

Title	抗 α -フェトプロテインモノクローナル抗体をキャリアとするターゲティングDDSに関する研究
Author(s)	益田, 和義
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/39277
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	益 田 和 義
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 1 1 6 7 1 号
学位授与年月日	平成 7 年 2 月 6 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	抗 α -フェトプロテインモノクローナル抗体をキャリアとする ターゲティング DDS に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 眞弓 忠範 (副査) 教授 馬場 道明 教授 三村 務 教授 西原 力

論 文 内 容 の 要 旨

肝癌細胞表面に存在するが、血中にも遊離する性質を有する α -フェトプロテイン (AFP) を標的抗原とする、抗 AFP モノクローナル抗体 (MoAb) をキャリアとするターゲティング DDS の可能性について検討した。

まず、ターゲティング用キャリアとして適切な抗体の検索を行い、得られた MoAb 80G の基本的な性質を調べた。分泌性タンパクである AFP を標的抗原とする場合のキャリアとしては、遊離 AFP よりも細胞表在性 AFP に対してより反応性の高い抗体が望ましい。このような観点から著者は、新規の性質を有する抗 AFP MoAb として 80G を見出した。本抗体の細胞表在性 AFP への結合は、遊離の AFP による阻害を極めて受けにくく、AFP 産生肝癌細胞を効率よくターゲティングするキャリアとして期待された。抗 AFP 抗体の ADCC 活性に関する報告はこれまでにないが、80G は *in vitro* において本活性を示すことが明らかになった。しかしながらこの作用は弱く、*in vivo* ノードマウス系による治療実験の結果、80G 単独投与では抗腫瘍効果がなかった。80G は、AFP 産生 HuH-7N 細胞を移植したノードマウスの血中遊離 AFP と格子構造をとらない免疫複合体 (500 kDa) を形成し、長時間血中に滞留した。これは、見かけ上の血清 AFP 濃度上昇の原因となった。興味深いことに、この免疫複合体は固相 AFP に対する結合活性を維持していた。この結果より、免疫ターゲティング療法の効果判定の際に血清 AFP 濃度を指標とする場合には、注意が必要であることがわかった。つぎに、80G のターゲティング用キャリアとしての有用性を確認するために、担癌ノードマウスにおける同抗体の組織移行性を評価した。80G の AFP 産生 HuH-7N 細胞への取り込みクリアランスは、コントロール群に比較し約 2 倍大きく、本抗体がアクティブターゲティング用キャリアとしての機能を有する可能性が示唆された。しかしながらその F(ab)₂ フラグメントは、HuH-7N 細胞へのアクティブな取り込みが起らなかった。ただし、肝臓および脾臓への取り込みクリアランスは極めて小さく、細網内皮系から回避する傾向が見られた。

次に、80G が AFP 産生肝癌細胞へのターゲティング用キャリアとして実際に適しているか否かを評価する目的で、本抗体をキャリアとするイムノトキシンを作製した。モデルトキシンとしては、単独では細胞内に入ることができず、細胞外では毒性を示さないタイプ 1 リボソーム不活性化タンパクの一種である gelonin (GL) を用いた。80G あるいは

はその F(ab')₂ フラグメントと GL から成る イムノトキシンを 5 種類合成した。Sephacryl S-200 によるゲルろ過および Blue Sepharose CL-6B によるアフィニティクロマトグラフィーを併用し、合成物から高純度のイムノトキシンを精製することができた。本精製方法は、イオン交換クロマトグラフィーを適用できない場合にも応用可能な汎用性の高い方法と推察された。精製物の収率の点から、GL への SH 基導入試薬としては SPDP よりも 2-iminothiolane の方が有利であることが明らかになった。得られた精製イムノトキシンは、抗体 1 分子当たり GL 1 分子から成る結合体であり、抗体活性の低下は認められなかった。

