

分子イメージングを駆使した ADC の開発

安永正浩,^{*,a} 眞鍋史乃,^b 辻 厚至,^c 古田 大,^d 緒方是嗣,^d
古賀宣勝,^a 藤原悠起,^a 佐賀恒夫,^c 松村保広^a

Development of ADCs Using Molecular Imaging

Masahiro Yasunaga,^{*,a} Shino Manabe,^b Atsushi Tsuji,^c Mamoru Furuta,^d Koretsugu Ogata,^d

Yoshikatsu Koga,^a Yuki Fujiwara,^a Tsuneo Saga,^c and Yasuhiro Matsumura^a

^aDivision of Developmental Therapeutics, EPOC, National Cancer Center; 6-5-1 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8577,

Japan; ^bSynthetic Cellular Chemistry Laboratory, RIKEN; 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan;

^cDiagnostic Imaging Program, Molecular Imaging Center, National Institute of Radiological Sciences;

4-9-1 Anagawa, Inage-ku, Chiba 263-8555, Japan; and ^dShimadzu Corporation;

1 Nishinokyo-Kuwabara-cho, Nakagyo-ku, Kyoto 604-8511, Japan.

(Received October 24, 2016)

Antibody–drug conjugates (ADCs) comprise an antibody, a linker, and a drug or payload. The selection of a tumor-specific antibody and development of a linker having an efficient controlled drug release (CDR) are critical steps in developing a fully functional and effective ADC. In our research strategy, molecular imaging technologies have been employed to evaluate the efficiency of antibody delivery and CDR of the linker. In preclinical setting, antibody delivery into the tumor area or antibody penetration through the tumor stroma in malignant lymphoma or pancreatic tumor was evaluated by *in vivo* fluorescence imaging technique. Positron emission tomography (PET) imaging studies were conducted using ⁸⁹Zr-labeled antibody to evaluate tumor targeting in a spontaneous carcinogenesis model. The model had dense stroma and was pathophysiologically very similar to human cancer. The drug imaging system, using microscopic mass spectroscopy (MMS) with enhanced resolution and sensitivity, was used for the evaluation of CDR. Paclitaxel (PTX)-incorporated micelle, a high-molecular-weight (HMW) carrier with CDR, showing similar properties as those of ADC, was analyzed. In contrast to free PTX, micelle selectively increased drug accumulation into the tumor and reduced toxicity in normal tissues by the enhanced permeability and retention (EPR) effect. Our drug imaging system has been used recently to evaluate the CDR of the ADC-linker. We present our work on the development of ADC using a molecular imaging technique.

Key words—antibody–drug conjugate; molecular imaging; drug delivery system; antibody; MS imaging

はじめに

欧米を中心に抗体医薬の臨床応用が進んでいる。さらに、次世代抗体医薬として、antibody–drug conjugate (ADC) や Bispecific antibody などの開発も盛んである。ADC の場合は、再発性や転移性

の難治性がんに対して有効性が示されている点が大きな強みである。また、ADC の場合はドラッグデザイン上、抗体はアクティブターゲティング能を持つ高分子キャリアと言える。さらに、薬剤を結合しているリンカーは、血中では安定で腫瘍部局所では薬剤を効率よくリリースできるコントロールド・リリース能が大変重要視されている。したがって、通常抗体医薬は分子標的剤の範疇として扱われることが多いが、ADC に関しては薬剤の特徴は drug delivery system (DDS) 製剤そのものとも言える。そこでわれわれは通常の DDS 製剤同様にドラッグデリバリーの観点から、ADC の研究開発を行っている。抗体の体内動態・腫瘍集積性や薬剤のコントロールド・リリースの観察・評価には分子イメージ

^a国立がん研究センター先端医療開発センター新薬開発分野 (〒277-8577 千葉県柏市柏の葉 6-5-1), ^b理化学研究所細胞制御化学研究室 (〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1), ^c放射線医学総合研究所分子イメージングセンター分子病態イメージング研究プログラム (〒263-8555 千葉県稲毛区穴川 4-9-1), ^d株式会社島津製作所 (〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町 1)

