

氏名	くりう あや 栗生 彩
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博士乙第 〇〇号
学位授与の日付	2019年7月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	新規サバイビン発現抑制剤 YM155 の抗腫瘍作用および PET イメー ジングの有用性に関する非臨床研究
論文審査委員	(主査) 教授 三澤 日出巳 (博士(薬学)) (副査) 教授 杉本 芳一 (薬学博士) 教授 服部 豊 (医学博士)

論文内容の要旨

【背景と目的】

細胞には、増殖の機能とともに自らを死滅させるアポトーシス（細胞死）と呼ばれる機能が備わっている。がんの特徴の一つに、自律性増殖があり、アポトーシスによる細胞死誘導機構の破綻が原因となり、形質変化したがん細胞が除去されることなく自律的に増殖を続ける。サバイビンは、ミトコンドリアを介するアポトーシスによって活性化するカスパーゼを阻害することで、抗アポトーシスタンパク質として機能することが報告されている。サバイビンは多くのがん細胞で発現しており、サバイビンの発現量ががんの悪性度や予後と相関することを示す報告もあることから、サバイビンはがん治療の有望なターゲットと考えられている。

YM155 はサバイビン発現抑制剤であり、サバイビン遺伝子プロモーターを用いたレポーターアッセイ系において、high throughput screening (HTS) でのヒット化合物の最適化によりアステラス製薬で独自に創製された化合物である。YM155 は正常細胞や他の IAP ファミリータンパク質の発現には作用せず、サバイビン特異的に発現を抑制する。また 119 個のヒトがん細胞株を用いたパネルスクリーニングにおいて、YM155 は広い抗腫瘍スペクトラムと強いがん細胞増殖阻害作用を示すことが示されている。

第一章の研究では、多くの患者が再発し、十分な治療オプションのない非ホジキンリンパ腫 (NHL) における YM155 単剤での有効性、および NHL の標準治療で広く用いられているリツキシマブと YM155 との併用効果について、ヌードマウスを用いたヒト NHL 細胞移植モデルを用いて検討した。第二章の研究では、NHL の診断、治療に有用とされている、positron emission tomography (PET) イメージングの有用性を検討する目的で、YM155 とリツキシマブを併用投与した時の感受性の早期検出の可能性を検討した。さらに YM155 の感受性を規定する因子として細胞内の YM155 取り込み量と増殖阻害活性の関係を検討し、¹¹C-YM155 のマイクロドージングによる腫瘍内移行性を PET イメージングすることで YM155 の感受性を事前に予測可能であるか、各種ヒト腫瘍移植マウスモデルを用いて検討した。

【方法】

1. *in vivo* 抗腫瘍効果評価

ヒト NHL 細胞懸濁液を作成し、BALB/c nu/nu ノードマウスの背部皮下に移植した。腫瘍形成後、YM155 は浸透圧ポンプにより 7 日間皮下持続投与、リツキシマブは静脈内投与した。経時的に腫瘍体積と体重測定を実施した。延命効果の検討は SCID マウスを用いて生存を指標に検討した。

2. サバイビン発現抑制作用および細胞死誘導作用の組織化学的解析

経時的（投与 3 および 7 日後）に採取した腫瘍サンプルについて、細胞増殖は Ki-67 染色、細胞死の誘導は TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色で評価した。腫瘍内のサバイビン発現は、自社サバイビン抗体を用い染色評価した。

3. PET による抗腫瘍効果評価

^{18}F -FDG および ^{18}F -FLT をトレーサーとして、ヒト NHL 細胞移植マウスの腫瘍部位の各トレーサーの腫瘍集積の強さを、PET イメージングで計測される放射能濃度を投与量と体重で補正して評価した。

4. YM155 による細胞増殖阻害活性と細胞内移行性の検討

39 種類のヒト癌細胞における YM155 の細胞内濃度は LC-MS/MS を用いて測定し、*in vitro* 増殖阻害活性との相関性を評価した。

5. PET を用いた ^{11}C -YM155 の腫瘍移行性および全身移行性検討

YM155 感受性および非感受性のヒト癌細胞移植マウスの腫瘍部位の ^{11}C -YM155 の集積の強さを、PET イメージングで計測される放射能濃度を投与量と体重で補正して評価した。

【結果】

第一章 YM155 の単剤およびリツキシマブあるいはリツキシマブを含む療法との併用における NHL に対する抗腫瘍作用

1. YM155 単剤投与による NHL 皮下移植マウスモデルにおける抗腫瘍効果

YM155 は、ヒト NHL を移植したマウスモデルにおいて、YM155 の 1 および 3 mg/kg/day 投与は、有意な腫瘍の退縮を誘導し、3 mg/kg/day 投与群においては完全退縮が認められた。

