

# 博士論文

論文題目 がん間質の不溶性フィブリンを標的とした  
がん分子イメージング薬剤開発の基礎研究

氏 名 生内 寿文

# 目次

要旨

序論

第一章 実験系の構築 低分子化抗不溶性フィブリン抗体作製と動物モデルの選定

1-1 諸言

1-2 方法

1-2-1 大腸菌による 102-10 scFv の発現と精製

1-2-2 多段階透析法による変性 102-10 scFv の巻き戻し

1-2-3 SDS-PAGE とウエスタンブロッティング

1-2-4 102-10 IgG 作製

1-2-5 102-10 Fab 作製

1-2-6 ELISA による抗フィブリン抗体の結合活性確認

1-2-7 ヒトがん細胞株培養

1-2-8 ヒトがん細胞株皮下移植モデルマウス作製

1-2-9 ヒト膵がん細胞株同所移植モデルマウス作製

1-2-10 膵がん自然発症三重変異モデルマウス作製

1-2-11 病理組織凍結切片作製とヘマトキシリン・エオジン染色

1-2-12 免疫組織化学染色

1-2-13 蛍光 *in vivo* イメージング

1-2-14 蛍光 *ex vivo* イメージング

1-3 結果

1-3-1 102-10 scFv の作製と活性確認

1-3-2 102-10 Fab の作製と活性確認

1-3-3 ヒトがん細胞株皮下腫瘍モデルマウスによる評価

1-3-4 ヒト膵がん細胞株同所移植モデルマウスによる評価

1-3-5 三重変異膵がん自然発症モデルマウスによる評価

1-3-6 各種モデルマウスの腫瘍組織像と不溶性フィブリン沈着

1-4 考察

## 第二章 抗不溶性フィブリン 102-10 Fab によるがん分子イメージング

2-1 諸言

2-2 方法

2-2-1 表面プラズモン共鳴解析

2-2-2 腫瘍組織内の 102-10 Fab 分布とフィブリン沈着の局在観測

2-2-3 フィブリンゲル濁度測定

2-2-4 マウス血小板の調製

2-2-5 フローサイトメトリーによる活性化血小板測定

2-2-6 血液凝固関連因子計測

2-2-7 統計解析

2-3 結果

2-3-1 102-10 Fab の作製と表面プラズモン共鳴解析による結合能評価

2-3-2 三重変異膵がん自然発症モデルマウスによる 102-10 Fab の腫瘍集積能評価

2-3-3 マウス膵がん組織における 102-10 Fab とフィブリン沈着の局在

2-3-4 102-10 Fab のフィブリンゲル形成および分解への影響 *in vitro* 試験

2-3-5 102-10 Fab の血液凝固系への影響 *in vivo* 試験

2-4 考察

総括

参考文献

## 謝辞

本論文の一部内容についてはToshifumi Obonai, Hirobumi Fuchigami, Fumiaki Furuya, Naoyuki Kozuka, Masahiro Yasunaga & Yasuhiro Matsumura. Tumour imaging by the detection of fibrin clots in tumour stroma using an anti-fibrin Fab fragment. *Scientific Reports* **6**, 23613; doi: 10.1038/srep23613 (2016) に掲載されている。

## 要旨

### 《序論》

がんと血液凝固に密接な関係があることは古くから知られており、また近年の臨床研究からも示される通りがん患者は血液凝固亢進状態にある。がん患者はしばしば血栓症を併発し、その場合、予後が不良であることも報告されている。血液凝固系の制御は生命維持に非常に重要であり、多数の因子が関連し複雑に制御されている。血液凝固系には内因系と外因系の二つのカスケードが存在するが、いずれも最終産物は安定化した不溶性フィブリンである。がん組織では外因系血液凝固開始因子の発現亢進、ずり応力の上昇、さらにがん細胞の周辺組織への浸潤による血管の損傷など複数の要因により至る所で血液凝固系が亢進し、凝固反応が起き続けていると考える。実際、さまざまな固形腫瘍組織のがん間質においてこの不溶性フィブリンの沈着が存在することが知られており、当研究室でも様々ながん種および検体において免疫組織化学染色により確認している。不溶性フィブリンは組織損傷、梗塞性疾患などでも形成されるが、この場合通常は痛みなどの症状を伴い、引き続き起こる線溶系の働きにより 3 週間以内に病変部の不溶性フィブリンは溶解され同部位はコラーゲンに置換される。つまり、無症候性で持続的な不溶性フィブリンの形成はがん特異的であると考える。

当研究室ではがん組織に選択的に薬剤を送達するドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発に長年にわたり取り組んできた。我々はがん間質に存在する不溶性フィブリン沈着に特異的に結合する抗体の取得に挑戦し、マウス抗不溶性フィブリン抗体 (102-10 IgM) の取得に成功した。さらに DDS ツールとして臨床応用を見据えヒトキメラ化に着手し、ヒト/マウス抗不溶性フィブリンキメラ抗体 (102-10 IgG) の開発にも成功した。102-10 IgG はヒトとマウスの不溶性フィブリンを認識するが、その前駆体で大部分のアミノ酸配列が共通であるフィブリノーゲンや可溶性フィブリンは認識しない特性を持つ。さらに化学発がんモデルマウスに投与された 102-10 IgG は選択的に腫瘍に集積することを既に確認および報告しており、がん分子イメージングプローブへの応用可能性が示唆されていた。しかし IgG は血中滞留性が非常に良好であるために、この腫瘍集積が正常組織と比べて十分なコントラストをもって確認されるまでにはマウスへの投与後数日経過する必要がある、102-10 IgG も例外ではなかった。一方、がんの画像診断の被検者には入院患者のみならず外来患者および健常者も含まれる。IgG を用いた分子イメージング薬剤で撮像するには、被験者が外来患者の場合、薬剤投与の数日後に再度外来が必要となり、診断する側も被験者側も双方にとって大きな負担となる。低分子化した抗体は生体内において IgG よりも短時間で全身に分布し、すぐに排出されることが知られている。がん間質特異抗体としてののがん組織への選択的集積と低分子化抗体の全身での薬物動態特性を生かすことで、薬剤投与当日のがんの分子イメージングが可能になると考えられる。以上のことより 102-10 IgG を

低分子化した抗体をがん分子イメージング薬剤に応用し、腫瘍組織を描出することを試みた。

本研究では、がん間質に存在する不溶性フィブリンを標的としたがん分子イメージング薬剤開発の基礎研究として①102-10 IgG の低分子化、②低分子化 102-10 抗体プローブの腫瘍集積性の評価、③毒性試験として低分子化 102-10 抗体の血液凝固と線溶系への影響の評価を行った。

## 《結果》

### 1. 低分子化抗フィブリン抗体の作製と結合能の評価

低分子化抗体には様々な形状があるが、本研究ではその生産性、親和性、安定性、分子サイズ等を考慮し、Fab が最適であると判断した。Fab は IgG をパパイン処理することで得られる一価の抗体断片である。断片化することで分子量が 150 kDa から 50 kDa となり、体内動態の変化に伴いイメージング可能となるコントラスト形成までの時間がかかなり短縮されることが期待される。図 1a に示すように作製した 102-10 Fab は SDS-PAGE によりその低分子化が確認された。さらに 102-10 IgG と比較すると幾分減少がみられるものの、ELISA によりヒトとマウスそれぞれの不溶性フィブリンへ結合するがその前駆体のフィブリノーゲンには反応せず、結合特異性を保持していることが確認された (図 1b)。

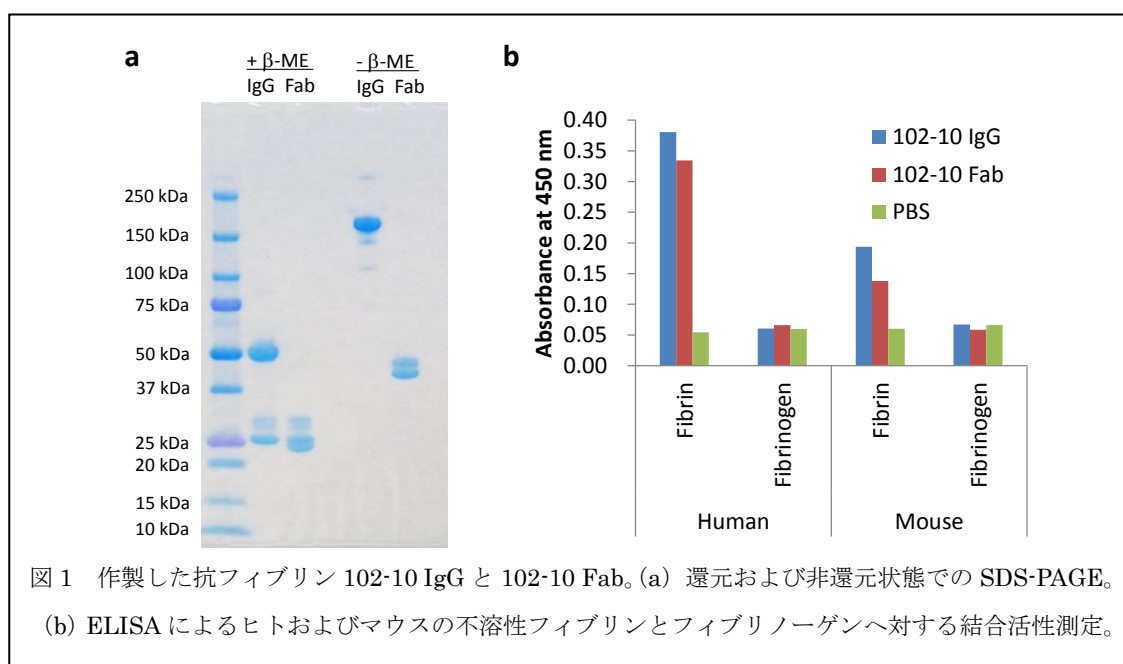


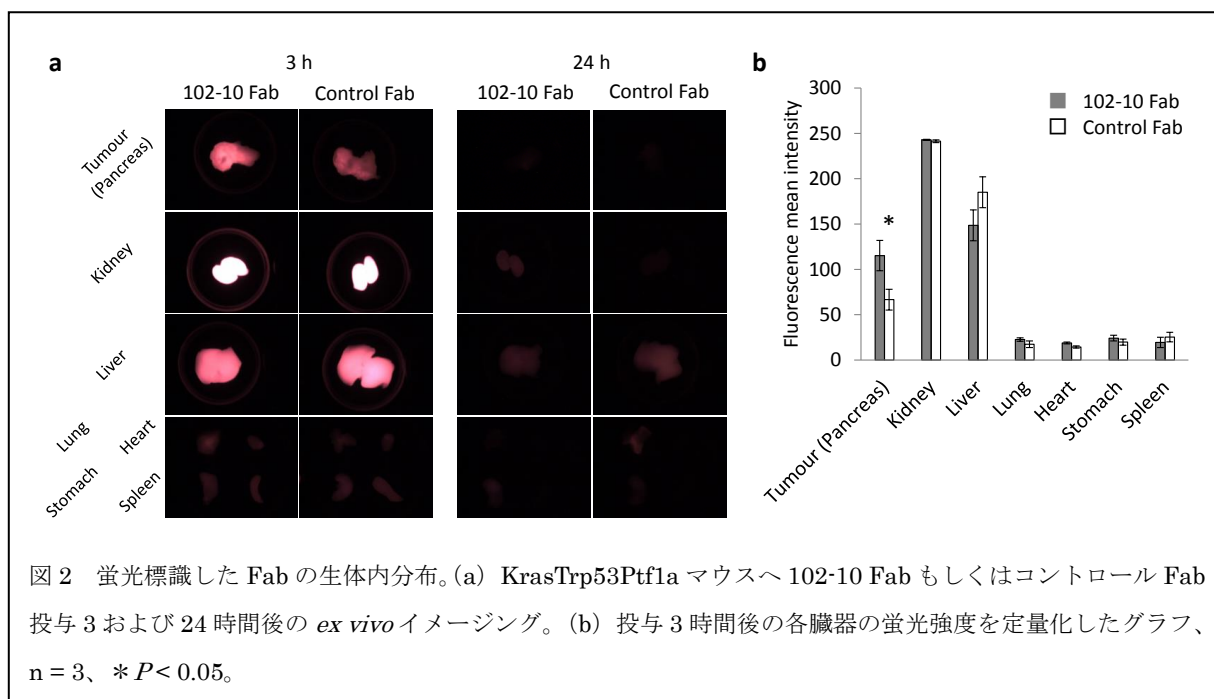
図 1 作製した抗フィブリン 102-10 IgG と 102-10 Fab。(a) 還元および非還元状態での SDS-PAGE。(b) ELISA によるヒトおよびマウスの不溶性フィブリンとフィブリノーゲンに対する結合活性測定。

### 2. 膵がん自然発症モデルマウスにおける抗フィブリン Fab の腫瘍集積性

ヒトがん細胞株をマウスの皮下や同所に移植した異種移植モデルではがん細胞ががん組織のほとんどを占め、ヒトがん組織にみられるような間質成分がほとんど形成されず、不溶性フィブリンもほとんど認められず、ヒト膵がんの大半を占める膵管腺がん (Pancreatic

Ductal Adenocarcinoma; PDAC) が示す特徴とは大きく異なっていた。PDAC を自然発症する三重変異遺伝子改変 (*KrasTrp53Ptf1a*) マウスでは、ヒト PDAC と同様に豊富な間質形成および不溶性フィブリン沈着が認められ、予備実験でも 102-10 Fab の腫瘍集積性が確認された。そのため 102-10 Fab プローブの生体内における腫瘍集積能の評価には、*KrasTrp53Ptf1a* マウスが本研究のモデルマウスに適切であると判断した。

蛍光標識した 102-10 Fab を *KrasTrp53Ptf1a* マウスへ投与後 3 時間の *ex vivo* イメージングの結果、102-10 Fab はコントロール Fab と比較して腫瘍のある膵臓へ有意に集積していた (図 2a および b)。この腫瘍集積は投与後 3 時間をピークに減少し、102-10 Fab 投与後 24 時間では同撮影条件下では各臓器においてもほとんど蛍光を検出することができなかった。さらに 102-10 Fab プローブ投与 3 時間後に腫瘍組織中の 102-10 Fab と不溶性フィブリン沈着のそれぞれの局在を確認した。その結果、尾静脈投与した 102-10 Fab と不溶性フィブリン沈着は、がん間質部で共局在していることが明らかとなった。この結果より *KrasTrp53Ptf1a* マウスへ投与された 102-10 Fab は速やかにがん組織に送達され、そこに存在する不溶性フィブリンに特異的に結合して腫瘍集積性を示し、投与後 24 時間ではそのほとんどが体外へ排出されることが示された。



### 3. 抗フィブリン Fab の血液凝固線溶系への影響

今後の臨床応用を見据え、102-10 Fab が血液凝固系および線溶系に影響するかどうかを確認した。血液凝固反応の最終段階では、フィブリノーゲンがトロンビンによる限定分解を受けて高分子化しゲル状の不溶性フィブリンとなる。血液凝固を模した *in vitro* の実験系で、102-10 Fab がこのフィブリンゲルの形成に影響するかを確認した。線溶系では、プラスミノーゲンが組織型プラスミノーゲン活性化因子 (tPA) により限定分解されて生成した

プラスミンが、不溶性フィブリン塊を分解する。凝固系の測定と同様に 102-10 Fab の存在下で不溶性フィブリンゲルの分解を経時測定し、その影響を評価した。

フィブリンゲルの形成はトロンビン阻害剤であるアンチトロンビン III (AT III) の存在下では強く阻害された。しかし 102-10 Fab の添加によるフィブリンゲルの形成阻害は認められなかった (図 3a)。またフィブリンゲル分解反応では、プラスミンの阻害剤である $\alpha_2$ -プラスミン阻害剤 ( $\alpha_2$ -PI) および tPA の阻害剤であるプラスミノーゲン活性化因子阻害剤-1 (PAI-1) の存在下ではフィブリンゲルが分解されるまでの明らかな時間延長が認められたが、102-10 Fab を添加した時のフィブリンゲル分解時間も変化がなかった (図 3b)。さらに *in vivo* の実験系においても、102-10 Fab およびコントロール Fab 投与後のマウスから採血したそれぞれの血液凝固関連因子の数値に有意差は見られなかった。

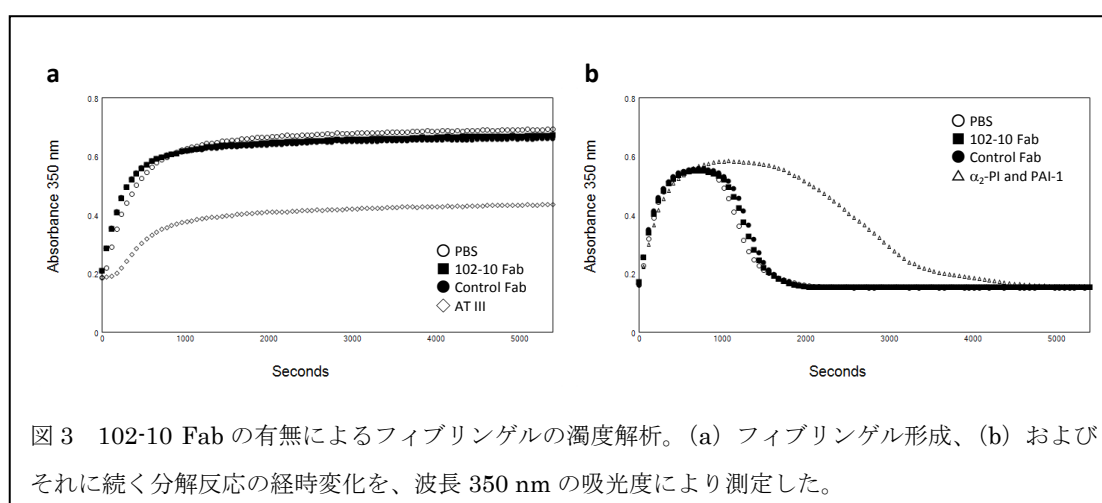


図3 102-10 Fabの有無によるフィブリンゲルの濁度解析。(a) フィブリンゲル形成、(b) およびそれに続く分解反応の経時変化を、波長 350 nm の吸光度により測定した。

## 《考察》

本研究で作製した 102-10 Fab を基本骨格としたプローブは、膵がんを自然発症する遺伝子改変マウスにおいて投与後早期に腫瘍組織への集積性を示し、その後迅速に体外排泄され、さらには血液凝固および線溶系への影響を示さなかったことから、がん画像診断を目的とした分子イメージング薬剤としての臨床応用可能性が示された。

## 《結論》

がん間質に存在する不溶性フィブリン沈着は、がん組織へ薬剤を送達する有望な標的であり、抗不溶性フィブリン抗体である 102-10 IgG を低分子化した 102-10 Fab はがん分子イメージングプローブとして良好な結果が得られた。今後、臨床応用を目指したさらなる開発研究を行うべきであると考えられる。



## 序論

がん組織はがん細胞のみでなく様々な細胞や成分から構成されている。特に固形腫瘍の場合、がん細胞の周囲には、不溶性フィブリンやコラーゲンなどの豊富な細胞外マトリックスや、線維芽細胞、炎症細胞（リンパ球、単球／マクロファージ）、血管構成細胞などのがん間質細胞が存在し、腫瘍組織中の細胞外マトリックスとがん間質細胞をあわせてがん間質と称され、がん細胞の増殖にはこれを取り巻くがん間質が形成するがん微小環境が大きく寄与していることが知られている<sup>1,2</sup>。がん組織中のがん細胞とがん間質の占める割合はがん種によって異なり、膵がんやスキルス胃がんはがん細胞よりもがん間質が大きな割合を占めることがよく知られている<sup>3,4</sup>。また脳腫瘍（glioblastoma multiforme; GBM）の主要な構造物はがん細胞、壊死組織および血管であるが、後者二つが占める割合が大きい腫瘍も多く、がん細胞以外をがん間質と捉えると、GBMもまたがん間質が豊富ながんである。膵がんは特になん間質が豊富な腫瘍である。膵がん全体の5年生存率は5~10%と極めて低いが<sup>5</sup>、早期発見ができて外科的切除などの適切な処置が施されれば5年生存率は50%弱となることが臨床的事実としてよく知られており<sup>6</sup>、その診断と検出が予後に非常に大きな影響を与えるがん種の一つである。膵がんの診断には主に血液検査、画像検査、内視鏡検査、組織検査が行われるが、血液検査では進行しないと各種腫瘍マーカーが高値とならないことが多く、現在は膵がんの存在診断において画像検査や超音波内視鏡検査が大きな役割を果たしている。画像検査においては近年、陽電子断層撮影法（positron emission tomography; PET）が質的診断能に優れることなどからがんの存在診断にも使用され始めているが、形態的診断能に優れるCTと組み合わせたPET/CTなどの画像検査を駆使しても、現在の画像解析能力では直ちに処置が必要な腫瘍であっても描出が困難なことが多いのが現状である<sup>7</sup>。分子イメージング技術とは疾患部位の生化学的特徴を、観察対象動物が生きている状態で非侵襲的に可視化する手法である<sup>8</sup>。がん分子イメージングは標識化合物

を用いて生体内の様々な標的分子を可視化し病変部の質的診断能に優れており、臨床応用を目的とした研究開発が盛んである<sup>9,10</sup>。現在臨床で最も質的診断能に優れるイメージング手法の一つである<sup>[18F]FDG-PET</sup>は、がん細胞の盛んな糖代謝による<sup>[18F]FDG</sup>集積を可視化する、がん細胞標的型のイメージング手法である。前述のとおり特に膵がんはがん間質ががん組織の大部分を占めているがん種であり、がん細胞を取り囲む厚いがん間質が抗がん剤のがん細胞への送達の障壁となっていることが知られている<sup>11-13</sup>。同様の理由でイメージング剤である<sup>[18F]FDG</sup>のがん細胞への送達が不十分となり腫瘍を描出できていない可能性がある。そこで膵がんのようにがん間質が豊富ながん種の場合には、その存在を逆手に取ったがん間質標的型イメージングプローブがその描出に有効なのではないかと考えた。

膵がんのがん間質形成機構は複数存在することが知られている。膵がん組織では分泌型成長因子であるソニック・ヘッジホッグシグナルが亢進しており、腫瘍増殖およびがん間質の発達と線維化に寄与している<sup>14,15</sup>。また膵星状細胞はがん細胞の増殖や転移に関与していることが示唆されており<sup>16</sup>、腫瘍組織の細胞外マトリックスを発達させることによりその線維化に中心的な役割を果たしていることが知られている<sup>17</sup>。これらの機構に加え、がん組織で連続的に引き起こされる組織損傷と創傷治癒過程による細胞外マトリックス形成によるがん間質形成機構がある(図 1-1-1-1)<sup>18</sup>。がん細胞は増殖・浸潤の過程で周囲の組織を溶かしながら正常組織を侵す。この時がん組織内に存在する微小な腫瘍および正常血管を損傷させ、微小出血を引き起こし、この微小出血を止めるために血液凝固反応が起こり、不溶性フィブリンが形成される。引き続き起こる線溶系の働きにより同部位の不溶性フィブリンはコラーゲンへ置換されるが、がん細胞が生体内で活動を続けている限りこの事象は繰り返されるものと考えられる。がんの悪性度が高いほど浸潤性が強く、血液凝固活性が高いことも知られている。創傷治癒過程でも同様の現象が起きるがそれは一過性であり、がんは「癒えない創傷」とも理解されている<sup>19</sup>。結果としてコラーゲンや不溶性フィブリンを豊富に含むがん間質を形成する。この現象は膵がんに限らず様々な固形腫瘍で起きてい

ると考えられ、これまでに多種の固形腫瘍で不溶性フィブリンの沈着が確認されている<sup>20</sup>。臨床研究においてもがん患者は血液凝固亢進状態であることが確認されており、不溶性フィブリンの塊である血栓を形成しやすくしばしば血栓症を併発し、血栓症と生命予後との関連も示唆されている<sup>21,22</sup>。さらに血栓症マーカーである可溶性フィブリン、フィブリン分解産物およびD-ダイマーががん患者で高値となることが報告されている<sup>23</sup>。しかしながら血栓症ではないがん患者においてもこれらマーカーが高値となる傾向があり、これは図1-1-1-1に示す繰り返される組織損傷と創傷治癒によりがん間質で不溶性フィブリンが形成される機構が働いている傍証とも考えらえる。

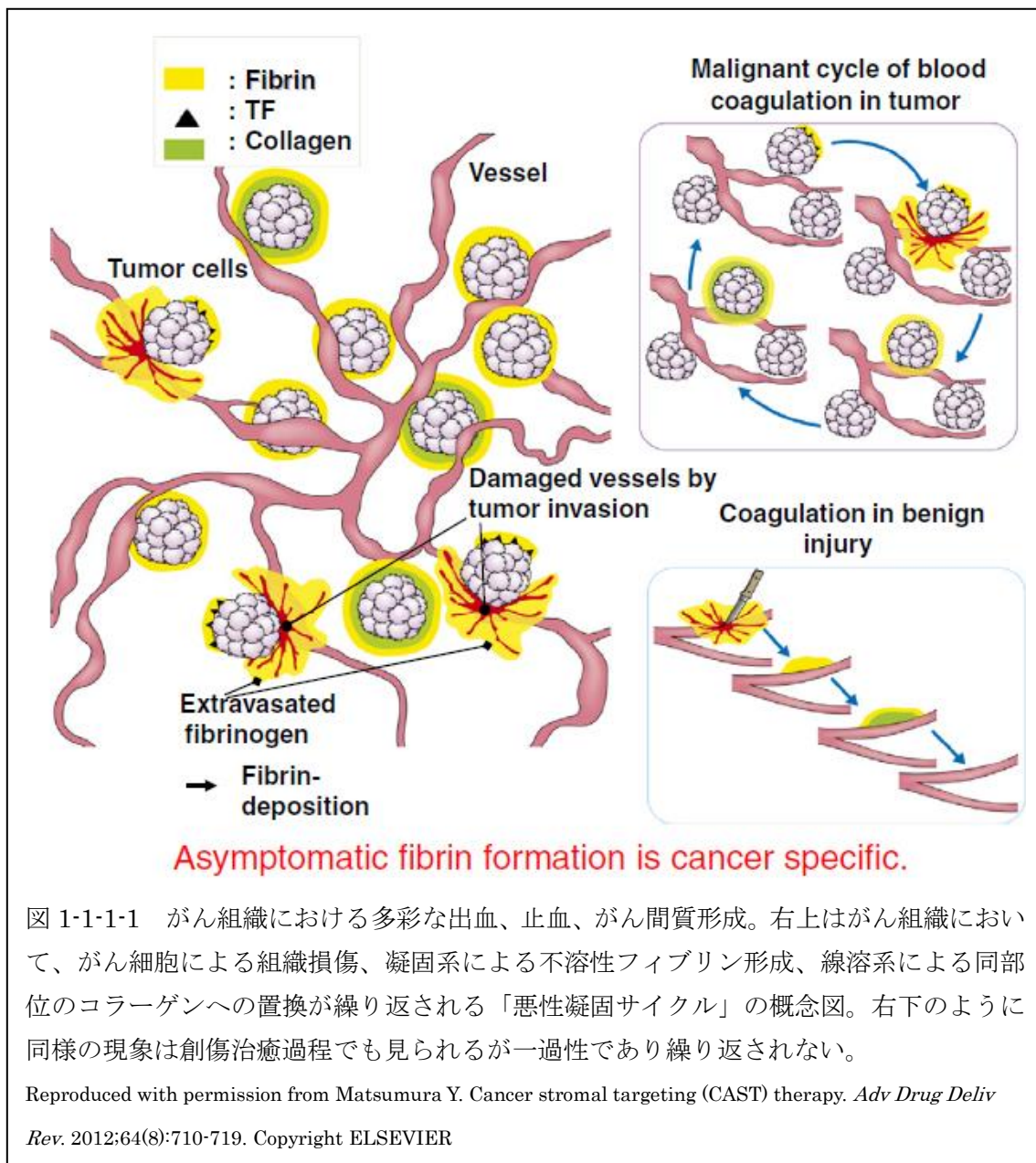
このがん間質に沈着する不溶性フィブリンを標的としたがん診断および治療のためのドラッグデリバリーシステム (drug delivery system; DDS) の開発が提唱されている<sup>18</sup>。DDSの理論的機構として Enhanced Permeability and Retention (EPR) effectがある<sup>24</sup>。これは腫瘍血管透過性亢進機構によるIgGなどの高分子が腫瘍内に集積するという現象であるが、この血管透過性亢進は内因系血液凝固の活性化におけるキニン<sup>25</sup>、外因系血液凝固の活性化におけるVascular Endothelial Growth Factor<sup>26</sup>両二者による血管透過因子によることが証明されている。内因系、外因系ともにそれぞれ特有の血管透過因子を産生しつつ、最終的に不溶性フィブリンががん局所で形成される。その結果、前述のように固形がんではフィブリン沈着を伴うがん間質が形成される<sup>20</sup>。フィブリンの沈着は急性梗塞性疾患、急性炎症、外傷でも認められるが、非悪性の疾患の病変部のフィブリン沈着は急性期のみで、しかも必ず症状を伴う。一方悪性疾患におけるフィブリン沈着は無症状で持続的に起きる。すなわち持続的、無症候性のフィブリン沈着はがん特異的と言える。そこで不溶性フィブリンのみを認識する抗体の樹立を試みた結果、可溶性のフィブリノーゲン、可溶性のフィブリン分解産物を認識せずに、目的とした不溶性フィブリンのみを認識する抗体の樹立に世界で初めて成功した。さらに当初開発した抗不溶性フィブリン抗体はマウスIgMであったがその後臨床応用を見据え、ヒト/マウスキメラ化した抗不溶性フィブリン抗体、

