

# 抗体治療

札幌医科大学医学部 消化器・免疫・リウマチ内科学講座<sup>\*1)</sup>・東京大学 医科学研究所<sup>\*2)</sup>

佐々木 茂<sup>\*1)</sup>・篠村恭久<sup>\*1)</sup>・今井浩三<sup>\*2)</sup>

## Antibody treatment

Thirty years ago, our forerunners spent thousands of hours aiming to realize antibody treatments. Would they ever have been able to imagine the advances in antibody treatments that we see today? Currently, antibody drugs cover not only malignant neoplasms but also autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus; allergic diseases such as bronchial asthma; inflammatory bowel diseases (IBD); neurological diseases; and osteoporosis; their effectiveness in these disorders have been investigated and reported. In this review, we will review the advances particularly in those against malignancies. We will also allude to their position in the treatments of RA and IBD, where now these drugs are the mainstays, and also to individual agents.

今から30年ほど前に抗体治療を目指しさまざまに苦闘されていた諸先輩は、現在の抗体医薬の進歩を予想されたであろうか。現在、抗体医薬の守備範囲は、当初想定されていた悪性腫瘍にとどまらず、関節リウマチや全身性エリテマトーデスをはじめとした自己免疫性疾患、気管支喘息などのアレルギー疾患、炎症性腸疾患や神経疾患、そして骨粗鬆症など多岐にわたり、その有効性が探られ報告されている。本稿では、おもに悪性腫瘍に対する抗体医薬の進歩を概説するとともに、今や、治療体系の主体をなしてきている関節リウマチや炎症性腸疾患における抗体医薬の位置づけや治療薬に関しても触れていきたいと思う。

Shigeru Sasaki<sup>\*1)</sup>, Yasuhisa Shinomura<sup>\*1)</sup>, Kozo Imai<sup>\*2)</sup>

Keywords: Antibody treatment, Malignant tumor, Autoimmune disease, Inflammatory disease

## 1. はじめに

抗体医薬は免疫学の進歩とともに世の中に登場し、いまや臨床において必須の薬剤となっている。モノクローナル抗体は1975年に Köhler と Milstein により開発された。1980年代になり、マウスモノクローナル抗体を用いた、いわゆるミサイル療法ががんに対する夢の治療薬として一躍脚光を浴びた。しかしながら、多くの期待に反して治療効果を発揮することはできなかった。ヒトにとってマウス抗体は異物であり、免疫反応が生じてしまうためであった。その後、遺伝子工学の進歩によって、この問題

も克服されていった。すなわち、1986年にはヒト抗体が作成されるようになった。このことをきっかけに、抗体医薬は再び輝きを取り戻していった。現在では対象疾患はがんにとどまらず、アレルギー疾患、関節リウマチ、炎症性腸疾患など、治療の範囲は広がり、さらには、これらの疾患の中心的治療薬にまでなっているのが現状である。

疾患に対する治療薬としては、1997年に悪性リンパ腫に対する治療薬として rituximab が登場した。そして、1998年に乳がんに対する trastuzumab が登場し、関節リウマチや Crohn 病に対する infliximab も登場した。そして、2000年には gemtuzumab ozogamicin が急性骨髄性白血病に対して登場した。引き続いて、2003年には cetuximab が大腸がん、adalimumab が関節リウ

<sup>\*1)</sup> Department of Gastroenterology, Rheumatology and Clinical Immunology, Sapporo Medical University

<sup>\*2)</sup> The Institute of Medical Science, the University of Tokyo

マチに対して、そして2004年には bevacizumab が大腸がんに対して登場した。そして、2005年には tocilizumab が Castleman 病に対して登場した。これらの薬剤は現在、それぞれの疾患に対する貴重な薬剤として存在している。この抗体医薬に関して急速な研究開発が続き、現在も多くの抗体がその候補として世に出ようとし、今後もさらに有効性をもった抗体医薬が登場してくることが期待されている。このような現状を、30年以上前にマウス抗体を用いて苦闘していた時代に想像できたであろうか(表1)。

## 2. 抗体医薬の進歩

抗体医薬の作用機序は、まず標的分子(抗原)と結合し効果を発揮する。その後の機序として大きく分けて2つの機序が考えられている。1つは、標的分子の作用を直接減弱あるいは増強する効果である。すなわち、標的分子が可溶性分子の場合には、抗体の結合により標的分子の受容体への結合が阻害される。または、標的分子が受容体の場合には、抗体が受容体へ結合することで、リガンドが受容体に結合するのが阻害される。このような機序で本来の効果が減弱されることになる。逆に、抗体が標的分子に結合することでシグナル伝達を活性化し、作用増強効果を発揮する抗体もある。さらに、抗体の作用機序には抗体特有のエフェクター効果が備わっている。具体的には抗体依存性細胞傷害活性(antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC)や補体依存性細胞傷害活性(complement-dependent cytotoxicity: CDC)というエフェクター活性が抗体には備わっている。細胞表面に存在する標的分子と結合した抗体が Fc $\gamma$  受容体を介してエフェクター細胞を結合して標的細胞を傷害する活性は、抗体依存性細胞傷害活性(ADCC 活性)といい、また、抗体が補体と結合することにより標的細胞を傷害する活性は、補体依存性細胞傷害活性(CDC 活性)と呼ばれている。特に、抗がん効果を発揮する抗体としては ADCC 活性が強く期待されているものが多く存在している。

