

審査の結果の要旨

氏名 井上博睦

本研究は EGF (epidermal growth factor)ファミリーの一員であり、大腸癌、膵臓癌などで発現が亢進するエピレギュリン(epiregulin) をノックアウトマウスに epiregulin 抗原を免疫して得られたマウスモノクローナル抗体を使用し、その性質を特徴づけた後、腫瘍への集積性を評価する手段としてイメージングを行った。またイメージングに用いるために抗体を標識するための適切な方法を開発した。

- 1 本研究で使用した epiregulin に対する 2 種類の抗体 (9E5, 6E2) はいずれも epiregulin 内の EGF ドメインに結合部位を有していた。また、FACS にて epiregulin 強制発現株の他、内在性に発現が亢進している大腸癌細胞株 DLD-1 においても FACS で陽性となることから、本抗体が細胞表面に表出した epiregulin に対して結合性が有していることが示された。この結果から膜型の epiregulin に対して結合性を有していることから以下に示す DLD-1 を免疫不全マウスに移植して得た腫瘍組織への集積性が期待される結果となった。尚、epiregulin を発現していない肝細胞癌細胞株 Huh-7 では、FACS において陰性であることが示された。
- 2 抗体を標識プローブとして使用するため、キレート剤である DOTA を導入した。抗体に対して導入する DOTA のモル比を高めてゆくと、DOTA を結合させた抗体の活性が低下することがわかり、DOTA を過剰に加えると有用な標識プローブとならない可能性が考えられた。9E5 抗体においては、抗体 1 に対して DOTA を 10 で加えた場合、導入前に比べて抗体の活性が低下するものの、抗体の活性が維持されることから、標識プローブとして利用可能であることが示された。一方 6E2 抗体では、DOTA を導入すると活性が著しく低下することより、本抗体を標識プローブとして使用することは不適切と考えられた。
- 3 上述の条件で DOTA 化した抗体を ⁶⁷Ga にて標識して作成した標識抗体を腫瘍を移植したマウスに投与し、経時的に腫瘍を摘出して腫瘍組織内の線量を計測することで腫瘍集積性を評価した。その結果、⁶⁷Ga 標識 9E5 抗体を投与した場合、大腸癌細胞株 DLD-1 を移植したマウスにおいては、投与後翌日より腫瘍への抗体の集積性が認められ、これは経時的に 3 日までの観察において漸増した。一方、DOTA 化により活性が著しく低下する 6E2 抗体を ⁶⁷Ga 標識したところ、その集積性は低く、また経時的にも殆ど変化は認められなかった。また epiregulin の発現のない Huh-7 を移植した場合は DLD-1 を移植した場合に比べ、投与 3 日後の腫瘍集積は低い状態であった。加えて、非標識 9E5 抗体を前投与すると ⁶⁷Ga 標識 9E5 抗体の集積は阻害されることがわかった。これらの結果より、腫瘍への集積には、抗体の活性と抗原の発現が関与していることが示された。
- 4 動物用 PET (positron emission tomography) を用いて、担癌マウスに標識抗体を投与してイメージングを行った。PET 核種である ⁶⁴Cu 標識 9E5 抗体を DLD-1 を移植した

マウスへ投与して、投与後 1 日目、2 日目、及び 3 日目と PET にてイメージングしたところ、投与翌日より腫瘍は良好に描出された。一方肝臓も集積が認められ、肝臓への非特異的な集積や、血液中に長期間安定に存在する標識抗体の影響が考えられた。対して ^{64}Cu 標識 6E2 抗体を投与した場合、腫瘍への集積は低かった。抗体の活性は腫瘍描出に影響していることが示された。

- 5 イメージング終了後、マウスを安楽死して腫瘍の他、主要な臓器を摘出してその放射能カウントを測定することで、体内への標識抗体の分布を評価した。その結果腫瘍への集積が最も良好であった。また集積の程度は ^{67}Ga 標識抗体で得られた結果と大きな相違はなかった。一方肝臓や血液における集積も高くより有効な標識プローブとするためにバックグラウンドを下げるための検討が今後の課題と思われた。

以上、本研究では **epiregulin** に対するモノクローナル抗体でキレート剤 DOTA を介して標識プローブを作成し、これを用いて腫瘍を良好にイメージングすることに成功した。このことは今後の大腸癌の検査、治療において本研究内で使用した抗体が高い有用性を持つことを証明しており、学位の授与に値するものと考えられる。