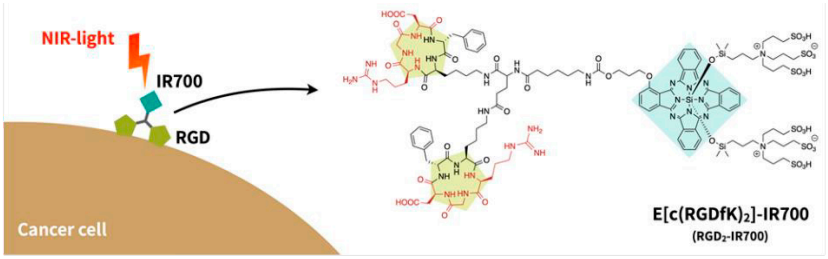
3　新しいがん光治療薬剤と治療効果モニタリング法の開発	小川　美香子

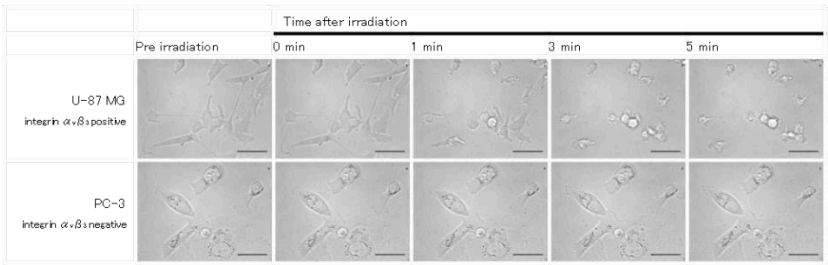
【目的】本研究では、我々がこれまでに見出した近赤外光によりがん細胞のみを特異的に殺傷する新たな手法である光免疫療法 Photo-immuno therapy（PIT）について、汎用性の向上を目指した新規薬剤開発と治療効果のモニタリング手法の開発を行った。PIT では、がん細胞表面に結合する抗体とフタロシアニン誘導体 IR700 からなる光反応性薬剤を投与後に近赤外光を照射し、がん細胞のみ特異的に殺傷する。本研究では、汎用性の向上を目指しインテグリンαvβ3 を標的化した薬剤開発を行った。また、光音響イメージングを用いた治療効果モニタリング手法の開発を行った。

【方法】インテグリンαvβ3 を標的とした薬剤 RGD_2-IR700 を合成した。これを用い、RGD_2-IR700 による PIT の効果を培養細胞を用いて検討した。さらに、担がんマウスを用いて体内動態と治療効果を検討した。また、抗体-IR700 複合体を担がんマウスに投与し光音響イメージングを行った。

【結果】培養細胞を用いた検討では、作製した薬剤 RGD_2-IR700 はインテグリンαvβ3 特異的に結合し、近赤外光の照射により、特異的かつ迅速な細胞の収縮を引き起こした。これは細胞の膨張を伴う既存の抗体 PIT と異なる現象であった。担がんマウスモデルを用いた体内動態検討では、投与後早い段階で腫瘍への集積と腫瘍対バックグラウンド比（TBR）が最大となった。治療効果検討では、抗体 PIT の場合と同様に、近赤外光照射後に腫瘍における IR700 の蛍光強度が大きく低下したが、その後、腫瘍の増殖は抑制されず、有意な治療効果は認められなかった。この知見は、RGD_2-IR700 を用いた PIT が、担がんマウスモデルにおいても既存の抗体 PIT と異なるメカニズムでがん細胞に作用することを示唆する。また、光照射前後、脱血後、腫瘍摘出後の各タイミングで光音響イメージングを行ったが、照射側と非照射側の腫瘍において蛍光イメージングで観察されたような差は認められなかった。IR700 に特徴的な近赤外光領域のシャープな吸収は 650 nm 付近から始まるため、より短波長のシグナルを得ることができる光音響イメージング装置を用いれば、ヘモグロビンのシグナルと分離して解析することができる可能性が高い。

インテグリンαvβ3 を標的とした薬剤を用いた PIT





3. 新しいがん光治療薬剤と治療効果モニタリング法の開発

小川　美香子

北海道大学 大学院薬学研究院 生体分析化学研究室

Key words：光治療，近赤外光，新規薬剤，治療効果評価

緒　言

本研究では、我々がこれまでに見出した、近赤外光によりがん細胞のみを特異的に殺傷する新たな手法である光免疫療法 Photo-immuno therapy（PIT）について、汎用性の向上を目指した新規薬剤開発と治療効果のモニタリング手法の開発を行った。

PIT は、がん細胞表面に結合する抗体とフタロシアニン誘導体 IR700 からなる光反応性薬剤を投与後に近赤外光を照射し、がん細胞のみ特異的に殺傷する新しいがんの光治療法である［1］（図 1）。PIT は副作用が極めて低く効果の高いがん治療法として注目されており、これまでに様々な抗体を利用した薬剤が国内外で開発されてきた。また、より効果の高い薬剤開発と光による化合物活性化手法の確立をめざし細胞傷害メカニズムの解明研究に取り組み、細胞膜表面での光による IR700 の凝集体形成が重要であることを見出した［2］。

