

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09167

研究課題名（和文）アスベスト曝露による悪性中皮腫の近赤外光線免疫療法を用いた早期診断と治療法の確立

研究課題名（英文）Establishment of early diagnosis and treatment of near-infrared photo-immunotherapy for malignant mesothelioma due to asbestos exposure

研究代表者

人見 敏明（HITOMI, Toshiaki）

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90405275

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：悪性新生物の新たな非侵襲性の早期診断および治療法として、近赤外蛍光分子イメージングおよび近赤外光線免疫療法が注目されている。これまでアスベスト曝露による悪性中皮腫に対する有効な治療法は確立されていない。本研究では、悪性中皮腫細胞株を用いて、癌幹細胞表面マーカーであるCD44特異的モノクローナル抗体と近赤外光線蛍光色素（IR700）による複合体を作製し、これに近赤外光線を照射し細胞毒性を評価した。細胞毒性には、近赤外光線照射の波長や照射時間が関係し、量、影響関係が認められた。近赤外光線免疫療法は、アスベスト曝露由来の悪性中皮腫に対して非侵襲性の新たな治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、悪性中皮腫細胞株を用いて癌幹細胞表面マーカーであるCD44を標的として近赤外蛍光分子イメージングおよび近赤外光線照射による効果をin vitro試験にて検証した学術的意義がある。近赤外蛍光分子イメージングおよび近赤外光線免疫療法は、将来的に非侵襲性の悪性中皮腫の治療法の一つとして確立できる科学的根拠として本研究結果は活用でき、社会的意義のある研究であったと考えている。

研究成果の概要（英文）：Near-infrared fluorescent molecular imaging and Near-infrared photo-immunotherapy are attracting attention as new non-invasive early diagnosis and treatment methods for malignant neoplasms. On the other hand, the verification by this method for malignant mesothelioma due to asbestos exposure has been hardly performed. In this study, we evaluated the cytotoxicity of malignant mesothelioma cell lines using the cancer stem cell surface marker CD44-specific monoclonal antibody and near-infrared light fluorescent dye (IR700) conjugate and near-infrared light irradiation. A dose-effect relationship was observed between the wavelength and duration of near-infrared light exposure and cytotoxicity. Near-infrared photoimmunotherapy targeting CD44 was suggested as a potential new treatment for malignant mesothelioma derived from asbestos exposure with a less invasive approach.

研究分野：衛生学

キーワード：社会医学 アスベスト 悪性中皮腫 近赤外蛍光分子イメージング 近赤外光線免疫療法 CD44

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫は、職業性曝露やアスベスト取り扱い工場の周辺住民にも被害が発生し、近年、阪神淡路大震災の復旧復興作業中にも、地震による建築物の倒壊により飛散したアスベスト粉塵曝露からの災害性中皮腫の発症も認められている。関連して、今後、東日本大震災の被災者やボランティア活動者における顕在化が懸念される。一方、首都直下型地震や東南海地震などの大規模な地震災害からのアスベスト曝露と健康被害が危惧されている。

現在、我が国ではアスベストの使用は法規制により全面禁止されているが、アスベスト含有建材を使用した建築物は数多く存在している。環境省の試算ではアスベスト含有建材は国内に約4,600万トンが存在し、今後の老朽化施設の取り壊しや自然災害による国民のアスベスト曝露は様々な機会が予測され、アスベスト曝露からの健康被害は過去の物ではなく、将来にわたり長く継続されることから予防医療や有効な治療法の確立は、社会医学において重要な課題である。

現在、悪性中皮腫の治療は胸膜肺全摘術などの外科手術、放射線治療、化学療法などの組み合わせで行われ、化学療法の1次治療としてシスプラチンとペメトレキセドの併用療法が承認されているが、発症早期に治療開始し、根治できる症例は多くない。さらに、免疫チェックポイント阻害薬(抗 Programmed death-1(PD-1)抗体)、遺伝子医薬(がん抑制遺伝子 Reduced Expression in Immortalized Cells (REIC)アデノウイルスベクター)、がん幹細胞標的薬、抗体薬物複合体(メソテリン抗体-細胞傷害性物質結合体)などの臨床試験が開始されたが、患者に負担なく、有効な治療方法としては確立されていない。

近年、米国 NIH の小林博士らは新たながん治療方法として近赤外光線免疫療法を提案した(*Mitsunaga M. et al. Nat Med., 17: 1685-91, 2011*)。この近赤外光線免疫療法は、がん細胞の細胞膜に特異的に作用する抗体に近赤外光蛍光色素(IRDye700DX: IR700)を結合させ、非侵襲的にがん細胞を識別(近赤外光照射による分子イメージング)そして、近赤外光線(690 nm)を照射してIR700で標識した特異抗体によってがん細胞を選択的に死滅させるため、副作用が少ない特徴を持っている。2015年から米国において頭頸部がんや食道がんの臨床試験が開始された。我々は、悪性中皮腫の新たな治療法として、近赤外光線免疫療法に注目しており、その基礎的な知見の収集は重要と考えている。

