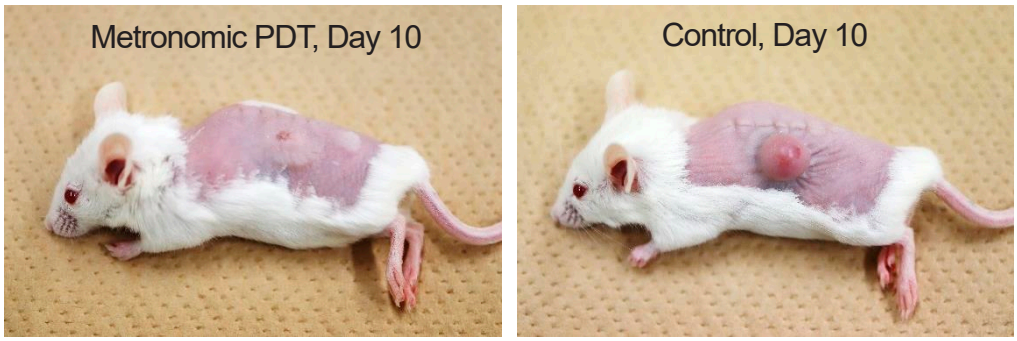
91　インプランタブル光デバイスを利用したがんの免疫療法	守本　祐司

【目的】光増感剤が集積されたがん組織に光を照射して細胞死を誘導する光線力学療法（PDT）という保険承認されているがん治療法がある。最近、照射強度を極微弱にする（×1/1,000）一方で、照射時間をはるかに長く（×1,000）したメトロノミック PDT（mPDT）の概念が提唱され、著者らは、無線給電方式インプランタブル LED デバイスを開発し、mPDT の光源として用いて、高い抗がん効果を発揮することを成功した。実臨床への応用を念頭におくと、光増感剤は医療行為である経静脈投与を必要とせず、患者自身で服用できる内服タイプの薬剤を用いるのが望ましい。そこで本研究では、内服することにより体内で光増感剤（プロトポルフィリン IX（PPIX））に変換される 5-アミノレブリン酸（ALA）を用いて、著者らの確立したシステムによる mPDT を行い、がん治療における有効性を検証した。

【方法】1. 皮内腫瘍モデルマウスに ALA 水溶液を経口投与して、腫瘍組織内 PPIX 濃度の時間推移を蛍光イメージングにより計測した。2. 皮内腫瘍モデルマウスの腫瘍部位の皮下に無線給電式インプランタブル LED デバイスを埋め込んだ。その後実験動物を 4 群に分けて、mPDT による抗腫瘍効果を調べた。3. インプランタブルデバイスの発光に伴う熱産生が、温熱作用として腫瘍増殖抑制に働く可能性を否定することを目的に、発光時の皮膚温を計測した。

【結果】ALA 水溶液の経口投与でマウス腫瘍内の PPIX 濃度が上昇し、少なくともその状態が投与後 10 時間は持続することがわかった。この結果をもとに、無線給電式インプランタブル LED デバイスを皮内腫瘍モデルに埋め込みメトロノミック PDT を行ったところ、腫瘍増殖を抑制できることがわかった（図）。さらにこの抗腫瘍効果は温熱作用ではなく、光化学的作用に起因することが示唆された。

5-アミノレブリン酸投与後のメトロノミック PDT による抗腫瘍効果



91. インプランタブル光デバイスを利用したがんの免疫療法

守本　祐司

防衛医科大学校 生理学講座

Key words：光線力学療法，光増感剤，がん，アポトーシス，無線給電

緒　言

光線力学療法（PDT）は保険承認されている有効性の高いがん治療法で、光増感剤投与後に腫瘍に対して照射強度 100 mW/cm^{2}程度の光を 10～20 分間照射し、産生される活性酸素によって細胞死を誘導する。細胞死は、ネクローシス主体の急速な細胞破壊で、がん細胞の内在性タンパクは急激に変性し、ただちに消化、除去される。

これに対して最近、照射強度を極微弱にする（×1/1,000）一方で、照射時間をはるかに長く（×1,000）したメトロノミック PDT（mPDT）の概念が提唱され［1］、PDT と同等以上の抗腫瘍効果が報告されており、著者らも最近、生体内部に留置でき、生体組織への接着性に優れたインプランタブル・ワイヤレス薄膜状 LED デバイスを開発し、mPDT の光源として用いることで、高い抗がん効果を発揮することを報告した［2］。

