

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19459

研究課題名（和文）外部からの光照射を必要としない革新的な光免疫療法の開発

研究課題名（英文）Development of photoimmunotherapy that not require external light irradiation

研究代表者

花岡 宏史（Hanaoka, Hirofumi）

関西医科大学・附属光免疫医学研究所・教授

研究者番号：50361390

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：放射性薬剤からのチェレンコフ光による外部からの光照射を必要としない新たな光免疫療法を確立することを計画した。抗体に対して光感受性色素であるIR700を結合したIR700結合抗体に対してクリック反応により90Y標識薬剤を導入したが、チェレンコフ光によるIR700の化学変化は認められなかった。その理由として、90YとIR700の距離がまだ離れすぎているからではないかと考えた。そこでIR700と放射性核種の距離がもっと近いIR700結合ペプチドのTyr残基に対して76Brを導入したところ、溶液のIR700由来の青色の消失が観察され、IR700の化学的変化が起こったことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光免疫療法は新たながん治療法として注目されており、臨床において優れた治療効果を示している。しかし光免疫療法においては、がんに対してどのように光を照射するかというのが一つの課題である。外部からの光照射を必要としないチェレンコフ光による新たな光免疫療法を確立できれば、光免疫療法をより多くのがんに適応可能になると考えられる。本研究において、放射性核種と光感受性色素であるIR700の距離を近づけることで、外部からの光照射と同様の反応を起こせる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We planned to establish a new photoimmunotherapy using cerenkov luminescence from radiopharmaceuticals, which does not require external light irradiation. We conjugated a photoabsorber IR700 to an antibody and reacted with a 90Y-labeled drug by a click reaction, but no chemical change of IR700 by cerenkov luminescence was observed. We thought that the reason for this might be that the distance between 90Y and IR700 was still too far. When 76Br was introduced to the Tyr residue of the IR700-conjugated peptide to make the distance between IR700 and the radionuclide closer, the disappearance of blue color of the IR700 solution was observed, suggesting that a chemical change of IR700 had occurred.

研究分野：放射線科学

キーワード：光免疫療法 チェレンコフ光 放射性薬剤 クリック反応

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光免疫療法は、光感受性色素である IR700 を結合した抗体を薬剤として体内に投与し、薬剤をがん組織に集積させた後にがん組織全体に光を照射することで、薬剤が結合したがん細胞のみを選択的に殺傷するという新たながん治療法である。2020 年 9 月に頭頸部癌の治療として世界で初めて我が国において認可されており、今後、多くのがんに対する新たな治療法として適応拡大されることが期待されている。一方で光免疫療法においては、がん組織に対して外部から光を照射することが必須である。体の深部のがんに対しては、穿刺下で細い光ファイバーを挿入して光を照射することが検討されているが、光ファイバーによる光の照射にも限界があり、光免疫療法のさらなる発展のためには「新たな光の照射法」の開発が望まれる。

一方、放射性核種 (RI) を有する放射性薬剤において、高エネルギーの線放出 RI を用いた場合に放射線と共に放出される光「チェレンコフ光」が注目されている。このチェレンコフ光には、光免疫療法に用いる IR700 の励起波長領域の光も含まれることから、光免疫療法における光源として利用可能である。従って、IR700 結合抗体と高エネルギー線放出核種を共局在させることで、光を外部から照射することなく光免疫療法を行うことができるのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、チェレンコフ光を用いた外部からの光照射を必要としない新たな光免疫療法を確立することであり、本研究期間においては、チェレンコフ光の照射に適した放射性薬剤を開発し、この薬剤を用いた光免疫療法の基盤技術を構築することを目的とする。チェレンコフ光の光の強さは線のエネルギーに依存することから、様々な RI の中で、線のエネルギーが強く半減期が比較的長いイットリウム-90 (^{90}Y) および臭素-76 (^{76}Br) を選択する。これらの RI で標識した放射性薬剤を用いれば、強いチェレンコフ光を長時間にわたり照射できると予想され、光免疫療法に用いることで高い治療効果が期待できる。光免疫療法薬である IR700 結合抗体と放射性薬剤とは、反応性が高く生体内でも進行することが知られているクリック反応を利用し、がん細胞表面で両者を結合させるという戦略を考えた。一方でエネルギーの強い線を用いた場合、骨髄や他臓器の放射線被ばくが懸念されることから、がん特異的に集積する放射性薬剤の開発が必要である。以上のような観点を考慮して、新規放射性薬剤を開発し、IR700 結合抗体を投与して一定時間後に抗体に対して特異的に結合する線放出核種標識薬剤を投与するという 2 段階の薬剤投与法を確立することで、外部からの光照射なしで光免疫療法の実施を目指す。

