

悪性中皮腫に対する新規光線ターゲット療法の開発に関する研究

名古屋大学高等研究院・医学系研究科呼吸器内科

s-YLC 特任助教 佐藤和秀

米国がんセンター・米国立衛生研究所

主席研究員 小林久隆

名古屋大学大学院医学系研究科病態内科学講座

呼吸器内科 教授 長谷川好規

1. 研究の背景・目的

悪性中皮腫は中皮細胞から発生する悪性腫瘍であり、その8割が胸膜から発生する。肺癌に比べて稀であるが、年間死亡数は増加傾向にあり、年間約千数百人が死亡しており、今後さらに増加することが予想されている。また、肺癌に比べて予後不良であり、5年生存率は治療に関わらず10%程度で、手術適応外ではさらに不良となる。切除不能例に対する化学療法として、これまでに様々な薬剤の臨床試験が行われてきたが、有効性の証明には至っておらず、新たな薬剤の開発が望まれている。

ポドプラニン¹⁾は、I型膜貫通型糖蛋白質であり、リンパ管内皮細胞やI型肺胞上皮細胞、糸球体のpodocyte(足細胞)に発現している。さまざまな腫瘍での発現も報告されており、肺癌特に肺扁平上皮癌や悪性胸膜中皮腫での発現亢進が報告されている¹⁾。このため、悪性胸膜中皮腫において、ポドプラニンが新たな治療標的となりうるのではないかと考えた。

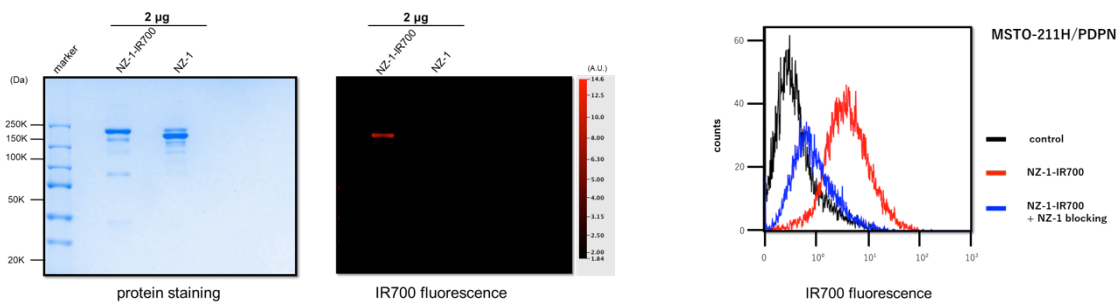
近赤外線免疫療法(Near Infrared Photoimmunotherapy ; NIR-PIT)は、抗体に水溶性の光感受物質であるIRDye 700DX(IR700)をconjugateし、近赤外光線を照射することで腫瘍細胞を破壊する治療である。抗体で標識し、さらに近赤外光線が照射された部位のみで反応が起こるため、かなり選択性の高い治療方法と言える。すでに、頭頸部癌領域においては臨床試験がすすめられており、再発頭頸部扁平上皮癌患者に対して、RM-1929(cetuximabにIR700をconjugateした薬剤)を用いてNIR-PITを行ったphase1試験では、治療1週間後に安全性、1か月後に効果判定を行い、奏効率75%(6/8例)、病勢コントロール率は100%であったと報告している。6例のうち3例ではCRとなり、

効果は持続的(4-16 か月)であったとしている²⁾。また、近年、そのあたらしい細胞破壊機序が明らかとなっており、ますます注目が集まっている³⁾。

そこで、抗ポドプラニン抗体として開発されたNZ-1を、NIR-PITの抗体として利用し、悪性胸膜中皮腫に対する新規治療の開発を目指すこととした⁴⁾。

2. 研究の対象ならびに方法

抗ポドプラニン抗体であるNZ-1に、水溶性光感受物質であるIRDye 700DX(IR700)をconjugateしてNZ-1-IR700を作製し、NIR-PITに利用可能か評価した。抗体とIR700のconjugateはこれまでの報告に則って行った⁵⁾⁶⁾。まず、作製したNZ-1-IR700とNZ-1を用いて電気泳動(SDS-PAGE)を行い、蛋白染色およびIR700の蛍光の確認を行って、NZ-1とIR700のconjugateを確認した。