しかし、抗体は抗原に対する特異性が高いという最大の利点を持つ一方で、特定の抗原を持つがん細胞しか対象にならないという汎用性にやや劣る側面も持つ。そこで、本研究では、汎用性の向上を目指し、多くのがん（特に転移性のがん）やがん周囲の新生血管に発現するインテグリン $\alpha v \beta 3$ を標的化した薬剤開発を行った。標的化分子には小分子ペプチドを用いることができるため、抗体に比較し生産コストが低く、また、構造制御も容易であるという利点もある。

また、PIT は薬剤を投与後に光を当てるだけという簡便な治療法であり、同様に治療効果を判断する簡便なイメージング法の開発が求められている。蛍光イメージングは、簡便であり特に動物実験において汎用されている。IR700 は蛍光分子でもあるため、薬剤ががんに分布する様子を蛍光イメージングにより捉えることができる。しかしながら、光の散乱・吸収の問題から、体内数 cm の深さから出てくる蛍光を捉えることは難しい。一方、近年、蛍光ではなく熱緩和過程により生じる音響波を捉える技術である光音響イメージング法が発展してきた。音であれば散乱・吸収の問題を克服できるため、深部病変の画像化が可能である。上述のとおり、光照射により IR700 は凝集体形成し蛍光を消失するが、蛍光シグナルと光音響シグナルの強度は相反関係にあるため、凝集体形成により光音響シグナルは大きくなる。すなわち、治療効果がある場合、凝集により光音響効果は増強し強い陽性画像となり得ると考え、本研究では光音響イメージング法の開発に取り組んだ。

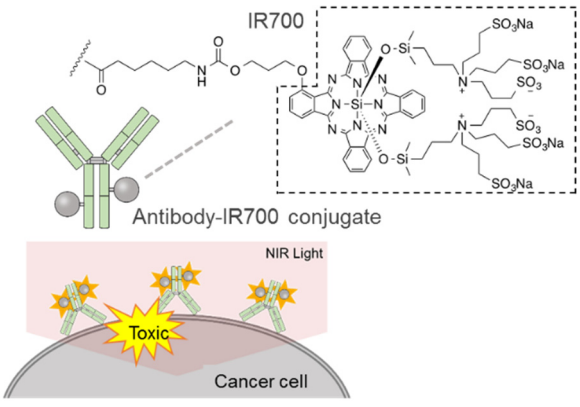


図 1. Photo-immuno therapy（PIT）
IR700 結合抗体を投与後光を照射することでがん細胞を殺傷する。

方法および結果

1. インテグリンαvβ3を標的とした薬剤の作製

近赤外光感受性のIR700と、2価環状RGDペプチドのRGD_2を塩基性条件下、DMSO中で反応させ、目的生成物であるRGD_2-IR700を得た（図2）。反応液の成分を逆相HPLCにて分析し、各成分を分取した。それぞれをMALDI-TOF-MSで質量分析したところ、保持時間が7.9分の画分が目的生成物RGD_2-IR700を含む画分であった。この画分を脱塩処理したのち、溶媒を減圧下で留去し、青緑色固体としてRGD_2-IR700を得た（35%）。この化合物を20μMPBS溶液とし、以降の*in vitro*、*in vivo*の検討に用いた。

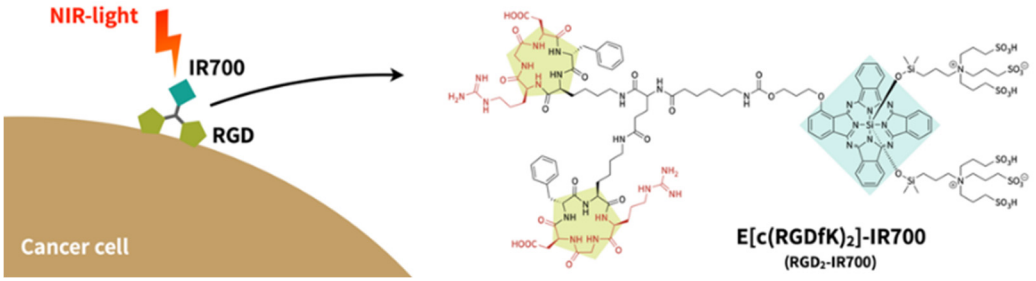


図2. RGDペプチドを用いた新規PIT薬剤
2つのRGDペプチドとIR700がグルタミン酸（Glu；E）で結合した構

2. *In vitro* 蛍光イメージング

IR700は近赤外光により励起され、赤色蛍光を発する分子であるため、蛍光イメージングに用いることができる。そこで、RGD_2-IR700がインテグリンαvβ3に特異的に結合することを確かめるため、IR700の蛍光を指標に細胞イメージングを行った。まず、インテグリンαvβ3高発現細胞株U-87 MGと、インテグリンαvβ3低発現細胞株PC-3を用いて検討した。各細胞にRGD_2-IR700（終濃度0.1μM）を添加し、1時間インキュベート後に撮像を行ったところ、U-87 MG細胞でのみ、IR700の赤色蛍光が認められた（図3）。

