

(海外特別研究員事業)

令和 3年 7月 29日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201960523

氏名 山口 藍子

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ヒューストン（国名： アメリカ合衆国）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

部位特異的 RI 標識「抗体-薬物複合体」を利用した放射免疫療法の開発

3. 派遣期間：平成 31年 4月 1日 ~ 令和 3年 6月 30日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名：テキサス大学ヘルスサイエンスセンター-ヒューストン校

部局名： Brown Institute of Molecular Medicine

5. 所期の目的の遂行状況及び成果...書式任意 書式任意（A4判相当3ページ以上、英語で記入も可）

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6.研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

1) Dual-drug antibody-drug conjugate (ADC)の開発

背景

抗体薬物複合体 (Antibody-drug conjugate, ADC) はがん化学療法薬の一種であり、近年高い注目を集めている。ADC は抗体の標的分子に対する高い親和性と特異性を利用し、腫瘍選択的に細胞殺傷性の薬剤を集積させることにより、従来の抗がん剤に比べ副作用を低減する一方で、高い治療効果と高い薬効の持続性を発揮することができる。実際、すでに 11 種類の ADC が米国食品医薬局に承認され、優れた臨床成績を収めている。しかしながら、同一腫瘍内における抗原発現強度の不均一性や薬剤排出ポンプの発現は、ADC の効果減弱に繋がることが知られており、さらなる分子設計の改善が求められている。そこで本研究では、乳がんの腫瘍不均一性克服を可能とする新しい ADC の開発を目的として、二種類の抗がん剤を搭載した dual-drug ADC を作製し、その有用性評価を行うこととした。後に、得られた技術的知見を基に、当初の目的である RI 標

た。その結果、いずれの dual-drug ADC も炎症誘発性サイトカインである TNF- α および IL-6 の産生は誘導しなかった。この結果から、各 dual-drug ADC は in vivo においても炎症反応を誘発することなく抗腫瘍効果を発揮できると期待される。

以上のことから、dual-drug ADC は HER2 発現の不均一な乳がんに対しても高い有効性を示す可能性が示唆された。これらの結果を受け、研修先研究室において非臨床薬物動態試験および in vivo における抗腫瘍効果の評価を実施した。複数の HER2 発現の不均一な乳がんモデルマウスを用いた治療実験において、dual-drug ADC は MMAF または MMAE の single drug ADC の同時投与群や市販薬である T-DM1、Enhertu に比べ高い抗腫瘍効果を発揮することが示された。以上の結果から、dual-drug ADC は腫瘍不均一性を有する乳がんに対する治療薬として有用であることが示された。本研究成果は英国科学誌 (Nature Communications (2021)12:3528, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23793>)にて公表された。

2) R-ADC の開発

背景

放射免疫療法 (radioimmunotherapy, RIT) は、ADC と同様に抗体の高い特異性を利用したがん治療法であり、抗体に搭載されたラジオアイソトープ (RI) が細胞障害作用を担う。しかしながら RIT は、血液系のがんに対して優れた臨床成績を収めている一方で、固形がんに対しては十分な治療効果は得られていない。このことから、RI 標識抗体の体内動態、腫瘍内不均一性の改善、さらに腫瘍の放射線感受性の向上など、様々な治療戦略が試みられてきた。しかしながら、近年 ADC 開発研究において得られた知見を RIT に応用した例は国内外において極めて少ない。そこで本研修では、新しい抗体医薬品「RI 標識 ADC (R-ADC)」を創出し、その有用性評価を行うことを目的とした。

