



Title	腫瘍血管内皮細胞を標的とする癌ターゲティング療法の開発と腫瘍血管内皮抗原の解析に関する研究
Author(s)	大泉, 巍雄
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42728
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	大泉巖雄
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第15698号
学位授与年月日	平成12年8月24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	腫瘍血管内皮細胞を標的とする癌ターゲティング療法の開発と腫瘍血管内皮抗原の解析に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 真弓 忠範
	(副査) 教授 山元 弘 教授 前田 正知 教授 松田 敏夫

論文内容の要旨

癌治療に大きく貢献してきた制癌剤は、現在では約40種類にわたる殺細胞性薬剤が見いだされ、ある種の癌ではその治癒さえも期待できるようになってきた。しかしながら、投与された制癌剤は全身の血液循環を巡り標的とする腫瘍組織に到達できる量は極く僅かである。そのため制癌剤の有効性が充分發揮できないだけでなく、骨髄・血球系など増殖性の高い組織や消化管・皮膚などで重篤な副作用が発現するなどの問題を抱えている。

この副作用発現回避のため、制癌剤自体に腫瘍組織へのターゲティング能を付与して選択的に腫瘍組織へ送達することで、優れた薬効と高い安全性を発揮させるドラッグデリバリーシステム(DDS)の研究開発が盛んに進められてきた。当初は癌細胞の膜抗原に対するモノクローナル抗体を制癌剤に付与して固形癌をターゲティングする DDS 研究開発が主流だったが、癌細胞への低到達性・癌抗原の heterogeneity・癌細胞の total cell killing の必要性などの理由から期待された薬効が得られていない。

そこでこれら問題点を解決すべく、筆者は「腫瘍血管内皮細胞」に着目した。以下に述べる様々な腫瘍血管の機能特性を考えると、固形癌の腫瘍血管内皮細胞を標的とし致死的作用をもたらす抗体ターゲティング療法が優れた抗腫瘍効果をもたらすであろうことが推察された。(1) 腫瘍血管内皮細胞は癌腫を問わず固形癌に必ず存在し、腫瘍の増殖を支持する。従って腫瘍血管を一部でも攻撃して壊死させれば、腫瘍組織への栄養供給を断ち切り兵糧攻めすることができるため、内皮細胞の total cell killing の必要もない。(2) 腫瘍血管内皮細胞特異的抗原の発現が腫瘍から促されており、抗体の標的となり得る新たな抗原が発見できる可能性がある。(3) 腫瘍血管内皮細胞は遺伝学的に安定かつ均質であるため、腫瘍血管内皮細胞の抗原に heterogeneity はないと考えられ、このため抗体ターゲティング療法から逸脱する population がなく、また遺伝子変異率も低いため治療抵抗性を獲得しづらい。(4) 血管内皮細胞は血管の内側を裏打ちしているため、薬剤が容易に到達する。(5) 腫瘍血管では物質透過性が亢進しており、また腫瘍組織のリンパ管はほとんど皆無のため、高分子物質でも内皮細胞の間隙をすり抜けて血管外へ漏出し長時間組織で停滞しやすく、内皮細胞のみならず腫瘍組織も攻撃することが期待できる。(6) 腫瘍内血管数と転移再発に相関性が認められるため、腫瘍血管を壊死させることで、原発癌から他臓器へ転移する初期の過程である転移癌細胞の血管内侵入を抑制し、その結果癌死亡の最大要因となっている転移を抑えることが可能となる。

従って「癌細胞」自体を標的とするのではなく、固形癌の「腫瘍血管内皮細胞」の特異的抗原に結合して殺細胞作用を誘導する抗体ターゲティング療法を筆者は考案し、腫瘍血管を退縮させることで腫瘍組織の壊死を誘導し強い抗

腫瘍効果を発揮することができるのかを検証した。選択的に腫瘍血管内皮細胞に結合するモノクローナル抗体を作製するため、ラット正常血管内皮細胞の抗血清を予めマウスへ投与して受動免疫を獲得した後に、ラットKMT-17 固形癌から *in vivo* での形質を維持したまま単離・培養した腫瘍血管内皮細胞を能動免疫することで、腫瘍血管内皮モノクローナル抗体の作製に成功した。作製した抗体は細胞および組織切片レベルで腫瘍血管内皮細胞への選択的かつ強い結合性を示し、その中でも TES-23抗体は制癌剤ネオカルチノスタチンとの immunoconjugate で、*in vitro* における腫瘍血管内皮細胞に対する選択的殺細胞作用を示した。また *in vivo* においても、TES-23抗体は優れた腫瘍組織移行性と固形癌に対する強い抗腫瘍効果を認めた。詳細な病理組織学的検討から、TES-23抗体による抗腫瘍作用メカニズムは、腫瘍血管内皮細胞を標的とした結果、形成された血栓が腫瘍血管血流を完全に遮断することで腫瘍細胞の増殖が停止し腫瘍組織の退縮が誘導されたことが明らかとなり、本研究コンセプトである「腫瘍血管内皮細胞を標的とする癌ターゲティング療法」の有用性が病理組織学的解析からも実証された。従って、TES-23抗体が本研究コンセプトを充分に満足する有用な固形癌ターゲティングキャリアとなりうることが明らかとなった。