*e-mail: mayasuna@east.ncc.go.jp

本総説は、日本薬学会第 136 年会シンポジウム S09 で発表した内容を中心に記述したものである。

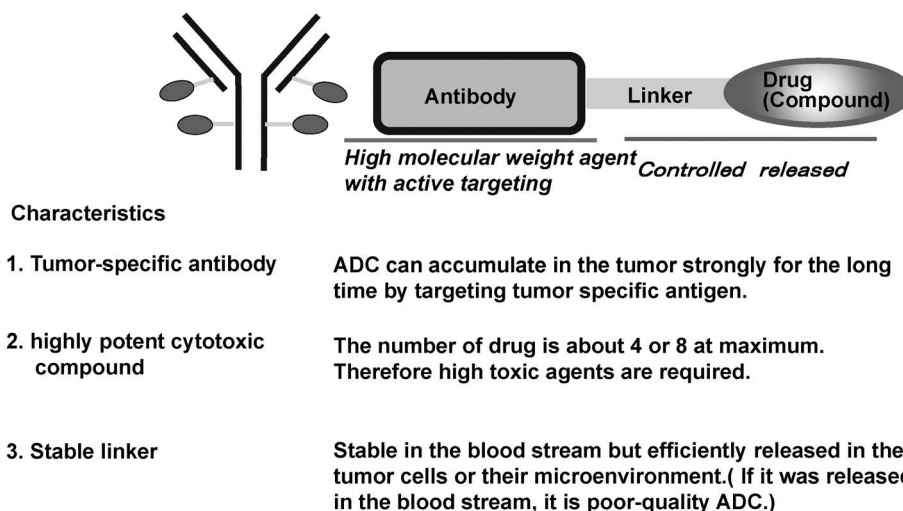


Fig. 1. Structure of ADC

ング・テクノロジーが大変効果的である。分子イメージングを駆使したわれわれのADCの研究開発について報告する。

ADC と DDS について

ADC は基本的に 1) がん特異抗体, 2) 毒性の強い薬剤 (化合物), 3) 安定性の高いリンカーで構成されている比較的単純な構造である (Fig. 1)。がん特異抗体は、高分子である抗体の持つ enhanced permeability and retention (EPR) 効果 (=腫瘍血管の未熟性による内皮細胞接着性のルーズ性と血管透過性亢進により 10–200 nm の高分子が漏れ易く、加えて回収系のリンパ管が欠如するために長く局所に留まる特性)¹⁾によるパッシブターゲティングと各抗体の持つ抗原特異的な親和性に依存したアクティブターゲティングにより、ADC をがん組織に強く長く集積させることができる。²⁾ また、抗体に付加できる薬剤数は平均 4 個で、最大でも 8 個程度なので、少量でも強い殺細胞効果を示す毒性の強い薬剤が使用される。さらに、抗体と薬剤を結ぶリンカーが大変重要であり、血中では安定で、がん組織・がん細胞内で薬剤を効率的にリリースできる必要がある。^{3,4)} Figure 1 に示すごとく抗体部分は DDS 製剤のキャリアに相当し、リンカー薬剤はコントロールド・リリース重視で作製されるということになる。したがって ADC は DDS 製剤の特徴を大きく備えているということになる。DDS 製剤は血中での安定性と滞留性のよさが長所で高分子キャリアの持つ EPR 効果に依存したパッシブターゲッ

ティングにより腫瘍選択的に強く長く集積することができる。また、よりサイズの小さな DDS 製剤が組織浸透性に優れており効果的に作用することも示されている。さらに、キャリアががん細胞に取り込まれるか、あるいは細胞外でキャリアから放出された薬剤ががん細胞に作用を及ぼすことで薬効を示すことができる。^{5–11)} Figure 2 に DDS 製剤と ADC の薬理薬効フェーズを示しているが、ADC も全く同様のフェーズで効果を示すことがよくわかる。リボソームやミセルなどの高分子キャリアが抗体に変わっただけでも言える。抗体デリバリーとコントロールド・リリースの評価が大変重要というわけである。そこで、われわれは分子イメージング・テクノロジーを積極的に活用している。すなわち、*in vivo* 蛍光/PET・SPECT イメージングによる抗体デリバリーの評価と質量顕微鏡による MS イメージングでリンカー薬剤のコントロールド・リリースの評価を行うというものである。

分子イメージングを用いた抗体デリバリーの評価薬理薬効フェーズの前期を理解する上で重要な要素が生体内クリアランスと EPR 効果ということになる。Figure 3 の *in vivo* イメージングで示すように、非特異抗体 IgG も EPR 効果によるパッシブターゲティングにより腫瘍に選択的に集積する。一方、特異抗体はパッシブターゲティングにアクティブターゲティングが加わるので、より強く長く腫瘍に集積することができる。一方低分子化 Fab は腎排出によるクリアランスが高まるのと EPR 効

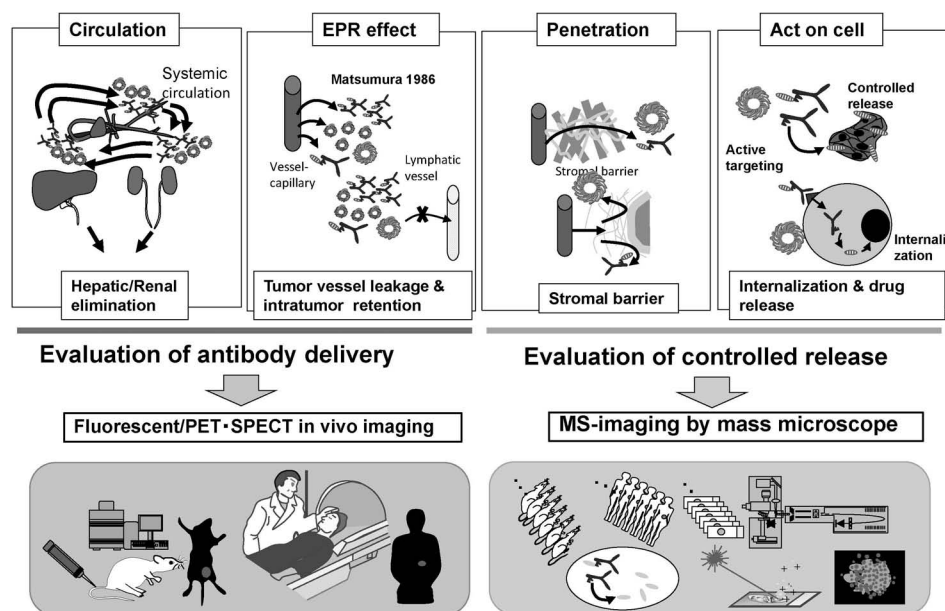
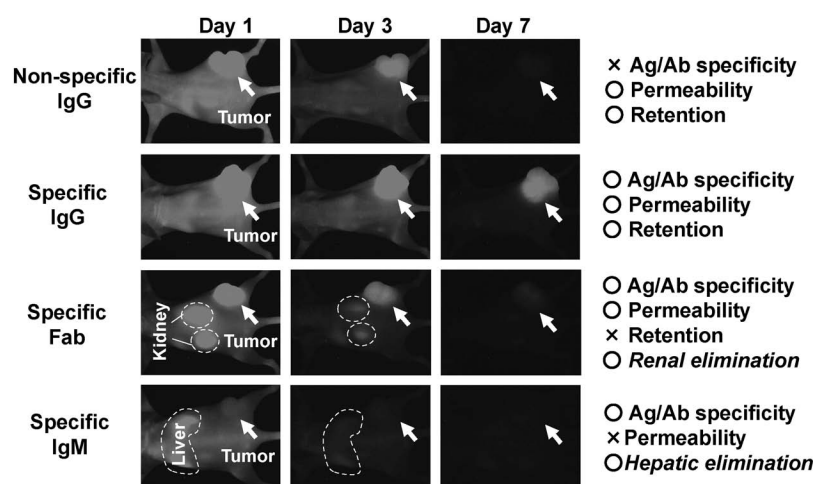


Fig. 2. Action Steps of ADC and Molecular Imaging Based Evaluation

Fig. 3. Evaluation of Antibody Delivery with *in Vivo* Imaging

In vivo imaging analysis of HT29 tumor was conducted using near-infrared labeled antibodies on day 1, 3 and 7 after the injection.

