

# 博士論文 (要約)

## 論文題目

血液凝固開始因子Tissue Factor (TF)に対する  
一本鎖抗体の作製とがん診断応用

氏 名 佐藤 隆太

目次	2
要旨	4
略語	9
第1章：背景及び目的	10
1.がんと血液凝固の関係	11
2.血液凝固の開始因子 Tissue Factor (TF)	12
3.がん標的としての TF	12
4.抗体の治療応用	13
5.抗体の診断応用	14
抗体の低分子化とがんイメージング	14
7.一本鎖抗体の特徴	15
8.本研究の目的	15
第2章：材料及び方法	17
1.細胞株と細胞培養	18
2.リコンビナント mTF 抗原タンパク質の作製	18
3.抗 mTF 抗体の作製	18
3-1. ラット免疫法	18
3-2. 細胞融合法	19
3-3. 抗 mTF 抗体産生ハイブリドーマスクリーニング	19
3-4. ELISA 法	19
3-5. 抗血液凝固機能測定	20
4.抗 mTF scFv の作製	20
4-1.ハイブリドーマ 1157 クローンの cDNA 合成	20
4-2.抗体可変部配列の決定	20
4-3. 抗 mTF scFv プラスミド構築	21
4-4. 抗 mTF scFv の発現	21
4-5. 抗 mTF scFv の精製	21
4-6.CBB 染色とウエスタンブロッティング	22
5.mTF 抗原に対する抗体の結合測定	22
5-1.SPR 解析	22
5-2.細胞免疫染色	23
5-3.フローサイトメトリー解析	23
5-4.抑制実験	24

6.モデルマウスの作製	24
6-1.化学発癌モデルマウスの作製	24
6-2.化学発癌モデルマウスの免疫染色と HE 染色	24
7.腫瘍イメージング実験	25
8.動物使用における倫理について	25
 第3章：結果	 27
1.抗 mTF IgG 抗体の選択と機能解析	28
2.抗 mTF scFv の作製	30
3.抗 mTFscFv の性状解析	32
3-1. <i>In vitro</i> における検討	32
3-1-1. SPR による結合能	32
3-1-2.フローサイトメトリーによる結合能	33
3-2. <i>In vivo</i> における検討	36
3-2-1. 化学発癌モデルマウスの作製と mTF の組織免疫染色	36
3-2-2. 化学発癌モデルマウスにおける抗 mTF 抗体の腫瘍集積性	37
3-2-3. 化学発癌モデルマウスにおける腎、肝への抗体集積性	40
 第4章：考察	 41
1. ハイブリドーマクローンの選択	42
2. 抗 mTF scFv の結合能と抗原特異性の評価	43
3. 抗 mTF scFv の腫瘍イメージングへの評価	44
4. 抗 mTF scFv の臨床応用への適合性と課題	45
 第5章：今後の展望	 48
 第6章：結語	 51
 引用、参考文献	 53
謝辞	58

# 要旨

# 論文の内容の要旨

## 論文題目 血液凝固開始因子Tissue Facotor (TF)に 対する一本鎖抗体の作製とがん診断応用

氏 名 佐藤 隆太

### [序論]

#### 1.血液凝固とがん

19 世紀からがんと血液凝固との関係性が示唆されており、がん患者において静脈血栓症や凝固異常ががんの合併症として数多く報告されている。また、多くのがん種で血液凝固因子の発現が亢進していることが知られている。こうした原因の1つはがんにおける血液凝固開始因子 Tissue Factor (TF)の過剰発現だとされている。TF は1 回膜貫通型の膜糖タンパク質であり、血管損傷の際に、血液中の凝固因子 VII と複合体を形成し、VIIa とすることで血液凝固のカスケードを開始させる。また、TF は膵がんや脳腫瘍、胃がんなど多くのがん種で高発現していることが知られる。がん組織においては、がん細胞が組織に浸潤する際に組織や血管を損傷させ、出血し、すぐさま血液凝固が引き起こる。がんはその無限増殖という特徴から、これらの出血、凝固ががん組織のいたるところで永続的に起こると考えられる。そのため、TF を標的とした抗体は、多くのがん種を標的とできる抗体であると考えられる。

#### 2.がん診断と抗体の低分子化

近年、MRI、PET や SPECT による分子イメージングががん研究における注目を浴びている。これまで多くのイメージングプローブが開発されてきた。抗体は「魔法の弾丸」としてがんイメージングの分野でも応用が期待される。抗体の腫瘍への選択的集積性に加えて、毒性の軽減は分子イメージングプローブとして必須の条件である。その理由は、がん患者のみならず健常者をも対象となるし、それらの検査は外来でしばしば行われるからである。しかし、IgG 抗体は、長い血中滞留性を示し、プローブ投与後、検査日まで数日を要する。また、肝臓などに比較的長く蓄積される。さらに、そのサイズの大きさからがん組織中の間質により阻まれ、肝心のがん細胞まで到達できないことがよく知られている。これらの点を克服するためにタンパク質工学の分野では、抗体の低分子化が行われてきた。酵素で

処理することによって IgG は F(ab)'<sub>2</sub> や Fab にすることができる。また、遺伝子工学的手法を用いることで、抗体可変部とペプチドリンカーからなる最少サイズの一本鎖抗体(scFv)が開発されてきた。

本研究では TF に対する scFv 抗体の作製と IgG と比較した腫瘍イメージングツールとしての性状解析を行った。

## [結果と考察]

### 1.抗マウス TF (mTF) IgG 抗体からの scFv 抗体作製

当研究室で樹立した抗マウス TF IgG 抗体産生ハイブリドーマ clone. 1157 の cDNA から配列情報を複数のプライマーを用いて増幅し、IgBLAST を用いて抗体の VH 及び VL の配列情報を読み取った。さらに、制限酵素配列したプライマーで PCR を行った。その後、pRA2 改変ベクターに VH 及び VL 配列を組み込み、

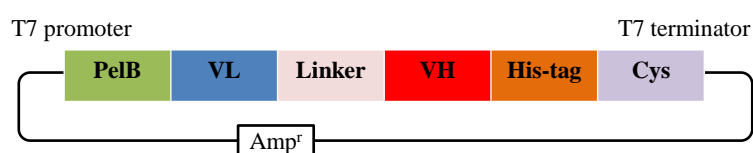


図 1. 抗 mTF scFv 抗体のプラスミド設計

両者の間にペプチドリンカー及び薬剤修飾のためにシステイン配列を組み込んだ(図 1)。大腸菌細胞株 BL21 株に上記のプラスミド(図 1)で形質転換させ、2×YT 培地で IPTG 添加後、6 時間培養した。抗 His 抗体を用いたウエスタンブロッティングによって目的の scFv が大腸菌の可溶性画分及び不溶性画分に発現していることを確認した(図 2-A)。Ni アフィニティ精製、ゲルろ過精製後、SDS-PAGE で単一バンドになっている 28 kDa のバンドを回収した(図 2-B, C)。

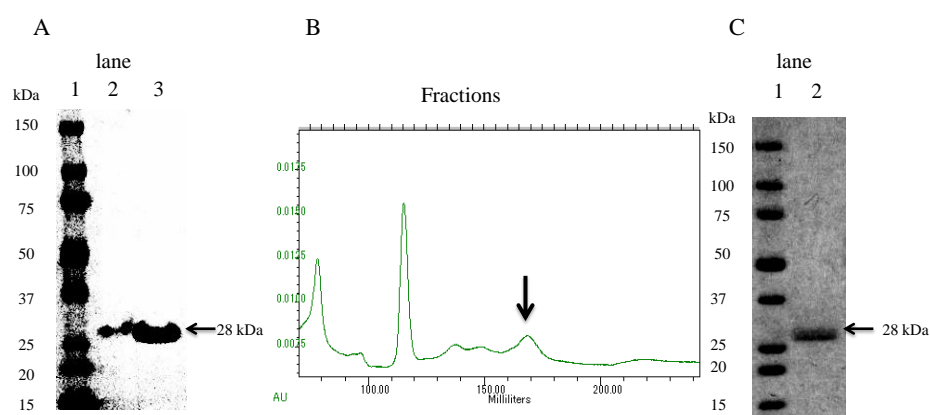


図 2. 抗 TFscFv 抗体の精製

A. 抗 His 抗体によるウエスタンブロッティング。lane1: サイズマーカー、lane2: 大腸菌可溶性画分、lane3: 大腸菌不溶性画分

B. 可溶性画分のゲルろ過クロマトグラフィー。矢印の画分を回収した。

C. 精製後 scFv の CBB 染色。28kDa のシングルバンドの scFv を回収した。

## 2. 抗 mTFscFv 抗体の結合活性

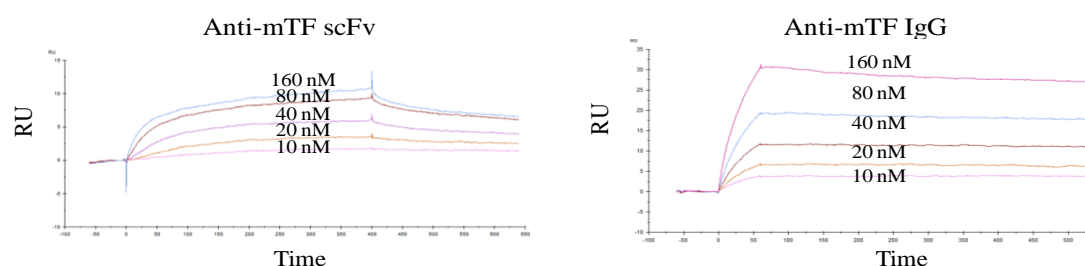
Surface Plasmon Resonance (SPR) 解析を用いて作製した scFv 抗体の結合能の解析を行った。Biacore センサーチップに組み換え mTF を固定化し、10 nM から 160 nM までの各濃度の抗体を投与し、結合能の解析を行った。その結果、作製した scFv は、濃度依存的な Resonance Unit (RU) の値の増加が見られた。また、IgG 抗体と比較して scFv はかい離速度 (kd) の増加が見られた。そのため、scFv のかい離定数 (KD) の増加が見られた(図 3-A、表 1)。また、mTF 高発現の LTPA-TF 細胞に対してフローサイトメトリー解析を行い、両抗体の細胞への結合を確認した(図 3-B-左)。さらに、各濃度の組み換え mTF タンパク質と抗体を 30 分抗原抗体反応させ、フローサイトメトリー解析を行った。その結果、加えた mTF 抗原の濃度依存的に抗体と LTPA-TF 細胞との結合抑制が認められた(図 3-B-右)。これらの結果から抗 mTF scFv の mTF 抗原特異性を確認した。

	ka	kd	KD
scFv	$7.44 \times 10^4$	$1.52 \times 10^{-3}$	$2.04 \times 10^{-8}$
IgG	$1.67 \times 10^5$	$8.07 \times 10^{-5}$	$4.82 \times 10^{-10}$

表 1. 抗 TFscFv 抗体と IgG 抗体比較

結合速度定数 (ka)、かい離速度定数 (kd)、かい離定数 (KD)

A



B

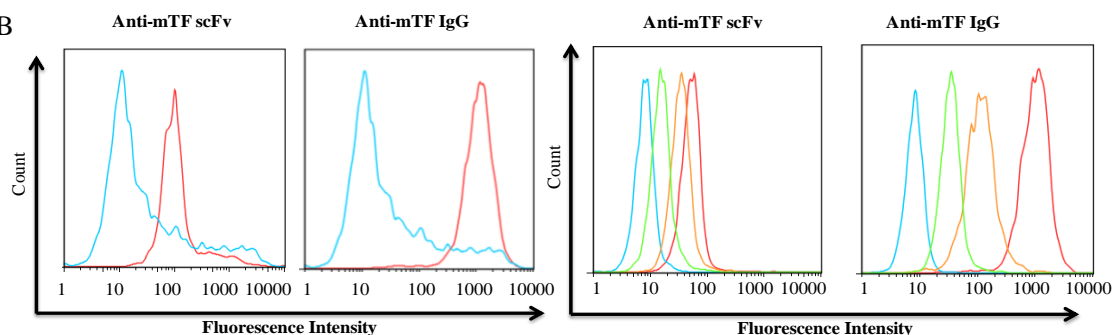


図 3. SPR とフローサイトメトリーによる抗 mTFscFv の結合解析

A. SPR による抗 mTFscFv と IgG 抗体の結合。

B. フローサイトメトリーによる LTPA-TF 腫がん細胞への抗体の結合測定と mTF 抗原への抑制測定。LTPA-TF 細胞に各抗 mTF 抗体は結合が見られた(左)。組み換え mTF 抗原と反応させた各抗 TF 抗体を高 TF 発現マウス脾臓がん細胞 LTPA-TF 対してフローサイトメトリー解析を行った。両抗 mTF 抗体の細胞への結合は添加したリコンビナント mTF 抗原依存的に抑制が見られ、抗体の特異性を確認することができた(右)。マウス TF 抗原は右から 0、19.2、192 pmol 添加した。左端のピークはコントロール抗体を示す。

### 3. In vivo imaging

マウスにおいて mTF 高発現の細胞株では、同種移植における生着率が悪く、形成した腫瘍においても細胞成分が主であり間質成分が少なかった。腫瘍モデルとして DMBA をイニシエーター、PMA をプロモーターとして誘発形成した皮膚自然化学発癌モデルを用いた(図 4-A)。すなわち、この腫瘍は、成長速度が臨床のヒト腫瘍と同じく遅く、間質が豊富で

あり mTF が高発現であるという特徴を示す(図 4-B)。また、mTF の発現はがん細胞の間質への浸潤部において強く認められた(図 4-C)。蛍光標識した mTF scFv 及びコントロール scFv、mTF IgG 抗体を 66.67  $\mu$ mol 化学発癌モデルマウスの尾静脈より注射した。腫瘍部の集積値は、scFv では 12 時間まで腫瘍部に集積が見られた。一方、IgG では 72 時間まで集積が見

