



Title	小児がんに対する光免疫療法の有用性について
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15930
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91762
Type	doctoral thesis
File Information	Jimei_Zhao(Keimi_Chou).pdf



博士論文

小児がんに対する光免疫療法の有用性について

令和6年3月申請

北海道大学
大学院歯学院口腔医学専攻

趙 継美

1. 緒言

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の治療法である¹⁾。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²⁾。光感受性物質であるIRDye700DX（IR700）は、フタロシアニン色素であり、波長690nmの近赤外線を照射することにより活性化される³⁾。APCががん細胞の抗原に結合し、近赤外光を照射することで、IR700が活性化し細胞が損傷を受ける（図1）⁴⁾。日本においては、頭頸部扁平上皮癌に対する上皮成長因子受容体（EGFR）を標的とした光免疫療法が2021年より保険収載されている⁵⁾。他にも様々な種類のがんに対するNIR-PITの前臨床・臨床試験が行われているが^{2,6)}、小児がんに対するNIR-PITの報告はほとんどない。

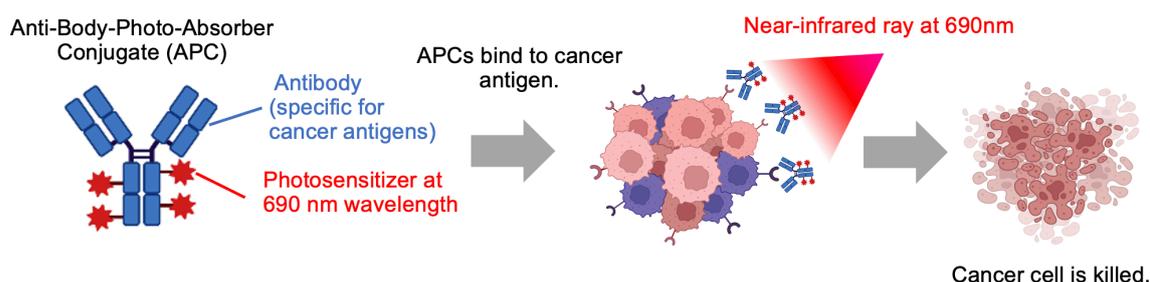


図1 近赤外線光免疫療法（NIR-PIT）の概要：抗体と光感受性物質からなるAPCが、がん抗原に結合し、近赤外線を照射すると、がん細胞が特異的に死ぬ。（BioRender.comにて作成）

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抗原を発現することが報告されている⁷⁾。GD2抗原は神経系由来の腫瘍細胞で発現し、正常組織では末梢神経・中枢神経以外にはほとんど発現していない^{8,9)}。神経芽腫は、脳腫瘍を除く悪性固形腫瘍のなかで最も割合の高い小児がんであり、7000人に1人の頻度で発症する。日本では年間150～200例の新規発症例があると推定されている^{10,11)}。また、骨肉腫は日本では

100万人あたり1~1.5人の頻度で発症するとされているが、若年者に好発し、10~20歳代が全患者の60%を占める。20歳未満では年間40例ほどの新規発症例が報告され、悪性骨腫瘍の中では最も発生頻度の高い小児がんである¹²⁾。

近年、集学的治療の進歩により、小児がんの生存率は向上しており、現在、神経芽腫の全症例における5年生存率は80~90%¹¹⁾、骨肉腫は約70%である¹²⁾。しかし、神経芽腫は発症時の年齢や転移の有無、遺伝子変異の有無、がん細胞の分化度などによりリスク分類されており、高リスクの症例では5年無病生存率が50%未満と未だ予後不良である¹⁰⁾。また、骨肉腫においても、発症時に遠隔転移のある症例は長期生存率が20%、治療後再発例は5年生存率が20%と報告されている¹²⁾。

従来のがん治療法である化学療法や放射線療法は正常な細胞や組織にも作用する治療法であり、様々な治療時合併症が生じる。口腔内においては、治療時合併症として口腔粘膜炎や味覚異常、唾液の分泌量減少による齲蝕の増加などが挙げられ、QOLの低下だけでなく、食事量の減少や粘膜炎からの敗血症などにより全身状態に大きく影響を及ぼす可能性もある。また、感染症などの治療時合併症で亡くなる患者も存在する。さらに、小児がんの生存率向上に伴い、成長発達時に受けた化学療法や放射線療法により、様々な晩期合併症が生じることも問題になっている¹³⁾。主なものとしては低身長や不妊、知能低下、臓器異常、二次がんなどが挙げられるが、口腔内においても歯や顎骨の発育不全や唾液分泌量の減少などが生じると報告されている¹⁴⁾。そのため、小児がんの生命予後をさらに改善し、かつ副作用や晩期合併症を軽減できるような治療法を開発することは、極めて重要である。

このような背景をふまえて、本研究では、GD2を標的としたNIR-PITの神経芽腫および骨肉腫に対する有効性を検討するため、*in vitro* および *in vivo* の実験を行った。

2. 材料と方法

2.1. 試薬

抗ヒトガングリオシド GD2 モノクローナル抗体 (clone 3F8) は、Nai-Kong Cheung 先生のご厚意により提供された。水溶性シリコンフタロシアニン誘導体である IRDye 700DX (IR700) NHS エステルは、Li-COR バイオサイエンスより入手した。他のすべての化学物質は試薬級のものを使用した。

2.2. 細胞培養

ヒト神経芽腫細胞株 SK-N-SH は、京都大学小児科滝田純子教授のご厚意により提供された。ヒト骨肉腫細胞株 NOS-10 および MG-63 は理研セルバンクより購入した。SK-N-SH および NOS-10 は RPMI-1640 培地、MG-63 は MEM 培地を用いて培養を行った。すべての培地には、10%ウシ胎児血清 (Thermo Fisher Scientific Inc.) および 1%ペニシリン/ストレプトマイシン (ナカライテスク株式会社) を添加した。細胞は、95%空気と 5%二酸化炭素の環境条件下で、37°C の加湿インキュベーター内で管理を行った。細胞培養物は、TaKaRa PCR マイコプラズマ検出セット (タカラバイオ株式会社) を用いて、マイコプラズマ感染に対して陰性であることを定期的に確認した。

2.3. フローサイトメトリーによる各細胞における GD2 発現の評価

各細胞 (5×10^6) を 35 mm 培養皿に播種し、37°C で 24 時間インキュベートを行った。PE 抗ヒトガングリオシド GD2 抗体 (BioLegend) 1.7 μ l と混合させ、氷上で 30 分間反応させた。各細胞株における GD2 発現量をフローサイトメトリー (Gallios ; Beckman Coulter) を用いて測定し、Kaluza Analysis 2.1 ソフトウェア (Beckman Coulter) を用いて分析した。

2.4. 抗 GD2 抗体-IR700 結合体 (3F8-IR700) の合成

抗 GD2 抗体 (clone 3F8) への IR700 の結合は、既報と同様の以下の方法で行った^{1,15)}。clone 3F8 を、0.1 M Na₂HPO₄ (pH 8.5) 中の IR700 と共に室

温で3時間インキュベートした。混合物をゲル濾過セファデックス G50 カラム (PD-10 ; サイティバ) を用いて精製した。clone 3F8 と IR700 との結合体を、以下 3F8-IR700 と略記する。3F8-IR700 のタンパク質濃度は Modified Lowry Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて測定した。また、分光光度計 (UV-1850 ; 島津製作所) の 689 nm での吸収により IR700 の濃度を測定し、各抗体に結合した IR700 の数を評価した。IR700 対抗体比は 3~6 であった。

2.5. 3F8-IR700 の蛍光顕微鏡観察

各細胞を 35 mm 培養皿に播種し、37°C で 24 時間インキュベートした。3F8-IR700 を 5 µg/mL 添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。蛍光顕微鏡 (CKX41 ; オリンパス) を用いて観察を行った。蛍光顕微鏡観察は、IR700 用の 673-748 nm 励起フィルターと 765-855 nm 発光フィルターを組み合わせで使用した。画像解析は ImageJ ソフトウェア (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) を用いた。

