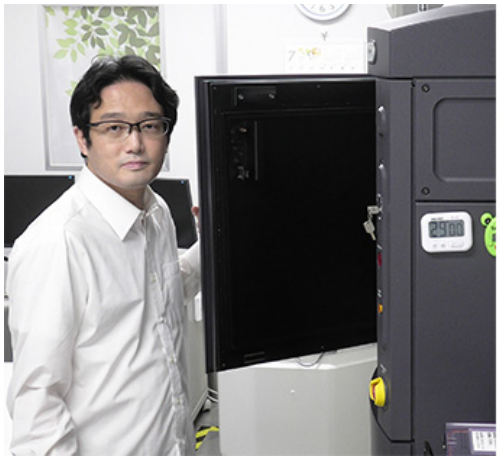
文部科学省マテリアル先端リサーチインフラ 令和 4 年度秀でた利用成果

光応答性 "Smart ADC" 開発

名古屋大学　佐藤 和秀，高橋 一臣
名古屋大学　湯川 博，馬場 嘉信



左から　佐藤 和秀（IVIS-Spectrum CT と），湯川 博

1．はじめに

がん治療は①外科②放射線③化学療法（抗がん剤）④がん免疫療法が開発され，がんを特異的に標的とする治療がそれぞれ理想として研究開発されてきた．なかでもがん分子標的治療として，遺伝子変異を標的とした低分子化合物，がん表面の特異的タンパク質の発現を標的とした抗体開発が進んでいる．第一世代としては抗体のみを用いて，抗体の Fc 部位を介した非特異的な効果である ADCC（Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity），CDC（Compliment Dependent Cytotoxicity）を期待したものが開発されたが，血液がん以外には効果が弱く改良が進められた．そうした開発の流れで，抗体を抗がん剤・放射線放出物質・光感受物質などで武装した“武装化抗体”が次世代型の抗体医薬として開発されている．これらは抗体と薬剤が結合した薬という意味の Antibody　Drug Conjugate（ADC）と呼ばれている．ADC は抗体に Linker と呼ばれる抗体と薬剤を結びつける構造体を介して，抗体に薬剤（抗がん剤）を付加するのが一般的で，抗がん剤以外に放射線物質や光感受物質を付加したものもある（**図 1**）．抗がん剤 ADC 開発は，がん標的治療の薬剤として臨床腫瘍学の分野でホットトピックになっており，日本では 5 種類が認可されている．世界中の製薬会社が開発にしのぎを削っており，日本発の新規 ADC も近年開発され活況を呈しており，日本の貢献が期待できる分野である．

“がん標的治療”を進めれば副作用が少なく，患者さんにとってのメリットが高いため，薬剤としての実装が期待されており開発が進んでいる．また，標的性が高くなればそれだけ全身副作用が減ることになるため，理想的であると言える．しかしながら，がん細胞は標的となる分子を一定ではなく，バラバラに発現することが知られており，がん細胞の不均一性の一つであり，がんの治療抵抗性と考えられている．肺がんの分子標的であるタンパク質分子 HER2 を染色した肺腺がんの自験切除例を示す（**図 2**）．腫瘍内部に HER2 が濃い部分とそうでは

