

平成 30 年 6 月 24 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04316

研究課題名(和文) 膵臓がん化学療法抵抗性の解明と間質標的ADCの創出

研究課題名(英文) Elucidation of the chemoresistance in pancreatic cancer and development of its tumor stroma targeting ADCs

研究代表者

安永 正浩 (Yasunaga, Masahiro)

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・ユニット長

研究者番号：80450576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：(1) ヒト膵臓がん同様の強いdesmoplastic reactionをもつ膵臓がんモデルマウスを作製した。(2) ロボット制御ESI法によるイオン化とLC-MS装置の組み合わせによる新しいドラッグイメージング法の開発に成功した。腫瘍内の薬剤デリバリーを高感度で観察できるようになった。(3) 間質部への優れたデリバリー効果を認めたa)線維芽細胞、b)星・壁細胞、c)腫瘍血管、d)腫瘍血管・リンパ管を標的にした抗体についてADCを作製した。(1)のモデルで、a)b)c)d)の順に強い抗腫瘍効果を認めた。(4) 抗組織因子抗体と抗フィブリン抗体についても、同上モデルでADCの治療効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：(1) Pancreatic cancer model mice with a strong desmoplastic reaction similar to human pancreatic cancer was prepared. (2) We succeeded in developing a new drug imaging method by combining robot-controlled ESI (Electrospray ionization) method and an LC-MS apparatus. It has become possible to observe drug delivery within the tumor tissue with high sensitivity. (3) a) Anti-fibroblast / b) stellate and parietal cell / c) blood-vessel / d) blood and lymphoid vessel antibodies showed good tumor-stroma targeting within the tumor tissues. Regarding antibody-drug conjugates (ADCs), they were newly-produced and therapeutic experiments were conducted in the model of (1). A strong antitumor effect was observed in the order of a)b)c)d).(4) Anti-tissue factor/fibrin ADCs also showed therapeutic effect in the same mouse model.

研究分野：総合生物

キーワード：抗体 ADC 膵臓がん がん間質 間質バリア DDS 分子イメージング ドラッグイメージング

## 1. 研究開始当初の背景

膵臓がんの化学療法抵抗性の原因として、がん細胞の周囲を取り囲む豊富な間質成分（腫瘍の約90%を占める）に焦点を当てて研究を行ってきた。これまでに、コラーゲン・フィブリンなど豊富な間質成分が薬剤や抗体の腫瘍内浸透性を抑制している、いわゆるがん間質バリアの存在を明らかにしてきた。この間質バリアを克服するために、間質を標的にしたADCとしてCAST(Cancer stromal targeting)療法；(1)抗間質抗体を用いて、Antibody-drug conjugate (ADC)を腫瘍間質に集積させる。(2)細胞外コントロールド・リリースによる抗がん剤の放出を考案して、抗コラーゲン4抗体・SN-38（SN-38は抗がん剤CPT-11の活性体）ADCと抗フィブリン抗体・SN-38ADCの開発に成功した。しかしながら、CAST療法のMOA(Mode of action)、特に、腫瘍を構成する血管や間質細胞を個別に障害を与えた場合との違いは不明のままであった。さらに、間質バリアに関して、ドラッグデリバリー障害の本態解明を進める必要があった。

## 2. 研究の目的

(1)間質バリアの病態生理を反映できる desmoplastic reactionを有する膵臓がん動物モデルを構築する。(2)間質バリアの病態メカニズム解析に必要な腫瘍組織内ドラッグイメージ法を開発する。(3)間質を構成する線維芽細胞、星・壁細胞、ストローマ細胞、単球・マクロファージ、腫瘍血管・リンパ管を標的にしたADCを新たに作製して、(1)のモデルで治療効果を比較検討する。(4)抗組織因子(TF)抗体や抗フィブリン抗体を用いたADCに関しても同上モデルで治療効果を確認する。以上により、間質バリアの病態解析を進め膵臓がんに有効なADCの研究開発を行う。

## 3. 研究の方法

(1)膵臓癌細胞SUIT2或いはBxPC3を用いた xenograftモデルと膵臓がん遺伝子改変モデル(GEM)マウスを用いて、ヒト膵臓がんの病理学的特徴である desmoplastic reactionを呈する動物モデルを構築する。

