



Title	癌関連線維芽細胞を標的とした膵癌に対する近赤外光線免疫療法に関する研究
Author(s)	米村, 洋輝
Description	配架番号 : 2964
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16654号
Issue Date	2025-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16654
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/98264
Type	doctoral thesis
File Information	YONEMURA_Hiroki.pdf, 全文



学 位 論 文

癌関連線維芽細胞を標的とした
膵癌に対する近赤外光線免疫療法に関する研究
(Study on near-infrared photoimmunotherapy for pancreatic
cancer targeting cancer associated fibroblasts)

2025 年 9 月

北 海 道 大 学

米 村 洋 輝

学 位 論 文

癌関連線維芽細胞を標的とした

膵癌に対する近赤外光線免疫療法に関する研究

(Study on near-infrared photoimmunotherapy for pancreatic
cancer targeting cancer associated fibroblasts)

2025 年 9 月

北 海 道 大 学

米 村 洋 輝

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
方法	9 頁
結果	14 頁
考察	30 頁
結論	33 頁
謝辞	34 頁
利益相反	35 頁
引用文献	36 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究は以下の論文に発表した。

- Hiroki Yonemura, Masaki Kuwatani, Kohei Nakajima, Atsushi Masamune, Mikako Ogawa, Naoya Sakamoto. Treatment of pancreatic cancer using near-infrared photoimmunotherapy targeting cancer-associated fibroblasts in combination with anticancer chemotherapeutic drug. Cancers (Basel). 2025 May 7;17(9):1584.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

- 米村 洋輝, 栗谷 将城, 坂本 直哉
第32回日本消化器関連学会週間 (JDDW), 2024年10月31日-11月2日, 神戸

要旨

【背景と目的】

膵管癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma : PDAC) は最も予後不良な癌種として知られ、その 5 年生存率は依然として非常に低く、日本では 10%未満と報告されている。また、発見された段階ですでに進行癌であることが多く、全身化学療法を行うことが多いが、その治療反応性は乏しい。PDAC の特徴はその豊富な腫瘍間質であり、間質が物理的な障壁となることで、癌細胞へ薬剤が十分に送達されないことが全身化学療法が奏功しない原因の一つとして挙げられる。

腫瘍間質は主に癌関連線維芽細胞 (cancer associated fibroblasts : CAFs) がその形成に参与している。CAFs は間質の構成成分 (コラーゲン, プロテオグリカン, 糖タンパク質, ヒアルロン酸) を分泌するだけでなく、腫瘍細胞の増殖や転移を促進したり、がんに対する免疫反応を抑制する因子を分泌したりすることで、腫瘍の進行に寄与する。そのため CAFs は、PDAC 患者の治療標的となり得ると考えられている。しかしながら、有望な前臨床試験の結果にもかかわらず、CAFs を標的とする戦略はいずれも確立された臨床治療にはつながっておらず、PDAC における CAFs を標的とする新たな治療アプローチが早急に必要とされている。

我々は近年登場した新しいがん治療法である近赤外光線免疫療法 (near-infrared photoimmunotherapy : NIR-PIT) に着目した。NIR-PIT はその高い抗腫瘍効果や正常細胞への影響が少ない点から、今後のがんに対する手術、放射線治療、化学療法に次ぐ新規治療として注目されている。NIR-PIT で CAFs を減少させることによって癌の増殖効果と癌間質量を低減し、抗腫瘍効果や薬剤浸透性の増加が得られるものと考えた。

本研究では PDAC において、CAFs をターゲットにした NIR-PIT を、抗癌剤治療もしくは癌細胞自体に対する NIR-PIT と併用することによる抗腫瘍効果の増強を明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】

ヒト PDAC 細胞株として Capan-1 を、膵癌領域においてヒト CAFs と考えられている膵星細胞 (pancreatic stellate cells : PSCs) である hPSC-5 を使用した。また、CAFs 表面に発現しているとされている線維芽細胞活性化タンパク質 (fibroblast activation protein : FAP) に対する抗ヒト FAP 抗体、ムチン型糖タンパク質ポドプラニン (podoplanin : PDPN) に対する抗 PDPN 抗体、膵癌細胞表面の糖鎖に特異的に結合するレクチンである rBC2LC-N と、光感受性物質の IRDye[®]700DX (IR700) との複合体 (それぞれ抗ヒト FAP 抗体-IR700 : α FAP-IR700, 抗 PDPN 抗体-IR700, rBC2LC-N-IR700) を作製し、*in vitro* において NIR-PIT 効果の確認を行った。

まず、蛍光顕微鏡とフローサイトメトリーを用いて hPSC-5 に α FAP-IR700 や抗

PDPN 抗体-IR700 が結合することの確認を行った。ついで hPSC-5 と α FAP-IR700 を用いて *in vitro* での NIR-PIT を行い、治療効果について蛍光顕微鏡観察とフローサイトメトリーにて評価を行った。蛍光顕微鏡下ではエチジウムホモダイマー1 を用いて死細胞の蛍光観察を行い、フローサイトメトリーではヨウ化プロピジウム染色で死細胞数を計測した。また、同様に Capan-1 に rBC2LC-N-IR700 が結合することと、それによる NIR-PIT の効果を確認した。

次に、hPSC-5 が Capan-1 の増殖能に寄与することを確認するために、両細胞を共培養した場合の Capan-1 細胞数と Capan-1 単独培養の細胞数との比較を行った。また、共培養細胞に α FAP-IR700 による NIR-PIT を施行し、Capan-1 の増殖能への影響を Capan-1 細胞数にて確認した。

加えて、hPSC-5 に対する NIR-PIT 施行時に免疫原性細胞死 (immunogenic cell death : ICD) が誘導されているか否かを、各アッセイキットを使用して確認した。

In vivo での検討として、BALB/c Slc-*nu/nu* に Capan-1 と hPSC-5 を混合して移植し、 α FAP-IR700 と rBC2LC-N-IR700 による二重 NIR-PIT、もしくは抗癌剤のゲムシタビン (gemcitabine : GEM) と α FAP-IR700 による NIR-PIT の併用による治療効果の評価を行った。

【結果】

hPSC-5 に対する抗ヒト FAP 抗体の結合率は高く、hPSC-5 には FAP 発現があることが確認できた。一方、抗 PDPN 抗体-IR700 と hPSC-5 においては結合による蛍光は全く観察されなかった。hPSC-5 に対する α FAP-IR700 を用いた NIR-PIT では、近赤外線 (NIR) 照射後から細胞の膨化が始まり、1 時間後には細胞死が確認できた。フローサイトメトリーによる定量評価においても、コントロール群に比較して 50 J/cm^2 での NIR-PIT 群では有意に死細胞の割合が高かった ($p < 0.05$)。また、既報通り Capan-1 に対して rBC2LC-N-IR700 は良好に結合し、NIR-PIT で細胞死が確認できた。

Capan-1 単独培養と比較すると、Capan-1 と hPSC-5 の共培養では Capan-1 細胞数が有意に増加した ($p < 0.05$)。 α FAP-IR700 による NIR-PIT を共培養細胞に対して行ったところ、Capan-1 の増殖能は Capan-1 単独培養と同程度まで低下した ($p < 0.05$)。

ICD 関連アッセイは、アデノシン三リン酸はコントロール群に比較して 50 J/cm^2 での NIR-PIT 群で有意に放出量が多かった ($p < 0.01$)。カルレティキュリンはコントロール群に比較して $25, 50 \text{ J/cm}^2$ での NIR-PIT 群では有意に膜表面への移行を認めた ($p < 0.05$)。高移動度グループボックス 1 の放出に関してはコントロール群と NIR-PIT 群の間で有意差は見られなかった ($p = 0.70$)。

In vivo において、 α FAP-IR700 と rBC2LC-N-IR700 による二重 NIR-PIT では α FAP-

IR700 による治療の明らかな上乗せ効果はみられなかった。GEM と α FAP-IR700 の併用療法に関して、GEM 単剤群と比較して GEM 併用 NIR-PIT 群では腫瘍のサイズが有意に減少した (day 28 : 79 vs. 382 mm³, $p < 0.01$)。NIR-PIT 単独群では、コントロール群と比較して腫瘍縮小効果は認められなかった (day 28 : 605 vs. 766 mm³, $p = 0.78$)。

【考察】

本研究では、PDAC の癌間質構造の主体をなす CAFs を標的にした NIR-PIT は、癌間質の物理的障壁を減弱し、GEM による化学療法の効果を高める可能性を示すことができた。

NIR-PIT の最大の利点は、特異抗体と照射領域の制御による、治療標的への高い選択性が挙げられる。本研究においても、NIR-PIT の顕微鏡観察では、 α FAP/tBC2LC-N-IR700 が結合して NIR が照射された領域でのみ細胞死が得られた点はそれを支持する。膵臓は後腹膜臓器であり、周囲には胃や十二指腸、大血管などに近接しているため、放射線や重粒子線による局所治療では他臓器への傷害が問題となることが多いが、NIR-PIT は、その標的選択性の高さから、より安全で有用な治療法となりうる。しかしながら膵臓内病変への選択的 NIR 照射は一つの課題としてあげられ、内視鏡的経鼻膵管ドレナージチューブを応用した専用照射デバイスの開発も同時に進行中である。

これまで、膵癌関連の CAFs は 3 つのサブタイプに分類でき、それぞれが癌促進作用や逆に癌抑制作用を含む様々な機能を有しているということが分かっている。我々の研究では、CAFs としての PSCs を標的とし、すべての CAFs が NIR-PIT によって破壊されている。今後各タイプの CAFs に特異的な細胞膜表面マーカーが同定されれば、癌促進作用をもつ CAFs のみをターゲットにすることができ、より効果的な NIR-PIT が実現されると考えられる。

【結論】

CAFs に対する NIR-PIT と抗癌剤治療との併用療法は、より効果的で選択的な PDAC に対する抗癌治療を可能とする。

略語表

α FAP-IR700	anti-human FAP antibody - IR700
ATP	adenosine triphosphate
CAFs	cancer associated fibroblasts
DAMPs	damage associated molecular patterns
ECM	extracellular matrix
EthD-1	ethidium Homodimer - 1
FAP	fibroblast activation protein
FBS	fetal bovine serum
GEM	gemcitabine
HMGB1	high mobility group box 1
ICD	immunogenic cell death
IR700	IRDye [®] 700DX
LED	light emitting diode
NIR	near-infrared
NIR-PIT	near-infrared photoimmunotherapy
PBS	phosphate buffered saline
PC/SM	penicillin/streptomycin
PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma
PDPN	podoplanin
PSCs	pancreatic stellate cells

緒言

膵管癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma : PDAC) の5年生存率は依然として非常に低く、日本や米国の調査では10%未満と報告されている (Rahib et al, 2014; Mizrahi et al, 2020; Siegel et al, 2020) . PDAC に対して、全身化学療法をはじめとした様々な集学的治療が行われているが、PDAC は早期に転移をきたし、治療への反応性が限られていることから、非常に予後不良な疾患として知られる。近年の癌治療の進歩にもかかわらず、その傾向は変わっていない (Hidalgo, 2010) . PDAC の特徴として、線維芽細胞や細胞外マトリックスを含む、間質の高度な線維化反応が挙げられる。これらの反応による豊富な腫瘍間質が物理的な障壁となることで、癌細胞への薬剤が十分に送達されないことが全身化学療法が奏功しない原因の一つとして挙げられる (Feig et al, 2012) .

腫瘍間質は主に癌関連線維芽細胞 (cancer associated fibroblasts : CAFs) がその形成に参与している。PDAC においては、可溶性因子の分泌や癌組織の構造を形成することでその役割を果たしている (Lynch and Watt, 2018) . また、CAFs は抗癌剤の物理的障壁である間質を分泌するだけでなく、腫瘍細胞の増殖や転移を促進したり、癌に対する免疫反応を抑制する因子を分泌したりすることで腫瘍の進行に寄与している (Wu et al, 2020) . したがって、CAFs は、PDAC の重要な治療標的となり得ると考えられている。

近年、間質やCAFsをターゲットとした研究が様々な癌腫において盛んに行われている。具体的には、ヒアルロニダーゼを使用して癌間質を減少させることで化学療法の効果が向上したという報告や (Jacobetz et al, 2013) , オールトランスレチノイン酸によって CAFs の活性化を阻害することで癌が抑制されたという報告がなされている (Kocher et al, 2020) . 更に、CAFs の活性化経路の一つとされているソニックヘッジホッグ経路に関しても、マウスを使用した前臨床モデルで研究がなされ、この経路の阻害によりゲムシタビン (gemcitabine : GEM) の効果が向上する可能性が示唆された (Olive et al, 2009) . しかし、同内容の第 I b/II 相試験では、有効な治療効果はみられなかった (Catenacci et al, 2015) . 有望な前臨床試験の結果にもかかわらず、CAFs を標的とするこれらの戦略はいずれも確立された臨床治療にはつながっておらず、PDAC における CAFs を標的とする新たな治療アプローチが早急に必要とされている。

以上の背景から、我々は近年登場した新しい癌治療法である近赤外光線免疫療法 (near-infrared photoimmunotherapy : NIR-PIT) に着目した。NIR-PIT は、細胞膜の表面抗原に対する特異抗体に光感受性物質 (IRDye® 700DX : IR700) を結合させた複合体を使用し、複合体が標的細胞に結合後、近赤外線 (near-infrared : NIR) を照射することで癌細胞を選択的に破壊する治療法である (Mitsunaga et al, 2011) . IR700 は蛍光性と強

い水溶性のリガンドを持ったフタロシアニン化合物であり、近赤外線照射によって水溶性のリガンドが外れ、蛍光性を失うとともに凝集する性質をもっている。複合体が結合した細胞膜において IR700 が凝集することで細胞膜傷害が発生し、水分が細胞内に流入することで細胞が膨潤し細胞死を引き起こす (Kobayashi and Choyke, 2019; Ogawa and Takakura, 2021)(図 1)。

