

論文の内容の要旨

論文題目 小細胞肺癌における抗体薬物複合体の新規治療標的の探索

氏名 四元 拓真

【背景と目的】小細胞肺癌は肺癌症例全体の15%程度を占め、悪性度の最も高い腫瘍の1つである。小細胞肺癌全体でみると本邦において5年生存率は20%程度と肺癌組織型分類の中で最も予後不良であり、約75%は診断時に遠隔転移を伴っていると報告される。また直近20年に渡り、標準治療は従来のエトポシド/イリノテカンにプラチナ製剤を組み合わせる化学療法からほぼ不変である。近年、未治療進展型の小細胞肺癌において抗PD-L1抗体が一次治療におけるカルボプラチン、及びエトポシドとの併用で全生存期間を延長するとともに、(全生存期間中央値：12.3ヵ月 vs 10.3ヵ月、ハザード比:0.70, 95%CI: 0.54-0.91, $p=0.0069$)、無増悪生存期間の延長を示し承認を得た。(無増悪生存期間中央値：5.2ヵ月 vs 4.3ヵ月、ハザード比：0.77, 95%CI: 0.62-0.96, $p=0.017$)。しかし、生存期間の延長は僅かであり、また限局型の小細胞肺癌に対しては適応がない。小細胞肺癌の遺伝子解析ではTP53やRB1など癌抑制遺伝子の変異が認められるものの治療標的となり得るようなドライバー遺伝子変異は同定されていない。このように小細胞肺癌に関しては非小細胞肺癌に比して治療選択肢が限られており、また外科的切除の適応はごく一部の早期症例に限られる。近年、小細胞肺癌に関連して新規治療標的となり得る分子に対する研究が進み、治療標的となり得る分子とその機能も報告されている。ただしいずれも実診療に導入されるまでに時間を費やすことは明らかであり、新規治療を多角的に模索し効力を持つモダリティの実臨床における使用を早期に現実化することが世界的に喫緊の課題となっている。

抗体薬物複合体(Antibody-drug conjugate, ADC)は近年開発されたモダリティであり、ターゲット分子を認識するモノクローナル抗体にペイロードと呼ばれる殺細胞性化合物を化学的に結合したもので、ターゲット分子を発現する腫瘍特異的に殺細胞性化合物を送達することを目的として科学的技術の進歩と共に開発されてきた。これまで血液腫瘍と転移性乳癌に対してADC治療薬が認可されている。しかし他の多くの固形腫瘍に対するADCで承認されたものがないのが現状である。小細胞肺癌を対象としたADCにDelta-like ligand 3 (DLL3)をターゲットとしたRovalpituzumab Tesirine (Rova-T)がある。DLL3陽性の再発難治性小細胞肺癌(n=339)に対する3次治療以降として客観的奏効率、全生存期間を検証した単アームの第2相試験において、全患者群での客観的奏効率12.4%(95%信頼区間：9.1-16.4%)、全生存期間中央値は5.6ヵ月(95%信頼区間：4.9-6.1ヵ月)と有用性が示唆される結果が報告された。しかし進行性小細胞肺癌に対する一次治療後の維持療法としてRova-Tをプラセボと比較した第3相試験の中間解析で有効な生存期間延長効果を示すことができず、Independent Data Monitoring Committeeの勧告によって臨床試験は中

止となった。他にも小細胞肺癌に関連して ADC の臨床試験、前臨床試験が進行しているが、DLL3 に対する ADC 以上に有望な結果は報告されていない。前述したように小細胞肺癌に対する新規治療モダリティの開発が待たれる状況であり、今回、小細胞肺癌に対する ADC の新規治療標的分子を探索することを目的とした。

