

令和 6 年 4 月 19 日現在

機関番号：23903  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2020～2023  
課題番号：20K08361  
研究課題名(和文) PDTと免疫チェックポイント阻害剤の併用療法による相乗効果のメカニズムの解明  
  
研究課題名(英文) The mechanism of synergistic effects of combination therapy with PDT and immune checkpoint inhibitors  
  
研究代表者  
田中 守 (Tanaka, Mamoru)  
  
名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教  
  
研究者番号：80617861  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：光線力学的療法(Photodynamic Therapy, PDT)は、光感受性物質が選択的に集積した腫瘍組織にレーザー光を照射し腫瘍細胞を選択的に破壊する低侵襲な治療法である。また免疫チェックポイント阻害剤は、持続的な腫瘍縮小効果を示すが、その奏効率は限定的である。本研究ではPDTと免疫チェックポイント阻害剤の併用療法の相乗効果の基礎的なメカニズムをDAMPsの放出や腫瘍内環境の変化を中心に解明し、今後の課題である免疫チェックポイント阻害剤に対する抵抗性・耐性を克服するための治療戦略の確立を目指す。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

PDTとICIそれぞれは現在すでに臨床応用をされており、さらに現在併用の臨床試験を施行しており、これにより効果が確認され今後標準治療となることが期待されている。今回の検討結果はその動機付けの一つになったかと考えている。

研究成果の概要(英文)：Photodynamic therapy (PDT) is a minimally invasive therapy that selectively destroys tumor cells by irradiating laser light onto tumor tissue where light-sensitive substances have selectively accumulated. Immune checkpoint inhibitors show sustained tumor shrinkage, but the response rate is limited.

We found that PDT induces immunogenic cell death (ICD) and activates anti-tumor immunity via the release of Damage-associated molecular patterns (DAMPs). radiation therapy (RT), and synergistic effects of combination therapy with immune checkpoint inhibitors are highly expected. In this study, we aim to elucidate the basic mechanism of the synergistic effect of combination therapy with PDT and immune checkpoint inhibitors, focusing on the release of DAMPs and changes in the tumor environment, and to establish a therapeutic strategy to overcome resistance and tolerance to immune checkpoint inhibitors, which is a future challenge.

研究分野：消化器内科

キーワード：PDT ICD DAMPs PD-1

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えるわが国において低侵襲な癌治療法の開発が望まれるが、この観点から注目を集めているのが PDT である。PDT とは、腫瘍親和性光感受性物質(photosensitizer, PS)の集積した癌組織に特定波長の光線を照射し、活性酸素の惹起で癌細胞のみを選択的に破壊する治療法である。現在、本邦では第 2 世代の Talaporfin sodium (TS) が食道癌にも保険適用となったが、その効果は十分とはいえず、またその効果は局所にとどまる。近年、従来の抗がん剤や RT の免疫応答のメカニズムが解明されつつあり、その有望性が明らかになってきている。RT では、アブスコパル効果により抗腫瘍免疫が活性化し、非照射のがん細胞にも抗腫瘍作用が起こることがわかっている。PDT においても、直接的な殺細胞効果のみではなく、ICD が誘導されることが報告されている (Castano AP, et al. Nat Rev Cancer. 2006 Jul;6(7): 535-45)。

