

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06671

研究課題名(和文) 免疫チェックポイント阻害剤の動態解析に基づく生理学的薬物動態モデルの構築

研究課題名(英文) Evaluation of Pharmacokinetic and efficacy of Anti-PD-1/PD-L1 Antibodies and development of PBPK models.

研究代表者

畠山 浩人 (Hatakeyama, Hiroto)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：70504786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：抗PD-1/PD-L1抗体は同一経路を標的とする免疫チェックポイント阻害剤であるが、両者の薬効におよぼす体内動態の影響に関する検討は不十分である。PD-1/PD-L1経路阻害感受性モデルにおいてPD-1抗体と比較するとPD-L1抗体の薬効は乏しかった。放射性同位体¹¹¹In標識抗体で体内動態を比較したところ、PD-L1抗体の血中濃度と腫瘍移行量がPD-1抗体と比較し著しく減少し、正常臓器への集積が増加していた。両抗体の標的分子の正常臓器での発現の違いから、動態特性に大きな差が生じ、腫瘍集積量と薬効に影響を及ぼすことが示唆された。また動態解析からPBPKモデルの構築を検討した。

研究成果の概要(英文)：Recently anti-PD-1 antibodies (aPD-1 Abs), anti-PD-L1 (aPD-L1) Abs have been approved. However, the difference between both Abs in pharmacokinetics and anti-tumor effects have not been fully understood. In this study, we analyzed the difference between both Abs in blood concentration, biodistribution and degradation in tumor-bearing mice by using aPD-1/PD-L1 Abs labeled with radioisotopes (¹¹¹In) and evaluated the relationship between PK and therapeutic effects. It was observed that aPD-L1 Abs were largely accumulated in normal tissues, especially in the spleen and liver and degraded rapidly compared with aPD-1 Abs, resulting that the blood concentration and distribution in tumors of aPD-L1 Abs tended to be low. the PK of aPD-1/PD-L1 Abs which target the same axis were not equivalent and the selectivity of expression of target molecules in both normal tissues and tumors should be considered to optimize their therapeutic efficacy. We attempted to develop PBPK models by obtained PK data.

研究分野：がん免疫治療

キーワード：免疫チェックポイント阻害剤 抗体医薬 薬物動態学

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害剤であるニボルマブは抗 PD-1 抗体で、細胞性免疫を担う細胞障害性 CD8 陽性 T 細胞 (以下 CD8(+))T 細胞) の表面の PD-1 (Programmed cell death 1) 分子を標的とした抗体医薬であり、そのリガンド PD-L1 発現癌細胞に対する T 細胞の免疫寛容を解除し、癌免疫を活性化することで抗腫瘍効果を誘導するが、奏効率は 30% 程度と低く、薬効を予測する方法やバイオマーカーなどの開発が望まれている。しかし、非臨床担癌モデルにおいて PD-1/PD-L1 経路阻害への感受性や耐性の分類は明確ではなく、比較検討は困難であった。

また抗 PD-1 抗体はニボルマブに加えてペンプロリズマブが、抗 PD-L1 抗体もアベルマブやアテゾリズマブ、デュルバルマブが承認された。同一経路を標的とする抗 PD-1 抗体と抗 PD-L1 抗体について薬効や体内動態について直接比較した臨床試験は存在せず、非臨床モデルを用いた比較検討は少なく、明確な区別は示されていない。また先述の通り、低い奏効率の割に、年間の治療費が 1500 万円と言われる高額な薬価は社会保障の根幹を揺るがす社会となっており、抗 PD-1 抗体と PD-L1 抗体のどちらを選択すべきか、免疫チェックポイント阻害剤の薬効を示す患者をどのように選択すべきかは重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究では非臨床モデルとして用いられるマウス担癌モデル 18 種類を作成し、PD-1/PD-L1 発現情報をもとに選択したモデルに対して、抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体を投与し PD-1/PD-L1 経路の阻害に対する感受性、耐性の検討を行い、抗 PD-1 抗体や抗 PD-L1 抗体に対する感受性や耐性マウス腫瘍モデルの分類を行う。分類された感受性・耐性モデルの腫瘍から遺伝子発現情報を取得し、感受性、耐性モデル間の比較を行うことで薬効や動態に影響する要因について検討する。体内動態の解析では、放射性同位体 ^{111}In で標識した抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体を、上記で分類された感受性、耐性モデルに投与し血中濃度や腫瘍および正常臓器への移行量を評価し、薬効に及ぼす動態的要因について検討する。