1. R-ADC の構築および in vitro 評価

1) で得られた知見を踏まえ、R-ADC の開発に着手した。ヘテロリンカー修飾抗体に対して抗がん剤ユニットである trans cyclooctene (TCO)-MMAE を反応させた後、キレートユニットである Bn-CHX-A"-DTPA-PEG-DBCO (Bn-CHX-A"-DTPA: [(R)-2-Amino-3-(4-isothiocyanatophenyl)propyl]-trans-(5,5)-cyclohexane-1,2-diamine-pentaacetic acid; PEG: polyethylene glycol; DBCO: dibenzocyclooctyne) を反応させることによりキレート修飾 ADC を構築した。得られたキレート修飾 ADC に非放射性ルテチウム (^{175}Lu) を結合させ、in vitro での HER2 特異性および細胞殺傷効果を調べた。その結果、 ^{175}Lu -DOTA-ADC はキレートユニット未修飾コントロールである MMAE ADC DAR2 と同程度の HER2 特異性および細胞殺傷効果を持つことが示された。これらのことからキレート修飾は ADC の HER2 特異性、細胞殺傷効果に影響を与えないことが示された。

2. 標識条件検討

得られたキレート修飾 ADC を用いて放射性ルテチウム (^{177}Lu) 標識実験を行った。 ^{177}Lu は 6.7 日と比較的長い半減期を持つ β 線放出核種であり、核医学治療に汎用される。キレート修飾 ADC に対し ^{177}Lu を加え 37°C、1 時間インキュベートすることにより目的とする ^{177}Lu -ADC を 95%以上の放射化学的収率で得た。反応液を分子排除クロマトグラフィに付し、未反応の ^{177}Lu を除去することにより、 ^{177}Lu 標識 ADC を放射化学的純度 95%以上、比放射能約 4 mCi/mg で得ることに成功した。

3. 体内放射能分布実験

^{177}Lu 標識 ADC の体内動態を調べるため、 ^{177}Lu 標識 ADC または従来型の RI 標識抗体を担癌マウスに投与し、体内放射能分布を調べた。担癌マウスモデルとしては JIMT-1 (Trop2 +) 皮下移植モデルを使用した。非標的臓器において ^{177}Lu 標識 ADC および従来する方法で作製した ^{177}Lu 標識抗体はある程度類似した体内分布

識 ADC (R-ADC)の作製及び評価を行った。

1. Dual-drug ADC の構築

Monomethyl auristatin E (MMAE) は ADC に汎用される有糸分裂阻害剤であり、非常に高い細胞殺傷効果を有する。また、脂溶性が高く細胞膜を透過可能なため、ADC から遊離後周辺の細胞にも容易に拡散・浸透し、抗原非発現細胞をも攻撃することができる (バイスタンダー効果)。一方で、薬剤排出ポンプの基質になりやすいことが知られている。Monomethyl auristatin F (MMAF)は MMAE と同様に高い細胞殺傷効果を有するが、バイスタンダー効果を示さず、薬剤排出ポンプの基質となりにくい。そこで我々は MMAE と MMAF の両者を搭載した ADC を構築した。抗体としては抗 human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) 抗体である Trastuzumab を選択した。研修先の土釜研究室では、二つの異なる分子の定量的な導入を可能とする分岐型リンカーの開発に成功している。そこで本研究ではまず、さらに多くの薬剤を搭載可能とするため、二つのアジド基と一つのテトラジンを有する改良型の分岐型リンカー (トリリンカー) の開発を行った。このトリリンカーおよび従来型の二薬剤搭載可能な分岐型リンカーを用いて dual-drug ADC の構築を試みたところ、種々の薬剤抗体比 (drug-to-antibody ratio; DAR 2+2, 4+2, and 2+4) を有する ADC をほぼ定量的に得ることに成功した。続いて、各 ADC の *in vitro* での安定性および疎水性を調べた。各 ADC を疎水性クロマトグラフィに付し、それぞれの保持時間を調べたところ、比較的脂溶性の高い MMAE の搭載数に従って ADC の疎水性が上昇する傾向がみられたものの、どの ADC も類似した保持時間を示した。また、各 ADC (1mg/mL in PBS) を 37°C で一か月間インキュベートした後、分子排除クロマトグラフィにより分析したところ、最も疎水性の高い dual-drug ADC MMAE/F 4+2 を含むすべての ADC において 95%以上が未変化体として検出され、凝集体の生成は認められなかった。