【方法】小細胞肺癌遺伝子の発現を評価するために、公開されているマイクロアレイデータを統計プラットフォーム R3.1.1 (<https://www.r-project.org/>) および生物データ解析パッケージ Bioconductor (<https://www.r-project.org/>) を用いて評価をした。Affymetrix GeneChipR Human Genome U133 Plus 2.0 Array から解析されたデータを用い、Gene Ontology を用いて膜タンパクに関連し、小細胞肺癌で高発現する 565 遺伝子について検討した。この中で補正後の蛍光シグナル値の平均値の差が 3 以上を示したものが 31 遺伝子であった。さらにこれらの中で NCBI より提供されている RNA シークエンスデータを参照し、発現が脳あるいは生殖器に局限した 6 遺伝子中、抗体が結合可能な細胞外ドメインを明確に持つ 5 遺伝子を同定した。この中の 1 遺伝子はタンパクの細胞外ドメインに対する一次抗体が確立されていないため候補から除外し、最終的に DLK1, SYT1, NRXN1, TRPM8 の 4 遺伝子を候補とした。使用した細胞株はこれらが高発現している小細胞肺癌株である SHP77、mild あるいは低発現している小細胞肺癌株である NCI-H526、小細胞肺癌患者の血液サンプルから抽出し細胞株樹立に成功した Patient-derived cell (PDC)、低発現株である HEK293 を用いた。また ADC において細胞毒性を示した NRXN1 に関連して、さらなる検証のため SHP77 から CRISPR/Cas9 を用いて NRXN1 をノックアウトした SHP77 KO 株を作成した。

それぞれの候補遺伝子に対し、細胞膜上の発現強度をフローサイトメトリーで計測した。小細胞肺癌細胞株における細胞表面の高発現が確認できた NRXN1, TRPM8 に対し、トポイソメラーゼII阻害薬であるネモルピシンの誘導体 PNU-159682 が細胞質でプロテアーゼにより分解されるリンカーで抗体に結合された secondary ADC を二次抗体として、それぞれの分子に対する一次抗体の存在下に細胞毒性を発揮するかを検証した。Day1 に細胞を播種し、Day2 に一次抗体、secondary ADC の順に添加して Day5 に Cell Counting Kit-8 を添加して 2 時間後に吸光度を測定することで細胞生存率を計測した。PDC については Day7 に吸光度を測定した。

細胞毒性試験で効果を示した NRXN1 について、実際に細胞死が誘導されていることを検証するため、アポトーシスアッセイを行った。細胞毒性試験と同様に試薬を添加し、吸光度を測定したタイミングで細胞調整を行い、Annexin-V と PI で染色し、フローサイトメトリーで計測し、ツーパラメーターヒストグラムで後期アポトーシス細胞の割合を解析した。フローサイトメトリーで検出した NRXN1 陽性細胞割合、細胞毒性試験、アポトーシスアッセイにおける解析については JMP Pro 14.2 (SAS Institute Inc., Cay, NC) を使用した。NRXN1 陽性細胞割合については一元配置分散分析後、Tukey's post hoc test を、細胞毒性試験における細胞生存率については二元配置分散分析後、Tukey's post hoc test

を、またアポトーシスアッセイにおける死細胞割合については細胞株ごとに、一元配置分散分析後、no-treatment 細胞をコントロールとした Dunnett's post hoc test をそれぞれ行った。いずれも P 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判定した。それぞれの実験では 3 回以上の独立した実験を行い、データはその結果の平均値±標準誤差で示した。

【結果】フローサイトメトリーでの解析で、高発現小細胞肺癌株の細胞表面における NRXN1, TRPM8 の高発現が確認できた。細胞毒性試験で ADC の効果を認めた NRXN1 について、NRXN1 陽性細胞割合は SHP77 : 40.5±0.5%, SHP77 KO: 7.0±2.1%, H526: 20.2±7.7%, PDC: 3.5±0.2%, HEK293: 1.1±0.1%, HEK293-NRXN1: 26.5±0.8%であった。細胞毒性試験については、TRPM8 では高発現株、低発現株いずれにおいても細胞毒性は示さなかったのに対し、NRXN1 を対象とした細胞毒性試験では高発現細胞株で細胞毒性を示し、低発現株では毒性が减弱した。SHP77 KO で細胞毒性効果が减弱し、HEK293-NRXN1 で細胞毒性効果が増強した。以上より、NRXN1 を介在した細胞毒性が示唆された。実際に NRXN1-mediated ADC による細胞死が誘導されていることを検証したアポトーシスアッセイでは、後期アポトーシス細胞割合を non-treatment 群と抗 NRXN1 モノクローナル抗体に secondary ADC を加えた群でそれぞれの細胞株において比較し、SHP77, SHP77 KO, NCI-H526, PDC, HEK293, HEK293-NRXN1, でそれぞれ 7.11% vs 50.3%, $p<0.0001$: 5.8% vs 8.8%, $p=0.325$: 9.7% vs 37.1%, $p<0.0001$: 25.6% vs 76.7%, $p<0.0001$: 1.5% vs 8.1%, $p=0.0002$: 1.1% vs 51.3%, $p<0.0001$ であり、有意に死細胞割合が上昇していた。

