

博士論文

小細胞肺癌モデルに対する  
放射免疫療法の病理学的解析および  
化学療法との併用による治療効果に関する検討

藤原健太郎

# 目次

本研究の要旨.....	1
Ⅰ. 序文.....	2
1. 小細胞肺癌.....	2
1.1 小細胞肺癌の疫学.....	2
1.2 小細胞肺癌の分類と治療.....	2
1.3 小細胞肺癌に対する分子標的治療.....	4
2. 放射免疫療法.....	5
2.1 放射免疫療法の概要.....	5
2.2 臨床における放射免疫療法.....	6
2.3 放射免疫療法に用いる放射性同位元素.....	7
3. これまでの研究.....	9
3.1 ROBO1.....	9
3.2 ROBO1 陽性肝細胞がんモデルマウスに対する RIT 実験.....	10
3.3 ROBO1 陽性小細胞肺癌モデルに対する RIT 実験.....	10
4. 本研究の概要.....	11
Ⅱ. 研究課題 1. 小細胞肺癌モデルマウスにおける <sup>90</sup> Y 抗 ROBO1 抗体を用いた放射免疫療法の病理学的解析.....	14
1. 目的.....	14
2. 方法.....	15
2.1 抗 ROBO1 抗体と抗体のキレート化.....	15
2.2 抗体の RI 標識と性能評価.....	16
2.2.1 放射性核種の入手.....	16
2.2.2 抗体の RI 標識.....	16
2.2.3 標識体の性能評価.....	17
2.3 モデル動物の作製.....	17
2.3.1 小細胞肺癌細胞株.....	17
2.3.2 小細胞肺癌モデルマウス.....	17
2.4 小細胞肺癌移植腫瘍における ROBO1 の発現解析.....	18
2.5 <sup>111</sup> In 抗 ROBO1 抗体による体内分布実験.....	19
2.6 <sup>90</sup> Y 抗 ROBO1 抗体による RIT 実験.....	20
2.6.1 治療実験.....	20
2.6.2 病理学的解析.....	20

2.7 統計処理.....	23
3. 結果 .....	23
3.1 小細胞肺癌移植腫瘍における ROBO1 の発現解析.....	23
3.2 <sup>111</sup> In 抗 ROBO1 抗体による体内分布実験 .....	24
3.3 <sup>90</sup> Y 抗 ROBO1 抗体による RIT 実験.....	24
3.3.1 治療実験.....	24
3.3.2 腫瘍の病理学的解析 .....	25
3.3.3 正常臓器の病理学的解析 .....	26
4. 考察 .....	28
4.1 <sup>111</sup> In 抗 ROBO1 抗体による体内分布実験 .....	28
4.2 <sup>90</sup> Y 抗 ROBO1 抗体による RIT 実験と病理学的解析.....	31
4.3 <sup>90</sup> Y 抗 ROBO1 抗体を用いた治療法の改善策 .....	38
4.4 本実験のまとめ .....	43
Ⅲ. 研究課題 2. 小細胞肺癌モデルマウスにおける RIT と化学治療の併用 治療の検討 .....	44
1. 目的 .....	44
2. 方法 .....	45
2.1 抗 ROBO1 抗体と抗体のキレート化.....	45
2.2 抗体の RI 標識と性能評価.....	45
2.2.1 放射性核種の入手.....	45
2.2.2 抗体の RI 標識.....	45
2.2.3 標識体の性能評価.....	46
2.3 シスプラチンの調製.....	46
2.4 モデル動物の作製.....	46
2.4.1 小細胞肺癌細胞株 .....	46
2.4.2 小細胞肺癌モデルマウス .....	47
2.5 RIT と化学治療の併用実験 .....	47
2.6 統計処理.....	49
3. 結果 .....	49
3.1 RIT と化学治療の併用実験 .....	49
4. 考察 .....	53
4.1 RIT と化学治療の併用による抗腫瘍効果.....	53
4.2 RIT と化学治療の併用による正常臓器への影響.....	55
4.3 本研究の limitation.....	56
4.4 今後の展望 .....	58
4.5 本実験のまとめ .....	61

IV. 結論.....	63
図表.....	64
引用文献.....	86
謝辞.....	93

## 本研究の要旨

小細胞肺癌は 5 年生存率 5~10%程度という予後の悪いがんであり、新規治療法の開発が求められている。本研究では、ROBO1 陽性小細胞肺癌モデルマウスに対し、<sup>90</sup>Y 抗 ROBO1 抗体による放射免疫療法 (RIT) の実験を行い、病理学的解析による治療効果の評価を行った。その結果、本 RI 標識抗体が小細胞肺癌に対し有意な治療効果を有すること、正常臓器への影響が一過性であることを明らかにした。さらに、治療効果の改善を目的として RIT と化学治療の併用治療実験を施行し、併用治療が RIT 単独治療よりも高い治療効果を示すことを明らかにした。本研究により小細胞肺癌の survival の改善に繋がり得る有用な知見を得た。

# I. 序文

## 1. 小細胞肺癌

### 1.1 小細胞肺癌の疫学

肺癌は全てのがん種で最も罹患率、死亡率の高いがんであり、世界で年間 138 万人が死亡している[1, 2]。小細胞肺癌は肺癌の 15%を占め、世界中で年間 18 万人以上の新規罹患者が確認されている[3]。小細胞肺癌のリスク要因としては長期間の喫煙が最も有力と考えられており、小細胞肺癌患者の 90%以上に重度の喫煙歴が認められている[4]。過去 30 年間の研究で、アメリカでの小細胞肺癌の新規罹患者数は減少傾向を示している[5]。これは、タバコの製品規格（ニコチン、タール含有量）や、喫煙習慣の変化等が関係していると思われる。しかし、東ヨーロッパやアジアなど、喫煙習慣が強く残る地域もあることから、罹患者は一定数発生すると予想される。

### 1.2 小細胞肺癌の分類と治療

小細胞肺癌は一般に限局期と進展期の 2つのステージに分類される。成長が早く、転移しやすいがんであり、小細胞肺癌患者の 3分の2が初回診断時に血行性転移が認められている[6]。主な転移箇所としては、対側肺、肝臓、副腎、脳、骨、骨髄などが挙げられる。治療を行わない場合の Median Survival Time (MST) は 2-4 ヶ月程

度、治療を行った場合でも 5 年生存率は 5-10%程度と予後が悪い[7, 8]。治療方法としては、小細胞肺癌は化学治療と放射線治療に対し高い感受性を有するため、これらによる治療が一般的である。小細胞肺癌の治療は、ごく初期（ステージⅠ）、限局期（ステージⅡ-Ⅲ）、進展期（ステージⅣ）によって分けられる[3]。ステージⅠでは外科的切除の後、化学治療が行われる。

限局期においては、併用化学放射線療法 (CCRT) または連続化学放射線療法 (SCRT) が実施され、その後の経過に応じて予防的頭蓋照射が行われる。限局期小細胞肺癌の MST は 15-20 ヶ月、2 年生存率は 20-40%である。化学療法ではプラチナ製剤（シスプラチン、カルボプラチン）をベースとした治療が行われ、放射線治療は胸部への外部照射が行われる。

進展期においては、放射線治療は治療適用から外れ、化学療法のみで治療が行われる。ファーストラインの治療は、プラチナ製剤をベースとし、エトポシドを併用した治療を 4-6 サイクル実施する[9, 10]。MST は 8-13 ヶ月、2 年生存率は 5%と、非常に予後不良である。

プラチナ製剤による化学療法は小細胞肺癌治療のスタンダードとして長く用いられてきたが、**survival** を若干改善する程度であり、治療法としては十分ではない。化学療法のみで治療を行わざるを得ない進展期小細胞肺癌治療の現状が予後の悪さの原因であると推察され、小細胞肺癌の予後の改善には、限局期と進展期の両

方に有効な治療法の開発が必要であると考える。

### 1.3 小細胞肺癌に対する分子標的治療

近年、小細胞肺癌に対するモノクローナル抗体を用いた分子標的治療の研究が行われている。モノクローナル抗体を患者に投与すると、血流によって全身にデリバリーすることが出来るため、原発巣だけでなく転移巣に対しても治療効果が期待出来る。分子標的治療の標的としては、Vascular endothelial growth factor receptor (VEGF)、Carcinoembryonic antigen (CEA)、Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R)、CD56、CD326などが報告されている。

血管新生は腫瘍の成長や転移に重要な働きを持ち、さらに小細胞肺癌の予後や survival にも関与することがわかっている[11, 12]。血管新生を惹起する因子として、VEGF が挙げられる。VEGF は VEGF 受容体陽性の内皮細胞においてチロシンキナーゼ活性を活性化し、血管の増殖や成熟、遊走を誘導する。VEGF の機能を阻害することでこれらの血管新生を抑制し、小細胞肺癌を含む固形がんの治療を行う試みがなされている[13]。ベバシズマブはヒト化抗 VEGF-A モノクローナル抗体であり[14]、非小細胞肺癌、大腸がん等の治療薬として FDA に認可された。小細胞肺癌に対しては phase II 臨床試験が実施された[15]。



CEA、IGF-1R 等に対するモノクローナル抗体による治療も試みられているが、臨床で認可された薬剤はない[16]。

## 2. 放射免疫療法

### 2.1 放射免疫療法の概要

放射免疫療法 (RIT) は、放射性同位元素で標識したがん特異的抗体 (RI 標識抗体) を用いた放射線治療の一種である[17-19]。生体に投与された RI 標識抗体は血流によって全身に運ばれ、がん細胞膜に発現している標的タンパク質に結合する。抗原に結合した RI 標識抗体から放出される放射線の細胞障害作用を利用して治療することが、RIT の作用機序である。

RIT の特徴として、RI 標識抗体が結合していないがん細胞に対しても **cross-fire effect** によって攻撃可能であることが挙げられる[19, 20]。一般に腫瘍は **heterogeneity** に富む組織であり、同一の腫瘍においても抗原の発現の有無や発現量に差が認められる場合がある。非 RI 抗体を用いた抗体治療では、抗原を発現していないがん細胞には抗体が結合することが出来ず、抗原陰性のがん細胞を撲滅できない可能性がある。一方、RIT で用いる RI 標識抗体が放出する放射線は数 mm 程度の飛程を持つため、抗体が結合した細胞だけでなく、近傍のがん細胞に対しても放射線照射が可能である。このため、RIT は **heterogeneity** に富んだがん組織の治療において

特に有用であると考えられる。また、RIT は血流によって抗体を全身にデリバリーすることが可能なため、外部放射線照射では対応できない転移したがんに対しても効果が期待できる。上記小細胞肺がんのような、放射線感受性が高いがんに対して、RIT は有効な治療手段になりうる。これまで、小細胞肺がんに対する RIT 薬剤の開発研究は動物実験、臨床研究を併せて複数報告されている[21, 22]。

さらに、RI 標識抗体は標的となるがんに特異的に集積する一方で、標的タンパク質を発現していない正常臓器への集積は、非特異的集積は認められるものの、がんと比較して明らかに低いことから、副作用を軽減できる治療法として注目されている。

## 2.2 臨床における放射免疫療法

臨床では、悪性リンパ腫に対する RIT 薬剤として Zevalin® および Bexxar® が実臨床に導入されている[23]。Zevalin® は抗 CD20 マウスモノクローナル抗体 (Ibritumomab) の  $^{90}\text{Y}$  標識体であり、2002 年に FDA に認可され、日本でも 2008 年に承認された。日本では再発または難治性低悪性度の B 細胞性非ホジキンリンパ腫またはマントル細胞リンパ腫に対し適用可能となっている。Bexxar は日本では未承認であるが、2003 年に FDA からは認可されている[24]。

一方、固形腫瘍に対する RIT の成功例は限られており、実臨床に導入されている薬剤はいまだ存在しない。これは、血液腫瘍である悪性リンパ腫と比べて固形腫瘍は

放射線感受性が低く、治療に必要な投与放射エネルギーが多くなるため、非特異的集積による骨髄抑制等の副作用がより深刻になるためである。抗体の **affinity** を向上させることで腫瘍へのデリバリー効率を上げ、投与放射エネルギーを減らすことが可能であるため、固形腫瘍に対する高親和性抗体の開発が世界中で行われている。実際、新規抗体を用いた RIT の動物実験や臨床試験が複数報告されており、固形腫瘍に対しても有効な治療法が確立できる可能性がある[21, 22, 25-28]。

### 2.3 放射免疫療法に用いる放射性同位元素

RIT では、主にβ線放出核種が用いられる[19]。外部放射線照射では体外から目的部位まで放射線を到達させるため、透過力が高く飛程の長いγ線が用いられるが、体内で標的部位に集積し放射線を照射する RIT では長い飛程は必要ないためである。

RIT 関連研究においてよく用いられる核種について、表 1 に示す。

β線放出核種の代表的なものとしては、 $^{131}\text{I}$  と  $^{90}\text{Y}$  が挙げられる[19]。 $^{131}\text{I}$  は半減期 8 日で 0.81MeV のβ線を放出する。非ホジキンリンパ腫の RIT 薬剤 Bexxar®は、抗 CD20 抗体 Tositumomab の  $^{131}\text{I}$  標識体であり、実臨床で用いられている。また、甲状腺機能亢進症や甲状腺がん術後の再発転移治療における  $^{131}\text{I}$  の内用療法は、最も古くから行われてきた核医学治療である。β線以外にγ線も放出するため、投与後の体内

動態解析を目的としたイメージングにも利用可能であるが、同時に長飛程のため標的外の臓器まで照射されるため、慎重なケアが必要である。

$^{90}\text{Y}$  は半減期 2.7 日、2.3 MeV の $\beta$ 線のみを放出する pure- $\beta$  emitter である。抗 CD20 抗体 Ibritumomab の  $^{90}\text{Y}$  標識体である Zevalin® は非ホジキンリンパ腫の RIT 薬剤として臨床で用いられている。平均飛程は 2.3mm と適当であり、高いエネルギーを有することから、 $^{90}\text{Y}$  は治療用核種として有用とされている。実際、単位放射能あたりの $\beta$ 線の照射量は  $^{131}\text{I}$  の 4.5 倍以上になる。このことから、 $^{90}\text{Y}$  は RIT の治療用核種としての第一選択として検討される核種であると言える。ただし、pure- $\beta$  emitter であることから体内動態解析のためのイメージングを行うことは出来ない。そのため、Zevalin® の治療前診断においては、 $^{90}\text{Y}$  と体内動態が同一である $\gamma$ 線放出核種  $^{111}\text{In}$  で標識した  $^{111}\text{In}$ -IbritumomabTiuxetan を患者に投与し、ガンマカメライメージングで異常集積の有無等を確認している[29]。細胞障害性が高い核種であることから、治療に際しては体内動態や投与量を慎重に検討する必要がある。

その他の核種としては、半減期 6.7 日で 0.5 MeV の $\beta$ 線放出核種である  $^{177}\text{Lu}$  や、より細胞障害性の高い $\alpha$ 線放出核種である  $^{211}\text{At}$ 、 $^{213}\text{Bi}$  等が挙げられる。 $\alpha$ 線は細胞障害性が高い上に生体内飛程は 0.2mm 程度であり、さらに周辺臓器への影響が少ないという利点があるが、物理的半減期が短いこと、入手や取り扱い等の点から、 $\alpha$ 線放出核種の臨床応用はされていない。

### 3. これまでの研究

#### 3.1 ROBO1

ROBO1 (roundabout, axon guidance receptor, homolog 1) は、ショウジョウバエの軸策誘導に関連する遺伝子として同定された、immunoglobulin superfamily の膜タンパク質である[30, 31]。Slit の受容体であり、Slit/ROBO1 のシグナル伝達系は腫瘍の転移や遊走、血管転移を促進することが報告されている[32-34]。一方で、ROBO1 ががん抑制遺伝子として機能しているとの報告もあり、ROBO1 の機能はがん腫によって異なることが示唆されている[35]。しかし、ROBO1 の発現制御メカニズム等は解明されていない点が多く、これらの違いがどのような細胞機能によって調節されているかは不明である。

ROBO1 は肝細胞がんや大腸がんの臨床サンプルでの発現が報告されている[36, 37]。Ito et al. らは肝細胞がんの臨床サンプル 98 例に対し免疫組織化学による発現解析を行い、肝細胞がんの 84.7%が ROBO1 陽性であること、脳を除く正常組織では ROBO1 陰性であることを明らかにした[36]。病変における陽性率が高く、正常組織での発現が低いことは、ROBO1 が免疫治療の標的タンパク質として有用である可能性を示唆している。このため、我々は Ito et al. の開発したマウス抗 ROBO1 モノクローナル抗体を用いて、<sup>90</sup>Y 抗 ROBO1 抗体による RIT 実験を実施した。

### 3.2 ROBO1 陽性肝細胞がんモデルマウスに対する RIT 実験

ROBO1 陽性肝細胞がん細胞株 HepG2 の移植モデルマウスを用い、RI 標識抗 ROBO1 抗体による RIT 実験を行い、EJNMMI research にて発表した[38]。

HepG2 移植マウスに  $^{111}\text{In}$  標識抗 ROBO1 抗体 ( $^{111}\text{In}$  抗 ROBO1 抗体) を尾静脈より投与し、任意の時点で安楽死させた後、腫瘍および各臓器を採取し、当該抗体の集積分布を調べる体内分布実験を行った。その結果、単位組織重量あたりの投与放射能集積比率 (%ID/g) は投与後 48 時間時点の腫瘍で  $15.0 \pm 0.69\% \text{ID/g}$  を示し、 $^{111}\text{In}$  抗 ROBO1 抗体の腫瘍への有意な集積性が確認された。このことから、抗 ROBO1 抗体は HepG2 移植腫瘍の RIT 薬剤として有用であると考えられたため、 $^{90}\text{Y}$  標識抗 ROBO1 抗体 ( $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体) による治療実験を実施したところ、有意な腫瘍の成長抑制効果が確認された。このことから、 $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体が肝細胞がんの治療において有効である可能性が示唆された。

### 3.3 ROBO1 陽性小細胞肺がんモデルに対する RIT 実験

Naito et al. の研究で、小細胞肺がんの臨床サンプルにおいて ROBO1 が発現していることが確認された (personal communication)。また、ヒト由来小細胞肺がん細胞株 NCI-H69 において、ROBO1 が発現していることが Xian et al. によって報告さ

れた[39]。小細胞肺癌に対し RIT が有効であることは、過去の研究で既に明らかになっている[21, 22]。このことから、 $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体による RIT が小細胞肺癌の治療薬として有用である可能性があると考え、小細胞肺癌モデルマウスを用いた RIT 実験を施行した。

その結果、 $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体 0.18 mCi を投与した小細胞肺癌モデルマウスの移植腫瘍は投与前と比較して最大  $3.93 \pm 6.2\%$  まで縮小した。また、生理食塩水を投与したコントロール群と比較して survival の有意な改善も得られており、 $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体が小細胞肺癌移植腫瘍に対し明らかな抗腫瘍効果を発揮することが確認された。しかし、投与後 20 日目以降には腫瘍の再増大が確認された。副作用については体重および汎血球減少が確認されたが、いずれも一過性であり、投与後 28 日目にはほぼ投与開始時と同程度まで回復した。

#### 4. 本研究の概要

本研究では、 $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体による RIT を行った腫瘍および正常臓器の病理学的解析と、抗腫瘍効果の増強を目的とした化学治療と RIT の併用治療実験を施行した。

これまでの研究で、我々は  $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体による有意な腫瘍の縮小を確認した。しかしその後、腫瘍は再増大を示しており、根治を得ることは出来なかった。このこ

とから、本抗体を用いた RIT で根治を目指すためには、更なる治療法の検討が必要であることが示された。そのためには、腫瘍が縮小した時点だけでなく、治療後に生存していた腫瘍細胞について解析し、再増大に至った理由を明らかにする必要があると考える。治療後に生存していた細胞としては、1. 腫瘍内で抗腫瘍効果を受けていなかった細胞と、2. 抗腫瘍効果は受けたものの細胞死に至らなかった細胞のどちらかが存在していたと推測される。仮に前者の細胞が多くを占めていた場合、本抗体による RIT ではそれらの細胞を死滅させることは難しいと思われ、本抗体による RIT 以外の方法を検討する必要がある。一方後者であれば、腫瘍に対する抗腫瘍効果は得られていることから、放射線増感剤等で RIT の抗腫瘍効果を増強することで根治や survival の改善が達成できる可能性がある。これらの検証を行うには、従来の実験で行った腫瘍径を経時的に測定する外観的な評価法ではなく、腫瘍の縮小から再増大に至るまでの細胞レベルでの変化を観察する必要がある。そのため、RIT の腫瘍における経時的な病理学的解析が必要であると考えた。正常臓器においても、血球減少とその後の回復に至るまでの病理学的変化を知ることは重要である。また、外部放射線治療や化学治療等による腫瘍と正常臓器の病理学的変化を観察した研究は為されている一方、RIT において経時的にそれらを追跡した研究はこれまで報告されていない [40]。そのため、RIT 後の腫瘍と正常臓器の経時的な観察が必要であると考え、「研



究課題 1. 小細胞肺癌モデルマウスにおける  $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体を用いた放射免疫療法  
の病理学的解析」を実施した。

また、新たな治療法の創出として、先行研究により、化学治療で用いられる抗がん  
剤シスプラチンが放射線増感作用を有しており、RIT との併用により有意な抗腫瘍効  
果の増強が得られることに着目し、「研究課題 2. 小細胞肺癌モデルマウスにおけ  
る RIT と化学治療の併用治療の検討」を行った[41]。

## II. 研究課題 1. 小細胞肺癌モデルマウスにおける

### $^{90}\text{Y}$ 抗 ROBO1 抗体を用いた放射免疫療法 of 病理学的解析

#### 1. 目的

$^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体を用いた RIT では、小細胞肺癌移植腫瘍は有意な縮小を示した。しかし、投与 20 日目頃より腫瘍の再増大が確認され、根治を得ることは出来ず、治療法の検討が必要であることが示された。治療法の検討を行うためには、腫瘍が縮小した際の病理学的変化だけでなく、再増大を示すまでの変化を経時的に観察し、腫瘍の根治を得られなかった原因を明らかにする必要がある。そのため、腫瘍容積の測定のみでなく、病理学的側面からの観察が必要と考え、 $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体を用いた放射免疫療法の経時的な病理学的解析を実施した。

また、投与後の  $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体の体内挙動を推定し、吸収線量の多い臓器を推定する必要がある。そのため、 $^{90}\text{Y}$  と同様の体内挙動を示すことが報告されている  $^{111}\text{In}$  で標識した  $^{111}\text{In}$  抗 ROBO1 抗体を用い、解剖法による体内分布実験を実施した。

## 2. 方法

### 2.1 抗 ROBO1 抗体と抗体のキレート化

本研究では、RIT 用抗 ROBO1 抗体として B5209B、免疫組織化学用抗 ROBO1 抗体として A7241A を使用した[36, 38]。本抗体はヒト肝細胞がん細胞から単離された ROBO1 cDNA をバキュロウイルスに導入してウイルス表面上に発現させ、それを gp64 過剰発現トランスジェニックマウスに免疫し樹立したハイブリドーマより産生される。ROBO1 の第 5 イムノグロブリンドメインを認識し、cell ELISA にて half-maximal binding 32.5 ng/ml で ROBO1 に結合することが確認されている。

B5209B は RI 標識のため、RIT において一般的に用いられているキレート剤 1,4,7,10-tetraazaacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA, Macrocyclic 社製) によりキレート化された[38]。抗 ROBO1 抗体を 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> 緩衝液 (pH9.0) に加え、遠心式フィルターユニット (ミリポア社、アミコンウルトラ-4) にて遠心分離 (3600rpm, 15 分) する濃縮処理を 3 回行った。その後、0.1 M NaHCO<sub>3</sub> 緩衝液 (pH 9.0) に ROBO1 抗体と DOTA をモル比 1 : 10 (抗体 : DOTA) で混合し、37°C で 1 時間インキュベートした。反応液に 0.1 M クエン酸アンモニウム緩衝液 (pH5.5) を加え、遠心式フィルターユニットにて遠心分離 (3600rpm, 15 分) を 3 回行い、DOTA 化した抗 ROBO1 抗体 (DOTA 抗 ROBO1 抗体) の濃縮液を取得した。