2. HER2 特異性および細胞殺傷効果

以上の結果を受け、ヒト乳がん細胞を用いて各 ADC の *in vitro* における HER2 特異性および細胞殺傷効果を調べた。細胞としては、KPL-4 (HER2 ++), JIMT-1 (HER2 +), および MDA-MB-231 (HER2 -) を用いた。ELISA 法により各 ADC の細胞結合性を調べたところ、すべての ADC は KPL-4 細胞に対して未修飾の抗 HER2 抗体と同程度の結合能を示した。一方で、MDA-MB-231 細胞に対しては結合性を示さなかった。このことから、抗体の薬剤修飾は trastuzumab 本来の HER2 特異性に影響を与えず、開発された各 ADC は HER2 を標的とした新規治療薬剤として有望である可能性が示唆された。そこで、KPL-4、JIMT-1 および MDA-MB-231 細胞を用いて各 ADC の細胞殺傷効果を評価した。種々の濃度の ADC を添加し、3 日間インキュベート後の細胞生存率を WST-8 法により調べたところ、すべての ADC は HER2 陽性細胞である KPL-4 および JIMT-1 細胞に対して高い細胞殺傷効果を示した (IC50: 0.05 nM 程度)。一方で、HER2 陰性細胞である MDA-MB-231 細胞においては殺細胞効果を示さなかった。これらのことから、各 ADC は HER2 特異的に高い細胞殺傷効果を発揮できることが示された。

3. Ad-mixed model における細胞殺傷効果

HER2 発現の不均一な腫瘍における各 ADC の有効性を調べるため、HER2 発現の低い JIMT-1 と HER2 陰性である MDA-MB-231 細胞の共培養モデル (ad-mixed model) を用いて細胞実験を行った。その結果、バイスタンダー効果を有する MMAE が搭載された ADC (MMAE ADC DAR4, dual-drug ADC MMAE/F 4+2, dual-drug ADC MMAE/F 2+4) は MMAF のみで構成された ADC (MMAF ADC DAR4) に比べ高い細胞殺傷効果を示した。

4. 炎症反応試験

Dual-drug ADC の炎症反応誘発性の有無を確認するため、ヒト白血病細胞 THP-1 を用いて細胞実験を行っ

傾向を示した一方で、血液においては ^{177}Lu 標識 ADC は ^{177}Lu 標識抗体に比べ高い集積を示した。また、腫瘍においても有意に高い集積を示し、投与 72 時間後における ^{177}Lu 標識 ADC および ^{177}Lu 標識抗体の腫瘍集積はそれぞれ 27.3%ID/g および 7.4%ID/g であった。これは、 ^{177}Lu 標識 ADC では、部位特異的に RI 修飾されているため、従来型のランダム標識に比べ抗体本来の腫瘍特異性に与える影響が小さいことに起因すると考えられる。RIT の治療効果は腫瘍にトータルでどれだけ放射線が当たったか（腫瘍の吸収線量）に大きく依存するため、この結果は、 ^{177}Lu 標識 ADC が従来型の RI 標識抗体に比べ高い抗腫瘍効果を発揮できる可能性を示唆している。

4. 治療実験

得られた ^{177}Lu 標識 ADC の *in vivo* での抗腫瘍効果を調べるため、JIMT-1 担癌マウスに対して ^{177}Lu 標識 ADC または従来型の ^{177}Lu 標識抗体各 3 MBq を単回投与し、腫瘍増殖を経過観察した。コントロール群には MMAE DAR2 ADC 0.7 mg/kg を単回投与した。その結果、MMAE DAR2 または RI 標識抗体投与群では JIMT-1 腫瘍の増殖抑制が認められなかった一方、 ^{177}Lu 標識 ADC 投与群では腫瘍縮小効果が認められた。

以上の結果から ^{177}Lu 標識 ADC は従来型の ^{177}Lu 標識抗体に比べ高い抗腫瘍効果を示す可能性が示された。今後さらなる分子設計の改良に加え、*in vitro* および *in vivo* における評価を行い、国際学会発表および論文文化に向けた準備を進めて行く予定である。