2.6. in vitro NIR-PIT : 蛍光顕微鏡観察

Calcein AM/Ethidium homodimer-1 (EthD-1) LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells ; Thermo Fisher Scientific Inc.) を用い、NIR-PIT 後の生細胞および死細胞を検出した。SK-N-SH、NOS-10、および MG-63 (各 2×10^5) を 35 mm 培養皿に播種し、37°C で 24 時間インキュベートした。3F8-IR700 を 5 µg/mL 添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。その後、細胞に近赤外線の光を 15 分間照射した。光照射の開始前および開始 1 時間後に蛍光顕微鏡を用いて細胞の観察を行った。蛍光顕微鏡は、Calcein AM には 460-490 nm 励起フィルターと 520 nm ロングパス発光フィルターの組み合わせ、または EthD-1 には 480-550 nm 励起フィルターと 590 nm ロングパス発光フィルターの組み合わせを使用した。

2.7. in vitro NIR-PIT : フローサイトメトリーによる定量的評価

各細胞 (5×10^5) を 35 mm 培養皿に播種し、 37°C で 24 時間インキュベートした。3F8-IR700 を $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 添加し、 37°C で 1 時間インキュベートした。各細胞に LED ランプを用いて 4、8、16、32 J/cm^2 の各照射量で近赤外線を照射した。1 時間後、細胞を回収し、PBS に懸濁した。死細胞を検出するヨウ化プロピジウム (PI ; Sigma-Aldrich) を懸濁液に添加し、室温で 30 分間インキュベートした。次いで、フローサイトメトリー (Gallios) を用いて PI 染色細胞の割合を評価した。データは Kaluza Analysis 2.1 ソフトウェアを用いて解析した。

2.8. 動物および腫瘍モデル

全ての *in vivo* 実験は、実験動物の管理および使用に関するガイドラインに従い、北海道大学動物管理委員会の承認を得て実施した。6 週齢の雌の BALB/c Slc-nu/nu ノードマウスを日本エスエルシー社から購入し、12 時間の明暗サイクル下で飼育した。イソフルランを用いた麻酔下にて *in vivo* 実験を行った。100 μL の PBS に懸濁した SK-N-SH、NOS-10 細胞 (各 $5 \sim 7 \times 10^6$) をマウスの左背部に皮下注射した。腫瘍体積は、最大径および幅をノギスで計測し、以下の式を用いて計算した：体積 = 最大径 \times 幅² $\times 0.5$ 。

2.9. 免疫染色によるマウス腫瘍の GD2 発現の評価

SK-N-SH、NOS-10 の腫瘍異種移植片をマウスから切除した。切除した腫瘍を至適切断温度で凍結し、スライス切片 (10 μm 厚) を作成した。GD2 抗原の発現を評価するために、免疫染色を行った。3% H_2O_2 でサンプルを 10 分間処理した後、ヤギ血清 (富士フイルム和光純薬株式会社) で室温で 1 時間処理し、非特異的染色のブロッキングを行った。一次抗体にはウサギ組換え抗 GD2 抗体 (clone 7A4 ; Absolute Antibody) を、二次抗体にはヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (ab6721 ; Abcam) を使用した。ペルオキシダーゼ染色 DAB キット (Brown Stain ; ナカライテスク株式会社) を用いて発色検出を行い、対比染色にはヘマトキシリンを用いた。10 倍および 40 倍の対物レンズを使用し、光学顕微鏡 (DP73 ; オリンパス) にて観察を行った。

2.10. in vivo NIR-PIT

NIR-PIT の治療効果を評価するために、左背部に SK-N-SH と NOS-10 の腫瘍を有する各 18、19 匹のマウスを無作為に以下の 4 群に分類した。: (i) 治療を行っていない群 (control 群); (ii) 3F8-IR700 を投与せず、近赤外線照射 (治療 1 日目に 50 J/cm²、2 日目に 100 J/cm²) のみ行った群 (Irradiation only 群); (iii) 100 µg の 3F8-IR700 を静脈内投与し、近赤外線照射を行わなかった群 (3F8-IR700 i.v. only 群); (iv) 100 µg の 3F8-IR700 を静脈内投与し、かつ近赤外線照射 (治療 1 日目に 50 J/cm²、2 日目に 100 J/cm²) を行った群 (NIR-PIT 群)。腫瘍細胞の注入後、腫瘍体積が 70 mm³ に達した段階で治療を開始し、治療開始後は腫瘍体積を 2 日ごとに計測した。腫瘍体積が 2000 mm³ に到達する、あるいは治療開始後の期間が 70 日に達する時点をエンドポイントとし、その後はマウスを安楽死させた。治療 1 日目、2 日目 (近赤外線照射前および直後)、および 3 日目に、IVIS Lumina Series III (Summit Pharmaceuticals Inc.) を用いてマウスの IR700 蛍光イメージングを行った (励起波長: 660 nm、発光波長: 710 nm ロングパスに設定)。ImageJ ソフトウェアを用いて蛍光画像解析を行った。関心領域 (ROI) を腫瘍部分に配置して蛍光強度を定量化し、各 ROI の平均蛍光強度を算出した。それにより、照射前後の蛍光強度の変化を評価した。

2.11. マウス腫瘍の組織学的評価

治療を行っていないマウス (control 群) および、100 µg の 3F8-IR700 を静脈内投与しかつ近赤外線照射 (治療 1 日目に 100 J/cm²) を行ったマウス (NIR-PIT 群) から、SK-N-SH、NOS-10 の腫瘍異種移植片を切除した。切除した腫瘍を至適切断温度で凍結し、スライス切片 (10 µm 厚) を作成した。NIR-PIT による腫瘍組織の変化を観察するために、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を標準プロトコルで施行した。10 倍および 40 倍の対物レンズを使用し、光学顕微鏡 (DP73) にて観察を行った。

2.12. 統計解析

統計解析は、GraphPad Prism バージョン 10 (GraphPad Software) を用いて行った。in vitro におけるフローサイトメトリーによる定量的評価、in vivo における腫瘍体積の計測結果は、多重比較のために Dunnett's 検定を行い、control 群に基づいてその他の群を比較した。また、in vivo における蛍光強度の変化については、多重比較のために Dunn 検定を行い、治療前後の蛍光強度を比較した。データは、4 回以上の実験からの平均標準誤差 (SEM) として提示した。さらに、in vivo における累積生存確率を Kaplan-Meier 生存曲線分析により解析し、その結果を log-rank 検定と比較した。すべての解析において、 $P < 0.05$ を統計学的に有意であると見なした。

3. 結果

3.1. 細胞株における GD2 発現

NIR-PIT は、APC ががん細胞膜上の抗原に結合し、近赤外線にさらされた場合にのみ細胞毒性を示す。その有効性は、がん細胞の抗原発現レベルに依存する¹⁶⁾。SK-N-SH、NOS-10、および MG-63 の各細胞株における GD2 抗原の発現量を、フローサイトメトリーにより評価した。その結果、全ての細胞株が GD2 を発現しており (図 2)、特に SK-N-SH が最も高い GD2 発現を示した。これらの結果より、抗 GD2 抗体を標的とした NIR-PIT がこれらの細胞株に適用できることが示された。

