

抗体薬物複合体を用いた光治療開発研究

名古屋大学高等研究院・医学系研究科呼吸器内科

s-YLC 特任助教 佐藤和秀

米国がんセンター・米国立衛生研究所

主席研究員 小林久隆

研究の背景・目的

近赤外光線免疫療法(NIR-PIT)は抗体に光感受物質の IR700 を結合させ、標的細胞に結合後に近赤外光を照射し、標的細胞を特異的に破壊する方法であり、EGFR 蛋白を標的とした頭頸部癌に対して、国際第3相臨床試験が行われている[1]。NIR-PIT の機序は解明されつつあり、近赤外光により IR700 が親水性から疎水性に変化し、抗体が凝集することで細胞膜を破壊し、液体が細胞内に入ることで細胞を破壊することが報告されている。しかし、副次的効果については未だ議論の余地がある[2]。

EPR効果とは、腫瘍組織では血管支持組織が存在しないため、血管間隙より薬剤が漏出し、かつ、リンパ系の発達不良により薬剤が腫瘍内に蓄積する現象である。しかし、通常 EPR 効果の影響は腫瘍学において限られた効果である[3], [4]。

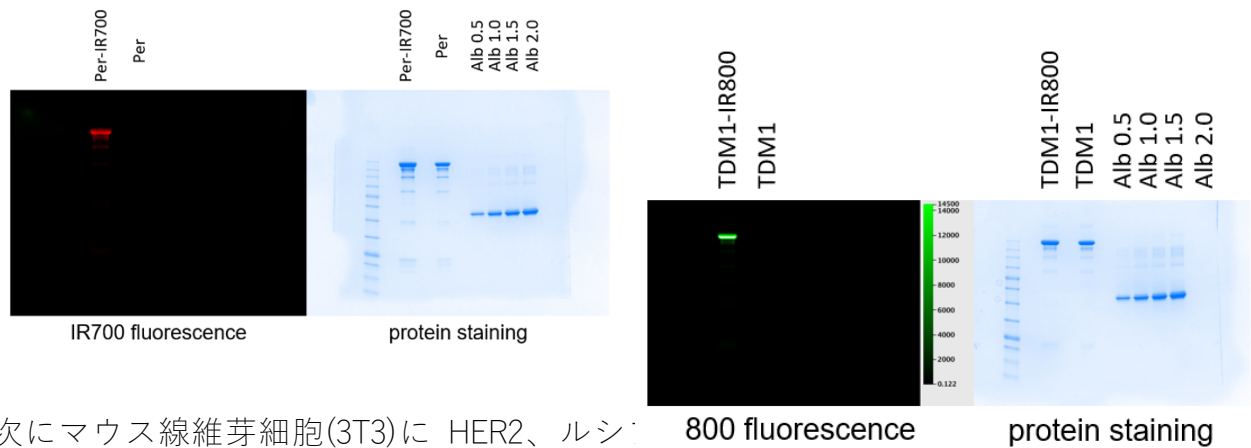
NIR-PIT は某血管腫瘍の細胞を破壊することで、血管透過性を亢進させ EPR 効果を増幅する。薬剤を投与するのみの場合と比較して、薬剤濃度と抗腫瘍効果の向上が報告されている[5]。しかし、NIR-PIT と薬剤投与の順序による効果の検討をした報告はない。

今回我々は NIR-PIT による EPR 効果を検討するため、抗 HER2 抗体（ペルツズマブ）を用いた NIR-PIT と、抗癌剤 HER2 抗体複合体（トラスツマブ エムタンシン）を用いた化学療法の投与順序による抗腫瘍効果の比較を行った。

