

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659299

研究課題名（和文） 特異抗体によるがんの標的医療（画像診断と同時治療）の開発

研究課題名（英文） Development of targeted therapy of cancer cells with diagnostic imaging through the application of immunoliposomes

研究代表者

松浦 栄次（MATSUURA EIJI）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：20181688

研究成果の概要（和文）：

本研究は、がん組織に特異的に集積し、生体イメージングによる高感度な診断と効率良い薬剤送達を同時に行える新規医療“Immuno-Theranostics”の開発をめざして行った。がん分化抗原であるメソセリン（MSLN）に対する抗MSLN抗体のヒト化、低分子化を進め臨床応用に向けて一歩前進できた。マウス抗MSLN抗体Fabを⁶⁴Cu標識し、担がんヌードマウスに投与して体内動態をポジトロン断層撮影法（PET）により解析し、抗体低分子化の影響を確認した。ヒト化抗メソセリン抗体IgGを結合し近赤外蛍光標識したリポソームを調製しMSLN陽性がん細胞培養に抗体依存的に取り込まれることを観察した。

研究成果の概要（英文）：

The present study was aimed to develop a monoclonal antibody-based probe for PET and drug delivery targeting mesothelin (MSLN) expressing cancer, through the application of immunoliposomes. A humanized monoclonal antibody was developed from a mouse monoclonal antibody against MSLN. We also started to develop its single-chain variable fragment (scFv). In vivo mouse PET imaging with ⁶⁴Cu-labeled Fab fragment of anti-MSLN antibody showed faster tumor targeting than the case with ⁶⁴Cu-labeled anti-MSLN IgG. Liposomes conjugated with humanized anti-MSLN antibody and labeled with Cy5.5 were taken into MSLN-expressing cultured cancer cells in an antibody-dependent manner.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：分子イメージング、Immuno-Theranostics、がん、メソセリン、リポソーム

1. 研究開始当初の背景

がんの治療成績向上のためには早期診断・治療の両側面での医療革新が不可欠であり、抗体医薬・遺伝子治療などの生物学

的製剤の開発が進んできた。近年、新たな臨床試験（第1相臨床試験の前段階試験）、すなわち、マイクロドーズ臨床試験が欧米を中心に試行され始めている。

岡山大学は、理化学研究所（神戸市）とともに連携大学院を設置し、また、申請者らが中心となって、分子イメージングを中心とする共同研究体制（おかやまメディカルイノベーションセンター；OMIC）を設置し、新医療創成の実現をめざしている。その中で、我々の開発する、分子イメージング診断とDDSによる標的医療が同時実施可能な次世代標的医療“Immuno-Theranostics”（診断と治療の一体化）に近い将来、医療の中核をなすと期待している。

細胞膜糖タンパク質、mesothelin（MSLN）は、中皮細胞の分化抗原として発見されたが、悪性中皮腫、膵がん、卵巣がん、肺がんなどに強発現しているとともに、soluble formが血中で検出されることが明らかとなり、がんの体外診断への応用が試みられている。我々は膜結合MSLNを標的とする画像診断への応用をめざし、数種類の抗MSLNモノクローナル抗体について様々ながん細胞との反応性を調べ、蛍光標識抗体や⁶⁴Cu標識抗体でin vivoイメージングを行い、基礎的検討をしてきた。

2. 研究の目的

本研究は、がんの診断と治療が同時に実施できる新規医療“Immuno-Theranostics”を、分子イメージング技術、抗体工学、DDS技術等の融合により開発検討することを目的とする。

脂質二分子膜からなるリポソームは生体膜と同様の成分からなる小胞で、膜モデルやドラッグデリバリーシステム（DDS）キャリア（マイクロキャリア）として注目されている。

