

# IGF1R を標的とした新規光免疫療法の確立

関西医科大学 新医学研究所 (仮称) 設備準備室

鈴木基史

## I 要 旨

インスリン様成長因子 1 受容体 (insulin-like growth factor 1 receptor: IGF1R) は膵がんにおいて過剰に発現することが知られており、新たな分子標的として着目されている。光免疫療法は、細胞膜タンパク質を標的とする抗体に光反応性色素 IR700 を結合した薬剤を使用する新しいがん治療法である。これまで様々ながん種を標的とした光免疫療法薬が開発されているものの、膵がんに対する光免疫療法に適した標的は確立されていない。そこで本研究では、光免疫療法の標的として IGF1R が利用可能かを評価し、膵がんを標的とする新たな光免疫療法の開発を目指した。IGF1R に対するモノクローナル抗体を IR700 で標識した Ab-IR700 を作製し、膵がん細胞 Panc1 において光免疫療法を実施したところ、細胞殺傷効果が約 4 割程度とこれまでの報告に比べて治療効果が低かった。その理由として Ab-IR700 の内在化が早いことが考えられた。そこで、IGF1R の内在化を抑制することが知られている clathrin inhibitor を併用して光免疫療法を実施したところ、光免疫療法の殺細胞効果を増強できることが明らかとなった。以上より、IGF1R は光免疫療法の新たな標的となりうるものの、治療薬剤の内在化が治療効果に影響することが明らかとなった。今後は、より内在化しにくい抗体を探索するとともに、clathrin inhibitor と光免疫療法の併用による増感効果について、マウス移植モデルを用いて検討する予定である。

## II 目 的

IGF1R は膵がん組織をはじめとする様々ながん組織に過剰発現しており、がんの増殖だけでなく放射線や化学療法に対する治療抵抗性に関与する。そのため、新たな分子標的治療薬剤の標的抗原として注目されておりこれまでに多くの治療用抗体が開発されている。モノクローナル抗体 Ganitumab とゲムシタビンの併用による転移性膵がんの患者における臨床試験も行われたものの、第 III 相試験では生存期間の延長が認められず、それ以降の開発は停止している。Ganitumab による治療効果が得られなかった理由のひとつとして、IGF シグナルの遮断により PI3K 下流シグナルが代償的に活性化し、がん細胞死が阻害されたことが挙げられている。

近年、新たながん治療法として、がんを標的とする抗体に近赤外光により反応する色素 (IR700) を結合させた薬剤を用いて治療を行う光免疫療法が開発されている。この治療法において、薬剤自体や光は人体に無害であり、薬剤が結合した細胞のみが光の照射により死滅する (図 1)。そのため、光免疫療法は他のがん治療に比べて侵襲性および副作用の少ない治療法として着目され、2020 年に日本において世界に先駆けて薬事承認を受け、既に保険診療による治療が行われている。光免疫療法において、抗体は IR700 をがん特異的に運ぶ役割のみを担っており、抗体自体による治療効果ではなく、光を照射することにより薬剤が結合したが

ん細胞を物理的に破壊することができる。従って、上記の様に治療効果が得られなかった抗体を再利用することが可能であり、臨床使用実績のある抗体を用いることができれば安全性などが担保されていることから、臨床応用への障壁は少ない。また、光免疫療法では腫瘍組織内に

残存する免疫細胞を傷つけずにがん細胞のみを殺傷することができることから、がん免疫の誘導により再発や転移の抑制も期待できる。そこで、本研究では、IGF1R を標的とする光免疫療法薬剤を開発し、膵がんにおける治療効果を評価することを目的とする。

