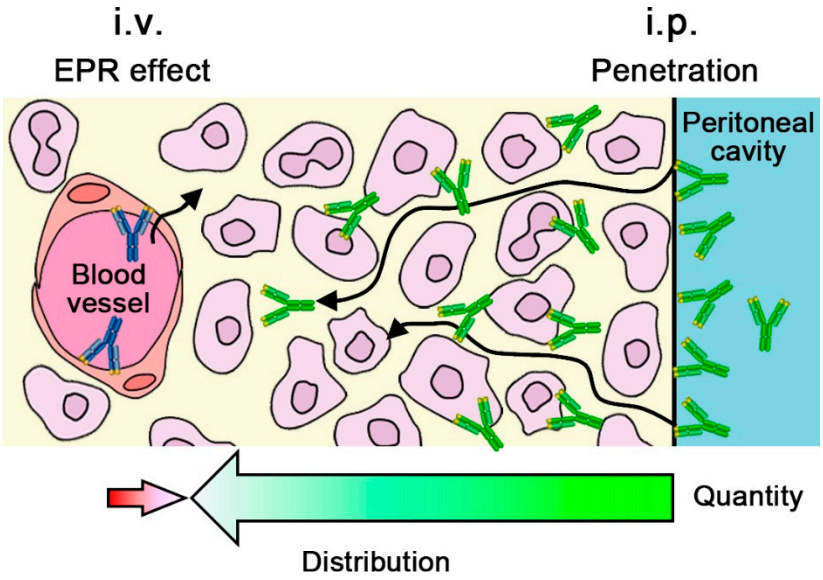
88　抗体・ナノDDSの腹腔内動態解析と免疫療法への展開	畠山　浩人

【目的】腹膜播種など腹腔内腫瘍の転移は予後が極めて不良であり新たな治療法が求められている。抗がん剤の腹腔内腫瘍への送達効率と治療効果の向上を目的に、抗がん剤を腹腔内（i.p.）投与する腹腔内化学療法の臨床研究が進められているが、静脈内（i.v.）投与と比較し明確な生存期間の延長は認められていない。近年、免疫チェックポイント阻害剤（ICI）によるがん免疫療法は従来の治療では根治困難な進行がんにも効果を示すことが報告されているが、奏効率は20%で、必ずしも多くの患者では効果がなく、奏功率の向上が課題である。ICI の腹腔内腫瘍への送達効率の向上と奏効率改善を目的して、腹膜播種モデルマウスにおいて ICI である抗 PD-L1 抗体の i.p.投与の有用性を i.v.投与と比較し検証した。

【方法】大腸がん細胞 MC38 を i.p.投与し腹膜播種モデルマウスを作製し、^{111}In を標識した抗 PD-L1 抗体を i.v.もしくは i.p.投与後、血液や腫瘍組織中の放射活性から濃度推移を、また SPECT／CT により全身分布を評価した。腹膜播種組織内の抗 PD-L1 抗体の分布を蛍光組織免疫染色で評価した。また抗 PD-L1 抗体を i.v.／i.p.投与後の腹膜播種重量や腹水量から抗腫瘍効果を評価した。

【結果】^{111}In 標識抗 PD-L1 抗体を i.v.／i.p.投与後の SPECT／CT 評価の結果、i.p.投与後は腹腔内における濃度が高く維持されていた。体内動態評価の結果、i.v.投与と比較し i.p.投与後に腹膜播種へ約 10 倍移行量が向上していることが示された。i.v.投与後は抗 PD-L1 抗体は血管周囲にのみ局在していたのに対し、i.p.投与後は、時間依存的に腫瘍表面から深部へ浸透している様子が観察された。*Ex vivo* 腹膜播種でも抗 PD-L1 抗体は時間依存的に組織表面から深部への浸透が確認された。従って、i.p.投与後、抗 PD-L1 抗体は腹腔内空間から腹膜播種へ直接移行し浸透することで、i.v.投与の 10 倍の移行量が達成されたと考えられる。その結果、抗 PD-L1 抗体の i.v.投与と比較して i.p.投与後の腹膜播種重量は有意に減少し一部個体では腫瘍が消失していた。またがん進行に伴い増加する腹水の減少も確認された。一方で、体重減少など副作用は観察されなかった。以上より、腹腔内投与は ICI の治療において有用な投与経路であり、ICI の腹膜播種治療における奏功率の向上に向け、今後ヒトにおける腹腔内 ICI 投与法の臨床研究が進むことが期待される。

