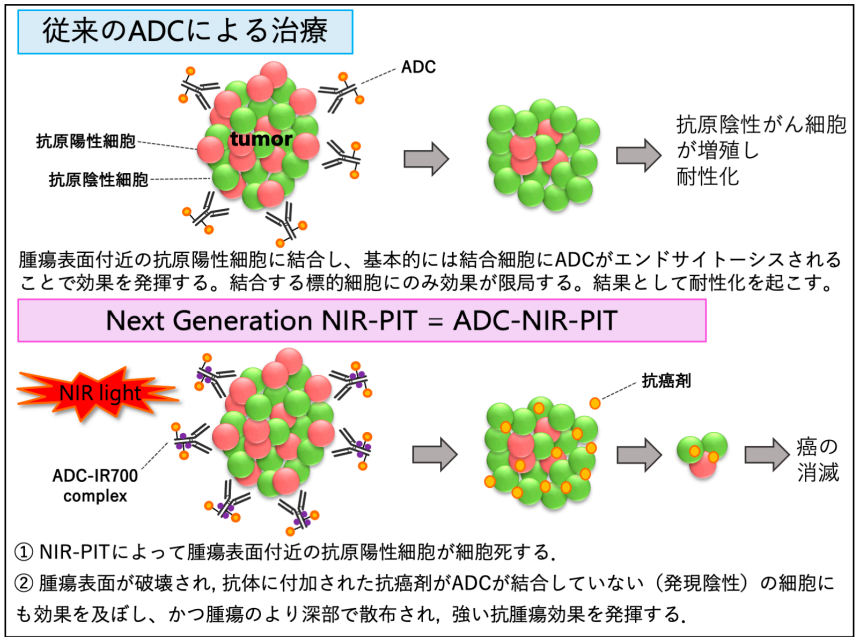
231　抗体薬物複合体を用いた新規光治療開発研究	佐藤　和秀

【目的】抗体医薬の中には抗体と低分子医薬品を結合させ効果を高めるコンセプトで開発された抗体薬物複合体（ADC）がある。近年、癌治療で注目を集めており、今後の標的癌治療として期待されている。しかしながら、固形腫瘍の不均一性（heterogeneity）のため、腫瘍内のターゲット分子の発現量が一定ではないことから、ADC の効果に腫瘍内でばらつきができてしまい、再発・抵抗性に繋がってしまうと言う問題があった。そこで、本開発研究では、臨床認可を受けている ADC に光感受性物質である IRDye700DX（IR700）を付加し、近赤外照射によって結合した標的細胞は近赤外光線免疫療法で破壊し、その近傍の ADC が結合しなかった癌細胞を光遊離した抗癌剤が破壊する新規の光ドラッグリリースがん根治概念を樹立する。

【方法】臨床で既に用いられている T-DM1（カドサイラ）に IR700 を付加し、抗原陽性細胞と陰性細胞を混ぜたモデルでその効果を *in vitro* と *in vivo* で検討した。抗原陰性細胞への細胞死効果をイメージングで計測するために、luciferase を遺伝子導入しモニターできるように実験系を組んだ。

【結果】T-DM1-IR700 を作製し、*in vitro* のミックスカルチャーでターゲットする細胞のみならず、非ターゲット細胞も細胞死に至らしめることを確認した。本治療概念は、ADC を用いたがん治療の新しい展開をしめすものであり、光による ADC の効果増強法として画期的なものであると考えられた。

従来の ADC の問題点と本研究のねらい



231. 抗体薬物複合体を用いた新規光治療開発研究

佐藤　和秀

名古屋大学 高等研究院 大学院医学系研究科 病態内科学講座 呼吸器内科

Key words：近赤外光線免疫療法，光薬物放出，抗体薬物複合体，がん不均一性

緒　言

抗体医薬の中には抗体と低分子医薬品を結合させ効果を高めるコンセプトで開発された抗体薬物複合体（ADC）がある。しかし、多くの固形腫瘍は単一クローンではなく複数の細胞集団で構成される（heterogeneity）為、治療ターゲットとなる抗原の発現が不均一で、抗体の結合部位が腫瘍の一部分に限られ、結果的に薬剤耐性化を生じる［1］。また高分子である抗体が腫瘍深部まで送達されにくい点や、腫瘍側の防御機構により薬剤が内部に浸透しにくい点から、充分な薬効が得られないといった問題点がある。

