

77. がん免疫療法の治療効果予測 PET イメージング法の開発

小野 正博

京都大学 大学院薬学研究科 病態機能分析学分野

Key words : イメージング, グランザイム B, パーフォリン

緒言

近年、がんに対する新たな治療法として免疫療法が大きな注目を集めている。抗 programmed cell death-1 (PD-1) 抗体や抗細胞障害性 T リンパ球抗原-4 (CTLA-4) 抗体などの免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) は、様々な種類のがんに対して劇的な有効性を示すものの、奏効率は 20~30%程度であり、その向上が強く望まれている。また重篤な副作用も報告されており、がん免疫療法の開始前あるいは初期段階において、適切な患者を選択し、正確に治療効果を予測するためのバイオマーカーの開発が非常に重要であると考えられる。

患者が免疫療法に対して奏効性を示すためには、ICI により引き起こされる細胞障害性 T 細胞 (CTL) のがん組織への浸潤が大きく関与していると考えられている [1]。図 1 に示すように、T 細胞は樹状細胞により提示されたがん抗原を認識、活性化し CTL として機能する。CTL は細胞障害性顆粒を形成し、がん細胞に対しそれを放出する。この細胞障害性顆粒には「グランザイム B」および「パーフォリン」が含まれている。パーフォリンはがん細胞膜上で重合して孔を形成し、セリンプロテアーゼに属するグランザイム B がこの孔を通じてがん細胞に侵入し、がん細胞での DNA 分解によるアポトーシスを誘導する。このようにグランザイム B およびパーフォリンは CTL のがん殺傷作用における重要な分子であり、これら分子は ICI の治療効果予測のための重要なバイオマーカーとなる可能性も示唆されている [1]。そこで本研究では、活性化 CTL 関連分子であるグランザイム B およびパーフォリンを標的とする生体分子イメージング法の開発を目的として、生体でグランザイム B およびパーフォリンに高い選択的結合性を示す新規 PET プローブの開発を計画した。

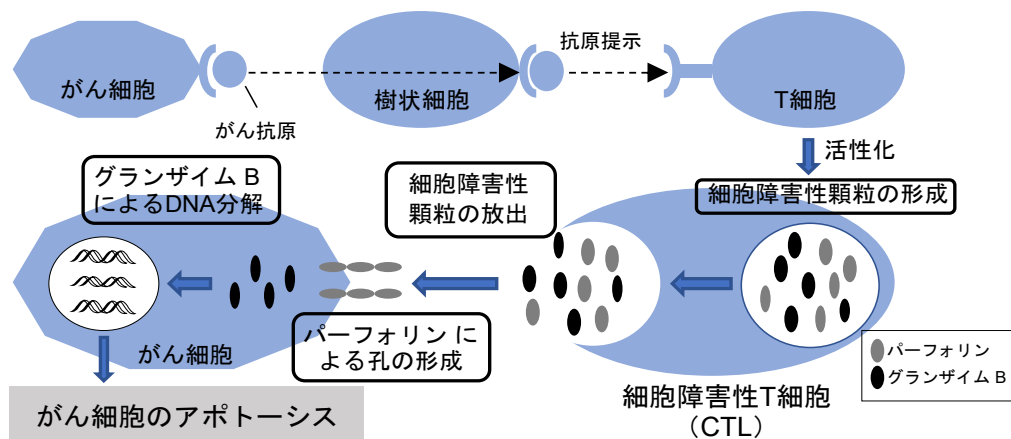


図 1. CTL のグランザイム B・パーフォリン依存性の細胞障害経路

パーフォリンおよびグランザイム B は細胞障害を引き起こす免疫活性を評価するバイオマーカーとなる可能性がある。

方法

1. 化合物の設計

グランザイム B に対する阻害活性が報告されているペプチド [2] をグランザイム B 認識部位として選択し、*N*-succinimidyl 4-fluorobenzoate (SFB) を介して PET 用核種である¹⁸F を導入した [¹⁸F]GC-1 を設計した。また、パーフォリン阻害剤として報告されているベンゼンスルホンアミド誘導体 [3] を基盤とした¹⁸F 標識 PC-1 および PC-2 を設計した。

