

光線力学療法（PDT）は治療標的外腫瘍の増殖  
を抑制できるか：従来型 PDT とメトロノミック

PDT との相違

すぎはら たかお  
杉原 崇生

(外科系プライマリー・ケアー学)

防衛医科大学校

令和 5 年度

## 目次

第 1 章 緒言	1 頁
第 2 章 対象と方法	3 頁
第 3 章 結果	
(1) 至適 PDT 条件設定のための予備実験	8 頁
(2) PDT が標的病変および標的外病変に与える影響	9 頁
(3) 抗 PD-L1 抗体薬併用 PDT が標的病変および標的外病変に与える影響	10 頁
(4) 標的外病変における腫瘍浸潤免疫細胞の検討	10 頁
第 4 章 考察	12 頁
第 5 章 結論	18 頁
謝辞	19 頁
略語一覧	20 頁
引用文献	21 頁
図表	27 頁

## 第1章 緒言

これまでがん治療は手術療法、化学療法、放射線療法が主体であった。近年、免疫チェックポイント阻害薬（ICI）が臨床応用されるようになり、多くの悪性腫瘍に対して生存期間の延長が示され、がん治療に対する腫瘍免疫への注目が高まっている(1-3)。切除不能食道癌においては、これまで一次治療として行われてきた化学療法に Nivolumab や Pembrolizumab を追加することで、全生存期間の有意な延長が示された(4, 5)。この機序として化学療法などの殺細胞性薬剤により腫瘍特異抗原が放出されることに加え、ICI が腫瘍細胞や樹状細胞により不活化された T 細胞の再活性化を促進することで腫瘍免疫が賦活化され、腫瘍細胞の免疫逃避を阻害することが考えられている(6, 7)。したがって、ICI による効率的ながん治療には、適切な腫瘍特異抗原の放出が重要な鍵を握る可能性がある。

1953 年に Mole らは、マウスの悪性腫瘍病変を放射線治療した際に、放射線照射部位のみならず非照射部位においても腫瘍の縮小が得られたことを報告した(8)。同様の事象は乳癌、悪性黒色腫、肝細胞癌、白血病など様々な悪性腫瘍においても報告され、“Abscopal 効果”として知られるようになった(9-12)。しかし、臨床的にはその発現頻度の低さや効果の弱さから、Abscopal 効果はこれまであまり注目されてこなかった(13)。Abscopal 効果を引き起こすメカニズムとしては、放射線治療による免疫原性細胞死により腫瘍抗原に特異的な免疫応答が獲得されることが考えられている。局所治療により放出された腫瘍抗原によって樹状細胞などの抗原提示細胞が活性化され、T 細胞の分化・誘導を促進することで全身性に抗腫瘍免疫が増強されるため、局所治療を行っていない遠隔転移巣に対しても腫瘍縮小効果を発揮すると考えられている(14)。したがって腫瘍免疫を賦活化する ICI は、理論的には Abscopal 効果を増強させる可能性があるものの、ICI の Abscopal 効果に与える影響に関しては未だ不明な点が多い(15, 16)。

光線力学療法（Photodynamic therapy : PDT）は、腫瘍親和性のある光増感剤を投与した後に、腫瘍組織に特定波長の光を照射することにより光化学反応を惹起させ、細胞障害により腫瘍組織の死滅を引き起こす治療法である。PDT は放射線治療と同様に局所治療ではあるものの、繰り返し治療することが可能であるといった利点がある(17-20)。PDT の抗腫瘍効果は光化学反応によって生成される一重項酸素による作用、もしくは温熱効果による作用が考えられている(21, 22)。PDT には、従来からある高強度光短時間照射型の PDT（conventional PDT、以下 cPDT）と 2000 年代から報告が始まった低強度光長時間照射型の PDT（metronomic PDT、以下 mPDT）の 2 種類の方法論が存在しており、いずれも抗腫瘍効果を発揮することが知られている。照射する全光エネルギー（J）は照射強度と照射時間の積になるので、両方法論において照射する全光エネルギーを同一にすることが可能である（図 1）(23)。mPDT では高強度光源を必要としないため、光源デバイスを小型化・菲薄化することが可能である。さらに無線給電によりワイヤレス化された小型光源を体内に埋め込むことができるため、拘束を伴わない PDT 治療や、体内の深部臓器の腫瘍に対する PDT 治療が可能となる(24)。我々はこの方法論を用いることで、mPDT により遠隔転移巣に対する Abscopal 効果が発揮されれば、低侵襲で画期的な全身性のがん治療法を確立できると仮説を立てた（図 2）。

これまでに cPDT を用いた Abscopal 効果の報告は基礎研究及び臨床報告などが見られるが(25-27)、mPDT による Abscopal 効果に関する報告はない。そこで本研究では、mPDT、cPDT という二つの異なる照射方法での腫瘍縮小効果の検証に加え、両者での Abscopal 効果の検討を行うとともに、ICI を併用することによるこれらの治療効果への影響について検討することを目的とした。

## 第2章 対象と方法

### (1) 倫理的事項

全ての動物実験は、日本学術会議によって作成された「動物実験の適切な実施のためのガイドライン」に従って行われ、実験プロトコールは全て防衛医科大学校動物実験規則に則り、動物実験倫理委員会による承認を受けた。(承認番号19009)

人道的エンドポイントは防衛医科大学校動物実験倫理委員会の定めた、腫瘍サイズが体重の10%を超えた時、腫瘍の長径が20 mmを超えた時、腫瘍に潰瘍、壊死、感染が生じた時、腫瘍が摂食や歩行の妨げになった時とした。

### (2) がん腫瘍モデル動物の作製

#### ① がん細胞株と培養方法

がん細胞株は予備実験でICIに対する感受性を有することを確認できたマウス結腸癌由来細胞株 Colon-26 を選定し、理化学研究所バイオリソース研究センター(筑波、茨城)から購入した。がん細胞株は、10%熱不活化ウシ胎児血清(Global Life Sciences Technologies Japan K.K.、東京)を加えた RPMI 培地(Thermo Fisher Scientific K.K.、東京)中で、37°C、5% CO<sub>2</sub>、湿度 95%の環境下で培養した。

#### ② 動物と飼育方法

4~6 週齢の雌 BALB/c マウス(日本 SLC、浜松)を購入後、特定の病原体を含まない環境下で給餌し、7~13 週齢まで飼育した後に実験に使用した。

#### ③ 腫瘍移植のためのがん細胞の調整

細胞培養液中の細胞密度が 80~90% の confluence になるように培養し、トリプシン (Thermo Fisher Scientific K.K.) を用いて収集、血球測定器を用いて細胞数を計測した。Hanks' Balanced Salt Solution (Thermo Fisher Scientific K.K.) を用いて  $5.0\sim 10.0\times 10^6$  細胞/mL となるように調整し、腫瘍細胞のマウスへの移植に用いた。