次に、TES-23抗体を含む腫瘍血管内皮モノクローナル抗体が結合する40kDa と 80kDa の naturally-occurring 抗原の同定を遺伝子クローニングにより実施した結果、40kDa 蛋白は機能不明ではあるが癌化・増殖に関連あると推定されている単鎖膜貫通型糖蛋白質 OTS-8 と、80kDa 蛋白は細胞一細胞や細胞一細胞基質間の接着分子、リンパ球ホーミングレセプター、癌細胞の転移性獲得に重要な接着分子である CD44H（標準型）と一致した。TES-23抗体は CD44H と結合することが判明したが、抗 CD44H 抗体が結合できない管腔形成している腫瘍血管内皮で発現する分子にも TES-23抗体が結合することが免疫組織化学的検討で明らかにされた。強力な血管新生阻害剤 endostatin と同様、管腔形成している腫瘍血管を標的とした癌ターゲティング療法は、管腔形成腫瘍血管から作られる新生腫瘍血管をも同時に標的とするため、優れた薬効が期待できることから、TES-23抗体が結合する管腔形成腫瘍血管の内皮細胞抗原の解明は新しい癌ターゲティング療法の創製に結びつく可能性が示唆された。また筆者が同定したもうひとつの腫瘍血管内皮抗原 OTS-8 は CD44H と会合体を形成していたことから、OTS-8 は、腫瘍血管内皮細胞の増殖や運動能に関わる CD44H の regulator として機能していると推定された。今後、さらなる CD44H と OTS-8 の会合体研究が、CD44 の多機能性蛋白としての全容と OTS-8 蛋白機能解明へ導くものと思われる。さらに OTS-8 と CD44H の会合体は、その腫瘍組織特異的分布から、新たな腫瘍血管内皮標的抗原となりうる可能性が示唆された。すなわち、正常血管内皮細胞での会合体発現は認められず、正常実質組織でも骨細胞系のみの発現のため、骨での副作用回避によっては OTS-8 と CD44H の会合体を標的としたターゲティング療法は優れた薬効と高い安全性を発揮する可能性が考えられた。

本研究により得られた知見は、腫瘍血管内皮細胞を標的とする抗体ターゲティング療法が、20年来の研究にもかかわらず期待された抗腫瘍効果が得られていない癌細胞を標的とする抗体ターゲティング療法に取って代わり得る、新しくかつ重要なストラテジーであることを提示したものである。またこれらの研究成果が、より腫瘍血管内皮細胞特異的な抗体ターゲティング療法の創出や腫瘍血管内皮細胞の病態生理機能解明へ応用されることが期待される。

論文審査の結果の要旨

從来より、腫瘍組織へのターゲティング能を付与して選択的に制癌剤を送達することで、優れた薬効と高い安全性を発揮させるドラッグ・デリバリー・システム (DDS) の研究開発が盛んに進められてきた。当初は、癌細胞の膜抗原に対するモノクローナル抗体を制癌剤に付与して、固形癌をターゲティングする DDS 研究開発が主流であった。しかしながら、この方法は血中から癌組織への送達性が極めて低率であること、癌抗原の Heterogeneity の問題、癌細胞の Total Cell Killing の必要性などの理由から、期待された薬効が得られていない。著者は以上の問題を解決すべく、癌組織血管内皮細胞が、癌種によらず数多くの共通した特性を有していることから、癌細胞自身ではなく癌組織血管内皮細胞に対するモノクローナル抗体をミサイルキャリアとして用いることを考えた。その結果、以下の成果が得られた。

- 1) ラット固形癌から、腫瘍血管内皮細胞の膜画分を抗原として、Passive/Active Immunization 法により、細胞お

より組織切片レベルで腫瘍血管内皮細胞を選択的に認識するモノクローナル抗体（TES-23）作製に成功した。

2) TES-23抗体は、制癌剤ネオカルチノスタチン（NCS）とのImmuno-conjugateで、腫瘍血管内皮細胞に対するin vitro 傷害活性を強く誘導した。

3) 担癌ラットに投与した TES-23抗体、TES-23-NCS 抗体は、ともに腫瘍組織に選択的に送達され、強い抗腫瘍効果を示した。

4) TES-23抗体投与による腫瘍血管内皮細胞の変性・壊死・脱落、それに伴う腫瘍血管の血栓形成を腫瘍組織病理所見で明らかにし、形成された血栓が腫瘍血管血流を完全に遮断することで、腫瘍細胞の増殖を停止し、腫瘍組織の退縮を誘導できることを証明した。

5) 本モノクローナル抗体が認識する腫瘍血管内皮抗原を、遺伝子クローニングにより同定し、40kDa 抗原は骨芽細胞から骨細胞への分化段階で発現する抗原 OTS-8であり、80kDa 抗原は細胞接着や癌転移を司る膜蛋白 CD44H であることを見出した。

6) OTS-8と CD44H がともに新生腫瘍血管内皮細胞で発現しており、かつ会合している事実を明らかにした。

以上の成果は、癌組織血管内皮細胞を標的とする癌ミサイル研究に対して、極めて有効な新しい方向性を提示しており、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものと考える。