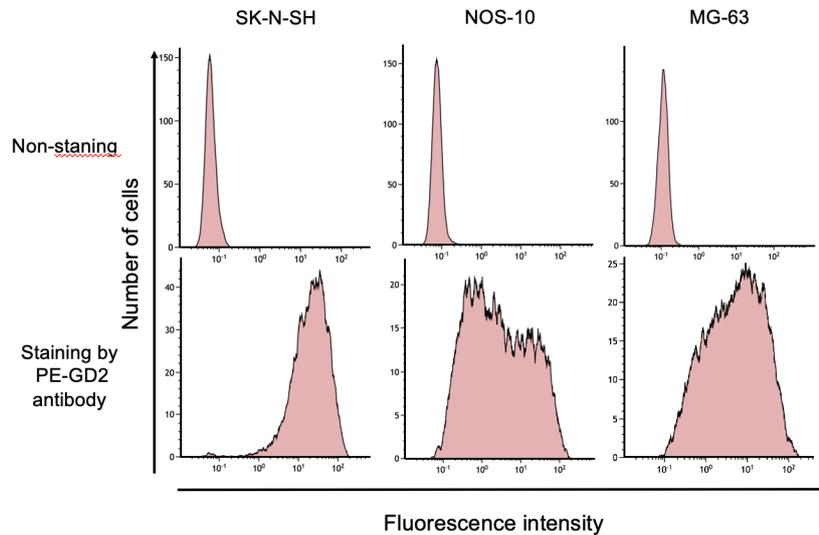


図2 各細胞株（SK-N-SH、NOS-10、MG-63）におけるGD2発現
 全ての細胞株はPE-GD2抗体にて染色され、特にSK-N-SHが最も高いGD2発現を示した。

3.2. 3F8-IR700の細胞への結合に関する蛍光顕微鏡観察

次に、細胞に3F8-IR700が結合しているかを確認するため、蛍光顕微鏡による観察を行った（図3）。その結果、IR700の蛍光シグナルが各細胞株で観察され、特にSK-N-SHが最も強い蛍光を示した。この結果は、図2のフローサイトメトリーにおける結果と一致した。これにより、3F8-IR700が各細胞のGD2抗原に結合することが示された。

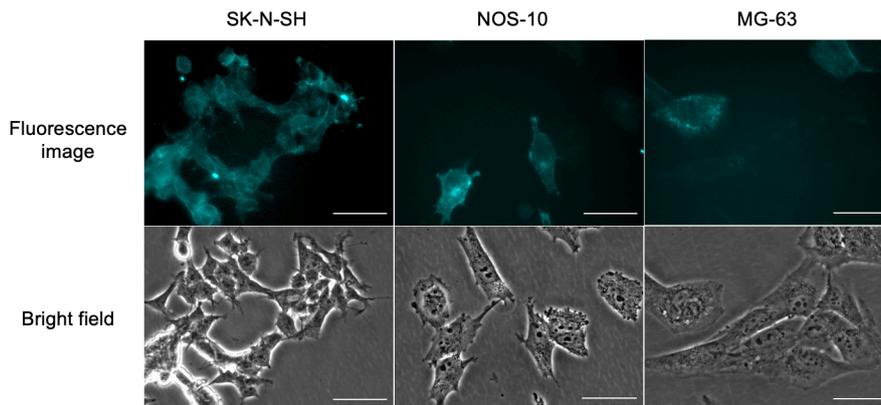


図3 3F8-IR700の各細胞株（SK-N-SH、NOS-10、MG-63）への結合
 全ての細胞株でIR700の蛍光が確認され、3F8-IR700がGD2抗原に結合していることが示唆された。特に、SK-N-SHで最も強い蛍光が認められた。スケールバーは50μmを示す。

3.3. in vitro NIR-PIT : 蛍光顕微鏡観察

細胞に対する NIR-PIT の効果を評価するために蛍光顕微鏡観察を行った。死細胞および生細胞は、EthD-1（死細胞）および Calcein AM（生細胞）の染色により区別した。SK-N-SH、NOS-10、MG-63 各細胞株における治療前後の明視野での観察像を図 4 に示す。どの細胞株においても、NIR-PIT を行った群のみに、細胞の形態学的変化（細胞の膨張と水疱の形成）が観察された。さらに、各細胞株を染色した観察像を図 5 に示す。どの細胞株においても、NIR-PIT を行った群では、3F8-IR700 の添加後、近赤外線照射前には細胞は Calcein AM により標識され緑色の蛍光を示したが、近赤外線照射後には EthD-1 により標識され赤色の蛍光を示した。LIVE/DEAD 染色における細胞のこれらの変化は、他の群では観察されなかった。これらの結果より、3F8-IR700 を用いた NIR-PIT が、in vitro で神経芽腫および骨肉腫に有効であることが示された。

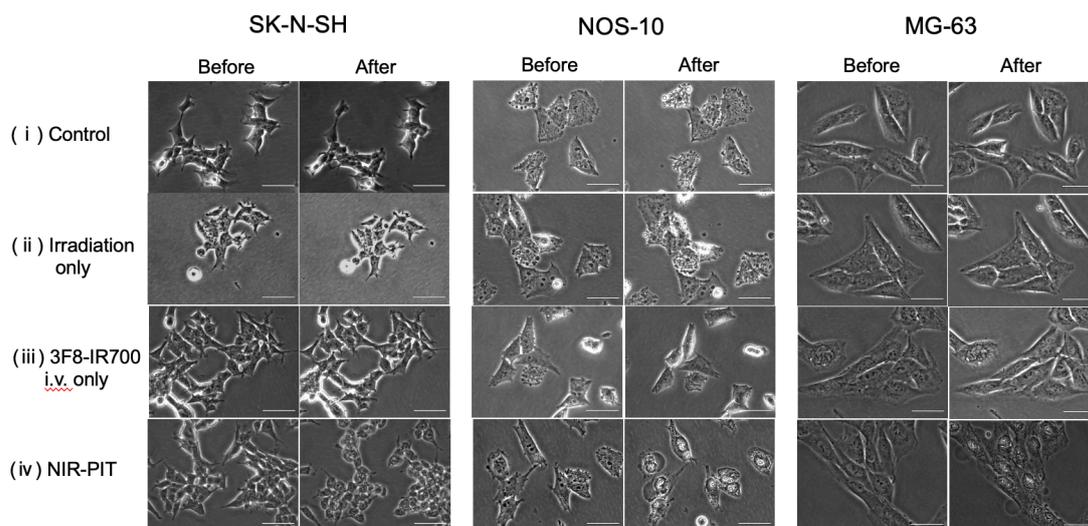


図 4 各細胞株（SK-N-SH、NOS-10、MG-63）における治療前後の明視野観察像

どの細胞株においても、NIR-PIT を行った群のみ、治療後に細胞の形態学的変化（細胞の膨張と水疱の形成）が観察された。スケールバーは 50 μm を示す。

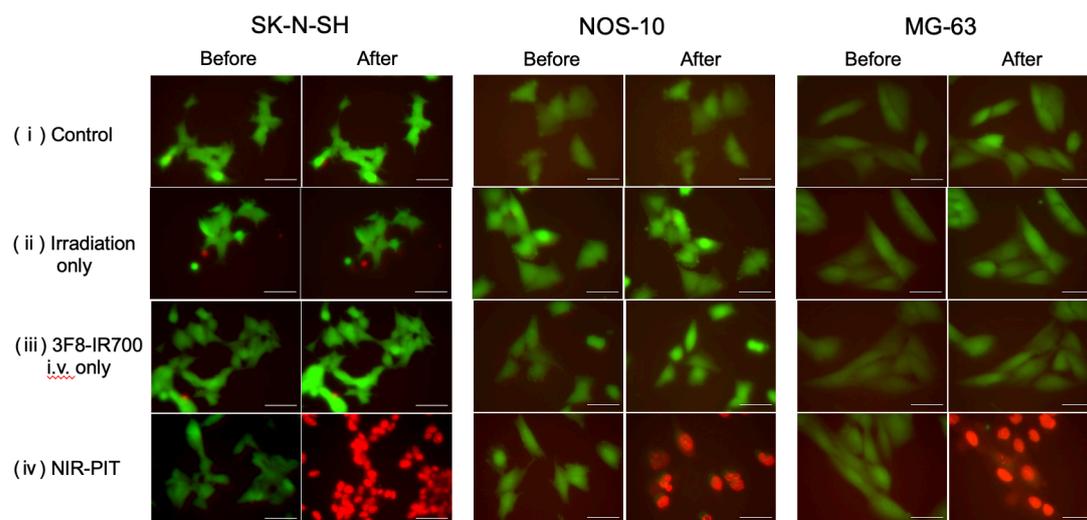


図5 各細胞株（SK-N-SH、NOS-10、MG-63）における治療前後の染色像

生細胞は Calcein AM で標識され緑色の蛍光を示し、死細胞は EthD-1 で標識され赤色の蛍光を示す。どの細胞株においても、NIR-PIT を行った群のみ、治療後に細胞が赤色に染色された。スケールバーは 50 μm を示す。

