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

平成 22 年度

修士論文

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 1 月 31 日提出

指導教員　松村保広　客員准教授

47-096337　久田　洋平

【目次】

要旨 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・4
第1章　背景・目的
1.　がんと凝固 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・8
1-1. がんと凝固の関係
1-2. 内因系凝固経路
1-3. 外因系凝固経路
1-4. Fibrinogen と Fibrin
1-5. Fibrin とがんの関係
2.　Enhanced Permeability and Retention （EPR）効果 ・・・・・・・・・・・・・12
3.　抗体のクラスと分子種 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 12
3-1. Immunoglobulin G（IgG）
3-2. Immunoglobulin M（IgM）
3-3. F(ab)’$_2$
3-4. F(ab)’
4.　目的 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 15
第2章　実験方法
1.　抗 Fibrin 抗体の確立・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 17
1-1. 抗 Fibrin IgM 産生ハイブリドーマ mouse IgM clone102-10 の作製
1-2. 抗 Fibrin IgG 産生ハイブリドーマ ヒト化 IgG clone102-10 の作製
1-3. mouse IgM clone102-10、ヒト化 IgG clone 102-10 大量培養
1-4. 抗 Fibrin IgM および IgG 大量精製
1-5. medium 濃縮
1-6. ゲルろ過カラムクロマトグラフィー
1-7. タンパク濃度測定
1-8. ELISA 法
1-9. SDS-PAGE
1-10. ウェスタンブロッティング
1-11. 抗体の特異性の検討
2.　抗 Fibrin IgG の F(ab)’$_2$化 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 22
2-1. Pepsin 処理
2-2. 抗 Fibrin F(ab)’$_2$溶液交換及び濃縮
2-3. ゲルろ過カラムクロマトグラフィー
2-4. Protein L による F(ab)’$_2$精製
2-5. 各クラスと分子種の反応性比較

3. *In vivo* 評価 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・24
3-1. 化学発癌マウス作製
3-2. Alexa 標識抗体の作製
3-3. 生体蛍光強度解析
3-4. 腫瘍血管からの抗体の漏出定量
第 3 章　実験結果
1. 抗 Fibrin 抗体産生 hybridoma の作製 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 27
2. mouse IgM clone 102-10 大量培養 ・・・・・・・・・・・ ・・・・・ ・・・ 28
3. 抗 Fibrin IgM の精製 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 28
4. 抗 Fibrin IgG の $F(ab)'_2$ 化 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 32
5. 作製した各クラスと分子種の反応性の比較 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 34
6. 創傷部と腫瘍部における Fibrin 形成の比較検討 ・・・・・・・・・・・・・・・・ 35
7. 抗 Fibrin IgG と IgM の腫瘍血管外への漏出の比較検討・・・・・・・・・・・・・ 35
8. 抗 Fibrin IgG と抗 Fibrin IgM の腫瘍集積性と生体内保持期間の比較検討・・・・・ 37
第 4 章　考察
1. 抗 Fibrin 抗体の精製と分子種の作製 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 39
2. 抗 Fibrin IgM と IgG の *in vivo* imaging ・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 41
第 5 章. 総括・今後の展望
1. 本研究の総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 44
2. 今後の展望 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 44
参考文献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 45
謝辞 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 47

要旨

抗 Fibrin 抗体を利用したがんの診断、治療への新たな試み

がん先端生命科学分野　47-096337　久田洋平
指導教官　松村保広

【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。

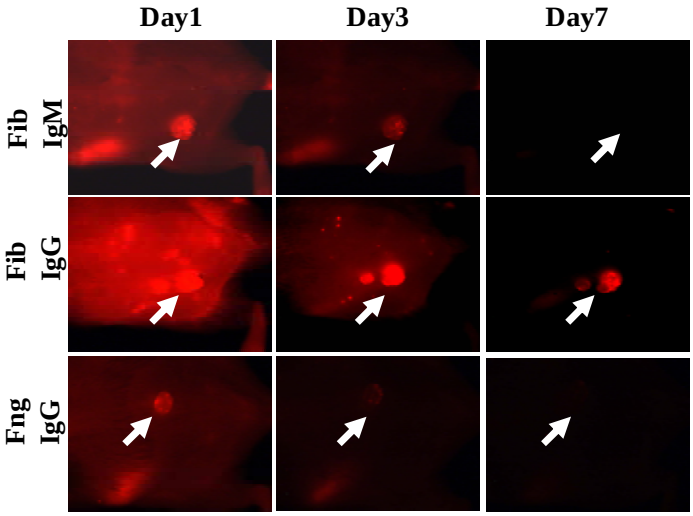


図 1. 抗 Fibrin IgG と抗 Fibrin IgM の生体内保持期間の比較検討

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。

第１章
背景・目的

1. がんと凝固

1-1. がんと凝固の関係

1800 年代のフランスの外科医 Trousseau が進行がんで血栓性静脈炎の報告をして以来[1]、がんと凝固には密接な関係があることが知られている。臨床的にもがんが存在すると、特に膵がん、胃がん、脳腫瘍などで深部静脈血栓症の発症が 4 倍程度になることが知られている。[2]静脈血栓症が生じる原因の 1 つに血液凝固の亢進が挙げられる。血液凝固経路には 2 つの経路（内因系と外因系）があり、どちらの経路もがんとの関連性が報告されている。

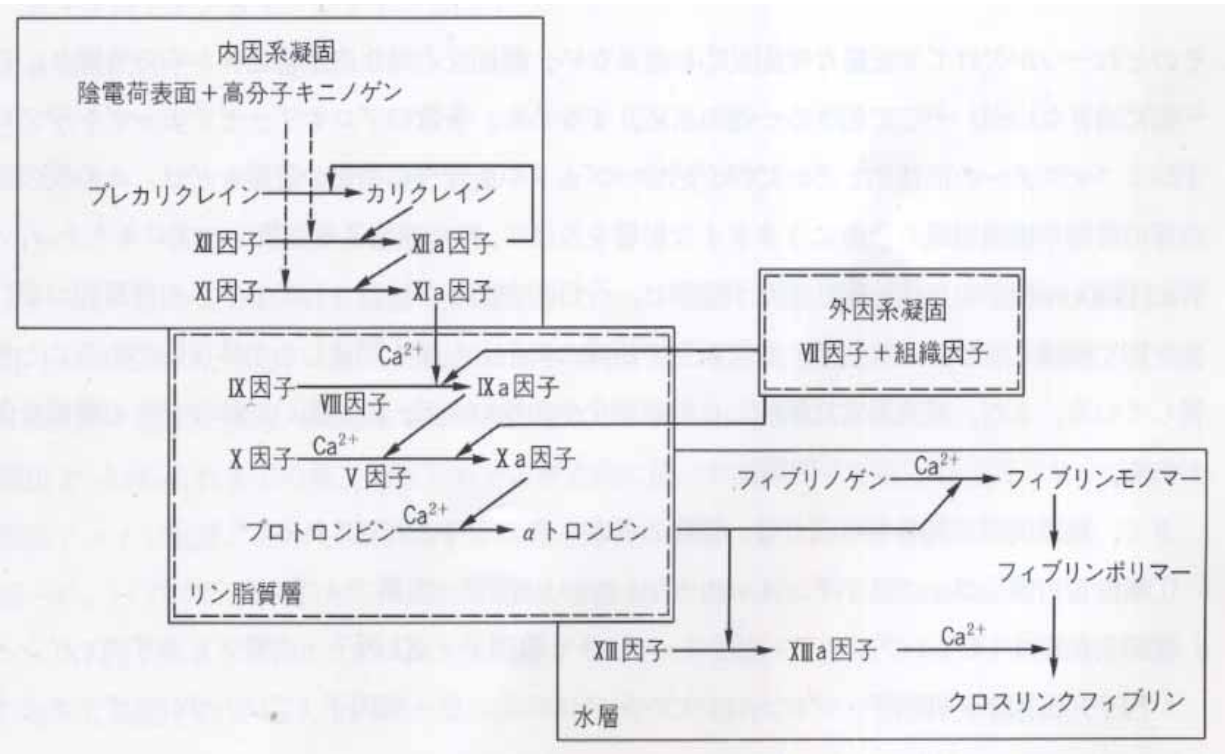
1-2. 内因系経路

反応に必要な因子が全て血中に存在するので、内因系とよばれる。引き金は血液の異物面（ガラスなどの陰性荷電体）との接触である。血中の凝固因子のうち接触因子とよばれる一群のタンパク（XII,XI,プレカリクレイン,高分子キニノゲン）が異物面に吸着して、活性化され、XI因子をXIa とする。[3, 4]一旦XIa が生成するとXIa はIXを活性化し、あとの反応は外因系と同様に進み、フィブリンができる。[5]（図 2）

内因系凝固因子の一つである高分子キニノゲンがカリクレインからの限定分解を受け、キニンの一種であるブラジキニンを放出することが知られている。[6]ブラジキニンは受容体である B2R に結合すると、さまざまな細胞内シグナルを活性化し、血管透過性を亢進する。[7]腫瘍組織中で血管透過性が亢進することは古くから知られており、その原因としてがんでキニン産生が増加し、キニンががんの血管透過性亢進に関係することが報告されている。[8, 9]

1-3. 外因系経路

引き金（組織因子）が血管外に存在するので外因系とよばれる。生体内において血管壁が損傷されて血液が組織液中の組織因子（TF）と接触することで起こる。TF が凝固Ⅶ因子と複合体をつくるとⅦ因子は活性化されてⅦa となる。次いでⅦa-TF 複合体はⅩ因子およびⅨ因子を活性化して、Ⅹa およびⅨa とする。さらにⅨa はⅧ因子（補助因子）の存在下でⅩ因子を活性化するので大量のⅩa ができる。次にⅩa はⅤ因子の存在下でプロトロンビンを活性化してトロンビンを生成する。トロンビンはフィブリノーゲンを限定分解してフィブリンに転換する。最終的にフィブリンは活性化ⅩⅢ因子により架橋をうけてクロスリンクフィブリン（フィブリン網）となる。[5, 10]（図 2）



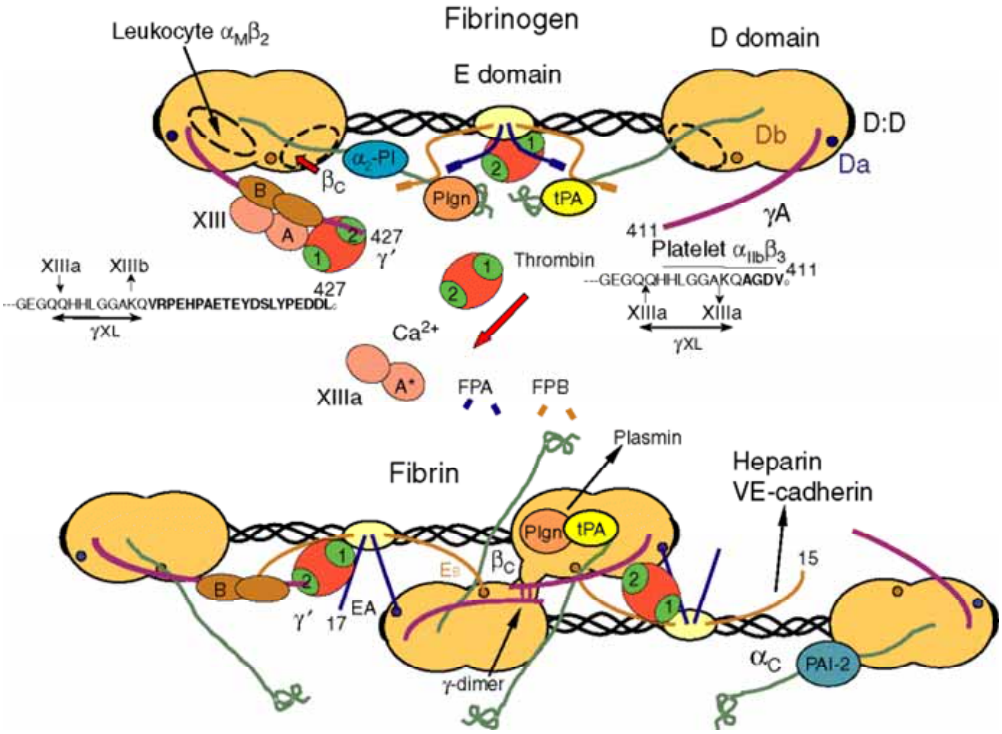
止血・血栓・線溶. 中外医学社, 1994 年 初版より

図 2. 凝固カスケード機構に関与する各因子の相互関係[5]