102-10 IgG の開発にも成功した。102-10 IgG はフィブリン前駆体のフィブリノーゲンから不溶性フィブリンへ立体構造変化することで初めて分子表面に露出する領域を認識し、フィブリノーゲンはもちろん、可溶性フィブリンおよび不溶性フィブリンの分解物である D-ダイマーなど、フィブリン関連分子は認識しない特徴を持つ<sup>20</sup>。これまでも抗フィブリン抗体開発の報告はあるが（例えば NYB-T2G1 や MH-1 など）<sup>27-29</sup>、不溶性フィブリンを含むすべてのフィブリン関連分子は、フィブリンとかなりの割合の共通アミノ酸配列を保持しており、真に不溶性フィブリン特異的な抗体は我々の知る限りない。さらに 102-10 IgG のエピトープ配列は魚類から哺乳類まで脊椎動物において広く保存されており、これらの動物実験での研究結果がヒトに外挿される可能性が高い。

ところで 1970 年代にハイブリドーマによるモノクローナル抗体産生技術が開発されて以来<sup>30,31</sup>、これまでに数多くのモノクローナル抗体によるがん診断および治療を目的とした非臨床および臨床研究がおこなわれてきた。また抗体工学分野の発展から低分子化抗体ではその結合親和性の変化のみならず、薬剤として血中へ投与した場合の体内動態はそれぞれの形状で著しく異なることが明らかとされている<sup>32</sup>。例えば分子量 150 kDa の IgG の場合、その高い生体親和性に加え Fc 部分を有するため血管内皮上に存在する FcRn との相互作用により血中へのリサイクリングが起こり、血中半減期は 1~3 週間である。一方、低分子化抗体は低分子化するほどに血中半減期が短くなり、28 kDa の一本鎖抗体 (single chain Fv ; scFv) の場合は 2~4 時間である<sup>33</sup>。治療用の抗体医薬として使用する場合には、血中半減期が長い IgG が腫瘍部への総送達量が高くなり、低分子化抗体と比較して大きな治療効果が期待される。ところが腫瘍を描出するイメージング薬剤としては、血管漏出性の増大と血中半減期の低下による撮影までのイメージング時間が短縮されるため、十分な親和性を保持している限り、低分子化抗体のほうが適していると考えられる。より小さい分子サイズは腫瘍内部への組織浸透性を向上させ、さらに低分子化に伴う抗体のエフェクター部位である Fc 部分の欠如は不必要なあるいは想定外の免疫反応を回避できる利点もある。

本研究の目的は、腫瘍部に存在する不溶性フィブリンを標的とした、抗不溶性フィブリン抗体を応用したがん分子イメージング薬剤開発の基礎研究である。イメージング薬剤としての望ましい重要な特性として、①生体へ投与後、標的臓器・組織への速やかな移行、②標的分子との高い親和性と特異性、③標的分子へ結合後の一定時間の滞留性、④イメージング終了後の速やかな体外へのクリアランス、が挙げられる。これらのことを総合的に考慮し、不溶性フィブリンへの特異性と親和性を担保しつつ、より低分子化した抗体が、本研究には適していると判断した。また、血液凝固関連因子を標的とした診断用および治療用抗体の研究開発はこれまでもいくつか行われ報告されているが、それら特有の課題として出血傾向や血栓形成など血液凝固線溶系への影響が懸念される。本研究では臨床応用を最終目標としているため、この特有の問題に対する毒性評価も行い、体内診断薬としての安全性の確認も実施した。

本論文の第一章ではまず低分子化抗体の作製と実験動物モデルの選定について述べる。続く第二章ではそこで構築した実験系によるがん分子イメージング薬剤としての機能評価および *in vitro* および *in vivo* で行った毒性評価について述べる。



## 第一章 実験系の構築 低分子化抗不溶性フィブリン抗体作製

### と動物モデルの選定

#### 1-1 諸言

抗体を用いたがん分子イメージングはこれまでも数多くの研究が報告されており、「序論」でも述べたとおり抗体の低分子化抗体は生体内の挙動が変化し、イメージング薬剤としてより望ましい特性を有すると考える。遺伝子工学および抗体工学の発展に伴い、現在、低分子化抗体としてそれぞれ異なる特徴を有する様々な形状が開発されており、目的によりその形状を適切に選択する必要がある。本研究では臨床の現場で使われるがん分子イメージングプローブの開発を最終目標としている。がん分子イメージングの被検者は入院中のがん患者のみならず外来での被検者も想定されるため、被検者の負担をできるだけ減らすべく、検査が一日で完了できるようイメージング薬剤投与から撮影までが短時間で明瞭なコントラストを持って腫瘍組織を描出し、さらに撮影後はその薬剤排泄が早期に行われることが望ましい。そのためには血管漏出性に優れ、血中半減期も短い小さな分子で、且つ一定程度の親和性を保持している、低分子化抗体を取得することが必要であると考えた。特定の分子に結合特異性を持つ次世代医薬品としての期待がもたれる分子標的分子や人工抗体の中にも IgG より分子量が小さいアフィボディ、モノボディ、DARPin など様々な形状のものがあるが<sup>34</sup>、血中で中和されることなくがん組織へ薬剤を送達するためには真に不溶性フィブリン特異的な結合能を示す 102-10 IgG の特性が必須であったため、102-10 IgG の可変領域を基本骨格とした低分子化抗体の取得を目指すこととした。上記要件を満たす低分子化抗体のうち、まず scFv の、続いて Fab の抗不溶性フィブリン抗体作製を検討した。

また今日がんの非臨床研究において様々な担がんモデルマウスが開発されており、実験目的に応じて適切な動物モデルを選択することが重要である<sup>35,36</sup>。その扱いやすさや手技の

簡便さからがん治療および診断の基礎研究でもっとも一般的に使用されているのは、培養したヒトがん細胞株を免疫不全マウスへ移植する異種移植（xenograft）モデルである。このほか患者腫瘍組織移植（patient-derived）モデル、転移モデルなども開発されているが、それぞれに有する特徴が異なる。本研究ではまずそれぞれの特徴が異なる皮下移植モデル、同所移植モデルおよび遺伝子改変マウス（oncomice）モデルの三つについて、がん間質の不溶性フィブリン沈着を標的とした実験モデルマウスという観点から比較評価した。



## 1-2 方法

### 1-2-1 大腸菌による 102-10 scFv の発現と粗精製

前任者により既に解析済みの抗フィブリン抗体 102-10 IgG の可変領域をクローニングして、102-10 scFv 発現プラスミドを構築した。発現プラスミドは pGEM-2 (プロメガ) を基本骨格とする津本浩平博士 (東京大学) より供与いただいたその改変プラスミドを用いた。T7 プロモーター制御下で、PelB-V<sub>H</sub>-(Gly-Gly-GlyGly-Ser)<sub>3</sub>-V<sub>L</sub>-(His)<sub>6</sub>-Cys が発現するように設計した。構築した発現プラスミドの配列は全てシーケンスにより確認後、102-10 scFv 発現プラスミドで大腸菌 BL21 (DE3) (メルクミリポア) を形質転換して、102-10 scFv 発現株とした。102-10 scFv 発現株を LB 培地 (MP Biomedicals) にて、28°Cあるいは 37°C 振とう培養し、波長 600 nm の吸光度が 0.5~0.6 に達した時点で 0.1-1.0 mM IPTG (和光純薬工業) を添加して発現誘導を行った。3-24 時間振とう培養後に菌体を回収し、培養液の 1/20 量の氷冷した 50 mM Tris-HCl (シグマ) / 200 mM NaCl (和光純薬工業) に懸濁し、超音波発生機 UD-201 (トミー精工) にて菌体を破碎した。菌体破碎後 4°C、8,000 x g、30 分間遠心分離することにより、上清の可溶性画分と沈殿の不溶性画分に分け、それぞれの分析に用いた。不溶性画分は 50 mM Tris-HCl / 200 mM NaCl / 2% Triton-X100 (シグマ) で洗浄後再度遠心分離を行った。沈殿をさらに氷冷したアセトン (和光純薬工業) と蒸留水で洗浄後、得られた沈殿を 6 M グアニジン (guanidine; Gdn) (和光純薬工業) を含む後述のヒスタグ結合緩衝液に懸濁し、4°Cで一晩振とうして可溶化した。

102-10 scFv は金属キレート親和性クロマトグラフィーにより精製できるように、C 末端側に His × 6 のヒスタグ配列を挿入して設計しており、以下の手順で変性 102-10 scFv を粗精製した。Ni-NTA アガロース樹脂 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) をクロマトグラフィーカラム (バイオ・ラッド) に適量注ぎ、樹脂 3 倍量の蒸留水と 6 M Gdn を含むヒスタグ結合緩衝液 (5 mM イミダゾール (シグマ) / 500 mM NaCl / 20 mM Tris-HCl)

で樹脂を洗浄後、サンプルを適量添加した。続いて樹脂 4 倍量の 6 M Gdn を含む溶出液 (10 mM イミダゾール / 500 mM NaCl / 20 mM Tris-HCl) で溶出後、樹脂 3 倍量の 6 M Gdn を含む溶出液 (200 mM イミダゾール / 500 mM NaCl / 20 mM Tris-HCl) で溶出し、最後に樹脂 3 倍量の 6 M Gdn を含む溶出液 (500 mM イミダゾール / 500 mM NaCl / 20 mM Tris-HCl) で完全溶出した。それぞれの画分はすべて回収し、以降の分析に用いた。

### 1-2-2 多段階透析法による変性 102-10 scFv の巻き戻しと精製

以下の方法は Tsumoto *et al.*<sup>37</sup> および Umetsu *et al.*<sup>38</sup> のプロトコルを基に若干の変更を加えたものである。Gdn により変性した 102-10 scFv 粗精製画分を 7.5  $\mu$ M に調整し、スペクトラム透析膜 MWCO: 3500 (スペクトラムラボラトリーズ) に封入後、4°C で以下の 8 つの外液、全て pH 8.0、に外液 1 から外液 8 の順にそれぞれ浸し、スターラーで可能な限りゆっくり攪拌しながら透析を行った。最後に内液を回収後、10,000  $\times g$  で 10 分間、遠心分離を行い上清のみを回収して、巻き戻し済み 102-10 scFv とした。外液 1-8 の組成を以下に示す。括弧内はインキュベーション時間を表す。

外液 1 (12 時間) ; 6 M Gdn / 200 mM NaCl / 1 mM EDTA / 50 mM Tris-HCl

外液 2 (6 時間) ; 3 M Gdn / 200 mM NaCl / 1 mM EDTA / 50 mM Tris-HCl

外液 3 (6 時間) ; 2 M Gdn / 200 mM NaCl / 1 mM EDTA / 50 mM Tris-HCl

外液 4 (12 時間) ; 1 M Gdn / 200 mM NaCl / 1 mM EDTA / 0.4 M Arg / 50 mM Tris-HCl

外液 5 (12 時間) ; 0.5 M Gdn / 200 mM NaCl / 1 mM EDTA / 0.4 M Arg / 50 mM Tris-HCl

外液 6 (12 時間) ; 200 mM NaCl / 1 mM EDTA / 0.2 M Arg / 50 mM Tris-HCl

外液 7 (4 時間) ; 200 mM NaCl / 1 mM EDTA / 0.2 M Arg / 50 mM Tris-HCl

外液 8 (4 時間) ; 200 mM NaCl / 1 mM EDTA / 0.2 M Arg / 50 mM Tris-HCl

巻き戻し済み 102-10 scFv をゲル濾過カラム Hi Load 26/600 Superdex 75 pg (GE ヘルスケア) をセットしたクロマトグラフィーシステム BioLogic DuoFlow 10 (バイオ・ラッ

ド)により最終精製を行った。この際、ランニング緩衝液にはPBSを使用することで、102-10 scFvをPBS懸濁サンプルに置換した。102-10 scFvを含む画分を回収後、Millex GV Filter Unit 0.22  $\mu\text{m}$  (メルクミリポア) でろ過し、4°Cあるいは-80°Cで保存した。

### 1-2-3 SDS-PAGE とウエスタンブロッティング

電気泳動するサンプルが非還元処理の場合には $\beta$ -メルカプトエタノール ( $\beta$ -ME) (和光純薬工業) 非添加のサンプルと等量のサンプルローディングバッファー (バイオ・ラッド) と混合し、還元処理の場合には $\beta$ -MEをサンプルローディングバッファー (バイオ・ラッド) の1/20量加えたものと混合し、95°Cで5分間処理した。加熱処理したサンプルを電気泳動システム、ミニプロティアン Tetra セル (バイオ・ラッド) を用いてミニプロティアン TGX ゲル 4-15% (バイオ・ラッド) にアプライして電気泳動した。分子量マーカーとしてデュアルカラースタANDARD (バイオ・ラッド) を一緒に泳動した。

電気泳動後、CBB染色を行う場合には、脱イオン水で洗浄したゲルをQuick-CBB (和光純薬工業) で染色し、タンパク質を検出した。ウエスタンブロッティングを行う場合には、転写装置、トランスブロットTurboブロッティングシステム (バイオ・ラッド) を用いてトランスブロットTurbo ミニ PVDF 転写パック (バイオ・ラッド) に転写した。転写後のPVDF膜を吸引式免疫反応システム、SNAP i.d. 2.0 (メルクミリポア) の説明書に従い、抗6 $\times$ ヒスチジン、モノクローナル抗体 (9F2)、ペルオキシダーゼ結合 (抗ヒスタグ抗体-HRP) (和光純薬工業) と反応させた。続いてウエスタンブロッティング発光検出試薬、ECL prime (GEヘルスケア) により発光反応後、画像自動検出システム、ChemiDoc XRS+ (バイオ・ラッド) にて撮影と画像処理を行った。

### 1-2-4 102-10 IgG の産生

当研究室で既に樹立済みのヒト/マウスキメラ抗不溶性フィブリン抗体である102-10 IgG

を産生する CHO-K1 を、大型恒温振とう培養機、BR-180LF (タイテック) にて 37°C、125 rpm、5% CO<sub>2</sub> で振とう培養した。培養液には無血清培地および添加物を混合して調製した、20% BD select CHO medium (ベクトン・ディッキンソン)、80% FreeStyle CHO Expression Medium (サーモフィッシャーサイエンティフィック)、1×HT (サーモフィッシャーサイエンティフィック)、0.1 ng/ml IL-6 (サーモフィッシャーサイエンティフィック)、375 µg/ml ハイグロマイシン (サーモフィッシャーサイエンティフィック)、5 µg/ml ピューロマイシン (サーモフィッシャーサイエンティフィック)、を用いた。102-10 IgG 産生細胞を約 3 × 10<sup>6</sup> cells/ml まで培養して培地交換後、7 日間振とう培養してから 102-10 IgG を含む培養上清を回収した。培養上清を Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE ヘルスケア) を用いて粗精製後、Hi Load 26/600 Superdex 200 pg (GE ヘルスケア) をセットしたクロマトグラフィーシステム BioLogic DuoFlow 10 (バイオ・ラッド) で分子ふるいクロマトグラフィーにより最終精製を行った。精製した 102-10 IgG は後述の ELISA および SPR 解析による活性測定と SDS-PAGE による純度と分子量の確認を行った。

#### 1-2-5 102-10 Fab の作製

102-10 Fab の作製には ImmunoPure Fab Preparation Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック) に付属の試薬等を使用し、プロトコルは添付文書に準拠した。まず固定化パパイン (サーモフィッシャーサイエンティフィック) と 102-10 IgG を混合して 37°C で約 6 時間インキュベーション後、プロテイン A (サーモフィッシャーサイエンティフィック) に未反応の IgG および Fc を吸着させ Fab と分離した。

続いて作製した 102-10 Fab を Hi Load 26/600 Superdex 200 pg (GE ヘルスケア) をセットしたクロマトグラフィーシステム BioLogic DuoFlow 10 (バイオ・ラッド) で分子ふるいクロマトグラフィーにより最終精製した。精製した 102-10 Fab は後述の ELISA および SPR 解析による活性測定と SDS-PAGE による純度と分子量の確認を行った。

102-10 Fab と同様の作製方法により抗ヒト CD20 抗体、リツキシマブ（全薬工業）、から作製した Fab をアイソタイプコントロール Fab とした。

#### 1-2-6 ELISA による抗フィブリン抗体の結合活性確認

TBS pH8.5 に懸濁したヒトおよびマウスフィブリノーゲン（シグマ）を 96 ウェルイムノプレート（サーモフィッシャーサイエンティフィック）に 0.25  $\mu\text{g}$  もしくは 1  $\mu\text{g}$ /ウェル分注し、4°Cで一晩インキュベーションした。その後上清を除去し、10% スクロースを含む PBS で 5 倍希釈したブロッキング試薬 N102（日油）で 4°C、二晩インキュベーションした後に室温で 2-3 時間乾燥させたものをヒトおよびマウスフィブリノーゲン固相化プレートとした。一方ブロッキング試薬添加前に、0.05 NIH unit/ml トロンビン（シグマ）、1 mM  $\text{CaCl}_2$ （和光純薬工業）および 7 mM L-システインを含む TBS pH8.5 溶液にて 37°Cで 1 時間インキュベーションしてフィブリノーゲンを限定分解させフィブリンを生成した。引き続き各ウェルを 0.01% Tween 20 を含む TBS pH8.5 で 3 回洗浄し、10% スクロースを含む PBS で 5 倍希釈したブロッキング試薬 N102 で 4°C、二晩インキュベーションした後に室温で 2-3 時間乾燥させたものをヒトおよびマウスフィブリン固相化プレートとした。いずれの固相化プレートも使用直前までウェルをシールで密閉し 4°Cで保存した。

抗フィブリン抗体と反応させる前に、それぞれの固相化プレートを 0.05% Tween 20 を含む TBS pH8.5（TBST）で一度洗浄後、4% ブロックエース（DS ファーマバイオメディカル）で希釈し 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  とした一次抗体液を 100  $\mu\text{l}$ /ウェル添加し、室温で 30 分間インキュベーションした。続いて TBST で各ウェルを 3 回洗浄し、二次抗体液を 100  $\mu\text{l}$ /ウェル添加し、室温で 30 分間インキュベーションした。必要に応じてさらに各ウェルを 3 回洗浄し、三次抗体液を 100  $\mu\text{l}$ /ウェル添加し、室温で 30 分間インキュベーションした。TBST で各ウェルを 3 回洗浄後、TMB 発色基質として 1-Step Slow TMB-ELISA（サーモフィッシャーサイエンティフィック）を 100  $\mu\text{l}$ /ウェル添加し、発色の様子を見ながら室温で 5~30 分間

インキュベーションした。最後に反応停止液として 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を 100 μl/ウェル添加し、波長 450 nm の吸光度を分光光度計、スペクトラマックスパラダイム (モレキュラーデバイス) で測定した。102-10 scFv を一次抗体とした場合には、二次抗体液には 4% ブロックエース (DS ファーマバイオメディカル) で 1,000 倍希釈した抗ヒスタグ-ビオチン (MBL) を用い、さらに三次抗体液には 4 ml 4% ブロックエース溶液に 50 μl アビジン DH (ベクターラボラトリーズ) および 50 μl ビオチン化 HRP (ベクターラボラトリーズ) を添加し 30 分間インキュベーションした混合液を用いた。102-10 Fab もしくは 102-10 IgG を一次抗体とした場合には、4% ブロックエースで 500 倍希釈した抗ヒトカップ鎖抗体 [SB81a] (HRP) (SouthernBiotech) を二次抗体液とした。それぞれの一次抗体の陰性対照には PBS を用いた。

#### 1-2-7 ヒトがん細胞株培養

ヒトスキルス胃がん原発巣より樹立した細胞株 HSC-44PE をマウスへの同所移植を繰り返すことで得られた同所移植すると腹膜転移を引き起こしやすい細胞株 44As3 を<sup>39-41</sup>、国立がん研究センターの柳原五吉博士から分与していただき、10% ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum; FBS) を含む RPMI 培地 (和光純薬工業) で培養した。ヒト膵がん細胞株 BxPC-3 および FPAF-II はともに American Type Culture Collection より購入し、それぞれ 10% FBS 含有 RPMI 培地および 10% FBS 含有 EMEM (和光純薬工業) で培養した。なおすべての細胞株の培地に 100 U/ml ペニシリン G (和光純薬工業)、100 μg/ml ペニシリン (和光純薬工業) および 0.25 μg/ml アムホテリシン B (和光純薬工業) を添加し、5% CO<sub>2</sub>、37°C で培養した。

#### 1-2-8 ヒトがん細胞株皮下腫瘍モデルマウス作製

それぞれの培養がん細胞を 0.25% トリプシン溶液 (和光純薬工業) で培養皿 (コーニン

グ) より剥離後、PBS で 2 回洗浄し適切な濃度に調整後、100  $\mu$ l 細胞 PBS 懸濁液を 6-7 週齢の BALB/c Slc-*nu/nu* マウス(日本 SLC)の皮下へ移植した。44As3 と BxPC-3 は  $1 \times 10^6$  個、HPAF-II は  $4 \times 10^5$  個をそれぞれ移植後、腫瘍径を測定しながら皮下移植マウスの飼育・管理を継続した。

#### 1-2-9 ヒト膵がん細胞株同所移植モデルマウス作製

ヒト膵がん細胞株 HPAF-II 培養細胞を 0.25% トリプシン溶液で培養皿より剥離後、PBS で 2 回洗浄し適切な濃度に調整後、50% マトリゲル (ベクトン・ディッキンソン) 含有細胞懸濁液を氷上で静置後、細胞懸濁液を 6-7 週齢の BALB/c Slc-*nu/nu* マウスの膵臓へ  $5 \times 10^5$  個 HPAF-II/100  $\mu$ l を同所移植した。その後イメージング実験を行うまで同所移植マウスの飼育・管理を継続した。

#### 1-2-10 膵がん自然発症三重変異モデルマウス作製

膵がんを自然発症する遺伝子改変マウスを作製するために、三種類の遺伝子改変マウスをそれぞれ掛け合わせて、三重変異遺伝子組換えマウスを作製した。掛け合わせた一つ目の変異遺伝子は膵臓組織でその変異が多くみられる Kras<sup>G12D</sup> を loxP-STOP-loxP (LSL) 配列の下流に組み込んだ LSL-Kras<sup>G12D</sup> で、この配列を保持するマウスは David A. Tuveson 博士 (コールド・スプリング・ハーバー研究所) および Christopher V. E. Wright 博士 (ヴァンダービルト大学) らが開発し<sup>42</sup>、ご厚意により分与いただいた。二つ目の変異遺伝子も膵臓に高頻度でその変異がみられる Trp53<sup>R172H</sup> を LSL 配列の下流に組み込んだ LSL-Trp53<sup>R172H</sup> で、この配列を保持するマウスをアメリカ国立がん研究所より入手した。三つ目の変異遺伝子は LSL 下流の Kras<sup>G12D</sup> と Trp53<sup>R172H</sup> を膵臓で発現させるために、膵臓特異的に発現する Ptf1a のタンパク質コード領域を Cre 組換え酵素に置換した Ptf1a-Cre で、川口義弥博士 (京都大学) らが開発したこの配列を保持したマウスを<sup>43</sup>、ご厚意により

分与いただいた。これら三種の遺伝子改変マウスを掛け合わせ、バックグラウンド系統が 129R1/C57BL/6 の LSL-Kras<sup>G12D</sup> ; LSL-Trp53<sup>R172H</sup> ; Ptf1a-Cre (KrasTrp53Ptf1a) 三重変異マウスを作製した。正常マウスコントロールには C57BL/6JJms (日本 SLC) を用い、10-21 週齢の KrasTrp53Ptf1a および正常マウスを実験に用いた。

なお本研究におけるすべての動物実験は国立がん研究センター実験動物安全管理委員会 (以後「委員会」とする) に承認されたものであり、すべての動物実験は委員会により示された動物実験に関する指針に則って行った。

#### 1-2-11 病理組織凍結切片作製とヘマトキシリン・エオジン染色

観察対象とする組織を外科的に切除・摘出し、PBS (サーモフィッシャーサイエンティフィック) で適度に洗浄した後に適度に水切りをし、O.C.T.コンパウンド (サクラファインテックジャパン) に包埋した。包埋サンプルをドライアイス上で急速凍結させ、組織切片作成時まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保管した。O.C.T.コンパウンド包埋凍結組織ブロックをクリオスタット (Leica (CM1860)) で厚さ 6-10  $\mu\text{m}$  に薄切し、スライドガラス (松浪硝子工業) に貼り付けた後に室温で 30 分間、風乾させた。乾燥済み組織サンプルを冷アセトン (和光純薬工業) に 10 分間浸漬して固定させた。その後ヘマトキシリン (武藤化学) に 2 分間浸漬させ 10 分間流水にて洗浄、さらにエオジン (武藤化学) に 2 分間浸漬させ 90 秒間流水にて洗浄した。最後にエタノール浸漬 2 分間を 3 回、その後キシレン浸漬 2 分間を 3 回行い、マウントクイック (大同産業) で封入後、バーチャルスライドシステム VS120 (オリンパス) で観察した。なおヒト正常臓器および臓器がん凍結組織切片は研究用組織検体のサンプルを購入し (OriGene Technologies)、染色を行った。

