

令和 4 年 9 月 1 日現在

機関番号：32667

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23067

研究課題名(和文) タンパク小分子を用いた頭頸部癌に対する新規光免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new photoimmunotherapy for oral and maxillofacial cancer using protein mimetic

研究代表者

竹澤 晴香(山口晴香)(Takezawa, Haruka)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・講師

研究者番号：00756942

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)：光免疫療法とは、癌をターゲットとする抗体(mAb)とIR700の結合体を標的癌細胞表面の受容体に結合させ光を当てると癌細胞だけが死滅する新規の癌治療法である。本研究では、抗体の代わりにタンパク小分子(Affibody)を用いることで、腫瘍深部への到達効率を上げたり癌細胞に対するより厳密な結合を可能にし、光免疫療法の治療対象を広げることを目的としていた。研究成果としては、EGFR過剰発現癌細胞においてAffibody-IR700結合体による光免疫療法で癌細胞をほぼ死滅させ、さらにmAb-IR700結合体併用の光免疫療法によって、治療効率を上げることが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク小分子(Affibody)を用いた光免疫療法を可能にしたことで、従来のモノクローナル抗体を用いた光免疫療法では対象となりにくい種類の癌もターゲットとなることを示すことが出来た。例えば、これまで繰り返し治療を必要としていた大きな腫瘍に関してはタンパク小分子が深部までの到達を可能にし、脳腫瘍についても効率的に血液脳関門を通過することで治療出来る可能性が示唆された。血液脳関門の通過効率についてはさらなる検討が必要であるものの、細胞レベルの実験では有効な結果が得られており、今後動物実験においても効果を確認していく。

研究成果の概要(英文)：Near infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT) is a new cancer treatment to induce the selective destruction of EGFR-overexpressing cancer cells by near infrared light irradiation when a monoclonal antibody (mAb) conjugated IR700 dye binds to the receptors. In this study, small protein molecules (Affibody) were used instead of monoclonal antibodies to expand the targets of photoimmunotherapy. As a result, the NIR-PIT using the Affibody-IR700 conjugate caused necrotic cell death in EGFR-overexpressing cancer cells, and the combination therapy using the mAb-IR700 conjugate and the Affibody-IR700 conjugate increased the efficiency of the treatment. These results were presented at the Japanese Association for Oral Biology and the Japanese Society of Oral Oncology, and a related paper was published (Int J Mol Sci. 2021 Nov; 22(22): 12213.) last year.

研究分野：分子イメージング・DDS

キーワード：光免疫療法 DDS IR700 dye Affibody

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、米国立衛生研究所の小林久隆が開発した光免疫療法が注目されている。光免疫療法とは、EGFR1, 2 ターゲットの mAb と IR700 の結合体を標的癌細胞表面の受容体に結合させ近赤外光 (波長: 690nm) を当てると、癌細胞のみがネクローシスを起こし死滅するという新規のがん治療法である。この治療過程で正常細胞には影響を与えないことがわかっており、すでに米国では頭頸部癌を対象にした治験が行われている。しかし、この mAb を用いた光免疫療法は、増大した腫瘍は治療しにくいなどの課題があった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Affibody を用いた光免疫療法により下記の3つの点を実現し、より効果的な新しい光免疫療法を開発することにある。

- (1) Affibody (6-7 kDa) はモノクローナル抗体に比べ組織への浸透性が高いため、より腫瘍の深部に効率的に到達する。
- (2) 分子標的薬と競合しないことを示し、従来の光免疫療法との併用を可能にすることで治療効果を上げる。
- (3) 血液脳関門(BBB)を効率的に通過することを証明し、脳腫瘍もターゲットになり得る可能性を示す。

3. 研究の方法

(1) EGFR 受容体ターゲットの Affibody 結合体を作製した。

すでに完成している EGFR2 ターゲットの Affibody-IR700 結合体の作製方法に従い、Anti-EGFR1 Affibody に IR700 を結合させ EGFR1 ターゲットの Affibody-IR700 結合体を作製した。