これらの抗体医薬の作用機序のうち、特に後者の

エフェクター活性をさらに増強するという試みが近年さまざまに行われ、抗体医薬の発達は、今後なおさまざまな方向に続いていく。

ADCC 活性の増強を目的としたそれらの試みのうちの1つとして、Fc 領域に人工的な修飾を加え、Fc $\gamma$  受容体との親和性を向上させる試みがなされている。Fc 領域にアミノ酸変異を導入したり、Fc 領域に結合している糖鎖に修飾を加えるといった工夫で ADCC 活性の増強が試みられている。一方、これらと異なる抗体の作用増強効果も試みられている。抗体自体の組織移行性を高める低分子化がその1つで、可変領域のみからなる単鎖抗体の試みもなされている。一方、異なる抗原と一緒に認識できる二重特異性抗体の開発もなされている。

次の項では、この抗体医薬を用いた臨床がどのような変化を遂げているかを関節リウマチ、炎症性腸疾患、そして悪性腫瘍に絞って進めていきたい。特に悪性腫瘍に対する抗体医薬の進歩は多岐にわたるものであり、詳しく述べたい。

## 3. 関節リウマチに対する抗体治療

### 3-1. 抗 TNF- $\alpha$ 抗体

関節リウマチに対する抗体医薬としては、まず抗 TNF- $\alpha$  抗体があげられる。マウス・ヒトキメラ抗体の infliximab(レミケード、Remicade<sup>®</sup>)、ヒト抗体の adalimumab(ヒュミラ、Humira<sup>®</sup>)、ヒト抗体の golimumab(シンボニー、Simponi<sup>®</sup>)、さらに Fc を欠如し PEG 化したヒト化抗体 certolizumab(シムジア、Cimzia<sup>®</sup>)が存在している。関節リウマチに対する抗体医薬として最初に登場したのがこれらの抗 TNF- $\alpha$  製剤であり、現在も第一選択として用いられている。日本リウマチ学会のガイドラインでは、関節リウマチにおいては、これらの生物学的製剤の高い治療効果をもとに、治療目標が著しく変化して、「すべての患者において臨床的寛解、もしくは、少なくとも低疾患活動性を目指す」ことが世界的なコンセンサスとなった。本邦においても、厚生労働省の研究班において、臨床的寛解の維持を目標とし、バイオフリー、ドラッグフリー寛解の可能性も視野に入れた関節リウマチの治療目標を提言している。

