

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15297

研究課題名(和文)抗体を用いた薬物輸送法の開発及び薬理的解析

研究課題名(英文)Development of drug delivery systems using antibody

研究代表者

高島 大輝(Takashima, Hiroki)

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・研究員

研究者番号：10785588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞傷害活性を持たない抗体を抗がん剤内包ミセルの外殻に結合させたイムノミセルの標的分子陽性がんモデルに対する薬効は、抗がん剤内包ミセルと抗体を併用した場合の薬効と比較して、有意に優れていた。一方で、直接作用を持つ抗体を結合させたイムノミセルの標的分子を発現するがんモデルに対する薬効は、併用療法と比較し、優れる傾向にあったが、両者の間に有意な差異は認めなかった。また、ミセル外殻に付加した抗体と腫瘍に発現する標的分子との抗原抗体反応を介して、ミセル製剤の腫瘍内での分布がより均一になることが、抗体付加によるミセル製剤の薬効増強メカニズムの一つであることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗腫瘍活性を持つ抗体は、ミセル製剤と併用することで薬効の上乗せ効果が得られるため、併用療法が抗体付加ミセルと同程度の薬効を示す場合がある。抗体をミセル製剤に付加するパイロット分子として応用する際は、ミセルに付加すべきか、もしくは併用することで十分であるかを抗体毎に検証することが重要であるということの本研究は明らかとした。また、ミセル外殻に付加した抗体と腫瘍に発現する標的分子との抗原抗体反応を介して、腫瘍内でのミセル製剤の分布がより均一になることが、抗体付加による薬効増強メカニズムの一つであることを明らかにした。将来ミセル製剤の開発を適切に進めていく上で、いずれも重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Anticancer agent-incorporating micelles conjugated with a monoclonal antibody without direct cytotoxic effects exerted significantly greater antitumor effects in a cancer model with high expression of target molecule than the combination of the antibody and micelles, and were distributed more diffusely throughout the target molecule-positive tumor tissue than micelles. On the other hand, immunomicelles conjugated to an antibody with direct cytotoxic effects did not show significant antitumor activity toward target molecule-positive cancer models compared to the combined use of the antibody and micelles.

研究分野：腫瘍学

キーワード：Drug Delivery System 抗体 抗体-薬物複合体 抗体付加抗がん剤内包ミセル

1. 研究開始当初の背景

我々は、Drug Delivery System (DDS) の理論に基づいた新規抗がん剤の開発研究を行っている。例えば、高分子化合物や抗体等の高分子タンパク質の正常臓器における血管外漏出は、低分子化合物と比較して制限される。その一方で、腫瘍では血管透過性が亢進しているために、高分子化合物や高分子タンパク質も血管外に漏出し、集積する。また、腫瘍では排出系であるリンパ管の増生が乏しいため、集積した薬剤は長時間にわたり腫瘍に留まる。この現象は、enhanced permeability and retention effect (EPR 効果) と呼ばれ、がん治療における DDS の理論的支柱の一つとなっている。薬剤抗がん剤を高分子化することによって正常臓器への分布を抑制し、腫瘍選択的に薬剤を送達させることができるため、毒性は軽減され、therapeutic window が開大する。EPR 効果を利用した薬物輸送を passive targeting と呼ぶのに対し、抗原抗体反応やリガントと受容体との相互作用を利用した薬物送達を active targeting と呼ぶ。active targeting と passive targeting の特性を併せ持つ抗がん剤は、低分子抗がん剤と比較して、毒性が軽減されるのみならず、腫瘍におけるターゲット分子の発現量に依存した薬効の増強が期待される。高分子タンパク質である抗体に低分子薬剤を結合させた抗体-薬物複合体 (antibody-drug conjugate : ADC) やナノ粒子製剤である抗がん剤内包ミセルの外殻に抗体を結合させた Antibody/Drug-Conjugated Micelle (ADCM) といった薬剤が、これに該当する。