(2) EGFR 受容体過剰発現癌細胞への特異的な結合を証明

細胞培養培地に Affibody-IR700 結合体を添加し、特異的な結合を確認。用いた細胞株は、口腔扁平上皮癌細胞(SAS, HSC2)・唾液腺癌細胞(HSY, A253, WR21)、乳癌(MDA-MB361, JIMT1, SK-BR3, BT474)であった。同時に、標識した分子標的薬(セツキシマブ・トラスツズマブ)を用いて Affibody と競合しないことも確かめた。

(3) EGFR 受容体過剰発現癌細胞に対する光免疫療法

EGFR 過剰発現細胞培養の培地に Affibody-IR700 結合体を添加し、近赤外光を1回から複数回照射した。その後、細胞生存率を求めた。分子標的薬との併用効果も確認した。

(4) mAb-IR700 結合体と Addibody-IR700 結合体併用の光免疫療法

mAb-IR700 結合体と Addibody-IR700 結合体を作り、両結合体を培養培地に添加し、光免疫療法を行った。結合体の併用が標的癌細胞の生存率に与える影響を確認した。

(5) 動物実験

免疫不全マウスの背部にそれぞれの癌細胞を移植し、mAb-IR700 もしくは Affibody-IR700 の結合体を静注後、近赤外光照射装置を用いて腫瘍部位に光をあて、腫瘍の大きさを継続的に計測した。

4. 研究成果

これまで得られた結果としては、EGFR 過剰発現癌細胞において、Affibody-IR700 結合体による光免疫療法で癌細胞をほぼ死滅させ(図1)、mAb-IR700 結合体と Affibody IR700 結合体併用の光免疫療法によって、治療効率を上げることが出来た(図2)。動物実験でも同様の結果が得られ(図3)、これらの成果は、昨年度の第63回歯科基礎医学会学術大会と第40回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会で発表した。また、11月に関連論文(Combination of Near-Infrared Photoimmunotherapy Using Trastuzumab and Small Protein Mimetic for HER2-Positive Breast Cancer, Int J Mol Sci. 2021 Nov; 22(22): 12213.)を発表した。現在検討中の血液脳関門モデルでの実験が完了し次第すべての結果をまとめた論文を執筆予定である。

