

リレー・フォー・ライフ プロジェクト研究助成金報告書

【テーマ】 難治性固形腫瘍を標的にした抗間質抗体・抗がん剤複合体の開発

【研究者】 安永正浩

【所属機関】 国立研究開発法人がん研究センター・先端医療開発センター・新薬開発分野

【研究の概要】

難治性がんである膵臓がんを対象にして、抗体デリバリーに影響を与える因子についての解析を行った。さらに、従来の抗細胞抗体・抗がん剤複合体とCAST(Cancer stromal targeting)療法剤である抗間質抗体抗がん剤複合体との薬理・薬効性の違いを、悪性リンパ種を対照にして、ヒトがん細胞皮下移植モデルで比較検討した。その結果、抗体の細胞内internalizationの低下と豊富な間質成分(間質バリア)が難治性がんの治療抵抗因子として存在することが示された。治療実験においては、悪性リンパ種モデルではCAST療法も一定の有効性を示したが、抗細胞抗体・抗がん剤複合体の方が強い抗腫瘍効果を認めた。一方、膵臓がんモデルでは、CAST療法が優れた抗腫瘍効果を示したが、抗細胞抗体抗がん剤複合体の効果は限定的であった。以上より、抗体の細胞内internalization効率、間質の構成成分やその多寡により抗体・抗がん剤複合体のドラッグデザインを選択する必要があるが、難治性がんの場合は、CAST療法剤が第一選択になるものと思われた。さらに、膵臓がん同所移植モデルマウスでもCAST療法剤の有効性を確認することができた。また、KRas、TP53変異による自然発がん系の膵臓がん遺伝子改変モデルマウスにおいても、蛍光標識抗間質抗体が腫瘍間質に効果的にデリバリーされていた。このように、ヒトがん病態に極めて類似した2種類の膵臓がんモデルにおいても、CASTの有効性が示された。引き続き、CAST療法剤の早期臨床応用を目指して研究開発を継続していく予定である。

【背景】

CAST療法とは、がん細胞を直接狙ったミサイル療法剤である抗細胞抗体・抗がん剤複合体ではなく、がん間質を標的にしたユニークな発想の抗体・抗がん剤複合体である。抗細胞抗体・抗がん剤複合体はがん細胞に取りこまれた後に抗がん剤をリリースできるように設計されている。ところが、脳腫瘍、スキルス胃がん、膵臓がん等の難治性がんにおいては、厚い間質の存在により抗体の腫瘍内浸透性は阻害されている。この間質バリアの存在下では、抗体・抗がん剤複合体はがん細胞まで到達できないので、抗体に付加された薬剤はリリースされずにその効果を発揮することができない。一方、CAST療法剤においては、抗体自体はがん細胞まで到達する必要がない。抗間質抗体によりがん間質に集積した場所から細胞外で抗がん剤がリリースされる設計になっている。低分子の薬剤は間質バリアの影響が少なくがん細胞まで到達可能であり、その薬効を十分に示すことができる。したがって、間質が多い難治性がんに対しても効果を発揮することができる。薬効としては、腫瘍細胞への直接的殺細胞効果に加え、強力な腫瘍血管新生抑制作用を有するのが大きな特徴である。これまでに、抗コラーゲン4抗体と抗フィブリン抗体を用いたCAST療法剤の開発に成功している(文献1-4)。一方で、抗HER2抗体に抗がん剤エムタンシンを付加した従

従来の抗細胞抗体・抗がん剤複合体が乳がんを対象にした臨床第3相試験でその有効性が証明された。乳がんのように血流の多い腫瘍では多少の間質が存在しても間質バリアの影響が少なく、従来型の抗細胞抗体・抗がん剤複合体でも効果的であることが示唆された。そこで、抗間質抗体・抗がん剤複合体である CAST 療法剤と従来の細胞標的性の抗細胞抗体・抗がん剤複合体との違いを、間質成分が異なる2種類の腫瘍モデル、1. 悪性リンパ種（血管が多く間質が少ない）モデルと、2. 膵臓がん（血管が少なく間質が多い）モデルで比較検討することにした。さらに、CAST 療法の効果を確認するために、膵臓がん同所移植モデルでの抗腫瘍効果と KRas、TP53 変異による自然発がん系の遺伝子改変モデルマウスでの抗体デリバリーの検証実験を行うこととした。

