

## 研 究 報 告 書

### 「光と生体の新たな相互作用を利用したがん治療法の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 27 年 12 月～平成 31 年 3 月

研 究 者: 小川 美香子

#### 1. 研究のねらい

本研究では、申請者らがこれまでに見出した、近赤外光によりがん細胞を特異的に殺傷することができる新たな現象 Photoimmuno therapy (PIT)について、近赤外光照射によって起こる細胞傷害のメカニズムを解明する。これにより、現在の問題点を解決しより効果的な新規薬剤の開発を行い、臨床応用へ向けた展開を図るとともに、本現象を利用した光の新たな医学利用法の開拓を目指す。

##### ❖ 光による細胞傷害メカニズムの解明(①)

PIT では、がん細胞表面に結合する抗体とフタロシアニン誘導体 IRDye700DX (IR700)からなる、光反応性薬剤を用いている。PIT では、標的細胞膜表面に特異的に光反応性薬剤が結合して細胞傷害を引き起こすので、正常細胞は傷害されないという特長を持つ。PIT に用いる光反応性薬剤について、より光反応性を高め効果の高いものとするためには、細胞傷害メカニズムの解明が不可欠である。

##### ❖ 新規光反応性薬剤の開発(②)

IR700 の化学構造を最適化し、より光反応性・細胞傷害性が高い化合物の創製を目指す。また、吸収波長の長波長化を図ることで光の組織透過性を高め、より深部組織まで治療可能な化合物を開発する。これにより、深部組織であっても、また光の強度が弱くても、PIT による効果的治療が可能になると期待できる。さらに、細胞標的化の観点においても、多くのがん(特に転移性のがん)やがん周囲の新生血管に発現するインテグリン  $\alpha v \beta 3$  を対象とした標的化分子を用いることで、より汎用性の高い薬剤の開発を目指す。

##### ❖ 特異的光治療法の最適化、臨床利用へ向けた展開(③-1)。

①、②の結果をもとに、動物モデルを用いて臨床応用を想定した検証を行い、治療法の最適化を図る。モデルとしては、浸潤性で正常組織との境界が不明瞭であり、また機能損傷の問題から通常外科手術による全摘が不可能である、脳腫瘍の中で最も悪性の難治がん GBM (glioblastoma multiform)を想定する。

##### ❖ 異分野融合による光の新たな活用法の開拓(③-2)。

また、医学・薬学・化学だけでなく工学・光学・物理学分野と効果的に連携し、光の新たな活用法の開拓を目指す。すなわち、光照射によって薬剤放出がおこる新規 Drug delivery system (DDS)の開発などを行う。

#### 2. 研究成果

##### (1)概要

本研究では、PIT のメカニズム解明を行った。この結果、近赤外光照射によって IR700 構造変化に伴う物性変化が起こりそれによる細胞膜傷害が起こること、その細胞膜傷害は不可逆的

であり、免疫原性細胞死(immunogenic cell death)による細胞死に至ることを明らかにした。すなわち新しいメカニズムに基づくがん治療であることを見出した。さらに、インテグリンを標的とした新しい薬剤の開発を行った。また、生体深部の治療のため、電磁誘導によりワイヤレスで給電可能な LED を開発し、マウス皮下に移植することでマウスのがんを治療することに成功した。

## (2) 詳細

### ① 光による細胞傷害メカニズムの解明

#### PIT 後のイオン・分子の流入

近赤外光照射直後から、Na<sup>+</sup>の流入を認めた。この流入は 4℃またはテトロドトキシン存在下でも見られたことから、チャネルやトランスポーターを通過せず、細胞膜を直接通過していると示唆された。一方で、Dextran 高浸透圧条件下では Na<sup>+</sup>の流入は認められなかった。以上のことから、PIT 初期に生じる膜傷害は、イオンを通過させる程度の大きさであるが、デキストランを通過させるほど大きくはないことが示唆された。