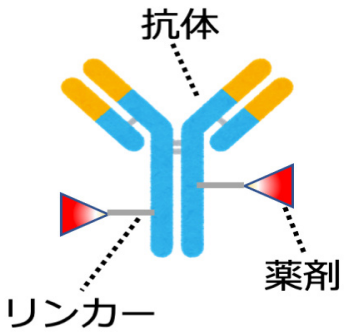


図 1　ADC の構造

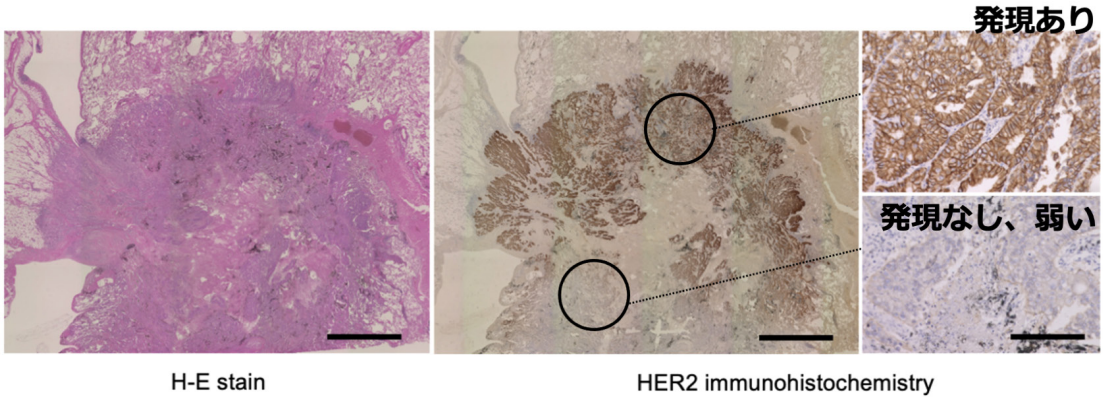


図 2　肺腺がん外科切除検体の HER2 免疫染色の 1 例，Bar = 5mm

ない部分が巣状に混在している．このように分子を標的とする治療は分子の発現が高ければ，効果が期待できるが，分子の発現が僅かであったり，無い場合は効果が限定されてしまう．よって，抗体を用いた分子標的治療薬の ADC の効果が限定されてしまうことが問題になっており，治療抵抗性に繋がっていた．従って，この抵抗性を克服する新規 ADC 概念の構築と創生が求められていた．

2．近年開発された近赤外光線免疫療法

Near-Infrared photoimmunothreapy（NIR-PIT）は，次世代のがん治療として，がん細胞表面の抗原に特異的な抗体に近赤外線に反応する probe をつけ，局所的に近赤外線を当てる事で治療を行う新規のがん治療である[1]．本治療は，2011 年に米国立衛生研究所（National Institutes of Health: NIH）・米国立癌研究所（National Cancer Institute: NCI）の主席研究員である小林 久隆博士が開発した治療法で probe（化学）と抗体（生物学，薬学）を至適条件下で conjugation し薬剤化し（conjugation chemistry）さらに近赤外光線（物理学・光科学）を加えた治療法を行う学際的な治療法である（**図 3**）．革新的なターゲット局所治療として，高い評価を得ており，そのユニークな細胞死機序が 2018 年に解明された．これらの経緯を経て，2020 年 9 月に再発既治療切除不能頭頸部がんに対して世界に先駆けて日本で限定承認され，保険診療収載されている．現在，保険適応の拡大に向けての活動が続けられている．NIR-PIT も抗体を応用した ADC の一種といえる．抗体と光の二重の選択性があり，超選択的にがん細胞のみを光破砕できる．現在，順調に頭頸部がんの治療応用が進んでいるが，その選択性が高いが故にがんの不均一性の影響により，再発に繋がってしまう可能性もある．よって，NIR-PIT もより効果を高めた次世代型を開発する必要性がある．