#### 1-2-12 免疫組織化学染色

「1-2-11 病理組織凍結切片とヘマトキシリン・エオジン染色」で述べた方法に従い、冷



アセトン（和光純薬工業）固定まで行い、その後 3% 過酸化水素水（和光純薬工業）に 20 分間浸漬して内因性ペルオキシダーゼを阻害した。続いて 5% スキムミルク（ベクトン・ディッキンソン）で 30 分間ブロッキングを行い、102-10 IgG をペルオキシダーゼ標識キット（同仁化学研究所）で HRP 標識したものを 5% スキムミルクで終濃度 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に希釈し、4°Cで一晩もしくは室温で 1 時間抗体反応を行った。その後 DAB 溶液（Dako）にて発色を行った。その後ヘマトキシリン（武藤化学）に 2 分間浸漬させ 10 分間流水にて洗浄した。最後にエタノール浸漬 2 分間を 3 回、その後キシレン浸漬 2 分間を 3 回行い、マウントクイック（大同産業）で封入後、バーチャルスライドシステム VS120（オリンパス）で観察した。

### 1-2-13 蛍光 *in vivo* イメージング

皮下腫瘍を形成させた担がんマウスに、近赤外線蛍光プローブ Alexa Fluor (AF) 750 で標識した 102-10 Fab-AF 750 もしくはコントロール Fab-AF 750 を尾静脈投与して、体内動態を確認した。AF 750 標識には SAIV Rapid Antibody Labeling Kit, Alexa Fluor 750（サーモフィッシャーサイエンティフィック）を使用し、方法は添付文章に準拠した。AF 750 標識したそれぞれの 102-10 Fab-AF 750 もしくはコントロール Fab-AF 750 は標識効率が若干異なるため、それぞれ 100  $\mu\text{g}$  中に含まれる標識した AF 750 の分子数が等量になるよう調整後、尾静脈投与した。続いて *in vivo* 生体観察システム、OV110（オリンパス）を使用してそれぞれの Fab-AF 750 の蛍光を観察することで、体内動態を確認した。投与後それぞれ 1 時間、4 時間、8 時間および 24 時間で麻酔下にて明視野および蛍光観察を行った。投与後 72 時間時点で腫瘍組織を外科的に切除し、「1-2-11 病理組織凍結切片作製とヘマトキシリン・エオジン染色」に記載した方法に従いスライドを作製し、それぞれの皮下腫瘍組織の病理組織像を観察した。

#### 1-2-14 蛍光 *ex vivo* イメージング

ヒト膵がん細胞株をマウス膵臓へ同所移植した担がんマウスおよび膵がんを自然発症する *KrasTrp53Ptf1a* マウスへ前述の「1-2-13 蛍光 *in vivo* イメージング」と同様に調製した 102-10 Fab-AF 750 もしくはコントロール Fab-AF 750 を 90  $\mu\text{g}$ 、マウスへ尾静脈投与した。投与 3 時間および 24 時間後にそれぞれのマウスを深麻酔下で開腹し、右心房へ切り込みを入れた後に左心室より 30 ml 生理食塩水（大塚製薬工場）を穏やかに注入し灌流して循環中の余剰な Fab-AF 750 を洗い出した。続いて腫瘍（膵臓）、腎臓、肝臓、肺、心臓、胃および脾臓をそれぞれ外科的に切除し、生理食塩水ですすいだ後に、蛍光観察システム、OV110 でそれぞれの臓器の Fab-AF 750 の蛍光を観察した。観察した画像は ImageJ 1.47v (NIH) で解析処理し定量化した。

## 1-3 結果

### 1-3-1 102-10 scFv の作製と活性確認

一本鎖抗体、scFv は図 1-3-1-1 に示した通り、遺伝子工学技術により作られる IgG の抗原結合領域を含む V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> の配列をペプチドリンカーで結んだ、分子量約 28 kDa のタンパク質である。大腸菌発現系で比較的容易で安価に作れることや遺伝子工学技術による改変のしやすさから、さまざまな分野において広く研究に応用されている。

102-10 IgG の配列解析は既に前任者により行われており、V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> の配列は既知となっていた。102-10 scFv の大量調製のために、まずこの既知の V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> の配列のクローニングを行い、pET システムによる 102-10 scFv の大腸菌発現系の構築を行った。scFv は遺伝子工学的に作成されるため様々な修飾が比較的容易であり、今日までにその研究目的によりさまざまなデザインが提案され構築されてきたが、本研究では 102-10 scFv の生体内での高い組織浸透性や、速やかな体外排出をその特性として期待していたため様々な修飾を行わずできるだけ分子量を抑えたシンプルなデザインとした。

大腸菌のペリプラズム領域に局在する DsbC はジスルフィド結合のかけ違い修正活性やタンパク質の折りたたみ活性を有するため<sup>44</sup>、ペリプラズム領域での scFv 発現が適していると考え、ペリプラズムへの移行シグナルペプチドである PelB を N 末端に付加した。また発現させた scFv の発現確認と精製のために C 末端側にヒスタグを付加し、さらに-SH 基を介して薬剤修飾を行うために C 末端に Cys 残基を導入した。V<sub>H</sub> と V<sub>L</sub> は 15 アミノ酸残基の(Gly-Gly-GlyGly-Ser)<sub>3</sub> で連結し、大腸菌に発現させる 102-10 scFv 全長のデザインは PelB-V<sub>H</sub>-(Gly-Gly-GlyGly-Ser)<sub>3</sub>-V<sub>L</sub>-(His)<sub>6</sub>-Cys とした。

構築した 102-10 scFv 発現プラスミドで大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換し発現誘導するにあたり、まず発現誘導条件の検討を行った。検討したのは培養温度 (28℃と 37℃)、誘導物質の IPTG 濃度 (0.1 mM、0.5 mM と 1.0 mM) と誘導時間 (3 時間、6 時間と 24 時間)

である。発現誘導後の大腸菌を可溶性画分と不溶性画分に分け、102-10 scFv がどちらの画分に発現しているかを抗ヒスタグ抗体-HRP を用いたウエスタンブロッティングにより確認した。その結果すべての発現誘導条件において、可溶性画分では 102-10 scFv の発現がみられず、不溶性画分においてのみ発現がみられた (図 1-3-1-2)。28°C培養の誘導後 6 時間の不溶性画分で特に強いシグナルが確認され、その条件の中でも 0.1 mM IPTG がウエスタンブロッティングでの見かけ上 102-10 scFv が一番強く誘導された。この結果を受け 28°C、0.1 mM IPTG で誘導後 6 時間培養した大腸菌の不溶性画分から 102-10 scFv を回収することとした。

遺伝子組換え技術を用いて大腸菌に特定のタンパク質を発現させる際、発現させたタンパク質が大腸菌内でしばしば封入体と呼ばれる不溶性顆粒を形成することがよく知られている。不溶性画分から封入体として得られるタンパク質は天然構造を失った凝集体であり、本来の持っている生理活性を失っている<sup>45</sup>。低分子化抗体を大腸菌で調製する際にもしばしば問題となりその克服のためにさまざまな手法が用いられてきたが、特にこのようにして得られた変性 scFv を、多段階透析法による効率的な巻き戻しにより、非常に高い回収率で活性のある scFv を得ることのできる実験系が開発されている<sup>37,38</sup>。この系では、目的の scFv を含む大腸菌不溶性画分を 6 M Gdn などの高濃度変性剤で一度可溶化させたのちに、透析により段階的に変性剤を除去しながら巻き戻しを促す。その際、scFv 本来の天然構造を持ち始める段階で Arg を添加することでその巻き戻し効率をさらに上げる事を可能としている。本研究ではこの方法に則り、大腸菌不溶性画分に発現した 102-10 scFv を巻き戻し、活性のある 102-10 scFv の取得を目指した。まず予備実験により決定した 102-10 scFv 発現誘導の条件である 28°C、0.1 mM IPTG、6 時間誘導培養から大腸菌不溶性画分を調製し、変性剤により可溶化後、102-10 scFv の C 末端側に付加したヒスタグを利用した金属キレート親和性カラムクロマトグラフィー精製により、変性 102-10 scFv を単離した。単離した 102-10 scFv は SDS-PAGE および抗ヒスタグ抗体-HRP を用いたウエスタンブロッティン

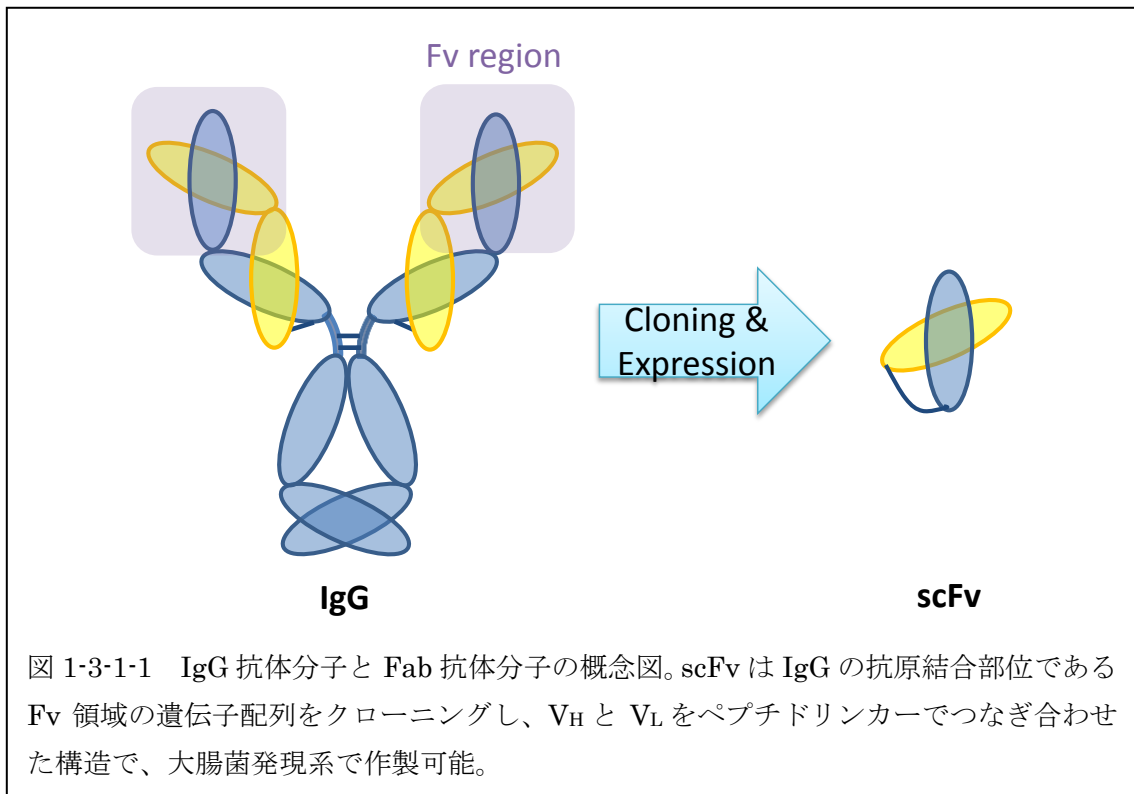
グにより確認した (図 1-3-1-3a)。ニッケルイオンを固定化したカラムでトラップされた 102-10 scFv は 200 mM イミダゾールを含む溶出液でそのほとんど溶出され、その分子量も予想された全長約 28 kDa であった。

金属キレート親和性カラムクロマトグラフィー精製により粗精製済みの変性 102-10 scFv を 7.5  $\mu$ M に調整後、透析膜に封入して多段階透析による変性剤の除去を行い変性 102-10 scFv の巻き戻しを行った。図 1-3-1-3b にその概略図を示す。この過程において、巻き戻しを促すために外液の Gdn 濃度 1 M 以下では 0.2 M もしくは 0.4 M Arg を添加した。最後に巻き戻し済みの 102-10 scFv のゲル濾過精製を行い、SDS-PAGE およびウエスタンブロッティングにより確認を行った結果、いずれも予想される全長約 28 kDa のシングルバンドが得られたため (図 1-3-1-3c)、102-10 scFv 最終精製品とした。

続いて ELISA により 102-10 scFv の活性確認を行った。102-10 scFv の抗原であるヒトフィブリンを固相化したプレートに対する反応性を測定した。固相化プレートの陰性対照にはフィブリンの前駆体であるヒトフィブリノーゲンおよび牛血清アルブミンを用いた。さらに PBS を 102-10 scFv の陰性対象とした。102-10 scFv はヒトフィブリノーゲンおよび牛血清アルブミンよりもヒトフィブリンへ強い結合活性を示したがその S/N 比は低く、102-10 scFv のヒトフィブリンへの親和性は想定していたものより低いものであった (図 1-3-1-4)。さらに最終的に得られたゲル濾過精製後の 102-10 scFv は大腸菌培養液 1l あたり 30-160  $\mu$ g であった。担がんマウスでの生体イメージング実験には、マウス一匹あたり 50-300  $\mu$ g 標識プローブの投与が必要であり、さらに *in vitro* でも様々な実験に使用することを考えると、実験に必要な十分量を準備にはかなりのコストを要する結果となってしまった。大腸菌での発現量を増やすために 102-10 scFv を融合タンパクで発現させる系や培地の検討、目的タンパク質の可溶性画分への発現を促すとされる低温発現誘導系も試みたが、高純度の 102-10 scFv を十分に調製することができなかった。V<sub>H</sub> と V<sub>L</sub> の順番を入れ替えることで scFv の発現量が増えることが一般的によく知られており、並行して V<sub>H</sub> と

V<sub>L</sub>の順番を入れ替えた発現プラスミド、PelB-V<sub>L</sub>-(Gly-Gly-GlyGly-Ser)<sub>3</sub>-V<sub>H</sub>-(His)<sub>6</sub>-Cys を構築し同様の実験を行ったが、順番を入れ替える前と比べて大きな変化は見られなかった。

以上の結果より、今回試みたいいくつかの大腸菌発現系で作製した 102-10 scFv は、親和性が期待していたものよりも低く、いくつかの発現系を試してみたもののその調製コストが大きすぎると判断したため、大腸菌発現系による 102-10 scFv の調製と、それによるがん分子イメージングプローブ開発は、一旦中止することとした。



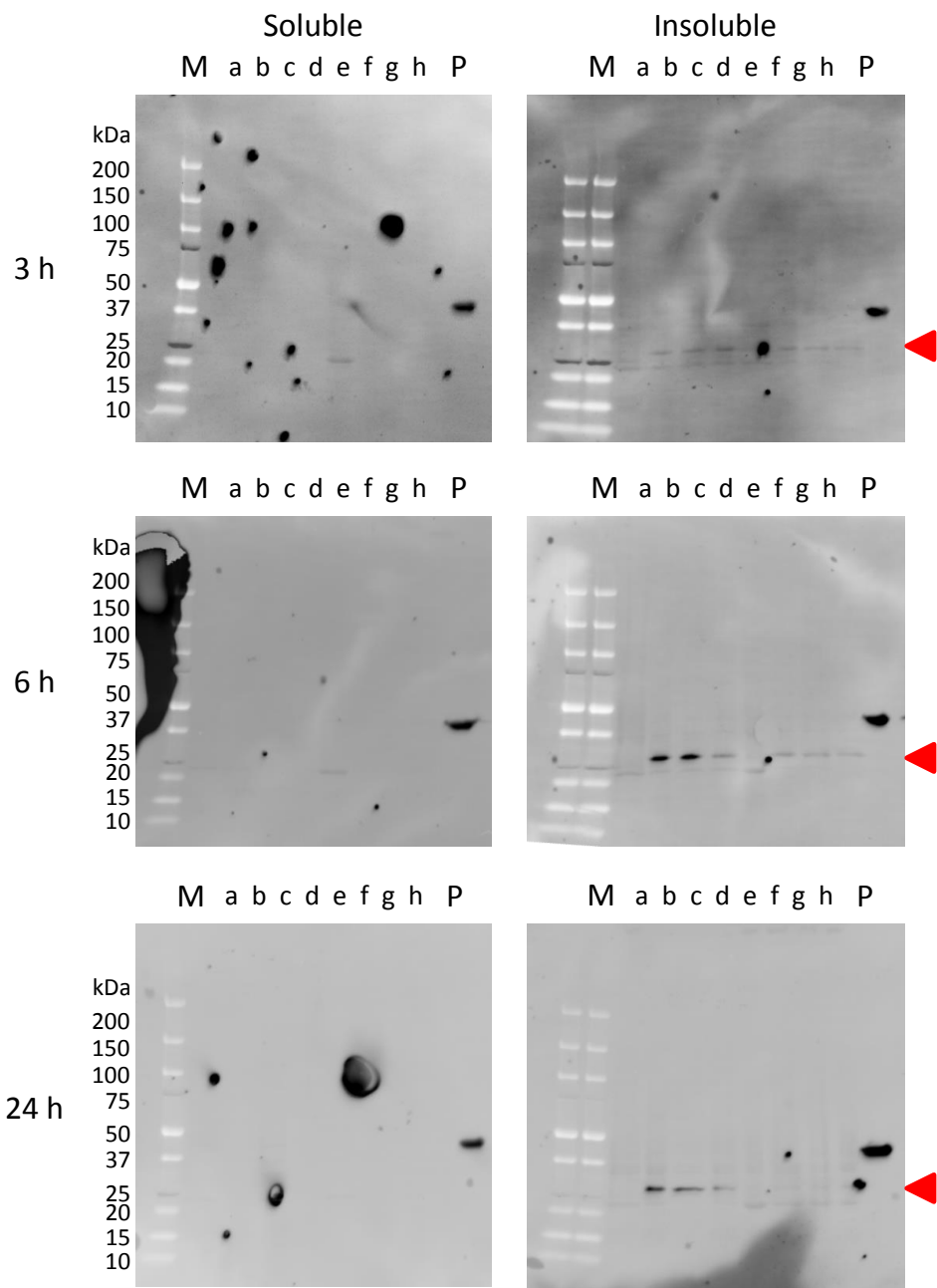


図 1-3-1-2 大腸菌による 102-10 scFv の発現誘導の条件検討。IPTG 添加後の誘導時間（1 時間、6 時間、24 時間）と培養温度（28°C、37°C）の違いによる、それぞれの可溶性および不溶性画分の 102-10 scFv 発現を、抗ヒスタグ抗体-HRP のウエスタンブロッティングにより検出・確認した。M; 分子量マーカー、P; ヒスタグポジコン。a-d が 28°C 振とう培養で異なる IPTG 濃度 a; 0 mM、b; 0.1 mM、c; 0.5 mM、d; 1.0 mM での、e-h が 37°C 振とう培養で異なる IPTG 濃度 e; 0 mM、f; 0.1 mM、g; 0.5 mM、h; 1.0 mM での発現誘導。赤色三角で示した位置が 102-10 scFv と推定されるバンド。



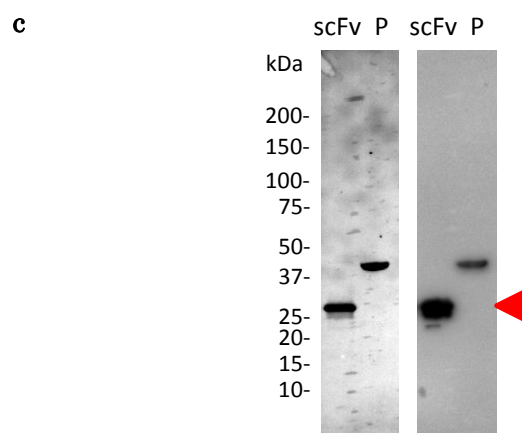
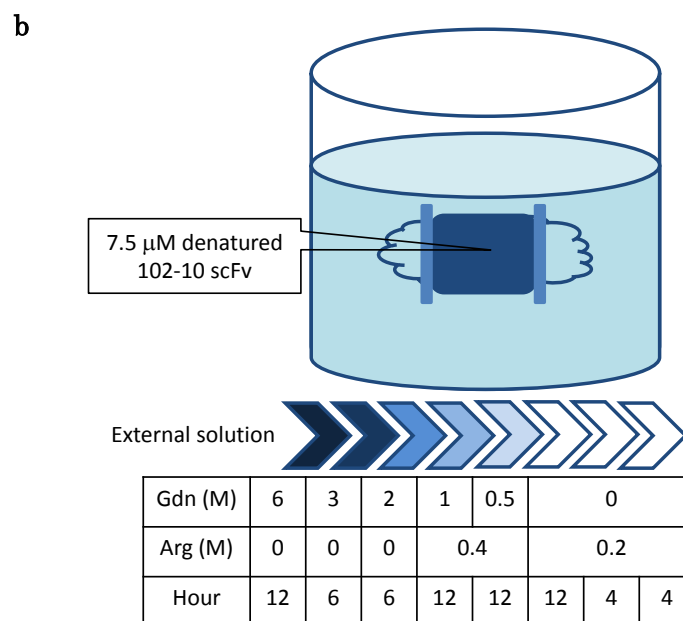
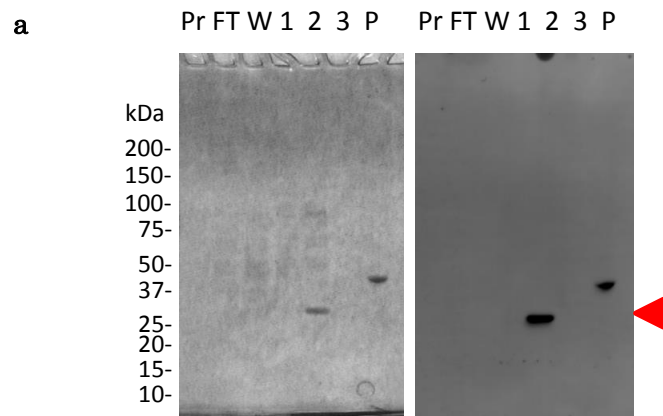


図 1-3-1-3 大腸菌で発現させた 102-10 scFv の単離、巻き戻し、精製。  
(説明文の続きは次ページへ)

(図 1-3-1-3 説明文の続き)

(a) 102-10 scFv を発現誘導した大腸菌の不溶性画分をヒスタグ精製した各画分の SDS-PAGE (左) と抗ヒスタグ抗体-HRP によるウエスタンブロッティング (右)。それぞれの画分は次の通り、Pr; プレカラム、FT; 素通り、W; ウォッシュ、1; 10 mM イミダゾール溶出、2; 200 mM イミダゾール溶出、3; 500 mM イミダゾール溶出、P; ヒスタグポジコン。赤色三角で示した位置が 102-10 scFv と推定されるバンド。(b) 変性 102-10 scFv の多段階透析による巻き戻し実験の概要図。透析に膜に封入した変性 102-10 scFv を封入量の 50 倍容量以上の外液に浸し、外液のグアニジン濃度を段階的に引き下げることにより、変性 102-10 scFv を活性のある立体構造に巻き戻した。1 M 以下のグアニジン透析過程においては、アルギニンを添加することで 102-10 scFv の巻き戻しの最適化を図った。(c) 巻き戻し済み 102-10 scFv をゲル濾過精製後の SDS-PAGE と抗ヒスタグ抗体-HRP によるウエスタンブロッティング。左は PVDF 膜転写後の CBB 染色の、右はウエスタンブロッティングの結果をそれぞれ示す。scFv; ゲル濾過精製後の 102-10 scFv 画分、P; ヒスタグポジコンをそれぞれ表す。赤色三角で示した位置が 102-10 scFv と推定されるバンド。すべてのサンプルは還元状態で電気泳動した。

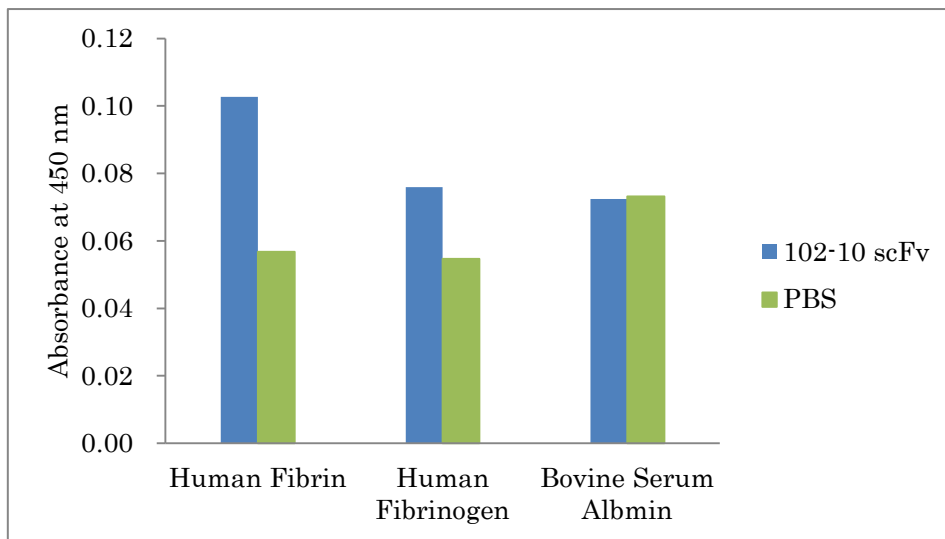
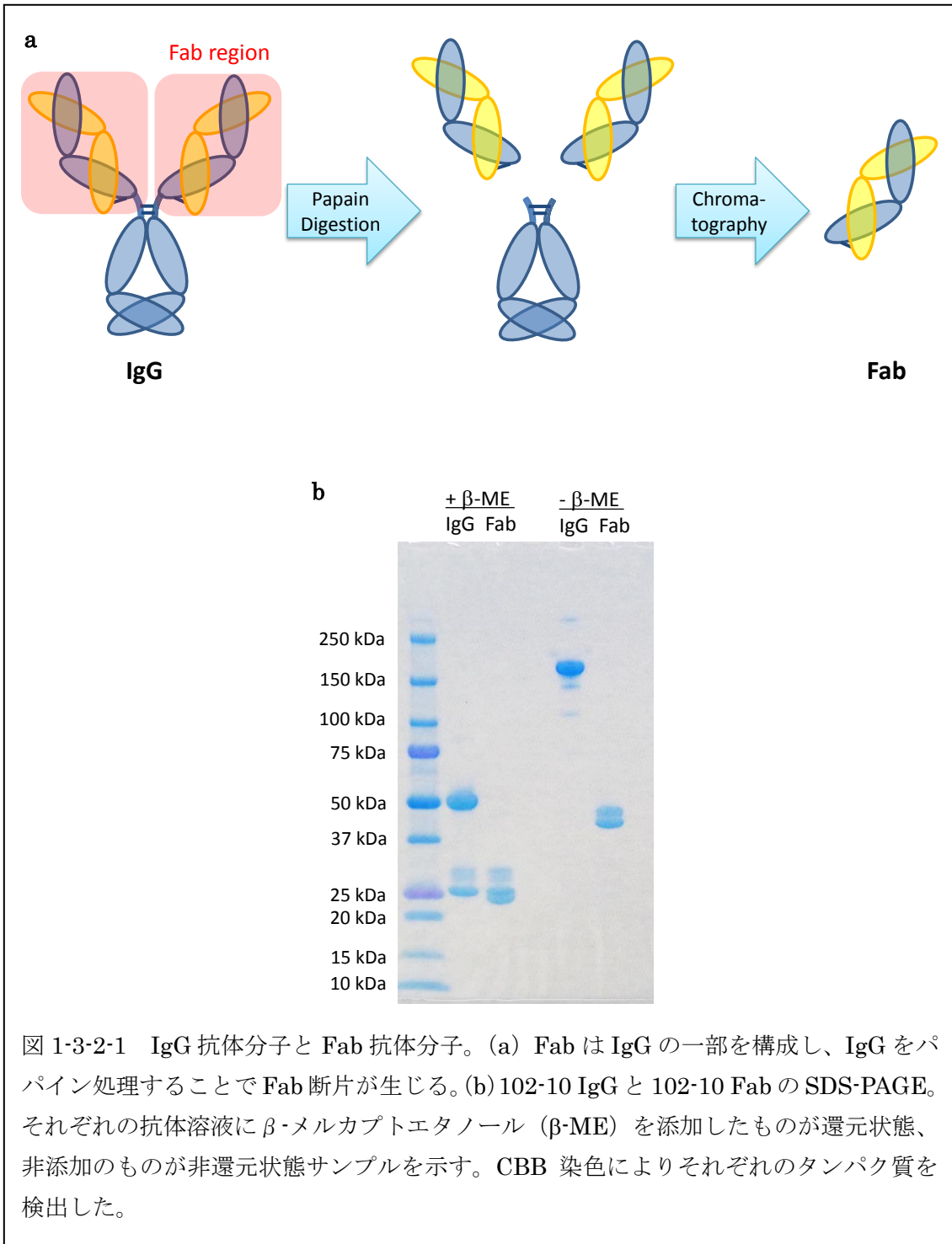


