

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32651

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2023

課題番号：20K22824

研究課題名(和文) 光反応性血管新生阻害剤による腫瘍選択的治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a Tumor-Selective Therapy Using Photo-Responsive Angiogenesis Inhibitors

研究代表者

西村 尚(Nishimura, Takashi)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：00884785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ApcMin/+マウスを用いて、腫瘍内血管内皮を標的とする新たに開発された光免疫療法がマウスに自然発がんした大腸がんにも有効が確認することである。血管内皮に発現する VEGFR-2を標的とした光感受性抗体化合物(DC101-IR700)を投与し、内視鏡下で腫瘍に集積する蛍光を確認した。さらに腫瘍に近赤外光を照射して光免疫療法を行い、無治療コントロールと比較して有意に良好な抗腫瘍効果が得られたことを確認した。治療後、がん細胞の消失と炎症細胞の浸潤、血管内皮のフィブリノイド壊死が観察され、病理学的にも腫瘍内の血管内皮傷害によって抗腫瘍効果が得られたことが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍内血管内皮のVEGFR-2を標的とする新しい光免疫療法(NIR-PIT)がマウス大腸がんの治療として有効であることを証明した。従来の皮下移植モデルとは違い、自然発がんするマウス大腸がんモデルを用いた実験で効果を証明したため、人へ臨床応用しやすいことが期待される。この治療は正常細胞は傷害しないため従来のがん治療法に比べて副作用が少なく、より腫瘍選択的で効果的な大腸がん治療法の確立に寄与する可能性がある。これにより、患者の生存率の向上、及び生活の質の改善が期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to evaluate the efficacy of a newly developed photoimmunotherapy (PIT) targeting tumor endothelial cells in spontaneously developed colorectal cancer in ApcMin/+ mice. The study utilizes a photosensitive antibody compound (DC101-IR700) targeting VEGFR-2, expressed on the endothelial cells. The fluorescence accumulation in the tumor was confirmed via endoscopy following the administration of the compound. Subsequent exposure of the tumor to near-infrared light initiated the PIT process. A significant antitumor effect was observed when compared to untreated controls. After treatment, pathological examination revealed the disappearance of cancer cells, infiltration of inflammatory cells, and fibrinoid necrosis of the vascular endothelium. These findings confirmed that the antitumor effects were mediated through vascular endothelial injury within the tumor.

研究分野：腫瘍

キーワード：光免疫療法 VEGFR-2 Minマウス 大腸癌 蛍光内視鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 近赤外光免疫療法 (Near-infrared photoimmunotherapy; NIR-PIT) は従来のがん治療と異なる新しいがん治療である。がん細胞特異的なモノクローナル抗体と生体に無害な近赤外光を吸収して蛍光を発するプローブ IRDye700DX (IR700) の化合物は、がん細胞膜に結合し、近赤外光の照射によって抗体の認識するがん細胞膜を標的選択的に破壊し、壊死が誘導される[1]。また、この治療は蛍光プローブ IR700 の蛍光局在をガイドとして光線治療を行うことができるがん標的選択性の高い副作用の少ない治療法である。

(2) 2020年に切除不能な局所進行又は局所再発の頭頸部癌に対して保険適応となったが、この薬剤は抗EGFR抗体にIR700を化合したものであった。EGFRは扁平上皮がんや腺がんによく発現しているが、上皮系腫瘍の分子発現は多様であり、がん細胞膜抗原を標的とした既存のNIR-PITを幅広いがん腫に適応させるのは困難である。

(3) 我々は新生血管に発現するVEGFR-2を標的とした新しい作用機序のNIR-PITを報告してきた[2]。腫瘍内血管内皮発現分子を標的とした抗VEGFR-2抗体(DC101)とIR700の化合物DC101-IR700を作成し、ヒト胃がん細胞株を皮下移植したマウスモデルに対し、DC101-IR700を用いたNIR-PITを施行し、高い抗腫瘍効果が得られたことを報告した。このがん新生血管に発現するVEGFR-2を標的とした新しい作用機序のNIR-PITは、幅広いがん腫に対する適応が期待されている。

