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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14975
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89018
Type	doctoral thesis
File Information	HIRATA_Hajime.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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)

2022 年　3 月

北海道大学

平田　甫

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)

2022 年　3 月

北海道大学

平田　甫

目　　次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・1 頁

要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・2 頁

略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・5 頁

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・6 頁

方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・9 頁

結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・17 頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・35 頁

結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・39 頁

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・40 頁

利益相反・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・41 頁

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・42 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Hajime Hirata, Masaki Kuwatani, Kohei Nakajima, Yuki Kodama, Yasuo Yoshikawa, Mikako Ogawa, Naoya Sakamoto. Near-infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT) on cholangiocarcinoma using a novel catheter device with light emitting diodes. Cancer Science. 2021;112:828-838

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Hajime Hirata, Masaki Kuwatani, Kohei Nakajima, Mikako Ogawa, Naoya Sakamoto. Photoimmunotherapy for cholangiocarcinoma using the novel catheter device with light emitting diodes in vivo
新規 LED カテーテルを使用した胆管癌に対する光免疫治療効果の検証
第 79 回日本癌学会総会 2019 年 10 月 1 日～3 日・広島

2. Hajime Hirata, Masaki Kuwatani, Kohei Nakajima, Mikako Ogawa, Naoya Sakamoto. Verification of the effect of near infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT) on cholangiocarcinoma and availability of the novel catheter device with light emitting diodes (LEDs) in vivo

UEGW 2020 年 10 月 10 日～14 日

要旨

【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。

略語表

本文中及び図中で使用した略語は以下の通りである。

Alexa488: Alexa Fluor 488
BSA: bovine serum albumin
CCA: cholangiocarcinoma
EGFR: Epidermal growth factor receptor
FBS: fetal bovine serum
HER2: Human epidermal growth factor receptor type 2
IR700: IRDye 700DX
IV: intravenous injection
LDC: lectin drug conjugate
LEDs: light emitting diodes
NIR-PIT: Near-infrared photoimmunotherapy
Pan-Alexa488: Panitumumab-Alexa488
Pan-IR700: Panitumumab-IR700
PBS: phosphate buffered saline
PDAC: pancreatic ductal adenocarcinoma
PDT: Photodynamic therapy
PI: propidium iodide
rBC2LCN: recombinant N-terminal BC2L-C Lectin
RPMI-1640: RPMI-1640 with L-glutamine and sodium bicarbonate liquid
Tra-Alexa488: Trastuzumab-Alexa488
Tra-IR700: Trastuzumab-IR700

緒言

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) による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 (Mitsunaga et al. , 2011 ; Kobayashi et al. , 2019) 。NIR-PIT には、局所に対する治療効果以外にも光照射を受けていない腫瘍に対しても免疫学的細胞死を誘導し遠隔転移に対する治療効果も期待されている (Ogawa et al. , 2017) 。基礎的研究では、肺癌、乳癌、膀胱癌、胃癌などの様々な標的抗原を発現する癌種において治療効果が示されている (Sato et al. , 2015 ; Jin et al. , 2018 ; Nagaya et al. , 2018 ; Nagaya et al. , 2018) 。

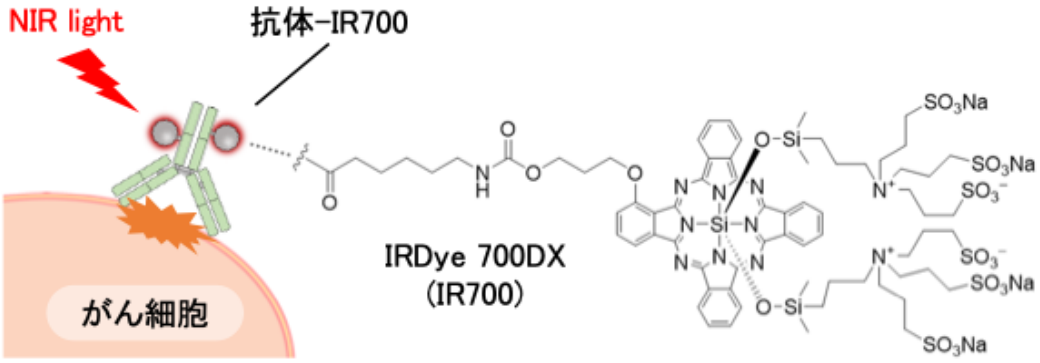

図 1 NIR-PIT

光免疫療法 (NIR-PIT) はがん細胞膜表面の抗原に結合する抗体に光感受性色素である IR700 を結合させた IR700 抗体複合体を使用し、同複合体ががん細胞膜に結合した所に近赤外線照射を行うことでがん細胞に対して特異的に障害を与える。

頭頸部癌に対する臨床試験においては、2018 年の第 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扁平上皮癌に対する第 3 相試験が進行している。 2020 年 11 月には本邦における薬事申請が承認されたため今後さらなる臨床試験の加速が推測される。光免疫治療は高い抗腫瘍効果を有しながらも正常細胞への影響は極めて少ないと考えられ、今後癌に対する手術、放射線治療、化学療法とは異なる新規治療法として期待されている。

胆管癌は消化器癌の中では日本において 5 %程度と比較的稀な疾患である。但しその 5 年生存率は 20-30 %程度と膵臓癌に次いで予後不良な癌種とされている。胆管癌の根治的治療は手術や肝移植であり、進行癌にはゲムシタビンとシスプラチン

を使用した緩和的化学療法を行うことが一般的である (Valle et al. , 2010) 。基礎的検討では胆管癌細胞には EGFR や HER2 などの治療標的可能であるターゲット分子が発現していることが確認されている (Pellat et al. , 2018) 。EGFR が肝内胆管癌で 11-27 %、肝外胆管癌で 5-19 %発現しており、HER2 が肝外胆管癌や胆嚢癌で 10-15 %発現していることが報告されている (Jain et al. , 2016; Chong et al. , 2016) 。これらの基礎的報告において胆管癌の分子標的治療の可能性を示唆しているが実際の臨床試験では既存のゲムシタビンとシスプラチンの併用療法に比較して EGFR や HER2 に対する分子標的治療は優位性が得られないことが示されている (Lee et al. , 2012 ; Ramanathan et al. , 2009) 。NIR-PIT は抗体 IR700 複合体と近赤外線照射を組み合わせた新規治療法で、上記のようにターゲットが発現している癌細胞であれば治療が可能であることから、既報において比較的 EGFR や HER2 の発現が認められている胆管癌に対しても抗体-IR700 複合体を用いた NIR-PIT が可能であると考えられる。

一方で膵臓癌は極めて予後不良な代表的疾患であり、本邦の直近の調査においても 5 年生存率が約 10 %未満と全癌で最低の数値を示し、米国での調査でも罹患率及び死亡率ともに高値で推移している (Rahib et al. , 2014) 。膵臓癌に対する治療として外科手術、抗癌剤治療、放射線照射などの集学的治療が行われているが (Kamisawa et al. , 2016) 、他の癌種と比較してその奏功は低い。近年、新規抗体薬の発見や、免疫チェックポイント阻害剤を使用した新規治療法の進展がみられ、それらは様々な癌腫での予後延長に大きく寄与している。しかし膵臓癌についてはいまだその恩恵が得られているとは言い難く、新規治療法の開発とその臨床への導入が強く望まれている。膵臓癌細胞の外層は細胞特異性が高い糖鎖層で構成されており、レクチンはその糖鎖を認識して結合することが可能なタンパク質として知られている (Miyoshi et al. , 2008) 。組み換えレクチンである rBC2LCN は、フコシル化されたヒト血液型エピトープ H 型 1、H 型 3、Globo-H (H 型 4) に特異性を持つ新規レクチンであり、グラム陰性菌 *Burkholderia cenocepacia* から同定された TNF 様レクチン分子であることが知られている (Sulak et al. , 2010) 。また、ヒト由来膵癌細胞との特異的な結合性が確認されており、LDC (Lectin Drug Conjugate) 製剤として膵癌に対し *in vivo* でその有用性が報告されている (Shimomura et al. , 2018; Fruta et al. , 2021) 。以上から、IR700 との複合体を作製することより、膵癌に対する NIR-PIT で薬剤としての利用が可能であると考えられる。

現行の臨床試験において NIR-PIT に用いられる光照射デバイスはファイバーの前面から光が出る表面照射用のフロンタルデフューザーによる外照射を行うか、レーザー光を棒状に照射可能なシンドリカルデフューザーを皮膚から腫瘍にニードルカテーテルを介し穿刺留置して照射を行うがこれらは光線力学療法でも使用されてい

る　(Kim et al. , 2020; Tahara et al. , 2021) 。また前臨床の報告では内視鏡や膀胱鏡を用いて消化管腫瘍や膀胱腫瘍に対して照射する方法も進められている (Nagaya et al. , 2018; Lee et al. , 2013) 。しかし、上述のデフューザーを使用して胆管や膵臓などの後腹膜臓器を照射するにはリスクや侵襲が大きく、繰り返し照射することも難しい。光ファイバーディフューザーを使用した場合には、胆管などの屈曲した管腔構造を持つ深部への挿入時に捩れてしてしまう危険性もある。そこで、LED を搭載可能なフレキシブルプリント基板を用いたカテーテルであれば、柔軟性があり捩れが生じないため、内視鏡とガイドワイヤーを使用して安全に胆管内に挿入し腫瘍に対して光照射することができると考えられる。胆膵領域で NIR-PIT を施行するためには安全に長期留置できる、新しい光照射デバイスの開発が求められる。

本研究においては、EGFR や HER2 抗体と-IR700 複合体を用いた胆管癌に対する NIR-PIT の有用性の検証、rBC2LCN と IR700 の複合体である rBC2LCN-IR700 複合体を用いた膵癌細胞に対する NIR-PIT の有用性の検証、さらに膵胆道癌で使用可能な NIR-PIT 治療用デバイスの開発を目的とした。

実験方法

【抗体 IR700 複合体、レクチン IR700 複合体の作成】

EGFR に対するヒト IgG2 モノクローナル抗体であるパニツムマブ (Vectibix) (武田薬品株式会社) 及び、HER2 に対する 95 %ヒト IgG1 抗体であるトラスツヅマブ (Herceptin) (中外製薬株式会社) をそれぞれ購入し使用した。光感受性薬剤として水溶性シリコンフロシタニン誘導体である IRDye 700DX NHS ester (Li-COR Bioscience 社) を購入し使用した。パニツムマブ及びトラスツズマブ (1 mg, 6.8 nmol) と IR700 (66.8 μg, 34.2 nmol) を 0.1 M Na2HPO4 (pH 8.5) 下で室温 3 時間のインキューベートを行った。これらの混合物から Sephadex G50 column (PD-10; GE Healthcare 社) を使用しパニツムマブ-IR700 (Pan-IR700) 複合体, トラスツズマブ-IR700 (Tra-IR700) 複合体を精製した。複合体の濃度測定は Modified Lowry Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific 社) を使用しマイクロプレートリーダー (Infinite M200; Tecan Austria GmbH 社) で 750 nm の吸光度を測定することで行った。

rBC2LCN は富士フィルム和光純薬株式会社より購入し使用した。rBC2LCN-IR700 の作製については rBC2LCN (200 μg, 12.5 nmol) と IR700 (48.9 μg, 25 nmol) を 0.1 M Na2HPO4 (pH 8.5) 下で室温 3 時間のインキュベートを行った。その後 Amicon Ultra (10 K; Merck 社) と遠心機 (Himac CR-N; Eppendorf Himac Technologies 社) を使用し精製した。複合体の濃度の測定は分光高度計 (UV-1800; 島津製作所) を使用し BSA アルブミンスタンダードと rBC2LCN の 280 nm の吸光度を測定し比較することで行った。IR700 の濃度については分光高度計を使用し 689 nm の吸光度を測定しそれぞれの抗体における蛍光分子の数を確認した。抗体への IR700 の結合が約 3 個、rBC2LCN への IR700 の結合が約 1 個程度となるよう調整した。

【胆管癌細胞に対する抗体 IR700 複合体の結合の確認】

細胞株はヒト胆管癌細胞株: HuCCT-1, YSCCC, TFK-1 を RIKEN Bio Resource Research Center Cell Bank から取得し、KMCH-1 を久留米大学医学部病理学講座 矢野博久先生より供与を受けた。各種細胞株は RPMI1640 (Sigma-Aldrich 社) +5 % Fetal bovine serum (Sigma-Aldrich 社) +1 % penicillin/streptomycin を用いて 37°C、95% air +5% CO_2 下で継代培養を行った。

・蛍光顕微鏡での観察

HuCCT-1、YSCCC、TFK-1、KMCH-1 をそれぞれ 35 mm dish の上に播種し 24 時間 37 ℃でインキュベートを行った。その後 Pan-IR700 もしくは Tra-IR700 を 5 μg/mL となるように添加し再度 1 時間 37 ℃でインキュベートを行った。Phosphate buffered saline (PBS) で dish を洗浄し蛍光顕微鏡 (CKX41; Olympus 社) で観察を行

った。蛍光観察は IR700 に対して励起フィルターを 673-748 nm とし蛍光フィルターを 765-855 nm とした。画像の解析は ImageJ 1.5 software (http://rsb.info. nih.gov/ij/) を使用し行った。

・フローサイトメトリー

HuCCT-1、YSCCC、TFK-1、KMCH-1 のそれぞれの細胞の EGFR 及び HER2 の発現を調べるためにフローサイトメトリーでの解析を行った。それぞれの細胞の 35 mm dish の播種し 37 ℃ で 24 時間インキュベートを行った。Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific 社) を標識したパニツムマブ (Pan-Alexa488)、及びトラスツズマブ (Tra-Alexa488) をそれぞれ用意し dish 培地内に 10 μg/mL となるよう添加し 37 ℃で 6 時間インキュベートを行った。PBS で洗浄した後に細胞を取り出しフローサイトメトリー (Gallios; Beckman Coulter 社) で蛍光強度の測定を行った。抗体複合体の特異的な結合を評価するために、過剰量の抗体単体 (100 μg/mL) を添加し複合体の細胞への結合をブロックした。データについては Kaluza Analysis 2.1 software (Beckman Coulter 社) を用いて解析を行った。