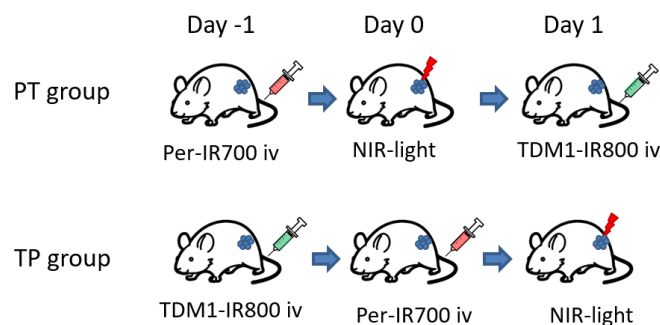
研究の対象ならびに方法

抗 HER2 抗体ペルツズマブに水溶性光感受物質である IRDye 700DX(IR700)を conjugate して、Per-IR700 を作成した。同様に抗 HER2 抗体薬物複合体のトラスツマブ エムタンシンに IR800 を conjugate して、TDM1-IR800 を作成した。抗体と IR700, IR800 の conjugate はこれまでの報告に則って行った。まず、作成した Per-IR700 と Per、TDM1-IR800 と TDM1

を用いて電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、蛋白染色、及び IR700、IR800 の蛍光の確認を行って、抗体と色素の conjugate を確認した。4)5)



次にマウス線維芽細胞(3T3)に HER2、ルシ (3T3/HER2-Luc-GFP)を用いて、ヌードマウスの皮下腫瘍移植モデルを作成し、Per-IR700 による NIR-PIT と TDM1-IR800 の注射を、PIT→TDM1 群(以下 PT 群)と TDM1→PIT 群(以下 TP 群)にわけて評価した。週齢8週の有胸腺ヌードマウスの臀部にそれぞれ 2×10^6 cells / 100uL の 3T3/HER2-Luc-GFP を皮下注射した。PT 群は移植後8日目に Per-IR700 100ug を尾静脈から経静脈的に全身投与し、9日目に 50J /cm² の NIR light を皮下腫瘍の部位に照射し、10日目に TDM1-IR800 100ug を尾静脈から経静脈的に全身投与した。TP 群は移植後8日目に TDM1-IR800 100ug を尾静脈から経静脈的に全身投与し、9日目に Per-IR700 100ug を尾静脈から経静脈的に全身投与し、10日目に 50J /cm² の NIR light を皮下腫瘍の部位に照射した。24日目まで IR700、IR800 の集積、腫瘍体積を測定した。腫瘍長径が 15mm を超えたマウスはイソフルラン麻酔後に CO₂ で安楽死させて、生存曲線を求めた。IR700、IR800 の観察、定量評価には Pearl Trilogy を用いた。統計的解析、AUC 測定は GraphPad Prism で解析をおこなった。



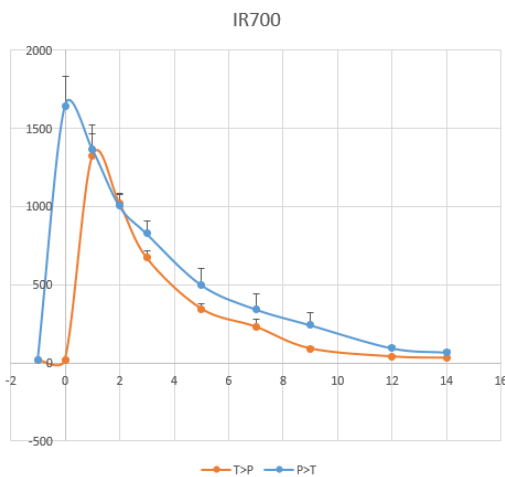
研究結果

初回薬剤投与日 (移植後8日目) を day -1 として、解析を行った。PT 群と TP 群で解析し

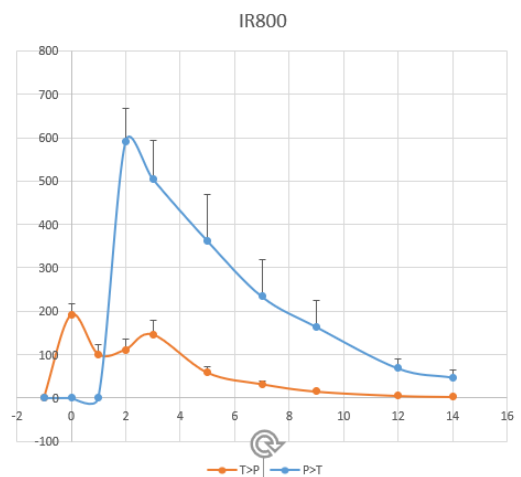
研究実績報告書

た。IR700 の AUC は PT 群の方が大きく (PT vs TP: 172634 vs 104993 (A.U.))、また、IR800 については PT 群の方が 3.6 倍大きかった (PT vs TP: 65765 vs 18157 (A.U.))。

