

主論文の要旨

**Targeted Phototherapy for Malignant Pleural
Mesothelioma: Near-Infrared
Photoimmunotherapy Targeting Podoplanin**

〔 悪性胸膜中皮腫に対する光免疫療法：
ポドプラニンを標的とした近赤外光線免疫療法 〕

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)

西永 侑子

【緒言】

悪性胸膜中皮腫(MPM)は中皮細胞から発生する悪性腫瘍で、予後不良な疾患である。肺癌に比べて稀であるが年間死亡数は増加傾向にあり、切除不能例に対する治療選択肢が乏しく、新たな薬剤の開発が望まれている。

ポドプラニン(PDPN)はI型膜貫通型糖蛋白質で、リンパ管内皮細胞やI型肺胞上皮細胞などに広く発現しており、血管肉腫や神経膠芽腫、肺癌・頭頸部癌・食道癌等の扁平上皮癌、悪性中皮腫など様々な悪性腫瘍での発現亢進も報告されている。PDPNに対する抗体であるD2-40は、これまでMPMにおける免疫染色の陽性マーカーとして使用されてきたが、2006年に抗腫瘍効果を示すラット抗ヒトポドプラニン抗体であるNZ-1が開発された。

近赤外光線免疫療法(Near Infrared Photoimmunotherapy ; NIR-PIT)は、腫瘍を標的とした抗体の特異性と、690nmの近赤外光線照射による光感受物質(IR700)によって誘発される毒性とを組み合わせて最近開発された、悪性腫瘍に対する新たな光標的治療である。NIR-PITは、局所再発頭頸部癌患者を対象とした国際第Ⅲ相試験が進行中であり、数年内に臨床導入される見込みである。MPMは局所浸潤傾向で転移が少ないという特性をもつため、NIR-PITの対象として適した疾患であると考え、今回の研究で、PDPNを標的としたMPMに対する新規治療法の開発を目指した。

【方法】

まず、当院におけるMPMの手術検体18例を対象として、NZ-1によるPDPNの免疫染色を行った。上皮型が15例、二相型が3例で、10%以上をPDPN陽性として評価したところ、陽性率は上皮型で86.7%(13/15例)、二相型で66.7%(2/3例)、全体で83.3%(15/18例)でこれまでの報告にほぼ一致するものであり、NZ-1によってPDPN発現の評価が可能であることを確認した。

次に、NZ-1に水溶性光感受物質であるIRDye700DX(IR700)をconjugateし、NZ-1-IR700を作製した。NZ-1-IR700とNZ-1を用いて電気泳動(SDS-PAGE)を行って、蛋白染色およびIR700の蛍光の確認を行い、NZ-1とIR700のconjugateを確認した。続いて、MPMの細胞株におけるPDPN発現を、フローサイトメトリーを用いてIR700の蛍光を測定することで評価した。また、MPMの細胞株のうちMSTO-211Hを用いてPDPNの強制発現株(MSTO-211H-PDPN-GFP)を樹立し、この強制発現株を用いてNZ-1によるblock studyを行って、NZ-1がPDPNを特異的に認識することを確認した。

*in vitro*でのNIR-PITによる標的細胞の変化を、死細胞染色(Propidium iodide(PI)染色)を用いて共焦点顕微鏡で直接観察した。加えてPDPN発現の有無によるNIR-PITの影響を評価するために、PDPN陽性と判断したH2373と陰性と判断したMSTO-211Hを共培養して、同様に共焦点顕微鏡で観察した。次に、NIR-PITの細胞傷害性を定量的に評価するために、PIT後の死細胞率とルシフェラーゼ活性を測定した。死細胞率は、PI染色の陽性率をフローサイトメーターで測定し、ルシフェラーゼ活性は、ルシフェラーゼ発現株(MSTO-211H-PDPN-luc-GFP,H2373-luc)を用いてプレートリーダー

でその発光を測定した。

次に、*in vivo*における NIR-PIT の効果を評価するために、皮下腫瘍移植モデルに対して NIR-PIT を実施した。ヌードマウスに H2373-luc を皮下移植して xenograft を 2 か所作製した。腫瘍が生着したところで NZ-1-IR700 を静脈投与し、投与 1 日後に xenograft の片側に NIR-light を 50J、2 日後に 100J を laser で照射した。効果判定はルシフェラーゼ活性と腫瘍体積で行った。ルシフェラーゼ活性は IVIS イメージングシステムを用いて測定し、腫瘍体積は、腫瘍長径(length)×腫瘍短径(width)²×0.5(mm³)で評価した。

続いて、MPM により近いモデルマウスとして胸膜播種モデルにおける NIR-PIT の効果を評価した。ヌードマウスに H2373-luc を胸腔内投与して胸膜播種モデルを作製し、3 日後に IVIS イメージングシステムを用いて腫瘍の生着を確認した。確認できたマウスに NZ-1-IR700 を投与し、その翌日に NIR-PIT を施行した。NIR-light は左右前胸部から各 15J ずつ laser で照射した。効果判定は、ルシフェラーゼ活性で評価した。

