

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	栗 生 彩
主 論 文 題 名 : 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				
【研究の背景および目的】 サバイビンは多くのがん細胞で過剰発現が確認されており、がん細胞におけるアポトーシス制御因子として、サバイビン発現量が、がんの悪性度や予後と相関することを示す報告がされている。一部の正常組織を除いて、正常組織での発現は認められないことから、がん治療の有望なターゲットとして考えられている。YM155 はアステラス製薬株式会社が創製されたサバイビン発現抑制薬である。第一章の研究では、ヒト B 細胞由来非ホジキンリンパ腫 (NHL) 細胞移植ヌードマウスモデルを用いて、YM155 単剤の有効性を検討した。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ことから、リツキシマブと YM155 との併用効果についても検討した。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抗腫瘍作用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への 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の PET イメージングにより YM155 の感受性を予測可能であるか、各種ヒト腫瘍移植マウスモデルを用いて検討した。 【方法】 <u>in vivo 抗腫瘍効果評価</u> ヒト NHL 細胞懸濁液を作成し、BALB/c nu/nu ヌ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として解析した。 <u>Survivin 発現抑制作用および細胞死誘導作用の組織化学的解析</u> 経時的に採取した腫瘍サンプルを 4%パラホルムアルデヒド固定し、パラフィン包埋、薄切、キシレンによる脱パラフィン後各種染色に供した。腫瘍内のサバイビン発現は、自社サバイビン抗体を用い、DAB で発色、ヘマトキシリンで後染色し評価した。細胞増殖は Ki-67 染色、細胞死 (アポトーシス) は TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色で評価した。 <u>PET による抗腫瘍効果評価</u> 糖代謝マーカーである [¹⁸F] -2-fluoro-2-deoxyglucose (¹⁸F-FDG) , 細胞生存マーカーである 3'-deoxy-3'[-¹⁸F] fluorothymidine (¹⁸F-FLT) を用いた PET スキャンを実施した。 <u>YM155 による細胞増殖阻害活性と細胞内移行性の検討</u> 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。				

PET を用いた ^{11}C -YM155 の腫瘍移行性検討

YM155 感受性および非感受性のヒト癌細胞をそれぞれ移植したマウスモデルにおける ^{11}C -YM155 の腫瘍移行性を PET で測定した。

【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、1 および 3 mg/kg/day 投与により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、免疫組織化学的に検討した。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-67 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 (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、複数サイクルを投与した結果、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。全身播種マウスモデルにおいても YM155 投与によりコントロールあるいはリツキシマブ投与 (単独) 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

NHL 皮下移植マウスモデルにおいて、YM155 およびリツキシマブが単剤では有意な腫瘍増殖抑制効果を示さない用量で 2 剤を併用したところ、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認められた。

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

NHL 皮下移植マウスを用いて、YM155 とリツキシマブを併用した時の抗腫瘍効果を ^{18}F -FDG、および ^{18}F -FLT の腫瘍内における集積を指標に評価した。併用群では早期 (投与 3 日目) から、 ^{18}F -FDG および ^{18}F -FLT の有意な集積抑制が観察された。更に Ki-67 染色による proliferation index の解析結果から、 ^{18}F -FLT の抗腫瘍効果の評価は実際の腫瘍内の細胞増殖の変化を捉えているこ

とが確認された。

2. 細胞内のYM155 取り込み量と増殖阻害活性の関係

ヒトがん細胞 (39 細胞株) における、YM155 の細胞内取り込み量と GI_{50} 値の相関を検討した結果、 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 ^{11}C -YM155 の腫瘍移行性の PET イメージング

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 ^{11}C -YM155 の腫瘍移行性について PET を用いて検討した結果、YM155 感受性の腫瘍では ^{11}C -YM155 の腫瘍移行性が高く、耐性腫瘍では移行性の低い傾向が示された。

【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併用における抗腫瘍作用が示された。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の発現抑制に伴うものであることが裏付けられた。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増殖進展に対する YM155 の有用性が示唆された。また、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られた。今後、YM155 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検討することで、併用メカニズムを更に解明する必要がある。

第二章の検討では、 ^{18}F -FDG-PET および ^{18}F -FLT-PET 何れにおいても併用効果は投与 3 日後から検出され、投与開始早期に抗腫瘍効果を捉える可能性が示唆された。形態情報を提供する CT とは異なり PET からは機能情報が得られるため、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早期の治療方針の策定に役立つ可能性が考えられる。次に、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から、 ^{11}C -YM155 のマイクロドージングによる腫瘍内移行性の PET イメージングによる YM155 の感受性予測の可能性を検討した。YM155 への感受性が高い腫瘍で ^{11}C -YM155 集積が高い傾向が示されたことから、 ^{11}C -YM155 を用いた PET イメージングが YM155 の感受性の予測に有用である可能性が示された。

【結論】

本研究より、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 の感受性因子として細胞内取り込みの寄与が示されたことから、 ^{11}C -YM155 の単回マイクロドージングによる ^{11}C -YM155 移行性の PET イメージングにより、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された。