

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09148

研究課題名(和文) 組織内不均一性を有するHER2陽性胃癌に有効な金ナノ粒子結合抗体薬物複合体の開発

研究課題名(英文) Gold nanoparticle-conjugated antibody-drug conjugates for HER2-positive gastric cancer with heterogeneity

研究代表者

黒田 新士(Kuroda, Shinji)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：60633758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：抗体薬物複合体であるトラスツズマブ・エムタンシン(T-DM1)に金ナノ粒子を結合することで作成した金ナノ粒子結合T-DM1(ATDM1)は、T-DM1と比較し、HER2陽性胃癌細胞株に、HER2依存的により多く取り込まれることで強力な細胞障害活性を發揮した。さらに、バイスタンダー効果を介して、その周囲のHER2陰性細胞株に対しても、有意な細胞障害活性を發揮することが証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌治療の課題のひとつが組織不均一性の克服であるが、本研究成果は、乳癌で主に臨床使用されている抗体薬物複合体であるT-DM1に金ナノ粒子を結合させることで、HER2陽性の標的細胞への薬物送達を向上させることができ、さらにバイスタンダー効果を介してその周囲の非標的細胞にも治療効果を期待できることから、組織不均一性を有する胃癌などの癌腫に対する新規治療薬の開発につながる可能性を秘めたものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Gold nanoparticle-conjugated trastuzumab emtansine (T-DM1) (ATDM1) produced potent cytotoxic effects on HER2-positive gastric cancer cells compared to T-DM1 by enhanced HER2-dependent incorporation into cells. Moreover, ATDM1 also produced strong cytotoxic effects on surrounding HER2-negative gastric cancer cells via bystander effect. These findings indicate that conjugation of gold nanoparticles with T-DM1 can be a promising treatment strategy to overcome heterogeneity in gastric cancer.

研究分野：消化器外科

キーワード：金ナノ粒子 抗体薬物複合体 胃癌 HER2 組織不均一性 バイスタンダー効果

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌治療において様々な抗体医薬が用いられているが、HER2 に対する特異的モノクローナル抗体であるトラスツズマブ (Tmab) はその代表的なもので、現在乳癌や胃癌に対して使用されている。抗体医薬を進化させたものとして、腫瘍選択性の高い抗体医薬に細胞障害活性を有する低分子医薬を結合させた、抗体薬物複合体 (antibody drug conjugate, ADC) が近年活発に開発されている。現在臨床で使用されているものに、トラスツズマブ エムタンシン (T-DM1) があり、これは Tmab にエムタンシンという低分子医薬をリンカーを介して結合させたものであり、現在 HER2 陽性乳癌に対して保険収載されている。一方で、HER2 陽性胃癌に対しては、国際ランダム化比較第 3 相臨床試験 (GATSBY 試験) において、二次治療でパクリタキセルに対して有意な有効性を示すことができなかった (Thuss-Patience PC, et al. Lancet Oncol. 2017)。その要因として、一次治療後の HER2 loss とともに、同じ HER2 陽性固形癌でも胃癌では乳癌よりも組織内不均一性が強く、T-DM1 の細胞内移行が不良であったことが指摘されている。

近年医学の分野においてナノテクノロジーへの注目度が高く、ドラッグデリバリーの観点から十~数百 nm の大きさのキャリアが理想的であることが分かっている。それは Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果によるもので、このサイズの新粒子は血管透過性の亢進した腫瘍組織に選択的に集積しやすい利点がある。ドラッグデリバリーに利用されるナノデバイスの中で、近年欧米で注目を浴びているものの一つに金ナノ粒子がある。金ナノ粒子は生体内での安定性に加え、抗体・ペプチドなどによる表面修飾が容易であるという特徴を有しており、分子標的薬や遺伝子治療のキャリアとして臨床開発されている。

### 2. 研究の目的

申請者は以前、金ナノ粒子に Tmab を結合させ、HER2 陽性胃癌細胞株への治療効果を確認する研究を行ってきたが、その中で、Tmab 単体よりも Tmab 結合金ナノ粒子の方が強力な細胞障害活性を示すことメカニズムとして、Tmab を金ナノ粒子に結合させた方が細胞内への取り込みが増強することが重要であることを確認した (Kubota T, Kuroda S, et al. Nanomedicine. 2018)。この知見と、前述の T-DM1 の胃癌に対する臨床試験の失敗の要因 (細胞内への取り込み不良) から、ADC に金ナノ粒子を結合させることで、ADC の細胞内への取り込みが増強し、組織内不均一性の強い胃癌においても有意な治療効果を発揮する薬剤となりえるのではないかという発想に至った。

本研究では、HER2 を標的とする金ナノ粒子結合抗体薬物複合体を作成し、HER2 陽性・陰性胃癌細胞株に対する治療効果を検討するとともに、HER2 不均一性を有する胃癌組織における治療効果の検討を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