次に、悪性中皮腫の細胞株におけるポドプラニンの発現を、フローサイトメトリーを用いて評価した。悪性中皮腫の細胞株は、ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、Y-MESO-9、Y-MESO-12、Y-MESO-14、MSTO-211H、NCI-H28、NCI-H226、NCI-H290、NCI-H2052、NCI-H2373、NCI-H2452を用いた。また、正常気管支細胞株(HBEC-3KT)、マウスの線維芽細胞株(3T3-p)でも同様にフローサイトメトリーによるポドプラニン発現の評価を行った。

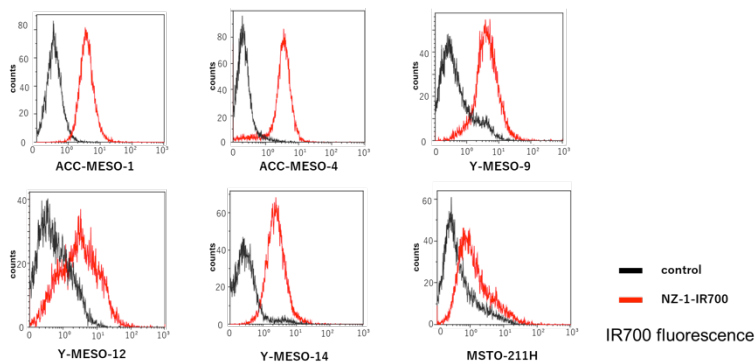
このうち、MSTO-211Hを用いて、ポドプラニンの強制発現株(MSTO-211H/PDPN)を樹立した。この強制発現株を用いて、NZ-1によるblock studyを行い、NZ-1がポドプラニンの特異的に認識することを確認した。また、同時にルシフェラーゼ、GFPを発現するように遺伝子導入してMSTO-211H/PDPN-luc-GFPを樹立し、これらの細胞株および悪性中皮腫の細胞株(ACC-MESO-1、Y-MESO-9、NCI-H28、NCI-H226)を用いて、*in vitro*のNIR-PITの実験を実施した。各細胞株を12wellプレートの4隅に、それぞれ 1×10^4 個ずつまき、37°Cで8時間incubateした。その後、NZ-1-IR700 10µg/mlを含んだmediumに置換し、37°Cで一晩incubateした。翌日mediumをPBSに置換し、Light Emitting Diodes(LEDs ;

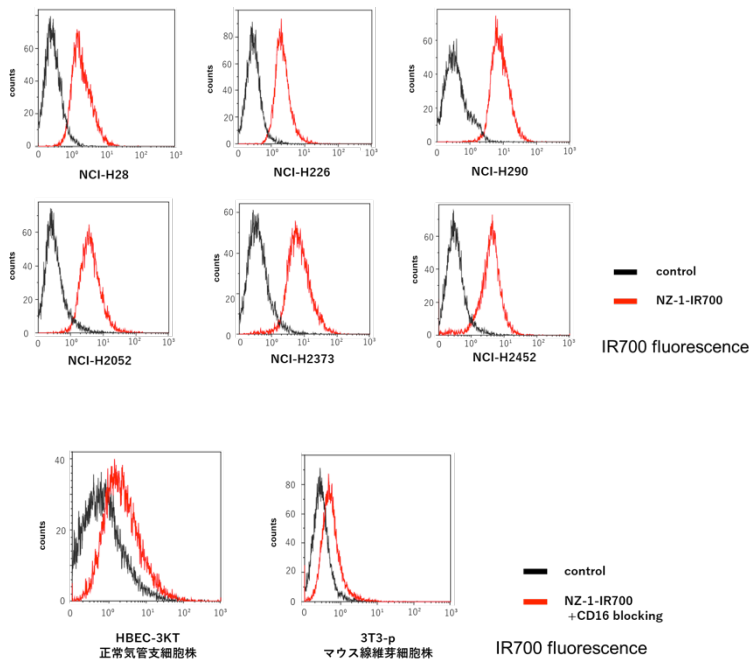
670-710nm)を用いて近赤外線を照射した。NZ-1-IR700を用いたNIR-PITによる細胞障害の効果判定は、luciferase活性とフローサイトメトリーによるPropidium iodide(PI)染色を用いて行った。Luciferase活性は、NIR-PIT照射24時間後に、mediumを150 μ g/mlのD-luciferin-containing media 200 μ lに置換し、Bioluminescence imaging(BLI)systemを用いて測定した。フローサイトメトリーは、NIR-PIT照射1時間後にPIを添加(最終濃度2 μ g/ml)し、室温で30分incubate後に行った。