果によるパッシブターゲティングの能力を失うので、腫瘍への集積日数は非特異抗体と同じである。さらに、IgM の場合は肝臓での代謝が速いので腫瘍血管からの漏出性・浸透性も悪いため、腫瘍の集積性は低下している。特異抗体なのに非特異抗体も標的特異性が低いという逆転現象が観察されることになる。*In vitro* では絶対みられない *in vivo* 特有の現象であり、抗体デリバリーを評価することの重要性を示している。

脳腫瘍・膵臓がんなどの難治性がんに対しても ADC の臨床応用が期待されているが、これまでの

ところ、基礎となる抗体医薬自体が臨床的には有効性が示されていないという大きな問題が存在する。われわれは、これら難治性がんの病理組織学特徴に着目した。すなわち、抗体医薬や ADC が有効な悪性リンパ種や乳がんでは血管が豊富で間質は少ない傾向にある。一方、脳腫瘍・膵臓がんではがん細胞以外の間質や壊死部分が多い。前者では血液脳関門の存在が、後者では乏血管性腫瘍ということで、抗体を含むドラッグデリバリーの大きな障害になっている。さらに、腫瘍内部では豊富な間質が抗体の腫瘍内浸透性を阻害している。いわゆる間質バリアに

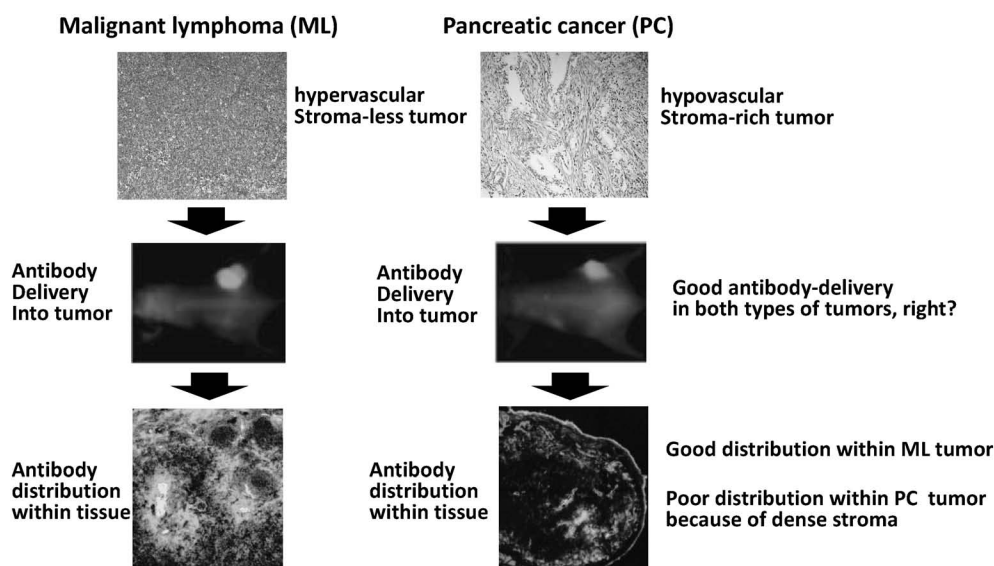


Fig. 4. Visualization of Tumor Stromal Barrier

Upper panel, hematoxylin-eosin staining of malignant lymphoma (left) and pancreatic cancer (right). Middle panel, *in vivo* imaging of fluorescent mAbs. Anti-CD 20 and anti-EpCAM mAbs were injected into malignant lymphoma (ML) and pancreatic cancer (PC) model respectively. Lower panel, distribution of anti-CD 20 mAb and anti-EpCAM mAb within ML tumor and PC tumor respectively.

よるドラッグデリバリー障害である。^{12,13)} この間質バリアを分子イメージングで可視化した。悪性リンパ種では血管以外の間質がほとんど存在しないが、膵臓がんでは、青色のがん細胞は茶色の厚い間質で覆われている。この2種類のがん種の動物モデルに対して、蛍光標識した腫瘍特異抗体を投与してデリバリーを観察・測定した。体全体の *in vivo* イメージングでは、どちらも腫瘍選択的に集積していた。しかしながら、腫瘍摘出後に組織内浸透性を確認したところ、悪性リンパ種では腫瘍全域に抗体が浸透していたのに対して、膵臓がんでは、腫瘍血管から漏出して周囲に浸透をしているが、腫瘍内部への浸透性は著しく低下していた。豊富な間質による抗体デリバリーの阻害効果をあらわしている。この問題に対して、間質を標的にした ADC として CAST 療法の開発を行っている。^{2,14-16)} 詳しくは他稿（松村）を一読してもらうとして、CAST 療法で使用している間質の不溶性フィブリンを標的にした抗フィブリン抗体の分子イメージングによる評価について、次節で紹介する。

PET イメージングの応用

抗体イメージング用 PET 核種では、⁶⁴Cu（銅、半減期 13 時間）、⁷⁶Br（臭素、半減期 16 時間）、⁸⁹Zr（ジルコニウム、半減期 72 時間）といった中半減期核種が用いられるが、今回は半減期が約 3 日

