

博士論文

抗GPR87モノクローナル抗体を用いた
扁平上皮癌の診断・治療法の開発

丹羽 俊輔

目次

要旨.....	1
第 1 章 序文.....	2
1. 肺扁平上皮癌に対する抗体医薬の必要性.....	2
2. GPR87 について.....	3
3. 本研究の目的.....	4
第 2 章 材料と方法.....	5
1. 材料.....	5
2. 細胞.....	5
3. 組換えプラスミドベクターの作製.....	5
4. hGPR87 stable CHO 細胞株の樹立.....	6
5. フローサイトメトリー解析.....	6
6. マウス.....	7
7. 免疫.....	8
8. 抗体作製.....	9
9. 抗体のアイソタイプ.....	10
10. GST 融合タンパク質の作製.....	10
11. ウェスタンブロット.....	10
12. ポンソー染色及びドットブロット.....	11
13. ADCC 活性.....	11
14. CDR をコードする DNA 塩基配列の検索.....	12
15. siRNA のトランスフェクション.....	13
16. リアルタイム PCR.....	13
17. 抗体による細胞染色.....	13
18. 免疫組織染色.....	14

19. DOTA 化による抗体親和性の検討.....	15
20. DOTA 化抗体の RI 標識化.....	15
21. PET イメージング.....	16
22. PET 撮像後におけるマウス体内の放射線分布.....	16
第 3 章 結果.....	17
1. hGPR87 stable CHO 細胞株の樹立.....	17
2. 抗 hGPR87 モノクローナル抗体の作製.....	17
3. 抗 hGPR87 モノクローナル抗体の評価.....	18
4. 癌細胞における内在性 hGPR87 検出.....	19
5. 癌組織の免疫組織染色.....	20
6. PET イメージング.....	20
第 4 章 考察.....	23
1. 抗体作製について.....	23
2. PET イメージングについて.....	25
3. 結語.....	29
図表.....	30
引用文献.....	60
特許出願.....	68
謝辞.....	69

図一覧

- 図 1 マイクロアレイ解析結果(hGPR87 発現パターン)
- 図 2 hGPR87 stable CHO 細胞株の樹立に用いた組換えベクター
- 図 3 DNA 免疫に用いた組換えベクター
- 図 4 GPR87 ノックアウトマウス
- 図 5 hGPR87 stable CHO 細胞における hGPR87 の局在
- 図 6 hGPR87 stable CHO 細胞における hGPR87 の局在(細胞染色)
- 図 7 フローサイトメトリーによる抗 hGPR87 作製抗体の評価
- 図 8 作製抗体 C0804 を用いた細胞染色
- 図 9 GST 融合タンパク質を用いたエピトープ解析
- 図 10 hGPR87、mGPR87、rGPR87 のアミノ酸配列
- 図 11 合成ペプチドを用いたエピトープ解析
- 図 12 マウスとの交差性
- 図 13 作製抗体の ADCC 活性
- 図 14 H 鎖 CDR 付近の DNA 配列
- 図 15 L 鎖 CDR 付近の DNA 配列
- 図 16 H 鎖 CDR 付近のアミノ酸配列
- 図 17 L 鎖 CDR 付近のアミノ酸配列
- 図 18 Me180 細胞における siRNA による hGPR87 発現レベルの低下
- 図 19 hGPR87 ノックダウン Me180 細胞における作製抗体によるフローサイトメトリー
- 図 20 作製抗体 C0804 による免疫組織染色
- 図 21 作製抗体 C0804 の DOTA 化に伴う親和性低下
- 図 22 ⁶⁴Cu 標識化 C0804 による wild/stable CHO 移植マウスの PET イメージング
- 図 23 作製抗体 C0804 による DLD1 細胞及び Me180 細胞のフローサイトメトリー
- 図 24 ⁶⁴Cu 標識化 C0804 による DLD1/Me180 担癌モデルマウスの PET イメージング

グ

図 25 DLD1/Me180 担癌モデルマウスにおける ^{64}Cu 標識化 C0804 の体内分布

表一覧

表 1 siRNA に用いたプライマーの塩基配列

表 2 抗体のアイソタイプ

表 3 作製抗体 C0804 の評価

表 4 作製抗体 C0804 による各癌の免疫組織染色結果（まとめ）

表 5 作製抗体 C0804 による正常組織又は癌組織非癌部の免疫組織染色結果（まとめ）

略語一覽

ADCC; Antibody-dependent cellular cytotoxicity

BSA; Bovine serum albumin

CDC; Complement-dependent cytotoxicity

CDR; Complementary determining region

CHO; Chinese hamster ovary

CT; Computed tomography

DOTA; 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-tetraacetic acid

EDTA; Etylenediamine tetra acetic acid

FACS; Fluorescence-activated cell sorting

FBS; Fetal bovine serum

Fv; Variable fragment

GEO mean; Geometric mean

GST; Glutathione S-transferase

GPR87; G protein-coupled receptor 87

HEPES; 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid

hGPR87; Human G protein-coupled receptor 87

I.D.; Injected dose

IPTG; Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside

iTLC-SG; Instant thin layer chromatography, silica gel

KLH; Keyhole limpet hemocyanin

mGPR87; Mouse G protein-coupled receptor 87

OSEM 3D/MAP; 3D-ordered subset-expectation maximization/ maximum a priori

PAGE; Polyacrylamide gel electrophoresis

PBS; Phosphate buffer saline

PET; Positron emission tomography

P/S; Penicillin/ streptomycin

p-SCN-Bz-DOTA; S-2-(4-isothiocyanatobenzyl)-DOTA

rGPR87; Rat G protein-coupled receptor 87

RI; Radioisotope

RNAi; RNA interference

RIT; Radioimmunotherapy

scFv; Single chain Fv

siRNA; Small interfering RNA

SDS; Sodium dodecyl sulfate

siRNA; Short interfering RNA

SPECT; Single photon emission computed tomography

TM; Transmembrane

Tris; 2-Amino-2(hydroxymethyl)propane-1,3-diol

要旨

系統的マイクロアレイ解析により、リガンド未知の G タンパク共役受容体である GPR87 が、肺扁平上皮癌などで発現亢進しているとの知見が得られた。そこで、GPR87 ノックアウトマウスにジーンガン免疫を行った結果、6 種類の抗 GPR87 モノクローナル抗体の作製に成功した。

これらの抗体はすべて IgG1 の抗 GPR87 モノクローナル抗体で、このうち、C0804 を癌組織の免疫組織染色を行ったところ、扁平上皮癌及び移行上皮癌で癌細胞に陽性所見が認められた。

C0804 を RI 標識化して Me180 担癌モデルマウスに投与し、PET イメージングを行った結果、RI 標識化抗体は癌部へ特異的に集積することが証明された。

第 1 章 序文

1. 肺扁平上皮癌に対する抗体医薬の必要性

肺癌による死亡者数は世界中で全癌死の 17%を占め最も多く、5 年生存率は約 15%で、年間約 130 万人がこの疾患で死亡している[1-2]。肺癌は、組織学的に、非小細胞癌と小細胞癌に大別され、肺癌の約 80%が非小細胞癌である[3]。非小細胞癌には腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌などが含まれ、そのうち、扁平上皮癌の出現頻度は肺癌全体の約 25%で、腺癌(約 40%)に次いで多い[2]。

非小細胞癌の治療は外科切除が主な手段であるが、転移・浸潤を伴い手術困難な場合には化学療法、放射線治療も行われる[2]。しかし、肺癌患者の 75%は転移・浸潤を伴った進行期であり[4]、進行期肺癌では、化学療法などにより生存期間の延長は認められるものの効果が限定的で、予後も不良である。そのため、進行期肺癌でより有効な治療手段の開発が求められている。

近年、系統的マイクロアレイ解析で標的候補を特定できるようになったことに伴い、各種の癌細胞に特異的な分子標的薬の開発が行われている。例えば、Gefitinib(EGF 受容体キナーゼ阻害剤)は、非小細胞の進行期肺癌に対する分子標的薬として臨床適応されている。しかし、Gefitinib は、既治療進行期非小細胞肺癌に対し、10~19%の奏効率しか示さず[5]、また、腺癌で効果が高く扁平上皮癌では有効性が低いことが報告された[6]。

また、分子標的薬の一つとして、抗体医薬の開発も進められている[7-8]。米国では、2007 年時点で 5 種類の抗体診断薬[9-13]及び 18 種類の治療用抗体医薬[14]が認可され、固形癌に対する抗体医薬として、Trastuzumab[15-16]、Cetuximab[17]、Bevacizumab[18-19]が上市されている。このうち、Bevacizumab は抗 VEGF ヒト型化モノクローナル抗体(IgG1)で、Bevacizumab と化学療法剤

の併用が化学療法剤単独の場合と比較して、非扁平上皮非小細胞の進行期肺癌に対し、生存期間を延長させたことが報告されている[20]。しかし、肺の扁平上皮癌に対して臨床適応された抗体医薬品はまだない。

GPR87は、構造からGPCR(Gタンパク質共役型受容体)の一つと推定される7回膜貫通型タンパク質であり、肺扁平上皮癌などで高発現していることが知られている。後述の通り、当研究室における系統的マイクロアレイ解析においても、肺扁平上皮癌の培養細胞株などでGPR87の発現が高かった。しかし、今日まで内在性のGPR87を認識できるモノクローナル抗体は得られていない。

そこで、本研究では、肺扁平上皮癌の治療用抗体のリードとなる特異性・有用性の高い抗GPR87マウスモノクローナル抗体の作製をめざすとともに、肺扁平上皮癌の治療法の開発に向け、作製した抗体C0804を用いて体外イメージングへの有用性の検討を行った。

2. GPR87 について

GPR87(G protein-coupled receptor 87)は、GPCRファミリー[21]に属するタンパク質であり、一部のP2Y受容体タンパク質の遺伝子と相同性があるが、機能などはほとんど分かっていない。

GPR87に関して、以下の論文が発表されている。2001年、Wittenbergerらにより、ESTデータマイニングの結果GPR87遺伝子を同定したことが報告された[22]。2007年、Tabataらにより、GPR87のリガンドがリゾホスファチジン酸(LPA)であることが報告された[23]が、この知見は追試が成功しておらず、まだ一般的に承認されるには至っていない[24]。2008年、Guggerらにより、GPR87が肺の扁平上皮癌で高発現していることが報告された[25]。また、Glattらにより、GPR87が、肺扁平上皮癌、肺腺癌、頭頸部癌、咽頭扁平上皮癌、喉頭扁平上皮

癌、皮膚扁平上皮癌、子宮頸部扁平上皮癌などで発現していることが報告された[26]。2009年、Zhangらにより、p53がGPR87遺伝子内のp53 responsive elementを介して直接GPR87を調節することが報告された[27-28]。

その他、当研究室における系統的マイクロアレイ解析によって、GPR87は、ヒト正常組織では皮膚及び胎盤、ヒト癌細胞株では、食道癌由来細胞株、胃癌由来細胞株、膵臓癌由来細胞株、肺癌由来細胞株、卵巣癌由来細胞株、子宮頸癌由来細胞株で、それぞれ高発現しているとの知見が得られた(図1)。

3. 本研究の目的

本研究では、(1)肺扁平上皮癌の治療用抗体のリードとなる特異性・有用性の高い抗hGPR87マウスモノクローナル抗体を作製するとともに、(2)作製した抗体の体外イメージングへの有用性を検討することを目的とした。

第 2 章 材料と方法

1. 材料

hGPR87 の cDNA クローンを東洋紡績より購入した。mGPR87 のゲノムはイントロンを有しないため、wild 129SvEvBrd 系統マウス(後述)の尻尾を proteinase K(WAKO)で溶解してゲノム DNA を抽出し、その DNA を鋳型として PCR で増幅し、mGPR87 の DNA を合成した。

hGPR87 の N 末端から 9~23 番目の 15 アミノ酸(KLPNN ELHGQ ESHNS)、及び、N 末端から 327~341 番目の 15 アミノ酸(KKSNT RTRSE SIRSL)の合成ペプチド(図 10 参照)と KLH とのコンジュゲート体を、ペプチド研究所より購入した。

2. 細胞

CHO 培養細胞株は Invitrogen より、DLD1(大腸腺癌培養細胞株)、Me180(子宮頸癌培養細胞株)を含む全ての癌培養細胞株は ATCC(American Type Culture Collection)より、マウスミエローマ細胞 NS-1 は大日本製薬より購入した。

Wild CHO 細胞及び hGPR87 stable CHO 細胞(後述)は 10%FBS, 1%P/S 添加 F12 培地(GIBCO)で、DLD1 は 10%FBS, 1%P/S 添加 RPMI1640 培地(GIBCO)で、Me180 は 10%FBS, 1%P/S 添加 DMEM 培地(GIBCO)で、ハイブリドーマ(後述)は 16%low-IgG FBS(GIBCO), 1%P/S 添加 RPMI1640 培地(GIBCO)で、37°C, 5%CO₂ インキュベーターで培養した。

3. 組換えプラスミドベクターの作製

3-1. hGPR87 stable CHO 細胞株の樹立に用いた組換えベクター

hGPR87 の cDNA を鋳型として、hGPR87 の cDNA の N 末端に FLAG タグを、両端に BglIII の制限酵素サイトをつけた DNA を PCR 法により作製し、制限酵素処理後、pIRES-EGFP ベクター(Clontech)のマルチクローニングサイトにその DNA を組み込み、組換えベクターFLAG-hGPR87/pIRES-EGFP を作製した(図 2 参照)。

3-2. DNA 免疫に用いた組換えベクター

hGPR87 の cDNA を鋳型として、hGPR87 の N 末端に HA タグを、C 末端に Myc タグ及び His タグを、両端に KpnI の制限酵素サイトをつけた DNA を PCR 法により作製し、制限酵素処理した。

CAG プロモーターを有するプラスミドにネオマイシン耐性遺伝子を挿入したベクターである pCXN2.1(-)のマルチクローニングサイトにその DNA を組み込み、組換えベクターHA-hGPR87-myc-His/pCXN2.1(-)を作製した(図 3 参照)。

4. hGPR87 stable CHO 細胞株の樹立

Lipofect Amine 2000(Invitrogen)を用いて、wild CHO 細胞に組換えベクター FLAG-hGPR87/pIRES-EGFP をトランスフェクションし、G418(Invitrogen)を final 1mg/mL 添加して選抜し、限界希釈法でクローニングし、hGPR87 stable CHO 細胞株を樹立した。

5. フローサイトメトリー解析

細胞プレートに PBS(-), 2mM EDTA を添加し、4°C, 5 分間処理して細胞を剥がし、FACS buffer(PBS(-), 2mM EDTA, 2% BSA)で懸濁し、 5×10^5 cells/mL に調製した。一次抗体を加え、4°C, 1 時間静置し、FACS buffer で 3 回洗浄後、二次

抗体を加え、4°C, 30 分間静置し、FACS buffer で 3 回洗浄した。二次抗体には、AlexaFluor647-R-phycoerythrin(Invitrogen)を用いた。抗体の評価は、FACS Calibur(Becton Dickinson)を用いて、付属の解析ソフトにより、各蛍光強度における細胞数を表すスペクトルと、Geo Mean(Geometric mean)を解析することで行った。

6. マウス

6-1. GPR87 ノックアウトマウス

GPR87 ノックアウトマウス及びその wild マウスを Lexicon 社より購入した。両マウスは 129SvEvBrd 系統のマウスで、ノックアウトマウスは、マウスゲノム上の GPR87 をコードする領域を LacZ 遺伝子で置換することにより、GPR87 をノックアウトしたマウスである(図 4 参照)。

6-2. hGPR87 stable CHO 細胞移植マウス

Wild CHO 細胞及び hGPR87 stable CHO 細胞をトリプシン処理し、PBS(-)で 3 回洗浄後、FBS 及び P/S を含有しない F12 培地で懸濁し、 5×10^7 cells/mL の細胞懸濁液をそれぞれ調製した。

ジエチルエーテル麻酔下で、免疫不全マウス(Balb/cAJc-nu/nu、メス、5~6 週齢、日本クレア)の左下腹部に wild CHO 細胞を、右下腹部に hGPR87 stable CHO 細胞を、それぞれ、細胞懸濁液 200 μ L(1×10^7 cells)皮下移植し、hGPR87 stable CHO 細胞移植マウスを作製した。

移植後、週 2 回、体重及び腫瘍径(長径、短径)を計測した。細胞の移植から 2~3 週間後、両腫瘍体積が 240~500 mm^3 に達したマウスを実験に用いた。腫瘍体積(近似値)を、(長径)²×短径/2 の式で算出した。

6-3. DLD1/Me180 担癌モデルマウス

DLD1 細胞及び Me180 細胞をトリプシン処理し、PBS(-)で 3 回洗浄後、FBS 及び P/S を含有しない PRMI1640 培地又は FBS 及び P/S を含有しない DMEM 培地で懸濁し、 5×10^7 cells/mL の細胞懸濁液をそれぞれ調製した。

ジエチルエーテル麻酔下で、免疫不全マウス(Balb/cAJc-nu/nu、メス、5~6 週齢、日本クレア)の左肩部に DLD1 細胞を、右肩部に Me180 細胞を、それぞれ、細胞懸濁液 200 μ L(1×10^7 cells)皮下移植し、DLD1/Me180 担癌モデルマウスを作製した。

移植後、週 2 回、体重及び腫瘍径(長径、短径)を計測した。細胞の移植から 3~4 週間後、両腫瘍体積が 500mm³ に達したマウスを実験に用いた。腫瘍体積(近似値)を、(長径)²×短径/2 の式で算出した。

7. 免疫

ジーンガン(Helios Gene Gun、BioRad)を用いて、GPR87 ノックアウトマウスに組換えベクターHA-hGPR87-myc-His/pCXN2.1(-)を打ち込み、DNA 免疫を行った[29-30]。付属プロトコルに従い、組換えベクターの DNA 量が 1 μ g/shot になるようにカートリッジを作製し、各免疫 2 shot ずつ、計 7~15 回、ほぼ 4 日ごとに免疫した。

DNA 免疫後、免疫マウスの血清を採取し、抗血清価の上昇を確認した。抗血清価の測定は、フローサイトメトリーにより行い、細胞に hGPR87 stable CHO 細胞を、一次抗体に最終濃度で 50 倍希釈した血清を用いた。

抗血清価の上昇が見られたマウスに対し、hGPR87 stable CHO 細胞で、ブースト免疫を行った。 1×10^7 cells/mL に細胞を調製し、200 μ L をマウスに尾静脈投