近年、新たな癌治療の方法として期待されている近赤外光線免疫療法（NIR-PIT）は、がん細胞の抗原に対する抗体と光感受性物質である IRDye700DX（IR700）を結合させた複合体、および近赤外光照射を組み合わせた異分野融合技術である（図 1）［2］。抗原 - 抗体反応により複合体が癌細胞へ選択的に集積し、IR700 の励起波長である近赤外光を照射すると、複合体が光化学反応し細胞死が誘導され、抗腫瘍効果を発揮する。抗体による癌集積性と光照射により高いターゲット選択性が得られ、副作用が軽減できる。加えて照射によるがん免疫賦活化の相互作用も示唆されている。既に臨床試験は始まり、2018 年 12 月から国際第三相試験が開始されており、2019 年 4 月に PMDA 先駆け申請許可をうけて、2020 年 9 月に世界に先駆けて日本で限定承認され、保険適応された（薬価 102 万円）［3］。

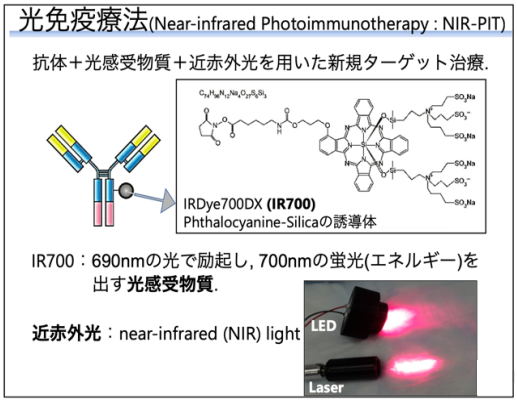


図 1. 近赤外光線免疫療法（NIR-PIT）概要

本研究の開発目的は、ADC 作用に NIR-PIT を組み合わせる事で、前述のような既存の ADC 治療の問題点を克服する事を目的とした新技術開発である。まず、ADC を用いた NIR-PIT 効果で抗原陽性がん細胞が細胞死し、腫瘍が破壊される。その結果、抗体に結合していた薬剤が腫瘍内で広範に散布され、ADC が結合しない周囲の抗原陰性がん細胞へも効果を及ぼすと仮定し実証、これらの抗腫瘍メカニズムの解明にも挑む。同時に、腫瘍が破壊されスペースが生まれる事で薬剤が腫瘍深部まで到達可能となり、高い抗腫瘍効果が発揮されると期待される（図 2）。