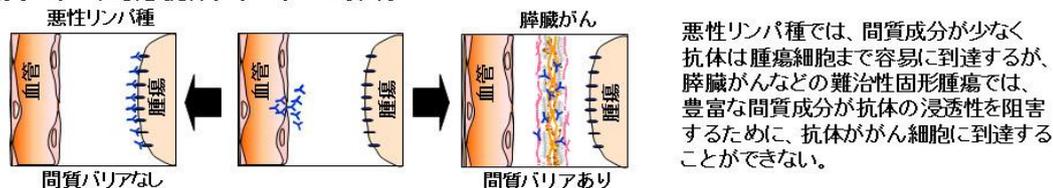
固形腫瘍における間質成分



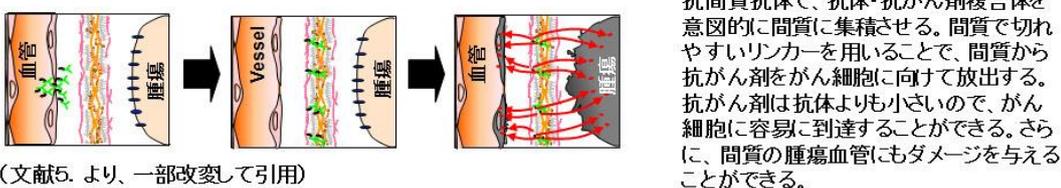
従来のミサイル療法剤(抗細胞抗体・抗がん剤複合体)と CAST療法剤(抗間質抗体・抗がん剤複合体)との比較

| 従来のミサイル療法剤 | 標的部位 | 結合リンカー | CAST療法剤 | 標的部位 | 結合リンカー |
|------------|--------------------------|--|---------|------------------------|--------------------------------------|
| | がん細胞表面分子 (HER2, EpCAMなど) | 1. 細胞内薬剤リリース 2. 細胞内酵素依存性 (ペプチド結合など) | | がん間質 (コラーゲン4, フィブリンなど) | 1. 細胞外薬剤リリース 2. 酵素非依存性 (エステル結合など) |

間質バリアによる抗体デリバリーの抑制



CAST療法の作用メカニズム



【研究の目的】

(1) 細胞内抗体internalization と血管と間質成分の多寡という、抗体デリバリーに影響を与えると思われる因子について難治性がんの特徴を明らかにする。(2) 従来の抗細胞抗体・抗がん剤複合体と抗間質抗体抗がん剤複合体を作製して、悪性リンパ種モデルと膵臓がんモデルに投与して効果の違いを比較検討する。(3) ヒト膵臓がん病態に近い膵臓がん同所移植モデルを自然発がん性の遺伝子改変モデルマウスを用いてCAST療法の有効性を

評価する。

【対象と方法】

(1) 悪性リンパ種などの血液性悪性腫瘍と乳がん、大腸がん、膵臓がんなどの固形腫瘍について、各細胞株を用いて、試験管内で蛍光標識抗体の細胞内取り込み (internalization) 効率の違いを比較検討した。抗細胞抗体として抗CD20抗体と抗EpCAM抗体を、CAST療法剤である抗間質抗体として抗コラーゲン4抗体を用いた。さらに、悪性リンパ種モデルと膵臓がんモデルを作製して、抗体デリバリーについて、腫瘍への到達性と腫瘍内部での浸透性を評価した。

(2) CAST療法として抗コラーゲン4抗体・SN-38 (抗がん剤・CPT-11の活性体) 複合体と従来の抗細胞ADC療法として抗CD20抗体・SN-38複合体、抗EpCAM抗体・SN-38複合体を作製した。前者は細胞外で非酵素的に薬剤をリリースできるようにエステル結合を用いた。また、後者は細胞内で酵素 (カルボキシエステラーゼ) 的に薬剤をリリースできるカルバメートを用いた。共に血中での安定性を保つため、ポリエチレングリコールを各結合部位に隣接させた。試験管内での薬剤リリース実験、試験管内での殺細胞効果、動物モデル (ヒトがん細胞の免疫不全マウス皮下移植モデル) での抗腫瘍効果を評価した。