内因系凝固、外因系凝固共に最終産物として、Fibrin が産生される。

1-4. Fibrinogen と Fibrin

Fibrinogen は肝実質細胞で合成、分泌され、血中（約 80 %）および組織液（約 20 %）に分布する分子量 340 kDa の糖タンパクである。[10] Fibrinogen は 45 nm の分子で、中央の E ドメインと coiled-coil segment でつながった外側の 2 つの D ドメインから成る。[11]（図 3）Aα・Bβ・γという 3 種類のポリペプチド鎖がジスルフィド結合（S-S 結合）して形成される半分子（Aα-Bβ-γ）が 2 個さらに S-S 結合した化学的ダイマー（Aα-Bβ-γ）$_2$で血漿中に約 3 mg/ml 存在する。[5, 12-16]（図 3）Aα鎖は 610 アミノ酸残基、Bβ鎖 461 アミノ酸残基、γ鎖は 410 アミノ酸残基からなる。[5, 14]血液凝固系が働き、トロンビンによりAα鎖の Arg16/Gly17 間のペプチド結合が、ついでBβ鎖上でも Arg14/Gly15 間が開裂され、Fibrinogen:（Aα-Bβ-γ）$_2$は(α-β-γ)$_2$に転じる。[5]こうして新しくできたα鎖の N 末端を E_A, β鎖の N 末端を E_B と呼び、それぞれの E_A,E_B は別の Fibrin の D ドメイン上の相補的結合ポケット（Da, Db）を介して重合する。[17-21] Fibrin は最終的に線維素溶解反応（線溶）により、分解される。[5]一方、トロンビンにより開裂したペプチド断片は、FibrinopeptideA（FPA）, FibrinopeptideB（FPB）として、血中に放出される。



J Thromb Haemost, 2005. ***3****(8): p. 1894-904.*

図 3. Fibrinogen と Fibrin の立体構造[11]

Fibrinogen において A α 鎖、B β 鎖は E ドメインに存在し、γ 鎖は D ドメインに存在する。Thormbin により、FPA と FPB が切断されると、Fibrin 同士が重合する。

1-5. Fibrin とがんの関係

がんにおいて Fibrinogen やほかの凝固因子は腫瘍血管から漏れだし、腫瘍の周りに Fibrin 沈着物を形成する。これらの沈着物は血管新生促進性の一時的なマトリックスを形成する。[22]マトリックスは内皮細胞接着、遊走能、増殖能、そして管腔形成を亢進する。[23]また、Fibrin が転移能を決定する重要な因子という報告[24]もあり、凝固系の最終産物である Fibrin は、がんの悪性化を亢進する働きがあると考えられる。

2. Enhanced Permeability and Retention （EPR）効果

正常血管では高分子は漏出しないが、低分子は容易に漏出する。しかし、リンパ管により回収される。一方、腫瘍血管は血管透過性が亢進しているため、正常血管からは漏出しない、抗体を含めた高分子タンパクやナノ粒子も血管外に漏出する。また、リンパ管での回収が不十分なため、がんに滞留する。[25]（図 4）

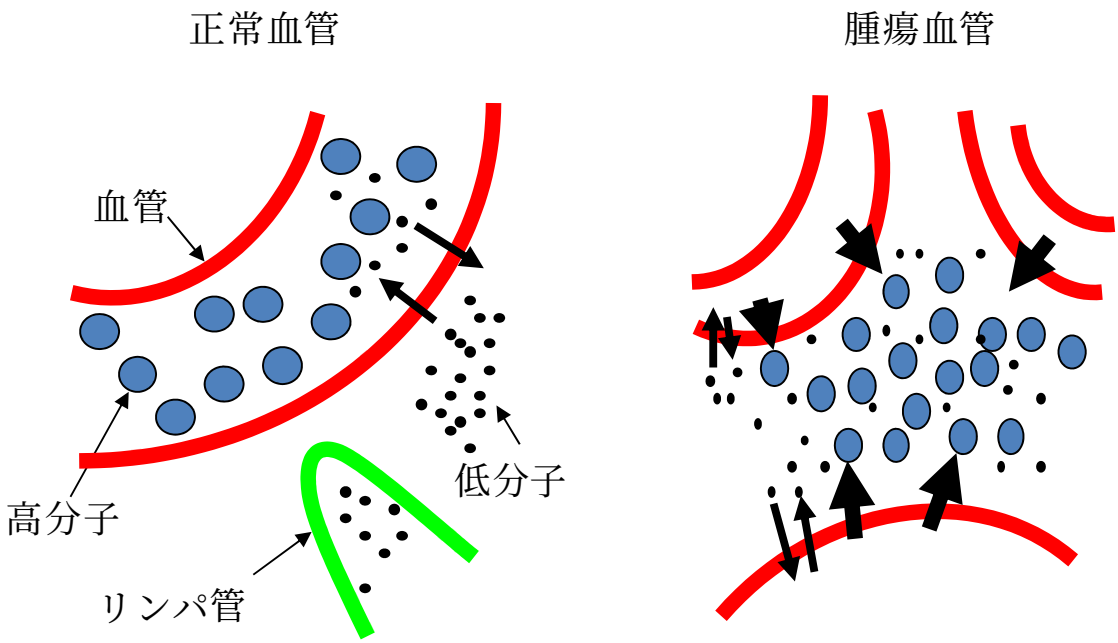


図 4. EPR 効果

腫瘍血管では正常血管で漏出しない高分子も漏出し、がん部に滞留する。

3. 抗体のクラスと分子種

3-1. Immunoglobulin G（IgG）

血液中の主要な免疫グロブリンで、分子量は約 150 kDa である。（図 5）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のクラスでもある。[26] IgG 分子の尾部（Fc）は補体を活性化するほかに，マクロファージや好中球がもつ特異的受容体にも結合する。これらの食細胞は，主にこの Fc 受容体を用いて，感染に応答して生産された IgG 抗体で覆われた感染微生物に結合し，取り込んで破壊する。[27]

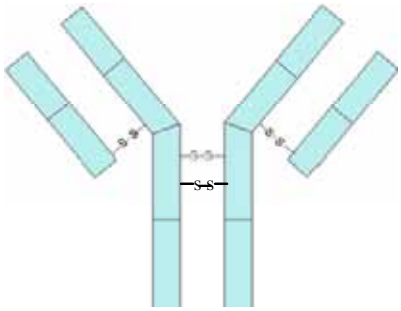


図 5.　IgG

重鎖と軽鎖がジスルフィド結合で結合し、重鎖同士もジスルフィド結合で結合した 2 価の抗体

3-2. Immunoglobulin M（IgM）

初期抗体応答で産生される抗体で、分子量は約 900 kDa である。J 鎖と呼ばれるポリペプチドで架橋された 5 量体の立体構造をなしており、重鎖はμ鎖と呼ばれる。（図 6）同一の抗原決定基を多数もつ抗原が分泌された五量体構造の IgM 分子 1 個に結合すると，五量体の構造が変わって補体系を活性化する。侵入した病原体の表面に抗原が存在すると，活性化した補体が白血球の食作用を亢進する。これをオプソニン効果とよぶ。[27]

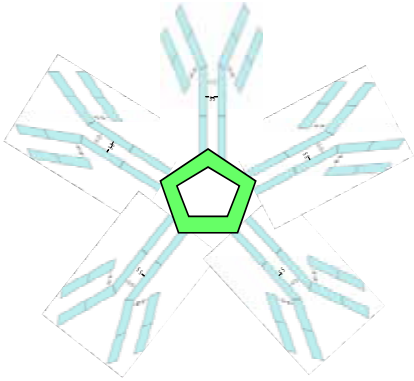


図 6. IgM

IgM は J 鎖を介して、5 量体を形成した構造をとる。また、重鎖はμ鎖と呼ばれ、他の抗体クラスと異なる特異的な構造をとる。

3-3. F(ab)’$_2$

IgG を酸性条件下で Pepsin 処理することで F(ab)’$_2$ が得られる。（図 7）F(ab)’$_2$ は 2 価の抗体であり、分子量は約 100 kDa である。（表 1）このように F(ab)’$_2$ は IgG に比べて低分子量

であるため IgG に比べて血中半減期が短い。[13, 28] また、Fc 部分が除かれた形態をとるため、IgG に比べてイムノグロブリンとしての抗原性が低い。

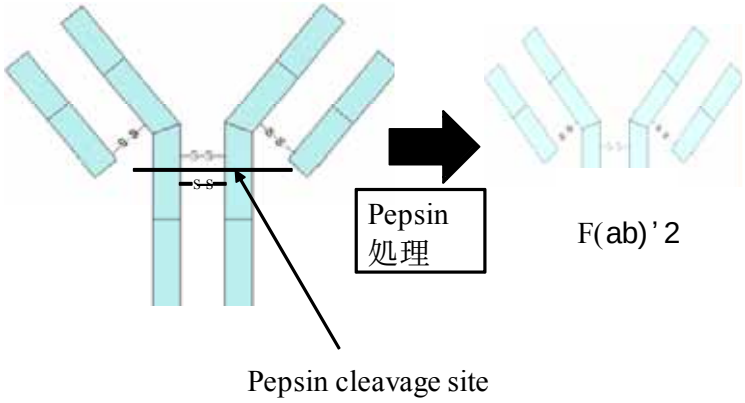


図 7.　Pepsin 酵素処理による F(ab)'$_2$ の作製

IgG に酸性条件（至適 pH3.7）で Pepsin を作用させると、分子量約 100 kDa の F(ab)'$_2$ が作製できる。

3-4. F(ab)'

F(ab)'$_2$ が還元されることにより、F(ab)'が産生される。[29]（図 8） F(ab)'は 1 価の抗体であり、分子量は約 50 kDa である。（表 1）F(ab)'$_2$ と同様に血中半減期が短い。

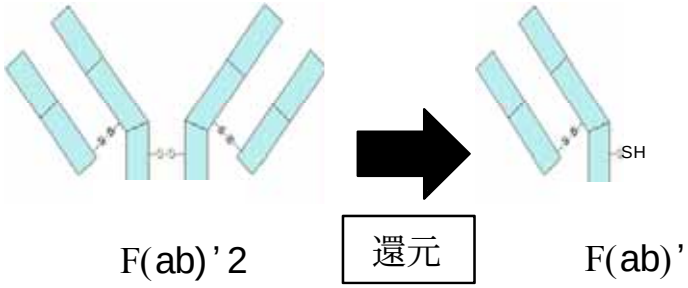


図 8.　F(ab)'$_2$ から F(ab)'への還元

F(ab)'$_2$ が還元を受けると、1 価の F(ab)'が作製される。

表 1. 抗体のクラスおよび分子種の価数と分子量の一覧

クラスおよび分子種	価数	分子量
IgG	2	150 kDa
IgM	10	900 kDa
F(ab)'2	2	100 kDa
F(ab)'	1	50 kDa

4.目的

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体系的比較検討」である。

まず、抗 Fibrin 抗体を作製し、Fibrin ががん特異的ターゲットになることを検証する。次に、IgM や IgG といった抗体クラスや $F(ab)'_2$ や F(ab)'といった分子種の分子量の異なる様々な Fibrin 抗体を担がんマウスに投与して、どのクラスあるいは分子種が治療薬あるいは診断薬として適しているかを分子量に着目して比較すること。