与した（1匹当たりの投与細胞数 2×10^6 cells）。

8. 抗体作製

ブースト免疫から3日後、免疫マウスから脾臓を摘出し、マウス脾臓細胞とマウスミエローマ細胞を10:1の割合で混合した。50%ポリエチレングリコール溶液（PEG1500、Roche）を、脾臓細胞 1.5×10^8 cells に対し500 μ Lの割合で攪拌しながらゆっくり添加し、RPMI1640培地を脾臓細胞 1.5×10^8 cells に対し4.5mLの割合で攪拌しながらゆっくり添加し、遠心・上清除去の後、10%FBS添加RPMI1640培地で懸濁し、96ウェルプレートに、 0.5×10^6 cells/well になるように、細胞を播種した。翌日、HAT選択培地(100 μ M hypoxanthine, 400nM aminopterin, 16 μ M thymidine, 10%FBS添加RPMI1640)に培地交換し、7~10日間培養した。

HAT選択培地で抗体産生不死化ハイブリドーマを培養した後、各ウェルの培養上清をそれぞれ採取し、抗hGPR87抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングした。スクリーニングはフローサイトメトリーを用いて行い、細胞にhGPR87 stable CHO細胞を、一次抗体にfinal 2倍希釈したハイブリドーマ培養上清を用いた。

スクリーニングでポジティブだったウェルについて、そのウェル内のハイブリドーマを限界希釈法によりモノクローニングした。

HPLC(AKTA explore 100, Amersham)で、カラムにHi Trap Protein G HP(GE)を、結合bufferに20mM Na phosphate, 10mM NaCl, 0.1mM EDTA(pH7.2)を、溶出bufferに100mM Glycine-HCl(pH2.7)を用いて、ハイブリドーマの培養上清から抗体を精製した。

9. 抗体のアイソタイプ

ハイブリドーマ培養上清を PBS(-), 1%(v/w) BSA で 100 倍希釈し、Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit(大日本製薬)を用いて、付属プロトコルに従い、アイソタイプを調べた。

10. GST 融合タンパク質の作製

hGPR87 の cDNA 又は mGPR87 の DNA を鋳型として、PCR 法により、hGPR87 の各細胞外領域又は mGPR87 の N 末端側の細胞外領域をコードする DNA(図 29 参照)を合成し、GST 融合タンパク質発現用ベクターである pGEX4T-1 ベクター (GE Healthcare)のマルチクローニングサイトにその DNA を組み込んだ。

大腸菌をその組換えベクターで形質転換し、5mL カルチャーでその大腸菌を一晩培養した。培養液を 10 倍希釈し、1mL カルチャーで 2 時間培養し、IPTG を final 0.5mM 添加して 2 時間培養し、各 GST 融合タンパク質を発現誘導した。

11. ウェスタンブロット

菌体を遠心分離により集めた後、サンプル buffer(final 2% SDS, 100mM DTT, 60mM Tris(pH6.8), 0.01% BPB, 10% Glycerol)で直接溶解し、滅菌水で 10 倍希釈した。10%ポリアクリルアミドゲルにそのサンプルをアプライし、電気泳動した後、Hybond ニトロセルロース膜(GE)に転写した。転写膜をブロックエース(雪印)溶解液に室温で 1 時間浸してブロッキングを行った。10%ブロックエース添加一次抗体液に浸して、室温で 1 時間振とうした。一次抗体には、抗 GST 抗体 (Santa Cruz, final 10 μ g/mL)又は各作製抗体(final 1 μ g/mL)を用いた。PBS(-)で 3 回洗浄後、二次抗体液に浸して、室温で 30 分間振とうした。二次抗体には、抗マウス IgG-Peroxidase Conjugate(Sigma, 8,000 倍希釈)を用いた。SuperSignal West

DuraExtended Duration Substrate(Thermo)を 5 倍希釈後転写膜に 5mL 滴下し、暗室内でフィルムに露光した。

12. ポンソー染色及びドットブロット

合成ペプチドと KLH とのコンジュゲート体の段階希釈液をニトロセルロース膜(GE)上に 1 μ L ずつ滴下し、ニトロセルロース膜を乾燥させた。ニトロセルロース膜を PBS(-)に浸した後、ポンソーS 染色液(final 1% ポンソーS, 5% 酢酸, 蒸留水)に浸し、5 分間振とうした。水洗し、各合成ペプチドが適当量滴下されたかどうか、ドットを確認した。

さらに水洗し、ポンソーS 染色液を除去した後、ニトロセルロース膜をブロックエース(雪印)溶解液に室温で 1 時間浸してブロッキングを行った。10%ブロックエース添加一次抗体液に浸して、室温で 1 時間振とうした。一次抗体には、各作製抗体(final 1 μ g/mL)を用いた。PBS(-)で 3 回洗浄後、二次抗体液に浸して、室温で 30 分間振とうした。二次抗体には、抗マウス IgG-Peroxidase Conjugate(Sigma, 8,000 倍希釈)を用いた。SuperSignal West DuraExtended Duration Substrate(Thermo)を 5 倍希釈後転写膜に 5mL 滴下し、暗室内でフィルムに露光した。

13. ADCC 活性

標的細胞として、Wild CHO 細胞又は hGPR87 stable CHO 細胞を 2×10^6 個を培地 200 μ L で懸濁し、 ^{51}Cr (185MBq/mL, Perkin Elmer)を 16 μ L 加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下で 1.5 時間インキュベートし、 ^{51}Cr を細胞内に取り込ませた後、96 ウェルプレート各ウェルに、その細胞を 1×10^4 cells(50 μ L)ずつ分注した。作製抗体 6 種(final 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 μ g/mL) 50 μ L 添加した。対照には、代わりに培地を同量添

加した。

マウスから脾臓細胞を採取し、GM-CSF(final 10ng/mL, Funakoshi), IL-2(final 50ng/mL, Funakoshi)添加 RPMI 培地で3日間培養した後、エフェクター細胞として、 5×10^6 cells (100 μ L)添加し(標的細胞：エフェクター細胞=1:50)、37°C, 4時間インキュベートした。

ADCC 活性により標的細胞が破壊されると、標的細胞内に取り込まれた ^{51}Cr が培養上清中に放出される。そこで、インキュベート後、各ウエルの培養上清を回収し、その線量をガンマカウンターで測定した。

同時に、細胞内に取り込まれた ^{51}Cr 量の値として、標的細胞 1×10^4 cells⁵に ^{51}Cr を取り込ませた後、2%NP-40 を添加して全標的細胞を破壊し、その培養上清を回収し、その線量をガンマカウンターで測定した。

そして、各抗体を加えた場合におけるガンマカウンターの測定値から抗体の代わりに培地を同量加えた場合における同測定値を減じた値(A)、及び、細胞内に取り込まれた ^{51}Cr 量の測定値から抗体の代わりに培地を同量加えた場合における同測定値を減じた値(B)を求めた。次に(A)を(B)で除し、そのパーセンテージを ADCC 活性の値(%)とした。

14. CDR をコードする DNA 塩基配列の検索

ハイブリドーマから、RNeasy Plus Mini kit(QIAGEN)で total RNA を抽出し、TaqMan Gold RT-PCR kit(Applied Biosystems)で total RNA を cDNA に変換した後、Mouse Ig-Primer set(Novagen)を用いて PCR を行い、各抗体の H 鎖、L 鎖の N 末端近傍をコードする DNA を増幅した。

次に、増幅した DNA をゲル精製し、Taq polymerase(TaKaRa)で 3'末端にアデニンを付加し、TOPO TA Cloning kit(Invitrogen)で T ベクターに組み込み、ミニ

プレップでそのベクタープラスミドを精製し、M13 のフォワードとリバースのプライマーを用いて、その PCR 産生物のシーケンスを調べた。

15. siRNA のトランスフェクション

Me180 細胞を 6-well プレート又は 10cm ディッシュに播種し、30～50%コンフルエントの状態、Lipofectamine RNAiMAX(Invitrogen)を用いて、hGPR87 に対する siRNA(Forward 配列:AAU AUA UGC GAA CUU CCG AUC UUC U, Invitrogen)をトランスフェクションし、24 時間培養した。同時に、対照として、Stealth RNAi Negative Universal Control LO(invitrogen)を同様にトランスフェクションし、24 時間培養した。

16. リアルタイム PCR

siRNA のトランスフェクションから 24 時間後、細胞から RNeasy Plus Mini kit(QIAGEN)で total RNA を抽出し、TaqMan Gold RT-PCR kit(Applied Biosystems)で total RNA を cDNA に変換し、その cDNA を鋳型とし、表 1 のプライマーを用いて、hGPR87 の発現量をリアルタイム PCR で測定した。発現量の標準化にはヒト Cyclophilin A を用いた。

17. 抗体による細胞染色

細胞が接着したカバーガラスを 4%パラホルムアルデヒド液に室温で 15 分間浸し、細胞を固定した。PBS(-)で洗浄後、2%BSA に室温で 15 分間浸し、ブロッキングを行った。PBS(-)で洗浄後、カバーガラスに一次抗体液を 100 μ L 滴下し、室温で 60 分間静置した。一次抗体には、抗 FLAG 抗体(SIGMA, final 10 μ g/mL)又は自作製抗体(final 10 μ g/mL)を用いた。PBS(-)で 3 回洗浄後、カバーガラスに

二次抗体液を 100 μ L 滴下し、室温で 30 分間静置した。二次抗体には、AlexaFluor594(Invitrogen)を用いた。スライドガラスにマウント液を一滴滴下し、カバーガラスを被せ、密封し、蛍光顕微鏡(LICA DMLB, 10 \times 60 倍)で観察した。

18. 免疫組織染色

新潟大学医歯学総合病院において、2003 年から 2009 年の間に癌と診断された患者から手術的に切除された癌の病巣を免疫組織染色の試料に用いた。用いた試料は、皮膚癌 14 例、舌癌 6 例、咽頭癌 4 例、喉頭癌 7 例、肺癌 38 例、食道癌 15 例、胃癌 5 例、大腸癌 35 例、膵癌 35 例、子宮頸癌 10 例、子宮内膜腺癌 9 例、乳癌 44 例、卵巣癌 36 例、腎癌 16 例、腎盂腎癌 8 例、膀胱癌 11 例、前立腺癌 10 例である。これらの検体を使用することについては、患者の同意を得ている。

室温条件下で、手術的に切除した病巣を 10%ホルマリン固定し、アルコールで段階的に脱水し、パラフィン包埋した。厚さ 4 μ m に連続切断し、MAS コートスライド上に載せた。連続切片の一部について、HE 染色、免疫染色を行い、各癌を病理組織学的に分類した。

各癌組織のパラフィン切片を、キシレンで脱パラフィン化し、100%エタノールに浸漬し、段階的にエタノール濃度を下げ、水和した。

切片をクエン酸バッファー(10mM, pH6.0)中でオートクローブ処理(121 $^{\circ}$ C, 15 分間)することにより抗原賦活化を行い、室温に戻した。切片を 100%無水メタノールに過酸化水素を 0.3%溶解した溶液に切片を 20 分間浸漬し、内在性ペルオキシダーゼの活性阻害を行った。

切片を PBS(-)で数回洗浄し、正常ヤギ血清で 10 分間ブロッキングし、一次抗体を添加し、4 $^{\circ}$ C 条件下で一晩静置した。PBS(-)で数回洗浄し、二次抗体とし

て、ペルオキシダーゼ標識化ヤギ抗マウス抗体(Histofine MAXPO, Nichirei)を添加し、室温条件下で1時間静置した。PBS(-)で数回洗浄し、0.01%過酸化水素、0.1mg/mL ジアミノベンジジンを含有する PBS(-)溶液に5分間浸漬し、DAB 免疫染色法により、免疫染色を行った。一次抗体には、作製抗体 C0804 (final 10 μ g/mL)を用いた。

19. DOTA 化による抗体親和性の検討

negative control IgG1(Dako)又は作製抗体 C0804 を 50mM Bicine-NaOH, 150mM NaCl(pH8.5)にバッファー交換し、10mg/mL に調製した。p-SCN-Bz-DOTA (Macrocyclics)を DMSO で 10mg/mL に溶解し、抗体溶液と DOTA 溶液をモル比で 1:10 又は 1:20 になるように混合し、35 $^{\circ}$ C で 24 時間静置し、抗体を DOTA 化した。DOTA 化抗体を用いて、hGPR87 stable CHO 細胞のフローサイトメトリーを行い、DOTA 化抗体の親和性を検討した。

20. DOTA 化抗体の RI 標識化

抗体と DOTA をモル比で 1:10 になるように混合した DOTA 化抗体 (2mg/mL) 0.3mg に対し、 ^{64}Cu を 74MBq 加え、45 $^{\circ}$ C で 60 分間静置し、RI 標識した。RI 標識化抗体を、Amicon Ultra-4(Millipore)を用いて、遠心濃縮した。

濃縮反応液の一部(2 μ L)を 0.1M クエン酸アンモニウム, 10mM DTPA 溶液 (pH5.5)で 100 倍希釈し、そのうちの 2 μ L を iTLC-SG(impregnated glass fiber sheets, Varian)に滴下し展開させた。展開後、RI 標識化抗体は移動が少なくシートの下側に展開し、free の ^{64}Cu は移動が大きくシートの上側に展開する。そこで、シート乾燥後、ガンマカウンター Wizard 3 automatic gamma counter(WALLAC)でシートの下側と上側のカウントをそれぞれ測定し、標識率を計測した。標識率は、

シート下側のカウント(cpm)/{シート上側のカウント(cpm)+シート下側のカウント(cpm)}×100 の式で算出した。また、280nm の吸光度を測定し、RI 標識化抗体の濃度を求めた。

21. PET イメージング

マウスに RI 標識化抗体を 5MBq 尾静脈投与し、その 24、48、72 時間後に、イソフルランで麻酔し、鎮静状態を維持させながら microPET(Inveon PET, SIEMENS)で PET 撮像した。RI 標識化抗体の投与後 24、48 時間の撮像では、120 分間エミッションスキャンを行い、投与後 72 時間の撮像では、180 分間エミッションスキャンを行った。撮像時には、マウスの体動を観察しながらイソフルランの吸入濃度を 1~4%の間で調節し、鎮静状態を維持させた。

装置付属の解析ソフト ASI Pro により、3D-MAP 法(OSEM 3D/MAP)で収集データを解析・再構成した。画像撮像において、吸収補正を行っていない。

22. PET 撮像後におけるマウス体内の放射能分布

RI 標識化抗体投与の 72 時間後、イソフルランを過剰吸入させ、マウスを安楽死させた。そのマウスから、移植細胞部及び各臓器を摘出し、各重量を電子天秤 HR-200(A&D)で計測するとともに、 γ カウンターCRC-25W(CAPINTEC)で各カウントを測定した。

また、カウントを測定する際に、マウスに投与した量と同量の RI 標識化抗体を分取し、 γ カウンターでそのカウント数を測定し、マウスに投与した RI 標識化抗体のカウント(全体量)を測定した。そして、移植細胞部・各臓器におけるカウントを全体量で除し、%I.D.を算出し、その値を移植細胞部・各臓器の重量で除して、%I.D./g を算出した。

第 3 章 結果

1. hGPR87 stable CHO 細胞株の樹立

wild CHO 細胞に組換えベクターFLAG-hGPR87/pIRES-EGFP をトランスフェクション後、薬剤選抜により、hGPR87 stable CHO 細胞株を樹立した。

hGPR87 stable CHO 細胞について、抗 Flag 抗体を一次抗体としてフローサイトメトリーを行い、図 5 に示す通り、hGPR87 が細胞膜上に発現していることを確認した。

また、同様に、hGPR87 stable CHO 細胞について抗 Flag 抗体を一次抗体として細胞染色を行ったところ、図 6 に示す通り、陽性反応物が細胞膜上に存在していた。

2. 抗 hGPR87 モノクローナル抗体の作製

GPR87 ノックアウトマウスをジーンガンによる DNA 免疫法によって免疫し、さらに hGPR87 stable CHO 細胞でブースト免疫した後、ハイブリドーマを作製した。hGPR87 と特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマ株を、hGPR87 stable CHO 細胞を用いたフローサイトメトリーによりスクリーニングした結果、6 つの抗 hGPR87 モノクローナル抗体 C0804, C0812, C0815, C0806, C0807, C0814 が得られた。

作製抗体を一次抗体として hGPR87 stable CHO 細胞のフローサイトメトリーを行った結果、図 7 に示す通り、作製抗体 6 種全てで、濃度依存的なスペクトルの移動が検出された。

また、作製抗体 C0804 を用いて細胞染色を行った結果、図 8 に示す通り、陽性反応物は hGPR87 stable CHO 細胞の細胞膜上に存在していた。

3. 抗 hGPR87 モノクローナル抗体の評価

3-1. 抗体のアイソタイプ

表 2 に示す通り、作製抗体 C0804, C0812, C0815, C0806, C0807, C0814 は、全て、重鎖のサブクラスが IgG1 で、軽鎖が κ 鎖であった。

3-2. GST 融合タンパク質を用いたエピトープ解析

作製抗体 C0804, C0812, C0815, C0806, C0807, C0814 を用いて hGPR87 の細胞外領域と GST との融合タンパク質のウェスタンブロットを行った結果、図 9 に示す通り、全ての作製抗体で、N 末端側細胞外領域と GST との融合タンパク質でバンドが検出された。この結果より、作製抗体 6 種はいずれも、hGPR87 全長中、N 末端側の細胞外領域(1~41 アミノ酸、図 10 参照)を認識することが分かった。

3-3. 合成ペプチドを用いたエピトープ解析

合成ペプチドを用いてドットブロットを行った結果、図 11 に示す通り、hGPR87 全長中、N 末端側 9~23 番目のアミノ酸配列を有する合成ペプチドを滴下した部分にドットを検出した。この結果より、作製抗体 6 種は、いずれも、hGPR87 全長中、N 末端側 9~23 番目の領域(図 10 参照)を認識することが分かった。

3-4. マウスとの交差性

作製抗体 C0804, C0812, C0815, C0806, C0807, C0814 を用いて、ヒト又はマウスの N 末端側細胞外領域と GST との融合タンパク質のウェスタンブロットを

行った結果、図 12 に示す通り、作製抗体 6 種はいずれも、mGPR87 の N 末端側細胞外領域と GST との融合タンパク質を認識しなかった。この結果より、作製抗体 6 種は、いずれも、mGPR87 を認識せず、これらの抗体はマウスとの交差性を有しないことが分かった。

3-5. ADCC 活性の測定

標的細胞に hGPR87 stable CHO 細胞を、エフェクター細胞として脾臓細胞を用いて作製抗体 C0804, C0812, C0815, C0806, C0807, C0814 の ADCC 活性を測定した結果、図 13 に示す通り、作製抗体 6 種は、いずれも、ADCC 活性を有することが示された。

