

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20706

研究課題名(和文) がん光免疫療法が引き起こす免疫・炎症反応の生体イメージングによる解析とその制御

研究課題名(英文) In vivo imaging of immune and inflammatory responses during cancer photoimmunotherapy

研究代表者

中島 孝平 (Nakajima, Kohei)

北海道大学・薬学研究院・助教

研究者番号：40907771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体イメージングを用いて、光を用いた新たながん治療法である光免疫療法(PIT)による免疫・炎症反応の推移を明らかにすることを目的とした。ヌードマウスにヒトがん細胞を移植して作製した担癌マウスにPITを行い、 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PETやMRIを用いて経時的に解析した結果、PITを行った腫瘍の周囲で炎症性浮腫が生じることが見出された。さらに、ImmunocompetentマウスであるC57BL/6JマウスにPITを行った場合、ヌードマウスと比較して血中電解質や炎症性サイトカインの変化などが大きいことが示され、T細胞などの免疫細胞がPITによる生理学的応答に深く関与していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、PITが引き起こす免疫・炎症反応の一端を明らかにすることに成功した。がん治療において、過剰な免疫・炎症応答は副作用に繋がる可能性がある一方、適切に免疫応答が活性化された場合は、抗腫瘍免疫応答の誘導を介して高い治療効果が得られる可能性も考えられる。したがって、本研究を足掛かりに引き続き検討を行うことで、臨床において副作用を回避しつつ効果的な治療を行うための方策につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the process of immune and inflammatory responses induced by near-infrared photoimmunotherapy (PIT), which is a newly developed cancer phototherapy, using in vivo imaging techniques. We performed PIT on tumor-bearing nude mice and analyzed them using  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PET and MRI. The results suggested that PIT induced inflammatory edema in surrounding tissue of the light-irradiated tumors. Furthermore, when PIT was performed on immunocompetent C57BL/6J mice, more significant changes in blood electrolytes was observed compared to nude mice. These results suggested inflammatory and/or immune cells such as T cells are considered to be deeply related to the physiological response during PIT.

研究分野：がん治療・イメージング

キーワード：光免疫療法 がん 生体イメージング

### 1. 研究開始当初の背景

光免疫療法 (PIT) は、抗体-光反応性化合物複合体 (抗体-IR700) の投与後に光を照射して行うがん治療法である (図 1) (1,2)。これまでに申請者は、PIT における細胞傷害メカニズムの解明に取り組み、光照射後に細胞膜が物理的に破壊されることを明らかにした (3-5)。がん細胞はその後、がん抗原などを放出する免疫原性細胞死 (Immunogenic cell death; ICD) に至り、樹状細胞の成熟や T 細胞の分化を誘導する。この際、免疫チェックポイント阻害剤を併用して免疫抑制状態を解除すると、光照射していない遠隔腫瘍も縮小する (6)。現在、ヒトにおいて転移巣に対する治療効果を検討する第 I 相臨床試験が進行中である。

しかし、免疫が過剰に活性化された場合には免疫関連有害事象 (Immune-related adverse events; irAE) と呼ばれる副作用が生じる (7)。申請者は最近、免疫チェックポイント阻害剤を投与したマウスに高い光照射量で PIT を行うと炎症・免疫応答が関与する副作用が生じることを見出し、PIT による ICD が免疫細胞を活性化することで相乗的に irAE を増悪させると考えた。また、照射部位に浮腫が形成されることも確認しているが、生じた免疫・炎症反応がどのような経過をたどって全身性の irAE に至るかは不明である。