3.4. in vitro NIR-PIT : フローサイトメトリーによる定量的評価

細胞に対する NIR-PIT の効果を定量的に評価するためにフローサイトメトリーを用いて解析を行った。SK-N-SH、NOS-10 および MG-63 の各細胞を用いた実験の結果を図 6 に示す。PI で染色された細胞の割合は、3F8-IR700 の添加かつ近赤外線照射により有意に増加した。これは、細胞膜が破壊された死細胞の割合が有意に増加したことを示している。さらに、PI 染色細胞の割合は、近赤外線照射線量に依存して増加する傾向が見られた。32 J/cm^2 の近赤外線照射後、SK-N-SH、NOS-10、MG-63 各細胞株の PI 染色細胞の割合はそれぞれ 91.4%、74.4%、67.6%であった。また、SK-N-SH では、3F8-IR700 の添加のみでも PI 染色細胞の割合が有意に増加した。フローサイトメトリーによる定量的評価の結果からも、3F8-IR700 を用いた NIR-PIT が in vitro で神経芽腫および骨肉腫に有効であることが示された。

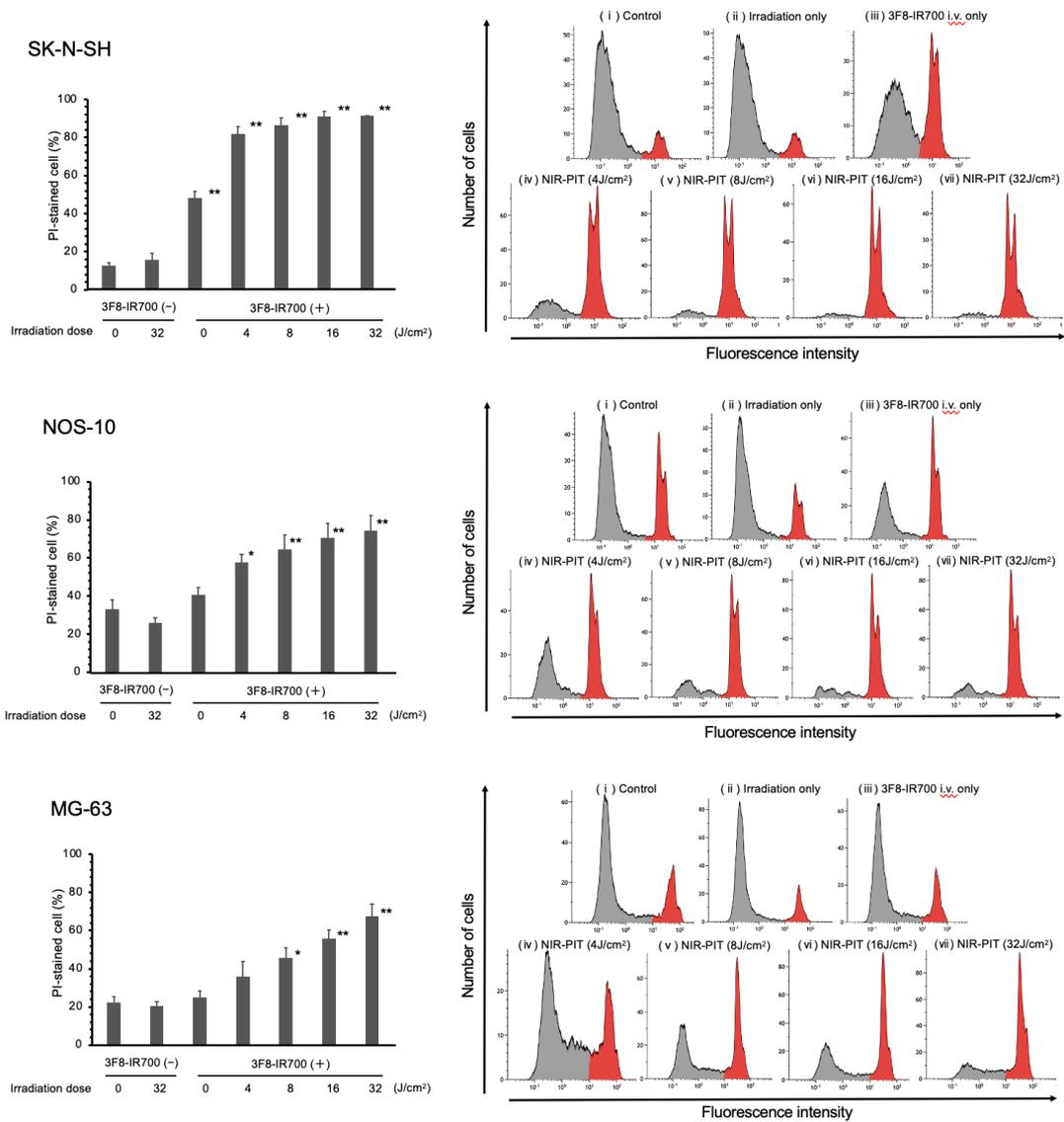


図6 各細胞株 (SK-N-SH、NOS-10、MG-63) における細胞死の定量
 左のグラフに各群の平均値と標準誤差を示す (n = 4、*P < 0.05、**P < 0.01、vs Control 群、Dunnett の検定)。どの細胞株においても、PI で染色した死細胞の割合 (右図の赤色で示す) は、3F8-IR700 の添加と近赤外線の照射によって有意に増加した。

3.5. マウスの神経芽腫・骨肉腫における GD2 発現

免疫組織染色により、マウスの SK-N-SH、NOS-10 の腫瘍異種移植片の GD2 発現を評価した。各腫瘍の異種移植片において GD2 の発現が確認された (図 7)。

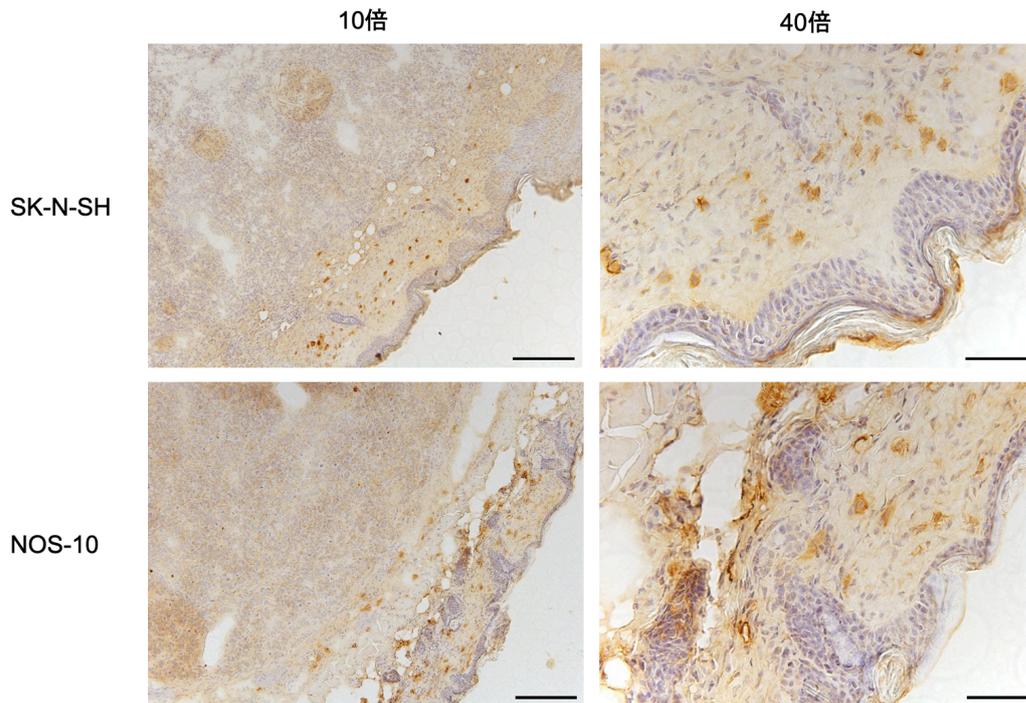


図7 マウス SK-N-SH 神経芽細胞腫、NOS-10 骨肉腫における GD2 発現
各腫瘍において GD2 の発現が確認された。スケールバーは 200 μm (10 倍)、50 μm (40 倍) を示す。

