

研 究 報 告 書
平成30年度：A課題

2020年 4月30日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀 田 知 光 殿

研究施設 名古屋大学高等研究院/大学院医学系研究科病態内科学呼吸器内科

住 所 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町65

研究者氏名 佐藤和秀



(研究課題)

光を用いた悪性中皮腫のターゲット治療診断システムの開発

平成31年 1月24日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しました
のでご報告いたします。

背景と研究目的

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、1980年代前半では100人程度であったが、その後増加し、2015年には1500人を超えており、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治療選択肢は乏しく、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いない。二次治療として2018年の8月にニボルマブが承認されたが、ガイドライン上の標準一次治療は、15年ほど前から変わらないシスプラチンとペメトレキセドの併用療法のみとなっており、新たな薬剤の開発が望まれている。

悪性胸膜中皮腫における、免疫染色の陽性マーカーとして有用とされているものに、カルレチニン、D2-40、WT-1などが挙げられるが、このうちD2-40は、膜タンパク質であるポドプラニンに対する抗体である。ポドプラニンは、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)などに広く発現している。また、血管肉腫や骨肉腫、神経膠腫、神経膠芽腫などのさまざまな悪性腫瘍での発現が報告されており、肺癌をはじめとした頭頸部癌、皮膚癌、食道癌、子宮頸癌などの扁平上皮癌や悪性胸膜中皮腫での発現亢進も報告されている。また近年、癌関連線維芽細胞(cancer-associated fibroblast; CAF)が、癌の進展に関わるという研究が注目されているが、肺癌におけるCAFでのポドプラニン発現が予後不良因子となりうるという報告が相次いでいる。このため、悪性胸膜中皮腫において、ポドプラニンを新たな治療標的とすることを考えた。免疫染色の抗体としてはD2-40が使用されているが、抗体医薬として、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。NZ-1は、ポドプラニンのplatelet aggregation-stimulating (PLAG) domain-2/3を認識するラットIgG2aモノクローナル抗体であるが、血小板との相互作用を阻害して、ポドプラニンのもつ血小板凝集活性を阻害することが報告されている。今回、この新たな抗ポドプラニン抗体であるNZ-1を、悪性胸膜中皮腫の治療として応用することを検討した。

近赤外光線免疫療法(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、局所再発頭頸部癌患者を対象とした第Ⅱ相試験の結果が2019年の6月に報告されている。RM-1929(抗EGFR抗体セツキシマブとIR700の複合体)を用いたPITの安全性と有効性を評価する治験であり、全奏効率は43%で、うち完全奏効が4名で認められた。無増悪生存期間中央値は5.2か月(95%CI:2.1-5.5)、全生存期間中央値は9.3か月(95%CI:5.2-16.9)で、重篤な有害事象は13名で確認され、うち3名がPIT関連ありと判断されているが、全般的には良好な忍容性であったとしている。これをうけて、現在、ASP-1929(RM-1929と同一有効成分)によるPITと標準療法との比較を行う国際共同第Ⅲ相試験が進行中である。

そこで、今回新たに開発された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、悪性胸膜中皮腫に対する新規の治療法の開発を目指すこととした。悪性胸膜中皮腫が、局所浸潤傾向であり、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た。

研究方法と結果

1) 外科検体を用いた検討

まず、当院における悪性胸膜中皮腫の手術検体18例を対象として、NZ-1によるポドプラニンの免疫染色を行った。手術検体のため肉腫型の症例はなく、上皮型が15例、二相型が3例であった。10%以上でポドプラニン陽性と判断して評価したところ、上皮型におけるポドプラニン陽性率が86.7%(13/15例)、二相型におけるポドプラニン陽性率が66.7%(2/3例)であり、全体でのポドプラニン陽性率は83.3%(15/18例)で、これまでの報告にほぼ一致するものであ

