



北海道公立大学法人
札幌医科大学
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	A novel strategy inducing autophagic cell death in Burkitt's lymphoma cells with anti-CD19-targeted liposomal rapamycin (CD19を標的としたリポソーム化ラパマイシンによるバーキッットリンパ腫のオートファジー誘導型新規治療法)
Author(s) 著者	小野, 薫
Degree number 学位記番号	甲第 2767 号
Degree name 学位の種類	博士 (医学)
Issue Date 学位取得年月日	2014-03-31
Original Article 原著論文	
Doc URL	
DOI	
Resource Version	

学位論文の内容の要旨

報告番号	甲第 2767 号	氏名	小野 薫
<p>A novel strategy inducing autophagic cell death in Burkitt's lymphoma cells with anti-CD19-targeted liposomal rapamycin CD19 を標的としたリポソーム化ラパマイシンによるバーキットリンパ腫のオートファジー誘導型新規治療法</p> <p>研究目的</p> <p>バーキットリンパ腫は、極めて aggressive な B 細胞性非ホジキンリンパ腫である。強力な抗がん剤治療により小児では治療成績が向上したものの、成人においては依然として予後不良のままである。</p> <p>治療成績を向上させるためには 2 つの治療戦略が想定される。1 つは分子標的薬の導入である。Mammalian target of rapamycin (mTOR) の阻害剤である rapamycin は、バーキットリンパ腫細胞を移植したマウスの腫瘍増殖、脾腫、そして骨髄転移を改善したとの報告があり、有望な薬剤の一つであると思われる。この rapamycin は癌細胞にオートファジー型細胞死を誘導する薬剤である。オートファジーのシグナル経路はアポトーシスやネクロシスなどの細胞死シグナルとは独立しており、これら 2 つの経路がブロックされた場合においてもバックアップ機構として機能する。このことは、腫瘍細胞が従来型の抗がん剤に抵抗性を獲得しても、rapamycin が効果を発揮する可能性を示唆している。</p> <p>もう 1 つのアプローチは特異的な drug delivery system (DDS) を採用することである。バーキットリンパ腫は細胞表面に CD19 を高度に発現しているため、この抗原は良い標的になると推測される。同様の理由で CD20 も候補にあがるが、CD19 を選択することにより、現在既に臨床で用いられている抗 CD20 モノクローナル抗体、リツキシマブの併用が可能になると考えられる。これまでの報告では、CD19 抗体を結合したリポソーム化ドキソルビシンやイマチニブが B 細胞性の悪性リンパ腫やフィラデルフィア染色体陽性急性リンパ芽急性白血病に有効であった。これらの報告において、ドキソルビシンやイマチニブのリポソーム化にはポリエチレングリコールを添加したリポソームが用いられているが、この方法では脾臓や肝臓などの臓器へリポソーム化した薬剤が非特異的に取り込まれるという問題点があった。一般に、肝脾マクロファージいわゆる網内系 (reticuloendothelial system:RES) による非特異的な取り込みを抑えるためには、陽性荷電のリポソームより陰性荷電のリポソームのほうが好ましい。陰性に荷電した核酸が効率的に被包されるため陽性荷電のリポソームが頻用されるが、生体内において陽性荷電のリポソームは陰性荷電の血清蛋白と凝集し、これが RES に取り込まれる一因となっているからである。一方で近年、当科の吉田らは L-fucose を結合させた陰性荷電のリポソームが RES に取り込まれることなく膵癌細胞へ抗がん剤を送達できることを <i>in vivo</i> で証明した。そこで今回我々は、この技術を応用することで rapamycin を内包した陰性荷電リポソームに CD19 抗体を結合し、これがバーキットリンパ腫に有効であるかを検討した。</p> <p>研究方法</p> <p>1) バーキットリンパ腫細胞株</p>			