3-6. CDR の DNA 塩基配列の決定

図 14～図 17 に示す通り、作製抗体 C0804, C0812, C0815 の H 鎖 V 領域(VH region)の配列中の CDR1～CDR3 の DNA 配列及びアミノ酸配列、並びに L 鎖 V 領域(VL region)の配列中の CDR1～CDR3 の DNA 配列及びアミノ酸配列の解析に成功した。

以上、作製抗体 6 種のうち、C0804 について評価をまとめて表 3 に示した。

4. 癌細胞における内在性 hGPR87 検出

子宮頸癌培養細胞株である Me180 細胞に hGPR87 に対する siRNA をトランスフェクションした結果、図 18 に示す通り、トランスフェクションから 24 時間後の Me180 細胞における hGPR87 発現レベルが mRNA レベルで 15.4%に有意にノックダウンされた。

そこで、作製抗体 C0804, C0812, C0815 を一次抗体に用いて、hGPR87 をノックダウンしていない Me180 細胞(control siRNA をトランスフェクションした細胞)とノックダウンした Me180 細胞(hGPR87 に対する siRNA をトランスフェクションした細胞)のフローサイトメトリーを行った。その結果、図 19 に示す通り、hGPR87 をノックダウンしていない Me180 細胞では、抗体濃度依存的なスペクトルのシフトが検出されたのに対し、hGPR87 をノックダウンした Me180 細胞ではスペクトルのシフトがより少なかった。

5. 癌組織の免疫組織染色

作製抗体 C0804 を用いて、癌組織の免疫組織染色を行った。その結果、図 20 及び表 4 に示す通り、扁平上皮癌では発生部位に関わらず癌細胞に陽性所見がみられた。移行上皮癌でも強陽性であった。陽性反応は細胞膜及び細胞質でみられた。陽性率は、表 4 に示す通り、肺扁平上皮癌で 81%、子宮頸癌で 80%、その他の扁平上皮癌及び移行上皮癌で 100%であった。

腺癌の免疫組織染色では、図 20 及び表 4 に示す通り、肺腺癌で弱陽性、膵臓癌で陰性～弱陽性であった。

その他、正常組織の免疫組織染色では、図 20 及び表 5 に示す通り、皮膚扁平上皮に弱陽性像がみられたほかは陰性であった。

6. PET イメージング

6-1. DOTA 化による抗体親和性の検討

抗体と DOTA の混合比率 1:10、1:20 で作製抗体 C0804 を DOTA 化し、hGPR87 stable CHO 細胞によるフローサイトメトリーを行った結果、図 21 に示す通り、C0804 のみの場合(DOTA 化していない場合)における一次抗体濃度 10 μ g/mL の

GeoMean は 731.22 であったのに対し、抗体:DOTA=1:10 では 527.72、抗体:DOTA=1:20 では 277.46 と親和性が低下した。

6-2. hGPR87 stable CHO 細胞移植マウスの PET イメージング

免疫不全マウスの左下腹部に wild CHO 細胞、右下腹部に hGPR87 stable CHO 細胞を移植した hGPR87 stable CHO 細胞移植マウスに、 ^{64}Cu 標識化 C0804 を投与し、その 24、48、72 時間後、microPET で撮像した。その結果、図 22 に示す通り、心プール集積では投与後 24 時間で高い集積が認められたが、投与後 48 時間及び 72 時間では集積が減少した。また、hGPR87 stable CHO 移植部では 24～72 時間で経時的な集積の増加を認めた。

6-3. DLD1/Me180 担癌モデルマウスの PET イメージング

図 23 に示す通り、作製抗体 C0804 による DLD1 細胞及び Me180 細胞のフローサイトメトリーを行った結果、大腸腺癌培養細胞株 DLD1 では抗体濃度によるスペクトルのシフトがほとんど観察されなかったのに対し、子宮頸癌培養細胞株 Me180 では一次抗体の濃度依存的にスペクトルがシフトした。そこで、DLD1 を hGPR87 発現の少ない細胞、Me180 を hGPR87 発現細胞として、免疫不全マウスの左肩部に DLD1 細胞、右肩部に Me180 細胞を移植し、DLD1/Me180 担癌モデルマウスを作製した。このマウスに、 ^{64}Cu 標識化 C0804 を投与し、その 24 及び 72 時間後、microPET で撮像した。その結果、図 24 に示す通り、(a) 及び(b)の 2 回のイメージングのいずれの場合も、心プール集積は ^{64}Cu 標識化 C0804 投与後 24 時間では集積が高かったのに対し、72 時間では集積が減少した。肝集積は ^{64}Cu 標識化 C0804 投与後 24 時間と 72 時間でほぼ同程度の集積が認められた。また、DLD1 移植部では高い集積は認められなかったのに対し、

Me180 移植部では、投与後 72 時間に高い集積が認められた。

6-4. DLD1/Me180 担癌モデルマウスにおける ^{64}Cu 標識化 C0804 の体内分布

DLD1/Me180 担癌モデルマウスに、 ^{64}Cu 標識化 negative control IgG1 又は ^{64}Cu 標識化 C0804 を投与し、投与から約 72 時間後に移植細胞部及び各臓器を摘出し ^{64}Cu 標識化抗体の体内分布を調べた。その結果、図 25 に示す通り、DLD1 移植部では ^{64}Cu -negative control IgG1 を投与した場合(n=3)と ^{64}Cu -C0804 を投与した場合(n=2)とで値がほとんど変わらなかったのに対し、Me180 移植部では ^{64}Cu -C0804 を投与した場合の値の方が高かった。negative control IgG1 と C0804 のどちらを投与した場合も、投与から約 72 時間後における血液プール、肝プールは高かった。

第4章 考察

1. 作製抗体について

近年、PAR 受容体(Protease-activated receptor)、LPA 受容体など、多くの GPCR が癌細胞の増殖などに関わっている可能性が示唆されている[31-32]。一方、GPCR は、立体構造が複雑かつ不安定で、抗原として認識されにくく、また、動物種間で配列が保存されており免疫寛容になりやすい。このため、GPCR の部分ペプチドを合成して免疫しても免疫原性が弱い場合が多く、他のタンパク質と比較して、そのネイティブな立体構造を認識する抗体を作製することは難しいとされている[33-34]。

本研究では、GPCR の一つと推定される GPR87 について、hGPR87 stable CHO 細胞株を樹立して、hGPR87 stable CHO 細胞を用いたフローサイトメトリーにより、hGPR87 特異的抗体をスクリーニングする系を確立するとともに、免疫寛容回避のために hGPR87 ノックアウトマウスを用いて、DNA 免疫(ジーン癌免疫)[29-30]と細胞免疫で免疫することで、6 種類のモノクローナル抗体(C0804, C0812, C0815, C0806, C0807, C0814)の作製に成功した。

本研究室では、他の GPCR についても DNA 免疫による抗体作製を試みたが抗体を作製できなかった。GPR87 でのみ DNA 免疫によって抗体を作製できた理由は、次の通りであると推測する。DNA 免疫を行う場合、ジーンガンで皮膚組織に発現ベクターを直接打ち込み、GPR87 を発現させる。一方、系統的マイクロアレイ解析の結果では、GPR87 は皮膚で比較的高発現していた。従って、GPR87 の発現に関与するタンパク質が皮膚又はその近傍に位置する細胞に発現しており、DNA 免疫を行った場合、皮膚細胞内に GPR87 が正常に発現しやすい環境が整っていたため、効率的な免疫が可能であったと考えられる。

子宮頸癌培養細胞株である Me180 細胞を用いたフローサイトメトリーでは、hGPR87 をノックダウンしていない Me180 細胞では、抗体濃度依存的なスペクトルのシフトが検出されたのに対し、hGPR87 をノックダウンした Me180 細胞を用いるとスペクトルのシフトが減少した。この結果より、作製抗体 C0804, C0812, C0815 は、子宮頸癌培養細胞株 Me180 細胞の細胞膜上に内在性に存在する hGPR87 を特異的に認識することが分かった。

そこで、このうち、作製抗体 C0804 を用いて、癌組織の免疫組織染色を試みた結果、図 20 及び表 4 に示す通り、扁平上皮癌及び移行上皮癌で癌細胞に陽性所見が認められた。扁平上皮癌は、肺癌[2]のほか、皮膚癌 [35-36]、頭頸部癌 [37-38]、食道癌[39]、子宮頸癌[40]などで、移行上皮癌は膀胱癌[41]及び腎盂腎癌で発生頻度が高い。従って、肺の扁平上皮癌に加え、他の各扁平上皮癌、移行上皮癌など、発生頻度の高い広範な癌の病理組織診断に対する作製抗体 C0804 の有用性が示唆された。

図 20 の免疫組織染色では、癌細胞の細胞膜のほかに、細胞質も染色された。この染色像が、hGPR87 が細胞膜以外の部分にも分布することによるものなのか、若しくは抗体が非特異的に結合したことによるものなのかについては、現時点で GPR87 の機能・細胞内動態などに関する知見がほとんどないので判断できない。ここには示さなかったが、各種癌培養細胞株(DLD1、KLM1、Capan1、H2009、A549、A431)を用いたフローサイトメトリーでは、他の膜タンパク質との交差性は検出されなかった。しかし、作製抗体 C0804 を用いた Me180 及び上記各癌培養細胞株のウェスタンブロットでは、特異的バンド及び非特異的バンドをいずれも検出できなかった(データ未開示)ので、細胞内の抗原に対する交差性の有無についてはわからない。

現在上市されている癌治療用抗体の多くは、ADCC 活性(抗体依存性細胞障害活性)、CDC 活性(補体依存性細胞障害活性)などのエフェクター活性により、癌細胞を破壊し、治療効果を発揮する[7-8]。抗体のエフェクター活性は、抗体のサブクラスによって異なることが知られている[42]。ヒトの IgG1 抗体は、ADCC 活性などのエフェクター活性を有するものが多く、癌治療用抗体の多くも IgG1 である[7]。作製抗体 C0804 は、アイソタイプが IgG1 であり、hGPR87 stable CHO 細胞に対し、強い親和性を示すとともに ADCC 活性を示した。また、作製抗体 C0804 は、フローサイトメトリーにより、細胞膜上に存在する hGPR87 を認識できるかどうかでスクリーニングを行ったため、生体内で立体構造を保持した hGPR87 を認識できる。以上の点から、作製抗体 C0804 は、癌診断・治療への適用可能性が示唆された。なお、例えば、cetuximab における PET イメージングなどによる癌診断の際の抗体投与量と治療用抗体の投与量とを比較すると、マウスの実験で、癌診断の際の抗体投与量(50 μ g)は治療用抗体の投与量(250 μ g)と比較して 1/5 である[43-44]。従って、PET 用診断剤として投与した場合における ADCC 活性の影響は、投与量を調節することにより回避できると考える。

2. PET イメージングについて

進行期の肺扁平上皮癌に対する化学療法の効果は限定的であり、進行期肺癌でより有効な治療手段の開発が求められている。これに対し、RI 標識化抗体を用いて治療用放射線を癌部へ運搬し、癌部を直接照射して抗癌効果を奏する治療法である RIT(Radioimmunotherapy)が有効な可能性がある[45]。

RIT 用抗体として、RI 標識化抗 CD20 モノクローナル抗体の Ibritumomab Tiuxetan が悪性リンパ腫に臨床適応されている。Ibritumomab Tiuxetan は、 β 線

核種の ^{90}Y で標識した抗体を用いて治療を行う RI 標識化抗体医薬である[46]。**Ibritumomab Tiuxetan** では、治療前に、 ^{90}Y の代わりに γ 線核種の ^{111}In で標識した同じ抗体を用いて SPECT で抗体の癌部への集積を確認する。この SPECT/RIT 法では、抗体治療前に有効性、標的以外の組織への集積の有無など、その適格性を確認できる[47]。

PET は陽電子核種を用いたコンピュータ断層撮影法であり、SPECT と比較して高い感度・解像度を有する[48]。そこで、 γ 線核種の代わりに ^{64}Cu などの陽電子核種を用いることにより、陽電子核種標識化抗体で PET 診断し、治療前に適格性を確認した上で RIT を行う癌治療法である PET/RIT 法を確立できる可能性がある[44]。

そこで、本研究では、肺扁平上皮癌の PET/RIT 法の開発に向け、作製抗体 C0804 を用いて microPET による体外イメージングへの適用性を検討した。

図 24 に示す通り、DLD1/Me180 担癌モデルマウス 2 個体に、 ^{64}Cu 標識化 C0804 を投与し、PET 撮像した結果、いずれの個体でも、心プール集積は ^{64}Cu 標識化 C0804 投与後 24 時間から 72 時間で減少し、肝集積は投与後 24 時間と 72 時間でほぼ同等であったのに対し、Me180 移植部では、DLD1 移植部と比較して投与後 72 時間に高い集積が認められ、Me180 移植部への特異的集積が示された。

DLD1/Me180 担癌モデルマウスにおける、投与から約 72 時間後の臓器摘出による ^{64}Cu 標識化抗体の体内分布でも、図 25 に示す通り、DLD1 移植部では、 ^{64}Cu -negative control IgG1 を投与した場合と ^{64}Cu -C0804 を投与した場合とで値がほとんど変わらなかったのに対し、Me180 移植部では、 ^{64}Cu -C0804 を投与した場合の値が高く、図 24 の投与後 72 時間における PET イメージングのデータと同様の傾向が観察された。

以上より、作製抗体 C0804 は、RI 標識化することにより癌部への高い特異的

集積を認め、肺扁平上皮癌に対する PET/RIT 法のリード抗体としての有用性が示唆された。

今回の PET イメージングでは、経時的漸減が観察されたものの、心・血液プール及び肝臓への高い集積が認められた。この心・血液プール及び肝臓への集積は、RI 標識化抗体を用いた従前の microPET のデータでも観察されており [44, 49-51]、本研究結果は、それらのデータと矛盾するものではなかった。PET/RIT 法における RI 標識化 C0804 の人体への投与を考慮した場合、これらの正常組織に対する RI 被ばくを低減する必要がある、今後、心・血液プール及び肝臓への集積を抑制する手段の検討が必要である。

本研究では、抗体のリジン残基にイソチオシアネート基を介してキレート剤の DOTA を結合させ、DOTA に ^{64}Cu を配位させて C0804 の RI 標識化を行った。C0804 の DOTA 化の際、図 21 に示す通り、DOTA 化により抗体の親和性を保持したものの、DOTA の濃度依存的な親和性の低下が観察された。作製抗体 C0804 は図 16 及び図 17 に示す通り CDR にリジン残基を有しており、DOTA 化による C0804 の親和性低下が、癌部への集積性を低下させている可能性がある。今後、より高い癌部への集積性を実現するために、DOTA 化に伴う親和性低下を回避する方法を検討する必要がある。

今後、作製抗体 C0804 を PET/RIT 法に適用するために、(1)抗体のヒト型化と、(2)RI 標識化抗体投与の際における正常組織の RI 被ばくの低減が必要となる。

抗体のヒト型化は、マウス抗体の免疫原性を低下させるために行うが、ヒト型化により、抗体の親和性が低下する場合が多い [52]。また、後述する scFv 化など抗体の低分子化の際も同様である [53]。抗体の親和性を保持又は向上させ

る抗体改変方法として、分子動力学計算を用いた改変抗体設計技術の開発が提案されている[54]。具体的には、抗原抗体複合体を結晶化し、抗体の CDR の配列と、結晶化で得られた座標情報に基づき、分子動力学計算を行い、最適な改変抗体を設計する。これにより、抗体を最適にヒト型化改変でき、かつ抗体の親和性を保持又は向上させることができる可能性がある。また、抗体の親和性を向上できれば、癌部への集積を高くでき、その分正常組織の被ばくを減少できる。

RI 標識化抗体投与の際における正常組織の RI 被ばくを低減する手段として、抗体の低分子化とプレターゲットイング法が有効な可能性がある。scFv 化など、抗体の低分子化により、その人工抗体の癌部への集積が速くなり[42, 55]、かつ投与後腎臓から速やかに排出されるため[56]、正常組織の被ばくを抑制できる。また、プレターゲットイング法は、Goldenberg らによって提唱された方法であり[57]、まず、scFv 化した人工抗体とストレプトアビジンを融合させたタンパク質を投与し、次に、RI 標識したビオチンを、数日後に投与する。これにより、ストレプトアビジンとビオチンの高い親和性を利用して、短時間で高い腫瘍集積率を達成でき、かつ治療効果・有効性を高く、被ばくによる副作用を少なくできる可能性がある。

系統的マイクロアレイ解析や免疫組織染色の結果では、人体において、癌組織よりは低レベルであるが、皮膚などの正常組織でも GPR87 が発現している可能性が示唆された。今後、PET/RIT 法における RI 標識化 C0804 の人体への投与を考慮した場合、RI 標識化した C0804 が、正常組織における内在性の GPR87 発現部位に集積するかどうかについても考慮する必要がある。図 10 に示す通り、hGPR87 と mGPR87 のアミノ酸配列における C0804 のエピトープ配列(15 アミ

ノ酸)の相同性は33%であり、図12に示す通りC0804はマウスとの交差性を有しない。本研究は、マウスを用いてPETイメージングを行っており、RI標識化したC0804が、皮膚などの正常組織における内在性のGPR87発現部位に集積するかどうかについては評価対象としていない。しかし、作製抗体C0804のエピトープ配列は、hGPR87のアミノ酸配列とアカゲザル及びマーモセットのGPR87と予想されるタンパク質のアミノ酸配列との間で100%の相同性を有するため、C0804はアカゲザル及びマーモセットとの交差性を有する可能性が高い。従って、被験動物にアカゲザル又はマーモセットを選択してPETイメージングなどを行うことにより、皮膚などの正常組織における内在性のGPR87発現部位に集積するかどうかについて、所見を得ることができると考えられる。

3. 結語

本研究では、系統的マイクロアレイ解析において扁平上皮癌などで発現亢進していたhGPR87に対する高親和性マウスモノクローナル抗体C0804の作製に成功した。そして、担癌モデルマウスに⁶⁴Cu標識化C0804を投与してPET撮像した結果、癌部に高い集積を認めた。以上より、作製抗体C0804は、扁平上皮癌に対するPET診断のリード抗体となる可能性を有することが示唆された。

