

博士論文（要約）

抗組織因子抗体の
膵臓がんに対する有用性

津村 遼

目次

論文内容の要旨	1
略語	5
第1章 序論	7
1. 膵臓がん	7
2. Drug delivery system (DDS)	8
2-1. がんに対する DDS	8
2-1-1. Passive targeting	8
2-1-2. Active targeting	10
2-2. 抗体製剤	10
3. 組織因子 (TF; Tissue factor)	12
3-1. がんと血液凝固	12
3-2. 正常組織における TF	12
3-2-1. TF の構造	12
3-2-2. TF の機能	13
3-2-3. TF の発現	13
3-3. 腫瘍組織における TF	14
3-3-1. TF の発現	14
3-3-2. TF の発現制御	14
3-3-3. TF の細胞内シグナル	15
3-3-4. TF と転移	15
3-3-5. TF と膵臓がん	16
4. 本研究の大目的	17
第2章 抗 TF 抗体の画像診断への応用	18
1. 膵臓がんの診断	18
1-1. 初期診断	18
1-2. 確定診断	19
2. 抗体を用いた画像診断	20
2-1. 画像診断の役割	20
2-2. 現在の PET イメージング	20
2-3. 画像診断における IgG の問題点	21
2-4. 抗体の改変	21
2-5. 研究目的	23

3. 実験方法	24
3-1. 細胞培養	24
3-1-1. 使用した細胞株	24
3-1-2. 細胞継代	24
3-1-3. 細胞保存	25
3-2. 抗体の作製	25
3-2-1. 使用したハイブリドーマ	25
3-2-2. 腹腔内移植及び腹水回収	25
3-2-3. 抗体精製	26
3-3. Fab 化抗体の作製	27
3-3-1. 使用した抗体	27
3-3-2. パパイン処理による断片化	27
3-3-3. ハイドロキシアパタイトカラムによる分離・精製	28
3-4. 純度及び分子サイズの測定	29
3-4-1. SDS-PAGE（非還元条件）	29
3-4-2. Bioanalyzer による純度測定	30
3-4-3. 粒子径の測定	30
3-5. リコンビナント TF 抗原に対する結合解析	30
3-5-1. 使用した大腸菌株とプラスミドベクター	30
3-5-2. リコンビナント TF 抗原の作製	31
3-5-2-1. 培養液の準備	31
3-5-2-2. 形質転換	31
3-5-2-3. タンパク質発現	31
3-5-2-4. His tag を用いた精製	32
3-5-3. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay（ELISA）	33
3-5-3-1. ELISA プレーットの作製	33
3-5-3-2. ELISA	33
3-5-4. Surface Plasmon Resonance（SPR）解析	34
3-6. BxPC3 細胞膜上に発現した TF 抗原に対する結合解析	35
3-6-1. 抗体の蛍光標識	35
3-6-2. Flow cytometry（FCM）解析	35
3-6-3. 細胞蛍光免疫染色	37
3-6-4. internalization assay	38
3-7. <i>in vivo</i> における動態解析	39
3-7-1. BxPC3 皮下移植モデルマウスの作製	39
3-7-2. <i>in vivo</i> imaging	40

3-7-3. 血中及び各臓器における投与抗体の残存量測定	40
3-7-4. 投与抗体の腫瘍内分布解析	41
3-8. 統計解析	42
4. 実験結果	43
4-1. <i>in vitro</i> における性状解析	43
4-1-1. 純度及び分子サイズ	43
4-1-2. 結合活性解析	45
4-2. <i>in vivo</i> における性状解析	48
4-2-1. <i>in vivo</i> imaging	48
4-2-2. 組織分布	50
5. 考察	53
5-1. <i>in vitro</i> における whole IgG と Fab の性状	53
5-2. <i>in vivo</i> における whole IgG と Fab の性状	54
6. 小括	57
 第3章 抗 TF 抗体の治療への応用	 58
1. 膵臓がんの治療	58
1-1. 膵臓がんの化学療法	58
2. 抗体を用いた治療応用	59
2-1. 現在の化学療法	59
2-2. 抗体抗がん剤複合体 (ADCs; antibody-drug conjugates)	59
2-2-1. ADCs の Linker と薬剤	61
2-2-2. ADCs の作用機序	62
2-3. 研究目的	63
3. 実験方法	65
3-1. 細胞培養	65
3-1-1. 使用した細胞株	65
3-1-2. 細胞継代	65
3-1-3. 細胞保存	65
3-2. 抗体の作製	65
3-2-1. 使用したハイブリドーマ	65
3-2-2. 腹腔内移植及び腹水回収	65
3-2-3. 抗体精製	65
3-3. 抗 TF IgGs のクローン選別	66
3-3-1. 使用した抗体	66
3-3-2. ELISA	66