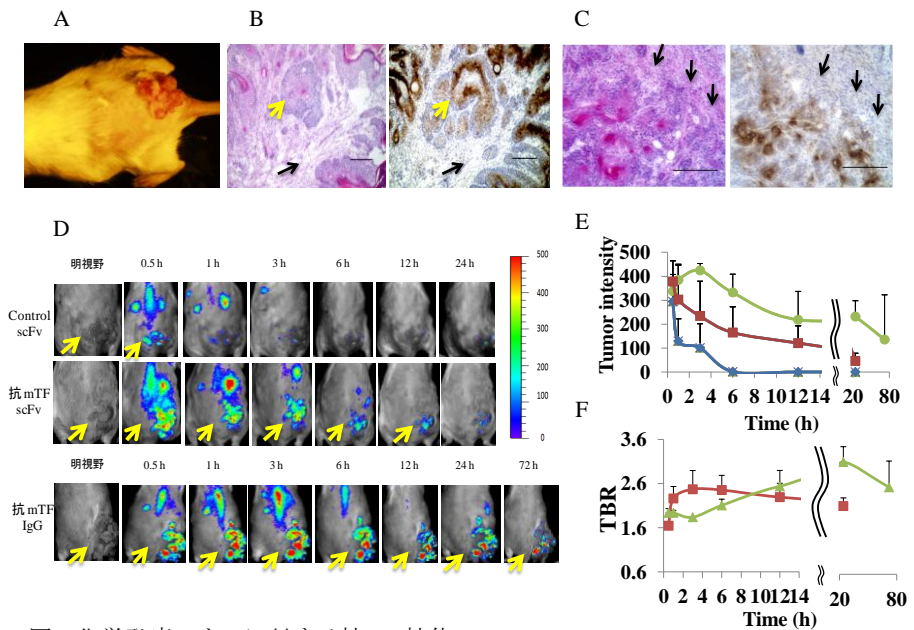


図 4.化学発癌マウスに対する抗 TF 抗体の *in vivo* imaging

A.化学発癌モデルマウスの腫瘍形成像 B.HE 染色における腫瘍組織像(左)と TF 発現(右)。黒矢印は間質、黄色矢印は腫瘍部分を示す。C.がん浸潤部における TF 発現。黒矢印は間質への浸潤部を示す。D. 抗 TF scFv、抗 TF IgG 抗体を用いた *in vivo* imaging。白矢印は腫瘍部を示す。E.腫瘍部における蛍光値の変化 F. 腫瘍/正常部のコントラスト比 (TBR)。

られた。コントロール scFv は 3 時間までに腫瘍部の集積が見られ、その後迅速に排出された(図 4-D, E)。また、腫瘍部と正常部との比 Tumor to background ratio (TBR)は、scFv において 3 時間で最大となり、IgG は 24 時間で最大となった(図 4-F)。これより、scFv は投与早い段階で腫瘍部に集まり、その後迅速にクリアランスされることが示唆された。こうした特徴はがん診断プローブとして、がんへの特異度の強さと毒性の軽減が期待できる。

### [結論]

本研究では、抗マウス TF scFv 抗体の作製と *in vitro* 及び *in vivo* における性状解析を行った。この scFv 抗体は、scFv として比較的高い親和性を有し、mTF 抗原特異的に結合した。In vivo において腫瘍部に集積し、投与早い段階から正常部とのコントラストが明確な特徴を有していた。また、迅速に生体内からクリアランスすることから将来のがん診断用プローブに適していることが示された。



## 略語

TF: Tissue Factor

scFv: single chain variable fragments

DDS: Drug Delivery Systems

EPR: Enhanced Permeability Retention

MMAE: Monomethyl auristatin E

PMA: phorbol myristate acetate

DMBA: 7,12-dimethyl- benz[*a*]anthracene

PBS: Phosphate buffered saline

HE: hematoxylin eosin stain

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

CBB: Coomassie brilliant blue

PET: Positron emission tomography

CT: Computed tomography

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polycrylamide gel electrophoresis

VEGF: Vascular endothelial growth factor

EGF: endothelial growth factor

K<sub>D</sub>: Dissociation constant

IgG: Immunoglobulin G

HRP: Horseradish peroxidase

VTE: Venous thromboembolism

k<sub>a</sub>: kinetic association rate constant

k<sub>d</sub>: kinetic dissociation rate constant

# 第 1 章

## 背景と目的

## 1. がんと血液凝固の関係

19 世紀の外科医 Armand Trousseau は、がん患者で静脈血栓症の頻度が高いことを報告していた<sup>1</sup>。現在においても、多種のがんで静脈血栓症 (VTE) や深部静脈血栓症 (DIC) は患者に重篤な合併症として多く報告されている<sup>2,3</sup>。また、基礎・トランスレーショナル研究でがんにおける内因系、外因系凝固が深く関わっていることも知られている<sup>4,5</sup>。Tissue Factor (TF) は外因系の血液凝固開始因子であり、凝固因子 VII と結合し、VIIa へと活性化させることで血液凝固を開始させる<sup>6-8</sup>。図 1 のカスケードのように血液凝固が TF より開始され、最終的にフィブリンが形成される。

### 図 1. 血液凝固カスケード (省略)

血液凝固は外因系と内因系の 2 つの経路に分かれている。

(Matsumura Y. Cancer stromal targeting (CAST) therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(8):710-719. Copyright ELSEVIER)

参考文献 9 より引用、一部改変。

こうしたがんにおける易出血傾向は悪性凝固サイクルによって説明できる (図 2)<sup>9</sup>。通常、怪我による損傷によって出血が起こり、血液中の血液凝固因子と組織に存在する TF が接触することで凝固が開始する。出血箇所は不溶性フィブリンが形成され、その後創傷部位は、凝固因子が分解されることでコラーゲンへと置換され治癒へと向かう。一方、がん組織では、がんの増殖や浸潤によって組織が損傷を受け、出血が引き起こされる。すぐに血液凝固系が働き、創傷治癒過程と同じイベントが起きる。しかし、がんは、無限増殖能を獲得した細胞であるので、がんが生体内で存在している限りこうした出血と凝固のサイクルががんのいたるところで永続的に起きているものと考えられる。また、産生されたコラーゲンはがん間質の構成成分となる。

### 図 2. がん組織における悪性凝固サイクル (省力)

がん組織では、がんの増殖や浸潤によって組織が損傷を受け、出血が引き起こされる。すぐに血液凝固系が働き止血、創傷治癒が行われる。しかし、がんは、無限増殖能を獲得した細胞であるので、こうした出血と凝固のサイクルががんのいたるところで永続的に起きているものと考えられる。また、産生されたコラーゲンはがん間質の構成成分となる。

(Matsumura Y. Cancer stromal targeting (CAST) therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(8):710-719. Copyright ELSEVIER)

参考文献 9 より引用、一部改変。

## 2.血液凝固開始因子 Tissue Factor (TF)

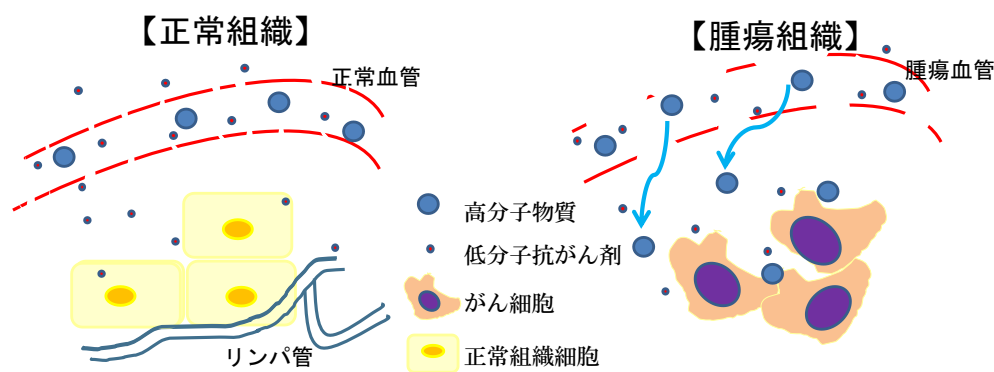
TF は、47 kDa の 1 回膜貫通型の膜糖タンパク質であり<sup>10</sup>、組織の多くの正常細胞に低発現しているが、出血により TF 発現量が増加することが知られている。また、多くのがん細胞に高発現している因子として知られている。がんの特徴的な低酸素や多くのがんで発現増加が見られる EGFR、VEGF などが TF の発現増加に寄与していることが分かっている。また、がん細胞膜上の TF も EGFR や VEGF の発現増加に関与していることも報告されている<sup>11</sup>。さらに、がん細胞のみならずがん間質細胞や血管内皮細胞でも TF 発現が報告されている<sup>12, 13</sup>。

## 3.がん標的としての TF

TF は多くのがん種で発現しており、The human protein atlas (ヒトのタンパク質発現情報データベース) によると約 77% のがん種で発現が見られる。特に、膵がんや胃がんなど浸潤性の強いがんで高い発現が知られている。さらに、様々ながんで TF の発現ががん患者の予後の悪さと相関していることが報告されている<sup>14-18</sup>。これらから、がんを発現する TF を標的とすることは、がん治療や診断に有効であると考えられる。当研究室では、今までにヒト TF を標的とした抗体の作製を行ってきており、作製した抗体はがん部に選択的に集積すること、がん転移を抑制することを報告した<sup>19</sup>。

#### 4.抗体の治療応用

現在、抗体治療においては、抗がん剤を抗体に付加させた Antibody-drug conjugates (ADCs)の研究開発が進められている<sup>20</sup>。この ADCs では抗体は薬剤のデリバリーツールとして腫瘍部に長く留まらせる必要がある。そのため、Enhanced permeability and retention (EPR)効果を受けやすい剤形にする必要がある<sup>21</sup>。EPR 効果とは、腫瘍における血管は正常血管と比較して透過性が亢進されており、血管内皮細胞の間隙が約 40 nm から 500 nm に広がっている。また、リンパ管の増生が未発達であり、血管から漏れ出た物質は長く腫瘍組織に留まる特徴を有する。そのため、数 10 nm にした薬剤は長く腫瘍部に留まる<sup>22</sup>。現在では、高分子ミセル (約 10 nm から 50 nm)やリポソーム (約 100 nm)などの DDS 製剤が開発され、がん治療などに応用されている<sup>23, 24</sup>。完全抗体である IgG は、約 10 nm であり、EPR 効果を受けやすいサイズであり、腫瘍部に長く留まる特徴を有する<sup>25</sup>。



#### **Enhanced permeability and retention (EPR)効果**

腫瘍組織において血管の透過性の亢進、リンパ管新生が未発達により高分子が長く留まる。

### 図 3.EPR 効果

腫瘍における血管は正常血管と比較して透過性が亢進されており、血管内皮細胞の間隙が約 40 nm から 500 nm に広がっている。また、リンパ管の増生が未発達であり、血管から漏れ出た物質は長く腫瘍組織に留まる特徴を有する。そのため、数 10 nm にした薬剤は長く腫瘍部に留まる。現在では、高分子ミセル(約 10 nm から 50 nm)やリポソーム(約 100 nm)などの DDS 製剤が開発され、がん治療などに期待されている。

## 5. 抗体の診断応用

近年、MRI や PET、SPECT による分子イメージングが、がん生物学、医薬品開発、がん診断などのがん研究において注目を浴びている。これまで多くの腫瘍可視化プローブが開発され、臨床の場で用いられている。抗体は、「魔法の弾丸」として腫瘍イメージング分野においてその利用が期待されている。腫瘍への特異性に加えて、利便性のよさや毒性の軽減が分子プローブとして求められている。この理由は、がん診断として外来において健常者に投与されるからであり、より安全性が求められる。IgG プローブは、血中の循環性が長いことや肝臓に多く集積するなど望まれない性質を持っている。さらに、IgG はがんにおける腫瘍での豊富な間質により阻まれ、抗体ががん細胞まで到達できないことが知られている<sup>26</sup>。この問題を解決するために、タンパク質工学技術によって低分子化された抗体プローブを開発がなされてきた。<sup>26-28</sup>

## 6. 抗体の低分子化とがんイメージング

IgG は、F(ab')<sub>2</sub>, Fab や single-chain variable fragment (scFv)に変換することができる。F(ab')<sub>2</sub> や Fab は酵素を用いて消化することで低分子化することができる。低分子化抗体は、図 4 のような各抗体分子種が存在し、サイズや分子量の違いから組織の浸透性やクリアランスが異なることが予想される。

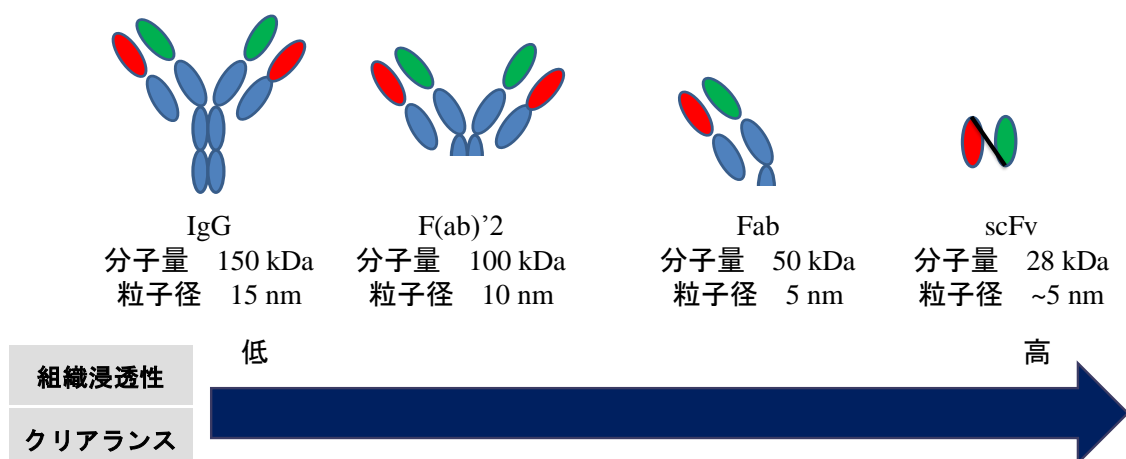


図 4.各抗体分子のサイズと特徴

抗体は、酵素処理や遺伝子改変によって各抗体分子種が存在し、分子量や粒子径が異なる。そのため、組織浸透性や生体クリアランスが異なる。

## 7.一本鎖抗体の特徴

一本鎖抗体 scFv は遺伝子工学の技術を用いて得ることができる<sup>29</sup>。ScFv は抗体の可変部である重鎖 (VH)と軽鎖 (VL)をペプチドリンカーで結んだ遺伝子改変抗体である。大腸菌を用いて産生することが可能であり、哺乳類細胞を用いた産生系よりも安価で大量に抗体が得られることが期待される。分子や粒子径の小ささから組織の浸透性やクリアランスが高いことが期待される。しかしながら scFv はしばしば、元の IgG と比較して結合能が低下することが知られている<sup>30</sup>。

