

最終講義 1

小海 康夫 教授 (医学部附属フロンティア医学研究所病態情報学)



略歴

[生年月日]

昭和 31 年 8 月 新潟県に生まれる

[学歴・職歴]

昭和 50 年 3 月 芝高等学校卒業
昭和 57 年 3 月 弘前大学卒業
昭和 59 年 6 月 弘前大学大学院退学
昭和 59 年 7 月 札幌医会大学医学部第一病理学講座 研究生
昭和 60 年 3 月 札幌医科大学医学部 助手
昭和 61 年 4 月 米国ペンシルバニア大学 研究員
平成 2 年 7 月 国立小児医療研究センター 病理研究室長
平成 7 年 4 月 札幌医科大学医学部医学科病理学第二講座 助教
平成 10 年 2 月 札幌医科大学医学部 講師
平成 12 年 9 月 札幌医科大学医学部 助教授
平成 15 年 6 月 札幌医科大学医学部 教授
平成 19 年 4 月 札幌医科大学医学部教育研究機器センター分子機能解析部門長
平成 23 年 4 月 札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所病態情報学部門
平成 23 年 4 月 札幌医科大学医学部教育研究機器センター蛋白質解析部門長
平成 23 年 4 月 札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所病態情報学部門
平成 24 年 4 月 札幌医科大学医学部教育研究機器センター蛋白質解析部門長
平成 30 年 4 月 札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所所長
令和 3 年 3 月 札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所病態情報学部門
勸奨退職

[資格・免許]

昭和 57 年 6 月 医師免許
平成 1 年 12 月 医学博士
平成 8 年 3 月 屍体解剖資格（病理）
平成 10 年 7 月 日本病理学会認定病理専門医
平成 10 年 12 月 日本臨床細胞学会細胞診指導医

[主な研究分野]

プロテオミクス、幹細胞移植、発生工学

[所属学会・主な学会活動等]

日本癌学会、日本分子生物学会、日本病理学会

[受賞歴]

平成 7 年 北海道化学技術賞
平成 13 年 米国骨代謝学会 Young Investigator's Award
平成 14 年 秋山記念生命科学研究助成
令和 2 年 北海道社会貢献賞

抄録

抗体による病理現象の認識についての一考察

小海 康夫

医学部附属フロンティア医学研究所病態情報学部門

モノクローナル抗体の開発によって均一な抗体を簡便に制作することが可能となっており、モノクローナル抗体を用いた分子を背景とした診断治療は実臨床にひろく活用されている。

本稿では、私が関わった 3 つの研究を通してモノクローナル抗体による病理現象のプロープとしての意義について考察を加える。

L29, L30 モノクローナル抗体は、人リンパ球 B 細胞分化因子を認識するモノクローナル抗体である。これらの抗体の開発により *in situ* で B 細胞の分化段階を分子レベルで検討することが可能となった。現在のリンパ腫の病理診断においてモノクローナル抗体が果たす役割とその意義について考察する。

ラット HER2(p185neu) の細胞がん化機構に関する

研究で、細胞型 p185neu の過剰発現だけではマウス線維芽細胞系での発がん性が認められず、EGFR 発現が必要であることを見出した。過剰発現した p185neu に対する固有のモノクローナル抗体は *in vivo* で抗腫瘍効果を示す。現在の HER2 療法の理論基盤に通じる p185neu に対するモノクローナル抗体による治療機構を考察する。

アルツハイマー病に代表される神経変性疾患において、特定のタンパク質のアミロイド化は疾患のホールマークである。プロテオミクスとタンパク質化学を応用してアルツハイマー病モデルマウスの老人斑に特異的に発現する分子を同定し、免疫定量系を確立した。本定量系は、アミロイド化した特定の分子を優先検出する。本免疫定量の特異性について考察する。

講義内容

抗体による病理現象の認識についての一考察

フロンティア医学研究所病態情報学部門

小海 康夫

図 1

抗体による病理現象の認識について私自身関わってきた研究を事例としてご紹介し、考察を加えさせていただきます。

病
理
学

やまいの
ことわりを
まなぶ

図 2

昭和 59 年 7 月に札幌医科大学第一病理学教室の研究生として研究人生を開始させていただきました。推薦状も無い私を菊地浩吉先生をはじめとする教室の皆さんは暖かく迎え入れてくださりました。ここに改めてお礼申し上げます。翌日からまるで 10 年前からいるような顔をして教室を歩き回りました。