2. 研究の目的

近赤外光線免疫療法によるがん治療法が国際的に注目されているが、アスベスト曝露からの悪性中皮腫に関する研究は開始されていない状況にある。本研究は、悪性中皮腫に対する新規の早期診断と治療法について、近赤外光線免疫療法の応用に着目し、ヒト培養細胞やラット悪性中皮腫発症モデルを用いて近赤外蛍光分子イメージングおよび近赤外光線免疫療法の基礎的研究成果の獲得を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞膜特異的抗体の選定と抗体-近赤外蛍光プローブの作製

ヒト悪性中皮腫細胞株(ACC-MESO-1, ACC-MESO-4, MSTO-211H)、不死化中皮細胞 Met-5A および CD44-緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現させた Met-5A(以下、Met-5A CD44-GFP 発現株)を用いて、ウエスタンブロット法および免疫染色によって悪性中皮腫における細胞膜特異的モノクローナル抗体(メソテリン、ポドプラニン、CD44、PD-1)の選定を検討した。

選定した抗体(CD44)と Phthalocyanine の誘導体である近赤外光蛍光色素 IR700(LI-COR 社)標識した結合体(以下、CD44-IR700 プローブ)およびコントロールとして IgG 抗体の結合体(以下、IgG-IR700 プローブ)を同様に作製した。プローブ濃度は製造会社の手順に従い、マイクロプレートリーダー(Varioskan LUX, Thermo Fisher Scientific)にて測定した。

(2) in vitro での近赤外蛍光分子イメージングおよび近赤外光線免疫療法による細胞毒性評価

ACC-MESO-1 細胞、Met-5A 細胞および Met-5A CD44-GFP 発現株を用いて、CD44-IR700 または IgG-IR700 プローブ 10 µg/mL 濃度と反応後、蛍光顕微鏡(KEYENCE BZ-X710, Keyence)にてIR700およびGFPフィルターで近赤外蛍光分子イメージングを行った。

各細胞株にCD44-IR700またはIgG-IR700プローブ0~10 µg/mLと反応後、近赤外光線を0~6 J/cm²で照射し、顕微鏡観察およびCell Counting Kit法(CCK-8, 同仁化学)により細胞毒性評価を検討した。

(3) ラット悪性中皮腫発症モデルを用いた FISH 法による悪性中皮腫における遺伝子解析

実験動物として F344 雄性ラットを用い、アスベストのうちのクリソタイル及びアモサイト(10mg/2mL)を一回腹腔内投与し(一群5匹、経時的観察を可能に複数群とする)、2年間の経過観察を行い、悪性中皮腫の発症動物を作製し、得られた悪性中皮腫とコントロール群からの中皮細胞について、悪性中皮腫で欠失することが報告されているがん抑制遺伝子 p16 (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2a (Cdkn2a (p16Ink4a/p14Arf)) プローブを用いて、FISH 試験により p16 遺伝子ホモ欠失細胞の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞膜特異的抗体の選定と抗体-近赤外蛍光プローブ

悪性中皮腫細胞株および Met-5A でのタンパク発現量と局在から各種抗体の中から選定した CD44 抗体と IgG 抗体より、CD44-IR700 および IgG-IR700 プローブの使用が可能となった。

(2) 近赤外蛍光分子イメージングと近赤外照射による細胞毒性評価

ACC-MESO-1 細胞、Met-5A 細胞および Met-5A CD44-GFP 発現株に対して CD44-IR700 および IgG-IR700 プローブ反応後、近赤外蛍光分子イメージングの結果を図 1 に示した。CD44-IR700 プローブでは、悪性中皮腫 ACC-MESO-1 に比べて、不死化中皮細胞 Met-5A で蛍光シグナルが低い傾向であり、コントロールプローブである IgG-IR700 では蛍光シグナルが認められなかった。Met-5A CD44-GFP 発現株では、CD44-IR700 と CD44-GFP の強い蛍光シグナルを得られ、両者の共在が認められた。

各細胞株にプローブ反応後、近赤外光線を照射した結果、CD44-IR700 による蛍光シグナルの高い細胞において、近赤外光線照射量に従い、顕微鏡観察下で細胞の形態が変化し、CCK-8 法により細胞毒性が確認された。

