



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	がん光免疫療法のメカニズム解明および適用拡大を目指した基礎的研究 [全文の要約]
Author(s)	中島, 孝平
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。【担当：薬学部図書室】 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第14400号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81683
Type	doctoral thesis
File Information	Kohei_Nakajima_summary.pdf



学 位 論 文 の 要 約

博士の専攻分野の名称 博士（薬科学） 氏 名 中島 孝平

学 位 論 文 題 名

がん光免疫療法のメカニズム解明および適用拡大を目指した基礎的研究

がんの三大療法は、外科治療、放射線治療、化学療法であるが、どの手法であっても正常細胞に影響があり、副作用として患者の体に大きな負担を強いることとなる。したがって、がん細胞のみを選択的に除去または殺傷できるがん治療法が求められている。そのような背景の中、がん細胞を特異的に認識する抗体にフタロシアニン誘導体である IR700 を結合した薬剤（抗体-IR700）投与後に近赤外光を照射して行う、光免疫療法（Photoimmunotherapy; PIT）が開発された。2020 年 12 月には厚生労働省によって保険収載され、現在注目されている治療法である。PIT は抗体-IR700 が結合し、かつ、光照射された細胞のみが死滅するため、一般的な抗がん剤と比較して高い標的選択性を有する。

これまでに、他の治療法で奏功しなかった患者にも有効であることが示されているが、PIT の細胞傷害メカニズムは明らかになっておらず、より高い治療効果などを目指した新規 PIT 薬剤の開発が難しい。また、光は組織を通過する際、散乱や吸収により減衰するため、体外から照射した光は生体深部に到達できない。深部の腫瘍を照射するため、現在、臨床では光ファイバーを腫瘍周囲に挿入しているが、挿入には全身麻酔が必要であり、患者および術者ともに負担が大きく、繰り返し治療が難しい。したがって、繰り返し治療を可能とする照射法が開発が望まれる。

そこで本研究では、光照射後に誘発される膜傷害に着目して細胞傷害メカニズムを解明し、さらに、陽電子放出断層撮影法（PET）を利用して *in vivo* での PIT のメカニズム解明も目指した。また、深部の腫瘍を PIT で治療可能とする体内埋め込み型光デバイスを開発した。

PIT では光照射時に細胞膜に抗体-IR700 が結合していればよく、細胞内に取り込まれる必要がないため、細胞膜傷害を起点として細胞死が誘発されると考えた。そこで第 1 章では、PIT で生じる膜傷害について大きさの異なる種々のイオンや分子を用いて検討した。蛍光指示薬を用いて Na^+ の流入を観察したところ、細胞膨張などの形態変化が観察される前に蛍光強度の上昇が見られ、 Na^+ が通過できる程度の膜傷害が誘発されたことが明らかとなった。さらに、イオンまたは分子の流入を定量的に検討するために $^{111}\text{In}^{3+}$ と、 $^{111}\text{In}^{3+}$ に DTPA を配位させた ^{111}In -DTPA を用いた。 $^{111}\text{In}^{3+}$ の流入量は、3 min と 60 min 後のどちらにおいても増加し、 $^{111}\text{In}^{3+}$ は光照射後の早期に流入することが示された。一方、 ^{111}In -DTPA は 60 min 後でのみ有意な流入量増加が認められた。以上の結果から、PIT は光照射直後にイオンが通過できるレベルの膜傷害を誘発し、その後傷害が亢進することでより大きな分子も通過できるようになり、細胞死に至ることが示唆された。また、当研究室の検討により、IR700 の水溶性の軸配位子が光照射によって切断されることで、フタロシアニンの疎水性相互作用によって水中で凝集体が形成されることが明らかとなっている。すなわち、光照射によって細胞膜上の抗体-IR700 の物性が変化し、細胞膜に物理的なストレスが生じて上記のように細胞膜が傷害されると考えられる。

ただし、抗体-IR700 は細胞膜上に保持され続けるわけではなく、時間経過とともにエンドサイトーシスによってリソソームへと内在化される。古くから行われている光治療法である光線力学療法は $^1\text{O}_2$ によって細胞を傷害すること、また、IR700 も $^1\text{O}_2$ を産生することから、内在化した抗体-IR700 は $^1\text{O}_2$ を介して細胞傷害を誘発する可能性があると考え、抗体-IR700 の局在と細胞傷害性の関連を検討した。細胞膜上およびリソソーム内の抗体-IR700 による細胞傷害性の違いを検討するため、抗体-IR700 を結合させた細胞を洗浄後、37℃で 0 または 24 h インキュベートして内

