

東京大学大学院新領域創成科学研究科

先端生命科学専攻

平成 22 年度

修士論文

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

【目次】

要旨	5
略語	8

第1章 背景・目的

1．抗体ミサイル療法	10
2．Enhanced permeability and retention	10
3．抗体インターナリゼーション	11
4．SN-38	12
5．抗体-抗がん剤の結合様式	13
6．SN-38 徐放性エステル結合	14
7．ErbB-2	16
8．EpCAM	16
9．目的	17

第2章 材料と実験方法

材料

1．抗体付加用 SN-38	19
2．B8-4	19

実験方法

1．細胞培養	19
1-1．使用した細胞株	
1-2．継代方法	
1-3．細胞保存方法	

2 . 抗体インターナリゼーションの観察	20
2-1 . 抗体の蛍光標識	
2-2 . 蛍光顕微鏡	
3 . 抗体への SN-38 付加	21
3-1 . DTT 還元	21
3-2 . 限外濾過	22
3-3 . SH 基定量	22
3-4 . 抗体への SN-38 付加反応	22
3-5 . 抗体濃度測定	23
3-6 . SN-38 結合抗体の分注	23
3-7 . SDS-PAGE	23
3-8 . SELDI-TOF-	24
3-8-1 . Protein Chip CM10 の調製	
3-8-2 . SELDI-TOF-MS 解析	
4 . Flow cytometry	25
5 . 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)	26
5-1 . Free SN-38 測定サンプル調製	
5-2 . Total SN-38 測定サンプル調製	
5-3 . SN-38 サンプルの濃度測定	
6 . 細胞生存活性測定	27
 第3章 実験結果	
1 . 抗体インターナリゼーション	30
2 . B8-4 への SN-38 付加	30

3 . SN-38 結合 B8-4 の抗原親和性	33
4 . SN-38 結合 B8-4 からの経時的 SN-38 放出	33
5 . SN-38 結合抗体による殺細胞効果	34
第4章 考察・今後の展望	
1 . 抗体インターナリゼーション	37
2 . B8-4 の SN-38 付加	37
3 . SN-38 結合 B8-4 の抗原親和性	38
4 . SN-38 結合 B8-4 からの経時的 SN-38 放出	39
5 . SN-38 結合 B8-4 による殺細胞効果	40
6 . 今後の展望	42
参考文献	43
謝辞	47

要旨

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 (CES) 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、カルボメート結合 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)

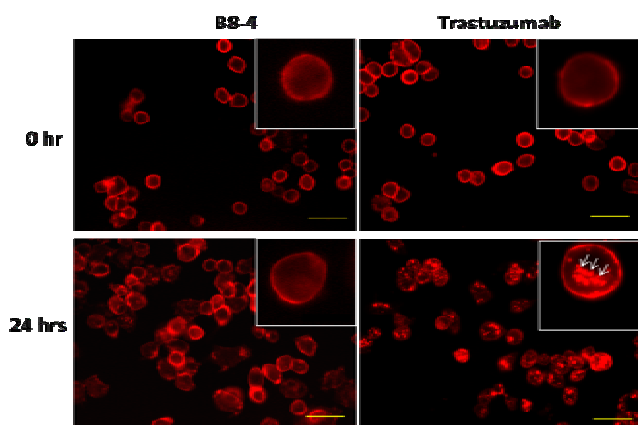


図 1 抗体インターナリゼーション

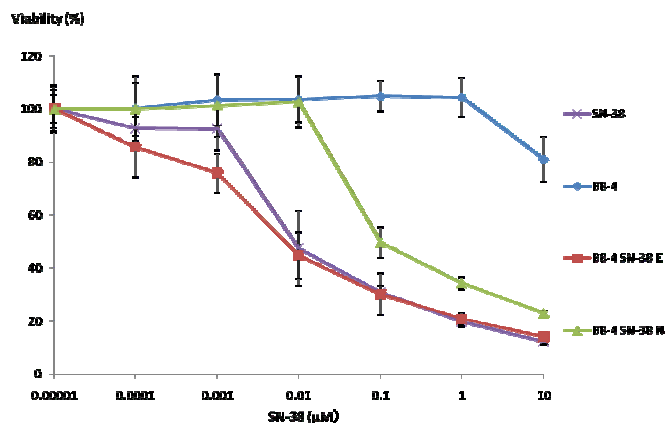


図 2 SN-38 結合 B8-4 の殺細胞効果

【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。

【略語】

DDS: Drug delivery system

DTT: Dithiothreitol

mab: Monoclonal antibody

DTNB: Dithionitrobenzoic acid

CES: Carboxylesterase

FBS: Fetal bovine serum

PBS: Phosphate buffered saline

PEG: Polyethylene glycol

SELDI-TOF-MS: Surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

EpCAM: Epithelial cell adhesion molecule

MW: Molecular weight

第 1 章

背景・目的

1. 抗体ミサイル療法

抗体ミサイル療法は、抗体の抗原特異性により抗がん剤の薬効を腫瘍部に集積させるために1980年代に考案された。これは抗体と抗がん剤が結合体を成しており、使用される抗体は腫瘍特異的に発現するタンパク質を認識する [1, 2]。抗体が、がん細胞に結合すると抗体がエンドサイトーシスによって細胞質に取り込まれる。この現象はインターナリゼーションと呼ばれている [3, 4]。その際、抗がん剤は抗体と共に細胞質内に取り込まれ、抗がん剤を放出し、殺細胞効果を与える [5, 6]。これが、一般的な抗体ミサイル療法の作用機構である (図1)。

しかし、このような抗体ミサイル療法剤は、リンパ腫などの、腫瘍血管が豊富で間質の少ないがんには高い治療効果を示しているが [7-9]、比較的腫瘍血管が少なく間質の多い一般的ながんでは臨床上有効性が示されていない。

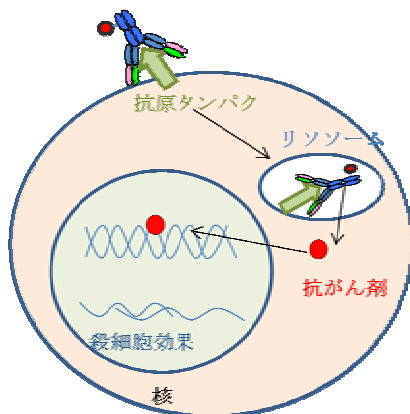


図1 抗体ミサイル療法剤作用機構

抗体のインターナリゼーションと共に、抗がん剤も取り込まれる。細胞質内で抗がん剤が放出されて殺細胞効果を示す。この場合はDNA合成阻害による殺細胞効果を例にとった。

2. Enhanced permeability and retention 効果

Enhanced permeability and retention (EPR) 効果は、腫瘍組織の血管透過性の上昇とリンパ管の形成不全から生じる現象である [10]。正常組織の血管では、ある一定以上の大

きさの高分子は漏出せず、さらに万が一漏れ出したとしてもリンパ管が分子の回収を行う。腫瘍組織中の血管では、抗体など高分子タンパクを含む高分子物質も容易に漏れだし、リンパ管の形成が不十分なため、漏れだした高分子が長期間保持される [10] (図 2)。これにより、腫瘍部では特異的に高分子が長時間集積されるため、抗体製剤の動態が腫瘍部へと限定される。

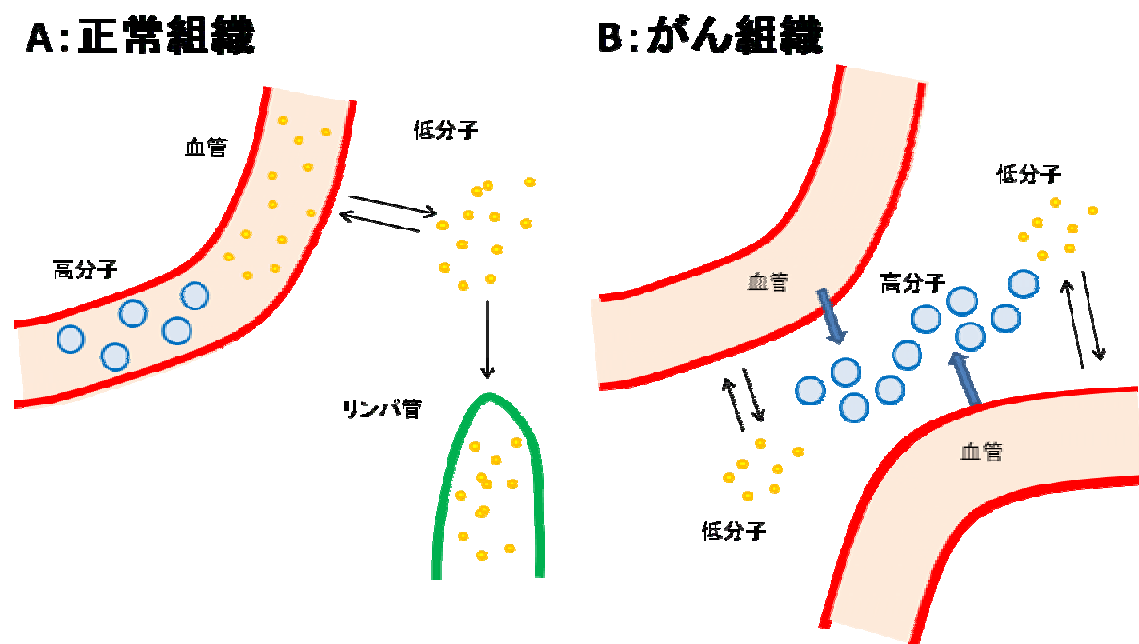


図 2 Enhanced permeability and retention (EPR) 効果

A：正常組織血管から低分子は漏出するが、高分子は漏出しにくい。

B：がんでは血管透過性が亢進しているため、正常血管から漏出しにくい高分子さえも血管外へ漏れだす。また、リンパ系の回収が不十分で、漏出した高分子が長くとどまる

3. 抗体インターナリゼーション

抗体ミサイル療法では、抗体製剤が腫瘍組織に到達した後、腫瘍血管から漏出し、がん細胞へと向かう。その後、抗体に結合した抗がん剤は、抗体のインターナリゼーションによって細胞質内へと移行する。そのため抗体ミサイル療法の薬効においてインターナリゼーションの効率が重要な要因となる [11]。

シグナル伝達を介する膜受容体は、リガンドの結合によって細胞内ドメインのチロシン残

基がリン酸化されることでエンドサイトーシスが誘導される [12-14]。抗体は、そのリガンドによる刺激を模倣することで、インターナリゼーションを引き起こす [12, 15, 16]。その際、受容体間の二量体形成が重要な役割を担っていることが知られている。さらに、同一の抗原を認識する抗体であっても、認識するエピトープ部位や抗体の形状が変化するとインターナリゼーション効率が変化する [12, 17]。