最終的にこの研究によって得られた知見を基にがん治療薬や診断薬の開発に応用することを目的とした。

第 2 章
実験方法

1. 抗 Fibrin 抗体の確立

1-1. 抗 Fibrin IgM 産生ハイブリドーマ mouse IgM clone102-10 の作製

Fibrinogen（SIGMA 社）を Thrombin（SIGMA 社）により分解して作製した Fibrin を完全フロインドアジュバンド（Difco 社）と混和したものを BALB/c mouse（日本クレア社）へ腹腔内投与した。その後 2 週間おきに 3 回、Fibrin と不完全フロインドアジュバンドの混和物を同一個体に投与した。最終免疫は Fibrin を PBS に希釈した最終免疫サンプルを尾静脈注射により投与した。最終免疫の 3 日後マウス脾臓を外科的に摘出し、ケーラーとミルスタインの方法[30]に従って、細胞融合を行った。以下簡単に方法を記す。免疫抗原を投与した mouse の脾臓細胞とミエローマ細胞（P3U1）を 4:1 の割合で 50(w/v) %polyethilene glycol 6000 (Wako 社) を RPMI 1640（invitrogen 社）で溶解した溶液中で 2 分間室温において反応させた。その後、遠心分離を行い、RPMI 1640 (+10(v/v) % Fetal Bovine Serum （FBS, SIGMA 社）、Antibiotic-Antimycotic （Anti-Anti, GIBCO 社）、+ hypoxyanthine-aminopterin-thymidine（HAT, SIGMA 社）)で懸濁し、その細胞懸濁液を flat-bottomed 96-well tissue culture palates (Costar Corning 社) へ播種し、37℃、5%CO_2 インキュベーター内にて培養した。これにより得たハイブリドーマの培養上清を ELISA 法を用いて、特異的抗 Fibrin 抗体が存在するかを評価した。ELISA 法で陽性を示したクローンの中から最も反応性の高いクローン（mouse IgM clone 102-10）を選出した。IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit（Santa Cruz Biotechnology 社）により、抗体のクラスとサブタイプを同定した。

1-2. 抗 Fibrin IgG 産生ハイブリドーマ ヒト化 IgG clone102-10 の作製

RT-PCR により、mouse IgM clone102-10 から重鎖の可変領域(Vh)cDNA と kappa 軽鎖可変領域(Vk)cDNA を単離した。

RT-PCR には以下のプライマーを使用した。

Vh

forward 5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3'

reverse 5'-GTTGTTCTGGTAGTTCCAGGTG-3'

Vk

forward 5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3'

reverse 5'-CCGCTTAATTAACTAACACTCATTCCTGTTGAAGCTCT-3'

Vh と Vk の cDNA は抗ヒト IgG_1 を発現するベクターに組み込んだ。

発現ベクターは CHO cell（RIKEN Bioresourse center）にトランスフェクションさせた。トランスフェクションした細胞を flat-bottomed 96-well tissue culture palates に 100 μL/well ずつ播種してクローニングした。安定なクローン（ヒト化 IgG clone 102-10）を単離した。

1-3. mouse IgM clone102-10、ヒト化 IgG clone 102-10 大量培養

mouse IgM clone 102-10 は HAT/ASF104N（味の素社）を用いて、ヒト化 IgG clone 102-10 は ASF104N｛＋Blasticidine（invivogen 社）,+Puromycine（SIGMA 社）,+Anti-Anti｝を用いて、150mm Dish (Corning 社)中で 2.0×10^7cells まで増やし、その後 Bello Cell 和研薬社　図 9）に移して、37℃、5%CO_2 インキュベーター内にて大量培養を行った。Bello Cell は 1 週間に 1 回 500 mL の培地を交換した。

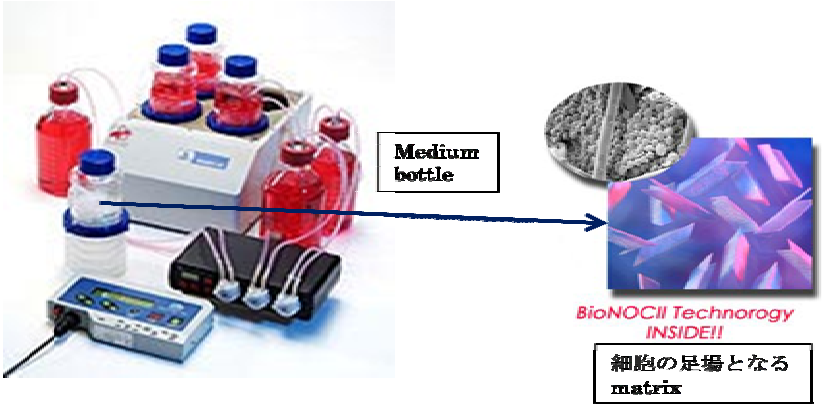


図 9. Bello Cell 概要図

Bello Cell タンク中には細胞の足場になる matrix が封入されており、大量培養が可能となる。Bello Cell タンクの底面は蛇腹状になっており、Bello Cell タンクを設置する機械部が周期的に上下動することで効率的なエアレーションと栄養供給が可能となる。

1-4. 抗 Fibrin IgM および IgG 大量精製

ハイブリドーマ培養中の Bello Cell の medium から抗体を精製するためにサンプルの濃縮、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー, SDS-PAGE, ELISA 法を行った。

1-5. medium 濃縮

各ハイブリドーマを培養している Bello Cell の medium bottle から 500 mL の medium を 50ml centrifuge tube（Corning 社）10 本で回収したのち、1200rpm, 4min, 4℃の条件で遠心して、上清を amicon8200（Millipore 社）に ultrafiltration membranes（Millipore 社）をセットして、medium を 10　mL に濃縮した。

1-6. ゲルろ過カラムクロマトグラフィー

濃縮した medium sample10 mL を Econo Column（BIO-RAD 社）に充てんした Sephacryl S-500（GE Heathcare 社）に apply した。Sephacryl S-500 精製では sample は Peristapump（ATTO 社）を用いて流速 0.25 mL/min で流し、Fraction collector（BIORAD 社）で 1ml/fraction ずつ回収した。

1-7. タンパク濃度測定

回収した fraction は NanoDrop（スクラム社）を用いて、タンパク定量を行った。

PBS(-)を 2 μL 測定器の上に添加し、吸光度を測定して blank とした。測定部を超純水でふいたのち、fraction sample を 2 μL 測定器の上に添加し、吸光度を測定した。

1-8. ELISA 法

96well plate(C8 Maxi Breakapart, nunc 社）に、1 μg Fibrinogen を PBS（invitrogen 社）で溶かした抗原溶液を 100 μL/well ずつ添加し、4℃で 24 時間保存した。翌日抗原溶液を捨て、4(w/v) %ブロックエース（DS ファーマバイオメディカル社）/PBS を 200 μl/well で 4℃で 48 時間ブロッキングした。作製した ELISA プレートのブロッキング溶液を捨て、タンパクを含有していた fraction sample を 100 μL/well 加え、37℃で 30 分 incubate した。その後サンプルを捨て、Tris buffered saline/Tween20（TBS-T）200 μL/well で 3 回洗った。2 次標識抗体として、IgG を検出する際には Peroxidase-conjugated rabbit Anti-human IgG（Jackson 社）を、IgM を検出する際には Peroxidase-conjugated Donkey Anti-mouse IgM（Jackson 社）をそれぞれ PBS(-)で 500 倍に希釈した抗体溶液を 100 μL/well 添加し、37℃で 30 分 incubate した。2 次標識抗体を捨て、TBS-T (TBS, 0.1(w/v) %Tween-20)200 μL/well で 3 回洗った。その後 1-step slow TMB（Thermo Scientific 社）を 100 μL/well 添加し、室温に 5 分置いた。2 規定の硫酸（Wako 社）を 100 μL/well で反応を止め、SPECTRAMAX190（日本モレキュラーデバイス社）で吸光度を測定した。

1-9. SDS-PAGE

パジェラン電気泳動槽（ATTO 社）に Super Sep Ace 5-20(w/v) %ゲル 17well（Wako 社）をセットして泳動 buffer（25 mM Tris, 192 mM グリシン, 0.1(w/v) %SDS, 全て Wako 社）で泳動槽を満たす、各 sample 10 μL に sample buffer（125 mM Tris-HCl pH6.8, 2.3(w/v) %SDS, 10 (w/v)%グリセリン, 10 μL/ml ブロムフェノールブルー, 全て Wako 社）2.5 μL の混合液をゲルに添加した。40 mA で 80 分間泳動したのち、固定液（10(v/v) %酢酸, 40(v/v) %メタノール, 全て Wako 社）で 20 分間固定した。Quick CBB（Wako 社）で 20 分間染色後、50(v/v) %メタノールで脱色した。

1-10. ウェスタンブロッティング

ろ紙 6 枚と PVDF 膜（Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore 社）を transfer buffer（50 mM Tris, 192 mM グリシン, 350 μM SDS, 20(v/v) %メタノール）で 2 時間浸し、電気泳動終了後のゲルを transfer buffer に 30 分浸した。ろ紙 3 枚、PVDF 膜、ゲル、ろ紙 3 枚の順で転写装置（Trans-blot SD SEMI-DRY Transfer Cell, BIORAD 社）で 12 V 100 分転写した。Blocking buffer(4(w/v) %スキムミルク(Difco 社), 0.02(w/v) %Tween-20/PBS)に浸し、4℃で 24 時間振とうした。Blocking buffer で 20,000 倍に希釈した Peroxidase-conjugated Donkey Anti-mouse IgM と PVDF 膜をハイブリバッグ（ASONE 社）に入れ、室温で 3 時間振とうした。0.1(w/v) %Tween PBS で 20 分間 3 回洗浄した。ECL Western Blotting Detection Rgagents (GE Healthcare 社) で発光させて High performance chemiluminescence film (GE Healthcare 社) に感光して検出した。

1-11. 抗体の特異性の検討

下記のペプチドを合成し、ELISA プレートを作製した。（図 10）下記の ELISA プレートを用いて、抗 Fibrin IgM に対して、ELISA 法を行った。

Fib-C（SIGMA 社）：ヒト Fibrinogen Aα鎖のトロンビン切断部位の Fibrin 側アミノ酸を合成

GPRVVERHQSAC

Fib-N（SIGMA 社）：ヒト Fibrinogen Aα鎖のトロンビン切断部位の FPA 側アミノ酸を合成

CSGEGDFLAEGGGVR

FPA（MBL 社）　：ヒト FPA の全長を合成

MFSMRIVCLVLSVVGTAWTADSGEGDFLAEGGGVR

keyhole-limpet hemocyanin（KLH, SIGMA 社）：Fib-C と Fib-N の担体として使われている。

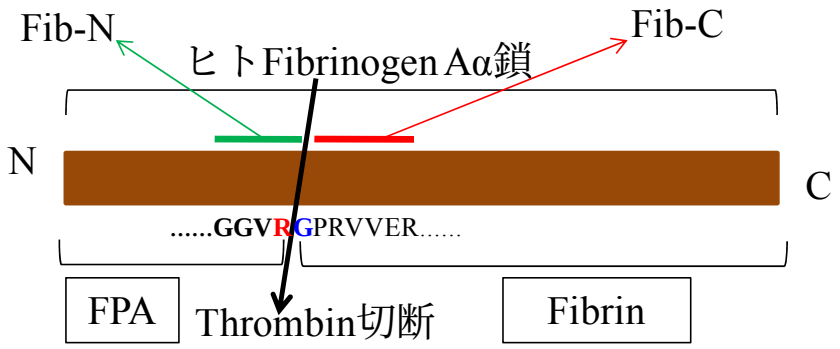


図 10.特異性解析に用いた合成ペプチド

全長を Fibrinogen Aα鎖とすると、Thrombin で切断された短いペプチドが FPA となり、長いペプチドが Fibrin となる。

Fib-N:ヒト FibrinogenAα鎖のトロンビン切断部位の FPA 側アミノ酸を 15 残基合成

Fib-C:ヒト FibrinogenAα鎖のトロンビン切断部位の Fibrin 側アミノ酸を 12 残基合成

2. 抗 Fibrin IgG の F(ab)'$_2$化

2-1. Pepsin 処理

1 mg/mL の精製抗 Fibrin IgG （BIOMATRIX 社）2,000 μL、Pepsin（ブタ胃由来 3400 Units/mg, Wako 社）を超純水 (Millipore 社)で 425 Units/mL に希釈した酵素溶液 2,000 μL、D.W.（GIBCO 社）4,000 μL、0.5 M クエン酸 buffer pH2.7（Wako 社）2,000 μL を 15 ml centrifuge tube (Corning 社)中で混合し、37 ℃で 1 時間 incubate した。その後、1.5 M Tris buffer pH10.0 を 1,000 μL 加えて溶液を中和した。

