



Radiolocalization of pancreatic Carcinoma Xenografts in Nude Mice with Radiolabeled Chimeric Fab Fragments of Anti-Carcinoembryonic Antigen Monoclonal Antibody A10

神垣, 隆

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1995-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1403

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001403>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	かみ かが たかし 神 垣 隆 (兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博い第962号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成7年3月31日
学位論文題目	Radiolocalization of Pancreatic Carcinoma Xenografts in Nude Mice with Radiolabeled Chimeric Fab Fragments of Anti-Carcinoembryonic Antigen Monoclonal Antibody A10 (癌胎児性抗原(CEA)に対するモノクローナル抗体A10のキメラ化Fabフラグメントのヌードマウス移植腫瘍への集積性の検討)
審査委員	主査 教授 斎藤 洋一 教授 河野 通雄 教授 尾原 秀史

論文内容の要旨

癌胎児性抗原(Carcinoembryonic Antigen, 以下CEA)に対するマウスモノクローナル抗体A10は胃癌, 大腸癌および膵癌などの消化器癌に特異的に反応し, CEA関連抗原の存在する胆管や顆粒球には反応を示さない。しかし, 消化器癌のイメージングやターゲッティングなどの臨床応用の際には, ヒトにとって異種蛋白であるマウス抗体の抗原性が問題となる。そこで, マウス抗体の抗原性を減弱させるために遺伝子組み替え操作によりもとのマウス可変領域とヒト定常領域を有するマウス-ヒト キメラ化 A10 Fab フラグメント(以下, キメラFab)を作製した。今回, ヒト膵癌担癌モデルを用いて, キメラFabの腫瘍集積性についてもとのマウス A10 IgG(以下, マウスIgG)およびマウス A10 Fab フラグメント(以下, マウスFab)と比較検討した。

キメラFabは大腸菌に発現ベクターを導入しその培養上清よりイオン交換クロマトグラフィーを用いて精製した。また, マウスFabはマウスIgGをパパイン消化することにより作製した。まず, ラクトパーオキシダーゼ法によりキメラFab, マウスFabおよびマウスIgGをヨード125(以下, ^{125}I)にて標識した。ヒトCEAを固相化したプレートを用いてビオチン化マウス A10 IgGとの競合結合阻害活性により各種標識抗体の活性を求め, もとの非標識抗体の活性と比較検討した。腫瘍集積性の検討では約 2×10^7 個のCEA産生ヒト膵癌細胞株BxPC-3をヌードマウスに皮下移植し担癌モデルを作製し, 移植4週間後に腫瘍径が約0.8-1.0cmになったものを集積性の検討に用いた。 ^{125}I にて標識した各抗体 $2.3 \mu\text{g}$ ($0.6\text{mCi}/\text{mg}$)をBxPC-3担癌ヌードマウスの尾静脈より投与し, 投与後3, 24および48時間に腫瘍を含む各組織を摘出した。各組織の放射活性を測定し組織単位重量当たりの%投与量(以下, %ID/g)を求め組織集積量とした。また, 腫瘍特異性を示す指標として単位重量当たりの腫瘍集積量/単位重量当たりの正常組織集積量(以下, 腫瘍/正常組織比)を求めた。コントロール群には ^{125}I にて標識した非特異的なヒトポリクローナル Fab フラグメント(以下, ヒトFab)を投与した。さらに, 投与後24時間の担癌マウスを用いて腫瘍を含む矢状断の切片を作製し, 全身オートラジオグラフィーにてキメラFabの臓器局在性についても検討を加えた。

^{125}I 標識キメラFab, マウスFabおよびマウスIgGはヒトCEAに対してもとの抗体と同等の活

性を示した。キメラFabの抗体活性はマウスIgGに比べ低いもののマウスFabと同等であった。BxPC-3 担癌ヌードマウスにおける集積性の検討では、キメラFabの腫瘍集積量は投与後3, 24および48時間ではそれぞれ5.28, 1.05および0.56% I D / g であり、正常組織の集積量に比べ有意に高く ($p < 0.045$)、コントロールヒトFabの腫瘍集積量である3.57, 0.47および0.18% I D / g にくらべ有意に高かった ($p < 0.05$)。また、投与後24および48時間ではキメラFabの正常組織への集積量はヒトFabにくらべ有意に低かった ($p < 0.05$)。キメラFabの腫瘍集積量はマウスIgGに比べ低値を示したが、マウスFabとの間には明らかな差を認めなかった。血中クリアランスの検討でも、キメラFabとマウスFabとの間には明らかな差はないものの両者ともにマウスIgGにくらべ血中より速やかに消失した。腫瘍特異性の検討ではキメラFabの腫瘍/血液比は投与後3, 24および48時間ではそれぞれ2.38, 48.91および56.61とマウス2gGの0.62, 3.21および4.50にくらべ有意に高い値を示した。また、投与後24および48時間における肝, 脾, 膵および肺に対する腫瘍/正常組織比の検討でもキメラFabはマウスIgGに比べ有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。しかしながら、投与後24および48時間におけるキメラFabとマウスFabの腫瘍/正常組織比には明らかな差を認めず、両者とも投与後24時間の腫瘍/正常組織比が48時間に比べ高かった。一方、投与後24時間におけるキメラFab, マウスFabおよびマウスIgGの腫瘍/腎比はそれぞれ8.6, 8.4および7.5と明らかな差を認めなかった。次に、担癌ヌードマウスの矢状断切片のオートラジオグラフィーの検討では、キメラFab投与マウスでは明らかな正常組織への集積はなく腫瘍のみの描出が可能であった。一方、マウスIgG投与マウスでは腫瘍への集積量も高かったが正常組織への非特異的な集積を認めた。マウスFabはキメラFabと同様の腫瘍局在性を示したが、ヒトFabを投与したマウスでは腫瘍は描出されなかった。膵癌は早期発見が困難で予後の悪い癌のひとつであり、新しい診断法の開発が望まれる。

