

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591447

研究課題名（和文） 抗体デリバリーを規定する腫瘍側生物学的抵抗因子の解析

研究課題名（英文） Analysis of the tumor biological factor regulating the antibody-delivery

研究代表者

安永 正浩 (YASUNAGA MASAHIRO)

独立行政法人国立がん研究センター・臨床開発センター・ユニット長

研究者番号：80450576

研究成果の概要（和文）：難治性固形腫瘍の膵臓がんにおいて、抗体デリバリーを阻害する腫瘍側生物学的抵抗因子としての間質バリアの存在を明らかにした。これらの腫瘍に対しては、抗間質抗体と細胞外薬剤放出リンカーの組み合わせなど適切なAntibody drug conjugate (ADC)をデザインすることで、抗体デリバリーの改善と共に治療効果を最大限に活かせることも明らかにした。また、悪性リンパ種などの間質バリアの影響が少ない腫瘍では、抗体デリバリーの阻害を受けずにすむので細胞を直接標的にしたADCも有効に作用することが示された。しかしながら、この場合には細胞内取り込み（internalization）効率の優れた抗体を使う必要がある。

研究成果の概要（英文）：In pancreatic cancer as a refractory solid tumor, tumor stromal barrier interferes with antibody-delivery. To improve the delivery and maximize the therapeutic effect of antibody drug conjugate (ADC) against such tumors, it is important to determine the most appropriate drug design e. g. combination of the anti-stroma antibody and the linker for the drug-release outside the cells. On the other hand, cell-targeting ADC is effective against malignant lymphoma as a stroma-poor tumor without the interference of antibody-delivery. In this type of ADC, an antibody having a high cell-internalization efficacy should be selected.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2011年度	200,000	60,000	260,000
2012年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：抗体デリバリー、抗体、ADC、DDS、間質バリア、膵臓がん、悪性リンパ種、SN-38

### 1. 研究開始当初の背景

抗体医薬の開発が進み、がんの分野でも臨床応用が進んでいる。さらに欧米を中心に抗体に抗がん剤を付加した Antibody drug conjugate (ADC) の開発も進んでいる。近年、乳がんに対して抗HER2抗体-DM1複合体の臨床試験での有効性が示された。しかしながら、従来ADCは血液性の悪性腫瘍には有効であるが、膵臓がんやスキルス胃がんなどの難治性固型腫瘍に関しては一般的に効果が低いとされていた。また、現時点でこれらの難治性固型腫瘍に有効な抗体医薬も存在しない。一方、乳がんは固型腫瘍の中でも抗HER2抗体を含む抗体医薬が効きやすいことが知られていた。この謎に関して、細胞内増殖・生存シグナルの抑制、抗体依存性細胞障害活性 (ADCC)、がん幹細胞及びそのニッチなど、細胞・分子生物学的観点から研究がなされてきたが、抗体デリバリーの観点から解析されることはなかった。

### 2. 研究の目的

(1) 細胞内抗体 internalization (2) 血管と間質成分の多寡という、抗体デリバリーに影響を与えると思われる因子についてがん種別に比較検討することで、その腫瘍側生物学的因子としての特性を明らかにしようというものである。

### 3. 研究の方法

(1) 悪性リンパ種などの血液性悪性腫瘍と乳がん、大腸がん、膵臓がんなどの固形腫瘍について、細胞株を用いて、試験管内で蛍光標識抗体の細胞内取り込み (internalization) 効率の違いを比較検討した。

(2) 血管・血流が豊富で間質の少ない悪性リンパ腫モデルと血管・血流が少なく間質の多い

膵臓がんモデルを作製して、抗体デリバリーについて、腫瘍への到達性と腫瘍内部での浸透性を評価した。

(3) 抗体デリバリーの違いに基づいて作製された抗細胞抗体ADCと抗間質抗体ADCについて (2) と同じ腫瘍モデルを用いて抗腫瘍効果の違いを比較検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 細胞内抗体 internalization

