

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03523

研究課題名(和文) 生体に安全なエネルギーによるがんナノセラノスティクスシステムの開発

研究課題名(英文) Nanotheranostic system for cancer with human safety energy device

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) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：光免疫療法はがん特異的モノクローナル抗体と光感受性蛍光プローブを結合させた抗体薬物複合体と近赤外光によって、がん細胞のみを分子標的的特異的にイメージングし破壊する新たながん治療法である。本研究課題では、光免疫療法を基盤として、幅広いがん腫に適応可能な新規抗体化合物の開発を行った。また、光反応性機能性リポソームの開発を行った。得られた知見を基に臨床応用へ繋げる研究を推進している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光免疫療法は再発頭頸部がん患者を対象として本邦においては臨床実用化に至った。本研究のように、光免疫療法の基盤技術を展開し新たな臨床応用へ繋げる検討は、がん患者の生命予後改善に寄与することが期待される。また、本研究による成果の創出は新たな研究開発のシーズにもなり得るため、社会的意義および学術的価値の高いものである。

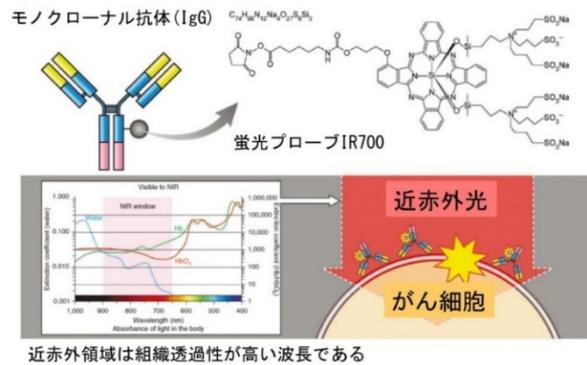
研究成果の概要(英文)：Molecular targeted therapies, such as monoclonal antibodies, were widely used for various cancers recently, leading to improve patients' outcomes. Photoimmunotherapy (PIT) is a new class of molecular targeted cancer theranostics, which employs monoclonal antibody conjugated to a photosensitizer, IR700, that is activated by focal near-infrared (NIR) light irradiation leading to necrotic cell death. In this study, we developed a new type of PIT agents targeting VEGFR-2 expressed on vascular endothelium in a tumor stroma and Trop2 expressed on various types of cancer cell. We also developed photoactivatable functionalized liposome that can be used for PIT. Further study is needed for clinical translation,

研究分野：生体医工学

キーワード：がん 抗体療法 分子イメージング 近赤外光 分子標的薬

1. 研究開始当初の背景

本邦におけるがんの死亡者数は増加の一途をたどり、2人に1人ががんに罹患し3人に1人が亡くなる最大の死因である。がんに対する三大治療法は手術療法、抗がん剤治療および放射線治療であり、各治療法の質的向上により治療成績・患者予後は着実に向上している。さらに、近年では分子標的薬が抗がん剤と共に広く使われるようになり、治療効果がさらに向上している。一方で、分子標的薬が単剤で十分な治療効果を示すのはがん患者の一部であり、治療効果を高める目的で抗体薬物複合体(antibody-drug conjugates; ADC)が以前より開発されてきた。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蛍光などのエネルギーを産生する光感受性蛍光プローブ IR700 を結合させた ADC を合成し、がん細胞のみを分子標的的特異的に近赤外光の照射によって破壊する方法を開発し、photoimmunotherapy(PIT: 光免疫療法)と命名し報告した(Mitsunaga et al. Nature Medicine. 2011)。この方法は光を使った分子標的的特異的生体イメージングの研究から発展して生まれた技術であり、イメージング(診断)だけでなくがん細胞特異的に光線治療を行うこともできる(セラノステイクス)。従来の光線治療法である photodynamic therapy (PDT) と異なり、PIT ではがん細胞膜表面に特異的に結合した状態の抗体化合物が近赤外光のエネルギーを吸収して物理的な細胞膜傷害を引き起こし、隣接する正常細胞(抗体が結合しない細胞)は傷害しない。また、PIT ではネクローシスによる細胞死が誘導され、通常の抗がん剤や放射線治療や PDT で誘導されるアポトーシスとは細胞死誘導メカニズムが異なる。抗 EGFR(human epidermal growth factor receptor)抗体である cetuximab をベースとした光感受性抗体化合物を用いた再発頭頸部がん患者を対象とした PIT の臨床試験が 2015 年より米国にて開始され、現在は第Ⅲ相試験が世界で進行中である。しかし、腫瘍の性質(腫瘍細胞の heterogeneity)、光の特性(組織深達性)、抗体の性質(腫瘍内薬物分布)など複数の要因により PIT の治療効果が限定的となる可能性が示唆されている。