抗 ROBO1 抗体 B5209B および A7241A の作製は東京大学先端科学技術研究センター浜窪研究室に依頼した。B5209B のキレート化は富士フイルム RI ファーマに依頼した。

## 2.2 抗体の RI 標識と性能評価

### 2.2.1 放射性核種の入手

体内動態解析に用いる放射性核種  $^{111}\text{In}$  (半減期 67.3 時間) は、Nordion 社 (カナダ) より  $^{111}\text{InCl}_3$  として購入した。治療用核種である  $^{90}\text{Y}$  (64 時間) は日本アイソトープ協会を介して、Eckert & Ziegler Nuclitec GmbH 社 (ドイツ) で製造された  $^{90}\text{YCl}_3$  を購入した。本研究で使用する放射性核種について、表 1 に示す。

### 2.2.2 抗体の RI 標識

$^{90}\text{YCl}_3$  を 0.25M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH5.5) に加え、抗体単位重量当たりの放射能が 2.5 mCi/mg になるよう DOTA-B5209B と混合して 37°C で 1 時間インキュベートし、 $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体を取得した。0.1 M リン酸緩衝液 (PBS, pH7.4) を移動相とし、脱塩カラム (GE ヘルスケア) で精製した。

$^{111}\text{In}$  抗 ROBO1 抗体も同様のプロトコールで作製し、実験に使用した。

### 2.2.3 標識体の性能評価

標識体の標識率と純度を薄層クロマトグラフィで評価し、標識率 95%以上、純度 99%以上であることを確認して実験に使用した。

competitive ELISA により、RI 標識抗 ROBO1 抗体の結合活性が intact の抗 ROBO1 抗体、DOTA 抗 ROBO1 抗体と同等であり、標識作業による結合活性の低下は認められないことを確認した[38]。

抗体の RI 標識と性能評価は富士フィルム RI ファーマに依頼した。

## 2.3 モデル動物の作製

### 2.3.1 小細胞肺癌細胞株

ROBO1 陽性細胞株として、ヒト小細胞肺癌細胞株 NCI-H69 (ATCC, HTB-119) を使用した[39]。10% FBS (GIBCO) + RPMI 1640 (Sigma) 培地にて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

### 2.3.2 小細胞肺癌モデルマウス

BALB/c ノードマウス (♂, 5 週齢) を日本クレアより購入し、1 週間の馴化飼育の後、細胞移植を行った。NCI-H69 培養細胞懸濁液の細胞生存率をトリパンプル一色素排除法により算出した。DPBS による洗浄で死細胞を除去し、生細胞数 2 x

10<sup>7</sup> 個/ml となるよう DPBS にて調製した。その後、マトリゲルと 1:1 で混合し、2 x 10<sup>6</sup> 個/200 $\mu$ l に調製した後、マウス右肩部に 21G 注射針で 200  $\mu$ l を移植した。飼育条件は固形飼料および水道水を自由摂食させた。体重と腫瘍体積の測定を週 2 回行った。腫瘍の体積は、腫瘍の長径と短径をノギスで測定し、以下の式より算出した。

$$\text{腫瘍体積(mm}^3\text{)} = 0.5 \times (\text{長径}) \times (\text{短径})^2$$

移植から 5 週間の飼育の後、動物実験に使用した。

#### 2.4 小細胞肺癌移植腫瘍における ROBO1 の発現解析

小細胞肺癌移植腫瘍における ROBO1 の発現を、免疫組織化学により解析した。小細胞肺癌モデルマウスから腫瘍を摘出し、約 5 mm 角にトリミング後、4% パラホルムアルデヒドで 4°C、一晩固定した。固定した試料はパラフィン包埋後、3  $\mu$ m 厚に薄切した。

切片を脱パラフィン、水和した後、10 mM Tris-1mM EDTA 溶液 (pH9.0) で 20 分間、圧力鍋にて加熱し、賦活処理を行った。冷却後、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-メタノールで室温下 30 分間の内在性ペルオキシダーゼの失活処理と、5% NGS による室温下、30 分間のブロッキングを行い、一次抗体として抗 ROBO1 抗体 A7241A (10  $\mu$ g/ml) を滴下して 4°Cで一晩インキュベートした。ネガティブコントロールには一次抗体を含ま

ない抗体希釈液（1% BSA-PBS）を使用した。二次抗体としてシンプルステイン MAX-PO（ニチレイ）を滴下し、室温下、30 分間インキュベートした。DAB 発色液 0.2 mg/ml 3,3'-ジアミノベンジジン-0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-0.05M Tris-HCl 溶液（pH7.6）による発色の後、マイヤー・ヘマトキシリンによる対比染色を行った。

染色後の試料は光学顕微鏡 BX-53（OLYMPUS）で検鏡した。

## 2.5 <sup>111</sup>In 抗 ROBO1 抗体による体内分布実験

RI 標識抗 ROBO1 抗体の体内動態を調べるため、<sup>111</sup>In 抗 ROBO1 抗体による体内分布実験を行った。<sup>111</sup>In 抗 ROBO1 抗体 10 μCi（抗体量 10 μg）を小細胞肺癌モデルマウスの尾静脈より投与した。投与後 6、24、48、72、144 時間の時点において、イソフルラン麻酔下で後大動脈より全採血を行い安楽死させた後、臓器を採取した。採取項目は血液、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、胃、小腸、大腸（盲腸含む）、副腎、脂肪、筋肉、皮膚、大腿骨、胸骨、精巣、腫瘍の全 19 項目とした。摘出臓器の重量を電子天秤で、臓器の放射能をガンマカウンターでそれぞれ測定し、各臓器の単位組織重量当たりの投与放射能集積比率 %Injected Dose/g (%ID/g) を以下の式により算出した。

$$\%ID/g = \frac{\text{臓器の放射能(mCi)}}{\text{投与放射能(mCi)} \times \text{臓器重量 (g)}} \times 100 (\%)$$

<sup>111</sup>In 抗 ROBO1 抗体の集積の経時的変化を%ID/g により評価した。

## 2.6 <sup>90</sup>Y 抗 ROBO1 抗体による RIT 実験

### 2.6.1 治療実験

小細胞肺癌モデルマウスをランダムに 2 群に群分けし (n=3 匹/群)、<sup>90</sup>Y 抗 ROBO1 抗体 0.2 mCi (RIT 群) または生理食塩水 (コントロール群) 200 μl を尾静脈より投与した。腫瘍体積は RIT 群で 310.5 ± 128.6 mm<sup>3</sup>、コントロール群で 273.5 ± 153.6 mm<sup>3</sup> だった。腫瘍体積と体重の測定を週 2 回実施し、4 週間の観察を行った。腫瘍の体積が 1,500 mm<sup>3</sup> を超えるか、20%以上の体重減少を実験のエンドポイントとして設定し、これらを超過した時点で安楽死させることとした。腫瘍の体積は 2.3.2 にて記載した式で算出し、腫瘍の成長率は下記の式より算出した。

$$\text{腫瘍成長率(\%)} = \frac{\text{任意の時点の腫瘍体積}}{\text{治療開始時(day0)の腫瘍体積}} \times 100$$

### 2.6.2 病理学的解析

小細胞肺癌モデルマウスをランダムに 5 群に群分けし (n=3 匹/群)、<sup>90</sup>Y 抗 ROBO1 抗体 0.2 mCi を尾静脈より投与した。投与後 0, 7, 14, 21, 28 日目に 1 群ずつイソフルラン麻酔下の脱血により安楽死させ、腫瘍と臓器 (心臓、肝臓、腎臓、肺、脾臓、膵臓、腸管、胸骨、大腿骨) を採取した。胸骨、大腿骨以外の試料は最大断面を作製し、4% パラホルムアルデヒドで 4°C、一晩の固定をした後、パラフ



インに包埋した。胸骨、大腿骨は 4°C で二晩の固定処理と、10% EDTA 溶液で 72 時間の脱灰処理を行った後、パラフィン包埋した。脱灰処理の間、液交換を 1 回行った。パラフィン包埋した試料を 3 μm 厚に薄切した。組織切片を脱パラフィン、水和した後、胸骨、大腿骨以外の組織はヘマトキシリン-エオジン染色で、胸骨、大腿骨はギムザ染色で染色し、形態学的解析を行った。

抗腫瘍効果を定量的に評価するため、Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)法と細胞分裂マーカー Ki-67 による免疫染色を行った。TUNEL 法は、DNA の二本鎖切断端に DNA ポリメラーゼ Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) を用いてビオチン標識 deoxyuridine triphosphate (dUTP) を付加し、伸長したビオチン化 DNA 鎖にペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを結合させ、DAB 発色させるアポトーシスの検出法である。治療を行った腫瘍ではアポトーシス細胞が増加することがわかっており、治療効果の評価に用いられている。Ki-67 は細胞周期の全ての phase で細胞の核に発現しているタンパク質である。乳がん、胃がん、大腸がん等の分化度、血管侵襲、リンパ節転移といったがんの悪性度や予後と良好な相関を示すことから、臨床では悪性度を評価するためのマーカーとして Ki-67 免疫染色が使用されている。また、治療により細胞分裂能が低下した腫瘍では、未治療の腫瘍よりも Ki-67 の発

現が低下することがわかっていることから、治療効果の評価系としても用いられている。

TUNEL 法は Apoptag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit

(Merck Millipore) を使用した。腫瘍切片を protease K 溶液 (20 µg/ml, タカラバイオ) で 15 分間、室温にて処理した。0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-メタノールによる室温下 30 分間の内在性ペルオキシダーゼの失活処理と、Equilibration buffer による室温下 5 分間の平衡化処理の後、TdT Enzyme と Reaction Buffer の混合液 (32:76) をアプライし、37°C、1 時間インキュベートした。切片を 37°C に加温した反応停止液に入れ、反応停止液中で 37°C、30 分間の反応停止処理を行った。反応停止処理中は 10 分間ごとに反応停止液の入った容器を振とうした。抗ジゴキシゲニン・ペルオキシダーゼ抗体を滴下し、室温で 30 分間インキュベートした。DAB 発色の後、ヘマトキシリンで対比染色を行った。

Ki-67 免疫染色のため、腫瘍切片を 10 mM クエン酸緩衝液 (pH6.0) で 15 分間、圧力鍋にて加熱し賦活処理した。冷却後、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-メタノールで室温下 30 分間の内在性ペルオキシダーゼの失活処理と、5% NGS による室温下、30 分間のブロッキングを行い、一次抗体として抗 Ki-67 抗体 (1:100, Leica) を滴下して 4°C で一晩インキュベートした。ネガティブコントロールには一次抗体を含まない抗体希釈液 (1% BSA-PBS) を使用した。二次抗体としてシンプルステイン MAX-PO (ニ

チレイ) を滴下し、室温下、30 分間インキュベートした。DAB 発色の後、ヘマトキシリンで対比染色を行った。

アポトーシス細胞と細胞分裂期の細胞を定量するため、TUNEL 陽性細胞と Ki-67 陽性細胞の割合を定量した。腫瘍切片上に 200  $\mu\text{m}$  四方の関心領域 (ROI) を 2 か所設定し、ROI 内の全細胞数と TUNEL 陽性細胞または Ki-67 陽性細胞を計数した。そして、陽性細胞率を以下の式により算出した。

$$\text{陽性細胞率(\%)} = \frac{\text{陽性細胞数}}{\text{全細胞数}} \times 100$$

## 2.7 統計処理

データは平均値 $\pm$ SD で表記した。t 検定を統計処理ソフト JMP 10.0.2 を用いて施行した。p 値 $< 0.05$  を以て有意差を有するものとした。

## 3. 結果

### 3.1 小細胞肺がん移植腫瘍における ROBO1 の発現解析

A7241A 抗体による NCI-H69 小細胞肺がん移植腫瘍の免疫染色を施行し、NCI-H69 細胞膜において染色が認められた (図 1)。このことから、NCI-H69 移植腫瘍は ROBO1 を発現していることが確認された。

### 3.2 <sup>111</sup>In 抗 ROBO1 抗体による体内分布実験

RI 標識抗 ROBO1 抗体の体内動態を調べるため、<sup>111</sup>In 抗 ROBO1 抗体による体内分布実験を施行した (図 2, 表 2)。腫瘍における <sup>111</sup>In 抗 ROBO1 抗体の集積は、投与後 6, 24, 48, 72, 144 時間でそれぞれ  $3.46 \pm 0.3$ 、 $6.42 \pm 0.5$ 、 $5.70 \pm 2.5$ 、 $9.37 \pm 2.0$ 、 $10.1 \pm 1.3\%$  ID/g であり、144 時間後が最も高い集積を示した。血液においては、投与後 6 時間の時点で  $19.2 \pm 2.1\%$  ID/g と比較的高い残存性を示したが、時間経過とともに減少し、24, 48, 72, 144 時間でそれぞれ  $13.2 \pm 1.0$ 、 $10.5 \pm 1.5$ 、 $9.94 \pm 1.5$ 、 $6.54 \pm 0.5\%$  ID/g だった。肝臓、腎臓、脾臓でも比較的高い集積が見られ、投与後 72 時間の時点でそれぞれ  $7.29 \pm 0.4$ 、 $6.34 \pm 1.1$ 、 $5.51 \pm 1.0\%$  ID/g だった。その他の臓器で高い集積を示した臓器はなかった。大腿骨と胸骨への集積は投与後 144 時間の時点でそれぞれ  $1.71 \pm 0.2$ 、 $1.13 \pm 0.2\%$  ID/g であり、有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。しかし、それ以前の時点では両者に有意差は認められなかった。

### 3.3 <sup>90</sup>Y 抗 ROBO1 抗体による RIT 実験

#### 3.3.1 治療実験

<sup>90</sup>Y 抗 ROBO1 抗体を用いた治療実験により、治療効果を評価した。コントロール群の腫瘍は増大を続け、投与 20 日目には一匹のマウスの腫瘍体積がエンドポイントである  $1,500 \text{ mm}^3$  を超過した (図 3a)。RIT 群では投与後から腫瘍体積の減少

が認められ、投与 13 日目には投与前と比べて  $19.3 \pm 6.1\%$ まで縮小した。投与 27 日目時点での腫瘍の成長率は RIT 群の方がコントロール群よりも低く、有意差が認められた ( $p < 0.01$ )。しかし、投与 20 日目より腫瘍の再増大が確認された。

コントロール群のマウスの体重は有意な減少は認められなかった(図 3b)。一方、RIT 群では投与前と比べて  $89.5 \pm 4.7\%$ まで体重が減少した。しかし、この体重減少は一過性であり、投与 8 日目以降、回復傾向を示した。

### 3.3.2 腫瘍の病理学的解析

治療後の腫瘍の病理学的解析を実施した。治療 0 日の腫瘍は所々に硝子様間質を伴う充実性増殖を示していた(図 4a)。投与 7 日目には広範な凝固壊死、アポトーシスが認められ、さらに細胞体の膨化や核の膨化、クロマチンの凝集といった細胞変性が腫瘍全体で確認された(図 4b)。投与 14 日目には凝固壊死や細胞変性のほか、凝固壊死した領域への組織球の集簇や繊維化が認められた(図 4c)。また、線維組織に囲まれる形で腫瘍細胞が点在している様子も確認された。投与 21 日目には凝固壊死した領域は見られなくなったが、組織球の集簇や繊維化は確認することが出来た(図 4d)。14 日と比べると細胞変性を呈する細胞の数は減少したが、まだ変性像を呈する細胞が複数個所で残存していた。投与 28 日目には変性した細胞は

ほとんど見られず、細胞体や核の大きさ等は投与 0 日と同等の形態を示していた(図 4e)。

治療前後での  $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体の影響を評価するため、投与 0 日および 7 日目の腫瘍に対し TUNEL 法と Ki-67 の免疫染色を行い、陽性細胞の定量を実施した(図 5)。TUNEL 陽性細胞率 (TUNEL index) は投与 0 日目で  $4.46 \pm 1.1\%$ 、投与 7 日目で  $8.83 \pm 1.2\%$ 、であり、治療後の方が有意に高かった ( $p < 0.01$ )。Ki-67 陽性細胞率 (Ki-67 index) は投与 0 日で  $55.0 \pm 13.9\%$ 、投与 7 日で  $27.2 \pm 3.4\%$ と、治療後が有意に低かった ( $p < 0.01$ )。

### 3.3.3 正常臓器の病理学的解析

治療後の全ての時点において、肝臓、脾臓、胸骨、大腿骨以外の臓器では病理学的変化は認められなかった(図 6—図 11)。

脾臓では、投与 7 日目に赤脾髄の造血細胞と白脾髄のリンパ球の顕著な減少が確認された(図 12b)。14 日目には赤脾髄において赤芽球、顆粒球系の細胞が凝集している regenerative islands が確認されたが、巨核球はほとんど確認できなかった(図 12c)。白脾髄のリンパ球の細胞密度は 7 日目と同程度であり、回復傾向は認められなかった。21 日目には赤脾髄の造血細胞(赤芽球、顆粒球、巨核球)の明らかな増加が認められ、白脾髄のリンパ球も若干増加した(図 12d)。リンパ球は白脾

髓の外縁付近に多く、中心静脈付近には少ないという分布傾向を示した。28 日目には赤脾髓の造血細胞は投与前と同程度まで回復し、白脾髓も中心部までリンパ球が分布し、細胞密度が均一になるなど、明らかな回復が認められた (図 12e)。

胸骨、大腿骨に対し、骨髓のギムザ染色を行った。投与 7 日目には胸骨で造血細胞が顕著に減少し、細胞密度は 20%程度まで低下した (図 13b)。残存している造血細胞は成熟した顆粒球が多くを占めており、幼弱な造血細胞はほとんど認められなかった。大腿骨では巨核球が若干したが、赤芽球、顆粒球の減少は認められなかった (図 14b)。大腿骨へのダメージは胸骨と比べて明らかに少なかった。14 日目には胸骨において赤芽球、顆粒球からなる **regenerative islands** が確認され、巨核球もいくらか認められた (図 13c)。大腿骨では巨核球が増加し、細胞密度は 0 日時点と同程度まで回復した (図 14c)。21 日目には胸骨の造血細胞が有意に増加し (図 13d)、28 日目には胸骨の骨髓の細胞密度も 0 日時点と同程度まで回復した (図 13e)。

肝臓では、投与 7 日目において肝細胞の風船状変化が確認されたが、14 日目には認められず、0 日時点と同様の形態を示していた (図 15)。

## 4. 考察

### 4.1 $^{111}\text{In}$ 抗 ROBO1 抗体による体内分布実験

本研究では、 $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体の体内動態を推定するため、 $^{111}\text{In}$  抗 ROBO1 抗体を使用した。 $^{111}\text{In}$  の標識体は  $^{90}\text{Y}$  の標識体と同じ体内挙動を示すことがわかっている [29]。 $^{90}\text{Y}$  は純 $\beta$ 線放出核種であるため組織中の飛程が数 mm と短く、組織中の放射能を正確に計測することは困難である。 $^{111}\text{In}$  は組織内飛程が長く $\beta$ 線よりも正確な計数が可能な $\gamma$ 線を放出し、半減期も 67.3 時間と  $^{90}\text{Y}$  (64 時間) とほぼ同等、体内挙動も同じであることから、 $^{90}\text{Y}$  標識体の体内動態解析には  $^{111}\text{In}$  標識体が一般に用いられている。

$^{111}\text{In}$  抗 ROBO1 抗体は投与後 144 時間の腫瘍において  $10.1 \pm 1.3\% \text{ID/g}$  の集積を示した。標的組織（腫瘍）で抗原を認識した RI 抗体はそのまま結合し長時間留まるため、標的組織における集積率は時間経過と共に増加する。本体内分布実験においても、 $^{111}\text{In}$  抗 ROBO1 抗体の集積率は時間経過と共に増加する傾向が確認された。このことから、 $^{111}\text{In}$  抗 ROBO1 抗体は小細胞肺癌移植腫瘍に対し特異的な集積性を有していると考えられる。我々は過去に肝細胞がん（HepG2 細胞株）モデルマウスに対し、 $^{111}\text{In}$  抗 ROBO1 抗体の体内分布実験を行い、最大  $15.0 \pm 0.69\% \text{ID/g}$  という集積率を得た [38]。本実験結果は、それよりも 32.7%低い数値である。これは、小細胞肺癌 NCI-H69 細胞株と肝細胞がん HepG2 細胞株における ROBO1 の発現量が



関与していると思われる。Ito et al.の解析により、NCI-H69 細胞株の 1 細胞あたり ROBO1 の発現量は HepG2 細胞株よりも 34.1%低いことがわかっている (data not shown)。これは上記体内分布実験で得られた両者に対する  $^{111}\text{In}$  抗 ROBO1 抗体の集積率の差とほぼ同等である。よって、細胞における ROBO1 の発現量の違いが、集積率に差が見られた原因であると考えられる。抗体の集積率は RIT の治療効果を決定する重要な要因であるため、本小細胞肺癌モデルでは肝細胞がんモデルよりも吸収線量が低くなることが予想された。しかし、肝細胞がんは放射線感受性の低いがん種であるのに対し、小細胞肺癌は放射線感受性の高いがん種である [3, 42]。そして、その肝細胞がん移植腫瘍に対し、 $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体は有意な抗腫瘍効果を示した [38]。このことから、集積率は低いものの、本 RI 抗体は小細胞肺癌に対し有意な抗腫瘍効果を発揮し得ると考えられた。

血液では投与後 144 時間において  $6.55 \pm 0.5\% \text{ID/g}$  と腫瘍に次ぐ数値を示し、RI 抗体の血中滞留性が認められた。血中の RI 抗体は全身被ばくの要因となるため、RI 抗体の血中濃度が長期間に渡り高い状態が維持されていた場合、RIT 用薬剤としての使用は不適切である。しかし、血中の RI 抗体濃度は時間経過と共に減少していたこと、他の RI 抗体を用いた先行研究でも血中濃度の経時的変化や投与 144 時間後の血中濃度に大きな差はなかったことから、本 RI 抗体の血中滞留性に問題はないと判断した [21, 27]。ただし、先行研究において実施された RIT 実験では、血中の RI 抗体

に起因すると思われる骨髄抑制等の造血系への副作用が認められたことから、本 RI 抗体においても同様の副作用が起こる可能性が考えられた。

正常臓器では肝臓、腎臓、脾臓において比較的高い集積が認められ、いずれも時間経過とともに低下するか、観察期間中ほぼ一定の数値を示した。しかし、Ito et al.はこれら臓器における ROBO1 の発現はほとんどないことを報告している[36]。また先に述べたとおり、RI 抗体の特異的集積は時間経過と共に集積率が増加する傾向を示す。このことから、本集積は  $^{111}\text{In}$  抗 ROBO1 抗体の特異的集積ではないと考えられる。これらの臓器で高い集積が見られた理由としては、第一に血流量が豊富な臓器であることが考えられる。肝臓や腎臓は血液プールとしては特に大きな臓器であることから、臓器に残留した血液中の RI 抗体が検出されていることが考えられる。その他の理由としては、肝臓、脾臓への集積は、RI 抗体が内皮細胞の Fc レセプターにトラップされた可能性が考えられる。これらの臓器は細網内皮系が発達しており、抗体をトラップし細胞内に取り込む Fc レセプターを発現している[43, 44]。Fc レセプターを介して内皮細胞に取り込まれた RI 抗体が検出された可能性がある。腎臓への集積の理由としては、第一に RI 抗体の尿中排泄の可能性が考えられる。しかし、過去の研究で本抗体の尿中への排泄はほとんど見られないことがわかっている[45]。よって、本集積は腎機能（腎ろ過）に由来するものではないと思われる。それ以外の可能性としては、前述の腎臓に残留した血液中の RI 抗体が有力である。腎臓はヒトでは心拍

出量の 20%以上を占める血流の豊富な臓器であり、マウスにおいても腎臓は血流が豊富であると推察される。<sup>111</sup>In 抗 ROBO1 抗体の腎臓への集積は、腎臓に残留した血液中の RI 抗体が原因である可能性が高いと考える。

