

平成21年5月18日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790855
 研究課題名（和文） 固形癌に対する RI 標識抗体治療の細胞殺傷メカニズムの解明と作用増強因子の探索
 研究課題名（英文） Mechanism elucidation of the lethal effect of radiolabeled antibody to solid tumor, and searching the factor enhanced this effect.
 研究代表者
 花岡 宏史 (HANAOKA HIROFUMI)
 群馬大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：50361390

研究成果の概要：培養細胞または担癌マウスに対して⁹⁰Y-抗体を負荷し、治療効果およびそのメカニズムについて検討を行った。培養細胞において⁹⁰Y-抗体の負荷により細胞死が観察され、少なくともその一部でアポトーシスが認められた。担癌マウスでは腫瘍縮小効果が観察された腫瘍を摘出し染色を行ったところ、⁹⁰Y-抗体投与早期よりアポトーシスが起っていた。以上より、放射免疫療法による細胞致死作用がアポトーシスに起因することが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	510,000	3,610,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：固形癌・RI 標識抗体・治療・放射免疫療法・アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞殺傷性の高い放射性同位元素 (RI) を結合した抗体を体内に投与し、体の内側からの放射線でがんを治療する『放射免疫療法』が注目されている。放射免疫療法の利点としては、①がんの特異性の高い抗体を用いることにより、がん細胞を選択的に殺傷することができる、②全身に点在する病巣や転移巣および診断で発見できないような小さな病変に対しても治療効果が期待できる、③RI は一定の飛程を有しているため、放出する放

射線により抗体が結合していない周辺のがん細胞に対しても殺傷効果を有する、という点が挙げられる。イットリウム-90 (⁹⁰Y) を結合したCD20 抗体 (商品名：ゼヴァリン®) は悪性リンパ腫に対する優れた治療薬として海外ではすでに臨床使用されていた。しかしながら固形癌に対する放射免疫療法は種々の検討が行われているにもかかわらず、大きな成果をあげられていない。そこで固形癌に対する放射免疫療法を成功させるために、様々な戦略が考えられている。固形癌の

治療がうまくいっていない原因についてはいろいろと考えられているが、一つには悪性リンパ腫に比べて固形癌の放射線感受性が低いことが指摘されており、固形癌の放射線感受性を高めることは、効果的な放射線免疫療法へとつながると期待されている。一般的な放射線による細胞死はアポトーシスによることが報告されているが、放射線免疫療法による細胞傷害性に関してはあまり報告がなかった。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目標は固形癌の放射線免疫療法を成功させることである。固形癌の治療がうまくいっていない原因の一つに放射線感受性の低さの関与が考えられていることから、本研究では、固形癌の放射線感受性を増強させることを目的として、まずは放射線免疫療法による細胞殺傷メカニズムを解明することを計画した。細胞殺傷メカニズムを詳細に解明することにより、どうすれば細胞死を効率的に起こさせることができるかを推測することができ、固形癌に対する放射線免疫療法の効果を増強することが可能となる。

3. 研究の方法

RIとしてはゼヴァリンでも用いられている細胞殺傷性の高いβ線放出核種である⁹⁰Yを使用した。金属である⁹⁰Yと抗体を直接結合させることはできないので、両者を結合させるために二官能性キレート試薬としてSCN-Bz-DTPA (4-isothiocyanatobenzyl-diethylenetriamine pentaacetic acid)を選択し、キレート剤と抗体をモル比5:1で反応させることによりDTPA-抗体を作製した。その後DTPA-抗体に⁹⁰Yを45°Cで1時間反応させることにより、⁹⁰Y標識抗体を作製した。DTPA結合抗体および⁹⁰Y標識抗体作製により抗体の抗原に対する結合能が低下する可能性が考えられるので、後述する結合実験を用いて結合能が保持されていることを確認した。

今回の研究では、標的分子として滑膜肉腫に特異的に発現している膜タンパク質『FZD10』を選択し、FZD10に対する抗体を上記の条件にて⁹⁰Y標識した。細胞株としては滑膜肉腫細胞株であるSY0-1と大腸癌細胞株DLD-1にFZD10を遺伝子導入したDLD-1/FZD10の2種類を用いた。各細胞におけるFZD10の発現及

び抗体の結合性については抗体をヨウ素-125 (¹²⁵I)で標識した抗体を用いた。加える非標識抗体の量を変化させ、¹²⁵I標識抗体の細胞への結合率と抗原の発現量を算出した。

培養細胞を用いた検討では、SY0-1およびDLD-1/FZD10を96穴のプレートに播いて一晚培養した後、実験に用いた。培養した癌細胞に対して⁹⁰Y標識抗体(5, 10, 20, 40 μCi)を加えて3時間インキュベートした後、培地を除き、リン酸緩衝液で洗浄した。その後、通常の増殖培地を加えて3日間培養し、細胞の生細胞数及びアポトーシスを測定した。生細胞数の測定及びアポトーシス検出には市販のキットを用いた。