i.v.／i.p.投与後の免疫チェックポイント阻害剤の腹腔内腫瘍移行メカニズム



88. 抗体・ナノ DDS の腹腔内動態解析と免疫療法への展開

畠山　浩人

*千葉大学 大学院薬学研究院 臨床薬理学研究室

Key words：免疫チェックポイント阻害剤，腹腔内投与，脂質ナノ粒子，がん治療

緒　言

腹腔内臓器を原発とするがんの進行に伴い、腹腔内の他臓器への転移や腹膜へ転移する腹膜播種に対する治療は主に全身化学療法であるが予後が悪く生存率は極めて低い。一因として腹腔内腫瘍への薬物送達効率の悪さが挙げられている。この問題を克服するため、腹腔内へ直接抗がん剤を投与する腹腔内化学療法の臨床研究が進められている。腹腔内化学療法は高濃度の抗がん剤が腹腔内腫瘍に直接暴露することができ、腫瘍組織の抗がん剤濃度が高く維持されることで薬効の増強や、全身暴露が回避されることによる副作用の低減が期待されている。進行性卵巣癌患者を対象とし化学療法を静脈内 (i.v.) もしくは腹腔内 (i.p.) 投与した臨床試験 GOG172 では i.p.投与群で生存期間の延長が示された [1]。一方で、生存期間の延長が認められない臨床試験の報告も存在し、現在に至るまで腹腔内化学療法が転移した腹腔内腫瘍の治療に有用か結論は出ていない。

腹膜播種モデルにおける検討で、抗がん剤を i.v.／i.p.投与した直後の腹腔内濃度には約 100 倍の差があり、腹腔内濃度が高く維持できているが、24 時間後には i.v.／i.p.投与で同等にまで腹腔内濃度が低下していた [2]。これは i.p.投与された抗がん剤は腹膜毛細血管より速やかに吸収されていると考えられる。また、腹膜播種における抗がん剤濃度は i.v.／i.p.投与で同等で腹膜播種への移行量の増加は観察されなかった。以上のことから、腹腔内化学療法が治療効果を促進しない理由として、i.p.投与後に腫瘍組織で抗がん剤濃度を期待しているほど高く維持できないことが一因と考えられる。

近年、抗腫瘍免疫を活性化するがん免疫療法が、外科、放射線、化学療法に次ぐ第 4 の治療法としてがん治療で適応拡大が進んでいる。免疫チェックポイント阻害剤（ICI）は、細胞障害性リンパ球（CTL）上に発現する免疫チェックポイント分子 programmed cell death 1（PD-1）やがん細胞上に発現する PD-1 のリガンド PD-L1 に対する抗体医薬である。PD-1／PD-L1 経路を阻害することで活性が抑制している CTL を再び活性化させ、抗腫瘍免疫を介したがん治療を実現している。従来の治療では根治が困難な進行がんにも効果が得られるが、奏功率は 20%と低く、奏効率の改善は課題である。筆者らは、これら免疫チェックポイント阻害剤は抗体医薬であり低分子抗がん剤と比較して分子量が大きいため、i.p.投与後に腹膜毛細血管からの吸収が回避され腹腔内濃度が高く維持され、その結果として腫瘍組織中への高い移行量が達成され奏効率を向上できるのではないかと予想した。そこで本研究では腹膜播種モデルマウスを用い、免疫チェックポイント阻害剤を i.v.／i.p.投与し、腹膜播種への移行や移行メカニズム、治療効果について評価し、腹膜播種治療における i.p.投与の有用性を検証した。

方　法

1. 免疫チェックポイント阻害剤への放射性同位体標識と腹膜播種モデルマウスにおける体内動態評価

ICI である抗 PD-L1 抗体（10F.9G2）にキレート剤 p-SCN-CHX-A"-DTPA を結合し、放射性インジウム（^{111}In）を配位させた。C57BL/6 マウスへマウス大腸がん MC38 を i.p.投与して腹膜播種モデルを作製した。^{111}In 標識抗 PD-L1 抗体（2 μg/mouse）を腹膜播種モデルへ i.p.もしくは i.v.投与し各タイムコースに麻酔下で腹膜播種組織や血液を回収し重量を測定後、各臓器中の^{111}In 活性を γ カウンタ（Wizard 3）で測定した。また^{111}In 標識抗 PD-L1 抗体

