

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15923

研究課題名(和文) 光を用いた肺がん征圧の試み：局所抗腫瘍免疫トリプルエンハンスメント

研究課題名(英文) Development of photo-lung cancer therapy: triple-enhancement of local anti-cancer immune-reaction

研究代表者

佐藤 和秀 (Sato, Kazuhide)

名古屋大学・高等研究院(医)・特任助教

研究者番号：20788658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：光を用いた新しいがん免疫治療の開発を目的とした。本研究では、腫瘍微小環境の重要分子のPD-L1をターゲットとした近赤外光線免疫療法の治療効果と、その効果の詳しい機序の解析を行った。In vitroの効果測定を細胞内にLuciferaseを導入したマウスがん細胞にて定量的に解析した。光量依存的な効果が得られたが、従来のがん表面抗原に対する治療効果に比べて限定的であった。次にマウス同種移植がんモデルを用いて、in vivo イメージングを活用し定量化をもって抗腫瘍効果の評価実験を行った。劇的な抗腫瘍効果をマウス同種移植がんモデルで認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんは未だ完治することが難しく、新規治療開発が必要である。本研究は、新規モダリティである近赤外光線免疫療法を腫瘍微小環境の分子であるPD-L1をターゲットに使用し、新しい概念の癌免疫療法を学術的に確立するものである。本研究によって、新規モダリティとしての光治療の可能性を広げる事ができ、これまでがん抗原の高発現に依存していた治療を幅広くがん患者さんに適応できるため、がん患者さん救済という社会的な意義が多大である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop a new cancer photoimmunotherapy. In this study, we analyzed the therapeutic effect of near-infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT) targeting PD-L1 which is an important molecule of tumor microenvironment and detailed mechanism of the effect. The in vitro effect measurement was quantitatively analyzed in mouse cancer cells into which luciferase was introduced. Although the light-dependent effect was obtained, it was limited as compared with the conventional NIR-PIT therapeutic effect on the cancer surface antigen. Next, using a mouse syngeneic tumor model, in vivo imaging was utilized to carry out quantitative evaluation of antitumor effect. A dramatic antitumor effect was observed in a mouse syngeneic tumor model.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：近赤外光線免疫療法 分子標的治療 腫瘍治療学 分子イメージング ガン免疫 医工連携

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近赤外線免疫療法(NIR-PIT)は2011年にNIHの小林らが開発した新しいがん治療モダリティである。がん細胞の表面に特異的に高発現しているがん抗原に対する抗体と光感受物質であるIR700DXを付加し、抗体・光感受物質複合体を作成し、経静脈的に投与した後、がん部位に690nmの近赤外光を照射することで正常細胞に障害を与えずにがん細胞のみを破壊する次世代のがん治療である。2018年に本研究代表者が中心となり、そのユニークな細胞死のメカニズムが解明された(Sato K, et al. ACS CS, 2018)。これまでの細胞死とは異なる新しい概念の細胞死であり、NIR-PITの新規治療の裏付けとなった。2018年から、局所再発頭頸部がんに対して、EGFRを標的として、国際第III相試験が開始されており、近い将来の認可が期待される。

近年、腫瘍微小環境の理解が進み、腫瘍細胞が自身の働きかけにより、周囲の癌免疫を阻害することが明らかとなってきた。そのような解明により創薬がすすみ、2014年に悪性黒色腫に認可された免疫チェックポイント阻害薬である抗PD-1抗体薬(Nivolumab)は、2015年に申請者の専門である非小細胞肺癌に認可されまたたく間に使用が広がった。腫瘍側の免疫チェックポイント分子であるPD-L1への抗体薬もこの流れで創薬され、2016年に抗PD-L1抗体薬(Pembrolizumab)が同様に認可された。腫瘍のPD-L1発現がTumor proportion Score (TPS)が1%あればPD-L1陽性の切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌に第1選択で使用でき、発現量が少なくても治療適応となっている。しかしながら、全身投与に伴う副作用、特に自己免疫疾患の発現が問題であった。