2-2. 抗 Fibrin F(ab)'$_2$溶液交換及び濃縮

作製した抗 Fibrin F(ab)'$_2$ を 1,100 μL ずつ濃縮カラム（Vivaspin 500, sartorius stedim 社）10 本に入れ、12,900 rpm, 10min, 4℃の条件で遠心して濃縮した。遠心後 PBS(-)を 500 μL 加えた。この操作を 8 回繰り返し、最後に total で 3 mL の濃縮 sample を回収した。

2-3. ゲルろ過カラムクロマトグラフィー

濃縮した抗 Fibrin F(ab)' sample 3 mL を Sephacryl S-300 に apply した。Sephacryl S-300 の精製条件は室温で流速 0.25 mL/min で流し、Fraction collector（BIORAD）で 1mL/fraction ずつ回収した。

タンパク濃度測定、SDS-PAGE（条件は前述）により、抗 Fibrin F(ab)’が含まれる fraction を特定した。

2-4. Protein L による F(ab)’$_2$ 精製

Protein L とはマウス、ヒトのイムノグロブリン軽鎖のκ鎖と結合することを特徴とする Peptostreptococcus magnus 由来のタンパク質である。これを使用すると、Fc ではなくκ鎖依存的精製が可能となる。

protein L Agarose（Thermo Scientific 社）を Econo Column に 5 mL 入れ、PERISTA PUMP につなぎ、PBS(-)を流速 0.5 mL/min で 120 分流して protein L Agarose を置換した。その後、抗 Fibrin F(ab)’が含まれる fraction をすべて 50 mL centrifuge tube に回収し、Peristapump を用いて、protein L と 50 mL centrifuge tube を環状につないだ。室温で 0.5 mL/min で 12 時間流したのち、0.1 M クエン酸 buffer pH3.0 で protein L Agarose をピペッティングして、20 分間静置した。Protein L Agarose のヒンジを開いて、溶出させた。溶出が終了したら 1.5 M Tris buffer pH10.0 で中和した。この操作を 7 回繰り返した。

2-5. 各クラスと分子種の反応性比較

表 1 に基づいて結合部位を等価にして、各抗体のクラスと分子種の反応性を比較すると計算は以下のようになる。

10 価に統一した場合、表 2 のように分子量が決まる。

IgM を 1mg/ml とした場合に分子量の比から IgG は 5/6 mg/mL、F(ab)’$_2$ と F(ab)’は 5/9 mg/mL となる。

この値を基に Fibrin plate を用いて ELISA 測定を行った。

表 2.抗体のクラスおよび分子種

クラスおよび分子種	価数	分子量	等価（10価に統一）にしたときの分子量
IgG	2	150 kDa	750 kDa
IgM	10	900 kDa	900 kDa
F(ab)'2	2	100 kDa	500 kDa
F(ab)'	1	50 kDa	500 kDa

3. *In vivo* 評価

3-1. 化学発癌マウス作製

8 週齢の FVB/N マウス（日本クレア社）の背中を剃毛し、皮膚に DMBA（250 μg /mL in aceton, SIGMA 社）を塗布した。DMBA 塗布の 1 週間後から PMA（25 μg/mL in acetone, SIGMA 社）を 32 週間塗布した。マウスの背中に腫瘍が形成されていることを確認し、ノギスを用いて腫瘍径を測定した。腫瘍の長径(L)と短径(W)を測定し、以下の公式で腫瘍体積(V)を算出した。

$$V=(L\times W^2)/2$$

上記公式に従い腫瘍体積が 70 mm^3を超えた時点から以下の実験に使用した。

3-2. Alexa 標識抗体の作製

抗 Fibrin IgM と抗 collagen Ⅰは Alexa Flour 555 Protein Labeling Kit（invitrogen 社）を、抗 Fibrin IgG は Alexa Flour 647 Protein Labeling Kit（invitrogen 社）を用いて標識した。Component B（1 M 重炭酸ナトリウム）のバイアルに 1 mL の超純水を加え、Vortex して完全に溶かした。500 μL の抗体溶液に 50 μL の 1 M の重炭酸ナトリウムを加えた。Reactive dye の vial に 1 M の重炭酸ナトリウムが入った抗体溶液を入れて、スターラーを用いて、室温で 1 時間攪拌した。スタンドに付属のカラムを設置した。カラムに Component C（purification resin）をゆっくりと注ぎ、カラムの底から排出された buffer をビーカーで受けた。カラムの上端から 3 cm まで resin が到達次第、column bed 上の buffer を捨てた。その後 Column bed の上に reactive dye の vial の抗体溶液を入れた。抗体溶液がすべて column bed に apply された後、超純水で 10 倍に希釈した component D（elution buffer）を加えた。2 つのカラーバンドがゲル中で次第に分離したので、1 つ目のカラーバンド（Alexa 標識抗体）を tube で回収し、4℃で保存した。

3-3. 腫瘍血管からの抗体の漏出定量

化学発癌マウスに Alexa488 標識抗 Fibrin IgM　600 μg と Alexa647 標識抗 Fibrin IgG 100 μg を 尾静脈注射により同時に投与した。抗体投与直後の化学発癌マウスの腫瘍血管を共焦点レーザー顕微鏡 A1R（ニコン社）で撮影した。腫瘍血管の外側の一点に焦点を合わせ、Alexa 555 標識抗 Fibrin IgM と Alexa647 標識抗 Fibrin IgG の蛍光強度を 5 分間連続して測定した。また、抗体投与後 1 時間の腫瘍血管を撮影し、Alexa555 標識抗 Fibrin IgM と Alexa647 標識抗 Fibrin IgG の蛍光画像を比較した。

3-4. 生体蛍光強度解析

等価の Alexa 標識抗体を尾静脈注射により投与し、*in vivo* 生体観察システム OV110（オリンパス社）を用いて、1 日目、3 日目、7 日目の蛍光を測定した。

第 3 章
実験結果

1. 抗 Fibrin 抗体産生 hybridoma の作製

がん特異的ターゲットとなりうる Fibrin に対する monoclonal 抗体を作製した。抗 Fibrin 抗体を産生するハイブリドーマを作製し、培養上清を ELISA 法により抗体活性を測定してスクリーニングした。その結果 mouse IgM clone 102-10 が得られた。また、mouse IgM clone 102-10 を遺伝子工学的に改変する事でヒト化 IgG clone 102-10 を得た。mouse IgM clone 102-10 とヒト化 IgG clone 102-10 の培養上清はどちらもヒト Fibrin とマウス Fibrin に反応性を示した。（図 11）その一方で、ヒト、マウス Fibrinogen との反応性を示さなかった。

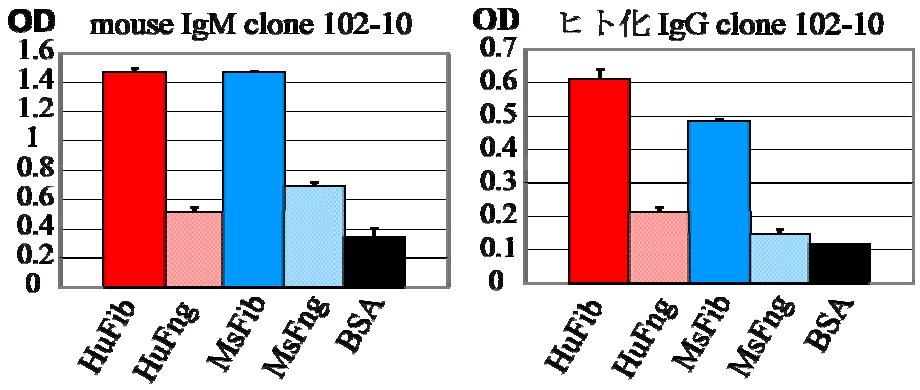


図 11. 抗 Fibrin IgM と抗 Fibrin IgG の交差性の検討

確立した mouse IgM clone 102-10 とヒト化 IgG clone 102-10 の培養上清を用いて、ELISA 法による検討を行った。ヒトとマウスの Fibrin plate と Fibrinogen plate、そして BSA plate を用いて交差性を確認した。

Hu：Human

Ms：Mouse

Fib：Fibrin

Fng：Fibrinogen

BSA：Bovine Serum Albumin

2. mouse IgM clone 102-10 大量培養

確立した mouse IgM clone 102-10 を大量培養装置 Bello cell 中で培養した。Bello cell 培養装置中の抗体濃度を測定したところ、経時的な増加が見られ、約 2 カ月で安定的な培養条件を確立した。（図 12）

