

氏名	いのせ ともや 猪瀬 智也
学位の種類	博士 (保健学)
学位授与年月日	2021年3月25日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士後期3年の課程) 保健学専攻
学位論文題目	血管新生阻害剤と抗 PD-L1 抗体医薬併用時の血管構造・機能の ナノバイオ解析
論文審査委員	主査 教授 権田 幸祐 教授 齋藤 春夫 教授 本間 経康

論文内容要旨

学籍番号：B8MD3001

氏名：猪瀬 智也

本文：

背景：近年、腫瘍免疫学の飛躍的な発展にともない、免疫療法が手術療法、化学療法、放射線療法と並び主要ながん治療法として認知されてきた。免疫療法の中でも、免疫チェックポイント経路の阻害を標的としたがん免疫療法 (ICI 療法) は、2014年に2つの抗 Programmed cell death-1 (PD-1) 抗体が悪性黒色種を対象に薬事認証されたことを皮切りに、現在では多くのがん種で適応されている。しかし、免疫細胞にとって劣悪な環境であるがん微小環境の影響のため、多くの固形のがん種において ICI 療法の奏効率は 10-30%に留まっている。近年、ICI 療法の奏功性を向上させる対策として、腫瘍血管をリモデリング (構造変化) させる必要性が提案され、ICI 療法と血管新生阻害剤との併用療法が前臨床試験や臨床試験において試みられている。血管新生阻害剤は、多くがマルチターゲットチロシンキナーゼ阻害剤 (マルチターゲット TKI) である。そのため、血管新生やがん増殖に関わる様々なチロシンキナーゼ (TK) に対し、TKI は異なる親和性で TK の阻害効果を示す。よって血管新生阻害剤の種類とがん腫の組み合わせによって、腫瘍血管のリモデリングのレベルが異なる結果が示されている。このような状況から、血管新生阻害剤と ICI 療法の併用療法の解析では、標的とするがん腫と選択した薬剤の組み合わせをそれぞれ別途評価することが必要となる。そこで本研究では、大腸がん移植モデルマウスを用い、レンバチニブと抗 Programmed cell Death-1 Ligand 1 (PD-L1) 抗体が腫瘍血管のリモデリングと ICI 療法の抗腫瘍効果に及ぼす影響を検討した。先行研究において、このがん腫と薬剤の組み合わせは検討されていないため、ICI 療法の新たな医療技術発展に貢献できる。また ICI 療法に関わる血管リモデリングの研究では、光学顕微鏡を用いた観察手法が主であり、in vivo 3 次元的に血管の構造や機能を可視化する方法は、これまで行われていなかった。本研究では、金ナノ粒造影剤と高分解能 CT を組み合わせた新たなイメージング技術によって、ICI 療法の効果を向上させる血管リモデリングの解析を試みた。

方法：野生型マウスにマウス大腸がん細胞を移植して、腫瘍モデルマウスとした。未治療 (Cont.) 群、レンバチニブ治療 (Len) 群、抗 PD-L1 抗体医薬治療 (PD-L1) 群、併用治療 (Len+PD-L1) 群の4群間を比較した。評価法としては、顕微鏡イメージングによる病理学的な解析に加え、独自に創製した2種類の金ナノ粒子造影剤を用いた X 線 CT イメージングによって血管リモデリングの in vivo 3 次元解析を実施した。

結果と考察：腫瘍体積測定結果より、Len+PD-L1 群 (併用療法) が最も大きな抗腫瘍効果を示し

た。併用療法を施した腫瘍内には、他の治療群よりも多くの細胞傷害性 T 細胞が浸潤していた。また、レンバチニブを投与した単剤と併用の両群で、血管密度の減少が確認された。細胞傷害性 T 細胞は血管を通して腫瘍組織に浸潤するため、血管内皮細胞マーカーの CD31 の局在面積あたりの細胞傷害性 T 細胞数を算出したところ、Len 群と Len+PD-L1 群が最大となった。抗腫瘍効果の結果を考慮すると、Len+PD-L1 群では、細胞傷害性 T 細胞自身の傷害能力が抗 PD-L1 抗体医薬によって活性化し、Len 群に比べ抗腫瘍効果が大きくなったことが示唆された。ICI 療法の効果を向上させる腫瘍血管リモデリングの *in vivo* 3 次元解析として、腫瘍全体の血管機能評価を 15 nm AuNP-PEG 造影剤 を用いて X 線 CT イメージングした。血管の構造および機能評価のタイミングは、腫瘍体積推移から治療介入 7 日目に大きな変化が予測されたため、このポイントで各群間を評価した。その結果、レンバチニブ未投与群と投与群間で血管リモデリングに大きな差が認められた。レンバチニブ投与群では、腫瘍内の血管密度が低下していることに加え、腫瘍血管の正常化が促され血管機能が改善していることが示唆された。併用療法群では、レンバチニブによる血管リモデリングの結果、抗 PD-L1 抗体の薬効が十分に発揮され、治療開始後 15 日目には強い抗腫瘍効果を引き起こしたと考えられた。本研究データより、大腸がんの ICI 療法には血管リモデリングが重要なことが示唆された。