### 2. 研究の目的

我々は、本研究計画から派生した、胸部腫瘍に対してのNIR-PIT治療を臨床応用を見据えて開発してきた(Isobe Y, Sato K\*, et al. EBioMedicine, 2020; Nishinaga Y<sup>+</sup>, Sato K<sup>+</sup>, et al. Cells, 2020; <sup>+</sup> equally contribution, \*corresponding author)。これらはすべて、がんの特異的に発現するがん抗原をターゲットにしたものであり、当該抗原の発現がない患者さんには適応ではなくなる。

本研究では、がん細胞が臓器横断的に発現している免疫チェックポイント分子に注目し、がんの免疫逃避機構という共通の機構を応用することで、発現は程々で(低発現で)、臓器横断かつ転移部にも一定の効果をj得ることができる次世代型の光がん免疫療法開発を行うことが目的である。また、引き続いて起こる免疫反応の詳細を検討し、新しい光がん免疫療法の1つとしての機序確立を狙う。本研究を達成する事で、臓器横断的に効果のある革新的光治療法を開発し、発現に依存しない次世代光治療開発とその作用機構詳細解明を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) F(ab')<sub>2</sub>の作成

IgG抗体(抗マウスPD-L1抗体(ラット由来))を酵素法にて消化し、HPLC分取を行うことでF(ab')<sub>2</sub>を生成した。

#### (2) anti-PD-L1-F(ab')<sub>2</sub>-IR700の作成

精製したF(ab')<sub>2</sub>をおおよそ、F(ab')<sub>2</sub>とIR700を1:2.5~3に成るように付加反応を行った。

#### (3) PD-L1高発現細胞の作成と結合性の確認

Flow CytometerとWestern Blotにより、(2)の結合性を評価した。

#### (4) In vitroでのAnti-PD-L1-F(ab')<sub>2</sub>-IR700のマウスがん細胞株への結合評価

マウスがん細胞株である、MC38、LL/2、Trump-C2におけるPD-L1の発現を、フローサイトメ

トリーを用いて評価した。

(5) In vitro での Anti-PD-L1- F(ab')<sub>2</sub>-IR700 を用いた NIR-PIT のマウスがん細胞株への細胞死効果

in vitro の NIR-PIT 実験では、死細胞染色である PI 染色と、マウスがん細胞に導入した luciferase 活性により評価を行った。

(6) In vivo での Anti-PD-L1- F(ab')<sub>2</sub>-IR700 を用いた NIR-PIT の同種マウスがん腫瘍モデルへの効果

in vivo のマウス同種がん移植モデルで NIR-PIT を行い、その効果を腫瘍体積と in vivo imaging により評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) F(ab')<sub>2</sub>の作成

使用する抗体による副反応 (ADCC:抗体依存性細胞障害、CDC:補体依存性細胞障害) を予防するために、F(ab')<sub>2</sub>を作成した。IgG 抗体(抗マウス PD-L1 抗体 (ラット由来))を酵素法 (ペプシン) にて消化し、HPLC 分取を行うことで F(ab')<sub>2</sub> を生成した (以下の実験で使用)。HPLC、SDS-PAGE にて確認した。本結果から、IgG の残りはほぼ無く、F(ab')<sub>2</sub> が作成されていることが証明された。

##### (2) anti-PD-L1-F(ab')<sub>2</sub>-IR700 の作成

精製した F(ab')<sub>2</sub> をおおよそ、F(ab')<sub>2</sub> と IR700 を 1:2.5~3 に成るように作成して、SDS-PAGE にて評価した。control, 抗 PD-L1 抗体から作成した F(ab')<sub>2</sub> に正確に IR700 が更かしていることが判明し、吸光度の解析から、抗体 1 に対して、IR700 は 2.5 であった。

##### (3) PD-L1 高発現細胞の作成と結合性の確認

ポジティブコントロール細胞として PD-L1 を高発現した細胞株を作成し、2 で作成した Anti-PD-L1- F(ab')<sub>2</sub>-IR700 の細胞への結合性と抗原性を確認した。IR700 付加物は PD-L1 への抗原性を示し、高発現細胞へ結合することが明らかになった。また、Western Blotting にて PD-L1 recombinant protein への抗原性を有していた。

