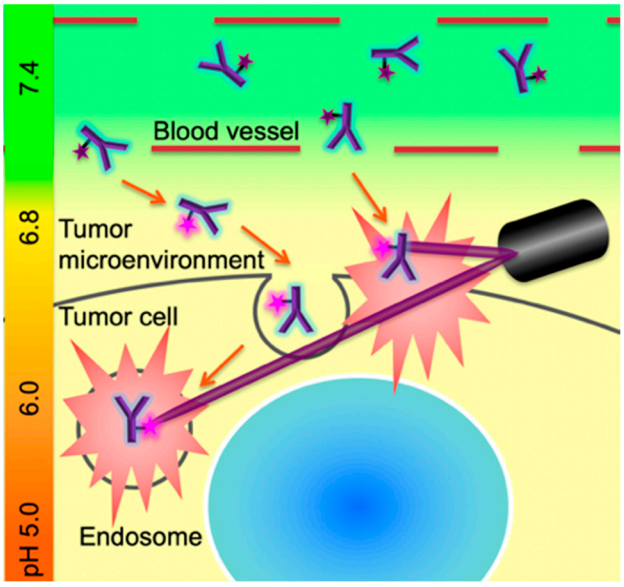
208　pH応答性光増感剤修飾抗体によるがん選択的光熱療法	蛭田　勇樹

【目的】光熱療法（photothermal therapy：PTT）は、近赤外吸収を持つ光増感剤が吸収した光を熱エネルギーに変換することを利用して、光増感剤の集積かつ強い近赤外光を照射した部位を特異的に発熱させ、熱に弱い固形がんの深部からがんを死滅させる方法である。そのため、正常組織への侵襲性が低く、副作用の小さな治療法になると考えられている。しかしながら、インドシアニングリーンやIR-780などのPTTプローブは、腫瘍への選択性、血中半減期が短いといった課題がある。そこで、本研究では、pH応答性近赤外蛍光プローブの開発、そして、このプローブの抗体医薬とのコンジュゲートにより、がん選択的光熱療法への応用を検討した。
【方法】目的のpH応答性近赤外蛍光プローブを合成した。紫外可視近赤外分光光度計により吸収スペクトル、分光蛍光光度計により蛍光スペクトルを測定した。HeLa細胞に蛍光プローブを添加し、pH 6.4およびpH 7.4で蛍光顕微鏡により観察した。また、それぞれのpH条件で808 nmレーザー（1 W／cm^2）を照射した際の細胞生存率を評価した。ラベル化部位を導入した蛍光プローブと抗体の複合体を作製し、紫外可視近赤外分光光度計、分光蛍光光度計、サイズ排除クロマトグラフィーによって得られた複合体の評価を行った。
【結果】置換基を変えることで数種類のpH応答性近赤外蛍光プローブを合成した。置換基を変えることで、応答するpHを任意に調節することが可能であった。また、正常組織周辺のpH 7.4とがん組織周辺のpH 6.4～6.8程度を認識して、吸光度・蛍光強度がOFF／ON制御できる誘導体も開発することができた。細胞の蛍光イメージングにおいて、pH 7.4と比較して、pH 6.4では強い蛍光を示したことから、pH応答性近赤外蛍光プローブが細胞のpHを認識して蛍光をOFF／ON制御できることが示された。PTTへの応用を見据えて、pH応答性近赤外蛍光プローブを細胞にインキュベーションし、レーザー照射した際の細胞毒性を評価した。pH 7.4では細胞毒性がみられないのに対して、pH 6.4では細胞毒性を確認することができた。これらの結果よりpH選択的な光熱療法への応用可能性が示唆された。ラベル化部位を導入した蛍光プローブと抗体の複合化について、反応時間、当量を変えて検討した。サイズ排除クロマトグラフィーにより、複合体の形成を確認することができたが、複合化に伴い、抗体の凝集体が確認された。今後は、複合化について検討を行い、凝集体が形成されないような条件検討を進めていく。