膵臓がん、脳腫瘍、胃がん患者では、静脈血栓症の合併率が高く、血液凝固異常を来していると考えられている。外因系血液凝固の開始因子である組織因子 (tissue factor: TF) は、これらを含む種々のがんを高発現しており、がん患者における血液凝固異常への関与が強く示唆されている。いくつかのがんにおいて、TF の発現と腫瘍の悪性度との間の相関性が示されており、また TF の発現が予後不良因子として報告されているがん種もある。我々は、これまでに独自の抗ヒト TF 抗体を複数樹立し、これらの腫瘍集積性を in vivo イメージング等によって検証して、効率的に腫瘍に集積するクローンの同定を行ってきた (図 1、H. Takashima et al. Sci. Rep., 7 (2017) 12341.)。加えて、抗 TF 抗体を用いて作製した ADC や ADCM の優れた抗腫瘍効果についても報告してきた。治療応用可能と判断したクローンに関しては、臨床応用すべく、ヒトキメラ化抗体やヒト化抗体を作製した。

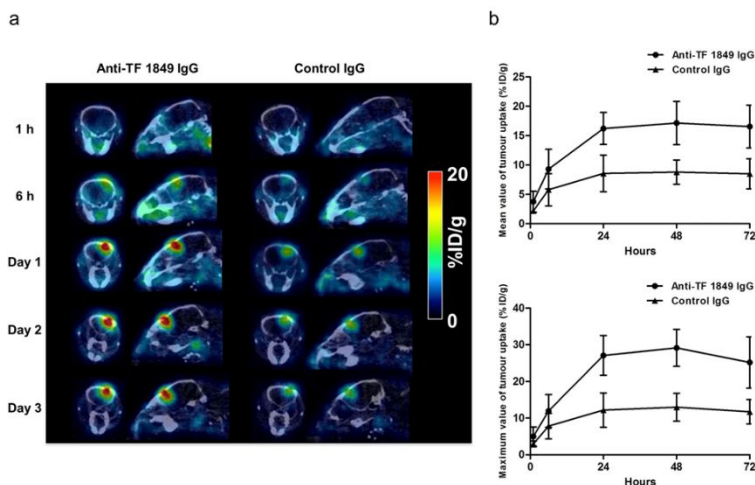


図1 悪性グリオーマ同所移植モデルにおける抗TF抗体の腫瘍集積

2. 研究の目的

ヒトキメラ化もしくはヒト化した抗 TF 抗体を用いて作製した ADC 及び ADCM の薬効を評価し、将来の臨床応用に向けた基礎データを収集すると共に、薬物動態試験など薬理学的な解析を加えて、ADC や ADCM の作用機序、我々が樹立した抗 TF 抗体の特性を明らかとすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

ADC:

ヒト化抗 TF 抗体に微小管阻害剤である (monomethyl auristatin E) MMEA を結合した ADC (抗 TF-ADC) を作製し、薬効評価を行った。

TF の発現量が異なる複数の細胞株を抗 TF-ADC で処理し、in vitro における殺細胞効果を検証した。

TF を高発現する細胞株を皮下に移植して作製した担癌マウスに ADC を投与し、腫瘍体積で in vivo における腫瘍増殖抑制効果を、投与後の体重減少で毒性を評価した。

ADCM:

内核にアントラサイクリン系抗がん剤であるエピルピシンを内包したミセル製剤を合成し、これに対してヒトキメラ化抗体 TF 抗体もしくは抗 human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) 抗体を付加して二種類の ADCM を作製した。

TF 及び HER2 の発現量が異なる細胞株をエピルピシン内包ミセル、抗体、エピルピシン内包ミセル+抗体（エピルピシン内包ミセルと抗体の併用）ADCM で処理し、それぞれの *in vitro* における殺細胞効果を評価した。

TF もしくは HER2 の発現量が異なる細胞株を皮下に移植して作製した担癌マウスに対してエピルピシン内包ミセル、抗体、エピルピシン内包ミセル+抗体、ADCM を投与し、*in vivo* における腫瘍増殖抑制効果を評価した。

TF の発現が高く、HER2 の発現が低い細胞株を皮下に移植した担癌マウスに、エピルピシン、エピルピシン内包ミセル、抗 TF 抗体付加エピルピシン内包ミセル（抗 TF-ADCM）、抗 HER2 抗体付加エピルピシン内包ミセル（抗 HER2-ADCM）を投与し、薬物動態試験を行った。加えて、TF 高発現・HER2 低発現腫瘍におけるエピルピシン内包ミセル、抗 TF-ADCM、抗 HER2-ADCM の腫瘍内の分布を評価した。

