

研究者：趙 継美

(所属：北海道大学大学院歯学院 口腔機能学講座 小児・障害者歯科学教室)

研究題目：小児がんに対する抗 GD2 抗体を用いた光免疫療法に関する研究

目的：

大学病院小児歯科での日々の臨床の中で、小児科に入院中の小児がん患者の周術期管理に携わることが多くある。がん治療の副作用や晩期合併症として口腔粘膜炎や歯の形成異常など、口腔に症状が生じる割合は高く、患者の QOL を大きく低下させる。また近年、医療の進歩により小児がんの生存率は向上しているが、未だに生命を救えない患者や、治療したとしても治療の合併症で苦しむ患者も少なくない。その中で、光免疫療法は、腫瘍細胞を特異的に破壊する副作用が少ない新しい治療法として近年開発が進んでいる。光免疫療法は、がん抗原に特異的な抗体と、光感受性物質を結合させ、近赤外線を照射することで、がん細胞を特異的に破壊する治療法である。光免疫療法は、日本では頭頸部の扁平上皮がんに臨床応用されているが、他のがんには適用されていない。小児がんに対して光免疫療法が有効であれば、対象となる小児の口腔症状を含む副作用の軽減や生存率の向上に寄与できる可能性がある。そこで、小児がんのうち神経芽腫・骨肉腫を対象として、抗 GD2 抗体を用いた光免疫療法の有用性を検討するため、基礎研究を行った。

対象および方法：

神経芽腫・骨肉腫を対象として、細胞実験と、動物実験をそれぞれ行った。実験には、抗ヒトガングリオシド GD2 モノクローナル抗体 (3F8) と、光感受性物質である IR700 を用いて結合体を精製した。GD2 を発現しているヒト神経芽腫細胞 SK-N-SH、ヒト骨肉腫細胞 NOS-10 の細胞株を用いた。

細胞実験では、各細胞株において、3F8-IR700 の結合体を加えた群 (添加群) / 加えていない群 (非添加群)、690nm の波長の近赤外線を照射した群 (照射群) / 照射していない群 (非照射群) に分類し、各々をかけ合わせた 4 群を設定した。処理の 1 時間後に顕微鏡観察およびフローサイトメトリーを行った。顕微鏡観察では、細胞の形態変化を観察し、またカルセイン-AM とエチジウムホモダイマー (EthD-1) を用いて生細胞と死細胞を識別した。フローサイトメトリーでは、死細胞をヨウ化プロピジウムで標識し、標識された細胞の割合を評価した。また、近赤外線の照射量を変化させ、照射量の違いによる死細胞割合の変化についても評価した。

動物実験では、各細胞を 5~7 週齢のメスのマウスの皮下に移植し、神経芽腫・骨肉腫のマウスモデルを作成した。各マウスモデルにおいて、3F8-IR700 結合体の注入と近赤外線照射を行った群 (治療群) と、非治療群の 2 群を設定した。治療群では、マウスの尾静脈より 3F8-IR700 結合体を投与し、 $100\text{J}/\text{cm}^2$ の近赤外線照射を行った。治療効果を組織学的に評価するため、治療後 1 日目に腫瘍を切除し、HE 染色を行った。

結果および考察：

細胞実験では、添加・照射群において、明視野における細胞の膨化とブレブの形成が観察された。これらの細胞の形態変化は、以前に報告された光免疫療法による細胞死と一致するものであった。また、すべての群の細胞は処理前にはカルセイン-AMで標識されており、生細胞であることが確認されたが、処理の1時間後には、添加・照射群の細胞のみ EdhD-1 で標識されており、治療によって細胞死が生じたことが確認された（図1・図2）。

さらに、フローサイトメトリーを用いた評価でも、添加・照射群において死細胞の割合が有意に増加したことが示され、照射量の増加に伴い割合はさらに増加する傾向が認められた（図3・図4）。

