

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16021

研究課題名（和文）抗体抗がん剤複合体における結合速度定数と性状の関係性

研究課題名（英文）Relationship between association rate constant and characteristics of antibody-drug conjugate

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・新薬開発分野・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）：本研究では抗体のアミノ酸改変によって、結合速度定数 k_a を上昇させることで、抗体抗がん剤複合体（antibody-drug conjugates, ADCs）の機能向上を目指した。組織因子に対するモノクローナル抗体について、抗体のアミノ酸改変を行ったところ、20倍以上 k_a が上昇した。改変型抗体は野生型抗体と比較して、TF陽性がん細胞PSN-1への細胞内在化効率が上昇し、改変型ADCは野生型ADCよりもPSN-1に対する殺細胞効果が高かった。一方、*in vivo*における腫瘍集積性や抗腫瘍効果では改変による優位性が示されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年複数の抗体抗がん剤複合体（antibody-drug conjugate, ADC）が承認され、ADCが有望ながん治療戦略である事が認知されている。今後の更なる追加検討が必須であるが、本研究において、抗体改変によりADCの薬効増強の可能性が示唆され、また結合速度定数がADC開発の抗体クローン選択に重要な指標になりえることが示唆された。これらの検討は、今後の高機能なADC医薬品創出に寄与すると考える。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we aimed to improve a potency of antibody-drug conjugates (ADCs) by increasing the association rate constants (k_a) of the antibody. The monoclonal antibody against tissue factor (TF) was modified some specific amino acids, and we confirmed that the k_a of the engineered antibody was more than 20 times higher than that of the wild-type antibody. The engineered antibody was more efficiently internalized into TF-positive cancer cell line, PSN-1 cells than the wild-type antibody. Also, the engineered ADC showed greater cytotoxicity against PSN-1 cells *in vitro* than the wild-type ADC. However, we could not observe the changes in the degree of tumor accumulation and the anti-tumor effect against PSN-1 tumor.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：抗体抗がん剤複合体 抗体改変技術 結合カイネティクス 性状評価

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 抗体抗がん剤複合体 (ADC; antibody-drug conjugate) の作用メカニズム

抗体抗がん剤複合体 (ADC; antibody-drug conjugate) は有望ながんの治療薬として基礎・臨床の双方から注目されている抗体製剤である。ADC はモノクローナル抗体と強力な抗がん剤、それらを繋ぎ薬剤放出制御を担うリンカーによって構成されている。現在開発されている ADC の殆どは、がん細胞膜表面上のタンパク質抗原を標的としており、標的抗原に結合後、抗原のエンドサイトーシス依存的に細胞内へと取り込まれる。その後、ライソソーム内のプロテアーゼによってリンカー構造が選択的に切断されることで薬剤が放出される。ADC に搭載されている多くの薬剤は微小管重合阻害や DNA 複製阻害を起こし、最終的にがん細胞のアポトーシスを誘導する。これらの一連の ADC の作用メカニズムから、ADC の薬効増強のためには、標的細胞への結合性や細胞内挙動を制御することが重要であると考えられる。

(2) 結合カイネティクスの重要性

抗体の結合力は結合定数 K_D (= 解離速度定数 k_d / 結合速度定数 k_a) で定義される。本研究では抗体の k_a に着目し、抗体のアミノ酸改変により k_a を上昇させる。抗体の k_a 上昇により、ADC の結合力の増強および細胞内への内在化効率の向上、ひいては標的がん細胞に対する殺細胞効果の増強が期待されるが、これまでに抗体の k_a 変化と ADC の性状変化及び治療効果の関係性に言及した報告は無い。そのため、結合カイネティクスを変化させる意義を明らかにして、結合カイネティクスを最適化する研究は ADC 研究開発において極めて必要性が高いと考える。

2. 研究の目的

本研究では k_a を変化させることで、「どのように抗体及び ADC の性状が *in vitro* 及び *in vivo* で変化するか」「抗腫瘍効果への影響があるか」を検証する。本研究により、抗体の k_a を変化させることで生じる ADC の *in vitro* 及び *in vivo* での性状変化を明らかにして、ADC 開発において k_a の最適化を行う意義を明確にする。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* における性状解析

組織因子 (tissue factor, TF) に対するモノクローナル抗体を用いてアミノ酸改変を行い、改変型抗体を作製する。野生型抗体と改変型抗体の結合カイネティクスを **BiaCore** により測定し、改変型抗体で k_a が上昇しているか確認した。次に、それぞれの抗体の TF 陽性腫がん細胞株に対する結合性を明らかにした。それぞれの抗体を蛍光色素標識して、TF 陽性腫がん細胞株への内在化効率を比較した。さらに、それぞれの抗体に monomethyl auristain E (MMAE) を含むリンカーを付加して ADC を作製した。ADC を TF 陽性腫がん細胞に添加し、がん細胞に対する殺細胞効果を検証した。

