特異性を重視した新たな癌の 分子イメージングと近赤外光線免疫療法

米国国立衛生研究所 米国国立がん研究所 分子イメージングプログラム*

小林久隆*

New technologies of cancer cell-specific molecular imaging and near infrared photoimmunotherapy

In this review, rational concepts for developing new technologies of molecular imaging and molecular targeting therapy for cancer based on multi-disciplinary science are introduced. First, the basis of next generation molecular imaging technologies for cancer cell-specific detection is discussed. Then, a newly developed cancer cell-specific therapy using antibody-photosensitizer conjugates and near infrared light, named photoimmunotherapy, which was evolved from the molecular imaging technology is introduced and discussed focusing on its basis, therapeutic effects, and applications.

より特異的な癌イメージングは、より正確な治療を可能にし、さらに超特異的癌治療は、癌に対しては強力でありながら、患者の体に対してはやさしい治療になりうるはずである。より良い癌の臨床を追い求める医学研究者として、さらなる「病気に厳しく、患者の体に優しい」方法の開発が、究極の目標である。この稿では、私たちの研究室で行ってきた特異性を重視した次世代のイメージング方法論、さらに造影薬剤作成と利用の基本理念と方向性を解説したい。加えて、次世代のイメージング技術の新たな進化形である、超特異的癌治療「近赤外光線癌治療」の開発理念と特徴、さらにそのさまざまな応用法についても触れたい。

Hisataka Kobayashi*

Keywords: Molecular imaging, Photoimmunotherapy, Cancer, Molecular target, Super-enhanced permeability and retention effect

1. はじめに

近年、生体内の情報を画像として読みとる生体画像科学は、「Molecular Imaging / 分子イメージング」という学問体系のもとで、大きな進歩を遂げてきた。科学の研究・開発の中で、生体画像科学は、応用科学の粋ともいえるべきものである。なぜなら、生物学・医学の情報をより良く読みとるためには、物理・工学と化学・薬学の基礎や技術の融合が必須であるからである。生物学・医学の中で、生体画像科学ほど物理・工学と化学・薬学に大きく依存する分野は稀であるし、物理・工学や化学・薬学から見ても、これほどはっきり医学という実学へのアウトプットに直接貢献できる学問領域は稀である。この

点について、先代の NIH Director であった放射線科医の Dr. Elias Zerhouni も、「分子イメージングは統合応用科学の完璧な見本“A perfect example of the multi-disciplinary integrated science”」と述べている。そういう意味で、生体画像科学は研究開発を進めていくには非常に多様性に富み、無限の可能性を秘めた興味ある研究領域である。

生体内の情報を画像として捉える方法は、約100年前のレントゲンのX線撮影に始まって、近年、急速に進歩してきた。そして、より詳細な形態情報、より機能的な情報、より特異的な分子情報へと生体内を画像化する技術の進化は止まるところを知らない。生体から得られる情報の増加は、最新の医学・より良い医療への革新を強く後押ししている。そのインフラとなる基礎学問も、物理・工学はX線発生装置の時代からは理論も装置も飛躍的に進化

* Molecular Imaging Program, National Cancer Institute, National Institutes of Health

して、核医学、Magnetic resonance imaging (MRI) のみならず、多様な画像を得ることができるようになった。化学・薬学はさまざまな新しい合成化合物やナノテクノロジーをはじめとした新材料を生み出して、生体イメージングへの応用の分野においても、高度な情報を得るとともに、容易に生体に応用できるような薬剤を生み出し続けている。生体から電子ひとつまでのすべてのスケールにおいて、この知識と技術の高い次元での融合の先に、生体画像科学が進化していく道があると考えている。従来の放射線科学では、研究を「撮像機器」、「臓器」、という医療側に沿った分け方が主流であった。しかし、本稿では、そのような既存の区分にとらわれず、大きく、広く、生体画像科学の基礎と体系を俯瞰し、そのうえで「より高度な情報を得るための方法を開発する」という視点で、癌診断に応用される分子イメージング技術の方向性を論じたいと考えている。

