

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07189

研究課題名（和文）マウス肺癌モデルを用いたCD73を標的とした赤外光線免疫療法の確立

研究課題名（英文）Establishment of near-infrared photoimmunotherapy targeting CD73 using mouse lung cancer model

研究代表者

畑中 豊（Hatanaka, Yutaka）

北海道大学・大学病院・特任准教授

研究者番号：30589924

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：がん微小環境において、アデノシン産生が亢進するとリンパ球上のA2受容体を介して免疫抑制状態を誘導し、免疫チェックポイント阻害（ICI）療法に対し抵抗性を示す。本研究では、AMPをアデノシンに変換する酵素であるCD73を標的とした近赤外光線免疫療法（NIR-PIT）の確立をマウス肺癌モデルを用いて行った。CD73陽性マウス肺癌細胞株の同種異所移植マウスに対し、CD73-IR700複合体を用いたNIR-PITを行ったところ、抗腫瘍効果が確認された。さらに抗PD-1治療との併用によりその効果はさらに増強し、CD73を標的とした本治療単独およびICI併用療法のin vivoでの有効性が証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、アデノシンカスケードにおいて細胞外アデノシンの生成の律速ステップであるCD73を標的としたNIR-PIT単独療法および抗PD-1抗体を用いた免疫チェックポイント阻害（ICI）療法を上乗せした併用療法の有効性がマウス肺癌細胞株移植腫瘍モデルにおいて示された。NIR-PITは新規治療技術であり、またCD73は新規がん免疫関連標的分子であることから、新たな治療選択肢の提供に向けた臨床開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：In the cancer microenvironment, enhanced adenosine production induces immune suppression through the A2 receptor on lymphocytes, leading to resistance to immune checkpoint inhibitor (ICI) therapy. In this study, we established near-infrared light immunotherapy (NIR-PIT) targeting CD73, an enzyme that converts AMP to adenosine, using a mouse lung cancer model. When NIR-PIT with CD73-IR700 complex was performed on syngeneic transplanted mice with CD73-positive mouse lung cancer cell lines, anti-tumor effects were observed. Furthermore, the combination with anti-PD-1 therapy further enhanced its efficacy, demonstrating the effectiveness of this therapy targeting CD73 alone and in combination with ICI therapy by anti-PD-1 in vivo.

研究分野：分子診断

キーワード：CD73 免疫チェックポイント阻害治療 非小細胞肺癌

## 様式 C - 19 , F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 期の NSCLC 患者に対しては、薬物療法が行われる。このうち非扁平上皮 NSCLC で、かつドライバー遺伝子変異陽性の場合には、分子標的治療が行われるものの、扁平上皮癌の多くは分子標的治療が行われない。またドライバー遺伝子変異陰性 NSCLC 患者に対しては、近年免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) 単独療法あるいは化学療法との併用療法が使用されるが、その効果は限定的である。そのため、NSCLC に対する新規治療法の開発が望まれている。

(2) がん細胞は低酸素状態になると膜型酵素である CD39 や CD73 の発現を上昇させることが知られている。CD39 はアデノシン三リン酸(ATP)をアデニル酸(AMP)に変換する酵素であり、エクト-5'-ヌクレオチダーゼとして知られる CD73 (NT5E)は、AMP をアデノシンに変換する酵素である。がん微小環境においてがん細胞は、アデノシンを生成し、T 細胞や NK 細胞上の A2a アデノシン受容体に結合することで、免疫を不活化させ、「免疫抑制状態」を成立させる。また、アデノシンは PD-L1 の発現を上昇させることで、細胞傷害性 T 細胞の活性を阻害する。したがって、「免疫抑制状態」にあるがん細胞において CD73 を阻害することで、自己のがん免疫を再活性化することができると考えられる。

(3) これまでの研究において、ヒト肺扁平上皮癌組織の 37%で CD73 発現し、CD73 高発現群は低発現群と比較し有意に予後不良であり、また正常肺にはほとんど発現がないこと、ヒト肺扁平上皮癌組織および由来細胞株において CD73 と PD-L1 発現が有意に相関していること、CD73/PD-L1 共発現群は、他群と比較し、極めて予後不良となることを明らかにした。以上より、臨床研究においても CD73 発現ががん免疫に関係し、肺扁平上皮癌の予後に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