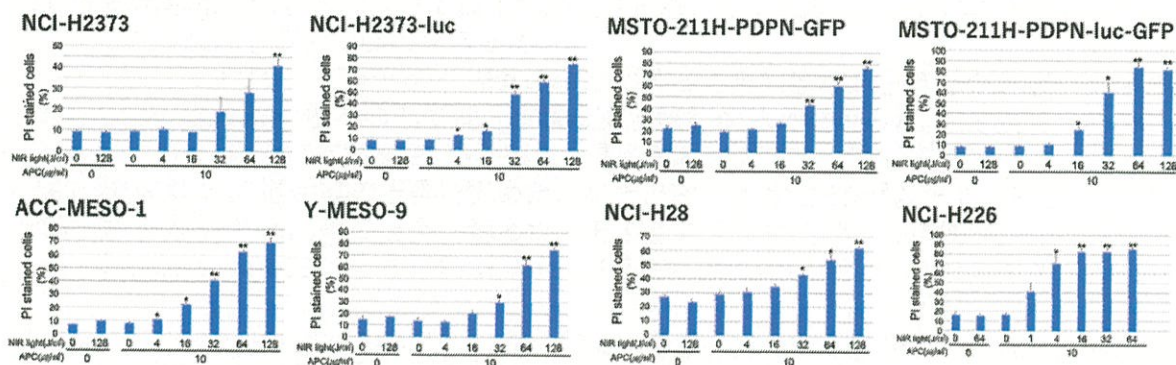
り、NZ-1 によってもポドプラニン発現の評価が可能であることを確認できた。

2) NZ-1 を用いた in vitro NIR-PIT

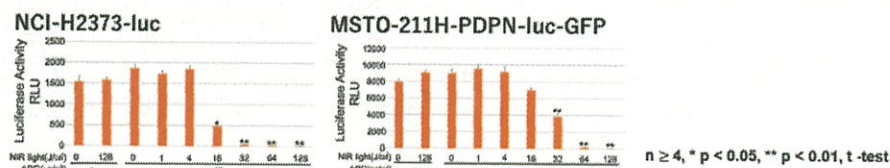
NZ-1 に、水溶性光感受物質である IRDye 700DX (IR700) を conjugate して NZ-1-IR700 を作製し、NIR-PIT を in vitro で行った。NIR-PIT の細胞傷害性を定量的に評価するために、PIT 後の死細胞率とルシフェラーゼ活性を測定した。死細胞率は、死細胞染色である PI を添加することで、その陽性率をフローサイトメーターで測定し、ルシフェラーゼ活性は、ルシフェリンを添加することで、プレートリーダーによって発光を測定した。ルシフェラーゼ活性は、ルシフェラーゼを遺伝子導入した MSTO-211H-PDPN-luc および H2373-luc の細胞株を用いて評価し、死細胞率はこれらの細胞株に加えて悪性中皮腫の細胞株 (ACC-MESO-1、Y-MESO-9、NCI-H28、NCI-H226) を用いて実験を行った。

どの細胞株においても、近赤外線的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-GFP では、 $32\text{J}/\text{cm}^2$ 以上で有意な PI 陽性率の上昇を認め、MSTO-211H/PDPN-luc-GFP では、 $64\text{J}/\text{cm}^2$ 以上で有意な PI 陽性率の上昇を認めた。また、H2373 は $128\text{J}/\text{cm}^2$ 以上で、H2373-luc は $32\text{J}/\text{cm}^2$ 以上で有意な PI 陽性率の上昇を認めた。その他の悪性中皮腫の細胞株では、ACC-MESO-1 で $32\text{J}/\text{cm}^2$ 以上、Y-MESO-9 で $64\text{J}/\text{cm}^2$ 以上、NCI-H28 で $128\text{J}/\text{cm}^2$ 以上、NCI-H226 では $16\text{J}/\text{cm}^2$ 以上で有意な PI 陽性率の上昇を認めた ($n = 4$, $** p < 0.01$, t -test)。また、ルシフェラーゼ発現株 (MSTO-211H/PDPN-luc-GFP、H2373-luc) を用いて NIR-PIT を行い、BLI を用いてルシフェラーゼ活性を測定することでも NIR-PIT の効果を評価したところ、MSTO-211H/PDPN-luc-GFP、H2373-luc とともに、NIR-PIT 後の細胞では $32\text{J}/\text{cm}^2$ 以上で relative light unit (RLU) の有意な低下を認め、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 ($n = 4$, $** p < 0.01$, t -test)。

死細胞染色 (PI 染色)



