

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26710010

研究課題名(和文)近赤外光を利用したがんの蛍光分子診断と光線免疫療法の確立

研究課題名(英文)Development of molecular-specific cancer theranostics utilizing near-infrared light and monoclonal antibody

研究代表者

光永 真人(Mitsunaga, Makoto)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：40433990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：がん分子標的モノクローナル抗体と生体に無害な近赤外光を吸収して蛍光や細胞障害性を惹起する光感受性物質を結合させた化合物を用いて、近赤外光の照射によりがん細胞のみを分子標的・特異的に破壊する治療法であるphotoimmunotherapy(PIT)を多様ながんに対してより効果的に適応させるための新たな手法の開発を行った。PITと抗がん剤の併用法、複数の抗体化合物併用によるPIT、多機能抗体化合物を用いたPITについて開発を行い報告した。

研究成果の概要(英文)：Photoimmunotherapy (PIT) is a recently developed molecular-targeted cancer theranostics based on conjugating a near-infrared photoactivatable fluorescence probe to a monoclonal antibody targeting cancer cell surface molecules. In this project, we have developed several methods to enhance therapeutic outcomes of PIT. (1) PIT in combination with chemotherapy (2) PIT utilizing two monoclonal antibodies recognizing different epitopes of cancer antigen. (3) PIT utilizing photoactivatable bifunctional antibody-drug conjugates.

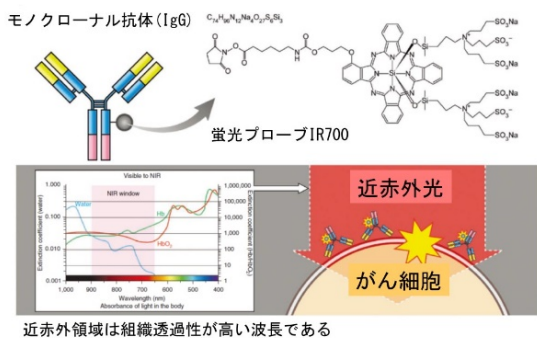
研究分野：腫瘍治療学

キーワード：がん 分子イメージング 近赤外光 抗体療法

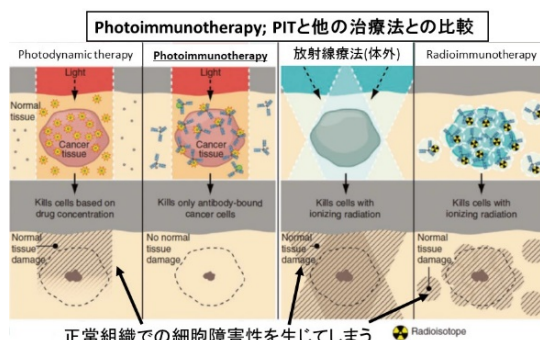
1. 研究開始当初の背景

手術療法、抗がん剤治療および放射線治療は、現代のがんに対する三大治療法であるが、がん分子標的モノクローナル抗体に代表される分子標的薬が抗がん剤と共に広く使われるようになり、治療効果が向上した結果、がん患者の予後は改善してきている。しかし、分子標的薬が単剤でがん患者に効果を示す疾患には限りがあることが知られており、その効果を高めるための方法について以前より盛んに研究がなされてきた。モノクローナル抗体に放射性物質やトキシンを結合させ、モノクローナル抗体を標的組織へのキャリアーとして使用する方法が現在臨床応用されているが、放射性物質やトキシン固有の総投与量に関連した治療毒性が存在することから、治療効果には限界が存在する。

この問題を解決するため、研究代表者らはがん分子標的モノクローナル抗体と、生体に無害な近赤外光を吸収して蛍光や熱などを産生する蛍光プローブ IR700 を結合させ、がん細胞のみを分子標的的特異的に破壊する方法を開発し、photoimmunotherapy (PIT) と名付けて報告してきた (Mitsunaga et al. Nat Med 2011)。この方法は、近赤外光の照射によってがんの蛍光診断と治療および治療効果の判定が分子標的的特異的に可能となる方法であり、繰り返しの薬剤投与や近赤外光照射でも正常細胞に障害を生じることなく標的細胞に対する治療効果を得ることが可能である (下図参照 Mitsunaga et al. Bioconjugate Chem 2012)。



光感受性物質を投与後に、光感受性物質が腫瘍へ EPR 効果などの機序で集積した状態において、光線療法を施行する光線力学療法 (PDT) と大きく異なり、PIT はモノクローナル抗体が標的的特異的に細胞膜に結合し、近赤外光の照射を受けてはじめて治療効果を細胞選択的に生じるため、副作用の少ない分子標的治療が実現可能である (下図参照: PIT は PDT や放射線療法と異なり正常組織に対する影響が少ない)。