3.6. 神経芽腫および骨肉腫マウスモデルに対する *in vivo* NIR-PIT

SK-N-SH、NOS-10 各細胞株を移植したマウスモデルに対して、3F8-IR700 を用いた NIR-PIT を行った。治療および蛍光イメージングのレジメンを図 8 に示す。どちらのマウスモデルにおいても、3F8-IR700 を投与した群 (3F8-IR700 i.v. only 群、NIR-PIT 群) では、3F8-IR700 を投与していない群 (Control 群、Irradiation only 群) よりも、腫瘍部分の IR700 の蛍光強度が高かった。また、NIR-PIT 群では、近赤外線照射後すぐに腫瘍の蛍光強度が減少したが、3F8-IR700 i.v. only 群では、その後数日かけて徐々に減少した (図 9)。NIR-PIT 群における IR700 の蛍光強度を定量した結果、腫瘍の蛍光強度は照射直後に減少する傾向があり、SK-N-SH マウスモデルでは 2 日目の照射後と 3 日目に、NOS-10 マウスモデルでは 2 日目に有意に減少した (図 10)。また、実験開始 10 日目において、SK-N-SH マウスモデルの NIR-PIT 群では腫瘍体積が有意に小さかった ($p < 0.05$) が、NOS-10 マウスモデルでは 4 群において明らかな差

は認められなかった（図 11）。エンドポイントに達するまでの生存期間には、どちらのマウスモデルにおいても有意な差は認められなかった（図 12）。これらの結果から、3F8-IR700 を用いた NIR-PIT は、マウスの神経芽腫、骨肉腫に対してある程度の治療効果があることが示された。

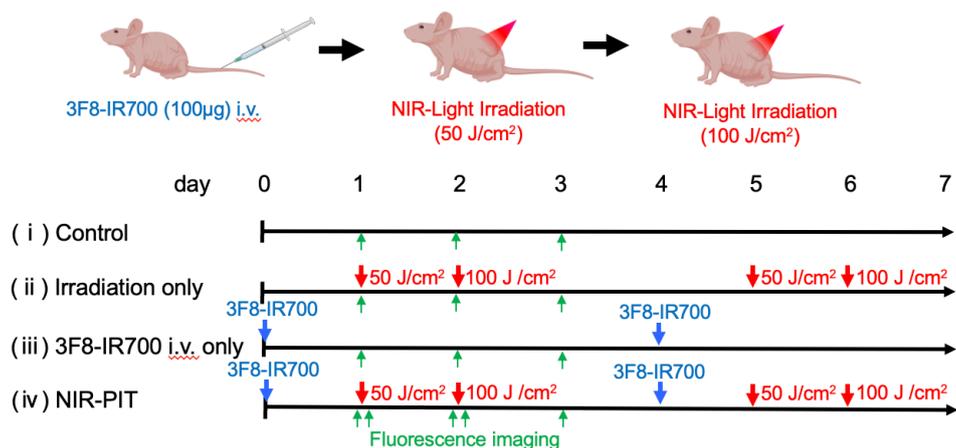


図 8 in vivo NIR-PIT における治療とイメージングのレジメン

NIR-PIT 群では、3F8-IR700 の静脈内投与、近赤外線照射 (50J/cm²、100J/cm²) を 1 ケールとして、2 サイクル行った。各マウスの IR700 蛍光イメージングを 1 日目、2 日目（照射前と照射直後）、3 日目に行った。（BioRender.com にて作成）

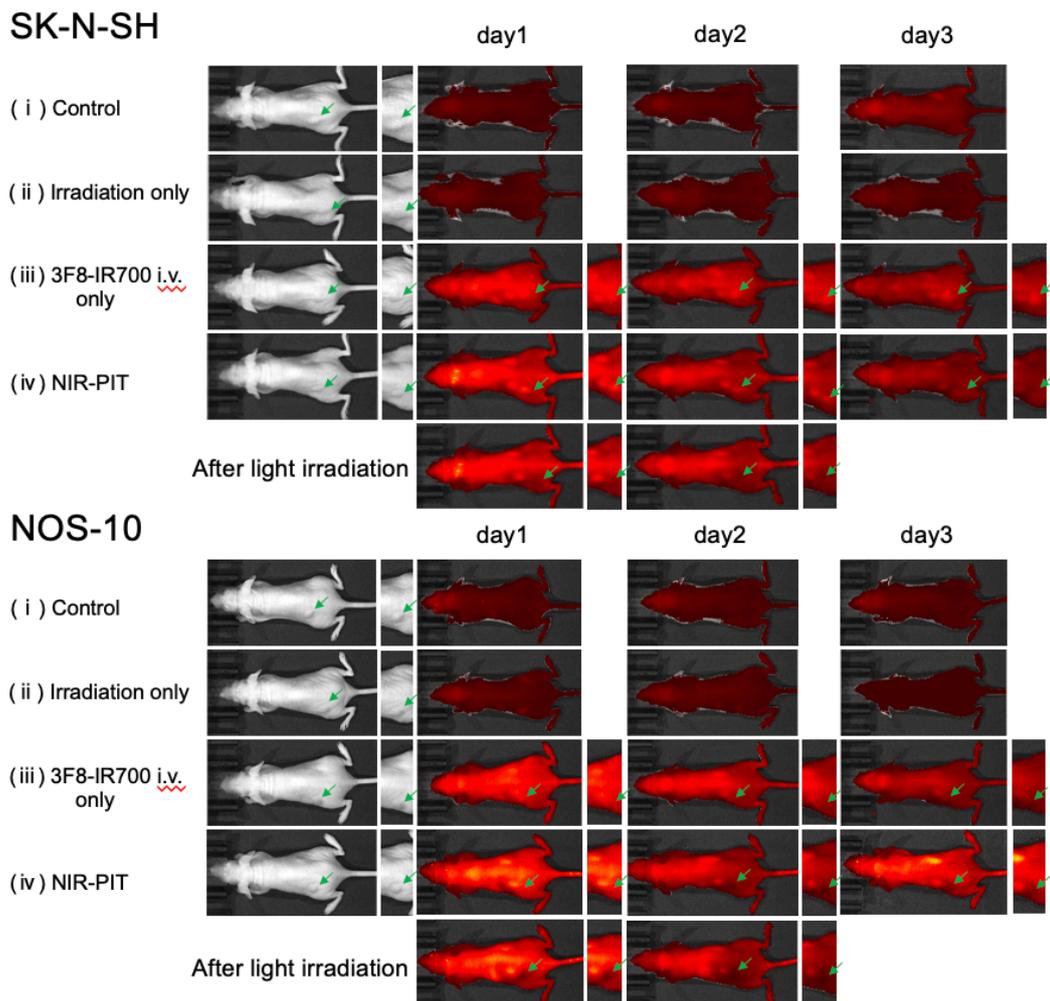


図9 各群のマウスの蛍光イメージング画像

腫瘍部位を緑の矢印で示す。NIR-PIT 群では、腫瘍部位の IR700 の蛍光が照射直後に消失したが、3F8-IR700 i.v. only 群では、数日間かけて徐々に減少した。