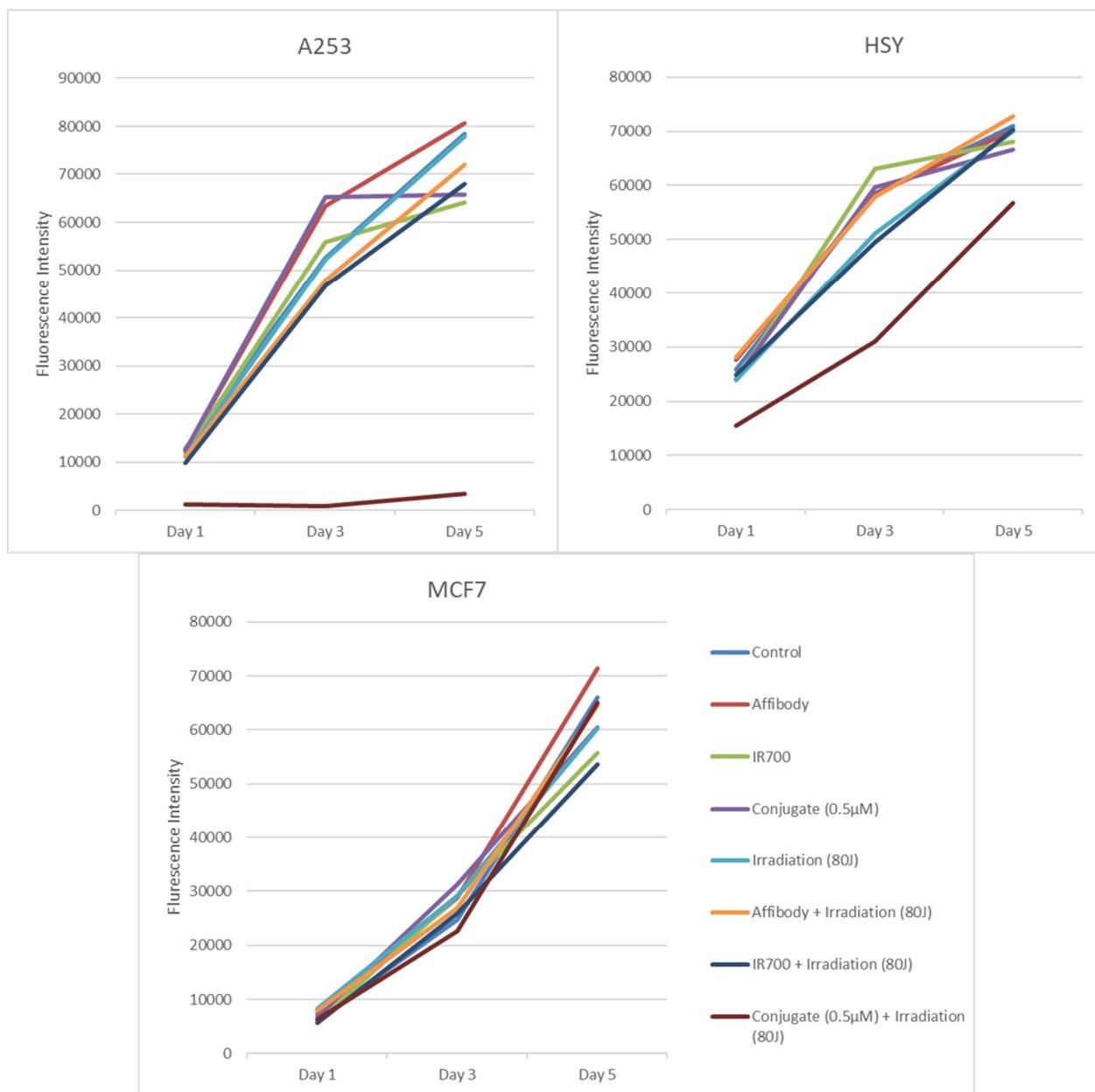


図1 EGFR 陽性の A253 細胞と HSY 細胞において、Affibody-IR700 複合体を作用させ近赤外光を照射したサンプルの細胞生存率が最も低かった。一方、EGFR 陰性の MCF7 細胞は他のサンプルと変わらない増殖を見せた。つまり、Affibody による光免疫療法は正常細胞には影響を与えないと言える。

