



展 TENBO 望

近赤外線を用いた 標的分子特異的がん治療



小林 久隆

Kobayashi Hisataka

(米国国立衛生研究所, 米国国立癌研究所)

1 はじめに

現在、がん治療の3つの主たる方法は、手術、化学療法、放射線治療である。これらのがん治療は、“外科手術で切り取る”にしても、“抗がん剤で殺す”にしても、“放射線で焼く”にしても、がん細胞のみではなく正常の臓器や細胞にも“切る”，“殺す”，“焼く”といったダメージを与えている。つまりがんに対する効果は，“正常の組織ごと取り出す”あるいは“がん細胞の方が正常組織より少し弱いから効く”ことに基づいていたわけである。言うなれば“毒をもって毒を制する”というような方法であったために、患者の体に大きな負担を強いているわけである。したがって、もし、正常細胞を殺すことなく、体内のがん細胞を壊したり取り除いたりすることができれば、より散らばったり、広がったりした進行性のがんに対しても、患者の体に大きな負担なく治療が行えるはずである。私の研究室では、このような新しい治療の方法論を理論的に組み上げて、実際に行うことを目標に研究を進めてきた。本稿では、この理論に基づいて最近開発した近赤外線を用いた Photo-immunotherapy（近赤外光線免疫療法）について、その開発経緯と、実際の効果などについて説明していきたい。

2 近赤外光線免疫療法の基本理論

数ある既存の生体内分子の中で、生きた細胞の膜表面分子に最も特異的に安定して結合することができる種類の分子は、抗体をおいてほかにない。実際に、病理でのがんの診断の多くは、現在でも抗体の特異性を用いた免疫組織染色によるところがほとんどである。もっとも利用しやすい IgG クラスの抗体を用いた治療は数多く開発され、現在、米国の US Food and Drug Administration (FDA) で認可されて臨床に使用されているものだけでも 25 種類以上ある¹⁾。抗体は、幾つかのサブクラス (IgG₁, IgG₄) の抗体分子自体が、免疫を利用した殺細胞効果を持つ。しかし、免疫を介した抗体自体の効果のみで、がんを完治させることは難しいのが現状である。

そのため、抗体の特異性を生かして、殺細胞効果の強い薬剤（細胞毒素、免疫賦活剤、抗がん剤、放射性同位元素 [β線, α線放出核種]) を腫瘍細胞に運ばせて治療を行う方法も開発され、そのうちの幾つかは、やはり臨床応用が行われている。しかしながら、殺細胞性薬剤の生理的代謝や排泄を行う臓器に毒性を起したり、抗体は比較的血中半減期が長いため放射能が骨髄抑制を引き起こしてしまうため、このよ

うな薬剤には、投与量に限界がある。このため、副作用を避けるために決定的ながんの特異的治療となり得ていない。

Ulichが抗体を“魔法の弾 (Magic bullet)”と呼んでから100年以上がたち、私も学生時代から含めると30年近く抗体の医学利用にかかわってきた。抗体の優れた抗原に対する結合の特異性が変わるところはないのであるが、残念ながら臨床の場において抗体は、まだ真の“魔法の弾”にはなり得ていないと、私は考えてきた。そこで、抗体の“優れた抗原に対する結合”をがん治療に生かすためには、抗体が抗原に対して結合した細胞に対してのみ殺細胞効果を引き起こす新しい方法が必要であるという結論に至った。また、抗体は比較的大きな分子であるので、生体内で生きた細胞の細胞膜を透過して細胞内に入り込むことは容易ではない。したがって、標的は細胞膜上になければならず、そこから細胞に障害を与える必要があると考えた。ただし、抗体が細胞膜上の分子に結合した時点で、抗体分子は細胞膜の非常に近く(数nm以内)にいるわけである。また、多くの場合、抗体はエンドサイトーシスによって、エンドソームからリソソームに運ばれて分解される。この間には、多くの化学反応に曝されるわけである。このような物理、化学的な基礎を背景にして、結合した細胞に対してのみ殺細胞効果を起こす方法論を作ればよいと考えるようになった。

物理、化学的な効果で、細胞にダメージを与えるためには、標的細胞の場所においてのみ局所で物理的、あるいは化学反応を起こすエネルギーを効率よく発生する必要がある。既存の反応の中で、このような効果を起こし得る現象として、光化学反応を用いることを考えた。ところが、生物で光を使うためには、幾つかの限界がある。光化学反応を効率よく起こすためには、エネルギーの高い波長の短い光子を用いる必要がある。しかし、細胞は、X線やγ線を含む紫外線よりも短い波長の光を浴びるとDNA