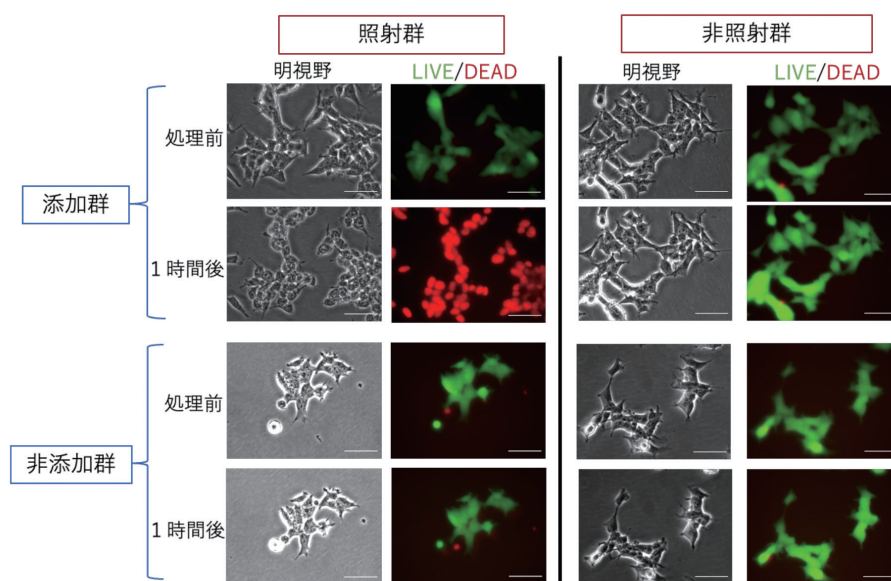


図1 神経芽腫細胞における顕微鏡実験の結果を示す。添加・照射群において、処理1時間後に細胞死が認められた。緑色はカルセイン-AM、赤色は EdhD-1 による標識を示す。

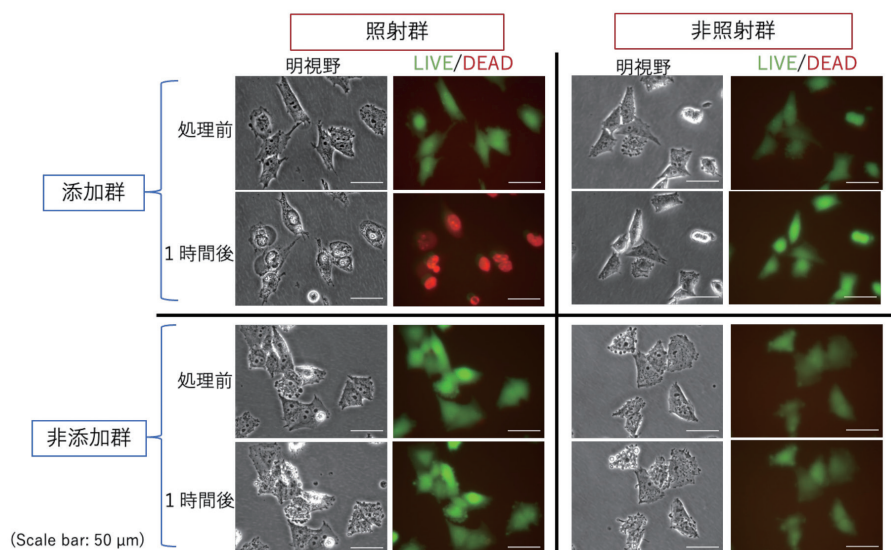


図2 骨肉腫細胞における顕微鏡実験の結果を示す。添加・照射群において、処理1時間後に細胞死が認められた。緑色はカルセイン-AM、赤色は EdhD-1 による標識を示す。