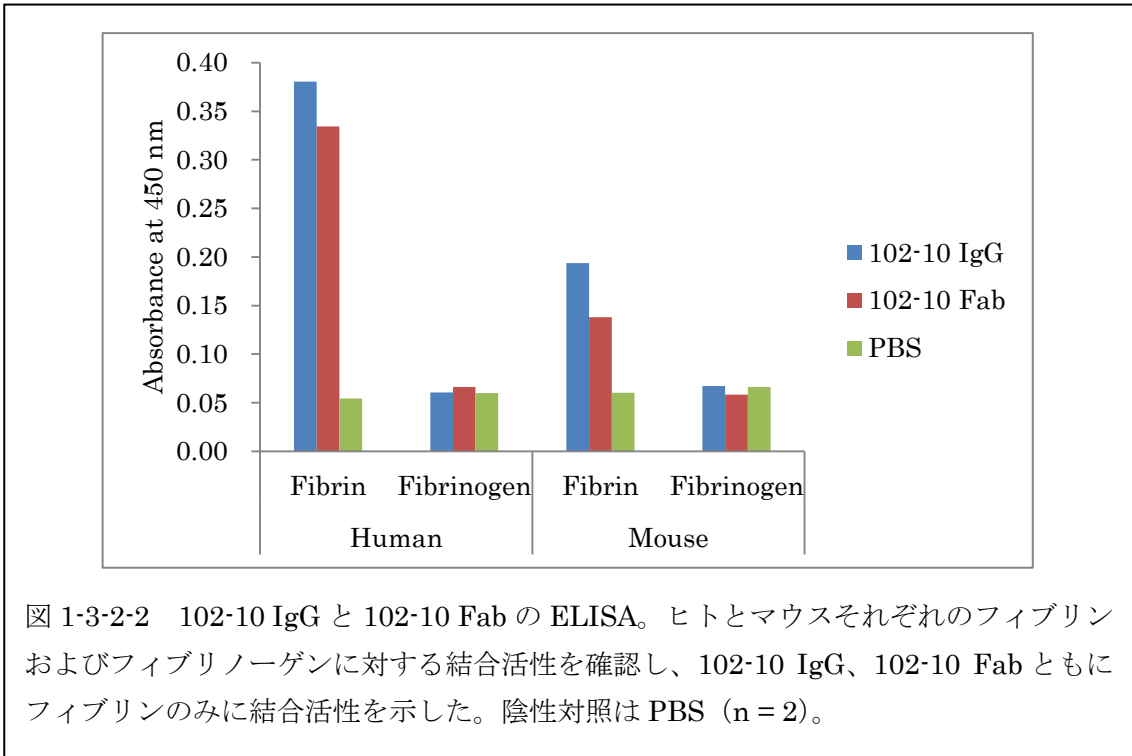
図 1-3-1-4 102-10 scFv の ELISA による活性確認。固相化したヒトフィブリン、ヒトフィブリノーゲン、およびウシ血清アルブミンに対する 102-10 scFv の結合能を測定した。PBS 溶液を 102-10 scFv の陰性対照とした (n = 2)。

### 1-3-2 102-10 Fab の作製と活性確認

次に、低分子化抗不溶性フィブリン抗体として 102-10 Fab の作製を討した。精製した 102-10 IgG を固定化パパイン処理、プロテイン A による Fc 部分の除去、および分子ふるいクロマトグラフィーにより単離・精製して 102-10 Fab を作製した (図 1-3-2-1a)。SDS-PAGE により精製した 102-10 IgG と 102-10 Fab の純度とサイズを確認した結果、非還元状態の 102-10 IgG は約 150 kDa の位置に主要な一つのバンドが認められ、同状態の 102-10 Fab は 50 kDa 弱の位置に主要なバンドが認められた (図 1-3-2-1b)。102-10 Fab は主要なバンドより高分子側にマイナーバンドが確認されたが、102-10 IgG は糖鎖修飾された軽鎖の存在が確認されており、糖鎖修飾の不均一性に起因するマイナーバンドであると推察された。一方還元状態においては、102-10 IgG は約 50 kDa の重鎖と約 25 kDa の軽鎖が、102-10 Fab は約 25 kDa の重鎖および軽鎖がそれぞれ主要なバンドとして確認され、102-10 IgG および 102-10 Fab とともに 25~30 kDa 付近に前述の糖鎖修飾された軽鎖によるマイナーバンドが確認された。すべてのサンプルにおいて本研究において問題のない純度であると判断し、以降の実験に用いた。

102-10 IgG および 102-10 Fab の結合活性を ELISA により測定した。前述の通り 102-10 IgG のエピトープ配列は脊椎動物において広く保存されており、実験的にマウスフィブリンにも交差反応することを既に実験的に証明済みである<sup>46</sup>。本研究でもヒトフィブリンとマウスフィブリンに対するそれぞれの結合活性を測定し、且つヒトとマウスそれぞれの、フィブリンの前駆体であるフィブリノーゲンに対する反応性も確認した。図 1-3-2-2 に示すように 102-10 Fab の結合能は 102-10 IgG のそれより劣るものの、ヒトとマウスそれぞれのフィブリンに結合活性を保持していた。さらにそれぞれのフィブリノーゲンには結合活性を示さなかった。以上の結果より、元の 102-10 IgG の親和性よりは劣るものの、ヒトとマウスのフィブリンへの結合活性を保持した 102-10 Fab を得られたものとし、以降の実験に用いた。





### 1-3-3 ヒトがん細胞株皮下移植モデルマウスによる評価

102-10 Fab プローブの生体内での挙動を調べるためには、動物実験でその腫瘍集積能や生体分布を評価する必要がある。実験動物種にはほかの動物と比べ飼育管理が比較的容易なマウスを選択した。今日様々な担がんモデルマウスが開発されているが、培養したヒトがん細胞株をマウスの皮下へ移植する皮下移植モデルはその手技が最も簡便であるため、まず皮下移植モデルを作製し、がん間質中の不溶性フィブリンを標的としたイメージングプローブの評価が可能であるか確認した。がん細胞株には臨床で最も豊富な間質形成がみられる膵がんの細胞株である BxPC-3 および HPAF-II と、同じく豊富ながん間質が形成されるスキルス胃がん細胞株より派生した 44As3 を用いた。BxPC-3 は本研究室で皮下移植においても若干の間質形成が認められていたことから選択した。HPAF-II は皮下移植と同所移植モデルマウスで血液凝固関連因子であるトロンビン-アンチトロンビン複合体 (TAT) および D-ダイマーの上昇が報告されていたことから選択した<sup>47</sup>。トロンビンの制御機構は他にも存在するためトロンビン生成が必ずしもフィブリン形成を促すものではないが、血漿中の TAT 濃度はトロンビン生成を反映し、血液凝固系の活性化を反映するものとされている<sup>48</sup>。また D-ダイマーはフィブリン分解産物の一つであり、これも血液凝固亢進状態を反映する因子の一つである。44As3 は同所移植においては比較的豊富ながん間質が形成される報告があるため選択した<sup>39</sup>。

それぞれのヒトがん細胞株を培養後、マウス一匹あたり BxPC-3 と 44As3 は  $1 \times 10^6$  個、HPAF-II は  $4 \times 10^5$  個をそれぞれ同一マウスの皮下に移植した。その後 13 日間、担がんマウスを飼育し腫瘍を成長させ、*in vivo* イメージング実験に用いた。102-10 Fab の挙動を追跡するために、近赤外線蛍光プローブ、AF 750 で 102-10 Fab を標識した 102-10 Fab-AF 750 およびコントロール Fab-AF 750 を担がんマウスへ尾静脈投与した。102-10 Fab-AF 750 およびコントロール Fab-AF 750 とともにそれぞれに含まれる蛍光団は等量となるよう調整後、マウスあたり 100  $\mu\text{g}$  を尾静脈投与した。それぞれのプローブを投与後 1 時間、4 時

間、8時間、24時間で蛍光 *in vivo* イメージングを行った結果、すべての皮下腫瘍において投与後8時間までは腫瘍への集積が一定程度認められたが、102-10 Fab-AF 750 の集積シグナルは病変部を描出するには小さく、コントロール Fab-AF 750 との差もほとんど見られなかった(図 1-3-3-1)。生体投与直後から腎臓で強いシグナルが確認されたことから 102-10 Fab-AF 750 は腎排泄により体外へ尿路系で排泄されていることが示唆され、投与後24時間では全身で蛍光の著しい減衰が確認された。102-10 Fab-AF 750 の腫瘍集積がほとんど見られなかったのは、後述のその病理組織像および免疫組織化学染色からも推察されるように皮下移植モデルにより形成される腫瘍の特性がヒト腫瘍と異なり、ターゲットとなるフィブリン沈着が著しく少ないことに起因すると考え、別の腫瘍モデルを検討することとした。



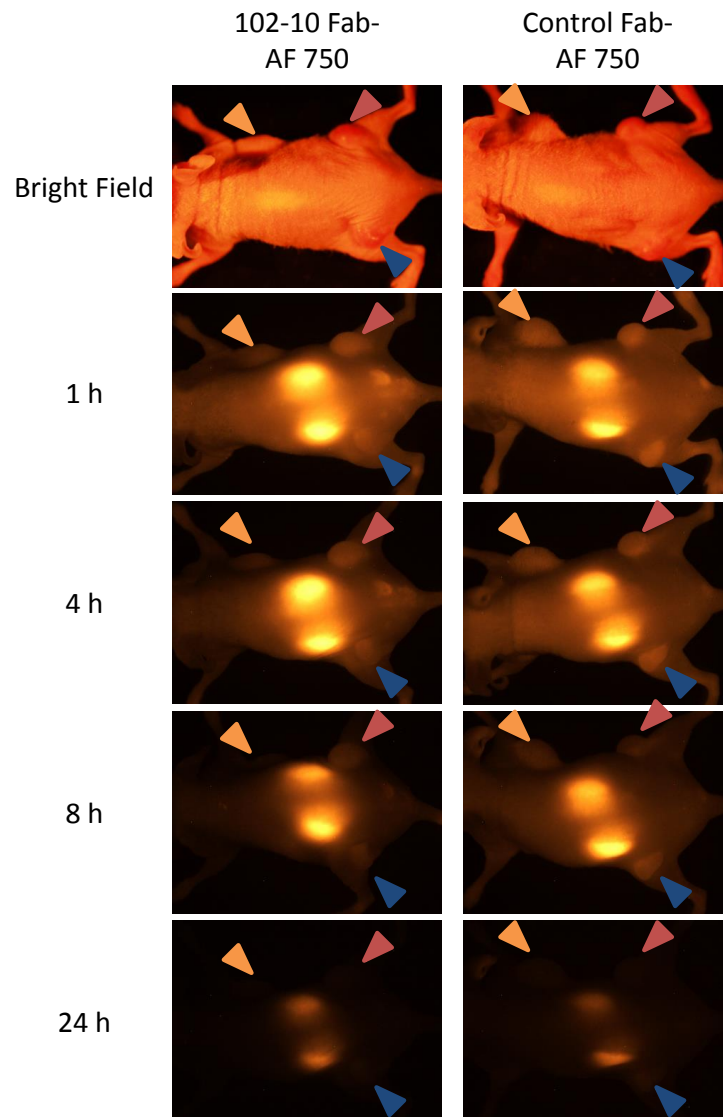


図 1-3-3-1 各種ヒトがん細胞株を皮下移植担がんマウスへ 102-10 Fab-AF 750 およびコントロール Fab-AF 750 尾静脈投与後の *in vivo* イメージング。投与後 24 時間までの画像を示す。各種三角形のうち橙色がヒト胃癌細胞株 44As3、赤色がヒト膵がん細胞株 BxPC-3、青色がヒト膵がん細胞株 HPAF-II の皮下腫瘍形成部位をそれぞれ示す。最も強い蛍光シグナルが認められるのは腎臓。

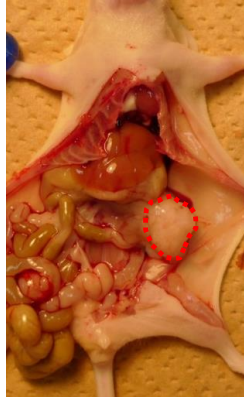
#### 1-3-4 ヒト膵がん細胞株同所移植モデルマウスによる評価

皮下移植モデルより技術的な難易度が上がるが、ヒトがん細胞株あるいはヒト腫瘍塊をその原発巣と同じ実験動物の臓器へ移植する同所移植モデルは、腫瘍局所の成長ホルモンや間質細胞等が移植した腫瘍にとってより自然で、より本来に近いがん微小環境を反映することが期待される<sup>35</sup>。さらに HPAF-II の同所移植モデルマウスは、ヒトのがん患者のように血液凝固亢進状態にあることが報告されている<sup>47</sup>。これらのことよりヒト膵がん細胞株、HPAF-II の同所移植モデルマウスが 102-10 Fab によるがんイメージングのモデルマウスになりえるのではないかと考え、その担がんマウスを作製し *in vivo* イメージングを実施した。

培養した HPAF-II を PBS で洗浄してから 50% マトリゲルに懸濁後、 $5 \times 10^5$  個をマウスの膵臓へ移植した。HPAF-II 同所移植マウスを 30 日間飼育して腫瘍を成長させた後、それぞれの蛍光団数を等しくした 90  $\mu$ g 102-10 Fab-AF 750 およびコントロール Fab-AF 750 を担がんマウスへ尾静脈投与した。それぞれの Fab を標識した AF 750 は近赤外線領域で生体透過性が優れてはいる蛍光分子であるが、生体内深部の膵臓の腫瘍に存在する蛍光分子を生体外から *in vivo* イメージングで観察することは困難であった。そのため皮下腫瘍の場合と異なり、尾静脈投与 3 時間後に各臓器を摘出し (図 1-3-4-1a)、蛍光 *ex vivo* イメージングにより各 Fab プローブの臓器分布を観察した。腫瘍が形成されている膵臓の蛍光強度は 102-10 Fab-AF 750 およびコントロール Fab-AF 750 投与マウスで、同程度に低い結果となった (図 1-3-4-1b)。生体投与された Fab は主に尿路系で排泄されることが「1-3-3 ヒトがん細胞株皮下移植モデルマウスによる評価」からも示唆されており、腎臓に強いシグナルが認められた。またその一部は肝臓のクッパー細胞により貪食され排泄されるため、肝臓にもシグナルが認められたが、他の主要臓器である肺、心臓、胃、脾臓のいずれの臓器にもシグナル強度に差異は見られなかった。腫瘍形成があった膵臓への 102-10 Fab-AF 750 集積がみられなかった原因の一つとして、皮下移植モデルと比較するとがん細胞を取り巻く微小環境はより本来的なものに近いものの、同所移植モデルにおいても形成される腫

瘍の特性がヒト腫瘍とはやはり異なり、後述するようにヒト膵がんと異なり腫瘍組織内の不溶性フィブリン沈着が形成されなかったことが主な原因と考えられる。以上の結果より、さらにヒト膵がんに近い特性を持つ腫瘍モデルマウスを検討することとした。

a



b

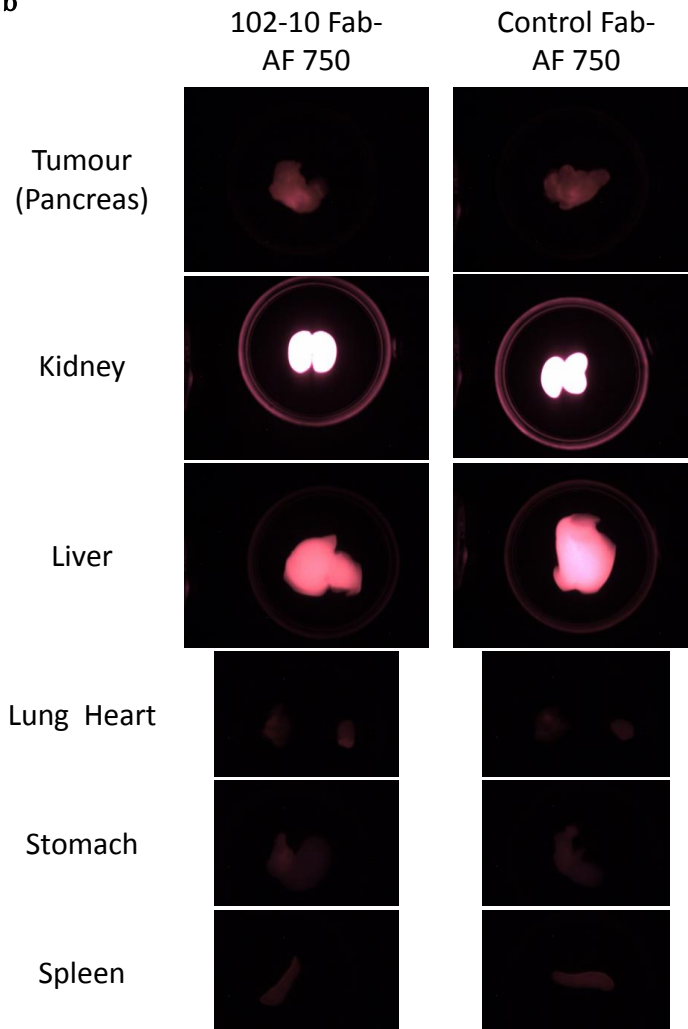
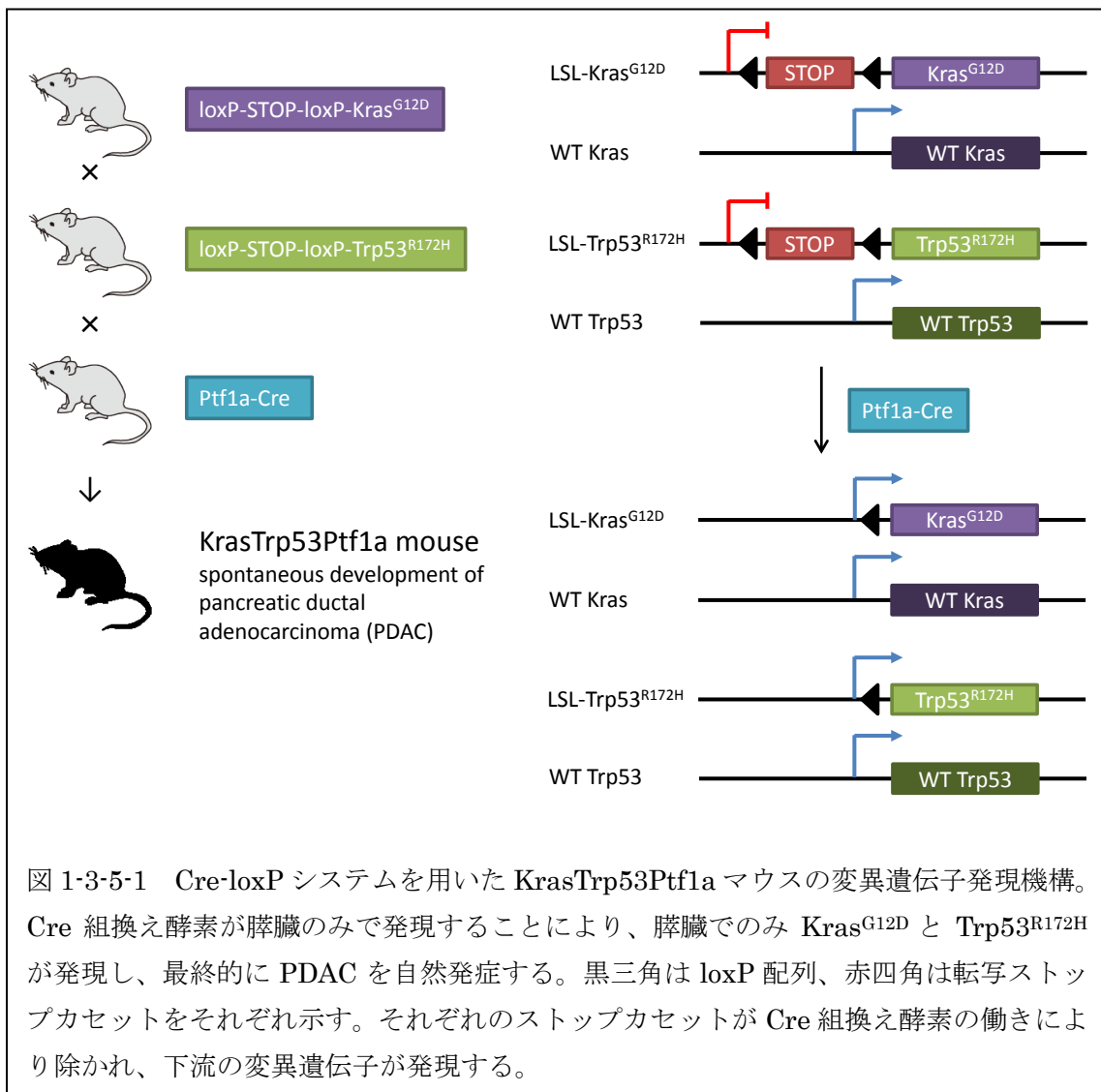


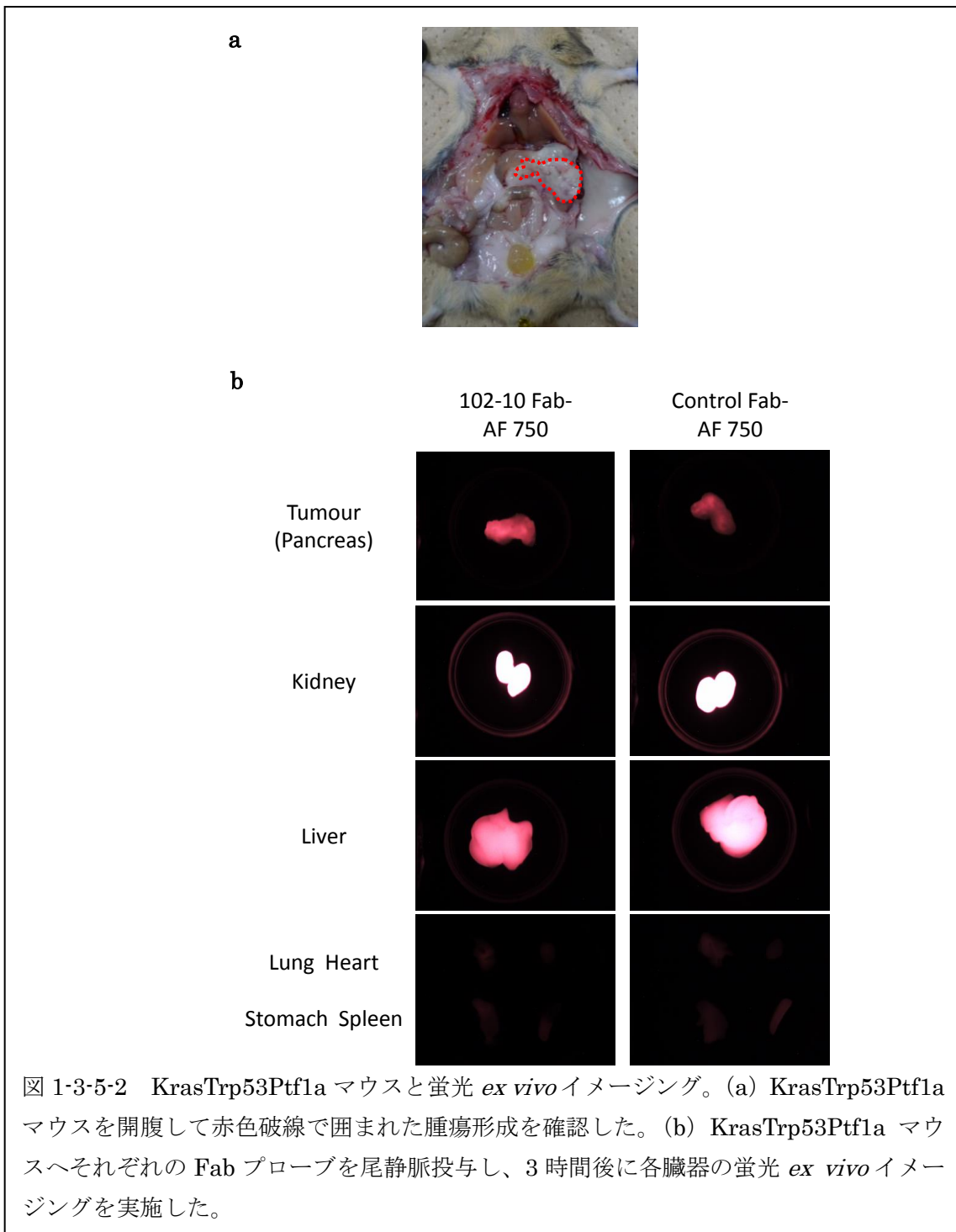
図 1-3-4-1 ヒト膵がん細胞株同所移植モデルマウスと蛍光 *ex vivo* イメージング。(a) HPAF-II をヌードマウスへ同所移植 30 日後の開腹により赤色破線で囲まれた腫瘍形成を確認した。(b) 同所移植 30 日後のモデルマウスへ Fab プローブを尾静脈投与し、3 時間後に実施した各臓器の蛍光 *ex vivo* イメージング。