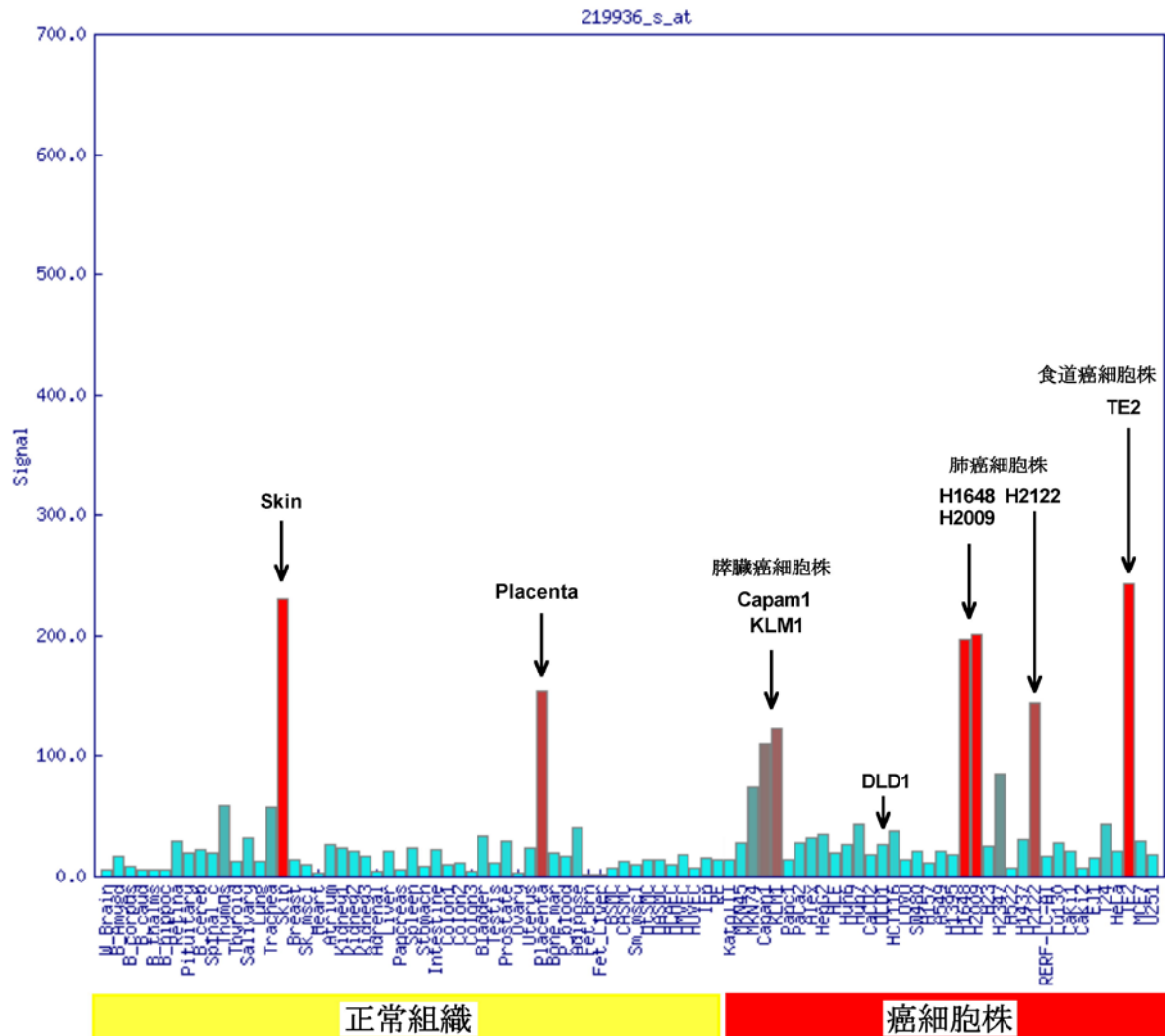


図1 マイクロアレイ解析結果(hGPR87 発現パターン)

マイクロアレイ解析の結果、正常組織では皮膚及び胎盤で、癌細胞株では膵臓癌、肺癌、食道癌で、RNA レベルで高発現していた。

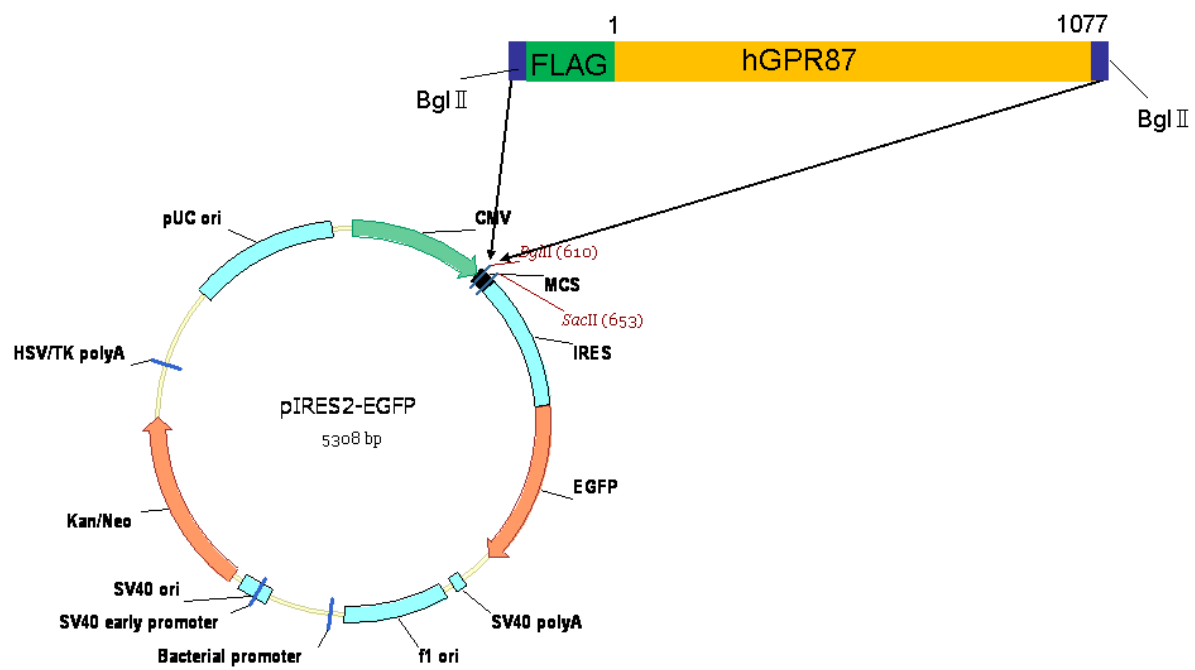


図 2 hGPR87 stable CHO 細胞株の樹立に用いた組換えベクター
 pIRES-EGFP ベクターのマルチクローニングサイトに FLAG-hGPR87 を組み込
 んだ。

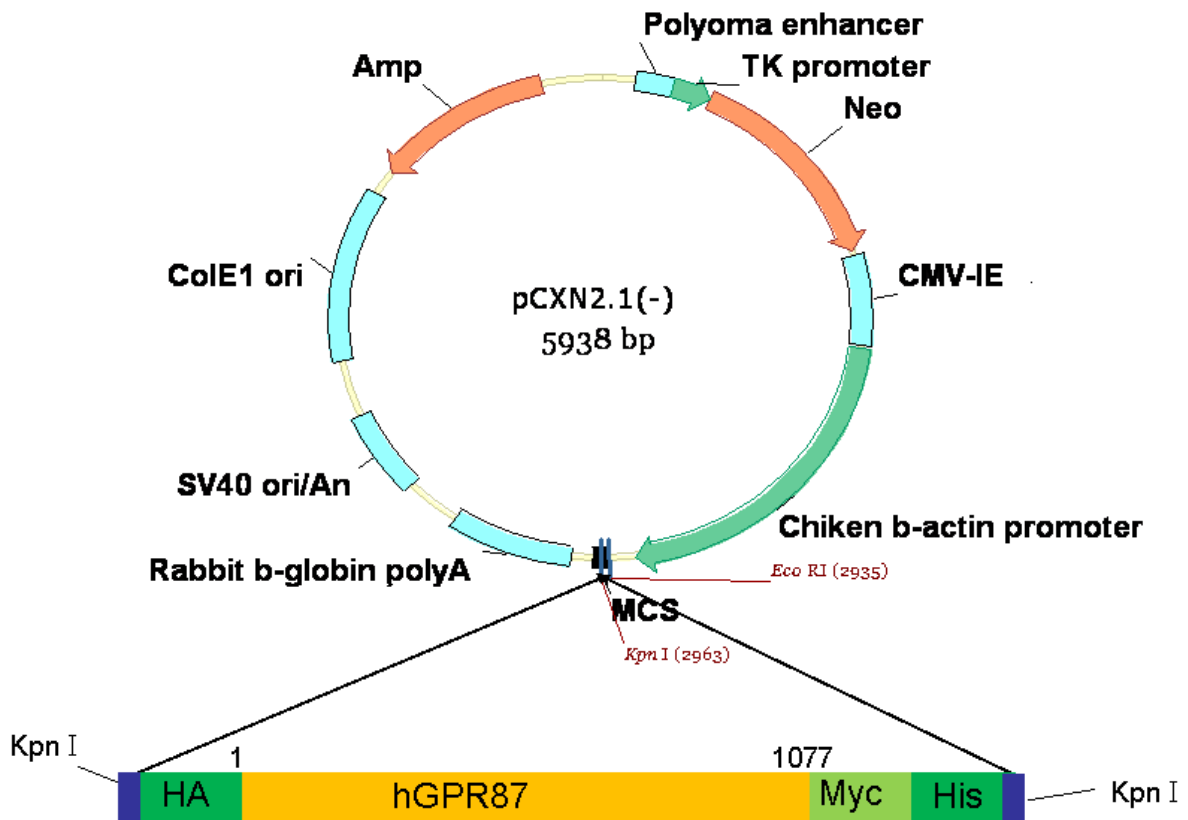
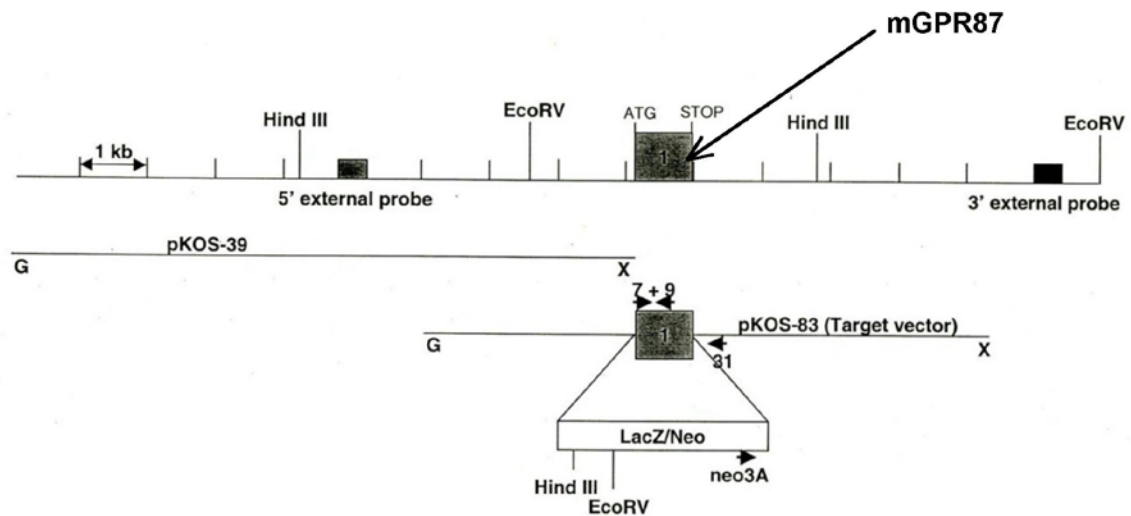




図3 DNA免疫に用いた組換えベクター

CAG プロモーターを有する pCXN2.1(-)ベクターのマルチクローニングサイトに HA-hGPR87-Myc-His を組み込んだ。

Targeting Strategy



Southern Strategies

Probe	5' external 	3' external 
Enzyme	Hind III	EcoRV
Wildtype	8.0 kb	8.8 kb
Targeted	5.4 kb	10.2 kb

PCR Strategies

Strategy	Wildtype	Targeted
Primers	7+9	neo3A+31
Wildtype	567 bps	-----
Targeted	-----	463 bps

図4 GPR87 ノックアウトマウス

図中の mGPR87 と記載された領域はマウスゲノム上の GPR87 をコードする領域で、この部分を LacZ 遺伝子で置換することにより、GPR87 をノックアウトした。

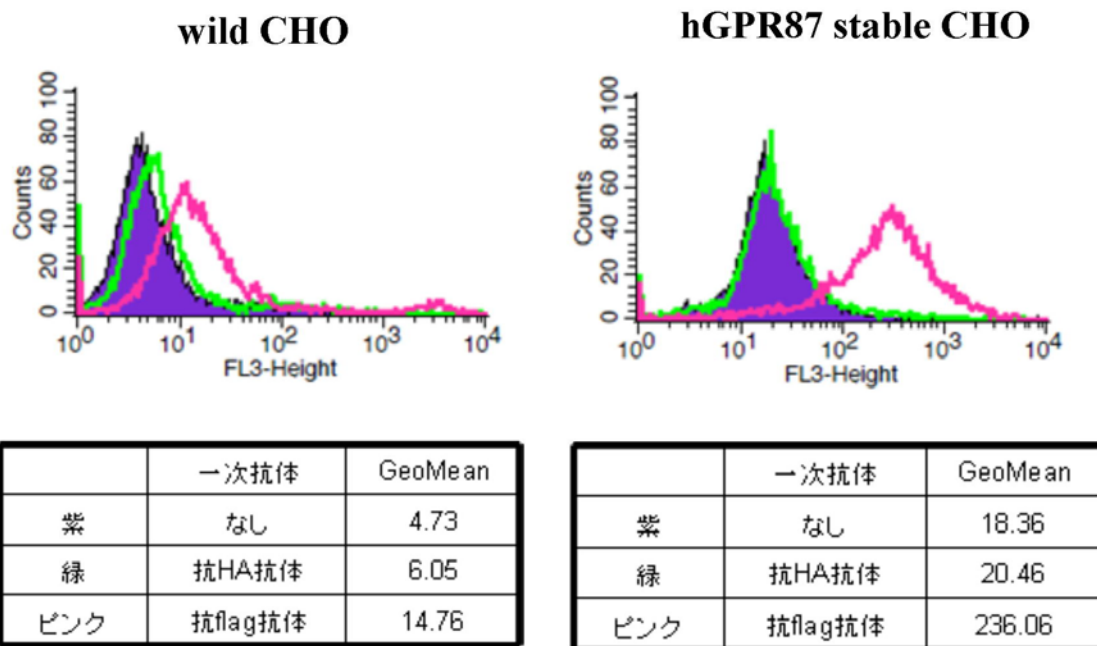


図5 hGPR87 stable CHO 細胞における hGPR87 の局在

一次抗体に抗 Flag 抗体を用いたフローサイトメトリーにより、hGPR87 が細胞膜上に発現していることを確認した。横軸:蛍光強度、縦軸:細胞数。それぞれ、一次抗体を加えなかった場合(紫)、一次抗体に抗 HA 抗体(final 10 μ g/mL)を用いた場合(緑)、一次抗体に抗 Flag 抗体(final 10 μ g/mL)を用いた場合(ピンク)のスペクトル。

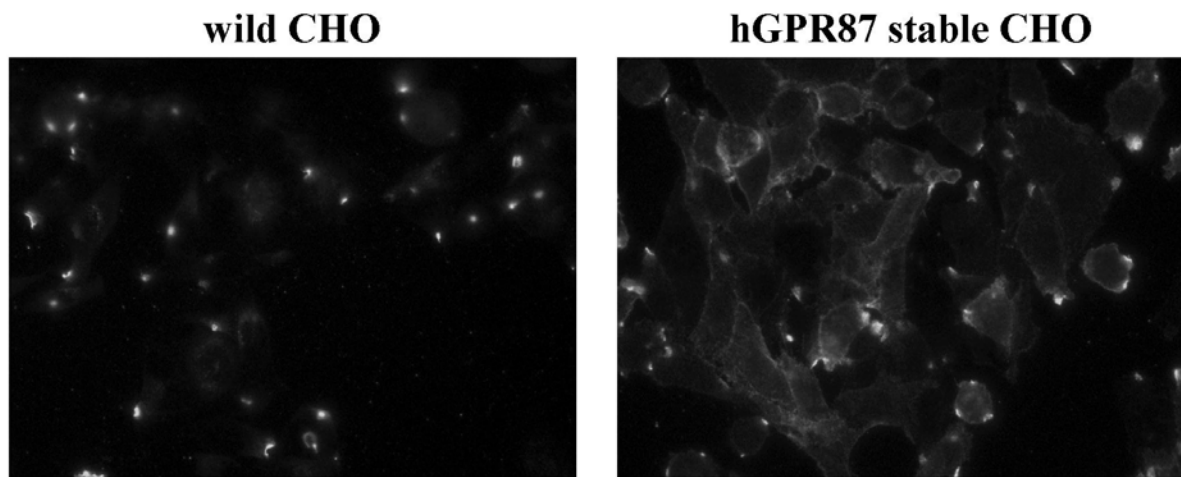


図 6 hGPR87 stable CHO 細胞における hGPR87 の局在(細胞染色)
一次抗体に抗 Flag 抗体(final 10 μ g/mL)を用いて細胞染色を行い、hGPR87 が細胞膜上に存在していることを確認した。

