



Title	がん光免疫療法のメカニズム解明および適用拡大を目指した基礎的研究
Author(s)	中島, 孝平
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第14400号
Issue Date	2021-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14400
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96765
Type	doctoral thesis
File Information	Kohei_Nakajima.pdf



博士学位論文

がん光免疫療法のメカニズム解明および
適用拡大を目指した基礎的研究

北海道大学大学院生命科学院
生命科学専攻・生命医薬科学コース
生体分析化学研究室

中島 孝平

2021 年 3 月

目次

目次.....	1
序論.....	3
本論.....	8
第 1 章 抗体-IR700 の局在の違いに着目した細胞死誘発メカニズムの検討.....	8
第 1 節 IR700 の光学特性および抗体-IR700 の作製.....	10
第 2 節 光照射後に生じる細胞膜傷害の亢進過程の検討.....	13
第 3 節 内在化した抗体-IR700 による細胞傷害性の検討.....	23
考察.....	32
第 2 章 生体内における PIT の作用機序の解明を目指した腫瘍に特有な機能的変化に 関する検討.....	36
第 1 節 <i>In vivo</i> における光照射後の IR700 の蛍光強度の変化.....	38
第 2 節 糖代謝イメージング剤 ¹⁸ F]FDG を用いた検討.....	41
第 3 節 低酸素イメージング剤 ¹⁸ F]FMISO を用いた検討.....	44
考察.....	48
第 3 章 深部の腫瘍を治療可能な体内埋め込み型ワイヤレス LED の開発.....	51
第 1 節 埋め込み型ワイヤレス LED 装置の作製.....	53
第 2 節 培養細胞に対する PIT による細胞傷害効果.....	57
第 3 節 担癌モデルマウスに対する PIT による治療効果.....	60
考察.....	65
総括.....	67

実験試薬・材料.....	68
実験操作・方法.....	73
略語.....	89
参考文献.....	91
謝辞.....	99

序論

我が国における死因の第一位は過去 30 年以上にわたって悪性新生物（がん）である。2019 年には総死亡者数に占める割合が 27.3%となり、それに続く老衰を除いた死因上位である心疾患 15.0%と脳血管疾患 7.7%を合わせた循環器疾患の割合（22.7%）よりも多い¹。様々ながん種で 5 年生存率は年々改善されつつあるものの、本邦だけでなく他国でもがん患者数は増加の一途をたどっており、がんの根治に向けた研究が国内外で精力的に行われている。

現在行われているがんの主な治療法には、外科治療、放射線治療、化学療法があり、これらはがんの 3 大療法と呼ばれている。薬を用いてがん細胞を死滅させる化学療法は、薬剤単独で使用されることも多いが、術前・術後補助化学療法や化学放射線療法などのように外科治療や放射線治療と併用して予後の改善のために利用されることもあり、がん治療において大きく貢献している。化学療法で用いられる薬剤は患者の病態を考慮して選択されるが、DNA の複製などを阻害する抗がん剤、増殖に関与する特定の標的分子に作用する分子標的薬、増殖に関わる体内のホルモンを調節するホルモン剤などに分類される。中でも、承認薬剤数が最も多い抗がん剤の歴史は古く、1942 年にギルマンによって開発されたアルキル化薬であるナイトロジェンマスタードによる悪性リンパ腫の治療が始まりであると言われている²。それから今日に至るまでアルキル化薬のみならず代謝拮抗薬、白金製剤など多くの抗がん剤が開発されてきたが、それらは DNA の複製や合成を標的としており、がん細胞の分裂速度が正常細胞よりも速いために細胞周期の静止期以外の状態にある場合が多いことを利用している。細胞分裂という細胞の基本的な現象に基づいているために、多くのがん種に有効である一方で、細胞増殖が比較的盛んな造血細胞や毛母細胞、腸管粘膜上皮細胞などの正常細胞も同時に障害を受けやすい³。すなわち、がん細胞への選択性は低く、骨髄抑制などの重篤な薬物有害事象に繋がった場合は患者にとって大きな負担となる。また、強い副作用のために投与量が制限され、完治までの投薬を断念せざるをえないこともある。

薬剤で生じる正常細胞への副作用の軽減および治療効果の向上を目指し、1990 年代には体内の特定の分子を標的とした化学療法薬である分子標的薬が誕生した。分子標的薬の開発にあたっては、がんの発症や増殖などに関わる分子機構の解明といった基礎研究の進展が大きく貢献し、現在までにチロシンキナーゼなどの多岐にわたるタンパク質を標的とする薬剤が実用化されてきた⁴。分子標的薬は分子量の違いから、低分子量で有機合成可能な小分子薬、高分子量のバイオ医薬品であるモノクローナル抗体薬の 2 つに大別される。現在までに国内外において 30 種類以上が承認されているがんの抗体薬

は、小分子薬と比較して標的への特異性と親和性が極めて高く、非特異的な薬効を及ぼしにくい⁵。がん細胞の表面分子に結合した抗体薬は、結合した標的分子の機能阻害や、抗体依存性細胞介在性傷害作用（Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; ADCC）や補体依存性細胞傷害作用（Complement-dependent cytotoxicity; CDC）によって治療効果を発揮する。しかし、これらの機序による単剤での治療効果は十分とは言えず、また、がん細胞が薬剤耐性を獲得してしまうことも問題となっている。そこで最近では、抗体の高い標的特異性と、抗がん剤の高い細胞障害性を活かし、強力な抗がん剤を抗体に結合させて殺細胞効果を増強させたトラスツズマブ デルクステカン（販売名：エンハーツ[®]）などを始めとする抗体-薬物複合体（Antibody-drug conjugate; ADC）が注目されている^{6,7}。

3 大療法以外にも多くのがん治療法が臨床で用いられているが、1903 年の報告から 100 年以上にわたって研究開発されている治療法が光線力学療法（Photodynamic therapy; PDT）である⁸⁻¹⁰。PDT では、光励起されることで初めて作用する薬剤（光増感剤）を投与後に、腫瘍に光照射をすることでがん細胞を死滅させる。特定波長の光を吸収した光増感剤は励起一重項状態となり、項間交差を経て三重項状態となる。その後、基底状態に戻る際に周囲の三重項酸素にエネルギーを与えて一重項酸素（¹O₂）を産生し、細胞小器官や細胞膜に酸化ストレスを与えることでがん細胞を死滅させる（Type II 反応）。もしくは、励起三重項状態の光増感剤が生成したラジカル種や過酸化水素が生体分子と反応して障害をもたらす（Type I 反応）が、PDT の細胞傷害メカニズムは主に Type II 反応によると言われている（図 1A）¹¹⁻¹³。本邦で初めて承認された PDT 薬剤はポルフィリン骨格を有するポルフィマーナトリウム（販売名：フォトフリン[®]）であり（図 1B）、現在では、肺がん、食道がん、胃がん、子宮頸部がんへの適用が認可されている。ただし、脂溶性が比較的高いことから腫瘍への集積および体内からの排泄に時間を要するため、第 2 世代の PDT 薬剤として水溶性がより高くクロリン骨格を有するタラポリフィンナトリウム（販売名：レザフィリン[®]）が開発され、2004 年に承認された（図 1B）¹⁴。本邦で承認済みの PDT 薬剤は以上の 2 剤のみであるが、次世代の PDT 薬剤として、ポルフィリンやクロリン以外の分子骨格を有する光増感剤の開発も進められている¹²。

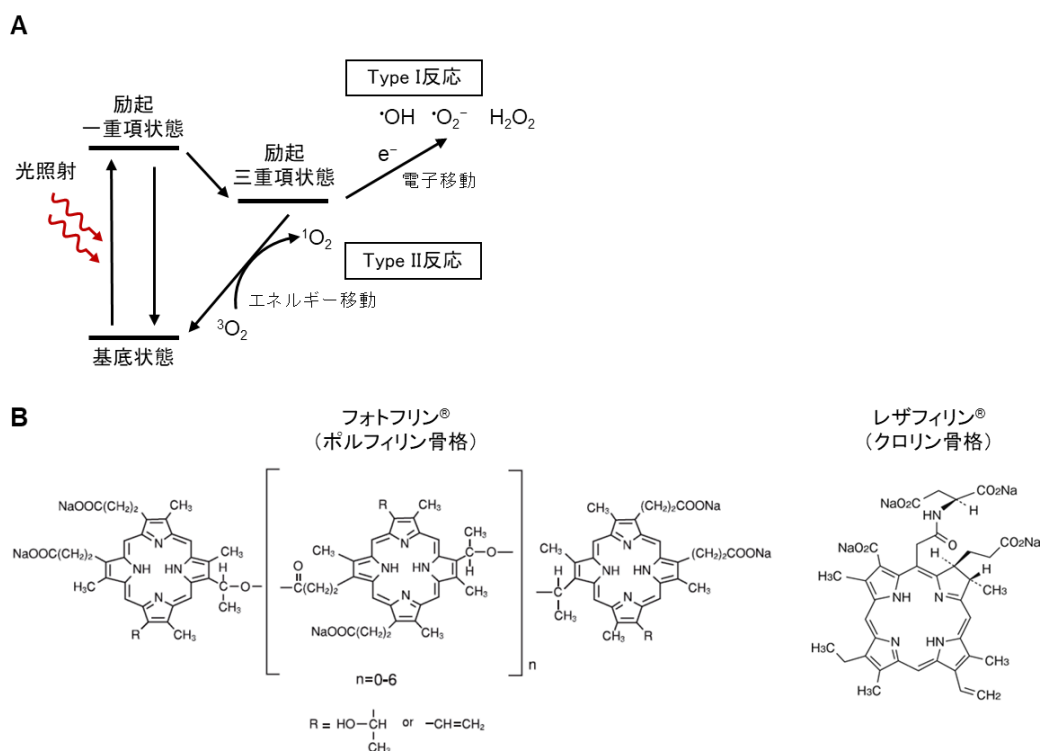


図 1 光線力学療法（PDT）の作用機序および承認済み PDT 薬剤の構造

(A) 光照射によって励起三重項状態に移行した光増感剤は、エネルギー移動によって一重項酸素（Singlet oxygen; $^1\text{O}_2$ ）を生成する（Type II 反応）。もしくは、電子移動によってラジカル種や過酸化水素を生成する（Type I 反応）。これら反応性分子ががん細胞に酸化的ストレスを与えることで細胞が障害される。(B) フォトフリリン®およびレザフィリン®の構造式。それぞれの添付文書から引用。

集積した薬剤に光照射をして行う光治療と、がん細胞を認識する抗体に殺細胞性の薬剤を結合させる ADC の概念を組み合わせたがんの新たな治療法として、2011 年に光免疫療法（Photoimmunotherapy; PIT）が開発された。PIT は、抗体に光反応性色素である IRDye 700DX（IR700）を結合した薬剤（抗体-IR700）投与後に近赤外光を照射して行う¹⁵⁻¹⁷。そのため、抗体を用いることによる高い標的特異性と、光照射領域の制御による部位選択性の両方を有しており、抗体-IR700 が結合し、かつ光照射された細胞のみが死滅する。一方、細胞に結合していても光照射されていない場合や光照射されていても細胞に結合していない場合は細胞傷害性を示さない（図 2）。2020 年 12 月 1 日には、初の PIT 薬剤である上皮成長因子受容体（Epidermal growth factor receptor; EGFR）を標的としたセツキシマブ サロタロカンナトリウム（販売名: アキシャルックス®）の頭頸部がんに対する適用が保険収載された。また、PIT を行ったがん細胞は、樹状細胞の成熟および抗原提示、がん抗原特異的細胞傷害性 T 細胞への分化などを介して抗腫瘍免疫応

答を活性化させる免疫原性細胞死（Immunogenic cell death; ICD）に至る^{18,19}。この免疫応答は、免疫チェックポイント阻害剤を用いることでさらに効果的に活性化できるため²⁰、現在、再発・転移性頭頸部がん、進行性皮膚がんに対して免疫チェックポイント阻害剤と併用した第 I 相臨床試験が進行中である。マウスを用いた前臨床試験においては EGFR 以外にも、上皮増殖因子受容体 type-2 (EGFR type-2; HER2)¹⁵、前立腺特異的膜抗原 (Prostate specific membrane antigen; PSMA)²¹、癌胎児性抗原 (Carcinoembryonic antigen; CEA)²²、B 細胞性リンパ腫に発現している CD20²³ など、がん細胞上の様々な抗原を標的とした PIT が報告されており、これら PIT 薬剤の臨床での利用も期待されている。

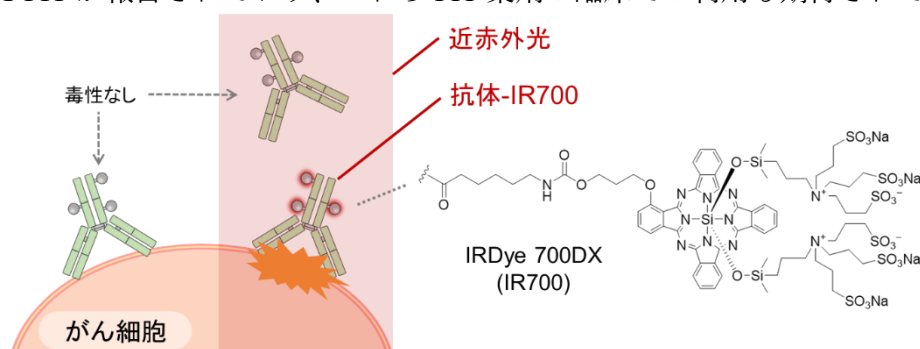


図 2 光免疫療法 (Photoimmunotherapy; PIT)

PIT では、抗体に光感受性化合物 IR700 を結合させた薬剤である抗体-IR700 を用いる。薬剤が細胞膜抗原に結合した状態で近赤外光を照射すると標的選択的な細胞死が誘発される。

このように、PIT はがん細胞を特異的に傷害する上に抗腫瘍免疫応答の活性化を誘発できる効果的ながん治療法である。古くからの光治療法である PDT とは細胞傷害の誘発のために光照射を行うという点で共通するが、前述したように PDT は $^1\text{O}_2$ を含めた活性酸素種 (Reactive oxygen species; ROS) によって傷害を与える一方で、PIT は ROS による傷害とは異なる作用機序を有すると考えられている^{15,24}。しかし、PIT を行ったがん細胞がどのようなメカニズムおよび過程で ICD に至るかは未だ明らかになっておらず、より高い治療効果などを目指した新規 PIT 薬剤の開発が難しい。また、PDT 薬剤のポルフィリン骨格およびクロリン骨格と比較して、PIT 薬剤のフタロシアニン骨格は組織透過性が比較的高い「生体の窓」と呼ばれる波長 650–900 nm の近赤外領域に強い光吸収帯 (Q 帯) を有しており^{11,25}、近赤外光の吸収効率が優れている。しかし、透過性が高い近赤外光であっても組織を通過する際の散乱や吸収などによる減衰は避けられず、体外からの照射では生体深部には光は到達できない^{25–27}。そのような部位の腫瘍を治療するために、現在、臨床では光ファイバーを腫瘍に挿入して内部からの光照射も行っているが、PIT は繰り返し治療によって治療効果が向上するため²⁸、治療の完遂のために光照射を複数回行うこともある。このような場合に適用可能な、生体深部にある

腫瘍への繰り返し照射をさらに容易とする光照射法の開発は、患者および術者の負担軽減につながると考えられる。

そこで本研究では、第 1 章においてがん細胞における抗体-IR700 の局在の違いに着目し、PIT による細胞死誘発の過程およびメカニズムの検討を行った。さらに第 2 章では、陽電子放出断層撮影法（Positron emission tomography; PET）などを利用し、代謝などの腫瘍に特有な機能的変化を明らかにすることで *in vivo* での PIT の作用機序の解明を目指した。第 3 章では、体外からの光が届きにくい深部の腫瘍を PIT で治療可能とする体内埋め込み型光デバイスを開発した。

本論

第 1 章

抗体-IR700 の局在の違いに着目した細胞死誘発メカニズムの検討

がん細胞、正常細胞に関わらず、致死的な傷害を受けた細胞は主に、シグナル伝達を介して制御される細胞死であるアポトーシスもしくは制御されない細胞死であるネクローシスにより死に至る²⁹⁻³¹。代表的な PDT 薬剤であるフォトフリン®は細胞内で主にミトコンドリアに集積する性質があるため、光照射によって産生された ROS はミトコンドリアに障害を与え、シトクロム c の放出やカスパーゼの活性化を介してアポトーシスを誘発するとされている^{11,32,33}。前臨床段階においてはミトコンドリア以外にも、リソソーム³⁴やゴルジ体³⁵、小胞体³⁶などの他の細胞内小器官に集積する PDT 薬剤も多数報告されている。また、細胞膜の内層である疎水部に集積するように設計された光増感剤は、ROS によって不飽和リン脂質を過酸化させることで細胞膜の機能障害を引き起こしてネクローシスを誘発する^{37,38}。すなわち、ROS が細胞傷害の引き金になるという点では各 PDT 薬剤の細胞傷害メカニズムは共通しているが、酸化的ストレスを与える細胞内小器官や最終的に誘発される細胞死様式はすべての光増感剤において共通ではない³⁹。

PIT 薬剤である抗体-IR700 も、PDT 薬剤と同様に光照射によって $^1\text{O}_2$ を産生するが、アジ化ナトリウム (NaN_3) などの各種 ROS クエンチャー存在下でも細胞死を引き起こすことが可能であり、酸化的ストレス以外の機序によって細胞傷害を示すと想定されている^{15,40,41}。また、酵素反応が進行しない 4°C においても細胞死が誘発されること、caspase-3 が活性化されないことからアポトーシスは主要な経路ではなく、PIT においては主に内容物の放出を伴うネクローシス/ICD が誘発される¹⁹。一般的に、ICD によって内容物を細胞外へ放出させるためには細胞膜が破壊される必要があるため、PIT においても細胞膜に傷害が生じているはずである。実際、これまでの検討から PIT では光照射時に細胞膜に抗体-IR700 が結合していればよく、細胞内に取り込まれなくても細胞死を誘発できることがわかっており、細胞膜傷害を起点として細胞死が誘発されていることを支持している。また、光照射後に細胞膜に水疱形成などといった顕著な形態変化が起こる様子が観察されている^{15,19,42}。しかし、PIT によって最終的に ICD となるがん細胞において、ROS や酵素反応を介さずに生じるどのような膜傷害が細胞死の起点となっ

ているかは明らかになっていない。したがって、PIT の細胞傷害メカニズムの解明のためには、がん細胞が顕著な形態変化を伴う ICD に至るまでの過程において、特に光照射後の早期に細胞膜で誘発される傷害の程度やその時間変化を検討することが重要である。

また、PIT で用いる抗体-IR700 は細胞膜上の標的抗原に結合した後、エンドサイトーシスによって内在化されてリソソームへと移行する。抗体-IR700 が光照射によって $^1\text{O}_2$ を産生すること、リソソーム集積型の PDT 薬剤も細胞死を誘発することから、PIT においては細胞膜上の抗体-IR700 だけでなく、内在化した抗体-IR700 も細胞死に寄与すると考えた。実際、PDT において薬剤の局在によって細胞傷害メカニズムが変化することを考慮すると、光照射時に細胞膜上に結合している抗体-IR700 と、リソソーム内に内在化している抗体-IR700 では細胞に及ぼす作用の大きさや機序が異なる可能性は高い(図 3)。そこで第 1 章では PIT の細胞傷害メカニズムの解明を目的とし、細胞における抗体-IR700 の局在の違いに着目して、細胞局在の異なる抗体-IR700 によって誘発される細胞傷害を検討した。

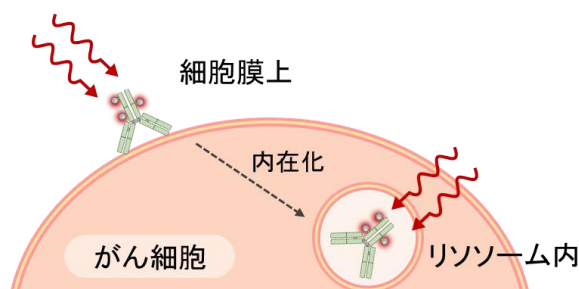


図 3 細胞における抗体-IR700 の局在の違い

がん細胞の細胞膜に結合した抗体-IR700 は、エンドサイトーシスによって徐々に内在化され、リソソームへ移行する。

第 1 節 IR700 の光学特性および抗体-IR700 の作製

IR700 の光学特性

IR700 の吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを測定した結果を図 4A に示す。前述したように、フタロシアニン骨格を有する IR700 は組織透過性が比較的高い「生体の窓」と呼ばれる波長 650–900 nm の近赤外領域に強い光吸収帯 (Q 帯) を有しており、近赤外光の吸収効率が優れている ($\epsilon = 165000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 689 nm)。一方、近赤外領域と比較して光の組織透過性は低いものの、波長 300–400 nm の紫外-可視光領域にも光吸収体 (Soret 帯) を有している。図 4A の右に示したスペクトルは波長 670 nm の光で IR700 を励起した際の蛍光スペクトルであり、IR700 が最大波長 699 nm の蛍光を発することが確認された。また、励起スペクトルは吸収スペクトルとよく一致しており、Soret 帯および Q 帯の励起によって IR700 は波長 699 nm 付近の蛍光を発することが示された (図 4B)。

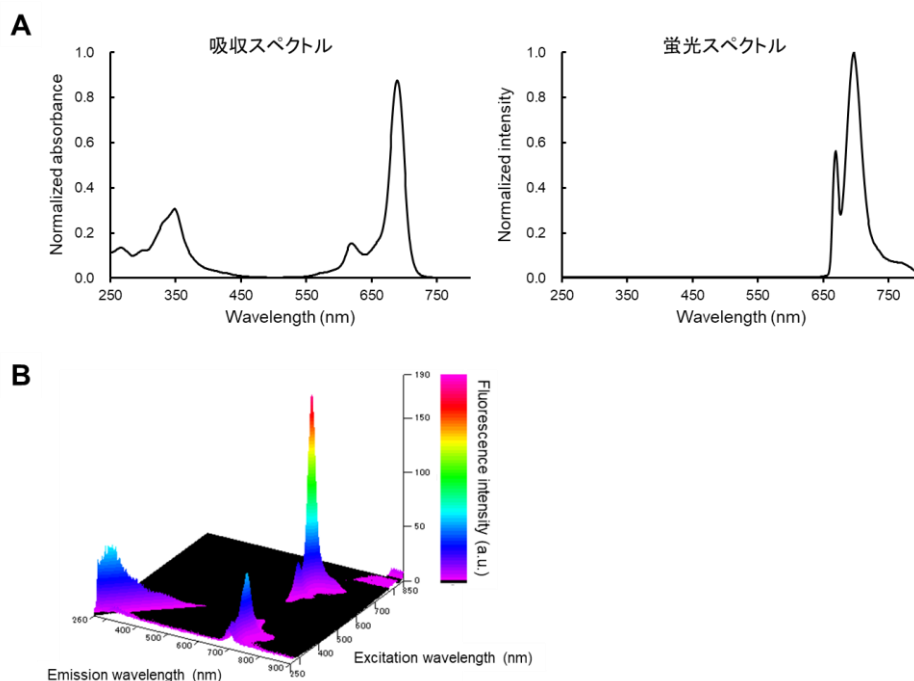


図 4 IR700 の光学スペクトル

(A) IR700 の吸収・蛍光スペクトル。 (B) IR700 の励起スペクトル。

抗体-IR700 の作製および光学特性

抗 HER2 抗体 Trastuzumab または抗 EGFR 抗体 Panitumumab に IR700 NHS ester を 5 当量で反応させ、抗体-IR700 (Tra-IR700、Pan-IR700) を作製した (図 5A)。Pan-IR700

の吸収スペクトルを測定したところ、波長 280 nm 付近にトリプトファンやチロシンなどの芳香族アミノ酸由来の吸収ピークが、波長 350 nm および 689 nm 付近に IR700 に由来する吸収ピークが認められた (図 5B)。689 nm の吸光度から溶液中の IR700 濃度を算出し、1 抗体あたり IR700 が平均約 3 分子結合している抗体-IR700 が作製できたことを確認した。

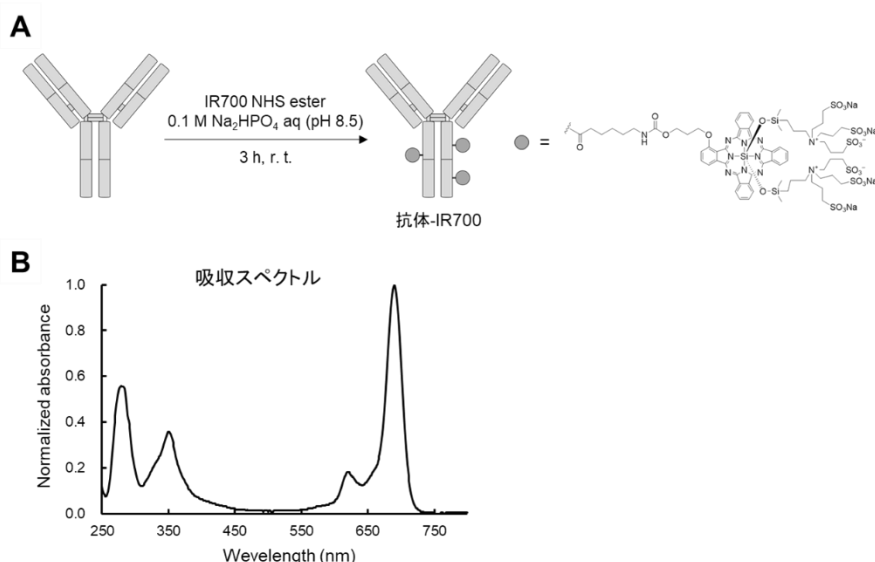


図 5 抗体-IR700 の作製および吸収スペクトル

(A) 抗体と 5 当量の IR700 NHS ester を 0.1 M Na_2HPO_4 溶液 (pH 8.5) 中で反応させ、抗体-IR700 を作製した。(B) 抗体-IR700 (Pan-IR700) の吸収スペクトル。

IR700 の Soret 帯励起による細胞傷害性の検討

現在臨床で行われている PIT を含め、PIT では組織透過性が比較的高い近赤外光を照射することによって IR700 の Q 帯 (650–750 nm) を励起して細胞傷害性を誘発させる。しかし、図 4B で示したように、IR700 は短波長領域の Soret 帯と近赤外光領域の Q 帯の両方で励起され、どちらの場合も最大波長 699 nm の蛍光を発する。したがって、光を吸収して励起されることから、Soret 帯の励起によっても細胞死を誘発することができると考え、細胞に短波長領域または近赤外光領域の光を照射して顕微鏡で観察した。その結果、Tra-IR700 を添加した 3T3-HER2 細胞では、Soret 帯および Q 帯励起の両方で細胞傷害が誘発されることが明らかとなった (図 6)。

ただし、以下のすべての検討では、一般的に PIT に用いられている波長 690 nm 付近の近赤外光を細胞または腫瘍に対して照射することで PIT を行った。

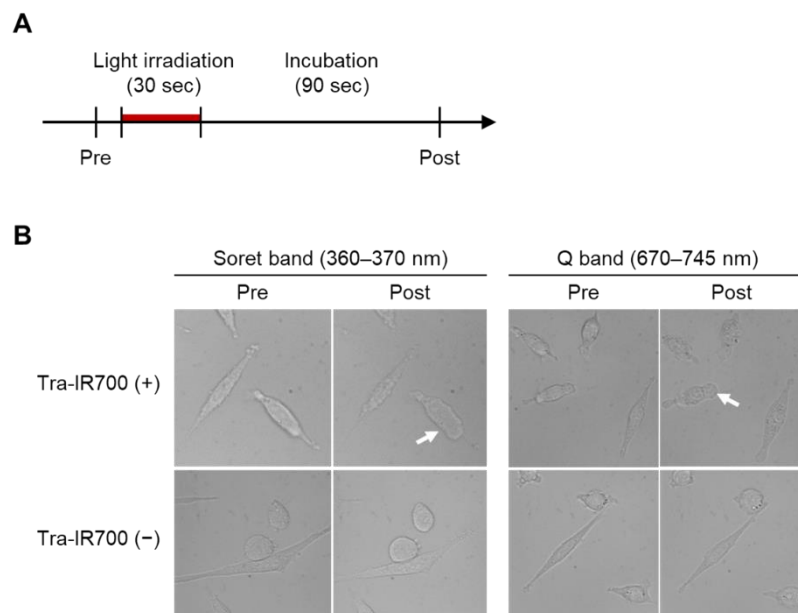


図 6 IR700 の Soret 帯および Q 帯励起による PIT

(A) 顕微鏡観察のタイムスケジュール。30 sec 間の光照射後、90 sec 後に細胞を観察した。(B) IR700 の Soret 帯および Q 帯によって吸収される波長の光を照射して PIT を行った細胞の顕微鏡画像。Tra-IR700 を添加した細胞においては、どちらの光吸収帯の励起によっても細胞傷害が認められた。画像内の矢印は細胞膨張や水疱形成などの形態変化が見られた箇所を示す。

第 2 節 光照射後に生じる細胞膜傷害の亢進過程の検討

細胞に結合していない培地中の IR700 が及ぼす影響

抗体-IR700 が細胞膜に結合または細胞内に取り込まれていることが細胞傷害性の誘発に必要であることを示すため、抗体に結合しておらず、また、高い水溶性のために細胞に取り込まれることがないと考えられる IR700 色素単体 (Free IR700) を用いた検討を行った。ここでは、HER2 を発現する 3T3-HER2 細胞および EGFR を発現する A431-GFP-luc 細胞に対して、Free IR700 もしくは抗体-IR700 (それぞれ Tra-IR700、Pan-IR700) を添加した細胞に光照射を行い顕微鏡で観察した。3T3-HER2 細胞では、添加した Tra-IR700 は細胞膜に結合しており IR700 の蛍光が観察された。さらに、光照射後には細胞に水疱形成などの形態変化が認められ、細胞死が誘発されたことが示された。一方、Free IR700 を添加した細胞では IR700 の蛍光は認められず、また、光照射後にも細胞傷害は見られなかった (図 7)。同様に、A431-GFP-luc 細胞においても、Free IR700 を添加した細胞では IR700 の蛍光は観察されず、また、光照射によって細胞傷害は誘発されなかった (図 8)。したがって、光照射をして細胞傷害を誘発させるためには、IR700 が培地中に溶解しているだけでは不十分であり、光照射時に抗体-IR700 が細胞に結合している必要があることが示された。

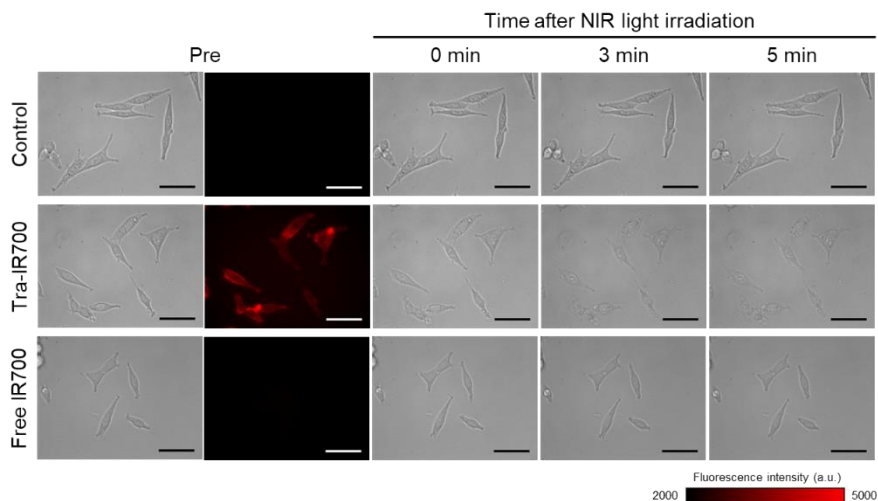


図 7 3T3-HER2 細胞における培地中の IR700 の影響

上段：何も添加していない細胞、中段：Tra-IR700 (終濃度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加した細胞、下段：Free IR700 (終濃度 0.1 μM) を添加した細胞、の光照射前後の蛍光顕微鏡画像。スケールバーは 50 μm 。

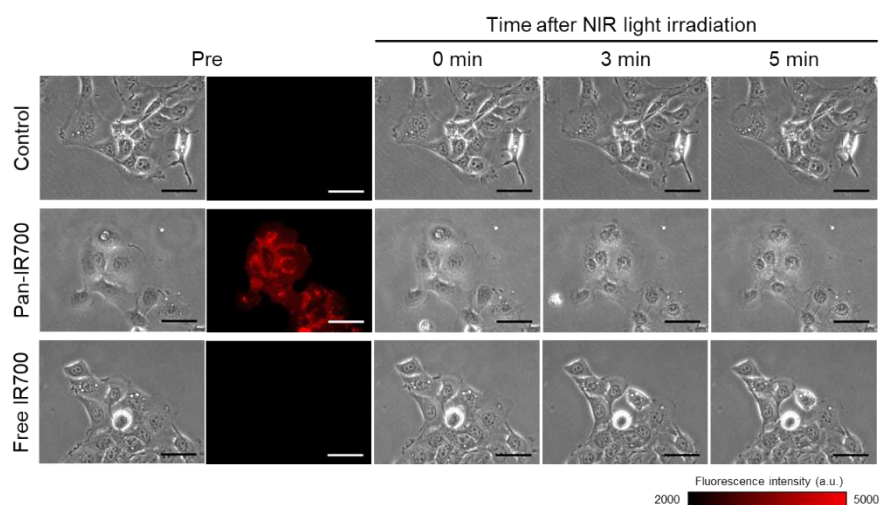


図 8 A431-GFP-luc 細胞における培地中の IR700 の影響

上段：何も添加していない細胞、中段：Pan-IR700（終濃度 5 $\mu\text{g/mL}$ ）を添加した細胞、下段：Free IR700（終濃度 0.1 μM ）を添加した細胞、の光照射前後の蛍光顕微鏡画像。スケールバーは 50 μm 。