膵癌は早期発見が困難で予後の悪い癌のひとつであり、新しい診断法の開発が望まれる。今回のキメラFabの膵癌腫瘍への集積性の結果より抗原陽性の膵癌細胞にキメラFabは特異的に結合することが示された。さらに、投与後24および48時間後ではマウスIgGに比べ高い腫瘍/正常組織比を示すことから、もとのマウスIgGにくらべより高い腫瘍特異性を有することが示された。マウス切片のオートラジオグラフィーの検討から腫瘍部と正常組織との間に高いコントラストを有することが示され、放射性核種にて標識することによりシンチグラフィーによるイメージングへの応用の可態性が示唆された。今回の検討ではキメラFabとマウスFabとの集積性に明らかな差を見いだせなかったが、キメラFabはヒト定常領域を有することから臨床応用の際によりマウスFabあるいはもとのマウスIgGに比べ抗原性が現弱される可態性がある。

論文審査の結果の要旨

癌胎児性抗原 (Carcinembryonic Antigen 以下 CEA) に対するマウスモノクローナル抗体 A10は膵癌などの消化器癌に特異的に反応し、CEA関連抗原の存在する胆管や顆粒球には反応を示さない。しかし、消化器癌のイメージングやターゲティングなどの臨床応用の際には、ヒトにとって異種蛋白であるマウス抗体の抗原性が問題となる。そこで、マウス抗体の抗原性を減弱させるため遺伝子組み替え操作によりもとのマウス可変領域とヒト定常領域を有するマウス・ヒト キメラ化 A10Fabフラグメント (以下、キメラFab) を作製した。今回、ヒト膵癌担癌モデルを用いて、キメラFabの腫瘍集積性についてもとのマウス A10IgG (以下、マウスIgG) およびマウス A10Fabフラグメント (以下、マウスFab) と比較検討した。

キメラFabは大腸菌に発現ベクターを導入しその培養上清よりイオン交換クロマトグラフィーを用いて精製した。また、マウスFabはマウスIgGをパパイン消化することにより作製した。まず、ラクトパーオキシダーゼ法によりキメラFab、マウスFabおよびマウスIgGをヨード125（以下、 ^{125}I ）にて標識した。ヒトCEAを固相化したプレートを用いてビオチン化マウスA10IgGとの競合結合阻害活性により各種標識抗体の活性を求め、もとの比標識抗体の活性と比較検討した。腫瘍集積性の検討では約 2×10^7 個のCEA産生ヒト膀胱癌細胞株BxPC-3をヌードマウスに皮下移植し担癌モデルを作製し、移植4週間後に腫瘍径が約0.8-1.0cmになったものを集積性の検討に用いた。

その成績は以下の様である。

- (1) ^{125}I 標識キメラFab、マウスFabおよびマウスIgGはヒトCEAに対してもとの抗体と同等の活性を示した。キメラFabの抗体活性はマウスIgGに比べ低いもののマウスFabと同等であった。
- (2) BxPC-3 担癌ヌードマウスにおける集積性の検討では、キメラFabの腫瘍集積量は正常組織の集積量に比べ有意に高く、コントロールヒトFabの腫瘍集積量に比べても有意に高かった。（ $p < 0.05$ ）。
- (3) また、投与後24および48時間ではキメラFabの正常組織への集積量はヒトFabにくらべ有意に低かった（ $p < 0.05$ ）。
- (4) クリアランスの検討でも、キメラFabとマウスFabとの間には明らかな差はないものの両者ともにマウスIgGにくらべ血中より速やかに消失した。
- (5) 腫瘍特異性の検討ではキメラFabの腫瘍／血液比はマウスIgGのものにくらべ有意に高い値を示した。
- (6) 投与後24および48時間における肝、脾、膵および肺に対する腫瘍／正常組織比の検討でもキメラFabはマウスIgGに比べ有意に高い値を示した（ $p < 0.05$ ）。
- (7) 担癌ヌードマウスの矢状断切片のオートラジオグラフィーの検討では、キメラFab投与マウスでは明らかな正常組織への集積はなく腫瘍のみの描出が可能であった。

これらの結果より、抗原陽性の膀胱癌細胞にキメラFabは特異的に結合することが示され、マウスの切片のオートラジオグラフィーの検討から腫瘍部と正常組織との間に高いコントラストを有することが示され、放射性核種にて標識することによりシンチグラフィーによるイメージングへの応用の可能性が示唆されたとの結論を導きだしている。

本研究は教室で開発したモノクローナルA10の臨床応用について、その膀胱癌の診断について研究したものであるが、初めてキメラ化A10Fabの作製に成功し、その腫瘍集積性について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。