2. 研究の目的

本研究課題では、PIT の臨床応用化を目指すために今後解決すべき問題点を検証し、新たな治療法として開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PIT と抗がん剤の併用による PIT 治療効果の増強効果・補助効果

HER2 分子を発現しているヒト胃がん細胞株 NCI-N87、また、HER2 分子を発現していない MKN-45 および SNU-1 を対象とした。HER2 標的モノクローナル抗体である trastuzumab に対して蛍光プローブ IR700 を結合させた化合物を合成した (Tra-IR700)。上記の細胞株に対して Tra-IR700 を添加し、IR700 の HER2 特異的な局在についてはフローサイトメーターを用いて確認した。また、細胞障害性を示す抗がん剤である 5-fluorouracil (5-FU) を添加した後に細胞障害性について評価した。各細胞における IC₅₀ 濃度は GraphPad Prism 6 software を用いて決定した。次に、上記細胞

株を Tra-IR700 と反応後に近赤外光の照射を行い、細胞膜障害性について評価した。さらに、IC₅₀ の 5-FU と Tra-IR700 を添加後に近赤外光の照射を行い、細胞障害性を評価した。最後に、ヌードマウスに上記細胞株を皮下移植し腫瘍モデルを作製した。腫瘍生着後に Tra-IR700 を静注し IR700 の局在を経時的に評価した。また、IR700 の局在した腫瘍に近赤外光を照射し、腫瘍体積の変化について近赤外光照射群と、非照射群などのコントロール群を比較して治療効果を検討した。

(2)異なるエピトープを認識する複数の抗体化合物の併用による PIT の効果増強

Trastuzumab とは別の HER2 のエピトープを認識するモノクローナル抗体である pertuzumab を用いて pertuzumab-IR700 (Per-IR700) を合成した。HER2 発現細胞および非発現細胞に対して Tra-IR700 および Per-IR700 を添加し、HER2 特異的な局在について蛍光顕微鏡やフローサイトメーターにて評価した。次に、HER2 陽性細胞株に対して、Tra-IR700 と Per-IR700 を添加し、洗浄後に近赤外光を照射し、照射後の細胞障害性について評価した。また、HER2 発現の異なる 6 種類の樹立細胞株 (3T3/HER2、NCI-N87、HCC-1419、HCC-1954、MKN-45、NIH/3T3) に対して Tra-IR700 を添加し、反応後に洗浄し一定の近赤外光を照射した後に細胞の生存率を評価した。最後に、HER2 陽性腫瘍と陰性腫瘍をヌードマウスに移植したモデルを作成し *in vitro* と同様に HER2 選択的蛍光イメージングおよび近赤外光線治療による抗腫瘍効果について評価した。

(3)Bifunctional antibody-drug conjugates による PIT 治療効果増強

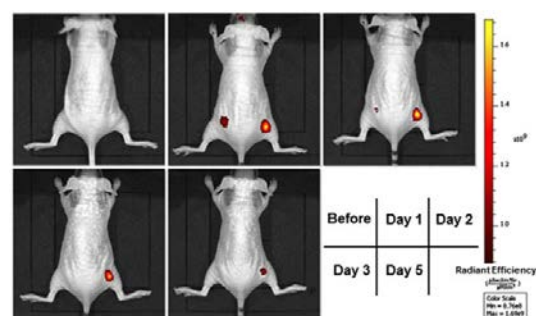
HER2 陽性細胞株に対して、Tra-IR700 (T-IR700) および trastuzumab に IR700 とチューブリン阻害剤 maytansinoid DM1 を結合させた化合物 (T-DM1-IR700) を合成し、*in vitro* お

よび *in vivo* の系において、近赤外光照射による抗腫瘍効果について (1) (2) と同様のモデルを用いて検討した。

4. 研究成果

(1) PIT と抗がん剤の併用による PIT 治療効果の増強効果・補助効果

フローサイトメーターによる HER2 分子発現の解析では、NCI-N87 細胞においてその発現を強く認めたが、MKN-45 および SNU-1 細胞ではほとんど認めなかった。各細胞株の MTS assay による IC₅₀ 濃度は NCI-N87 細胞 4.623 ± 0.421 μM (mean ± SE)、MKN-45 細胞 3.52 ± 0.829 μM、SNU-1 細胞 13.10 ± 0.914 μM であった。細胞に対して Tra-IR700 および IC₅₀ 濃度の 5-FU と 24 時間反応後近赤外光の照射を行ったところ、NCI-N87 細胞では trastuzumab による抗体依存性細胞障害性 (ADCC) に加えて、近赤外光の照射量に依存した細胞障害性を認め、その効果は 5-FU の添加により優位に増強された。一方で、MKN-45 細胞および SNU-1 細胞においてはわずかに 5-FU の効果がみられるのみで、trastuzumab や近赤外光による細胞障害性は認めなかった。NCI-N87 細胞および MKN-45 細胞をヌードマウスへ皮下移植し、腫瘍モデルを作製し Tra-IR700 を静注したところ、HER2 特異的な IR700 の局在を *in vivo* イメージングシステムにて 24 時間後より確認可能であった。IR700 の標的腫瘍特異的な集積は、Tra-IR700 静注 24~48 時間後に最も高かった (下図)。そこで、Tra-IR700 静注