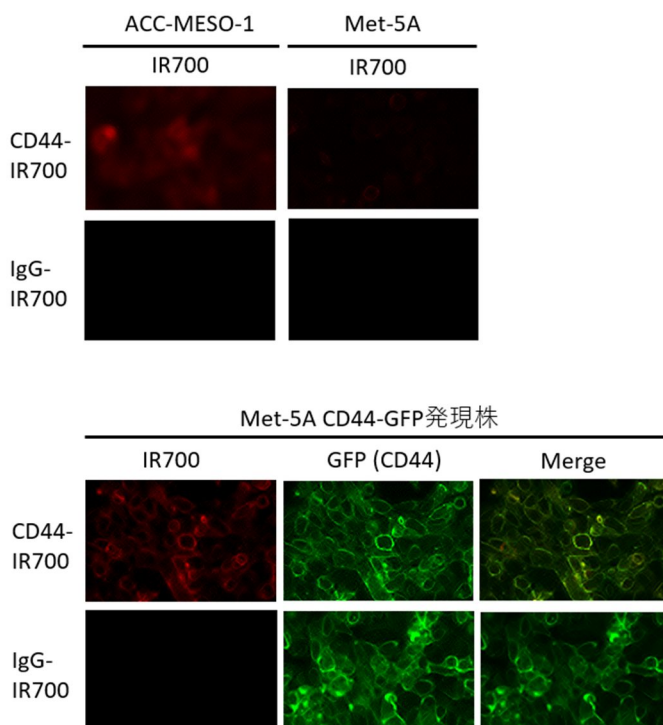
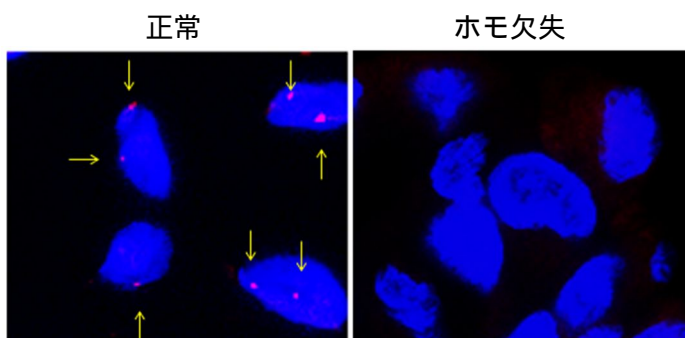


図 1 In vitro での近赤外蛍光分子イメージング

(3) ラット悪性中皮腫発症モデルを用いた FISH 法による悪性中皮腫における遺伝子解析

図 2 に示すように、アスベスト投与群の中皮腫細胞では、p16 遺伝子を含む領域 (CDKN2A/2B) でのホモ欠失が高率に認められた。一方、中皮細胞群での CDKN2A/2B のホモ欠失の増加は認められなかった。FISH 法による p16 遺伝子ホモ欠失の検査は、悪性中皮腫患者において臨床診断法として実用化が進んでおり、本実験結果は、臨床診断における悪性中皮腫患者での知見と一致していた。



黄色矢印：CDKN2A/2B
青：核 (DAPI 染色)

図 2 FISH 法による CDKN2A/2B 欠失の評価

(4) まとめ

本研究では、悪性中皮腫および不死化中皮細胞において、癌幹細胞表面マーカーである接着分子 CD44 を標的とした近赤外蛍光分子イメージングについて検証した。また CD44-IR700 プローブを用いた近赤外光線照射での検討結果から、近赤外光線照射の波長および照射時間と細胞毒性においては、量-影響関係を確認した。アスベスト曝露由来の悪性中皮腫に対して、現在でも有効な治療法は普及していないが、本研究から、新たな非侵襲性の治療法として位置づける近赤外光線免疫療法は、関連領域の研究を含めて進展させるべき研究課題と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 人見敏明、高田礼子、曹洋、網中雅仁、山内博
2. 発表標題 FISH法を用いたchrysotile及びforsteriteによるラット腹膜中皮腫の評価
3. 学会等名 第25回日本免疫毒性学会学術年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山内博、高田礼子、人見敏明、曹洋、網中雅仁、神山宣彦
2. 発表標題 悪性中皮腫の予防対策としてのアスベスト無害化処理と安全性評価
3. 学会等名 第90回日本産業衛生学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 人見敏明、曹洋、網中雅仁、高田礼子、山内博
2. 発表標題 FISH法によるクリソタイル及びその無害化品の中皮腫評価
3. 学会等名 第88回日本衛生学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

聖マリアンナ医科大学 研究者情報 人見敏明
<http://gyoseki.marianna-u.ac.jp/smuhp/KgApp?kyoinId=ymsyoydgy>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	高田 礼子 (TAKATA Ayako) (30321897)	聖マリアンナ医科大学・医学部・教授 (32713)	
研究 協力者	山内 博 (YAMAUCHI Hiroshi) (90081661)	聖マリアンナ医科大学・医学部・客員教授 (32713)	