2. 候補化合物の非標識体および標識前駆体の合成

非標識体である GC-1 はテトラペプチドと SFB を反応させることにより合成した。また、非標識体である PC-1、PC-2、および [¹⁸F]PC-2 の標識前駆体である化合物 A を合成した。

3. *In vitro* 親和性評価

グランザイム B 親和性は阻害実験により評価した。グランザイム B、基質、および GC-1 または [Ac]IETD[CHO] (25 pM~250 μM) を混和し、37°C で 30 分間静置した。励起波長 380 nm、蛍光波長 500 nm で蛍光強度を測定し、GraphPad Prism を用いて阻害曲線を描き、50%阻害濃度 (IC₅₀) を算出した。

パーフォリン親和性は既報の方法 [3, 4] を参考に評価した。パーフォリンと PC-1 または PC-2 (20 mM) を混和し、室温で 30 分間静置した。Jurkat 細胞 (1.0×10⁵ cells/mL) に添加後、37°C、5% CO₂ 下で 1 時間静置した。細胞懸濁液とトリパンブルーを混和し、生細胞濃度を測定した。

4. ¹⁸F 標識

[¹⁸F]SFB を既報の方法 [5] により作製し、リン酸緩衝生理食塩水中で母体ペプチドと反応させた。逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により精製し、 [¹⁸F]GC-1 を得た。

ジメチルスルホキシド/アセトニトリル混合溶液に K [¹⁸F]F を加え、マイクロ波 (50 W) で 10 分間反応させた。逆相 HPLC により精製し、 [¹⁸F]PC-2 を得た。

5. PET

BALB/c マウスに CT26 細胞 (1×10⁶ cells/mouse) を皮下移植し、ICI 治療群として、移植 3、6、9 日後に抗 PD-1 抗体 (200 μg) および抗 CTLA-4 抗体 (100 μg) を腹腔内投与した (n=10)。また非治療群として、移植 3、6、9 日後の CT26 細胞移植マウスに生理食塩水を腹腔内投与した (n=8)。移植 12 日後に [¹⁸F]GC-1 の生理食塩水溶液 (100~200 μL、2.2~3.7 MBq) をマウスの尾静脈に投与した。投与 1 時間後、PET 撮像 (10 分間) を行った。その後、マウス腫瘍の容積を CT26 細胞移植 28 日後まで週 3 回測定した。

6. *Ex vivo* オートラジオグラフィ (ARG)

C57BL/6J マウスに MC38 細胞 (1×10⁶ cells/mouse) を皮下移植し、移植 3、6、9 日後に抗 PD-1 抗体 (200 μg) および抗 CTLA-4 抗体 (100 μg) を腹腔内投与した。移植 12 日後に [¹⁸F]PC-2 の 10% エタノールおよび 0.1% Tween80 含有生理食塩水溶液 (200 μL、955 kBq) をマウスの尾静脈に投与した。投与 30 分後、腫瘍を摘出した後、凍結切片を作製し、ARG 画像を取得した。また、隣接切片を、抗パーフォリン抗体を用いて免疫染色し、パーフォリンの局在を確認した。

結果および考察

1. 候補化合物の非標識体および標識前駆体の合成

GC-1、PC-1、PC-2、および化合物 A をそれぞれ総収率 80、12、6、および 13% で得た。

2. *In vitro* 親和性評価

GC-1 について *in vitro* におけるグランザイム B に対する親和性を評価した (表 1)。GC-1 のグランザイム B に対する結合性が示され、その親和性はグランザイム B に対する阻害活性が報告されている [Ac]IETD[CHO] と比較して、わずかに低い結果となった。GC-1 のグランザイム B 結合アミノ酸配列は [Ac]IETD[CHO] に由来するものであり、ペプ

