



Title	近赤外線光免疫療法による腫瘍微小環境変化の病理組織学的解析
Author(s)	千田, 健博
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15505号
Issue Date	2023-03-23
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k15505">https://doi.org/10.14943/doctoral.k15505</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/91625">https://hdl.handle.net/2115/91625</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Takehiro_Chida.pdf



博士論文

---

近赤外線光免疫療法による  
腫瘍微小環境変化の病理組織学的解析

---

令和5年3月申請

北海道大学

大学院歯学院口腔医学専攻

千田健博

## 目次

要旨.....	3
緒言.....	5
材料と方法.....	9
結果.....	17
考察.....	27
結論.....	34
謝辞.....	34
参考文献 .....	35
図の説明 .....	38

## 要旨

日本人の最大死因であるがんに対する治療は手術・化学療法・放射線治療の3つを主軸として行われてきた。これらの治療法では様々な副作用や治療に伴う合併症が報告されており、重篤な副作用や合併症から死に至るケースも少なくない。そのため、正常細胞には影響を与えず、がん細胞のみを破壊する新しい治療法の開発が望まれている。現在、がんの新たな治療法として期待されている近赤外線光免疫療法（NIR-PIT）の臨床研究が進行している。NIR-PIT は、光吸収体（IR700）をがん細胞と特異的に結合する抗体に結合させた複合体を患者の体内に静注し、近赤外線光を照射することでがん細胞を破壊する治療法である。臨床試験により NIR-PIT の一定の治療効果が確認されているが、NIR-PIT による腫瘍微小環境への影響を病理組織学的に解明した報告は未だない。そこで我々は NIR-PIT による腫瘍微小環境の変化を組織学的に解析することで、治療効果の機序を解明し、より効果的な NIR-PIT の治療法の開発の一助となることを目的とし、研究を行った。

EGFRを発現するヒト舌扁平上皮癌 SAS 皮下移植マウスに光感受性物質 IR700 結合 EGFR 抗体を投与し、近赤外線光を照射した。照射後腫瘍を摘出し、HE 染色、免疫組織化学染色（IHC）を実施し、NIR-PIT による治療効果を病理組織学的に解析

した。

近赤外線光照射後 24 時間以内には腫瘍全体の体積の縮小はみられなかったが、組織学的には腫瘍内部の壊死領域の拡大を認めた。NIR-PIT によりがん細胞は細胞膜の EGFR 発現の低下や核の消失などの形態学的変化を示した。また NIR-PIT により腫瘍血管面積の増大や腫瘍血管内腔の拡張が認められた。さらに NIR-PIT により、拡張血管周囲にマクロファージが集積することが示された。

以上の結果から、NIR-PIT 照射後早期に血管腔の拡張を伴うマクロファージ動員増大などの腫瘍微小環境の変化が生じることが示された。

## 緒言

現在の日本人の最大死因である「がん」の克服は超高齢化社会を迎えた現在の日本における喫緊の課題である。従来のがん治療は、手術・化学療法・放射線治療の3つの治療法が主軸となつて行われてきた。これらの治療法では腫瘍の残存、播種・転移した腫瘍に対する効果が限定的であることやがん細胞以外の正常な細胞にも少なからず傷害を与えることが知られている。また、化学療法による間質性肺炎や肝機能障害、腎機能障害など様々な副作用や治療に伴う合併症が報告されており(1)、重篤な副作用が直接的な死因につながるケースも少なくない。

近年第四の治療法として普及している抗 PD-1、抗 CTLA4 抗体などの免疫チェックポイント阻害薬（オプジーボ®やキイトルーダー®）などを用いた免疫療法は従来の化学療法と比較し副作用が少ないといわれているが、奏成功率はおよそ 20%(2)と低く、また、間質性肺炎、大腸炎、甲状腺機能低下症、肝障害、発疹、白斑、下垂体炎、I 型糖尿病、腎機能障害、重症筋無力症、末梢神経障害、筋炎、ぶどう膜炎などの免疫関連有害事象が報告されている(3)。そのため、正常細胞には影響を与えず、がん細胞のみを特異的に破壊する新しい治療法の開発が望まれている。

光線力学療法（photo dynamic therapy : PDT）ががんの新たな治療法として期待さ

れており、これまでに臨床応用されている。PDT はポルフィリン誘導体という腫瘍親和性の高い光増感物質を静脈注射して病巣に集積させ、そこに低出力レーザー光を照射することで、がん細胞を死滅させる治療法である。光増感剤との化学反応によりがん細胞内の酸素が活性酸素に変化する。活性酸素はがん細胞をアポトーシスに誘導し、死滅させる。PDT は日本では 1996 年に肺癌を対象に臨床応用が開始され(4)、現在では、肺癌、悪性脳腫瘍、膀胱癌などを対象に、PDT 治療が行われている。PDT 治療の最大の利点は、レーザー光照射野のみに限定した治療が可能ということである。そのため、病変以外の正常な細胞を傷害するリスクが少なく、臓器の機能を温存でき、術後の患者の負担が軽減される。一方これまでに PDT による光線過敏症が報告されている(5)。PDT 治療では施行前に光感受性物質を付着させた抗体投与が必要となる。そのため、顔や皮膚など露出した部分に蛍光灯や日光等の紫外線が当たると化学反応により発疹や水疱形成が生じることが報告されている。また、PDT はアポトーシスを誘導する治療法であるため、がん細胞がアポトーシスを起こすまでの反応に時間を要することが知られており、治療後の壊死物質や、凝血塊の除去が必要になることなどが報告されている(6)。

一方、2011 年に近赤外線光免疫療法 (Near Infrared Photoimmunotherapy : NIR-

PIT)が、従来の PDT とは全く異なる理論と機序をもつ治療法として開発された。NIR-PIT は、光吸収体 (IR700) をがん細胞と特異的に結合する抗体に結合させた抗体を患者の体内に静注し、近赤外線を照射することでがん細胞を破壊する治療法である。光吸収体が近赤外線光により活性化すると、熱が産生され、がん細胞の細胞膜に孔が形成される。浸透圧によりその孔から細胞内に細胞外液が流入するため、がん細胞が膨潤・破裂し、ネクローシスを起こす。使用する抗体の受容体がない正常細胞には影響がないとされ、副作用がほとんどないと考えられている(7)。

NIR-PIT により近赤外線光による直接的ながん細胞の傷害のみだけではなく、腫瘍免疫が増強されることが報告されている(8)。破壊されたがん細胞から放出された細胞内容物により樹状細胞が活性化され、腫瘍抗原がリンパ球に提示される。次いで細胞障害性 T 細胞が活性化され、腫瘍免疫が増強される。腫瘍免疫の増強により、直接 NIR-PIT により治療した局所腫瘍のみならず、遠隔転移した腫瘍も消失することが報告されている(9)。

現在、日本では全国のがん治療施設において再発頭頸部癌を対象として NIR-PIT の第三相臨床試験が実施されている(10)。臨床試験により NIR-PIT の一定の治療効果が確認されているが、腫瘍の残存や深部組織の治療が困難であるなどさまざま

な課題も報告されている (10)。

NIR-PIT による腫瘍あるいは周囲正常組織の病理組織学的な変化については不明な点が多く、NIR-PIT による腫瘍微小環境への影響を病理組織学的に解明した報告は未だない。

そこで本研究では NIR-PIT 治療による腫瘍微小環境の変化を組織学的に解析し、治療効果の機序を明らかにすることを目的に研究を行った。

## 材料と方法

### 1. 細胞培養

ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株 SAS 細胞 は JCRB (日本) より購入した。ヒト類表皮癌由来細胞株 A431 細胞は RIKEN BRC (日本) より購入した。SAS 細胞, A431 細胞は熱処理により非動化した牛胎児血清 (FBS : Gibco, NY, USA) を終濃度 10% で添加した RPMI-1640 Medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) で培養した。MS1 細胞は熱処理により非動化した牛胎児血清を終濃度 10%で添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) で培養した。実験に使用した全ての細胞は 37° C、5%CO<sub>2</sub> 大気下にて培養した。また、実験に用いた細胞がマイコプラズマに感染していないことは Mycoplasma detection kit (MycoAlert, Lonza, Basel, Switzerland) を用いて確認した。

### 2. 抗体及び試薬

EGFR に対する完全ヒト化 IgG2 モノクローナル抗体 (mab) である Panitumumab (Vectibix®) は、武田薬品工業(日本)から購入した。水溶性のシリ

カフタロシアニン誘導体である IRDye700DX ( IR700 ) NHS エステルは、Li-COR Bioscience から購入した。

### 3. IR700 結合抗 EGFR mAb の合成

抗 EGFR-mAb である Panitumumab (Vectibix®) (1mg, 6.7 nmol/L) を IR700 (65.1  $\mu$ g, 33.3 nmol, DMSO 中 10 mmol / L) および 0.1 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 8.5) と室温で 1 時間インキュベートした。混合物をゲルろ過カラム (Sephadex G50, PD-10; GE Healthcare, Milwaukee, USA) でろ過し、Panitumumab-IR700 (Pan- IR700) を精製した。Modified Lowry Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, IL, USA) を使用し、マイクロプレートリーダー (Infinite M200; Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria) で 750 nm での近赤外線光吸収を測定することにより、IR700 の蛍光タンパク質濃度を決定した。IR700 の濃度は、分光光度計 (UV-1800: 島津製作所、京都、日本) を使用して、各 mAb に対する IR700 の結合数を確認した。mAb あたりの IR700 の結合数は3であった。

#### 4. マウス

腫瘍移植実験には 6 週齢の雌ヌードマウス (BALB/c AJcl-nu/nu, Clea, Japan) を使用した。マウスは Specific pathogen free (SPF) 条件下で飼育された。なお, 本研究に関わる動物実験は, 「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」(承認番号:13-0058) に基づき行った。

#### 5. In Vivo NIR-PIT

ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株 SAS 細胞 ( $1 \times 10^6$  個) をマウス右側背部皮下に移植した。腫瘍が約  $100\text{mm}^3$  の体積に到達したとき、マウスを2つの実験群にランダムに分け、以下の治療実験を実施した。

(実験1)  $100\ \mu\text{g}$  の Pan-IR700 の静脈内注射を行い、翌日近赤外線光  $100\text{J}$  を照射し、照射直後 (0 時間後)、1 時間後、6 時間後、24 時間後に腫瘍を摘出した。

(実験2)  $100\ \mu\text{g}$  の Pan-IR700 の静脈内注射を行い、翌日に近赤外線光  $50\text{J}$  ,  $100\text{J}$ 、 $100\text{J} \times 2$  ( $100\text{J}$  照射後翌日に再度  $100\text{J}$  を照射) を照射し、それぞれ照射後 24 時間で腫瘍を摘出した。

(実験1)、(実験2) それぞれの実験群に未治療の Control 群を設定した。

近赤外線光 LED 照射装置 (MLL-III-690-800 mW , Changchun New Industries Optoelectronics Tech, Co, Ltd.) を用いて、波長  $690 \pm 5$  nm の近赤外線光を  $250 \text{ mW/cm}^2$  の条件下にそれぞれ  $50 \text{ J/cm}^2$  (3 分 20 秒)、 $100 \text{ J/cm}^2$  (6 分 40 秒) の照射を行った。

近赤外線光照射前後には IVIS Spectrum (Caliper Life Science, Waltham, MA, USA) を用いて腫瘍移植部におけるがん細胞に付着した IR700 由来の蛍光シグナルを検出した。

近赤外線光照射前の蛍光シグナルを確認し、腫瘍への抗体の付着を確認し、照射後の蛍光シグナル消失をもって、NIR-PIT の奏功を確認した。

摘出腫瘍組織を 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (和光純薬工業株式会社) にて 24 時間浸漬固定し、通報に従いパラフィンブロックを作製した。

## 6. フローサイトメトリー

SAS 細胞  $1.0 \times 10^5$  個に Biologend Alexa Fluor 488 anti-human EGFR antibody (Biologend, clone AY13 Cat #352907) と Biologend Alexa Fluor 488 Mouse IgG1,  $\kappa$  Isotype Ctrl (Biologend, clone MOPC-21 Cat#400132) の抗体を  $1 \mu\text{l}$  滴下し、30 分間インキュベートした。Positive control には EGFR が高発現であることが知られている A431 細胞を、Negative control には MS1 細胞を使用した。抗体を室温で 30 分間インキュベートし、BD FACSAria<sup>II</sup> セルソーター (Biologend) を用いてフローサイトメトリー解析を行った。

## 7. 免疫組織学的解析

腫瘍組織のパラフィンブロックはマイクローム (リトラーム N700, 大和工業, 日本) を用いて厚さ  $4 \mu\text{m}$  の切片を作製した後、通法に従い、脱パラフィン, 脱水処理後, TE バッファー (Tris/EDTA 溶液 : pH9.0) を用いて加熱処理し、抗原の賦活化を行った。次に  $0.5\% \text{H}_2\text{O}_2$  を 10 分間反応させて内因性ペルオキシダーゼを不活性化した。リン酸緩衝液 (Phosphate-buffered saline : PBS) で洗浄し、5% Goat serum albumins (GSA) 含有 PBS を用いて 10 分間処理し、非特異的反

応を阻害した.一次抗体として抗 CD31 抗体 (ab28364, Lot.#GR3247742-11, Abcam, Cambridge) は 100 倍に希釈して用いた。抗  $\alpha$  SMA 抗体 (ab5694, Lot:GR3183259-2, Abcam, Cambridge) は、1000 倍に希釈して用いた。抗 EGFR 抗体 (Biolegend #4267, D38B1, Lot : 24, Cell signaling, Danvers) は 500 倍に希釈して用いた。抗 CD68 抗体 (ab125212 Lot.#GR3384571-1, Abcam, Cambridge) は 500 倍に希釈して用いた。一次抗体は 4°C で 15 時間反応させた。その後、HRP 標識抗ウサギ二次抗体 (P0448, Lot.41372205, Dako, 東京), HRP 標識抗ラット二次抗体 (P0450, Lot.41372205 Dako, 東京) を 100 倍に希釈して用いた。二次抗体は室温で 60 分間作用させ、DAB (3,3 -diaminobenzidine, Dako, 東京) にて発色後、マイヤーのヘマトキシリンで核染色を行った。水洗後、脱水、透徹を行い封入し、光学顕微鏡にて検鏡した。染色画像は Nanozoomer slide scanner (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) でデジタル画像として取得した。

