

【目的】悪性固形腫瘍（がん）内の酸素環境は不均一で、血管から離れた領域に低酸素領域が存在する。低酸素刺激にさらされたがん細胞は悪性形質と治療抵抗性を獲得し、がんの再発と患者の予後不良の原因となる。この問題を克服するために、低酸素がん細胞を標的とする治療法の開発が進められているが、これを治療成績の向上に繋げるためには、患者ごとに異なる「腫瘍内低酸素領域の量」をモニターし、腫瘍内低酸素領域が多く、低酸素標的治療が有効な患者を選別する検査法を確立することが不可欠である。この様な背景の下、予備研究を通じて我々は、低酸素刺激を受けたがん細胞が血中に分泌するタンパク質として SPINK1 を発見し、血中の SPINK1 濃度を指標に腫瘍内低酸素をモニターする手法（下図）を着想した。この手法の Proof-of-Concept を取得すること、および本手法を実現する上で必要となる、力価と特異性の高い独自の抗 SPINK1 抗体を作製するために重要な情報の取得を目的として本研究を実施した。

【方法】*in vitro* と *in vivo* の実験を実施して、これまでの研究で独自に見出していた低酸素誘導性分泌タンパク質 SPINK1 に着目し、その血中濃度を指標に腫瘍低酸素をモニターする手法の proof-of-concept を取得した。また、特異性と力価の高い抗 SPINK1 抗体を作製するために、抗原として最適な領域を計算科学的に同定した。

【結果】各種のヒト由来がん細胞株を様々な酸素分圧下（20～0.1%未満）で培養することにより、酸素濃度 0.1% 未満という極めて重度の条件下でのみ、SPINK1 の発現が転写開始段階で誘導されることを見出した。低酸素刺激依存的に新規産生された SPINK1 タンパク質は細胞外に分泌された。培地に蓄積した SPINK1 タンパク質の濃度は、細胞内 SPINK1 mRNA 量と正に相関した。ヒト由来がん細胞株を下肢大腿部皮下に移植した実験腫瘍モデルにおいて、SPINK1 タンパク質は血管遠位の低酸素領域で強く発現していた。SPINK1 蛋白質は低酸素領域近傍においても僅かに検出され、低酸素領域から拡散していることが伺えた。移植腫瘍において SPINK1 タンパク質と内在性低酸素マーカー CA9 タンパク質の発現量は強い相関を示した。移植腫瘍に供給される酸素量を薬理的に低下させた場合に、その程度に相関して腫瘍内 SPINK1 発現量と血漿中 SPINK1 濃度がともに増加した。これらのデータから、低酸素領域から血中に分泌された SPINK1 を指標に腫瘍内の低酸素分画を予測できる可能性が示された。血中タンパク質を検出・定量する手法として ELISA 法が一般的であるが、良好な抗 SPINK1 抗体がないことが問題であった。そこで本研究では、力価と特異性の高い抗 SPINK1 モノクローナル抗体を作製するために必要な、最適な抗原となり得るペプチド配列を計算科学的に同定した。

低酸素誘導性分泌タンパク質の血中濃度を指標に腫瘍低酸素をモニターする手法の概略図