チドの N 末端へのフルオロ安息香酸の導入はグランザイム B 結合性にわずかに影響を与えることが示唆された。

表 1. グランザイム B 親和性

	IC ₅₀ (nM)
GC-1	602 ± 85
[Ac]IETD[CHO] (control)	159 ± 32

いずれの数値も独立した 3 回の実験の結果を基に平均値 ± 標準偏差で示している。

また、PC-1 および PC-2 についてパーフォリンに対する阻害活性を評価した (図 2)。パーフォリンおよび阻害剤の非存在下と比較して、パーフォリンの添加により生細胞濃度が有意に低減し、パーフォリンの細胞障害性が示唆された。一方、PC-1 または PC-2 の存在下では生細胞濃度が回復し、両化合物がパーフォリンの細胞障害活性を阻害することが示唆された。

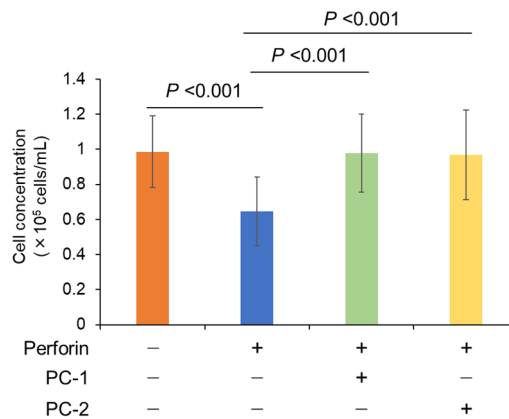


図 2. パーフォリン阻害実験

PC-1 および PC-2 はパーフォリンの細胞障害性を阻害したことが示唆された。有意差は Dunnett's test により評価した。

3. ¹⁸F 標識

[¹⁸F]SFB を放射化学的収率 44% で作製し、[¹⁸F]GC-1 を放射化学的収率 12% で得た。また、[¹⁸F]PC-2 を放射化学的収率 2% で得た。

4. PET

ICI 治療マウスおよび非治療 (生理食塩水投与) マウスの PET について、各群の代表的な画像を図 3 に示す。ICI 治療の有無に関わらず、[¹⁸F]GC-1 は顕著な腫瘍集積を示さなかった。しかし PET 撮像後に各マウスの腫瘍成長を観測したところ、非治療群では経時的な腫瘍成長が確認された一方、ICI 治療群では顕著な腫瘍成長が確認されなかった。よって [¹⁸F]GC-1 では ICI 治療の効果を予測することが難しく、プローブの更なる改善が必要であると考えられた。

