

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 平 川 容 子

「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」と題する本研究では、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、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結果、及びこのモノクローナル抗体が認識する抗原を同定した結果が述べられている。

第1章では抗体の開発と、これを利用した癌ターゲティング療法の試みが主に述べられている。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基き、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 と融合する方法が用いられた。クローンの選択は、固定化した癌細胞株への結合、癌組織から調製した細胞への結合、癌組織切片中の癌細胞に対する結合を指標とした。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(サブクラス IgG1)が樹立され、GAH と名付けられた。細胞への反応性は、胃癌、大腸癌で高く、得られる限りの多くの正常細胞では低く、陰性コントロール抗体の場合とほぼ同程度であった。組織染色でも、このモノクローナル抗体は胃癌、大腸癌、乳癌に対して高い反応性、高い陽性率を示した。一方、肺癌に対しては反応性を示した例が見られなかった。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と考え、この性質があるかを胃癌細胞株に結合後、37°C 1 時間保温すると、高率に細胞内に取り込まれる様子が観察された。従って、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。

このモノクローナル抗体を結合した抗癌剤封入リポソームを作製して、その効果を *in vitro* で癌細胞を用いて、また *in vivo* でヌードマウスを用いて検証した結果が次に述べられている。このリポソーム製剤(ILD)は、抗癌剤ドキソルビシンをジパルミトイルフォスファチジルコリンを主とした混合脂質で作製したリポソーム内に封入し、リポソーム表面にモノクローナル抗体 GAH の F(ab')<sub>2</sub> 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を結合させて作製した。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、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 でさらに保温して経時変化を共焦点顕微鏡で観察した。37°C 1 時間で ILD の細胞内への取り込みが認められたが、モノクローナル抗体 GAH の F(ab')<sub>2</sub> 断片を持たないコントロールリポソームでは細胞への結合や取り込みが殆ど見られなかった。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。投与量はドキソルビシンとして最大耐用量にほぼ匹敵する 3 mg/kg とし、リポソームに封入していないドキソルビシン、抗体を持たないコントロールリポソームに封入したドキソルビシン、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、ILDのみが顕著な抗腫瘍効果を示した。

第2章ではモノクローナル抗体 GAH が認識する癌細胞表面抗原を、解析し同定した結果が述べられている。培養細胞よりもヌードマウスにおける皮下移植腫瘍から調製した細胞にこのモノクローナル抗体が強く結合する特性を持っていたため、胃癌細胞株を皮下移植して増殖させた腫瘍塊を材料として抗原の精製が試みられた。また、抗原エピトープは SDS に感受性であると予想されたため、緩和な条件で古典的なクロマトグラフィーによる精製が試みられた。抗原を含む画分は 200kDa の蛋白質を主に含んでおり、そのアミノ酸配列を解析した結果、ヒト非筋肉型ミオシン IIA 重鎖の部分配列と一致した。この分子の遺伝子は既にクローニングされていたので、強制発現細胞を作製し、その可溶化上清を、モノクローナル抗体 GAH 又は陰性コントロール抗体で免疫沈降して市販の抗ヒト非筋肉型ミオシン IIA 重鎖ウサギポリクローナル抗体で検出した。その結果、GAH がこのタンパク質を特異的に免疫沈降することが確認された。このタンパク質は細胞骨格蛋白質であり通常細胞内に存在するが、癌細胞ではその一部が表面に露出していると考えられたので、MKN45 胃癌細胞の表面をビオチン標識し、モノクローナル抗体 GAH による免疫沈降物をペルオキシダーゼ標識アビジンで検出した。その結果、*in vivo* で増殖した胃癌細胞ではこの分子が表面に露出していることが確かめられた。さらにヒト非筋肉型ミオシン IIA 重鎖が癌細胞表面に露出していることを検証するために、抗ヒト非筋肉型ミオシン IIA 重鎖ウサギポリクローナル抗体の胃癌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が反応が認められなかった。そこで、非筋肉型ミオシン IIA 重鎖の部分ペプチド配列に対する抗体、すなわちアミノ酸番号 631-640、852-861、及び 1951-1960 (C 末端) 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。その結果、いずれも *in vivo* で増殖した MKN45 細胞に対して高い結合性を示し、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ので、C 末端がこの胃癌細胞の表面に露出していると考えられた。癌抗原とは無関係と思われる細胞骨格蛋白質が癌細胞表面抗原となっている例は報告があるが、非筋肉型ミオシン IIA 重鎖が癌細胞表面抗原となる可能性が示された初めての例である。

以上のように学位申請者は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を樹立し、ドキソルビシン封入リポソームを用いたターゲティングに有効であることを示した。このモノクローナル抗体は癌細胞表面に露出したヒト非筋肉型ミオシン IIA 重鎖を認識することが強く示唆された。本研究で用いられたヒトモノクローナル抗体取得の方法はユニークであり、またそのエピトープは従来知られていなかった癌抗原と考えられる。さらに、本研究成果は癌の化学療法における副作用軽減、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。よって本研究を遂行した平川容子は博士(薬学)の学位を取得するに値すると判断した。