こうして作製したイムノトキシンの抗腫瘍効果および体内分布を調べることにより、80G が単独では細胞内に入ることのできない GL を細胞内に送達するキャリアとなり得るかを検証した。5 種類のイムノトキシンはいずれも、*in vitro* において AFP 産生 HuH-7 細胞に特異的な殺細胞効果を示した。このうち、2-iminothiolane により修飾された GL を含むイムノトキシンがより高い活性を有していた。ジスルフィド結合体とチオエーテル結合体の殺細胞効果には、顕著な差がなかった。また、抗体部分を F(ab')₂ にフラグメント化することで、HuH-7 細胞に対する *in vitro* 殺細胞活性が約 100 倍高まった。しかしながら同時に、AFP 非産生 HuH-13 細胞に対しても弱い非特異的細胞毒性が観察された。*in vitro* で活性の高かった 80G-SS-GL (IT)、80G-CS-GL (IT) および F(ab')₂-CS-GL (IT) は、*in vivo* ヌードマウスの系においても AFP 産生 HuH-7N 細胞に対して選択的な増殖抑制効果を示した。これらのイムノトキシンの活性は同程度であったがジスルフィド結合体投与群のマウスに有意な体重減少が見られた。副作用が発現したジスルフィド結合体は、チオエーテル結合体に比し肝臓、腎臓および脾臓に対して有意に高い移行性を示し、副作用は肝毒性によることが明らかになった。F(ab')₂-CS-GL (IT) では、腫瘍への移行性は低いものの、血中濃度を高く維持することにより、腫瘍への分布が改善されていることが示唆された。ただし総合的に判断すると、抗体部分を F(ab')₂ にフラグメント化しても、期待したほどターゲティング効率が向上しなかったと結論される。

以上の結果より、分泌性タンパクである AFP に対する MoAb 80G は、GL のように単独では細胞内に入れられないものを細胞質内に送達することが可能であり、AFP 産生肝癌に対するターゲティング用キャリアとなり得ることが明らかになった。また、体内でより安定なチオエーテル結合体が、その場合のターゲティング DDS として有望であると考える。

論文審査の結果の要旨

従来より、癌細胞に指向性を有するモノクローナル抗体を用いて、癌のイメージングおよびターゲティング療法に関する研究が行われてきた。この場合の標的抗原としては腫瘍特異抗原が望ましいが、未だ特異抗原は見い出されておらず、標的抗原としては正常細胞にも微量ながら存在する腫瘍関連抗原が用いられている。その中で、癌胎児性抗原である α -フェトプロテイン (AFP) は、成人肝癌の約 80% から分泌されるため重要な肝癌マーカーとなっており、同時に癌細胞表面にも存在することが確認されている。AFP のように血中にも遊離する抗原が、はたしてターゲティングを目的とした標的抗原として適するか否か、さらには、遊離抗原と結合した抗体が、細胞内へ効率よく internalization するか否か、と言う議論が長年にわたって行われてきた。これら議論の焦点は、抗体と遊離抗原との免疫複合体の形成が、抗体の血中から癌細胞への移行および取り込みにどのような影響をもたらすかにある。

しかしながら、これまでの研究はターゲティングに適した抗体の選択が十分になされていなかった。さらに、このような遊離抗体に対する抗体のターゲティング用キャリアとしての機能に関する評価が乏しかった。そこで著者は、AFP に対するモノクローナル抗体を作製し、遊離 AFP の存在下においても細胞表在性 AFP に対して高い反応性を有する抗体がターゲティング用キャリアとして適すると考え、そのような抗体の検索を行った。さらに、選択した抗体のキャリアとしての機能を免疫学的、生物化学的、腫瘍生物学および薬物速度論的解析により評価し、本抗体を用いたターゲティング・DDS の可能性について考察を行った。

その結果, 1) AFP 産生肝癌細胞に対するターゲティング用キャリアとして有望な抗AFP モノクローナル抗体, 80G を新規に見出した。本抗体の細胞表在性 AFP への結合は, 遊離の AFP による阻害を極めて受けにくく, 血中の遊離 AFP と免疫複合体を形成した後も, 癌細胞表面 AFP に対する結合活性を維持することを明らかにした。2) 80G の AFP 産生 HuH-7N 細胞への取り込みクリアランスは特異的に高く, 本抗体がアクティブターゲティング用キャリアとしての機能を有する可能性が示唆された。その F(ab')₂ フラグメントでは細網内皮系から回避する特徴を有するものの, HuH-7N 細胞へのアクティブな取り込みは起こらないことが判明した。3) 80G は, 単独で細胞内に入ることの出来ないタイプ1リボソーム不活性化蛋白, gelonin を AFP 産生肝癌細胞の細胞質内に送達することが可能であり, 本抗体がターゲティング用キャリアとして有用であることを実証した。

以上の成果は, DDS の中で最も困難とされているターゲティング領域に重要な示唆を与えるものであり, 博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいと考える。