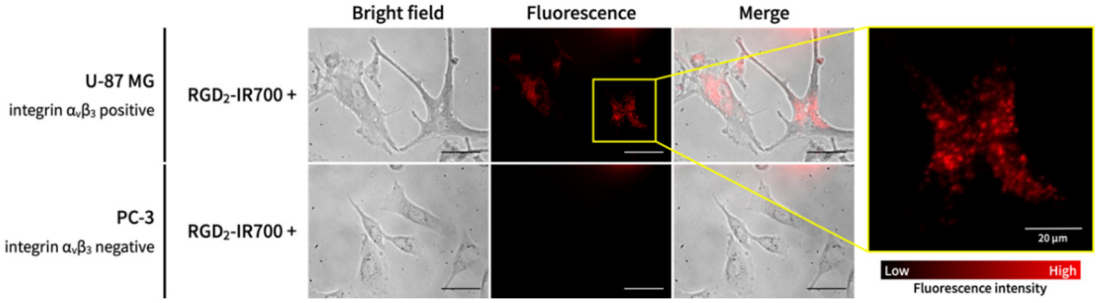


図3. 培養細胞を用いたRGD_2-IR700の蛍光イメージング
インテグリンαvβ3を高発現するU-87 MG細胞でのみRGD_2-IR700の蛍光が認められた。スケールバーは50μm。

さらに、RGD_2-IR700 のインテグリン$\alpha v\beta 3$ への結合特異性をより詳細に検討した。標的化分子単体（RGD2）を用いた結合阻害実験では、RGD_2-IR700（終濃度 0.1 μM）と共に RGD_2-IR700 の 10 倍量の RGD2（終濃度 1.0 μM）を加えた。その結果、細胞内 RGD_2-IR700 の蛍光強度が低下し、RGD_2-IR700 のインテグリン$\alpha v\beta 3$ への結合は RGD_2により競合阻害されることが示された（図 4A）。一方、U-87 MG 細胞に対して IR700（終濃度 0.1 μM）を添加して蛍光を観察したが、細胞内に蛍光はほとんど認められなかった（図 4B）。

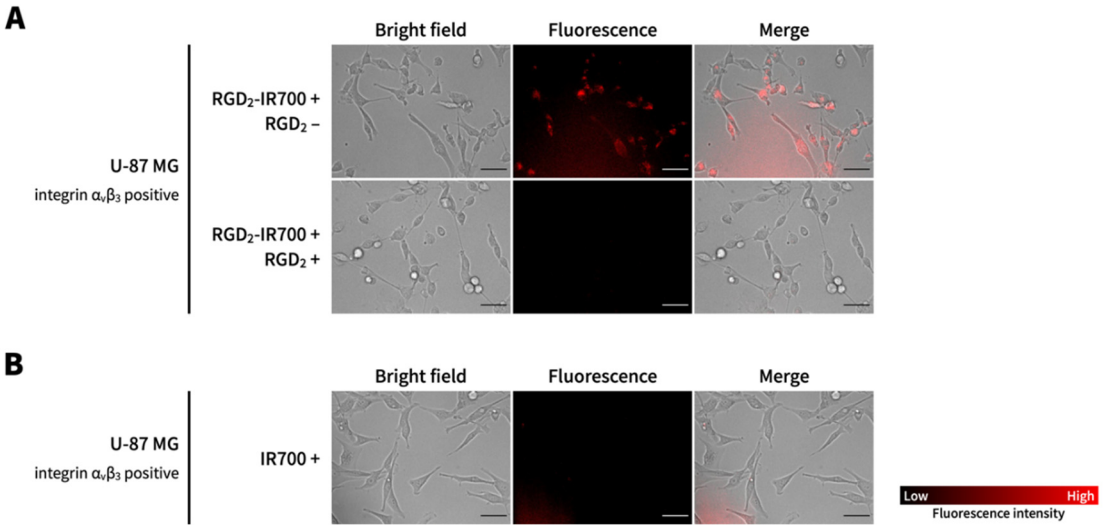


図 4. RGD_2-IR700 の結合特異性の検討

A) RGD_2-IR700 を RGD2 と共にインキュベートさせインテグリン$\alpha v\beta 3$ への結合を阻害した条件でのイメージング画像。RGD_2-IR700 のインテグリン$\alpha v\beta 3$ への結合は、RGD_2により阻害された。

B) RGD_2の結合していない IR700 単独でのイメージング画像。細胞内に蛍光はほとんど認められなかった。スケールバーは 50 μm。

3. *In vitro* PIT

RGD_2-IR700 による PIT の効果を、培養細胞を用いて検討した。U-87 MG 細胞と PC-3 細胞に RGD_2-IR700（終濃度 0.1 μM）を添加し、1 時間インキュベート後に近赤外光を照射したところ、U-87 MG 細胞においてのみ、光照射後に細胞の迅速な収縮が認められた（図 5）。