3-3-3. FCM 解析	66
3-3-4. TF activity assay	66
3-3-5. SPR 解析	67
3-4. ADCs の作製	67
3-4-1. 使用した Linker と薬剤	67
3-4-2. ADCs の作製	68
3-4-3. Drug-antibody ratio (DAR) の測定	69
3-5. <i>in vitro</i> における抗 TF ADCs の性状解析	70
3-5-1. SDS-PAGE (非還元条件)	70
3-5-2. ゲル濾過クロマトグラフィー	70
3-5-3. ELISA	70
3-5-4. 殺細胞効果	71
3-5-5. ADCs の蛍光標識	71
3-5-6. internalization assay	71
3-6. <i>in vivo</i> における抗 TF ADCs の性状解析	72
3-6-1. BxPC3 皮下移植モデルマウスの作製	72
3-6-2. 抗腫瘍効果検討	72
3-6-2-1. 腫瘍サイズ 200 mm ³ における検討	73
3-6-2-2. 腫瘍サイズ 600 mm ³ における検討	73
3-6-3. 投与 ADCs の腫瘍内分布解析	73
3-7. 統計解析	73
4. 実験結果	74
4-1. 抗 TF IgGs のクローン選別と性状解析	74
4-2. <i>in vitro</i> における抗 TF ADCs の性状解析	77
4-3. 抗腫瘍効果検討	82
4-4. 投与 ADCs の腫瘍組織内分布	85
5. 考察	87
5-1. <i>in vitro</i> における各 IgG の性状解析	87
5-2. <i>in vitro</i> における抗 TF ADCs の性状解析	88
5-3. 抗腫瘍効果検討	90
5-4. 解離速度定数と抗腫瘍効果	93
6. 小括	95
総括と今後の展望	96
参考文献	97
謝辞	102

論文の内容の要旨

論文題目 抗組織因子抗体の膵臓がんに対する有用性

氏 名 津村 遼

第1章 序論

膵臓がんは予後不良な固形腫瘍の一つであり 5 年生存率が 6.7% (2004～2010 年、NCI) と低い。そのため、膵臓がんの治療法開発に対する意義は高い。膵臓がんに対する治療薬開発を行う上では、腫瘍組織への効率的な薬剤送達と副作用の軽減という二つの観点から、Drug Delivery System (DDS) が重要な戦略となる。近年、抗体はその抗原特異性から、腫瘍組織への選択的な薬剤送達を可能にする DDS ツールとして注目されている。それゆえ、膵臓がんに対する有望な新規抗体の研究開発は臨床への多大なる貢献が期待出来る。

我々は、腫瘍組織のターゲット抗原として外因系血液凝固の開始因子である組織因子 (TF; Tissue factor) に着目した。TF は膵臓がんを含む多くのがん細胞膜表面上に過剰発現が認められ、腫瘍間質細胞においても発現亢進が報告されている。また、TF はがんの成長や転移、血管新生、悪性度と関連することが示唆されている。このような TF とがんの関係性から、我々は TF が有望な腫瘍組織のターゲットになりえると考え、膵臓がんの治療応用を目指した抗 TF モノクローナル抗体の研究開発を行ってきた。

DDS ツールとしての抗体開発を行う上では、診断と治療の両面への応用を行うことが重要であると考えられる。本研究では、第2章で前者 (特に画像診断への応用)、第3章で後者への抗TF抗体の有用性を評価した。

第2章 抗TF抗体画像診断への応用

一般に、抗体を用いた体内診断にはポジトロン断層法（PET）や単一光子放射断層撮影（SPECT）、核磁気共鳴画像法（MRI）などの画像診断法が用いられる。明瞭な画像の取得や副作用の軽減という観点から、診断薬は腫瘍組織へ迅速かつ選択的に集積し、同時に素早く生体内から排出されることが求められる。しかし、一般にIgGは高い血中滞留性を示すため、体外への排出が遅く、腫瘍部と正常部のコントラスト比が高くなるまでに抗体診断薬を投与してから数日を要する。

その解決策の一つが IgG の低分子化である。低分子化した抗体は、Fc ドメインの欠如やサイズ変化によって生体内で示す挙動が大きく変化する。しかし、低分子化したことによる影響（アフィニティーや安定性）は抗体ごとに異なるため、各抗体において低分子化抗体の有用性を評価する必要がある。

そこで、本研究では抗 TF whole IgG と抗 TF Fab（以降、Fab）の *in vitro* 及び *in vivo* における性状解析を行い、Fab の画像診断への有用性を検討することを目的とした。

【結果・考察】

(a) *in vitro* における性状解析

抗 TF whole IgG と Fab の Surface Plasmon Resonance（SPR）解析の結果、両者ともに TF 抗原に対して高い結合活性を持ち、また Fab は抗 TF whole IgG よりも抗原から解離しやすいことが示唆された。Flow Cytometry（FCM）解析では、抗 TF whole IgG と Fab は TF 高発現ヒト膀胱がん細胞株 BxPC3 に対して抗体濃度依存的な結合性を示した。

(b) *in vivo* における性状解析

蛍光標識した抗TF whole IgGとFabをBxPC3皮下移植モデルマウスへそれぞれ尾静脈投与した結果、抗TF whole IgGは高い血中滞留性と長時間に渡る腫瘍部集積性を示した。一方、Fabは迅速に腫瘍部に集積後、数時間で体外へ排出された。

また、腫瘍部と非腫瘍部の蛍光強度比（TBR; tumor-to-background ratio）を抗 TF whole IgG と Fab で比較した結果、抗 TF whole IgG と Fab はそれぞれ蛍光標識抗体投与 24 時間後と 12 時間後に TBR のピークが得られた。すなわち、抗 TF whole IgG と比較して、Fab は投与後に、より早い時間で TBR のピークが得られることが示された。

