

審査の結果の要旨

氏名 小松 紀子

本研究は、頭頸部扁平上皮癌 (Head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) における Robo (Roundabout homolog) 1 の発現を明らかにし、Robo1 を新規治療標的因子とした、抗 Robo1 抗体イムノトキシン (Immunotoxin, IT) による HNSCC の副作用が少なく、治療効率の高い治療法の開発につながる知見を得ることを目的とした。そのため、HNSCC における Robo1 の発現解析、HNSCC 細胞株およびゼノグラフトマウスにおける抗 Robo1 抗体 IT (IT-Robo1) の細胞傷害性試験、IT の内在化を促進する薬剤送達法の検討を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. HNSCC 細胞株 (HSQ-89, Sa3, HO-1-u-1, SAS)、口腔 SCC 臨床検体 (上下顎歯肉癌、頬粘膜癌、口腔底癌、舌癌) にて Robo1 の発現解析を行った。Robo1/CHO (Robo1 強制発現細胞)、HSQ-89、Sa3、HO-1-u-1、SAS の順に、フローサイトメトリーによる Robo1 タンパクの 1 細胞あたりの発現量は、220,000、22,300、3,010、184、33.7 分子、Robo1 の mRNA の 1 細胞あたりの発現量は、1.97、0.281、0.0226、HO-1-u-1、SAS は検出限界値以下であった。Robo1/CHO の Robo1 タンパクあるいは mRNA の発現量を基準とした際に、HSQ-89、Sa3 でそれぞれその 1/10、1/100 程度の発現量であり、Robo1/CHO、HSQ-89、Sa3 の間の Robo1 のタンパク発現および mRNA 発現は比例を認めた。
また、口腔 SCC 臨床検体 (上下顎歯肉癌、頬粘膜癌、口腔底癌、舌癌) で Robo1 陽性症例を認めた。これらの結果より、Robo1 は HNSCC における有用な標的因子であることが示された。
2. IT-Robo1 による細胞傷害性試験では、Robo1 抗原に対する高い結合能を有する抗 Robo1 抗体 (B5209B 抗体) (Kd =30pM) IT を用いても、IT-Robo1 単独では HNSCC 殺傷効果が乏しく、Robo1 のタンパク発現を 200,000 分子程度認める Robo1/CHO でも細胞殺傷効果は不十分であった。この結果から、IT-Robo1 の細胞への内在化が不十分である可能性が考えられ、IT 内在化促進の方法を併用する必要性が示された。
3. IT 内在化促進のため、界面活性作用により、細胞膜を破壊し併用薬剤の細胞質内への内在化を促進する薬剤であるサポニンを用いた。HSQ-89 細胞株における IT-Robo1 とサポニン 3.5 µg/ml の持続的投与では、IT-Robo1 4.2~0.168 nM の際に、細胞生存率が約 0%となり、十分な細胞殺傷効果が得られたが、IT-NC

(Negative control) 4.2 nM においても細胞生存率が約 30%程度まで低下した。IT-NC においても細胞生存率が低下し、IT-Robo1 による特異的な細胞殺傷効果を得られなかったため、IT およびサポニンを臨床で使用する状況に近い、それらの間歇的投与を行い、IT-Robo1 4.2 nM の際に細胞生存率が約 40%、IT-NC 4.2 nM の際に細胞生存率が 100%であった。IT-Robo1 とサポニン 3.5 µg/ml の持続的投与、間歇的投与、共に、IT-NC と比較して IT-Robo1 は ANOVA 解析により有意差を認め ($p < 0.01$)、腫瘍増殖抑制効果を示した。

4. IT 内在化促進のため、PCI (Photochemical internalization) を併用した。PCI は、光増感剤が IT と一緒にエンドサイトーシスでライソゾームに局在させ、光増感剤に反応する波長により励起させることで一重項酸素を発生し、活性の状態で IT が細胞質に放出され、IT による細胞毒性が高まる考えられている。

HSQ-89 細胞株における IT-Robo1 と光増感剤 TPPS2a 0.1 µg/ml、光源 (450 nm LED) 1 時間照射 (9.5 mW/cm², 34.1 J/cm²) による PCI の併用では、IT 0.84 nM 以上で細胞生存率は 0%であり、IT-Robo1 単独と比較して、IT-Robo1+PCI で ANOVA 解析により有意に低い細胞生存率であり ($p < 0.01$)、腫瘍増殖抑制効果を示した。

