

博士論文

論文題目 がん間質を標的とした抗フィブリンクロット
 特異抗体 102-10 の性状解析

氏名 久田 洋平

目次

略語	1
論文内容の要旨	2
第1章 背景と目的	
1. がんと血液凝固	6
2. 血液凝固カスケード	7
2-1. 外因系凝固	7
2-2. 内因系凝固	9
3. 血液凝固の最終産物: フィブリンクロット	9
4. がん組織における悪性凝固サイクル	11
5. Drug delivery system (DDS)	12
6. 間質 targeting	14
7. 研究目的	15
第2章 in vitro における抗フィブリンクロット特異抗体 102-10 の性状解析 実験方法	
1. 抗フィブリンクロット特異キメラ抗体 102-10 の確立	17
1-1. 免疫原調整	17
1-2. 抗フィブリンクロット IgM のキメラ IgG 化	17
2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	18
3. in vitro で作製したフィブリンクロットの蛍光免疫染色	18
4. がん関連プロテアーゼによるフィブリンクロットの分解	19
5. Western blot	20
6. 102-10 のエピトープの同定	21
6-1. フィブリノゲン B β 鎖の単離	21
6-2. フィブリノゲン B β 鎖のリシルエンドペプチダーゼによる分解	21
6-3. フィブリノゲン B β 鎖の分解物のアミノ酸シーケンス	21
6-4. 合成ペプチドを用いた 102-10 のフィブリンクロットへの結合の 競争阻害実験	22
7. 102-10 のエピトープ部位のフィブリノゲンにおける立体構造検索	22
8. 新規抗 B β 鎖抗体と抗 γ 鎖抗体の確立	22
9. 新規抗 B β 鎖抗体と抗 γ 鎖抗体を用いた競争阻害実験	23
10. 統計解析	23

実験結果

1. 102-10 の抗原特異性の評価 24
2. 102-10 のエピトープの同定 26
3. 102-10 のエピトープ部位のフィブリノゲンにおける構造 29
4. 102-10 のエピトープ部位のフィブリンクロットにおける新規構造変化 . . . 30

考察

1. 102-10 の抗原特異性の評価 33
2. 102-10 のエピトープの同定 34
3. 102-10 のエピトープ部位のフィブリノゲンにおける構造と
フィブリンクロットにおける新規構造変化 35

第 3 章 in vivo における抗フィブリンクロット特異抗体 102-10 の腫瘍集積性の 評価と臨床検体における悪性度とフィブリンクロットの沈着の相関

実験方法

1. 非悪性疾患マウスモデルの作製 37
2. 組織免疫染色 37
3. 睪がんトランスジェニック (TG) マウスの作製 38
4. 蛍光標識 102-10 の腫瘍集積性の評価 38
 - 4-1. ex vivo による評価 38
 - 4-2. 蛍光免疫染色による評価 39
5. 化学発がんマウスモデルの作製 40
6. 放射性同位体標識 102-10 の作製と PET/CT による 102-10 の
腫瘍集積性の評価 40
7. Hematoxylin Eosin (HE) 染色 41

実験結果

1. 非悪性疾患マウスモデルにおけるフィブリンクロットの動態 41
2. 睪がんトランスジェニック (TG) マウスにおける蛍光標識 102-10 の
腫瘍集積性の評価 42
3. 化学発がんマウスモデルにおける放射性同位体標識 102-10 の
腫瘍集積性の評価 45
4. 悪性疾患と非悪性疾患のヒト臨床検体におけるフィブリンクロットの
組織免疫染色 46
5. ヒト脳腫瘍における悪性度とフィブリンクロットの沈着の相関 47

考察

1. 非悪性疾患におけるフィブリンクロットの動態 49
2. 102-10 の腫瘍集積性 49

3. ヒト臨床検体におけるフィブリンクロットの組織免疫染色	50
今後の展望	52
結語	56
参考文献	57
謝辞	62

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd.

Scientific Reports Vol.3, Art No.2604, 6 September 2013, DOI: 10.1038/srep02604,

copyright 2013

略語

DDS: Drug delivery system

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

CBB: Coomassie brilliant blue

NMR: Nuclear magnetic resonance

PET: Positron emission tomography

CT: Computed tomography

VTE: Venous thromboembolism

TF: Tissue factor

VEGF: Vascular endothelial growth factor

FPA: Fibrinopeptide A

FPB: Fibrinopeptide B

mAb: monoclonal antibody

EPR: Enhanced permeability and retention

TBS: Tris-buffered saline

IgM: Immunoglobulin M

IgG: Immunoglobulin G

PBS: Phosphate-buffered saline

TBS-T: Tris-buffered saline-Tween 20

HRP: Horseradish peroxidase

EGFR: Epidermal growth factor receptor

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

PDB: Protein Data Bank

s.d.: standard deviation

Mw: Molecular weight marker

N-DSK: N-disulfide knot

DMBA: 7, 12-Dimethylbenz[a]anthracene

PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate

DF: *p*-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine B

TG: Transgenic

KD: Dissociation constant

ka: kinetic association rate constant

kd: kinetic dissociation rate constant

論文の内容の要旨

論文題目 がん間質を標的とした抗フィブリンクロット 特異抗体 102-10 の性状解析

氏名 久田 洋平

【序論】

フィブリノゲンは2組のA α 鎖、B β 鎖、 γ 鎖がジスルフィド結合で重合している2量体の血中糖タンパクである。血液凝固経路の最終段階でフィブリノゲンはトロンビンによる限定分解を受け、可溶性フィブリンを形成し、可溶性フィブリン同士が次々に重合し、不溶性のフィブリンクロットを形成する。トランスグルタミナーゼ活性をもつ血液凝固第 XIII 因子によりフィブリンクロットの分子間に共有結合が形成され、安定化する。最終的にフィブリンクロットは線溶系のプラスミンによる分解を受け、可溶性のD-ダイマーとなって血中に流れる。フィブリンクロットの形成は血栓止血関連の事象の中で最も重要であり、創傷治癒、心筋梗塞、脳梗塞、炎症、がんの浸潤転移にも関与している。

がん患者で血液凝固活性が亢進していることは広く知られている。腫瘍が浸潤する際に、隣接する正常細胞や腫瘍血管を破壊し、微小な出血が起こり、止血のためにフィブリンクロットの形成が至るところで見られる。腫瘍で形成されたフィブリンクロットはプラスミンで分解を受け、やがてコラーゲンに置き換わるが、腫瘍細胞が体内で生存する限り、浸潤を繰り返し、フィブリンクロットは形成され続ける。一方、炎症性疾患や梗塞性疾患でもフィブリンクロットの形成は見られるが、急性期、活動期のみで、フィブリンクロットの形成は一過性であり、ヒトの場合、2、3週以内にフィブリンクロットは溶失する。すなわちフィブリンクロットは、がんの病態特異的なタンパクであると考え、がん周囲のフィブリンクロットを標的とする抗体 (102-10) を作製した。

本研究では、102-10 のがん周囲のフィブリンクロットへのドラッグデリバリーシステム (DDS) ツールとしての有用性を示すことを目的とし、1) 102-10 の特異性評価とエピトープ検索、2) 102-10 のがんの周囲のフィブリンクロットへの DDS ツールとしての有用性の評価、3) 102-10 抗体を用いたがんの悪性度判定への臨床応用のための予備検討、以上の3点の検討を行った。

【結果と考察】

1. 102-10はフィブリンクロットのみ反応性を示した。

102-10がフィブリノゲンに反応せずに、フィブリンクロットのみ反応することは既に明らかになっていた (Yasunaga *et al. Cancer Sci* 2011)。しかしながら、可溶性フィブリンや、D-ダイマーといったフィブリン関連分子との反応性は明らかになっていなかった。そこで、まず可溶性フィブリンとD-ダイマーに対する102-10の反応性をELISAで確認した。その結果、102-10はフィブリンクロットのみ反応し、他のフィブリン関連分子には反応しなかった (図1a)。また、市販の抗フィブリン抗体と比較すると、102-10のみがフィブリンクロットに高い特異性を示した (図1b)。これまでフィブリンクロットを標的とした抗体は世界中の研究グループにより作製されてきたが (Pacella *et al. Mol Immunol* 1983 他多数)、フィブリンクロットのみを特異的に認識する抗体は報告が無い。本実験により102-10はフィブリンクロットのみを認識する唯一の抗体であることが示された。

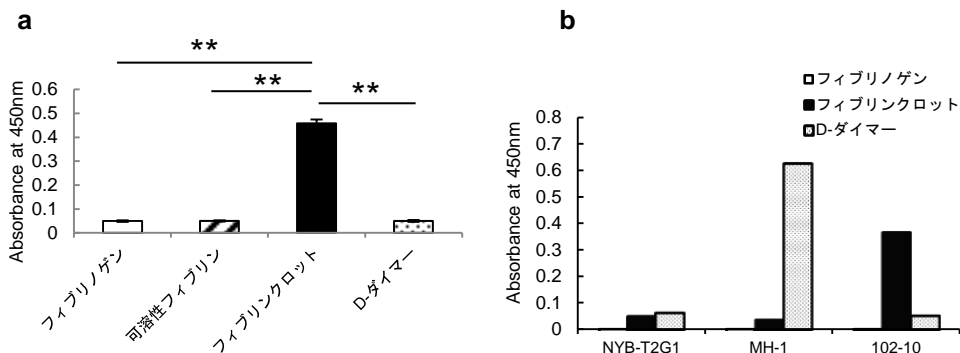


図1. 102-10の特異性評価

a. 102-10はフィブリンクロットのみ反応した。(n=6, means±s.d., ** P<0.01)

b. 市販の抗フィブリン抗体(NYB-T2G1とMH-1)と比較して、102-10のみがフィブリンクロットに特異性を示した。

2. 102-10のエピトープ検索からフィブリンクロットのみで起こる新規の構造変化を発見した。

102-10の特異性がどのような機序に起因するかを明らかにするために、エピトープ検索を行うこととした。エピトープ検索の過程で、102-10は未処理のフィブリノゲンには反応しないが、変性条件でフィブリノゲンのBβ鎖に反応することがWestern blotにより明らかになった (図2a)。そこで、Bβ鎖を単離して、リシルエンドペプチダーゼでBβ鎖を分解した。その結果、102-10と反応するペプチド断片を10 kDa付近に確認した。このペプチド断片を単離し、アミノ酸シーケンサーにより86アミノ酸を同定した。86アミノ酸をさらに5つの合成ペプチドに分けて、競争阻害実験を行ったところ、No.5の16アミノ酸が102-10のエピトープとして同定された (図2b)。

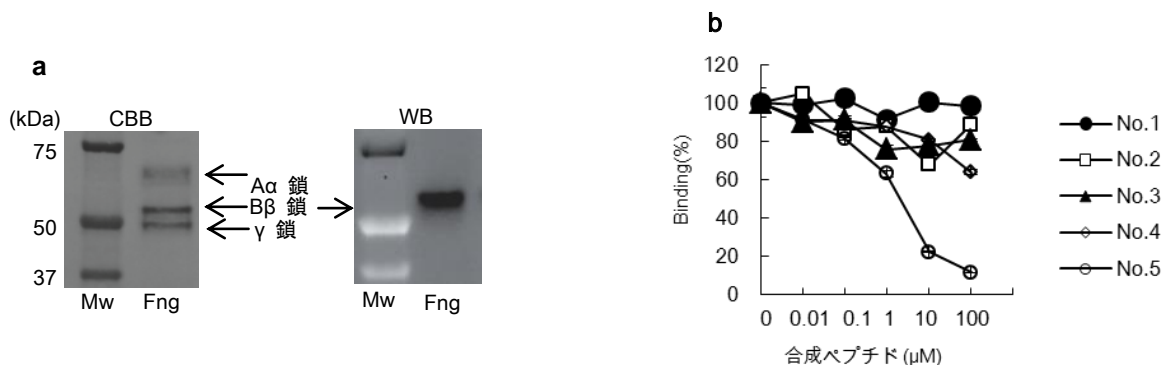


図2. 102-10のエピトープ検索

- a. 102-10はB β 鎖に反応した。
- b. No.5の合成ペプチド(16アミノ酸)のみが102-10のフィブリンクロットへの結合を阻害した。
($n=3$, means \pm s.d., $P<0.01$; No.4 vs. No.5)

先行論文の立体構造のデータ (Kollman *et al. Biochemistry* 2009) から、フィブリノゲンにおいて102-10のエピトープは、 γ 鎖と疎水性相互作用を形成しており、 γ 鎖に覆われているためにエピトープになり得ないことが明らかになった (図 3a)。そのため、フィブリンクロットではこの疎水性相互作用が切断されて、エピトープ部位に空間が生じると仮説を立てた。不溶性タンパクであるフィブリンクロットはX線結晶構造解析やNMRによる立体構造解析が適用できない。そこで、仮説を証明するために①102-10のエピトープ部位に対する抗体と、②エピトープ部位と疎水性相互作用を形成している γ 鎖に対する抗体を新規に作製した。もしこれら2つの抗体がフィブリノゲンに反応せずに、フィブリンクロットのみ反応すれば、仮説が証明され、フィブリンクロットで生じた空間から侵入した抗体がエピトープに結合できるようになると考えた。ELISAの結果、新規に作製した2つの抗体は、フィブリンクロットのみ反応し、仮説は証明された (図 3b)。本実験により、フィブリンクロットと他のフィブリン関連分子を見分けることができる新規の構造変化が明らかになり、102-10はその新規構造変化部位を認識していることが明らかになった。

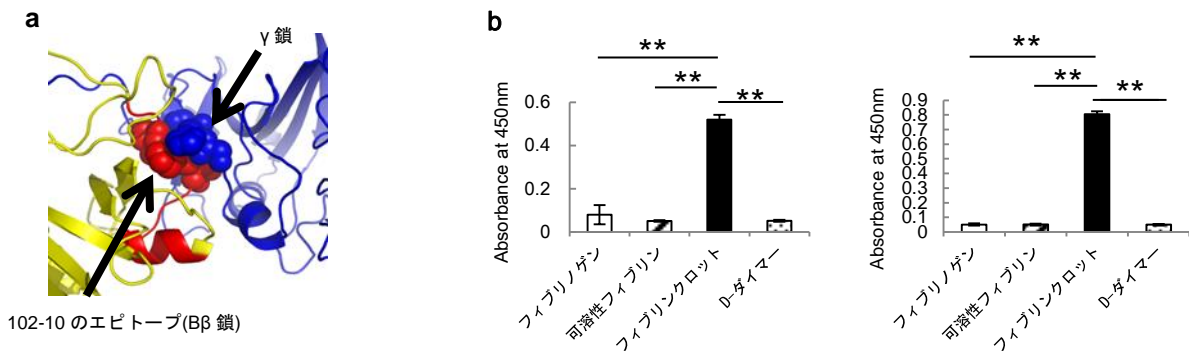


図3. フィブリンクロットにおける102-10のエピトープ部位の新規構造変化

- a. フィブリノゲンにおける102-10のエピトープ部位の立体構造。 γ 鎖がエピトープ部位を覆っている。
- b. (左) 102-10のエピトープ部位に対する新規抗体と(右) γ 鎖に対する新規抗体の特異性評価。どちらもフィブリンクロットのみ反応した。
($n=8$, means \pm s.d., ** $P<0.01$)

3. 102-10は化学発がんマウスモデルの腫瘍に顕著に集積した。

In vivo で腫瘍集積性を評価するために、放射性同位元素である ^{89}Zr を 102-10 に付加した複合体を作製した。化学発がんマウスモデルに ^{89}Zr 付加 102-10 を投与し、腫瘍集積性を PET/CT で検討した。その結果、投与後 5 日目に control IgG と比較して、102-10 は高い腫瘍集積性を示した (図 4a)。更に、 ^{89}Zr 付加 102-10 を投与したマウスの腫瘍を摘出して、フィブリンクロットの組織免疫染色とオートラジオグラフィーを確認したところ、フィブリン沈着の多い箇所に ^{89}Zr 付加 102-10 の集積が多いことが明らかになった (図 4b)。本実験により、102-10 は優れた腫瘍集積性をもつことが明らかになった。

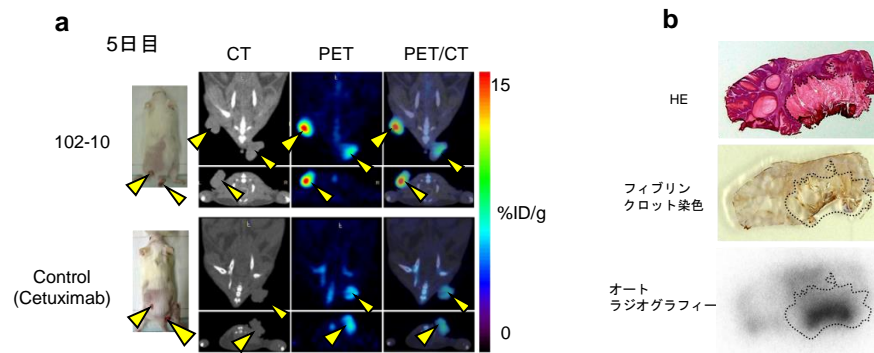


図4. 化学発癌マウスモデルに対する102-10の腫瘍集積性の評価
 a. 102-10はcontrol IgGに比べて、高い腫瘍集積性を示した(黄矢印は腫瘍部)。
 b. ^{89}Zr 付加102-10は腫瘍内のフィブリンクロットと共局在した(点線部)。

4. ヒトの脳腫瘍において、腫瘍の悪性度とフィブリンクロットの沈着に相関を認めた。

脳腫瘍の代表であるグリオーマは悪性度により、grade1 (悪性度低) から grade4 (悪性度高) に分けられる。Grade1/2: 20 例、grade3: 20 例、grade4: 20 例に対して、フィブリンクロットの組織免疫染色を行った。染色度合を3群に分け、フィブリンの染色が明らかに見られないものを (-)、わずかだが、明らかに染色されているものを (+)、不均一あるいはびまん性に強く染色されているものを (++)とした (図 5a)。その結果、grade4 では 100% (20/20) の症例でフィブリンクロット陽性で、65% (13/20) の症例は強い染色であった。Grade3 では 40% (8/20) の症例でフィブリンクロット陽性で、10% (2/20) の症例は強い染色であった。Grade1/2 では 60% (12/20) の症例でフィブリンクロット陽性で、10% (2/20) の症例は強い染色であった (図 5b)。本実験により、Grade 4 では他の低 grade の症例と比べて、フィブリンクロットの沈着が多いことが明らかになり、腫瘍の悪性度とフィブリンクロットの沈着に相関を認めた。

