

論文の内容の要旨

論文題目 抗体抗がん剤複合体のドラッグデザインにおける 質量顕微鏡の有用性の検討

氏名 藤原 悠起

【序論】

一般的に膵癌罹患者の生存率は低いことが知られている。現在の膵癌に対する化学療法の選択肢は、ゲムシタビン (GEM)、S-1単独療法、GEM + S-1、GEM + エルロチニブ併用療法、及びFOLFIRINOX療法 (5-FU + ロイコボリン + イリノテカン + オキサリプラチン)がある。これらの選択薬は全生存期間を延長するが副作用が強く、更なる選択薬の追加が望まれている。抗体抗がん剤複合体 (antibody-drug conjugate; ADC)はモノクローナル抗体 (monoclonal antibody; mAb)にリンカーを介して抗がん剤を付加したプロドラッグであり、有効な選択薬の一つになると期待されている。膵癌で高発現するtissue factor (TF)に着目し、微小管重合阻害剤monomethyl auristatin E (MMAE)をvaline-citrulline (Val-Cit)リンカーを介してhuman TFに対するmAbに結合したADCを作製した (human TF ADC)。これまでにヒト膵癌モデルマウスを用いてhuman TF ADCの性状解析、及び抗腫瘍効果について報告してきた。抗腫瘍効果の観点から、腫瘍血管から漏れだしたADCが腫瘍深部に浸透し抗がん剤を放出することが求められる。これまでに高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography; HPLC)や液体クロマトグラフィー質量分析計 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LC-MS/MS)を用いて腫瘍全体に含まれる抗がん剤量を定量した報告はあるが、ADCから放出される抗がん剤の腫瘍内分布に関する報告はない。最適なADCのドラッグデザインのためにも、抗がん剤の腫瘍内分布を検討することが望まれている。

質量顕微鏡は光学顕微鏡と大気圧MALDI-IT-TOF MS (matrix assisted laser desorption/ionization-ion trap-time-of-flight mass spectrometry)が融合した分析計測機器である (Figure. 1)。光学顕微鏡で観察した試料をそのまま質量分析 (mass spectrometry; MS)し、高い解像度をもって得られた各イオンピーク (質量電荷比 m/z 50-5,000)の可視化 (imaging mass spectrometry; IMS)が行える新技術である。薬理的解析に用いられるトレーサー実験やオートラジオグラフィーはターゲット分子に放射性同位体をラベル化する必要がある。トレーサー実験によりADCがmAbと同様の薬物動態を示すことが示されたが、腫瘍組織においてADCから抗がん剤が放出されたかどうか解析することは困難である。一方で質量顕微鏡はラベル化が不要であり、薬効を有する抗がん剤を可視化することができる。IMSをADC研究に応用し、ADCの腫瘍内組織内で起こる現象を捉えることで、プロドラッグであるADCの最適な評価ができると考えた。

本研究において、質量顕微鏡を用いてADCから放出される抗がん剤の腫瘍内分布を検討した。本論にて、1) LC-MS/MSを用いた腫瘍内MMAE量の定量、2) MMAEの質量分析とIMSに用いるMMAE由来イオンピークの検討、3) 質量顕微鏡を用いた腫瘍内MMAE分布の可視化について、それぞれも結果と考察を詳しく示し、それらを結論でまとめた。

