

博士論文（要約）

頭頸部癌を標的としたサポリン標識抗 Robo1 抗体(イムノトキシン)の光化学的
内在化法併用による新規治療法の開発

小松 紀子

本研究は、頭頸部扁平上皮癌 (Head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) における Robo (Roundabout homolog) 1 の発現を明らかにし、Robo1 を新規治療標的因子とした、抗 Robo1 抗体イムノトキシン (Immunotoxin, IT) による HNSCC の副作用が少なく、治療効率の高い治療法の開発につながる知見を得ることを目的とした。

癌は日本の死亡原因第一位であり、そのうち、頭頸部癌の死亡者数は 3.0% と少ないが、世界では 6 番目に多い癌である。頭頸部癌は、全癌の約 1% を占め、口腔癌、上顎洞癌、上・中・下咽頭癌、喉頭癌、甲状腺癌、唾液腺癌などに分類され、病理組織学的に扁平上皮癌 (SCC) が 90% 以上を占める HNSCC は社会の高齢化に伴い、今後更に増加すると考えられている。従来の標準治療による機能障害は大きな問題となっており、機能障害が少なく治療効果の高い新規治療法が期待されている。

機能障害の少ない治療効果の高い新規治療法の 1 つとしてモノクローナル抗体による抗体医薬の治療法が挙げられ、近年、抗体医薬の承認は増加傾向にある。HNSCC の治療では、上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) に結合して EGFR 作用を阻害するセツキシマブ、キラー T 細胞上の PD-1 (Programmed cell death 1) と結合して T 細胞の活性化状態を維持し、癌細胞の増殖効果を抑制するニボルマブ、がそれぞれ FDA (Food and Drug Administration) に 2006 年、2016 年に承認された。最近、免疫療法と光化学療法を併用した小林らの近赤外線免疫療法 (Near-infrared photoimmunotherapy, NIR-PIT) では、IR700 (フタロシアニン) という蛍光色素を抗 EGFR 抗体に結合させ、投与した後、癌部局所に波長 700nm の近赤外線を照射するという手法で、制御性 T 細胞を除去し、キラー T 細胞を活性化し、癌細胞の増殖を抑制することが明らかになり、標準治療で完治しなかった頭頸部癌患者を対象とした第二相試験が終了し、良好な結果を得ている。

本研究で標的因子として着目したのは、キイロシヨウジョウバエにおいて発生段階における軸索誘導因子として発見され、1 回膜貫通受容体である Robo1 である。Robo1 は、軸索誘導以外に、細胞移動や細胞骨格への関与だけではなく、近年、Robo1 の発現は、大腸癌、小細胞肺癌、神経膠腫、乳癌、そして、HNSCC でも報告されるようになった。また、Robo1 のリガンドである SLIT2 と結合して生じる SLIT2/Robo1 シグナルが、癌細胞の浸潤、転移、上皮間葉移行 (EMT)、腫瘍血管新生における重要な役割を果たすと報告されるようになり、Robo1 は抗体による癌治療法の標的因子としての可能性の高いものであると考えられる。

頭頸部扁平上皮癌 HNSCC における Robo1 の発現を明らかにし、Robo1 を新規治療標的因子とした、抗 Robo1 抗体 IT による HNSCC の副作用が少なく、治療効率の高い治療法の開発を目指す。

HNSCC 細胞株 (HSQ-89 (上顎洞 SCC 由来), Sa3 (下顎歯肉 SCC 由来), HO-1-u-1 (口腔底 SCC 由来), SAS (舌 SCC 由来)) に対して、ウエスタンブロッティング、フローサイトメトリー、免疫染色による Robo1 のタンパク発現解析、qRT-PCR による Robo1 の mRNA 発現解析を行った。また、口腔 SCC 臨床検体 (上下顎歯肉癌、頬粘膜癌、口腔底癌、舌癌) に対して免疫組織染色による Robo1 のタンパク発現解析を行った。Robo1/CHO (Robo1 強制発現細胞)、HSQ-89、

Sa3、HO-1-u-1、SAS、Robo4/CHO (Robo4 強制発現細胞) の順に、フローサイトメトリーによる Robo1 タンパクの 1 細胞あたりの発現量は、220,000、22,300、3,010、184、33.7 分子、Robo4/CHO は検出限界値以下であった。Robo1 の mRNA の 1 細胞あたりの発現量は、1.97、0.281、0.0226、HO-1-u-1、SAS、Robo4/CHO は検出限界値以下であった。Robo1/CHO の Robo1 タンパクあるいは mRNA の発現量を基準とした際に、HSQ-89、Sa3 でそれぞれその 1/10、1/100 程度の発現量であり、Robo1/CHO、HSQ-89、Sa3 の間の Robo1 のタンパク発現および mRNA 発現は比例を認めた。また、口腔 SCC 臨床検体（上下顎歯肉癌、頬粘膜癌、口腔底癌、舌癌）で Robo1 陽性症例を認めた。これらの結果より、Robo1 は HNSCC における有用な標的因子であることが示された。

