

## 光励起ターゲット治療の細胞死メカニズム詳細解明

名古屋大学大学院医学系研究科・高等研究院

特任講師 佐藤和秀

### 研究の背景・目的

申請者は次世代のがん治療として、がん細胞表面の抗原に特異的な抗体に近赤外線に反応する probe をつけ、局所的に近赤外線を当てる事で治療を行う Near-Infrared photoimmunotherapy (PIT) を見だし、肺がんを含めた難治がんの診断や治療に応用するための基礎的な研究を行ってきた。PIT により引き起こされる細胞死の生物学的な基礎メカニズムとそれに続くダイナミックな生理学的変化や、免疫反応を解明し、さらなる臨床応用を目指している。

本研究は、probe (化学) と抗体 (生物学、医学、薬学) を至適条件下で conjugation し薬剤化を行い (conjugation chemistry)、さらに近赤外光線 (光学・物理学) を加えた治療法を行う学際的な治療である<sup>1)</sup>。特徴は超選択的な細胞死で、隣り合っている標的細胞のみに細胞障害を10分以内の細胞障害を与えることが可能である。本治療は、新しいがん治療モダリティとして2020年9月に、EGFR 高発現の再発既治療頭頸部がんに限定承認された。これら素晴らしい効果や其の革新性とは裏腹に、国際第3相試験の開始時には PIT の詳しい細胞死のメカニズムはわかっていなかったが、2018年11月申請者が IR700 の光化学反応 (IR700 の構造変化と疎水化) が本治療の起点であることを見出した<sup>2)</sup>。従来の光治療 (例えば光線力学療法など) は酸化ストレスが光で細胞死が誘導するとされており、正常細胞や免疫細胞なども含めてすべて酸化ストレスを与えて細胞死を誘導する。しかしながら、PIT は、水溶性の光吸収プローブの IR700 の側鎖である siranol 基が近赤外光照射によって遊離することで、抗体・IR700 複合体が細胞膜上で急速に疎水化して凝集することが起点であり、このため、迅速な細胞死が起こる。

本細胞死は世界初の光化学細胞死であることを証明したが、未だ細胞死の生物学的な側面は不明であり、その詳細解明が求められている。本研究では、PIT の光化学細胞死の生物学的なメカニズムを追究する。本解明に基づき、臨床研究のさらなる進展・裏づけや、新光化合物の創生、新規分野開拓など今後の光治療・光化学分野のさらなる革新の創出を可能とする。

## 研究の方法

抗 HER2 抗体の trastuzumab や抗 EGFR 抗体の panitumumab に IR700 を付加して tra-IR700 や pan-IR700 を作成した。

走査型電子線誘電顕微法 (SE-ADM) の観察では、生物試料を 2 枚の窒化ケイ素 (SiN) 膜からなる試料ホルダーに入れ、上側の SiN 膜をタングステン (W) 層でコーティングする。W でコーティングされた SiN 膜に電子ビーム (EB) を照射すると、EB は散乱され、そのほとんどが W 層に吸収されるため、生物試料は EB によるダメージから保護される。従って、生きた細胞のなんスケールイメージングが可能である。観察の際に近赤外光線を照射して、治療の前後で細胞を生きたまま観察した。

細胞破壊の浸透圧による影響を観察するために、20% Sucrose 入の PBS の場合と通常の PBS での NIR-PIT の効果の差を検討した。

GFP-アクチンの恒常発現細胞を構築するために Lifeact-GFP を遺伝子導入した細胞を観察し、NIR-PIT での光照射によるリアルタイム変化を検討した。

NIR-PIT の細胞内アクチン変化を生化学的に検討するために治療した細胞融解材料を用いた Western 解析を行った。

## 研究結果

### 1. SE-ADM による解析

SE-ADM を用いて HER2 高発現マウス線維芽細胞株である 3T3-HER2 細胞株を観察した。in vitro CD44 標的 NIR-PIT 処理 4T1E/EM3 細胞と同様に、in vitro HER2 標的 NIR-PIT 処理 3T3-Her2 細胞は、対照細胞、NIR-光処理細胞、および NIR-光を照射せずに tra-IR700 で処理した細胞では変化が観察されなかったのに対し、in vitro HER2 標的 NIR-PIT 処理 3T3-Her2 細胞は、形質膜およびオルガネラ膜の損傷と黒い粒子 (ドット) の存在を示した (図 1A)。In vitro で HER2 を標的とした NIR-PIT は、細胞膜下の細胞質に様々な粒子を生成した (図 2B)。これは、NIR-PIT の実施により小さな凝集体が発生し、強度が増強したことを示唆している。in vitro で EGFR 標的 NIR-PIT を行ったヒト皮膚がん細胞株 A431 を SE-ADM を用いて画像化した場合でも同様の結果が得られた。