(3) ヒトがん病態に近い膵臓がん同所移植モデルを作製して抗コラーゲン4抗体・SN-38複合体を投与して抗腫瘍効果を確認した。KRasとTP53変異による膵臓がん遺伝子改変モデルマウスに蛍光あるいは放射線標識した抗フィブリン抗体を投与して、腫瘍へのデリバリー効果を評価した。

【結果】

(1) 悪性リンパ種細胞株Ramos、RLに対して蛍光標識した抗CD20抗体は、投与後数時間から半日の間に、高いinternalization効率を示した。大腸がん細胞株HT29とすい臓がん細胞株SUIT2に蛍光標識した抗EpCAM抗体を投与したところ、予想に反して低いinternalization効率を示された。抗細胞抗体・抗がん剤複合体が血液性悪性腫瘍で有効で固形腫瘍で効果が低くなる原因のひとつに細胞内internalization効率の低下が挙げられた。

全身性のin vivoイメージングでは、悪性リンパ種と膵臓がんの両方において、抗細胞抗体の抗CD20抗体と抗EpCAM抗体は腫瘍選択的に集積していた。また、非特異性抗体もEPR(Enhanced Permeability and Retention)効果で腫瘍に対して受動的に集積するが、各特異抗体は、非特異抗体よりも長期に腫瘍に集積することが判明した。この結果から、能動的標的性はERP効果あるいは受動的標的性の上乗せ効果として作用するということが理解できた。ところが、蛍光抗体の腫瘍内部の浸透性の違いを比較検討すると両モデルで大きな違いが存在することが明らかになった。すなわち、悪性リンパ種モデルでは、蛍光抗体は腫瘍全体に浸透していたが、膵臓がんモデルでは、血管外漏出後、一部は腫瘍内部への浸透が見られたが、多くの蛍光抗体が腫瘍内部への浸透が抑制されていた。この結果は、膵臓がんモデルの場合には間質バリアによって抗体の腫瘍内部での浸透性が抑制されたこ

とによるものと理解された。

(2) 抗 CD20 抗体、抗 EpCAM 抗体には細胞内リリース型・カルバメート結合を、抗コラーゲン 4 抗体には細胞外リリース型・エステル結合を用いた SN-38 複合体を作製した。

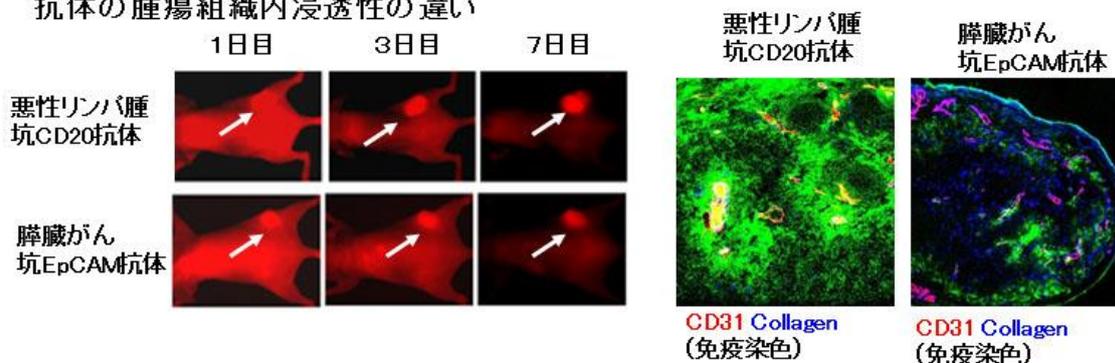
試験管内での薬剤リリース実験では、細胞内環境下のカルボキシエステラーゼ存在下では、エステル結合、カルバメート結合共に 80-90%以上の薬剤がリリースされた。一方、細胞外環境下の培養液中では、エステル結合は 90%以上の薬剤をリリースすることは出来たが、カルバメート結合は僅かにしかリリース出来なかった。エステル結合、カルバメート結合が各々細胞外リリース、細胞内リリースとして機能を発揮することが明らかになった。