【膵癌細胞に対する rBC2LCN-IR700 複合体の結合の確認】

細胞株はヒト膵癌細胞株: Capan-1、Panc04.03、CFPAC-1 を American Type Culture Collection (ATCC) より購入し MIAPaCa-2 を RIKEN Bio Resource Research Center Cell Bank から取得した。各種細胞株は RPMI1640 + 5 % FBS+ 1 % penicillin/streptomycin を用いて 37 ℃、95 % air +5 % CO_2 下で継代培養を行った。

・蛍光顕微鏡での観察

Capan-1、Panc04.03、CFPAC-1、 MIAPaCa-2 をそれぞれ 35 mm dish の上に播種し 24 時間 37 ℃でインキュベートを行った。その後 rBC2LCN-IR700 を 1 μg/mL となるように添加し再度 1 時間 37 ℃でインキュベートを行った。PBS で dish を洗浄し蛍光顕微鏡で観察を行った。蛍光観察は IR700 に対して励起フィルターを 673-748 nm とし蛍光フィルターを 765-855 nm とした。画像の解析は ImageJ 1.5 software を使用し行った。

・フローサイトメトリー

Capan-1、Panc04.03、CFPAC-1、MiaPACA-2 の細胞の 35 mm dish の播種し 37 ℃ で 24 時間インキュベートを行った。Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific 社) を標識した rBC2LCN (rBC2LCN-Alexa488) を用意し dish 培地内に 1 μg/mL となるよう添加し 37 ℃で 3 時間インキュベートを行った。PBS で洗浄した後に細胞を取り出しフローサイトメトリー で蛍光強度の測定を行った。データについては Kaluza Analysis 2.1 software を用いて解析を行った。

【胆管癌細胞に対する *in vitro* での NIR-PIT】

・蛍光顕微鏡での観察

Calcein AM/Ethidium homodimer-1 (EthD-1) (Thermo Fisher Scientific 社) を使用し生細胞と死細胞の判別を行った (LIVE/DEAD staining) 。HuCCT-1、YSCCC、TFK-1、KMCH-1 のそれぞれの細胞を 35 mm dish に播種し 37 ℃で 24 時間インキュベートを行った。その後 Pan-IR700 もしくは Tra-IR700 を 5 μg/mL となるように添加し再度 1 時間 37 ℃でインキュベートを行った。Calcein AM/EthD-1 を添加後にそれぞれの細胞に LED (50 mW/cm^2)で 60 秒間 (3 J/cm^2)照射を行い、光照射後直後から蛍光顕微鏡での観察を行った。

蛍光観察は Calcein に対して励起フィルターを 460-490 nm とし蛍光フィルターを 765-855 nm とした。また、EthD-1 に対して励起フィルターを 480-550 nm とし蛍光フィルターを 590 nm とした。

・フローサイトメトリー

それぞれのヒト胆管癌細胞 5.0×10^6 細胞を 35 mm dish 上に播種し 24 時間 37 ℃でインキュベートを行った。HuCCT-1 と YSCCC の培地には Pan-IR700 を 10 μg/mL となるよう添加し、TFK-1 と KMCH-1 の培地には Tra-IR700 を 10 μg/mL となるよう添加した。37 ℃, 6 時間でインキュベートを行い、LED による近赤外線を 1, 2, 5, 10, 30 J/cm^2 でそれぞれ照射した。1 時間後に細胞を取り出し PBS で懸濁後に Propidium iodide (Life Technologies 社) を死細胞検出目的で添加した。30 分間室温でインキュベートした後に Propidium iodide で染色した細胞をフローサイトメトリーで検出を行った。データについては Kaluza Analysis 2.1 software を用いて解析を行った。

【膵癌細胞に対する *in vitro* での NIR-PIT】

・蛍光顕微鏡での観察

Capan-1、Panc04.03、CFPAC-1、MiaPACA-2 のそれぞれの細胞を 35 mm dish に播種し 37 ℃で 24 時間インキュベートを行った。その後 rBC2LCN-IR700 を 1 μg/mL となるように添加し再度 1 時間 37 ℃でインキュベートを行った。Calcein AM/EthD-1 を添加後にそれぞれの細胞に LED (50 mW/cm^2)で 60 秒間 (3 J/cm^2)照射を行い、光照射後直後から蛍光顕微鏡での観察を行った。

蛍光観察は Calcein に対して励起フィルターを 460-490 nm とし蛍光フィルターを 765-855 nm とした。また、EthD-1 に対して励起フィルターを 480-550 nm とし蛍光フィルターを 590 nm とした。

・フローサイトメトリー

それぞれのヒト膵癌細胞 5.0×10^6 細胞を 35 mm dish 上に播種し 24 時間 37 ℃でインキュベートを行った。その後培地に rBC2LCN-IR700 を 1 μg/mL となるよう添加

した。37 ℃、3 時間でインキュベートを行い、LED による近赤外線を 1, 2, 5, 10, 20 J/cm^2 でそれぞれ照射した。1 時間後に細胞を取り出し PBS で懸濁後に Propidium iodide を死細胞検出目的で添加した。30 分間室温でインキュベートした後に Propidium iodide で染色した細胞をフローサイトメトリーで検出を行った。データについては Kaluza Analysis 2.1 software を用いて解析を行った。

【新開発 LED カテーテルを使用した *in vitro* 及び *in vivo* での胆管癌に対する NIR-PIT の治療効果の検討】

今回 LED 挿入用とガイドワイヤーなどのデバイスアクセス用の 2 つのルーメンを持つ NIR-LED カテーテルを新たに開発した（図 2）。ポリウレタン製のカテーテルの外径は 2.2 mm とした。長さ 20.0 mm の FPC（フレキシブルプリント回路）上に，波長 680～700 nm の LED（SMT690D；ウシオ電機セミコンダクターズ社）を 3 mm 間隔で配置した。電力密度は，光パワーメーター（PM121D：Thorlabs 社，20 mW/cm2）で測定した。FPC には 2 種類の K 熱電対を取り付け，1 つは LED の直下に設置してその温度を測定し，もう 1 つは FPC の遠位端に設置してカテーテルの外側の温度を測定した。LED の温度は制御装置でモニターを行い温度が設定温度の 50 ℃を超えると、LED が自動的に停止するよう調整した。

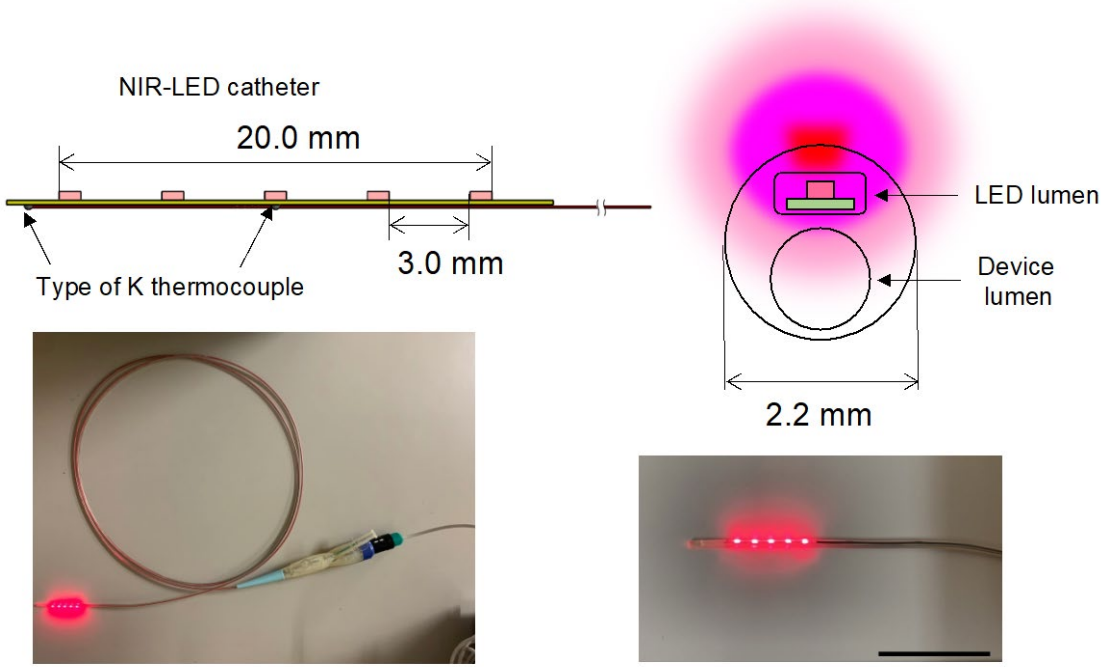

図 2 NIR-LED カテーテル

LED とフレキシブルプリント回路の模式図。カテーテルには 1.6 mm の LED チップが 5 個取り付けられている（左上）。LED ルーメンとデバイスルーメンを持つカテーテルの断面図。カテーテルは、LED の内腔の上側から近赤外光を発生させることができる（右上）。有線の NIR-LED カテーテルの概要（左下）。カテーテルの正面（右下）。Scale bar: 30 mm

次に HuCCT-1 と KMCH-1 を 60 mm dish に播種し 37 ℃で 24 時間インキュベートを行った。HuCCT-1 には Pan-IR700 を、KMCH-1 には Tra-IR700 をそれぞれ 5 μg/mL で添加を行い 1 時間 37 ℃でインキュベートを行った。Calcein AM/EthD-1 を添加後に LED カテーテルを使用し 500 秒間 (10 J/cm^2) 照射を行った。光照射 1 時間後に蛍光顕微鏡で観察を行った。LED カテーテルの先端を培地内に浸した上で、持続して光照射を行い治療ができることを確認した。

今回この LED カテーテルを使用したマウスに対する実験は，「北海道大学動物実験に関する規程」に従って行った。実験用マウスは BALB/c Slc-nu/nu ヌードマウス (6 週齢雌) を使用し，日本エスエルシー社より購入した。治療などの実験中には、マウスに対してイソフルランでの吸入麻酔を行った。

100 μL の PBS に懸濁した 400 万個の HuCCT-1 細胞を右背側に皮下注射した。腫瘍細胞の注入後、腫瘍の体積が 150 mm^3 に達した時点で治療を開始した。腫瘍体積の測定には，腫瘍の縦方向の最大径と横方向の最大径をノギスで測定した。腫瘍の

体積は、腫瘍体積 (mm^3) = (長径 (mm) ×短径 $(mm)^2$) /2 で計算し記録した (Lai et al. , 1992) 。治療後のマウスの皮膚の損傷を注意深く観察した。

右背部に HuCCT-1 腫瘍を有する 32 匹のマウスを以下の 8 グループに無作為に分別し、NIR-LED カテーテル装置を用いた NIR-PIT の効果について検討を行った。

(Group 1)　0 日目に Pan-IR700 100 μg を静脈注射し、1 日目に LED カテーテルを腫瘍下に挿入して 1 時間 (72 J/cm2) 近赤外線光を照射した。
(Group 2)　0 日目に Pan-IR700 100 μg を静脈注射し、1 日目に LED カテーテルを腫瘍下に挿入 (近赤外線光を照射しない) 。
(Group 3)　0 日目に Pan-IR700 100 μg を静脈注射 (LED カテーテルなし) で投与。
(Group 4)　0 日目に静脈注射なし、1 日目に腫瘍下に LED カテーテルを挿入し、1 時間 (72 J/cm2) 近赤外線光を照射した。
(Group 5)　0 日目に静脈注射なし、1 日目に腫瘍下に LED カテーテルを挿入 (近赤外線光を照射しない) 。
(Group 6)　0 日目に Pan-IR700 100 μg を静脈内注射し、外部からの近赤外線レーザー光 (MLL-III-690-800 mW; Changchun New Industries Optoelectronics Tech 社）で 288 秒間 (250 mW/cm2、72 J/cm2) 照射した。
(Group 7)　0 日目に Tra-IR700 100 μg を静脈注射し、腫瘍の下に NIR-LEDs カテーテルを挿入して 1 日目に 1 時間 (72 J/cm2) 近赤外線光を照射、
(Group 8)　無治療（LED カテーテル挿入及び静脈注射なし）。

治療後、週に 3 回、2 週間にわたって個々のマウスの腫瘍体積と体重を測定した。FluorVivo Imaging System (Indec BioSystem 社) を用いて，32 匹のマウスの IR700 蛍光画像を 1 日目 (近赤外光照射前と照射直後) と 2 日目に実施した (励起：600-640 nm，蛍光：665 nm) 。蛍光画像解析は ImageJ 1.5 software を用いて行った。

図 3 腫瘍移植マウスに対する LED カテーテルを用いた光照射治療

カテーテルをマウスの皮下に挿入し播種した胆管癌腫瘍に対して LED での近赤外線照射を行った。

【*In vivo* での膵癌に対する NIR-PIT の治療効果の検討】

100 μL の PBS に懸濁した 300 万個の Panc04.03 細胞を右側の背側に皮下注射した。腫瘍細胞の注入後、腫瘍の体積が 100 mm^3 に達した時点で治療を開始した。腫瘍体積の測定には，腫瘍の縦方向の最大径と横方向の最大径をノギスで測定した。腫瘍の体積は、腫瘍体積 (mm^3) = (長径 (mm) ×短径 $(mm)^2$) /2 で計算し記録した (Lai et al. , 1992) 。

右背部に Panc04.03 腫瘍を有する 12 匹のマウスを以下の 4 グループに無作為に分別し、レーザー外照射 (MLL-III-690-800 mW; Changchun New Industries Optoelectronics Tech 社) による NIR-PIT の効果について検討を行った。