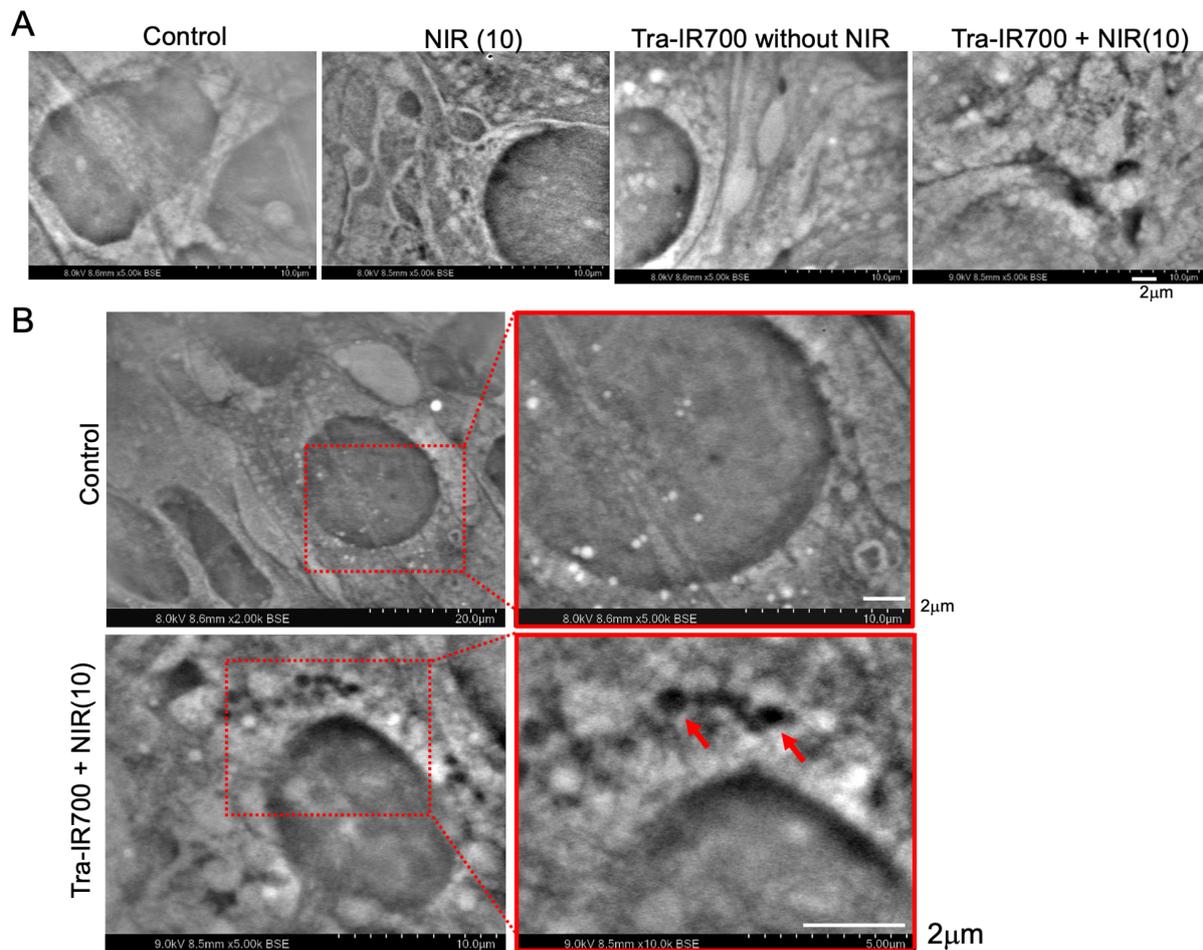


図1 : SE-ADMによる *in vitro* HER2 標的 NIR-PIT 処理 3T3-Her2 細胞の観察

(A) 3T3-Her2 細胞の SE-ADM 像 (5000×)。コントロール (無処理)、近赤外光を 10 分間照射 (近赤外光のみ)、近赤外光を照射しない tra-IR700、近赤外光を 10 分間照射した tra-IR700 をそれぞれ 5kV EB、-9V バイアスで測定した。(B) 3T3-Her2 細胞の SE-ADM 画像。上図はコントロール細胞の画像 (2000×)、左図の赤枠内は高倍率画像 (5000×) で、8 kV EB で測定した。下パネルは、HER2 標的 NIR-PIT 処理 3T3-Her2 細胞 (近赤外光 10 分間照射) の画像 (5000×) と左パネル赤四角の高倍率画像 (10000×) で、9kV の EB と-9V バイアスで測定した。HER2 を標的とした NIR-PIT 処理 3T3-Her2 細胞の細胞小器官内に、様々なナノサイズの黒い粒子 (約 50-500 nm) が観察された。スケールバー、2 μm。

