

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10497

研究課題名(和文) 治療応答性分子を標的とする新しいIRI治療コンセプトの実証研究

研究課題名(英文) POC study of a new radioimmunotherapy targeting molecules response to therapy

研究代表者

須堯 綾 (Sugyo, Aya)

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・主任技術員(任常)

研究者番号：00415415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：治療に应答する分子のひとつであるCD147に対するRI治療を膵癌モデルマウスで検証した。膵癌モデルマウスにおいて、gemcitabine(Gem)とX線による外照射治療を行い、GemまたはX線単独治療よりもGemとX線の併用療法の治療効果が高いことを実証した。抗CD147抗体をIn-111で標識し、細胞結合実験とモデルマウスでの体内動態を評価し、腫瘍細胞への結合と腫瘍への集積が高いことを実証した。Y-90で抗CD147抗体を標識し、GemまたはRITの単独治療とGemとRITの併用療法の治療効果を評価した。単独治療に比べGemとRITの併用療法の治療効果が高いことが実証された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

効果的な転移がんの治療法の開発が社会から強く求められており、転移がんの治療として、主に化学療法が行われているが、現状では治療効果は低いことが大きな問題である。放射線療法は、全身性の治療に適していないが、標的アイソトープ治療(Targeted Radioisotope Therapy, TRT)は、化学療法と同様に全身性の治療であり、転移がんの治療に利用できる。放射線増感効果のある抗がん剤等により発現誘導される分子(治療応答分子)を標的とした放射免疫療法(Radioimmunotherapy, RIT)により、増感効果と総吸収線量の増加を両立させることで、治療効果の向上を図るものである。

研究成果の概要(英文)：We selected CD147 as a target molecule response to therapy. The efficacy of combined treatment of X-rays radiation therapy and gemcitabine (Gem) in a pancreatic cancer model was more effective than Gem or X-ray monotherapy. Cell binding assays showed that ¹¹¹In-labeled CD147 antibody bound to pancreatic cancer cells. Biodistribution of ¹¹¹In-labeled antibody in tumor-bearing mice. The radiolabeled antibody bound highly to cells and accumulated highly in pancreatic cancer xenografted tumors but low in major normal organs. To evaluate the therapeutic efficacy, tumor volumes and body weights were periodically measured in mice receiving Gem, radioimmunotherapy (RIT), and both RIT and Gem. Combined treatment using RIT with Gem significantly suppressed tumor growth and the efficacy was superior than the other treatments.

研究分野：分子イメージング

キーワード：膵がんモデルマウス RIT CD147

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでのがん研究の成果により、多くのがん原発巣の局所制御率は大きく改善し、初期のがんでは、生存率が非常に高くなっている。しかし未だに転移がんにより多くの患者さんが亡くなっており、効果的な転移がんの治療法の開発が強く求められている。

転移がんの治療として主に化学療法が行われているが、現状では治療効果が低いことが問題となっている。標的アイソトープ治療(Targeted Radioisotope Therapy, TRT)は化学療法と同様に全身性の治療であり、転移がんの治療に利用できる。化学療法と異なり、粒子の運動エネルギーによるDNA切断が主な細胞死メカニズムとなり、がんや正常組織の集積性を評価すれば、治療効果の有害事象の予測ができる。放射線増感効果のある抗がん剤等により発現誘導される分子(治療応答分子)を標的とした放射免疫療法(Radioimmunotherapy, RIT)により、増感効果と総吸収線量の増加を両立させることで、治療効果の向上を図るものである。

2. 研究の目的

近年、線放出核種を利用したTRTの開発が活発だが臨床においては数ミリ以上の転移がんの治療も想定しなければならず、それに適した飛程を持つ線放出核種によるTRTの開発が必須である。しかし高頸がんを対象とした臨床試験では未だ満足のいく治療効果が得られておらず、ブレイクスルーが強く求められている。

本研究では、抗がん剤等の治療に応答し発現が上昇するがん細胞の膜表面に存在する治療応答分子を標的とした新しいコンセプトに基づいたTRTの開発のために最適な標的分子の探索・発現誘導パターン解析を行った。次にシミュレーションによる治療プロトコル作成と治療効果の検証を放射線抵抗性の膀胱がん細胞を移植したモデル動物にRITと膀胱がんの治療に使用される標準薬で放射線増感効果のあるgemcitabine(gem)との併用療法で治療の有効性を検証した。

