

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07778

研究課題名(和文)ポドプランニンに対するがん特異的抗体(CasMab)を用いた放射免疫療法の開発

研究課題名(英文)Radioimmunotherapy with Anti-podoplanin cancer-specific monoclonal antibody

研究代表者

須藤 仁美(Sudo, Hitomi)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 分子イメージング診断治療研究部・主任
研究員(任常)

研究者番号：10415416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：放射免疫療法(Radioimmunotherapy; RIT)は、がん細胞に高発現している抗原を標的にした抗体に治療用のラジオアイソトープ(RI)を標識し体内に投与する放線治療法である。本研究では腫瘍に発現しているポドプランニンの特異的に認識する抗体を治療用RIで標識し、マウスモデルを用いてその治療効果と副作用の検証を行なった。治療用RIである90Yや225Acで標識した抗体を投与したマウスでは、重篤な副作用なしに明らかな抗腫瘍効果がみられた。この結果から治療核種で標識した腫瘍特異的抗ポドプランニン抗体は、ポドプランニンを高発現している腫瘍に対する治療として有望であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウス皮下腫瘍と比較して、患者由来組織でのポドプランニンの発現は高い傾向にあったことから、この抗体を用いたRITは中皮腫患者ではより高い治療効果が期待できる。RI標識した本抗体が臨床応用されれば、中皮腫の新たな画期的な治療法となるだろう。また、ポドプランニンは脳腫瘍など様々ながんで高発現していることが報告されており、本抗体を用いたRITが中皮腫以外の固形がんの治療にも応用が可能であり、難治性固形がんの治療法開発に大きな進展をもたらすと期待される。

研究成果の概要(英文)：Radioimmunotherapy (RIT) is a selective internal radiation therapy using radiolabeled monoclonal antibodies against tumor-associated antigens. In this study, we radiolabeled antibodies which recognized cancer specific podoplanin and evaluated the potential of podoplanin-targeted RIT using mouse model. Giving 90Y- and 225Ac-labeled anti-podoplanin antibodies showed markedly antitumor effect without obvious adverse effects. These results suggests that the radiolabeled anti-podoplanin antibody is a promising RIT agent as a new therapeutic option for podoplanin-expressing tumors.

研究分野：核医学

キーワード：ポドプランニン 放射免疫療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

放射免疫療法 (Radioimmunotherapy; RIT)は、がん細胞に高発現している抗原に対する抗体に治療用のラジオアイソトープ (RI) を標識し体内に投与する放線治療法であり、高い抗腫瘍効果を示す。化学療法と同様に全身性の治療であり、特に播種性・転移性のがんの治療に有効であると言われている。また RI を使用していることから、がんや正常組織への集積性を画像診断機器により非侵襲的に評価することが可能で、治療効果や有害事象を予測できるメリットもある。しかしながら標的分子である抗原は多くの場合正常細胞にも発現しており、これらに対する副作用が懸念される。がん細胞だけを認識することができる抗体を用いれば、正常細胞への副作用を抑えることができ、その分治療抗体を大量に投与することが可能になり、高い治療効果が期待できる。

従来から細胞ががん化すると細胞表面の糖鎖が変化する事が言われていたが、研究協力者の加藤らは、このがん細胞に特異的な糖鎖を認識する抗体 (Cancer-specific monoclonal Antibody; CasMab) の開発に成功した^{1,2}。この抗体を RIT に利用することで、正常細胞に対する副作用を抑えつつ、高い治療効果をもたらすと考えられる。CasMab を活用した RIT により十分な治療効果が確認されれば、RI を用いた新しい放射線治療として、難治性固形がんの治療法開発に大きな進展をもたらすと期待される。

2. 研究の目的

ポドプラニン は膜貫通型糖タンパク質で、複数のがんで高発現していることが知られており、がん治療における標的分子のひとつとして注目されている。本研究では、ポドプラニンが高発現していることが報告されている中皮腫モデルを用いて、CasMab を用いた RIT の有用性を示すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 中皮腫患者におけるポドプラニンの発現の検証

市販の患者由来組織アレイを用いて、ポドプラニンタンパク質の発現を免疫組織化学染色により評価した。

(2) RIT に適した抗ポドプラニン抗体の選択

ポドプラニン発現細胞に高い親和性をもつ複数の抗ポドプラニン抗体を ¹¹¹In で標識し、ポドプラニンを高発現している細胞 (PC10、LN319 および H226) を用いて cell binding assay を行い、RI 標識が親和性に与える影響を検証した。また、¹¹¹In 標識した CasMab を PC10 担癌マウスに投与し、1、2、4、7 日後に、SPECT/CT 撮像を行ない、腫瘍集積を評価した。これらの結果をもとに、以降の実験に用いる抗体を選択した。