このようなマウス生体内における抗TF whole IgGとFabの動態の違いは、分子サイズによる排出・代謝経路（whole IgGは肝臓、Fabは腎臓）やFcドメインの有無による血中安定性、抗原からの解離速度が起因していると考えられる。

以上の結果から、抗 TF Fab は抗 TF whole IgG と比較して、短時間での画像診断が可能であり、有効な画像診断薬の DDS ツールになりえることが示唆された。一方で、抗 TF whole IgG は長時間にわたって高い腫瘍集積性を示すことから、治療目的の DDS ツールに適することが示唆された。

第3章 抗TF抗体の治療への応用

近年、SGN-35やT-DM1といった抗体抗がん剤複合体（ADCs; antibody-drug conjugates）の承認により、抗体のがん治療応用法としてADCsの研究開発が注目を集めている。この背景には、有効な抗体の開発の他に、抗体と薬剤を繋ぐLinkerテクノロジーの進歩やADCsに用いる抗がん剤の最適化が寄与している。前章より示唆された、抗TF IgGは治療応用に適するという結果から、本章では抗TF ADCの有用性検討を行った。

先行研究において、我々は既に抗TF ADCが高い腫瘍増殖抑制効果を持つことを示した。しかし、ADCsの抗腫瘍効果を高めるためには、抗体やLinker、薬剤の最適化が求められる。これまで、Linkerや薬剤に関する詳細な検討は多く報告されてきたが、ADCsに適した抗体の性状に関する報告は少ない。

よって本研究では、同一のLinker（Maleimide-PEG₁₂-Valine-Citrulline）と薬剤（MMAE; monomethyl auristatin E）を用いて4種類の抗TF ADCsを作製し、抗体の性状とADCsの性状及び抗腫瘍効果を比較検討し、ADCsに適した抗体の性状を明らかにすることを目的とした。

【結果・考察】

(a) 抗体の選別

ADCsに用いる抗体の選別のために、当研究室が樹立した10種類の抗TF IgGを用いてELISAとFCMを行った。その結果、両解析において高い結合活性を示したのは3クローンであった。これらのSPR解析の結果、clone no.Z > X > Yの順で高い結合力を持ち、同様の順でTF抗原から解離しにくい性質を持つことが示された。

以上より、ADCsに用いるクローンとして、上記の3クローンを用いることとした。また、negative control抗体としてELISAで反応性を示さなかったclone no.Wを用いた。

(b) *in vitro*におけるADCsの性状解析

各IgGを還元処理後に、IgGのチオール基とLinkerのマレイミド基を反応させ、MMAEの付加を行った。作製したADCsのSDS-PAGE（非還元条件）の結果、全てのADCsにおいて還元処理の影響による断片化が見られた。しかし、ELISAではADC化による結合活性への顕著な影響は見られなかった。

BxPC3を用いて各ADCの殺細胞効果及びinternalization効率を解析した結果、3クローンのADCs（clone no.X, Y, Z）はcontrol ADCと比較して顕著に高い殺細胞効果、及びinternalization効率を示した。一方で、これら3クローンのADCの間には、*in vitro*の性状における顕著な差異が見られなかった。

(c) *in vivo*におけるADCsの抗腫瘍効果

まず、BxPC3皮下移植モデルマウスを用いて、腫瘍サイズが200 mm³に達した時点で各薬剤を尾静脈投与した。その結果、3クローンのADCs（clone no.X, Y, Z）の投与群はその他の群と比較して有意に高い腫瘍増殖抑制効果を示した。また、これら3クローンのADCsの間には有意差が見られなかった。これは、*in vitro*の結果と一致する結果であった。

次に、同様の方法で腫瘍サイズが 600 mm³ に達した時点で投与を開始した。その結果、これまで同様に 3 クローン の ADCs (clone no.X, Y, Z) の投与群は、他の投与群と比較して顕著に腫瘍増殖抑制効果を示した。しかし、治療開始後初期において、ADC (clone no.Y) 投与群は ADC (clone no.Z) 投与群よりも有意に高い抗腫瘍効果を示した (投与開始後 3 日目; $p < 0.05$ 、7 日目; $p < 0.01$)。

我々はこの要因として IgG の解離速度定数に着目した。すなわち、抗原から解離しにくい ADC (clone no.Z) は血管から漏出後に腫瘍組織の辺縁部の抗原にトラップされ、腫瘍組織内部まで浸透しづらいと考えられる (図 1 左)。一方で、抗原から解離しやすい ADC (clone no.Y) は腫瘍辺縁部の抗原に結合後、より早く解離することで腫瘍組織内部まで浸透しやすいと考えられる (図 1 右)。その結果、ADC (clone no.Y) は ADC (clone no.Z) よりも腫瘍内部まで薬剤を送達することが可能となり、投与後初期において高い抗腫瘍効果を示したと推察した。