このことから、インターナリゼーションを引き起こしやすい膜タンパクとして、シグナル伝達を誘導しリガンド結合後 2 量体形成を起こす膜受容体が挙げられる。対照的に、抗体におけるインターナリゼーションを起さないケースとしては、上記以外の膜タンパク質、抗体が膜タンパクのリン酸化を誘導しないタイプ、リン酸化を誘導する抗体であっても、抗体の形状を変化させることでインターナリゼーションの誘導性が変化する場合、などが考えられる。

4 . SN-38

イリノテカン塩酸塩である CPT-11 は、直腸がん、肺がん、卵巣がんなどで有効性を示してきた [18-22]。CPT-11 はプロドラッグであり、生体中のカルボキシエステラーゼ (CES) によって生物学的活性代謝物 7-ethyl-10-hydroxy-CPT (SN-38, MW = 392.404, 図 3) へと変換される [23, 24]。SN-38 は植物アルカロイドであるカンプトテシンの類似体であり、DNA トポイソメラーゼ I の阻害作用を持つ。CPT-11 と比較して、SN-38 は様々ながん細胞を用いた *in vitro* の実験において最高 1,000 倍程度の細胞毒性を有することが確認されている [23]。CPT-11 は肝臓や腫瘍中で SN-38 へと変換されるが、変換される割合は投与された CPT-11 の質量の 10% 以下である [25, 26]。さらに、CPT-11 が SN-38 へと変換される割合は、個人の CES の活性の遺伝的素質に依存している [27]。

このように、SN-38 は非常に高い薬効を示しているが、水に対して極めて不溶性であるため、直接の化合物を投与できない点 [28]、プロドラッグ CPT-11 として投与できても S

N-38 への変換効率の低い点が利用の課題となっている [25-27]。そのため、SN-38 を選択的にデリバリーして効果的にリリースする薬剤は、がん治療において高い有効性があると考えられる。そこで、抗体に SN-38 を結合させて腫瘍まで送達し、効果的な薬物放出制御ができれば、高い抗腫瘍効果を得られるのではないかと考えた。

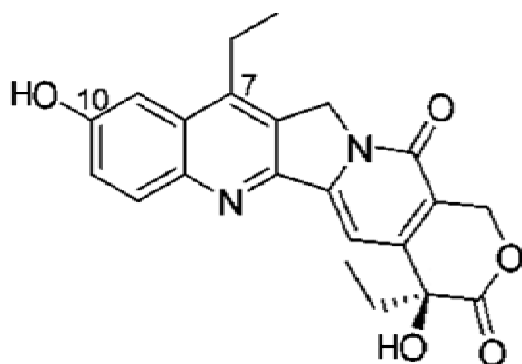


図 3 SN-38 (7-ethyl-10-hydroxy-CPT) 分子構造 ([24] より引用 一部改変)

5. 抗体-抗がん剤の結合様式

抗体ミサイル療法剤の効果を決定するもう 1 つの要因として、抗体-抗がん剤の結合様式が挙げられる [29]。抗体ミサイル療法剤を作製するにあたって、その結合種類は多数存在する。例として、エンドサイトーシスの還元電位で解離するジスルフィド結合 [30, 31]、タンパク分解性の分解によって解離するチオエーテル結合 [31]、リソソーム中のカテプシンで解離するペプチド結合 [32]、細胞質中のカルボキシルエステラーゼによって解離するカルバメート結合 [33] などが使われてきた。これらはいずれも細胞内に取り込まれることで抗がん剤を放出する剤形である。従って、インターナリゼーション効率の低い抗体と抗がん剤とを、この結合様式を用いて結合させても殺細胞効果が低いと考えられる (図 4)。

しかし、がん治療の抗体療法において、サイトカイン受容体などのインターナリゼーションされやすい膜タンパク質の中で、がん特異的なものは少数しかないと考えられる [34]。そして、タンパク共役型や接着分子などインターナリゼーション効率の低いマーカーで開発されていく可能性が高い。

そのような状況から、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の効果的な結合様式が必要であると考えた。

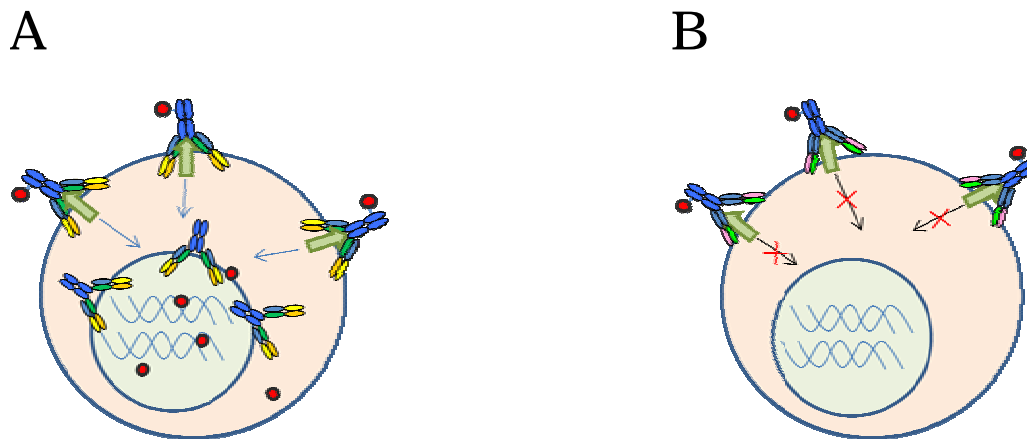


図4 抗がん剤を細胞内で放出する剤形の抗体ミサイル療法剤

A：インターナリゼーション効率の高い抗体

抗体が細胞中に取り込まれて効率よく抗がん剤を放出できる。

B：インターナリゼーション効率の低い抗体

抗体が細胞中に取り込まれず、抗がん剤を放出できない。

6. SN-38 徐放性エステル結合

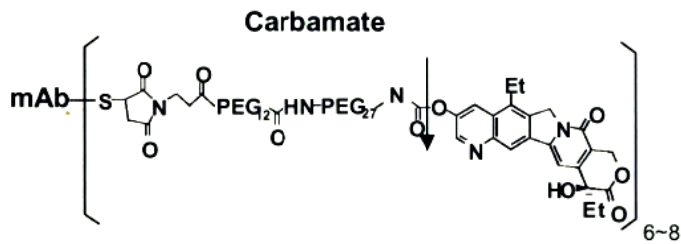
当研究室では、抗体と抗がん剤の結合方法として、2種類の様式を用いている。

以下に示すのは、SN-38 を抗体と結合させるための化合物である (図 5)。両化合物では共に、求核反応により抗体分子中のチオール基と共有結合を起こすマレイミド基 [35, 36]、生体中への適合性を高める PEG 鎖がスペーサーとして含まれている [37, 38]。それらに以下の各結合様式で SN-38 が結合している。

1 つは、カルバメート結合である(図 5A)。この結合は、細胞質中の CES による加水分解で解離する。従って、この様式で結合した抗がん剤は、抗体のインターナリゼーション後に、細胞内の CES によって解離して薬剤が放出される。もう 1 つは、本研究における新規抗体-抗がん剤の結合様式として、非酵素的に加水分解によって解離するエステル結合がある(図 5B)。これは、インターナリゼーションに依存せず、細胞の内外で時間依存的に

SN-38 を放出することができる。従って、この結合様式を用いれば、インターナリゼーション効率の低い抗体であっても、がん細胞表面から SN-38 を放出し、細胞を攻撃することが可能になる (図 6)。

A



B

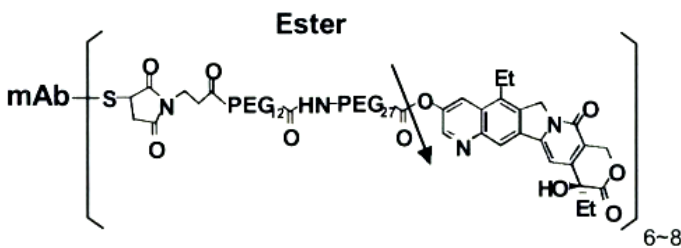


図 5 抗体付加用 SN-38

A : カルバメート結合 SN-38

細胞質中の CES によって解離する。 MW=2575

B : エステル結合 SN-38

非酵素依存的に加水分解によって解離する。 MW = 2447

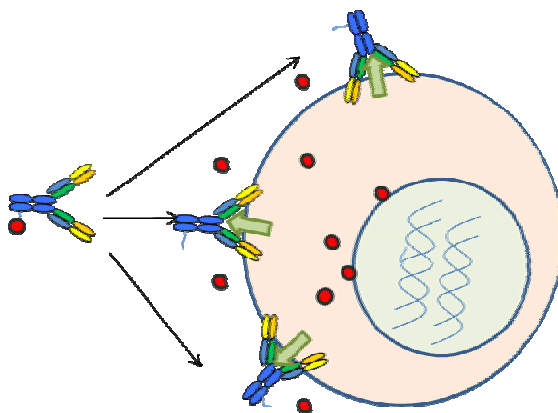


図 6 エステル結合型抗体 DDS

抗体のインターナリゼーションが起こらなくとも、細胞表面から抗がん剤を放出する。

7. ErbB-2

ErbB-2 (Her2/neu) は、乳がんの発がんと増殖におけるその役割で注目を集めている [39-41]。ErbB-2 は受容体チロシンキナーゼ ErbB ファミリーに属し、細胞を増殖や分化に導くシグナル伝達に関与している。ErbB-2 はリガンドに結合すると直ちに、他の ErbB ファミリーとヘテロ 2 量体を形成する [39]。乳がんにおける 15-20%の症例で ErbB-2 の遺伝子が増幅し、結果として腫瘍組織中でタンパク質の過剰発現が起こる。ErbB-2 の過剰発現は乳がんの悪性化と転移性を促進させ、予後不良の原因の 1 つとなっている [40]。このように、一部の乳がんでは ErbB-2 が過剰に発現していて、リガンド結合後 2 量体を形成することから、抗体結合後インターナリゼーションを起こす膜受容体の候補となり得る。

8. EpCAM

Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM/CD326) は上皮細胞分化抗原の 1 種であり、多くのがんでの過剰発現が確認されている。EpCAM は、ホモタイプの非カルシウム依存性細胞接着因子であり、安定な細胞間接着と組織の形態形成に必要である [42, 43]。また EpCAM は Cadherin-Catenin 経路と関与しており、それゆえ、発生や癌化に関与する細胞内情報伝達系 Wnt シグナル伝達系との関与が確認されている。そのような背景から、EpCAM は胃腸管系、泌尿器系の様々ながんにおける免疫療法の標的として使われてきた [42, 44]。