BALB-c nu/nu マウスにエピルピシン、エピルピシン内包ミセル、ADCM を投与し、血液毒性、肝障害、腎機能障害を評価した。

4. 研究成果

ADC:

作製した抗 TF-ADC は、細胞膜上の TF の発現量の多寡に依存して、がん細胞に結合し、*in vitro* において殺細胞効果を発揮した。また、TF を高発現する皮下腫瘍モデルに対する抗 TF-ADC の薬効は、コントロール抗体で作製した ADC と比較して有意に優れていた。薬剤投与後の体重減少は、認めなかった。

標的分子を発現するがん細胞に結合した ADC が内在化された後に薬剤が抗体から放出されることで、薬効を発揮するという ADC の mode of action (MOA) に矛盾しない結果であった。

ADCM:

本研究で用いた抗 TF 抗体は、抗体単剤では *in vitro* において細胞傷害活性を示さなかった。一方、抗 HER2 抗体は、がん細胞の増殖を 30% 程度抑制し、抗腫瘍活性を認めた。TF 高発現細胞株に対するエピルピシン内包ミセルと抗 TF 抗体との併用、抗 TF-ADCM の殺細胞効果は、エピルピシン内包ミセルと同等であった。一方、HER2 高発現細胞株に対するエピルピシン内包ミセルと抗 HER2 抗体との併用、抗 HER2-ADCM の細胞増殖抑制効果は、エピルピシン内包ミセルと比較して、有意に優れていた。

TF 高発現腫瘍を形成させた担癌マウスに対して、抗 TF 抗体単剤では、有意な腫瘍増殖抑制効果を示さなかった。この担癌マウスに対するエピルピシン内包ミセルと抗 TF 抗体との併用療法の腫瘍増殖抑制効果は、エピルピシン内包ミセルと同等であったが、抗 TF-ADCM の腫瘍増殖抑制効果は、エピルピシン内包ミセル、ミセル製剤と抗体との併用療法の双方に対して有意に優れていた。一方、HER2 を高発現する皮下腫瘍モデルに対して、抗 HER2 抗体は、単剤で有意な腫瘍増殖抑制効果を示した。エピルピシン内包ミセルと抗 HER2 抗体との併用療法、抗 HER2-ADCM は、いずれも HER2 高発現モデルに対して、エピルピシン内包ミセルと比較し、有意に優れる腫瘍増殖抑制効果を発揮した。抗 HER2-ADCM の薬効は、併用療法に対して優れる傾向は示したが、両者の間に有意な差異は認めなかった。抗 TF 抗体は、単独では抗腫瘍活性を示さないため、ミセル製剤に対する併用ではエピルピシン内包ミセルの治療効果を増強させなかったが、ミセル外殻に結合させることによって薬物動態に変化が生じ、抗腫瘍効果を有意に増強させたと考えられる。一方、抗腫瘍活性を有する抗 HER2 抗体は、エピルピシン内包ミセル製に併用することによって、上乘せ効果を示した。また、今回用いた抗 HER2 抗体に関しては、ミセル製剤との併用療法と抗 HER2-ADCM の薬効に有意な差異は認めなかった。抗体毎にミセルに付加すべきか否かを検証することが重要である。

薬物動態試験を実施したところ、エピルピシン内包ミセル、抗 TF-ADCM、抗 HER2-ADCM の血中滞留性、肝臓、腎臓、心臓への臓器分布は、いずれも同等であった。抗体付加は、ミセル製剤の血中での安定性を障害することはなく、毒性増強を招くような動態変化も来さないと考える。実際に BALB-c nu/nu マウスに対してこれらを投与し、血液毒性、肝障害、腎機能障害を評価したが、いずれも同等であり、白血球減少及び肝障害を認めたが、双方とも一過性であった。