光照射後の Na^+ の細胞内流入の観察

以上のことから、PIT においては細胞膜上に結合または細胞内に取り込まれている抗体-IR700 が細胞傷害性を示すと考えられる。そこで次に、細胞膜上に結合した抗体-IR700 が誘発する膜傷害を評価するために、 Na^+ 濃度が高いほど蛍光強度が大きくなる Na^+ センサー（CoroNa Green）を用いて Na^+ の細胞内流入を観察し、光照射後に細胞膜をイオンが通過するか検討した（図 12）。水和した Na^+ のイオン半径はおよそ 0.5 nm であり⁴³、細胞外と細胞内の Na^+ 濃度はそれぞれおよそ 130 mM と 5–15 mM であるため⁴⁴、細胞膜に Na^+ 以上の大きさの傷害が起こった場合には Na^+ は細胞内に流入し、細胞内の Na^+ 濃度は上昇する。

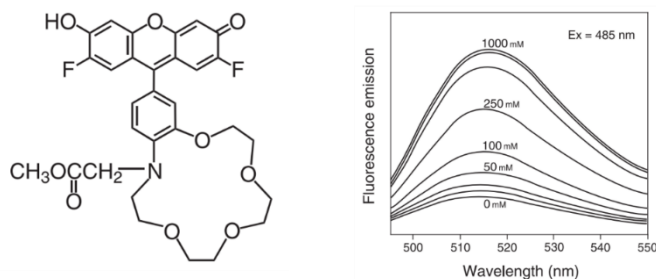


図 9 CoroNa Green の構造（左）と蛍光スペクトル（右）

Thermo Fisher Scientific 社の製品マニュアルより引用。蛍光スペクトル内の濃度は、 Na^+ 濃度を示す。

まず、3T3-HER2 の細胞質における Na^+ 濃度の変化を蛍光顕微鏡で観察するために、CoroNa Green-AM の添加濃度やインキュベーション時間についての検討を行った。その結果、 Na^+ のイオノフォアであるグラミシジン添加前の状態では蛍光強度が小さいものの、添加後 30 min に蛍光強度が大きく上昇し、顕微鏡による観察に適した条件が見いだされた（終濃度 $5\text{ }\mu\text{M}$ で、 37°C で 5 min インキュベート）。また、CoroNa Green-AM を添加した培地で長時間インキュベートすると細胞毒性が現れることもわかり、5 min 間のインキュベートによって CoroNa Green-AM を細胞に必要量を取り込ませた後、PBS で細胞を洗浄してから観察を行うこととした。

以下に示す、CoroNa Green-AM を用いて、PIT を行った細胞における Na^+ 濃度の変化の検討では、このように決定した同一の条件によって行った。

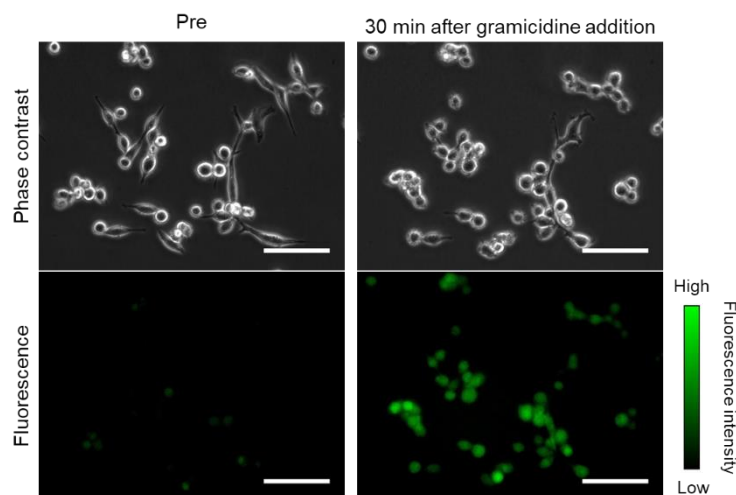


図 10 Na^+ イオノフォア添加時の CoroNa Green の蛍光強度の変化

CoroNa Green-AM を取り込ませた 3T3-HER2 に Na^+ のイオノフォアであるグラミシジンを添加すると、細胞内の Na^+ 濃度が上昇して蛍光強度が大きくなった。スケールバーは $100\text{ }\mu\text{m}$ 。

PIT を行った細胞では光照射直後に CoroNa Green の蛍光強度の上昇が見られ、PIT によって細胞内の Na^+ 濃度が上昇したことが示された（図 11A）。また、この Na^+ 流入は酵素反応が働かない 4°C 下（図 11B）または多くの Na^+ チャネルを阻害するテトロドトキシン（Tetrodotoxin; TTX）存在下（図 11C）でも同様に見られたため、 Na^+ はチャネルやトランスポーターなどを通過しているのではなく、傷害を受けた細胞膜を通過していることが示唆された。続いて、誘発される膜傷害の程度を高浸透圧条件での Na^+ 流入を観察することで検討した。高浸透圧条件では細胞膜の傷害が溶質分子よりも大きい場合のみ Na^+ 流入が起こる（図 12）。そこで、高浸透圧培地は溶液中では電離してイオンとなる 25 mM 塩化ナトリウムまたは高分子である 50 mM デキストラン（ $\sim 3.7\text{ nm}$ ）を溶解

させて調製した⁴⁵。塩化ナトリウム高浸透圧培地では、通常の培地と同様に光照射後に Na^+ の流入が見られた (図 13A)。一方、デキストラン高浸透圧培地では、 Na^+ は細胞内へ流入しなかった (図 13B)。

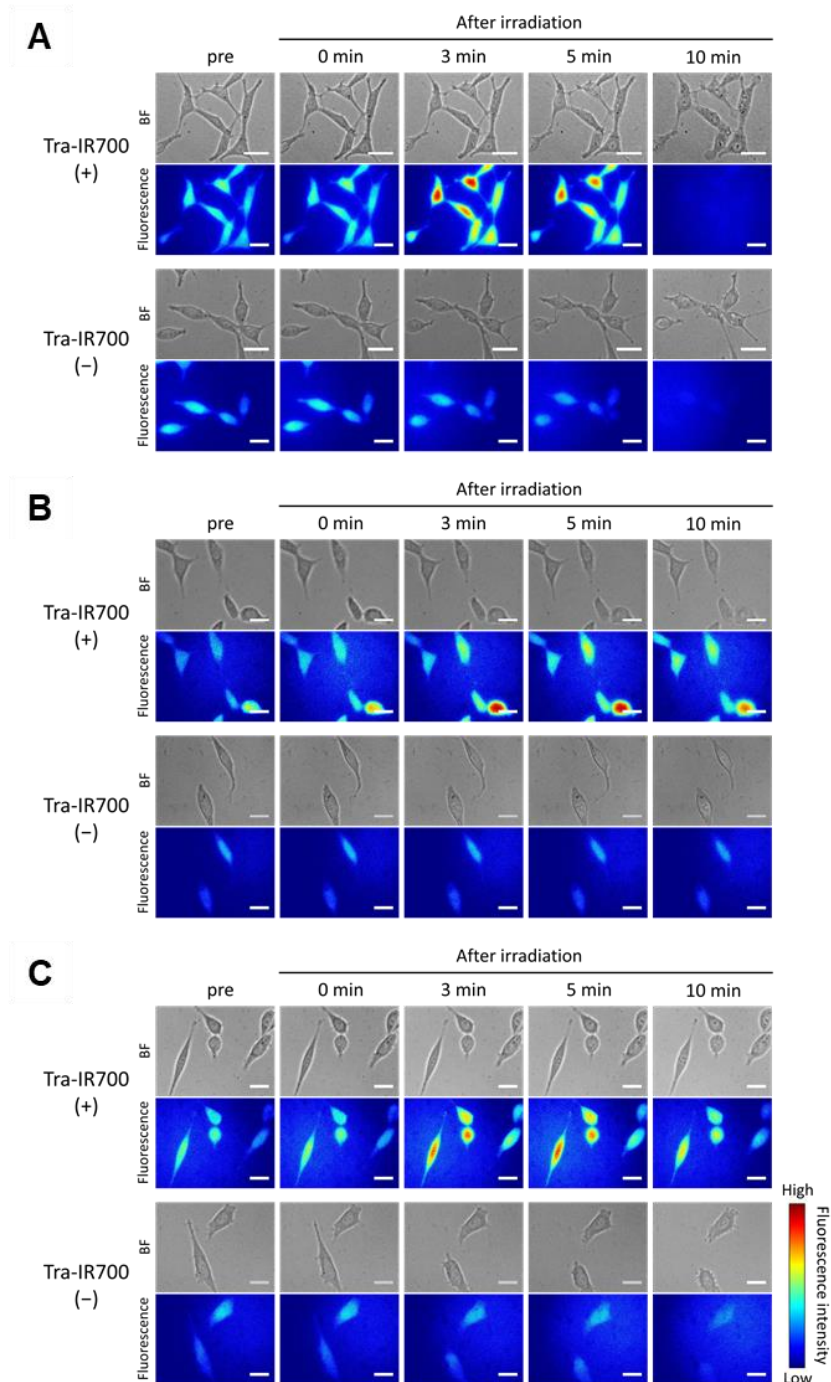


図 11 PIT を行った細胞への Na^+ 流入

(A) 37°C、(B) 4°C、(C) TTX 存在下 それぞれにおける、Tra-IR700 (+) 細胞 (上段) と Tra-IR700 (-) 細胞 (下段) の明視野画像と CoroNa Green 蛍光画像。どの条件でも、Tra-IR700 (+) 細胞でのみ光照射後に Na^+ が細胞内へ流入した。スケールバーは 20 μm 。

以上の結果から、PIT を行った細胞で光照射直後に生じる初期の膜傷害は、イオンである Na^+ や Cl^- を通過させる程度の大きさではあるが、デキストランを通過させるほど大きくはないことが示唆された。

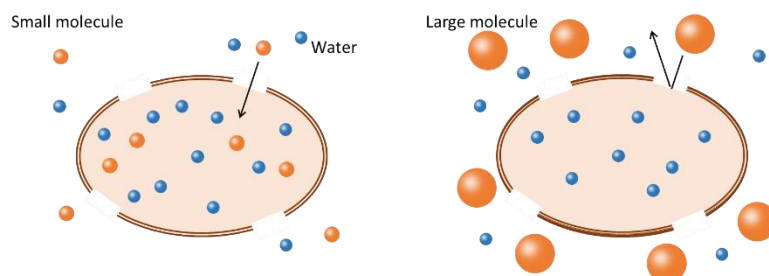


図 12 異なる高浸透圧条件下における細胞内への分子流入

(左) 細胞膜の傷害よりも小さな溶質分子によって培地が高浸透圧になっている場合、培地中の水分子や Na^+ などは細胞内に流入する。

(右) 細胞膜の傷害よりも大きな溶質分子によって培地が高浸透圧になっている場合、培地中の分子の細胞内流入は起こらない。

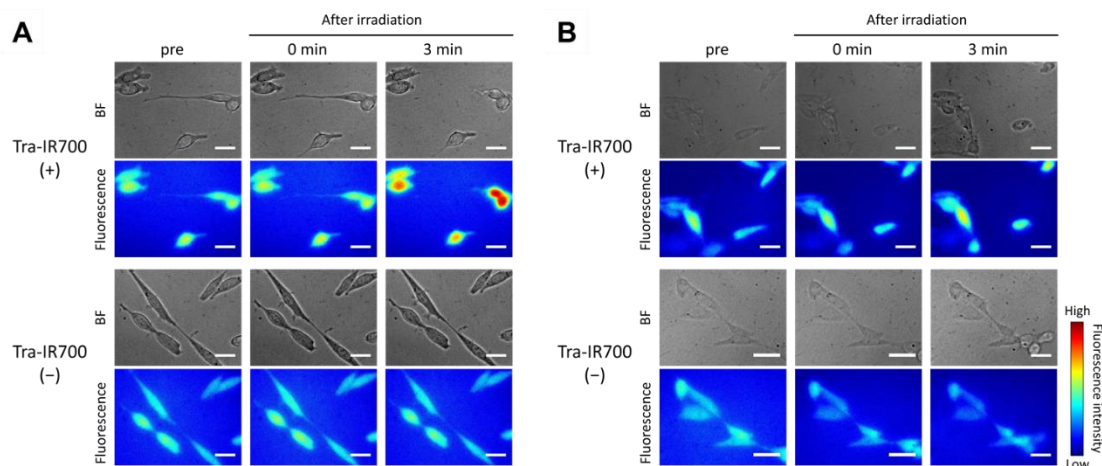


図 13 高浸透圧条件下における PIT を行った細胞への Na^+ 流入

(A) 塩化ナトリウム高浸透圧培地における、Tra-IR700 (+) 細胞（上段）と Tra-IR700 (-) 細胞（下段）の明視野画像と CoroNa Green 蛍光画像。通常の培地と同様に Tra-IR700 (+) 細胞でのみ光照射後に Na^+ が細胞内へ流入した。

(B) デキストラン高浸透圧培地における、Tra-IR700 (+) 細胞（上段）と Tra-IR700 (-) 細胞（下段）の明視野画像と CoroNa Green 蛍光画像。Tra-IR700 (+) と (-) のどちらでも、 Na^+ の細胞内流入は認められなかった。スケールバーは 20 μm 。

光照射後の細胞膜透過性の変化

次に、光照射後の細胞膜透過性の変化を、イオンよりも大きな2種類の蛍光分子である Calcein と EthD-1 を用いて評価した (図 14)。また、これらの分子の大きさはそれぞれおよそ 1.4 と 2.6 nm である。培地中に添加した Calcein-AM は生細胞の膜を透過し、エステラーゼによって分解され蛍光性の分子になるとともに水溶性が向上するために細胞内に滞留するが、細胞膜に分子サイズよりも大きな傷害が生じた場合には細胞膜を通過して細胞外へ流出する。一方、EthD-1 は水溶性が高いために生細胞の膜は透過できないが、分子サイズよりも大きな傷害が細胞膜に生じると細胞内に流入し、細胞内の DNA や RNA などの核酸と結合することで蛍光を発する。

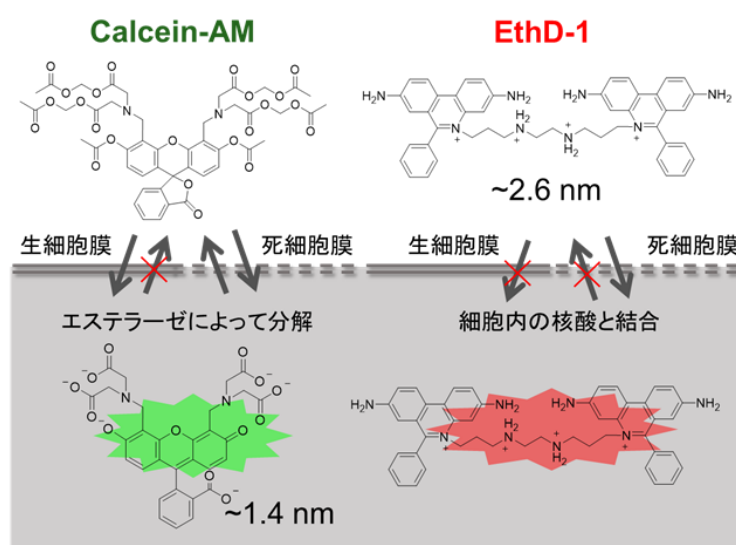


図 14 Calcein-AM と EthD-1 の細胞内外への流入・流出

Calcein-AM は生細胞の膜を透過し、エステラーゼによって分解されることで細胞内に滞留するが、細胞膜に分子よりも大きな傷害が生じた場合には細胞外へ流出する。一方、EthD-1 は生細胞の膜は透過しないが、細胞膜に傷害が生じると細胞内に流入し、核酸と結合することで蛍光を発する。

その結果、光照射直後である 0 min には Calcein の流出は見られなかったものの、明視野画像で顕著な膜傷害が観察される前の光照射 3 min 後には細胞外への流出が認められた (図 15)。さらにその後、時間経過とともに細胞膜の傷害が大きくなり、明視野画像で水疱などの形成が確認できるようになると Calcein より分子サイズの大きい EthD-1 も細胞内に流入した。以上の結果から、PIT によって生じた膜傷害は時間経過とともに不可逆的に亢進することが示唆された。

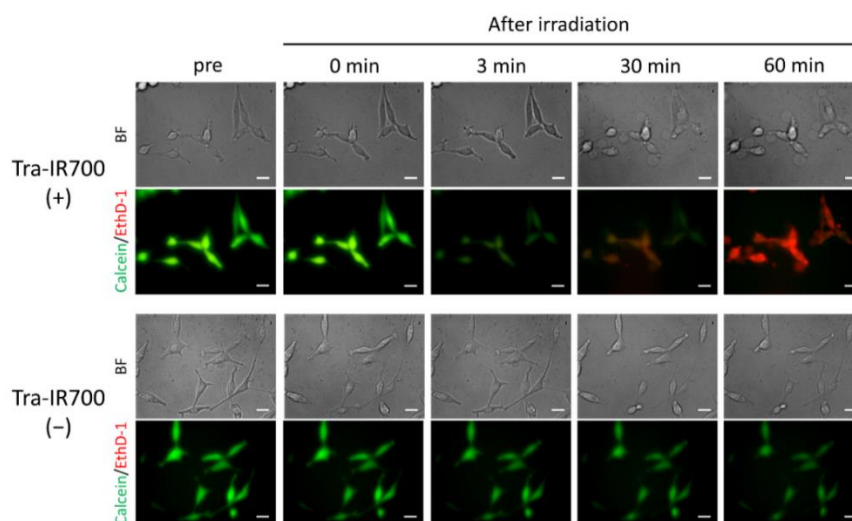


図 15 PIT を行った細胞の細胞膜透過性の変化

Tra-IR700 を添加した細胞（上段）と Tra-IR700 を添加していない細胞（下段）の光照射前後の明視野画像と Calcein/EthD-1 蛍光画像。Tra-IR700 (+)では、Calcein は光照射 3 min 後に細胞外へ流出し、EthD-1 は明視野画像で水疱が見られてから流入した。一方、Tra-IR700 (-) では、Calcein の退色は見られたものの、EthD-1 の細胞内流入は認められなかった。スケールバーは 20 μm 。

$^{111}\text{In}^{3+}$ の細胞内流入の定量

以上のように顕微鏡によって観察された PIT による細胞膜傷害を定量的に検討するため、光照射 3 min および 60 min 後のイオンの細胞内流入量を放射性同位体である $^{111}\text{In}^{3+}$ を用いて測定した。水溶液中での $^{111}\text{In}^{3+}$ の水和イオン半径はおよそ 0.4 nm である⁴³。また、本実験も通常の培地の他に塩化ナトリウムまたはデキストランによる高浸透圧培地を用いて検討した。

通常培地と塩化ナトリウム高浸透圧培地では、光照射 3 min と 60 min 後の両方で $^{111}\text{In}^{3+}$ の流入量増加が認められたが、それぞれの時間による流入量に有意な差は認められなかったことから、 $^{111}\text{In}^{3+}$ の細胞内への流入量は光照射後早期に平衡に達することが示唆された。一方で、デキストラン高浸透圧培地では、3 min 後には流入は認められなかったが、3 min と比較して 60 min で $^{111}\text{In}^{3+}$ の流入量が増加し、細胞膜傷害が時間経過とともに亢進したと考えられる（図 16A）。

^{111}In -DTPA の細胞内流入の定量

続いて、イオンよりも大きな分子の細胞内流入を検討するため、 $^{111}\text{In}^{3+}$ に DTPA を配位させた ^{111}In -DTPA を用いて細胞内流入量を測定した。 ^{111}In -DTPA の分子サイズはおおよそ 1 nm である^{46,47}。

^{111}In -DTPA は通常培地と塩化ナトリウム高浸透圧培地では、光照射 3 min 後には細胞内に流入しなかったものの、60 min 後には細胞内へ流入した (図 16B)。したがって、Calcein と EthD-1 を用いて観察されたような、光照射後の時間経過とともに進行する細胞膜透過性の亢進が、放射性同位体を用いた定量的な検討によっても明らかとなった。一方で、デキストラン高浸透圧培地では Tra-IR700 (+)群と(-)群で ^{111}In -DTPA の取り込み量に有意な差は認められなかった。

$[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ の細胞内流入の定量

次に、水分子の流入量を $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ を用いて定量した。通常培地および塩化ナトリウム高浸透圧培地では、光照射 3 min と 60 min 後に細胞内へ流入する傾向が認められた。その一方で、デキストラン高浸透圧培地では、Tra-IR700 (+)群と(-)群で流入量に差は認められなかった (図 16C)。

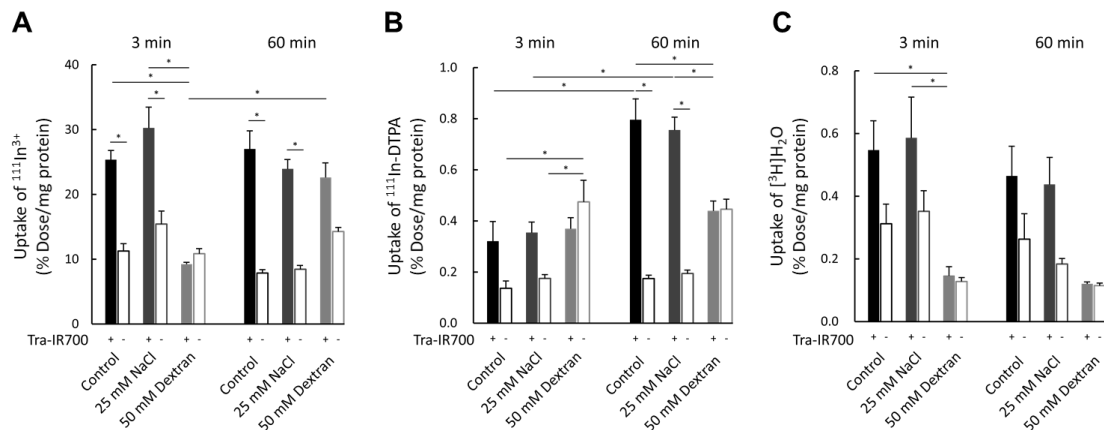


図 16 $^{111}\text{In}^{3+}$, ^{111}In -DTPA, $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ の細胞内流入

通常浸透圧の培地 (Control)、塩化ナトリウム高浸透圧培地 (25 mM NaCl)、デキストラン高浸透圧培地 (50 mM Dextran) における、光照射 3 min と 60 min 後の (A) $^{111}\text{In}^{3+}$, (B) ^{111}In -DTPA, (C) $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ の細胞内流入量。データは平均値 $\pm$ 標準誤差 ($n=4$) として示し、有意差検定は Tukey-Kramer test によって行った ($p^* < 0.05$)。

細胞骨格の変化の観察

以上のことから PIT を行った細胞では、細胞膜に生じた微小な傷害が時間経過とともに不可逆的に亢進することがわかった。しかし、一般的に微小な細胞膜傷害は細胞死を誘発しないため、PIT においては細胞膜だけでなく細胞膜を内側から保持する細胞骨格タンパク質も傷害を受けていると考えた。そこで、アクチンプローブを用いてアクチン繊維の変化を観察した。

HMRef は東京大学大学院薬学系研究科 浦野泰照博士らが開発した緑色蛍光分子であり、細胞膜を透過して細胞内に入りアクチンフィラメントに特異的に結合する（図 17）。Tra-IR700 添加のみで光照射を行っていない細胞（NIR (-)）では、蛍光画像撮影時のレーザー光による退色が生じたために若干の蛍光強度の減少が見られたものの大きな変化は認められなかった。一方、光照射をして PIT を行った細胞では、照射量依存的に時間経過とともにアクチンフィラメントが破綻してく様子が観察された（図 18）。さらに、これらの蛍光画像から、0 min を基準に蛍光強度の比を算出したところ、照射細胞ではアクチンプローブの蛍光強度が光照射開始後 10 min で有意に減少していた。またこのとき、照射量が大きい細胞のほうが蛍光強度の減少率が大きかった（図 19）。

以上のことから、PIT を行った細胞では、細胞膜を内側から支えているアクチンフィラメントの破綻が起きていることが示唆され、これが細胞膜傷害の亢進に関わっている可能性が考えられる。

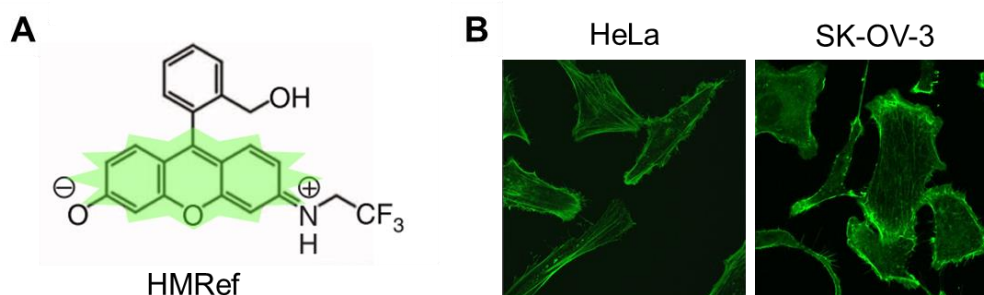


図 17 蛍光プローブ HMRef によるアクチンイメージング

(A) 緑色蛍光プローブ HMRef の構造式

(B) アクチンイメージングの例（左: HeLa 細胞、右: SK-OV-3 細胞）

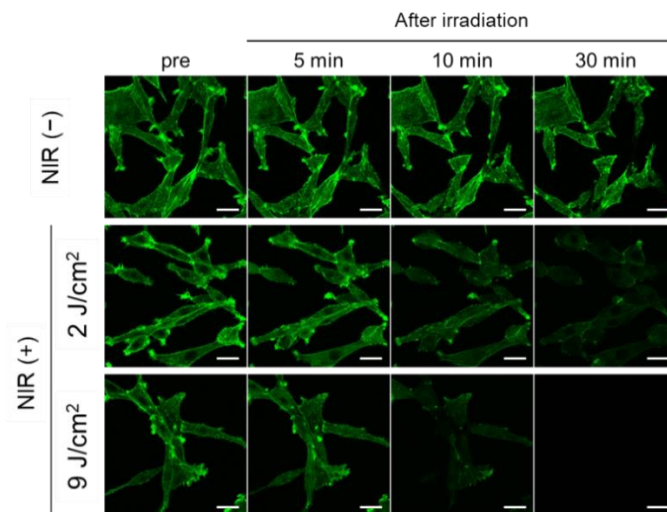


図 18 PIT を行った細胞のアクチンイメージング

(上段) 光照射を行っていない細胞では、蛍光画像撮影時のレーザー光による退色が生じたために若干の蛍光強度の減少が見られたものの 30 min 後まで大きな変化は認められなかった。(中段、下段) 光照射をして PIT を行った細胞では、時間経過とともにアクチンプローブの蛍光強度が減少した。スケールバーは 20 μm 。

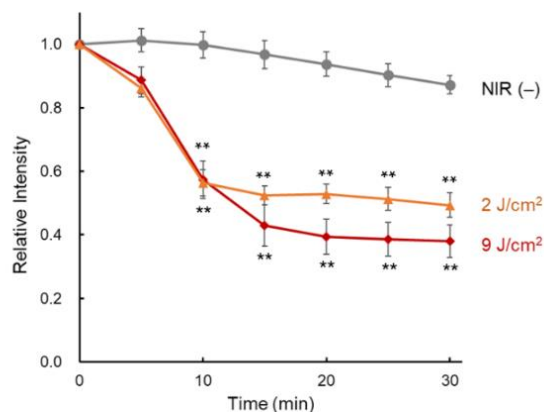


図 19 PIT を行った細胞におけるアクチンプローブの蛍光強度の変化

光照射を行っていない細胞と比較して、光照射を行った細胞では照射開始から 10 min でアクチンプローブの蛍光強度が有意に減少した。このとき、照射量が大きいほうがその減少率は大きかった。データは平均値 $\pm$ 標準誤差 ($n = 3-4$) として示し、有意差検定は student's t test によって行った ($p^{**} < 0.01$)。

第3節 内在化した抗体-IR700 による細胞傷害性の検討

Tra-IR700 の内在化の進行

続いて、内在化した抗体-IR700 による細胞傷害性を検討するために、まず、3T3-HER2 細胞において細胞膜上の HER2 に結合した Tra-IR700 の内在化過程を共焦点顕微鏡によって観察した。図 20A に示すように、Tra-IR700 は洗浄直後である内在化 0 h では細胞膜上にのみ局在していた。内在化 6 および 24 h では細胞膜上には局在している Tra-IR700 は観察されず、LysoTracker Green で染色されていたリソソームと共局在する様子が観察された。これらの結果から、細胞膜に結合した Tra-IR700 はエンドサイトーシスを介してリソソームへ内在化され、内在化 6 h と 24 h では主にリソソームに局在していたことが示された。

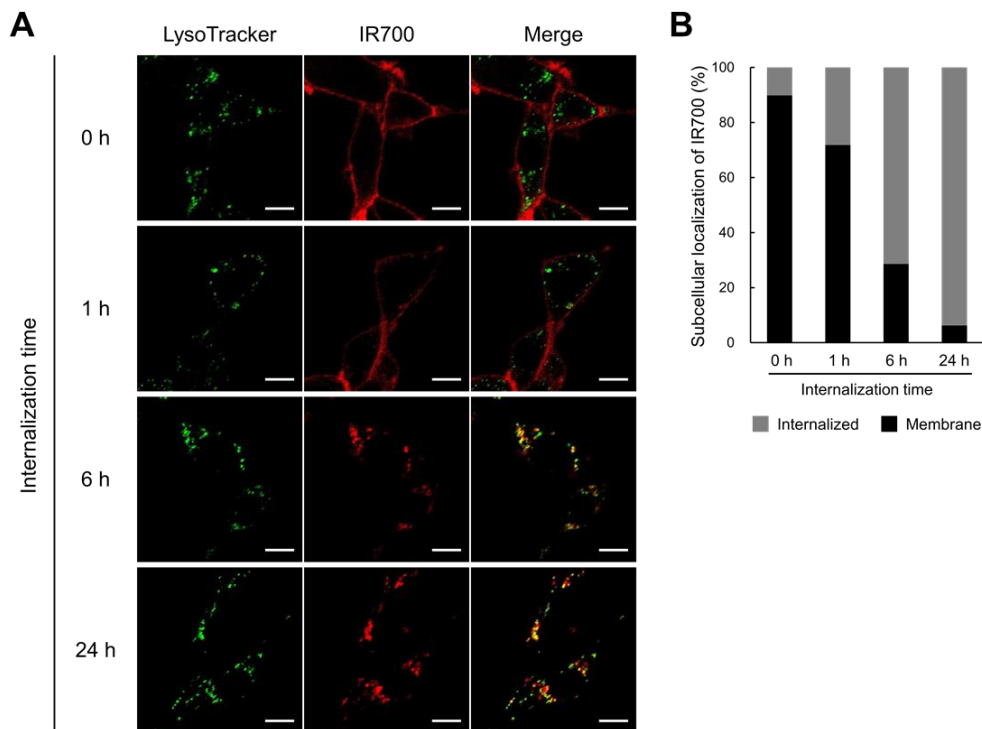


図 20 細胞膜に結合した Tra-IR700 の内在化の進行

(A) LysoTracker Green と IR700 の蛍光を共焦点顕微鏡で観察した。内在化 0 h では、Tra-IR700 は細胞膜のみに局在していたが、内在化 6 および 24 h では、リソソームに主に局在していた。スケールバーは 10 μ m。 (B) 各細胞における Tra-IR700 の局在の定量解析。細胞膜上の Tra-IR700 の割合は、内在化時間が増加するとともに減少し、内在化 24 h でほぼすべてがリソソームに局在した。

取得した画像に関心領域を設定して定量的に解析した結果、内在化された IR700 の割合は内在化時間の経過とともに増加し、ほぼすべてがリソソームに局在していることが示された (図 20B)。すなわち定量的な解析によって、Tra-IR700 は内在化 6 h では主にリソソームに位置していたが、一定量の Tra-IR700 は細胞膜に結合していることが明らかとなった。

Tra-IR700 の局在が細胞生存率に与える影響

細胞膜上およびリソソーム内の Tra-IR700 が誘発する細胞傷害性を、様々な内在化条件の細胞に対して MTT アッセイをすることによって検討した。図 21A に、この実験のタイムコースを示す。図 21B は、Tra-IR700 を 1 h インキュベートした細胞を洗浄後、0, 1, 6, 24 h インキュベートして内在化を進行させた条件の結果である。上段および下段は、それぞれ 0.5 J/cm² および 2 J/cm² の近赤外光を照射した条件の結果である。照射量 0.5 J/cm² の場合、Tra-IR700 の内在化が時間経過とともに進むにつれて細胞生存率が上昇し、内在化 24 h の細胞では細胞傷害性は認められなかった。一方、照射量が大きな 2 J/cm² では、すべての内在化条件で細胞生存率が有意に低下した。すなわち、照射量が小さい場合には内在化した抗体-IR700 は細胞傷害を誘発しないが、照射量が大きい場合には細胞傷害を誘発することが示された。

