

学位授与番号：甲 1 0 1 1 号

氏 名：伊藤 公博

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 28 年 3 月 23 日

学位論文名：

**HER2 陽性ヒト胃癌細胞に対する化学療法を併用した光線免疫療法の有効性の検討：異なる細胞障害機序による抗腫瘍効果の増強**

主論文名：

**Molecular Targeted Photoimmunotherapy for HER2-positive Human Gastric Cancer in Combination with Chemotherapy Results in Improved Treatment Outcomes Through Different Cytotoxic Mechanisms.**

（**HER2 陽性ヒト胃癌細胞に対する化学療法を併用した光線免疫療法の有効性の検討：異なる細胞障害機序による抗腫瘍効果の増強**）

学位審査委員長：教授 矢永勝彦

学位審査委員：教授 馬目佳信 教授 炭山和毅

# 論 文 要 旨

論文提出者名	伊藤 公博 指導教授名 松藤 千弥
<p data-bbox="196 409 403 443">主論文題名</p> <p data-bbox="180 461 1369 589">Molecular Targeted Photoimmunotherapy for HER2-positive Human Gastric Cancer in Combination with Chemotherapy Results in Improved Treatment Outcomes Through Different Cytotoxic Mechanisms.</p> <p data-bbox="180 602 1278 683">(HER2 陽性ヒト胃癌細胞に対する化学療法を併用した光線免疫療法の有効性の検討 : 異なる細胞障害機序による抗腫瘍効果の増強)</p> <p data-bbox="196 696 1430 777">Kimihiro Ito, Makoto Mitsunaga, Seiji Arihiro, Masayuki Saruta, Mika Matsuoka, Hisataka Kobayashi, Hisao Tajiri. BMC Cancer. 2016; 16:37.</p> <p data-bbox="180 840 1430 1160">光線免疫療法 (Photoimmunotherapy ; PIT) は癌治療用モノクローナル抗体に蛍光プローブ IR700 を結合させ、IR700 結合モノクローナル抗体を癌細胞の標的分子に結合させた後、近赤外光を照射することで速やかに癌細胞を破壊する新しい癌治療法である。しかし、モノクローナルな増殖を示さない胃癌などの上皮性癌に対しては標的分子の発現の程度で PIT の治療効果に差がみられ、また腫瘍内に IR700 結合モノクローナル抗体が均一に分布しない場合にも治療効果は制限される。本研究では PIT に化学療法を併用することで上記の問題点を克服し、PIT 単独治療よりも高い抗腫瘍効果が得られるかについて HER2 陽性ヒト胃癌細胞を用いて検討した。</p> <p data-bbox="180 1173 1430 1494">HER2 標的モノクローナル抗体 trastuzumab に IR700 を結合させた化合物である trastuzumab-IR700 を合成し、化学療法には 5-FU を使用した。HER2 陽性ヒト胃癌細胞株 NCI-N87 に対して PIT 単独群 (trastuzumab-IR700 投与+近赤外光照射)と 5-FU 併用 PIT 群における治療効果を評価した。細胞障害は LIVE/DEAD assay と trypan blue exclusion assay で評価し、また各治療群におけるアポトーシスの影響を評価するため caspase-3 活性を測定した。動物実験ではマウス腫瘍モデルに対し上記の治療を行い、経時的な腫瘍体積の計測と腫瘍組織の病理学的変化で抗腫瘍効果を評価した。</p> <p data-bbox="180 1507 1430 1926">LIVE/DEAD assay では PIT 単独施行直後において強い細胞障害を認めたが、5-FU を併用することでさらに有意な強い細胞障害を認めた。Trypan blue exclusion assay でも同様に PIT に 5-FU を併用することでより強い細胞障害が治療後長期間にわたり認められた。Caspase-3 活性は、直接細胞膜破壊を引き起こす PIT 自体ではその上昇を認めず、5-FU を併用した PIT では有意な上昇を認めた。これらより、PIT による細胞障害は主にネクローシスの誘導が中心であり、5-FU を併用することでアポトーシスの機序が加わり、より強い細胞障害が引き起こされたことが考えられた。マウス腫瘍モデルでも 5-FU を併用した PIT 群で PIT 単独群と比べ長期間にわたる有意な抗腫瘍効果を認め、さらに腫瘍組織の病理学的評価においても PIT に伴う広範な壊死所見に加え、残存細胞にはアポトーシスの初期変化と考えられる細胞核の膨化を伴う変性を認めた。</p> <p data-bbox="180 1939 1430 2020">以上より、HER2 陽性胃癌細胞において 5-FU を併用した PIT は、PIT によるネクローシスに 5-FU によるアポトーシスの機序も加わり、PIT 単独治療と比較して抗腫瘍効果を増強させた。</p>	

