

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

委託業務成果報告（業務項目）

がん間質を標的にした抗体・分子イメージング法の開発に関する研究

研究代表者 安永 正浩

国立がん研究センター 東病院・臨床開発センター・新薬開発分野

研究分担者 小西 大

国立がん研究センター 東病院・肝胆膵外科

研究分担者 成田 善孝

国立がん研究センター 中央病院・脳脊髄腫瘍科

脳腫瘍・膵臓がんのトランスレーショナル研究では、フィブリンについて臨床病理学的特徴と共に、イメージング用分子マーカーとしての有用性を明らかにする。臨床応用として抗間質（フィブリン、組織因子）抗体を用いたイムノPET・SPECTの開発を行う。本年度は、フィブリンの免疫染色について解析を進めた。さらに、抗間質抗体の低分子化を行い、蛍光標識後に *in vivo* イメージングで評価を行ったところ、同抗体の診断用ツールとしての有用性が示された。

A．研究目的

分子イメージングによる難治性のグリオブラストーマ（脳腫瘍）・膵臓がんの組織浸潤部情報や治療後残存 *viability* を評価できる技術の創出と、将来的ながん検診・早期診断への応用のために、従来のがん細胞ではなく間質を標的にしたイメージング用プローブを開発する。画像自体の解像度に加えて質的診断の精度を上げることを目的とする。トランスレーショナル研究ではがん間質バイオマーカーとしてのフィブリンと組織因子(TF)の臨床病理学的特徴を明らかにする。また、臨床応用として抗間質イムノPET・SPECT 或いはMRI プローブに関わる技術開発を行い、非臨床試験で POC(Proof of concept)を取得する。

B．研究方法

1．トランスレーショナル研究

ヒト膵臓がんと脳腫瘍の臨床検体を対象にして抗フィブリン抗体の免疫染色のプロト

コール化のため、抗原賦活条件、ブロッキング試薬の選択、一次抗体の濃度と溶解バッファーの選択、二次抗体の選択と濃度、洗浄法、発色法についての条件を検討し、最適化を行った。

2．イムノPET・SPECT プローブの開発

抗フィブリン抗体について、蛋白工学に基づき低分子 Fab 化を行った。ヒトがん病態に類似した膵臓がん遺伝子改変モデルマウスに蛍光標識抗体を投与して *in vivo* イメージングを行い、腫瘍集積性と生体内分布を観察した。抗TF抗体に関しては、H鎖とL鎖の可変部位(VH、VL)の遺伝子をクローニングして、ヒトキメラ化を行った。さらに、抗フィブリン抗体同様に、低分子 scFv 及び Fab 化を行い、蛍光標識後に *in vivo* イメージングで特性評価を行った。

C．研究結果

1．トランスレーショナル研究

研究方法に記載した - の条件を最適化

して、ヒト臨床検体を対象にした抗フィブリン抗体の免疫染色のプロトコール化を行った。脳腫瘍と膵臓がんについて、各臨床検体の症例数を蓄積しているところである。

2. イムノ PET・SPECT プロープの開発

蛋白工学を駆使して、抗フィブリン抗体の低分子 Fab 化を行った。ELISA 試験と分子間相互作用解析(BIACORE)で測定した抗原親和性は高く、オリジナル IgG とほぼ同等であった。膵臓がん遺伝子改変モデルマウスにおける *in vivo* イメージングでは、Fab プロープは投与後 3 時間で高い腫瘍特異的集積性を示し、24 時間以内に体外に排出された。抗 TF 抗体に関しても、遺伝子クローニング・ヒトキメラ化に成功した。引き続き、低分子 scFv 及び Fab 化を行い、ELISA 試験、フローサイトメトリー、分子間相互作用解析(BIACORE)で抗原親和性が保たれていることを確認した。蛍光標識後に *in vivo* イメージングを行い、分子イメージング用プロープとしての有用性を確認した。

D. 考察

抗フィブリン抗体に関して免疫染色をプロトコール化することで、実験者の違いに伴うサンプル間の染色性の違いを回避できるようになった。

抗フィブリン抗体と抗 TF 抗体ともに、抗体プロープを低分子化することで、全長 IgG と比較して、クリアランスが早く撮影時間が大幅に短縮できることが判明した。生体内蓄積性が低いので安全性が高く、尚且つ当日のみの外来診療が可能な患者にやさし

