

## 第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

### Development of a new minimally invasive phototherapy for lung cancer using antibody-toxin conjugate

抗体-毒素複合体を用いた肺癌に対する新しい低侵襲な光療法の開発

日本医科大学大学院医学研究科 呼吸器外科学分野

大学院生 園川 卓海

Thoracic Cancer, 2023 年 掲載

DOI: 10.1111/1759-7714.14776.

光線力学的治療（Photodynamic Therapy: PDT）は、光感受性物質とレーザー照射を用いた癌治療の一つである。肺癌領域においては、中心型早期肺癌に対する標準的な治療法の一つとして確立されている。一方、赤色光を用いた現在の PDT では、赤色レーザー光の光特性により進行癌に対する治療効果は限定的であり、腫瘍径が 30 mm を超えるような腫瘍に対する抗腫瘍効果を向上させるためには、新たなブレイクスルーが必要である。そのため、申請者は、イムノトキシンと PDT で使用される光感受性物質である mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) を組み合わせて使用する新しい光治療法 intelligent targeted antibody phototherapy (iTAP) の開発を目的として研究を行った。イムノトキシンとして細胞毒素であるサポリンと抗上皮成長因子受容体（epidermal growth factor receptor: EGFR）抗体であるセツキシマブの複合体（サポリン-セツキシマブ複合体）を開発した。

iTAP の細胞殺傷原理は、細胞毒性を有するサポリンがセツキシマブによって癌細胞に特異的に輸送され、細胞内のエンドソームに取り込まれる。その後、癌細胞に集積した NPe6 と赤色レーザー光照射によって生ずる光線力学的反応によりサポリンがエンドソームから細胞質へ移行し、細胞死が引き起こされると考えられる。

はじめに、細胞表面に発現する EGFR に結合し、エンドサイトーシスで細胞内のエンドソームに取り込まれたセツキシマブが、NPe6 と光照射によって細胞質へ放出されることを検証した。ヒト類上皮癌細胞株である A431 細胞を使用し、蛍光色素である fluorescein isothiocyanate (FITC) で標識したセツキシマブ、NPe6、光照射の処理を行い、蛍光顕微鏡で観察した。FITC は pH の上昇に伴い蛍光強度が上昇することが報告されているため、FITC で標識したセツキシマブの治療に伴う細胞内の局在の変化を蛍光顕微鏡で評価した。解析の結果、NPe6 (20  $\mu$ M) と光照射 (37.6 J/cm<sup>2</sup>) をそれぞれ単独で処理するものと比較して、それらを共に加えることで蛍光強度は有意に上昇し、NPe6 と光照射の光線力学的反応により、セツキシマブが細胞内エンドソームから細胞質へ放出されることが確認された。この結

果から、iTAPにおいて、サポリン-セツキシマブ複合体が光線力学的反応により細胞質内に放出され、サポリンの細胞毒性を誘導するのではないかと考えられた。次に、A431、ヒト肺腺癌細胞株 A549、ヒト乳癌細胞株 MCF7 細胞株における iTAP の細胞毒性を検討するために細胞傷害性試験を施行した。まず、3つの細胞株 (A431、A549、MCF7) について、細胞表面の EGFR の発現量をフローサイトメトリーで評価した。細胞あたりの EGFR の発現は A431 で高発現、A549 で中等度発現、MCF7 で低発現であった。それらの3つの細胞株に対して、細胞傷害性試験を行ったところ、サポリン-セツキシマブ複合体単独の細胞毒性と比較して、NPe6、光照射を共に追加することでいずれの細胞株でも細胞毒性が増強することが示された。なお、本試験で用いた NPe6 の用量、光照射量 (30  $\mu$ M NPe6、37.6 J/cm<sup>2</sup> 光照射) は、そのみでは細胞毒性は認められない量であった。*in vivo* での iTAP の抗腫瘍効果を検討するために、担癌マウスモデルを用いた動物実験で評価した。A549 細胞株を右大腿部皮下に移植した BALB/c ヌードマウスに対して、コントロール群、サポリン-セツキシマブ複合体単独群、NPe6-PDT 単独群、サポリン-セツキシマブ複合体と NPe6-PDT を組み合わせる iTAP 群に分け、それぞれの治療効果を検証した。iTAP 群では、サポリン-セツキシマブ複合体 (3 mg/kg) を腹腔内投与し、その2日後に NPe6-PDT (5 mg/kg NPe6 を静脈投与、投与2時間後に 30 J/cm<sup>2</sup> 光照射) を実施した。各治療後の腫瘍体積を経時的に測定した。その結果、サポリン-セツキシマブ複合体単独群 (3 mg/kg) や NPe6-PDT 単独群 (5 mg/kg NPe6、30 J/cm<sup>2</sup> 光照射) と比較して、低用量のサポリン-セツキシマブ複合体と NPe6-PDT を組み合わせる iTAP では、非常に強く腫瘍の増殖を抑制した。

これらの結果、iTAP は、NPe6 と光照射の光線力学的反応の特性によりサポリン毒性を誘導し、強い抗腫瘍効果を有することが明らかになった。

二次審査においては、iTAP の免疫賦活作用の可能性、今後臨床応用する上での克服すべき課題、本手法におけるサポリンやセツキシマブの意義、PDT の現状などについての質問があり、いずれも本研究、過去の報告を基にそれぞれの確かな回答を得た。

本研究は、iTAP の肺癌細胞に対する最初の報告である。iTAP は、従来の PDT とは異なる低侵襲治療法であり、PDT の適応とされていない進行癌や他の難治性固形癌に対する新しい治療法となる可能性がある。そして、今後の臨床応用に期待される意義のある論文と考えられた。

以上より、本論文は学位論文として価値あるものと認定した。