また、MSTO-211H/PDPN-luc-GFPを用いて、ヌードマウスの皮下腫瘍移植モデルで*in vivo*のNIR-PITを実施した。週齢8週の無胸腺ヌードマウスの両側臀部にそれぞれ6 x 10⁶ cells / 100 μ LのMSTO-211H/PDPN-luc-GFPを皮下注射し、13日後にNZ-1-IR700 100 μ gを尾静脈から経静脈的に全身投与、14日目に50J/cm²、15日目に100J/cm²のNIR lightを皮下腫瘍の片側のみに照射し、腫瘍体積、腫瘍のルシフェラーゼ発光を評価した。ルシフェラーゼ発光の観察および定量評価にはIVIS spectrum CTを用いた。

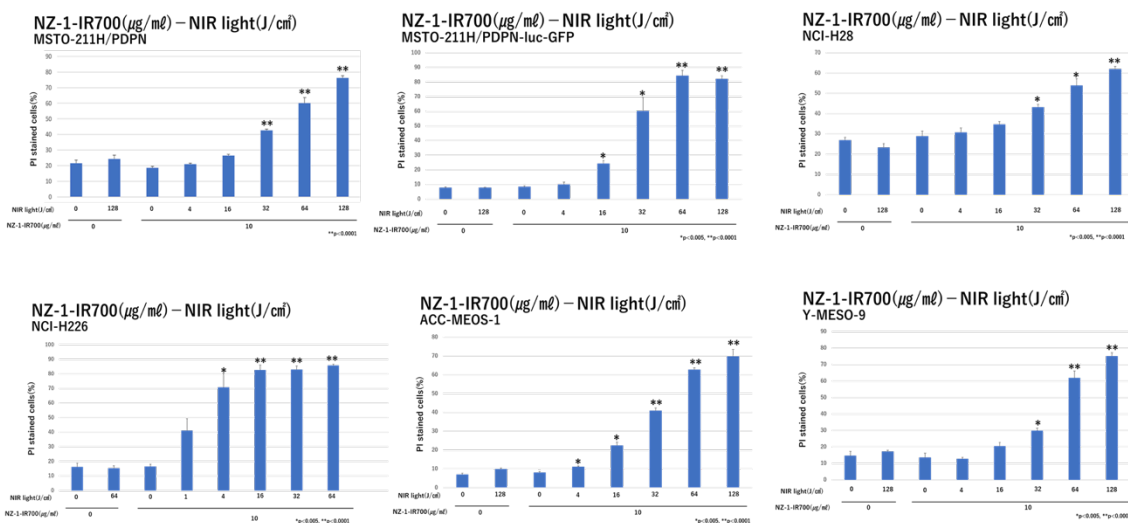
3. 研究結果

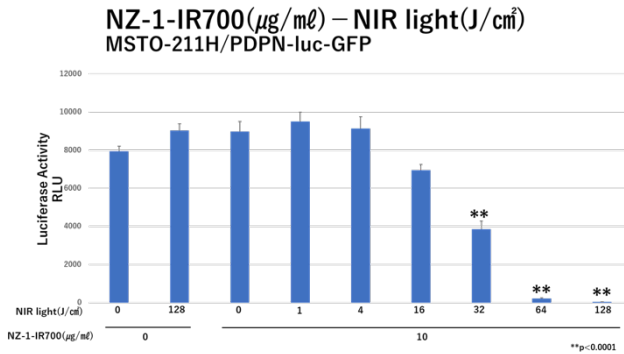
(1) 悪性中皮腫の細胞株におけるポドプラニンの発現を、フローサイトメトリーを用いて評価した結果、Y-MESO-12とMSTO-211Hはポドプラニン発現陰性と判断し、それ以外の細胞株はポドプラニン発現陽性と判断した。これらの細胞株のうち、ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、Y-MESO-9、Y-MESO-12、Y-MESO-14はJapanese由来の細胞株であり、MSTO-211H、NCI-H28、NCI-H226、NCI-H290、NCI-H2052、NCI-H2373、NCI-H2452はCaucasian由来の細胞株であるが、ポドプラニンの発現に概ね人種差はないものと判断した。