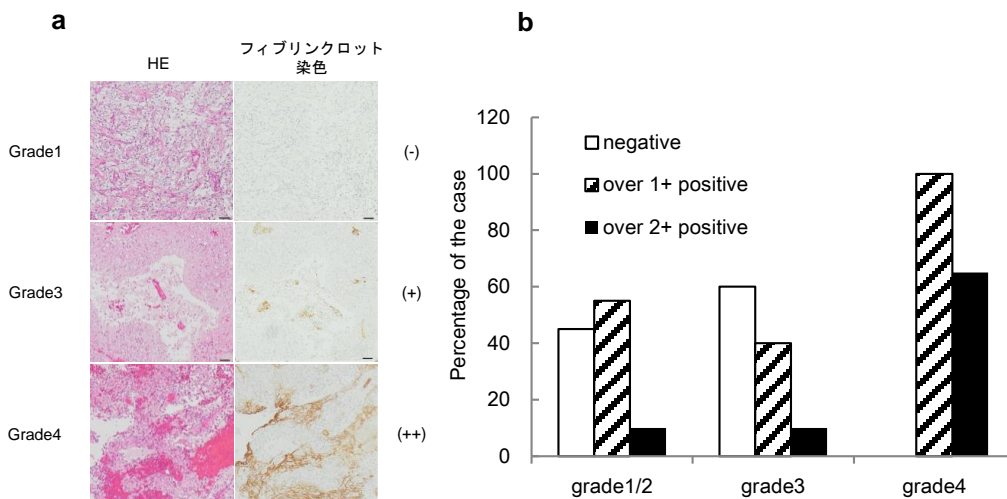


図5. ヒト脳腫瘍検体に対するフィブリンクロットの組織免疫染色
 a. 染色度合を(-), (+), (++)の3群に分けた (Bar: 100 μm)。
 b. 各gradeを20例ずつ染色したところ、grade4は他の低gradeの症例に比べてフィブリンの沈着が多く見られた。また、腫瘍の悪性度とフィブリンクロットの沈着に相関を認めた ($R = 0.56$, $P = 1.55\text{E-}05$)。

【結論】

本研究では、in vitro、in vivo、臨床検体の評価による抗フィブリンクロット特異抗体 102-10 の性状解析を行い、1) 102-10 はフィブリンクロットのみで起こる新規構造変化部位を特異的に認識していた、2) 102-10 はその特異性ゆえにがん周囲の間質に存在するフィブリンクロットへの有望な DDS ツールになりうる、3) がんの悪性度とフィブリンの沈着に相関を認め、悪性度の判定への臨床応用が期待される、以上の3点の結論が得られた。

第1章 背景と目的

1. がんと血液凝固

1865年にフランスの内科医 Armand Trousseau が、がん患者において血液凝固が亢進しており、四肢の静脈血栓症が起りやすいことを提唱した¹。皮肉にもその2年後に彼自身の左腕に血栓性静脈炎が起こっていることに気づき、その1月後に胃がんで亡くなっている。それ以来、がんと血液凝固の関係は広く知られており、現在までに多くの研究結果が報告されている。代表的なものとして、膵がん、脳腫瘍、胃がんでは静脈血栓症 (Venous thromboembolism: VTE) の発症率が優位に高く (図 1a)²、VTE を合併しているがん患者の予後は、VTE を合併していないがん患者の予後に比べて、不良であるということが報告されている (図 1b)³。

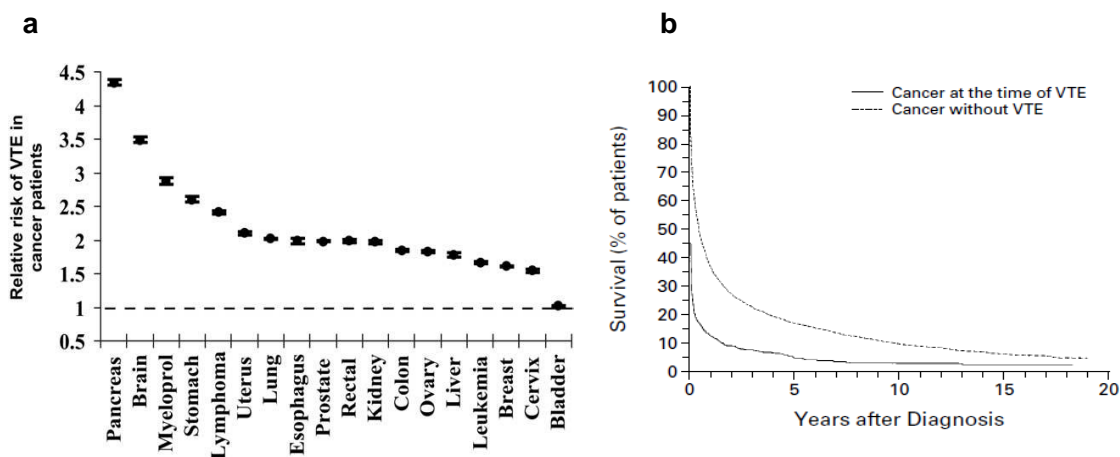


図 1. がんと血液凝固の関係 (a) 健常人の VTE の発症リスクを 1 としたとき、がん患者の VTE の相対的なリスクが示されている。(b) VTE を合併していないがん患者の予後 (破線) に比べて、VTE を合併しているがん患者の予後 (実線) が悪いことが示されている。参考文献 2, 3 よりそれぞれ引用。

(Reproduced with permission from Stein PD, et al. Incidence of venous thromboembolism in patients hospitalized with cancer. *Am J Med.* 2006;119(1):60-68. Copyright ELSEVIER) (Reproduced with permission from Sorensen HT, et al. Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism. *N Engl J Med.* 2000;343(25):1846-1850, Copyright Massachusetts Medical Society.)

2. 血液凝固カスケード

血液凝固カスケードは以下に示す外因系凝固と内因系凝固に大別されるが、カスケードの下流で2つの経路は合流し、最終産物としてフィブリンクロットを産生する (図 2)。

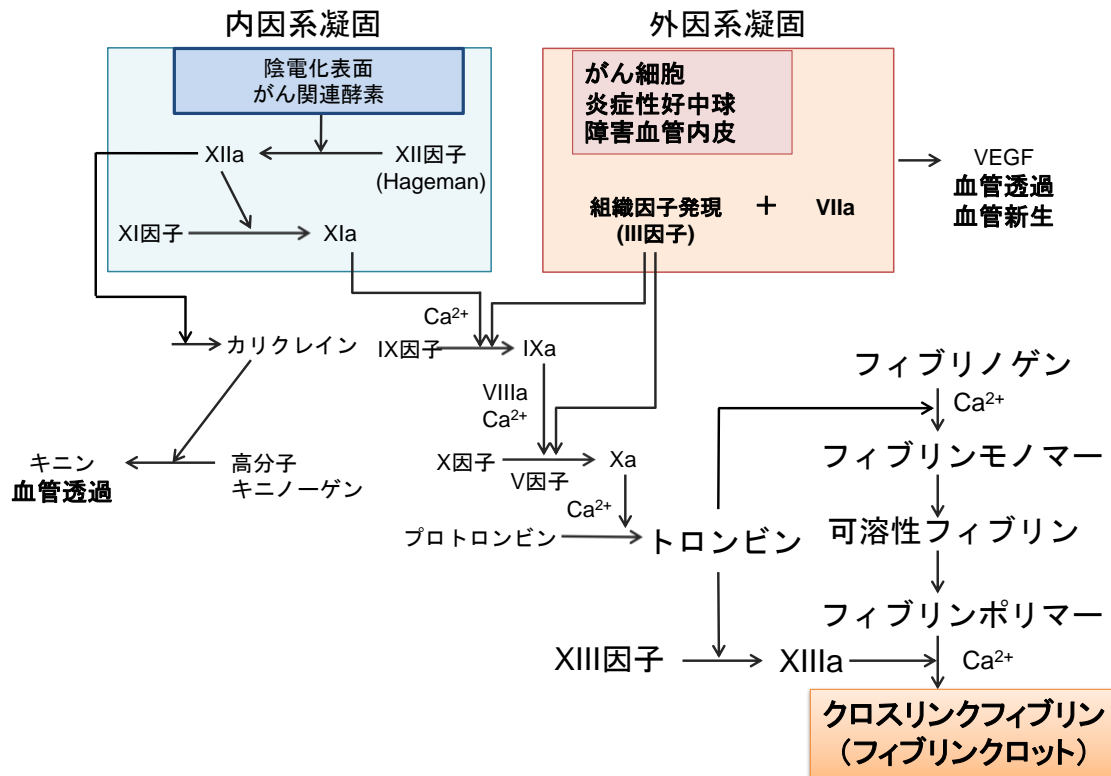


図 2. 血液凝固カスケード 血液凝固は外因系と内因系の2つの経路にわかれているが、どちらの経路も最終的にはクロスリンクフィブリンを産生する。また、内因系はキニン産生系としても働き、血管透過性を亢進しがん組織の微小環境に影響を与える⁴。一方、外因系凝固の開始因子 TF も VEGF の発現を亢進し、血管透過性亢進や血管新生に働く⁵。参考文献 24 より引用、一部改変。

(Reproduced with permission from Matsumura Y. Cancer stromal targeting (CAST) therapy. *Adv Drug Deliv Rev.*

2012;64(8):710-719. Copyright ELSEVIER)

2-1. 外因系凝固

外因系凝固の引鉄は、血管壁が損傷して、血液中の第 VII 因子あるいは、活性化第 VII 因子が組織液中の組織因子 (第 III 因子; Tissue Factor: TF) と結合するこ

とである。TFは、血液が直接接する組織や臓器には存在せず、血管壁、血管平滑筋、周皮細胞、血管外膜の線維芽細胞といったように血管の周囲の細胞に発現が見られる⁶⁻¹⁰。また、脳、肺、腎臓、心臓、精巣、胎盤に組織特異的なパターンで発現が見られる¹¹⁻¹³。TFは脳のアストロサイトや、肺の上皮細胞、心臓の心筋細胞、そして胎盤のトロホブラスト(栄養芽細胞)に発現している^{6-8,11,12,14}。TFが第VII因子と複合体を形成すると、第VII因子は活性化されて活性化第VII因子になる。TFと活性化第VII因子複合体の基質は2つ存在する。1つは、第IX因子で、活性化第IX因子に変換する。もう一つは第X因子で、活性化第X因子になる。カルシウム、リン脂質膜の存在下で活性化第IX因子は活性化第VIII因子と複合体(Xase)を形成して、第X因子を活性化第X因子に変換する。第X因子は、カルシウム、リン脂質膜の存在下で補因子である活性化第V因子と複合体(プロトロンビナーゼ複合体)を形成する¹⁵。プロトロンビナーゼ複合体は、活性をもたないプロトロンビンをセリンプロテアーゼである α -トロンビンに変換する。

プロトロンビンの切断からトロンビンの産生はいくつかのステップで起こる。最初の切断はArg320で起こり、中間体のメイゾトロンビンを産生する。その後、Arg271の切断により、プロトロンビン断片1.2を産生し、活性型の α -トロンビンを産生する¹⁶。

血液凝固の最終段階はフィブリン形成である。可溶性のフィブリノゲンは不溶性のフィブリンクロットに変換する。フィブリンクロットは創傷治癒の過程で創傷部位を覆い、損傷した組織を保護する。この高度に制御されたプロセスはいくつかの段階を経て起こる。はじめに2量体のフィブリノゲンは α -トロンビンにより、分解を受け、可溶性のフィブリンモノマーを産生する。フィブリン

モノマー同士は次々に重合し、非共有結合により、繊維や鎖を形成する。最後に形成されたフィブリンはトロンビンによって活性化された血液凝固第 XIII 因子による触媒を受け、クロスリンクフィブリン (フィブリンクロット) を形成する¹⁷。

2-2. 内因系凝固

異物面や陰性荷電表面に第 XII 因子が結合すると、局所濃度を高め、自己活性化して、活性化第 XII 因子になることから内因系凝固は始まる。ひとたび陰性荷電表面に凝集すると、活性化第 XII 因子はプレカリクレインからカリクレインへの変換と、第 XI 因子から活性化第 XI 因子への変換をもたらす¹⁵。高分子キニノーゲンの切断によりキニンの産生も起こる。これらの変化により、活性化第 IX 因子の形成に至る。以降の反応は外因系と同様に進み、フィブリンクロットが作られる¹⁸。

3. 血液凝固の最終産物: フィブリンクロット

フィブリノゲンは 340 kDa の分子で、29 個のジスルフィド結合により、3 組のポリペプチド鎖 (A α 、B β 、 γ) がホモダイマーを形成した分子である。フィブリノゲンは 2 g/L~4 g/L の濃度で血漿中に存在する血中糖タンパクで、肝臓で産生され、およそ 4 日の半減期であり、止血、創傷治癒、炎症、感染、血管新生、そしてがんに関与する¹⁹⁻²¹。

血液凝固カスケードが活性化すると、トロンビンが生成され、フィブリノゲンに作用すると、フィブリノゲンの A α 鎖の N 末端から 16 番目の Arg と 17 番目の Gly の間と B β 鎖の N 末端から 14 番目の Arg と 15 番目の Gly の間を切断

する。これはフィブリンモノマーと呼ばれる。切断された N 末端側の断端はそれぞれフィブリノペプチド A (FPA)、フィブリノペプチド B (FPB) と呼ばれる。フィブリンモノマーは瞬時に 2 分子のフィブリノゲンと結合して可溶性フィブリンになる^{22,23}。可溶性フィブリンはさらにトロンビンが作用するとフィブリンの重合化が起こり、第 XIII 因子によりフィブリンクロットが形成される。フィブリンクロットが形成されると、それを溶解する線溶系が活性化され、活性化セリンプロテアーゼであるプラスミンによる分解を受け、可溶性の D-ダイマーが生成される (図 3)²⁰。

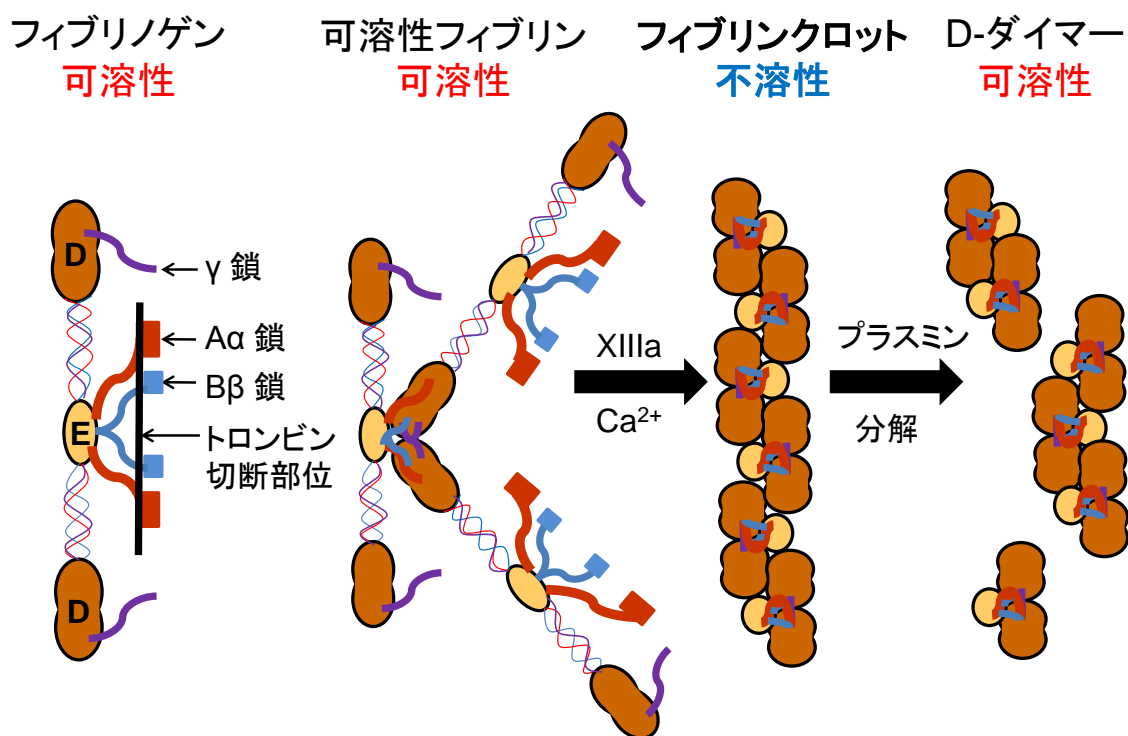


図 3. フィブリノゲンからフィブリンクロットの形成、分解 血液凝固経路が活性化して、前駆体のフィブリノゲンの N 末端がトロンビンにより切断を受けて、FPA、FPB を遊離する。この状態はフィブリンモノマーと呼ばれるが、フィブリンモノマーはすぐにフィブリノゲン分子と会合して、可溶性フィブリンを形成する。やがて、活性化第 XIII 因子とカルシウムイオンによる架橋を形成して、フィブリンクロットを形成する。その後、プラスミンによって分解を受ける。

4. がん組織における悪性凝固サイクル

悪性度の高い腫瘍は周囲の正常組織を破壊し、より浸潤性の高いがんはより破壊的にふるまう。これらのがん細胞集団が、隣接する正常組織や腫瘍血管を破壊すると、微小な出血ががん組織中のいたるところで起こり、止血のためにフィブリンクロットが速やかに形成される。フィブリンクロットはやがて、創傷治癒や他の非悪性疾患の過程と同様にコラーゲン性の間質に置き換わる。心筋梗塞、脳梗塞、創傷、活動期のリウマチにおける非悪性疾患におけるフィブリンクロット形成は急性期及び活動期のみで、症状を伴い、プラスミンによる分解で消失し、数週以内にコラーゲンに置き換わる。一方、がんにおけるフィブリンクロット形成は、がん細胞が体内で生存する限り潜在的に続く。実際にがんの浸潤転移は無症候性に進む (図 4)²⁴。それゆえに無症候性で持続的なフィブリンクロット形成はがんの病態特異的な所見といえる。

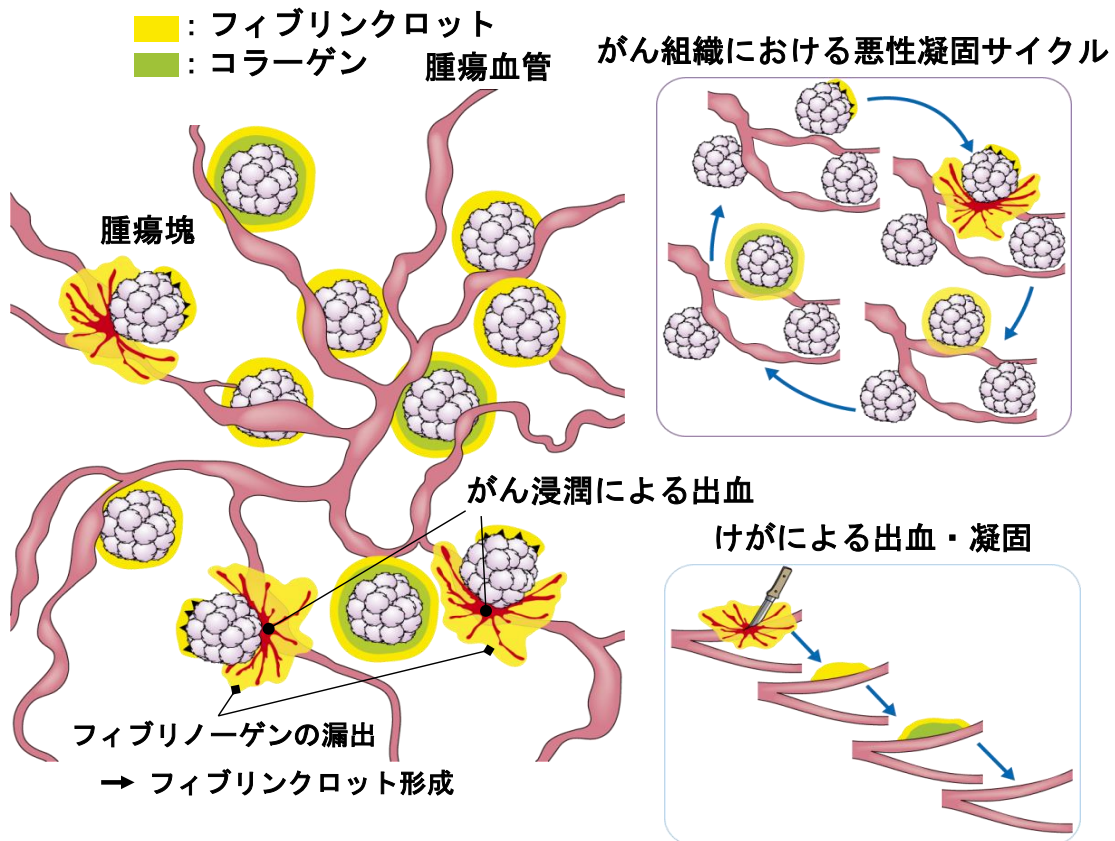


図 4. がん組織における悪性凝固サイクル けがによる出血などでは、出血が起きると、血液凝固カスケードが活性化して、フィブリンクロットが産生され、およそ 2 週間でコラーゲンに置き換わる (右下)。一方、がん組織ではがん細胞が浸潤して、腫瘍血管に到達すると、腫瘍血管を破壊する。するとフィブリンクロットの産生、コラーゲンへの転換が起こる。がん組織では、がん細胞が体内に生存する限り、このような「悪性凝固サイクル」が起こり続ける (右上)。がん組織中のいたるところで悪性凝固サイクルが起こっていると考えられる (左)。参考文献 24 より引用、一部改変。