表1 これまでに日米欧で認可された抗体医薬

平成26年10月7日 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

名称	商品名	構造	標的	主な適応疾患	承認年			産生細胞
					US	EU	Japan	
マウス抗体								
<i>muromonab-CD3</i>	Orthoclone OKT3	IgG2a	CD3	腎移植後の急性拒絶反応	1986	NA	1991	mouse hybridoma
<i>ibritumomab tiuxetan</i>	Zevalin	IgG1 κ (MX-DTPA: <sup>90</sup> Y標識)	CD20	B細胞性非ホジキンリンパ腫	2002	2004	2008	CHO
		IgG1 κ (MX-DTPA: <sup>111</sup> In標識)		イブリツモマブ チウキセタンの集積部位の確認			2008	CHO
<i>iodine 131 Tositumomab</i>	Bexxar	IgG2a λ ( <sup>131</sup> I標識)	CD20	非ホジキンリンパ腫	2003	NA	NA	mammalian cell
<i>catumaxomab</i>	Removab	mIgG2a κ (EpCAM), rIgG2b λ (CD3)	EpCAM, CD3	癌性腹水	NA	2009	NA	rat/mouse bridoma
キメラ抗体								
<i>abciximab</i>	ReoPro	IgG1 (Fab)	GP1Ib/IIa	心筋虚血	1994	NA	NA	mammalian cell
<i>rituximab</i>	Rituxan/MabThera	IgG1 κ	CD20	B細胞性非ホジキンリンパ腫	1997	1998	2001	CHO
<i>basiliximab</i>	Simulect	IgG1 κ	CD25	腎移植後の急性拒絶反応	1998	1998	2002	Sp 2/0
<i>infliximab</i>	Remicade	IgG1 κ	TNF α	関節リウマチ	1998	1999	2002	Sp 2/0
<i>cetuximab</i>	Erbixur	IgG1 κ	EGFR	頭頸部癌、結腸・直腸癌	2004	2004	2008	Sp 2/0
<i>brentuximab vedotin</i>	Adcetris	IgG1 (MMAE修飾)	CD30	ホジキンリンパ腫	2011	2012	2014	CHO
<i>siltuximab</i>	Sylvant	IgG1 κ	IL-6	キャッスルマン病	2014	NA	NA	CHO
ヒト化抗体								
<i>dacizumab</i>	Zenapax	IgG1 κ	CD25	腎移植後の急性拒絶反応	1997	1999	NA	
<i>palivizumab</i>	Synagis	IgG1 κ	RSV F protein	RS ウイルス感染	1998	1999	2002	NSO
<i>trastuzumab</i>	Herceptin	IgG1 κ	HER2	転移性乳癌	1998	2000	2001	CHO
<i>gemtuzumab ozogamicin</i>	Mylotarg	IgG4 κ (カリケアマイシン修飾)	CD33	急性骨髄性白血病	2000	refused	2005	NSO
<i>alemtuzumab</i>	Campath	IgG1 κ	CD52	B細胞性慢性リンパ性白血病	2001	2001	2014	CHO
<i>omalizumab</i>	Xolair	IgG1 κ	IgE	喘息	2003	2005	2009	CHO
<i>efalizumab</i>	Raptiva	IgG1 κ	CD11	尋常性乾癬	2003	2004	NA	CHO
<i>bevacizumab</i>	Avastin	IgG1 κ	VEGF	結腸・直腸癌	2004	2005	2007	CHO
<i>natalizumab</i>	Tysabri	IgG4 κ	α4 integrin	多発性硬化症	2004	2006	2014	murine myeloma cell
<i>tocilizumab</i>	Actemra	IgG1 κ	IL-6R	キャッスルマン病、関節リウマチ	2010	2009	2005	CHO
<i>ranibizumab</i>	Lucentis	IgG1 κ Fab	VEGF-A	加齢黄斑変性	2006	2007	2009	E.Coli
<i>eculizumab</i>	Soliris	IgG2/4 κ	C5	発作性夜間血色素尿症	2007	2007	2010	NSO
<i>certolizumab pegol</i>	Cimzia	Fab+PEG	TNF α	関節リウマチ、重症クローン病	2008	2009	2012	E.Coli
<i>mogamulizumab</i>	Poteligeo	IgG1 κ	CCR4	CCR4陽性成人T細胞白血病リンパ腫	NA	NA	2012	CHO
<i>pertuzumab</i>	Perjeta	IgG1 κ	HER2	HER2陽性手術不能または再発乳癌	2012	2013	2013	CHO
<i>trastuzumab emtansine</i>	Kadcyla	IgG1 κ (メイタンシン修飾)	HER2	HER2陽性転移・再発乳癌	2013	2013	2013	CHO
<i>obinutuzumab</i>	Gazyva	IgG1	CD20	慢性リンパ性白血病	2013	NA	NA	CHO
<i>vedolizumab</i>	Entyvio	IgG1	α4 β7 integrin	クローン病	2014	2014	NA	CHO
<i>pembrolizumab</i>	Keytruda	IgG4 κ	PD-1	黒色腫	2014	NA	NA	
ヒト抗体								
<i>adalimumab</i>	Humira	IgG1 κ	TNF α	関節リウマチ	2002	2003	2008	CHO
<i>panitumumab</i>	Vectibix	IgG2 κ	EGFR	結腸・直腸癌	2006	2007	2010	CHO
<i>golimumab</i>	Simponi	IgG1 κ	TNF α	関節リウマチ	2009	2009	2011	Sp 2/0-Ag14
<i>ustekinumab</i>	Stelara	IgG1 κ	IL12, IL23-p40	乾癬	2009	2009	2011	Sp 2/0
<i>canakinumab</i>	Ilaris	IgG1 κ	IL-1 β	クリオピリン関連周期性症候群	2009	2009	2011	Sp2/0-Ag14
<i>ofatumumab</i>	Arzerra	IgG1 κ	CD20	慢性リンパ性白血病	2009	2010	2013	NSO
<i>denosumab</i>	Prolia/Xgeva ランマーク	IgG2	RANKL	骨病変、骨粗鬆症	2010	2010	2012	CHO
<i>ipilimumab</i>	Yervoy	IgG1 κ	CTLA4	黒色腫	2011	2011	NA	CHO
<i>belimumab</i>	Benlysta	IgG1 λ	BlyS	SLE	2011	2011	NA	NSO
<i>raxibacumab</i>	Raxibacumab	IgG1 λ	<i>B. anthracis</i> toxin	吸入炭疽、肺炭疽	2012	NA	NA	murine cell
<i>ranucicimab</i>	Cyramza	IgG1	VEGFR2	胃癌	2014	NA	NA	NSO
<i>nivolumab</i>	Opdivo	IgG4	PD-1	悪性黒色腫	NA	NA	2014	CHO

NA: Not approved (未承認)

(国立医薬品食品衛生研究所ウェブサイトより <http://www.nihs.go.jp/dccb/TEXT/Mab-T1.pdf>)

infiximabはMTXと併用する。ヒト抗体のadalimumab、golimumab、ヒト化抗体のcertolizumabは単独使用が可能であるが、MTXとの併用で有効性の向上と同等の安全性が確認されている。副作用に関してはやはり感染の問題が残っている。細菌性肺炎、結核、ニューモシスチス肺炎、薬剤性肺障害などが重要な副作用となっている。

### 3-2. 抗IL-6抗体

インターロイキン6(IL-6)は関節リウマチにおいて過剰発現され、さまざまな病態を引き起こすことが知られている。抗IL-6受容体抗体のヒト化抗体tocilizumab(アクテムラ、Actemra<sup>®</sup>)は、IL-6のシグナル伝達を阻害することによって抗リウマチ効果を示す薬剤である。ガイドラインでは、「tocilizumabは、関節リウマチ患者の臨床症状の改善・関節破壊進行の抑制・身体機能の改善に有効であることが本邦での臨床試験により証明された薬剤である。」と記されている。副作用としては、抗TNF- $\alpha$ 抗体と同様に感染症があげられる。特に抗TNF- $\alpha$ 抗体抵抗例に対する選択肢としても重要な薬剤となっている。これらの抗体医薬の登場により、関節リウマチの治療は今や画期的な変化を示している。