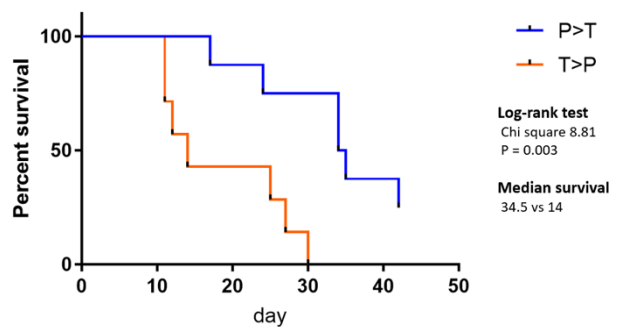
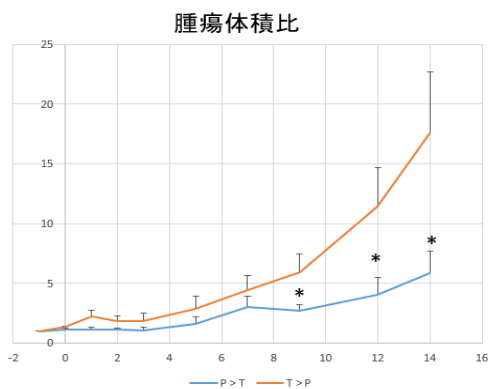
腫瘍体積は、腫瘍長径(length) × 腫瘍短径(width)² × 0.5(mm³)で算出し、day -1 の体積との比で比較したところ、day 9 から PT 群で有意な縮小を認めた (n=7, p<0.05)。また、生存は PT 群の方が有意に長かった (PT vs TP: 34.5 vs 14 日, p<0.05 (Log-rank test))。



AUC
 P>T: 172634 (95%CI 130805-214463)
 T>P: 104993 (95%CI 82014-127973)



AUC
 P>T: 65765 (95%CI 34343-97188)
 T>P: 18157 (95%CI 12410-23904)



考察

今回の研究では、NIR-PIT による EPR 効果の抗腫瘍効果を、NIR-PIT と化学療法の順序と治療効果を評価することで示した。既報による EPR 効果の検討はコントロールを NIR-PIT 単独または薬剤単独で検討しており、純粋な治療順序による抗腫瘍効果と予後を検討した本研究は貴重である。EPR 効果は血管間隙から薬剤が漏出するため、分子量が大きい物ほ

ど漏出しない。本研究では分子量の大きい抗癌剤 HER2 抗体複合体で検討し、これはほぼすべての抗癌剤で EPR 効果が期待できることを示している。今後は標本を作製しさらなる検討を行う予定である。

Reference

- [1] M. Mitsunaga, M. Ogawa, N. Kosaka, L. T. Rosenblum, P. L. Choyke, and H. Kobayashi, "Cancer cell-selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules," *Nat. Med.*, vol. 17, no. 12, pp. 1685–1691, 2011.
- [2] K. Sato *et al.*, "Photoinduced Ligand Release from a Silicon Phthalocyanine Dye Conjugated with Monoclonal Antibodies: A Mechanism of Cancer Cell Cytotoxicity after Near-Infrared Photoimmunotherapy," *ACS Cent. Sci.*, vol. 4, no. 11, pp. 1559–1569, 2018.
- [3] D. Kalyane, N. Raval, R. Maheshwari, V. Tambe, K. Kalia, and R. K. Tekade, "Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): Nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer," *Materials Science and Engineering C*, vol. 98, Elsevier Ltd, pp. 1252–1276, 2019.
- [4] Y. Matsumura and H. Maeda, "A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs," *Cancer Res.*, vol. 46, no. 8, pp. 6387–6392, 1986.
- [5] H. Kobayashi and P. L. Choyke, "Super enhanced permeability and retention (SUPR) effects in tumors following near infrared photoimmunotherapy," *Nanoscale*, vol. 8, no. 25, Royal Society of Chemistry, pp. 12504–12509, 2016.