

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14931

研究課題名（和文）抗組織因子抗体を用いた抗体抗がん剤複合体の有用性評価

研究課題名（英文）Feasibility study of antibody-drug conjugates against tissue factor

研究代表者

津村 遼（Tsumura, Ryo）

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：90785586

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：膵がんを発症する遺伝子組み換えマウスからがん細胞を単離し、腫瘍間質に富む膵がん同所移植モデルの作製に成功した。Tissue factor（TF）を標的としたantibody-drug conjugate（ADC）の作製を2種類のリンカーを用いて行い、優れたリンカーの選別を行った。作製した抗TF-ADCは上記モデルにおいて、腫瘍増殖を顕著に抑制し、同モデルマウス生存期間を有意に延長した。薬剤投与によるマウスの体重減少は見られなかった。治療後の腫瘍組織を用いて免疫染色を行った結果、抗TF-ADCはTF陽性のがん細胞だけでなく、TFの発現が亢進した腫瘍血管細胞も標的に出来る可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TFを標的としたADCの一つ、tisotumab vedotinは既に臨床試験が進んでいる。TFは本来、血液凝固の開始因子として機能しているため、正常組織にも少なからず発現が見られる。そのため、宿主由来TF抗原に交差する抗体を用いた検討は必須であるが、これまでそのような報告は無かった。本研究では、腫瘍間質を豊富に形成するマウス膵がん細胞株を樹立すると共に、抗マウス抗体を用いて作製したADCの抗腫瘍活性を評価することで、より臨床腫瘍を模倣した抗TF-ADCの評価系を構築した。そのため、本研究により得られた知見は今後の抗TF-ADCを開発、さらには改良する上で重要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We prepared mouse a pancreatic cancer cell line derived from genetically engineered mice. The pancreatic cancer cell line had an ability to form orthotopic tumors with an abundant stroma. Therefore, we adopted this mouse model to evaluate the drug efficacy. Also, we prepared anti-tissue factor (TF) antibody-drug conjugate (ADC) using two types of linker and investigated the feasibility of them. Anti-TF ADC showed greater antitumor effect and more extended survival time than control ADC in the orthotopic tumor model. Treatment with anti-TF ADC did not affect mouse body weight changes in these experiments. Furthermore, immunofluorescence staining indicated anti-TF ADC targeted not only to TF-positive tumor cells, but also to TF-positive tumor vascular endothelial cells.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：抗体 組織因子 腫瘍間質 ドラッグデリバリー 抗体抗がん剤複合体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

**DDS の重要性と抗体分子** 近年の科学技術の目覚ましい発展によって、がんに対する診断・治療は日々進歩している。しかし、腫瘍間質の豊富な膵がんや胃がんなど難治性の固形腫瘍においては、未だその治療効果が限定的であり、有効な治療法の開発が求められている。この問題を解決する上で、Drug Delivery System(DDS)技術を駆使した治療薬の開発は重要であると考えられる。DDS 製剤は、腫瘍組織選択的に抗がん剤を送達し、正常部への抗がん剤の暴露を最小限に抑えることができる。その結果、抗がん剤の腫瘍組織集積量を増大して治療効果を高めると同時に、副作用の軽減や有効薬剤投与量の増量が期待できる。

固形腫瘍に対する DDS の概念には、passive targeting と active targeting という 2 つの概念が考えられる。高分子タンパク質である抗体分子(粒子径が約 15 nm)は上記両方の概念による作用が期待できることから、固形腫瘍に対する DDS ツールとして有用である。

**がん と TF の関連性** 組織因子(tissue factor, TF)は外因系血液凝固経路の開始因子として知られる 1 回貫通型膜タンパク質である。TF は膵がんや胃がんなど多くのがん種で過剰発現していることが報告されている。また、炎症性サイトカインの発現上昇等に起因して、腫瘍組織における TF の発現上昇は、がん細胞のみではなく、腫瘍血管内皮細胞や腫瘍関連線維芽細胞など腫瘍間質を構成する細胞群でも報告されている。さらに近年、TF はがんの増殖や転移、血管新生、悪性度と相関することも示唆されており、TF が固形腫瘍に対する有望な標的抗原になると考え、当分野では複数の抗 TF モノクローナル抗体を独自に樹立してきた。

