

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15582

研究課題名(和文) 深部病巣を標的とするTheranosticsに不可欠な新規放射線光学療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel radiological-photo-therapy essential for Theranostics targeting deep lesions

研究代表者

松浦 栄次 (MATSUURA, Eiji)

岡山大学・中性子医療研究センター・教授

研究者番号：20181688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：光照射により細胞傷害性が誘導できる光増感剤を用いた光線力学的治療(PDT)は、近赤外光の透過性の低さ故、体表部位の病巣に対してのみ有効で深部組織への治療奏効性が低い。そこで本研究では、当該問題解決のため、PET核種の β^+ 線放出に伴い発生するCherenkov光を体内光源として活用することを検討した。我々がこれまでに確立してきた特異抗体・Zr-89標識薬剤搬送技術(DDS)からなる革新的「Theranostics(治療+診断同時施行)技術」にCherenkov光によるPDT効果を付与することでPDT効果の問題点(限界)を克服するための、新しい基礎技術の幾つかについて検証ができた。

研究成果の概要(英文)：Photodynamic therapy (PDT) using a photosensitizer capable of inducing cytotoxicity by light irradiation is effective only for the lesion closed to the body surface, due to low permeability of the near infrared light, and is ineffective for therapy targeting the deep tissues. To solve the problem, we studied using Cherenkov light generated by β^+ -ray emission of a PET nuclide as an internal light source. We have given the PDT effect by Cherenkov light to the innovative "Theranostics (a treatment and diagnostic enforcement) technology" consisting of the specific antibody/Zr-89 labeled-drug delivery system (DDS) that we have ever established. We were newly able to verify some of the new basic technologies to overcome the problem (limit) of the PDT effect.

研究分野：放射線化学、臨床検査学、病態医化学

キーワード：Theranostics Photodynamic Therapy Cherenkov光 Lactosome Drug Delivery System

1. 研究開始当初の背景

2015年、Photo-immunotherapy (近赤外光線免疫療法)の1例目が異例の早さでFDAより治験許可を得たことで、PDTによる新たながん治療戦略の時代を迎えた。光照射により細胞傷害性の活性酸素種を生じる光増感剤を、がん細胞特異的な抗体に結合させ、投与後、体外からの光照射によりがん細胞のみを死滅させるというものであり、現状、近赤外照射光(700-900 nm)と、それに対応する光増感剤が用いられるが、光が到達し効果が得られるのは、減衰効果ゆえ、体表近傍の組織(最大2 cm程度)に限定される。一方、Cherenkov光は、生体中などで β 線等の放出に伴い観測される250-600 nmの波長域を持つ光であるとともに、がんなどのイメージング診断に応用されるPET核種も β^+ 線を放出するとともにCherenkov光を発する。本研究では、PET核種に由来するCherenkov光を体内光源とした体内深部でのPhotodynamic therapy (PDT)の実現と診断・治療の融合(Theranostics)を目指した基盤研究を実施するものである。

2. 研究の目的

平成28年度は、PET核種から放出されるCherenkov光に対して励起可能な光増感剤の探索と評価、および、モデルマウスを用いた特異抗体の集積能の評価等を行う。

一方、平成29年度は、光照射により細胞傷害性が誘導できる光増感剤を用いた光線力学的治療(photodynamic therapy; PDT)は、外部照射光の生体透過性の低さゆえ、体表部位の病巣に対してのみ有効で深部組織への治療奏効性は低い。この問題を解決するため、PET核種の β^+ 線放出に伴い発生するCherenkov光を体内光源として活用することを検討する。本研究では、申請者らがこれまでに確立してきた「Theranostics(治療+診断同時施行)技術」にCherenkov光によるPDT効果を付与し、従来の体外からの光照射によ

るPDT効果の問題点(限界)を克服することを目的とし、光増感剤、動物モデル、薬剤搬送システム(DDS)について基盤研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) Cherenkov光および光増感剤によるROS産生量の測定