図 21C は、Tra-IR700 を 24 h インキュベートした細胞を洗浄後、0, 1, 6, 24 h インキュベートして内在化を進行させた条件の結果である。図 21B と比較して、Tra-IR700 のインキュベーション時間が長いため、細胞膜に結合した後に細胞内に取り込まれている Tra-IR700 の分子数が多い。この条件では、Tra-IR700 を添加したが光照射をしなかった細胞の生存率は、内在化 0, 1, 6 h でどちらの処理もしていない細胞と比較して有意に低下した。これは、IR700 と結合した Trastuzumab が細胞膜上の HER2 に結合し、細胞増殖シグナルを阻害したためと考えられる⁴⁸。しかし、Tra-IR700 を培地から除去することで、Trastuzumab-HER2 の相互作用を介した増殖阻害シグナルが消失するため、内在化 6 h から 24 h の間に細胞生存率が回復したと考えられる。本条件は、図 21B よりも細胞内に集積した抗体-IR700 量が多い条件であり、PIT を行った細胞における細胞生存率の低下の割合も大きかった。

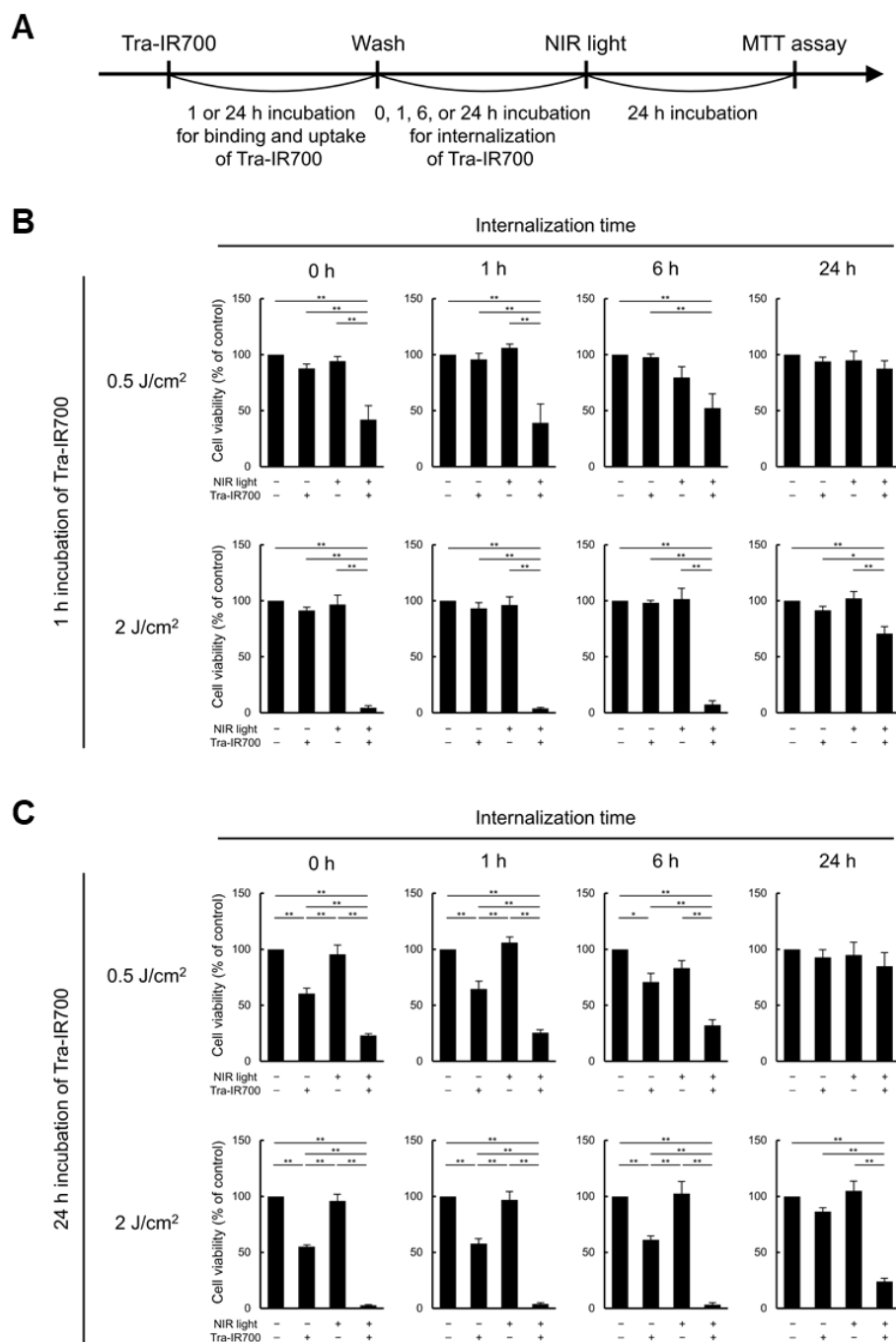


図 21 Tra-IR700 の局在が細胞生存率に与える影響

(A) 実験のタイムコース。(B) 洗浄前に Tra-IR700 を 1 h インキュベートした細胞の生存率。上段: 0.5 J/cm²、下段: 2 J/cm²。(C) 洗浄前に Tra-IR700 を 24 h インキュベートした細胞の生存率。上段: 0.5 J/cm²、下段: 2 J/cm²。データは平均値 ± 標準誤差 (n = 4) として示し、有意差検定は Tukey-Kramer test によって行った (p* < 0.05, p** < 0.01)。

さらに、図 21 で示した照射量 0.5 および 2 J/cm² 以外に 0.25、1 J/cm² を加えた、照射量 0, 0.25, 0.5, 1, 2 J/cm² の 5 条件の細胞に対して MTT アッセイをし、光照射量と細胞傷害性の関連を検討した。薬剤添加および光照射のどちらも行っていない細胞 (NIR light (-), Tra-IR700 (-)) に対する各処置群の細胞生存率を図 22A に、薬剤添加は行っているが光照射は行っていない細胞 (NIR light (-), Tra-IR700 (+)) に対する細胞生存率を図 22B に示した。図 22A および B の左側のグラフは、Tra-IR700 を 1 h インキュベートした細胞を洗浄後、0, 1, 6, 24 h インキュベートして内在化を進行させた条件の結果である。内在化時間が 0, 1, 6 h の細胞は、照射量 0.25 J/cm² では光照射を行っていない細胞と比較して、細胞生存率の若干の減少傾向が認められた。照射量 0.5 J/cm² では、図 21B でも示されたように内在化 0, 1 h の細胞では細胞生存率が 35%程度にまで低下していたが、内在化 6 h の細胞では 56%であり、細胞生存率に約 20%の差があった。照射量が 1 J/cm² 以上の場合、内在化 0, 1, 6 h の細胞の細胞生存率は 10%と同程度であった。一方、内在化 24 h の細胞では、すべての照射量において細胞傷害性が認められず、内在化した Tra-IR700 が細胞死を誘発しないことが示された。

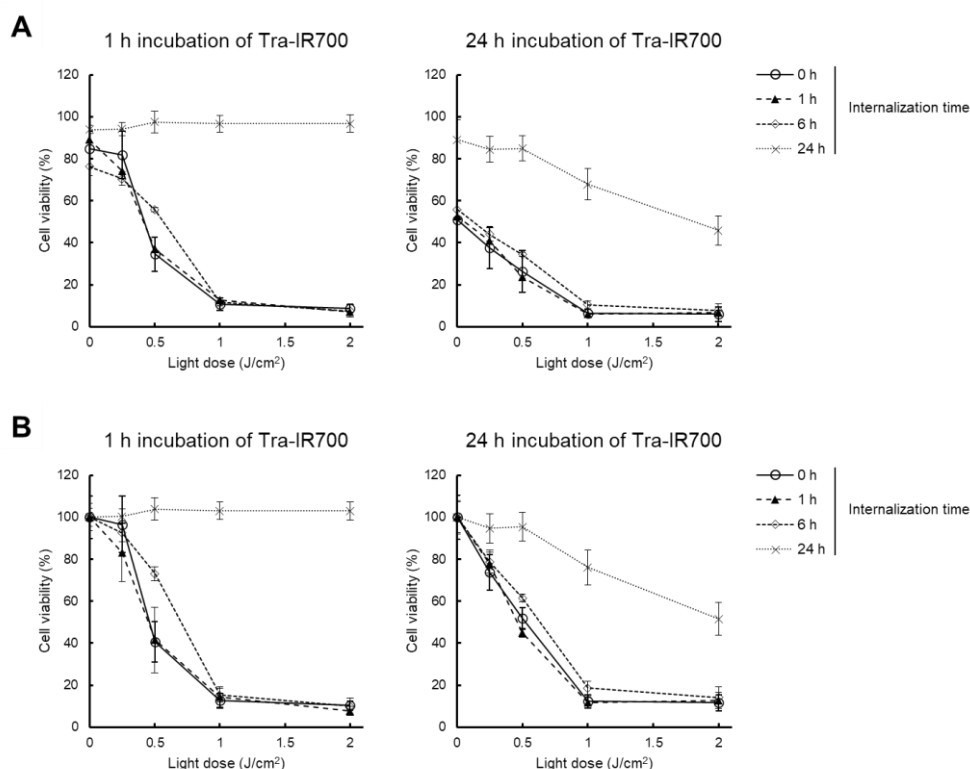


図 22 照射量と細胞生存率の関連

(A) 薬剤添加および光照射のどちらも行っていない細胞に対する各処置群の細胞生存率。(B) 薬剤は添加しているが光照射は行っていない細胞に対する細胞生存率。それぞれの光照射量は 0, 0.25, 0.5, 1, 2 J/cm² の 5 条件で行った。

図 22A および B の右側のグラフは、Tra-IR700 を 24 h インキュベートした細胞を洗浄後、0, 1, 6, 24 h インキュベートして内在化を進行させた条件の結果である。本条件の細胞は、図 22A と比較して、細胞内に取り込まれた Tra-IR700 の分子数が多い。内在化時間が 0, 1, 6 h の細胞では、照射量 0.25 J/cm^2 以上で細胞生存率が低下しており、照射量 1 J/cm^2 以上では 10%以下となった。一方、内在化 24 h の細胞は 0.5 J/cm^2 までは細胞生存率が低下しなかったことから、リソソーム内に内在化した Tra-IR700 は照射量 0.5 J/cm^2 以下は細胞傷害性を誘発しないことが明らかとなった。これに対し、細胞膜上の Tra-IR700 は照射量 0.5 J/cm^2 でも細胞傷害性を示したため、細胞膜上の Tra-IR700 の方が同じ照射量の光照射後に細胞死を誘発しやすいと考えられる。

Tra-IR700 を加えた培地で 24 h インキュベートした後に、24 h 内在化させた細胞では、照射量 2 J/cm^2 の場合に細胞生存率の有意な低下が認められた（図 21C、下段、最も右のグラフ）。しかし、この時点でも少量の Tra-IR700 が細胞膜上に存在し、それによって細胞傷害性が誘導されていた可能性がある。そこで、光照射の直前にグリシンバッファーで洗浄して抗体-抗原結合を解離させた細胞の細胞生存率を評価した。グリシンバッファーによる洗浄は内在化 24 h の細胞の生存率に影響を与えなかったことから、内在化 24 h の細胞で認められた細胞傷害性は、細胞膜上の Tra-IR700 ではなくリソソーム内の Tra-IR700 によって誘発されていることが示唆された（図 23）。以上の結果から、リソソーム中の Tra-IR700 は高い照射量では細胞傷害性を示したが、その効果は細胞膜上の Tra-IR700 によって誘導される細胞傷害性よりも小さいことが示された。

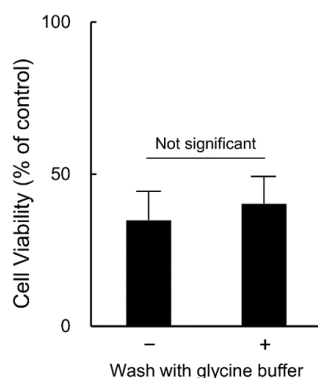


図 23 内在化 24 h の細胞における細胞膜上の Tra-IR700 による影響の検討

洗浄前に Tra-IR700 を 24 h インキュベートし、洗浄後さらに 24 h インキュベートした細胞をグリシンバッファーによって洗浄した後に光照射した。その 24 h 後、MTT アッセイによって細胞生存率を算出した。データは平均値 $\pm$ 標準誤差 ($n=4$) として示し、有意差検定は Student's *t* test によって行った。

内在化した抗体-IR700 による細胞傷害における $^1\text{O}_2$ の寄与

続いて、 $^1\text{O}_2$ クエンチャーとして知られている NaN_3 の存在下で MTT アッセイを行い、内在化した Tra-IR700 による細胞傷害性への $^1\text{O}_2$ の影響を検討した。10 mM NaN_3 存在下での細胞傷害性は、Tra-IR700 の内在化が進むにつれて小さくなり、内在化 24 h では細胞生存率の低下は認められなくなった (図 24)。したがって、内在化した Tra-IR700 は、 $^1\text{O}_2$ を介して細胞傷害を誘発していることが示唆された。一方、内在化 0 h および 1 h で Tra-IR700 が細胞膜上に保持されている細胞では NaN_3 の存在下でも細胞傷害性を誘発したこともわかり、細胞膜上の Tra-IR700 は $^1\text{O}_2$ 産生によらないメカニズムで細胞傷害を引き起こすことが確認された。後述するが、 $^1\text{O}_2$ クエンチだけでなく、IR700 の光化学反応にも NaN_3 が関与することが最近明らかになってきている。

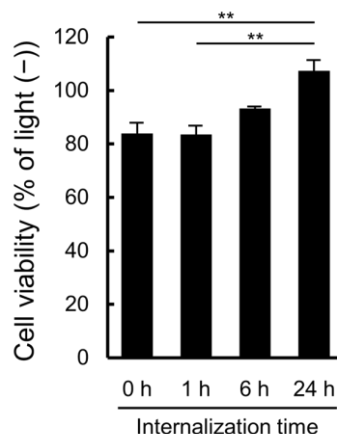


図 24 $^1\text{O}_2$ クエンチャー存在下での細胞傷害性

洗浄前に Tra-IR700 を 24 h インキュベートし、洗浄後さらに 24 h インキュベートした細胞に NaN_3 (10 mM) を添加した後に光照射した。データは平均値 $\pm$ 標準誤差 ($n = 4$) として示し、有意差検定は Tukey-Kramer test によって行った ($p^{**} < 0.01$)。

内在化した抗体-IR700 によって誘発される細胞死様式の検討

細胞膜上およびリソソーム内の Tra-IR700 によって誘導される細胞死の様式を、各処置後に Annexin V/PI で染色した細胞をフローサイトメトリーで解析することで検討した。Annexin V のみ陽性の細胞は早期アポトーシス、Annexin V および PI 陽性の細胞は後期アポトーシス細胞もしくは PIT においては ICD とみなされる。本実験のフローサイトメトリーの代表的なプロットが図 25A、各象限で示される細胞死様式の割合を示したグラフが図 25B である。早期アポトーシスから後期アポトーシスへの移行を検討するために、光照射 1 h と 6 h 後の細胞を解析した結果、細胞膜上およびリソソーム内の Tra-IR700 は、早期および後期アポトーシスを誘発しなかったことがわかった。一方、細胞膜が著しく傷害して PI によって染色された死細胞の割合は、すべての PIT 処置群

において有意に増加した（図 25C）。これらの結果から、細胞膜上およびリソソーム内の Tra-IR700 はどちらも、細胞膜傷害を伴う ICD を誘発していることが示唆された。さらに、細胞傷害性への寄与に関しては、細胞膜上 Tra-IR700 のほうがリソソーム内の Tra-IR700 よりも約 3 倍大きいという結果が得られ、図 21 に示した細胞生存率アッセイの結果とも一致した。

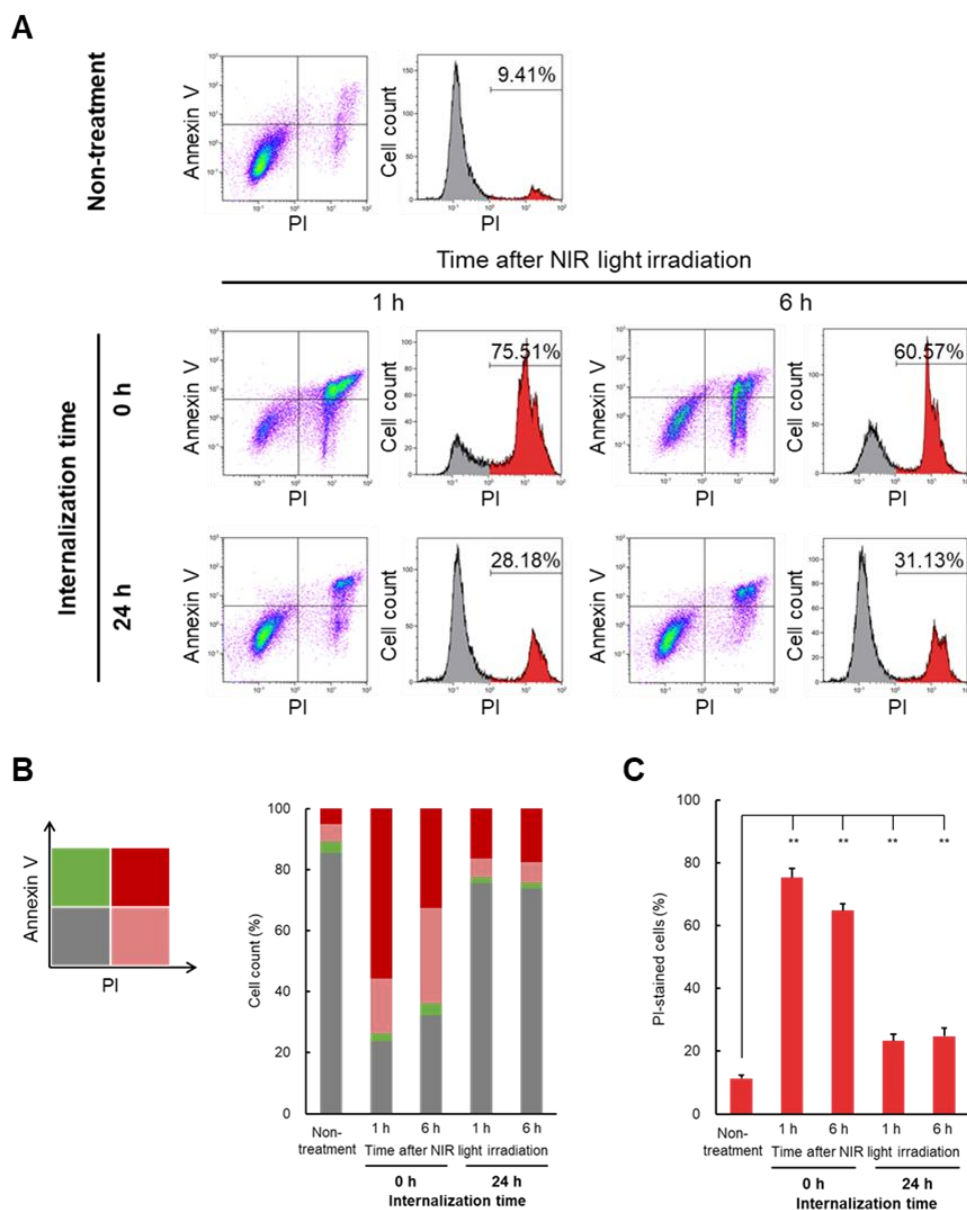


図 25 フローサイトメトリーを用いた Annexin V/PI 染色細胞の解析

洗浄前に Tra-IR700 を 24 h インキュベートし、洗浄後さらに 24 h インキュベートした細胞に光照射を行った。(A) フローサイトメトリーのプロット。(B) 各細胞死様式の割合。(C) PI 陽性細胞の割合。データは平均値 ± 標準誤差 (n = 4) として示し、有意差検定は Dunnett's test によって行った ($p^{**} < 0.01$)。

光照射前後の細胞の明視野および IR700 蛍光画像

PIT を行った細胞を蛍光顕微鏡で観察し、細胞の形態変化および IR700 の蛍光の変化を検討した。図 26A は、洗浄前に Tra-IR700 を 1 h インキュベートし、洗浄後 0, 1, 6, 24 h インキュベートした後に光照射した細胞の顕微鏡画像である。内在化 6 および 24 h の細胞において、光照射前には IR700 はリソソーム内に顆粒状となって局在している様子が観察されたが、光照射直後に IR700 は細胞質全体に拡散した（黄色矢頭）。また、PIT で認められる細胞死の特徴である細胞膜上の水疱形成が光照射後の細胞では観察され、図 25 でも明らかにされたように、内在化した Tra-IR700 もアポトーシスではなく ICD を誘発することが示唆された。

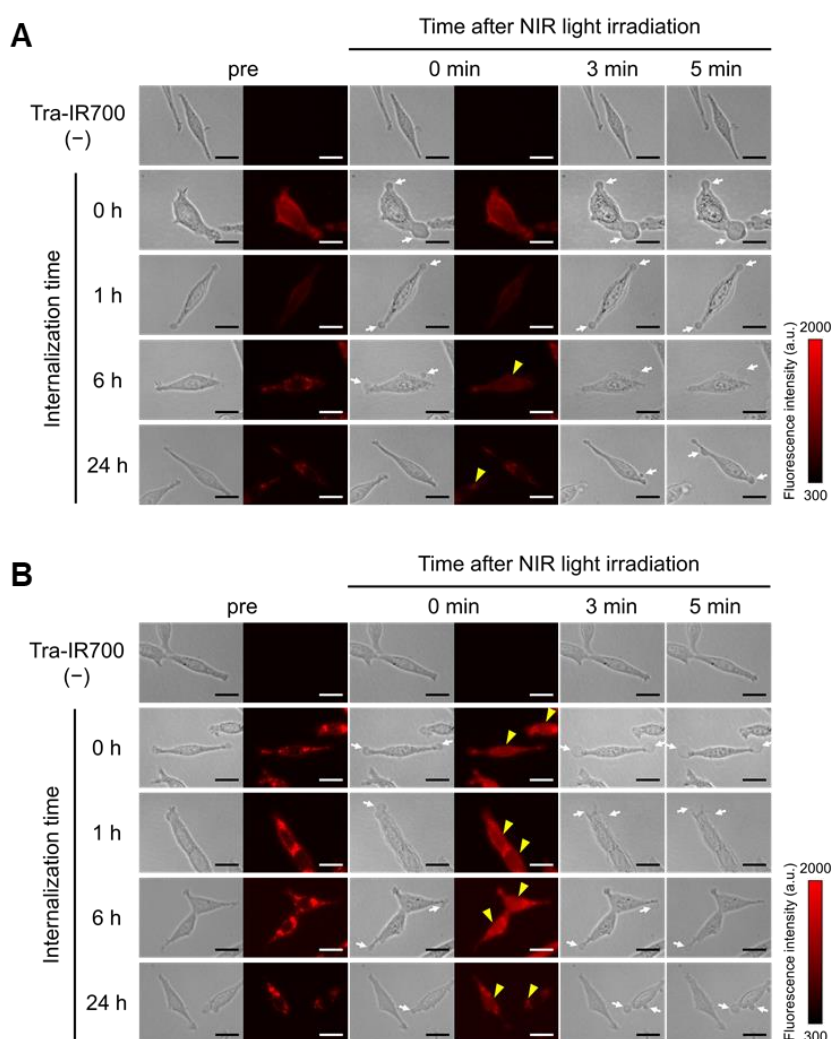


図 26 光照射前後の細胞の蛍光顕微鏡画像

洗浄前に Tra-IR700 を(A)1 h、(B) 24 h インキュベートした細胞。Tra-IR700 がリソソームに局在した細胞では、光照射前にはリソソームに局在していた IR700 が光照射後には細胞質全体に拡散していた（黄色矢頭）。また、細胞膜には水疱形成がみられた（白矢印）。スケールバーは 10 μm 。

図 26B は洗浄前に Tra-IR700 を 24 h インキュベートし、洗浄後 0, 1, 6, 24 h インキュベートした後に光照射した細胞の顕微鏡画像である。細胞内の IR700 の蛍光強度は Tra-IR700 を 1 h インキュベートした図 26B の条件よりも高く、細胞内に IR700 がより多く集積していることを示している。また、こちらの条件でも、リソソームに局在していた IR700 は光照射後に細胞質全体に拡散しており（黄色矢頭）、細胞膜においては水疱形成が観察された。また、Tra-IR700 を 1 h インキュベートした図 26A と比較すると、内在化 24 h の条件で水疱が形成されやすかった。これらの結果は、内在化した Tra-IR700 がリソソームの傷害を誘発し、リソソームの内容物を細胞質へ放出することで、細胞死を誘発することを示唆している。

カテプシン B の免疫細胞染色

PITを行った細胞においてリソソームの内容物が細胞質に放出されていることをさらに詳細に検討するため、リソソーム内に存在する代表的な酵素であるカテプシン B を免疫細胞染色した。Tra-IR700 を 24 h 内在化させた細胞のカテプシン B を蛍光顕微鏡で観察したところ、光照射を行っていない細胞では細胞内にカテプシン B が顆粒状に集積している様子が観察された一方、 8 J/cm^2 および 16 J/cm^2 の光照射を行った細胞では集積が認められず、また細胞全体の蛍光強度が小さくなった（図 27）。これらの結果は、内在化した Tra-IR700 がリソソームを破壊して、カテプシン B を含むリソソーム内酵素などの内容物を細胞質へ放出することを示唆しており、IR700 の蛍光の顕微鏡観察から導かれた結論を支持する。

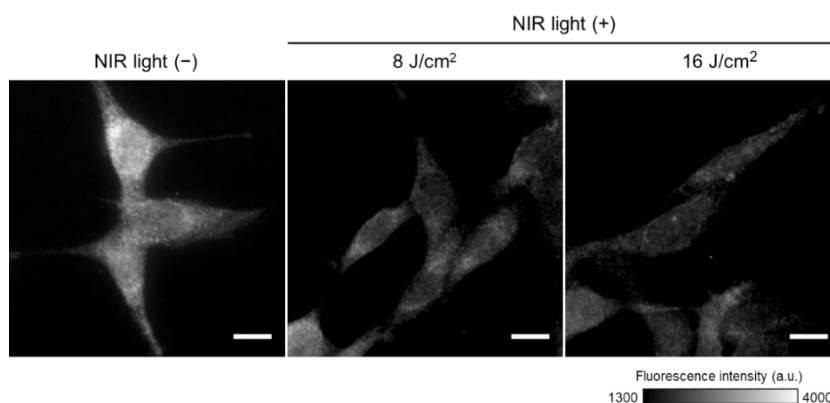


図 27 カテプシン B の免疫細胞染色

光照射を行っていない細胞では細胞内にカテプシン B が顆粒状に集積している様子が観察された一方、 8 および 16 J/cm^2 の光照射を行った細胞は集積が認められなかった。スケールバーは $10 \mu\text{m}$ 。

考察

PIT を行った細胞は、膨張、水疱形成、細胞膜の崩壊を経て^{15,49}、最終的に内容物の放出を伴う ICD に至ることが報告されている¹⁹。第 1 節にて、著者はまず様々なイオンや分子を用いることで、細胞膜上の抗体-IR700 によって誘発される細胞膜傷害の変化について検討した。その結果、PIT によって細胞に水疱などの顕著な形態変化が観察される前に、 Na^+ などのイオンは通過させるがデキストランのような大きな分子は通過させないような大きさの膜傷害が生じていることが明らかとなった(図 11A、図 13)。また、このときの Na^+ の流入は Na^+ トランスポーターやチャネルの機能を止めた条件でも同様に観察されたため、 Na^+ はこれらを介さずに傷害が起こった細胞膜を通過していることが示唆された(図 11B,C)。続いて、イオンよりも大きな 2 種の蛍光分子を用いて細胞膜透過性の変化を検討したところ、光照射後徐々に Calcein ($\sim 1.4 \text{ nm}$) が流出、EthD-1 ($\sim 2.6 \text{ nm}$) が流入することが明らかになった(図 13)。

蛍光顕微鏡を用いて観察されたこのような細胞膜傷害の変化は、放射性同位体である $^{111}\text{In}^{3+}$ と ^{111}In -DTPA を用いた定量的検討によっても支持される結果となった。図 16A,B に示したように、 $^{111}\text{In}^{3+}$ は光照射 3 min と 60 min 後の両方で細胞内に流入したのに対し、 ^{111}In -DTPA は光照射 60 min 後のみ細胞内に流入した。すなわち、PIT は光照射直後に $^{111}\text{In}^{3+}$ を通過させるような大きさの膜傷害を引き起こした後、時間経過とともに膜傷害が亢進することで ^{111}In -DTPA が通過できるようになったことが示唆された。また、デキストラン高浸透圧条件では、Tra-IR700 (+)群への $^{111}\text{In}^{3+}$ の取り込み量が光照射 3 min 後よりも 60 min 後のほうが高かったため、膜傷害が 60 min 後には大きさ約 3.7 nm ほどのデキストラン分子を通過させるほど大きくなったと考えられる。一方で、デキストラン高浸透圧条件における ^{111}In -DTPA の取り込み量は、3 min と 60 min 後で差が見られなかった。この原因として、 ^{111}In -DTPA がデキストランと相互作用して培地中での拡散速度が低下し、細胞内に入るのにより長い時間が必要になった可能性がある。また、このように相互作用した ^{111}In -DTPA が細胞膜に吸着した結果、通常浸透圧条件に比べて Tra-IR700 (-)群への集積量が大きくなったと考える⁵⁰⁻⁵²。以上をまとめると、PIT は光照射直後に小さなイオンのみを通過させるような膜傷害を誘発し、これが時間経過とともに不可逆的に亢進してより大きな分子が通過できるようになると考えられる。

通常は細胞膜に小さな傷害が生じて、細胞が有する膜傷害修復機構によって脂質二重膜が元に戻るために細胞死は誘発されない^{53,54} (e.g., エレクトロポレーション法⁵⁵、ビーズローディング法⁵⁶)。これに対し、PIT によって誘発される小さな膜傷害は不可逆的に拡大し、その後細胞膜は修復することなく透過性が亢進することが本研究によって明らかとなった。 Ca^{2+} 流入などによって細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇すると細胞骨格の分解が

促進されることが報告されているが³¹、図 18 の結果からも、PIT で見られる不可逆的な膜傷害の亢進にアクチンなどの細胞骨格タンパク質が関与している可能性が考えられる⁵⁷。また、細胞外からイオンが流入することで細胞内のイオンバランスが崩れた場合、浸透圧差によって水の流入が起きるため細胞は膨張する^{58,59}。実際、本検討でも通常浸透圧条件では水分子が細胞内に流入しており、細胞膨張に関与している可能性が高い (図 16C)。したがって、PIT においては、細胞膜上の抗体-IR700 が光照射直後に誘発するイオンを通すような小さな膜傷害が、その後の不可逆的な膜透過性の亢進、細胞膜の崩壊につながり、がん細胞の ICD の引き金となると考えられる⁶⁰。

また、当研究室では、IR700 の水溶性の軸配位子が光照射によって切断されることで、フタロシアニンの疎水性相互作用によって水中で凝集体を形成すること、さらに、IR700 を抗体に結合させた薬剤である抗体-IR700 も光照射によって凝集体となることを明らかにしている (図 28)^{61,62}。すなわち、光照射によって細胞膜上の抗体-IR700 の物性が水溶性から不溶性へと急激に変化し、細胞膜に物理的なストレスが生じて上記のように細胞膜が傷害されると考えられる。今後、実際に抗体の構造変化がどのように脂質二重膜に作用して傷害を引き起こすかを検討する上で、本検討で得られた小さな膜傷害が誘発されるという知見が役立つと考える。また、この光化学反応は脱酸素条件で促進されることも示されており、 $^1\text{O}_2$ による酸化的ストレスを起点とする PDT とは異なり低酸素条件でも治療効果を発揮できる可能性がある。

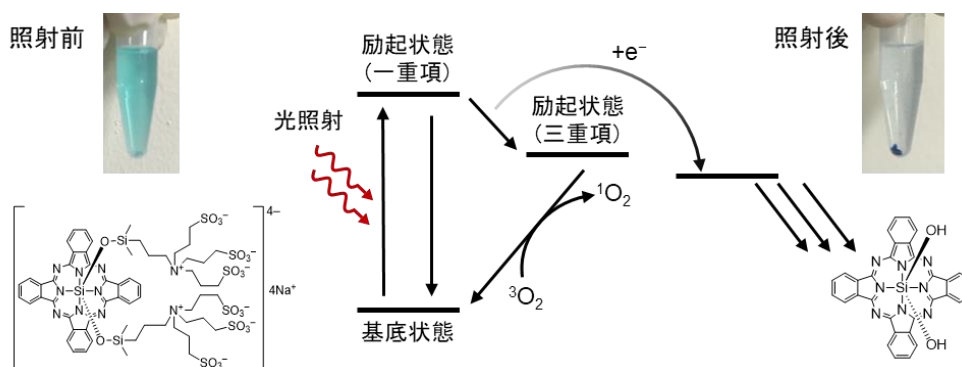


図 28 光照射後の IR700 の凝集体形成反応

光照射によって IR700 の水溶性の軸配位子が切断されることで、フタロシアニンの疎水性相互作用によって水中で凝集体を形成する。文献⁶¹を参考に作成。

さらに第 2 節では、細胞膜上の抗体-IR700 のみならず、内在化した抗体-IR700 も細胞傷害性に寄与しているか検討した。抗体-IR700 は、標的細胞に発現する受容体と結合

