

東京大学大学院新領域創成科学研究科
先端生命科学専攻

平成 24 年度

修士論文

組織因子（Tissue Factor ,TF）に対する
種々のサイズの抗体作製と腫瘍集積性の検討

2013 年 1 月 31 日提出
指導教員 松村 保広 客員教授

47-116345 津村 遼

要旨

組織因子 (Tissue Factor, TF) に対する種々のサイズの抗体作製と腫瘍集積性の検討

がん先端生命科学分野 47116345 津村遼

指導教員 松村 保広

【背景・目的】

19世紀に仏の外科医 Trousseau が、がん患者において四肢の血栓症が高頻度で発症することを報告して以来、がんと血栓症との関係性は古くから知られている。最近では、あらゆるがん患者において静脈血栓症の起こる頻度が高いという臨床報告がある。その原因の1つとして、腫瘍組織における血液凝固亢進状態が考えられる。腫瘍組織では腫瘍塊が成長・浸潤を続ける限り、腫瘍血管を破壊して出血が起こり、血液凝固反応が開始される。このような現象は、いわゆる通常の出血・梗塞栓疾患によって起こる一過性の血液凝固とは異なり、無症状で永続的に持続することから、がん特有であると考えられる。

血液凝固機構には内因系と外因系があり、当研究室では外因系凝固の開始因子である組織因子 (Tissue Factor, TF) に着目している。TFは47 kDaの一回膜貫通型糖タンパク質であり、種々のがん細胞膜に高発現していると同時に、腫瘍血管内皮細胞やその周囲の間質に存在する細胞にも発現していると報告されている。当研究室はこれまで、TFに対するモノクローナル抗体を作製し、生体内でのがんの浸潤や転移におけるTFの役割の解明を行ってきた。本研究では、当研究室が樹立した抗TFモノクローナル抗体を用いて、TFをターゲットとしたDrug Delivery System (DDS) 製剤の開発を目指している。

抗体分子のサイズ変化は、それにより生体内挙動が大きく変動するため、抗体を用いたDDS製剤開発を行う上で検討が必須な項目の一つである。一般的に、低分子の抗体はIntact IgGと比較して、組織浸透性やクリアランス速度の向上、Fc部位欠如による自己免疫反応の回避といった利点が期待され、主に画像診断への臨床応用に有用であると考えられる。

本研究の目的は、第1に抗TFモノクローナル抗体の分子量の違いによるマウス生体内での挙動変化を明確化すること、第2に分子量の異なる抗体分子それぞれに適した臨床応用方法を検討することである。

【方法】

anti-mouse TF Intact IgGとanti-human TF Intact IgGをそれぞれタンパク質分解酵素で処理して、これらのF(ab')₂とFabを得た。得られたF(ab')₂とFabは、それぞれゲル濾過クロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィーを用いて分離精製した。各種抗体分子の抗体活性検討は、リコンビナントTF抗原を用いたELISAや、TF高発現がん細胞株を用いたFlow Cytometry解析によって行った。最後に、BxPC3皮下移植モデルマウスに蛍光標識した各種抗体分子を尾静脈投与し、一定時間経過ごとに*in vivo imaging*を行うことで、各種抗体分子のマウス生体内での挙動を観察した。

【結果と考察】

Intact IgG のタンパク質分解酵素処理産物を用いた SDS-PAGE (非還元) と Western blotting の結果から、F(ab')₂ と Fab が得られた事を確認し、クロマトグラフィーによって分離精製した。低分子化した抗体は、ELISA や Flow Cytometry 解析によって、リコンビナント TF 抗原とがん細胞膜表面に発現した TF 抗原に対して、抗体活性を保持することを確認した。また anti-mouse TF 抗体と anti-human TF 抗体が、それぞれの TF 抗原に対してお互いに交差しないことを確認した。

ヒト膵臓がん細胞株 (BxPC3) 皮下移植モデルマウスに、蛍光標識した各サイズの抗体分子を尾静脈投与し、一定時間経過ごとに *in vivo* imaging を行った (図 1)。どの抗体サイズにおいても、anti-human TF 抗体の方が anti-mouse TF 抗体よりも高い腫瘍集積性と保持性を示した。これはがん細胞 (BxPC3) 由来の TF 発現量が、マウス腫瘍血管内皮細胞及びその周囲の間質細胞由来の TF 発現量よりも顕著に高いためであると考えられる。また、分子サイズが大きい Intact IgG は血中半減期が長く、長期にわたる腫瘍への集積が見られた。一方で、Fab は腎臓による迅速なクリアランスが見られ、早い時間での腫瘍部と非腫瘍部のコントラストが得られた。F(ab')₂ に関しては、Intact IgG と Fab の中間的な挙動を示した。これらの特性から、anti-TF Intact IgG は細胞障害性物質を付加させるなどした治療目的の抗体製剤への応用に適しており、一方で Fab は造影剤や放射性同位体を付加させた画像診断薬への応用に適していると考えられる。

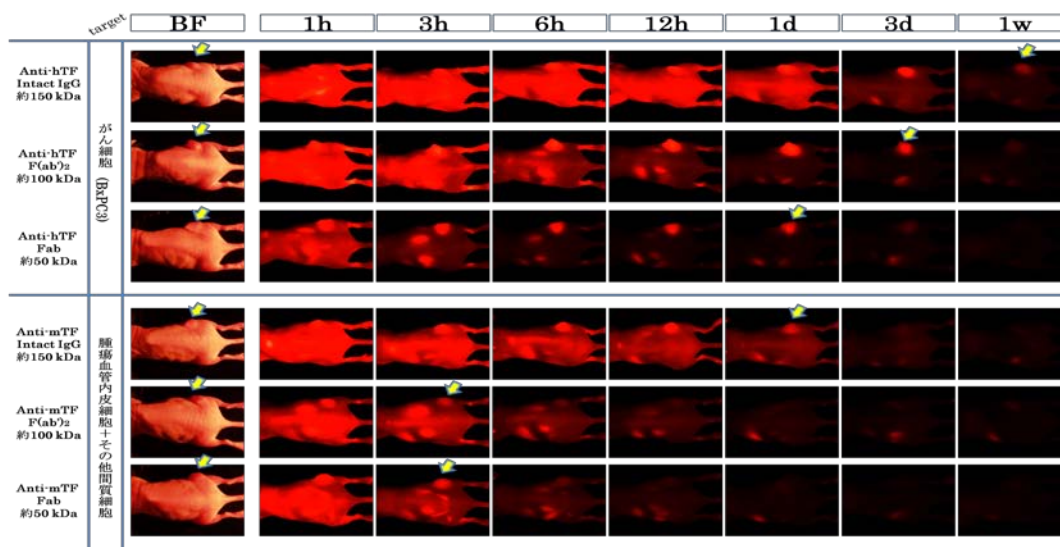


図 1. ヒト膵臓がん細胞株 (BxPC3) 皮下移植モデルマウスにおける各種抗体分子の *in vivo* imaging

【結論】

抗 TF モノクローナル抗体を用いた DDS 製剤開発において、得られたの結果から Intact IgG は治療へ、Fab は診断への臨床応用に適していることが明らかとなった。今後は、*in vivo* における定量的な抗体分布の解析や、ヒトのがんに近いマウスモデルを用いての検討を行い、抗 TF モノクローナル抗体の新規抗体医薬品としての可能性を更に検討する予定である。