

## 光免疫療法について

生体分析化学研究室・教授

小川 美香子

この度は芳香に寄稿する機会をいただき、誠にありがとうございます。私は、2015年に生体分析化学研究室に着任し、放射線、光を使った生体イメージング研究を行っております。本稿では、生体イメージング研究の過程で生まれ、また現在、北海道大学のスタッフ・学生とともに治療メカニズム解明と新薬開発に取り組んでいる、がん治療法「光免疫療法」について紹介させていただきます。

### 1. 光免疫療法の発見

私は、2007年から2009年までポスドクとして米国国立衛生研究所(National Institute of Health; NIH)の小林久隆先生のもとに留学し、がんの光イメージング研究に取り組んでいた。ある日、作ったイメージング剤をがん細胞に作用させ、蛍光イメージングのため光を照射し顕微鏡で観察していると、がん細胞がみるみるうちに死んでいった。光を当てる前は問題がないのに、イメージングのために光を当てると何度やっても死んでしまう。これは使えないと思った。そこで小林先生に、こんなにがん細胞を簡単に殺してしまう薬は使えませんと報告した。冷静に考えると、可笑しい報告である。それを聞いた小林先生は、これはがん治療に使えるとおっしゃった。私はがん細胞をイメージングすることしか考えていなかった。視野が狭すぎて、がん細胞を殺し残念がってしまったのである。これが、光免疫療法(Photoimmunotherapy, PIT)開発の始まりである。

その後、種々の基礎検討を含む前臨床試験が行われ、2015年に米国で切除不能な局所再発の頭頸部扁平上皮癌患者を対象とした第I/IIa相試験が、2018年には国内第I相試験が実施された。これらの結果をもって、2019年、本邦にて先駆け審査指定制度の対象製品に指定され、その後、条件付き早期承認を受け、2020年11月に世界に先駆けて薬価収載された。現在、国際共同第III相試験が継続中である。

### 2. PITによる細胞死の特徴

PITでは、がん細胞膜抗原に結合する抗体に、光反応性色素であるフタロシアニン化合物IR700を結合させたものを薬剤として用いる<sup>1</sup>。抗体IR700複合体を静脈投与後、近赤外光を照射することで治療を行う。IR700自体に毒性はなく、また、極めて水溶性が高いこともあり尿中に排泄されるため体内に蓄積されることもない。抗体IR700複合体ががん細胞膜に結合した状態で近赤外光を照射すると、その細胞のみが選択的に殺傷される。抗原を持たない周囲の細胞への影響は無く、また、血中に存在する抗体IR700複合体も近赤外光があたっても毒性を示さない。このような特徴により、原理的に副作用を極めて小さくできると考えられる。

PITによる細胞死の特徴として、細胞膜に薬剤が結合していれば効果を示し、細胞内へ薬剤が取り込まれる必要が無いことが挙げられる。すなわち、細胞膜を起点とした細胞傷害であり、また、この細胞膜の傷害は不可逆である。PITでは細胞が膨張し破裂することを観察している。これは、光により小さな細胞膜傷害が生じることで、細胞内外の浸透圧差、イオン勾配により水やイオンなどが流入し細胞が膨らむことによる。細胞膜の傷は細胞が膨らむにつれ大きくなり、やがて細胞内部のタンパクや核酸が放出され細胞は死に至る<sup>2</sup>。