(Reproduced with permission from Matsumura Y. Cancer stromal targeting (CAST) therapy. *Adv Drug Deliv Rev.*

2012;64(8):710-719. Copyright ELSEVIER)

5. Drug delivery system (DDS)

Drug delivery system (DDS) とは、必要な薬剤を必要な場所を選択的に集積させる技術の総称である。DDS は、2 つの主要な戦略に基づいており、それぞれ Active targeting と Passive targeting と呼ばれる。Active targeting はモノクローナル

抗体 (mAb) やリガンドとがんに関連する抗原やレセプターの特異的な結合を利用する。一方、Passive targeting は Enhanced permeability and retention effect (EPR 効果) が寄与している。すなわち、低分子は正常な血管から容易に漏れだすため、血中半減期が短い。高分子は大きすぎて正常血管を通過することができず、様々な臓器の細網内皮系にトラップされない限り、血中を循環するため血中半減期が長い。一方、固形腫瘍組織においては、腫瘍血管の構造が正常血管に比べて疎であり、血管透過性も亢進している。そのため正常血管では漏出することのない高分子さえも容易に漏出する。また、リンパ回収系の欠如により効果的なクリアランスが行われず、高分子は腫瘍組織に蓄積する (図 5)²⁵⁻²⁷。Passive targeting に基づく DDS 製剤として、抗がん剤内包ミセル製剤や抗がん剤内包リポソーム製剤の開発が進められてきた。

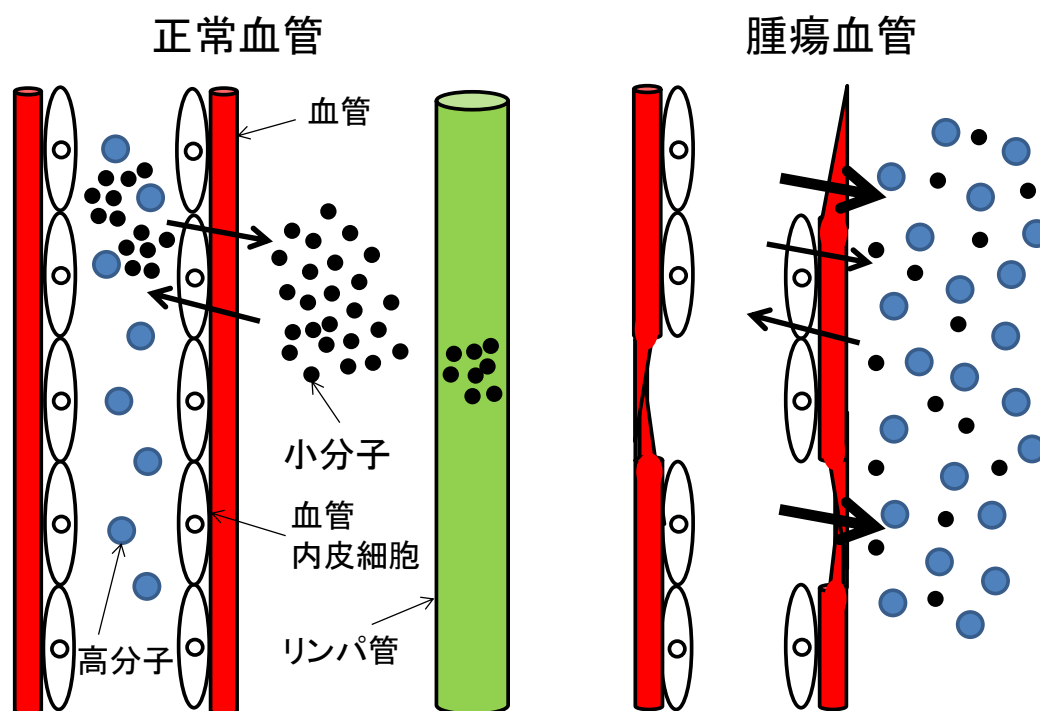


図 5. EPR 効果 血管透過性が亢進しているため、正常血管では漏れだすことのない高分子 (抗体) も血管外へ漏れだす。またリンパ回収が不十分で、がん貯留する。

6. 間質 targeting

上記のようにがんにおける DDS は Active targeting と Passive targeting を軸に発達してきた。特に Active targeting と Passive targeting の両方の効果が期待される抗体は、抗がん剤、毒素、放射性物質を結合した誘導ミサイル療法として期待された。しかしながら、このミサイル療法が奏効しない例が存在した。その理由の一つとして挙げられるのが、間質バリアーの存在である。がん組織中には、間質と呼ばれる主に細胞外マトリックスや線維芽細胞から成る、がん以外の成分が存在する。間質が豊富ながんではミサイル療法剤ががん細胞に到達する前に間質バリアーにより浸透が阻害されてしまう (図 6a)。当研究室ではこれまでに間質バリアーを突破するために、様々な剤形を考案してきた²⁸⁻³⁰。その基本戦略が間質 targeting である。すなわち、がん間質に特徴的に発現しているタンパクに対する抗体を作製し、抗体と抗がん剤をリンカーテクノロジーで結合する。抗体抗がん剤複合体はがん間質に到達した後にリンカーテクノロジーにより抗がん剤をリリースする。リリースされた抗がん剤は低分子であるため、間質バリアーを突破して、がん細胞や腫瘍血管に到達するという機序である (図 6b)。リンカーには様々なタイプが存在し、抗がん剤を徐放的にリリースするエステル結合や、がんの特徴的なプロテアーゼであるカテプシンや線溶系のプラスミンの切断部位をもつリンカーなどを開発してきた。

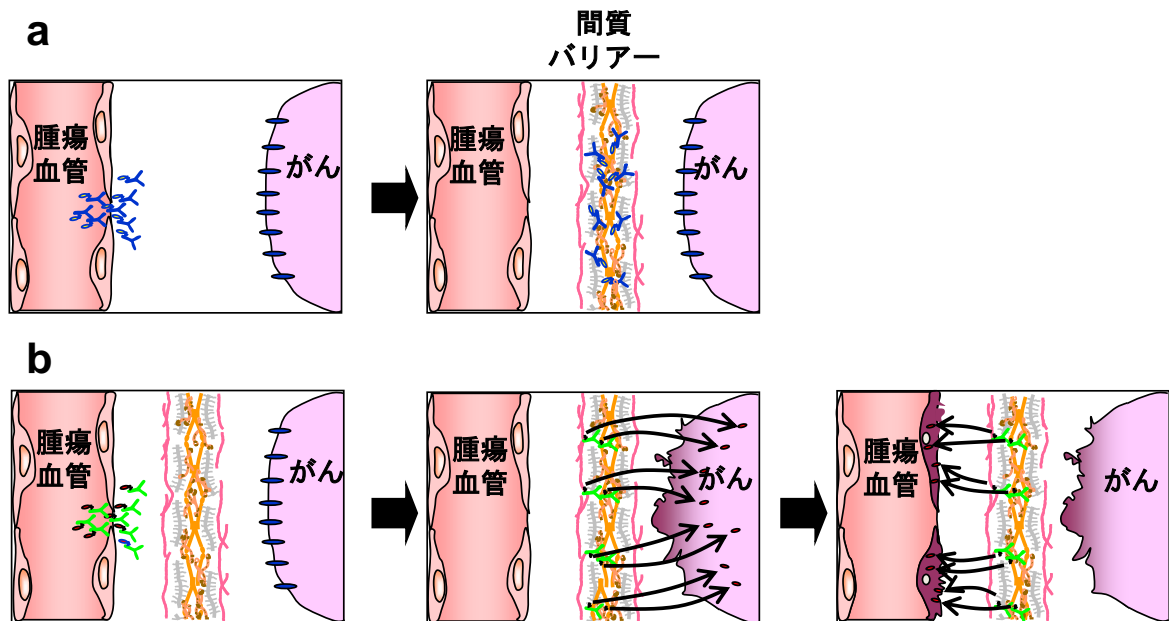


図 6. 間質 targeting (a) ミサイル療法剤の模式図。抗体が細胞に到達する必要があるが、実際にはがん間質にトラップされてしまう。(b) 間質 targeting 抗体 DDS 製剤の模式図。間質から 2 次的に薬剤を放出し、がん細胞と腫瘍血管の両方を攻撃する。参考文献 29 より引用、一部改変。

(Reproduced with permission from Yasunaga M, et al Cancer-stroma targeting therapy by cytotoxic immunoconjugate bound to the collagen 4 network in the tumor tissue. *Bioconjug Chem.* 2011;22(9):1776-1783. Copyright 2011 American Chemical Society)

7. 研究目的

がん組織における悪性凝固サイクルの考えに則り、フィブリンクロットをがんの病態特異的な標的タンパクと考え、当研究室ではこれまで抗フィブリンクロットキメラ抗体 (clone 102-10) を開発してきた。最終的には、102-10 と造影剤の複合体や抗体抗がん剤複合体などの剤形でがん間質 targeting DDS 製剤として臨床応用を目指している。しかしながら、102-10 はエピトープが不明であり、特異性もこれまでほとんど明らかになっていなかった。

そこで、本研究では以下の 3 点を目的とした。

1. *in vitro* において、102-10 の詳細な性状を明らかにする。

2. *in vivo* において、102-10 の DDS ツールとしての有用性を評価する。

3. 様々な病態の臨床検体を用いてフィブリンクロットの多寡を確認し、がんの悪性度とフィブリンクロットの多寡の関連性を評価する。

1 に関しては、102-10 の特異性評価とエピトープ検索を行うこととした。2 に関しては、自然発がんマウスモデルを用いて、*in vivo* において腫瘍集積性を評価することで 102-10 の DDS ツールとしての有用性を評価することとした。3 に関しては、102-10 がどのような症例で有効性を発揮するかを検討するために様々な臨床検体でフィブリンクロットの組織免疫染色を行い、がんの悪性度とフィブリンクロットの多寡の関連性を評価することとした。

第 2 章 in vitro における抗フィブリンクロット特異抗体

102-10 の性状解析

実験方法

1. 抗フィブリンクロット特異キメラ抗体 102-10 の確立

1-1. 免疫原調整

ヒト由来フィブリノゲン (Sigma, St Louis, MO) を Tris-buffered saline (TBS, Sigma) で 20 mg/mL の濃度に、ヒト由来トロンビン (Sigma) を TBS で 200 units/mL の濃度にそれぞれ希釈した。494 μ L の 20 mg/mL フィブリノゲン、395.2 μ L の 0.1 M CaCl₂ (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan)、49.4 μ L の 200 units/mL のトロンビン、49.4 μ L の TBS を全量 1000 μ L として 2.0 mL チューブ (Eppendorf, Hamburg, Germany) で 37°C で 1 時間反応させた。作製したフィブリンクロットを 100 mL ビーカーに入れ、60 mL の TBS で、4°C で 30 分攪拌して洗浄した後、100 mL の TBS に入れ替え、4°C で 30 分同様の洗浄を 2 回行った。洗浄後のフィブリンクロットを液体窒素で凍らせ、同様に液体窒素で冷やしておいた乳鉢と乳棒で粉碎した。この破砕物の PBS 浮遊物を免疫原とし、医学生物学研究所 (MBL, Nagoya, Japan) に依頼して抗体の作製を行った。

1-2. 抗フィブリン IgM のキメラ IgG 化

得られた抗体が IgM であったため、重鎖と軽鎖の可変領域の cDNA を単離して、ヒト由来 IgG を発現するベクターに導入した。ベクターは Chinese hamster ovary cell に遺伝子導入して、抗フィブリンクロットキメラ抗体 IgG (clone

102-10) を発現する安定株を得た。以上の工程を前任者が行い、確立した 102-10 抗体を引き継いだ。

2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

フィブリノゲン、可溶性フィブリン (Sekisui Medical, Tokyo, Japan)、D-ダイマー (Sekisui Medical)、Bovine serum albumin (BSA, Roche, Basel, Switzerland) をそれぞれ ELISA の抗原として使用した。Phosphate-buffered saline (PBS) で希釈した 1 μg の抗原を Maxi soap 96-well plate (Thermo, Waltham, MA) に 4°C で 12 時間固定化した。フィブリンクロット plate を作製するために、フィブリノゲン plate はその後、終濃度 0.05 units/mL のトロンビン、1 mM の CaCl_2 、7 mM の L-cystein (Roche) を TBS でメスアップし、全量 100 μL とした溶液に 37°C で 1 時間反応させた。200 μL の TBS-Tween 20 (0.01% TBS-T, Thermo) で 3 回洗浄し、200 μL の PBS で 5 倍希釈した N102 (Nichiyu, Tokyo, Japan) で 3 時間ブロッキングを行った。N102 を捨て、4% ブロックエース (DS pharma, Osaka, Japan) で希釈した 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Horseradish peroxidase (HRP, DOJINDO, Kumamoto, Japan) 標識した抗体 100 μL を室温で 1 時間反応させた。TBS-T で 3 回洗浄後、1-Step Slow TMB-ELISA (Thremo) を室温で 30 分反応させた。反応後の plate は SPECTRAMAX190 (Molecular Devices, Tokyo, Japan) で 450 nm の吸光波長を検出した。

3. in vitro で作製したフィブリンクロットの蛍光免疫染色

1-1 で詳述したように in vitro でフィブリンクロットを作製し、OCT compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) で包埋し、凍結した。Tissue Tek Cryo3 (Sakura Finetek) で 6 μm 厚の薄層切片を作製した。ドライヤーで 30 分風乾後、PBS で 5

分洗浄した後、PBS で 5%に希釈した Difco skim milk (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) で、室温で 30 分ブロッキングを行った。PBS で 3 回洗浄後、Alexa Fluor 647 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 標識した 102-10 と control 抗体として、抗 Epidermal growth factor receptor (EGFR) 抗体の Cetuximab (Bristol-Myers Squibb, New York, NY) を 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で、室温で 30 分反応させた。PBS で 3 回洗浄後、Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL) で蛍光退色を防止して、BZ-9000 (Keyence, Osaka, Japan) で観察を行った。

4. がん関連プロテアーゼによるフィブリンクロットの分解

150 μL の 20 mg/mL フィブリノゲン、120 μL の 0.1 M CaCl_2 、15 μL の 200 units/mL のヒトトロンビン、15 μL の TBS を全量 100 μL として、37°C で 1 時間反応させて、フィブリンクロットを作製した。上記の操作で 6 塊のフィブリンクロットを作製し、PBS で 2 回洗浄した後、それぞれのフィブリンクロットをヒト由来プラスミン (Molecular Innovation, Novi, MI)、ヒト由来エラスターゼ (Sigma)、ヒト由来カリクレイン (Sigma)、ヒト由来 Matrix metalloprotease-9 (MMP-9, Sigma)、ヒト由来カテプシン B (Sigma)、ヒト由来カテプシン D (Sigma) と反応させた。反応条件を以下に示した。400 μL の PBS 中でフィブリンクロットと、44.4 μL の 15.3 μM プラスミンを 37°C で反応させた。21 時間後に 22 μL の 31.4 μM ヒト由来 α_2 -PI (Haematologic Technologies Inc., Essex, VT) で反応を停止した。300 μL の 100 mM Tris-HCl pH8.3 (Wako Pure Chemical) と 960 mM NaCl (Wako Pure Chemical) の混合 buffer 中でフィブリンクロットと 300 μL の 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ エラスターゼを 37°C で反応させた。5 時間後に 105 μL の 7 \times コンプリートミニ (Roche) で反応を停止した。200 μL の PBS 中でフィブリンクロットと 458 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のカリク

レインを 37°C で反応させた。21 時間後に 45 μL の 7 \times コンプリートミニで反応を停止した。4.8 μL の 11 mg/mL APMA (Sigma) と 1.2 μL の 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MMP-9 を 37°C で 30 分反応させた。50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl_2 , 150 mM NaCl, 0.05% Brij35 (TCNB buffer, Sigma) 300 μL 中でフィブリンクロットとプレインキュベートした 6 μL MMP-9/APMA を 37°C で反応させた。21 時間後に 63 μL の 7 \times コンプリートミニで反応を停止した。300 μL の 1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)/PBS 中でフィブリンクロットと 3 μL の 1 mg/mL カテプシン B を 37°C で反応させた。29 時間後に 34.5 μL の 7 \times コンプリートミニで反応を止めた。300 μL の 0.1 M クエン酸 buffer pH3.5 中でフィブリンクロットと 31 $\mu\text{g}/3 \mu\text{L}$ の 2056 units/mg カテプシン D を 37°C で反応させた。29 時間後に 3.4 μL の 7 \times コンプリートミニで反応を止めた。その後、それぞれの可溶性フィブリンクロット分解物を抗原とし、ELISA を行った。

5. Western Blot

1 $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$ のサンプルを等量のサンプルバッファー (Bio-Rad, Hercules, CA) と混合した。変性条件の際には、サンプルバッファーに 1/20 量の β -メルカプトエタノール (Bio-Rad) を加え、サンプルを 96°C で 5 分熱変性した。4-20% Mini protean TGX-gel (Bio-Rad) にサンプルを添加し、200V、30 分の条件で Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行った。その後、ゲルを Transblot turbo PVDF (Bio-Rad) に転写して、SNAP i.d. (Millipore, Billerica, MA) を用いて抗原抗体反応を行った。0.3% Difco skim milk/0.1% PBS-Tween20 でブロッキングし、ブロッキング溶液で 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整した HRP 標識抗体を室温で 10 分反応させた。TBS-T で 3 回洗浄して、ECL prime (GE Healthcare,