**ADC の開発** 現在、抗体分子を用いたがん治療応用法として抗体抗がん剤複合体(antibody-drug conjugate, ADC)が注目を集めている。ADC は抗体分子と抗がん剤、それらを繋ぐリンカーによって構成される。Brentuximab vedotin (SNG-35、2011 年 FDA 承認)や trastuzumab emtansine (T-DM1、2013 年 FDA 承認)といった ADC が各国で承認されて以降、ADC は有望ながん治療戦略として認知されており、さらなる新規 ADC の開発が望まれている。

**抗 TF-ADC** 上記背景に基づいて、研究代表者らは抗 TF-ADC の研究開発を行ってきた。抗 TF-ADC に関して既に多報の報告があるが、これらの報告は抗ヒト TF-ADC を用いた異種移植モデル(ヒトのがん細胞をマウスへ移植したモデル)による評価であり、宿主(マウス)に発現する TF 抗原への評価は十分にされていない。上述の通り、TF はがん細胞だけではなく、腫瘍間質細胞での発現上昇も報告されていることから、抗 TF-ADC は両方の細胞集団を標的にできると考えられる。また、TF は凝固・止血という本来の生理学役割から、恒常的に心臓や脳、肺などの重要器官、及び血管外膜に微弱な発現が認められる。すなわち、抗 TF-ADC のヒト臨床応用への外挿を見据えた場合、宿主由来 TF 抗原も認識する ADC での評価は必須であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、抗マウス TF (mTF) 抗体を用いて抗 mTF-ADC を作製し、腫瘍間質豊富な膵がんモデルにおいて、その有用性及び作用機序を検証することである。

## 3. 研究の方法

**(1) *in vivo* 評価モデルの構築** 抗 mTF-ADC の *in vivo* における有用性評価を行う上で、動物モデルの作製は必須である。しかし、市販されているヒト及びマウスがん細胞株を用いて作製した皮下移植モデルは、腫瘍間質が乏しく、膵がんなどの腫瘍間質が豊富な臨床組織学的特性を保持していない。本研究では、ヒト腫瘍組織に類似したモデルの作製を試みる。具体的には、Hingorani SR らが 2005 年に報告した膵がんを自然発症する遺伝子改変マウス( $Kras^{G12D/+}$ ;  $Trp53^{R172H/+}$ ; Ptf1a-Cre、KPC マウス)からマウス膵がん細胞株の樹立を行い、皮下移植モデルおよび膵同所移植モデルを作製する。

**(2) 抗 mTF-ADC の最適化** ADC のポテンシャルを最大限に高める上で、ADC の構成要素である抗体、薬剤及びリンカーの最適化は必須である。現在、研究代表者は結合活性が高い抗 mTF 抗体として 3 クローン を樹立しており、また抗体と薬剤をつなぐリンカー化合物も 2 種類保有している。抗原結合活性や殺細胞効果試験、薬剤放出効率などの *in vitro* における ADC の性状解析を行い、抗 mTF-ADC に適した剤形の決定を行う。

**(3) *in vivo* における治療効果の検討** 最適化した抗 mTF-ADC 及び作製したマウスモデルを用いて、*in vivo* における治療効果の検討を行う。また、治療後の腫瘍組織を免疫組織染色することによって、抗 mTF-ADC の作用メカニズムを明確にする。さらに、治療中のマウスの体重変化を測定し、将来の抗 TF-ADC の有用性を評価・考察する。

## 4. 研究成果

**(1) *in vivo* 評価モデルの構築** KPC マウスを用いて、マウス膵がん細胞株(mPan-wt)の樹立を行った。また、同細胞株を用いて mTF 強制発現株(mPan-TF)の作製も行った。これらの細胞株、及び従来用いられるヒト膵がん細胞株 5 種類をヌードマウスへ同所移植した結果、作製した