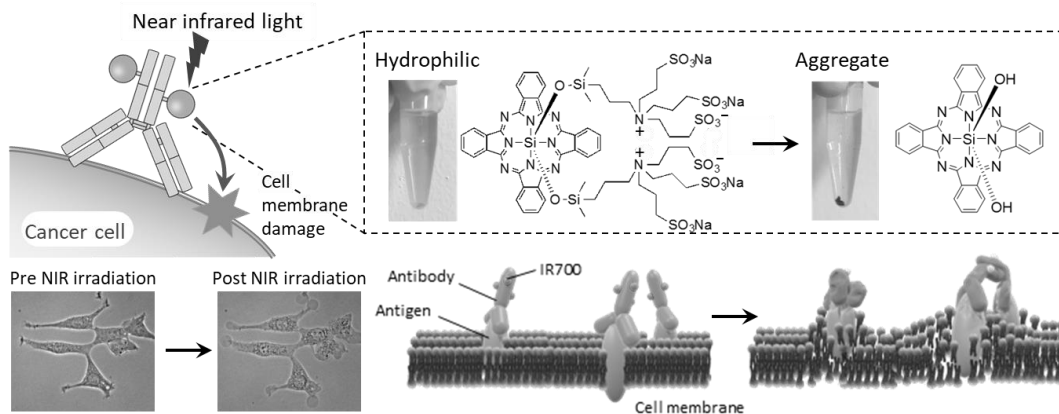
このような細胞の内容物を放出する細胞死は、免疫原性細胞死(Immunogenic cell death)と呼ばれる。つまり、アポトーシスのような静かな細胞死と異なり、死んだがん細胞からDAMPs(Damage associated molecular patterns)が放出されることで、免疫細胞である樹状細胞が活性化する。すると、

活性化樹状細胞上に死んだがん細胞が持っていた細胞膜抗原が提示され、これを認識する T 細胞が誘導される。そして、T 細胞が抗原を持つ残ったがん細胞を攻撃する。このように、直接殺傷することができなかつたがん細胞も、免疫の力により殺すことが可能となる。

### 3. 細胞膜傷害のメカニズム

PIT では、光により小さな細胞膜傷害が生じそれがやがて大きくなっていくことを、当時大学院生として在籍していた中島孝平君（現：当研究室助教）が解析し論文報告した<sup>3</sup>。しかし、なぜ細胞膜傷害が生じるのかその肝心のメカニズムが判っていなかった。光増感剤を使った一般的な光治療では、光照射により生じる一重項酸素などの活性酸素が細胞傷害のキープレイヤーとして働く。しかし、PIT では、一重項酸素発生を阻害しても細胞死が起こる。中島君が後に行った実験では、細胞膜の傷害については一重項酸素以外の要素が関わることを示している<sup>4</sup>。

先述のように PIT では、光感受性物質として IR700 という水溶性フタロシアニン化合物を利用している。この化合物の水溶性は、フタロシアニンの中心元素である Si から上下に伸びた二本の水溶性軸配位子により担保されている。化学的観点から PIT のメカニズム解明を行うことで、新しい薬を開発しようと研究していた大学院生の安藤完太君は、IR700 に近赤外光を照射するとこの軸配位子が切断されて不溶性の凝集体を生成することを示してくれた<sup>5</sup>。IR700 は  $\pi$  電子が豊富な平面構造をしているため、水溶性軸配位子が切断されると  $\pi$ - $\pi$  相互作用により分子のスタッキングが起こる。つまり、細胞膜上の抗原に抗体が結合した状態で IR700 が光照射されると、細胞膜上で抗体と抗原を巻き込んで凝集体が作られる。これにより細胞膜がひきつれる形となり、細胞膜に傷がつくと考えられる。傷害に伴い、細胞膜の裏打ちタンパクであるアクチン繊維が破壊されることも観察している。すなわち、きっかけは小さな膜の傷であるにも関わらず、膜が修復されることなく傷は大きく広がっていく。最近、医学研究院の大場教授との共同研究により、PIT 中の細胞膜の変化の様子を実際に観察することに成功し、抗体-IR700 複合体が結合した細胞に光を照射すると細胞膜につままれたような突起とくぼみができることを見出している。



### 4. 新しい薬剤の開発へ

現在、認可されている薬剤では、抗 EGFR 抗体であるセツキシマブが用いられている。細胞膜抗原に結合する抗体であれば原理的に PIT が可能であり、別の抗体を用いることで種々のがんに応用可能である。これまでに、動物実験では、HER2、PSMA、CEA、TROP2、PD-L1、CD20、CD44 など様々な抗原に対する抗体での治療効果が確認されている。今後、様々ながんへの適用拡大が期