同様の理念は治療法の開発においても、ほぼ同等に当てはまる。現在、癌治療の3つの主たる方法は、手術、化学療法、放射線治療である。これらの癌治療は、「外科手術で切り取る」にしても、「抗癌剤で殺す」にしても、「放射線で焼く」にしても、癌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。つまり癌に対する効果は、「正常の組織ごと取り出す」あるいは「癌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。言ってみれば「毒を以て毒を制する」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、上記の診断法で論じたのと同様に集学的な合理的な新理論に基づいて、もし正常細胞を殺すことなく、特異的に体内の癌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癌に対しても、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、近年、このような新しい治療の方法論を理論的に組みあげて、実際に臨床応用することを目標にして研究を進めてきた。この理論に基づいて、2011年に開発した近赤外線を用いた近赤外光線免疫療法 (Photoimmunotherapy; PIT) について、その開発経緯と実際の効果、さまざまな癌治療への応用法、臨

床治療の準備状況などについても紹介したい。

2. *In vivo* の分子イメージングに用いられる 画像診断機器とそれぞれの特徴

現在、分子イメージングに用いられている、主力の生体イメージング方法論は、核医学、MRI、光イメージングの3種類であり、これらはすべて信号の読み出しとして波長は異なるが電磁波を使っている (図1)。それ以外では、超音波断層も一部で使われているが、超音波造影剤に用いられる気泡・液泡 (バブル) は、他の造影剤・プローブに比べると非常に大きく、直径1ミクロン前後である。感度は、ほぼ1つのバブルを認識できるほど非常に高いのだが、他の診断機器に使用される造影剤とは薬剤の動態や標的運搬性という点で大きく異なるので、以下に述べる標的特異性の高い分子イメージングの方法論としては、一般的な方法になり得ない。この事実は、私が2008年よりプログラム委員を担当している世界分子イメージング学会の演題数の90%以上がこの3種類の方法を使用していることから証明できる。

これらの各々の機器においては、それぞれの物理的な特徴があり、それゆえ特徴のある利点と欠点がある。例えば、核医学 (Positron emission tomography (PET) を含む) を用いた手法の大きな利点は、その高い感度にある。1pM 程度の濃度の薬剤を画像化できるのは、放射性同位元素を用いた核医学の方法と光イメージングのみである。ポジトロンを用いる陽電子断層法 (PET) は高い感度が利点であり、また、シングルフォトン (PET 以外) の核種を用いた場合は、標識する核種の選択によって診断画像を撮ることができる方法を効果的な治療の方法へと発展できる可能性があることが利点である。欠点は非常に低い空間、時間解像度である。現実問題として、人の画像で空間解像度を5mm以下にすることは難しく、マウスの画像でさえ解像度の高い PET でも空間解像度を1mm以下にすることは物理的に困難である。また、核医学画像単独では、十分な解剖学的情報を得られないので、位置の確認には他の手法での解剖学的情報の採取と画像の統合

図1 生体画像の物理的背景。分子イメージングの主たる三撮像機器は、生体を深くまで貫通できる波長の異なる長さの電磁波を信号として読み取っている。

が必要になる。また、撮像時間も十分な解像度の画像を得るためには、少なくとも分単位の時間をかける必要があり、他の機器に比べると空間・時間解像度とも10から1000倍も劣る。

MRIの利点は、核医学とは逆に優れた空間解像度(シングルミクロン)と時間解像度(数十ミリ秒)に加えて高い組織コントラストにある。また、CTや核医学と異なり、放射線被曝がないため、生体の同一部位を反復して画像を撮ることが可能である。したがって、詳細な解剖学的位置で、その場所の経時変化を画像化することが可能である。これは、血流動態などの変化の速い生理的機能を描出するのに優れている。一方で、MRIの欠点は造影剤に対する感度の低さである。ガドリニウム造影剤の場合、どのように良い条件にしても薬剤の濃度が10 μM 以上必要で、核医学と比較すると1万倍以上感度に差がある。酸化鉄粒子を使った場合は、大きな粒子にすればするほど粒子数でいえば相当に感度を高めることができ、1ミクロン以上の大きさの酸化鉄粒子であれば1個の粒子を生体内でもMRIで描画することができる。しかし、鉄の原子数でいえば、

