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 27 年度

修士論文

難治性がんの診断・治療に向けた
新規抗不溶性フィブリン抗体の作製及び性状解析

2016 年 1 月 13 日提出

指導教員　松村 保広 教授

47-146315　髙塚　直幸

難治性がんの診断・治療に向けた新規抗不溶性フィブリン抗体の作製及び性状解析

修了年月　2016 年 3 月
先端生命科学専攻　がん先端生命科学分野　47-146315　髙塚直幸
指導教員　松村保広教授

【キーワード】不溶性フィブリン、抗体、難治性がん、診断、治療

【研究背景・目的】

不溶性フィブリンは前駆体のフィブリノゲンとは異なり、正常な生理的条件下の組織には存在せず、出血や炎症など病理的状態の組織に特異的に存在する。その病変部ではフィブリノゲンが血管外に漏れ、活性化したトロンビンがフィブリノゲンの N 末端の領域を切り出し、生じたフィブリンモノマーが重合することでフィブリンが形成される。

心筋梗塞や脳梗塞、外傷による不溶性フィブリン形成は急性期のみの一過性のものであり、2~3 週間以内に不溶性フィブリンはコラーゲンに置き換わる。一方、がんではがん細胞が浸潤する際に周囲の血管を破壊しながら出血を引き起こし、その結果、不溶性フィブリンが形成され、コラーゲンに置換される（図 1)。こうしたサイクルは腫瘍が存在する限り無症状に繰り返し起こり続ける。したがって、不溶性フィブリンが無症候性で存在し続けるのは、がん特異的現象であるといえる。このような考えから不溶性フィブリンをがんの病態特異的な標的タンパクと考え、当研究室では不溶性フィブリン抗体（clone 102-10)を開発した。

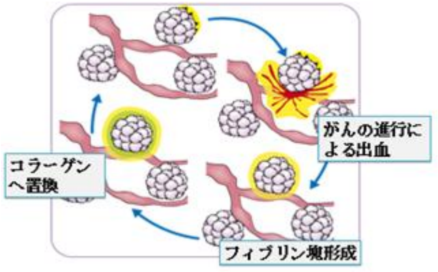

図1: がん組織における悪性凝固サイクル

clone 102-10 は研究レベルで使用するには十分な親和性を有している。しかし、臨床で使うためにはより親和性の高い抗体の取得が必要と考えた。その理由として、臨床で重要視される薬剤投与量を減量できる点が挙げられる。また、ヒト化を行うにあたり、親和性が低下するなど性状が変化する可能性がある点も挙げられる。そして、新規抗体を取得し選択肢を増やすことは、治療や診断に適した抗体を比較検討することができるため意義があると考えている。そもそも不溶性フィブリンはフィブリノゲン由来であるため、不溶性フィブリンのみを認識し、フィブリノゲンや可溶性フィブリンを認識しない抗体の作製は困難である。そこで、clone 102-10 のエピトープ及び不溶性フィブリン特異的な領域に着目することにより、効率よく高親和性の抗体が取得できるのではないかと考えた。以上の理由から、本研究では不溶性フィブリン特異的な領域の立体構造に着目した新規免疫原の作製を行い、それを用いることで不溶性フィブリン特異的な抗体の取得を目指した。また、取得できた抗体の性状解析を行い、難治性がんの診断および治療に適している抗体の選定を目指した。

【方法・結果】

clone 102-10 のエピトープ部分を C 末端側から 4 アミノ酸残基短くしたペプチド {short peptide（図 2)}と一次構造上では連続していないが立体構造上では連続しており clone 102-10 のエピトープと一部重複している領域を模倣した 5 種類のペプチド {steric structure like peptide (図 2)}、フィブリノゲンの Bβ 鎖の D-domain 部分のリコンビナントタンパク質（図 3)をそれぞれ作製し、免疫原として用いた。