正常臓器における RI 抗体の集積は、当該臓器への吸収線量がそれ以外の臓器と比べて増加することを意味する。特に脾臓は造血組織であり、放射線感受性が高い。よって、肝臓、腎臓、脾臓に対し放射線による影響が発生する可能性が考えられた。

## 4.2 <sup>90</sup>Y 抗 ROBO1 抗体による RIT 実験と病理学的解析

### 4.2.1 <sup>90</sup>Y 抗 ROBO1 抗体の抗腫瘍効果

本研究は、小細胞肺癌に対する <sup>90</sup>Y 抗 ROBO1 抗体による RIT 後の組織の病理学的変化を経時的に追跡した最初の研究である。

<sup>90</sup>Y 抗 ROBO1 抗体の RIT により、腫瘍の体積は有意に減少した。さらに、細胞変性、広範な凝固壊死、アポトーシス細胞の増加、Ki-67 陽性細胞の減少等の病理学的変化も確認された。治療を受けた腫瘍細胞では細胞死や細胞変性等の形態学的、病理学的な変化が誘導される[40]。治療を行った腫瘍において見られる細胞の反応は、1. 細胞死（アポトーシス、凝固壊死）、2. 細胞変性（細胞成分の膨化、クロマチンの凝集）、3. 変化なしの 3 種類が挙げられる。

治療によって誘導される「1. 細胞死」は、病理学的には壊死とアポトーシスに大別される。壊死は凝固壊死、融解壊死等の種類が存在するが、いずれもストレス刺激により生じる不可逆的な細胞障害である。凝固壊死では細胞核が融解し、細胞の形態が崩れ細胞質が流出する。そのため、凝固壊死に陥った領域では核の染色性が失われ、流出した細胞質により一様に好酸性に染色される。これは細胞質内の塩基性物質の減少や消失と、ミトコンドリアの増加、膨化に基づく変化と考えられている。虚血部においても凝固壊死が誘導されることがあるが、その領域は狭く限定的である。一方、治療効果によって誘導された凝固壊死は広範囲にわたる傾向があり、見分けることが可能である。実際、RI 抗体投与 7 日目の腫瘍において認められた凝固壊死は腫瘍の 7 割近くに及ぶ例もあったのに対し、腫瘍が増大して生じた凝固壊死は範囲が限定的だった。融解壊死は壊死組織の自己融解が本体であり、壊死細胞からのリソソームに由来する水解酵素の作用によって生じる。脂質に富む中枢神経組織などで見られる壊死像であり、本研究では確認されなかった。アポトーシスは内的あるいは外的要因（ウイルス・細菌等の感染、虚血、化学物質、放射線等）によるストレスで惹起される細胞障害の非可逆的变化であり、細胞死に際して細胞質等を流出させることなく、最終的にアポトーシス小体を形成する。HE 染色では投与 7 日目においてアポトーシス細胞の増加が確認できた上、TUNEL 法によ

る定量解析でも、RIT 群の 7 日目腫瘍の TUNEL index は 0 日の腫瘍よりも有意に高い数値を示した。

「2. 細胞変性」は凝固壊死やアポトーシスとは異なり可逆的な変性である。変性が進みクロマチンの凝集等に至れば細胞死に陥るが、逆に変性が収まれば正常な細胞に戻る。観察では、可逆的な段階にある細胞のほか、クロマチンが凝集した細胞も確認された。腫瘍の観察においてこれらの病理学的変化が確認されたことは、<sup>90</sup>Y 抗 ROBO1 抗体が腫瘍細胞に有意な抗腫瘍効果を有していることを示している。

「3. 変化なし」の場合、腫瘍細胞に病理学的な変化は認められず、生食群（コントロール）と同様の細胞の形態を示す。過去の研究において肝細胞がんモデルマウスに非 RI 標識抗 ROBO1 抗体を投与した実験では、当該腫瘍には病理学的変化は認められず、非 RI 標識抗 ROBO1 抗体には有意な抗腫瘍効果はないと判断された[38]。本研究では切片上の全ての細胞で凝固壊死、アポトーシス、細胞変性のいずれかが認められたことから、<sup>90</sup>Y 抗 ROBO1 抗体が小細胞肺がん移植腫瘍に対し有意な抗腫瘍効果を有していることが病理学的にも示された。

本実験において、RIT 群の腫瘍は投与 20 日目以降には再増大に転じた。また、14 日目には凝固壊死領域への組織球の集簇と線維化が認められ、21 日目には組織球や線維化が認められる一方、凝固壊死は見られなくなった。組織球は凝固壊死した細胞の残骸を貪食し、処理する細胞である。その後、遊走してきた線維芽細胞と

組織球が入れ替わることで、組織の欠損した部位が修復される。これらは凝固壊死に対する生体の免疫反応であり、治療で発生した病理学的変化に対応して惹起される現象である。21日目の時点で凝固壊死が認められなかったことは、その時点で細胞を死滅させるだけの抗腫瘍効果が得られていないことを示唆している。さらに、細胞変性から回復した細胞が認められたことから、 $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体の治療効果は21日目には減弱していると考えられる。実際、投与20日経過時点での $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体の放射能は200分の1近くにまで減衰しており、本推測とは矛盾しない。過去の研究においても腫瘍の成長曲線は同様の経過をたどっていることから、これ以降腫瘍が RIT の効果により細胞死に陥ることはないと思われる。よって、 $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体単独治療では根治を得ることは難しいと思われ、更なる治療プロトコルの検討が必要であると考え。腫瘍全体で細胞変性等の病理学的変化が確認されたことから、治療後に生存している細胞でも RIT による抗腫瘍効果は得られていたと判断出来る。よって、プロトコルの検討方針としては、これらの細胞を死滅させるため、RIT の抗腫瘍効果を増強することが有効であると考え。

投与放射エネルギーの増加は最も簡便に腫瘍の吸収線量を増やすことが出来、効果が期待出来る方法である。しかし、過去の実験より、本研究で投与した 0.2mCi は最大耐用量 (MTD) に近いことがわかっており、これ以上の増加は重篤な副作用が発生する可能性があることから、投与量の増加による抗腫瘍効果の改善は困難である。

そのため、投与量を増やすことなく、治療効果を向上させることが求められる。具体的な改善策については、4.3  $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体を用いた治療法の改善にて記述する。

#### 4.2.2 $^{90}\text{Y}$ 抗 ROBO1 抗体の正常臓器への影響

本研究で RIT 群において認められた正常臓器への影響としては、体重減少、造血細胞の減少、肝細胞の風船状変化が挙げられる。しかし、これらの変化は一過性であり、観察期間中に死亡した個体はいなかったことから、本研究の投与量 0.2mCi は致命的な投与量ではなかったと考える。

脾臓では 14 日目に赤芽球、顆粒球系の細胞で形成される **regenerative islands** が認められ、21 日目には巨核球を含む造血細胞の明らかな増加が確認された。

**regenerative islands** は、幼弱な造血細胞の集合体で、減少した造血細胞が回復する際に認められる病理像である。これらの結果は、投与 14 日目～20 日目に造血細胞の回復が始まっていることを示しており、本 RIT 実験による脾臓へのダメージは一過性であることが病理学的に確認された。

胸骨では造血細胞の顕著な減少が認められ、その程度は大腿骨よりも明らかに重度であった。体内分布実験の結果、両者への RI 標識抗体の集積にほとんど差はなく、このダメージの差は RI 標識抗体の集積性によるものではないと思われる。こ

の現象の原因としては、血液や高集積エリアからの被ばくが考えられる。RI 抗体の高い集積性を示した腫瘍は右肩に移植されている上、肝臓、腎臓でも比較的高い集積が認められた。また、心臓は集積性自体は低いものの、血液プールとしては大きな容量を有している。これらは大腿骨よりも胸骨に近い位置にあり、高集積部位からの物理的な位置関係が、胸骨と大腿骨でダメージが異なる原因だった可能性がある。RI 抗体による造血組織への影響に関しては、Esteban et al. が血液中の  $^{90}\text{Y}$  標識抗体や非特異的集積が主な原因であることを報告している[46, 47]。このことから、造血系へのダメージは造血組織への RI 抗体の特異的集積ではなく、血液中の RI 抗体や高集積部位からの被ばくが大きな要因になっていると推察され、臨床応用を検討する際には慎重に考慮する必要がある。しかし、 $^{90}\text{Y}$  の組織内飛程は数 mm 程度と短い。体の小さなマウスでは近傍臓器からの距離が近いいため影響を受けやすいが、体の大きなヒトでは影響が軽減できる可能性がある。

大腿骨における造血細胞への影響は、投与 7 日目に巨核球が減少したのみだった。また、脾臓、胸骨においては赤芽球、顆粒球は 14 日目に回復傾向が見られたのに対し、巨核球は 21 日目と、巨核球の減少や回復は赤芽球、顆粒球とは異なる傾向を示した。これは、巨核球とそれ以外の造血細胞との放射線感受性に違いがあるためと考えられる。赤芽球、顆粒球、巨核球はそれぞれ赤芽球前駆細胞 (erythroid burst-forming unit, BFU-E)、顆粒球・単球系前駆細胞 (colony-forming unit



granulocyte granulocyte-macrophage, CFU-GM)、巨核球系前駆細胞

(colony-forming unit megakaryocyte, CFU-Meg) から分化する。CFU-GM は放射線抵抗性である一方、幼弱な CFU-Meg や BFU-E は放射線高感受性である [48]。

Kashiwakura et.al は骨髄前駆細胞の放射線感受性に関する研究を報告している [49, 50]。BFU-E、混合系前駆細胞 (CFU-Mix)、CFU-Meg に対し 2 Gy の X 線を照射し、照射後の細胞の生存率を解析した実験では、CFU-Meg の生存率は BFU-E、CFU-Mix よりも有意に低かった。このことから、CFU-Meg の放射線感受性は BFU-E、CFU-GM よりも高いと考えられ、本 RIT において骨髄前駆細胞が受けた放射線のダメージは、CFU-Meg が最も大きかったと推察される。巨核球の前駆細胞である CFU-Meg のダメージが大きく、CFU-GM や BFU-E よりも回復が遅れたことが、巨核球の回復が赤芽球、顆粒球よりも遅かった原因であると考えられる。

肝臓では、投与 7 日目に肝細胞の風船状変化が確認された。肝臓は体内分布実験で  $^{111}\text{In}$  抗 ROBO1 抗体が高い集積を示した上、血液プールとしても大きな臓器である。よって、RIT においても  $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体からの被ばく量が特に多い臓器だったと考えられ、本結果は肝臓に集積した  $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体からの被ばくが原因であると考えられる。しかし、風船状変化は可逆的な変性であり、実際 14 日目には見られなくなっている。このことから、本抗体投与量における肝臓への影響は一過性であり、致命的な要因にはならないと思われる。

以上のことから、 $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体の正常臓器への影響は一過性であることが病理学的に確認された。しかし、造血系への明らかなダメージが確認されたことから、治療に対しては慎重な配慮が必要であると思われる。

### 4.3 $^{90}\text{Y}$ 抗 ROBO1 抗体を用いた治療法の改善策

4.2.1 にて記載した通り、 $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体を用いた RIT で小細胞肺がんの根治を目指すためには、抗腫瘍効果を増強する方針での改善策が期待出来る。しかし、投与放射エネルギーを増やすことは副作用の観点から困難である。そのため、投与放射エネルギーを変えずに治療効果を改善することが求められる。その方法としては、1. 抗体の腫瘍への集積性の改善と、2. 腫瘍の放射線感受性の向上が考えられる。以下、それぞれについて考察を行う。

#### 4.3.1 抗体の腫瘍への集積性の改善について

RIT の治療効果は、RI 抗体を腫瘍にいかに多く集積させることが出来るかに大きく依存する。このため、抗体を効率よく腫瘍に集積させることは、RIT を行う上で極めて重要である。抗体の集積性を決定する要因としては、抗体のアフィニティと、腫瘍における抗原の発現量の 2 点に関与している。これらを改善することで、抗体の腫瘍への集積性が向上し、治療効果を増強出来ると考えられる。それぞれについて、先行研究を参考に改善方法の考察を行う。

まず、使用する抗体のアフィニティを向上させることが挙げられる。抗体のアフィニティは腫瘍への集積率に大きく寄与するため、アフィニティを向上させることで、投与放射線量を変えずに集積率を増加することができる。本研究で用いた B5209B 抗体以上のアフィニティを有する抗体を使用することで、抗体の集積性が改善し、治療効果の増強に繋がると思われる。

腫瘍における抗原の発現も重要な要因である。RIT はモノクローナル抗体の抗原抗体反応により、腫瘍に RI 抗体を集積させる治療法である。よって、細胞の抗原発現量や陽性率は RI 抗体の集積率と治療効果に大きく影響する。そのため、腫瘍における抗原の発現量を増加させ、抗体の集積率を向上させる研究が報告されている。Murray et al. は  $^{131}\text{I}$  標識抗 tumor-associated glycoprotein (TAG) -72 抗体 ( $^{131}\text{I}$  抗 TAG-72 抗体) を用いた臨床研究において、インターフェロン $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) を投与した乳がん患者では TAG-72 抗原の発現が増加し、 $^{131}\text{I}$  抗 TAG-72 抗体の集積が向上したと報告している[51]。また、Meredith et al. も消化管腫瘍患者において同様の報告をしており、投薬によるがん特異抗原の発現の増強は RI 抗体の集積を改善するための手法として期待出来る[52]。しかし、この手法の実現には標的抗原の発現制御メカニズムの解明が不可欠である。本研究で標的としている ROBO1 はいまだ不明な点の多い分子であり、その発現制御メカニズムも解明されていない。

今後、ROBO1 の発現制御メカニズムを解明し、投薬による ROBO1 抗原の増加の可能性について、検討を行う必要があると考える。

以上のことから、抗体の集積性を改善するためには、抗体のアフィニティを向上させる、または投薬により腫瘍における抗原の発現量を増加させるといった方法が考えられる。

#### 4.3.2 腫瘍の放射線感受性の向上

腫瘍の放射線感受性は放射線治療の効果を決定する重要な要因である。放射線感受性の高い腫瘍は、それだけ高い効果が期待出来る。そのため、投薬により腫瘍細胞の放射線感受性を向上させ、RIT の治療効果を増強するという研究が行われている。細胞の放射線感受性を高める物質は放射線増感剤と呼ばれ、その作用機序は様々である。以下、代表的な放射線増感剤ごとに考察を行う。

シスプラチンやパクリタキセル等の抗がん剤は、単純な抗腫瘍効果だけでなく、腫瘍の放射線感受性を向上させる放射線増感剤としても働くことが報告されている[53]。シスプラチンの放射線増感剤としての作用機序は、細胞に取り込まれたシスプラチンの白金に放射線が当たり、二次電子線が発生しているためであると考えられている[54]。パクリタキセルは細胞分裂において機能する紡錘体の形成を過剰に促進し、最も放射線感受性の高い時期である G2/M 期で細胞周期を停止 (G2/M

arrest) させることが、放射線増感の機序であると考えられている[53, 55]。これら抗がん剤との併用により RIT の治療効果を増強することが期待されており、Al-Ejeh et al. はシスプラチンと RIT の併用治療により腫瘍モデルマウスの survival が改善した研究を報告している[41]。このことから、<sup>90</sup>Y 抗 ROBO1 抗体と化学治療との併用は有用である可能性がある。

放射線増感剤には、細胞が放射線で受けたダメージを修復する機構を阻害し、細胞死を誘導するものが存在する。放射線による細胞死は、一般的に放射線照射で発生する DNA 損傷（一本鎖切断、二本鎖切断等）によって誘導される[56]。しかし、細胞には切断された DNA の修復機構が備わっており、DNA の修復に関わる因子としては poly ADP ribose polymerase (PARP)、Aurora-A 等が報告されている[57-59]。これらの因子が DNA 修復を促進し、治療後の腫瘍細胞の生存に寄与していると考えられている。PARP inhibitor は PARP の働きを阻害し、腫瘍の DNA 修復を阻害して細胞死を誘導する物質であり、RIT と PARP inhibitor との併用により RIT 単独での治療よりも治療効果が改善したという研究が報告されている[60]。<sup>90</sup>Y 抗 ROBO1 抗体と PARP inhibitor の併用治療も、有効である可能性がある。

腫瘍組織中の酸素分圧を向上させ、RIT の治療効果を増強させるという方法も考えられる。<sup>90</sup>Y 抗 ROBO1 抗体が放出するβ線は、細胞中の水分子を電離・励起することでフリーラジカルを発生させ、そのフリーラジカルが DNA を損傷させること

で治療効果を発揮する[61]。ラジカルの産生量は腫瘍の産生量は酸素分圧と相関があり、酸素分圧の低い条件下ではラジカルの産生量が減少し、治療効果が低下することがわかっている。そして、腫瘍の成長に伴い、腫瘍内部には酸素分圧の低い低酸素領域が発生することが報告されている[62]。低酸素領域に存在する細胞（低酸素細胞）は上記酸素効果により治療効果を受けにくく、放射線治療抵抗性を示す。また、低酸素誘導因子（Hypoxia Inducible Factor）等の働きにより、血管新生、浸潤、転移が促進されるなど、低酸素細胞の撲滅はがん治療において重要なテーマであると考えられている。がん組織中の低酸素領域に対する対処法としては、Kinuya et al. が大腸がんモデルマウスと血管拡張剤ペントキシフィリンを用いた研究を報告している[63]。大腸がんモデルマウスに血管拡張剤を投与したところ、腫瘍の酸素分圧が改善したという結果が得られており、Kinuya et al. は酸素分圧の改善により RIT の治療効果が増強できる可能性を指摘している。血管拡張剤と併用することで、<sup>90</sup>Y 抗 ROBO1 抗体の治療効果を高められる可能性がある。

以上のことから、RIT を用いて小細胞肺がんの根治を目指す方法としては、種々の薬剤との併用治療を行うことにより、腫瘍細胞の放射線感受性を向上させ、RIT の治療効果を増強することが考えられる。

#### 4.4 本実験のまとめ

本実験では、小細胞肺癌モデルマウスに対する<sup>90</sup>Y抗ROBO1抗体を用いたRITの治療効果について、病理学的側面から評価を行った。<sup>90</sup>Y抗ROBO1抗体は小細胞肺癌移植腫瘍に対し凝固壊死や細胞変性の誘導など、有意な抗腫瘍効果を示したが、投与後20日程度で細胞変性から回復する細胞が見受けられ、効果が減弱していることが示唆されるなど、治療プロトコルの検討が必要であることが示された。また、正常臓器に対しても一過性ではあるが病理学的な影響が確認され、治療プロトコルの検討を行う際、慎重な配慮が求められることが示された。

### Ⅲ. 研究課題 2. 小細胞肺癌モデルマウスにおける

#### RIT と化学治療の併用治療の検討

##### 1. 目的

先の研究により、 $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体単独での RIT では治療効果には限界があり、**survival** の改善や根治を得るためには治療プロトコルの検討を行い、治療効果を増強する必要があることが示された。

シスプラチンは、小細胞肺癌治療において一般的に用いられているプラチナ製剤である[6, 22, 64]。放射線治療の増感効果があることがわかっており、実際に RIT とシスプラチンの併用により治療効果が増強することが報告されている[41]。このことから、 $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体とシスプラチンを併用することで、**survival** の改善が期待できると判断し、 $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体の RIT とシスプラチンの化学治療の併用による治療効果について検討を行った。



## 2. 方法

### 2.1 抗 ROBO1 抗体と抗体のキレート化

RIT 用抗 ROBO1 抗体として DOTA-B5209B を使用した[36, 38]。抗体の DOTA 化手順は「1.  $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体を用いた放射免疫療法の病理学的解析」にて記載した方法と同じである (2.1 参照)。

抗 ROBO1 抗体 B5209B の作製は東京大学先端科学技術研究センター浜窪研究室に依頼した。B5209B のキレート化は富士フイルム RI ファーマに依頼した。

### 2.2 抗体の RI 標識と性能評価

#### 2.2.1 放射性核種の入手

体内動態解析に用いる放射性核種  $^{111}\text{In}$  (半減期 67.3 時間) は、Nordion 社 (カナダ) より  $^{111}\text{InCl}_3$  として購入した。治療用核種である  $^{90}\text{Y}$  (64 時間) は日本アイソトープ協会を介して、Eckert & Ziegler Nuclitec GmbH 社 (ドイツ) で製造された  $^{90}\text{YCl}_3$  を購入した。

#### 2.2.2 抗体の RI 標識

「1.  $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体を用いた放射免疫療法 of 病理学的解析」にて記載した方法と同じである (2.2.2 参照)。

### 2.2.3 標識体の性能評価

「1.  $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体を用いた放射免疫療法の病理学的解析」にて記載した方法と同じである (2.2.3 参照)。

抗体の RI 標識と性能評価は富士フィルム RI ファーマに依頼した。

## 2.3 シスプラチンの調製

シスプラチン (製品番号 P4394) はシグマアルドリッチより購入した。インキュベータで  $50^{\circ}\text{C}$  に加温した生理食塩水にシスプラチンを  $1\text{ mg/ml}$  の濃度で溶かした。その後、投与量に応じて生理食塩水で希釈し、実験に使用した。調製後は遮光し、常温で保管した。

## 2.4 モデル動物の作製

### 2.4.1 小細胞肺癌細胞株

ROBO1 陽性細胞株として、ヒト小細胞肺癌細胞株 NCI-H69 (ATCC, HTB-119) を使用した [39]。10% FBS (GIBCO) + RPMI 1640 (Sigma) 培地にて  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下で培養した。

## 2.4.2 小細胞肺癌モデルマウス

BALB/c ノードマウス (♂, 5 週齢) を日本クレアより購入し、1 週間の馴化飼育の後、細胞移植を行った。移植手順は「研究課題 1. 小細胞肺癌モデルマウスにおける  $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体を用いた放射免疫療法の病理学的解析」にて記載した方法と同じである (2.3.2 参照)。

飼育条件は固形飼料および水道水を自由摂食させた。体重と腫瘍体積の測定を週 2 回行った。腫瘍の体積は、腫瘍の長径と短径をノギスで測定し、以下の式より算出した。

$$\text{腫瘍体積}(\text{mm}^3) = 0.5 \times (\text{長径}) \times (\text{短径})^2$$

移植から 5 週間の飼育の後、動物実験に使用した。

## 2.5 RIT と化学治療の併用実験

### 2.5.1 治療実験

小細胞肺癌モデルマウスをランダムに 5 群 (n=7 匹/群) に分け、それぞれ生食群、シスプラチン単独群、RIT 単独群、3 mg/kg 併用群、5 mg/kg 併用群とした。投与スケジュールについて、表 3 に示す。生食群と RIT 単独群には生理食塩水 0.2 ml、シスプラチン単独群と 5mg/kg 併用群にはシスプラチン 5 mg/kg、3 mg/kg 併用群にはシスプラチン 3 mg/kg を腹腔内投与した (day -1)。1 日後 (day 0)、生食

群とシスプラチン単独群に生理食塩水 0.2 ml、RIT 単独群、3 mg/kg 併用群、5 mg/kg 併用群に  $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体 0.18 mCi を尾静脈より投与した。実験開始時の腫瘍の体積は生食群で  $211.6 \pm 100.3 \text{ mm}^3$ 、シスプラチン単独群で  $222.6 \pm 102.8 \text{ mm}^3$ 、RIT 単独群で  $221.4 \pm 112.1 \text{ mm}^3$ 、3 mg/kg 併用群で  $232.9 \pm 115.4 \text{ mm}^3$ 、5 mg/kg 併用群で  $194.9 \pm 135.1 \text{ mm}^3$  であり、各群間に有意差はなかった。週 2 回の腫瘍と体重の測定を治療後 90 日まで、週 1 回の血球測定を治療後 28 日まで実施した。