当時の教室には高速の FACS もありません、質量分析器もありません、まして次世代シーケンサーなどは開発の最中で概念作りの段階でした。機械といえは大きな遠心機、大きな蛍光顕微鏡、小さな水銀灯で動く FACS そして電気泳動用のパワーサプライくらいでした。しかし教室には全国から若者が集い、熱気にあふれていました。そんな中で切磋琢磨の環境を与えていただいた幸運に改めて感謝申し上げます。

研究を開始するにあたって菊地先生から教えていただいた言葉のスライドです。病理学とは「やまいのことわりを まなぶ」学問なのだよと教えてくださいました。その言葉は当時の私の胸にすんと入りこみ、本日この瞬間も私の体のなかで生きています。以来病理学の学びをこの言葉に導かれて進めてまいりました。

え
見れば分かる

図 3

さて病理学研究の基本は観察であります。すなわちよく見ることです。肉眼で、顕微鏡でじっくりと観察することが病理現象をとらえる基本とされています。当時の私も一生けん命に観察しました。しかしいくら見てもわからないことが実に多いことに気づきました。いくら見てもわからないのです。

夜空を見上げると星が満天に瞬いています。光る星は恒星であることが知られています。太陽の仲間です。ですから地球のような惑星が恒星の回りをめぐっているはずですが、惑星は光りませんので見えません。天文学の進歩でブラックホールという光までも飲み込んでしまう天体が知られています。さらに宇宙は目に見えないダークマターで満ちているそうです。これらはすべて肉眼では見ることはできません。しかし異なる方法で検出することにより存在を知り調べることができるようになります。

そうなんです。見るだけではわからないのです。見れば分かるのではなく見え（・）れば分かるのです。以来見えるようになるための新しい顕微鏡を探し続けてまいりました。質量分析器であったり遺伝子改変動物であったり、いままでは見ることはできなかった新しい視野を与えてくれる顕微鏡を探し続けています。最初に出会った新しい顕微鏡がモノクローナル抗体でした。肉眼では決して見えない細胞の分化やがん化を組織内すなわち in situ で検出できる探索子です。

モノクローナル抗体による抗原認識について

図 4

モノクローナル抗体はケーラーとミルシュタインによって発表された画期的な方法論です。私が菊地先生のもとで研究を開始したころは、教室を上げてモノクローナル抗体を用いた研究が繰り返られていました。私の研究の開始とはモノクローナル抗体との出会いでした。

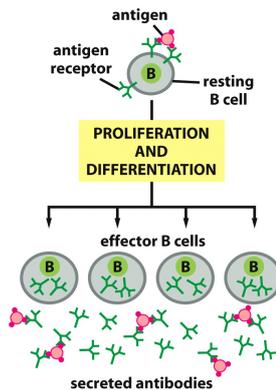


Figure 25-17 Molecular Biology of the Cell (© Garland Science 2008)

図 5

ご存知のように B 細胞は抗原を認識し、活性化分化の後に形質細胞になり抗体を産生します。生体内では産生される抗体は種々の抗原に向かったものが混在しており、抗原の特異性を用いた研究には不向きです。モノクローナル抗体の出現によって特異的な抗原にターゲットを当てた研究が可能になりました。

モノクローナル抗体は、ひとつの抗原決定基に対する抗体を無限に作成することができます。さらに B 細胞抗原受容体は、遺伝子構造がもっとも詳細に研究されている代表的な遺伝子ですので、カセット化された便利な遺伝子改変技術が確立しています。マウスで作成したモノクローナル抗体を短期間でヒト化することも可能です。

物質としてモノクローナル抗体を無尽蔵に作成可能であることは、新しい抗体を作成できれば素早く工業化に持ち込めることを意味します。特定の分子、特定の生命現象を標的にした治療戦略を組むことが可能になります。すなわちモノクローナル抗体は分子標的療法を可能にした橋渡し研究の架け橋そのものというわけです。