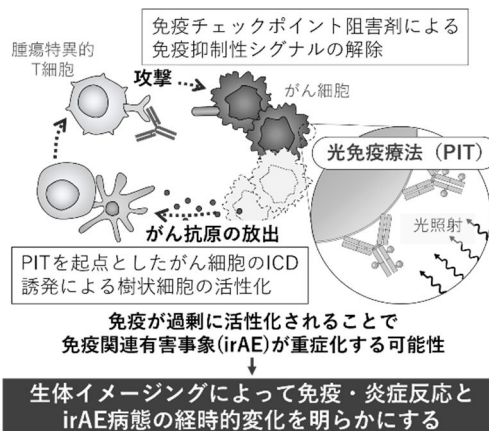


図 1. PIT による ICD と免疫関連有害事象

図 1. PIT による ICD と免疫関連有害事象

### 2. 研究の目的

血中マーカーは特定の臓器障害を反映するため、臨床においても広く使われている。しかし、重篤な障害が生じる前の生体反応を捉えるためには、血液検査に先立って組織の機能的変化を評価できる可能性がある生体イメージングの利用が最適である。また、免疫が暴走する兆候の可視化は、irAE の回避につながる。

そこで本研究は、PIT と免疫チェックポイント阻害剤の併用時の irAE の制御を目指し、生体イメージングによって免疫・炎症反応と irAE 病態の経時的变化を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 3-1. ノードマウスを用いたイメージングによる検討

A431 がん細胞を移植したノードマウスにおける PIT 後の生理学的応答を [<sup>18</sup>F]FDG-PET と MRI を用いて経時的に解析した。BALB/c nu/nu ノードマウス (6~8 週齢、メス) の左右臀部の皮下に、 $5 \times 10^6$  cells の A431 細胞を移植して担癌マウスを作製した。移植 8 日後、腫瘍体積が約 150 mm<sup>3</sup> に達したタイミングで実験に用いた。抗 EGFR 抗体 panitumumab に IR700 を結合させた薬剤 (Pan-IR700) 100 μg を尾静脈投与した。24 時間後、右側の腫瘍にのみ、波長 690 nm のレーザーを用いて 100 J/cm<sup>2</sup> 照射した (強度 150 mW/cm<sup>2</sup>)。IR700 は蛍光分子であるが、光照射によって光化学反応が起こると、蛍光が消失することがわかっている。そこで、光照射前後に IR700 の蛍光イメージングを行い、光照射が適切に行われたかを確認した。光照射の 3 時間または 24 時間後、3 T の MRI 装置 (Signa HDxt 3.0 T MR scanner, GE Healthcare) を用いて、T2-WI, T1-WI, DWI を撮影した。MRI の撮影後、6.7 MBq の [<sup>18</sup>F]FDG を投与し、PET 装置 (HITS-655 K, Hamamatsu Photonics KK.) で画像を取得した。

#### 3-2. Immunocompetent マウスとノードマウスにおける PIT 後の炎症反応

Immunocompetent マウスである C57BL/6J マウス (7 週齢、メス) の臀部の皮下に、 $6 \times 10^6$  cells の MC38 細胞を移植して担癌マウスを作製した。がん細胞の移植 4 日後、腫瘍体積が約 30-50 mm<sup>3</sup> に達したタイミングで実験に用いた。抗 CD44 抗体 (BioXCell) に IR700 を結合させた薬剤 (CD44-IR700) 100 μg を尾静脈投与した。24 時間後、腫瘍に波長 690 nm のレーザーを用いて 50 J/cm<sup>2</sup> または 200 J/cm<sup>2</sup> 照射した (強度 150 mW/cm<sup>2</sup>)。光照射の 2 時間後にマウスを安楽死し、血液を採取した。血液アナライザー i-STAT (Abbott) を用いて、血中の各種電解質濃度ならびにヘマトクリット値を測定した。さらに、血液を遠心分離することで血漿を得て、ELISA によって炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  および IL-6 の濃度を測定した。なお、比較のために、BALB/c nu/nu ノードマウス (7 週齢、メス) の臀部の皮下に、 $6 \times 10^6$  cells の MC38 細胞を移植して担癌マウスを作製し、C57BL/6J マウスと同様に血液の解析を行った。