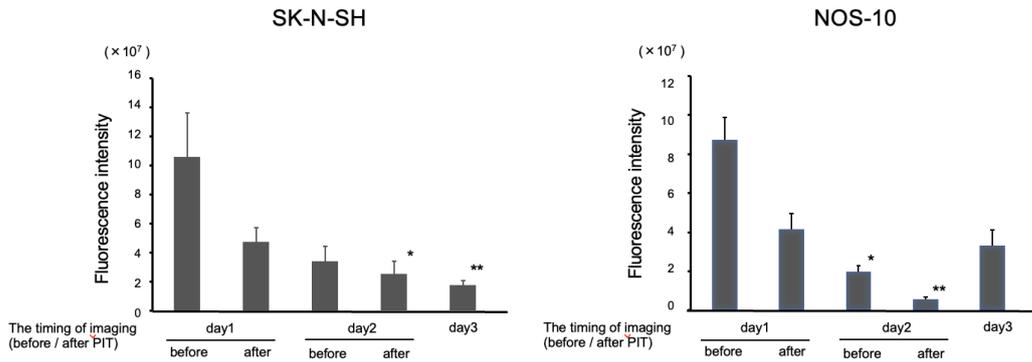


図 10 マウス腫瘍部位の IR700 蛍光強度の定量

NIR-PIT 群の各マウスモデルの平均値と標準誤差を示す (n = 5、*P < 0.05、**P < 0.01、vs day1 before、Dunn 検定)。SK-N-SH マウスモデルでは 2 日目の照射後と 3 日目、NOS-10 マウスモデルでは 2 日目に有意に減少した。

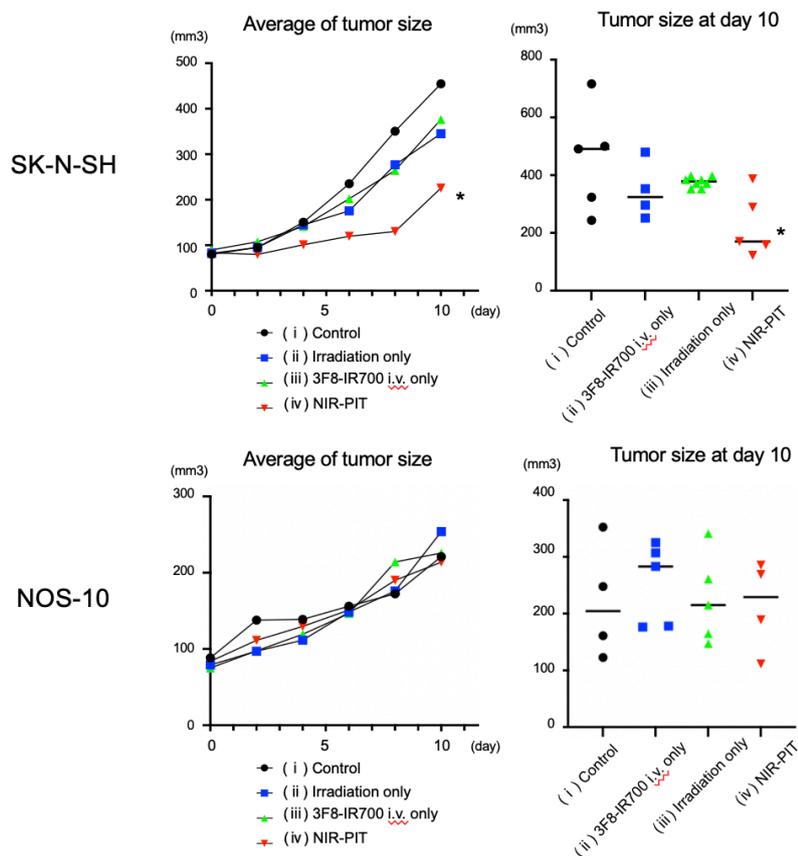


図 11 実験開始から 10 日間の腫瘍成長曲線と 10 日目の腫瘍サイズ

各群のマウスモデルの平均値と標準誤差を示す (n = 4 または 5、*P < 0.05、vs control、Dunnnett 検定)。SK-N-SH マウスモデルでは、実験 10 日目において、NIR-PIT 群にて腫瘍増殖が有意に抑制された。

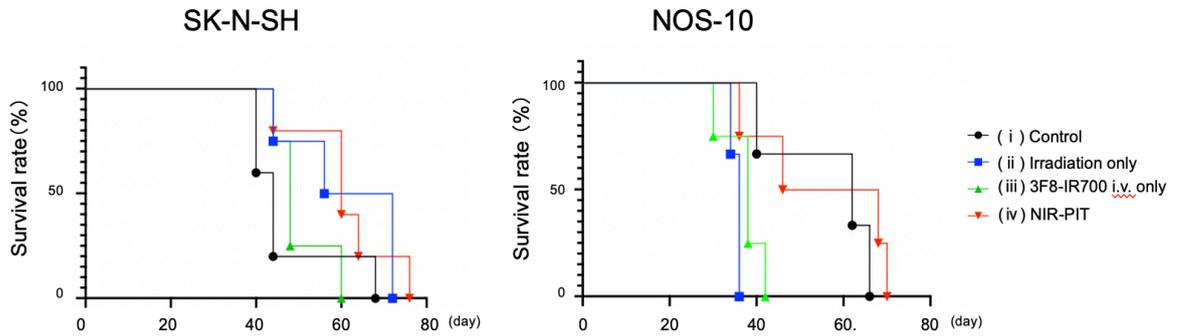


図 12 エンドポイントに達するまでの Kaplan-Meier 生存曲線解析

いずれの腫瘍のマウスモデルにおいても、生存期間の有意な延長は認められなかった (n = 4 または 5、vs control、Log-rank 検定)。

3.7. マウス腫瘍の組織学的評価

マウスの神経芽腫および骨肉腫に対する NIR-PIT の効果について組織学的評価を行った。照射翌日に腫瘍を摘出し、HE 染色を行った。どちらのマウスモデルにおいても、NIR-PIT 群では腫瘍のびまん性の壊死が観察されたが、control 群では明らかな損傷は認められなかった (図 13)。

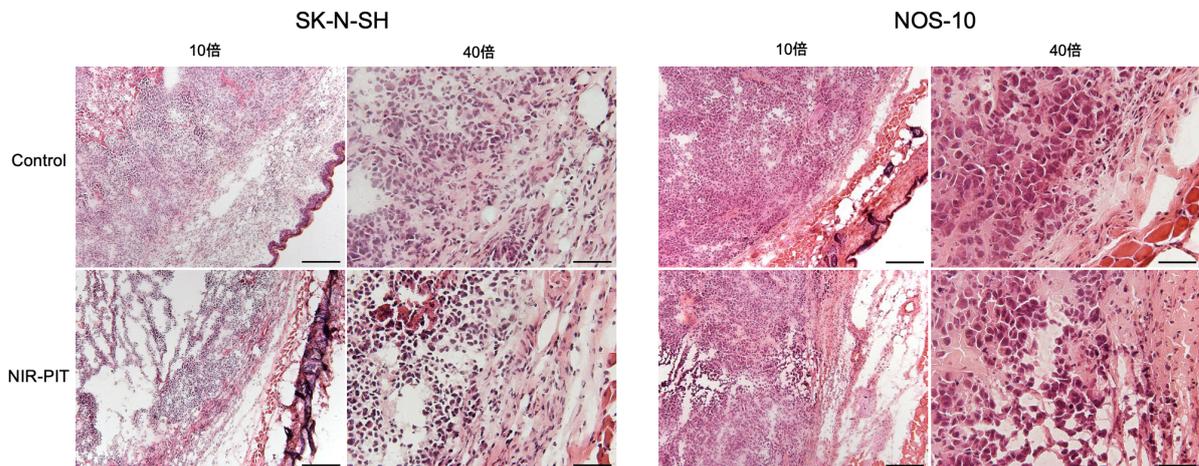


図 13 マウス腫瘍の組織学的評価

いずれの腫瘍のマウスモデルにおいても、NIR-PIT 群では腫瘍のびまん性の壊死が観察された。

4. 考察

抗 GD2 抗体を用いた NIR-PIT の有効性に関する前臨床研究の報告は過去に 1 件ある¹⁷⁾。本研究では、既報とは別の抗 GD2 抗体と細胞株を使用した。既報と同様の効果が確認された。既報では、in vivo 実験としてリンパ腫の細胞株を用いたマウスモデルの実験がなされており、神経芽腫のマウスモデルを用いた実験は行われていなかった。これまで、前臨床および臨床試験として、35 種類の抗原を標的とした NIR-PIT が試みられているが^{2,6)}、GD2 抗原や小児がんを対象とした研究は非常に限られており、今後さらに研究を行っていく必要がある。