やはり μM のオーダーの量が必要である。このため、特異性が高く十分なMRI信号を出すことのできる造影剤を作成することは簡単ではない。比較的大きな酸化鉄粒子を用いて細胞を標識し、MRIで細胞の動態を観察する細胞追跡イメージング(Cell tracking imaging)では1つの細胞を描出することが可能である。現在、核医学や光イメージングでは、生体内で細胞1つを標識して観察することは、ほとんど不可能であるので、生体内での細胞追跡画像に関してはMRIが最も感度の良い機器である。

光イメージングの利点は、ほぼ核医学と同等に感度がかかなり高く(1pM)、浅いところであれば、空間・時間解像度もMRIと同様にシングルミクロン、数ミリ秒まで高めることが可能である。これに加えて、光信号は多色の信号を用いること、スイッチをオン・オフするように一分子の発する信号強度を調節することなど、非常に多様な調節が可能である。既存の臨床放射線機器で用いられている造影剤は、ほとんどの場合に信号が一定の強度で発せられており、描出したい対象でのみ信号を発生させるという概念はなかった。光イメージングでは、その感

度の高さとその多様な調節の両方を用いることにより、これまでできなかった「癌だけを光らせる」などといった非常に特異性の高い造影剤・プローブを作成することが可能になった。一方で、光イメージングの大きな欠点は、体の深部まで画像化することが難しいことである。理論的には、10cm程度の深部まで断層像として捉えることが可能ではあるが、これを実現するためには撮像対象の条件が理想的でなければならず、実際に生体では数cm程度の深さの標的を捉えることが限界であろう。したがって、光イメージング自体は既存のどれかの画像診断機器にとって代わるようなものではないが、これまで得ることができなかった情報を描出するためのイメージング手法であり、実際に目視の観察を必要とする手術や内視鏡といった臨床の手技を「第三の目」として支援するには適している。したがって、他の画像手段と組み合わせることによって、さらに高度な情報を撮ることが可能になる。

3. 既存の造影剤のデザイン

解剖を超えたイメージング情報を得るためには、多くの場合、造影剤が使われる。元来、コントラストの悪い X 線写真上に追加情報を加えるため、ヨード造影剤による X 線吸収によってフィルム上の新たな「影」を「造」ることにより、使用し始められた「造影」薬剤は、当然ながら薬剤自身が信号を出すことが常識であった。核医学においても、放射性同位元素から放射線を出すのを止めることはほとんど不可能であるため、イメージング薬剤の信号発生をコントロールするという概念は存在しなかった。MRI における常磁性体のガドリニウムを用いるような造影剤の場合は、Meade らが作成したように化学的にガドリニウムと水分子の接触をコントロールすることによって、造影効果(プロトンの緩和度: Relaxivity)を変化させることができる造影剤をデザインすることも可能である¹⁾。この MRI 造影剤はやや構造が複雑であり、生体に利用できる量を合成することは簡単ではない。光イメージング、特に有機蛍光団を信号分子に用いる場合には、比較的単純な構造でもこのような信号を変化させる造影剤のデ

ザインが可能であり²⁾、また、多様な光化学の理論の応用もできるため、生体内の微小環境や生理化学反応に応じて、造影効果を出すことができる造影剤を多様にデザインし、大量に作成することができる^{3,4)}。

4. より特異的な情報を得るためのイメージング方法論

既存のイメージングから、より高度な情報を得るためには大きく分けて2つの方法論がある。1つは、より多くのより複雑な情報を撮ることであり、もう1つはより質の良い情報を抽出して得ることである。