#### ④ 担がんモデル動物の作製

担がんモデル動物を作成するために、マウスにミダゾラム (0.3 mg/kg)、メドトミジン (4 mg/kg)、ブトルファノール (5 mg/kg) 混合物の腹腔内投与により全身麻酔を行った。マウスの背部を剃毛した後、Colon-26 細胞をリン酸緩衝生理食塩水で懸濁し、 $5.0\times 10^5$  細胞/50  $\mu$ L をマウスの背部左側 (標的病変) に、 $1.0\times 10^5$  細胞/20  $\mu$ L をマウスの背部右側 (標的外病変) の皮下に注射した (図 3)。

### (3) PDT の方法

#### ① cPDT の方法

cPDT は全身麻酔下に行った。cPDT によるレーザー照射には CNI 社 (Changchun New Industries Optoelectronics Tech. Co., Changchun, China) のレーザー照射装置 (BA-MRL-III-650-200mW) を用いた。光の中心波長は、フォトニックマルチチャンネル分光分析システム (PMA-11、浜松ホトニクス株式会社、浜松) を用いて測定し  $\lambda = 652$  nm であることを確認した。レーザーは腫瘍から 3 cm の高さから照射し、直径 1 cm の範囲を治療可能となるよう設定した。光増感剤として meta-Tetra (hydroxyphenyl) chlorin (mTHPC) (Merck, Darmstadt, Germany) 0.3 mg/kg を経静脈的に投与し、24 時間後に標的病変に対して  $15\sim 30$  mW/cm<sup>2</sup> の出力で、 $4\sim 8$  J/cm<sup>2</sup> のエネルギー量となるように cPDT を行った (図

4A)。

ICI を使用する実験では、抗 PD-L1 抗体薬である Atezolizumab (Selleck Chemicals LLC, Houston, USA) 2.5 mg/kg を実験プロトコールに準じて 3 回、腹腔内投与した (図 5A)。

Control として全身麻酔後に cPDT と同様にマウスを固定し、光照射を行わないものとした。

## ② mPDT の方法

無線給電の電源システムには B&PLUS 社 (埼玉、日本) のワイヤレス給電台 (RD-RVE-BI01) を使用した。電源系には電磁誘導方式を用い、共振周波数は 1.07 MHz、アンテナボードのサイズは 280 mm (幅) × 200 mm (奥行) × 10 mm (高さ) でマウスのケージを十分にカバーでき、またアンテナボード上面から 0~40 mm の伝送距離で電源を供給することが可能である (図 4B)。無線給電式埋込型 LED デバイスとして、B&PLUS 社の LED チップ (埼玉、日本、 $\lambda = 650$  nm、サイズ : 8.0 × 11.0 × 1.0 mm、重量 : 58 mg) を、ウレタンポリマーをベースとした UV 硬化型樹脂 (Beauty World Co., Ltd.、大阪) で封止して使用した。LED 素子から発せられる光の中心波長は、フォトリックマルチチャンネル分光分析システム (PMA-11、浜松ホトニクス株式会社) を用いて確認した。LED 素子の出力は、フォトダイオードセンサ (PD-300-SH、Ophir 社、埼玉) を搭載したパワーメータを用いて測定した。

LED デバイスは、腫瘍移植後 3~7 日目に背部正中に皮膚切開を行い、左背側の皮下に存在する腫瘍と体幹部筋肉との間の層を剥離しスペースを作成し、LED が腫瘍の直下に来るように位置調整を行い留置した。

光増感剤として mTHPC 0.3 mg/kg を経静脈的に投与し、原則 24 時間後にアン

テナボードの電源を on にし、標的病変に対する mPDT を 48 時間行った。実験プロトコールに準じて、これを 3 セット行った (図 5B)。本 LED デバイスでは出力に応じて、光源の一点を中心として概ね 6~8 mm の範囲を治療可能であった。

ICI を使用する実験では cPDT 同様、抗 PD-L1 抗体薬 Atezolizumab (Selleck Chemicals LLC) 2.5 mg/kg を実験プロトコールに準じて 3 回、腹腔内投与を行った。

Control として mPDT 用の LED チップと同様の大きさのダミーチップを挿入し、給電などの条件は同様とした。

#### (4) 腫瘍増殖の評価と免疫学的検討

##### ① 腫瘍体積の算出

腫瘍サイズは電子ノギスを用いて経時的に、相互に直交する 3 つの寸法を測定した。腫瘍の体積は、以下の式に従って決定した。

$$\text{Tumor Volume} = (\text{Diameter 1} \times \text{Diameter 2} \times \text{Diameter 3}) \times \pi / 6$$

##### ② Flowcytometry (FCM)

実験に用いたマウスを腫瘍移植後 21 日目に犠死させ、標的外病変を採取した。採取した腫瘍は細断し、collagenase、DNase を用いて細胞毎に解離させたのち、70  $\mu$ m のセルストレーナーで機械的な破碎を加え、単細胞の懸濁液にした。T 細胞の細胞外標識には PE-抗 CD3 抗体 (REAffinity, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)、PE-Vio<sup>®</sup>770-抗 CD4 抗体 (REAffinity, Miltenyi Biotec)、APC-Vio-抗 CD8a 抗体 (REAffinity, Miltenyi Biotec)、制御性 T 細胞 (Treg) の細胞内標識には Vio<sup>®</sup>R667-抗 FoxP3 抗体 (REAffinity, Miltenyi Biotec)、死細胞の染色には Zombie Aqua Fixable Viability kit (BioLegend, San Diego, USA) を用いた。



FCM のデータは FACS Canto II (BD Biosciences, New Jersey, USA) を用いて収集し、FlowJo ソフトウェア (Tree Star, Oregon, USA) を用いて解析した。

#### (5) 統計学的検証

各統計の解析は JMP® pro 14.0 (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA) を用いて行い、2 群間の比較は Wilcoxon 順位和検定を用いて解析した。また 4 群間の比較はノンパラメトリックな多重比較である Steel-Dwass 検定を用いて解析した。いずれも  $p < 0.05$  を有意とし、各グラフは平均値 ± 標準誤差で表記した。

### 第3章 結果

#### (1) 至適 PDT 条件設定のための予備実験

##### ① cPDT

至適な cPDT 条件を設定するための予備実験として、cPDT 前日に mTHPC 0.3 mg/kg を経静脈投与し、移植後 8 日目に fluence rate は 30 mW/cm<sup>2</sup>、light dose は 10 J/cm<sup>2</sup> の条件下で照射を行った（各群 N=4）（図 6 A）。その結果、cPDT 後 2 日目から標的病変の縮小を認めたものの、この条件で cPDT を施行したマウスにおいて、治療後に著明な体重減少を認めた（図 6 B）。cPDT 後 7 日目に犠死させ解剖した結果、4 例中 3 例において、cPDT の影響と思われる炎症・変性が皮下腫瘍を超え腎臓や脾臓といった内臓にまで及んでいた（図 6 C）。この結果を受けて light dose を下げると、炎症が深達しにくくなるものの cPDT の局所効果が低下してしまうため、局所効果を保ちつつマウスへダメージを与えない light dose を予備実験において検索した。また fluence rate を下げると光の深達距離が短くなるため light dose を保ったままでも深部へ炎症が波及しにくくなる結果を得た。以上の予備実験の結果から cPDT の条件として、fluence rate は 30 mW/cm<sup>2</sup>、light dose を 4 J/cm<sup>2</sup>、もしくは fluence rate は 15 mW/cm<sup>2</sup>、light dose を 8 J/cm<sup>2</sup> と定め、これらの条件では cPDT 前後で体重の変化が起こらないこと、炎症が内臓まで及ばないことを確認した。