### 3-3. Immunocompetent マウスを用いたイメージングによる検討

C57BL/6J マウス (9 週齢、メス) の肩の皮下に、 $6 \times 10^6$  cells の MC38 細胞を移植して担癌マウスを作製した。移植 12 日後、腫瘍体積が約  $150 \text{ mm}^3$  に達したタイミングで実験に用いた。抗 CD44 抗体 (BioXCell) に IR700 を結合させた薬剤 (CD44-IR700)  $100 \mu\text{g}$  を尾静脈投与した。24 時間後、腫瘍に波長 690 nm のレーザーを用いて  $50 \text{ J/cm}^2$  光照射した (強度  $150 \text{ mW/cm}^2$ )。光照射の 24 時間後、 $3.7 \text{ MBq}$  の  $^{18}\text{F}$ FDG を尾静脈投与し、PET 装置 (Inveon small-animal multimodality PET/CT system, Siemens Medical Solutions) を用いて投与 40-50 min 後の積算画像を取得した。

## 4. 研究成果

### 4-1. ノードマウスを用いたイメージングによる検討

ヒトがん細胞 A431 を移植したノードマウスにおける PIT 後の生理学的応答を PET や MRI を用いて経時的に解析した。まず、光照射前後で IR700 の蛍光を観察したところ、光照射した側の腫瘍でのみ蛍光が消失しており、光照射が適切にされたことが示された (図 2)。

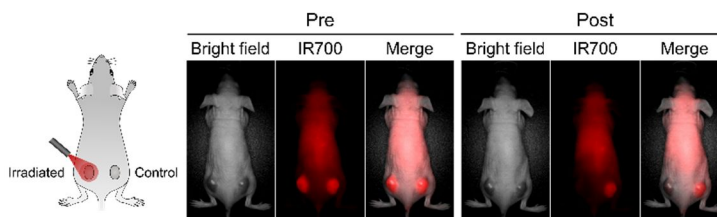


図 2. 光照射前後の IR700 蛍光イメージング画像

続いて、光照射の 3 時間および 24 時間後に  $^{18}\text{F}$ FDG-PET ならびに MRI 撮影を行った。その結果、腫瘍内では光照射の 3 時間および 24 時間後に、 $^{18}\text{F}$ FDG 集積量が有意に低下し、PIT によるがん細胞の糖代謝の低下を PET によって非侵襲的に可視化できることが示された。一方、光照射した腫瘍の周囲では、 $^{18}\text{F}$ FDG が高集積かつ T2-WI ならびに DWI にて高シグナルの領域が認められた (図 3)。その領域では、T1-WI では変化が見られなかった。 $^{18}\text{F}$ FDG が高集積であることから、糖代謝が亢進しているマクロファージなどの炎症性細胞が集積していると考えられる上、MRI 画像の特徴から浮腫が生じていると考えられる。すなわち、ノードマウスにおいて、PIT を行った腫瘍の周囲では、炎症性浮腫の領域が生じることが示唆された。なお、血中の炎症性サイトカイン濃度を測定したところ、未処置マウスと比較して、PIT を行ったマウス血中の IL-6 濃度は有意に高いことが示され、炎症性反応が起きていることを支持する結果であった。以上の結果については、Molecular Imaging and Biology 誌に発表した(8)。