2. 研究の目的

今までに報告されているNIR-PITの研究成果はマウス皮下腫瘍モデルを用いた検討が大部分であったが、本研究課題ではマウスに自然発症する腫瘍に対してVEGFR-2を標的とするNIR-PITによって診断・治療が可能であるかについて、臨床的に課題の多い潰瘍性大腸炎合併大腸がんの克服を目指して、腸炎を背景に自然発がんするマウスモデルを用いて検討を行った。

本研究の目的は、Apc^{Min/+}マウスを用いて、腫瘍内血管内皮を標的とする新たに開発されたNIR-PITがマウスに自然発がんした大腸がんにも有効か確認することである。また、蛍光内視鏡を用いてマウス大腸がんの蛍光イメージングが可能かの検討も行った。

3. 研究の方法

(1) 抗マウスVEGFR-2抗体(DC101)とIR700を結合し、DC101-IR700を作成した。またがん細胞膜に発現するCD44に対する抗CD44抗体とIR700を結合し、CD44-IR700を作成した。In Vitro実験ではマウス大腸がんの細胞株Colon26を使用した。Colon26にDC101-IR700もしくはCD44-IR700を投与し、蛍光顕微鏡にてDC101-IR700、CD44-IR700のColon26細胞での局在を、またフローサイトメトリーにて蛍光強度を測定した。さらに近赤外光を照射することでNIR-PITを施行し、細胞障害性の評価も行った。

(2) Apc^{Min/+}マウスに2%デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を1週間内服させ、その2週間後にマウスをサクリファイスした。そして大腸を摘出して腫瘍が形成されているかを確認し、病理学的評価を行った。またDC101-IR700を静注した翌日にもマウスの大腸を摘出し、IVIS® Imaging SystemにてEx Vivo蛍光イメージングを施行した。

(3) Apc^{Min/+}マウスに2%DSSを1週間内服させ、その1週間後にマウス大腸がんの内視鏡による観察を行った。細径内視鏡をマウスの肛門から挿入し、白色光画像と蛍光画像を同時に撮影できるシステムにて、内視鏡観察を行った。

(4) Apc^{Min/+}マウスに2%DSSを1週間内服させ、その2週間後にIn vivoにおけるNIR-PITを施行した。DC101-IR700を投与し、翌日にマウス大腸の肛門からファイバーディフューザーを1cm挿入し、近赤外光を大腸の管腔内から照射した。その1週間後にマウスをサクリファイスして腸管を摘出し、治療効果について検討した。コントロール群、DC101-IR700投与のみの群、近赤外光の照射のみの群、NIR-PITを施行した群の4群で比較した。また病理学的な評価も行った。

4. 研究成果

(1) In vitro NIR-PIT

In vitro実験にて、CD44-IR700はColon26細胞において細胞膜に局在を蛍光顕微鏡で認めたが、DC101-IR700では蛍光が認められなかった(図1)。

Colon26 細胞に特異的に結合する CD44-IR700 と DC101-IR700 の蛍光シグナルをフローサイトメトリーで測定し、CD44 と VEGFR-2 の発現レベルを評価した。

フローサイトメトリーによる mean fluorescence intensity (MFI: アイソタイプ IgG コントロールとの比) は、CD44-IR700 の投与で 18.89 ± 0.47 、DC101-IR700 の投与で 1.16 ± 0.01 であった(平均 \pm SEM, n = 3)(図 2)。これらの結果から、大腸がん細胞株である Colon26 の細胞膜表面には VEGFR-2 が発現していないことが明らかとなった。