##### ② mPDT

至適な mPDT 条件を設定するための予備実験として、原則プロトコールに則り（図 5B）、アンテナボードの出力を 19 V、21 V、23 V、25 V に設定して治療標的病変の縮小効果を検討した。計算上、48 時間の mPDT を 3 セット行った際の総エネルギー量(J)は、19 V で 3.0 J、21 V で 4.6 J、23 V で 6.3 J、25 V で 8.1 J に相当

すると考えられた。

その結果、アンテナボードの出力を 19 V に設定した場合（各群 N=6）には、Control と比較すると腫瘍縮小効果を認めたものの、経時的に標的病変は増大した（図 7A）。一方、出力を 21 V（各群 N=6）、23 V（各群 N=2）、25 V（各群 N=8）に設定した場合には Control と比較して腫瘍縮小効果を認め、治療開始から 10 日目以降も標的病変の縮小を維持していた（図 7B～D）。また mPDT の影響と思われる体重減少などは認めなかった。以上の結果から、mPDT のアンテナボードの出力は 21 V 以上が望ましいと考え、前述の cPDT の条件と理論値として同等の全光エネルギーを照射すべく、アンテナボードの出力を主として 23 V として以下の実験を行った。

### ③ cPDT および mPDT における病理学的検討

cPDT（fluence rate: 30 mW/cm<sup>2</sup>、light dose: 4 J/cm<sup>2</sup>）施行 24 時間後、および mPDT（23V、48 時間照射）施行後に犠死させ、治療を行った標的病変をそれぞれ採取し、HE 染色および TUNEL 染色を行った（図 8 A、B）。HE 染色では cPDT、mPDT とともに核の濃縮、細胞の縮小、好酸性細胞質を示す PDT により変性した領域が見られた。TUNEL 染色ではこの変性した領域内に TUNEL 染色陽性細胞が多く認められた。この変性した領域内の任意の異なる 5 点で TUNEL 染色陽性細胞数を測定し、cPDT と mPDT の apoptotic index を算出し、Wilcoxon 順位和検定を用いて統計学的に検討した結果、mPDT の apoptotic index が有意に高い結果であった（cPDT 42.6 ± 2.7 vs mPDT 72.2 ± 2.7 ; p < 0.05）（図 8 C）。

### (2) PDT が標的病変および標的外病変に与える影響

cPDT（fluence rate: 30 mW/cm<sup>2</sup>、light dose: 4 J/cm<sup>2</sup>、Control 群 N=6、cPDT

群 N=5) では、標的病変において Control と比較して腫瘍の増殖を抑制することが可能であったが、標的外病変に対しては腫瘍の増殖抑制効果を認めなかった (図 9A)。cPDT の条件を fluence rate: 15 mW/cm<sup>2</sup>、light dose: 8 J/cm<sup>2</sup> (各群 N=4) としても同様の結果であった (図 9B)。mPDT (アンテナボード出力 23 V、各群 N=6) においても同様に、標的病変においては Control と比較して有意に腫瘍の増殖を抑制することが可能であったが、標的外病変に対しては腫瘍の増殖抑制効果を認めなかった (図 10A)。アンテナボード出力を 21 V (各群 N=4) (図 10B)、19 V (各群 N=4) (図 10C) においても検討したが、同様の結果だった。

### (3) 抗 PD-L1 抗体薬併用 PDT が標的病変および標的外病変に与える影響

抗 PD-L1 抗体薬を併用することで cPDT 単独 (fluence rate: 30 mW/cm<sup>2</sup>、light dose: 4 J/cm<sup>2</sup>) と比較して標的病変をより効果的に治療することが可能であった (図 11B 左)。また標的外病変に関しては、Control と比較して抗 PD-L1 抗体薬の投与単独においても腫瘍の増殖抑制効果を認めたが、抗 PD-L1 抗体薬に cPDT を加えることでさらに腫瘍の縮小効果を認めた (図 11B 右) (Control 群 N=4、cPDT 群 N=4、抗 PD-L1 抗体薬群 N=8、cPDT+抗 PD-L1 抗体薬群 N=9)。

一方で、mPDT (アンテナボード出力: 23 V、各群 N=10) に関しては、標的病変では抗 PD-L1 抗体薬の併用の有無にかかわらず腫瘍を縮小させることが可能であったが、標的外病変においては抗 PD-L1 抗体薬単独と比較して mPDT を併用した場合においても腫瘍の増殖抑制効果を認めず、むしろ抗 PD-L1 抗体薬の効果が減弱する結果であった (図 12B 右)。アンテナボードの出力を 19 V (Control 群 N=4、mPDT 群 N=4、抗 PD-L1 抗体薬群 N=8、mPDT+抗 PD-L1 抗体薬群 N=9) 及び 21 V (Control 群 N=4、mPDT 群 N=4、抗 PD-L1 抗体薬群 N=3、mPDT+抗 PD-L1 抗体薬群 N=5) として同様の実験を行ったが、標的外病変に対

する抗 PD-L1 抗体併用 mPDT の腫瘍増殖抑制効果は認めなかった (図 13)。

#### (4) 標的外病変における腫瘍浸潤免疫細胞の検討

標的外病変に浸潤する免疫細胞について FCM を用いて検討した。cPDT 単独では標的外病変での CD3<sup>+</sup>細胞、CD8<sup>+</sup>細胞の増加を認めなかったが、抗 PD-L1 抗体薬投与及び抗 PD-L1 抗体薬併用 cPDT では CD3<sup>+</sup>細胞、CD8<sup>+</sup>細胞のいずれも増加した (図 14)。一方で抗 PD-L1 抗体薬併用 mPDT において、cPDT で認められた標的外病変での CD3<sup>+</sup>細胞、CD8<sup>+</sup>細胞の増加は明らかではなく、むしろ抗 PD-L1 抗体薬単独の場合よりも CD3<sup>+</sup>細胞、CD8<sup>+</sup>細胞は減少する傾向を認めた。また Treg に関しては cPDT と mPDT で各群同様の動きを示し、PDT と抗 PD-L1 抗体薬の併用により減少する傾向を認めた。統計解析には Steel-Dwass 検定を用いたが、各群間にはいずれも有意差を認めなかった。