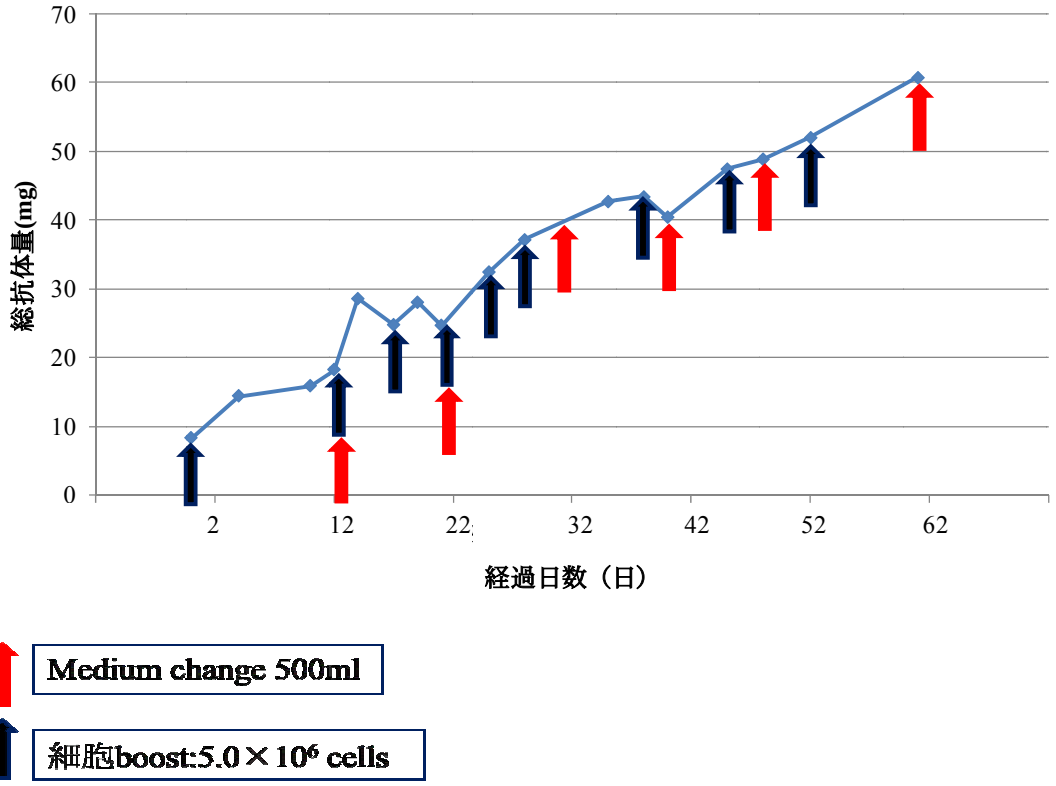


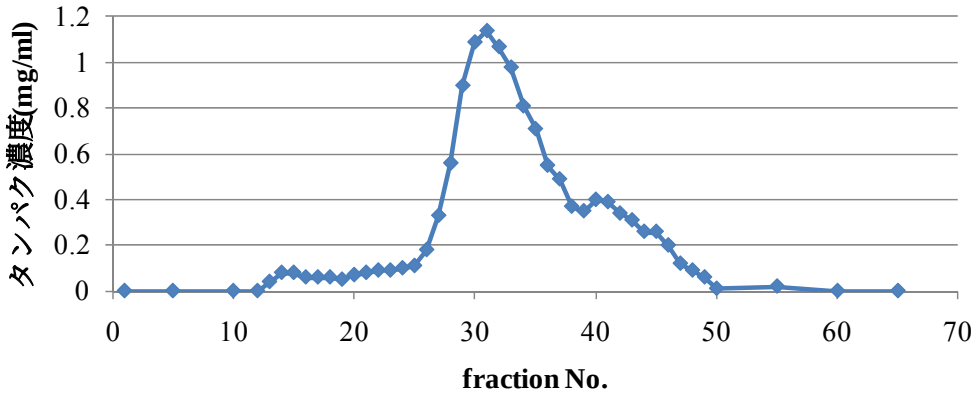
図 12. 抗 Fibrin IgM の抗体量の経時変化

Bello Cell は 10 日の周期で培地交換を行い、上記のように hybridoma の boost を行った。標準品の抗 Fibrin IgM を基に standard curve を描いて、抗体量を決定した。

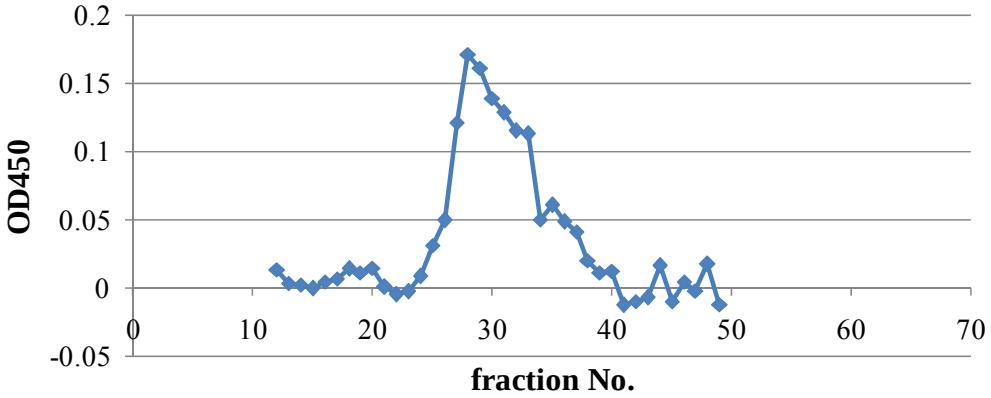
3. 抗 Fibrin IgM の精製

In vitro および in vivo 実験で使用できる抗 Fibrin IgM 抗体を得るために、mouse IgM clone 102-10 の培養上清から抗 Fibrin IgM を精製した。大量培養装置 Bello Cell から mouse IgM clone 102-10 培養上清を回収し、培養上清からの抗 Fibrin IgM を精製した。精製 fraction のタンパク濃度のピーク（図 13a）と抗体活性のピーク（図 13b）から fraction 24～34 までを

選んで濃縮、再精製した。再精製した fraction のタンパク濃度のピーク（図 14a）と抗体活性のピーク（図 14b）から fraction 25～30 までを選んで濃縮した。その結果 2.73 mg/mL の精製抗 Fibrin IgM が 700 μL 得られた。精製抗 Fibrin IgM はヒト Fibrin に対して高い特異性を示した。（図 15a）また、Western blotting 法により、純度の高い抗 Fibrin IgM であることを確認した。（図 15b）



a.



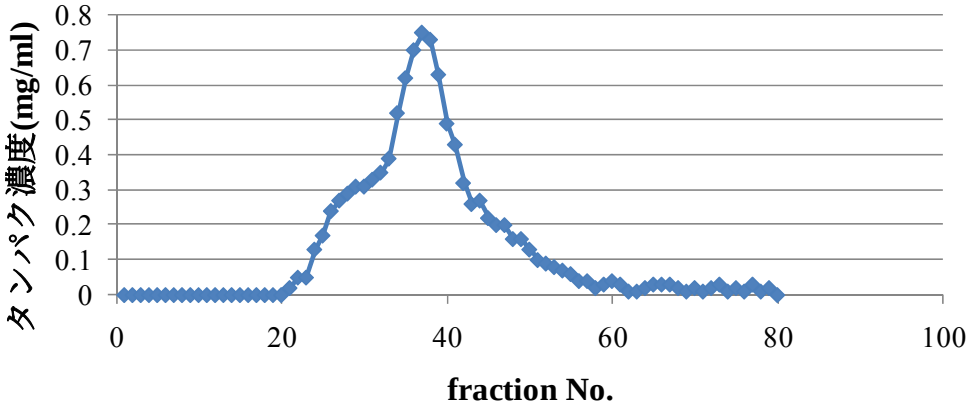
b.

図 13. 一次精製 fraction タンパク濃度測定と反応性測定

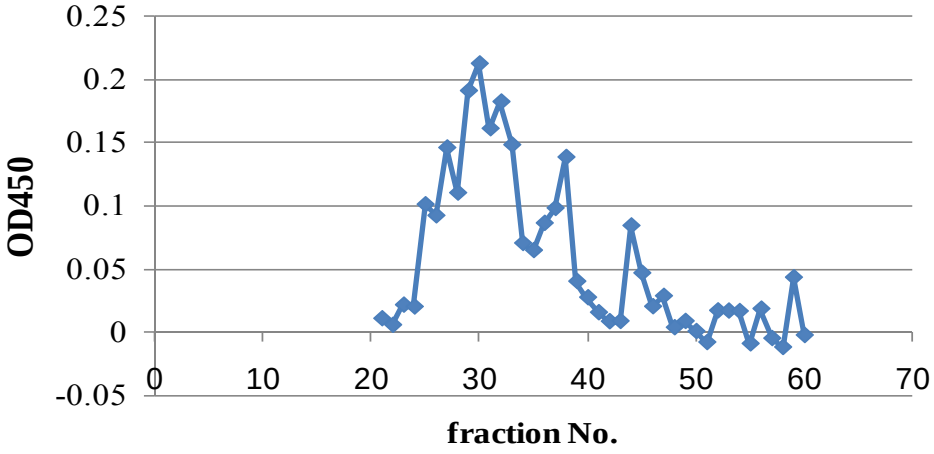
Bello cell から培養上清を 500 mL 回収し、ultrafiltration membrane を装着した Amicon8200 により 10ml に濃縮した。10 mL の濃縮培養上清を Sephacryl S-500 により精製し、精製 fraction は Fraction collector を用いて 1 mL/fraction 回収した。

a. 各 Fraction を Nano Drop を用いてタンパク濃度を測定した。

b. 各 fraction を ELISA 法により、反応性を測定した。



a



b

図 14. 二次精製 fraction タンパク濃度と反応性測定

一次精製の fraction 24～34 の濃縮サンプルを Sephacryl S-300 を用いて二次精製し、精製 fraction は Fraction collector を用いて、1 mL/fraction 回収した。

a. 各 Fraction を Nano Drop を用いてタンパク濃度を測定した。

b. 各 fraction を ELISA 法により、反応性を測定した。

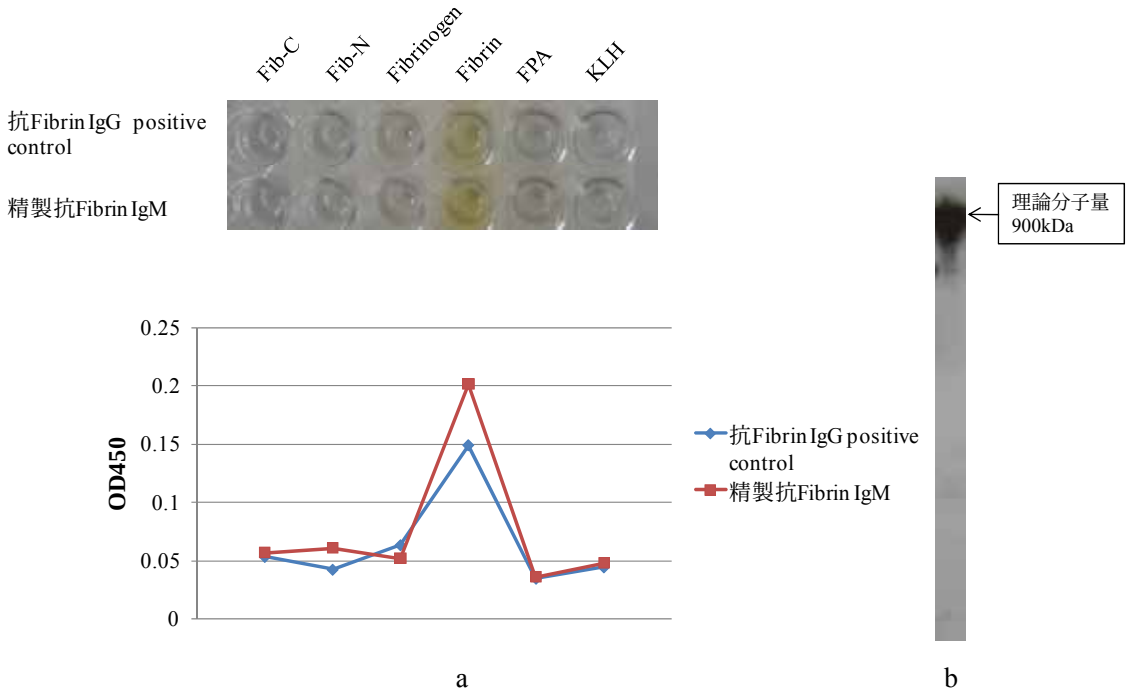


図 15. 精製抗 Fibrin IgM 特異性と純度の検討

a. Fib-C プレート、Fib-N プレート、Fibrinogen プレート、Fibrin プレート、FPA プレート、KLH プレート（図 11）を用いて ELISA 法を行い、各プレートに対する精製抗 Fibrin IgM の反応性を調べた。上段は発色後のプレートの写真、下段はプレートの発色を定量化したグラフ。