*現在の所属：千葉大学 大学院薬学研究院 薬物学研究室

（20μg/mouse）を i.p.もしくは i.v.投与し各タイムコースに麻酔下で Single Photon Emission Computed Tomography／Computed Tomography（SPECT／CT）装置（MILabs）を用いて SPECT／CT イメージを撮像し、^{111}In 活性について PMOD ソフトで定量化した。

2. 免疫チェックポイント阻害剤の腫瘍組織内分布評価

抗 PD-L1 抗体（20μg/mouse）を MC38 腹膜播種モデルマウスへ i.p.もしくは i.v.投与し、各タイムコースに腹膜播種組織を回収し、凍結切片（10μm）を作製した。anti-CD31 抗体（ab119341）を 4℃で一晩、2 次抗体（Alexa488 標識 anti-rat IgG 抗体：A21208、Alexa568 標識 anti-hamster IgG 抗体：A21112）を 25℃で 1 時間インキュベーションし、DAPI で核染色後、蛍光顕微鏡（BZ-X710）で観察した。また ImageJ を用いて蛍光強度を定量した。MC38 腹膜播種モデルマウスより腹膜播種腫瘍を摘出し、抗 PD-L1 抗体（10F.9G2、50μg/mL）に浸し、室温で各タイムコースまでインキュベーション後、上記と同様に免疫組織染色を行った。

3. 抗腫瘍効果と毒性の評価

C57BL/6 へ MC38 細胞を腹膜播種後 3、6、8、10、13 日に抗 PD-L1 抗体（rat IgG2b、10F.9G2）（200μg/mouse）を i.p.もしくは i.v.投与した。コントロールは未処置とした。腹膜播種後 15 日に麻酔下で開腹し腹膜腫瘍の重量および腹水量を測定した。毒性の指標として経時的な体重変化を測定した。

結　果

1.　抗 PD-L1 抗体の臓器移行に対する投与経路の影響

^{111}In 標識した抗 PD-L1 抗体を MC38 腹膜播種モデルへ i.v.／i.p.投与し組織移行量を評価した（図 1A）。i.v.投与後の血中濃度と比較して i.p.投与後の血中濃度は投与初期に低く、6 時間以降は同程度で推移した（図 1B）。一方で、MC38 腹膜腫瘍への移行量は、i.p.投与 24 時間後を最大として i.v.投与の約 10 倍の送達を達成し、72 時間後まで腫瘍組織中濃度は高く推移していた（図 1C）。

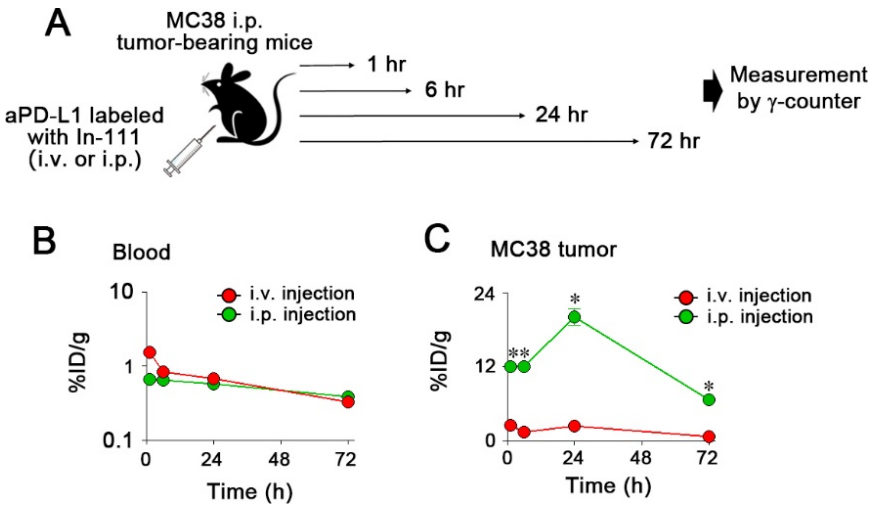


図 1.　i.v.／i.p.投与後の抗 PD-L1 抗体の MC38 腹膜播種モデルマウスにおける体内動態

A)　体内動態評価スケジュール。MC38 腹膜播種モデルへ^{111}In 標識抗 PD-L1 抗体（2μg/mouse）投与後 1～72 時間後の各臓器の^{111}In 活性を評価した。