## 第4章 考察

本研究では、まず予備実験として、効率的な腫瘍縮小効果と周囲正常組織に対する影響という観点から、cPDT、mPDT の至適条件に関する検討を行った。次に至適条件での PDT を行った結果、cPDT および mPDT のいずれにおいても標的病変に対して腫瘍縮小効果が得られた。標的外病変に対する検討では、cPDT、mPDT いずれにおいても PDT 単独では標的外病変の腫瘍増殖抑制効果は認められなかったが、cPDT では抗 PD-L1 抗体薬と併用した場合に標的外病変の腫瘍増殖抑制効果を認めた。一方で、mPDT では抗 PD-L1 抗体薬と併用した場合においても標的外病変の腫瘍増殖抑制効果は認められなかった。

FCM の結果では、抗 PD-L1 抗体薬併用 cPDT により腫瘍の縮小を認めた標的外病変では CD3<sup>+</sup>細胞および CD8<sup>+</sup>細胞の増加が認められたが、抗 PD-L1 抗体薬併用 mPDT を施行した標的外病変では腫瘍は増大し、CD3<sup>+</sup>細胞、CD8<sup>+</sup>細胞は抗 PD-L1 抗体薬単独の場合よりもむしろ減少する傾向を認めた。これらの結果から、腫瘍組織に浸潤する CD3<sup>+</sup>細胞および CD8<sup>+</sup>細胞の動態は、腫瘍増殖抑制効果をよく反映していると考えられた。

Yu らは、標的病変に対する microwave ablation を行った際の標的外病変における浸潤リンパ球を解析し、腫瘍縮小を認めた標的外病変には CD4<sup>+</sup>細胞、CD8<sup>+</sup>細胞が多く浸潤し、特に抗腫瘍効果を発揮する Interferon- $\gamma$  陽性細胞の浸潤が顕著であったと報告しており、本検討における抗 PD-L1 抗体薬併用 cPDT での標的外病変における腫瘍浸潤免疫細胞の結果と類似するものであった(28)。

標的病変に PDT を施行した際に、標的外病変に対する抗腫瘍効果を発揮させる、すなわち Abscopal 効果を効率的に誘導するためには、①適切な腫瘍特異抗原の放出、②宿主の腫瘍免疫の賦活化、が重要と考えられる(15, 29)。

今回の検討で Abscopal 効果が得られなかった要因として、まず①適切な腫瘍特

異抗原の放出に関して、両 PDT における標的病変に対する組織障害範囲の相違が考えられた。cPDT では直径 1 cm の照射野全体を面として同時にかつ概ね均等に治療できるが、本検討に用いた mPDT は点光源であり、光が到達する概ね直径 6～8 mm の範囲しか治療が行えず、また mPDT が治療効果を呈するまでの間にも腫瘍自体は増大してしまうことから、一定以上のサイズの病変を完全に消退させることは困難であった。そのため mPDT は cPDT より腫瘍が小さいうちから治療を開始できるよう治療開始時期を早めに設定しており、それに伴い両 PDT において腫瘍特異抗原の放出量に差があった可能性がある。

続いて②宿主の腫瘍免疫の賦活化、が適切に行われなかった可能性について以下 4 点が要因として考えられた。

1 点目は、本研究で用いたマウス結腸癌由来細胞株 Colon-26 の抗原性が弱かった可能性がある。Colon-26 を用いた Abscopal 効果の報告も認めるものの(30)、Colon-26 の抗原性がそれほど強くないとする報告もある(31, 32)。PDT による腫瘍特異抗原の放出量や抗腫瘍免疫の賦活化の程度にはがん細胞株により差がある可能性があり、別の細胞株でも同様の検討を行うべきであった。

2 点目として、cPDT と mPDT では標的外病変に対して異なる免疫反応が惹起された可能性がある。本研究での標的病変の病理学的検討では、cPDT と mPDT において両者とも腫瘍細胞の変性を認めたものの、mPDT の apoptotic index が有意に高値であった。mPDT では apoptosis 主体の細胞死を誘導していた可能性があり、PDT における細胞死の過程の違いが、腫瘍特異抗原の放出に影響を及ぼした可能性が考えられる(23)。2006 年にミラノで開催された European Molecular Biology Organization (EMBO) 会議において、組織損傷あるいは壊死組織の存在を生体に知らしめ、それ自体に組織障害性を有する mediator を“Alarmin”と呼称することが提唱された(33)。Alarmin は免疫担当細胞上の Toll-like receptor 等を介し

て自然免疫・獲得免疫を共に活性化させるとされている。細胞死の様式が apoptosis 主体で組織障害としては軽微と考えられる mPDT では Alamin 放出が減弱もしくは欠如したことで免疫系が十分に惹起されず、一方で cPDT における necrosis の割合の大きい組織損傷では Alamin が十分量放出され腫瘍免疫が惹起された可能性がある。この各 PDT における細胞死の過程の差異が Alarmin の放出に差異を生じ、標的外病変における腫瘍増殖抑制効果の差に影響した可能性が考えられた。

3 点目として、腫瘍の移植部位による免疫応答の差異が影響した可能性がある。本研究ではマウス背側に腫瘍を作成し検討を行った。cPDT 単独、mPDT 単独で治療を行った際には、標的病変の縮小を認めたものの、標的外病変ではいずれも腫瘍増殖抑制効果を認めなかった。Yu らは 7 週齢雌 BALB/c マウスの両鼠径部に大腸癌細胞株 (CT26) を移植し、microwave ablation を行ったところ、標的病変のみならず標的外病変も縮小することを報告した(28)。この研究に使用したマウス種、週齢は本研究と同様であるが、使用したがん細胞株や標的病変に対する治療方法に加え、移植した部位が鼠径部であることが本研究デザインとの相違であった。Fu らは同じ大腸癌細胞株 (CT26) であっても、移植する部位により腫瘍増大速度、抗 PD-L1 抗体薬の治療効果、腫瘍浸潤免疫細胞の多寡に相違があることを報告しており、腫瘍移植部位によっても宿主の抗腫瘍免疫の強度に相違があることが窺われた(34)。これらの報告からリンパ組織が豊富な鼠径部腫瘍では免疫応答が起こりやすく Abscopal 効果を誘導しやすい可能性があると考えられた。今回は皮下に埋設する LED デバイスの体動に伴う位置ズレの影響を最小限にするために後脚の影響を受けにくい背側に腫瘍を作成したが、PDT の標的外病変に対する治療効果の研究においては移植部位の違いにより免疫応答に差異が生じる可能性についても念頭に置く必要があると考えられた。



4点目としては、mPDT では持続的な光照射を行うことから、遊走してきた樹状細胞などの抗原提示細胞が光化学反応により障害され、リンパ球に対して有効な抗原提示が行えなかった可能性が考えられた。