抗がん剤を内部に封入したリポソームをがんの特異的な抗体で被覆する（免疫リポソーム）。目的の病巣へ効率よく届けることのできる免疫リポソームによる標的治療では、毒性の強い抗がん剤を目的のがん細胞にだけ届けることにより、抗がん剤単独投与よりも副作用が少なく、かつ、がんを抑制する効率の良い、人に優しい治療が期待できる。臨床応用のためには複数回投与を考慮し、マウスモノクローナル抗体をヒト型化、低分子化する必要がある。

さらに、リポソームを近赤外蛍光や半減期の短い⁶⁴Cu等のPET用核種で標識することで腫瘍のin vivoイメージングが可能となることを利用して、リポソーム内包薬剤の送達に

よる治療と同時に標識物による病巣の局在部位とその大きさの定量的評価を目指す。すなわち、診断と治療を同時に行うことのできる次世代生物学的製剤（“Immuno-Theranostics”）の開発に関する基盤研究を行う。

3. 研究の方法

(1) MSLN抗体のヒト化

申請者らが開発したマウスモノクローナル抗MSLN抗体のCDRおよびフレームワークの遺伝子配列を決定し、マウス抗体の遺伝子配列情報を基に、データベースからマウス抗体のフレームワークと最も近いヒト抗体のフレームワークの配列を選んだ。選んだヒト抗体のフレームワークとマウス由来CDR領域を組み合わせて、発現ベクターを構築しCHO細胞で導入発現した。抗体高産生株を選択し培養上清中に分泌された抗体をprotein Aカラムで精製した。

(2) MSLN固相に対するELISA

ヒト化抗MSLN抗体、キレート剤修飾マウス抗MSLN抗体、抗MSLN抗体のFabフラグメントのMSLN抗原に対する結合は、MSLNを固相化したELISAを用いて測定した。MSLN 1 μg/mlを96穴マイクロタイタープレートに加えて4℃で一晩インキュベートし、その後ブロッキングを行い、系列希釈した抗体液を加えて室温で1時間反応させた。検出は、用いた抗体の型に合わせてHRP標識抗ヒトIgGあるいはHRP標識抗マウスIgG（whole、またはFab）にて行い、発色基質はTMBUSを用いた。

(3) ヒト化抗MSLN抗体の低分子化

ヒト化した抗MSLN抗体のL鎖およびH鎖の可変領域の遺伝子配列をlinker配列によって、「L鎖の可変領域、Linker配列、H鎖の可変領域」-Protein A-Tagという順番で組み合わせた一本鎖抗体（single chain variable fragment；scFv）の作製を行った。

ヒト化した抗MSLN抗体の可変領域を含む4種類の候補コンストラクトを作製しそれぞれの発現ベクターを作製し、大腸菌で分泌発現させ、培養上清を回収した。この培養上清を硫酸沈殿して10倍濃縮した液について、(2)項で述べたMSLN固相化プレートを用いたELISAを行い、検出にはウサギ抗pharage poly IgG抗体とHRP標識ヤギ抗ウサギIgG poly Fab'抗体を用いた。

(4) がん細胞へのin vitro抗体結合試験

ヒト膵臓がん細胞BxPC-3、CFPAC-1、PANC-1はATCCより購入した。8ウェルチャンバースライドに2 x 10⁴ cells/wellで播種して37℃

CO₂インキュベーターで培養し、3日後に実験に用いた。抗体との結合実験では、細胞を3.7%ホルムアルデヒドで固定後、ブロッッキングを行い、IgG ヒト化抗 MSLN 抗体と4°Cで一晩インキュベートし、その後 Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体および Alexa Fluor 594 標識コムギ胚芽アグルチニン、DAPI で室温1時間インキュベートした。各操作の間には PBS で3回洗浄した。最後に水性包埋剤で封入し、共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 (Carl Zeiss) にて観察した。