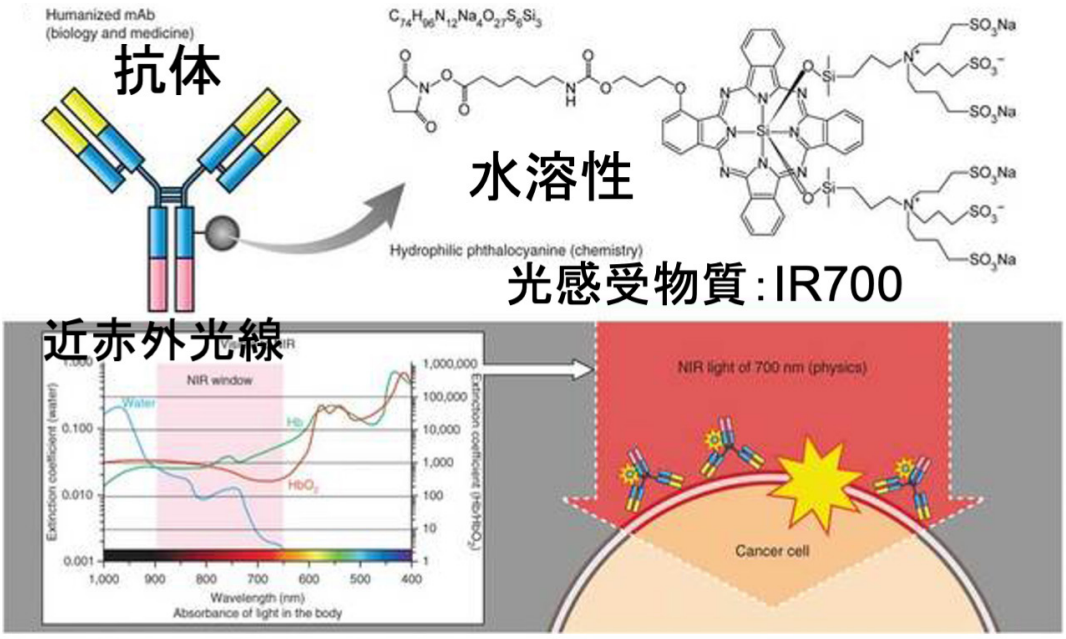


図 3　近赤外光栓免疫療法（Near Infrared Photoimmunotherapy; NIR-PIT）の概要

3．近赤外光線免疫療法の機序

NIR-PIT の細胞死機序に関しては，2018 年に著者等によって解明された [2]．NIR-PIT の細胞死の開始起点は，光吸収体の IR700 の近赤外光照射による疎水化と，それに引き続く抗体・抗原タンパク質の凝集であると証明されている．この反応は低酸素で，電子供与体がリッチな環境で進みやすい事がわかっている．かわりに，酸素が豊富な条件では，IR700 は酸化ストレスを局所的に出す．従って，細胞膜上のがん特異抗原に結合している抗体・IR700 複合体が近赤外光線照射により突然に凝集し，結合相手の細胞膜抗原をタンパク変性させることで物理的な細胞膜障害として働き，細胞内外の浸透圧差により細胞が破裂し，細胞死が誘導される．本機序は，これまでの概念と全く異なる，新しい光細胞死であり，NIR-PIT が新しい抗癌モダリティとしての優位性を持つと証明され，世界に先駆けて日本で限定承認されるに至った（**図 4**）．われわれは，この新規の光化学反応誘導細胞死を光化学細胞死と名付けた．

4．Smart ADC の開発

4．1　Smart ADC の概要

上記，抗体を用いた ADC の治療抵抗性のがんの抵抗性を克服する新技術として，光照射により，NIR-PIT 効果と光励起薬剤放出技術を組み合わせた “Smart ADC” を開発した [3]．本コンセプトは，光によって Smart ADC が結合した標的細胞は NIR-PIT の光化学細胞死により破砕され，同時に周囲へ ADC として付加されている抗がん剤を光リリースする．リリースされた抗がん剤は周囲の Smart ADC が結合していない，抗原の発現が少ない・または無いがん細胞に作用し，抗がん剤の作用によってがん細胞を細胞死させる（**図 5**）．この近傍への新規 ADC 効果を Photo-bystander 効果と名付けた．本コンセプトにより，これまで問題になっていた腫瘍の不均一性を克服できる可能性があり，腫瘍の根治性が増すものと考えられる．

4．2　Photo-bystander 効果を検証する実験系の開発と定量評価

さて，上記コンセプトを証明する実験系として，抗体の標的タンパク質を発現するがん細胞と，その発現をしていないがん細胞を混ぜた実験系を構築した．Photo-bystander 効果を評価するために，抗体標的タンパク質を発現していないがん細胞に発光遺伝子である luciferase（luc）と緑色蛍光 GFP を遺伝子導入し恒常発現細胞を樹立した．本系によって，luciferase の発光強度を定量計測することで，培養状態や生体内での Photo-bystander 効果を評価できる．生体内の腫瘍構築では，実際の人腫瘍を模した標的タンパク質 HER2 の発現の斑な混合腫瘍が構築できた（**図 6**）．これらの抗体の標的タンパク質を発現していないがん細胞の活性を生体内で評価する事ができるのが，ARIM-JAPAN で支援いただいた IVIS SPECTRUM CT（**図 7**）を用いた発光生体リアルタイムイメージング法が活用できる．本装置により，説得力のあるデータを示すことが可能となった．