本研究の目的



208. pH 応答性光増感剤修飾抗体によるがん選択的光熱療法

蛭田　勇樹

慶應義塾大学 理工学部 応用化学科 分析化学研究室

Key words：光熱療法，光増感剤，近赤外蛍光，抗体，蛍光イメージング

緒　言

光線力学療法（photodynamic therapy：PDT）は、ポルフィリンやフタロシアニン誘導体などの光増感剤を全身投与し、患部に対して光照射することで産生される一重項酸素等の活性酸素種による酸化反応により患部を破壊する治療法である。副作用としては、光増感剤の皮膚等の正常組織への集積に基づく光過敏症が知られている。また、酸素が必要であるため、低酸素状態にあるがん組織深部ではその作用は限定的である。米国国立衛生研究所（NIH）の主任研究員である小林久隆らの研究グループが、光線力学療法に免疫療法を組み合わせた光免疫療法（Photoimmunotherapy：PIT）を新たながん治療法として報告した［1］。近赤外吸収を持つフタロシアニン色素 IR700 を結合させた抗体が、がん細胞表面にある特有の抗原に結合し、近赤外レーザーを照射することで細胞膜表面にダメージを与え、ネクローシスを誘導する。さらにネクローシスにより、がん細胞内の物質が細胞外へ放出されることで、がんに対する免疫系が活性化され、レーザーを照射していない腫瘍に対しても治療効果を発揮することがわかっており、転移がんへの効果も期待されている。現在、臨床第 3 相試験が実施中である。このように、「光」を利用した「治療」技術は、次世代のがん医療の創生に向けて急速に発展を遂げている。

光熱療法（photothermal therapy：PTT）は、近赤外吸収を持つ光増感剤が吸収した光を熱エネルギーに変換することを利用して、光増感剤の集積かつ強い近赤外光を照射した部位を特異的に発熱させ、熱に弱い固形がんの深部からがんを死滅させる方法である［2，3］。そのため、PDT と比べて、正常組織への侵襲性が低く、副作用の小さな治療法になると考えられている。例えば、インドシアニングリーンや IR-780 といったシアニン系骨格を持つ蛍光色素を内包したナノ粒子に近赤外レーザーを照射すると、1 分以内に 50℃以上に発熱させることが可能であり、担がんマウスモデルでの抗がん効果が報告されている［4］。化学療法と違い、発熱し、物理的にがん組織を殺傷するため、薬剤耐性といった問題も生じない。さらに、これらの PTT プローブは、近赤外領域に蛍光を持つため、がんの蛍光イメージングへの応用も可能であり、治療と診断を同時に行うセラノスティクスへの応用も期待される。しかしながら、インドシアニングリーンや IR-780 などの PTT プローブは、腫瘍への選択性、血中半減期が短いといった課題がある。

そこで、本研究では、pH 応答性近赤外蛍光プローブの開発、そして、このプローブの抗体医薬とのコンジュゲートにより、がん選択的 PTT への応用を検討した。

方　法

1. pH 応答性近赤外蛍光プローブ

目的の pH 応答性近赤外蛍光プローブを合成し、^{1}H NMR、^{13}C NMR、HRMS により同定した。紫外可視近赤外分光光度計により吸収スペクトル、分光蛍光光度計により蛍光スペクトルを測定した。

2. 細胞の蛍光イメージング

HeLa 細胞をガラスボトムディッシュに 24 時間インキュベーションした。その後、蛍光プローブを添加し HeLa 細胞を 2 時間インキュベーションした。MEM で洗浄し、ニゲリシンの入った pH 6.4 および 7.4 の高濃度 K^+ HBSS バッファーに交換した。その後、蛍光顕微鏡により細胞を観察した。

3. 細胞生存率評価

HeLa 細胞を 96 ウェルプレートに 24 時間インキュベーションした。その後、蛍光プローブを添加し HeLa 細胞を 2 時間インキュベーションした。MEM で洗浄し、ニゲリシンの入った pH 6.4 および 7.4 の高濃度 K^+ HBSS バッファーに交換した。10 分間インキュベーションし、808 nm レーザー（1 W／cm^2）を 5 分間照射した。MEM で洗浄し、新しい MEM に交換して 2 時間インキュベーションした。その後 WST Assay による細胞生存率を確認した。

4. 抗体医薬とのコンジュゲート

ラベル化部位を導入した蛍光プローブと抗体の複合体を作製した。ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて精製を行った。紫外可視近赤外分光光度計、分光蛍光光度計、サイズ排除クロマトグラフィーによって得られた複合体の評価を行った。

結果および考察

1. pH 応答性近赤外蛍光プローブの特性評価

置換基を変えることで数種類の pH 応答性近赤外蛍光プローブを合成した。合成した蛍光プローブを DMSO 溶液とし、各 pH の緩衝液で希釈したサンプルの吸光度変化を図 1 に示す。置換基を変えることで、応答する pH を任意に調節することが可能であった。また、正常組織周辺の pH 7.4 とがん組織周辺の pH 6.4～6.8 程度を認識して、吸光度が　OFF／ON 制御できる誘導体も開発することができた。蛍光応答に関しても吸光度変化と同様の pH 応答を示した。

