

審査の結果の要旨

論文題目 新規肝細胞癌抗原に対するモノクローナル抗体の作製と解析

氏名 伊藤 浩孝

DNA マイクロアレイを用いた肝細胞癌の網羅的な遺伝子発現解析により新規の肝細胞癌抗原候補を同定すること、そしてその候補分子のモノクローナル抗体を作製し、抗体医薬品の標的抗原としての可能性、及び診断マーカーとしての可能性を評価することを目的として本研究は実施された。

本研究において GeneChipU95 を用いた肝細胞癌の解析により、ROBO1 mRNA が発現亢進していることが明らかとなった。そして、臨床検体の非癌部、癌部のペア検体 8 例の定量的 PCR により、ROBO1 が全例で 2 倍以上のレベルで発現亢進していることが明らかとなった。ROBO1 は胎児肝臓などで顕著な発現を示すが、その他の正常組織では脳内の神経系組織に若干発現が認められる程度であることから、肝細胞癌での発現亢進の特異性が高い ROBO1 に着目した研究が展開された。

ROBO1 はショウジョウハエの遺伝的スクリーニング研究において、軸策の正中交差を制御する分子としてクローニングされ、Slit タンパクの受容体であることが報告されている (Kidd ら、Cell, 92, 205-215, 1998、Wang ら、Cell, 96, 771-784, 1999、Kidd ら、Cell, 96, 785-794, 1999、Brose ら、96, 795-806, 1999)。また、別の知見として、ROBO1 遺伝子が肺癌の癌抑制遺伝子の存在する染色体領域 3p12 に位置し、肺癌、乳癌においてそのプロモーター領域のメチル化により発現抑制されていること (Dallol ら、Oncogene, 21, 3020-3028, 2000) そして ROBO1 遺伝子ヘテロ欠損マウスの解析において、コントロールと比較し癌の発生率が 3 倍増加するという事などから、ROBO1 が癌抑制遺伝子候補と現在は考えられている (Xian ら、Cancer Research, 64, 6432, 2004) (ホモ欠損マウスは胎生致死、または 1 年以内に肺気管形成不全で死亡)。そのため、ROBO1 は癌組織において発現抑制されているとこれまで考えられているが、ROBO1 の癌における発現亢進の報告は本研究が最初のものである。

はじめに ROBO1 に対するモノクローナル抗体の作製を、gp64 結合型抗原と gp64 発現トランスジェニックマウスに免疫する方法、及び可溶型 sROBO1-His と自己免疫疾患マウス MRL/lpr マウスに免疫する方法等のさまざまな免疫方法を実施し、数種の抗 ROBO1 モノクローナル抗体を作製した。

そして、その抗 ROBO1 モノクローナル抗体の一つを用いた免疫組織染色により、ROBO1 がタンパクレベルにおいても肝細胞癌で発現亢進していることを証明した。44 例中 27 例に

において発現亢進し、陽性率は 61.4%であった。ROBO1 は肝細胞癌に限局し、特に低分化型肝細胞癌の細胞膜が特異的に染色されたことから、抗体医薬品の標的分子としてのポテンシャルを ROBO1 が有することが明らかとなった。

さらに、ROBO1 の立体構造を認識する FACS 解析陽性の抗 ROBO1 モノクローナル抗体により、ROBO1 発現 HEK293 細胞のみならず肝癌細胞株 Alexander に対しても、*in vitro* の補体依存性細胞障害活性（CDC 活性）を有することが明らかとなった。また、同抗体により、ROBO1 発現 HEK293 細胞に対して、抗体依存性細胞障害活性（ADCC 活性）を有することが明らかとなった。

また、本研究にて、ROBO1 の N 末端領域（エクドメイン）が shedding され、肝癌細胞株である Alexander、HepG2、HuH6、及び HuH7 において、可溶性 ROBO1 が培養上清中にリリースされることが明らかとなった。さらに、ウエスタンブロット解析により、可溶性 ROBO1 は肝炎、肝硬変患者血清中には認められなかったが、肝細胞癌患者剖検血清中には 24 例中 23 例において検出されることが明らかとなった。可溶性 ROBO1 がヒト生体内で存在することがはじめて証明することに成功した。

本研究にて、ROBO1 を標的とした抗 ROBO1 モノクローナル抗体による肝細胞癌の治療の可能性、及び可溶性 ROBO1 を指標とした肝細胞癌の血清診断の可能性を示すことに成功した。

よって本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。