## 8. 壊死領域の算出方法

HE 染色標本を用いて、画像閲覧ソフト NDP.view2 (HAMAMATSU, 日本) により総腫瘍面積と腫瘍中の壊死領域面積を計測し、総腫瘍面積における壊死領域面積の割合の平均値を算出した。腫瘍組織内のがん細胞が存在しない領域を壊死領域と定義し、評価した。

## 9. 腫瘍血管の解析

画像解析ソフト Image J を使用し、CD31 陽性血管内皮面積の腫瘍面積における割合の平均値を算出した。

管腔構造を認める CD31 陽性血管を拡張血管と定義し、腫瘍部の CD31 陽性血管数における拡張血管数の割合の平均値を算出した。

腫瘍血管の周皮細胞被覆率を評価するため、抗 CD31 抗体及び抗  $\alpha$  SMA 抗体を使用し、免疫二重染色を行なった。20 倍の強拡大視野において、CD31 (茶、DAB) 陽性領域を腫瘍血管とし、その周囲にみられる  $\alpha$  SMA (赤、Bulcan Red) 領域を周

皮細胞とした。血管が集中しているホットスポット（5ヶ所）に認められる血管の周皮細胞による被覆率を4群（0-25%, 26-50%, 51-75%, 76-100%）に分け、1視野（20倍）内の総腫瘍血管数における4群それぞれの血管数の割合の平均値を算出した。

#### 10. 免疫細胞の評価

CD68 陽性細胞の密度（陽性細胞総数/総腫瘍面積）の平均値を算出した。

連続切片を用いて、40倍の強拡大視野においてCD31染色標本における拡張血管部、非拡張血管部、壊死部にみられるCD68陽性細胞のそれぞれ5視野の密度（陽性細胞数/面積）の平均値を算出した。

#### 11. 統計解析

統計処理は統計解析ソフト JMP Pro16（JMP STATISTICAL DISCOVERY）を使用した。統計処理は Control 群との比較に DUNNETT 検定を行い、統計的有意差を  $P < 0.05$  とした。また、グラフは平均値 ± 標準偏差で示した。

## 結果

### SAS 細胞における EGFR の発現

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 SAS 細胞を用いて、EGFR の発現をフローサイトメトリー（蛍光活性化セルソーティング FACS）により定量評価した。Positive-control としてヒト類表皮癌細胞株である A431 を、Negative-control としてマウス睪島由来不死化血管内皮細胞株である MS1 を用いた。フローサイトメトリーにより SAS 細胞で EGFR の発現が高いことが示された（Fig.1a）。

生体内での SAS 細胞における EGFR の発現を確認するため、SAS 細胞のヌードマウスへの皮下移植モデルを実験に使用した。腫瘍体積が  $100\text{mm}^3$  に到達した時に腫瘍を摘出し、パラフィンブロックを作成した。4  $\mu\text{m}$  に薄切し、抗 EGFR 抗体を使用し免疫染色を実施した。その結果、腫瘍細胞の細胞膜に EGFR の発現が確認できた（Fig1b）。

以上より SAS 細胞の細胞膜に EGFR が発現していることが示された。そこで、ヌードマウスへの SAS 細胞皮下移植モデルを使用し、抗 EGFR 抗体 Panitumumab-IR700 (Pan-IR700) を用いた NIR-PIT 療法を行うこととした。

## NIR-PIT 後早期には腫瘍体積の減少は認めなかった

6 週齢の雌ヌードマウス (BALB/c AJcl-nu/nu) の SAS 細胞皮下移植モデルを実験に用いて、NIR-PIT 後早期の腫瘍組織の変化を病理組織学的に解析した。腫瘍体積が  $100\text{mm}^3$  に到達した時に、Pan-IR700 をマウス尾静脈から静脈内投与し、24 時間後に近赤外線光照射を行った (Fig.2a)。治療群において、近赤外線光照射前後に蛍光イメージング装置 IVIS を使用し、治療前後における腫瘍の蛍光強度を測定した。近赤外線光照射前には腫瘍部に蛍光シグナルがみられたが、近赤外線光照射後には蛍光シグナルが消失した。以上より NIR-PIT が奏功したことが示された。(Fig.2b)

Pan-IR700 投与時、近赤外線光照射時、近赤外線光照射 24 時間後に腫瘍の体積を測定した (Fig.2c)。その結果、非治療群、治療群ともに近赤外線光照射 24 時間後に腫瘍体積の減少はみられなかった。また近赤外線光照射量を変えてそれぞれの群で Pan-IR700 投与時、近赤外線光照射時、近赤外線光照射 24 時間後に腫瘍体積を測定した (Fig.2d)。近赤外線光照射 24 時間後に再度近赤外線光を照射した群では 2 回目の近赤外線光照射 24 時間後にも腫瘍体積を測定した。その結果、非治療群と近赤外線光 0J、50J、100J を 1 回照射した群では腫瘍体積の減少はみられなかったが、近赤外線光 100J を 2 回照射した群では 1 回目の光照射時からごくわずかに腫

瘍体積の減少をみとめた。

#### **NIR-PIT により腫瘍壊死領域は拡大した**

近赤外線光 100J 照射直後、1 時間後、6 時間後、24 時間後に腫瘍を摘出し (Fig.2a)、ホルマリン固定後、通法に従い、パラフィンブロックを作製した。マイクロームで  $4\mu\text{m}$  に薄切し、HE 染色を実施し、壊死領域の面積を測定し、定量的に評価した。

近赤外線光照射直後、1 時間後、6 時間後の群は非治療群と比較し、壊死領域の割合はほとんど変わらなかったが、24 時間後の群は腫瘍のおよそ 80%に壊死を認めた (Fig.3b)。

#### **近赤外線照射量依存的に腫瘍壊死領域は拡大した**

近赤外線光の照射量を変え、近赤外線照射 24 時間後に腫瘍を摘出した。摘出した腫瘍をホルマリン固定後、通法に従い、パラフィンブロックを作製した。マイクローム

で 4  $\mu$  m に薄切し、HE 染色を実施し、壊死領域の面積を測定し、定量的に評価した。近赤外線照射 0J 群は非治療群と比較し、壊死領域の割合にほとんど差はみられなかった (Fig.4b)。近赤外線照射 50J 群、100J 群、近赤外線 100J を 2 回照射した群では、非治療群と比較し、壊死領域の増加を認めた。また 0J、50J、100J と照射量依存的に壊死領域が増加する傾向がみられたが、100J 照射群と、100J を 2 回照射した群では壊死領域の割合はほとんど変わらなかった。

#### **NIR-PIT により腫瘍血管は拡張した**

NIR-PIT が腫瘍血管に与える影響を評価するため、パラフィン切片を用いて、血管内皮細胞のマーカーである CD31 抗体により免疫組織染色 (IHC) を実施した (Fig. 5a)。管腔構造を成している CD31 陽性血管を拡張血管とすると、拡張血管は非治療群では腫瘍深部に分布しているが、NIR-PIT 治療群では腫瘍深部、皮膚側ともに拡張血管がみられた (Fig.5a)。近赤外線光照射後 24 時間以内の NIR-PIT 治療群では非治療群と比較し、腫瘍血管密度が高かった。また近赤外線光照射 24 時間後の群では近赤外線光照射直後、1 時間後、6 時間後の群と比較し、腫瘍血管密度が高か

った。このことから NIR-PIT により腫瘍血管密度が増加することが示された (Fig.5b)。

近赤外線光照射後 24 時間以内の NIR-PIT 治療群では非治療群と比較し、拡張血管 (管腔構造を成す血管) の割合が増加した (Fig.5c)。

近赤外線光の照射量を変え、腫瘍血管の密度、形態について観察した。非治療群、近赤外線光 0J 照射群では腫瘍深部にのみ拡張血管がみられた (Fig.6a)。近赤外線光 50J 照射群では皮膚側にのみ拡張血管がみられた。近赤外線光 100J 照射群、近赤外線光 100J を 2 回照射した群では腫瘍深部、皮膚側ともに拡張血管がみられた (Fig.6a)。近赤外線光 0J 照射群、50J 照射群、100J 照射群、近赤外線光 100J を 2 回照射した群では、非治療群と比較し、治療群において腫瘍血管面積の増大を認められた (Fig.6b)。さらに近赤外線を 1 回照射した群では、照射量依存的に血管面積の増大を認めた。また治療群では、非治療群と比較し、拡張血管 (管腔構造を成す血管) の割合が増加し、近赤外線を 1 回照射した群では、照射量依存的に増加が確認された (Fig.6c)。

以上より、近赤外線光の照射により腫瘍血管密度、拡張血管の割合が増加することが示された。また、近赤外線の照射により拡張血管の分布に変化がみられることが示された。

## **NIR-PIT 早期においては腫瘍血管の性質には変化を認めなかった**

NIR-PIT による腫瘍血管の成熟度の変化を評価するため、血管内皮細胞のマーカである CD31 抗体とその血管内皮を被覆する周皮細胞のマーカである  $\alpha$  SMA 抗体を用いて、二重免疫組織染色 (IHC) を実施し (Fig 7a)、腫瘍血管の周皮細胞の被覆率を定量的に評価した。

近赤外線光照射 24 時間以内では、非治療群、治療群共に周皮細胞の被覆率が 25%以下である血管が 70%以上を占め、NIR-PIT により腫瘍血管の周皮細胞の被覆率に変化は認めなかった。(Fig.7b)

異なる照射量においても、非治療群、治療群共に周皮細胞の被覆率が 25%以下である血管が 70%以上を占め、治療群においても異なる照射量での血管の性質に変化は認めなかった。(Fig.8b)

以上より、NIR-PIT により腫瘍血管の成熟度に変化はみられないことが示された。

## **NIR-PIT はがん細胞の形態に変化をもたらした**

NIR-PIT 治療後、経時的にがん細胞の形態を観察すると全ての群で、腫瘍中央部のがん細胞の細胞膜に全周性に EGFR の発現がみられた。しかし、NIR-PIT 治療群では壊死領域との境界部に、細胞膜に EGFR の発現がみられないがん細胞を認めた (Fig.9a 矢印)。近赤外線光照射後 1 時間群では腫瘍細胞に EGFR 陽性の細胞膜はあるものの、核が消失した細胞が散見された (Fig.9a 矢頭)。近赤外線照射後 6 時間群では核が消失した細胞がさらに多くみられた。

近赤外線の強度を変え、がん細胞の形態を観察すると全ての群で、腫瘍中央部のがん細胞の細胞膜に全周性に EGFR の発現がみられた。抗体のみを投与し近赤外線を照射していない群 (0J) ではがん細胞の全ての細胞膜に EGFR の発現がみられた (Fig.9b)。近赤外線を 1 回照射した群では近赤外線照射後 24 時間で 50J 照射群、100J 照射群ともに、核が消失した細胞はほとんど認めなかった。近赤外線を 2 回投与した群では核が消失した細胞が散見された。

以上より、近赤外線照射直後に腫瘍細胞の細胞膜に損傷が生じることが示された。また、近赤外線照射 1 時間後には細胞膜は保たれているが、核が消失した細胞がみられ、細胞死が生じていることが示された。近赤外線光照射後 24 時間では核が消失した細胞がほとんどみられなかったが、壊死細胞がマクロファージなどにすでに貪食

されたと考えられた。

#### **NIR-PIT により経時的に免疫細胞の集積を認めた**

腫瘍への免疫細胞の集積を病理組織学的に評価するため、マクロファージのマーカーである抗 CD68 抗体を用いて免疫組織染色を行い、腫瘍組織への免疫細胞の集積を定量的に評価した。

非治療群、近赤外線光照射 24 時間後の拡張血管部、非拡張血管部の腫瘍血管周囲、壊死部の CD31、CD68 免疫染色像を示す (Fig.10a)。非治療群では拡張血管部、非拡張血管部、壊死部に CD68 陽性細胞はごくわずかにみられるのみであった。非治療群と比較し、近赤外線光照射 24 時間後に、拡張血管周囲に類円形の CD68 陽性細胞が多くみられた。近赤外線光照射 24 時間後の非拡張血管部、壊死部には CD68 陽性細胞がごくわずかにみられるのみであった。腫瘍全体の CD68 陽性細胞密度を測定すると、非治療群と比較し治療群では CD68 陽性細胞の細胞密度は高く、治療群において経時的に増加する傾向を示した (Fig.10b)。非治療群と比較し、近赤外線光照射 24 時間後の腫瘍全体の CD68 陽性細胞密度は有意に高かった。拡張

血管周囲、非拡張血管周囲、壊死部の CD68 陽性細胞の密度を測定すると、CD68 陽性細胞は、非治療群、治療群ともに、血管周囲で壊死領域よりも細胞密度が高かった (Fig.10c)。また全ての群で拡張血管周囲の CD68 陽性細胞密度が最も高かった。

非治療群、近赤外線光 50J、100J を 1 回照射した群、100J を 2 回照射した群の拡張血管部、非拡張血管部の腫瘍血管周囲、壊死部の CD31、CD68 免疫染色像を示す (Fig.11a)。非治療群では拡張血管部、非拡張血管部、壊死部に CD68 陽性細胞はごくわずかにみられるのみであった。非治療群と比較し、近赤外線光 50J 照射群では、拡張血管周囲に類円形の CD68 陽性細胞が多くみられた。近赤外線光 50J 照射群の非拡張血管部、壊死部には CD68 陽性細胞がごくわずかにみられるのみであった。

腫瘍全体の CD68 陽性細胞密度を測定すると、抗体単独投与群 (0J) では CD68 陽性細胞の細胞密度は非治療群とほとんど変わらなかった (Fig.11b)。また、非治療群と比較し、近赤外線光照射群では CD68 陽性細胞の細胞密度は高い傾向がみられた。非治療群と比較し、近赤外線光 50J、100J 照射群では CD68 陽性細胞の細胞密度は有意に高かった。拡張血管周囲、非拡張血管周囲、壊死部の CD68 陽性細胞の密度を測定すると、抗体単独投与群では拡張血管周囲、非拡張血管周囲、壊死部で CD68 陽性細胞の密度はほとんど変わらなかったが、近赤外線光照射群では近赤外

線光の照射量によらず拡張血管周囲で細胞密度が最も高かった(Fig.11c)。

以上の結果より、近赤外線光照射により、CD68 陽性マクロファージが拡張血管周囲に集積することが示された。

## 考察

現在、日本では全国のがん治療施設において再発頭頸部癌を対象として第三相臨床試験が実施されている(10)。臨床試験により NIR-PIT の一定の治療効果が確認されているが、腫瘍の残存や疼痛、光線過敏症などさまざまな課題が報告されている(10)。NIR-PIT による腫瘍あるいは周囲正常組織の病理組織学的な変化については不明な点が多く、NIR-PIT による腫瘍微小環境への影響を病理組織学的に解明した報告は未だない。そこで本研究では NIR-PIT による腫瘍微小環境の変化を組織学的に解析し、治療効果の機序を明らかにすることを目的に研究を行った。

