抗 Fibrin 抗体を利用したがんの診断、治療への新たな試み

2011 年 3 月修了
先端生命科学専攻　47-096337　久田洋平
指導教員　松村保広　客員准教授
キーワード：DDS, がん, EPR 効果, 抗体, フィブリン, 血液凝固

【背景・目的】

19 世紀に、フランスの外科医 Trousseau が初めてがん患者と血栓症の関係性を提唱した。最近の研究結果においてもがん患者は凝固性が亢進しているという報告が数多くなされている。これまで我々の研究室でも内因系血液凝固因子の開始因子 FactorⅫが、腫瘍組織中における血管透過性の亢進に関与しているキニンを産生する開始因子であることを示し、また内因系血液凝固因子が、がん組織の微小環境へ関与していることを明らかにしてきた歴史がある。また、外因系血液凝固因子 Tissue Factor （TF）ががんの浸潤の主要因子である Matrix Metalloproteinase-9（MMP-9）を活性化し、がんの浸潤を亢進している可能性についても示してきた。今回我々は特に血液凝固系の最終産物である Fibrin に着目した。Fibrin 形成は特にがん組織に限ったことではなく、創傷、心筋梗塞、脳梗塞の発症時、関節リウマチの活動期などに認められる。しかしがん以外における Fibrin 形成は急性期、あるいは活動期のみで、形成された Fibrin は線溶系の Plasmin により分解されて 2 週間以内に Collagen に置き換わる。一方がん患者ではがん細胞が体内で生存している限り増殖、浸潤を繰り返し、がん部で Fibrin 形成と Collagen への転換が起こり続ける。このように Fibrin はがん患者以外では一過性に形成されるが、がん患者では恒常的に形成されるタンパク質であり、がん特異的ターゲットになりうると考えた。このような背景のもと、Fibrin を狙った抗体はがん特異的に集積することを期待し、抗 Fibrin 抗体を作製した。

本研究の目的は「抗体の分子量の違いによる腫瘍集積性の比較検討」である。抗 Fibrin IgM や抗 Fibrin IgG,抗 Fibrin F(ab)'$_2$,抗 Fibrin F(ab)'といった様々な抗 Fibrin 抗体のクラスや分子種の腫瘍集積性や腫瘍内保持期間、腫瘍血管からの漏出を体系的に比較する。この結果を、Fibrin を狙った抗体 DDS（drug delivery system）製剤治療法や診断薬の開発に応用したいと考えている。上記について鋭意研究を行ったところ、知見が得られたので報告する。

【方法】

抗 Fibrin IgM と抗 Fibrin IgG を作製し、抗 Fibrin IgG を様々な分子種に加工した。また、化学発癌マウスを作製し、Alexa 標識抗 Fibrin IgM と Alexa 標識抗 Fibrin IgG を投与し、*in vivo* imaging にて腫瘍血管からの漏出、腫瘍集積性、腫瘍部における保持期間を比較検討した。

【結果】

がん特異的ターゲットになりうる抗 FibrinIgM,IgG monoclonal 抗体産生株の樹立に成功した。抗 Fibrin IgM,IgG の反応性を検討したところ、どちらもマウス、ヒト Fibrin に対して交差性を示した。また、併せて抗 Fibrin IgM, IgG の大量培養、大量精製の条件を確立した。更に In vivo で抗体の分子量による腫瘍集積性を比較検討するため、抗 Fibrin IgG に酵素処理を行って、抗 Fibrin F(ab)'$_2$ を作製した。4℃保存により F(ab)'$_2$（分子量 100 kDa）は分子量 50 kDa の分子に分解された。これにより、IgM（900 kDa）,IgG（150 kDa）,F(ab)'$_2$,（100 kDa）,F(ab)'（50 kDa）という分子量の大きく異なる 4 種の抗体分子を作製することに成功した。次に化学発癌マウスを作製し、がん部と創傷部の Fibrin 形成を比較したところ、がん部では Fibrin が恒常的に発現しており、創傷部では 7 日で Fibrin 発現が消失した。また、抗 Fibrin IgM,IgG を化学発癌マウスに投与し、腫瘍血管からの漏出を確認したところ、抗 Fibrin IgM に比して、抗 Fibrin IgG は腫瘍血管から容易に漏出した。腫瘍内での保持期間は抗 Fibrin IgM が 3 日で代謝されてしまうのに対し、抗 Fibrin IgG は 7 日間保持された。

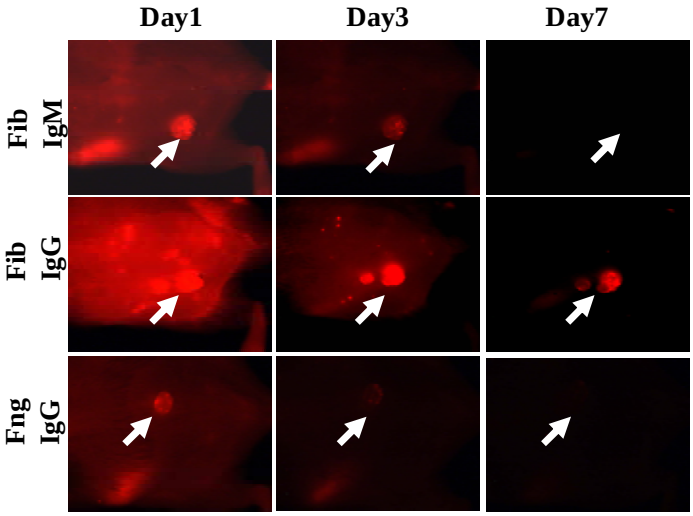

図 1. 抗 Fibrin IgG と抗 Fibrin IgM の生体内保持期間の比較検討

Alexa647 標識抗 Fibrin IgM600 μg と Alexa647 標識抗 Fibrin IgG を 100 μg を別々の化学発癌マウスに尾静脈注射で投与し、in vivo 生体観察システム OV110 を用いて、1 日目、3 日目、7 日目を測定した。コントロールとして抗 Fibrinogen IgG を化学発癌マウスに 100 μg 投与した。

Fib IgM：抗 Fibrin IgM,　Fib IgG：抗 Fibrin IgG,　Fng IgG：抗 Fibrinogen IgG

【結論】

Fibrin はがんで恒常的に発現し、がん以外では一過性に発現していることから、腫瘍特異的ターゲットになる可能性が示唆された。抗体 DDS 製剤への応用化を念頭に、化学発癌マウスに抗 Fibrin IgM,IgG を投与して比較すると、IgG のほうが腫瘍血管から容易に漏出し、腫瘍集積性が高く、腫瘍内での保持期間が長く、抗体製剤に適した結果を示した。以上のことから、Fibrin は腫瘍特異的タンパクであり、Fibrin をターゲットにした抗体 DDS 製剤開発は臨床応用が期待できるものと考えられた。