著者らの研究［2］においては、光増感剤としてポルフィマーナトリウムを 3 日毎に経静脈的に投与した。しかし、実臨床への応用を念頭におくと、静脈を介した投薬プロトコールは患者の利便性を低下させる。したがって、適用する光増感剤は、医療行為である経静脈投与を必要とせず、患者自身で服用できる内服タイプの薬剤が望ましい。すると現時点では、5-アミノレブリン酸（ALA）がもっとも要望にかなった薬剤である。

そこで本研究では、ALA を経口的に投与して著者らの確立したシステムを用いた mPDT を行い、がん治療における有効性を検証した。

方　法

1.　無線給電式インプランタブル LED デバイスと給電システム

無線給電式インプランタブル LED デバイスとしては、NFC（Near Field Communication）-LED デバイス（共立電子産業、大阪；model：KP-NFLEG（λ = 530 nm）、size：7.0×11.0×0.8 mm、weight：～20 mg）を光硬化型樹脂で封止したものを使用した。無線給電の供給には、手作りの平面アンテナを用いた。

2.　モデル動物の作製

がん細胞とマウスを用いて皮内腫瘍モデルを作製した。マウス大腸がん細胞（C26）の浮遊液（5.0×10^{5}個、50 μL）を麻酔下にある 7 週令メス Balb/c マウス（体重 20 g 前後）の背部皮内に注射した。その後通常条件で飼育して腫瘍サイズが約 35～55 mm^{3}に達した個体を以下の実験に供した。

3.　ALA 投与法および PPIX 濃度測定

ALA が生体へ投与されると、生体内で代謝され、光増感剤として機能するプロトポルフィリン IX（PPIX）が産生される。さらに ALA 投与後の PPIX は腫瘍組織に好集積することが知られている［3］。そこで、mPDT において最適な光照射（発光）時間を決めるために、ALA 投与後の PPIX 濃度の時間推移を計測した。5-aminolevulinic acid（hydrochloride）（ナミキ商事株式会社、東京）を純水に溶解し、ゾンデをマウス口腔内に挿入して食道に 300 μL 注入した（4 mg/匹）。

PPIX は蛍光物質でもあるので、腫瘍内集積を蛍光測定によって間接的に知ることができる。イソフルランで吸入麻酔されたマウスの腫瘍部位における蛍光を *in vivo* イメージングシステム（IVIS Lumina シリーズⅢ、PerkinElmer）で可視化（Ex.400 nm / Em.530 nm）した。腫瘍からの蛍光量は、Living Image ®ソフトウェア 3.0（PerkinElmer）

を用いて計算した。

4.　インプランタブルデバイスの埋め込みと治療プロトコール

マウスの背部皮膚を切開して皮下組織と筋膜の間を剥離したのち、その結果生じた空隙に無線給電式インプランタブル LED デバイスを埋め込んだ。その際、皮内腫瘍の真下に LED の発光面が来るようにデバイスを留置し、その後、皮膚を縫合閉鎖した。動物を以下の 4 つのグループに分けて実験を行った。

① 無処置群：ALA 投与無し、光の被照射なし　（ALA－photo－）群（n＝6）
② ALA 投与のみ、光の被照射なし　（ALA＋photo－）群（n＝6）
③ ALA 投与無し、光の被照射のみ　（ALA－photo＋）群（n＝6）
④ mPDT：ALA 投与あり、光の被照射あり　（ALA＋photo＋）群（n＝6）

Day 0 にマウスを飼育しているケージを平面アンテナの上に設置して、③（ALA－photo＋）群、④（ALA＋photo＋）群ではデバイスを発光（約 50 μW）させた（図 1）。発光の持続時間は一日 8 時間とした（理由は後述）。また、②（ALA＋photo－）群と④（ALA＋photo＋）群には、Day 0 より AM9 にゾンデを用いてマウス食道に 300 μL 注入してやり（4 mg/匹）、これを 5 日間続けた。なお、④（ALA＋photo＋）群対しては、ALA 水溶液の注入後よりデバイスを 8 時間発光させるようにした。



図 1.　Free moving マウスの背部皮内で発光し続けるインプランタブルデバイス
アンテナボード（不可視）上に置かれたケージ内で自由に動くマウスの背部皮内でインプランタブルデバイスが発光（緑色）し続けることを確認した。

