

SN-38 結合抗体における SN-38 徐放性の違いによる殺細胞効果の比較検討

2011 年 3 月修了 先端生命科学専攻 がん先端生命科学分野 47-096334 中村彰吾

指導教員 松村保広 客員准教授

キーワード：DDS, がん, 抗体

【背景・目的】

通常の抗がん剤は全身に大量投与される。それが正常組織にも影響を及ぼし、副作用が生じる原因となっている。そこで 1980 年代に抗体ミサイル療法剤が開発された。これは抗がん剤の作用をがん細胞に集中させることを狙いとしている。

抗体ミサイル療法剤の作用機序として、抗体が抗原結合後、細胞内に取り込まれ、抗がん剤を放出するということが考えられている。この抗体ミサイル療法剤は、リンパ腫など血液性のがんには高い治療効果を示しているが、固形腫瘍では臨床上有効性が示されていない。その理由の一つに、抗体インターナリゼーションの効率の違いが挙げられる。抗体インターナリゼーションとは、抗体が抗原結合後、リガンド媒介性のエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる現象である。この現象の効率は、抗原タンパクや抗体のエピトープによって異なることが知られており、結果的に抗体ミサイル療法における薬効の違いとして現れると考えられる。

また、抗体ミサイル療法における、重要なポイントとして抗体-抗がん剤の結合様式が挙げられる。一般的な抗体ミサイル療法では、インターナリゼーションの際に抗体が曝される細胞内の酵素を利用して抗がん剤を放出する剤形が使われていた。当研究室では、抗がん剤-抗体の結合様式として、細胞質内の carboxylesterase による分解を受け解離するカルバメート結合と、細胞外で時間依存的な加水分解によって解離するエステル結合の 2 種類の技術を有している。カルバメート結合で抗がん剤を付加した抗体はインターナリゼーションを経て細胞内で抗がん剤を放出する。それに対して、エステル結合で抗がん剤を付加した抗体は、インターナリゼーション非依存的に細胞内外でのどちらでも抗がん剤を放出することができる。この現象から、インターナリゼーション効率の低い抗体では、エステル結合を用いて細胞表面から抗がん剤を放出させるような剤形が高い効果を上げられると予想した。そこで本研究では、この作業仮説を検証するため、低インターナリゼーション効率の抗体に、エステル結合、カルバメート結合 2 種類の結合様式を用いて、抗がん剤 SN-38 を結合させ、それらの殺細胞効果の比較検討を行い、知見を得たので報告する。

【方法】

まず、インターナリゼーション効率の異なる抗体を見つける実験を行った。ErbB-2 はがん細胞増殖のシグナル伝達に関与しており、細胞膜表面で 2 量体を形成することから、インターナリゼーション効率が高いと予想した。また、EpCAM は細胞増殖シグナル伝達に関与する際、細胞膜内でタンパク分解が生じて、開裂した細胞内ドメインが核へと移行することから、インターナリゼーション効率は低いと推定した。そこで、乳がん細胞株 SK-BR-3

を用いて、抗 EpCAM 抗体 B8-4、抗 ErbB-2 抗体 Trastuzumab のインターナリゼーションを観察した。次に、B8-4 にポリエチレングリコールをスペーサーとしてエステル結合、カルバメート結合でそれぞれ SN-38 を付加した。作製した SN38 結合 B8-4 の殺細胞効果を測定した。

【結果と考察】

各抗体を加えた直後の蛍光を観察したところ両抗体は細胞膜に結合していることがわかる。各抗体の染色後 24 時間のインターナリゼーションを観察したところ、Trastuzumab では既に細胞内で取り込まれ、小胞状の蛍光の塊が細胞内で多数観察された。それに対し B8-4 では変化が見られなかった (図 1)。このことから、Trastuzumab はインターナリゼーション効率の高い抗体であることを確認した。それに対して、B8-4 はインターナリゼーション効率の低い抗体であることを確認した。

B8-4 を DTT 還元後、エステル結合とカルバメート結合で SN-38 を付加した。それぞれのサンプルで SDS-PAGE を実施したところ、B8-4 の IgG 分子が、還元によってヒンジ領域のジスルフィド結合が解離して一価の IgG になったことを確認した。また、SN-38 を付加した抗体サンプルでは SN-38 が結合した分、分子量の増加が確認された。

エステル結合による SN-38 結合 B8-4(B8-4 SN-38 E)、カルバメート結合による SN-38 結合 B8-4(B8-4 SN-38 N)の殺細胞効果を比較測定したところ、B8-4 SN-38 E は B8-4 SN-38 N の 10 倍程度高い薬効を示した (図 2)。

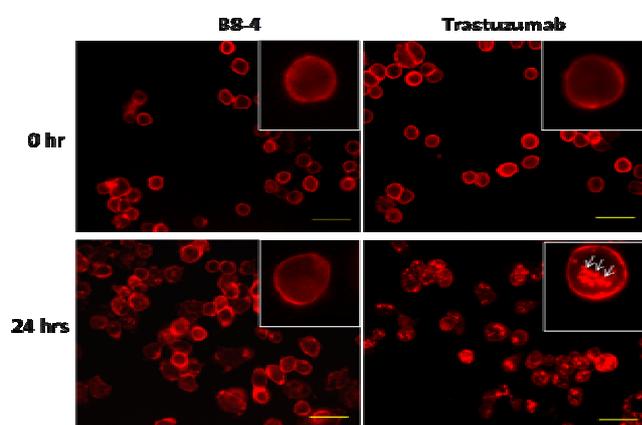


図 1 抗体インターナリゼーション

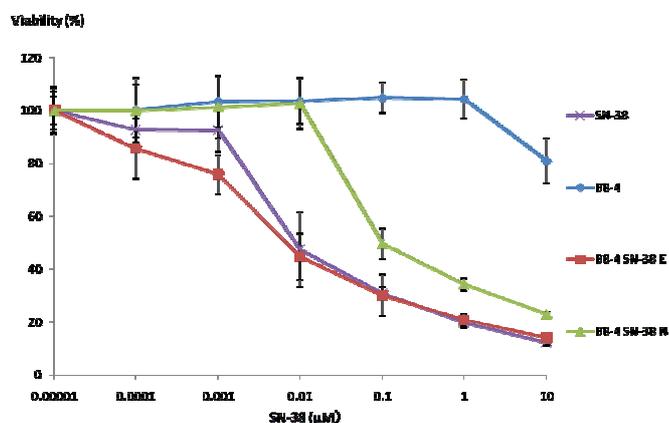


図 2 SN-38 結合 B8-4 の殺細胞効果

【結論】

B8-4 SN-38 E は、B8-4 SN-38 N より有意に高い殺細胞効果を示した。この結果よりインターナリゼーション効率の低い抗体を用いた抗がん剤結合抗体には、細胞内リリースよりもエステル結合を用いて細胞表面で SN-38 を徐放的にリリースし、細胞外からアタックする剤形が有効であることが示唆された。