## 2.5.2 病理学的解析

小細胞肺癌モデルマウスをランダムに 4 群 (n=2 匹/群) に分け、それぞれ生食群、シスプラチン単独群、RIT 単独群、5 mg/kg 併用群とした。2.5.1 と同様のスケジュールで生理食塩水、シスプラチン、 $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体の投与を行った (表 3)。投与 7 日目 (day 7) に麻酔下の脱血により安楽死させ、腫瘍と臓器 (肝臓、腎臓、脾臓、腸管、胸骨、大腿骨) を採取した。胸骨、大腿骨以外の試料は最大断面を作製し、4% パラホルムアルデヒドで  $4^\circ\text{C}$ 、一晩の固定をした後、パラフィンに包埋した。胸骨、大腿骨は  $4^\circ\text{C}$  で二晩の固定処理と、10% EDTA 溶液で 72 時間の脱灰処理を行った後、パラフィン包埋した。脱灰処理の間、液交換を 1 回行った。パラフィン包埋した試料を  $3 \mu\text{m}$  厚に薄切した。組織切片を脱パラフィン、水和し

た後、胸骨、大腿骨以外の組織は HE 染色で、胸骨、大腿骨はギムザ染色で染色し、形態学的解析を行った。

抗腫瘍効果を定量的に評価するため、TUNEL 法によるアポトーシス細胞の定量を行った。「1. 小細胞肺癌モデルマウスにおける  $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体を用いた放射免疫療法の病理学的解析」にて記載した方法と同様の手順で染色を行い、各サンプル 3 ヶ所に ROI を設定し、定量解析を行った。

## 2.6 統計処理

データは平均値 $\pm$ SD で表記した。Student's t test および one-way ANOVA、Tukey-Kramer の HSD 検定を統計処理ソフト JMP 10.0.2 を用いて施行した。p 値  $<0.05$  を以て有意差を有するものとした。また、Kaplan-Meier 曲線も JMP 10.0.2 を用いて作製した。

## 3. 結果

### 3.1 RIT と化学治療の併用実験

#### 3.1.1 治療実験

$^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体とシスプラチンを用いた治療実験により、治療効果を評価した。核治療群の腫瘍体積の変化を図 16a に示す。生食群の腫瘍は増大を続け、投与

37日目には全てマウスの腫瘍体積がエンドポイントである  $1,500 \text{ mm}^3$  を超過した。Median Survival Time (MST) は 27 日だった。シスプラチン単独群の腫瘍は投与 9 日目まで腫瘍の成長が抑制されていたが、明らかな縮小は見られなかった。また、13 日目には増大を始め、37 日目に全てのマウスの腫瘍体積がエンドポイントを超過した (MST=30 日)。RIT 単独群の腫瘍は明らかな縮小を示し、投与 16 日目に最少となり、0 日目と比較して  $12.1 \pm 6.2\%$  まで縮小した。20 日目から再増大が見られ、55 日目に全てのマウスがエンドポイントを超過した (MST=51 日)。3 mg/kg 併用群の腫瘍は明らかな縮小が認められ、投与 20 日目に最少となり  $8.24 \pm 7.6\%$  まで縮小した (0 日比)。23 日目より再増大が確認され、69 日目に全てのマウスがエンドポイントを超過した (MST=55 日)。5 mg/kg 併用群では腫瘍の明らかな縮小が認められ、投与 20 日目に最少となり、 $8.03 \pm 8.4\%$  まで縮小した (0 日比)。23 日目より再増大が見られたが、一例が観察期間終了の 90 日時点で腫瘍の成長が抑制されたまま生存していた (MST=65 日)。各治療群の生存時間曲線を図 16b に示す。Tukey-Kramer の HSD 検定を使った全てのペアの比較により、5 mg/kg 併用群の生存期間は他の全ての群と有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。観察期間終了まで生存した個体の 90 日時点での腫瘍体積は  $58.2 \text{ mm}^3$  だった。

投与後の体重を測定したところ、シスプラチン単独群、RIT 単独群、3 mg/kg+RIT 群、5 mg/kg+RIT 群において、それぞれ  $91.5 \pm 2.7\%$ ,  $90.4 \pm 8.8\%$ ,  $87.0 \pm 3.2\%$ ,  $86.4$

± 4.0%まで減少したが、これらの変化は一過性であった (図 17a)。生食群の体重は有意な変化は認められなかった。投与 7 日目の時点において、すべてのペアを Tukey-Kramer の HSD 検定により比較を行ったところ、生食群と 3 mg/kg 併用群または 5 mg/kg 併用群の間にのみ有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。

投与後の白血球、赤血球、血小板を測定した (図 17b-d)。RIT 単独群では、WBC、RBC、PLT が 15 日目にそれぞれ  $41.0 \pm 24.1\%$ ,  $70.8 \pm 20.2\%$ ,  $40.2 \pm 12.9\%$ まで減少した (0 日比)。3 mg/kg+RIT 群では、WBC、RBC、PLT が 15 日目にそれぞれ  $19.4 \pm 9.5\%$ ,  $68.2 \pm 6.9\%$ ,  $20.1 \pm 8.8\%$ まで減少した (0 日比)。5 mg/kg+RIT 群では、WBC、RBC、PLT が 15 日目にそれぞれ  $20.3 \pm 8.6\%$ ,  $61.6 \pm 5.3\%$ ,  $19.0 \pm 9.6\%$ まで減少した (0 日比)。これらの変化は一過性であり、22 日目より回復傾向を示した。血球が最も減少した 15 日時点でのすべてのペアの血球を Tukey-Kramer の HSD 検定により比較したところ、WBC、RBC、PLT のすべてにおいて生食群とシスプラチン単独群の間には有意差は認められなかった。また、RI 抗体を投与した群 (RIT 単独群、3 mg/kg 併用群、5 mg/kg 併用群) の間にも有意差は認められなかった。WBC、PLT では、RI 抗体を投与した群の血球カウントは生食群、シスプラチン単独群よりも有意に低かった ( $p < 0.05$ )。RBC においては、RI 抗体を投与した群と生食群の間には有意差が認められた ( $p < 0.01$ )。シスプラチン単独群と 5 mg/kg 併用群の間には有意差が認められたが ( $p < 0.05$ )、シスプラチン単独群と

RIT 単独群または 3 mg/kg 併用群の間には有意差は認められなかった。

### 3.1.2 腫瘍の病理学的解析

腫瘍の HE 染色により、生食群の腫瘍細胞は充実性増殖を示し、ところどころに硝子様間質が認められた (図 18a)。シスプラチン単独群では個細胞性壊死のほか、軽度な細胞体の膨化が認められた (図 18b)。RIT 単独群では凝固壊死のほか、明らかな細胞体と核の膨化が確認された (図 18c)。5 mg/kg 併用群では、RIT 単独群を上回る広範な凝固壊死、個細胞性壊死の増加、アポトーシス細胞の増加が認められ、細胞体や核の膨化も確認された (図 18d)。

TUNEL 法によるアポトーシス細胞の定量解析では、TUNEL index は生食群、シスプラチン単独群、RIT 単独群、5 mg/kg 併用群でそれぞれ  $2.22 \pm 0.56\%$ 、 $3.41 \pm 1.3\%$ 、 $10.5 \pm 3.9\%$ 、 $21.1 \pm 7.2\%$  だった (図 19)。Tukey-Kramer の HSD 検定を使った全てのペアの検定により、5mg/kg 併用群の TUNEL index と他の全ての群とで有意差が認められた ( $p < 0.01$ )。

### 3.1.3 正常臓器の病理学的解析

腎臓および腸管では全ての群で病理学的変化は認められなかった (図 20, 21)。脾臓、胸骨、大腿骨においては、生食群、シスプラチン単独群では病理学的変化は



認められなかった (図 22a-b, 図 23a-b, 図 24a-b)。

RIT 単独群において、胸骨の造血細胞の減少が認められた (図 23c)。生食群と比較して造血細胞の細胞密度は 20~50%程度まで低下しており、巨核球はほとんど見られなかった。大腿骨では造血細胞の減少は認められなかった (図 24c)。脾臓の赤脾髄でも造血細胞が顕著な減少を示し、白脾髄ではリンパ球の細胞密度の減少が確認された (図 22c)。

5 mg/kg 併用群において、胸骨の造血細胞の細胞密度が生食群と比較して 10%程度まで減少し、大腿骨でも巨核球の減少が見られた (図 23d, 図 24d)。脾臓においては、赤脾髄の造血細胞と白脾髄のリンパ球が RIT 単独群以上に顕著な減少を示した (図 22d)。肝臓の肝細胞において風船状変化が確認された (図 25d)。

## 4. 考察

### 4.1 RIT と化学治療の併用による抗腫瘍効果

治療実験により、5 mg/kg 治療群の survival は他の全ての治療群と有意差が認められた。病理学的解析においても 5 mg/kg 併用群の腫瘍は RIT 単独群以上の細胞変性が見られ、TUNEL index も高い数値を示した。さらに、治療群の治療強度は生食群、シスプラチン単独群、RIT 単独群、3 mg/kg 併用群、5 mg/kg 併用群の順に強くなり、腫瘍体積の変化、生存時間曲線、TUNEL index は治療強度依存的な改善を示した。

このことから、RIT と化学治療の併用により、抗腫瘍効果が有意に増強されたと考える。

抗腫瘍効果が改善した理由としては、1. シスプラチンによる直接的な治療効果と、  
2. シスプラチンによる放射線増感作用が考えられる。しかし、本実験ではシスプラチンの投与は1回のみであり、コントロールであるシスプラチン単独群では数日程度の腫瘍の成長抑制効果は認められたが、9日目には再増大が見られるなど、効果の減弱が示唆されており、さらに survival の改善も得られなかった。このことから、本実験系におけるシスプラチンの直接的な治療効果は弱く、5 mg/kg 併用群で得られた明らかな抗腫瘍効果の改善に大きく寄与はしたとは考え難い。本実験系においては、シスプラチンの治療効果よりも放射線増感作用による寄与が大きいと推測する。

RIT と化学治療の併用により、小細胞肺癌移植腫瘍に対する治療効果は有意に増強された。しかし、投与 20 日目以降には併用群でも再増大が認められるなど、根治には至らず、治療の抗腫瘍効果が不十分であることが示された。興味深い点として、RIT 単独群と併用群でほぼ同一時点（投与 20 日目）から腫瘍の再増大が認められた。

「研究課題 1. 小細胞肺癌モデルマウスにおける  $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体を用いた放射免疫療法の病理学的解析」に記載した通り、 $^{90}\text{Y}$  の物理学的半減期のため、投与 20 日目頃には RIT の抗腫瘍効果は大きく減弱しており、生存している腫瘍細胞は変性から回復しつつあることが明らかになっている。シスプラチンとの併用により抗腫瘍

効果が増強されているが、 $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体の放射能が投与 20 日目頃には大きく減衰していることは RIT 単独群と同様である。すなわち、20 日目時点で生存している腫瘍細胞に対しては併用群でも十分な治療効果を得ることは出来ないと推察される。よって、RIT による小細胞肺がんの根治を目指す際には、RI 抗体の抗腫瘍効果が得られている間に腫瘍細胞を根絶するための治療プロトコルの検討が必要であると考えられる。

#### 4.2 RIT と化学治療の併用による正常臓器への影響

RIT を行った群では、生食群、シスプラチン単独群と比較して造血系へのダメージが大きい傾向が示された。また、有意差はなかったものの、RIT を行った群ではシスプラチンの投与量依存的に造血系へのダメージが増強される傾向が認められた。病理学的解析でも、RIT 単独群の骨髄、脾臓よりも 5 mg/kg 併用群の方がよりダメージが大きく、血球測定と一致する結果が得られている。これはシスプラチンによる造血細胞への細胞障害性と放射線増感効果が原因と考えられ、今後、併用治療を検討する際には骨髄抑制に対する慎重な配慮が必要である。

併用治療群で認められた病理学的な変化は造血細胞とリンパ球の減少以外には、肝細胞の風船状変化のみだった。血球測定で治療 21 日目以降には骨髄抑制の回復傾向が認められたことから、造血細胞やリンパ球の減少は一過性であると思われる。また、

肝細胞の風船状変化は可逆的な細胞変性であることから、肝臓へのダメージも一過性であると考えられる。さらに、本実験において腫瘍の体積がエンドポイントを超過した以外の理由で死亡したマウスはいなかった。以上のことから、本実験で施行した<sup>90</sup>Y抗ROBO1抗体とシスプラチンの投与量は致死的ではないと考えられる。

#### 4.3 本研究の limitation

本実験では、治療実験のマウスの匹数を一群あたり7匹で実施した。マウスを用いたRITの先行研究においては、一群あたりの匹数は5匹以上が一般的である[21, 26, 38, 65]。本研究はそれを十分に満たしており、実験系としての信頼性には問題はないと考える。

一方、病理学的解析は一群あたり2匹で実施し、さらに3mg/kg併用群は解析を行っていない。本実験は治療実験と病理学的解析を1回の実験で同時に実施したが、飼育・投与できるマウスの個体数に上限があったため、治療実験の統計学的信頼性を担保することを優先し、病理学的解析は一群あたり2匹、群数は3mg/kg併用群を除く計4群に設定した。そのため、TUNEL indexを含む統計学的信頼性は低いと言わざるをえない。しかしながら、病理学的解析は各種染色による顕微鏡下での形態学的観察が主たる評価方法であり、統計解析は補足的な位置付けである。本実験の観察では、HE染色サンプルにおいて治療強度に応じた病理学的変化が確認されている上、

TUNEL 法によるアポトーシス細胞の観察でも 5 mg/kg 併用群の方が RIT 単独群よりもアポトーシス細胞が多いことは明らかである。加えて、各群 2 匹の病理像はほぼ同様の形態を示しており、個体差や治療効果の過度なばらつきは認められない。以上のことから、一群あたりの匹数は少ないものの、病理学的解析の主たる目的は十分に達成されており、実験結果の評価に大きな問題はないと考える。また、3 mg/kg 併用群の治療効果は腫瘍の体積変化から RIT 単独群と 5 mg/kg 併用群の中間に位置しており、病理学的解析でもそれに近い病理像が得られることが推測されることから、3 mg/kg 併用群の解析は必須ではないと考える。

併用治療群の対照として、シスプラチン単独群には day -1 においてシスプラチン 5 mg/kg を 1 回だけ投与した。本実験は併用治療の放射線増感作用による治療効果を評価することが目的であり、RIT 単独群、シスプラチン単独群はそれぞれの投与薬剤の対照として設定された。しかし、化学治療は継続的な投与により治療効果を得る治療法である。日本における小細胞肺癌の化学治療ではシスプラチンとイリノテカンの PI 療法が標準治療として取り入れられている[66]。今後、併用治療と化学治療の治療効果の比較を行う際には、標準治療に則った化学治療群を対象として設定する必要がある。

#### 4.4 今後の展望

RIT と化学治療の併用により、明らかな治療効果の増強と survival の改善が得られ、観察期間終了時に一例が腫瘍の成長が抑制された状態で生存しているという結果が得られた。さらに、本実験の副作用によって死亡した個体はなく、致死的な治療ではないことが確認された。RIT と化学治療の併用により治療効果が増強されることが示されたことから、RIT を主軸とした治療は小細胞肺がんの survival の改善に繋がる可能性がある。しかしながら、併用群でも大部分は腫瘍の再増大が認められたことから、更なる治療プロトコールの改善が必要であると思われる。

今後の具体的な改善策としては、1.  $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体の追加投与、2.  $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体と PARP inhibitor との併用治療、3. 化学治療のコースに則った RIT との併用治療、4.  $^{177}\text{Lu}$  標識抗 ROBO1 抗体による RIT、5.  $^{90}\text{Y}$ - $^{177}\text{Lu}$  カクテルによる RIT、6.  $^{90}\text{Y}$ - $^{177}\text{Lu}$  カクテルと化学治療の併用治療等が考えられる。

$^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体の追加投与に関しては、当研究室の古山が過去に検討を行っている[45]。1 回目の  $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体の投与から 21 日目に 2 回目の投与を行ったところ、マウスの生存期間の延長が達成された。しかし、腫瘍の再増大が認められた上、投与 2 回目の抗腫瘍効果は 1 回目よりも低いことが明らかになった。このことから、1.  $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体の追加投与は十分な効果は期待できないと考える。

PARP inhibitor は、放射線照射によって生じた DNA の二本鎖切断を修復を阻害し、アポトーシスを誘導する放射線増感剤である[67]。RIT と PARP inhibitor の併用治療により、肺癌モデルマウスの survival が改善したとの報告があることから、<sup>90</sup>Y 抗 ROBO1 抗体と PARP inhibitor との併用治療は有効である可能性がある[60]。また、PARP inhibitor 以外の放射線増感剤との併用も考えられる。Heat Shock Protein 90 (HSP90) inhibitor はタンパク質の折り畳みに関与する分子シャペロン HSP90 の阻害剤であり、HSP90 inhibitor で処理した腫瘍細胞の放射線感受性が向上したとの報告がされている[68]。RIT との併用治療に関する報告はされていないが、併用治療の候補として期待出来る。

4.3 にて記載した通り、小細胞肺癌の化学治療は抗がん剤を継続的に投与して行われる。本実験ではシスプラチンは1回しか投与していないため、シスプラチン本来の抗腫瘍効果が十分に得られたとは言い難い。治療コースに則った上で併用治療を行えば、RIT と化学治療の両方の治療効果が得られると考えられ、3. 化学治療のコースに則った RIT との併用治療はマウスの予後を大きく改善する可能性がある。

4.1 にて、投与 20 日目には RIT の抗腫瘍効果が減弱してしまうことを記載した。これは <sup>90</sup>Y の半減期が 2.7 日と比較的短いことに起因している。長半減期の核種を使い、長い期間抗腫瘍効果を得ることで、治療効果が改善する可能性がある。そのための方法として、<sup>177</sup>Lu の使用が注目されている。<sup>177</sup>Lu は半減期 6.7 日、最大エネルギー

—0.5 MeV のβ線放出核種である[19]。<sup>90</sup>Y よりも半減期が長いため、集積した部位で長期間放射線を照射することが出来る。さらに、<sup>90</sup>Y (2.3 MeV) よりもβ線のエネルギーが低いため組織内飛程が短く (<sup>90</sup>Y 11 mm vs <sup>177</sup>Lu 2 mm)、骨髄等の非標的臓器への被ばくを軽減できることから、より多くの放射能を投与することが出来る。さらに、小型の腫瘍に対しては <sup>90</sup>Y 標識抗体よりも <sup>177</sup>Lu 標識抗体の方が有効であるとの報告もあり、<sup>177</sup>Lu は <sup>90</sup>Y に代わる RIT の治療用核種として期待されている[69]。実際に <sup>177</sup>Lu 標識抗体を用いた肺がんモデルマウスに対する RIT が有効であった旨の報告もされており、4. <sup>177</sup>Lu 抗 ROBO1 抗体による RIT は有力な治療手段となる可能性がある[60]。

<sup>90</sup>Y 標識抗体と <sup>177</sup>Lu 標識抗体を混合して投与するカクテル療法も考えられる。先行研究としては、神経内分泌腫瘍に対するペプチド治療薬 DOTATATE や DOTATOC の <sup>90</sup>Y 標識体と <sup>177</sup>Lu 標識体を一定の割合で混合し、同時に生体に投与する、<sup>90</sup>Y-<sup>177</sup>Lu カクテル療法が報告されている[70-74]。β線のエネルギーが高く、半減期が短い <sup>90</sup>Y で大きな腫瘍を攻撃し、残存した腫瘍細胞を低エネルギー、長半減期の <sup>177</sup>Lu で叩くことを目的とした治療法である。<sup>90</sup>Y と <sup>177</sup>Lu の物理的性状を利用した治療法であり、膵臓がん移植ラットを用いた <sup>90</sup>Y-<sup>177</sup>Lu カクテルの治療実験では、<sup>90</sup>Y-DOTATOC と <sup>177</sup>Lu-DOTATATE の各単独治療群の MST がいずれも 75 日以下であったのに対し、カクテル治療群では MST が 150 日を超えるなど、明らかな survival



の改善が得られている[73]。臨床研究では、神経内分泌腫瘍患者に対しカクテル治療群（n=25）と  $^{90}\text{Y}$ -DOTATATE 単独群（n=25）による治療の比較検討が実施され、2年生存率はカクテル治療群で 89%、 $^{90}\text{Y}$ -DOTATATE 単独群では 62%だった[72]。骨髄への毒性が認められるものの  $^{90}\text{Y}$ -DOTATATE 単独群と同等であり、治療の耐容性も良好であることから、筆者らは実用に問題はなく、安全であると判断している。以上のことから、 $^{90}\text{Y}$ - $^{177}\text{Lu}$  カクテル療法はそれぞれの単独治療よりも治療効果が高く、有望な治療法であると考えられる。しかし、 $^{90}\text{Y}$ - $^{177}\text{Lu}$  カクテル療法はペプチド治療薬では報告されている一方、モノクローナル抗体を用いたカクテル療法ははまだ報告されていない。ペプチドと比べて分子量が大きい抗体は血中半減期が長いため、より慎重な副作用へのケアが求められると思われる。

$^{90}\text{Y}$ - $^{177}\text{Lu}$  カクテル療法と化学療法の併用も効果が期待出来る治療法である。併用治療の有効性は本研究で示した通りであり、さらにカクテル療法は単独治療を上回る治療効果を望める。両者を組み合わせることで、小細胞肺がんの根治的な治療法の開発に繋がる可能性がある。

#### 4.5 本実験のまとめ

本実験では、小細胞肺がんモデルマウスに対し、RIT と化学治療の併用による治療効果への寄与について検討を行った。併用治療群では RIT 単独群と比べて有意な survival の改善が得られたほか、一例が観察期間終了まで生存した。さらに、病理学

的にも RIT 単独治療よりも強い抗腫瘍効果が得られていることが確認された。このことから、RIT と化学治療の併用は小細胞肺癌治療において有用であることが示された。しかし、併用群でも大部分の腫瘍で再増大が認められたことから、更なる治療法の改善が必要であると考ええる。また、一過性に RIT 単独群よりも強い骨髄抑制等の副作用が確認されたことから、今後の検討においては慎重な配慮が求められる。

## IV. 結論

本研究では、小細胞肺癌に対する<sup>90</sup>Y抗ROBO1抗体を用いたRITの病理学的解析と、RITと化学治療の併用による治療効果への寄与について検討を行った。

RIT後の腫瘍組織では広範な凝固壊死やアポトーシス等の不可逆的かつ致死的な細胞の変化、および細胞体、核の膨化といった可逆的な細胞変性が認められ、本RITにより有意な抗腫瘍効果が得られることを病理学的に明らかにした。さらに、正常臓器におけるRITの影響は一過性であり、致死的ではないことを病理学的に明らかにした。

RITと化学治療の併用治療実験では、併用治療によりRIT単独治療以上のsurvivalの改善が得られることを明らかにした。さらに、副作用はRIT単独治療より強くなるものの、造血系に限局しており、致死的ではないことを明らかにした。

本研究により、ROBO1陽性小細胞肺癌に対するRITの有効性が示され、今後の小細胞肺癌のsurvivalの改善に繋がり得る重要な知見が得られた。

図表

Isotope	Half life	Radiation	Energy
$^{111}\text{In}$	67.3 h	$\gamma$	171 keV, 245 keV
$^{90}\text{Y}$	64 h	$\beta$	2.3 MeV
$^{131}\text{I}$	8 d	$\beta, \gamma$	0.81 MeV
$^{177}\text{Lu}$	6.7 d	$\beta, \gamma$	0.5 MeV
$^{211}\text{At}$	7.2 h	$\alpha$	5.87 MeV
$^{213}\text{Bi}$	45.7 min	$\alpha$	5.87 MeV