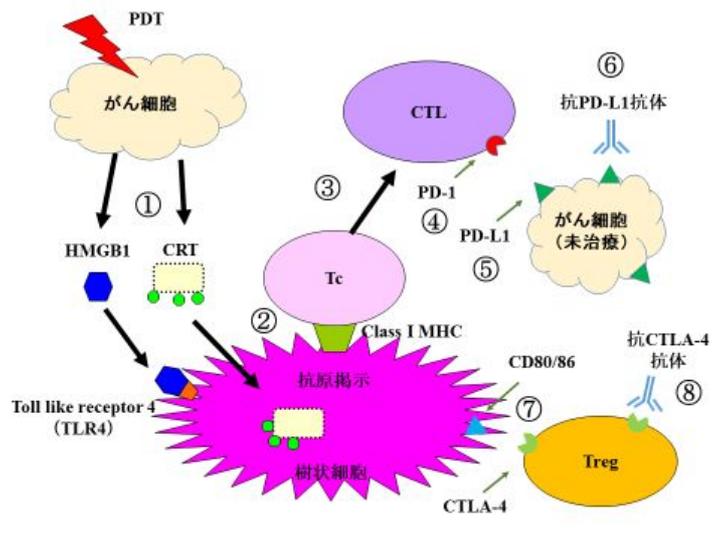
したがって、PDT に免疫チェックポイント阻害薬を併用することで相乗効果が期待できる(下図)。その予想されるメカニズムは、がん組織に PDT を行うとがん細胞に ICD を誘導してがん抗原や DAMPs が放出される、がん抗原や DAMPs は樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞に取込まれ、抗原提示細胞上の主要組織適合抗原複合体 (major histocompatibility complex, MHC) に提示される。MHC はがん抗原を介して細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 上の T 細胞受容体 (T cell receptor, TCR) と反応して CTL を活性化し、抗腫瘍免疫を活性化させ非治療部位にも抗腫瘍効果を発揮する。

しかし、その抑制メカニズムとして、CTL は活性化されると PD-1 (Programmed death-1) が発現する。がん細胞には PD-1 のリガンドである PD-L1 が発現している。PD-1 と PD-L1 が結合すると CTL は増殖が抑制される。PDT でダメージを受けたがん細胞には myeloid-derived suppressor cells (MDSC) が集積し、MDSC は制御性 T 細胞

(regulatory T cell, Treg) を増加させる。

Treg は CTLA-4 (CTL-associated protein 4) を発現しており、そのリガンドである CD80/86 は抗原提示細胞に発現している。CTLA-4 と CD80/86 が結合すると抗原提示細胞の活性化が抑制される。

そこで PD-1 と PD-L1 の結合 ( ) CTLA-4 と CD80/86 の結合 ( ) をこれらの特異抗体 (抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 CTLA-4 抗体) で阻害すると CTL の抗腫瘍活性を高めることができると考えられる。



**PDT と免疫チェックポイント阻害剤の併用療法の相乗効果のメカニズム (予想)**

## 2. 研究の目的

本研究では PDT と免疫チェックポイント阻害剤の併用療法による相乗効果のメカニズムを解明することを目標とする。今後の臨床応用、臨床効果の向上、臨床適応範囲の拡大において基礎的なメカニズムを解明することは必須と考える。

## 3. 研究の方法

### ① PDT と免疫チェックポイント阻害剤の併用療法の殺細胞メカニズムの解析

癌細胞株に光感受性物質を投与し、660nm の LED ( LEDR-660DL , Optocode Corporation , Tokyo , Japan ) を 16 J/cm<sup>2</sup> 照射し PDT を施行し、WST-8 細胞増殖アッセイによる殺細胞効果の測定、さらには Caspase-3 FITC ( MBL )、PI でラベルし FACS Calibur ( BD Biosciences , Tokyo , Japan ) にてアポトーシス、ネクローシスを検討した。

#### PDT による ICD の指標となる DAMPs の発現の検討

PDT 処理した細胞の Calreticulin ( CRT ) の免疫蛍光染色を行い、蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡下で観察する。さらに HMGN1、ATP の発現を FACS Calibur にて解析する。

#### Syngeneic 皮下移植腫瘍モデルでの PDT と免疫チェックポイント阻害剤の併用療法の抗腫瘍効果の検討

正常免疫マウス ( BALB/c、C57BL/6 ) の側背部皮下にマウスの大腸癌細胞株 ( CT26、CMT93 ) を移植し、皮下腫瘍移植モデルを作成し、光感受性物質を尾静脈より投与・レーザー照射 ( PDL664、メディカル SG 社製 ) を行い同日より免疫チェックポイント阻害剤を腹腔内投与し腫瘍体積の経時変化を測定した。また対側にも腫瘍を作成し非照射の腫瘍の縮小効果についても検討した。