抗 PD-L1 抗体薬の効果の主体は免疫細胞上の PD-1 と腫瘍細胞上に発現する PD-L1 の結合による T 細胞の不活化を防ぐことにある。抗 PD-L1 抗体薬単独での標的外病変への浸潤 CD3<sup>+</sup>細胞、CD8<sup>+</sup>細胞数上昇は、T 細胞の不活化防止に伴う抗腫瘍効果により腫瘍細胞の破壊が促進され、抗原放出の増加に伴い抗原提示細胞による抗原提示が効果的に行われ、T 細胞の遊走、腫瘍浸潤が増加したものと推測される。一方抗 PD-L1 抗体薬併用 mPDT においては標的外病変に浸潤する CD3<sup>+</sup>細胞、CD8<sup>+</sup>細胞の細胞数が減少しており、T 細胞の遊走・浸潤が十分に惹起されなかったことが窺われた。抗 PD-L1 抗体薬単独では惹起された反応が mPDT を行うことにより阻害された結果であり、癌免疫サイクルにおける T 細胞の遊走・浸潤の増加に先立つ、抗原提示細胞による抗原提示のプロセスが阻害された可能性が最も疑われた(35)。すなわち腫瘍組織内に残存する mTHPC と継続的な光照射による光化学反応により、遊走してくる抗原提示細胞が障害されてしまい、有効な抗原提示、T 細胞の活性化が行われなかった可能性が考えられた。

PDT に伴う標的外病変のサイズの推移を予備実験も含め詳細に観察すると、Control 群よりも cPDT 群、mPDT 群の標的外病変の方が若干大きくなる傾向があるように見受けられた。PDT では cPDT と mPDT で程度の差はあれ抗腫瘍免疫を向上させるものと当初考えていたが、PDT 単独では逆に標的外病変の増大に働く可能性も検討する必要がある結果であった。

抗腫瘍免疫を抑制する働きを持つ細胞として Treg が知られているが、本検討において腫瘍浸潤 CD3<sup>+</sup>細胞中の Treg の割合は cPDT と mPDT で各群同様の動きを示した。標的外病変が増大した抗 PD-L1 抗体薬併用 mPDT 群では Treg の浸潤

割合が高くなることが予想されたが、抗 PD-L1 抗体薬併用 cPDT 群と同様の結果であり、PDT と抗 PD-L1 抗体薬併用による腫瘍サイズの変化には Treg はあまり関与していないように見受けられた。他方で近年では抗腫瘍免疫を強力に抑制する細胞群として骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) 等が注目されており(36-38)、PDT に伴う組織障害から炎症反応が惹起され、MDSC 等が誘導されたことで抗腫瘍免疫が抑制された可能性について考慮すべきと考えられた。

その他、PDT による vascular shut down 効果により腫瘍組織が低酸素状態となると、その刺激により血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 等が放出されるとする報告がある(39, 40)。VEGF は血管新生を促進し間接的に腫瘍増大に寄与しうる。このように癌微小環境において、PDT 後に腫瘍増大に働くサイトカイン等が放出されていた可能性も否定できない。

今後こうした PDT に伴い放出されうるサイトカイン等や、MDSC 等の抗腫瘍免疫に対して抑制的に働く細胞群に関しても Abscopal 効果に影響を与える因子として検討する必要があると考えられた。

本検討にはいくつかの limitation が挙げられる。一つ目は、先述したように Colon-26 細胞株単独での検討である点である。細胞株毎の抗原性の違い等により本実験とは異なる結果となる可能性があり、別細胞株でも同様の検討を行う必要があると考えられた。

次に、本研究において ICI として抗 PD-L1 抗体薬だけの検討にとどまっているという点である。抗 PD-1 抗体薬や抗 CTLA-4 抗体薬での検討、もしくはこれらの併用による標的外病変への影響についても検討が必要と考えられた。

最後に、本検討で用いた LED が点光源であったという点である。本 LED デバイスの光照射方向は片側性であり腹腔内臓器側への影響を皆無にできる利点があったが、点光源であることから cPDT のように腫瘍全体を面として均等に同時に

治療することができなかった。現在、教室では照射面積の拡張など、LED 光源の改良を行っており、これが開発されれば面光源による腫瘍全体への均一な mPDT が可能となり、より正確な mPDT による標的外病変への影響を検証することが可能となる。

本研究において、我々の「mPDT による局所治療により、Abscopal 効果を利用した遠隔転移巣に対する治療が可能である」という仮説は実証されなかった。mPDT と抗 PD-L1 抗体薬との併用において標的外病変の増殖抑制効果を認めなかった要因を表 1 にまとめた。難治性である遠隔転移巣に対する Abscopal 効果を利用した治療概念は、有害事象の少ない画期的な治療戦略であると考えられる。しかし、Abscopal 効果により遠隔転移巣の縮小を認めたとの報告は散見されるものの、臨床的にはその効果の発現や機序に関しては未だ controversial である(41)。本検討では、PDT としてはほぼ同等の全光エネルギーであるものの、抗 PD-L1 抗体薬投与下において cPDT のみに標的外病変の腫瘍縮小効果を認め、mPDT ではその効果を認めなかった。何故今回の mPDT では Abscopal 効果を誘導できなかったのかを検証することは、今後 PDT を利用した Abscopal 効果によるがん治療の開発に役立つものと考えられた。

## 第5章 結論

1. cPDT、mPDT いずれも治療標的病変の腫瘍縮小効果が得られたが、いずれも標的外病変の腫瘍増殖抑制効果を認めなかった。
2. 抗 PD-L1 抗体薬を併用した場合には、cPDT では標的外病変の腫瘍増殖抑制効果を認めたが、mPDT では標的外病変の腫瘍増殖抑制効果は確認されなかった。
3. 抗 PD-L1 抗体薬併用 cPDT では、標的外病変での CD8<sup>+</sup>細胞の浸潤が mPDT と比較して高度であった。
4. 今後、mPDT による Abscopal 効果を利用した標的外病変に対する治療の開発には、PDT の方法論や腫瘍免疫学的見地からの検討が必要であると考えられた。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導、ご高閲を賜りました防衛医科大学校病院医療安全・感染対策部の辻本広紀教授、外科学講座の上野秀樹教授に深甚なる感謝の意を表します。

また終始直接ご指導を頂きました防衛医科大学校生理学講座の守本祐司教授に深謝いたしますとともに、研究にご協力いただきました青木清乃様、諸先生方に感謝申し上げます。

## 略語一覧（アルファベット順）

CD	cluster of differentiation
cPDT	conventional photodynamic therapy
FCM	flowcytometry
HE	hematoxylin and eosin
ICI	Immune checkpoint inhibitor
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenous
MDSC	myeloid-derived suppressor cells
mPDT	metronomic photodynamic therapy
mTHPC	meta-tetra (hydroxyphenyl) chlorin
PDT	photodynamic therapy
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Treg	regulatory T cell
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated digoxigenin-dUTP nick end labeling
VEGF	vascular endothelial growth factor