## 8.本研究の目的

上述したように、がん診断において抗体の応用が求められている。TF は、がん標的として多くのがんに発現していることやがん組織に加え、腫瘍血管などのがん間質にも発現していることなどドラッグデリバリーの標的タンパク質として有用な因子である。

本研究において、抗 TF scFv の作製を行い、IgG と比較した性状解析とイメージングツールとしての評価を目的とした。

第一に mTF の細胞外ドメイン部分の配列情報からリコンビナント mTF 抗原を得て、ラットに免疫した。得られた脾臓細胞からハイブリドーマを作製し、抗 mTF IgG の作製を行った。第二に、ハイブリドーマの配列情報から抗体可変部を増幅させ、抗 mTF scFv の作製を行った。第三に、各 mTF IgG 及び scFv の性状解析を *in vitro* 及び *in vivo* で行った。これらの実験により、作製した抗 mTF scFv についてがん診断薬としての有用性を検討した。



## 第 2 章

### 方法と材料

## 1.細胞株

マウス腭がん細胞 LTPA、ヒト腭がん細胞 BxPC3 は American Type Culture Collection (ATCC 社)より購入した。マウス TF (mTF)を強制発現した LTPA-TF 株は、mTF 遺伝子を pEF6 vector (Invitrogen 社)に導入させた。LTPA-TF 細胞は、安定的に mTF を発現し、ブラストサイジンでセレクションし作製した。細胞は、RPMI1640 (Wako 社)に 10% FBS (Gibco 社)、100 units/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン、0.25 µg/ml アンホテリシン B (Wako 社)、5% CO<sub>2</sub>、37°C で培養した。

## 2.リコンビナント mTF 抗原の作製

NIH データベースの mTF の配列情報の細胞外ドメイン部分の配列を pET ベクターに組み込み、大腸菌細胞株で発現させたものを用いた (Bio Matrix 社)。

## 3.抗 mTF 抗体の作製

### 3-1.ラット免疫法

免疫原としてリコンビナント mTF を用いた。免疫原を PBS に希釈して 0.32 mg/ml としたものを 1/3 量の Freund's complete adjuvant (FCA: Becton Dickinson and company 社) と混合し、エマルジョンを調製する。免疫原 : FCA エマルジョンを Wister ラット (メス、7 weeks~10 weeks)の腹腔に 700 µl ずつ投与した。14 日後、35 日後に免疫原を PBS に希釈して 0.1 mg/ml としたものを 75% 量の RIBI Adjuvant (Sigma 社)と混合し、ラット腹腔に 350 µl 投与した。56 日後に上記の免疫原 : FCA エマルジョンを 700µl、70 日後、91 日後、112 日後、133 日後、154 日後に上記の免疫原 : RIBI Adjuvant 混合物 350 µl をラット腹腔に投

与した。免疫 3 回目以降に投与 7 日後に尾静脈より採血して得た血清を用いてリコンビナント mTF を固相とした ELISA 法で血清抗体価を評価した。

### 3-2.細胞融合法

免疫原投与 14 日後に麻酔下で脱血死させたラットから脾臓を摘出した。脾臓を RPMI1640 培地中でほぐして得た脾細胞と p3.x63 マウスミエローマ細胞を PEG 法にて融合させた。融合細胞を HAT 含有培地に懸濁し 96 ウェルプレート中で 10 日～14 日培養した。得られた培養上清をスクリーニングに供し、陽性抗体産生ウェルを選択した。

### 3-3.抗 mTF 抗体産生ハイブリドーマスクリーニング

評価用抗原として、リコンビナント mTF およびリコンビナントヒト TF の二種類を用いた。ELISA 法を行い、リコンビナント mTF に陽性、リコンビナントヒト TF に陰性となるウェルを選択した。ハイブリドーマを限界希釈法でクローニングし、抗 mTF 抗体産生細胞株として樹立した。

### 3-4.ELISA 法

リコンビナント mTF 抗原を 1 $\mu$ g/ml、50 $\mu$ l/ well で ELISA プレート (Maxosorp, nunc 社)に固相化した。ブロッキングとして、0.1% BSA/TBS-0.1% Tween 20 を各 200  $\mu$ l/ well 添加し、1 時間室温で行った。その後、各抗体濃度を添加し抗原抗体反応を 1 時間行った。TBS-0.1%Tween 20 で洗浄を行なった。洗浄後、二次抗体として HRP 標識ウサギ抗ラット IgG+IgA+IgM (Dako 社)を 0.1% BSA/TBS-0.1% Tween 20 で希釈し、2  $\mu$  /ml 添加した。30 分、室温で反応させた。洗浄後、呈色反応として TMB 試薬を添加させ、20 分反応させた。その後、

2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を添加し、呈色を停止した。吸光度測定をプレートリーダーにて 450nm の O.D.を読み取った。上記の実験は、前任者 (齊藤洋平博士、西條信史博士)が行い以降の実験を引き継いだ。

### 3-5.抗血液凝固機能測定

丸底の 2 ml チューブにリコンビナント mTF 抗原を 3.5 ng 及び抗 mTF 抗体を 3 µg になるように加え、全体量が 50 µl になるように超純水で調整し 37°C で 30 分反応させた。その後、反応液に 50 µl のマウス血漿、25mM CaCl<sub>2</sub> を 100 µl 添加し、37°C の恒温槽で静置し、フィブリン凝集が見られるまでの時間を測定した。

## 4.抗 mTF scFv の作製

### 4-1.ハイブリドーマ 1157 クローンの cDNA 合成

抗 mTF 抗体クローン 1157 のハイブリドーマから RNA を RNeasy Mini kit (Qiagen 社)を用いて抽出し、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems 社) を用いて、RNA と kit の逆転写酵素、ランダムプライマーを GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems 社) を用いて 25°C で 10 分間、37°C で 120 分間、85°C で 5 秒間反応させて、cDNA を合成した。

### 4-2.抗体可変部の配列の決定

合成した cDNA に対して抗体可変部の VH、VL 領域を認識する複数のプライマー<sup>31</sup>を用いて、94°C で 15 秒、55°C で 15 秒、68°C で 1 分を 35 サイクルの条件で PCR を行った。抗体可変部の配列であることを IgBLAST によって確認を行った。

#### 4-3. 抗 mTF scFv のプラスミド構築

制限酵素サイトを付加させるために。以下のプライマーを用いて再び増幅を行った。VL に対して 5'CATGCCATGGGGGACATTGTGTAAACACAGTCTCC 3' (forward) 、5' GGCGGCGGCTGATTTCCAGTTTGGTCCCCCCTCC 3' (reverse)。VH に対しては 5'GGATATCGAGGTGATGTTGGTGGAGTCGGGAGGAG 3' (forward) 及び 5' TCCCGGCGGCTGAGGAGACTGTGACCATGACTCCT 3' (reverse) を用いた。プラスミドには、6-His tag 及び システイン残基を付加させ、VH-VL の間は(Gly4-Ser)<sub>3</sub> リンカーを挿入した。改変 pRA2 ベクターに上記配列を入れ込み、ベクターを設計した。

#### 4-4. 抗 mTF scFv の発現

抗 mTF scFv の発現は大腸菌細胞株 BL21 (Takara Bio 社)にプラスミドを導入させ、200 µg/ml ampicilin (Wako 社)を添加した LB-agar (Takara Bio 社)の培養液で 37°C で 18 時間培養した。その後、200 µg/ml ampicilin を添加した 2 × YT 培地で濁度が 0.6 (O.D.600)になるまで培養し、isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)を 500 µM になるように添加した。その後 37°C で 6 時間培養し遠心して回収した。(8000 × g, 30 min, 4°C)。回収した菌体は 500 mM NaCl 、20 mM Tris-HCl (pH 8.0, 4°C)で懸濁し、ペレットを超音波破碎 (UD-201, TOMY 社)し、遠心分離 (10000 × g, 30 min, 4°C)で上清を回収した。

#### 4-5. 抗 mTF scFv の精製

超音波破碎した上清を Millex-GP (0.22 µm, PES, Merck-Millipore 社)のフィルターを通じ、ソニケーションバッファーで平衡化させた Ni-NTA アガロー

ス (Invitrogen 社)に通じた。アガロースは 5mM のイミダゾール濃度にしたソニケーションバッファーで洗浄した。その後、イミダゾール濃度 10、20、50、100、200、300、500 mM のバッファーで溶出を行った。溶出後のサンプルは、PBS で平衡化を行った。その後、Superdex75 column (GE Healthcare 社)、Duo Flow (Bio-Rad Laboratories 社)を用いてゲルろ過をおこなった。各フラクションは、SDS-PAGE で解析を行った。精製した抗 mTF scFv、IgG は使用まで 4°C で保存した。コントロール scFv は、津本研究室から供与された抗ニワトリリゾチーム scFv を用いた。作製にあたっては、参考文献にしたがって発現、精製を行った<sup>32</sup>。

#### **4-6.CBB 染色とウエスタンブロッティング**

抗 mTF scFv は、PVDF 膜 (Bio-Rad Laboratories 社)に転写し、0.3%スキムミルク PBS (Becton Dickinson 社) に 30 分反応させた。その後、Snapid システム (Merck-Millipore 社) を用いてメンブレンを 2 µg/ml の抗 His-tag mAb conjugated with peroxidase (Wako 社) に室温で 10 分反応させた。その後、PBS containin 0.1% Tween 20 (PBS-T, Sigma 社)で 3 回洗浄を行い、タンパク質を ECL prime (GE Healthcare 社) を用いて発色させた。画像イメージは Chemidoc XRS+ system (Bio-Rad Laboratories 社)を用いて撮影を行った。

### **5.mTF 抗原に対する抗 mTF scFv と IgG の結合測定**

#### **5-1.SPR 解析**

抗 TF scFv と IgG の mTF への結合が Biacore T200(GE healthcare 社)を用いた表面プラズモン共鳴 (SPR)法で測定を行った。ランニングバッファーとして HBS-EP+ buffer (GE Healthcare 社)を使用前に脱気して用いた。精製した mTF

抗原を pH5.0、10mM の酢酸ナトリウム (GE Healthcare 社) で Biacore sensor chip CM5 (GE Healthcare 社) の表面に固定化させた。mTF 抗原の RU 値は scFv に対して約 1600、IgG に対して約 20 をアミンカップリング法によって固定化した。それから、各 mTF 抗体を 10 から 160nM の濃度でセンサーチップに流し、測定を行った。解析は、The BIA evaluation software (GE Healthcare 社) の 1:1 結合モデルを用いて行った。かい離定数 (KD) は、次の公式を用いて算出した。

$$KD = \text{かい離速度定数 (kd)} / \text{結合速度定数 (ka)}$$

## 5-2.細胞免疫染色

カルチャースライドチャンバー4 (Becton Dickinson and company 社) に  $1.0 \times 10^5$ /well で細胞を播種し、18 時間 RPMI1640 (Wako 社)、10% FBS (Gibco 社)、100 units/ml ペニシリン、100  $\mu\text{g/ml}$  ストレプトマイシン、0.25  $\mu\text{g/ml}$  アンホテリシン B (Wako 社)、5% CO<sub>2</sub>、37°C で培養した。PBS で洗浄後、4%パラホルムアルデヒドで10分間固定化した。3 %スキムミルク PBS でブロッキングを行い、2  $\mu\text{g}$  の蛍光標識した抗 mTF IgG 1157 で1時間反応させた。PBS で洗浄後、DAPI (Invitrogen 社) で核染色を行った。画像イメージは、共焦点顕微鏡 BZ-9000 (Keyence 社) で観察を行った。

## 5-3.フローサイトメトリー解析

LTPA、LTPA-TF、BxPC3 細胞を用いた抗 TF 抗体の結合反応は、Guava (Merck-Millipore 社) を用いてフローサイトメトリー解析を行った。5-ml チューブに  $2.0 \times 10^5$  の細胞数で回収し、35.7 p mol の蛍光標識した各抗 TF 抗体を 4°C で 30 分反応させた。その後、0.5% BSA、2 mM EDTA の PBS (B.E. PBS) で洗浄を行い、PI solution (Invitrogen 社) で染色した。フローサイトメトリーのデータ

は FLOWJO (Tree Star 社)を用いて解析を行った。コントロールは、1157 クローンのアイソタイプ抗体を蛍光標識したものをを用いた。

#### 5-4.抑制実験

17.9 pmol の蛍光標識した scFv 及び 2.1 pmol の IgG を 0、19.2、192 p mol の mTF 抗原 4°C で 30 分反応させた。その後、 $2.0 \times 10^5$  LTPA-TF 細胞に反応液を添加し、さらに 4°C で 30 分反応させた。B.E.PBS で洗浄後、PI solution (Invitrogen 社)と反応させ、上述のフローサイトメトリー解析を行った。

### 6. モデルマウスの作製

#### 6-1 化学発癌マウスの作製

化学発癌モデルマウスの作製は、以前に報告されている方法で作製を行った<sup>33</sup>。イニシエーターとしてアセトンに溶かした 7,12 dimethylbenz [ $\alpha$ ] anthracene (DMBA; 250  $\mu$ g/ml, Sigma 社) を除毛した 6 週齢のメス FVB/N マウスに塗布した。その一週後より、プロモーターとしてアセトンに溶かした phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 25  $\mu$ g/ml, Sigma 社) を週に 1 回塗布した。PMA の塗布は 25 週以上行い、実験に用いた。

#### 6-2.腫瘍組織免疫染色

腫瘍はマウスに麻酔下で摘出した。組織を Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek 社)で満たし、ドライアイス上で凍結させた。腫瘍標本は、The cryostat3 DM (Sakura Finetek 社)でスライドガラス (Muto Pure Chemicals 社)に上に 10  $\mu$ m の厚さで切り出した。PBS で洗浄後、切片は 4% パラホルムアルデヒドで 15 分、室温で固定化した。その後、PBS で洗浄し、内在性の peroxidase 活性をブロック