蛍光分子 Calcein については、光照射直後の流出は見られなかったが、その後徐々に細胞外へと流出した。その後、時間経過とともに細胞膜の障害が大きくなると、Calcein より分子サイズの大きい EthD-1 も細胞膜を通過して流入し始めた。これらの結果から、PIT は細胞膜にごく小さな傷害を与えた後、その膜傷害は時間経過とともに不可逆的に亢進することが示唆された。

また、放射標識体を用いて定量評価したところ、上記保証する結果となり、①<sup>111</sup>In<sup>3+</sup>や<sup>3</sup>H-H<sub>2</sub>O は PIT 後すぐに流入が完了していること、②<sup>111</sup>In-DTPA 程度の大きさの分子は膜傷害がある程度亢進してからでないと流入しないこと、③PIT によって引き起こされる膜障害は Dextran のような巨大な分子は通過できない程度であることが示された。

PIT を行った細胞では、照射量依存的に時間経過とともにアクチンが破綻してく様子が観察された。以上のことから、PIT を行った細胞においては、細胞膜を内側から支えているアクチン繊維の破綻が起きていることが示唆され、これが細胞膜傷害の亢進に関わっている可能性が考えられた。

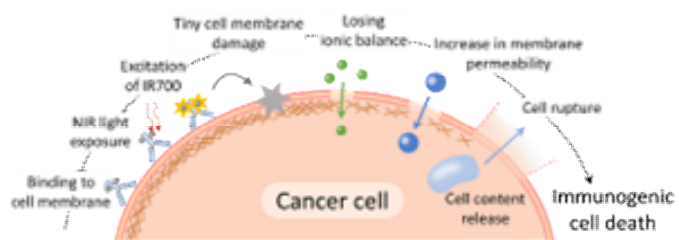


図 1 PIT の細胞膜への作用の概要

#### PIT 後の免疫の活性化(Immunogenic cell death)による細胞死

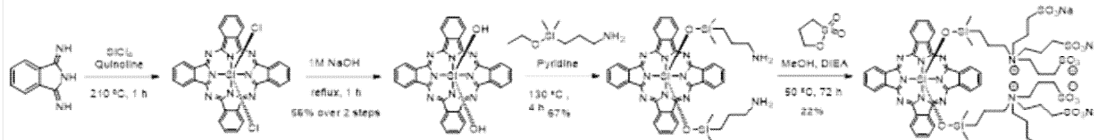
PIT では細胞の膨潤がおり、細胞の体積が大きくなることを見出した。この膨潤は一重項酸素の消去剤を加えても変化が無かった。また、この反応に伴い、免疫原性細胞死 Immunogenic cell death (ICD)の際に放出される DAMP が放出されていることも確認され、樹状細胞の活性化も認めた。

すなわち、PIT は小さな細胞膜傷害を起点とし、免疫活性化を伴う細胞死であることが示された。

❖ 以上の結果は論文にて発表し(成果リスト論文 2、論文 4)、日本癌学会・日本薬学会等にて報告した。また、World Molecular Imaging Congress 2017 にて Travel award を受賞した。

## 光照射による IR700 の構造変換に関する検討

IR700 の光応答性を調べるために、IR700 と同様の軸配位子を持つフタロシアニン誘導体 Pc を合成した。



続いて、光応答性の検討のため Pc 1  $\mu$ M の各種溶液に  $\lambda = 676.5$  nm ( $3.5$  mW/cm<sup>2</sup>) の近赤外光を 30 min (6.2 J) 照射し、光照射前後の吸光度変化を(光照射後の吸光度/光照射前の吸光度  $\times 100$ )で評価した(図 2)。結果、電子供与体存在下かつ光照射下においてのみ吸光度変化が生じ、脱気により吸光度変化が促進することが示された。反面、電子受容体存在下では、吸光度変化が生じなかった。