## 引用文献

1. Yin J, Lin S, Fang Y, Jiao H, Chen Z, Tang H, Gu J, Zhang S, Sun L, Li Y, Han Y, Chen Q, Chen H, Li Z, Tan L. Neoadjuvant therapy with immunoagent (nivolumab) or placebo plus chemotherapy followed by surgery and adjuvant treatment in subjects with resectable esophageal squamous cell carcinoma: study protocol of a randomized, multicenter, double blind, phase II trial (NATION-2203 trial). *J Thorac Dis.* 2023;15(2):718-30.
2. Kahraman S, Erbas UE, Yalcin B. Who should be treated with pembrolizumab in addition to standard of care in advanced cervical cancer? *Med Oncol.* 2022;39(3):33.
3. Janjigian YY, Shitara K, Moehler M, Garrido M, Salman P, Shen L, Wyrwicz L, Yamaguchi K, Skoczylas T, Campos Bragagnoli A, Liu T, Schenker M, Yanez P, Tehfe M, Kowalyszyn R, Karamouzis MV, Bruges R, Zander T, Pazo-Cid R, Hitre E, Feeney K, Cleary JM, Poulart V, Cullen D, Lei M, Xiao H, Kondo K, Li M, Ajani JA. First-line nivolumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for advanced gastric, gastro-oesophageal junction, and oesophageal adenocarcinoma (CheckMate 649): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2021;398(10294):27-40.
4. Doki Y, Ajani JA, Kato K, Xu J, Wyrwicz L, Motoyama S, Ogata T, Kawakami H, Hsu CH, Adenis A, El Hajbi F, Di Bartolomeo M, Braghiroli MI, Holtved E, Ostoich SA, Kim HR, Ueno M, Mansoor W, Yang WC, Liu T, Bridgewater J, Makino T, Xynos I, Liu X, Lei M, Kondo K, Patel A, Gricar J, Chau I, Kitagawa Y, CheckMate 648 Trial I. nivolumab combination therapy in advanced esophageal squamous-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2022;386(5):449-62.
5. Sun JM, Shen L, Shah MA, Enzinger P, Adenis A, Doi T, Kojima T, Metges

JP, Li Z, Kim SB, Cho BC, Mansoor W, Li SH, Sunpaweravong P, Maqueda MA, Goekkurt E, Hara H, Antunes L, Fountzilas C, Tsuji A, Oriden VC, Liu Q, Shah S, Bhagia P, Kato K, Keynote Investigators. Pembrolizumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for first-line treatment of advanced oesophageal cancer (KEYNOTE-590): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet*. 2021;398(10302):759-71.

6. Lesterhuis WJ, Punt CJ, Hato SV, Eleveld-Trancikova D, Jansen BJ, Nierkens S, Schreiber G, de Boer A, Van Herpen CM, Kaanders JH, van Krieken JH, Adema GJ, Figdor CG, de Vries IJ. Platinum-based drugs disrupt STAT6-mediated suppression of immune responses against cancer in humans and mice. *J Clin Invest*. 2011;121(8):3100-8.

7. Bracci L, Schiavoni G, Sistigu A, Belardelli F. Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer. *Cell Death Differ*. 2014;21(1):15-25.

8. Mole RH. Whole body irradiation; radiobiology or medicine? *Br J Radiol*. 1953;26(305):234-41.

9. Hu ZI, McArthur HL, Ho AY. The Abscopal effect of radiation therapy: What is it and how can we use it in Breast Cancer? *Curr Breast Cancer Rep*. 2017;9(1):45-51.

10. Postow MA, Callahan MK, Barker CA, Yamada Y, Yuan J, Kitano S, Mu Z, Rasalan T, Adamow M, Ritter E, Sedrak C, Jungbluth AA, Chua R, Yang AS, Roman RA, Rosner S, Benson B, Allison JP, Lesokhin AM, Gnjatic S, Wolchok JD. Immunologic correlates of the abscopal effect in a patient with melanoma. *N Engl J Med*. 2012;366(10):925-31.



11. Ohba K, Omagari K, Nakamura T, Ikuno N, Saeki S, Matsuo I, Kinoshita H, Masuda J, Hazama H, Sakamoto I, Kohno S. Abscopal regression of hepatocellular carcinoma after radiotherapy for bone metastasis. *Gut*. 1998;43(4):575-7.
12. Sham RL. The abscopal effect and chronic lymphocytic leukemia. *Am J Med*. 1995;98(3):307-8.
13. Tomaciello M, Conte M, Montinaro FR, Sabatini A, Cunicella G, Di Giammarco F, Tini P, Gravina GL, Cortesi E, Minniti G, De Vincentis G, Frantellizzi V, Marampon F. Abscopal effect on bone metastases from solid tumors: A systematic review and retrospective analysis of challenge within a challenge. *Biomedicines*. 2023;11(4).
14. Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Immunogenic cell death in radiation therapy. *Oncoimmunol*. 2013;2(10):e26536.
15. Kodet O, Nemejcova K, Strnadova K, Havlinova A, Dundr P, Krajsova I, Stork J, Smetana K, Jr., Lacina L. The abscopal effect in the era of checkpoint inhibitors. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13).
16. Nelson BE, Adashek JJ, Lin SH, Subbiah V. The abscopal effect in patients with cancer receiving immunotherapy. *Med*. 2023;4(4):233-44.
17. Tsujimoto H, Morimoto Y, Takahata R, Nomura S, Yoshida K, Horiguchi H, Hiraki S, Ono S, Miyazaki H, Saito D, Hara I, Ozeki E, Yamamoto J, Hase K. Photodynamic therapy using nanoparticle loaded with indocyanine green for experimental peritoneal dissemination of gastric cancer. *Cancer Sci*. 2014;105(12):1626-30.
18. Tsujimoto H, Morimoto Y, Takahata R, Nomura S, Yoshida K, Hiraki S, Horiguchi H, Miyazaki H, Ono S, Saito D, Hara I, Ozeki E, Yamamoto J, Hase K.

Theranostic photosensitive nanoparticles for lymph node metastasis of gastric cancer. *Ann Surg Oncol*. 2015;22 Suppl 3:S923-8.

19. Wang H, Ewetse MP, Ma C, Pu W, Xu B, He P, Wang Y, Zhu J, Chen H. The "Light Knife" for gastric cancer: Photodynamic therapy. *Pharmaceutics*. 2022;15(1).

20. Yano T, Wang KK. Photodynamic therapy for gastrointestinal cancer. *Photochem Photobiol*. 2020;96(3):517-23.

21. McCaughan JS, Jr. Photodynamic therapy of malignant tumors. *Prog Clin Biol Res*. 1988;278:163-9.

22. Nomura S, Morimoto Y, Tsujimoto H, Arake M, Harada M, Saitoh D, Hara I, Ozeki E, Satoh A, Takayama E, Hase K, Kishi Y, Ueno H. Highly reliable, targeted photothermal cancer therapy combined with thermal dosimetry using a near-infrared absorbent. *Sci Rep*. 2020;10(1):9765.