した後にエンドサイトーシスを介してリソソームへ内在化されるが、抗体や受容体の種類によって内在化の速度は異なる。本検討においては Tra-IR700 が内在化 24 h でリソソーム内に局在する様子が観察された (図 20)。内在化された抗体-IR700 が光照射後に細胞傷害性を誘導するかどうかを調べたところ、内在化 24 h でリソソーム内に局在する抗体-IR700 は、 2 J/cm^2 の高い照射量では細胞傷害を誘発することが示された (図 21、図 25)。しかし、細胞膜上の抗体-IR700 のほうが、リソソーム内の抗体-IR700 よりも大きな細胞傷害性を示した。例えば、細胞膜上の抗体-IR700 によって誘発された PI 陽性の死細胞の割合は、リソソーム内の抗体-IR700 による割合よりも約 3 倍高かった (図 25C)。また、内在化時間の異なる各細胞における IR700 の局在を定量的に解析したところ、内在化 24 h の細胞における膜上の抗体-IR700 の割合は内在化 6 h の細胞よりも小さかった (図 20B)。この IR700 の局在の違いが、内在化 6 h の細胞と 24 h の細胞間での細胞傷害性の大きさの違いの原因となっていると考えられる。以上のことから、内在化された抗体-IR700 も PIT において細胞死に寄与しているものの、主に細胞膜上の抗体-IR700 が細胞傷害を誘発することが示された。

細胞膜上の抗体-IR700 による細胞傷害は $^1\text{O}_2$ クエンチャーである NaN_3 の存在下でも観察された一方、内在化 24 h の細胞においては NaN_3 の添加によって細胞傷害性が完全に阻害された (図 24)。すなわち、凝集体形成に伴って細胞膜に物理的なストレスを生じさせる細胞膜上の抗体-IR700 とは異なり、内在化した抗体-IR700 は $^1\text{O}_2$ によって細胞に傷害を与えることが示唆された。さらに、図 26 の顕微鏡画像から、リソソーム内の抗体-IR700 はリソソーム膜を破壊して内容物を細胞質へ漏出させることが示された⁶³。最近、 $^1\text{O}_2$ のクエンチだけでなく抗体-IR700 の凝集体形成反応にも NaN_3 が関与することがわかってきた。しかし、一般的に抗原-抗体の結合は pH 6 以下の低 pH 環境で乖離し、pH がおよそ 5 であるリソソーム内では抗体-IR700 はリソソーム膜には結合していないと想定されるため、本検討において内在化した抗体-IR700 は凝集体形成を介してはリソソーム膜に傷害を与えてはいないと考えられる。したがって、内在化した抗体-IR700 は、凝集体形成を介してではなく、 $^1\text{O}_2$ によってリソソーム膜を破壊することで細胞死を誘発する可能性が高い。

軽微なリソソームの傷害はアポトーシスを誘導する一方、著しいリソソームの傷害はネクローシスを含む制御不能な細胞死を誘発すると知られている⁶⁴⁻⁶⁶。例えば、カテプシンなどのリソソーム内の酵素が部分的に放出された場合、アポトーシスなどのプログラム細胞死につながるシグナル伝達経路が活性化される。一方、リソソームの内容物が著しく放出された場合は、細胞質の pH が低下するなどによって、細胞小器官が急速に破壊され、制御不能な細胞死が誘発される。本検討にて、リソソーム内に局在した抗体-IR700 は光照射によってアポトーシスではなく ICD を引き起こすことを見出し、内在化

された抗体-IR700 がリソソームに対して顕著な損傷を誘発していることが示唆された (図 25A および 4B) ⁶⁷。

以上、第 1 章では、細胞膜上の抗体-IR700 もリソソーム内の抗体-IR700 も、光照射後にどちらも ICD を誘発するが、そのメカニズムは異なることが明らかとなった。内在化した抗体-IR700 は、 $^1\text{O}_2$ によってリソソーム膜を破壊して内容物を細胞質に漏出させることで細胞を傷害する。一方、細胞膜上の抗体-IR700 は、 $^1\text{O}_2$ の産生ではなく凝集体形成を介した物理的ストレスによって微小であるが不可逆的な膜傷害を誘発し、アクチン繊維の破綻を伴って細胞死を誘発する (図 29)。すなわち、がん細胞における抗体-IR700 の細胞傷害メカニズムは、抗体-IR700 の局在によって異なることが示された ^{60,67}。

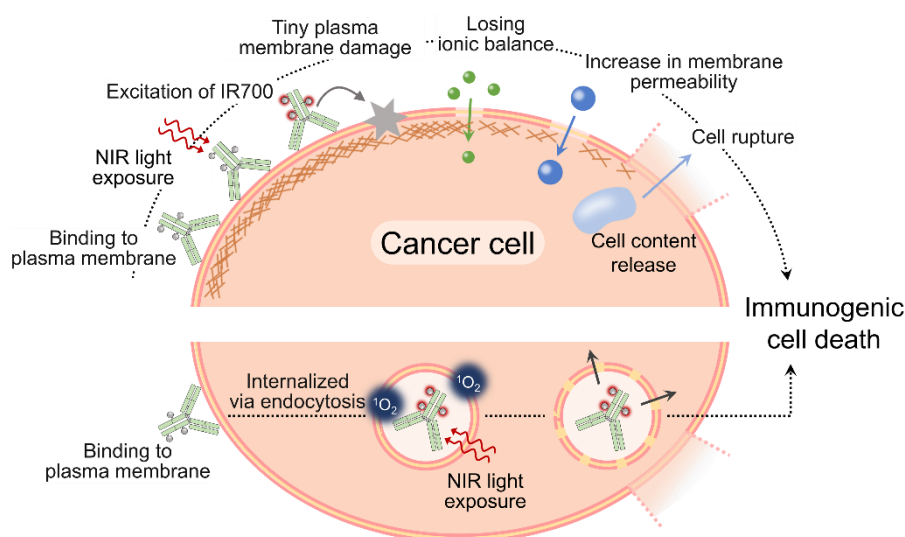


図 29 細胞膜上および内在化した抗体-IR700 による細胞傷害のメカニズム

(上段) 細胞膜上の抗体-IR700 による細胞傷害メカニズム、(下段) リソソーム内の抗体-IR700 による細胞傷害メカニズムの模式図。

第 2 章

生体内における PIT の作用機序の解明を目指した

腫瘍に特有な機能的変化に関する検討

第 1 章にて、PIT では内在化した抗体-IR700 よりも細胞膜上の抗体-IR700 が細胞傷害に寄与しており、光照射直後に微小であるが不可逆的な膜傷害が生じることで細胞死が誘発されることを明らかにした。この細胞傷害のきっかけは抗体-IR700 の凝集体形成であり、酵素反応が関与せず細胞膜を物理的に傷害するため、迅速にがん細胞を死滅させる。当研究室の検討により、光化学反応が進行して不溶性の凝集体となった IR700 および抗体-IR700 は水中で蛍光を発さなくなるため、IR700 の蛍光強度の減少は凝集体形成反応の進行を反映することが示されている⁶¹。このような光照射後の IR700 の蛍光強度の減少は培養細胞を顕微鏡で観察した際にも認められており、抗体-IR700 が溶液中だけでなく細胞においても光照射によって凝集体を形成していることを示唆している。しかし、抗体-IR700 の凝集体形成によって培養細胞で生じた PIT による迅速な細胞傷害が、*in vivo* で腫瘍においても誘発されているかは明らかになっていない。

薬剤である抗体-IR700 の物性変化に加え、PIT によって腫瘍で誘発される代謝などの機能的変化の検討は、PIT の作用機序を明らかにする上で重要な知見を与える。PIT は迅速に細胞を傷害していると予想され、形態には変化が見られない治療早期の腫瘍に特有な機能的変化を検討するためには、生体内の機能情報が得られるイメージング法が適している。陽電子放出核種を用いる PET は、基礎研究のみならず臨床においても利用されている核医学イメージング法の一つであり、特に、糖代謝イメージング剤 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose ([¹⁸F]FDG) がよく用いられる。¹⁸F]FDG はグルコースの 2 位に陽電子放出核種 ¹⁸F を導入した誘導体で、グルコースと同様にグルコーストランスポーターを介して細胞内に取り込まれてヘキソキナーゼによってリン酸化を受けるが、その後の代謝を受けないために細胞内に蓄積する。また、がん細胞は一般的に、酸素が十分にある条件でも主に解糖系によってエネルギー産生を行っており、正常細胞と比較して糖代謝が亢進しているため（ワールブルグ効果）^{68,69}、¹⁸F]FDG はがん細胞に高い集積を示す。すなわち、¹⁸F]FDG を用いることで腫瘍の糖代謝を PET によってイメージングすることができる。そこで本研究では、PIT を行った腫瘍における¹⁸F]FDG の集積の変化を検討することで、PIT が糖代謝に与える影響の解明に取り組んだ。

解糖系の亢進を含め、がん細胞は正常細胞とは異なる代謝経路を利用することで生存し、無秩序に増殖する。がんの増殖に伴って酸素を十分に得られなくなった細胞は血管内皮細胞増殖因子（Vascular endothelial growth factor; VEGF）を放出して血管新生を誘発するが、増殖に対して血管新生が追いつかない場合には酸素供給が不足して腫瘍内に低酸素領域が形成される⁷⁰⁻⁷²。このように生じた低酸素下のがん細胞は、放射線治療に対して治療抵抗性を示すため、照射前に腫瘍内が低酸素であるかを把握することは治療方針の決定に重要である。例えば、低酸素イメージング剤 [¹⁸F]fluoromisonidazole ([¹⁸F]FMISO) を用いた PET イメージングにて、腫瘍内に [¹⁸F]FMISO が高集積して低酸素状態である非小細胞性肺癌患者は、[¹⁸F]FMISO 低集積の患者と比較して放射線治療の予後が悪いことが示されている⁷³。このように効果に差が生じるのは、放射線治療では酸素がフリーラジカルと反応することで生成されるペルオキシラジカルが細胞傷害に大きく関与するためと考えられており、古くから酸素効果と呼ばれている^{74,75}。一方、第 1 章で述べたように、抗体-IR700 の凝集体形成反応は脱酸素条件で促進されることから、PIT は酸素に依存しない細胞傷害メカニズムを有することが当研究室の検討によって示唆されている⁶¹。そこで、*in vivo* において PIT が低酸素腫瘍に対して治療効果を示すかを検討することは、PIT の作用機序の解明につながると考えられる。

以上のことから、第 2 章においては、生体内における PIT の作用機序の解明を目指し、光照射後に抗体-IR700 に生じる変化や、腫瘍における糖代謝や酸素状態などの機能的変化を蛍光イメージングおよび、[¹⁸F]FDG と [¹⁸F]FMISO を用いた PET などによって検討した。

第 1 節 *In vivo* における光照射後の IR700 の蛍光強度の変化

培養細胞における IR700 の蛍光の変化

まず、*in vitro* における光照射前後の IR700 の蛍光強度の変化を検討するために、EGFR を発現することが報告されている 4 種のヒトがん細胞株（ヒト類表皮由来 A431、ヒト胆管癌由来 HuCCT-1、ヒト膵癌由来 BxPC-3、ヒト神経膠芽腫由来 U87MG）を、蛍光顕微鏡を用いて観察した（図 30）。その結果、用いたすべてのがん細胞株において、Pan-IR700 を加えた群（Pan-IR700 (+)）で光照射前に IR700 の蛍光が細胞膜上および細胞内に観察され、細胞に Pan-IR700 が集積していることが示された（Pre）。その後、5 min 間の光照射後に再び細胞を観察したところ、IR700 の蛍光強度が大きく減少していた（Post）。光照射された抗体-IR700 は凝集体を形成した後に蛍光を発さなくなるため⁶¹、本検討によって水溶液中のみならず細胞においても抗体-IR700 が凝集体を形成すること、さらにこの現象は細胞種によらず認められることが示唆された。また、光照射後の明視野画像では細胞や核の膨張と水疱形成などの顕著な形態変化が認められ、PIT によって細胞死が誘発されていることがわかった。一方、Pan-IR700 を加えていない群（Pan-IR700 (-)）では IR700 の蛍光は観察されず、また、形態変化も認められなかった。

担がんマウスにおける IR700 の *in vivo* 蛍光イメージング

続いて、*in vitro* で EGFR を発現するがん細胞株において認められた IR700 の蛍光の消失が *in vivo* でも同様に観察されるかを、IR700 の *in vivo* 蛍光イメージングによって検討した（図 31）。本検討では、EGFR を発現する A431-GFP-luc 細胞を左右両背に移植した担癌マウスを用いた。まず、光照射前に蛍光イメージングを行ったところ、Pan-IR700 が左右の皮下腫瘍に高集積している様子が観察された。さらに、光照射直後にも同様に IR700 の蛍光イメージングを行った結果、照射側の腫瘍においてのみ蛍光が消失しており、非照射側の腫瘍と比較して強度は有意に減少していた（ $p < 0.05$ ）⁷⁶。以上の結果から、本モデルにおいて PIT 薬剤の腫瘍への集積を蛍光イメージングにより観察でき、また、*in vitro* と同様に腫瘍に集積した抗体-IR700 が光照射によって凝集体を形成したことが示唆された。

ルシフェラーゼの *in vivo* 発光イメージング

PIT を行った細胞では、傷害を受けた細胞膜を ATP が通過して細胞外へ漏出することが報告されている¹⁹。したがって、ルシフェラーゼを発現させた細胞に対して PIT を行くと、酸素、ATP、 Mg^{2+} を必要とするルシフェラーゼとルシフェリンの反応による発光が生じなくなるため、発光強度の変化をもとに光照射後早期に治療効果をモニタリング

することが可能であると報告されている⁷⁷。本検討においてもまず、*in vitro*において、培養プレート中の A431-GFP-luc 細胞に対して PIT を行った 1 h 後に発光強度を測定したところ、対照群と比較して発光強度が半分以下に減少していた（図 32A）。さらに、IR700 の蛍光イメージングに用いたものと同じモデルマウスを用いた *in vivo* の検討においても、光照射 24 h 後には照射側腫瘍の発光強度が低下した（図 32B）。したがって、本検討で用いた担癌マウスにおいて、PIT による治療効果が認められることが確認された。

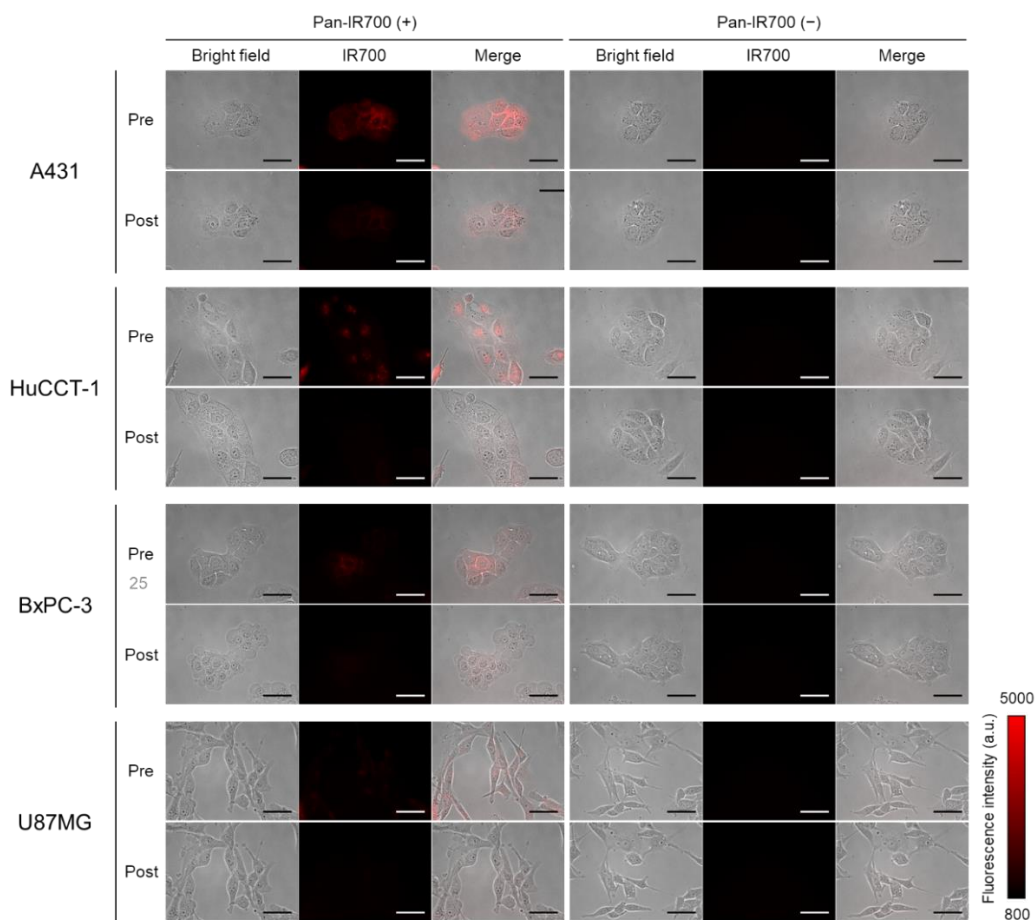


図 30 *In vitro*における細胞の形態変化および IR700 の蛍光強度の変化

EGFR を発現する細胞株（A431、HuCCT-1、BxPC-3、U87MG）を観察した。Pan-IR700 を添加した細胞（Pan-IR700 (+)）では光照射前（Pre）には IR700 の蛍光が観察されたが、光照射後（Post）にはその蛍光強度は減少した。また、光照射後には細胞膨張と水疱形成（矢印）を伴う細胞傷害が観察された。スケールバーは 50 μm。

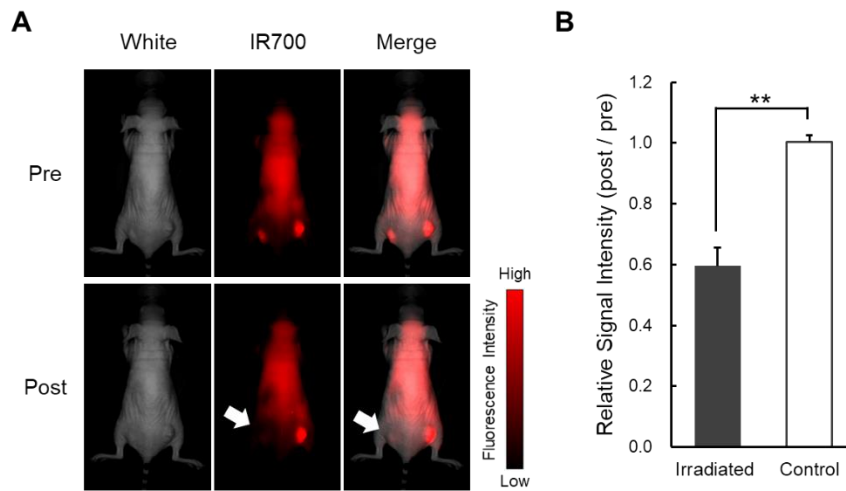


図 31 IR700 の *in vivo* 蛍光イメージング

(A) Pan-IR700 を投与した担癌マウスの光照射前後の IR700 蛍光イメージング画像、(B) 蛍光強度の定量値。マウス背中左側の腫瘍 (矢印) にのみ光照射したところ、照射側の腫瘍でのみ IR700 の蛍光が消失していた。データは平均値 $\pm$ 標準誤差 ($n=8$) として示し、有意差検定は Student's *t* test によって行った ($p^{**} < 0.01$)。

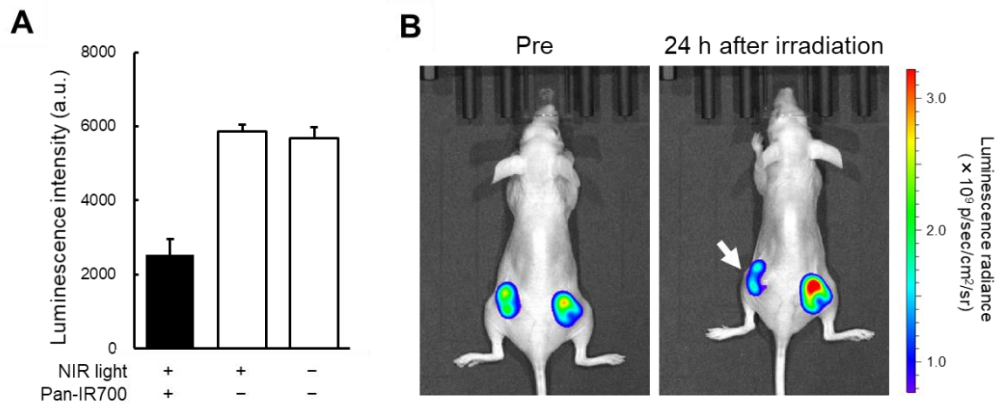


図 32 *In vitro* 発光強度の測定および *in vivo* 発光イメージング

(A) *In vitro* で PIT を行った A431-GFP-luc 細胞における発光強度の変化。データは平均値 $\pm$ 標準誤差 ($n=4$) として示した。(B) *In vivo* で PIT を行った A431-GFP-luc 細胞を移植した担癌マウスの発光イメージング画像。光照射 24 h 後では、非照射側腫瘍 (右) と比較して照射側腫瘍 (左) の発光強度は小さかった。

第2節 糖代謝イメージング剤 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ を用いた検討

$[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PET 画像と集積量

続いて、PIT を行った腫瘍内の治療後ごく早期からの糖代謝の変化を経時的に検討するため、光照射 3 h および 24 h 後に $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PET を撮像した。マウスの冠状断面の $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PET 画像、腫瘍内に関心領域を設定して集積量を定量した結果を図 33 に示す。光照射 3 h 後では、左側の照射側腫瘍における $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ の集積は、右側の非照射側腫瘍における $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ の集積と比べて顕著に少ないことが PET 画像からわかった。 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ の集積量を定量したところ、非照射側と比べて照射側腫瘍への集積量は有意に低かった (3 h: 1.9 ± 0.5 vs 7.6 ± 1.1 %ID/g)。光照射 24 h 後の $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PET 画像においても、左側の照射側腫瘍における $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ の集積量は、右側の非照射側腫瘍における $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ の集積量と比べて有意に低かった (24 h: 1.5 ± 0.8 vs 6.4 ± 1.7 %ID/g)。以上の結果から、PIT は光照射後早期に照射側腫瘍の糖代謝を著しく低下させることが示された。

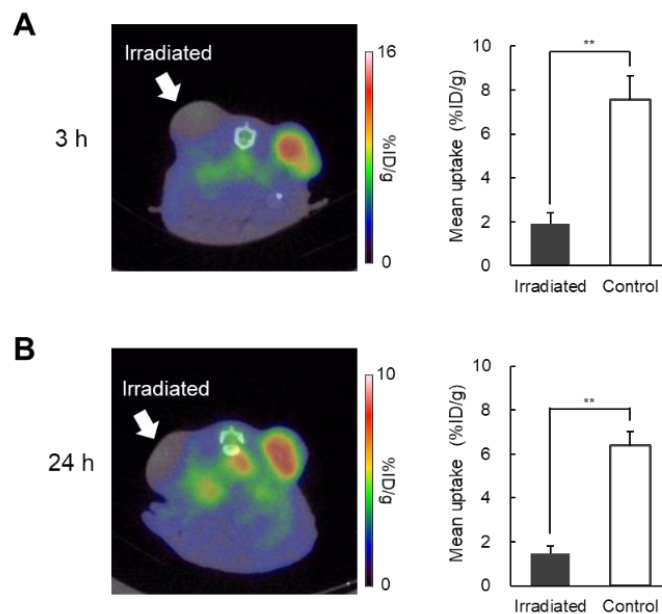


図 33 光照射 3 h 後および 24 h 後の $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PET 画像と集積量

(A) 光照射 3 h 後の PET 画像 (左)、 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ の集積量 (右)。(B) 光照射 24 h 後の PET 画像 (左)、 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ の集積量 (右)。ともに PET 画像左側が照射側の腫瘍。データは平均値 $\pm$ 標準誤差 ($n = 7-9$) として示し、有意差検定は Student's t test によって行った ($p^{**} < 0.01$)。

[¹⁸F]FDG-ARG と HE 染色の比較

PET を撮影したマウスを安楽死させた後に腫瘍を摘出し、凍結切片を作製して ARG および HE 染色を行った。照射 3 h 後の結果を図 34 に、照射 24 h 後の結果を図 35 に示した。照射 3 h 後における照射側腫瘍と非照射側腫瘍の ARG を比較すると、照射側腫瘍では [¹⁸F]FDG 低集積の領域が広く認められた。さらに照射側腫瘍の ARG と HE 染色を比較した結果、[¹⁸F]FDG は集積しないものの壊死していない領域が観察され、PIT によって組織が壊死に至る前に腫瘍の糖代謝が低下したことが示された (図 34)。

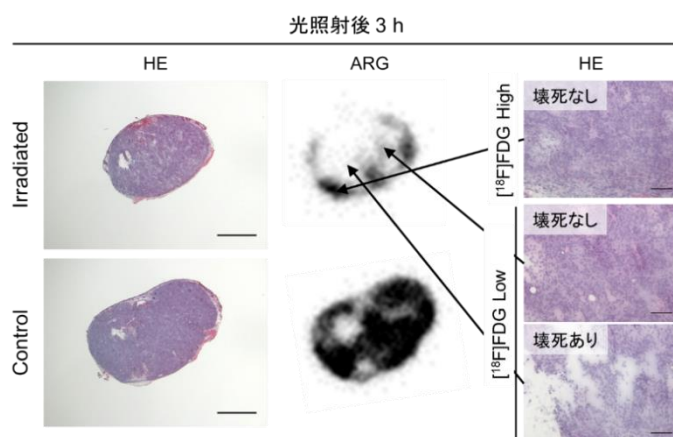


図 34 照射 3 h 後の ARG および HE 染色

照射側腫瘍において、組織が壊死していなくても [¹⁸F]FDG が集積しておらず、腫瘍の糖代謝が低下している領域が観察された。弱拡大画像のスケールバーは 2 mm、強拡大画像のスケールバーは 200 μ m。

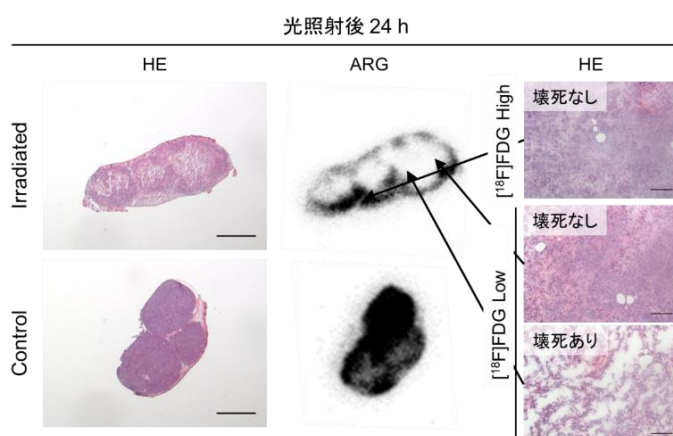


図 35 照射 24 h 後の ARG および HE 染色

照射側腫瘍では広範囲に壊死が観察され、PIT による治療効果が確認された。弱拡大画像のスケールバーは 2 mm、強拡大画像のスケールバーは 200 μ m。

光照射 24 h 後の照射側腫瘍では広範囲に壊死が認められ、 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ 低集積領域の大部分を占めていた。一方、非照射側腫瘍では壊死は認められず、3 h 後の非照射側腫瘍と同様に $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ は腫瘍全体に集積していた（図 35）。以上の結果から、PIT を行った腫瘍では顕著な壊死が生じない光照射 3 h 後の段階でも腫瘍の糖代謝が低下しており、24 時間後には腫瘍組織は壊死に至ることが示された。

***In vitro* における $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ の取り込み量の変化**

In vivo で腫瘍の糖代謝が低下することが明らかとなったため、続いて、がん細胞の糖代謝が低下しているか検討するために、PIT を行ったがん細胞の $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ の取り込み量の変化を *in vitro* において検討した。この結果、光照射 1 h 後には、PIT を行っていないがん細胞と比較して $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ の取り込み量が有意に低下しており、PIT によってがん細胞の糖代謝が迅速に低下したことが示された（図 36）。

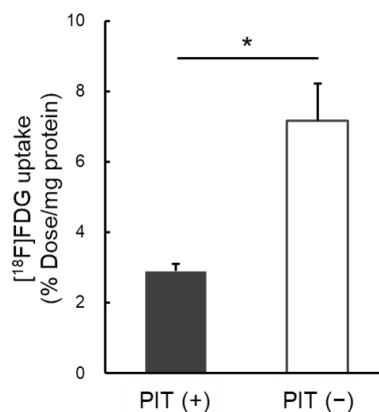


図 36 PIT を行ったがん細胞における $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ の取り込み量の変化

PIT を行ったがん細胞の $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ の取り込み量は、PIT を行っていないがん細胞と比較して有意に低下した。データは平均値 $\pm$ 標準誤差 ($n = 3$) として示し、有意差検定は Student's *t* test によって行った ($p^* < 0.05$)。

第3節 低酸素イメージング剤 ^{18}F FMISO を用いた検討

^{18}F FMISO-PET 画像と集積量

PIT を行った担癌マウスにおける腫瘍内の低酸素領域を画像化するため、低酸素イメージング剤 ^{18}F FMISO を投与して PET を撮像した。 ^{18}F FMISO-PET では、光照射 3 h および 24 h 後のどちらにおいても非照射側の腫瘍に ^{18}F FMISO が集積している（図 37）ことから、本検討で用いた担癌マウスの腫瘍内では低酸素領域が形成されていることが示された。 ^{18}F FDG を用いた際の HE 染色で広範囲に壊死が認められた結果（図 35）を考慮すると、低酸素状態の腫瘍に対しても PIT が治療効果を示すことが示唆された。

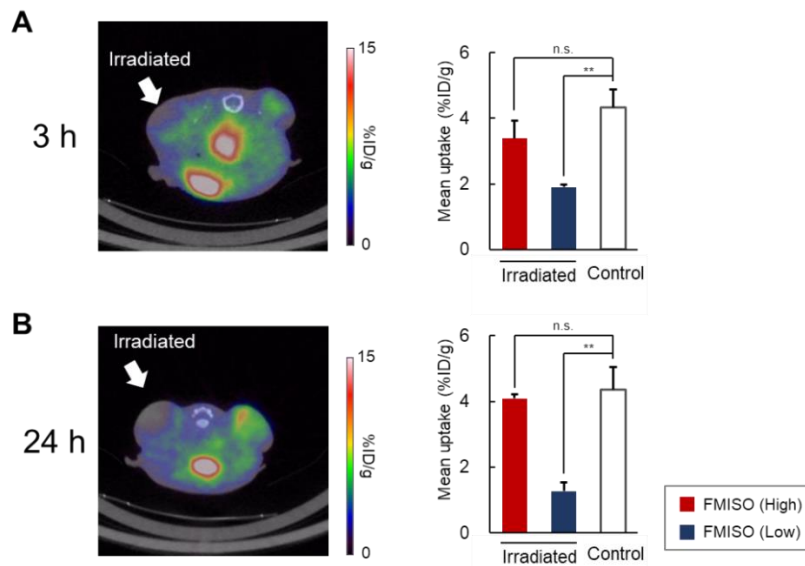


図 37 光照射 3 h 後および 24 h 後の ^{18}F FMISO-PET 画像と集積量

(A) 光照射 3 h 後の PET 画像（左）、 ^{18}F FMISO の集積量（右）。(B) 光照射 24 h 後の PET 画像（左）、 ^{18}F FMISO の集積量（右）。PET 画像左側が照射側の腫瘍。データは平均値 $\pm$ 標準誤差 ($n = 4-5$) として示し、有意差検定は Dunnett's test によって行った ($p^{**} < 0.01$)。

一方、光照射後の時間に関わらず照射側腫瘍において腫瘍周縁部で ^{18}F FMISO 集積が高かったものの、腫瘍中心部では ^{18}F FMISO 集積が低かった。また、非照射側腫瘍においては PET 画像上で、腫瘍全体に ^{18}F FMISO が集積していた。照射側腫瘍での ^{18}F FMISO 高集積領域と ^{18}F FMISO 低集積領域のそれぞれに関心領域を設定して集積量を算出したところ、中心部で認められた ^{18}F FMISO 低集積領域では、3 時間後、24 時間後ともに非照射側腫瘍と比較して有意に低い集積値を示した (3 h: 1.9 ± 0.1 vs 4.3 ± 0.5 %ID/g, 24 h: 1.3 ± 0.3 vs 4.4 ± 0.7 %ID/g)。したがって、PIT により照射側腫瘍の中心部への酸素供給が亢進され、低酸素状態が解消されたことが示唆された。

[¹⁸F]FMISO-ARG と Pimonidazole 免疫組織染色の比較

光照射後 3h 後の腫瘍における Pimonidazole の免疫組織染色像と凍結切片から取得した [¹⁸F]FMISO-ARG を比較した (図 38)。Pimonidazole は、低酸素部位に集積する免疫組織染色用の一般的な薬剤であり、[¹⁸F]FMISO が腫瘍内の低酸素部位特異的に集積していることを確認できる。その結果、照射側腫瘍、非照射側腫瘍ともに、Pimonidazole 陽性領域と [¹⁸F]FMISO 集積領域は一致し、本実験で用いた担癌マウスにおいて [¹⁸F]FMISO が非特異的に集積したのではなく、低酸素部位特異的に集積したことが示された。