(2)MALDI(Matrix assisted laser desorption/ionization)によるイオン化とTOFMS(Time of flight mass spectrometry)による測定を行う質量顕微鏡に加えて、ロボット制御ESI(Electrospray ionization)によるイオン化とLC-MS(Liquid Chromatography-Mass spectrometry)装置の組み合わせによる質量分析によるドラッグイメージング法を開発する。

(3)新たにA)線維芽細胞、B)星・壁細胞、C)ストローマ細胞、D)単球・マクロファージ、E)腫瘍血管、F)腫瘍血管・リンパ管を標的にした抗体を準備・精製して特性評価を行う。次いで、ADC(Antibody-drug conjugate)を作製して、膵臓がんモデルで治療効果を確認する。

(4)CAST療法剤の抗フィブリン抗体を用いたADCと膵臓がん細胞と間質の両方を標的可能な組織因子(TF)を標的にしたADCに関しても、上記膵臓がんモデルで治療実験を行い、治療効果を確認する。

## 4. 研究成果

(1)膵臓癌細胞SUIT2或いはBxPC3を用いた膵臓がん xenograftモデルと膵臓がんGEMモデルから腫瘍組織を摘出してHE染色とコラーゲン・フィブリンの免疫染色を行った。では間質成分30-50%程度であったが、は70-80%であった。さらに、コラーゲン染色は共に陽性であったが、フィブリン染色は前者では弱く、後者では強陽性であった。GEMモデルは、ヒト膵臓がん組織のHE染色と免疫

染色像に極めて類似しており間質バリアの病態解析に最適と判断された。しかしながら、GEM モデルは深部腫瘍かつ多発傾向にあるため、MRI など画像解析を用いたとしても腫瘍サイズを正確に計測することが困難であった。そこで、GEM モデルの腫瘍部から複数の膵臓がん細胞株を樹立した。免疫不全マウスに移植して皮下腫瘍を形成させた allograft model を作製した。HE 染色、コラーゲン・フィブリン免疫染色でオリジナルの GEM モデルと同様の病理組織像を示している細胞株を同定して、以後の治療実験に用いることにした。これにより、複数の ADC の有効性を簡便に比較検証することができるようになった。

#### (2) ドラッグイメージング

ドラッグイメージングに関しては、質量顕微鏡による MALDI-TOFMS では、通常投与量で治療実験を行った場合には、多くの薬剤が感度不足で詳細な観察が困難であることが判明した。そこで、ESI によるイオン化と高感度 LC-MS 装置の組み合わせによる新しい MS イメージング(ESI-MSI)法の開発に取り組んだ。治療実験においても、質量顕微鏡で観察出来なかったペイロードが ESI-MSI で観察可能であることが判明した。LC-MS のスペックにも依存するが、質量顕微鏡の 10-100 倍以上高感度で測定できることが示され、膵臓がん間質におけるドラッグデリバリーの障害を測定・観察できるようになった。

#### (3) 間質細胞標的 ADC

A)線維芽細胞、B)星・壁細胞、C)ストローマ細胞、D)単球・マクロファージ、E)腫瘍血管、F)腫瘍血管・リンパ管を標的にした抗体を新たに準備・精製した。近赤外線標識した各抗体を膵臓がん GEM モデルに投与した。A)B)E)F)は膵臓がん間質部に強く集積していたが、C)D)の集積は僅かであった。そこで、

治療実験はA)B)E)F)抗体で行うこととした。(1) で開発した GEM 由来膵臓がん細胞 allograftモデルに対して、同様にA)B)E)F)抗体が強く集積することを確認して治療実験を行うことにした。Val-Citリンカーで MMAE を付加した ADC を作製して、同上 Allograftモデルで治療実験を行った。A)、B)、E)、F)の順に強い抗腫瘍効果を認めた。

#### (4) 抗フィブリン/TF抗体のADC

抗フィブリン抗体と抗TF抗体についても、ADCを作製した。抗TF抗体は(3)同様に細胞内リリース型Val-Citリンカーを用いた。抗フィブリン抗体に関しては細胞外リリース型リンカーを使用した。いずれも抗がん剤は MMAEを用いた。(3)と同じGEM由来膵臓がん細胞allograftモデルで強い抗腫瘍効果を認めた。

