HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	小児がんに対する光免疫療法の有用性について［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	趙, 継美
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15930号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91761
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Jimei_Zhao(Keimi_Chou)_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（歯学）　　氏　名　　趙　　継　美

学　位　論　文　題　名
小児がんに対する光免疫療法の有用性について

キーワード（５つ）　　光免疫療法　，神経芽腫　，骨肉腫　，GD2　，小児がん

近赤外線光免疫療法（NIR-PIT）は、がん細胞を特異的に死滅させる新しいがん治療法である。NIR-PIT では、光感受性物質とがん抗原に特異的な抗体との結合体（Anti-Body-Photo-Absorber Conjugate：APC）が使用される。NIR-PIT で使用される光感受性物質である IRDye700DX （IR700）は、690nm の近赤外線で活性化される。APC ががん抗原に結合し、近赤外線を照射することで IR700 が活性化し、標的細胞が損傷を受け、死滅する。日本では、頭頸部扁平上皮がんに対する抗 EGFR 抗体を用いた NIR-PIT が保険収載されており、様々な種類の抗体やがんを対象とした NIR-PIT の臨床試験・前臨床試験が行われている。しかし、小児がんに対する NIR-PIT の報告はほとんどない。

小児がんは 15 歳未満で生じるがんの総称である。小児がんの内容は成人のがんと大きく異なり、白血病、脳腫瘍や、神経芽腫をはじめとする種々の胎児性腫瘍や肉腫などの固形腫瘍から成る。小児がんの中でも、神経芽腫と骨肉腫はがん抗原として GD2 抗原を発現していることが知られている。近年、集学的治療の進歩によって小児がんの生存率は向上しているが、転移例や治療後再発例など、未だに予後の悪い症例もある。さらに、従来のがん治療法である化学療法や放射線療法は、正常細胞や組織にも作用するため、副作用として口腔粘膜炎を含む様々な治療合併症が生じる。また、小児がんの生存率向上に伴い、小児がんサバイバーの成長発達時に受けた化学療法や放射線療法による晩期合併症も問題となっている。NIR-PIT はがん細胞に非常に特異的な治療法であるため、副作用の少ない治療法として期待されている。本研究では、神経芽腫と骨肉腫を対象として、抗 GD2 抗体を用いた NIR-PIT について実験を行い、その有用性について検討した。

実験では、APC として、抗ヒト GD2 モノクローナル抗体（クローン 3F8）に光感受性物質である IR700 を結合させた。以下、結合体を 3F8-IR700 と表記する。ヒト神経芽腫細胞株（SK-N-SH）とヒト骨肉腫細胞株（NOS-10、MG-63）を in vitro の実験に、SK-N-SH と NOS-10 を in vivo の実験に用いた。各細胞株において、GD2 抗原が発現していることと、3F8-IR700 が細胞へ結合することを、フローサイトメトリーと蛍光顕微鏡を用いて確認した。in vitro では、各細胞株に対して NIR-PIT を行い、治療前後の細胞の変化を蛍光顕微鏡で観察するとともに EthD-1 および Calcein AM を用いた染色によっ

て細胞の生死を評価した。また、治療後の細胞をヨウ化プロピジウムで染色し、染色された死細胞の割合をフローサイトメトリーにて定量的に評価した。in vivo では、各細胞株を 6 週齢の雌の BALB/c Slc-nu/nu ヌードマウスの左背部に皮下注射し、各腫瘍の異種移植マウスモデルを作製した。各腫瘍の異種移植片について免疫染色を行い、GD2 抗原が発現していることを確認した。マウスの腫瘍に対して NIR-PIT を行い、腫瘍部位の IR700 蛍光イメージングと腫瘍サイズの経時的測定、腫瘍の組織学的評価を行った。

in vitro の実験結果では、NIR-PIT 後の細胞の形態学的変化（細胞の膨張と水疱の形成）が顕微鏡で観察され、EthD-1 の染色により細胞死が確認された。また、フローサイトメトリーを用いた解析では、NIR-PIT 後では死細胞の割合が有意に上昇し、さらに近赤外線の照射量の増加に伴い死細胞の割合も増加する傾向が認められた。in vivo の実験結果では、NIR-PIT 後に腫瘍部位の蛍光強度の低下が認められ、神経芽腫マウスモデルでは実験開始 10 日目に NIR-PIT を行った群で腫瘍体積が有意に小さかった。しかし、骨肉腫マウスモデルでは腫瘍の成長抑制は認められず、いずれの腫瘍マウスモデルにおいても、エンドポイントに達するまでの生存期間には明らかな差は認められなかった。一方で、腫瘍の組織学的評価では、神経芽腫・骨肉腫マウスモデルともに NIR-PIT 後の腫瘍では腫瘍組織の壊死と微小出血が認められた。

in vitro の結果より、抗 GD2 抗体を用いた NIR-PIT が、神経芽腫および骨肉腫に対して有効であることが示唆された。in vivo の結果からは、抗 GD2 抗体を用いた NIR-PIT が、神経芽腫マウスモデルの一定期間における腫瘍成長抑制に効果があること、神経芽腫および骨肉腫マウスモデルの腫瘍組織に損傷を加えることが示されたが、長期的な腫瘍成長抑制効果は認められなかった。NIR-PIT は抗原の発現量に応じて治療効果が異なることがわかっており、今回使用した骨肉腫細胞株は神経芽腫細胞株よりも GD2 抗原の発現量が少なかったため、in vivo の実験結果では骨肉腫マウスモデルの腫瘍成長抑制に対して明らかな効果が認められなかったと考えられる。また、NIR-PIT の治療レジメンの違いにより治療効果が異なるという報告や、他の治療法との併用によって治療効果が増強するという報告もある。今回の実験で用いたレジメンよりもさらに NIR-PIT の治療効果が期待できるような条件がある可能性があるため、今後検討していく必要がある。また、NIR-PIT では近赤外線の照射を受けた局所のがん細胞に対して特異的に細胞死が生じるが、免疫の活性化により転移巣などの遠隔のがん細胞にも免疫原性細胞死が生じることがわかっている。そのため、近年新しく臨床応用や臨床試験が行われている、抗体療法やキメラ抗原受容体（CAR）T 細胞療法などの免疫療法よりも、さらに特異的で副作用が少なく、かつ同等の免疫学的効果が期待できる。実際の臨床現場では、神経芽腫や骨肉腫は今回 in vivo の実験で検討を行った皮下よりもさらに深部組織に発生することが多いため、腫瘍部位への近赤外線照射のための装置および方法についても検討する必要がある。

本研究より、小児がんの中で神経芽腫および骨肉腫に対する抗 GD2 抗体を用いた NIR-PIT の有効性が示唆された。治療レジメンや条件などを今後検討していくことで、さらに効果が期待できると考えら

れる。NIR-PIT は様々な抗体や腫瘍に対して研究が進められているが、GD2 抗体や、神経芽腫および骨肉腫を対象としたものはほとんど報告がない。従来の治療法よりも特異的な効果が認められ、副作用が少ないことが期待される NIR-PIT が臨床応用されれば、現在の医療技術では救命できない多くの患者を救うことができ、様々な晩期合併症で苦しむ小児がんサバイバーを減らすことができる可能性がある。今後、臨床応用に向けてさらに研究を続けていく所存である。