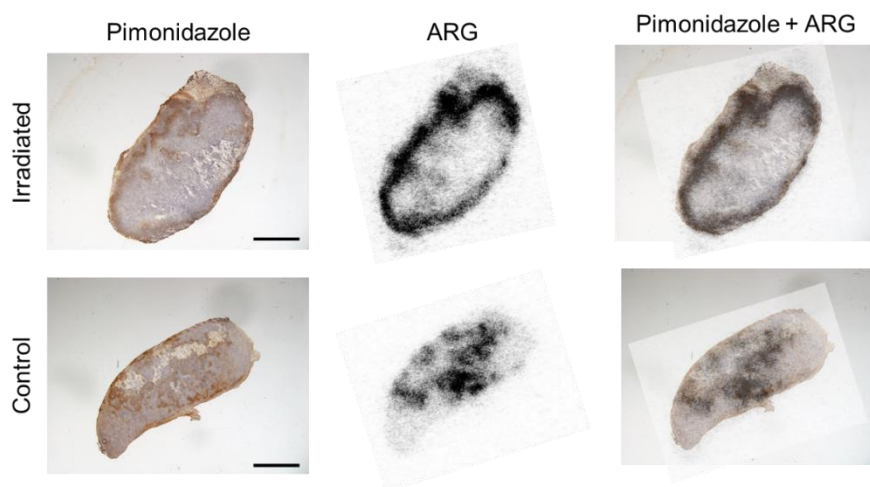


図 38 [¹⁸F]FMISO-ARG と Pimonidazole 免疫組織染色

光照射 3h 後の担癌マウスから摘出した (上段) 照射側腫瘍、(下段) 非照射側腫瘍の Pimonidazole 免疫組織染色および [¹⁸F]FMISO-ARG。スケールバーは 2 mm。

[¹⁸F]FMISO-ARG

光照射 3 h 後および 24 h 後における、照射側腫瘍および非照射側腫瘍の [¹⁸F]FMISO-ARG の結果を図 39 に示す。[¹⁸F]FMISO-PET においては、光照射後の時間に関わらず照射側腫瘍において周縁部で高い [¹⁸F]FMISO 集積が、中心部で低い [¹⁸F]FMISO 集積が認められたが、ARG においても PET と同様の集積分布が確認された。一方、非照射側の腫瘍では、PET 画像では [¹⁸F]FMISO が腫瘍全体に集積しているように見えたが、解像度がより高い ARG においては、腫瘍内で [¹⁸F]FMISO が不均一に集積していることが明らかとなった。ただし、照射側腫瘍のように、中心部と周辺部とで偏った集積は認められなかった。以上の PET および ARG の結果から、PIT により照射側腫瘍の中心部への酸素供給が亢進されることで、低酸素状態が解消されたことが示唆された。

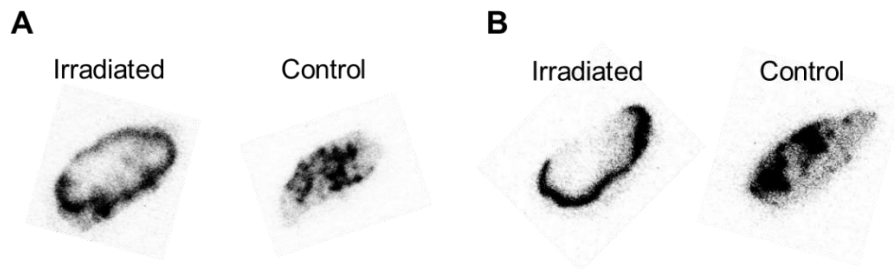


図 39 $[^{18}\text{F}]\text{FMISO-ARG}$

(A) 光照射 3 h 後、(B) 光照射 24 h 後の腫瘍切片の $[^{18}\text{F}]\text{FMISO-ARG}$ 。

血管内皮細胞マーカーCD31 の免疫組織染色

続いて、このように酸素供給の亢進が照射側腫瘍の中心部で生じて低酸素状態が解消される理由を検討するために、血管内皮細胞マーカーである CD31 の免疫組織染色を行い $[^{18}\text{F}]\text{FMISO-ARG}$ と比較した。その結果、光照射 3 h 後の腫瘍における $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ 低集積領域では、CD31 陽性の血管内皮細胞が占める面積が多い傾向が認められた (図 40)。すなわち、腫瘍内の血流が PIT によって変化することで腫瘍中心部へ酸素が供給される可能性が示された。一方で 24 h 後の照射側腫瘍では大部分が壊死しており (図 41)、 $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ が細胞内に集積しなかったもしくは送達されなかったと考えられる。

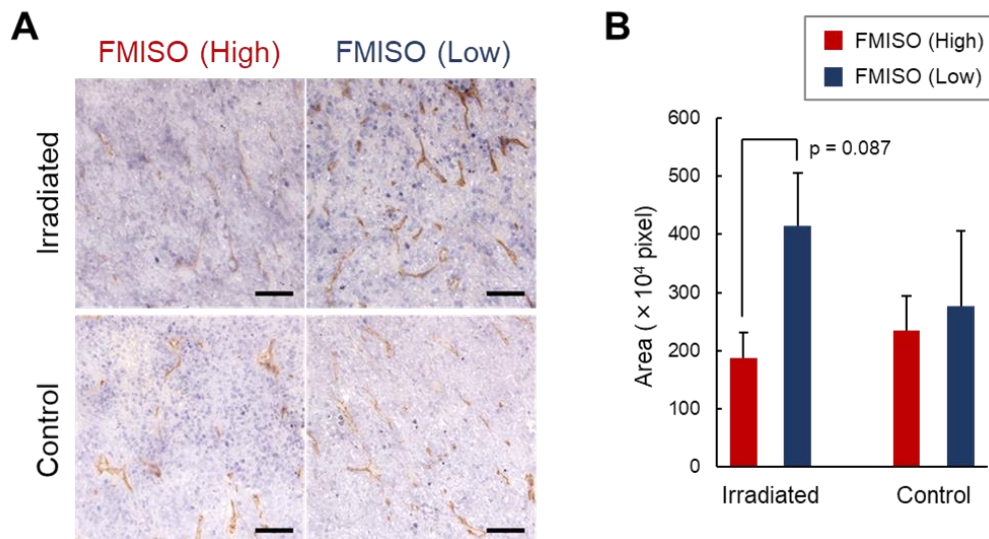


図 40 光照射 3 h 後の腫瘍における CD31 免疫組織染色

(A) (上段) 照射側腫瘍、(下段) 非照射側腫瘍の CD31 免疫組織染色。スケールバーは 20 μm 。(B) CD31 陽性領域の定量値。データは平均値 $\pm$ 標準誤差 ($n = 3$) として示し、有意差検定は student's t test によって行った。

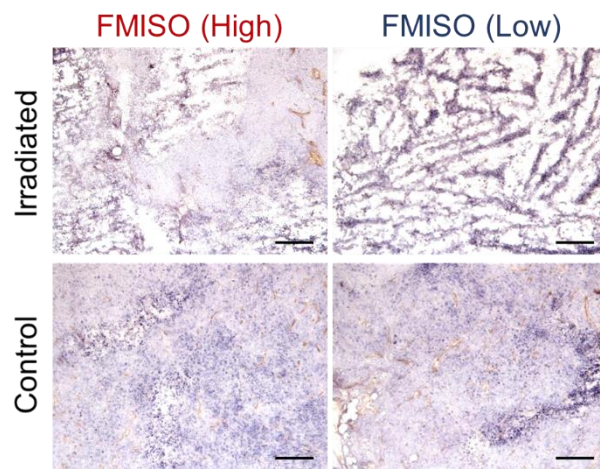


図 41 光照射 24 h 後の腫瘍における CD31 免疫組織染色

(上段) 照射側腫瘍、(下段) 非照射側腫瘍の CD31 免疫組織染色。スケールバーは 200 μm 。

考察

水溶液中の IR700 は、フタロシアニン骨格に結合している水溶性の軸配位子が光照射によって切断されることで凝集体を形成する。また、抗体-IR700 も光照射によって水溶液中で凝集体を形成すること、また、原子間力顕微鏡 (Atomic force microscopy; AFM) を用いた検討においてマイカ基板上の抗体-IR700 の形状が変化して凝集体となることがわかっており^{61,62,78}、この物性変化が細胞膜上で生じることではがん細胞が傷害されることが考えられる。凝集体形成の反応が進行するとともに IR700 は蛍光を発さなくなるが、EGFR を発現する 4 種のがん細胞と Pan-IR700 を用いた本検討において、培養細胞においても光照射後に IR700 の蛍光が消失することが確認された (図 30)。また、*in vivo* においても、100 J/cm² の光照射 (250 mW/cm², 6 min 40 sec) の直前および直後に蛍光イメージングを行ったところ、光照射した側の腫瘍でのみ IR700 の蛍光が消失していた (図 31)。したがって、水溶液や培養細胞においてのみならず、生体内でも抗体-IR700 の凝集体形成の反応が進行していると考えられ、培養細胞において示された PIT による迅速な細胞傷害が、*in vivo* においても誘発されている可能性が示唆された。実際、治療を行ったマウスにおいては、切断された IR700 の軸配位子が尿中に排泄されることも見いだされており、生体内で凝集体形成反応が生じていることを支持している⁶¹。

糖代謝イメージング剤 [¹⁸F]FDG を用いて PIT による腫瘍の糖代謝の変化を検討したところ、光照射 3 h 後において、非照射側の腫瘍と比較して照射側腫瘍への [¹⁸F]FDG の集積量は有意に小さいことが明らかとなった。また、光照射 24 h 後にも同様に、照射側腫瘍への [¹⁸F]FDG の集積量は有意に小さかった (図 33)。また、HE 染色および ARG を比較することで、組織学的変化と [¹⁸F]FDG 集積の関連を検討したところ、光照射 3 h 後の腫瘍では壊死していなくても [¹⁸F]FDG が集積していない領域が観察され、PIT は治療後早期にがん細胞の糖代謝を低下させることが示された (図 34)。さらに、光照射 24 h 後の HE 染色では広範囲に壊死が認められ、がん細胞の糖代謝が低下した後に腫瘍は壊死に至ることが示された (図 35)。既報において、光照射後 1.25 h であるさらに治療早期の段階でも腫瘍の糖代謝が低下することが示されているが⁷⁹、HE 染色と ARG との比較などの検討はされておらず、本研究によって腫瘍が壊死に至るまでの過程における組織学的な変化も含めた知見が得られた。

さらに、低酸素イメージング剤 [¹⁸F]FMISO を用いた結果、本検討で用いたマウス腫瘍は PET において [¹⁸F]FMISO が高集積であり、低酸素領域が形成されていることが確認された (図 37)。ARG では、非照射側の腫瘍への [¹⁸F]FMISO の集積分布は [¹⁸F]FDG ほど均一ではなく、特に壊死領域の近傍に高い [¹⁸F]FMISO 集積が認められた (図 39)。また、この分布は Pimonidazole と一致しており、¹⁸F]FMISO は低酸素領域特異的に集積し

たことがわかった(図 38)⁸⁰。このように低酸素領域が形成されている腫瘍に対して PIT を行ったところ、照射後 24 h の HE 染色像において広範囲の壊死領域が形成されており、PIT が低酸素腫瘍に対しても治療効果を示すことが明らかとなった。さらに、 ^{18}F FMISO-PET 画像の照射側腫瘍においては、光照射後の時間に関わらず腫瘍の周辺部で高い ^{18}F FMISO 集積が、中心部で低い ^{18}F FMISO 集積が観察された(図 37)。ARG においても、腫瘍中心部で ^{18}F FMISO が低集積、周辺部で ^{18}F FMISO が高集積であり、PET と同様の集積分布が認められた(図 39)。このように照射側の腫瘍において ^{18}F FMISO が中心部で低集積になる理由を検討するために、腫瘍切片の血管内皮細胞の免疫組織染色を行った結果、光照射 3 h 後の腫瘍の ^{18}F FMISO 低集積領域では血管内皮細胞が占める割合が高い傾向が認められた(図 40)。したがって、PIT を行った腫瘍の中心部では血管の拡張とともに血流が増大し、低酸素状態が解消されることが示唆された。また、PIT によって腫瘍内圧が減少し、薬剤が腫瘍に送達されやすくなるとの報告もあり、腫瘍内の血流が増大することを支持している⁸¹。

このような PIT によって引き起こされる腫瘍に特有な機能的変化について、核磁気共鳴画像法(Magnetic resonance imaging; MRI)⁸²や、化合物のスペクトル変化を捉えることができる光音響イメージングなどの他の生体イメージング法を利用することで、腫瘍内の水分子の拡散や抗体-IR700 の凝集体形成などに関する情報を得ることができ、*in vivo*における PIT の作用機序の解明がより進むと考えられる。また、腫瘍内では ^{18}F FMISO が高集積することによって画像化できる慢性低酸素に加え、分単位で変化する間欠性低酸素の存在が指摘されている⁸³。今後、電子常磁性共鳴(Electron paramagnetic resonance; EPR)イメージング法などの技術の発展によって高い時間分解能と空間分解能で腫瘍内の酸素分圧を捉えることができれば、光照射中に腫瘍内で生じる変化も明らかになると考えている。

PET イメージング剤を用いて PIT 後の腫瘍に特有な機能的変化を検討した本研究成果は、PIT の作用機序の解明だけでなく治療効果の予測や判定にも応用できると考えられる。図 31 で示されたように、IR700 の凝集体形成反応の進行は蛍光イメージングによって迅速かつ簡便に可視化することができる。したがって、光照射中、あるいは光照射直後に、腫瘍に対して適切な光照射がされており、その後に治療効果が現れるかどうかを把握するのに極めて有用である。また、PET では適切な分子イメージング剤を用いることで、腫瘍に特有な生化学・生理学的性質に基づいた機能情報を取得することができる。本研究で用いた ^{18}F FDG および ^{18}F FMISO の集積量は PIT 後に大幅に減少しており、治療効果の指標として利用できる可能性がある。術中には蛍光イメージング、治

療後の経過観察には PET などのように複数のイメージングモダリティーを組み合わせれば迅速かつ正確に PIT の治療効果の予測や判定が行えると考ええる。

以上、本章において、*in vitro* で認められた光照射後の抗体-IR700 の凝集体形成が、*in vivo* でも誘発されていることが IR700 の *in vivo* 蛍光イメージングによって示唆された。また、 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ を用いた検討から PIT による壊死に至る以前の光照射後早期に腫瘍の糖代謝が低下することが明らかとなった。さらに、 $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ を用いた検討から、PIT によって腫瘍中心部への血流が増加することで、酸素供給が亢進されることが示唆された。したがって本研究は、PIT によって生体内で生じる腫瘍特異的な機能的変化を明らかにしたとともに、光照射後早期に認められる $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ および $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ の集積減少が治療効果の指標として利用できる可能性も示したものであるといえる。

第 3 章

深部の腫瘍を治療可能な体内埋め込み型ワイヤレス LED の開発

現在、臨床においては PIT の光照射デバイスとして、光ファイバー前方の照射を行う体表面照射用のフロンタルディフューザーと、光ファイバー側面から円柱状に光を放出する組織内照射用のシリンドリカルディフューザーの 2 種類が用いられている（図 42）。体表面付近のがん細胞に対しては、体外から照射するフロンタルディフューザーを用いることで光照射を行うことができる。しかし、PIT で用いる波長 690 nm の近赤外光は可視光の中では生体透過性が比較的高い光であるものの、組織による吸収や散乱などの影響による減衰は避けられないため、体内深部の腫瘍を治療するためには体外からの照射では不十分である^{25,26}。そこで、フロンタルディフューザーのみでは照射できない部位がある場合には、シリンドリカルディフューザーを腫瘍に挿入することで光照射して治療する。

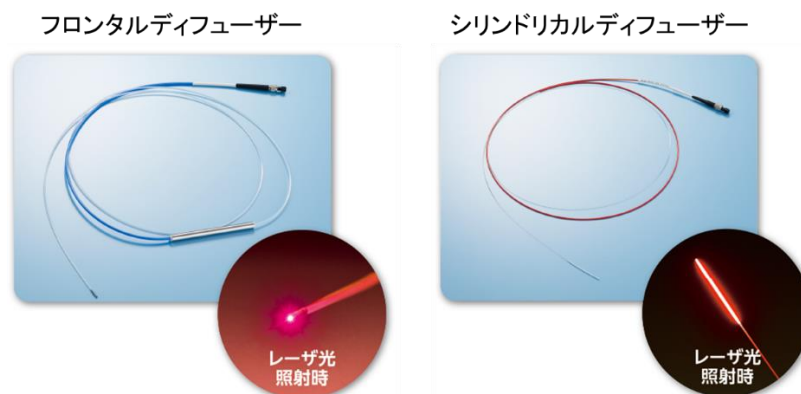


図 42 臨床における光照射デバイス

（左）光ファイバー前方の照射を行う体表面照射用のフロンタルディフューザー、（右）光ファイバー側面から円柱状に光を放出する組織内照射用のシリンドリカルディフューザー。楽天メディカル社 Web サイト（https://hcp.rakuten-med.jp/product_overview）より引用（2020 年 12 月 28 日 閲覧）。

PIT では、薬剤投与と翌日の光照射による単回の治療よりも、繰り返し治療のほうが高い抗腫瘍効果が得られることが報告されている^{28,84}。抗体-IR700 自体には毒性はなく、臨床においても、PIT 薬剤の投与と光照射のサイクルを、完全奏効が得られない場合には最大 4 回まで行って治療できると定められている。繰り返し治療を行う際、体外からの光照射が容易な体表面付近のがん細胞であれば、上述したフロンタルディフューザー

を用いることで容易に光照射可能である。一方、外部からの光照射では不十分な腫瘍においてはシリンドリカルディフューザーを挿入することとなるが^{85,86}、繰り返し照射の都度の挿入の手技を省くことは患者および術者の負担軽減につながると考えられる。

そこで著者は、体内に留置できる光デバイスを用いれば、深部の腫瘍も容易に繰り返して光照射できると考え、PIT で利用可能な体内埋め込み型光デバイスを開発した。この際、体内埋め込み型光デバイスの電力として電池を用いた場合には、電解液漏出や起電力低下の懸念が生じる。そこで、本デバイスにおいては電磁誘導を利用したワイヤレス給電技術を用いて体外から電力を供給することとした。これにより、体内埋め込み部分を小型に設計できる上、電池とは異なり半永久的な電力供給が可能である⁸⁷。また、デバイスの埋め込みによる侵襲性を軽減するために、光源には小型な発光体である LED (Light-emitting diode) を選択した。

すなわち第 3 章では、体外からの光が到達できない深部の腫瘍を PIT によって治療するために、電磁誘導によって体外から電力供給できる体内埋め込み型ワイヤレス LED を開発し、PIT の光源として機能して治療効果を示すか検討した。

第 1 節 埋め込み型ワイヤレス LED 装置の作製

外部給電装置の作製

送電コイルは直径 2 mm の銅リッツ線を内径 150 mm、外径 300 mm になるように 6 回巻いて作製した。このコイルと 1 MHz で共振するコンデンサー、送電コイル、インバーターを直列に接続して外部給電装置を作製した（図 43A、B）。インバーターから回路に高周波電流が流れることで、LED カプセルにワイヤレスで電力を供給するための磁場が発生する。

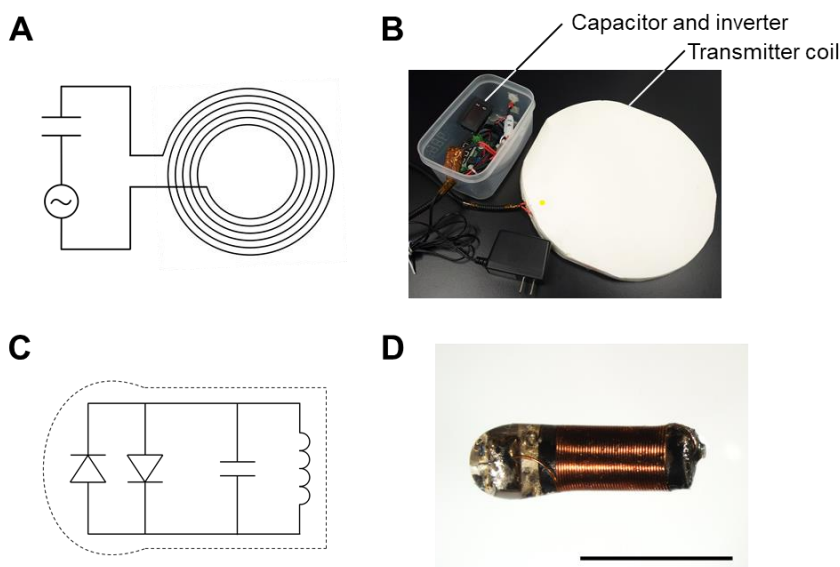


図 43 埋め込み型ワイヤレス LED 装置

(A) 外部給電装置の回路図。コンデンサー、送電コイル、インバーターを直列で接続して作製した。(B) 外部給電装置の写真。(C) LED カプセルの回路図。受電コイル、LED 素子 2 個、コンデンサーを並列に接続して作製した。(D) LED カプセルの写真。体内埋め込み後の免疫応答を避けるために、カプセル全体はエポキシ樹脂によって被覆されている。スケールバーは 5 mm。

LED カプセルの作製

受電コイルは、直径 2 mm、長さ 5 mm の透磁性の高いフェライトに直径 0.1 mm の銅線を 30 回程度巻いて作製した。光源として、波長 680–700 nm の近赤外光を発する LED 素子（SMT690D, ウシオ オプトセミコンダクター）を 1 カプセルの先端に 2 個搭載した。これらの受電コイル、LED 素子、コンデンサーを並列に接続し、長さ 7 mm 程度の LED カプセルを作製した（図 43C, D）。なお、体内埋め込み後の免疫応答を避けるために、エポキシ樹脂によって LED カプセル全体を被覆した⁸⁸。

このように作製したワイヤレス LED カプセルを担癌マウスに留置した後、*in vivo* 蛍光イメージングを行ったところ、LED カプセル自体が IR700 を同じ波長領域の蛍光を

発することが明らかとなった。そこで、LED カプセルを留置したマウスで IR700 の蛍光イメージング画像を取得するため、*in vivo* の検討においては LED カプセルを黒い塗料で染めて蛍光を発さないように処置した後にエポキシ樹脂によって全体を被覆した LED カプセルを用いた（図 44）。

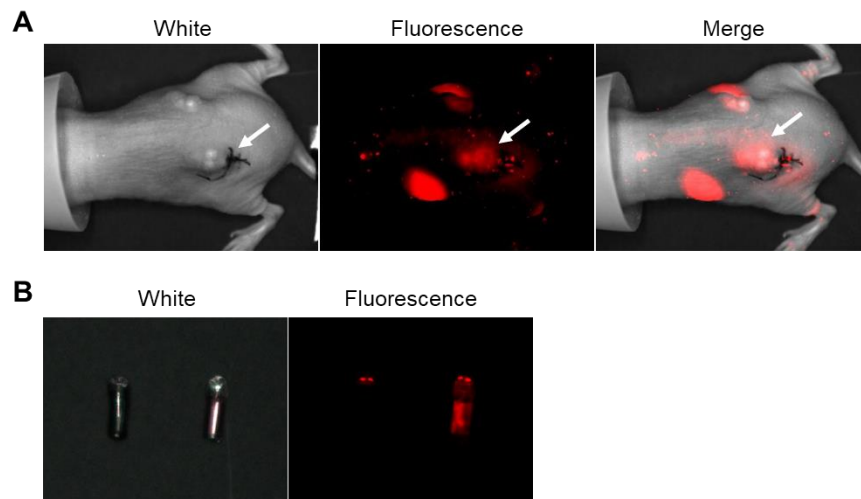


図 44 ワイヤレス LED カプセル由来の蛍光

(A) Pan-IR700 を投与した担癌マウスの腫瘍下部にワイヤレス LED カプセルを留置して IR700 の蛍光を撮影したところ、LED カプセル由来の蛍光が認められた。(B) 左: 黒い塗料によって蛍光を発さないように処置したワイヤレス LED カプセル、右: 黒い塗料によって蛍光を発さないように処置していないカプセル。エポキシ樹脂の塗布の前の処置により、カプセルの大部分で IR700 の波長領域の蛍光が認められなくなった。

解析ソフトウェアによる磁束密度のシミュレーション

磁束密度のシミュレーションソフトウェア Femtet[®]による解析の結果、作製した送電コイルに 0.6 A の電流が流れたときに生じる磁束密度は、最大点・中心点ともに送電コイルからの距離が長くなるにつれて小さくなった（図 45）。

また、送電コイルから 4 cm 以上離れた位置で磁束密度の最大値が 0.1 mT 以下になることが明らかとなった。国際非電離放射線防護委員会（ICNIRP; International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection）によって磁束密度が 0.1 mT 以下では人体に影響がないことが示されているため、以下のすべての実験では、LED カプセルは送電コイルから 5 cm 以上離れた位置で動作させた。

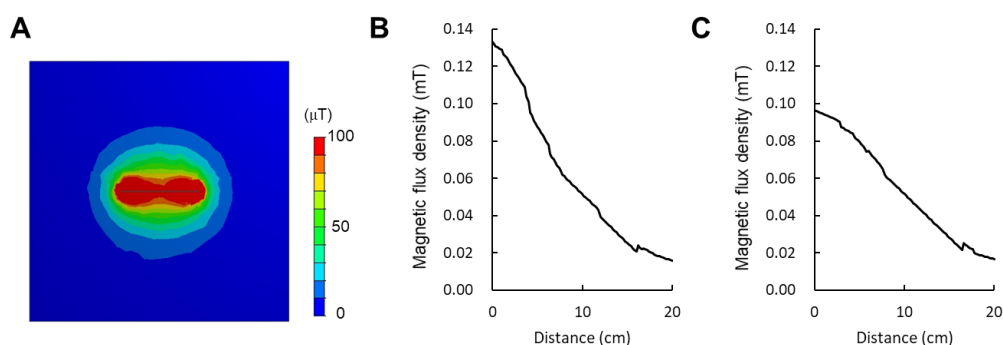


図 45 Femtet[®]による磁束密度のシミュレーション

(A) 送電コイルを中心としてその上下に生じている磁場の磁束密度のカラーマップ。中央の黒い直線は、側方から見た直径 30 cm の送電コイルを示す。

(B) 送電コイルに対して平行な平面上における最大磁束密度の変化（最大点）。距離 5 cm 以上では磁束密度は 0.1 mT を超えない。

(C) 送電コイル中心地の真上の点における磁束密度の変化（中心点）。

ワイヤレス LED 装置の光強度

外部給電装置から発する磁場によって受電コイルを内蔵する LED カプセルにワイヤレスで電力を供給し、LED を発光させることに成功した（図 46）。そのときの強度を光パワーメーターで測定したところ、Z 軸方向と XY 軸方向それぞれで、高さ 100 mm では 2.8 mW/cm² と 1.1 mW/cm²、高さ 150 mm では 0.61 mW/cm² と 0.44 mW/cm²、高さ 200 mm では 0.52 mW/cm² と 0.20 mW/cm² であった（表 1）。LED カプセルと外部給電装置間の距離に関わらず、LED カプセルが Z 軸方向で送電コイル中心部に位置しているときに送電効率が最大、LED カプセルが XY 軸方向で送電コイル周縁部に位置しているときに送電効率が最小となる。また、微弱ではあるものの、Z 軸方向を向いた LED カプセルは高さ 400 mm の位置でも点灯することを確認した。成人の腹部体厚の平均が 200 mm 以下であることを考慮すると、本研究で作製したワイヤレス LED 装置は、ヒト体内の LED カプセルの留置場所に関わらず外部給電装置から電力を供給できる能力を有すると考えられる。

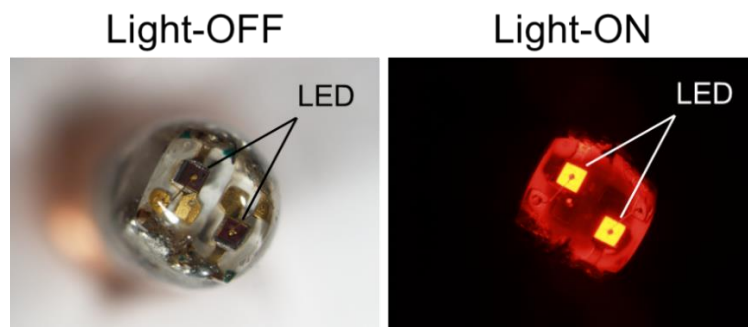


図 46 LED カプセル点灯時の様子

(左; Light-OFF) 非点灯時。(右; Light-ON) 点灯時。LED 素子がカプセル先端に 2 個設置されている。

表 1 ワイヤレス LED 装置の光強度

Power supply distance (mm)	Power density (mW/cm ²)	
	Z-axis	XY-axis
100	2.8	1.1
150	0.61	0.44
200	0.52	0.20

第 2 節 培養細胞に対する PIT による細胞傷害効果

A431-GFP-luc 細胞に対する PIT

培養ディッシュ底面に LED カプセルを配置し、送電コイルから 150 mm 離して設置した。LED カプセルと Pan-IR700 を用いて、EGFR を発現する A431-GFP-luc 細胞に対して PIT を行ったところ、光照射と薬剤添加の両方を行った細胞では、細胞膨張と水疱形成などの顕著な細胞傷害が認められた (図 47)。また、死細胞を染色する蛍光試薬である EthD-1 で染まった死細胞の数は近赤外光の照射時間すなわち照射量依存的に増加した。一方、薬剤を加えず光照射のみを行った細胞、薬剤のみを加えた細胞では細胞傷害が認められなかった。

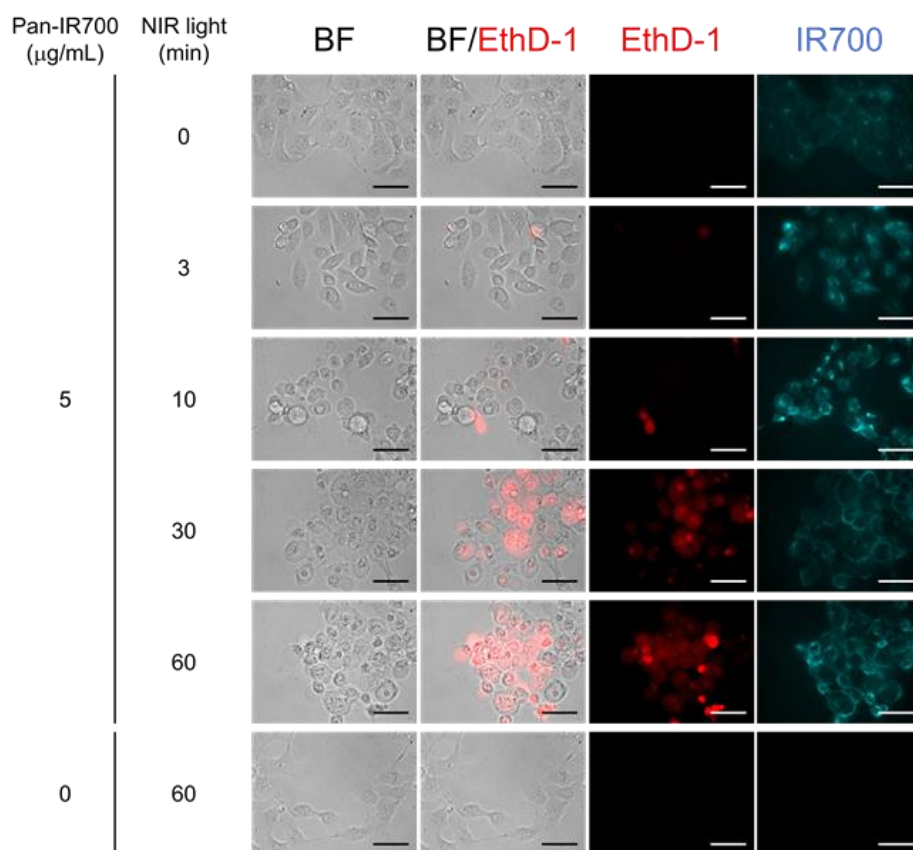


図 47 A431-GFP-luc 細胞に対する PIT (顕微鏡画像)

PIT を行った A431-GFP-luc 細胞の明視野 (BF)・蛍光画像。細胞は Pan-IR700 (5 $\mu\text{g/mL}$) を添加して 37°C で 1 h インキュベートした後、ワイヤレス LED 装置によって光照射を行った。明視野画像では細胞膨張や水疱形成などの細胞傷害が認められ、蛍光画像では EthD-1 で染まる様子が観察された。スケールバーは 50 μm 。

また、光照射後の A431-GFP-luc 細胞の培地中にルシフェリンを添加して発光イメージングを行ったところ、発光強度は光照射を行った領域で減少し、その減少の範囲は照射量に依存して拡大した（図 48A）。また、この画像から発光強度を定量したところ、照射量依存的に発光強度が低下していることが確認された（図 48B）。以上の結果から、開発した LED カプセルを用いて、A431-GFP-luc 細胞に対して PIT を行えることが示された。

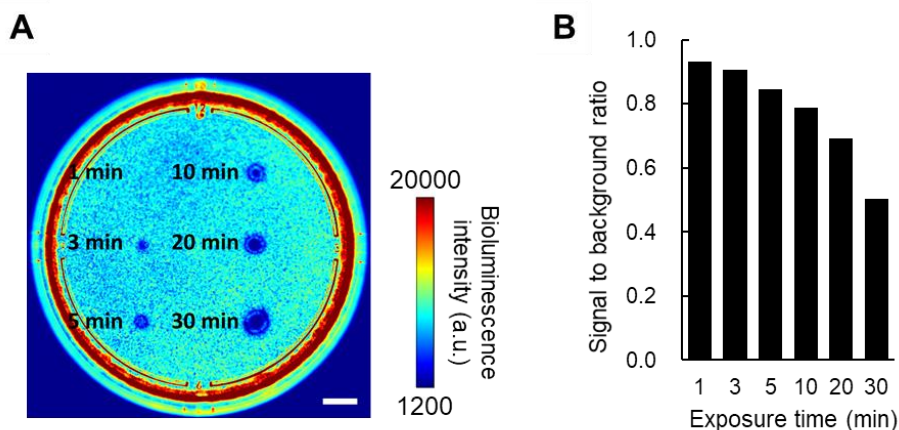


図 48 A431-GFP-luc 細胞に対する PIT（発光イメージング画像）

PIT を行った A431-GFP-luc 細胞を培養する培養ディッシュの (A) 発光イメージング画像、および (B) 各部位の発光強度の定量値。10 cm ディッシュの 6 ヶ所に対して、異なる照射時間（1, 3, 5, 10, 20, 30 min）で光照射を行ったところ、照射量依存的にルシフェラーゼの発光強度の減少が認められた。スケールバーは 1 cm。