## 4. 炎症性腸疾患に対する抗体治療

炎症性腸疾患は腸管の慢性炎症疾患であり、潰瘍性大腸炎とCrohn病が含まれる。いずれの疾患も原因不明であり、現時点では寛解・維持が治療の目標となっている。抗体治療ではじめに適応となったものは抗TNF- $\alpha$ 抗体であるinfiximabであり、現在、潰瘍性大腸炎、Crohn病、いずれも適応となっている。また、同じ抗TNF- $\alpha$ 抗体adalimumabも潰瘍性大腸炎およびCrohn病の適応となっている。これらの抗体医薬の登場は炎症性腸疾患に対して高い有効性を打ち出している。特にCrohn病に関して、劇的な変化を遂げたといえる。

## 5. 悪性腫瘍に対する抗体治療

これまでの多くのがんに対する研究にもかかわらず、その成果が、がんの発生抑止および死亡率の低下に関して、人類に大きな恵みをもたらしているとはいえない。一方、画像診断や腫瘍マーカーに関する研究の進歩により、多くのがんにおける早期診断は可能になりつつある。この診断技術の長足の進歩により、早期がんに関しては、手術を主体とした治療度の高い治療法が確立されつつあり、この点に関しては、がんの研究が大きな成果となりつつあることは確かである。一方、一般的に、有効性の高い治療法がまだまだ十分には確立していない進行がんにおいては、そのような成果が見いだせないでいる。そのことが、全体としてのがん医療に関する充足度を押し下げていると思われる。

進行がんに対する治療の現状は、いわゆる抗がん剤を主体とした治療だけでは現状を打破することが不可能に近いことを示している。そのような状況のなかで登場してきたのが、抗体医薬である。近年のがん治療における最も大きな進歩に、この抗体医薬を主体とした分子標的薬の開発があげられ、それが実際に、がん治療の一翼を担う存在として認められつつあり、進行がんに対する治療も大きく変わっていく可能性が見えてきている。

現在の分子標的薬の開発の多くの努力は、がん細胞の成長因子受容体やその細胞内シグナル伝達、またgeneticあるいはepigeneticな変化を標的とした治療薬の開発に向けられている。実際の物質としてはmonoclonal antibody、small molecule、そしてantisense oligonucleotideなどがあげられる。このうち、抗体医薬は“魔法の弾丸”と称されて以来、特にがん治療に対して非常に高い期待とともに、最も長い開発の歴史をもっている。今日の実臨床におけるがん治療において抗体医薬への期待は非常に大きいものとなっている。

まず、現在、悪性腫瘍に対する抗体医薬品として、本邦で認可されている代表的な抗体に関して概説す

る。さらに、特に肝細胞がんに対して私たちが行っている分子解析を通じた抗体医薬の研究の一端も併せてお示ししたい。

### 5-1. 抗CD20抗体

#### ① rituximab (リツキサン、Rituxan®)

悪性リンパ腫に対する抗体医薬品で、標的であるCD20に対する抗体としては、現在、本邦ではrituximab、ibritumomab tiuxetanが悪性リンパ腫に対して認可されている。このうちrituximabは1997年にFDAで認可された世界で最初のモノクローナル抗体である。抗CD20抗体は、当初、マウス型抗体が作成され、この抗体に対するヒト抗体の産生が生じ、抗CD20抗体の開発は一時中断した時期もあった。しかしながら、その後の遺伝子工学の進歩によりマウス・ヒトキメラ型抗体が作成され、大きな進展を示した。この抗CD20抗体の作用機序としてはADCC活性、CDC活性、そしてアポトーシスの誘導が主なものとして考えられている。さらに最近、いわゆるワクチン効果の機序も考えられている。

悪性リンパ腫に対する治療はこの10数年で大きな進歩を遂げた。とりわけ非ホジキンリンパ腫において、このrituximabの登場は非常に大きく、標準治療として抗体医薬が含まれることになったわけである。rituximabはマウス・ヒトキメラモノクローナル抗体であるが、CD20陽性のB細胞性非ホジキンリンパ腫に適応となっている。rituximabの登場まで、長らくCHOP療法が標準治療として行われてきたが、ここにrituximabが登場したわけである。単独での使用も行われるが、CHOP療法との併用も行われてきた。CHOP療法の群とこれにrituximabを加えた群との比較において、CR率、event-freeおよびoverall survivalに関して、いずれも後者のrituximab併用群の有意な効果を認めた。CR率は前者が63%に対して後者は76%であった<sup>1)</sup>。現在では、この併用療法が標準治療となっている。その後もこのデータを追認するデータが報告され、生存率の改善に寄与していることが明らかにされている。徐々にCHOP療法を超えた治療法が見いだされたことになる。それが抗体医薬であり、このことが現