EpCAM は細胞分裂を引き起こすシグナル伝達に関与する際、細胞膜内で EpCAM の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 [45, 46]。それ故、抗 EpCAM 抗体のインターナリゼーション効率は低いと考えられる。

9 . 目的

以上のことを踏まえ、従来の抗体ミサイル療法が固形腫瘍に効果が出ない要因の一つとして、既存の抗体ミサイル療法は、抗がん剤結合抗体のインターナリゼーション効率が低い可能性が考えられる。そのため、抗がん剤結合抗体のインターナリゼーション効率が低くても、十分な治療効果を得るための抗体療法の開発が必要になると考えた。そこで、インターナリゼーション効率の低い抗体にエステル結合を介して SN-38 を付加することで細胞表面から抗がん剤を放出させる剤形を考案した。

本研究の目的は、低インターナリゼーション効率の抗体に、エステル結合、カルバメート結合の 2 種類の様式で SN-38 を結合させ、それらの殺細胞効果を比較検討することで、細胞外 SN-38 放出性の新規抗体ミサイル療法 (抗体 DDS) の有効性を検証することである。

第 2 章

材料と実験方法

材料

1. 抗体付加用 SN-38

エステル結合 及び、カルバメート結合で抗体に SN-38 を付加するための化合物は眞鍋史乃先生 (独立行政法人理化学研究所) により合成していただいた。具体的な方法としては、PEG 末端に無水マレイミド基を付加し、他方の末端にエステル結合、又はカルバメート結合で SN-38 を付加していただいた。エステル結合リンカー付き SN-38 を以下 SN-38 E と略記する。また、カルバメート結合リンカー付き SN-38 を以下 SN-38 N と略記する。

2. 抗 EpCAM 抗体 (B8-4)

当研究室にて確立されたマウス抗ヒト EpCAM モノクローナル抗体 (IgG1) 産生ハイブリドーマ (B8-4) より精製した抗体を研究に用いた。以下、抗ヒト EpCAM モノクローナル抗体を B8-4 と表記する。

実験方法

1. 細胞培養

1-1. 使用した細胞株

ヒト乳がん細胞株 SKBR-3 を American Type Culture Collection 社より購入した。

1-2. 継代方法

SK-BR-3 を McCoy's 5A Medium (modified) (Wako 社) { + 10, (v/v) % Fetal Bovine Serum (Tissue Culture Biologicals 社), + 1 (v/v) %, L-Glutamine (Sigma 社), + 1 (v/v) % Antibiotic-Antimycotic (Anti-Anti, Gibco 社) } にて培養し、その培養細胞が 150mm Dish (Corning 社) 上でコンフルエント状態となっていることを位相差顕微鏡にて確認した。その後、クリーンベンチ内にて培養上清を除去し、PBS (-) (DPBS, Invitrogen 社) を加えて洗浄し

た後に、再度除去した。2mL の Trypsin-EDTA (0.25 (w/v) %, Trypsin-1mmol/l, EDTA・4Na Solution With Phenol Red, Wako 社) を加えて、37 °C、5%CO₂ インキュベーター内に数分間放置した。位相差顕微鏡にて細胞が剥がれていることを確認した後、18 mL の McCoy's 5A Medium (modified) を加えて、細胞懸濁液を 50 mL centrifuge tube (Corning 社) に回収した。回収した細胞懸濁液は 1200rpm, 4min, 4 °C の条件で遠心して、上清を除去後、10 mL の McCoy's 5A Medium (modified) に再懸濁した。McCoy's 5A Medium (modified) を 25 mL 加えた新しい 150mm Dish を用意して、そこへ 1 mL の細胞懸濁液を加えてゆっくりと dish を振蕩した。位相差顕微鏡で dish 上に均一に播種されていることを確認した後、37 °C、5%CO₂ インキュベーター内にて培養した。

1-3 . 細胞保存方法

培養細胞が 150mm Dish 上でコンフルエント状態となっていることを位相差顕微鏡にて確認した後、上述の方法で細胞懸濁液を 50 mL centrifuge tube に回収して遠心分離を行い、上清の除去を行った。続いて、5 mL のセルバンカー (細胞凍結保存液 血清タイプ セルバンカー 1、日本全薬工業社) を加えて懸濁した後、細胞保存用 tube (Cryotube Vials, nunc 社) に 0.8 mL ずつ分注して、-80 °C にて保存した。6 カ月以上の長期保存の際、その翌日に液体窒素に移して保存した。

2 . 抗体インターナリゼーションの観察

2-1 . 抗体の蛍光標識

抗体の蛍光標識は、Alexa Fluor 647 Protein Labeling Kit (invitrogen 社) を用いて行った。PBS で濃度 1 mg/mL に調整した抗体溶液に、1/10 体積量の 1 M 炭酸ナトリウム溶液 (Component B) を加えた。その混合溶液 100 µL を Alexa fluor 647 reactive dye (Component A) に加えた。反応溶液を室温で 1 時間静置した、15 分に一度転倒混和した。

反応溶液の静置中に、Spin column (Component D) を組立て、そこに Purification resin (Component C) を加えた。さらに Spin column に Purification resin を入れ、ベッドボリュームを 1.5 mL にした。その後 Spin column を、スイング型ローターを用いて 1,100 × g, 4 で 3 分間遠心を行った。1 時間静置した反応溶液を、Spin column に添加し、ベッド面に吸収させた。Spin column の下に empty collection tube (Component E) を置いて、スイング型ローターを用いて 1100 × g, 4 で 5 分間遠心を行った。この作業によって、Alexa 647 蛍光色素が抗体に標識された。

2-2 . 蛍光顕微鏡

Culture Slides 4 Chamber (BD Falcon 社) に細胞を 5×10^4 個/well で播種して、500 μ l の培地中で 37 °C、5%CO₂ インキュベーター内にて 24 時間培養した。そこに蛍光標識した抗体を、抗体濃度が 30 μ g/well となるよう加えて、37 °C、5%CO₂ インキュベーター内にて 30 分静置した。その後、培地上清を吸引し、PBS (-) 500 μ l で洗浄した後、再び McCoy's 5A Medium (modified) 500 μ L を添加した。その後、蛍光顕微鏡 Biozero BZ-8100 (KEYENCE) で抗体の局在を観察した。

3 . 抗体への SN-38 付加

3-1 . DTT 還元

抗体溶液 5 mg/mL を 2 mL、5 × PBS (-) pH 8.0 を 2ml 、Ultra Pure Distilled Water (Gibco 社) 4ml を 10ml Centrifuge tube (CORNING) で混合し、37 °C 恒温槽で 30 分間ブレインキュベーションを行った。その後、50mM DTT (SIGMA 社) を 2 mL 加え、再び 37 °C 恒温槽で 30 分間インキュベーションを行った。

3-2 . 限外濾過

Ultrafiltration Membranes DIA25mm (MILLIPORE 社) を蒸留水に 60 分浸し、表面のグリセロールを取り除き、Stirred Ultrafiltration Cells 8010 (MILLIPORE 社) に取り付けた。Stirred Ultrafiltration Cells 8010 に、3-1. で還元した抗体溶液を加え、付属のスターラーで 500 rpm で攪拌させながら、0.25 MPa の窒素圧をかけてろ過を行った。10 mL の溶液が 1 mL になったところで PBS (-) を 9 mL 追加し、再び限外濾過を行った。この行程を合計 4 回行い、DTT を 0.001 mM になるまで希釈した。限外濾過後、タンパク質量濃度を吸光度計 nano drop (Nano Drop Technologies 社) を用いて A280 を基に測定した。

3-3 . SH 基定量

DTNB を PBS (-) に溶かし、終濃度 5mM とした。5mM DTNB 溶液 2 μ L と、3-2 . 限外濾過後の還元抗体溶液 8 μ L を混合し、室温で 20 分静置した。発色した溶液の A412nm の吸光を nano drop によって測定した。この時、0.1 mM-0.005 mM の DTT 溶液の希釈系列を作製し、還元抗体溶液 8 μ L の代わりに反応させ、SH 基定量の標準曲線とした。標準曲線を基に、A412 より抗体溶液中の換算 DTT 濃度を算出する。DTT は 1 分子中に SH 基を 2 つ有するので、換算 DTT 濃度を 2 倍して溶液中の SH 基の濃度を算出した。

3-4 . 抗体の SN-38 付加反応

還元抗体溶液に、SH 基の 4 倍量の抗体付加用 SN-38 (SN-38 E, SN-38 N) を加えた。その後、混合した抗体溶液を 37 °C の恒温槽に入れ 30 分間インキュベートをし、その後 4 °C の冷蔵庫内で 60 分間静置した。その後、DTNB より SH 基の定量を行い、反応前後の SH 基の濃度の差から抗体 1 分子に結合した SN-38 の濃度を求めた。その後、未反応の抗体付加用 SN-38 除去のため、Ultrafiltration Membranes DIA25mm (分子量 1,0000 カット) を用いて限外濾過によって溶液交換を行い、最終的に未反応の抗体付加用 SN-38 を 1,000 倍に

希釈した。その後、抗体濃度を 2.0 mg/mL まで濃縮後、MILLEX GV (MILLIPORE 社) を用いてフィルター滅菌を行った。

3-5 . 抗体濃度測定

SN-38 の独自の吸光によって、SN-38 付加反応後は抗体濃度を nano drop では測定できない。そこで、BCA Protein Assay Kit For Protein Assays Using Bicinchoninic Acid (Pierce 社) と吸光度計 SPECTRA MAX 190 を用いてタンパク質濃度を測定した。タンパク定量のための標準曲線は、Trastuzumab (中外製薬) を 0-2.0 mg/mL の間で希釈系列を作って作製した。

3-6 . SN-38 結合抗体の分注

3-3. より求めた抗体 1 分子あたりの結合 SN-38 個数と、3-6. より求めた抗体濃度から、溶液中の SN-38 の濃度を算出した。その後、SN-38 について 9.0 (nmol) ずつ分注し、-80 で凍結保存した。

3-7 . SDS-PAGE

電気泳動用ゲルは Super SepTMAce, 5-20%, 17well (WAKO 社) を用いた。泳動用バッファー (25mM Tris, 192mM グリシン, 0.1 (w/v) % SDS) を満たした泳動槽にゲルをセットし、5 × SDS 試料希釈用バッファー (125mM Tris-HCl pH6.8, 2.3 (w/v) % SDS, 10 (w/v) % グリセリン, 5 (v/v) % 2-メルトカプトエタノール, 10 µg/mL ブロムフェノールブルー) 2.5 µL と Ultra Pure Distilled Water で 10 µL に希釈した抗体サンプル 10 µg を混合し、ゲルにアプライした。この際、分子量マーカーとして Precision Plus Protein Standards 10 µL をアプライした。電圧を 20V/枚ゲルで 80 分間泳動を行った。その後、タンパク固定液 (酢酸 (WAKO 社) 100 mL、メタノール (WAKO 社) 400 mL、Ultra Pure Distilled Water 500 mL) をプラスチック製容器に