2. 研究の目的

本研究課題では前述した問題を解決するための新たな PIT 技術の創出を目的とした。

- (1) がん細胞膜に発現する分子はがん腫によって大きく異なる。例えば頭頸部がんでは EGFR、乳がんでは HER2(EGFR2)、前立腺がんでは PSMA(prostate specific membrane antigen)が高発現している。これらの分子を標的とした PIT を行う場合、それぞれの標的を認識する抗体と光感受性プローブの化合物を合成する必要がある。実用化にはそれぞれの化合物で臨床試験が必要となる。本研究課題では、幅広いがん腫に対して一つの光感受性抗体化合物で治療が可能となる分子標的としてがん間質に存在する血管内皮細胞発現分子および trophoblast cell-surface antigen 2 (Trop2) を標的とした PIT について開発・検討した。
- (2) 高分子製剤である抗体は腫瘍内血管の近傍組織と比較して、血管から離れた部位ではその分布が不良となる。また、腫瘍組織内の分子発現の不均一性によって、光感受性抗体化合物による抗腫瘍効果は不均一となる。本研究課題では、光感受性抗体化合物と薬剤を内包可能で生体適合性の高いリン脂質を結合させた光反応性機能性リポソームにつ

いて開発した。

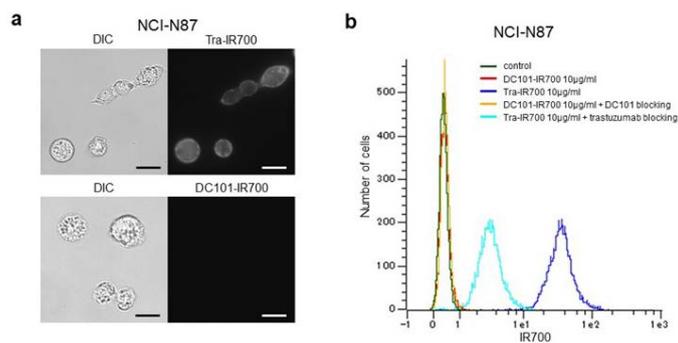
3. 研究の方法

- (1) ①腫瘍内間質に存在する新生血管の内皮細胞に発現する分子 VEGFR-2 を標的とした抗体と光感受性物質を結合させた抗体化合物を合成し、ヒト胃がん細胞株とヌードマウス皮下腫瘍モデルを用いて近赤外光による抗腫瘍効果について検討を行った。
②ヒトの正常組織には限られた量しか発現していないが、多くのがん種で広く発現している分子である Trop2 を標的とした抗体と光感受性物質を結合させた抗体化合物を合成し、ヒト胆道がんおよび膵臓がん細胞株とヌードマウス皮下腫瘍モデルを用いて近赤外光による抗腫瘍効果について検討を行った。
- (2) 光感受性抗体化合物と薬剤内包リポソームを結合させた光反応性機能性リポソームの合成を行い、近赤外光照射による新規化合物の抗腫瘍効果について検討を行った。

4. 研究成果

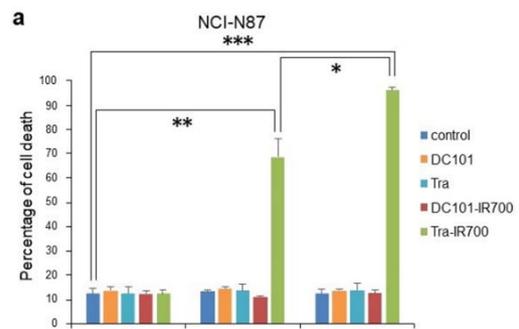
- (1) ①ヒト胃がん細胞株である NCI-N87 を検討の対象として用いた。NCI-N87 は HER2 陽性の細胞株であり、腫瘍新生血管の内皮細胞には VEGFR-2 が発現している。ヌードマウスに皮下移植した腫瘍モデルを作製し、光感受性抗マウス VEGFR-2 抗体化合物 (DC101-IR700) を全身投与して、近赤外光照射による抗腫瘍効果を検討した。

右上段 a NCI-N87 細胞株において HER2 特異的な光感受性抗 HER2 抗体化合物 (Tra-IR700) の局在を蛍光顕微鏡で認めたが、DC101-IR700 では認めなかった。b また、フローサイトメトリーにおいても Tra-IR700 の