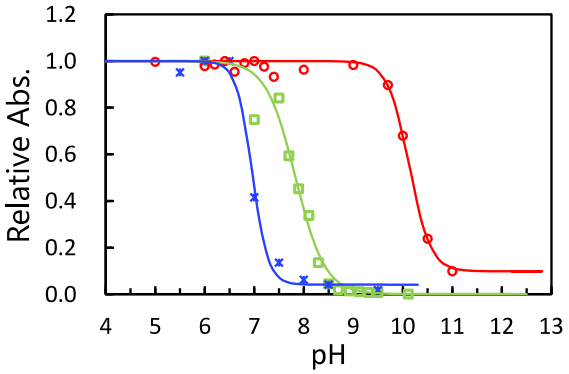


図 1.　pH 応答性近赤外蛍光プローブの pH 応答
置換基を変えることで応答 pH が変化。

2. 細胞の蛍光イメージング

pH 7.4 と pH 6.4 での HeLa 細胞の蛍光イメージング画像を図 2 に示す。pH7.4 と比較して、pH 6.4 では強い蛍光を示したことから、pH 応答性近赤外蛍光プローブが細胞の pH を認識して蛍光を OFF／ON 制御できることが示された。

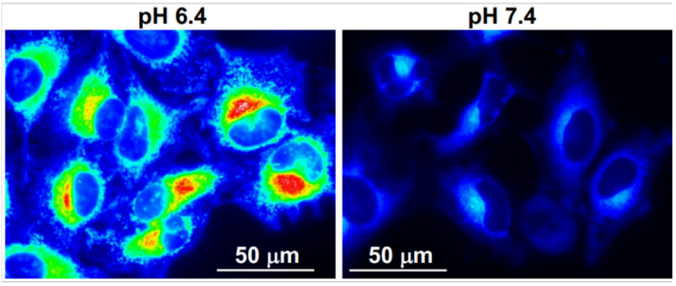


図 2. pH 応答性近赤外蛍光プローブによる HeLa 細胞の蛍光イメージング
pH 6.4 で輝度が大きく、低 pH を認識して蛍光が ON になっている（スケールバー：50 μm）。

3. 細胞生存率評価

光熱療法への応用を見据えて、pH 応答性近赤外蛍光プローブを細胞にインキュベーションし、レーザー照射した後の細胞生存率を図 3 に示す。pH7.4 では細胞毒性がみられないのに対して、pH6.4 では細胞毒性を確認することができた。これらの結果より pH 選択的な光熱療法への応用可能性が示唆された。

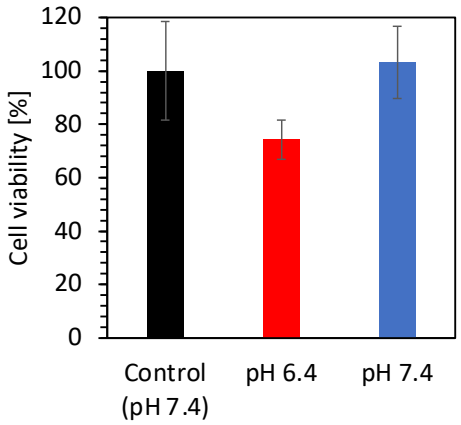


図 3. pH 応答性近赤外蛍光プローブとレーザー照射による PTT 効果
WST アッセイの結果（n=3、平均±標準偏差）、Control（pH7.4）は細胞のみ。

4. 抗体医薬とのコンジュゲート

ラベル化部位を導入した蛍光プローブと抗体の複合化について、反応時間、当量を変えて検討した。サイズ排除クロマトグラフィーにより、複合体の形成を確認することができたが、複合化に伴い、抗体の凝集体が確認された。今後は、複合化について検討を行い、凝集体が形成されないような条件検討を進めていく。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京理科大学先進工学部の上村真生講師、慶應義塾大学理工学部の岡浩太郎教授、新藤豊特任助教である。

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) Jung HS , Verwilst P , Sharma A , Shin J , Sessler JL , Kim JS . Organic molecule-based photothermal agents: an expanding photothermal therapy universe. Chem Soc Rev. 2018 Apr 3;47(7):2280-2297. PMID: 29528360 DOI: 10.1039/c7cs00522a

3) Zou L, Wang H, He B, Zeng L, Tan T, Cao H, He X, Zhang Z, Guo S, Li Y. Current Approaches of Photothermal Therapy in Treating Cancer Metastasis with Nanotherapeutics. Theranostics. 2016 Mar 21;6(6):762-72. PMID: 27162548 DOI: 10.7150/thno.14988.

4) Wu L, Fang S, Shi S, Deng J, Liu B, Cai L. Hybrid polypeptide micelles loading indocyanine green for tumor imaging and photothermal effect study. Biomacromolecules. 2013 Sep 9;14(9):3027-33. Epub 2013 Aug 13. PMID: 23941524 DOI: 10.1021/bm400839b