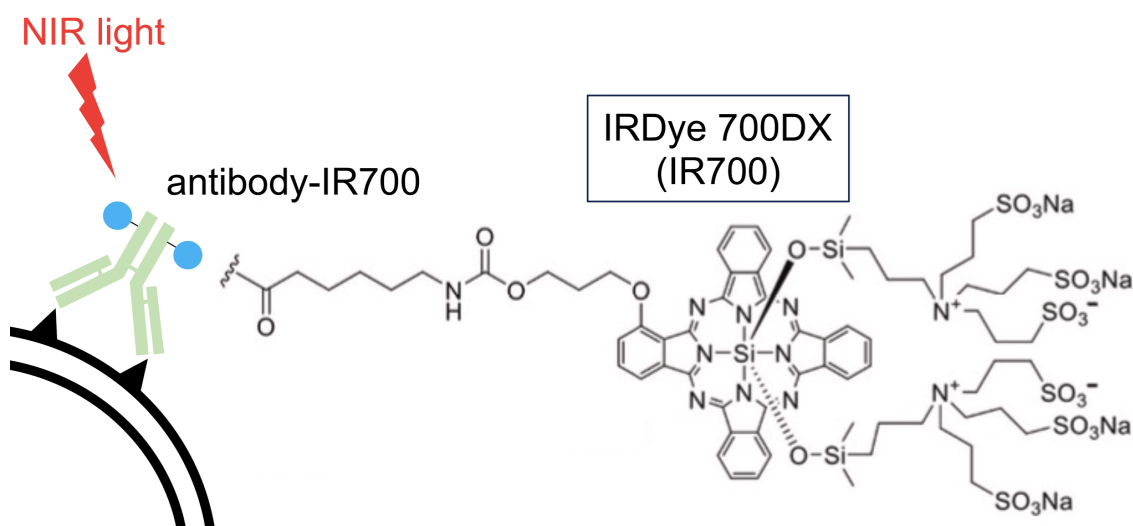


図 1. NIR-PIT

近赤外線光免疫療法 (NIR-PIT) は、細胞表面抗原の特異抗体と光感受性物質である IR700 を結合させた複合体を使用し、その複合体を細胞膜に結合させ、近赤外線照射を行うことで標的細胞に特異的に傷害を与え細胞死を誘導する。

また、NIR-PIT は照射された標的細胞そのものに対する治療効果に加え、カルレディキュリンの細胞膜移行やアデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate : ATP), 高移動度グループボックス 1 (high mobility group box 1 : HMGB1) などの損傷関連分子パターン (damage associated molecular patterns : DAMPs) を放出することで樹状細胞を活性化させ、免疫原性細胞死 (immunogenic cell death : ICD) を誘発し、照射を行っていない細胞に対しても効果を示すことが知られている (Krysko et al, 2012; Ogawa et al, 2017; Fucikova et al, 2020) 。 NIR-PIT はその高い抗腫瘍効果や正常細胞への影響がほぼ見られない点から、新規のがん治療法として注目されており、本邦においても切除不能な局所進行又は局所再発の頭頸部癌に対して 2021 年 1 月に保険承認されている。過去の研究において、ヒト血液型エпитープ H 型 1/3/4 に特異性をもつ組み換えレクチンである rBC2LCN が、膵癌に特異的に結合することが知られており (Shimomura et al, 2018) , 抗体の代わりに rBC2LCN を用いた NIR-PIT の前臨床モデルの報告がある (Kuroda et al, 2023) 。今回我々は膵癌細胞に対する NIR-PIT の一つとしてこちらの使用

を試みた。

NIR-PIT は本来癌細胞を標的にしたものであるが、抗体の種類を変えることで、癌細胞以外のさまざまな細胞を標的として傷害できることが報告されている (Kato et al, 2021; Wakiyama et al, 2022) 。したがって、CAFs を標的にした NIR-PIT は、癌と CAFs の相互作用を抑制することで癌の増殖能を低減し、癌間質構造の変化をきたすことで薬剤の透過性を高め、化学療法の治療効果を高める可能性が考えられる。PDAC 領域における報告はないものの、食道癌の前臨床モデルにおいては CAFs を標的にした NIR-PIT が抗癌剤の治療効果を高めるとの報告があり (Watanabe et al, 2019; Katsube et al, 2021) ，他の癌腫より腫瘍間質が豊富である PDAC においてはより有用な治療法となる可能性がある。

本研究においては、CAFs の表面に発現していると言われている線維芽細胞活性化タンパク質 (fibroblast activation protein : FAP) やポドプラニン (podoplanin : PDPN) に着目し (Biffi and Tuveson, 2021) ，PDAC における CAFs を標的にした NIR-PIT と、癌細胞自体に対する NIR-PIT もしくは抗癌剤治療との併用による抗腫瘍効果の増強を明らかにすることを目的とした。

方法

【細胞株および細胞培養】

ヒト PDAC 由来の脾星細胞である hPSC-5 (理化学研究所バイオリソースセンター) を CAFs として, Capan-1 (American Type Culture Collection) をヒト PDAC 細胞株として使用した. hPSC-5 は 5 % CO₂ 存在下, 10 % ウシ胎児血清 (fetal bovine serum : FBS ; Thermo Fisher SCIENTIFIC) および 1 % ペニシリン/ストレプトマイシン (penicillin/streptomycin : PC/SM ; nacalai tesque Inc.) を添加した DMEM/Ham's F-12 (nacalai tesque Inc.) を用いて培養した. Capan-1 は 5 % CO₂ 存在下, 10 % FBS および 1 % PC/SM を添加した RPMI1640 (nacalai tesque Inc.) を用いて培養した. hPSC-5 については, 有限増殖細胞であるため, 継代を 6~10 回行ったものを使用した. 細胞培養におけるマイコプラズマ感染の有無については, 定期的に TaKaRa PCR Mycoplasma Detection Set (Takara Bio Inc.) を用いて検査した.

【抗体および試薬】

抗ヒト FAP 抗体 (427819 ; R&D Systems ; 5 mg/mL) , 抗 PDPN 抗体 (101AP ; life technologies ; 1 mg/mL) , IRDye[®] 700DX NHS Ester (IR700 ; Li-COR Bioscience ; 1 mg/mL) , rBC2LC-N (富士フイルム和光純薬株式会社 ; 1.5 mg/mL) , 抗カルレティキュリン抗体-Alexa Fluor[®] 488 (ab196158 ; abcam ; 0.5 mg/mL) , Alexa Fluor[®] 488 (A20000 ; life technologies ; 1 mg/mL) , およびゲムシタビン塩酸塩 (Eli Lilly ; 10 mg/mL) を使用した.

【動物】

マウスを用いたすべての実験は, 「北海道大学動物実験に関する規程」に従って実施された. 動物実験プロトコールは北海道大学動物実験倫理審査委員会の承認・審査を受けた (15-0119) . 6 週齢の雌ヌードマウス (BALB/c Slc-nu/nu ; 日本 SLC 株式会社) を購入し, 蛍光画像における動物由来の自家蛍光を低減させるため, 実験の 4~5 日前からアルファルフアフリーの飼料で飼育した.

【抗体/rBC2LC-N-色素複合体の調製】

抗ヒト FAP 抗体, 抗 PDPN 抗体, rBC2LC-N と色素を 0.1 M Na₂HPO₄ (pH 8.5) 中で室温で 3 時間インキュベートした. 抗ヒト FAP 抗体-色素複合体は, 30 K の Amicon Ultra (Merck) を, rBC2LC-N-IR700 は 10 K の Amicon Ultra を使用して, 遠心機 (Himac CR-N ; Eppendorf Himac Technologies) で 4°C, 2000 xg の条件下でサンプルを精製した. 抗 PDPN 抗体-IR700 は, Hitrap Protein G HP カラム (Global Life Sciences Technologies Japan) で精製した. プレートリーダー (Infinite[®] 200 PRO ; TECAN JAPAN) とビシンコ

ニン酸アッセイキット (Thermo Fisher SCIENTIFIC) を用いて複合体の 562nm の吸光度を測定し、複合体の濃度がそれぞれ約 1 mg/mL となるように各物質の用量を調整した。IR700 および Alexa Fluor® 488 の濃度は、それぞれ 689 nm および 495 nm の波長で分光光度計 (UV-1800; 島津製作所) を用いて算出し、抗体/rBC2LC-N に結合した色素の数を、抗体 (もしくは rBC2LC-N)-IR700 で約 3-4, 抗体-Alexa Fluor® 488 で約 7 となるように調整した。

【hPSC-5 における FAP の発現の確認】

hPSC-5 を 35mm ディッシュ (Corning) に 3.0×10^5 /ディッシュの密度で播種し、24 時間培養した。その後、ディッシュをリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline : PBS; nacalai tesque Inc.) で洗浄し、培地を交換し、抗ヒト FAP 抗体-Alexa Fluor® 488 複合体を 5, 20 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。トリプシンを用いて細胞を回収し、フローサイトメーター (Gallios; Beckman Coulter) を用いて蛍光強度を測定した。得られたデータは、Kaluza Analysis 2.1 ソフトウェア (Beckman Coulter) を用いて解析した。

【hPSC-5 に対する $\alpha\text{FAP-IR700}$ による in vitro NIR-PIT】

・蛍光顕微鏡を用いた定性評価

hPSC-5 を 35 mm ディッシュに 3.0×10^5 /ディッシュとなるように播種し、24 時間培養した。ディッシュを PBS で洗浄し、培地を交換後、抗ヒト FAP 抗体-IR700 複合体 (anti-human FAP antibody - IR700 : $\alpha\text{FAP-IR700}$) を 5 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で添加し、37°C で 1, 3, 6, 12, 24 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、蛍光顕微鏡 (CKX41 ; OLYMPUS) で $\alpha\text{FAP-IR700}$ の hPSC-5 への結合の確認を行った。蛍光観察では、IR700 の励起フィルターを 673-748nm, 蛍光フィルターを 765-855nm に設定した。

PBS で洗浄後、エチジウムホモダイマー1 (ethidium Homodimer-1 : EthD-1 ; Thermo Fisher SCIENTIFIC) を 1 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で添加し、細胞に顕微鏡の励起フィルター (673-748 nm) を通して NIR を 120 秒間照射した (18 J/cm^2)。照射後 3 時間経過した細胞を、励起フィルター480-550 nm および蛍光フィルター590 nm で観察し、死細胞数を測定した。蛍光顕微鏡で得られた画像は、Image J 1.53 ソフトウェア (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) で解析した。

・フローサイトメトリーを用いた NIR-PIT による死細胞の定量解析

hPSC-5 を 35mm ディッシュに 3.0×10^5 /ディッシュとなるように播種し、24 時間培養した。その後、ディッシュを PBS で洗浄し、培地を交換した。 $\alpha\text{FAP-IR700}$ を 5 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で添加し、3 時間インキュベートした。発光ダイオード (light emitting diode : LED) [670-710 nm (L690D-66-16100 ; Epitex Inc.)] からの NIR を 5, 25, および 50

J/cm² で照射し、密度はレーザーパワーメーター (PM100, Thorlabs , 50 mW/cm²) を使用して測定した。3 時間後、細胞を回収し、PBS で懸濁し、0.01mg/mL のヨウ化プロピジウム (Life Technologies) とともに室温で 15 分間インキュベートした。死細胞はフローサイトメトリーで検出し、得られたデータは、前述の方法で分析した。

【Capan-1 に対する rBC2LC-N-IR700 による *in vitro* NIR-PIT】

・蛍光顕微鏡を用いた定性評価

Capan-1 を 35 mm ディッシュに 3.0×10^5 /ディッシュとなるように播種し、24 時間培養した。ディッシュを PBS で洗浄し、培地を交換後、rBC2LC-N-IR700 複合体を 1 µg/mL の濃度で添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、蛍光顕微鏡で rBC2LC-N-IR700 の hPSC-5 への結合の確認を行った。蛍光観察では、IR700 の励起フィルターを 673-748nm、蛍光フィルターを 765-855nm に設定した。

PBS で洗浄後、EthD-1 を 1 µg/mL の濃度で添加し、細胞に顕微鏡の励起フィルター (673-748 nm) を通して NIR を 10 秒間照射した (1.5 J/cm²)。照射後 1 時間経過した細胞を、励起フィルター 480-550 nm および蛍光フィルター 590 nm で観察し、死細胞数を測定した。蛍光顕微鏡で得られた画像は、前述の方法で分析した。

・フローサイトメトリーを用いた NIR-PIT による死細胞の定量解析

Capan-1 を 35mm ディッシュに 3.0×10^5 /ディッシュとなるように播種し、24 時間培養した。その後、ディッシュを PBS で洗浄し、培地を交換した。rBC2LC-N-IR700 複合体 を 1 µg/mL の濃度で添加し、1 時間インキュベートした。LED からの NIR を 1, 5, および 10 J/cm² で照射し、密度はレーザーパワーメーターを使用して測定した。1 時間後、細胞を回収し、PBS で懸濁し、0.01mg/mL のヨウ化プロピジウムとともに室温で 15 分間インキュベートした。死細胞はフローサイトメトリーで検出し、得られたデータは前述の方法で分析した。

【hPSC-5 と Capan-1 の共培養】

Capan-1 のみの群、Capan-1 と hPSC-5 の共培養のみを行う群、共培養したものに αFAP-IR700 による NIR-PIT を施行する群の 3 群に分けて、35 mm ディッシュに各細胞を 4 ディッシュに播種した (Capan-1 : 3.0×10^5 /ディッシュと hPSC-5 : 1.0×10^5 /ディッシュ)。NIR-PIT は播種より 24 時間後の day 1 に行った。αFAP-IR700 を 5 µg/mL の濃度で添加し、3 時間インキュベートした後に LED からの NIR を 50 J/cm² で照射した。day 1 (NIR-PIT 施行直前), day 3, day 5 において、蛍光顕微鏡を用いて低拡大の 1 視野あたりの Capan-1 の細胞数をカウントし、5 視野の平均値を算出した。蛍光顕微鏡で得られた画像は、前述の方法で解析した。

