

パーティクルを使用した放射線による免疫療法剤標的化と、放射線 Abscopal effect による癌転移治療の開発

Delivery system of immunotherapeutic agent directed by two radiation sessions, and
treatment of metastasis through abscopal effect

原田 聡¹⁾

Satoshi HARADA

¹⁾ 岩手医科大学医学部

放射線医学講座

佐藤 隆博²⁾

Takahiro SATO

²⁾ 量研先進ビーム利用施設部

ビーム技術開発課

（概要）

マウス左下腿に、MM48 腫瘍を移植後、第 1 回目の放射線を腫瘍に加え、腫瘍血管内皮に P-selectin 抗原を誘導する。P-selectin 抗原が最大に達した時点で、P-selectin 抗体で標識した上記放射線感受性パーティクルを、経静脈的に注入する。9 時間後に第 2 回目の放射線を照射する。第 2 回目の放射線照射し、抗原補足剤を放出させる。その後、経時的に、マウスを屠殺、肝臓、脾臓、肺、腎臓、肺、腫瘍を剖出、大気 micro PIXE camera のターゲットに加工する。次に、パーティクルに含まれる Fe、抗癌剤や免疫療法剤に含まれる Pt を micro PIXE camera を用いて画像化する。画像より、放射線による腫瘍内のパーティクルの腫瘍、肝臓、脾臓、肺、腎臓に捕捉されたパーティクルのカウント数からパーティクルの体内動態を、パーティクルの携帯変化から、腫瘍高原補足材の放出を計測する。

キーワード：

Drug Delivery System (DDS).

Radiation.

Micro Probe Imaging.

Particle Induced X-ray Emission (PIXE).

1. 目的

標的化された PD-L1 阻害薬による原発癌の癌治療と、それに伴う Abscopal effect を利用した肺転移の治療を、放射線により内容を放出するパーティクルと、2 回の放射線照射によって実現する。

2. 実施方法

<I Particle 作成>

- ① 第 1 回目の放射線照射用 Particle 作成：poly-lactic-co-glycolic-acid (PLGA) の Nanoprecipitation 法により、Antigen-Capturing Nanoparticle (AC-NP) を作成した。同 Particle を、P-selectin 抗原と共に、ヒアルロン酸-アルギン酸溶液に混和後、VLR1/2 抗体を含む Ca, Fe 溶液中で重合させ、第 1 回目の放射線照射に使用する Particle を作成する。
- ② 第 2 回目の放射線照射用 Particle 作成：免疫療法剤 PD-L1 阻害薬をヒアルロン酸-アルギン酸溶液に混和後、P-selectin 抗体を含む Ca, Fe 溶液中で重合させ、第 2 回目の放射線照射に使用する Particle を作成する。

<II 実験治療>

- ① I Particle 作成の項 ①で作成した Particle を MM46 (乳がん) 担癌マウス (原発巣左下腿、肺転移ありの C3He/N マウス、6 週齢オス) に尾静脈より静脈注射し、VEGFR1/2 の抗原抗体反応で、左下腿の原発巣と肺転移巣に集積させる。集積は、高崎量子応用研究所 micro PIXE camera によって定量化する。
- ② 集積した Particle に第 1 回目の放射線を照射 (100KeV X-ray 10 or 20 Gy) を施行、放射線により破壊された腫瘍細胞からは腫瘍蛋白、腫瘍抗原が放出され、それらは Particle により放出された AC-NP に捕捉された。AC-NP は捕捉された腫瘍蛋白や腫瘍抗原を、樹脂状細胞 (Dendritic cell, DC) に伝え、DC は CD8⁺-T-cell (キラー T 細胞) を感作、活性化する。他方、Particle からは、P-selectin 抗原を放出させ、腫瘍血管内皮、転移巣血管内皮に沈着させる。Particle からの AC-NP 放出は、高崎量子応用研究所 micro PIXE camera によって観察、放出率を算出する。
- ③ II Particle 作成の項 ②で作成した Particle を尾静脈より静脈注入し、P-selectin 抗原抗体反応により、左下腿原発巣と肺転移巣に集積させる。集積の程度は micro PIXE camera により算出し、集積度が最大となる時点を求める。
- ④ Particle 集積が最大となった時点で、第 2 回目の放射線照射 (100KeV X-ray 10 or 20 Gy) を施行する。Particle からは免疫療法剤 PD-L1 阻害薬が放出される。同薬剤は、II 実験治療②で感作、活性化された CD8⁺T-cell と共に、左下腿原発腫瘍、肺転移を攻撃させる。抗腫瘍効果は Growth delay 法で、抗転移作用は肺結節数減少により評価する。

3. 結果及び考察、今後の展開等

第一回目の放射線照射 : I Particle 作成の項 ①で作成した Particle は、尾静脈静注後、VEGFR-1/2 の抗原抗体反応により、左下腿原発巣、および肺転移巣に集積した。最大集積度は尾静脈静注後 72 時間後に認められた。同時点で、第 1 回目の放射線照射を加えると、AC-NP が放出され、AC-NP は、放射線による腫瘍細胞破壊で放出された腫瘍蛋白、腫瘍抗原を捕捉、DC-に受け渡し、CD8⁺T-cell を感作、活性化した。他、パーティクルは P-selectin 抗原を放出し、P-selectin 抗原を、左下腿原発巣と肺転移の血管内皮に沈着した。