マウス膵がん細胞株は、ヒト膵がん細胞株と比較して、単一腫瘍組織面積当たりにおける SMA やコラーゲン I の陽性領域が有意に広く、間質に富んだ腫瘍を形成した(図 1)。すなわち、作製したマウス膵がん細胞株により形成された腫瘍は、KPC マウスの腫瘍と類似した組織形態学的特徴を有し、ヒトの膵がん組織を模倣していることが示唆された。また、mPan-TF の同所性移植により形成された腫瘍では高い mTF の発現が見られ、がん細胞だけでなく腫瘍血管内皮細胞を含む腫瘍間質でも TF 発現が亢進していた(図 1)。これらの結果から、作製したマウス膵がん細胞株は抗 TF-ADC を評価する上で、有用な細胞株であることが示唆された。

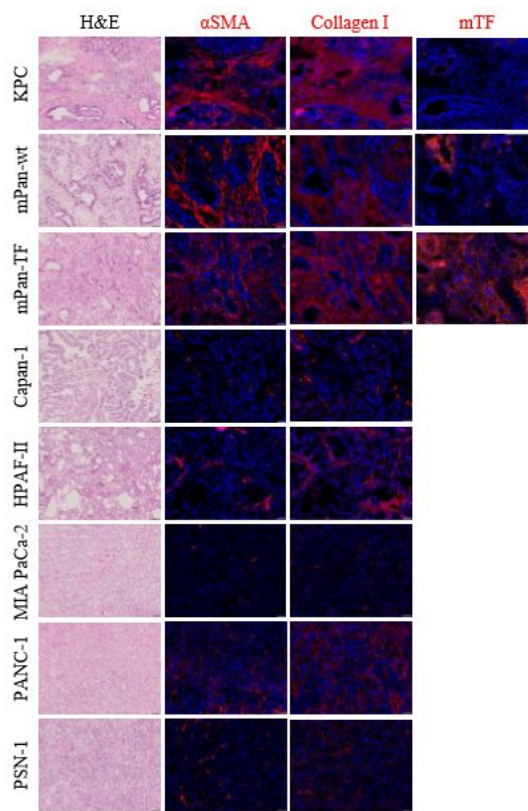


図 1. 各膵がんモデルの腫瘍組織染色画像

※参考文献 1 から抜粋

**(2) ADC の作製と *in vitro* の性状評価** 当研究室で樹立した 3 種類の抗 mTF モノクローナル抗体を用いて、*in vivo* imaging を行った。その結果、clone.1157 が最も高い腫瘍集積性を示したため、以降の検討には抗 mTF 抗体として同クローンを用いた。Isotype control 抗体と抗 mTF 抗体、及び maleimide based conjugation (MC) と bis-alkylating conjugation (bisAlk) の 2 種類のリンカーを用いて、計 4 種類の ADC の作製を行った(図 2a)。樹立した mPan-wt と mPan-TF を用いて各 ADC の *in vitro* の性状解析を行った結果、2 種類の control ADCs は細胞結合活性、及び細胞内在化、殺細胞効果を示さなかった。一方、2 種類の抗 mTF-ADCs は同等の細胞結合活性、及び細胞内在化、殺細胞効果を示し、結合活性は抗 mTF 抗体と同等であった(図 2b-d)。ADC のリンカーを選択的に切断するライソソーム内酵素、カテプシン B の添加による搭載薬剤 monomethyl auristatin E (MMAE) のリリース実験を行った結果、4 種類全ての ADC は同等の MMAE リリース効率を示した。