3. 研究の方法

(1)標的分子(治療応答分子)候補の発現誘導の検証、標的分子の選択

本研究では浸潤および転移において重要な役割を示し、膀胱がんにおいて高発現することが報告され、gemによる発現誘導も確認されているが、発現の程度や期間等の詳細な検討はされていないCD147[1,2]を標的分子として研究を進めた。この分子を認識する高親和性完全ヒト抗体である抗CD147抗体は、PETイメージングにも有効であることを確認してきた[3]。

腫瘍形成することを確認しているヒト膀胱がん由来細胞株のBxPC-3をイソフルラン麻酔下でヌードマウス(5週齢・オス)の大腿皮下に移植し、モデル動物を作成した。モデル動物に抗CD147抗体を25 μ g投与し、1、3、7日後の腫瘍をサンプリングし、10%ホルマリンで固定し、パラフィン包埋した。1 μ mになるように薄切片、スライドに貼り付けた。抗CD147抗体で免疫染色を行い発現の誘導の程度と期間の検証を行った。

(2)標的分子の放射性標識

金属核種は交代と直接結合しないためキレート剤を放射性標識に用いた。In-111およびY-90標識のためp-SCN-CHX-A"-DTPAを抗CD147抗体と遮光、37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートし、結合させた。

(3)放射性標識抗体の*in vitro*における評価

In-111標識抗体とBxPC-3細胞の細胞結合実験を行った。細胞数を 1×10^7 、 5×10^6 、 2.5×10^6 、 1.3×10^6 、 6.3×10^5 、 3.1×10^5 、 1.6×10^5 、 7.8×10^4 、 3.9×10^4 に調整し、In-111標識交代を加え、氷上で1時間インキュベートした。洗浄して結合しなかった放射性標識抗体を除去し、細胞に結合しなかった放射性標識交代の放射活性を測定した。

競合阻害実験では放射性標識抗体と濃度を变化させた非標識抗体(0, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 ng/ μ l)を加え、 5×10^4 に細胞数を調整したBxPC-3と氷上で1時間インキュベートした。洗浄後細胞に結合した放射性標識抗体の放射活性を測定した。

(4)放射性標識抗体の腫瘍集積の検証

体内動態の実験は腫瘍の直径がおよそ8mmに達した時に行った。37kBq、タンパク量25 μ gに調整したIn-111標識抗体をマウスの尾静脈に注射した。30分、1、2、4、7日後に5匹ずつマウスを安楽死させ、主要臓器及び腫瘍を摘出し、重量と取り込まれた標識抗体の放射活性を測定した。またこのデータをもとに治療各種であるY-90で標識した場合の腫瘍及び正常組織への被ばく線量を推定した。

(5)RITとgemの併用療法の検証

モデルマウスの腫瘍の直径がおよそ8mmに達した時、Y-90標識抗CD147抗体を0.925, 1.85, 3.7MBqに調整し、Y-90標識抗体と非標識抗体、コントロールとしてPBSを尾静脈注射し、週2回の腫瘍・体重計測を行った。

上記の実験より効果の高い線量を選択し、放射線増感効果のあるgemとの併用療法を行った。gemは1匹あたり240mg/kgになるように調整し、標識抗体投与前日に尾静脈注射を行った。PBS、gem単独療法、RIT単独療法、gem+RIT(RITは1回または2回投与)併用療法を行い、週2

回の腫瘍・体重計測を行った。

(6)外照射と gem の併用療法の検証

モデルマウスの腫瘍の直径がおよそ 8mm に達した時、X 線を 0, 5, 15, 30Gy 照射した。併用療法の実験の時は照射の 1 日前に放射線増感効果のある gem を 240mg/kg になるように調整して尾静脈注射を行った。週 2 回の腫瘍・体重計測を行った。

(7)病理解析

PBS、非標識抗体、gem、RIT、gem+RIT 投与後、1、3、7 日後の腫瘍をサンプリングし、10%ホルマリンで固定し、パラフィン包埋した。1 μm になるように薄切し、スライドに貼り付けた。HE 染色と Ki-67 染色を行い、治療後の腫瘍を観察した。

4. 研究成果

抗 CD147 抗体を投与後、BxPC-3 腫瘍における CD147 の発現をコントロール(PBS)と比較した。コントロールは CD147 が強く発現しているが、抗体投与 1 日後は弱い発現を示し、3 日後以降再び強い発現を示した (図 1)。