表 1. RIT 関連研究において使用される核種

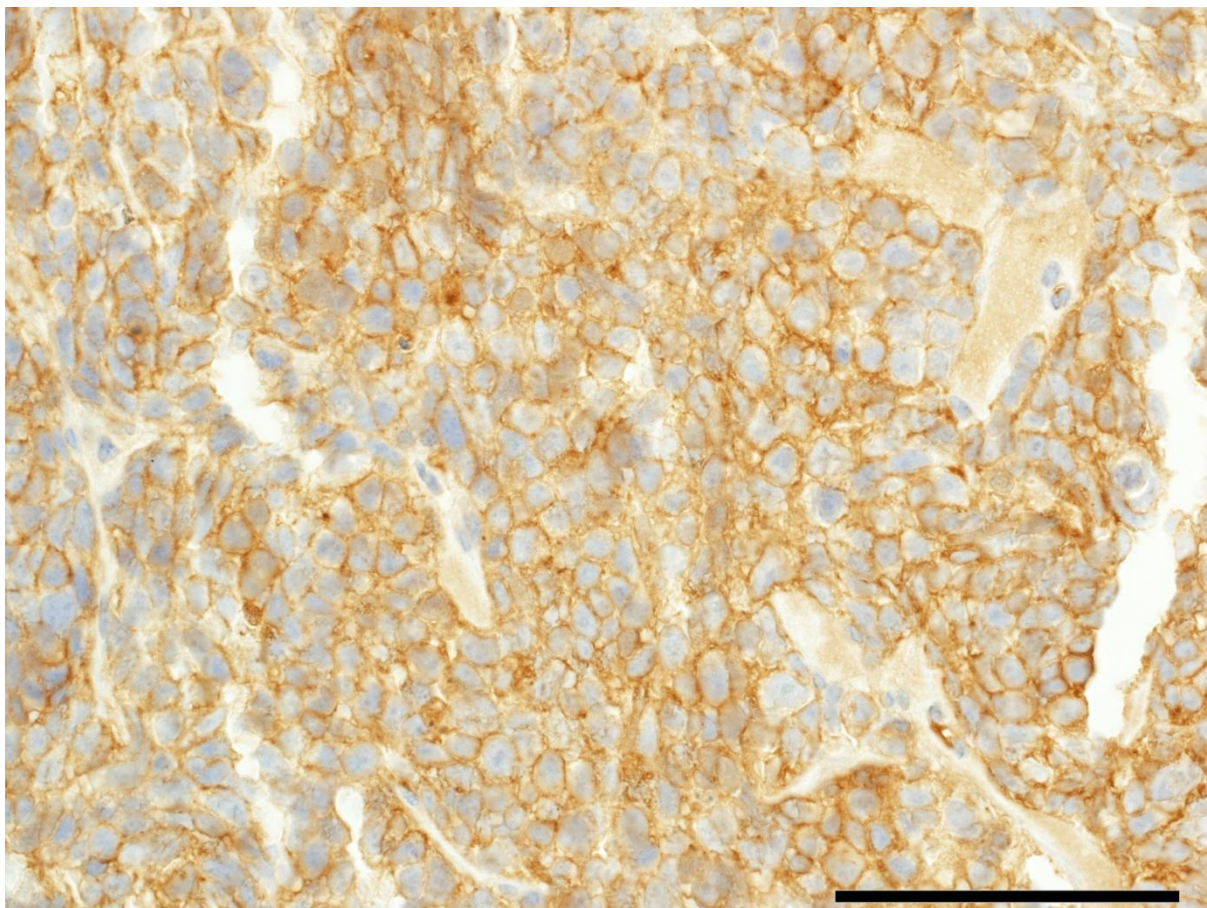


図 1. 小細胞肺癌移植腫瘍における ROBO1 の免疫組織化学  
小細胞肺癌移植腫瘍に対する抗 ROBO1 抗体の免疫組織化学により、  
陽性像が確認された（対物 40 倍、Scale bar = 100  $\mu$ m）。

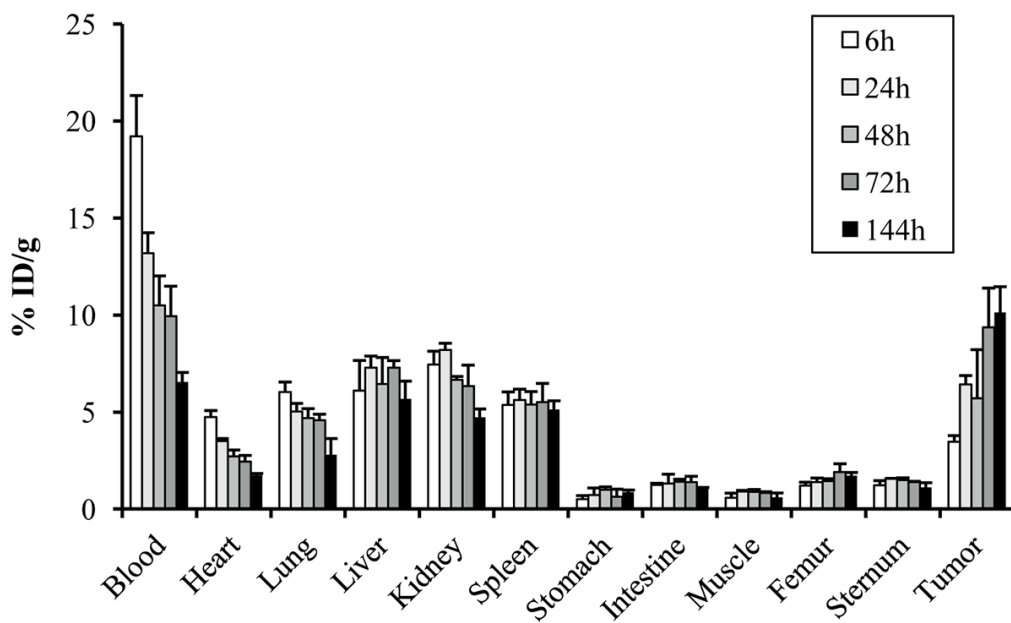


図 2. 小細胞肺癌モデルマウスによる  $^{111}\text{In}$  抗 ROBO1 抗体の体内分布実験  
 小細胞肺癌移植腫瘍へ時間経過と共に増加する特異的な集積性を認めた。

	6 h	24 h	48 h	72 h	144 h
Blood	19.2 ± 2.1	13.2 ± 1.0	10.5 ± 1.5	9.94 ± 1.5	6.55 ± 0.5
Heart	4.74 ± 0.3	3.51 ± 0.1	2.71 ± 0.3	2.25 ± 0.3	1.75 ± 0.1
Lung	6.04 ± 0.5	5.03 ± 0.4	4.68 ± 0.5	4.57 ± 0.3	2.81 ± 0.8
Liver	6.10 ± 1.6	7.29 ± 0.6	6.44 ± 1.4	7.29 ± 0.4	5.68 ± 0.9
Kidney	7.46 ± 0.7	8.21 ± 0.3	6.67 ± 0.2	6.34 ± 1.0	4.73 ± 0.4
Spleen	5.36 ± 0.7	5.62 ± 0.6	5.38 ± 0.7	5.52 ± 0.1	5.14 ± 0.4
Stomach	0.51 ± 0.2	0.72 ± 0.4	1.00 ± 0.1	0.64 ± 0.4	0.86 ± 0.1
Intestine	1.25 ± 0.1	1.32 ± 0.5	1.41 ± 0.1	1.40 ± 0.3	1.02 ± 0.1
Muscle	0.59 ± 0.2	0.90 ± 0.1	0.89 ± 0.1	0.83 ± 0.1	0.61 ± 0.2
Femur	1.20 ± 0.2	1.39 ± 0.2	1.44 ± 0.1	1.92 ± 0.4	1.71 ± 0.2
Sternum	1.22 ± 0.2	1.56 ± 0.02	1.49 ± 0.1	1.39 ± 0.04	1.13 ± 0.2
Tumor	3.46 ± 0.3	6.42 ± 0.5	5.70 ± 2.5	9.37 ± 2.0	10.14 ± 1.3

表 2. 小細胞肺癌モデルマウスによる  $^{111}\text{In}$  抗 ROBO1 抗体の体内分布実験  
小細胞肺癌移植腫瘍へ時間経過と共に増加する特異的な集積性を認めた。  
(単位: %ID/g)

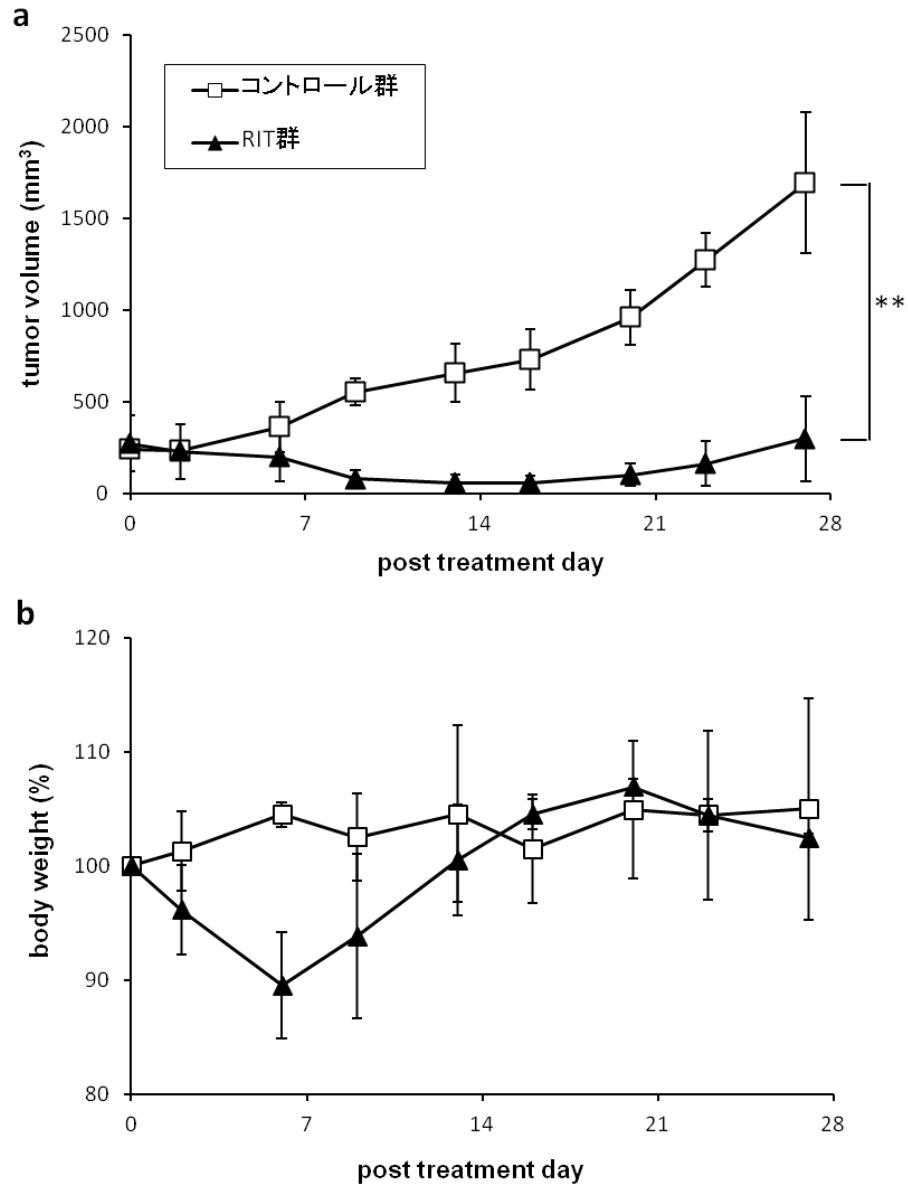


図 3. <sup>90</sup>Y 抗 ROBO1 抗体による RIT 後の腫瘍体積とマウス体重の変化  
 (a) 腫瘍体積の変化、(b) 体重の変化 (\*\* p<0.05)



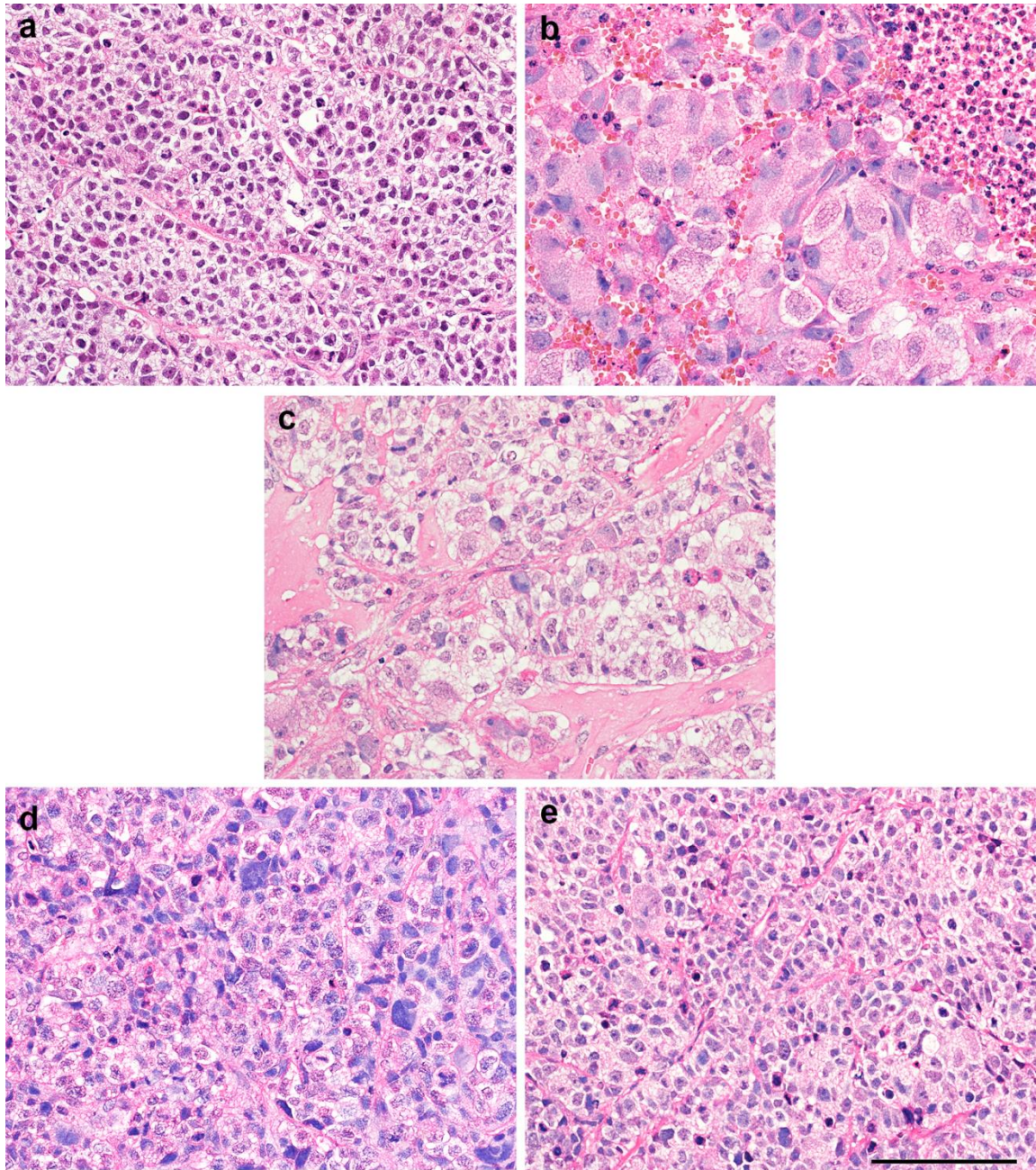


図 4. RIT 後の腫瘍の病理学的解析

(a) 投与 0 日目、(b) 投与 7 日目、(c) 投与 14 日目、  
(d) 投与 21 日目、(e) 投与 28 日目 (対物 40 倍、Scale bar = 100  $\mu$ m)



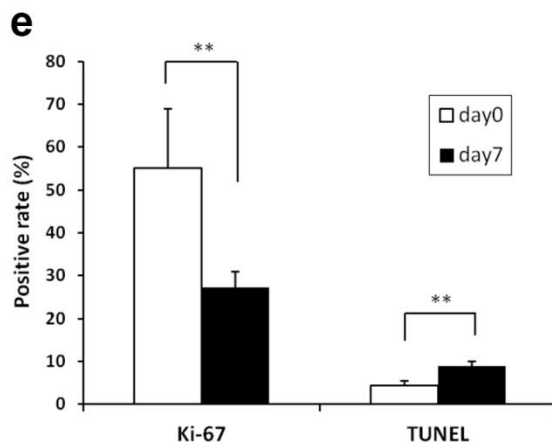
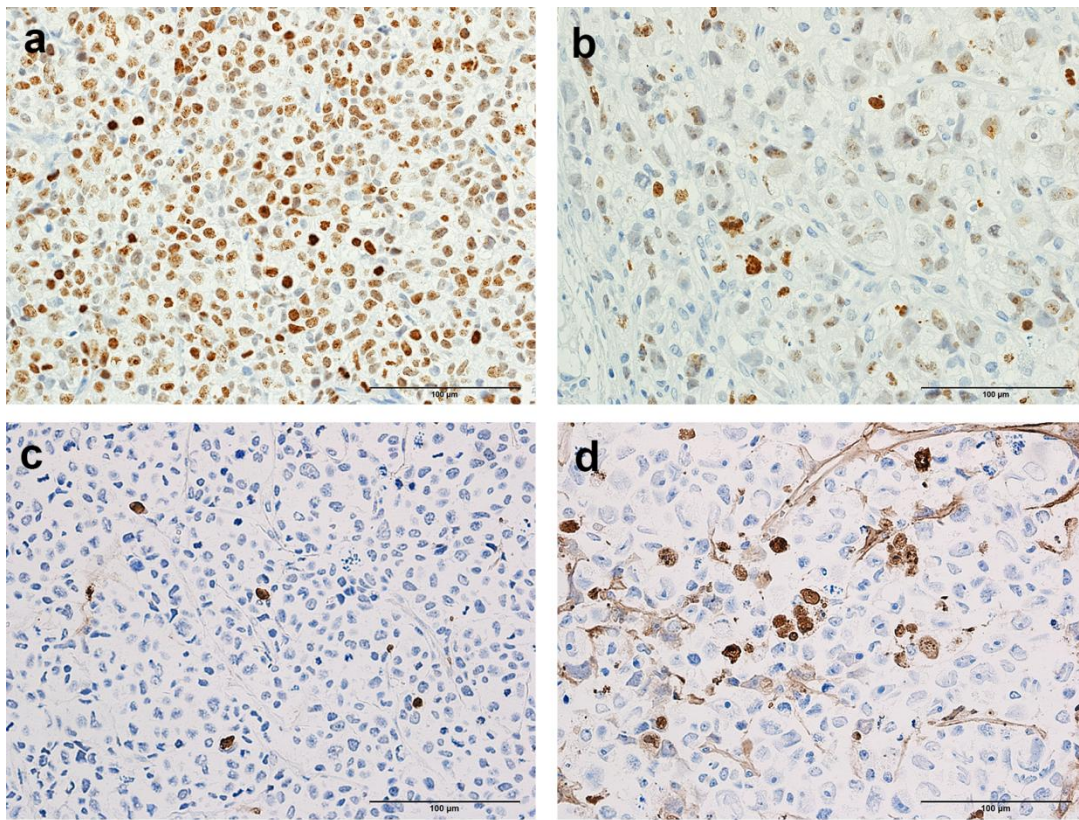


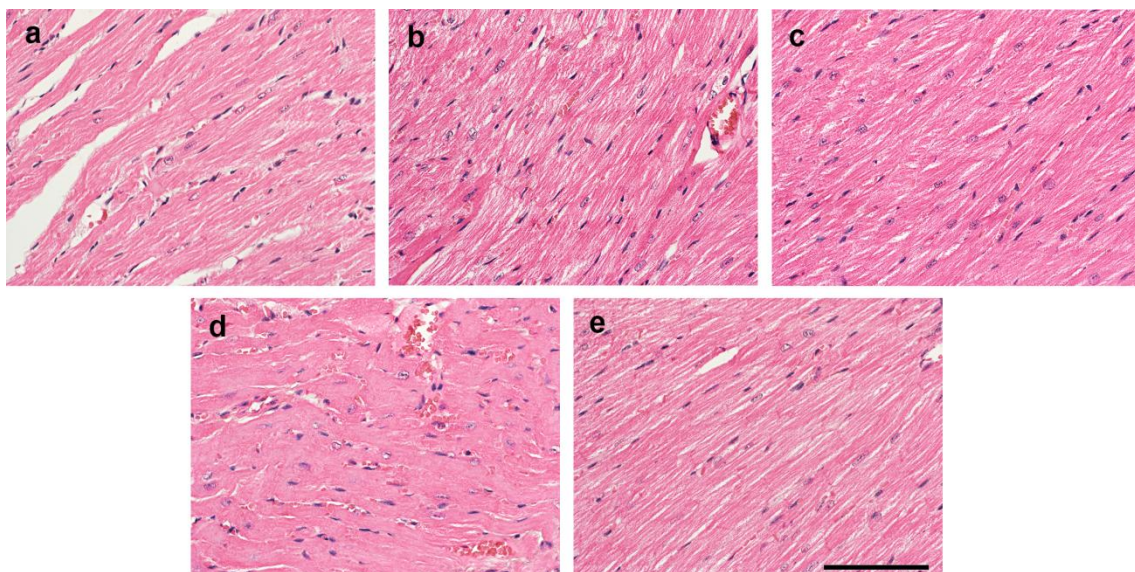
図 5. RIT 後の腫瘍の免疫組織化学および TUNEL 解析

(a) 投与 0 日目の Ki-67 染色像、(b) 投与 7 日目の Ki-67 染色像

(c) 投与 0 日目の TUNEL 像、(d) 投与 7 日目の TUNEL 像

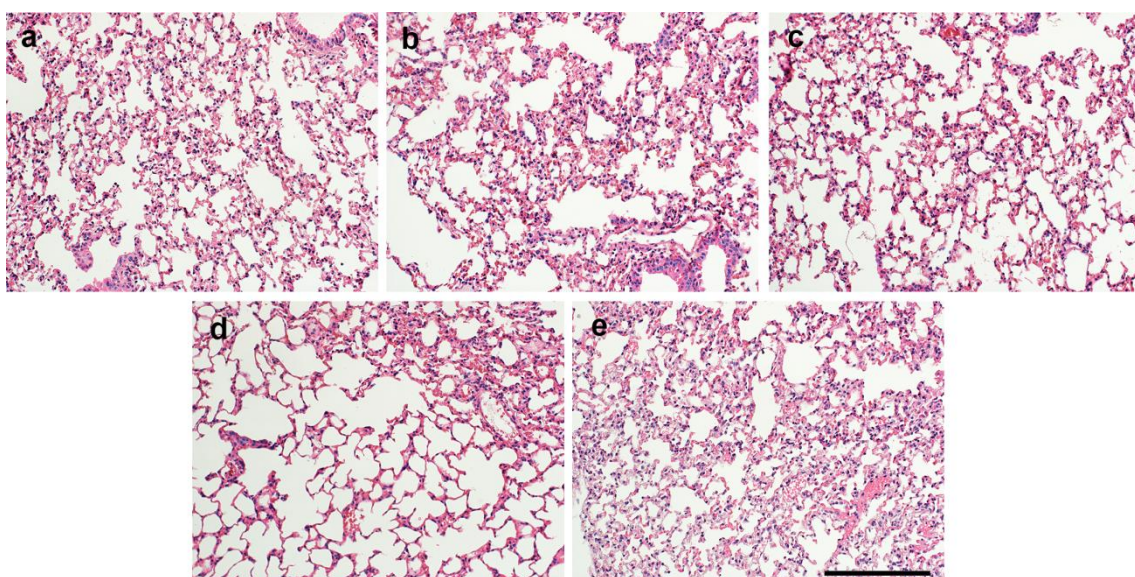
(e) Ki-67 index と TUNEL index (対物 40 倍、Scale bar = 100 μm、\*\* p<0.05)