NIR-PIT による局所での細胞死のメカニズムは以下の通りである：光感受性物質が 690nm の光照射によって励起され、細胞膜を損傷する。損傷した部位より細胞外液が細胞に流れ込み、細胞が死ぬ^{4,18,19)}。in vitro の実験で観察された細胞の形態学的変化は、このメカニズムが生じたことを示している。過去の報告でも、NIR-PIT によって細胞に同様の変化が生じたことがしめ示されている^{1, 20-22)}。

フローサイトメトリーを用いた in vitro の実験では、3F8-IR700 の添加のみでも、SK-N-SH の死細胞の割合が有意に増加しており、他の細胞でも死細胞の割合が増加する傾向が認められた。顕微鏡観察や in vivo の実験ではそのような傾向は認められなかったが、3F8-IR700 の添加自体が腫瘍細胞に何らかの影響を与える可能性がある。実際に、今回の研究で使用した 3F8 の抗体が、ある種の神経芽腫細胞に対して細胞毒性があることが報告されている²³⁾。

in vitro の実験結果より、NIR-PIT が神経芽腫と骨肉腫ともに有効であることが示唆された。神経芽腫 (SK-N-SH) のマウスモデルでは、NIR-PIT を行ったマウスでは腫瘍体積の増加が有意に抑制されたが、生存率に有意な差は認めなかった。今回の in vivo の実験の治療レジメンでは、NIR-PIT (3F8-IR700 添加 → 近赤外線 50 J/cm² の照射 → 近赤外線 100 J/cm² の照射) を 2 サイクル行い、一連の治療の直後である 10 日目に、NIR-PIT の効果が認められた。しかし、NIR-PIT を行ったマウスにおいても 10 日目以降に腫瘍の増殖が認められ、

エンドポイントに達するまでの日数に有意な差は認められなかった。NIR-PITに関する過去の報告では、APCの投与量や近赤外線照射線量、およびNIR-PITのサイクル数などによって治療効果が異なることが示唆されている²⁴⁻²⁶⁾。治療レジメンを検討することで、今後、神経芽腫に対して、より効果的なNIR-PITの条件を見つけられる可能性がある。

骨肉腫（NOS-10）のマウスモデルでは、NIR-PITを行っても、腫瘍体積と生存期間ともに有意な差を認めなかった。しかし、蛍光強度の変化はNIR-PITの前後で有意な差が認められたため、NIR-PITの直後ではある程度の効果があることが示唆されるが、実際の腫瘍の増殖に対して臨床的な効果は認められなかった。in vitroの実験で確認された骨肉腫細胞（NOS-10 および MG-63）におけるGD2発現は、神経芽腫細胞よりも多様であり、in vitroにおけるNIR-PITについても、有効性は認められたが神経芽腫細胞ほど顕著ではなかった。NIR-PITは抗体依存的な治療法であり、抗原の発現量によってその有効性が大きく異なることがわかっている¹⁶⁾。本研究で用いた骨肉腫の細胞株は、SK-N-SHよりもGD2抗原の発現量が少なかったため、骨肉腫マウスモデルを用いた実験の結果が明らかにならなかった可能性がある。また同じ腫瘍であっても、GD2の発現量は細胞株によって異なる可能性があるため、骨肉腫に対するNIR-PITの効果を評価するには、GD2の発現量が多い他の細胞株も使用して検討する必要がある。同様に、SK-N-SH細胞に対してはNIR-PITは有効であったが、GD2発現量が少ないタイプの神経芽腫に対しては、より効果的な治療プロトコルを検討するべきである。近年、神経芽腫に対する抗GD2抗体療法が、抗CD47抗体と併用することで効果が増強すること²⁷⁾、またEZH2阻害剤が神経芽腫のGD2発現量を増加させることが報告されている²⁸⁾。これらのようなアプローチと組み合わせることで、神経芽腫に対するNIR-PITの有効性もより高まる可能性がある。

神経芽腫に対する抗GD2抗体療法は臨床応用されており、GD2抗原を標的とするキメラ抗原受容体（CAR）T細胞療法も臨床試験が行われている²⁹⁻³²⁾。これらの治療法はがん細胞に特異的であり、従来のがん治療よりも副作用が少

ないことが期待されている。しかし、GD2 抗原は神経原性の正常組織にも少量ではあるが発現しており、これらの治療法はその組織に副作用を引き起こすことが報告されている^{8,9)}。一方、NIR-PIT では近赤外線を局所（がん原発部位）に照射し、局所でのみ直接的な細胞死が起こるため、よりがん細胞に特異的な効果が期待でき、副作用の軽減につながる可能性がある。さらに、局所的な効果に加えて、NIR-PIT は免疫原性細胞死を引き起こすと考えられている¹⁸⁾。局所的な細胞死が生じると、細胞内の物質が放出され、樹状細胞などの免疫細胞が活性化する。そのため、NIR-PIT は局所だけでなく、転移巣などの遠隔組織にも有効であることが報告されている（アブスコパル効果）^{4,33)}。さらに、免疫チェックポイント阻害剤と併用することで、NIR-PIT の治療効果が高まることも報告されている³⁴⁾。

今回の *in vivo* 実験では皮下腫瘍モデルを用いたが、実際の臨床現場では神経芽腫や骨肉腫は体内のより深部の組織に発生することが多い。近赤外線の組織への浸透深度は、表面から約 2cm である³⁴⁾。そのため、そのような深部組織に近赤外線を照射するための装置および方法を検討する必要がある。近年、発光ダイオードを搭載したカテーテルや、血管内治療デバイスに光照射システムを搭載させたもの（ET-BLIT）など、深部の腫瘍部位に近赤外線を照射する技術が開発されている^{6,16)}。

今後は、神経芽腫・骨肉腫に対してより効果的な NIR-PIT プロトコルを検討するとともに、神経芽腫に対しては NIR-PIT の臨床応用を目指し、ヒトに対しても使用することのできるヒト化抗体を用いた前臨床試験を行う予定である。

5. 結論

in vitro 実験により、抗 GD2 抗体を用いた光免疫療法 of 神経芽腫および骨肉腫に対する有効性が示唆された。また、マウスモデルを用いた実験により、神経芽腫に対する有効性が示唆された。今後、臨床応用に向けて、さらに研究を続けていく必要がある。

謝辞

今回の学位研究にあたり、抗体を分けてくださった Nai-Kong Cheung 先生、細胞株を分けてくださった京都大学小児科滝田純子教授に感謝致します。

また、医学部小児科という異分野での貴重な研究の機会を与えて頂きました北海道大学大学院歯学研究院小児・障害者歯科学教室の八若保孝教授、本研究の機会を与えて頂き御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究科小児科学分野の真部淳教授、本研究に関して様々なご指導やご助言を頂きました植木将弘先生、ご協力やご助言を頂きました長祐子先生、寺下友佳代先生、平林真介先生、実験機器の使用やご指導をはじめ様々な御協力を頂きました北海道大学大学院薬学研究院生体分析化学研究室の小川美香子教授、中島孝平先生、その他に私の研究を支えて下さったすべての皆様に深く感謝を致します。