(3) ¹¹¹In 標識抗ポドプラニン抗体の腫瘍および臓器への集積の検証

上記 (2) で選択した抗体を ¹¹¹In で標識し、中皮腫由来細胞 H226 担癌マウスに投与した。投与 1、2、4、7 日後に腫瘍、血液および臓器 (脳、肺、肝臓、脾臓、腸、腎臓、筋肉、脛骨) を抽出した。腫瘍および臓器の重量を測定後、放射活性をガンマーカウンターで測定した。

(4) 線量評価

上記 (3) で得られたデータを元に、治療核種 (⁹⁰Y および ²²⁵Ac) で標識した抗ポドプラニン抗体を投与による腫瘍や各臓器における放射線の吸収線量を算出した。この数値をもとにマウスへの RI 投与量を決定した。細胞障害性における ²²⁵Ac の ⁹⁰Y に対する生物学的効果比 (Relative Biological Effectiveness、RBE) は 5 とした³。

(5) ⁹⁰Y 標識抗体での治療効果と副作用の検証

線放出核種である ⁹⁰Y で標識した抗ポドプラニン抗体 NZ-12 および NZ-16 (3.7MBq) を H226 担癌マウスに投与し、腫瘍体積および体重を週 2 回以上、8 週間測定した。腫瘍体積が 800mm³ を超えた場合および投与時と比べて 20%以上の体重減少が観察された場合は、動物愛護の観点より安楽死させた。また、⁹⁰Y 標識抗体投与 1、3、7 日後に腫瘍および骨髄 (大腿骨) を抽出し、ホルマリンで固定した。固定した組織は、パラフィン包埋後、切片を作成し HE 染色および免疫組織化学染色 (Ki-67、TUNEL 染色) を行った。

(6) ²²⁵Ac 標識抗体での治療効果と副作用の検証

線放出核種である ²²⁵Ac で標識した抗ポドプラニン抗体 NZ-16 (11.1kBq) を担癌マウスに投与し、上記 (5) と同様の検証を行なった。

4. 研究成果

(1) がん患者におけるポドプラニンの発現

中皮腫患者由来組織アレイにおいて、全体の90%の腫瘍でポドプラニンの高発現が認められた。中皮腫由来細胞株 H226 をマウスの皮下に移植した腫瘍に比べ、強い染色性を示した。このことから、ヒト中皮腫におけるポドプラニンの発現は、マウス皮下腫瘍より高いと考えられる。

(2) RITに適した抗ポドプラニン抗体の選択

従来型抗ポドプラニン抗体 (NZ-12) と CasMab を ^{111}In で標識し、ポドプラニン高発現細胞 (PC10、H226) への結合性を評価した。従来型の抗体に比べて、CasMab 抗体の結合性は低かった。また、 ^{111}In 標識抗体の PC10 腫瘍への集積を SPECT/CT で評価した。 ^{111}In 標識した CasMab は NZ-12 に比べ、腫瘍への集積は低い傾向にあった (図1)。RI 標識をしていない CasMab は NZ-12 に比べて高い結合性を持つことから、RI 標識が抗原との結合に影響を与えていると考えられた。NZ-12 は、がん細胞特異的な糖鎖を認識する CasMab ではないが、腫瘍に発現しているポドプラニンを特異的に認識する抗体であるため、NZ-12 を用いた RIT の評価を行うことにした。さらに、既存の抗ポドプラニン抗体を改変し、より高い結合性をもつクローンを作成した。得られた抗体のうちの1つ NZ-16 は、RI 標識による親和性の影響を受けず、NZ-12 に比べて高い細胞結合性を有していた (図2)。

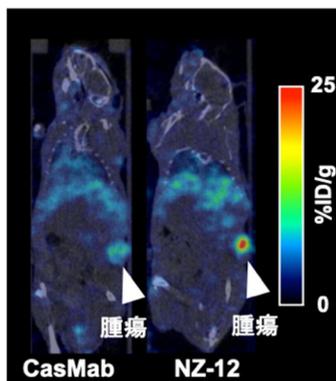


図1 SPECT/CT画像(投与4日後)