NZ-1を用いたこれらの悪性中皮腫細胞株の評価は、既報と概ね一致していた。⁷⁾ また、HBEC-3KTおよび3T3-pにおいては、FC regionと非特異的に結合してしまうため、FC regionを抗CD16抗体でblockした結果、NZ-1-IR700によってHBEC-3KTおよび3T3-pは認識されず、正常の気管支細胞や種の異なるマウスの細胞は認識しないことを確認した。



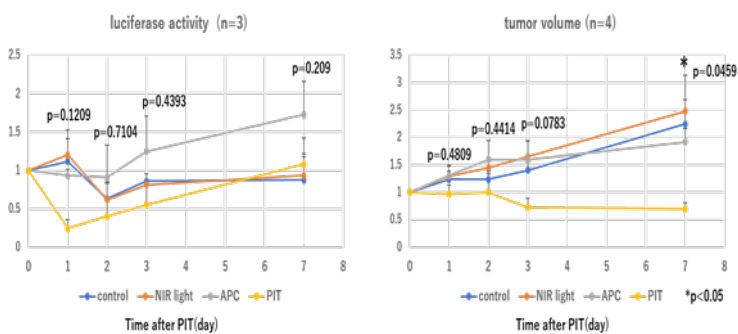


in vitro の NIR-PIT 実験では、フローサイトメトリーによる PI 染色の結果、どの細胞株においても、近赤外線の光量の増加に伴って死細胞率が上昇した。近赤外線の照射のみや NZ-1-IR700 の投与のみでは、有意な細胞障害は認めなかった。MSTO-211H/PDPN では、32J/cm²以上で有意な PI 陽性率の上昇を認め、MSTO-211H/PDPN-luc-GFP では、64J/cm²以上で有意な PI 陽性率の上昇を認めた。また、ACC-MESO-1 では 32J/cm²、Y-MESO-9 では 64J/cm²、NCI-H28 では 128J/cm²、NCI-H226 では 16J/cm²で有意な PI 陽性率の上昇を認めた。また、MSTO-211H/PDPN-luc-GFP を用いて NIR-PIT を行い、BLI を用いた luciferase 活性の測定を行ったところ、NIR-PIT 後の細胞株では、relative light unit (RLU) の有意な低下を認め、光量依存性に luciferase 活性の低下を認めた。