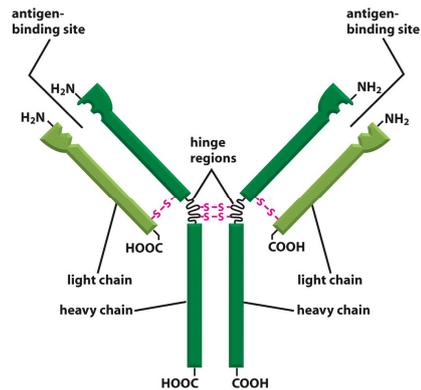


Figure 25-21 Molecular Biology of the Cell (© Garland Science 2008)

図 6

ご存じのように抗体は重鎖と軽鎖からなる 2 量体です。ちょうど Y の形をしています。Y の字それぞれの先端に抗原は結合することから、抗原抗体結合は単なる結合ではなく抗原へ構造的な影響を与える結合となります。これは抗体が単なる特異的結合プローブにはとどまらず、抗原の生物活性へ影響を及ぼす、すなわち生物学的リガンドとなりうることに通じています。抗体は特異的な結合に加え生命現象のプローブとなることが可能な構造体であると言えます。

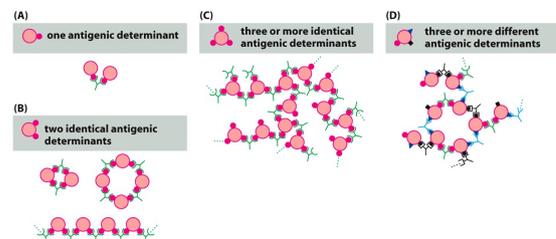


Figure 25-19 Molecular Biology of the Cell (© Garland Science 2008)

図 7

Y 字のために実にさまざまな結合様式を示すことが可能です。この図から Y 字の先にひとつの分子が結

合しうるパターンからリング状に結合したり、さらに凝集体を形成するような結合も可能となります。Y字であることの意義が見て取れます。

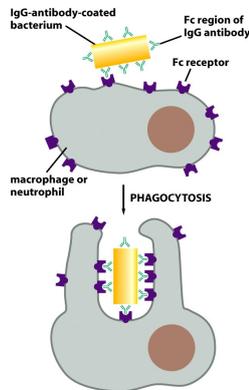


Figure 25-24a Molecular Biology of the Cell (© Garland Science 2008)

図 8

細菌に結合してマクロファージの食食を促進するオプソニン効果はおそらく先のスライド7でお示したさまざまな結合様式が細菌上で抗体によって繰り広げられており、オプソニン効果とはそれらの結合の集合値であることが予想されます。

モノクローナル抗体による B細胞分化抗原の同定とリンパ腫診断について

図 9

ここからはモノクローナル抗体を用いた診断への橋渡し研究をご紹介します。

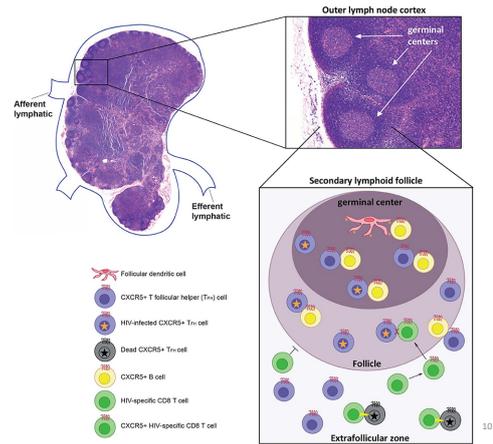


図 10

Bリンパ腫は最も頻度の高いリンパ腫であり、さまざまな亜系からなる多様な悪性腫瘍です。リンパ腫の診断はリンパ球の正常発生カウンターパートに対応して系統づけられています。このことから元々の性質を反映するリンパ腫診断体系が確立されるべきであることが理解できます。

Clin. exp. Immunol. (1986) 64, 382-391.