抗体結合・Cy5.5 標識リポソームのとりこみ実験では、3日間培養した細胞を無血清培地で洗浄した後、1%FCS を含む培地で所定濃度に希釈した抗体結合リポソームを加え、37°Cで2時間培養した。その後、固定を行い、Alexa Fluor 488 標識コムギ胚芽アグルチニンおよび DAPI で処理し、共焦点レーザー顕微鏡 LSM780 (Carl Zeiss) にて観察した。

(5) マウス抗 MSLN 抗体 Fab の作製と ⁶⁴Cu 標識抗体 PET プローブの調製

マウス抗 MSLN 抗体をペプシン処理し、Protein A カラムにより Fab フラグメントを精製した。この Fab フラグメント、または対照として用いたマウス IgG 抗 MSLN 抗体にキレート剤 DOTA (1, 4, 7, 10-Tetraazacyclododecane-1, 4, 7, 10-tetraacetic acid) で修飾した。Fab または IgG の1分子あたりに結合した DOTA の分子数は、TOF/MS により分子量を10回測定してその平均値から算出した。OMIC の小型サイクロトロン (Cypris HM-12S : 住友重機械工業) で作製した ⁶⁴Cu と反応させた後、限外濾過により標識抗体プローブを精製した。薄層クロマトグラフィー、HPLC により純度試験を行った。

(6) 担がんマウスの抗体 PET イメージングおよび体内分布解析

Balb/c *nu/nu* マウス右大腿皮下に PANC-1 細胞を 1×10^7 個/匹移植し、その2週間後に、同じマウスの左大腿皮下に BxPC-3 細胞を 5×10^6 個/匹、右肩皮下 CFPAC-1 細胞を 2.5×10^6 個/匹、移植した。さらにその18日後に PET 実験を行った。

⁶⁴Cu 標識抗メソセリン抗体 Fab を担がん Balb/c *nu/nu* マウス13匹に 2.66 ± 0.05 MBq/匹、尾静脈より投与した。そのうちの4匹は投与直後、3、6、12、24時間後にイソフルラン麻酔下で小動物用 PET 装置 (Clairvivo PET : 島津製作所) にて PET 撮像を行い、その後小動物用 *in vivo* CT システム (eXplore Locus : GEヘルスケア) にて CT 撮像を行った。PET 撮像はカウント強度により15から60分間行った。他のマウスは所定時間後に安楽死させ、各臓器への放射能分布をγ-カウンターにて測定した。

(7) 抗体結合リポソームの調製

抗体の溶媒を25mM HEPES 140 mM NaCl 2mM EDTA pH8.0 に置換し、抗体に対してモル比で10または20倍の2-iminothiolane を加え、室温で1時間攪拌してチオール化した。その後 PD-10 カラムにより未反応の

2-iminothiolane を除いた。SH 基の量は 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) により測定した。ジオレオイルホスファチジルコリン/ジオレオイルホスファチジルグリセロール/コレステロール/ポリエチレングリコール (PEG) 2000 結合ジステアロイルホスファチジルセリン (DSPE) /末端マレイミド PEG3400 結合 DSPE

(DSPE-PEG3400-MAL) のクロロホルム/メタノール 1/1 溶液をガラス梨型フラスコに 30/30/40/1/1 のモル比で加え、エバポレーターにより溶媒を除去して管壁に薄膜形成後、HSPES バッファーまたは抗がん剤溶液を加え、湯煎および攪拌を行い多重層リポソームを形成した。これを超音波処理後 0.1 μm のフィルターをセットしたエクストルーダーに通し、小さい1枚膜リポソーム (SUV) とした。その後、チオール化した抗体溶液を加え、4°Cで一晩転倒混和しながらインキュベートした。その後、Sephacrose CL-4B カラムによりゲル濾過を行い、抗体結合リポソームと未反応の抗体を分離した。

抗体を蛍光標識する場合はローダミン標識 DSPE (Avanti Polar Lipids) を総脂質の 5 mol% 加えた。または DSPE-PEG2000-NH₂ (日油) を Cy5.5 monofunctional dye (GEヘルスケア) と炭酸バッファー pH 8.8 中で反応させて PD-10 により精製したものを凍結乾燥し、リポソーム総脂質の 0.1 mol% 加えてから脂質薄膜を形成し、その後は暗所で水和、エクストルージョン、抗体結合等の操作を行った。