入れてゲルを浸し、20 分間振蕩した。20 分後、固定液を容器から抜いて、Quick-CBB (WAKO 社) の SolutionA と SolutionB を等量混合した染色液を容器に入れ、ゲルを浸し、30 分間振蕩した。その後、染色液を除去し、水：メタノール= (1:1, v/v) の混合溶液にゲルを入れ、30 分間振蕩して脱色した。脱色後、泳動ゲルの写真を撮影した。

3-8 . SELDI-TOF-MS

SELDI-TOF-MS とは、表面エンハンス脱離イオン化 (SELDI : Surface enhanced laser desorption ionization) と空間飛行質量分析 (TOF-MS : Time of Flight mass spectrometer) を組み合わせた分析システムである。SELDI とはチップ表面に固定した化学官能基や分子を利用して、試料中に存在している特定の性質を持つ分子をチップ上に細く精製し、その後、レーザーを照射することで捕捉された分子の脱理、イオン化を行う手法である [47] 。チップにはプロテインチップを用いる。またイオン化された分子は通常 TOF-MS を用いて質量分析測定を行う。TOF-MS とは、加速させた荷電粒子 (今回はイオン化したタンパク質) の飛行時間を計測することにより対象の質量を測定する分析計である [47] 。

3-8-1 . Protein Chip CM10 の調製

本実験には Protein chip CM10 (CIPHERGEN 社) (以下 Chip と表記する) に、50 mM Glycine-HCl, pH3.0 (以下 Binding/Washing Buffer と表記する) を 150 μ L 添加して 5 分間振蕩した。5 分後、Binding/Washing Buffer を除去し、再び Chip に Binding/Washing Buffer 150 μ L を添加して 5 分間振蕩した。その後、Binding/Washing Buffer を除去し、1.0 mg/ mL 抗体溶液を Binding/Washing Buffer で 10 倍希釈したサンプルを Chip に 100 μ L 添加し、20 分間振蕩した。サンプル溶液を除去した後、Binding/Washing Buffer を 150 μ L 添加し、5 分間振蕩した。Binding/Washing Buffer を除去し、400 μ L の超純水で洗浄した後、20 分室温で乾燥させた。

3-8-2 . SELDI-TOF-MS 解析

50% アセトニトリル (関東化学社) 、0.5% トリフルオロ酢酸 (WAKO 社) の水溶液を 140 μ L を SPA tube (Bio Rad 社) に加え、Vortex にかけてよく混合した。SPA 混合溶液を 5 分間静置した後、スピンドウンし、上清を 1 μ L ずつ Chip に添加した。そして、Protein Chip System, series 4000 (Bio Rad 社) で測定した。

4 . Flow Cytometry

SN-38 付加抗体サンプルの抗原親和性を確認するため、Flow Cytometry による測定を行った。クリーンベンチ内にて培養上清を除去し、PBS (-) を加えて細胞を洗浄した後に、再度除去した。5 mL の Cell Dissociation Solution (1 \times) Non-enzymatic (SIGMA 社) を加えて、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ インキュベーター内に 10 分間放置した。位相差顕微鏡にて細胞接着が剥がれていることを確認した後、20 mL の B.E. PBS (1.7 (v/v) % BSA (SIGMA 社) , 2mM EDTA) を加えて、細胞懸濁液を 50 mL centrifuge tube (Corning 社) に回収した。5 mL Polystyrene Round -Bottom Tube (BD Falcon 社) に細胞 3.0 \times 10⁵ 個ずつ分注し、1500rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5min で遠心を行った。上清をデカントで除去し、抗体サンプルを抗体量で 1 μ g 投与し、氷上で 20 分静置した。静置後、各チューブに 4 mL の B.E. PBS を加え、1500rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5min で遠心を行った。遠心後、上清をデカントで除去し、Alexa 647 標識 2 次抗体 (Invitrogen) を 2 μ L ずつ加え、氷上で 20 分静置した。静置後、再び各チューブに 4 mL の B.E. PBS を加え、1500 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5 min で遠心を行った。遠心後、上清をデカントで除去し、B.E. PBS を 500 μ l 加え細胞を懸濁した。その後、500 μ L の細胞懸濁液を 5 mL Polystyrene Round -Bottom Tube with Cell-Strainer Cap (BD Falcon 社) に移して細胞塊を取り除き、死細胞選別のために Propidium Iodide (invitrogen) を 1 μ L を 加えた。その後、BD FACS Calibur フローサイトメーター (BD 社) によって 647nm の蛍光波長を測定した。データの解析は FlowJo (TOMY DIGITAL BIOLOGY) を用いて行った。測定によって得た、二次抗体結合

による蛍光強度を各サンプルの親和性として判断した。

5. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

5-1. Free SN-38測定サンプル調製

HPLCを用いてSN-38結合抗体から遊離したSN-38の濃度を測定した。HPLCとは、液体である移動相を用いて、サンプル溶液を固定相が詰まったカラムに流し、移動相と固定相との親和性の違いによりサンプル中の各成分を分離するものである。本研究では、カラム中のシリカゲルを固定相とし、アセトニトリル：メタノール=55：45 (V/V) の混合液を移動相とした。内部標準としてのCPTを、1mM ギ酸/メタノール (1：1, V/V) の混合液で20 nMに調整した。SN-38結合抗体サンプルを50 μ L, 1 mM ギ酸/メタノール (1:1, V/V) 混合液 10 μ L, 超純水 20 μ L, 20 nM CPT 30 μ L を混合し、よくタッピングした。その後、サンプル溶液をCentrifugal Filter Units (MILLIPORE) に移し、12,000 \times g, 3min, 4 で遠心した。フロースルーをポリマーロボスクリーバイアル(Cat. 11191021 大阪ケミカル社) に移し、ロボスクリーューキャップ (Cat. 5394F-09G 大阪ケミカル社) を蓋にして閉じた。尚、始めに抗体溶液中のSN-38濃度が500 mMを超える場合、500 mM 以下になるよう、サンプルをPBSで希釈した。

5-2. Total SN-38測定サンプル調製

SN-38結合抗体において、抗体に結合しているSN-38と遊離したSN-38の総濃度を測定した。内部標準としてのCPTを、1mM ギ酸/メタノール (1:1, V/V) の混合液で20 nMに希釈した。SN-38結合抗体サンプルを50 μ L, 100%メタノール 5 μ L, 0.1 M HCl 5 μ L, 0.7 M NaOH 10 μ L を混合し、室温で30分静置した。静置後、サンプル溶液に0.7 M HCl 10 μ L, 20nM CPT 30 μ L を加えた。その後、サンプル溶液をCentrifugal Filter Units (MILLIPORE) に移し、12,000 \times g, 3min, 4 で遠心した。その後、フロースルーをポリマーロボスクリーバイアル (大阪ケミカル社 Cat. 11191021) に移し、ロボスクリーューキャップ (大阪ケミカル社 Cat.5394F-09G)

を蓋にして閉じた。尚、始めに抗体溶液中のSN-38濃度が500 mMを超える場合、500 mM以下になるよう、サンプルをPBSで希釈した。

5-3 . SN-38サンプルの濃度測定

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって5-2. 及び 5-3.のサンプル中のSN-38の濃度を測定した。サンプルの分画はWaters 2695 Separation Module (Waters社) を用いた。高純度シリカゲルベース逆相HPLCカラム Mightysil RP-18 GP 150-4.6 (5 µm) を使用した。移動相は、0.1 M 酢酸アンモニウム (pH 4.2) : メタノール = (55:45, v/v) の混合溶液を用いて、1.00 mL/minの流速で送圧した。カラムの溶出液は、Waters 2475 Multi Fluorescence Detector(Waters社) 、Waters 2996 Photodiode Array Detector (Waters社) 、を用いて蛍光波長430 nm,でSN-38のarea、 蛍光波長540 nmで内部標準であるCPTのareaを測定した。SN-38のareaとCPTのareaの比から、SN-38のresponseを求めた。以下にその公式を示す。() SN-38結合抗体のリリース (%) はTotal SN-38測定サンプルのresponseに対する、各測定時間のFree SN-38測定サンプルのresponseの割合に100を掛けて算出した。以下にその公式を示す。()

$$\text{SN-38 response}=\text{SN-38 area}/\text{CPT area}$$

$$\text{SN-38 リリース (\%)}=\text{Free resuponse}/\text{Total response} \times 100$$

6 . 細胞生存活性測定

96 Well Cell Culture Cluster (COSTAR 社) に細胞を $2,000 \times 10^3$ 個/well で播種して、100 µLの培地中で 37 °C、5%CO₂ インキュベーター内にて 48 時間培養した。細胞播種 48 時間後、上清を除去し、培地で希釈した薬剤を 100 µL/well ずつ加えた。薬剤は、SN-38 換算濃度にして 10 - 0.0001 µM の範囲で 1/10 ずつ希釈して調製した。抗体単体を加えるときは、他のSN-38 結合抗体の中で最も加える抗体量が多くなる条件と等しくなるよう調製した。薬剤を添加して 15 分後、薬剤入りの培地を除去し、新たに培地を 100 µL/well ずつ 加えた。その

後 37 °C、5%CO₂ インキュベーター内にて 72 時間培養した。72 時間後、培地を除去し、Cell Counting Kit-8 (DOJINDO) を培地で 10 倍希釈した混合溶液を 100 μL/well ずつ加えた。その後、37 °C、5%CO₂ インキュベーター内にて 2 時間培養し、SPECTRA MAX190 を用いて A450nm を測定した。

7. 統計解析

本研究のデータ解析は Student's *t*-test を用いた。P<0.05 を有意差ありとした。

第 3 章 実験結果

1. 抗体インターナリゼーション

乳がん細胞株 SK-BR-3 を用いて、抗 EpCAM 抗体 B8-4 と抗 ErbB-2 抗体 Trastuzumab のインターナリゼーション効率を観察した (図 7)。その結果、0 時間では両抗体は膜表面に結合していることが確認できた。24 時間後の B8-4 では 0 時間と比較して変化が見られないのに対し、Trastuzumab は 24 時間においてほぼ全ての細胞内で多数の小胞状の蛍光が確認された。