両細胞株をマウスのわき腹に5×10⁶ずつ摂取し、担癌マウスモデルを作製した。担癌マウスにおける抗FZD10抗体の腫瘍集積性は、⁹⁰Yと類似した金属的性質を有している診断用核種であるインジウム-111 (¹¹¹In)を用いた。¹¹¹In標識抗体をそれぞれの担癌モデルマウスに投与し、経時的に各臓器を摘出し、その重量と放射能を測定した。それぞれの集積量は、投与放射能に対する各臓器の放射能の割合を各臓器の重さで除した値『%dose/g』を算出した。治療実験では、それぞれの担癌モデルマウスに対し、100, 150, 200 μCiの⁹⁰Y標識抗体を投与し、週2回、腫瘍の大きさを測定した。また副作用の指標として体重を測定も同時に行った。治療後の腫瘍を摘出し、TUNEL法によりアポトーシスの検出を行った。

4. 研究成果

DTPA結合及び⁹⁰Y標識により抗体の抗原に対する結合能はわずかに減少したものの⁹⁰Y標識抗体はFZD10発現細胞に対し十分な結合能を保持していた。また⁹⁰YのDTPA-抗体標識率はおよそ90%であった。臨床に用いる場合には標識率が95%以上で精製を必要としないことが強く望まれることから、本標識抗体の作製については標識抗体作製法の最適化を行ない、95%以上の標識率を達成する必要がある。

結合実験において、抗FZD10抗体は、滑膜肉腫細胞株SY0-1および大腸癌細胞株DLD-1/FZD10に対して特異的に高い結合性を示したが、その結合量はDLD-1/FZD10細胞の方が有意に多く、FZD10抗原の発現量は約40倍と算出された。

培養細胞に対し、 ^{90}Y 標識抗体を加えたところ、細胞への ^{90}Y 標識抗体の結合量は結合実験の結果と同様にDLD-1/FZD10の方が多かったに

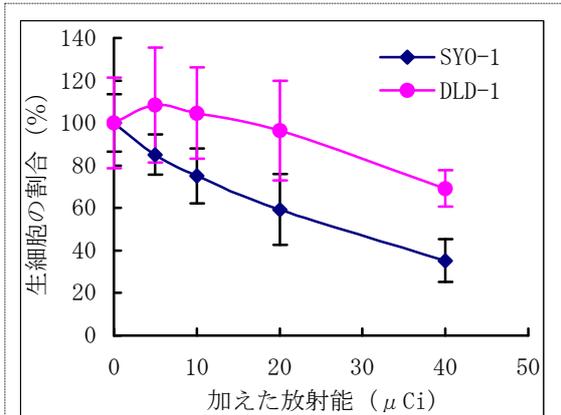


図 1. 培養細胞の生存に与える ^{90}Y 抗体の影響

もかかわらず、SYO-1の方が低放射能において生細胞数の減少すなわち細胞死が認められた(図1)。この結果から2種の細胞株は放射線感受性が大きく異なり、滑膜肉腫細胞株SYO-1の方が放射線感受性が高いことが示唆された。また、この培養細胞実験系においてもアポトーシスが起きているかどうかを検討したところ、両細胞とも細胞死が起こる線量の放射能を加えた群においてアポトーシスが起きていることが明らかとなった。ただしアポトーシスを正確に定量するには至っておらず、細胞死とアポトーシスとの相関を得ることはできなかった。今後、さらに実験系を最適化し、放射免疫療法によるアポトーシスと細胞死の関係について明らかにしていく予定である。

担癌マウスにおける ^{111}In 標識抗体の腫瘍集積性を検討したところ、48時間後の集積量はSYO-1: $22.0 \pm 4.5\%$ dose/g、DLD-1/FZD10: $49.0 \pm 4.2\%$ dose/gとFZD10の発現量が多いDLD-1/FZD10腫瘍に対してより高い放射能集積が認められた。このことから ^{111}In 標識抗体とほぼ同様の体内動態を示す ^{90}Y 標識抗体の腫瘍集積量もDLD-1/FZD10腫瘍の方が多いたことが示唆される。SYO-1腫瘍への集積量は、論文で報告されている他の抗体を用いた検討に比べるとそれほど高くないが、これは抗原であるFZD10の発現がそれほど多いものではないことに起因すると考えられる。

^{90}Y 標識抗体による治療実験を行ったところ、SYO-1腫瘍では治療早期より腫瘍縮小効果が認められ、ほとんどのマウスにおいて腫瘍が消失したのに対し、 ^{90}Y 標識抗体の腫瘍集積量