在化を進行させた後に光照射を行った。細胞生存率を評価した結果、照射量 2 J/cm^2 では内在化 24 h の細胞でも細胞傷害性が認められたが、0 h の細胞と比較して傷害性は著しく小さかった。さらに、 $^1\text{O}_2$ 除去剤である NaN_3 を添加して内在化 24 h の細胞生存率を検討したところ、細胞生存率の低下が完全に阻害された。

以上の結果から、PIT では主に細胞膜上の抗体-IR700 が凝集体を形成して微小な膜傷害を誘発し、その後不可逆的に膜傷害が亢進することが示された。一方、内在化した抗体-IR700 の細胞傷害への寄与は小さいものの、 $^1\text{O}_2$ を介して細胞死を誘発すると考えられる。

続いて、第2章では、*in vivo* における PIT の作用機序の解明を目指し、PET 用糖代謝イメージング剤 ^{18}F FDG および低酸素イメージング剤 ^{18}F FMISO を用いて、PIT に伴う腫瘍内の糖代謝と低酸素領域の変化に着目した検討を行った。がん細胞を左右両背に移植した担癌マウスに、抗体-IR700 を投与し、片側の腫瘍にのみ光照射して PIT を行った。照射から 3 時間後に、 ^{18}F FDG または ^{18}F FMISO を用いて PET を撮像した。 ^{18}F FDG-PET 画像から左右の腫瘍への ^{18}F FDG の集積量を定量した結果、非照射側と比較して照射側腫瘍への集積量は有意に低かった。腫瘍切片のオートラジオグラムと HE 染色像を比較したところ、壊死していなくても ^{18}F FDG が低集積である領域が広く観察された。 ^{18}F FMISO-PET では、照射側腫瘍の中心部に ^{18}F FMISO 低集積の領域が、周辺部に高集積の領域が認められた。中心部の ^{18}F FMISO 低集積領域の集積量は、非照射側腫瘍と比較して有意に低かった。また、ARG においても照射側の腫瘍内で PET と同様の集積分布が確認された。このように ^{18}F FMISO が中心部で低集積となる理由を検討するため、腫瘍切片の血管内皮細胞を免疫染色したところ、 ^{18}F FMISO 低集積領域では血管が占める面積が多い傾向にあった。

これらの結果から、PIT は壊死が認められない光照射後早期に腫瘍内の糖代謝を低下、血流を増加させることで腫瘍中心部の低酸素状態を解消させることが示された。

第3章では、外部からの光が届きにくい深部の腫瘍を PIT で治療するために、ワイヤレス給電技術によって体外から体内の LED カプセルに電力供給する体内埋め込み型光デバイスを開発した。電磁誘導を利用したワイヤレス給電にしたことにより、留置する LED カプセル内の電源部分を小型に設計できる上、電池を用いた場合に生じる電解液漏出などの危険性を避けることができる。さらに、PIT では照射量が大きいほど効果が増強することや繰り返し治療が有効であることを踏まえると、本光デバイスを使用すれば連続的な光照射によって大きな照射量が得られる上に繰り返しの光照射も容易にできるため、PIT との組み合わせによって高い治療効果が見込まれる。LED カプセルに対して外部給電装置から給電した結果、200 mm の給電距離でも十分な照度が得られた (2.8 mW/cm^2)。成人の腹部体厚の平均が 200 mm 以下であることを考慮すると、本装置は移植場所に関わらず外部給電装置から電力を供給できる能力を有すると考えられる。次に、本装置を用いて PIT でがんの治療効果が得られるかを検証した。担癌マウスに抗体-IR700 を投与後、LED カプセルを腫瘍近傍に植えた。ケージは外部給電装置の上部に設置し、LED カプセルを留置してから 6 日間、マウスの腫瘍を継続的に光照射した。この結果、LED カプセルを植えて PIT を行った腫瘍の増殖は有意に抑制され、さらに day 3 以降は腫瘍が徐々に縮小した。さらに、HE 染色では著しい壊死が観察された。以上、開発したワイヤレス LED 装置を用いた PIT で治療効果が得られることが確認され、外部からの光照射が困難な深部の腫瘍への適用の可能性が示された。

以上、本研究成果は、治療メカニズムに基づいた新規 PIT 薬剤の開発や、光が届きにくい深部の腫瘍への PIT の適用拡大などに貢献し、がん光免疫療法のさらなる発展に資するものである。