PET核種に由来するCherenkov光および光増感剤依存的に活性酸素(Reactive Oxygen Species; ROS)が産生されるか否かを調べるため、光増感剤と ^{18}F NaFまたはいずれか一方をROSにより分解され蛍光能を有するSinglet Oxygen Sensor Green (SOSG)とともにBlack wall 96穴プレート上で混合し、その6時間後に発光・蛍光*in vivo*イメージングシステム(IVIS Spectrum)を用いて撮像し定量することで、各サンプル中のROS産生量を比較した。

(2) Klotho KOマウスモデルの病態解析

Cherenkov光によるPDTの評価のために、がん細胞移植マウスや動脈硬化好発モデルマウスの検討に加え、老化モデルマウスであるKlotho KOマウスを将来的に用いることを想定し、病態の発症、Theranosticsのために我々が作製した病態特異的抗体の反応性について解析を行った。

(3) 光増感剤修飾抗体の調製およびそれによる治療効果の検証

腫瘍への選択的な光増感剤の送達を可能にするため特定のがん種に高発現することが知られるHER2に対する抗体へ光増感剤を修飾することとした。その手法として、*N*-Hydroxysuccinimide (NHS)をMESバッファー(pH 6.0)に溶解した後、光増感剤および1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide Hydrochloride (EDAC)を添加することで、光増感剤のカルボン酸を活性化

させた。0.1 M リン酸バッファー (pH 8.5) に溶解した抗体に対して 2.5、5、10、25、50、または 100 等量の活性化光増感剤を加え、37°C で 1 時間インキュベートした。その後、抗体に結合しなかった余剰の光増感剤を遠心分離および PD-10 カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより除去した (図 1)。

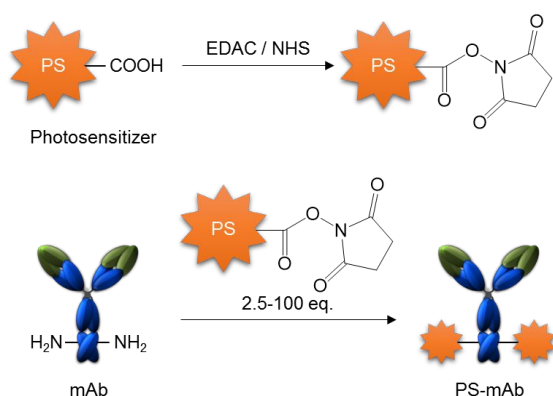


図 1 . 光増感剤修飾抗体の調製

得られた光増感剤修飾抗体の腫瘍局所への送達量を調べるため、HER2 高発現細胞株である NCI-N87 を BALB/c ノードマウスに移植して担がんさせたマウスに対して 100 μg の光増感剤修飾抗体を尾静脈より投与し、その 48 時間後に IVIS Spectrum による蛍光イメージングを行った。得られた画像を定量することで、光増感剤の腫瘍集積量を比較した。

本研究の目的とする PET 核種由来の Cherenkov 光による PDT 効果を検証するため、上記の検討より最も高い腫瘍集積性を示した光増感剤修飾抗体およびがんに対して高い集積性を有する PET 薬剤である [^{18}F]FDG を用いて腫瘍増殖抑制効果を評価した。その手法として、NCI-N87 担がんマウスに対して 500 μg の光増感剤修飾抗体を尾静脈より投与し、その 1 日および 3 日後に 40 MBq の [^{18}F]FDG を尾静脈より投与した。その後、経時的に腫瘍サイズおよび体重を測定した。また、[^{18}F]FDG 投与後にその腫瘍集積性を確認するため、小動物用 PET イメージング装置を用い