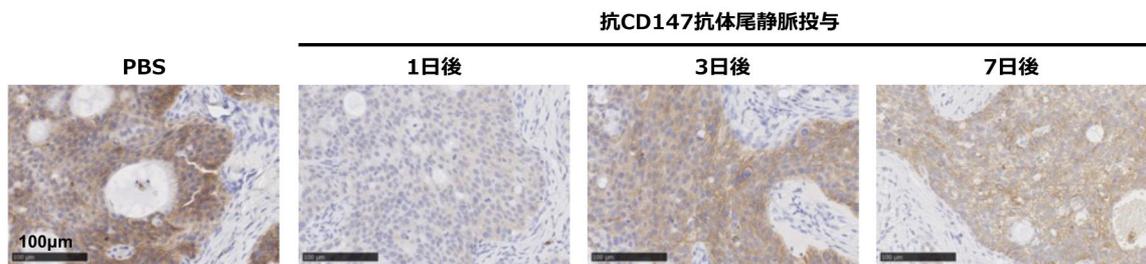


図1. CD147の発現

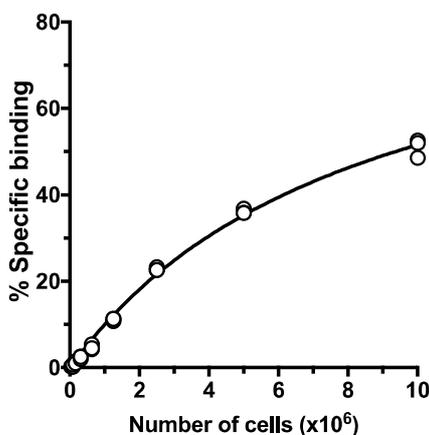


図 2. 細胞結合実験

BxPC-3 で細胞数を変えて行った結合実験において、In-111 標識抗体は 1×10^7 個のとき 51% の結合を示した (図 2)。これらのことから放射性標識抗 CD147 抗体は膵がん細胞の BxPC-3 腫瘍への高い結合を示すことが明らかとなった。

体内動態実験では In-111 標識抗体投与直後は血液、肺への集積が高かったが、時間経過とともに集積が下がった。腫瘍への集積は投与直後では低かったが、時間経過とともに 4 日後 ($16.8 \pm 2.6\%ID/g$) まで集積が上がり、その後わずかに推移席が下がったが、他の組織と比べても高い集積を維持した (表 1)。また体内動態実験のデータに基づいて治療核種の Y-90 の吸収線量を推定した。それぞれ 0.925MBq、1.85MBq、3.7MBq 標識した場合の腫瘍への吸収される被ばく線量は 4.85Gy、9.69Gy、19.39Gy に相当することが示された。

表 1. In-111-抗D147抗体による体内動態

	30分	1日後	2日後	4日後	7日後
血液	54.0 ± 2.9	28.0 ± 2.9	25.6 ± 1.8	20.4 ± 3.1	13.1 ± 3.0
肺	17.1 ± 2.8	10.4 ± 1.6	9.5 ± 1.0	8.0 ± 2.3	6.2 ± 0.4
肝臓	9.0 ± 0.9	5.9 ± 0.5	6.2 ± 0.6	6.6 ± 1.6	5.6 ± 1.4
脾臓	6.7 ± 1.6	4.6 ± 0.6	4.6 ± 0.5	4.1 ± 0.9	3.7 ± 0.2
膵臓	2.7 ± 0.8	2.1 ± 0.2	2.0 ± 0.2	1.6 ± 0.3	1.2 ± 0.2
小腸	2.3 ± 0.3	2.2 ± 0.3	2.2 ± 0.2	1.8 ± 0.4	1.3 ± 0.3
腎臓	10.5 ± 0.5	6.0 ± 0.6	6.0 ± 0.5	4.9 ± 0.8	3.7 ± 0.5
筋肉	0.7 ± 0.2	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.2	1.2 ± 0.3	1.0 ± 0.1
骨	2.8 ± 0.3	2.1 ± 0.3	2.3 ± 0.4	2.0 ± 0.5	1.7 ± 0.1
腫瘍	1.0 ± 0.2	9.2 ± 0.7	16.1 ± 0.9	16.8 ± 2.6	15.0 ± 1.6