の ⁸⁹Zr を用いた。抗体 IgG の場合は投与半減期が 3-7 日と長いので、半減期が 1 日以下の ⁶⁴Cu（銅）や ⁷⁶Br よりも、有効と判断した。Figure 4 に実際に撮影したイムノ PET を例示する。ヒト同様の間質が豊富な病理組織像を示す皮膚化学発がんモデルを使用した。¹⁴⁾ 蛍光イメージング同様にコントロール抗体も EPR 効果で腫瘍に集積するが、抗フィブリン抗体はより強く長く腫瘍に集積することができる。同じく下段に PET/CT イメージングで冠状断面と横断面を示している。PET 画像で腫瘍部に抗フィブリン抗体が選択的に集積しており、CT 画像で検出された腫瘍部と一致していることがよくわかる (Fig. 5)。¹⁷⁾ 最近では PET/CT に加えて PET/MRI の普及も進んでいる。すなわち、CT や MRI の形態診断に加えて、PET による機能診断が同時に可能というわけである。臨床的には PET プローブは、現時点では FDG やメチオニンなど細胞代謝を標的にしたものが主流であるが、今後は抗体をプローブにしたイムノ PET の臨床応用も進むものと思われる。今回われわれは ADC の研究開発用にイムノ PET（あるいは SPECT）を活用したが、今後は ADC のコンパニオン診断やがんの早期診断や悪性度の判別などの質的診断に対してもイムノ PET（あるいは SPECT）は有用と考えている。実際に欧米では、個人の特性に基づくプレジジョン医療の

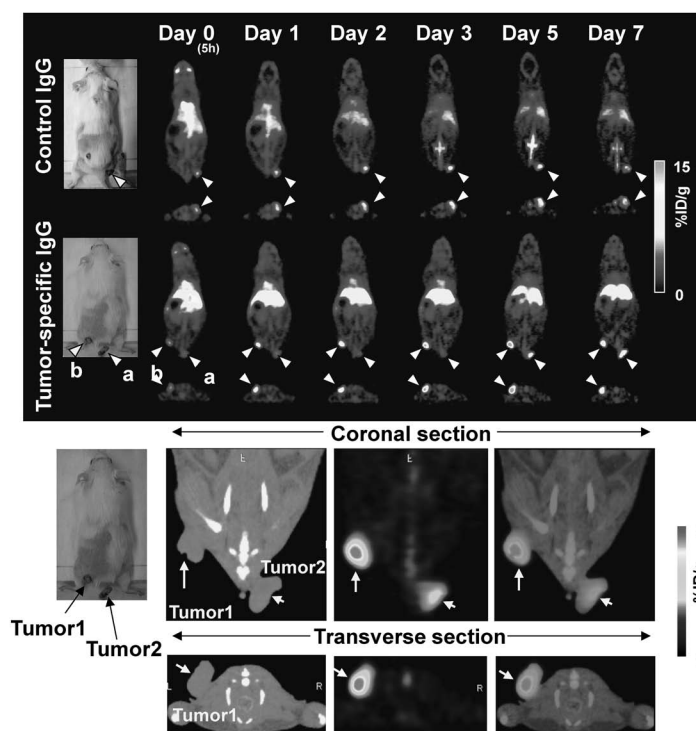


Fig. 5. Evaluation of Antibody Delivery with PET Imaging

PET imaging analysis of HT29 tumor was conducted using Zr labeled antibodies on day 0, 1, 2, 3, 5 and 7 after the injection. PET/CT was also done.

実践にイムノPETを積極的に活用しようという試みも始まっている。¹⁸⁾

MS イメージングと質量顕微鏡

MS イメージングとは、質量分析装置を用いて、病理組織切片上にある生体分子や代謝物などの標的分子の局在を直接可視化する方法である。¹⁹⁻²²⁾ 質量分析の際に、重要になるのが標的分子のイオン化である。今回は matrix-associated laser desorption/ionization (MALDI) 法を用いている (Fig. 6)。MALDI 法では調製した混合結晶にレーザーを照射することによって、マトリックスが光を共鳴吸収して急速に気化する。このとき同時にマトリックスがイオン化する。試料である生体分子はレーザー照射によって、直接イオン化することはないが、照射部位周辺のマトリックスとともに脱離が生じる。このあと、イオン化したマトリックスと生体分子との間でプロトンや電子のやり取りが行われることで、生体分子のイオン化が起こる。マトリックスとしては、タンパク質の分析にはシナピン酸 (Sinapinic acid) がよく使われるが、ペプチドあるいはトリプシン消化ペプチドの分析には α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) や 2,5-dihydroxybenzoic

acid (DHB) が用いられる。また低分子代謝物の分析 (主に脂質の分析) には DHB をマトリックスとして測定することが多い。MALDI が生体分子のイオン化のことで、イオン化した生体分子を分析が解析するのが、質量分析法としての time-of-flight MS (TOF MS) である (Fig. 6)。原理はシンプルで、質量の違いに基づく飛行時間の違い (軽い分子は速く、重い分子は遅く空中を飛行する) から分子量を算出して分子を同定するというものである。同じ分子でも電荷数 2 の分子は電荷数 1 の同一分子より 2 倍早くなる。したがって、正確には質量電荷比 m/z が測定されることになる。この質量電荷比はその分子に特徴的なもので、これを基に分子を同定できるという訳である。このよう MALDI で生じた分子イオンを検出器で測定することで、対象分子の質量分析を行うことができる。

今回、われわれがドラッグイメージングに活用した MS イメージング装置は質量顕微鏡と呼ばれるもので、MS イメージング技術に光学顕微鏡システムを融合した新しいコンセプトのイメージング装置である。²³⁾ 専用の顕微鏡装置により対象組織の透過光画像が直接得ることができるので、MS イメージ