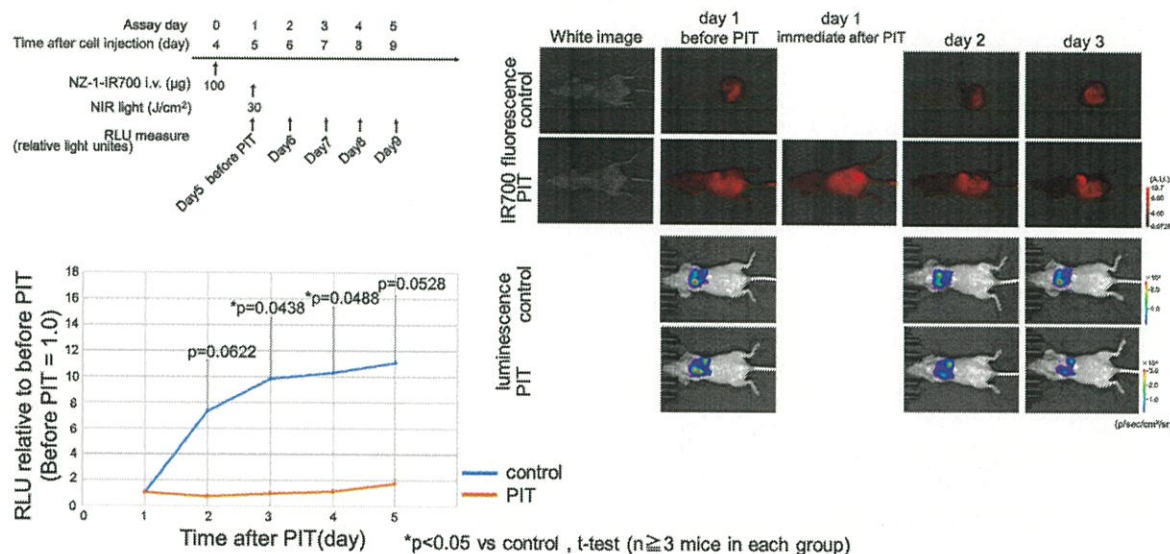
ルシフェラーゼ活性



$n \geq 4$, $* p < 0.05$, $** p < 0.01$, t -test

続いて、悪性胸膜中皮腫により近いモデルマウスにおける NIR-PIT の効果を評価するために、胸膜播種モデルを作製した。ポドプラニン強制発現株 (MSTO-211H-PDPN-luc-GFP) を右胸腔へ投与し、7 日後に NZ-1-IR700 $100\mu\text{g}/\text{body}$ を尾静脈から静脈投与した。その 24 時間後に ex vivo イメージングを取得し、IVIS イメージングシステムによってルシフェラーゼ活性を、Pearl imager によって IR700 の蛍光を測定することで、腫瘍の生着を評価した。ルシフェラーゼ活性の評価では、ヌードマウスの胸壁で発光が確認でき、胸壁に腫瘍が生着していることを確認した。また、NZ-1-IR700 を投与したマウスでは、胸壁に IR700 の蛍光が集積していることが確認でき、胸膜播種モデルが作製され、NIR-PIT の評価に利用可能であると判断した。次に胸膜播種モデルに対する in vivo NIR-PIT の効果を評価した。NIR-PIT 前後にルシフェラーゼ発光と IR700 の蛍光の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は、体表面からの撮影のため、IR700 集積の消失の確認までは困難であったが、ルシフェラーゼ活性は、NIR-PIT を施行したマウスで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、NIR-PIT 前を 1 として比で評価したところ、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

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。

今回の実験系では、胸膜播種モデルに対する NIR-PIT の際に、体表面から NIR-light の照射を行っている。実際の臨床においては、胸腔ドレナージを行う場合と同様に、ポートを造設して胸腔内からの照射を想定しており、現在光照射デバイスについても同時並行して開発中である。

悪性胸膜中皮腫は局所浸潤傾向であり、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、転移巣が多発する場合など、NIR-PIT のみではすべての転移巣に対して照射を行うことができず、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。

今回の研究において、NZ-1 を用いたポドプラニンを標的とした NIR-PIT は、悪性胸膜中皮腫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。

学会発表

1. ○ Nishinaga Y, Isobe Y, Yasui H, Takahashi K, Taki S, Matsui T, Hasegawa Y, Kato Y, **Sato K**, Targeting Photo-Therapy for Malignant pleural Mesothelioma; Near Infrared Photodynamic Immunotherapy Targeting Podoplanin, Poster, 2019 World Conference on Lung Cancer, 2019 Sep 8, Barcelona, Spain, 2019 Sep 8
2. 西永侑子、**佐藤和秀**、磯部好孝、高橋一臣、安井裕智、滝俊一、金子美香、加藤幸成、長谷川好規

悪性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、第 60 回日本肺癌学会学術集会、日本肺癌学会、大阪、2019 年 1 2 月

論文発表

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

Nishinaga Y, **Sato K**, Yasui H, Taki S, Takahashi K, Shimizu M, Endo R, Koike C, Kuramoto N, Nakamura S, Fukui T, Yukawa H, Baba Y, K Kaneko M, Chen-Yoshikawa TF, Kobayashi H, Kato Y, Hasegawa Y.

Cells. 2020 Apr 20;9(4). pii: E1019. doi: 10.3390/cells9041019.

謝辞

本研究を遂行するに当たり、公益財団法人がん研究振興財団のサポートに感謝申し上げます。