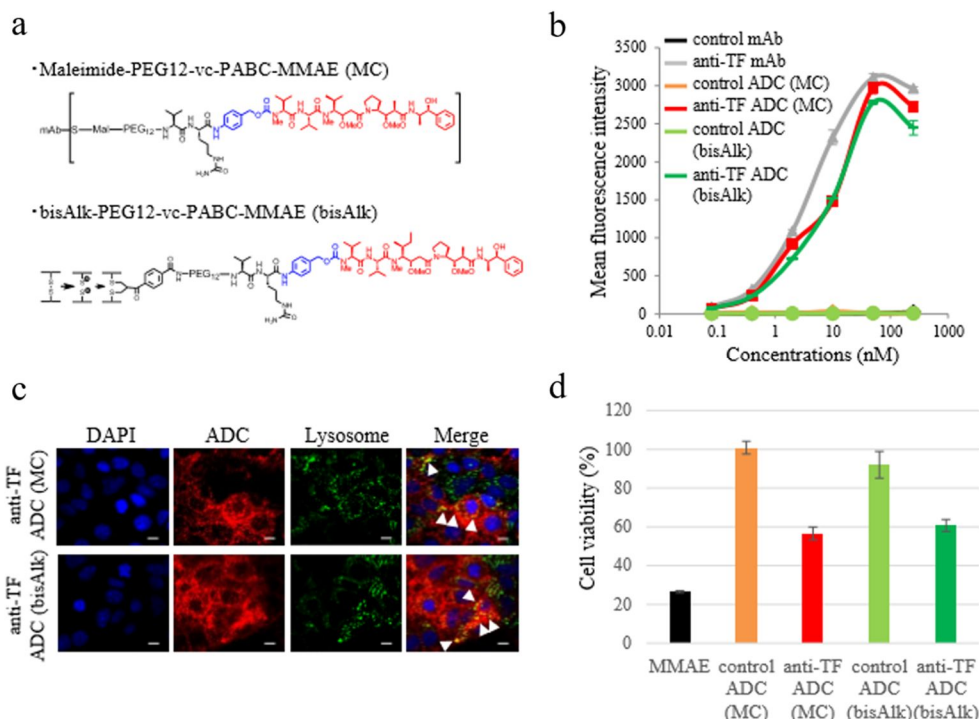


図 2. 作製した ADC の *in vitro* における性状解析。(a) リンカーと MMAE の化学構造。(b) mPan-TF に対する各抗体及び ADC の結合活性( $n=3$ )。 (c) mPan-TF に対する各 ADC の細胞内在化を示した蛍光免疫染色画像。(d) mPan-TF に対する各薬剤 (30 nM 添加) の殺細胞効果( $n=3$ )。

参考文献 1 から抜粋

**(3) 皮下移植モデルにおける治療効果** 次に上記4種類のADCを用いて mPan-wt と mPan-TF の皮下移植モデルにおける治療実験を行った。mPan-wt 皮下移植モデルにおいて、抗 mTF-ADC (MC) は control ADC (MC) と比較して有意な腫瘍増殖抑制効果を示さなかった (20 mg/kg、週2回、計6回投与)。一方、抗 mTF-ADC (bisAlk) は control ADC (bisAlk) と比較して有意な抑制効果を示した (20 mg/kg、週2回、計6回投与)。また、mPan-TF 皮下移植モデルにおいては、2種類の抗 mTF-ADCs はどちらもそれぞれの control ADC と比較して、有意な腫瘍増殖抑制効果を示した (20 mg/kg、週2回、計6回投与)。同実験において、2種類の抗 mTF-ADC 間での比較では、腫瘍増殖抑制効果に有意差が見られなかった。さらに、投与量を 10 mg/kg、週2回、計6回として mPan-TF 皮下腫瘍モデルの治療実験を行った結果、抗 mTF-ADC (bisAlk) は DPBS 群と比較して有意な腫瘍増殖抑制効果を示したものの、抗 mTF-ADC (MC) は示さなかった。これらの結果から、リンカーとして bisAlk の方が MC よりも腫瘍内での安定性に優れ、有用であることが示唆された。よって、以降の検討では bisAlk を用いた ADC のみを検証した。