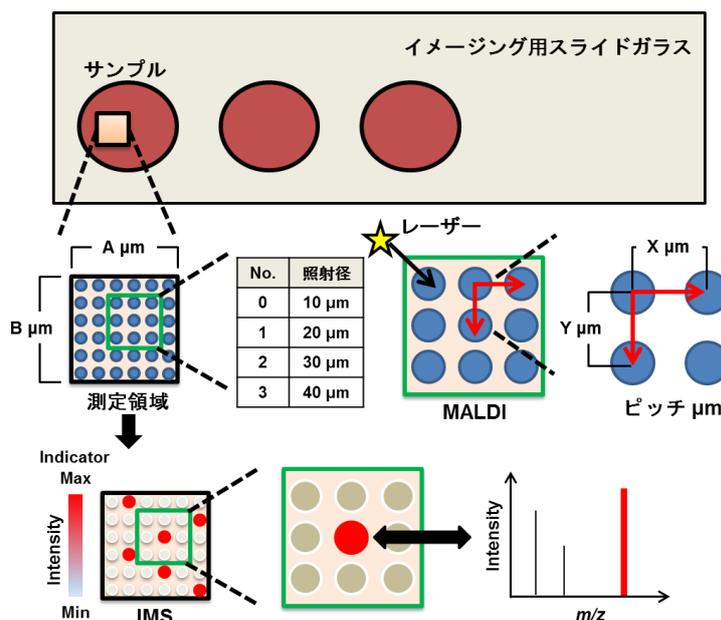


Figure. 1 質量顕微鏡を用いたimaging mass spectrometry (IMS)までの概略図

イメージング用スライドガラス上にセットされたサンプルを光学顕微鏡で撮影しマトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (matrix-assisted laser desorption ionization; MALDI)測定領域を指定する。得られたマススペクトルを画像データに変換し、各イオンピークをintensityに応じて可視化できる。

【本論】

Human TF陽性ヒト膵癌細胞株BxPC-3を皮下移植したマウスを用いて実験を行った。Rat anti-human TF mAb (IgG2b)を還元処理しジスルフィド結合を解離させシステイン残基にVal-Cit-MMAEを結合し、drug-to-Antibody Ratio (DAR)が2-4になるように調整したhuman TF

ADCを作製した。Control ADCとしてrat-IgG2b isotype mAbを用いてhuman TF ADCと同様の方法でVal-Cit-MMAEを結合したものをを用いた。腫瘍内MMAE分布を解析するため、ADC投与は10 mg/kgの単回投与とした。一般的に静脈投与された低分子抗がん剤は全身に広く拡散し、腫瘍以外の臓器に作用することで副作用を起こす可能性がある。一方で、ADCは静脈投与後enhanced permeability and retention effect (EPR効果)により受動的に腫瘍組織に集積し、能動的にがん細胞表面抗原に結合し抗がん剤を放出するすと考えられる。

動物実験は、国立がん研究センターが定める動物実験倫理規定に従い動物倫理委員会の承認を得たうえで行った。

1) LC-MS/MS を用いた腫瘍内 MMAE 量の定量

MMAE単剤とADCの腫瘍内MMAE量を検討することとした。10 mg/kg ADCに相当するMMAE量である0.2 mg/kg MMAE単剤を投与し、投与後3時間、24時間、72時間目に腫瘍を外科的切除し解析した。MMAE単剤をマウスに投与した場合、早い段階で腫瘍組織内濃度が高まり、経時的に腫瘍内MMAE量が減少していくと考えられる。MMAE単剤投与3時間後の腫瘍組織1.0 gにおけるMMAE量 (mol)が最も高く、投与後24時間、72時間と腫瘍内MMAEは減少した。

10 mg/kgのhuman TF ADCとcontrol ADCをBxPC-3皮下腫瘍担癌マウスの尾静脈より投与し、投与後3時間、24時間、72時間目に腫瘍を外科的切除し比較した。Control ADCとhuman TF ADC投与群どちらも投与後3時間における腫瘍内MMAE量は上昇しなかった。投与後24時間において、control ADCと比べて有意にhuman TF ADC投与群の腫瘍内MMAE量が上昇した。投与後72時間において、control ADCとhuman TF ADC投与群どちらも腫瘍内MMAE量が減少した。

2) MMAE の質量分析と IMS に用いる MMAE 由来イオンピークの検討

マトリックス α -シアノ-ヒドロキシケイ皮酸 (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid; CHCA)を溶媒(75% アセトニトリル + 0.02% トリフルオロ酢酸 + 2.0 mM 酢酸ナトリウム + 1/1000 アニリン)に溶解したものをを用いて、MMAEを結晶化し、質量顕微鏡を用いてMMAEのMS及びtandem MS (MS/MS)を行った。MMAEの化学式は $C_{39}H_{67}N_5O_7$ であり、モノアイソトピック質量は717.50である。MSにより、プロトン付加 m/z 718.4 $[M + H]^+$ 、ナトリウム付加 m/z 740.4 $[M + Na]^+$ 、カリウム付加 m/z 756.4 $[M + K]^+$ のpositiveイオンが3種類検出された。MS/MSにより、各種positiveイオンをプレカーサーイオンとして得られるそれぞれのMS/MSスペクトルを検出し、構造的に帰属させた。IMSは、指標 (red-purple)を用いてintensityに応じたMMAEをレーザー径に応じたドットで表される。添加量を変えたMMAEを用いることで、視覚的にMMAE量に応じたIMSが観察された。