**図 6. RIT 後のマウス心臓の病理学的解析**

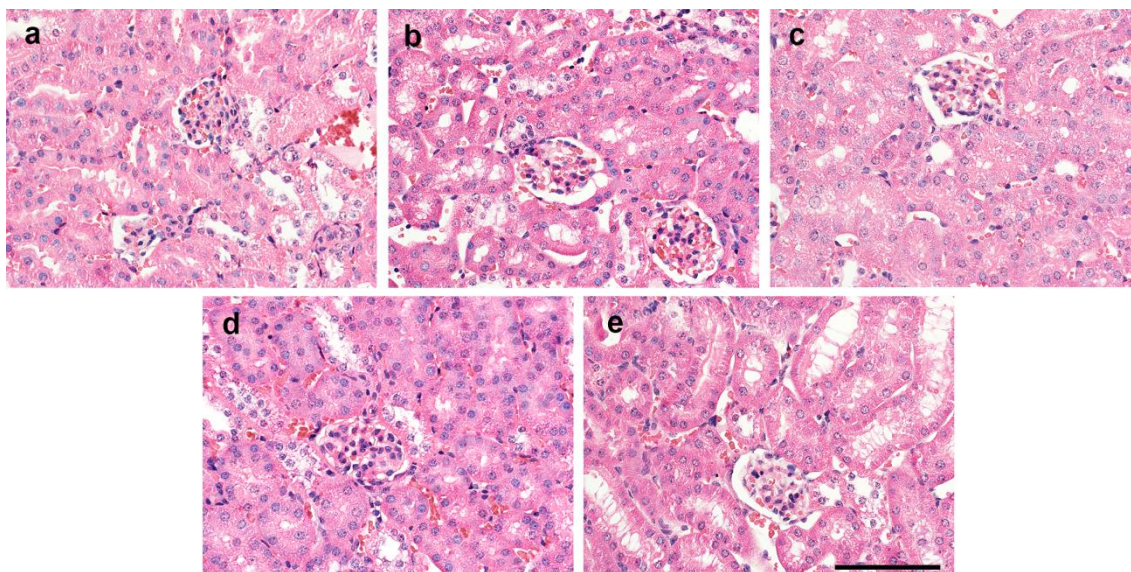
(a) 投与 0 日目、(b) 投与 7 日目、(c) 投与 14 日目、  
(d) 投与 21 日目、(e) 投与 28 日目 (対物 40 倍、Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ )



**図 7. RIT 後のマウス肺の病理学的解析**

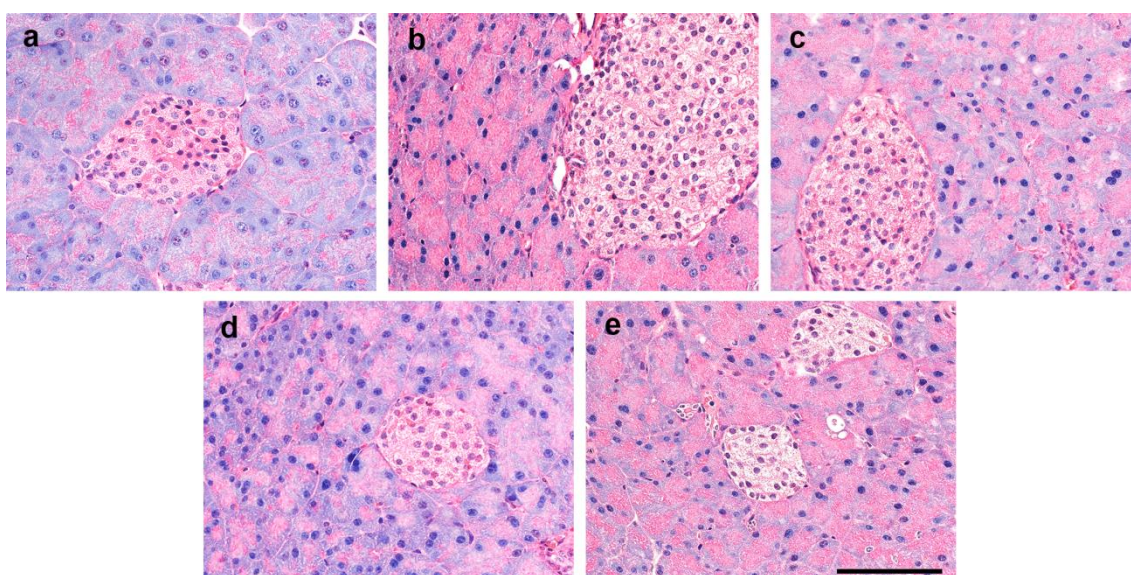
(a) 投与 0 日目、(b) 投与 7 日目、(c) 投与 14 日目、  
(d) 投与 21 日目、(e) 投与 28 日目 (対物 20 倍、Scale bar = 200  $\mu\text{m}$ )





**図 8. RIT 後のマウス腎臓の病理学的解析**

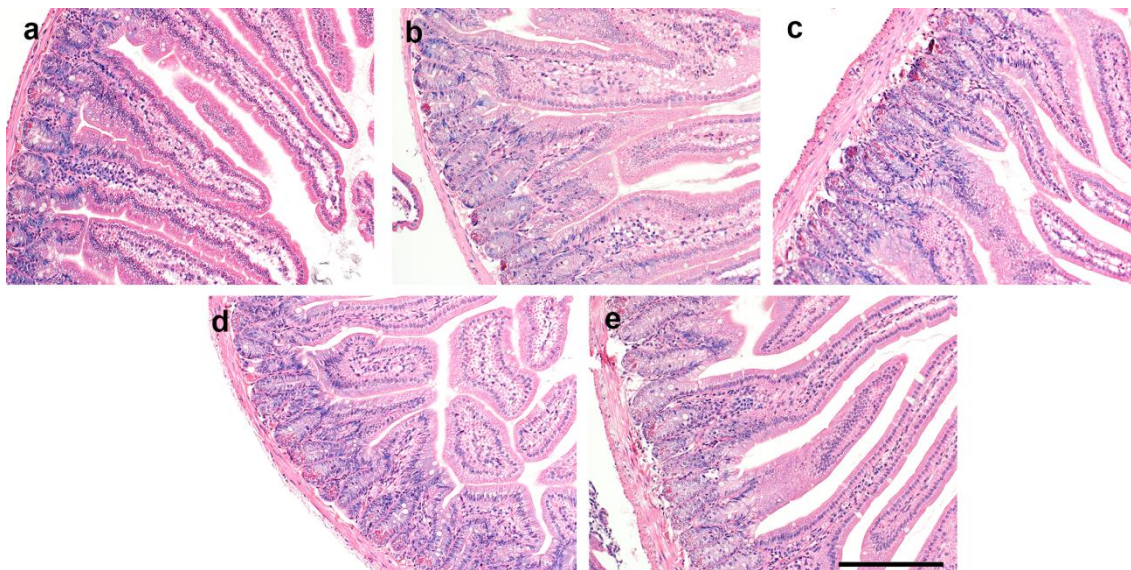
(a) 投与 0 日目、(b) 投与 7 日目、(c) 投与 14 日目、  
 (d) 投与 21 日目、(e) 投与 28 日目 (対物 40 倍、Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ )



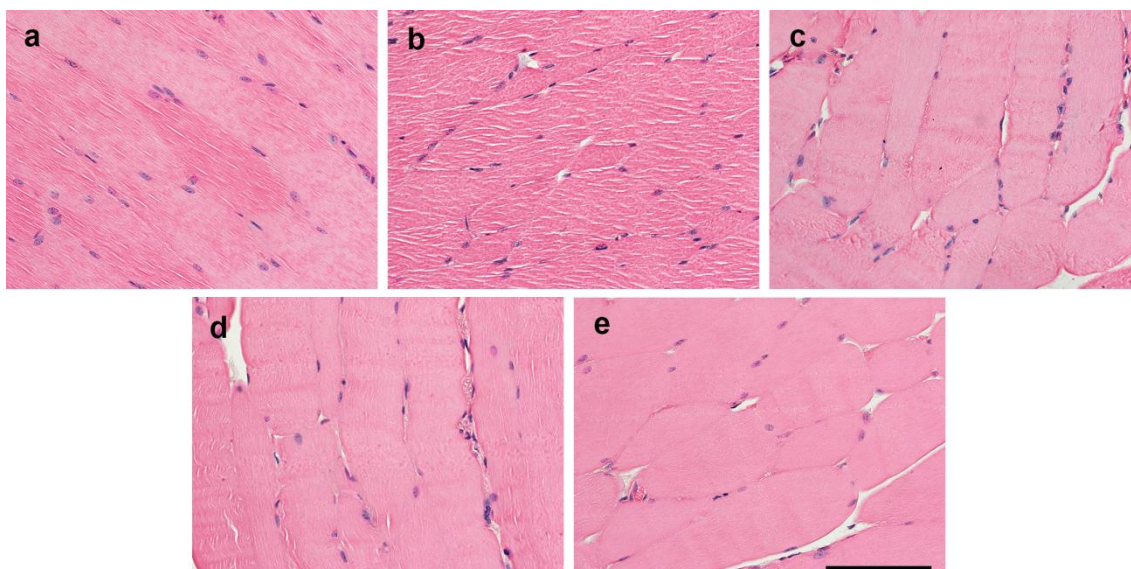
**図 9. RIT 後のマウス脾臓の病理学的解析**

(a) 投与 0 日目、(b) 投与 7 日目、(c) 投与 14 日目、  
 (d) 投与 21 日目、(e) 投与 28 日目 (対物 40 倍、Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ )



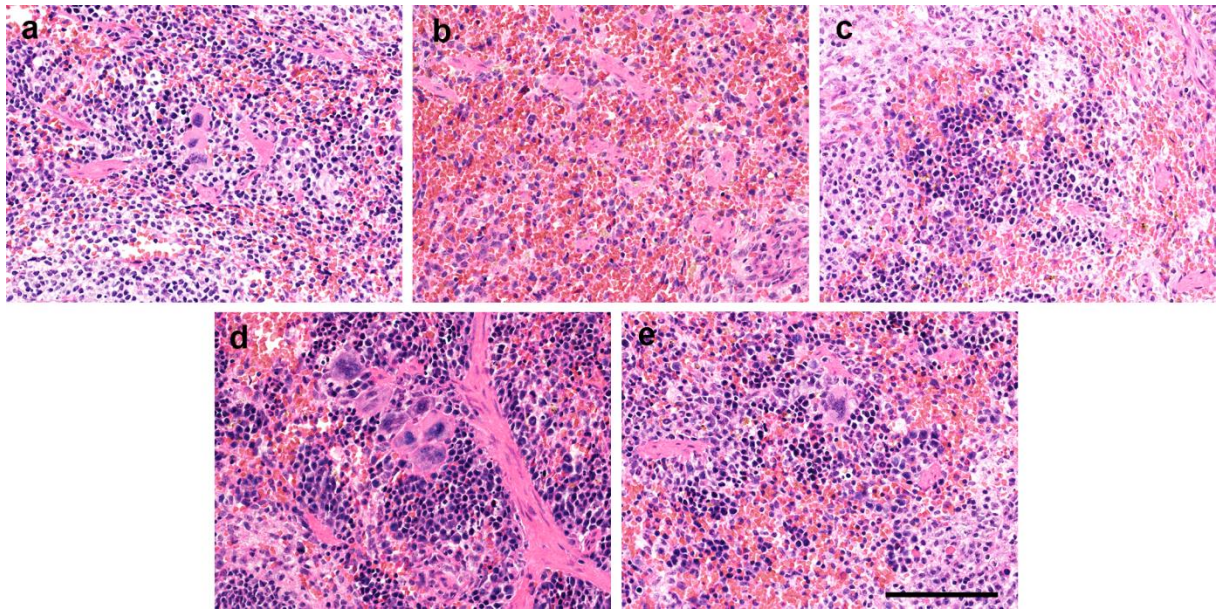


**図 10. RIT 後のマウス腸管の病理学的解析**  
 (a) 投与 0 日目、(b) 投与 7 日目、(c) 投与 14 日目、  
 (d) 投与 21 日目、(e) 投与 28 日目 (対物 20 倍、Scale bar = 200  $\mu\text{m}$ )

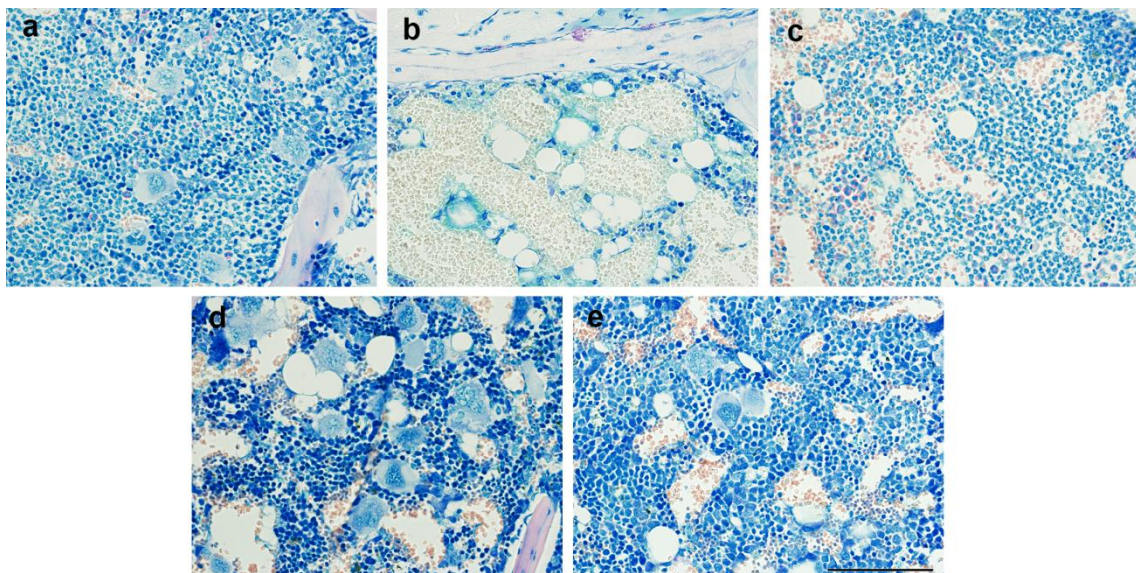


**図 11. RIT 後のマウス筋肉の病理学的解析**  
 (a) 投与 0 日目、(b) 投与 7 日目、(c) 投与 14 日目、  
 (d) 投与 21 日目、(e) 投与 28 日目 (対物 40 倍、Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ )





**図 12. RIT 後のマウス脾臓の病理学的解析**  
 (a) 投与 0 日目、(b) 投与 7 日目、(c) 投与 14 日目、  
 (d) 投与 21 日目、(e) 投与 28 日目 (対物 40 倍、Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ )



**図 13. RIT 後のマウス胸骨の病理学的解析**  
 (a) 投与 0 日目、(b) 投与 7 日目、(c) 投与 14 日目、  
 (d) 投与 21 日目、(e) 投与 28 日目 (対物 40 倍、Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ )



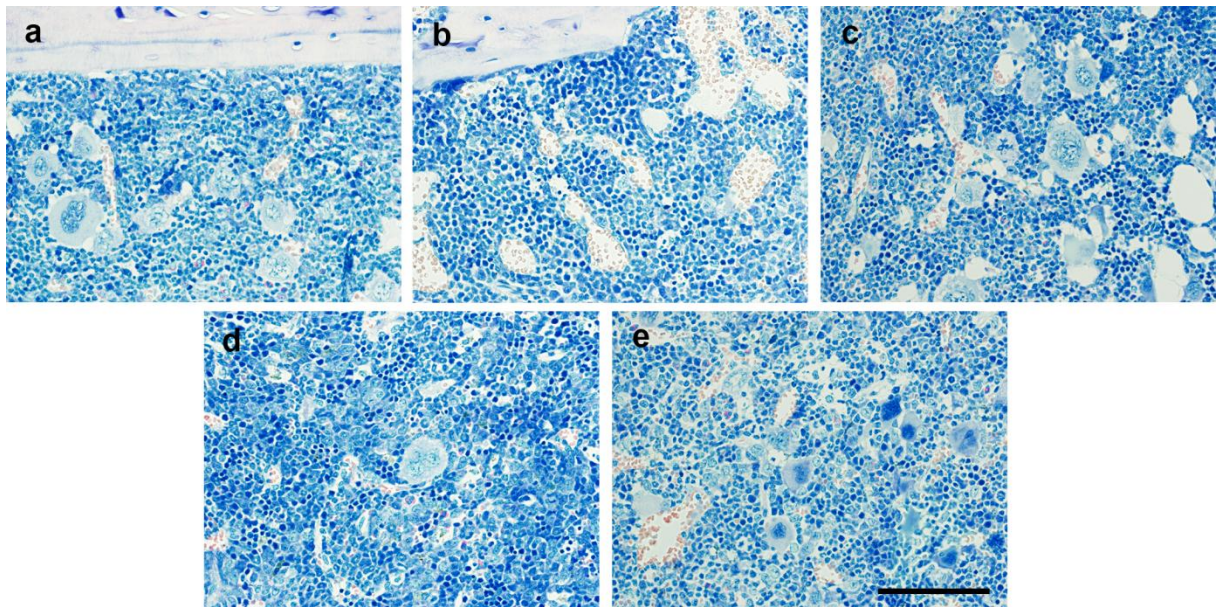


図 14. RIT 後のマウス大腿骨の病理学的解析  
 (a) 投与 0 日目、(b) 投与 7 日目、(c) 投与 14 日目、  
 (d) 投与 21 日目、(e) 投与 28 日目 (対物 40 倍、Scale bar = 100  $\mu$ m)

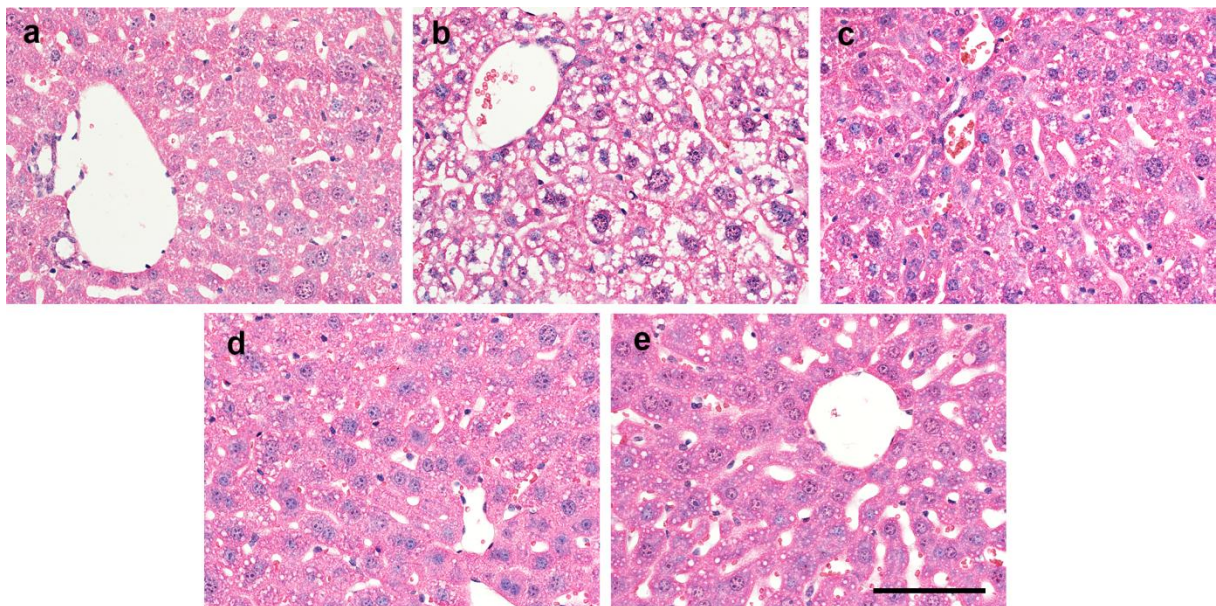


図 15. RIT 後のマウス肝臓の病理学的解析  
 (a) 投与 0 日目、(b) 投与 7 日目、(c) 投与 14 日目、  
 (d) 投与 21 日目、(e) 投与 28 日目 (対物 40 倍、Scale bar = 100  $\mu$ m)

	Day -1	Day 0
生食群	生理食塩水	生理食塩水
シスプラチン単独群	5 mg/kg シスプラチン	生理食塩水
RIT 単独群	生理食塩水	0.18 mCi <sup>90</sup> Y 抗 ROBO1 抗体
3 mg/kg 併用群	3 mg/kg シスプラチン	0.18 mCi <sup>90</sup> Y 抗 ROBO1 抗体
5 mg/kg 併用群	5 mg/kg シスプラチン	0.18 mCi <sup>90</sup> Y 抗 ROBO1 抗体