本技術開発は、ADC の固形がんに対する治療概念を変革する可能性がある。

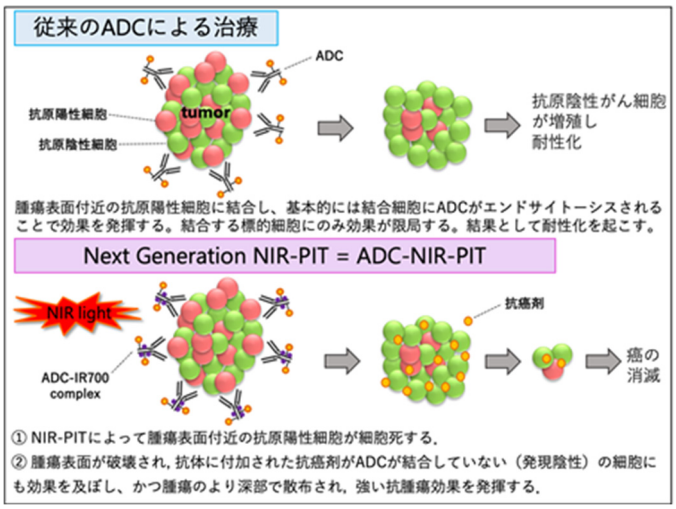


図 2. ADC と NIR-PIT を組み合わせる次世代型光励起 ADC 概念

方　法

HER2 を標的とした ADC であるトラスツズマブ・エムタンシン（T-DM1）と IR700 の複合体（T-DM1-IR700）、および通常の抗 HER2 抗体であるトラスツズマブと IR700 複合体（Tra-IR700）を用いて NIR-PIT を行い、HER2 陰性細胞に対する効果の比較を行った。T-DM1 は非開裂リンカーであり、細胞内にエンドサイトーシスされた場合にのみ抗がん剤である DM1 が遊離し、細胞をアポトーシスさせる薬剤であり、細胞外への効果は最小限とされている。 細胞には 3T3/HER2（HER2 陽性）とルシフェラーゼを遺伝子導入した MDAMB-468-luc（HER2 陰性）を用い、ルシフェラーゼの測定にはプレートリーダーおよび IVIS spectrum CT を用いた。ルシフェラーゼ活性のモニターを行うことで、抗原陰性細胞である非標的腫瘍細胞への効果をモニタリングできる系を構築した。

結果および考察

1.　T-DM1-IR700 と Tra-IR700 の作製

T-DM1 と Tra に IR700 を付加して、T-DM1-IR700 と Tra-IR700 を作製した（図 3A）。SDS-PAGE による蛋白染色と IR700 の蛍光を確認することで作製の成功を確認した（図 3B）。

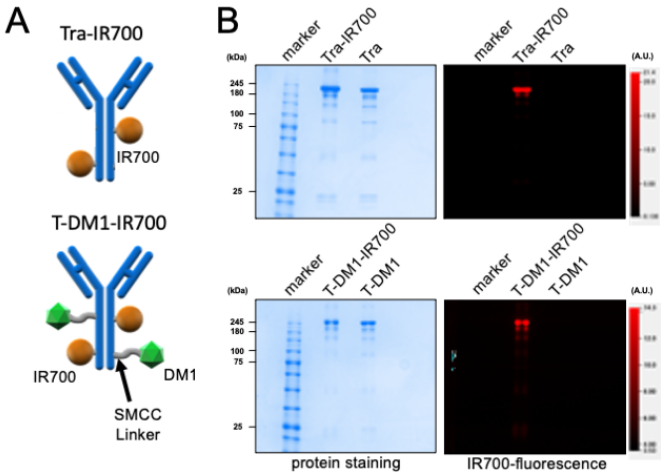


図 3. T-DM1-IR700 と Tra-IR700 の作製

A） T-DM1-IR700 と Tra-IR700 の概要図。

B） T-DM1-IR700 と Tra-IR700 の SDS-PAGE による IR700 付加の確認。

2. *In vitro* での光バイスタンダー殺細胞効果

In vitro では、3T3/HER2 と MDAMB-468-luc を共培養した後に NIR-PIT を行い、4 日後に抗原陰性の MDAMB468-luc への影響を luciferase 活性によって測定することで評価を行った（図 4A）。T-DM1-IR700 ではルシフェラーゼの活性が低下して HER2 陰性の細胞活性が低下したが、Tra-IR700 では luciferase 活性は低下せず、T-DM1-IR700 に特異的な反応であることが示された（図 4B）。このことから、Tra-IR700 と同様に T-DM1-IR700 は NIR-PIT の効果として HER2 発現のターゲット細胞を破砕するのみならず、非標的細胞への殺細胞効果を生じることを見出した。上記、非標的細胞である、MDAMB468-luc 細胞の luciferase 活性が低下し、標的細胞への ADC の効果が、起きるはずのない非標的細胞へ及んでいることが判明した。