**(4) 同所移植モデルにおける治療効果** mPan-TF を同所移植したモデルにおいて治療実験を行った。20 mg/kg、週2回、計6回投与した結果、抗 mTF-ADC は MMAE 単剤及び control ADC と比較して、有意な腫瘍増殖抑制効果を示した (図 3a)。また、同モデルにおいて 20 mg/kg、週3回、計9回投与した結果、抗 mTF-ADC はマウス生存期間を有意に延長し (図 3b)、ADC 投与によるマウスの体重減少も全く見られなかった (図 3c)。

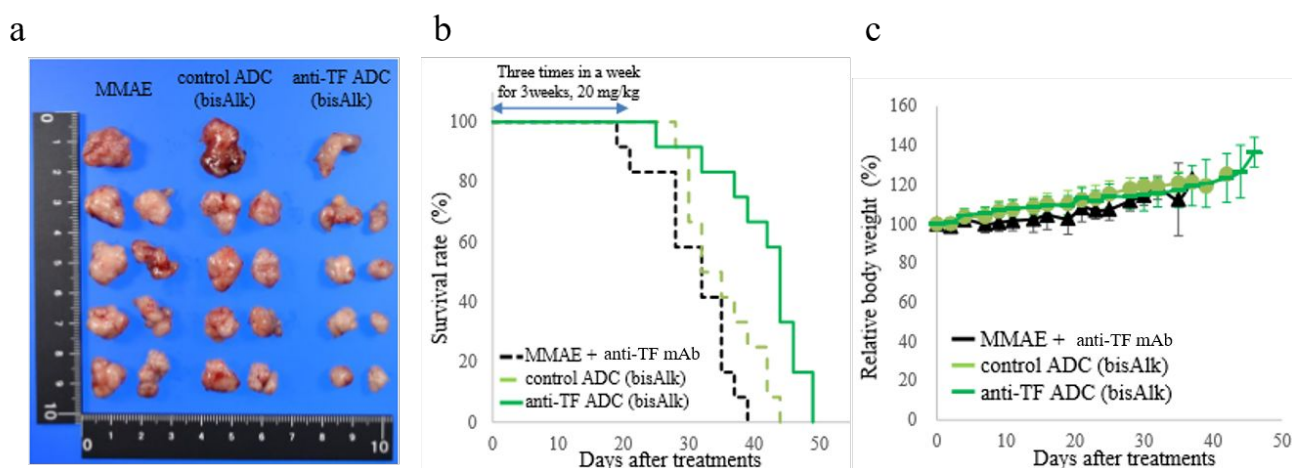


図 3. mPan-TF 同所移植モデルにおける治療実験. (a) 治療開始3週間後に摘出したマウス腫瘍の画像 ( $n = 9$ ). (b) 治療実験における同所移植モデルマウスの生存期間曲線 ( $n = 11$ ). (c) サバイバル実験におけるマウスの体重変化 ( $n = 11$ ).  
参考文献 1 から抜粋

**(5) 治療後の腫瘍組織** 上記図 3a において摘出したマウス腫瘍の蛍光免疫組織染色を行い、control ADC 投与群と抗 mTF-ADC 投与群で、治療後の各マーカーの発現を比較検証した。その結果、腫瘍組織内における mTF 及び CD31 の発現は、抗 mTF-ADC 投与群で有意に減少していた (図 4a, b)。一方で、SMA の発現は変化しなかった (図 4c)。これらのことから、抗 TF-ADC は TF 陽性のがん細胞だけでなく、TF 陽性の腫瘍血管内皮細胞へも障害活性を持つ可能性が示唆された。すなわち、抗 TF-ADC の抗腫瘍効果は、がん細胞及び腫瘍血管内皮細胞を障害することで発揮されると考えられる。