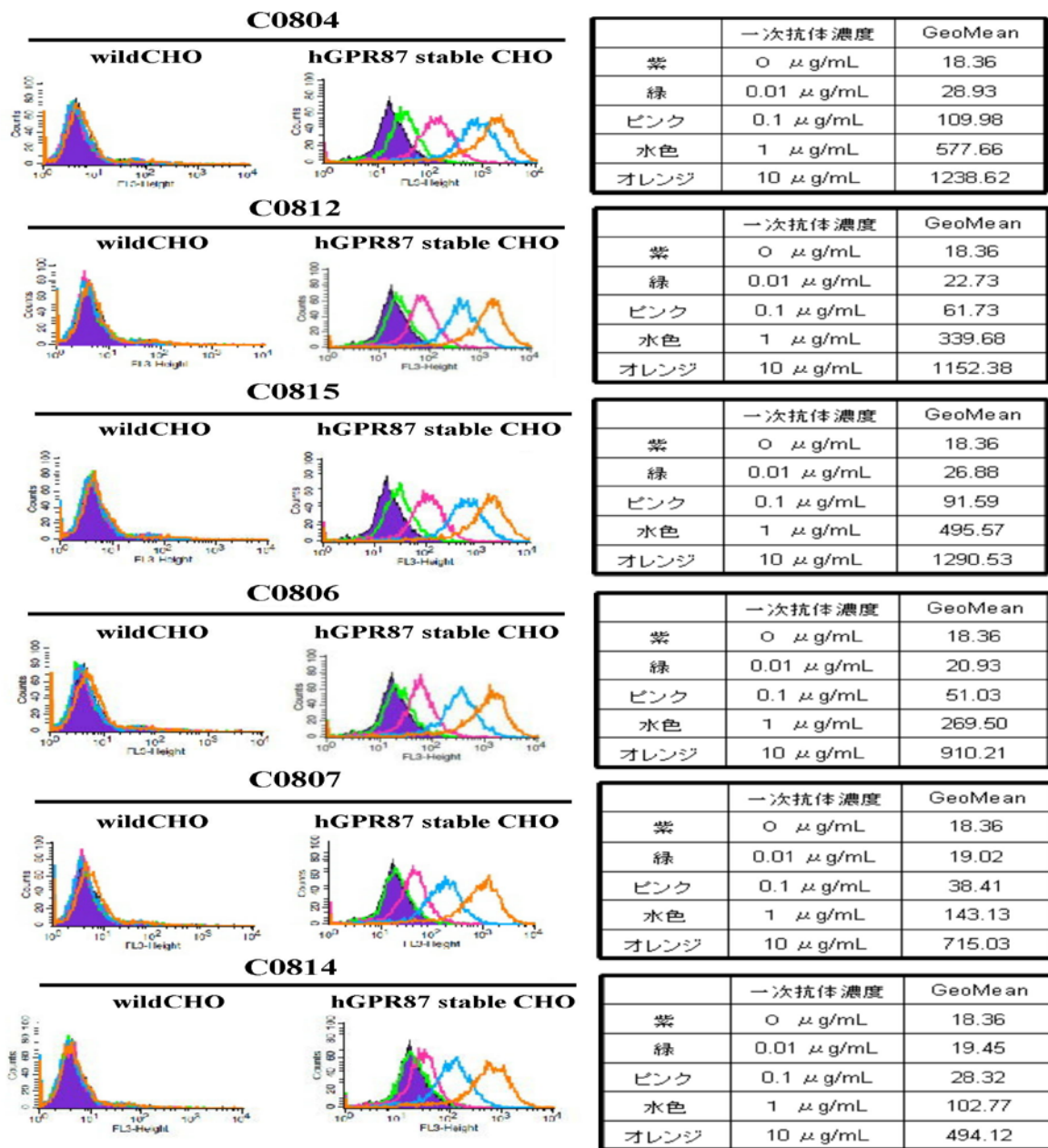
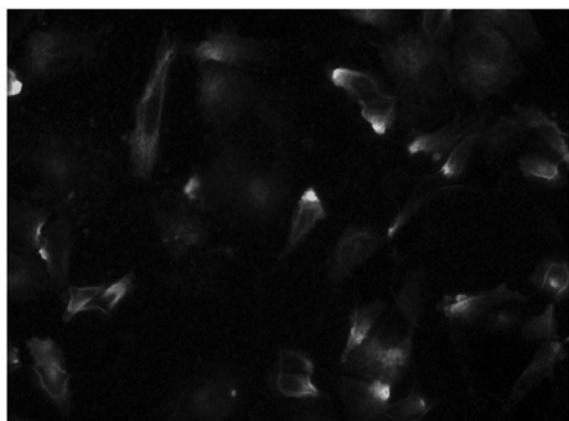


図7 フローサイトメトリーによる抗 hGPR87 作製抗体の評価

作製抗体(C0804, C0812, C0815, C0806, C0807, C0814)が、hGPR87 stable CHO 細胞の細胞膜上に存在する hGPR87 を認識することが示された。横軸:蛍光強度、縦軸:細胞数。一次抗体を加えなかった場合(紫)、及び、一次抗体濃度が final 0.01(緑), 0.1(ピンク), 1(水色), 10 μ g/mL(オレンジ)の場合のスペクトル。

wild CHO



hGPR87 stable CHO

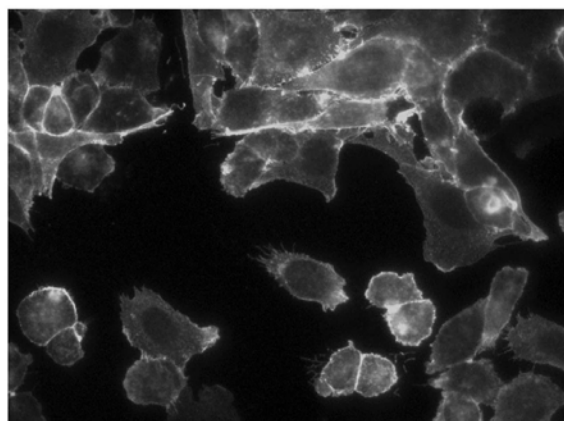


図 8 作製抗体 C0804 を用いた細胞染色

細胞染色でも、作製抗体 C0804 が、hGPR87 stable CHO 細胞の細胞膜上に存在する hGPR87 を認識することが確認された。

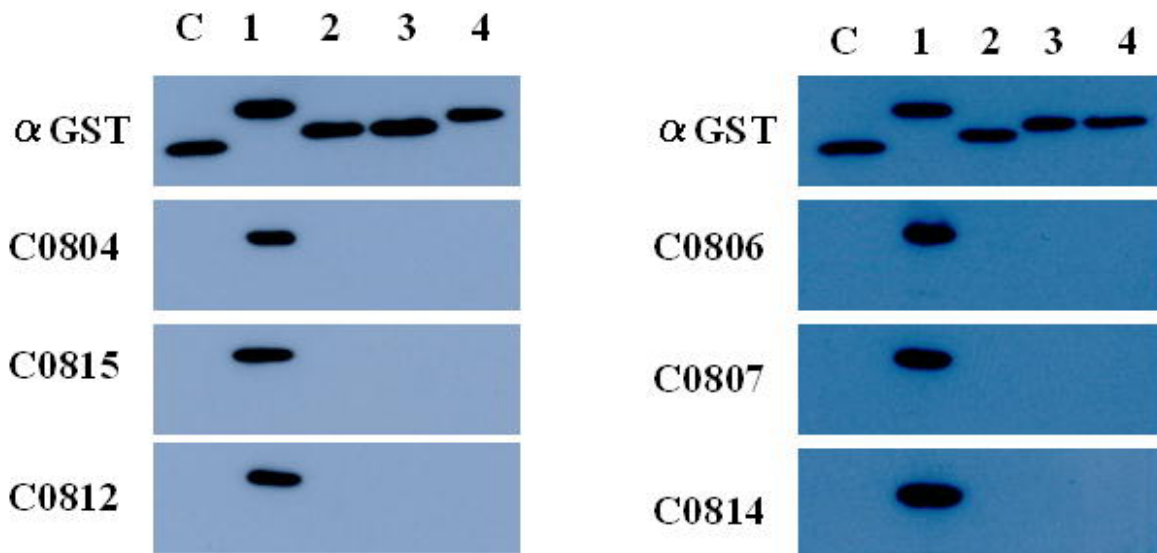


図9 GST融合タンパク質を用いた作製抗体のエピトープ解析

GST 融合タンパク質のウエスタンブロットの結果、作製抗体(C0804, C0812, C0815, C0806, C0807, C0814)は、hGPR87 全長中、N 末端側の細胞外領域(1~41 アミノ酸)を認識することが分かった。レーン C:GST, レーン 1:N 末端側細胞外領域と GST との融合タンパク質, レーン 2:第 2-3 膜貫通領域間の細胞外領域と GST との融合タンパク質, レーン 3: 第 4-5 膜貫通領域間の細胞外領域と GST との融合タンパク質, レーン 4: 第 6-7 膜貫通領域間の細胞外領域と GST との融合タンパク質。

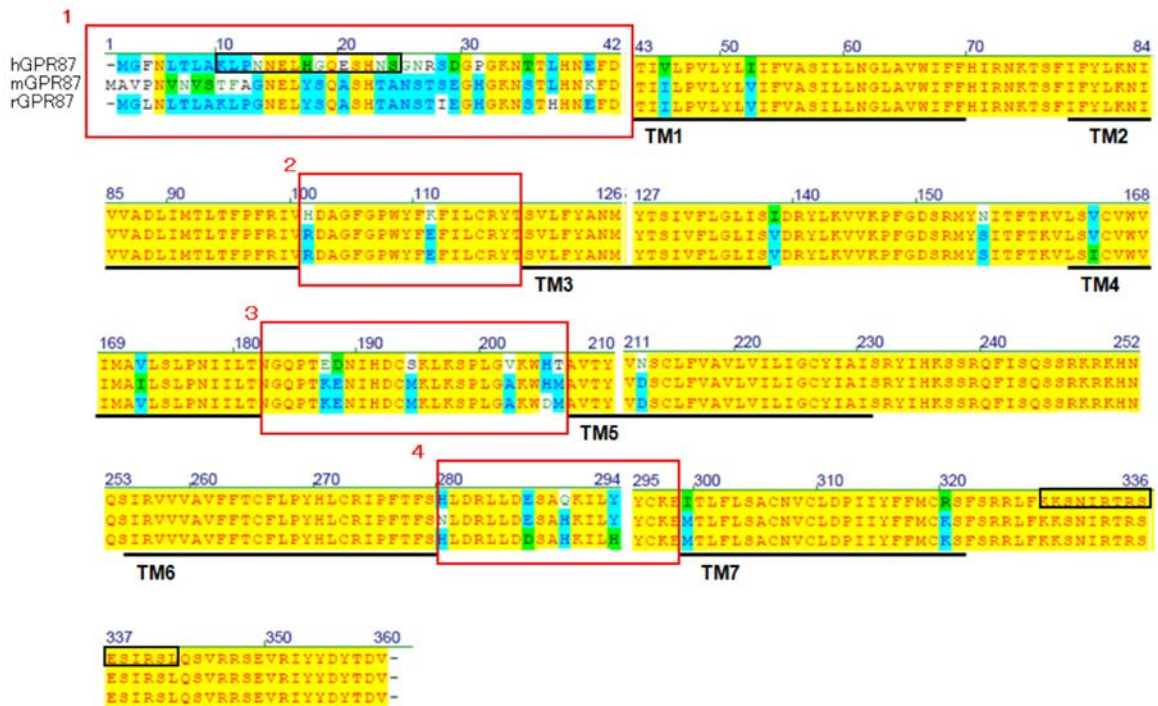


図 10 hGPR87、mGPR87、rGPR87 のアミノ酸配列

hGPR87(全長 358 アミノ酸)、mGPR87(全長 359 アミノ酸)、rGPR87(全長 358 アミノ酸)。赤枠：細胞外領域、TM1～TM7：膜貫通領域、黒枠：合成ペプチドのアミノ酸配列。

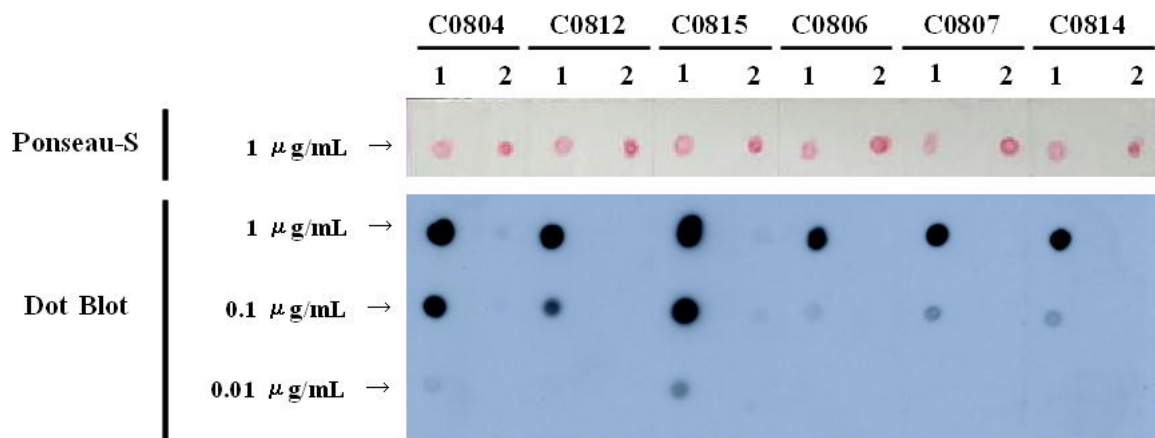


図 11 合成ペプチドを用いたエピトープ解析

hGPR87 全長中、N 末端側 9～23 番目のアミノ酸配列を有する合成ペプチドを用いたドットブロットの結果、作製抗体(C0804, C0812, C0815, C0806, C0807, C0814)は、そのペプチドを認識した。レーン 1:hGPR87N 末端側合成ペプチド、レーン 2: hGPR87C 末端側合成ペプチド(N 末端から 327～341 番目のアミノ酸配列を有する合成ペプチド)。

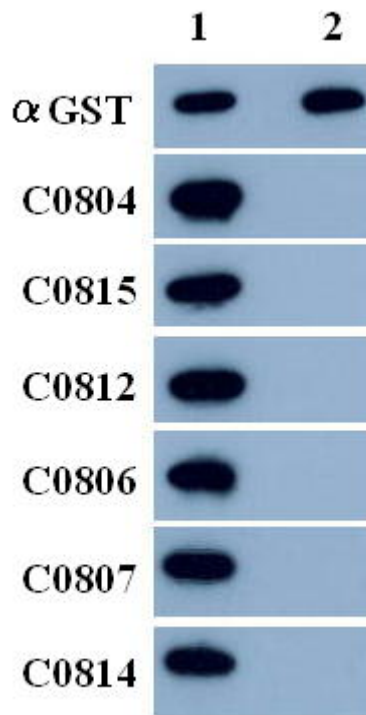


図 12 マウスとの交差性

GST 融合タンパク質のウェスタンブロットの結果、作製抗体(C0804, C0812, C0815, C0806, C0807, C0814)は、mGPR87 を認識しなかった。レーン 1:hGPR87 の N 末端側細胞外領域と GST との融合タンパク質, レーン 2:mGPR87 の N 末端側細胞外領域と GST との融合タンパク質。

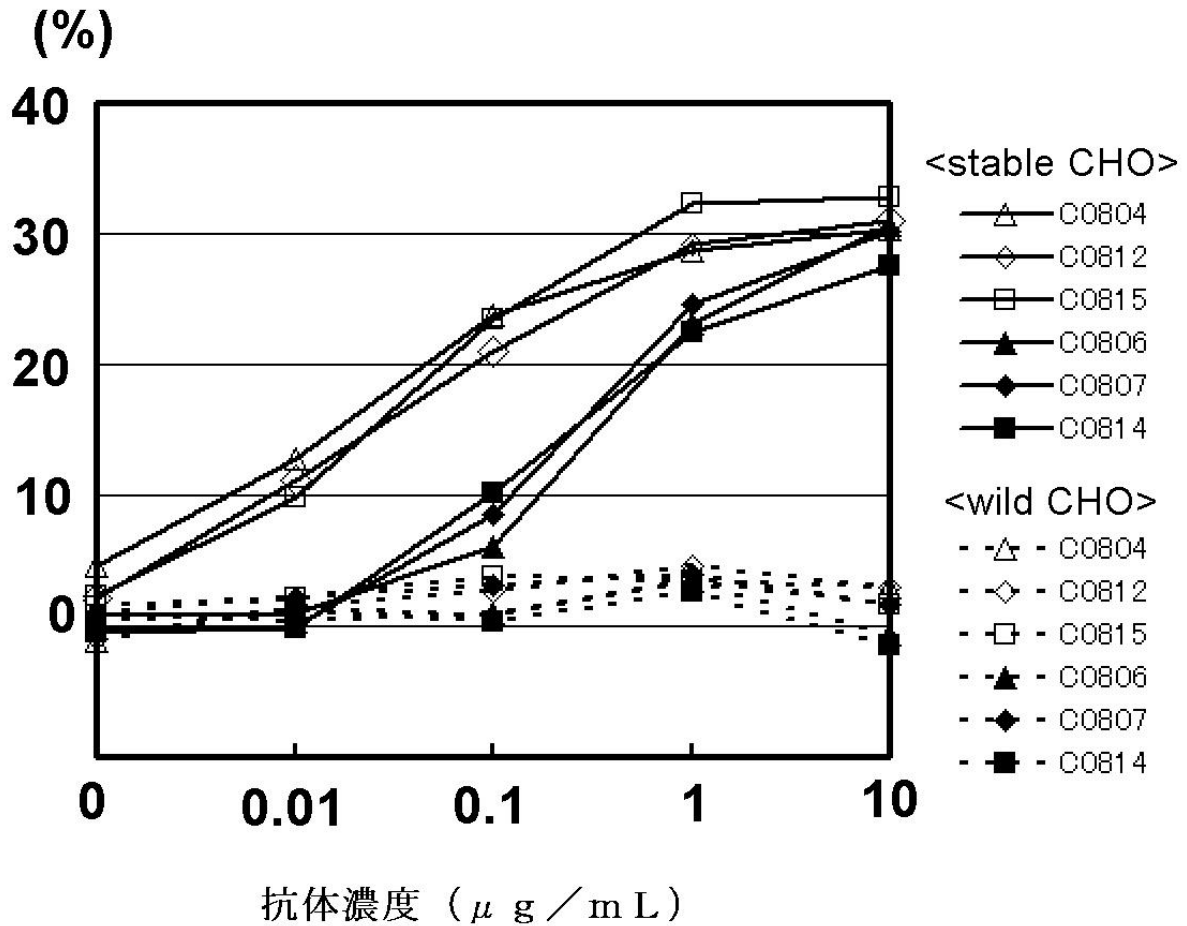


図 13 作製抗体の ADCC 活性

hGPR87 stable CHO 細胞を標的細胞として用いて ADCC 活性を測定した結果、作製抗体(C0804, C0812, C0815, C0806, C0807, C0814)は、ADCC 活性を有することが分かった。横軸:抗体濃度、縦軸:ADCC 活性(%). 標的細胞: hGPR87 stable CHO 細胞(実線)又は wild CHO 細胞(破線)。標的細胞:エフェクター細胞比 1:50。n=2 でその平均値を示した。