この仮説を証明するために、蛍光標識した ADC (clone no.Y) と ADC (clone no.Z) を BxPC3 皮下移植モデルマウスにそれぞれ尾静脈投与して、投与後 3 時間後に腫瘍組織を摘出した。腫瘍組織の蛍光免疫染色の結果、ADC (clone no.Y) の方が ADC (clone no.Z) よりも腫瘍内部まで浸透していることが示唆された。

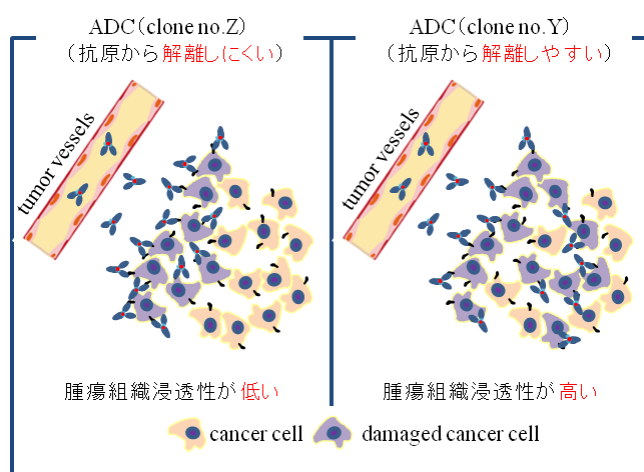


図1. 解離速度定数の違いによる腫瘍組織浸透性

以上の結果から、IgGの解離速度定数が、ADCs作製においてIgG性状の重要な要素になる可能性が示唆された。これは抗TF ADCのみならず、他のADCsをデザインする際のIgGのクローン選択にも有用な知見になることが期待される。

本研究の総括

本研究において、(1) 抗TF Fabは抗TF IgGと比較して、投与後短時間で撮影が可能であるため、画像診断のDDSツールとして有用である、(2) 抗TF ADCはヒト膵臓がん細胞株BxPC3の皮下移植モデルマウスにおいて、腫瘍増殖抑制効果を示す、(3) IgGの解離速度定数が、ADCs作製においてIgGの性状の重要な要素になる、という3点の結論が示唆された。

略語

ADCC : antibody-dependent cellular cytotoxicity

ADCs : Antibody-drug conjugates

CDC : complement-dependent cytotoxicity

CDRs : complementarity determining regions

CT : computed tomography

CTCs : circulating tumor cells

DAR : Drug-antibody ratio

DDS : drug delivery system

EGFR : epidermal growth factor receptor

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EMT : epithelial-to-mesenchymal transition

EPR : enhanced permeability and retention

Erk1/2 : extracellular regulated kinase 1/2

FBS : Fetal Bovine Serum

FCM : Flow cytometry

FcRn : neonatal Fc receptor

FDG : 2-deoxy-2-[18F]-fluoro-D-glucose

IgG : Immunoglobulin G

IL-8 : interleukin-8

Jak/STAT : Janus kinase/ signal transducers and activators of transcription

JNK : c-jun N-terminal kinase

LPS : Lipopolysaccharide

MAPK : mitogen-activated protein kinase

MMAE : Monomethyl auristatin E

MRCP : magnetic resonance cholangiopancreatography

MRI : magnetic resonance imaging

MW : molecular weight

NK 細胞 : natural killer 細胞

PAR2 : protease activated receptor 2

PET : positron emission tomography

PI : Propidium Iodide

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

PTEN : phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10

ROI : regions of interest

SPR : Surface Plasmon resonance

TBR : Tumor-to-background ratio

TF : Tissue factor

TNF- α : tumor necrosis factor- α

vc Linker : Valine-Citrulline Linker

VEGF : vascular endothelial growth factor

VTE : venous thromboembolism

第 1 章 序論

1. 膵臓がん

膵臓がんは予後不良な固形腫瘍の一つであり、5 年生存率が 6.7%と他のがん種と比較しても低いことが知られる（図 1）⁽¹⁾。日本においても、2013 年の膵臓がん死亡者数は男女合わせて 30,672 人であり、他のがん種の年間死亡者数と比較しても、膵臓がんによる年間死亡者数は肺がん、胃がん、大腸がんに次いで 4 番目に多いことが報告されている⁽²⁾。また、2011 年の膵臓がん年間罹患数は男女合わせて 33,095 人であることから、膵臓がんの生存率が著しく低いことが明らかである。このような、膵臓がんの統計データを踏まえても、膵臓がんに対する新規診断・治療法開発を行う意義は高いと考える。