2. 免疫組織化学的検討

NHL 皮下移植モデルにおいて YM155 の 3 mg/kg/day を 7 日間持続投与した時の腫瘍内のサバイビン発現量の変化および細胞死誘導を、投与開始前、投与開始 3 日後および 7 日後に免疫組織化学染色により検討した。YM155 の抗腫瘍作用はサバイビン mRNA およびタンパク発現の有意な抑制を伴うものであった。また、YM155 投与群においては細胞増殖の指標である mitotic index (HE 染色) および proliferation index (Ki 染色) が

有意に減少し、アポトーシス細胞が増加していることが示された。以上から、YM155 の NHL における抗腫瘍作用は、サバイビン発現抑制による細胞増殖の停止とアポトーシスの誘導を伴うものであることが確認された。

3. YM155 複数サイクル投与による NHL 皮下移植および全身播種マウスモデルにおける抗腫瘍効果

YM155 の 1 mg/kg および 3 mg/kg の 7 日間持続投与+14 日間休薬を 1 サイクルとして、YM155 を複数サイクル投与した結果、各サイクルにおいて腫瘍退縮あるいは腫瘍増殖の抑制が観察された。3 mg/kg 投与においては、その効果は休薬期間中も持続された。ヒト NHL 細胞を静脈内投与して全身播種させたモデルにおいて YM155 投与によりコントロールあるいはリツキシマブ投与と比較して有意な生存期間の延長が観察された。

4. YM155 とリツキシマブの併用投与による NHL 皮下移植マウスモデルにおける抗腫瘍効果

次に NHL 皮下移植モデルにおける YM155 とリツキシマブの併用抗腫瘍作用を検討した。YM155 およびリツキシマブの単剤では有意な腫瘍増殖抑制効果を示さない用量を併用したところ、それぞれの薬剤による抗腫瘍効果の相加を上回る、強い腫瘍退縮が観察された。同様に全身播種モデルにおいても併用により有意な延命期間の延長が示された。

第二章 PET イメージングを用いた早期薬効検出と YM155 感受性腫瘍の投与前検出

1. PET イメージングによる YM155 とリツキシマブとの併用効果の早期検出

ヒト NHL 細胞である WSU-DLBCL- 2 の皮下移植マウスモデルを用いて評価した。YM155 の皮下持続投与およびリツキシマブ静脈内投与前および 3 日目の移植マウスを用いて、糖代謝マーカーである ^{18}F -FDG、および細胞生存マーカーである ^{18}F -FLT の腫瘍内における集積を指標として評価した。投与 3 日目において併用群ではコントロール群と比較して、 ^{18}F -FDG および ^{18}F -FLT の集積の有意な抑制が観察された。 ^{18}F -FLT の結果が実際の腫瘍内の細胞増殖の変化を捉えているかを確認するために Ki-67 染色で proliferation index を求めた結果、 ^{18}F -FLT の結果同様、投与 3 日目においてコントロール群と比較して併用群で有意な細胞増殖の阻害が観察された。

2. 細胞内の YM155 取り込み量と増殖阻害活性の関係

YM155 の細胞内取り込み量と GI_{50} 値の相関を評価する為に、ヒトがん細胞から 39 細胞株を選択し、1 μM の YM155 を 4 時間作用した時の YM155 取り込み量と GI_{50} 値の関係を検討した。その結果、 GI_{50} 値と細胞内 YM155 取り込み量に有意な相関 (Pearson' s $r = -0.5709$; $P = 0.001$) が示された。

3. 各種 YM155 感受性および耐性腫瘍に対する PET イメージングを用いた ^{11}C -YM155 の腫瘍移行性

YM155に感受性を示す癌細胞およびYM155耐性を示す癌細胞を移植したマウスモデルにおける、移植した腫瘍への¹¹C-YM155移行性についてPETを用いて検討した。SUV値で層別化をした場合、¹¹C-YM155の腫瘍集積が高い腫瘍(SUV>0.3)ではYM155が高い抗腫瘍効果を示し、集積の低い腫瘍(SUV<0.3)では耐性を示した。

【考察】

第一章の研究から、新規サバイビン発現抑制剤YM155のNHLに対する単剤およびリツキシマブとの併用における抗腫瘍作用が示された。サバイビンは、NHLにおいても高発現してNHLの予後と相関していることが報告されていたが、本研究の免疫組織学的検討の結果から、サバイビンの発現がNHLの増殖進展に寄与しており、YM155の抗腫瘍作用はサバイビン発現の抑制に伴うものであることが裏付けられた。NHLの中で最も頻度の高いDLBCLの治療アルゴリズムとして、巨大な腫瘍(bulky mass)がある場合は治療コース数を増やしたより強力な治療が必要とされている。本研究において、YM155を複数サイクル投与しても多くのマウスのbulky mass病変に対し耐性を示すことなく効果を維持し続けること、全身播種マウスモデルにおいても延命効果を示したことから、より臨床病態に近い状況でのがんの増殖進展に対するYM155の有用性が示唆された。また、リツキシマブおよびリツキシマブを含む療法との併用が各種NHLにおける治療戦略から重要とされているが、YM155とリツキシマブとの併用効果が示されたことで、YM155がリツキシマブの新たな併用薬オプションとなり得ると考える。今後、YM155との併用時におけるリツキシマブの各種細胞内の生存シグナルへの影響を更に検討することで併用メカニズムを解明する必要がある。