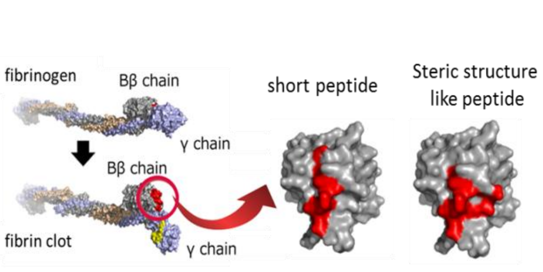

図2: 免疫原として作製したペプチド

その結果、short peptide とリコンビナントタンパク質を免疫原としたとき、計 9 種類の新規抗不溶性フィブリン抗体の作製に成功した。DDS 製剤において重要な血管外漏出と腫瘍内浸透性は Isotype が IgM よりも IgG の方が優れていることが知られているため、性状解析には IgG である 7 種類の抗体（clone A~G）を用いた。それらの抗体は ELISA の結果、clone 102-10 より高い親和性を有していた（図 4）。また、SPR 解析でも ELISA と同様の結果が得られた。ELISA とは異なる条件で不溶性フィブリンに反応することを示すためにフィブリン塊を用いて免疫染色を行った結果、全ての新規抗体がフィブリン塊に反応することが確認できた。以上の実験から、不溶性フィブリンに反応することが示されているため、組織において染まったところにフィブリンが沈着しているという考えのもと膵臓がんモデルマウスの原発巣と正常マウスの膵臓を用いて免疫組織染色を行った。抗不溶性フィブリン抗体は膵臓がんのがん間質を染めることができ、正常の膵臓は染まらなかったことから、がん間質にフィブリンが沈着しているということと抗不溶性フィブリン抗体の特異性を確認することができた（図 5）。

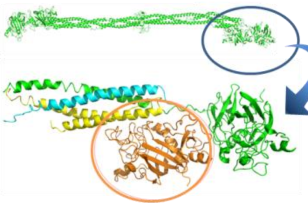

図3: 免疫原として作製したリコンビナントタンパク質(下図の丸で示した領域)

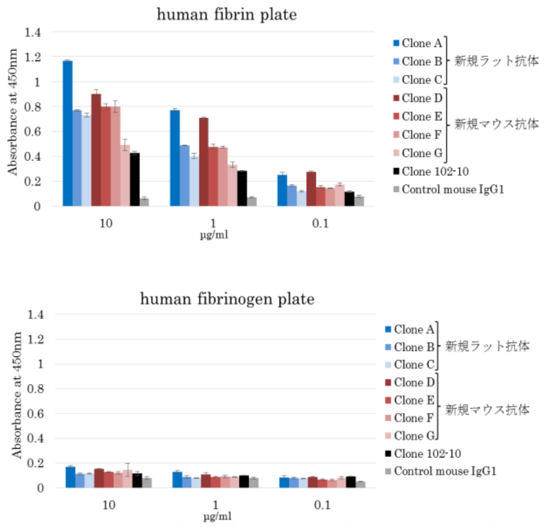

図4: ELISAによる抗体の親和性の比較(N=3, means±SD)

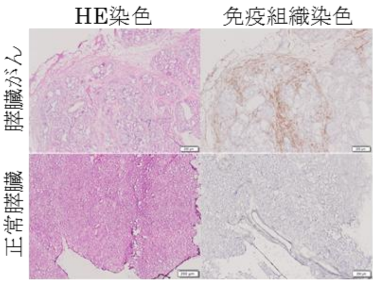

図5. 免疫組織染色

続いて、*in vivo* での性状解析を行った。膵臓がんモデルマウス由来の膵臓がん細胞株を用いて皮下移植モデルを作製し、*in vivo* imaging を行った結果、clone A, E, G の血中滞留性および腫瘍への集積性は clone 102-10 より高いことが確認できた。また、*in vivo* imaging 後に腫瘍を摘出し、免疫染色を行った結果、投与した抗不溶性フィブリン抗体の局在とがん間質に存在する不溶性フィブリンの局在が一致していたため、投与した抗体はがん間質部の不溶性フィブリンに結合していることが示された。抗体の生体内分布と腫瘍への集積を定量するために膵臓がんモデルマウスを用いて *ex vivo* imaging を行った。その結果、clone A, E は clone 102-10 より腫瘍集積性が高いことが明らかになった（図 6）。*in vivo* での性状解析により clone A, E は clone 102-10 より血中滞留性と腫瘍集積性が高いことを確認することができた。

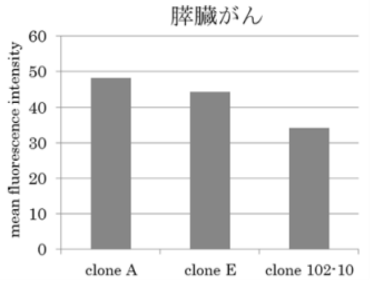

図6. *ex vivo* imagingによる抗体の評価(N=2)

【結論】

本研究により、不溶性フィブリンを標的とした抗体作りの基盤が確立した。short peptide を免疫することで効率良く抗不溶性フィブリン抗体が取得でき、*in vitro* と *in vivo* での評価により clone A, E という clone 102-10 より親和性と腫瘍集積性が高い抗体の取得に成功した。今回取得した抗体または将来本研究のような手法で取得できた抗体が臨床応用され、がんの診断及び治療に貢献することを願っている。