HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	胆膵領域癌に対する近赤外線照射光免疫治療の基礎的研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	平田, 甫
Description	配架番号：2671
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14975号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85851
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	HIRATA_Hajime_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　平田　甫

学 位 論 文 題 名

胆膵領域癌に対する近赤外線照射光免疫治療の基礎的研究

(Basic study on near infrared photoimmunotherapy for biliary and pancreatic cancer)

【背景と目的】近赤外線光免疫治療 (NIR-PIT) は、癌と結合した分子標的モノクローナル抗体と光感受性薬剤 (IR700) の複合体に近赤外線を照射することで、癌細胞を選択的に破壊する治療法である。実臨床では、2018 年の頭頸部癌に対する第 2 相試験においてその有用性が報告され、現在は局所再発頭頸部癌に対する第 3 相試験が進行している。 また 2020 年 11 月には本邦における薬事申請が承認され、保険収載されたことから今後さまざまな癌に対する新規治療法として期待される。

膵臓癌および胆管癌は、消化器癌の中では日本において 1、2 番目に予後不良な癌種とされるが、いずれも根治的治療は外科的切除であり、進行癌には化学療法などを行うことが一般的でいずれも分子標的治療の恩恵を得られていない。一方、NIR-PIT は、標的となる分子が発現している癌細胞であれば治療が可能であると考えられている。一部の胆管癌では EGFR (Epidermal growth factor receptor) や HER2 (Human epidermal growth factor receptor type 2) を発現することが報告されていることから、胆管癌に対する EGFR や HER2 を標的とした NIR-PIT の有効性の検証を第一の目的とした。次に、組み換えレクチンである rBC2LCN (recombinant N-terminal BC2L-C Lectin) は、ヒト由来膵癌細胞表面の糖タンパク質との特異的な結合性が確認されており、IR700 との複合体精製により NIR-PIT で薬剤として利用可能であると考えられることから、rBC2LCN-IR700 の膵癌細胞に対する NIR-PIT の治療効果の検証を行うことを第二の目的とした。さらに、胆道領域に留置可能で安定的な留置と近赤外線照射が可能なデバイスの開発を行い同デバイスが実際に in vivo における NIR-PIT で治療効果が得られるか検証することを第三の目的とした。

【対象と方法】ヒト胆管癌細胞である HuCCT-1, YSCCC、TFK-1、KMCH-1 とヒト膵癌細胞である Capan-1、Panc04.03、CFPAC-1、MIAPaCa-2 を本研究で使用した。胆管癌細胞についてはまず蛍光顕微鏡とフローサイトメトリーを使用して EGFR 及び HER2 の発現についての確認と定量を行った。その後、発現がみられた細胞での NIR-PIT の治療効果を確認するため、蛍光顕微鏡下では LIVE/DEAD 染色の蛍光観察を行い、フローサイトメトリーでは PI (Propidium iodide) 染色で死細胞を計測した。膵癌細胞については同様に蛍光顕微鏡とフローサイトメトリーを使用し rBC2LCN-IR700 の膵癌細胞への結合性について確認を行い、その後 *in vitro* での同薬を使用した NIR-PIT を行いその治療効果について検討を行った。

次に実際に新規開発した LED カテーテルを使用して NIR-PIT が可能か検討を行った。まず dish 内で培養した胆管癌細胞に対して培地内でカテーテルでの光照射を行い治療効果が得られるか確認を行った。つづいて *in vivo* の検討では、胆管癌細胞を皮下に播種したマウスに対して抗体-IR700 を投与後に LED カテーテルを使用して NIR-PIT を行った。光照射はカテーテル挿入後 1 時間行い、治療前後での IR700 の蛍光観察を行った。治療後は 2 週間マウスの腫瘍と体重について計測を行った。また膵癌細胞を播種したマウスについては外照射での NIR-PIT の治療効果の検討を行った。rBC2LCN-IR700 を投与後に外照射での近赤外線照射を行い、治療後 2 週間程度マウスの腫瘍と体

