

論文内容の要旨

論文題目 抗エピレギュリン (epiregulin) 抗体を標識プローブとした大腸癌担癌マウスのイメージング及び腫瘍集積性の評価

指導教員 小池和彦教授

東京大学大学院医学研究科

平成 18 年 4 月入(進)学

医学博士課程

氏名 井上博睦

エピレギュリン (epiregulin) は 50 個程度のアミノ酸からなる増殖因子で、EGF (epidermal growth factor) ファミリーの一員である。epiregulin は大腸癌、膵臓癌などの癌でその発現が亢進するものの、正常組織においては発現が抑制されていることが知られ、治療の標的として有用性が高い。国立国際医療センターにて作成された epiregulin をノックアウトしたマウスを提供してもらい、これに抗原を免疫させ、得られた脾臓細胞とミエローマ細胞を融合させて作成したハイブリドーマを培養して得た抗体のうち、細胞膜に表出した epiregulin を認識する抗体 (9E5、6E2) を選別すると、発現が高い大腸癌細胞株である DLD-1 に対し、

フローサイトメトリーにて解析した結果、濃度依存性に反応することが示された。また DLD-1 を抗体で細胞染色すると、細胞表面が均一に染色されることが示された。この DLD-1 を 5 週令程度の低免疫性マウス (BALB/cAJc1-nu/nu) に 5×10^6 個皮下移植すると数週間には肉眼的に確認できる腫瘍が形成された。この担癌マウスを使用し、作成された抗体が腫瘍内に集積するか、また投与後に集積が経時的に変化するのか、及びマウス体内の腫瘍以外の臓器への集積について調べることにした。この目的の評価のため抗体をラジオアイソトープにて標識し、その発する放射能を測定することにより行うことにした。抗体を使用する核種 (^{64}Cu , ^{67}Ga) にて標識するためにキレート剤である DOTA を抗体に付加させる (DOTA 化抗体) が、DOTA 化抗体は付加前の抗体 (intact 抗体) に比べて活性が低下するものの、適切なモル比で DOTA を導入すると、活性を保持できることが分かった。またこの DOTA 化抗体を良好に標識でき、標識により抗体の活性には変化ないことが示された。 ^{67}Ga 標識抗体をマウス体内へと投与することで腫瘍集積性をみた実験では、集積は投与 1 日目、2 日目、及び 3 日目とその集積は漸増してゆき、腫瘍組織には投与全体の放射能のうち、腫瘍組織重量 (g) あたり 10 数%の集積 (% injected dose/gram) が認められた。抗体の活性を低下させた場合、また抗原を発現していない細胞株 (Huh-7) で腫瘍を作った場合、いずれにおいてもその集積は 1/2 以下に低下した。また非標識抗体を標識抗

抗体投与に先立ち投与すると、標識抗体の腫瘍への集積は阻害され、低い値となった。これらのことから集積には抗体と抗原の特異的な反応が関与していることが示された。本抗体をさらに PET(positron emission tomography)核種で標識し、投与したマウスを投与後 1、2、及び 3 日後と撮像したところ、腫瘍は投与翌日から良好に描出されることが示された。同じように腫瘍を形成させたマウスを作り、活性が低下した抗体を標識して撮像を行った場合では、腫瘍の描出は不良であった。一方で腫瘍以外に肝臓が描出され、この傾向は観察期間内で著変は認めず、また血液貯留部位の集積も観察期間内で高度であり、これらの結果は抗体が血中に安定に存在することと、抗体が肝臓をはじめとした組織に非特異的に集積する現象を反映したものであると思われた。撮像終了後 (すなわち 3 日目) にマウスから腫瘍の他、脳、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、胃、膵臓、小腸、大腸、筋肉、骨と摘出し、その重量と放射能カウントを測定して得た摂取率 (%ID/g) は、腫瘍において最も高く、この得られた結果は前述した ^{67}Ga 標識抗体投与により得た値と同じ程度の結果が得られた。また PET 画像で確認できた肝臓や血液の値も腫瘍に次いで高く、画像から得た知見を反映したものであると思われた。その一方でそのほかの臓器への集積は概して低く、血液/組織比をとると肝臓以外の臓器においては 0.5 以下となった。このことは、抗体を投与した場合、肝臓以外の臓器においては非特異的に集積することでその臓器障害が極

めて懸念される状況にはない可能性が高いことを示唆する。PET 画像より解析して得た血液、肝臓、及び腫瘍への%ID/g の推移を評価する実験を行った。結果、腫瘍においては投与翌日、2 日目、3 日目で漸増し、これは ^{67}Ga 標識抗体による実験の結果と矛盾ないものであった。また 3 日目の腫瘍の組織重量あたりの%ID/g は、撮像終了後の解剖より得た結果と殆ど同じ値を示したことから、PET 画像解析手法の有用性も確かめられた。抗体の活性を低下させた場合の PET 画像解析では、腫瘍への取り込みは低いもので、腫瘍を描出できなかった画像の結果を裏付けることとなった。

PET が臨床において病変部位の検索、同定に有用であることは既に疑いないが、一方で現在使用されている PET probe (^{18}F FDG) は、腫瘍によっては取り込みの程度が不良であったり、炎症性病変に対する集積 (偽陽性) 、さらには癌の種類による特異性をみることはできないなどの欠点がある。さらに精度の高い probe の作成は臨床においてさらに期待の高まる場所であり、上記の弱点を克服する意味で抗原と特異的に反応する抗体の性質を利用した probe 開発は合理的であるといえる。実際既にいくつかの抗体や抗体改変物質を probe とした新たな PET (immuno-PET) が応用され始めている。さらに別の観点からいえば、抗体は分子標的治療の先駆的存在であり、その治療における立場は悪性リンパ腫などの血液疾患において揺るぎのないものである。そして固形腫瘍においても治

療現場に登場してきている。今後この傾向に変わりなく、さらに有用性を高める挑戦は加速するであろう。その意味でも抗体の腫瘍への集積性を可視的に評価することのできる PET イメージングはその重要性は高まる一方である。上記の結果から本研究で用いた抗体が、将来 PET プローブとして、また治療手段として有用性が高い可能性を示唆され、epiregulin を標識した抗体による類似の研究報告がなく、重要性が高いと思われ報告する。結論として、抗 epiregulin 抗体を PET プローブとして利用可能な標識抗体とすることに成功した。また PET 核種である ^{64}Cu にて標識した抗体を投与した場合、DLD-1 にて腫瘍を形成すると腫瘍は投与翌日から良好に描出され、集積は投与後 3 日の観察期間で漸増することが分かった。このことは本抗体が治療、検査両面において、今後開発を進めてゆく有用性が高いことを示している。