23. Singh G, Alqawi O, Espiritu M. Metronomic PDT and cell death pathways. *Methods Mol Biol*. 2010;635:65-78.

24. Kirino I, Fujita K, Sakanoue K, Sugita R, Yamagishi K, Takeoka S, Fujie T, Uemoto S, Morimoto Y. Metronomic photodynamic therapy using an implantable LED device and orally administered 5-aminolevulinic acid. *Sci Rep*. 2020;10(1):22017.

25. Thong PS, Ong KW, Goh NS, Kho KW, Manivasager V, Bhuvaneshwari R, Olivo M, Soo KC. Photodynamic-therapy-activated immune response against distant untreated tumours in recurrent angiosarcoma. *Lancet Oncol*. 2007;8(10):950-2.

26. Lou J, Aragaki M, Bernards N, Kinoshita T, Mo J, Motooka Y, Ishiwata T, Gregor A, Chee T, Chen Z, Chen J, Kaga K, Wakasa S, Zheng G, Yasufuku K. Repeated porphyrin lipoprotein-based photodynamic therapy controls distant

disease in mouse mesothelioma via the abscopal effect. *Nanophotonics*. 2021;10(12):3279-94.

27. Sasaki M, Tanaka M, Kojima Y, Nishie H, Shimura T, Kubota E, Kataoka H. Anti-tumor immunity enhancement by photodynamic therapy with talaporfin sodium and anti-programmed death 1 antibody. *Mol Ther Oncolytics*. 2023;28:118-31.

28. Yu L, Xie H, Wang L, Cheng M, Liu J, Xu J, Wei Z, Ye X, Xie Q, Liang J. Microwave ablation induces abscopal effect via enhanced systemic antitumor immunity in colorectal cancer. *Front Oncol*. 2023;13:1174713.

29. Nabrinsky E, Macklis J, Bitran J. A Review of the abscopal Effect in the Era of Immunotherapy. *Cureus*. 2022;14(9):e29620.

30. Shiraishi K, Ishiwata Y, Nakagawa K, Yokochi S, Taruki C, Akuta T, Ohtomo K, Matsushima K, Tamatani T, Kanegasaki S. Enhancement of antitumor radiation efficacy and consistent induction of the abscopal effect in mice by ECI301, an active variant of macrophage inflammatory protein-1alpha. *Clin Cancer Res*. 2008;14(4):1159-66.

31. Araki A, Hazama S, Yoshimura K, Yoshino S, Iizuka N, Oka M. Tumor secreting high levels of IL-15 induces specific immunity to low immunogenic colon adenocarcinoma via CD8+ T cells. *Int J Mol Med*. 2004;14(4):571-6.

32. Sneed RA, Stevenson AP, Stewart CC. Quantitation of the host cell infiltration kinetics of the nonimmunogenic colon 26 tumor by multiparameter flow cytometry. *J Leukoc Biol*. 1989;46(6):547-55.

33. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*. 2007;81(1):1-5.

34. Yamagishi K, Kirino I, Takahashi I, Amano H, Takeoka S, Morimoto Y, Fujie

- T. Tissue-adhesive wirelessly powered optoelectronic device for metronomic photodynamic cancer therapy. *Nat Biomed Eng.* 2019;3(1):27-36.
35. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity.* 2013;39(1):1-10.
36. Hinshaw DC, Shevde LA. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. *Cancer Res.* 2019;79(18):4557-66.
37. Wu Y, Yi M, Niu M, Mei Q, Wu K. Myeloid-derived suppressor cells: an emerging target for anticancer immunotherapy. *Mol Cancer.* 2022;21(1):184.
38. Yi M, Li T, Niu M, Mei Q, Zhao B, Chu Q, Dai Z, Wu K. Exploiting innate immunity for cancer immunotherapy. *Mol Cancer.* 2023;22(1):187.
39. Deiningner MH, Weinschenk T, Morgalla MH, Meyermann R, Schluesener HJ. Release of regulators of angiogenesis following Hypocrellin-A and -B photodynamic therapy of human brain tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;298(4):520-30.
40. Ferrario A, von Tiehl KF, Rucker N, Schwarz MA, Gill PS, Gomer CJ. Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma. *Cancer Res.* 2000;60(15):4066-9.
41. Kaminski JM, Shinohara E, Summers JB, Niermann KJ, Morimoto A, Brousal J. The controversial abscopal effect. *Cancer Treat Rev.* 2005;31(3):159-72.

図表

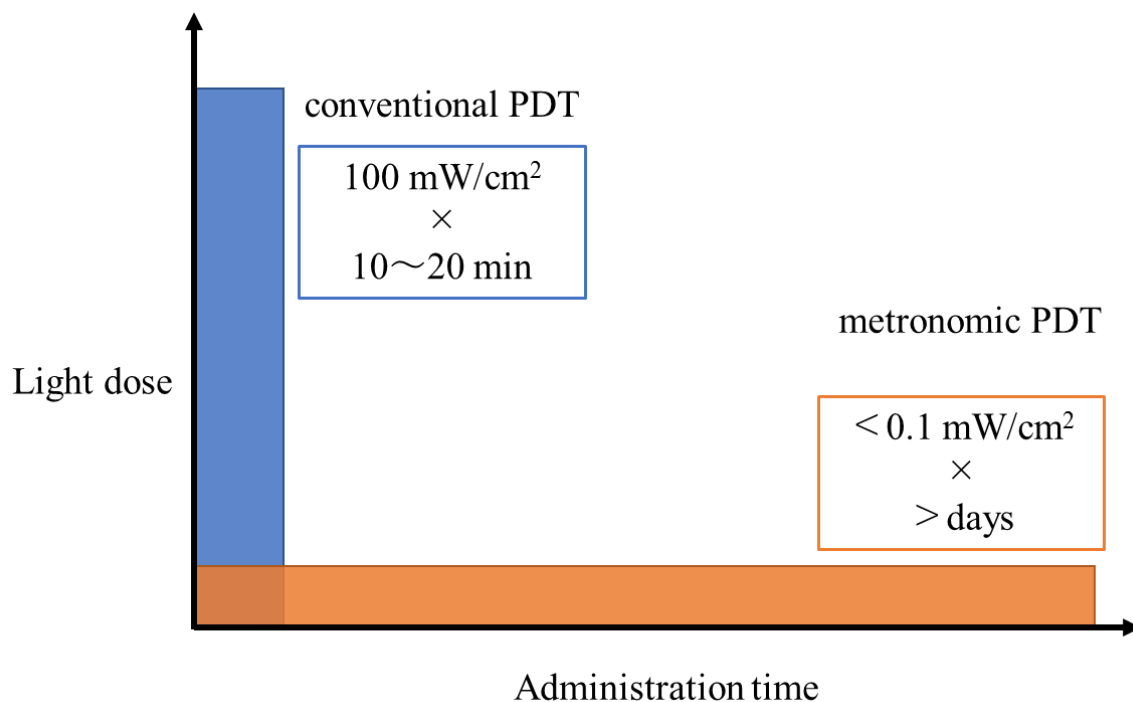


図1 conventional PDT と metronomic PDT との概念

cPDT では高強度光 ( $100 \text{ mW/cm}^2$ 程度) を 10~20 分の短時間照射することで、mPDT では低強度光 ( $< 0.1 \text{ mW/cm}^2$ ) を数日間持続的に照射することで抗腫瘍効果を発揮する。照射する全光エネルギー (J) は照射強度と照射時間の積であり、cPDT と mPDT とでは照射する全光エネルギーを同一にすることが可能である。