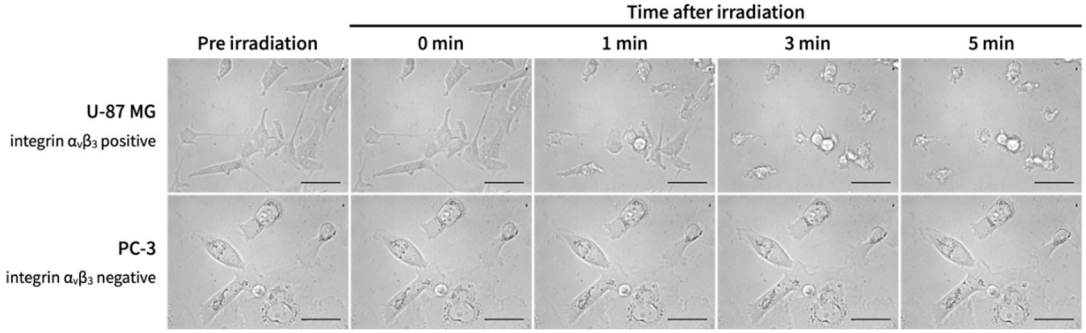


図 5. RGD_2-IR700 を用いた PIT における細胞の形態変化

近赤外光を 10 秒間（2 J/cm^2）照射し、その後の形態変化を撮像した。インテグリン$\alpha v\beta 3$ を高発現する U-87 MG 細胞では光照射後に迅速な細胞の収縮が認められたが、インテグリン$\alpha v\beta 3$ を低発現する PC-3 細胞では同様の反応は認められなかった。スケールバーは 50 μm。

また、近赤外光や RGD_2-IR700 単独でこの反応が引き起こされないことを確認するため、対照実験を行った。U-87 MG 細胞に対して、RGD_2-IR700 の添加と近赤外光の照射の一方あるいは両方を行わなかった群では、いずれも細胞の収縮は認められなくなった（図 6A）。さらに、RGD_2（0.1 μM）または IR700（0.1 μM）を単独で添加して光照射を行っても、細胞の収縮はほとんど認められなかった（図 6B）。