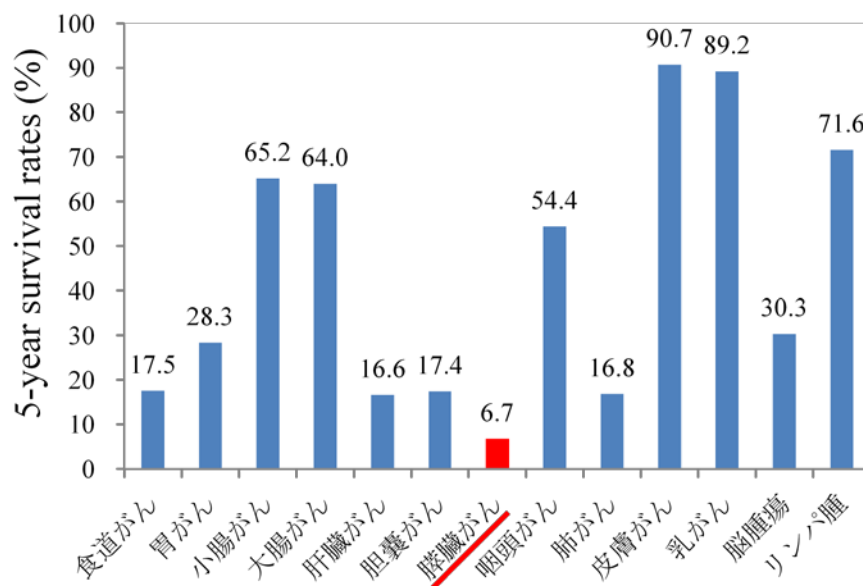


図 1. 2004-2010 における様々ながん種の 5 年生存率⁽¹⁾ (抜粋、改変)

2. Drug delivery system (DDS)

DDS (Drug Delivery system) とは、投与する薬剤の剤形や投与方法などを最適化することで、生体内での薬剤の吸収・分布・代謝を制御して、薬剤の薬効を最大限に高める技術である。

2-1. がんに対する DDS

一般的に、がんの治療に用いる低分子抗がん剤の副作用は強力であり、それらを用いたがんの治療には副作用が伴うことが懸念される。そのため、腫瘍組織に選択的に抗がん剤を送達し、正常部への抗がん剤の暴露を最小限に抑え、抗がん剤の腫瘍組織集積量を増大して治療効果を高めると同時に、副作用の軽減や投与量の減少といった利点が期待される DDS の概念は、膵臓がんに対する有用な新規製剤を開発する上で重要である。

膵臓がんを含めた固形腫瘍に対する DDS の概念には、腫瘍組織の脈管系の特性を活かした passive targeting と、分子間の特異的な結合能を活かした active targeting という 2 つの戦略が重要である。

2-1-1. Passive targeting

通常、正常血管では、低分子物質は血管外へ漏出することが出来るが、血管内皮細胞等の血管を構成する細胞が密な構造を保つことで、数十 nm 以上の大きさを持つ高分子物質は血管外へ漏出しにくいと考えられる (図 2) (3)。また、正常組織内ではリンパ管が発達しているため、血管外に漏出した物質はリンパ管から回収されやすい (図 2)。一方で、腫瘍血管では、恒常的な炎症等に起因して、血管透過性が亢進し、血管内皮細胞間に間隙が生じるため、正常血管では漏出しにくい高分子物質が容易に血管外へ漏出すると考えられる (図 2) (3)。さらに、腫瘍組織内ではリンパ管形成が不十分であるため、漏出した高分子物質は

リンパ管で回収されずに腫瘍組織内に長期間保持される（図 2）（3）。

このような現象は EPR（enhanced permeability and retention）効果と呼ばれ、がん領域における passive targeting の基本概念となっている。つまり、通常の抗がん剤のような低分子製剤は、腫瘍血管だけではなく、正常血管からも漏出しやすいため、正常組織への副作用が問題となる。一方で、抗体を含む高分子タンパク質やミセル製剤、リポソーム製剤といった高分子製剤は、正常血管から漏出しにくく、腫瘍血管選択的に漏出すると同時に、腫瘍組織中に長期間留まる。そのため、このような高分子製剤は低分子製剤と比較して、治療効果の増大と副作用の軽減が期待出来る。現在、EPR 効果を利用した passive targeting による固形腫瘍に対する高分子製剤の研究開発が基礎及び臨床で盛んに行われている。