Fib-C：ヒト Fibrinogen の Thrombin 切断部位の Fibrin 側から 12 アミノ酸を合成

Fib-N：ヒト Fibrinogen の Thrombin 切断部位の Fibrin 側から 15 アミノ酸を合成

Fibrinogen：Native のヒト Fibrinogen

Fibrin：ヒト Fibrinogen を Thrombin 処理したタンパク

FPA ：ヒト FPA の全長を全合成したタンパク

KLH ：keyhole-limpet hemocyanin　Fib-C と Fib-N の担体のタンパク

青線：抗 Fibrin IgG 標準品

赤線：今回精製した抗 Fibrin IgM

b. 精製抗 Fibrin IgM に対して、ウェスタンブロッティング assay を行った。

4. 抗 Fibrin IgG の F(ab)'$_2$化

薬剤送達の担体や診断薬の候補として、いずれの抗体分子種が適切かを調べるために IgG から F(ab)'$_2$を作製した。抗 Fibrin chimera IgG を Pepsin 処理して作製された抗 Fibrin F(ab)'$_2$をゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより精製した。（図 16）精製 fraction 29～37 を濃縮し濃縮 sample を SDS-PAGE で確認した。（図 17a）その結果 F(ab)'$_2$の理論分子量バンド 100 kDa を確認した。一方 50 kDa 付近にコンタミネーションバンドが見られたため、Protein L 精製を行った。（図 17b）その結果コンタミネーションバンドを除去することに成功し、純度の高い抗 Fibrin F(ab)'$_2$を得た。4℃で 2 か月保存したのち、再度 SDS-PAGE で確認したところ 100 kDa のバンドが消失し、50 kDa に新たなバンドが見られた。このことから抗 Fibrin F(ab)'$_2$分解を受け、抗 Fibrin F(ab)'になったことが示唆された。（図 17c）

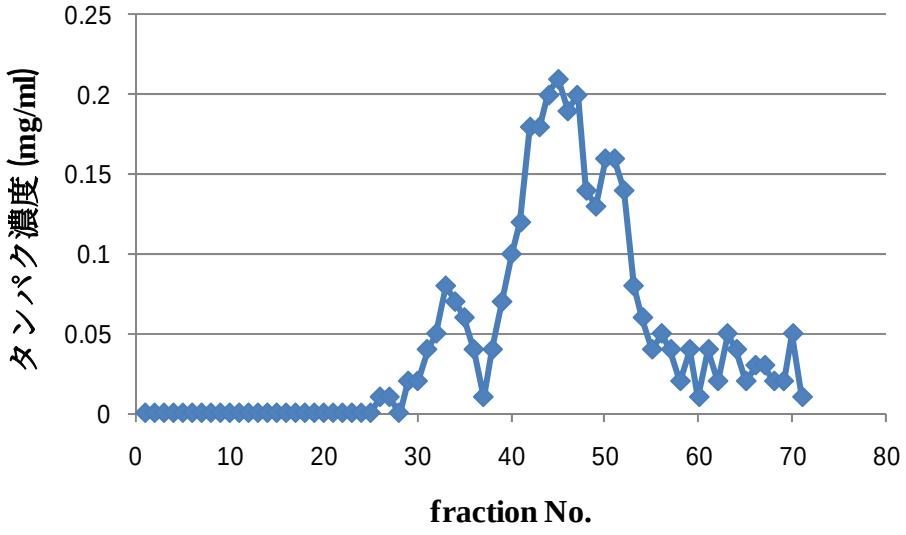
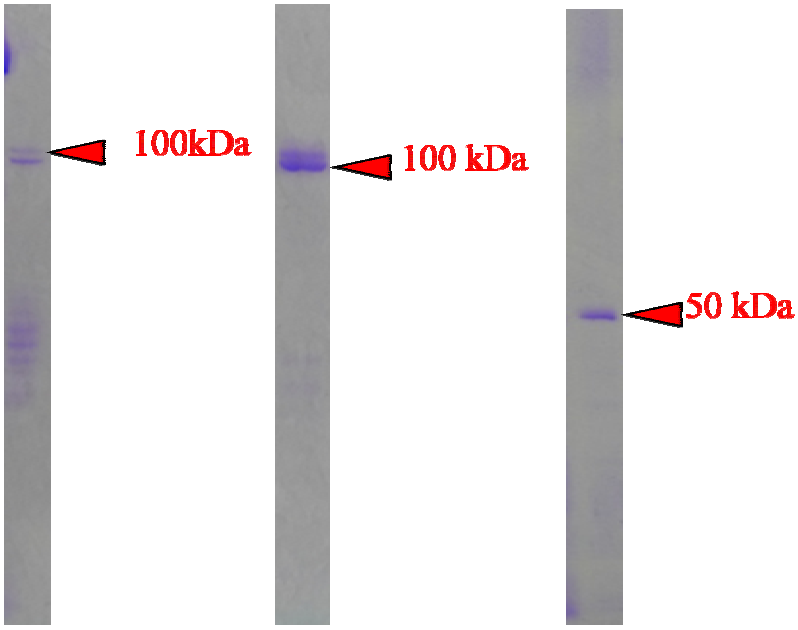


図 16. 抗 Fibrin F(ab)'$_2$精製 fraction タンパク濃度測定

抗 Fibrin chimera IgG2 mL を Pepsin で 37 ℃ 1 時間処理した。Pepsin 処理後の sample を Sephacryl S-300 で精製した。精製 fraction は 1mL/tube ずつ fraction collector を用いて回収した。



a　　b　　c

図 17 精製後の抗 Fibrin F(ab)'$_2$

a. Pepsin 処理後の sample を Sephacryl S-300 で精製し、fraction 29～37 を濃縮カラムを用いて濃縮した。濃縮された抗 Fibrin F(ab)'$_2$ sample を SDS-PAGE により分子量を確認した。

b. Sephacryl S-300 精製後の抗 Fibrin F(ab)'$_2$ sample はコンタミネーションタンパクが含まれていたため、Protein L による精製を行い、SDS-PAGE によりタンパクを確認した。

c. Protein L 精製を行った後、4℃ 2 か月間保存した sample を SDS-PAGE により分子量を確認した。

5. 作製した各クラスと分子種の反応性の比較

これまで精製した各クラスと分子種の反応性を評価するため、抗体濃度と抗体の反応性と確認済みの標準品の反応性を比較した。その結果 IgM に関しては、標準品の 90 %の活性を有しており、F(ab)’に関しては、IgG 標準品と比較して、80 %の活性を有していた。(図 18)

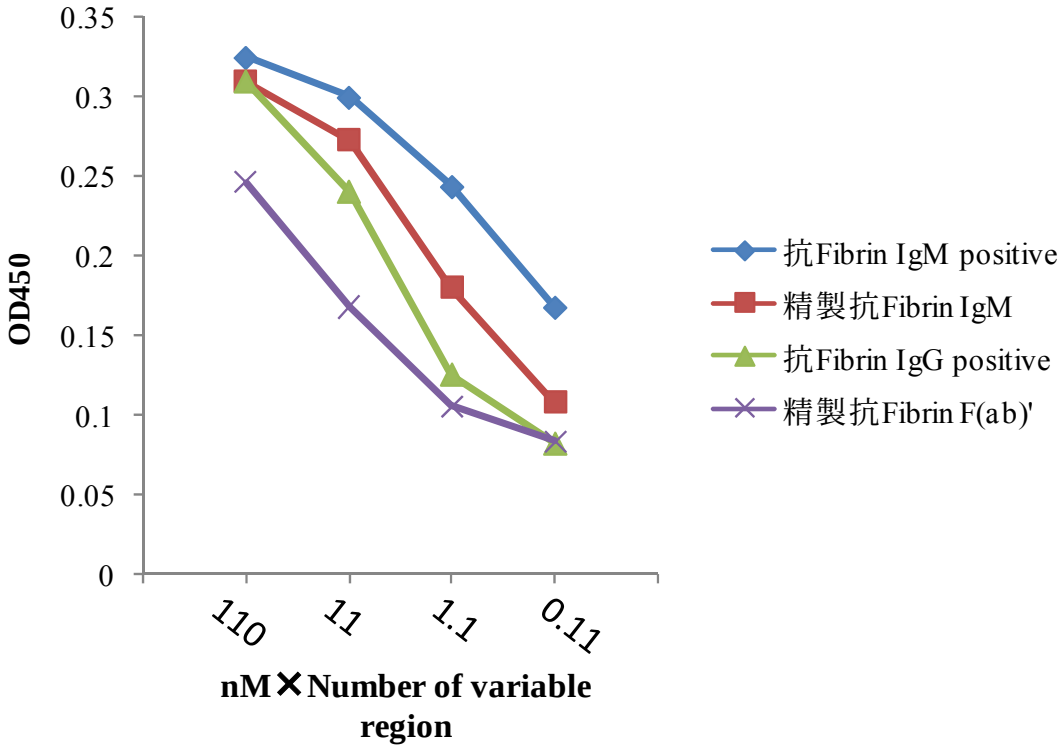


図 18. 各クラスと分子種の反応性の比較

各抗体分子種間の反応性を比較するため、各分子種の価数を揃えて、Fibrin plate を用いて ELISA 法を行った。（表 2）

青線：抗 Fibrin IgM 標準品

赤線：今回精製した抗 Fibrin IgM

緑線：抗 Fibrin IgG 標準品

紫線：今回精製した抗 Fibrin F(ab)’

6. 創傷部と腫瘍部における Fibrin 形成の比較検討

化学発癌マウスの皮膚を一部切除し、Alexa 標識抗 Fibrin IgG を投与した。コントロールとして Alexa 標識抗 collagen Ⅰ抗体を投与した。その結果、創傷部では 7 日目には傷が治癒し、Fibrin の発現が消失した。一方腫瘍部では、7 日目でも傷は治癒されず Fibrin 発現が見られた。創傷部、腫瘍部ともに collagen Ⅰは 7 日間を通して、発現し続けていた。（図 19）

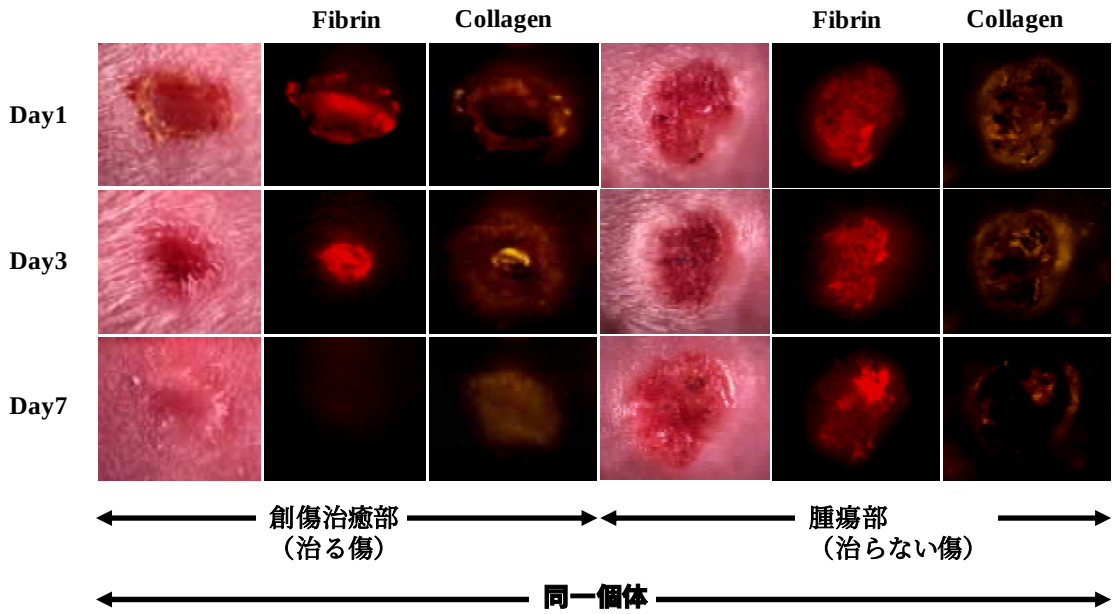


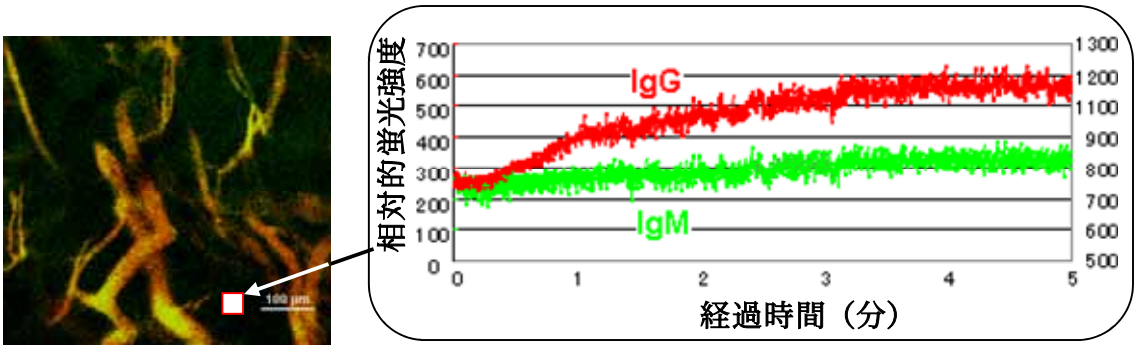
図 19. 創傷部と腫瘍部の Fibrin 発現の比較

化学発癌マウスの皮膚を傷つけ、Alexa647 標識抗 Fibrin IgG 100 μL と Alexa 555 標識抗 collagen Ⅰ抗体を 100 μL ずつ同じ個体に尾静脈注射により投与した。抗体投与後 1 日目、3 日目、7 日目に生体蛍光強度解析を行った。