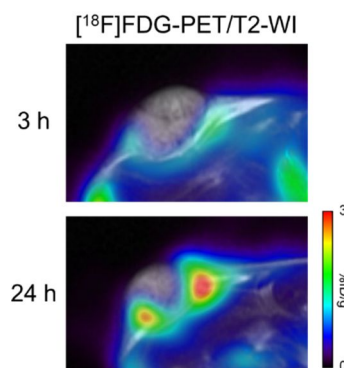


図 3.  $^{18}\text{F}$ FDG-PET 画像と T2-WI の重ね合わせ

### 4-2. Immunocompetent マウスとノードマウスにおける PIT 後の炎症反応の比較

免疫チェックポイント阻害剤と PIT 併用時の免疫・炎症反応の解析に先駆けて、PIT 単独治療時の免疫・炎症反応の解析を以下の通り行った。まず、PIT を行った担癌マウスの血中の炎症性サイトカイン濃度および電解質濃度を測定した。マウス由来 MC38 細胞を移植した C57BL/6J マウスおよび BALB/c nu-nu マウスに移植して作製した担癌マウスを実験に用いた。それぞれの腫瘍に PIT を行い、血中の TNF- $\alpha$  および IL-6 の濃度を ELISA で測定したところ、T 細胞が存在せず免疫不全であるノードマウスと比較して免疫系が保たれている C57BL/6J マウスで炎症性サイトカインが大きく上昇した。また、電解質濃度は C57BL/6J マウスにおいては Na および Ca が低下、K が上昇したのに対し、ノードマウスにおいては変化が認められなかった。したがって、炎症性サイトカイン産生や電解質の変動には、PIT によって誘発される宿主の免疫応答が関与していることが示唆された。また、これらの変動量は光の照射量依存的に増加することも明らかとした。さらに、照射量依存的にヘマトクリット値が上昇したことから脱水が生じている可能性が考えられ、全身性の炎症反応が生じていることを支持する結果であった。

### 4-3. Immunocompetent マウスを用いたイメージングによる検討

4-2 にて、C57BL/6J マウスとノードマウスで PIT によって誘発される炎症応答が異なることが示された。そこで次に、免疫系が保たれている C57BL/6J マウスにがん細胞を移植した担癌マウスに PIT を行い、 $^{18}\text{F}$ FDG-PET イメージングを行った。図 4 に示すように、PIT を行った腫瘍

では、腫瘍中心部への $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ 集積は顕著に低下した。これは、4-1で認められたヌードマウスにおける結果と同様に、PITによってがん細胞の糖代謝が急激に低下したと考えられる。一方、ヌードマウスにおいてPITを行った腫瘍周囲で認められた炎症性浮腫については、MRIによる検討をまだ実施していないため解析できていないため、今後検討していく予定である。

引き続き、PETやMRIなどの生体イメージング法を用いた検討を行うことで、PITによる全身性の炎症を抑えつつ、がんの治療効果を最大にするような治療レジメンを見出すことを目指す。さらに、ステロイドやサイトカインの中和抗体による炎症の制御についても検討を行う予定である。

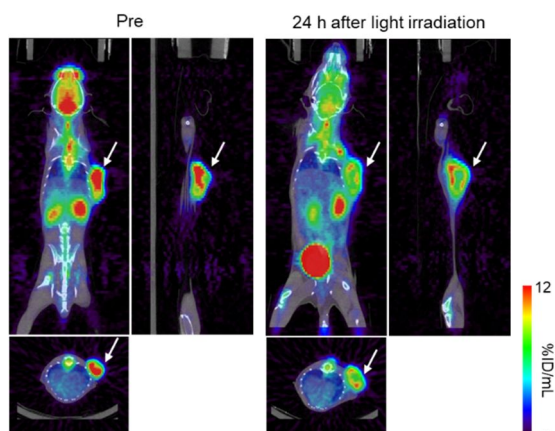


図 4. PIT を行った C57BL/6J マウスにおける $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PET を用いた検討