これまでにがん細胞を使用した *in vitro* での NIR-PIT による治療実験では、近赤外線光照射後数秒で細胞に形態学的変化を示し、破裂・壊死することが報告されている(11)。我々の解析では腫瘍壊死領域の割合は近赤外線照射 6 時間後までに変化はみられなかった。近赤外線光照射後 24 時間では腫瘍のおよそ 80%の領域に壊死を認めたと、腫瘍体積の減少は認めなかった。一般的に創傷治癒の過程において、壊死細胞は炎症期においてマクロファージを初めとした炎症細胞の貪食により処理されるが、治療後 24 時間では腫瘍の壊死が確認されるものの、マクロファージなどの炎症細胞による壊死細胞の貪食処理が追いつかず、腫瘍全体の体積に変化がなか

ったものと考えられる。抗体のみの投与でも、非治療群と比較し、一定の抗腫瘍効果  
を認めた報告(11)があるが、本実験においては、抗体のみの投与では抗腫瘍効果  
は確認できなかった。より詳細に残存した腫瘍細胞の形態学的変化について観察す  
るために EGFR の免疫組織化学染色を行なった。その結果、非治療群では全てのガ  
ン細胞の細胞膜に全周性に EGFR の発現を認めた。治療群では近赤外線光照射直  
後は残存腫瘍中心部のガン細胞においては、非治療群と同様に細胞膜に EGFR の  
発現を認めたが、壊死領域との境界部ではガン細胞の細胞膜の一部で EGFR の発  
現がみられなかった。このことから近赤外線照射直後にガン細胞の細胞膜に膜タン  
パクの発現の変化がみられることが示された。さらに時間が経過すると、細胞膜に障  
害はみられないが、核が消失した壊死細胞と考えられる細胞が認められた。核が消  
失した細胞は近赤外線光照射後 6 時間群において最も多く確認できた。近赤外線光  
照射後 24 時間群の残存腫瘍部には、核の消失を示すがン細胞はみられなかった。  
このことから近赤外線光照射 24 時間後には壊死細胞はマクロファージなどによって  
すでに排除され、標本上では観察されないと考えられる。

我々の実験結果からはこれまでの報告のような近赤外線照射直後の細胞の破壊  
は観察されないが、生体内の腫瘍組織においては、腫瘍に近赤外線が到達するまで

に皮膚や線維組織が介在することから、腫瘍の破壊が起きるまでに時間がかかることが考えられる。また、近赤外線光照射後には、細胞の形態は保たれているが核が消失している凝固壊死に類似した組織像を示すがん細胞がみられるが、このような細胞死をおこした細胞は形態が保たれているため、腫瘍体積や壊死領域の割合が変わらないような結果になったと考えられる。

近赤外線光は人体に無害であり、照射量の制限は必要ないと考えられている。本研究では近赤外線光照射群においては、照射量依存的に壊死領域の増大が認められた。これは近赤外線の照射エネルギーが増大するに従い、近赤外線光と IR-700 との反応が増加するためと考えられる。NIR-PIT では近赤外線光による直接的な細胞傷害のみならず、近赤外線光と IR700 の化学反応により活性酸素（ROS）が産生され(12)、この活性酸素が抗腫瘍効果を増幅させることが報告されている。本研究では1抗体当たり IR700 が3つ以上付着していることが、Pan-IR700 生成時に確認されている。近赤外線光と IR700 との反応数が多いほど、近赤外線光による直接的な細胞傷害数も多くなり、また活性酸素（ROS）の産生も多くなるため、抗腫瘍効果が増強されることが示唆される。

近赤外線光のエネルギーが大きいほど、組織深部到達性は向上することが報告

されている(13)。近赤外線光 100J 照射 24 時間後には残存腫瘍が腫瘍深部にのみ認められ、皮膚側にはほとんどみられなかった。このことから 100J の近赤外線光では組織の厚みによりがん細胞への到達量が減弱し、腫瘍深部のがん細胞を完全に破壊することができなかったと考えられる。100J を2回照射した群においては抗体投与 24 時間後に初回の近赤外線光 100J を照射しており、さらに 24 時間後に 100J を照射している。初回の近赤外線光照射後、腫瘍に付着していた Pan-IR700 のほとんどは消失すると考えられているが、血中に循環している抗体（半減期は 96 時間程度）が腫瘍に再付着するまでの時間は 24 時間後と考えられているので、1 回照射群と 2 回照射群で腫瘍あたりの抗体の付着数に大差はないと推測できる。しかし、近赤外線光単回照射群と 2 回照射群において壊死領域割合は変化がなく、2 回目の照射後も単回照射群と同様に深部に腫瘍が残存している。このことから 100J の近赤外線光は腫瘍深部のがん細胞まで到達しないことが推測される。

我々はこれまでに腫瘍微小環境における血管新生の機序・変化を報告している(14)。NIR-PIT は抗体-IR700 複合体が結合しない細胞に影響はないと報告されているが(15)、NIR-PIT による腫瘍血管への影響が本当にみられないのか確認するため、NIR-PIT 前後の腫瘍血管の性質の変化を評価することとした。

これまでに腫瘍血管の正常化により腫瘍血管の周皮細胞被覆率の割合が増加することが報告されている(15)。そこで腫瘍血管の性質を周皮細胞被覆率の割合で評価することとした。非治療群と比較し、治療群における腫瘍血管の周皮細胞被覆率にはほとんど差は認めなかった。非治療群、治療群ともに周皮細胞の被覆がないもしくは僅かに被覆している未熟な血管が約7割に上った。この結果から NIR-PIT は血管周皮被覆率に影響を与えないことが示された。

血管の形態を観察すると非治療群と比較し、NIR-PIT 治療群で内腔がみられる拡張血管の割合が増加しており、NIR-PIT により血管が拡張していることが示された。血管が拡張した理由としては、腫瘍の壊死が進行したことにより腫瘍血管に対する組織間圧から解放されたことが示唆された。しかし近赤外線光照射後6時間までは腫瘍壊死領域は非治療群と比較しほとんど変わらないが、近赤外線光照射後1時間で拡張血管の割合が増加しており、この時点での血管拡張に腫瘍組織間圧の開放が関与したとは考えにくい。そこで近赤外線光照射直後には近赤外線光により発生する熱により、腫瘍血管が拡張したのではないかと考えた。また、近赤外線光は組織の厚みにより減弱すると考えられることから、より近赤外線光の効果が高いと考えられる皮膚側に拡張血管がみられるようになったと考えられた。非治療群と Pan-IR700 単

独投与群では拡張血管は腫瘍深部にのみみられ、非治療群と比較し Pan-IR700 単独投与群では拡張血管の割合はわずかに増加するのみであり、近赤外線光照射による熱が加わっていないためと考えられた。

本研究ではヌードマウス (BALB/c AJcl-nu/nu) を使用しているため、成熟 T リンパ球の評価はできないが、評価が可能であるマクロファージの集積を評価した。経時的に組織を観察すると、時間依存的にマクロファージの増加を認め、特に拡張血管部においてマクロファージの集積を認めた。マクロファージの集積は腫瘍血管が拡張したことで、拡張血管周囲への単球の輸送が容易になったためと考えられた。しかし、拡張血管周囲のみならず、非拡張血管周囲でも非治療群と比較し、治療群でマクロファージの増加が認められた。マクロファージは組織修復の際に組織損傷直後に損傷部の血管に引き寄せられ、修復プロセスに関連していることが報告されている (16)。損傷部に集積したマクロファージは VEGF を供給し、修復の初期段階において創傷部位で血管新生を促進することが報告されている。このことからマクロファージが拡張血管を経て腫瘍部に到達し、損傷部の拡張血管あるいは非拡張血管に引き寄せられ集積していると考えられた。

本研究では、NIR-PIT により腫瘍の壊死がみられたが、腫瘍深部に腫瘍の残存が

みられた。近赤外線光が腫瘍深部のがん細胞に到達しなかったことが示唆されるため、近赤外線光の照射強度の調節により腫瘍を完全に消失させることは可能であると考えられる。また、今回は細胞性免疫を欠くヌードマウスを用いたため、免疫の活性化による抗腫瘍効果の増強について検討することができなかった。今後は免疫能を有するマウスに腫瘍を移植する系を用いて、自己免疫の活性化による抗腫瘍効果の増強により、今回と同様の NIR-PIT の治療条件でも腫瘍を完全に消失させることができるかどうか検討する必要がある。本研究では腫瘍部以外の正常組織に損傷はみられなかったが、ヒトの腫瘍をヌードマウスに移植した系を用いて、ヒトの EGFR 抗体を NIR-PIT 治療に使用したため、マウスの正常組織に与える影響についての検証は不可能である。これを検証するため、免疫能を有するマウスに腫瘍を移植し、マウスの抗体を使用した実験を行いたいと考えている。

## 結論

本研究から、NIR-PIT 治療後早期に腫瘍微小環境の変化が生じることが示された。

今後は NIR-PIT により腫瘍微小環境に変化が生じる要因を解明し、より効果的な治

療法の開発に繋げていきたい。

## 謝辞

本研究に多大なるご支援とご協力をいただきました北海道大学大学院歯学研究院 口腔

病態学分野血管生物分子病理学教室 樋田京子教授、松田彩助教、間石奈湖助教

ならびに血管生物分子病理学教室 教室員各位，北海道大学大学院薬学研究院生態

分析化学教室 小川美香子教授ならびに中島孝平助教、北海道大学大学院歯学研

究院口腔病態学分野口腔顎顔面外科教室 鄭漢忠名誉教授、大廣洋一教授ならびに

教室員各位，北海道大学大学院医学院外科学講座呼吸器外科学教室元准教授、藤

田医科大学医学部呼吸器外科学教授 樋田泰浩先生に厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

1. 縄田 修一 . がん化学療法における副作用と対応. 薬剤学, 2007 ; 67 : 121-124.
2. 猪爪 隆史. 免疫チェックポイント阻害剤の効果と副作用, 日本皮膚科学会雑誌, 2018, 128, 6 , 1291-1299
3. 門野 岳史 . 免疫チェックポイント阻害剤による免疫関連副作用の実際, 日本臨床免疫学会会誌, 2017, 40 , 2, p. 83-89
4. 奥仲 哲弥, 坂庭 信行, 臼田 実男, 池田 徳彦, がんにおける光線力学的療法 (PDT)の現状, レーザー研究, 2011, 39, 2 , p. 101-105
5. 玉置 将司, 大橋 真也, 廣橋 研志郎, 吉岡 正博, 天沼 裕介, 武藤 学, レザフィリン PDT における光線過敏症対策, 日本レーザー医学会誌, 2019-2020, 40 巻, 1号, p. 62-66
6. Andreas .P Berger, Hannes Steiner, Arnulf Stenzl, Thomas Akkad, Georg Bartsch, Lorenz Holtl , Photodynamic therapy with intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid for patients with recurrent superficial bladder cancer: a single-center study ,2003 ,

7. Mitsunaga, M., Ogawa, M., Kosaka, N. et al. Cancer cell-selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules. *Nat Med* 2011. 17, 1685–1691
8. Mikako Ogawa, Hisataka Kobayashi . et al. Immunogenic cancer cell death selectively induced by near infrared photoimmunotherapy initiates host tumor immunity. *Cancers* 2020, 12 , 12 , 3747
9. Hiroaki Wakiyama , Peter L. Choyke and Hisataka Kobayashi. et al. Increased Immunogenicity of a Minimally Immunogenic Tumor after Cancer – Targeting Near Infrared Photoimmunotherapy *Cancers* . 2020, 12, 3747
10. David M. Cagnetti MD et al. Phase 1/2a, open-label, multicenter study of RM-1929 photoimmunotherapy in patients with locoregional, recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *HEAD NECK*. 2020, 43. 3875
11. Kimihiro Ito, Hisataka Kobayashi and Hisao Tajiri et al. Molecular targeted photoimmunotherapy for HER2-positive human gastric cancer in combination with chemotherapy results in improved treatment outcomes through different cytotoxic mechanisms. *BMC Cancer*. 2016. 16:37

- 1 2. Reema Railkar , Hisataka Kobayashi , and Piyush K. Agarwal et al.  
Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) – targeted Photoimmunotherapy  
(PIT) for the Treatment of EGFR-expressing Bladder Cancer . Mol Cancer Ther.  
2017. 16. 10. 2201–2214.
- 1 3. Fuyuki F. Inagaki, Peter L Choyke, and Hisataka Kobayashi , Fluorescence  
Imaging of Tumor – Accumulating Antibody–IR700 Conjugates Prior to Near–  
Infrared Photoimmunotherapy (NIR–PIT) Using a Commercially Available Camera  
Designed for Indocyanine Green . Mol. Pharmaceutics 2021, 18, 3, 1238–1246
- 1 4. Kyoko Hida, Taisuke Kawamoto, Noritaka Ohga, Kosuke Akiyama, Yasuhiro  
Hida, Masanobu Shindoh. Altered angiogenesis in the tumor microenvironment.  
Pathology International, 2011. 61. 630–637
- 1 5. Hisataka Kobayashi and Peter L. Choyke . Near–Infrared  
Photoimmunotherapy of Cancer . Acc. Chem. Res. 2019, 52, 8, 2332–2339
- 1 6. David B Gurevich , et al. Live imaging of wound angiogenesis reveals  
macrophage orchestrated vessel sprouting and regression. The EMBO Journal.  
2018. 37. e97786

## 図の説明

### Figure 1. SAS における EGFR の発現

- (a) MS1, A431, SAS における EGFR 発現量を FACS により評価した。
- (b) SAS 皮下移植モデルの腫瘍組織における EGFR の発現を組織免疫染色により評価した (左図ルーペ像: Scale bar = 2.5mm 右図強拡大像(対物 100 倍 油浸): Scale bar = 50  $\mu$ m)。

### Figure 2. NIR-PIT 後 24 時間以内には腫瘍の縮小は認めなかった

- (a) In vivo 実験 プロトコール
- (b) 担癌マウスの近赤外線光照射前後におけるがん細胞由来蛍光シグナルの in vivo イメージング装置 IVIS による検出画像
- (c) NIR-PIT 後 24 時間以内の腫瘍体積の測定結果 (n=3~4)
- (d) 異なる近赤外線光照射量による腫瘍体積の測定結果 (n=4)