Piscataway, NJ) を基質として反応させた。Chemidoc imager (Bio-Rad) で化学発光を検出した後、必要に応じて Quick CBB (Wako Pure Chemical) でタンパクの検出を行った。

6. 102-10 のエピトープの同定

6-1. フィブリノゲン B β 鎖の単離

5 μ g のフィブリノゲンを変性条件で SDS-PAGE を行い、ゲルを EZ-Stain reverse (ATTO, Tokyo, Japan) で染色した。B β 鎖のバンドをゲルから切り抜き、Atto prep MF column (ATTO) を用いて、添付文書通りにタンパク抽出を行った。

6-2. フィブリノゲン B β 鎖のリシルエンドペプチダーゼによる分解

単離した B β 鎖をタンパク : 酵素の重量比で 45 : 1 の割合で、37°C で 6 時間、リシルエンドペプチダーゼ (Wako Pure Chemical) と反応させた。

6-3. フィブリノゲン B β 鎖の分解物のアミノ酸シーケンス

リシルエンドペプチダーゼによる分解後の B β 鎖を SDS-PAGE で展開し、102-10 抗体を用いた Western blot を行った。陽性バンドの中で一番分子量の小さいバンドを 6-1 の方法で単離した。単離した B β 鎖の分解物を PPSQ-33A プロテインシーケンサー (Shimadzu, Kyoto, Japan) を使って、アミノ酸配列を解析した。

6-4. 合成ペプチドを用いた 102-10 のフィブリンクロットへの結合の

競争阻害実験

得られた B β 鎖の分解物のアミノ酸配列を基に 5 つの合成ペプチド[No.1 (B β 149-178), No.2 (B β 179-208), No.3 (B β 209-234), No.4 (B β 170-186), No.5 (B β 201-216), Sigma]を作製した。これらの合成ペプチドを段階希釈 (0.01-100 μ M)して、1 μ g/mL の HRP 標識した 102-10 と 4% ブロックエース中で 37°C で 1 時間反応させた。反応液をフィブリンクロット plate に添加し、以後は ELISA と同様の操作を行った。

7. 102-10 のエピトープ部位のフィブリノゲンにおける立体構造検索

フィブリノゲンの結晶構造は RCSB Protein Data Bank (PDB, <http://www.Rcsb.org/pdb/home/home.do>) から入手した。PDB から得た座標情報 (PDB: 3GHG) を PyMOL ver1.3r1 edu (<http://www.pymol.org/pymol>) で解析した。B β 鎖と γ 鎖の表面電荷 (-5 kT/e, 赤、+5 kT/e, 青) は APBS ソフトウェア (<https://www.sites.google.com/a/poissonboltzmann.org/software/apbs>) で表した。全てのイメージ図は PyMOL ver1.3r1 edu で表した。以上の解析は花岡慎悟博士に依頼した。

8. 新規抗 B β 鎖抗体と抗 γ 鎖抗体の確立

102-10 のエピトープである (B β 201-216: CNIPVVS β GKECEEIIR) と、エピトープ部位とフィブリノゲンにおいて相互作用を形成する γ 鎖領域 (γ 206-220: KNWIQYKWGFHLS β P) のリコンビナントペプチドを作製した。フィブリノゲン B β 鎖と γ 鎖の DNA (Origene Technology, Rockville, MD) を pET21b (Novagen,

Darmstadt, Germany) に導入し、リコンビナントペプチドを作製した。生後 6 週の BALB/cAnNCrIcrlj マウス (Charles River Japan, Yokohama, Japan) の腹腔内に 50 μg の B β 鎖のリコンビナントペプチドと Freund's complete adjuvant (Beckton Dickinson) の混合物を投与した。3~5 回の免疫を 2 週おきに行った。最後の免疫は尾静脈から行った。 γ 鎖のリコンビナントペプチドの免疫は ITM 社 (Matsumoto, Japan) に委託した。完成した抗体のスクリーニングはフィブリンクロット plate とフィブリノゲン plate を用いた ELISA を行い、最終的にどちらの抗体もモノクローナル抗体として樹立した。

9. 新規抗 B β 鎖抗体と抗 γ 鎖抗体を用いた競争阻害実験

50 μL の 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HRP 標識新規抗 B β 鎖抗体を 50 μL の 4% ブロックエース、50 μL の 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の未標識の新規抗 B β 鎖抗体、50 μL の 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の未標識の新規抗 γ 鎖抗体とそれぞれ 37°C で混合し、フィブリンクロット plate 上で ELISA を行った。新規抗 γ 鎖抗体に対しても同様の実験を行った。

10. 統計解析

2 群間の比較には student's *t*-test を適用した。対照群と 2 群以上の比較には、Steel's test を適用した。競争阻害実験の検定には二元配置分散分析法を適用した。関連の検定には、スピアマンの順位相関係数の検定を適用した。以上の検定は Statcel3 (OMS, Saitama, Japan) を用いて行った。

実験結果

1. 102-10 の抗原特異性の評価

102-10 がフィブリンクロットに反応し、前駆体のフィブリノゲンに反応しないこと、そして 102-10 はヒトとマウスのフィブリンクロットに交差反応するためにマウスモデルを用いた *in vivo* 実験で使用できることは既に明らかになっていた²⁸。しかしながら、可溶性フィブリンや D-ダイマーといった他のフィブリン関連分子との反応性は明らかになっていなかった。そこで、ELISA によりフィブリン関連分子との反応性の比較を行った。その結果、102-10 はフィブリンクロットのみに反応し、他のフィブリン関連分子には反応しないことが明らかになった ($n=6$, means \pm s.d., $**P < 0.01$. 図 7a)。また、*in vitro* で作製したフィブリンクロットの凍結切片を用いた蛍光免疫染色においては、control IgG と比べ、102-10 はフィブリンクロットに明らかに反応性が高かった (図 7b)。更にフィブリノゲン、フィブリンクロット、D-ダイマーを用いて行った市販の抗フィブリン抗体との比較においては、NYB-T2G1 は全ての抗原に反応性が低く、MH-1 は D-ダイマーに強く反応したが、102-10 のみがフィブリンクロットに高い特異性を示した ($n=2$, means, 図 7c)。がん部ではフィブリンクロットが、がんで特徴的に発現するプロテアーゼにより分解を受けている可能性があると考え、がん関連プロテアーゼとして代表的なエラスターゼ、カリクレイン、MMP-9、カテプシン B、カテプシン D、そして線溶系のプラスミンによるフィブリンクロットの分解実験を行った。30 時間までプロテアーゼで反応させたところ、全てのプロテアーゼでフィブリンクロットは分解されることを確認した (図 7d)。がん関連プロテアーゼによるフィブリンクロット分解物の ELISA を行ったところ、

102-10 はプロテアーゼで分解したフィブリンクロット由来の可溶性分解物には反応しないことが明らかになった ($n = 5$, means \pm s.d., 図 7e)。

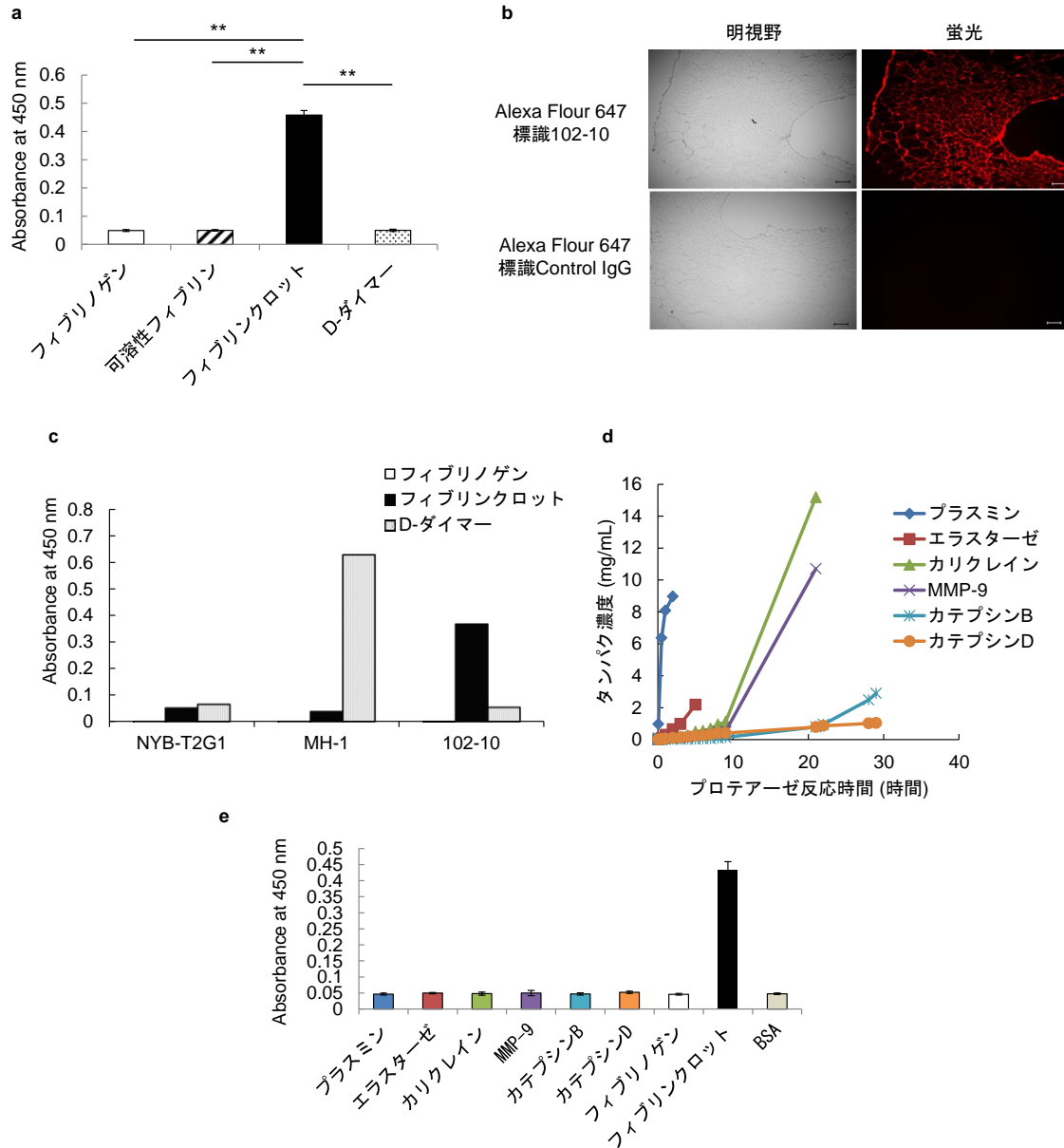


図 7. 102-10 の抗原特異性 (a) ELISA により、抗原特異性を確認したところ、102-10 はフィブリンクロットのみに反応した ($n = 6$, means \pm s.d., $**P < 0.01$)。 (b) in vitro で作製したフィブリンクロットの蛍光免疫染色を行ったところ、蛍光標識した 102-10 は control IgG に比べ、明らかに反応性が高かった (bar: 100 μ m)。 (c) ELISA により、市販の抗フィブリン抗体と 102-10 の反応性の比較を行ったところ、102-10 のみがフィブリンに高い特異性を示した ($n = 2$, means)。 (d) フィ

ブリンクロットをがん関連プロテアーゼで 30 時間まで反応させた。(e) 102-10 はがん関連プロテアーゼによるフィブリンクロットの分解物には反応しなかった ($n = 5$, means \pm s.d.)。

2. 102-10 のエピトープの同定

102-10 の特異性はどのような機序に起因しているのかを調べるためにエピトープ検索を行うこととした。エピトープ検索の過程で、Western blot において 102-10 は変性条件のフィブリノゲンに反応することを見出した (図 8a)。また、変性条件と未処理のフィブリノゲンに対して、102-10 を用いた ELISA を行ったところ、102-10 は変性条件のフィブリノゲンにおいて、優位に反応性が上昇した ($n = 7$, means \pm s.d., ** $P < 0.01$, 図 8b)。CBB 染色の結果と Western blot の結果を比較すると、102-10 は変性フィブリノゲンの B β 鎖に反応することが明らかになった (図 8c)。

102-10 のエピトープをさらに狭めるために B β 鎖を単離し、Lysyl endopeptidase を用いて分解した。その分解物の Western blot を行ったところ、10 kDa 付近に 102-10 と反応する B β 鎖分解断片を認めた (図 8d)。さらにその 10 kDa の分解断片を単離し、プロテインシーケンサーにより、アミノ酸配列の同定を行った。その結果、10 kDa の分解断片の N 末端から 26 残基のアミノ酸配列を同定した。(B β 149-174, 表 1)。N 末端が同定されたこと、リシルエンドペプチダーゼの切断部位がリジン残基の C 末端側であることや B β 鎖分解断片の分子量が 10 kDa 程度であることから B β 鎖分解断片の全アミノ酸配列として、86 アミノ酸 (B β 149-234, 理論分子量: 9.73 kDa) を同定した。得られた 86 アミノ酸をさらに表 2 のように 5 つに分けて、No.1 (B β 149-178), No.2 (B β 179-208), No.3 (B β 209-234), No.4 (B β 171-186), No.5 (B β 201-216) の合成ペプチドを作製し、競争阻害実験を行

った。その結果、No.5 と呼ばれる 16 アミノ酸 (CNIPVVSGKECEEIIR) のみが 102-10 のフィブリンクロットへの結合を阻害し、102-10 のエピトープとして同定された ($n = 3$, means \pm s.d., $P < 0.01$, No.4 vs. No.5, 図 8e)。

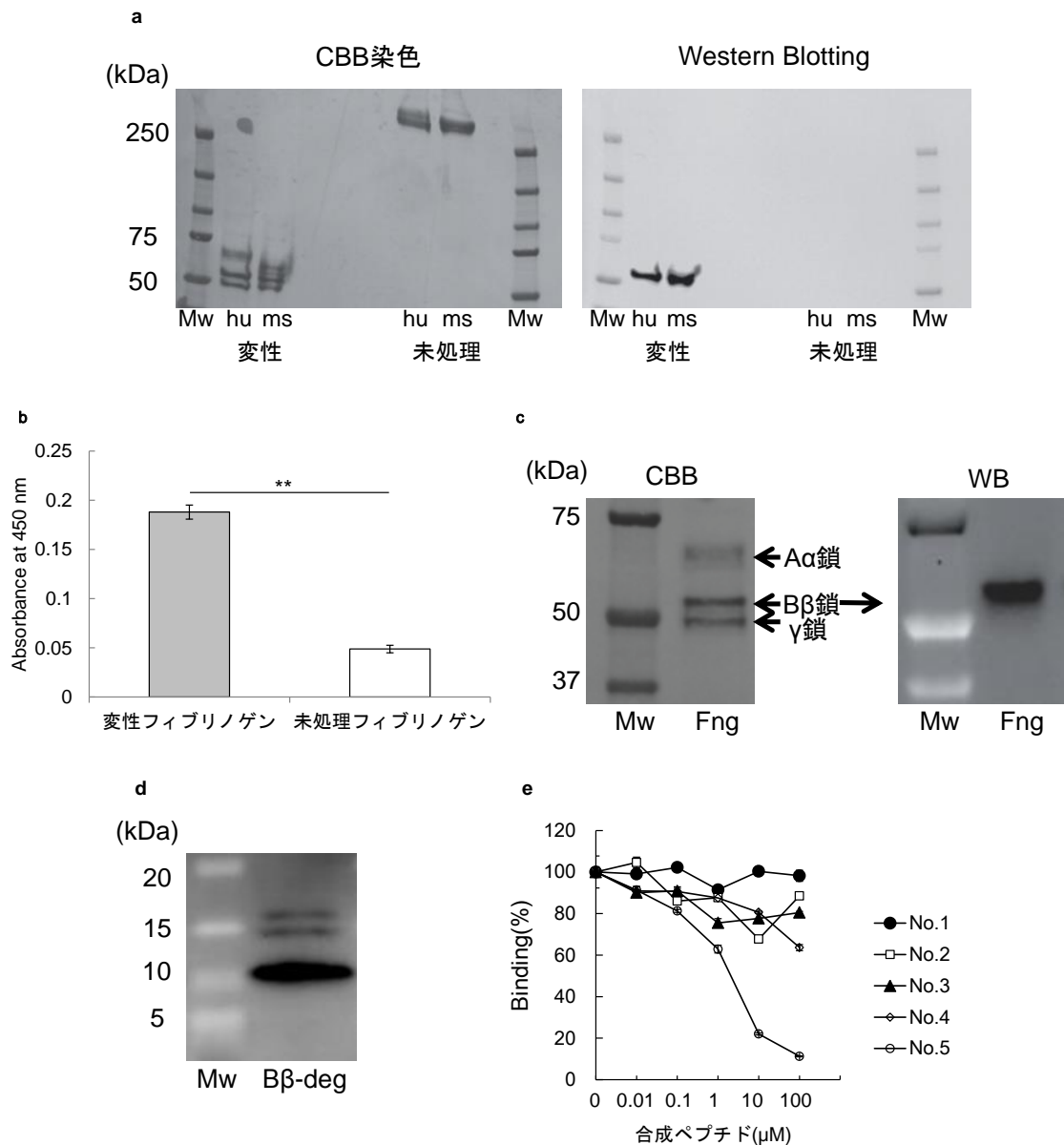


図 8. 102-10 のエピトープの同定 (a) 102-10 は変性条件のヒト (hu) とマウス (ms) のフィブリノゲンに Western blot で反応した (Mw: Molecular weight marker)。 (b) 変性条件のフィブリノゲンと未処理のフィブリノゲンに対して、ELISA を行ったところ 102-10 は変性条件のフィブリノゲンに優位に反応した ($n = 7$, means

± s.d., ** $P < 0.01$). (c) CBB 染色と Western blot (WB) の結果を比較すると、102-10 は B β 鎖に反応していることが明らかになった (Fng: フィブリンノゲン)。 (d) リシルエンドペプチダーゼによる B β 鎖の分解物 (B β -deg) の Western blot を行った。 10 kDa 程度のバンドを検出し、単離してアミノ酸シーケンスを行った。 (e) 10 kDa のリシルエンドペプチダーゼによる B β 鎖の分解物のアミノ酸配列から 5 つの合成ペプチドを作製し、102-10 とフィブリンクロットの結合の競争阻害実験を行った。 No.5 の合成ペプチドのみが 102-10 のフィブリンクロットへの結合を優位に阻害した ($n = 3$, means ± s.d., $P < 0.01$, No.4 vs. No.5)。

表 1. リシルエンドペプチダーゼによるフィブリンノゲン B β 鎖分解断片の
アミノ酸シーケンス

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Gly	Gln	Leu	Tyr	Ile	Asp	Glu	Thr	Val	Asn
His	Asp	Glu	Thr	Ser	Glu	Met	Try	Leu	Ile
	Val		Ala	Gly		Asn	Ala		Gly
	Pro						Phe		Ala
							Leu		
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Ser	Asn	Ile	Pro	Thr	Asn	Leu	Arg	Val	Leu
Gln	Pro	Asp	Ser	Gln	Val	Lys	Gly	Tyr	Thr
		Ala	Leu	Gly			Pro		
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Arg	Ser	Ile	Leu	Glu	Asn				
Val	Tyr			Met					