次に、IR700 の光分解物の同定を行った。

Pc 1  $\mu$ M, 1 mM アスコルビン酸ナトリウム (NaAA) 水溶液 (pH7.5) に  $\lambda = 676.5$  nm ( $3.5$  mW/cm<sup>2</sup>) の近赤外光を 30 min (6.2J)、60 min (12.4 J)照射した後に HPLC で確認した。結果 Pc は光照射によって、二種類の分解物を生成していることが分かった(図 3)。そこで、それぞれのピークを分取し、光分解物の構造決定を行った。その結果、分解物Aは、軸配位子が一つ切断されたもの、分解物Bは軸配位子が二つとも切断されているものであることが示され、分解物Aは反応中間体であることが判った。以上より、IR700 は光照射により軸配位子が切断され、疎水性の化合物Bになることが示された。

また、光照射によって抗体の形態変化や凝集が起こることが示され、また、Alexa488 をさらに結合させた複合体を用いることで IR700 抗体複合体は光照射後に抗原への結合能が失われることが判った。

❖ 以上の結果は論文にて発表し(成果リスト

論文 1)、プレスリリースを行った。また、米国癌学会・日本薬学会等にて報告した。

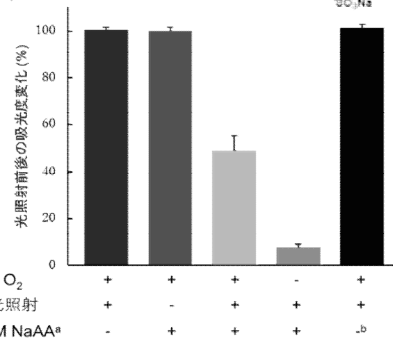


図 2 光照射したときの溶液の吸光度変化  
水溶液に光を照射したところ沈殿を生じ、吸光度の減少が認められた。<sup>a</sup>NaAA: L-ascorbic acid sodium salt (電子供与体) <sup>b</sup> 3-(4-nitrophenyl)pentanedioic acid (電子受容体)

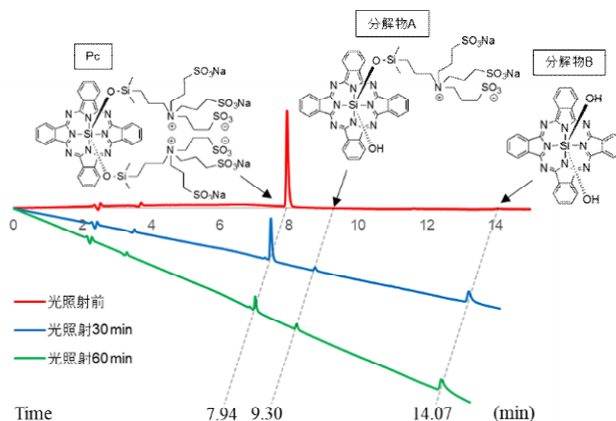


図 3 光照射後の HPLC チャート  
光照射により分解物 A と B が生成することが判った。

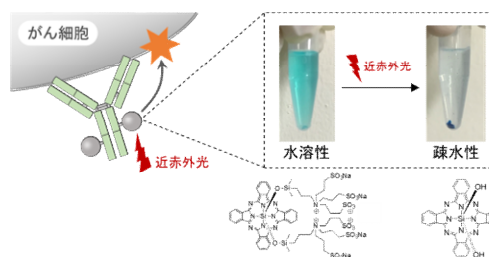


図 4 細胞膜近傍での急激な物性変化が細胞膜傷害を誘発する。

以上、PIT の細胞障害メカニズムは、光照射によって IR700 構造変化に伴う物性変化が起こりそれによる細胞膜傷害が起こること、その細胞膜傷害は不可逆的であり、ICD による細胞死に至ることを明らかにした。

## ② 新規光反応性薬剤の開発

インテグリン  $\alpha_v\beta_3$  への結合親和性と生体内安定性を高めるため 2 価環状にした RGD ペプチドと IR700 を結合させた薬剤 (RGD<sub>2</sub>-IR700) を合成した。

HRMS (ESI<sup>-</sup>): m/z calcd for C<sub>129</sub>H<sub>180</sub>N<sub>30</sub>O<sub>40</sub>S<sub>6</sub>Si<sub>3</sub><sup>2-</sup>: 1532.53 [M-2H]<sup>2-</sup>; found: 1533.63, m/z calcd for C<sub>129</sub>H<sub>179</sub>N<sub>30</sub>O<sub>40</sub>S<sub>6</sub>Si<sub>3</sub><sup>3-</sup>: 1021.35 [M-3H]<sup>3-</sup>; found: 1022.08.