Characterization of two distinct antigens expressed on either resting or activated human B cells as defined by monoclonal antibodies

YASUO KOKAI, YOSHIFUMI ISHII & KOKICHI KIKUCHI Department of Pathology, Sapporo Medical College, Sapporo, Japan

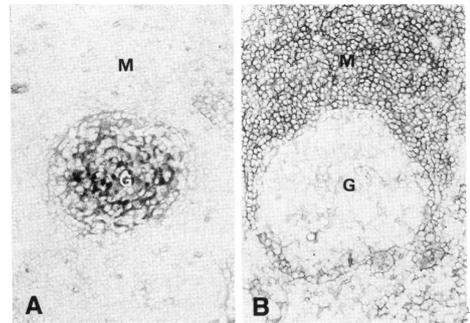


図 11

B細胞はリンパ濾胞内で暗殻と胚中心を形成し、暗殻から胚中心へと分化活性化が進むことが知られています。我々は世界に先駆けてこのイベントを可視化することを可能としたモノクローナル抗体のパネルを開発しリンパ腫診断へ応用しました。

Table II
Rappaport classification

Lymphocytic, well differentiated	Follicular (nodular)/diffuse
Lymphocytic, poorly differentiated	Follicular (nodular)/diffuse
Mixed Cell (lymphocytic-histiocytic)	Follicular (nodular)/diffuse
Histiocytic (Reticulum cell sarcoma)	Follicular (nodular)/diffuse
Undifferentiated	mostly diffuse

図 12

当時のリンパ腫診断は Rappaport 分類と呼ばれる形態学的分類に留まっており、HE 染色上の形態のみでの診断は、リンパ腫の生物学的性格を反映することが極めて困難であり、そのため治療にも大きな混乱が存在していました。結果として B 細胞リンパ腫は極めて予後不良の疾患としてとらえられていました。

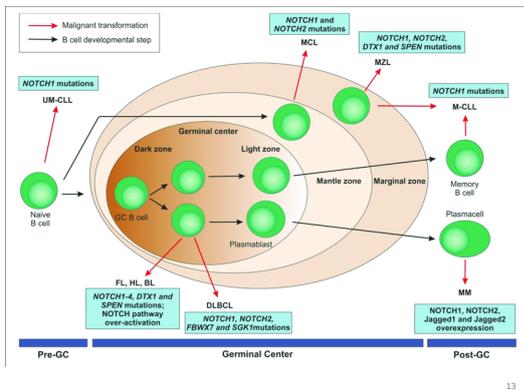


図 13

その後モノクローナル抗体を用いた客観的な分化マーカーの発現様式に基づいた診断体系が構築され、誰でも世界のどこでも共通の診断結果が得られるようになり、再現性の高い診断が実現しました。それによって生物学的に均一なリンパ腫群が検出され予後に基づいた合理的な治療が実施され、現在の B リンパ腫の画期的な予後改善につながりました。

J Clin Pathol 1987;40:1405-1412
Monoclonal antibody L26: an antibody that is reactive with normal and neoplastic B lymphocytes in routinely fixed and paraffin wax embedded tissues

A J NORTON, P G ISAACSON
From the Department of Histopathology, University College and Middlesex Medical School, London

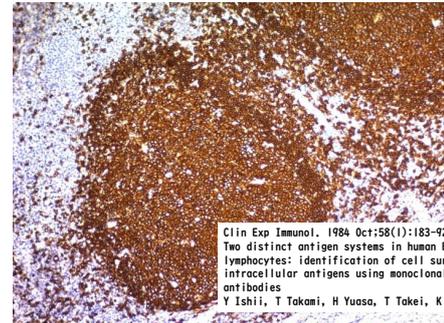


図 14

とここまでは大変結構な展開なのですが、大いに反省すべき事柄も残っています。この図は L26 というホルマリン固定パラフィン切片で B リンパ球と B リンパ腫を in situ で同定できる世界で最初の抗体によるリンパ濾胞の免疫染色です。この仕事をきっかけにホルマリン固定パラフィン切片を用いた腫瘍の診断がまるで燎原の火のごとく世界に広まり、現在は誰でもどこでもホルマリン固定パラフィン切片を用いて客観的ながん診断が可能となりました。すばらしいの一言なのです。しかし L26 を開発したのは確かに札幌医大の石井、高見、菊池らなのですが、論文にしたのはアイザックソンという病理学者になってしまいました。我々の大いに反省すべき怠惰と言わざるを得ません。この場を借りて菊地浩吉先生にお詫び申し上げます。いいわけですが、当時米国へ留学が決まっていた私の心はすでに L26 からも飛び立っておりましたことをご報告いたします。申し訳ありません。