前者の理論は簡単にいうと、これまで「1つの検査、一種類の画像」であったものから「1つの検査、多種種類の画像」へということである。そのためには、①2つ以上の機器で同時撮像する (Multimodality imaging)、②異なる信号を発する2つ以上の造影剤を同時に用いて撮像する (Multiple color imaging)、③同じ対象物を同時に異なる2つ以上の撮像法で撮って画像を作成する (Multiple signal imaging)、という3種類の方法がある。2つ以上の機器を用いれば、前節で述べたようなそれぞれの機器の弱点を補い、長所を生かした撮像が可能であるし、別々の信号を発する2つ以上の造影剤を用いて撮像するか、または、異なる2つ以上の撮像法で撮って画像を作成すれば、同じ対象物から同時に独立の2つの情報を得られるので、より詳細な数理解析が可能になるわけである。後者の理論は、画像上でなにかの対象物を見たいときには、その対象物の信号と背景の信号で見きわめるわけであるので、造影剤自身が対象物のところでは最高の信号を出す、対象物以外のところでは最小の信号を出すようにつくられておれば、より質の良い対象物の情報が得られるはずである。このような標的や環境に応じて発する信号が変化する造影剤は、“Activatable”あるいは“Smart”(活性可能な、賢い)造影剤と総称されている²⁾。次世代のイメージング理論を総称して、Multiplexed imaging(多変量イメージング、あるいは、多次元イメージング)などと呼ばれている⁵⁾。

上記の方法論はそれぞれ理論的に独立している

ので、さらにこれらの方法論を組み合わせることもできる。例えば、前者の Multimodality imaging と後者の Smart imaging probe を組み合わせて、薬物動態と薬物の標的への到達と結合を同一生体内で観察することができる(図2)⁶⁾。また、前者の中で、①Multimodality imaging と③Multiple signal imaging を組み合わせて、体内におけるリンパ流とリンパ流にのってリンパ節へと移動する細胞を同時に描出することができる⁷⁾。

スマート造影薬剤にも、単純に標的(たとえば癌)のところにおいて信号を出すのみではなく、より複雑な高次の機能を持たせることも可能であり、さらなる臨床のニーズに応じた薬剤の作成も進めている。その例としては「生きている癌細胞が光り、治療して死ぬと消える」蛍光薬剤⁸⁾や、外科手術や内視鏡の手技や手術の術中に使えるように「スプレーして1分以内に光る」蛍光薬剤(図3)⁹⁾なども作成してきた。この蛍光薬剤は、マウスの化学薬品誘導結腸癌において内視鏡での応用が有効であることを確

認できた¹⁰⁾。

このような理論に基づいた新しいイメージング技術の発展はここ数年間で始まったばかりであり、これからさらに熟成されていく領域であろうと考えている。

5. 特異的な情報を得るためのイメージング方法論は、特異的な治療へと進化できるか？

これまでに述べてきたとおり、イメージングの技術も基本的なものは非常に単純な理論に基づいた方法論であった。それを物理・化学・医学の融合領域として高めることによって、より特異的かつ高度な情報が得られるようになってきた。同じ理論は治療についても、ほぼ同様に適応できる。具体的には、上記に述べてきたイメージングの「正常の細胞を見せずに、癌細胞のみを描出する」命題を、癌治療の「正常の細胞を傷つけずに、癌細胞のみを殺す」という課題に書き換えることは、上記の理論で開発

図2 放射性同位元素(常時オン)と環境可変(スマート)光シグナルを出す方法で同時標識した単一抗体を用いたマルチプレックス・イメージング。二機種同時撮像+分子特異的可変(スマート)シグナルの組み合わせ。放射性同位元素画像は、定量的な抗体の生体内薬物動態を、光スマートシグナルを出す画像は、抗体の抗原への結合を画像化している。

図3 急速活性化スマートシグナル造影剤(ガンマ・グルタミン酸ペプチダーゼ反応造影剤)による、腹腔内播種した卵巢癌の腹腔内視鏡画像。1分以内に卵巢癌の腹腔内播種が明瞭に描出された。手術や内視鏡を用いた手技中に用いるのに適している。