5.　治療効果の評価

腫瘍サイズは皮膚の上よりノギスをあてて、最長径、最短径、高さをそれぞれ計測した。サイズ計測は Day0、3、7、10、14 に行った。

6.　インプランタブルデバイスの発光による熱産生の計測

無線給電式インプランタブル LED デバイスの発光に伴う不可避的な熱産生が、温熱作用として腫瘍増殖抑制に働く可能性を否定することを目的に、第 4 項と同様の手技により動物にデバイスを埋め込み、発光時の皮膚温を計測した。温度モニタリングには赤外線サーモグラフィ（FSV-2000、アピステ、大阪）を用いた。

7.　統計学的手法

データは平均値±標準偏差で示した。統計分析は、一元配置分散分析を行い、群間比較は Turky-Kramer の HSD 検定（JMP Pro ver 14）を行った。p 値が 0.05 未満のとき、統計学的に有意と判断とした。

結　果

1. ALA 内服後の PPIX 量の経時変化

ALA 水溶液をゾンデで経食道投与したのちの腫瘍部位における PPIX 由来の蛍光強度の推移を図 2 に示す。投与後 1 時間から蛍光強度は増加して、同 2 時間で最高値を呈した。その後漸減していったが、測定を続けた 10 時間までの蛍光強度はいずれも 0 時間時点での蛍光強度よりも有意に増加しており、投与後少なくとも 1～10 時間までは腫瘍部位において PPIX が蓄積していることが示唆された。しかしながら、投与後 7 時間以降の蛍光強度はほぼプラトーとみなせたので、mPDT の治療効果を検討する実験では、発光デバイスを ALA 投与後から 8 時間までの間発光させることにした。

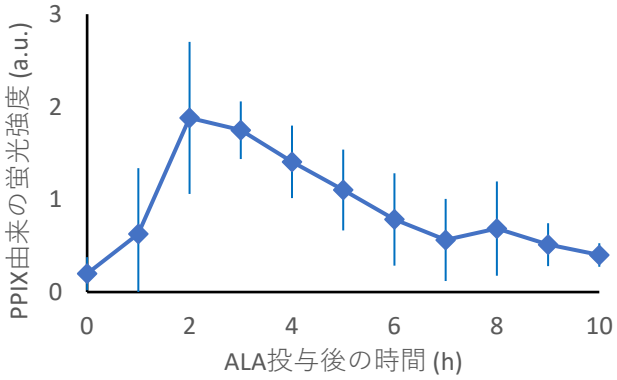


図2. ALA投与後の腫瘍内PPIX濃度の時間変化

ALA投与後1時間よりPPIX濃度は上昇し、2時間で最高値に達する。投与後少なくとも10時間までは上昇が認められる（投与時間0 hの蛍光光度に対して、それ以降のすべての計測値は有意に高い。n ＝ 6、$p<0.05$）。

2. 無線給電式インプランタブル LED デバイスによるメトロノミック PDT の抗腫瘍効果

「方法」の第 4 項に従って治療効果を検討する実験を行った。4 つの群に分けたマウスにおける治療開始後 14 日目の各腫瘍サイズの図 3 に示す。mPDT 群④（ALA＋photo＋）動物の腫瘍サイズはその他の群（①、②、③）の動物の腫瘍サイズに比して、約半分程度にまで有意に小さくなった。そのうえ、mPDT 群④（ALA＋photo＋）では 6 匹中 1 匹において腫瘍の消失がみられた。

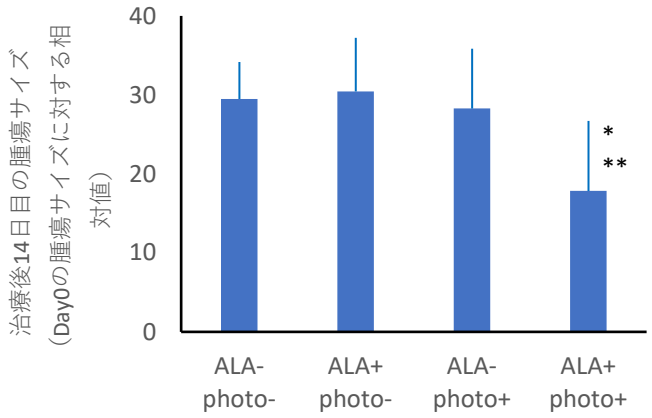


図3. 4つの実験群における腫瘍サイズの比較

mPDTを行った群（ALA＋photo＋）の腫瘍サイズは、他の実験対象群に比して有意に小さかった（* $p = 0.0093$ to（ALA－photo－）. ** $p = 0.015$ to （ALA＋photo－））。

