

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16819

研究課題名（和文）光線力学的治療法の免疫賦活効果の解析と免疫チェックポイント阻害療法増強効果の検証

研究課題名（英文）Evaluation of immunostimulatory effect of photodynamic therapy and its potential in enhancing Immunecheckpoint blockade Therapy

研究代表者

山本 新九郎（Yamamoto, Shinkuro）

高知大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00793150

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、免疫チェックポイント阻害薬による腫瘍免疫応答の活性化をさらに増強する治療法を確立するため、5-アミノレブリン酸を用いた光線力学的療法（ALA-PDT）の免疫賦活効果を解析し、それによる免疫チェックポイント阻害療法の増強効果を検証した。実験の結果、ALA-PDT併用により、免疫チェックポイント阻害薬の抗腫瘍効果が増強される傾向を見出した。さらに、制御性T細胞の有無が増強効果に関連している可能性を見出した。ALA-PDTと免疫チェックポイント阻害薬併用療法が有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、5-アミノレブリン酸を用いた光線力学的療法の併用により、免疫チェックポイント阻害薬の抗腫瘍効果が増強される傾向を見出している。現在、免疫チェックポイント阻害薬は、癌薬物治療の中心的薬剤であり、本研究結果は他癌腫への応用も期待されるため、その学術的・社会的意義は大きいと言える。

研究成果の概要（英文）：In this study, immunostimulating effects of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy (ALA-PDT) were analyzed to establish a therapeutic approach to further enhance the activation of tumor immune responses by immune checkpoint inhibitors, and the potentiation of immune checkpoint inhibitor therapy by such therapy was verified. As a result of the experiment, we found a trend that the ALA-PDT combination enhanced the anti-tumor effect of immune checkpoint inhibitors. Furthermore, this study clarified part of the immune mechanism of the enhancement effect and suggested the usefulness of the combination therapy of ALA-PDT and immune checkpoint inhibitors.

研究分野：腫瘍学

キーワード：光線力学的治療 免疫チェックポイント阻害薬 膀胱癌 5-アミノレブリン酸 アブスコパル効果

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害薬は、新たな癌治療として注目され、膀胱癌を含め多くの癌に対する治療法として広く普及してきている。免疫チェックポイント阻害薬の主な治療標的は、活性化 T 細胞の表面に発現する受容体である Programmed cell death 1 (PD-1) や、抗原提示細胞の表面や血管内皮そして癌細胞の表面に発現する Programmed death-ligand 1(PDL-1)である。免疫チェックポイント阻害薬を用いた癌免疫療法の今後の課題は、免疫チェックポイント阻害薬による腫瘍免疫応答の活性をより高めることである。そして、免疫チェックポイント阻害薬と免疫賦活効果を有する治療法との併用療法を開発することは、その課題解決の方法の一つと考えられる。そこで、癌特異性が高く、低侵襲な治療法である 5-アミノレブリン酸を用いた光線力学的治療 (photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid : ALA-PDT)に着目した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、癌特異性が高く低侵襲な治療である ALA-PDT の免疫賦活効果を解析するとともに、ALA-PDT 併用による免疫チェックポイント阻害療法の抗腫瘍効果増強効果を評価し、免疫チェックポイント阻害薬との併用に有用な免疫賦活効果を持つ新たな治療法を確立することである。

3. 研究の方法

細胞株の選定：動物実験に適した細胞株を選定するため、PDL-1 阻害薬を投与した先行報告のある 2 つのマウス膀胱癌細胞株 (MBT-2, MB-49) を選択した。

ALA-PDT の治療メカニズムとして、ALA 投与により、癌細胞特異的に PpIX が異常集積し、そこに励起光が照射されると、活性酸素種が発生し、細胞死が誘導される。そのため、ALA-PDT の治療効果には、活性酸素種の発生が関連する。5-アミノレブリン酸 (5-aminolevulinic acid: ALA) の代謝産物である Protoporphyrin IX (PpIX) の蓄積量、光照射、発生した活性酸素種に対する各細胞株の感受性が影響する。

(1) 5-アミノレブリン酸 (5-aminolevulinic acid: ALA) 投与による各細胞株の Protoporphyrin IX (PpIX) の細胞内蓄積量の評価

マウス膀胱癌細胞株 (MBT-2, MB-49) に ALA を投与し (ALA 濃度条件: 0, 250, 500 μ M), 投与 4 時間後の細胞内 PpIX 蓄積量を flow cytometry で評価した。