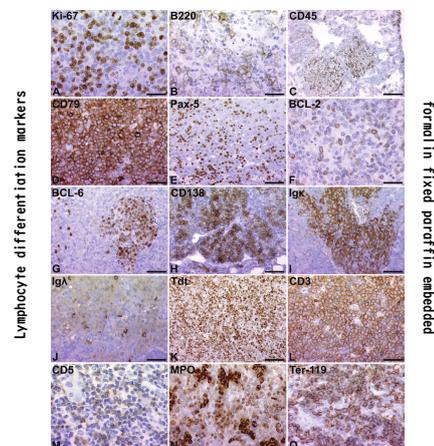


図 15

それはさておきホルマリン固定パラフィン切片の診断体系はあらゆる腫瘍に応用展開され、正確な診断がおおいに治療と予後の改善につながりました。

モノクローナル抗体による
In vivo腫瘍増殖抑制とTwo receptor theory

図 16

当時の米国は分子生物学の黎明期であり、この極めて強力な方法論を学ぶべく米国へ留学しました。

Cell, Vol. 58, 287-292, July 26, 1989. Copyright © 1989 by Cell Press

Synergistic Interaction of p185c-neu and the EGF Receptor Leads to Transformation of Rodent Fibroblasts

Yasuo Kokai, Jeffrey N. Myers, Takuro Wada, Valerie I. Brown, Charles M. Levine, James G. Davis, Kunio Dobashi, and Mark I. Greene
Department of Pathology and Laboratory Medicine
University of Pennsylvania
Philadelphia, Pennsylvania 19104-6092

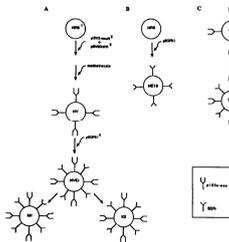


Figure 1. Correlation of Cell Lines
(A) The cell line NRE1 was cotransfected with p185c-neu and pEGFP1 (green) and cultured in media containing 600 μM methotrexate. The resulting cell line, NRE1, which overexpresses p185c-neu, was subsequently transfected with the pEGFP1 plasmid. Transfectants were selected in media containing 500 μg/ml G418. The resulting cell line, NRE2, coexpresses p185c-neu and EGFR. M1 and M2 were cloned by limiting dilution of the NRE2 cell line.
(B) NRE2 cells were also transfected with pEGFP1 and transfectants termed NRE3 were selected in media containing 500 μg/ml G418.
(C) GFP cells, which coexpress p185c-neu, were transfected with pEGFP1, and the resulting cell line, NRE3, overexpresses both p185c-neu and EGFR.
* Pines and Hirschmann (1977)
† Bagshaw et al. (1980)
‡ Simonsen and Leinman (1985)
§ Gorman and Melnick (1986)
¶ Hung et al. (1986)

図 17

そこでの研究の成果は Cell 誌に掲載されました。この仕事はハーセプチン治療の礎となる基礎研究として高い評価を受けました。

Trastuzumab - Mechanism of Action and Use in Clinical Practice
Clifford A. Hudis, M.D.
N Engl J Med 2007; 357:39-51.

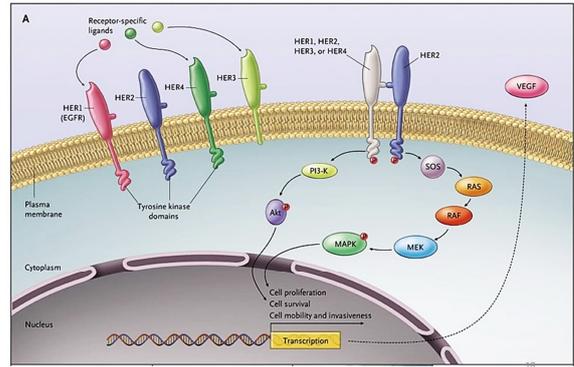


図 18

オリジナル論文のタイトルからは意味が分かりにくいので、その後の New England Journal of Medicine に掲載された総説を引用して私の仕事を説明させていただきます。今日ハーセプチンと呼ばれるに至った受容体型チロシンキナーゼは、当時 ErbB2 とか neu とか HER2 とか、取り扱っている研究者ごとに名称が異なり混乱していました。そこで本分子群を HER 分子群とすることが決まりました。HER 分子群は4つの受容体型チロシンキナーゼよりなり、HER2 は2番目に見出されたメンバーです。さらに3と4があります。HER1 は Epidermal Growth Factor Receptor です。HER1,3,4 はそれぞれに固有のリガンドを有した受容体型チロシンキナーゼです。しかし HER2 はリガンドが無いオーファンなのです。そのため HER1 と結合しなければがんシグナルが出せないということを私たちが発表しました。さらに幸運なことに HER1 と HER2 が結合する部位を遮断する抗体が存在しており、その抗体で処理すると HER2 でがん化したヌードマウス腫瘍が regress することが観察されたのです。今日のハーセプチン治療の幕開けです。