するために 30%の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> メタノールで 20 分つけた。ブロッキングは、5 % skim milk で 1 時間行った。切片は、抗 mTF IgG 1157 (2 µg/ml) を一次抗体として 1 時間室温で反応させた。PBS 洗浄後、切片を抗 rat IgG-HRP (Histostar、MBL 社) を二次抗体として室温で 1 時間反応させた。その後、DAB (Dako 社) で 1 分反応させ、ヘマトキシリン溶液で染色を行った。画像イメージは、共焦点顕微鏡 BZ-9000 (Keyence 社)で観察を行った。

## 7.腫瘍イメージング実験

化学発癌を形成させたマウスに対して、蛍光標識抗体を 100 µl of 6.67 µM をマウスの尾静脈より注射した。蛍光イメージングは IVIS in-vivo imaging system (Caliper Life Sciences 社) を用いて行い、投与から 0.5、1、3、6、12、24、72 時間後の撮影を(Ex / Em = 604 / 640)で行った。蛍光強度の計測は、先行研究を参考に行った<sup>34</sup>。イメージ解析は、IVIS software を用いて、腫瘍部の中の平均値を計測した。腫瘍における蛍光値は、次の計算式により算出を行った。

腫瘍部蛍光値 = (投与後の腫瘍蛍光値) – (投与前の腫瘍蛍光値)。バックグラウンドの蛍光値は、腫瘍が形成している逆側の背中部分の皮膚を計測した。

Tumor-background ratio (TBR) は、次の計算式で算出した。

TBR = (投与後腫瘍部蛍光値) / (投与後バックグラウンド蛍光値)。コントロール scFv は、抗ニワトリ卵白リゾチーム scFv である HyHEL10 scFvLH (HEL)を用いた<sup>35</sup>。また、各臓器を抗体投与 3 時間、24 時間後に摘出し、蛍光値を上述と同様のフィルターを用いて測定した。

## 8.動物実験倫理

全ての動物実験は、国立がんセンターの動物実験委員会の使用ガイドラ

イに従い、実験を行った。このガイドラインは、日本における動物実験倫理としての広く用いられ、法律を遵守しているものである。

# 第 3 章

## 結果

## 1.抗 mTF IgG の選択と機能解析

図 5 に示す流れによって抗 mTF IgG を作製した。リコンビナント mTF 抗原は細胞外ドメイン部分の配列から得た。作製は、大腸菌株 BL21 株の不溶性画分にリコンビナント mTF が発現させ、精製後グアニジン塩酸塩溶液中に保存した。使用にあたっては、PBS に溶液を置換して実験に用いた。

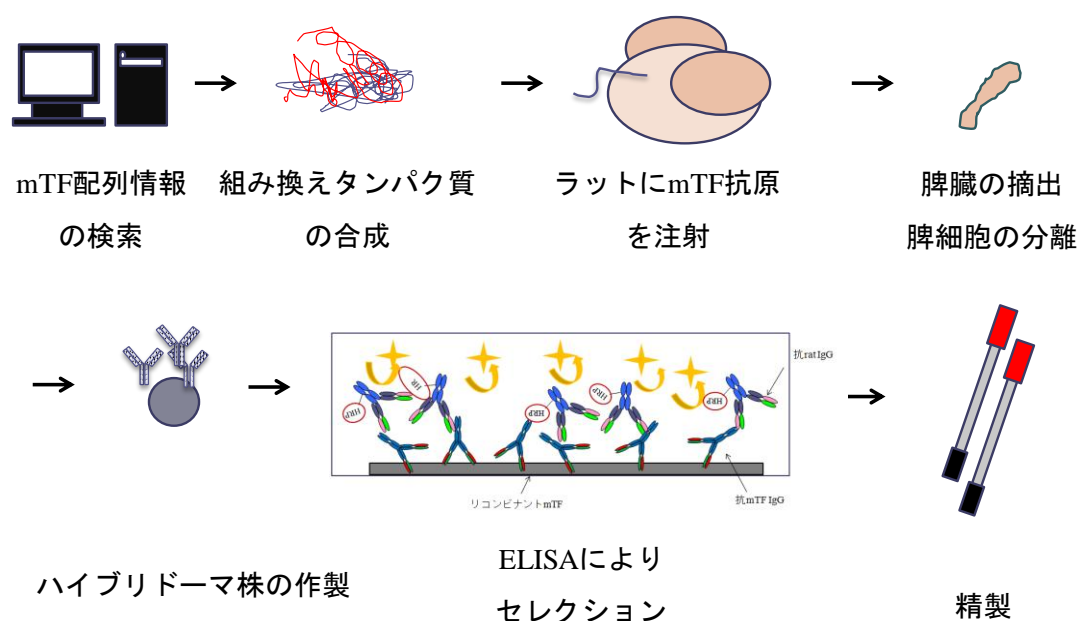


図 5.抗 mTF IgG の作製

mTF の配列情報から作製したリコンビナント mTF を免疫原としてラットに注射し、ラット脾臓からハイブリドーマを作製した。クローニング後、ELISA によって高親和性のクローンを選択した。

作製したハイブリドーマは、28 種のクローンに抗体の産生が見られた。それらから、リコンビナント mTF を固定化したプレートを用いた ELISA によって結合能を確認した (図 6)。クローニングの後に mTF 抗原に高親和性のクローン 983、1157、1216 クローンを選択した。1157 は、抗体の産生量が高く、高親和性を有する 1157 クローンを以降の実験に用いた。この 1157 クローンは、mTF 抗原に対して添加した抗体濃度依存的な結合活性が見られた (図 7)。

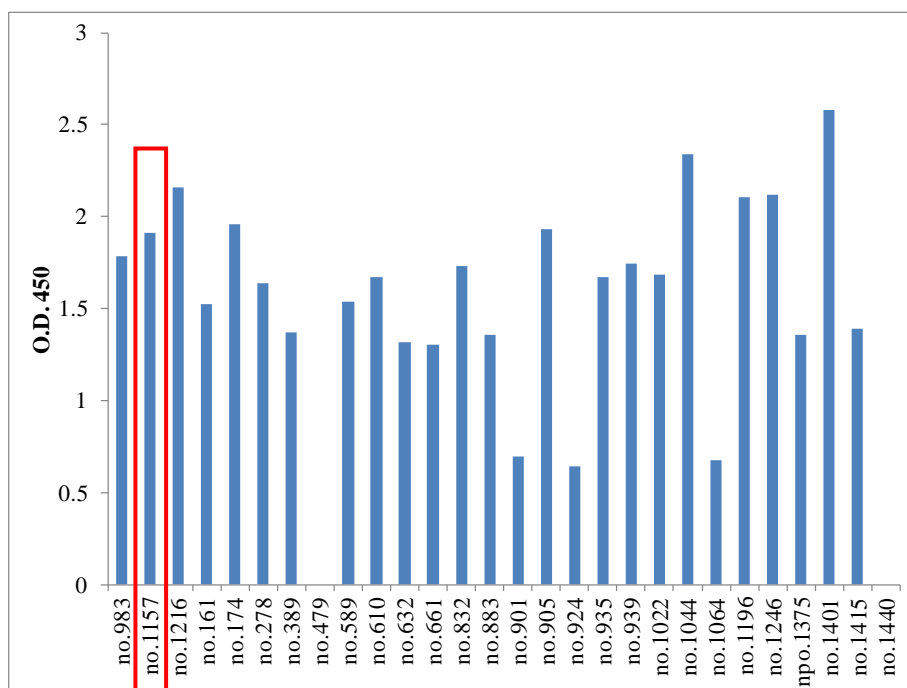


図 6.mTF 抗原に対する抗 mTF 抗体の選択

リコンビナント mTF 抗原を固層化した ELISA によって、各ハイブリドーマ培養上清からリコンビナント mTF 抗原に対する高い親和性を有する 1157 クローンを選択した。

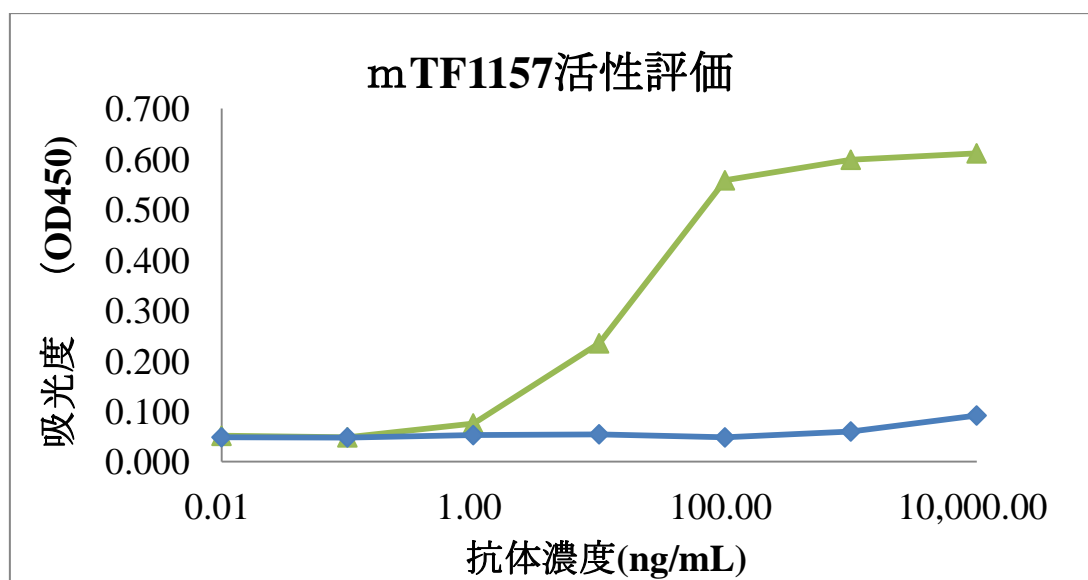


図 7.抗 mTF 抗体 1157 クローンの活性評価

ELISA によって 1157 クローン抗体は、固定化させたリコンビナント mTF に対し抗体濃度依存的反応が見られた (緑)。一方、リコンビナントヒト TF 抗原 (青)には反応が見られなかった。

各 983、1157、1216 クローン抗体に対して抗凝固能を測定した。その結果、1157 には抗凝固能を有していることが明らかになった (図 8)。しかし、抗凝固による凝固の延長時間はわずかであり、動物実験における抗凝固の影響は少ないことが予想された。連続投与におけるマウスへの体重減少や易出血傾向などの副作用は認められなかった (data not shown)。

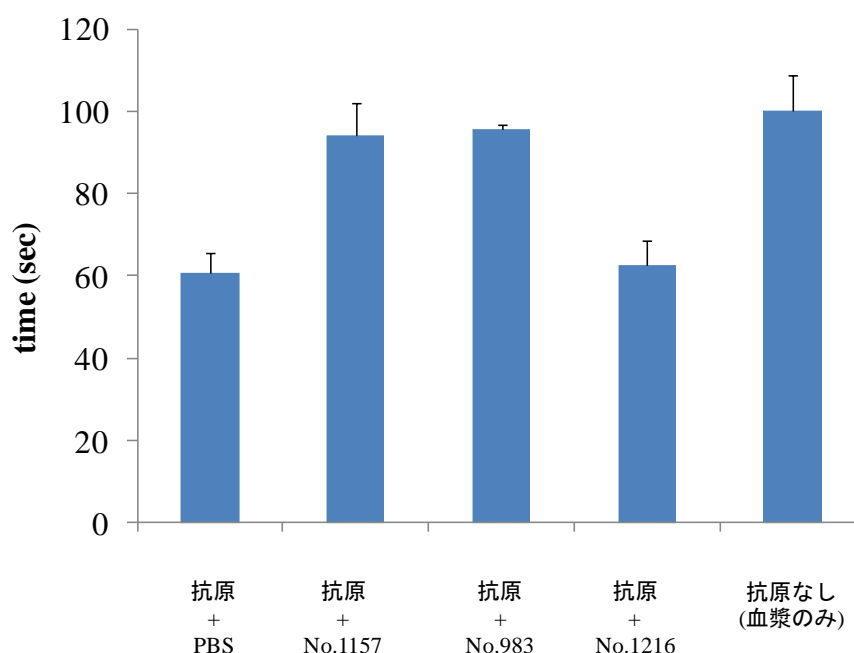


図 8.抗 mTF 抗体の血液凝固への影響

各抗体の抗血液凝固能をクロッティングアッセイによって計測した。リコンビナント mTF 抗原に精製抗体を添加した後、室温で 30 分反応させた。その後、マウス血漿、CaCl<sub>2</sub> を添加して 37℃ でインキュベートし、凝固時間を計測した。N=3

## 2.抗 mTFscFv の作製

図 9 に示す流れによって抗 mTF scFv を作製した。抗 mTF モノクローナル抗体 1157 の VH 及び VL 領域の配列情報の決定を行った。その特異性を先行研究の方法<sup>36, 37</sup>によって IgBLAST を用いて確認を行った (data not shown)。VH 及び VL の配列を津本研究室より、供与された改変 pRA2 ベクターに組み込んだ。抗 mTF scFv のコンストラクトは、図 10 に示した。

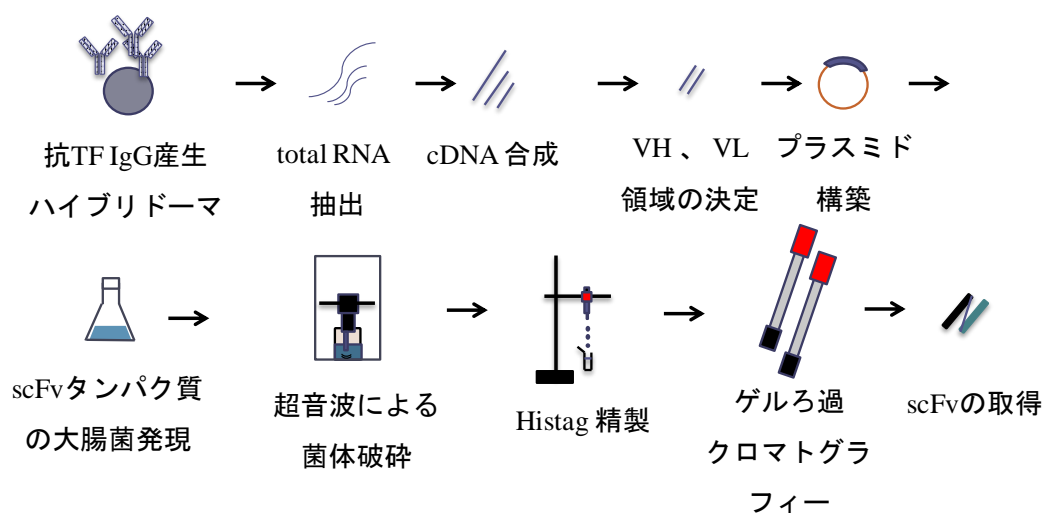


図 9. 抗 mTF scFv の作製

抗 TF 抗体産生ハイブリドーマから RNA を抽出し、cDNA 合成を行った。VH、VL 領域の共通配列を認識する複数のプライマーを用いて増幅を行い、ベクターに組み込んだ。大腸菌で発現を行い、精製後 scFv を得た。