4. 研究成果

(1) MSLN 抗体のヒト化および低分子化

申請者らが開発したマウスモノクローナル抗 MSLN 抗体のヒト化を行った。ヒト化抗体の特異性がマウス型の場合と同様であることを ELISA および培養細胞の組織染色により確認した。すなわち、FACS により MSLN の細胞表面発現が確認されているヒト臓器がん細胞株 BxPC-3 および CFPAC-1 で特異的な結合がみられた。本抗体は臨床の画像診断に使用することを目標としているため、ヒト化は必須であり、抗原特異性を保持しつつ抗体のヒト化を行うことができたことは重要なステップである。

さらに、このヒト化抗体の L 鎖および H 鎖の可変領域の遺伝子配列を linker 配列によって、「L 鎖の可変領域 (VK)、Linker 配列、

H鎖の変領域 (VH) -Protein A-Tag という順番で組み合わせた一本鎖抗体 scFv の作製を行った。最初の培養では、目的物よりも、多量体やその分解産物が多くみられ、VH と VK の会合が不安定なために間違った S-S 結合を形成した可能性が考えられた。そこで、アミノ酸置換やリンカーの変更を行い、目的物の産生効率を改善した。培養上清の ELISA を行い、MSLN に対する濃度依存的な結合を確認した。

(2) マウス抗 MSLN 抗体 Fab の作製と ⁶⁴Cu 標識抗体 PET プローブの調製

MSLN 抗体のヒト化、およびその低分子化に時間を要するため、その間に抗体の低分子化の影響を調べる目的で、もとのマウス抗 MSLN 抗体を酵素的に低分子化した。ペプシン処理により F(ab')₂ でなく Fab フラグメントが得られ、protein A 素通り画分を集め、限外ろ過により濃縮し、GLPC で分子量約 48000 のシングルピークであることを確認した。この Fab に対し、キレート剤 DOTA を 1:50 のモル比で混和し、室温で 1 時間反応させ、PD-10 カラムで DOTA 修飾 Fab を精製した。これを TOF/MS により測定し、元の Fab との分子量測定値の差から、Fab 1 分子あたり 0.7 個の DOTA が結合していることが算出された。

(3) 担がんマウスの抗体 PET イメージングおよび体内分布解析

マウス抗 MSLN 抗体 Fab と精製 ⁶⁴Cu を混和し 40°C、1 時間反応後限外ろ過によりフリーの ⁶⁴Cu を除き、⁶⁴Cu 標識 Fab を得た。⁶⁴Cu 標識マウス抗 MSLN 抗体 Fab を担がんヌードマウス 1 匹あたり 2.66 MBq、尾静脈より投与し、投与直後、3、6、12 および 24 時間後に PET 撮像、CT 撮像を行った。また、別のマウスで同じ経過時間の臓器分布を γ カウンターにて測定した。その結果、投与 6 時間後から、膜型 MSLN 発現陽性の BxPC-3 および CFPAC-1 腫瘍で、MSLN 陰性の PANC-1 腫瘍に対し有意に高い ⁶⁴Cu 標識 Fab の集積を示した。⁶⁴Cu 標識抗 MSLN 抗体 IgG を用いた以前の実験と比較すると、血中クリアランスが大幅に早まり、肝臓への集積が著しく減少した。そして MSLN 陽性腫瘍で有意な集積が見られるのが 24 時間以降から 6 時間以降とで早まった。これらの結果により、調製した Fab が元の抗体の特異性を保持していることが示唆され、低分子化により画像診断に要する時間を短縮することができた。