(4) 近赤外線免疫療法 (Near-infrared photoimmunotherapy, NIR-PIT) は、がん細胞に選択性の高い抗体-IR700 結合体の集積した腫瘍に近赤外光を照射することで、周囲の正常細胞に影響を与えず、がん細胞のみを特異的に攻撃する新たな治療法であり (Nat Med 2011), EGFR を標的とした Cetuximab-IR700 結合体 (ASP-1929) の臨床試験では有望な結果が得られている。NIR-PIT は標的がん細胞の細胞膜を傷害して細胞を破裂させることで、いわゆる「免疫原性細胞死」が誘導される。これによりがん免疫が活性化され、遠隔転移など別な箇所が存在するがん組織への傷害を引き起こす (アブスコパル効果)。

### 2. 研究の目的

本研究では、マウス肺癌モデルを用いた CD73 を標的とした IR700 結合体を利用した近赤外線免疫療法および ICI との併用療法の検証を行う。近赤外線照射後に起こるいわゆる「免疫原性細胞死」によりがん自己免疫の活性化を促し、さらに CD73 を遮断することで免疫抑制状態にある肺癌に対し、がん免疫の再活性化を誘導するものである。またこれに PD-1/PD-L1 経路を阻害する ICI 療法を上乗せすることにより、とくに PD-L1 発現腫瘍に対しより高い治療効果が期待できる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 試薬および細胞株

TY/23-IR700 複合体に作製に用いる IRDye700DX NHS エステルは、楽天メディカル (Tokyo, Japan) より入手し、抗マウス CD73 特異的 mAb である TY23 は、BioXCell (West Lebanon, NH, USA) より購入した。マウス細胞株である LLC (mouse, lung ca.) は ATCC より、CMT167 (mouse, lung ca.) は ECACC より、それぞれ入手した。

#### (2) マウス肺癌細胞株を用いた in vitro における NIR-PIT の評価

NIR-PIT の抗原特異的局在及び効果を評価するために、蛍光顕微鏡での評価を行った。各細胞は 35mm ガラスボトム dish に  $1.0 \times 10^5$  cells を播種させ、37 °C で 24 時間インキュベート後に TY/23-IR700 複合体を  $5 \mu\text{g/ml}$  添加しさらに 37 °C で 24 時間インキュベートさせた。インキュベーション後、細胞を同培地で洗浄し、蛍光観察を行った。また NIR-PIT 後の生/死染色は Calcein AM/Ethidium homodimer-1 (EthD-1) を用いて行った。4well チャンバースライドに  $5.0 \times 10^4$  cells/well を播種させ、37 °C で 24 時間インキュベート後に培地を交換し、TY/23-IR700 を  $5 \mu\text{g/ml}$  添加した。その後さらに 37 °C で 24 時間インキュベートさせ EthD-1 処理 30 分後に、蛍光顕微鏡での観察を行った。照射と観察の前後で生細胞と死細胞の検出を行った。

#### (3) マウス移植腫瘍モデルを用いた in vivo における NIR-PIT の評価

マウスを用いた検討は、「実験動物の飼育と使用に関するガイドライン」に則り、北海道大学動物管理委員会の承認を得て実施した。マウス移植腫瘍モデルには雌性 C57BL/6JJms (SLC) を用いた。CMT167 を 1 匹当たり  $1.0 \times 10^7$  cells を PBS100  $\mu\text{L}$  に懸濁し、マウス左後肢の皮下に移植し

た。細胞注射後、癌が増大するまで同様の環境で飼育した。CD73 に対する NIR-PIT, aPD-1mAb による ICI 治療, およびその併用療法の有効性に関し比較・検討するために左後肢に CMT167 腫瘍を有する 30 匹のマウスを n=5 ずつ, 以下 6 群に無作為に割り付けた; 治療介入を行わなかった群(コントロール群), Light 照射のみを行った群(NIR 照射単独群), TY/23(aCD73mAb)-IR700 の投与のみ(Ab-IR700 投与単独群), CD73 に対する NIR-PIT 治療を行った群(PIT 単独群), RMP1-14(aPD-1mAb)による ICI 治療を行った群(ICI 投与単独群), PIT に ICI 治療を併用した群(PIT+ ICI 併用群)。治療スケジュールを図 1 に示す。各治療に関しては, 治療開始日を day0 として, day6 までを 1 クールとした。PIT に関しては CD73-IR700 結合体 100  $\mu$ g を day0 に尾静注にて投与をし, day1 に NIR 照射を行った。ICI に関しては aPD-1mAb を day0 に 200ng 腹腔内投与し, それ以降は隔日(day2, 4, 6)で 100ng ずつ投与した。これを 2 クール行い, それ以降治療は行わずに観察をした。30 匹のマウスの IR700 蛍光イメージングを IVIS Lumira In vivo Imaging System を用いて, Day1, 2, 3, 6 に行った。

