

論文の内容の要旨

論文題目 抗組織因子抗体の膵臓がんに対する有用性

氏名 津村 遼

第1章 序論

膵臓がんは予後不良な固形腫瘍の一つであり 5 年生存率が 6.7% (2004~2010 年、NCI) と低い。そのため、膵臓がんの治療法開発に対する意義は高い。膵臓がんに対する治療薬開発を行う上では、腫瘍組織への効率的な薬剤送達と副作用の軽減という二つの観点から、Drug Delivery System (DDS) が重要な戦略となる。近年、抗体はその抗原特異性から、腫瘍組織への選択的な薬剤送達を可能にする DDS ツールとして注目されている。それゆえ、膵臓がんに対する有望な新規抗体の研究開発は臨床への多大なる貢献が期待出来る。

我々は、腫瘍組織のターゲット抗原として外因系血液凝固の開始因子である組織因子 (TF; Tissue factor) に着目した。TF は膵臓がんを含む多くのがん細胞膜表面上に過剰発現が認められ、腫瘍間質細胞においても発現亢進が報告されている。また、TF はがんの成長や転移、血管新生、悪性度と関連することが示唆されている。このような TF とがんの関係性から、我々は TF が有望な腫瘍組織のターゲットになりえると考え、膵臓がんの治療応用を目指した抗 TF モノクローナル抗体の研究開発を行ってきた。

DDS ツールとしての抗体開発を行う上では、診断と治療の両面への応用を行う事が重要であると考えられる。本研究では、第2章で前者 (特に画像診断への応用)、第3章で後者への抗TF抗体の有用性を評価した。

第2章 抗TF抗体画像診断への応用

一般に、抗体を用いた体内診断にはポジトロン断層法 (PET) や単一光子放射断層撮影 (SPECT)、核磁気共鳴画像法 (MRI) などの画像診断法が用いられる。明瞭な画像の取得や副作用の軽減という観点から、診断薬は腫瘍組織へ迅速かつ選択的に集積し、同時に素早く生体内から排出される事が求められる。しかし、一般にIgGは高い血中滞留性を示すため、体外への排出が遅く、腫瘍部と正常部のコントラスト比が高くなるまでに抗体診断薬を投与してから数日を要する。

その解決策の一つが IgG の低分子化である。低分子化した抗体は、Fc ドメインの欠如やサイズ変化によって生体内で示す挙動が大きく変化する。しかし、低分子化したことによる影響 (アフィニティーや安定性) は抗体ごとに異なるため、各抗体において低分子化抗体の有用性を評価する必要がある。

そこで、本研究では抗 TF IgG と抗 TF Fab (以降、Fab) の *in vitro* 及び *in vivo* における性状解析を行い、Fab の画像診断への有用性を検討することを目的とした。

【結果・考察】

(a) *in vitro* における性状解析

抗 TF IgG と Fab の Surface Plasmon Resonance (SPR) 解析の結果、両者ともに TF 抗原に対して高い結合活性を持ち、また Fab は抗 TF IgG よりも抗原から解離しやすい事が示唆された。Flow Cytometry (FCM) 解析では、抗 TF IgG と Fab は TF 高発現ヒト膵臓がん細胞株 BxPC3 に対して抗体濃度依存的な結合性を示した。

(b) *in vivo* における性状解析

蛍光標識した抗TF IgGとFabをBxPC3皮下移植モデルマウスへそれぞれ尾静脈投与した結果、抗TF IgGは高い血中滞留性と長時間に渡る腫瘍部集積性を示した。一方、Fabは迅速に腫瘍部に集積後、数時間で体外へ排出された。

また、腫瘍部と非腫瘍部の蛍光強度比 (TBR; tumor-to-background ratio) を抗 TF IgG と Fab で比較した結果、抗 TF IgG と Fab はそれぞれ蛍光標識抗体投与 24 時間後と 12 時間後に TBR のピークが得られた。すなわち、抗 TF IgG と比較して、Fab は投与後に、より早い時間で TBR のピークが得られる事が示された。

このようなマウス生体内における抗TF IgGとFabの動態の違いは、分子サイズによる排出・代謝経路 (IgGは肝臓、Fabは腎臓) やFcドメインの有無による血中安定性、抗原からの解離速度が起因していると考えられる。

以上の結果から、抗 TF Fab は抗 TF IgG と比較して、短時間での画像診断が可能であり、有効な画像診断薬の DDS ツールになりえる事が示唆された。一方で、抗 TF IgG は長時間にわたって高い腫瘍集積性を示すことから、治療目的の DDS ツールに適することが示唆された。

第3章 抗TF抗体の治療への応用

近年、SGN-35やT-DM1といった抗体抗がん剤複合体（ADCs; antibody-drug conjugates）の承認により、抗体のがん治療応用法としてADCsの研究開発が注目を集めている。この背景には、有効な抗体の開発の他に、抗体と薬剤を繋ぐLinkerテクノロジー進歩やADCsに用いる抗がん剤の最適化が寄与している。前章より示唆された、抗TF IgGは治療応用に適するという結果から、本章では抗TF ADCの有用性検討を行った。

先行研究において、我々は既に抗TF ADCが高い腫瘍増殖抑制効果を持つことを示した。しかし、ADCsの抗腫瘍効果を高めるためには、抗体やLinker、薬剤の最適化が求められる。これまで、Linkerや薬剤に関する詳細な検討は多く報告されてきたが、ADCsに適した抗体の性状に関する報告は少ない。