に損傷を起こしてしまう。そのため、光子が通過していく皮膚や正常の組織にダメージを与えてしまう。したがって、がん細胞のところのみで細胞毒性を起こすには、可視光より長い波長の光を使う必要があった。さらに、生体にはコラーゲン、ヘモグロビン、水といった、光の吸収物質が多々あるため、体の深部に光を到達させるためには、700 nm~850 nmあたりの近赤外領域の光子を使用する必要がある²⁾(図1)。

そこで私は、抗体に結合させることによってがん細胞上に運ぶことができる分子で、そこで効率よく700 nm~850 nmあたりの近赤外領域の光子を吸収して、何らかのエネルギーを発生し、抗体の付着した細胞のみを殺傷することができる化学物質を探すことを始めた。この発生するエネルギーが光であれば、“蛍光”である。私の研究室では、がん細胞のみを蛍光画像で見せるイメージングを開発するために、100種類を超える蛍光物質を用いて、がん細胞でのみ発光する技術も開発してきた³⁻⁷⁾。ただ、可視光や近赤外光を発光するのでは、細胞には何も影響を与えない。逆に可視光や近赤外光を蛍光として効率よく発生しない抗体結合化合物を作ると、エネルギーを熱や酸化反応に転用することができるわけである。研究過程でこのような化合物も相当数作成されていたので、その中から、最も効率よく細胞障害を起こせる抗体結合化合物を選んだ。それが、IR700といわれるPhthalocyanineの誘導体である。抗体-IR700結合体は、以下に述べるように予測通り細胞の実験でも生体内の腫瘍の実験でも、特異的かつ効率的な細胞障害効果を出すことができた。このような、理論的な背景と至適物質の選択に基づいて、私は近赤外線を用いたPhoto-immunotherapy(近赤外光線免疫療法)を開発してきたわけである²⁾。

3 近赤外光線免疫療法の効果

近赤外光線免疫療法の効果は、既存のほかの

超集学的がん治療(分子標的光治療)の説明

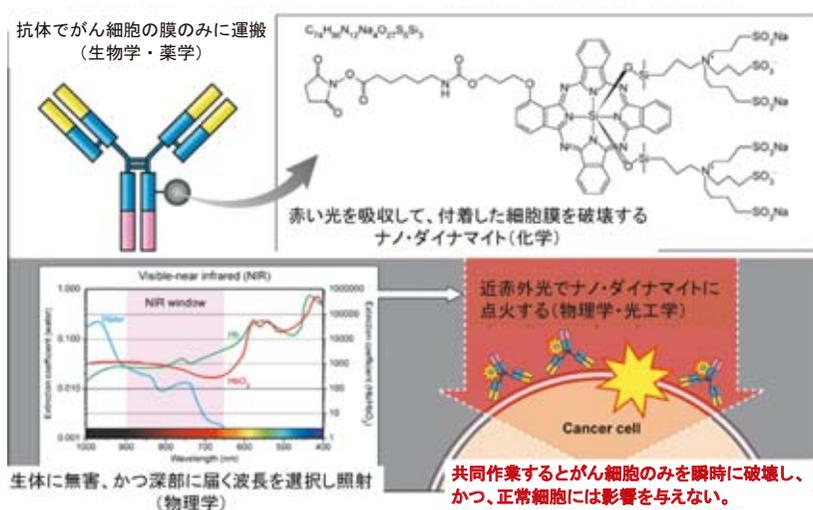


図1 近赤外光線免疫療法のメカニズム解説図

がん治療と比べるとかなり異なるものである。近赤外光を照射している間に、抗体-IR700の付着している脂質二重膜に非常に急速に障害が進んで、細胞形態が変化し内容物が漏出して壊死が起こる。この現象の非常に面白いところは、細胞がすべての生理機能を停止した摂氏4度においても、この細胞膜障害は37度の場合と全く変化なく進むことである。これは、この急速な細胞膜障害が、何らかの生理現象によって引き起こされているものでも、加熱によるものでもないことを示している。また、抗体をすべて細胞外においた条件で、活性酸素の中和剤を加えても、この急速な細胞膜障害は、止まらない。これらの事実から、私たちはこの急速な細胞膜障害は、光を吸収したIR700が、周囲の温度を急速に上昇させることによって水の膨張が起こり、その圧力波によって細胞膜が障害されると考えている。このような圧力波は、距離の2乗に反比例して減衰するうえ、抗体に結合したIR700は、前記のように細胞膜から遠くても数nm、幾つかの分子はほとんど細胞膜に接していると考えられるため、抗体が接着している細胞膜の変化は起こすことができても、隣の