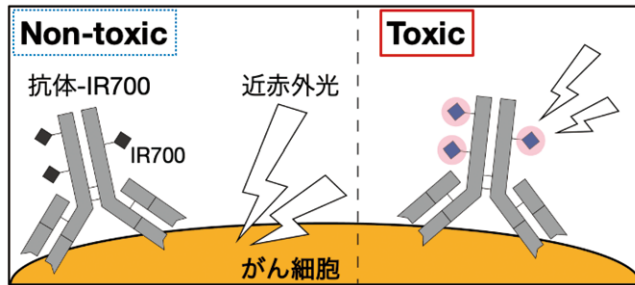


図1 光免疫療法の概要

### III 方法

#### 新規光免疫療法薬剤 anti-IGF1R antibody-IR700 conjugate (Ab-IR700) の作製

0.1 M リン酸緩衝液 (pH8.5) に、抗 IGF1R 抗体と IR700 を 1 : 5 の物質比で溶解し、室温で一晩インキュベートして反応させた後にゲルろ過カラム (PD-10) にて精製した (図 2)。

#### 膵がん細胞株における IGF1R 発現の評価

膵がん細胞株 Panc1、MIA PaCa-2、SUIT-2 の細胞膜における IGF1R の発現量について、上記で Ab-IR700 を作製する際に使用したモノ

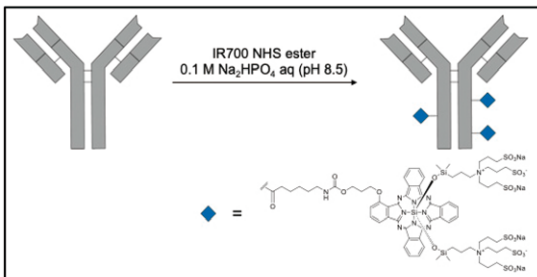


図2 光免疫療法薬剤の作製

クローナル抗体と同じクローンで、PE 標識された抗体を用いて評価した。細胞をトリプシンで回収した後に、PE 標識抗体を 1 h、4℃ でインキュベートし、フローサイトメトリーを用いて細胞への結合量を評価した。

#### 顕微鏡下で光免疫療法を行った際の細胞形態の観察

Panc1 をガラスボトムディッシュに播種し、一晩インキュベートして細胞を接着させた。Ab-IR700 を終濃度 10 μg/mL で培地に添加し、37℃ または 4℃ で 1 h インキュベートした。PBS で洗浄することで培地中の余分な Ab-IR700 を除去し、新鮮培地を加えてから顕微鏡下で細胞に近赤外光を 5 min 照射した。また、照射の 5 min 前に細胞膜染色試薬を添加した。

#### in vitro での光免疫療法による細胞殺傷効果の評価

Panc1 を 35 mm dish に播種し、一晩インキュベートして細胞を接着させた。Ab-IR700 を終濃度 10 μg/mL で培地に添加し、37℃ で

1 h インキュベートした。PBS で洗浄後に、新鮮培地を加えてから近赤外光を発する LED を用いて照射した。照射から 24 h 後に細胞生存について WST 試薬を用いて評価した。また、抗体の内在化を阻害するため、clathrin inhibitor または caveolae inhibitor を Ab-IR700 と同時に処理し、近赤外光を照射後に同様に細胞生存率を評価した。

## IV 結果

### 膵がん細胞株における IGF1R 発現の評価

光免疫療法では、光免疫療法薬剤が細胞膜上に結合し光が照射されることで治療効果を発揮する。そのため、3 種類の膵がん細胞株

(Panc1、MIA PaCa-2、SUIT-2) の細胞膜上における IGF1R の発現量をフローサイトメトリーにより評価した。全ての細胞膜上に IGF1R が発現しており、その中でも最も IGF1R の発現量が高い Panc1 を以下の実験で使用した (図 3)。

### Ab-IR700 の Panc1 への結合及び内在化の評価

作製した Ab-IR700 が Panc1 の細胞膜に結合し、光免疫療法薬剤として機能するかを顕微鏡下で観察し評価した。細胞に Ab-IR700 を処理し、37°C で 1 h インキュベートしたところ、Ab-IR700 のほとんどが細胞膜上ではなく、細胞内に内在化していた (図 4A)。そこで、4°C で 1 h インキュベートしたところ、Ab-IR700 は

