

令和 5 年 4 月 4 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12699

研究課題名(和文) 腫瘍関連抗原と免疫チェックポイント分子CTLA4を同時標的化する光免疫療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of cancer photoimmunotherapy allowing simultaneous targeting of tumor-associated antigen and immune checkpoint molecule CTLA-4

研究代表者

白須 直人 (Shirasu, Naoto)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：70551422

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)：本研究では、近赤外光感受性物質を結合させたアビジン(AvIR)と、腫瘍関連抗原およびCTLA-4に特異的なビオチン化抗体(BioAb)を用いた光免疫療法(AvIR-PIT)のによって、腫瘍細胞のみならず制御性T細胞を併せて殺傷するAvIR-PITについての検討を行った。マウス乳癌由来4T-1-luc2細胞株およびCTLA-4を安定発現するCHO-K1細胞をモデルとした用いたin vitroにおけるAvIR-PITを検討した結果、表面抗原特異的で強力な殺細胞効果が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コロナ禍の制約の中でin vivoにおけるAvIR-PITの詳細な解析には着手できなかったが、腫瘍関連抗原と免疫チェックポイント分子を同時標的化するAvIR-PITのコンセプトをin vitroにおいて実証することができた。AvIRを用いたPITは今回標的としたCD44やCTLA-4に留まらず、さまざまな細胞表面抗原を標的化して殺傷できるため、より有効な標的分子を対象とすることで、近赤外光照射腫瘍のみならず、転移した遠隔腫瘍に対しても腫瘍免疫応答を惹起するような治療へと展開できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated the efficacy of AvIR-PIT, a photoimmunotherapy using avidin conjugated with a near-infrared photosensitizer (AvIR), and biotinylated antibodies (BioAbs) specific to tumor-related antigens and CTLA-4, for not only killing tumor cells but also regulatory T cells. We evaluated AvIR-PIT in vitro using mouse breast cancer-derived 4T-1-luc2 cells and CHO-K1 cells stably expressing CTLA-4, and confirmed that it exhibited a strong and specific cytotoxic effect against surface antigen-positive cells.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：光免疫療法 CTLA-4 免疫チェックポイント分子

## 1. 研究開始当初の背景

生体に無害な特定波長の光と光感受性物質 (PS) の利用により光化学反応を惹起して細胞を傷害する光線力学療法は、低侵襲性で安全性の高い治療法として期待されている。しかしながら、従来の PS は腫瘍への集積性や選択性が低く、標的近傍の正常組織にも光毒性が及ぶといった問題のため、癌の治療法としては一般的ではない。近年、腫瘍関連抗原 (TAA) に特異的な抗体分子と PS とのコンジュゲートを用いて腫瘍細胞を標的化し、これに対して光照射を行うことで腫瘍細胞のみを殺傷する光免疫療法 (PIT) が、その高い特異性と有効性から注目されており、現在、抗上皮成長因子受容体 (EGFR) 抗体と PS とのコンジュゲートを用いた再発頭頸部がんに対する第 III 相臨床試験が進行中である。研究代表者も、血中のヘモグロビンや水分子による吸収が少なく生体透過性が高い 690 nm の近赤外光 (NIR) によって励起される PS である IRDye700DX (IR700) と、代表的な TAA である抗癌胎児性抗原 (CEA) 抗体とのコンジュゲートを用いて、CEA 陽性腫瘍に特異的な *in vitro* および *in vivo* における PIT の成功を報告している。しかしながら、一般に腫瘍は不均一な細胞集団で構成されており、また、病状や放射線・抗癌剤治療の経過に伴って TAA の発現パターンが動的に変化したり、腫瘍が治療抵抗性を獲得することが知られている。そのため、現行の癌治療法や単一の TAA に対する抗体のみを用いる PIT では、一時的な腫瘍の退縮は見込めても癌根治は極めて困難であると考えられ、事実、研究代表者の報告でも腫瘍細胞の再増殖を認めている。