て PET 撮像を行った。

(4) Theranostics に資する Lactosome (Drug Delivery System: DDS) の有用性の評価

poly(sarcosine)-poly(L-lactic acid) の AB 型両親媒性ポリデブシペプチドを用いて調製した高分子ミセルが、AB 型ラクトソームと呼ばれるものであり、EPR 効果によりがん組織に集積する。しかしながら、ミセルなどのナノ粒子製剤は、免疫系に容易に認識され IgM を誘導することで、初回投与と二回目以降の投与とで体内動態が変化することが知られる (Accelerated Blood Clearance: ABC 現象)。この ABC 現象を回避するため 3 個の poly(sarcosine) ブロックを poly(L-lactic acid) ブロックに結合させた A₃B 型ラクトソームによるミセル型 DDS キャリアを作製し、マウス投与後に ELISA により血清中 IgM 産生をまた *in vivo*(脾細胞)における各種炎症性サイトカイン産生を qPCR にて確認した。

4 . 研究成果

(1) Cherenkov 光および光増感剤による ROS 産生量

ROS による SOSG 由来の蛍光強度を調べた結果、SOSG 単独に比べ SOSG に ^{18}F または光増感剤のいずれか一方を添加したものの、および ^{18}F と光増感剤のみを混和したサンプルでは蛍光強度はほとんど変化しなかった。一方で、SOSG に ^{18}F および光増感剤を加えたもので大きく増大した。この結果より、 ^{18}F と光増感剤の共存下において ROS が産生されたことが示唆された。

(2) Klotho KO マウスモデルの病態解析

血清学的評価により、Klotho KO マウスの血中無機リン酸濃度、カルシウム濃度、およびアルカリホスファターゼ活性は対照と比較して有意に高い血中環境である一方、脂質代謝に異常は見られないことを確認した。次

に組織化学的評価を行い、Klotho KO マウスで観察された動脈および腎臓の異所性石灰化病変部には骨代謝マーカーのほか、3H3 抗体(酸化 LDL・2GPI 複合体に対する抗体；粥状動脈硬化特異的)や CL15 抗体(異所性石灰化に特異的)が認識する抗原が発現していることを確認した(図 2)。Klotho KO マウスの動脈および腎臓では、異所性石灰化病変と骨代謝マーカー、および、3H3 抗体と CL15 抗体の抗原がほぼ同一の場所に存在することを確認した。さらに 3H3 scFv を ^{89}Zr 標識しマウスに投与した後体内動態を調べた。さらに、オートラジオグラフィーの結果より、Klotho KO の動脈では対照よりも放射能が高く集積していることを確認した一方で、腎臓を含むその他の臓器では有意な差は確認されなかった。

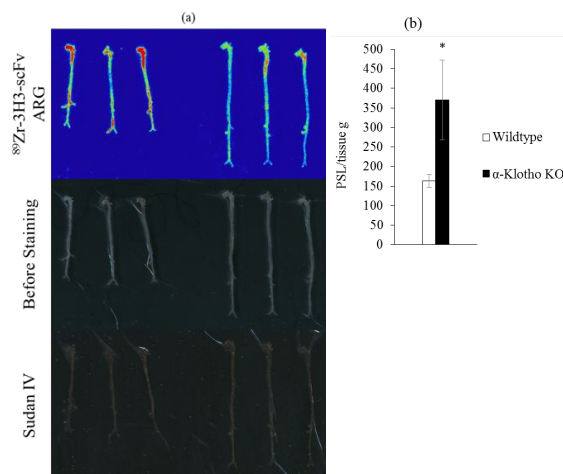


図 2. ^{89}Zr 標識 3H3 scFv 投与マウス由来大動脈のオートラジオグラフィー。a) 左 3 本が Klotho KO マウス、右 3 本が対象マウス。b) オートラジオグラフィーにより得られた放射能の積算値。

(3) 光増感剤修飾抗体の調製およびそれによる治療効果

2.5、5、10、25、50、および 100 等量の活性化光増感剤を加えて光増感剤修飾抗体を調整した結果、抗体 1 分子あたりに修飾された光増感剤分子数はそれぞれ 0.15、0.56、1.37、2.01、および 2.91 であった。得られ