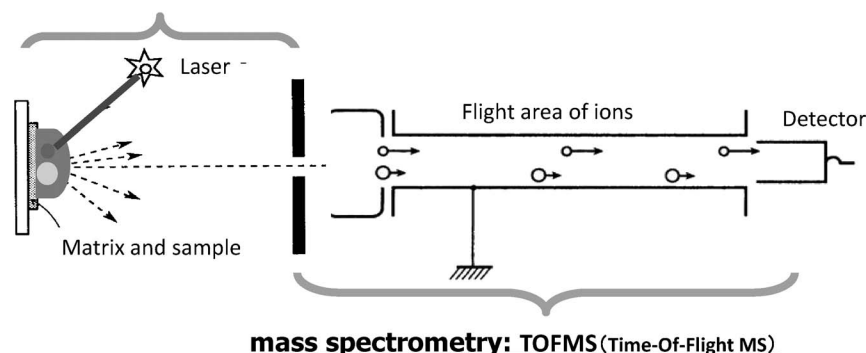
Ionization: MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)**mass spectrometry: TOFMS (Time-Of-Flight MS)**

Fig. 6. Principle of MALDI-TOFMS

Matrix is absorbing the laser energy and helping to ionizing the non-absorbing sample. Charged ions of various sizes are then generated from the sample. The velocity of the attracted ions is determined by the law of conservation of energy. Ions with smaller m/z value (lighter ions) and more highly charged ions move faster through the drift space until they reach the detector. Consequently, the time of ion flight differs according to the mass-to-charge ratio (m/z) value of the ion. m/z ; Dimensionless quantity formed by dividing the mass of an ion in unified atomic mass units by its charge number.

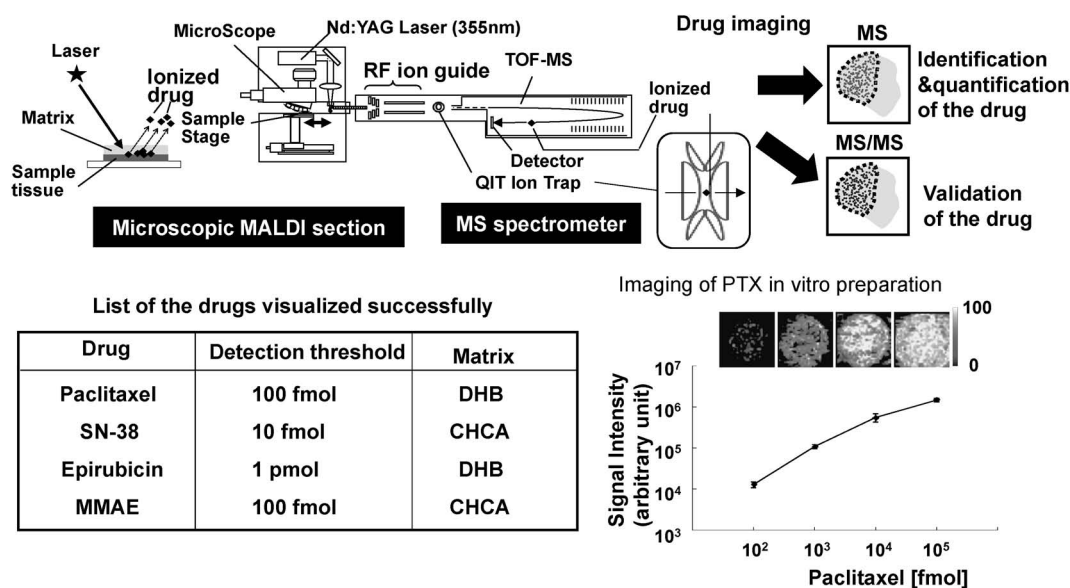


Fig. 7. Drug Imaging with Mass-microscope

A schematic representation of our drug imaging system is shown. Imaging data were acquired using a mass microscope. In the analysis, MS and tandem mass spectrometry (MS/MS) were used for quantification and validation, respectively. In the lower right, images and graph show the positive correlation of imaging intensity and concentration of paclitaxel (PTX) (m/z 892.3 [M+K]⁺).

ング画像との対比が容易である。さらに、 $5\text{--}10\ \mu\text{m}$ の高い空間分解能を有する。薬剤の可視化に有利と考えた。

質量顕微鏡・MS イメージングによるコントロールド・リリースの評価

前述の MS イメージング装置・質量顕微鏡を用いて、ドラッグイメージングの開発を行い、コントロールド・リリースの評価に応用した (Fig. 7).^{23,24)} ADC の場合は付加できる薬剤が通常 3–4 個で最大でも 8 個なので、薬剤によっては感度不足で見えないこともある。そこで、薬剤を 200 個以上

搭載できる抗がん剤内包ミセルでの評価を先行して行った (Fig. 8).²³⁾ Figure 8 には、上段に低分子化合物として投与されたフリーのパクリタキセル (paclitaxel; PTX) が、下段には高分子 DDS 製剤として投与されたミセルからリリースされた PTX (PTX-ミセル) が腫瘍組織と末梢神経周囲の正常組織別に示されている。フリーの PTX は低分子であるため、腫瘍へもデリバリーされ集積するが、正常の末梢神経周囲にも同じようにデリバリーされ集積するので、副作用としての末梢神経炎の原因となる。一方、PTX-ミセルに関しては、腫瘍部では、