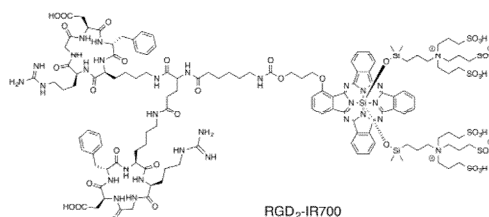


図 5 インテグリン  $\alpha_v\beta_3$  を標的とした新規薬剤

## ③ 光の臨床利用および新たな活用法の開拓

### ワイヤレス給電 LED を用いた光線免疫療法に関する検討

生体深部の治療のため、電磁誘導によりワイヤレスで給電可能な LED を開発し、体内に留置可能な PIT 光源としての利用を試みた。開発した LED カプセルを図 6 に示す。



図 6 ワイヤレス LED カプセル。  
bar=5 mm

給電コイルから高さ 5 cm の位置の LED カプセルの光の強度 (at 690 nm) は 40 mW/cm<sup>2</sup> であった。給電コイルと LED カプセル間の距離が 20 cm でも LED の点灯を認めた。細胞実験にて効果を確認した

のち、マウスを用いた検討を行った。その結果、LED を植えて光照射を行った腫瘍では、day 5 と day 6 で LED を植えたが植えない側に比較し有意に小さかった (図 7)。一方、断線させたダミー LED を植えたマウスにおいては LED を植えた側と植えていない側で体積変化に差はなかった。また、LED を植えてからマウスの体重に変化はなく、LED 植え込みによる副作用は認められなかった。さらに、HE 染色から、LED を植えて光照射をした腫瘍でのみがん細胞が死んでいる様子が見られた。

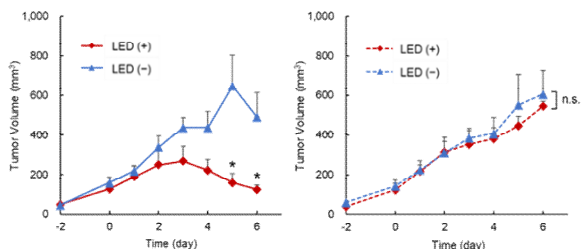


図 7 ワイヤレス LED カプセルによる治療の結果  
LED カプセルを植えた側では腫瘍体積が減少した (左図赤)。ダミーの LED カプセルには効果がなかった (右図赤)。

以上の結果から、in vitro、in vivo の両方で今回開発したワイヤレス LED を用いた NIR-PIT の効果が確認され、体外からの光が届かないような深部にある腫瘍の治療に適応できる可能性が示唆された。

❖ 以上の結果は論文にて発表し (成果リスト論文 3)、日本癌学会・日本薬学会等にて報告した。また、World Molecular Imaging Congress 2018 にて Travel award を受賞した。



### 3. 今後の展開

本研究では、PIT のメカニズム解明を達成し、近赤外光照射により薬剤の物性が変化することでがん細胞膜上で細胞特異的に細胞を殺傷するという新しい癌治療メカニズムであることを見出した。

今後はこの解明したメカニズムに基づき、より効果と汎用性の高い新しい薬剤開発を行う。さらに今回得られた知見は、光による化合物の物性変換が細胞機能を操作できることを示したものであり、この観点からの技術開発にもつながると考える。すなわち、フタロシアニンに限らず他の構造の化合物についても光による物性変換を利用した薬剤開発を行っていく。

### 4. 自己評価

(研究目的の達成状況)

