



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)_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏名 趙 継美

審査担当者 主査 教授 八 若 保 孝
副査 教授 大 廣 洋 一
副査 教授 樋 田 京 子
副査 教授 真 部 淳 (医学研究院)

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

審査は、審査担当者全員の出席の下、公聴会形式で実施された。はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われ、審査担当者ならびに公聴会参加者が提出論文の内容および関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた。

小児がんは15歳未満で生じるがんの総称である。近年、小児がんの生存率は向上しているが、未だに予後の悪い症例もある。また、従来のがん治療法である化学療法や放射線療法は、副作用として様々な治療時合併症や晩期合併症を引き起こす。よって、小児がんの生存率をさらに向上させ、合併症を減少させるための治療法の開発が望まれる。

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、がん抗原に特異的な抗体と、690nmの近赤外線で活性化される光感受性物質との結合体（Anti-Body-Photo-Absorber Conjugate : APC）が使用される。APCががん抗原に結合し近赤外線が照射されることで、がん細胞が死滅する。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が保険収載されている。様々な種類の抗体やがんを対象としたNIR-PITの研究が行われているが、小児がんに対する報告はほとんどない。そこで本研究では、がん抗原としてGD2抗原を発現している神経芽腫と骨肉腫に対する抗GD2抗体を用いたNIR-PITについて実験を行った。

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）と光感受性物質であるIRDye700DX（IR700）との結合体（3F8-IR700）を精製した。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にて確認した。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。各腫瘍について免疫染色を行い、GD2 抗原の発現を確認した。また NIR-PIT を行い、腫瘍部位の蛍光イメージングと腫瘍サイズの経時的測定、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、NIR-PIT 後では死細胞の割合が有意に上昇し、近赤外線照射量の増加に伴いその割合は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 群で腫瘍体積が有意に小さな値を示した。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、組織学的評価では、各腫瘍において NIR-PIT 後に腫瘍組織の壊死が認められた。

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が示された。今後、より効果的な NIR-PIT のレジメンを検討するとともに、神経芽腫に対しては臨床応用に向けてさらに研究を続けていく所存である。

引き続き、論文内容および関連事項について審査担当者から以下のような質問がなされた。

- (1) 今回の研究で標的とした GD2 抗原の腫瘍細胞における役割は何か
- (2) GD2 抗原の正常組織での発現はどのようなものか
- (3) 実際に臨床検体においても、骨肉腫と神経芽腫とで GD2 抗原の発現に差があるのか
- (4) *in vivo* の実験において、光免疫療法を行なった群とそうでない群とで生存期間に差がなかった理由をどのように考えるか
- (5) *in vivo* の実験において治療後に再度増殖した腫瘍の組織学的・免疫学的評価は行なったか
- (6) 今回は局所への効果に対してのみの評価であったが、アブスコパル効果（免疫学的な効果）の評価について、今後どのような実験を考えているか
- (7) 薬剤の投与量や光免疫療法のサイクル数を増やすことでさらに効果が得られる可能性はあるか
- (8) 腫瘍の深部まで近赤外線が到達していたかについての評価は行なったか
- (9) 薬剤を腫瘍に十分量到達させることが治療効果の向上につながるか、そのためにどうすれば良いか

以上の質問に対して申請者から適切な回答が得られた。審査担当者との質疑応答を通して、申請者が本研究ならびに関連分野を十分に理解し、幅広い知識を有していることが明らかになり、本研究のさらなる発展・進展が期待された。

以上のことから、審査担当者全員が、本研究が学位論文に十分に値し申請者は博士(歯学)の学位を授与される資格があると認めた。