B)　^{111}In 標識抗 PD-L1 抗体の血中濃度推移。血中濃度は単位血液重量当たり、投与量（ID）当たりの濃度（% ID／g）として評価（n＝3～4、平均±SE）。

C)　^{111}In 標識抗 PD-L1 抗体の MC38 腹膜播種組織中の濃度推移（n＝3～4、平均±SE）。*P＜0.05、**P＜0.01（ウェルチの t 検定）。

抗 PD-L1 抗体の i.v.／i.p.投与後の腹腔内や全身分布の様子を評価するため、SPECT／CT を撮像した。i.v.投与後 5 分において、高い血中濃度を反映して心臓や、また肝臓で高いシグナルが検出されたが、他の腹腔内臓器への移行は確認できなかった（図 2A）。その後腹腔内領域でもシグナルが検出されたが、96 時間まで腹膜播種で高いシグナルは検出できなかった。一方で、i.p.投与後は、投与後 5 分に腹腔内全域で高いシグナルが検出された（図 2B）。また腋窩リンパ節と想定されるリンパ節にも移行が確認された。その後も 48 時間まで腹膜播種領域を含む腹腔内で高いシグナルが検出された。この結果から、抗 PD-L1 抗体の i.p.投与直後から腹腔内で高い濃度を維持し腹膜播種へ効率よく移行することが示された。

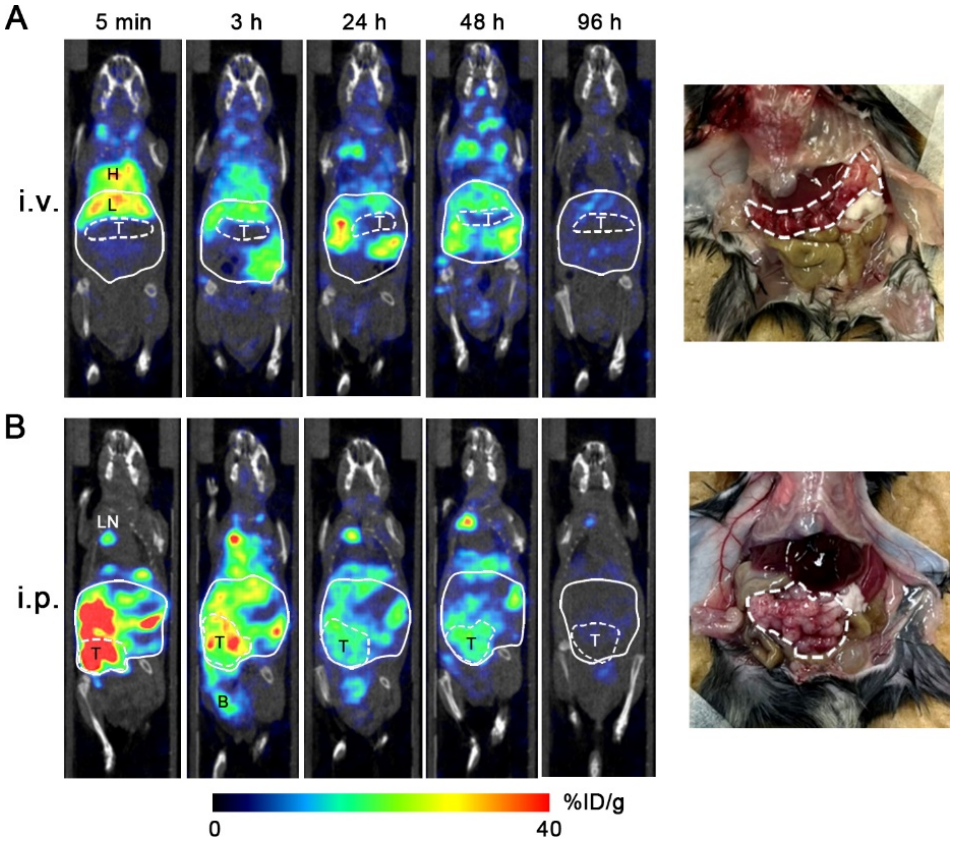


図 2. 抗 PD-L1 抗体の i.v.／i.p.投与後の MC38 腹膜播種モデルの SPECT／CT 画像

A) ^{111}In 標識抗 PD-L1 抗体（20 μg/mouse）の i.v.投与 5 分、3、24、48、96 時間後の SPECT／CT 画像（左）および、96 時間後における腫瘍部位（右）。