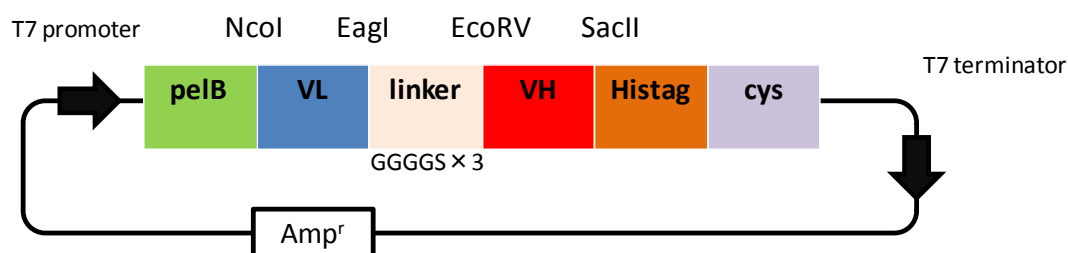


図 10. 抗 mTF scFv のプラスミド設計

pRA2 ベクターに 1157 クローンの VL 及び VH 配列を VL-リンカー-VH の順序で入れ込んだ。精製のための Histag 配列と薬剤修飾のための cys 配列を付加させた。

ウエスタンブロッティングによって目的とする抗 mTF scFv は、プラスミドを形質転換させた大腸菌の細胞溶出液の可溶性画分とインクルージョンボディの不溶性画分に含まれていた (図 11-A)。抗 TF scFv は 6-His tag がついており、ニッケルとゲルろ過クロマトグラフィーによる精製を行った。ゲルろ過クロマトグラフィーによる結果は、大腸菌の可溶性画分に抗 TF scFv が単量体 (黒矢印)に多く発現していることを示した (図 11-B)。単量体の scFv は、SDS-PAGE

によって 28 kDa の単一のタンパク質になっていることを示した (図 11-C)。

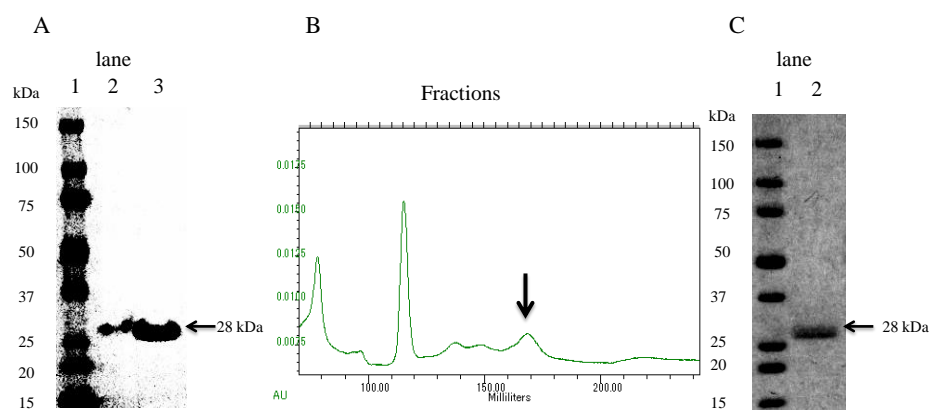


図 11. 抗 mTF scFv のタンパク質発現

抗 mTF scFv は大腸菌を用いて作製し、ウェスタンブロッティングによって大腸菌の可溶性画分及び不溶性画分に発現していることを示した。(A) 抗 His-tag 抗体を用いたウェスタンブロッティング。レーン 1: サイズマーカー; レーン 2: 大腸菌可溶性画分、抗 mTF scFv; レーン 3: 大腸菌不溶性画分、抗 mTF scFv。矢印は 28 kDa を示す。(B) 可溶性画分のゲルろ過クロマトグラフィー。矢印部分を回収した。(C) 精製後、単量体抗 mTF scFv の SDS-PAGE 及び CBB 染色。レーン 1: サイズマーカー; レーン 2: 抗 mTF scFv。矢印は 28 kDa を示す。

### 3. 抗 mTF 抗体の性状解析

#### 3-1. *In vitro* における検討

##### 3-1-1. SPR による結合能解析

抗 mTF scFv は、SPR 法を用いて測定を行った。SPR シグナル (Resonance Unit, RU) は、10 nM から 160 nM までの scFv 及び IgG の抗体投与量で観察された (図 12)。かい離速度定数は、抗 mTF scFv が IgG よりも早かった。一方、結合速度定数は、scFv は IgG よりも低かった。結果として、抗 mTF scFv は、約  $2.04 \times 10^{-8}$  のかい離定数を示した。一方、抗 mTF IgG (clone 1157) は、 $4.82 \times 10^{-10}$  を示した (表 1)。scFv では、結合速度定数よりかい離速度定数の増加が顕著であった。



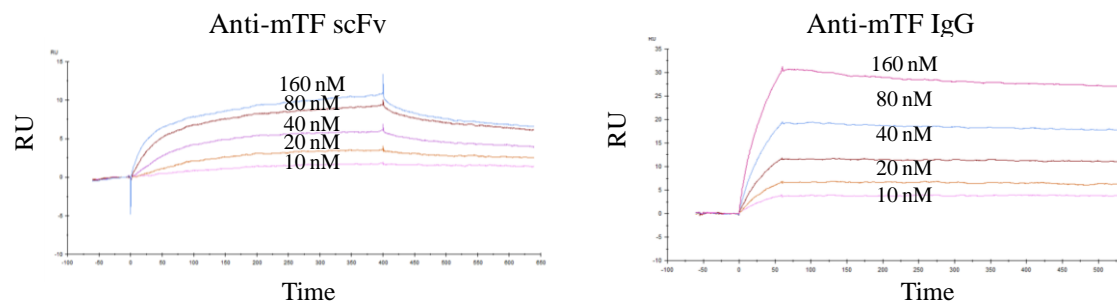


図 12. SPR 法による抗 mTF scFv の結合活性の測定

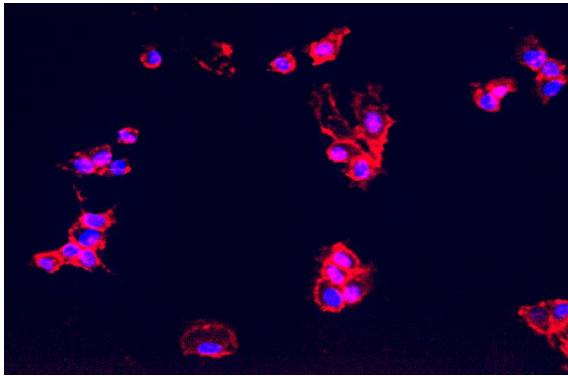
(A) SPR を用いた抗 mTF scFv と IgG の結合プロット。センサーチップに mTF 抗原を固定化し、抗 mTF scFv と IgG を投与した。その結果、10nM から 160nM 間において各抗体で抗体濃度依存的に RU 値の増加が見られた。抗 mTF scFv の mTF 抗原への結合速度定数は IgG よりも低下が見られた。一方、かい離速度定数は、抗 mTF scFv は IgG よりも増加が見られた。

	結合速度定数 (ka)	かい離速度定数 (kd)	かい離定数 (KD)
抗mTF scFv	$7.44 \times 10^4$	$1.52 \times 10^{-3}$	$2.04 \times 10^{-8}$
抗mTF IgG	$1.67 \times 10^5$	$8.07 \times 10^{-5}$	$4.82 \times 10^{-10}$

表1.各抗体のKD値 (kd/ka)

### 3-1-2.フローサイトメトリーによる結合能解析

生きている細胞に発現している mTF 抗原に作製した抗体が結合するかを確認するために LTPA-TF 細胞を作製した。この LTPA-TF は細胞膜上に mTF の発現が見られた (図 13)。



**図.13 mTF 抗原の強制発現株の作製と免疫染色**

LTPA 膵がん細胞に mTF を強制発現させることで、mTF 高発現株の作製を行った。細胞染色において mTF が膜に高発現することを示した。

マウス膵がん細胞である LTPA-TF 細胞に対しての抗 mTF scFv、IgG の結合を測定するために、フローサイトメトリーを行った。その結果、抗 mTF scFv、IgG の LTPA-TF 細胞への結合を確認した (図 14)。また、mTF が低発現の LTPA と強発現させた LTPA-TF を用いてフローサイトメトリーを行った。その結果、mTF のタンパク発現量に応じて、結合ピークの移動が見られた (図 14)。抗 mTF scFv の結合は、IgG と比較して約 1/10 となっていた。この結果から、SPR 解析と同様に結合能の低下が見られた。また、抗 mTF 抗体はヒト TF 高発現の膵がん細胞 BxPC3 には反応しなかった (図 15)。

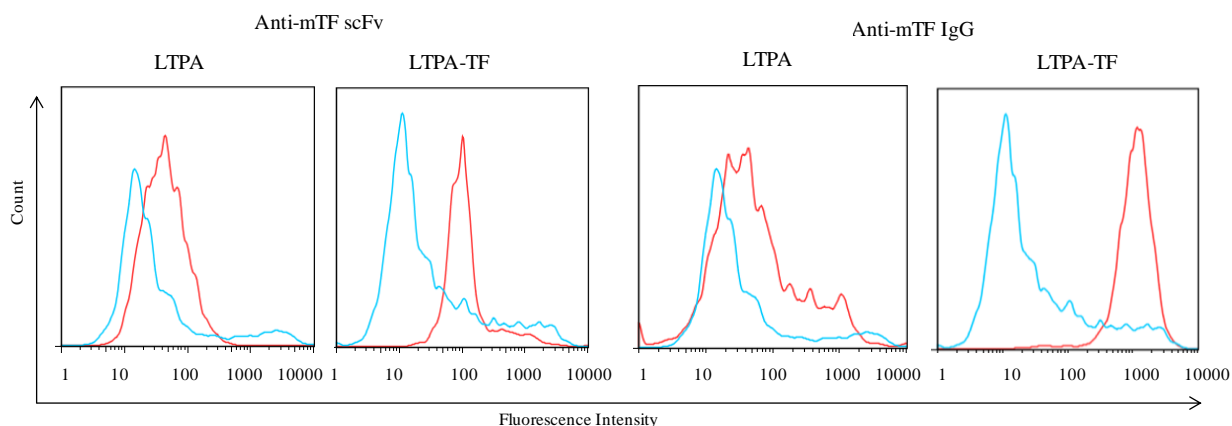


図 14. LTPA 細胞及び LTPA-TF 細胞へのフローサイトメトリー解析

抗 mTF scFv の細胞に発現する mTF 抗原の特異性を示した。結合能は、IgG に比較して低下が見られた。赤は抗 mTF 抗体の投与を示す。青はコントロール抗体の投与を示す。

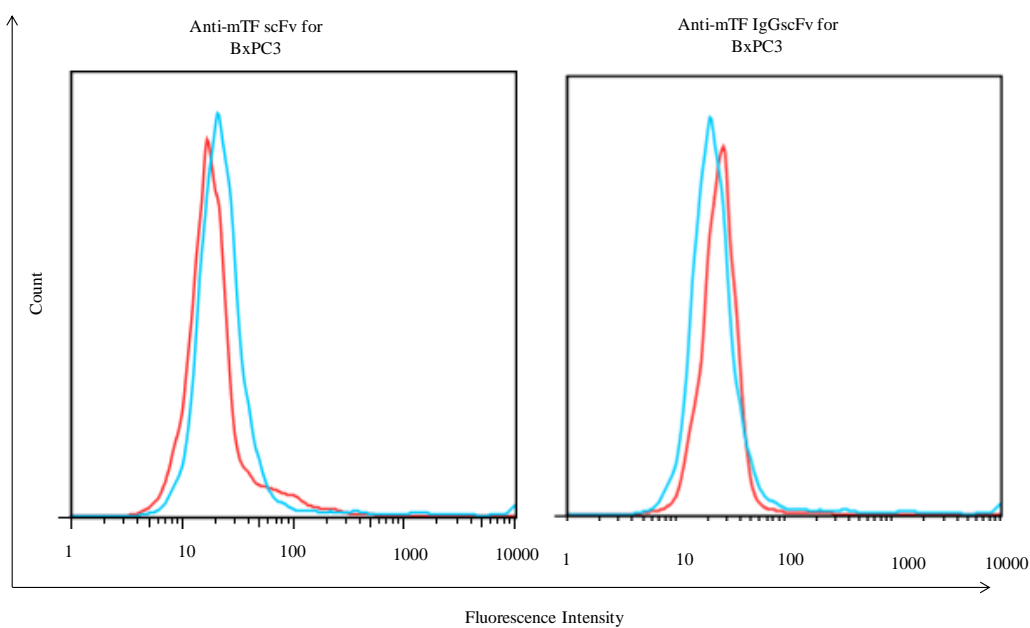


図 15. 抗 mTF 抗体のヒト TF 抗原との交差性

抗 mTF 抗体は、ヒト TF 抗体発現の膵がん細胞に交差しなかった。BxPC3 cells を用いたフローサイトメトリー解析を行った。抗 mTF scFv 及び、抗 mTF IgG は BxPC3 cells に結合が見られなかった。

また、mTF 抗原への特異性を確認するために、抑制実験を行った。抗

mTF scFv、IgG は、添加した mTF 抗原濃度依存的に結合し、フローサイトによる LTPA-TF 細胞への結合に抑制が見られた (図 16)。これより、抗 mTF scFv、IgG の mTF 抗原への特異性を確認することができた。