試験管内での殺細胞効果では、悪性リンパ種細胞株では、抗 CD20 抗体・SN-38 複合体はフリーの SN-38 よりも低い濃度でがん細胞を障害した。抗 EpCAM 抗体・SN-38 複合体は膵臓がん細胞株において、一定の細胞障害作用を有するものの、フリーの SN-38 よりも高い濃度を必要とした。抗コラーゲン 4 抗体・SN-38 複合体は、いずれの細胞でも有効な抗腫瘍効果を得るためには、フリーの SN-38 より高い濃度を必要としたが、培養液中には間質が存在しないので、参考値として記録した。

動物モデルでの抗腫瘍効果では、悪性リンパ種モデルでは、生理食塩水投与コントロール群に比較して、抗 CD20 抗体・抗がん剤複合体が著明な抗腫瘍効果を示した。その次に抗コラーゲン 4 抗体・抗がん剤複合体が強い抗腫瘍効果を示した。膵臓がんモデルでは、抗コラーゲン 4・SN-38 複合体が最も強い抗腫瘍効果を示した。抗 EpCAM 抗体・SN-38 複合体も有効性を示したが、効果は限定的であった。

(3) 膵臓がん同所移植モデルに抗コラーゲン 4 抗体・SN-38 複合体を投与した。生理食塩水投与群と CPT-11 投与群に比較して、有意に長い生存期間の延長を認めた。膵臓がん遺伝子改変モデルマウスに蛍光標識した抗フィブリン抗体を投与した。組織学的解析を行ったところ、膵臓がん部（病理組織学的に腺管がん）周囲のフィブリン強陽性の間質部に抗フィブリン抗体が選択的に強く集積していることを確認することができた。

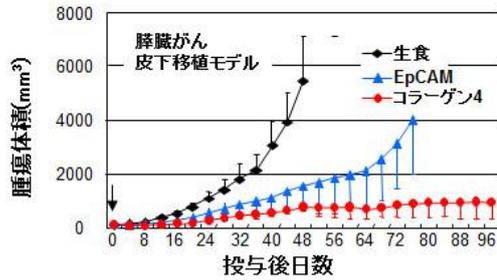
抗体の腫瘍組織内浸透性の違い



全身性のin vivoイメージングでは、抗細胞抗体は腫瘍全体(白矢印)に運ばれているようにみえるが、組織切片で詳しくみると、悪性リンパ種では緑色の抗体は腫瘍全体に広がっているが、膵臓がんでは、腫瘍の辺縁のみで内部への浸透性が悪いことがわかる。

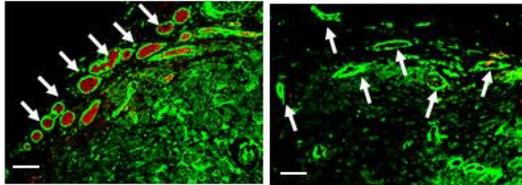
(文献5. より、一部改変して引用)

抗コラーゲン4抗体を用いたCAST療法剤の抗腫瘍効果と腫瘍血管障害作用



膵臓がん皮下移植モデルに対して抗コラーゲン4抗体・SN-38複合体(赤線部)が生食(黒線部)、抗EpCAM抗体・SN-38複合体(青線部)よりも、強い抗腫瘍効果を認めた。