【hPSC-5 に対する α FAP-IR700 による NIR-PIT での ICD の確認】

hPSC-5 細胞を 35mm ディッシュに 3.0×10^5 /ディッシュの密度で播種し、24 時間培養した。PBS で洗浄後、培地交換し、 α FAP-IR700 を $5 \mu\text{g/mL}$ の濃度で添加し、3 時間インキュベートした。上記を実施したあと、以下の 3 つのアッセイをそれぞれ別途行った。

・ ATP アッセイ

LED を用いて NIR を $5, 25, 50 \text{ J/cm}^2$ で照射した。NIR 照射 3 時間後に上清を回収し、 4°C , 5000 xg で 5 分間遠心分離した。遠心後の上清中の ATP 濃度を ENLITEN[®] ATP assay キット (Promega) を用いて測定した。マイクロプレート (96 ウェル, 白色平底; Corning) に、上記の上清/スタンダード (10^{-12} - 10^{-9} M)/ 0 M のコントロールとして培地 (FBS と PC/SM フリーの DMEM/Ham's F-12), をそれぞれ $100 \mu\text{L}$ 添加し、組み換えルシフェラーゼ/ルシフェリン試薬を $100 \mu\text{L}$ /ウェル添加した。添加後速やかにプレートリーダーで発光を測定した。

・ カルレティキュリンアッセイ

LED を用いて NIR を $5, 25, 50 \text{ J/cm}^2$ で照射した。NIR 照射 3 時間後に細胞を回収し、PBS で懸濁し、抗カルレティキュリン抗体-Alexa Fluor[®] 488 とともに室温で 45 分間インキュベートした。蛍光強度はフローサイトメトリーで測定した。

・ HMGB1 アッセイ

LED を用いて NIR を 50 J/cm^2 で照射した。NIR 照射後 24 時間経過した時点で上清を回収し、 4°C , 300 xg で 3 分間遠心分離した。遠心後の上清を Amicon ultra (10 K) と遠心機を用いて 10 倍に濃縮し、HMGB1 濃度をヒト HMGB1 ELISA キット (ARG81185; Arigo) を用いて測定した。キットのマイクロプレートに上記の上清, スタンダード (HMGB1 濃度: 0 - 20 ng/mL) を $100 \mu\text{L}$ /ウェルずつ添加, ついで西洋ワサビペルオキシダーゼ抗体結合体を $200 \mu\text{L}$ /ウェルを添加し、 4°C で 16 時間インキュベートを行った。その後に洗浄液でプレートを洗浄し、テトラメチルベンジジン基質溶液を $100 \mu\text{L}$ /ウェル加え、室温で 10 分インキュベートした。最後に反応停止液を $50 \mu\text{L}$ /ウェル添加し、プレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定した。

【Capan-1 と hPSC-5 を用いた PDAC 腫瘍モデルに対する rBC2LC-N-IR700 と α FAP-IR700 による *in vivo* NIR-PIT の効果の確認】

6 週齢の BALB/c Slc-nu/nu マウスの右臀部皮下に、Capan-1 を 3.0×10^6 個と hPSC-5 を 1.0×10^6 個を混合して移植した。平均腫瘍体積が約 50 mm^3 に達した時点で、マウスを NT (no treatment) 群, rBC2LC-N-IR700 による NIR-PIT 単独群, rBC2LC-N-IR700 と α FAP-IR700 を用いた NIR-PIT 併用療法群の 3 群に分けた。rBC2LC-N-IR700 と α FAP-IR700 (いずれも $100 \mu\text{g}$ /マウス) を 1 日目, 8 日目, 15 日目に尾静脈から投与した。PIT

群では、静脈内投与の 24 時間後と 48 時間後に、外照射レーザー (MLL-III-690-800 mW; Changchun New Industries Optoelectronics Tech Co.) を 50 J/cm^2 /マウス (150 mW/cm^2 , 333 秒) で照射した。蛍光画像は光照射の前後で IVIS イメージングシステム (Perkinelmer) を用いて取得した。腫瘍体積は (長径 $\times$ 短径 $^2/2$) の式を用いて算出し、推移を確認した。

【Capan-1 と hPSC-5 を用いた PDAC 腫瘍モデルに対する α FAP-IR700 による *in vivo* NIR-PIT と GEM の併用効果の確認】

6 週齢の BALB/c Slc-nu/nu マウスの右臀部皮下に、Capan-1 を 3.0×10^6 個と hPSC-5 を 3.0×10^6 個を混合して移植した。平均腫瘍体積が約 80 mm^3 に達した時点で、マウスを NT (no treatment) 群, GEM 単独療法群, α FAP-IR700 を用いた NIR-PIT 単独療法群, GEM と α FAP-IR700 を用いた PIT 併用療法群の 4 群に分けた。GEM (1 mg/マウス) と α FAP-IR700 (100 μg /マウス) を 1 日目, 8 日目, 15 日目に尾静脈から投与した。PIT 群では、静脈内投与の 24 時間後と 48 時間後に、外照射レーザーを 75 J/cm^2 /マウス (150 mW/cm^2 , 500 秒) で照射した。蛍光画像は光照射の前後で IVIS イメージングシステム (Perkinelmer) を用いて取得した。腫瘍体積は (長径 $\times$ 短径 $^2/2$) の式を用いて算出し、推移を確認した。

【統計解析】

すべての統計解析は、R (The R Foundation for Statistical Computing) 用のグラフィカルユーザーインターフェースである EZR (Saitama Medical Center, Jichi Medical University) を使用して実施した (Kanda, 2013) 。多重比較には、一元配置 ANOVA および Dunnett 検定を用いた。 p 値が 0.05 未満の場合、統計学的有意差があると判断した。

結果

【hPSC-5 細胞表面上における FAP 発現の確認】

hPSC-5 細胞表面に FAP が発現していることを確認するために、抗ヒト FAP 抗体-AlexaFluor®488 を用い、フローサイトメトリーによる定量的解析を行った。図 2 に示すように、5 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で添加した際の結合率は 94%，20 $\mu\text{g/mL}$ では 95%であり、試薬の濃度を変えても結合率は変わらず、FAP が hPSC-5 の細胞表面に十分に発現していることが示された。

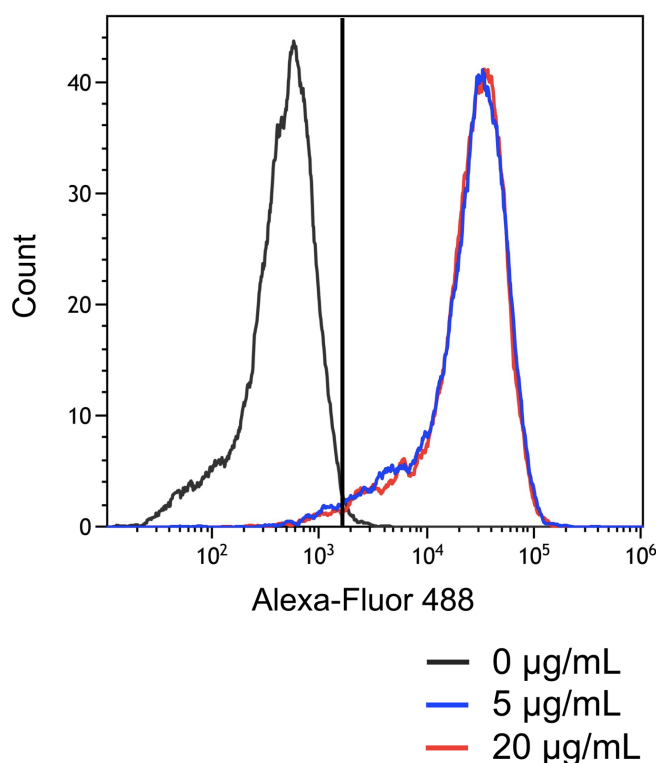


図 2 hPSC-5 と抗ヒト FAP 抗体-Alexa Fluor®488 の結合のフローサイトメトリーによる評価

hPSC-5 において抗ヒト FAP-Alexa Fluor®488 の結合が観察され、FAP 抗原の hPSC-5 細胞表面上の発現が確認された。黒：コントロール，青：5 $\mu\text{g/mL}$ ，赤：20 $\mu\text{g/mL}$

【hPSC-5 細胞表面への $\alpha\text{FAP-IR700}$ 結合の確認】

抗ヒト FAP 抗体-AlexaFluor®488 により hPSC-5 細胞表面での十分な FAP 発現が確認されたため、 $\alpha\text{FAP-IR700}$ の hPSC-5 への結合性、反応時間による差違を蛍光顕微鏡を用いて確認した。図 3 に示すように、hPSC-5 とのインキュベーション時間が長くなるにつれ、蛍光強度が強くなった。1 時間インキュベートした時点で蛍光が確認され、3 時間インキュベートした時点で最も強い hPSC-5 細胞表面上での $\alpha\text{FAP-IR700}$ による

蛍光が確認された。6 時間以上インキュベートしたものについては、IR700 が hPSC-5 細胞内に移行し、蓄積している様子が観察された。すなわち α FAP-IR700 は、抗ヒト FAP 抗体-AlexaFluor[®]488 と同様に、hPSC-5 にも結合することが観察された (図 3)。

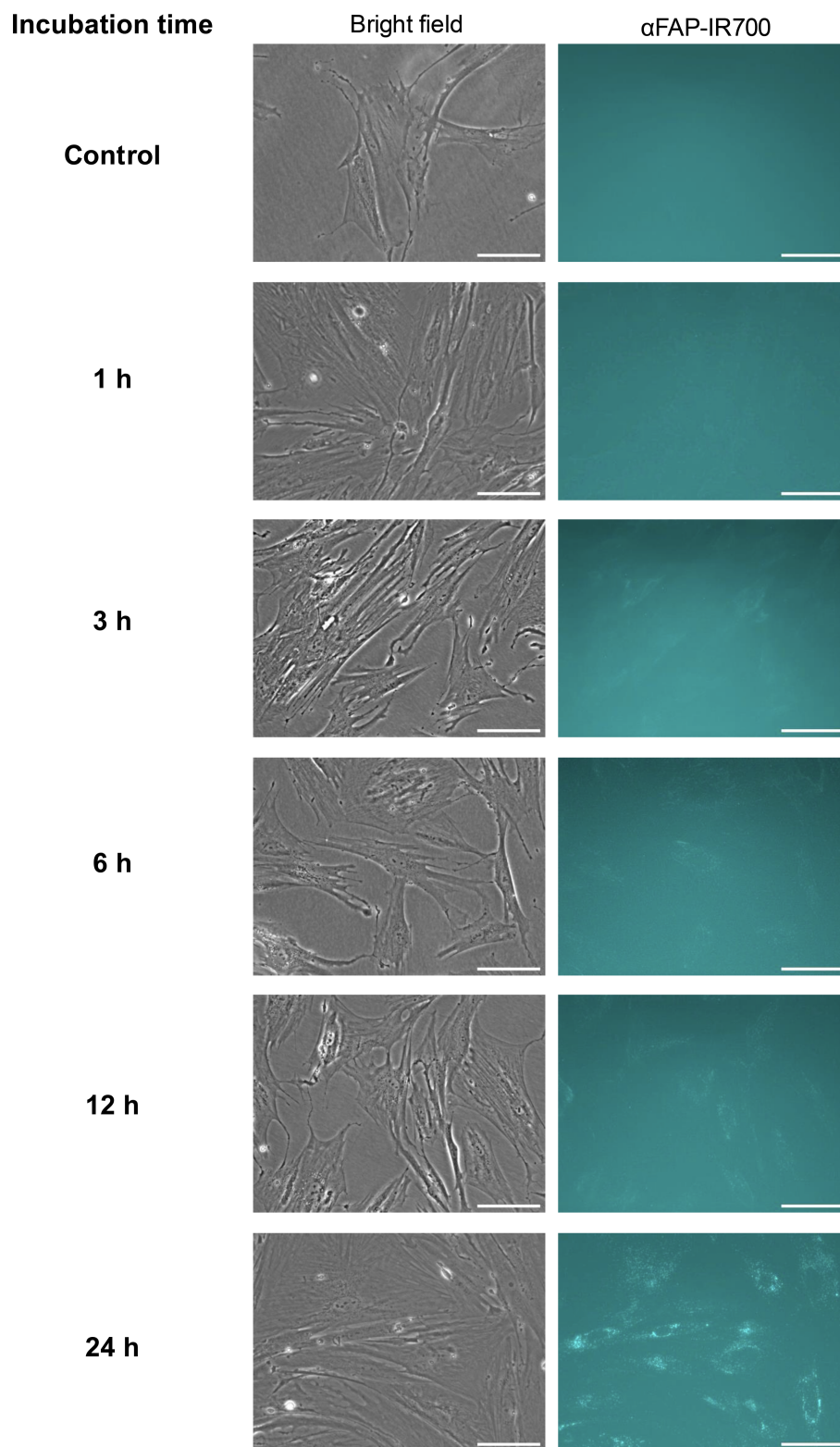


図3 hPSC-5 と α FAP-IR700 の蛍光顕微鏡観察

hPSC-5 に FAP 抗体-IR700 を添加後、1, 3, 6, 12, 24 時間後に蛍光顕微鏡観察を行った。いずれの時点においても α FAP-IR700 の hPSC-5 への結合による蛍光が確認されたが、6 時間以上のインキュベートを行ったものは α FAP-IR700 が細胞内へ移行していることが確認された。Scale bar : 100 μ m

