

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830119

研究課題名(和文) がんとその周辺微小環境の包括的制御を指向した高汎用性光免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of integrative and cooperative photoimmunotherapy targeting cancer and its microenvironment

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍関連抗原TAAのマーカ-に特異的なビオチン化抗体BioAbと光感受性物質を結合させたアビジンAvIRとを用いた、腫瘍とその周辺微小環境とを併せて標的とする光免疫療法PITの開発を行った。抗TAA-BioAbで標識した腫瘍細胞にAvIRを結合させて光照射を行った結果、極めて抗原選択的かつ強力な殺細胞効果を認めた。癌幹細胞マーカ-CD44に対するBioAbを用いたPITは効果的にヒト腫瘍細胞株を殺傷し、腫瘍スフェア形成能を著しく減少させた。癌関連線維芽細胞CAFのマーカ-FAPのBioAbを用いたPITにより、CAFによる造腫瘍能増強効果を抑制できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Tumors are composed of heterogeneous cells arising from cancer stem cells (CSCs), and are maintained by the peri-tumoral stromal cells including cancer-associated fibroblasts (CAFs). We developed a novel photoimmunotherapy (PIT) utilizing a near infrared photosensitizer-avidin conjugate (AvIR) and biotinylated antibodies targeting the markers of CSCs and CAFs. Human breast carcinoma MCF-7 cells contain a CD44 positive CSC population. CD44-targeted PIT remarkably reduced the ability of MCF-7 cells to form mammospheres, suggesting that CD44 targeting is sufficient to eradicate the CSCs. In modified soft agar assay, an increased number of MCF-7 colonies were obtained in the presence of primary breast CAFs. Enhancement of clonogenicity induced by CAFs, however, was abrogated by PIT with biotinylated anti-fibroblast activation protein. In conclusion, AvIR-mediated PIT may allow efficacious control of tumor and its microenvironment.

研究分野：免疫生化学

キーワード：光免疫療法 癌幹細胞

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 (PDT) 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、従来の光感受性物質は腫瘍への集積性や選択性が低く、標的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未だ一般的ではない。近年、腫瘍関連抗原 (TAA) に特異的な抗体分子と光感受性物質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) が注目されている。既に申請者は、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フタロシアン系光感受性物質・IRDye700DX 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* 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、病状の進行や放射線・抗癌剤治療の経過等に伴って 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、研究代表者ら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 の発現変化に応じて 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光感受性物質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ため、新たな方法論に基づく光免疫療法の開発が急務となっている。

2. 研究の目的

本研究では、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IRDye700DX を結合させたコンジュゲート (AvIR) を用いた新規 PIT の開発を目的とした。すなわち、予め TAA 特異的なビオチン化抗体 (BioAb) により腫瘍細胞を標識し、これに AvIR を結合させることで PIT の標的とする戦略である。既製品を含め、腫瘍抗原特異的な BioAb は無数に存在しているため、これらを利用できるとなれば PIT の適用範囲は飛躍的に増大する。様々な BioAb を逐次的、あるいは複数種同時に用いることによって、TAA の発現変化に対応可能なユニバーサルな PIT が達成され、異なる TAA を発現するような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同時に標的化することも可能となるため、他に類を見ない包括的かつ高効率な癌治療法となると期待される。

3. 研究の方法

(1) AvIR の作製

IRDye700DX の活性エステル体を脱グリコシル化アビジン (NeutrAvidin) と縮合させたのち、ゲル濾過によって精製した。

(2) TAA 発現 CHO 細胞を標的とした AvIR-PIT

AvIR を用いた PIT の抗腫瘍効果および抗原選択性を検討するため、CEA もしくは EpCAM を安定発現する CHO 細胞を、対応する BioAb にて標識し、さらに AvIR を結合させたのちに、LED ライトを用いて 690 nm の NIR を照射した。PIT 処理後の細胞生存性を蛍光染色法および細胞内 ATP を指標とした発光アッセイ系にて調べた。

