

膵癌特異的ガングリオシドに対する光免疫療法の適用

東京都健康長寿医療センター研究所

課長代理級研究員 佐々木 紀彦

(共同研究者)

東京都健康長寿医療センター研究所 研究部長 石渡 俊行

はじめに

膵癌は極めて予後が悪く5年生存率は30年前とほとんど変わらず、約8%である。膵癌は早期発見が困難で発見時には80%が手術不能であり、これらの症例は抗癌剤や放射線治療を行っても生存期間は約半年である。一方で、手術が可能な症例も術後に高率に再発や転移が発見される。膵癌は60歳以上に増加する高齢者癌であり、超高齢社会の本邦はもとより欧米などの先進国を中心に、世界的に患者数が急増している。膵癌は早期診断が困難で有効な治療法が存在せず、国際社会が高齢化を迎えるなか重大な社会問題となっており、一刻も早い有効な治療法の開発が必要である。

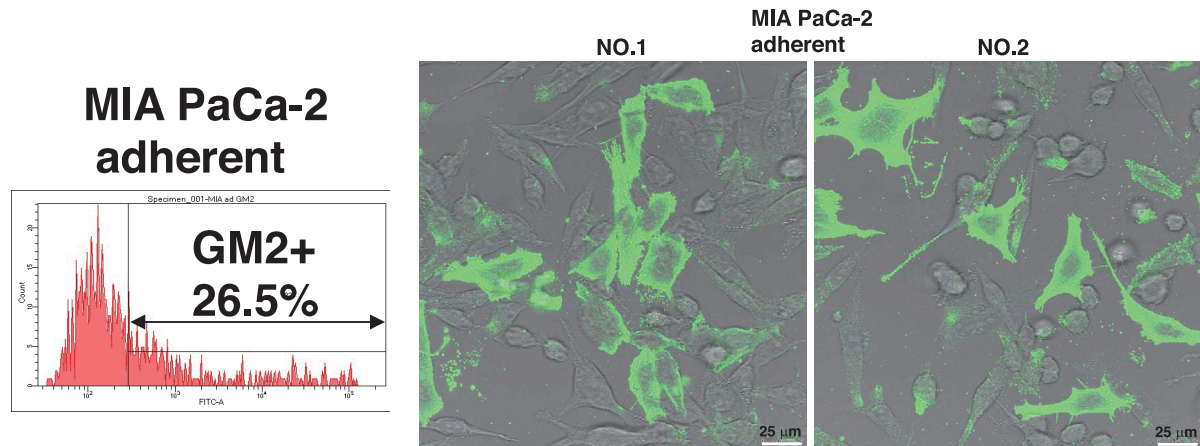
近年、癌の新しい画期的治療法として米国国立がん研究所（NCI）の小林らが開発した、光免疫療法が注目されている。本邦ではすでに頭頸部癌で治験が始まり、昨年6月には厚労省より再発症例に条件付き早期承認制度が適用されるなど大きな期待を集めている。光免疫療法は光感受性物質（IR-700）を付加した癌細胞特異的抗体を投与し、抗体が結合した癌細胞を非熱性赤色光の照射で死滅させる。このため癌細胞のみを死滅させることが可能で、副作用も少ない治療法として様々な癌種において実用化が期待されている。申請者らは、これまで細胞表面抗原である糖脂質の一群のガングリオシドに着目して研究を行い、膵癌細胞に特異的に発現するガングリオシドを発見、報告した（論文発表および特許出願済）。本研究では、膵癌の新たな治療法として、膵癌特異的ガングリオシドの光免疫療法への適用可能性について検証を行った。