た光増感剤修飾抗体を担がんマウスに投与し、その 48 時間後に蛍光イメージングを実施した結果、25-100 等量の光増感剤を反応させた抗体において腫瘍を明瞭に描出することができた(図 3)。

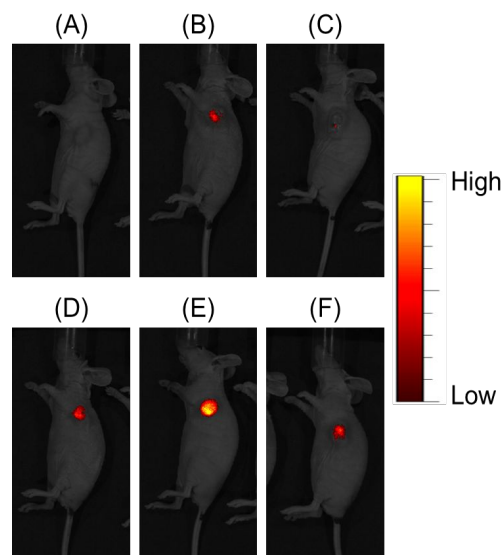


図 3. 光増感剤修飾抗体投与後の担がんマウスの蛍光画像。(A) 2.5、(B) 5、(C) 10、(D) 25、(E) 50、(F) 100 等量の光増感剤を反応させた抗体。

得られた画像を用いて腫瘍への光増感剤の集積量を定量したところ、50 等量で最も高い腫瘍集積性を示した(図 4)。

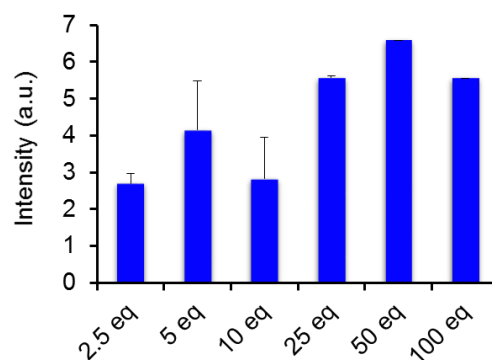


図 4. 蛍光画像による光増感剤の腫瘍集積量。

また、 ^{18}F FDG の腫瘍集積性を調べるため、その投与後に PET 撮像を行ったところ、明瞭に腫瘍を描出したことから Cherenkov 光源として治療に応用可能であることが示唆された(図 5)。

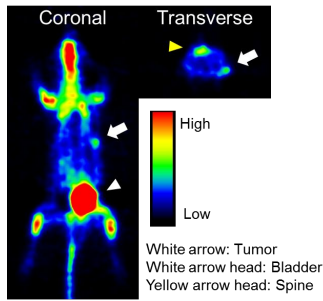


図 5 . $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ の NCI-N87 担がんマウス投与後の PET 画像。

次に Cherenkov 光による PDT 効果を検証するため、担がんマウスに対して最も腫瘍集積性の高かった 50 等量の光増感剤を修飾した抗体および $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ 、またはいずれか一方を投与した後、各群の腫瘍サイズおよび体重を経時的に調べた。その結果、光増感剤修飾抗体または $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ のうち一方のみを投与した群は同様に時間経過とともに腫瘍サイズが増大した(図 6)。一方で、光増感剤修飾抗体と $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ の両者を投与した群は一方のみを投与した群と比べ、腫瘍増殖が抑制される傾向にあった。また、マウスの体重についてはいずれの群についても大きな増減は確認されなかったことから、毒性を呈さないことが示唆された。