第 2 回目の放射線照射 : P-selectin で標識した Particle (含 PD-L1 阻害剤) を、P-selectin 抗原が最大となった、第 1 回目の放射線照射 9 時含後に尾静脈より注射した。P-selectin の抗原抗体反応による Particle 集積は、注射 9 時間後に最大となり、その時点で第 2 回目の放射線照射を施行した。Particle は PD-L1 阻害剤を放出し、放出された PD-L1 阻害剤は、第 1 回目の放射線照射で感作、活性化された CD8⁺T-cell と相乗的に左下腿の原発腫瘍と転移巣を攻撃した。結果、左下腿の原発腫瘍に対しては EF (Enhancement Factor) 1.6 の抗腫瘍効果を、肺転移に関しては、転移巣の数が 62% まで減少した。

今後は未解析の CD4⁺T-cell (ヘルパー T 細胞)、腫瘍抗原 FasL と、抗腫瘍効果増強、および癌転移形成抑制との関連性に関して、解析を進めていくつもりである。

4. 引用(参照)文献等

1. S Harada, S Ehara, K Ishii, H Yamazaki, S Matsuyama, T Sato, et al. Targeted delivery of chemotherapeutic agents using improved radiosensitive liquid core microcapsules and assessment of their antitumor effect. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 75:455-62.
2. S Harada, S Ehara, K Ishii, A Tanaka, T Sato, S Matsuyama, et al. Improved radiosensitive microcapsules using H2O2. *Int J PIXE* 2010; 20:29-36.
3. S Harada, S Ehara, K Ishii, A Tanaka, T Sato, S Matsuyama, et al. Increasing antitumor effects of chemoradiotherapy by drug efflux inhibition with encapsulated Anti-RLIP-76. *Int J. PIXE* 2011; 21:39-46.
4. S Harada, S Ehara, K Ishii, H Yamazaki, S Matsuyama, T Sato, et al. Decreasing size of radiosensitive capsules from micro to nano, and its increased antitumor effect and decreasing adverse effect. *Int J PIXE* 2012; 22:57-64.
5. V. Torchilin. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Adv Drug Deliv Rev* 2011; 63:131-5.
- 22
6. S Harada, S Ehara, K Ishii, T Sato, M Koka, et. al. Targeted concurrent chemoradiotherapy, by using improved, microcapsules that release carboplatin in response to radiation, improves detectability by computed tomography as well as antitumor activity while reducing adverse effect in vivo. *Biomed. Pharmacother.* 2015; 70: 196-205.
7. T. Segawa, S. Harada, T. Sato, S Ehara. Delivery and Effectiveness of Carboplatin via Targeted Delivery Compared to Passive Accumulation of Intravenously Injected Particles Releasing Carboplatin upon Irradiation. *Radiat. Res.* 2020; 193: 263-273. 2020.
8. Denis E Hallahan and Subbulakshimi Virudachalam. Accumulation of P-selectin in the lumen of irradiated blood vessels. *Radiat. Res.* 1999; 152: 6-13.
9. G. Hariri, Y. Zhang, A. Fu, et. al. Radiation-Guided P-Selectin Antibody Targeted to Lung Cancer. *Ann Biomed Eng.* 2008; 36(5): 821-830.
10. Hong J, Zhang Z, Lv W, Zhang M, Chen C, Yang S, et al. Icaritin synergistically enhances the radiosensitivity of 4T1 breast cancer cells. *Plos One* 2013; 8:1-9.
11. de Souza CM, Araujo e Silva AC, de Jesus Ferraciolli C, Moreira GV, Campos LC, dos Reis DC, et al. Combination therapy with carboplatin and thalidomide suppresses tumor growth and metastasis in 4T1 murine breast cancer model. *Biomed Pharmacother* 2014; 68:51-7.
12. Donnelly ET, Kelley M, Rockwell S. Effects of RSR13 and oxygen on the cytotoxicity of cisplatin and carboplatin to EMT6 mouse mammary tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer. Chemother Pharmacol* 2004; 53:43-50.
13. Moulder JE, Rockwell S. Hypoxic fractions of solid tumors: experimental techniques, methods
23
of analysis, and a survey of existing data. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1984; 10:695-712.
- 14 Harada S, Ehara S, Ishii K, Tanaka A, Sato T, Matsuyama S, et al. Improved radiosensitive microcapsules using H2O2. *Int. J. PIXE* 2010; 20:29-36.
15. Harada S, Ehara S, Ishii K, Tanaka A, Sato T, Matsuyama S, et al. Increasing antitumor effects of chemoradiotherapy by drug efflux inhibition with encapsulated Anti-RLIP-76. *Int. J. PIXE* 2011; 21:39-46.