一方、抗 PDPN 抗体-IR700 と hPSC-5 においては結合による蛍光は全く観察されなかった (図4) 。 Capan-1 と α FAP-IR700 や抗 PDPN 抗体-IR700 に関しても、結合による蛍光は認められなかった (図5) 。



図4 hPSC-5 と抗 PDPN 抗体-IR700 の蛍光顕微鏡観察

hPSC-5 に抗 PDPN 抗体-IR700 を添加 1 時間後に蛍光顕微鏡観察を行ったが蛍光は認めなかった。Scale bar : 50 μ m

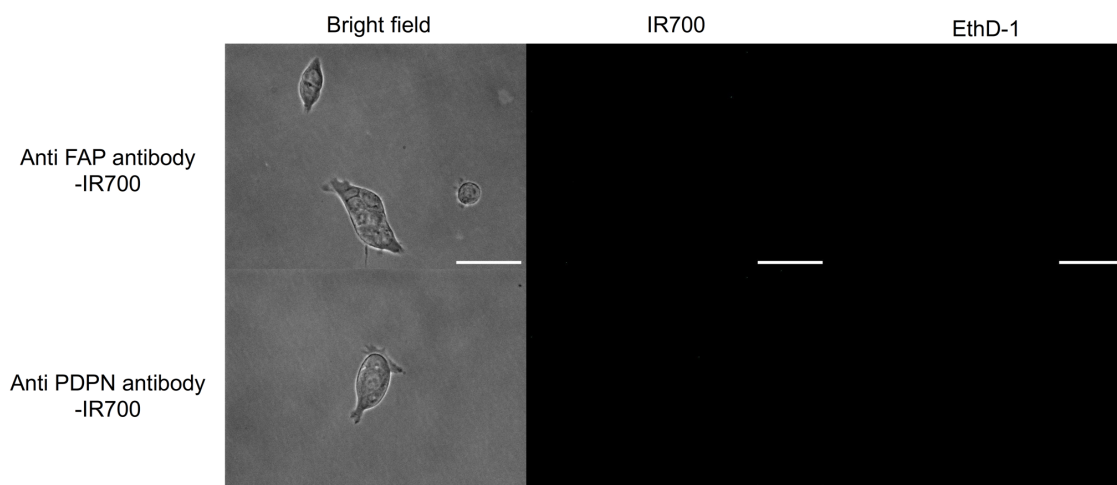


図5 Capan-1 と α FAP-IR700 や抗 PDPN 抗体-IR700 の蛍光顕微鏡観察

Capan-1 に α FAP-IR700 や抗 PDPN 抗体-IR700 を添加 1 時間後に蛍光顕微鏡観察を行ったが、蛍光は認めなかった。Scale bar : 50 μ m

【hPSC-5 に対する α FAP-IR700 による *in vitro* NIR-PIT】

・蛍光顕微鏡を用いた定性評価

次のステップとして、hPSC-5 における NIR-PIT 効果を *in vitro* で検証することとした。図 6 に示すように、NIR 照射 3 時間後には、すべてのインキュベーション時間条件において hPSC-5 の膨化が明視野で観察され、かつ EthD-1 による核染色が蛍光観察で観察され、細胞死が確認できた。細胞の膨化は NIR 照射直後から始まっていた (図 7A,B) 。 NIR 照射 3 時間後には照射野すべての細胞の細胞死が確認されたが、非照射野においては細胞膨化や EthD-1 による核染色も観察されず、照射野のみで細胞死が誘導されたことが確認された (図 7C-E) 。

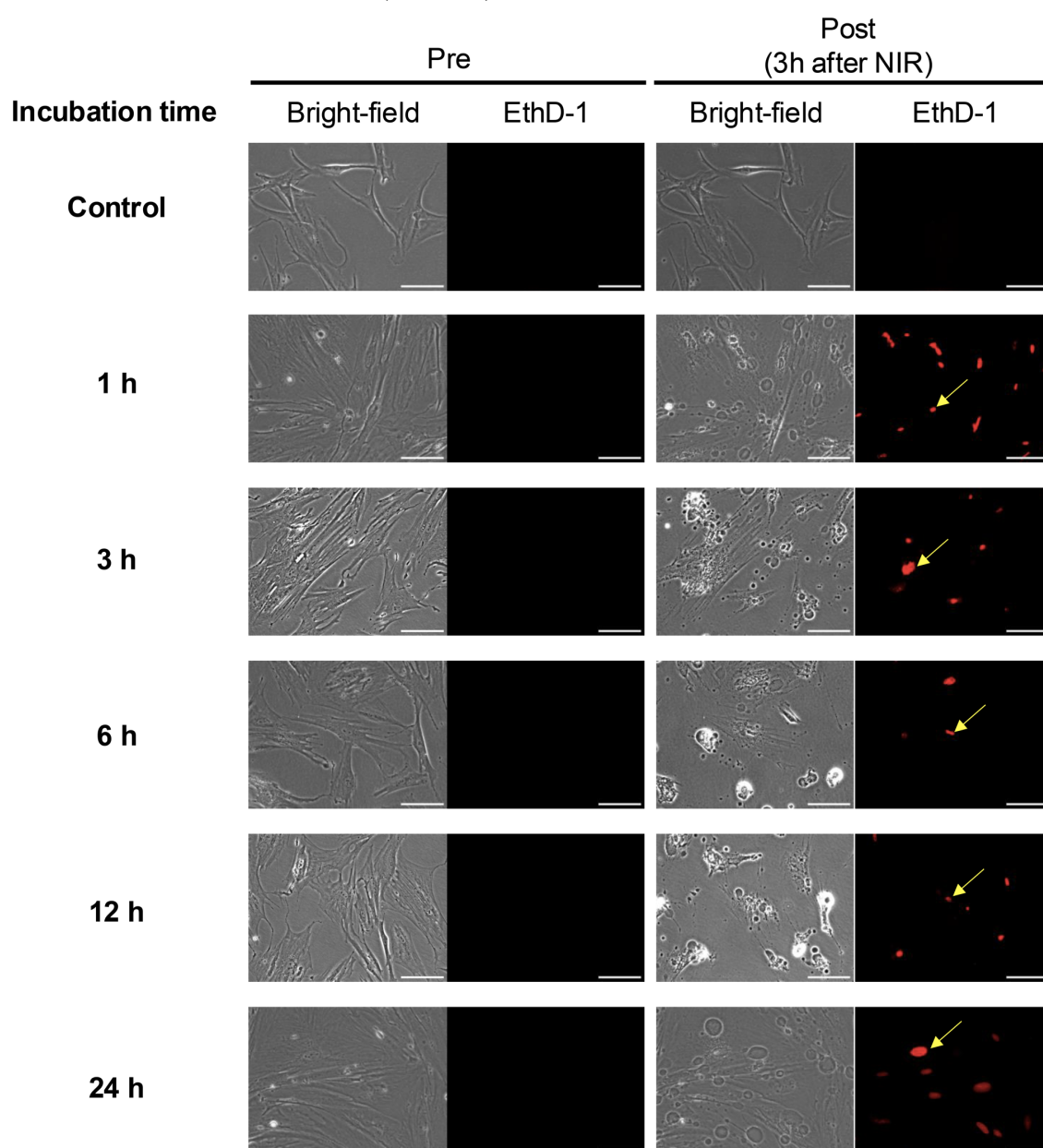


図6 hPSC-5 に対する α FAP-IR700 による *in vitro* NIR-PIT

各インキュベーション時間において、照射後3時間後の明視野観察において細胞の膨化を認め、蛍光顕微鏡観察において EthD-1 による核染色 (代表的なものを黄矢印で示す) がみられ、NIR-PIT による細胞死を認めた。Scale bar : 100 μ m

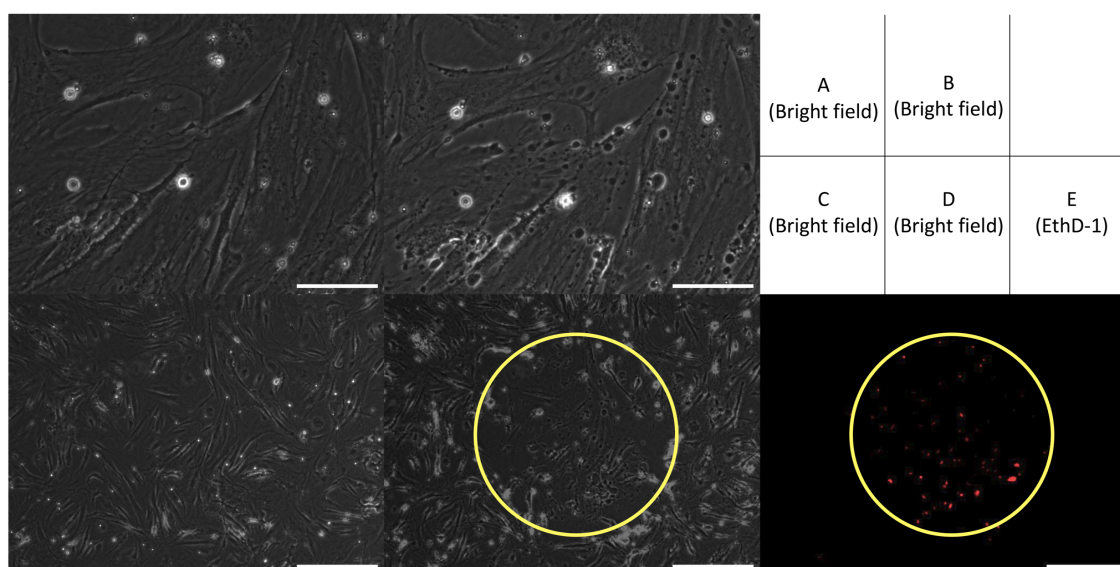


図7 hPSC-5 に対する α FAP-IR700 による *in vitro* NIR-PIT 後の経過

A, B : NIR 直後には細胞膜表面に膨化を認めた (A : 照射前, B : 照射直後 ; Scale bar : 100 μ m) . C-E : 細胞死は NIR を照射した領域 (黄色線内) のみで観察された (C : 照射前の低倍率観察, D : 照射 3 時間後の明視野画像, E : 照射 3 時間後の蛍光観察 ; Scale bar : 500 μ m)

・フローサイトメトリーを用いた NIR-PIT による死細胞の定量解析

hPSC-5 に対する α FAP-IR700 を用いた NIR-PIT による細胞死について、フローサイトメトリーによる定量的評価の結果を図 8 に示す。コントロール群 (NIR : 0 J/cm², α FAP-IR700 : 0 μ g/mL) と比較すると、NIR 照射 50 J/cm², α FAP-IR700 : 5 μ g/mL および 20 μ g/mL での NIR-PIT 群では、統計的に有意な細胞死が観察された (n=5, * p <0.05) . また、NIR : 25 J/cm², α FAP-IR700 : 5 μ g/mL による NIR-PIT 群では細胞死が観察される傾向が認められたものの、コントロール群と比較して、統計的に有意な差は認められなかった (n=5, p =0.31) . その他の群とコントロール群との間には有意な差は認められなかった (NIR : 50 J/cm² 単独, p =1 ; α FAP-IR700 : 5 μ g/mL 単独, p =1 ; NIR : 5 J/cm², α FAP-IR700 : 5 μ g/mL, p =1 ; NIR : 5 J/cm², α FAP-IR700 : 20 μ g/mL, p =1 ; vs コントロール群) .

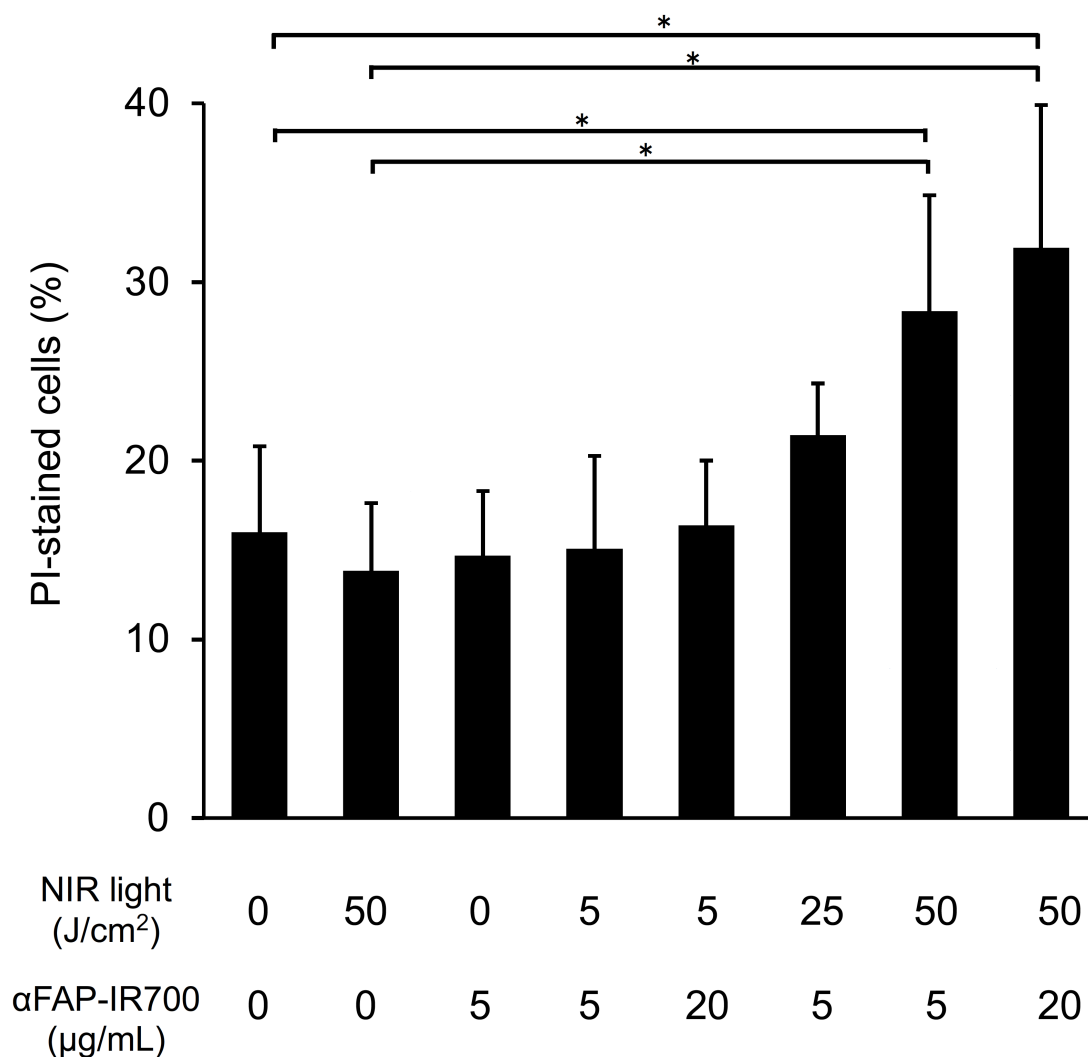


図8 フローサイトメトリーを用いた hPSC-5 と αFAP-IR700 による *in vitro* での NIR-PIT による細胞死の定量

hPSC-5 に対して αFAP-IR700 による NIR-PIT を行い、NIR 照射 3 時間後の細胞を回収し、ヨウ化プロピジウム染色での死細胞割合を平均値±標準誤差として算出した。コントロール群に比較して 50 J/cm² での NIR-PIT 群では有意に死細胞の割合が高かった (n = 5, * $p < 0.05$ vs コントロール群, Dunnett's test)。

