

|         |   |    |        |
|---------|---|----|--------|
| 氏名      | なりひら きょういち<br>成平 恭一   |    |        |
| 学位の種類   | 博士（医学）  |    |        |
| 報告番号    | 甲第 1717 号   |    |        |
| 学位授与の日付 | 平成 30 年 3 月 15 日  |    |        |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）  |    |        |
| 学位論文題目  | Enhanced cell killing and apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells with ultrasound in combination with cetuximab coated albumin microbubbles<br>（セツキシマブ被覆アルブミンマイクロバブルと超音波の併用による口腔扁平上皮癌細胞の細胞死滅およびアポトーシスの増強について） |    |        |
| 論文審査委員  | （主 査） 福岡大学  | 教授 | 喜久田 利弘 |
|         | （副 査） 福岡大学  | 教授 | 坂田 俊文  |
|         | 福岡大学  | 教授 | 岩崎 昭憲  |
|         | 福岡歯科大   | 教授 | 平木 昭光  |

## 内 容 の 要 旨

### 【目的】

口腔咽頭悪性腫瘍の約 90%は口腔扁平上皮癌（OSCC）である。OSCC については検出技術、根本的な外科手術、その発生および進行機構を含む様々な研究が行われている。さらに放射線または抗癌剤に対する腫瘍感受性を誘導するための戦略が提案されているが、OSCC は未だ予後の悪い腫瘍の一つである。

最近、超音波（US）/マイクロバブル媒介技術が検討されている。腫瘍ターゲッティング、イメージングおよび治療機能を単一のマイクロバブル（MB）に組み合わせることは、特定の癌の診断および治療を同時に行うことができるため大きな注目を集めている。特にアルブミン MB は多くのタイプの分子標的化のための汎用性のあるプラットフォームになる可能性を秘めている。抗体のような様々な生体分子は、アルブミン MBs の表面上に結合されて、癌の能動的な標的診断または治療を提供することができる。我々はこの抗体の候補として、局所的に進行している頭頸部扁平上皮癌の併用療法の適応であるセツキシマブ（Erbitux）を選択した。セツキシマブ（Erbitux）はヒトを特異的に標的とする免疫グロブリン（Ig）G1 クラスのキメラのヒト/ネズミモノクローナル抗体であり、OSCC を始めとする頭頸部癌細胞の表面に発現する上皮成長因子受容体（EGFR）への抗体である。

今回、我々はヒト扁平上皮癌細胞への選択的な殺細胞効果を達成するために、OSCCの表面上に発現されたEGFRの特異的標的化に使用できるセツキシマブでUS造影剤アルブミンMBを被覆した。これをセツキシマブ被覆アルブミンマイクロバブル(CCAM)として、治療用USによる選択的腫瘍細胞死滅およびアポトーシスの即時の増加をIn vitroでEGFR発現腫瘍細胞と非EGFR発現腫瘍細胞とで比較した。さらに、この造影剤が従来のUS撮像装置で視覚化できるかどうか評価することも目的とした。

#### 【対象と方法】

アルブミン外殻を有するマイクロバブルはパーフルオロプロパンガスを封入し、高速振盪組織ホモジナイザー装置(Precellys Evolution, Bertin Instruments, France)にて攪拌して作成した。本研究には口腔扁平上皮癌細胞株HSC-2と対照としてヒト骨髄単球性リンパ腫細胞株U937を使用した。両者とも初期生存率が99%以上の細胞株を実験に使用した。セツキシマブはMerck-Serano (Erbix, Geneva, Switzerland)から購入し、細胞に超音波を照射する直前に125, 250, 375  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で試薬を含むマイクロバブルで混合した。

両者の癌細胞株HSC-2とU937を培養マルチウェルで超音波処理した。超音波露光システムは4つの独立した超音波発生器(KTAC-4000, NepaGene, Chiba, Japan)と4つの非集束径20mm超音波トランスデューサ(KP-S20, NepaGene, Chiba, Japan)からなり、24ウェル細胞培養プレート(SARSTEDT Lumox multiwell 24, Nümbrecht, Germany)を超音波伝達ゲル(Aquasonic 100, Parker lab, NJ, USA)を介して超音波トランスデューサの音響放射線表面上に置いた。0.8、0.9および1.0  $\text{W}/\text{cm}^2$ の3つの音響強度 $I_{\text{sp}}(t)$ (空間平均時間ピーク)を有する超音波エネルギーで24ウェル細胞培養プレートを15秒間同時曝露とした。セツキシマブ分子標的化ナノ気泡650  $\mu\text{L}$ を各ウェルの2mLの細胞懸濁液に添加した。5分後、超音波をHSC-2細胞およびマイクロバブルに曝露した。超音波照射実験は1)無処理対照群、2)超音波単独群、3)非標的化アルブミンマイクロバブルと超音波群、4)セツキシマブ分子標的化アルブミンマイクロバブルと超音波群の4群を設定した。超音波照射処理後、24ウェルプレートの各ウェルからHSC-2細胞を直ちに回収した。細胞生存率の測定のためにトリパンブルー色素排除試験を直ちに実施した。U937を同様に調製し、HSC-2細胞と同じ超音波条件および群で処理した。HSC-2およびU937癌細胞のアポトーシス事象は、3チャンネル(明視野、緑色蛍光、赤色蛍光)であるTali Image-Based Cytometer(Life Technologies Japan, Tokyo, Japan)によって測定した。標的微小泡の表面にセツキシマブの存在を視覚化するために、Readilink®抗体ラベリングキットによる蛍光標識抗体法を用いた。血管の管腔内の時間-信号強度曲線を得るために、超音波イメージング評価のための血管模倣フローモデルシステムを用いた。測定データを平均±標準偏差(SD)として表示した。ウェルチの補正を含む独立t検定を用いてデータを分析した。SPSSソフトウェア(IBM, NY, USA)を用いて、様々なグループ間の統計的有意性の差を分析した。 $p < 0.05$ の確率値は統計的に有意であると