(3) 癌幹細胞を標的とした AvIR-PIT

ヒト乳癌細胞株 MCF-7 について、磁気ソーティングによって CD44 および CD24 の発現量を指標とした細胞分画を行った。mammosphere 形成アッセイおよびマトリゲルを用いた invasion アッセイにより、造腫瘍能を評価した。CD44、CD24、および EpCAM 特異的な BioAb を単独、あるいは併用して標識した MCF-7 に対して AvIR-PIT を行い、その後の細胞生存性を調べた。また、PIT 処理後の死細胞を除去し、残存した生存細胞のみ用いた mammosphere アッセイによって、AvIR-PIT の造腫瘍能に対する効果を調べた。

(4) 癌関連線維芽細胞 (CAF) に対する PIT

ヒト乳癌組織由来初代培養 CAF を播種した培養プレート上で軟寒天培地をゲル化させ、その上に 0.4% アガーを含む mammosphere 形成培地中に懸濁させた MCF-7 を重層した。さらに、ビオチン化抗 fibroblast activation protein (FAP) 抗体および AvIR を含む培地を重層したのち、NIR 照射を実施した。その 7 日後に形成されたスフェア数を計測した。

4. 研究成果

(1) AvIR-PIT は TAA 特異的で強力な光毒性効果を発揮する

CEA もしくは EpCAM を発現する CHO 細胞に対して、抗 CEA-あるいは抗 EpCAM-BioAb を結合させ、さらに AvIR で処理したのちに NIR を照射した。その結果、対応する TAA を発現する CHO 細胞のみが効率よく殺傷されることが判明した。また、AvIR のみの処理では全く細胞は傷害されなかった。さらに、CEA 発現 CHO 細胞と EpCAM 発現 CHO 細胞とを共培養した状況下で同様の AvIR-PIT を実施した場合においても、きわめて TAA 選択的な殺細胞効

果が認められた。すなわち、抗 CEA-BioAb を用いた際には、例え EpCAM 発現細胞が CEA 発現細胞と隣接していたとしても、前者のみが特異的に殺傷される一方、後者には全く影響は認められなかった。また、両抗体を併用した場合には、両者の細胞は同時に全て殺傷された。このような光毒性効果は、BioAb や AvIR 濃度および NIR 照射量に依存的であった。

ヒト胃癌細胞株 MKN-45 は CEA 陽性であり、CD44 を高発現する造腫瘍の高い癌幹細胞様のポピュレーションを含む。MKN-45 に対して抗 CEA-もしくは抗 CD44-BioAb を用いた AvIR-PIT を施すと著しい細胞生存性の低下を認めたが、両抗体のそれぞれ半量を併用して PIT を実施すると、さらに効果的な殺細胞効果が得られた。

以上の結果から、TAA 特異的な BioAb と AvIR を用いた PIT は、標的細胞に対してきわめて高選択的で強力な光毒性効果を発揮することが判明した。

(2) 癌幹細胞マーカーを標的とした AvIR-PIT は効果的な抗腫瘍効果を発揮する

ヒト乳癌細胞株 MCF-7 はその多くが EpCAM 陽性であり、その中でも CD44⁺/CD24^{low} の細胞が造腫瘍能の高い画分であるとされる。実際に、それらの発現を指標にソーティングした細胞分画について mammosphere 形成アッセイおよびマトリゲル浸潤アッセイを行った結果、確かにスフェア形成能や浸潤能力が高い CD44⁺/CD24^{low} 細胞群が存在していた。このような MCF-7 に対し、抗 EpCAM-あるいは抗 CD44-BioAb を用いた AvIR-PIT を実施した。その結果、抗 CD44-BioAb では中程度の、抗 EpCAM-BioAb ではより強力な殺細胞効果が認められた。ここにおいても、それぞれの抗体を単独で用いた場合よりも、両抗体を半量ずつ併用した方がより高い殺細胞効果が得られた。これは、不均一な細胞集団に対して複数種の BioAb を用いた治療が優位性をもつことを支持する結果である。

