

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：34401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22988

研究課題名(和文)悪性神経膠腫に対するPTX3、IL13R 2を標的とした近赤外光線免疫療法

研究課題名(英文)Near-infrared photoimmunotherapy for malignant glioma targeting PTX3 and IL13Ra2

研究代表者

木村 誠吾 (Kimura, Seigo)

大阪医科薬科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：10874886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：近赤外光免疫療法(NIR-PIT)は、光線力学的細胞毒性と抗腫瘍免疫増強作用を利用した新しいがん治療法である。膠芽腫は、腫瘍の不均一性が高く、細胞表面抗原が多様であることが特徴であり、複数の抗原を同時に標的とするNIR-PITの方が効果的であると考えた。In vitroでは、EGFRとIL13R 2の両方を標的としたNIR-PITで、EGFRとIL13R 2のみを標的としたNIR-PITと比較して、腫瘍を死滅させる効果が有意に高かった。これらの結果は、EGFRとIL13R 2を標的としたNIR-PITが、膠芽腫に対する新規かつ有効な治療法になる可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は脳実質発生腫瘍の中で最も罹患率が高く、かつ最も予後不良な脳腫瘍であり、集学的治療を行ったとしてもその平均生存期間は12～15か月前後である。そのため、NIR-PITは膠芽腫の新たな治療法として期待されている。膠芽腫は非常に不均一な腫瘍であるため、各腫瘍抗原の種類や量にはばらつきがあり、複数の抗原を標的にすることで、NIR-PITの抗腫瘍免疫活性化の効率を高める可能性がある。本研究では、悪性神経膠腫の細胞膜に高発現するEGFRおよびIL13R 2に対する抗体を併用と単独治療とを比較したはじめての研究である。膠芽腫に対するPIT-NIRの足掛かりとなる学術的・社会的意義の高い研究となった。

研究成果の概要(英文)：Near-Infrared Photoimmunotherapy (NIR-PIT) is a new cancer treatment based on photodynamic cytotoxicity and anti-tumor immunopotential. Glioblastoma is characterized by high heterogeneity of tumors and diversity of cell surface antigens, so NIR-PIT targeting multiple antigens simultaneously would be more effective than by targeting a single antigen. In vitro, NIR-PIT targeting both EGFR and IL13R 2 was significantly more effective in killing tumors than NIR-PIT targeting EGFR and IL13R 2 alone. These results suggest that NIR-PIT targeting both EGFR and IL13R 2 may be a novel and effective treatment for heterogeneous glioblastoma.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：photoimmunotherapy glioblastoma EGFR IL13R 2 glioma

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近赤外線免疫療法 (Near-Infrared Photoimmunotherapy: 以下 NIR-PIT) は、がん抗原を標的とする抗体 (Ab) にフタロシアニン色素 (IR700) を結合させた光感受性抗体薬 (IR700-Ab) と近赤外線 (IR700 に対する励起光: 波長 690nm) を利用する光線力学治療の一種である。光感受性抗体薬に生じる光線力学反応によって全ての腫瘍細胞を障害することなく、がん細胞から多量に放出されるがん抗原を利用してがんに対する細胞性免疫を増強させる点が本治療法の白眉である。すなわち、悪性腫瘍に対する標準治療として使用される抗がん剤や放射線治療では、免疫細胞にも強い抑制が掛かるのに対し、NIR-PIT ではがん免疫を司る免疫細胞の障害がほとんど起こらない点において、旧来の治療法とは一線を画する。本研究では、悪性神経膠腫に特異的に発現するがん抗原を標的とする光感受性抗体薬を用いて、神経膠腫に対する NIR-PIT の治療法について検証を行う。

本研究によって治療効果が認められれば、臨床の現場で脳腫瘍切除後に NIR-PIT を行うことで、腫瘍細胞を根絶でき、悪性神経膠腫の患者の生命予後・機能予後を大幅に改善する可能性がある。本研究では、悪性神経膠腫の細胞膜上に高発現し、正常細胞に低発現する抗原として、先行研究で有効性が示されている EGFR に加えて PTX3 や IL13R 2 をターゲットとした NIR-PIT の治療効果についての検証を行う。

### 2. 研究の目的

膠芽腫は、WHO 悪性度 IV の脳腫瘍で、脳実質発生腫瘍としては最も多く、最も予後が悪い。集学的治療 (手術、化学療法、放射線療法) を行っても、膠芽腫患者の全生存期間の中央値は 12 ~ 15 カ月、5 年生存率は 3 ~ 5% に過ぎない。そのため、NIR-PIT は膠芽腫の新たな治療法として期待されている。膠芽腫で遺伝子発現が特異的に高発現するがん抗原を標的とする光感受性抗体薬 (IR700-Ab) を用いて、膠芽腫に対する NIR-PIT の治療効果について検証を行った。

膠芽腫で高発現を示す腫瘍抗原には、EGFR と IL13R 2 がある。膠芽腫患者において、受容体の高発現の頻度は、EGFR で 84%、IL13R 2 で 79% であった。一方、IL13R 2 の発現は精巢に限られており、他の正常な体細胞組織では全くないか低い。さらに、IL13R 2 の発現は、テモゾロミド化学療法に対する膠芽腫の耐性とも関連している。したがって、EGFR と IL13R 2 を標的とした光感受性抗体を組み合わせた NIR-PIT は、治療抵抗性の膠芽腫をより効率的に攻撃できる可能性があり、EGFR と IL13R 2 を標的とした NIR-PIT の治療効果について検証を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) *in vitro* での細胞障害活性を評価するために、EGFR および IL13R 2 に対する光感受性抗体 (anti-EGFR-Ab/IR700、anti-IL13R 2-Ab/IR700) を作成し、これらをヒトグリオーマ細胞株 (U87MG, U251, U138, A172) の培養培地に添加した後に NIR 光を照射し、光線力学反応による殺細胞効果について WST-8 assay で評価を行なった。

