

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13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。

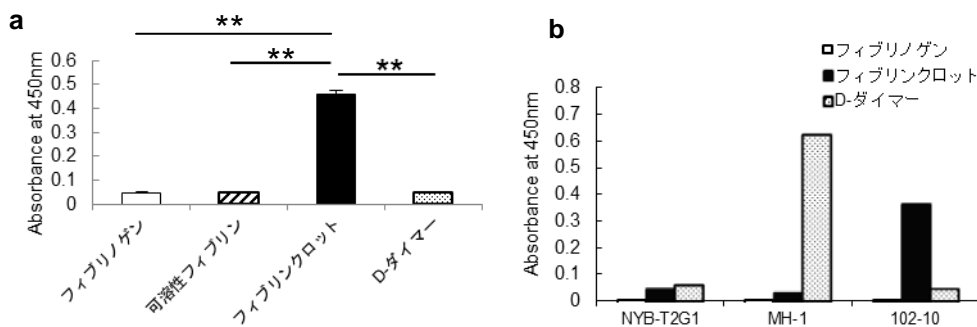


図1. 102-10の特異性評価

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、変性条件下でフィブリノゲンの B β 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、B β 鎖を単離して、リシルエンドペプチダーゼで B β 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)。

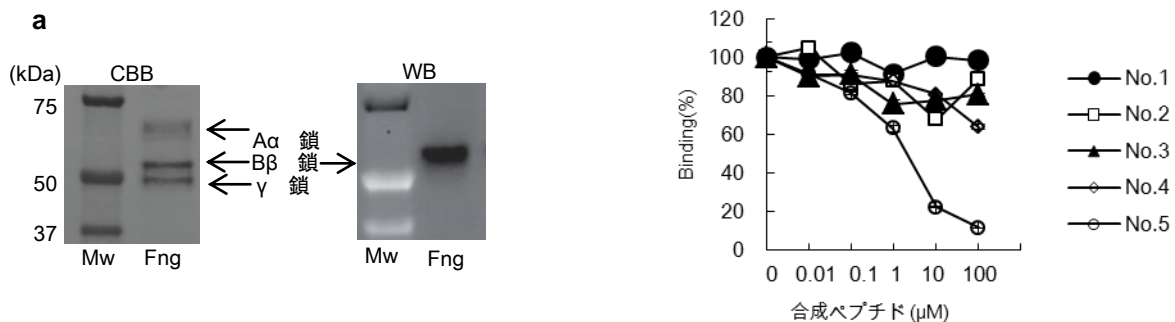


図2. 102-10のエピトープ検索

- 102-10はB β 鎖に反応した。
- 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。

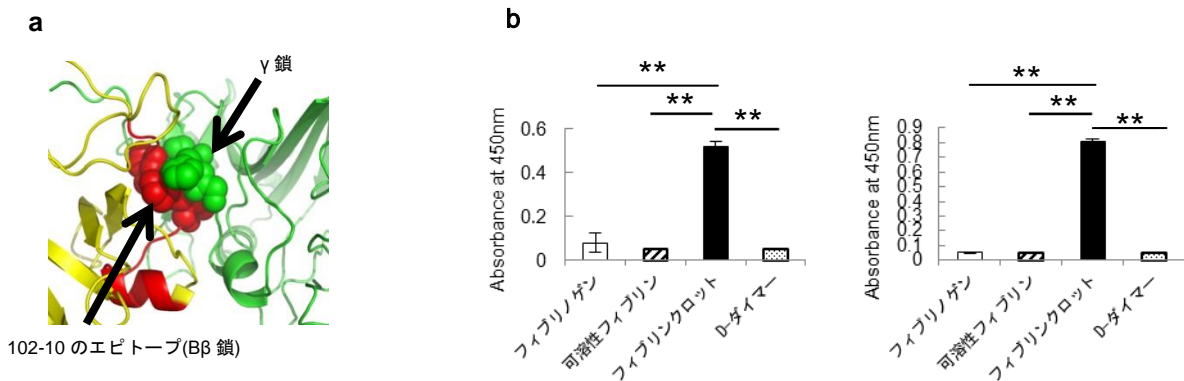


図3. フィブリンクロットにおける102-10のエピトープ部位の新規構造変化

- 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。
- (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 は化学発癌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。化学発癌マウスモデルに ^{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 は顕著に腫瘍に集積することが明らかになった (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。

