

論文の内容の要旨

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

《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、診断する側も被検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)。

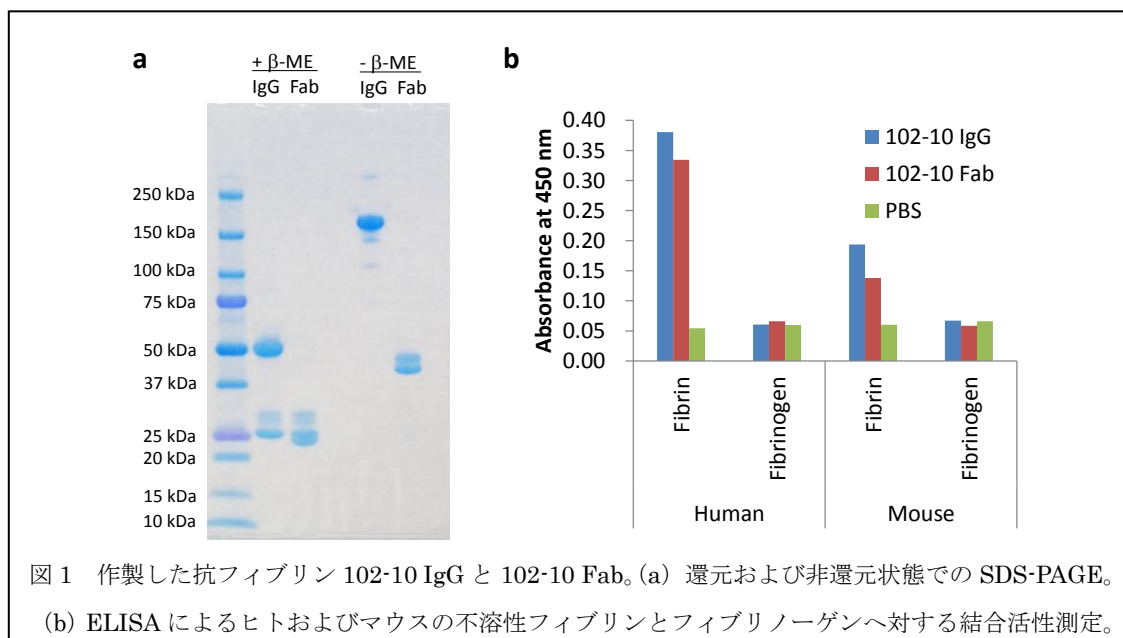


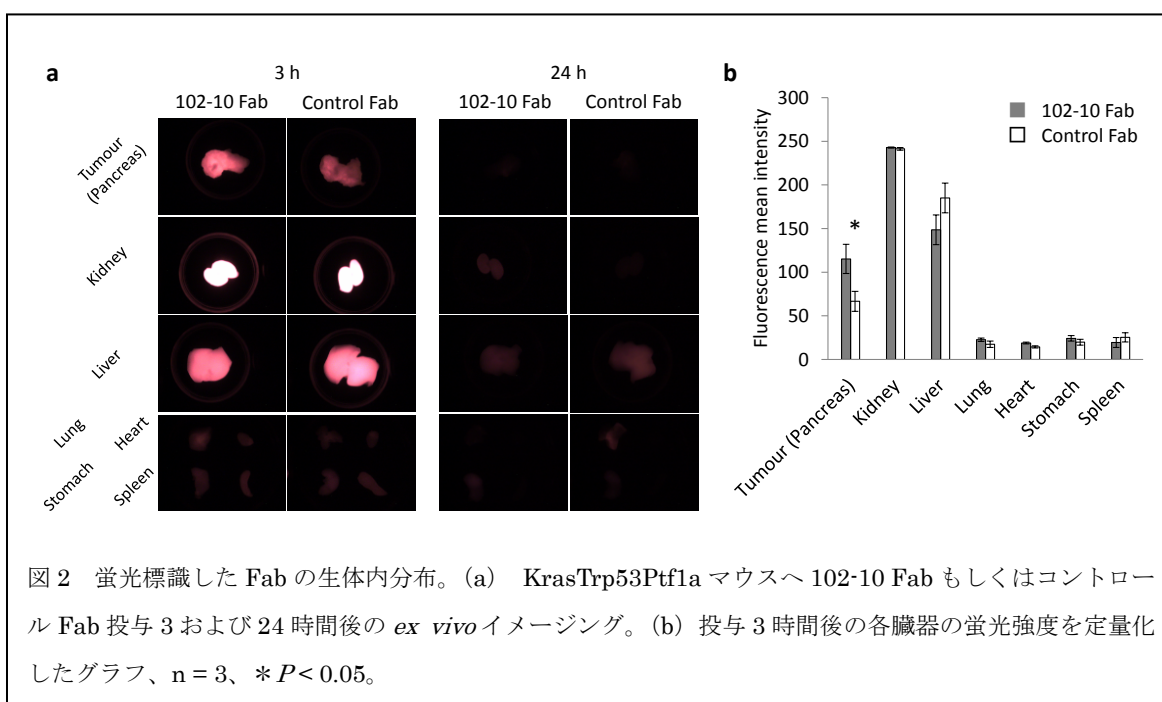
図 1 作製した抗フィブリン 102-10 IgG と 102-10 Fab。(a) 還元および非還元状態での SDS-PAGE。(b) ELISA によるヒトおよびマウスの不溶性フィブリンとフィブリノーゲンへ対する結合活性測定。

2. 睥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、プラスミノゲンが組織型プラスミノゲン活性化因子 (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継時測定し、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 α_2 -プラスミン阻害剤 (α_2 -PI) および 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) 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。

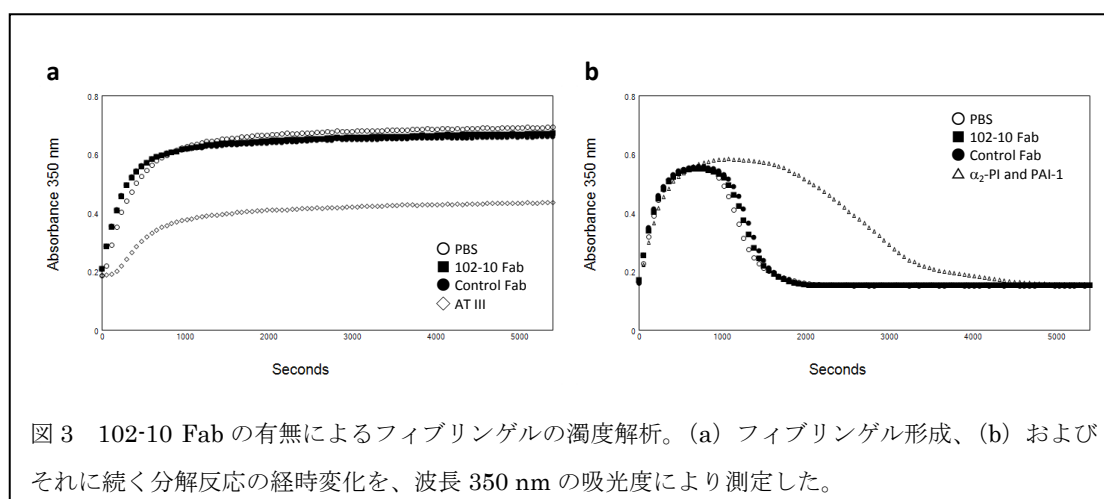


図3 102-10 Fabの有無によるフィブリンゲルの濁度解析。(a) フィブリンゲル形成、(b) およびそれに続く分解反応の経時変化を、波長 350 nm の吸光度により測定した。

《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。