抗 TF 抗体付加によるエピルピシン内包ミセルの薬効増強メカニズムを解明すべく、TF を高発現し、HER2 の発現が低い腫瘍を形成させた担癌マウスに対して、エピルピシン内包ミセル、抗 TF-ADCM、抗 HER2-ADCM を投与し、回収した腫瘍中のエピルピシン濃度を測定したが、有意な差異は認めなかった。そこで、ミセル外殻を形成するポリエチレングリコールを免疫染色の手法で検出し、各薬剤の腫瘍内の分布を評価した。エピルピシン内包ミセルと抗 HER2-ADCM と比較し、抗 TF-ADCM は腫瘍内により均一に分布していた。ミセル外殻に付加した抗体と腫瘍に発現する標的分子との抗原抗体反応を介して、ミセル製剤の腫瘍内での分布がより均一になることが、ADCM の薬効増強メカニズムの一つであると考えられた。

ADC は、腫瘍に発現する標的分子の発現に依存して腫瘍に集積し、より高い濃度で薬剤が腫瘍中に放出されることで、薬効を発揮すると報告されている。これに対して、ADCM 投与時の腫瘍中の薬剤濃度は、抗体を付加していないミセル製剤と同等であった。その一方で、抗体を付加す

ることによって、ミセル製剤は標的分子を発現する腫瘍中でより均一に分布していた。ミセル外殻に付加した抗体と腫瘍に発現する標的分子との抗原抗体反応は、ミセル製剤投与時の腫瘍中の薬剤濃度を上昇させるのではなく、より均一に薬剤を腫瘍内に浸透させることで、薬効を増強させることが示唆された。

抗体をミセル製剤に付加するパイロット分子として応用する場合、外殻に付加することで薬効の増強効果が得られる抗体と、外殻への付加は必ずしも必要ではなく、ミセル製剤との併用によって、付加した場合と同程度の薬効増強効果が得られる抗体とが存在するため、付加すべきか、もしくは併用することで十分であるかを抗体毎に検証することが重要であるということを、本研究は明らかとした(図2、H. Takashima et al J. Control. Release, 323 (2020) 138-150.)

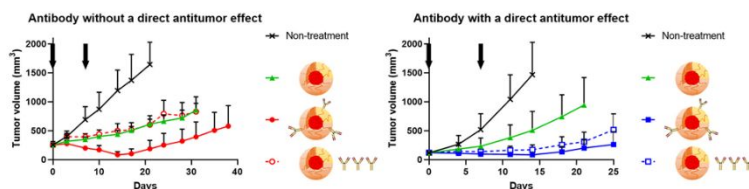


図2 ミセルに付加した抗体の直接作用がADCMの薬効に及ぼす影響

<引用文献>

H. Takashima, A.B. Tsuji, T. Saga, M. Yasunaga, Y. Koga, J.I. Kuroda, S. Yano, J.I. Kuratsu, Y. Matsumura, Molecular imaging using an anti-human tissue factor monoclonal antibody in an orthotopic glioma xenograft model, Sci. Rep., 7 (2017) 12341.