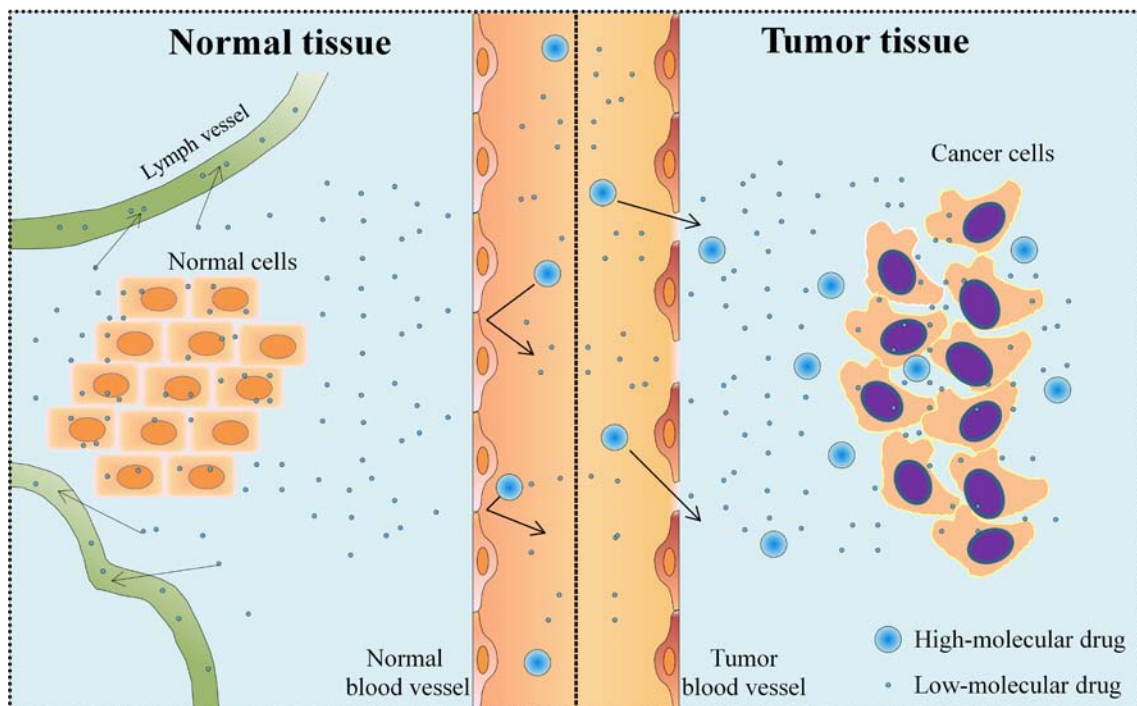


図 2. EPR 効果の概略図

2-1-2. Active targeting

Active targeting は、抗原や受容体に特異的に結合し作用するモノクローナル抗体やリガンドを用いた DDS の概念である。すなわち、薬剤送達のターゲットとなる腫瘍組織もしくはがん細胞に発現する抗原や受容体に対するモノクローナル抗体やリガンドを DDS ツールとして用いることで、その抗原もしくは受容体を選択的な薬剤の送達が可能となる。

その中でも、抗体製剤として最も多く臨床応用されている免疫グロブリン G (IgG; Immunoglobulin G) は分子量が約 150 kDa (粒子径が約 15 nm) であり、その分子サイズ及び抗原特異的結合性から、腫瘍組織への DDS ツールとして、passive targeting と active targeting の両方の作用が期待出来るため、有用な DDS ツールであると考えられる。

2-2. 抗体製剤

現在、がん領域において、抗体製剤が既にいくつか承認されている (表 1) (4)。それらの中で、2011 年以降に承認された抗体製剤が全体の約半数を占めることから、抗体製剤の開発は近年急速に成長している研究領域であると言える。

表 1. がん領域で使用されている抗体製剤^{(4)改変}

名称	商品名	構造	分類	target	US承認	日本承認	主な適応症例
rituximab	Rituxan	IgG1κ	キメラ抗体	CD20	1997	2001	B細胞性非ホジキンリンパ腫
trastuzumab	Herceptin	IgG1κ	ヒト化抗体	Her2	1998	2001	転移性乳がん
gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	IgG4κ(カリキアマイシン修飾)	ヒト化抗体	CD33	withdrawn	2005	急性骨髄性白血病
alemtuzumab	Campath	IgG1κ	ヒト化抗体	CD52	2001	2014	B細胞性非ホジキンリンパ腫
ibritumomab tiuxetan	Zevalin	IgG1κ(Yttrium-90 or Indium-111標識)	マウス抗体	CD20	2002	2008	B細胞性慢性リンパ性白血病
iodine 131 tositumomab	Bexxar	IgG1κ(Iodine-131標識)	マウス抗体	CD20	2003	未承認	非ホジキンリンパ腫
cetuximab	Erbix	IgG1κ	キメラ抗体	EGFR	2004	2008	頭頸部がん、結腸・直腸がん
bevacizumab	Avastin	IgG1κ	ヒト化抗体	VEGF	2004	2007	結腸・直腸がん
panitumumab	Vectibix	IgG2κ	ヒト抗体	EGFR	2006	2010	結腸・直腸がん
ofatumumab	Arzerra	IgG1κ	ヒト抗体	CD20	2009	2013	慢性リンパ性白血病
ipilimumab	Yervoy	IgG1κ	ヒト抗体	CTLA4	2011	2015	黒色腫
brentuximab vedotin	Adcetris	IgG1(MMAE修飾)	キメラ抗体	CD30	2011	2014	ホジキンリンパ腫
pertuzumab	Perjeta	IgG1κ	ヒト化抗体	Her2	2012	2013	HER2陽性手術不能または再発乳がん
obinituzumab	Gazyva	IgG1	ヒト化抗体	CD20	2013	未承認	慢性リンパ性白血病
trastuzumab emtansine	Kadcyla	IgG1κ(メイトンシン修飾)	ヒト化抗体	Her2	2013	2013	HER2陽性転移・再発乳がん
blinatumomab	Blincyto	(scFv) ₂	マウス抗体	CD19,CD3	2014	未承認	急性リンパ性白血病
pembrolizumab	Keytruda	IgG4κ	ヒト化抗体	PD-1	2014	未承認	黒色腫
ramucirumab	Cyramza	IgG1	ヒト抗体	VEGFR2	2014	2015	胃癌
nivolumab	Opdivo	IgG4	ヒト抗体	PD-1	2015	2014	悪性黒色腫
mogamulizumab	Poteligeo	IgG1κ	ヒト化抗体	CCR4	未承認	2012	CCR4陽性成人T細胞白血病リンパ腫