3. 研究の方法

1) 光免疫療法に適した放射性薬剤の開発

RI としては、高エネルギー線放出核種である ^{90}Y および高エネルギー +線 (ポジトロン) 放出核種である ^{76}Br を選択した。またクリック反応としては、生体内においても速やかに反応することが報告されているテトラジン (Tz) と Trans-Cyclooctene (TCO) の組み合わせを選択した。 ^{90}Y に関しては、リンカーを介してキレート剤である DOTA とテトラジンを結合した DOTA-Tz に対して標識を行い ^{90}Y -DOTA-Tz を得た。一方、光免疫療法薬となる抗体側としては、上皮成長因子受容体 (EGFR) に対する抗体「セツキシマブ」に対して光感受性色素である IR700 および TCO を結合した。チューブ内で、 ^{90}Y -DOTA-Tz と IR700-セツキシマブ-TCO を反応させ、その後の溶液の変化を観察した。 ^{76}Br に関しては、チロシンの側鎖に対してクロロミン T 法で導入することとし、標識前駆体として Tyr-Tz を作製した。 ^{76}Br は研究分担者の石岡が量研機構高崎研究所において製造を行った。

また RI と IR700 との間の距離の影響を検討する目的で、別途ペプチドに対して IR700 が結合した分子を作製し評価を行った。EGFR に対して親和性を持つ環状ペプチドを既報に従い作製し、ペプチド側鎖の Lys 残基に対して IR700 を結合した。この IR700 ペプチドに対して、クロロミン T 法により ^{76}Br 標識を行い、溶液の変化を観察した。

2) 放射性薬剤のマウス体内動態の検討

担がんマウスに対して TCO-セツキシマブを投与し、翌日に血中の抗体をクリアランスさせる目的で Tz-ガラクトースアルブミンを投与、その後 ^{111}In -DOTA-Tz を投与し、経時的に各臓器の重量と放射能を測定することで放射性薬剤の体内分布を検証した。対照群として、あらかじめ TCO-セツキシマブと ^{111}In -DOTA-Tz を反応させた後に投与し、同様に体内分布実験を実施した。

4. 研究成果

DOTA-Tz を ^{90}Y 標識することで ^{90}Y -DOTA-Tz を作製することができた。ただし HPLC で分取を行ったが、前駆体である DOTA-Tz を完全に除去することはできなかった。IR700-セツキシマブ-TCO と ^{90}Y -DOTA-Tz をチューブ内で混合したところ、高分子画分 (抗体画分) に放射能が認められたことから、溶液中でクリック反応が進行し、 ^{90}Y が抗体に結合したことが示唆された。その後、溶液の変化を観察したが、色の変化は観測されなかったことから、チェレンコフ光による IR700 の化学変化が起こらなかったと想定された。その理由として、放射性核種である ^{90}Y と IR700 の

距離がまだ離れすぎているからではないかと考えた。両者は抗体の Lys 残基側鎖のアミンに対してランダムに導入されるが、距離的に近くなる確率はそれほど高くないと予想される。そこで IR700 と放射性核種の距離がより近くなるようなモデル化合物を作製し、RI と IR700 の距離の関係性を検討することとした。化合物としては IR700 結合ペプチドの Tyr 残基に対して ^{76}Br を導入することで、一分子のペプチド中に RI と IR700 の両者が結合する分子を作製することとした(下図 1 左)。その結果、IR700 ペプチドをクロラミン T 法により ^{76}Br 標識することで、1 日後には溶液の IR700 由来の青色の消失が観察され、IR700 の化学的変化が起こったことが示唆された(下図 1 右)。一方でクロラミン T を入れずに ^{76}Br を混合した場合には、色の変化は観察されなかったことから、この色の変化は ^{76}Br がペプチドの Tyr 残基に導入されたことにより生じた変化であり、チェレンコフ光により IR700 の化学変化が起こったことが示唆された。また、IR700 標識抗体に対して同様にクロラミン T 法により ^{76}Br 標識検討を行ったところ、色の変化は認められなかったことから、やはり RI と IR700 間の距離が重要であることが示唆された。