### 1-3-5 三重変異膵がん自然発症モデルマウスによる評価

ヒト膵がんにおいてがん原遺伝子の *Kras* およびがん抑制遺伝子の *Trp53* はそれぞれ 90-95% および 75-80% と高頻度で変異していることが報告されている<sup>49</sup>。これらの変異遺伝子を膵臓で発現した膵がんモデルマウスは、ヒト膵がんと病理学的に非常に類似していることが報告されている<sup>36,42</sup>。さらに *Kras* と *Trp53* 以外に起こる遺伝子変異および生化学的性質なども類似しており、ヒト膵がんの性質と病態とよく反映したモデルとされている<sup>36</sup>。そのため、これらの変異を有した遺伝子改変マウス (oncomice) が本研究に適しているのではないかと考えた。部位特異的組換えシステムの *Cre-loxP* システムで膵臓特異的に *Kras*<sup>G12D</sup> と *Trp53*<sup>R172H</sup> を膵臓特異的に発現させるため、まず *Kras*<sup>G12D</sup> と *Trp53*<sup>R172H</sup> の遺伝子上流近傍に *loxP* 配列を組み込んだ (*LSL-Kras*<sup>G12D</sup> および *LSL-Trp53*<sup>R172H</sup>) 遺伝子改変マウス<sup>42</sup>、さらに膵臓の発生初期に発現する *Ptf1a* のタンパクコード領域をバクテリオファージ P1 の *Cre* に置き換えた (*Ptf1a-Cre*) 遺伝子改変マウスを準備した<sup>43</sup>。次に *LSL-Kras*<sup>G12D</sup>、*LSL-Trp53*<sup>R172H</sup> および *Ptf1a-Cre* それぞれの遺伝子改変マウスを掛け合わせた *LSL-Kras*<sup>G12D</sup> ; *LSL-Trp53*<sup>R172H</sup> ; *Ptf1a-Cre* (*KrasTrp53Ptf1a*) 三重変異マウスを作製した (図 1-3-5-1)。*KrasTrp53Ptf1a* マウスの飼育・繁殖する過程で適宜マウスの膵臓 (腫瘍) を摘出し病理組織を確認した結果、本研究の飼育環境下で生後 8 週齢以内に膵管腺がん (pancreatic ductal adenocarcinoma; PDAC) をほぼ確実に発症しており、*ex vivo* イメージング実験には 12 週齢以降のマウスを用いた。*Kras*<sup>G12D</sup> と *Trp53*<sup>R172H</sup> は *Ptf1a-Cre* の制御下で発現をするため、膵臓以外ではこれらの変異遺伝子は発現しない。発症した膵がんが進行すると隣接する臓器への浸潤が認められた。まれに肝転移が認められた症例も存在したが、そこに至るまでには数か月の期間を要した。本研究においてはすべての動物実験を 21 週齢以下の外観および行動に異常のないマウスで実施し、また開腹時に膵臓以外へのがんの浸潤および転移がないことを確認しており、膵臓以外の臓器への影響はないと判断した (図 1-3-5-2a)。

KrasTrp53Ptf1a マウスを用いて、予備的試験な 102-10 Fab イメージング実験を行い、モデル動物として適しているか評価をした。それぞれ AF 750 で標識した 102-10 Fab およびコントロール Fab を準備し、それぞれに含まれる蛍光団数を等量に調整したのち、マウスあたり 90  $\mu$ g を尾静脈投与した。同所移植モデルの場合と同様、生体外観察である *in vivo* イメージングではその蛍光を検出することができないため、投与 3 時間後に *ex vivo* イメージングを行った。腫瘍（脾臓）の蛍光強度はコントロール Fab-AF 750 投与マウスと比較すると、102-10 Fab-AF 750 投与マウスで明らかに強いシグナルが確認された(図 1-3-5-2b)。予備実験であったため n = 1 の結果であり、統計学的解析を行うことができなかったが、これまでの皮下腫瘍モデルや同所移植モデルのとは明らかに異なる結果であった。またその他の臓器に関しては、排泄経路に関与している腎臓や肝臓では予想された程度の生理的集積がみられたが、その他の観察臓器ではほとんどシグナルが認められなかった。この結果から、本研究においては脾がんを自然発症する KrasTrp53Ptf1a マウスを用いることが適している可能性が高く、それぞれのモデルマウスの病理組織を観察することとした。







### 1-3-6 各種モデルマウスの腫瘍組織像と不溶性フィブリン沈着

102-10 Fab プローブの集積がみられなかった皮下移植および同所移植モデルマウスと集積が認められた膵がん自然発症 *KrasTrp53Ptf1a* 遺伝子改変モデルマウスの腫瘍では、病理組織学的にどのような相違があるのか、組織切片を観察比較することで確認した。ヒト膵がん細胞株 BxPC-3 の皮下腫瘍組織、HPAF-II の同所移植腫瘍組織と *KrasTrp53Ptf1a* マウスの腫瘍（膵臓）組織の凍結切片をそれぞれヘマトキシリン・エオジン（HE）染色後に観察した。腫瘍組織はすべて膵がんモデルの腫瘍であり、比較対象としてヒト PDAC 組織を観察した。また参考としてマウスおよびヒト正常膵臓も観察した。BxPC-3 皮下腫瘍は、大部分のがん細胞とわずかな間質から組織されていた（図 1-3-6-1a）。ほかの一般的なマウスの皮下腫瘍組織と比較するとがん間質組織が形成されている部類ではあるが、ヒト PDAC 組織と比較するとその割合は極小であった。同所移植した HPAF-II の腫瘍組織は腺管構造を維持した高分化型の組織像を示した。がん間質も幾分形成されていたが、それでもヒト PDAC よりはかなり少ないものであった（図 1-3-6-1b）。*KrasTrp53Ptf1a* マウスの腫瘍（膵臓）組織は摘出時に正常膵臓と比較して硬化が認められ線維化が進んでおり、またその組織像は腺管構造を維持した中-高分化型であり、がん間質が豊富に認められた。今回検討した動物モデルの中ではヒト PDAC と組織学的に最も類似していた（図 1-3-6-1c）。対象としたヒト PDAC は中分化型であり、がん間質組織が大部分を占め線維化が進んでいた様子がかがえ、その中に浸潤したがん細胞が散在していた（図 1-3-6-1d）。それぞれの病理組織像はマウスおよびヒト正常膵臓とは著しく異なるものであった（図 1-3-6-1e および f）。

「序論」でも述べたとおり腫瘍組織の不溶性フィブリン形成はがん細胞の活動による微小出血が原因の一つであると考えられる。形成された不溶性フィブリンは線溶系により分解され、細胞外マトリックスの一種であるコラーゲンへ置換され、がん間質を形成する。がん微小環境においてこのような生体反応が連続的に起きていると考えられることから、

がん間質が豊富なものは、多くの不溶性フィブリンが形成されていると考えられる。その検証も含め、引き続きそれぞれの組織の不溶性フィブリン沈着を免疫組織化学染色により確認した。BxPC-3の皮下腫瘍では間質部分に若干の不溶性フィブリン沈着を認めたものの、そもそも間質割合が少ないこともあり、組織全体での不溶性フィブリン沈着はかなり少ないものであった(図 1-3-6-2a)。同所移植した HPAF-II の腫瘍組織では間質組織においても不溶性フィブリンがほとんど検出されず、不溶性フィブリン陰性であった(図 1-3-6-2b)。**KrasTrp53Ptf1a** マウスの腫瘍(膵臓)ではがん間質領域に不溶性フィブリン沈着が強陽性に認められ(図 1-3-6-2c)、この程度や分布の様子はヒト PDAC のそれと類似点を確認された(図 1-3-6-2d)。マウスおよびヒト正常膵臓では不溶性フィブリン沈着は認められなかった(図 1-3-6-2e および f)。

以上の結果から本研究で検討した限りではヒト PDAC と同様にごん間質が豊富な **KrasTrp53Ptf1a** マウスの腫瘍組織では強い不溶性フィブリンの沈着が認められ、腫瘍組織中でごん間質が占める割合が大きいほど不溶性フィブリン沈着も強くみられる傾向が認められた。蛍光 *in vivo* および *ex vivo* イメージングの予備実験の結果も勘案すると、102-10 Fab プローブの集積がみられた **KrasTrp53Ptf1a** マウスの腫瘍組織は膵がん皮下移植腫瘍組織および同所移植腫瘍組織とその特徴が異なり、ヒト PDAC にみられる豊富ながん間質形成と強い不溶性フィブリン沈着などの特徴を有しており、本研究のモデルマウスとして適していると判断し以降の実験へ用いることとした。

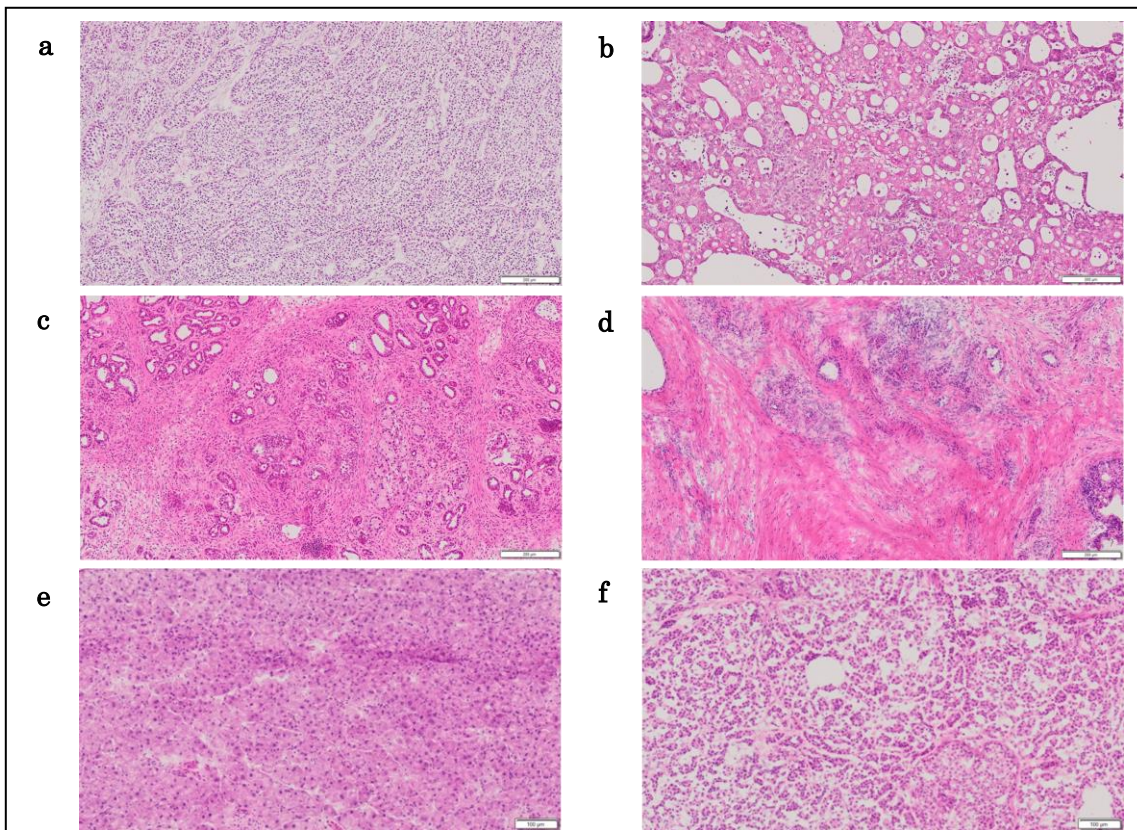


図 1-3-6-1 各種がんおよび正常組織の HE 染色による病理組織像。(a) ヒト膵がん細胞株 BxPC-3 の皮下移植腫瘍組織。(b) ヒト膵がん細胞株 HPAF-II の同所移植腫瘍組織。(c) 膵がん自然発症 *KrasTrp53Ptf1a* マウスの腫瘍 (膵臓) 組織。(d) ヒト PDAC 組織。(a) ~ (d) スケールバーは 200  $\mu\text{m}$  を表す。(e) マウス正常膵臓組織。(f) ヒト正常膵臓組織。(e) ~ (f) スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を表す。

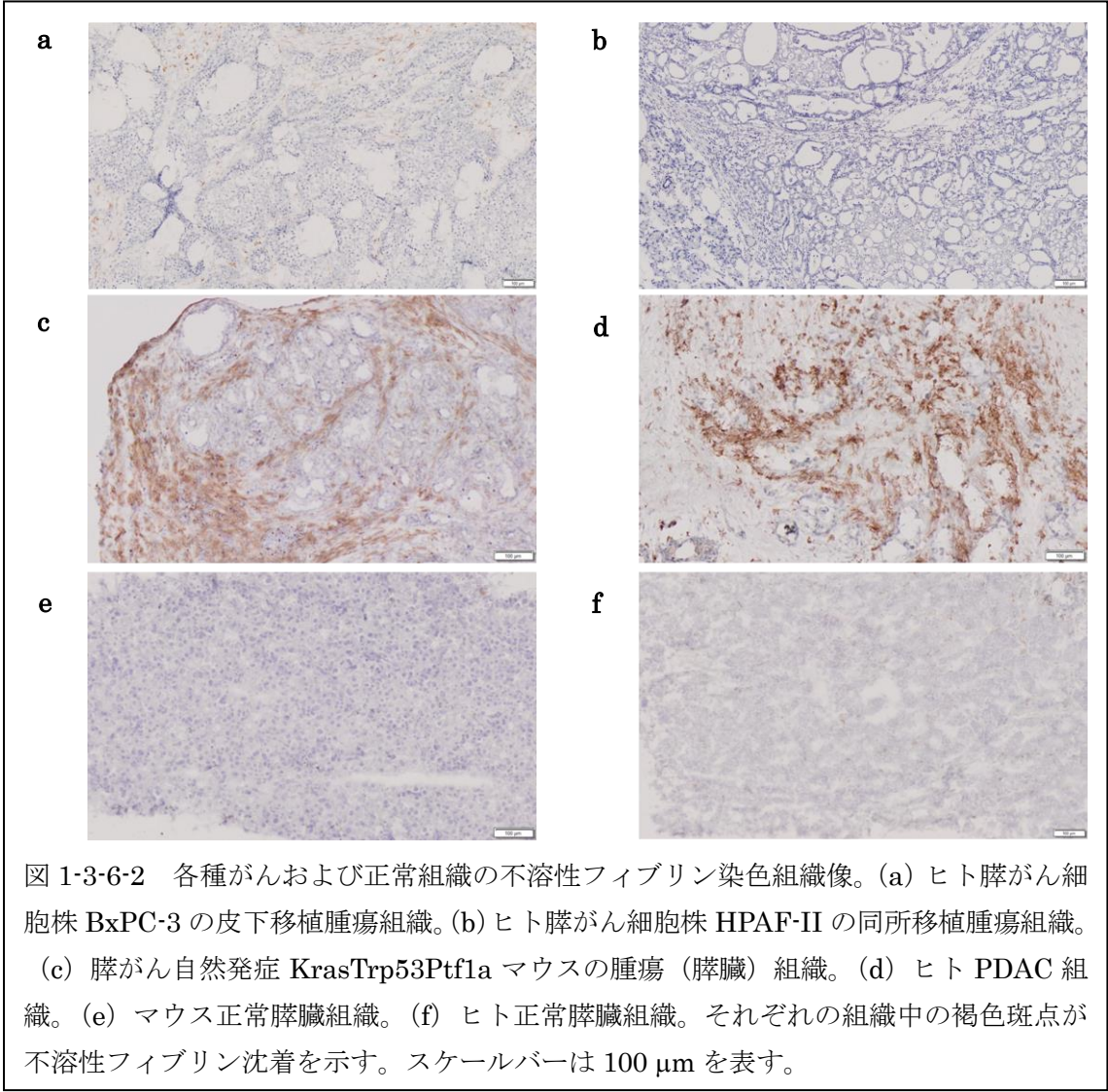


図 1-3-6-2 各種がんおよび正常組織の不溶性フィブリン染色組織像。(a) ヒト膵がん細胞株 BxPC-3 の皮下移植腫瘍組織。(b) ヒト膵がん細胞株 HPAF-II の同所移植腫瘍組織。(c) 膵がん自然発症 KrasTrp53Ptfla マウスの腫瘍 (膵臓) 組織。(d) ヒト PDAC 組織。(e) マウス正常膵臓組織。(f) ヒト正常膵臓組織。それぞれの組織中の褐色斑点が不溶性フィブリン沈着を示す。スケールバーは 100 μm を表す。

## 1-4 考察

大腸菌発現系により作製を試みた 102-10 scFv は、不溶性画分からの変性剤による可溶化および多段階透析法による巻き戻しにより、ヒトフィブリンに対する結合活性を有する 102-10 scFv を得ることができた。しかしながらその収量は当初想定していたものより少量であった。当初は本研究でのがん分子イメージングプローブへの応用はもとより、抗がん剤の腫瘍組織へ送達するパイロット分子としての研究開発も想定していたため、必要量を確保するためのコストがかなり大きくなってしまふことが予想された。原因として 102-10 IgG の V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> の遺伝子配列もしくはアミノ酸配列が大腸菌内で大量発現することに不向きだった可能性、発現させた 102-10 scFv のアミノ酸一次配列や高次構造が今回の巻き戻しの系に不向きだった可能性など、102-10 scFv 配列に起因する特性が障壁となった可能性が考えられる。一方 102-10 IgG から調製した 102-10 Fab はヒトおよびマウスフィブリンのみに反応する結合特異性を保持していた。さらに 102-10 IgG からの作製効率は 30% 程度で再現性があり、一般的に同手法で作製される Fab と遜色なく、本研究で見込まれる使用量を調製するコストも対応できる範囲内であったため、がん分子イメージングプローブへ応用することとした。

さらに動物モデルの検討においては、それぞれの研究目的に応じた担がんモデルマウス選択の重要性を再認識するに至った。臨床検体ではさまざまな固形腫瘍においてその組織内に不溶性フィブリン沈着がみられることが報告されているが<sup>20,50</sup>、実験的に作られた多くの担がんマウスモデルにおいてはヒトではがん間質が豊富に形成される膾炙がんでさえその細胞株の異種移植モデルにおいてはがん間質の形成が乏しく<sup>51</sup>、不溶性フィブリン沈着もほとんど見られないことが報告されている<sup>18</sup>。今日までにさまざまな担がんモデルマウスが開発されているが<sup>35</sup>、その簡易さゆえ多くの実験系で用いられているヒトがん細胞株を免疫不全マウス皮下に移植する皮下移植モデルでは、そのがん組織の大部分ががん細胞から構成

されがん間質がほとんど存在せず、実際の臨床病理組織を反映していないことが多く<sup>35</sup>、本研究も例外ではなかった。本研究で検討した条件においては、膵がんを自然発症する遺伝子改変モデル、**KrasTrp53Ptf1a** マウスではコントロール Fab と比較して 102-10 Fab プロローブの明らかな腫瘍（膵臓）への集積が確認された。さらにそれぞれのモデルの腫瘍組織像を HE 染色で確認した結果、**KrasTrp53Ptf1a** マウスの組織像が示す腫瘍組織の不均一性や豊富に存在するがん間質などの特徴が、ヒト PDAC の示す組織像と非常に類似していた。もとより膵がん自然発症遺伝子改変モデルマウスの腫瘍は時間をかけて発がん過程が進行し、ヒト PDAC の生化学的特徴を模しているとされ、他の研究報告でもがん間質を標的とした膵がん治療の研究開発に用いられているが<sup>11,12,52</sup>、本研究においても適切なモデルマウスであると考えられた。**KrasTrp53Ptf1a** マウスで形成される腫瘍は、前述のような特性に加えてヒトの難治性がんにみられるような、正常間質を侵しながら増殖していく攻撃的な浸潤性の増殖による周辺組織を破壊する特性が、豊富ながん間質形成および不溶性フィブリン沈着をもたらしたのではないかと推察される。

今回検討した結果から、本研究では不溶性フィブリンを標的としたがん分子イメージングプローブ開発の基本骨格には 102-10 Fab を用い、また実験動物には **KrasTrp53Ptf1a** マウスを用いて、がん間質の不溶性フィブリンを標的としたがん分子イメージングの概念実証を行っていくこととした。

## 第二章 抗不溶性フィブリン 102-10 Fab によるがん分子イメージング

### 2-1 諸言

第一章で検討を行った結果、分子サイズ、生産性、親和性および生体分布など総合的に考慮し 102-10 Fab が分子イメージングプローブとして有望であることが示唆され、さらに動物実験によるその評価には PDAC を自然発症する遺伝子改変マウス、KrasTrp53Ptf1a マウスが適切であることが示唆された。以上のことから構築した実験系を用いて、102-10 Fab を基本骨格としたがん分子イメージングプローブの開発に向けて、さらなる検討を行うこととした。

まずは 102-10 Fab の結合能について、ELISA 以外の方法でも確認をすることで多面的にその評価を行った。次に KrasTrp53Ptf1a マウスに尾静脈投与した 102-10 Fab の腫瘍集積性を評価し、さらに腫瘍組織内のフィブリン沈着のそれぞれの局在を観察することで 102-10 Fab の腫瘍集積性がフィブリンに対する結合特異的であるかどうかを調べた。最後に毒性試験としてフィブリンゲル形成および分解や生体内の血液凝固関連因子に 102-10 Fab が影響を及ぼすかどうかを調べた。

以上の解析により 102-10 Fab のがん分子イメージング薬剤としての機能、適性の評価を行った。

## 2-2 方法

### 2-2-1 表面プラズモン共鳴解析

表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance; SPR) 解析は Biacore T200 (GEヘルスケア) を用いて行った。102-10 IgG のエピトープ配列を含む合成ペプチド (CNIPVVGKECEEIIRHHHHHHW; 下線部がエピトープ配列) (シグマ) をリガンドとして、10 mM 酢酸ナトリウム pH 5.5 に懸濁し(終濃度 2 µg/ml)、CM5 センサーチップ (GEヘルスケア) にアミンカップリング法により固定化した (78.4 RU)。リファレンスセルは活性化・ブロッキングセルとした。NBS-N緩衝液 pH 7.4 (GEヘルスケア) に懸濁した 102-10 IgG もしくは 102-10 Fab (終濃度 46.8-1,500 nM) をアナライトとし、25°Cにてマルチサイクル法で測定した。相互作用測定の流速は 30 µl/min、接触時間を 120 秒間、解離時間を 120 秒間とした。再生は 10 mM グリシン-塩酸緩衝液 pH 1.5 (GEヘルスケア) で行い、流速は 30 µl/min、接触時間を 30 秒間、安定化時間を 30 秒間とした。解析は Biacore T200 evaluation software, version 1.0 (GEヘルスケア) にて Binding Model もしくは Bivalent Analyte により実施した。

### 2-2-2 腫瘍組織内の 102-10 Fab 分布とフィブリン沈着のそれぞれの局在観測

腫瘍組織内での 102-10 Fab およびコントロール Fab の局在観察のために、それぞれの Fab を Alexa Fluor 647 Antibody Labeling Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック) により蛍光分子 Alexa Fluor (AF) 647 で標識した 102-10 Fab-AF 647 およびコントロール Fab-AF 647 を準備した。また腫瘍組織内のフィブリン沈着を蛍光免疫組織化学染色で確認するために同様のラベリングキットを使用し、102-10 IgG-AF 488 を準備した。

それぞれに含まれる AF 647 の分子数を等量に調整した 102-10 Fab-AF 647 およびコントロール Fab-AF 647 を、それぞれ 270 µg ずつ KrasTrp53Ptf1a マウスおよび



C57BL/6JJms 正常マウス（日本 SLC）に尾静脈投与した。投与 3 時間後に「1-2-14 蛍光 *ex vivo* イメージング」と同様の手順で腫瘍（膵臓）あるいは正常膵臓を摘出後、「1-2-11 病理組織凍結切片作製とヘマトキシリン・エオジン染色」で述べた方法に従い、冷アセトン（和光純薬工業）固定まで行った。その後 5% スキムミルク（ベクトン・ディッキンソン）で 30 分間ブロッキングし、続いて 5% スキムミルクで終濃度 1  $\mu\text{g/ml}$  に希釈した 102-10 IgG-AF 488 を用い、4°C で一晩もしくは室温で 1 時間抗体反応を行った。最後に 1  $\mu\text{g/ml}$  DAPI で核を対比染色し、Fluoromount G（SouthernBiotech）で封入後、バーチャルスライドシステム VS120（オリンパス）で蛍光観察した。

### 2-2-3 フィブリンゲル濁度測定

フィブリンゲル形成および分解反応は Kim *et al.* が考案した方法<sup>53</sup>に若干の変更を加えた方法で測定した。

フィブリンゲル形成反応の測定は、2.0 mg/ml フィブリンノーゲン（シグマ）、5 mM CaCl<sub>2</sub>（和光純薬工業）、0.01% Tween 80（MP Biomedical）および 0.5 NIH unit/ml トロンビン（シグマ）で調製したゲル形成反応液に 10  $\mu\text{g/ml}$  102-10 Fab あるいはコントロール Fab を添加して HBS pH 7.4 で 100  $\mu\text{l}$  とした反応系を 96 ウェルプレート（コーニング）上で反応系を作製した。続いて 37°C でフィブリンゲル形成に伴う濁度の上昇を、吸収波長 350 nm の変化を分光光度計、スペクトラマックスパラダイム（モレキュラーデバイス）で毎分測定することにより観測した。陰性対照としてフィブリンゲル形成反応系に Fab の代わりにトロンビン阻害剤として 0.3 unit/ml アンチトロンビン III（商品名；アンスロビン、CLS ベーリング）を添加した。

フィブリンゲル分解反応は、上記ゲル形成反応液に 0.2  $\mu\text{M}$  プラスミノノーゲン（Enzyme Research Laboratories）と 0.3 nM 組織型プラスミノノーゲン活性化因子（Technoclone）して HBS pH 7.4 で 100  $\mu\text{l}$  とし、ゲル形成反応後に連続して分解反応が進む系を作製した。

この反応系に 10 µg/ml 102-10 Fab あるいはコントロール Fab を添加し、陰性対照として線溶系阻害剤の 0.1 µM α<sub>2</sub>-プラスミン阻害剤 (Hematologic Technologies)、2.0 ng/ml プラスミノゲン活性化因子阻害剤-1 (Prospec) を添加して 37°C で波長 350 nm の吸光度変化を分光光度計、スペクトラマックスパラダイム (モレキュラーデバイス) で毎分測定した。

#### 2-2-4 マウス血小板の調製

マウス血小板の調製は Goodall *et al.* が報告している方法<sup>54</sup> に若干の変更を加えた方法で行った。27 ゲージニードル付シリンジ (テルモ) を用いて深麻酔下のマウス心採血を行い、0.5-1.0 ml の新鮮全血を、200 µl 20 U/ml ヘパリン (田辺三菱製薬) に懸濁した。500 × *g* で 5 分間遠心分離後、中・上層の血小板を含む画分として回収した。その後さらに 300 × *g* で 8 分間遠心分離後、上層の血小板を含む画分を回収し、0.5 µM プロスタサイクリン (Cayman Chemical) を添加した。1,300 × *g* で 8 分間遠心分離後、血小板沈殿を 1 ml B.E.PBS (2 mM EDTA (ロシュ)、0.1% BSA (同仁化学研究所) 含有 PBS) に懸濁し、0.02 U/ml アピラーゼ (New England BioLabs) および 0.5 µM プロスタサイクリンを添加し、37°C で 5 分間静置した。続いて 1,300 × *g* で 5 分間遠心分離後、再び血小板沈殿を 1 ml B.E.PBS に懸濁し、0.02 U/ml アピラーゼおよび 0.5 µM プロスタサイクリンを添加し、37°C で 5 分間静置した。再度 1,300 × *g* で 5 分間遠心分離後、血小板沈殿を 0.5 ml B.E.PBS に懸濁し、0.02 U/ml アピラーゼおよび 0.5 µM プロスタサイクリンを添加し、37°C で 30 分間静置後のサンプルをマウス血小板溶液とした。低温刺激で血小板は活性化するため、上記の操作は全て室温あるいは 37°C で行った。