厚さ10 μ mの腫瘍組織上にスプレーガンを用いてマトリックスを塗布し直接質量分析することから、一般的にIMSは組織由来のイオンピークが散見されターゲット分子の可視化を阻害する。

腫瘍組織からMMAEが検出できるよう、無治療群の腫瘍組織から検出されないMMAE由来イオンピークを探索する必要がある。半定量的な解析に用いるため、最適なMMAE由来マスペクトルは高いintensityとspecificity両方が求められる。質量顕微鏡を用いたMMAEのIMSは、 $[M + Na]^+$ をプレカーサーイオンとして得られるMS/MSスペクトル m/z 496.3を用いた。

3) 質量顕微鏡を用いた腫瘍内 MMAE 分布の可視化

無治療の腫瘍組織からは MMAE を検出しないが、MMAE 単剤を投与した腫瘍組織から経時的に MMAE が減少していることが観察された。更に human TF ADC を投与した腫瘍組織から MMAE の IMS を行った結果、投与後 24 時間の腫瘍組織が最も MMAE が広範囲に分布していた。これら質量顕微鏡を用いた IMS の結果は、LC-MS/MS の結果と大きな解離はなかった。質量顕微鏡により腫瘍組織における MMAE の半定量的な解析が行えることがわかった。

マウス BxPC-3 皮下腫瘍組織は、癌部とそれを取り巻く間質部で構成されている。間質部は抗がん剤の妨げになるという報告があることから、ADC かれ腫瘍組織に放出される抗がん剤の腫瘍内分布を検討すべきである。質量顕微鏡により、human TF ADC から腫瘍組織に放出された MMAE の詳細な IMS を取得した。測定エリア 1.0 mm^3 当たりを検出される MMAE を画像解析した結果、human TF ADC は間質部に比べて統計的に優位に癌部で MMAE を放出していることがわかった。

【結論】

MMAEのMSにより、プロトン付加体 m/z 718.4 $[M + H]^+$ 、ナトリウム付加体 m/z 740.4 $[M + Na]^+$ 、カリウム付加体 m/z 756.4 $[M + K]^+$ のpositiveイオン3種類が検出された。質量顕微鏡を用いたMMAEのIMSは、 $[M + Na]^+$ をプレカーサーイオンとして得られるMS/MSスペクトル m/z 496.25を用いた。MMAEの半定量的なIMSが得られた。MMAEを結合しているADCとMMAE単剤を区別することができ、ADCを投与した腫瘍からMMAE分布を解析した。Human TF ADC投与後24時間のBxPC-3皮下腫瘍から間質部に比べ統計的に有意に癌部からMMAEを検出した。これまでに当研究室において、ヒト膵癌BxPC-3皮下腫瘍モデルマウスを用いてcontrol ADCに比べてhuman TF ADC投与群の抗腫瘍効果が有意に高いことを報告してきた。Human TF ADCがhuman TF陽性BxPC-3細胞で構成される癌部においてMMAEを放出したことで抗腫瘍効果を発揮したと考えられる。

アメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration; FDA)の報告から現在50以上のADCに関する臨床試験が行われている。様々なターゲットに加え、血中安定性が高く、がん細胞選択的に抗がん剤を放出する新規リンカーが検討されている。リンカーテクノロジーの進歩は、ADC治療域の拡大に繋がる重要な研究である。質量顕微鏡はリンカーテクノロジー評価の有効な解析ツールとなり、最適なADCのドラッグデザイン開発に向けた研究を加速させると考えられる。