(Group 1) 0 日目に rBC2LCN-IR700 20 μg を静脈注射し、6 時間後に外部よりレーザー装置を用いて 400 秒間 (100 J/cm^2) 近赤外線光を照射した。
(Group 2) 0 日目に外部よりレーザー装置を用いて 400 秒間 (100 J/cm^2) 近赤外線光を照射した。
(Group 3) 0 日目に rBC2LCN -IR700 20 μg を静脈注射で投与した。
(Group 4) 無治療（近赤外線照射及び静脈注射なし）。

【病理組織学的解析】

新開発 LED カテーテルを用いた胆管癌に対する NIR-PIT 治療後の腫瘍及び膵癌に対する NIR-PIT 治療後の腫瘍における病理組織学的変化の評価を行った。胆管癌ではグループ 1 のマウス 1 匹 [NIR (+) Pan-IR700 (+) LED カテーテル (+)] とグループ 8 のマウス 1 匹 [NIR (−) Pan-IR700 (−) LED カテーテル (−)] を 7 日目に、膵癌で

はループ 1 のマウス 1 匹 [NIR (+) rBC2LCN-IR700 (+)] とグループ 4 のマウス 1 匹 [NIR (−) rBC2LCN-IR700 (−)] を 3 日目に安楽死させた。摘出した腫瘍は、O.C.T. コンパウンド (サクラファインテックジャパン社) で凍結した。凍結したスライス切片 (厚さ 10μm) を作成し，ヘマトキシリン・エオジンで染色した。スライドは、4×および 20×の対物レンズを用いて BX41 顕微鏡 (オリンパス社) で撮像を行った。

また rBC2LCN-IR700 の腫瘍内への取り込みを確認するため rBC2LCN-IR700 20 μg をマウスに静脈投与し 6 時間後に腫瘍を摘出し、薬剤投与を行っていないマウスの腫瘍と併せて凍結切片を作成した。スライドは BX41 顕微鏡で IR700 の蛍光観察を行い蛍光観察は IR700 に対して励起フィルターを 673-748 nm とし蛍光フィルターを 765-855 nm とした。

【統計解析】

測定された値は、平均値 ± SEM (平均値の標準誤差) で示した。統計解析は，JMP Pro 16.1.0 ソフトウェア (SAS Institute 社) を用いて行った。多重比較については，One-way ANOVA および Dunnett's 検定を用いた。P 値 ＜ 0.05 を有意差とした。

実験結果

【胆管癌細胞の EGFR 及び HER2 の発現の確認】

蛍光顕微鏡での観察では HuCCT-1 と YSCCC で Pan-IR700 添加後に IR700 の蛍光を確認することができこれらの細胞株の細胞表面に EGFR を発現していることが示された。また、KMCH-1 では Tra-IR700 添加後に IR700 の蛍光を確認でき、細胞表面に HER2 を発現していることが示された。これらの結果から Pan-IR700 は HuCCT-1 と YSCCC 細胞の EGFR と結合し、Tra-IR700 は KMCH-1 細胞の HER2 と結合する事が確認された。

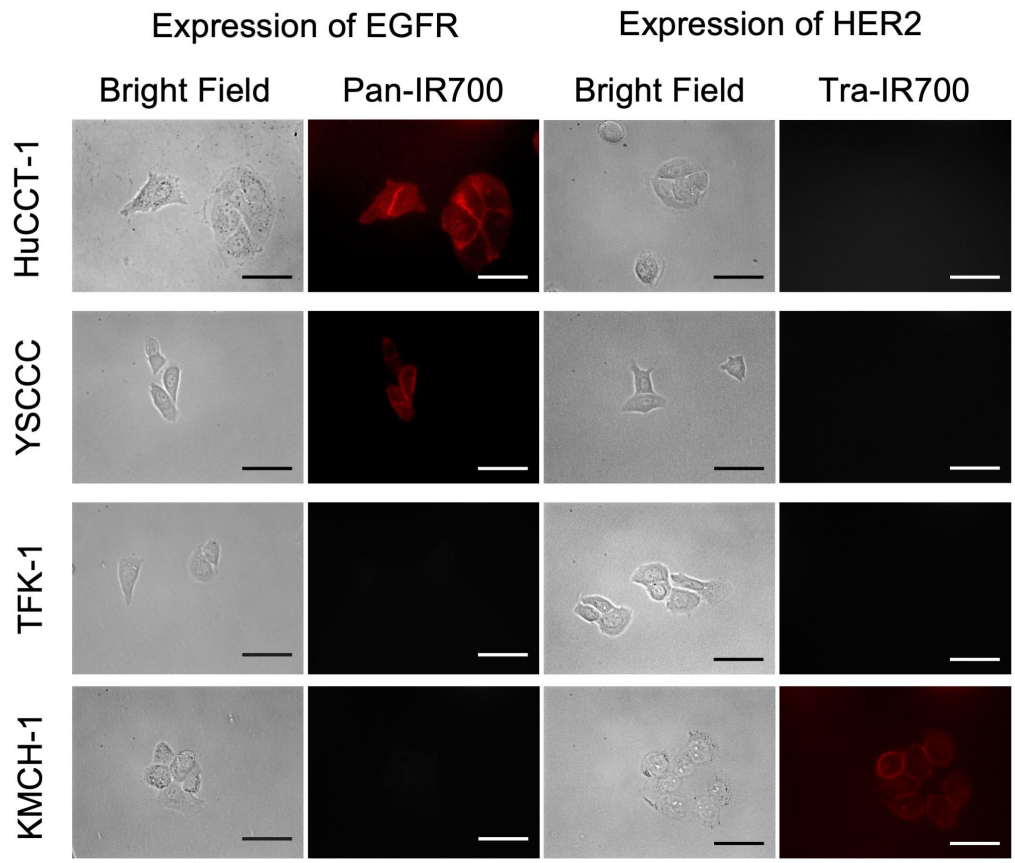

図 4 HuCCT-1、YSCCC、TFK-1、KMCH-1 細胞の蛍光顕微鏡観察

4 種類の細胞は Pan-IR700、Tra-IR700 を添加後 PBS で洗浄して IR700 の蛍光の観察を行った。Scale bar: 50 μm

フローサイトメトリーでは EGFR または HER2 の発現について定量的に解析を行った所、結果は蛍光イメージングの結果と一致していた。Pan-Alexa488 の結合は HuCCT-1 及び YSCCC の細胞で確認された。Tra-Alexa488 の結合は KMCH-1 で観察されたが TFK-1 では観察されなかった。また Pan-Alexa488 の HuCCT-1 及び YSCCC への結合と Tra-Alexa488 の KMCH-1 への結合は、対応する非標識抗体を過剰に添加することで阻害されることが確認された。これらの結果から、Pan-Alexa488 は HuCCT-1 及び YSCCC の EGFR に特異的に結合し、Tra-Alexa488 は KMCH-1 細胞の HER2 に特異的に結合することが示された。

以上、蛍光顕微鏡とフローサイトメトリーの結果から、HuCCT-1 と YSCCC は EGFR を、KMCH-1 は HER2 を発現していることが確認された。

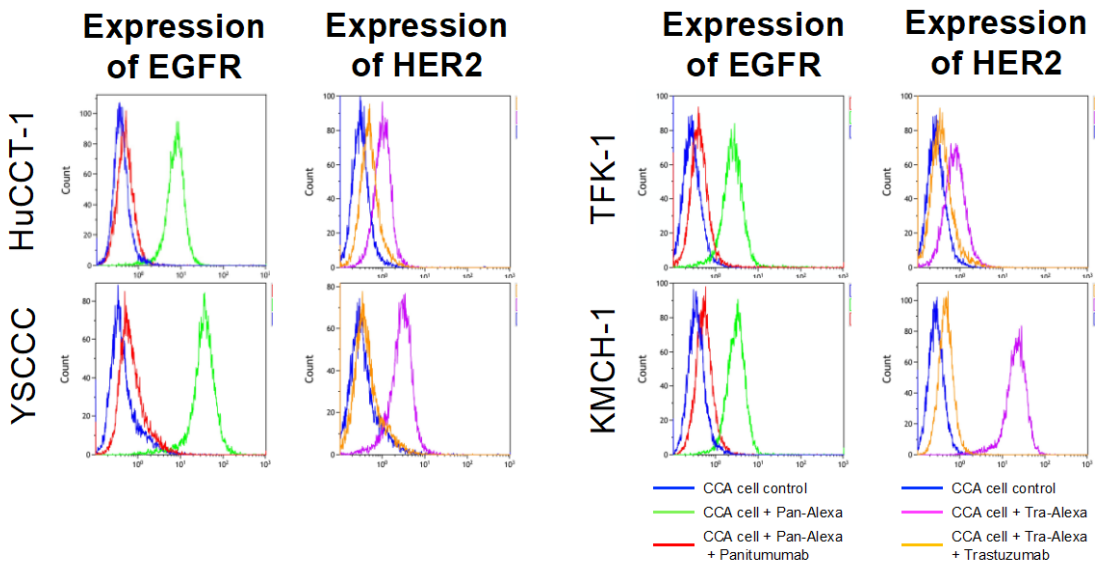

図 5 HuCCT-1、YSCCC、TFK-1、KMCH-1 細胞のフローサイトメトリー結果

4 種類の細胞について EGFR と HER2 の発現の定量を行った。HuCCT-1 と YSCCC への Pan-Alexa488 の結合と KMCH-1 への Tra-Alexa488 への結合は対応する過剰量の非標識抗体により阻害されることが確認された。

【膵癌細胞に対する rBC2LCN-IR700 の結合の確認】

蛍光顕微鏡での観察で Capan-1、Panc04.03、CFPAC-1 で rBC2LCN-IR700 添加後に IR700 の蛍光を確認することができこれらの細胞株の細胞表面に rBC2LCN-IR700 が結合することが示された。一方、MIAPaCa-2 では薬剤添加後に IR700 の蛍光は確認されず、rBC2LCN-IR700 は同細胞表面と結合しないことが確認された。

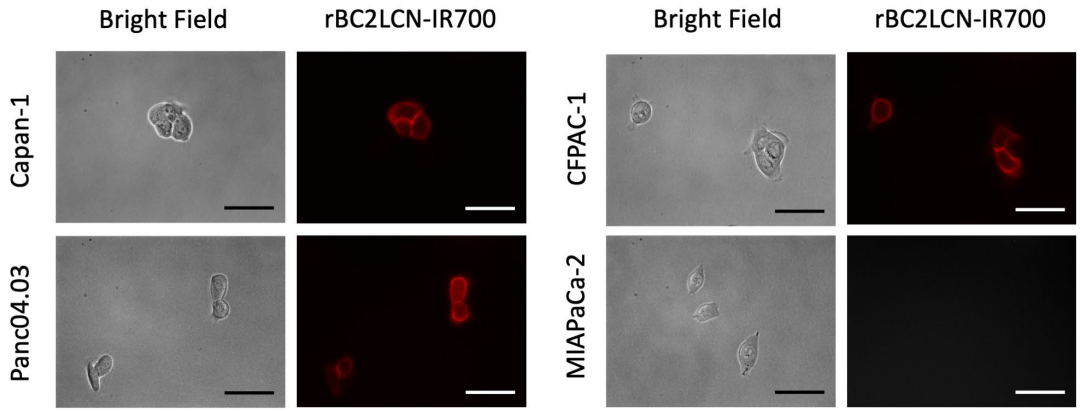

図 6 Capan-1、Panc04.03、CFPAC-1、MIAPaCa-2 細胞の蛍光顕微鏡観察

4 種類の細胞は rBC2LCN-IR700 を添加後 PBS で洗浄して IR700 の蛍光の観察を行った。Scale bar: 50 μm

フローサイトメトリーで rBC2LCN の結合について定量的に解析を行った所、結果は蛍光イメージングの結果と一致していた。rBC2LCN-Alexa488 の結合は Capan-1 及び Panc04.03 の細胞で確認された。一方で CFPAC-1 は rBC2LCN-Alexa488 と結合する集団と結合しない集団により構成されていることが推測された。また MIAPaCa-2 については rBC2LCN-Alexa の結合は認めないことが本実験でも明らかとなった。これらの結果から、rBC2LCN-Alexa488 は Capan-1 及び Panc04.03 に確実に結合することが示された。

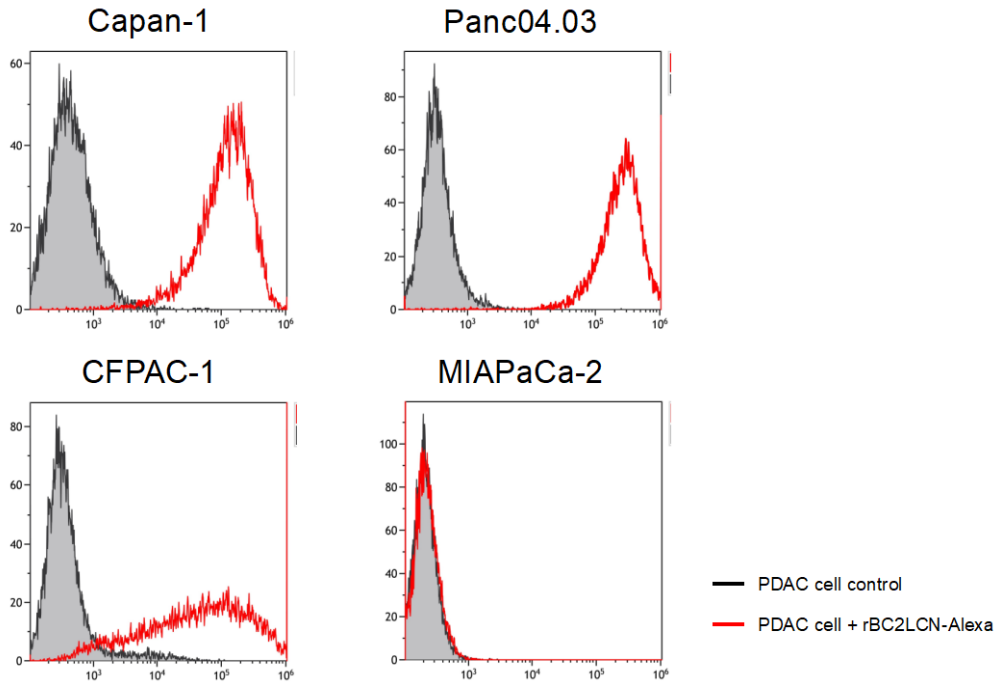

図 7 HuCCT-1、YSCCC、TFK-1、KMCH-1 細胞のフローサイトメトリー結果

4 種類の細胞について rBC2LCN の結合について定量を行った。Capan-1 と Panc04.03 への rBC2LCN-Alexa488 の結合が確認された。