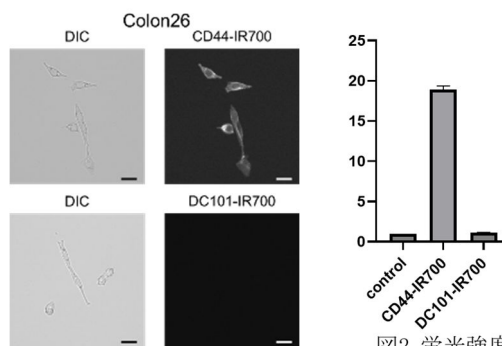


図1 蛍光顕微鏡

次に、35mmDish にまいた Colon26 細胞に CD44-IR700 もしくは DC101-IR700 を投与した後に近赤外光を照射し、In vitro NIR-PIT を施行した。CD44-IR700 を用いた NIR-PIT では近赤外光の光量依存的に細胞死亡率が上昇したのに対し、DC101-IR700 を用いた NIR-PIT では細胞死は誘導されなかった(図 3)。従来の NIR-PIT 実験と同様に、In vitro NIR-PIT では、標的細胞の膜に抗体が結合すれば効果を発揮することが確認され、VEGFR-2 は大腸がん細胞株 (Colon26) には発現しておらず、DC101-IR700 を用いた NIR-PIT では治療効果がないことが確認された。

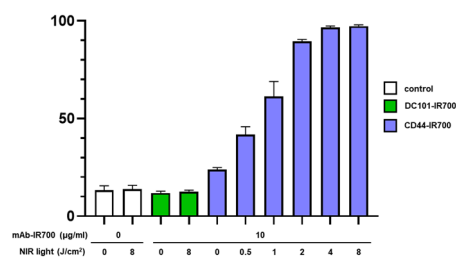


図3 細胞傷害性の評価

(2) マウス大腸がんの発生確認と Ex vivo imaging

Apc^{Min/+}マウスに DSS を 1 週間内服させ、その 2 週間後にマウスをサクリファイスし、大腸を摘出し観察した。肉眼的にも隆起した腫瘍が確認され、H.E. 染色においても腺がんであることが確認された(図 4)。

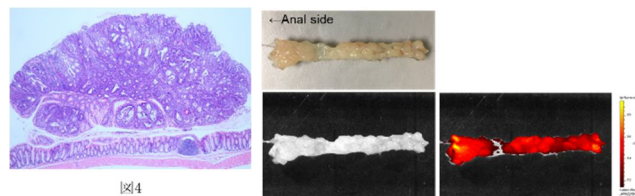


図4

図5 Ex vivo imaging

また DC101-IR700 を投与した翌日に大腸を摘出し、蛍光イメージング装置 (IVIS) にて撮影した画像では、腫瘍に一致して IR700 のシグナルが集積していることが確認された(図 5)。

このことから、Apc^{Min/+}マウスに DSS を内服させることで大腸がんが発がんし、また Ex vivo 蛍光イメージングにて、DC101-IR700 は腫瘍に一致して集積することが判明した。

(3) マウス大腸がんの蛍光内視鏡観察

蛍光内視鏡にて、腫瘍に一致した IR700 の蛍光を観察することが可能であった(図 6)。

(4) In vivo NIR-PIT

In vivo NIR-PIT を施行した 1 週間後にマウスを摘出し、治療効果判定を行った。腸管を切り開き、肛門から 1cm までの腸管の面積を測定した。またその範囲内に存在する腫瘍の面積も測定し、腫瘍/腸管面積の比を算出した。腫瘍腸管面積比はコントロール群で 0.62 ± 0.05 、近赤外光照射群で 0.60 ± 0.06 、DC101-IR700 投与群で 0.63 ± 0.06 、NIR-PIT 群で 0.04 ± 0.02 であった(平均 \pm SEM, n=7, *P < 0.0001: PIT 群 vs. コントロール群; Student's t test)。

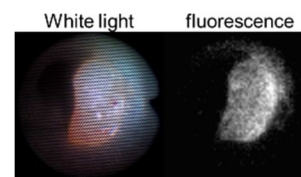


図6 蛍光内視鏡画像

(5) 病理学的検討

H.E. 染色にて、近赤外光を照射した範囲は炎症細胞浸潤、壊死所見を認め腫瘍細胞は消失していた。管腔側の血管内皮にはフィブリノイド壊死の所見が観察された。CD34 染色による血管内皮の評価では、血管は漿膜側で検出されたが、管腔側では内皮細胞の密度が低下していることが観察された(図 8)。DSS を内服させず、腫瘍を発生しなかったマウスにも DC101-IR700 を用いた NIR-PIT を施行したが、粘膜には病理学的に傷害が認められなかった(図 9)。