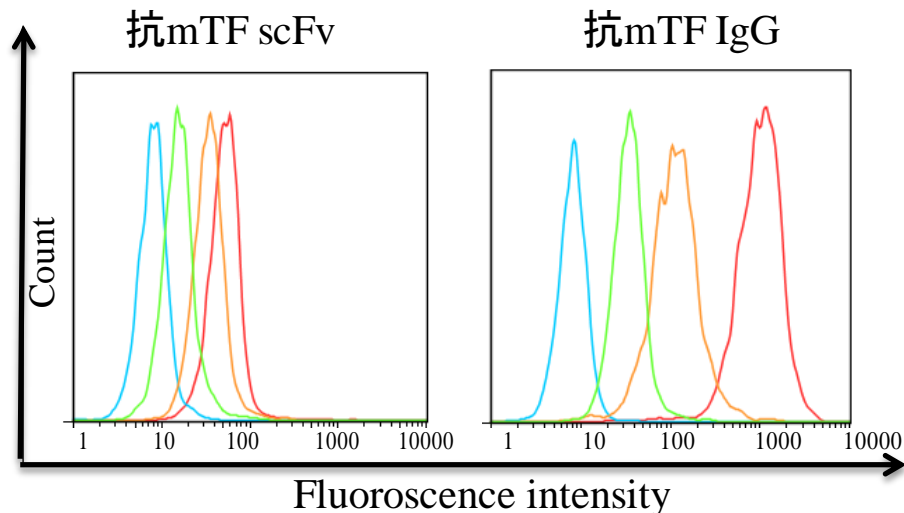


図 16. LTPA-TF 細胞を用いた抑制実験

4°Cにおいて、30 分 mTF 抗原タンパク質と各 mTF 抗体を反応させ、フローサイトメトリーで細胞と反応させた、その結果、添加した mTF 抗原に依存的に LTPA-TF 細胞と蛍光標識した抗 mTF 抗体と結合に抑制が認められた。0 pmol (赤)、19.2 pmol (黄色)、192 pmol (緑) の mTF 抗原を添加した。青はコントロール抗体の添加を示している。

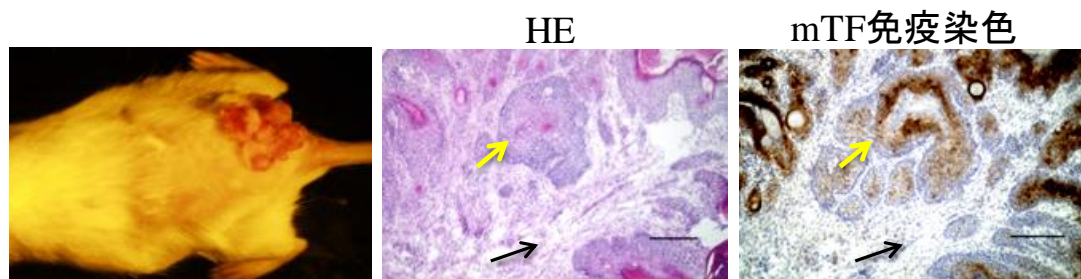
### 3-2. *In vivo* における検討

#### 3-2-1. 化学発癌モデルマウスの作製と mTF の組織免疫染色

LTPA や LTPA-TF 腫がん細胞を同種移植した皮下移植マウスで抗 mTF scFv と IgG の生体分布を測定しようとした。しかし、それらの細胞はヌードマウス、NOD-Scid、NOG マウスに対しても生着が見られなかった。そのため化学発癌マウスを用いた。この化学発癌マウスは、ヒトのがん組織に類似した豊富ながん間質を有している。これらの腫瘍は、潰瘍性の変化を示す (図 17-左)。

HE 染色では、豊富な間質を示した (図 17-中央)。さらに、抗 TF mIgG1157 クロ

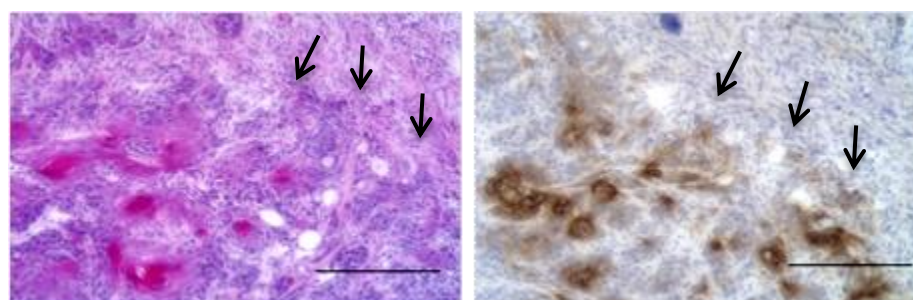
ーンを用いた mTF の免疫染色は、がん部における mTF の過剰発現を示した (図 17-右)。また、特にがん浸潤部に強く mTF が発現していた (図 18)。



**図 17. 化学発癌モデルマウスの組織像と mTF 免疫染色**

皮膚がんの集団がマウスの背中部分にできる。これらの腫瘍は、部分的に潰瘍ができる。HE 染色によるがん細胞集団と腫瘍免疫染色 (中央)。腫瘍は間質が豊富な組織像を示した。抗 mTF 抗体(1157 クローン)を用いた免疫染色 (左)。腫瘍部において mTF が高発現している。黄色の矢印は腫瘍集団を示す。黒矢印はがん間質を示す。

Scale bar: 200  $\mu$ m



**図 18.がん浸潤部における mTF 抗原の発現**

HE 染色による扁平上皮がんのがん浸潤部 (左)。矢印は、間質部への浸潤を示している。抗 mTF 抗体(1157 クローン)を用いた免疫染色 (右)。がん浸潤部において mTF が高発現していることを示している。矢印は正常部へのがん細胞の浸潤を示している。

Scale bar: 200  $\mu$ m

### 3-2-2. 化学発癌モデルマウスにおける抗 mTF 抗体の腫瘍集積性

*In vivo imaging* では、コントロール scFv は腫瘍部に集積していなかったのに対し、抗 mTF scFv は、投与 1 時間より腫瘍部に選択的に集積した。抗 TF scFv は、投

与から 12 時間まで腫瘍部に集積した。一方、抗 mTF IgG は、投与 72 時間まで腫瘍部に選択的に集積した (図 19、図 20)。抗 mTF scFv の TBR は、投与 3 時間で最大となった。一方、抗 TF IgG の TBR は、投与 24 時間で最大となった (図 21)。また、この自然化学発がんモデルは、よく用いられるヌードマウス xenograft モデルと異なり、腫瘍の自然史 (発がん、増殖、転移、死亡) および腫瘍間質が臨床のヒトがんと同様であり、また TF 発現もヒト臨床がんと同様に高発現しているという大きなメリットがあるが、図 19 で分かるように、通常の実験腫瘍と異なり、1 匹のマウスに 1 個の腫瘍というわけではなく、多数の大小不同の腫瘍からなる。したがって、n 数をマウスで確保するのではなく、マウス 1 匹ごとに各腫瘍への集積性を確認するという評価系になった。全部で 3 匹の同腫瘍担がんマウスで解析したが、他 2 匹とも同様な結果であった。

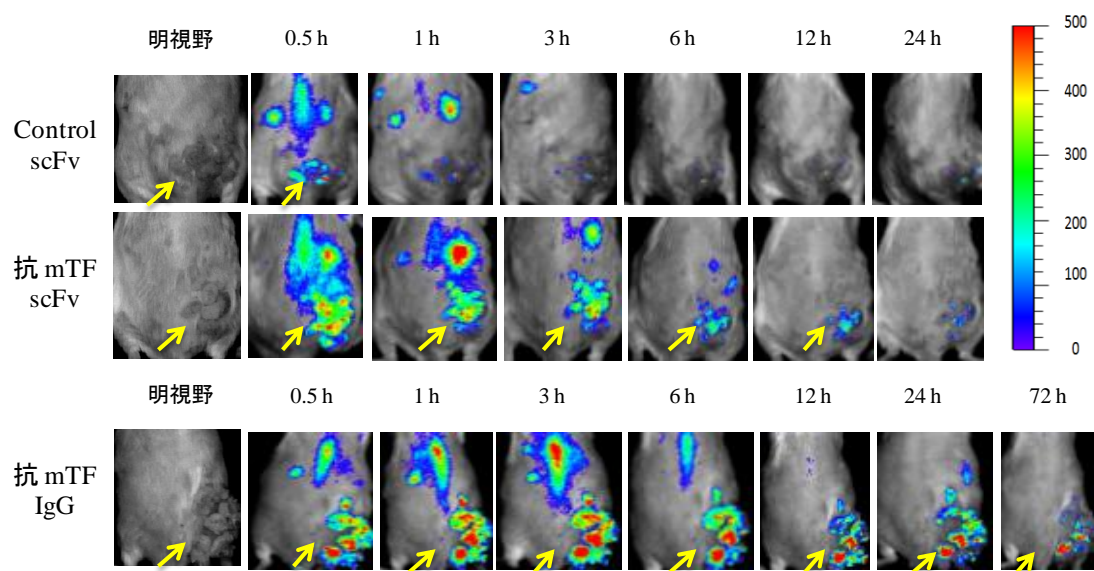


図 19.化学発癌マウスを用いた腫瘍イメージング

蛍光標識した control scFv (抗ニワトリリゾチーム scFv)、抗 mTF scFv、抗 mTF IgG をマウス尾静脈より投与し、各投与時間において蛍光を測定した。腫瘍は黄色の矢印で示している。

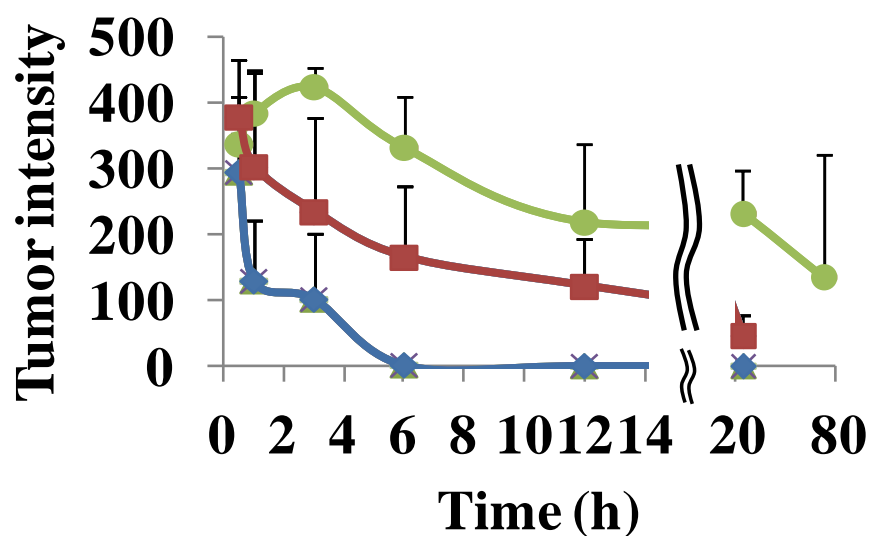


図 20.腫瘍部における蛍光強度

コントロール scFv (青)、抗 mTFscFv (赤)、抗 mTF IgG (緑)。各時間において、3 つの腫瘍部における蛍光強度を測定した。抗 mTF scFv は選択的に腫瘍部に投与 1 時間後より集まっており、12 時間まで腫瘍部に留まった。一方で、抗 mTF IgG は、腫瘍部に投与 72 時間以上集積した。

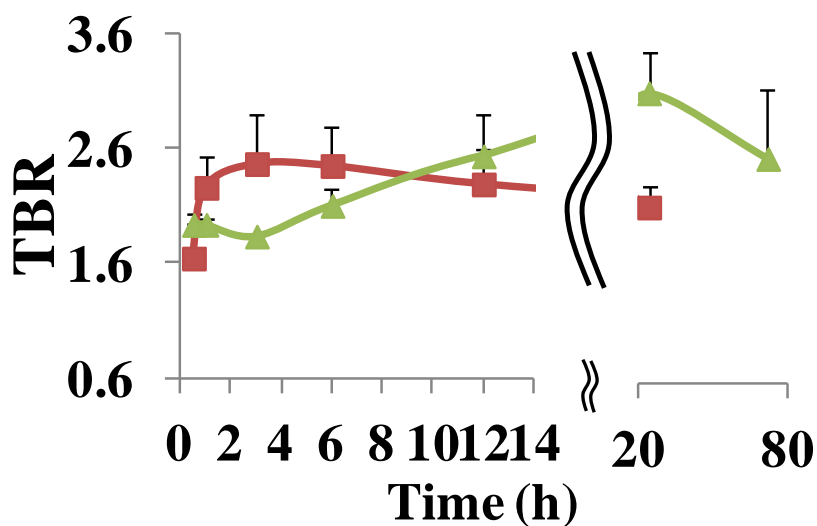


図21. 抗mTF scFvと抗mTF IgGでの腫瘍部と正常部とのコントラスト比(TBR)の比較

抗 mTF scFv (赤)、抗 mTF IgG (緑)。各時間において、3 つの腫瘍部の TBR を測定した。抗 mTF scFv の TBR は、抗体投与 3 時間後に最大となった。一方で、抗 mTF IgG では、投与 24 時間において TBR が最大となった。



### 3-2-3.化学発癌モデルマウスにおける腎、肝への抗体集積性

各抗体は、化学発癌モデルマウスに投与後 3 時間及び 24 時間で犠牲にし、各臓器を摘出し、*ex vivo* を行い各臓器における蛍光強度を測定した。その結果、抗 mTF scFv は投与 3 時間で腎に強く集積が見られた。一方、24 時間において集積は見られなかった。抗 mTF scFv の肝臓における集積は 3 時間では見られたが、24 時間においては、腎臓と同様に集積は見られなかった。一方、抗 mTF IgG では、3 時間において腎臓に集積が見られたが、24 時間後においては、腎への集積は見られなかった。肝臓においては、3 時間、24 時間ともに集積が見られた (図 22)。