B) ^{111}In 標識抗 PD-L1 抗体（20 μg/mouse）の i.p.投与 5 分、3、24、48、96 時間後の SPECT／CT 画像（左）および、96 時間後における腫瘍部位（右）。

実線：腹腔内領域、点線：腹膜播種部位。H：心臓、L：肝臓、T：巣用、LN：リンパ節。

2. I.p.投与後の抗 PD-L1 抗体の移行メカニズムの解明

MC38 腹膜播種マウスへ i.v.／i.p.投与後の抗 PD-L1 抗体の腹膜播種組織内の分布を蛍光免疫組織染色で評価した。i.v.投与後、30 分では腫瘍組織では抗 PD-L1 抗体は検出されず、6、24 時間後に血管周囲に分布していた（図 3A）。一方で i.p.投与では、投与後 30 分ですでに、腫瘍組織周辺に抗 PD-L1 抗体が検出され、時間経過とともに組織深部へ浸透している様子が観察された（図 3B）。そこで、摘出した MC38 腫瘍組織を抗 PD-L1 抗体を含む溶液でインキュベーションした結果、抗 PD-L1 抗体は時間依存的に腫瘍組織周囲から内部へ浸透している様子が観察された。以上より、i.p.投与された抗 PD-L1 抗体は、腹腔内空間から直接腹膜播種組織へ分布し、表面から深部へと浸透することで腹膜播種へ移行していることが示された。