(2) 各細胞株の ALA-PDT に対する治療感受性評価

マウス膀胱癌細胞株 (MBT-2, MB-49) に ALA を投与し (ALA 濃度条件: 0, 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000 μ M), 投与 4 時間後に波長 630nm で光照射を行い (3.6J), MTT assay を用いて細胞生存率を評価した。

(2) 各細胞株の PDL-1 発現評価

免疫チェックポイント阻害薬として PDL-1 阻害薬 (抗 PDL-1 抗体) を選定するため、マウス膀胱癌細胞株 (MBT-2, MB-49) の PDL-1 蛋白質発現を評価した (Western Blotting)。

(4) 細胞性免疫保有マウスを用いた多発性担癌マウスモデルによる評価

(1)-(3) の結果から選定した細胞株 (MBT-2) を細胞性免疫保有マウス (C3H/He) の背部 2 箇所皮下移植し、多発性担癌マウスモデルを作製した。免疫チェックポイント阻害薬として PDL-1 阻害薬 (抗 PDL-1 抗体) を選定した。作製した多発性担癌マウスモデルを 4 群 (コントロール群、PDL-1 阻害薬単独群、ALA-PDT 単独群、PDL-1 阻害薬+ ALA-PDT 併用群) に分け、動物実験を行った。

ALA-PDT に関しては、ALA 溶解液を腹腔内投与し、投与 3 時間後に光照射を行った。PDL-1 阻害薬+ALA-PDT 併用群は、PDL-1 阻害薬投与下に、背部 2 箇所の腫瘍の片側にのみ ALA-PDT を実施した。ALA-PDT を実施した腫瘍を「PDT 治療腫瘍」、実施しなかった腫瘍を「非 PDT 治療腫瘍」とした。非 PDT 治療腫瘍において、腫瘍組織の免疫学的な因子 (CD8 陽性 T 細胞等) と治療効果 (経時的腫瘍体積、腫瘍組織染色による評価) の解析を行い、ALA-PDT による免疫賦活効果と ALA-PDT による免疫チェックポイント阻害療法増強効果を評価した。

4. 研究成果

- (1) ALA 投与による各細胞株の Protoporphyrin IX (PpIX) の細胞内蓄積量の評価
MBT-2 では、ALA 投与後の細胞内 PpIX 蓄積量は、ALA 濃度条件 (0, 250, 500 μ M) と正の相関を示した。MB-49 でも同様の傾向がみられた。
- (2) 各細胞株の ALA-PDT に対する治療感受性評価
MBT-2 および MB-49 では、ALA-PDT 後の細胞生存率は、ALA 濃度の相関を示した。特に、ALA 濃度が 125 μ M 以上で細胞生存率の顕著な低下を示した。治療感受性としては、MBT-2 の方がやや高かった。
- (3) 各細胞株の PDL-1 発現評価
MBT-2 および MB-49 における PDL-1 蛋白質発現はほぼ同等であった。

以上の *in vitro* 実験の結果から、より ALA-PDT 治療感受性の高いマウス膀胱癌細胞株 MBT-2 を用いて、*in vivo* 実験を行った。

- (4) 細胞性免疫保有マウスを用いた多発性担癌マウスモデルによる評価
PDL-1 阻害剤単独群の腫瘍に比べ、ALA-PDT+PDL-1 阻害剤併用群の非 PDT 治療腫瘍の腫瘍体積は、増殖抑制傾向を示し、ALA-PDT と PDL-1 阻害剤の併用療法が非 PDT 治療腫瘍に対する PDL-1 阻害剤の抗腫瘍効果を増強する可能性が示唆された。また、非 PDT 治療腫瘍を用いて、免疫関連細胞に対する免疫組織染色を行い、組織学的評価も行った。その結果、Foxp3 陽性細胞 (制御性 T 細胞) の有無が ALA-PDT による PDL-1 阻害剤抗腫瘍効果の増強効果と関連している傾向がみられた。

本研究により、*in vitro* 実験からはマウス膀胱癌細胞株 (MBT-2, MB-49) に対する ALA-PDT の治療感受性が明らかとなり、*in vivo* 実験からは、ALA-PDT 併用による PDL-1 阻害剤の抗腫瘍効果増強効果の可能性が示唆された。さらに、その増強効果の免疫メカニズム解明に繋がり得る知見が得られた。本研究成果を活かし、免疫チェックポイント阻害薬の抗腫瘍効果を増強する免疫賦活作用を有する新たな治療法の確立を目指していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shinkuro Yamamoto, Hideo Fukuhara, Shun-ichiro Ogura, Keiji Inoue
2. 発表標題 Evaluation of the enhanced anti-tumor effect of Immune checkpoint inhibitor therapy in combination with photodynamic therapy
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2023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
---------	---------