

令和元年5月15日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01427

研究課題名(和文) がんとその周辺微小環境を包括的に制御する高効率光免疫療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of integrative photoimmunotherapy of cancer and its microenvironment

研究代表者

白須 直人 (Shirasu, Naoto)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：70551422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、腫瘍関連抗原などの各種マーカー抗原に特異的なビオチン化抗体と、近赤外光感受性物質を結合させたアビジンであるAvIRを用いた新規な光免疫療法(PIT)の確立を目的とした。癌関連線維芽細胞(CAF)とヒト乳癌細胞株との共培養系に対してAvIR-PITを施した結果、CAFに対する強い細胞傷害性とスフェア形成能の抑制が確認された。また、ヒト肝癌細胞株に対する検討では、癌幹細胞性の高いSP細胞群に対してAvIR-PITが著しい殺細胞効果を示すことを明らかとした。これらの結果は、AvIR-PITが腫瘍細胞とその周辺微小環境とを併せて標的とする包括的な癌治療法として極めて有望であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光免疫療法(PIT)は、がん細胞に特異的な抗原に対する抗体と光感受性物質とのコンジュゲートを用いる侵襲性の低い新しいがん治療法として注目されているが、PITを様々ながんに対応させるには、都度そのがんに特化したコンジュゲートを作製する必要があり、高コストで極めて煩雑である。我々は表面抗原に対するビオチン化抗体と、光感受性物質を結合させたアビジン(AvIR)を用いた新規なPIT(AvIR-PIT)の確立を目指した。AvIR-PITは、原理的に如何なる抗原にも対応可能であり、がん細胞のみならず周辺の微小環境をも標的とすることができるため、極めて有効ながん治療法となりうるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to establish a novel photoimmunotherapy (PIT) using a biotinylated antibody specific for various marker antigens, such as tumor-associated antigens, and a near-infrared photosensitizer-conjugated avidin (AvIR). When AvIR-PIT was applied to tumor spheres formed by co-culture of cancer-associated fibroblasts with a human breast cancer cells, strong cytotoxicity and disruption of the spheres were observed. In addition, in studies on human hepatoma cell lines, AvIR-PIT was shown to have a significant cytotoxic effect on SP cells with high cancer stem cell potential. These results indicate that AvIR-PIT holds promise as a comprehensive treatment for cancer that targets tumor cells and their surrounding microenvironment.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：光免疫療法 抗体療法

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体に無害な特定波長の光と光感受性物質の利用により光化学反応を惹起して細胞を傷害する光線力学療法 (PDT) は、低侵襲性で安全性の高い治療法として期待されている。しかしながら、従来の光感受性物質は腫瘍への集積性や選択性が低く、標的傍の正常組織にも光毒性が及ぶといった問題のため、癌の治療法としては一般的ではない。近年、腫瘍関連抗原 (TAA) に特異的な抗体分子と光感受性物質とのコンジュゲートを用いて腫瘍細胞を標的化し、これに対して光照射を行うことで腫瘍細胞のみを殺傷する光免疫療法 (PIT) が注目されている。既に研究代表者は、血中のヘモグロビンや水分子による吸収が少なく生体透過性が高い 690 nm の近赤外光によって励起される光感受性物質・IRDye700DX と、代表的な TAA である抗腫瘍胎児性抗原 (CEA) 抗体とのコンジュゲートを用いて、CEA 陽性腫瘍に特異的な *in vitro* および *in vivo* PIT の成功を報告している。しかしながら、一般に腫瘍は不均一な細胞集団で構成されており、また、病状の進行や放射線・抗癌剤治療の経過等に伴って TAA の発現パターンが動的に変化したり、腫瘍が治療抵抗性を獲得することが知られている。そのため、現行の癌治療法や単一の TAA に対する抗体のみを用いる PIT では、一時的な腫瘍の退縮は見込めても癌根治は極めて困難であると考えられ、事実、研究代表者の報告でも腫瘍細胞の再増殖を認めている。広範な癌種や TAA の発現変化に PIT を有効に適用させるには、様々な TAA に対応した一連の特異的な抗体と光感受性物質のコンジュゲートを都度準備して治療を行う必要があると考えられるが、これは極めて煩雑であり、時間的・経済的なコストが高く現実的ではなかった。

2. 研究の目的

そこで研究代表者は、上記のような問題点を回避して、多様な腫瘍や TAA に適応可能な汎用性の高い PIT を実現するため、アビジンに IRDye700DX を結合させたコンジュゲート (AvIR) を用いた新規な PIT の開発を検討してきた (科研費・若手研究(B): H26-27 年度採択課題)。予め TAA 特異的なバイオチン化抗体 (BioAb) により腫瘍細胞を標識し、これに AvIR を結合させることで PIT の標的とする戦略である。既製品を含め、腫瘍抗原特異的な BioAb は無数に存在しているため、これらを利用できるとなれば PIT の適用範囲は飛躍的に増大する。様々な BioAb を逐次的、あるいは複数種同時に用いることによって、TAA の発現変化に対応可能なユニバーサルな PIT が達成され、異なる TAA を発現するようなヘテロな腫瘍細胞集団のみならず、腫瘍の微小環境を構成する間質細胞や血管内皮細胞、さらには癌幹細胞等をも標的とする包括的な癌治療が可能となる。本研究では、「がんとその周辺微小環境を包括的に制御する高効率光免疫療法の確立」を目標とし、将来的な臨床適用へ向けての *in vitro* および *in vivo* における基礎的研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) BioAb と AvIR を用いた PIT による光毒性効果発現の検証