【Capan-1 に対する rBC2LC-N-IR700 による *in vitro* NIR-PIT】

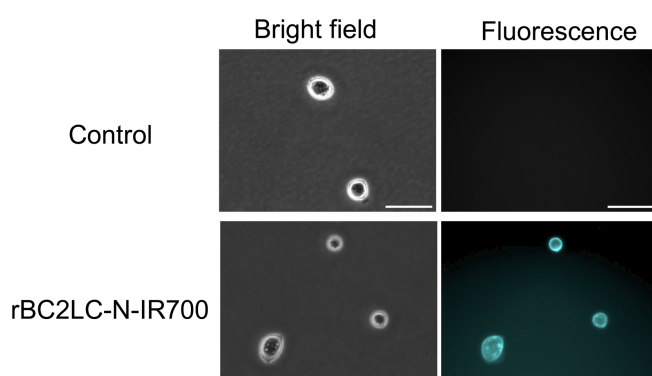
・蛍光顕微鏡を用いた定性評価

Capan-1 に rBC2LC-N-IR700 が結合するという既報に基づき、我々は追証実験を行った。既報通り、rBC2LC-N-IR700 は Capan-1 に結合を認めた (図 9 A)。NIR 照射後 1 時間後には Capan-1 は膨化と、EthD-1 による核染色を呈し、既報通りに細胞死が得られた (図 9 B)。

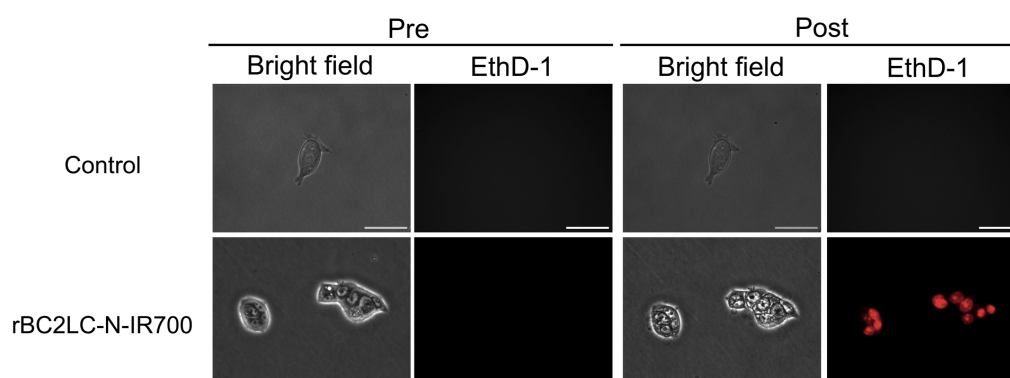
・フローサイトメトリーを用いた NIR-PIT による死細胞の定量解析

Capan-1 に対する rBC2LC-N-IR700 を用いた NIR-PIT による細胞死について、フローサイトメトリーによる定量的評価の結果を図 9 C に示す。コントロール群 (NIR : 0 J/cm², rBC2LC-N-IR700 : 0 µg/mL) と比較すると, NIR : 5 J/cm², rBC2LC-N-IR700 : 1 µg/mL の NIR-PIT 群では, 統計的に有意な細胞死が観察された ($n=3$, $*p<0.05$)。また, NIR : 5 J/cm², rBC2LC-N-IR700 : 5µg/mL および NIR : 10 J/cm², rBC2LC-N-IR700 : 1µg/mL による NIR-PIT 群でも細胞死が観察された. ($n=3$, $**p<0.01$)。その他の群とコントロール群との間には有意な差は認められなかった (NIR : 10 J/cm² 単独, $p=1$; rBC2LC-N-IR700 : 1 µg/mL 単独, $p=1$; NIR : 1 J/cm², rBC2LC-N-IR700: 1 µg/mL, $p=1$ vs コントロール群)。

(A)



(B)



(C)

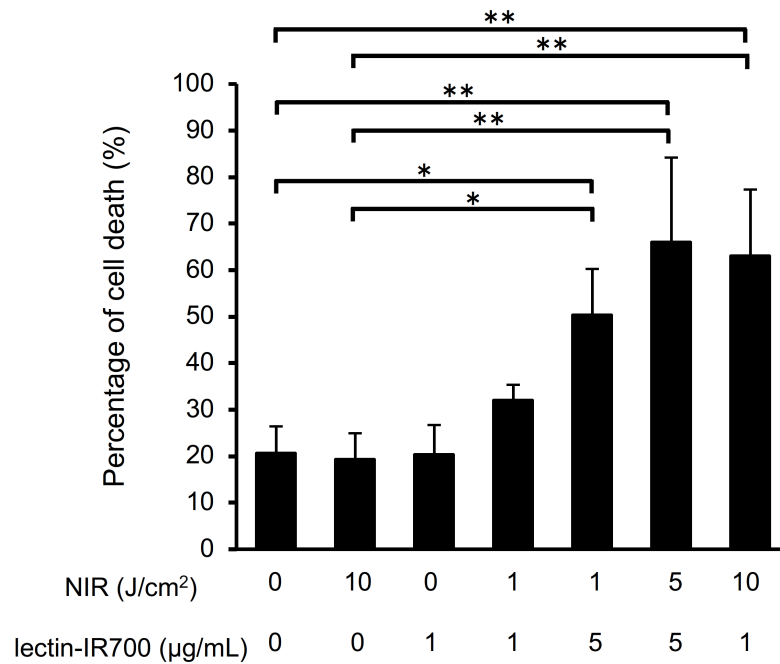


図9 Capan-1 に対する rBC2LC-N-IR700 の結合と, NIR-PIT の定性/定量評価

A: rBC2LC-N-IR700 は Capan-1 への結合が確認された. Scale bar: 50 μm B: NIR 照射後 1 時間で Capan-1 は膨化と EthD-1 による核染色を呈したことから, 細胞死が確認できた. Scale bar: 50 μm C: フローサイトメトリーによる定量評価においても NIR-PIT を施行した群 (NIR: 1 J/cm², rBC2LC-N-IR700: 1 $\mu\text{g/mL}$ 以外) はコントロール群と比較して有意な細胞死が見られた ($n=3$, $*p<0.05$, $**p<0.01$, Dunnett's test).

【hPSC-5 と Capan-1 の共培養】

hPSC-5 と Capan-1 の相互作用が腫瘍増殖に寄与するのか, また hPSC-5 の阻害が Capan-1 の増殖能力を低下させるのかを検証するために, hPSC-5 と Capan-1 の共培養モデルに対して $\alpha\text{FAP-IR700}$ を用いて NIR-PIT を実施した (図 10). Capan-1 単独群と比較すると, Capan-1 と hPSC-5 の共培養群では, Capan-1 細胞数が有意に増加した ($n=4$, $*p<0.05$). $\alpha\text{FAP-IR700}$ を用いた NIR-PIT を共培養群に対して行ったところ, Capan-1 の増殖能は Capan-1 単独群と同程度まで低下した ($n=4$, $*p<0.05$).

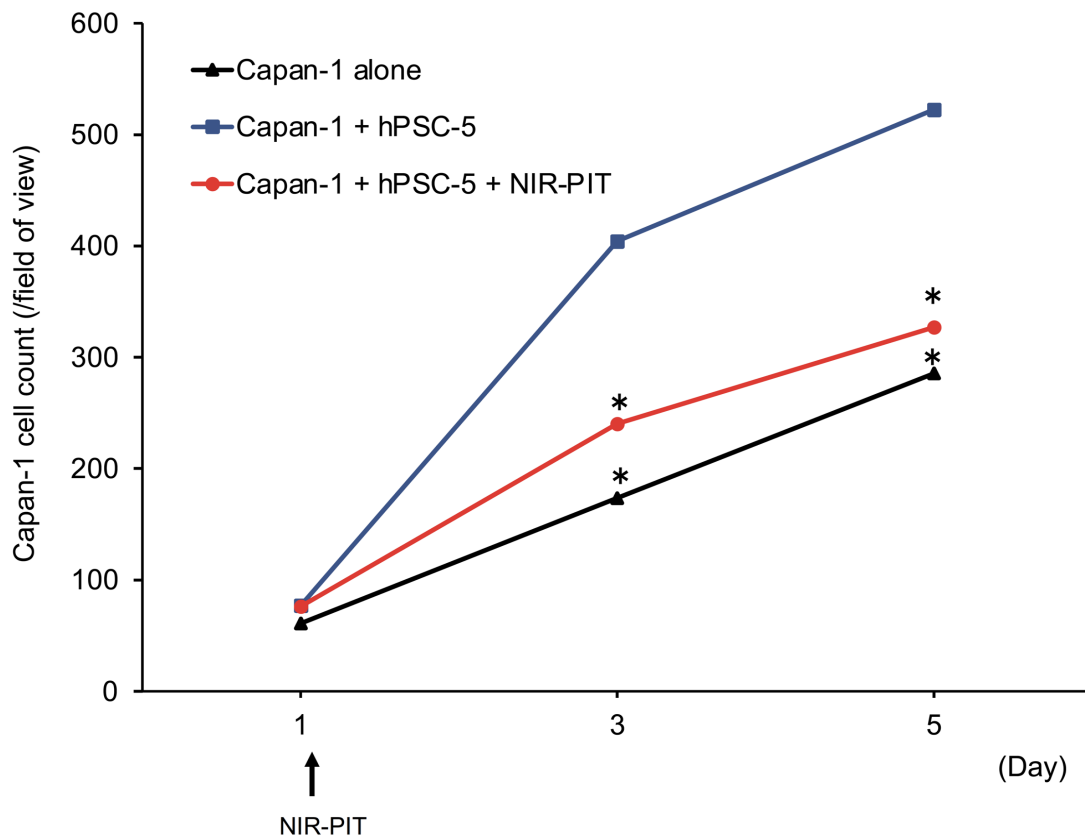


図 10 hPSC-5 と Capan-1 の共培養モデルに対する NIR-PIT の有無での Capan-1 増殖能の変化

hPSC-5 と共培養した Capan-1 は、Capan-1 単独と比較して早く増殖した。hPSC-5 を NIR-PIT で減少させると、Capan-1 の増殖は Capan-1 単独培養のものと同程度まで低下した ($n=4$, $*p<0.05$ vs Capan-1 + hPSC-5 群, Dunnett's test).

【hPSC-5 に対する α FAP-IR700 による NIR-PIT での ICD の確認】

CAFs に対する NIR-PIT での ICD の有無を確認するために、hPSC-5 を用いて ATP アッセイ、カルレティキュリンアッセイ、HMGB1 アッセイを実施した。

ATP アッセイでは、コントロール群 (NIR : 0 J/cm², α FAP-IR700 : 0 μ g/mL) と比較して、NIR : 50 J/cm², α FAP-IR700 : 5 μ g/mL による NIR-PIT 群では、有意に細胞外に ATP が放出された ($n=3$, $**p<0.01$)。他の群とコントロール群では有意な差は見られなかった (NIR : 50 J/cm² 単独, $p=1$; α FAP-IR700 : 5 μ g/mL 単独, $p=1$; NIR : 5 J/cm², α FAP-IR700 : 5 μ g/mL, $p=1$; NIR : 25 J/cm², α FAP-IR700 : 5 μ g/mL, $p=1$) (図 11 A)。

カルレティキュリンアッセイでは、コントロール群と比較して 25 および 50 J/cm² の照射を行った NIR-PIT 群において、細胞膜上へのカルレティキュリン移行の有意な増加が認められた ($n=3$, $*p<0.05$)。5 J/cm² の NIR-PIT 群では、カルレティキュリン

の膜表面への移動の傾向が認められたが、有意差は認められなかった ($n=3, p=0.06$) .
また、その他の群とコントロール群との間に有意差は認められなかった (NIR : 50 J/cm² 単独, $p=1$; α FAP-IR700 : 5 μ g/mL 単独, $p=1$) (図 11 B) .

HMGB1 アッセイでは、コントロール群と比較して 50 J/cm² の NIR-PIT 群において HMGB1 がわずかに放出される傾向が認められたが、有意差は認められなかった ($n=3, p=0.70$) . 他の群においても、有意な HMGB1 放出は確認されなかった (NIR : 50 J/cm² 単独, $p=1$; α FAP-IR700 : 5 μ g/mL 単独, $p=1$) (図 11 C) .

