

主論文の要旨

**Near Infrared Photoimmunotherapy Targeting DLL3
For Small Cell Lung Cancer**

〔 DLL3 を標的とした小細胞肺癌に対する近赤外線光免疫療法 〕

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)

磯部 好孝

【緒言】

小細胞肺癌は肺癌の約 15%を占める。多くが進展型で発見され、治療手段が限られ予後が悪いため、新規治療の要望は多い。

Notch signaling pathway のリガンドである Delta-like protein 3 (DLL3)は近年見出された、小細胞肺癌に特異的な治療標的である。DLL3 を標的とした薬剤として抗体薬物複合体、Rovalpituzumab-tesirine が作成され、臨床試験が行われてきたが、結果は芳しく無く 2019 年 8 月に開発が終了となった。よって、DLL3 に対する新たな治療アプローチが必要とされている。

近赤外線光免疫療法は 2011 年に報告された新機序の癌治療法である。標的細胞が発現する抗原に対する特異的抗体に光感受物質の IR700 を結合させ、抗体・光感受物質複合体が細胞表面に結合しているときに波長 690nm 付近の近赤外光を照射すると細胞に速やかなネクローシスが誘導される。抗体と光照射によって二重に対象を選択しており、極めて選択性の高い治療法である。現在、国際第 3 相試験(RUZERA301)が実施されており、数年以内の臨床導出が期待されている。

今回我々は DLL3 を標的とした新しい治療法を開発することを目的として、抗 DLL3 モノクローナル抗体である Rovalpituzumab と NIR-PIT を用い、前臨床の小細胞肺癌に対する新機序治療法研究を行った。

【対象と方法】

1. 小細胞肺癌手術検体の免疫染色

名古屋大学医学部附属病院で同意が得られた日本人患者さんの手術検体を用い、小細胞肺癌組織について抗 DLL3 抗体(Delta3/DLL3 IHC-plus™)を用い、免疫染色を行った。

2. 試薬

IRDye 700DX NHS を、LI-COR Bioscience から購入した。Rovalpituzumab は Creative Biolabs から入手した。

3. 細胞株

DLL3、GFP、およびルシフェラーゼを恒常的に発現する SBC5 および 3T3 細胞株を、RediFect Red-FLuc レンチウイルス粒子および DLL3-GFP レンチウイルス粒子を遺伝子導入することによって確立した(SBC5-DLL3-luc-GFP / 3T3-DLL3-luc-GFP)。RFP 恒常発現 Balb / 3T3 細胞を、RFP (EF1a)-プロレンチウイルス粒子によるトランスフェクションにより確立した(3T3-RFP)。

4. Rovalpituzumab-IR700 (Rova-IR700) の合成と小細胞肺癌細胞株における DLL3 の発現

Rovalpituzumab を、Na₂HPO₄、IR700 と共にインキュベートし、混合物を Sephadex G50 カラムで分離精製した。複合体を SDS-PAGE により評価した。蛍光バンドは、Odyssey Imager を用いて 700 nm の蛍光チャンネルで測定した。DLL3 への特異的結合

を確認するために、フローサイトメトリー（Gallios）解析を SBC3、HBEC3 を用いて行った。小細胞肺癌細胞株の DLL3 発現を Rova-IR700 を用いフローサイトメトリーで評価した。

5. 共焦点蛍光顕微鏡

AIRsi および TiE-AIR で観察を行った。1 万個の細胞をガラスボトムディッシュに播種し、Rova-IR700(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を培地に添加しインキュベートした。培地を PBS に交換し、ヨウ化プロピジウム(PI)または Sytox Blue を添加した。細胞を近赤外光(4 J/cm^2)照射し、その前後を撮像し検討した。

6. *In vitro* NIR-PIT

In vitro 細胞傷害性を、ルシフェラーゼ活性およびフローサイトメトリーと PI 染色で定量的に評価した。20 万個の細胞を 12 ウェルプレートに播種し、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の rova-IR700 と共にインキュベートした。培地を PBS に交換し、近赤外光を照射した。D-ルシフェリン含有培地(150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 200 μl)を NIR-PIT の 24 時間後に細胞に投与し、発光をプレートリーダーで分析した (Powerscan 4)。フローサイトメトリー解析では、照射の 1 時間後に細胞をウェルから剥離し、PI を添加した。PI 蛍光を FACS Calibur を用い 1 万個細胞にて評価した。

7. 動物と腫瘍モデル

In vivo 実験は、名古屋大学の動物管理使用委員会の規則に従って行われた。8-12 週齢の雌の胸腺欠損ヌードマウスを用いた。600 万個の SBC5-DLL3-luc-GFP 細胞をマウスの右背部に皮下接種した。腫瘍体積評価は、最大径と幅を体表から測定し、最大径 \times 幅² \times 0.5 と計算した。移植の 13 日後に腫瘍体積が約 200 mm^3 程度に至ったマウスのうち、D-ルシフェリン (15 mg/ml , 200 μL) を腹腔内注射し、IVIS イメージングシステムで発光が経時的に評価可能であったマウスを実験に組み入れた。腫瘍の最大径が 15mm を超えた場合、動物実験プロトコルに従って二酸化炭素で安楽死処置を行った。