広範な癌種や TAA の発現変化に PIT を有効に適用させるには、様々な TAA に対応した一連の特異的な抗体と PS のコンジュゲートを都度準備して治療を行う必要があると考えられるが、これは極めて煩雑であり、時間的・経済的なコストが高く現実的ではない。そこで研究代表者は、このような問題を回避して多様な腫瘍や TAA に適応可能な汎用性の高い PIT を実現するため、アビジンに IR700 を結合させたコンジュゲート (AvIR) を用いた新規な PIT について検証してきた。無数に存在する抗原特異的な BioAb は容易に入手可能であるため、これらを標的化に利用できるとなれば PIT の適用範囲は飛躍的に増大する。研究代表者は、この戦略に則り、様々な BioAb を逐次的、あるいは複数種同時に用いることで、TAA の発現変化にも対応可能な AvIR-PIT の有用性を実証し、ヘテロな腫瘍細胞集団のみならず、腫瘍の微小環境を構成する間質細胞や血管内皮細胞、さらには癌幹細胞等をも標的とする包括的な癌治療への道を拓いた (*Cancer Cell Int.* 19:299 (2019))。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、独自に開発した AvIR-PIT の新たな応用展開として、細胞傷害性 T リンパ球抗原 4 (CTLA-4) に特異的な BioAb を標的化分子として採用する。CTLA-4 は T 細胞の活性化に伴って発現が誘導され、T 細胞の補助刺激受容体である CD28 と、そのリガンドである抗原提示細胞上の CD80/CD86 との結合を拮抗的に阻害することによって、T 細胞の免疫応答を負に制御する免疫チェックポイント分子である。また CTLA-4 は、抗腫瘍免疫応答の抑制に中心的な役割を担う FoxP3 陽性制御性 T 細胞 (Treg) 上には恒常的に発現しており、CD80/CD86 との結合を介して抗原提示細胞の成熟を阻害し、T 細胞の活性化を抑制する。悪性黒色腫に対して本邦でも承認されている抗 CTLA-4 抗体・イピリムマブは、活性化 T 細胞の抑制的調節を遮断するとともに、Treg の機能を抑制して抗腫瘍免疫応答を亢進し、腫瘍抗原特異的な T 細胞を増殖・活性化させて抗腫瘍効果を発揮する。その臨床効果は時に著明かつ持続的だが、単剤での奏効率は 10-20% 程度であり、適応する患者を層別化するバイオマーカーも同定されていない現状である。一方、PIT によって引き起こされる迅速かつ強力な細胞損傷は、標的細胞からの腫瘍抗原やダメージ関連分子パターン (DAMPs) の放出を誘導し、抗原提示細胞の活性化と成熟を促すと考えられるが、Treg によって免疫抑制的な微小環境が構築されている状況では有効な抗腫瘍免疫応答の成立が阻害されてしまう。そこで、同時に多種の細胞を標的化して特異的に殺傷できるという AvIR の強みを活かし、TAA と CTLA-4 の双方を標的分子とした AvIR-PIT について検討することとした。すなわち、TAA と CTLA-4 に特異的な BioAb のカクテル抗体を AvIR の標的化に使用することにより、前者でバルクの腫瘍細胞を叩きつつ、後者によって腫瘍内部に浸潤している Treg を殺傷・除去することで抗腫瘍免疫を効果的に誘導し、治療効果の増強を図る戦略である。これにより、Treg によって抑制されていた腫瘍局所の免疫応答が回復し、PIT によって傷害された癌細胞由来の抗原に特異的な CTL の増殖が誘導された結果、光照射部位を超えて全身性の抗腫瘍効果が導かれるものと期待される。

## 3. 研究の方法

#### ( 1 ) 腫瘍細胞と Treg を同時標的化した AvIR-PIT の細胞傷害効果の検証

ルシフェラーゼを恒常発現する BALB/c マウス乳癌由来 4T-1-luc2 細胞株 (約 40%が CD44 陽性) および新たに作製した CTLA-4 を安定発現する CHO-K1 細胞を標的として、CD44 あるいは CTLA-4 に特異的な BioAb (それぞれ BioCD44, BioCTLA4) と AvIR を用いた PIT の *in vitro* における殺細胞効果について検証した。それぞれの細胞に対して BioAb および AvIR を投与し、AvIR の標的結合性と選択性について、IR700 の蛍光を指標としたフローサイトメトリーによって解析を行った。また、標的結合後の AvIR の局在について、共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光イメージングによって明らかにした。それぞれの標的細胞に対して BioAb および AvIR を結合させた後、LED 照明装置 (ピーク波長 : 690 nm) を用いて NIR (1~5 J/cm<sup>2</sup>) を照射し、PIT を実施した。PIT 後の細胞について、フローサイトメトリーおよび細胞生存性アッセイを行った。