H. Takashima, Y. Koga, R. Tsumura, M. Yasunaga, M. Tsuchiya, T. Inoue, E. Negishi, M. Harada, S. Yoshida, Y. Matsumura, Reinforcement of antitumor effect of micelles containing anticancer drugs by binding of an anti-tissue factor antibody without direct cytotoxic effects, J. Control. Release, 323 (2020) 138-150.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 高島 大輝、津村 遼、古賀 宣勝、安永 正浩、原田 充訓、松村 保広	4. 巻 34
2. 論文標題 抗がん剤内包イムノミセルの前臨床試験	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 29～37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2745/dds.34.29	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takashima Hiroki, Koga Yoshikatsu, Tsumura Ryo, Yasunaga Masahiro, Tsuchiya Masami, Inoue Tadashi, Negishi Eriko, Harada Mitsunori, Yoshida Sei, Matsumura Yasuhiro	4. 巻 323
2. 論文標題 Reinforcement of antitumor effect of micelles containing anticancer drugs by binding of an anti-tissue factor antibody without direct cytotoxic effects	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 138～150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jconrel.2020.03.048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 高島 大輝、古賀 宣勝、津村 遼、淵上 弥史、松村 保広、安永 正浩	4. 巻 35
2. 論文標題 抗体デリバリーとがんモデル	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 443～447
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2745/dds.35.443	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高島 大輝、津村 遼、古賀 宣勝、安永 正浩、土屋 方美、田辺 千尋、田中 亮佑、原田 充訓、吉田 聖、松村 保広
2. 発表標題 抗組織因子抗体付加抗がん剤内包ミセルの開発研究
3. 学会等名 第34回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroki Takashima, Ryo Tsumura, Yoshikatsu Koga, Masahiro Yasunaga, Masami Tsuchiya, Chihiro Tanabe, Ryosuke Tanaka, Mitsunori Harada, Sei Yoshida, Yasuhiro Matsumura
2. 発表標題 Preclinical evaluation of Antibody/Drug-Conjugated Micelle with anti-tissue factor antibody
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高島 大輝、辻 厚至、佐賀 恒夫、眞鍋 史乃、原田 充訓、津村 遼、安西 高廣、安永 正浩、古賀 宣勝、黒田 順一郎、武笠 晃丈、松村 保広
2. 発表標題 抗組織因子抗体を用いたグリオーマイメージングと抗体の薬物輸送への応用
3. 学会等名 第36回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高島 大輝、安永 正浩、辻 厚至、佐賀 恒夫、眞鍋 史乃、原田 充訓、津村 遼、安西 高廣、古賀 宣勝、黒田 順一郎、武笠 晃丈、松村 保広
2. 発表標題 抗組織因子抗体を用いたグリオーマイメージングと抗体の薬物輸送への応用
3. 学会等名 第14回日本分子イメージング学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高島 大輝、津村 遼、古賀 宣勝、安永 正浩、原田 充訓、松村 保広
2. 発表標題 抗体付加抗がん剤内包ミセルの前臨床研究
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高島 大輝、辻 厚至、眞鍋 史乃、原田 充訓、津村 遼、古賀 宣勝、安永 正浩、黒田 順一郎、武笠 晃丈、松村 保広
2. 発表標題 抗組織因子抗体を用いたグリオーマイメーキングと抗体デリバリーの治療応用
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高島 大輝、辻 厚至、佐賀 恒夫、眞鍋 史乃、原田 充訓、津村 遼、安西 高廣、古賀 宣勝、安永 正浩、黒田 順一郎、武笠 晃丈、松村 保広
2. 発表標題 抗組織因子抗体を用いた新規薬物送達システムの開発研究
3. 学会等名 第20回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高島 大輝
2. 発表標題 抗体付加抗がん剤内包ミセルの開発研究
3. 学会等名 第2回C01学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroki Takashima, Ryo Tsumura, Yoshikatsu Koga, Masahiro Yasunaga, Masami Tsuchiya, Chihiro Tanabe, Mitsunori Harada, Sei Yoshida, Yasuhiro Matsumura
2. 発表標題 Enhanced antitumor effect of epirubicin-incorporating immunomicelles
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高島 大輝、眞鍋 史乃、辻 厚至、佐賀 恒夫、津村 遼、安西 高廣、安永 正浩、古賀 宣勝、黒田 順一郎、武笠 晃丈、松村 保広
2. 発表標題 抗組織因子抗体薬物複合体の悪性グリオーマモデルにおける前臨床試験
3. 学会等名 第37回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroki Takashima, Yoshikatsu Koga, Ryo Tsumura, Masahiro Yasunaga, Masami Tsuchiya, Tadashi Inoue, Eriko Negish, Chihiro Tanabe, Mitsunori Harada, Sei Yoshida, Yasuhiro Matsumura
2. 発表標題 Development of micelles containing anticancer drugs conjugated with an anti-tissue factor antibody without direct cytotoxic effects
3. 学会等名 2020 Controlled Release Society Virtual Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroki Takashima, Yoshikatsu Koga, Ryo Tsumura, Masami Tsuchiya, Tadashi Inoue, Eriko Negishi, Mitsunori Harada, Sei Yoshida, Yasuhiro Matsumura, Masahiro Yasunaga
2. 発表標題 Antitumor effect of nanomicelles conjugated to an anti-tissue factor antibody without a direct cytotoxic effect
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------