

論文の内容の要旨

論文題目 胃癌反応性ヒトモノクローナル抗体の樹立とターゲティング療法への応用

氏 名 平川 容子

癌の治療成績は、集学的治療の進歩により向上しつつあるが、特に進行癌では未だに満足できる成績とは言えず、癌化学療法においては依然として副作用回避、薬剤耐性の克服が課題である。そこで抗癌剤をより効率的に癌細胞に集中させることにより効果を高めることを目指して癌反応性ヒトモノクローナル抗体を樹立し、認識抗原の解析を行い、さらに抗体を表面に結合させた抗癌物質封入リポソームを作製して抗腫瘍効果を検討した。

癌ターゲティング療法に用いられる抗体に求められる特性として、(1) ヒトモノクローナル抗体であること、(2) 生きた癌細胞の表面に反応すること、(3) 癌特異性、陽性率が共に高く従来の抗癌抗体とは異なる反応性を示すこと、(4) 標的癌細胞の中に取り込まれること、が挙げられる。

ヒトモノクローナル抗体の作製方法としては、癌患者の血中に自己の癌に反応する抗体が存在していることに着目し、癌患者の所属リンパ節から得られたリンパ球とマウスミエローマ細胞 P3U1 と融合するハイブリドーマ法を用いた。クローンの選択は、初めに固定化した各種癌細胞株、次に臨床の癌、正常組織から調製した生細胞の表面に対する反応性を指標に行った。さらに組織切片に対する反応性を確認し、最終的に大腸癌患者の所属リンパ節細胞からヒトモノクローナル抗体 GAH (サブクラス IgG1) を樹立した。生癌細胞への反応性は、細胞に GAH の FITC 標識体を抗体結合がほぼ飽和する濃度 (50 μ g/ml) で添加してフローサイトメトリーで解析し、生細胞 1 個当たりの抗体結合数を算出し、その値を細胞表面の GAH 結合サイト数と見なして各細胞間で比較した。その結果、癌細胞においては 1×10^5 / 細胞以上で、胃癌、大腸癌で高く、中でもスキルス胃癌では 10^6 オーダーであった。一方で各種正常細胞では約 3×10^4 程度であり陰性コントロール抗体の場合とはほぼ同程度であった。組織切片染色では、GAH は胃癌、大腸癌、乳癌に対して反応性を示し、特に胃癌では 93% (14 例中 13 例) という高い陽

性率を示した。一方で肺癌、及び各種の正常組織に対しては反応性を示さなかった。また、抗体結合リポソームによるターゲティング療法においては、抗体が標的細胞内に取り込まれる性質であることが重要であるが、GAH についても胃癌細胞株 MKN45、B37 に結合後、37°C 1 時間で細胞内に取り込まれる様子が観察された。以上、ヒトモノクローナル抗体 GAH は癌ターゲティング療法に用いる抗体として必要な特性を備えていることが示された。

GAH 結合抗癌剤封入リポソーム、MCC-465 (以下 ILD) は、抗癌剤ドキシソルピシン (DXR) をジパルミトイルフォスファチジルコリン (DPPC) を主とした混合脂質で作製したりポソーム内に封入し、リポソーム表面に GAH の F(ab)₂ 断片、及びリポソームの血中滞留性を上げるために分子量 5000 の 2 本鎖のポリエチレングリコール (PEG) を順次結合させて作製した。抗体を結合していない PEG リポソーム (以下 LD) は、抗体結合ステップのみを除いて作製した。ILD の標的細胞への反応性、及び挙動を調べるために、脂質親和性の蛍光色素 PKH2 でリポソームを蛍光標識し、共焦点顕微鏡で観察した。ヒト胃癌細胞株 B37 に添加して 4°C 1 時間反応させた後、37°C でさらにインキュベートして経時変化を観察した結果、37°C 1 時間で ILD の細胞内への取り込みが認められたが、LD では細胞への結合が殆ど認められなかった。また取り込まれた ILD は数時間から 18 時間では核の周辺に集積している様子が認められ、24 時間後では核内で DXR の赤色蛍光が検出された。

ILD の *in vivo* での抗腫瘍効果は、胃癌細胞株 B37 のヌードマウス腎皮膜下移植モデルで検討した。投与量は DXR として最大耐用量にほぼ匹敵する 3 mg/kg とし、フリーの DXR、LD、ILD を、移植翌日から 1 週間間隔で 3 回投与し、22 日目に腫瘍サイズを測定した。その結果、フリーの DXR、及び LD では効果が認められなかったが、ILD は顕著な抗腫瘍効果を示した。