#### ( 2 ) AvIR-PIT の *in vivo* における抗腫瘍効果の検証

正常な免疫応答能をもつ BALB/c マウスの背側両体側に、4T-1-luc2 細胞を皮下移植して同種同系担がんモデルを作製した。このマウスに対して、BioCD44 および BioCTLA-4 を単独あるいは混合投与し、さらに AvIR を投与し、非侵襲リアルタイム *in vivo* イメージングシステム・IVIS Lumina II を用いて、IR700 由来の蛍光と、ルシフェリン投与による腫瘍細胞由来の生物発光とを指標として、BioAb と AvIR の生体内組織分布および腫瘍への集積性を時空間的に解析した。AvIR の集積を確認した後、片側の腫瘍に対してのみ NIR (100 J/cm<sup>2</sup>) を照射して PIT を実施する。両側腫瘍の生物発光量および腫瘍径を経時・経日的に測定した。さらに、治療後の腫瘍組織を摘出し、組織化学的な解析に備えて保存した。

### 4 . 研究成果

#### ( 1 ) 腫瘍細胞と Treg を同時標的化した AvIR-PIT の細胞傷害効果

4T-1-luc2 細胞、あるいは CTLA-4 発現 CHO-K1 細胞に対し、BioCD44 and/or BioCTLA-4 と AvIR を投与し、AvIR-PIT を行った。その結果、対応する抗原を発現する細胞に対してのみ、PIT による著しい殺細胞効果が認められた。この抗腫瘍効果は光線強度および抗体濃度依存적であった。これらの細胞を共培養したところに AvIR-PIT を行った場合、対応する抗原を発現しない細胞は抗原を発現する細胞に隣接している場合においてさえ全く傷害されず、極めて高い選択性を示すことが明らかとなった。さらに、低酸素培養下においても AvIR-PIT の効果は減弱せず、強い抗腫瘍効果が発揮された。BioAb と AvIR の標的細胞に対する高い結合親和性と選択性は、フローサイトメトリーと共焦点レーザー顕微鏡による解析からも確認された。

#### ( 2 ) AvIR-PIT の *in vivo* における抗腫瘍効果

4T-1-luc2 細胞を BALB/c マウスの背側両体側に皮下移植し、同種同系担がんモデルを作製した。このマウスに対して BioCD44/BioCTLA-4/AvIR を混合投与し、右側腫瘍のみに NIR を照射して AvIR-PIT を実施した。腫瘍由来の生物発光を *in vivo* イメージングシステムにより計測し、抗腫瘍効果を調べた結果、NIR を照射した腫瘍のみならず、非照射側の腫瘍の生物発光が減弱した例も認められ、AvIR-PIT によるアブスコパル効果の発現が確認できた。しかしながら、NIR 照射腫瘍に対する抗腫瘍効果自体の安定性が低く、腫瘍の増大を抑えられなかった例も少なからず確認され、その影響もあってアブスコパル効果を定量的に評価できるレベルの結果を得るに至らなかった。AvIR の蛍光は腫瘍への明確な集積性を示していたが、さらなる抗腫瘍効果を得るためには投与経路の変更や投与量の再検討が必要であると考えられた。より詳細な条件検討を行う予定であったが、研究期間を通じてのコロナ禍の煽りを受け、実験動物舎への入舎制限なども相俟って、思うように研究を進めることが叶わなかった。

#### < 引用文献 >

白須直人、芝口浩智、山田博美、黒木政秀、安永晋一郎、Cancer Cell International、19、2019、299

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Kiyoshima C, Shirasu N, Urushiyama D, Fukagawa S, Hirakawa T, Yoshikawa K, Izuchi D, Miyata K, Kurakazu M, Yotsumoto F, Hiromatsu K, Nomiya M, Eiji O, Hirose S, Ogura Y, Hayashi T, Hata K, Nabeshima K, Yasunaga S, Miyamoto S.	4. 巻 7(5)
2. 論文標題 MicroRNAs miR-4535 and miR-1915-5p in amniotic fluid as predictive biomarkers for chorioamnionitis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Future Sci OA.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2144/fsoa-2021-0006	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	安永 晋一郎  (Yasunaga Shin'ichiro)  (50336111)	福岡大学・医学部・教授   (37111)	
研究分担者	芝口 浩智  (Shibaguchi Hiroto)  (60295061)	福岡大学・医学部・講師   (37111)	

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