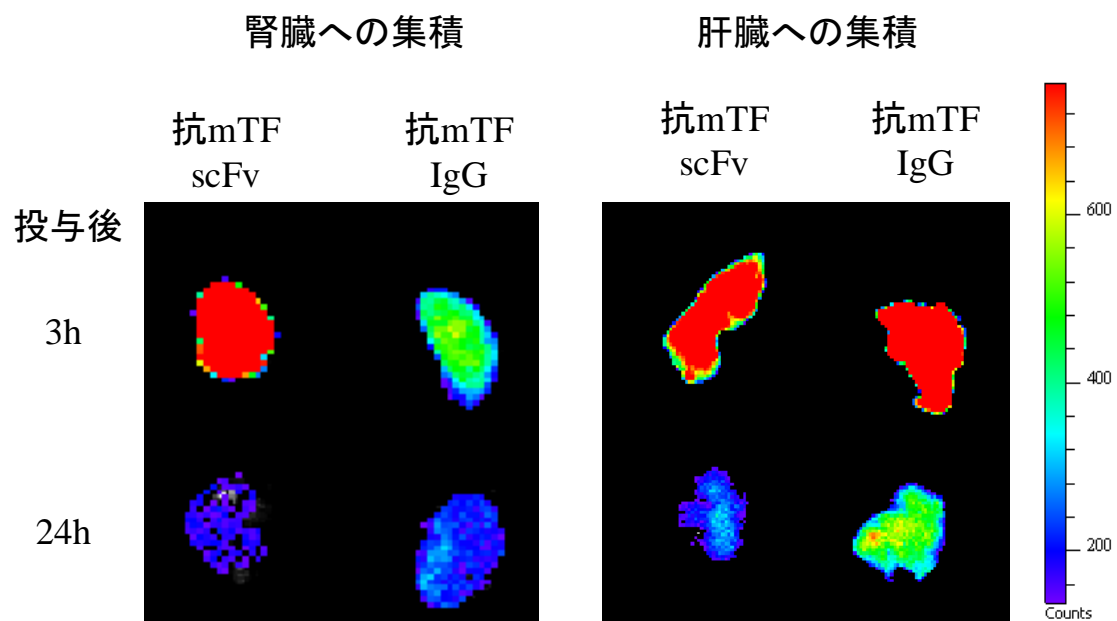


図22. 抗mTF scFv 、抗mTF IgGの腎、肝臓への集積性

化学発癌マウスに蛍光標識した抗 TF 抗体を投与し、投与後 3 時間、24 時間で腎と肝臓を摘出し、蛍光強度を計測した。その結果、抗 mTF scFv は投与 3 時間で腎に強く集積が見られた。一方、24 時間においては集積は見られなかった。肝臓における集積は 3 時間では見られたが、24 時間においては、腎臓と同様に集積は見られなかった。一方、抗 mTF IgG では、24 時間後においても肝臓への集積が見られた。



# 第 4 章

## 考察

## 1.ハイブリドーマクローンの選択

本研究では、mTF に対する高親和性の IgG の作製に成功した。1157 クローンは、mTF 抗原に対して生細胞が発現する mTF やがん組織に存在する mTF に対して結合が見られた。これより、抗 mTF IgG はフローサイトメトリーでの解析や免疫染色においても用いられる抗体であることを明らかにした。また、作製した抗 mTF IgG は、ヒト TF 抗原に対しては結合せず、mTF に特異的に結合することが分かった。作製した抗 mTF IgG は標的としている細胞外ドメイン部分でヒトとマウスで交差しないことが明らかになった。

作製にあたっては、約 2000 のハイブリドーマクローンから抗体産生が見られる 28 クローンを選択し、mTF 抗原に結合が見られる陽性のクローン、及び huTF 抗原に陰性のクローンを選択した。その後、高親和性のクローン No. 983、No.1157、No.1216 株の 3 種を選択した。これらは、抗凝固作用をもつのが、No.983、No.1157 であり、No.1216 は抗凝固作用を有していなかった。この理由として各々のエピトープの違いが考えられる。血液凝固は、TF と血漿中の凝固因子 FVII が結合すること活性化し、血液凝固因子 X を Xa と活性化が進めさせていく。最終的にフィブリノーゲンがトロンビンの活性化によって不溶性フィブリンとなる。作製した 3 種の抗体は、結合するエピトープが異なることが予想され、No.983、No.1157 の抗体は、mTF のアミノ酸配列のうち VII または、X との結合する部分にあるために抗凝固に働くものと考えられる。一方、抗凝固機能をもたない No.1216 は、mTF のアミノ酸配列のうち、VII 及び X の結合領域とは異なる部分にエピトープがあるものと考えられる。これらの抗凝固作用においては、生体に投与した場合に易出血傾向などの副作用の原因となる可能性がある。しかし、マウスに抗凝固作用がある 1157 抗体を投与しても、顕著な副作用は認められなかった。ヒトに応用する場合に用いられる抗体は、抗ヒト TF 抗体であるが、こ

これらの出血などの副作用は慎重に検討を行っていかねばならないと考えられる。

## 2. 抗 mTF scFv の結合能と抗原特異性の評価

本研究では、mTF に対する高親和性の scFv の作製に成功した。システムインは薬剤修飾のために抗 mTF scFv の C 末端に付加させた。現在までに様々な種類の scFv が生み出されているが、scFv は元の IgG と比較して標的となる抗原に対して低親和性になることや大腸菌のインクルージョンボディに発現しやすいことが知られている。この場合、グアニジンなどによる可溶化剤に対して不溶性タンパク質の巻き戻しが必要とされる<sup>38,39</sup>。作製した抗 mTF scFv は大腸菌の可溶性画分に存在していたので抗 mTF scFv は、SDS-PAGE 分析により高い純度で、簡便に取得することができた。次に SPR 解析を用いて抗 mTFscFv の抗原結合性を評価した。元の抗 mTF IgG は  $KD = 4.82 \times 10^{-10}$  であるが、抗 mTF scFv は早いかい離速度定数と低い結合速度定数によって KD 値は  $2.04 \times 10^{-8}$  を示した。また、結合速度定数とかい離速度定数を比較すると、かい離速度定数の増加が顕著であり、scFv 化することによって結合への影響よりもかい離速度が増加した影響によって KD 値の増加となったと考えられる。この抗 mTF scFv のかい離定数の増加は IgG が二価の抗体であるのに対して抗 mTF scFv は、一価であることに起因していると考えられる。現在までに scFv の KD は  $1 \times 10^{-9}$  から  $1 \times 10^{-7}$  までのものが報告あり、がんイメージングに活用されている<sup>29,30,40</sup>。我々の scFv の KD 値は  $2.04 \times 10^{-8}$  であるので、がんイメージングに適していることが示唆された。この KD の低下は、価数の要因以外に scFv 化することによる安定性の低下が考えられる。作製した抗体の保存条件など、応用するためにはこれらの検討も必要になると考えられる。

高い TF 発現が、膵がんや脳腫瘍、胃がんなどの多くのヒトのがん種にあるということが報告されている。しかしながら、マウスのがん細胞で mTF が高発現しているという報告はなかった。それゆえ、我々はマウス膵がん細胞である LTPA に対して、mTF 遺伝子を挿入してある mTF を強制発現させた LTPA-TF を作製した。フローサイトメトリー解析では、作成した抗 mTF scFv と mTF 抗原との結合を確認した (図 14)。さらに、mTF 発現量の異なる LTPA と LTPA-TF を用いたフローサイトメトリー解析の結果、抗 mTF scFv は細胞表面上の mTF の発現量依存的に結合することを確認した (図 14)。また、リコンビナント mTF 抗原を用いた抑制実験から、作製した抗 mTF scFv の mTF 抗原への高い抗原特異性を有していることを明らかにした。

### 3. 抗 mTF scFv 腫瘍イメージングへの評価

抗 mTFscFv を用いたがん診断の可能性を評価するにあたり化学発癌モデルマウスを用いたこのモデルマウスは、高度に分化した扁平上皮がんを形成する。我々は化学発癌モデルマウスのがん浸潤部に mTF が高く発現していることを明らかにした。さらに、この腫瘍はとても腫瘍成長が遅く、最終的に転移し、マウスを死に至らせるのに約 1 年かかる。この化学発癌は、皮下異種移植した腫瘍と比較してより臨床でのヒトのがんに類似している<sup>41</sup>。これらのことから、マウスにおける腫瘍イメージング実験を行うのに適したモデルであると考えた。

*In vivo imaging* において、投与したコントロール scFv は投与 3 時間までにおいて生体内から消失した。その多くは腎より排出が観察され、腫瘍への明瞭など集積がほとんど見られなかった。一方で、抗 mTF scFv は、投与 1 時間から 12 時間まで腫瘍部に集積が見られた。腎への集積は、3 時間まで観察され、

その後排出された。さらに、抗 TF IgG と scFv で腫瘍部分と正常部分との集積性の割合 (TBR)を算出した。抗 mTF scFv の TBR の最大値は 3 時間であった。一方、IgG の TBR の最大値は、投与後 24 時間であった。この TBR の最大値差異は、抗体のサイズによるものと考えられる。IgG の分子量は 150 kDa であり、それゆえ IgG は腎の網内系を通過することができない。また、IgG は長い血中半減期を有する特徴を有する<sup>42</sup>。さらに IgG は、EPR 効果によって長い腫瘍集積性を示すために、腫瘍部に長く留まったと考えられる<sup>22</sup>。一方、scFv は、分子量は 28 kDa と小さく、Fc 部分が欠如しており、EPR 効果を十分に得ることができない。かつ、早い生体クリアランスと早い TBR ピークとなったことが示唆される。また、腎及び、肝に対しての抗体の集積性を *Ex vivo* によって測定した。抗 mTF scFv は、投与後 3 時間において腎への集積が見られ、排泄される尿も投与した抗体の蛍光色を示していた。投与後 24 時間において、腎への抗 mTF scFv 集積は観察されなかった。これより抗 mTF scFv は、腎より生体外へ迅速に排出されることが示唆される。肝臓においては、投与 3 時間において蛍光が観察されたが、24 時間においては、観察されなかった。これより、scFv は投与 24 時間で生体から排出されるものと考えられる。一方、抗 mTF IgG は、投与後 3 時間及び 24 時間においても肝臓で IgG が検出された。IgG は肝臓の網内系へ捉えられ、長く集積したのと考えられる。これらの特徴は、それぞれの抗体分子ががん治療に IgG、がん診断に scFv が薬剤の輸送に適していることが示唆される。

#### 4.抗 mTF scFv の臨床応用への適合性と課題

分子イメージングとしての抗 Her2 scFv は、既に報告されているが、その利用は Her2 陽性のがんに限られる<sup>43,44</sup>。それゆえ、抗 Her2 抗体は、多くのがん種での診断というよりも治療効果予測としての適応が考えられる。一方で、

TF は、がん細胞や間質に高い頻度で発現している。それゆえ、抗 TF scFv は、多種類のがん診断を可能にすることが期待される。さらに、TF の発現はがんの悪性度を相関していることが報告されている<sup>45</sup>。TF 発現の検出は、VTE のような重篤な合併症の予測にも有用である可能性がある。一方で、臨床での診断利用の際には、安全性と測定時間も考えなければならない。この理由は、がん検査が外来で通常行われ、さらに健常者においても実行されるからである。IgG は、Fc 領域を含み、それは重篤なアレルギー反応を引き起こす可能性のきつかけとなりうる。それゆえ、scFv は Fc がないことにより、IgG よりも安全性が高いと考えられる。抗 TF IgG は、PET imaging として使われている<sup>46</sup>。このイメージングプローブは、イメージングが完了するまでに数日かかる。よって、外来での診断を受ける患者において、利便性に乏しいと考えられる。一方、分子サイズの小さい scFv は、より早いクリアランスと早いピークを迎え、半日ほどで試験が完了することが予想される。

また、MRI は、しばしば、ガドリニウム造影剤が用いられている<sup>47,48</sup>。例えば、腫瘍部との境界や血管への浸潤が判明させるために、MRI はガドリニウム造影剤が用いられている。しかし、ガドリニウムは、副作用としておう吐などが問題とされる。また、詳細な浸潤部分やがん細胞の存在の検出や早期がんの発見は困難である。また、次世代の臨床におけるイメージングとして、抗体を用いた MRI の造影剤は、解像度と画像の感度の増加が求められることが予想できる。本研究の結果から、抗 mTF scFv は mTF 陽性のがん細胞に結合することが示された。さらに、早いクリアランスは、ガドリニウム毒性の減少へとつながることが示唆された。脳腫瘍や膵がんなどは高い TF 発現を示していることが多く分かっている。それゆえ、抗 TF scFv は、MRI プローブとしての有力な候補として期待できる。

結論として今回作製した抗 mTF scFv は、マウスへの生体投与後、早い生体内クリアランスと腫瘍選択的な集積が見られた。このように、抗 TF scFv は難治性の固形がんの診断に有力なツールと言える。

## 第 5 章

### 今後の展望



本研究では、がんと血液凝固の関係に注目し、血液凝固開始因子 TF に対する抗体の作製とその性状解析を行った。TF は、外因系凝固開始因子としての血液凝固に関する疾患やがんにおいて研究がなされてきた。TF は、がんではない正常の組織においてその発現は低く抑えられている。こうした TF の特徴は、がんにも薬剤を運ぶ上で薬剤をより多く腫瘍部に運び、正常部には蓄積しないという点で非常にがん治療、がん診断にとって魅力的である。

今回作製した抗 TF scFv は、腫瘍部に集積し、投与の早い段階で高い TBR を示した。さらに、分子量や粒子径のサイズから投与から 12 時間以内に生体から消失する。これらの特徴は抗 TF scFv が診断薬を付加させることでがんのイメージングに適していることを示唆している。これらの特徴から、この scFv 付加の診断薬は、診断薬を付加させた IgG よりも短時間で診断結果が得られるというメリットが考えられる。また、TF は、がん組織において、がんの細胞集団中に発現が観察され、特にがんの浸潤部分に強い発現している。そのため、scFv 付加の診断薬は、がんと正常部との境界をより詳細にイメージングできる可能性がある。以上の抗 TF scFv2 の 2 つの特徴は、がん診断薬として非常に効果的であると考えられる。

また、抗 mTF scFv 及び抗 mTF IgG は、mTF 特異的な抗体であることを明らかにした。これまでに TF は、がん細胞に発現している以外に腫瘍の間質や血管内皮細胞などにも発現していることが分かっている。また、がん細胞での発現やがん環境により血管内皮細胞や繊維芽細胞の TF 発現が増加することが知られている。当研究においてもヒト TF 高発現の膀胱がん細胞 BxPC3 がヒト血管内皮細胞 HUVEC のヒト TF 発現が増加することを確認している。今後は、TF 発現変化をマウスの株を用いて基礎的な検討を行っていきたいと考えている。このように TF は、がんの発生の初期から発現が見られる因子であり、さらに、