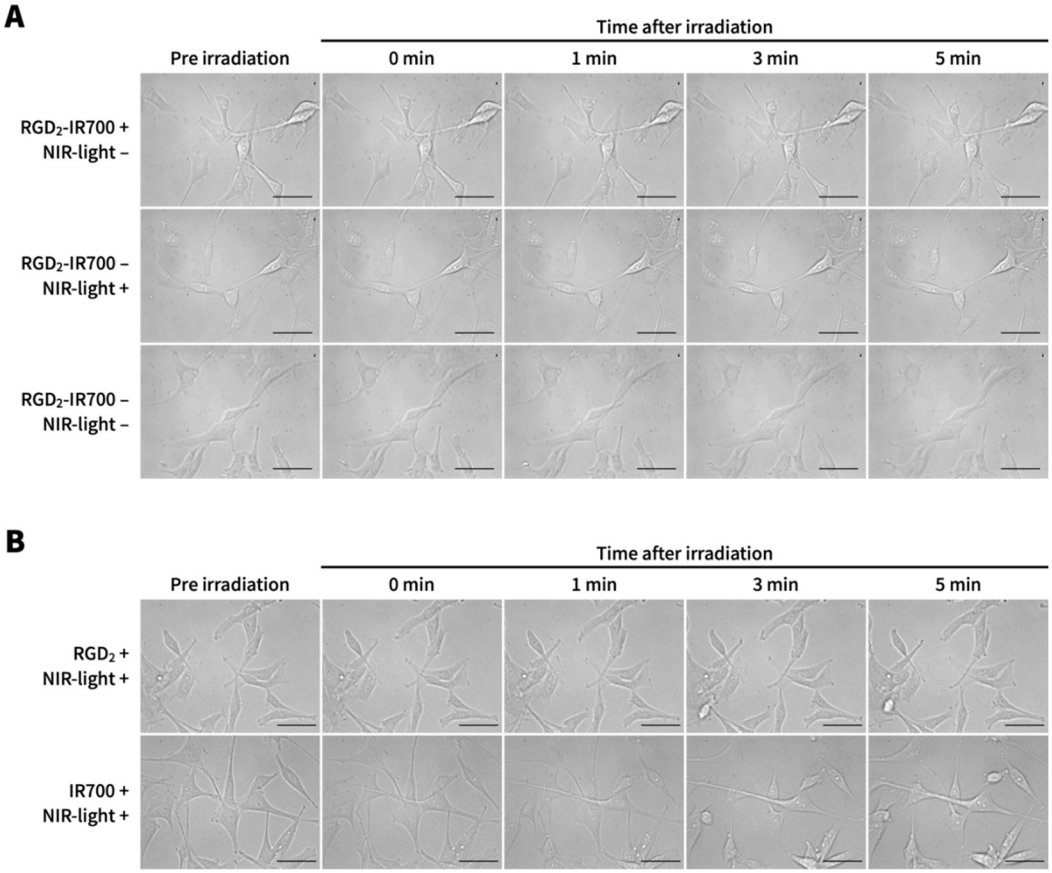


図 6. RGD_2-IR700 を用いた PIT の対照実験における細胞の形態変化

インテグリン $\alpha v \beta 3$ を高発現する U-87 MG 細胞に対して対照実験を行った。

A） RGD_2-IR700 添加と近赤外光照射の一方あるいは両方を行わなかった群では、細胞の収縮は認められなくなった。

B） RGD_2 または IR700 を添加して光照射を行なった群では、細胞の収縮はほとんど認められなかった。スケールバーは 50 μm。

4. RGD_2-IR700 の体内動態解析

In vivo での治療における RGD_2-IR700 の投与から光照射までの時間を決定するために、治療に先立って、RGD_2-IR700 の腫瘍への集積の時間変化を IR700 の蛍光イメージングにより測定した。

担がんマウスに RGD_2-IR700（2 nmol in 100 μL PBS）を尾静脈投与し、投与 5 分後以降の各時間において蛍光イメージングを行った。その結果を図 7A に示す。上段は可視光画像、中段は IR700 の蛍光画像、下段はそれらの重ね合わせの画像であり、各時間において、腫瘍内に関心領域（ROI）を設定して IR700 の蛍光強度を定量した。RGD_2-IR700 は、尾静脈投与 5 分後には腫瘍への集積量が最大となり、72 時間後までに大部分が体外に排出された（図 7B）。また、頭頂部をバックグラウンドとして、腫瘍対バックグラウンド比（Tumor-to-background ratio : TBR）を算出したところ、尾静脈投与の 1 時間後に最大となった（図 7C）。これらのことから、近赤外光の照射を行うのは、RGD_2-IR700 の腫瘍に対する十分な集積が認められ、かつ、TBR が最大となる 1 時間後に行うこととした。

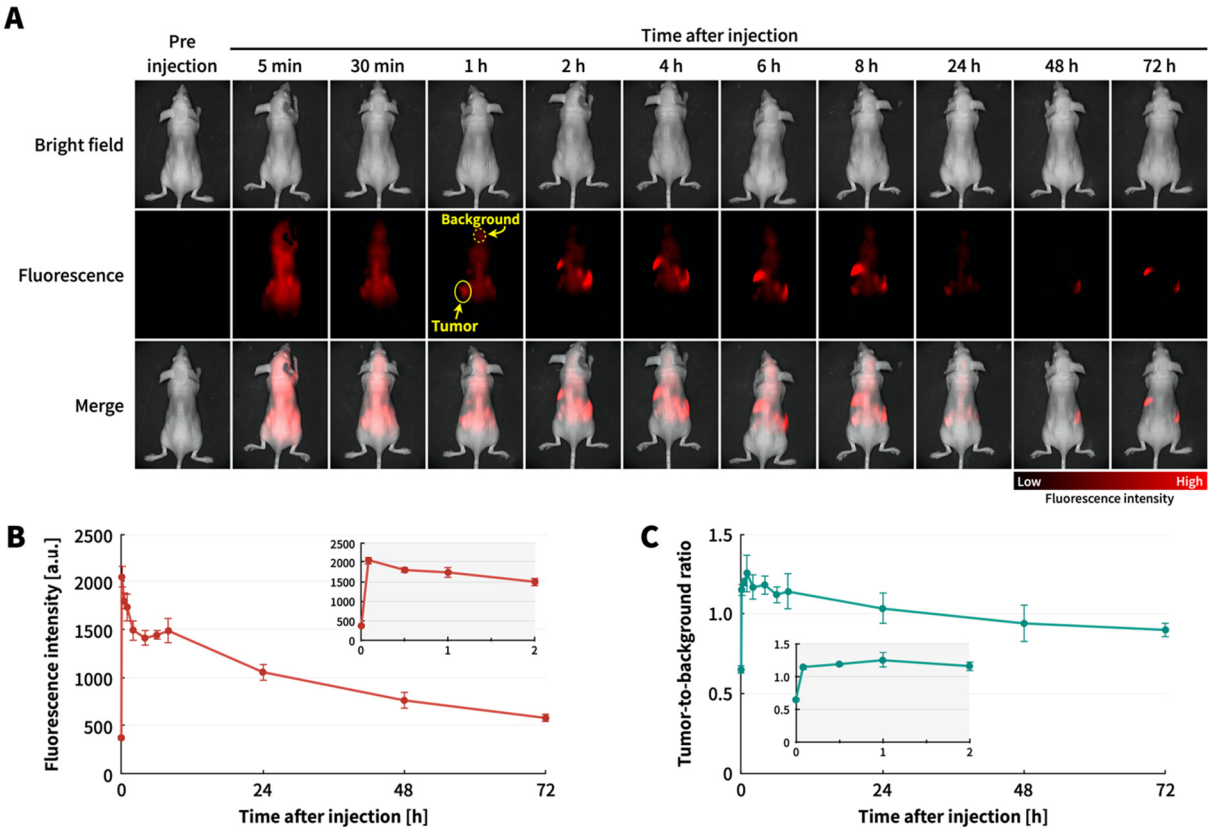


図 7. 担がんマウスモデルにおける RGD_2-IR700 の体内動態解析

A) イメージング画像。上段は可視光画像、中段は蛍光画像、下段はそれらの重ね合わせの画像を示す。腫瘍は実線の円で、バックグラウンドとして設定した頭頂部は破線の円で示してある。