#### PDT と免疫チェックポイント阻害剤の併用療法の腫瘍内環境変化の検討

Syngeneic 皮下移植腫瘍モデルに PDT と免疫チェックポイント阻害剤の併用療法を行った後、動物を安楽死させ、マウスから腫瘍を摘出し組織学的な検討、さらには細胞傷害性分子の発現について評価した。

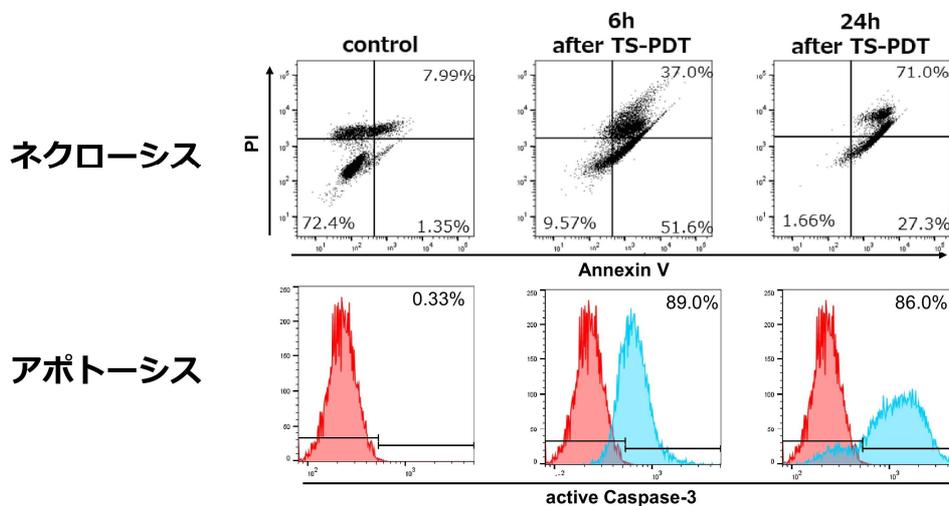
## 4. 研究成果

### ① PDT と免疫チェックポイント阻害剤の併用療法の殺細胞メカニズムの解析

24 時間後のタラポルフィン PDT による 24 時間後 IC<sub>50</sub> を測定し殺細胞効果を確認した。タラポルフィンを用いた PDT では濃度依存的に殺細胞効果があることがわかった。

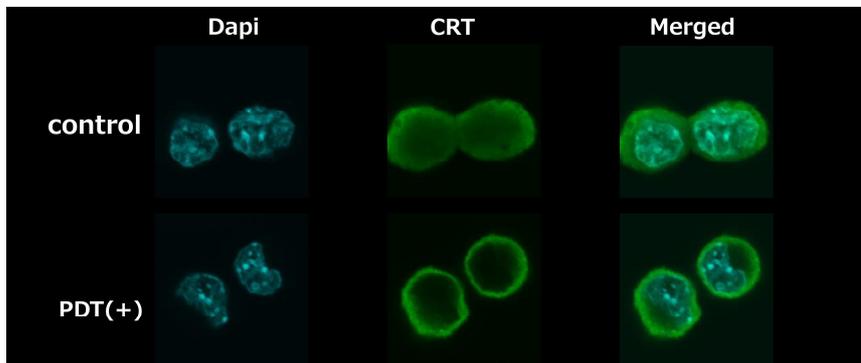
Cancer cell	Murine-Colon ca.	Human-Colon ca.	Human-Esophagus ca.
	MC38	HCT116	KYSE30
<b>TS</b>	11.2 ± 0.6μM	14.2 ± 1.4μM	6.5 ± 0.4μM