①メカニズム解明の当初目的は達成できたと思う。②新規薬剤の開発に関しては、特許申請も行い概ね達成されたと思うが、今後、得られた結果を基にさらなる検討をする必要がある。③新しい応用については、新たな展開の可能性が見出されたため当初目的とはやや異なる方向性での研究を進めた。その点では当初目的が達成されたとは言えないが、今後の新たな技術開発につながったという点では評価できると考える。

(研究の進め方)

本研究成果は、学部学生を含む学生の力によるところも大きい。研究への取り組み方・結果の解釈・結果の社会実装など様々な点において考慮しつつ、効果的に進めることができたと思う。研究費は主に必要な分析機器および薬剤や実験動物などの消耗品および成果発表に使用し、効率的に使用することができたと思う。

(研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果)

新しい光治療メカニズムを見出した今回の成果は、既存技術の応用性の向上だけでなく新しい技術の発展にもつながるものであると考える。

(その他)

化学・生物学・物理学の研究者が光の極限に挑むという目標のもと集まった今回のさきがけ研究で、自身にはなかった新しい観点に基づく研究展開の可能性を見出すことができた。

### 5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Sato K, Ando K, Okuyama S, Moriguchi S, Ogura T, Totoki S, Hanaoka H, Nagaya T, Kokawa T, Takakura H, Nishimura M, Hasegawa Y, Choyke PL, Ogawa M, Kobayashi H. Photoinduced Ligand Release from a Silicon Phthalocyanine Dye Conjugated with Monoclonal Antibodies: A Mechanism of Cancer Cell Cytotoxicity after Near-Infrared Photoimmunotherapy. ACS Central Sci, in press.
2. Nakajima K, Takakura H, Shimizu Y, Ogawa M. Changes in plasma membrane damage inducing cell death after treatment with near-infrared photoimmunotherapy. Cancer Sci 109, 2889-2896 (2018).

3. Nakajima K, Kimura T, Takakura H, Yoshikawa Y, Kameda A, Shindo T, Sato K, Kobayashi H, Ogawa M. Implantable wireless powered light emitting diode (LED) for near-infrared photoimmunotherapy: device development and experimental assessment in vitro and in vivo. *Oncotarget* 9, 20048–20057 (2018).
4. Ogawa M, Tomita Y, Nakamura Y, Lee MJ, Lee S, Tomita S, Nagaya T, Sato K, Yamauchi T, Iwai H, Kumar A, Haystead T, Shroff H, Choyke PL, Trepel JB, Kobayashi H. Immunogenic cancer cell death selectively induced by near infrared photoimmunotherapy initiates host tumor immunity. *Oncotarget* 8, 10425–10436 (2017).

## (2)特許出願

研究期間累積件数:2 件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

## (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 【プレスリリース】論文1に関するプレスリリースを行った。(2018/11/5)
2. 【学会発表】第 77 回日本癌学会学術総会 (2018/9/27、大阪) Kohei Nakajima, Hideo Takakura, Mikako Ogawa, Near-infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT) using wireless light-emitting diode system to treat tumors in deep tissue,
3. 【学会発表】第 77 回日本癌学会学術総会 (2018/9/27、大阪) Kazuki Terada, Hideo Takakura, Kohei Nakajima, Mikako Ogawa, Development of a new therapeutic agent for photoimmunotherapy with small peptides as a targeting ligand.
4. 【学会発表・トラベルアワード受賞】World Molecular Imaging Congress 2018 (2018/9/15、シアトル) Kohei Nakajima, Toshihiro Kimura, Hideo Takakura, Yasuo Yoshikawa, Atsushi Kameda, Takayuki Shindo, Kazuhide Sato, Hisataka Kobayashi, Mikako Ogawa, Development of implantable wireless powered light emitting diode (LED) for near-infrared photoimmunotherapy.
5. 【学会発表】BMAS2018 (第 31 回バイオメディカル分析化学シンポジウム) (2018/8/29、福岡) 小川美香子「光で癌を攻略する～イメージングから治療まで～」