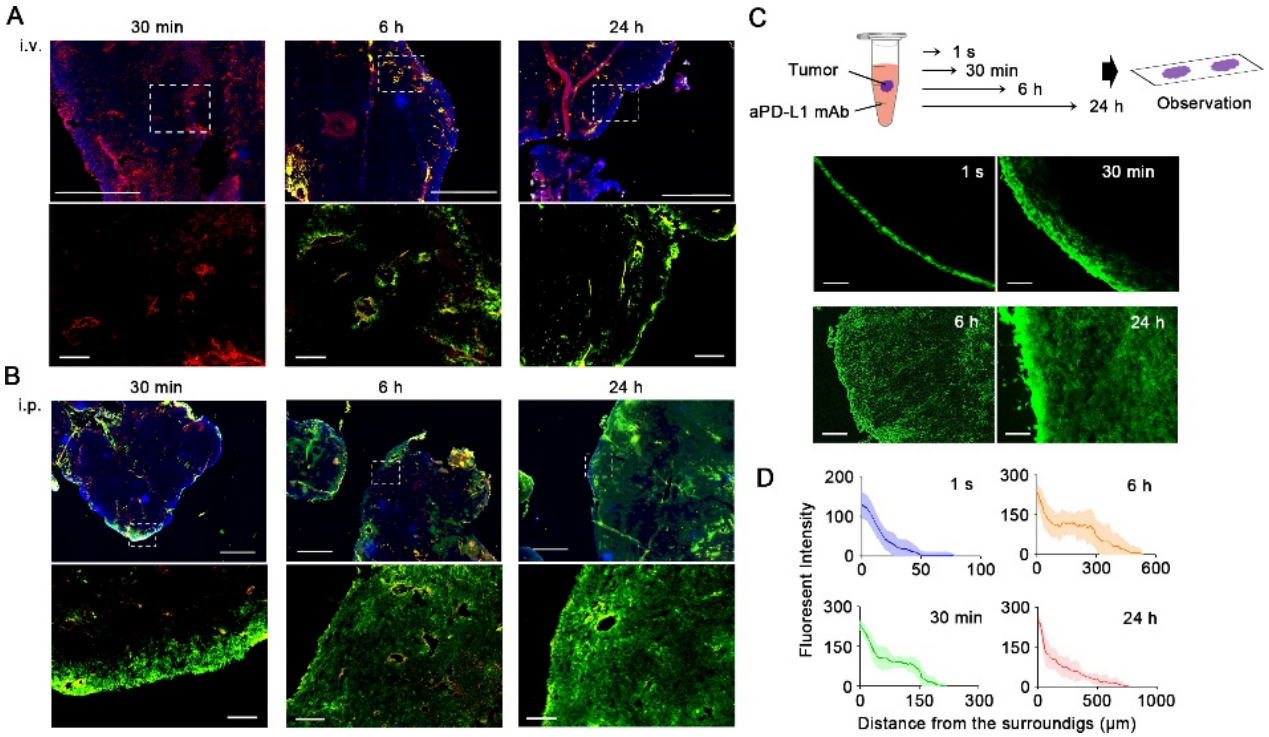


図 3. i.v.／i.p.投与後の MC38 腹膜播種組織中の抗 PD-L1 抗体分布

A) 抗 PD-L1 抗体（20 μg/mouse）の i.v.投与 30 分、6、24 時間後の蛍光免疫組織画像。

B) 抗 PD-L1 抗体（20 μg/mouse）の i.p.投与 30 分、6、24 時間後の蛍光免疫組織画像。

① 下段は上段点線領域の拡大画像。Scale bar：上段 1,000 μm、下段 100 μm。

② 青：核、赤：血管、緑：投与した抗 PD-L1 抗体。

C) 抗 PD-L1 抗体の *ex vivo* 腹膜播種組織中の浸透評価。抗 PD-L1 抗体（50 μg/mL）中に室温で 1 秒、30 分、6、24 時間インキュベーション後の、腹膜播種の蛍光免疫組織画像。Scale bar：100 μm。緑：抗 PD-L1 抗体。

D) C の画像で定量した抗 PD-L1 抗体浸透距離。各時間 20 か所で腫瘍組織表面からの蛍光強度を Image J で定量。実線：平均浸透距離、背景色：SD。

3. 抗 PD-L1 抗体の i.v.／i.p.投与後の抗腫瘍効果の比較

MC38 腹膜播種マウスへ抗 PD-L1 抗体を i.v.／i.p.投与後の腫瘍増殖抑制効果について評価した。i.p.投与群ではコントロール群と比較して有意に腫瘍重量が減少し、一部のマウスでは腫瘍が消失していた（図 4A）。また、腹水量も i.v.投与群と比較して有意な減少が観られた（図 4B）。一方で、体重の経時変化は変化がなく、体重減少に至る副作用は確認されなかった。

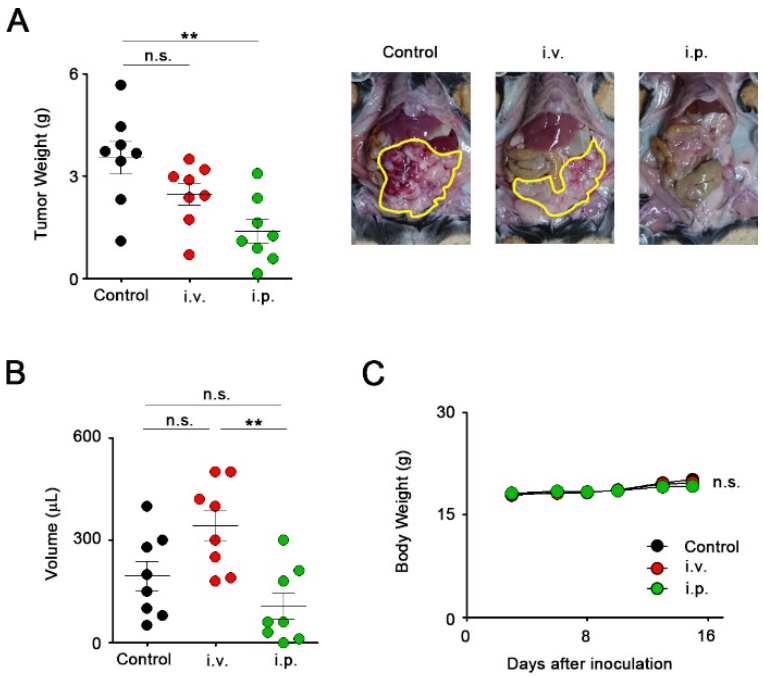


図 4. MC38 腹膜播種マウスへ抗 PD-L1 抗体を i.v.／i.p.投与後の抗腫瘍効果

A, B）腹膜播種移植後 3、6、8、10、13 日後に抗 PD-L1 抗体（200μg/mouse）を i.v.／i.p.投与し、15 日後の（A）腹膜播種組織重量（左）および各群の開腹時の様子（右、黄色線は腹膜播種の領域）、および（B）腹水量。平均±SE。