抗 Robo1 抗体イムノトキシン (IT-Robo1) による細胞傷害性試験では、IT-Robo1 濃度が 4.2 nM の時、Robo1/CHO、HSQ-89、HUVEC の細胞生存率はそれぞれ、40%、60%、80%であり、Robo1 のタンパク発現量のある程度反映した効果が示唆されたが、IT-NC (Negative control) 投与時の細胞生存率と比較して、いずれも ANOVA 解析により有意差を認めなかった ($p \geq 0.01$)。Robo1 抗原に対する高い結合能を有する抗 Robo1 抗体 (B5209B 抗体) ($K_d = 30 \text{ pM}$) IT を用いても、IT-Robo1 単独では HNSCC 殺傷効果が乏しく、Robo1 のタンパク発現を 200,000 分子程度認める Robo1/CHO でも細胞殺傷効果は不十分であった。この結果から、IT-Robo1 の細胞への内在化が不十分である可能性が考えられ、IT 内在化促進の方法を併用する必要性が示された。そのため、抗体や IT の内在化を促進する因子として知られているサポニンおよび PCI (Photochemical internalization) に着目した。サポニンは、界面活性作用により、細胞膜を破壊し、併用薬剤の細胞質内への内在化を促進する薬剤として漢方薬などに含有されている。また、PCI は、光増感剤が IT と一緒にエンドサイトーシスでライソゾームに局在させ、光増感剤に反応する波長により励起させることで一重項酸素を発生し、活性の状態で IT が放出され、IT による細胞毒性が高まる考えられている。

HSQ-89 細胞株における IT-Robo1 と光増感剤 TPPS2a 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、光源 (450 nm LED) 1 時間照射 (9.5 mW/cm^2 , 34.1 J/cm^2) による PCI の併用では、IT 0.84 nM 以上で細胞生存率は 0%であり、IT-Robo1 単独と比較して、IT-Robo1+PCI で ANOVA 解析により有意に低い細胞生存率であり ($p < 0.01$)、腫瘍増殖抑制効果を示した。

各細胞株における IT-Robo1 と光増感剤 AlPcS2a (Robo1/CHO, HSQ-89, Sa3 : 5.0 $\mu\text{g/ml}$, HO-1-u-1, SAS, HUVEC, Robo4/CHO : 0.5 $\mu\text{g/ml}$)、光源 (650 nm LED) 5 分照射 (62.7 mW/cm^2 , 18.8 J/cm^2) による PCI の併用では、Robo1/CHO、HSQ-89、HUVEC の IT-Robo1 の IC50 はそれぞれ 54pM、34pM、110pM であった。Robo1/CHO、HSQ-89、HUVEC 細胞株は、IT-Robo1 単独と比較して IT-Robo1+PCI で ANOVA 解析により有意に低い細胞生存率であり ($p < 0.01$)、腫瘍増殖抑制効果を示した。一方、Sa3、HO-1-u-1、SAS、Robo4/CHO 細胞株は IT-Robo1+PCI は IT-Robo1 単独と比較して ANOVA 解析により有意差を認めなかった ($p \geq 0.01$)。

以上より、HNSCC 細胞株において、IT-Robo1+PCI では、IT-Robo1 単独と比較して腫瘍増殖抑制効果を示した。

また、IT-Robo1 と光増感剤 AlPcS2a (Sa3 : 5.0 $\mu\text{g/ml}$, HO-1-u-1, SAS, Robo4/CHO : 0.5 $\mu\text{g/ml}$)、光源 (650 nm LED) 10 分照射 (62.7mW/cm², 37.6J/cm²) と照射時間を 2 倍にした場合では、Robo1 のタンパク発現量が 3,000 分子程度以上 (Sa3 細胞株) あれば、IT 濃度依存性の効率的な細胞死を誘導できることが明らかとなった。一方、Robo1 の発現数が 30 程度の SAS、Robo1 の発現数が測定限界値未満であった Robo4/CHO (Robo4 強制発現細胞) では、IT-Robo1+PCI は IT-Robo1 と比較して ANOVA 解析により有意差を認めなかった ($p \geq 0.01$)。

そこで、HNSCC 細胞株のうち、Robo1 のタンパク発現量の高い HSQ-89 細胞株のゼノグラフトマウスを作製し、*in vivo* における IT-Robo1 とサポニン併用あるいは PCI 併用の検討を行った。HSQ-89 細胞株ゼノグラフトマウスにおける抗 IT-Robo1+サポニンは IT-Robo1 単独と比較して ANOVA 解析により有意に腫瘍増殖抑制効果を示した ($p < 0.01$)。また、HSQ-89 細胞株ゼノグラフトマウスにおける抗 IT-Robo1+PCI 併用は、IT-Robo1 単独と比較して ANOVA 解析により有意に腫瘍増殖抑制効果を示した ($p < 0.01$) が、腫瘍の消失には至らなかった。原因として、IT、AlPcS2a が固形癌の癌細胞への取り込みが不十分な可能性、AlPcS2a を励起する波長が 650nm であることから癌深部に治療に必要なエネルギーが到達していない可能性などが考えられた。しかし、本研究の結果からは、その原因は明らかではなく、今後は HSQ-89 ゼノグラフトマウスにおける、IT、サポニン、AlPcS2a の癌細胞への到達について評価を行う必要があると考えられる。

IT の内在化を促進する因子として、IT-Robo1 にサポニンを併用すると、PCI と同様に IT-Robo1 単独と比較して高い効果を得たが、腫瘍への治療選択性を考慮すると、主に光照射部位で効果を発揮する PCI と比べて、腫瘍への治療選択性が低い。一方で、サポニンは光の到達深度の問題はないが、サポニンの癌細胞への到達の問題が残る。IT-Robo1 と PCI にサポニンを併用することで光の到達深度の問題について補足できる可能性については今後検討が必要である。

以上、本論文は HNSCC における Robo1 のタンパクおよび mRNA 発現を明らかにし、IT-Robo1 に薬剤送達法として IT の内在化を促進するサポニンあるいは PCI を併用することで腫瘍増殖抑制効果を示すことを明らかにした。本研究は、HNSCC における Robo1 の治療標的因子としての可能性を示し、IT の内在化を促進する薬剤送達法は、抗 Robo1 抗体による IT だけではなく、これまでに発現量が少ないために、ADC (Antibody drug conjugate) の開発が断念されていた様々な標的因子、免疫チェックポイントなどの併用療法への応用が可能と考えられる。