

氏 名	芦原 敬允
(ふりがな)	(あしはら けいすけ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 1117 号
学位審査年月日	令和2年1月29日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Pharmacokinetic evaluation and antitumor potency of liposomal nanoparticle encapsulated cisplatin targeted to CD24-positive cells in ovarian cancer (卵巣癌に対する CD24 陽性細胞を標的とするシス プラチン内包リポソームの薬物動態評価と抗腫瘍効 果)
論文審査委員	(主) 教授 朝日 通雄 教授 高井 真司 教授 田中 慶太郎

学位論文内容の要旨

《目的》

卵巣癌は抗癌剤の感受性が比較的高い癌種であるが、生存率の最も低い婦人科癌である。その理由として、転移や再発病巣は多くの場合 key drug である白金製剤に対する耐性を獲得することが挙げられる。卵巣癌治療においては白金製剤耐性化を凌駕し、卵巣癌の特徴的な進展様式である腹膜播種転移を制御することが可能となれば、難治性卵巣癌の新たな治療戦略と成り得る。癌細胞の浸潤・転移過程において、細胞間接着や細胞極性を失い、間質内へ浸潤し転移する上皮間葉形態転換 (EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition)

が示されている。一方、様々な癌種で癌幹細胞の表現マーカーとして CD24 が報告されており、我々は CD24 の発現が卵巣癌の予後不良因子であることを見出し着目してきた。CD24 とは glycosyl-phosphatidylinositol 結合型タンパクであり、細胞表面マーカーの一つである。先行研究において、難治性卵巣癌細胞株である CaOV3 における EMT 現象に CD24 が関与していることを確認した。よって、CD24 発現細胞を標的とする drug delivery system を構築することで、難治性卵巣癌の浸潤・転移を制御できる可能性が示唆された。本研究では、シスプラチン (CDDP) 内包リポソームに抗 CD24 抗体を結合させることによる、CD24 発現細胞への標的性を確認し、薬物動態評価と抗腫瘍効果について検証した。

《方 法》

1. CD24-GL-CDDP-Cy5.5 の作製について

親水性でアニオン性の性質をもち、ホスファチジルコリン、およびホスファチジリエタノールアミンから構成されたリポソーム (GLYCOLIPO:片山化学工業) を基として、シスプラチンを内包し、色素である Cy5.5 を付与させた (GL-CDDP-Cy5.5)。GL-CDDP-Cy5.5 に架橋試薬として DTSSP (dithiobis(sulfosuccinimidylpropionate)) を用いて、抗 CD24 抗体を結合させ、CD24 発現細胞に標的性能を持つ CD24-GL-CDDP-Cy5.5 を作製した。

2. 難治性卵巣癌細胞における CD24-GL-CDDP-Cy5.5 の抗腫瘍効果について

難治性卵巣癌細胞株である CaOV3 を用いた。以前の研究より、CaOV3 は CD24 陽性細胞と陰性細胞が混在しており、CD24 陽性分画では、細胞浸潤能、白金製剤耐性能、細胞塊 (spheroid) 形成能の促進を認めた。CaOV3 に対する CD24 発現細胞への標的性を検証するために、まず蛍光顕微鏡を用いて Cy5.5 の色素を確認した。続いて flow cytometry を用いて、CD24 発現細胞の Cy5.5 の色素集積を検証した。

3. ICP-OES (Inductivity coupled plasma optical emission spectrometer) を用いたヌードマウスにおける薬物動態評価について

卵巣癌の特徴的な進展様式である腹膜播種転移を模倣するために、CaOV3 をヌードマウスの腹腔内に移植した。2 週間後、腹膜播種病巣および腹水形成後に PBS、CDDP (10 mg/kg)、GL-CDDP-Cy5.5 (10 mg/kg)、CD24-GL-CDDP-Cy5.5 (10 mg/kg) の静脈投与を行い、6 時間後、24 時間後、48 時間後に安楽死を行った。それぞれの検体である腹膜播種病巣、腎臓、肝臓を摘出し、ICP-OES を用いて CDDP に含まれるプラチナ濃度の測定を行い、それぞれの薬剤および経過時間ごとの薬物動態評価を検証した。