#### 2-2-5 フローサイトメトリーによる活性化血小板測定

調製した  $1 \times 10^6$  個マウス血小板を 100 µl B.E.PBS に懸濁し、1 µg/ml 抗マウス CD41

FITC (eBioscience)、2 µg/ml 抗ヒト/マウス CD62P APC (eBioscience)、1 NIH unit/ml トロンビン (シグマ) を適宜添加し、室温で 15 分間静置した。それぞれの標識済み抗体の添加量は添付文書に従った。その後、1 ml B.E.PBS 添加による反応停止および洗浄後、1,300 × *g* で 5 分間遠心分離し、沈殿を 0.5 ml B.E.PBS に懸濁した。最後にセルストレーナーキャップ付きラウンドチューブ (ファルコン) でろ過後、フローサイトメーター Aria II (ベクトン・ディッキンソン) で測定を行った。

#### 2-2-6 血液凝固関連因子検査

血小板数については心採血したマウス全血に 0.1% EDTA を添加し、4°C で保存および輸送を行い外部検査受託機関 (LSI メディエンス) により、セルパック (シスメックス) および XT-2000iV (シスメックス) を用いた電気抵抗検出法にて測定した。APTT、PT およびフィブリノーゲンについては心採血したマウス全血に 0.32% クエン酸ナトリウム (和光純薬工業) を添加した後、4°C、1,200 × *g* で 30 分間、遠心分離後、得られた上清を血漿画分として -20°C で保存および輸送を行い外部受託機関 (LSI メディエンス) にて、上記検査項目を測定した。APTT はヒーモスアイエル・シンサシル・APTT (アイ・エル・ジャパン) を用いた散乱光測定法により、PT はヒーモスアイエル・リコンビプラスチン (アイ・エル・ジャパン) を用いた散乱光分析法により、フィブリノーゲンはヒーモスアイエル・フィブ・C (II) (アイ・エル・ジャパン) を用いた透過光測定法により測定した。それぞれの測定機器には ELITE PRO (アイ・エル・ジャパン) を使用した。すべての測定は独立した 3 回の実験サンプルを用いて行った。

#### 2-2-7 統計解析

二群間の値を比較した *ex vivo* 蛍光イメージングによる 102-10Fab-AF 750 とコントロール Fab-AF 750 の腫瘍集積性の比較 (図 2-3-2-3) および 102-10 Fab およびコントロール

Fab 投与マウスの血液凝固関連因子検査値比較（表 2-3-5）の統計処理にはスチューデントの t 検定を用い、P 値（両側確率）により有意差の有無を判断した。

## 2-3 結果

### 2-3-1 102-10 Fab の作製と表面プラズモン共鳴解析による結合能評価

精製した 102-10 Fab を分子イメージングプローブとして用いるに先立ち、ヒトとマウスのフィブリンに対する結合活性を ELISA での確認に加え別の実験方法でも確認するために、SPR 解析を行った。102-10 IgG の抗原となるフィブリンは不溶性タンパク質であるが、通常 SPR 解析の対象となるタンパク質相互作用は通常は双方が可溶性タンパクであり、一方が不溶性タンパクに対する解析を行った報告は未だなく、その有用性も明らかとなっていない。これまでの研究により 102-10 IgG のエピトープ配列は既に明らかとなっているため<sup>20</sup>、可溶性のエピトープペプチドを合成しそのペプチドに対する相互作用を測定した。この場合も算出される  $K_D$  値が 102-10 IgG および 102-10 Fab の真の抗原である不溶性フィブリンに対する結合活性をそのまま示すものではないとは推察されるが、結合活性の参考値にはなりうると考え実施した。リガンドに 102-10 IgG のエピトープ配列を含む合成したペプチドを用い、リファレンスセルは活性化・ブロッキングセルとし、アナライトは 46.8~1,500 nM で 6 段階に希釈した 102-10 IgG もしくは 102-10 Fab として SPR 解析を行った。102-10 IgG および 102-10 Fab とともにエピトープペプチドに対する結合活性を示した (図 2-3-1-1)。それぞれ独立した実験を 3 回ずつ行い、それぞれの  $K_D$  値を算出した。それぞれの  $K_D$  値を 1:1 Binding Model で解析した場合、102-10 IgG は  $7.63 \pm 1.40 \times 10^{-8}$  M、102-10 Fab は  $2.60 \pm 0.23 \times 10^{-7}$  M を示した。102-10 IgG については Bivalent Analyte も実施し、その場合の  $K_D$  値は  $3.13 \pm 0.46 \times 10^{-7}$  M であった。以上の結果より SPR 解析においても 102-10 IgG と比較すると親和性の低下がみられるもの 102-10 Fab は結合活性を保持していることが示唆された。

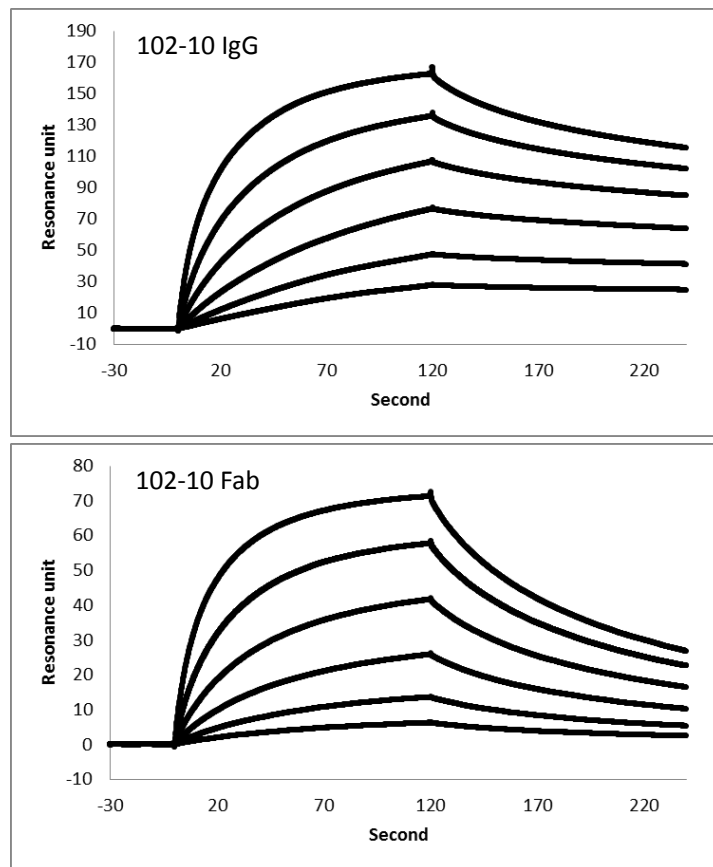


図 2-3-1-1 SPR 解析によるエピトープに対する 102-10 IgG および 102-10 Fab それぞれの結合活性測定。エピトープペプチドをリガンド (78.4 RU)、抗体をアナライト (46.8、93.7、187.5、375、750、1500 nM) として解析した。

### 2-3-2 三重変異膵がん自然発症モデルマウスによる 102-10 Fab の腫瘍集積と生体内分布

本論文中的「1-3-5 三重変異膵がん自然発症モデルマウスによる評価」および「1-3-6 各種モデルマウスの腫瘍組織像と不溶性フィブリン沈着」において、KrasTrp53Ptf1a マウスが本研究のモデル動物として有望であることが示唆されたため、この動物モデルで蛍光標識 102-10 Fab プローブによる腫瘍イメージングを行った。

まず作製した 102-10 Fab を分子イメージングプローブとするために、102-10 Fab 中の一級アミンである Lys 残基を標的とする NHS エステル修飾により、生体透過率の高い近赤外領域の蛍光分子 AF 750 で標識した。この Lys 残基を標的とした蛍光標識前後で 102-10 Fab の親和性と特異性に影響があるかどうかを ELISA により測定した。ELISA プレート上に GST タグを付加した 102-10 IgG のエピトープペプチドを固定化し、陰性対照として GST タグのみを固定化したものとの比較により、その結合活性を測定した。その結果、蛍光分子 AF 750 の標識前後の 102-10 Fab はともに GST タグ付加エピトープペプチドに同程度に結合し、GST タグのみには反応性を示さなかった (図 2-3-2-1)。この結果より、アミノ基を標的とした蛍光分子 AF 750 修飾の有無による 102-10 Fab の活性変化はないことが確認された。

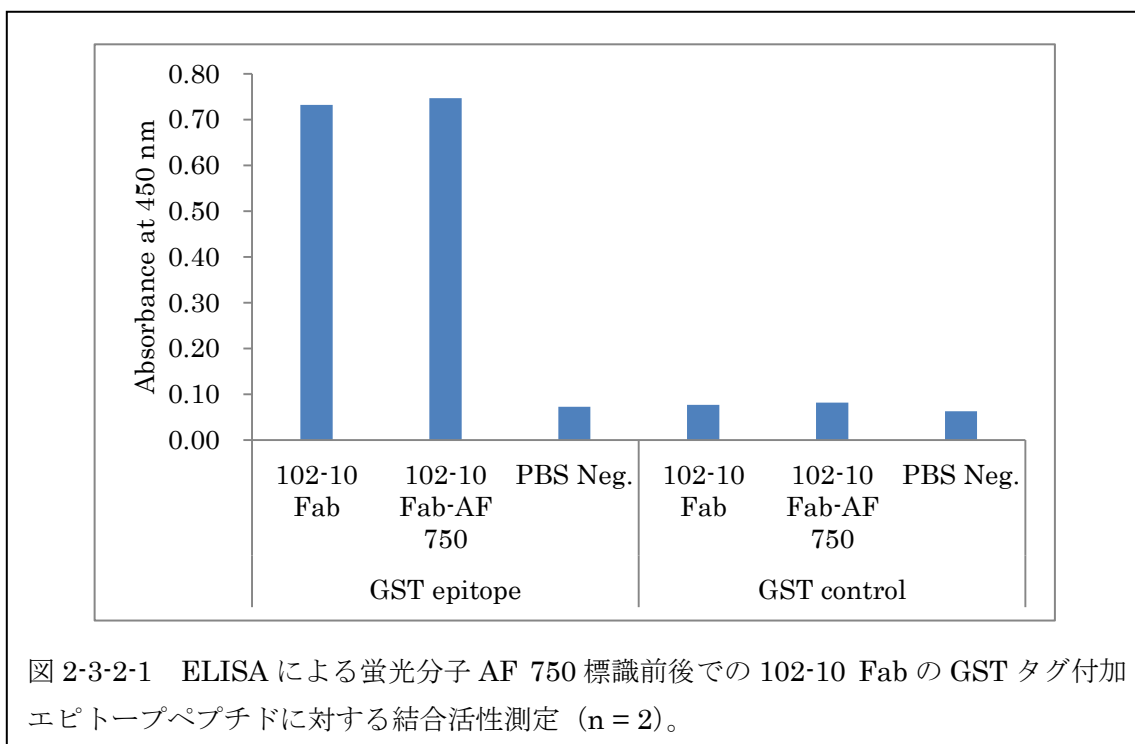
続いてこの蛍光標識した 102-10 Fab を KrasTrp53Ptf1a マウスおよびコントロールとして正常マウスに投与して、腫瘍 (膵臓) とほか主要臓器への生体内分布を蛍光イメージング装置により観察した。尾静脈投与したプローブは、それぞれ 102-10 Fab-AF 750 とコントロール Fab-AF 750 に含まれる蛍光分子数が等量となるよう調整し、マウス一匹当たり 90  $\mu\text{g}$  とした。各臓器の蛍光強度は、尾静脈投与 3 時間後および 24 時間後に深麻酔下で生理食塩水による灌流を行った後に、各臓器を摘出して *ex vivo* イメージングにより観察した。その結果、102-10 Fab-AF 750 は KrasTrp53Ptf1a マウスの腫瘍 (膵臓) に投与後 3 時間で顕著に集積性を示したが、コントロール Fab-AF 750 で集積性がほとんど見られず (図 2-3-2-2a)、予備検討として実施した「1-3-5 三重変異膵がん自然発症モデルマウスによる

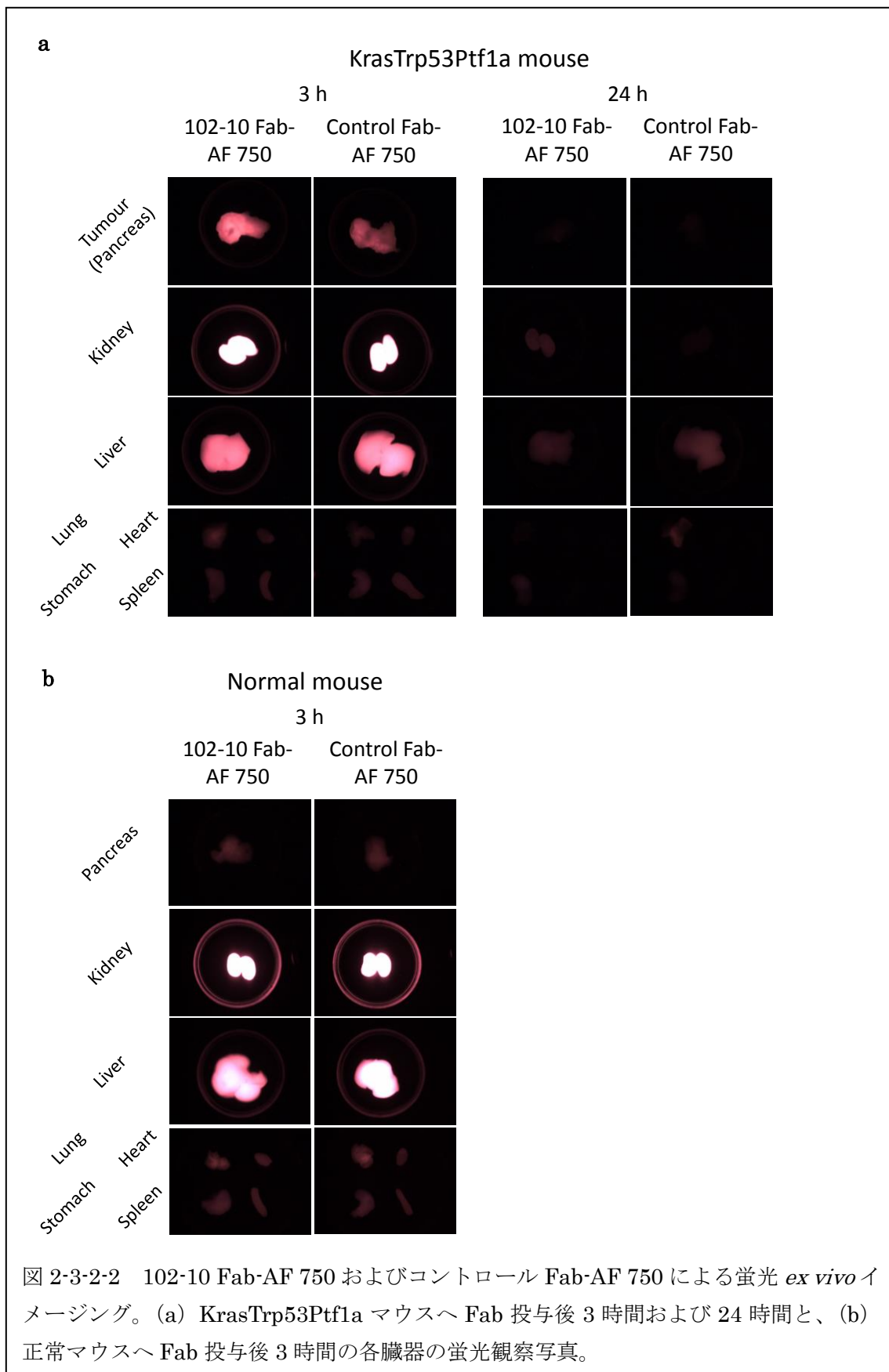
評価」の再現性を確認することができた (n = 3)。KrasTrp53Ptf1a マウスへ Fab-AF 750 投与後 3 時間では腎臓と肝臓への集積も認められるが、この二臓器は体外への排泄に関わる臓器である。生体内へ投与された外因性の物質はおおよそ分子量 60 kDa を境に、低分子は腎臓の腎糸球体濾過により尿経路で、高分子は肝臓の類洞のクッパー細胞の貪食により糞便経路で排泄される。分子量が約 50 kDa である Fab は主に尿経路により、一部は糞便経路で排泄されるため、腎臓と肝臓に生理的集積が認められたが、そのほかの主要臓器である肺、心臓、胃、脾臓での非特異的な集積は観察されなかった。さらにこの集積は 102-10 Fab-AF 750、コントロール Fab-AF 750 とともに投与後 24 時間ではほとんど確認されず、その大部分が生体内から排出されたものと推察された。一方正常マウスへ投与されたそれぞれの蛍光標識 Fab は投与後 3 時間でも脾臓への集積は認められず、脾臓への非特異的集積もないことが確認された (図 2-3-2-2b)。腎臓や肝臓への生理的集積の程度は KrasTrp53Ptf1a マウスの場合と同様であった。

KrasTrp53Ptf1a マウスの投与後 3 時間の蛍光 *ex vivo* イメージング画像を画像解析ソフト ImageJ で解析、定量化し、102-10 Fab-AF 750 とコントロール Fab-AF 750 の各臓器における蛍光強度を比較した。KrasTrp53Ptf1a マウスに形成される腫瘍は脾臓に散在的に発生し、脾臓全体へ浸潤していくと考えられる。その進行過程は個体差もあるが、これまで生後 8 週でほとんどすべてのマウスにおいて病理組織像では腫瘍形成が確認されたが、開腹して脾臓を目視で確認しても外観からは腫瘍が形成されている部位と正常脾との区別が難しいものも存在した。そのためそれぞれの蛍光強度を定量化するための関心領域は、取り出した脾臓全体を含む領域とした。また、AF 750 は近赤外領域の蛍光であるが、検出できる生体深度は数 mm 程度である。それぞれの臓器の厚みは異なるため、異なる臓器間での比較は困難であるが、102-10 Fab-AF 750 とコントロール Fab-AF 750 をそれぞれ投与したマウスの同一臓器間での比較は可能であると判断した。102-10 Fab-AF 750 投与マウスの腫瘍 (脾臓) の蛍光強度はコントロール Fab-AF 750 投与マウスのそれと比較して、有



意に高かった (図 2-3-2-3)、 $P < 0.05$ 。肝臓への集積はコントロール Fab-AF 750 が若干高かったものの有意差はなく、ほかの臓器においても 102-10 Fab-AF 750 とコントロール Fab-AF 750 の集積量に有意差は見られなかった。以上より蛍光 *ex vivo* イメージングにおいて、102-10 Fab-AF 750 は投与後 3 時間で KrasTrp53Ptf1a マウスの腫瘍 (脾臓) へ集積し、十分なコントラストを形成した。また投与後 24 時間でそのほとんどが体外へ排出され、他の正常臓器への異常あるいは非特異的な生理的集積も認められなかった。





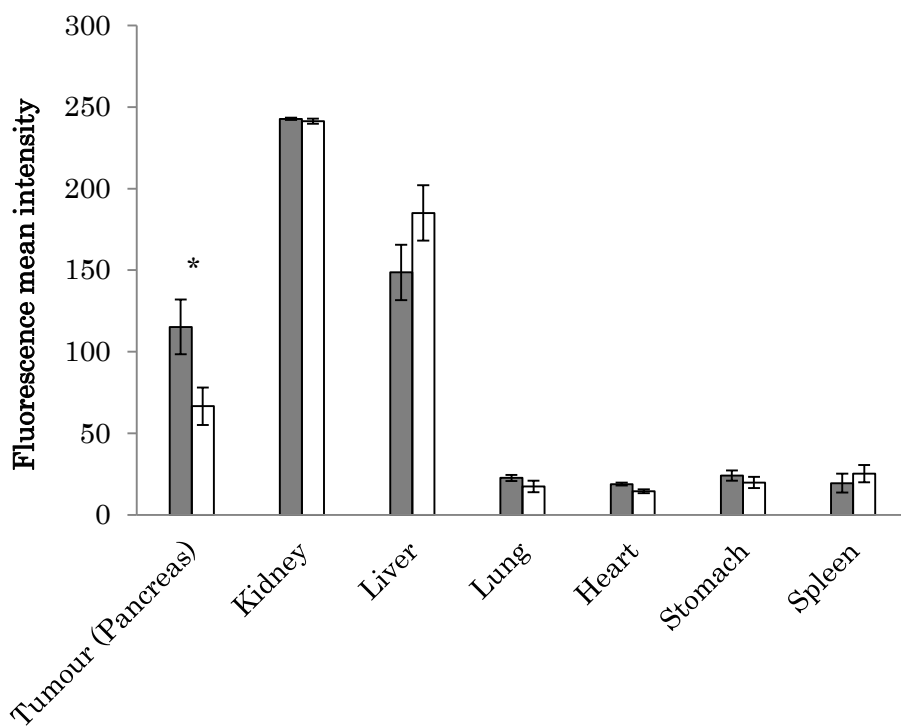


図 2-3-2-3 KrasTrp53Ptf1a マウスに 102-10 Fab-AF 750 もしくはコントロール Fab-AF750 投与後 3 時間の各臓器の蛍光 *ex vivo* イメージング画像を定量化したグラフ。灰色が 102-10 Fab-AF 750 の、白色がコントロール Fab-AF 750 の標準偏差付加平均蛍光強度を示す (n = 3) ; \* $P < 0.05$ 。

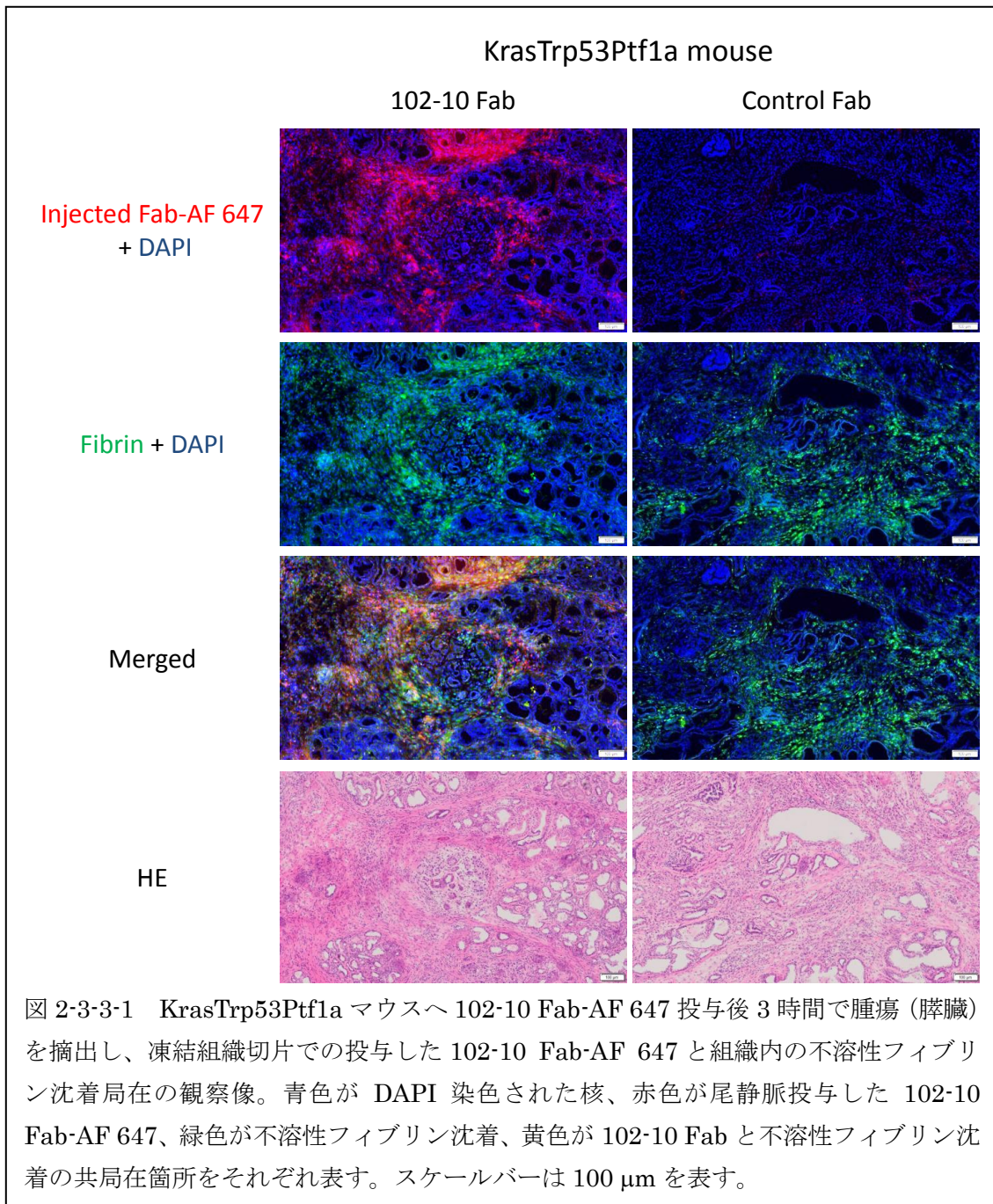
### 2-3-3 マウス膵がん組織における 102-10 Fab とフィブリン沈着の局在