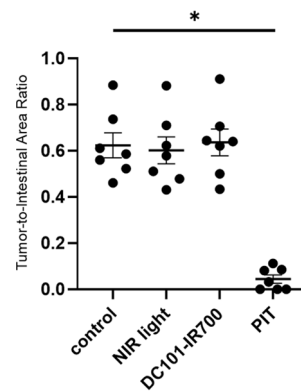
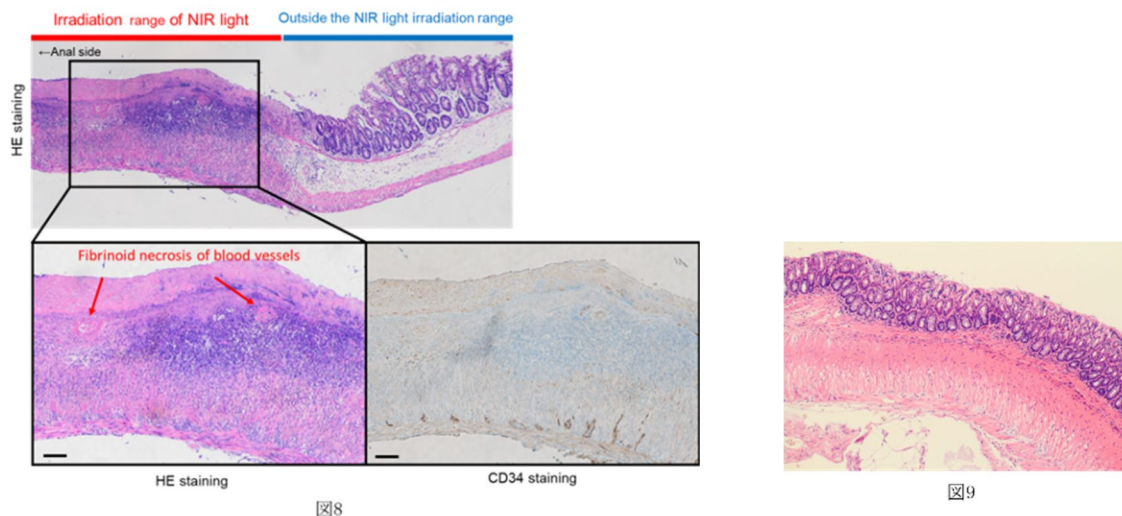


図7 In vivo NIR-PIT



本研究では自然発がんしたマウス大腸がんに対し、内視鏡にて蛍光イメージングが可能であることを証明し、さらに血管内皮に発現する分子に対する VEGFR-2 抗体を用いた NIR-PIT にて、高い抗腫瘍効果が得られることを証明した。

<引用文献>

- [1] Mitsunaga M, Ogawa M, Kosaka N, Rosenblum LT, Choyke PL, Kobayashi H. Cancer cell selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules. *Nat Med.* 2011;17:1685-1691.
- [2] Nishimura T, Mitsunaga M, Ito K, Kobayashi H, Saruta M. Cancer neovasculature targeted near infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT) for gastric cancer: different mechanisms of phototoxicity compared to cell membrane targeted NIR PIT. *Gastric Cancer.* 2020;23:82-94.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takashi Nishimura, Makoto Mitsunaga, Hiroki Saijo, Masayuki Saruta
2. 発表標題 Near-infrared photoimmunotherapy for colitis-associated colorectal cancer in a mouse model.
3. 学会等名 Asian Pacific Digestive Week 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西村 尚、光永 真人
2. 発表標題 マウス潰瘍性大腸炎関連大腸癌に対する近赤外セラノスティクス内視鏡
3. 学会等名 日本癌学会学術総会 (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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