rituximab-coated target cells is inhibited by the C3b component of complement. *Blood* **111** : 1456–1463, 2008.
 - 13) van Meerten T, van Rijn RS, Hol S et al. Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin. Cancer Res.* **12** : 4027–4035, 2006.
 - 14) Bonavida B. : Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways : implications in chemo/immuno-resistance, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions. *Oncogene* **26** : 3629–3636, 2007.