4．3　Smart ADC からの光照射による薬剤遊離の証明

Smart ADC として，現在乳がんと胃がんに認可されている ADC であるカドサイラ（Trastuzumab-emtansin; T-DM1）に光感受物質 IR700 を追加で付加することで，T-DM1-IR700 を作成した．T-DM1-IR700 はがんに特異的に発現する HER2 タンパク質を標的とした薬剤であり，3T3/HER2 細胞に結合し，MDAMB-468-luc-GFP 細胞 (ヒト乳がん細胞) に結合しないことを確認した（**図 8**A）．

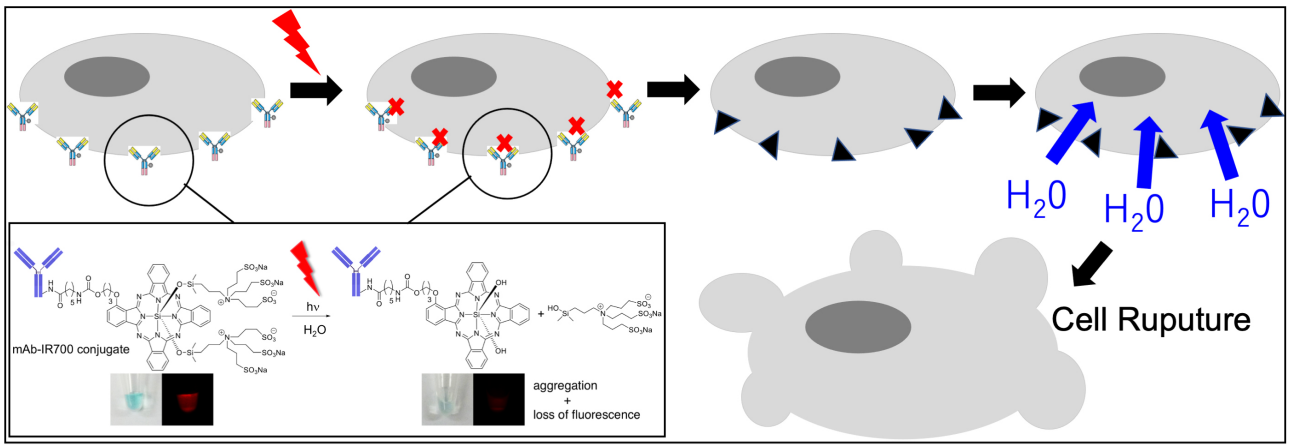


図 4　近赤外光栓免疫療法の機序の概要

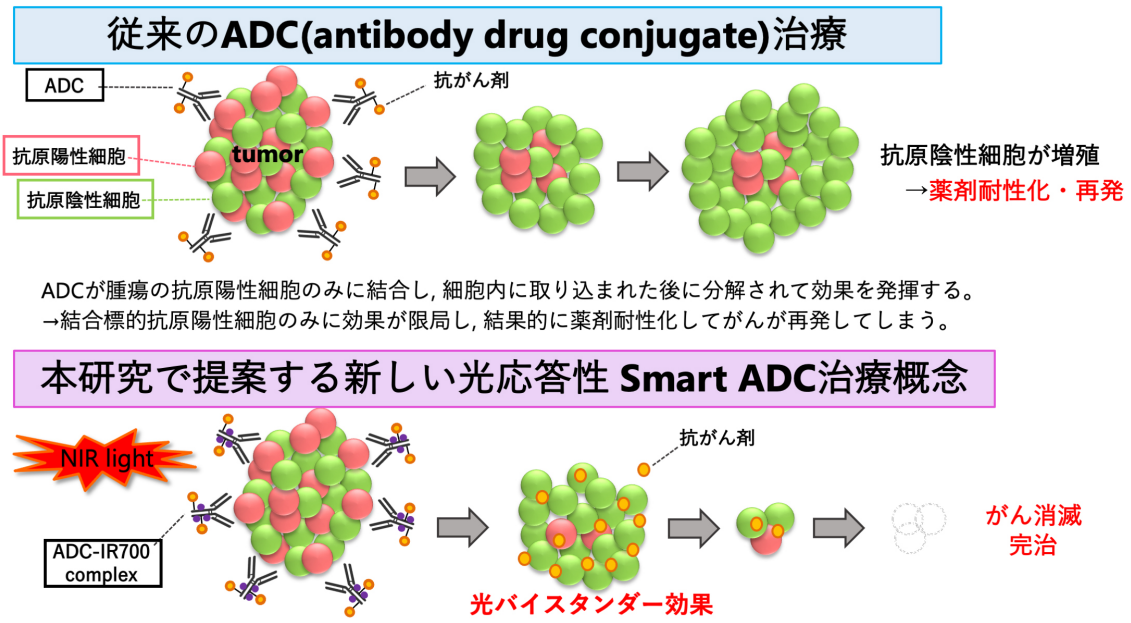


図 5　Smart ADC 概念

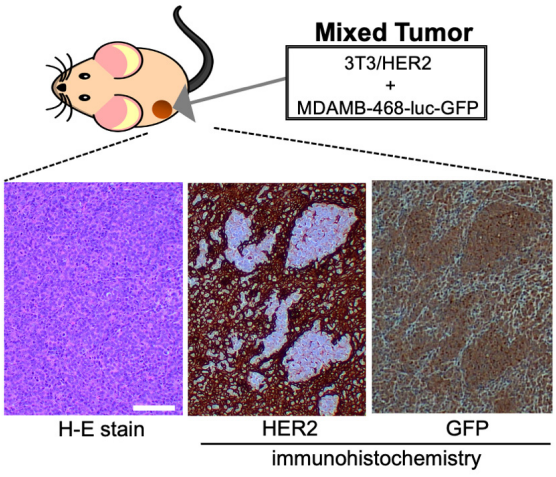


図 6　マウス混合腫瘍モデル

図 7　IVIS-SPECTRUM CT