がんと凝固の関係性から幅広いがん種に対して TF は高発現が見られ、多種多様のがんに適応できる。

抗体医薬の研究を行うにあたり、考慮しなければならないのは副作用である。今回得られた抗 TF IgG 抗体には抗凝固作用の有するクローン (No.1157, No.983)と抗凝固作用の有さない IgG 抗体クローン (No.1216)が得られた。これらの抗凝固作用の有無は、抗体のエピトープの違いによるものと考えられる。TF は、血液中の FVII や FX と結合し凝固カスケードを進行させる (図 1)。抗凝固に働く抗 TF 抗体は、TF と FVII または FX との結合する箇所にエピトープがあるものと思われる。今回扱った抗体は、抗 mTF 抗体であるので、直接ヒトへの外挿はできないが、血液凝固系を動かす機能と関連するエピトープについての知見を得ることは重要と考える。人への応用を考えた場合、こうした抗凝固作用への影響をより一層考慮しなければならない。抗凝固による副作用は、凝固が抑制されたことによる出血があげられる。臨床応用する際に、こうした副作用は特に重視すべき部分である。がん診断においては、健常者への投与も考えられるため、抗凝固への影響は十分に検討する必要がある。

また、抗体自身の抗原性によるアレルギーが課題となる。一本鎖抗体である scFv はその多くが大腸菌を用いて作製が行われている。人に投与する場合の抗原性は高く、哺乳類細胞である CHO 細胞や HEK293 を用いた産生系がその対策として考えられる。抗 TF scFv の配列情報をこれらの哺乳類細胞に導入し、培養系による作製を行うことで、抗体の抗原性への影響を検討していく予定である。

## 第 6 章

### 結語

マウスの化学発癌モデルの免疫染色の結果より、恒常的に高い mTF の発現があることを示した。また、このモデルマウスの腫瘍組織の HE 染色の結果からヒトの臨床組織像と類似した間質が豊富ながん組織であり、がんの浸潤部に mTF が発現していることを明らかにした。

診断的意義としては、抗 TF scFv 抗体をプローブとした PET/CT や MRI において、多くのがん種におけるがんの検出が可能であると考えられる。

本研究により、マウス腫瘍組織において mTF が高い発現を示していることを示し、TF を標的とした抗体の応用可能性を示した。今後、抗 TF scFv は、診断ツールとしての応用可能性が期待できる。今後、臨床応用に適した形に改良が加えられ、がん診断に貢献することを期待している。本研究を基盤とした臨床応用され、がん患者の健康と幸せに貢献できることを切に願う。

## 引用、参考文献

- [1] Carrier M, Le Gal G, Wells PS, Fergusson D, Ramsay T, Rodger MA. Systematic review: the Trousseau syndrome revisited: should we screen extensively for cancer in patients with venous thromboembolism? *Annals of internal medicine*. 2008; 149: 323-33.
- [2] Blom JW, Doggen CJ, Osanto S, Rosendaal FR. Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *JAMA*. 2005; 293: 715-22.
- [3] Thaler J, Koder S, Kornek G, Pabinger I, Ay C. Microparticle-associated tissue factor activity in patients with metastatic pancreatic cancer and its effect on fibrin clot formation. *Transl Res*. 2013.
- [4] Matsumura Y, Kimura M, Yamamoto T, Maeda H. Involvement of the kinin-generating cascade in enhanced vascular permeability in tumor tissue. *Japanese journal of cancer research : Gann*. 1988; 79: 1327-34.
- [5] Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002; 20: 4368-80.
- [6] Hoffman M, Colina CM, McDonald AG, Arepally GM, Pedersen L, Monroe DM. Tissue factor around dermal vessels has bound factor VII in the absence of injury. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2007; 5: 1403-8.
- [7] Jesty J, Beltrami E. Positive feedbacks of coagulation: their role in threshold regulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25: 2463-9.
- [8] Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol*. 1989; 134: 1087-97.
- [9] Matsumura Y. Cancer stromal targeting (CAST) therapy. *Advanced drug delivery reviews*. 2012; 64: 710-9.
- [10] Kocaturk B, Versteeg HH. Tissue factor-integrin interactions in cancer and thrombosis: every Jack has his Jill. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2013; 11 Suppl 1: 285-93.
- [11] Mechtcheriakova D, Schabbauer G, Lucerna M, et al. Specificity, diversity, and convergence in VEGF and TNF- $\alpha$  signaling events leading to tissue factor up-regulation via EGR-1 in endothelial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2001; 15: 230-42.
- [12] Rong Y, Post DE, Pieper RO, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. PTEN and hypoxia regulate tissue factor expression and plasma coagulation by glioblastoma. *Cancer*

research. 2005; 65: 1406-13.

[13] Abe K, Shoji M, Chen J, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor production and angiogenesis by the cytoplasmic tail of tissue factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 8663-8.

[14] Yamashita H, Kitayama J, Ishikawa M, Nagawa H. Tissue factor expression is a clinical indicator of lymphatic metastasis and poor prognosis in gastric cancer with intestinal phenotype. *Journal of surgical oncology*. 2007; 95: 324-31.

[15] Nitori N, Ino Y, Nakanishi Y, et al. Prognostic significance of tissue factor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005; 11: 2531-9.

[16] Seto S, Onodera H, Kaido T, et al. Tissue factor expression in human colorectal carcinoma: correlation with hepatic metastasis and impact on prognosis. *Cancer*. 2000; 88: 295-301.

[17] Poon RT, Lau CP, Ho JW, Yu WC, Fan ST, Wong J. Tissue factor expression correlates with tumor angiogenesis and invasiveness in human hepatocellular carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003; 9: 5339-45.

[18] Ueno T, Toi M, Koike M, Nakamura S, Tominaga T. Tissue factor expression in breast cancer tissues: its correlation with prognosis and plasma concentration. *British journal of cancer*. 2000; 83: 164-70.

[19] Saito Y, Hashimoto Y, Kuroda J, et al. The inhibition of pancreatic cancer invasion-metastasis cascade in both cellular signal and blood coagulation cascade of tissue factor by its neutralisation antibody. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2011; 47: 2230-9.

[20] Adem YT, Schwarz KA, Duenas E, Patapoff TW, Galush WJ, Esue O. Auristatin antibody drug conjugate physical instability and the role of drug payload. *Bioconjugate chemistry*. 2014; 25: 656-64.

[21] Kobayashi H, Turkbey B, Watanabe R, Choyke PL. Cancer drug delivery: considerations in the rational design of nanosized bioconjugates. *Bioconjugate chemistry*. 2014; 25: 2093-100.

[22] Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res*. 1986; 46: 6387-92.

[23] Yamamoto Y, Hyodo I, Takigahira M, et al. Effect of combined treatment with the epirubicin-incorporating micelles (NC-6300) and 1,2-diaminocyclohexane platinum (II)-incorporating micelles (NC-4016) on a human gastric cancer model. *International*

journal of cancer Journal international du cancer. 2014; 135: 214-23.

- [24] Mo R, Jiang T, Gu Z. Recent progress in multidrug delivery to cancer cells by liposomes. *Nanomedicine (London, England)*. 2014; 9: 1117-20.
- [25] Maruyama K. Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects. *Advanced drug delivery reviews*. 2011; 63: 161-9.
- [26] Tang Y, Wang J, Scollard DA, et al. Imaging of HER2/neu-positive BT-474 human breast cancer xenografts in athymic mice using <sup>111</sup>In-trastuzumab (Herceptin) Fab fragments. *Nuclear Medicine and Biology*. 2005; 32: 51-8.
- [27] Schaefer JV, Pluckthun A. Transfer of engineered biophysical properties between different antibody formats and expression systems. *Protein Eng Des Sel*. 2012; 25: 485-506.
- [28] Labrijn AF, Meesters JI, de Goeij BE, et al. Efficient generation of stable bispecific IgG1 by controlled Fab-arm exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110: 5145-50.
- [29] Adams GP, Schier R. Generating improved single-chain Fv molecules for tumor targeting. *J Immunol Methods*. 1999; 231: 249-60.
- [30] Cyranka-Czaja A, Wulhfard S, Neri D, Otlewski J. Selection and characterization of human antibody fragments specific for psoriasin - a cancer associated protein. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012; 419: 250-5.
- [31] Andris-Widhopf J, Steinberger P, Fuller R, Rader C, Barbas CF, 3rd. *Phage Display A Laboratory Manual*. CSH Press. New York, 2011; 53-64.
- [32] Tsumoto K, Ueda Y, Maenaka K, et al. Contribution to antibody-antigen interaction of structurally perturbed antigenic residues upon antibody binding. *The Journal of biological chemistry*. 1994; 269: 28777-82.
- [33] Yasunaga M, Manabe S, Matsumura Y. New concept of cytotoxic immunoconjugate therapy targeting cancer-induced fibrin clots. *Cancer Sci*. 2011; 102: 1396-402.
- [34] Thurber GM, Weissleder R. Quantitating antibody uptake in vivo: conditional dependence on antigen expression levels. *Mol Imaging Biol*. 2011; 13: 623-32.
- [35] Tsumoto K, Nakaoki Y, Ueda Y, et al. Effect of the order of antibody variable regions on the expression of the single-chain HyHEL10 Fv fragment in *E. coli* and the thermodynamic analysis of its antigen-binding properties. *Biochemical and biophysical research communications*. 1994; 201: 546-51.
- [36] Proba K, Worn A, Honegger A, Pluckthun A. Antibody scFv fragments without disulfide bonds made by molecular evolution. *J Mol Biol*. 1998; 275: 245-53.
- [37] Ye J, Ma N, Madden TL, Ostell JM. IgBLAST: an immunoglobulin variable domain sequence analysis tool. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41: W34-40.
- [38] Sushma K, Bilgimol CJ, Vijayalakshmi MA, Satheeshkumar PK. Recovery of active anti TNF-alpha ScFv through matrix-assisted refolding of bacterial inclusion bodies using

- CIM monolithic support. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012; 891-892: 90-3.
- [39] Fukunaga A, Tsumoto K. Improving the affinity of an antibody for its antigen via long-range electrostatic interactions. *Protein Eng Des Sel.* 2013.
- [40] Zhou Y, Drummond DC, Zou H, et al. Impact of single-chain Fv antibody fragment affinity on nanoparticle targeting of epidermal growth factor receptor-expressing tumor cells. *J Mol Biol.* 2007; 371: 934-47.
- [41] Hisada Y, Yasunaga M, Hanaoka S, et al. Discovery of an uncovered region in fibrin clots and its clinical significance. *Sci Rep.* 2013; 3: 2604.
- [42] Chen B, Jerger K, Frechet JM, Szoka FC, Jr. The influence of polymer topology on pharmacokinetics: differences between cyclic and linear PEGylated poly(acrylic acid) comb polymers. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society.* 2009; 140: 203-9.
- [43] Olafsen T, Tan GJ, Cheung CW, et al. Characterization of engineered anti-p185HER-2 (scFv-CH3)2 antibody fragments (minibodies) for tumor targeting. *Protein Eng Des Sel.* 2004; 17: 315-23.
- [44] Zdobnova TA, Stremovskiy OA, Lebedenko EN, Deyev SM. Self-assembling complexes of quantum dots and scFv antibodies for cancer cell targeting and imaging. *PloS one.* 2012; 7: e48248.
- [45] Lima LG, Monteiro RQ. Activation of blood coagulation in cancer: implications for tumor progression. *Biosci Rep.* 2013.
- [46] Hong H, Zhang Y, Nayak TR, et al. Immuno-PET of tissue factor in pancreatic cancer. *J Nucl Med.* 2012; 53: 1748-54.
- [47] Makino A, Harada H, Okada T, et al. Effective encapsulation of a new cationic gadolinium chelate into apoferritin and its evaluation as an MRI contrast agent. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine.* 2011; 7: 638-46.
- [48] Ileva LV, Bernardo M, Young MR, et al. In vivo MRI virtual colonography in a mouse model of colon cancer. *Nature protocols.* 2014; 9: 2682-92.



Cancer Sci. 2014 Dec;105(12):1631-7. doi: 10.1111/cas.12557. Epub 2014 Nov 20.  
copyright 2014

## 謝辞

本研究は国立がん研究センター東病院新薬開発分野 分野長、東京大学大学院 新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 客員教授の松村保広先生のご指導の下、研究を行いました。同研究室において、室長の安永正浩先生、古賀宣勝先生には感謝しきれません。また、研究室の医師の工藤昌尚先生、菅谷明德先生、山本祥之先生、高島大輝先生、山崎信義先生、福岡聖大先生、黒田順一郎先生、高橋遍先生にはいつも学ばせて頂くことばかりで、感謝しております。実験に関しましては、町田光さん、花岡慎悟さん、西條信史さん、瀧ヶ平美里さん、古谷大さん、山内真由美さんには多くの実験に関する助言、ご指導をして頂きました。同研究室秘書の椎名薫さん、嶋田真美子さん、進藤博子さん、中山円さんに生活面や事務手続きに関してサポートして頂きました。また、東京大学医科学研究所 津本浩平先生には、タンパク質の発現から精製をはじめ、分子間相互作用実験についてのご助言を頂き、多くの学ばせて頂きました。津本研究室の方々にも、他の研究室の私に、心遣いをしていただき、非常に感謝しております。東京大学新領域創成科学研究科博士課程3年の生内寿文さん、2年の津村遼さん、藤原悠起さん、瀧上弥史さん、修士課程2年の山崎聡子さん、新関考朗さん、1年の高塚直幸さん、辛くも、楽しい研究生活を送ることができました。また、同分野修了の斎藤洋平さん、藤澤優さん、久田洋平さんには何度も激励とやさしいお言葉をかけて頂きました。特に最終学年においては、論文が間に合うのかといったストレスをかかえておりましたが、皆様のおかげでここまで到達できたのだと実感しました。今後は、受けたご恩を少しずつ返しながら、自分の能力を発揮し、社会に貢献できるように尽力していきたいと考えております。特に博士課程で得られた経験や国立がん研究センターで研究した経験を次の世代に伝えていくことや教育という分野で尽力致します。その際にまた、先生方のお話や研究をお聞きし、若い世代に伝えていきたいと考えております。今後ともよろしくお願い申し上げます。

皆さまのお陰でこの5年間を充実したものにできました。最後になりましたが、今まで私を支えてくれました、家族の隆敏、厚子、恵輔、奈津美に心から感謝を致します。

平成27年 3月24日 佐藤隆太