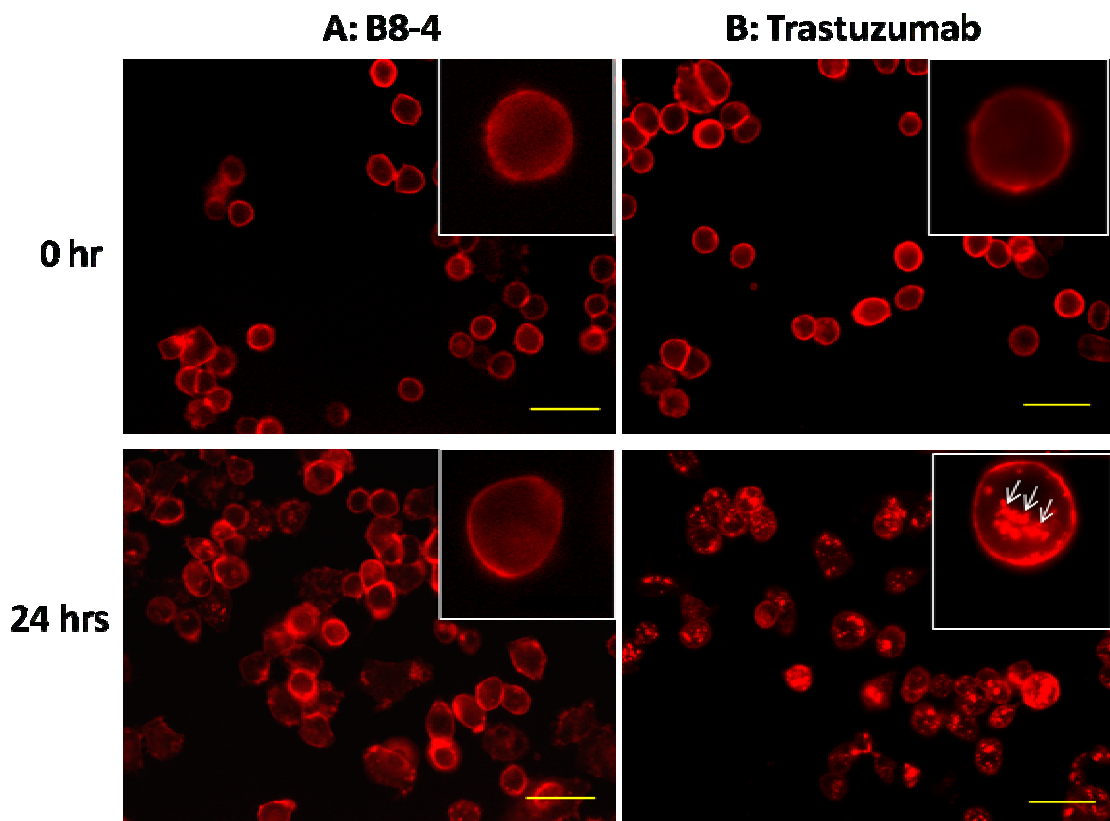


図 7 抗体インターナリゼーションの観察

乳がん細胞株 SK-BR-3 を用いて、A: Trastuzumab , B: B8-4 のインターナリゼーションを比較観察した。2 つの抗体は Alexa 647 によって標識し、免疫化学的細胞染色を行った。抗体投与直後と 24 時間後の画像を示す。Scale bars: 50 μ m

2. B8-4 への SN-38 付加

抗 EpCAM 抗体 B8-4 を DTT 処理によって還元した (以下、B8-4 を DTT 処理したサンプル

ルを B8-4 DTT Treatment と略記する)。還元後、SH 基の定量を行った。還元した B8-4 に、SN-38 E 及び SN-38 N で SN-38 を付加した (以下、B8-4 に SN-38 を付加したものをそれぞれ、B8-4 SN-38 E, B8-4 SN-38 N と略記する)。SN-38 付加前後の SH 基濃度の差から、抗体 1 分子に結合した SN-38 の濃度を求めた。その結果、B8-4 SN-38 E には 1 分子あたり平均 SN-38 が 6.94 分子結合しており、B8-4 SN-38 N には 1 分子あたり平均 SN-38 が 6.43 分子結合していることがわかった (表 1)。

薬剤付加後、B8-4、B8-4 DTT Treatment、B8-4 SN-38 E、B8-4 SN-38 N を SDS-PAGE にかき、CBB 染色後、写真を撮影した (図 8)。その結果、B8-4 では 150 kDa 付近に主要なバンドが確認された、B8-4 DTT Treatment では 75 kDa 付近に主要なバンドが確認された、B8-4 SN-38 E と B8-4 SN-38 N では、100 ~ 250 kDa にかけてスミアバンド (広域に薄い染色が認められる状態) が確認された。

さらに、SDS-PAGE で確認されたスミアバンドの分子量の範囲を詳しく解析するため、SELDI-TOF-MS を用いて各抗体サンプルの分析を行った。本論文では、75kDa 付近の解析結果を示す (図 9)。B8-4, B8-4 DTT Treatment では、約 75kDa にピークが確認された。しかし、SN-38 付加を施した B8-4 SN-38 E, B8-4 SN-38 N では 75kDa のピークが消失していた。さらに B8-4 SN-38 E, B8-4 SN-38 N では、77kDa から 87kDa にかけて複数のピークが連なったブロード状のピークが確認された。

表 1 SN-38 の付加個数

サンプル	Number of SN-38 /antibody
B8-4 SN-38 E	6.94
B8-4 SN-38 N	6.43

マレイミド結合 SN-38 と反応前後の SH 基を定量し、その差から抗体 1 分子に結合した理論分子量を計算した。

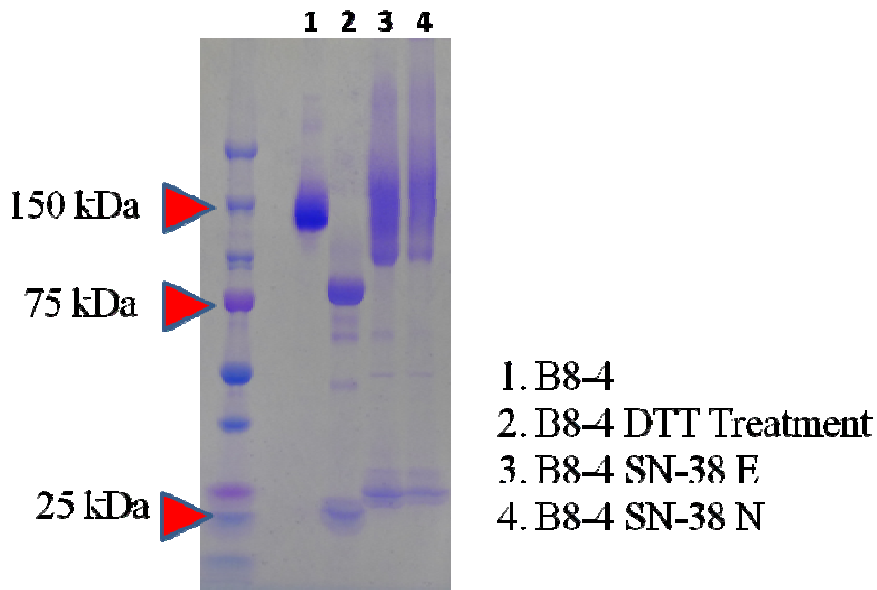


図 8 B8-4 SN-38 付加サンプル SDS-PAGE

B8-4, B8-4 DTT Treatment, B8-4 SN38 E, B8-4 SN38 N を SDS-PAGE にかけた。1. B8-4 では、150 kDa にバンドが出現した。2. B8-4 DTT Treatment では 75kDa 付近にバンドが出現した。3. B8-4 SN-38 E, 4. B8-4 SN-38 N では 10-25kDa の範囲でスミアバンドが確認された。

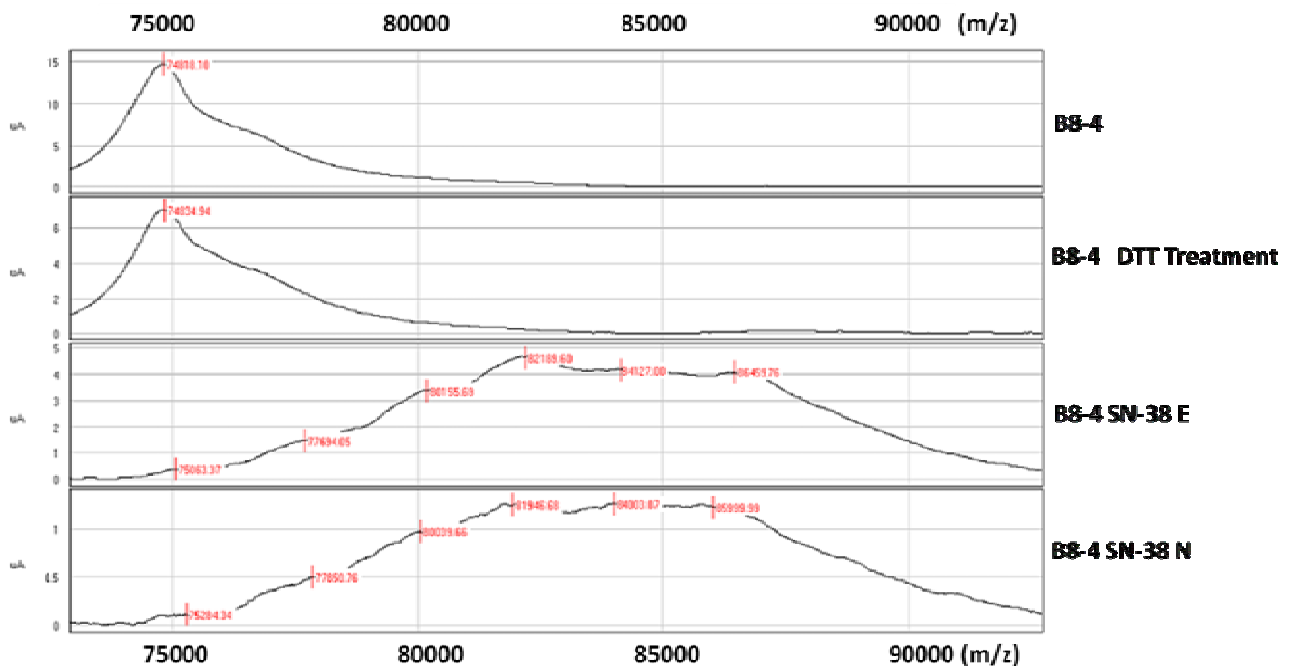


図 9 B8-4 SN-38 付加サンプル SELDI-TOF-MS 解析

B8-4, B8-4 DTT Treatment, B8-4 SN-38 E, B8-4 SN-38 N のサンプルで SELDI-TOF-MS 解析を行った。75 k Da 付近のピークを示す。ここでは (m/z) を分子量 Da として扱う。また、グラフは Da についての定性評価なのでサンプル毎に縦軸の目盛は異なる。

3 . SN-38 結合 B8-4 の抗原親和性

DTT による還元と SN-38 付加で抗原親和性の低下がないかを確認するため、B8-4, B8-4 DTT Treatment, B8-4 SN-38 E, B8-4 SN-38 N の生細胞で発現されている EpCAM への親和性をフローサイトメトリーにより測定した。その結果、以下のヒストグラムを得られた (図 10) 。 B8-4, B8-4 DTT Treatment, B8-4 SN-38 E, B8-4 SN-38 N のサンプル間でピークのパターンに変化は見られなかった。