(2) *in vivo* における性状解析

腫がん細胞株を皮下したヌードマウスに対して、蛍光色素標識したそれぞれの抗体を尾静脈投与し、各抗体のマウス体内動態を明らかにした。また、腫がん細胞株皮下移植モデルにおいて、

野生型 ADC と改変型 ADC の抗腫瘍効果の比較検討を行った。

4. 研究成果

(1) 結合カインेटクス

リコンビナントヒト TF 抗原に対する抗 TF 野生型抗体と抗 TF 改変型抗体の k_a を測定した結果、改変型抗体は野生型抗体と比較して 20 倍以上も k_a が上昇した (図 1)。この結果から、アミノ酸改変により k_a が上昇することが示された。また、TF 高発現膵がん細胞株である BxPC-3 に対する各抗体の結合性を確認した結果、どちらの抗体も BxPC-3 に対する強い結合性が確認され、一方でコントロール抗体として用いたリツキシマブは結合性を示さなかった。

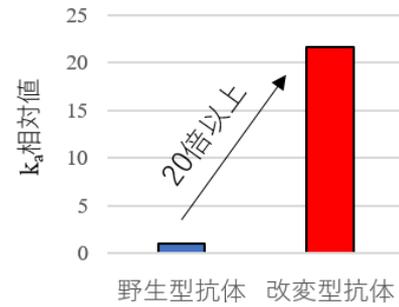


図 1. k_a の相対的变化

(2) 細胞内在化効率

抗 TF 野生型抗体と抗 TF 改変型抗体をそれぞれ Alexa Fluor 488 で標識して、BxPC-3 に 4 時間接触させ、細胞内への内在化効率を測定した。その結果、改変型抗体と野生型抗体との内在化効率に有意差は見られなかった (図 2A)。一方、TF を中程度に発現する膵がん細胞株 PSN-1 に対しては、改変型抗体の内在化効率が野生型抗体を有意に上回る結果が得られた (図 2B) ($p < 0.01$)。野生型抗体と比較して改変型抗体の PSN-1 への内在化効率が上昇した事は

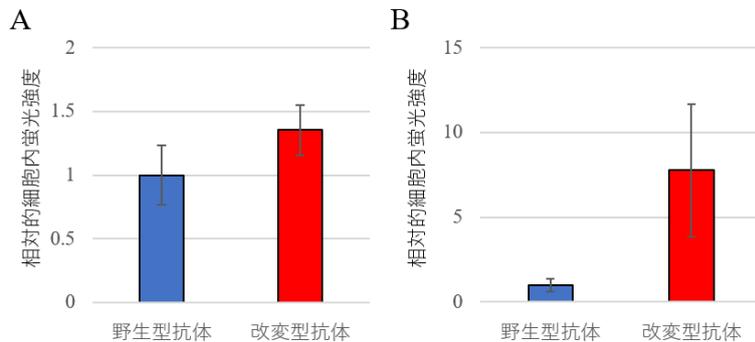


図 2. (A) BxPC-3 および (B) PSN-1 に対する細胞内への内在化効率比較. 抗体接触時間 4 時間 (n = 3)

図 3 画像からも明らかである。

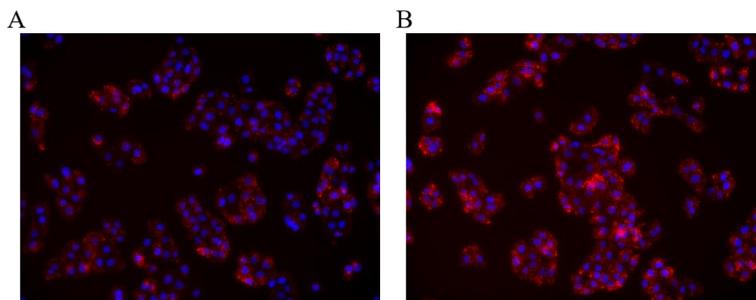


図 3. (A) 野生型抗体および (B) 改変型抗体の PSN-1 に対する細胞内への内在化画像. 抗体接触時間 4 時間. 赤: 標識抗体. 青: 細胞核 (DAPI)

(3) ADC 作製と *in vitro* 殺細胞効果

抗 TF 野生型抗体と抗 TF 改変型抗体をそれぞれ至適条件で還元処理し、フリーになった抗体のチオール基に対して、MMAE を含むリンカー化合物のマレイミド基を反応 (マイケル付加反応) させ、抗体へのリンカー化合物の付加を行った。抗体還元条件を最適化することで、それぞれの drug-antibody ratio を 3 程度 (2.5~3.5) に調製した。作製した野生型 ADC と改変型 ADC を MMAE 換算濃度で 0.3 もしくは 3 nM となるように培養液で調製し、TF 陽性膵がん細胞株である BxPC-