無治療群 治療群



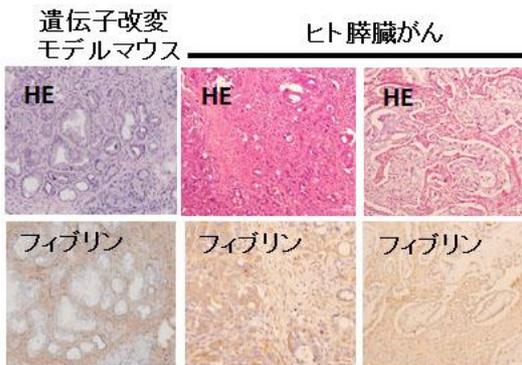
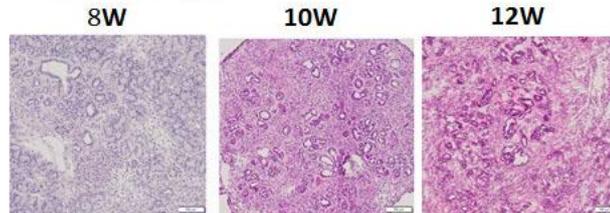
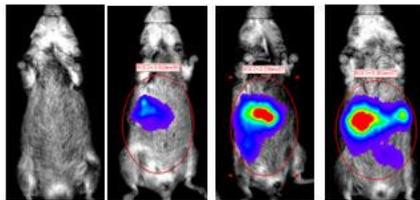
無治療群と抗コラーゲン4抗体・SN-38複合体で治療した群の腫瘍血管(白矢印)を比較すると、治療群でのみ著明な障害を認めることができた。(抗腫瘍血管障害作用が実証された。)

(文献3. より、一部改変して引用)

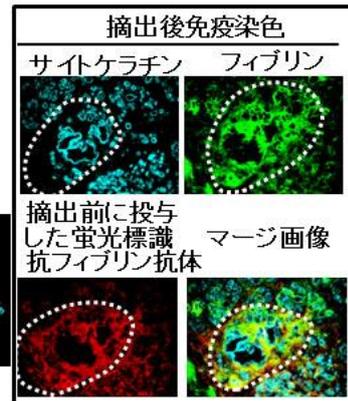
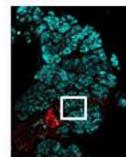
膵臓がん遺伝子改変モデルマウスと抗フィブリン抗体の腫瘍へのデリバリー効果

pPtf1a-Cre; 膵臓特異的プロモーター
支配下のCre蛋白発現
(膵臓特異的遺伝子スイッチオン)

LSL K-ras G12D; ドライバー変異遺伝子
LSL p53(R172H); がん抑制遺伝子



抗フィブリン抗体の特異的集積性



遺伝子変異、発症形式、病理組織がヒト膵臓がん類似した究極のヒト膵臓がんモデルである膵臓がん遺伝子改変モデルマウスを、安定的に動物実験として利用することが出来るようになった。蛍光標識した抗フィブリン抗体を投与して、膵臓がんの間質に特異的に集積していることを確認することが出来た。

【考察】

Milstein C と Köhler G のモノクローナル抗体作製法の発見以来、魔法の弾丸としての抗体医薬の治療への応用を目指した研究が本格的に始まった。1990 年代になり、キメラ抗体やヒト化抗体などの抗体エンジニアリングの発展と共に臨床開発上の問題点が克服されて、多くの抗体医薬が臨床導入される結果となった。抗体に抗がん剤を付加した抗体・抗がん剤複合体も、抗体エンジニアリングの発展と抗体医薬の成功が起爆剤となり臨床開発が進み、本年度に抗 HER2 抗体に抗がん剤エムタンシンを付加した T-DM1 の再発性乳がんへの有効性が証明され、FDA で承認申請されたことは記憶に新しい。今後、多くの抗体医薬と抗体・抗がん剤複合体の臨床応用が進むものと思われるが、開発時に適応疾患と抗体やドラッグデザインの選択が大変重要になってくるものと思われる。T-DM1 の場合は、第一に適応が HER2 陽性の乳がん患者に限られているということである。さらに、乳がんは組織学的に腫瘍血管が豊富で血流が多く、多少の間質が存在しても間質バリアの影響は少なく、抗 HER2 抗体を含む抗細胞抗体を用いた従来の抗体・抗がん剤複合体が効果を発揮しやすいがん種であったということである。一方、膵臓がんなどの難治性固形腫瘍では、本実験(1)が示すように、間質バリアによって抗体の腫瘍内浸透性が低下しており、薬剤ががん細胞まで到達できないので、その効果を十分に発揮することができない。間質バリアは①間質内の細胞成分や蛋白質による物理的通過障害、②convection や diffusion といった薬理的浸透性障害、③血管から腫瘍細胞への到達距離の延長による送達障害といった複合的な要素により抗体の腫瘍内浸透性を障害しているものと考えている。また今回の実験(1)から明らかになったように、細胞内 internalization 効率の低下も治療抵抗性の大きな一因となり得る。したがって、間質の構成成分やその多寡と共に抗体の細胞内 internalization 効率を加味して抗体・抗がん剤複合体のドラッグデザインを選択する必要があると思われる。