赤円は、フィブリンノゲン B β 鎖のアミノ酸配列を示す。赤字はプロテインシーケンサーで同定できなかったフィブリンノゲン B β 鎖の配列。アミノ酸シーケンスにより、10 kDa 分解物の N 末端から 26 残基のアミノ酸配列(B β 149-174)を同定した。

表 2. 合成ペプチドの作製

MKRMVSWSFHKLKTMKHL LLLLLL CVFLVKSQGVNDNEEGFFSARGHRPLDKK
 REEAPSLRPAPPPI SGGGYRARP AKA AATQKKVERKAPDAGGCLHADPDLGV
 LCPTGCQLQEALLQ QERPIRNSVDELNNNVEAVSQTSSSSSFQYMYLLKDLWQ
 KRQKQVKDNENVVNEYSSELEK **No.1** **HQLYIDETVNSNIPTNLRVLR** **No.4** **ILENLR** **SKIQ**
KLESDV **No.2** **No.5** **CNIPVVSGKECEEIIR** **No.3**
KLESDVSAQMEYCRTPCTVSCNIPVVSGKECEEIIRKGGTSEMYLIQPDSSV
KPYRVYCDMNTENGGWTVIQNRQDGSVDFGRKWDPYKQGFGNVATNTDGK
 NYCGLPGEYWLGNDKISQLTRMGPTELLIEMEDWKGDKVKAHYGGFTVQNE
 ANKYQISVNKYRGTAGNALMDGASQLMGENRTMTIHNGMFFSTYDRDNDGW
 LTSDPRKQCSKEDGGGWYNRCHAANPNGRYYWGGQYTWDMAKHGTDD
 GVVWMNWKGSWYSMRKMSMKIRPFFPQQ

フィブリノゲン B β 鎖の全アミノ酸配列を示した (シグナルペプチドは除く)。10 kDa 分解物のアミノ酸配列 (B β 149-234) を 5 つの合成ペプチドに分けた。No.1 (B β 149-178, 赤), No.2 (B β 179-208, 水色), No.3 (B β 209-234, 緑), No.4 (B β 171-186, 紫), No.5 (B β 201-216, 橙色) で示した。

3. 102-10 のエピトープ部位のフィブリノゲンにおける構造

Protein Data Bank (PDB) のヒトフィブリノゲンの立体構造のデータ (PDB: 3GHG³¹) により、102-10 のエピトープはフィブリノゲンにおいて γ 鎖の一部と疎水性相互作用と水素結合を形成することにより覆われており、エピトープになり得ないことが明らかになった (図 9)。そこで我々は、フィブリンクロットでは構造変化を起こし、疎水性相互作用と水素結合が崩れて、エピトープ部位の構造変化により空間が生じると仮説を立てた。そして構造変化によって空間が生じ、102-10 が生じた空間を裏打ちする B β 鎖のエピトープに結合することができるようになったと考えた。

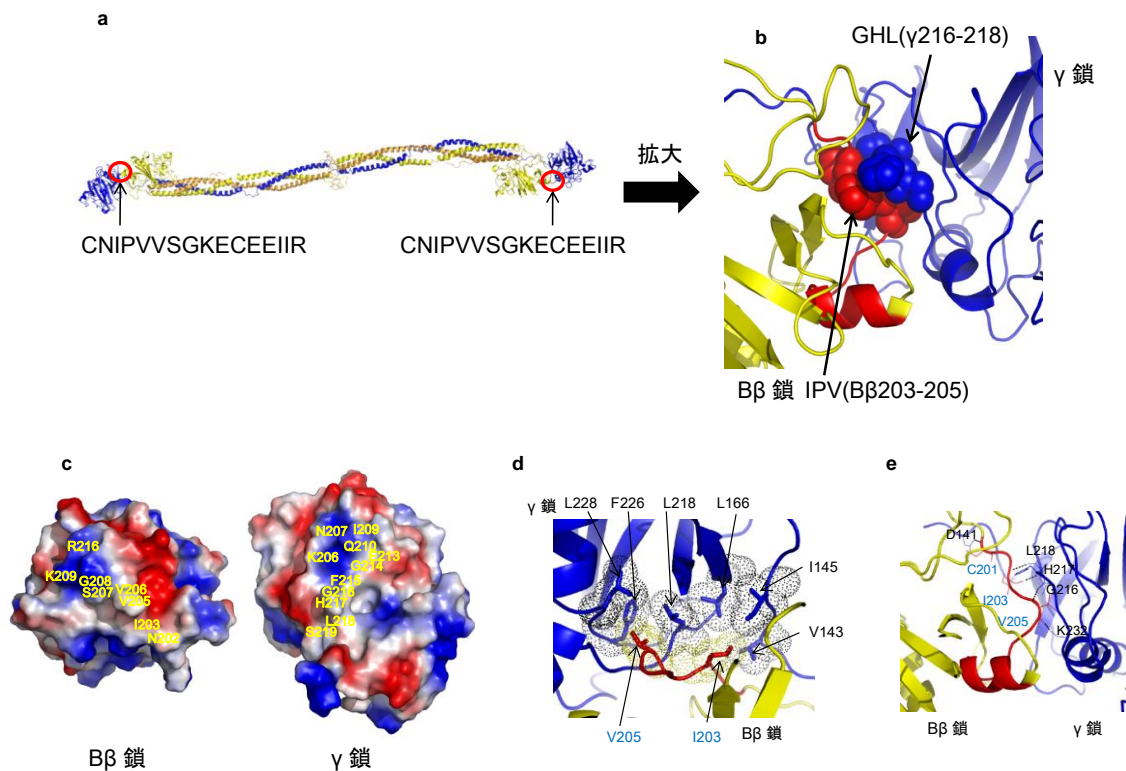


図 9. 102-110 のエピトープ部位のフィブリノゲンにおける立体構造 (a) 102-110 のエピトープ (Bβ201-216, 赤円) はγ鎖 (青) と相互作用していた。(b) 特に Bβ203-205 と γ216-218 は疎水性相互作用を形成していた。(c) Bβ鎖 (左) と γ鎖 (右) の表面電荷 (-5 kT/e, 赤、+5 kT/e, 青) を示した。エピトープのアミノ酸配列とそれに対応する γ鎖のアミノ酸配列を黄色文字で示した。(d) Bβ鎖 (黄) と γ鎖 (黒) の間の疎水性相互作用。Bβ鎖のアミノ酸を青文字、Bβ鎖の疎水性相互作用を黄ドット、γ鎖のアミノ酸を黒文字、γ鎖の疎水性相互作用を黒ドットで示した。(e) Bβ鎖 (黄色) と γ鎖 (青) の間の水素結合。Bβ鎖のアミノ酸を青文字、γ鎖のアミノ酸を黒文字で示した。

4. 102-110 のエピトープ部位のフィブリンクロットにおける新規構造変化

フィブリンクロットは不溶性タンパクであるために、X線結晶構造解析や NMR といった既存の立体構造解析が適用できない。それゆえにフィブリンクロットの立体構造はこれまで明らかになっていない。

そこで、フィブリンクロット形成による立体構造変化の結果 102-10 のエピトープが露出することを証明するために、下記の方法を選択した。すなわち 102-10 のエピトープに対する新規モノクローナル抗体 (抗 B β 鎖抗体) を作製する、同様に 102-10 のエピトープと相互作用を形成する γ 鎖領域 (γ 206-220) に対する新規モノクローナル抗体 (抗 γ 鎖抗体) を作製する。もしこれら 2 つのモノクローナル抗体がフィブリンクロットのみ反応し、フィブリノゲンに反応しなければ、上記の仮説が証明され、フィブリンクロットで生じた空間から侵入した抗体がエピトープに結合したことになる。抗 B β 鎖抗体、抗 γ 鎖抗体ともにフィブリノゲン、可溶性フィブリン、D-ダイマーといったフィブリン関連タンパクと反応せずに、フィブリンクロットのみ反応することが ELISA により示された ($n = 8$, means \pm s.d., $**P < 0.01.$, 図 10a)。本実験により、フィブリンクロットと他のフィブリン関連分子を見分けることができる新規の構造変化が明らかになり、102-10 はその新規構造変化部位を認識していることが明らかになった (図 10b)。

さらに、抗 B β 鎖抗体と抗 γ 鎖抗体は同時にフィブリンクロットに反応することから、新規構造変化部位は、2 分子の抗体が同時に侵入できる大きさをもつことが明らかになった ($n = 8$, means \pm s.d., $**P < 0.01.$, 図 10c, d)。

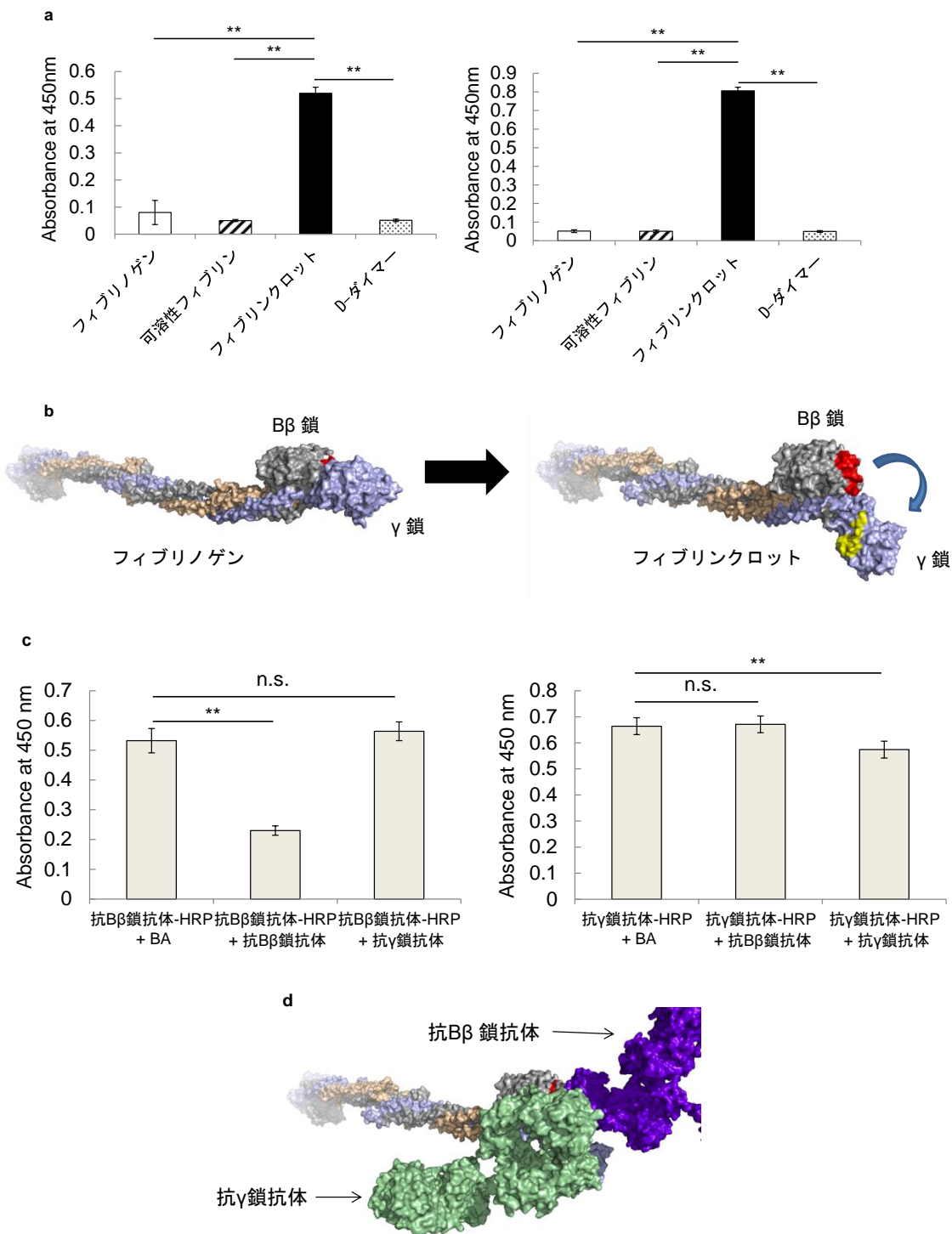


図 10. 102-10 のエピトープ部位のフィブリンクロットにおける新規構造変化
 (a) 抗 B β 鎖抗体 (左) と抗 γ 鎖抗体 (右) はそれぞれフィブリンクロットのみに反応した ($n = 8$, means \pm s.d., $**P < 0.01$)。 (b) フィブリノゲンからフィブリンクロットへの変化のイメージ図。新規構造変化はフィブリンクロットに変化する

ときのみ起こる (青矢印)。(c) 新規構造変化によって形成される空間の評価。HRP 標識抗 B β 鎖抗体は未標識の抗 B β 鎖抗体に阻害されたが、未標識の抗 γ 鎖抗体に阻害されなかった (左, $n = 8$, means \pm s.d., $**P < 0.01$)。HRP 標識抗 γ 鎖抗体は未標識の抗 γ 鎖抗体に阻害されたが、未標識の抗 B β 鎖抗体に阻害されなかった (右, $n = 8$, means \pm s.d., $**P < 0.01$)。BA: ブロックエース。(d) 抗 B β 鎖抗体と抗 γ 鎖抗体は新規構造変化部位に同時に結合することが明らかになった。

考察

1. 102-10 の抗原特異性の評価

これまでに抗フィブリン抗体は世界中で作られてきた³²⁻³⁸。その多くはフィブリノゲンと可溶性フィブリンを区別することができるが、フィブリンクロットのみを認識する抗体は存在しなかった。当研究室では、世界ではじめて、フィブリンクロットのみを特異的に認識する抗体 102-10 を樹立した (図 7a)。102-10 は *in vitro* で作製したフィブリンクロットを液体窒素で凍らせ、乳鉢と乳棒で粉々に破碎して、破碎物をアジュバントと混ぜてマウスに免疫するという特異な方法で樹立された。この方法は Gargan 等の方法³⁷を参考に行っているが、Gargan 等が作製した抗体 MH-1 は図 7c の様に、フィブリンクロットにはほとんど反応せず、D-ダイマーに反応性が高い。そして、MH-1 のエピトープは明らかになっておらず、続報も存在しない。また、MH-1 自体は市販されておらず、MH-1 を産生するハイブリドーマを入手して、ハイブリドーマの培養上清を精製して、抗体を樹立した。推奨の培養方法で培養したものの、ハイブリドーマの状態によっては遺伝子の変異などが起こり、抗体の特異性が変化している可能性も否定できない。一方、当研究室の 102-10 は可変部位の塩基配列は判明しているために、特異性の変化の問題は回避できる。また、MH-1 と同様に抗フィブリン抗体として知られる NYB-T2G1 は、(T) N-DSK (disulfide knot) と呼ばれる主にフィ

ブリノゲンの E 分画から成る領域 ($A\alpha 17-51, B\beta 15-118, \gamma 1-78$)₂ を免疫して作られた抗体である³⁹。NYB-T2G1 のエピトープは B β 15-42 に存在することが明らかになっている⁴⁰。NYB-T2G1 もフィブリノゲンとフィブリンクロットを区別することができることが報告されているが、フィブリンクロットほどの反応性ではないものの D-ダイマーとも反応 (フィブリンクロットの 73% の反応性) してしまうことが報告されている⁴¹。この報告は我々の結果 (図 7c) と異なるものの、NYB-T2G1 の特異性に関しては議論の余地があり、条件によって反応性が著しく変わることが報告されており⁴²、コンセンサスが得られていない。一方で、NYB-T2G1 抗体のエピトープの N 末端である B β 15-18 はフィブリンクロットの重合の際に、別のフィブリノゲン (あるいはフィブリンモノマー) の B β 鎖と knob-hole 相互作用を形成することがわかっている⁴³。以上のことから NYB-T2G1 のエピトープはフィブリンクロットでは抗体が侵入しにくいことが容易に予想され、フィブリンクロットへの反応性が低くなったと考えられる。

がん関連プロテアーゼによるフィブリンクロットの分解物に 102-10 は反応しなかった。これらの分解物のがん患者の血中に存在する可能性があるが、分解物に血中で中和されることなく、がん組織のフィブリンクロットに到達しうることが示された。

2. 102-10 のエピトープの同定

上述したように 102-10 のエピトープは不溶性タンパクであるため、エピトープの同定がこれまで困難であった。ELISA においてはフィブリノゲンに反応せず、フィブリンクロットのみに反応することは明らかになっていたが²⁸、フィブリンクロット自体は不溶性タンパクであるために Western blot を行うことができ

なかった。そのような中で、可溶性のフィブリンクロット分解物に対して変性条件で Western blot を行うと、102-10 は反応するという実験結果が得られ、変性条件でフィブリノゲンに対して Western blot を行うという着想に至った (図 8a)。

3. 102-10 のエピトープ部位のフィブリノゲンにおける構造とフィブリンクロットにおける新規構造変化

クロットにおける新規構造変化

Doolittle と Cohen らのグループが 2000 年にそれぞれニワトリとウシのフィブリノゲンの立体構造を相次いで決定し^{44,45}、それから 9 年後の 2009 年にヒトフィブリノゲンの立体構造は Doolittle らのグループによって決定された³¹。

フィブリンクロットは不溶性タンパクであるために、X 線結晶構造解析や NMR といった構造解析手法が適用できない。そのため、フィブリンクロットの立体構造はこれまで明らかになっていない。そこで、フィブリンクロットの構造の一部を模倣して、構造を解析する研究が主流となった。例えば、フィブリノゲンの結晶構造と、フィブリン断片と合成ペプチドの複合体の結晶構造からフィブリンクロットの立体構造モデルを予測するといった試みがなされてきた^{46,47}。本研究では、ヒトフィブリノゲンの立体構造 (図 9a) と当研究室の 102-10 抗体のエピトープ (図 8e) が解明されたことで、フィブリンクロットのみで起こる新規構造変化を見出した (図 10b)。この新規構造変化部位に対する新規抗フィブリンクロットモノクローナル抗体 (抗 B β 鎖抗体及び抗 γ 鎖抗体) を作製し、それらの抗体がフィブリンクロットに特異的であることを証明することで (図 10a)、新規構造変化の存在を証明した (図 10b)。これはあくまで傍証であることは否めないが、冒頭で述べたように不溶性タンパクは構造解析ができないために、本方法が現状の限界であると考えられる。他の方法として、分子架橋剤

Ethylene glycol bis[succinimidylsuccinate]と Bis[sulfosuccinimidyl]suberate を用いて、フィブリノゲンでは水素結合と疎水性相互作用によってエピトープ部位が架橋されることはないが、フィブリンクロットではエピトープ部位に空間が生じているために架橋され、架橋後のフィブリノゲンとフィブリンクロットの分解物を比較すると、フィブリンクロットのみでエピトープ部位が架橋された断片が検出されると考え、実験を行った。しかしながら、これらの分子架橋剤が反応するリジン及びアルギニン残基は、エピトープ部位の水素結合と疎水性相互作用面の外に存在するために、フィブリノゲンでもフィブリンクロットでも同様に架橋されてしまい、分子架橋剤を用いた方法は失敗した。今後、構造解析技術の発展により、フィブリンクロットの構造がさらに解析されることを期待したい。