#### [参考文献]

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 Nov 6;17(12):1685–91.
2. Kobayashi H, Choyke PL. Near-Infrared Photoimmunotherapy of Cancer. *Acc Chem Res.* 2019 Aug 20;52(8):2332–9.
3. Nakajima K, Takakura H, Shimizu Y, Ogawa M. Changes in plasma membrane damage inducing cell death after treatment with near-infrared photoimmunotherapy. *Cancer Sci.* 2018 Sep;109(9):2889–96.
4. Nakajima K, Ogawa M. Phototoxicity in near-infrared photoimmunotherapy is influenced by the subcellular localization of antibody-IR700. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020 Sep;31:101926.
5. Nakajima K, Miyazaki F, Terada K, Takakura H, Suzuki M, Ogawa M. Comparison of low-molecular-weight ligand and whole antibody in prostate-specific membrane antigen targeted near-infrared photoimmunotherapy. *Int J Pharm.* 2021 Nov 20;609:121135.
6. Nagaya T, Friedman J, Maruoka Y, Ogata F, Okuyama S, Clavijo PE, et al. Host Immunity Following Near-Infrared Photoimmunotherapy Is Enhanced with PD-1 Checkpoint Blockade to Eradicate Established Antigenic Tumors. *Cancer Immunol Res.* 2019 Mar;7(3):401–13.
7. Postow MA, Sidlow R, Hellmann MD. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med.* 2018 Jan 11;378(2):158–68.
8. Nakajima K, Sugikawa A, Yasui H, Higashikawa K, Suzuki C, Natsume T, et al. In vivo imaging of acute physiological responses after treatment of cancer with near-infrared photoimmunotherapy. *Mol Imaging Biol* [Internet]. 2023 May 16; Available from: <https://doi.org/10.1007/s11307-023-01822-9>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakajima Kohei, Homma Mitsunori, Suzuki Motofumi, Yokouchi Yuta, Matsuda Takuma, Takakura Hideo, Hirata Kenji, Kuge Yuji, Ogawa Mikako	4. 巻 108-109
2. 論文標題 Reduction of tumor hypoxia by anti-PD-1 therapy assessed using pimonidazole and [18F]FMISO	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nuclear Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 85~92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nucmedbio.2022.03.005	査読の有無 有
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 Kohei Nakajima, Mikako Ogawa	4. 巻 61
2. 論文標題 Application of imaging for antibody-based cancer therapies : photoimmunotherapy and immune checkpoint blockade therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the Imaging Society of Japan	6. 最初と最後の頁 643-651
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11370/isj.61.643	査読の有無 有
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 Kohei Nakajima , Akiyo Sugikawa , Hironobu Yasui , Kei Higashikawa , Chie Suzuki , Takahiro Natsume , Motofumi Suzuki , Hideo Takakura , Mayu Tomita , Sachi Takahashi , Kenji Hirata , Yasuhiro Magata , Yuji Kuge , Mikako Ogawa	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 In vivo imaging of acute physiological responses after treatment of cancer with near-infrared photoimmunotherapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Imaging and Biology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11307-023-01822-9	査読の有無 有
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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 中島 孝平, 安井 博宣, 東川 桂, 高倉 栄男, 間賀田 泰寛, 久下 裕司, 小川 美香子
2. 発表標題 Evaluation of biological characteristics in photoimmunotherapy-treated tumors using PET and MRI
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 中島孝平, 杉川晃代, 安井博宣, 東川桂, 高倉栄男, 鈴木千恵, 間賀田泰寛, 久下裕司, 小川美香子
2. 発表標題 光免疫療法が腫瘍に及ぼす機能的変化に関するFDG-/FMISO-PETおよびMRIを用いた検討
3. 学会等名 第61回 日本核医学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kohei Nakajima, Akiyo Sugikawa, Hironobu Yasui, Kei Higashikawa, Hideo Takakura, Chie Suzuki, Yasuhiro Magata, Yuji Kuge, Mikako Ogawa
2. 発表標題 PET and MR imaging of physiological responses after near-infrared photoimmunotherapy of cancer
3. 学会等名 The 11th China-Japan-Korea Symposium on Radiopharmaceutical Sciences (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島 孝平, 本間 充憲, 鈴木 基史, 横内 勇太, 松田 拓真, 高倉 栄男, 平田 健司, 久下 裕司, 小川 美香子
2. 発表標題 抗PD-1抗体が腫瘍内の低酸素状態に及ぼす影響に関する低酸素PETイメージング剤を用いた検討
3. 学会等名 第34回 バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kohei Nakajima, Mitsunori Homma, Motofumi Suzuki, Yuta Yokouchi, Takuma Matsuda, Hideo Takakura, Kenji Hirata, Yuji Kuge, Mikako Ogawa
2. 発表標題 Influence of anti-PD-1 therapy on tumor hypoxia assessed with pimonidazole and [18F]FMISO
3. 学会等名 13th Congress of the World Federation of Nuclear Medicine and Biology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kohei Nakajima, Mitsunori Homma, Motofumi Suzuki, Yuta Yokouchi, Takuma Matsuda, Hideo Takakura, Kenji Hirata, Yuji Kuge, Mikako Ogawa
2. 発表標題 Anti-PD-1 therapy reduces tumor hypoxia: evaluation with pimonidazole and [18F]fluoromisonidazole as hypoxia probes
3. 学会等名 12th AACR-JCA joint conference (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