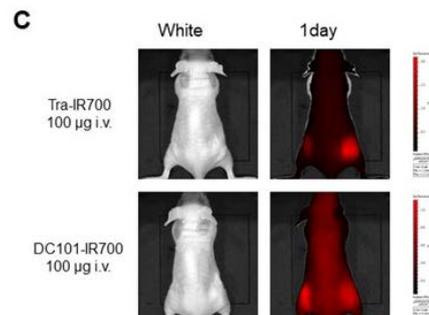


特異的な結合を認めたが、DC101-IR700 では認めなかった。Tra-IR700 の特異的なシグナルは、過量の IR700 非結合 trastuzumab の投与により消去された。

次に、in vitro における細胞傷害性を評価した。右中段 a NCI-N87 に対して、抗体-IR700 の特異的な結合が認められる Tra-IR700 投与後の近赤外光照射により細胞傷害が誘導されたが、DC101-IR700 では近赤外光照射をしても細胞傷害は誘導されなかった。



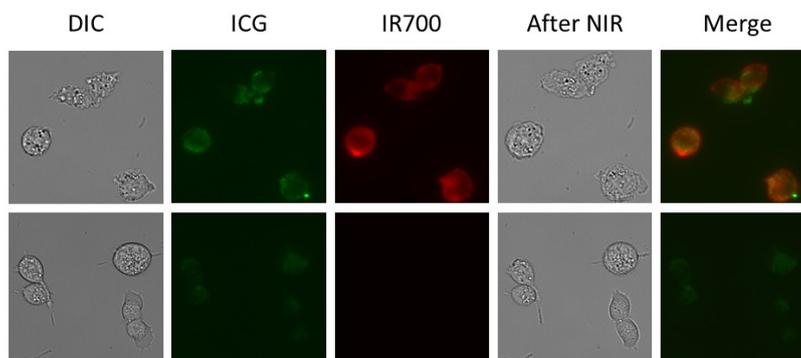
右下段 c さらに、NCI-N87 をヌードマウス皮下右臀部に、HER2 陰性 BALB/3T3 細胞株を左臀部に移植した腫瘍モデルに対して抗体化合物を静脈投与すると、Tra-IR700 は HER2 選択的に、DC101-IR700 は腫瘍選択的に局在した。



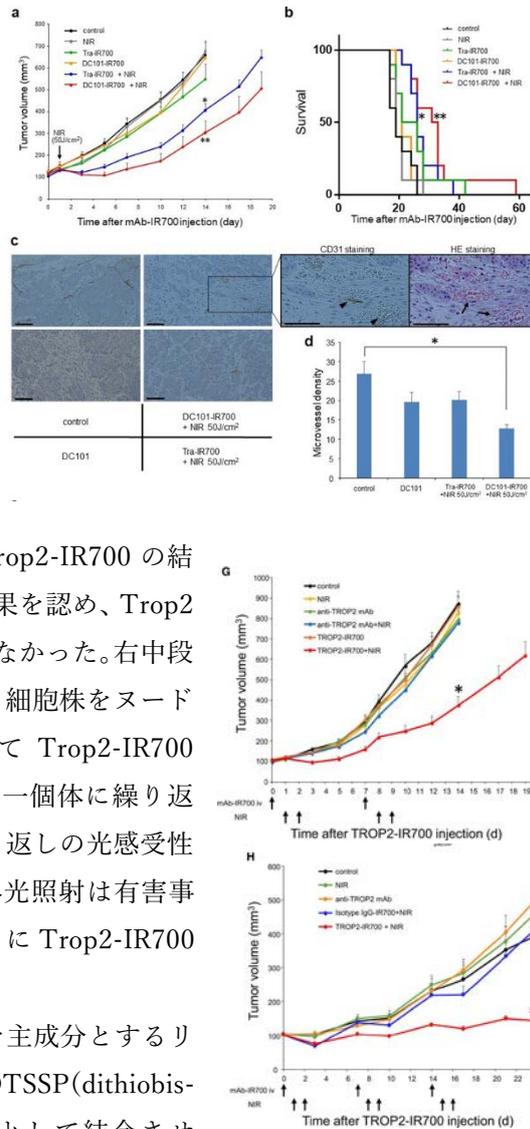
右上段 ab 抗体化合物を投与後 1 日で近赤外光を照射すると、対照群と比較して有意な PIT 群(Tra-IR700+NIR および DC101-IR700+NIR)の抗腫瘍効果を認めた。右上段 cd DC101-IR700 による PIT の効果は腫瘍内新生血管の減少が寄与している可能性が示された。