#### (5) 結語

膵臓がんの治療抵抗性の原因となる間質バリアの病態解析に有用なモデルを作製した。解析手段としての ESI-MSI を用いたドラッグイメージング法の開発にも成功した。線維芽細胞/星・壁細胞/腫瘍血管/腫瘍血管・リンパ管を標的にした抗体の膵臓がん間質部へのデリバリー効果を確認した。さらに ADC を作製して治療実験を行い、治療効果を確認した。抗フィブリン抗体と抗 TF 抗体についても ADC を作製して治療実験を行い、有効性を確認した。

#### 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9件)

1. Yasunaga M, Manabe S, Tsuji A, Furuta M, Ogata K, Koga Y, Takashima H, Nishida T, Matsumura Y. Mass spectrometry imaging for early discovery and development of

cancer drugs. AIMS Med Sci. 査読有 2018, 5, 162-180.

2. Yasunaga M, Manabe S, Tsuji A, Furuta M, Ogata K, Koga Y, Saga T, Matsumura Y. Development of antibody-drug conjugates using DDS and molecular imaging. Bioengineering 査読有 2017, 4, E78.

3. Takashima H, Tsuji AB, Saga T, Yasunaga M, Koga Y, Kuroda JI, Yano S, Kuratsu JI, Matsumura Y. Molecular imaging using an anti-human tissue factor monoclonal antibody in an orthotropic glioma xenograft model. Sci Rep. 査読有 2017, 7, 12341.

4. Yasunaga M, Manabe S, Matsumura Y. Immunoregulation by IL-7R-targeting antibody-drug conjugates: overcoming steroid-resistance in cancer and autoimmune disease. Sci Rep. 査読有 2017, 7, 10735.

5. 安永 正浩, 眞鍋 史乃, 辻 厚至, 古田 大, 緒方 是嗣, 古賀 宣勝, 藤原 悠起, 佐賀 恒夫, 松村 保広. 分子イメージングを駆使したADCの開発. Yakugaku Zasshi 査読有 2017, 137, 535-544.

6. Fujiwara Y, Furuta M, Manabe S, Koga Y, Yasunaga M, Matsumura Y. Imaging mass spectrometry for the precise design of antibody-drug conjugates. Sci Rep. 査読有, 2016, 6: 24954

7. Obonai T, Fuchigami H, Furuya F, Kozuka N, Yasunaga M, Matsumura Y. Tumour imaging by the detection of fibrin clots in tumour stroma using an anti-fibrin Fab fragment. Sci Rep. 査読有, 2016, 6: 23613,

8. Tsumura R, Sato R, Furuya F, Koga Y, Yamamoto Y, Fujiwara Y, Yasunaga M, Matsumura Y. Feasibility study of the Fab fragment of a monoclonal antibody against tissue factor as a diagnostic tool. Int J Oncol. 2015, 47, 2107-14.

9. 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, 137, 1457-66.

[学会発表](計17件)

1. 安永正浩, 西条信史, 花岡慎悟, 安西高廣, 津村遼, 松村保広 Development of novel diagnosis and treatment of CRC by mAb targeting of a newly-identified multi-pass membrane protein. 第76回日本癌学会学術総会 シンポジウム 2017/9/29 横浜

2. 安永正浩, 辻厚至, 高島大輝, 佐賀恒夫, 松村保広. 難治性がんに対する分子イメージング法の開発. 第33回日本DDS学会学術集会 口演 2017/7/7 京都

3. 安永正浩, 辻厚至, 高島大輝, 佐賀恒夫, 松村保広. 難治性がんを標的にしたイムノPETイメージング法の開発. 第11回日本分子イメージング学会 口演 2017/5/25 横浜

4. Yasunaga M. Antibody-drug conjugates for treating steroid-resistant malignancies and autoimmune diseases. Antibody Engineering & Therapeutics. Invited lecture 2017/12/13 San Diego.

5. Yasunaga M. Development of antibody-drug conjugate by utilizing molecular imaging. Federation of Asian Societies for Molecular Imaging. Invited lecture 2017/8/26 Seoul.

6. Yasunaga M, Furuta M, Ogata K, Fujiwara Y, Koga Y, Matsumura Y. Visualisation of EPR effect and active targeting by using microscopic mass spectrometry. AACR Annual Meeting. Poster 2017/4/4 Washington DC.