よって本研究では、同一のLinker（Maleimide-PEG₁₂-Valine-Citrulline）と薬剤（MMAE; monomethyl auristatin E）を用いて4種類の抗TF ADCsを作製し、抗体の性状とADCsの性状及び抗腫瘍効果を比較検討し、ADCsに適した抗体の性状を明らかにする事を目的とした。

【結果・考察】

(a) 抗体の選別

ADCsに用いる抗体の選別のために、当研究室が樹立した10種類の抗TF IgGを用いてELISAとFCMを行った。その結果、両解析において高い結合活性を示したのは3クローンであった。これらのSPR解析の結果、clone no.Z > X > Yの順で高い結合力を持ち、同様の順でTF抗原から解離しにくい性質を持つ事が示された。

以上より、ADCsに用いるクローンとして、上記の3クローンを用いることとした。また、negative control抗体としてELISAで反応性を示さなかったclone no.Wを用いた。

(b) *in vitro*におけるADCsの性状解析

各IgGを還元処理後に、IgGのチオール基とLinkerのマレイミド基を反応させ、MMAEの付加を行った。作製したADCsのSDS-PAGEの結果、全てのADCsにおいて還元処理の影響による断片化が見られた。しかし、ELISAではADC化による結合活性への顕著な影響は見られなかった。

BxPC3を用いて各ADCの殺細胞効果及びinternalization効率を解析した結果、3クローンのADCs (clone no.X, Y, Z) はcontrol ADCと比較して顕著に高い殺細胞効果、及びinternalization効率を示した。一方で、これら3クローンのADCの間には、*in vitro*の性状において顕著な差異が見られなかった。

(c) *in vivo*におけるADCsの抗腫瘍効果

まず、BxPC3皮下移植モデルマウスを用いて、腫瘍サイズが200 mm³に達した時点で各薬剤を尾静脈投与した。その結果、3クローンのADCs (clone no.X, Y, Z) の投与群はその他の群と比較して有意に高い腫瘍増殖抑制効果を示した。また、これら3クローンのADCsでは有意差が見られなかった。これは、*in vitro*の結果と一致する結果であった。

次に、同様の方法で腫瘍サイズが 600 mm^3 に達した時点で投与を開始した。その結果、これまで同様に3クローンのADCs (clone no.X, Y, Z) の投与群は他の投与群と比較して顕著に腫瘍増殖抑制効果を示した。しかし、治療開始後初期において、ADC (clone no.Y) 投与群はADC (clone no.Z) 投与群よりも有意に高い抗腫瘍効果を示した (投与開始後3日目; $p < 0.05$, 7日目; $p < 0.01$)。

我々はこの要因としてIgGの解離速度定数に着目した。すなわち、抗原から解離しにくいADC (clone no.Z) は血管から漏出後に腫瘍組織の辺縁部の抗原にトラップされ、腫瘍組織内部まで浸透しづらいと考えられる (図1左)。一方で、抗原から解離しやすいADC (clone no.Y) は辺縁部の抗原に結合後、より早く解離することで腫瘍組織内部まで浸透しやすいと考えられる (図1右)。その結果、ADC (clone no.Y) はADC (clone no.Z) よりも腫瘍内部まで薬剤を送達する事が可能となり、投与後初期において高い抗腫瘍効果を示したと推察した。

この仮説を証明するために、蛍光標識したIgG (clone no.Y) とIgG (clone no.Z) をBxPC3皮下移植モデルマウスにそれぞれ尾静脈投与して、投与後3時間後に腫瘍組織を摘出した。腫瘍組織の蛍光免疫染色の結果、IgG (clone no.Y) の方がIgG (clone no.Z) よりも腫瘍内部まで浸透している事が示唆された。

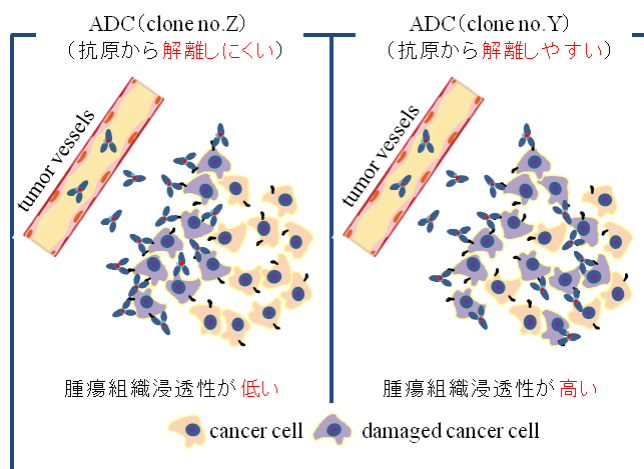


図1. 解離速度定数の違いによる腫瘍組織浸透性

以上の結果から、IgGの解離速度定数が、ADCs作製においてIgG性状の重要な要素になる可能性が示唆された。これは抗TF ADCのみならず、他のADCsをデザインする際のIgGのクローン選択にも有用な知見になる事が期待される。

本研究の総括

本研究において、(1) 抗TF Fabは抗TF IgGと比較して、投与後短時間で撮影が可能であるため、画像診断のDDSツールとして有用である、(2) 抗TF ADCはヒト膀胱がん細胞株BxPC3の皮下移植モデルマウスにおいて、腫瘍増殖抑制効果を示す、(3) IgGの解離速度定数が、ADCs作製においてIgGの性状の重要な要素になる、という3点の結論が示唆された。