待される。

当研究室では、キャリアとして小分子リガンドが利用可能か検討するため、転移性のがん細胞に高発現するインテグリン  $\alpha v \beta 3$  に結合する RGD ペプチドや、前立腺特異的膜抗原 (Prostate specific membrane antigen; PSMA) に結合する Glu-Urea-Lys 構造からなる小分子リガンド (GUL) を用い検討中である。博士課程の大学院生である寺田一貴くんは、RGD ペプチドを IR700 に結合させた薬剤 (RGD-IR700) を合成し様々な検討を行っている。これまでに RGD-IR700 を培養細胞にふりかけ光を照射すると、細胞がディッシュから一瞬で剥がれるものの、強い細胞死は起こさないことを観察している。これは、抗体-IR700 とは全く異なる現象である。また、修士課程の大学院生の宮崎風香さんは、GUL を IR700 に結合させた薬剤 (GUL-IR700) を開発し検討を行ってきた<sup>6</sup>。GUL-IR700 と抗 PSMA 抗体をキャリアとして使用した抗体-IR700 の治療効果を比較したところ、GUL-IR700 においても治療効果を認めたが、抗体-IR700 とは細胞死の様式が異なり、抗体-IR700 によって生じた細胞膜の水疱形成が GUL-IR700 を添加した細胞では見られなかった。GUL-IR700 では細胞内への内在化の速度が早いこと、および、分子量が小さいことから、細胞膜傷害を誘発するほどの凝集体を細胞膜上で形成できないことが原因であると考えられる。GUL-IR700 による細胞死は主に細胞内での一重項酸素発生によるものであり、がん免疫の活性化という観点からも治療効果が異なる可能性が高い。すなわち、光感受性物質として IR700 を用いれば同じメカニズムで作用するわけではなく、キャリアによって治療効果が異なる可能性に留意が必要であることも判ってきた。

また、現在、抗体に組み合わせる光感受性物質は IR700 が用いられているが、現在我々は、より効果の高い薬剤の開発研究にも取り組んでいる。上述のように、軸配位子の切断が本治療において鍵である。そこで、この軸配位子切断反応のメカニズム解明に取り組んだ。研究室配属前の 2 年生の時から、当研究室で研究活動を行っていた原田さんは、計算化学にも興味を持っており、理学研究院の武次教授の研究室にも出入りをしていた。そこで、原田芽生さんが両研究室の架け橋となり、光化学反応メカニズムを理論の面から行うこととした。この結果、光励起後に IR700 が電子供与体から電子を受け取りラジカルアニオン体となり、このアニオンラジカル体に水が配位しプロトン化を受けることで Si-O 結合が切断され軸が切断されるということを見出した<sup>7</sup>。すなわち、本結果は、軸配位子の構造や pH により切断されやすさが変化することを示唆するものである。原田さんの同級生である松廣志乃さんは、解明したメカニズムからより切断されやすいと想定される薬剤を実際に合成し、実験の面からこの理論が正しいことを証明するとともに、より効果の高い薬剤開発への道筋を示した。現在、本研究は後輩の学生に引き継がれさらに検討が進んでいる。

IR700 は光励起されたあと、三重項状態へと遷移する。光反応過程を考えると、三重項状態への遷移の効率を高めることも重要である可能性が高い。本観点からの研究には、博士課程の大学院生である後藤悠斗君が中心となって取り組んでおり、今後の薬剤開発が期待される<sup>8</sup>。

光の波長の観点からも、新規薬剤開発の可能性がある。IR700 は 690 nm の光を吸収する。この波長の光は、可視光に比べれば我々の体を透過しやすいものの、有効治療範囲は 1 cm 程度の深さまでとされている。もし、光の波長を 800 nm 程度まで伸ばすことができれば、より深部の照射が可能となる。先述した安藤君は、光の吸収波長を伸ばす研究にも取り組んでくれた。この結果、800 nm の光を吸収する化合物の開発に成功している。細胞実験では治療効果を認めたが、マウスを用いた実験では残念ながら十分な効果が得られていない。現在、この原因の解明に取り組み、新しい薬剤の開発を目指して研究を進めている。