我々は、この特殊な効果を“cytotoxic photo-bystander effect（光バイスタンダー殺細胞効果）”と名付けて、この効果が他の細胞種（e.g. Calu3＋MEDAMB468-luc）での組み合わせでも同様な効果があるかを確認した。この効果は、がんの抗原発現の不均一性を克服できる可能性があることを示唆した。

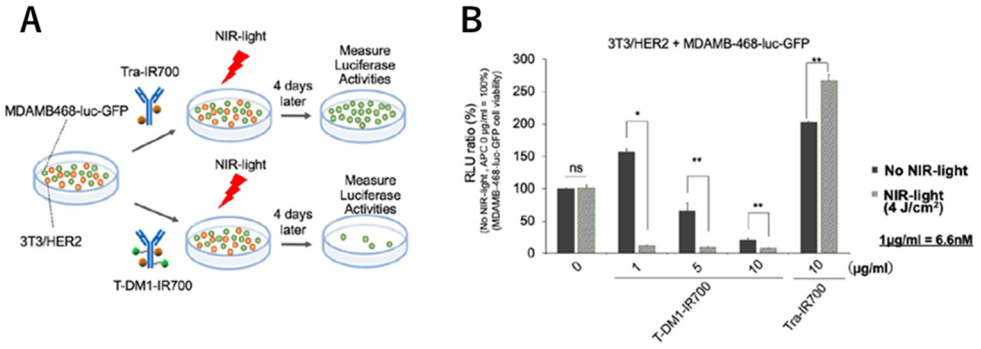


図 4. *In vitro* での光バイスタンダー殺細胞効果

A） *In vitro* での cytotoxic photo bystander effect の評価実験の概要。

B） MDAMB468-luc の luciferase 活性の検討。Tra-IR700 では、ターゲットされた 3T3/HER2 細胞が死滅し、それによってできたスペースに MDAMB468-luc が増殖し、control よりも luciferase 活性が上がっている。一方、T-DM1-IR700 では、光照射によって MDAMB468-luc が細胞死することで、luciferase 活性が下がっている事がわかる。この現象は 1、5、10 mg/ml のどの濃度でも生じていた。* $p<0.0001$、** $p<0.001$（Student's T test）。

3. *In vivo* での混合腫瘍の作製

In vivo では両細胞をヌードマウスの皮下臀部へ共移植して NIR-PIT を行った。モデルとして、HER2 の陽性と陰性の混合腫瘍（3T3/Her2+MDAMB468-luc）を作製した。混合腫瘍がきちんとできているかを HER2 免疫染色キットで染色し確認した（図 5）。

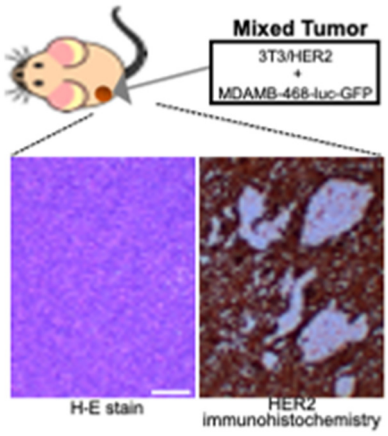


図 5. *In vivo* での HER2 発現／非発現混合腫瘍の確認
HER2 の陽性と陰性の混合腫瘍（3T3/Her2+MDAMB468-luc）が生着していることが、HER2 染色により明らかとなった。スケールバー：300 mm。

4. *In vivo* での光バイスタンダー殺細胞効果

3 で作製した混合腫瘍の xenografted マウス腫瘍モデルを用いて、Tra-IR700 と T-DM1-IR700 を尾静脈から静脈注射して、1 日後に光照射をした。luciferase 活性をイメージングすることで、*in vivo* での光バイスタンダー殺細胞効果を Bioluminescence imaging（BLI）でモニターした。その結果、両側腫瘍モデルで、Tra–IR700 では BLI を行うと、腫瘍増殖に伴って luciferase 活性が増大することが判明した。その一方で、T-DM1-IR700 では光照射した腫瘍のみで選択的に、luciferase 活性が減少し、Day4 ではほぼ消失することが判明した（図 6A）。非標的細胞である、MDAMB468-luc 腫瘍の luciferase 活性が低下し、標的腫瘍への ADC の効果が、起きるはずのない非標的腫瘍へ及んでいることが判明した。luciferase 活性を定量すると明らかに T-DM1-IR700 では減少しており（図 6B）、生存期間を延長することが明らかとなった（図 6C）。