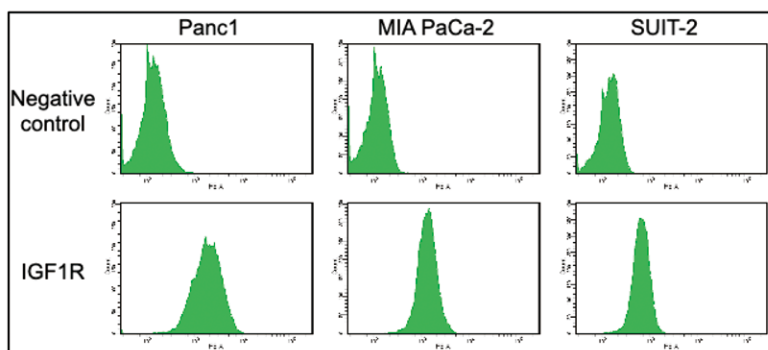


図 3 膵がん細胞における IGF1R の発現比較

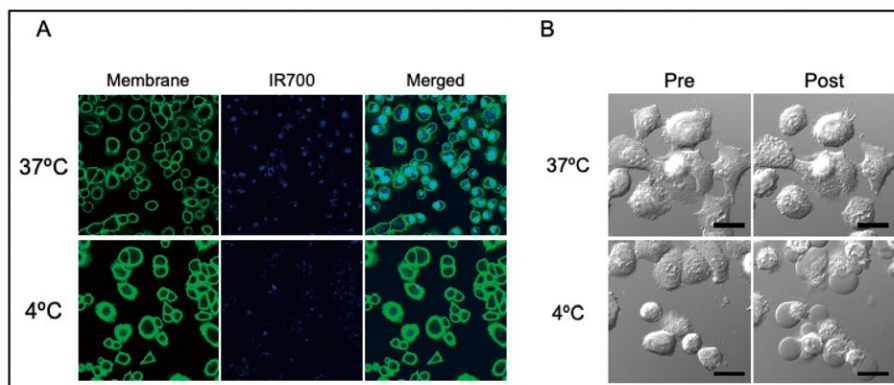


図 4 Ab-IR700 の細胞への結合の評価

細胞膜上に結合していた。この時に顕微鏡下で近赤外光を照射すると、抗体が内在化していた37℃で抗体を処理した細胞ではほとんど変化がなかったのに対して、4℃で処理した細胞では、光免疫療法の特徴的な細胞形態変化である水疱形成と細胞膨張が観察された (図4B)。

**in vitro での光免疫療法の細胞殺傷効果の評価と Clathrin inhibitor による増感効果**

Ab-IR700 を用いた光免疫療法の細胞殺傷効果

果を WST assay により評価した (図5)。細胞に 20 J/cm<sup>2</sup> の近赤外光を照射してから 24 h 後に細胞生存率を評価したところ、薬剤または近赤外光単独では、ほとんど細胞死は観察されなかったが、Ab-IR700 と近赤外光の併用により有意な細胞生存率の低下が観察された。また、Ab-IR700 の内在化を caveolae inhibitor または clathrin inhibitor を用いて抑制したところ、clathrin inhibitor により殺細胞効果の有意な増強が観察された。