**Figure 3. NIR-PIT により腫瘍壊死領域は拡大した**

(a) Control (非治療群)、近赤外線照射 0 時間後、1 時間後、6 時間後、24 時間後の腫瘍の H E 染色像

左から腫瘍全体像 (赤線:腫瘍全体、黄線:壊死領域)、腫瘍部拡大像 (対物 40 倍, Scale bar: 50  $\mu$  m)、壊死領域拡大像 (対物 40 倍, Scale bar : 50  $\mu$  m)

(b) 各群の経時的な腫瘍壊死領域の定量解析結果 (n=3~4)

全体の腫瘍面積に占める壊死領域面積の割合からグラフを作成した。

**Figure 4. 近赤外線光照射量依存的に腫瘍壊死領域は拡大した**

(a) Control (非治療群)、0J、50J、100J の近赤外線光を 1 回照射した群、100J の近赤外線光を 2 回照射した群の腫瘍の H E 染色像

左から、腫瘍全体像 (赤線:腫瘍全体、黄線:壊死領域)、腫瘍部拡大像 (対物 40 倍, Scale bar: 50  $\mu$  m)、壊死領域拡大像 (対物 40 倍, Scale bar : 50  $\mu$  m)

(b) 異なる近赤外線光照射量における腫瘍壊死領域の定量解析結果 (n=4)

全体の腫瘍面積に占める壊死領域面積の割合からグラフを作成した。

## Figure 5. NIR-PIT により腫瘍血管は拡張した

(a) Control (非治療群)、近赤外線照射 0 時間後、1 時間後、6 時間後、24 時間後の腫瘍の CD31 免疫組織染色像

左から各群の CD31 免疫染色像 (対物 40 倍, Scale bar : 50  $\mu$  m)、ルーペ像 (赤線: 腫瘍全体、黄線: 壊死領域、橙塗りつぶし: 拡張血管分布領域):

(b) NIR-PIT 後の経時的な腫瘍血管面積の割合の定量解析結果 (n=3~4)

残存腫瘍面積に対する腫瘍血管面積の割合からグラフを作成した。

(c) 腫瘍部における拡張血管数の割合

残存腫瘍部の腫瘍血管の総数における拡張血管の割合からグラフを作成した。

## Figure 6. NIR-PIT により腫瘍血管は拡張した

(a) Control (非治療群)、近赤外線光 0J、50J、100J を 1 回照射した群、100J を 2 回照射した群の CD31 免疫組織染色像

左から各群の CD31 陽性血管像 (対物 40 倍, Scale bar : 50  $\mu$  m)、拡張血管分布領

域（赤線：腫瘍全体、黄線：壊死領域、橙塗りつぶし：拡張血管分布領域，Scale bar：2.5mm）

(b) NIR-PIT 後の経時的な腫瘍血管面積の割合の定量解析結果（n=3~4）

残存腫瘍面積に対する腫瘍血管面積の割合からグラフを作成した。

(c) 腫瘍部の拡張血管数の割合

残存腫瘍部の腫瘍血管の総数における拡張血管の割合からグラフを作成した。

#### Figure 7. NIR-PIT 早期では腫瘍血管の性質に変化がなかった

(a) Control(非治療群)、近赤外線照射 0 時間後、1 時間後、6 時間後、24 時間後の CD31、 $\alpha$  SMA 免疫組織二重染色像（対物 40 倍, Scale bar：50  $\mu$  m、茶：CD31 陽性領域，赤： $\alpha$  SMA 陽性領域）

左：拡張血管部 右：非拡張血管部

(b) NIR-PIT 後の経時的な腫瘍血管面積の割合の定量解析（n=3~4）

位相差顕微鏡強拡大下（対物 20 倍）において CD31 陽性血管周囲の  $\alpha$  SMA 陽性

周皮細胞被覆率を4段階（0-25%、26-50%、51-75%、76-100%）に分け、それぞれの血管数割合の平均値からグラフを作成した。

Figure 8. NIR-PIT 早期に腫瘍血管の性質に変化がなかった

(a) Control（非治療群）、近赤外線光 0J、50J、100J を 1 回照射した群、100J を 2 回照射した群の CD31、 $\alpha$  SMA 免疫組織二重染色像（対物 40 倍, Scale bar : 50  $\mu$  m、茶:CD31 陽性領域 , 赤:  $\alpha$  SMA 陽性領域）

左: 拡張血管部 右: 非拡張血管部

(b) NIR-PIT 後の腫瘍血管面積の割合の定量解析（n=3~4）

位相差顕微鏡強拡大下（対物 20 倍）において CD31 陽性血管周囲の  $\alpha$  SMA 陽性周皮細胞被覆率を4段階（0-25%、26-50%、51-75%、76-100%）に分け、それぞれの血管数割合の平均値からグラフを作成した。

Figure 9. NIR-PIT 直後に腫瘍細胞に障害が生じた

(a) Control（非治療群）、近赤外線照射 0 時間後、1 時間後、6 時間後、24 時間後の EGFR 免疫組織染色像（対物 100 倍,油浸 , Scale bar : 50  $\mu$  m）

(b) Control (非治療群)、近赤外線光 0J、50J、100J を 1 回照射した群、100J を 2 回照射した群の EGFR 免疫組織染色像 (対物 100 倍, 油浸, Scale bar : 50  $\mu$  m)

Figure 10. NIR-PIT により経時的にマクロファージの集積が増加した

(a) Control (非治療群)、近赤外線照射 0 時間後、6 時間後、24 時間後の CD31 免疫組織染色像 (拡張血管部、非拡張血管部、壊死部) (対物 40 倍, Scale bar : 50  $\mu$  m)、CD68 免疫染色像 (拡張血管部、非拡張血管部、壊死部) (対物 40 倍, Scale bar : 50  $\mu$  m)

(b) 腫瘍全体における CD68 陽性細胞数を総腫瘍面積で割り、平均値をグラフ化した (DUNNETT 検定: \* P<0.05 vs control)

(c) 各群における拡張血管部、非拡張血管部、壊死部の CD68 陽性細胞密度の平均値をグラフ化した (DUNNETT 検定: \* P<0.05(vs 拡張血管 control), + P<0.05(vs 非拡張血管 control), ★P<0.05(vs 壊死部 control))

Figure 11. NIR-PIT によりマクロファージの集積が増加した

(a) Control (非治療群)、近赤外線光 0J、50J、100J を 1 回照射した群、100J を 2 回照射した群の CD31 免疫組織染色像 (拡張血管部、非拡張血管部、壊死部) (対物 40 倍, Scale bar : 50  $\mu$  m)、CD68 免疫染色像 (拡張血管部、非拡張血管部、壊死部) (対物 40 倍, Scale bar : 50  $\mu$  m)

(b) 腫瘍全体の CD68 陽性細胞数を総腫瘍面積で割った平均値をグラフ化した

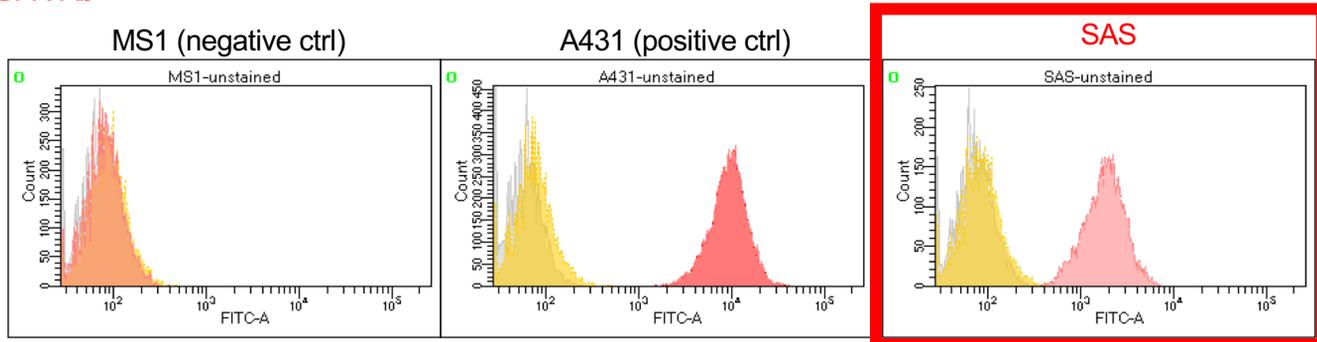
(DUNNETT 検定: \* P<0.05 vs control )

(c) 各群の拡張血管部、非拡張血管部、壊死部における CD68 陽性細胞密度の平均値をグラフ化した ( DUNNETT 検定: \* P<0.05(vs 拡張血管 control), + P<0.05(vs 非拡張血管 control), ★P<0.05(vs 壊死部 control) )

Fig.1 SASの細胞膜にEGFRの発現を認めた

(a) FACS

Unstained  
Isotype Ctrl  
 $\alpha$ EGFR-Ab



(b) IHC EGFR

SAS IHC  
Brown : DAB

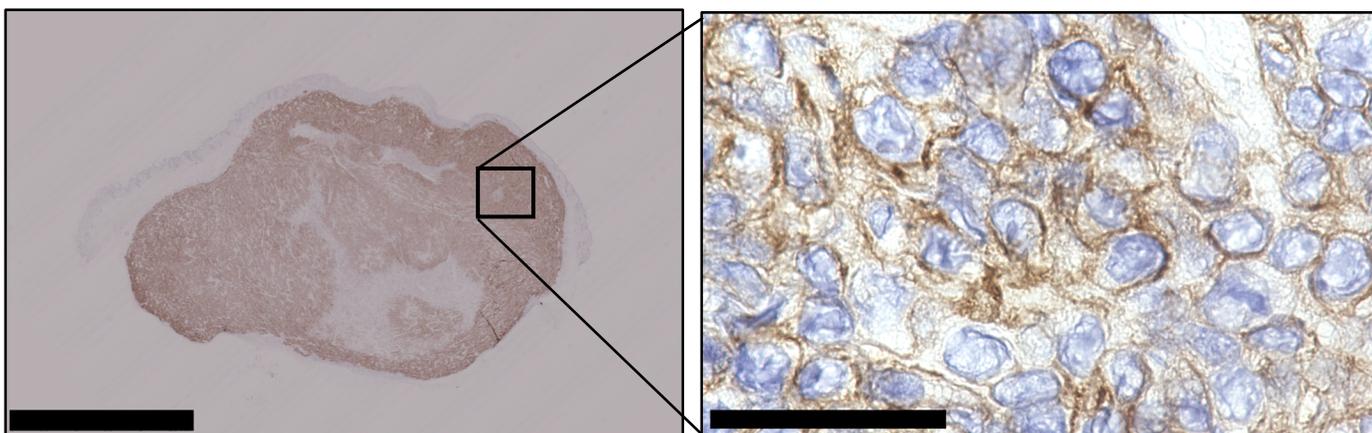
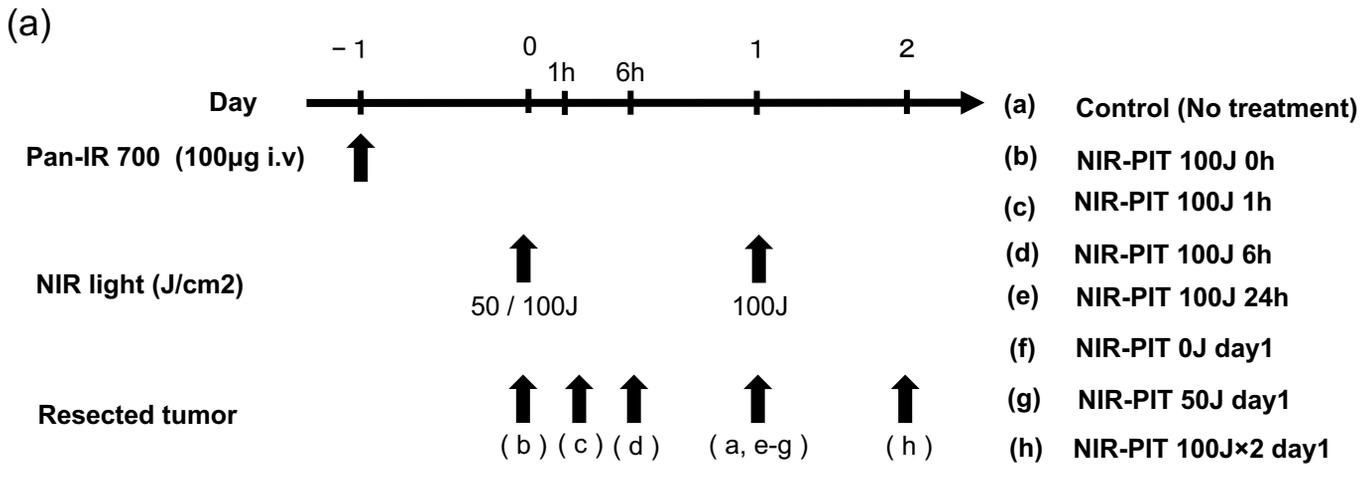
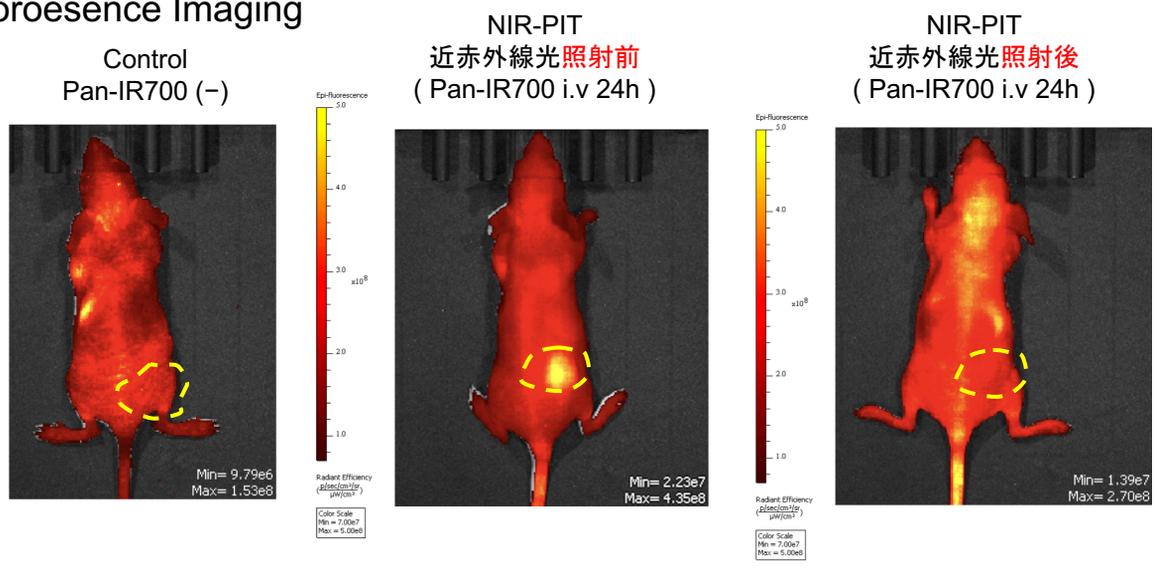