J Clin Invest. 2007 Aug 1; 117(8): 2051-2058.
ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies
 Hongtao Zhang,¹ Alan Berezov,¹ Qiang Wang,¹ Geng Zhang,¹ Jeffrey Drebin,² Ramachandran Murak,² and Mark I. Greene¹
¹Department of Pathology and Laboratory Medicine and ²Department of Surgery, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania, USA

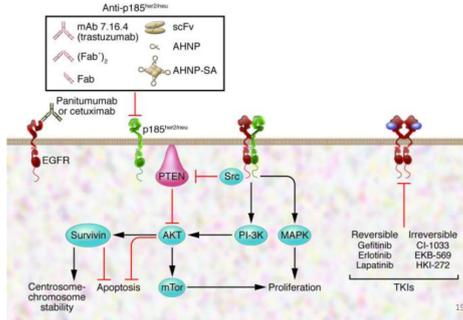


図 19

まとめるとこの図になります。HER2 は HER1 とヘテロ結合し 2 受容体で初めてがん遺伝子になり、その結合を阻害するとがん増殖はキャンセルされます。

Trastuzumab - Mechanism of Action and Use in Clinical Practice
 Clifford A. Hudis, M.D. N Engl J Med 2007; 357:39-51.

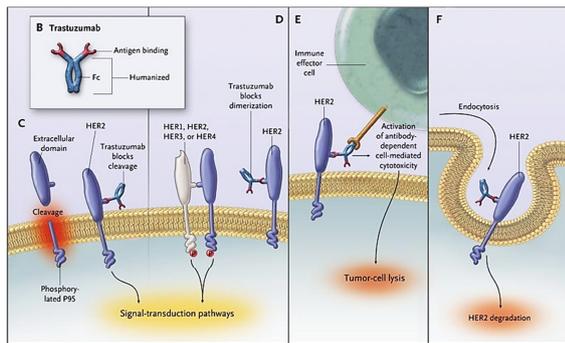


図 20

ハーセプチンは現在広く臨床応用され、がん治療における分子標的治療の最初で最大の成功例と言われています。その効果のメカニズムは複数存在し、そのうちのひとつ、図では D の仕組みを私たちが見出したこととなります。



図 21

ハーセプチン治療のほんの一端に触れただけの仕事ですが、あきらかに本治療体系の最初の嚆矢を放ったことの幸運に感謝すると同時にハーセプチンが世界で広く高く評価されていることに大きな喜びを感じます。

モノクローナル抗体による amyloid化タンパク質の検出と神経変性疾患

図 22

最後に医療人育成センターの相馬教授のお仕事に参加させていただいている研究をご紹介します。私たちは偶然アミロイド化したタンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体を開発できました。細菌のインクルージョンボディーからの組み換えタンパク質を可溶化するとアミロイド化することが報告されています。私たちの扱っていた分子も細菌で組み換え発現をさせ refold したらアミロイド化しました。

UV-Visible absorption spectra of a Congo red solution.

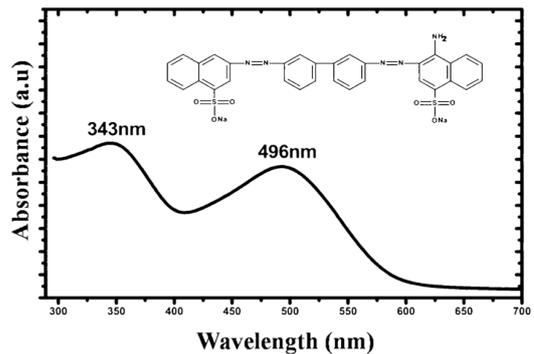


図 23

アミロイドとはアミノ酸の一次配列からは類推しがたい高次構造です。コンゴ赤と呼ばれる色素に結合し吸光度が red shift する一群のタンパク質です。すなわち分子生物学のセントラルドグマから逸脱した分子群ということになります。配列に依存しない高次構

造変化は神経変性疾患でしばしば観察され、神経変性疾患の病態と深く関わっています。

Congo Red spectrum peak shift by Ab peptides.