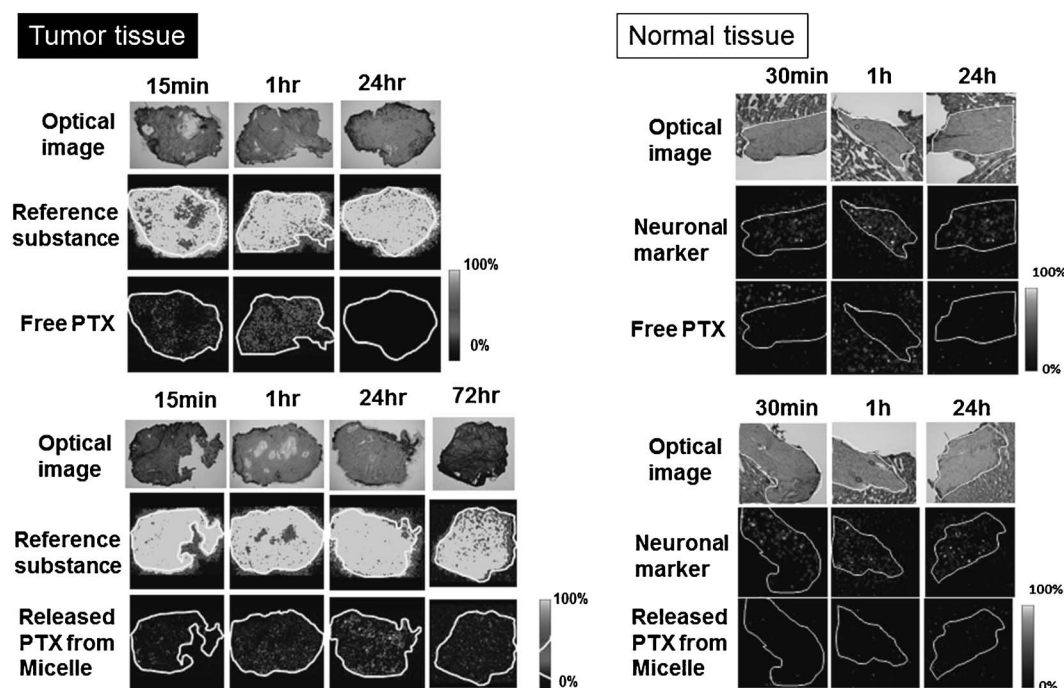


Fig. 8. Visualisation of DDS Drug

In tumor tissue, upper, middle, and lower columns show optical images, reference substance (an arbitrary signal of m/z 824.6), and PTX (specific signal of m/z 892.3 $[M+K]^+$), respectively. In normal tissue, upper, middle, and lower columns show optical images, neuronal marker (sphingomyelin-specific signal of 851.6 m/z), and PTX (specific signal of m/z 892.3 $[M+K]^+$), respectively. Neuronal area is delineated by a white line.

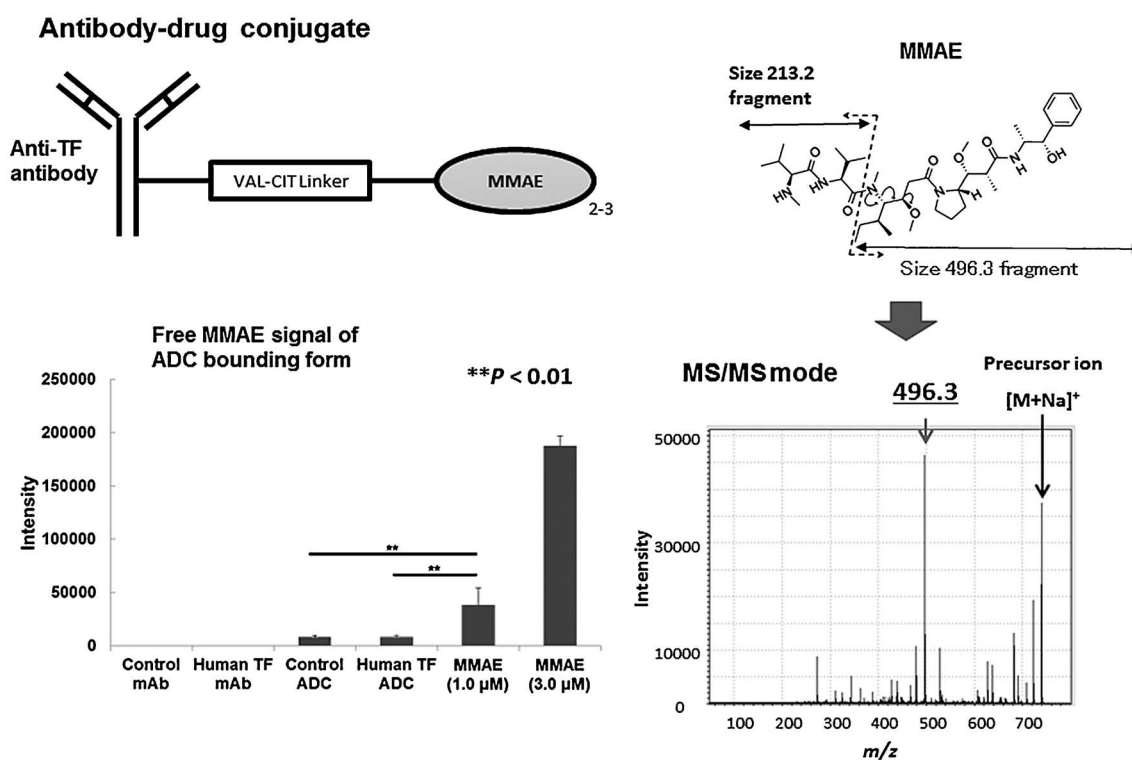


Fig. 9. Visualization of MMAE Released from ADC

The MMAE-specific MS/MS fragment, m/z 496.3, was determined when $[M+Na]^+$ was used as a precursor ion in the MS/MS analysis. In MS analysis, MMAE signal (m/z 740.4) of the antibody, ADCs and each MMAE samples were measured. It was confirmed that MS imaging analysis was capable of distinguishing between MMAE alone and ADCs conjugated with MMAE.