## 2. 浸透圧による NIR-PIT 効果検討

*in vitro* で HER2 標的 NIR-PIT 処理した 3T3-Her2 細胞を通常または高浸透圧条件下 (PBS 中 20%スクロース : s-PBS) で評価し、*in vitro* で HER2 標的 NIR-PIT 処理した細胞死が物

理的膜損傷後の細胞内への水分流入に依存するかどうかを検討した。細胞はNIR 光照射前に PBS または s-PBS 中で1時間インキュベートした。NIR 光照射と PI 染色の間、サンプルはそれぞれ PBS と s-PBS 中で維持した (図 2A)。酸化ストレス誘導剤である TBHP とのインキュベーション、および対照処理または NIR-光単独処理では、通常の浸透圧条件下 (PBS) よりも高浸透圧条件下 (s-PBS) の方が PI 染色細胞の割合が有意に増加したことから、高浸透圧条件下 (s-PBS) では細胞障害が増加することが示唆された。対照的に、高浸透圧条件下 (s-PBS) では、通常の浸透圧条件下 (PBS) で観察された割合と比較して、in vitro HER2 標的 NIR-PIT 処理 3T3-Her2 細胞 (1J/cm<sup>2</sup> および 2J/cm<sup>2</sup> の両方) で PI 染色された割合の有意な減少が観察された (図 2B)。