各細胞株における IT-Robo1 と光増感剤 AlPcS2a (Robo1/CHO, HSQ-89, Sa3 : 5.0 µg/ml, HO-1-u-1, SAS, HUVEC, Robo4/CHO : 0.5 µg/ml)、光源 (650 nm LED) 5 分照射 (62.7 mW/cm², 18.8 J/cm²) による PCI の併用では、Robo1/CHO、HSQ-89、HUVEC の IT-Robo1 の IC₅₀ はそれぞれ 54pM、34pM、110pM であった。

Robo1/CHO、HSQ-89、HUVEC 細胞株は、IT-Robo1 単独と比較して IT-Robo1+PCI で ANOVA 解析により有意に低い細胞生存率であり ($p < 0.01$)、腫瘍増殖抑制効果を示した。一方で、Sa3、HO-1-u-1、SAS、Robo4/CHO 細胞株は IT-Robo1+PCI は IT-Robo1 単独と比較して ANOVA 解析により有意差を認めなかった ($p \geq 0.01$)。

以上より、HNSCC 細胞株において、IT-Robo1+PCI では、IT-Robo1 単独と比較して腫瘍増殖抑制効果を示した。

5. IT-Robo1 と光増感剤 AlPcS2a (Sa3 : 5.0 µg/ml, HO-1-u-1, SAS, Robo4/CHO : 0.5 µg/ml)、光源 (650 nm LED) 10 分照射 (62.7mW/cm², 37.6J/cm²) と照射時間を 2 倍にした場合では、Robo1 のタンパク発現量が 3,000 分子程度以上 (Sa3 細胞株) あれば、IT 濃度依存性の効率的な細胞死を誘導できることが明らかとなった。一方、Robo1 の発現数が 30 程度の SAS、Robo1 の発現数が測定限界値未満であった Robo4/CHO (Robo4 強制発現細胞)では、IT-Robo1+PCI は IT-Robo1 と比較して ANOVA 解析により有意差を認めなかった ($p \geq 0.01$)。
6. HSQ-89 細胞株ゼノグラフトマウスにおける抗 IT-Robo1+サポニンは IT-Robo1 単独と比較して ANOVA 解析により有意に腫瘍増殖抑制効果を示した($p < 0.01$)。

7. HSQ-89 細胞株ゼノグラフトマウスにおける抗 IT-Robo1+PCI 併用は、IT-Robo1 単独と比較して ANOVA 解析により有意に腫瘍増殖抑制効果を示した ($p < 0.01$)。
8. HSQ-89 細胞株における IT-Robo1 と光増感剤 AlPcS2a、光源 (650 nm LED) 5 分照射 (62.7 mW/cm^2 , 18.8 J/cm^2) による PCI の併用では、IT-Robo1 単独と比較して有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた。一方、HSQ-89 細胞株ゼノグラフトマウスにおける抗 IT-Robo1+PCI 併用は、IT-Robo1 単独と比較して ANOVA 解析により有意に腫瘍増殖抑制効果を示した ($p < 0.01$)が、腫瘍の消失には至らなかった。原因として、IT、AlPcS2a が固形癌の癌細胞への取り込みが不十分な可能性、AlPcS2a を励起する波長が 650nm であることから癌深部に治療に必要なエネルギーが到達していない可能性などが考えられた。しかし、本研究の結果からは、その原因は明らかではなく、今後は HSQ-89 ゼノグラフトマウスにおける、IT、サポニン、AlPcS2a の癌細胞への到達について評価を行う必要があると考えられる。
9. IT の内在化を促進する因子として、IT-Robo1 にサポニンを併用すると、PCI と同様に IT-Robo1 単独と比較して高い効果を得たが、腫瘍への治療選択性を考慮すると、主に光照射部位で効果を発揮する PCI と比べて、腫瘍への治療選択性が低い。一方で、サポニンは光の到達深度の問題はないが、サポニンの癌細胞への到達の問題が残る。IT-Robo1 と PCI にサポニンを併用することで光の到達深度の問題について補足できる可能性については今後検討が必要である。

以上、本論文は HNSCC における Robo1 のタンパクおよび mRNA 発現を明らかにし、IT-Robo1 に薬剤送達法として IT の内在化を促進するサポニンあるいは PCI を併用することで腫瘍増殖抑制効果を示すことを明らかにした。本研究は、HNSCC における Robo1 の治療標的因子としての可能性を示し、IT の内在化を促進する薬剤送達法は、抗 Robo1 抗体による IT だけではなく、これまでに発現量が少ないために、ADC (Antibody drug conjugate) の開発が断念されていた様々な標的因子、免疫チェックポイントなどの併用療法への応用が可能と考えられ、更なる発展が見込めると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。