%ID/g±SDで表示

Y-90 標識抗体をモデルマウスに PBS、0MBq、0.925MBq、1.85MBq、3.7MBq 投与し、治療効果を観察した。腫瘍の増殖は PBS、0MBq、0.925MBq で有意差は見られませんでした。1.85MBq と 3.7MBq では投与後約 2 週間まで腫瘍の増殖を抑制し、その後徐々に増殖した (図 3A)。抑制効果の最も高かった 3.7MBq を選択し、gem との併用療法実験を行なった。治療群はコントロールである PBS 投与群、gem 単独療法、RIT 単独療法、gem+RIT (RIT は 1 回または 2 回投与) 併用療法を比較した。Gem 単独療法は PBS に比べ、有意な治療効果はえられなかった。PBS 及び gem 投与と比較して、RIT、gem+RIT、gem+RIT × 2 は有意な増殖抑制効果を示した。また gem+RIT × 2 は gem+RIT よりも良好な腫瘍増殖抑制効果を示した (図 3B)、しかしながら gem+RIT × 2 は 5 匹中 3 匹が投与後 14~17 日に放射線障害のため死亡した。

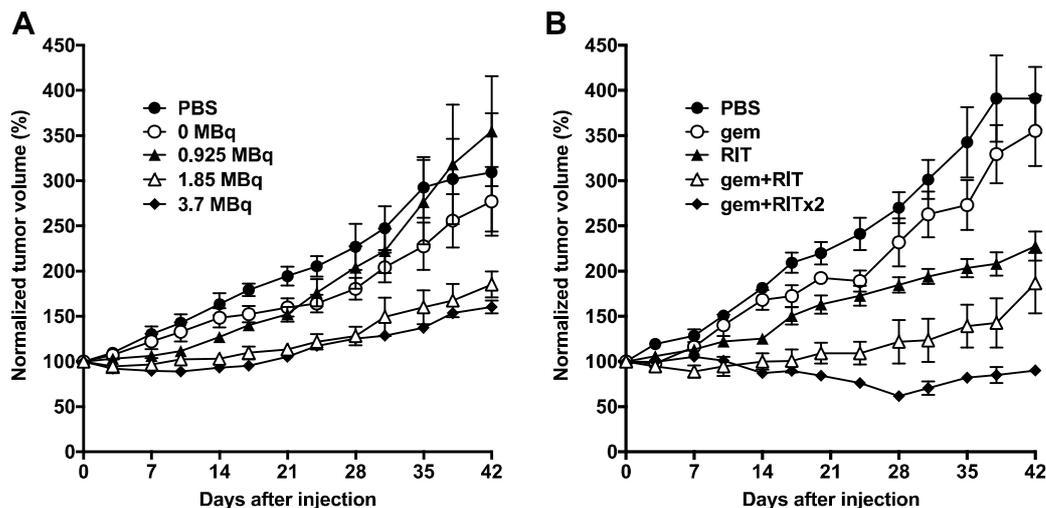


図3. 標識抗体治療実験

モデルマウスを用いて Gem と X 線照射の併用療法の治療効果を調べた。対応する線量で X 線単独で照射するよりも gem との併用でより腫瘍抑制する傾向がみられ、特に 5Gy と 15Gy では gem との併用療法は、X 線単独治療よりも有意に強い腫瘍抑制効果を示した (図 4)。

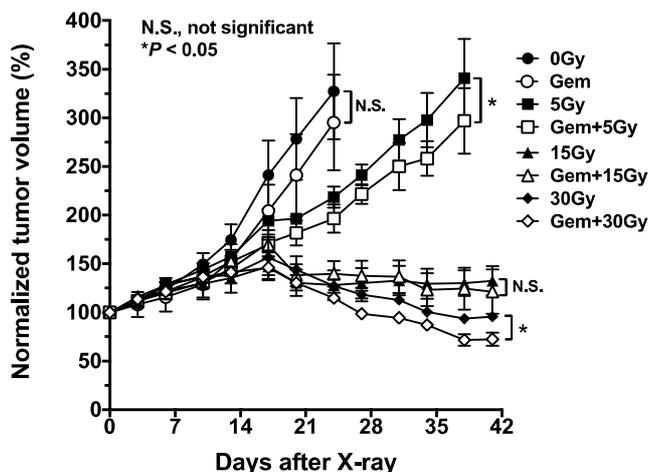


図4. X線照射治療実験

PBS、非標識抗体、gem、RIT、gem+RIT をモデルマウスに投与し、1、3、7 日後の腫瘍の HE 染色を行なった。PBS、非標識抗体、gem は組織に明らかな変化は見られなかったが、RIT、gem+RIT では投与 7 日後に細胞の肥大が見られた (図 5)。Ki-67 染色し、陽性細胞を計測して細胞増殖を確認した。RIT、gem+RIT で投与 7 日後までに妖精細胞が増えているが、単独療法と、併用療法による陽性細胞数に有意差は見られなかった (図 6)。