細胞には変化を起こすことができないわけである。細胞の破壊の仕方が、焦点集中超音波(Focused ultrasound)を用いた細胞障害に似ているところも、この仮説を強くサポートしている。実際に、抗原を発現させた細胞と抗原を発現させない細胞との共培養系でも、抗原を発現している細胞が、完全に死に絶える条件で近赤外光線免疫療法を行っても、すぐ隣にある抗原を発現していない細胞は、全く障害を受けない²⁾(図2)。

生体内においての腫瘍を移植したマウスの実験でも、近赤外光を十分に照射した場合、腫瘍は照射終了直後には既に生きていた反応を失い、2~3日後には組織学的にも腫瘍細胞が完全に消失する²⁾(図3)。腫瘍の大きさも時間とともに収縮する。抗体を分割投与して近赤外光も反復照射することによって、多くのマウスの腫瘍を完治させることができた⁸⁾。この腫瘍への治療効果は、IR700の蛍光によるイメージングでも予測することができる(図3)。十分な効果がある治療を行った場合、腫瘍周辺には近赤外光照射の6~8時間後に一過性の浮腫が見られ、1日後には消退する。これは、破壊され

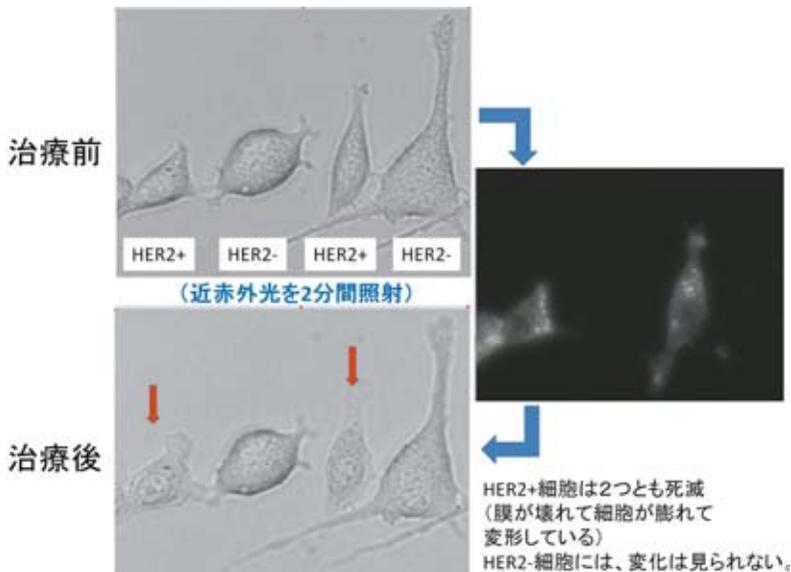


図2 近赤外線免疫療法で治療した HER2 抗原発現細胞 (NIH3T3/HER2) と HER2 抗原非発現細胞 (NIH3T3) の共培養系
HER2 抗原発現細胞のみが形態を変化させて壊死している
右は蛍光イメージング画像

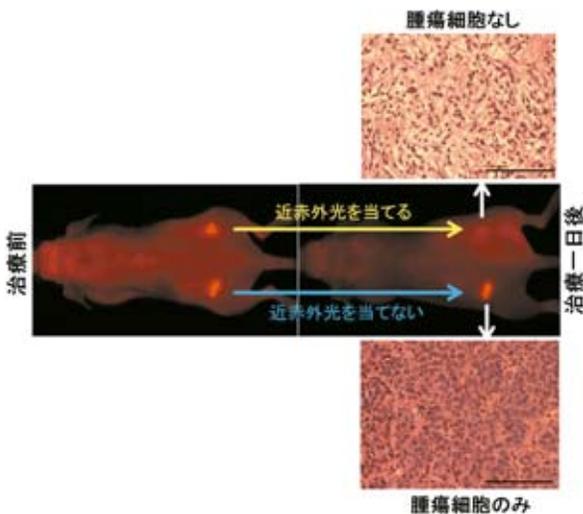


図3 近赤外線免疫療法で治療したマウスに移植した HER1 抗原発現腫瘍 (A431)
マウスの右 (図の上) の腫瘍のみに近赤外光を照射した。右の画像は 1 日後。既に近赤外光を照射した腫瘍は、蛍光を失っている。さらに 2 日後の組織像では、近赤外光を照射した腫瘍には、がん細胞が消失して肉芽組織に置き換わっている