在の抗体医薬の注目度の高さの原因ともなっているわけである。

#### ② ibritumomab tiuxetan (ゼヴァリン、Zevalin®)

rituximabと同じCD20を標的とする悪性リンパ腫に対する治療薬として本邦で認可されているものにibritumomab tiuxetanがある。これはCD20に対するマウスモノクローナル抗体で、これに放射線同位元素であるyttrium-90(<sup>90</sup>Y)を結合した抗体医薬品である。リンパ腫細胞の放射線に対する感受性が高いことを利用した放射免疫療法といえる。このibritumomab tiuxetanはCD20陽性の再発または難治性の低悪性度B細胞性非ホジキンリンパ腫およびマントル細胞リンパ腫を適応症として認可されている。腫瘍細胞に選択的に結合し、放射性同位元素<sup>90</sup>Yが放射するβ線により、その細胞や近傍の標的となる悪性リンパ腫細胞に障害を与えられられている。この治療法は、ibritumomab tiuxetan-イットリウム(<sup>90</sup>Y)とibritumomab tiuxetan-インジウム(<sup>111</sup>In)の2剤がセットになって使用される。実際の使用は、前処置として、CD20抗体であるrituximabを点滴静注し、正常細胞上にわずかに発現しているCD20をマスクすることで、正常細胞にibritumomab tiuxetanが結合するリスクを下げる。その後、ibritumomab tiuxetan-インジウムを投与し、<sup>111</sup>Inが発するγ線を全身シンチグラムで検出することで、治療薬であるibritumomab tiuxetan-イットリウムの生体内分布を予測する。すなわち、ibritumomab tiuxetan-インジウムは治療用ではなく、治療の適否の決定の検出用に用いられる。ibritumomab tiuxetan-インジウムの結果に基づき、ibritumomab tiuxetan-イットリウムの治療を行うか否かを決定し投与を行う。rituximabの投与からibritumomab tiuxetan-イットリウムの投与まで要する期間は1週間となる。また、<sup>90</sup>Yの物理的半減期が64.1時間と比較的短いため、本薬剤は受注生産となっている。

#### ③ ofatumumab (アーゼラ、Arzerra®)

ofatumumabは抗CD20ヒト抗体である。2013年4月にB細胞性慢性リンパ性白血病(B-CLL)

に対して承認された。rituximabと抗原認識部位が異なり、よりCDC活性が強いといわれている。ofatumumabによる再発・難治性B-CLLに対する海外第II相試験では、約半数がrituximabによる前治療歴があったが、overall response rateはrituximabの前治療歴がある患者で43%、rituximabの前治療歴がない患者で53%、奏効例における奏効期間中央値は約6ヵ月と比較的良好な成績も報告された。さらに現在、悪性リンパ腫に対する開発も進行中であり、ofatumumabとrituximabの比較試験なども行われている。

## 5-2. 抗HER2抗体

### ①trastuzumab(ハーセプチン、Herceptin<sup>®</sup>)

固形がんに対する抗体医薬品の代表格がこのtrastuzumabである。増殖因子受容体であるHER2に対するヒト化抗体である。HER2は多くの上皮性腫瘍に発現されていることが報告されている。trastuzumabの作用機序としては、HER2の細胞外領域に結合して、ADCC活性の誘導やHER2からのシグナル伝達阻害などを生じると考えられている。HER2陽性乳がんに対して用いられ、これまで多くの臨床試験が行われ報告されてきている。転移性乳がん単剤として用いた成績としては、overall response rateが26%などがあげられる<sup>2)</sup>。また、doxorubicinとcyclophosphamideあるいはpaclitaxelとこれにtrastuzumabを加えた群との比較で、またdocetaxel単剤群とこれにtrastuzumabを加えた群のいずれにおいてもtime to disease progression、response rate、median overall survivalに関して有意差をもってtrastuzumabを加えた群で良好な成績が報告された<sup>3,4)</sup>。これら以外にも多くの化学療法との併用が試みられ、報告されている<sup>5)</sup>。さらに、早期の乳がん症例に対するadjuvantとしてのtrialが多く行われ、高い有用性が報告されている<sup>6)</sup>。現在、trastuzumabはこのように乳がん治療において必須の薬剤として用いられている。

また、他の種々のがんに対する治療も試みられている。胃がんに関する臨床試験にToGA試験がある。この試験は胃がんに対して初めて行われた分

子標的薬の第III相試験であり、切除不能進行・再発HER2陽性胃がんに対して行われた。コントロール群は5FUあるいはcapecitabinとcisplatinumの群、そしてこれにtrastuzumabを加えた群である。HER2陽性は22.1%であり、特にアジアでは55%と他地域に比して高率であった。overall survivalはコントロール群が11.1ヵ月、trastuzumab群が13.8ヵ月で有意差をもって生存期間の延長が報告された。progression free survivalは5.5ヵ月に対して6.7ヵ月、response rateは34.5%に対して47.3%といずれも有意差をもってtrastuzumab群が上まわっていた。2011年本邦において、HER2陽性胃がんに対して承認された。

