

## 審査の結果の要旨

氏名 丹羽 俊輔

本研究は、PET/RIT 法による肺扁平上皮癌の診断・治療法の開発に向け、肺扁平上皮癌の治療用抗体のリードとなる特異性・有用性の高い抗 hGPR87 マウスモノクローナル抗体の作製、及び、作製した抗体の体外イメージングへの有用性の検討を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 系統的マイクロアレイ解析の結果、GPCR の一つと推定される GPR87 が肺扁平上皮癌で高発現していた。この知見に基づき、抗 hGPR87 モノクローナル抗体の作製を試みた。hGPR87 stable CHO 細胞株を樹立して、hGPR87 stable CHO 細胞を用いたフローサイトメトリーにより、hGPR87 特異的抗体をスクリーニングする系を確立するとともに、免疫寛容回避のために hGPR87 ノックアウトマウスを用いて、DNA 免疫(ジーン癌免疫)と細胞免疫で免疫することで、6 種類のモノクローナル抗体(C0804, C0812, C0815, C0806, C0807, C0814)の作製に成功した。
2. 作製した抗 hGPR87 モノクローナル抗体の評価を行った。抗体のアイソタイプを行った結果、作製抗体 6 種の全てで、重鎖のサブクラスが IgG1 で、軽鎖が  $\kappa$  鎖であった。エピトープ解析の結果、作製抗体 6 種は、いずれも、hGPR87 全長中、N 末端側 9~23 番目の領域を認識することが分かった。作製抗体 6 種は、いずれも、マウスとの交差性を有さないこと、ADCC 活性を有することが示された。その他、作製抗体 C0804, C0812, C0815 の CDR の DNA 塩基配列を決定した。
3. 系統的マイクロアレイ解析では、子宮頸癌培養細胞株である Me180 細胞で hGPR87 が内在性に高発現していた。そこで、作製抗体 C0804, C0812, C0815 を一次抗体に用いて、hGPR87 をノックダウンしていない Me180 細胞とノックダウンした Me180 細胞のフローサイトメトリーを行った。その結果、hGPR87 をノックダウンしていない Me180 細胞では、抗体濃度依存的なスペクトルのシフトが検出されたのに対し、hGPR87 をノックダウンした Me180 細胞を用いるとスペクトルのシフトが減少した。これより、作製抗体 C0804, C0812, C0815 は、子宮頸癌培養細胞株 Me180 細胞の細胞膜上に内在性に存在する hGPR87 を特異的に認識することが示

された。

4. 作製抗体 C0804 を用いて、癌組織の免疫組織染色を試みた結果、扁平上皮癌及び移行上皮癌で癌細胞に陽性所見が認められ、各扁平上皮癌、移行上皮癌など、発生頻度の高い広範な癌の病理組織診断に対する作製抗体 C0804 の有用性が示唆された。

5. 大腸腺癌培養細胞株 DLD1 を hGPR87 発現の少ない細胞、子宮頸癌培養細胞株 Me180 を hGPR87 発現細胞として、免疫不全マウスの左肩部に DLD1 細胞、右肩部に Me180 細胞を移植し、DLD1/Me180 担癌モデルマウスを作製した。この DLD1/Me180 担癌モデルマウスに、<sup>64</sup>Cu 標識化 C0804 を投与し、microPET で撮像した。その結果、いずれの個体でも、心プール集積は <sup>64</sup>Cu 標識化 C0804 投与後 24 時間から 72 時間で減少し、肝集積は投与後 24 時間と 72 時間でほぼ同等であったのに対し、Me180 移植部では、DLD1 移植部と比較して投与後 72 時間に高い集積が認められ、Me180 移植部への特異的集積が示された。

以上、本論文では、系統的マイクロアレイ解析において扁平上皮癌などで発現亢進していた hGPR87 に対する高親和性マウスモノクローナル抗体 C0804 の作製に成功した。また、担癌モデルマウスに <sup>64</sup>Cu 標識化 C0804 を投与して PET 撮像した結果、癌部に高い集積を認めた。作製抗体 C0804 は、扁平上皮癌に対する PET 診断のリード抗体となる可能性を有するものであり、PET/RIT 法による肺扁平上皮癌の診断・治療法の開発に貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。