重について計測を行った。胆管癌、膵癌の *in vivo* での NIR-PIT 後には、いずれも病理組織学的に治療効果の評価を行った。

【結果】*In vitro* の検討では胆管癌細胞株 HuCCT-1 と YSCCC で EGFR の発現が、KMCH-1 で HER2 の発現が確認された。TFK-1 ではいずれの発現も認めなかった。ターゲットとなる抗原が確認された細胞で NIR-PIT を行ったところ、蛍光顕微鏡下及びフローサイトメトリーで治療効果が確認された。膵癌細胞株 Capan-1、Panc04.03 では rBC2LCN-IR700 との結合が認められており、これらの細胞において蛍光顕微鏡及びフローサイトメトリーで NIR-PIT の治療効果を認めた。治療効果が得られた細胞は光照射量を増やすことでフローサイトメトリーの計測において死細胞が増えることが確認された。

次に LED カテーテルを使用した検討では dish 内の胆管癌細胞に対して、抗体-IR700 添加後に培地内でカテーテルによる近赤外線照射を行ったところ、蛍光顕微鏡下の LIVE/DEAD 染色で細胞死を確認し、治療効果が得られる事を確認した。胆管癌に対する *in vivo* の検討では抗体-IR700 添加後に LED カテーテルでの光照射を行った群では非治療コントロール群と比較し腫瘍の増殖が有意に抑制され、薬剤添加後に外照射を行った群と同様の治療効果が得られることが確認された。治療期間内にマウスに対する LED カテーテルによる侵襲はほぼ認めなかった。膵癌での検討では、外照射群で腫瘍の増殖が有意に抑制された。また、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色による病理組織学的検討では、NIR-PIT 治療群で胆管癌、膵癌共に腫瘍の壊死が確認された。

【考察】本研究では，EGFR または HER2 を標的とした NIR-PIT が胆管癌細胞株に、rBC2LCN を使用した NIR-PIT が膵癌細胞株に有効であることを示し，標的の発現レベルや結合の度合いと細胞死の割合に関係があることを確認した。効果的な NIR-PIT を実現するためには、がん細胞の膜上のターゲットと特異的な抗体や小分子が必要である。現在、胆管癌の約 40%に治療標的となりうる遺伝子変化があることが報告されており，NIR-PIT は胆管癌に対して優れた治療法になると考えられる。また膵癌に対して rBC2LCN を用いて NIR-PIT を行ったが、抗体 IR700 複合体に結合する癌表面抗原は 1 対 1 で対応しているのに対してレクチン IR700 複合体が結合する部位は様々な糖タンパク質に対応しているため細胞表面に同複合体を多数結合することで有効な NIR-PIT が可能となることが期待される。さらに、既存の抗体薬と比較して、レクチンは細菌系で作製できることから医療コストの面で優れていると考えられる。

さらに本研究では、新開発 LED カテーテルを用いて、侵襲性の少ない近赤外光を腫瘍に連続的に照射し、マウスの胆管癌腫瘍を治療した。そして、このカテーテルによる NIR-PIT は、従来の外部からの近赤外線レーザー照射と同等の効果があることも示された。今回使用したカテーテルは、内視鏡的逆行性胆管造影法または経皮経肝的ルートで胆管に挿入できるように設計されている。このカテーテルを胆管に挿入することで、肝外・肝内胆管癌や膵頭部癌に対する NIR-PIT が臨床現場で可能になると考えられる。さらに、このカテーテルを内視鏡的経鼻胆管ドレナージチューブと同様の方法を用いて使用することで、必要な治療期間中、腫瘍に継続的に近赤外線を照射することができる。現行の NIR-PIT 治療よりも胆膵領域での使用に有用であると考えられる。

NIR-PIT でより良い結果を得るためには、適切な抗体などの担体の選択、個々の腫瘍に応じたデバイスの選択とその安全性と耐久性を考慮する必要がある。

【結論】EGFR または HER2 を発現している胆管癌細胞および rBC2LCN との結合を示す膵癌細胞に対して、NIR-PIT が有効であること、そして LED を搭載した新開発カテーテルが胆管癌に対する NIR-PIT に有用であることが示された。