ALA：アミノレブリン酸投与の有無。photo：インプランタブルデバイスからの発光の有無。

3. インプランタブルデバイスの発光による熱産生の計測

2 匹のマウスの背部皮下に、1 匹には発光するデバイスをもう 1 匹には発光しないデバイスを埋め込み、麻酔下状態で平面アンテナ上に静置して無線給電を開始して 13 分後の皮膚温度分布を赤外線サーモグラフィで取得した。その結果、両者の皮膚温には有意な差を認めず、デバイス発光による産熱は腫瘍増殖に影響しないことが示唆された。

考　察

本研究より、5-アミノレブリン酸（ALA）水溶液の経口投与でマウス腫瘍内の PPIX 濃度が上昇し、少なくともその状態が投与後 10 時間は持続することがわかった。この結果をもとに、無線給電式インプランタブル LED デバイスを皮内腫瘍モデルに埋め込みメトロノミック PDT を行ったところ、腫瘍増殖を抑制できることがわかった。さらにこの抗腫瘍効果は温熱作用ではなく、光化学的作用に起因することが示唆された。

PDT で用いられる光増感剤の開発研究が多くなされているが、実臨床で承認されているものは少なく、ポルフィリン誘導体およびフタルシアニン誘導体のいずれかで、本邦においては保険収載されている 2 剤（ポルフィマーナトリウムとタラポルフィンナトリウム）はともに前者に分類される物質である。そして、ALA を除くすべてが経静脈投与で使用される。なお、ALA そのものは光増感剤ではなく光増感剤前駆物質ともいうべき分子で、ALA が体内で代謝され生成される PPIX が光増感物質としての機能を発揮する。PPIX 自体はポルフィリン誘導体の一つである。

ALA は現在、PDT 用の薬剤として本邦では保険適用となっていないが、欧米では臨床使用されているところもある。しかし、ALA は経口投与が可能であるため、静脈投与を必要とする他の光増感剤と比較すると、投与そのものに医療行為を伴わず、患者の身体的負担も軽いので、使用に関するハードルは低い。また、著者らが開発を進めている無線給電による完全埋め込み型の発光デバイスと ALA 内服を組み合わせたメトロノミック PDT は、デバイスの体内埋め込み以降に医療行為を必要としないため、在宅治療へと展開できる。

ALA 使用の問題点としては、PPIX 分子においては光照射によって産生される活性酸素の量が、他の薬剤分子に比して少ないことである。しかしながら ALA は、従来の PDT で使用する場合よりもメトロノミック PDT で使用する場合の方が、殺細胞効果もアポトーシス誘導効果も高いことが報告されている［4］。したがって今後、発光デバイスの光強度を増大させたり、ALA 内服と発光スケジュールの最適化などを検討して、治療効果の増強を図っていきたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京工業大学生命理工学院の藤枝俊宣氏、九州大学先導物質化学研究所の藤田克彦氏、プレアデステクノロジーズの坂上恵氏、早稲田大学先進理工学研究科の武岡真司氏、杉田凜氏、Singapore University of Technology and Design, Digital Manufacturing and Design Centre の山岸健人氏ならびに防衛医科大学校生理学講座の桐野泉氏である。

文　献

1） Bisland SK, Lilge L, Lin A, Rusnov R, Wilson BC. Metronomic photodynamic therapy as a new paradigm for photodynamic therapy: rationale and preclinical evaluation of technical feasibility for treating malignant brain tumors. Photochemistry and photobiology. 2004;80:22-30. Epub 2004/09/02. doi: 10.1562/2004-03-05-RA-100.1. PubMed PMID: 15339204.

2） Yamagishi K, Kirino I, Takahashi I, Amano H, Takeoka S, Morimoto Y, et al. Tissue-adhesive wirelessly powered optoelectronic device for metronomic photodynamic cancer therapy. Nat Biomed Eng. 2019;3(1):27-36. Epub 2019/04/02. doi: 10.1038/s41551-018-0261-7. PubMed PMID: 30932063.

3) Kriegmair M, Baumgartner R, Lumper W, Waidelich R, Hofstetter A. Early clinical experience with 5-aminolevulinic acid for the photodynamic therapy of superficial bladder cancer. Br J Urol. 1996;77(5):667-71. Epub 1996/05/01. doi: 10.1046/j.1464-410x.1996.09717.x. PubMed PMID: 8689107.
4) Shi X, Zhang H, Jin W, Liu W, Yin H, Li Y, et al. Metronomic photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid induces apoptosis and autophagy in human SW837 colorectal cancer cells. Journal of photochemistry and photobiology B, Biology. 2019;198:111586. Epub 2019/08/23. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2019.111586. PubMed PMID: 31437760.