された技術にとってはあまり大きな変更ではない。現実的には、前述の「癌細胞のみを光らせる」というスマート造影薬剤で癌細胞からのみ放出することができ、光エネルギーを細胞障害へと転用することによって、「癌細胞のみを殺す」技術を開発できるはずである。そして、物理生物学的必要事項である「細胞を傷つけない近赤外光(紫外線や放射線のようなDNA損傷をすべての細胞に起こすものでなく、かつ体の奥まで到達できる波長)」と化学生物学(ケミカルバイオロジー)的必要事項である「癌細胞のみに結合し光を当てれば結合した細胞を殺すが、細胞膜に結合しなければ、あるいは、光を当てなければ、いかなる細胞も傷つけることがない光治療製剤結合抗体」を同時に実現することにより、正常の体にとって直接に「毒」となるものをなにも用いないで、体の中の癌細胞のみを選んで消滅させる方法を合理的にデザインすることができるわけである。私たちはこの理論に基づいて、2011年に近赤外光線免疫療法(Near infrared PIT)を完成し、発表した¹¹⁾。

6. 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。実際に病理での癌の診断も、現在でも多くは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。最も利用しやすいIgGクラスの抗体を用いた治療は数多く開発され、2012年現在、米国のFDAで認可され、臨床に使用されているものだけで

も32種類ある¹²⁾。抗体は、いくつかのサブクラス(IgG1, IgG4)の抗体分子自体が Antigen dependent cellular cytotoxicity (ADCC) や Complimentarity dependent cytotoxicity (CDC) などの免疫機能を利用した殺細胞効果を持つ。抗体治療は一定の効果を上げてはいるが、このような宿主の免疫系を介した抗体自体による治療効果のみで、癌を完治させることは難しいのが現状である。

さらに、癌に対する効果を増強するため、抗体の癌細胞への結合特異性を生かして、殺細胞効果の強い薬剤(細胞毒素、免疫賦活剤、抗癌剤、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ている。そのいくつかはすでに臨床応用がなされているが、殺細胞性薬剤が生理的代謝や排泄を行う臓器に毒性を起こしたり、抗体の比較的半減期が長いため、抗体に結合した放射性同位元素が発する放射能が放射線感受性の高い骨髄抑制を引き起こしてしまうため、このような薬剤は投与量に限界がある。このような副作用を避ける必要があるために、既存の抗体結合薬剤は決定的な癌の特異的治療となり得ていない。

ユーリッヒが抗体を「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」にはなっていない。抗体の「優れた抗原に対する結合」を癌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。薬物動態的観点では、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。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(数ナノメートル以内)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、エンドソームからライ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。このような生物学、薬物動態学を背景にして、物理、化学的な基礎を加味して、「結合した細胞に対してのみ殺細胞効果を起こす」具体的な方法論を合理的にデザインすればよいわけである。

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、局所で物理的影響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。既知の現象の中では、光化学反応がこのような効果を起こしうるものの1つである。ところが、生物で光を使うためにはいくつかの限界がある。光化学反応を効率よく起こすためには、エネルギーの高い光子(波長の短い電磁波)を用いる必要がある。しかし、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、すべての細胞はDNAに損傷を起こしてダメージを受けてしまう。つまり、体外から光を照射した場合、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、癌細胞のところのみで細胞毒性を起こすには、可視光かそれ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、体の深部に治療に十分な光子を到達させるためには、700ナノメートルから850ナノメートルあたりの近赤外領域の光子を使用する必要がある¹¹⁾。

そこで、私たちは抗体に結合させることによって癌細胞上に運ぶことができる分子で、そこで効率よく700ナノメートルから850ナノメートルあたりの近赤外領域の光子を吸収して、なん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選択した。この発生するエネルギーが光であれば「蛍光」であり、診断に応用す