### ②pertuzumab(パージェタ、Perjeta<sup>®</sup>)

抗HER2抗体の2番目にpertuzumabが2013年6月に乳がんに対して認可された。pertuzumabはtrastuzumabとは異なる部位に結合する抗HER2ヒト化抗体である。trastuzumabがHER2の細胞外領域IVに結合するのに対して、pertuzumabはHER2の細胞外領域IIに結合して、HER2と他のHERレセプター(EGFR/HER1、HER3およびHER4)の二量体化形成を特異的に阻害することによって、シグナル伝達を抑制すると考えられる。また、pertuzumabとtrastuzumabの作用機序は相互に補完すると考えられている。pertuzumabはtrastuzumabとの併用により、HERシグナル伝達系をより広範囲に遮断すると考えられている。今後、HER2陽性転移性乳がん治療のfirst lineに入っていくことが想定されている。

### ③trastuzumab emtansine(T-DM1、カドサイラ、Kadcyla<sup>®</sup>)

抗HER2抗体の3番目にtrastuzumab emtansine(T-DM1)が登場した。trastuzumab emtansineはtrastuzumabに化学療法剤emtansine(DM1)を結合させた抗体である。trastuzumab、taxan系抗がん剤の治療歴をもつHER2陽性局所進行/転移性乳がんを対象としたcapecitabin+rapatinibとT-DM1を比較した第III相試験の中間結果でprogression free survivalはT-DM1群

と capecitabin + rapatinib 群でそれぞれ9.6 ヶ月、6.4 ヶ月であり、T-DM1 群で有意な延長が得られ、また、2年の overall survival についてそれぞれ64.5%、47.5%と報告された。2013年9月本邦において承認された。現在、さらに T-DM1 単剤と T-DM1 + pertuzumab の比較試験も行われている。

### 5-3. 抗EGFR抗体

#### ① cetuximab (アービタックス、Erbix<sup>®</sup>)

cetuximab は増殖因子受容体である EGFR (epidermal growth factor receptor, HER1) に対するマウス・ヒトキメラ抗体である。EGFR は HER2 と同様に ErbB (HER) ファミリーに属し、多くの上皮性腫瘍に高発現していることが報告されている。この抗体の作用機序としては、シグナル伝達系に対する直接作用が最も考えられる。その他、ADCC 活性や CDC 活性も考えられているが明らかにはなっていない。irinotecan に抵抗性の転移性大腸がんの症例に対して行った cetuximab 単剤群と irinotecan と cetuximab を併用する群との比較試験において、前者の response rate が10.8% に対して後者は22.9%、time to progression は前者が1.5 ヶ月に対して後者は4.1 ヶ月、overall survival は前者が6.9 ヶ月に対して後者は8.6 ヶ月と irinotecan との併用群において優れた効果が報告された<sup>7)</sup>。その後、実際に使用され、また多くの臨床試験に至っている。この cetuximab の効果に関して、EGFR のシグナル伝達の下流に位置する重要な遺伝子である K-ras の変異と cetuximab の効果に関する報告がなされた。best-supportive care の患者さんと cetuximab を投与した患者さんとを比較した報告であるが、K-ras に変異のない群では overall survival に関して、前者で4.8 ヶ月に対して後者で9.5 ヶ月、time to progression については前者で1.9 ヶ月に対して後者で3.7 ヶ月と cetuximab 投与群において有意な効果を認めた。一方、K-ras の exon2 に変異を認めた群では cetuximab 投与の効果は認められなかった<sup>8)</sup>。このような分子解析の結果から、現状では、cetuximab は K-ras に変異のない症例に対して用いることとなり、irinotecan を含む化学療法に抵抗性となった場合では、K-ras の

変異がない症例に対して、FOLFIRI (irinotecan, fluorouracil, leucovorin) 療法に cetuximab を併用することを、転移性大腸がんの first line とすべきと報告された<sup>9)</sup>。さらにその後、種々の進行がんに対する cetuximab を用いた群と用いなかった群との randomized controlled trial が報告され、総じて cetuximab の有効性が報告されている<sup>10)</sup>。ただし、これらはまだ限られた症例での成績であり、現状のシグナル伝達系を考えてもこの結果が一般化できるかについては、多くの追試と *in vitro* での研究も必要であろう。

#### ② panitumumab (ベクティビックス、Vectibix<sup>®</sup>)

panitumumab は、同じ EGFR に対する抗体であるが、IgG2 ヒトモノクローナル抗体である点が大きな特徴である。EGF receptor の dimerization の阻害作用を有している抗体であり、化学療法抵抗性となった転移性大腸がんに対して認可されている<sup>11)</sup>。cetuximab に比べて EGFR に対して特異的かつ高親和性に結合し、EGFR のシグナル伝達の直接阻害作用に関してより強く効果を発揮すると考えられている。一方、ヒト型化モノクローナル抗体であるため cetuximab に比べてアレルギー機序による副作用が軽減されている。適応は EGFR 陽性で K-ras 遺伝子野生型の治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸がんである。その作用機序は cetuximab と概ね同じである。ただし、抗体による ADCC 活性は IgG サブクラスの中で IgG1 と IgG3 が強い活性をもつとされることから、cetuximab が IgG1 抗体であるのに対して、panitumumab は IgG2 抗体であるため ADCC 活性や CDC 活性は作用機序としては比較的弱いと考えられる。