また、私はもともと放射化学を専門としているということもあり、いわゆる放射線を使って化合物の構造変換をする研究に現在取り組んでいる。レントゲンや X 線 CT などに使われる硬 X 線は、可視光などと同じ電磁波であるが、生体透過性が高い。このため、レントゲンや X 線 CT では体の中の構造が透けて見える。もし、X 線で軸配位子を切断することができれば、生体深部でも利用でき PIT

の適用範囲が広がる。現在、X 線に反応する化合物開発を、獣医学研究院の稲波教授とともに行っているところである。さらに、IR700 だけでなく、他の化合物にもこの発想が応用できれば、現在可視光が主に使われているケージド化合物(光などで刺激されることにより、薬が放出される化合物)の活性化にも X 線を使うことができるようになり、マウスだけでなくヒトでも使える化合物開発につながる、広く使える技術になると考えている。

## 5. おわりに

現在、承認されている薬剤は、抗 EGFR 抗体であるセツキシマブと IR700 の複合体の、セツキシマブ サロタロカンナトリウム(アキシャルクス®)である。現在の適用は、化学放射線療法等の標準的な治療の実施が困難かつ、切除不能な局所進行または局所再発の頭頸部がん患者である。本剤 640 mg/m<sup>2</sup>(体表面積)を 2 時間以上かけて点滴静注し、点滴静注終了 20~28 時間後にレーザー光を病巣部位に照射する。レーザー光源には PIT 用に開発された 690 nm の半導体レーザー照射装置を使用する。なお、光に反応する薬剤であるので、点滴静注バッグは遮光カバーで被覆する。薬剤を調製する際も、強い光が当たらないような注意が必要である。本邦では 2021 年 9 月現在、33 拠点でアキシャルクス®による治療が施行可能である。北大病院も 33 拠点のうちの一つであり、北海道唯一の拠点である。今後、抗体の種類を増やし適用疾患を増やすなどの発展が期待される。また、北大薬学部の力を結集し、より反応性の高い薬剤の開発、より深部まで届く波長で反応する薬剤の開発、新たなメカニズムで反応する薬剤の開発を進め、多くの患者さんに届く薬へと発展させていきたいと考えている。

北大薬学部へ赴任しはじめて自分の研究室を持ち、試行錯誤というよりも右往左往しながら、これまで研究を進めてきた。光免疫療法に関する研究だけでなく、本稿では触れられなかった他の研究についても、夢は語るけれどなんだか頼りない私を支えてくれる研究室のスタッフと学生がいなければ、どれも達成できなかったものばかりである。他の研究室の先生方にも、研究面はもちろんのこと、研究室運営の観点でも多くのことを教えていただいた。ついでに、おすすめの呑み屋さんも教えていただき生活も充実した。この場を借りて、皆様に厚く深くお礼を申し上げたい。そして、時折ふらっと私の部屋に来て励ましの言葉をくれる同窓会長の松田彰先生、何かと気にかけていただけの大塚榮子先生にも、感謝を申し上げたい。

また今後とも、同窓生の皆様のご指導・ご鞭撻を賜りますよう、よろしく願い致します。



#### 参考文献

1. Mitsunaga M, et al., *Nat Med* 17(12), 1685-1691 (2011).
2. Ogawa M, et al., *Oncotarget* 8(6), 10425-10436 (2017).
3. Nakajima K, et al., *Cancer Sci* 109(9), 2889-2896 (2018).
4. Nakajima K, Ogawa M. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 31(101926 (2020).
5. Sato K, et al., *ACS Cent Sci* 4(11), 1559-1569 (2018).
6. Nakajima K, et al., *Int J Pharm* 609(121135 (2021).
7. Kobayashi M, et al. *Chempluschem* 85(9), 1959-1963 (2020).
8. Takakura H, et al., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 408(113094) (2021).