また 6 時間が 24 時間後のタラポルフィン PDT によりネクローシス・アポトーシスが誘導されていることを確認した。

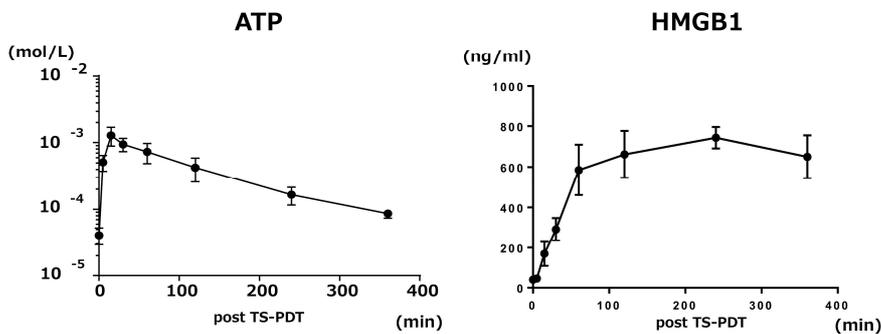


### PDTによるICDの指標となるDAMPsの発現の検討

蛍光免疫染色を用いて、CRTを評価した。CRTは通常は細胞の小胞体中存在するが、アポトーシスに伴い細胞表面に表出しシグナルとしてはたらくことが知られている。PDT後の細胞では、細胞表面で濃く染色され、細胞表面への移行が確認した。

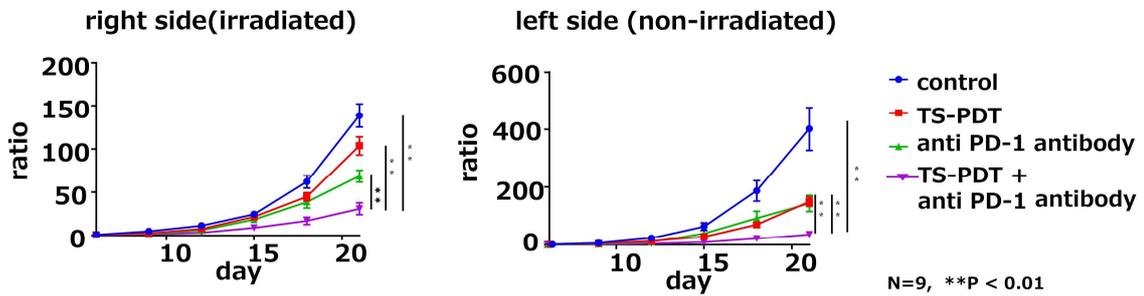


ATP・HMGB1ともに、PDT後早期より放出がおこることを確認した。以上よりTS-PDTにて細胞死がおこり、DAMPsがリリースされることがわかったため、PDTと抗PD1抗体を組み合わせることで、癌免疫サイクルを活性化し、治療相乗効果が得られるのではと考えた。



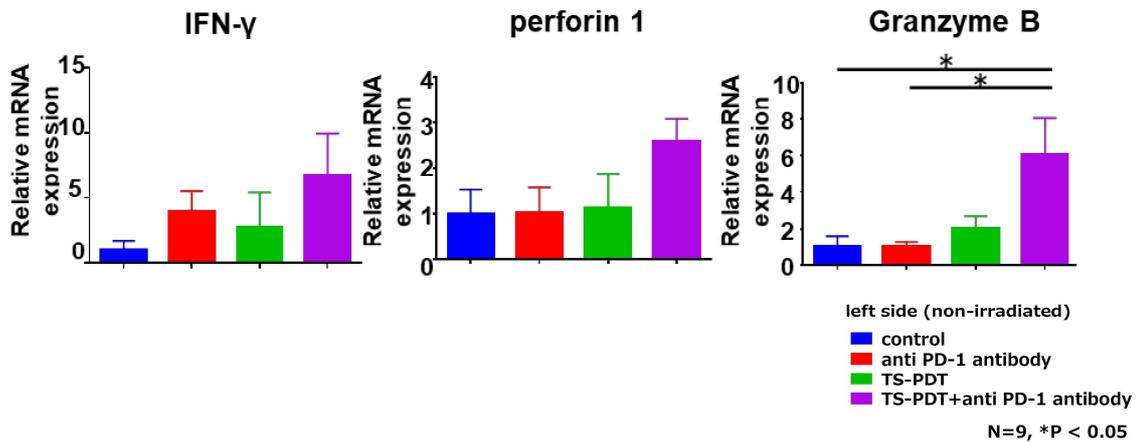
### Syngeneic皮下移植腫瘍モデルでのPDTと免疫チェックポイント阻害剤の併用療法の抗腫瘍効果の検討