C）体重の経時変化。平均±SE（n=8）。

**P＜0.01、N.S.：Not significant difference（One-way ANOVA with Tukey–Kramer test）。

考　察

本研究で、免疫チェックポイント阻害剤である抗 PD-L1 抗体の i.v.／i.p.投与の違いが腹膜播種組織への移行、分布また薬効に及ぼす影響について明らかとすることができた。臨床で ICI はヒトへ静脈内から投与されるが、本研究結果は i.p.投与することで、i.v.投与よりも効率よく腫瘍組織へ送達可能であることを示している。抗がん剤は低分子であり腹腔内から腹膜毛細血管などから吸収されると考えられるが、ICI は高分子であり分子量の観点から血管からの吸収は少なく、i.p.投与後腹腔内での濃度が高く維持されると考えらえる。i.p.投与後、抗 PD-L1 抗体は腹腔内空間から直接腫瘍へ移行し深部へ浸透することが示された。一方で、i.v.投与後は抗 PD-L1 抗体は血管周囲に留まっていた。抗体医薬など高分子は i.v.投与後、enhanced permeability and retention（EPR）効果と呼ばれる現象で腫瘍組織へ集積するが［3］、i.p.投与後は血管を介さず EPR 効果とは異なるメカニズムで腫瘍組織へ集積したことを示している。これは腫瘍への生体高分子の移行の新たな原理と考えられる。また本腹膜播種モデルは血管透過性が非常に悪いため、i.v.投与後の移行が制限されている可能性が高く、腫瘍微小環境の特性は組織内分布に影響する要因である。今後 i.v.投与と比較して i.p.投与が ICI の移行に有利な腫瘍微小環境の特性を見出すことができれば、投与経路について患者ごとに投与経路の選択が可能となると考えられる。また i.p.投与後初期から腋窩リンパ節などリンパ節で抗 PD-L1 抗体の移行が認められた。腹腔内腫瘍は主にリンパ系を介して転移することから［4］、i.p.投与は、腹腔内腫瘍のみならず、リンパ系を介した転移巣へも効率的に ICI が送達可能と考えられ、治療に加えてリンパ節転移など診断にも有用な投与経路であると考えられる。以上より、腹腔内投与経路は ICI の治療において有用であり、今後ヒトにおける臨床研究が進むことが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、千葉大学大学院薬学研究院分子画像薬品学研究室の上原知也教授、鈴木博元助教、量子科学技術研究開発機構分子イメージング診断治療研究部の辻厚至グループリーダーを始め多くの共同研究者にご協力頂きました。また本研究を実施するにあたり、公益財団法人上原記念生命科学財団からご支援頂きましたことを改めて御礼申し上げます。

文　献

1） Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L, et al., Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. N. Engl. J. Med. 2006 Jan 5;354(1):34-43. PMID: 16394300 DOI: 10.1056/NEJMoa052985

2） Los G, Mutsaers PH, van der Vijgh WJ, et al. Direct diffusion of cis-diamminedichloroplatinum(II) in intraperitoneal rat tumors after intraperitoneal chemotherapy: a comparison with systemic chemotherapy. Cancer Res. 1989 Jun 15;49(12):3380-4. PMID: 2720692（DOI 記載なし）

3） Matsumura Y. Barriers to antibody therapy in solid tumors, and their solutions. Cancer Sci. 2021 Aug;112(8):2939-2947.PMID: 34032331 DOI: 10.1111/cas.14983.

4） Yonemura Y, Endo Y, Obata T, Sasaki T. Recent advances in the treatment of peritoneal dissemination of gastrointestinal cancers by nucleoside antimetabolites. Cancer Sci. 2007 Jan;98(1):11-8. PMID: 17052255 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2006.00350.x.