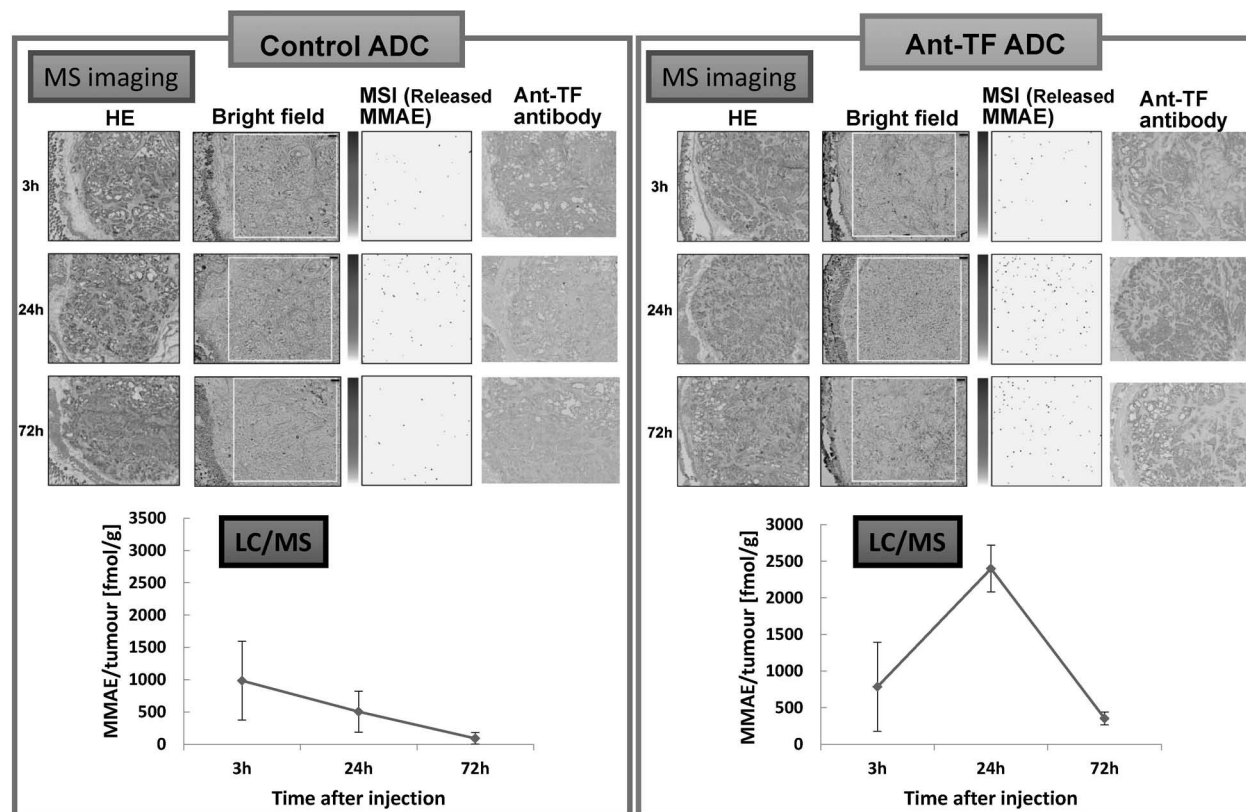


Fig. 10. Evaluation of Controlled Release of ADC by Using MS Imaging

H&E staining is shown in the left column. The rectangles on the bright field show the measurement area. The released MMAE signals obtained from m/z 496.3 using mass-microscope are shown as pseudo-colour images. The signals of antibody/ADC were acquired from immunostaining with horseradish peroxidase (HRP) labelled anti-IgG antibodies.

投与後 24 時間にピークで 72 時間後も PTX を検出できた。正常では高分子の DDS 製剤は漏出しないため、PTX-ミセルのシグナルはほとんど検出されない。すなわち、MS イメージングで EPR 効果を可視化することに成功したことになる。ついで、DDS 製剤に続いて、ADC の可視化に挑戦した。²⁴⁾ 対象として、抗組織因子 (TF) 抗体・MMAE 複合体を用いた。MMAE の場合は PTX の場合と異なり、MS モードでは *vivo* に投与した場合、サイズが同じ生体由来の分子と重なるため、MMAE のみを分離観察できないという問題が生じた。そこで、MS/MS で MMAE 由来のサイズ 496.3 フラグメントを観察することで、生体由来の分子と区別して可視化・観察することがわった。さらに、MALDI におけるレーザー照射による影響で ADC のリンカー結合部が外れてフリーの MMAE が検出されていないことを確かめた (Fig. 9)。すなわち、MS イメージングで観察した 496.3 のフラグメントは ADC よりリリースされた MMAE ということにな

る。Figure 10 には膵臓がんモデルにコントロールの非特異的 ADC と腫瘍特異的な抗 TF 抗体の ADC を投与した後の腫瘍を摘出して、質量顕微鏡で観察した MS イメージング画像を示している。コントロール ADC に対して、24 時間後をピークに腫瘍内部でリリースされた MMAE を確認することができた。シグナルの特異性を LC-MS で検証できた。ADC 自体に関しては、連続切片で組織切片中の抗体/ADC に対して抗 IgG 抗体を用いて免疫染色を行うことで検出することができた。コントロール抗体が 3 時間をピークに一過性に腫瘍に集積しているのに対して、抗 TF 抗体の ADC は 24 時間後に強く集積していた。このことから、抗 TF 抗体の ADC のコントロールド・リリースがうまくいっていることが理解できた。²⁴⁾ この測定結果を反映して非臨床試験においても、抗 RT 抗体の ADC は膵臓がんモデルで強い抗腫瘍効果を示すことを確認することができた。²⁵⁾

まとめ

1. 高分子でアクティブターゲティングを有する抗体とコントロールド・リリース能を有するリンカー・薬剤の組み合わせである antibody-drug conjugate (ADC) は、DDS 製剤そのもので、抗体デリバリーとコントロールド・リリースの評価は大変重要と言える。