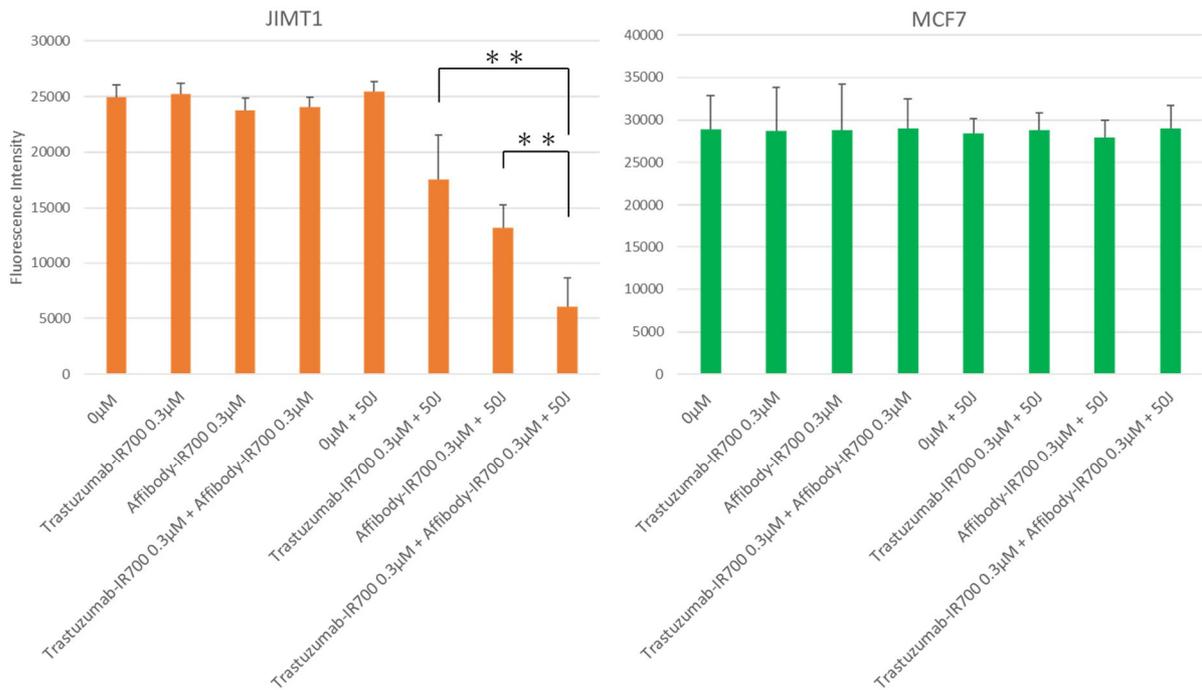


図2 EGFR の発現が少ない JIMT1 細胞においてモノクローナル抗体による光免疫療法単体もしくは Affibody による光免疫療法単体よりも両者を併用した方が細胞生存率が下がった。EGFR 陰性の MCF7 細胞では、同じ手法を用いても細胞生存率に影響はなかった。つまり、EGFR 発現が少なくてもモノクローナル抗体と Affibody による光免疫療法併用で効果を上げられ、その際正常細胞には影響を与えないことが分かった。

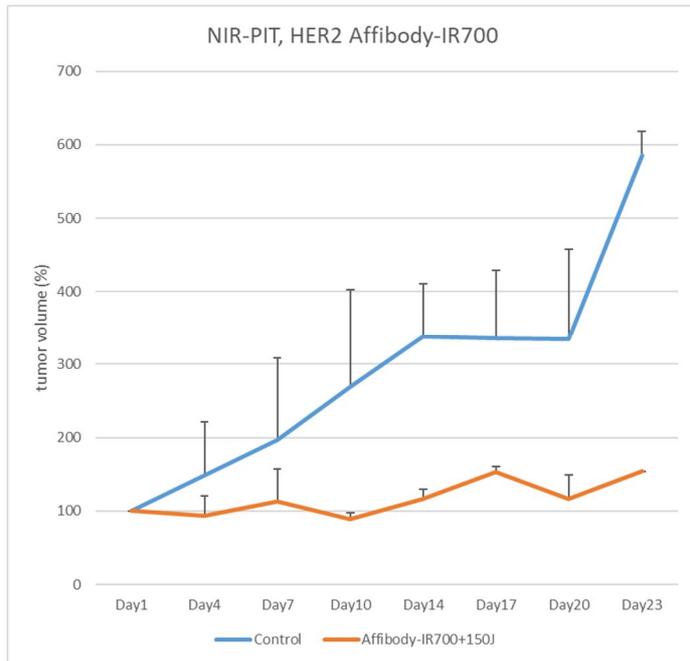


図3 動物実験において、光免疫療法を行った EGFR 強発現の腫瘍は治療後 23 日経過した後も腫瘍サイズは大きくならなかった。一方、コントロールの腫瘍は急激に増大した。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Haruka Yamaguchi, Jotaro On, Takao Morita, Takamasa Suzuki, Yasuo Okada, Junya Ono and Andreas Evdokiou	4. 巻 22
2. 論文標題 Combination of Near-Infrared Photoimmunotherapy Using Trastuzumab and Small Protein Mimetic for HER2-Positive Breast Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222212213	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

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口晴香, 森田貴雄
2. 発表標題 EGFR 過剰発現唾液腺癌に対する新しい光免疫療法
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口晴香
2. 発表標題 EGFR 過剰発現唾液腺癌に対する抗体小分子を用いた光免疫療法
3. 学会等名 第40回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
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			
オーストラリア	アデレード大学医学部外科学講座	Basil Hetzel Institute, BCRU		