

論文審査の結果の要旨

氏名 藤原 悠起

本論文は、全四章から成り、第一章は背景と目的、第二章は実験方法、第三章は結果と考察が述べられており、最後に第四章で結論を述べている。

第一章は、抗体抗がん剤複合体 (ADC)について、歴史的背景から現在の問題点までを詳しく述べていた。ADC がミサイル療法と呼ばれた時代の臨床研究結果に着目し、これまで歩んできた ADC 研究について述べられていた。ADC の評価は抗腫瘍効果や体重減少だけでなく薬理学的解析を行なうべきであるとし、血液凝固開始因子 tissue factor (TF)抗体に Val-Cit リンカーMMAE を結合した human TF ADC の薬理学的解析を行なうことを研究目的とする旨を述べていた。ADC の薬理学的解析を行なう理由について二点、言及していた。一点目、ADC はプロドラックであり、HPLC や LC-MS/MS、トレーサー実験などの実験手法では、ADC から MMAE が放出されたか否かを検討できないという技術的側面が記述されていた。二点目、腫瘍組織で抗がん剤の浸透を妨げる要因 (間質細胞、免疫細胞など)があり、腫瘍深部にまで抗がん剤が到達しないという腫瘍学的側面が記述されていた。以上より、human TF ADC の腫瘍内 MMAE の定量とその分布を明らかにすることを目的としていた。腫瘍内分布の解析に用いた質量顕微鏡は、大気圧 MALDI-IT-TOF MS と光学顕微鏡が融合した最新分析機器であると説明していた。本実験は、質量顕微鏡を用いて MMAE が検出できるかという基礎的な検討からスタートし、MMAE のイオン化に用いるマトリックスの選定、質量顕微鏡の定量性の検討、MMAE イメージングに用いるフラグメントイオン探索、そして、腫瘍内 MMAE 分布の解析という流れで述べられていた。

第二章は、実験に用いた分析機器、LC-MS/MS と質量顕微鏡の 2 種類について詳述されていた。実験に用いた control ADC と human TF ADC は Val-Cit リンカーMMAE を理化学研究所の眞鍋史乃先生に提供していただき、自ら抗体に付加して作製していた。ヒト膀胱がん細胞株 BxPC-3 皮下腫瘍マウスを用いて実験していた。MMAE 単剤、control ADC と human TF ADC を担がんマウス尾静脈より投与して、3 時間、24 時間、及び 72 時間後の腫瘍組織を解析対象としていた。解析に用いた質量顕微鏡の実験方法は、取扱から細かい条件まで詳しく記載されていた。また、MS と MS/MS の条件について詳細な設定を含めて記載されていた。画像解析について、イメージ J の使用方法が述べられていた。

第三章は、MMAE のイオン化に用いるマトリックスの選定、MMAE の MS と MS/MS、そして、腫瘍内 MMAE 分布の検討結果と考察が述べられていた。

MMAE のイオン化ができるかを 2 種類のマトリックス、2, 5-ジヒドロキシ安息香酸

(DHB)と α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (CHCA)の比較を行い、どちらが MMAE イメージングに適しているかを検討していた。それぞれの結晶の形状に着目し、結晶の不均一性が低い CHCA がイメージングに適していると述べられていた。

MMAE の MS で 3 種類の陽イオンが検出されたと報告している。これらの m/z では腫瘍内 MMAE を検出できないために、MMAE の MS/MS を行っていた。MMAE イメージングの候補となるイオンピークは、感度と特異度の観点から選定していた。候補となる MS/MS フラグメントの中から m/z 740.4/496.3 を MMAE のイメージングに用いるとしていた。質量顕微鏡の定量性についても述べられていたが、腫瘍内 MMAE を定量するには至らないと考察していた。

MMAE 単剤、control ADC、及び human TF、それぞれの投与群の経時的変化を LC-MS/MS と質量顕微鏡を用いて検討していた。MMAE 単剤と control ADC は投与後から腫瘍内 MMAE が減少しているのに対し、human TF ADC は投与後 3 時間から 24 時間まで腫瘍内 MMAE は上昇しているという結果を示していた。Human TF ADC 投与後 24 時間の腫瘍内 MMAE 分布に特徴があるかを、腫瘍組織をがん部と間質部に分けて検討していた。質量顕微鏡の最大空間分解能で腫瘍組織を解析した結果、human TF ADC はがん部に MMAE を放出していることが明らかになったとし、これが human TF ADC の高い抗腫瘍効果に影響していると考察していた。

第四章は、human TF ADC の腫瘍組織における薬理的解析 (LC-MS/MS と質量顕微鏡) の結果についてまとめていた。これまで行われてきた抗腫瘍効果などの動物実験だけでなく、質量顕微鏡を用いて ADC の腫瘍内抗がん剤分布を検討すべきであると主張していた。

本論文は、一から質量顕微鏡の実験系を立ち上げ、腫瘍内から MMAE 分布を解析する実験手法を確立した初めての報告である。この技術をプロドラッグである human TF ADC 研究に応用し、その腫瘍内 MMAE 分布を明らかにした。MMAE は ADC 開発に欠かせない抗がん剤であることから、この研究は生命科学と医科学の両面において優れた成果を示している。

本論文は国立がん研究センター東病院の安永正浩博士、古賀宣勝博士、島津製作所の古田大氏、理化学研究所の眞鍋史乃博士との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。したがって、博士 (生命科学)の学位を授与できると認める。

以上 1943 字