## 論文審査の結果の要旨

伊藤公博（きみひろ）氏、大学院3年生の大学院博士課程の学位請求論文は主論文一編1冊、参考論文1編1冊よりなり、主論文は“Molecular Targeted Photoimmunotherapy for HER2-positive Human Gastric Cancer in Combination with Chemotherapy Results in Improved Treatment Outcomes Through Different Cytotoxic Mechanisms.”（ヒト胃癌細胞に対するHER2特異的光線免疫療法は化学療法との併用により異なった細胞障害メカニズムで抗腫瘍効果を増強させる）と題するもので、本年のBMC Cancer誌（Impact factor 3.362）に掲載されています。指導教授は松藤千弥学長です。ここでは主論文についてのみその要旨を説明いたします。

光線免疫療法（Photoimmunotherapy ; PIT）は癌治療用モノクローナル抗体に蛍光プローブ IR700 を結合させ、その化合物を癌細胞の標的分子に結合させた後、近赤外光を照射することで、励起された IR700 が速やかに癌細胞を破壊する新しい癌治療法です。しかし、多くの上皮性癌はモノクローナルな増殖を示さず、また腫瘍内に IR700 が均一に分布しないなどが想定され、十分な治療効果が期待できない場合があります。伊藤氏はPITに抗癌剤を併用することで上記の問題点を克服し、PIT単独

よりも高い抗腫瘍効果が得られるか否かを HER2 陽性胃癌細胞で検討しました。

方法ですが，HER2 標的モノクローナル抗体 trastuzumab に IR700 を結合させて Tra-IR700 を合成し，抗癌剤には 5-FU を使用しました．まず In vitro で，HER2 陽性ヒト胃癌細胞株 NCI-N87 に対し，PIT 単独群 (Tra-IR700 投与＋近赤外光照射) と 5-FU 併用 PIT 群で治療効果を比較検討しました．治療直後の細胞障害を LIVE/DEAD assay で，治療後長期間にわたる細胞障害を trypan blue exclusion assay で，またアポトーシスの影響を caspase-3 活性の測定により評価しました．In vivo ではマウス皮下腫瘍モデルに対して同様に PIT 単独群と 5-FU 併用 PIT 群で，経時的な腫瘍体積の計測と治療後の腫瘍組織の病理学的変化を評価しました。

結果ですが，in vitro で LIVE/DEAD assay では PIT 単独群で明らかな死細胞数の増加を認めましたが，5-FU 併用でさらに死細胞数が増加しました．Trypan blue exclusion assay でも PIT 単独群と比べ 5-FU 併用 PIT 群で長期間にわたり有意な残存生細胞数の低下を認めました．Caspase-3 活性は，PIT 単独群では明らかな上昇がない一方，5-FU 併用 PIT 群では有意に上昇しました．PIT による細胞障害は直接細胞膜を破

壊すネクロシスの誘導が中心であり、5-FU 併用によりアポトーシスが加わり、さらに強い細胞障害が惹起されたと考えられました。

次に In vivo のマウス腫瘍モデルにおいては、PIT 単独群と 5-FU 併用 PIT 群の両群とも治療直後から著明な抗腫瘍効果を認めましたが、時間の経過とともに PIT 単独群では腫瘍体積が増加した一方、5-FU 併用 PIT 群では治療後長期間にわたり腫瘍増殖が抑制されました。腫瘍組織の病理学的評価では 5-FU 併用 PIT 群では PIT による広範な肉芽組織の形成に加え、一部の残存細胞にアポトーシスによると考えられる核の膨化を伴う細胞変性を認め、PIT で残存した癌細胞に対する 5-FU によるアポトーシスの誘導が加わり、高い抗腫瘍効果が得られたと考えられました。

以上より、伊藤氏は HER2 陽性ヒト胃癌細胞に対する PIT と 5-FU の併用という異なった細胞障害メカニズムの組み合わせが、PIT 単独治療と比較して有意に良好な抗腫瘍効果を発現したと結論付けました。

以上の趣旨の研究結果の主論文に対し、平成 28 年 3 月 11 日に指導教授の松藤千弥学長ご臨席の下、馬目佳信教授、炭山和毅教授と共に公開審査会を開催いたしました。

審査ではまず伊藤氏がプレゼンテーションを行いました。その際、

伊藤氏は参考論文のデータとして、trastuzumab と異なるエピトープに結合する pertuzumab との併用でPITの有効性が増強することも披露いたしました。

各審査委員，ならびに審査会出席者より質問として，IR700のモノクローナル抗体への結合法，結合するIR700の分子数，抗癌剤として5FUを使用した理由，投与量の設定，胃癌のheterogeneityを考慮した検討か否か，腫瘍周囲の非癌部の障害の有無，臨床のPhase 1 studyを行う場合の対象患者のStageの設定すなわち局所制御を目指すのかあるいは遠隔転移巣の制御を目指すのか，治療による腫瘍崩壊症候群の発生の可能性，局在が深部におよぶ病変への対応など，多くの質問がなされましたが，伊藤氏は適切に回答しました。なお，thesisの一部に関して若干の文言の訂正を要するとの指摘があり，伊藤氏は後日それに的確に対応してthesisの変更を行いました。

馬目、炭山両教授と慎重審議の結果、本委員会としては学位請求論文として十分な価値があるものと認定いたしました。