15 nm AuNP-PEG 造影剤は、ピンポイントのタイミングで高コントラスト CT イメージングが可能であるが、体外排泄能がないため腫瘍血管の間質部位への漏出が大きく、同一血管の経時的な観察は不可能であった。血管リモデリングと ICI 療法の相関を深く理解するためには、数日間以上同一血管を経時観察可能な造影剤の開発が重要となる。体外排泄可能な小粒子径金ナノ粒子を新たに合成し、これをラクトフェリタンパク質 (LF) と複合体化させた新たな造影剤 (sAu/GSH-LF) を開発した。この造影剤で腫瘍血管を計測した結果、同一血管の 3 日間のダイナミックな構造変化を可視化することに成功した。sAu/GSH-LF を用いた CT イメージングによって、レンバチニブ投与群の血管リモデリング解析を行うことが今後の課題となるが、様々な実験水準のモデルマウスの X 線 CT イメージングを実施するには多くの造影剤が必要となる。そのため、現在、sAu/GSH-LF の大量合成法を開発中である。

結論：本研究では、レンバチニブによる腫瘍血管の血管密度減少と機能向上により、がん微小環境が改善し、抗 PD-L1 抗体医薬の薬効が十分に引き出された。この結果より、大腸がんに対するレンバチニブと抗 PD-L1 抗体医薬の併用治療は臨床応用が有望な治療法になることが期待された。また本研究で確立した X 線 CT イメージングによる腫瘍血管の構造・機能変化の解析技術は、モデルマウスを用いた創薬や血管新生阻害剤と ICI 療法の新たな組み合わせの評価に有効であり、これらの技術を基盤として前臨床試験の精度向上や臨床応用への展開が期待される。

審査結果の要旨

博士論文題目血管新生阻害剤と抗 PD-L1 抗体医薬併用時の血管構造・機能のナノバイオ解析.....

所属専攻・分野名保健学専攻..... 医用物理学分野.....

学籍番号.....B8MD3001.....氏名.....猪瀬 智也.....

本論文は、大腸がん細胞を移植したモデルマウスに対し、血管新生阻害剤レンバチニブと免疫チェックポイント阻害 (ICI) 薬の抗 Programmed cell Death-1 Ligand 1 (PD-L1) 抗体の併用療法が、ICI 療法の抗腫瘍効果に及ぼす影響を検討している。先行研究において、大腸がんに対しレンバチニブと抗 PD-L1 抗体で対がん効果を評価した例は無い。またこれまでの ICI 療法に関わる血管構造変化の研究では、光学顕微鏡を用いた観察手法が主であり、*in vivo* 3次元で血管の構造や機能を可視化する方法は、十分に行われていなかった。本論文はこれらの課題解決を行うとともに、ICI 療法に重要な血管構造解析のさらなる技術革新を目指し、血管構造評価に重要な血管造影剤を新たなコンセプトのもと開発を行った。

本論文の主な新規性・成果としては、以下の4点が挙げられる。

- 大腸がんに対するレンバチニブと抗 PD-L1 抗体医薬の単剤療法および併用療法、それぞれの治療効果に関して腫瘍体積測定を行い、併用治療の高い有効性を示すことに成功した。
- 併用療法による抗腫瘍効果の主な要因は、レンバチニブにより腫瘍血管の正常化が進み、細胞傷害性 T 細胞の腫瘍組織への浸潤性が向上したことであった。
- 腫瘍全体の EPR 効果の可視化を利用した血管正常化の解析は、これまでに無い方法であり、この方法によって初めて抗 PD-L1 抗体の薬効亢進に極めて重要な血管病態変化の全体像が示された。
- 腎排泄可能な小粒径金ナノ粒子とタンパク質を複合化した新規造影剤の創製によって、15 nm 金ナノ粒子造影剤では実現困難であった同一腫瘍血管の経時的な CT イメージング手法の確立に成功した。

上記の結果より、レンバチニブによる腫瘍血管の血管密度減少と機能向上により、がん微小環境が改善し、大腸がんへの抗 PD-L1 抗体医薬の薬効が十分に引き出され、併用治療が有望な治療法になることが期待された。また本研究で確立した X 線 CT イメージングによる腫瘍血管の構造・機能変化の解析技術は、モデルマウスを用いた創薬や血管新生阻害剤と ICI 療法の新たな組み合わせの評価に有効であり、これらの技術を基盤として前臨床試験の精度向上や臨床応用への展開が期待される。

以上の理由から、本論文は博士（保健学）の学位論文として合格と認める。