IRDye700DX の活性エステル体と脱グリコシル化アビジンとの縮合によって AvIR を作製した。併せて、研究代表者の所属研究室にて独自に作製した CEA あるいは EpCAM 特異的な完全ヒト型モノクローナル抗体のバイオチン化を行った。これらの TAA を発現する CHO 細胞あるいはヒト腫瘍細胞株 MKN45 (CEA⁺, EpCAM⁺)、HT29 (CEA⁺, EpCAM⁺) 等を標的として、本研究の治療戦略が有効であるかの検証を実施した。まず、BioAb および AvIR の標的細胞への結合性をフローサイトメトリーにて確認した。培養細胞表面に BioAb および AvIR を結合させた後、LED 照明装置 (ピーク波長: 690 nm) により近赤外光を照射して PIT を行った。PIT 後の細胞生存性の低下を指標とし、その効果を判定した。また、標的結合後の IRDye の局在部位を、共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光イメージングによって調べ、PIT による細胞傷害の分子機構についてアポトーシスやネクローシスのマーカーを指標として精査した。一般に、低酸素腫瘍は各種治療に対する抵抗性が高いとされ、このことは、溶存酸素に由来する ROS 産生が光毒性の発現に必須である通常の光線力学療法が癌治療に有効でない一因となっている。一方、IRDye-PIT は抗腫瘍効果に対する ROS の寄与が小さいことから、低酸素分圧下でも有効である可能性が高いため、低酸素培養条件下の腫瘍細胞に対する AvIR-PIT の効果についても併せて検討した。

(2) 腫瘍関連細胞に対する AvIR-PIT の効果

癌関連繊維芽細胞 (CAF) や新生血管内皮細胞のマーカー膜タンパク質に対する特異的な BioAb を用い、それら腫瘍関連細胞に対する AvIR-PIT を実施してその効果を調べた。まずヒト乳癌組織由来初代 CAF 細胞との共培養によって形成させた乳がんスフェアに対して AvIR-PIT を実施した。また、軟寒天培地を隔てた CAF との共培養系を用い、スフェア形成能に関わる CAF に対する PIT の効果を検討した。さらに、腫瘍細胞由来細胞外マトリックスゲルにより血管形成させたヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に対して、抗 CD105-BioAb を用いた AvIR-PIT を行った。

(3) 癌幹細胞に対する AvIR-PIT の有効性の検証

MKN45 細胞には、造腫瘍能および薬剤耐性能が高い癌幹細胞様のポピュレーションが含まれ、CD44v がそのマーカーであることが知られる。抗 CD44v 抗体を用いた細胞分画によって癌幹細胞を濃縮し、これに対して抗 CD44v-BioAb を用いた AvIR-PIT を行った。さらに、ヒト肝癌細胞株 HuH7-luc では、Hoechst 排出能を指標とした side-population (SP) 細胞群に対する AvIR-PIT

の効果についても検討した。

(4) AvIR-PITの *in vivo*における抗腫瘍効果の検証

ルシフェラーゼを定常発現する発光腫瘍細胞 HuH-7-luc を免疫不全マウスの肝臓に同所移植した担癌モデルマウスを作製した。これに対して、抗 CD133 and/or 抗 EpCAM-BioAb をそれぞれ単独あるいは併用投与し、さらに AvIR を投与した。IRDye700DX 由来の蛍光とルシフェリン投与による腫瘍細胞由来の生物発光とを指標とし、非侵襲リアルタイム *in vivo*イメージングによって、BioAb-AvIR 複合体の生体内組織分布および腫瘍への集積性を時空間的に解析した。AvIR の集積を確認した後、体外から近赤外光を照射して PIT を実施した。腫瘍の生物発光量を経時・経日的に測定し、*in vivo*における AvIR-PIT の抗腫瘍効果の検証を行なった。