3. 研究の方法

(1) PD-1/PD-L1 経路感受性の分類

上皮系として乳がん 4T1、MM48、FM3A、EMT6、大腸がん CT26、MC38、Colon26、肺がん 3LL、KLN205、腎がん Renca、膀胱がん MBT2 の 11 種類、肉腫としてメラノーマ B16F1 および B16F10、骨肉腫 LM8、繊維芽肉腫 Meth-A、NFSa Y83 の 5 種をまた T 細胞リンパ腫 EL4、肥満細胞腫 P815 の 2 種類、合計 18 種類のマウスがん細胞株を入手した。各がん細胞について同系マウス (C57BL/6、BALB/c、C3H、DBA/2、6 週齢、雌性) の背部皮下に $1 \sim 3 \times 10^6$ cells/mouse で移植後、腫瘍体積が 500 mm³ 前後で腫瘍組織を回収した。RNAzol 溶液中でホモジナイズ後、Direct-zol RNA MiniPrep Kit を用いて RNA を抽出し、RNA 濃度および純度は NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific) にて確認した。ReverTra Ace® qPCR RT を用いて逆転写 PCR 反応を行い cDNA を取得し、TUNDEBIRD SYBR qPCR Mix を用いて real-time PCR (StepOne Real Time PCR System, Applied Biosystems) にて、各腫瘍組織中の PD-1/PD-L1 遺伝子発現量を測定した。タンパク質は上記腫瘍塊の一部を RIPA bufer 中でホモジナイズし、BCA 法でタンパク質濃度を測定しウェスタンブロッティング法にて評価した。各発現量からモデル間で相対的発現量を算出し担癌モデルを選択し薬理試験を実施した。

薬理試験はがん細胞を上記と同様に同系マウス (6 週齢、雌性) 移植し、移植後 5、8、12 日に、コントロール IgG 抗体 (2A3, Bioxcell)、抗 PD-1 抗体 (RMP1-14, Bioxcell)、抗 PD-L1 抗体 (10F.9G2, Bioxcell) をそれぞれ 200ug/100uL PBS/mouse の投与量で腹腔内投与し、腫瘍体積をもとに腫瘍増殖を評価し、感受性、耐性の分類を行った。

(2) PD-1/PD-L1 抗体の体内動態評価

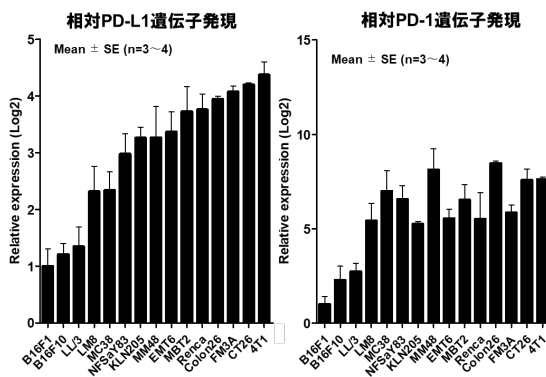
抗 PD-1 抗体および抗 PD-L1 抗体にキレート剤 SCN-CHX-A^{99m}-DTPA を約 1:2 程度の割合で結合させ線放出核種である ^{111}In を配位させ、ゲルろ過カラムにて未反応の ^{111}In を除き精製することで ^{111}In 標識抗 PD-1 抗体および抗 PD-L1 抗体を作製した。PD-1/PD-L1 経路阻害に感受性を示した担癌モデルに対

して抗 PD-1 抗体あるいは抗 PD-L1 抗体を投与し、5 分、3 時間、6 時間、24 時間、48 時間、120 時間、216 時間まで複数のタイムポイントで血液や腫瘍、肝臓、脾臓、肺、腎臓など 10 種類の臓器を摘出した。重量を測定したのち、カウンターにて臓器中の線を測定し、各臓器への抗体移行量を %Injected dose(ID)/g tissue として算出、評価した。

4. 研究成果

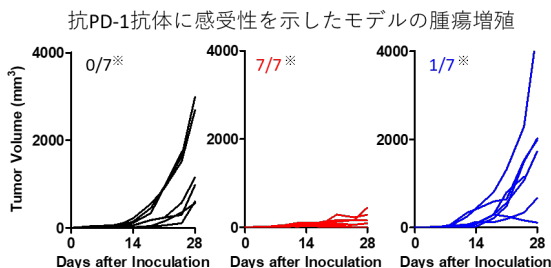
(1) PD-1/PD-L1 経路感受性の分類

上皮系、肉腫系 16 がん種の腫瘍組織中の PD-1/PD-L1 遺伝子発現は、最大と最小で各々 200、20 倍の差が存在しており、確立したモデル間には発現量に大きな差を含んでいた。



PD-L1 低発現担癌モデルから 3 種類、中発現担癌モデルから 3 種類、高発現担癌モデルから 3 種類の計 9 種類を選択し薬理試験を行った。その結果、3 モデルが抗 PD-1 抗体に感受性を示し、残りの 6 モデルは抗 PD-1 抗体にตอบสนองせず耐性であった。

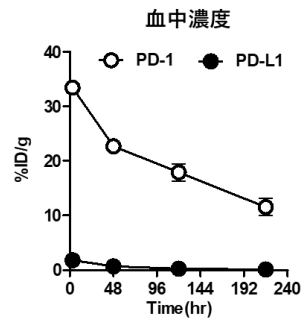
一方で、いずれの感受性モデルにおいても、抗 PD-L1 抗体の投与によりみられた抗腫瘍効果は抗 PD-1 抗体のものと比べ劣っていることが示された。PD-1/PD-L1 経路阻害には感受性であるため、この薬効の差は抗 PD-1 抗体と抗 PD-L1 抗体の体内動態が関与しているのではないかと考えられた。