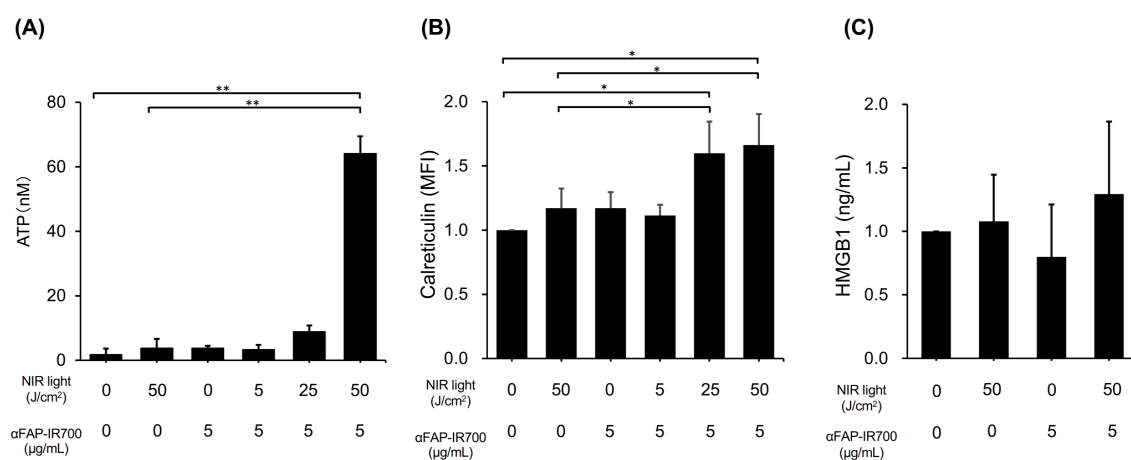


図 11 ICD 関連アッセイ

A : ATP アッセイ. NIR : 50 J/cm², α FAP-IR700 : 5 μ g/mL による NIR-PIT 群では、細胞外に有意に ATP が放出された ($n=3, **p<0.01$, vs コントロール群, Dunnett's test).
 B : カルレティキュリンアッセイ. NIR : 25 および 50 J/cm², α FAP-IR700 : 5 μ g/mL による NIR-PIT 群では有意にカルレティキュリンの細胞膜上への移行がみられた ($n=3, *p<0.05$, vs コントロール群, Dunnett's test). C : HMGB1 アッセイ. NIR : 50 J/cm², α FAP-IR700 : 5 μ g/mL による NIR-PIT ではわずかに HMGB1 の放出される傾向が見られたが有意差はなかった ($n=3, p=0.70$ vs コントロール群, Dunnett's test).

【Capan-1 と hPSC-5 を用いた PDAC 腫瘍モデルに対する rBC2LC-N-IR700 と α FAP-IR700 による *in vivo* NIR-PIT】

Capan-1 と hPSC-5 を混合移植したマウスモデルにおける rBC2LC-N-IR700 と α FAP-IR700 を用いた二重 NIR-PIT の効果を検証した. rBC2LC-N-IR700 や α FAP-IR700 を投与した 24 時間後の腫瘍組織において、いずれも複合体の集積が確認され、NIR 照射直後には、両群とも蛍光は消失した (図 12).

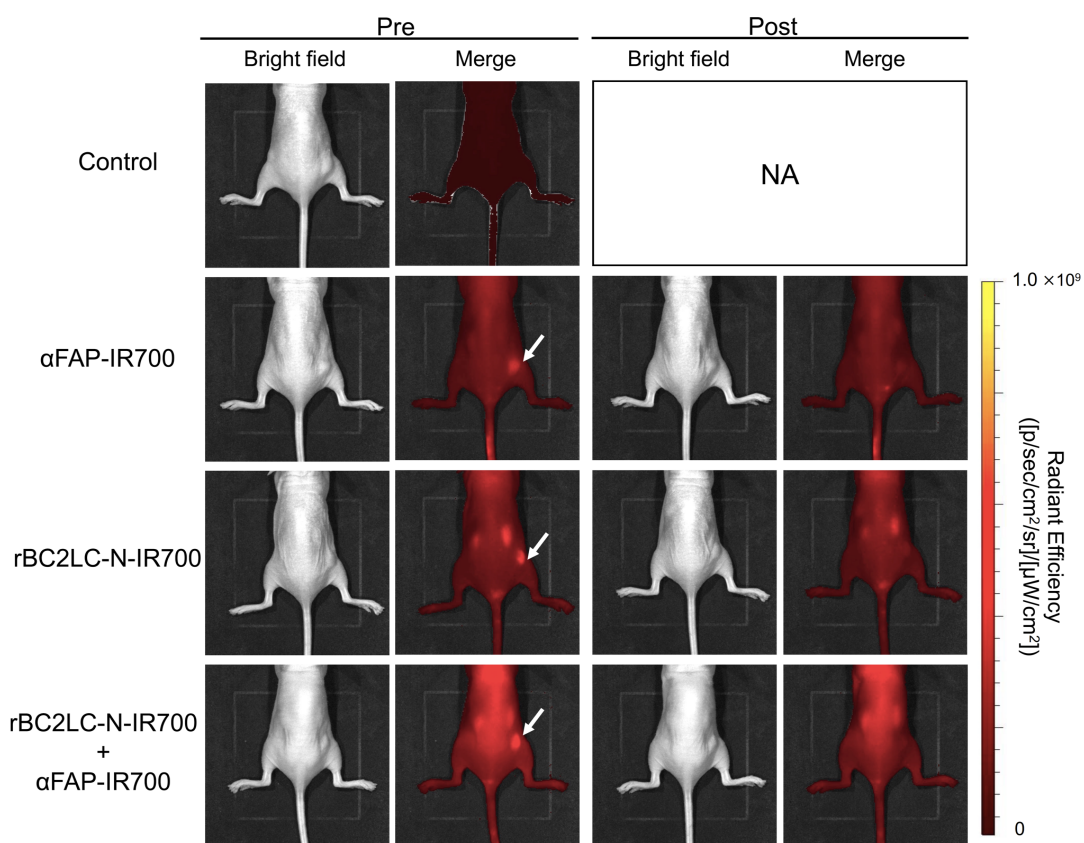


図 12 *In vivo* における rBC2LC-N-IR700 と α FAP-IR700 の腫瘍部への集積

rBC2LC-N-IR700 や α FAP-IR700 を投与した 24 時間後の腫瘍において、それぞれの集積が確認された (白矢印) . NIR 照射直後には、いずれの腫瘍においても rBC2LC-N-IR700 と α FAP-IR700 による蛍光は消失した.

その後の腫瘍体積に関しては、NT 群と比較して治療開始後 8 日目 (以下、治療開始後 X 日目を day X と略す) 以降より、rBC2LC-N-IR700 による NIR-PIT 単独群と rBC2LC-N-IR700 と α FAP-IR700 を用いた NIR-PIT 併用療法群は有意に腫瘍体積の減少を認めた (day 8 : 30 or 31 vs. 69 mm³ ; n = 3, ** p < 0.01) . しかしながら、rBC2LC-N-IR700 による NIR-PIT 単独群と rBC2LC-N-IR700 と α FAP-IR700 を用いた NIR-PIT 併用療法群の間においてはその後一貫して腫瘍体積の有意差はみられなかった (day 28 : 23 vs. 32 mm³ ; n = 3, p = 1) (図 13) .

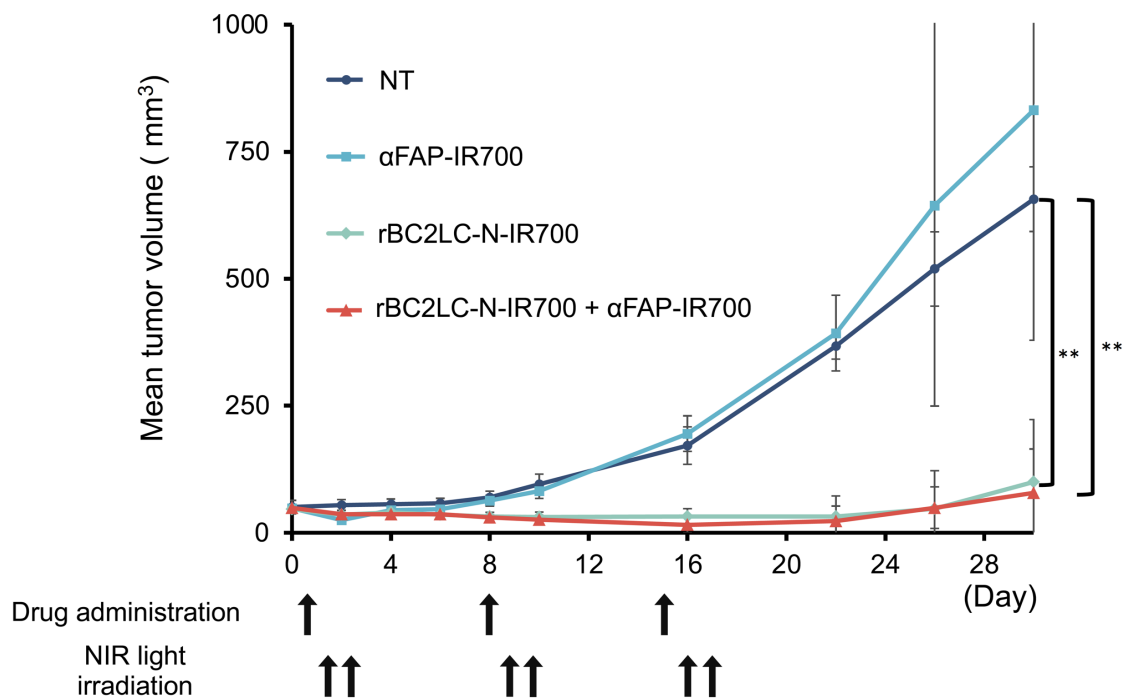


図 13 *In vivo* における rBC2LC-N-IR700 と αFAP-IR700 による NIR-PIT 後の腫瘍体積の推移

rBC2LC-N-IR700 による NIR-PIT 単独群と、rBC2LC-N-IR700 と αFAP-IR700 を用いた NIR-PIT 併用療法群は NT 群と比較して有意に腫瘍体積の減少をみとめた (day 8-28, $n = 3$, $**p < 0.01$, Dunnett's test). しかし、rBC2LC-N-IR700 による NIR-PIT 単独群と rBC2LC-N-IR700 と αFAP-IR700 を用いた NIR-PIT 併用療法群との間において有意な差は認められなかった ($n = 3$, $p = 1$, Dunnett's test).

rBC2LC-N-IR700 による NIR-PIT の治療効果が強く、二重 NIR-PIT の治療効果(hPSC-5 へ対する NIR-PIT の治療上乗せ効果) を十分に示すことが困難と考えられたため、hPSC-5 に対する NIR-PIT が、抗癌剤 GEM による治療に上乗せ効果を有するかを検証することを目的とし、以下の実験を行った。

【Capan-1 と hPSC-5 を用いた PDAC 腫瘍モデルに対する αFAP-IR700 による *in vivo* NIR-PIT】

最後に、Capan-1 と hPSC-5 を混合移植したマウスモデルに対して、GEM による治療へ αFAP-IR700 を用いた NIR-PIT を併用することでの治療上乗せ効果を検証した。先の実験結果より、hPSC-5 の細胞量が少ないために Capan-1 の増殖の中で hPSC-5 が淘汰されてしまった (相互作用するに至らなかった) 可能性や、治療開始が早く、腫瘍内で hPSC-5 の活性化が不十分であった可能性、hPSC-5 へ対する NIR-PIT の NIR 照

射量が少なかった可能性を勘案し、hPSC-5 を Capan-1 と同量の 3.0×10^6 個とし、治療開始日を腫瘍体積が 80 mm^3 となった段階とし、NIR 照射量を $75 \text{ J/cm}^2/\text{マウス}$ として実験を行った。

$\alpha\text{FAP-IR700}$ 投与 24 時間後の腫瘍組織において、NIR-PIT 群および GEM 併用 NIR-PIT 群ともに $\alpha\text{FAP-IR700}$ の集積が確認された。NIR 照射直後には、両群とも $\alpha\text{FAP-IR700}$ による蛍光は消失した (図 14)。