B) 腫瘍における蛍光強度の時間変化。腫瘍における蛍光強度は RGD_2-IR700 投与の 5 分後に最大となった。

C) 蛍光強度の腫瘍対バックグラウンド比（Tumor-to-background ratio : TBR）の時間変化。TBR は RGD_2-IR700 投与の 1 時間後に最大となった。

5. *In vivo* PIT

RGD_2-IR700 を用いた PIT による治療効果の検討にあたっては、左右臀部の腫瘍（U-87 MG）の右側のみに光照射を行った（図 8A）。抗体 PIT では、光照射後に腫瘍における IR700 の蛍光強度が低下することが報告されており、その後の治療効果の指標とされている。本検討でも同様に、光照射後に腫瘍の蛍光強度の低下が認められた（図 8B）。しかし、その後の腫瘍体積は増加し、有意な治療効果は認められなかった（図 9C、D）。一方、体重の減少は認められず、副作用はほとんどないと考えられた（図 8E）。

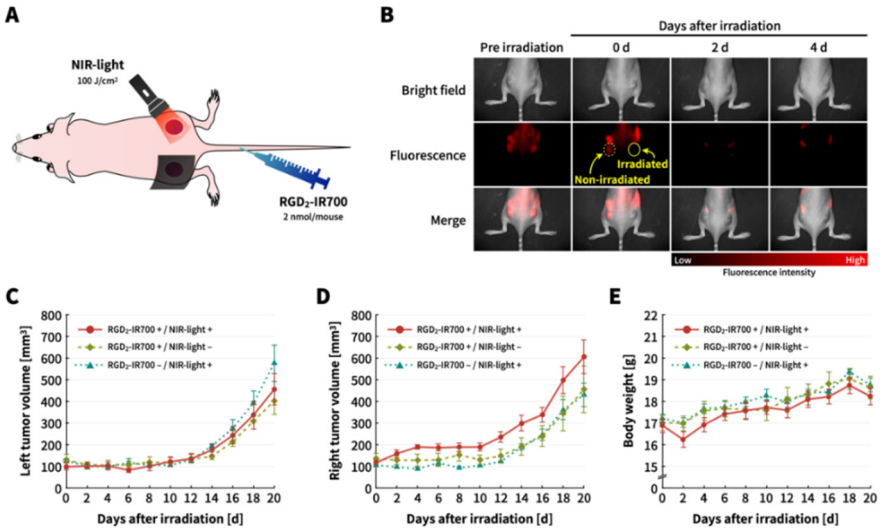


図 8. 担がんマウスモデルに対する RGD_2-IR700 を用いた PIT

A) 治療の概略図。左右臀部の腫瘍について、右側腫瘍に対してのみ光照射を行なった。
この間、左側腫瘍はアルミ箔で被覆した。

B) RGD_2-IR700 投与後 1 時間で光照射を行なった群における、光照射前後での蛍光強度の変化。
光照射後に腫瘍における IR700 の蛍光強度が低下した。

C, D) 各群における、近赤外光を（C）照射しなかった左側腫瘍と、（D）照射した右側腫瘍の体積変化。
各群の間で、腫瘍体積に有意な差は認められなかった。

E) 各群の体重の変化。

6. 光音響イメージングに関する検討

EGFR を高発現する A431 細胞（ヒト上皮様細胞癌由来）を、BALB/c Slc -nu./nu マウスの左右の尻の皮下に移植（5×10^5 cells/tumor）して担がんマウスを作製した。抗 EGFR 抗体 Panitumumab に IR700 を結合させた薬剤（Pan-IR700）を投与（100 μg, i.v.）し、その 24 h 後に 690 nm のレーザーを用いて片側の腫瘍に光照射して PIT を行った（250 mW/cm^2、100 J/cm^2）。光照射の前後で Clear view（INDEC BioSystems）を用いて IR700 の蛍光イメージングを行った。この結果、Pan-IR700 の投与 24 h 後である光照射を行う直前には左右の腫瘍に Pan-IR700 が高集積している様子が観察された（図 9、pre）。光照射を行うと、照射側の腫瘍（右側）でのみ、IR700 の蛍光が消失した（図 9、post）。一方、光照射を行っていない側の腫瘍（左側）では IR700 の蛍光が維持していた。したがって、本条件で腫瘍に対して光照射が十分にされており、IR700 が凝集体を形成した結果、蛍光を発さなくなったことが示された。