【胆管癌細胞に対する *in vitro* での NIR-PIT】

まず蛍光顕微鏡下で EGFR を発現する HuCCT-1 と YSCCC、HER2 を発現する KMCH-1、及び TFK-1 に対して NIR-PIT の治療効果の確認を行った。LIVE/DEAD 染色では蛍光顕微鏡下で近赤外線照射後に Calcein の流出と EthD-1 の細胞内への取り込みが確認された。また明視野でも 3 種類の細胞ではネクローシスによる細胞死の特徴である細胞の膨張や水疱形成などの細胞機能障害が認められた。一方で TFK-1 では近赤外線照射しても細胞に明らかな変化は認められなかった。

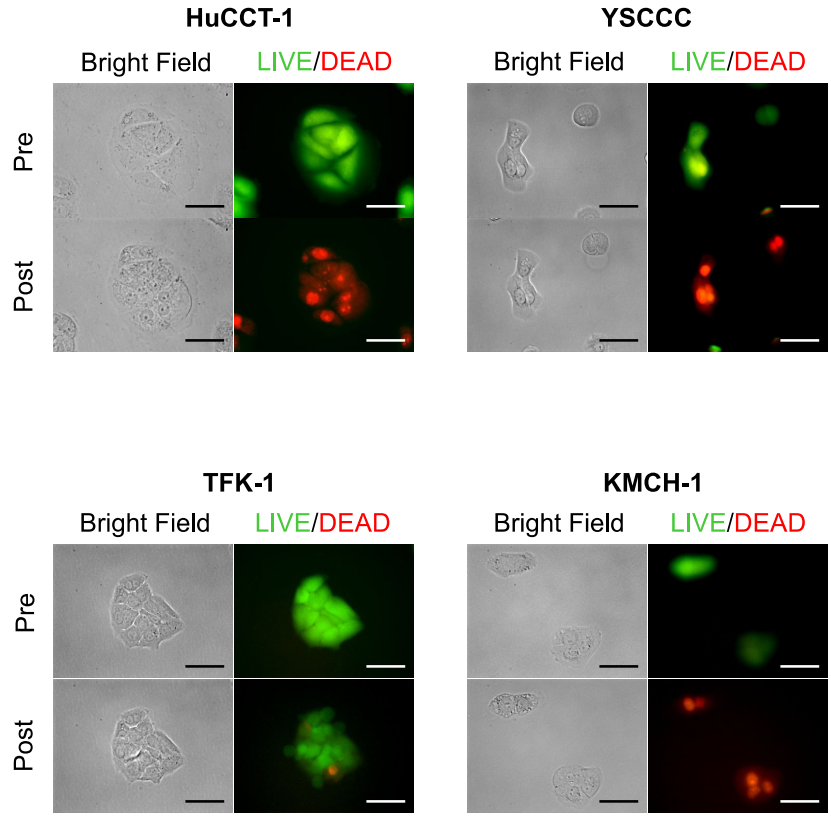

図 8 NIR-PIT 治療を行った胆管癌細胞に対する LIVE/DEAD 染色での評価

HuCCT-1、YSCCC と KMCH-1 では NIR-PIT 後に EthD-1 (赤色) の強い取り込みと Calcein (緑色) の流出が確認された。Scale bar: 50 μm

次にフローサイトメトリーでの死細胞の定量では EGFR を発現する HuCCT-1 と YSCCC の両細胞において、光の照射量を増やすほど死細胞の数が増えることが確認された。同様の傾向が HER2 を発現する KMCH-1 においても確認された。以上の結果から EGFR や HER2 などの標的となる抗原を発現する胆管癌細胞では NIR-PIT による治療が可能であることが示された。

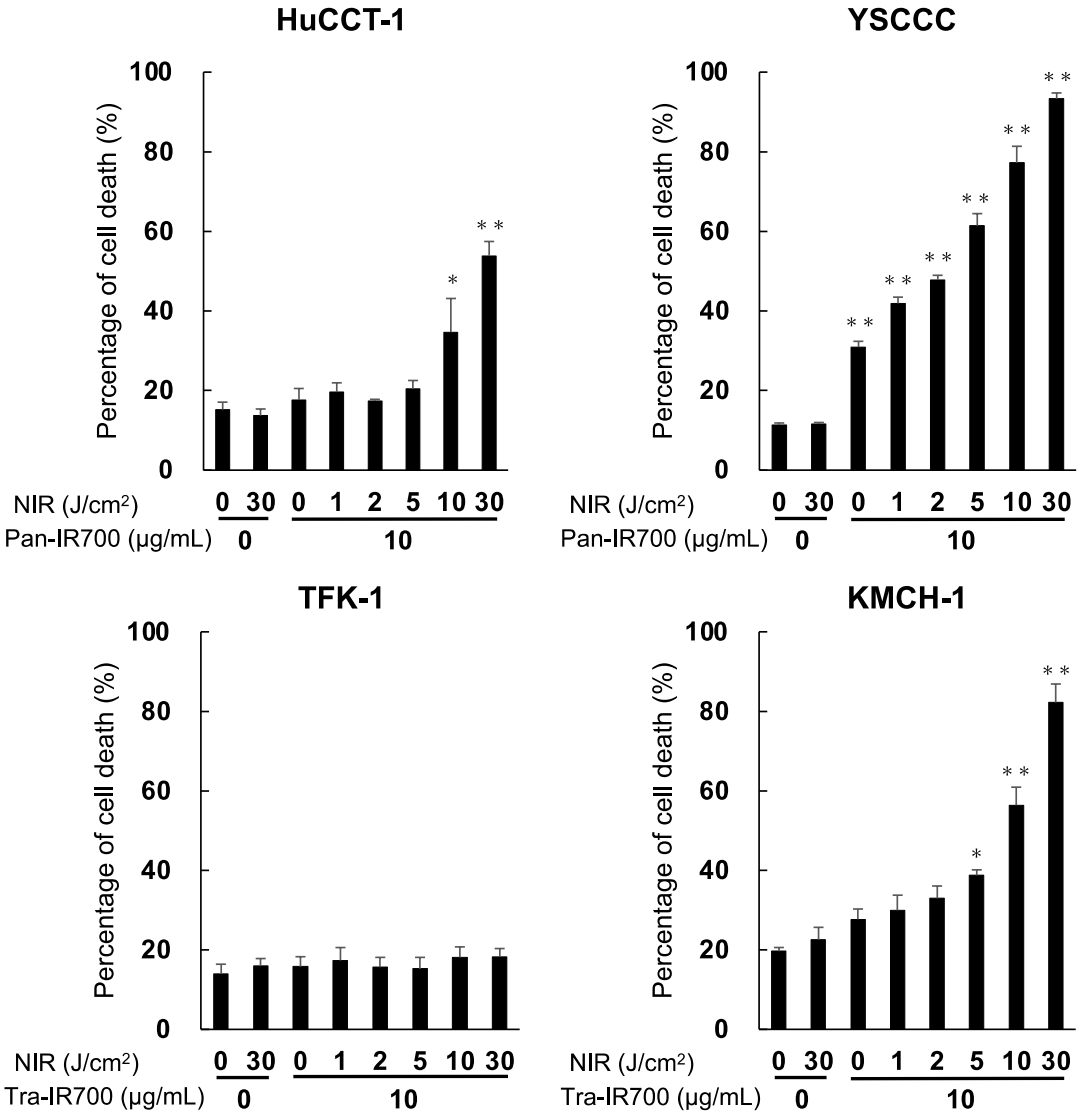

図 9 フローサイトメトリーを用いた NIR-PIT での細胞死の定量

HuCCT-1、YSCCC、KMCH-1 の死細胞の割合が光照射量に比例して増加することが確認された。TFK-1 では Tra-IR700 を添加し光照射を行っても死細胞の増加は確認されなかった。データは平均値±SEM で示した（n = 4、*p < 0.05、**p < 0.01、Dunnett's t-test）。

【膵癌細胞に対する *in vitro* での NIR-PIT】

蛍光顕微鏡では rBC2LCN との結合を認めた Capan-1 と Panc04.03 の両細胞において LIVE/DEAD 染色で近赤外線照射後に Calcein の流出と EthD-1 の細胞内への取り込みが確認された。また明視野では 2 種類の細胞ではネクローシスによる細胞死の特徴である細胞の膨張や水疱形成などの細胞機能障害が認められた。一方で CFPAC-1 では rBC2LCN との結合が特異的でないため近赤外線照射後の Calcein の流出が弱いことが確認された。また MIAPaCa-2 ではでは近赤外線照射しても細胞に明らかな変化は認められなかった。

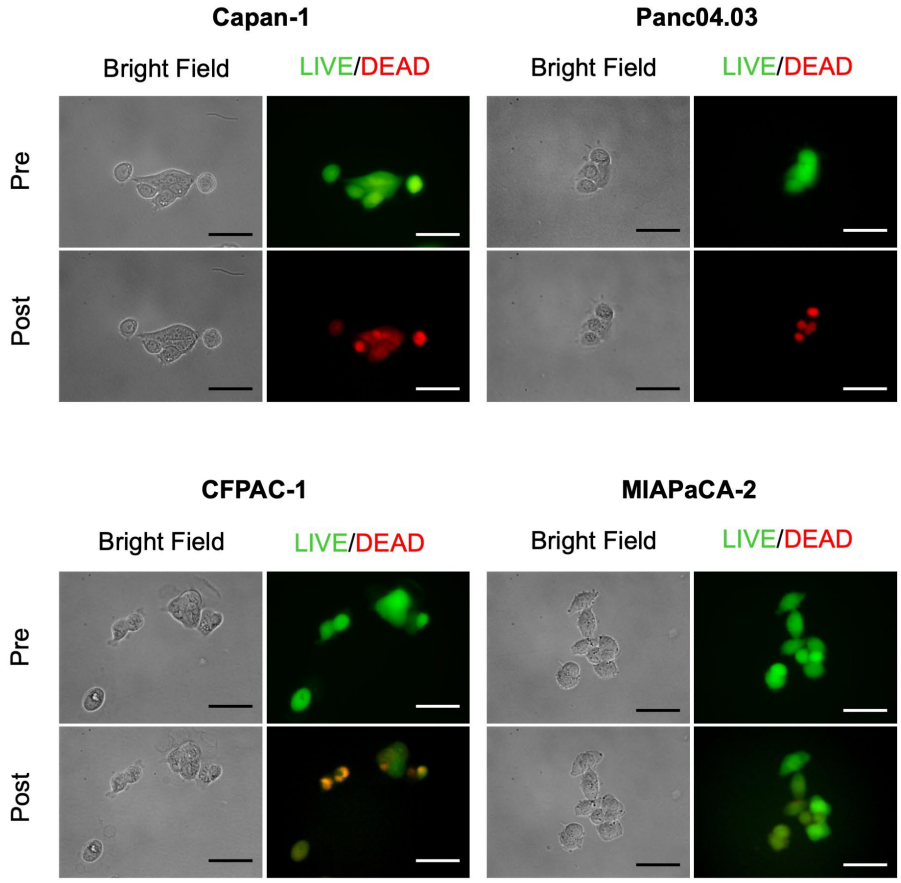

図 10 NIR-PIT 治療を行った胆管癌細胞に対する LIVE/DEAD 染色での評価

Capan-1 と Panc04.03 では NIR-PIT 後に EthD-1 (赤色) の強い取り込みと Calcein (緑色) の流出が確認された。Scale bar: 50 μm

フローサイトメトリーでの死細胞の定量では rBC2LCN と結合する Capan-1 と Panc04.03 の両細胞で、光の照射量を増やすほど死細胞の数が増えることが確認された。以上の結果から rBC2LCN と結合する膵癌細胞では NIR-PIT による治療が可能であることが示された。