悪性リンパ種細胞株 Ramos、RL に対して蛍光標識した抗 CD20 抗体は、投与後数時間から半日の間に、高い internalization 効率を示した。同様に乳がん細胞株 SKBR3 に対して、蛍光標識した抗 HER2 抗体を投与したところ、細胞表面に残存する抗体と細胞内に取り込まれる 2 種類の表現型が同一細胞内に混在した。大腸がん細胞株 HT29 とすい臓がん細胞株 SUI2 に蛍光標識した抗 EpCAM 抗体を投与したところ、予想に反して低い internalization 効率が示された。細胞標的性 ADC が血液性悪性腫瘍で有効で固形腫瘍で効果が低くなる原因のひとつに細胞内 internalization 効率の低下が挙げられた。また、乳がんでは、高い internalization 効率が必要な ADC と、逆に低い internalization 効率による細胞外表面での持続陽性が必要な ADCC の両方が有効に作用するとされているが、今回の検討で同一細胞においても相反する両者が起こり得ることが示された。したがって、抗 HER2 抗体 ADC の場合には細胞内に取り込まれて薬剤を放出して殺細胞効果を示す通常の薬効に加えて、ADCC も併せもつ優れた薬剤ということになる。

#### (2) 抗体デリバリー

全身性のin vivoイメージングでは、悪性リンパ種と膵臓がんの両方において、抗細胞抗体の抗CD20抗体と抗EpCAM抗体は腫瘍選択的に集積していた。また、非特異性抗体もEPR(Enhanced Permeability and Retention)効果で腫瘍に対して受動的に集積するが、各特異抗体は、非特異抗体よりも長期に腫瘍に集積することが判明した。この結果から、Active targetingはERP効果あるいはPassive targetingの上乗せ効果として作用するということが理解できた。ところが、蛍光抗体の腫瘍内部の浸透性の違いを比較検討すると両モデルで大きな違いが存在することも。今回の研究で明らかになった。すなわち、悪性リンパ種モデルでは、蛍光抗体は腫瘍全体に浸透していたが、膵臓がんモデルでは、血管外漏出後、一部は腫瘍内部への浸透が見られたが、多くの蛍光抗体が腫瘍内部への浸透が抑制されていた。この結果は、膵臓がんモデルの場合には間質バリアによって腫瘍内部における抗体デリバリーが抑制されたことによるものと理解された。間質バリアは(1)間質内の細胞成分や蛋白質による物理的通過障害、(2)convectionやdiffusionといった薬理的浸透性障害、(3)血管から腫瘍細胞への到達距離の延長による送達障害といった複合的な要素により抗体デリバリーを障害しているものと考えられた。

#### (3) 抗細胞抗体ADCと抗間質抗体ADCの薬効比較

抗CD20抗体と抗EpCAM抗体には細胞内リリース型のカルバメート結合リンカーで抗がん剤SN-38を付加したADCを作製した(以下CD20-C-SN38、EpCAM-C-SN38と記載)。CD20-C-SN38は悪性リンパ腫で著明な抗腫瘍効果(40%の個体で腫瘍が完全消失)を示したが、EpCAM-C-SN38の膵臓がんでの抗腫瘍

効果は弱かった。そこで、膵臓がん間質に豊富なコラーゲン4を標的にした抗体に、細胞外リリース型のエステル結合リンカーでSN-38を付加したADCを作製した(以下Col4-E-SN38と記載)。Col4-E-SN38は膵臓がんでは著明な抗腫瘍効果を示した。

#### (4) 結語

腫瘍側生物学的因子としての間質バリアを明らかにして、適切なADCをデザインすることで、抗体デリバリーの改善と共に薬剤を有効に作用させることができることを明らかにした。また、間質バリアの影響が少ない場合には、細胞を標的にしたADCが有効と思われるが、この場合には抗体の細胞内取り込み(internalization)効率の優れた抗体を選択すべきであることが示された。

#### 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3件)

1. Yasunaga M, Manabe S, Tarin D, Matsumura Y. Tailored immunoconjugate therapy depending on a quantity of tumor stroma. *Cancer Sci.* 査読有, 2013, 104, 231-7.
2. Yasunaga M, Manabe S, Tarin D, Matsumura Y. Cancer-stroma targeting therapy by cytotoxic immunoconjugate bound to the collagen 4 network in the tumor tissue. *Bioconjug Chem.* 査読有, 2011, 22, 1776-83.
3. Yasunaga M, Manabe S, Matsumura Y. New concept of cytotoxic immunoconjugate therapy targeting cancer-induced fibrin clots. *Cancer Sci.* 査読有, 2011, 102, 1396-402.