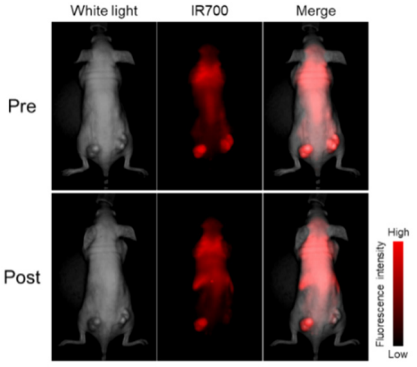


図 9. 光照射前後の IR700 の蛍光イメージング
光照射前（pre）では左右の腫瘍で IR700 の強い蛍光シグナルが認められたが、光照射後（post）では、照射側の腫瘍（右側）でのみ IR700 の蛍光が消失していた。

次に、蛍光イメージングと同様に、光照射の前後で MSOT in Vision256（iThera Medical）を用いて、*in vivo* で光音響イメージングを行った（図 10（A））。光音響イメージングはスペクトルの違いによってシグナルを分離（アンミキシング）できるという特徴を有するが、左右の腫瘍を含むマウスの体内から IR700 のシグナルをアンミキシングすることはできなかった。そこで、図 10（B）には IR700 の最大吸収波長近傍の 685 nm 励起時の画像を、図 10 （C）にはそれらの画像に関心領域（ROI）を設定してシグナル強度を定量したグラフを示した。光照射の前後で比較したところ、腫瘍内の光音響シグナルの強度や分布に変化は認められなかった。

生体内に豊富に存在するヘモグロビンは光音響シグナルを発するため、IR700 由来のシグナルがヘモグロビン由来のシグナルに隠れてしまい検出されなかった可能性を考えた。そこで、マウスを安楽死させ、脱血させた後に再度イメージングを行った。しかし、安楽死前の *in vivo* イメージングと同様、照射側の腫瘍と非照射側の腫瘍で画像やシグナル強度に有意な差はなかった。さらに、摘出した腫瘍のみで *ex vivo* イメージングをしても照射側の腫瘍と非照射側の腫瘍で違いは認められなかった。

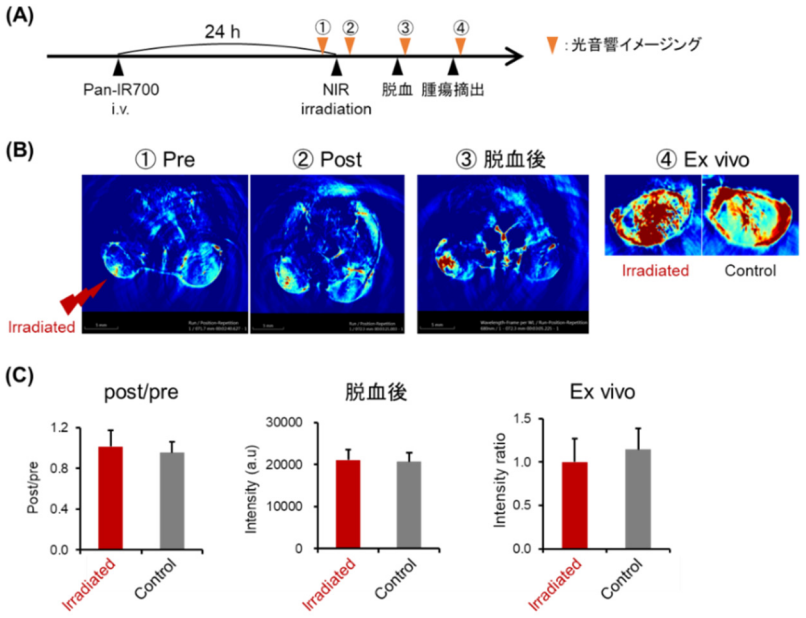


図 10. 光音響イメージング

A） イメージングのレジメン。Pan-IR700 の投与 24 h 後に、片側の腫瘍に対して光照射を行った。光音響イメージングは光照射の前後（①, ②）、脱血後（③）、腫瘍摘出後（④）の 4 点で行った。

B） 光音響イメージングの画像。①：光照射前、②：光照射後、③：脱血後、④：腫瘍摘出後（*Ex vivo*）。

C） 定量解析の結果。左：post/pre、中央：脱血後、右：腫瘍摘出後（*Ex vivo*）。各群に有意な差は認められなかった（n = 5、student's t-test、$p < 0.05$）。

考　察

現在の PIT では抗体ががん細胞への標的化分子として用いられているが、抗体以外の標的化分子を利用できれば、PIT の適用拡大につながると思われる。そこで、PIT におけるがん細胞への新たな標的化分子として RGD ペプチドを用い、転移性腫瘍に発現するインテグリン $\alpha v \beta 3$ を標的とした PIT が実用可能か検討した。