4. CT 画像や生存曲線による CD24-GL-CDDP-Cy5.5 の抗腫瘍効果について

難治性卵巣癌細胞株である CaOV3 を、方法 3 と同様にヌードマウスの腹腔内に移植した。移植 1 週間経過後から、PBS、CDDP (10 mg/kg)、GL-CDDP-Cy5.5 (10 mg/kg)、CD24-GL-CDDP-Cy5.5 (10 mg/kg) を週 1 回静脈投与し、3 週間観察した。治療開始後から、ヌードマウスの腹部骨盤部の CT 画像をもとに測定された最大腹部面積の増加率を経時的に測定し、CD24-GL-CDDP-Cy5.5 により腹囲増加の抑制効果を検証した。また、それぞれの治療群における生存期間の測定を行い、抗腫瘍効果を検証した。

5. CD24-GL-CDDP-Cy5.5 による EMT 現象の制御について

方法 3 で用いたヌードマウスの播種病巣を摘出し、CD24、E-cadherin、Snail の免疫染色を施行した。治療群ごとの CD24 の発現を測定し、CD24-GL-CDDP-Cy5.5 による抑制効果を検証した。また、EMT 現象における関連因子である、E-cadherin、Snail の発現をスコア化して、EMT 現象の制御効果を検証した。

《結 果》

1. GLYCOLIPO に抗体を無修飾の GL-CDDP-Cy5.5 と、抗 CD24 抗体修飾させた CD24-GL-CDDP-Cy5.5 の作製を行った。両薬剤ともに、リポソームの直径中央値は 158 nm で安定し、内包されている CDDP 濃度は 2.0 mg/ml であることを確認し、今回の研究で用いた。
2. 難治性卵巣癌細胞株である CaOV3 に GL-CDDP-Cy5.5 と CD24-GL-CDDP-Cy5.5 の投与後、蛍光顕微鏡で Cy5.5 の観察を行ったが、細胞内に Cy5.5 の集積する割合に、両薬剤では差を認めなかった。そこで、同様に両薬剤を投与した CaOV3 に、CD24 抗体に FITC を結合させ、flow cytometry で測定を行った。CD24-GL-CDDP-Cy5.5 を投与した細胞で、FITC の吸光度が高い細胞に Cy5.5 の吸光度が高いという結果が得られた。*in vitro* において、CD24-GL-CDDP-Cy5.5 は CD24 発現細胞を標的として集積していることが示された。
3. CaOV3 による腹膜播種モデルを作製し、PBS、CDDP、GL-CDDP-Cy5.5、CD24-GL-CDDP-Cy5.5 の尾静脈投与を行い、時間経過とともに安楽死を行い、腹膜播種病巣、腎臓、肝臓の検体を採取した。ICP-OES を用いたところ、腹膜播種組織で CD24-GL-CDDP-Cy5.5 が最も高いプラチナ濃度を維持していたが、GL-CDDP-Cy5.5 と比べて有意差は認めなかった ($p=0.21$)。CD24-GL-CDDP-Cy5.5 は CDDP と比較して、48 時間後でプラチナ濃度の減少が少なく、有意に高値であった ($p<0.05$)。肝臓においては GLYCOLIPO で内包されている薬剤 (GL-CDDP-Cy5.5、CD24-GL-CDDP-Cy5.5) で、CDDP 群と比較して有意に高いプラチナ濃度の維持を認めた ($p<0.05$)。一方、腎臓においては CDDP 群で有意に高いプラチナ濃度の維持を認め ($p<0.05$)、GLYCOLIPO による特徴と考えられた。
4. 腹膜播種モデルを再度作製し、同薬剤の尾静脈投与を継続しながら、CT 画像による最大腹囲の面積を測定し、投与開始日から比較して腹囲増加率を測定した。CD24-GL-CDDP-Cy5.5 群は他の薬剤群と比較して、腹囲増加率が有意に抑制された ($p<0.05$)。また、CD24-GL-CDDP-Cy5.5 群は、GL-CDDP-Cy5.5 群を比較したところ、生存期間に有意差は認めなかったが、延長傾向を認めた ($p=0.20$)。CD24-GL-CDDP-Cy5.5