抗体製剤は、ターゲットとなる抗原によって多種多様な作用メカニズムを持つ(5)。例えば、ターゲットとなるがん細胞表面上の抗原に結合した trastuzumab や rituximab のような IgG 分子は、免疫エフェクター細胞による抗体依存性細胞障害活性 (ADCC; antibody-dependent cellular cytotoxicity) の媒介や、補体依存的な細胞障害活性 (CDC; complement-dependent cytotoxicity) の誘導を行い、その結果、直接的にがん細胞のアポトーシス誘導を引き起こす。ターゲット抗原によっては、抗体分子は血管新生の阻害薬としても働くこともでき (bevacizumab)、抑制性のシグナルを阻害することで細胞障害性 T 細胞の働きを強めることも可能である (ipilimumab、nivolumab)。また、免疫エフェクター細胞とがん細胞の両方を認識するバイスペシフィック抗体 (blinatumomab) などの改変抗体も開発されており、その他にも、放射性同位体 (ibritumomab tiuxetan、iodine 131 tositumomab) や抗がん剤 (brentuximab vedotin、trastuzumab emtansine) の DDS ツールとしても抗体分子が既に用いられている。

3. 組織因子 (TF; Tissue factor)

3-1. がんと血液凝固

がんと血液凝固との関連性は古くから知られる。その発端はフランスの医師 Trousseau が、がん患者において四肢の血栓症が高頻度で発症することを報告した 1865 年にまでさかのぼる(6)。臨床研究においても、膵臓がんや脳腫瘍などのがん患者は、健常者と比較して、静脈血栓症 (VTE; venous thromboembolism) の発症リスクが高まると報告されている(7)。

異常な血液凝固反応は、腫瘍組織内においても起こっていると考えられる。腫瘍組織内では、腫瘍塊の成長・浸潤により、正常及び腫瘍血管が破壊され、出血を引き起こし、血液凝固亢進状態が持続すると考えられる。このような血液凝固亢進状態は、腫瘍組織内において、腫瘍塊が成長・浸潤を続ける限り、無症状で永続的に起こり続ける、いわゆる、がん組織特異的な現象であると考えられる(8)。

また、EPR 効果で重要な腫瘍血管透過性因子ブラジキニンは内因系凝固経路の亢進によって(9)、腫瘍組織の血管新生に関与する VEGF (Vascular endothelial growth factor) は外因系凝固経路の亢進によって(10)、それぞれ腫瘍局所で産生されることも明らかにされている。

3-2. 正常組織における TF

3-2-1. TF の構造

TF は CD142、トロンボプラスチンとも呼称される分子量 47 kDa の膜 1 回貫通型糖タンパク質であり、type-II サイトカインレセプター様の構造を持つ。TF は、血液中の凝固因子である Factor VII/VIIa と複合体を形成する 219 アミノ酸残基からなる細胞外ドメインと、23 残基の膜貫通ドメイン、リン酸化部位を持つ 21 残基の細胞内ドメインで構成される(11)。

3-2-2. TF の機能

血液凝固反応を起こす反応経路には内因系血液凝固経路と外因系血液凝固経路の 2 つの反応経路があり、生体内における血液凝固反応には後者が重要な役割を持つことが知られる(12)。TF は外因系血液凝固経路の開始因子であり、すなわち、血液凝固反応において重要な役割を持つことで知られる。

外因系血液凝固反応は、血管の損傷に伴う血中凝固因子への TF の露出が引き金となって開始される。まず、TF はセリンプロテアーゼである Factor VII/VIIa と複合体を形成し、Factor VIIa-TF 複合体は Factor X を Factor Xa に活性化する。次に、Factor Xa はプロトロンビンを活性化して、セリンプロテアーゼであるトロンビンを生成する。最終的に、トロンビンにより可溶性のフィブリノゲンは繊維状の不溶性フィブリンに変換され、血液凝固が生じる。

また、Factor VIIa-TF 複合体は血液凝固反応以外にも、TF 発現細胞の細胞内シグナル伝達に関与していることが知られる（後述）。

3-2-3. TF の発現

正常組織において、TF は血管平滑筋細胞やペリサイト、血管外膜の線維芽細胞で恒常的に発現することが報告されている(13, 14)。通常、血管中膜及び外膜で恒常的に発現する TF と血中の凝固因子は、血管内皮細胞がバリアーの役割を果たすことで接触しない。それ故、正常組織では不要な血液凝固反応は起こらない。しかし、一度、血管が損傷を受けると、血中の凝固因子に TF が暴露されることで、即座に血液凝固反応が開始される。即座に反応を起こすことによって、血管の構造安定化を保持し、失血を防ぐことが出来る。そのため、出血時の凝固反応が即座に行われなければ生命に危機を及ぼすと考えられる。つまり、生命維持に重要な役割を担う臓器である脳や心臓、肺、腎臓、胎盤においては、恒常的に TF が発現することが報告されている(15)。

また、血管内皮細胞や線維芽細胞、単球、血小板では、リポ多糖（LPS）やインターロイ

キン-1 β 、TNF- α といった炎症性サイトカインの刺激によって、TF の発現が上昇することが報告されている(16, 17)。

3-3. 腫瘍組織における TF

近年 TF は、血液凝固反応の開始因子としての機能のみならず、細胞内でのシグナル伝達を開始する因子であることも明らかになっており、がんの成長や血管新生、転移、悪性度など、がんとの様々な関連性が示唆されている。