24 時間後に IR700 集積腫瘍に対して近赤外光を照射すると、対照群に比して腫瘍体積の増

大を抑制することが可能であった。更に、その効果は 5-FU の併用投与により増強された。

(2) 異なるエピトープを認識する複数の抗体化合物の併用による PIT の効果増強

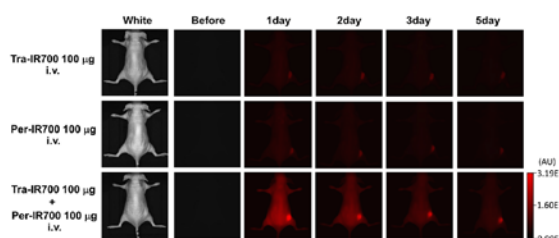
蛍光顕微鏡を用いた解析から trastuzumab および pertuzumab は HER2 陽性細胞の細胞膜およびリソソームに局在していた。Tra-IR700 および Per-IR700 との反応によって、HER2 標的特異的かつ用量依存的に IR700 のシグナルは増加したが、 $10 \mu\text{g/mL}$ の濃度以上では標的分子の飽和により、シグナルの増加は見られなかった。一方で、Tra-IR700 と Per-IR700 を併用し細胞株へ添加すると、単剤投与では得られないシグナルの増強を認めた。細胞障害性の検討では、Tra-IR700 または Per-IR700 に近赤外光照射を加えると、有意な細胞障害性が誘導され、さらに、併用投与群では細胞障害性が有意に増強された。また、近赤外光による細胞障害性は光のエネルギーに依存して増強された。HER2 発現の異なる 6 種類の樹立細胞株を用いた PIT による細胞障害性の検討では、HER2 の発現、つまり、IR700 の強度に比例して近赤外光による細胞障害性が誘導された。HER2 陽性腫瘍と陰性腫瘍をヌードマウスに移植したモデルを作成し、腫瘍生着後に Tra-IR700 と Per-IR700 を併用投与し、*in vivo* イメージングシステムにて 24 時間後に観察したところ、HER2 選択的な IR700 のシグナルの局在を認めた。一方で、HER2 陰性腫瘍に対する集積はほとんど観察されなかった。一定の大きさに至った HER2 陽性腫瘍に対して Tra-IR700 および Per-IR700 を投与し、経時的に IR700 の蛍光強度を測定し観察したところ、投与用量に依存して IR700 のシグナル

強度は増強され、また、併用投与にて有意なシグナルの増強を認めた (前図)。シグナル強度の最も高い静注 24 時間後の状態で、近赤外光の照射を行ったところ、HER2 選択的かつ IR700 のシグナル強度に依存した治療効果が得られた。

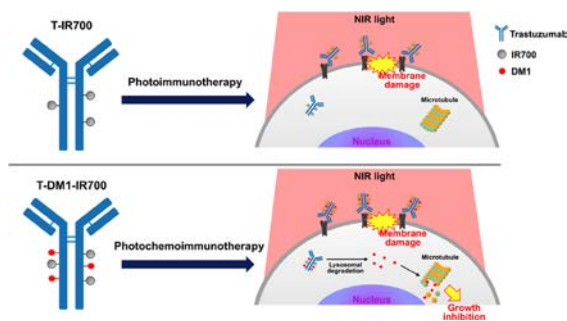
同一抗原の異なるエピトープを認識する抗体の併用、または、異なる抗原を認識する抗体の併用による PIT は治療効果を増強させる手法として有用であると考えられた。