### 5-4. 抗VEGF抗体

#### ① bevacizumab (アバスチン、Avastin<sup>®</sup>)

bevacizumab は VEGF (vascular endothelial growth factor) に対する中和抗体であり、ヒト化抗体である。VEGF はがんの血管新生に関与し、その増殖進展に重要な因子であり、このため本抗体は多くのがん腫に対する効果が期待されている。大腸がんに対しては IFL 療法群とこれに bevacizumab

を併用した群を比較して、response rate で前者が35%に対して後者が45%、time to progressionは前者が6.2ヵ月に対して後者が10.6ヵ月と併用療法の有効性が報告された<sup>12)</sup>。現状では進行大腸がんのfirst lineとして標準的な治療法となっており、さらにadjuvantとして、modified FOLFOX6にアバシチンを併用した報告もみられ<sup>13)</sup>、さらにFOLFIRI療法、Capeox療法などの併用療法もすでに広く行われている。また、抗体医薬品を2剤併用する試みも行われている。未治療の転移性大腸がんに対してcapecitabine、oxaliplatinそしてbevacizumabを投与した群とこれにさらにcetuximabを加えた群を比較した検討である。結果はmedian progression-free survivalで前者が10.7ヵ月に対して後者が9.4ヵ月であり、抗体医薬品を2剤併用した群のほうがむしろ有効性が少ないという結果であった<sup>14)</sup>。このことから単純に併用することが有効性の増大には結びつかないことを示している。今後、多くの知見の集積が必要と考えられる。

本邦におけるがん種の多くを占めているのはやはり消化器がんである。一方、このように、現状では、消化器がんに対する標的薬としての抗体医薬は大腸がんに対して大きなインパクトをもって登場している。しかしながら、他の消化器がんに対しては、抗体医薬はまだ発展途上といわざるを得ない。

## 6. 肝細胞がんに対する抗体医薬開発へ向けて

このような状況から、私たちは肝細胞がんに対する新薬創出のストラテジーを検討してきた。Interferon (IFN) と抗がん剤の投与により、アポトーシスが誘導される可能性についても論じてき

た<sup>15,16)</sup>。また、このライン上に抗体医薬の開発を試みている。肝細胞がんは現在、残念ながら本邦においてがんの死因の第4位に位置し、また世界的にみてもがんの死因の高位に位置している。特に、肝予備能力も低下した進行した肝細胞がんにおいては、治療の選択肢も少なく、予後の改善が得られていないのが現状である。この進行した肝細胞がんに対する治療薬として、肝予備能力に影響を与えない副作用の少ない抗体医薬はまさにうってつけの治療法と考えられる。

一方、FGFR-1 (fibroblast growth factor receptor-1) は、肝細胞がんにおいて、発現されていることが報告され、その進展に関与していることが知られている増殖因子受容体である<sup>17)</sup>。われわれのこれまでのFGFR-1に関する分子解析で、*in vitro* および *in vivo* のいずれにおいてもヒト肝がん細胞において、IFNの投与によりFGFR-1がさらに過剰発現されることが明らかになった<sup>18)</sup>。このFGFR-1は、非がん肝細胞には発現されていないこと、また、FGFR-1を介した刺激は細胞増殖および細胞浸潤、さらに血管新生に関与していることが報告されている。このようなことから、このIFNと抗FGFR-1抗体を併用することで、非がん肝細胞には影響を与えず、すなわち肝予備能力の低下を引き起こさず、肝がん細胞の増殖抑制、血管新生阻害が可能になることが予想された。このようなことから私たちは、FGFR-1に対する抗体を作製し、IFNとの併用によるヒト肝がん細胞に対するその抗がん効果の検討を行ってきたが、*in vitro* および *in vivo* のいずれにおいても、強い抗がん効果が認められている。現在、さらに、この抗体の作用増強をめざした構造改変を行っている。

## 文献

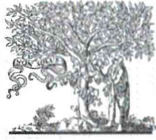
- 1) Coiffier B, Haioun C, Ketterer N, Engert A et al.: Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study. *Blood*, 15:92:1927-1932, (1998)
- 2) Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al.: Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2- overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 20:719-726 (2002)
- 3) Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al.: Use of

chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, 344:783-792 (2001)

- 4) Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, et al.: Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 Study Group. *J Clin Oncol*, 23:4265-4274 (2005)
- 5) Robert N, Leyland-Jones B, Asmar L, et al.: Randomized phase III study of trastuzumab, paclitaxel, and carboplatin compared with trastuzumab and paclitaxel in women with



- HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 24:2786-2792 (2006)
- 6) Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, et al: Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med*, 354:809-820 (2006)
  - 7) Cunningham D, Humblet Y, Siena S et al: *N Engl J Med*, 351: 337-345 (2004)
  - 8) Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al: K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*, 359: 1757-1765 (2008)
  - 9) Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E et al: Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 360: 1408-1417 (2009)
  - 10) Liu L, Cao Y, Tan A, Liao C, Gao F: Cetuximab-based therapy versus non-cetuximab therapy for advanced cancer: a meta-analysis of 17 randomized controlled trials. *Cancer Chemother Pharmacol*, 65: 849-861(2010).
  - 11) Van Cutsem E, Peeters M, Siena S et al.: Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy- refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 25:1658-1664 (2007)
  - 12) Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny et al.: Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 350:2335-2342 (2004)
  - 13) Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ et al.: Initial safety reports of NSABP C-08: A randomized phase-III study of modified FOLFOX6 with or without Bevacizumab for the adjuvant treatment of patients with stage II or III color cancer. *J Clin Oncol* 27: 3385-3390(2009)
  - 14) Jolien Tol, M.D., Miriam Koopman, M.D., Annemieke Cats M.D.et al.: Chemotherapy, Bevacizumab, and Cetuximab in Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med*, 360:563-71 (2009)
  - 15) Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H et al.: Integration of interferon-  $\alpha / \beta$  signalling to p53 responses in tumor suppression and antiviral defence. *Nature*, 424:516-521 (2003)
  - 16) Imai K, Takaoka A: Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nature Rev Cancer*, 6:714-727 (2006)
  - 17) Xinqiang H, Chungong Y, Chengliu J et al.: Ectopic activity of fibroblast growth factor receptor 1 in hepatocytes accelerates hepatocarcinogenesis by driving proliferation and vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. *Cancer Res*, 66:1481-1490 (2006)
  - 18) Sasaki S, Ishida T, Toyota M et al.: Interferon-  $\alpha / \beta$  and anti-fibroblast growth factor receptor 1 monoclonal antibody suppress hepatic cancer cells in vitro and in vivo. *PLoS One* 5:e19618 (2011)



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Biomaterials

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biomaterials](http://www.elsevier.com/locate/biomaterials)

## Actively-targeted polyion complex micelles stabilized by cholesterol and disulfide cross-linking for systemic delivery of siRNA to solid tumors



Yusuke Oe<sup>a</sup>, R. James Christie<sup>a</sup>, Mitsuru Naito<sup>b</sup>, Stewart A. Low<sup>b</sup>, Shigeto Fukushima<sup>b</sup>, Kazuko Toh<sup>a</sup>, Yutaka Miura<sup>a</sup>, Yu Matsumoto<sup>a</sup>, Nobuhiro Nishiyama<sup>a,c</sup>, Kanjiro Miyata<sup>a,\*\*</sup>, Kazunori Kataoka<sup>a,b,d,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

<sup>b</sup> Department of Materials Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

<sup>c</sup> Polymer Chemistry Division, Chemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of Technology, R1-11, 4259 Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama 226-8503, Japan

<sup>d</sup> Department of Bioengineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

<sup>e</sup> Center for NanoBio Integration, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 May 2014

Accepted 16 May 2014

Available online 13 June 2014

#### Keywords:

siRNA delivery

Polyion complex micelle

Active targeting

Cyclic RGD peptide

Cholesterol modified siRNA

### ABSTRACT

For small interfering RNA (siRNA)-based cancer therapies, we report an actively-targeted and stabilized polyion complex micelle designed to improve tumor accumulation and cancer cell uptake of siRNA following systemic administration. Improvement in micelle stability was achieved using two stabilization mechanisms; covalent disulfide cross-linking and non-covalent hydrophobic interactions. The polymer component was designed to provide disulfide cross-linking and cancer cell-targeting cyclic RGD peptide ligands, while cholesterol-modified siRNA (Chol-siRNA) provided additional hydrophobic stabilization to the micelle structure. Dynamic light scattering confirmed formation of nano-sized disulfide cross-linked micelles (<50 nm in diameter) with a narrow size distribution. Improved stability of Chol-siRNA-loaded micelles (Chol-siRNA micelles) was demonstrated by resistance to both the dilution in serum-containing medium and counter polyion exchange with dextran sulfate, compared to control micelles prepared with Chol-free siRNA (Chol-free micelles). Improved stability resulted in prolonged blood circulation time of Chol-siRNA micelles compared to Chol-free micelles. Furthermore, introduction of cRGD ligands onto Chol-siRNA micelles significantly facilitated accumulation of siRNA in a subcutaneous cervical cancer model following systemic administration. Ultimately, systemically administered cRGD/Chol-siRNA micelles exhibited significant gene silencing activity in the tumor, presumably due to their active targeting ability combined with the enhanced stability through both hydrophobic interactions of cholesterol and disulfide cross-linking.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Small interfering RNA (siRNA) inhibits expression of genes by a sequence-specific gene silencing effect, known as RNA interference

(RNAi) [1–3]. This property has generated much interest for development of siRNA drugs that inhibit production of proteins associated with disease. However, low bioavailability of siRNA has hampered its translation into clinical use. Efforts to improve the efficacy of siRNA drugs have led to development of many types of siRNA-loaded nanoparticles to overcome biological hurdles associated with siRNA delivery, e.g., enzymatic degradation, accumulation in non-target organs/tissues and inefficient cellular uptake [4–6]. In particular, the ability to target specific cells has proven to be highly effective for enhanced accumulation of nanoparticles in solid tumors through systemic administration and has also been

\* Corresponding author. Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan. Tel.: +81 3 5841 7138; fax: +81 3 5841 7139.

\*\* Corresponding author. Tel.: +81 3 5841 1701; fax: +81 3 5841 7139.

E-mail addresses: [miyata@bmw.t.u-tokyo.ac.jp](mailto:miyata@bmw.t.u-tokyo.ac.jp) (K. Miyata), [kataoka@bmw.t.u-tokyo.ac.jp](mailto:kataoka@bmw.t.u-tokyo.ac.jp) (K. Kataoka).