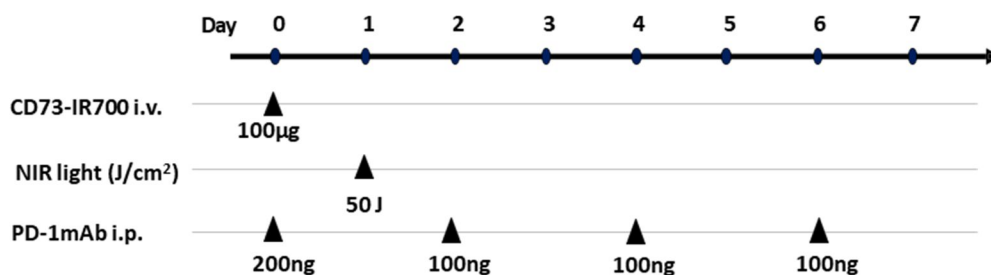


図1 C57/BL6Jマウス肺癌移植腫瘍モデルを用いた投与・照射スケジュール。

#### 4. 研究成果

##### (1) マウス肺癌細胞株を用いた in vitro における NIR-PIT の評価

CD73-IR700 複合体は, マウス肺癌細胞株に結合後, NIR 照射を行うことにより, 壊死性細胞死が誘導された(図 2)。

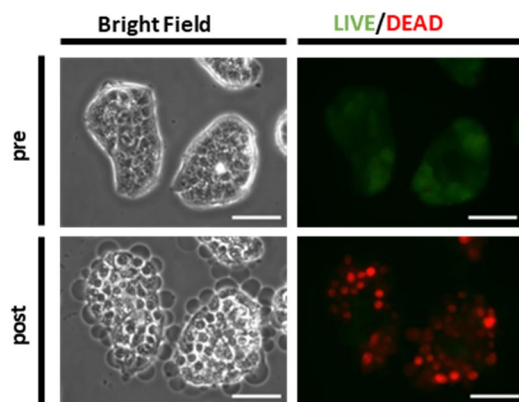


図2 マウス肺癌細胞株に対する抗CD73-IR700結合体を用いた NIR-PITによる細胞死の誘導

##### (2) マウス移植腫瘍モデルを用いた in vivo における NIR-PIT の評価

CD73 陽性腫瘍に対する NIR-PIT, 抗 PD-1 治療およびその併用療法の in vivo での有効性を IVIS でのイメージングにより確認を行った。Ab-IR700 投与単独群マウスにおいては, 腫瘍部に特に薬剤が集積し最も強い蛍光シグナルを認めた(図 3a) PIT 単独群と PIT+ ICI 併用群は Day1 の照射後に IR700 の蛍光シグナルの低下を認めた。Day2 以降は体内への薬剤は徐々に wash out され減弱した。6 群の観察期間中の腫瘍体積の経時変化を図 3b に示す。PIT 単独群, ICI 治療単独群, PIT+ ICI 併用群は他の群と比べて腫瘍増大は抑制された。この中で PIT+ ICI 併用群の腫瘍増大抑制効果が最も高く, コントロール群(day16), NIR 照射単独群(day14), Ab-IR700 投与単独群(day12, day14, day16)いずれと比較しても腫瘍増大は有意に抑制された(図 3b)。また屠殺までの期間の生存解析を行ったところ, 6 群比較において予後に有意差を認め, PIT+ ICI 併用群が最も長く生存した( $p < 0.01$ )(図 3c)。