8. 生体蛍光イメージング

IR700 蛍光画像は、蛍光画像装置 (Peal Imager) にて撮像した。

9. *In vivo* における DLL3 標的 NIR-PIT

異種移植片を持ったマウスを無作為に以下の 4 群 : 1) 対照群 2) 近赤外光照射単独群 3) Rova-IR 投与単独群 4) NIR-PIT 群、に割り付けた。Rova-IR700 を投与する群には Day -1 (腫瘍細胞の皮下注射から 13 日後) に Rova-IR700 50 μg を尾静注投与した。近赤外光を照射する群には Day 0 に 100 J/cm^2 、Day 1 に 50 J/cm^2 の近赤外光を照射した。

10. 統計

別段の指定がない限り、データは最小 4 回の実験からの平均値 \pm SEM として表す。統計ソフトウェア (GraphPad Prism) を用いて統計分析を行った。p 値 <0.05 を統計的に有意な差とした。

【結果】

1. 小細胞肺癌手術検体の免疫染色

小細胞肺癌症例 10 例のうち 8 例で腫瘍細胞の 1%以上に DLL3 の発現を認めた。

2. IR700 と抗 DLL3 抗体の結合

SDS-PAGE で Rova-IR700 は抗体のバンドに一致して IR700 の蛍光を認めたが、Rovalpituzumab 単独では検出可能な蛍光シグナルを示さなかった (図 1a)。DLL3 および Rova-IR700 を用いた Western Blotting で、Rova-IR700 が DLL3 を認識することを確認した (図 1b)。フローサイトメトリー解析において、SBC3 上の DLL3 シグナルは、過剰な Rovalpituzumab の添加によりブロックされ、このことから Rova-IR700 は特異的に DLL3 に結合することが示された (図 1c)。HBEC3 ではシグナルがほとんど観察されなかった。よって、Rovalpituzumab と IR700 の付加が確認され、Rova-IR700 が DLL3 に特異的に認識することが確認された。白人患者から樹立された H69 と H82、日本人患者から樹立された SBC3 と SBC5 はほぼ同等の DLL3 発現を認めた (図 1d)。

3. DLL3 発現細胞株における *in vitro* NIR-PIT

SBC5-DLL3-luc-GFP および 3T3-DLL3-luc-GFP の蛍光顕微鏡観察を NIR-PIT の前後に行った。近赤外光 (4 J/cm^2) への曝露後、細胞の膨張と破裂、および死細胞蛍光染色が観察された (図 2a)。DLL3 を発現していない非標的細胞の 3T3-RFP に変化は観察されなかった (図 2b)。

次にフローサイトメトリーとルシフェラーゼ活性で定量評価を行った。PI で評価した細胞死率は光量に依存的に増加した。NIR-light 単独または Rova-IR700 単独では有意な細胞傷害性は認められなかった (図 2c)。ルシフェラーゼ活性は、NIR-PIT 群において活性の有意な減少を示した (図 2d)。以上から DLL3 を標的とした NIR-PIT が *in vitro* で光量依存的に細胞死を誘導することが確認された。

4. 担癌マウスモデルにおける DLL3 を標的とした *in vivo* NIR-PIT

右背部に異種移植片を持つマウスにおいて、IR700 の蛍光は、近赤外光照射後に減少した。対照群、近赤外光単独群、および Rova-IR700 単独群の腫瘍発光は、腫瘍増殖のため漸増を示した。対照的に、NIR-PIT 群のルシフェラーゼ活性は Day 2 まで有意に減少した (図 3a, b)。腫瘍体積は Day 3 と Day 7 において対照群に対し NIR-PIT 群で有意な縮小を認めた (図 3c)。NIR-PIT 群で有意な生存の延長を認めた (図 3d)。

【考察】

抗 DLL3 抗体と NIR-PIT を用い、小細胞肺癌に対する新機序の治療法を前臨床で検討した。日本人小細胞肺癌検体の染色では 8 割に DLL3 の発現を認め、既報と同様であった。また白人と日本人由来の小細胞肺癌細胞株において、DLL3 の発現は同等であり、人種を超えて広く小細胞肺癌に発現していることが示唆された。Rova-IR700 と近赤外光を用いた NIR-PIT は *in vitro* において標的細胞のみを障害し、非標的細胞は障害しなかった。*In vivo* の実験では皮下異種移植片をもつマウスモデルにおいて、NIR-PIT 群は対照群に対し有意な腫瘍増大抑制効果と生存の延長を示した。

本研究で実施した NIR-PIT は既存のいずれの治療法とも異なる機序で癌細胞を障害し、選択性が高いため副作用が軽微で、既存治療とも併用しうることが期待される。胸腔内に適切に近赤外光を照射するデバイス開発の必要性や、進展型小細胞肺癌に対する他治療との併用治療は今後も検討が必要である。

【結語】

DLL3 を標的とした NIR-PIT は小細胞肺癌に対する新たな治療になりえる。