CAST 療法剤は、抗間質抗体をドラッグデリバリーシステム(DDS)製剤のキャリアとして応用したものである。抗体はサイズが 10-20nm であり EPR(Enhanced Permeability and Retention)効果を強く示すことで腫瘍選択的に集積することができる。さらに、抗体のもつ能動的標的性で長く腫瘍に集積することができる。この場合、間質が多いほど抗体は集積しやすく、薬剤を運ぶ DDS キャリアとして有効に作用することができる。また、薬剤の放出も細胞外で徐々に行われるように上手く設計されている。一方、抗細胞抗体・抗がん剤複合体は、細胞内に取り込まれて細胞内酵素の作用により薬剤が放出される設計になっている。したがって、間質が多いほど、抗体・抗がん剤複合体はがん細胞に到達しにくくなるので、薬剤放出上も不利という訳である。この薬効の違いを今回の実験(2)で示すことができた。さらに、実験(3)のヒトがん病態に極めて類似した2種類の膵臓がんモデルで、CAST 療法の有効性を確認することができた。膵臓がんの場合、遺伝子改変モデルマウスに加えヒトの臨床組織検体の免疫染色結果からも、コラーゲン4よりもフィブリンの方が間質に豊富に存在することが明らかになった。したがって、現時点では膵臓がんに対する抗間質抗体はコラーゲン4よりもフィブリンが有効と判断している。現在、製剤の最適

化と性能評価を重ねながら、ヒト膵臓がんモデルである遺伝子改変モデルマウスでの治療効果の確認を行っているところである。引き続き、CAST 療法剤の早期臨床応用を目指した研究開発を継続していく予定である。

【文献】

1. Matsumura Y. Cancer stromal targeting (CAST) therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012; 64: 710–9.
2. Yasunaga M, Manabe S, Matsumura Y. New concept of cytotoxic immunoconjugate therapy targeting cancer-induced fibrin clots. *Cancer Sci.* 2011; 102: 1396–402.
3. Yasunaga M, Manabe S, Tarin D, Matsumura Y. Cancer–stroma targeting therapy by cytotoxic immunoconjugate bound to the collagen 4 network in the tumor tissue. *Bioconjug Chem.* 2011; 22: 1776–83.
4. Yasunaga M, Manabe S, Tarin D, Matsumura Y. Tailored immunoconjugate therapy depending on a quantity of tumor stroma. *Cancer Sci.* 2013; 104: 231–7.
5. Yasunaga M, Manabe S, Matsumura Y. Tumor stromal barrier and cancer stromal targeting therapy. *Microvascular Reviews and Communications.* 2013; 6: 2–8.
6. Hisada Y, Yasunaga M, Hanaoka S, Saijou S, Sugino S, Tsuji A, Saga T, Tsumoto K, Manabe S, Kuroda J, Kuratsu J, Matsumura Y.. Discovery of an uncovered region in fibrin clots and its clinical significance. *Sci Rep.* 2013, 3, 2604.
7. Sato R, Obonai T, Tsumura R, Tsumoto K, Koga Y, Yasunaga M, Matsumura Y. Preparation and characterization of anti-tissue factor single-chain variable fragment antibody for cancer diagnosis. *Cancer Sci.* 2014, 105, 1631–7.