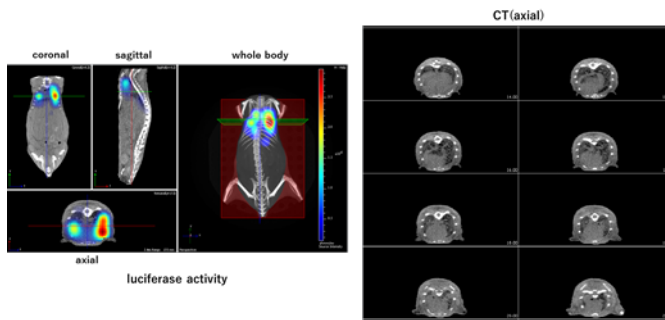




(2) 腫瘍細胞を2か所定植したヌードマウスのうち、NZ-1-IR700を投与する群と投与しない群にわけ、腫瘍の片側のみにNIR-lightを照射することで、腫瘍をcontrol群、NZ-1-IR700単独(APC)群、NIR light単独群、PIT群の4群にわけて解析した。腫瘍体積は、腫瘍長径(length)×腫瘍短径(width)²×0.5(mm³)で算出し、初回NIR-light照射前の体積との比で比較したところ、初回NIR-light照射7日後にPIT群で有意な縮小を認めた(n=4, p<0.05 vs. APC)。また、IVIS spectrum CTでルシフェラーゼ発光の定量を行い、初回NIR-light照射前の発光との比を比較したところ、腫瘍体積と同様に初回NIR-light照射7日後に有意なルシフェラーゼ発光の低下を認めた(n=4, p<0.05 vs. APC)。



また、無胸腺ヌードマウスの胸腔内へMSTO-211H/PDPN-luc-GFPを 6×10^6 cells / 400 μL 投与することで、胸膜播種モデルを作製し、IVIS spectrum CTにて、ルシフェラーゼの発光と腫瘍の進展を評価した。



4. 考察

今回の研究では、抗ポドプラニン抗体である NZ-1 が、NIR-PIT の抗体として利用可能であることを示した。悪性中皮腫の細胞株を用いた *in vitro* の NIR-PIT によって十分な効果が得られることを証明し、また、ヌードマウスを用いた *in vivo* の NIR-PIT においても、皮下腫瘍に対しては良好な結果を示したため、悪性中皮腫に対する新規治療の開発を目的として、今後は胸膜播種モデルでも NIR-PIT を施行し、その効果を評価していく予定としている。

5. 文献

- 1) Ordonez NG. : Podoplanin: a novel diagnostic immunohistochemical marker. *Adv Anat Pathol.* 13(2):83-88, 2006
- 2) S. T. Kachuparambil, D. McDonald, M. Fidler, K. Stenson, N. Vasan, M. A. Razaq. : A phase I, multicenter, open-label, dose-escalation, combination study of RM-1929 and photoimmunotherapy in patients with recurrent head and neck cancer. *Annals of oncology (Abstract Book of the 42nd ESMO Congress; ESMO2017)*
- 3) Sato K, Ando K, Okuyama S, Moriguchi S, Ogura T, Totoki S, Hanaoka H, Nagaya T, Kokawa R, Takakura H, Nishimura M, Hasegawa Y, Choyke PL, Ogawa M, Kobayashi H. Photo-induced ligand release from a silicon phthalocyanine dye conjugated with monoclonal antibodies; A mechanism of cancer cell cytotoxicity after near infrared photoimmunotherapy. *ACS Cent. Sci.*, 2018 Nov 28; 4(11), pp 1559-1569
- 4) Kato Y, Kaneko MK, Kuno A, Uchiyama N, Amano K, Chiba Y, Hasegawa Y, Hirabayashi J, Narimatsu H, Mishima K, Osawa M. :

Inhibition of tumor cell-induced platelet aggregation using a novel anti-podoplanin antibody reacting with its platelet-aggregation-stimulating domain.

Biochemical and Biophysical Research Communications 349;1301-1307, 2006

5)Mitsunaga M, Ogawa M, Kosaka N, Rosenblum LT, Choyke PL, Kobayashi H.:

Cancer cell – selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules.

Nat Med 17:1685-91. doi:10.1038/nm.2554, 2011

6)Sato K, Watanabe R, Hanaoka H, Harada T, Nakajima T, Kim I.:

Photoimmunotherapy:Comparative effectiveness of two monoclonal antibodies targeting the epidermal growth factor receptor.

Mol Oncol 8:620-32. doi:10.1016/j.molonc.2014.01.006, 2014

7)Abe S, Morita Y, Kaneko MK, Hanibuchi M, Tsujimoto Y, Goto H, Kakiuchi S, Aono Y, Huang J, Sato S, Kishuku M, Taniguchi Y, Azuma M, Kawazoe K, Sekido Y, Yano S, Akiyama S, Sone S, Minakuchi K, Kato Y, Nishioka Y.:

A novel targeting therapy of malignant mesothelioma using anti-podoplanin antibody.

Thr Journal of Immunology 190;6239-6249, 2013