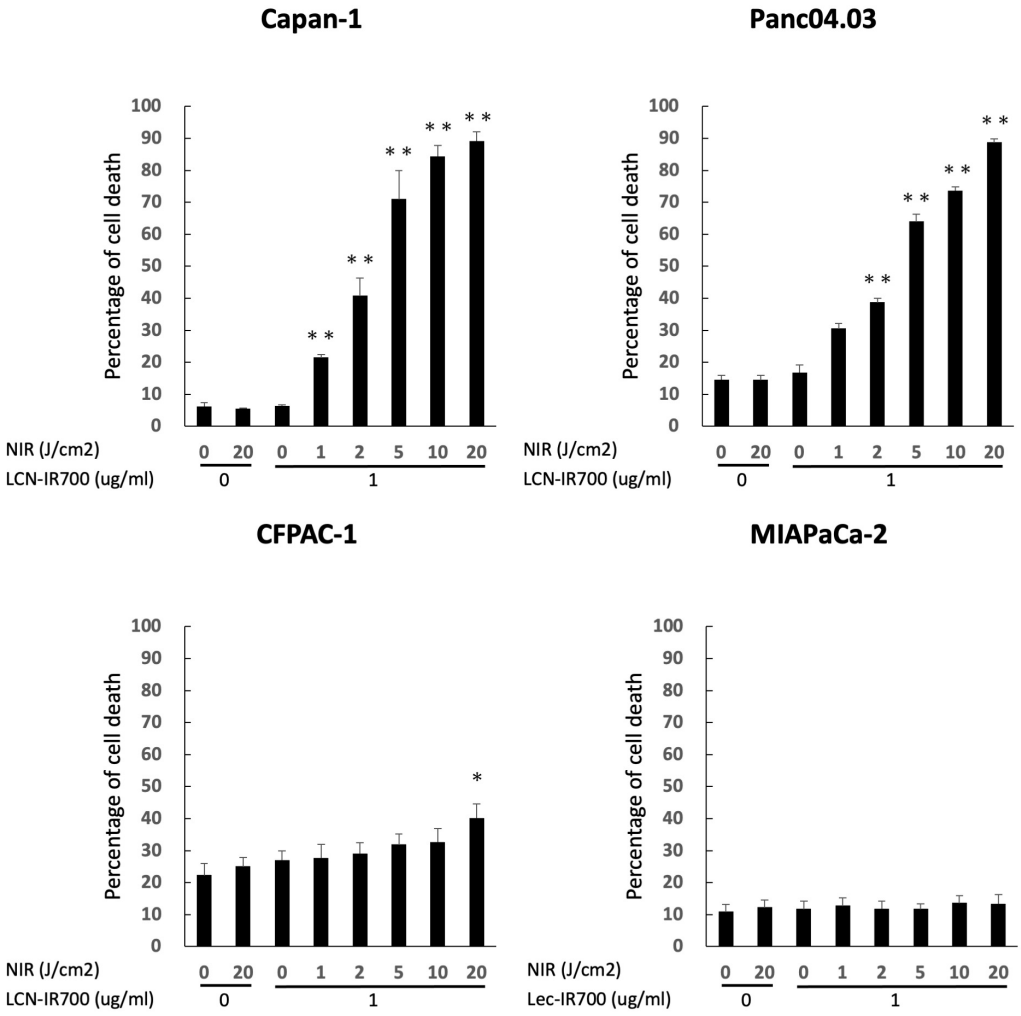

図 11 フローサイトメトリーを用いた NIR-PIT での細胞死の定量

Capan-1、Panc04.03 の死細胞の割合が光照射量に比例して増加することが確認された。データは平均値±SEM で示した（n = 4、*p < 0.05、**p < 0.01、Dunnett's t-test）。

【新開発 LED カテーテルを使用した *in vitro* 及び *in vivo* での胆管癌に対する NIR-PIT の治療効果の検討】

新開発 LED カテーテルを使用した NIR-PIT では、dish の培地内に留置したカテーテルでの光照射 1 時間後に HuCCT-1 と KMCH-1 の両細胞で EthD-1 が細胞内に取り込まれていることが確認された。新開発 LED カテーテルにおいても *in vitro* で外照射と同様に胆管癌細胞に対して NIR-PIT での治療が可能であることが示された。

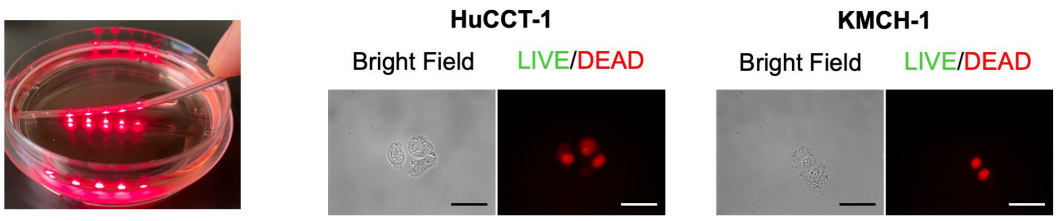

図 12 新開発カテーテルを使用した胆管癌細胞に対する NIR-PIT と LIVE/DEAD 染色での評価

細胞を培養した dish に薬剤添加後、LED カテーテルを dish の培地内に挿入し光照射を行った。HuCCT-1 と KMCH-1 の細胞で NIR-PIT 後に EthD-1 (赤色) の強い取り込みとが確認された。Scale bar: 50 μm

LED カテーテルの NIR-PIT での治療の有効性について評価するため HuCCT-1 担癌マウスを使用し *in vivo* での検討を行った。

IR700 の腫瘍への集積は Group 1 マウス [NIR (+) Pan-IR700 (+) LED カテーテル (+)] で光照射前の day 1 で確認された。IR700 の蛍光は近赤外線照射後に速やかに消失しており、LED カテーテルを使用することで有効に近赤外線照射を行えていることが確認された。Group 1 マウスの day 2 での蛍光観察では光照射後の腫瘍に対して Pan-IR700 が再集積している所見が認められた。また、同様の所見が外照射を行った Group 6 マウス [NIR (+) Pan-IR700 (+) 外照射 (+)] においても確認された。Group 2 マウス [NIR (−) Pan-IR700 (+) LED カテーテル (+)] 及び Group 3 マウス [NIR (−) Pan-IR700 (+) LED カテーテル (−)] では day 1 から day 2 で持続的な Pan-IR700 の集積が確認された。Group 7 マウス [NIR (+) Tra-IR700 (+) LED カテーテル (+)]では Tra-IR700 の集積は確認されなかった。

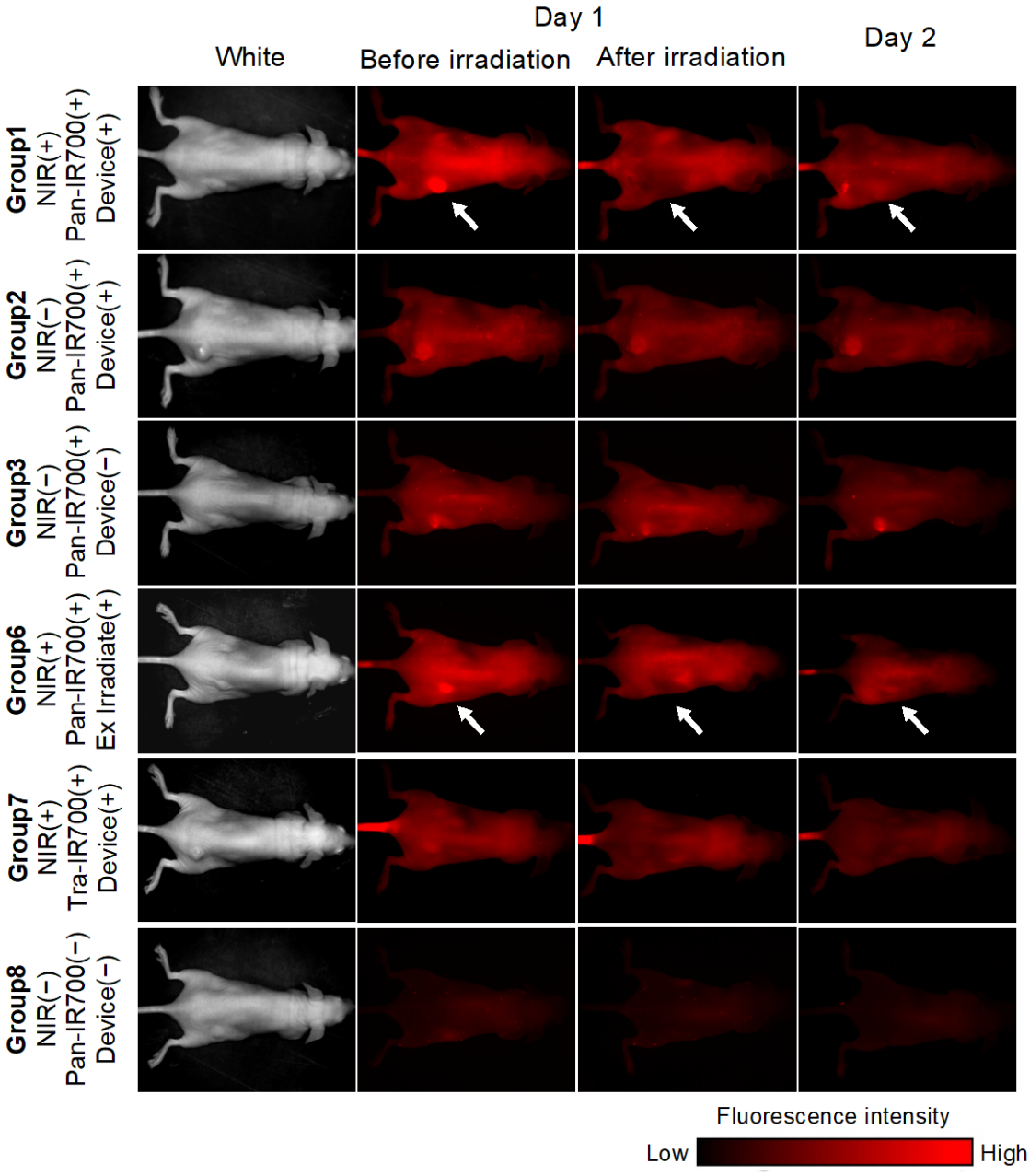

図 13 各グループにおけるマウスの蛍光観察

Group 1 と Group 6 のマウスでは NIR-PIT 前に腫瘍への IR700 の集積が確認され治療後には速やかに消失した。Group 1 では治療 1 日後に腫瘍への再集積が確認された。 (白矢印) 。Device = LED カテーテル

Group 1 マウス [NIR (+) Pan-IR700 (+) LED カテーテル (+)] と Group 6 マウス [NIR (+) Pan-IR700 (+) 外照射 (+)] の HuCCT-1 腫瘍体積の成長は対照群の Group 8 マウス [NIR (−) Pan-IR700 (−) LED カテーテル (−)] と 2 週間後に比較し有意に抑制された。Group 2、3、4、5、7 の腫瘍の成長は対照群 Group 8 と同様であった。

期間中での体重の測定も行ったが 14 日までの各群間で差は確認されなかった。今回の新開発 LED カテーテルは，長さ 20 mm の間に 5 つの LED 光源を備えており，照射領域はマウスの腫瘍をカバーするのに十分な広さであった。さらに，このカテーテルには温度測定用の熱電対温度計が付いており，熱傷を避けるためにカテーテルの温度を確認しながら NIR-PIT を行うことができた。このカテーテルからの NIR 発光時、室内環境で測定すると、LED 付近の温度は約 46℃、カテーテル外の温度は 37℃であり，カテーテルの体内接触部が 37℃以下であったことから，照射中に熱傷や LED の自動消灯は起こらなかった。

各マウスのカテーテル挿入部に傷が認められたがいずれも数日間で消失した。カテーテルを使用した NIR-PIT 治療後に 2 匹のマウスの表皮に軽度の熱傷が認められたが、これも 1 週間ほどで消失した。外照射を行ったマウスでは皮膚障害は確認されなかった。

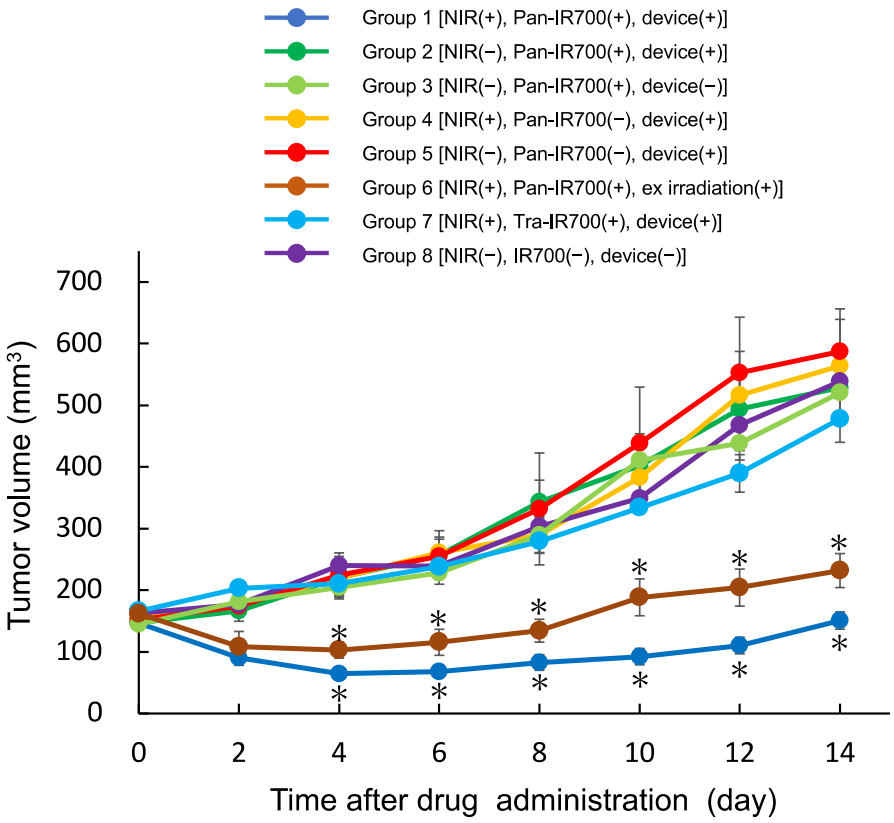

図 14 胆管癌に対する *In vivo* NIR-PIT 後の腫瘍ボリュームの変化

Group 1 と Group 6 のマウスでは対照群 Group 8 と比較し腫瘍の成長が有意に抑制された。データは平均値±SEM で示した（n = 4、 *p < 0.01、Dunnett's t-test）。