SKW6.4, Raji および Namalwa 細胞は American Type Culture Collection (ATCC)から購入した。ドキシソルピシンに抵抗性の SKW6.4 細胞 (SKW-DOX) は、低濃度のドキシソルピシン(10 ng/ml)に長期間暴露して得た。また、*in vivo* 実験において SKW6.4 細胞を IVIS システムにより検出する目的で、赤色蛍光を発する Red Fluorescent Protein (RFP)の遺伝子をレンチウイルスで同細胞に導入し、SKW-RFP 細胞を樹立した。

2) 患者由来のバーキットリンパ腫細胞

札幌医大倫理委員会の承認を得た後、文書で同意書の得られたバーキットリンパ腫患者からリンパ腫細胞を得た。胸膜浸潤した症例の胸水、または白血球化した症例の末梢血から CD19 陽性細胞を磁気ビーズで選別した。

3) 抗体結合リポソームの作製

まず、凍結乾燥法により蛍光物質 Cy5.5 もしくは rapamycin を dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), Dipalmitoylphosphatidyl-ethanolamine (DPPE), dicetylphosphate (DCP), コレステロールそしてガングリオシドから構成される陰性荷電のリポソーム、グライコリポ(GL)へ封入した。次に、親水性を付加するため、リポソーム表面へ bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS3)をリンカーとして Tris(hydroxymethyl)aminomethane を結合させた。そして、抗 CD19 抗体あるいは抗 CD2 抗体を、ガングリオシドに結合させた HAS (human serum albumin)へ 3,30-dithiobis(sulfosuccinimidyl)propionate (DTSSP)を用いてクロスリンクさせた。Cy5.5 もしくは rapamycin を内包したグライコリポを GL-Cy5.5 もしくは GL-Rap, そして抗 CD2 抗体を結合した GL-Cy5.5 もしくは GL-Rap を CD2-GL-Cy5.5 もしくは CD2-GL-Rap, 更に抗 CD19 抗体を結合した GL-Cy5.5 もしくは GL-Rap を CD19-GL-Cy5.5 もしくは CD19-GL-Rap と名付けた。

4) 細胞傷害性の検討 (*in vitro*)

細胞数は WST-1 法で半定量した。すなわち、1 well につき 0.5×10^5 個の細胞を 96-well 培養プレートに播種した後、リポソーム化 rapamycin を添加して 72 時間培養した。その後、細胞培養液 100 μ l に対し WST-1 溶液を 10 μ l 添加して 1 時間培養した。還元された WST-1 の吸光度(450 nm)は ELISA プレートリーダーで測定した。

5) 動物実験

すべての動物実験は札幌医大動物実験委員会の承認を得て行った。Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) mice (雌, 6-7 週齢, 体重 19-21 g)は Charles River Laboratories から購入した。抗 CD19 抗体を結合したグライコリポの CD19 に対する特異性を検討する実験では、 1.0×10^7 個の SKW6.4 細胞をマウスの左背部皮下へ移植した。その 7 日後、CD19-GL-Cy5.5 と CD2-GL-Cy5.5 を尾静脈から投与し、腫瘍に取り込まれた Cy5.5 の赤色蛍光を IVIS システムで撮影した。CD19-GL-Cy5.5 の抗腫瘍効果を検討する実験では、 2.0×10^6 個の SKW-RFP 細胞を NOD/SCID マウスの腹腔内へ移植し、GL, Rap, GL-Rap, CD2-GL-Rap そして CD19-GL-Rap を尾静脈から週 2 回で投与した。生存は毎日確認し、RFP の赤色蛍光を IVIS システムで週 1 回撮影した。