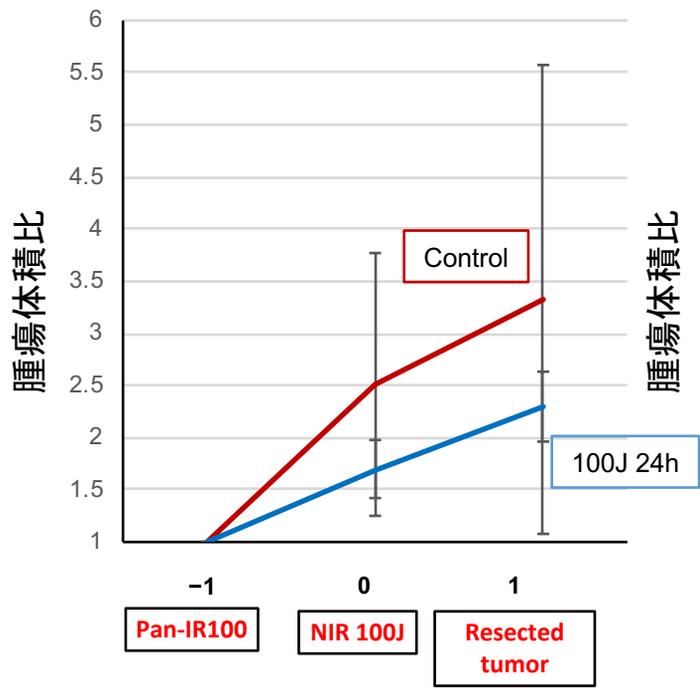
Fig.2 : NIR-PIT後24時間以内では腫瘍体積の減少は認めなかった



(b) Fluorescence Imaging



(c) Tumor growth curve



(d) Tumor growth curve

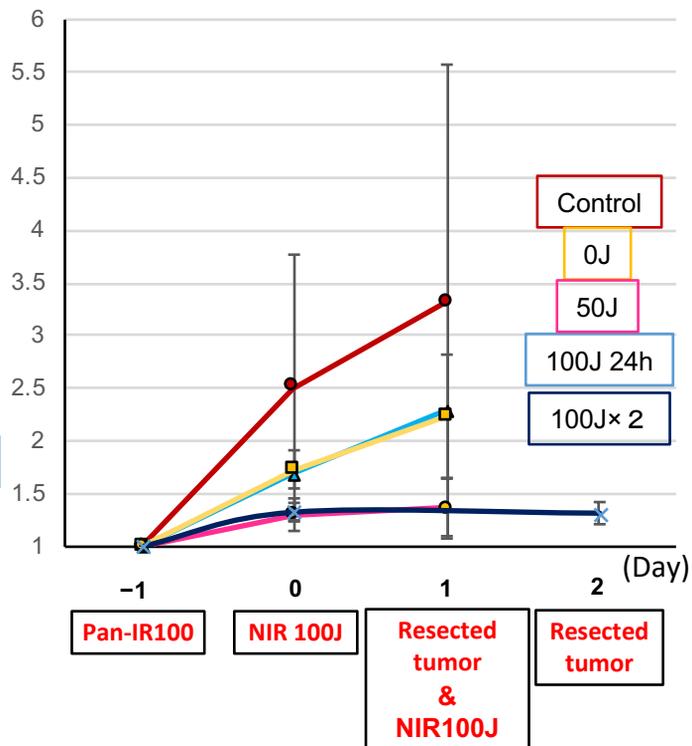


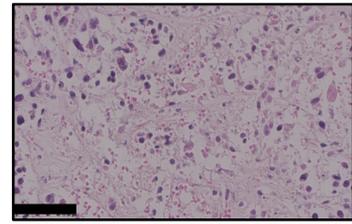
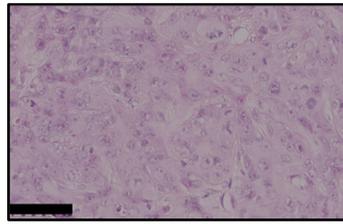
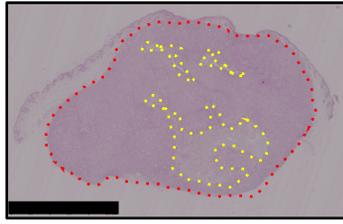
Fig.3 NIR-PITにより腫瘍壊死領域は拡大した

(a) HE染色像

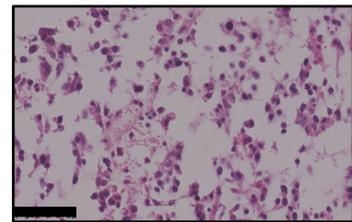
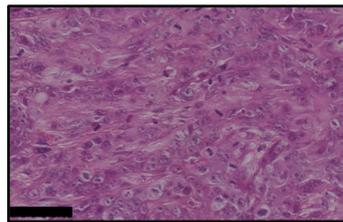
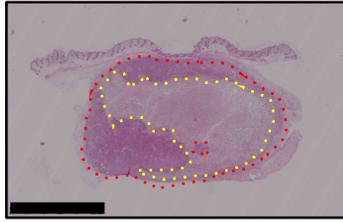
腫瘍部

壊死部

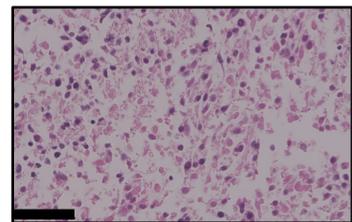
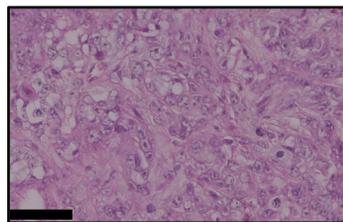
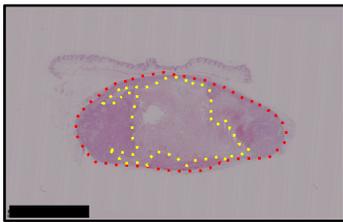
Control



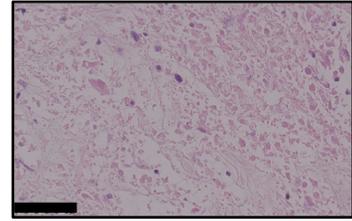
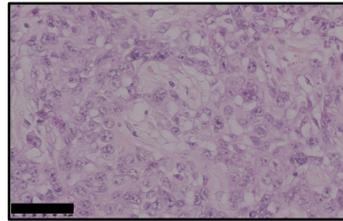
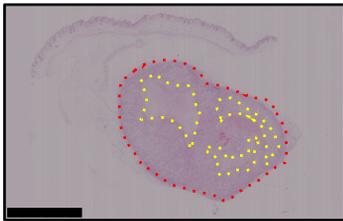
0h



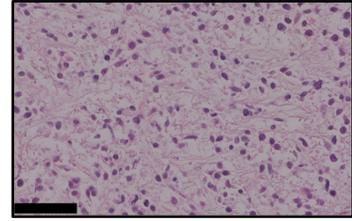
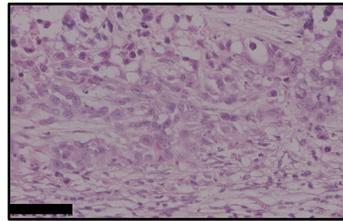
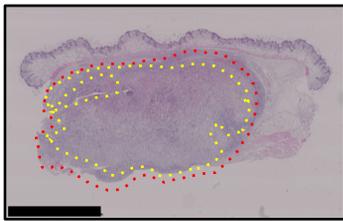
1h



6h



24h



( scale bar : 2.5mm )

( scale bar : 50 μm )

( scale bar : 50 μm )

(b) 腫瘍壊死領域 (%)

■ NIR-PIT

□ Control

HE staining

Necrosis area × 100 (%)

—————  
Total tumor area

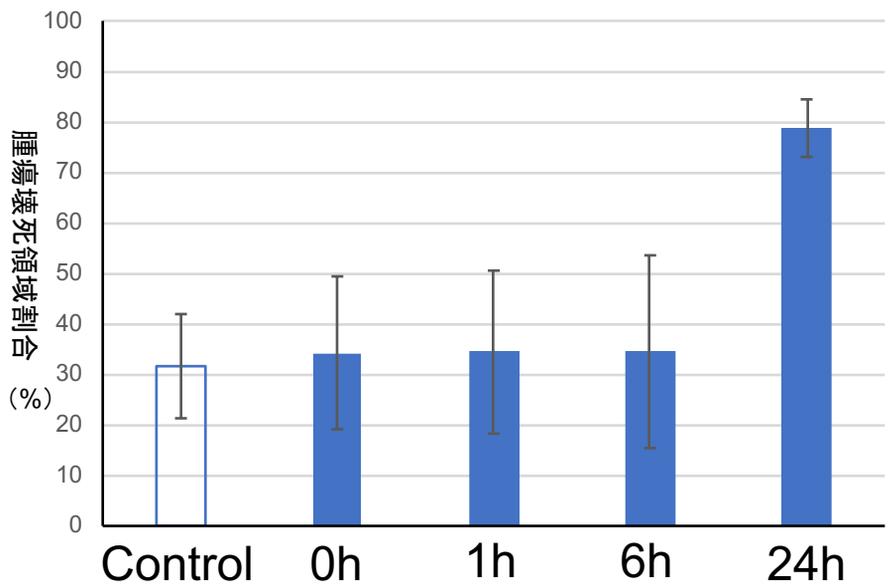
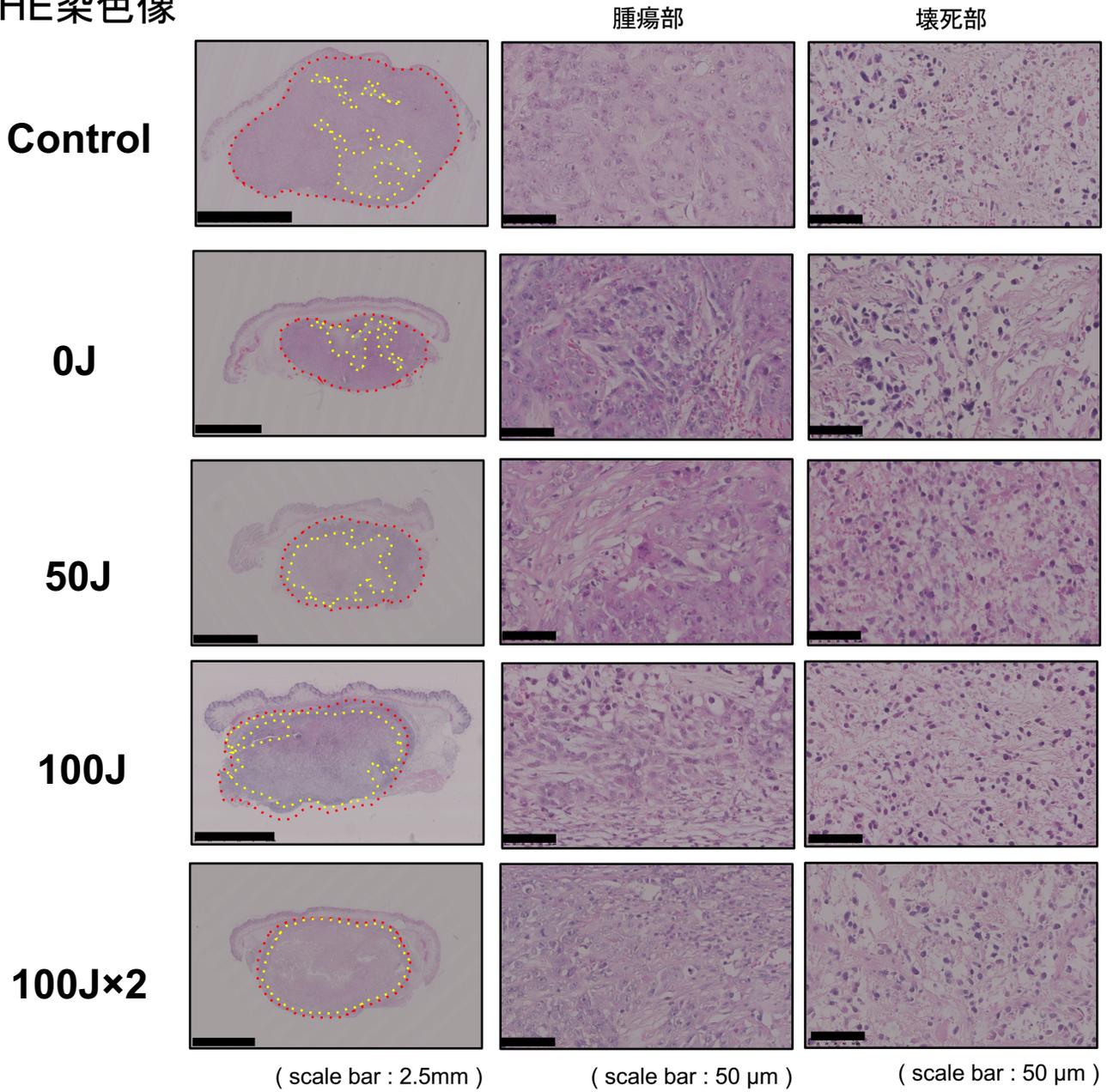


Fig.4 照射量依存的に腫瘍壊死領域は拡大した

(a) HE染色像



(b) 腫瘍壊死領域 (%)

■ NIR-PIT  
□ Control

HE staining

Necrosis area × 100 (%)