2. 抗体デリバリーの評価には、*in vivo* 蛍光/PET イメージングが、コントロールド・リリースの評価には、質量顕微鏡を用いた MS イメージングが大変有用であった。ADC の研究開発における分子イメージングの有用性が示された。

おわりに

21 世紀はバイオ医薬品の時代と言われている。中でもいち早く臨床応用が達成されて、爆発的に研究開発が進んでいるのが抗体医薬である。最近承認された免疫チェックポイント阻害剤は抗 PD-1/PD-L1 抗体であり、スタチン抵抗性の高脂血症に対して有効性が示されたのも抗 PCSK9 抗体である。²⁶⁾ ADC の場合も再発性・転移性の悪性リンパ腫や乳がんでも有効性が示されている。抗体の持つ優れたターゲティング能と多彩な生物活性に付加薬剤の効果が加わり、臨床上也優れた効果を示すことに成功しているものと思われる。^{27,28)} 従来の分子標的剤が分子を狙うのに対して、ADC は病因となる細胞や微小環境を狙いうちすることができる。まだ、研究段階ではあるが、ADC と分子標的剤の組み合わせも魅力的と思われる。残念ながら、わが国でのアカデミア・製薬企業の ADC への関心度は低調であるが、欧米を中心にしたこの分野の発展は疑いの余地がないと思われる。読者の中で一人でも多くの方が ADC に興味を持たれ、本研究領域に参加してもらい、わが国の長期低迷状態が 1 日でも早く解消できればと切に願っている。

謝辞 発表の機会を頂いた関係の先生方、皆様に深謝いたします。本稿の研究内容は国立がん研究センター、理化学研究所、放射線医学総合研究所、株式会社島津製作所が中心になって行ったものですが、共著者以外にも他の研究機関を含めて多くの方にご協力頂きました。ここに深謝申し上げます。

利益相反 古田 大と緒方是嗣は株式会社島津

製作所の社員である。

REFERENCES

- 1) Matsumura Y., Maeda H., *Cancer Res.*, **46**, 6387-6392 (1986).
- 2) Matsumura Y., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **64**, 710-719 (2012).
- 3) Wu A. M., Senter P. D., *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1137-1146 (2005).
- 4) Mack F., Ritchie M., Sapra P., *Semin. Oncol.*, **41**, 637-652 (2014).
- 5) Duncan R., *Anticancer Drugs*, **3**, 175-210 (1992).
- 6) Kogure K., Akita H., Yamada Y., Harashima H., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 559-571 (2008).
- 7) Oku N., Asai T., Watanabe K., Kuromi K., Ogino K., Taki T., *J. Liposome Res.*, **13**, 25-27 (2003).
- 8) Maruyama K., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **63**, 161-169 (2011).
- 9) Shiraishi K., Yokoyama M., *Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 878-882 (2013).
- 10) Cabral H., Kataoka K., *J. Control. Release*, **190**, 465-476 (2014).
- 11) Matsumura Y., *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **44**, 515-525 (2014).
- 12) Olson P., Hanahan D., *Science*, **324**, 1400-1401 (2009).
- 13) Yasunaga M., Manabe S., Matsumura Y., *Microvasc. Rev. Commun.*, **6**, 2-8 (2013).
- 14) Yasunaga M., Manabe S., Matsumura Y., *Cancer Sci.*, **102**, 1396-1402 (2011).
- 15) Yasuanga M., Manabe S., Tarin D., Matsumura Y., *Bioconjug. Chem.*, **22**, 1776-1783 (2011).
- 16) Yasuanga M., Manabe S., Tarin D., Matsumura Y., *Cancer Sci.*, **104**, 231-237 (2013).
- 17) Hisada Y., Yasunaga M., Hanaoka S., Saijou S., Sugino T., Tsuji A., Saga T., Tsumoto K., Manabe S., Kuroda J., Kuratsu J., Matsumura Y., *Sci Rep.*, **3**, 2604 (2013).
- 18) Bahce I., Yaqub M., Smit E. F., Lammertsma A. A., van Dongen G. A., *Lung Cancer*, in press.
- 19) Cornett D. S., Reyzer M. L., Chaurand P., Caprioli R. M., *Nat. Methods*, **4**, 828-833 (2007).

- 20) Schwamborn K., Caprioli R. M., *Nat. Rev. Cancer*, **10**, 639–646 (2010).
- 21) Castellino S., Groseclose M. R., Wagner D., *Bioanalysis*, **3**, 2427–2441 (2011).
- 22) Saito Y., Waki M., Hameed S., Hayasaka T., Setou M., *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 1417–1424 (2012).
- 23) Yasunaga M., Furuta M., Ogata K., Koga Y., Yamamoto Y., Takigahira M., Matsumura Y., *Sci. Rep.*, **3**, 3050 (2013).
- 24) Fujiwara Y., Furuta M., Manabe S., Koga Y., Yasunaga M., Matsumura Y., *Sci Rep.*, **6**, 24954 (2016).
- 25) Koga Y., Manabe S., Aihara Y., Sato R., Tsumura R., Iwafuji H., Furuya F., Fuchigami H., Fujiwara Y., Hisada Y., Yamamoto Y., Yasunaga M., Matsumura Y., *Int. J. Cancer*, **137**, 1457–1466 (2015).
- 26) Reichert J. M., *MAbs.*, **8**, 197–204 (2016).
- 27) Younes A., Bartlett N. L., Leonard J. P., Kennedy D. A., Lynch C. M., Sievers E. L., Forero-Torres A., *N. Engl. J. Med.*, **363**, 1812–1821 (2010).
- 28) Verma S., Miles D., Gianni L., Krop I. E., Welslau M., Baselga J., Pegram M., Oh D. Y., Diéras V., Guardino E., Fang L., Lu M. W., Olsen S., Blackwell K., EMILIA Study Group, *N. Engl. J. Med.*, **367**, 1783–1791 (2012).