細胞株及び治療薬は下記のものを使用した。

<細胞株>

HER2 陽性トラスツズマブ感受性ヒト胃癌細胞株: NCI-N87

HER2 陽性トラスツズマブ抵抗性ヒト胃癌細胞株: MKN7

HER2 陰性ヒト胃癌細胞株: MKN74

ルシフェラーゼ発現 MKN74 細胞株: MKN74-Luc

マウス胃癌細胞株: T3-2D

<治療薬>

金ナノ粒子結合 T-DM1: ATDM1

<コントロール治療薬>

PBS、金ナノ粒子 (c-AuNP)、T-DM1

#### (1) ATDM1 の質的評価

ATDM1 を作成し、電子顕微鏡や動的散乱光測定による粒子径測定、分光光度計によるピーク吸収波長のシフトなどにより質的評価を行った。

#### (2) HER2 陽性・陰性胃癌細胞株に対する ATDM1 の治療効果

NCI-N87、MKN7、MKN74、T3-2D に対して、PBS、c-AuNP、T-DM1、ATDM1 (4 群) で治療を行い、XTT アッセイにて細胞障害活性を測定した。

#### (3) ATDM1 の治療メカニズム

NCI-N87 と MKN7 に対し 4 群で治療を行い、ウェスタンブロットやフローサイトメトリーを用いて、アポトーシスや細胞周期の検討を行った。

#### (4) バイスタンダー効果の検討

NCI-N87 と MKN74 (緑蛍光標識あり) を 1:1 で共培養し、4 群治療を行い、MKN74 に対する治療効果を比較検討した。

#### (5) マウス皮下腫瘍モデルにおける ATDM1 の治療効果

Balb/c ノードマウスに NCI-N87 皮下腫瘍モデルおよび NCI-N87 と MKN74-Luc を混ぜた組織不均一皮下腫瘍を作成し、4 群治療（3 回/週）を行った。

#### 4 . 研究成果

##### ( 1 ) ATDM1 の質的評価

電子顕微鏡にて、10nm 金ナノ粒子表面に 5nm 金ナノ粒子で標識した T-DM1 の結合を肉眼的に確認し、また分光光度計にてピーク波長が 6nm シフト( 520nm 526nm )していることから、ATDM1 が確実に作成されていると判断した。

##### ( 2 ) HER2 陽性・陰性胃癌細胞株に対する ATDM1 の治療効果

ATDM1 は、用量依存的に細胞障害活性の増強を認めたが、0.5ug/ml の濃度では、HER2 陽性株である NCI-N87 と MKN7 においては治療効果が確認されたものの、HER2 陰性株である MKN74 と T3-2D においては治療効果を認めなかった。また、4 群比較においては、NCI-N87 および MKN74 の両細胞株において、ATDM1 は他の治療群と比較し有意な細胞障害活性を発揮した。

##### ( 3 ) ATDM1 の治療メカニズム

NCI-N87 に対して、ATDM1 はウェスタンブロットで明らかに cPARP と LC3-II の増強を認め、アポトーシスとオートファジーを誘導したが、MKN74 においては、他の治療群と比較して cPARP と LC3-II の発現に変化を認めなかった。フローサイトメトリーによる細胞周期の検討では、NCI-N87 と MKN74 の両細胞株において、ATDM1 で G2/M 期の上昇を認めた。

##### ( 4 ) バイスタンダー効果の検討

NCI-N87 と MKN74 ( 緑蛍光標識 ) の共培養の系で、4 群治療したところ、ATDM1 のみが MKN74 に対して有意に高い細胞障害性を示した。これは、ATDM1 は直接的に MKN74 には取り込まれずに治療効果を示さないため、NCI-N87 に取り込まれて治療効果を示したのちに、その治療効果が MKN74 にも波及した ( バイスタンダー効果 ) ことを示唆するものと考えられた。

##### ( 5 ) マウス皮下腫瘍モデルにおける ATDM1 の治療効果

NCI-N87 皮下腫瘍に対して、ATDM1 は他の治療群と比較し、有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた。NCI-N87 と MKN74-Luc の不均一皮下腫瘍に対しては、総和の腫瘍体積の検討では、ATDM1 は他の治療群と比較して有意な腫瘍増殖抑制効果を認め、バイスタンダー効果を評価するための MKN74-Luc に対する IVIS の検討では、有意差は認められなかったものの ATDM1 でルシフェラーゼの発光強度が低い傾向が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本癌学会総会やAACRなどで学会発表を予定していたが、新型コロナウイルスの感染拡大によりキャンセルをせざるを得ない状況となったため、いまだ本研究成果について発表を行うことができていないが、現在、論文発表に向けて準備を行っているところである。

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
---------	---------