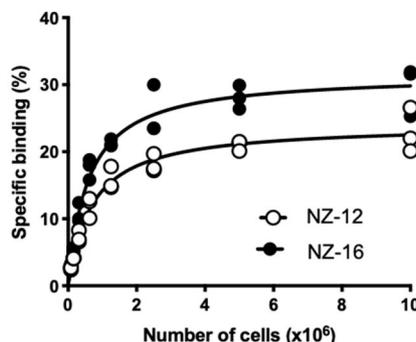


図2 ^{111}In 標識NZ-12およびNZ-16の細胞結合性

(3) ^{111}In 標識抗ポドプラニン抗体の集積の検証

^{111}In 標識 NZ-12 と NZ-16 の血液クリアランスは、それぞれ 3.3 日と 3.7 日であった。両抗体とも、正常臓器への集積は投与後時間とともに減少し、問題になるような集積はみられなかった。肝臓を除く正常臓器における ^{111}In 標識 NZ-16 の集積は NZ-12 に比べて高い傾向にあったが、肝臓への ^{111}In 標識 NZ-16 の集積は NZ-12 に比べて優位に低かった。 ^{111}In 標識 NZ-16 の腫瘍集積は、各タイムポイントにおいて NZ-12 より高い傾向にあり、特に投与 4 日後では優位に高い集積を示した (図3)。

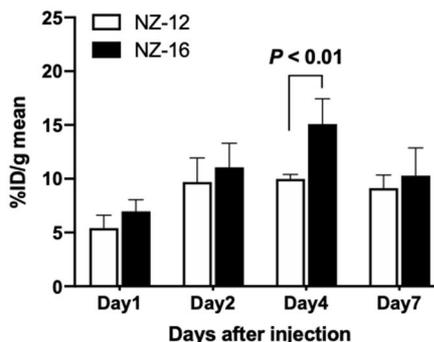


図3 ^{111}In 標識NZ-12およびNZ-16の腫瘍集積

(4) 線量評価

^{111}In の腫瘍および臓器への集積のデータをもとに、 ^{90}Y および ^{225}Ac で標識した NZ-12 と NZ-16 を投与した際の腫瘍および正常臓器の吸収線量を算出した。いずれの核種においても、1MBq の RI 標識 NZ-16 による腫瘍および臓器における吸収線量は、NZ-12 に比べて高い傾向にあった。 ^{90}Y -RIT の投与量を 3.7MBq と仮定した場合の腫瘍や臓器への吸収線量を算出した。NZ-12 および NZ-16 とともに正常臓器での吸収線量は最大耐容量を超えることはなかったため、 ^{90}Y -RIT の投与量を 3.7MBq とした。3.7MBq の ^{90}Y 標識 NZ-16 と同等の放射線量を与える ^{225}Ac 標識 NZ-16 の投与量は、 ^{225}Ac と ^{90}Y の腫瘍の吸収線量および細胞障害性における RBE を考慮して、11.1kBq とした。

(5) ^{90}Y 標識抗体での治療効果と副作用の比較検証

^{90}Y で標識した NZ-12 と NZ-16 による RIT の効果と副作用を比較した。3.7MBq の ^{90}Y 標識 NZ-12 と ^{90}Y 標識 NZ-16 の投与により、腫瘍の増殖が抑制された。しかしながら、投与 21 日目以降すべての腫瘍の再増殖が観察された。 ^{90}Y 標識抗体を投与したマウスの腫瘍の HE 染色から、時間経過とともにネクロシスが広がることが確認できた。また、 ^{90}Y 標識抗体の投与により、腫瘍組織の増殖細胞 (Ki-67 陽性細胞) の減少が見られた。 ^{90}Y 標識 NZ-16 を投与したマウスの腫瘍

組織では、 ^{90}Y 標識 NZ-12 を投与したマウスの腫瘍に比べて、増殖細胞の割合が少なかった。また、アポトーシスをおこした細胞はほとんど観察できなかった。

^{90}Y 標識した NZ-12 および NZ-16 を投与したマウスでは、投与7日目をピークに一時的な体重減少が見られたが、その後回復した。また、いずれの抗体においても骨髄での重篤な障害は見られなかった。

以上のことから、抗ポドプラニン抗体を用いた ^{90}Y -RIT は中皮腫の治療法として有望であると考えられる。

(6) ^{225}Ac 標識抗体での治療効果と副作用の検証

^{90}Y および ^{225}Ac で標識した NZ-16 による RIT の効果と副作用を比較した。3.7MBq の ^{90}Y 標識 NZ-16 の投与により、一時的に腫瘍増殖は抑制されたが、投与21日後より再増殖をはじめた。一方、11.1kBq の ^{225}Ac 標識 NZ-16 を投与したマウスの腫瘍は、投与10日目まで腫瘍体積の増殖が見られたが、その後減少した。 ^{225}Ac 標識 NZ-16 投与群において、完全に消失した腫瘍はなかったが、観察期間中の再増殖はみられなかった。投与7日後までの病理解析では、 ^{90}Y と ^{225}Ac の間に違いは見られなかった。