##### (4) In vitro での Anti-PD-L1- F(ab')<sub>2</sub>-IR700 のマウスがん細胞株への結合評価

マウス細胞株における PD-L1 の発現を、フローサイトメトリーを用いて評価した結果、すべての細胞株で PD-L1-IR-700 の結合が認められた。また、その発現量は各がん細胞で僅かな発現であった。

(5) In vitro での Anti-PD-L1- F(ab')<sub>2</sub>-IR700 を用いた NIR-PIT のマウスがん細胞株への細胞死効果

in vitro の NIR-PIT 実験では、フローサイトメトリーによる PI 染色 (死細胞染色) の結果、どの細胞株においても、近赤外線的光量の増加に伴って死細胞率が上昇した。近赤外線の照射のみや PD-L1 - F(ab')<sub>2</sub>-IR700 の投与のみでは、有意な細胞障害は認めなかった。いずれの細胞株でも、64J/cm<sup>2</sup>以上で有意な PI 陽性率の上昇を認めた。64J/cm<sup>2</sup>以上では、これまでの前研究では高発現株であれば 90%以上の細胞死が通常見られるため、in vitro での効果はかなり限定的と考えられた。また、LL/2-luc を用いて NIR-PIT を行い、luciferase 活性の測定を行ったところ、NIR-PIT 後の細胞株では、relative light unit (RLU) の有意な低下を認め、光量依存性に luciferase 活性の低下を PI と同様に認めた。様々な癌腫において、PD-L1 をターゲットとした NIR-PIT は 128 J/cm<sup>2</sup>で 50%程度の細胞障害を誘導した。効果はかなり限定的であると言える。

(6) In vivo での Anti-PD-L1- F(ab')<sub>2</sub>-IR700 を用いた NIR-PIT の同種マウスがん腫瘍モデル

への効果

in vivo のマウス同種がん移植モデルでは、in vitro の結果からは推定できないほどの高い治療効果が得られた。10%の確率で完治する個体も得ることができた。

両側臀部腫瘍モデルでは、片側のみの光照射で、対側にも効果が見られた。in vivo イメージングにより、視覚・定量的に効果測定ができた。効果確定により、腫瘍特異抗原に依存しない新しい概念の光治療創生につながると考えている。現在、これらの興味深い結果のメカニズム解析を遂行中であり、腫瘍免疫の活性化を評価している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sato Kazuhide, Ando Kanta, Okuyama Shuhei, Moriguchi Shiho, Ogura Tairo, Totoki Shinichiro, Hanaoka Hirofumi, Nagaya Tadanobu, Kokawa Ryohei, Takakura Hideo, Nishimura Masayuki, Hasegawa Yoshinori, Choyke Peter L., Ogawa Mikako, Kobayashi Hisataka	4. 巻 4
2. 論文標題 Photoinduced Ligand Release from a Silicon Phthalocyanine Dye Conjugated with Monoclonal Antibodies: A Mechanism of Cancer Cell Cytotoxicity after Near-Infrared Photoimmunotherapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Central Science	6. 最初と最後の頁 1559 ~ 1569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscentsci.8b00565	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 Isobe Y, Sato K, Nishinaga Y, Takahashi K, Taki S, Yasui H, Shimizu M, Endo R, Koike C, Kuramoto N, Yukawa H, Nakamura S, Fukui T, Kawaguchi K, Chen-Yoshikawa TF, Baba Y, Hasegawa Y.	4. 巻 52
2. 論文標題 Near infrared photoimmunotherapy targeting DLL3 for small cell lung cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 102632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2020.102632.	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 -
1. 著者名 Nishinaga Y, Sato K, Yasui H, Taki S, Takahashi K, Shimizu M, Endo R, Koike C, Kuramoto N, Nakamura S, Fukui T, Yukawa H, Baba Y, K Kaneko M, Chen-Yoshikawa TF, Kobayashi H, Kato Y, Hasegawa Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 Targeted Phototherapy for Malignant Pleural Mesothelioma: Near-Infrared Photoimmunotherapy Targeting Podoplanin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 E1019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9041019.	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 磯部好孝、滝俊一、高橋一臣、安井裕智、西永侑子、佐藤和秀	4. 巻 39
2. 論文標題 光を用いた肺がん制圧への挑戦：DLL3をターゲットとした光励起治療・診断システムの開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 がん治療のあゆみ	6. 最初と最後の頁 7-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