3 と PSN-1 に添加した。24 時間反応後、それぞれのウェルを培養液で wash し、追加で 48 時間インキュベーションし、その後 WST-8 アッセイによりがん細胞の viability を測定した。

その結果、BxPC-3 に対して、どちらの薬剤濃度においても野生型 ADC と改変型 ADC の殺細胞効果に有意差は見られなかった (図 4A)。

一方、PSN-1 に対しては、野生型 ADC と比較して改変型 ADC の殺細胞効果がどちらの薬剤濃度においても有意に高い結果となった (図 4B) ($p < 0.01$)。

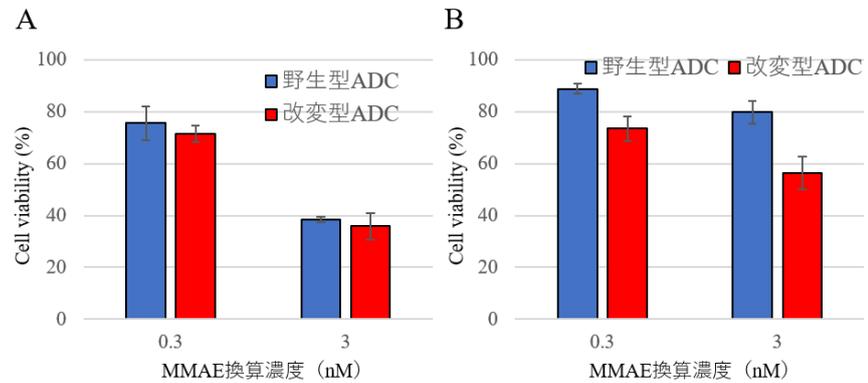


図 4. (A) BxPC-3 および (B) PSN-1 に対する各 ADC の殺細胞効果. 薬剤接触時間 24 時間 (n = 3)

(4) 担癌マウスにおける体内動態

抗 TF 野生型抗体と抗 TF 改変型抗体、およびコントロール抗体としてリツキシマブをそれぞれ Alexa Fluor 647 標識し、TF 陽性腫がん細胞株 BxPC-3 を皮下移植したヌードマウスに 100 μg/匹ずつ尾静脈投与した。その後、OV110 (Olympus) により経時的にマウス体内の蛍光強度を *in vivo* imaging を行った。その結果、野生型抗体も改変型抗体もリツキシマブと比較して高い腫瘍への集積性を示した (図 5A)。

また、野生型抗体と改変型抗体の腫瘍部における蛍光強度の比較では、有意な差が見られなかったが、改変型抗体の方が投与後 3 日、および 7 日後で低い集積性を示す傾向が示された (図 5A)。正常部での蛍光強度を測定することで、血中での滞留性を比較検討した。その結果、投与後 1 日、および 3 日後において、3 つの抗体間で有意な差が見られなかった (図 5B)。この結果は、図 5A

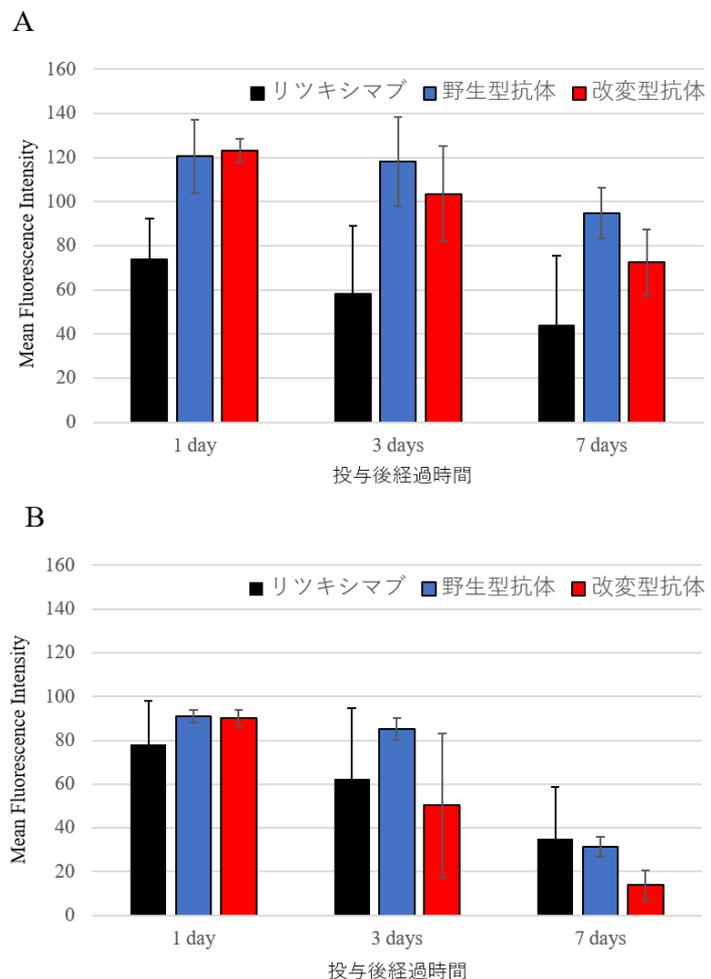


図 5. (A) 腫瘍部および (B) 体側の正常部における投与後 1 日、3 日、および 7 日後の蛍光強度 (n = 3)