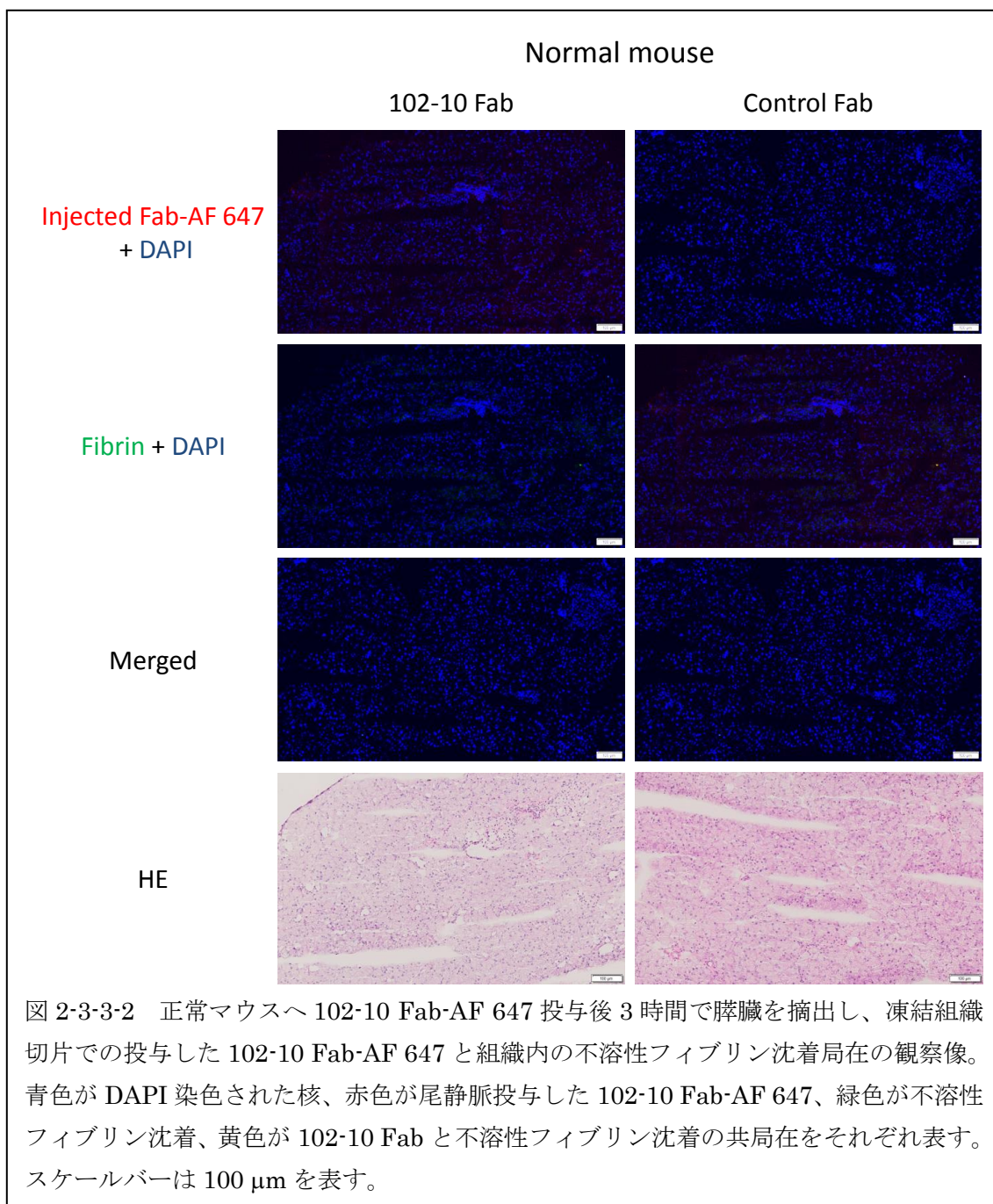
102-10 Fab-AF 750 の KrasTrp53Ptf1a マウスの腫瘍（膵臓）への集積が、102-10 Fab が腫瘍内のフィブリン沈着に結合した集積に起因するものであることを確かめるために、腫瘍組織内での投与した 102-10 Fab と不溶性フィブリン沈着のそれぞれの分布、局在を蛍光免疫組織化学染色により確認した。蛍光免疫組織化学染色の観察に用いたバーチャルスライドシステム VS120 では *ex vivo* イメージング実験で使用した近赤外線蛍光分子の AF 750 が観察できないため、AF 750 より短波長の AF 647 で、102-10 Fab およびコントロール Fab を標識した。AF 647 で標識したそれぞれ 270  $\mu$ g Fab-AF 647 を KrasTrp53Ptf1a マウスへ尾静脈投与し、投与後 3 時間で腫瘍（膵臓）を摘出し、凍結組織切片を観察してそれぞれの Fab の腫瘍内分布を確認した。同時に AF 488 で蛍光標識した 102-10 IgG で組織内の不溶性フィブリン沈着を染色し、多重染色により生体投与後 3 時間の 102-10 Fab-AF 647 およびコントロール Fab-AF 647 の局在との比較を行った。生体投与された 102-10 Fab-AF 647 はマウス PDAC の間質部分への強い集積が確認され、その集積が認められた間質部分には、強い不溶性フィブリン沈着も確認された（図 2-3-3-1）。コントロール Fab-AF 647 を投与されたマウス PDAC にも間質部分にフィブリン沈着が強陽性に認められたが、コントロール Fab の集積はほとんど認められなかった。この二つのマウス PDAC は HE 染色像を見る限りにおいては、顕著な病理組織学的な違いは認められなかった。

この 102-10 Fab-AF 647 のがん間質への集積および組織内の不溶性フィブリン沈着が、マウス正常膵臓で確認されるかを、正常マウスにて同様の実験を行い確認した。図 2-3-3-2 に示されるように正常膵臓の凍結組織切片においては、生体投与された 102-10 Fab-AF 647 およびコントロール Fab-AF 647 とともに確認されず、組織内のフィブリン沈着も認められなかった。HE 組織像は通常のマウス正常膵臓にみられる所見と同様であった。

これらの結果より、生体内へ投与された 102-10 Fab は投与後 3 時間で腫瘍組織内の不溶性フィブリン沈着を標的として能動的に集積し、その局在は腫瘍組織内のフィブリン沈着

と非常によく一致することが示された。マウス正常膵臓では同様の現象は見られず、102-10 Fab が不溶性フィブリン存在部位に特異的に集積していることが示された。







#### 2-3-4 102-10 Fab のフィブリンゲル形成および分解への影響 *in vitro* 試験

血液凝固とがんの関連性は古くから知られており、抗血液凝固剤や血液凝固関連因子に対する抗体を用いたがん治療法の研究開発もこれまでに数多く行われている<sup>55-59</sup>。血液凝固系および線溶系はそれに関わる因子が非常に多く、複雑なカスケードにより制御されている。そのためそれらの治療薬剤を臨床応用する場合には、正常な血液凝固および線溶反応を阻害し、出血傾向や血栓症発症などを含む有害事象が起きないかどうかについて、細心の注意を払う必要がある。本研究で用いている抗不溶性フィブリン 102-10 Fab もその後の臨床応用を見据えているため、血液凝固および線溶系に及ぼす影響を評価すべきであると考えた。

まずは *in vitro* の実験系で、血液凝固系を模したフィブリンゲルの形成および線溶系を模したフィブリンゲルの分解に 102-10 Fab が影響するかどうかを調べた。初めに 96 ウェルプレート内でフィブリノーゲンにトロンビンを加えフィブリンゲルが形成される過程が、102-10 Fab の有無により変化するかどうかを継時的濁度測定により確認した。102-10 Fab プローブの臨床応用を想定している PET/SPECT イメージングは非常に高感度であるため、生体への投与量は治療用の抗体医薬品と比較して微量でよい。既に臨床試験が実施されているトラスツズマブで治療中の患者さんに対する<sup>64</sup>Cu]-DOTA-Trastuzumab による PET イメージングでは、通常治療量の 1/100 以下に相当する<sup>64</sup>Cu]-DOTA-Trastuzumab を生体内へ投与してイメージングを実施している<sup>60,61</sup>。本研究においてはその数倍量を投与量の目安とし、102-10 Fab の添加量は終濃度 10 µg/ml とした。フィブリノーゲンはカルシウムイオン存在下でトロンビンにより限定分解を受けフィブリンゲルへと化学変化するが、トロンビンの阻害剤であるアンチトロンビン III (AT III) の添加時には薄くもろいフィブリンゲルの形成が確認された。一方、102-10 Fab あるはコントロール Fab 添加時のフィブリンゲル形成は PBS 添加時のそれとほとんど変わらないものであった (図 2-3-4-1a)。次に、同様の実験系にて 102-10 Fab の有無でフィブリンゲル分解過程に変化があるかを調べた。

プラスミノゲン (PLG) と組織型プラスミノゲン活性化因子 (tPA) をフィブリンゲル形成測定で調製した反応液に加え、フィブリンゲル形成反応に引き続き分解反応が起きる系の濁度の継時変化が 102-10 Fab の有無により変化するかを確認した。陰性対照群にはプラスミノゲンから生成されるプラスミンの阻害剤である $\alpha_2$ -プラスミン阻害剤と、tPA の阻害剤であるプラスミノゲン活性化因子阻害剤-1 (PAI-1) を添加した。これら二つの阻害剤添加ウェルではフィブリンゲル分解の時間延長がみられたが、102-10 Fab およびコントロール Fab 添加時のフィブリンゲル分解反応は PBS 添加時のそれとほぼ変わらないものであった (図 2-3-4-1b)。以上の結果より、*in vitro* 実験系においてフィブリンゲルの形成および分解反応にも 102-10 Fab は影響を及ぼさないことが示唆された。

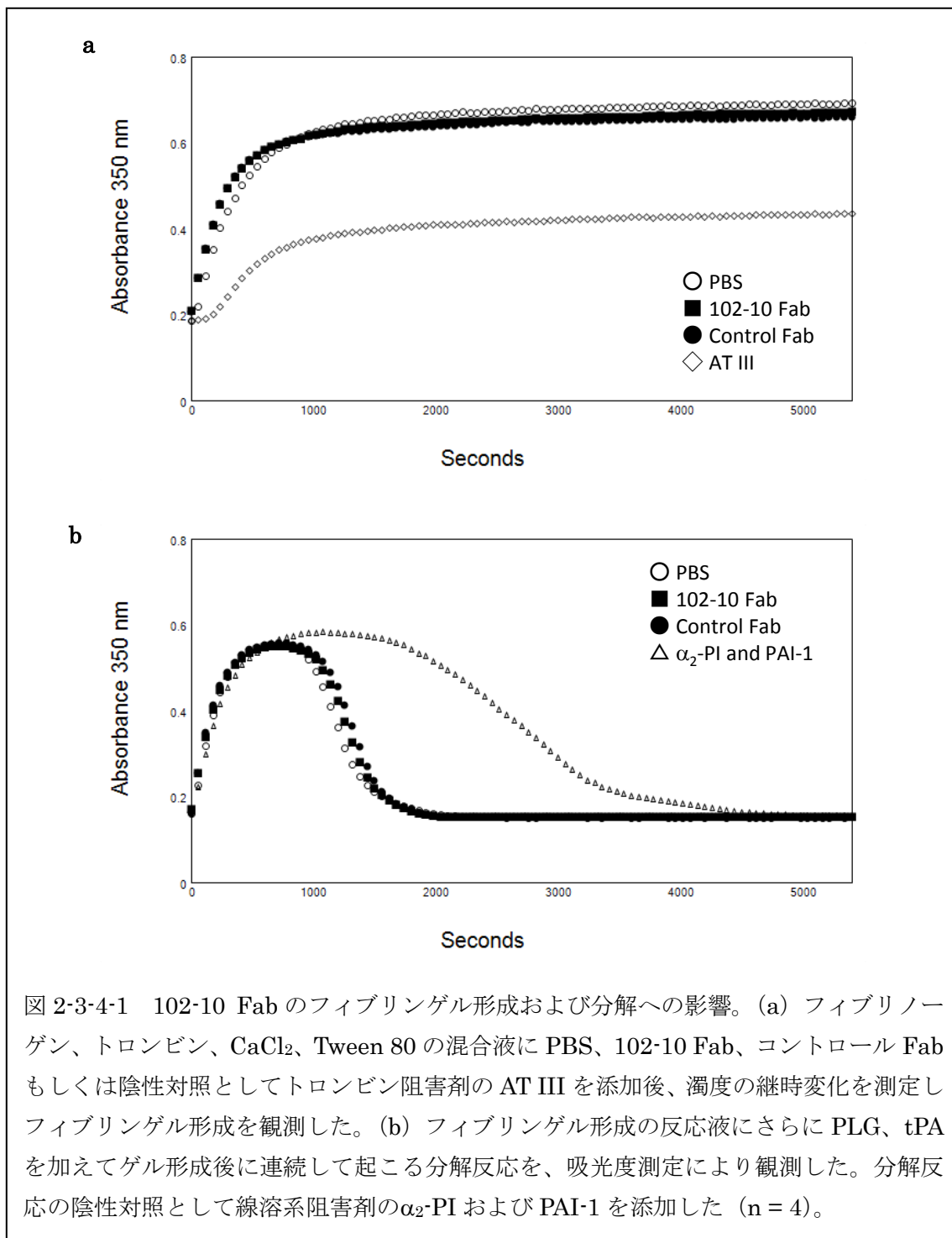


図 2-3-4-1 102-10 Fab のフィブリンゲル形成および分解への影響。(a) フィブリンノーゲン、トロンビン、CaCl<sub>2</sub>、Tween 80 の混合液に PBS、102-10 Fab、コントロール Fab もしくは陰性対照としてトロンビン阻害剤の AT III を添加後、濁度の経時変化を測定しフィブリンゲル形成を観測した。(b) フィブリンゲル形成の反応液にさらに PLG、tPA を加えてゲル形成後に連続して起こる分解反応を、吸光度測定により観測した。分解反応の陰性対照として線溶系阻害剤の $\alpha_2$ -PI および PAI-1 を添加した (n = 4)。

### 2-3-5 102-10 Fab の血液凝固系への影響 *in vivo* 試験

これまでに複数の抗フィブリン抗体開発の報告があるが、そのうちのいくつかは抗体の存在下でフィブリンゲル形成反応が遅滞するあるいは阻害されることが示されている<sup>62,63</sup>。このような既報から、抗フィブリン抗体の臨床応用を目的とする本研究の場合、*in vivo*における血液凝固系に対する影響についても評価する必要がある。生体防御反応のひとつである血液凝固においては、血管壁が傷つけられるとさまざまな刺激やシグナルにより血小板が活性化、凝集し損傷部位をふさぐ一次止血と、引き続き起こる血液凝固カスケードにより形成されるフィブリン網により凝集した血小板を覆って強固にする二次止血とが存在する。一次止血反応で中心的な役割を担う血小板の活性化および二次止血反応の指標として血液凝固関連因子の検査値が 102-10 Fab の投与により変化があるかどうかを *in vivo* の実験系で検討した。

血液中の血小板は膜貫通型糖タンパクである CD41 (GPIIb) をその表面に発現しており、またトロンビンや ADP により活性化した血小板は $\alpha$ 顆粒中にある CD62P (P-セレクトリン) が膜表面に移動、出現する<sup>54</sup>。102-10 Fab を投与したマウス全血から血小板を豊富に含む画分を調製後、CD41 を血小板マーカーとして、CD62P を活性化血小板マーカーとしてフローサイトメトリーで解析することで、102-10 Fab の影響を評価した。102-10 Fab もしくはコントロール Fab をマウスあたり 20  $\mu$ g 尾静脈投与し、*ex vivo* イメージング実施と同じタイミングの投与 3 時間後に採血した血液から血小板画分を調製し、フローサイトメトリー解析を行った。102-10 Fab 投与マウスおよびコントロール Fab 投与マウスから調製した血小板画分は、そのほとんどが CD41 陽性であったが、CD62P は陰性であった (図 2-3-5-1a および c)。つまりそれぞれの Fab 投与マウスの血液から得られた血小板は休止状態にあることが示された。得られた血小板画分が活性化能を保持していることを確認するために、それぞれの血小板画分にトロンビンを添加して同様のフローサイトメトリー解析を行った。その結果、どちらの血小板画分もトロンビンの作用により CD62P 陽性画分の上昇が確認さ

れた (図 2-3-5-1b および d)。これらの結果を一元比較すると、102-10 Fab およびコントロール Fab 投与後 3 時間のマウス血小板は血小板が同程度に休止状態にあり、且つトロンビン添加による活性化も同程度であったことから (図 2-3-5-1e)、102-10 Fab による血小板活性化に及ぼす影響は見られなかった。

さらに 102-10 Fab およびコントロール Fab 投与マウス血液の血小板数、活性化部分トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time; APTT) <sup>※1</sup>、プロトロンビン時間 (prothrombin time; PT) <sup>※2</sup> およびフィブリノーゲン濃度を測定することで、二次止血の主要な機構である血液凝固系へかかる影響があるかを調べた。これらの検査は臨床現場でも行われ、血液凝固系異常の判断にも使われている検査項目である。臨床での血液凝固検査項目はもっと多数あるが、マウスから採血できる量やマウス血液で実施可能な検査項目が限定されていることから、検査可能であった上記 4 項目について実施した。血小板活性化試験の場合と同様に、102-10 Fab もしくはコントロール Fab 投与 3 時間後に採血し調製したサンプルを、外部検査受託機関 (LSI メディエンス) にて各検査項目の測定を行った。PT は既報の値より若干小さいものの、ほかは全て正常の範囲内であった (表 2-3-5) <sup>64</sup>。それぞれの検査項目を 102-10 Fab 投与およびコントロール Fab 投与マウスで比較を行ったが、すべての検査項目で統計的有意差はなかった。以上の結果より、102-10 Fab 投与によるマウス生体内での血小板数、血液凝固内因系と外因系、およびフィブリノーゲンレベルへ顕著な影響はないものと判断した。

<sup>※1</sup>APTT は「内因系凝固機序に関係する高分子キニノーゲン、プレカリクレイン、第 XII・XI・X・IX・VIII・V・II 因子の凝固活性を総合的に反映し」、<sup>※2</sup>PT は「外因系凝固因子の第 VII・X・V 因子、プロトロンビン、フィブリノーゲンの凝固活性を総合的に検査する方法である」 <sup>48</sup>。

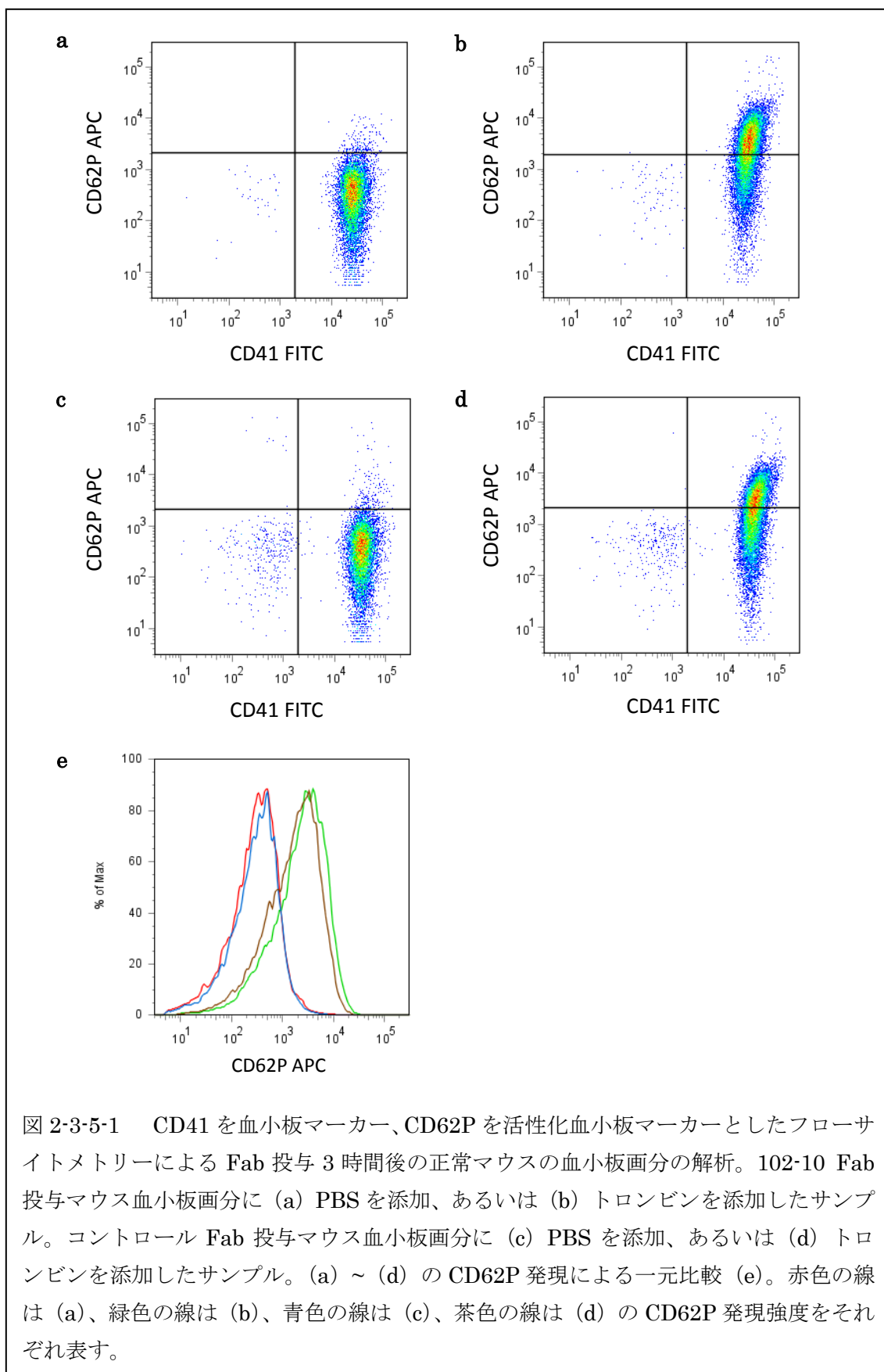


図 2-3-5-1 CD41 を血小板マーカー、CD62P を活性化血小板マーカーとしたフローサイトメトリーによる Fab 投与 3 時間後の正常マウスの血小板画分の解析。102-10 Fab 投与マウス血小板画分に (a) PBS を添加、あるいは (b) トロンビンを添加したサンプル。コントロール Fab 投与マウス血小板画分に (c) PBS を添加、あるいは (d) トロンビンを添加したサンプル。(a) ~ (d) の CD62P 発現による一元比較 (e)。赤色の線は (a)、緑色の線は (b)、青色の線は (c)、茶色の線は (d) の CD62P 発現強度をそれぞれ表す。

	102-10 Fab	Control Fab
Platelet ( $\times 10^4/\text{ml}$ )	102.1 $\pm$ 12.0	108.4 $\pm$ 16.1
APTT (sec)	30.6 $\pm$ 1.7	33.9 $\pm$ 3.1
PT (sec)	7.8 $\pm$ 0.1	7.9 $\pm$ 0.2
Fibrinogen (mg/dl)	180.7 $\pm$ 9.9	205.3 $\pm$ 64.7

表 2-3-5 102-10 Fab およびコントロール Fab 投与マウスの血液凝固関連因子測定値。正常な C57BL/6JJms マウスにそれぞれの Fab を尾静脈投与 3 時間後に採血した検査値。それぞれの検査項目の平均値と標準偏差を示す (n = 3)。すべての群間比較において有意差はなかった。

## 2-4 考察

102-10 Fab のエピトープペプチドに対する親和性は、低分子化前の 102-10 IgG に比べ劣るものの十分な結合活性を保持していることを SPR 解析でも確認することができた。特に 102-10 Fab においては算出された  $K_D$  値は  $2.60 \pm 0.23 \times 10^{-7} \text{ M}$  と一般的な抗体医薬品のそれと比較すると低親和性であったにもかかわらず、102-10 Fab プローブは KrasTrp53Ptf1a マウスの腫瘍（脾臓）への良好な集積性を示した。これまで報告されている SPR 解析のタンパク相互作用は全て可溶性タンパク同士の相互作用であり、不溶性タンパクに対する SPR 解析による評価についてはその有用性は明らかとなっていない。生体内での集積性に及ぼす要素は複数あるものの、*in vitro* で確認された低い親和性と *in vivo* で観察された高い腫瘍集積性の合理的な説明は現段階では難しく、エピトープペプチドに対する SPR 解析の結果が、生体内での不溶性フィブリンに対する親和性そのものを測定できていない可能性はある。しかしながら、不溶性フィブリンに結合する抗体の親和性を、SPR 解析により再現性を持って安定的に測定できる方法を構築できた意義は大きい。102-10 IgG や 102-10 Fab は医薬品応用を目的としてさらなる研究開発を行うことは間違いなく、その過程でいくつかの品質管理項目を設けることは必須となる。今回構築したエピトープペプチドをリガンドに用いた SPR 解析はその項目の一つとなるべきであり、今後も物性や安定性など医薬品に求められる評価系を構築していく必要があると考える。

また KrasTrp53Ptf1a マウスへ投与された 102-10 Fab-AF 750 は投与 3 時間後でコントロール Fab-AF 750 と比較して有意差を持って腫瘍（脾臓）への集積が確認され、さらにはその他の主要臓器（肺、心臓、胃、脾臓）へは集積しなかったことから、臨床応用した場合、薬剤投与当日にがんの画像診断を行うことができる可能性が示唆された。さらに 102-10 Fab プローブの腫瘍集積性はがん間質の不溶性フィブリン沈着への結合に起因することが、投与した 102-10 Fab-AF 647 と不溶性フィブリン沈着の共局確認実験から示唆さ



れた。蛍光 *ex vivo* イメージングの解析値ではあるが 102-10 Fab とコントロール Fab のシグナル／ノイズ比は 2 倍程度であり、より明瞭に高感度で腫瘍を描出するためにもさらにその値を大きくする必要があると考える。不溶性フィブリンに対して 102-10 IgG より高親和性の抗体クローンを応用することが一つの解決法である。本論文では取り上げなかったが、102-10 IgG のエピトープペプチドを免疫することにより不溶性フィブリンに特異的な抗体を既に複数取得済みである。今後はこれらのクローンからもイメージングプローブを作製し、102-10 Fab プローブと比較検討することも検討している。

これまでも血液凝固関連因子を標的とした治療薬剤開発が行われてきた例はあるが、その標的によっては投与後に出血傾向がみられた<sup>65</sup>、あるいは深刻な出血傾向が確認されたとの報告がある<sup>66</sup>。また非臨床試験において、外因系の血液凝固開始因子である組織因子 (tissue factor; TF) に対する抗体 (CNTO 859, Mab-5G9) を用いた実験を行ったところ、それぞれ乳がん細胞の転移と増殖を抑制する効果が認められたものの血液凝固阻害が示されたとの報告がある<sup>59,67</sup>。がんの診断および治療ではないものの、別の抗 TF 抗体 (Sunol-cH36, ALT-836) を用いた冠動脈疾患と急性呼吸窮迫症候群に対する臨床試験では重篤な出血傾向は見られなかった<sup>68,69</sup>。前述したように、血液凝固関連因子は多数存在し複雑に制御されており、それらを標的とした薬剤開発には血液凝固系および線溶系への影響について特別な配慮が必要である。本研究で標的としているフィブリンは血液凝固系の最終産物であり、同様の課題を内包していると考えそれらに対する影響を評価したが、*in vitro* および *in vivo* 両方の実験系において影響はないことが示された。

以上のことより、102-10 Fab を基本骨格としたイメージングプローブは、機能性と安全性の両面において、がん分子イメージング薬剤として有望である結果が示唆された。102-10 Fab の素材となった IgG はキメラ抗体であり、102-10 Fab 配列の 50% はマウス由来のものである。現在臨床で使用されている主たる抗体医薬品はキメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体の 3 つであり、後者のものほど論理的に免疫原性が低い。本研究で開発した不溶

性フィブリンイメージングプローブの安全性を向上させるためにも、今後は抗不溶性フィブリンのヒト化ないしは完全ヒト抗体の開発を行っていくべきと考える。ヒト化については 102-10 IgG の相補性決定領域 (complementarity determining region; CDR) がすでに解析済みであるので、鋳型とするヒト抗体へ CDR を移植することで作製が可能である。また前述のとおり、102-10 IgG のエピトープペプチドを免疫することで、抗不溶性フィブリン抗体を取得できることが既に確認されている<sup>20</sup>。完全ヒト化抗体については、ヒト抗体を産生することのできるトランスジェニックマウスへ、そのエピトープペプチドを免疫することで完全ヒト抗不溶性フィブリン抗体を取得することができる可能性が高い。今後はこれらのことにも挑戦していきたい。

