

学位論文題名

腫瘍血管内皮細胞を標的とした抗体治療薬の抗原解析

学位論文内容の要旨

固形腫瘍は直径が2 mm を超えるところから新しい微小血管、すなわち腫瘍血管を形成して宿主の血液からその増殖に必要な栄養や酸素を摂取する。腫瘍血管は血流に直接さらされているため、薬剤は容易に到達して効果を発揮し周囲の腫瘍細胞への栄養供給を断つことによって効率的な腫瘍増殖抑制効果が期待できる。

我々は以前、KMT-17 ラット線維肉腫から腫瘍血管内皮細胞 (tumor endothelial cells; TEC) を単離し培養して TEC に対するモノクローナル抗体 (monoclonal antibody; MAAb) を作製した。これらの MAAb は TEC に発現する 40 kD および 80 kD タンパクを認識していた。80 kD タンパクを認識する TES-23 MAAb は KMT-17 線維肉腫のラット皮下移植モデルで抗腫瘍効果を示し、ヒト腫瘍血管にも交差性を示した。

今回、ラット TEC に発現する抗原解析を行ない、TES-23 MAAb のヒト抗原に対する交差反応性を解析してヒトへの臨床応用の可能性について検討した。まず、KMT-17 線維肉腫の TEC に発現する 40 kD および 80 kD 抗原の遺伝子クローニングを行なった。TEC から λ gt11 cDNA ライブラリを作製し、40 kD 抗原を認識する TES-17 MAAb でスクリーニングした結果、40 kD 抗原はラット OTS-8 と一致した。80 kD 抗原は、最初に ROS 17/2.8-5 ラット骨肉腫細胞の cDNA ライブラリを TES-27 MAAb でスクリーニングした結果、ラット造血型 CD44 (hematopoietic CD44; CD44 H) と一致した。次に、TEC cDNA ライブラリから CD44 の DNA プローブによってラット CD44 H 遺伝子をクローニングし、TES-23 MAAb や TES-27 MAAb の抗原がラット CD44 H であることをウェスタンブロットで確認した。続いて、KMT-17 線維肉腫の TEC における OTS-8 や CD44 の発現を免疫組織化学によって解析した。その結果、OTS-8 や CD44 は KMT-17 線維肉腫の新生 TEC に発現していることが示された。また、TES-23 MAAb は新生 TEC に発現するラット CD44 と管腔形成した TEC に発現するエピトープの双方を認識していた。さらに、TEC における CD44 アイソフォームの発現を分子生物学的に解析した結果、CD44 のエクソン 5s と 6s との間にエクソン 6v のみが単独で挿入された CD44 アイソフォームの mRNA がごく少量存在していた。

次に、抗腫瘍効果を示した TES-23 MAAb のヒト抗原に対する交差反応性を解析した。免疫沈降法によって TES-23 MAAb は HT-1080 ヒト線維肉腫に発現する CD44 を認識していた。フローサイトメトリーで TES-23 MAAb は HT-1080 やヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells; HUVEC) に発現する CD44 を比較的強く認識したが、ヒト末梢血単核球 (human peripheral blood mononuclear cells; hPBMC) に発現する CD44 にはほとんど反応性を示さなかった。これらの細胞について CD44 の活性化の指標であるヒアルロン酸 (hyaluronic acid; HA) 結合能を解析した。その結果、HT-1080 や HUVEC に発現する CD44 は HA 結合能がある活性化型であり、hPBMC に発現する CD44 は不活性化型であった。一般に、リンパ球をフォルボールエステルで刺激すると CD44 は活性化型に変化する。そこで、MOLT-4 ヒトリンパ腫をフォルボールミリステートアセテートで刺激して CD44 の HA 結合能を誘導した結果、TES-23 MAAb の反応性が刺激前と比較して相対的に増加した。以上の結果より、TES-23 MAAb は活性化型ヒト CD44 を優位に認識して hPBMC にほとんど結合しなかったため、ヒト臨床において白血球減少の副作用を回避して腫瘍血管に作用し、抗腫瘍効果を発揮しうる可能性が考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 前 出 吉 光
副 査 教 授 小 沼 操
副 査 教 授 岩 永 敏 彦
副 査 助 教 授 昆 泰 寛

学 位 論 文 題 名

腫瘍血管内皮細胞を標的とした抗体治療薬の抗原解析

本研究の背景として、固形腫瘍に対する化学療法は現在のところ、抗癌剤の腫瘍内浸透性が悪く、治療効果は低い。この治療効果を高める目的で、申請者は、腫瘍内に形成された腫瘍血管を薬剤の標的とすることによって、腫瘍細胞への栄養補給を絶ち、結果的に腫瘍の増殖を抑制する治療法の開発に取り組んできた。その結果として、ラット線維肉腫の血管内皮細胞に対するモノクローナル抗体を作成したが、この抗体は、ラット血管内皮細胞に発現する分子量 40kD 及び 80kD の蛋白質を認識した。さらに、80kD の蛋白質を認識する抗体は、ラット線維肉腫の増殖を抑制したことから、腫瘍血管を標的とした抗体療法の有用性が明確となった。

以上の成果を踏まえて、本論文において申請者は、ラット血管内皮細胞に発現する抗原の解析を行うとともに、ラット血管内皮に対するモノクローナル抗体の、ヒト血管内皮に対する交差反応性を解析して、ヒトへの臨床応用の可能性を示唆した。すなわち、ラット線維肉腫血管内皮細胞の分子量 40kD 及び 80kD 蛋白の遺伝子クローニングを行い、比較検討した結果、40kD 蛋白は OTS-8、80kD 蛋白は CD44H であることを明らかにすると共に、申請者が作成したラット血管内皮に対するモノクローナル抗体は、OTS-8 及び CD44 をそれぞれ認識することを証明した。ついで、免疫組織化学的解析により、ラット OTS-8 及び CD44 は、新生血管内皮細胞に発現することを明らかにした。さらに、これまでの成績で明らかとなった、ラット線維肉腫血管内皮細胞に対するモノクローナル抗体の抗腫瘍効果をヒトの癌治療に応用することを目的として、同モノクローナル抗体の、ヒト抗原に対する交差反応性を検討した。その結果、同モノクローナル抗体は、ヒト線維肉腫に発現する CD44 を認識するがヒト末梢血単核球に発現する CD44 には反応性を示さなかったことから、同抗体は臨床医学においても有用性をもつと考えられた。

以上の成果は癌治療法の発展に大きく寄与するものであり、よって審査員一同は上記学位論文提出者 谷口健治氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。