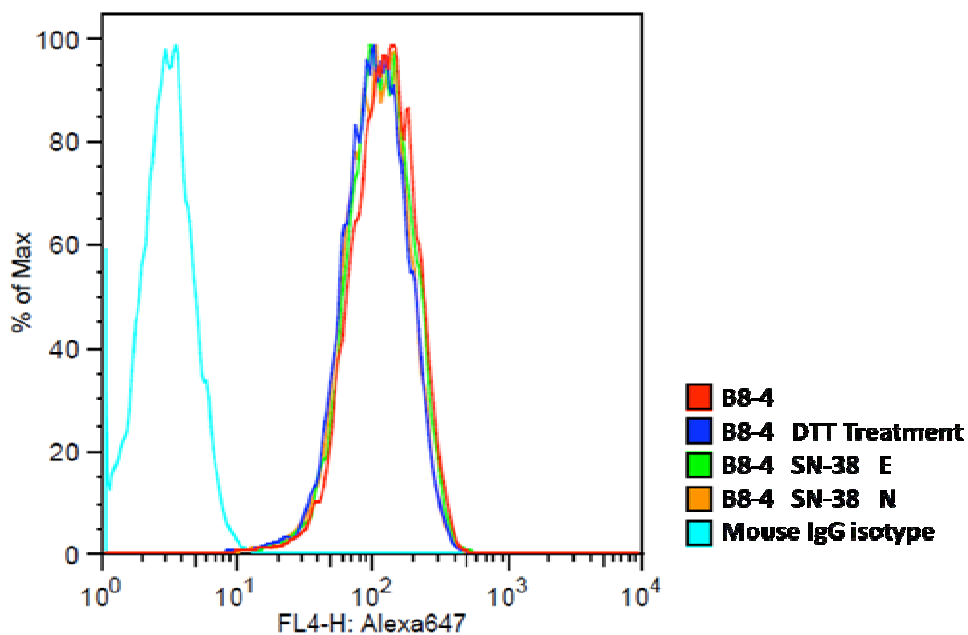


図 10 抗原親和性の Flow Cytometry による測定

B8-4, B8-4 DTT Treatment, B8-4 SN-38 E, B8-4 SN-38 N の、EpCAM を発現している生細胞への親和性を測定した。各抗体サンプルを 1 次抗体として加え、2 次抗体に Alexa 647 標識抗体を加えた。Facs により蛍光波長 647nm を測定した。

4 . SN-38 結合 B8-4 からの経時的 SN-38 放出

エステル結合が、非酵素環境下で時間依存的に SN-38 を放出しているかを確認するため B8-4 SN-38 E, B8-4 SN-38 N を PBS 中 37 でインキュベーションし、経時的に Free SN-38 の濃度を HPLC により測定した。その結果、以下のグラフを得られた (図 11) 。両サンプルにおいて SN-38 の濃度が経時的に増加していった。B8-4 SN-38 E は、各時間で B8-4 SN-38 N

より高い速度で SN-38 を放出している事が確認できた。

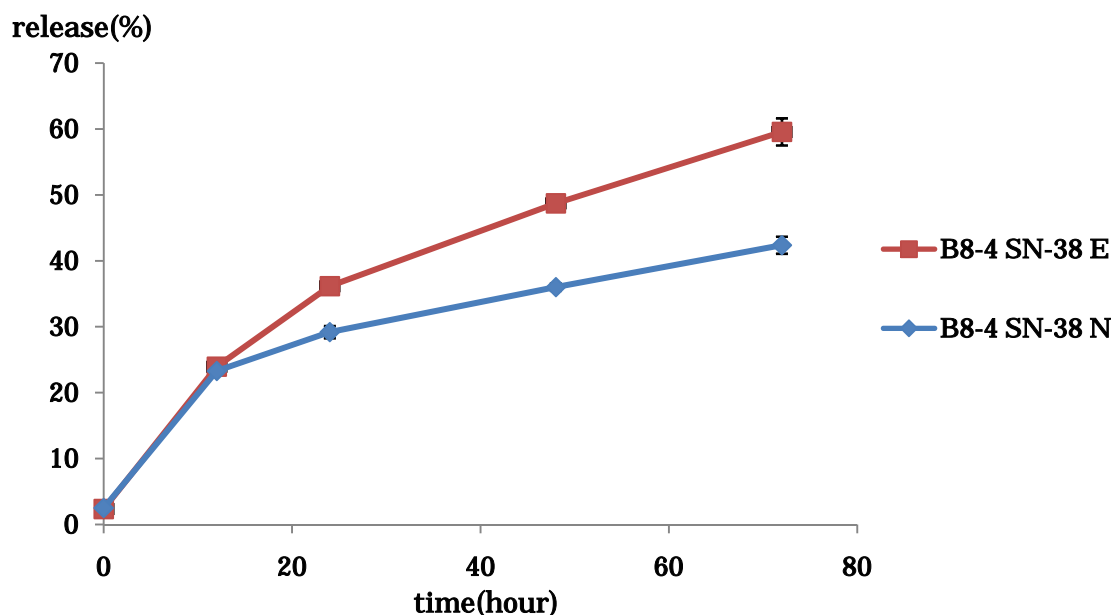


図 11 Free SN-38 濃度測定の時コース

B8-4 SN-38 E, B8-4 SN-38 N の Total SN-38 濃度が $500 \mu\text{M}$ 以下になるよう PBS で希釈し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ インキュベーター内にてインキュベートした。インキュベーター中 0, 12, 24, 48, 72 時間後の Free SN-38 の濃度を測定した。0 時間で両サンプルの Total SN-38 の濃度も測定した。Total SN-38 濃度と、各時間の Free SN-38 濃度の値を基準に release (%) を算出した。

5. SN-38 結合抗体による殺細胞効果

SN-38 結合抗体の殺細胞効果を示す。各 SN-38 換算濃度に対する Viability をグラフに表すと以下のようなになった (図 12)。さらに、図 12 より各サンプルについて IC_{50} を算出した結果、以下のようなになった (図 13)。その結果、カルバメート結合と比較してエステル結合 B8-4 SN-38 の殺細胞効果が約 10 倍程度高い薬効を示していた。

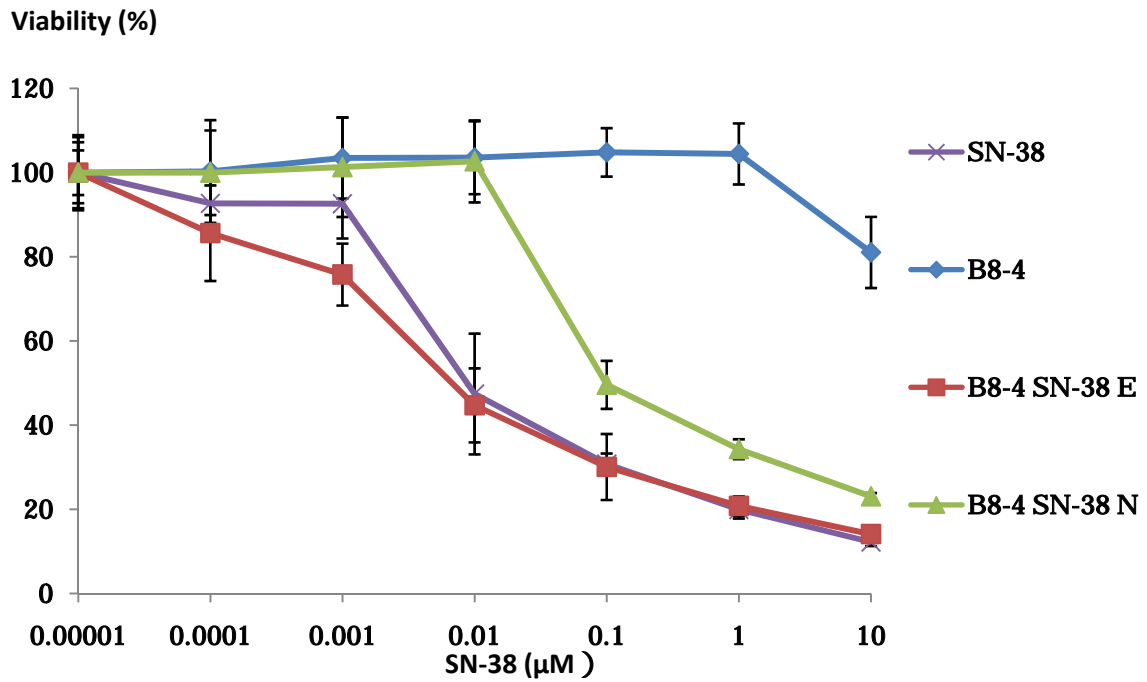


図 12 SN-38 結合 B8-4 の殺細胞効果の測定

B8-4, B8-4 SN-38 E, B8-4 SN-38 N, SN-38 の殺細胞効果を測定した。

各 SN-38 換算濃度における細胞の Viability をグラフで示す。n=6

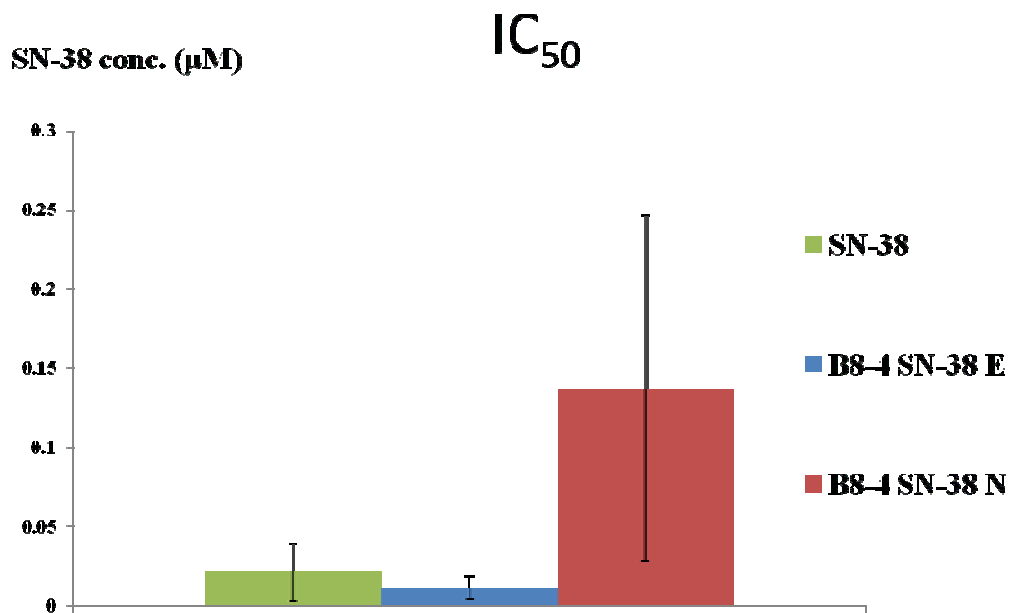


図 13 SN-38 結合 B8-4 の IC₅₀

B8-4, B8-4 SN-38 E, B8-4 SN-38 N の IC₅₀ を算出した。

*; p<0.05 (mean ± SD, Student's *t*-test) 、n=6

第4章

考察・今後の展望

考察

1. 抗体インターナリゼーション

今回は Trastuzumab と B8-4 でインターナリゼーションの効率を比較した。Trastuzumab で染色した多くの細胞は、染色の 24 時間後、細胞中に小胞状の蛍光の塊が確認された。(図 7B) これは細胞中に取り込まれた抗体、またはその分解物の蛍光であると考えられる。それに対して、B8-4 で染色した細胞では細胞中の蛍光の塊は確認できなかった。(図 7A) Trastuzumab はインターナリゼーションを起こす抗体であると知られているが、その効率は低いという報告がある [48]。その Trastuzumab と比較して、さらに抗体取り込みの効率が著しく低いことから、B8-4 はインターナリゼーション効率が低い抗体であると判断できる。