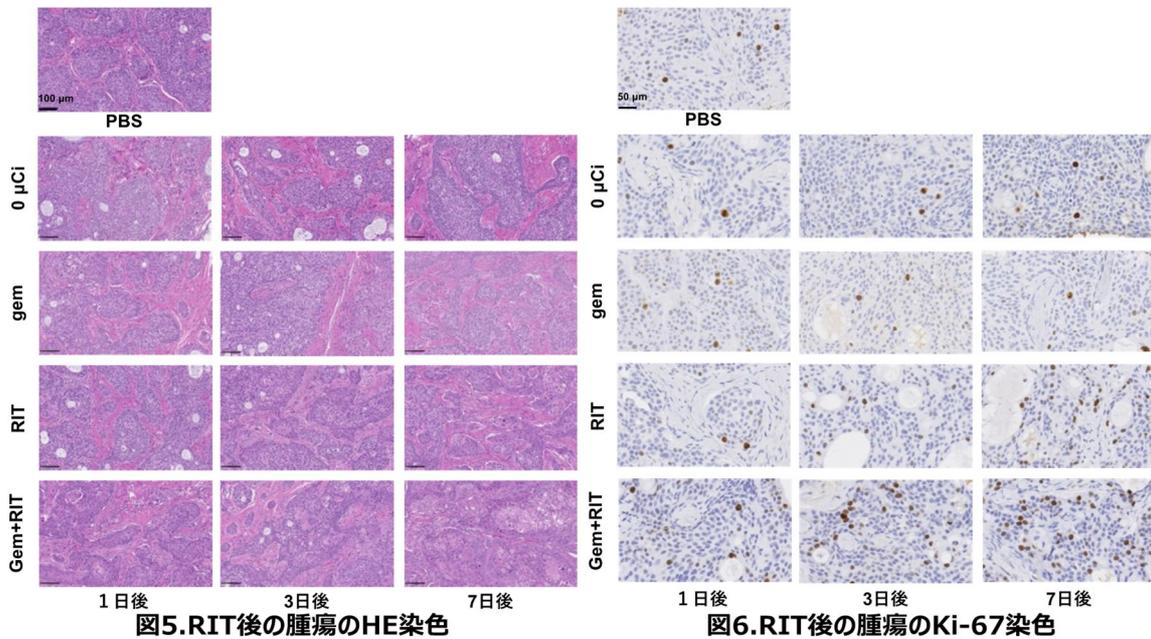


図5.RIT後の腫瘍のHE染色

図6.RIT後の腫瘍のKi-67染色

これらの結果から RIT と gem を併用した治療法は難治性膵がんの BxPC-3 細胞移植モデルマウスの腫瘍の増殖を有意に抑制した。しかしながら gem+RIT × 2 では放射線障害による影響が見られるなど、今後もさらなる治療法の改善のための研究が望まれる。

< 参考文献 >

1. Riethdorf, S.; Reimers, N.; Assmann, V.; Kornfeld, J.-W.; Terracciano, L.; Sauter, G.; Pantel, K. High incidence of EMMPRIN expression in human tumors. *Int. J. Cancer* 2006, 119, 1800–1810.
2. Weidle, U.H.; Scheuer, W.; Eggle, D.; Klostermann, S.; Stockinger, H. Cancer-related issues of CD147. *Cancer Genom. Proteom.* 2010, 7, 157–169.
3. Sugyo, A.; Tsuji, A.B.; Sudo, H.; Nagatsu, K.; Koizumi, M.; Ukai, Y.; Kurosawa, G.; Zhang, M.-R.; Kurosawa, Y.; Saga, T. Evaluation of ⁸⁹Zr-labeled human anti-CD147 monoclonal antibody as a positron emission tomography probe in a mouse model of pancreatic cancer. *PLoS ONE* 2013, 8, e61230.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sugyo Aya, Tsuji Atsushi, Sudo Hitomi, Koizumi Mitsuru, Ukai Yoshinori, Kurosawa Gene, Kurosawa Yoshikazu, Saga Tsuneo, Higashi Tatsuya	4. 巻 19
2. 論文標題 Efficacy Evaluation of Combination Treatment Using Gencitabine and Radioimmunotherapy with 90Y-Labeled Fully Human Anti-CD147 Monoclonal Antibody 059-053 in a BxPC-3 Xenograft Mouse Model of Refractory Pancreatic Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2979 ~ 2979
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19102979	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----