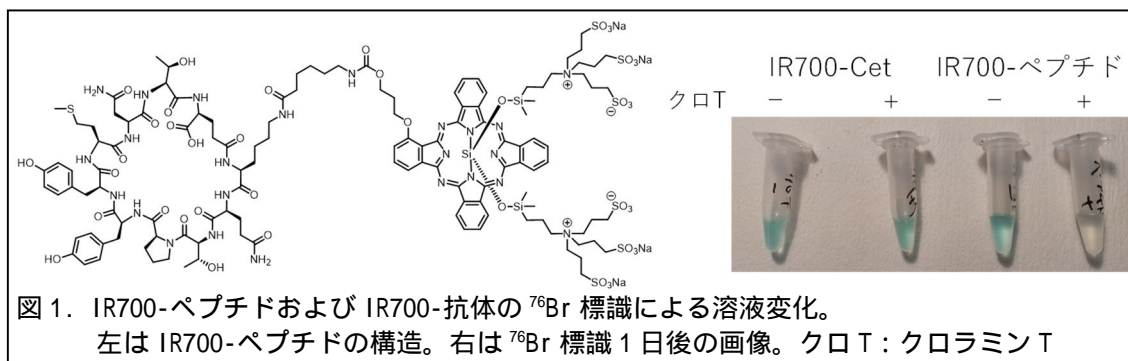


図 1. IR700-ペプチドおよび IR700-抗体の ^{76}Br 標識による溶液変化。

左は IR700-ペプチドの構造。右は ^{76}Br 標識 1 日後の画像。クロ T: クロラミン T

そこで抗体標識において IR700 と RI の距離が常に近くなるための新たな戦略として、IR700 と TCO を結合した化合物を設計・合成し、これを抗体に結合するという考え方を考えた。この分子設計では、TCO は IR700 近傍のみに存在するため、RI は Tz と TCO とのクリック反応により常に IR700 の近傍に配置されることとなる。IR700 をシステインのアミンに結合し、TCO にマレイミドを導入しシステインのチオールと反応させることで IR700-TCO 標識試薬を作製、NHS エステルを介して抗体に導入した。上述と同様に ^{90}Y -DOTA-Tz を作製し、IR700-TCO-抗体に対して溶液中において反応させたが、抗体に対して ^{90}Y -DOTA-Tz を結合させることができなかった。この原因として一つには前駆体の DOTA-Tz が混入しているため、TCO への ^{90}Y -DOTA-Tz が阻害されたためと考えられた。また得られた IR700-TCO 標識薬剤が少量であり、十分量を抗体に結合させることが出来なかった、また少量の抗体での実験となってしまったことも要因と考えられる。今後は IR700-TCO 標識試薬をスケールアップして合成し、さらなる評価を行う予定である。

一方、担がんマウスに対して TCO-抗体を投与した後に ^{111}In -DOTA-Tz を投与し、薬剤の体内動態を検討したところ、血液クリアランスが早く腫瘍集積性は不十分であった(下図 2)。チューブ内で先にクリック反応により ^{111}In -DOTA-Tz を TCO 抗体に結合させた後に投与した検討においては、投与 24 時間後に 30%dose/g 以上の腫瘍集積が観察されたことから、TCO 抗体と ^{111}In -DOTA-Tz との反応性は問題なく、生体内において両者が出会わなかったことが推察される。すなわち、 ^{111}In -DOTA-Tz の血液クリアランスが早く腫瘍に移行しないため、TCO 抗体との間でクリック反応する機会がなかったと考えられた。

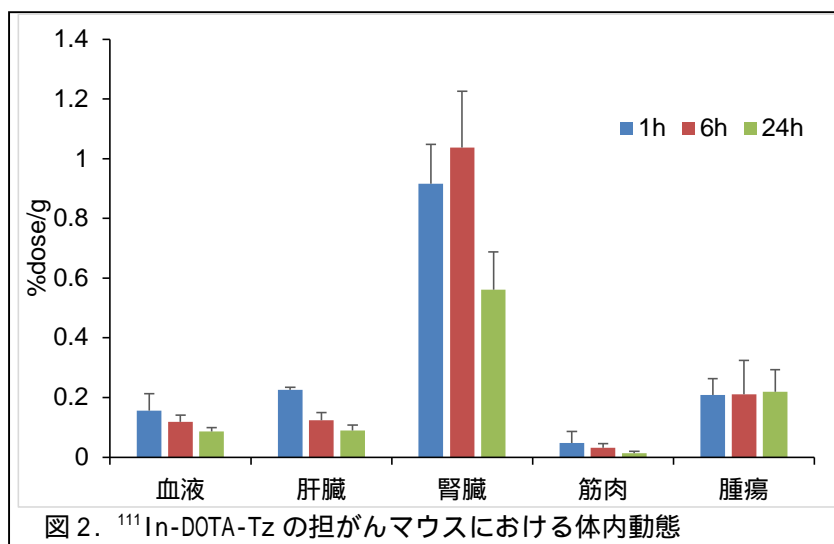


図 2. ^{111}In -DOTA-Tz の担がんマウスにおける体内動態

図 2 のグラフを見ると他臓器からは経時的に消失しているのに対し、腫瘍では滞留性が認められることから、腫瘍へ移行したものは抗体と結合して滞留しているのではないかと考えられる。

以上の結果より、RI と IR700 を近傍に存在させることができれば、チェレンコフ光による光免疫療法を実践できる可能性が示された。今後は適切な IR700-TCO 標識薬剤を作製する必要があると考えられる。一方で、放射性薬剤に関しては、いかに腫瘍に集積させるかが重要課題であり、血中滞留性を増加させる必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	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	石岡 典子 (Ishioka Noriko) (30354963)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用 研究所 放射線生物応用研究部・部長 (82502)	

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