表 3. 併用実験の投与スケジュール



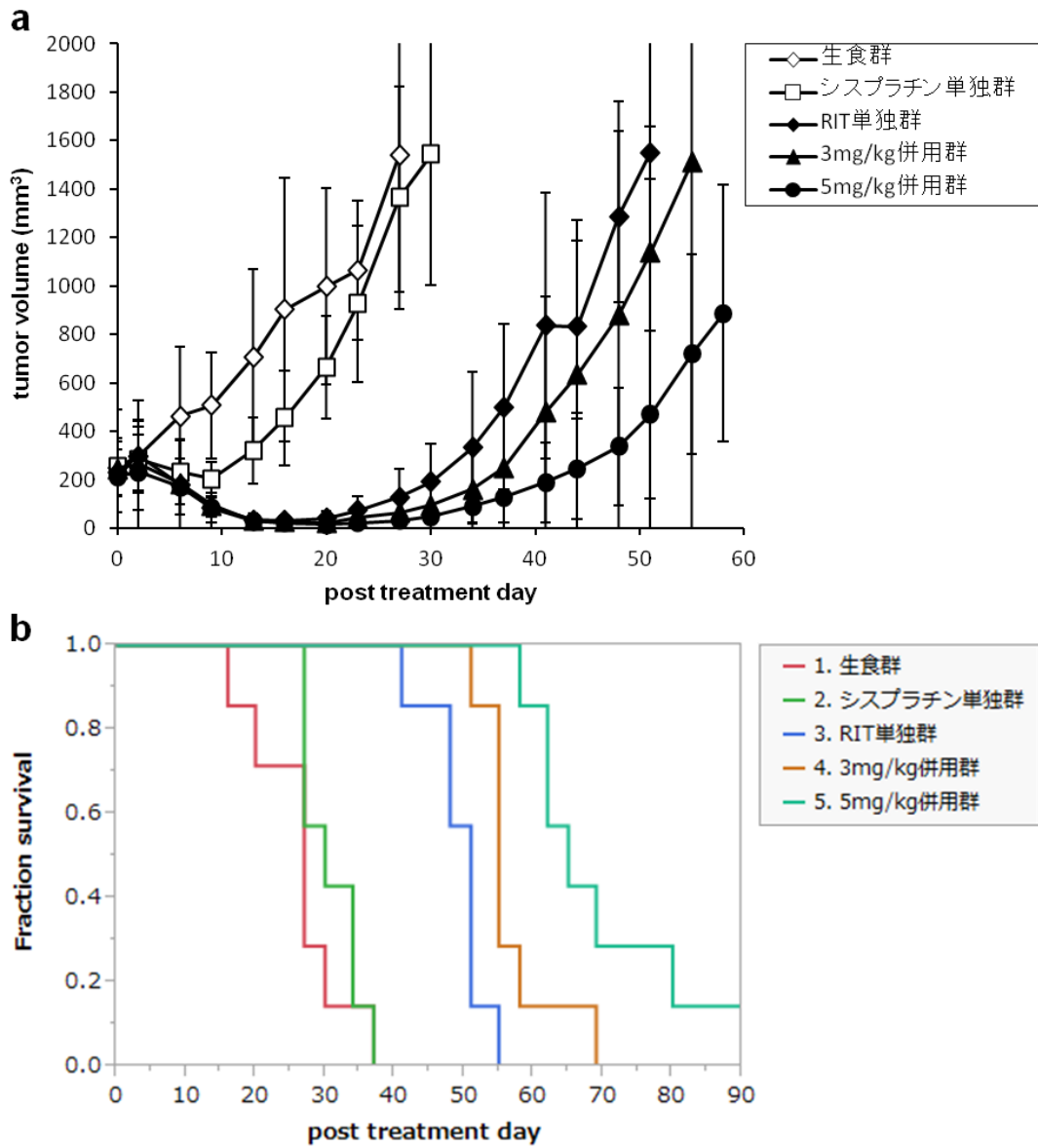


図 16. RIT と化学治療による併用治療後の腫瘍体積の変化と生存時間曲線  
 (a) 腫瘍体積の変化、(b) 生存時間曲線

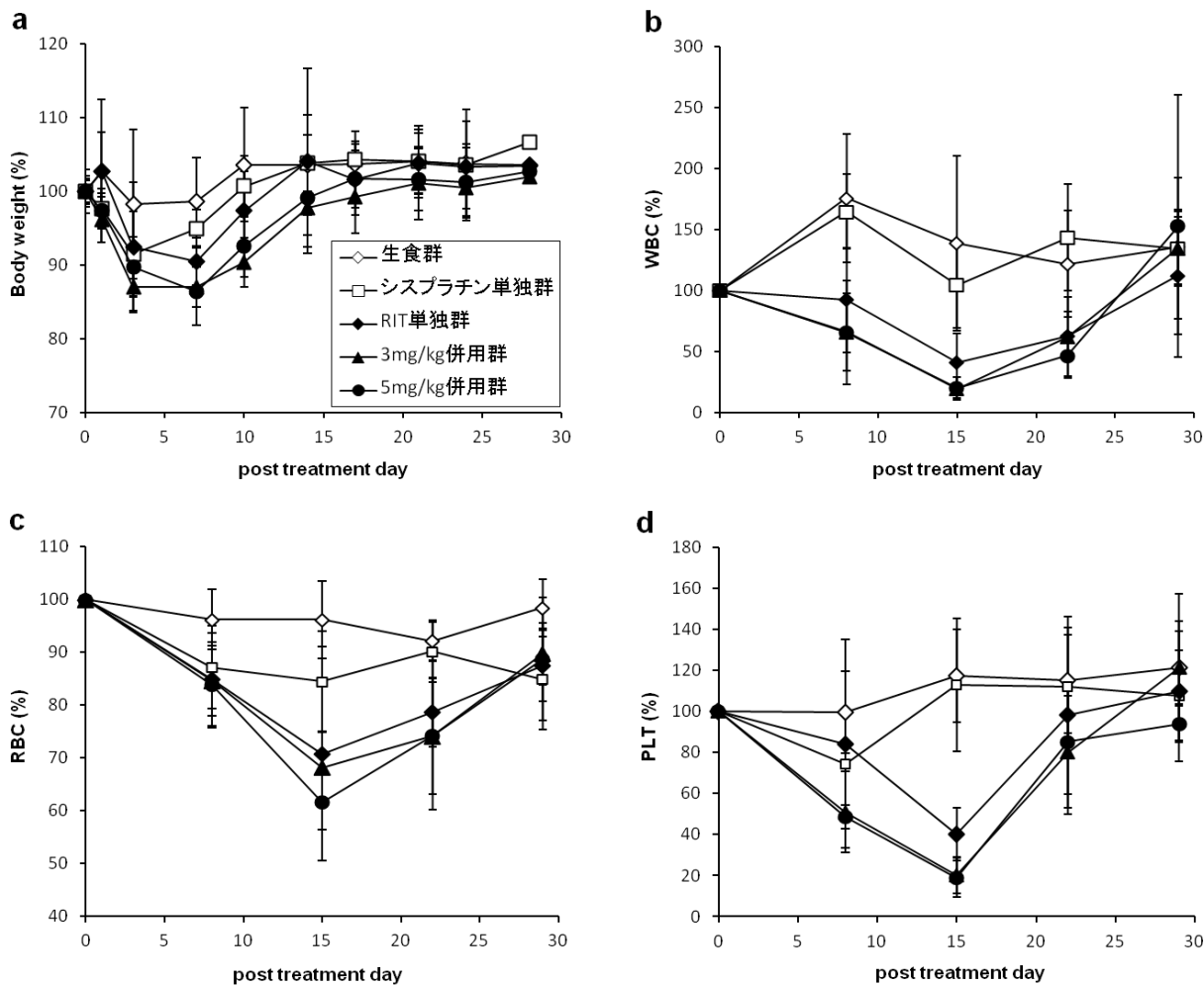


図 17. 併用治療後のマウス体重と血球数の変化

(a) 体重、(b) 白血球 (WBC)、(c) 赤血球 (RBC)、(d) 血小板 (PLT)

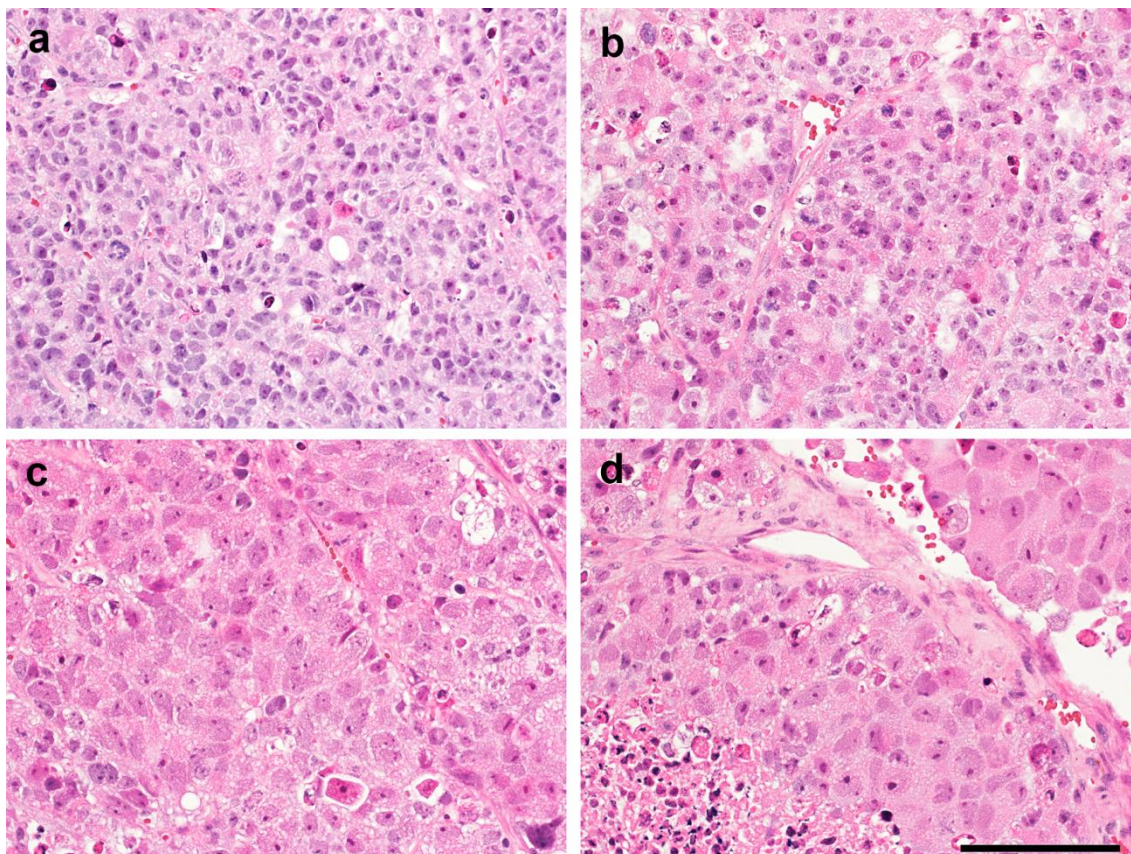


図 18. 治療 7 日目における腫瘍の病理学的解析

(a) 生食群、(b) シスプラチン単独群、(c) RIT 単独群、(d) 5 mg/kg 併用群  
(対物 40 倍、Scale bar = 100  $\mu$ m)

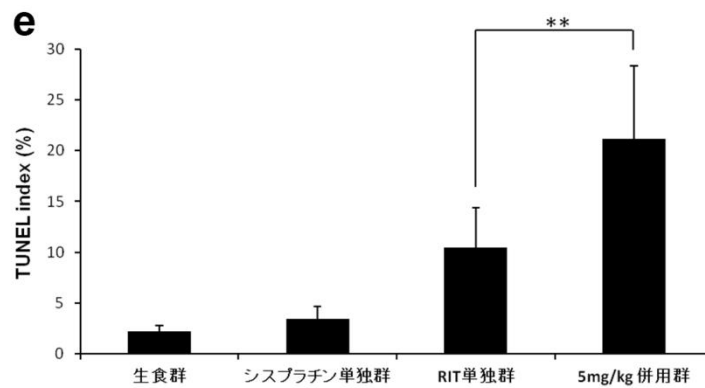
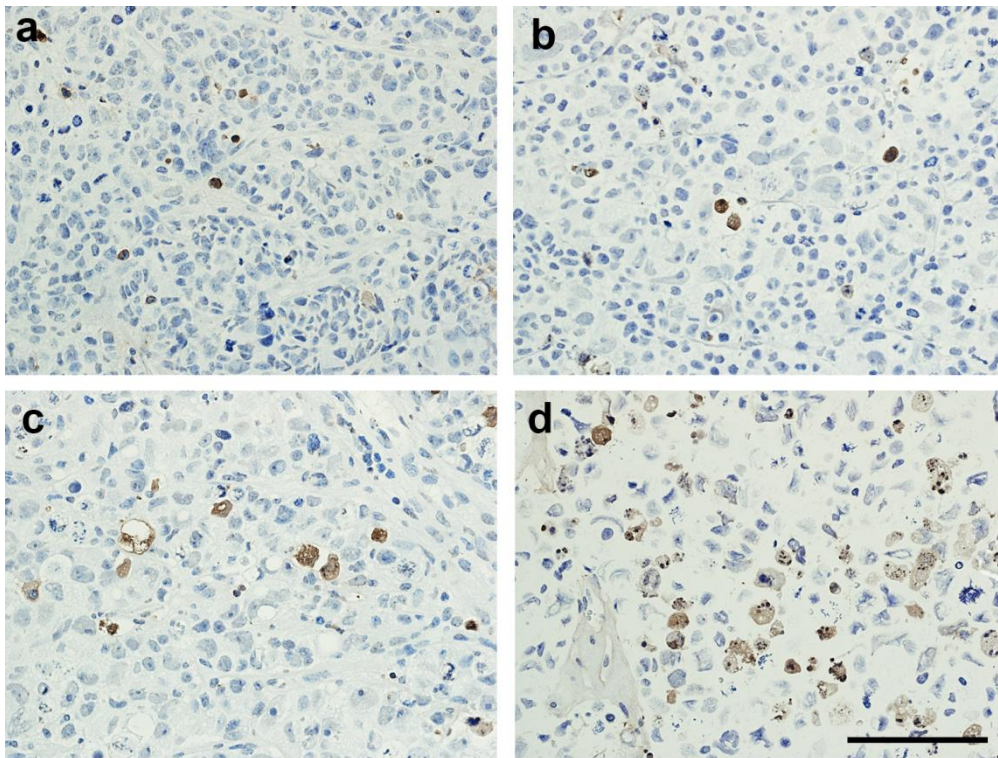


図 19. 治療 7 日目における各治療群の腫瘍の TUNEL 解析  
 (a) 生食群の TUNEL 像、(b) シスプラチン単独群の TUNEL 像  
 (c) RIT 単独群の TUNEL 像、(d) 5 mg/kg 併用群の TUNEL 像  
 (e) TUNEL index ((対物 40 倍、Scale bar = 100  $\mu$ m、\*\*  $p < 0.05$ )



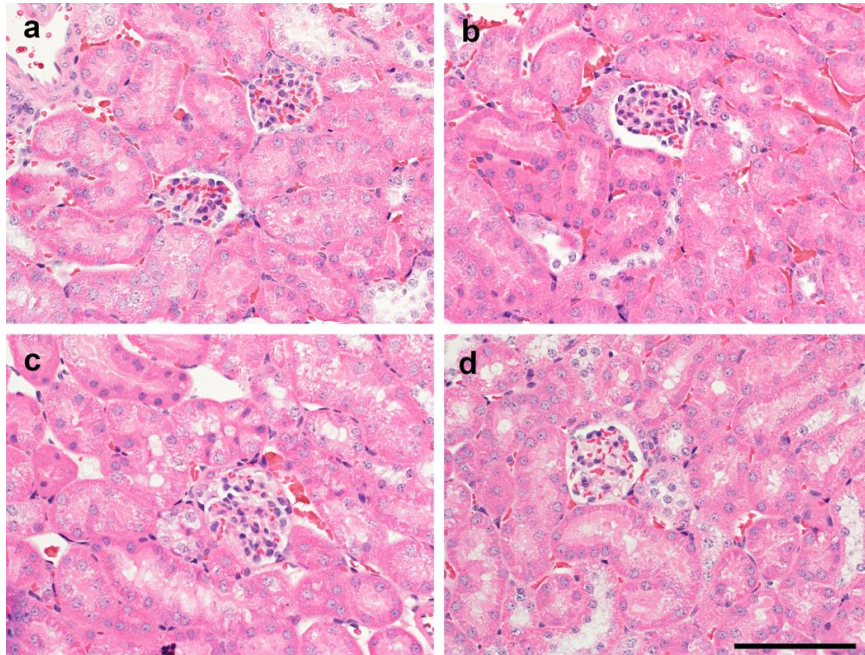


図 20. 併用治療後のマウス腎臓の病理学的解析

(a) 生食群、(b) シスプラチン単独群、(c) RIT 単独群、(d) 5mg/kg 併用群  
(対物 40 倍、Scale bar = 100  $\mu$ m)

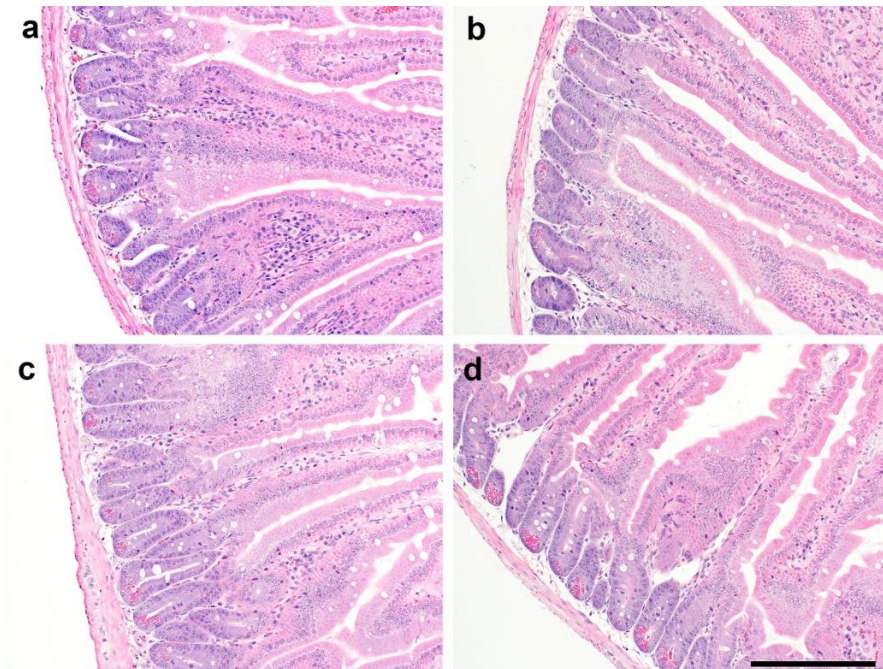


図 21. 併用治療後のマウス腸管の病理学的解析

(a) 生食群、(b) シスプラチン単独群、(c) RIT 単独群、(d) 5 mg/kg 併用群  
(対物 40 倍、Scale bar = 100  $\mu$ m)



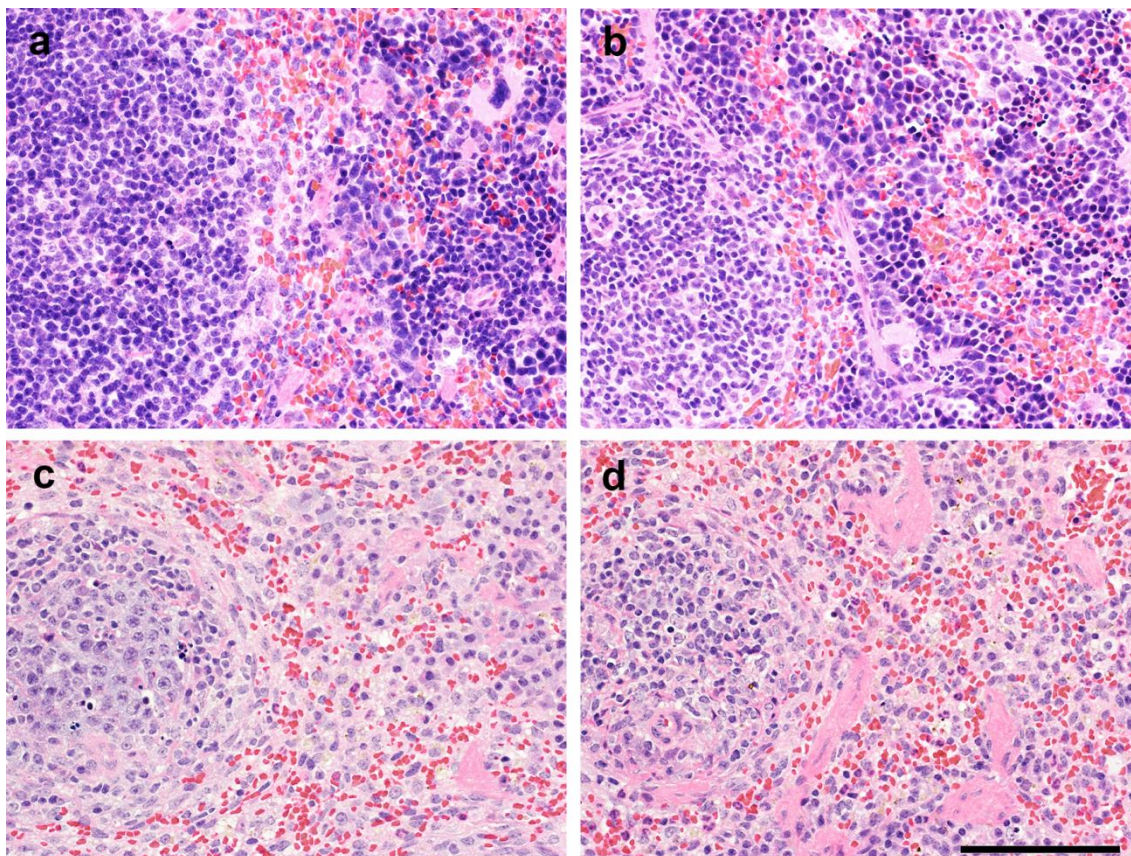


図 22. 併用治療後のマウス脾臓の病理学的解析

(a) 生食群、(b) シスプラチン単独群、(c) RIT 単独群、(d) 5 mg/kg 併用群  
(対物 40 倍、Scale bar = 100  $\mu$ m)



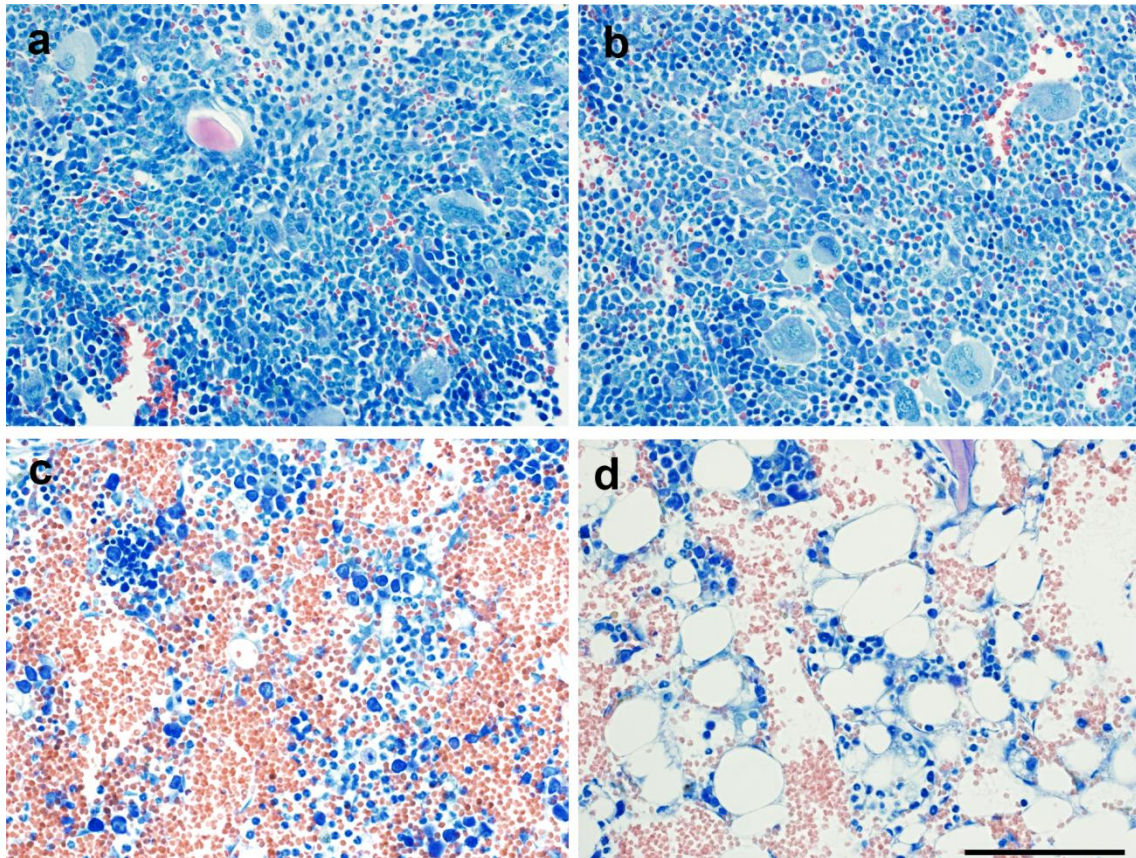


図 23. 併用治療後のマウス胸骨の病理学的解析

(a) 生食群、(b) シスプラチン単独群、(c) RIT 単独群、(d) 5 mg/kg 併用群  
(対物 40 倍、Scale bar = 100  $\mu$ m)