結 果

8種類のヒト膵臓癌細胞株（PANC-1, KP4, PK-8, PK-45P, T3M-4, PK-1, PK-59, MIA PaCa-2）について、主要な7種類のガングリオシド（GM3, GM2, GM1, GD1a, GD3, GD2, GD1b）の細胞表面での発現をFACS解析で検討した結果、GM2がMIA PaCa-2細胞で他と比べて高発現していることを見出していた（Sasaki N et al, Scientific Reports 誌、2019）。そこで、GM2を標的として、MIA PaCa-2細胞を用いて光免疫療法への応用可能性について検討した。MIA PaCa-2細胞では、FACS解析の結果に示すように、接着培養下

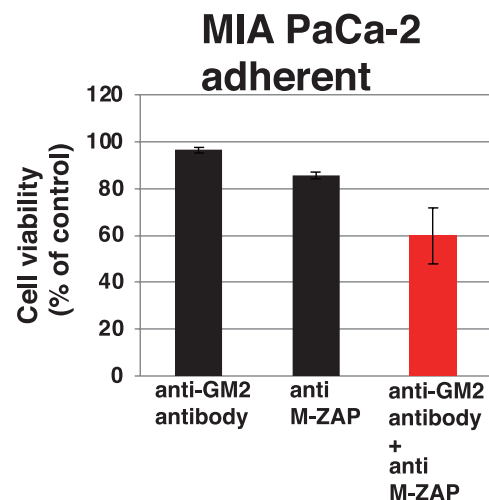
図1 MIA PaCa-2におけるGM2の発現性

接着培養のMIA PaCa-2において、GM2の発現性をFACS解析および免疫染色で調べた。



では20～30%でGM2陽性である（図1左）。我々は、MIA PaCa-2細胞の特性について昨年報告しているが（Sasaki N et al, BBRC 誌、2020）、この細胞は、接着状態では球形と紡錘形の2種類の形態を示し、時に浮遊細胞も生み出している。GM2の免疫染色の結果、2種類の形態のうち、紡錘形の細胞にGM2が発現していることがわかった（図1右）。次に、こうした紡錘形のGM2陽性細胞に対し、2次抗体にサポリン毒素が結合しているセカンドイムノトキシンによる細胞死誘導の検討を行った。セカンドイムノトキシンは、標的細胞膜上の抗原を介して細胞内に取り込まれ、サポリンの作用によりリボソームを不活性化し、標的細胞のみに細胞死を誘導する。MIA PaCa-2細胞をプレートに接着培養し、1次抗体の抗GM2抗体とセカンドイムノトキシンのanti-M-ZAPを添加して培養を行った。コントロールとして、1次抗体またはセカンドイムノトキシンのみで行った。その結果、コントロールに比べ、有意に生存率が低下することがわかった。すなわち、GM2を発現している20~30%の紡錘形細胞に対し、GM2を標的とした細胞死誘導が可能であることが示された。近年の我々の報告（Sasaki N et al, Scientific Reports 誌、2019）において、MIA PaCa-2細胞では3次元培養を行うと、80~90%前後の細胞でGM2が陽性になることを報告している。3次元培養はより生体内に近い培養条件のため、in vivoでの適用可能性の検証として、次に3次元培養下でセカンドイムノトキシンの効果を検討した。結果として