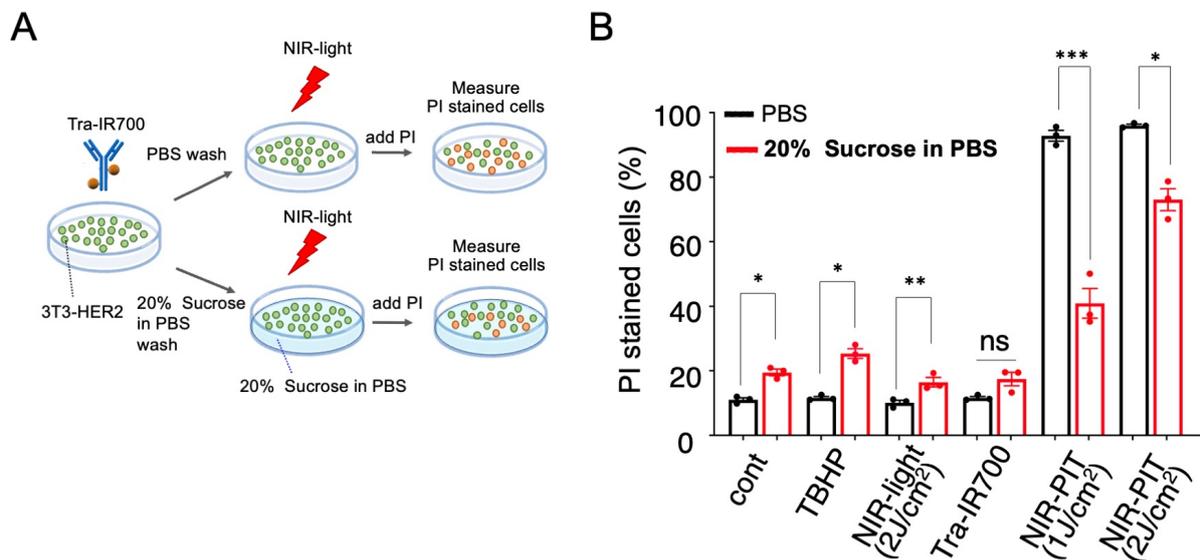


図 2 : 高浸透圧条件下での in vitro NIR-PIT 効果

(A) PBS または PBS 中 20%スクロース (高浸透圧条件) 中の 3T3-Her2 細胞に対する in vitro HER2 標的 NIR-PIT 効果。実験手順を示す。

(B) PBS または PBS 中 20%スクロース中で in vitro HER2 標的 NIR-PIT 細胞の PI 染色率を定量した (n=3, \*p=0.0021 (control), 0.001 (TBHP), 0.0025 (NIR-PIT 2 J/cm<sup>2</sup>) < 0.005, \*\* p = 0.0172 < 0.05, \*\*\* p = 0.0004 < 0.0005, student's t test)。TBHP ; 最終 200 μM TBHP インキュベーション、NIR-light ; tra-IR700 インキュベーションなしで NIR-light 照射のみ。

### 3. NIR-PIT によるアクチン変化の解析

in vitro で HER2 標的 NIR-PIT 処理した 3T3-Her2 細胞の細胞溶解液で免疫ブロッティング

を行った。細胞および細胞上清 (PBS) を含む全細胞溶解液を、Methods のセクションに記載したように調製した (図 3A)。コントロール、NIR 光のみ、および TBHP 処理と同様に、*in vitro* NIR-PIT による処理は、核内タンパク質であるヒストン H3 のレベルの変化を誘導しなかった。ErbB2 (HER2) タンパク質は、光化学反応後、NIR 光量依存的に tra-IR700 に結合して凝集する。興味深いことに、*in vitro* で HER2 を標的とした NIR-PIT を実施すると、 $\beta$ -アクチンのレベルも NIR 光量依存的に減少した。免疫ブロット膜にブロットされた tra-IR700 による蛍光も、NIR-光量依存的に減少したことから、以前に報告されたように、IR700 リガンド放出による凝集が tra-IR700 で起こったことが示唆された (図 3A)。

3T3-Her2-lifeact-GFP 細胞と 3T3-RFP-lifeact-GFP 細胞の混合培養で *in vitro* HER2 標的 NIR-PIT を行った。Tra-IR700 は 3T3-Her2-lifeact-GFP に結合したが、3T3-RFP-lifeact-GFP には結合せず、IR700 の蛍光を示した。3T3-RFP-lifeact-GFP 細胞 (\*印) の GFP および RFP 蛍光は、近赤外光 (690 nm Laser) 照射 30 分後まで変化しなかった (図 3B)。一方、tra-IR700 とインキュベートした 3T3-Her2-lifeact-GFP 細胞の IR700 および GFP 蛍光は、近赤外光照射 30 分後に徐々に減少した。3T3-Her2-lifeact-GFP 細胞膜のアクチン-GFP 蛍光は、HER2 標的 NIR-PIT の実施とともに減少した。細胞膜の破裂と細胞質の漏出 (ブリーブの形成; 矢印で示す) が DIC で観察された。