培養細胞を用いた検討では、作製した薬剤 RGD_2-IR700 はインテグリン $\alpha v \beta 3$ 特異的に結合し、近赤外光の照射により、特異的かつ迅速な細胞の収縮を引き起こした。しかし、この「細胞の収縮」は、抗体 PIT での光照射後に見られる「細胞の膨張」と正反対の現象であった。抗体 PIT では、抗体-IR700 複合体（Ab-IR700）が標的分子へ結合し、かつ、近赤外光の照射を受けると、まず、IR700 が励起されて軸配位子が切断され、その構造が親水性から不溶性へと大きく変化する。この物性変化により、抗体の凝集が引き起こされることが示唆されており、この凝集が細胞膜に対し物理的な傷害を与え、水の流入を伴って膨張すると報告されている［2, 3］。この作用メカニズムを考慮すれば、

IR700 が結合している分子が抗体のような高分子のタンパク質ではなく小分子のペプチドである本検討の場合、IR700 の励起によりその構造は変化したとしても、薬剤の凝集には至らない可能性がある。したがって、RGD_2-IR700 を用いた PIT では、薬剤の凝集による細胞膜の物理的な傷害を伴わない、別の様式で細胞傷害が引き起こされていると考えられる。

また、標的分子も、細胞傷害性に大きく影響すると考えられる。本検討で標的としたインテグリンαvβ3 は、腫瘍やその新生血管に過剰発現する分子であり、細胞接着分子としての役割を持つ。細胞の膨張という形態変化が生じる従来の抗体 PIT では、様々な腫瘍で過剰発現する上皮成長因子受容体（Epidermal growth factor receptor；EGFR）など、多くの分子が標的とされているが、本検討のようにインテグリンαvβ3 を標的とした例はこれまでにない。このようなインテグリンαvβ3 を標的とした場合、光照射後にインテグリンαvβ3 自体に何らかの変化が起こり、培養容器の底面との接着が弱くなり剥がれることで、細胞が収縮した可能性が考えられる。

一方、担がんマウスモデルを用いた検討では、RGD_2-IR700 の体内動態評価と治療効果検討を行った。既存の抗体 PIT では、Ab-IR700 の体内動態がやや遅く腫瘍への集積に時間を要するため、Ab-IR700 投与の 1 日後に近赤外光を照射している。一方、本検討の RGD_2-IR700 を用いた PIT では、体内動態が改善され、投与後早い段階で腫瘍への集積と腫瘍対バックグラウンド比（TBR）が最大となった。この結果は、薬剤投与後、より早期に近赤外光の照射を行うことが可能となることを示している。治療効果検討では、抗体 PIT の場合と同様に、近赤外光照射後に腫瘍における IR700 の蛍光強度が大きく低下したが、その後、腫瘍の増殖は抑制されず、有意な治療効果は認められなかった。この知見は、RGD_2-IR700 を用いた PIT が、担がんマウスモデルにおいても既存の抗体 PIT と異なるメカニズムでがん細胞に作用することを示唆する。既存の抗体 PIT との相違点をより詳細に検討することで、どのように分子設計をすれば治療効果が得られるか、新たな知見を見出すことができると考えられる。

以上のように、RGD_2-IR700 を用いてインテグリンαvβ3 を標的とした PIT では、既存の抗体 PIT と比較して、細胞傷害のメカニズムが大きく異なる可能性が高い。今後、RGD_2-IR700 を用いた PIT で細胞傷害がどのようなメカニズムで引き起こされるか、種々の観点から検討を進める。

また、本研究では光照射前後（*in vivo*）、脱血後、腫瘍摘出後（*ex vivo*）の各タイミングで光音響イメージングを行ったが、照射側と非照射側の腫瘍において蛍光イメージングで観察されたような差は認められなかった。その理由として、用いたイメージング装置（MSOT in Vision256）は波長 680～900 nm の範囲のシグナルしか得ることができず、IR700 に適したアンミキシングを行えなかったことが挙げられる。IR700 に特徴的な近赤外光領域のシャープな吸収は 650 nm 付近から始まるため、より短波長のシグナルを得ることができる光音響イメージング装置を用いれば、ヘモグロビンのシグナルと分離して解析することができる可能性が高い。また、腫瘍内に存在する IR700 分子の絶対量が少ないことも理由として考えられ、今後、1 抗体あたりに結合する IR700 の結合数を増やしたり、薬剤の集積量を増やしたりすることでより強いシグナルを腫瘍から得るなどの検討を進める。

文　献

1） 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 Nov 6;17(12):1685-91. PMID: 22057348 DOI: 10.1038/nm.2554.

2） Sato K, Ando K, Okuyama S, Moriguchi S, Ogura T, Totoki S, Hanaoka H, Nagaya T, Kokawa R, Takakura H, Nishimura M, Hasegawa Y, Choyke PL, Ogawa M, Kobayashi H. 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 Nov 28;4(11):1559-1569. Epub 2018 Nov 6. PMID: 30555909 DOI: 10.1021/acscentsci.8b00565.

3） 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 Sep;109(9):2889-2896. Epub 2018 Jul 14. PMID: 29949672 DOI: 10.1111/cas.13713.