研究成績

1) 抗 CD19 抗体を結合したリポソームの CD19 に対する特異性

まず、3 種類のバーキットリンパ腫細胞株、SKW6.4, Raji, および Namalwa の rapamycin

感受性を検討したところ、SKW6.3細胞が最も高感受性であったため、以後の検討にはこの細胞株を選択した。同細胞におけるCD19の発現はフローサイトメトリーで確認した。次に、SKW6.4細胞へGL, GL-Cy5.5, CD2-GL-Cy5.5そしてCD19-GL-Cy5.5を添加した。フローサイトメトリーではCD19-GL-Cy5.5を添加した細胞で、Cy5.5の赤色蛍光が最も強く検出された。また、蛍光顕微鏡観察でも同サンプルの蛍光が最も強かった。SKW6.4細胞をNOD/SCIDマウスに皮下移植して、CD19-GL-Cy5.5を尾静脈から投与したところ、皮下腫瘍に赤色蛍光が観察された。蛍光は投与2日目でピークとなり、以後は徐々に減衰した。体表面からの観察では、肝臓や脾臓に非特異的な取り込みは認められなかった。一方CD2-GL-Cy5.5を投与したマウスでは、皮下腫瘍に蛍光は観察されなかった。

2) 抗CD19抗体を結合したりポソーム化 rapamycin (CD19-GL-Rap) の性状

透過型電子顕微鏡を用いた観察では、GL, GL-Rap, CD2-GL-RapそしてCD19-GL-Rapの形状は均一な球形であった。粒子径はおおよそ140 nm, 脂質濃度は30 mg/ml, ゼータ電位は-65 mV, rapamycin濃度は1.2 mg/ml, 抗体濃度は121 µg/mlであった。

3) CD19-GL-Rapの細胞傷害性 (*in vitro*)

SKW6.4細胞にGL-Rap, CD2-GL-RapそしてCD19-GL-Rapを添加し72時間培養したところ、CD19-GL-Rapで最も強い細胞傷害性が認められた。一方、CD19-GL-Rapの細胞障害性は、SKW6.4細胞をあらかじめ抗CD19抗体で処理することにより中和されたが、抗CD2抗体ではこの中和効果を再現できなかった。また、2名の患者から採取したパーキットリンパ腫細胞を用いた検討においても、CD19-GL-Rapの細胞障害性は確認された。更に、ドキシソルピシンに耐性を獲得したSKW6.4細胞すなわちSKW-DOX細胞に対しても、CD19-GL-Rapは十分な細胞障害性を発揮した。

4) CD19-GL-Rapによるオートファジー型細胞死の誘導

SKW6.4細胞にCD19-GL-Rapを添加したところ、ウエスタンブロット法によりオートファジー型細胞死のマーカーであるLC3-IIがCD19-GL-Rapの濃度に依存して検出された。また、CD19-GL-RapがSKW6.4細胞に誘導する細胞死は、オートファジーの阻害剤である3-methyladenine (3MA)によって抑制された。一方、アポトーシス細胞死の阻害剤Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD-FMK)やネクロシス細胞死の阻害剤であるN-acetyl L-cysteine (NAC)は、CD19-GL-RapがSKW6.4細胞に誘導する細胞死を抑制しなかった。

5) CD19-GL-Rapの抗腫瘍効果 (*in vivo*)

赤色蛍光物質のRFPを遺伝子導入したSKW6.4細胞すなわちSKW-RFP細胞をNOD/SCIDマウスの腹腔内に移植すると、SKW-RFP細胞の増殖にともない赤色蛍光が体表面より検出される。GL投与群では、赤色蛍光がおおよそ移植後21日で検出されるのに対し、Rap, GL-Rap, CD2-GL-Rap投与群では28日、CD19-GL-Rapでは35日であった。また、35日目における赤色蛍光強度を比較したところ、CD19-GL-Rap投与群はRap, GL-RapおよびCD2-GL-Rap投与群より低値であった。また、生存期間中央値はGL投与群が33日、Rap, GL-Rap, CD2-GL-Rap投与群がそれぞれ36, 37, 40日で、CD19-GL-Rap群の57日はいずれの群と比較しても有意差があった。