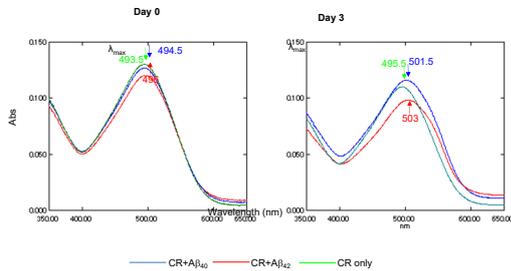


図 24

アミロイドペプチドでコンゴ赤の red shift を観察するとアミロイド化が進展するにつれ吸光度のより長波長への変異が観察されます。この現象を指標に分子のアミロイド化が検出できます。

Difference spectrum of Ab peptides at various incubation time.

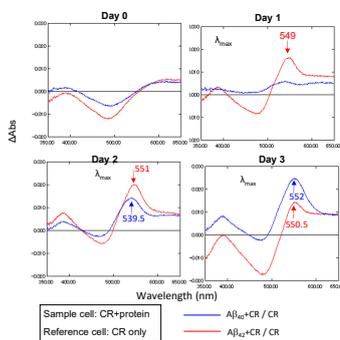


図 25

アミロイドペプチドのアミロイド化を時系列で観察しました。Aβ 40 および Aβ 42 いずれの分子も時間依存的にアミロイド化の指標であるコンゴ赤の red shift が観察されます。

Difference spectrum of recombinant MFG-E8 proteins at various incubation time.

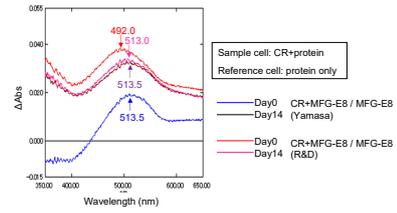
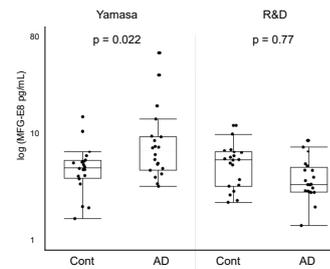


図 26

我々が見出した新しいアミロイドタンパク質の MFG-E8 のコンゴ赤の red shift を示します。

Difference of plasma MFG-E8 as measured by Yamasa or R&D ELISA.



Yamasa Abs preferentially detect amyloidogenic MFG-E8.
R&D Abs detect native MFG-E8.

図 27

このアミロイド化 MFG-E8 と native な MFG-E8 を別々に認識する免疫定量系でアルツハイマー病患者さんと年齢相応の正常高齢者の血液中の MFG-E8 を測定したところアルツハイマー病患者ではアミロイド化した MFG-E8 が有意に増加していました。

Logistic regression analysis for AD by either Yamasa ELISA but not by R&D ELISA.

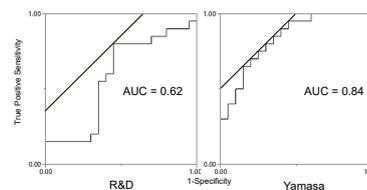


図 28

ロジスティック解析により高い感度特異度でアルツハイマー病と正常者を分別できることが示されました。

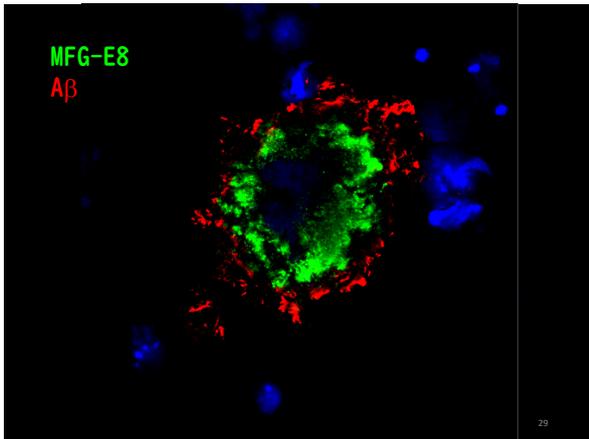


図 29

アルツハイマー病モデルマウスの MFG-E8 の分布は老人斑特異的であることが示されました。図中緑部分が MFG-E8、赤はアミロイドペプチドを示します。アルツハイマー病で検出されたアミロイド前駆タンパク質、タウタンパク質に続く 3 番目のタンパク質の可能性がります。アルツハイマー病の病理はタンパク質のアミロイド化の促進という環境の変化なのかもしれませぬ。