4. 研究成果

(1) BioAb と AvIR を用いた PIT による光毒性効果発現の検証

ビオチン化抗 CEA 抗体 (Bio-C2-45) およびビオチン化抗 EpCAM 抗体 (Bio-M13-57) は、当研究室で樹立したハイブリドーマより得られた抗体から調製した。ヒト CEA もしくは EpCAM を発現させた CHO 細胞に対し、これらの BioAb と AvIR とを用いて PIT を行なった。その結果、対応する抗原を発現する細胞に対してのみ、PIT による著しい殺細胞効果が認められた。この抗腫瘍効果は光線強度および抗体濃度依存的であった。これらの CHO 細胞を共培養したところに AvIR-PIT を行なった場合、対応する抗原を発現しない細胞は抗原を発現する細胞に隣接している場合においてさえ全く傷害されず、極めて高い選択性を示すことが明らかとなった。さらに、低酸素培養下においても AvIR-PIT の効果は減弱せず、また、種々の ROS スカベンジャー共存下でも強い抗腫瘍効果が発揮された。同様の強い抗腫瘍効果とその高い標的特異性は、HT-29 や MKN-45 細胞でも確認された。

(2) 腫瘍関連細胞に対する AvIR-PIT の効果

ヒト乳癌細胞株 MCF-7-luc は CD24⁻、CD44⁺の造腫瘍性の高い癌幹細胞画分を含んでいる。AvIR-PIT が、このような細胞群にも有効であるか検証するため、Bio-CD44 抗体を用いた AvIR-PIT を行なった。細胞内 ATP を指標とした細胞生存性アッセイ、ならびにフローサイトメトリーによる解析の結果、標的とした CD44⁺の細胞群のみが特異的に殺傷されていることが判明した。さらに、この AvIR-PIT 後に生き残った細胞のみを分画し、これを用いてスフェア形成アッセイを行なったところ、著しいスフェア形成能の低下が認められた。一方、ヒト乳癌組織由来 CAF をプレート底面に播種し、軟寒天培地を隔てた上層に MCF-7-luc を培養すると、そのスフェア形成能が高まるが、CAF のマーカーである FAP に対する BioAb を用いた AvIR-PIT を培養開始直後に実施すると、CAF によるスフェア形成能の増強効果が完全にキャンセルされることが判明した。この結果は、AvIR-PIT の標的特異性の高さを改めて示すとともに、がんの周辺微小環境を標的とした AvIR-PIT の治療戦略の有効性を示すものであると考えられた。また、軟培地上でチューブ構造を形成させた HUVEC 細胞に対して、Bio-CD105 抗体を用いた AvIR-PIT を行なった結果、チューブ構造の崩壊が確認された。

(3) 癌幹細胞に対する AvIR-PIT の有効性の検討

MCF-7-luc 同様に、MKN-45-luc も CD44 陽性の細胞群ががん幹細胞様の活性が高い画分として知られるが、これも Bio-CD44 抗体を用いた AvIR-PIT によって極めて高効率に殺傷可能であることが判明した。HuH-7-luc 細胞は Hoechst 排出能が高いいわゆる SP 細胞群が存在しており、実際、この細胞群の造腫瘍性が高いことが知られている。この SP 細胞群の発現抗原を調べたところ、CD133 および EpCAM を高発現することがわかったため、これらに対する BioAb を用いた AvIR-PIT を実施した。その結果、バルクの細胞群のみならず、特に SP 細胞を極めて高効率に殺傷できることが明らかとなった。さらに、PIT 後の生細胞には造腫瘍性がないことをスフェア形成アッセイによって確認した。以上の結果は、AvIR-PIT ががん幹細胞に対して極めて効果的であり、がん幹細胞を標的とすることが腫瘍抑制に有効であることを示した。

(4) AvIR-PITの *in vivo*における抗腫瘍効果の検証

HuH-7-luc 細胞の同所移植担癌モデルマウスに対して Bio-CD133 と Bio-EpCAM を単独、あるいは併用した AvIR-PIT を実施した (各 100 μg、n=6)。その結果、腫瘍由来の生物発光が消失した例もあったが、抗腫瘍効果の安定性は低く、腫瘍の増大を抑えられなかった例も少なからず確認された。今回、薬剤の投与経路は眼窩静脈叢経由で行なった。AvIR の蛍光は腫瘍への集積性を示していたが、さらなる抗腫瘍効果を得るためには腫瘍内投与や投与量の検討が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

芝口 浩智、Luo Naixiang、白須 直人、黒木 求、黒木 政秀、Enhancement of antitumor activity by using a fully human gene encoding a single-chain fragmented antibody specific for carcinoembryonic antigen、*Oncotargets Ther.*、査読有、10 巻、2017、3979-3990

DOI: 10.2147/OTT.S140174

〔学会発表〕(計 1 件)

白須 直人、山田 博美、芝口 浩智、黒木 求、黒木 政秀、安永 晋一郎、腫瘍環境の統括的制御を指向した高汎用性光線免疫療法の開発、第 21 回バイオ治療法研究会、2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：安永 晋一郎

ローマ字氏名：Yasunaga, Shin'ichiro

所属研究機関名：福岡大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：5 0 3 3 6 1 1 1

研究分担者氏名：芝口 浩智

ローマ字氏名：Shibaguchi, Hirotomo

所属研究機関名：福岡大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：6 0 2 9 5 0 6 1

(2)研究協力者

研究協力者氏名：山田 博美

ローマ字氏名：Yamada, Hiromi

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、研究者個人に帰属されます。