3T3-HER2 細胞に対する PIT

続いて、他のがん細胞株に対しても本装置を用いた光照射によって PIT を行えるか検討するため、A431-GFP-luc 細胞における PIT と同様の照射条件で、Tra-IR700 を用いて HER2 を発現する 3T3-HER2 細胞に対して PIT を行った。光照射を開始してから 2 h 後に蛍光顕微鏡を用いて細胞の形態を観察したところ、明視野画像において細胞膨張と水疱形成などの形態変化が認められた（図 49）。また、死細胞染色試薬 EthD-1 で染まった死細胞の数は照射量依存的に増加した。一方、薬剤添加または光照射の片方のみを行った細胞では上記のような細胞傷害は認められなかった。以上の結果から、開発したワイヤレス LED 装置が培養細胞に対して PIT の光源として機能して細胞死を引き起こすことが示された。

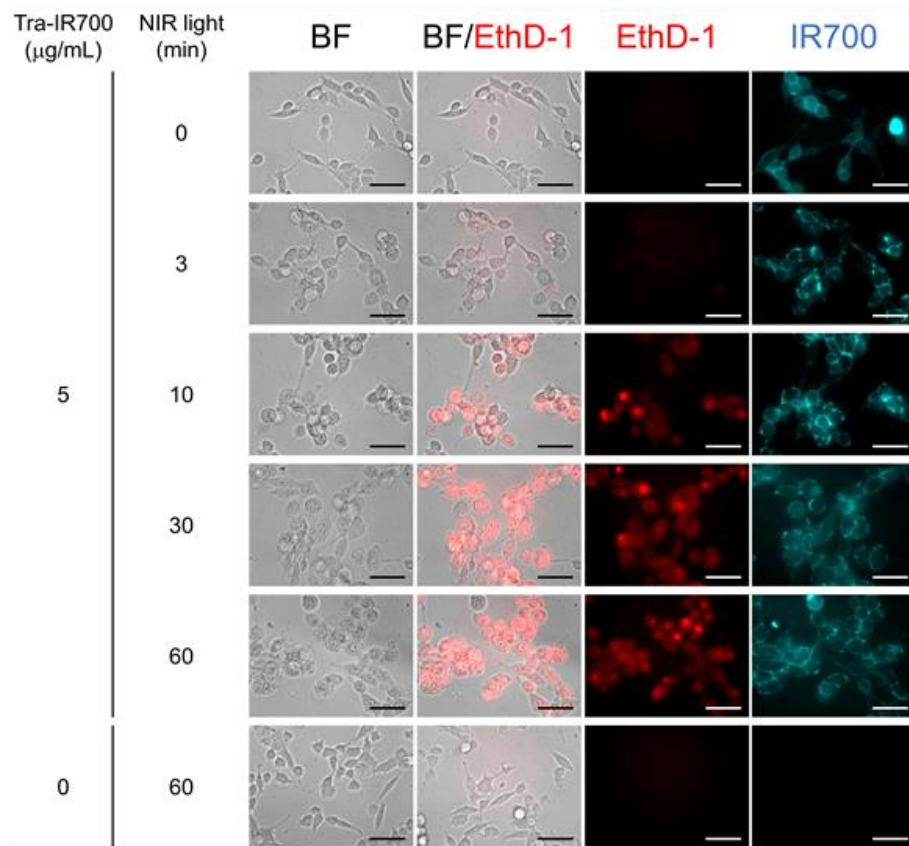


図 49 3T3-HER2 細胞に対する PIT

PIT を行った 3T3-HER2 細胞の明視野・蛍光画像。細胞は Tra-IR700 (5 $\mu\text{g/mL}$) を添加して 37°C で 1 h インキュベートした後、ワイヤレス LED 装置によって光照射を行った。明視野画像では顕著な細胞傷害が観察され、蛍光画像では EthD-1 の取り込み量の増大が認められた。スケールバーは 50 μm 。

第3節 担癌モデルマウスに対する PIT による治療効果

IR700 蛍光イメージング

次に、*in vivo* において本ワイヤレス LED 装置が PIT の光源として機能するか検討した。第2章で示したように、光照射された腫瘍では抗体-IR700 の凝集体形成反応の進行に伴って IR700 の蛍光強度が大きく減少する⁶¹。そこで、開発したワイヤレス LED 装置によって腫瘍が十分に光照射されているかを IR700 の蛍光イメージングによって検討した。Day 1 では、Pan-IR700 は両側の腫瘍に集積していた。Day 2 では、治療群 (PIT-treated) の LED カプセルを植えて光照射を行った側の腫瘍 (LED (+)_NIR (+)) は、もう片方の腫瘍 (LED (-)_NIR (-)) と比較して IR700 の蛍光強度が有意に減少した。したがって、皮下に留置した LED カプセルにより腫瘍が十分に光照射されたことが示された。一方、ダミーLED を留置した非治療群 (Non-treated) においては、両腫瘍間に IR700 の蛍光強度に差は認められなかった (図 50)。

また、day 6 に腫瘍を摘出した後に *ex vivo* 蛍光イメージングを行ったところ、*in vivo* の結果と同様、LED カプセルを植えて光照射を行った側の腫瘍 (LED (+)) は、もう片方の腫瘍 (LED (-)) と比較して IR700 の蛍光強度が小さかった。

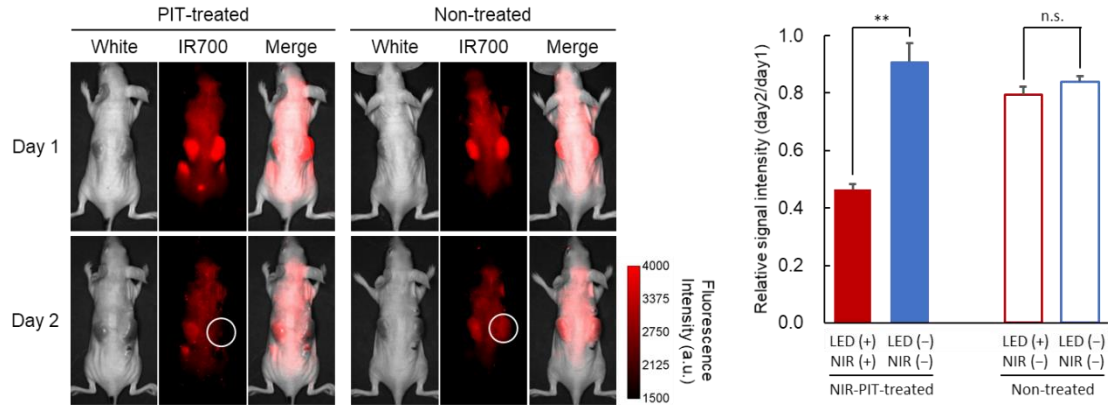


図 50 IR700 の *in vivo* 蛍光イメージング

(左) 治療群 (PIT-treated) と非治療群 (Non-treated) のマウスの day 1 と day 2 における IR700 蛍光イメージング画像。白丸は LED カプセルを留置した側の腫瘍を示しており、治療群ではその腫瘍で IR700 の蛍光が消失していた。

(右) 各腫瘍における蛍光強度の比 (day 2/day 1)。治療群で LED カプセルを植えた側の腫瘍 (LED (+)_NIR (+)) でのみ蛍光強度が有意に減少した。(n = 6 treated mice, n = 3 non-treated mice, **p < 0.01)。データは平均値 ± 標準誤差として示し、有意差検定は student's *t* test によって行った (p** < 0.01)。

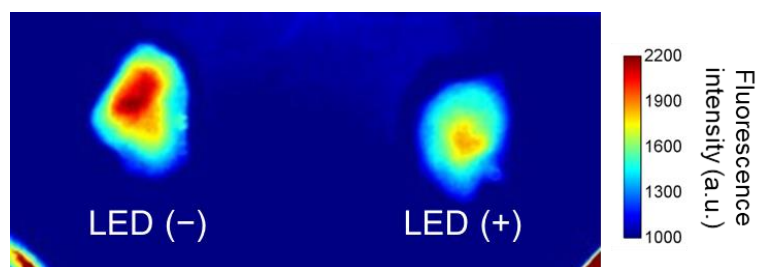


図 51 IR700 の *ex vivo* 蛍光イメージング

Day 6 に摘出した腫瘍の IR700 蛍光イメージング画像。LED を留置して光照射を行った側の腫瘍（右）は行っていない側（左）の腫瘍と比較して IR700 の蛍光強度が小さかった。

GFP 蛍光イメージング

Day 6 で腫瘍を摘出する直前にがん細胞が発現する GFP の *in vivo* 蛍光イメージングを行った。その結果、ワイヤレス LED カプセルを留置して光照射した腫瘍(LED (+)_NIR (+)) でのみ A431-GFP-luc 細胞由来の GFP の蛍光が消失しており、PIT による治療効果が *in vivo* イメージングによって示された (図 52) ^{89,90}。一方、ダミーの LED カプセルを留置した腫瘍 (LED (+)_NIR (-)) や、LED を留置していない側の腫瘍では GFP の蛍光が観察された。

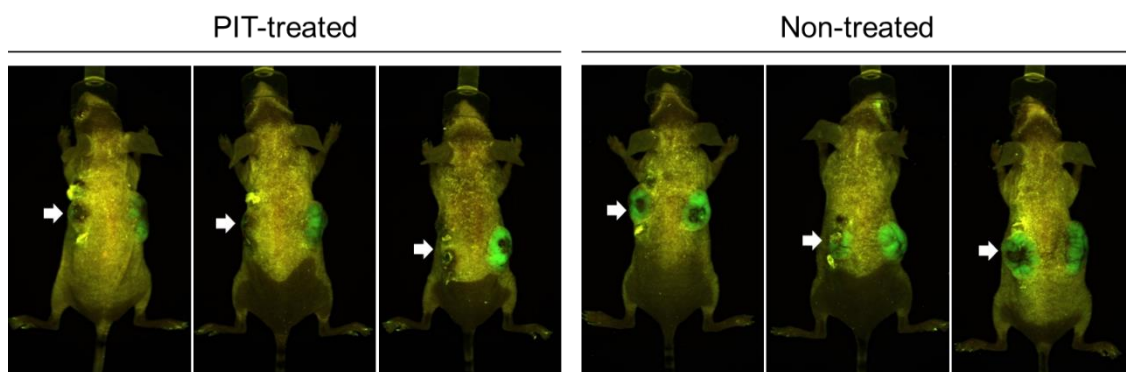


図 52 GFP 蛍光イメージング

Day 6 における治療群 (PIT-treated) と非治療群 (Non-treated) のマウスの GFP 蛍光イメージング画像。左側が LED カプセルを留置した側の腫瘍であり、治療群の光照射を行った腫瘍 (LED (+)_NIR (+)) でのみ GFP の蛍光が消失していた。一方、ダミーの LED カプセルを留置した腫瘍 (LED (+)_NIR (-)) や、右側の LED を留置していない側の腫瘍では蛍光が認められた。(n=3)

腫瘍体積の変化

Day -2 から day 6 までの腫瘍体積の変化を図 53 に示す。治療群のマウスでは、LED カプセルを植えていない腫瘍 (LED (-)_NIR (-)) と比較し、LED カプセルを植えた側の腫瘍 (LED (+)_NIR (+)) の体積は、day 5 と day 6 で有意に小さかった (day 5, 6: $p = 0.011, 0.010$) (図 53A)。一方、非治療群のマウスでは、ダミーLED カプセルを植えた腫瘍 (LED (+)_NIR (-)) と植えていない腫瘍 (LED (-)_NIR (-)) で体積に有意な差は認められなかった (図 53B)。また、day 6 に摘出した腫瘍の画像を図 54 に示す。治療群で光照射を行った腫瘍 (LED (+)_NIR (+)) はその他の腫瘍よりも長径および短径が小さかった。

以上の結果から、開発したワイヤレス LED 装置を PIT の光源として利用することで、*in vivo* においても治療効果が認められることが明らかとなった。

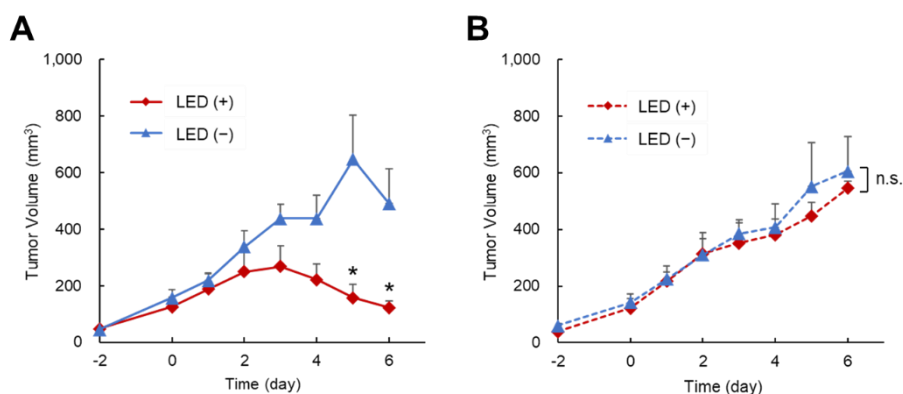


図 53 腫瘍体積の変化

(A) 治療群の LED カプセルを植えた側 (LED (+)) と植えていない側の腫瘍 (LED (-)) の day -2 から day 6 における体積変化。LED カプセルを植えて光照射を行った腫瘍では、その腫瘍体積が day 5 と day 6 の両日で有意に抑制された ($n = 6$)。

(B) 非治療群の LED カプセルを植えた側 (LED (+)) と植えていない側の腫瘍 (LED (-)) の day -2 から day 6 における体積変化。2 種の腫瘍間に有意な差は認められなかった ($n = 3$)。

データは平均値 $\pm$ 標準誤差として示し、有意差検定は student's *t* test によって行った ($p^* < 0.05$)。

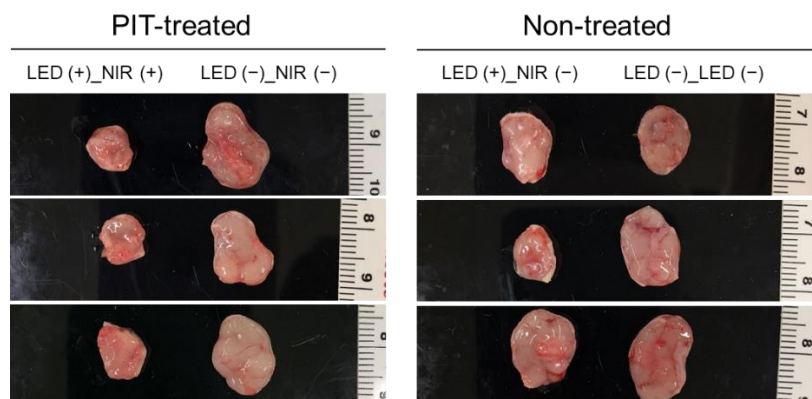


図 54 摘出した各腫瘍の画像

Day 6 に摘出した腫瘍の写真。治療群（PIT-treated）の光照射を行った腫瘍（LED (+)_NIR (+)）はその他の腫瘍と比べて長径、短径ともに顕著に小さかった。（n = 3）

マウス体重の変化

LED カプセルの埋め込みや外部給電装置からの磁場によるマウスへの影響を検討するため体重を測定した。その結果、治療群と非治療群の両方でマウス体重に変化は認められず（図 55）、本治療法によるマウスへの全身性の副作用はないかもしくは極めて小さいことが示唆された。

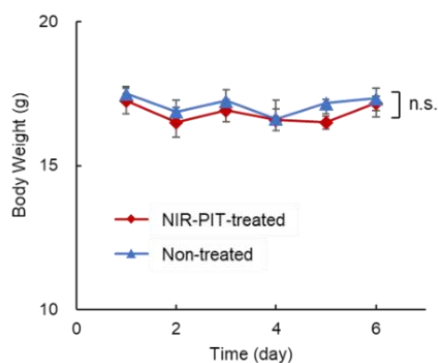


図 55 マウス体重の変化

治療群、非治療群のマウスの両方で体重に大きな変化はなく、2 者の間に有意な差は認められなかった（n = 6 treated mice, n = 3 non-treated mice）。データは平均値 ± 標準誤差として示し、有意差検定は student's *t* test によって行った。

HE 染色

摘出した腫瘍切片の HE 染色の結果、治療群で光照射を行った腫瘍 (LED (+)_NIR (+)) では腫瘍組織に著しい壊死が観察され、腫瘍体積の変化だけでなく組織学的検討によっても PIT による治療効果が確認された。一方、治療群の LED を植えていない側の腫瘍 (LED (-)_NIR (-))、および、非治療群の両腫瘍 (LED (+)_NIR (-)、(LED (-)_NIR (-)) では傷害は観察されなかった (図 56)。

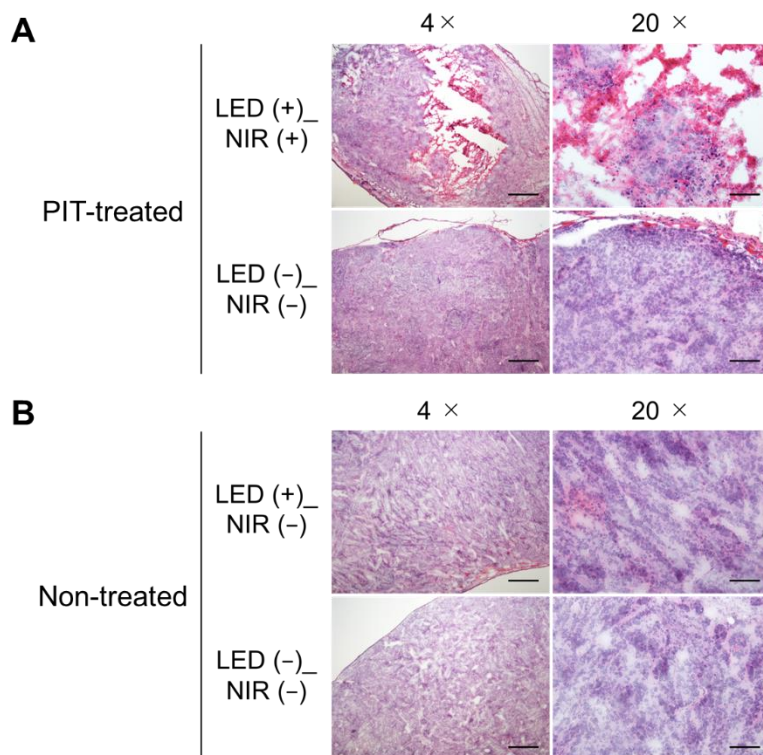


図 56 ワイヤレス LED 装置によって PIT を行った腫瘍の HE 染色

(A) 治療群マウスの腫瘍の HE 染色像。LED カプセルによって光照射を行った LED (+)_NIR (+) 腫瘍では組織の壊死が認められた一方で、LED カプセルを植えていない LED (-)_NIR (-) 腫瘍では組織に大きな変化はなかった。

(B) 非治療群マウスの腫瘍の HE 染色像。LED カプセルの留置の有無に関わらず、組織に著しい変化は認められなかった。

4xの画像のスケールバーは 500 μm 、20xの画像のスケールバーは 100 μm 。

考察

本章で著者は、PIT に適用可能な体内埋め込み型ワイヤレス LED 装置の開発に成功した (図 57)。電磁誘導を利用したワイヤレス給電技術では、磁場の強度が強いほど供給できる電力は大きくなるが、本装置では人体への影響を避けるため、ICNIRP がヒトへの利用のために定めたガイドラインに従い磁束密度を 0.1 mT 以下に設定した⁹¹。作製したワイヤレス LED 装置は、外部給電装置と LED カプセル間の距離が 200 mm であっても 0.20 mW/cm² 以上の強度の近赤外光を発した (表 1)。すなわち、成人の腹部体厚の平均が 200 mm 以下であることを考慮すると、ヒト体内の LED カプセルの留置場所に関わらず外部給電装置から電力を供給できる能力を有すると考えられる。以上のことから、本章で示したワイヤレス LED 装置は、ヒト深部の腫瘍にも適用できる PIT の光デバイスとして利用可能である。

電磁誘導に基づくワイヤレス給電技術を用いた装置の場合、磁場強度と供給できる電力や距離との間には密接な関係があり、LED の光強度を上げるためには磁場強度を大きくする必要がある。しかし、前述したように人体への影響を考慮すると利用可能な磁場強度には上限があるため、LED の発光強度や給電距離も制限を受ける。したがって強度や給電距離が求められる臨床での利用を見据えた場合、効率良く電力供給を行うことが重要となる。そこで、本装置では送電コイルと受電コイルの共振周波数の差を最小に設計したり、透磁性の高いフェライトを受電コイル内部に設置したりすることで Q 値を向上させた。この結果、PIT を行うのに必要な十分な強度を持つワイヤレス LED 装置の開発に成功した。

PIT による細胞傷害効果は近赤外光の強度 (W/cm²) ではなく、強度に時間を乗じた照射量 (J/cm²) に依存することが報告されている^{92,93}。これまでに、マウス皮下腫瘍はレーザーまたは LED による照射量 50–150 J/cm² の近赤外光によって十分に治療されることが明らかになっている^{77,92,94}。臨床における照射量は 50 J/cm² に設定されているが、光強度と照射時間を考慮すると本実験条件では腫瘍への照射量は最大で 320 J/cm² に達すると推定される。したがって、本装置によって PIT を行うのに十分な照射量を達成できたために顕著な治療効果に至ったと考える (図 53、図 56)。本 LED カプセルは一旦体内に埋め込めば長期間にわたって継続的に光照射をすることができるため、電源を供給し続ける限り照射量を大きくすることが可能である。

また、PIT の治療効果は複数回の薬剤投与や光照射によっても増強される²⁸。これは、PIT によって血管周辺のがん細胞が破壊されることで腫瘍内圧が低下して血管透過性が向上し、体内を循環する抗体-IR700 複合体が血管から離れた場所に位置するがん細胞へ

到達しやすくなるためと考えられている。すなわち、2 回目以降の光照射では、1 回目の PIT では十分な傷害を起こせなかったがん細胞に対しても効果を示すことができる^{81,95}。本実験におけるマウス腫瘍は、LED カプセルを埋め込んだ後、5 日間にわたり継続的に光照射されるため、その間に再集積した薬剤が随時光照射されることによって治療効果がより増強された可能性が高い。

本ワイヤレス LED 装置のような体内埋込み型の光デバイスは、臨床において例えば胆管がんに応用可能であると考えており、より具体的な光デバイスの開発を進めている。胆管がんはしばしば胆管を狭窄して肝臓の機能障害や黄疸を引き起こし、患者を死に至らしめる^{96,97}。したがって、胆汁が滞らないようにするために、がん細胞によって狭窄した胆管を広げる胆管ステントが利用される。そこで、LED を胆管ステントの外周に取り付けた光デバイスを胆管に留置すれば、胆管の狭窄を防ぐと同時に PIT により管を取り巻くがん細胞を破壊することができると考えている。このような利用法に加え、本章で開発したような体内埋込み型 LED カプセルを外科手術後に病変周囲に留置して PIT を行うことで、手術では取り切れなかったがん細胞を根絶するのに役立つ可能性もある。

以上、今回開発したワイヤレス LED 装置により、体外からの光照射が困難である深部の腫瘍の治療が可能であることが示唆された（図 57）⁹⁸。

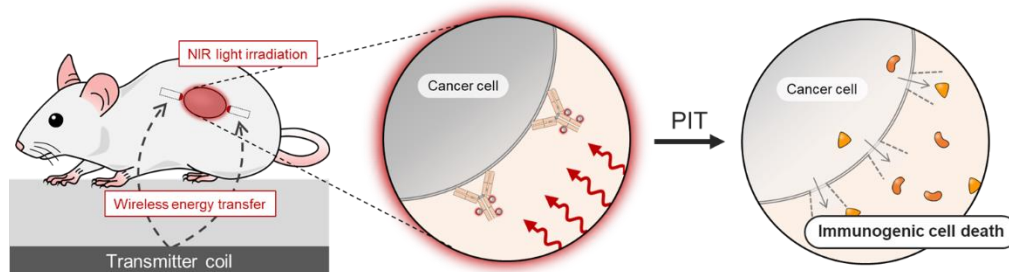


図 57 ワイヤレス LED 装置による治療の模式図

総括

- 1) PIT のメカニズム解明を目指し、イオンや分子を用いて細胞膜傷害の変化を検討した結果、光照射によって細胞膜上の抗体-IR700 が小さな物理的膜傷害を誘発し、その後不可逆的に膜傷害が亢進することで細胞死に至ることが示された。一方、リソソーム内の抗体-IR700 による細胞傷害性は小さいことも明らかとなり、内在化されにくい PIT 薬剤を開発すればより高い効果が得られると考える。
- 2) *In vivo* においても抗体-IR700 は物性変化し、PIT による壊死が認められない光照射後の早期に腫瘍内の糖代謝を低下、血流を増加させることで腫瘍中心部への酸素供給を亢進させることを示した。PIT によって生体内で生じる変化を明らかにしたとともに、PET イメージング剤 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ および $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ の集積減少が治療効果の指標となる可能性を示した。
- 3) 電磁誘導を利用したワイヤレス給電技術を利用することで、ヒト深部の腫瘍にも適用できる照度と送電距離を達成した新たな光デバイスの開発に成功した。また、本ワイヤレス LED 装置によってマウス腫瘍を PIT によって治療可能であることを示した。本装置を留置することで、外部からの光照射が困難であった腫瘍も PIT で治療できるようになると考えられる。

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

実験試薬・材料

【各章共通】

IR700 結合抗体の作製

0.1 M Na₂HPO₄ (pH 8.5) 水溶液

リン酸水素二ナトリウム

富士フイルム和光純薬

1.42 g を DDW 100 mL に溶解して調製した。

抗体

Trastuzumab (ハーセプチン注射用 60)

中外製薬

Panitumumab (ベクティビックス点滴静注 100mg)

武田薬品工業

5 mM IR700 (in DMSO) 溶液

IRDye700DX NHS ester

Li-COR Bioscience

0.5 mg を DMSO 51 μ L に溶解して調製した。

ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (Ca, Mg 不含) (PBS)

ナカライテスク

ゲルろ過クロマトグラフィーカラム

Sephadex G50 (PD-10)

GE Healthcare

タンパク定量

Modified Lowry Protein Assay Kit

Thermo Fisher Scientific Inc.

細胞株

3T3-HER2

NIH 小林久隆博士より分与

A431

理化学研究所 バイオリソース研究センター

A431-GFP-luc

NIH 小林久隆博士より分与

HuCCT-1

理化学研究所 バイオリソース研究センター

BxPC-3

新潟大学近藤英作博士より分与

U87MG

ATCC

細胞培養

RPMI-1640 Medium

Sigma-Aldrich

DMEM

Sigma-Aldrich

Phenol-red-free RPMI-1640

ナカライテスク

Fetal bovine serum (FBS)	gibco
Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (PC-SM)	ナカライテスク
0.25% Trypsin-EDTA (1X)	gibco
塩化ナトリウム	富士フイルム和光純薬
Dextran from Leuconostoc spp. Mr ~6,000 (デキストラン)	Sigma-Aldrich
HEPES	同仁化学研究所

凍結ブロックの作製

O.C.T. Compound	サクラファインテックジャパン
-----------------	----------------

HE 染色

マイヤー・ヘマトキシリン液	武藤化学
1% エオシン Y 液	武藤化学
エタノール	日本アルコール販売
キシレン	富士フイルム和光純薬

【第 1 章 抗体-IR700 の局在の違いに着目した細胞死誘発メカニズムの検討】

細胞内 Na⁺の濃度変化の観察

CoroNa Green-AM	Molecular Probes
Tetrodotoxin (TTX)	富士フイルム和光純薬

細胞膜透過性の変化の観察

LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit	Molecular Probes
--------------------------------------	------------------

放射性同位体の細胞内取り込み

塩化インジウム (¹¹¹ In) 注 (¹¹¹ InCl ₃)	日本メジフィジックス
インジウム DTPA (¹¹¹ In) 注 (¹¹¹ In-DTPA)	日本メジフィジックス
トリチウム水 ([³ H]H ₂ O)	PerkinElmer
0.05% トリプシン	ナカライテスク
0.1 mM 水酸化ナトリウム水溶液	ナカライテスク
液体シンチレーションカクテル HIONIC-FLUOR	PerkinElmer
BCA protein assay kit	Thermo Fisher Scientific

アクチン骨格の蛍光イメージング

HMRef

東京大学大学院薬学系研究科 浦野泰照博士らが合成したものをを用いた。

抗体-IR700 の細胞局在の観察

LysoTracker Green DND-26

Thermo Fisher Scientific Inc.

MTT アッセイ

MTT

同仁化学研究所

アジ化ナトリウム (NaN_3)

Sigma-Aldrich

DMSO

富士フイルム和光純薬

グリシンバッファー (50 mM Glycine, 100 mM NaCl (pH 2.8))

グリシン

富士フイルム和光純薬

塩化ナトリウム

富士フイルム和光純薬

塩酸

富士フイルム和光純薬

超純水 100 mL に、グリシン 0.38 g、塩化ナトリウム 0.58 g を溶解した。pH メーター (F-72S、HORIBA) で測定しながら 100 μL 強の塩酸を添加し、pH を 2.8 に合わせた。

フローサイトメトリーによる細胞死様式の検討

Annexin V Alexa Fluor 488 conjugate

Invitrogen

ヨウ化プロピジウム (Propidium iodide; PI)

Sigma-Aldrich

Binding Buffer (10 mM HEPES、140 mM NaCl、2.5 mM CaCl_2)

HEPES

同仁化学研究所

塩化ナトリウム

富士フイルム和光純薬

塩化カルシウム

富士フイルム和光純薬

超純水 100 mL に、HEPES 0.238 g、塩化ナトリウム 0.812 g、塩化カルシウム 0.028 g を溶解して調製した。

カテプシン B の免疫細胞染色

マイルドホルム 10N

富士フイルム和光純薬

Triton X-100

富士フイルム和光純薬

2 mL PBS に対して 2 μL 添加して 0.1% 溶液を調製した。

Fetal bovine serum (FBS)

gibco

Anti-Cathepsin B Polyclonal Antibody Alexa Fluor 555 conjugate

Bioss Inc.