## 総括

本研究では世界で初めての不溶性フィブリンのみを真に特異的に認識する抗体クローン 102-10 の低分子化抗体による腫瘍イメージングを試みた。102-10 IgG の低分子化抗体として最初に取り組んだ 102-10 scFv では、想定していた程にはその精製タンパクの収量を確保することができず、かつ低親和性であった。そのためそれ以降の *in vitro* および *in vivo* 実験の実施は困難であると判断し 102-10 scFv による腫瘍イメージング実験は断念した。想定される原因の一つに 102-10 IgG の可変領域配列が大腸菌発現および巻き戻しの系に不適だった可能性がある。酵母や昆虫細胞発現系による scFv の調製も行われており<sup>70,71</sup>、それらの発現系を検討することで 102-10 scFv を大量かつ安価に作製できる系を構築できる可能性があるかもしれない。また、102-10 IgG のエピトープ解析によりフィブリノーゲンや可溶性フィブリンではその分子内に隠れているが、不溶性フィブリンでのみ露出する領域が明らかとなっている<sup>20</sup>。この発見をもとに複数の新たな抗不溶性フィブリン抗体を開発することにも成功しており、これら新規抗体クローンの可変領域配列は 102-10 IgG の配列とは異なる。新規抗不溶性フィブリン抗体クローンの scFv 作製を大腸菌発現系を試みた場合、大腸菌内での発現も 102-10 scFv の場合とは変化する可能性が大きい。あるいは 102-10 IgG のエピトープペプチドを用いたファージディスプレイ法などにより、不溶性フィブリン特異的な新規 scFv を作製することも考えられる。いずれにしても本研究ではいったん断念したものの、抗不溶性フィブリン scFv の DDS 応用研究の再検討を行う価値はあると考えている。

また、がん間質の不溶性フィブリンを標的とした DDS 研究において、モデル動物の選定が非常に重要であることが本研究により改めて示された。ヒト膵がん細胞株 BxPC-3 皮下移植モデルマウスは、実験手技が簡便であるががん間質形成が乏しくヒト膵がんとの生化学的特徴の乖離がみられた。ヒト膵がん細胞株 HPAF-II 同所移植モデルマウスは、皮下移

植モデルと比較するとヒト PDAC に近い組織像を示したものの、それでもがん間質およびフィブリン沈着形成はヒト膵がんの病態を十分に反映しているものではなかった。

**KrasTrp53Ptf1a** マウスに代表される膵がんを自然発症する遺伝子改変マウスはもとより生化学的特徴や病態もヒト PDAC に類似しているとされており<sup>36,42</sup>、その作製に大きなコストを必要とするものの、豊富ながん間質形成とその組織内にヒト PDAC と類似した染色像で強いフィブリン沈着が認められるなどヒト膵がんの病態をよく反映しており、三つのモデル動物の中では本研究に最も適していた。培養したがん細胞株をマウスの皮下あるいは同所へ移植するモデルではがん細胞が一定の場に限局した状態で増殖していくが、**KrasTrp53Ptf1a** マウスの膵がんはがん細胞が正常間質組織に浸潤しながら増殖し、腫瘍組織内で腫瘍部と非腫瘍部が混在しながら不均一性を形成しつつ腫瘍全体として増殖していく様子がその組織像から確認された。この浸潤、増殖過程がヒト膵がんの進行過程と類似していることが、ヒト PDAC にみられるようながん間質およびフィブリン沈着を形成させる主な要因であると推察される。

膵がんを自然発症する **KrasTrp53Ptf1a** マウスを用いたがん間質中に散在する不溶性フィブリンを標的とした 102-10 Fab プロープによる腫瘍イメージング実験では、生体投与後 3 時間で良好な腫瘍集積性を示し、投与後 24 時間で投与プロープの大部分が体外へ排泄されることが示された。イメージング機器によるがんの画像検査の検査対象は入院患者のみならず外来の被検者も含まれるため、イメージング薬剤投与後可能な限り早期に撮影を行い、撮像後は早期にイメージング薬剤は体外へ排泄されることが望ましい。本研究の結果から、これらイメージング薬剤に望まれる特性を持っていることを確認することができた。また血液凝固系および線溶系への影響も示さなかったことから現時点で懸念される有害事象もない。これらの結果はがん間質を標的とした DDS 戦略である「cancer stromal targeting (CAST) diagnosis and therapy<sup>18</sup>」の概念を強く支持するものであると考える。

本研究では 102-10 Fab プロープの臨床応用可能性を遺伝子改変膵がん自然発症モデル

マウスで実証した。現在膵がんの画像診断で使用されている CT や MRI、 $[^{18}\text{F}]\text{FDG-PET}$  イメージングに加え選択肢の一つとなることを目標として、さらなる研究開発を行うべきであると考ええる。102-10 Fab プローブは豊富ながん間質を標的とすることで、がん細胞を標的とする $[^{18}\text{F}]\text{FDG-PET}$  イメージングでは検出できない大きさの腫瘍を描出できる可能性があると考ええる。また膵がんの中でも PDAC は悪性度が高く検出後すぐに治療開始となるが、同じ膵がんでも粘液産生嚢胞腫瘍や膵神経内分泌腫瘍は悪性度が低く腫瘍が 5 mm 以下など小さいうちは、最近では発見後も経過観察する場合もしばしばある。もちろんこのような場合も腫瘍が大きくなり始めたら治療を開始する必要があるが、様子を見てよいがんも存在する。一方で 102-10 IgG の先行研究で難治性がんのグリオーマは悪性度とフィブリン沈着量に正の相関が確認されており<sup>20</sup>、不溶性フィブリンを標的とした PET イメージングにより描出される腫瘍は悪性度が高く、すぐさま適切な処置が必要ながんである可能性がある。つまり 102-10 Fab プローブを用いたイメージングによりがんの悪性度を診断できる可能性もあると考えている。

今後は臨床での使用を想定して放射性同位体で標識した 102-10 Fab による PET もしくは SPECT イメージングを実施する計画である。また悪性度の異なるがんのイメージングも検討したいと考えている。本研究では膵がんモデルマウスを対象としたが、他のがん間質が豊富ながん種である難治性がんのグリオーマやスキルス胃がんについても、102-10 Fab プローブを用いた腫瘍イメージングが有効である可能性が高いと考えており、その評価を行いたいと考えている。さらに今回は蛍光イメージングによる腫瘍集積性が確認された。蛍光内視鏡を用いた食道がんの診断などには蛍光プローブのまま使用できるため、消化管内視鏡による画像診断の分野での応用も現在検討中である。さらに現在我々はがん治療薬として、がん間質の不溶性フィブリンを標的とした抗不溶性フィブリン抗体-薬剤複合体 (antibody-drug conjugate; ADC) の研究開発を並行して行っている。この ADC のコンパニオン診断薬に、あるいは投薬による治療効果判定に 102-10 Fab プローブを応用し、がん

間質に不溶性フィブリン沈着が確認される多種の固形腫瘍を治療対象とした新たながん診療の開発を検討したいと考えている。一方でがんと不溶性フィブリンが示す生物学についてもさらなる理解を深め、がんの悪性度と不溶性フィブリンの相関仮説の検証やがん組織内のフィブリン沈着量と予後の関係性についてさらなる研究を行いたいと考えている。

本研究以外にもこれまでにフィブリンに結合能を示すペプチドを用いたがんあるいは血栓症の体内診断薬の研究開発がいくつか報告されている。フィブリン結合ペプチドとして EPIX Medical Inc. が開発を手掛けた EP-2410R とその派生物は、生体内の血栓のイメージング薬剤およびグリオーマおよび乳がんのイメージング薬剤として研究報告がされている<sup>72-79</sup>。MRI による血栓可視化のイメージング薬剤として第二相試験まで行っており非常に興味深い。しかしながらその結合特異性やフィブリンのどの領域へ結合性を示すのかなど明らかとしていない内容も多く、今後のさらなる研究報告が待たれる。また Jan Pilch 博士 (Burnham Institute for Medical Research) らの報告に始まったフィブリン-フィブロネクチン複合体を認識するペプチドである CLT1 および CLT2 とその派生物を腫瘍イメージング薬剤へ応用した研究も複数報告されている<sup>80-85</sup>。こちらもその結合領域など不明な点もあり、詳細な生化学的解析など今後のさらなる報告を期待したい。さらに乳がんを自然発症する遺伝子改変マウスによる *in vivo* スクリーニング系により、腫瘍組織の血液凝固塊へ特異的に結合する CREKA (Cys-Arg-Glu-Lys-Ala) ペプチドが取得された<sup>86</sup>。フィブロネクチンとフィブリンがその結合標的である CREKA ペプチドを応用した前立腺がんや乳がん検出の MRI のイメージング剤や<sup>87,88</sup>、体内診断のみならず脳腫瘍治療のミセル製剤など治療用 DDS 製剤の研究<sup>89</sup>、さらには血栓の検出と治療のための DDS 製剤研究も行われており<sup>90</sup>、こちらも今後の展開に注目したい。

本研究が膀胱がん代表されるがん間質が豊富な難治性がんの診断および治療の発展に寄与できれば幸いである。

## 参考文献

1. Mueller, M.M. & Fusenig, N.E. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature reviews. Cancer* **4**, 839-849 (2004).
2. Gkretsi, V., Stylianou, A., Papageorgis, P., Polydorou, C. & Stylianopoulos, T. Remodeling Components of the Tumor Microenvironment to Enhance Cancer Therapy. *Frontiers in oncology* **5**, 214 (2015).
3. Erkan, M., *et al.* The activated stroma index is a novel and independent prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* **6**, 1155-1161 (2008).
4. Yashiro, M. & Hirakawa, K. Cancer-stromal interactions in scirrhus gastric carcinoma. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society* **3**, 127-135 (2010).
5. Rahib, L., Fleshman, J.M., Matrisian, L.M. & Berlin, J.D. Evaluation of Pancreatic Cancer Clinical Trials and Benchmarks for Clinically Meaningful Future Trials: A Systematic Review. *JAMA oncology* (2016).
6. Seppanen, H., *et al.* The Results of Pancreatic Resections and Long-Term Survival for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Single-Institution Experience. *Scandinavian journal of surgery : SJS : official organ for the Finnish Surgical Society and the Scandinavian Surgical Society* (2016).
7. 日本膵臓学会 & 診療ガイドライン改訂委員会, 日. *科学的根拠に基づく膵癌診療ガイドライン: 2013年版*, (金原出版, 2013).
8. *がんの分子イメージング*, (化学同人, 2015).

9. Weissleder, R. & Pittet, M.J. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* **452**, 580-589 (2008).
10. Kaur, S., *et al.* Recent trends in antibody-based oncologic imaging. *Cancer letters* **315**, 97-111 (2012).
11. Olive, K.P., *et al.* Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science (New York, N.Y.)* **324**, 1457-1461 (2009).
12. Provenzano, P.P., *et al.* Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer cell* **21**, 418-429 (2012).
13. Lunardi, S., Muschel, R.J. & Brunner, T.B. The stromal compartments in pancreatic cancer: are there any therapeutic targets? *Cancer letters* **343**, 147-155 (2014).
14. Yauch, R.L., *et al.* A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature* **455**, 406-410 (2008).
15. Bailey, J.M., *et al.* Sonic hedgehog promotes desmoplasia in pancreatic cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **14**, 5995-6004 (2008).
16. Hwang, R.F., *et al.* Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer research* **68**, 918-926 (2008).
17. Moir, J.A., Mann, J. & White, S.A. The role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer. *Surgical oncology* **24**, 232-238 (2015).
18. Matsumura, Y. Cancer stromal targeting (CAST) therapy. *Advanced drug delivery reviews* **64**, 710-719 (2012).
19. Dvorak, H.F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *The New England journal of medicine* **315**,



- 1650-1659 (1986).
20. Hisada, Y., *et al.* Discovery of an uncovered region in fibrin clots and its clinical significance. *Scientific reports* **3**, 2604 (2013).
  21. Stein, P.D., *et al.* Incidence of venous thromboembolism in patients hospitalized with cancer. *The American journal of medicine* **119**, 60-68 (2006).
  22. Sorensen, H.T., Mellekjaer, L., Olsen, J.H. & Baron, J.A. Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism. *The New England journal of medicine* **343**, 1846-1850 (2000).
  23. Yamashita, Y., *et al.* Elevated fibrin-related markers in patients with malignant diseases frequently associated with disseminated intravascular coagulation and venous thromboembolism. *Internal medicine (Tokyo, Japan)* **53**, 413-419 (2014).
  24. Matsumura, Y. & Maeda, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer research* **46**, 6387-6392 (1986).
  25. Matsumura, Y., Kimura, M., Yamamoto, T. & Maeda, H. Involvement of the kinin-generating cascade in enhanced vascular permeability in tumor tissue. *Japanese journal of cancer research* **79**, 1327-1334 (1988).
  26. Dvorak, H.F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **20**, 4368-4380 (2002).
  27. Kudryk, B., Rohoza, A., Ahadi, M., Chin, J. & Wiebe, M.E. Specificity of a monoclonal antibody for the NH<sub>2</sub>-terminal region of fibrin. *Molecular immunology* **21**, 89-94 (1984).

28. Rosebrough, S.F., *et al.* Aged venous thrombi: radioimmunoimaging with fibrin-specific monoclonal antibody. *Radiology* **162**, 575-577 (1987).
29. Gargan, P.E., Gaffney, P.J., Pleasants, J.R. & Ploplis, V.A. A monoclonal antibody which recognises an epitopic region unique to the intact fibrin polymeric structure. *Fibrinolysis* **7**, 275-283 (1993).
30. Kohler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497 (1975).
31. Köhler, G., Howe, S.C. & Milstein, C. Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines. *European Journal of Immunology* **6**, 292-295 (1976).
32. Wu, A.M. Engineered antibodies for molecular imaging of cancer. *Methods (San Diego, Calif.)* **65**, 139-147 (2014).
33. Freise, A.C. & Wu, A.M. In vivo imaging with antibodies and engineered fragments. *Molecular immunology* **67**, 142-152 (2015).
34. 次世代医薬開発に向けた抗体工学の最前線, (シーエムシー出版, 2012).
35. Wartha, K., Herting, F. & Hasmann, M. Fit-for purpose use of mouse models to improve predictivity of cancer therapeutics evaluation. *Pharmacology & therapeutics* **142**, 351-361 (2014).
36. Guerra, C. & Barbacid, M. Genetically engineered mouse models of pancreatic adenocarcinoma. *Molecular oncology* **7**, 232-247 (2013).
37. Tsumoto, K., *et al.* Highly efficient recovery of functional single-chain Fv fragments from inclusion bodies overexpressed in Escherichia coli by controlled introduction of oxidizing reagent--application to a human single-chain Fv fragment. *Journal of immunological methods* **219**, 119-129 (1998).

38. Umetsu, M., *et al.* How additives influence the refolding of immunoglobulin-folded proteins in a stepwise dialysis system. Spectroscopic evidence for highly efficient refolding of a single-chain Fv fragment. *The Journal of biological chemistry* **278**, 8979-8987 (2003).
39. Yanagihara, K., *et al.* A photon counting technique for quantitatively evaluating progression of peritoneal tumor dissemination. *Cancer research* **66**, 7532-7539 (2006).
40. Yanagihara, K., *et al.* Development and biological analysis of peritoneal metastasis mouse models for human scirrhous stomach cancer. *Cancer science* **96**, 323-332 (2005).
41. Yanagihara, K., *et al.* Establishment of two cell lines from human gastric scirrhous carcinoma that possess the potential to metastasize spontaneously in nude mice. *Cancer science* **95**, 575-582 (2004).
42. Hingorani, S.R., *et al.* Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer cell* **7**, 469-483 (2005).
43. Kawaguchi, Y., *et al.* The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nature genetics* **32**, 128-134 (2002).
44. Goemans, C., Denoncin, K. & Collet, J.F. Folding mechanisms of periplasmic proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1843**, 1517-1528 (2014).
45. Burgess, R.R. Refolding solubilized inclusion body proteins. *Methods in enzymology* **463**, 259-282 (2009).
46. Yasunaga, M., Manabe, S. & Matsumura, Y. New concept of cytotoxic immunoconjugate therapy targeting cancer-induced fibrin clots. *Cancer science* **102**,

- 1396-1402 (2011).
47. Wang, J.G., *et al.* Tumor-derived tissue factor activates coagulation and enhances thrombosis in a mouse xenograft model of human pancreatic cancer. *Blood* **119**, 5543-5552 (2012).
  48. 図説血栓・止血・血管学: 血栓症制圧のために, (中外医学社, 2005).
  49. Dunne, R.F. & Hezel, A.F. Genetics and Biology of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Hematology/oncology clinics of North America* **29**, 595-608 (2015).
  50. Colpaert, C.G., *et al.* Cutaneous breast cancer deposits show distinct growth patterns with different degrees of angiogenesis, hypoxia and fibrin deposition. *Histopathology* **42**, 530-540 (2003).
  51. Majumder, K., *et al.* A Novel Immunocompetent Mouse Model of Pancreatic Cancer with Robust Stroma: a Valuable Tool for Preclinical Evaluation of New Therapies. *Journal of Gastrointestinal Surgery* **20**, 53-65 (2016).
  52. Jacobetz, M.A., *et al.* Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut* **62**, 112-120 (2013).
  53. Kim, P.Y., Stewart, R.J., Lipson, S.M. & Nesheim, M.E. The relative kinetics of clotting and lysis provide a biochemical rationale for the correlation between elevated fibrinogen and cardiovascular disease. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **5**, 1250-1256 (2007).
  54. Goodall, A.H. & Appleby, J. Flow-cytometric analysis of platelet-membrane glycoprotein expression and platelet activation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **272**, 225-253 (2004).
  55. Cole, M. & Bromberg, M. Tissue factor as a novel target for treatment of breast cancer. *The oncologist* **18**, 14-18 (2013).

56. Kasthuri, R.S., Taubman, M.B. & Mackman, N. Role of tissue factor in cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**, 4834-4838 (2009).
57. Koga, Y., *et al.* Antitumor effect of antitissue factor antibody-MMAE conjugate in human pancreatic tumor xenografts. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **137**, 1457-1466 (2015).
58. Yamamoto, Y., *et al.* Enhanced antitumor effect of anti-tissue factor antibody-conjugated epirubicin-incorporating micelles in xenograft models. *Cancer science* **106**, 627-634 (2015).
59. Versteeg, H.H., *et al.* Inhibition of tissue factor signaling suppresses tumor growth. *Blood* **111**, 190-199 (2008).
60. Kurihara, H., *et al.* (64)Cu-DOTA-trastuzumab PET imaging and HER2 specificity of brain metastases in HER2-positive breast cancer patients. *EJNMMI research* **5**, 8 (2015).
61. Tamura, K., *et al.* 64Cu-DOTA-trastuzumab PET imaging in patients with HER2-positive breast cancer. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **54**, 1869-1875 (2013).
62. Lugovskoy, E.V., Gritsenko, P.G., Kolesnikova, I.N., Lugovskaya, N.E. & Komisarenko, S.V. A neoantigenic determinant in coiled coil region of human fibrin beta-chain. *Thrombosis research* **123**, 765-770 (2009).
63. Putelli, A., Kiefer, J.D., Zadory, M., Matasci, M. & Neri, D. A fibrin-specific monoclonal antibody from a designed phage display library inhibits clot formation and localizes to tumors in vivo. *Journal of molecular biology* **426**, 3606-3618 (2014).
64. Emeis, J.J., *et al.* A guide to murine coagulation factor structure, function, assays,

- and genetic alterations. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **5**, 670-679 (2007).
65. Zacharski, L.R., *et al.* Effect of warfarin anticoagulation on survival in carcinoma of the lung, colon, head and neck, and prostate. Final report of VA Cooperative Study #75. *Cancer* **53**, 2046-2052 (1984).
66. Vincent, J.L., Artigas, A., Petersen, L.C. & Meyer, C. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial assessing safety and efficacy of active site inactivated recombinant factor VIIa in subjects with acute lung injury or acute respiratory distress syndrome. *Critical care medicine* **37**, 1874-1880 (2009).
67. Ngo, C.V., *et al.* CNTO 859, a humanized anti-tissue factor monoclonal antibody, is a potent inhibitor of breast cancer metastasis and tumor growth in xenograft models. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **120**, 1261-1267 (2007).
68. Morrow, D.A., *et al.* Potent inhibition of thrombin with a monoclonal antibody against tissue factor (Sunol-CH36): results of the PROXIMATE-TIMI 27 trial. *European heart journal* **26**, 682-688 (2005).
69. Morris, P.E., *et al.* A phase I study evaluating the pharmacokinetics, safety and tolerability of an antibody-based tissue factor antagonist in subjects with acute lung injury or acute respiratory distress syndrome. *BMC pulmonary medicine* **12**, 5 (2012).
70. Cao, X., Yu, H., Chen, C., Wei, J. & Wang, P. Expression and characterization of recombinant humanized anti-HER2 single-chain antibody in *Pichia pastoris* for targeted cancer therapy. *Biotechnology letters* **37**, 1347-1354 (2015).
71. Kurasawa, J.H., *et al.* Insect cell-based expression and characterization of a

- single-chain variable antibody fragment directed against blood coagulation factor VIII. *Protein expression and purification* **88**, 201-206 (2013).
72. Botnar, R.M., *et al.* In vivo magnetic resonance imaging of coronary thrombosis using a fibrin-binding molecular magnetic resonance contrast agent. *Circulation* **110**, 1463-1466 (2004).
73. Vymazal, J., *et al.* Thrombus imaging with fibrin-specific gadolinium-based MR contrast agent EP-2104R: results of a phase II clinical study of feasibility. *Investigative radiology* **44**, 697-704 (2009).
74. Morelli, J.N., Runge, V.M., Williams, J.M., Beissner, R.S. & Tweedle, M. Evaluation of a fibrin-binding gadolinium chelate peptide tetramer in a brain glioma model. *Investigative radiology* **46**, 169-177 (2011).
75. Uppal, R., *et al.* Molecular imaging of fibrin in a breast cancer xenograft mouse model. *Investigative radiology* **47**, 553-558 (2012).
76. Starmans, L.W., *et al.* Evaluation of In-Labeled EPep and FibPep as Tracers for Fibrin SPECT Imaging. *Mol Pharm* (2013).
77. Starmans, L.W., *et al.* Noninvasive visualization of tumoral fibrin deposition using a peptidic fibrin-binding single photon emission computed tomography tracer. *Mol Pharm* **12**, 1921-1928 (2015).
78. Ciesinski, K.L., *et al.* Fibrin-targeted PET probes for the detection of thrombi. *Mol Pharm* **10**, 1100-1110 (2013).
79. Kolodziej, A.F., *et al.* Fibrin specific peptides derived by phage display: characterization of peptides and conjugates for imaging. *Bioconjugate chemistry* **23**, 548-556 (2012).
80. Pilch, J., *et al.* Peptides selected for binding to clotted plasma accumulate in tumor

- stroma and wounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 2800-2804 (2006).
81. Knowles, L.M., Malik, G., Hood, B.L., Conrads, T.P. & Pilch, J. CLT1 targets angiogenic endothelium through CLIC1 and fibronectin. *Angiogenesis* **15**, 115-129 (2012).
82. Knowles, L.M., *et al.* CLT1 targets bladder cancer through integrin alpha5beta1 and CLIC3. *Molecular cancer research : MCR* **11**, 194-203 (2013).
83. Aladin, F., Lautscham, G., Humphries, E., Coulson, J. & Blake, N. Targeting tumour cells with defects in the MHC Class I antigen processing pathway with CD8+ T cells specific for hydrophobic TAP- and Tapasin-independent peptides: the requirement for directed access into the ER. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **56**, 1143-1152 (2007).
84. Tan, M., Wu, X., Jeong, E.K., Chen, Q. & Lu, Z.R. Peptide-targeted Nanoglobular Gd-DOTA monoamide conjugates for magnetic resonance cancer molecular imaging. *Biomacromolecules* **11**, 754-761 (2010).
85. Tan, M., *et al.* MR molecular imaging of prostate cancer with a peptide-targeted contrast agent in a mouse orthotopic prostate cancer model. *Pharmaceutical research* **29**, 953-960 (2012).
86. Simberg, D., *et al.* Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 932-936 (2007).
87. Wu, X., *et al.* Peptide targeted high-resolution molecular imaging of prostate cancer with MRI. *American journal of nuclear medicine and molecular imaging* **4**, 525-536 (2014).



88. Zhou, Z., *et al.* MRI detection of breast cancer micrometastases with a fibronectin-targeting contrast agent. *Nature communications* **6**, 7984 (2015).
89. Chung, E.J., *et al.* Fibrin-binding, peptide amphiphile micelles for targeting glioblastoma. *Biomaterials* **35**, 1249-1256 (2014).
90. Wen, A.M., *et al.* Shaping bio-inspired nanotechnologies to target thrombosis for dual optical-magnetic resonance imaging. *Journal of materials chemistry. B, Materials for biology and medicine* **3**, 6037-6045 (2015).

## 謝辞

国立がん研究センター先端医療開発センター兼任東京大学大学院新領域創成科学研究科の松村保広分野長および教授には、上長として且つ指導教員として温かいご指導をいただき誠に感謝いたしております。同所属の安永正浩ユニット長および教授には、研究の基礎から論文の執筆まで様々なご助言をいただき誠に感謝いたしております。国立がん研究センター先端医療開発センターの古賀宣勝室長には実験手技から臨床での実際まで様々な技術と知識をご教授いただき誠に感謝いたしております。同所属の柳原五吉博士には、ヒトスキルス胃癌派生細胞株 44As3 をご分与いただき深く感謝申し上げます。

東京大学大学院工学系研究科兼任東京大学医科学研究所の津本浩平教授ならびに岡本未央さんには低分子化抗体 scFv の作製技術および巻き戻し法を丁寧にご教授いただき深く感謝申し上げます。

コールド・スプリング・ハーバー研究所の David A. Tuveson 教授、ヴァンダービルト大学の Christopher V. E. Wright 教授および京都大学 iPS 細胞研究所の川口義弥教授には、LSL-Kras<sup>G12D</sup> および Ptf1a-Cre 遺伝子改変マウスをご供与いただき深く感謝申し上げます。

国立がん研究センター先端医療開発センター新薬開発分野（旧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）の小池浩代さんならびに溝口万里さんによる抗不溶性フィブリン抗体開発、また久田洋平さんによるその詳細な解析の礎の上に本研究が遂行できたことを感謝申し上げます。

本研究を遂行するに当たり様々なご支援をいただいた国立がん研究センター先端医療開発センター新薬開発分野（旧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）の山本祥之先生、山崎信義先生、福岡聖大先生、菅谷明德先生、工藤昌尚先生、高島大輝先生、瀧ヶ平美里さん、古屋文昭さん、町田光さん、渕上弥史さん、西條信史さん、花岡慎悟さん、安西高廣さん、津村遼さん、山内真由美さん、椎名薫さん、嶋田真美子さん

ん、中山円さん、小車健悟さん、今井麻友美さん、梶口卓摩さん、宗岡聡さん、新関孝朗さん、山崎聡子さん、佐藤隆太さん、藤原悠起さん、高塚直幸さん、米山諒さん、合羽節次さん、有田大悟さん、皆様方に心より感謝申し上げます。

2016年8月 生内 寿文