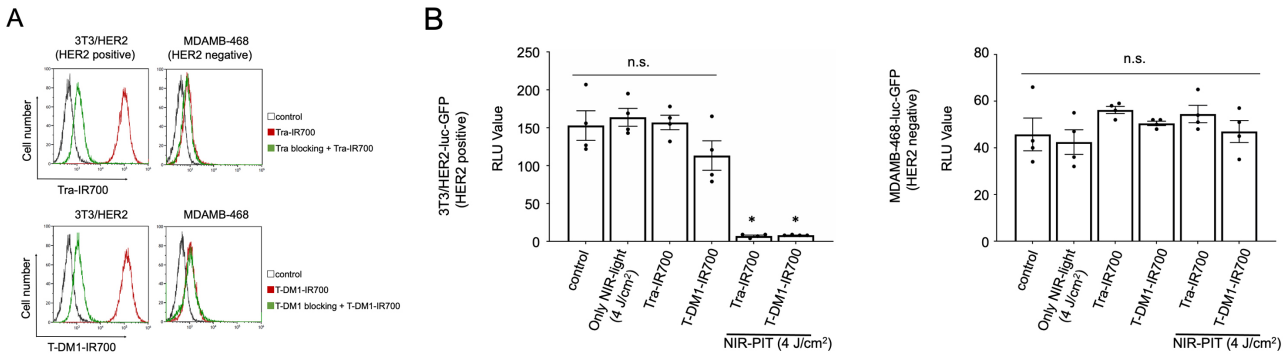


図 8　A. HER2 抗原を発現する 3T3 ／ HER2 細胞と発現しない MDAMB468 への tra-IR700 と T-DM1-IR700 の結合性　B. Tra-IR700 と T-DM1-IR700 を用いた近赤外光線免疫療法の効果，3T3/HER2 細胞は標的があるので効果があるが，発現の無い MDAMB-468-luc-GFP には効果がない.

T-DM1-IR700 は近赤外光照射で NIR-PIT の効果を 3T3-HER2 細胞には発揮したが，結合できない MDAMB-468-luc-GFP 細胞には発揮しなかった（**図 8**B）．T-DM1-IR700 は近赤外光照射によって，抗がん剤である DM1 の誘導体を遊離することを HPLC と質量分析によって証明した（**図 9**）．これらのことから，T-DM1-IR700 は NIR-PIT の効果と DM 1 誘導体を光刺激で遊離する 2 重の作用を持つ Smart ADC であると証明できた．