〔学会発表〕(計14件)

1. 安永正造、杉野隆、辻厚至、佐賀恒夫、眞鍋史乃、松村保広 Development of CAST (Cancer stromal targeting) diagnosis and therapy using anti-fibrin monoclonal antibody 第38回日本微小循環学会総会 口演 2013/2/9 東京慈恵会医科大学
2. 安永正造、杉野隆、辻厚至、佐賀恒夫、眞鍋史乃、松村保広 Developmental strategy of CAST (Cancer stromal targeting) therapy using DDS (Drug delivery system) and Imaging technology The Chemo-Bio Informatics Society Annual Meeting 2012 ポスター 2012/10/15 東京・タワーホール船堀
3. 安永正造、杉野隆、辻厚至、佐賀恒夫、眞鍋史乃、松村保広 Development of fibrin-targeting CAST (Cancer stromal targeting) diagnosis and therapy 第71回日本癌学会学術総会 口演 2012年9月19日 ロイトン札幌
4. 安永正造、辻厚至、杉野隆、佐賀恒夫、眞鍋史乃、松村保広 フィブリンを標的にしたPET・CTイメージングとがん診断への応用 第7回日本分子イメージング学会 ポスター 2012年5月25日 アクトシティ浜松中ホール・コンgresセンター
5. 安永正造、杉野隆、辻厚至、佐賀恒夫、眞鍋史乃、松村保広 抗フィブリン抗体を用いたCancer Stroma targeting(CAST)診断法の開発 第28回日本DDS学会 口演 2012年7月5日 札幌コンベンションセンター
6. 安永正造、眞鍋史乃、松村保広 CAST(Cancer stromal targeting)療法による腫瘍微小循環の制御 第37回日本微小循環学会 口演 2012年3月17日 盛岡グランドホテル
7. 安永正造、眞鍋史乃、松村保広 Development of Cancer Stromal Targeting (CAST) Therapy by Utilizing in vivo Imaging 日本情報計算化学生物学会 2011年11月9日 神戸国際会議場
8. 安永正造、眞鍋史乃、松村保広 腫瘍組織成分と細胞特性に応じた抗体抗がん剤複合体の治療戦略 第70回日本癌学会 口演 2011年10月5日 名古屋国際会議場
9. 安永正造、久田洋平、眞鍋史乃、松村保広 in vivoイメージングを用いたがん間質ターゲットCAST療法の開発 第20回日本バイオイメージング学会 ポスター 2011年9月2日 千歳科学技術大学
10. 安永正造、眞鍋史乃、松村保広 間質抗体を利用したがん標的治療法の開発 第27回日本DDS学会 シンポジウム 2011年6月9日 東京大学本郷キャンパス
11. 安永正造、眞鍋史乃、久田洋平、中村彰吾、松村保広 In vivoイメージングを用いた抗体DDS製剤開発戦略 第6回日本分子イメージング学会 シンポジウム 2011年5月27日 神戸国際会議場
12. 安永正造、久田洋平、中村彰吾、松村保広 in vivoイメージングによる腫瘍微小循環における抗体動態の解析 第36回日本微小循環学会

環学会 口演 2011年2月12日 名古屋市立  
大学病院

13. 安永正浩、眞鍋史乃、松村保広 間質バ  
リア克服のための抗体DDS製剤の開発戦略  
第69回日本癌学会学術総会 口演 2010年9  
月22日 リーガロイヤルホテル大阪

14. 安永正浩、眞鍋史乃、松村保広 間質タ  
ーゲット 日本生体医工学学会ナノメディ  
シンフォーラム シンポジウム 2010年9月  
4日 東京慈恵会医科大学

〔図書〕(計1件)

安永正浩、松村保広、シーエムシー出版、抗  
間質抗体を利用したがん標的治療 ドラッ  
グデリバリーシステムの新展開Ⅱ 2012年  
発行 136-143

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：抗フィブリン抗体・薬剤複合体による  
新規DDS製剤  
発明者：松村保広、安永正浩、眞鍋史乃  
権利者：国立がん研究センター・理学研究所  
種類：特許  
番号：特願2010-139572  
出願年月日：2010年6月18日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

東病院 臨床開発センター 研究グループと  
研究内容 治療開発グループ 新薬開発分野  
スタッフ

<http://www.ncc.go.jp/jp/ncce/rcio/research/itd/mayasuna.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安永 正浩 (Yasunaga Masahiro)  
独立行政法人国立がん研究センター・  
臨床開発センター・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)  
独立行政法人国立がん研究センター・  
臨床開発センター・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