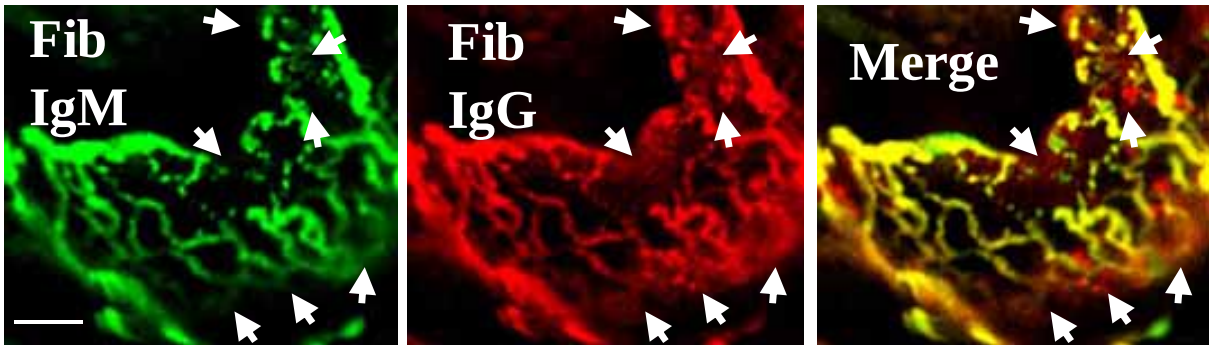
7. 抗 Fibrin IgG と IgM の腫瘍血管外への漏出の比較検討

腫瘍血管を通過して、腫瘍内部への薬剤の送達物質としてどの抗体分子種が優れているかを確認するために化学発癌マウスに Alexa 488 標識抗 Fibrin IgM および Alexa 647 標識抗 Fibrin IgG を投与し、腫瘍血管からの漏出を real time *in vivo* 共焦点レーザー顕微鏡で確認した。腫瘍血管の外側の一点に焦点を合わせ、相対的蛍光強度を定量分析したところ、Alexa647

標識抗 Fibrin IgM に比べて抗 Fibrin IgG のほうが高い蛍光強度を示した。（図 20a）また矢印で示した箇所において、抗 Fibrin IgG が抗 Fibrin IgM に対して著明に血管外に漏出していることを確認した。（図 20b）



a.



b

図 20. 抗 Fibrin IgG と抗 Fibrin IgM の腫瘍血管での漏出の比較

a. 化学発癌マウスに等価の Alexa 488 標識抗 Fibrin IgM（600 μg）と Alexa 647 標識抗 Fibrin IgG（100μg）を同時に投与した。抗体投与と同時に real time *in vivo* 共焦点レーザー顕微鏡で腫瘍血管を観察した。腫瘍血管の外側の一点に焦点を合わせ、5 分間連続して相対的蛍光強度を測定した。

b. 抗体投与後 1 時間で腫瘍血管を撮影し、Alexa488 標識抗 Fibrin IgM と Alexa 647 標識抗 Fibrin IgG の蛍光画像を比較した。

Fib IgM：抗 Fibrin IgM

Fib IgG：抗 Fibrin IgG

Merge：抗 Fibrin IgM と抗 Fibrin IgG を重ね合わせた蛍光画像

8. 抗 Fibrin IgG と抗 Fibrin IgM の腫瘍集積性と生体内保持期間の比較検討

抗体の抗原集積性と生体内での保持期間は抗体製剤及び診断薬の開発に不可欠である。そこで腫瘍内での抗体の腫瘍集積性と保持期間を比較するため、Alexa 標識抗 Fibrin IgM と抗 Fibrin IgG を化学発癌マウスに投与して、in vivo 生体観察システム OV110 を用いて、腫瘍集積性と保持期間を比較した。

その結果、コントロールとして使用した抗 Fibrinogen IgG は 1 日目は若干腫瘍への集積が見られるが、3 日目には完全に消失した。抗 Fibrin IgM,IgG は 1 日目は著明な腫瘍集積性を示したが、3 日目に抗 Fibrin IgM はほぼ消失し、抗 Fibrin IgG は 7 日目まで生体内で保持されていた。（図 21）

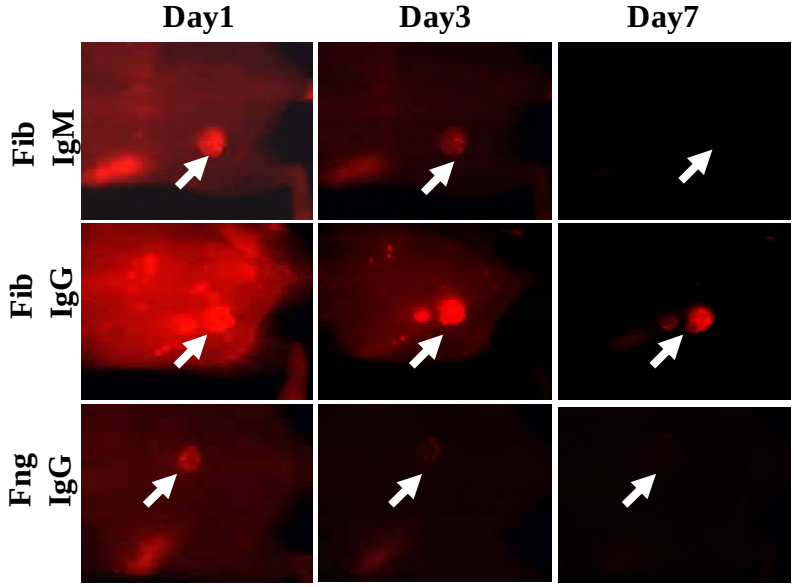


図 21. 抗 Fibrin IgG と抗 Fibrin IgM の生体内保持期間の比較検討

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

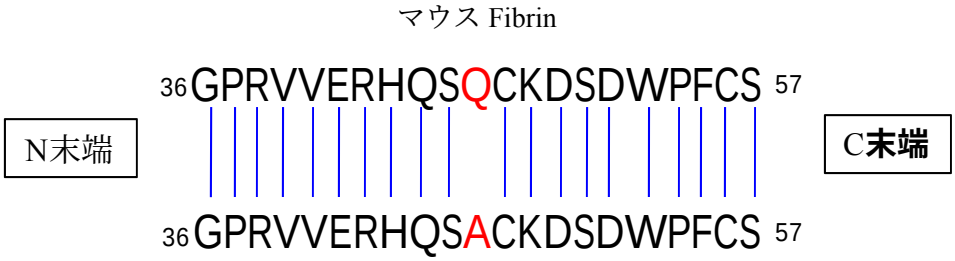
第４章
考察・今後の展望

1. 抗 Fibrin 抗体の精製と分子種の作製

これまで、IgG の抗体製剤が臨床応用の主流となってきているが、腫瘍集積性に関して、同じ抗原の他の抗体クラスや分子種と体系的に比較した報告はない。そこで様々なクラスや分子種の抗体を作製し、どのクラスや分子種の腫瘍集積性が高いか、腫瘍組織内での代謝が速いかといったことを分子量に基づいて、体系的に比較することにした。

まず、今回のターゲットとなる抗原を Fibrin と定め、in vivo で使用する抗体を得るために hybridoma を確立し、hybridoma の大量培養、抗体の大量精製に取り組んだ。抗体医薬の研究では抗体産生技術は非常に重要である。ELISA による反応性実験から今回確立した抗 Fibrin IgM、IgG はマウスとヒトの Fibrin に高い反応性を示した。（図 11）マウスとヒトに交差性が表れたのは、トロンビンで切断されたあとの Fibrin のアミノ酸配列がマウスとヒトで非常によく似ており（図 22）、両者を認識する hybridoma が確立したためと考えられる。このように確立された hybridoma 株 mouse IgM clone 102-10（図 12）とヒト化 IgG clone 102-10（data not shown）を大量培養し、IgM と IgG を大量精製した。（図 13、14）その結果今回得られた抗 Fibrin IgM と抗 Fibrin IgG はヒト Fibrin に特異的に反応した。Fibrinogen には反応せずに Fibrin のみに反応したことから、我々が確立した抗 Fibrin IgM と抗 Fibrin IgG はアミノ酸の一次配列ではなく、Thrombin 切断部位の Fibrin 側の三次構造を認識していると考えられた。（図 23）次に精製抗 Fibrin IgG を用いて、抗 Fibrin $F(ab)'_2$ の作製を行った。(図 15, 16a)　Protein L による軽鎖精製直後は $F(ab)'_2$ の理論分子量である 100 kDa にタンパクが見られたが（図 16b）、4℃で 2 か月間保存したところ 50 kDa に分解された。分子量が 1/2 に減少していることから考えて、$F(ab)'_2$ が F(ab)’に分解されたと考えられる。（図 7）このような分解を防ぐために酸化剤、例えば GSSG（酸化型グルタチオン）を入れるなど保存安定性を検討していく必要がある。今回精製した抗 Fibrin IgM と F(ab)’の反応性を比較したところ抗 Fibrin IgM は標準品と同等の反応性を有していた。F(ab)’は IgG 標準品の 80%程度の反応性を有しており、in vivo 実験に十分使用できると考えられた。$F(ab)'_2$ の反応性が IgG

の標準品に対して 80%程度に反応性が減少した理由としては、Pepsin 酵素処理時の酵素反応溶液の影響、カラムグロマトグラフィーによる物理的損傷、プロテイン L 精製過程において酸溶出やアルカリ溶液による中和の影響が挙げられる。作製・精製段階で抗体に対して負荷を与えたため、抗体の抗原認識部位に損傷が生じ、反応性が減少したと考えられる。