4．4　Smart ADC：T-DM1-IR700 の in vitro photo-bystander effect

次に，T-DM1-IR700 の効果を検討するために，標的である HER2 タンパクを高発現するがん細胞と，HER2 を発現しない，ないしは低発現のがん細胞の混合 in vitro 培養系を確立した．DM1 がない T-IR700 では，NIR-PIT の効果で HER2 を発現する細胞（3T3/HER2）が光化学細胞死されスペースが空くことによって，非標的細胞である MDAMB-468-luc-GFP 細胞が増殖することで，4 日後の luciferase 発光は近赤外光照射群で増加した．一方，T-DM1-IR700 は，4 日後の luciferase 活性は低下し，非標的細胞である MDAMB-468-luc-GFP 細胞の増殖が抑制されていることが判明した（**図 10**）．また，光照射後の培養上清からは DM1 誘導体が検出された（**図 11**）．従って，T-DM1-IR700 は，標的とする細胞を光化学細胞死するだけではなく，近傍の非標的細胞である MDAMB-468-luc-

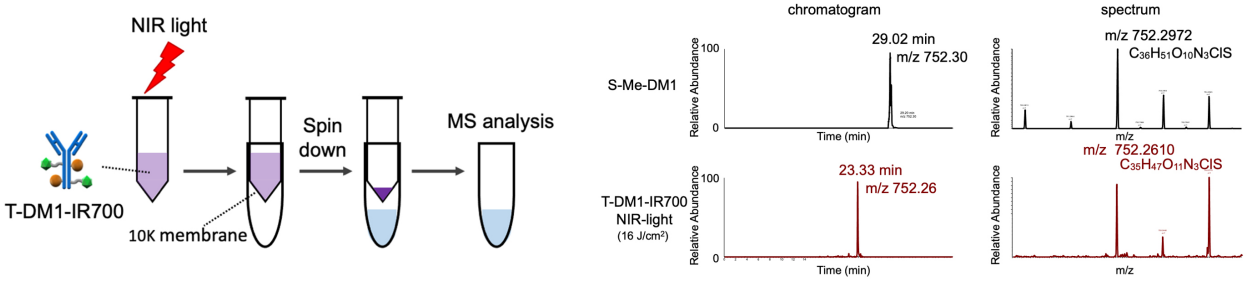


図 9　T-DM1-IR700 の近赤外光線照射による DM1 誘導体の遊離

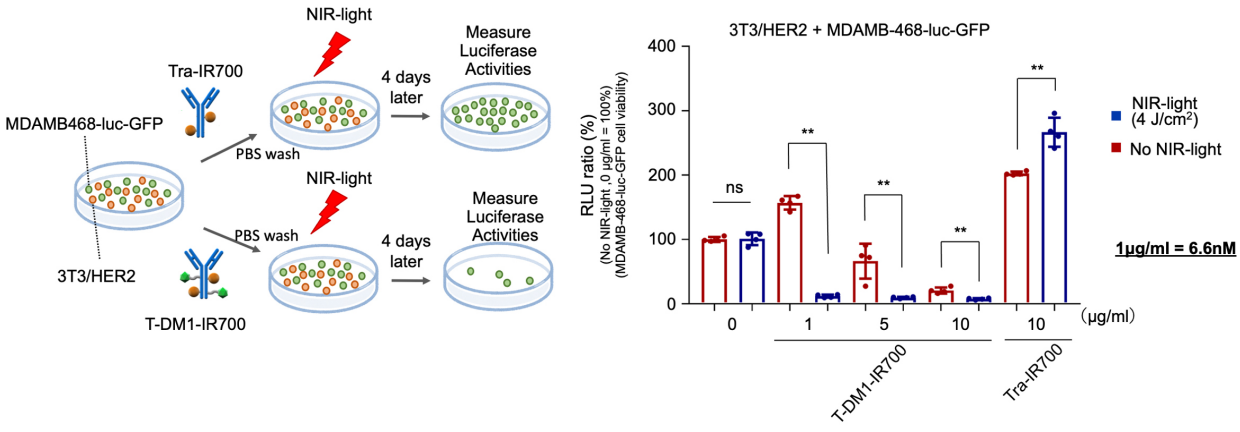


図 10　in vitro photo-bystander 効果

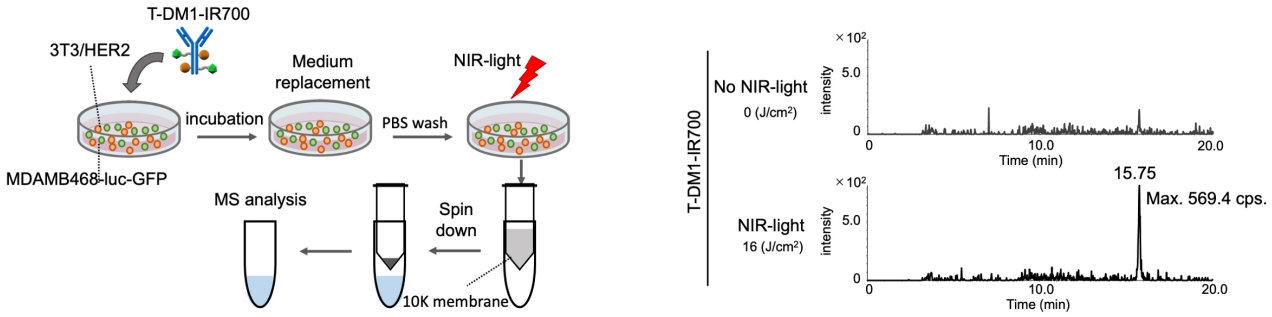


