

## 【背景】

光線力学的治療 (Photodynamic Therapy: PDT) は、光感受性物質とレーザー照射を用いた癌治療の一つである。PDT は、手術などの他の治療モダリティと異なり、低侵襲で、繰り返し施行することが可能である。肺癌領域においては、中心型早期肺癌に対する標準的な治療法の一つとして確立されている。一方、赤色光を用いた現在の PDT では、赤色レーザー光の光特性により進行癌に対する治療効果は限定的である。腫瘍径が 30mm を超えるような腫瘍に対する抗腫瘍効果を向上させるためには、新たなブレイクスルーが必要である。本研究では、イムノトキシンと光感受性物質である mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) を組み合わせて使用する新しい光治療法 intelligent targeted antibody phototherapy (iTAP) の開発を目的とした。イムノトキシンとして細胞毒素であるサポリンと抗 epidermal growth factor receptor (EGFR) 抗体であるセツキシマブの複合体 (サポリン-セツキシマブ複合体) を開発した。

iTAP の細胞殺傷原理は、細胞毒性を有するサポリンがセツキシマブによってがん細胞に特異的に輸送され、細胞内のエンドソームに集積される。その後、NPe6 と赤色レーザー光照射によって生ずる光線力学的反応によりサポリンがエンドソームから細胞質へ移行し、細胞死が引き起こされる。したがって、PDT や従来の薬物治療より強い抗腫瘍効果が期待され、がん治療における光治療の可能性を広げることが期待される。

## 【方法】

細胞表面に発現する EGFR に結合し、エンドサイトーシスで細胞内のエンドソームに取り込まれたセツキシマブが、Npe6 を使用した PDT によって細胞質内へ放出されることを検討した。ヒト類上皮癌細胞株である A431 細胞に蛍光色素である fluorescein isothiocyanate (FITC) で標識したセツキシマブ、NPe6、光照射の処理を行い、蛍光顕微鏡で観察した。FITC は pH の上昇に伴い蛍光強度が上昇することが報告されているため、FITC で標識したセツキシマブの治療に伴う細胞内の局在の変化を蛍光顕微鏡で評価した。次に、A431、ヒト肺腺癌細胞株 A549、ヒト乳癌細胞株 MCF7 細胞株における iTAP の細胞毒性を検討するために細胞傷害性試験を施行した。細胞生存率は、CCK-8 を用いて評価し、ImageJ ソフトウェアより 50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出した。

また、*in vivo* での iTAP の抗腫瘍効果を検討するために、担癌マウスモデルを用いた動物実験で評価した。A549 細胞株を右大腿部皮下に移植した BALB/c ノードマウスに対して、サポリン-セツキシマブ複合体 (イムノトキシン)、Npe6-PDT の単独治療、それらを組み合わせる iTAP 群に分け、それぞれの治療効果を検証した。iTAP 群では、サポリン-セツキシマブ複合体 (3 mg/kg) を腹腔内投与し、その 2 日後に Npe6-PDT (5 mg/kg NPe6 を静脈投与、投与 2 時間後に 30 J/cm<sup>2</sup> 光照射) を実施した。抗腫瘍効果は、治療後の腫瘍体積を経時的に測定することで評価した。

## 【結果】

蛍光顕微鏡による解析の結果、NPe6 (20 μM) と光照射 (37.6 J/cm<sup>2</sup>) による光線力学的

反応により、セツキシマブが細胞内エンドソームから細胞質へ放出されることが確認された。この結果から、iTAPにおいて、サポリン-セツキシマブ複合体が NPe6-PDTにより細胞質内に放出され、サポリンの細胞毒性を誘導するのではないかと考えられた。

*in vitro* の解析では、まず3つの細胞株 (A431、A549、MCF7) について、細胞表面の EGFR の発現量をフローサイトメトリーで評価した。細胞あたりの EGFR の発現量は A431 で約 48 万個、A549 で約 8 万個、MCF7 で約 1000 個程度であった。それらの3つの細胞株に対して、細胞傷害性試験を行ったところ、サポリン-セツキシマブ複合体単体の細胞毒性と比較して、NPe6、照射処理を共に追加することでいずれの細胞株でも細胞毒性が増強することが示された。なお、本試験で用いた NPe6 の用量、照射量 (30  $\mu$ M NPe6、37.6 J/cm<sup>2</sup> 照射) は、それのみでは細胞毒性は認められない量であった。

A549 担癌マウスモデルを用いた *in vivo* の実験では、サポリン-セツキシマブ複合体単体治療 (3 mg/kg) や PDT 単体治療 (5 mg/kg NPe6、30 J/cm<sup>2</sup> 照射) と比較して、低用量のサポリン-セツキシマブ複合体と Npe6-PDT を組み合わせる iTAP では、非常に強く腫瘍の増殖を抑制した。

これらの結果、iTAP は、NPe6 と照射による光線力学的反応でサポリン毒性を誘導し、強く抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。

#### 【結論】

本研究は、NPe6 と赤色レーザー照射によって生ずる光線力学的反応の特性を利用しイムノトキシシンの殺細胞効果を向上させる iTAP の肺癌細胞に対する最初の報告である。iTAP 法は、現在の PDT に勝る新たな低侵襲治療法であり、進行癌や他の固形癌に対する新しい治療法となる可能性がある。