	1	開始コドン		50
C0804H-1	AT	GATTGGGTG TGGACCTTGC CATTGCTGAT GGCAGCTGCC	
C0812H-1	GGGAATTCAT	GAAATGCACC TGGGTCTTCC TCTTCTCTCT GTCAGGAACT	
C0815H-2	AT	GCTTGGGTG TGGACCTTGC CATTGCTGAT GGCAGCTGCC	
	51		VH region	100
C0804H-1	CAAAGTATCC	AAGCACAGAT	CCAGTTGGTG CAGTCTGGAC CTGAGCTGAA	
C0812H-1	GCAGGTGTCC	ACTCTGAGGT	CCAGCTGCAA CAGTCTGGAC CTGACCTGGT	
C0815H-2	CAAAGTATCC	AAGCACAGAT	CCAGTTGGTG CAGTCTGGAC CTGAGCTGAA	
	101		CDR1	150
C0804H-1	GAAGCCTGGA	GAGACAGTCA	AGATCTCTCT CAAGGTCTCT	GGTTATACCT
C0812H-1	GAAGCCTGGA	GCTTCAATGA	AGATATCTCT CAAGGCTTCT	GGTTACTCAT
C0815H-2	GAAGCCTGGA	GAGACAGTCA	AGATCTCTCT CAAGGTCTCT	GGTTATACCT
	151			200
C0804H-1	TCACAGACTA	TTCAATGCAC	TGGGTGAAGC AGGCTCCAGG AAAGGGTTTA	
C0812H-1	TCACAGACTA	CACCATGCAC	TGGGTGAAGC AGAGCCATGG AAAGAACTTT	
C0815H-2	TCACAGACTA	TTCAATGCAC	TGGGTGAAGC AGGCTCCAGG AAAGGGTTTA	
	201		CDR2	250
C0804H-1	AAGTGGATG	GCTGGATAAA	CACTGAGACT GGTAAACCAA CATATGCAGA	
C0812H-1	GAGTGGATTG	GACTTATTAA	TCCTTACAAT GATGGTACTA CCTACAACCA	
C0815H-2	AAGTGGATG	GCTGGATAAA	CACTGAGACT GGTAAACCAA CATATGCAGA	
	251			300
C0804H-1	TGACTTCAAG	GGACGGTTTG	CCTTCTCTTT GGAAGCCTCT GCCAGCACTG	
C0812H-1	GAAGTTCAAG	GGCAAGGCCA	CATTAACTGT AGACAAGTCA TCTAGCACAG	
C0815H-2	TGACTTCAAG	GGACGGTTTG	CCTTCTCTTT GGAAGCCTCT GCCAGCACTG	
	301			350
C0804H-1	CCTATTTGCA	GATCAAGAAG	CTCAAAAATG AGGACACGGC TACATATTC	
C0812H-1	CCTACATGGA	GCTGCTGAGT	CTGACATCTG AGGACTCTGC AGTCTATTAC	
C0815H-2	CCTATTTGCA	GATCAACACC	CTCAAAAATG AGGACACGGC TACATATTC	
	351		CDR3	400
C0804H-1	TGTGCCTCAC	TGGACTACTG	GGGCCAAGGC ACCACTCTCA CAGTTTCTTC	
C0812H-1	TGTGCATCAT	TGGACTACTG	GGGTCAAGGA ACCTCAGTCA CCGTCTCCTC	
C0815H-2	TGTGCCTCAC	TGGACTACTG	GGGCCAAGGC ACCACTCTCA CAGTTTCTTC	
	401			450
C0804H-1	AGCCAAAACG	AGACCCCCAC	CCCGTCTATC CACTGGCCCC TGGAAAGCTTG	
C0812H-1	AGCCAAAACG	AGACCCCCAC	CC GTTTATC CCCTGGCCCC TGGAAAGCTTG	
C0815H-2	AGCCAAAACG	AGACCCCCAT	CC GTCTATC CACTGGCCCC TGGAAAGCTTG	
	451			
C0804H-1	GG			
C0812H-1	GG			
C0815H-2	GG			

図 14 H鎖 CDR 付近の DNA 配列

作製抗体(C0804, C0812, C0815)の H 鎖 V 領域(VH region)の配列中、CDR1～CDR3 の DNA 配列。

	1	開始コドン		50
C0804L-1	ACTAGTCGAC	ATGAAGTTGC	CTGTTAGGCT	GTTGGTGCTG ATGTTCTGGA
C0812L-4	ACTAGTCGAC	ATGAAGTTGC	CTGTTAGGCT	GTTGGTGCTG ATGTTCTGGA
C0815L-1CGAC	ATGAAGTTGC	CTGTTAGGCT	GTTGGTGCTG ATGTTCTGGA
	51		VL region	100
C0804L-1	TTCCTGCTTC	GAACAGT	GAT GTTTTGATGA	CCCAAAGTCC ACTCTCCCTG
C0812L-4	TTCCTGCTTC	GAGCAGT	GAT GTTGTGATGA	CCCAAAGTCC ACTCTCCCTG
C0815L-1	TTCCTGCTTC	GAGCAGT	GAT GTTTTGATGA	CCCAAAGTCC ACTCTCCCTG
	101		CDR1	150
C0804L-1	CCTGTCAGTC	TTGGAGATCA	AGCCTCCATC	TCTTGCAGAT CTAGTCAGAA
C0812L-4	CCTGTCAGTC	TTGGAGATCA	AGCCTCCATC	TCTTGCAGAT CTAGTCAGAG
C0815L-1	CCTGTCAGTC	TTGGAGATCA	AGCCTCCATC	TCTTGCAGAT CTAGTCAGAA
	151			200
C0804L-1	CGTTGTACAT	AGTAGTGGAA	ACACCTATTT	AGAA TGGTTC CTGCAGAAAC
C0812L-4	CCTTGTACAC	AGTAGTGGAA	ACACCTATTT	AGAT TGGTAC CTGCAGAAAGC
C0815L-1	CGTTGTACAT	AGTAGTGGAA	ACACCTATTT	AGAA TGGTTC CTGCAGAAAC
	201		CDR2	250
C0804L-1	CAGGCCAGTC	TCCAAAGCTC	CTGATCTACA	AAGTTTCCAG CCGATTTTCT
C0812L-4	CAGGCCAGTC	TCCAAAGCTC	CTGATCTACA	AAGTTTCCAA CCGATTTTCT
C0815L-1	CAGGCCAGTC	TCCAAAGCTC	CTGATCTACA	AAGTTTCCAA CCGATTTTCT
	251			300
C0804L-1	GGGGTCCCAG	ACAGGTTGAG	TGGCAGTGGA	TCAGGGACAG ATTTCACACT
C0812L-4	GGGGTCCCAG	ACAGGTTGAG	TGGCAGTGGA	TCAGGGACAG ATTTCACACT
C0815L-1	GGGGTCCCAG	ACAGGTTGAG	TGGCAGTGGA	TCAGGGACAG ATTTCACACT
	301			350
C0804L-1	CAAGATCAGC	AGAGTGGAGG	CTGAGGATCT	GGGAGTTTAT TACTGCTTTC
C0812L-4	CAAGATCAGC	AGAGTGGAGG	CTGAGGATCT	GGGAGTTTAT TTCTGCTCTC
C0815L-1	CAAGATCAGC	AGAGTGGAGG	CTGAGGATCT	GGGAGTTTAT TACTGCTTTC
	351	CDR3		400
C0804L-1	AAGGTTCAICA	TGTTCCGTAC	ACGTTCCGGAG	GGGGGACCAA GCTGGAAATA
C0812L-4	AAAGTACGCA	TGTTCCGTAC	ACGTTCCGGAG	GGGGGACCAA GCTGGAAATA
C0815L-1	AAGGTTCAICA	TGTTCCGTAC	ACGTTCCGGAG	GGGGGACCAA GCTGGAAATA
	401	VL region		450
C0804L-1	AAACGGGCTG	ATGCTGCACC	AACTGTATCC	ATCTTCCAC CATCCAGTAA
C0812L-4	AAACGGGCTG	ATGCTGCACC	AACTGTATCC	ATCTTCCAC CATCCAGTAA
C0815L-1	AAACGGGCTG	ATGCTGCACC	AACTGTATCC	ATCTTCCAC CATCCAGTAA
	451			
C0804L-1	GCTTGGG			
C0812L-4	GCTTGGG			
C0815L-1	GCTTGGG			

図 15 L鎖 CDR 付近の DNA 配列

作製抗体(C0804, C0812, C0815)のL鎖V領域(VL region)の配列中、CDR1~CDR3のDNA配列。

	1			VH region			50
C0804H-1	MDWVWTL PFL	MAAAQSIQAD	IQLVQSGPEL	KKPGETYKIS	CKVSGYTFTD		
C0812H-1	MECTWVFLFL	LSGTAGVHSE	YQLQQSGPDL	VKPGASMKIS	CKASGYSFTD		
C0815H-2	MAWVWTL PFL	MAAAQSIQAD	IQLVQSGPEL	KNPGETYKIS	CKVSGYTFTD		
	51	CDR1		CDR2			100
C0804H-1	YSMH	WYKQAP	GKGLKWM	AWI NTETGKPTYA	DDFKGRFAFS	LEASASTAYL	
C0812H-1	YTMH	WYKQSH	GKNFEW	IGLI NPYNDGTTYN	QKFKGKATLT	VDKSSSTAYM	
C0815H-2	YSMH	WYKQAP	GKGLKWM	AWI NTETGKPTYA	DDFKGRFAFS	LEASASTAYL	
	101		CDR3		VH region		148
C0804H-1	QINN	LKNEDT	ATYFCASLDY	WGQGTTLTYS	SAKTTPPPRL	STGPWKLG	
C0812H-1	ELLS	LTSEDS	AVYYCASLDY	WGQGSVTYS	SAKTTPPPVY	PLAPGSL.	
C0815H-2	QINT	LKNEDT	ATYFCASLDY	WGQGTTLTYS	SAKTTPPSVY	PLAPGSL.	

図 16 H 鎖 CDR 付近のアミノ酸配列

作製抗体(C0804, C0812, C0815)の H 鎖 V 領域(VH region)の配列中、CDR1～CDR3 のアミノ酸配列。

	1			VL region			CDR1	50
C0804L-1	MKLPVRLLYL	MFWIPASNSD	VLMTQTPLSL	PVSLGDQASI	SC	RSSQNVVH		
C0812L-4	MKLPVRLLYL	MFWIPASSSD	VVMTQTPLSL	PVSLGDQASI	SC	RSSQSLVH		
C0815L-1	MKLPVRLLYL	MFWIPASSSD	VLMTQTPLSL	PVSLGDQASI	SC	RSSQNVVH		
	51			CDR2				100
C0804L-1	SSGNTYLEWF	LQKPGQSPKL	LIYKVSTRFS	GVPDRFSGSG	SGTDFTLKIS			
C0812L-4	SSGNTYLHWY	LQKPGQSPKL	LIYKVSNRFS	GVPDRFSGSG	SGTDFTLKIS			
C0815L-1	SSGNTYLEWF	LQKPGQSPKL	LIYKVSNRFS	GVPDRFSGSG	SGTDFTLKIS			
	101		CDR3		VL region			149
C0804L-1	RVEAEDLGYY	YCFQGSHVPY	TFGGGTKLEI	KRADAAPTYS	IFPPSSKLG			
C0812L-4	RVEAEDLGYY	FCSQSTHVPY	TFGGGTKLEI	KRADAAPTYS	IFPPSSKLG			
C0815L-1	RVEAEDLGYY	YCFQGSHVPY	TFGGGTKLEI	KRADAAPTYS	IFHHPVSL.			

図 17 L 鎖 CDR 付近のアミノ酸配列

作製抗体(C0804, C0812, C0815)のL鎖V領域(VL region)の配列中、CDR1~CDR3のアミノ酸配列。

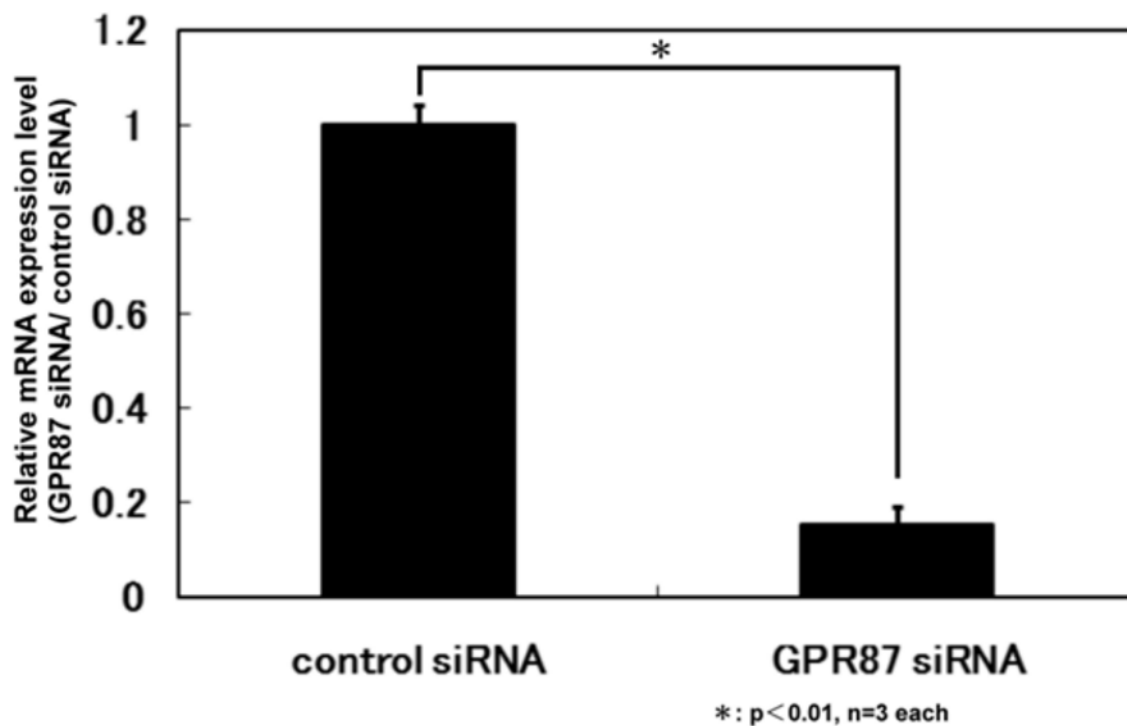


図 18 Me180 細胞における siRNA による hGPR87 発現レベルの低下

hGPR87 に対する siRNA をトランスフェクションした場合、control siRNA をトランスフェクションした場合と比較して、トランスフェクションから 24 時間後の Me180 細胞における hGPR87 発現レベルが 15.4% にノックダウンされた。縦軸：Me180 細胞に control siRNA をトランスフェクションした場合の hGPR87 発現レベルの平均を 1 とした時の相対的な hGPR87 発現レベル。ヒト Cyclophilin A の発現量で標準化した。n=3 で平均値と標準偏差を示した。2 標本 t 検定 (p<0.01) により、有意差があった。

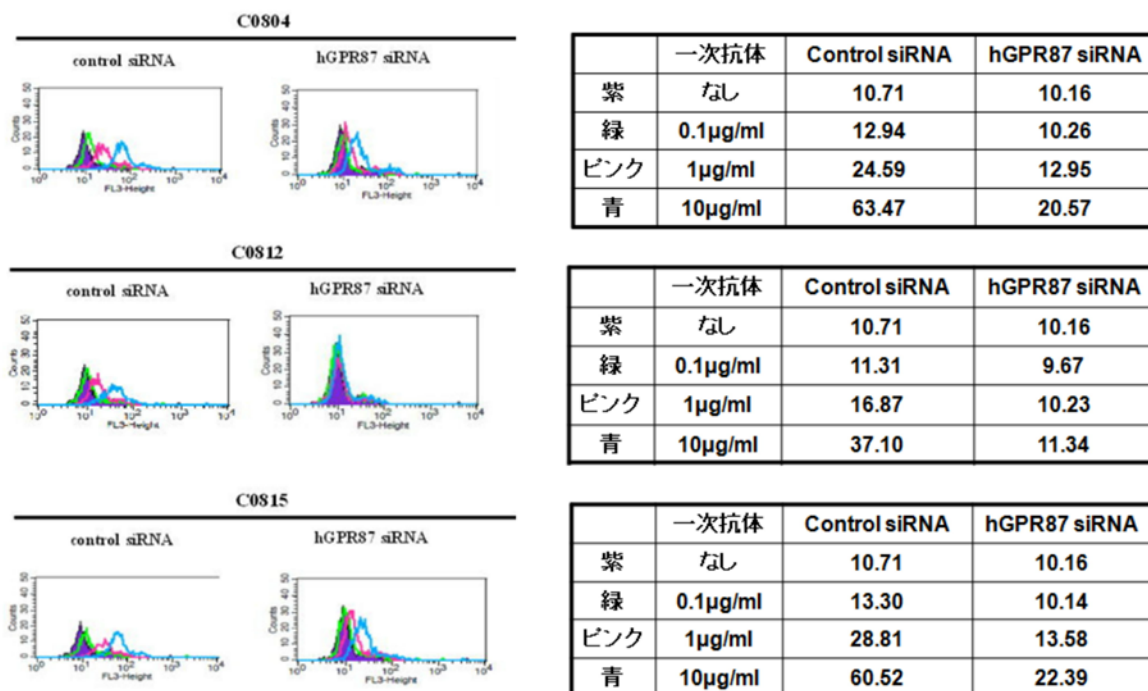


図 19 hGPR87 ノックダウン Me180 細胞における
作製抗体によるフローサイトメトリー

作製抗体(C0804, C0812, C0815)では、hGPR87 を siRNA によってノックダウンした場合、スペクトルのシフトが減少した。横軸:蛍光強度、縦軸:細胞数。control siRNA は、control siRNA をトランスフェクションしてから 24 時間後の Me180 細胞の結果を、hGPR87 siRNA は、hGPR87 に対する siRNA をトランスフェクションしてから 24 時間後の Me180 細胞の結果を示す。一次抗体を加えなかった場合(紫)、及び、一次抗体濃度が final 0.1(緑), 1(ピンク), 10µg/mL (水色)の場合のスペクトル。