図 11　in vitro photo-bystander 効果の機序；上清からの DM1 誘導体の検出

GFP 細胞を殺傷することができる “Photo-bystander” 効果を発揮したと考えられた．様々な細胞の組み合わせで本効果はがん細胞の種類や臓器に依らず発揮されることがわかっている．

4．5　Smart ADC：T-DM1-IR700 の in vivo photo-bystander effect

4．2 で解説した混合腫瘍マウスモデルを用いて，T-DM1-IR700 を前日に静脈注射して，右の混合腫瘍のみに光照射をすると，抗原陰性の MDAMB-468-luc-GFP 腫瘍にも luciferase の活性がイメージングで低下していることから in vivo photo-bystander 効果が発揮されていることが証明できた．Tra-IR700 の場合は，抗がん剤が無いことから，効果はみられない（**図 12**）．生体内の腫瘍の不均一性モデルへの根治性を高めることができた．

5．おわりに

Smart ADC 開発によって，従来の ADC とは異なり，より根治性を高めた治療が可能にることが，ARIM-JAPAN の利用によって証明でき，今後の開発への概念実証が可能となった（**図 13**）[3]．近赤外光線免疫療法と抗がん剤薬剤の効果を同時に発出できる治療が可能となり，実装されれば社会的にも患者さんへの貢献が大である．T-DM1 薬剤は数年以内の特許切れによる Biosimilar 薬が予定され経済的にも安価に対応できる．本概念を用いた薬剤開発を今後も継続して，癌根絶に向けた光科学を応用した治療法を開発していきたい．