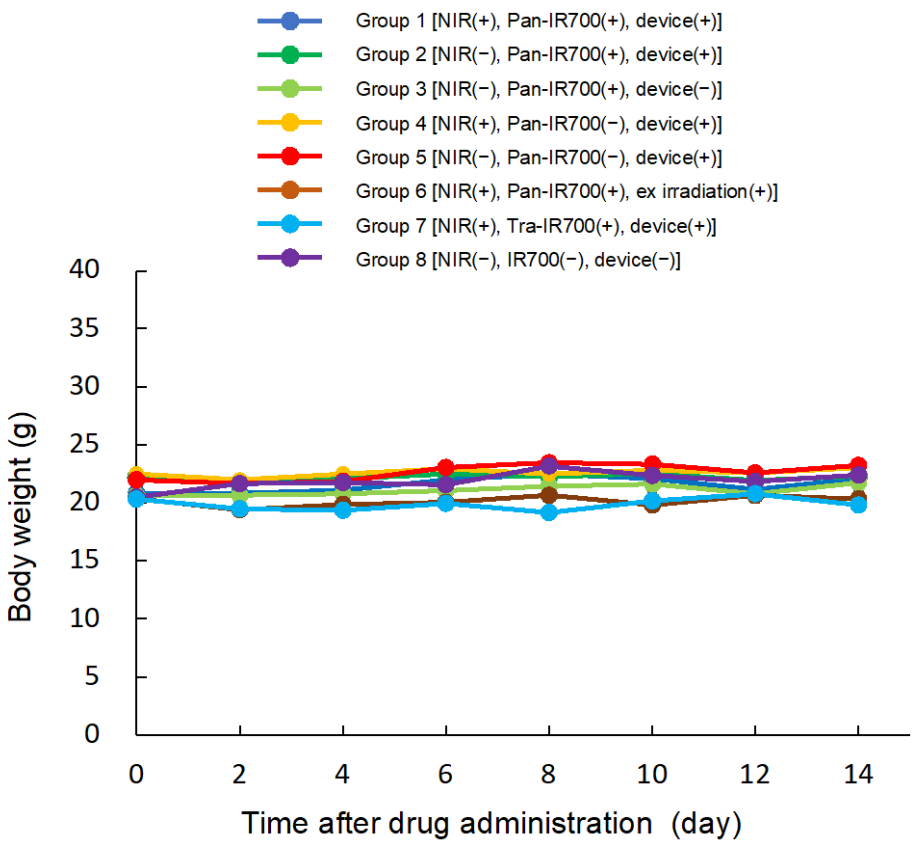

図 15 胆管癌に対する *In vivo* NIR-PIT 後のマウス体重の変化
マウスの体重の変化に差は確認されなかった。（n = 3, Dunnett's t-test）

【*In vivo* での膵癌に対する NIR-PIT】

Group 1 マウス [NIR (+) rBC2LCN-IR700 (+)] の Panc04.03 腫瘍体積の成長は対照群の Group 4 マウス [NIR (−) rBC2LCN-IR700 (−)] と 2 週間後に比較し有意に抑制された。Group 2、3 の腫瘍の成長は対照群 Group 4 と同様であった。期間中での体重の測定も行ったが 16 日までの格群間で差は確認されなかった。なお外照射を行ったマウスは熱傷などの皮膚障害は確認されなかった。

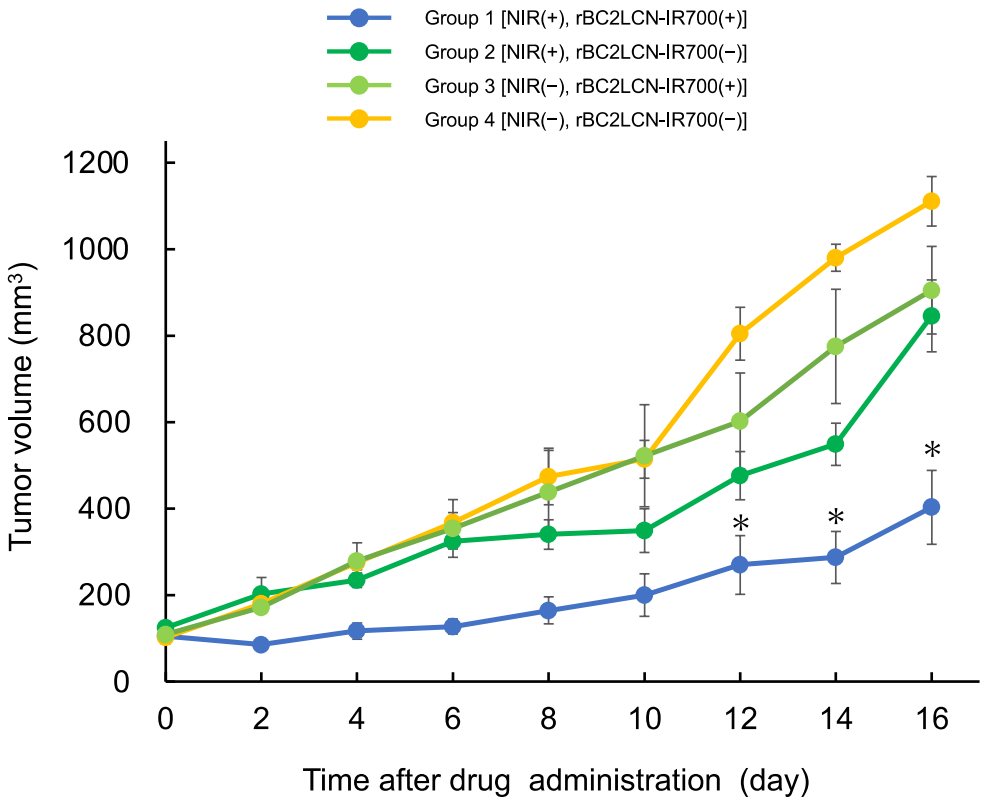

図 16 膵癌に対する *in vivo* NIR-PIT 後の腫瘍ボリュームの変化

Group 1 のマウスでは対照群 Group 4 と比較し腫瘍の成長が有意に抑制された。データは平均値±SEM で示した（n = 3、*p < 0.01、Dunnett's t-test）。

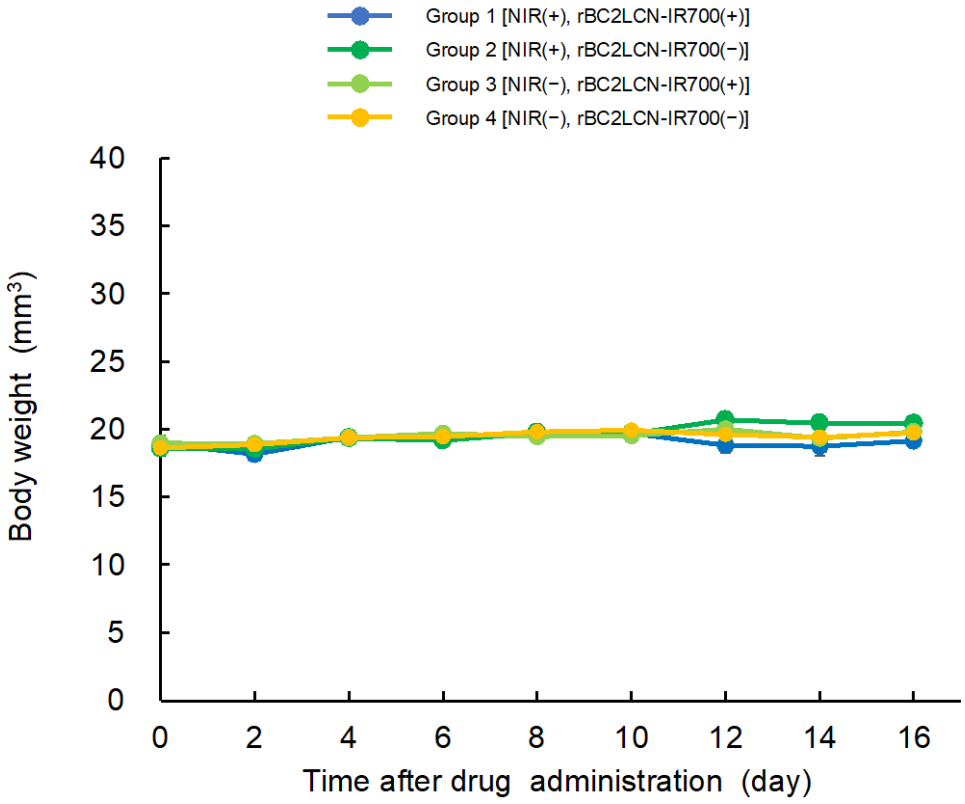

図 17 膵癌に対する *in vivo* NIR-PIT 後のマウス体重の変化
マウスの体重の変化に差は確認されなかった。（n = 3、Dunnett's t-test）

【病理組織学的解析】

胆管癌に対する NIR LED カテーテルを使用した検討において、Group 1 マウス [NIR (+) Pan-IR700 (+) LED カテーテル (+)] の腫瘍の H&E 染色では、微小出血と癌細胞死を伴い、顕著な治療効果が確認された。しかし、対照群である Group 8 マウス [NIR (−) Pan-IR700 (−) LED カテーテル (−)] では、明らかな損傷は見られなかった。

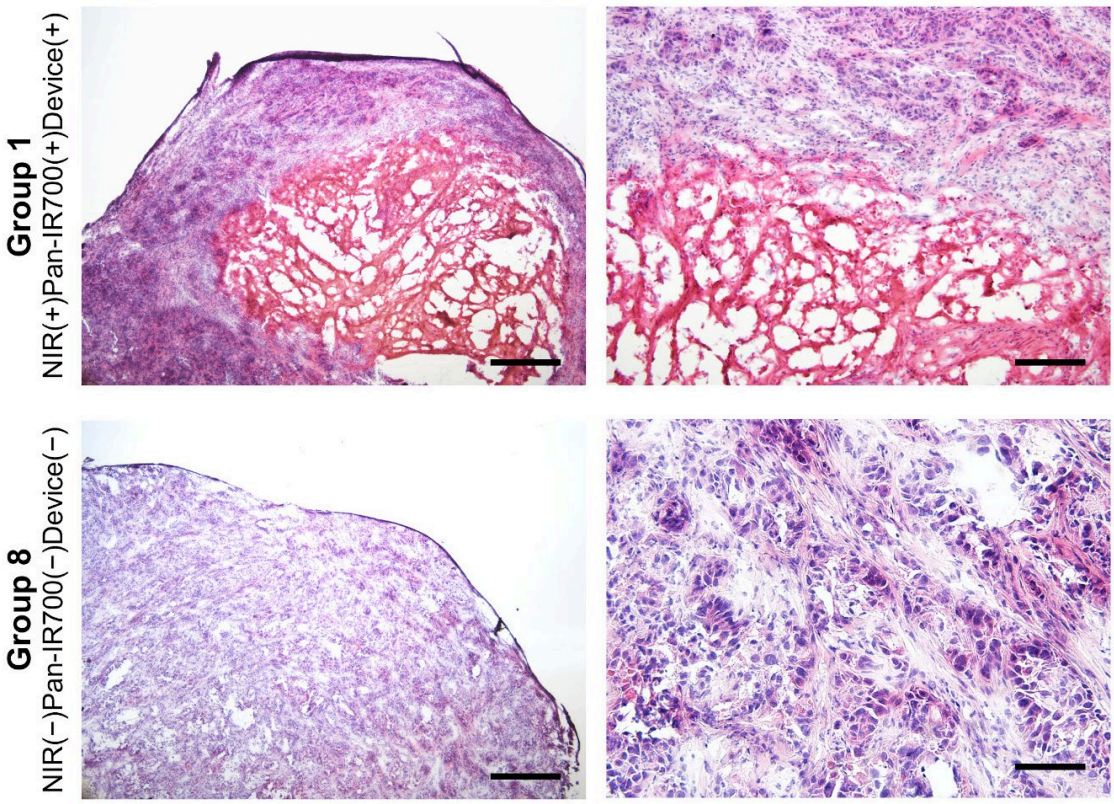

図 18 胆管癌に対する *in vivo* NIR-PIT 後腫瘍の病理組織学的解析

Group 1 マウス [NIR (+) Pan-IR700 (+) LED カテーテル (+)] の腫瘍では、腫瘍の中心部に出血と腫瘍細胞の消失が観察された。Scale bar: 500 μm (4×画像) ; 100 μm (20×画像) 。

膵癌に対する外照射による NIR-PIT を行った検討において、Group 1 マウス [NIR (+) rBC2LCN-IR700 (+)] の腫瘍の H&E 染色では、腫瘍内全体での癌細胞死を伴い、顕著な治療効果が確認された。しかし、対照群である Group 4 マウス [NIR (−) rBC2LCN-IR700 (−)] では、明らかな損傷は見られなかった。

膵癌の腫瘍切片での蛍光観察では rBC2LCN-IR700 の投与を行ったマウスの腫瘍で腫瘍内に強い IR700 の蛍光が確認された。対照群の切片では IR700 の蛍光は確認されなかった。

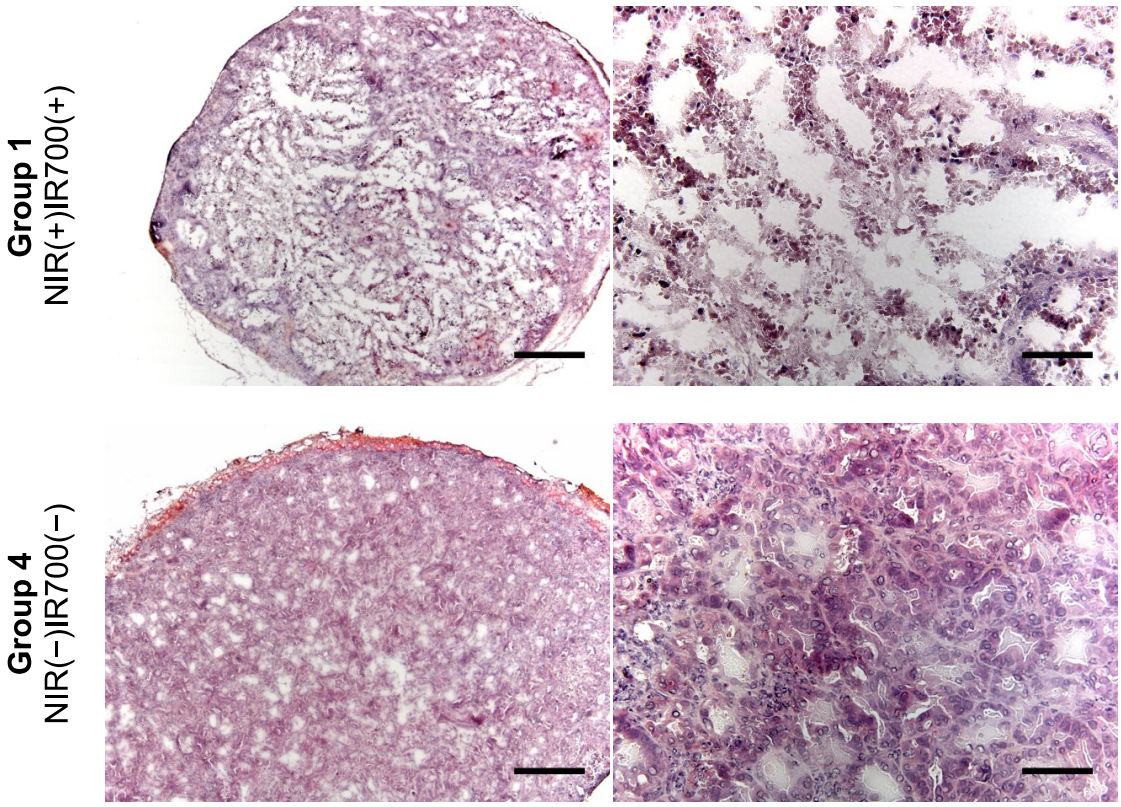

図 19 膵癌に対する *in vivo* NIR-PIT 後腫瘍の病理組織学的解析

Group 1 マウス [NIR (+) rBC2LCN-IR700 (+)] の腫瘍では、腫瘍の全体に及ぶ腫瘍細胞の消失が観察された。Scale bar: 500 μm (4×画像) ; 100 μm (20×画像) 。