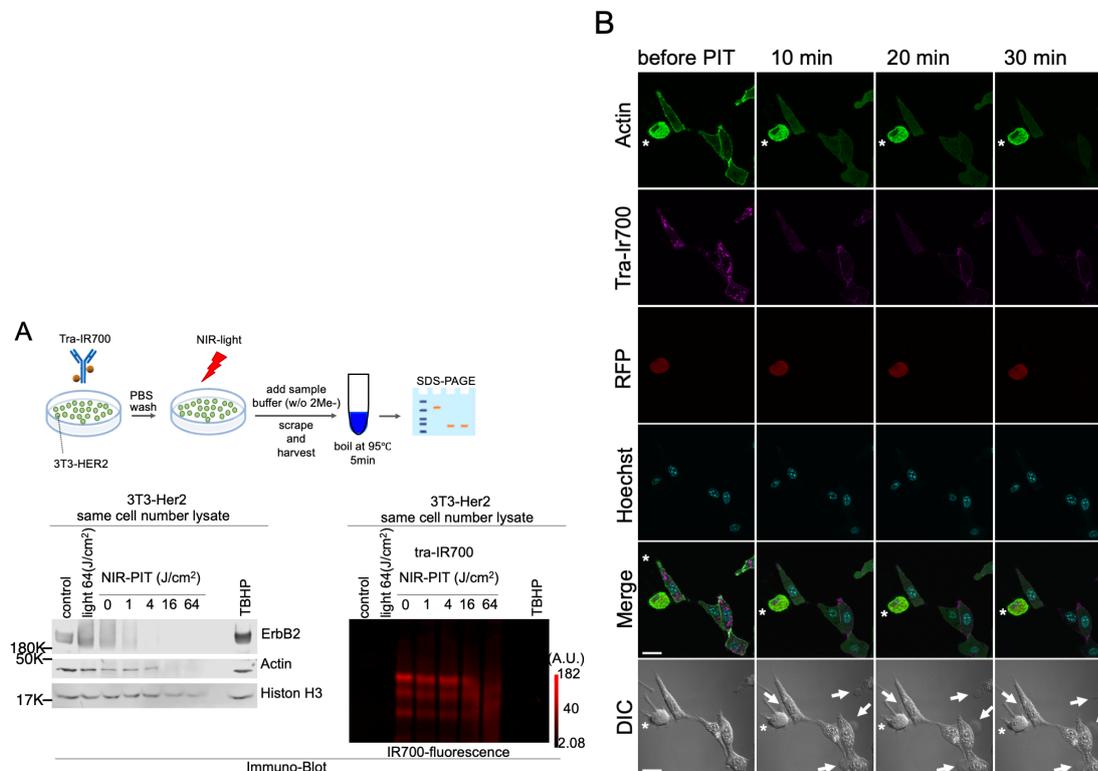


図 3 : *in vitro* HER2 標的 NIR-PIT におけるアクチンの関与

(A) in vitro HER2 標的 NIR-PIT の 3T3-Her2 細胞溶解液に対する免疫ブロッティング。上図はサンプルの調製方法と SDS-PAGE、イムノブロット法を示している (メソッドも参照)。ErbB2 (HER2)、アクチン、ヒストン H3 レベルが分析された。ヒストン H3 (核内タンパク質) を内部コントロールとして用いた。ブロッティング膜の 700nm の蛍光は、右図に示すように、ライセート中の tra-IR700 を示した。TBHP; 最終 200  $\mu$ M TBHP インキュベーション。 (B) 3T3-Her2-lifeact-GFP および 3T3-RFP-lifeact-GFP に対する in vitro HER2 標的 NIR-PIT (2J/cm<sup>2</sup>) 効果の蛍光顕微鏡観察。\* 印の細胞は 3T3-RFP-lifeact-GFP 細胞を表す。矢印で示した細胞はブリーブを形成し、破裂した。スケールバー、40  $\mu$ m。

### 考察

細胞膜下のアクチンフィラメントが NIR-PIT による細胞死に重要な役割を果たしていること、また、コンジュゲートの光吸収剤 IR700 の光化学反応により、NIR-光照射時にアクチンフィラメントの凝集が起こることが示された。細胞膜下の皮質アクチンが破壊されることで、浸透圧条件によっては細胞内に水が流入し、細胞破裂が起こる。これらの結果は、NIR-PIT によって誘導される細胞死のメカニズムが、従来の細胞死メカニズムとは異なるユニークなものであることを示唆している。

### 今後

追加実験データを取得した後、投稿する予定である。

### Reference

- [1] M. Mitsunaga, M. Ogawa, N. Kosaka, L. T. Rosenblum, P. L. Choyke, and H. Kobayashi, “Cancer cell-selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules,” *Nat. Med.*, vol. 17, no. 12, pp. 1685-1691, 2011.
- [2] K. Sato *et al.*, “Photoinduced Ligand Release from a Silicon Phthalocyanine Dye Conjugated with Monoclonal Antibodies: A Mechanism of Cancer Cell Cytotoxicity after Near-Infrared Photoimmunotherapy,” *ACS Cent. Sci.*, vol. 4, no. 11, pp. 1559-1569, 2018.