第二章の検討では、PETイメージングが臨床でがんの診断・治療に有用とされていることから、YM155の抗腫瘍効果判定およびYM155の事前の効果予測におけるPETイメージングの有用性を検討した。本章の研究において、¹⁸F-FDG-PETおよび¹⁸F-FLT-PETいずれにおいても併用効果は投与3日後から検出され、敏感かつ早期に抗腫瘍効果を捉えることが示された。形態情報を提供するCTとは異なりPETは機能情報を得られることから、細胞内の代謝活性や細胞生存状況を推し量るツールとして¹⁸F-FDGおよび¹⁸F-FLTによるYM155の抗腫瘍効果の判定は早期の治療方針策定に役立つ可能性がある。第一章の検討を基に実施された臨床試験(アステラス製薬)において、YM155に感受性を示さない患者層がいることが明らかとなっている。また、サバイビンmRNAとYM155の感受性には弱い相関しかないことが既報より示され、何らかの別の因子が関与することが示唆されている。YM155の腫瘍移行性に注目した第二章の検討では、YM155の増殖阻害活性は細胞内へのYM155の取り込み量との相関が高いことが示された。また*in vivo*においても、¹¹C-YM155の腫瘍内への集積を指標にYM155の感受性を示す腫瘍か否かを、PETイメージングにより事前に層別化できる可能性が示唆された。臨床においても、YM155の感受性を¹¹C-YM155の単回マイクロドージングで腫瘍内移行性を直接的に且つ細胞内への取り込みに伴って起こる細胞外輸送も含めて、PETイメージングによって包括的に予測できる可能性があると考えられる。

【結論】

第一章および第二章の研究より、NHLにおいてはYM155によるサバイビン発現抑制がNHL治療のオプションの一つとなり得ること、更にYM155の早期薬効検出のモダリティとしてPETイメージングが有用であることが示された。また、YM155の感受性の因子としての細胞内取り込みの寄与が示されたことにより、 ^{11}C -YM155の単回マイクロドージングによる ^{11}C -YM155の移行性のPETイメージングにより、YM155に感受性の高い腫瘍をYM155の投与前に検出できる可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

学位申請者の実験から、YM155の抗腫瘍作用は、サバイビン発現量の抑制とアポトーシスの誘導を伴い、特にNHLの増殖進展においてサバイビンが寄与すること、YM155の抗腫瘍作用は非特異的なものではなくサバイビンを阻害することによるものであることが裏付けられた。また、臨床により近い実験系であるNHL細胞皮下移植マウスモデルを用い、YM155の複数サイクル投与はほとんどの個体で耐性を示すことなく効果を維持し続けること、またbulky mass病変に対しても強い退縮作用を有すること、全身播種マウスモデルにおいて延命効果を示すこと、などのYM155の有用性を示す非臨床研究での成果が得られた。

さらに、NHLの治療に重要であるとされているリツキシマブとの併用効果を検討し、YM155はリツキシマブとの併用により、単剤では投与後に再増殖する条件においても、完全退縮を伴う併用効果および延命効果の延長が認められた。

一方で、YM155の感受性および耐性発現と、YM155の細胞内取り込み活性の相関を解析することで、薬効発現と細胞内取り込み活性とに強い相関があり、 ^{11}C -YM155マイクロドージングにより薬効予測が可能であることを動物実験で示した。

申請者の上記の実験結果および考察は、サバイビンに作用する薬物開発の可能性を広げるとともに、NHL治療の新たなオプションを探索するための重要な知見を提供するものであると高く評価された。

審査会において、YM155のがん細胞への取り込み及び濃縮機構、NHLの既存の標準治療との差別化および優位性、短半減期アイソトープを用いたYM155マイクロドージングの実現可能性、などの質問があったが、応答は概ね妥当であった。

以上より、申請者は博士（薬学）の学位を授与されるに相応しいと判断した。

論文目録

【主論文に関する原著論文】

1. Kita A, Nakahara T, Yamanaka K, Nakano K, Nakata M, Mori M, Kaneko N, Koutoku H, Izumisawa N, Sasamata M. Antitumor effects of YM155, a novel survivin suppressant, against human aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Res.* 2011;35(6):787-92.
2. Kita A, Mitsuoka K, Kaneko N, Nakata M, Yamanaka K, Jitsuoka M, Miyoshi S, Noda A, Mori M, Nakahara T, Sasamata M. Sepantronium bromide (YM155) enhances response of human B-cell non-Hodgkin lymphoma to rituximab. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;343(1):178-83.
3. Mitsuoka K, Kita A, Murakami Y, Shirasuna K, Noda A, Yamanaka K, Kaneko N, Miyoshi S. Predicting response to sepantronium bromide (YM155), a survivin suppressant, by PET imaging with [¹¹C]YM155. *Nucl Med Biol.* 2018;64-65:41-6.