図2 セカンドイムノトキシンによる細胞死誘導
接着培養のMIA PaCa-2において、GM2を標的にセカンドイムノトキシンによる細胞死誘導を検討した。

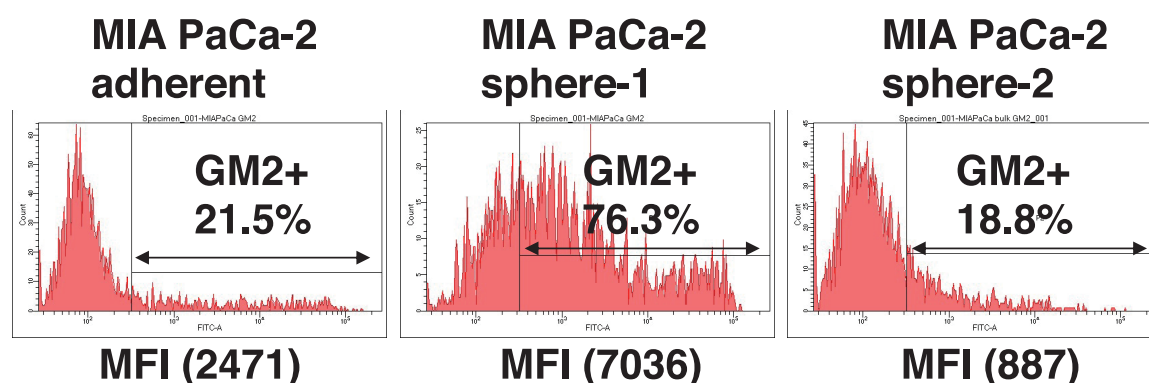


は、接着培養のように細胞死の効果はみられなかった。

3次元培養下では、MIA PaCa-2細胞は細胞同士が結合し凝集した細胞塊を形成する (Minami F, Sasaki N et al, Scientific Reports 誌、2021)。上述したように、3次元培養したMIA PaCa-2細胞を単一細胞にバラバラにして抗体染色を行い、FACS解析を行うと80~90%前後が陽性を示す。今回、in vivoでの抗体の作用を考慮し、細胞塊への抗体の反応性について検討した。接着培養では、約20%でGM2が陽性なのに対し、3次元培養した細胞塊では、通常の単一細胞での染色で約80%が陽性だった (図3)。一方、細胞塊のまま抗体染色を行い、FACS解析を行うと、陽性率が20%以下で、蛍光強度も接着培養下の細胞よりも低いことがわかった。

図3 抗体の反応性について

接着培養または3次元培養のMIA PaCa-2において、抗GM2抗体の反応性を検討した。Sphere-1では単一細胞にした状態で、Sphere-2では、Sphereの状態での抗体反応を行った。



考 察

今回、接着培養下のMIA PaCa-2細胞では、20～30%のGM2陽性の紡錘形細胞に対してセカンドイムノトキシンによる細胞死誘導はみられた。一方、3次元培養下では80～90%がGM2陽性であるにもかかわらず、セカンドイムノトキシンによる効果はみられなかった。図3で示すように、3次元培養で形成された細胞塊のままでは立体障害などにより抗体の反応性が低下することがわかった。すなわち、3次元培養下で細胞死誘導が難しい理由として、抗体の浸透性に問題がある可能性がある。また、セカンドイムノトキシンによる細胞死誘導には、抗体がエンドサイトーシスで細胞内に取り込まれる必要があるため、3次元培養の細胞塊における取り込み能にも問題があるかもしれない。これらの可能性については、IR-700標識した抗体を反応させて、非熱性赤色光の照射による細胞死がみられるか検討する必要がある。

要 約

ガングリオシドのGM2陽性率が高いMIA PaCa-2細胞において、接着培養下では、2種類の形態のうち、紡錘形の細胞でGM2が陽性であることがわかった。このGM2陽性の紡錘形細胞に対し、セカンドイムノトキシンによる細胞死誘導を検討した結果、GM2依存的に細胞死が誘導されることがわかった。MIA PaCa-2細胞はより生体内に近い3次元培養下では、80～90%前後の細胞でGM2陽性を示すが、セカンドイムノトキシンによる効果がみられなかった。抗体の反応性について検討した結果、3次元培養で形成された細胞塊のまま抗体染色を行うと、単一細胞での染色に比べて陽性率が格段に低下することがわかった。3次元培養で形成される細胞塊へのIR-700標識した抗体による反応性、非熱性赤色光の照射による細胞死誘導については今後検討をする必要がある。

文 献

本研究助成金により、以下の論文を発表した。

1. Sasaki N, Toyoda M, Ishiwata T. Gangliosides as Signaling Regulators in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021 May 11;22 (10) :5076.