ることができる。私の研究室では、癌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、百種類を超える蛍光物質を用いて、癌細胞でのみ発光する技術を開発してきた^{2-5,8)}。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。逆に可視蛍光や近赤外蛍光を効率よく発生しない光吸収物質—抗体結合化合物をつくると、エネルギーを熱や光励起酸化反応に転用することができるわけである。抗体を用いた細胞特異的分子イメージング技術を開発する過程でこのような副産物も相当数作成されていた。私たちはその中から、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、IRDye700DX(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、予測どお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)を開発できたわけである(図4)¹¹⁾。

7. 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、既存の他の癌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、主として細胞質の内容物が漏出して数分内に壊死が起こる。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度とまった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なんらかの生理現象によって引き起こされているものでも、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が光化学的な変化を起こすことによって、直接的に結合タンパクに構造の変化を起こし、膜の裏打ちタンパクの機能障害を起こすことによって、細胞膜の機能が直接に障

超特異的癌治療(近赤外光線免疫治療)のメカニズム

図4 近赤外光線免疫治療の解説

害されると考えている。細胞膜の機能障害は、急速な細胞外の水の流入を許し、細胞は膨化し、ついには細胞膜が破裂することによって壊死に至る。したがって、抗体の結合した細胞のみを殺傷することができるわけである。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を用いて、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、隣接する抗原を発現していない細胞は全く障害を受けない¹¹⁾。

生体内に腫瘍を移植したマウスの実験においても、抗体IR700結合体の集積した腫瘍に近赤外光を十分に照射した場合、腫瘍細胞は照射終了直後にはすでにATP産生¹³⁾や糖代謝¹⁴⁾といった生存反応を失い、2～3日後には組織学的にも腫瘍細胞がほぼ完全に消失する¹¹⁾。腫瘍の大きさも時間経過とともに2日程度で収縮し消失する。抗体を分割投与して近赤外光も反復照射する治療計画を用いることによって、80%以上のマウスの腫瘍を完治させることもできた¹⁵⁾。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。十分な効果がある治療を行った場合にはIR700の蛍光は消失し、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。

そして、腫瘍治療部には急速に肉芽組織が形成される。これは、破壊された細胞からの構成物放出によるToll-like receptorなど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、そのあとに続く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ときの、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。

8. 近赤外光線免疫療法の適応

近赤外光線免疫療法は、まったく新しい概念の癌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癌はすべてその適応となることであろう。すでに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。実際、2015年初頭より Epidermal growth factor receptor

(EGFR)を標的にした頭頸部癌、食道癌の臨床治験がすでに米国FDAによって薬剤承認されている抗体CetuximabのIR700結合体を用いて欧米で実施予定である。さらに、近赤外光線免疫療法の新たな適応としては、近赤外光線免疫療法の短時間の近赤外光照射で広範に散らばった癌細胞を消滅することができる特性を利用して、手術中に癌細胞を完全に取り切ることが難しいため、再発が患者の命を奪うことが多い膵臓癌や悪性中皮腫、卵巣癌の腹膜転移などの目には見えない細胞レベルの残存癌細胞に対して、現在より侵襲の少ない縮小手術を行って残存腫瘍細胞を手術終了前に、近赤外光線免疫療法で完全に癌細胞を消滅させて治療を終わる新たな治療法も計画されている。この状況を模した近赤外光線免疫療法と外科手術を組み合わせた治療は動物実験においては非常に良好な結果を得ている。また、血液中を流れている癌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用いて、手術前後の血中癌細胞の除去による転移抑制や血液癌の治療に応用することも可能である。また、癌幹細胞様細胞を標的することで癌の再発を抑制する研究も行われ、良好な結果を得ている。癌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バクテリアなどの除去にも応用できる。