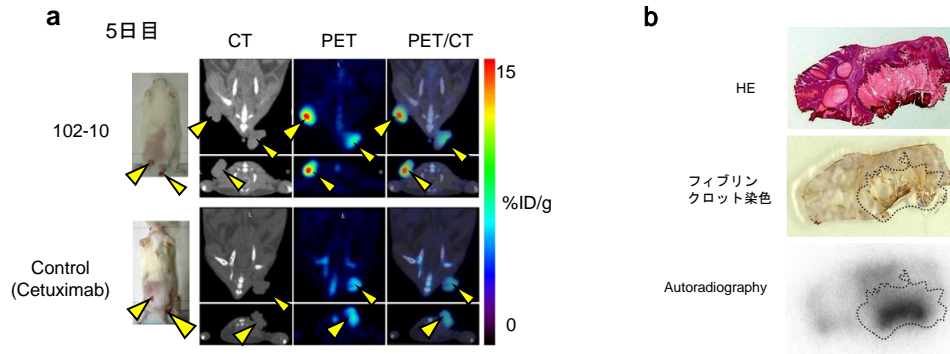


図4. 化学発癌マウスモデルに対する102-10の腫瘍集積性の評価
 a. 102-10はcontrol IgGに比べて、顕著な腫瘍集積性を示した。
 b. ^{89}Zr 付加102-10は腫瘍内のフィブリンクロットと共局在した(点線部)。

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関係を認めた。

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。染色結果を 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 (+)、不均一で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関係を認めた。

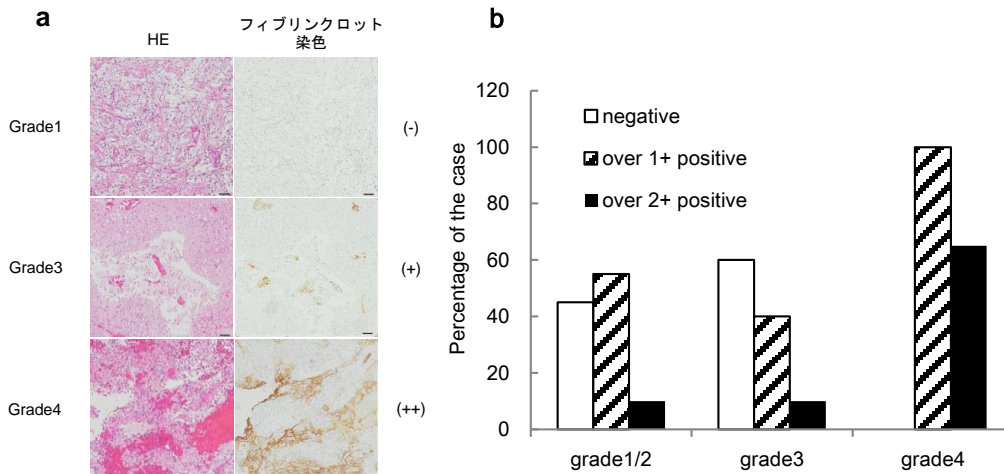


図5. ヒト脳腫瘍検体に対するフィブリンクロットの組織免疫染色
 a. 染色結果を(-), (+), (++)の3群に分けた (Bar : 100 μm)。
 b. 各gradeを20例ずつ染色したところ、grade4は他の低gradeの症例に比べてフィブリンの沈着が多く見られた。また、腫瘍の悪性度とフィブリンクロットの沈着に相関関係を認めた ($R = 0.56$, $P = 1.55\text{E-}05$)。

【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関係を認め、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。