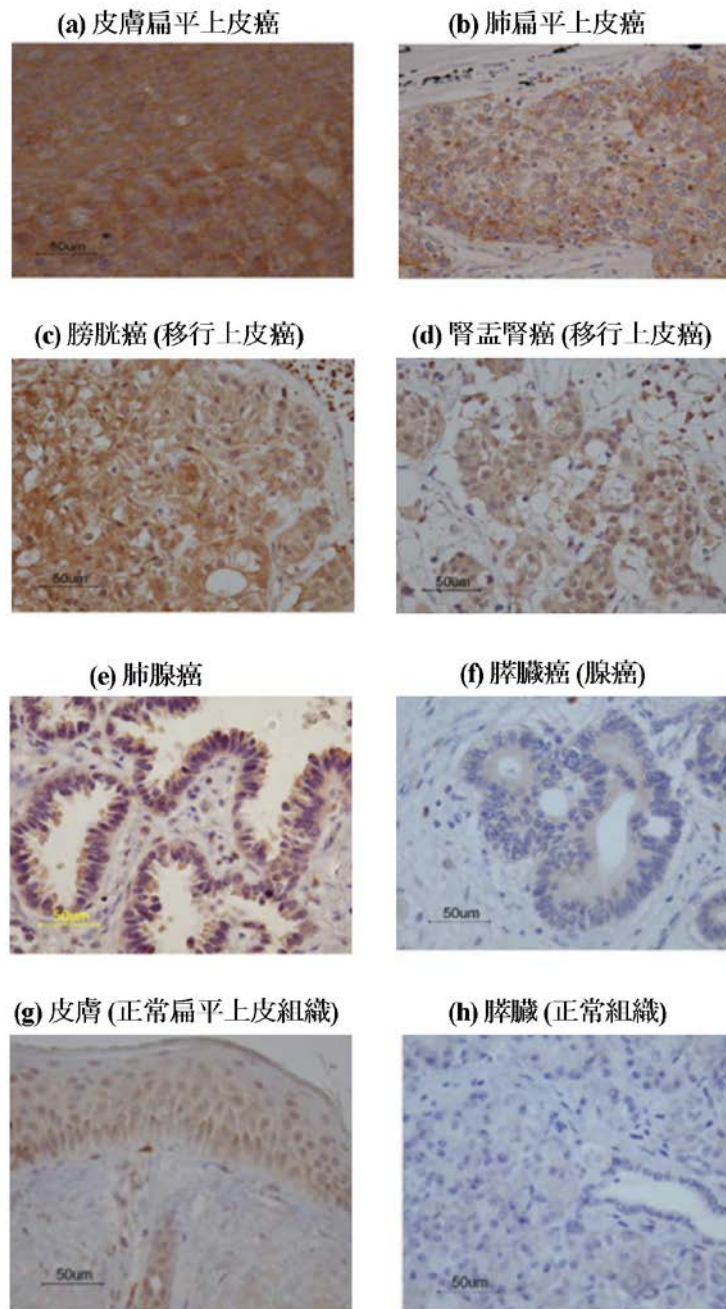
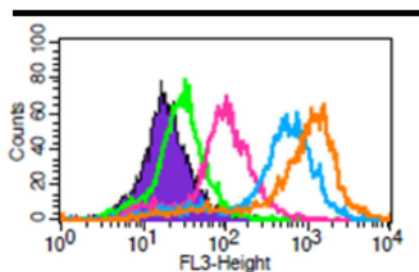


図 20 作製抗体 C0804 による免疫組織染色

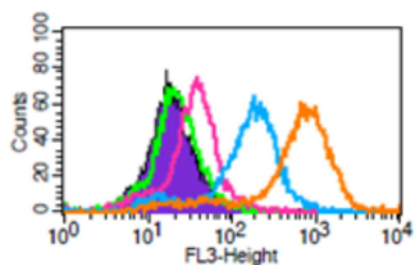
扁平上皮癌、移行上皮癌で陽性所見がみられた。腺癌では、肺腺癌で弱陽性、膵臓癌で陰性～弱陽性であった。正常組織では、皮膚扁平上皮に弱陽性像がみられたほかは陰性であった。ホルマリン固定、パラフィン切片、DAB 法。使用抗体:C0804(final 10µg/mL)。

C0804



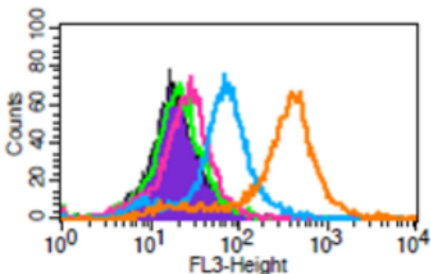
	一次抗体濃度	GeoMean
紫	0 μg/mL	18.32
緑	0.01 μg/mL	26.31
ピンク	0.1 μg/mL	82.59
水色	1 μg/mL	405.23
オレンジ	10 μg/mL	731.22

C0804:DOTA=1:10



	一次抗体濃度	GeoMean
紫	0 μg/mL	18.32
緑	0.01 μg/mL	19.77
ピンク	0.1 μg/mL	31.91
水色	1 μg/mL	136.23
オレンジ	10 μg/mL	527.72

C0804:DOTA=1:20



	一次抗体濃度	GeoMean
紫	0 μg/mL	18.32
緑	0.01 μg/mL	19.28
ピンク	0.1 μg/mL	23.46
水色	1 μg/mL	58.90
オレンジ	10 μg/mL	277.46

図 21 作製抗体 C0804 の DOTA 化に伴う親和性低下

C0804 のみ、又は、1:10、1:20 の混合比率で C0804 を DOTA 化し、hGPR87 stable CHO 細胞のフローサイトメトリーを行った結果、DOTA の比率の増加に伴い、C0804 の親和性が低下した。横軸:蛍光強度、縦軸:細胞数。一次抗体を加えなかった場合(紫)、及び、一次抗体濃度が final 0.01(緑), 0.1(ピンク), 1(水色), 10μg/mL(オレンジ)の場合のスペクトル。

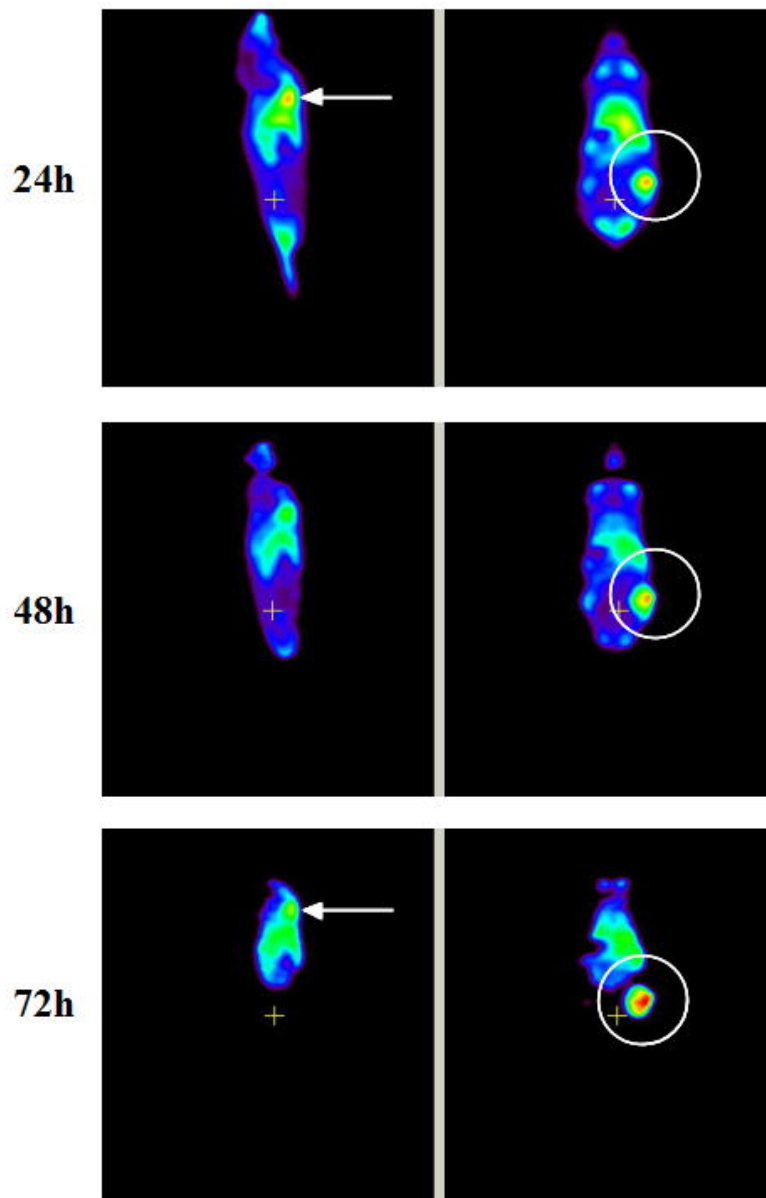


図 22 ^{64}Cu 標識化 C0804 による

wild/stable CHO 移植マウスの PET イメージング

心プール集積は ^{64}Cu -C0804 投与後 24 時間以降減少したのに対し(矢印)、hGPR87 stable CHO 移植部では 24~72 時間で経時的に集積が増加した(囲み部)。背側から見た再構成像で、上側が頭側。左図：矢状断面、右図：水平前頭断面。左下腹部：wild CHO 移植(224.3mm^3)、右下腹部：hGPR87 stable CHO 移植(417.7mm^3)、抗体:DOTA=1:10。

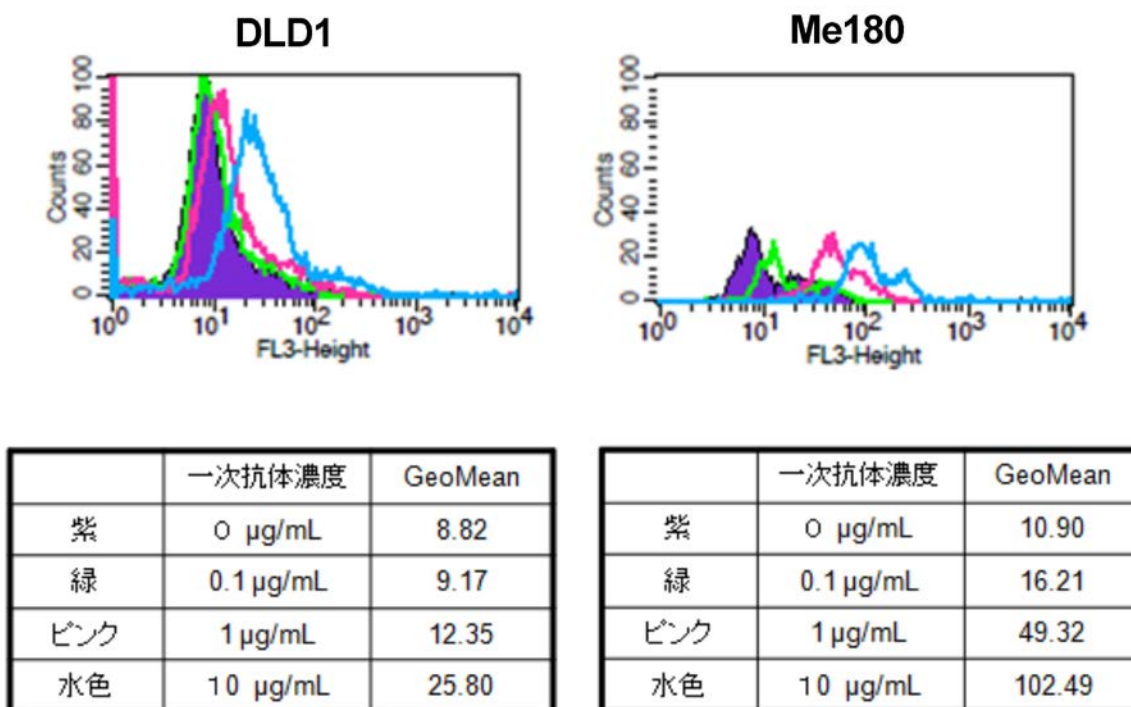


図 23 作製抗体 C0804 による

DLD1 細胞及び Me180 細胞のフローサイトメトリー

大腸腺癌培養細胞株 DLD1 ではスペクトルのシフトがほとんど観察されなかったのに対し、子宮頸癌培養細胞株 Me180 では一次抗体の濃度依存的にスペクトルがシフトした。横軸: 蛍光強度、縦軸: 細胞数。一次抗体を加えなかった場合(紫)、及び、一次抗体濃度が final 0.1(緑), 1(ピンク), 10µg/mL (水色)の場合のスペクトル。使用抗体 : C0804。

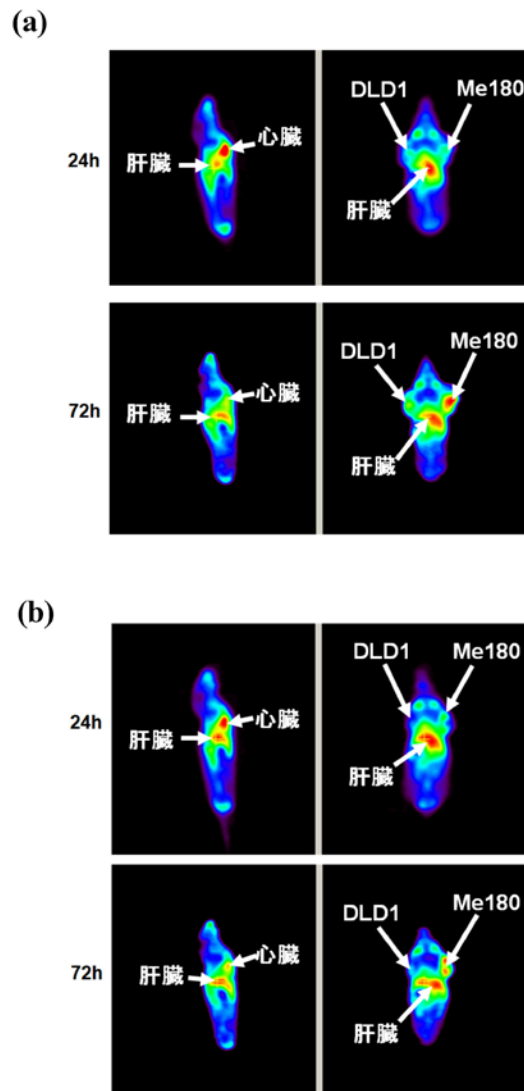


図 24 ^{64}Cu 標識化 C0804 による

DLD1/Me180 担癌モデルマウスの PET イメージング

(a)及び(b)のイメージングにおいて、心プール集積は ^{64}Cu -C0804 投与後 24→72 時間で減少し、肝集積は 24 時間と 72 時間でほぼ同等であったのに対し、Me180 移植部では DLD1 移植部に比べ投与後 72 時間での集積が高かった。背側から見た再構成像で、上側が頭側。左図：矢状断面、右図：水平前頭断面。
 (a)左肩部：DLD1 移植($1,740\text{mm}^3$)、右肩部：Me180 移植(329.0mm^3)、(b)左肩部：DLD1 移植(188.9mm^3)、右肩部：Me180 移植(574.9mm^3)。抗体:DOTA=1:10。

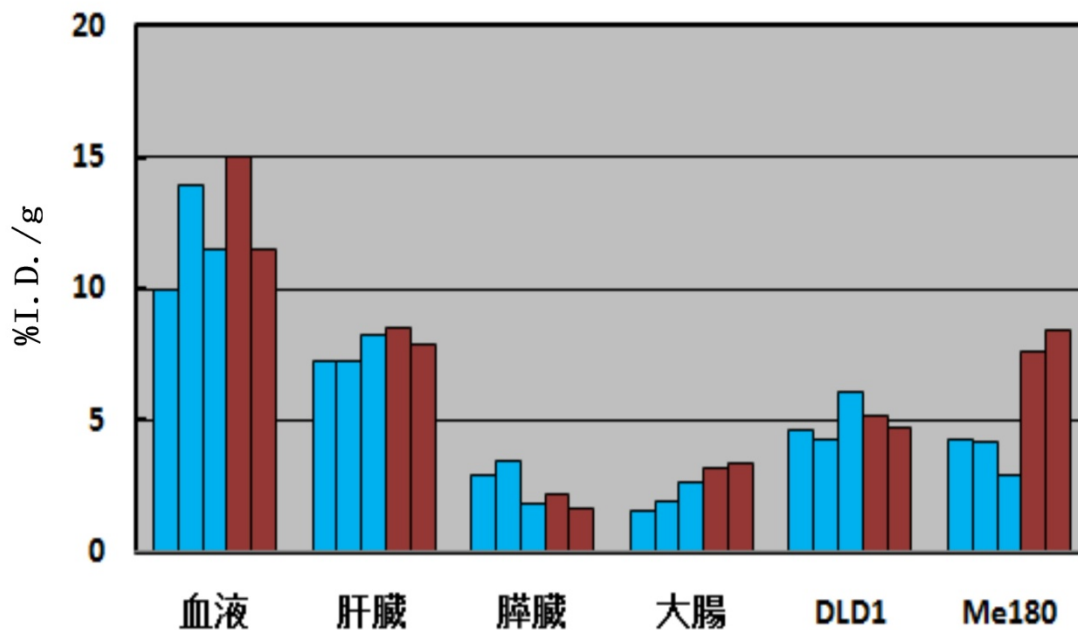


図 25 DLD1/Me180 担癌モデルマウスにおける ^{64}Cu 標識化 C0804 の体内分布
 投与から約 72 時間後に解剖により得られた ^{64}Cu 標識化抗体の体内分布。DLD1
 移植部では ^{64}Cu -negative control IgG1 を投与した場合(水色、n=3)と ^{64}Cu -C0804
 を投与した場合(赤色、n=2)とで値がほとんど変わらなかったのに対し、Me180
 移植部では ^{64}Cu -C0804 を投与した場合の値が高かった。血液プール、肝プール
 は両者とも高かった。 ^{64}Cu -negative control IgG1 投与個体はそれぞれ投与の 69,
 70, 71 時間後、 ^{64}Cu -C0804 投与個体はそれぞれ投与の 72, 75 時間後に安楽死さ
 せ、各臓器を摘出した。抗体:DOTA=1:10。

表 1 siRNA に用いたプライマーの塩基配列

遺伝子	増幅部位	プライマーの塩基配列	
human Cyclophilin A	190-368	FW	ttc gtg ctc tga gca ctg gag a
		RV	gga ccc gta tgc ttt agg atg gag
hGPR87	245-394	FW	cca gcc acc aca atg aaa g
		RV	tgg taa ttt tgc aag cgt ca

表 2 抗体のアイソタイプ

抗体	サブクラス (重鎖)	軽鎖
C0804	IgG1	κ
C08012	IgG1	κ
C0815	IgG1	κ
C0806	IgG1	κ
C0807	IgG1	κ
C0814	IgG1	κ

表 3 作製抗体 C0804 の評価

種類	抗 hGPR87 マウスモノクローナル抗体
アイソタイプ	IgG1, κ
エピトープ	hGPR87 全長中、N 末端側 9～23 番目の領域
mGPR87 との交差性	なし
ADCC 活性	あり
CDR 領域の DNA 配列	配列情報あり
フローサイトメトリー	hGPR87 stable CHO 細胞、Me180(子宮頸癌培養細胞株)で利用できる。
細胞染色、免疫組織染色	利用できる。
ウェスタンブロット	<ul style="list-style-type: none"> ・hGPR87 の N 末端側細胞外領域と GST との融合タンパク質を大腸菌で発現させた場合、hGPR87 全長を組換えバキュロウイルスで発現させた場合、wild CHO に FLAG-hGPR87/pIRES-EGFP をトランジェントでトランスフェクションした場合、hGPR87 を認識できる。 ・hGPR87 stable CHO 細胞及び Me180(子宮頸癌培養細胞株)での発現量では hGPR87 を認識できない。
ELISA	<ul style="list-style-type: none"> ・ hGPR87 stable CHO 細胞を用いた cell ELISA には利用できる。 ・ hGPR87 の N 末端から 9～23 番目の合成ペプチドを用いたペプチド ELISA には使用できない。