臨床検体で NRXN1 の mRNA 発現を検証した結果、正常肺組織での発現を 1 とした相対的な発現は小細胞肺癌組織、腺癌組織、扁平上皮癌組織の順で中央値がそれぞれ 104.6、3.5、38.2 であり、小細胞肺癌組織で高い傾向にあった。

正常臓器における NRXN1 の mRNA 発現強度を解析した結果、脳以外の臓器での発現は脳に比して 1/3 未満であった。

【考察】

NRXN1 は NRXN ファミリーの中の 1 つであり、中枢神経系においてはシナプス前末端に発現する 1 回膜貫通型タンパク質である。シナプス後部に発現する NRXN1 の内因性リガンドであるニューロリジンと結合することでシナプス前末端内の伝達物質放出や接着細胞因子として働き、シナプスの成熟や機能に関与していることが知られている。NRXN1 の SNP を始めとする様々な遺伝子異常が自閉症や統合失調症などの精神神経疾患に関与しているとする研究が多数報告されているが、腫瘍における NRXN1 の機能や役割については知見がなく、本研究の結果を受けて、小細胞肺癌における NRXN1 の機能をはじめとする役割を研究することは小細胞肺癌の発生、増殖や転移様式などの解明に寄与する可能性があり意義深いと考えられる。

NRXN1 高発現の組織に対し、ADC が効果を発揮する可能性が示されたが、NRXN1 の発現については小細胞肺癌細胞株や組織で高発現を示さない集団もあると考えられる。この

場合、NRXN1 の発現が NRXN1-mediated ADC に対する感受性を測るバイオマーカーとなり得る。

今回、NRXN1 高発現の SHP77 に対して secondary ADC が抗 NRXN1 抗体存在下で細胞毒性を示し、NRXN1 をノックアウトした SHP77 KO で細胞毒性効果が減弱したこと、NRXN1 低発現の HEK293 で細胞毒性を呈さず、NRXN1 を強制発現させた HEK293-NRXN1 で細胞毒性が増強したことから、NRXN1 選択的な効果が示唆される。今後 *In vivo* での対腫瘍効果を研究していく上で、ペイロードを直接結合した抗 NRXN1 抗体の精製とその最適化が望まれる。ペイロードの種類、リンカーの性質、エピトープ、薬物抗体比など、検討すべき点は多い。

本研究では NRXN1 を介在した一次抗体と secondary ADC 複合体の細胞内在化と細胞内 trafficking は直接観察していない。secondary ADC に直接色素を結合させることはメーカーで取り扱いがないということ、また secondary ADC の宿主も秘匿事項であり、三次抗体を使用することも検討したがこのような理由により断念した。ペイロードを直接結合した ADC を最適化する中で細胞内在化については今後の研究で検証すべき課題である。

また、今回 ADC で効果を示さなかった候補分子については脳で低発現のものは CAR-T 療法における研究対象となり得ると考えられ、こちらも今後の研究を待ちたい。

【結論】 NRXN1 は小細胞肺癌のある集団に高発現していることが見込まれ、脳以外の正常臓器での低発現と併せて ADC の小細胞肺癌に対する有望な新規ターゲットとなり得る。