9. 近赤外光線免疫療法のナノ薬剤運搬の増強

近赤外光線免疫療法の副産物として、非常に面白い現象に近赤外光線免疫療法後の腫瘍組織へのナノ薬剤運搬の増強がある。通常の腫瘍にもEPR効果(Enhanced permeability and retention effect)として、ナノ薬剤は他の正常臓器より多く運搬される。しかし、近赤外光線免疫療法直後にナノ薬剤を投与すると、投与1時間後には通常のEPR効果を示す治療していない腫瘍に比して25倍の濃度のナノ薬剤が腫瘍組織に分布し、数日以上にわたって貯留し続ける(図5)¹⁶⁾。この現象は、EPR効果同様に10nmから200nmの大きさを持つ薬剤において見られる。リポソームやアルブミンを基質とした抗癌剤封入ナノ薬剤を用いた場合においても同様に、近赤外光線免疫療法後の腫瘍には15倍程度の高濃度の薬剤集積が認められ、この薬剤濃度に応じた高い治療効果が認められた¹⁷⁾。私たちは、この近赤外光線免疫療法後の非常に強いナノ薬剤の運搬増強をPIT-induced super-enhanced permeability and retention effect(SUPR効果)と呼んでいる。

SUPR効果が起こる理由はいたって合理的である(図6)。腫瘍細胞は腫瘍血管の近傍では、酸素や栄養を十分に受けることができるため非常に活発に分裂して増殖する。近赤外光線免疫療法に用いられる

図5 SUPR効果の実際。近赤外光線免疫療法直後に静脈注射された50nmの直径を持つ量子ドット800(右図)は、投与一時間後には治療していない腫瘍(白色円)に対して治療された腫瘍(黄色円)内に24倍の濃度で集積している。

図6 SUPR効果の起こる仕組み

抗体-IR700結合体は、静脈注射で全身に投与されるため腫瘍血管を介して腫瘍内に運搬される。したがって、抗体-IR700結合体は腫瘍血管近傍の腫瘍細胞に最も高濃度で結合することができる。近赤外光を照射するとこの部位の腫瘍細胞から壊されていくことになる。近赤外光線免疫療法は特異性が高いため、腫瘍血管は障害を受けることなく、逆に周囲の密集した癌細胞が消失するため、血流を保ちながら拡張し、さらに透過性を増す。このため、近赤外光線免疫療法直後に投与されたナノ薬剤は、10倍以上の濃度で広範囲かつ均等に腫瘍内に運搬されるわけである。一旦、腫瘍間質内に運搬されたナノ薬剤は、8～12時間後に起こる血管周囲組織の修復によって血管内に戻ることを阻害されて、長期にわたって腫瘍組織内に留まることになり、数日のうちに徐々に腫瘍床から周囲の組織へと拡散していく。SUPR効果は、腫瘍の構造と生理、近赤外光線免疫療法の抗体の動態によって引き起こされているので、異なる標的分子を介した近赤外光線免疫療法を行っても、ほとんどの腫瘍で同様に認められる。脾

癌など薬物運搬の難しい癌などを治療する場合に、近赤外光線免疫療法と低濃度のナノ薬剤投与の併用を用いた治療が有効であろうと考えており、前臨床実験を進めており臨床応用を計画している。

10. おわりに

この稿においては、私たちのグループで行ってきた次世代のイメージング方法論、さらに造影薬剤作成と利用の理論と方向性を解説した。加えて、次世代イメージング技術の新たな進化形である、超特異的癌治療「近赤外光線癌治療」の開発コンセプトと応用を解説した。より特異的な癌イメージングは、より正確な治療を可能にし、さらに超特異的癌治療は、癌に対しては強力でありながら、患者の体に対してはやさしい治療になりうるはずである。癌治療とイメージング科学を追求する医学研究者として、さらなる「病気に対してより効果があり、患者の体に優しい」方法の開発が、私の研究における究極の目標である。