—————  
Total tumor area

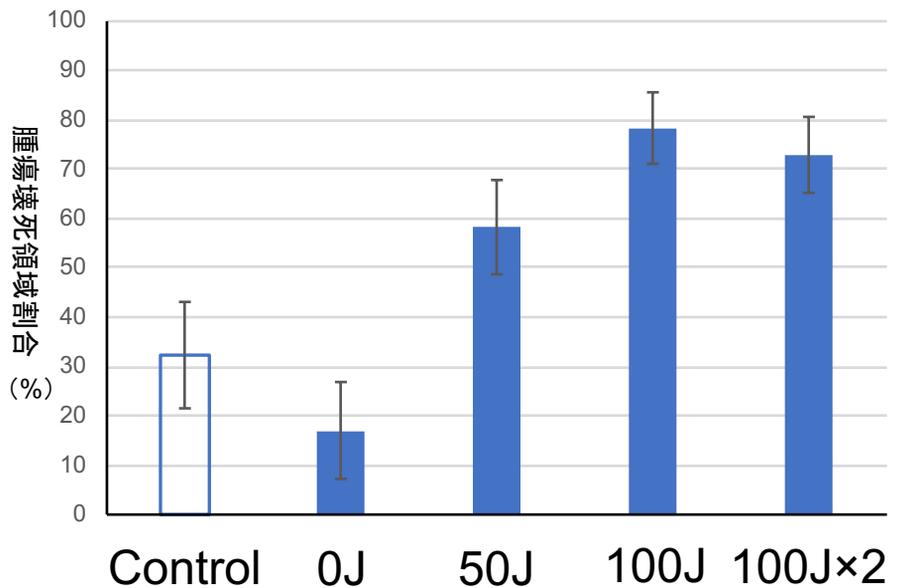


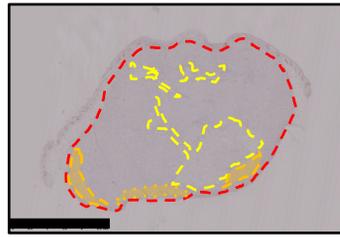
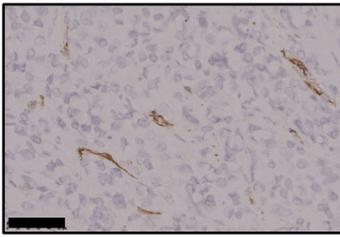
Fig.5 NIR-PITにより腫瘍血管は拡張した

(a) IHC CD31

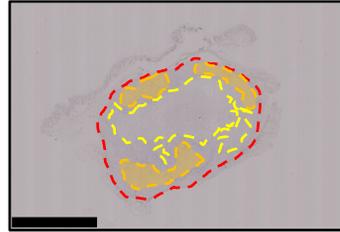
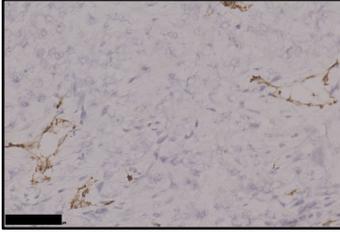
拡張血管

拡張血管領域

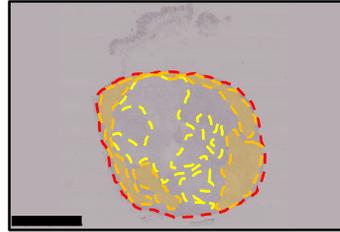
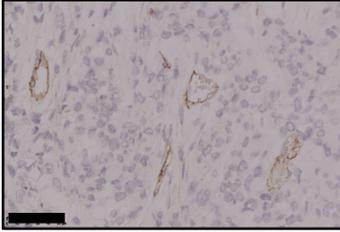
Control



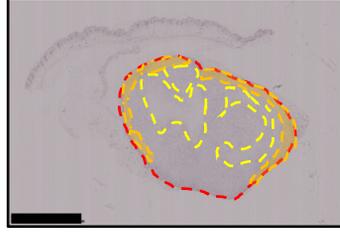
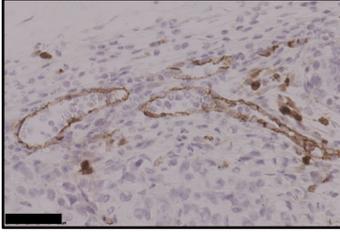
0h



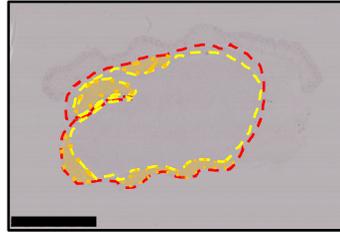
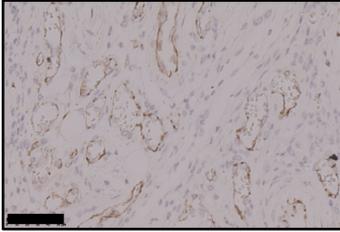
1h



6h



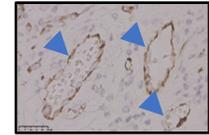
24h



腫瘍領域

壊死領域

拡張血管領域



拡張血管：  
管腔構造を成している血管

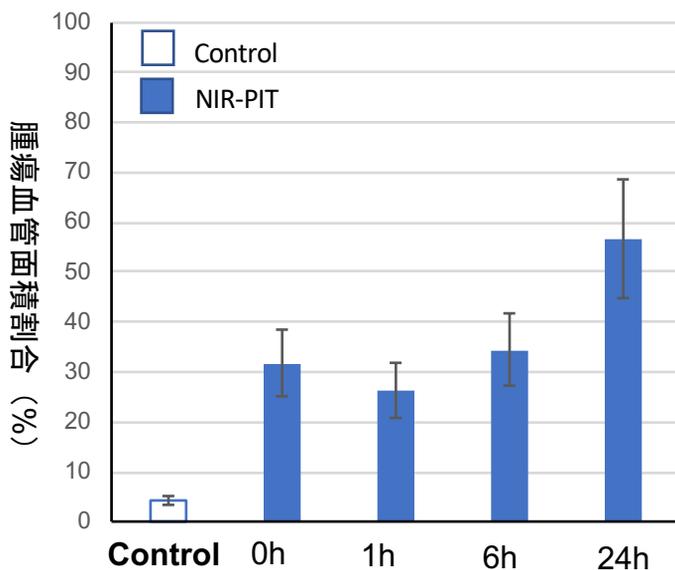
• DOI: [10.1016/j.clinimaq.2020.06.029](https://doi.org/10.1016/j.clinimaq.2020.06.029)

CD31陽性拡張血管数  
/ CD31陽性血管数の割合を測定した

( scale bar : 50 μm )

( scale bar : 2.5mm )

(b) 腫瘍部の血管面積



(c) 腫瘍部の拡張血管割合

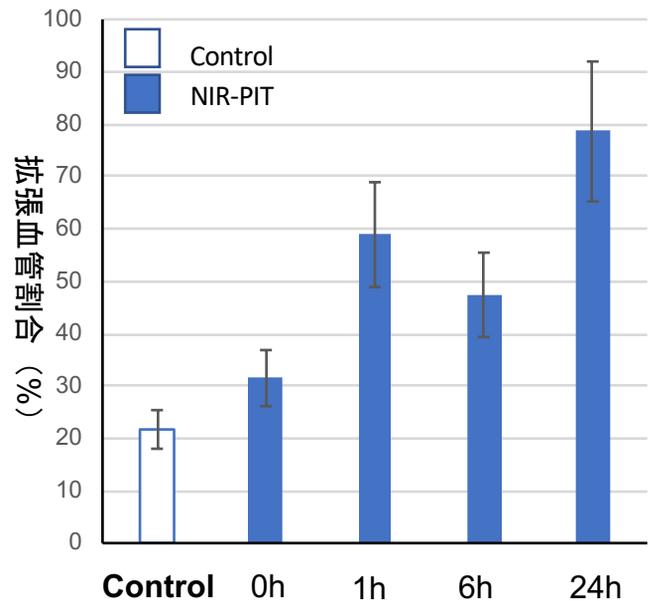


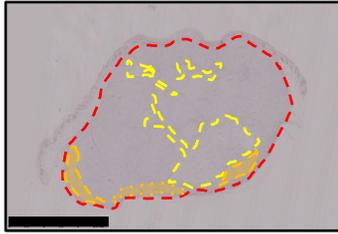
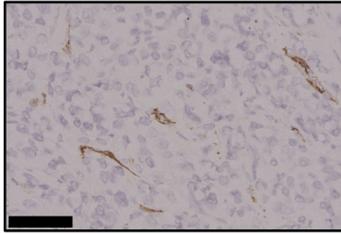
Fig.6 NIR-PITにより腫瘍血管は拡張した

(a) IHC CD31

腫瘍血管部

拡張血管領域

Control

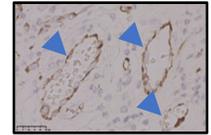
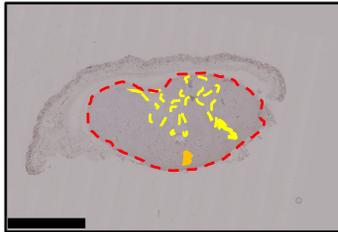
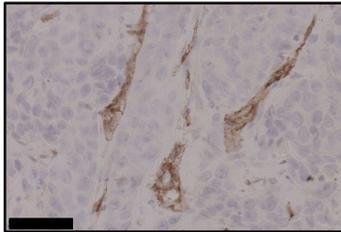


腫瘍領域

壊死領域

拡張血管領域

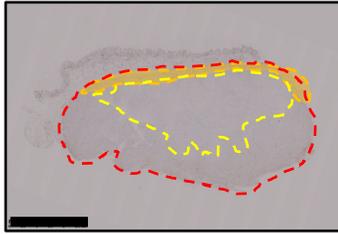
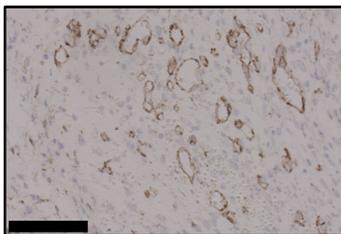
0J



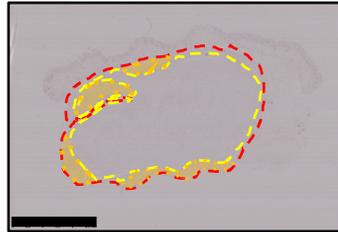
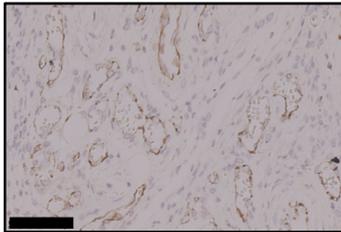
拡張血管：  
管腔構造を成している血管

• DOI: [10.1016/j.clinimaq.2020.06.029](https://doi.org/10.1016/j.clinimaq.2020.06.029)

50J

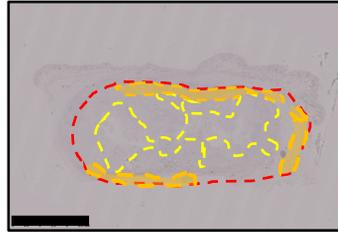
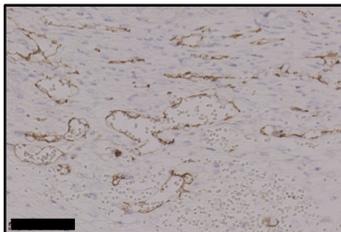


100J



CD31陽性拡張血管数  
/ CD31陽性血管数の割合を測定した

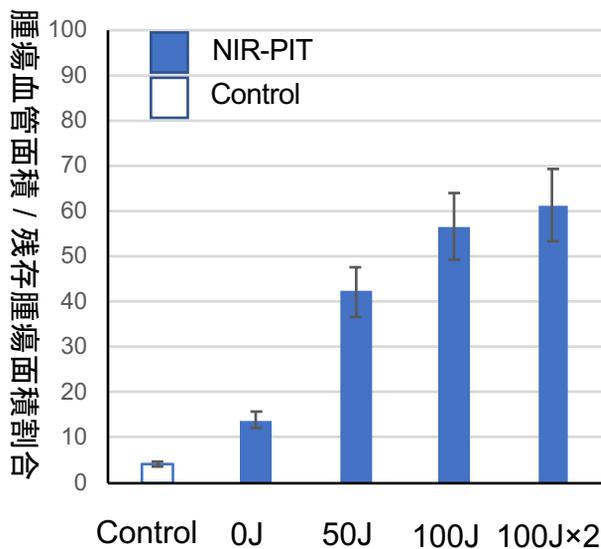
100J×2



( scale bar : 50 μm )

( scale bar : 2.5mm )

