

**令和5年度 創薬基盤推進研究事業 研究開発課題
中間報告書**

研究開発課題名	モダリティ別蛍光プローブ・イメージング法とがんモデルの選択及び最適化による薬物動態評価法の開発	
代表機関名	国立研究開発法人国立がん研究センター	
研究開発代表者	所属 役職	先端医療開発センター新薬開発分野 分野長
	氏名	安永 正浩
全研究開発期間	令和3年11月30日 ～ 令和8年3月31日 (予定)	

研究開発成果概要：

研究代表者は、蛍光イメージングを用いて、固形がんにおける抗体デリバリーを阻害する間質バリアの存在を実証してきた。その経緯から、現状の蛍光イメージングにおいて、**passive targeting**(EPR 効果に基づく高分子サイズに依存した腫瘍集積性)と **active targeting**(がん細胞特異的な結合に依存した腫瘍集積性)が区別できていないという問題点に直面してきた。さらに、間質バリアを克服するために抗体の低分子化を行い、**passive targeting** の影響を無くしたが、体循環・血中や周囲正常組織に存在する蛍光抗体の存在による S/N 比低下が問題視された。

そこで、EPR 効果の影響を受ける高分子と EPR 効果の影響を受けない低中分子を区別して、各モダリティに適した蛍光プローブ/イメージング法を開発し、薬物動態(PK)評価の基盤を整備する。他方、評価系に関しては、一般的には個体差の少ない Cell line-derived xenograft (CDX)が有利であるが、実臨床への応用を考えた場合には、個体(個人)差を有するが、がん heterogeneity(C/He)とがん間質微小環境(TME)を有する patient-derived xenograft (PDX)の使用が現実的である。近年、マウス前臨床試験とヒト臨床結果の乖離が指摘されている。そこで、がん heterogeneity とがん間質微小環境を有する TR 用 CDX モデルを新たに構築して、各モダリティの in vivo の PK 評価法に有用な蛍光イメージング法の開発及び動物モデルの選択・適正化に役立てる。

(1) 低中分子モダリティ用蛍光プローブの開発

S/N 比の高い低中分子モダリティ用蛍光プローブの開発に必要なケミカルバイオロジーの技術基盤の整備を行った。その結果、波長が 650～700nm の4種類の蛍光色素 SiR650(COOH/Me)及び SiR700(COOH/Me)をプラットフォームとして活用できるようになった。蛍光分子の近赤外線化は、組織透過性の向上による in vivo イメージングでの有効性と共に、ex vivo における組織自家蛍光によるバックグラウンドの低下により、弱いシグナルの観測にも有用である。共同研究先からのリクエストがあった場合には、整備・確立したケミカルバイオロジー・ベースの技術基盤により、水溶性・蛍光波長などのパラメーターを調整したオーダーメイド用蛍光色素の合成も可能となった。次いで、近赤外線光蛍光プローブの有効性を検証するために、ツールドラッグとして、低分子葉酸リガンドにペプチドリンカーを介して SiR650(COOH)を付加した蛍光プローブを作製した。葉酸受容体陽性卵巣がん細胞株 KB を対象にして、in vitro での特異的結合性を確認した。次いで、同動物モデルで、in vivo 蛍光イメージングを行い、腫瘍部において高い S/N 比を示すことを確かめた。

(2) 高分子モダリティ用蛍光プローブの開発

蛍光が OFF から ON へと変化する蛍光色素を合成して、抗体プローブに標識することで、高分子モダリティ用の active targeting 評価系を構築するものである。そこで、高分子モダリティ用蛍光プローブの開発に必要なケミカルバイオロジーの技術基盤の整備を行った。まずは、Halo Tag を用いた蛍光 OFF-ON スwitchingの原理検証を行った。Halo Tag 結合前の蛍光 OFF 状態から、Halo Tag 結合した5分後に蛍光シグナルが検出され、10分後には蛍光シグナルが ON になっていることを確認することが出来た。さらに、高分子モダリティ用の active targeting 評価系の開発を開始して、ツールドラッグとしての抗 EGFR 抗体の準備・選択を行い、開発を継続した。

(3) モダリティ別蛍光イメージング法の開発と動物モデルの選択・適正化

がん heterogeneity とがん間質微小環境を有する TR 用 CDX モデルを新たに構築して、各モダリティの in vivo の PK 評価法に有用な蛍光イメージング法の開発及び動物モデルの選択・適正化に役立てる。各モダリティの in vivo 評価に必要な CDX/PDX モデルを整備した。さらに、Cancer associated fibroblast (CAF)細胞の in vitro 培養系での調整法を確立した。膵臓がん細胞と CAF の混合スフェロイドで、蛍光イメージングによる抗体デリバリー評価に有用であることを確かめた。引き続き、マクロファージ (MΦ)の in vitro 培養系での調整を行った。CAF 同様に、蛍光イメージングによる抗体デリバリー in vitro 評価に有用であることを確かめた。

(4) 研究計画の変更に伴う追加項目

①本蛍光イメージング技術のシーズ対応展開研究として、令和4年度調整費により、門之園哲哉准教授（東京工業大学）提供シーズ：抗 HER2 ナノボディについて、オーダーメイドで蛍光色素 SiR680(COOH) 合成と動物モデルでの薬物動態解析を行った。

②令和4年度調整費・令和5年度研究課題連携により、華山力成教授（金沢大学）提供のシーズ：人工エクソソームをコードする mRNA の薬物動態解析法の研究開発を行い、抗体以外のモダリティとしてナノ粒子に関しても、本蛍光イメージング・PK 評価法を活用して、その有用性を示す実験を行った。これまでに、DiR で蛍光標識した脂質ナノ粒子(LNP)に関して、蛍光イメージングで PK 解析を行った。

③令和5年度調整費により、本田諒准教授（岐阜大学）提供のシーズ：Non-G12C 変異型 RAS を標的とするキメラ型タンパク質】の薬物動態解析法の研究開発も開始した。現在、動物モデルの作製と提供されたシーズの生体投与を含めた予備検討を行った。

以上