群は、PBS 群、CDDP 群との比較した場合には、有意な生存期間の延長を認めた ($p<0.05$)。これらの結果より、CD24-GL-CDDP-Cy5.5 の抗腫瘍効果が示唆された。

5. 治療を施行した播種病巣モデルの腹膜播種組織に対して CD24、E-cadherin、Snail の免疫染色を施行し、比較した。CD24-GL-CDDP-Cy5.5 群において、他の薬剤群よりも CD24 陽性細胞の有意な減少を認めた ($p<0.05$)。さらに、CD24-GL-CDDP-Cy5.5 群において、E-cadherin の有意な上昇 ($p<0.05$) と、Snail の有意な減少を認めた ($p<0.05$)。これらの結果より、CD24-GL-CDDP-Cy5.5 の CD24 発現細胞に対する減少効果によって、EMT 現象が制御されていることが示唆された。

《結 論》

本研究では、予後不良である難治性卵巣癌に対する新たな治療法として、CD24 発現細胞を標的とした drug delivery system の効果を検証した。我々の先行研究から、難治性卵巣癌において CD24 発現細胞は浸潤能、白金製剤耐性能、細胞塊 (spheroid) 形成能の更新を認めることから、癌幹細胞類似細胞 (CSCL: Cancer Stem Cells-Like) の性質を持つことが考えられた。CD24-GL-CDDP-Cy5.5 は難治性卵巣癌モデルの腹膜播種組織において高いプラチナ濃度の維持を認め、組織移行性を有することが示唆された。また、CD24 発現細胞の減少と EMT 現象の抑制を認めたことから、CD24-GL-CDDP-Cy5.5 によって選択的に CSCL に白金製剤を投与することが可能となり、他の薬剤に比べて高い抗腫瘍効果を得られたと考えられた。薬剤移行性による多臓器に対する副作用を検討する課題は残るが、CD24 を標的とした drug delivery system が、難治性卵巣癌に対する治療選択枝の一つとなる可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

卵巣癌は抗癌剤の感受性が比較的高い癌種であるが、転移や再発病巣の多くは key drug である白金製剤に対する耐性を獲得することから、予後不良な婦人科癌である。卵巣癌治療においては白金製剤耐性化を凌駕し、卵巣癌の特徴的な進展様式である腹膜播種を制御することが可能となれば、難治性卵巣癌の新たな治療戦略と成り得る。癌細胞の浸潤・転移過程において、上皮間葉形態転換 (EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition) 現象が重要である。一方、様々な癌種で癌幹細胞の表現マーカーとして CD24 が報告されている。申請者らの先行研究から、卵巣癌において CD24 発現細胞が EMT 現象と関連がある癌幹細胞類似細胞 (CSCL: Cancer Stem Cells-Like) の性質を持つことが示唆された。本研究は、難治性卵巣癌に対する CD24 発現細胞を標的とした drug delivery system の構築に向けて、*in vitro*、*in vivo* で検証を行ったものである。

申請者は、GLYCOLIPO (片山化学工業) に注目し、未修飾の CDDP 内包リポソーム (GL-CDDP-Cy5.5) と、CD24 陽性細胞に指向性をもたせるために抗 CD24 抗体を修飾させた CDDP 内包リポソーム (CD24-GL-CDDP-Cy5.5) を開発した。次に難治性卵巣癌細胞株 CaOV3 を腹腔内に移植した難治性卵巣癌の腹膜播種モデルマウスを作製した。その腹膜播種モデルに対して CD24-GL-CDDP-Cy5.5 を投与することにより以下の結果を得た。

- 1) CD24-GL-CDDP-Cy5.5 は腹膜播種組織内への CD24 を標的としたと考えられる選択的薬物移行性を示した。
- 2) CSCL の性質を持つ CD24 発現細胞の抑制によると考えられる EMT 現象の抑制を認めた。
- 3) 腹囲増加率の低下と生存期間の延長傾向を認めた。

これらの結果は、CD24-GL-CDDP-Cy5.5 が予後不良な進行卵巣癌に対する新たな治療薬となる可能性を示唆しており、今後の卵巣癌に対する治療戦略に重要な知見を提供するものと考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Oncology Letters 19 : 1872-1880, 2020 Mar

doi : 10.3892/ol.2020.11279