(b) 腫瘍部の血管面積



(c) 腫瘍部の拡張血管割合

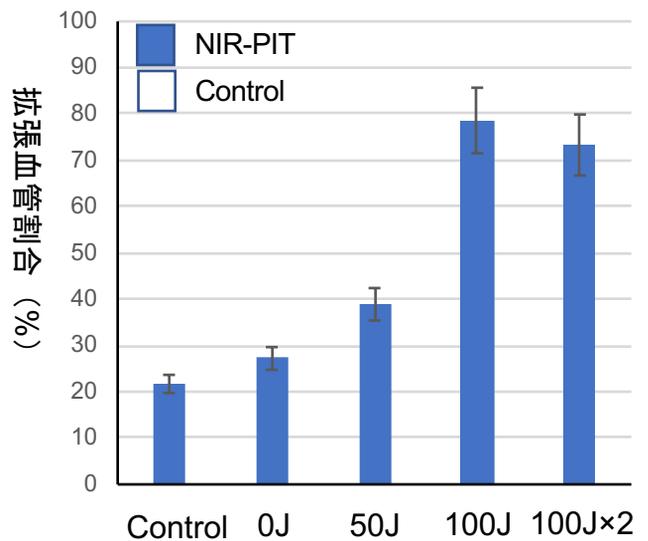
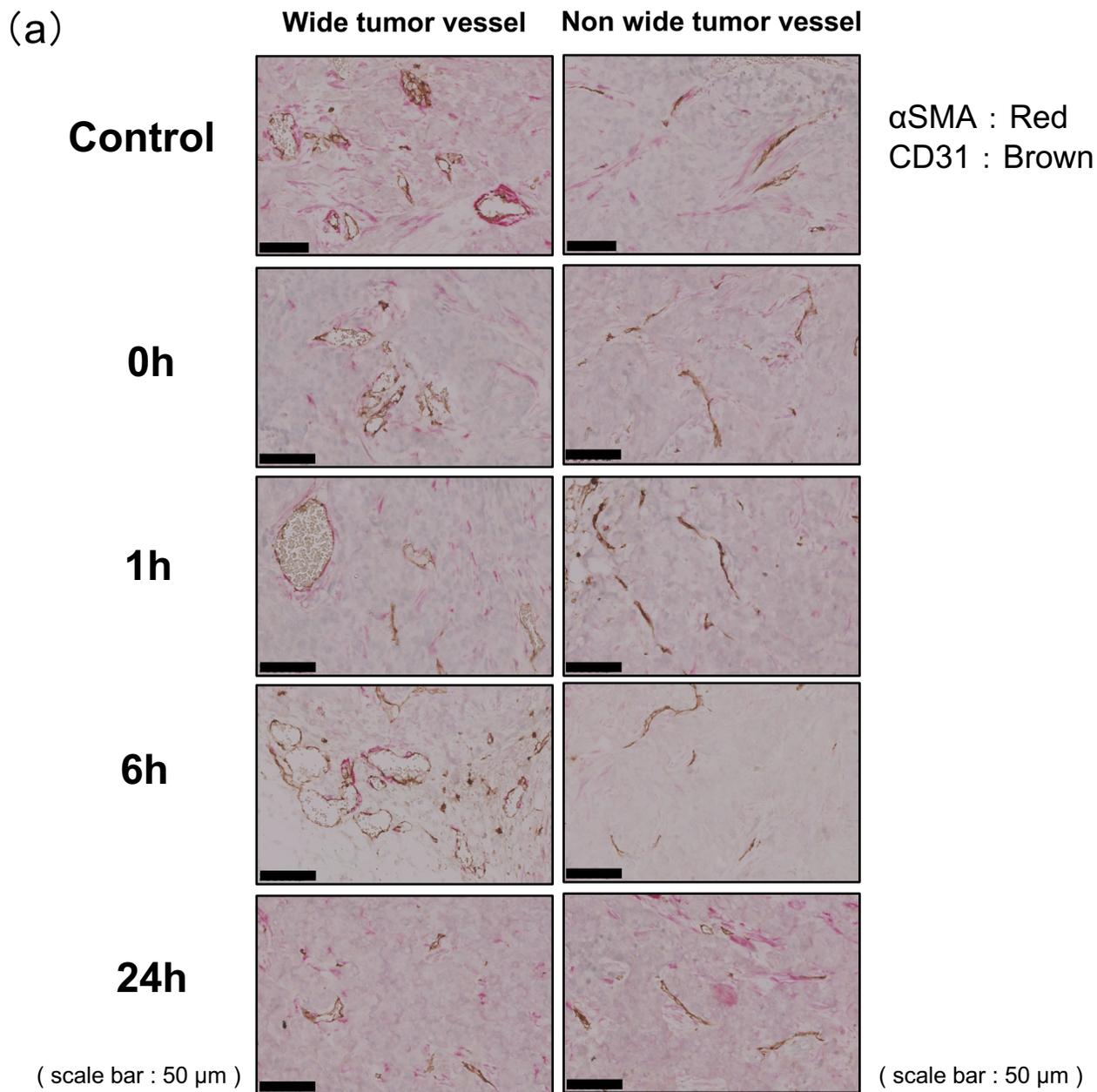


Fig.7 NIR-PIT早期に腫瘍血管の性質に変化がなかった



(b)

### 血管周皮細胞の被覆率

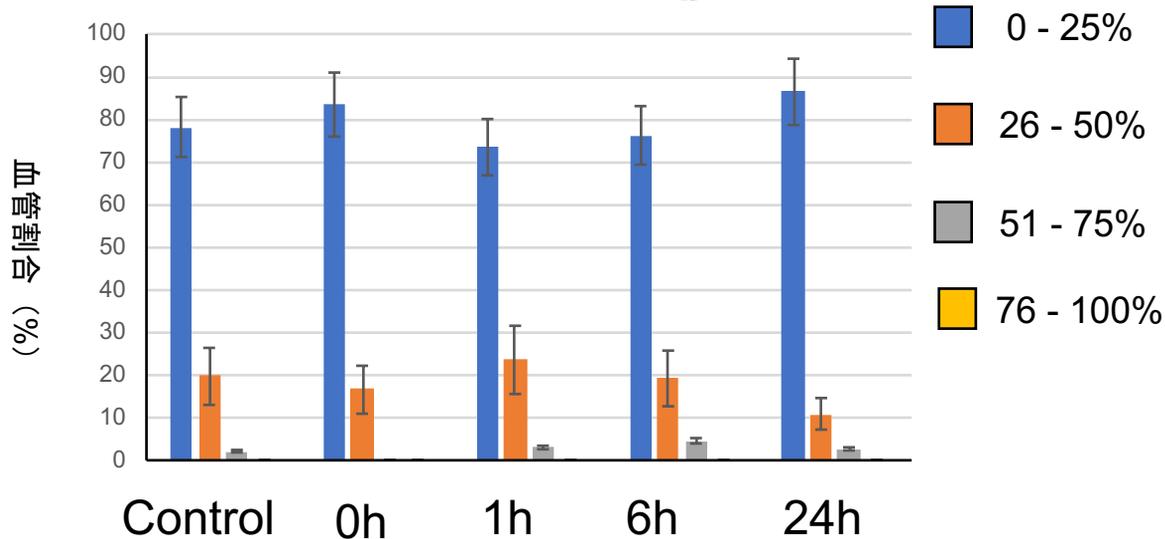
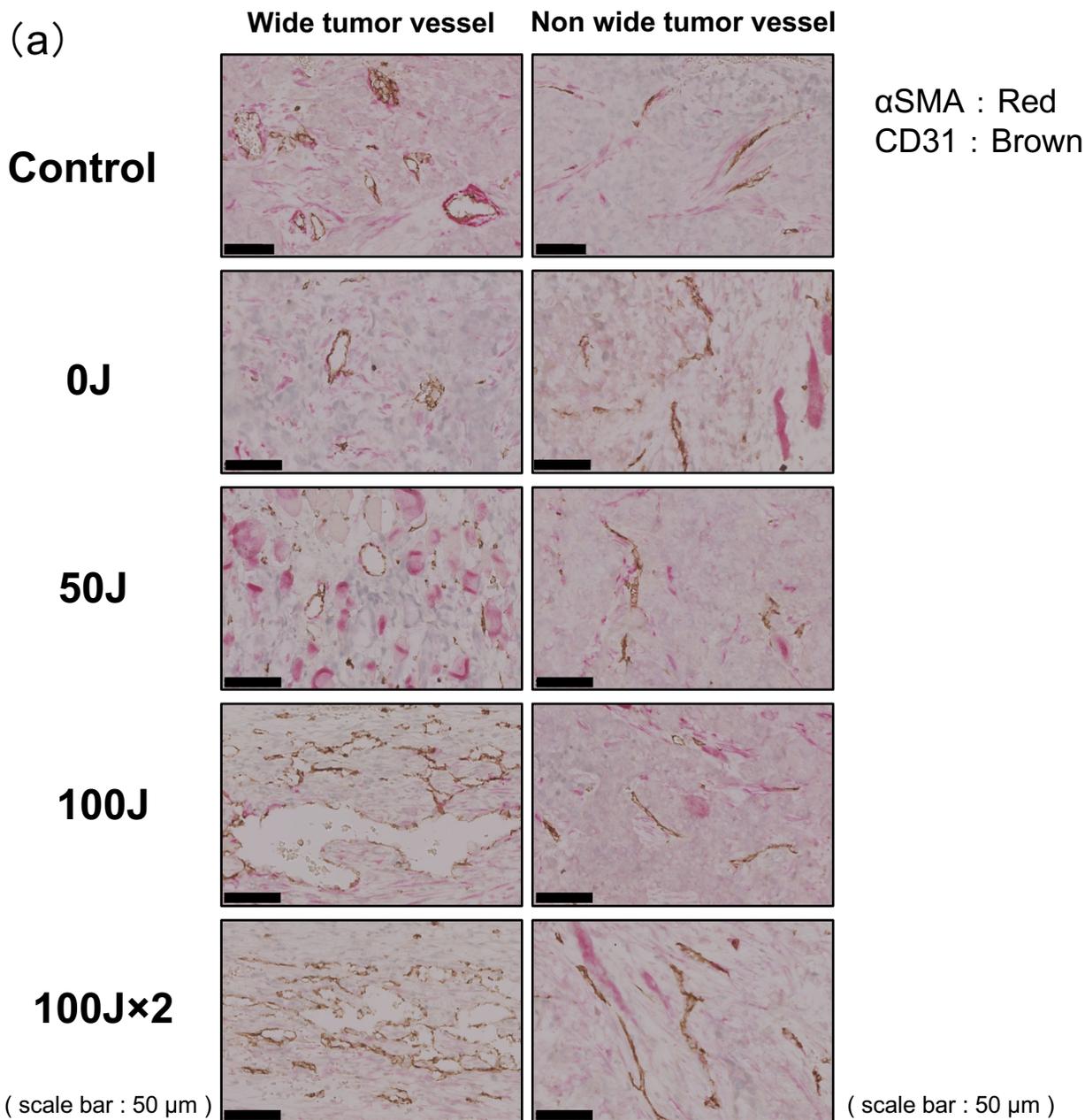


Fig.8 NIR-PIT早期に腫瘍血管の性質に変化がなかった



(b)

### 血管周皮細胞の被覆率

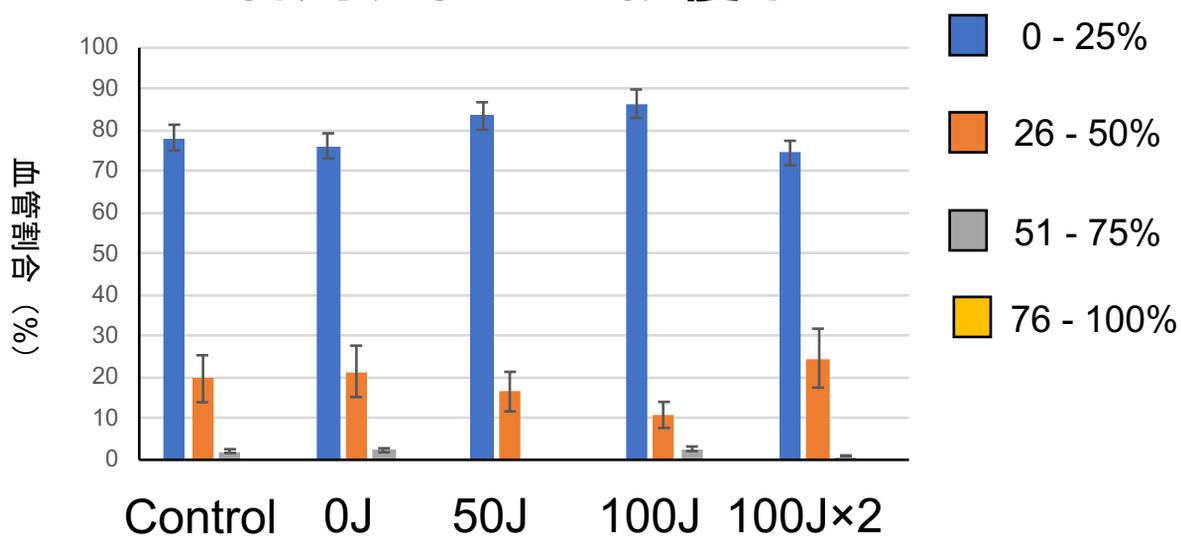
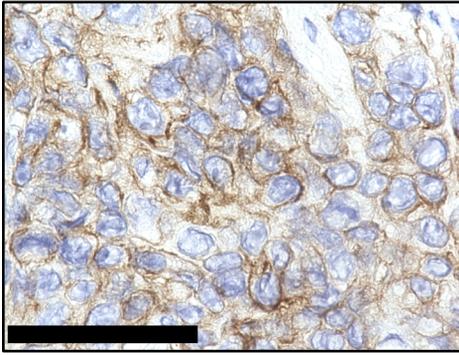


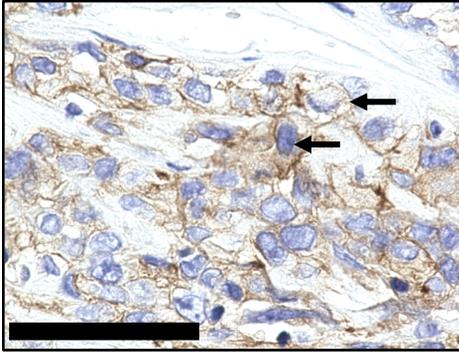
Figure 9 : NIR-PIT直後に腫瘍細胞に障害が生じた

( a )

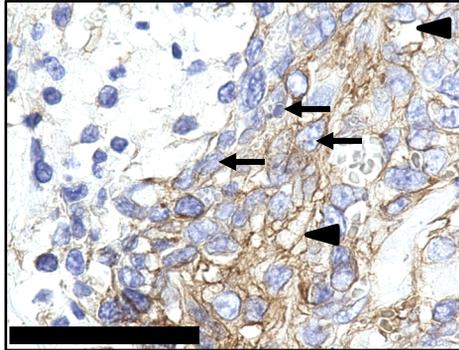
Control



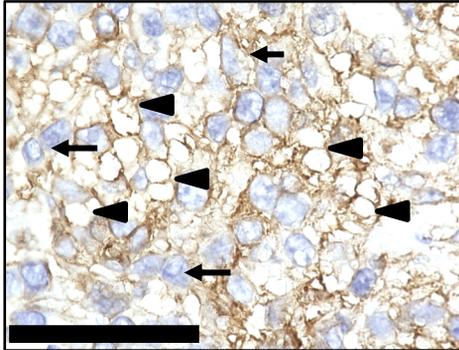
0h



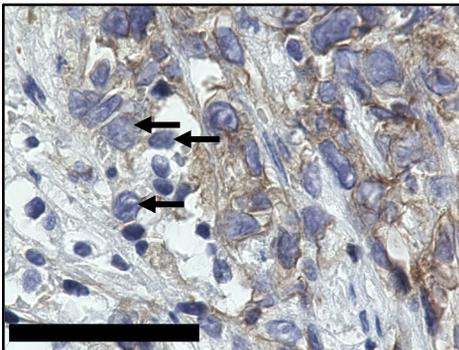
1h



6h

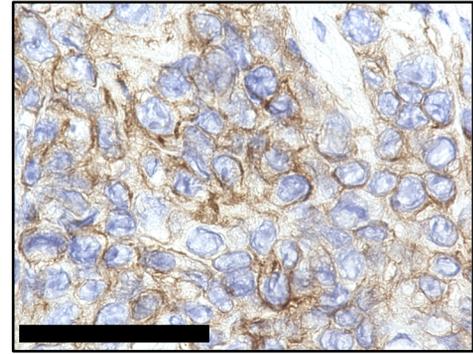


24h

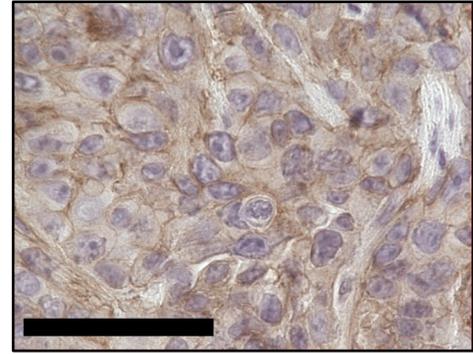


( b )