考察

リポソームを用いた薬剤の送達に関し、B細胞リンパ腫を対象とする際には、CD19やCD20がともに標的として適しているものの、CD19のほうがCD20より素早く internalize されるという報告がある。同一の報告において、CD19抗体結合リポソーム化ドキソルビシンはCD20抗体結合のそれよりB細胞リンパ腫に有効であることが示されている。更に、CD19を標的とした場合は、現在既に臨床で用いられている抗CD20モノクローナル抗体、リツキシマブを併用する選択肢が残されるというメリットがある。

しかしながらバーキットリンパ腫のような難治性のB細胞リンパ腫を対象とした場合、CD19抗体結合リポソームに内包する薬剤が従来用いられているドキソルビシンで適切なものかについては疑問が残る。今回の試みで我々は、内包する薬剤として rapamycin を選択したが、それは rapamycin がオートファジー型細胞死を誘導し、そのシグナルはドキソルビシンのような従来用いられている抗癌剤によって誘導されるアポトーシス/ネクロトーシスの細胞死シグナル経路と交差しないからである。実際、CD19抗体結合リポソーム化ラパマイシンはドキソルビシンに耐性を獲得したバーキットリンパ腫細胞株に対しても十分な細胞傷害性を発揮した。この結果は、われわれの治療戦略が難治性のバーキットリンパ腫に対しても有用であることを示唆している。また、リンパ腫に対する治療効果とは別に、rapamycin を選択したもうひとつの理由として安全性があげられる。同剤は臓器移植後の免疫抑制剤として既に臨床で用いられている薬剤であり、有害事象は用量依存性の骨髄抑制や脂質異常などである。

なお、近年では新規の mTOR 阻害剤である temsirolimus や everolimus が腎癌などの治療に用いられているが、これらもまたドキソルビシン抵抗性のバーキットリンパ腫細胞株に有効であることを確認している。バーキットリンパ腫に対する mTOR 阻害剤を用いたオートファジー誘導型の治療は、更に進化する可能性を有すると考えている。一方、リポソームを用いて生体における薬剤の送達を試みる際、その多くが肝脾の RES 系で非特異的に取り込まれるという問題点がある。これを解決するために、我々は当科吉田らの方法を導入した。吉田らは、L-fucose を結合した陰性荷電のリポソームを用いることで、RES 系による非特異的な取り込みを抑制し、抗癌剤を特異的に腫瘍細胞へ送達することに成功している。この技術を応用して抗 CD19 抗体を結合した陰性荷電のリポソームを用いたところ、*in vivo* の投与でマウス体表面から肝脾への取り込みを示唆する蛍光は検出されなかった。陰性荷電のリポソームを選択する妥当性が示されたものと考えている。

結論として、本研究により、CD19抗体結合リポソーム化ラパマイシンがバーキットリンパ腫に対するオートファジー誘導型の新規治療法となりうる可能性が示された。

論文審査の要旨及び担当者

平成 26 年 1 月 9 日提出

(平成 26 年 3 月 31 日授与)

報告番号	甲第 2767 号	氏名	小野 薫
論文審査 担当者	主査 加藤 淳二	副査 渡邊 直樹	
	委員 小海 康夫	委員 堀尾 嘉幸	

論文題名	A novel strategy inducing autophagic cell death in Burkitt's lymphoma cells with anti-CD19-targeted liposomal rapamycin (CD19を標的としたリポソーム化ラパマイシンによるバーキットリンパ腫のオートファジー誘導型新規治療法)
------	--

結果の要旨

本研究では、バーキットリンパ腫における CD19 抗原高発現を利用して、抗 CD19 抗体を結合させたリポソームをキャリアーとし、腫瘍細胞へのドラッグデリバリーを試みた。また抗 CD19 抗体結合リポソームに mTOR 阻害剤であるラパマイシンを内包化しオートファジー細胞死の誘導を試みた。その結果、in vitro、in vivo 両者において高い抗腫瘍効果を示し、マウスでの生存期間の延長を認めた。本研究は抗 CD19 抗体結合ラパマイシン内包リポソームがバーキットリンパ腫に対する新たな治療法となる可能性を示し、学位論文として十分に値するものであると考えられた。