

# 論文概要

## ○論文題目

Utility of epirubicin-incorporating micelles tagged with anti-tissue factor antibody clone with no anticoagulant effect

(抗凝固活性のない抗組織因子抗体を付加したエピルビシンミセル製剤の有用性)

○指導教員 人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 兵頭一之介 教授

(所属) 筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻

(氏名) 菅谷明德

目的：

固形腫瘍に対するナノ粒子製剤の開発は、透過性亢進と滞留（EPR: Enhanced Permeability Retention）効果に基づき進められてきた。その目的は、抗癌剤を内包化した高分子物質が透過性の亢進した腫瘍血管で漏出しやすく、またリンパ回収系の乏しい腫瘍組織で長く停滞することにより抗腫瘍効果が上がると同時に、正常血管では漏出しにくく有害事象を軽減することにある。この考えのもとに、我々はエピルビシンを内包した pH 応答性ミセル製剤（NC-6300）を作成し、前臨床研究で、エピルビシンの抗腫瘍効果の維持・増強と副作用軽減を示してきた。

現在、抗がん剤を高分子化することによる腫瘍集積性に加えて、担体表面に腫瘍選択性を有する抗体を付加することによって、能動的腫瘍集積性を介した新規の次世代ナノ粒子製剤も開発が進んでいる。我々は腫瘍選択的ターゲット分子として組織因子（Tissue factor; TF）を選択し研究を進めた。外因系凝固因子である TF はさまざまな固形がんを高発現しており、臨床的に TF 高発現は膵癌において予後因子として知られている。これまでに抗 TF 抗体（clone1849）を付加した NC-6300 を開発し（anti-TF1849-NC-6300）、前臨床研究で、膵がん、胃がんにおいて従来の NC-6300 に比し、有意な腫瘍増殖抑制効果を明らかにした。しかしながら、この抗 TF 抗体（clone 1849）は凝固阻害活性を有しており、ヒト体内で凝固異常を起こす可能性を含んでいる。そこで本研究では、凝固活性に影響を及ぼさない抗 TF 抗体を付加したミセル製剤を開発することとした。また、ミセルに付加する抗 TF 抗体の形状を最適化するため、IgG、F(ab')<sub>2</sub>、Fab' の 3 種類の形状をそれぞれ付加した NC-6300 を作成し検討した。

対象と方法：

以前、樹立したラットハイブリドーマから得られたラット抗体から凝固阻害作用が少なく特異結合作用のある抗ヒト TF モノクローナル抗体をスクリーニングした。抗体の特異結合力を見るために、表面プラズモン共鳴分析法を用いてアフィニティを計測した。抗体の抗凝固活性は、human TF activity assay で評価した。以上の検討から凝固阻害作用を有さない最適のクローンを選択した。またミセルに付加する抗 TF 抗体の形状を最適化するため、IgG、F(ab')<sub>2</sub>、Fab' の 3 種類の形状の抗体をそれぞれ付加した NC-6300 を準備した。

作成した 3 種の anti-TF-NC-6300 のサイズを計測し、それぞれヒト血漿と混合し、フィブリン形成までの時間を計測する clotting assay を行った。また、それぞれの薬剤について、TF 高発現ヒト膵がん細胞株 BxPC3 とコントロールとして TF 低発現ヒト膵がん細胞株 SUI2 を用いて、flow cytometry によりアフィニティを解析し、また、WST-8 assay により IC<sub>50</sub> 値を求め、*in vitro* における殺細胞効果を比較した。さらに、BxPC3、SUI2 各細胞株を用いたヌードマウス皮下移植モデルを作成し、*in vivo* における各薬剤の腫瘍増殖抑制効果を計測した。

結果：

特異結合作用を保持し凝固阻害作用が少ない抗 TF 抗体として、表面プラズモン共鳴分析法で測定されたアフィニティーが clone1849 と比し 76%程度に保たれており、human TF activity assay が 98.5%と、ほとんど凝固活性に影響のなかった抗 TF 抗体 clone 1859 を選択した。次に、その IgG、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'をそれぞれ付加した anti-TF1859-NC-6300 を 3 種類 (anti-TF1859IgG-NC-6300、anti-TF1859F(ab')<sub>2</sub>-NC-6300、anti-TF1859Fab'-NC-6300) 作成した。3 種類の実験のサイズはおよそ 50-60nm であった。Flow cytometry では、anti-TF1859-NC-6300 は抗体の形状にかかわらず、TF 高発現ヒト膵がん細胞株 BxPC3 において高い結合性を示し、TF 低発現ヒト膵がん細胞株 SUIT2 ではその結合性は見られなかった。また、*in vitro* における殺細胞効果では、BxPC3 において抗体の形状にかかわらず 3 種類とも anti-TF1859-NC-6300 は NC-6300 に比し IC<sub>50</sub> 値の改善を認めたが抗体の種類間で有意差は認められなかった。また、コントロールの SUIT2 においては anti-TF1859-NC-6300 は NC-6300 と同等の抗腫瘍活性を示した。

BxPC3 皮下移植マウスモデルにおいて、3 種類の anti-TF1859-NC-6300 は抗体の形状にかかわらず、NC-6300 に比し、有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた。抗体の形状別では clone 1859 IgG を付加した NC-6300 が最も良好な腫瘍増殖抑制効果を示す傾向にあった。SUIT2 では、この有意な腫瘍増殖抑制効果の増強は認められなかった。3 種類の anti-TF1859-NC-6300 投与マウスにおいて、死亡や有意な体重減少を認めなかった。

考察：

本研究では、新たに作成した凝固阻害作用のない anti-TF1859-NC-6300 の有意な腫瘍増殖抑制効果が示された。付加する抗体の形状によるミセル製剤のサイズの差は 10nm 以下でサイズは 50-60nm 程度であった。50nm である従来の NC-6300 に比し、サイズの増大による EPR 効果の減弱を危惧していたが、このサイズでは EPR 効果には影響しないものと考えられた。Anti-TF1859-NC-6300 は *in vivo* において、抗体の形状によらず、NC-6300 に比し腫瘍増殖抑制効果の増強を示した。NC-6300 に付加する抗 TF 抗体は、製造工程が簡易であることを加味し、IgG が最良であると思われた。

本研究における限界として、マウス血漿と用いた抗ヒト TF 抗体は交差反応を示さないため、マウスの *in vivo* 実験では出血の副作用の検討ができない。現在、いくつかの抗 TF 抗体製剤はヒト臨床試験で安全性が報告され始めているものの、本製剤においても first-in human 試験で安全性確認試験が必要である。

結論：

凝固阻害作用を有さない Anti-TF1859-NC-6300 の良好な抗腫瘍効果を認めた。NC-6300 に付加する抗 TF 抗体は、whole IgG が適切であると考えられた。