本研究の結果から, マウスモデルでの CD73 を標的とした NIR-PIT ならびに NIR-PIT と抗 PD-1 併用療法の有効性が証明された。

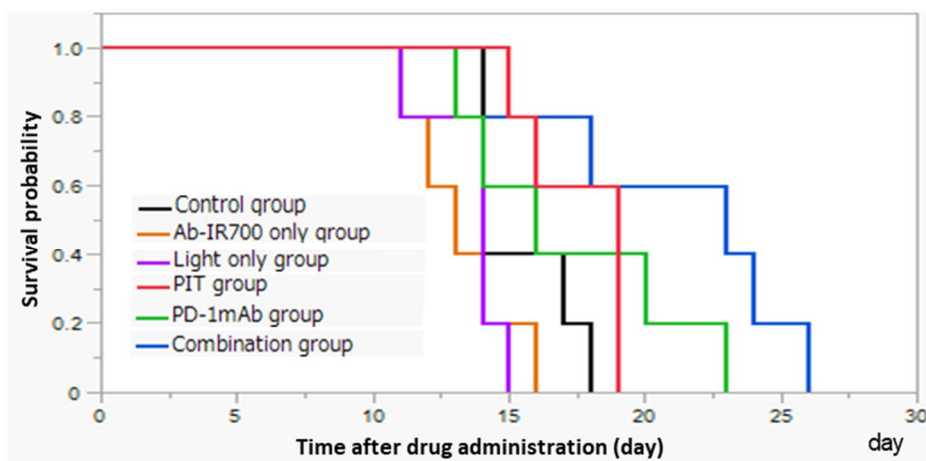
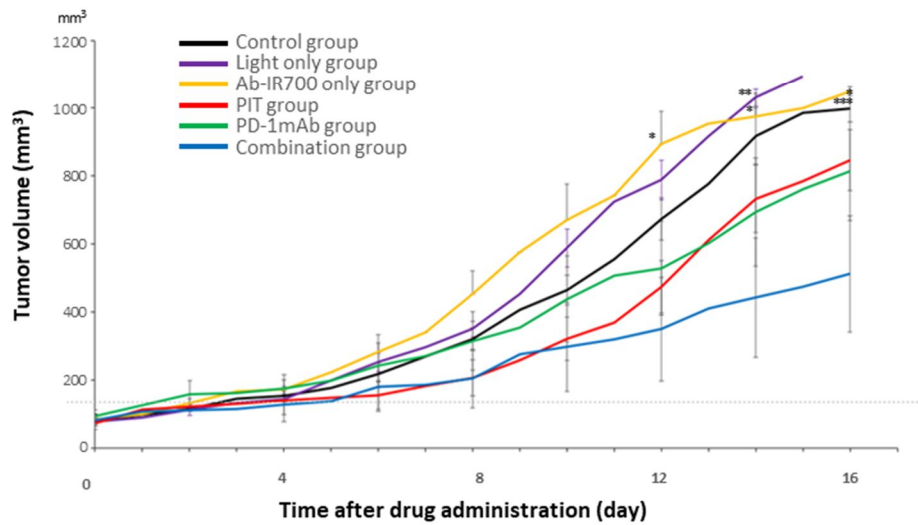
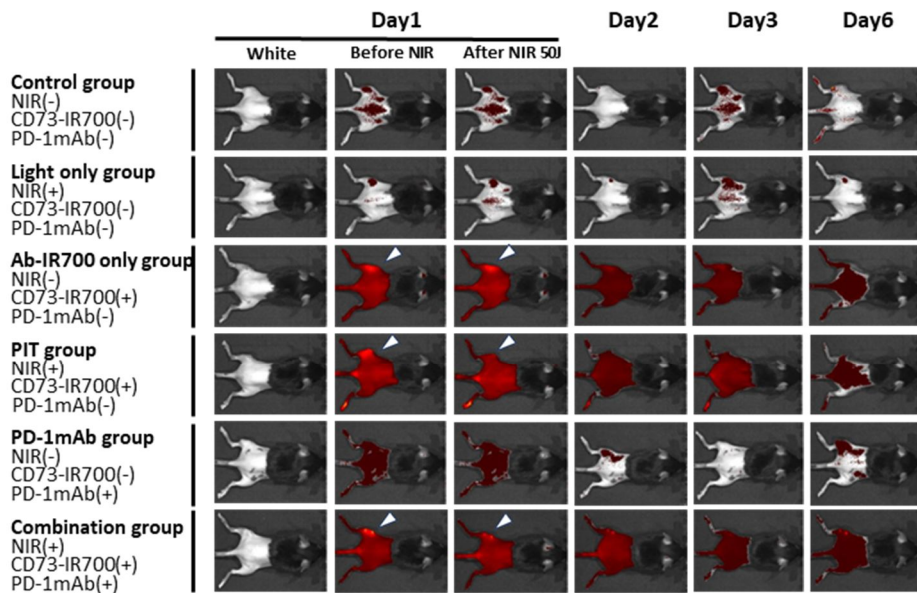


