

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09009

研究課題名（和文）がん微小環境に対するPhotoimmunotherapyの前臨床研究

研究課題名（英文）Preclinical study of photoimmunotherapy for tumor microenvironment

研究代表者

野間 和広（Noma, Kazuhiro）

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：10534761

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）：in vitroにてCAFsを標的とする抗体（抗FAP抗体）Sibrotuzumabを用いたPITの効果を検証した。癌細胞にはHerceptinやCetuximabを用いたPIT-cancerを確立した。癌に対するPITを同時に行うin vitroのDual-PITの効果を確認した。さらに食道癌患者より得られたPatient derived xenograft (PDX)を用いたin vivo実験を行った。結果、Sibrotuzumabを用いたPITはin vitroに加えPDXモデルにおいてもその効果を認めた。さらに癌およびCAFsに対するDual-PIT治療は著明な抗腫瘍効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においては既に臨床応用されていた抗体抗FAP抗体Sibrotuzumabを用いたPhotoimmunotherapy (PIT)の開発、並びに癌に対するPITとの同時療法の良い治療効果を示した。さらに患者由来PDXモデルを用いたより臨床応用に近いモデルでの治療効果を示しより臨床応用での治療効果を示した。Dual-PITは一度の照射で2つの標的、特に腫瘍微小環境（TME）並びに癌細胞を治療する画期的な方法である。TMEの中心的役割を担うCAFsの治療はTMEのremodelingを行うこととなり免疫療法などと強い相乗効果が期待される。まさに全ての癌治療を大きく改善する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The efficacy of Photoimmunotherapy (PIT) utilizing Sibrotuzumab, an anti-FAP antibody targeting Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs), was evaluated through in vitro experiments. PIT-cancer models were established by Herceptin and Cetuximab with cancer cells. The study confirmed the effectiveness of Dual-PIT in vitro, wherein simultaneous PIT was applied to both cancer cells and CAFs. Additionally, in vivo experiments were conducted using patient-derived xenografts (PDX) derived from esophageal cancer patients. The results demonstrated the efficacy of PIT with sibrotuzumab not only in vitro but also in the PDX model. Moreover, the Dual-PIT treatment approach, targeting both cancer cells and CAFs, exhibited significant anti-tumor effects.

研究分野：Tumor microenvironment

キーワード：Tumor microenvironment CAFs Esophageal cancer Photoimmunotherapy immunotherapy

1. 研究開始当初の背景

癌細胞を標的とした新規治療の開発が進み飛躍的に予後改善を認める癌種も出てきていたが依然として難治性を示す癌もあり、それには「がん微小環境」による作用、特にがん微小環境において中心的な役割を担うとされる癌関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblasts: CAFs) が関与しているとされ、その制御法開発が活発化していた。Near infrared-Photoimmunotherapy (NIR-PIT) は、2011 年に NIH の小林久隆らにより乳癌細胞に対する光線免疫療法が発表された。PIT は抗 HER2 抗体である Trastuzumab に特殊蛍光色素 IR700 を抱合し (antibody-photosensitizer conjugate: APC)、癌細胞表面と抗原抗体反応させ近赤外線光を照射し HER2 陽性細胞のみ特異的に殺傷する治療法である。本技術は当時既に米国では抗 EGFR 抗体を用いて頭頸部癌に対する有効性が示され、本邦においては大規模な Phase I/II が開始となっていた。今後多くの癌に対する臨床応用が期待されていた。

我々はそれまでに食道癌における CAFs に注目し CAFs の細胞治療として NIH 小林らと協力し CAFs 特異的な表面抗原 FAP (fibroblasts activation protein) を標的とした NIR-PIT-CAFs を開発した。in vitro/ in vivo では PIT で CAFs を制御し、癌増殖や治療抵抗性を阻害することに成功していた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、食道癌に対する PIT-癌細胞と我々が開発してきた PIT-CAFs と同時治療を行いその有効性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

- 1) まず当科での食道癌症例における CAFs と予後の相関関係を確認する。
- 2) 続いて PIT-CAFs に関しては臨床応用に近づけるために臨床実績のある抗体 Sibrotuzumab (抗 FAP 抗体) を用いて PIT 治療を確立する。
- 3) さらに in vivo においては癌および線維芽細胞株を用いた Xenograft にて PIT-CAFs と PIT-癌細胞の併用治療の有効性を検証する。
- 4) 食道癌の切除標本より患者由来腫瘍モデル Patient derived xenograft を作成する。
- 5) 最後に Patient Derived Xenograft を用いて癌細胞に対する PIT との同時併用療法の治療効果を検討する。