GAH が認識する癌細胞表面抗原の解析については、GAH がフローサイトメトリー解析において、培養細胞よりもその皮下移植腫瘍から調製した細胞の表面に強く反応する特性を持っていたため、細胞表面抗原量が多い MKN45 の皮下移植細胞 (以下 MKN45sc) を抗原精製の材料として用いた。細胞抽出液の SDS-PAGE ウェスタンブロット解析では特異的な抗体結合が検出されなかったことから、抗原活性は SDS 処理に感受性であると予想されたため、抗原の精製は出来る限り緩和な条件で行った。先ず MKN45sc の粗膜画分を調製し、デオキシコール酸で可溶化した上清を Q-セファロース HP で分画後、GAH によるドットプロットアッセイ法で抗原活性を検出した。その結果、抗原活性は 1M NaCl で溶出した後の 8M 尿素による溶出画分に多く含まれていた。この画分は 200kDa の蛋白質を主に含んでおり、アミノ酸配列を解析した結果、ヒト非筋肉型ミオシン IIA 重鎖 (推定分子量 227 kDa、以下 nmMHCA) の部分配列と一致した。GAH の nmMHCA への反応は尿素などの変性剤を含まない条件でも確認した。即ち nmMHCA の強制発現細胞を作製し、その NP-40 による可溶化上清を、GAH、および陰性コントロール抗体で免疫沈降して市販の抗 nmMHC ウサギポリクローナル抗体 (BT-561) で検出した。その結果、GAH は nmMHCA を特異的に免疫沈降することが確認された。

nmMHCA は細胞骨格蛋白質の一種で通常細胞内に存在するが、GAH が細胞表面で nmMHCA を認識するならば、少なくともその一部は細胞表面に露出していると考えられる。そこで MKN45 の培養細胞 (以下 MKN45cul) と MKN45sc の表面をビオチン標識し、GAH による免疫沈降物を HRP 標識アビジンで検出した。その結果、MKN45sc を免疫沈降した場合のみ 200kDa の主要な成分が検出され、MKN45cul では殆ど検出されなかった。アミノ酸配列

解析の結果、この 200kDa 蛋白質についても nmMHCA と一致した。また、この免疫沈降物を BT-561 で染色すると、MKN45sc のみならず MKN45cul においても 200kDa 蛋白質が検出された。この結果から、nmMHCA は両方の細胞に存在するが、MKN45sc では細胞表面に露出していることが示唆され、フローサイトメトリー解析で認められた両細胞の反応性の違いが説明できる。しかしながら GAH が nmMHCA そのものではなく、nmMHCA を含む複合体を認識している可能性も考えられるため、ビオチン標識免疫沈降で認められた 200kDa 以外についてもアミノ酸配列を行った。その結果、2 本は nmMHCA、1 本は β -アクチンの配列と一致した。 β -アクチンに関しては市販の標準品に対する反応をドットプロットアッセイ法で調べたが、GAH は反応しなかった。

さらに nmMHCA の細胞表面への露出を検証するために、BT-561 の細胞表面への反応性をフローサイトメトリーで解析した。しかし MKN45cul、MKN45sc いずれに対しても反応が認められなかった。そこで、nmMHCA のペプチド抗体、すなわちアミノ酸番号 631-640、852-861、及び C 末端である 1951-1960 に対するウサギポリクローナル抗体を作成して反応性を調べた結果、いずれも MKN45cul に対してよりも MKN45sc に高い反応性を示し、特に C 末端を認識する抗体においてその傾向が強かった。従って、BT-561 の認識エピトープとは異なる部位、主に C 末端が MKN45sc の表面に露出している可能性が示唆された。

以上、GAH は何らかの機序により細胞表面に露出した nmMHCA を認識していることが示された。癌抗原とは無関係と思われる細胞骨格蛋白質が、それ自体、あるいは何らかの酵素による分解物の形で癌細胞表面抗原となっている例がこれまで幾つか報告されているが、nmMHCA が癌細胞表面抗原となる可能性が示されたのは今回が初めてである。

<総括>

大腸癌患者の所属リンパ節細胞を用いてヒトモノクローナル抗体 GAH を樹立した。GAH は胃癌、大腸癌、乳癌に高い反応性を示し、特に胃癌に対してはほぼ全例に反応したが、検討を加えた限りでは正常組織には反応しなかった。GAH の認識抗原は、癌細胞表面に露出したヒト非筋肉型ミオシン IIA 重鎖であることが強く示唆された。また GAH を DXR 封入リポソーム表面に結合させた MCC-465 は、GAH 反応性の癌を移植したモデルにおいて、DXR の効果が認められない細胞に対しても高い抗腫瘍効果を示したことから、副作用軽減、薬剤耐性回避を可能にするターゲティング療法として有用であると考えられる。