2. B8-4 への SN-38 付加

B8-4 を還元・SN-38 付加した各サンプルを SDS-PAGE にアプライしたところ、B8-4 では 150 kDa の周辺でバンドが確認された。(図 8) これは B8-4 が IgG であるため 1 分子が 150kDa の分子量があることを示している。B8-4 DTT Treatment では、75 kDa と 25kDa 付近にバンドが確認された。75 kD の分子は、IgG 分子の H 鎖と H 鎖をつなぐヒンジ領域のジスルフィド結合が還元されて解離した一価の IgG 分子 (以下 half IgG と表記する)、また 25kDa の分子は、DTT の還元によって脱落した L 鎖であると考えられる。B8-4 SN-38 E, B8-4 SN-38 N では 10-25 kDa 付近でスミアバンドが確認された。これは、B8-4 DTT Treatment に複数個の SN-38 が結合した結果、分子量がランダムに増加したためと推測された。理論上の SN-38 付加個数の分子量以上の増加が見られたのは、SN-38, マレイミド, PEG には SDS のドデシル基の負電荷を帯びないため、電気泳動での物理的抵抗が分子量以上に増したためと考えられる。

それを検証するため、各抗体サンプルの SELDI-TOF-MS 解析を行った。SELDI-TOF-MS 解析ではクロマトマトグラフィー様の性質を持ったチップ表面に、タンパク質溶液などのサ

サンプル溶液をアプライすることで、混合液中の成分を一定の物理的・化学的な性質でチップ上に結合させ、特定の成分のみをチップ上に上げることができる。その後、残った成分をイオン化、レーザー照射を経て、分子毎の滞空時間から、特定の成分をさらに細かな質量毎に分離して解析できる [47]。B8-4, B8-4 DTT Treatment では 75 kDa でピークが見つかった。これは、図 8 の B8-4 DTT Treatment の SDS-PAGE でも検出された half IgG 分子であると推測される。しかし、B8-4 では SDS-PAGE では 75kDa のバンドは検出されなかった。これは SELDI-TOF-MS は SDS-PAGE と比較して超高感度で分子を検出できるため、B8-4 サンプル中に微量に含まれていた half IgG 分子を検出したためであると考えられる。

B8-4 SN-38 E, B8-4 SN-38 N では、前述の 75 kDa のピークは検出されなかった。しかし、77-87 kDa にかけて、複数のピークが連なったブロードのピークが検出された。連なっている各ピークの差はそれぞれ 2,000 Da 前後である。抗体付加用 SN-38 はマレイミドと PEG が結合しており、その分子量は 2,500 Da 前後である。SN-38 が抗体に結合すると、加水分解により SN-38 単体が解離したとしても、抗体は分子量にして 2,100 Da 程度は増えることになる。このことから、ブロードのピークは、ジスルフィド結合の還元により生じた half IgG に、複数の SN-38 がランダムに結合し、試料調整中に SN-38 単体が遊離した結果生じたものだと考えられた。このように、SDS-PAGE では正確に検出できなかった非タンパク質の付加による抗体の分子量の増加も SELDI-TOF-MS により正確に分析することが可能であった。

3 . SN-38 結合 B8-4 の抗原親和性

Flow Cytometry を用いて、各抗体サンプルが結合した細胞の Alexa647 の蛍光波長を測定した結果、B8-4 DTT Treatment, B8-4 SN-38 E, B8-4 SN-38 N のピークの位置と形状に変化がなかった。このことより、各抗体サンプルは、未処理の B8-4 抗体サンプルと同程度の抗原親和性があると考えられた。

抗体の構造において、抗原親和性と最も関与する部分は Hv と Cv という組み合わせに関

与するドメインである。IgG のヒンジ領域のジスルフィド結合が解離して一価になったとしても、IgG の抗原親和性は変わらない。しかし、L 鎖の脱落は抗原親和性を完全に失う要因となる。図 8 より、DTT の処理を行ったタンパク質のバンドパターンの中に、脱落した L 鎖と考えられるバンドが存在した。このことより、一部の抗体分子で抗原親和性の低下が疑われる。それにも関わらず、今回の Flow Cytometry で抗原親和性の低下が認められなかったのは、実験に使用する抗原数に対して、有効な抗体分子数が飽和していることが原因と考えられる。従って、より正確な抗体の抗原親和性を確認するために、抗体の濃度の希釈系列を用いて、それぞれについて Flow Cytometry を行う必要があると考えられた。

本実験では、 1.32×10^7 (IgG molecule/cell) の割合で抗体を添加している（これは、サンプル中の抗体を解離していない whole IgG: MW=150,000 として計算している）。この濃度は、5 . SN-38 結合抗体による殺細胞効果の測定において SN-38 濃度 0.1-0.001 (μM) の中間に相当する抗体量である（細胞播種 48 時間後の薬剤添加時、8,000 cells/well として計算した）。従って、今後の Flow cytometry では、今回の実験の 1/10, 1/100 に希釈した抗体濃度での親和性をサンプル間で比較する必要がある。

4 . SN-38 結合 B8-4 からの経時的 SN-38 放出

2 種類の SN-38 結合 B8-4 を 37 °C PBS でインキュベーションし、経時的に Free SN-38 濃度を測定したところ B8-4 SN-38 E は B8-4 SN-38 N の約 1.5 倍量の SN-38 を放出していた。（図 11）これより、B8-4 SN-38 E の中のエステル結合が非酵素環境下で、B8-4 SN-38 N と比較して効率的に SN-38 徐放していることを確認できた。しかし、B8-4 SN-38 E と B8-4 SN-38 N で著しい差が確認できなかった。

エステル結合、カルバメート結合の解離の速度を決定する要因は、温度、pH、CES 濃度の 3 点が挙げられる。本実験では、温度と pH に関しては、ほぼ生体中と等しい。さらに、多くの哺乳動物の血液中に CES は見出されるが、ヒトでは CES を介した有意な加水分解活

性は血漿中では検出されないことが知られている [49]。このことより、血液中での SN-38 のリリースは生体中でも概ね変化しないと考えられる。

図 11 より、12 時間までの B8-4 SN-38 E と B8-4 SN-38 N では、リリースの速度がほぼ等しい。このことから、SN-38 E と SN-38 N では共に、通常より早い速度でリリースを起こす分子が存在する可能性が挙げられる。従って、今後は 12 時間程度の pre-incubation 後、限外濾過により遊離した SN-38 を除去し、そこを 0 時間として SN-38 の濃度の増加を測定すれば、B8-4 SN-38 E と B8-4 SN-38 N のリリースの差が一層顕著に現れると考えられる。

5 . SN-38 結合 B8-4 による殺細胞効果

各抗体サンプルで IC_{50} を算出した結果、B8-4 SN-38 E の IC_{50} は、B8-4 SN-38 N の IC_{50} に比べ 1/10 程度の値だった。これは B8-4 SN-38 E が B8-4 SN-38 N と比較して、10 倍程度高い薬効があることを示している。

EpCAM は、B8-4 の結合後もインターナリゼーションが起きない。従って、細胞外で CES が存在しない環境下では、B8-4 SN-38 N のカルバメート結合が解離することはできないため、SN-38 を放出できない。そのため SN-38 単独投与と比較して B8-4 SN-38 N の薬効が低くなったと考えられる。それに対して、B8-4 SN-38 E のエステル結合は水の存在する環境で加水分解によって解離する。従って、B8-4 SN-38 E は、抗原である EpCAM のインターナリゼーションが起ころなくても SN-38 を放出する。そのため、B8-4 SN-38 N と比較して B8-4 SN-38 E の薬効が著しく高くなったと考えられる。これは、インターナリゼーション効率の低い抗体においては、エステル結合を用いて細胞外で SN-38 を放出する剤形が有効であることを示唆している。

しかし、SN-38 を単剤で投与したときの IC_{50} 値は、B8-4 SN-38 E の IC_{50} と比較して有意差がなかった。本実験では、殺細胞効果の測定時に薬剤を 15 分間暴露させて培地を交換して、一度 Free SN-38 を除去している。そのため SN-38 単体の薬効は極めて低くなると予想

した。本実験の結果は、その予想と矛盾している。この理由として2つのことが考えられる。1つは、SN-38の放出が十分ではないことが疑われる。図11より、B8-4 SN-38 Eの3日後のSN-38放出量は約60%であった。故に、SN-38換算量で同量入れたB8-4 SN-38 Eの単離した有効なSN-38の量が72時間後では低く、SN-38単剤との差が出なかったことが考えられる。これを検証するために、より長期間の培養後の細胞生存活性を測定する必要がある。

もう1つの理由として、SN-38は分子量392.4の低分子化合物であるため、15分という短時間であっても、時間内で十分に細胞内に取り込まれ、薬効を示している可能性が考えられる。この場合は、B8-4 SN-38 Eが*in vitro*の系においてSN-38単剤の薬剤曝露と同様の薬効を示しており、B8-4 SN-38 Eの有効性を強く証明する。これを検証するためには、SN-38単剤の曝露時間を調整して殺細胞効果を測定する必要がある。

いずれにしても、本研究ではSN-38結合B8-4を用いて、エステル結合によるSN-38徐放性抗体による殺細胞効果が、カルバメート結合によるSN-38細胞内放出性抗体の薬効を大きく上回った。このことより、インターナリゼーション効率の低い抗体であれば、SN-38と抗体をエステル結合で付加し、細胞表面からSN-38を放出する剤形が有効であることが示唆された。