GPRVVERHQSACKDSDWPFCS

図 22.マウスとヒトの Fibrin のアミノ酸配列

Mus musculus fibrinogen alpha chain (Fga), transcript variant 1, mRNA

NM_001111048.1 より引用

Homo sapiens fibrinogen alpha chain (FGA), transcript variant alpha, mRNA

NM_021871 より引用

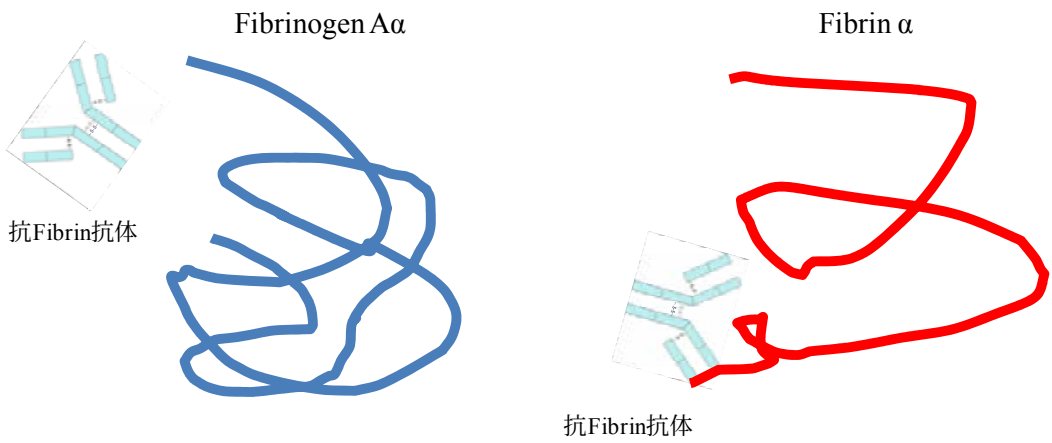


図 23.抗 Fibrin 抗体の三次構造認識概略図

抗 Fibrin 抗体は Fibrinogen アミノ酸配列に含まれる Fibrin 一次配列を認識せず、Fibrin α の三次構造のみを認識して結合する。

2. 抗 Fibrin IgM と IgG の *in vivo* imaging

Fibrin ががん特異的ターゲットになりうることを検討する目的と抗体の分子量の違いによる腫瘍集積性や代謝速度を比較する目的で化学発癌マウスを作製した。化学発癌マウスは腫瘍血管や間質の形成、腫瘍の成長の様式がヒトの腫瘍と類似しており、今回我々が想定しているヒトがんにおけるフィブリン形成腫瘍モデルに近いと考えた。化学発癌マウスを用いてまず、がん部と創傷部の Fibrin 形成を比較した。創傷部では 7 日目には傷が治癒して、Fibrin が collagen に置き換わっていく過程が見られた。一方、腫瘍部では、傷が治らず Fibrin が恒常的に発現し続けていた。（図 19）これにより、がん以外では Fibrin 形成は一過性であり、がんでは恒常的に Fibrin が発現し続けているという仮定が裏付けられた。これにより、Fibrin はがん特異的にターゲティングできる可能性が示唆された。次に腫瘍血管から IgG と IgM のどちらがより漏れ出しやすいかを検討した結果、IgG のほうがより腫瘍血管から漏出しやすいという結果が得られた。（図 20）EPR 効果[25]に基づいて考えると、IgM も IgG も血管外に漏れだすように考えられるが、IgM のような巨大分子では腫瘍血管のような微細な血管は通過しにくく、腫瘍血管の外に漏れにくいと考えられた。図 20 の結果に関しては、分子の粒子径も考慮する必要があると考えている。最後に腫瘍集積性と腫瘍内保持期間の検討であるが（図 21）、抗体投与後一日目に非特異抗体が腫瘍部に集積しているのは、EPR 効果によるものと考えられる。[25]　一方、等価の抗 Fibrin IgM が IgG と比較して、抗体投与後一日目の腫瘍集積性が低いことは IgM が細網内皮系に捕捉されているからであると考えられる。[31]その後 3 日目以降 IgM が腫瘍内から消失してしまうことは、IgM のほうが生体内で早く代謝されてしまう可能性が示唆された。

今回の実験では、*in vivo* 実験に必要量の抗 Fibrin F(ab)'$_2$ と抗 Fibrin F(ab)'の精製が間に合わなかったために IgM と IgG のみ比較したが、今後必要量を精製して、異なる分子量の 4 種類の抗体分子を比較する予定である。これまでの結果では、IgG が腫瘍集積性が高く、腫瘍内保持期間が最も高くなり、抗体製剤への臨床応用に適した剤形になると考えられる。

一方、F(ab)’$_2$ あるいは F(ab)’が腫瘍集積性は高いが、代謝されやすいため腫瘍内保持期間が短く、Fc 部分の抗原性も抑えられているため、むしろ診断薬に適した剤形になるのではないかと予想している。

第 5 章　総括

1. 本研究の総括

Fibrin が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を確認できたことで、Fibrin は腫瘍特異的ターゲットになりうることが示唆された。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 と抗 Fibrin IgG を投与して比較した際に、IgG のほうが腫瘍血管から漏出しやすく、腫瘍集積性が高く、腫瘍内での保持期間が長く、抗体製剤により適した結果を示した。以上のことから、がん病態における Fibrin の特異性を明らかにしつつ、Fibrin をターゲットにした抗体 DDS 製剤は臨床応用が期待できると考えられた。

2. 今後の展望

今回の一連の流れで当研究室において、抗体を大量に作り出す技術の基礎を築けたと考えている。今後は *in vitro* や *in vivo* の実験に使用できる純度、量、反応性の抗体精製を念頭に、抗体回収に取り組んでいく。更に抗体切断、標識など、抗体修飾技術の確立も必要である。今回の *in vivo* の評価において、$F(ab)'_2$ と F(ab)'の抗体量が足りず、IgG と IgM の比較のみ行った。そのため、IgG より小さい分子量の抗体分子種の比較検討が出来ず、生体内でどのような挙動を示すか不明である。早急に *in vivo* の実験に使用できる抗体量を精製して *in vivo* で比較検討していく予定である。*In vivo* 実験において抗体の分子量の違いによる腫瘍からの抗体の漏出、腫瘍集積性、腫瘍内保持期間が体系的に整理されれば、抗体 DDS 製剤や診断薬の臨床応用の際に有用なデータになると考えている。本研究から間質をターゲットとする抗体 DDS の中でもフィブリンは有効なターゲットであることが確認できた。今後、得られた知見を基にがんにおける Fibrin の生物学的意義を考察すると共に、この研究を実用化まで進められるように努力したい。

【参考文献】

1. Varki, A., *Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms.* Blood, 2007. **110**(6): p. 1723-9.
2. Stein, P.D., et al., *Incidence of venous thromboembolism in patients hospitalized with cancer.* Am J Med, 2006. **119**(1): p. 60-8.
3. Saito H, K.T., *Factor XII, prekallikrein, and high-molecular-weight kininogen.* Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis. Marcel Dekker Inc, 1995: p. 269-85.
4. 一瀬白帝, *図説　血栓・止血・血管学　血栓症制圧のために.* 中外医学社, 2005.
5. 松田道生, *止血・血栓・線溶.* 中外医学社, 1994
6. Fujikawa K, S.H., *The Metabolic Basis of Inherited Disease.* Contact activation, 1989: p. 2189.
7. Leeb-Lundberg, L.M., et al., *International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences.* Pharmacol Rev, 2005. **57**(1): p. 27-77.
8. Matsumura, Y., et al., *Involvement of the kinin-generating cascade in enhanced vascular permeability in tumor tissue.* Jpn J Cancer Res, 1988. **79**(12): p. 1327-34.
9. Matsumura, Y., et al., *Kinin-generating cascade in advanced cancer patients and in vitro study.* Jpn J Cancer Res, 1991. **82**(6): p. 732-41.
10. Saito H, *Normal hemostatic mechanisms.* Disorders of Hemostasis, 3rd. Philadelphia :WB Saunders, 1996: p. 23-52.
11. Mosesson, M.W., *Fibrinogen and fibrin structure and functions.* J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1894-904.
12. Doolittle RF, B.III.B., Strong D, et al, *The covalent structure of human fibrinogen.* The Chemistry of Physiology of the Human Plasma Proteins 1989.
13. Goldenberg, D.M., *Monoclonal antibodies in cancer detection and therapy.* Am J Med, 1993. **94**(3): p. 297-312.
14. Henschen, A., *On the structure of functional sites in fibrinogen.* Thromb Res, 1983. **Suppl 5**: p. 27-39.
15. Hoeprich, P.D., Jr. and R.F. Doolittle, *Dimeric half-molecules of human fibrinogen are joined through disulfide bonds in an antiparallel orientation.* Biochemistry, 1983. **22**(9): p. 2049-55.
16. Huang, S., Z. Cao, and E.W. Davie, *The role of amino-terminal disulfide bonds in the structure and assembly of human fibrinogen.* Biochem Biophys Res Commun, 1993. **190**(2): p. 488-95.
17. Everse, S.J., et al., *Crystal structure of fragment double-D from human fibrin with two different bound ligands.* Biochemistry, 1998. **37**(24): p. 8637-42.
18. Medved, L.V., et al., *Localization of a fibrin polymerization site complementary to Gly-His-Arg sequence.* FEBS Lett, 1993. **320**(3): p. 239-42.
19. Pratt, K.P., et al., *The primary fibrin polymerization pocket: three-dimensional structure of a*

30-kDa C-terminal gamma chain fragment complexed with the peptide Gly-Pro-Arg-Pro. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(14): p. 7176-81.

20. Shainoff, J.R. and B.N. Dardik, *Fibrinopeptide B in fibrin assembly and metabolism: physiologic significance in delayed release of the peptide.* Ann N Y Acad Sci, 1983. **408**: p. 254-68.
21. Shimizu, A., G.M. Nagel, and R.F. Doolittle, *Photoaffinity labeling of the primary fibrin polymerization site: isolation and characterization of a labeled cyanogen bromide fragment corresponding to gamma-chain residues 337-379.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(7): p. 2888-92.
22. Nagy, J.A., et al., *Pathogenesis of tumor stroma generation: a critical role for leaky blood vessels and fibrin deposition.* Biochim Biophys Acta, 1989. **948**(3): p. 305-26.
23. Fernandez, P.M., S.R. Patierno, and F.R. Rickles, *Tissue factor and fibrin in tumor angiogenesis.* Semin Thromb Hemost, 2004. **30**(1): p. 31-44.
24. Palumbo, J.S., et al., *Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells.* Blood, 2000. **96**(10): p. 3302-9.
25. Matsumura, Y. and H. Maeda, *A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs.* Cancer Res, 1986. **46**(12 Pt 1): p. 6387-92.
26. Nelson, A.L. and J.M. Reichert, *Development trends for therapeutic antibody fragments.* Nat Biotechnol, 2009. **27**(4): p. 331-7.
27. Alberts, B., *Molecular Biology of The Cell fifth edition.* 2010.
28. Yokota, T., et al., *Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms.* Cancer Res, 1992. **52**(12): p. 3402-8.
29. Stura, E.A., Fieser, G.G., Wlison, I.A.,, *Crystallization of Anti bodies and Antibody-Antigen Complexes.* Immunomethods, 1993. **3**: p. 164-179.
30. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.* Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-7.
31. D.L.Brown, *In vivo generation and clearance of soluble immune complexes containing IgM antibodies in normal and decomplemented rabbits.* clin.exp.Immunol, 1981. **43**: p. 231-239.

【謝辞】

研究室として所属した国立がん研究センター東病院臨床開発センターがん治療開発部部長、松村保広先生には大変感謝しております。興味深いテーマを与えてくださり、大きなやりがいを感じながら研究活動に携わることができました。また、がん治療開発部の安永正浩先生、黒田順一郎先生、古賀宣勝先生、高橋遍先生、大橋建也さん、小池浩代さん、瀧ヶ平美里さん、本田玲子さんには研究を始め多くのことをご指導して頂き、また椎名薫さん、阿部恵子さん、進藤博子さん、嶋田真美子さんには生活面においても常に援助をして頂きました。心より感謝しております。

また、同研究科の厚海奈穂さん、星野歩子さん、稲塚歩佳さん、小野塚博子さん、齋藤洋平さん、藤澤優さん、天野芳隆君、伊藤傑君、鈴木牧人君、松島洸達君、佐藤隆太君にも心より感謝しております。皆さんがいたからこそ研究室での生活が有意義で楽しいものになりました。

そして、同期の千葉政子さん、須藤夏希さん、今野まつみさん、中村彰吾君とは学生生活を共有し、常に私を支えてくれました。共に学生生活を送れたことを大変感謝しております。

最後になりましたが、これまで常に私を支えてくれた家族にも心から感謝の意を表して謝辞と致します。

2011 年 1 月 31 日

久田洋平