第3章 in vivo における抗フィブリンクロット特異抗体 102-10 の腫瘍集積性の評価と臨床検体における 悪性度とフィブリンクロットの沈着の相関

実験方法

1. 非悪性疾患マウスモデルの作製

脳梗塞ラットモデルは、メスの Sprague-Dawley にイソフルラン (Abbott, North Chicago, Illinois) 麻酔をかけ、頸動脈を露出させ、内径 0.5 mm のポリエチレンチューブ (Natsume Seisakusho, Tokyo, Japan) でカニューレションした。中大脳動脈は 3-0 ナイロンモノフィラメント (Ethicon, Somerville, NJ) による縫合を施し、塞栓形成した。

創傷マウスモデルは、メスの FVB/N にイソフルラン麻酔をかけ、背中に直径 1 cm の創傷を行った。創傷は未処置にした。創傷治癒の経過は毎日観察した。

炎症マウスモデルは、メスの DBJ/1 に 2 mg の抗コラーゲン 2 抗体 (Chondrex, Redmond, WA) と抗コラーゲン 4 抗体 (clone 35-4) を腹腔内投与した。3 日目に 50 µg の Lipopolysaccharide (Chondrex) を腹腔内投与した。

全ての動物実験は国立がん研究センター動物実験倫理委員会の承認を受けた上でガイドラインに従って行った。

2. 組織免疫染色

臨床検体の組織切片は福島県立医大から提供された。グリオーマの組織切片は熊本大学から提供された。全ての臨床検体は各研究機関の倫理委員会の承認

を得て、提供された。組織切片はパラフィン包埋され、キシレンに3分ずつ3回、99.5%エタノールに3分ずつ3回浸して脱パラフィンを行った。その後、10 mM のクエン酸バッファー pH6.0 に浸して、120°C で10分抗原賦活を行った。5% Difco skim milk でブロッキングした後に、10 µg/mL の 102-10 を添加し、室温で1時間反応させた。PBS で3回洗浄した後、HRP 標識した抗ヒト IgG 二次抗体 (MBL) を室温で1時間反応させた。PBS で3回洗浄した後、DAB (Dako, Glostrup, Denmark) で酵素基質反応を行った。その後、マイヤーヘマトキシリン (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan) で、室温で10分核染色を行った。99.5%エタノールに3分ずつ3回、キシレンに3分ずつ3回、脱水脱色と透徹を行い、Mount-Quick (Daido Sangyo, Tokyo, Japan) で封入した。

3. 腓がんトランスジェニック (TG) マウスの作製

腓がんのトランスジェニック (TG) マウスは以下の遺伝子組み換えマウスの交配により、作製した。①B6.129S4-Krastm4Tyj/J ②B6.FVB-Tg(Ipfl-cre)1Tuv ③B6.129P2-Trp53tm1Brn/J ④RosaA26-pCAGGs-LSL-Luciferase
以上のマウスは京都大学から提供された。

4. 蛍光標識 102-10 の腫瘍集積性の評価

4-1. ex vivo による評価

IVIS animal imaging system (Caliper, Hopkinton, MA) と Living image software (Caliper) により、腓がん TG マウスのルシフェラーゼ活性を算出した。ルシフェラーゼ活性の指標として、Total Flux を使用して毎週記録した。Total Flux が

9.0×10⁶以上のマウス (9.747×10⁶-1.561×10⁷) 6 匹を、群間に統計的有意差が無いように 2 群に分けた。

Alexa Fluor 647 標識 102-10 と control IgG (Biolegend, San Diego, CA) を 50 μg、腭がんの TG マウスに投与した。72 時間後マウスの臓器を外科的に摘出し、OV110 small animal imaging system (Olympus, Tokyo, Japan) で蛍光を検出した。蛍光の評価は、OV100/110 in vivo imaging software (Olympus) を使用して、臓器の蛍光強度の平均を算出した。蛍光強度の指標には target-to-background ratio を使用して、未処理の臓器の background に対して、蛍光標識抗体を投与した臓器の蛍光の割合を算出した。

4-2. 蛍光免疫染色による評価

腭がん TG マウスに対して、Alexa Fluor 647 標識 102-10 を 300 μg 投与した。24 時間後に臓器を外科的に摘出し、OCT compound に包埋して凍結し、10 μm の薄層切片を作製した。ドライヤーで 30 分風乾後、冷 4%パラホルムアルデヒド (Wako Pure Chemical) で 10 分固定した。抗フィブリン IgM と Alexa488 標識抗 mouse IgG (invitrogen) を 37°C で 30 分反応させておき、結合しなかった 2 次抗体をマウス血清 (Dako) でブロッキングした。組織切片は 5% Difco skim milk で、室温で 30 分ブロッキングして、上記免疫複合体を遮光下室温で 30 分反応させた。PBS で 1000 倍に希釈した DAPI (invitrogen) で 5 分核染色を行った後、PBS で 3 回洗浄し、Fluoromount-G で封入した。

5. 化学発がんマウスモデルの作製

化学発がんマウスモデルは、250 µg/mL でアセトン (Wako Pure Chemical) に希釈した 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (Sigma) を剃毛したメスの FVB/N の背中に塗布した。1 週間後、25 µg/mL でアセトンに希釈した phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma) を毎週塗布した。PMA の処置は 32 週行った。

6. 放射性同位体標識 102-10 の作製と PET/CT による 102-10 の

腫瘍集積性の評価

p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine B (DF) を 102-10 に標識した。DF と IgG の標識の比率は 1.0 から 1.3 であった。その後、PD10 column (GE healthcare) でサイズ排除クロマトグラフィーを行い、さらに Sephadex G-50 spin column (GE healthcare) で精製した。⁸⁹Zr-oxlate はサイクロトロンを使って、放射線医学総合研究所で作製した。DF 標識した 102-10 (100 µg/20 µL) を 5.0-5.6 MBq の ⁸⁹Zr-oxlate pH7-9 (3.7-5.6 GBq/mL) と室温で 1 時間反応させた。放射性同位体標識 102-10 は Sephadex G-50 spin column で精製した。50 mM の diethylene triamine pentaacetic acid pH7 を移動相として使用した薄層クロマトグラフィーの結果、標識効率は 73-96% であり、純度は 96-98% であり、活性は 37-44 kBq/µg であった。

3.7 MBq の ⁸⁹Zr 標識 102-10 を尾静脈から投与した。PET のデータは麻酔下で small animal PET system (Inveon, Munich, Germany) により得た。測定中体温は 37°C に保った。画像は 3D maximum a posteriori 法 (18 反復、16 分画、 $\beta = 0.2$) で減弱補正を行わず、再構成した。放射性同位体の取り込みは (% injected dose/gram: % ID/g) で表した。PET スキャン後、CT 画像は 90 kVp と 200 µA に X 線光源をセットした small-animal CT system (R_mCT2, Rigaku, Tokyo, Japan) で

得た。その後、外科的に腫瘍を摘出し、OCT compound に包埋して、20 μm の切片厚で薄層切片を作製した。連続切片でフィブリンクロットの組織免疫染色、Hematoxylin Eosin (HE) 染色、オートラジオグラフィを行うサンプルを用意した。オートラジオグラフィを行うサンプルは imaging plate (Fujifilm, Tokyo, Japan) に切片を作製した。以上の実験は放射線医学総合研究所の佐賀恒夫博士、辻厚至博士に依頼した。

7. Hematoxylin Eosin (HE) 染色

4%ホルムアルデヒドで10分固定した凍結切片あるいは脱パラフィン後の、PBSで洗浄後、マイヤーヘマトキシリンで10分核染色した。流水で10分脱色を行った後、エオジンアルコール (Muto Pure Chemicals) で細胞質を染色した。流水で洗浄後、99.5%エタノールに3分ずつ3回浸し、キシレンに3分ずつ3回浸して、脱水脱色と透徹を行った。最後に Mount-Quick で封入した。

実験結果

1. 非悪性疾患マウスモデルにおけるフィブリンクロットの動態

がん組織における悪性凝固サイクル (背景4) の項で述べたように、非悪性疾患におけるフィブリンクロット形成が一過性であるかどうかを確認するために、脳梗塞ラットモデル、皮膚創傷マウスモデル、関節炎マウスモデルを確立した。それぞれのモデルを25日目まで経過観察したところ、脳梗塞ラットモデルでは2日目及び9日目では患部にフィブリンクロットが集積しているのに対して、15日目ではフィブリンクロットは消失していた。また、皮膚創傷マウスモデルでは、2日目及び7日目では患部にフィブリンクロットが集積しているのに対して、

14 日目にはフィブリンクロットは消失していた。関節炎マウスモデルにおいても 4 日目、11 日目にはフィブリンクロットの集積は見られたが、25 日目には、フィブリンクロットは消失していた (図 11)。以上の結果より、非悪性疾患において、フィブリンクロットの集積性は一過性であることを確認した。

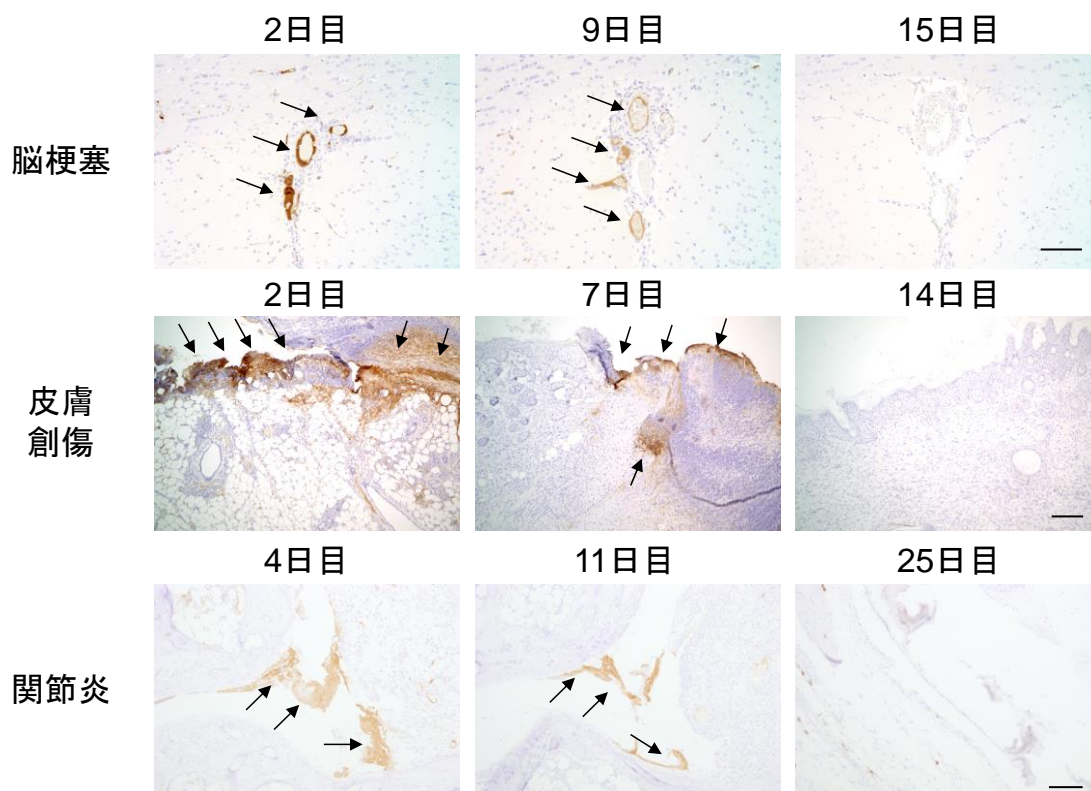


図 11. 非悪性疾患マウスモデルにおけるフィブリンクロットの動態

脳梗塞ラットモデル (上)、皮膚創傷マウスモデル (中央)、炎症マウスモデル (下) ではフィブリンクロットの沈着は急性期 (左、中央)で見られるが、後期 (右) では見られなかった (bar: 100 μ m)。矢印はフィブリンクロットを示す。

2. 腭がんトランスジェニック (TG) マウスにおける蛍光標識 102-10 の腫瘍集積性の評価

102-10 の腫瘍集積性を確認するために、がん原遺伝子である *KRAS* とがん抑制遺伝子である *TP53* の恒常変異をもち、ルシフェラーゼを発現する腭がん TG

マウスを作製した (図 12a)。この TG マウスはヒト膵がんの発生を模倣すると報告されている⁴⁸。TG マウスの膵がんに対して、102-10 を用いた組織免疫染色を行ったところ、フィブリンクロットが陽性であることを確認した (図 12b)。次に、TG マウスに蛍光標識した 102-10 と control IgG を投与した。投与後 72 時間に TG マウスから臓器を摘出し、蛍光を観察した (図 12c)。膵がんと肝臓の蛍光を定量したところ 102-10 は control IgG に比べて優位に膵がんを集積した ($n = 3$, means + s.d., * $P < 0.05$, 図 12d)。一方、抗体の代謝臓器である肝臓への集積においては、統計的有意差は無かった (図 12d)。また、蛍光標識した 102-10 を投与後 24 時間の TG マウスの膵がんを摘出し、蛍光免疫染色を行った。その結果、投与した 102-10 の局在はがん組織中に存在するフィブリンクロットの局在と重なり、102-10 はがん組織中のフィブリンクロットに到達していることが示された (図 12e)。

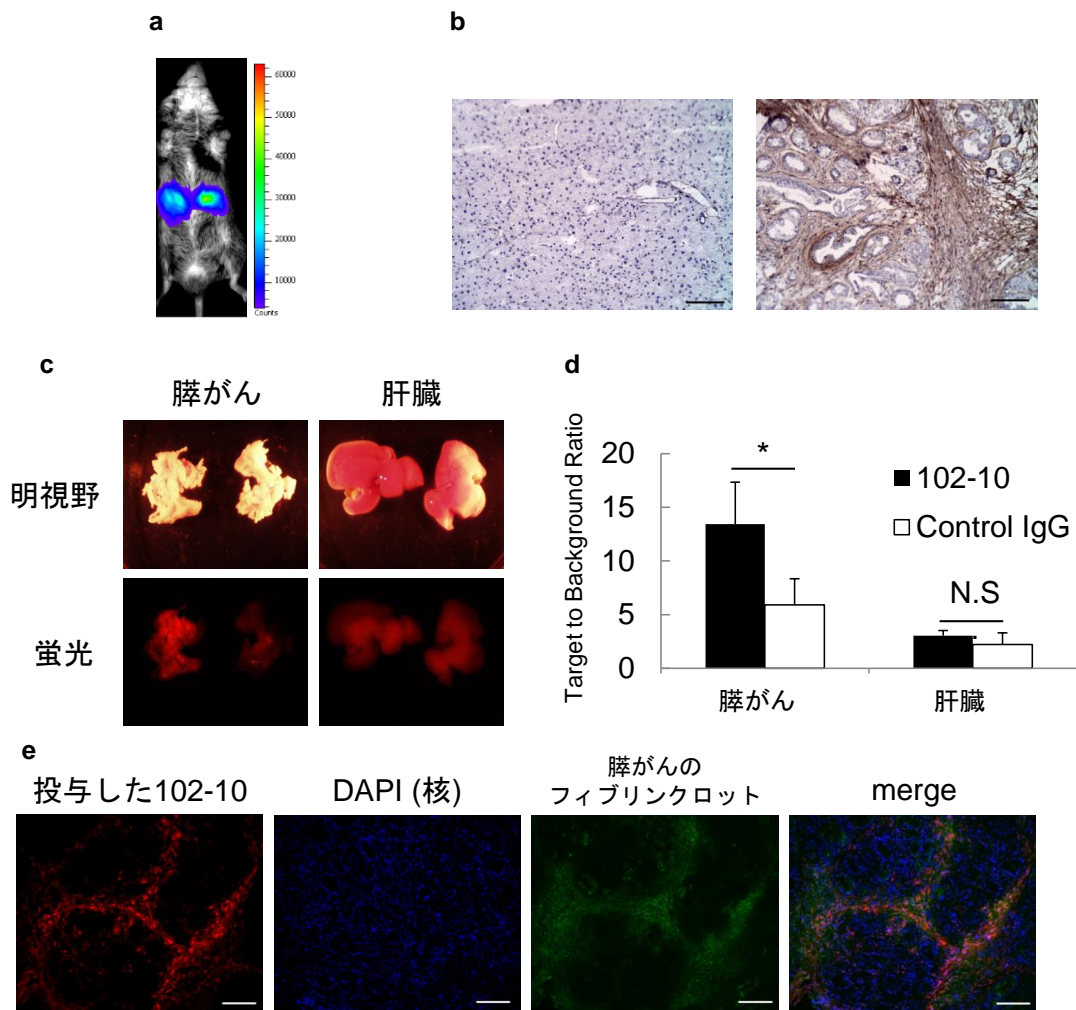


図 12. 膵がんトランスジェニック (TG) マウスにおける 102-10 の腫瘍集積性 (a) Luciferase を発現する膵がん TG マウスを作製した。(b) 正常マウスの膵臓はフィブリンクロット陰性であるが (左, bar: 100 μ m)、TG マウスの膵がんはフィブリンクロット陽性であった (右, bar: 100 μ m)。(c) 蛍光標識抗体投与後 72 時間の臓器。膵がんにおいては 102-10 のほうが腫瘍に集積している様子だった。一方肝臓においては 102-10 の腫瘍集積性は同程度だった。(d) 蛍光標識抗体投与後 72 時間の膵がん と肝臓の蛍光を定量したところ、control IgG と比較して、102-10 は優位に膵がん に集積した ($n = 3$, means + s.d., $*P < 0.05$)。一方、肝臓への集積に関して、102-10 と control IgG の間に統計的有意差は無かった。(e) 蛍光標識 102-10 投与後 24 時間の膵がんの凍結切片の蛍光免疫染色を行ったところ、投与した 102-10 (左: 赤) は膵がん組織中のフィブリンクロットの局在 (中央右: 緑) と重なった (右)。全て bar: 100 μ m。

3. 化学発がんマウスモデルにおける放射性同位体標識 102-10 の

腫瘍集積性の評価

次に PET/CT への臨床応用を想定して、 ^{89}Zr 標識 102-10 を作製した (図 13a)。組織型がヒト扁平上皮がんを模倣すると報告されている 49 化学発がんマウスモデルに ^{89}Zr 標識 102-10 と control IgG を投与し、5 日後に PET/CT を行ったところ、102-10 は control IgG に比べて、高い腫瘍集積性を示した (図 13b)。 ^{89}Zr 標識 102-10 を投与した化学発がんマウスモデルの腫瘍を摘出して、連続切片で HE 染色、組織免疫染色、オートラジオグラフィーを行った結果、フィブリンクロットの局在と放射性同位体の分布が一致した (図 13c)。以上の結果より、 ^{89}Zr 標識 102-10 はがん組織のフィブリンクロットに到達し、PET/CT において検出可能であることが示された。