文献

1. Mitsunaga M, Ogawa M, Kosaka N, Rosenblum LT, Choyke PL, Kobayashi H. Cancer cell-selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules. *Nat Med.* 2011;17(12):1685-1691.
2. Kato T, Wakiyama H, Furusawa A, Choyke PL, Kobayashi H. Near Infrared Photoimmunotherapy; A Review of Targets for Cancer Therapy. *Cancers.* 2021;13(11):2535.
3. 小川美香子：光と薬による特異的がん治療：光免疫療法の現状と展望，*ファルマシア*，2021;57(6):475-479
4. Kobayashi H, Choyke PL. Near-Infrared Photoimmunotherapy of Cancer. *Acc Chem Res.* 2019;52(8):2332-2339.
5. Shinozaki T, Matsuura K, Okano W, et al. Eligibility for Photoimmunotherapy in Patients with Unresectable Advanced or Recurrent Head and Neck

- Cancer and Changes before and after Systemic Therapy. *Cancers (Basel)*. 2023;15(15).
6. Mohiuddin TM, Zhang C, Sheng W, et al. Near Infrared Photoimmunotherapy: A Review of Recent Progress and Their Target Molecules for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2023;24(3).
 7. Dobrenkov K, Ostrovnaya I, Gu J, Cheung IY, Cheung NK. Oncotargets GD2 and GD3 are highly expressed in sarcomas of children, adolescents, and young adults. *Pediatr Blood Cancer*. 2016;63(10):1780-1785.
 8. Cavdarli S, Groux-Degroote S, Delannoy P. Gangliosides: The Double-Edge Sword of Neuro-Ectodermal Derived Tumors. *Biomolecules*. 2019;9(8).
 9. Mastrangelo S, Rivetti S, Triarico S, et al. Mechanisms, Characteristics, and Treatment of Neuropathic Pain and Peripheral Neuropathy Associated with Dinutuximab in Neuroblastoma Patients. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(23):12648.
 10. 神経芽腫 概要：小児慢性特定疾病情報センター
https://www.shouman.jp/disease/details/01_05_027/
(2023.11.15 アクセス)
 11. Neuroblastoma Treatment (PDQ®)-Health Professional Version : NCI
<https://www.cancer.gov/types/neuroblastoma/hp/neuroblastoma-treatment-pdq> (2023.11.15 アクセス)
 12. 骨肉腫 概要：小児慢性特定疾病情報センター
https://www.shouman.jp/disease/details/01_05_035/
(2023.11.15 アクセス)

13. Bhatia S. Long-term Complications of Therapeutic Exposures in Childhood: Lessons Learned From Childhood Cancer Survivors. *Pediatrics*. 2012;130(6):1141-1143.
14. Seremidi K, Kloukos D, Polychronopoulou A, Kattamis A, Kavvadia K. Late effects of chemo and radiation treatment on dental structures of childhood cancer survivors. A systematic review and meta-analysis. *Head Neck*. 2019;41(9):3422-3433.
15. Nakajima K, Miyazaki F, Terada K, Takakura H, Suzuki M, Ogawa M. Comparison of low-molecular-weight ligand and whole antibody in prostate-specific membrane antigen targeted near-infrared photoimmunotherapy. *Int J Pharm*. 2021;609:121135.
16. Hirata H, Kuwatani M, Nakajima K, et al. Near-infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT) on cholangiocarcinoma using a novel catheter device with light emitting diodes. *Cancer Sci*. 2021;112(2):828-838.
17. Inagaki FF, Kato T, Furusawa A, et al. Disialoganglioside GD2-Targeted Near-Infrared Photoimmunotherapy (NIR-PIT) in Tumors of Neuroectodermal Origin. *Pharmaceutics*. 2022;14(10).
18. Ogawa M, Tomita Y, Nakamura Y, et al. Immunogenic cancer cell death selectively induced by near infrared photoimmunotherapy initiates host tumor immunity. *Oncotarget*. 2017;8(6):10425-10436.
19. Nakajima K, Takakura H, Shimizu Y, Ogawa M. Changes in plasma membrane damage inducing cell death after treatment with near-infrared photoimmunotherapy. *Cancer Sci*. 2018;109(9):2889-2896.

20. Ogata F, Nagaya T, Okuyama S, et al. Dynamic changes in the cell membrane on three dimensional low coherent quantitative phase microscopy (3D LC-QPM) after treatment with the near infrared photoimmunotherapy. *Oncotarget*. 2017;8(61):104295-104302.
21. Nagaya T, Nakamura Y, Sato K, et al. Near infrared photoimmunotherapy with avelumab, an anti-programmed death-ligand 1 (PD-L1) antibody. *Oncotarget*. 2017;8(5):8807-8817.
22. Takahashi K, Taki S, Yasui H, et al. HER2 targeting near-infrared photoimmunotherapy for a CDDP-resistant small-cell lung cancer. *Cancer Med*. 2021;10(24):8808-8819.
23. Cheung NK, Guo H, Hu J, Tassev DV, Cheung IY. Humanizing murine IgG3 anti-GD2 antibody m3F8 substantially improves antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity while retaining targeting in vivo. *Oncoimmunology*. 2012;1(4):477-486.
24. Mitsunaga M, Nakajima T, Sano K, Choyke PL, Kobayashi H. Near-infrared theranostic photoimmunotherapy (PIT): repeated exposure of light enhances the effect of immunoconjugate. *Bioconjug Chem*. 2012;23(3):604-609.
25. Fujimura D, Inagaki F, Okada R, et al. Conjugation Ratio, Light Dose, and pH Affect the Stability of Panitumumab-IR700 for Near-Infrared Photoimmunotherapy. *ACS Med Chem Lett*. 2020;11(8):1598-1604.
26. Nakajima T, Sato K, Hanaoka H, et al. The effects of conjugate and light dose on photo-immunotherapy induced cytotoxicity. *BMC Cancer*. 2014;14(1):389.

27. Theruvath J, Menard M, Smith BAH, et al. Anti-GD2 synergizes with CD47 blockade to mediate tumor eradication. *Nature Medicine*. 2022;28(2):333-344.
28. Mabe NW, Huang M, Dalton GN, et al. Transition to a mesenchymal state in neuroblastoma confers resistance to anti-GD2 antibody via reduced expression of ST8SIA1. *Nat Cancer*. 2022;3(8):976-993.
29. Chan GC-F, Chan CM. Anti-GD2 Directed Immunotherapy for High-Risk and Metastatic Neuroblastoma. *Biomolecules*. 2022;12(3):358.
30. Anderson J, Majzner RG, Sondel PM. Immunotherapy of Neuroblastoma: Facts and Hopes. *Clin Cancer Res*. 2022;28(15):3196-3206.
31. Del Bufalo F, De Angelis B, Caruana I, et al. GD2-CART01 for Relapsed or Refractory High-Risk Neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2023;388(14):1284-1295.
32. Straathof K, Flutter B, Wallace R, et al. Antitumor activity without on-target off-tumor toxicity of GD2-chimeric antigen receptor T cells in patients with neuroblastoma. *Sci Transl Med*. 2020;12(571).
33. Kobayashi H, Furusawa A, Rosenberg A, Choyke PL. Near-infrared photoimmunotherapy of cancer: a new approach that kills cancer cells and enhances anti-cancer host immunity. *Int Immunol*. 2021;33(1):7-15.
34. Maruoka Y, Wakiyama H, Choyke PL, Kobayashi H. Near infrared photoimmunotherapy for cancers: A translational perspective. *EBioMedicine*. 2021;70:103501.