表 4 作製抗体 C0804 による各癌の免疫組織染色結果（まとめ）

ヒト癌組織		評価	n	陽性率
皮膚癌	扁平上皮癌（有棘細胞癌）	+++	7	100%
	基底細胞癌	+	7	100%
	メラノーマ（悪性黒色腫）	++	7	100%
頭頸部癌	舌癌（扁平上皮癌）	+++	6	100%
	咽頭癌（扁平上皮癌）	+++	4	100%
	喉頭癌（扁平上皮癌）	+++	7	100%
肺癌	扁平上皮癌	+++	16	81%
	腺癌	++	6	66%
	小細胞癌	+	5	60%
	大細胞癌	-	4	0%
	カルチノイド腫瘍	-	4	0%
食道癌	扁平上皮癌	+	10	80%
	腺癌	+	5	90%
胃癌	腺癌	-	5	0%
大腸癌	腺癌	-	35	0%
膵癌	管状腺癌	- ~ ±	35	0%
乳癌	腺癌	- ~ ±	44	0%
卵巣癌		-	36	0%
子宮癌	子宮頸癌（扁平上皮癌）	+	10	80%
	子宮内膜癌（腺癌）	+	9	100%
腎癌	腎細胞癌（腺癌）	-	16	0%

	腎盂腎癌（移行上皮癌）	++	8	100%
膀胱癌	移行上皮癌	+++	6	100%
	腺癌	±	5	0%
前立腺癌	腺上皮癌	±	10	0%

表 5 作製抗体 C0804 による正常組織又は癌組織非癌部の免疫組織染色結果
(まとめ)

皮膚	扁平上皮組織	±
肺	気管支上皮細胞	+
	肺胞	—
食道	扁平上皮細胞	±
	腺上皮細胞	±
大腸	粘膜上皮細胞	—～±
子宮	子宮頸癌（扁平上皮癌）非癌部	—～±
	子宮腺癌非癌部	—～±
膵臓	腺房細胞、ランゲルハンス細胞	—～±

引用文献

1. World Health Organization, "Cancer", Fact sheet No.297 (February 2009).
7. Lauren G. Collins, M.D., Christopher Haines, M.D., Robert Perkel, M.D., and Robert E. Enck, M.D. Lung cancer: Diagnosis and management. *American Family Physician*. Volume 75, Number 1, 2007: 56-63.
3. Yusuke Oji, Yayoi Kitamura, Eriko Kamino, Aiko Kitano, Noriyoshi Sawabata, Masayoshi Inoue, Masahide Mori, Shin-ichi Nakatsuka, Nao Sakaguchi, Kaori Miyazaki, Michiyo Nakamura, Ikuyo Fukuda, Junya Nakamura, Naoya Tatsumi, Tetsuya Takakuwa, Sumiyuki Nishida, Toshiaki Shirakata, Naoki Hosen, Akihiro Tsuboi, Riichiro Nezu, Hajime Maeda, Yoshihiro Oka, Ichiro Kawase, Katsuyuki Aozasa, Meinoshin Okumura, Shinichiro Miyoshi and Haruo Sugiyama. WT1 IgG antibody for early detection of nonsmall cell lung cancer and as its prognostic factor. *Int. J. Cancer*. 125, 381-387 (2009).
4. Bastarrika G, Garcia-Velloso MJ, Lozano MD, Montes U, Torre W, Spiteri N, Campo A, Seijo L, Alcaide AB, Pueyo J, Cano D, Vivas I, et al. Early lung cancer detection using spiral computed tomography and positron emission tomography. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:1378-83.
5. Kris MG, Natale RB, Herbst RS, et al. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with nonsmall cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA* 2003;290:2149-58.
6. Tetsuya Mitsudomi, Takayuki Kosaka, Hideki Endoh, Yoshitsugu Horio, Toyoaki Hida, Shoichi Mori, Shunzo Hatooka, Masayuki Shinoda, Takashi Takahashi, and Yasushi Yatabe. Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene Predict

Prolonged Survival After Gefitinib Treatment in Patients With Non–Small-Cell Lung Cancer With Postoperative Recurrence. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*. 23: 11: 2513-2520, 2005.

7. Alan N. Houghton & David A. Scheinberg. Monoclonal antibody therapies-a 'constant' threat to cancer. *Nature Medicine* Volume 6 Number 4 April 2000: 443-446.

8. Martin J. Glennie and Jan G.J. van de Winkel. Renaissance of cancer therapeutic antibodies. *Drug Discovery Today*. Vol. 8, No.11 June 2003: 503-510.

9. Bohdiewcs PJ. Indium-111 satumomab pendetide: the first FDA-approved monoclonal antibody for tumor imaging. *J Nucl Med Technol* 26(3):155-163,1998.

10. Hladik P, Vizda J, Bedrna J, Simkovic D, Strnad L, Smejkal K, Voboril Z. Immunoscintigraphy and intra-operative radioimmuno detection in the treatment of colorectal carcinoma. *Colorectal Dis* 3:380-386,2001.

11. Fuster D, Maurel J, Muxi A, Setoain X, Ayuso C, Martin F, Ortega ML, Fuertes S, Pons F. Is there a role for (99m)Tc-anti-CEA monoclonal antibody imaging in the diagnosis of recurrent colorectal carcinoma? *Q J Nucl Med* 47(2) :109-115, 2003.

12. Breitz HB, Tyler A, Bjorn MJ, Lesley T, Weiden PL. Clinical experience with Tc-99m noftumomab merpentan (Verluma) radioimmunoscintigraphy. *Clin Nucl Med* 22(9):615-620.

13. Han M, Partin AW. Current clinical application of the In-capromab pendetide scan (ProstaScint(R) Scan, Cyt-356). *Rev Urol*3(4):165-171, 2001.

14. Makiko Yamashita, Yoshinori Katakura and Sanetaka Shirahata. Recent advances in the generation of human monoclonal antibody. *Cytotechnology* (2007) 55:55-60.

15. Gabriel N. Hortobagyi, M.D. Trastuzumab in the treatment of breast cancer. *The New England Journal of Medicine*. October 20, 2005: 1734-1736.

16. Neil L. Spector and Kimberly L. Blackwell. Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2009; 27: 5838-5847.
17. W. Bou-Assaly, S. Mukherji. Cetuximab (Erbix). *AJNR AM J Neuroradiol* 2010; 31: 626-27.
18. S.K. Mukherji. Bevacizumab (Avastin). *AJNR AM J Neuroradiol* 2010; 31: 235-36.
19. Madhi Saranadasa, Eunice S. Wang. Vascular endothelial growth factor inhibition: Conflicting roles in tumore growth. *Cytokine* (2010), doi: 10.1016./j.cyto.2010.06.012.
20. Sandler AB, Gray R, Brahmer J, Dowlati A, Schiller JH, Perry MC, et al. Randomized phase II/III trial of paclitaxel (P) plus carboplatin (C) with or without bevacizumab (NSC # 704865) in patients with advanced non-squamous non-small cell lung cancer (NSCLC): an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) trial—E4599. Accessed October 6, 2006, at: <http://www.asco.org/portal/site/ASCO/menuitem>.
21. Kristen L. Pierce, Richard T. Premont and Robert J. Lefkowitz. Seven-transmembrane receptors. *Molecular Cell Biology*. Volume 3; September 2002: 639-650.
22. Timo Wittenberger, H. Chica Schaller and Susanne Hellebrand. An expressed sequence tag (EST) data mining strategy succeeding in the discovery of new G-protein coupled receptors. *J.Mol.Biol.* (2001) 307, 799-813.
23. Ken-ichi Tabata, Kiyoshi Baba, Akira Shiraishi, Masahiro Ito, Norihisa Fujita. The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys. Res. Commun.* (2007), doi:10.1016/j.bbrc.2007.09.063.

24. Ji Woong Choi, Deron R. Herr, Kyoko Noguchi, Yun C. Yung, Chang-Wook Lee, Tetsuji Mutoh, Mu-En Lin, Siew T. Teo, Kristine E. Park, Alycia N. Mosley, and Jerold Chun. LPA receptors: Subtypes and biological actions. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2010. 50: 157-86.
25. Mathias Gugger, Richard White, Susan Song, Bea Waser, Renzo Cescato, Pierre Riviere and Jean Claude Reubi. GPR87 is an overexpressed g-protein coupled receptor in squamous cell carcinoma of the lung. *Disease Markers* 24 (2008) 41-50.
26. Sebastian Glatt, Daniel Halbauer, Stefan Heindl, Andreas Wernitznig, Daniela Kozina, Kuan-Chung Su, Christina Puri, Pilar Garin-Chesa and Wolfgang Sommergruber. hGPR87 contributes to viability of human tumor cells. *Int. J. Cancer*:122, 2008-2016 (2008).
27. Yanhong Zhang, Yingjuan Qian, Wenfu Lu, and Xinbin Chen. The G protein-coupled receptor 87 is necessary for p53-dependent cell survival in response to genotoxic stress. *Cancer Res* 2009,69(15): OF1-8.
28. Yanhong Zhang, Ariane Scoumanne and Xinbin Chen. G protein-coupled receptor 87: A promising opportunity for cancer drug discovery. *Mol Cell Pharmacol* 2010;2(3):111-116.
29. Kristina K. Peachman, Mangala Rao, and Carl R. Alving. Immunization with DNA through the skin. *Methods* 31 (2003) 232-242.
30. Harriet L. Robinson and Tamera M. Pertmer. Nucleic acid immunizations. *Current Protocols in Immunology* UNIT 2.14.
31. Robert T. Dorsam and J. Silvio Gutkind. G-protein-coupled receptor and cancer. *Cancer* Volume 7; February 2007: 79-94.
32. Gordon B. Mills and Wouter H. Moolenaar. The emerging role of lysophosphatidic

acid in cancer. *Cancer* Volume 3; August 2003: 582-591.

33. Yuka Sasaki, Hiromichi Kosaka, Katsuaki Usami, Hiroe Toki, Hironori Kawai, Norihiko Shiraishi, Toshio Ota, Kazuyasu Nakamura, Akiko Furuya, Mitsuo Satoh, Kazumasa Hasegawa, Kazuhiro Masuda. Establishment of a novel monoclonal antibody against LGR5. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 394 (2010) 498–502.

34. Hannah Jörißen, Nuran Bektas, Edgar Dahl, Arndt Hartmann, Anette ten Haaf, Stefano Di Fiore, Hans Kiefer, Andreas Thess, Stefan Barth and Torsten Klockenbring. Production and characterisation of monoclonal antibodies against RAI3 and its expression in human breast cancer. *BMC Cancer* 2009, 9:200 doi:10.1186/1471-2407-9-200.

35. David E. Elder M.B., Ch.B., F.R.C.P.A. Skin cancer, Melanoma and other specific nonmelanoma skin cancers. *Cancer*.1995;75:245-56.

36. Rudiger Greinert. Skin cancer: New Markers for better prevention. *Pathology*.2009;76:64-81.

37. Weining Zhen, MD, Lucy H. Karnell, PhD, Henry T. Hoffman, MD, Gerry F. Funk, MD, John M. Buatti, MD, Herman R. Menck, MBA. The national cancer data base report on squamous cell carcinoma of the base of tongue. *HEAD&NECK*. August 2004: 660-674.

38. Jay S. Cooper, MD, Kim Porter, MPH, Katherine Mallin, PhD, Henry T. Hoffman, MD, Randal S. Weber, MD, Kian K. Ang, MD, PhD, E. Greer Gay, RN, PhD, MPH, Corey J. Langer, MD. National cancer database report on the head and neck: 10-year update. *HEAD&NECK*.-DOI 10.1002/hed June 2009: 748-758.

39. Eric Elton, MD. Esophageal Cancer. *Dis Mon* 2005; 51: 664-684.

40. W.A.A. Tjalma, T.R. Van Waes, L.E.M. Van den Eeden and J.J.P.M. Bogers. Role of human papillomavirus in the carcinogenesis of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. Vol. 19, No.4, pp.469-483, 2005.
41. Donald S. Kaufman, William U. Shipley, Adam S. Feldman. Bladder cancer. *Lancet* 2009; 374: 239-49.
42. Leonard G Presta. Molecular engineering and design of therapeutic antibodies. *Current Opinion in Immunology* 2008, 20: 460-470.
43. Fortunato Ciardiello, Rosa Caputo, Roberto Bianco, Vincenzo Damiano, Grazia Pomatico, Stefano Pepe, A. Raffaele Bianco, Sudhir Agrawal, John Mendelsohn, Giampaolo Tortora. Cooperative Inhibition of Renal Cancer Growth by Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibody and Protein Kinase A Antisense Oligonucleotide. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 90, No. 14, July 15, 1998.
44. Gang Niu, Xilin Sun, Qizhen Cao, Donald Courter, Albert Koong, Quynh-Thu Le, Sanjiv Sam Gambhir, and Xiaoyuan Chen. Cetuximab-Based Immunotherapy and Radioimmunotherapy of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2010;16:2095-2105.
45. Manuel J. Koppe, Ernst J. Postema, Frits Aarts, Wim J.G. Oyen, Robert P. Bleichrodt and Otto C. Boerman. Antibody-guided radiation therapy of cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 24: 539–567, 2005.
46. Marcus R. Use of ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan in non-Hodgkin's lymphoma. *Seminars in Oncology*. 2005 Feb; 32(1 Suppl 1):S36-43.
47. Diagnostic imaging prior to ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan (Zevalin) treatment in

follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Hell J Nucl Med* 2008;11:12–15.

48. R. Edward Coleman. Single Photon Emission Computed Tomography and Positron Emission Tomography in Cancer Imaging. *CANCER* February 15 Vol. 67 Supplement 1261-1270 1991.

49. Shiloh M. Martin, Robert T. O'Donnell, David L. Kukis, Craig K. Abbey, Hayes McKnight, Julie L. Sutcliffe, Joseph M. Tuscano. Imaging and Pharmacokinetics of ^{64}Cu -DOTA-HB22.7 Administered by Intravenous, Intraperitoneal, or Subcutaneous Injection to Mice Bearing Non-Hodgkin's Lymphoma Xenografts. *Mol Imaging Biol* (2009) 11:79-87.

50. Weibo Cai & Kai Chen & Lina He & Qizhen Cao & Albert Koong & Xiaoyuan Chen. Quantitative PET of EGFR expression in xenograft-bearing mice using ^{64}Cu -labeled cetuximab, a chimeric anti-EGFR monoclonal antibody. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2007) 34:850–858.

51. Bishnuhari Paudyal, Pramila Paudyal, Noboru Oriuchi, Hirofumi Hanaoka, Hideyuki Tominaga and Keigo Endo. Positron emission tomography imaging and biodistribution of vascular endothelial growth factor with ^{64}Cu -labeled bevacizumab in colorectal cancer xenografts. *Cancer Sci* 2011; 102: 117–121.

52. Sato K, Tsuchiya M, Saldanha J, Koishihara Y, Ohsugi Y, Kishimoto T, Bendig MM Humanization of a mouse anti-human interleukin-6 receptor antibody comparing two methods for selecting human framework regions. *Molecular immunology*, Vol. 31, No. 5, pp, 371-381, 1994.

53. Tove Olafsen, David Betting, Vania E. Kenanova, Felix B. Salazar, Pat Clarke, Jonathan Said, Andrew A. Raubitschek, John M. Timmerman, and Anna M. Wu. Recombinant Anti-CD20 Antibody Fragments for Small-Animal PET Imaging of

B-Cell Lymphomas. *J Nucl Med* 2009; 50:1500–1508.

54. Louis A. Clark, P. Ann Boriack-Sjodin, John Eldredge, Christopher Fitch, Bethany Friedman, Karl J.M. Hanf, Matthew Jarpe, Stefano F. Liparoto, You Li, Alexey Lugovskoy, Stephan Miller, Mia Rushe, Woody Sherman, Kenneth Simon and Herman Van Vlijmen. Affinity enhancement of an in vivo matured therapeutic antibody using structure-based computational design. *Protein Science* (2006), 15:949–960.

55. Anna M. Wu, Paul J. Yazaki, Shih-wa Tsai, Khoi Nguyen, Anne-Line Anderson, Deborah W. McCarthy, Michael J. Welch, John E. Shively, Lawrence E. Williams, Andrew A. Raubitschek, Jeffrey Y. C. Wong, Tatsushi Toyokuni, Michael E. Phelps, and Sanjiv S. Gambhir. High-resolution microPET imaging of carcinoembryonic antigen-positive xenografts by using a copper-64-labeled engineered antibody fragment. *PNAS* July 18, 2000 vol. 97 no. 15 8495–8500.

56. Douglas W. Schneider, Tara Heitner, Bruno Aliche, David R. Light, Kirk McLean, Noboru Satozawa, Gordon Parry, Jeongsoo Yoo, Jason S. Lewis, and Renate Parry. In Vivo Biodistribution, PET Imaging, and Tumor Accumulation of ⁸⁶Y- and ¹¹¹In-Antimindin/RG-1, Engineered Antibody Fragments in LNCaP Tumor-Bearing Nude Mice. *J Nucl Med* 2009; 50:435–443.

57. Robert M. Sharkey, Habibe Karacay, Gary L. Griffiths, Thomas M. Behr, Rosalyn D. Blumenthal, M. Jules Mattes, Hans J. Hansen, and David M. Goldenberg. Development of a streptavidin-anti-carcinoembryonic antigen antibody, radiolabeled biotin pretargeting method for radioimmunotherapy of colorectal cancer. Studies in a human colon cancer xenograft model. *Bioconjugate Chem.* 1997, 8, 595-604.

特許出願

PCT/JP2010/001112

発明の名称「新規モノクローナル抗体、並びにその使用」

優先日：2009年2月20日、出願日：2010年2月20日

謝辞

東京大学先端科学技術研究センター児玉龍彦教授、浜窪隆雄教授、油谷浩幸教授、望月康弘准教授、先浜俊子准教授、岩成宏子助教、渡辺亮博士、杉山暁博士、三原誠氏、菅康祐実験助手、新潟大学医歯学総合研究科細胞機能講座内藤眞教授、大橋瑠子助教、姜淑英研究員、東京大学人体病理深山正久教授、東京大学医学部附属病院放射線科百瀬敏光准教授、株式会社ペルセウスプロテオミクス須藤幸夫氏、松浦正氏、佐藤広一氏、中田淑子氏、富士フィルムR I ファーマ株式会社日野明弘氏はじめ、本研究をご指導・ご助言頂きました方々に、心から感謝致します。