【結果】

MPM の細胞株における PDPN 発現をフローサイトメトリーにて評価した結果、Y-MESO-12 と MSTO-211H は PDPN 陰性と判断し、それ以外は PDPN 陽性と判断し、この結果は既報と概ね一致していた。正常気管支細胞株 (HBEC-3KT) とマウス線維芽細胞株 (3T3-p) でも同様に評価を行い、NZ-1-IR700 がいずれも認識しないことを確認した。

次に、*in vitro*での NIR-PIT の効果を評価した。MSTO-211H-PDPN-luc-GFP および H2373-luc を用いた共焦点顕微鏡による観察では、微分干渉像において、近赤外線照射後の標的細胞が破裂し浮腫状となっている様子が確認された。PIT 前にみられた IR700 の蛍光は PIT 後に消失し、PIT 後には死細胞染色である PI が陽性となった。また H2373 と MSTO-211H を共培養して観察した結果、H2373 は NIR-light 照射後すぐに細胞が膨張しはじめ、最終的に破裂した一方、MSTO-211H には全く変化がなく、PDPN 陽性で抗体が認識した細胞のみで変化が起ることを確認した。

*in vitro*での NIR-PIT による細胞傷害の定量評価では、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有意な死細胞率上昇を認めた。近赤外光線の照射のみや NZ-1-IR700 の投与のみでは有意な細胞傷害は認めなかった ($n \geq 4, **p < 0.01, t\text{-test}$)。また、ルシフェラーゼ発現株を用いてルシフェラーゼ活性を測定した結果、NIR-PIT 後の細胞では 32J/cm²以上で relative light unit (RLU) の有意な低下を認め、近赤外光線の照射のみや NZ-1-IR700 の投与のみでは有意な細胞傷害は認めず、NIR-PIT 施行で光量依存性にルシフェラーゼ活性の低下を認めた ($n \geq 4, **p < 0.01, t\text{-test}$)。

皮下腫瘍移植モデルにおける NIR-PIT の効果を、NIR-PIT 前後のルシフェラーゼ発光と IR700 の蛍光イメージを取得して観察した。片側の腫瘍のみに NIR-light を照射したところ、照射直後に IR700 の蛍光は消失し、翌日にはルシフェラーゼ活性による発光も低下した。ルシフェラーゼ活性および腫瘍体積を経時的に測定して NIR-PIT に

よる効果をその推移で評価したところ、腫瘍体積は NIR-PIT 群で有意な増大抑制を認め、ルシフェラーゼ発光も NIR-PIT 群において照射 1 日後には有意な低下を認めた (* $p < 0.05$ vs. 薬剤投与群, t-test, $n \geq 3$ mice in each group)。

続いて、胸膜播種モデルに対する NIR-PIT の効果を評価した。皮下腫瘍移植モデルと同様に NIR-PIT 前後にルシフェラーゼ発光と IR700 の蛍光イメージを取得して観察したところ、コントロール群と比較して、NIR-PIT を施行したマウスでルシフェラーゼ活性が減少する傾向にあった。ルシフェラーゼ発光を定量し、経時的な推移を測定して評価したところ、ルシフェラーゼ発光は NIR-PIT 群において有意な増加抑制を示した (* $p < 0.05$ vs. コントロール群, t-test, $n \geq 3$ mice in each group)。

【考察】

今回の研究では、PDPN を標的とした MPM に対する NIR-PIT の治療効果を検討しており、抗ヒトポドプラニン抗体である NZ-1 と NIR-PIT を組み合わせることによって、MPM に対する新規の治療法の開発を目指している。

本研究では、NZ-1 によって免疫染色による組織診断から、NIR-PIT による治療まで、同一の抗体によって行えることを証明した。NZ-1 を含めた抗ヒトポドプラニン抗体は、リンパ管内皮細胞などの PDPN を発現する正常細胞も認識するため、NIR-PIT の実施にあたってはその影響が懸念される。しかし、抗ヒトポドプラニン抗体については、腫瘍細胞における PDPN を特異的に認識する cancer-specific monoclonal antibody (CasMab®) が 2014 年に確立されている。現在 CasMab® の開発がすすめられており、将来的には CasMab® を NIR-PIT に応用することで、さらに選択性の高い治療を目指している。また、MPM は局所浸潤傾向で遠隔転移が少ない疾患であるため、NIR-PIT に適した疾患であると考えているが、転移巣が多発するなど、NIR-PIT のみでは効果不十分となる可能性もある。そのような場合には、NIR-PIT による有害事象が軽度であるため、免疫チェックポイント阻害薬を含めた化学療法と併用することで対応できるものと考えている。

【結語】

今回の研究において、NZ-1 を用いた PDPN を標的とした NIR-PIT は、MPM に対して有望な新規の治療法になりうることが示唆された。