

主論文の要旨

**HER2 targeting near-infrared photoimmunotherapy
for a CDDP-resistant small-cell lung cancer**

〔 HER2 陽性シスプラチン耐性小細胞肺癌を標的とした光免疫療法 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 呼吸器内科学分野

(指導：橋本 直純 准教授)

高橋 一臣

【緒言】

進行期の小細胞肺癌 (small cell lung cancer: SCLC) に対してシスプラチン (cisplatin: CDDP) 併用化学療法は高い奏効率を示すが、短期間で耐性化して病状再発をきたし予後不良な経過を辿るため、有効な新規治療が望まれる。HER2 は有用な癌治療標的である膜受容体タンパクであり一部の SCLC に過剰発現を認めるが、HER2 を標的とした肺癌治療は確立していない。光免疫療法 (near-infrared photoimmunotherapy: NIR-PIT) は抗体と光感受性物質である水溶性フタロシアニン dye (IR700) との複合体および近赤外光 (near infrared light: NIR-light) による新規の癌標的治療である。抗体-IR700 の複合体を静脈内投与すると癌抗原と特異的に結合し、NIR-light の照射によって光化学反応を惹起し壊死性細胞死を誘導する。本研究では抗 HER2 抗体であるトラスツズマブ (Trastuzumab: Tra) を用いて HER2 陽性 SCLC に対する NIR-PIT の有効性を検討した。

【対象および方法】

HER2 陽性 SCLC の細胞株である SBC-3 と同細胞の抗癌剤耐性株を用いた。細胞にはルシフェラーゼを遺伝子導入した。既報の手順に従って Tra と IR700 を conjugate し Tra-IR700 の複合体を作成した。各細胞の HER2 発現量は Western blot 法とフローサイトメトリー (FACS) で評価した。In vitro では細胞に Tra-IR700 を添加した後 LED を用いて 690nm の NIR-light を照射し NIR-PIT を行った。NIR-PIT 前後の細胞形態を位相差顕微鏡で観察し、また NIR-PIT の効果を評価するため NIR-light を 0~128J/cm² 照射して FACS による PI 死細胞染色の陽性割合と細胞ルシフェラーゼ活性を測定した。In vivo では 8~10 週齢のヌードマウスの臀部へ腫瘍細胞を皮下移植して xenograft を作成し、15 日目に腫瘍が 200mm³ に達した個体を評価に用いた。Tra-IR700 を尾部より静脈内へ投与し、IR700 の蛍光波長を 72 時間後まで撮影して体内薬物動態を観察した。またレーザーを用いて Tra-IR700 の投与 24 時間後に 50J/cm²、48 時間後に 100J/cm² の NIR-light を腫瘍へ照射し、腫瘍のルシフェラーゼ活性、腫瘍体積、生存期間を測定して NIR-PIT の効果を評価した。腫瘍体積は長径×短径²×0.5 で算出し、生存期間は腫瘍の長径が 20mm を超える時点とした。

【結果】

Tra-IR700 を SDS-PAGE を用いて電気泳動を行い、ゲルをタンパク染色すると Tra が染色された。また 700nm の蛍光波長でゲルを撮影するとバンドを認め、両者が一致したことから Tra と IR700 との共有結合が確認された (Figure 1-A)。

各細胞の HER2 発現量を Western blotting で評価すると親株の SBC-3 よりも同細胞の抗癌剤耐性株、特に CDDP 耐性株 (SBC-3/CDDP) において HER2 の発現量が増加していた (Figure 1-B, C)。FACS でも同様の傾向を認めた (Figure 1-D)。この結果より本研究では SBC-3 と SBC-3/CDDP を用いて比較検討を行うことにした。

In vitro では SBC-3 と SBC-3/CDDP の増殖速度に差がないことを確認した (Figure 2-A)。位相差顕微鏡を用いて NIR-PIT 前後で観察を行うと、治療前の細胞は形態が丸く

保たれ細胞表面と内部に Tra-IR700 との結合が確認された。細胞に NIR-light を照射すると数分後から表面が膨張して不整となり最終的には破裂した。また PI 死細胞染色は陽性であり、IR700 は治療に伴い蛍光が減弱した (Figure 2-B)。次に NIR-PIT の効果を評価した。治療後の PI 死細胞染色の陽性率は NIR-light の照射量に依存して増加し、同じ照射量においては SBC-3 よりも SBC-3/CDDP での細胞死亡率の方が有意に高かった (Figure 2-C)。細胞ルシフェラーゼ活性も NIR-light の照射量に比例して viability は低下し、SBC-3 よりも SBC-3/CDDP で有意に顕著であった (Figure 2-D)。これらの結果から NIR-PIT の細胞障害性が示され、また HER2 抗原量の多い SBC-3/CDDP でより高い効果が得られることが判明した。

In vivo では Tra-IR700 の体内薬物動態を評価した。Tra-IR700 は投与後 30 分で腫瘍へ集積し始め、約 24 時間後に最も高集積であった (Figure 3-A、B)。また投与後 72 時間まで安定して腫瘍へ集積し、SBC-3 よりも SBC-3/CDDP でより高集積を認めた (Figure 3-C)。この結果から NIR-light は Tra-IR700 投与後 24 時間での照射が最も効果的であり、また照射回数は単回ではなく複数回行うことで治療効果が高まる可能性が示唆され、これらを踏まえて *in vivo* での治療プロトコルを決定した。次に NIR-PIT の効果を評価した。NIR-PIT を行った翌日からいずれの腫瘍もルシフェラーゼ活性が一時低下したが、SBC-3 よりも SBC-3/CDDP でより顕著であり持続期間も長かった (Figure 4-A、B)。腫瘍体積も治療後には両者で一時減少し、その後の増殖抑制効果は SBC-3/CDDP で有意に高かった (Figure 4-C)。生存期間も SBC-3/CDDP の方が長い傾向を認めた (Figure 4-D)。

【考察】

本研究では HER2 陽性 SCLC に対する Tra-IR700 を用いた NIR-PIT の有効性を証明した。また HER2 の発現量は親株よりも抗癌剤耐性株、特に CDDP 耐性株で増加し、NIR-PIT は CDDP 耐性株により高い効果を呈したことから、腫瘍の抗原量と NIR-PIT の治療効果には正の相関性があることが示唆された。本治療をヒトに応用する際は、まず SCLC に対して奏効率の高い CDDP 併用化学療法を行い、CDDP に耐性化して腫瘍の HER2 発現量が増加した二次治療以降における選択肢に検討するとより効果的であると考えた (Figure 5)。また NIR-PIT は直接的な細胞障害のみならず、急速な細胞壊死により漏出した癌抗原に反応して樹状細胞が活性化し、自己免疫サイクルが促進して照射をしてしない遠隔病巣にも効果が認めると報告があり、早期に転移や病状進行をきたす SCLC に対しても NIR-PIT の有効性が期待できる。しかしながら今後の実用化に向けては NIR-light の照射方法の検討が必要である。体外からでは光が肺内病巣までは到達できないため、内視鏡を用いた照射デバイスの開発などが考慮される。

【結語】

HER2 陽性 SCLC に対して Tra-IR700 を用いた NIR-PIT は有効な標的治療法であった。NIR-PIT の治療効果は癌抗原の発現量と相関性が認められた。