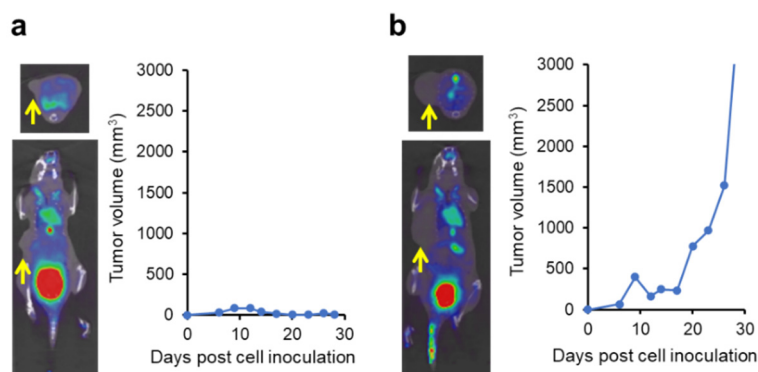


図3. [¹⁸F]GC-1によるPET撮像

ICI治療群および生理食塩水投与群について代表例を示す。

- a) ICI治療群におけるPET画像および腫瘍容積の変化。
- b) 生理食塩水投与群におけるPET画像および腫瘍容積の変化。

PET画像における黄色矢印は腫瘍の位置を示している。

5. *Ex vivo*ARG

[¹⁸F]PC-2をICI治療マウスに投与した際の*ex vivo*ARGの結果を図4に示す。腫瘍において[¹⁸F]PC-2の局所的な集積が認められ、その分布は同一切片の免疫染色により確認したパーフォリンの局在と一致する傾向が示唆された。これより、[¹⁸F]PC-2は腫瘍組織に発現したパーフォリンに対して結合したことが示唆され、パーフォリンイメージングプローブとしての基礎的性質を示した。

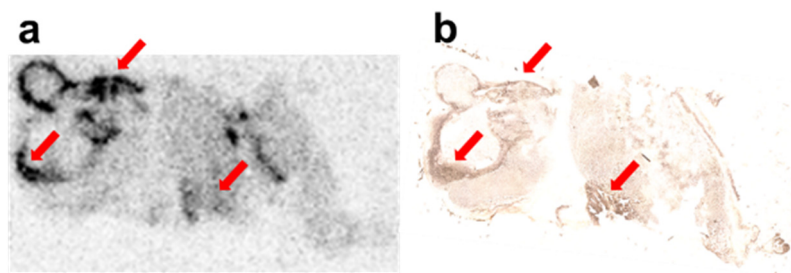


図4. [¹⁸F]PC-2による*ex vivo*ARG

[¹⁸F]PC-2は*in vivo*でパーフォリンに結合したことが示唆された。

- a) *Ex vivo*ARG画像。
- b) 同一切片のパーフォリン免疫染色画像。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学大学院薬学研究科病態機能分析学分野の飯國慎平助教、山田幸輝学士である。

文献

- 1) Tumeo PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, Chmielowski B, Spasic M, Henry G, Ciobanu V, West AN, Carmona M, Kivork C, Seja E, Cherry G, Gutierrez AJ, Grogan TR, Mateus C, Tomasic G, Glaspy JA, Emerson RO, Robins H, Pierce RH, Elashoff DA, Robert C, Ribas A. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*. 2014 Nov 27;515(7528):568-71. PMID: 25428505 DOI: 10.1038/nature13954

- 2) Cullen SP, Adrain C, Lüthi AU, Duriez PJ, Martin SJ. Human and murine granzyme B exhibit divergent substrate preferences. *J Cell Biol.* 2007 Feb 12;176(4):435-44. Epub 2007 Feb 5. PMID: 17283187 DOI: 10.1083/jcb.200612025
- 3) Spicer JA, Miller CK, O'Connor PD, Jose J, Giddens AC, Jaiswal JK, Jamieson SMF, Bull MR, Denny WA, Akhlaghi H, Trapani JA, Hill GR, Chang K, Gartlan KH. Inhibition of the cytolytic protein perforin prevents rejection of transplanted bone marrow stem cells in vivo. *J Med Chem.* 2020 Mar 12;63(5):2229-2239. Epub 2019 Sep 26. PMID: 31525966 DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b00881
- 4) Spicer JA, Miller CK, O'Connor PD, Jose J, Huttunen KM, Jaiswal JK, Denny WA, Akhlaghi H, Browne KA, Trapani JA. Benzenesulphonamide inhibitors of the cytolytic protein perforin. *Bioorg Med Chem Lett.* 2017 Feb 15;27(4):1050-1054. Epub 2016 Dec 23. PMID: 28110869 DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.12.057
- 5) Tang G, Zeng W, Yu M, Kabalka G. Facile synthesis of N-succinimidyl 4-[¹⁸F]fluorobenzoate ([¹⁸F]SFB) for protein labeling. *J Label Compd Radiopharm* 2008 Jan 02;51(1):68-71. DOI: 10.1002/jlcr.1481