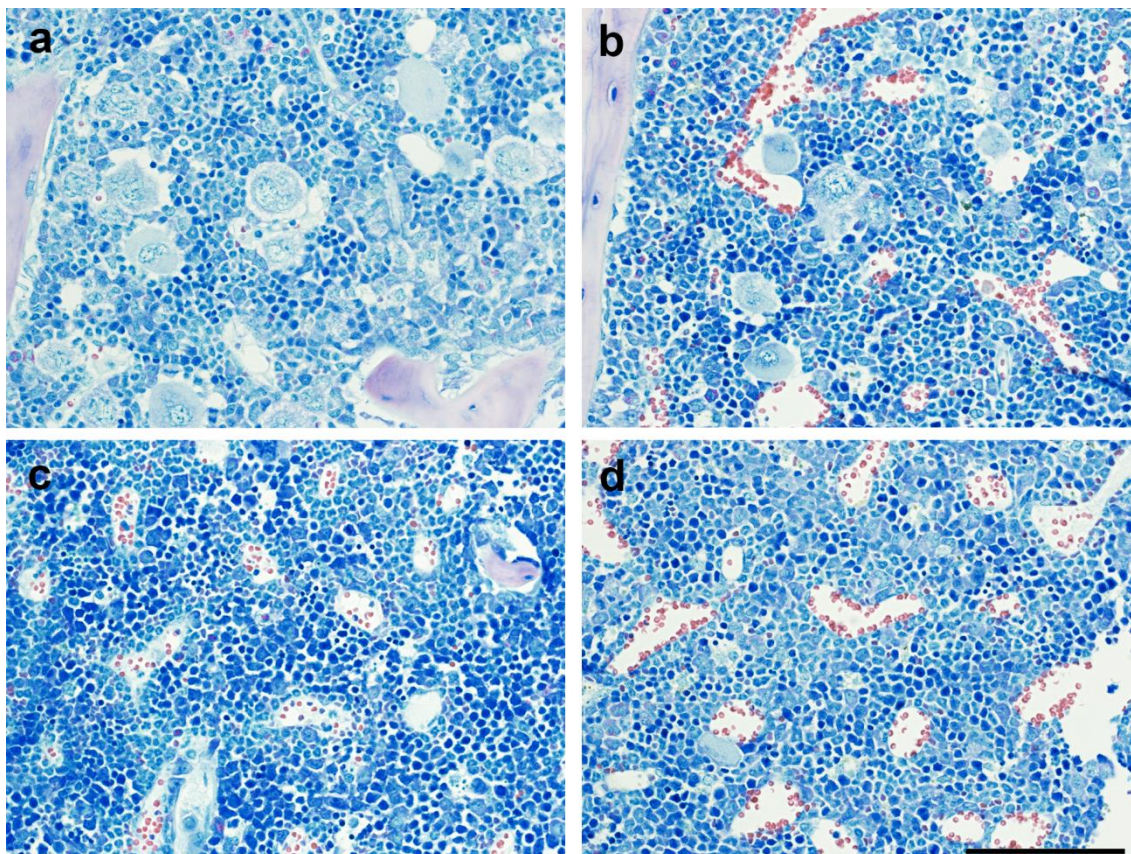


図 24. 併用治療後のマウス大腿骨の病理学的解析

(a) 生食群、(b) シスプラチン単独群、(c) RIT 単独群、(d) 5 mg/kg 併用群  
(対物 40 倍、Scale bar = 100 $\mu$ m)



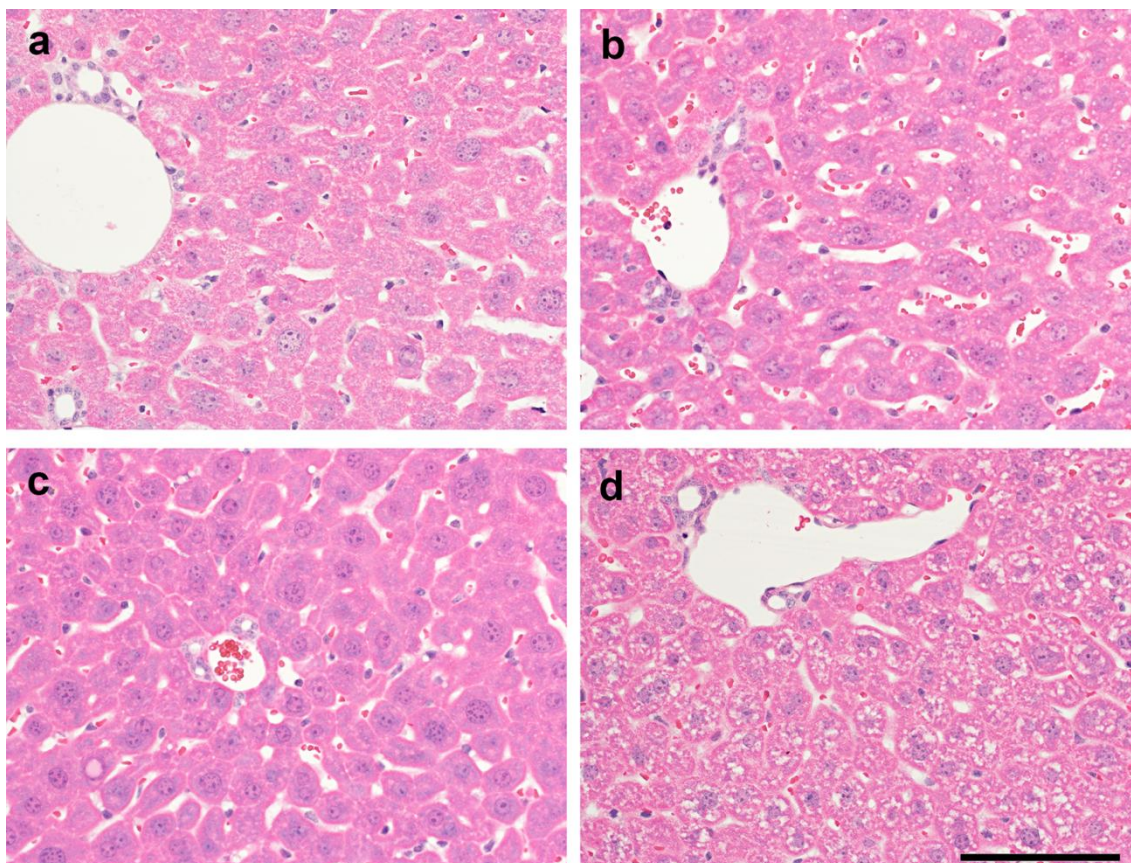


図 25. 併用治療後のマウス肝臓の病理学的解析

(a) 生食群、(b) シスプラチン単独群、(c) RIT 単独群、(d) 5 mg/kg 併用群  
(対物 40 倍、Scale bar = 100 $\mu$ m)

## 引用文献

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM: **Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008.** *Int J Cancer* 2010, **127**:2893-2917.
2. Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE: **Lung cancer: diagnosis and management.** *Am Fam Physician* 2007, **75**:56-63.
3. van Meerbeeck JP, Fennell DA, De Ruyscher DK: **Small-cell lung cancer.** *Lancet* 2011, **378**:1741-1755.
4. Devesa SS, Bray F, Vizcaino AP, Parkin DM: **International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising.** *Int J Cancer* 2005, **117**:294-299.
5. Govindan R, Page N, Morgensztern D, Read W, Tierney R, Vlahiotis A, Spitznagel EL, Piccirillo J: **Changing epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results database.** *J Clin Oncol* 2006, **24**:4539-4544.
6. Kalemkerian GP, Akerley W, Bogner P, Borghaei H, Chow L, Downey RJ, Gandhi L, Ganti AK, Govindan R, Grecula JC, Hayman J, Heist RS, Horn L, Jahan TM, Koczywas M, Moran CA, Niell HB, O'Malley J, Patel JD, Ready N, Rudin CM, Williams CC, Jr.: **Small cell lung cancer.** *J Natl Compr Canc Netw* 2011, **9**:1086-1113.
7. Lassen U, Osterlind K, Hansen M, Dombernowsky P, Bergman B, Hansen HH: **Long-term survival in small-cell lung cancer: posttreatment characteristics in patients surviving 5 to 18+ years--an analysis of 1,714 consecutive patients.** *J Clin Oncol* 1995, **13**:1215-1220.
8. Zhan J, Han Q, Wang K: **Development of antibody therapeutics for small cell lung cancer.** *Expert Opin Investig Drugs* 2013, **22**:235-244.
9. Pujol JL, Carestia L, Daures JP: **Is there a case for cisplatin in the treatment of small-cell lung cancer? A meta-analysis of randomized trials of a cisplatin-containing regimen versus a regimen without this alkylating agent.** *Br J Cancer* 2000, **83**:8-15.
10. Mascaux C, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Lafitte JJ, Lemaitre F, Meert AP, Vermylen P, Sculier JP: **A systematic review of the role of etoposide and cisplatin in the chemotherapy of small cell lung cancer with methodology assessment and meta-analysis.** *Lung Cancer* 2000, **30**:23-36.

11. Lucchi M, Mussi A, Fontanini G, Faviana P, Ribechini A, Angeletti CA: **Small cell lung carcinoma (SCLC): the angiogenic phenomenon.** *Eur J Cardiothorac Surg* 2002, **21**:1105-1110.
12. Zhan P, Wang J, Lv XJ, Wang Q, Qiu LX, Lin XQ, Yu LK, Song Y: **Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in patients with lung cancer: a systematic review with meta-analysis.** *J Thorac Oncol* 2009, **4**:1094-1103.
13. Ferrara N, Kerbel RS: **Angiogenesis as a therapeutic target.** *Nature* 2005, **438**:967-974.
14. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W: **Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer.** *Nat Rev Drug Discov* 2004, **3**:391-400.
15. Patton J, Spigel D, Greco F, Liggett W, Zubkus J, Baskette M, Schreeder M, Woytowicz D, Nelson E, Hainsworth J: **Irinotecan (I), carboplatin (C), and radiotherapy (RT) followed by maintenance bevacizumab (B) in the treatment (tx) of limited-stage small cell lung cancer (LS-SCLC): Update of a phase II trial of the Minnie Pearl Cancer Research Network.** *ASCO Meeting Abstracts* 2006, 7085.
16. Grunnet M, Sorensen JB: **Carcinoembryonic antigen (CEA) as tumor marker in lung cancer.** *Lung Cancer* 2012, **76**:138-143.
17. Sharkey RM, Goldenberg DM: **Perspectives on cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibodies.** *J Nucl Med* 2005, **46 Suppl 1**: 115S-127S.
18. Goldenberg DM: **Monoclonal antibodies in cancer detection and therapy.** *Am J Med* 1993, **94**:297-312.
19. Milenic DE, Brady ED, Brechbiel MW: **Antibody-targeted radiation cancer therapy.** *Nat Rev Drug Discov* 2004, **3**:488-499.
20. White CA: **Radioimmunotherapy in non-Hodgkin's lymphoma: focus on 90Y-ibritumomab tiuxetan (Zevalin).** *J Exp Ther Oncol* 2004, **4**:305-316.
21. Yoshida C, Tsuji AB, Sudo H, Sugyo A, Kikuchi T, Koizumi M, Arano Y, Saga T: **Therapeutic efficacy of c-kit-targeted radioimmunotherapy using 90Y-labeled anti-c-kit antibodies in a mouse model of small cell lung cancer.** *PLoS One* 2013, **8**:e59248.
22. Zhan J, Han Q, Wang K: **Development of antibody therapeutics for small cell lung cancer.** *Expert Opin Investig Drugs* 2013, **22(2)**:235-44.
23. Fink-Bennett DM, Thomas K: **90Y-ibritumomab tiuxetan in the treatment of relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma.** *J Nucl Med*

- Technol* 2003, **31**:61-68.
24. Friedberg JW, Fisher RI: **Iodine-131 tositumomab (Bexxar): radioimmunoconjugate therapy for indolent and transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma.** *Expert Rev Anticancer Ther* 2004, **4**:18-26.
  25. Wong JY, Chu DZ, Williams LE, Liu A, Zhan J, Yamauchi DM, Wilczynski S, Wu AM, Yazaki PJ, Shively JE, Leong L, Raubitschek AA: **A phase I trial of (90)Y-DOTA-anti-CEA chimeric T84.66 (cT84.66) radioimmunotherapy in patients with metastatic CEA-producing malignancies.** *Cancer Biother Radiopharm* 2006, **21**:88-100.
  26. Yoshioka H, Yamamoto S, Hanaoka H, Iida Y, Paudyal P, Higuchi T, Tominaga H, Oriuchi N, Nakagawa H, Shiba Y, Yoshida K, Osawa R, Katagiri T, Tsunoda T, Nakamura Y, Endo K: **In vivo therapeutic effect of CDH3/P-cadherin-targeting radioimmunotherapy.** *Cancer Immunol Immunother* 2012, **61**:1211-1220.
  27. Veeravagu A, Liu Z, Niu G, Chen K, Jia B, Cai W, Jin C, Hsu AR, Connolly AJ, Tse V, Wang F, Chen X: **Integrin alphavbeta3-targeted radioimmunotherapy of glioblastoma multiforme.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**:7330-7339.
  28. Liu Z, Liu Y, Jia B, Zhao H, Jin X, Li F, Chen X, Wang F: **Epidermal growth factor receptor-targeted radioimmunotherapy of human head and neck cancer xenografts using 90Y-labeled fully human antibody panitumumab.** *Mol Cancer Ther* 2010, **9**:2297-2308.
  29. Onthank DC, Liu S, Silva PJ, Barrett JA, Harris TD, Robinson SP, Edwards DS: **90Y and 111In complexes of a DOTA-conjugated integrin alpha v beta 3 receptor antagonist: different but biologically equivalent.** *Bioconjug Chem* 2004, **15**:235-241.
  30. Seeger M, Tear G, Ferres-Marco D, Goodman CS: **Mutations affecting growth cone guidance in Drosophila: genes necessary for guidance toward or away from the midline.** *Neuron* 1993, **10**:409-426.
  31. Kidd T, Brose K, Mitchell KJ, Fetter RD, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Tear G: **Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors.** *Cell* 1998, **92**:205-215.
  32. Wang B, Xiao Y, Ding BB, Zhang N, Yuan X, Gui L, Qian KX, Duan S, Chen Z, Rao Y, Geng JG: **Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity.** *Cancer Cell* 2003, **4**:19-29.

33. Mertsch S, Schmitz N, Jeibmann A, Geng JG, Paulus W, Senner V: **Slit2 involvement in glioma cell migration is mediated by Robo1 receptor.** *J Neurooncol* 2008, **87**:1-7.
34. Xu Y, Li WL, Fu L, Gu F, Ma YJ: **Slit2/Robo1 signaling in glioma migration and invasion.** *Neurosci Bull* 2010, **26**:474-478.
35. Dallol A, Forgacs E, Martinez A, Sekido Y, Walker R, Kishida T, Rabbitts P, Maher ER, Minna JD, Latif F: **Tumour specific promoter region methylation of the human homologue of the Drosophila Roundabout gene DUTT1 (ROBO1) in human cancers.** *Oncogene* 2002, **21**:3020-3028.
36. Ito H, Funahashi S, Yamauchi N, Shibahara J, Midorikawa Y, Kawai S, Kinoshita Y, Watanabe A, Hippo Y, Ohtomo T, Iwanari H, Nakajima A, Makuuchi M, Fukayama M, Hirata Y, Hamakubo T, Kodama T, Tsuchiya M, Aburatani H: **Identification of ROBO1 as a novel hepatocellular carcinoma antigen and a potential therapeutic and diagnostic target.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**:3257-3264.
37. Grone J, Doeblner O, Loddenkemper C, Hotz B, Buhr HJ, Bhargava S: **Robo1/Robo4: differential expression of angiogenic markers in colorectal cancer.** *Oncol Rep* 2006, **15**:1437-1443.
38. Fujiwara K, Koyama K, Suga K, Ikemura M, Saito Y, Hino A, Iwanari H, Kusano-Arai O, Mitsui K, Kasahara H, Fukayama M, Kodama T, Hamakubo T, Momose T: **A 90Y-labelled anti-ROBO1 monoclonal antibody exhibits antitumour activity against hepatocellular carcinoma xenografts during ROBO1-targeted radioimmunotherapy.** *EJNMMI Research* 2014, **4**:29.
39. Xian J, Aitchison A, Bobrow L, Corbett G, Pannell R, Rabbitts T, Rabbitts P: **Targeted disruption of the 3p12 gene, Dutt1/Robo1, predisposes mice to lung adenocarcinomas and lymphomas with methylation of the gene promoter.** *Cancer Res* 2004, **64**:6432-6437.
40. 田中良明 吉: **癌・治療効果判定の画像診断.** 2005.
41. Al-Ejeh F, Darby JM, Brown MP: **Chemotherapy synergizes with radioimmunotherapy targeting La autoantigen in tumors.** *PLoS One* 2009, **4**:e4630.
42. Forner A, Llovet JM, Bruix J: **Hepatocellular carcinoma.** *Lancet* 2012, **379**:1245-1255.
43. Lobo ED, Hansen RJ, Balthasar JP: **Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics.** *J Pharm Sci* 2004, **93**:2645-2668.

44. Takai T: **Roles of Fc receptors in autoimmunity.** *Nat Rev Immunol* 2002, **2**:580-592.
45. 古山桂太郎: **RI 標識化癌特異的抗体を用いた腫瘍イメージングおよび放射免疫療法に関する研究.** *Book RI 標識化癌特異的抗体を用いた腫瘍イメージングおよび放射免疫療法に関する研究*, 2012.
46. Esteban JM, Schlom J, Mornex F, Colcher D: **Radioimmunotherapy of athymic mice bearing human colon carcinomas with monoclonal.** *Eur J Cancer Clin Oncol* 1987, **23**:643-655.
47. Esteban JM, Hyams DM, Beatty BG, Merchant B, Beatty JD: **Radioimmunotherapy of human colon carcinomatosis xenograft with 90Y-ZCE025.** *Cancer Res* 1990, **50**:989s-992s.
48. Heylmann D, Rodel F, Kindler T, Kaina B: **Radiation sensitivity of human and murine peripheral blood lymphocytes, stem and progenitor cells.** *Biochim Biophys Acta* 2014, **1846**:121-129.
49. Takahashi K, Monzen S, Hayashi N, Kashiwakura I: **Correlations of cell surface antigens with individual differences in radiosensitivity in human hematopoietic stem/progenitor cells.** *Radiat Res* 2010, **173**:184-190.
50. Kashiwakura I, Kuwabara M, Inanami O, Murakami M, Hayase Y, Takahashi TA, Takagi Y: **Radiation Sensitivity of Megakaryocyte Colony-Forming Cells in Human Placental and Umbilical Cord Blood.** *Radiat Res* 2000, **153**:144-152.
51. Murray JL, Macey DJ, Grant EJ, Rosenblum MG, Kasi LP, Zhang HZ, Katz RL, Riger PT, LeBherz D, Bhadkamkar V, et al.: **Enhanced TAG-72 expression and tumor uptake of radiolabeled monoclonal antibody CC49 in metastatic breast cancer patients following alpha-interferon treatment.** *Cancer Res* 1995, **55**:5925s-5928s.
52. Meredith RF, Khazaeli MB, Plott WE, Grizzle WE, Liu T, Schlom J, Russell CD, Wheeler RH, LoBuglio AF: **Phase II study of dual 131I-labeled monoclonal antibody therapy with interferon in patients with metastatic colorectal cancer.** *Clin Cancer Res* 1996, **2**:1811-1818.
53. Caffo O: **Radiosensitization with chemotherapeutic agents.** *Lung Cancer* 2001, **34 Suppl 4**:S81-90.
54. Zheng Y, Hunting DJ, Ayotte P, Sanche L: **Role of Secondary Low-Energy Electrons in the Concomitant Chemoradiation Therapy of Cancer.** *Phys Rev Lett* 2008, **100**:198101.
55. Rowinsky EK, Donehower RC: **Paclitaxel (taxol).** *N Engl J Med* 1995, **332**:1004-1014.

56. Li L, Story M, Legerski RJ: **Cellular responses to ionizing radiation damage.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001, **49**:1157-1162.
57. Schreiber V, Hunting D, Trucco C, Gowans B, Grunwald D, De Murcia G, De Murcia JM: **A dominant-negative mutant of human poly(ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis, and sister chromatid exchange following DNA damage.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**:4753-4757.
58. de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, Masson M, Dierich A, LeMeur M, Walztinger C, Chambon P, de Murcia G: **Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:7303-7307.
59. Wang Y, Sun H, Wang Z, Liu M, Qi Z, Meng J, Sun J, Yang G: **Aurora-A: a potential DNA repair modulator.** *Tumour Biol* 2014, **35**:2831-2836.
60. Staudacher AH, Al-Ejeh F, Fraser CK, Darby JM, Roder DM, Ruszkiewicz A, Manavis J, Brown MP: **The La antigen is over-expressed in lung cancer and is a selective dead cancer cell target for radioimmunotherapy using the La-specific antibody APOMAB(R).** *EJNMMI Res* 2014, **4**:2.
61. 飯田博美: *放射線概論*. 通商産業研究社; 1989.
62. Peitzsch C, Perrin R, Hill RP, Dubrovskaja A, Kurth I: **Hypoxia as a biomarker for radioresistant cancer stem cells.** *Int J Radiat Biol* 2014, **90**:636-652.
63. Kinuya S, Yokoyama K, Konishi S, Li XF, Watanabe N, Shuke N, Takayama T, Bunko H, Michigishi T, Tonami N: **Improved response of colon cancer xenografts to radioimmunotherapy with pentoxifylline treatment.** *Eur J Nucl Med* 2001, **28**:750-755.
64. Murray N, Turrisi AT, 3rd: **A review of first-line treatment for small-cell lung cancer.** *J Thorac Oncol* 2006, **1**:270-278.
65. Adams GP, Shaller CC, Dadachova E, Simmons HH, Horak EM, Tesfaye A, Klein-Szanto AJ, Marks JD, Brechbiel MW, Weiner LM: **A single treatment of yttrium-90-labeled CHX-A"-C6.5 diabody inhibits the growth of established human tumor xenografts in immunodeficient mice.** *Cancer Res* 2004, **64**:6200-6206.
66. 進展型小細胞肺癌 1 次治療  
[<https://www.haigan.gr.jp/uploads/photos/874.pdf>]
67. Albert JM, Cao C, Kim KW, Willey CD, Geng L, Xiao D, Wang H, Sandler A, Johnson DH, Colevas AD, Low J, Rothenberg ML, Lu B: **Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase enhances cell death and improves tumor**

- growth delay in irradiated lung cancer models. *Clin Cancer Res* 2007, **13**:3033-3042.
68. Enomoto A, Fukasawa T, Takamatsu N, Ito M, Morita A, Hosoi Y, Miyagawa K: **The HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin modulates radiosensitivity by downregulating serine/threonine kinase 38 via Sp1 inhibition.** *Eur J Cancer* 2013, **49**:3547-3558.
  69. Scott AM: **Radioimmunotherapy of prostate cancer: does tumor size matter?** *J Clin Oncol* 2005, **23**:4567-4569.
  70. Brans B, Mottaghy FM, Kessels A: **90Y/177Lu-DOTATATE therapy: survival of the fittest?** *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011, **38**:1785-1787.
  71. Kunikowska J, Krolicki L, Hubalewska-Dydejczyk A, Mikolajczak R, Sowa-Staszczak A, Pawlak D: **Clinical results of radionuclide therapy of neuroendocrine tumours with 90Y-DOTATATE and tandem 90Y/177Lu-DOTATATE: which is a better therapy option?** *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011, **38**:1788-1797.
  72. Ashton CE, Jeans SP, Valle JW: **Combination therapy of 177Lu and 90Y Dotatate for treatment of neuroendocrine cancer.** *Nucl Med Commun* 2014, **35**:585-587.
  73. de Jong M, Breeman WA, Valkema R, Bernard BF, Krenning EP: **Combination radionuclide therapy using 177Lu- and 90Y-labeled somatostatin analogs.** *J Nucl Med* 2005, **46 Suppl 1**:13s-17s.
  74. Seregni E, Maccauro M, Coliva A, Castellani MR, Bajetta E, Aliberti G, Vellani C, Chiesa C, Martinetti A, Bogni A, Bombardieri E: **Treatment with tandem [(90)Y]DOTA-TATE and [(177)Lu] DOTA-TATE of neuroendocrine tumors refractory to conventional therapy: preliminary results.** *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2010, **54**:84-91.



## 謝辞

常に暖かいご指導をいただきました東京大学大学院医学系研究科生体物理医学専攻放射線医学講座核医学百瀬敏光准教授に心より感謝致します。また、お忙しい中、私の学位審査をしていただきました主査の宮川清教授、副査の高戸毅教授、門野岳史准教授、高尾英正講師、榎本敦講師に深謝致します。生体物理医学専攻大友邦教授、高橋美和子病院講師、古山桂太郎特任助教、病因・病理学専攻深山正久教授、池村雅子特任講師、東京大学先端科学技術研究センター浜窪隆雄教授、児玉龍彦教授、岩成宏子特任准教授、三井健一氏、新井修氏、熊倉嘉貴元助教、三協ラボサービス株式会社菅康佑氏、富士フイルム RI ファーマ株式会社日野明弘氏、笠原裕之氏、齋藤泰孝氏、本研究を進めるにあたり、ご指導ご助言をいただきました方々に、厚くお礼申しあげます。実験施設の使用について、東京大学アイソトープ総合センター、東京大学医学部附属病院 RI 中央研究室に感謝致します。最後に、いつも応援してくれる父、母、祖父、祖母に心から感謝致します。