文献

- 1) Louie AY, Huber MM, Ahrens ET, Rothbacher U, Moats R, Jacobs RE, et al. In vivo visualization of gene expression using magnetic resonance imaging. *Nat Biotechnol.* 2000; 18: 321-5.
- 2) Kobayashi H, Choyke PL. Target-cancer-cell-specific activatable fluorescence imaging probes: rational design and in vivo applications. *Acc Chem Res.* 2011; 44: 83-90.
- 3) Kobayashi H, Ogawa M, Alford R, Choyke PL, Urano Y. New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging. *Chem Rev.* 2010; 110: 2620-40.
- 4) Kobayashi H, Longmire MR, Ogawa M, Choyke PL. Rational chemical design of the next generation of molecular imaging probes based on physics and biology: mixing modalities, colors and signals. *Chem Soc Rev.* 2011; 40: 4626-48.
- 5) Kobayashi H, Longmire MR, Ogawa M, Choyke PL, Kawamoto S. Multiplexed imaging in cancer diagnosis: applications and future advances. *Lancet Oncol.* 2010; 11: 589-95.
- 6) Ogawa M, Regino CA, Seidel J, Green MV, Xi W, Williams M, et al. Dual-modality molecular imaging using antibodies labeled with activatable fluorescence and a radionuclide for specific and quantitative targeted cancer detection. *Bioconjug Chem.* 2009; 20: 2177-84.
- 7) Kosaka N, Bernardo M, Mitsunaga M, Choyke PL, Kobayashi H. MR and Optical imaging of early micrometastases in lymph nodes: Triple labeling with nano-sized agents yielding distinct signals. *Contrast Media Mol Imaging.* 2012 7: in press.
- 8) Urano Y, Asanuma D, Hama Y, Koyama Y, Barrett T, Kamiya M, et al. Selective molecular imaging of viable cancer cells with pH-activatable fluorescence probes. *Nat Med.* 2009; 15: 104-9.
- 9) Urano Y, Sakabe M, Kosaka N, Ogawa M, Mitsunaga M, Asanuma D, et al. Rapid cancer detection by topically spraying a gamma-glutamyltranspeptidase-activated fluorescent probe. *Sci Transl Med.* 2011; 3: 110ra9.
- 10) Mitsunaga M, Kosaka N, Choyke PL, Young MR, Dextras CR, Saud SM, et al. Fluorescence endoscopic detection of murine colitis-associated colon cancer by topically applied enzymatically rapid-activatable probe. *Gut.* 2013; 62: 1179-86.
- 11) Mitsunaga M, Ogawa M, Kosaka N, Rosenblum LT, Choyke PL, Kobayashi H. Cancer cell-selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules. *Nat Med.* 2011; 17: 1685-91.
- 12) Rosenblum LT, Choyke PL, Kobayashi H. Molecular antibody-based imaging of cancer: Quantitative and specific detection of cancer with radioimmunotargeting and activatable optical antibody-based imaging. *Therap Deliv.* 2011; 2: 345-58.
- 13) Mitsunaga M, Nakajima T, Sano K, Kramer-Marek G, Choyke PL, Kobayashi H. Immediate in vivo target-specific cancer cell death after near infrared photoimmunotherapy. *BMC Cancer.* 2012; 12: 345.
- 14) Sano K, Mitsunaga M, Nakajima T, Choyke PL, Kobayashi H. Acute Cytotoxic Effects of Photoimmunotherapy Assessed by 18F-FDG PET. *J Nucl Med.* 2013; 54: 770-5.
- 15) Mitsunaga M, Nakajima T, Sano K, Choyke PL, Kobayashi H. Near-infrared theranostic photoimmunotherapy (PIT): repeated exposure of light enhances the effect of immunoconjugate. *Bioconjug Chem.* 2012; 23: 604-9.
- 16) Sano K, Nakajima T, Choyke PL, Kobayashi H. Markedly enhanced permeability and retention effects induced by photo-immunotherapy of tumors. *ACS Nano.* 2013; 7: 717-24.
- 17) Sano K, Nakajima T, Choyke PL, Kobayashi H. The effect of photoimmunotherapy followed by liposomal daunorubicin in a mixed tumor model: a demonstration of the super-enhanced permeability and retention effect after photoimmunotherapy. *Mol Cancer Ther.* 2014; 13: 426-32.