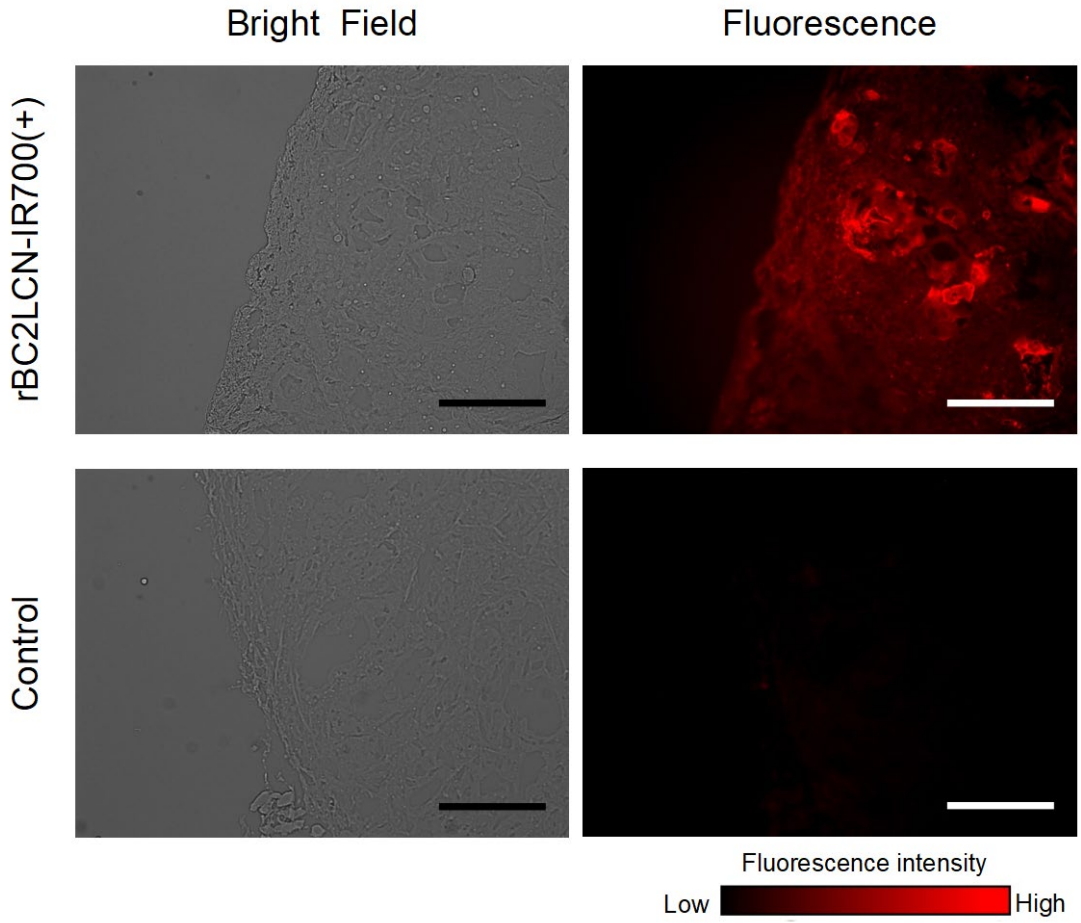

図 20 膵癌病理組織における IR700 蛍光の観察

rBC2LCN-IR700 の投与を行ったマウスの腫瘍では、腫瘍内に IR700 の蛍光の集積が確認された。Scale bar: 100 μm (20×画像) 。

考察

今回、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 LED カテーテルが胆管癌の NIR-PIT に有用であることを明らかにした。

効果的な NIR-PIT を実現するためには、近赤外線光源に加えて、癌細胞の膜上のターゲットと特異的な抗体もしくは結合性物質 (タンパク) が必要である。膀胱癌、肺癌、乳癌など多くの種類の癌を標的とした NIR-PIT が基礎研究で報告されている (Nagaya et al. , 2018 ; Sato et al. , 2015 ; Jin et al. , 2016) 。先行研究では，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いるため (Nakamura et al. , 2015, ; Valle et al. , 2017) ， NIR-PIT は胆管癌に対しても優れた治療法になると考えられる。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。EGFR と HER2 以外にも、Nishimura らは、腫瘍関連カルシウムシグナルトランスデューサー2 (TROP2) を標的とした胆管癌や膵癌に対する NIR-PIT を示している (Nishimura et al. , 2019) 。NIR-PIT は、シグナル伝達に頼らず、IR700 コンジュゲートに結合した標的細胞を物理的に破壊する治療法であるため (Sato et al. , 2018) 、近赤外線照射デバイス (新開発 LED カテーテル) と適切な抗体や小分子と IR700 コンジュゲートの組み合わせにより、胆管癌細胞や膵癌細胞に対する NIR-PIT が可能になると考える。

現在行われている臨床試験では、抗体 IR700 複合体を用いた光免疫治療が主体である。しかし、基礎研究においては、通常の抗体よりも小さい Fab 抗体、Affibody、そして RGD ペプチドなど低分子と IR700 複合体を使用した光免疫治療のメリットと可能性が報告されている (Mao et al. , 2018 ; Okada et al. , 2019 ; Nakajima et al. , 2021) 。レクチンは抗体よりも低分子であるタンパクであり、膵癌の他に直腸癌、乳癌に対しても特異的に結合する薬剤担体としてレクチン (rBC2LCN) を用いた LDC 製剤の可能性が報告されているが (Mawaribuchi et al. , 2020 ; Kitaguchi et al. , 2020) 、光感受性薬剤を結合させた光免疫治療に関しては本検討が初めてである。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おり効率的に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。既存の抗体薬作製には細胞の培養、及び動物の生体内での増生が必要であることから、生産コストが通常の薬剤よりも高くなることが多い。しかし、今回使用する rBC2LCN は *Burkholderia cenocepacia* 由来のレクチンである BC2L-C の N

末端ドメインを大腸菌内で発現させた組み換え体であり、rBC2LCN は細菌系で作製できる点において、通常の抗体薬よりも低コストで生産可能である。よって本レクチンを使用した臨床での NIR-PIT 用薬剤としての使用は医療コストの点で優れていると考えられる。

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、この新規カテーテルによる 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。今回開発した LED 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。これにより、今回の研究や過去の研究で示されているように、光量に応じて NIR-PIT の治療効果を高めることができると考えられる (Mitsunaga et al. , 2012 ; Nakajima et al. , 2014) 。また，NIR-PIT による血管透過性の向上とナノドラッグの送達量の増加を誘発する SUPR 効果 (Super-Enhanced permeability and retention effect) は，IR700 蛍光イメージングで Pan-IR700 複合体の再集積を示した我々の *in vivo* 実験で示されているように、胆管癌に対しても期待されると考えられる (Kobayashi et al. , 2016) 。したがって、今回開発した新しいカテーテルは連続照射が可能であり、現在の NIR-PIT 治療で用いられているデバイスよりも胆膵領域で有用であると考えられる。

胆管癌や膵癌の症例の多くは、しばしば閉塞性黄疸に悩まされ、内視鏡的な胆道ドレナージを必要とする (Lai et al. , 1992) 。今回のカテーテルを胆管癌患者の NIR-PIT に使用する場合、今回開発したカテーテルには十分なドレナージルーメンがないため、胆道減圧のために別のドレナージチューブやステントが必要となる。将来的には、LED チップを小型化し、カテーテル内に胆道ドレナージルーメンを搭載することで、NIR-PIT と胆道ドレナージを同時に行うことができるようになる。さらに、*in vivo* の検討では、低温熱傷が観察されたため、LED カテーテルデバイスは、NIR-PIT 中の熱傷を避けるために、取り付けられた温度監視センサーを使用する必要がある (Okuyama et al. , 2017) 。また今回のデバイスの様に有線の LED カテーテルを使用するのではなく、腫瘍による狭窄部に合わせて設置できるワイヤレス光照射ステントのようなデバイスを開発することも望ましいと考える。このステントデバイスは、チューブが体外に出ないため、カテーテルに比べて患者への負担が少ない。しかし、有線のカテーテルとは異なり、光を照射するための電源供給の方法を考慮する必要がある。当研究室は以前、NIR-PIT 用の埋め込み型ワイヤレス LED デ

バイスを開発しており (Nakajima et al. , 2018) 、今後ステントデバイスを開発する際には、このシステムが解決策になる可能性もある。

今後、膵癌に対する NIR-PIT を行うためには、腫瘍部に対する直接的な近赤外線照射も必要である。膵臓は後腹膜臓器で体内深部に位置することから既存の体表外からの近赤外線照射では減衰し治療効果は得られない。今回胆管癌の検討で使用した LED カテーテルは胆管周囲の膵頭部癌に対しても有用であると考えられるが、膵体部や尾部領域の照射には効率的ではないと考えられる。そのため超音波内視鏡を使用し経胃、もしくは経十二指腸から腫瘍を直接穿刺しレーザーを仕込んだ穿刺針を直接膵臓腫瘍内に挿入し光照射を行えるデバイスの開発が光線力学療法の領域で進んでいるが (DeWitt et al. , 2019)。現在、このようなデバイスが膵体尾部領域の膵癌における PIT 治療の領域で応用できないかの検討を行っている。

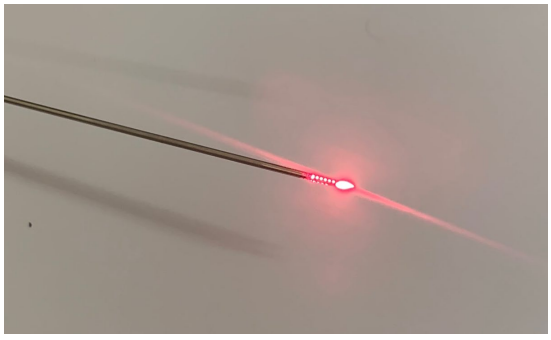

図 21 膵癌に対する NIR-PIT デバイス

現在超音波内視鏡下に穿刺可能な光照射デバイスの開発を行っている。

本研究には、今後解決すべきいくつかの研究上の制限が認められた。一つ目には、ヒト胆管癌細胞株や膵癌細胞株を用いた異種異所性移植マウスモデルを使用した。皮下注射された腫瘍の大きさを評価し、特に胆管癌腫瘍についてはその中の IR700 の蛍光を検出することは容易であった。本研究で NIR-PIT を行う際に、マウスの胆管内にカテーテルを挿入することはサイズとして困難であり行っていない。さらに，内視鏡やガイドワイヤーを用いた本カテーテルの操作性の評価も行えていない。今後、より大型の動物モデルを使用し内視鏡やガイドワイヤーを用いて本カテーテルを実際に胆管内に挿入することで、カテーテルの安定性、柔軟性及び耐久性を評価することを考えている。二つ目は、ヒト胆管癌や膵癌細胞を用いた異種移植マウスモデルを用いたことで、NIR-PIT 効果の免疫原性メカニズムを調べることができていない点である。NIR-PIT は局所のがん細胞に直接ダメージを与えるだけでなく、宿主の免疫細胞を活性化し、転移性腫瘍を減少させる治療法である (Ogawa et al. , 2017) 。カテーテルからの近赤外線が胆管癌や膵癌などの腫瘍全体に

照射されなくても、免疫システムによって根本的に治癒することができる。したがって、免疫原性細胞死に関してこの治療効果を研究するためには、同種移植のマウスモデルでの検討が必要となると考えられる。

今回の研究により、胆管癌細胞と膵癌細胞に対する NIR-PIT の有効性と、新開発 LED カテーテルデバイスによる胆管癌に対する NIR-PIT の治療可能性を示した。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。

結論及び総括

本研究から得られた新知見は以下の通りである。

(1) EGFR 及び HER2 が発現している胆管癌細胞では NIR-PIT による治療効果が確認され、光量に応じて効果が増強した。

(2) rBC2LCN と結合する膵癌細胞において NIR-PIT による治療効果が認められた。またこの効果は *in vivo* における外照射でも確認され、rBC2LCN-IR700 は膵癌に対する NIR-PIT に有用である。

(3) 今回近赤外線照射可能な LED カテーテルの開発を行い、胆管癌腫瘍に対するカテーテルを使用した NIR-PIT の有効性が示された。

本研究において EGFR 及び HER2 が発現している胆管癌細胞では *in vitro* と *in vivo* において NIR-PIT による治療効果が確認された。これまでの臨床試験で胆管癌に対する抗 EGFR 抗体や抗 HER2 抗体を用いた治療法は現行の化学療法に対して有効性が示せておらず、今回の知見により胆管癌上に EGFR や HER2 など標的可能な抗原があれば NIR-PIT による治療効果が得られる可能性があると考えられる。