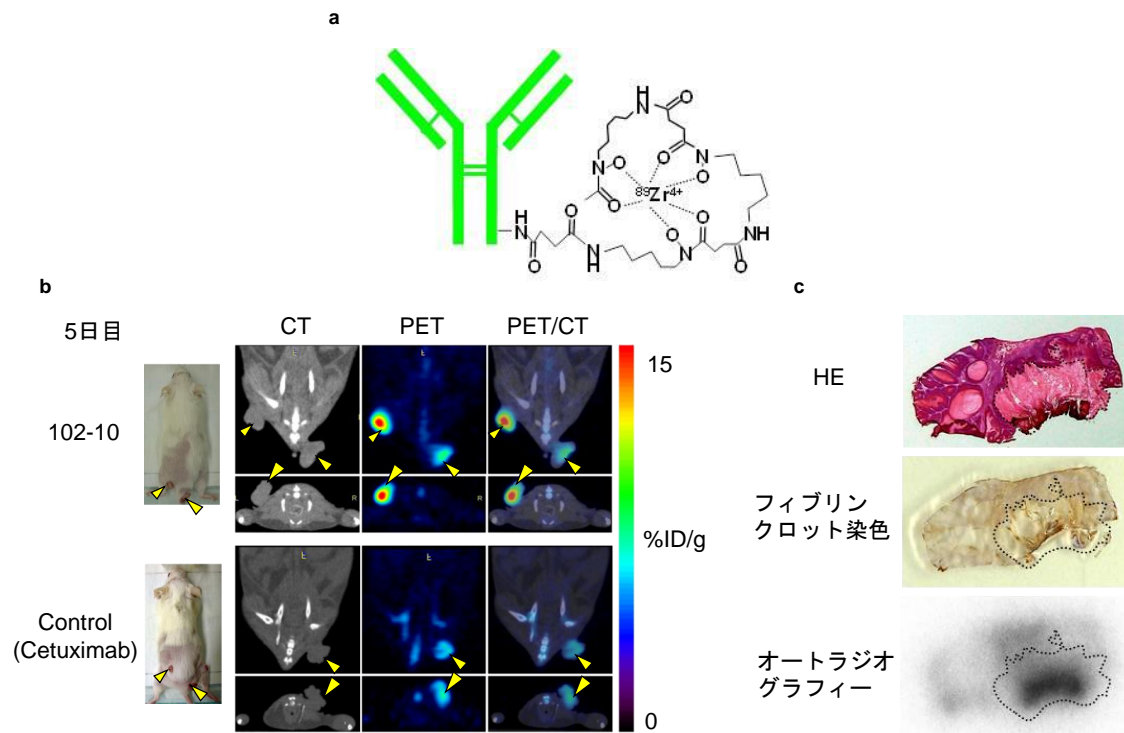


図 13. 化学発がんマウスモデルにおける放射性同位体標識 102-10 の腫瘍集積性の評価 (a) 102-10 に ^{89}Zr を標識した PET プローブを作製した。(b) ^{89}Zr を標識した 102-10 と control IgG を化学発がんマウスモデルに投与して、5 日目に

PET/CT を行った。102-10 は control IgG に比べて顕著な腫瘍集積性を示した。黄色矢印は腫瘍の位置を示している。(c) PET/CT 後の腫瘍を外科的に切除して、連続切片で HE 染色、フィブリンクロット染色、オートラジオグラフィを行った。フィブリンクロットの局在と ^{89}Zr 標識した 102-10 の局在は重なった。破線部は腫瘍間質を示している。

4. 悪性疾患と非悪性疾患のヒト臨床検体におけるフィブリンクロットの組織免疫染色

悪性疾患と非悪性疾患のヒト組織中にフィブリンクロットが存在するかどうかを評価するために、ヒト臨床検体を用いた組織免疫染色を行った。その結果、悪性疾患におけるフィブリンクロットの陽性率は、脳腫瘍 (15/15)、肺がん (4/4)、膵がん (6/7)、卵巣がん (3/3)、胃がん (10/10)、悪性リンパ腫 (0/5)であった。一方、非悪性疾患におけるフィブリンクロットの陽性率は、急性心筋梗塞 (2/2)、心筋梗塞発症数週後 (0/2)、急性脳梗塞 (4/4)、脳梗塞発症数週後 (0/2)、急性膵炎 (4/4)、慢性膵炎 (0/3) であった (表 3, 図 14)。

表 3. ヒト手術検体のフィブリンクロット染色結果一覧

悪性腫瘍におけるフィブリンクロットの染色結果						
	神経膠芽腫 (脳腫瘍)	肺がん	膵がん	卵巣がん	胃がん	悪性リンパ腫
Positive	15	4	6	3	10	0
Negative	0	0	1	0	0	5

非悪性疾患におけるフィブリンクロットの染色結果						
	急性 心筋梗塞	心筋梗塞 発症数週後	急性 脳梗塞	脳梗塞 発症数週後	急性 膵炎	慢性 膵炎
Positive	2	0	4	0	4	0
Negative	0	2	0	2	0	3

Positive: 顕微鏡下で視野の30%にフィブリンクロットの染色がみられる症例
 Negative: 全くフィブリンクロットの染色が見られない症例

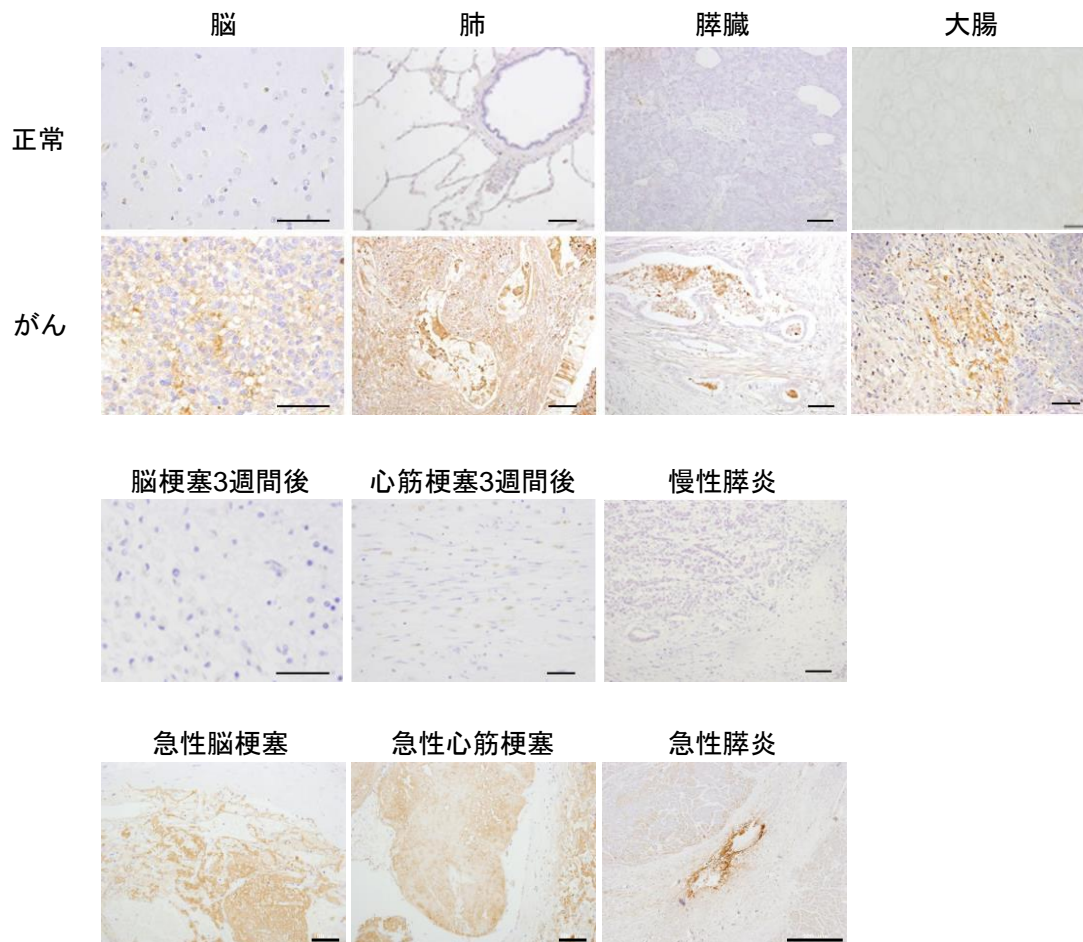


図 14. 悪性疾患と非悪性疾患のヒト臨床検体におけるフィブリンクロットの免疫染色 悪性疾患では、がん部ではフィブリンクロットの沈着が見られたが、正常部 (非がん部) では、フィブリンクロットの沈着は見られなかった (bar: 100 μm)。一方、非悪性疾患では、急性期ではフィブリンクロットが陽性であるが、後期や慢性疾患ではフィブリンクロットは陰性であった (bar: 100 μm , 急性膵炎のみ bar: 500 μm)。

5. ヒト脳腫瘍における悪性度とフィブリンクロットの沈着の相関

ヒト脳腫瘍の代表であるグリオーマの grade1/2: 20 例、grade3: 20 例、grade4: 20 例に対して、フィブリンクロットの組織免疫染色を行った。染色度合を 3 群に分けた。フィブリンクロットの染色が明らかに見られないものを (-)、わずかだが、明らかに染色されているものを (+)、不均一あるいはびまん性に強く染色さ

れているものを (++) とした (図 15a)。その結果、grade4 では 100% (20/20) の症例でフィブリンクロット陽性で、65% (13/20) の症例は強い染色であった。

Grade3 では 40% (8/20) の症例でフィブリンクロット陽性で、10% (2/20) の症例は強い染色であった。Grade1/2 では 60% (12/20) の症例でフィブリンクロット陽性で、10% (2/20) の症例は強い染色であった (図 15b)。本実験により、Grade 4 では他の低 grade の症例と比べて、フィブリンクロットの沈着が多いことが明らかになり、腫瘍の悪性度とフィブリンクロットの沈着に相関が認められた ($R = 0.56, P = 1.55E-05$)。

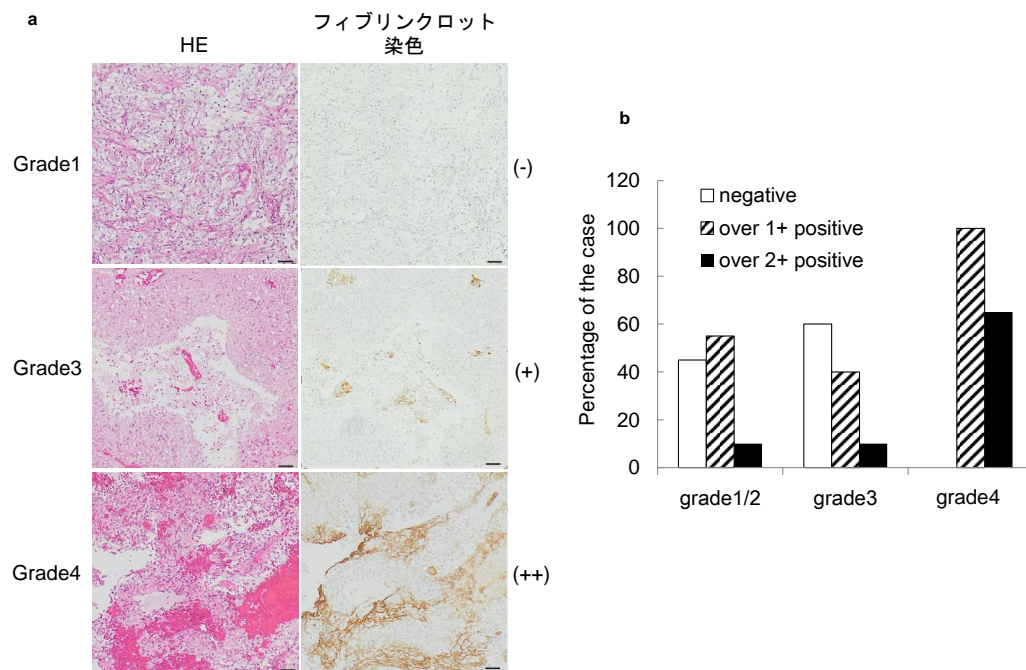


図 15. ヒト脳腫瘍における悪性度とフィブリンクロットの沈着の相関

(a) ヒト脳腫瘍 (グリオーマ) サンプルの HE 染色 (左) とフィブリンクロットの免疫染色 (右)。フィブリンクロットの染色度合を 3 群に分けた。フィブリンクロットの沈着が見られないものを (-)、わずかだが、明らかに染色されているものを (+)、不均一あるいはびまん性に強く染色されているものを (++) とした (bar: 100 μ m)。 (b) 各 grade のフィブリンクロットの染色結果の一覧。Grade は WHO の分類に則り、各 grade で 20 症例ずつ染色した。Grade とフィブリンクロットの沈着の間の相関が認められた ($R = 0.56, P = 1.55E-05$)。

考察

1. 非悪性疾患におけるフィブリンクロットの動態

脳梗塞ラットモデル、皮膚創傷マウスモデル、炎症マウスモデルを用いて、フィブリンクロットの形成を経時的に観察した結果、全ての症例において、フィブリンクロットは11日目までは観察されているが、25日目までに全ての症例でフィブリンクロットは消失していた(図11)。上記の結果は、非悪性疾患モデルにおいては、急性期ではフィブリンクロットの沈着が見られるが、回復期ではフィブリンクロットは消失することを示唆しており、がん組織における悪性凝固サイクル(背景4)の項で述べたようにヒトの非悪性疾患において、フィブリンクロットは一過性に形成されることを支持する結果であった。

2. 102-10の腫瘍集積性

本研究では腭がんTGマウスモデルと皮膚化学発がんマウスモデルの2種類の自然発がんマウスモデルを用いて、102-10の腫瘍集積性の検討を行った。従来は、皮下移植マウスモデルや同所移植マウスモデルなど、マウスの皮下や臓器に直接がん細胞を注入するマウスモデルが汎用されていたが、それらは臨床のヒトのがんに比べ腫瘍の成長が急激であり、一般的にがん細胞を注入してから約1週間から2週間程度で 100 mm^3 以上のがんを形成し、間質形成や腫瘍血管の構築などのがん微小環境において、臨床のヒトのがんに類似しているとは言い難かった。一方で、今回使用した2種類の自然発がんマウスモデルは、がんの発達⁴⁸や間質形成、組織型⁴⁹において、実際のヒトのがんに類似していることが報告されており、特に本実験で着目している間質形成において、優れたモデルである。実際に腭がんTGマウスモデルは生後約3ヶ月の個体を使用し、化学

発がんマウスモデルは DMBA 塗布後 3 ヶ月の個体を使用おり、腭がんは大きさを測定することはできないが、皮膚発がんマウスは 3 ヶ月で 100 mm³程度の腫瘍を形成する。これら二種類のがんにおいて、102-10 は優れた腫瘍集積性を示し (図 12d, 図 13b)、本結果は臨床に外挿が可能と考えられ、今後の臨床応用が期待された。

3. ヒト臨床検体におけるフィブリンクロットの組織免疫染色

ヒトの悪性疾患においては、悪性リンパ腫を除く全ての固形がんでフィブリンクロットは高い陽性率を示した (表 3)。悪性リンパ腫は先行論文では静脈血栓症が起りやすいがんと報告されているので (図 1a)、今回の結果と矛盾する²。原因の一つとしては、患者の治療歴が考えられる。一般に悪性リンパ腫は抗がん剤治療が奏効しやすいがんとして知られている。一方で抗がん剤が静脈血栓症を惹起することも報告されており⁵⁰⁻⁵²、患者の治療法や治療期間などでフィブリンクロットの形成に影響が出ることが考えられた。今回の臨床検体は、脳腫瘍を除くと、10 例程度であり、フィブリンクロット形成とがんの悪性度については症例数を増やし、それぞれの臨床病理的因子を加味した解析が必要と考えられる。

非悪性疾患においては、急性期の梗塞性疾患や炎症性疾患ではフィブリンクロットの形成がみられたが、陳旧性の梗塞性疾患や慢性の炎症ではフィブリンクロットの形成は見られなかったことから、動物実験と同様に非悪性疾患でのフィブリンクロットの形成は一過性であることを支持する結果が得られた。

がんの悪性度とフィブリンクロットの沈着に相関が見られた (図 15b)。現在のところ、脳腫瘍のみの検討にとどまっているが、今後、他のがん種でも検討を

進めて、がんの悪性度判定のスクリーニングツールとしても臨床応用を目指したい。

今後の展望

本研究では、がんと血液凝固の関係に着目し、血液凝固因子のフィブリノゲン及びフィブリンクロットを研究対象とした。フィブリンクロットは血栓の主要な構成タンパクであり、古くから研究されてきた。しかしながら、その重合過程は複雑であり、立体構造解析は未だに解明されておらず、研究対象として非常に魅力的なタンパクである。また、アルツハイマー病の原因タンパクであるアミロイド β やクロイツフェルト・ヤコブ病の原因タンパクである PrP^{Sc} も不溶性タンパクであり、構造が明らかになっていない。今後の立体構造解析技術の進歩に加え、今回得た手法を取り入れることにより、これらの難治性疾患の原因タンパクの構造を解明したい。

また、102-10 がフィブリンクロットに特異的な抗体であることを明らかにした。これまでに作製されてきた抗フィブリン抗体との大きな違いは、従来の抗体にもフィブリノゲンと可溶性フィブリンを区別することができる抗体が存在していたが、不溶性のフィブリンクロットのみを認識できる抗体は存在しなかった。102-10 は唯一フィブリンクロットのみを認識できる抗体である。可溶性フィブリンや D-ダイマーはフィブリンクロットの形成前後で血中濃度が上昇することが知られており、仮に従来の抗体を血中に投与した場合には血中に存在する可溶性フィブリンや D-ダイマーと免疫複合体を形成してしまい、速やかに細網内皮系にトラップされてしまうと考えられる。一方で 102-10 は血中のフィブリン関連分子とは反応せずに、がん組織の周囲に存在するフィブリンクロットに選択的に集積する。

そして、脳腫瘍において悪性度とフィブリンクロットの沈着の相関を明らかにしたが、脳腫瘍以外のがん種において、最も進行度が高い stage 4 のがんでき

え、症状を伴わずに進む。痛みや出血などの症状が伴った場合には、がんは神経浸潤していたり、骨や血管を破壊していたりする。すなわち症状を伴うがんは、見つけても手遅れである可能性が高い。これらのことを総合すると、脳腫瘍だけでなく、他のがんでも悪性度が高ければサイズが小さいいわゆる早期の状態においてもフィブリンクロットの沈着が認められる可能性が示唆される。逆に抗フィブリンクロット抗体をプローブとする PET/CT で陽性であれば、悪性度が高い、つまり治療の必要性が高いがんである可能性が高い。一方、他の検査で発見された早期の腫瘍が本 PET/CT で陰性であれば、経過観察で良いという臨床的価値が出てくる。それゆえに無症候性のがんを、抗体を用いて検出することは非常に意義がある。

当研究室では、外因系血液凝固の開始因子である TF のモノクローナル抗体を保有しており、一般に予後が悪いとされる低分化の胃がんにおいて、TF 陽性のがんではフィブリンクロットも陽性であるという傾向を認めつつある。今後、TF とフィブリンクロットの免疫染色の結果と予後の相関にも着目したい。

抗体製剤の開発において、抗体の親和性解析は欠かせない。現在、抗体医薬品として用いられている抗体の親和性の指標である解離定数 (KD) は、100 pM 以下であるといわれている (値が小さいほど、結合力が大きい)。これまで不溶性タンパクに対する抗体の親和性解析の報告例はほとんどないため、Biacore T200 (GE healthcare) を用いた表面プラズモン共鳴法により、様々な条件で 102-10 の親和性解析を進めている。現在までのところ抗原をフィブリンクロットにするか、エピトープのリコンビナントペプチドにするかで、得られる結果が大きく異なることがわかっている(表 3, 図 16a, b, c)。特にフィブリンクロットを抗原に用いて、抗体の 1 価の反応を算出した表 3 の 2 の方法においては、結