3-3-1. TF 発現

腫瘍組織における TF の発現は、悪性脳腫瘍や膵臓がん、非小細胞肺癌、大腸がん、腎臓がん、卵巣がん、前立腺がん、肝細胞がん、乳がんといった多くのがん種で報告されている(18, 19)。また、腫瘍組織における TF の発現上昇は、がん細胞のみではなく、腫瘍組織内における炎症性サイトカイン発現上昇等に起因して、血管内皮細胞や線維芽細胞などの腫瘍間質細胞でも報告されている(20)。

腫瘍組織における TF 発現の多寡は、がん種によって様々であるが、通常、進行がんではその発現量が上昇すると報告されている(21)。そのため、TF は予後予測因子としても有用であることがと示唆されている(22)。

3-3-2. TF の発現制御

がんにおける TF 発現は、著名ながん関連因子によって制御されていると考えられている。例えば大腸がんでは、K-*ras* や p53 の変異によって、MAPK や PI3K シグナル経路が活性化し、その結果、TF の発現が誘導される(23)。また、EGFR の発現増加や変異型 EGFRvIII の活性化は、がん細胞における TF 発現制御に関与していることが示されている。実際、グリ

オーマでは、MAPK や PI3K シグナル経路を抑制するがん抑制遺伝子 PTEN によって、EGFR 依存的な TF 発現が抑制されることが明らかになっている(24)。

TF 発現制御には、このようながん遺伝子もしくはがん抑制遺伝子の他にも、低酸素条件や EMT などにも関与していると報告されている(19)。

3-3-3. TF の細胞内シグナル

TF は、Factor VIIa と複合体を形成することで、細胞内のシグナル伝達経路を活性化し、がん関連遺伝子の転写制御や細胞生存、細胞骨格の変化といった広い範囲にわたる細胞制御に関与することが知られている(19)。

TF と Factor VIIa の複合体形成による細胞内シグナルに関しては、PAR2 を介したシグナル経路がよく知られている。まず、TF/Factor VIIa 複合体が、G タンパク質共役受容体である PAR2 の細胞外領域 N 末端の特定部位を切断することで、PAR2 はヘテロ 3 量体 G タンパク質と結合して、細胞内のシグナル伝達を開始される(25)。これにより、MAPK ファミリーである Erk1/2 や p38、JNK の活性化を引き起こす。さらに、Src 様キナーゼ、PI3K、Jak/STAT 経路や Rho GTPases Rac1 を活性化し、その結果、細胞生存や細胞骨格の再編成を誘導する(25)。MAPK と PI3K の両経路の活性化は、異常な転写プログラムや発がん性タンパク質合成の促進の原因となることが知られている。また、TF/Factor VIIa 複合体による PAR2 活性化は、VEGF や CXCL-1、IL-8 のような血管新生因子の生成も誘導すると報告されている(26, 27)。

3-3-4. TF と転移

TF はがん細胞の転移にも関与する可能性が示唆されている。血中で循環しているがん細胞 (CTCs; circulating tumor cells) が TF を発現することで、がん細胞表面上におけるフィブリン形成を誘導する。このようなフィブリンで細胞膜表面を覆われたがん細胞は、微小血

管にトラップされやすいと考えられる。また、このようながん細胞表面上のフィブリン形成は、NK 細胞の攻撃からも、CTCs を守る役割を果たしていると考えられている(28, 29)。

3-3-5. TF と膵臓がん

上記した TF とがんとの関連性は、膵臓がんにおいても多数報告されている。Khorana らの報告によれば、54%の膵臓がん患者の腫瘍組織において、TF が高発現しており、また、TF 高発現の膵臓がん患者は、低発現の膵臓がん患者と比較して、VEGF の発現亢進が見られると同時に VTE 発症確率も高いことが示されている(30)。また、膵臓がんの予後と TF との関連性も示唆されており、予後が悪い膵臓がんにおいて、TF の過剰発現が多く見られる(21, 31)。このような TF と膵臓がんとの関連性から、TF は有望な膵臓がんのターゲット抗原になると考えられる。

4. 本研究の大目的

膵臓がんに対する有望な新規診断・治療薬の開発ニーズは高いと考えられる。また、DDS の概念は腫瘍組織選択的に薬剤を送達するための重要な戦略であり、その中でも抗体分子は passive targeting と active targeting を利用することで、膵臓がんを含む多くの固形腫瘍に対して有用な DDS ツールになりえる。さらに、がんと血液凝固との関連性は古くから知られており、血液凝固の開始因子である TF は膵臓がんを含む種々の腫瘍組織において過剰発現していることが報告されている。

このような背景から、我々は抗 TF モノクローナル抗体が膵臓がんに対する有用な DDS ツールになりえると考え、本研究の最終的な目的を、膵臓がんに対する抗 TF モノクローナル抗体を用いた新規診断・治療薬の開発と定めた。

本博士論文では、抗 TF モノクローナル抗体の膵臓がんに対する診断及び治療応用への有用性を、それぞれ第 2 章及び第 3 章において、研究結果を踏まえて論じるものとする。