図3 C57/BL6Jマウス肺癌移植腫瘍モデルを用いたin vivo治療効果の評価  
a; IVISによるイメージングを用いた画像評価, b; 治療群間の腫瘍体積の経時変化,  
c; 治療群間の生存解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takahashi Hirofumi, Sakakibara Konishi Jun, Furuta Megumi, Shoji Tetsuaki, Tsuji Kosuke, Morinaga Daisuke, Kikuchi Eiki, Kikuchi Junko, Noguchi Takuro, Hatanaka Kanako C., Hatanaka Yutaka, Shinagawa Naofumi, Konno Satoshi	4. 巻 114
2. 論文標題 Notch pathway regulates osimertinib drug-tolerant persistence in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1635 ~ 1650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15674	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuda Hiroyuki, Ogawa Toru, Sadatsuki Yasunari, Tsujino Toshiaki, Wada Shingo, Kim Seok-Won, Hatanaka Yutaka	4. 巻 61
2. 論文標題 Budget impact analysis of next-generation sequencing versus sequential single-gene testing in Japanese patients with advanced non-small-cell lung cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 61 ~ 73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2022.10.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morii Eiichi, Hatanaka Yutaka, Motoi Noriko, Kawahara Akihiko, Hamakawa Shinji, Kuwata Takeshi, Nagatomo Tadasuke, Oda Yoshinao, Okamoto Aikou, Tanaka Ryota, Iyoda Akira, Ichiro Maeda, Matsuo Yukiko, Nakamura Nobuyuki, Nakai Tokiko, Fukuhara Mei, Tokita Kazuya, Yamaguchi Tomohiko, Takenaka Masataka, et al.	4. 巻 90
2. 論文標題 Guidelines for Handling of Cytological Specimens in Cancer Genomic Medicine	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pathobiology	6. 最初と最後の頁 289 ~ 311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000528346	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Naka Tomoaki, Hatanaka Yutaka, Tabata Yukiko, Takasawa Akira, Akiyama Hideo, Hida Yasuhiro, Okada Hiromi, Hatanaka Kanako C., Mitsuhashi Tomoko, Kushitani Kei, Amatya Vishwa Jeet, Takeshima Yukio, Inai Kouki, Kaga Kichizo, Matsuno Yoshihiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Identification of Novel Diagnostic Markers for Malignant Pleural Mesothelioma Using a Reverse Translational Approach Based on a Rare Synchronous Tumor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 316 ~ 316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics12020316	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hirai Noriko, Hatanaka Yutaka, Hatanaka Kanako C., Uno Yuji, Chiba Shin-Ichi, Umekage Yasuhiro, Minami Yoshinori, Okumura Shunsuke, Ohsaki Yoshinobu, Sasaki Takaaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Cyclin-dependent kinase 4 upregulation mediates acquired resistance of dabrafenib plus trametinib in BRAF V600E-mutated lung cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Lung Cancer Research	6. 最初と最後の頁 3737 ~ 3744
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/tlcr-21-415	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Morimoto Hirofumi, Hida Yasuhiro, Maishi Nako, Nishihara Hiroshi, Hatanaka Yutaka, Li Cong, Matsuno Yoshihiro, Nakamura Toru, Hirano Satoshi, Hida Kyoko	4. 巻 12
2. 論文標題 Biglycan, tumor endothelial cell secreting proteoglycan, as possible biomarker for lung cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thoracic Cancer	6. 最初と最後の頁 1347 ~ 1357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1759-7714.13907	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	加藤 達哉 (Kato Tatsuya) (20624232)	北海道大学・大学病院・教授  (10101)	
研究分担者	小川 美香子 (Ogawa Mikako) (20344351)	北海道大学・薬学研究院・教授  (10101)	
研究分担者	畑中 佳奈子 (Hatanaka Kanako) (10399834)	北海道大学・大学病院・特任講師  (10101)	

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
---------	---------