[学会発表] 計15件(うち招待講演 1件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Sato K, Moriguchi S, Kokawa R, Ohta M, Hirade M, Nakajima H, Choyke PL, Hasegawa Y, Kobayashi H.
2. 発表標題 Single Molecule Imaging of antibody photo-probe conjugates which induce cytotoxicity on target cells, with a FM-AFM
3. 学会等名 World Molecular Imaging Congress 2018, Seattle, WA USA, 2018 Sep12 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sato K
2. 発表標題 Near infrared photoimmunotherapy: mechanism and applications
3. 学会等名 International Workshop on Quantum Sensing & Biophotonics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Isobe Y, Sato K, Takahashi K, Taki S, Yasui H, Nishinaga Y, Matsui T, Hasegawa Y.
2. 発表標題 Near infrared photoimmunotherapy targeting SCLC: preclinical experience
3. 学会等名 World Conference on Lung Cancer (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishinaga Y, Isobe Y, Yasui H, Takahashi K, Taki S, Matsui T, Hasegawa Y, Kato Y, Sato K
2. 発表標題 Targeting Photo-Therapy for Malignant pleural Mesothelioma; Near Infrared Photoimmunotherapy Targeting Podoplanin
3. 学会等名 World Conference on Lung Cancer (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤和秀
2. 発表標題 特別企画「留学のすすめ：internationalとinterdisciplinary-NIH留学体験～」
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤和秀
2. 発表標題 近赤外光線免疫療法のメカニズムの解明
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤和秀、小川美香子、西村雅之、粉川良平、長谷川好規、小林久隆
2. 発表標題 質量分析で明らかになる近赤外光線免疫療法のメカニズム
3. 学会等名 第44回日本医用マススペクトル学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤和秀、安藤完太、粉川良平、高倉栄男、西村雅之、長谷川好規、Choyke PL, 小川美香子、小林久隆
2. 発表標題 近赤外光線免疫療法の細胞死メカニズムの解明
3. 学会等名 第41回日本光医学・光生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuhide Sato, Mikako Ogawa, Ryohei Kokawa, Masayuki Nishimura, Yoshinori Hasegawa, Peter Choyke, Hisataka Kobayashi
2. 発表標題 Mechanism of cancer cell cytotoxicity after near-infrared photoimmunotherapy
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤和秀、小川美香子、安藤完太、粉川良平、西村雅之、長谷川好規、Peter L. Choyke、小林久隆
2. 発表標題 近赤外光線免疫療法のメカニズムの解明
3. 学会等名 第40回日本レーザー医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤和秀
2. 発表標題 近赤外光線を用いたターゲット治療の機序解明
3. 学会等名 第28回日本赤外線学会研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤和秀
2. 発表標題 近赤外光線免疫療法の機序解明とさらなる応用
3. 学会等名 第22回癌治療増感研究シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤和秀
2. 発表標題 近赤外光線免疫療法の応用開発研究
3. 学会等名 第22回癌治療増感研究シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 磯部好孝、佐藤和秀、西永侑子、高橋一臣、安井裕智、滝俊一、長谷川好規
2. 発表標題 DLL3を標的とした小細胞肺癌に対する近赤外光線免疫療法の開発
3. 学会等名 第60回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西永侑子、佐藤和秀、磯部好孝、高橋一臣、安井裕智、滝俊一、金子美香、加藤幸成、長谷川好規
2. 発表標題 悪性中皮腫に対する光免疫療法：ポドプランインを標的とした近赤外光線免疫療法
3. 学会等名 第60回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ポリペプチド	発明者 鳴瀧彩絵, 大槻主税, 中村仁, 佐藤和秀, 夏目和宜	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-200444	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----