考えられた。

### 【結果】

セツキシマブ被覆アルブミンマイクロバブル (CCAM) 存在下で  $0.9\text{W} / \text{cm}^2$  および  $1.0\text{W} / \text{cm}^2$  での US 照射の細胞死滅率は非標的化アルブミンマイクロバブル群と比較して有意に高かった ( $p < .05$ )。一方、選択的細胞死滅は、セツキシマブとの親和性をもたないヒト骨髄単球性リンパ腫細胞株 (U937) では観察されなかった。さらに、CCAM の存在下での超音波照射は、U937 細胞 ( $4.0 \pm 0.8\%$ ) と比較して、HSC-2 細胞 ( $21.0 \pm 3.8\%$ ) の細胞アポトーシス率は 5 倍を示した。

蛍光標識されたセツキシマブ-マイクロバブルの画像をマルチチャンネル蛍光顕微鏡で観察したところ、アルブミンマイクロバブルは明視野画像に小さな暗点として現れ、一部は癌細胞の表面に付着していた。テキサスレッド染色されたアルブミンマイクロバブルがマイクロバブル上で観察され、HSC-2 細胞の近くに付着または位置していた。さらに赤色視野における細胞イメージの様な赤色と比較して緑色色素で標識した抗 EGFR 抗体 (セツキシマブ) も細胞膜の近くで明るい緑色の蛍光として観察することができた。赤色および緑色蛍光画像の画像マージ後、マイクロバブル (赤色) および抗 EGFR-抗体ゾーン (緑色) の位置は重複し、それらは同じマイクロバブルであることが示された。

フローファントムにおける超音波イメージングでアルブミン微小気泡のエコー源性を調べた。コントラスト撮像モードでは、血管モデル内で増強は観察されなかった。一方、標準モードではマイクロバブル注入の直前にマイクロバブルが音響信号として検出された。また、コントラストイメージングによる血管管腔内での増強が見られた。フロー容器の管腔内の時間-信号強度曲線はベースラインからピーク強度まで約 40 秒で増加した。アルブミンマイクロバブルは超音波イメージングによって明確に視覚化することができた。

### 【結論】

セツキシマブ被覆アルブミンマイクロバブルは HSC-2 細胞に対して選択的殺細胞効果を期待できる新規の治療/診断用マイクロバブルとして適用できることを立証した。

## 審査の結果の要旨

本研究論文は最近様々な腫瘍組織内での効果的な蓄積のための潜在的な薬物担体として検討されている超音波 (US) /マイクロバブル媒介技術をさらに発展し、口腔扁平上皮

癌に特異的に多く発現するマーカーの上皮成長因子受容体（EGFR）に効果的薬剤のセツキシマブをバブルと併用することで、正常細胞への為害性を軽減し、癌細胞に選択的に殺細胞効果を示すことを示した。これは世界初の研究論文である。

ヒト扁平上皮癌細胞 HSC2 への選択的な殺細胞効果を達成するために、OSCC の表面上に発現された EGFR の特異的標的化に使用できるセツキシマブで US 造影剤アルブミン MB を被覆した。これをセツキシマブ被覆アルブミンマイクロバブル（CCAM）として、治療用 US による選択的腫瘍細胞死滅およびアポトーシスの即時の増加を In vitro で EGFR 発現腫瘍細胞と非 EGFR 発現腫瘍細胞とで比較した。また、この造影剤が従来の US 撮像装置で視覚化できるかを検証した。

その結果、EGFR 発現のないヒト白血病細胞の U937 と比較し、HSC2 において殺細胞効果の増強と、有意なアポトーシス率の上昇を認めた。また、アルブミンマイクロバブルは超音波イメージングによって明確に視覚化することが確認でき、今後抗癌治療法として発展性が期待できるものであることを示した。

#### 1. 斬新さ

上皮成長因子受容体（EGFR）に効果的薬剤のセツキシマブをバブルと併用することで、正常細胞への為害性を軽減し、口腔扁平上皮癌細胞に選択的に殺細胞効果を示した報告は今までなく、非常に斬新であった。