4. 研究成果

- 1) 食道癌の臨床検体を用いて FAP 陽性 CAFs と食道癌患者の予後の関係を検証した。それぞれの症例腫瘍組織切片に FAP を用いて免疫染色を行い FAP の発現を ImageJ を用いて Area index (%) を用いて数値化し検討した。Area index の中央値を cut off とし、多い群と少ない群に分け臨床病理学的に検討した。結果、FAP-CAFs が多い症例は OS ならびに DFS とともに予後が悪いことが示された。以上より本研究評価法では食道癌において FAP-CAFs が多く発現している (間質が増生している) 症例は予後不良であると示された。このことは PIT-CAFs が予後改善をもたらす可能性を示唆した。
- 2) 続いて in vitro において食道癌細胞株 TE8 並びに食道線維芽細胞株 FEF3、また肺由来線維芽細胞株 WI38 を用いて抗 FAP 抗体 (Sibrotuzumab) を用いた PIT-CAFs の CAFs の特異的殺傷能力を検証した。まず in vitro において上述の癌細胞株が線維芽細胞を活性化し CAFs 化させる (FAP を発現する) が否か確認した。食道癌細胞株 TE8 を用いた刺激実験では線維芽細胞株 FEF3 また WI38 細胞株は活性化され FAP を高発現することが示された。さらに in vivo (nude mouse) にて食道癌細胞株 TE8 と線維芽細胞株 FEF3 との共培養では癌細胞単独培養腫瘍より共培養群の方がより腫瘍増殖することが示された。また腫瘍内での CAFs の増生も確認した。続いて Sibrotuzumab を用いて PIT を開発した。光感受性物質 IR700 を抗体に抱合し APC を作成し、実際に TE8 を用いて刺激し CAFs 化させた FEF3 や WI38 の線維芽細胞株の PIT 効果を検証した。いずれも光量依存的に CAFs 化した線維芽細胞の殺細胞効果を示した。
- 3) 続いて上記の細胞株を用いて in vivo における治療効果を検証した。まず CAFs の多い腫瘍モデルを作成し癌細胞単独を標的とした PIT、また CAFs 単独、さらに両方の抗体を用いた同時二つ細胞標的 (Dual-targeted) の治療効果を検証した。コントロール (無治療) に比べ上記 3 群はいずれも有意に治療効果を認め、Dual 治療が最も強い治療効果を示した。CAFs 単独治療よりも Dual 治療の方が有意に治療効果を認めたが、Dual 治療は癌細胞単独とは有意な差を示さなかった。
- 4) 上記実験を行うと同時に PDX モデル作成を行った。食道癌切除症例からの腫瘍切除片を用いて PDX を作成した。継代を進めるにあたり表現型が変化しないか元の切除標本 (永久標本) と PDX の EGFR 並びに FAP の発現を確認した。また腫瘍微小環境の変化がないか検証した。いずれも原発巣と変化なく表現型が維持されていることが示された。また CAFs に関し

ても FAP 以外のマーカーである SMA や治療抗体である Sibrotuzumab を用いた別の評価法で検証したが、いずれも間質の細胞に発現し CAFs のマーカーとしての維持も示された。

- 5) 最後に上記 in vivo 試験を PDX モデルにて検証した。コントロール（無治療）に比べ何の 3 群も有意に治療効果を示した。ここでも Dual 治療が最も強い治療効果を示したが、癌単独、CAFs 単独、Dual 治療群それぞれの有意差は認めなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河崎健人、小林照貴、野間和広ほか
2. 発表標題 癌関連線維芽細胞による免疫抑制環境での免疫チェックポイント阻害薬の有効性の探求
3. 学会等名 第42回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 國友知義、小林照貴、野間和広ほか
2. 発表標題 Drug repositioning による新規がん治療の開発に向けて -がん関連線維芽細胞由来 IL-6 の作用と制御
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河崎健人、小林照貴、野間和広ほか
2. 発表標題 癌関連線維芽細胞がPD-1/PD-L1を制御し予後を不良にする
3. 学会等名 第32回日本消化器癌発生学会総会 / 第10回国際消化器癌発生会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林照貴、野間和広ほか
2. 発表標題 癌細胞および癌関連線維芽細胞を標的とした光免疫療法
3. 学会等名 日本癌局所療法研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林照貴、野間和広ほか
2. 発表標題 A novel photoimmunotherapy for cancer-associated-fibroblasts targeting fibroblast activation protein- ~Sunrise of targeting tumor microenvironment therapy~
3. 学会等名 日本外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林照貴、野間和広ほか
2. 発表標題 Development of novel photoimmunotherapy targeting cancer associated fibroblasts
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林照貴、野間和広ほか
2. 発表標題 癌細胞および癌関連線維芽細胞を標的とした光免疫療法の新たな開発
3. 学会等名 日本消化器癌発生学会
4. 発表年 2020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	白川 靖博 (Shirakawa Yasuhiro) (60379774)	岡山大学・医学部・客員研究員 (15301)	

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