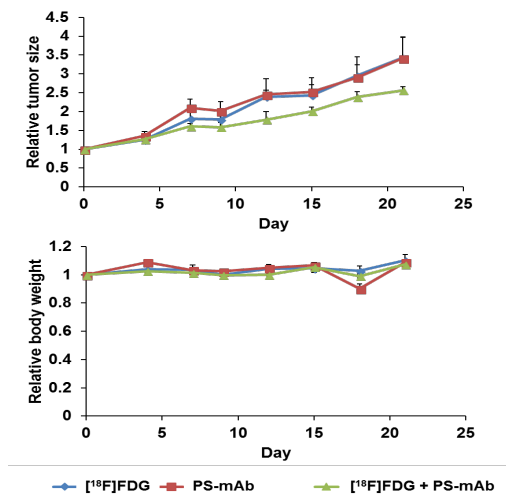


図 6 . 光増感剤修飾抗体および $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ 投与後の NCI-N87 担がんマウスの腫瘍サイズ(上段)および体重変化(下段)。

(1)および(3)の結果から、光増感剤および $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ がともに腫瘍に局在することで、局

所的に ROS が産生されることでがん細胞傷害作用を誘導したことが示唆された。本研究期間内に有意な腫瘍増殖抑制作用を確認することはできなかったが、今後検討を重ね最適な治療レジメンを確立することで、生体深部における腫瘍局所における PDT を可能にする新たな治療法となり得ると期待される。

(4) Lactosome からなる (Drug Delivery System) に有用性の評価

Theranostics への応用に向けて、両親媒性の生分解性ポリマーより構成される 2 種類の Lactosome (AB 型、および A_3B) について、抗体修飾および PET 核種である ^{89}Zr を標識し、EPR 効果・抗体特異性によってエフェクター分子を標的病巣へ搬送可能な剤型を決定した。上記 2 種の Lactosome を C57BL6 マウスに静脈内投与し、一週間後の血清中抗 Lactosome 抗体価 (IgM) を ELISA で、また、脾細胞における各種炎症性サイトカイン発現を qPCR にて定量した。図 7 には血清中 IgM 抗体価を示したが、AB 型に比べ A_3B 型 Lactosome では、抗 Lactosome 抗体価の誘導が抑えられていた。またデータは示していないが、AB 型および A_3B 型 Lactosome の静脈投与によって、各種サイトカイン (TNF、IL-1、IL-1、IL-2、IL-6、IL-10) 産生量に有意な変化が認められ、今後のさらなる機序解明に期待が寄せられる。

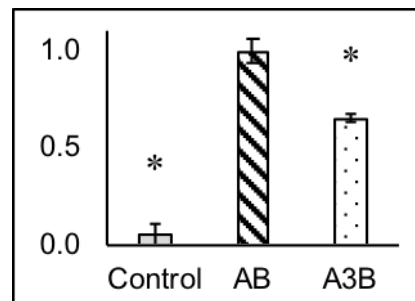


図 7 . Lactosome 投与により誘導された IgM。
* : $P < 0.05$ 、Y 軸は吸光度 (450 nm)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

なし

[雑誌論文](計0件)

なし

[学会発表](計3件)

1. Matsuura E. Harnessing autoimmunity (disease-specific autoantibodies and its variant) in theranostics of disease. Joint meeting of Lupus and Asian Congress on Autoimmunity, Melbourne, Australia, March 26-19, 2017.
2. Matsuura E. Harnessing autoimmunity (disease-specific antibodies and its variant) in theranostics. Joint meeting of Australia's MedTech Conference and International Conference on Mechanics in Medicine and Biology (ICMMB), Melbourne, Australia, May 24-25, 2017.
3. Matsuura E. The modern revolution and future cancer medicine and oncological management. Scholar Summit 2017. Depok, Indonesia, October 10-11, 2017.

[図書](計0件)

[産業財産権]

なし

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計 件)

なし

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

松浦 栄次 (MATSUURA, Eiji)

岡山大学・中性子医療研究センター・教授

研究者番号：20181688

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

小淵 浩嗣 (KOBUCHI, Hirotsugu)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：10304297

竹中 文章 (TAKENAKA, Fumiaki)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10642522

(4)研究協力者

明日 卓 (AKEHI, Masaru)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50786738