学 学び、問う
問 学ぶと、問われる

能動

受動

図 30

ここまで私の小さな病理研究の旅をご紹介させていただきました。低空飛行の日もありました。乱気流に巻き込まれたこともありましたが、しかし皆さまのおかげで最終講義にたどりつくことができました。学問は学び問うと書きます。ずっと学問に入り浸っていたら、学んだ学問に問われる日々がやって来ました。受け身の学びにまい進していきたくないと希望しております。

本日は最終講義を実施させていただきますありがとうございます。

昭和59年、大好きな北海道の地で菊地浩吉教授の研究生として病理学の研究を開始させていただきました。以来37年間、病理の深淵に魅せられ研究に没頭してまいりました。分子を変数とした病いの因数分解は、もとより浅学菲才であるわたくしには困難に満ちた冒険でした。しかし時おり差し込むわずかな光に導かれ進んでまいりました。そんなわたくしを、辛抱強く暖かくご指導いただき感謝のことばもありません。学長をはじめとする札幌医科大学のすべての教職員諸兄弟姉妹に心から感謝を申し上げます。

突然門戸をたたいたわたくしを快く受け入れてくださった札幌医科大学の皆さま、とりわけ病理学講座菊地浩吉先生、手に手を取って研究の指導をしてくださった石井良文先生、曲がり角で迷うたびに適切な道をお示しくださった松浦晃洋先生など、数え上げれば恩顧を賜った諸先輩、先生方はきりがありません。なかならず教授にまで取り上げていただき、身の幸運に驚くばかりです。ご厚情のすべてに札幌医科大学の皆さまの深い暖かさを実感いたします。

建学の精神

一、進取の精神と自由闊達な気風

一、医学・医療の攻究と地域医療への貢献

とはわたくしの道しるべとなったことばです。今後も建学の精神を具現する一病理学徒として研鑽を重ねてまいりたいと希望しております。引き続きご指導のほど、よろしくお願ひ申し上げます。現在までにお授け頂いたご指導に重ねて感謝を申し上げ、わたくしのお礼の言葉とさせていただきます。長く大変お世話になりました。ありがとうございます。 令和3年3月吉日 小海康夫

図 31

最後のスライドです。

本日は最終講義を実施させていただきますありがとうございます。

昭和 59 年、大好きな北海道の地で菊地浩吉教授の研究生として病理学の研究を開始させていただきました。以来 37 年間、病理の深淵に魅せられ研究に没頭してまいりました。分子を変数とした病いの因数分解は、もとより浅学菲才であるわたくしには困難に満ちた冒険でした。しかし時おり差し込むわずかな光に導かれ進んでまいりました。そんなわたくしを、辛抱強く暖かくご指導いただき感謝のことばもありません。学長をはじめとする札幌医科大学のすべての教職員諸兄弟姉妹に心から感謝を申し上げます。

突然門戸をたたいたわたくしを快く受け入れてくださった札幌医科大学の皆さま、とりわけ病理学講座菊地浩吉先生、手に手を取って研究の指導をしてくださった石井良文先生、曲がり角で迷うたびに適切な道をお示しくださった松浦晃洋先生など、数え上げれば恩顧を賜った諸先輩、先生方はきりがありません。なかならず教授にまで取り上げていただき、身の幸運に驚くばかりです。ご厚情のすべてに札幌医科大学の皆さまの深い暖かさを実感いたします。

建学の精神

一、進取の精神と自由闊達な気風

一、医学・医療の攻究と地域医療への貢献

とはわたくしの道しるべとなったことばです。今後も建学の精神を具現する一病理学徒として研鑽を重ねてまいりたいと希望しております。引き続きご指導のほど、よろしくお願ひ申し上げます。現在までにお授け頂いたご指導に重ねて感謝を申し上げ、わたくしのお礼の言葉とさせていただきます。長く大変お世話になりました。

ありがとうございました。