6. 今後の展望

本研究から、異なる剤形で作製された抗がん剤の徐放性の違いから、がん細胞への殺細胞効果が有意に異なることが確認された。今後、がん特異的な抗原の発見が一層進み、臨床応用される抗原が増えてくるものと考えられる。その際、本研究で得た知見が礎となり、個々の症例に応じた抗体-抗がん剤の結合様式を自由に設計することにより、抗がん剤のリリースをコントロールできるようになった結果、各腫瘍における最適な抗体 DDS を設計できる日が来ることが期待される。

【参考文献】

1. Dillman, R.O., *Monoclonal antibodies for treating cancer*. Ann Intern Med, 1989. **111**(7): p. 592-603.
2. Buchsbaum, D.J. and T.S. Lawrence, *New trends in the use of radioimmunoconjugates for the therapy of cancer*. Targeted Diagn Ther, 1990. **3**: p. 215-55.
3. Hisatsune, A., et al., *Internalization of MUC1 by anti-MUC1 antibody from cell membrane through the macropinocytotic pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **388**(4): p. 677-82.
4. Burtrum, D., et al., *A fully human monoclonal antibody to the insulin-like growth factor I receptor blocks ligand-dependent signaling and inhibits human tumor growth in vivo*. Cancer Res, 2003. **63**(24): p. 8912-21.
5. Doronina, S.O., et al., *Enhanced activity of monomethylauristatin F through monoclonal antibody delivery: effects of linker technology on efficacy and toxicity*. Bioconjug Chem, 2006. **17**(1): p. 114-24.
6. Erickson, H.K., et al., *Antibody-maytansinoid conjugates are activated in targeted cancer cells by lysosomal degradation and linker-dependent intracellular processing*. Cancer Res, 2006. **66**(8): p. 4426-33.
7. Breccia, M. and F. Lo-Coco, *Gemtuzumab ozogamicin for the treatment of acute promyelocytic leukemia: mechanisms of action and resistance, safety and efficacy*. Expert Opin Biol Ther. **11**(2): p. 225-34.
8. Hoffmann, M., et al., *(90)Y-ibritumomab tiuxetan (Zevalin) in heavily pretreated patients with mucosa associated lymphoid tissue lymphoma*. Leuk Lymphoma. **52**(1): p. 42-5.
9. William, B.M. and P.J. Bierman, *I-131 tositumomab*. Expert Opin Biol Ther. **10**(8): p. 1271-8.
10. Matsumura, Y. and H. Maeda, *A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs*. Cancer Res, 1986. **46**(12 Pt 1): p. 6387-92.
11. Kuo, S.R., et al., *Antibody internalization after cell surface antigen binding is critical for immunotoxin development*. Bioconjug Chem, 2009. **20**(10): p. 1975-82.
12. Yarden, Y., *Agonistic antibodies stimulate the kinase encoded by the neu protooncogene in living cells but the oncogenic mutant is constitutively active*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(7): p. 2569-73.
13. Honegger, A.M., et al., *Point mutation at the ATP binding site of EGF receptor abolishes protein-tyrosine kinase activity and alters cellular routing*. Cell, 1987.

- 51(2): p. 199-209.
14. Glenney, J.R., Jr., et al., *Ligand-induced endocytosis of the EGF receptor is blocked by mutational inactivation and by microinjection of anti-phosphotyrosine antibodies*. Cell, 1988. **52**(5): p. 675-84.
 15. Yarden, Y. and J. Schlessinger, *Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation*. Biochemistry, 1987. **26**(5): p. 1434-42.
 16. Yarden, Y. and J. Schlessinger, *Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor*. Biochemistry, 1987. **26**(5): p. 1443-51.
 17. Hurwitz, E., et al., *Suppression and promotion of tumor growth by monoclonal antibodies to ErbB-2 differentially correlate with cellular uptake*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(8): p. 3353-7.
 18. Bodurka, D.C., et al., *Phase II trial of irinotecan in patients with metastatic epithelial ovarian cancer or peritoneal cancer*. J Clin Oncol, 2003. **21**(2): p. 291-7.
 19. Douillard, J.Y., et al., *Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial*. Lancet, 2000. **355**(9209): p. 1041-7.
 20. Negoro, S., et al., *Randomised phase III trial of irinotecan combined with cisplatin for advanced non-small-cell lung cancer*. Br J Cancer, 2003. **88**(3): p. 335-41.
 21. Noda, K., et al., *Irinotecan plus cisplatin compared with etoposide plus cisplatin for extensive small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2002. **346**(2): p. 85-91.
 22. Saltz, L.B., et al., *Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group*. N Engl J Med, 2000. **343**(13): p. 905-14.
 23. Hamaguchi, T., et al., *Phase I study of NK012, a novel SN-38-incorporating micellar nanoparticle, in adult patients with solid tumors*. Clin Cancer Res. **16**(20): p. 5058-66.
 24. Moon, S.J., et al., *Antibody conjugates of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) for targeted cancer chemotherapy*. J Med Chem, 2008. **51**(21): p. 6916-26.
 25. Rothenberg, M.L., et al., *Phase I and pharmacokinetic trial of weekly CPT-11*. J Clin Oncol, 1993. **11**(11): p. 2194-204.
 26. Slatter, J.G., et al., *Pharmacokinetics, metabolism, and excretion of irinotecan (CPT-11) following I.V. infusion of [(14)C]CPT-11 in cancer patients*. Drug Metab Dispos, 2000. **28**(4): p. 423-33.
 27. Guichard, S., et al., *CPT-11 converting carboxylesterase and topoisomerase activities in tumour and normal colon and liver tissues*. Br J Cancer, 1999. **80**(3-4): p. 364-70.

28. Atyabi, F., et al., *Preparation of pegylated nano-liposomal formulation containing SN-38: In vitro characterization and in vivo biodistribution in mice*. Acta Pharm, 2009. **59**(2): p. 133-44.
29. Carter, P.J. and P.D. Senter, *Antibody-drug conjugates for cancer therapy*. Cancer J, 2008. **14**(3): p. 154-69.
30. Austin, C.D., et al., *Oxidizing potential of endosomes and lysosomes limits intracellular cleavage of disulfide-based antibody-drug conjugates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(50): p. 17987-92.
31. Lewis Phillips, G.D., et al., *Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate*. Cancer Res, 2008. **68**(22): p. 9280-90.
32. Sutherland, M.S., et al., *Lysosomal trafficking and cysteine protease metabolism confer target-specific cytotoxicity by peptide-linked anti-CD30-auristatin conjugates*. J Biol Chem, 2006. **281**(15): p. 10540-7.
33. Coyne, C.P., T. Jones, and T. Pharr, *Synthesis of a covalent gemcitabine-(carbamate)-[anti-HER2/neu] immunochemotherapeutic and its cytotoxic anti-neoplastic activity against chemotherapeutic-resistant SKBr-3 mammary carcinoma*. Bioorg Med Chem. **19**(1): p. 67-76.
34. 設楽研也, *癌の抗体療法*. Drug Delivery System, 2003. **18**(4): p. 377-384.
35. Miyamoto, R., et al., *Enhanced target-specific accumulation of radiolabeled antibodies by conjugating arginine-rich peptides as anchoring molecules*. Bioconjug Chem. **21**(11): p. 2031-7.
36. Wakankar, A.A., et al., *Physicochemical stability of the antibody-drug conjugate Trastuzumab-DM1: changes due to modification and conjugation processes*. Bioconjug Chem. **21**(9): p. 1588-95.
37. Guiotto, A., et al., *Synthesis, characterization, and preliminary in vivo tests of new poly(ethylene glycol) conjugates of the antitumor agent 10-amino-7-ethylcamptothecin*. J Med Chem, 2004. **47**(5): p. 1280-9.
38. Monfardini, C. and F.M. Veronese, *Stabilization of substances in circulation*. Bioconjug Chem, 1998. **9**(4): p. 418-50.
39. Graus-Porta, D., et al., *ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling*. EMBO J, 1997. **16**(7): p. 1647-55.
40. Bange, J., E. Zwick, and A. Ullrich, *Molecular targets for breast cancer therapy and prevention*. Nat Med, 2001. **7**(5): p. 548-52.
41. Siegel, P.M., et al., *Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenic mice: implications*

- for human breast cancer*. EMBO J, 1999. **18**(8): p. 2149-64.
42. Chaudry, M.A., et al., *EpCAM an immunotherapeutic target for gastrointestinal malignancy: current experience and future challenges*. Br J Cancer, 2007. **96**(7): p. 1013-9.
 43. Went, P., et al., *Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers*. Br J Cancer, 2006. **94**(1): p. 128-35.
 44. Lie, D.C., et al., *Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis*. Nature, 2005. **437**(7063): p. 1370-5.
 45. Maetzel, D., et al., *Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(2): p. 162-71.
 46. Denzel, S., et al., *Initial activation of EpCAM cleavage via cell-to-cell contact*. BMC Cancer, 2009. **9**: p. 402.
 47. Tang, N., P. Tornatore, and S.R. Weinberger, *Current developments in SELDI affinity technology*. Mass Spectrom Rev, 2004. **23**(1): p. 34-44.
 48. Austin, C.D., et al., *Endocytosis and sorting of ErbB2 and the site of action of cancer therapeutics trastuzumab and geldanamycin*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(12): p. 5268-82.
 49. Li, B., et al., *Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma*. Biochem Pharmacol, 2005. **70**(11): p. 1673-84.

【謝辞】

研究室として所属した国立がんセンター東病院臨床開発センターがん治療開発部部長松村保広先生には公私ともにご指導頂き大変感謝しております。また、がん治療開発部の安永正浩先生、黒田順一郎先生、古賀宣勝先生、高橋遍先生、大橋健也さん、小池浩代さん、瀧ヶ平美里さん、本田玲子さんには研究を始め多くのことをご指導して頂き、また椎名薫さん、嶋田真美子さん、進藤博子さんには生活面においても多くのサポートをして頂きました。心より感謝しております。抗体付加用 SN-38 を合成して下さった理化学研究所の眞鍋先生へ感謝申し上げます。

また、同研究科の稲塚歩佳さん、小野塚博子さん、齋藤洋平さん、藤澤優さん、星野歩子さん、須藤夏希さん、千葉政子さん、佐藤隆太君、伊藤傑君、天野芳隆、鈴木牧人君、松島洸達君、には心より感謝しております。皆さんがいたからこそ研究室での生活が有意義で楽しいものになりました。

そして、研究室の同期の久田洋平君、今野まつみさんとは研究生活を切磋琢磨し、常に私を支えてくれました。共に研究生活を送れたことを大変嬉しく思っています。ありがとうございました。

最後になりましたが、24年間私を支え続けてくれた両親にも心から感謝の意を表して謝辞と致します。