これらの結果から、光照射によって、ADC から抗がん剤が腫瘍局所で遊離することで、抗原陰性腫瘍にも抗癌活性が発揮されることが *in vivo* でも証明できた。

上記、*in vitro*、*in vivo* での cytotoxic photo bystander effect を証明する事ができた。今後はそのメカニズムについて検討を行っていく予定である。

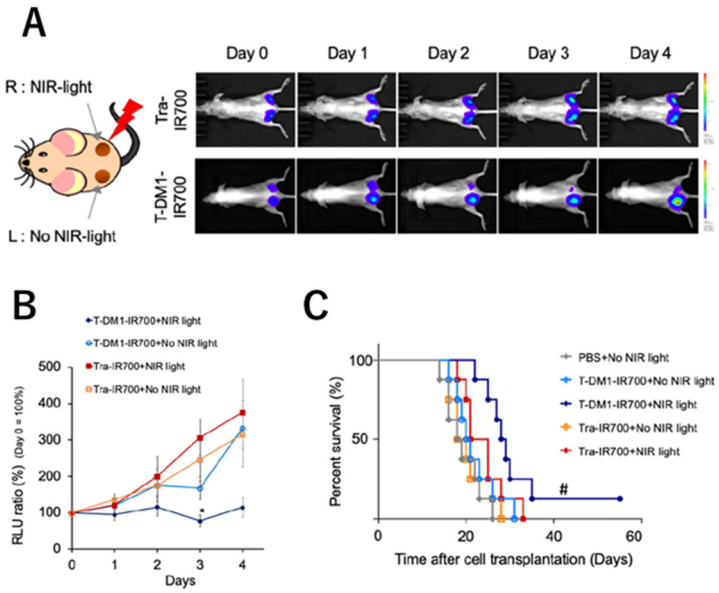


図 6. *In vivo* での光バイスタンダー抗腫瘍効果

A） マウスの両臀部に図 5 の混合腫瘍を作製し、Tra-IR700 と T-DM1-IR700 を静脈投与して右腫瘍のみに光照射を行った。経時的に T-DM1-IR700 の照射腫瘍のみで luciferase 活性が低下した。

B） luciferase 定量で、T-DM1-IR700 の照射腫瘍のみで luciferase 活性が有意に低下した。$n = 8$ mice/group、*$p < 0.05$（Kruskal–Wallis test with Dunn's post-hoc test）。

C） 生存期間の検討では、T-DM1-IR700 の照射個体で生存期間が有意に延長し、1 匹は完治した。$n = 8$ mice/group、#$p < 0.05$（Log-Lank test）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、名古屋大学大学院医学系研究科病態内科呼吸器内科の高橋一臣先生と米国立がんセンター・米国立衛生研究所（NCI／NIH）の小林久隆先生である。また、名古屋大学大学院医学系研究科病態内科呼吸器内科の安井裕智先生、滝俊一先生、名古屋大学工学研究科未来社会創造機構の馬場嘉信先生、湯川博先生の協力に感謝いたします。

文　献

1） Chari RV. Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. Acc Chem Res. 2008 Jan;41(1):98-107. doi: 10.1021/ar700108g. PMID: 17705444

2） Kobayashi H, Choyke PL. Near-Infrared Photoimmunotherapy of Cancer. Acc Chem Res. 2019 Aug 20;52(8):2332-2339. doi: 10.1021/acs.accounts.9b00273. Epub 2019 Jul 23. PMID: 31335117

3） https://rakuten-med.com/us/news/press-releases/2020/09/25/7442/