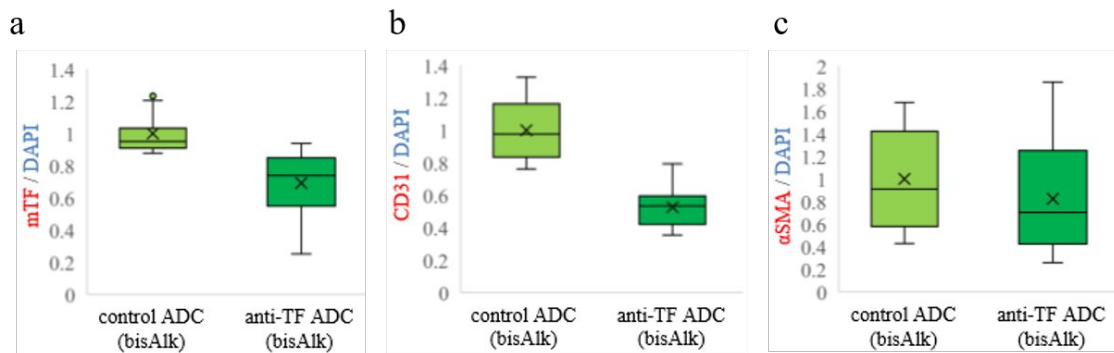


図 4. 各 ADC で治療したマウス腫瘍組織における各マーカー分子の相対的発現量 ( $n = 16$ ). (a) mTF. (b) CD31. (c) SMA.  
参考文献 1 から抜粋

**(6) 総括** 本研究により、抗 TF-ADC に用いるリンカーとして、MC リンカーよりも bisAlk リンカーの方が腫瘍組織内安定性に優れ、有用であることが示唆された。また抗 TF-ADC は、TF 陽性のがん細胞だけでなく、TF 発現が亢進した腫瘍血管内皮細胞も標的と示した。さらに、抗 TF-ADC 投与がマウスの体重変化に影響しないことも示した。本研究は宿主（マウス）由来 TF 抗原を認識する抗 TF-ADC を用いて、その作用を検証した初めての報告である。得られた知見により、現在臨床試験が進行中の tisotumab vedotin の改良型 ADC を提案すると共に、抗 TF-ADC の新たな作用機序を示した。本研究の成果は、今後、抗 TF-ADC の更なる臨床開発する上で重要な知見になったと考える。

<参考文献>

1. Evaluation of the antitumor mechanism of antibody-drug conjugates against tissue factor in stroma-rich allograft models. [Tsumura R](#), Manabe S, Takashima H, Koga Y, Yasunaga M, Matsumura Y. *Cancer Sci.* 2019. 110(10):3296-3305.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsumura R, Manabe S, Takashima H, Koga Y, Yasunaga M, Matsumura Y.	4. 巻 110(10)
2. 論文標題 3.Evaluation of the antitumor mechanism of antibody-drug conjugates against tissue factor in stroma-rich allograft models.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3296-3305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14146.	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 該当する

1. 著者名 津村遼	4. 巻 35-2
2. 論文標題 1.組織因子（tissue factor, TF）を標的とした抗体抗がん剤複合体の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 152-153
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 津村遼、眞鍋史乃、高島大輝、古賀宣勝、安永正浩、松村保広
2. 発表標題 組織因子を標的とした抗体抗がん剤複合体の膵がん同所移植モデルにおける治療評価
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 津村遼、眞鍋史乃、高島大輝、古賀宣勝、安永正浩、松村保広
2. 発表標題 The in vivo study of antibody-drug conjugates against mouse tissue factor
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 Ryo Tsumura, Shino Manabe, Hiroki Takashima, Yoshikatsu Koga, Masahiro Yasunaga, Yasuhiro Matsumura
2. 発表標題 Dual targeting of antibody-drug conjugates against mouse tissue factor in vivo
3. 学会等名 9th World ADC San Diego (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 津村遼
2. 発表標題 抗組織因子 (Tissue factor) 抗体を用いたADCの研究開発.
3. 学会等名 理研シンポジウム. エンジニアリングネットワーク・ワークショップ. 第二回精密武装抗体の合成と機能評価. (招待講演)
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