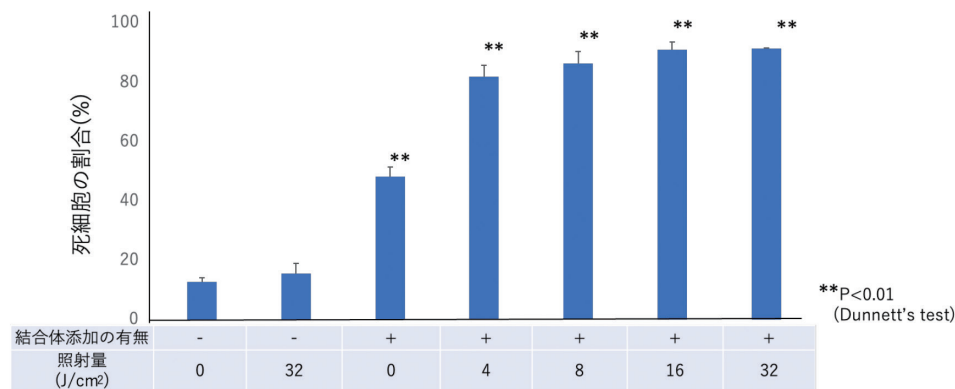


図3 神経芽腫細胞におけるフローサイトメトリーの結果を示す。死細胞の割合は添加・照射群において有意に増加し、照射量の増加に伴いさらに増加した。

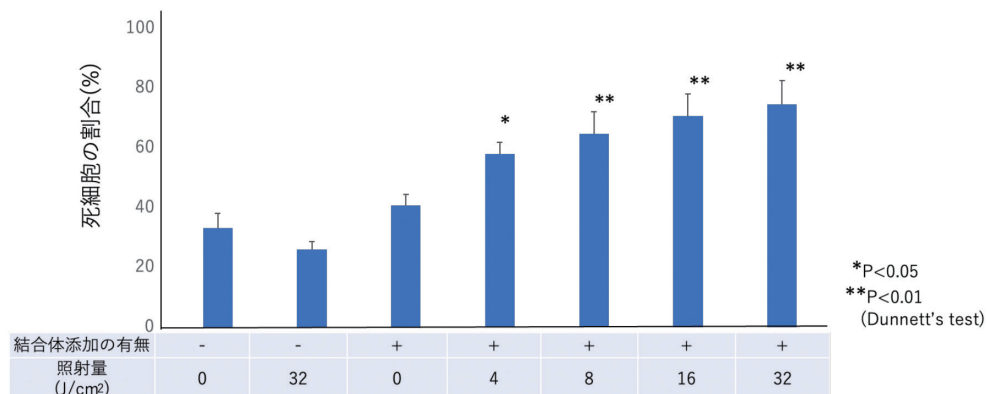


図4 骨肉腫細胞におけるフローサイトメトリーの結果を示す。死細胞の割合は添加・照射群において有意に増加し、照射量の増加に伴いさらに増加した。

動物実験では、治療群において、腫瘍組織の破壊が組織学的に確認された（図5）。

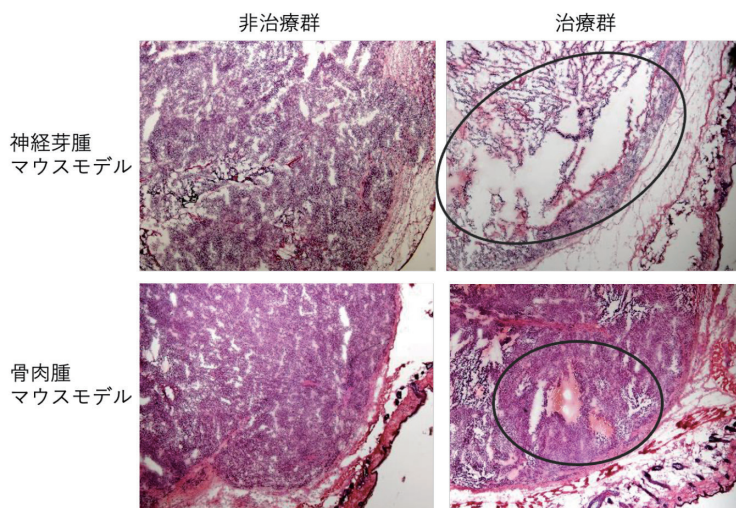


図5 各マウスモデルにおけるHE染色の結果を示す。治療群において、黒線で囲った部分に腫瘍組織の破壊が認められた。
(×4)

成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

2023年5月 国際神経芽腫学会（ANR2023）にてポスター発表（予定）

2023年9月 第65回日本小児血液・がん学会にて口頭あるいはポスター発表（予定）

2023年中に英語論文として発表（予定）