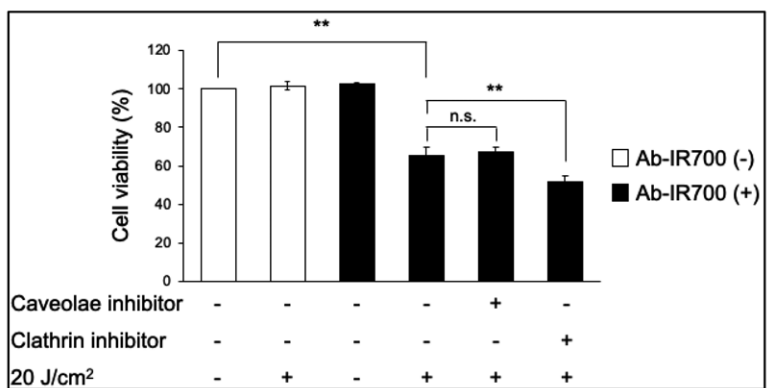


図5 in vitroでの光免疫療法

**V 考 査**

光免疫療法の細胞殺傷効果については、細胞膜上に結合した抗体-IR700 複合体に近赤外光が照射されることで IR700 の構造変化が生じ、その際に細胞膜に不可逆的な膜傷害が発生することで細胞内に細胞外液が流入し細胞が破裂することが明らかとなっている<sup>1)</sup>。本検討では、光免疫療法後の細胞生存率が最大でも約 60% であり、これまでの上皮細胞増殖因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) を標的とした光免疫療法の同様の条件下における検討に対して治療効果が低かった。その要因の一つとして、Ab-IR700 が細胞内に内在化してしまい、膜損傷が生じにくかったことが考えら

れる。EGFR や IGF1R などの受容体型チロシンキナーゼはリガンドが結合することで活性化し、その後内在化し分解される。内在化までの時間は受容体により異なり、EGFR では 24 時間であるのに対して、IGF1R では 6-7 時間程度と推定されている。EGFR に比べて受容体の内在化が早かったことが細胞殺傷効果の減弱につながったと考えられる。過去の報告では、IGF1R を標的とする ganitumab は、IGF1R に結合後も内在化が生じることなく IGF1R 活性を低下させることが報告されている<sup>2)</sup>。ganitumab の様に内在化しにくい抗体を光免疫療法薬剤に使用することで、より効果的な IGF1R を標的とした光免疫療法薬剤を作製できる可能性がある。

受容体型チロシンキナーゼは、clathrin または caveolin を介したエンドサイトーシスにより内在化する。IGF1R についても、ユーイング肉腫において clathrin および caveolin の両方を介して内在化することが報告されている<sup>3)</sup>。本検討では、clathrin inhibitor を用いることで Ab-IR700 の治療効果を増強できたのに対し、caveolin を介したエンドサイトーシスの阻害は光免疫療法の治療効果に影響を与えなかった。このことから、膵がん細胞において IGF1R の内在化は clathrin を介して内在化することが明らかとなった。また、光免疫療法の増感効果についてはこれまでに報告はなく、臨床展開を考える上で重要な知見となり得る。今後は、clathrin inhibitor による増感効果について、膵がん移植マウスモデルを用いて検討を行う予定である。

## VI 結 語

本研究により、IGF1R は膵がんに対する光免疫療法の新たな標的として有用である可能性が示された。また、抗体薬剤の内在化が早く十分な治療効果が得られない場合には、Clathrin inhibitor 等により内在化を抑制することで治療効果を増強できることを明らかにした。これは、今後の光免疫療法薬剤の開発を考える上で重要な知見となり得る。今後は内在化しにくい抗体の開発や in vivo での検討を行い、臨床研究への展開を目指す。

### 参考文献

- 1) Nakajima K, Takakura H, Shimizu Y, Ogawa M. Changes in plasma membrane damage inducing cell death after treatment with near-infrared photoimmunotherapy. *Cancer Sci*, 2018; 109(9): 2889-2896.
- 2) Calzone FJ, Cajulis E, Chung YA, Tsai MM, Mitchell P, Lu J, Chen C, Sun J, Radinsky R, Kendall R, Beltran PJ. Epitope-specific

mechanisms of IGF1R inhibition by ganitumab. *PLoS One*, 2013; 8(2): e55135.

- 3) Martins AS, Ordóñez JL, Amaral AT, Prins F, Floris G, Debiec-Rychter M, Hogendoorn PC, de Alava E. IGF1R signaling in Ewing sarcoma is shaped by clathrin-/caveolin-dependent endocytosis. *PLoS One*, 2011; 6(5): e19846.