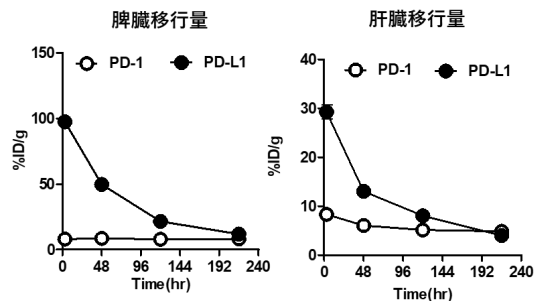
* 顕著な抗腫瘍効果が得られた個体数

(2) PD-1/PD-L1 抗体の体内動態評価

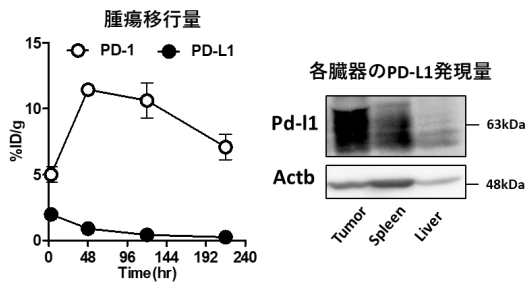
上記(1)で見られた抗 PD-1 抗体と抗 PD-L1 抗体の薬効に与える体内動態の影響を評価するため、健常マウスや、PD-1/PD-L1 経路阻害感受性の 2 種類の担癌マウスへ ¹¹¹In 標識抗体を投与した。抗 PD-1 抗体と比較して、抗 PD-L1 抗体は血中から速やかに消失していた。



一方で、組織移行については、抗 PD-L1 抗体肝臓や脾臓など正常組織へ多く分布した。これは、PD-L1 が正常組織に存在するマクロファージなどにも発現している一方で、PD-1 は腫瘍組織中などで活性化した T 細胞にのみ発現しているためと考えられる。



その結果、抗 PD-L1 抗体の腫瘍組織への移行量も抗 PD-1 抗体と比較して著しく少なかった。用いたモデルの腫瘍組織中の PD-L1 分子の発現量をウェスタンブロッティング法で評価したところ、抗 PD-L1 抗体が多く集積した肝臓や脾臓と同程度以上であったことから、腫瘍組織中は PD-L1 発現が陽性であることが示された。従って抗 PD-L1 抗体の腫瘍移行は、腫瘍組織の PD-L1 発現量よりも血中濃度依存的であることが示唆された。この抗 PD-L1 抗体の低い腫瘍移行量が、抗 PD-1 抗体よりも薬効が劣っている要因の一つであることが考察された。



取得した動態データに基づき PBPK モデルについても構築を試み、一部の動態を反映したが、正確に動態を記述するためにさらにデータを追加する必要があるため、今後さらにデータを取得し PBPK モデルの構築を行う。

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)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Hatakeyama H (Corresponding author), Fujiwara T, Sato H, Terui A, Hisaka A. Investigation of metabolomic changes in sunitinib-resistant human renal carcinoma 786-O cells by capillary electrophoresis-time of flight mass spectrometry. *Biol. Pharm. Bull.*, 41: 619-627 (2018) 査読有
DOI: 10.1248/bpb.b17-00992
2. Hatakeyama H (Corresponding author). Recent advances in Endogenous and Exogenous stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery and therapeutics. *Chem. Pharm. Bull.*, 65(7): 612-617 (2017) 査読有
DOI: 10.1248/cpb.c17-00068

[学会発表](計 4 件)

1. 照井亜侑、畠山浩人、樋坂章博. 免疫チェックポイント阻害剤感受性/耐性モデルにおける PD-L1 発現量の相関性に関する検討. 日本薬学会第 137 年会. 2017 年 3 月 26 日. 仙台
2. 畠山浩人、照井亜侑、樋坂章博. 抗 PD-1 抗体感受性・耐性マウスモデルの探索と感受性に影響を及ぼす因子の解析. 第 21

回日本がん免疫学会学術総会. 2017 年 6 月 29 日. 千葉

3. Hatakeyama H, Terui A, Hisaka A. Prediction of efficacy of immune checkpoint inhibitors using an immune checkpoints gene signature in non-clinical sensitive and resistant models. Third CRI-CIMT-EATI-AACR International Cancer Immunotherapy Conference. 2017 年 9 月 7 日. Mainz, Germany
4. 栗野泰大、畠山浩人、鈴木博元、小久保朋美、照井亜侑、荒野泰、樋坂章博. 担癌マウスにおける免疫チェックポイント阻害剤の組織内分布の解析とそれらが薬効特性に及ぼす影響. 日本薬学会第 138 年会. 2018 年 3 月 25-27 日. 金沢

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等
<http://www.p.chiba-u.jp/lab/cpp/>

6. 研究組織
(1)研究代表者

畠山 浩人 (HATAKEYAMA, Hiroto)
千葉大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：70504786

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()