#### 2. 重要性

セツキシマブ負荷アルブミンマイクロバブルと超音波の併用が口腔扁平上皮癌に対して有意に殺細胞効果があることを定量的に実証した。この結果は大変有意義である。

#### 3. 研究方法の正確性

本研究は 3 回以上の検証実験を行っており、高い精度の研究と言えた。

#### 4. 表現の明確さ

目的、対象、方法、結果の表現は明確である。また、結果についての考察も明確に表現されていた。

#### 5. 主な質疑応答

1) Q この実験でセツキシマブを選んだ理由は何か。

A 以前の研究では酸化チタニウムと超音波で口腔扁平上皮癌への殺細胞効果を認めたが、酸化チタニウム自体に生体為害性があり、別の材料・手法での抗癌治療を探索し、正常細胞に影響を極力少なくし、癌細胞への選択性を持たせる意味で、現時点でも認可・臨床応用されている EGFR 阻害薬のセツキシマブが候補に上がった。

- 2) Q EGFR の発現が多い、他のセルラインを使っても結果は同じだったのか。  
A この使用した口腔扁平上皮癌の HSC2 以外には特に実験を行っていない。
- 3) Q 実際に生体実験でのヌードマウスを使った際の腫瘍の縮小率はどうだったのか。  
A 今回は最後に提示した腫瘍内の血管への造影性のみを検証したものであり、縮小率の検証までは至っていない。今後、行う予定である。
- 4) Q マイクロバブルの技術は以前からあるが、この実験では細胞をバラバラにするのが目的なのか、破壊するのが目的なのか。  
A 主にバブルの破裂によるせん断応力での細胞膜の破壊を期待するものである。
- 5) Q アポトーシスは照射の早い段階で起こるものなのか。膜を破壊した後でアポトーシスが誘導されるのか。  
A アポトーシスがいつの段階で起こったかは定かではないが、超音波照射後にアポトーシス小体の形成等の発現が認められたという報告もあり、今回もその発現ではと考えている。
- 6) Q 超音波を照射する時間はどれくらいか。長時間当てないといけないのか。  
A 今回の実験は超音波照射は 15 秒間行っている。
- 7) Q バブルを体内に注入することによる問題はないのか。バブルを注入すると血管で塞栓を起こす可能性はないのか。  
A 生体内でのバブルの挙動については人体では定かではないが、今回のマウス実験では塞栓した徴候は認められなかった。実際に注入する場合にはバブルの量に関してはさらなる検証が必要であると思われる。
- 8) Q 超音波の周波数はどのように決定したのか。  
A 以前からの研究より、バブルが効果的にキャビテーションを起こすと考えられる強度を設定して検証している。
- 9) Q EGFR とさらに強い親和性を示すリガンド等で代用できるものはないのか。再度セツキシマブを選択した理由を知りたい。  
A 本邦において頭頸部癌で認可されている EGFR 阻害薬と考えた際に、セツキシマブが最も相応しいものと考えた。
- 10) Q 顕微鏡像において実際に細胞膜表面に接着しているバブルの数が少ない気がするがどうか。  
A バブルもマイクロ・ナノ含めて大小様々な大きさのものが試薬には含まれており、顕微鏡像で確認できるものはある程度大きいものに限られるが、実際には視認出来ない小さいバブルが細胞膜表面に接着しているものと考えている。
- 11) Q FDG-PET 等の検査のように、マイクロバブルに FDG を接着させて使用する例はあるのか。  
A FDG をバブルに接着させることは私が涉猟しえる限りではない。理論的には可能と考える。

- 1 2) Q 口腔扁平上皮癌の全てで EGFR が発現しているのか。  
A 資料がないため定かではないが、約 60%ほどの発現率であったと思われる。
- 1 3) Q SCC に対して、セツキシマブを使用した際のレスポンスレートほどの程度であるか。  
A 資料がないため、回答は困難である。
- 1 4) Q 今回のような殺細胞効果の判定は、以前は MTT アッセイ等を用いていたが、トリパンブルー色素排除法がポピュラーであるのか。  
A 今回、生死判定を簡便に行う際に検討したのがトリパンブルー色素排除法であった。アッセイについては今後検討したい。

本論文では、ヒト扁平上皮癌細胞への選択的な殺細胞効果を達成するために、OSCC の表面上に発現された EGFR の特異的標的化に使用できるセツキシマブで US 造影剤アルブミン MB を被覆したセツキシマブ被覆アルブミンマイクロバブル (CCAM) を作成し、治療用 US による選択的腫瘍細胞死滅およびアポトーシスの即時の増加を In vitro で EGFR 発現腫瘍細胞と非 EGFR 発現腫瘍細胞とで比較し、EGFR 発現腫瘍細胞において有意な殺細胞効果とアポトーシスの誘導が得られることを呈示した。さらに、この造影剤が従来の US 撮像装置で視覚化できることも明示された。

以上の内容の斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明確さ、及び質疑内容の結果を踏まえ、審査員で討議の結果、本論文は学位に値すると評価された。