②Trop2 発現ヒトすい臓がん細胞株 PK-59, KP-3L および胆道がん細胞株 TFK-1, HuCCT-1 を検討の対象として用いた。細胞レベルにおける検討では、他の抗体化合物による PIT と同様に、Trop2-IR700 の結合量に依存した近赤外光による抗腫瘍効果を認め、Trop2 陰性細胞株に対しては抗腫瘍効果を認めなかった。右中段 GH Trop2 強発現の PK-59 および TFK-1 細胞株をヌードマウスに皮下移植した腫瘍モデルに対して Trop2-IR700 を投与後に近赤外光を照射する処置を同一個体に繰り返し行い、抗腫瘍効果の評価を行った。繰り返しの光感受性抗体化合物投与および繰り返しの近赤外光照射は有害事象なく安全に施行可能であり、両腫瘍ともに Trop2-IR700 PIT 群の有意な抗腫瘍効果を認めた。

- (2) DPPC(dipalmitoylphosphatidylcholine)を主成分とするリポソームに光感受性抗 EGFR 抗体を DTSSP(dithiobis-sulfosuccinimidylpropionate)をリンカーとして結合させた化合物を合成した。新規光反応性機能性リポソームは外径 150nm の均一な分散を示し、Zeta potential は約-60 mV であった。ICG を内包させた光反応性機能性リポソームを EGFR 陽性または陰性細胞に投与して ICG および IR700 の分布を評価したところ、in vitro では ICG および IR700 は抗体の標的選択的に局在し、近赤外光照射によって、PIT の効果も誘導された(下図)。また、相乗的な抗腫瘍効果の誘導が期待する目的で、抗がん剤をリポソーム内に内包させることも可能であった。



次に、EGFR 陽性細胞をマウスへ移植したモデルで検討を行ったところ、新規光反応性機能性リポソームは first-pass metabolism の影響により肝臓を含めた網内系で大部分が処理され、bioavailability の改善が必要と判断された。リポソームの PEG 修飾化について引き続き検討を行っている。



本研究課題では、がん間質に存在する新生血管内皮細胞を標的とした新たなPITを開発した。既存のPITとは異なった抗腫瘍効果を誘導することを確認した。幅広いがん腫に発現するTrop2を標的としたPITを開発しその有用性を確認した。さらに、薬剤を内包可能なリポソームとPITを組み合わせた、新たながん診断治療法を開発した。PITの技術を展開し、新たな臨床応用へ繋げるための開発を引き続き行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takashi Nishimura, Makoto Mitsunaga, Ryoichi Sawada, Masayuki Saruta, Hisataka Kobayashi, Noriko Matsumoto, Toru Kanke, Hiroyuki Yanai, Koji Nakamura	4. 巻 8
2. 論文標題 Photoimmunotherapy targeting biliary pancreatic cancer with humanized anti TROP2 antibody	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 7781 ~ 7792
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.2658	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Takashi Nishimura, Makoto Mitsunaga, Kimihiro Ito, Hisataka Kobayashi, Masayuki Saruta	4. 巻 23
2. 論文標題 Cancer neovasculature-targeted near-infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT) for gastric cancer: different mechanisms of phototoxicity compared to cell membrane-targeted NIR-PIT	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 82 ~ 94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10120-019-00988-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 9件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 光永真人、小林久隆
2. 発表標題 がん光免疫療法を基盤とした新たな抗感染療法の開発
3. 学会等名 日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 光永真人、小林久隆
2. 発表標題 内視鏡分子イメージングから光免疫療法へ theranostics 最前線
3. 学会等名 日本癌治療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Nishimura, Makoto Mitsunaga
2. 発表標題 TROP2-targeted photoimmunotherapy in experimental human pancreatic cancer
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 光永真人、西村尚、伊藤公博
2. 発表標題 消化器悪性腫瘍に対する光免疫療法の利活用へ向けた臨床前検討
3. 学会等名 日本レーザー医学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto Mitsunaga, Takashi Nishimura
2. 発表標題 In vivo molecular theranostics for biliary-pancreatic cancer using near-infrared photoimmunotherapy
3. 学会等名 World Molecular Imaging Congress 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Nishimura, Makoto Mitsunaga
2. 発表標題 In vivo biliary-pancreatic cancer-targeted photoimmunotherapy using humanized anti-TROP2 monoclonal antibody
3. 学会等名 日本癌学会総会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 光永真人、伊藤公博、西村尚
2. 発表標題 蛍光プローブを用いた消化器がん分子イメージングと分子標的的特異的がん近赤外光線治療
3. 学会等名 日本消化器関連学会週間（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 光永真人
2. 発表標題 光免疫療法 研究開発から実用化まで
3. 学会等名 日本免疫・細胞治療学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Nishimura, Kimihiro Ito, Makoto Mitsunaga
2. 発表標題 Vascular endothelial growth factor receptor 2 targeted near-infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT); different mechanism of phototoxicity compared to cell membrane targeted NIR-PIT
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2018（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 Conjugate of Antibody Targeting Blood Vessels and Photosensitizer	発明者 Makoto Mitsunaga	権利者 Jikei University
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/008059	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------