におけるリツキシマブと抗 TF 抗体の腫瘍集積性の明らかな差は、血中での安定性ではなく、BxPC-3 へのアクティブターゲティングによる差であることを示唆している。野生型抗体と改変型抗体との比較では、腫瘍部の蛍光強度と同様、投与後時間が経過するにつれて、血中での蛍光強度も改変型抗体の方が低くなる傾向にあった。

(5) *in vivo* における抗腫瘍効果検討

項目③において、野生型 ADC と改変型 ADC の *in vitro* 殺細胞効果の差が見られた TF 陽性腺がん細胞株 PSN-1 をヌードマウスの皮下に移植して担癌マウスを作製した。腫瘍サイズの平均が 200~300 mm³ になった時点で

DPBS、野生型 ADC もしくは改変型 ADC を尾静脈投与し、治療実験を開始した (Day0)。それぞれの ADC は 5 mg/kg を週 1 回、計 2 回投与し、その後経時的に腫瘍径の測定を行った。その結果、野生型 ADC 投与群と改変型 ADC 投与群では DPBS 投与群と比較して、腫瘍の増殖が抑制される傾向が見られた。一方、野生型 ADC と改変型 ADC の抗腫瘍効果に有意な差は見られなかった。また治療開始 14 日以降では、改変型 ADC 投与群の方が野生型 ADC 投与群よりも腫瘍の再増殖が早い傾向が見られた (有意差無し)。

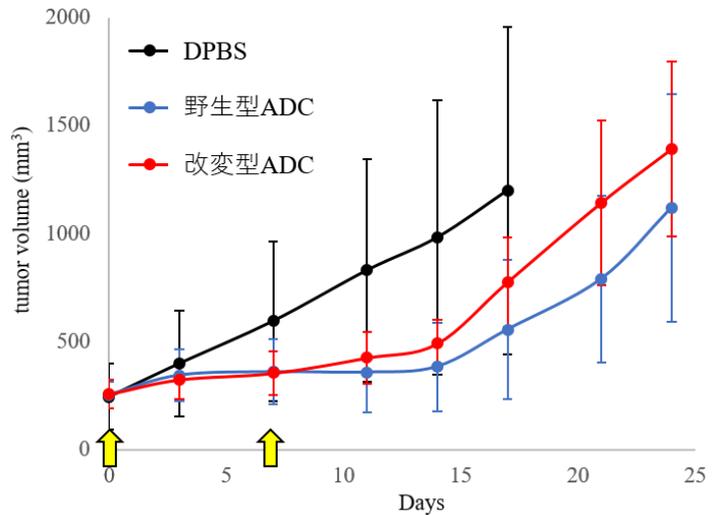


図 6. PSN-1 担癌マウスにおける治療実験 (n = 4) . 黄色矢印は投与日 (Day0 と Day7) を示す. 投与量は 5 mg/kg. 腫瘍径は短径×短径×長径×1/2 で算出.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 0件）

1. 著者名 Tsumura Ryo, Anzai Takahiro, Manabe Shino, Takashima Hiroki, Koga Yoshikatsu, Yasunaga Masahiro, Matsumura Yasuhiro	4. 巻 45
2. 論文標題 Antitumor effect of humanized anti-tissue factor antibody-drug conjugate in a model of peritoneal disseminated pancreatic cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 329 ~ 336
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2020.7850	査読の有無 有
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 0件）

1. 発表者名 Ryo Tsumura, Takahiro Anzai, Hiroki Takashima, Yoshikatsu Koga, Masahiro Yasunaga.
2. 発表標題 Antibody engineering for improving efficacy of antibody-drug conjugates.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津村遼, 安西高廣, 高島大輝, 古賀宣勝, 松村保広, 安永正浩.
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patient-derived xenograftモデルにおける治療効果
3. 学会等名 第37回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryo Tsumura, Takahiro Anzai, Shino Manabe, Hiroki Takashima, Yoshikatsu Koga, Masahiro Yasunaga, Yasuhiro Matsumura.
2. 発表標題 Antibody-drug conjugate targeting tissue factor for pancreatic cancer treatment.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津村遼, 眞鍋史乃, 安西高廣, 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 (tissue factor) を標的とした抗体抗がん剤複合体の開発.
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会. (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

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