7. Yasunaga M, Manabe S, Matsumura Y. Development of antibody-drug conjugates against refractory cancer. 10th Anniversary of Protein & Peptide Conference. Invited lecture 2017/3/23 Fukuoka.

8. Yasunaga M, Manabe S, Tsuji A, Furuta M, Ogata K, Fujiwara Y, Koga Y, Matsumura Y. Development of ADC utilizing molecular imaging. Antibody Engineering & Therapeutics. Poster. 2016/12/13 San Diego.

9. 安永正浩 抗体DDS 情報計算化学生物学会 2016年大会・分子ロボティクス研究会 シンポジウム 2016/10/25 東京

10. 安永正浩, 古賀宣勝, 高島大輝, 菅谷明徳, 内藤 健一郎, 松村保広 Novel targeted chemotherapy by using anti-tissue factor antibody conjugated micelle. 第75回日本

癌学会学術総会 インターナショナル・セッション 2016/10/6 横浜

11. 安永正浩、松村保広 Development of antibody-drug conjugate against refractory cancer by utilizing molecular imaging. 第41回日本微小循環学会 口演 2016年9月23日 東京

12. Yasunaga M, Manabe S, Tsuji A, Furuta M, Ogata K, Fujiwara Y, Koga Y, Matsumura Y. Development of CAST therapy by utilizing molecular imaging. World Molecular Imaging Congress. Poster. 2016/9/10 New York.

13. 安永正浩、眞鍋史乃、辻厚至、古田大、緒方是嗣、高島大輝、藤原悠起、古賀宣勝、佐賀恒夫、松村保広. 難治性がんに対する antibody-drug conjugate (ADC)の開発. 第32回日本DDS学会学術集会 口演 2016/7/1 静岡

14. 安永正浩、眞鍋史乃、辻厚至、古田大、緒方是嗣、高島大輝、藤原悠起、古賀宣勝、佐賀恒夫、松村保広. 分子イメージングを駆使した難治性がんに対する antibody-drug conjugate の開発. 第10回日本分子イメージング学会 口演 2016/5/28 神戸

15. Yasunaga M. Developmental strategy of CAST (Cancer stromal targeting) therap. Antibody Engineering & Therapeutics. Invited lecture. 2015/12/9 San Diego.

16. 安永正浩、古田大、緒方是嗣、藤原悠起、古賀宣勝、松村保広 Visualisation of drug delivery and EPR effect by using microscopic mass spectrometry 第74回日本癌学会学術総会 口演 2015/10/9 名古屋

17. Yasunaga M, Furuta M, Ogata K, Fujiwara Y, Koga Y, Matsumura Y. Molecular imaging of drug delivery by using high resolution microscopic mass spectrometry. World Molecular Imaging Congress. Poster. 2015/9/5 Honolulu.

〔図書〕(計3件)

1. 安永正浩、眞鍋史乃、辻厚至、古田大、緒方是嗣、古賀宣勝、藤原悠起、佐賀恒夫、松村保広. 技術情報協会 抗体薬物複合体の研究開発における分子イメージングの有用性 PHARMSTAGE 2017. 42-48.

2. 安永正浩 シーエムシー出版 抗体薬物複合体(ADC)の設計開発・第7章 ADC 設計のための分子イメージングの有用性 2016

3. 安永正浩、眞鍋史乃、松村保広 北隆館 BIO Clinica 抗体 DDS 2015.

〔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:

〔その他〕  
ホームページ等  
国立がん研究センター・先端医療開発センター・新薬開発分野・スタッフプロフィール  
<http://epoc.ncc.go.jp/about/staff/yasunaga.php>  
東京大学大学院新領域創成科学研究科・連携講座・がん先端生命科学分野・教員紹介  
<https://www.youtube.com/watch?v=-w41XuptYw&feature=youtu.be>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

安永 正浩 (Yasunaga Masahiro)  
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・ユニット長  
研究者番号: 80450576

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

松村保広 (Matsumura Yasuhiro)  
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・分野長  
研究者番号: 90209619

眞鍋史乃 (Manabe Shino)  
独立行政法人理化学研究所・伊藤細胞制御  
化学・専任研究員  
研究者番号: 60300901