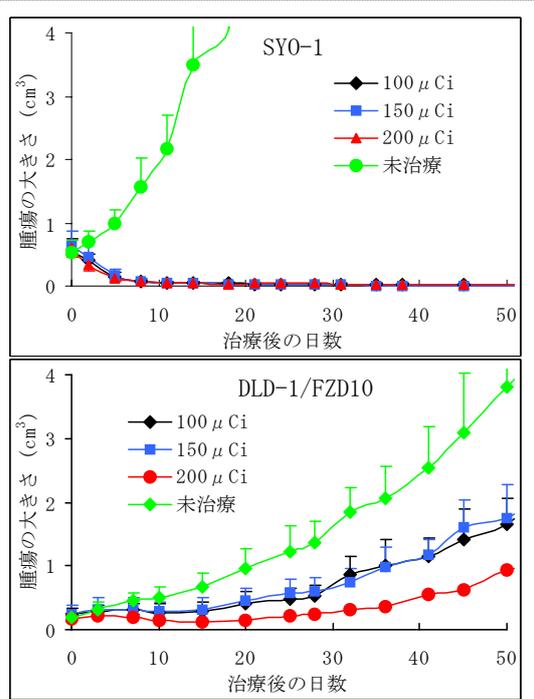


図 2. ^{90}Y 標識抗体による担癌マウス治療

がより多いと予想されるDLD-1/FZD10腫瘍では増殖抑制効果は認められたものの、腫瘍の縮小には至らなかった(図2)。このことから、ある程度の放射能集積は必要であると考えられるが、単純に ^{90}Y がたくさん集まれば治療効果が得られるというわけではないことが明らかとなった。SYO-1腫瘍において、論文での報告と比較して、腫瘍集積量が少ないにもかかわらず、投与早期から高い治療効果(論文での報告と比較しても非常に高い効果)が得られたことから、本細胞株は放射線感受性が高いことが示唆された。このことから、放射免疫療法の標的となる抗原としては、腫瘍に非常に高発現している必要はないと考えられる。マウスへの ^{90}Y 標識抗体の投与量として200 μCi は多すぎであり、ほとんどのマウスが放射能の副作用で死んでしまった。100 μCi および150 μCi 投与群においても一過性の体重減少はみられたが、1ヵ月後には未治療群と同じレベルに回復した。SYO-1モデルマウスにおいては投与量による違いはなく、DLD-1/FZD10モデルマウスにおいては、200 μCi 投与群では腫瘍の増殖抑制効果が高いようではあるが、生き残った1匹のみの結果であるので、有意とはいえない。

投与早期より非常に高い治療効果が得られたSYO-1モデルマウスに対し、 ^{90}Y 標識抗体を100 μCi 投与し、投与3日後、6日後、10日後に腫瘍を摘出し(それぞれ別のマウス)、

TUNEL法によりアポトーシスの検出を行ったところ、経時的にアポトーシスを起こしている部位が増加しているのが観察された(図3、茶色の部分がアポトーシスを起こしている部位)。この結果は治療実験において腫瘍が

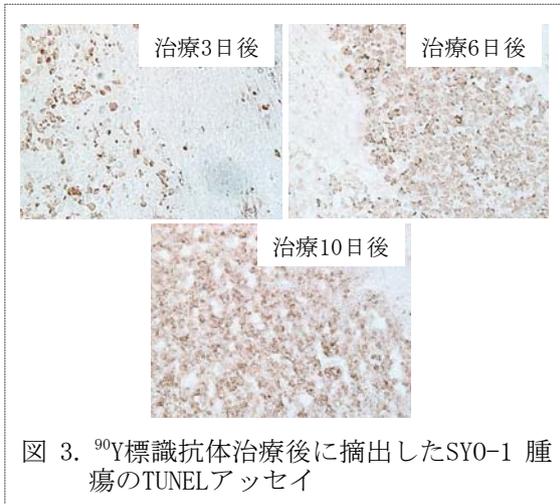


図 3. ⁹⁰Y標識抗体治療後に摘出したSY0-1 腫瘍のTUNELアッセイ

縮小していく経時変化とよく相関しており、⁹⁰Y標識抗体による腫瘍縮小効果がアポトーシスによる細胞死に起因することが示唆された。

以上の検討結果をまとめると、

- *In vitro in vivo*において⁹⁰Y標識抗体による細胞死はアポトーシスによることが確認された。
- ⁹⁰Y標識抗体による傷害性の強さが培養細胞での実験と担癌マウスによる実験で一致していた。
- ⁹⁰Y標識抗体の集積量よりも癌細胞の放射線感受性が治療効果に大きく寄与していることが示唆された。

本研究結果から、放射免疫療法においては腫瘍の放射線感受性が重要であることが明らかとなった。固形癌に対する放射免疫療法を成功させるためには固形癌の放射線感受性を高めること、特に癌細胞にアポトーシスをより効率的に起こさせることが重要であると考えられる。今後、さらに放射免疫療法によるアポトーシスの経路を明らかにし、その効果を増強するような薬剤を用いて、培養細胞による放射免疫療法的作用増強効果について検討していく予定である。残念ながら放射免疫療法的作用増強因子を見出すまでには至らなかったが、本研究の成果は今後の放射免疫療法の研究の進展に寄与するもので

あると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Hanaoka H, Katagiri T, Fukukawa C, Yoshioka H, Yamamoto S, Iida Y, Higuchi T, Oriuchi N, Paudyal B, Paudyal P, Nakamura Y, Endo K. Radioimmunotherapy of solid tumors targeting a cell-surface protein, FZD10: Therapeutic efficacy largely depends on radiosensitivity. *Ann Nucl Med* 2009; 23, in press 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花岡 宏史 (HANAOKA HIROFUMI)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50361390