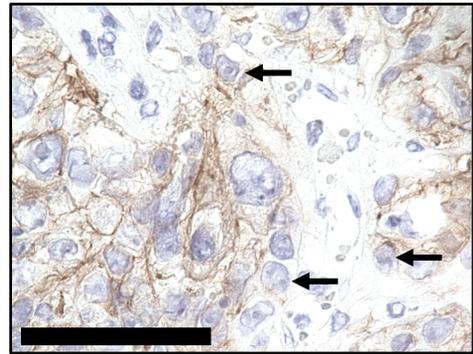
Control



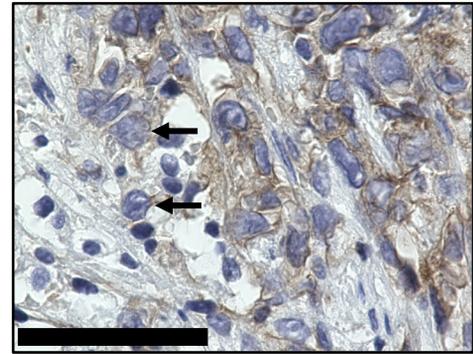
0J



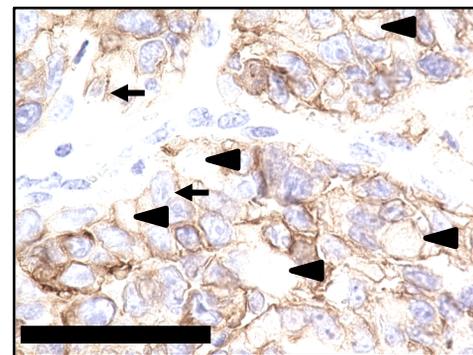
50J



100J



100J×2



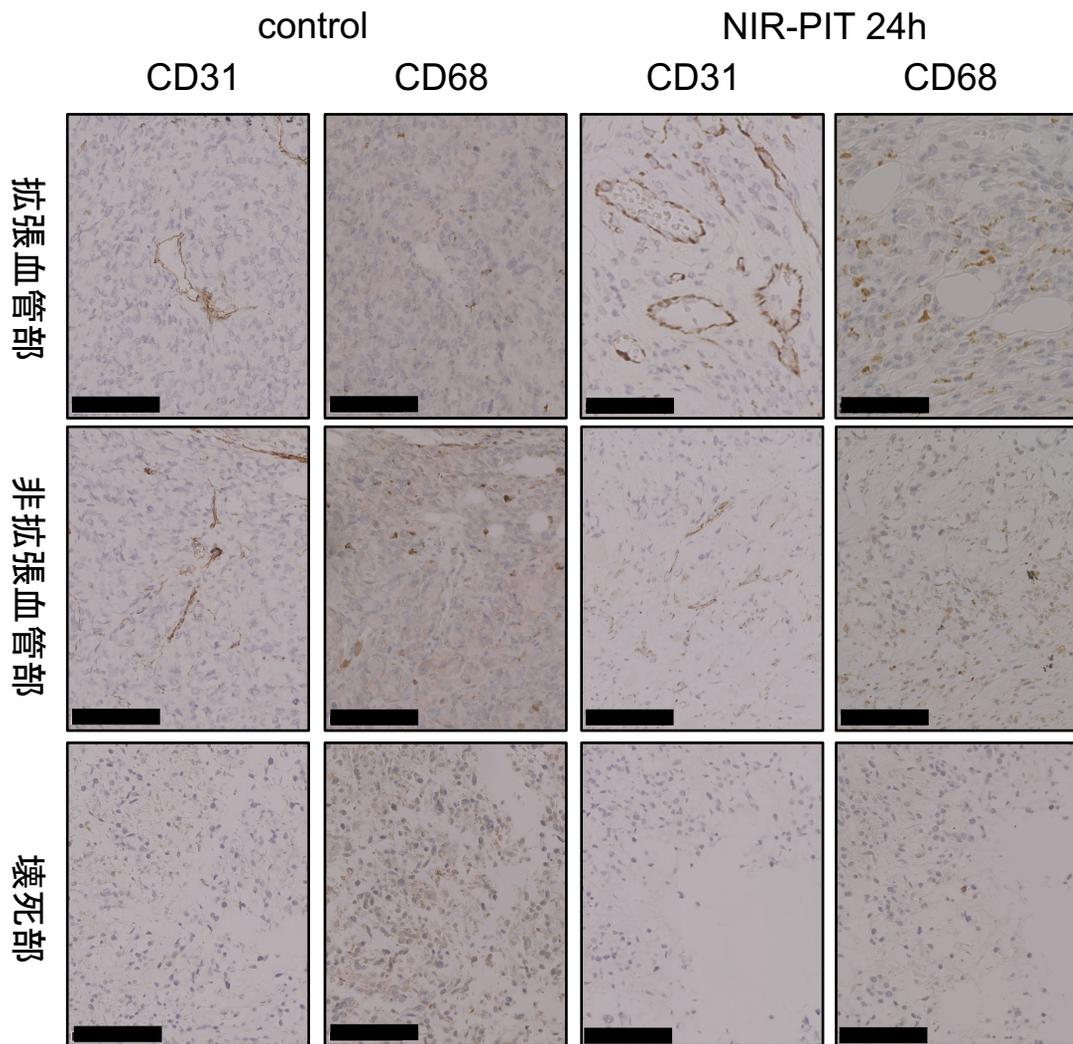
▲ : 核が消失した細胞 ( scale bar : 50 μm )

← : EGFR陽性細胞膜欠損細胞

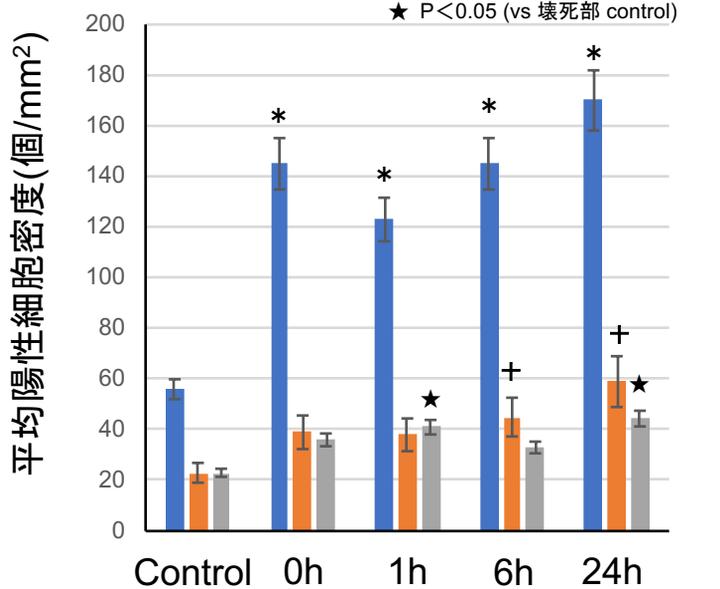
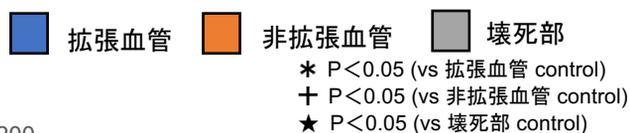
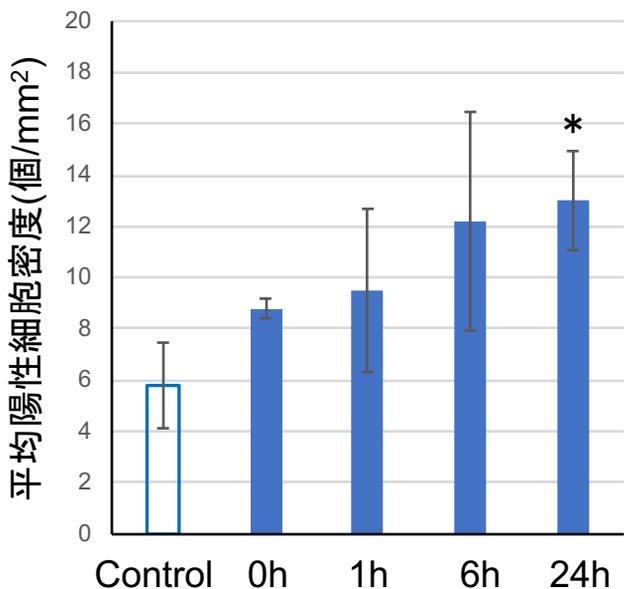
( scale bar : 50 μm )

Fig.10 NIR-PITにより経時的にマクロファージの集積を認めた

(a) 血管部位におけるマクロファージの集積

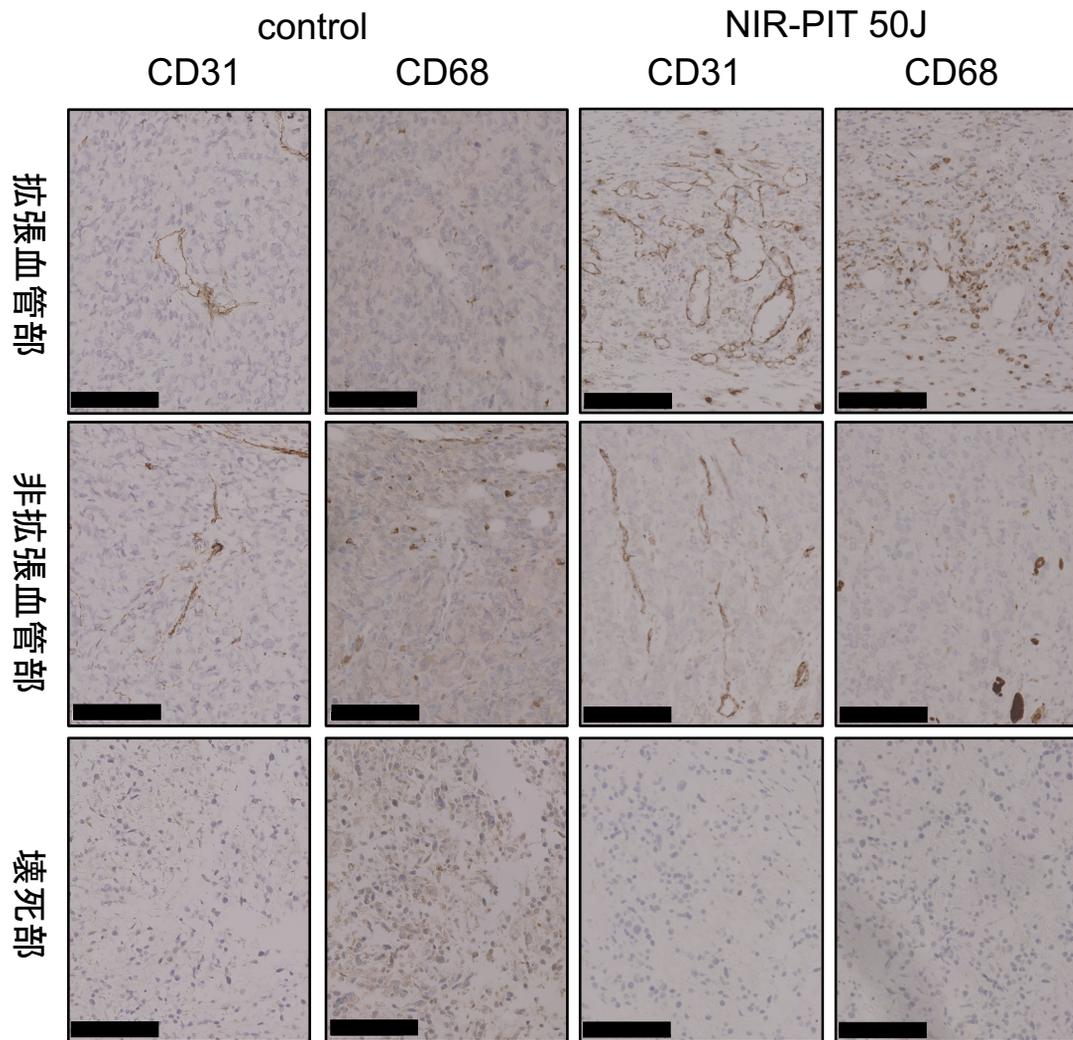


(b) 腫瘍全体のCD68陽性細胞密度 (c) 各部位のCD68陽性細胞の密度



**Fig.11 NIR-PITによりマクロファージの集積を認めた**

**(a) 血管部位におけるマクロファージの集積**

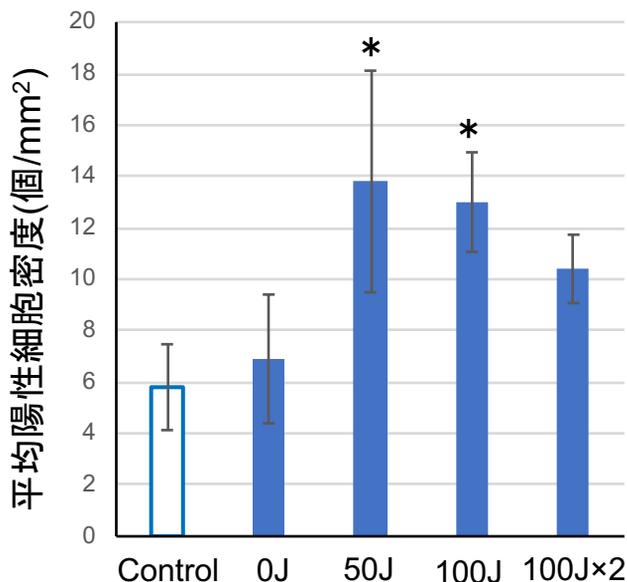


( scale bar : 100 μm )

**(b) 腫瘍全体のCD68陽性細胞密度 (c) 各部位のCD68陽性細胞の密度**

□ Control      ■ NIR-PIT

\* P<0.05 ( vs control )



■ 拡張血管      ■ 非拡張血管      ■ 壊死部

\* P<0.05 (vs 拡張血管 control)

+ P<0.05 (vs 非拡張血管 control)

★ P<0.05 (vs 壊死部 control)