(3) Bifunctional antibody drug conjugates による PIT 治療効果増強

Trastuzumab 1 分子に対して抗がん物質 maytansinoid DM1 は 3~3.5 分子、また光感受性物質 IR700 は 3~4 分子結合させた。新規化合物は質量分析により結合物質に応じた分子量の変化を確認できた。新規化合物 trastuzumab-DM1-IR700 (T-DM1-IR700) は、既存の trastuzumab や trastuzumab-IR700 (T-IR700) と比べて HER2 陽性がん細胞に対する抗体の特異的結合性に変化は見られなかった。次に、*in vitro* における細胞障害性について trastuzumab、T-IR700、T-DM1、T-DM1-IR700 と近赤外光照射の有無で比較したところ、T-DM1-IR700 に近赤外光を照射した群では、T-IR700 に近赤外光を照射した群や T-DM1 による処置群と比べて細胞障害性の増強効果を認めた。次に、*in vivo* 皮下腫瘍モデルにおける T-DM1-IR700 の結合性および近赤外光照射による治療効果について *in vitro* 同様の対照と比較検討を行った。*In vivo* imaging system による蛍光分子イメージングでは T-DM1-IR700 は T-IR700 と同レベルの HER2 特異的腫瘍局在を示し、近赤外光を照射した治療検討では、特に大きな腫瘍モデルにおいて T-DM1-IR700 による近赤外光線療法の有意的治療効果増強が確認された。新規化合物 T-DM1-IR700 は近赤外光が十分に届きにくい巨大腫瘍や深部組織腫瘍において、T-IR700 による光線治療



効果を補完する有望な化合物となり得ることが示唆された（下図）。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 3 件）

- (1) Ito K, [Mitsunaga M](#), Nishimura T, Saruta M, Iwamoto T, Kobayashi H, Tajiri H Near-infrared photochemoimmunotherapy by photoactivatable bifunctional antibody-drug conjugates targeting human epidermal growth factor receptor 2 positive cancer. *Bioconjug Chem.* 査読有 2017;28(5):1458-1469. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00144.
- (2) Ito K, [Mitsunaga M](#), Nishimura T, Kobayashi H, Tajiri H. Combination photoimmunotherapy with monoclonal antibodies recognizing different epitopes of human epidermal growth factor receptor 2: an assessment of phototherapeutic effect based on fluorescence molecular imaging. *Oncotarget.* 査読有 2016;7(12):14143-52. doi: 10.18632/oncotarget.7490.
- (3) Ito K, [Mitsunaga M](#), Arihiro S, Saruta M, Matsuoka M, Kobayashi H, Tajiri H. Molecular targeted photoimmunotherapy for HER2-positive human gastric cancer in combination with chemotherapy results in

improved treatment outcomes through different cytotoxic mechanisms. *BMC Cancer.* 査読有 2016;16:37. doi: 10.1186/s12885-016-2072-0.

〔学会発表〕（計 7 件）

- (1) [Mitsunaga M](#), Nishimura T, Ito K. Vascular endothelial growth factor receptor 2 targeted photoimmunotherapy. *American Association for Cancer Research* 2018. Chicago, IL 2018/04
- (2) Ito K, [Mitsunaga M](#). Near-infrared molecular imaging guided photochemoimmunotherapy by bifunctional antibody-drug conjugates targeting HER2-positive cancer cells. *World Molecular Imaging Congress* 2017. Philadelphia, PA 2017/09
- (3) 伊藤公博、[光永真人](#) 多機能抗体薬物複合体を用いた HER2 特異的的近赤外光線療法 第 76 回日本癌学会学術総会 横浜 2017/09
- (4) [光永真人](#) 蛍光分子イメージングをガイドとした HER2 特異的的近赤外光線免疫療法 第 74 回日本癌学会学術総会 横浜 2016/09
- (5) [Mitsunaga M](#), Ito K, Nishimura T, Tajiri H. Strategies to enhance a treatment effect of HER2-targeted theranostic photoimmunotherapy in experimental human gastric cancer. *Digestive Disease Week* 2016. San Diego, CA. 2016/04
- (6) Ito K, [Mitsunaga M](#), Arihiro S, Saruta M, Matsuoka M, Tajiri H. Molecular targeted theranostic photoimmunotherapy combining two types of monoclonal antibodies targeting different epitopes of

HER2: enhanced phototherapeutic
effect based on fluorescence
molecular imaging. World Molecular
Imaging Congress 2015. Honolulu,
HI. 2015/09

- (7) Ito K, Mitsunaga M, Arihiro S,
Saruta M, Matsuoka M, Tajiri H.
Molecular targeted theranostic
photochemoimmunotherapy for HER2-
positive human gastric cancer in
mice. Digestive Disease Week 2015.
Washington, DC. 2015/05

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：血管を標的とする抗体と光増感剤との
コンジュゲート

発明者：光永真人

権利者：東京慈恵会医科大学

種類：特許

番号：特願 2018-042803

出願年月日：2018/3/9

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

光永 真人 (MITSUNAGA MAKOTO)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：40433990

(2) 研究協力者

伊藤 公博 (ITO KIMIHIRO)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：60794336

西村 尚 (NISHIMURA TAKASHI)

東京慈恵会医科大学・大学院生