具体的には、5000 個の U87MG、U251、U138、A172 をウェルプレートに播種し、37 °C で 24 時間培養した。培地を、anti-EGFR-Ab/IR700 または anti-IL13R 2-Ab/IR700 (10 µg/mL) を含む培地に交換した。細胞を腫瘍に接着させ、PBS で洗浄し、細胞に 690nm 赤色 LED を用いて NIR 光を照射した。光パワーメーターを用いて、25mW/cm<sup>2</sup> のパワー密度を測定した。各ディッシュへの照射量は、16 J/cm<sup>2</sup> とした。照射して 1 時間後、PBS で洗浄した後、Cell Counting Kit-8 を投与して 2 時間後に 450nm の吸光度を測定した。殺細胞率は 1 - (対象の吸光度/コントロールの吸光度) で求めた。また、J 数を上げることで治療効果を変更するかを知るために、濃度を一定にして、J 数別に同様のアッセイで行った。

(2) anti-EGFR-Ab/IR700 または anti-IL13R 2-Ab/IR700 を使用した PIT 処理後の細胞増殖抑制効果を colony forming assay で評価を行なった。

具体的には、U87MG、U251、U138、A172 にそれぞれの IR700-Ab を曝露し、励起後に細胞 500 個をウェルプレートに播種した。細胞を 12 日間培養した後にコロニーをメタノールで固定し、ギムザ染色し、コロニーの数を測定した。コロニーは、顕微鏡で撮影し、解析した。U138 はコロニーを形成しなかったため、カウントができなかった。

### 4. 研究成果

(1) *in vitro* での anti-EGFR-Ab/IR700 と anti-IL13R 2-Ab/IR700 を併用した NIR-PIT は、コントロール群や anti-EGFR-Ab/IR700、anti-IL13R 2-Ab/IR700 単独群と比較して有効な殺腫瘍効果を証明した。

また、anti-EGFR-Ab/IR700 または anti-IL13R 2-Ab/IR700 を用いた NIR-PIT による細胞毒性は、リアルタイム PCR による EGFR ( $R^2=0.88$ ,  $p<0.001$ ) または IL13R 2 ( $R^2=0.78$ ,  $p<0.001$ ) の発現レベルと有意な正の相関関係があった。つまり、多様性をもつ膠芽腫であるが、PIT にお

ける標的細胞膜抗原の発現量と殺細胞効果で有意な正の強い相関関係を証明できた。EGFR と IL13R 2 の両方を標的とした NIR-PIT は、大量の腫瘍細胞を破壊することで、抗腫瘍免疫の活性化の効率を高めることも期待できる。

(2) colony forming assay を用いて、EGFR と IL13R 2 の両方を標的とした NIR-PIT は、単独群と比較して、膠芽腫の増殖能を有意に抑制した。これまでの報告では、EGFR と IL-13R 2 の両方が高発現している腫瘍は、腫瘍増殖能が劇的に高まることが明らかになっている。今回の EGFR と IL13R 2 の両方を標的とした NIR-PIT では、EGFR が低発現、IL13R 2 が低発現の腫瘍が残る可能性があるが、それらの腫瘍は他の腫瘍に比べて増殖力が弱いことが予想される。したがって、EGFR と IL13R 2 を併用した NIR-PIT は、増殖能の高い GBM の治療オプションとなり、患者の予後を改善する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 蒲原 明宏, 野々口 直助, 服部 能英, 木村 誠吾, 井畑 知大, 川端 信司, 鱈淵 昌彦
2. 発表標題 EGFRとIL13R 2を標的とする光感受性抗体を併用した膠芽腫に対する近赤外光線免疫療法
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第80回学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蒲原 明宏, 野々口 直助, 服部 能英, 木村 誠吾, 井畑 知大, 川端 信司, 鱈淵 昌彦
2. 発表標題 膠芽腫に対する近赤外光線免疫療法 : EGFRとIL13R 2を標的とする新規光感受性抗体薬の有効性
3. 学会等名 第42回日本レーザー医学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野々口直助, 蒲原 明宏, 木村 誠吾, 矢木 亮吉, 池田 直廉, 古瀬 元雅, 川端 信司, 鱈淵 昌彦
2. 発表標題 グリオーマのEGFRおよびIL13Ra2を標的とする光線免疫療法用抗体の細胞障害活性の検討
3. 学会等名 第39回日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akihiro Kambara, Naosuke Nonoguchi, Yoshihide Hattori, Seigo Kimura, Tomohiro Ihata, Shinji Kawabata, Masahiko Wanibuchi
2. 発表標題 Near-infrared immunotherapy for glioblastoma using a combination of photosensitive antibodies targeting EGFR and IL13R 2
3. 学会等名 1ST JCA-AACR PRECISION CANCER MEDICINE INTERNATIONAL CONFERENCE (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浦原 明宏, 野々口 直助, 服部 能英, 木村 誠吾, 井畑 知大, 川端 信司, 鱈淵 昌彦
2. 発表標題 膠芽腫に対するEGFRとIL13Ra2を標的とした近赤外光線免疫療法
3. 学会等名 第21回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関