Antibody Diluent with Background Reducing Components

Dako

ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI

Invitrogen

【第 2 章 生体内における PIT の作用機序の解明を目指した腫瘍に特有な機能的変化に関する検討】

発光イメージング

D-ルシフェリンカリウム

富士フイルム和光純薬

PET イメージング剤

[¹⁸F]FDG および [¹⁸F]FMISO は北海道大学病院サイクロトロンにて合成したものを使用した。

動物実験

イソフルラン吸入麻酔液「ファイザー」

ファイザー

Hypoxypore-1 Omni Kit

コスモ・バイオ

免疫組織染色

Hypoxypore-1 Omni Kit

コスモ・バイオ

Rat monoclonal anti-mouse endothelial cell marker CD31

dianova

Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP

Dako

Goat Anti-Rat IgG H%L (HRP)

Abcam

DAB ENVISION+ キット/HRP (1 drop/mL)

Dako

Antibody Diluent with Background Reducing Components

Dako

TBS 溶液 (50 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH7.6)

トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン

富士フイルム和光純薬

塩化ナトリウム

富士フイルム和光純薬

塩酸

富士フイルム和光純薬

トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン 18.171 g、塩化ナトリウム 26.198 g を超純水 3 L に溶解した後、pH が 7.6 になるように塩酸を 10 mL 程度添加して調製した。

3% H₂O₂ 溶液

過酸化水素

関東化学

過酸化水素 15 mL を超純水 500 mL に溶解して調製した。

[¹⁸F]FDG の取り込み

低グルコース培地

Sigma-Aldrich

DMEM - low glucose (D6046-500ML)

0.1 mM 水酸化ナトリウム水溶液

ナカライテスク

【第3章 深部の腫瘍を治療可能な体内埋め込み型ワイヤレス LED の開発】

蛍光・発光イメージング

Ethidium homodimer-1 (EthD-1)

Molecular Probes

D-ルシフェリンカリウム

富士フイルム和光純薬

動物実験

イソフルラン吸入麻酔液「ファイザー」

ファイザー

アロンアルファ A 三協

第一三共

実験操作・方法

【各章共通】

IR700 結合抗体の作製

0.1 M Na_2HPO_4 (pH 8.5) 300 μL に、HER2 を標的とするヒト型 IgG1 モノクローナル抗体 Trastuzumab または EGFR を標的とする完全ヒト型 IgG2 モノクローナル抗体 Panitumumab 1 mg と IR700 を 1 : 5 の物質質量比で溶解した。室温で 3 h インキュベートして反応させた後、PD-10 カラムにアプライした反応溶液を PBS で溶出して抗体-IR700 を精製した。

精製した抗体-IR700 溶液について、以下の手順で 1 抗体あたりに結合する IR700 の数を算出した。まず、タンパク質濃度を、Modified Lowry Protein Assay Kit を用いて IR700 の吸収がない 750 nm の吸光度をプレートリーダー (Infinite M200, Tecan Austria GmbH) を用いて測定することで求めた。次に、吸光度計 (UV-1800, 島津製作所) を用いて IR700 の吸収が最大となる 689 nm の吸光度から IR700 濃度を求めたところ、物質質量比でおよそ抗体 : IR700 = 1 : 3 の割合で結合した抗体-IR700 である Trastuzumab-IR700 (Tra-IR700) および Panitumumab-IR700 (Pan-IR700) を得た。

細胞培養

3T3-HER2 細胞は、アメリカ国立衛生研究所 小林久隆博士らにより、マウス胎児線維芽細胞である NIH3T3 細胞に HER2 を発現させることで作製された。A431-GFP-luc 細胞は同じく、ヒト類表皮癌由来 A431 細胞に Green fluorescent protein (GFP) とルシフェラーゼ (Luciferase) を発現させることで作製された。3T3-HER2、A431、A431-GFP-luc、HuCCT-1、BxPC-3 細胞は、RPMI-1640 培地に対して 10% FBS と 1% PC-SM を添加した培地で培養した (37°C, 5% CO_2)。U87GM 細胞は、DMEM 培地に対して 10% FBS と 1% PC-SM を添加した培地で培養した (37°C, 5% CO_2)

【第 1 章 抗体-IR700 の局在の違いに着目した細胞死誘発メカニズムの検討】

IR700 の Soret 帯および Q 帯励起による細胞傷害性の検討

18 × 18 mm のカバーガラスを底面に置いた 3.5 cm ディッシュに、3T3-HER2 細胞 2×10^5 個播種した後、37°C, 5% CO_2 で 24 h インキュベートした。Tra-IR700 を終濃度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で培地に添加し、37°C で 24 h インキュベートした。カバーガラスを取り出して十分量

の PBS で優しく洗浄した後、細胞接着面が下側になるようにスライドガラス上に置いた。その後、正立蛍光顕微鏡 (BX41、オリンパス) を用いて、光照射前および光照射終了 90 sec 後の細胞の形態変化を観察した。対物レンズは 40 倍のものを用了。IR700 の Soret 帯の励起は、蛍光顕微鏡の励起フィルター (360–370 nm) を介して、細胞に 30 sec 照射することで行った。Q 帯の励起は、蛍光顕微鏡の励起フィルター (670–745 nm) を介して、細胞に 30 sec 照射することで行った。画像処理は、ImageJ ソフトウェア (ver. 1.49) を用いて行った。

細胞に結合していない培地中の IR700 が及ぼす影響

3T3-HER2 細胞または A431-GFP-luc 細胞 3.0×10^5 個を 3.5 cm ディッシュに播種し、24 h インキュベートした (37°C, 5% CO₂)。以下の 3 群に分けて実験を行った。1. 培地中に何も添加しなかった (Control)。2. Tra-IR700 または Pan-IR700 を終濃度 5 µg/mL で培地に添加し、37°C で 1 h インキュベートした (TRa-IR700 または Pan-IR700)。3. IR700 NHS ester を PBS に溶解させた後 4 日間室温で放置させて NHS エステルを不活性化させ、終濃度 0.1 µM (抗体-IR700 と IR700 の分子数が一致する濃度) で培地に添加し、37°C で 1 h インキュベートした (Free IR700)。その後、673–748 nm の励起フィルターと 765–855 nm の蛍光フィルターを有する蛍光顕微鏡 (CKX41、オリンパス) を用いて、細胞の形態変化と IR700 の蛍光を観察した。対物レンズは 40 倍のものを用了。細胞への光照射は、蛍光顕微鏡の励起フィルター (673–748 nm) を介して継続的に行い、照射開始から 0, 3, 5 min 後に細胞を観察した。画像処理は、ImageJ ソフトウェア (ver. 1.49) を用いて行った。

Na⁺濃度の観察に向けた条件検討

PIT によって引き起こされる細胞内の Na⁺濃度の変化を観察するために、Na⁺濃度依存的に蛍光強度が増強される Na⁺センサーである CoroNa Green-AM を用了。CoroNa Green-AM はその脂溶性のために細胞膜を通過して細胞内に入り、細胞質に存在するエステラーゼによって AM 基 (アセトキシメチル基) が切断されて細胞内に滞留し (CoroNa Green)、Na⁺濃度依存的に緑色の蛍光を発する⁹⁹。

3T3-HER2 細胞 2.0×10^5 個を 3.5 cm ディッシュに播種し、24 h インキュベートした (37°C, 5% CO₂)。5 mM CoroNa Green-AM の添加量およびインキュベート時間を変えた条件の細胞を顕微鏡で観察した。Na⁺の細胞内への流入は、Na⁺のイオノフォアであるグラミシジンを終濃度 4 µM を添加することで誘発させた。

Na⁺の細胞内流入の検討

3T3-HER2 細胞 2.0×10^5 個を 3.5 cm ディッシュに播種し、24 h インキュベートした (37°C, 5% CO₂)。Tra-IR700 を終濃度 5 µg/mL で培地に添加し、37°C で 55 min インキュベートした。さらに、5 mM CoroNa Green-AM を終濃度 5 µM になるよう培地に添加し、37°C で 5 min インキュベートした。PBS 1 mL で 2 回洗浄後、通常の培地または 2 種類の高浸透圧培地を 2 mL 加えた。これら 2 種類の高浸透圧培地は、塩化ナトリウムまたはデキストランをそれぞれ 25 mM と 50 mM になるように RPMI-1640 培地に溶解させることで調製した。培地添加直後、倒立蛍光顕微鏡 (BX41、オリンパス) を用いて細胞を観察した。CoroNa Green の蛍光観察には、励起光に 460–490 nm のバンドパスフィルターを、蛍光に 520 nm のロングパスフィルターを用いた。細胞への光照射は 670–710 nm の近赤外光を発する Light-emitting diode (LED, L690D-66-16100、Epitex) を用いて 2 J/cm² になるように照射した (50 mW/cm², 40 sec)。このときの強度は光パワーメーター (PM100、Thorlabs) を用いて測定した。

また、Na⁺チャネルやトランスポーターなどによる影響を検討するために、同様の実験を 4°C または 1 µM TTX 存在下で行った¹⁰⁰。画像処理は ImageJ ソフトウェア (ver. 1.49) で行った。

細胞膜透過性の変化の検討

PIT を行った細胞の細胞膜透過性の変化を評価するために、細胞の物理的または生物学的な性質に基づいて細胞に集積する 2 種の蛍光分子 Calcein-AM と EthD-1 を含有する LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit を用いた。細胞膜を透過する Calcein-AM はその脂溶性によって生細胞の細胞膜を通過して細胞内に入り、細胞内エステラーゼによって切断されることで緑色蛍光を発する分子 (Calcein) となって細胞内に滞留する。ただし、細胞膜に傷害が生じた場合には Calcein は細胞外へ漏出する。一方で、EthD-1 はその大きさと電荷によって生細胞の細胞膜は通過できないが、細胞膜に傷害が起こって透過性が亢進すると細胞内に流入し、そこで核酸と結合することで赤色蛍光を発する。これら 2 種の蛍光分子の大きさは ChemBioDraw (ver 14.0、PerkinElmer) を用いて推定した^{46,47}。

3T3-HER2 細胞 2.0×10^5 個を 3.5 cm ディッシュに播種し、24 h インキュベートした (37°C, 5% CO₂)。Tra-IR700 を終濃度 5 µg/mL で培地に添加して 37°C で 30 min インキュベートし、Calcein-AM と EthD-1 をそれぞれ終濃度で 1 µM と 2 µM になるよう培地に添加し、さらに 37°C で 30 min インキュベートした。その後、培地を取り除き、同じ濃度の Calcein-AM と EthD-1 を含む新しい RPMI-1640 培地を加えて倒立蛍光顕微鏡 (CKX41、オリンパス) を用いて細胞を観察した。Calcein の蛍光観察には、励起光に 460–490 nm のバンドパスフィルターを、蛍光に 520 nm のロングパスフィルターを用いた。EthD-1

の蛍光観察には、励起光に 480–550 nm のバンドパスフィルターを、蛍光に 590 nm のロングパスフィルターを用いた。細胞への光照射は 670–710 nm の近赤外光を発する LED を用いて照射量 2 J/cm²で行った。画像処理は ImageJ ソフトウェア (ver. 1.49)で行った。

¹¹¹In³⁺、¹¹¹In-DTPA、[³H]H₂O の取り込み

光照射を行った細胞へのイオンまたは小分子の流入を定量するために ¹¹¹In³⁺ と ¹¹¹In-DTPA をそれぞれ用いた。また、細胞への水分子の流入を定量するために [³H]H₂O を用いた。

3T3-HER2 細胞 1.0×10⁶ 個を 3.5 cm ディッシュに播種して 24 h インキュベートした。PBS で洗浄後、Tra-IR700 5 µg/mL を含む RPMI-1640 培地に取り替えて、37°C で 60 min インキュベートした。培地を取り除き、¹¹¹In³⁺ (18.5 kBq/2 mL)、¹¹¹In-DTPA (37 kBq/2 mL)、[³H]H₂O (20 kBq/2 mL) を含有した通常の RPMI-1640 培地および 25 mM 塩化ナトリウムまたは 50 mM デキストランを RPMI-1640 に溶解させた高浸透圧培地を 2 mL/dish 添加した。細胞への光照射は 670–710 nm の近赤外光を発する LED を用いて照射量 2 J/cm²で行った。

光照射後、37°C、5% CO₂ で 3 min または 60 min インキュベートした。浮遊している細胞と接着している細胞を 0.05% トリプシン溶液 250 µL を用いてすべて回収した。その後、細胞を遠心分離して PBS で洗浄し、0.1 mM 水酸化ナトリウム水溶液 500 µL で細胞を溶解させた。¹¹¹In の放射能は γ カウンター (1480 Wizard 3、PerkinElmer) を用いて測定した。[³H]H₂O の放射能はサンプル 100 µL を液体シンチレーションカクテル 4 mL に溶解させた後、液体シンチレーションカウンター (LSC-5100、日立アロカメディカル) を用いて測定した。

タンパク質濃度は BCA protein assay kit を用い、570 nm の吸光度をプレートリーダー (Sunrise、TECAN) で測定することで求め、細胞への ¹¹¹In³⁺、¹¹¹In-DTPA、[³H]H₂O の取り込み量を % Dose/mg protein として算出した。

アクチンイメージング

HMRef は東京大学大学院薬学系研究科 浦野泰照博士らが開発した緑色蛍光分子であり、細胞膜を透過して細胞内に入りアクチンフィラメントに特異的に結合する (図 17)。

3T3-HER2 細胞 5.0×10⁵ 個を 3.5 cm glass-bottom dish に播種して 6 h インキュベートした後、Tra-IR700 を終濃度 5 µg/mL で培地に添加して 18 h インキュベートした。細胞を PBS 1 mL で洗浄した後、0.5 µM の HMRef を含む phenol-red-free RPMI-1640 培地 300 µL

をディッシュに添加した。その直後、共焦点顕微鏡（Nikon A1、ニコン）を用いてアクチン骨格の観察を行った。このとき、HMRefの蛍光観察には、励起光に 465–495 nm のバンドパスフィルターを、蛍光に 513–558 nm のバンドパスフィルターを用いた。Z 軸方向は 1 μm 間隔で合計 5 枚撮影し、画像処理を ImageJ ソフトウェア（ver. 1.49）を用いて行った。細胞への光照射は 670–710 nm の近赤外光を発する LED（L690D-66-16100、Epitex）によって行った。

抗体-IR700 の細胞局在の観察

3T3-HER2 細胞 2.0×10^5 個を 3.5 cm glass-bottom dish に播種して 24 h インキュベートした（37°C, 5% CO₂）後、Tra-IR700 を終濃度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で培地に添加して 4°C で 5 分間インキュベートし、細胞膜上の HER2 と結合させた。その後、細胞を PBS 1 mL で 2 回洗浄し、細胞に結合していない培地中の余分な Tra-IR700 を取り除いた。新しい培地を 2 mL 添加し、細胞膜上の Tra-IR700 がエンドサイトーシスを介して内在化されるように 37°C で 0, 1, 6, 24 時間インキュベートした。細胞を観察する 15 min 前に、LysoTracker Green DND-26 を培地中に終濃度 0.1 μM となるように添加して 37°C でインキュベートすることでリソソームを染色し、培地中の余分な LysoTracker Green は、phenol-red-free RPMI-1640 培地 1 mL で 2 回洗浄して取り除いた。このように処置した細胞を、40 $\times$ 対物レンズを設置した共焦点顕微鏡（Nikon A1、ニコン）を用いてリソソームと IR700 の細胞局在を観察した。LysoTracker Green の蛍光を検出するために、488 nm の青色レーザーと 500–550 nm のバンドパス発光フィルターを使用した。IR700 の蛍光を検出するために、638 nm の赤色レーザーと 662–737 nm の発光フィルターを使用した。画像処理は、ImageJ ソフトウェア（ver. 1.49）を用いて行った。

細胞生存率アッセイ

3T3-HER2 細胞を 48 well プレートに 2×10^4 細胞/250 $\mu\text{L}/\text{well}$ 播種し、37°C で 24 時間インキュベートした。Tra-IR700 を終濃度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で添加し、37°C で 1 時間または 24 時間インキュベートした。細胞を PBS 250 μL で 2 回洗浄して培地中の余分な薬剤を除去した後、さらに 37°C で 0, 1, 6, 24 時間インキュベートし、細胞膜に結合した Tra-IR700 をリソソームに内在化させた。その後、670–710 nm の LED（L690D-66-16100、Epitex）を用いて、0.5 または 2 J/cm² になるように細胞に近赤外光を照射した（50 mW/cm², 10 sec または 40 sec）。このときの強度は、光パワーメーター（PM100、Thorlabs）を用いて測定した。その後 37°C で 24 時間インキュベートし、細胞生存率を MTT アッセイによって算出した。MTT を PBS に溶解して 5 mg/mL とした溶液を、各 well に 7.5 μL ずつ添加し（終濃度 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）、37°C で 1.5 時間インキュベートした。上清を取り除き、

DMSO 200 μ L を添加して不溶性のホルマザンを溶解した。ホルマザンが溶解した後、プレートリーダー (Infinite M200, Tecan Austria GmbH) を用いて 535 nm での吸光度を測定した。細胞生存率 (%) = $100 \times (\text{対象とする群の吸光度} - \text{blank}) / (\text{未処置群の吸光度} - \text{blank})$ 。

24 h 内在化させた細胞においても、Tra-IR700 が細胞膜上にわずかに残存している可能性があり、そのため細胞膜上に残存した Tra-IR700 が細胞傷害性に影響を与えている可能性がある。そこで、抗体-抗原の結合を乖離させるグリシンバッファー (50 mM Glycine, 100 mM NaCl (pH 2.8)) を用いた。本実験では、内在化のためにインキュベートした細胞に光照射する直前に培地を取り除き、氷冷したグリシンバッファー 250 μ L を添加して 5 min インキュベートした。その後、新しい培地 250 μ L を添加し、光照射を行い、上記と同様の手順で MTT アッセイを行った。

内在化した抗体-IR700 による細胞傷害性における $^1\text{O}_2$ の役割を調べるために、光照射の 3 min 前に、 $^1\text{O}_2$ クエンチャーである NaN_3 を培地に添加した。 NaN_3 の終濃度は 1 または 10 mM とした。本実験では、Tra-IR700 のインキュベーション時間は 24 h、照射量は 2 J/cm^2 とした。

細胞死様式の検討

Annexin V Alexa Fluor 488 conjugate および PI を用いて、PIT によって誘発される細胞死様式を検討した。3T3-HER2 細胞 5.0×10^5 個を 3.5 cm ディッシュに播種し、24 h インキュベートした (37°C , 5% CO_2)。培地に Tra-IR700 を終濃度 $5 \mu\text{g/mL}$ で添加し、 37°C で 24 h 細胞に取り込ませた。培地を取り除き、PBS 1 mL で 2 回洗浄した後、Tra-IR700 を内在化させるために 37°C で 0 または 24 h インキュベートした。近赤外光照射 (2 J/cm^2) 後、 37°C で 1 または 6 h インキュベートした。

浮遊した細胞を含む上清を 5 mL エッペンにすべて回収した後、0.05%トリプシン溶液 250 μ L で細胞を剥離させ、PBS 200 μ L $\times$ 2 によって細胞を回収した。細胞懸濁液を遠心し、上清を取り除いて PBS 1 mL で再懸濁した。これを再び遠心して上清を取り除いた。Annexin V Alexa Fluor 488 conjugate 溶液 5 μ L および 0.2 mg/mL PI 溶液 2 μ L を溶解した Binding buffer 100 μ L で細胞を再び懸濁し、暗所かつ室温で 15 min 染色した。その後、Binding buffer 400 μ L を加えて溶液の体積を増やし、10 μm のフィルターに通じて単細胞にした後、Gallios Flow Cytometer (Beckman-Coulter) を用いて測定した。488 nm のレーザーによって励起した Alexa Fluor 488 および PI の蛍光は、それぞれ 564–606 nm および 500–550 nm の蛍光フィルターを用いて測定した。取得したデータは、Kaluza Analysis 2.1 ソフトウェア (Beckman-Coulter) を用いて解析した。

蛍光顕微鏡を用いた細胞の観察

3T3-HER2 細胞 1×10^5 個を 3.5 cm ディッシュに播種後、培地に Tra-IR700 を添加（終濃度 $5 \mu\text{g/mL}$ ）して 37°C で 1 または 24 h インキュベートした。培地を取り除き、細胞を PBS 1 mL で 2 回洗浄し、細胞膜に結合した Tra-IR700 をリソソームへ内在化させるために 37°C で 0, 1, 6, 24 h インキュベートした。その後、673–748 nm の励起フィルターと 765–855 nm の蛍光フィルターを有する蛍光顕微鏡（CKX41、オリンパス）を用いて、細胞の形態変化と IR700 の蛍光を観察した。対物レンズは 40 倍のものをを用いた。光照射は、蛍光顕微鏡の励起フィルター（673–748 nm）を介して、細胞に近赤外光を 30 sec 照射した（ 150 mW/cm^2 , 4.5 J/cm^2 ）。画像処理は、ImageJ ソフトウェア（ver. 1.49）を用いて行った。

蛍光顕微鏡を用いた細胞の観察

18 × 18 mm のカバーガラスを底面に置いた 3.5 cm ディッシュに、3T3-HER2 細胞 1×10^5 個播種した後、培地に Tra-IR700 を添加（終濃度 $5 \mu\text{g/mL}$ ）して 37°C で 24 h インキュベートした。培地を取り除き、細胞を PBS 1 mL で 2 回洗浄した後、新たな培地を 2 mL 加えて 37°C で 24 h インキュベートして、Tra-IR700 を内在化させた。670–710 nm の LED を用いて近赤外光を照射して PIT を行った（ 50 mW/cm^2 , 40 sec, 2 J/cm^2 ）。室温で 5 min 放置した後、カバーガラスをディッシュからゆっくり取り出して PBS に浸して洗浄した。続いて、マイルドホルム 2 mL を加えた 6 well plate にカバーガラスを入れ、室温で 60 min インキュベートして細胞を固定した。次に、PBS 2 mL を加えた 6 well plate にカバーガラスを入れ、室温で 5 min インキュベートして細胞を洗浄した。さらにもう一度洗浄した後、細胞膜の透過処理のために 0.1% Triton X-100 2 mL を加えた 6 well plate にカバーガラスを入れ、室温で 5 min インキュベートした。その後、PBS 2 mL で細胞を 2 回洗浄した。FBS を PBS で 3% に希釈した溶液 2 mL を加えた 6 well plate にカバーガラスを入れ、室温で 15 min インキュベートしてブロッキングした。パラフィルム上に抗体溶液（1:1000）100 μL を添加し、その上に細胞接着面が下向きになるようにカバーガラスを置いた。湿箱内にて 37°C で 1 h インキュベートした後、同様の方法で PBS によって 4 回洗浄した。カバーガラスを純水に浸し、余分な水分を除去して ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI を用いて封入した。

その後、530–550 nm の励起フィルターと 575–625 nm の蛍光フィルターを有する正立蛍光顕微鏡（BX41、オリンパス）を用いて、抗カテプシン抗体に結合する色素の蛍光を観察した。対物レンズは 40 倍のものをを用いた。画像処理は、ImageJ ソフトウェア（ver. 1.49）を用いて行った。

統計解析

定量値はすべて平均値 ± 標準誤差 で示した。統計解析は JMP Pro 12.2.0 ソフトウェア (SAS Institute) を用いた。他群検定は、one way ANOVA (Analysis of variance) の後に Tukey-Kramer test を行い、P 値が 0.05 以下となる場合を統計的に有意な差があると定めた。

【第 2 章 生体内における PIT の作用機序の解明を目指した腫瘍に特有な機能的変化に関する検討】

細胞の蛍光顕微鏡観察

A431、HuCCCT-1、BxPC-3、U87MG 細胞 2×10^5 個を 3.5 cm ディッシュに播種後、培地に Pan-IR700 を添加 (終濃度 $5 \mu\text{g/mL}$) して 37°C で 1 h インキュベートした。その後、673–748 nm の励起フィルターと 765–855 nm の発光フィルターを有する蛍光顕微鏡 (CKX41、オリンパス) を用いて、光照射前後に細胞の形態変化と IR700 の蛍光を観察した。対物レンズは 40 倍のものを用了。光照射は、蛍光顕微鏡の励起フィルター (673–748 nm) を介して、細胞に近赤外光を 5 min 照射した (150 mW/cm^2)。画像処理は、ImageJ ソフトウェア (ver. 1.49) を用いて行った。

担癌マウスの作製

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則に基づき実施した。実験操作はイソフルランによる麻酔下で行った。

A431-GFP-luc 細胞 (5×10^6 個) を Balb/c Slc-nu/nu マウス (6 週齢、メス、日本エスエルシー) の左右両背の皮下に移植して担癌マウスを作製した。長径が約 8 mm に達する移植 7–10 日後から実験を開始した。腫瘍の大きさはノギスを用いて長径と短径を測定し、その体積は (長径) $\times$ (短径)² $\times$ 0.5 で算出した¹⁰¹。

In vivo 発光イメージング

発光イメージングはイソフルランによる麻酔下で、IVIS Lumina LT (Perkin Elmer) を用いて行った。D-ルシフェリンカリウム 15 mg/mL の PBS 溶液をマウス腹腔内に $200 \mu\text{L}$ 投与し、その 10 min 後に発光イメージングを行った。

***In vivo* 蛍光イメージング**

IR700 の蛍光イメージングはイソフルランによる麻酔下で、Clear View Imaging System (Indec Biosystem) に nIr-1 フィルターセット (635–675 nm の励起バンドパスフィルター、695–766 nm の蛍光バンドパスフィルター) を用いて行った。光照射の直前および直後に撮影した。画像処理は ImageJ ソフトウェア (ver. 1.49) で行った。

担癌マウスに対する PIT

Pan-IR700 (100 µg/100 µL PBS) をマウス尾静脈より投与した。投与 24 h 後、690 nm のレーザー MLL-III-690-800mW (Changchun New Industries Optoelectronics Tech, Co., Ltd.) を用いて片側の腫瘍にのみ 100 J/cm² の光照射をした (250 mW/cm², 6 min 40 sec)。

[¹⁸F]FDG および [¹⁸F]FMISO-PET の撮影

PET 撮影の 12 h 前から担癌マウスを新しいケージに移して水だけを与えて絶食させた。光照射の 3 h 後もしくは 24 h 後に、約 4 MBq の [¹⁸F]FDG もしくは [¹⁸F]FMISO を静脈投与した (図 58)。

[¹⁸F]FDG が筋肉へ集積するのを避けるため、[¹⁸F]FDG 投与後すぐにマウスはイソフルラン麻酔下にした。投与 20 min 後、PET/CT 装置 (Inveon small-animal multimodality PET/CT system、Siemens Medical Solutions) のベッドにマウスを固定し、CT を撮影した。さらに、投与後 40–50 min の 10 min 間 [¹⁸F]FDG-PET を撮像した。[¹⁸F]FMISO は投与後 90 min まで非麻酔で維持した後、投与 95 min 後に PET/CT 装置のベッドにマウスを固定して CT を撮影した。さらに、投与後 115–120 min の 10 min 間 [¹⁸F]FMISO-PET を撮像した。腫瘍の低酸素領域の免疫組織染色のために、安楽死の 1 h 前に Pimonidazole 1.2 mg/100 µL PBS を静脈投与した。

取得した PET/CT 画像は Filtered back projection (FBP) 法によって再構成した (マトリックス: 256 × 256 × 318、ボクセルサイズ: 0.388 × 0.388 × 0.398 mm³)。PET 画像は 10 min 間の積算画像を示した。なお、CT 画像をもとに吸収・散乱補正を行った^{102,103}。

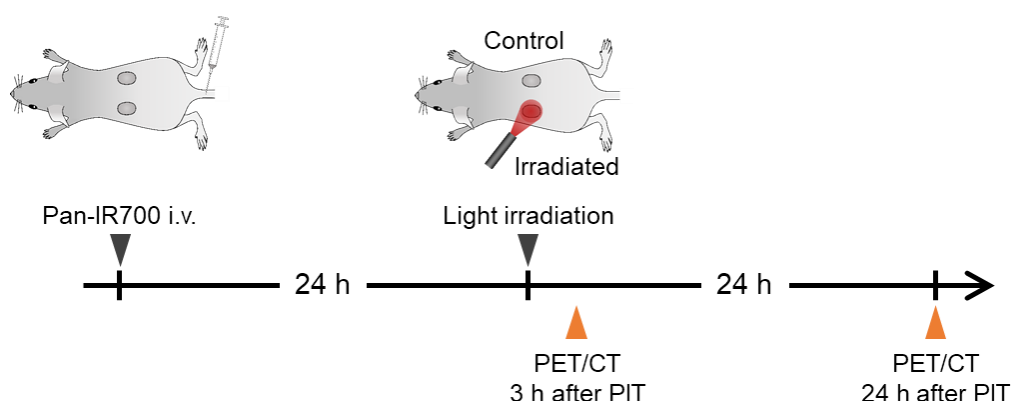


図 58 PIT および PET/CT のタイムスケジュール

担癌マウスに Pan-IR700 を投与した 24 h 後に、片側の腫瘍にのみ光照射を行った。その 3 h または 24 h 後に ^{18}F FDG または ^{18}F FMISO を投与して PET/CT を撮影した。

凍結切片の作製

PET/CT の撮影後、断頭によってマウスを安楽死させた。その後すぐに両背の腫瘍を摘出して O.C.T. Compound を用いて凍結ブロックを作製した。クライオスタット（ライカ）を用いて厚さ 10 μm の凍結切片を作製した。

オートラジオグラフィー（ARG）

ARG を行うため、作製した各凍結切片をイメージングプレートに貼付して冷蔵庫内で一晩放置した。イメージングプレートを光に当てないように注意しながらフルオロ・イメージアナライザー（FLA-7000、富士フイルム）にセットし、腫瘍切片における ^{18}F FDG および ^{18}F FMISO の分布を画像化した。画像は TIF ファイルでエクスポートし、画像処理は ImageJ ソフトウェア（ver. 1.49）で行った。

HE 染色

HE 染色は以下の手順で行い、スライドは正立顕微鏡（BX41、オリンパス）に 4 倍と 20 倍の対物レンズを使用して撮影した。

1. 100%エタノール 5 min
2. 蒸留水 5 min
3. ヘマトキシリン 45 min
4. 流水洗 45 min
5. 70%エタノール 1 min
6. エオシン 30 sec
7. 流水洗 1 min
8. 80%エタノール 1 min
9. 90%エタノール 1 min
10. 100%エタノール 1 min×3
11. キシレン 3 min×3
11. 封入

免疫組織染色

作製した凍結切片中の Pimonidazole および CD31 を以下の手順にて免疫組織染色を行った。

Pimonidazole

1. 脱水 100%エタノール 5 min
2. TBS 3 min
3. Super PAP (Peroxidase-antiperoxidase) ペンで組織の周囲を囲う。
4. TBS 3 min
4. 3% H₂O₂ (内因性ペルオキシダーゼ阻害) 10 min
5. 洗浄 TBS 3 min ×2
6. 1 次抗体 PAb2627AP (1:150) 60 min
7. 洗浄 TBS 3 min ×2
8. 2 次抗体 Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP (1:200) 30 min
9. 洗浄 TBS 3 min ×2
10. DAB 10 min 程度 (なるべく光を当てない)
11. 洗浄 TBS 3 min ×2
12. 洗浄 純水 5 sec
13. ヘマトキシリン 60 min
14. 流水洗 20 min
15. エタノール 80% 1 min → 90% 1 min → 100% 1 min ×3
16. キシレン 5 min ×3
17. 封入

CD31

1. 脱水 100%エタノール 5 min
2. TBS 3 min
3. Super PAP ペンで組織の周囲を囲う。
4. TBS 3 min
5. 3% H₂O₂ (内因性ペルオキシダーゼ阻害) 30 min
6. 洗浄 TBS 3 min ×2
7. 1 次抗体 Rat monoclonal anti-mouse endothelial cell marker CD31 (1:100) 4°C、over night
8. 洗浄 TBS 3 min ×2
9. 2 次抗体 Goat Anti-Rat IgG H^oL (HRP) (1:500) 30 min
10. 洗浄 TBS 3 min ×3
11. DAB 5 min 程度 (なるべく光を当てないようにした)
12. 洗浄 TBS 3 min ×2
13. 洗浄 純水 5 sec
14. ヘマトキシリン 60 min
15. 流水洗 20 min
16. エタノール 80% 1 min → 90% 1 min → 100% 1 min ×3
17. キシレン 5 min ×3
18. 封入

がん細胞への^[18F]FDG の取り込み実験

PIT を行ったがん細胞の糖代謝の変化を検討するために、^[18F]FDG の取り込み実験を行った。3T3-HER2 細胞 1.0×10⁶個を 3.5 cm ディッシュに播種して 24 h インキュベートした。PBS で洗浄後、Tra-IR700 5 μg/mL を含む低グルコース DMEM 培地に取り替えて、37°C で 60 min インキュベートした。^[18F]FDG (370 kBq/dish) を添加し、その直後に 670–710 nm の近赤外光を発する LED を用いて照射量 2 J/cm² で光照射を行った。光照射後、37°C、5% CO₂ で 60 min インキュベートした。浮遊している細胞と接着している細胞を 0.05% トリプシン溶液 250 μL を用いてすべて回収した。その後、細胞を遠心分離して PBS で洗浄し、0.1 mM 水酸化ナトリウム水溶液 500 μL で細胞を溶解させた。放射能は γ カウンター (1480 Wizard 3) を用いて測定した。タンパク質濃度は BCA protein assay

kit を用い、570 nm の吸光度をプレートリーダー（Sunrise）で測定することで求め、細胞への $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ の取り込み量を % Dose/mg protein として算出した。

統計解析

定量値はすべて平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。統計解析は JMP Pro 12.2.0 ソフトウェア（SAS Institute）を用い、Student's t tests もしくは Dunnett's tests によって有意差検定を行った。P 値が 0.05 以下となる場合を統計的に有意な差があると定めた。

【第 3 章 深部の腫瘍を治療可能な体内埋め込み型ワイヤレス LED の開発】

磁束密度のシミュレーション

解析シミュレーションソフト Femtet[®]（ver.2017.0, ムラタソフトウェア）を用い、作製した外部給電装置の周囲に生じる磁束密度を解析した。グラフは送電コイルに対して平行な平面を定め、その平面と送電コイルと 0 mm から 200 mm まで連続的に変化させ、平面上の磁束密度が最大値をとる点（最大点）と送電コイル中心地の真上の点（中心点）について表示した。

LED の強度測定

本ワイヤレス LED 装置で用いる磁場強度は、磁場による人体への影響を避けるために ICNIRP が定めたガイドラインに従った。すなわち、Femtet[®]による解析結果に基づき、磁束密度が 0.1 mT 以下になる範囲で実験を行った⁹¹。

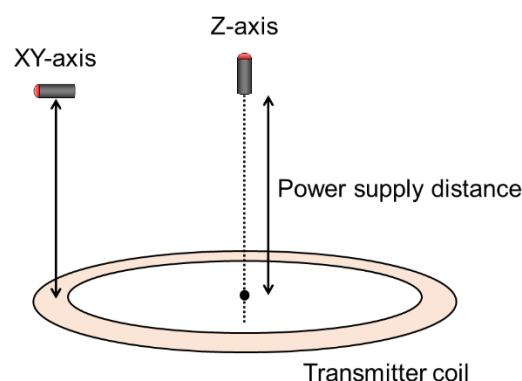


図 59 LED カプセルの強度測定

強度の測定は送電コイルと LED カプセル間の距離を変化させて測定した。なお、Z 軸方向は送電コイルの中央部で、XY 軸方向は送電コイルの端で行った。

ワイヤレス LED の発光強度は図 59 に示すように、LED カプセルを Z 軸方向および XY 軸方向でそれぞれ固定し、送電コイルと LED カプセル間の距離を変化させて測定した。測定には光パワーメーター (PM121D, Thorlabs) を用い、単位面積あたりの強度 (mW/cm^2) として算出した。

培養細胞に対する PIT

1. 顕微鏡観察

A431-GFP-luc 細胞または 3T3-HER2 細胞を 35 mm ディッシュに撒き、24 h インキュベートした (37°C , $5\% \text{CO}_2$)。PBS 1 mL で洗浄後、15 mM HEPES、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Pan-IR700 または 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tra-IR700 含有 phenol-red-free RPMI-1640 2 mL を添加し、 37°C で 1 h インキュベートした。その後、死細胞を蛍光顕微鏡で観察するために EthD-1 を終濃度 2 μM で添加した。ワイヤレス LED 装置からの近赤外光の強度を $1.3 \text{ mW}/\text{cm}^2$ になるように設定し、それぞれのディッシュについて、底面から 0, 3, 10, 30, 60 min 近赤外光を照射した (それぞれ照射量 0, 0.23, 0.78, 2.2, $4.7 \text{ J}/\text{cm}^2$) (図 60)。照射開始の時点から 2 h 後、倒立蛍光顕微鏡 (CKX41, オリンパス) を用いて細胞を観察した。EthD-1 の蛍光観察には、励起光に 480–550 nm のバンドパスフィルターを、蛍光に 590 nm のロングパスフィルターを用いた。IR700 の蛍光観察には、励起光に 673–748 nm のバンドパスフィルターを、蛍光に 765–855 nm のバンドパスフィルターを用いた。