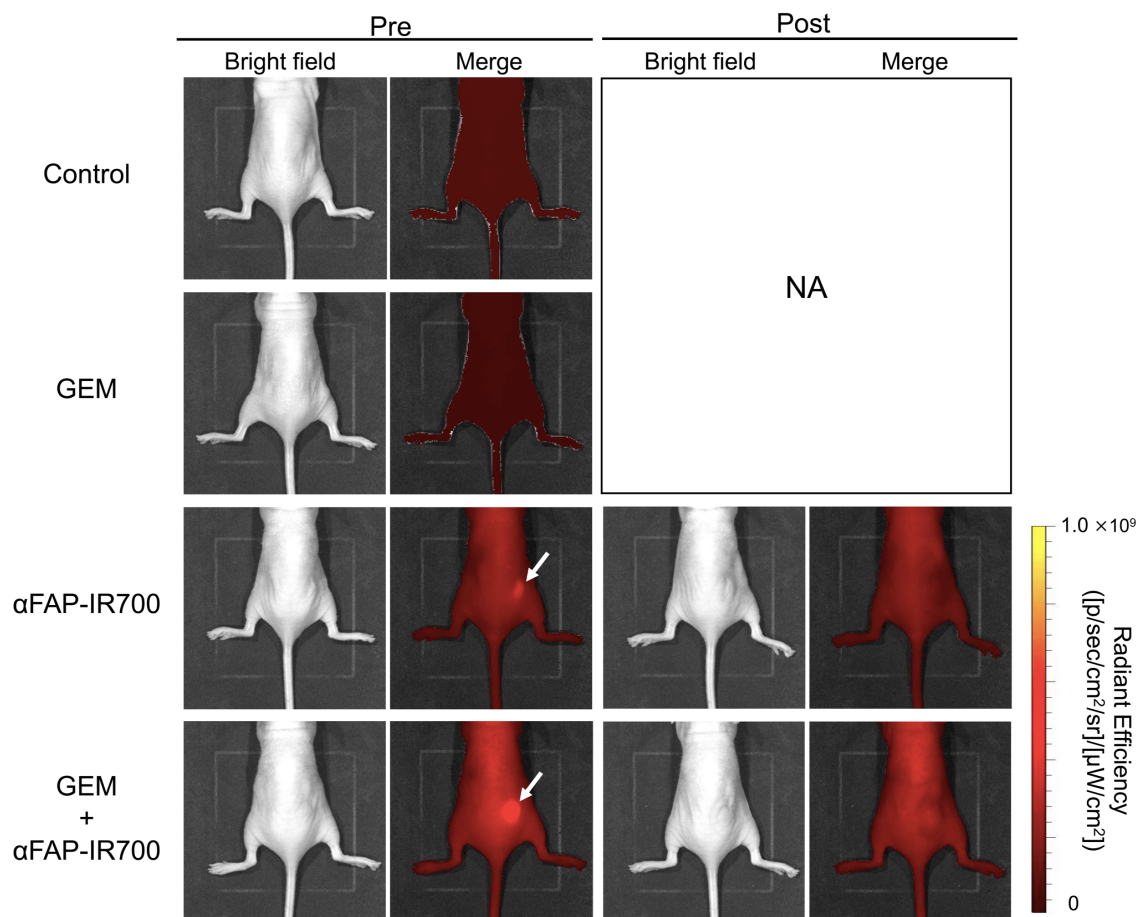


図 14 *In vivo* における $\alpha\text{FAP-IR700}$ の腫瘍部への集積

$\alpha\text{FAP-IR700}$ を投与した 24 時間後の腫瘍において、NIR-PIT 群および GEM 併用 NIR-PIT 群ともに $\alpha\text{FAP-IR700}$ の集積が確認された (白矢印)。NIR 照射直後には、両群とも $\alpha\text{FAP-IR700}$ による蛍光は消失した。

NT 群 (Capan-1 と hPSC-5 を混合移植) の腫瘍体積は、移植 4 日後 (図 15A, B の day 0) の治療開始時には 80 mm^3 に成長していたが、Capan-1 単独群では腫瘍塊はまだ形成されておらず、移植 6 日後に腫瘍が観察された (平均 15 mm^3) (図 15A, B の day 2)。その後、NT 群の腫瘍は Capan-1 群よりも速い速度で成長を続けた (day 28 : 766 mm^3 vs. 263 mm^3 ; $n=3$, $**p<0.01$)。day 14 では、併用療法群は NT 群と比較して、腫

瘍体積が有意に減少した (day 14 : 50.2 vs. 115 mm³ ; n = 3, * $p < 0.05$) . 一方で GEM 単剤群は NT 群と比較して腫瘍体積の減少は見られなかった (day 14 : 75.9 vs. 115 mm³ ; n = 3, $p = 0.09$) (図 15C) . day 28 では, GEM 単剤群と比較すると, GEM 併用 NIR-PIT 群では腫瘍体積が有意に減少した (day 28 : 79 vs. 382mm³ ; n = 3, ** $p < 0.01$) . NIR-PIT 単剤療法群では, NT 群と比較して腫瘍の縮小効果は認められなかった (day 28 : 605 vs. 766 mm³ ; n = 3, $p = 0.78$) (図 15C).

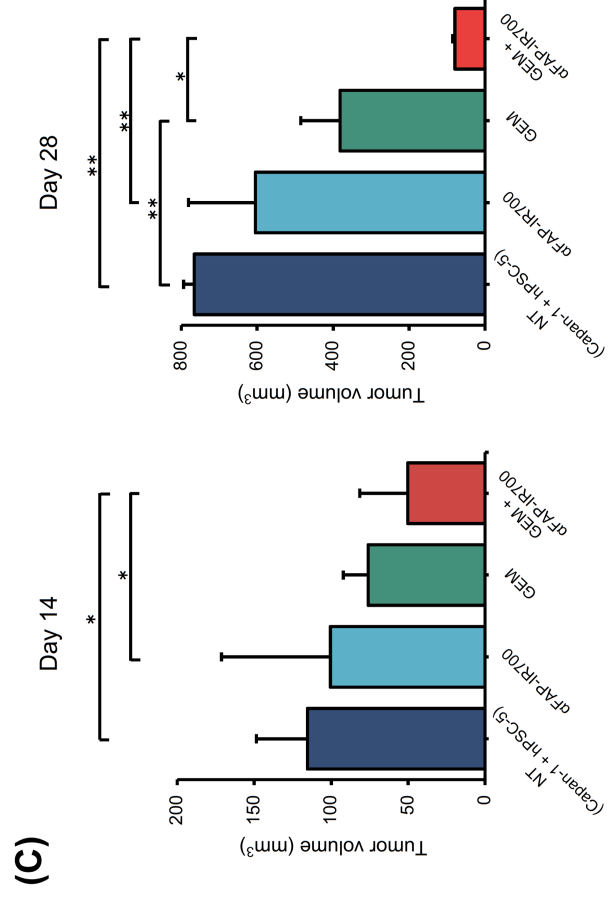
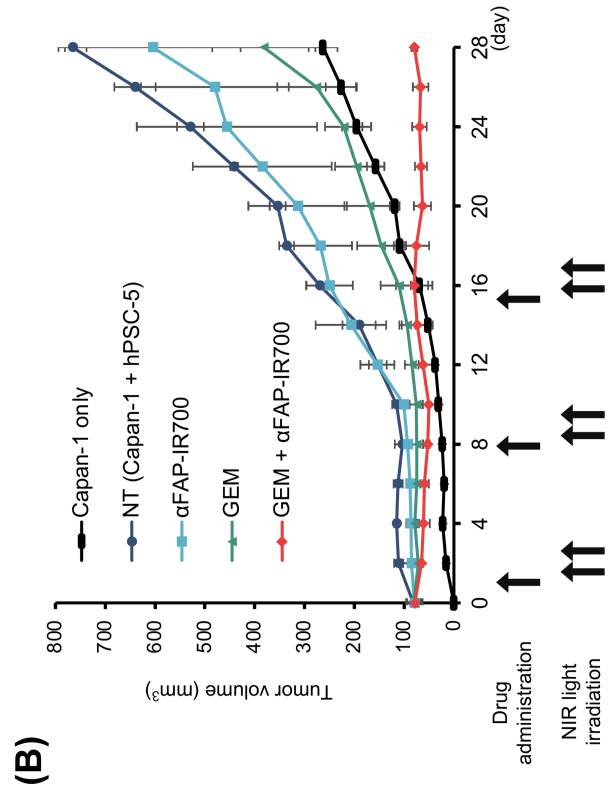
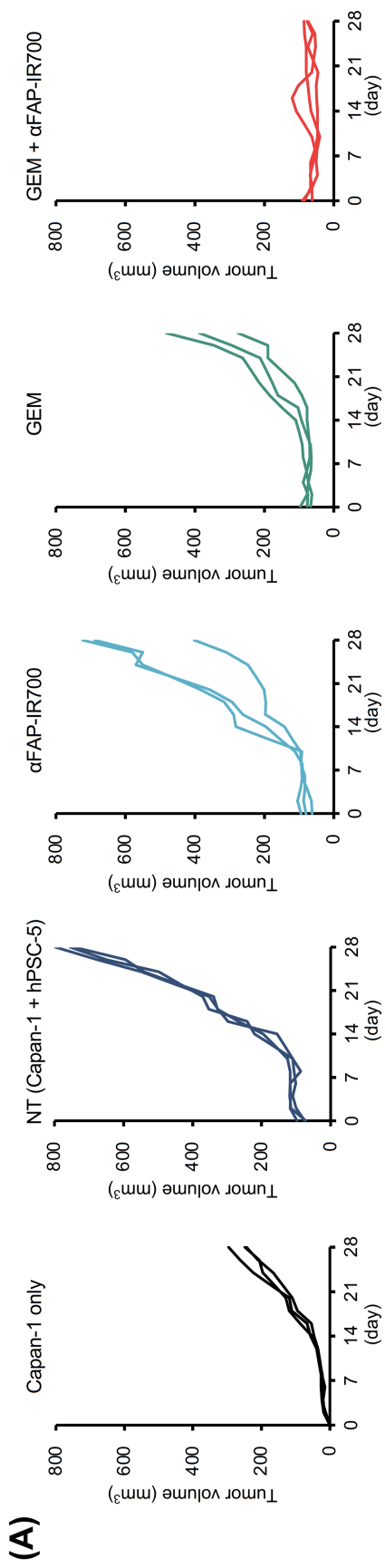


図 15 *In vivo* における Capan-1 と hPSC-5 の混合腫瘍モデルに対する α FAP-IR700 による NIR-PIT 後の腫瘍推移

A : 各群における腫瘍体積の Spider plot. B : Capan-1 単独群と比較すると, Capan-1 + hPSC-5 (NT) 群では, 有意に腫瘍の増大を認めた. 併用療法群においては, GEM 単独療法群と比較して有意な腫瘍縮小効果が見られた. C : 治療 14 日目と 28 日目の腫瘍体積の比較. 14 日目では, 併用療法群では NT 群および NIR-PIT 単剤療法群と比較して, 腫瘍体積が有意に減少した. 28 日目には, 併用療法群では GEM 単独療法群と比較して腫瘍容積が有意に減少した ($n = 3$, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, Dunnett's test) .

考察

本研究は、PDAC の間質構造の主体をなす CAFs を標的にした NIR-PIT は、癌-CAFs 相互作用と癌間質の物理的障壁を減弱し、GEM による抗癌剤療法の効果を高めることを示した。

これまで、癌間質や CAFs を標的とする薬剤によって腫瘍間質が減少することが多くの研究で報告されているが (Jacobetz et al, 2013; Olive et al, 2009; Catenacci et al, 2015) , これらの薬剤は標的選択性が低いため、正常組織に副作用を引き起こす可能性がある。これに対し、NIR-PIT では抗体-IR700 複合体と結合し NIR を照射された細胞のみが死滅することから、標的細胞に対する極めて高い選択性が最大の利点である (Paraboschi et al, 2021) 。本研究においても、細胞死は NIR を照射した部位のみで観察され (図 6C-E) , NIR-PIT の選択性を示した。また、 50 J/cm^2 の NIR を照射した hPSC-5 において有意な細胞死が誘導された。CAFs 上の FAP の発現レベルは癌細胞表面の標的抗原ほどは高くないため、癌細胞を標的とした NIR-PIT (Hirata et al, 2021) と比較すると、CAFs を標的とした NIR-PIT ではより大きな光線量が必要とされた。過去の研究では、CAFs は $25\text{--}50 \text{ J/cm}^2$ の光線量で照射しないと細胞死を起こさないことが示されている (Glabman et al, 2024) が、これは本研究のデータとも一致している。膵臓は後腹膜臓器で、胃、十二指腸、大血管に近接しているため、これらの臓器へのダメージは避けなければならない。図 8 に示すように、IR700 と結合しない細胞には NIR 照射による細胞毒性は示さないため、適切な光照射が行われれば、NIR-PIT は PDAC に対して安全な方法であると考えられる。我々のグループでは、深部への NIR 照射を行うために、内視鏡的胆管ドレナージチューブのような専用照射装置を開発している (Hirata et al, 2021) 。この装置は PDAC にも応用可能であり、PDAC の CAFs を標的とした NIR-PIT を実施できる可能性がある。

本研究において、PDAC を移植したマウスにおいて、rBC2LC-N を用いた癌細胞への NIR-PIT と $\alpha\text{FAP-IR700}$ を用いた CAFs への NIR-PIT を併用することによる治療の上乗せ効果を示すことはできなかった。rBC2LC-N が Capan-1 に良好な結合性を有する事が報告されていたため (Kuroda et al, 2023) , 本研究では Capan-1 を主な PDAC 細胞株として使用した。しかし、rBC2LC-N-IR700 による NIR-PIT の抗腫瘍効果が非常に強かったために、CAFs に対する NIR-PIT の上乗せ効果がマスクされてしまった可能性が考えられる。より腫瘍間質の多い低分化型の PDAC 細胞株や、免疫能を有する同系マウスモデルにおいて同様の二重 NIR-PIT を行うことで、CAFs への NIR-PIT による上乗せ効果が確認できる可能性がある。一方で、CAFs を標的とした NIR-PIT 単独療法では有意な腫瘍抑制効果は得られなかったが、CAFs を標的とした NIR-PIT と GEM の併用では相乗効果が得られた。すなわち、NIR-PIT による間質細胞の減少は、

GEM を含む抗癌剤の送達を改善し、その治療効果を増強する方法であることが示唆された。現在、PDAC に対する抗癌剤療法の主流は、フルオロウラシル、ロイコボリン、イリノテカン、オキサリプラチン (FOLFIRINOX) 療法と GEM + nab-Paclitaxel 併用療法であるが、高齢者や併存疾患を有する患者には種々の副作用により忍容性が保てず、GEM 単剤治療となり十分な治療効果が得られない場合がある (Von Hoff et al, 2013; Conroy et al, 2011)。本研究の結果から、GEM 単剤の治療効果を高める、もしくは FOLFIRINOX 療法や GEM + nab-Paclitaxel 療法に NIR-PIT を併用することで抗癌剤投与量を低減し、忍容性を保つことでよりよい治療効果を期待できると考えられた。さらに、NIR 照射直後に細胞膜上で細胞の膨潤などの形態変化が観察され、照射後 1 時間で細胞死が完了した (図 6, 図 7)。NIR-PIT の迅速な細胞傷害効果は、CAFs を標的としたキメラ抗原受容体 T 細胞療法 (Wang et al, 2014) などの他の治療法よりも早期の段階で治療効果をもたらす可能性がある。そのため、進行が非常に早い PDAC においては、CAFs を標的とした NIR-PIT のアプローチはより有用と考えられる。