また、rBC2LCN と結合する膵癌細胞でも同様に NIR-PIT の治療効果が確認されており膵癌に対する新規治療として今後発展することが望まれる。

一方で NIR-PIT は薬剤の他に近赤外線照射が必要となり、胆管癌や膵癌などの深部癌に対する光照射方法が課題となっていた。今回胆道用に開発したカテーテルデバイスは *in vivo* での検討において外照射と同様の治療効果を示し、治療による持続的な近赤外線照射が可能であることが示された。今後より大型の動物モデルでの検討を行い、実際に内視鏡下での同カテーテル留置と安定的な光照射が可能であるか検討が必要である。さらに臨床応用可能な膵癌に対する光照射デバイスの開発を行うことも必要である。

謝辞

本研究に際して、多くのご支援とご指導を頂きました北海道大学病院消化器内科の栗谷将城講師、北海道大学大学院医学研究院内科学分野消化器内科学教室の坂本直哉教授に深く感謝申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、直接的な御指導を多岐にわたりいただきました北海道大学大学院薬学研究院生体分析科学教室の中島孝平助教、小川美香子教授に深く感謝申し上げます。また胆管癌細胞株 KMCH-1 を提供頂いた久留米大学医学部病理学講座の矢野博久教授に感謝申し上げます。

最後に本研究にあたり御協力頂きました北海道大学大学院医学研究院内科学分野消化器内科学教室の皆様、研究室スタッフの皆様方に心より感謝申し上げます。

本研究は、日本学術振興会(Grant Numbers JP 19H03593, Grant-in-Aid for JSPS Fellows JP 20J12988)、内視鏡医学研究振興財団、上原記念生命科学財団および永井記念薬学研究奨励支援事業より研究助成を得たものである

利益相反

本研究は日本ライフライン株式会社から資金提供を受けて行った。本研究のデザイン、分析、およびデータの解釈について、資金提供者は関与していない。

引用文献

Aung W, Tsuji A, Sugyo A, Takashima H, Yasunaga M, Matsumura Y, Higashi T. (2018). Near-infrared photoimmunotherapy of pancreatic cancer using an indocyanine green-labeled anti-tissue factor antibody. World journal of gastroenterology. 28, 5491-5504.

Chengqiong Mao, Ping Qu1, Michael J. Miley, Yan Zhao1, Zibo Li, Xin Ming1. (2018). P-glycoprotein targeted photodynamic therapy of chemoresistant tumors using recombinant fab fragment conjugates. Biomater Sci. 24, 3063–3074.

Dawn Q. Chong, Andrew X. Zhu. (2016). The landscape of targeted therapies for cholangiocarcinoma: current status and emerging targets. Oncotarget; 7: 46750–46767.

DeWitt JM, Sandrasegaran K, O'Neil B, House MG, Zyromski NJ, Sehdev A, Perkins SM, Flynn J, McCranor L, Shahda S. (2019). Phase 1 study of EUS-guided photodynamic therapy for locally advanced pancreatic cancer. Gastrointestinal Endoscopy; 89: 390-398.

Euhus DM, Hudd C, LaRegina MC, Johnson FE. (1996). Tumor measurement in the nude mouse. J Surg Oncol; 31: 229–234.

Furuta T, Oda T, Kiyoi K, Yusuke O, Kimura S, Kurimori K, Miyazaki Y, Yu Y, Furuya K, Akashi Y, Shimomura O, Tateno H. (2021). Carcinoembryonic antigen as a specific glycoprotein ligand of rBC2LCN lectin on pancreatic ductal adenocarcinoma cells. Cancer Science; 112: 3722-3731.

Jain A, Javle M. (2016) Molecular profiling of biliary tract cancer: a target rich disease. J Gastrointest Oncol; 7: 797–803.

Jin J, Krishnamachary B, Mironchik Y, Kobayashi H, Bhujwalla ZM. (2016). Phototheranostics of CD44-positive cell populations in triple negative breast cancer. Scientific Reports; 6: 27871.

Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, Takaori K. (2016). Pancreatic Cancer. Lancet; 388: 73-85.

Kitaguchi D, Oda T, Enomoto T, Ohara Y, Owada Y, AkashiY, Furuta T, Yu Y, Kimura S, Kuroda Y, Kurimori K, Miyazaki Y. (2020). Lectin drug conjugate therapy for colorectal cancer. Cancer Science; 111: 4548-4557.

Kobayashi H. Coyke PL. (2016). Super enhanced permeability and retention (SUPR) effects in tumors following near infrared photoimmunotherapy. Nanoscale; 8: 12504–12509.

Kobayashi H, Choyke PL. (2019). Near-Infrared Photoimmunotherapy of Cancer. Accounts of Chemical Research; 52: 2332–2339.

Kobayashi H, Griffiths GL, Choyke PL. (2020). Near Infrared Photoimmunotherapy: Photo-Activatable Antibody-Drug Conjugates (ADCs). Bioconjugate Chemistry; 31: 28–36.

Lai EC, Mok FP, Tan ES, Lo CM, Fan ST, You KT, Wong J. (1992). Endoscopic Biliary Drainage for Severe Acute Cholangitis. N Engl J Med; 326: 1582–1586.

Lee J, Park SH, Chang HM, Kim JS, Choi HJ, Lee MA, Jang JS, Jeung HC, Kang JH, Lee HW, et al. (2012). Gemcitabine and Oxaliplatin with or without Erlotinib in advanced biliary tract cancer: A multicentre, open label, randomised, phase3 study. Lancet Oncol; 13: 181–188.

Lee JY, Diaz RR, Cho KS, Lim MS, Chung JS, Kim WT, Ham WS, Choi YD. (2013). Efficacy and safety of photodynamic therapy for recurrent, high grade nonmuscle invasive bladder cancer refractory or in tolerant to bacille Calmette Guerin immunotherapy. J Urol; 190: 1192–1199.

Lum YL, Luk JM, Staunton DE, Ng Dennis K. P, Fong WP. (2020). Cadherin-17 Targeted Near-Infrared Photoimmunotherapy for Treatment of Gastrointestinal Cancer. Molecular pharmaceutics; 17, 3941-3951.

Mawaribuchi S, Haramoto Y, Tateno H, Onuma Y, Aiki Y, Ito Y. (2020). rBC2LCN lectin as a potential probe of early-stage HER2-positive breast carcinoma. FEBS Open Bio; 10: 1056-1054.

Michele M. K, Arash Darafsheh. (2020). Light Sources and Dosimetry Techniques for Photo dynamic Therapy. Photochemistry and Photobiology; 96: 280–294.

Mitsunaga M, Ogawa M, Kosaka N, Rosenblum LT, Choyke PL, Kobayashi H. (2011). Cancer cell selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules. Nat Med; 17: 1685–1691.

Mitsunaga M, Nakajima T, Sano K, Choyke PL, Kobayashi H. (2012). Near-infrared theranostic photoimmunotherapy (PIT): Repeated exposure of light enhances the effect of immunoconjugate. Bioconjug Chem; 23: 604–609.

Miyoshi E, Nakano M. (2008). Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: detailed analyses of oligosaccharide structures. Nat Proteomics; 8: 3257–3262.

Nakajima K, Kimura T, Takakura H, Yoshikawa Y, Kameda A, Shindo T, Sato K, Kobayashi H, Ogawa M. (2018). Implantable wireless powered light emitting diode (LED) for near-infrared photoimmunotherapy: device development and experimental assessment in vitro and in vivo. Oncotarget; 9: 20048–20057.

Nakajima K, Takakura H, Shimizu Y, Ogawa M. (2018). Changes in plasma membrane damage including cell death after treatment with near-infrared photoimmunotherapy. Cancer Science; 109: 2889–2896.

Nakajima K, Miyazaki F, Terada K, Takakura H, Suzuki M, Ogawa M. (2021) Comparison of low-molecular-weight ligand and whole antibody in prostate-specific membrane antigen targeted near-infrared photoimmunotherapy. International journal of Pharmaceutics; 609: 121135.

Nakajima T, Sato K, Hanaoka H, Watanabe R, Harada T, Choyke PL, Kobayashi H. (2014). The effects of conjugate and light dose on photo-immunotherapy induced cytotoxicity. BMC Cancer; 14: 389.

Nakamura H, Arai Y, Totoki Y, Shirota T, Elzawahry A, Kato M, Hama N, Hosoda F, Urushidate T, Ohashi S, et al. (2015). Genomic spectra of biliary tract cancer. Nature Genetics; 47: 1003–1010.

Nagakawa T, Kayahara M, Ikeda S, Futakawa S, Kakita A, Kawarada H, Matsuno M, Takeda T, Takasaki K, Tanimura H, et al. (2002). Biliary tract cancer treatment: results from the Biliary Tract Cancer Statistics Registry in Japan. J Hepatobiliary Pancreat Surg; 9: 569–575.

Nagaya T, Okuyana S, Ogata F, Maruoka Y, Knapp DW, Kraguannis SN, Fezekas-Singer J, Choyke PL, LeBlanc AK, Jensen Jarolim E, Kobayashi H. (2018). Near infrared photoimmunotherapy targeting bladder cancer with a canine anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody. Oncotarget 9: 19026–19038.

Nagaya T, Okuyama S, Ogata F, Maruoka Y, Choyke PL, Kobayashi H. (2018). Endoscopic near infrared photoimmunotherapy using a fiber optic diffuser for peritoneal dissemination of gastric cancer. Cancer Science; 109: 1902–1908.

Nishimura T, Mitsunaga M, Sawada R, Saruta M, Kobayashi H, Matsumoto N, Kanke T, Yanai H, Nakamura K. (2019). Photoimmunotherapy targeting biliary-pancreatic cancer with humanized anti-TROP2 antibody. Cancer Medicine; 8: 7781–7792.

Ogawa M, Tomita Y, Nakamura Y, Lee MJ, Lee S, Tomita S, Nagaya T, Sato K, Yamauchi T, Kobayashi H, et al. (2017). Immunogenic cancer cell death selectively induced by near infrared photoimmunotherapy initiates host tumor immunity. Oncotarget; 8: 10425–10436.

Okada R, Maruoka Y, Furusawa A, Inagaki F, Nagaya T, Fujimura D, Choyke PL, Kobayashi H. (2019) The Effect of Antibody Fragments on CD25 Targeted Regulatory T Cell Near Infrared Photoimmunotherapy (NIR-PIT). Bioconjugate Chemistry; 30, 2624–33.

Okuyana S, Nagaya T, Ogata F, Maruoka Y, Sato K, Nakamura Y, Coyke PL, Kobayashi H. (2017). Avoiding thermal injury during near-infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT): the importance of NIR light power density. Oncotarget; 8: 113194–113201.

Pellat A, Vaquero J, Fouassier L. (2018). Role of ErbB/HER Family of Receptor Tyrosine Kinases in Cholangiocyte Biology. Hepatology; 67: 762–773.

Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. (2014). Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. Cancer Research; 74: 2913-2921.

Ramanathan RK, Belani CP, Singh DA, Tanaka M, Lenz HJ, Yen Y, Kindler HL, Iqbal S, Longmate J, Mack PC, et al. (2009). A phase II study of lapatinib in patients with advanced biliary tree and hepatocellular cancer. Cancer Chemother Pharmacol; 64:777–783.

Sano K, Nakajima T, Choyke PL, Kobayashi H. (2013). Markedly Enhanced Permeability and Retention Effects Induced by Photo Immunotherapy of Tumors. ACS Nano; 22: 717–724.

Sato K, Ando K, Okuyama S, Noriguchi S, Ogura T, Totoki S, Hanaoka H, Nagaya T, Kokawa R, Kobayashi H. (2018). Photoinduced Ligand Release from a Silicon Phthalocyanine Dye Conjugated with Monoclonal Antibodies: A Mechanism of Cancer Cell Cytotoxicity after Near-Infrared Photoimmunotherapy. ACS Cent. Sci; 4: 1559–1569.

Sato K, Nagaya T, Mitsunaga M, Choyke PL, Kobayashi H. (2015). Near infrared photoimmunotherapy for lung metastases. Cancer Lett; 365: 112–121.

Shimomura O, Oda T, Tateno H, Ozawa Y, Kimura S, Sakashita S, Noguchi M, Hirabayashi J, Asashima M, Ohkohchi N. (2018). A Novel Therapeutic Strategy for Pancreatic Cancer: Targeting Cell Surface Glycan Using rBC2LC-N Lectin–Drug Conjugate (LDC). Molecular Cancer Therapeutics; 17: 183-195.

Sulak O, Cioci G, Delia M, Lahmann M, Varrot A, Imberty A, Wimmerova M. (2010). A TNF-like Trimeric Lectin Domain from Burkholderia cenocepacia with Specificity for Fucosylated Human Histo-Blood Group Antigens. Structure; 18: 59-72.

Tahara M, Okano S, Enokida T, Ueda Y, Fujisawa T, Shinozaki T, Tomioka T, Okano W, Biel MB, Ishida K, Hayashi R. (2021). A phase I, single-center, open-label study of RM-1929 photoimmunotherapy in Japanese patients with recurrent head and neck squamous cell carcinoma. International Journal of Clinical Oncology; 10: 1812-21.

Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthoney A, Maraveya A, Madhusudan S, Iveson T, Hughes S, Pereira SP, Roughton M, Bridgewater J. (2010). ABC-02 Trial Investigators. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. N Engl J Med; 362: 1273–1281.

Valle J, Lamarca A, Goyal L, Barriuso J, Zhu A. (2017). New horizons for precision medicine in biliary tract cancers. Cancer Dicov; 7: 943-962.

Waseem D, Tushar P (2017). Intrahepatic, perihilar and distal cholangiocarcinoma: management and outcomes. Ann Hepatol; 16: 133–139.