抗 EpCAM-BioAb あるいは抗 CD44-BioAb を用いた AvIR-PIT を行った後に生き残った細胞のみをそれぞれ集め、新しい培養プレートに播種してそれぞれのスフェア形成能を調べた結果、いずれの細胞も著しいスフェア形成能の低下が認められた。上述のように、CD44 を標的とした PIT は、殺細胞効果自体は抗 EpCAM 抗体を用いた場合よりも強くないことから、癌幹細胞様の細胞がより殺傷されたために同等の強力な抗腫瘍効果が得られたものと考えられる。

(3) CAF を標的とした AvIR-PIT は近傍癌細胞の造腫瘍能を抑制する

予めヒト乳癌組織由来の CAF を播種したプレート上に軟寒天培地を隔てて MCF-7 を培養すると、MCF-7 単独培養時と比較して、mammosphere 形成能が高まった。このような非接触共培養系において、培養開始 24 時間

後に、CAF で発現が上昇する FAP に対する BioAb と AvIR とを含む培地に置換し、翌日 NIR 照射を行った。その 7 日後に形成されたスフェア数を計測した結果、PIT 処理した MCF-7 のスフェア数が CAF なしで培養した MCF-7 のそれと同等となった。すなわち、CAF によって誘導される MCF-7 の造腫瘍能の増強効果が、抗 FAP-BioAb を用いた AvIR-PIT によって完全に消失することが判明した。

以上の *in vitro* の結果より、TAA のみならず CSC や CAF のマーカーに対する BioAb を複数用いることでそれらを同時に標的化できる AvIR-PIT の戦略は、バルクの腫瘍細胞を叩くとともに CSC や CAF を殺傷することで効果的に腫瘍とその微小環境をコントロール可能な有望な治療法となりうるものと考えられた。現在、これらの知見をもとに MCF-7 の同所移植腫瘍モデルを作製し、*in vivo* における AvIR-PIT の有効性の実証に向け、検討を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① 白須直人, 黒木政秀, CEACAM5 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5 (carcinoembryonic antigen)), *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.*, 査読有, in press.
- ② 黒木政秀, 白須直人, Novel treatment strategies for cancer and their tumor-targeting approaches using antibodies against tumor-associated antigens., *Anticancer Res.*, 査読有, 34 巻, 2014, 4481-4488.
- ③ 白須直人, 黒木政秀, Chimeric antigen receptor (CAR) の遺伝子導入 T 細胞による腫瘍の治療., *臨床免疫・アレルギー科*, 査読有, 61 巻, 2014, 621-626.
- ④ 白須直人, 山田博美, 芝口浩智, 黒木求, 黒木政秀, Potent and specific antitumor effect of CEA-targeted photoimmunotherapy. *Int. J. Cancer*, 査読有, 135 巻, 2014, 2697-2710.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 白須直人, 山田博美, 芝口浩智, 黒木求, 黒木政秀, 安永晋一郎, Integrative and cooperative photoimmunotherapy for cancer using avidin-conjugated near infrared photosensitizer., 第 74 回日本癌学会学術総会, 名古屋国際会議

- 場 (名古屋), 2015 年 9 月 18 日
- ② 白須直人, 山田博美, 芝口浩智, 黒木求, 黒木政秀, In vivo antitumor effect of CEA-targeted photoimmunotherapy., 第 73 回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜 (横浜), 2014 年 9 月 27 日
- ③ 白須直人, 芝口浩智, 黒木求, 黒木政秀, CEA を標的とした抗腫瘍光免疫療法., 第 18 回日本がん免疫学会総会, ひめぎんホール (松山), 2014 年 7 月 31 日

6. 研究組織

(1) 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