(4) ヒト化抗 MSLN 抗体結合リポソームの調製と培養がん細胞への取り込み

ヒト化抗 MSLN 抗体 IgG に 1:20 のモル比で 2-iminothiolane を混和し、室温 1 時間反応させて PD-10 により精製した。得られたチ

オール化抗体を DTNB で測定し 1 分子あたり約 9 個の SH 基を持つことが推定された。

Cy5.5 標識リポソームを調製する場合、総脂質の 0.1 mol% の DSPE-PEG2000-Cy5.5 を加えて調製した小さい一枚膜リポソームに上述のチオール化抗体を混和し、4°C で一晩おいてリポソームを構成する DSPE-PEG3400-MAL と反応させた後、Sephacrose CL-4B にアプライした。溶出液を 0.5ml ずつ分画し、230nm および 678nm の吸光度を測定するとともに ELISA にて抗体活性を測定した。void volume に出てくる吸光度、抗体活性のともに高い画分を集めて限外ろ過により濃縮した。

このようにして調製した IgG ヒト化抗 MSLN 抗体結合リポソーム (L-Ab)、あるいは対照として DSPE-PEG-MAL を含まず抗体を結合しなかった Cy5.5 標識リポソーム (L-C) を、8-well チャンバースライドに播いた BxPC-3、CFPAC-1 細胞の上清に、脂質濃度をそろえて加え、37°C、2 時間培養した後、固定して、共焦点顕微鏡で観察した。BxPC-3 では L-C のわずかな取り込みが、また L-Ab の顕著な抗体依存的取り込みが観察された。CFPAC-1 でも L-Ab の取り込みが観察された。

以上をまとめると、抗体のヒト化、低分子化を進めることができ、がん抗原である MSLN に対する抗体を用いた臨床での画像診断およびがん組織への標的医療に向けて、一歩近づくことができた。またマウス抗 MSLN 抗体 Fab を調製し、⁶⁴Cu 標識して担がんマウスの PET イメージングおよび体内分布を解析したことにより抗 MSLN 抗体 IgG の低分子化の影響の一例、すなわち投与後最適 PET 画像を得るのに要する時間の短縮と体内クリアランスの加速を確認することができた。さらに、ヒト化抗体結合リポソームを近赤外蛍光標識し、MSLN 陽性細胞特異的な取り込みを観察したことで、本リポソームを用いた *in vivo* 蛍光イメージングへの準備が進んだ。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 5 件)

- ① E. Matsuura, L.R. Lopez. Autoimmunity, oxidative inflammation, and b2-glycoprotein I in early atherogenesis. Controversies in rheumatology & autoimmunity, Apr. 6, 2013, Budapest, Hungary.
- ② 松浦栄次、「抗体を用いる標的医療：動脈硬化、がんへの新たな取り組み」、シンポジウム「橋渡し研究加速ネットワーク構築に向けて」、2012 年 7 月 7 日、岡

山

- ③ E. Matsuura, L.R. Lopez, Y. Shoenfeld, P.R.J. Ames. β 2-Glucoprotein I and oxidative inflammation in atherogenesis of autoimmune atherothrombotic diseases. 8th International congress on autoimmunity, May 12, 2012, Granada Spain.
- ④ 松浦栄次、「ナノバイオ標的医療の新しい展開—分子イメージングを含めて—」、文部科学省「橋渡し研究支援推進プログラム」橋渡し研究ネットワーク構築事業シンポジウム、2012年1月16日、大阪
- ⑤ 松浦栄次、「分子イメージングを核とするおかやまメディカルイノベーションセンター (OMIC) の設立と将来展望」、第51回日本核医学会学術総会、2011年10月29日、つくば

〔その他〕

ホームページ (岡山大学 産学官連携センター「おかやまメディカルイノベーションセンター (OMIC) 」

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/crc/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 栄次 (MATSUURA EIJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：20181688

(2) 研究分担者

小林 和子 (KOBAYASHI KAZUKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20304298

(3) 連携研究者