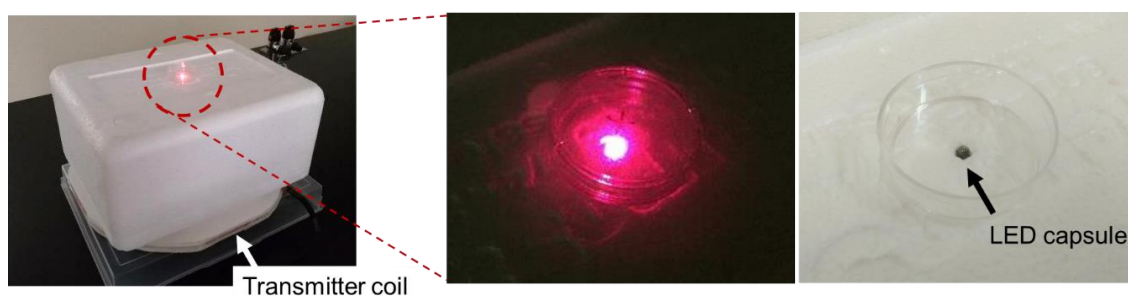


図 60 顕微鏡観察に用いる培養細胞に対する光照射の様子

培養ディッシュの底面に LED カプセルを 1 個設置し、ディッシュの中央部に任意の時間で光照射を行った。その後、倒立蛍光顕微鏡を用いて細胞を観察した。

2. 発光イメージング

PIT によって細胞傷害が引き起こされると細胞内 ATP が減少するため、ルシフェラーゼによるルシフェリンの発光強度が低下することが知られている^{77,104}。そこで EthD-1 を用いた蛍光イメージングに加え、ワイヤレス LED 装置を用いた PIT による細胞傷害性を発光イメージングによっても検討した。

A431-GFP-luc 細胞を 10 cm ディッシュに撒き、24 h インキュベートした (37°C, 5% CO₂)。上清を取り除いて PBS 1 mL で洗浄後、15 mM HEPES と 5 µg/mL Pan-IR700 含有 phenol-red-free RPMI-1640 10 mL を添加して 37°C で 1 h インキュベートした。1 枚のディッシュについて 6 ヶ所に同時に 6 つの条件 (1, 3, 5, 10, 20, 30 min (それぞれ 0.08, 0.23, 0.39, 0.78, 1.5, 2.2 J/cm²)) で光照射を開始した (図 61)。その後、終濃度が 150 µg/mL となるように D-ルシフェリンカリウムを培地中に添加し、LAS-4000 mini (富士フイルム) を用いて発光イメージングを行った。

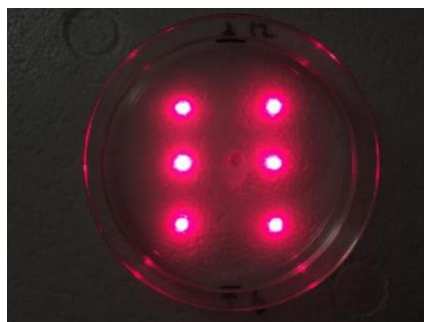


図 61 発光イメージングに用いる培養細胞に対する光照射の様子

10 cm ディッシュの底面の 6 ヶ所に LED カプセルを 6 個設置し、1, 3, 5, 10, 20, 30 min 光照射を行った。その後、D-ルシフェリンカリウムを培地中に添加 (150 µg/mL) して発光イメージングを行った。

担癌マウス

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則に基づき実施した。実験操作はイソフルラン (ファイザー) による麻酔下で行った。

A431-GFP-luc 細胞 (5 × 10⁶ 個) をマウス (Balb/c Slc-nu/nu マウス (6 週齢、メス、日本エスエルシー)) の左右両背の皮下に移植し、移植 6 日後から実験を開始した。腫瘍の大きさはノギスを用いて毎日測定し、その体積は (長径) × (短径)² × 0.5 で算出した¹⁰¹。体重は電子秤を用いて測定した。

In vivo 蛍光イメージング

IR700 の蛍光イメージングは Fluor Vivo Imaging System (Indec Biosystem) に 600–640 nm の励起バンドパスフィルターと 665 nm の蛍光ロングパスフィルターを設置して行った。GFP の蛍光イメージングは Clear View Imaging System (Indec Biosystem) に 452–487 nm の励起バンドパスフィルターと 500 nm の蛍光ロングパスフィルターを設置して行った。画像処理は ImageJ ソフトウェア (ver. 1.49) で行い、関心領域は腫瘍に対して手動で設定した。

担癌マウスに対する PIT

100 μ g/100 μ L PBS の Pan-IR700 を day 0 と day 3 の合計 2 回マウス尾静脈より投与した。Day0 以降、マウスを以下のように 2 群に分けて実験を行った (図 62A)。(1) PIT-treated mice: 近赤外光を発する LED カプセルを植えた腫瘍 (LED (+)_NIR (+)) と LED カプセルを植えていない腫瘍 (LED (-)_NIR (-)) を有するマウス。(2) Non-treated mice: 断線させて光を発さないようにしたダミーの LED カプセルを植えた腫瘍 (LED (+)_NIR (-)) と LED カプセルを植えていない腫瘍 (LED (-)_NIR (-)) を有するマウス。このとき、LED カプセルは腫瘍の両側から挟むように皮下に植え、アロンアルファ A 三協 (第一三共) を用いて固定した (図 62B)。ダミーの LED カプセルは、LED カプセルの埋め込みによる腫瘍成長への影響を評価するために用いた。

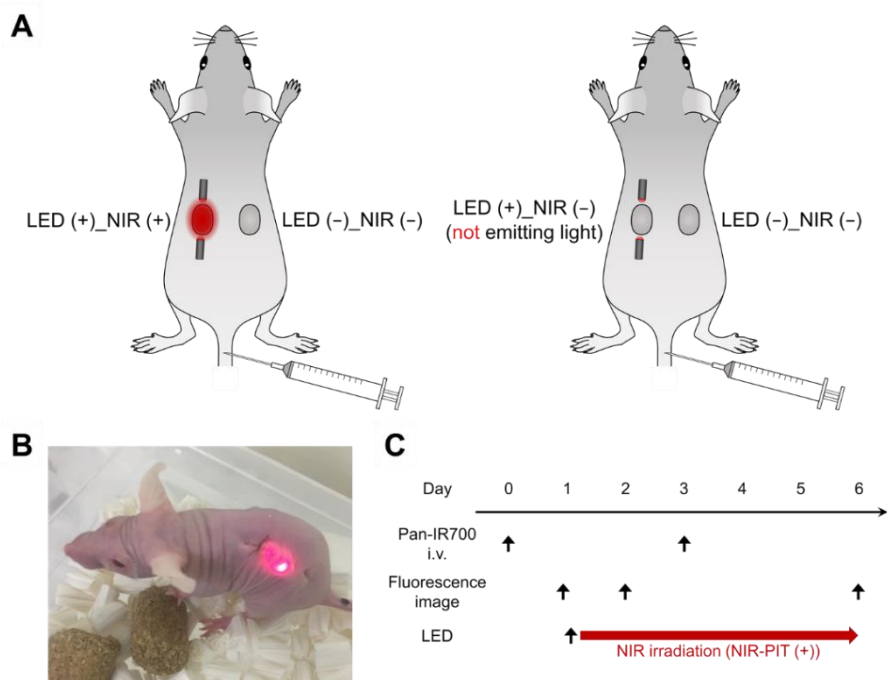


図 62 担癌モデルマウスに対する PIT

(A) LED を留置したマウスの模式図。(左) PIT-treated mice: 近赤外光を発する LED カプセルを植えた腫瘍 (LED (+)_NIR (+)) と LED カプセルを植えていない腫瘍 (LED (-)_NIR (-)) を有する。(右) Non-treated mice: 断線させて光を発さないようにしたダミーの LED カプセルを植えた腫瘍 (LED (+)_NIR (-)) と LED カプセルを植えていない腫瘍 (LED (-)_NIR (-)) を有する。(B) 留置した LED カプセルによって腫瘍が光照射されている様子。(C) 治療およびイメージングのレジメン。

治療およびイメージングは（図 62C）に示すレジメンに沿って行った。マウスは LED カプセル埋め込み後、実験終了時まで外部給電装置の上で飼育した（外部給電装置とケージ底面の距離は 50 mm）ため、LED (+)_NIR (+)の腫瘍は day 1 から day 6 まで継続的に光照射された。IR700 蛍光イメージングは day 1 と day 2 に、GFP 蛍光イメージングは day 6 に行った。

HE 染色

Day 6 に腫瘍を摘出して O.C.T. Compound を用いて凍結ブロックを作製し、その後クライオスタット（ライカ）を用いて厚さ 10 μ m の凍結切片を作製した。

HE 染色は以下の手順で行い、スライドは正立顕微鏡（BX41、オリンパス）に 4 倍と 20 倍の対物レンズを使用して撮影した。

1. 100%エタノール 5 min
2. 蒸留水 5 min
3. ヘマトキシリン 45 min
4. 流水洗 45 min
5. 70%エタノール 1 min
6. エオシン 30 sec
7. 流水洗 1 min
8. 80%エタノール 1 min
9. 90%エタノール 1 min
10. 100%エタノール 1 min×3
11. キシレン 3 min×3
11. 封入

統計解析

定量値はすべて平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。統計解析は JMP Pro 12.2.0 ソフトウェア（SAS Institute）を用い、student's *t* tests によって有意差検定を行った。

略語

ANOVA	Analysis of variance
ADC	Antibody-drug conjugate
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
AFM	Atomic force microscopy
ARG	Autoradiography
ATP	Adenosine triphosphate
CDC	Complement-dependent cytotoxicity
CT	Computed tomography
CEA	Carcinoembryonic antigen
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTPA	Diethylene triamine pentaacetic acid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EthD-1	Ethidium homodimer-1
EPR	Electron paramagnetic resonance
FBS	Fetal bovine serum
[¹⁸ F]FDG	2-deoxy-2-[¹⁸ F]fluoro-D-glucose
[¹⁸ F]FMISO	[¹⁸ F]fluoromisonidazole
GFP	Green fluorescent protein
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HER2	Epidermal growth factor receptor type-2
ICNIRP	International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection
ICD	Immunogenic cell death
INF- γ	Interferon-gamma
IR700	IRDye700DX
LED	Light-emitting diode
MRI	Magnetic resonance imaging
NIR	Near-infrared
Pan-IR700	Panitumumab-IR700
PAP	Peroxidase-antiperoxidase
PBS	Phosphate-buffered saline

PC-SM	Penicillin-Streptomycin Mixed Solution
PDT	Photodynamic therapy
PET	Positron emission tomography
PI	Propidium iodide
PIT	Photoimmunotherapy
PSMA	Prostate-specific membrane antigen
ROS	Reactive oxygen species
Tra-IR700	Trastuzumab-IR700
TTX	Tetrodotoxin
VEGF	Vascular endothelial growth factor

参考文献

1. 厚生労働省. 令和元年(2019) 人口動態統計月報年計（概数）の概況.
2. Gilman A, Philips FS. The biological actions and therapeutic applications of the B-chloroethyl amines and sulfides. *Science*. 1946;103:409–15.
3. Katzung BG. Basic & Clinical Pharmacology (14th Edition). McGraw-Hill Education. 2018.
4. Ke X, Shen L. Molecular targeted therapy of cancer: The progress and future prospect. *Front Lab Med*. 2017;1:69–75.
5. Carter PJ, Lazar GA. Next generation antibody drugs: Pursuit of the “high-hanging fruit.” *Nat Rev Drug Discov*. 2018;17:197–223.
6. Tamura K, Tsurutani J, Takahashi S, et al. Trastuzumab deruxtecan (DS-8201a) in patients with advanced HER2-positive breast cancer previously treated with trastuzumab emtansine: a dose-expansion, phase 1 study. *Lancet Oncol*. 2019;20:816–26.
7. Beck A, Goetsch L, Dumontet C, Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16:315–37.
8. H. VT, Josionek A. Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. *Münch Med Wochenschr*. 1903;1:2042–4.
9. Dolmans DEJGJ, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:380–7.
10. Kessel D. Photodynamic Therapy: A Brief History. *J Clin Med*. 2019;8:1581.
11. Agostinis P, Berg K, Cengel K a, et al. Photodynamic therapy of cancer : an update. *CA Cancer J Clin*. 2011;61:250–81.
12. Zhang J, Jiang C, Figueiró Longo JP, Azevedo RB, Zhang H, Muehlmann LA. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2018;8:137–46.
13. Ormond AB, Freeman HS. Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials (Basel)*. 2013;6:817–40.
14. Baskaran R, Lee J, Yang SG. Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications. *Biomater Res*. 2018;22:1–8.
15. Mitsunaga M, Ogawa M, Kosaka N, Rosenblum LT, Choyke PL, Kobayashi H. Cancer cell-selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules. *Nat Med*. 2011;17:1685–91.

16. Kobayashi H, Choyke PL. Near-Infrared Photoimmunotherapy of Cancer. *Acc Chem Res.* 2019;52:2332–9.
17. Kobayashi H, Griffiths GL, Choyke PL. Near-Infrared Photoimmunotherapy: Photoactivatable Antibody-Drug Conjugates (ADCs). *Bioconjug Chem.* 2020;31:28–36.
18. Green DR, Ferguson T, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:353–63.
19. Ogawa M, Tomita Y, Nakamura Y, et al. Immunogenic cancer cell death selectively induced by near infrared photoimmunotherapy initiates host tumor immunity. *Oncotarget.* 2017;8:10425–36.
20. Nagaya T, Friedman J, Maruoka Y, et al. Host immunity following near infrared photoimmunotherapy is enhanced with PD-1 checkpoint blockade to eradicate established antigenic tumors. *Cancer Immunol Res.* 2019;7:401–13.
21. Nagaya T, Nakamura Y, Okuyama S, et al. Near-Infrared Photoimmunotherapy Targeting Prostate Cancer with Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) Antibody. *Mol Cancer Res.* 2017;15:1153–62.
22. Maawy AA, Hiroshima Y, Zhang Y, et al. Near infra-red photoimmunotherapy with anti-CEA-IR700 results in extensive tumor lysis and a significant decrease in tumor burden in orthotopic mouse models of pancreatic cancer. *PLoS One.* 2015;10:1–11.
23. Nagaya T, Nakamura Y, Sato K, Harada T, Choyke PL, Kobayashi H. Near infrared photoimmunotherapy of B-cell lymphoma. *Mol Oncol.* 2016;10:1404–14.
24. Railkar R, Krane LS, Li QQ, et al. Epidermal growth Factor receptor (EGFR) Targeted photoimmunotherapy (PIT) for the treatment of EGFR expressing bladder cancer. *Mol Cancer Ther.* 2017;16:2201–14.
25. Kobayashi H, Ogawa M, Alford R, Choyke PL, Urano Y. New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging. *Chem Rev.* 2010;110:2620–40.
26. Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F, Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects. *Lasers Med Sci.* 2009;24:259–68.
27. Weissleder R, Ntziachristos V. Shedding light onto live molecular targets. *Nat Med.* 2003;9:123–8.
28. Mitsunaga M, Nakajima T, Sano K, Choyke PL, Kobayashi H. Near-infrared theranostic photoimmunotherapy (PIT): Repeated exposure of light enhances the effect of immunoconjugate. *Bioconjug Chem.* 2012;23:604–9.
29. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 1995;146:3–15.

30. Trump BE, Berezsky IK, Seung H, Phelps PC. The Pathways of Cell death: Oncosis, Apoptosis, and Necrosis. *Toxicol Pathol.* 1997;25:82–8.
31. Fink SL, Cookson BT, Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis : Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infect Immun.* 2005;73:1907–16.
32. Photofrin-pdt AI, Wu Y, Xing D, Chen WR. Single Cell FRET Imaging for Determination of Pathway of Tumor Cell Apoptosis Induced by Photofrin-PDT. *Cell cycle.* 2006;5:729–34.
33. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, et al. Photodynamic Therapy. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 1998;90:889–905.
34. Boya P, Andreau K, Poncet D, et al. Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion. *J Exp Med.* 2003;197:1323–34.
35. Gomes-da-Silva LC, Zhao L, Bezu L, et al. Photodynamic therapy with redaporfin targets the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *EMBO J.* 2018;37.
36. Buytaert E, Callewaert G, Hendrickx N, et al. Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *FASEB J.* 2006;20:756–8.
37. Moan J, Pettersen EO, Christensen T. The mechanism of photodynamic inactivation of human cells in vitro in the presence of haematoporphyrin. *Br J Cancer.* 1979;39:398–407.
38. Kim J, Santos OA, Park JH. Selective photosensitizer delivery into plasma membrane for effective photodynamic therapy. *J Control Release.* 2014;191:98–104.
39. Yoo JO, Ha KS. New Insights into the Mechanisms for Photodynamic Therapy-Induced Cancer Cell Death. 1st ed. Vol. 295, International Review of Cell and Molecular Biology. Elsevier Inc.; 2012. 139–174 p.
40. Shirasu N, Yamada H, Shibaguchi H, Kuroki M, Kuroki M. Potent and specific antitumor effect of CEA-targeted photoimmunotherapy. *Int J Cancer.* 2014;135:2697–710.
41. Ito K, Mitsunaga M, Arihiro S, 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;16:1–10.
42. Nakamura Y, Nagaya T, Sato K, et al. Alterations of filopodia by near infrared photoimmunotherapy: evaluation with 3D low-coherent quantitative phase microscopy. *Biomed Opt Express.* 2016;7:2738–48.
43. Marcus Y. Ionic Radii in Aqueous Solutions. *Chem Rev.* 1988;88:1475–98.

44. Iamshanova O, Mariot P, Lehen'kyi V, Prevarskaya N. Comparison of fluorescence probes for intracellular sodium imaging in prostate cancer cell lines. *Eur Biophys J*. 2016;45:765–77.
45. Venturoli D, Rippe B. Ficoll and dextran vs. globular proteins as probes for testing glomerular permselectivity: effects of molecular size, shape, charge, and deformability. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;288:F605-613.
46. Lu X, Nguyen V, Zeng X, Elliott BJ, Gin DL. Selective rejection of a water-soluble nerve agent stimulant using a nanoporous lyotropic liquid crystal-butyl rubber vapor barrier material: Evidence for a molecular size-discrimination mechanism. *J Memb Sci*. 2008;318:397–404.
47. Baransi K, Dubowski Y, Sabbah I. Synergetic effect between photocatalytic degradation and adsorption processes on the removal of phenolic compounds from olive mill wastewater. *Water Res*. 2012;46:789–98.
48. Kreutzfeldt J, Rozeboom B, Dey N, De P. The trastuzumab era: current and upcoming targeted HER2+ breast cancer therapies. *Am J Cancer Res*. 2020;10:1045–67.
49. Ogata F, Nagaya T, Okuyama S, et al. Dynamic changes in the cell membrane on three dimensional low coherent quantitative phase microscopy (3D LC-QPM) after treatment with the near infrared photoimmunotherapy. *Oncotarget*. 2017;8:104295–302.
50. Al Soraj M, He L, Peynshaert K, et al. siRNA and pharmacological inhibition of endocytic pathways to characterize the differential role of macropinocytosis and the actin cytoskeleton on cellular uptake of dextran and cationic cell penetrating peptides octaarginine (R8) and HIV-Tat. *J Control Release*. 2012;161:132–41.
51. Mains PE, Sulston IA, Wood WB. Dominant maternal-effect mutations causing embryonic lethality in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1990;125:351–69.
52. Lei L, Tao W, Min W, Bei L, Ran C, Rongying Z. The effect of the size of fluorescent dextran on its endocytic pathway. *Cell Biol Int*. 2015;39:531–9.
53. Andrews NW, Almeida PE, Corrotte M. Damage control: cellular mechanisms of plasma membrane repair. *Trends Cell Biol*. 2014;24:734–42.
54. Blazek AD, Paleo BJ, Weisleder N. Plasma Membrane Repair: A Central Process for Maintaining Cellular Homeostasis. *Physiology*. 2015;30:438–48.
55. Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO Journal*. 1982;1:841–5.
56. McNeil PL, Warder E. Glass beads load macromolecules into living cells. *J Cell Sci*. 1987;88(Pt 5):669–78.

57. Liu X, Van Vleet T, Schnellmann RG. The role of calpain in oncotic cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004;44:349–70.
58. Trump BF, Berezesky IK. The role of altered $[Ca^{2+}]_i$ regulation in apoptosis, oncosis, and necrosis. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1313:173–8.
59. Okada Y, Sato K, Numata T. Pathophysiology and puzzles of the volume-sensitive outwardly rectifying anion channel. *J Physiol.* 2009;587:2141–9.
60. Nakajima K, Takakura H, Shimizu Y, Ogawa M. Changes in plasma membrane damage inducing cell death after treatment with near-infrared photoimmunotherapy. *Cancer Sci.* 2018;109:2889–96.
61. Sato K, Ando K, Okuyama S, et al. 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.* 2018;4:1559–1569.
62. Kobayashi M, Harada M, Takakura H, et al. Theoretical and Experimental Studies on the Near-Infrared Photoreaction Mechanism of a Silicon Phthalocyanine Photoimmunotherapy Dye: Photoinduced Hydrolysis by Radical Anion Generation. *Chempluschem.* 2020;85:1–6.
63. Papadopoulos C, Kravic B, Meyer H. Repair or lysophagy: dealing with damaged lysosomes. *J Mol Biol.* 2020;432:231–9.
64. Wang F, Gómez-Sintes R, Boya P. Lysosomal membrane permeabilization and cell death. *Traffic.* 2018;19:918–31.
65. Zhou W, Guo Y, Zhang X, Jiang Z. Lys05 induces lysosomal membrane permeabilization and increases radiosensitivity in glioblastoma. *J Cell Biochem.* 2020;121:2027–37.
66. Li M, Tian R, Fan J, Du J, Long S, Peng X. A lysosome-targeted BODIPY as potential NIR photosensitizer for photodynamic therapy. *Dye Pigment.* 2017;147:99–105.
67. Nakajima K, Ogawa M. Phototoxicity in near-infrared photoimmunotherapy is influenced by the subcellular localization of antibody-IR700. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;31:101926.
68. Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009;324:1029–33.
69. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer.* 2004;4:891–9.
70. Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis. *Biochem.* 2008;73:751–62.
71. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:721–32.

72. Harris AL. Hypoxia - A key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:38–47.
73. Watanabe S, Inoue T, Okamoto S, et al. Combination of FDG-PET and FMISO-PET as a treatment strategy for patients undergoing early-stage NSCLC stereotactic radiotherapy. *EJNMMI Res*. 2019;9.
74. Höckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: Definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93:266–76.
75. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 2002;18:872–9.
76. Sato K, Nagaya T, Choyke PL, Kobayashi H. Near infrared photoimmunotherapy in the treatment of pleural disseminated NSCLC: Preclinical experience. *Theranostics*. 2015;5:698–709.
77. Maruoka Y, Nagaya T, Nakamura Y, et al. Evaluation of early therapeutic effects after near infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT) using luciferase-luciferin photon-counting and fluorescence imaging. *Mol Pharm*. 2017;14:4628–35.
78. Fujimura D, Inagaki F, Okada R, et al. Conjugation Ratio, Light Dose, and pH Affect the Stability of Panitumumab-IR700 for Near-Infrared Photoimmunotherapy. *ACS Med Chem Lett*. 2020;11:1598–604.
79. Sano K, Mitsunaga M, Nakajima T, Choyke PL, Kobayashi H. Acute Cytotoxic Effects of Photoimmunotherapy Assessed by ¹⁸F-FDG PET. *J Nucl Med*. 2013;54:770–6.
80. Hatano T, Zhao S, Zhao Y, et al. Biological characteristics of intratumoral [F-18]-fluoromisonidazole distribution in a rodent model of glioma. *Int J Oncol*. 2013;42:823–30.
81. Sano K, Nakajima T, Choyke PL, Kobayashi H. Markedly Enhanced Permeability and Retention Effects Induced by Photo-immunotherapy of Tumors. *ACS Nano*. 2013;7:717–24.
82. Nakamura Y, Bernardo M, Nagaya T, et al. MR imaging biomarkers for evaluating therapeutic effects shortly after near infrared photoimmunotherapy. *Oncotarget*. 2016;7:17254–64.
83. Zimny M, Gagel B, DiMartino E, et al. FDG - A marker of tumour hypoxia? A comparison with [¹⁸F]fluoromisonidazole and pO₂-polarography in metastatic head and neck cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2006;33:1426–31.
84. Sato K, Nagaya T, Mitsunaga M, Choyke PL, Kobayashi H. Near infrared photoimmunotherapy for lung metastases. *Cancer Lett*. 2015;365:112–21.

85. Sato K, Watanabe R, Hanaoka H, Nakajima T, Choyke PL, Kobayashi H. Comparative effectiveness of light emitting diodes (LEDs) and Lasers in near infrared photoimmunotherapy. *Oncotarget*. 2016;7:14324–35.
86. Okuyama S, Nagaya T, Sato K, et al. Interstitial near-infrared photoimmunotherapy: effective treatment areas and light doses needed for use with fiber optic diffusers. *Oncotarget*. 2018;9:11159–69.
87. Ho JS, Yeh AJ, Neofytou E, et al. Wireless power transfer to deep-tissue microimplants. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111:7974–9.
88. Kim JD, Sun C, Suh IS. A proposal on wireless power transfer for medical implantable applications based on reviews. *IEEE Wirel Power Transf Conf 2014, IEEE WPTC 2014*. 2014;166–9.
89. Hoffman RM. The multiple uses of fluorescent proteins to visualize cancer in vivo. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:796–806.
90. Sato K, Choyke PL, Kobayashi H. Photoimmunotherapy of gastric cancer peritoneal carcinomatosis in a mouse model. *PLoS One*. 2014;9.
91. International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. Guidelines for limiting exposure to time-varying electric and magnetic fields (1 Hz to 100 kHz). *Health Phys*. 2010;99:818–36.
92. Mitsunaga M, Nakajima T, Sano K, Kramer-Marek G, Choyke PL, Kobayashi H. Immediate in vivo target-specific cancer cell death after near infrared photoimmunotherapy. *BMC Cancer*. 2012;12:345.
93. Nakajima T, Sato K, Hanaoka H, et al. The effects of conjugate and light dose on photoimmunotherapy induced cytotoxicity. *BMC Cancer*. 2014;14:389.
94. Sano K, Nakajima T, Choyke PL, Kobayashi H. The effect of photoimmunotherapy followed by liposomal daunorubicin in a mixed tumor model: a demonstration of the super-enhanced permeability and retention effect after photoimmunotherapy. *Mol Cancer Ther*. 2014;13:426–32.
95. Nagaya T, Nakamura Y, Sato K, Harada T, Choyke PL, Kobayashi H. Improved micro-distribution of antibody-photon absorber conjugates after initial near infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT). *J Control Release*. 2016;232:1–8.
96. Seyama Y, Kubota K, Sano K, et al. Long-Term Outcome of Extended Hemihepatectomy for Hilar Bile Duct Cancer with No Mortality and High Survival Rate. *Ann Surg*. 2003;238:73–83.

97. Tompkins RK, Thomas D, Wile A, Longmire WP. Prognostic factors in bile duct carcinoma: analysis of 96 cases. *Ann Surg*. 1981;194:447–57.
98. Nakajima K, Kimura T, Takakura H, et al. Implantable wireless powered light emitting diode (LED) for near-infrared photoimmunotherapy: device development and experimental assessment in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2018;9:20048–57.
99. Meier SD, Kovalchuk Y, Rose CR. Properties of the new fluorescent Na⁺ indicator CoroNa Green: Comparison with SBF1 and confocal Na⁺ imaging. *J Neurosci Methods*. 2006;155:251–9.
100. Goldin AL. Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol*. 2001;63:871–94.
101. Euhus DM, Hudd C, LaRegina MC JF. Tumor measurement in the nude mouse. *J Surg Oncol*. 1996;31:229–34.
102. Tomita M, Yasui H, Higashikawa K, et al. Anti PD-1 treatment increases [¹⁸F]FDG uptake by cancer cells in a mouse B16F10 melanoma model. *EJNMMI Res*. 2018;8:82.
103. Tomita M, Suzuki M, Kono Y, Nakajima K, Matsuda T, Kuge Y. Influence on [¹⁸F] FDG uptake by cancer cells after anti-PD-1 therapy in an enforced- immune activated mouse tumor. *EJNMMI Res*. 2020;10:24.
104. Sato K, Nagaya T, Nakamura Y, Harada T, Choyke PL, Kobayashi H. Near infrared photoimmunotherapy prevents lung cancer metastases in a murine model. *Oncotarget*. 2015;6:19747–58.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究のけの字もわからない研究室配属時から5年半にわたって終始ご指導、ご鞭撻を賜りました北海道大学大学院薬学研究院 生体分析化学研究室 小川美香子教授に心より深く感謝申し上げます。的確なご指導のもと研究を行う機会や、得られた成果を論文や国内外の学会で発表する機会を与えて頂きましたことは、学生生活におけるかけがえのない財産となりました。当時はとてもつらかった（小川先生もだとは思いますが…すみません。）最初の WMIC は今では良い思い出です。つらさを乗り越えたあの達成感を後輩たちにも是非経験して頂きたいと常々思います。

得られた結果に対して多くの議論を交わして頂いただけでなく、実験が円滑に行えるよう研究生活を支えて頂きました北海道大学大学院薬学研究院 生体分析化学研究室 高倉栄男講師に深く感謝致します。「発表タイトルを考えるプロ」と言って無茶振りをしても、毎回しっかり考えて提案してくださり大変助かりました。

獣医学というバックグラウンドから貴重なご助言を頂き、また、17 時以降は私的なことに関しても日々励ましてくださいました同 鈴木基史助教に深く感謝致します。分子生物学的なアプローチの仕方だけでなく、今後非常に大切な学生とのコミュニケーションの取り方に関しても先生を見て多くのことを学びました。

また、研究活動の初期に、細胞培養などの基本的な操作から丁寧にご指導頂きました京都大学医学部附属病院放射線部 志水陽一助教に深く感謝致します。

野球大会なども楽しみつつご指導頂きました立命館大学立命館グローバル・イノベーション研究機構 河野裕允准教授に深く感謝致します。

ワイヤレス LED 装置を用いた動物実験のデザインに関するご助言や、3T3-HER2 細胞、A431-GFP-Luc 細胞をご提供頂きました米国国立衛生研究所 小林久隆主任研究員、佐藤和秀博士に深く感謝致します。

アクチンの蛍光イメージング剤 HMRef をご提供頂きました、東京大学大学院薬学系研究科 薬品代謝化学教室 浦野泰照教授、上野匡助教、東京大学大学院医学系研究科 細胞分子薬理学教室 浅沼大祐講師に深く感謝致します。

ワイヤレス LED 装置の作製にご協力頂きました、株式会社セイバー 木村俊広様、日本ライフライン株式会社 吉川恭央様、株式会社ビー・アンド・プラス 亀田篤志様、進藤崇之様に深く感謝致します。

本論文の審査をご快諾頂きました、北海道大学大学院医学研究院 内科学講座消化器内科学教室 坂本直哉教授、北海道大学大学院薬学研究院 生体分子機能学研究室 前仲勝実教授に心より深く感謝致します。

本研究の遂行にあたって経済的にご援助頂きました、日本学術振興会 特別研究員奨励費（課題番号: 20J12988）、日本薬学会 長井記念薬学研究奨励金、東京生化学研究会 奨学補助金に深く感謝致します。

日々の研究生活を共にし、研究室外でもバレーボールやスキー旅行、入会はしていませんが料理教室など様々なイベントに付き合ってくださいました北海道大学大学院薬学研究院 生体分析化学研究室内の学生の皆様、卒業生の皆様に心より感謝致します。本研究における PET イメージング剤を用いた実験は、杉川晃代学士、富田真由学士にご協力頂きました。また、辛くも楽しい研究生活において常に励まし合い、研究の節目節目に熱い議論を交わし、卒業後はたまにお中元やお歳暮を送ってくださいました安藤完太修士、大平貴之修士、金子祐太修士、栗田展輝学士、中村和貴学士ら研究室の同期に深く感謝致します。

また、博士課程を修了するまでに支えてくださった友人などすべての方々に深く感謝致します。特に、北海道大学大学院薬学研究院 薬品製造化学研究室 栗原拓丸修士など博士課程に進学した薬学部同期らとの学内外での交流は、孤独になりがちな博士課程生活の癒やしでした。誠にありがとうございます。

最後に、まさか札幌で8年間も学生を続けるとは思ってもみなかったと存じますが、本当に長いこれまでの学生生活をご支援くださいました父恒夫、母美鈴に心より深く感謝申し上げます。おかげで不自由なく学生生活を送ることができました。また、今考えてみると、幼少期からいろいろな場所に連れて行き多くの経験をする機会を与えてくれたおかげで、「科学」に対して強い興味を持てるようになったと思います。

今後は、研究から得た発見を通じて薬学を発展させ、社会に貢献できるよう頑張っていきます。引き続き応援の程どうぞよろしくお願い致します。

2021 年 3 月 中島孝平