合速度定数 (k_a) が 8.427×10^2 と非常に小さい (図 16b)。このことから Biacore センサーチップ上で作製したフィブリンクロットに 102-10 の 1 価の結合が弱い可能性が考えられた。センサーチップとフィブリンクロットはアミンカップリングで結合しているため、アミンカップリングにより、102-10 が認識するフィブリンクロット特有の立体構造が変化している可能性も考えられた。可溶性タンパクに対する抗体の親和性解析においては、通常リコンビナントペプチドを用いて、抗体の 1 価の反応を算出する。そのモデルに一番近いのが表 3 の 1 の方法であり、 $KD = 125 \text{ nM}$ が得られている (図 16a)。一方、フィブリンクロットは無数のフィブリン分子で構成されており、例えば直径 400 nm の円形のフィブリンクロットの断面には 5000 分子のフィブリン分子が存在し、直径 900 nm になると 25000 分子存在すると報告されている^{53,54}。すなわち、実際のフィブリンクロット上では、102-10 は 1 価の結合よりも 2 価の結合をしている可能性が高いと考えた (図 16d)。表 3 の 3 の方法は、フィブリンクロット上で 102-10 が 2 価の結合をしていることを想定したモデルであり、この方法では $KD = 80.39 \text{ nM}$ が得られている (図 16c)。尚、測定法としては multi cycle kinetics と single cycle kinetics の 2 つの方法が存在する。Multi cycle kinetics が一般的な測定方法であり、5 濃度の抗体を流路系で流して抗原抗体反応を測定するが、1 濃度毎に抗原から抗体を解離させる操作 (抗原の再生) を行う。一方、single cycle kinetics は抗原の再生ができないサンプルに適用し、抗原の再生をしないで 5 濃度の抗体を次々に流路に流して測定する。Multi cycle kinetics と single cycle kinetics ではほぼ同等の結果が得られることがわかっている。フィブリンクロットを抗原に用いた場合は抗原の再生ができなかったため、single cycle kinetics 法を採用した。これら

の結果は議論の余地があるが、今後不溶性タンパクの抗体の親和性解析の標準法を確立したい。

表 3. 102-10 の親和性解析モデル

	1	2	3
抗原	リコンビナントペプチド	フィブリンクロット	フィブリンクロット
測定法	multi cycle kinetics	single cycle kinetics	single cycle kinetics
解析方法	bivalent analyte model	bivalent analyte model	1:1 binding
結合速度定数:ka	2.770×10^4	8.427×10^2	3.202×10^3
解離速度定数:kd	3.474×10^{-3}	5.825×10^{-3}	2.687×10^{-4}
解離定数:KD (kd/ka)	125 nM (1.25×10^{-7})	6.912 μ M (6.912×10^{-6})	80.39 nM (8.393×10^{-8})

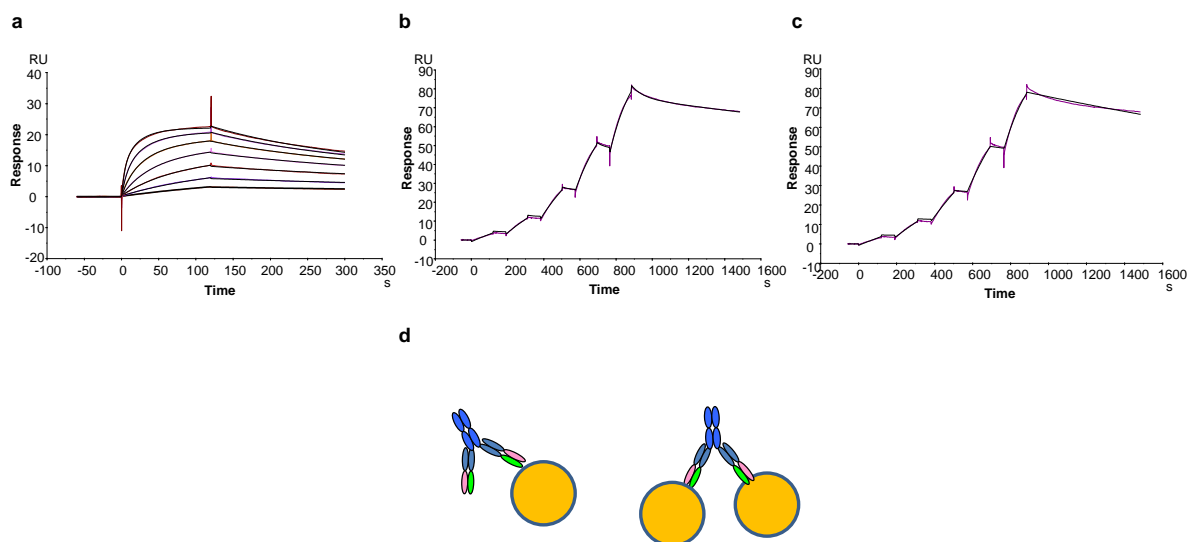


図 16. 102-10 の親和性解析 (a) リコンビナントペプチドを抗原として、Multi cycle kinetics で測定し、bivalent analyte model で解析を行ったセンサーグラム。(b) フィブリンクロットを抗原として、single cycle kinetics で測定し、bivalent analyte model で解析を行ったセンサーグラム。(c) フィブリンクロットを抗原として、single cycle kinetics で測定し、1:1 binding model で解析を行ったセンサーグラム。(d) 1 価の結合 (左) と 2 価の結合 (右) モデル。

結語

マウス及びラットの非悪性疾患モデルの経時的な免疫染色の結果と、ヒト臨床検体の非悪性疾患の免疫染色の結果から非悪性疾患においては、フィブリンクロットは一過性の発現であることを示した。一方、がん組織においては、恒常的にフィブリンクロットが産生されており、悪性度が高いがんではフィブリンクロットの沈着が多いことを示した。以上より、フィブリンクロットは、がんの病態特異的なターゲットになりうることを示した。

診断的意義としては、102-10抗体をプローブとしたPET/CTやMRIにおいて、「今、治療が必要な」がんを見つけることが可能と考えられる。また、治療的意義としては抗がん剤や治療用放射性同位体を選択的に届けることが可能になると考える。

本研究により、フィブリンクロットを標的としたがん間質標的診断及び治療の基盤が確立した。今後 102-10 の親和性向上を図る一方で、本研究が臨床応用され、がんの診断及び治療に貢献することを願ってやまない。

参考文献

1. A.Trousseau. Plegmasia alba dolens. *Lectures on clinical medicine, delivered at the Hotel-Dieu, Paris*. 1865;5:281-332.
2. Stein PD, Beemath A, Meyers FA, Skaf E, Sanchez J, Olson RE. Incidence of venous thromboembolism in patients hospitalized with cancer. *Am J Med*. 2006;119(1):60-68.
3. Sorensen HT, Mellemkjaer L, Olsen JH, Baron JA. Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism. *N Engl J Med*. 2000;343(25):1846-1850.
4. Matsumura Y, Kimura M, Yamamoto T, Maeda H. Involvement of the kinin-generating cascade in enhanced vascular permeability in tumor tissue. *Jpn J Cancer Res*. 1988;79(12):1327-1334.
5. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol*. 2002;20(21):4368-4380.
6. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol*. 1989;134(5):1087-1097.
7. Fleck RA, Rao LV, Rapaport SI, Varki N. Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody. *Thromb Res*. 1990;59(2):421-437.
8. Flossel C, Luther T, Muller M, Albrecht S, Kasper M. Immunohistochemical detection of tissue factor (TF) on paraffin sections of routinely fixed human tissue. *Histochemistry*. 1994;101(6):449-453.
9. Bouchard BA, Shatos MA, Tracy PB. Human brain pericytes differentially regulate expression of procoagulant enzyme complexes comprising the extrinsic pathway of blood coagulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(1):1-9.
10. Schechter AD, Spirn B, Rossikhina M, et al. Release of active tissue factor by human arterial smooth muscle cells. *Circ Res*. 2000;87(2):126-132.
11. Mackman N, Sawdey MS, Keeton MR, Loskutoff DJ. Murine tissue factor gene expression in vivo. Tissue and cell specificity and regulation by lipopolysaccharide. *Am J Pathol*. 1993;143(1):76-84.
12. Erlich J, Parry GC, Fearn C, et al. Tissue factor is required for uterine hemostasis and maintenance of the placental labyrinth during gestation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(14):8138-8143.

13. Hartzell S, Ryder K, Lanahan A, Lau LF, Nathan D. A growth factor-responsive gene of murine BALB/c 3T3 cells encodes a protein homologous to human tissue factor. *Mol Cell Biol.* 1989;9(6):2567-2573.
14. Eddleston M, de la Torre JC, Oldstone MB, Loskutoff DJ, Edgington TS, Mackman N. Astrocytes are the primary source of tissue factor in the murine central nervous system. A role for astrocytes in cerebral hemostasis. *J Clin Invest.* 1993;92(1):349-358.
15. Norris LA. Blood coagulation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2003;17(3):369-383.
16. Doyle MF, Haley PE. Meizothrombin: active intermediate formed during prothrombinase-catalyzed activation of prothrombin. *Methods Enzymol.* 1993;222:299-312.
17. Weisel JW. Fibrin assembly. Lateral aggregation and the role of the two pairs of fibrinopeptides. *Biophys J.* 1986;50(6):1079-1093.
18. Scott CF, Silver LD, Purdon AD, Colman RW. Cleavage of human high molecular weight kininogen by factor XIa in vitro. Effect on structure and function. *J Biol Chem.* 1985;260(19):10856-10863.
19. Tennent GA, Brennan SO, Stangou AJ, O'Grady J, Hawkins PN, Pepys MB. Human plasma fibrinogen is synthesized in the liver. *Blood.* 2007;109(5):1971-1974.
20. Weisel JW. Fibrinogen and fibrin. *Adv Protein Chem.* 2005;70:247-299.
21. Lyman GH, Khorana AA. Cancer, clots and consensus: new understanding of an old problem. *J Clin Oncol.* 2009;27(29):4821-4826.
22. Soe G, Kohno I, Inuzuka K, Itoh Y, Matsuda M. A monoclonal antibody that recognizes a neo-antigen exposed in the E domain of fibrin monomer complexed with fibrinogen or its derivatives: its application to the measurement of soluble fibrin in plasma. *Blood.* 1996;88(6):2109-2117.
23. Tsuji A, Wada H, Matsumoto T, et al. Elevated levels of soluble fibrin in patients with venous thromboembolism. *Int J Hematol.* 2008;88(4):448-453.
24. Matsumura Y. Cancer stromal targeting (CAST) therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(8):710-719.
25. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumor-tropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 1986;46(12 Pt 1):6387-6392.
26. Duncan R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(5):347-360.

27. Maeda H, Matsumura Y. EPR effect based drug design and clinical outlook for enhanced cancer chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(3):129-130.
28. Yasunaga M, Manabe S, Matsumura Y. New concept of cytotoxic immunoconjugate therapy targeting cancer-induced fibrin clots. *Cancer Sci.* 2011;102(7):1396-1402.
29. Yasunaga M, Manabe S, Tarin D, Matsumura Y. Cancer-stroma targeting therapy by cytotoxic immunoconjugate bound to the collagen 4 network in the tumor tissue. *Bioconjug Chem.* 2011;22(9):1776-1783.
30. Yasunaga M, Manabe S, Tarin D, Matsumura Y. Tailored immunoconjugate therapy depending on a quantity of tumor stroma. *Cancer Sci.* 2013;104(2):231-237.
31. Kollman JM, Pandi L, Sawaya MR, Riley M, Doolittle RF. Crystal structure of human fibrinogen. *Biochemistry.* 2009;48(18):3877-3886.
32. Pacella BL, Jr., Hui KY, Haber E, Matsueda GR. Induction of fibrin-specific antibodies by immunization with synthetic peptides that correspond to amino termini of thrombin cleavage sites. *Mol Immunol.* 1983;20(5):521-527.
33. Laudano AP, Doolittle RF. Synthetic peptide derivatives that bind to fibrinogen and prevent the polymerization of fibrin monomers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978;75(7):3085-3089.
34. Kudryk B, Rohoza A, Ahadi M, Chin J, Wiebe ME. A monoclonal antibody with ability to distinguish between NH₂-terminal fragments derived from fibrinogen and fibrin. *Mol Immunol.* 1983;20(11):1191-1200.
35. Scheefers-Borchel U, Muller-Berghaus G, Fuhge P, Eberle R, Heimburger N. Discrimination between fibrin and fibrinogen by a monoclonal antibody against a synthetic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(20):7091-7095.
36. Schielen WJ, Voskuilen M, Tesser GI, Nieuwenhuizen W. The sequence A alpha-(148-160) in fibrin, but not in fibrinogen, is accessible to monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(22):8951-8954.
37. Gargan PE, Graffney PJ, Pleasants JR, Ploplis VA. A Monoclonal Antibody which Recognises an Epitopic Region Unique to the Intact Fibrin Polymeric Structure. *Fibrinolysis.* 1993;7(4):275-283.
38. Hui KY, Haber E, Matsueda GR. Monoclonal antibodies to a synthetic fibrin-like peptide bind to human fibrin but not fibrinogen. *Science.* 1983;222(4628):1129-1132.

39. Kudryk B, Rohoza A, Ahadi M, Chin J, Wiebe ME. Specificity of a monoclonal antibody for the NH₂-terminal region of fibrin. *Mol Immunol.* 1984;21(1):89-94.
40. Bini A, Fenoglio JJ, Jr., Mesa-Tejada R, Kudryk B, Kaplan KL. Identification and distribution of fibrinogen, fibrin, and fibrin(ogen) degradation products in atherosclerosis. Use of monoclonal antibodies. *Arteriosclerosis.* 1989;9(1):109-121.
41. Hamaguchi M, Bunce LA, Sporn LA, Francis CW. Plasmic degradation of fibrin rapidly decreases platelet adhesion and spreading. *Blood.* 1994;84(4):1143-1150.
42. Kudryk BJ, Bini A. Monoclonal antibody designated T2G1 reacts with human fibrin beta-chain but not with the corresponding chain from mouse fibrin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(7):1848-1849.
43. Everse SJ, Spraggon G, Veerapandian L, Doolittle RF. Conformational changes in fragments D and double-D from human fibrin(ogen) upon binding the peptide ligand Gly-His-Arg-Pro-amide. *Biochemistry.* 1999;38(10):2941-2946.
44. Yang Z, Mochalkin I, Veerapandian L, Riley M, Doolittle RF. Crystal structure of native chicken fibrinogen at 5.5-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(8):3907-3912.
45. Brown JH, Volkmann N, Jun G, Henschen-Edman AH, Cohen C. The crystal structure of modified bovine fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(1):85-90.
46. Spraggon G, Everse SJ, Doolittle RF. Crystal structures of fragment D from human fibrinogen and its crosslinked counterpart from fibrin. *Nature.* 1997;389(6650):455-462.
47. Yang Z, Mochalkin I, Doolittle RF. A model of fibrin formation based on crystal structures of fibrinogen and fibrin fragments complexed with synthetic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(26):14156-14161.
48. Hingorani SR, Wang L, Multani AS, et al. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell.* 2005;7(5):469-483.
49. Yang Y, Zhou ZT, Ge JP. Effect of genistein on DMBA-induced oral carcinogenesis in hamster. *Carcinogenesis.* 2006;27(3):578-583.

50. Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ, 3rd. Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study. *Arch Intern Med.* 2000;160(6):809-815.
51. Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Lyman GH. Risk factors for chemotherapy-associated venous thromboembolism in a prospective observational study. *Cancer.* 2005;104(12):2822-2829.
52. Blom JW, Vanderschoot JP, Oostindier MJ, Osanto S, van der Meer FJ, Rosendaal FR. Incidence of venous thrombosis in a large cohort of 66,329 cancer patients: results of a record linkage study. *J Thromb Haemost.* 2006;4(3):529-535.
53. Ariens RA. Counting 1 fibrin molecule at a time. *Blood.* 2013;121(8):1251-1252.
54. Hategan A, Gersh KC, Safer D, Weisel JW. Visualization of the dynamics of fibrin clot growth 1 molecule at a time by total internal reflection fluorescence microscopy. *Blood.* 2013;121(8):1455-1458.

謝辞

本研究は国立がん研究センター東病院 臨床開発センター 新薬開発分野分野長 兼 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 客員教授 松村保広先生の御指導の元に行いました。同ユニット長の安永正浩先生、同室長の古賀宣勝先生、同部所属の剣持広知先生、高橋遍先生、山本祥之先生、山崎信義先生、工藤昌尚先生、福岡聖大先生、同研究室研究員の三江直子さん、大津美沙さん、大橋建也さん、小池浩代さん、溝口万里さん、瀧ヶ平美里さん、町田光さん、生内寿文さん、淵上弥史さん、西條信史さん、花岡慎悟さん、古屋文昭さん、古田大さん、山内真由美さんには実験に関して多くの御助言、御指導、御協力をいただきました。同研究室秘書の椎名薫さん、嶋田真美子さん、片寄幸恵さん、阿部恵子さん、進藤博子さんには生活面や事務的な手続きに関して、手厚いサポートをしていただきました。共同研究者の静岡がんセンターの杉野隆先生には、臨床検体の提供や組織切片の評価をしていただきました。放射線医学総合研究所の佐賀恒夫先生と辻厚至先生には放射性同位体標識 102-10 作製と PET/CT の実験を行っていただきました。東京大学医科学研究所の津本浩平先生には、フィブリンクロットの構造に関する御助言と分子間相互作用解析実験の御助言をいただきました。理化学研究所の眞鍋史乃先生には、102-10 の作製から御協力いただき、フィブリンクロットの構造に関するご助言をいただきました。熊本大学の倉津純一先生と黒田順一郎先生には臨床検体の提供と組織切片の評価をしていただきました。京都大学 iPS 細胞研究所の川口義弥先生には遺伝子組み換えマウスを提供していただきました。化学及血清療法研究所の岩永貞昭先生には、フィブリノゲンとフィブリンクロットの構造に関して御助言をいただきました。GE healthcare の三谷知也さんには、分子間相互作用解析実験に関してご指導いただきました。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 がん先端生命科学分野 博士課程 2 年の佐藤隆太君、博士課程 1 年の津村遼君、藤原悠起君、修士課程 2 年の榊口卓摩君、宗岡聡君、修士課程 1 年の新関孝朗君、山崎聡子さんにも支えていただき、研究を行うことが出来ました。また、同分野修了の齋藤洋平さん、藤澤優さん、橋本侑季さん、中村彰吾君には何度も励ましの言葉をかけていただきました。振り返ると 5 年間で多くの人に支えて頂いたことを改めて実感します。今後は受けた御恩を少しずつ返しながらか後輩たちに繋いでいきたいと考えております。

最後になりますが、家族の久田眞佐男、久田直美、久田峻介にはいつも支えていただき、修了することが出来ました。心から感謝し、お礼申し上げます。