^{90}Y および ^{225}Ac で標識した NZ-16 を投与したマウスでは、投与7日目をピークに一時的な体重減少が見られたが、その後回復した。また、いずれの核種においても骨髄での重篤な障害は見られなかった。

以上のことから、 ^{225}Ac で標識した抗ポドプラニン抗体は ^{90}Y で標識した場合に比べ高い治療効果を持つことが示された。

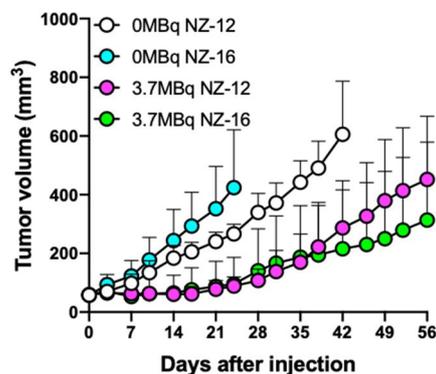


図4 ^{90}Y -標識NZ-12およびNZ-16投与後の腫瘍体積

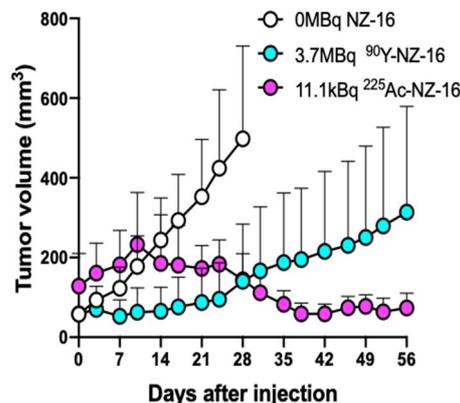


図5 ^{90}Y -および ^{225}Ac 標識NZ-16投与後の腫瘍体積

< 引用文献 >

1. Kato, Y. and M.K. Kaneko, *A Cancer-specific Monoclonal Antibody Recognizes the Aberrantly Glycosylated Podoplanin*. Scientific Reports, 2014. **4**(1): p. 5924.
2. Yamada, S., et al., *LpMab-23: A Cancer-Specific Monoclonal Antibody Against Human Podoplanin*. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother, 2017. **36**(2): p. 72-76.
3. Sgouros, G., et al., *MIRD Pamphlet No. 22 (Abridged): Radiobiology and Dosimetry of α -Particle Emitters for Targeted Radionuclide Therapy*. Journal of Nuclear Medicine, 2010. **51**(2): p. 311-328.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sudo Hitomi, Tsuji Atsushi B., Sugyo Aya, Kurosawa Gene, Kurosawa Yoshikazu, Alexander David, Tsuda Hiroyuki, Saga Tsuneo, Higashi Tatsuya	4. 巻 21
2. 論文標題 Radiolabeled Human Monoclonal Antibody 067-213 has the Potential for Noninvasive Quantification of CD73 Expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2304 ~ 2304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21072304	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sudo Hitomi, Tsuji Atsushi B., Sugyo Aya, Saga Tsuneo, Kaneko Mika K., Kato Yukinari, Higashi Tatsuya	4. 巻 110
2. 論文標題 Therapeutic efficacy evaluation of radioimmunotherapy with 90Y-labeled anti-podoplanin antibody NZ-12 for mesothelioma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1653-1664
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13979	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hitomi Sudo, Atsushi B. Tsuji, Aya Sugyo, Tsuneo Saga, Mika K. Kaneko, Yukinari Kato, and Tatsuya Higashi
2. 発表標題 Preclinical evaluation of an anti-podoplanin antibody NZ-12 as a radioimmunotherapy agent for malignant mesothelioma
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hitomi Sudo, Atsushi B. Tsuji, Aya Sugyo, Mitsuru Koizumi, Gene Kurosawa, Yoshikazu Kurosawa, Tsuneo Saga, Tatsuya Higashi
2. 発表標題 Development of a noninvasive imaging technique to detect the expression of CD73 mediating immunosuppression in cancer
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	加藤 幸成 (Kato Yukinari)		
研究協力者	辻 厚至 (Tsuji Atsushi) (60303559)		
研究協力者	須堯 綾 (Sugy Aya) (00415415)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------