PDT照射側ではPDTおよび抗PD1抗体併用群にて、PDT単独、抗PD1抗体単独治療群に対して、強い抗腫瘍効果を認めた。PDT単独群においても、非治療群よりも抗腫瘍効果をしめしているのはアブスコパル効果によるものと考えられた。4群の比較では、照射側同様に、併用群において最も抗腫瘍効果を認めた。

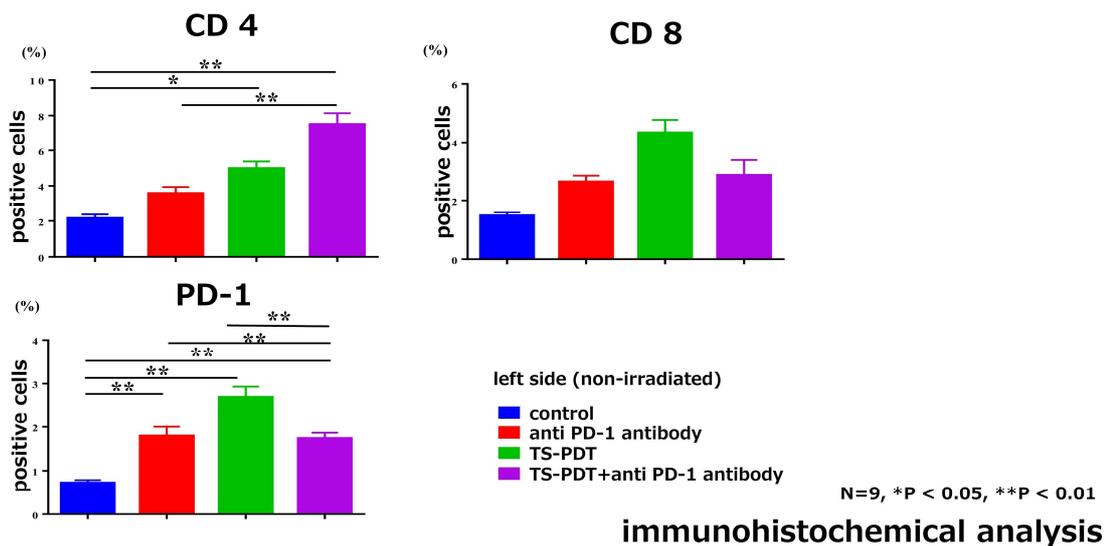


PDT と免疫チェックポイント阻害剤の併用療法の腫瘍内環境変化の検討

TS-PDT と PD-1 抗体を併用した治療群では IFN- $\gamma$ ・perforin 1・GranzymeB が上昇していることがわかり、併用療法による強化された免疫誘導が示唆された。



同様に、TIL の評価になします。IFN $\gamma$  や PFN1 などの細胞障害性因子がでていることを裏付けるよう、CD4/CD8 といった細胞障害性 T 細胞が誘導されていることを確認した。また PDT 単独治療に関しては、コントロール群と比較すると、細胞障害性 T 細胞の誘導を認めますが同時に PD1 の upregulation が起こっていることもわかった。