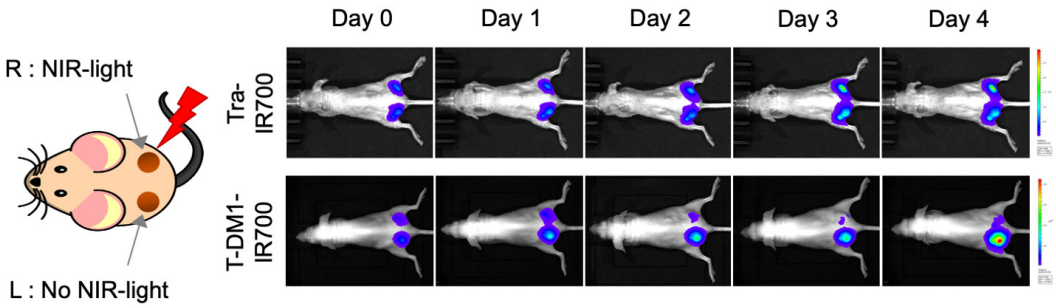


図 12　in vivo photo-bystander 効果

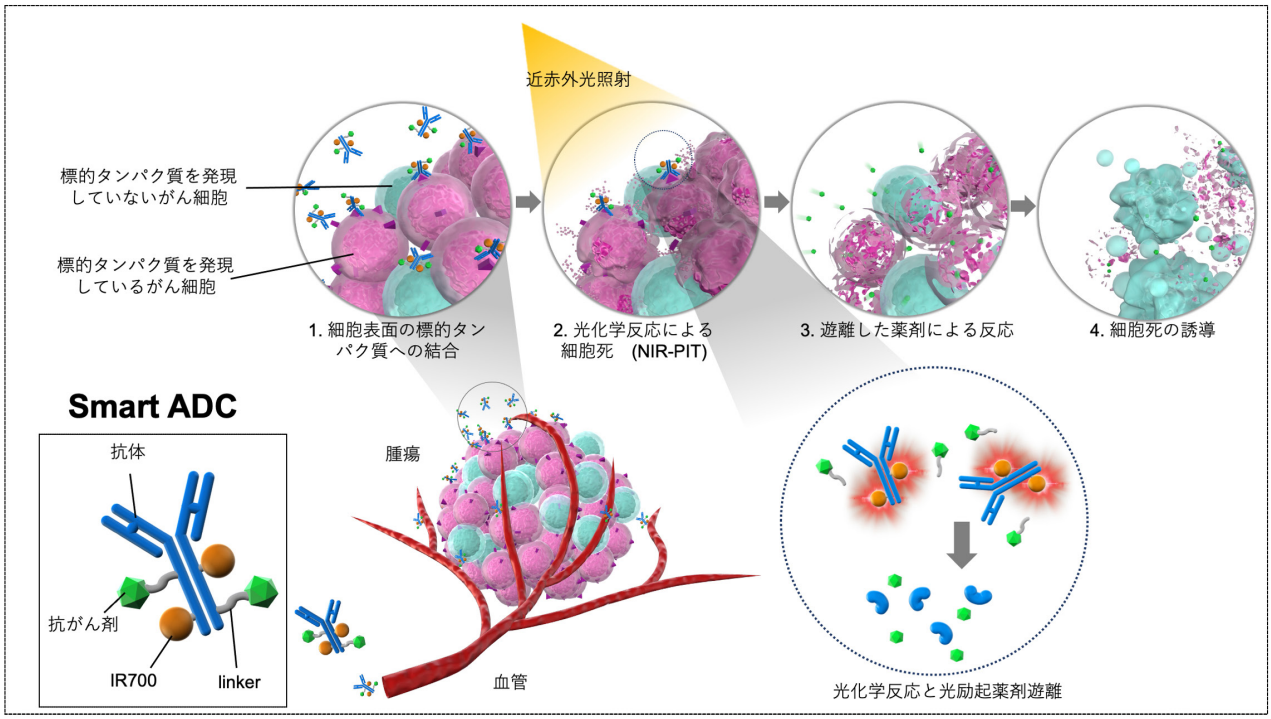


図 13　光応答性 Smart ADC

6．謝辞

本研究は文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム事業 S-18-NU-0032，S-19-NU-0021，S-20-NU-0007，S-21-NU-0017（分子・物質合成　名古屋大学）の支援にて実施した．ここに感謝申し上げる．

参考文献

[1] Mitsunaga M, Ogawa M, Kosaka N, Rosenblum LT, Choyke PL, Kobayashi H.
Cancer cell-selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules
Nat Med. 2011 Nov 6;17(12):1685-91. doi: 10.1038/nm.2554.

[2] Sato K, Ando K, Okuyama S, Moriguchi S, Ogura T, Totoki S, Hanaoka H, Nagaya T, Kokawa R, Takakura H, Nishimura M, Hasegawa Y, Choyke PL, Ogawa M, Kobayashi H.
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. 2018 Nov 28;4(11):1559-1569. doi: 10.1021/acscentsci.8b00565.

[3] Takahashi K, Yasui H, Taki S, Shimizu M, Koike C, Taki K, Yukawa H, Baba Y, Kobayashi H, Sato K.
Near-infrared-induced drug release from antibody-drug double conjugates exerts a cytotoxic photo-bystander effect
Bioeng Transl Med. 2022 Aug 21;7(3):e10388. doi: 10.1002/btm2.10388.

（名古屋大学高等研究院　名古屋大学大学院医学系研究科
病態内科学講座呼吸器内科学　佐藤 和秀）

ARIM Biomaterials

【お問い合わせ】
名古屋大学 次世代バイオマテリアル拠点
☎ 052-789-4664
E-mail arim-support@nanobio.nagoya-u.ac.jp

ホームページ
https://nls.mirai.nagoya-u.ac.jp/nextgenbiomater/