い分子イメージング用プロープであることが示された。

E. 結論

今回検討した低分子化抗体プロープは安全性が高く、当日のみの外来診療が可能な分子イメージング用プロープであることが判明した。本技術は安全かつ患者に優しい新規医療技術に資する内容であることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Koga Y, Manabe S, Aihara Y, Sato R, Tsumura R, Iwafuji H, Furuya F, Fuchigami H, Fujiwara Y, Hisada Y, Yamamoto Y, Yasunaga M, Matsumura Y. Antitumor effect of antitissue factor antibody-MMAE conjugate in human pancreatic tumor xenografts. *Int J Cancer*. 2015.
2. Ahn J, Miura Y, Yamada N, Chida T, Liu X, Kim A, Sato R, Tsumura R, Koga Y, Yasunaga M, Nishiyama N, Matsumura Y, Cabral H, Kataoka K. Antibody fragment-conjugated polymeric micelles incorporating platinum drugs for targeted therapy of pancreatic cancer. *Biomaterials*. 2014, 23-30.
3. Sato R, Obonai T, Tsumura R, Tsumoto K, Koga Y, Yasunaga M, Matsumura Y. Preparation and characterization of anti-tissue factor single-chain variable fragment antibody for cancer diagnosis. *Cancer Sci*. 2014. 105, 1631-7.
4. Sugimoto M, kahashi S, Kojima M, Gotohda N, Kato Y, Kawano S, Ochiai A, Konishi M. What is the nature of pancreatic consistency? Assessment of the elastic modulus of the pancreas and comparison with tactile sensation, histology, and occurrence of postoperative pancreatic fistula after

pancreaticoduodenectomy. *Surgery* 2014. 156, 1204-11.

5. Sugimoto M, Mitsunaga S, Yoshikawa K, Kato Y, Gotohda N, Takahashi S, Konishi M, Ikeda M, Kojima M, Ochiai A, Kaneko H. Prognostic impact of M2 macrophages at neural invasion in patients with invasive ductal carcinoma of the pancreas. *Eur J Cancer*. 2014. 50, 1900-8.

6. Arita H, Narita Y, Yoshida A, Hashimoto N, Yoshimine T, Ichimura K. IDH1/2 mutation detection in gliomas. *Brain tumor pathology*. 2014.

7. Arita H, Narita Y, Matsushita Y, Fukushima S, Yoshida A, Takami H, Miyakita Y, Ohno M, Shibui S, Ichimura K. Development of a robust and sensitive pyrosequencing assay for the detection of IDH1/2 mutations in gliomas. *Brain tumor pathology*. 2015. 32, 22-30.

8. Takami H, Yoshida A, Fukushima S, Arita H, Matsushita Y, Nakamura T, Ohno M, Miyakita Y, Shibui S, Narita Y, Ichimura K. Revisiting TP53 Mutations and Immunohistochemistry-A Comparative Study in 157 Diffuse Gliomas. *Brain Pathol*. 2014.

8. 安永正浩、眞鍋史乃、松村保広 間質を標的とした治療法開発と展望 がんと間質 文光堂 病理と臨床 2014, 32, 57-63.

9. 高橋進一郎、大野泉、小西大、池田公史. Borderline resectable 膵癌に対する集学的治療 癌の臨床. 2014. 60, 81-89.

10. 高橋進一郎、小西大、池田公史、小林達伺、秋元哲夫、小嶋基寛. Borderline resectable 膵癌に対する術前S-1 併用放射線療法 膵癌治療 up-to-date 2015 術前補助療法の適応と効果 4 .

2 . 学会発表

1. Yasunaga M , Manabe S, Tarin D, Matsumura Y. Development of CAST (Cancer stromal targeting) therapy. 25th Antibody Engineering & Therapeutics. 2014-12/8-12/10, Huntington Beach, USA.

2. K.Kitaguchi, Y.Kato, N.Gotohda, H.Shibasaki,

T.kinoshita, S.takahashi, M.Konishi A resected case of intraductal tubulopapillary neoplasm of the pancreas, and the revieww of intraductal neoplasms of the pancreas experienced in our institution.

IHPBA2014(International Hepato-Pancreato-Biliary Association) 2014/3/22-27.Seoul, Korea.

3. 高橋進一郎, 小西大, 後藤田直人, 加藤祐一郎. 膵癌・門脈合併切除例の短期及び長期成績 ~ 分枝温存及び門脈切除距離の意義 第 2 6 回日本肝胆膵外科学会学術集会. 2014/6/11-13.

4. 廣方玄太郎, 高橋 進一郎, 加藤 祐一郎, 後藤田 直人, 小西 大. 残膵再発切除症例に対する検討. 第 2 6 回日本肝胆膵外科学会学術集会. 2014/6/11-13.

5. 高橋大五郎, 後藤田 直人, 加藤 祐一郎, 高橋 進一郎, 小西 大. 第 5 因子欠乏症合併膵頭部癌に対し亜全胃温存膵頭十二指腸切除術を施行した 1 例. 第 2 6 回日本肝胆膵外科学会学術集会. 2014/6/11-13.

6. 高橋進一郎, 小西大, 後藤田直人, 加藤祐一郎. 化学放射線療法後の Borderline resectable 膵癌に対する S M A 周囲廓清. 第 7 6 回日本臨床外科学会総会. 2014/11/20-22.

G . 知的財産権の出願・登録状況

明の名称：抗 Tissue Factor モノクローナル抗体

発明人：松村保広、安永正浩、古賀宣勝、山本祥之、佐藤隆太、津村遼、片岡一則、西山伸宏、三浦裕、眞鍋史乃、加藤泰己 出願人：独立行政法人国立がん研究センター 国立大学法人 東京大学 独立業際法人理化学研究所 ナノキャリア株式会社

特願 2014-18586(出願日：2014 年 2 月 5 日)