PDT では直接的な細胞死のみならず、腫瘍免疫が増強されることがわかり、また、PDT と免疫チェックポイント阻害薬の併用による治療効果の増強が vitro とよび vivo にて確認した。上記の結果より、タラポルフィンを用いた光線力学的療法は免疫チェックポイント阻害薬との併用により治療効果の増強が示唆された。これらのデータをまとめ Mol Ther Oncolytics. 2023 Mar 16; 28: 118-131.として報告した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sasaki Makiko, Tanaka Mamoru, Kojima Yuki, Nishie Hirotsada, Shimura Takaya, Kubota Eiji, Kataoka Hiromi	4. 巻 28
2. 論文標題 Anti-tumor immunity enhancement by photodynamic therapy with talaporfin sodium and anti-programmed death 1 antibody	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Oncolytics	6. 最初と最後の頁 118 ~ 131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omto.2022.12.009	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 Tanaka Mamoru, Sasaki Makiko, Suzuki Taketo, Nishie Hirotsada, Kataoka Hiromi	4. 巻 539
2. 論文標題 Combination of talaporfin photodynamic therapy and Poly (ADP-Ribose) polymerase (PARP) inhibitor in gastric cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1 ~ 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.12.073	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Suzuki Taketo, Tanaka Mamoru, Sasaki Makiko, Ichikawa Hiroshi, Nishie Hirotsada, Kataoka Hiromi	4. 巻 12
2. 論文標題 Vascular Shutdown by Photodynamic Therapy Using Talaporfin Sodium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2369 ~ 2369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12092369	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Kataoka Hiromi, Nishie Hirotsada, Tanaka Mamoru, Sasaki Makiko, Nomoto Akihiro, Osaki Tomohiro, Okamoto Yoshiharu, Yano Shigenobu	4. 巻 10
2. 論文標題 Potential of Photodynamic Therapy Based on Sugar-Conjugated Photosensitizers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 841 ~ 841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm10040841	査読の有無 無
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12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mamoru Tanaka
2. 発表標題 Efficacy of photodynamic therapy with talaporfin sodium as a salvage treatment for local failure of esophageal cancer.
3. 学会等名 3rd World Congress of GI Endoscopy, ENDO 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Makiko Sasaki, Mamoru Tanaka, Yuki Kojima, Hirotsada Nishie, Takaya Shimura, Eiji Kubota, Hiromi Kataoka
2. 発表標題 Potentiality and future prospects of photodynamic therapy as cancer immunity therapy
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木槇子、田中守、小島悠揮、西江裕忠、片岡洋望
2. 発表標題 タラポルフィンナトリウムを用いた光線力学療法による癌免疫誘導の解析と免疫チェックポイント阻害薬併用による相乗効果の検討
3. 学会等名 第32回日本光線力学学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木槇子 田中守 小島悠揮 西江裕忠 片野敬仁 尾関啓司 志村貴也 久保田英嗣 片岡洋望
2. 発表標題 光線力学療法による癌免疫誘導と免疫チェックポイント阻害薬併用による相乗効果
3. 学会等名 第19回日本消化管学会総会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐々木慎子、田中 守、西江裕忠、片岡洋望
2. 発表標題 Talaporfin sodiumを用いた光線力学的療法と抗PD-L1抗体による治療相乗効果の検討
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 守, 西江 裕忠, 片岡 洋望
2. 発表標題 タラポルフィンを用いた光線力学的療法の成績～vascular shut downの基礎的検討も含めて～
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木 慎子, 田中 守, 片岡 洋望
2. 発表標題 光線力学的療法による免疫原性細胞死誘導および癌免疫療法との相乗効果の検討
3. 学会等名 第101回 日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西江裕忠 , 小島悠揮, 佐々木慎子, 田中守 , 片岡洋望
2. 発表標題 食道癌遺残再発例に対する内視鏡治療 ～当院での光線力学的療法の治療成績～
3. 学会等名 第75回日本食道学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 守
2. 発表標題 当院における食道癌化学放射線療法後の局所遺残再発例に対するPDTの有害事象について
3. 学会等名 LASER WEEK IN TOKYO
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木槿子、田中 守、西江裕忠、片岡洋望
2. 発表標題 Talaporfin sodiumを用いた光線力学的療法と抗PD-L1抗体による治療相乗効果の検討
3. 学会等名 第41回日本レーザー医学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木槿子、田中 守、片岡洋望
2. 発表標題 当院における食道癌化学放射線療法後の局所遺残再発例に対するタラポルフィンナトリウムを用いた光線力学的療法の成績
3. 学会等名 第61回日本消化器内視鏡学会東海支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Makiko Sasaki, Mamoru Tanaka, Taketo Suzuki, Hirotada Nishie, Hiromi Kataoka
2. 発表標題 Photodynamic diagnosis for detection of gastrointestinal stroma tumors (GIST) using 5-aminolaevulinic acid
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究 分担 者	片岡 洋望  (KATAOKA HIROMI)  (40381785)	名古屋市立大学・薬学総合研究院(医学)・教授    (23903)	

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
---------	---------