現在、活性化された CAFs は、炎症性 CAFs、筋線維性 CAFs、抗原提示 CAFs の 3 つの主なサブタイプに分類されることが知られており、それぞれが癌促進作用や癌抑制作用を含む様々な機能を有していることが分かっている (Biffi and Tuveson, 2021)。しかし、サブタイプに特異的なマーカーはまだ同定されておらず、現在の分類は α 平滑筋アクチン発現量やその局在によってのものに留まっている (Öhlund et al, 2017; Geng et al, 2021)。本研究では、*in vitro* における共培養実験において、 α FAP-IR700 を用いた NIR-PIT が Capan-1 癌細胞の増殖を有意に抑制することが示された (図 10) が、 α FAP-IR700 を用いた NIR-PIT 単独群では *in vivo* での腫瘍抑制は得られなかった (図 13, 15)。腫瘍内間質細胞のサブタイプの多様性が、*in vitro* と *in vivo* の結果の差に関連している可能性がある。癌促進作用を有する間質細胞に特異的な表面マーカーが同定され、モノクローナル抗体が確立されれば、癌促進作用を持つ間質細胞を標的とした NIR-PIT は、PDAC において、本研究の α FAP-IR700 を用いた NIR-PIT よりも有意な治療効果をもたらすことが考えられた。

癌を標的とした NIR-PIT は、癌細胞の ICD を誘導し、続いて免疫応答を活性化する。その結果、CD8+ T 細胞などの抗癌免疫細胞によって、非照射部位の腫瘍にも治療効果が現れると報告されている (Ogawa et al, 2017)。ICD は、カルレティキュリンの細胞膜への移行と、ATP や HMGB1 などの DAMPs の放出によって特徴づけられる (Fucikova et al, 2020)。炎症性 CAFs の ICD は、薬剤によっても引き起こされる可能性があり、CD8+ T 細胞や NK 細胞によって産生されるインターフェロン- γ の刺激によって促進される可能性があることが、過去の報告で示されている (Herbert and Balachandran, 2022)。さらに、インターフェロン- γ は抗腫瘍免疫応答も活性化させるため、本研究では α FAP-IR700 を用いた NIR-PIT が CAFs の ICD を誘導するかどうか

を検証した。本研究では、NIR-PITによってATPの細胞外放出とカルレティキュリンの細胞膜への移行は認められたが、HMGB1の放出は認めなかった。その理由の一つとして、HMGB1は細胞外では不安定であることが考えられる。HMGB1の機能と安定性は酸化還元状態に依存しており、完全に酸化されると容易に分解されるようになる (Lv et al, 2024)。抗体-IR700は活性酸素種 (ROS) を生成し、細胞死に寄与することが示されている (Chalouni and Doll, 2018; Nakajima and Ogawa, 2020) ため、IR700による活性酸素種がHMGB1の酸化と分解を誘導している可能性がある。しかし、これまでの癌細胞のICDに関する知見を考慮すると、CAFsのICDも α FAP-IR700を用いたNIR-PITによって誘導されると推測される。したがって、NIR-PITによるCAFsの枯渇は、PDACにおける間質の減少によるだけでなく、抗腫瘍免疫の活性化による治療効果も示す可能性がある。アログラフトモデルを用いたさらなる研究により、CAFsのICDとそれに続く抗腫瘍免疫応答の解明につながることを期待される。

本研究のLimitationとしては、第一にhPSC-5のようなPDAC由来のCAFsがほとんど樹立されておらず、*in vitro* と *in vivo* における様々な種類のCAFsの特性を確認できなかった点である。第二に今回使用した腫瘍モデルがゼノグラフトモデルであり、NIR-PITによるICDを病理学的に評価できなかった点である。この点に関しては今後免疫系が機能するアログラフトモデルでの検討を進めていきたい。第三にはNIR-PITによる腫瘍微小環境の透過性の変化や抗癌剤の到達性についても*in vivo*での確認ができていない点である。

結論として、本研究はCAFsに対するNIR-PITと抗癌剤療法を併用することで、PDACに対する抗癌作用を高めることを示した。今後の研究では、腫瘍促進性のCAFsへのより選択的なNIR-PIT効果を高めることでNIR-PITを最適化し、臨床応用につなげたい。

結論

本研究で得られた新規知見は以下の通りである.

- ・CAFs に対する NIR-PIT と抗癌剤治療との併用療法は, より効果的で選択的な PDAC に対する抗癌治療を可能とすることを示した.

- ・CAFs の多様性のため, CAFs をターゲットにした NIR-PIT 単独の治療では, 抗腫瘍効果は得られなかった.

- ・癌細胞のみではなく, 癌関連の非癌細胞においても NIR-PIT による ICD が誘導される可能性が示唆された.

今後の課題としては, アログラフトモデルを作成し, 同併用療法の治療効果と CAFs への NIR-PIT による ICD 誘導の検証を経て, 本研究結果をより強固なものにする必要がある. さらに, 今後の臨床応用に向けて, 中〜大動物を用いて, 臍臓に NIR を照射するためのデバイスの開発を進めることが必要である.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導・ご助言をいただきました北海道大学病院消化器内科講師の栗谷将城先生、北海道大学大学院医学研究院内科学分野消化器内科学教室の坂本直哉教授に深く感謝いたします。

研究の具体的な手技等のご指導をいただきました北海道大学大学院薬学研究院生体分析科学教室の学生の皆様、中島孝平助教、小川美香子教授に深く感謝申し上げます。

ヒト臍星細胞株 hPSC-5 を提供いただいた東北大学医学部消化器内科学講座の正宗淳教授にも感謝申し上げます。

最後に、日々の診療の中、様々な面でご援助いただきました北海道大学病院消化器内科胆膵グループの先生方に心より感謝申し上げます。

利益相反

本研究は楽天メディカル，日本ライフライン株式会社から研究の一部に対する資金提供を受けて行った．本研究のデザイン，分析，およびデータの解釈について，資金提供者は関与していない．

引用文献

Biffi G and Tuveson D A (2021) Diversity and Biology of Cancer-Associated Fibroblasts. *Physiol Rev.* 101, 147-176.

Catenacci D V, Junttila M R, Karrison T, Bahary N, Horiba M N, Nattam S R, Marsh R, Wallace J, Kozloff M, Rajdev L, et al (2015) Randomized Phase Ib/II Study of Gemcitabine Plus Placebo or Vismodegib, a Hedgehog Pathway Inhibitor, in Patients With Metastatic Pancreatic Cancer. *J Clin Oncol.* 33, 4284-4292.

Chalouni C and Doll S (2018) Fate of Antibody-Drug Conjugates in Cancer Cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 37, 20.

Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul J L, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, et al (2011) FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 364, 1817-1825.

Feig C, Gopinathan A, Neesse A, Chan D S, Cook N and Tuveson D A (2012) The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res.* 18, 4266-4276.

Fucikova J, Kepp O, Kasikova L, Petroni G, Yamazaki T, Liu P, Zhao L, Spisek R, Kroemer G and Galluzzi L (2020) Detection of immunogenic cell death and its relevance for cancer therapy. *Cell Death Dis.* 11, 1013.

Geng X, Chen H, Zhao L, Hu J, Yang W, Li G, Cheng C, Zhao Z, Zhang T, Li L, et al (2021) Cancer-Associated Fibroblast (CAF) Heterogeneity and Targeting Therapy of CAFs in Pancreatic Cancer. *Front Cell Dev Biol.* 9, 655152.

Glabman R A, Olkowski C P, Minor H A, Bassel L L, Kedei N, Choyke P L and Sato N (2024) Tumor Suppression by Anti-Fibroblast Activation Protein Near-Infrared Photoimmunotherapy Targeting Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancers (Basel).* 16, 499.

Herbert A and Balachandran S (2022) Z-DNA enhances immunotherapy by triggering death of inflammatory cancer-associated fibroblasts. *J Immunother Cancer.* 10, e005704.

Hidalgo M (2010) Pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 362, 1605-1617.

Hirata H, Kuwatani M, Nakajima K, Kodama Y, Yoshikawa Y, Ogawa M and Sakamoto N (2021) Near-infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT) on cholangiocarcinoma using a novel catheter device with light emitting diodes. *Cancer Sci.* 112, 828-838.

Jacobetz M A, Chan D S, Neesse A, Bapiro T E, Cook N, Frese K K, Feig C, Nakagawa T, Caldwell M E, Zecchini H I, et al (2013) Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut.* 62, 112-120.

Kanda Y (2013) Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* 48, 452-458.

Kato T, Okada R, Furusawa A, Inagaki F, Wakiyama H, Furumoto H, Okuyama S, Fukushima H, Choyke P L and Kobayashi H (2021) Simultaneously Combined Cancer Cell- and CTLA4-Targeted NIR-PIT Causes a Synergistic Treatment Effect in Syngeneic Mouse Models. *Mol Cancer Ther.* 20, 2262-2273.

Katsube R, Noma K, Ohara T, Nishiwaki N, Kobayashi T, Komoto S, Sato H, Kashima H, Kato T, Kikuchi S, et al (2021) Fibroblast activation protein targeted near infrared photoimmunotherapy (NIR PIT) overcomes therapeutic resistance in human esophageal cancer. *Sci Rep.* 11, 1693.

Kobayashi H and Choyke P L (2019) Near-Infrared Photoimmunotherapy of Cancer. *Acc Chem Res.* 52, 2332-2339.

Kocher H M, Basu B, Froeling F E M, Sarker D, Slater S, Carlin D, deSouza N M, De Paepe K N, Goulart M R, Hughes C, et al (2020) Phase I clinical trial repurposing all-trans retinoic acid as a stromal targeting agent for pancreatic cancer. *Nat Commun.* 11, 4841.

Krysko D V, Garg A D, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P and Vandenabeele P (2012) Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 12, 860-875.

Kuroda Y, Oda T, Shimomura O, Hashimoto S, Akashi Y, Miyazaki Y, Furuya K, Furuta T, Nakahashi H, Tatenos H, et al (2023) Lectin-based phototherapy targeting cell surface glycans for pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 152, 1425-1437.

Lv G, Yang M, Gai K, Jia Q, Wang Z, Wang B and Li X (2024) Multiple functions of HMGB1 in cancer. *Front Oncol.* 14, 1384109.

Lynch M D and Watt F M (2018) Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. *J Clin Invest.* 128, 26-35.

Mitsunaga M, Ogawa M, Kosaka N, Rosenblum L T, Choyke P L and Kobayashi H (2011) Cancer cell-selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules. *Nat Med.* 17, 1685-1691.

Mizrahi J D, Surana R, Valle J W and Shroff R T (2020) Pancreatic cancer. *Lancet.* 395, 2008-2020.

Nakajima K and Ogawa M (2020) Phototoxicity in near-infrared photoimmunotherapy is influenced by the subcellular localization of antibody-IR700. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 31, 101926.

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

Ogawa M and Takakura H (2021) Photoimmunotherapy: A new cancer treatment using photochemical reactions. *Bioorg Med Chem.* 43, 116274.

Öhlund D, Handly-Santana A, Biffi G, Elyada E, Almeida A S, Ponz-Sarvise M, Corbo V, Oni T E, Hearn S A, Lee E J, et al (2017) Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J Exp Med.* 214, 579-596.

Olive K P, Jacobetz M A, Davidson C J, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, Madhu B, Goldgraben M A, Caldwell M E, Allard D, et al (2009) Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science.* 324, 1457-1461.

Paraboschi I, Turnock S, Kramer-Marek G, Musleh L, Barisa M, Anderson J and Giuliani S

(2021) Near-InfraRed PhotoImmunoTherapy (NIR-PIT) for the local control of solid cancers: Challenges and potentials for human applications. *Crit Rev Oncol Hematol.* 161, 103325.

Rahib L, Smith B D, Aizenberg R, Rosenzweig A B, Fleshman J M and Matrisian L M (2014) Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res.* 74, 2913-2921.

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

Siegel R L, Miller K D and Jemal A (2020) Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 70, 7-30.

Von Hoff D D, Ervin T, Arena F P, Chiorean E G, Infante J, Moore M, Seay T, Tjulandin S A, Ma W W, Saleh M N, et al (2013) Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med.* 369, 1691-1703.

Wakiyama H, Furusawa A, Okada R, Inagaki F, Kato T, Furumoto H, Fukushima H, Okuyama S, Choyke P L and Kobayashi H (2022) Opening up new VISTAs: V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation (VISTA) targeted near-infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT) for enhancing host immunity against cancers. *Cancer Immunol Immunother.* 71, 2869-2879.

Wang L C, Lo A, Scholler J, Sun J, Majumdar R S, Kapoor V, Antzis M, Cotner C E, Johnson L A, Durham A C, et al (2014) Targeting fibroblast activation protein in tumor stroma with chimeric antigen receptor T cells can inhibit tumor growth and augment host immunity without severe toxicity. *Cancer Immunol Res.* 2, 154-166.

Watanabe S, Noma K, Ohara T, Kashima H, Sato H, Kato T, Urano S, Katsube R, Hashimoto Y, Tazawa H, et al (2019) Photoimmunotherapy for cancer-associated fibroblasts targeting fibroblast activation protein in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 20, 1234-1248.

Wu Y, Zhang C, Jiang K, Werner J, Bazhin A V and D'Haese J G (2020) The Role of Stellate Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Targeting Perspectives. *Front Oncol.* 10, 621937.