た細胞膜より放出された細胞の内容物（核酸やヒストン）による Toll-like receptor を介した白血球の活性化と遊走，集積を反映していると考えられるが，現在のところ腫瘍の実験をヌードマウスで行っているため，その後続くであろう細胞性免疫への移行は確認できていない。繰り返し治療を行った時の腫瘍の完治率が非常に高いことを考えると，ヌードマウスにおいても，白血球による効果は腫瘍細胞を完全に死滅させるための助けになっているのではないかと推測している。

4 近赤外線免疫療法の適応

近赤外線免疫療法は，全く新しい概念のがん治療であると同時に，方法論としては，“ある種の細胞を生体の局所から取り除くことができる”初めての方法であろうと考えている。もちろん，細胞膜の分子標的ができる通常のがんは，すべてその適応

となることであろう。既にFDAに認可され治療に用いられている抗体の効果を飛躍的に増強するのが、臨床応用への最も早道であろう。さらに、これまでになかった適応としては、近赤外光線免疫療法は、短時間の近赤外光照射で広範に散らばったがん細胞を消滅することができるので、例えば手術で取りきることが難しかった膵臓癌や悪性中皮腫、卵巣癌の腹膜転移などのがんに対して縮小手術を行って、手術終了前に、近赤外光線免疫療法で取り残し部分のがん細胞を完全に消滅させて治療を終わることも可能であろう。また、血液中を流れているがん細胞や白血病細胞などは、抗体の注射とリストバンド型や毛布型の照射装置などでの就寝時の長時間照射などを行って、手術前後の血中がん細胞の除去による転移抑制や血液がんの治療に応用することも可能である。がん以外の疾患においても、慢性関節リウマチで、滑膜内の自己攻撃細胞の除去や、難治性感染症における薬物耐性細菌などの除去にも役立てることができると考えている。

5 おわりに

私たちの開発した近赤外光線免疫療法は、前記のように非常に強力で、かつ特異性が高い。したがって、従来のがん治療と比較しても、がん細胞に対しては強力ではあるが患者の体には優しい治療を行うことが可能である。また、近赤外光の照射量や範囲、抗体の投与量、投与方法などを変化させることによって、治療の範囲や効果が詳細にコントロールできるので、安全に治療を行うことが可能である。さらに、この近赤外光線免疫療法は、がんに対してのみならず、自己免疫疾患など、ほかのある種の細胞に起因している疾患に関しても様々な新しい応用が考えられる、利用範囲の広い方法論である。これまでの実験結果からは、今のところ臨

床応用への問題点はほとんど見付かっておらず、できるだけ早い臨床への応用を進めて、一刻も早く多くの患者の役に立てるように準備を進めている。

参考文献

- 1) Rosenblum, L. T., Choyke, P. L., and Kobayashi, H., Molecular antibody-based imaging of cancer: Quantitative and specific detection of cancer with radioimmunoimaging and activatable optical antibody-based imaging, *Therap Deliv*, **2**, 345–358 (2011)
- 2) Mitsunaga, M., Ogawa, M., Kosaka, N., Rosenblum, L. T., Choyke, P. L., and Kobayashi, H., Cancer cell-selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules, *Nat Med*, **17**, 1685–1691 (2011)
- 3) Urano, Y., Asanuma, D., Hama, Y., Koyama, Y., Barrett, T., Kamiya, M., Nagano, T., Watanabe, T., Hasegawa, A., Choyke, P. L., and Kobayashi, H., Selective molecular imaging of viable cancer cells with pH-activatable fluorescence probes, *Nat Med*, **15**, 104–109 (2009)
- 4) Kobayashi, H., Longmire, M. R., Ogawa, M., Choyke, P. L., and Kawamoto, S., Multiplexed imaging in cancer diagnosis: applications and future advances, *Lancet Oncol*, **11**, 589–595 (2010)
- 5) Kobayashi, H., Ogawa, M., Alford, R., Choyke, P. L., and Urano, Y., New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging, *Chem Rev*, **110**, 2620–2640 (2010)
- 6) Kobayashi, H., and Choyke, P. L., Target-cancer-cell-specific activatable fluorescence imaging probes: rational design and in vivo applications, *Acc Chem Res*, **44**, 83–90 (2011)
- 7) Kobayashi, H., Longmire, M. R., Ogawa, M., and Choyke, P. L., Rational chemical design of the next generation of molecular imaging probes based on physics and biology: mixing modalities, colors and signals, *Chem Soc Rev*, **40**, 4626–4648 (2011)
- 8) Mitsunaga, M., Nakajima, T., Choyke, P. L., and Kobayashi, H., Near infrared theranostic photoimmunotherapy (PIT) : Repeatedly shining light enhances the effect of immunoconjugate, *Bioconjug Chem*, **23**, 604–609 (2012)