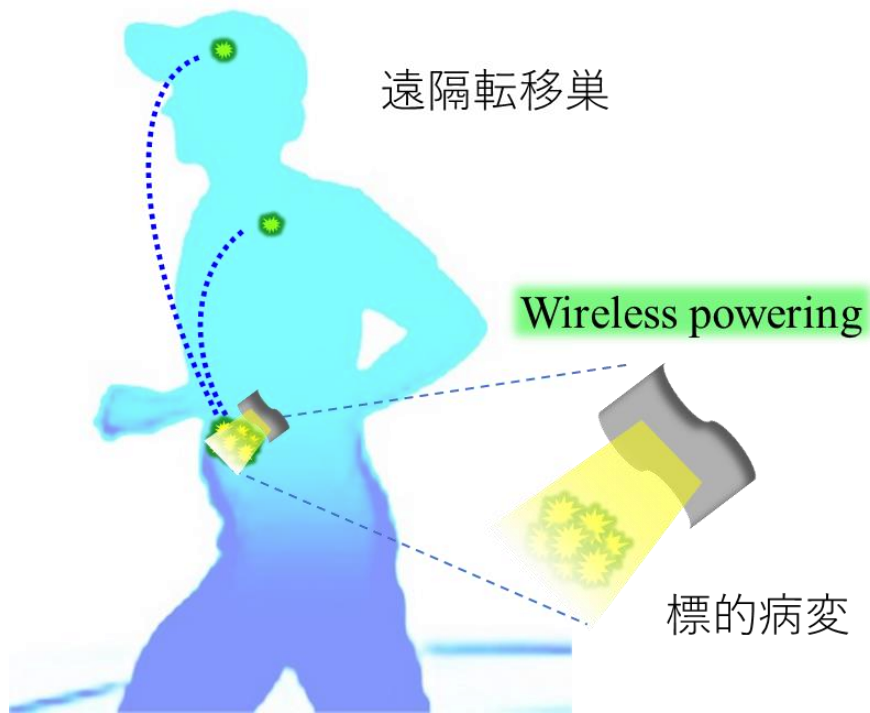
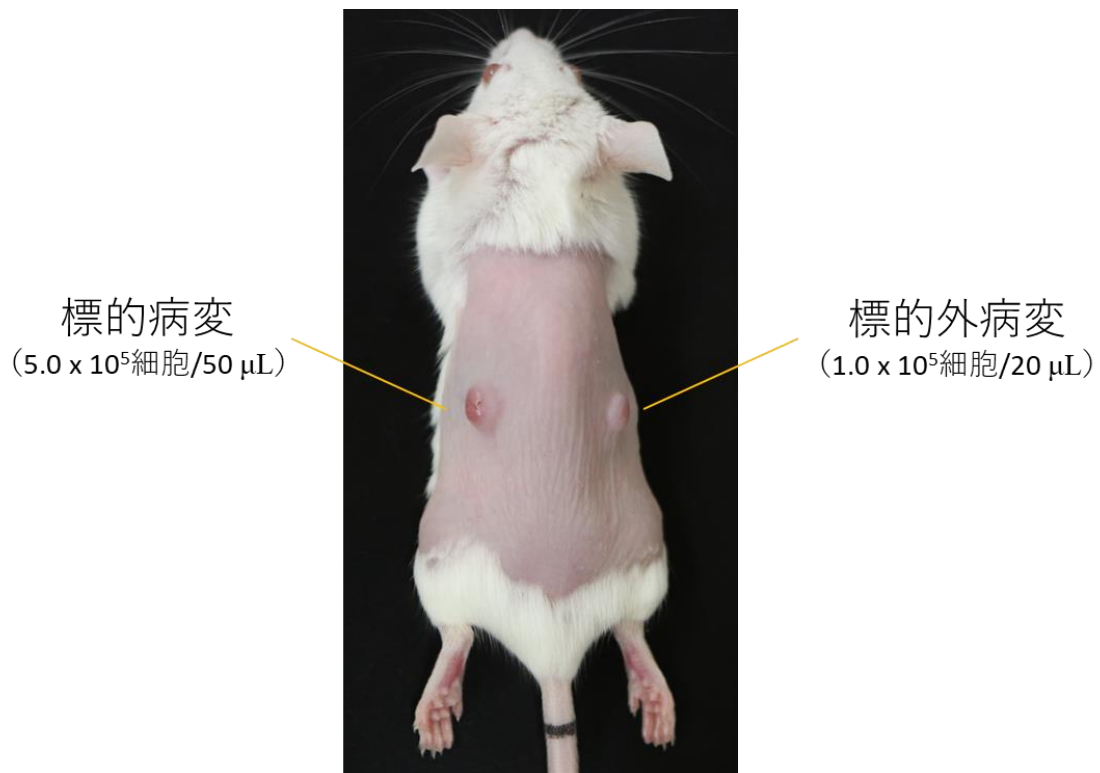


図2 遠隔転移巣に対する Abscopal 効果を利用した mPDT による治療の仮説

mPDT は低強度光でも抗腫瘍効果が得られ、高強度光源を必要としないために光源デバイスを小型化・菲薄化することが可能である。さらに無線給電によりワイヤレス化された小型光源を体内に埋め込むことができるため、拘束を伴わない PDT 治療や、体内の深部臓器の腫瘍に対する PDT 治療が可能となる。我々はこの方法論を用いることで、mPDT により遠隔転移巣に対する Abscopal 効果が発揮されれば、低侵襲で画期的な全身性のがん治療法を確立できると仮説を立てた。



### 図3 マウス背部への腫瘍移植方法

全身麻酔後、マウスの背部を剃毛した後、Colon-26 細胞をリン酸緩衝生理食塩水で懸濁し、 $5.0 \times 10^5$  細胞/ $50 \mu\text{L}$  をマウスの背部左側（標的病変）に、 $1.0 \times 10^5$  細胞/ $20 \mu\text{L}$  をマウスの背部右側（標的外病変）の皮下に注射した。

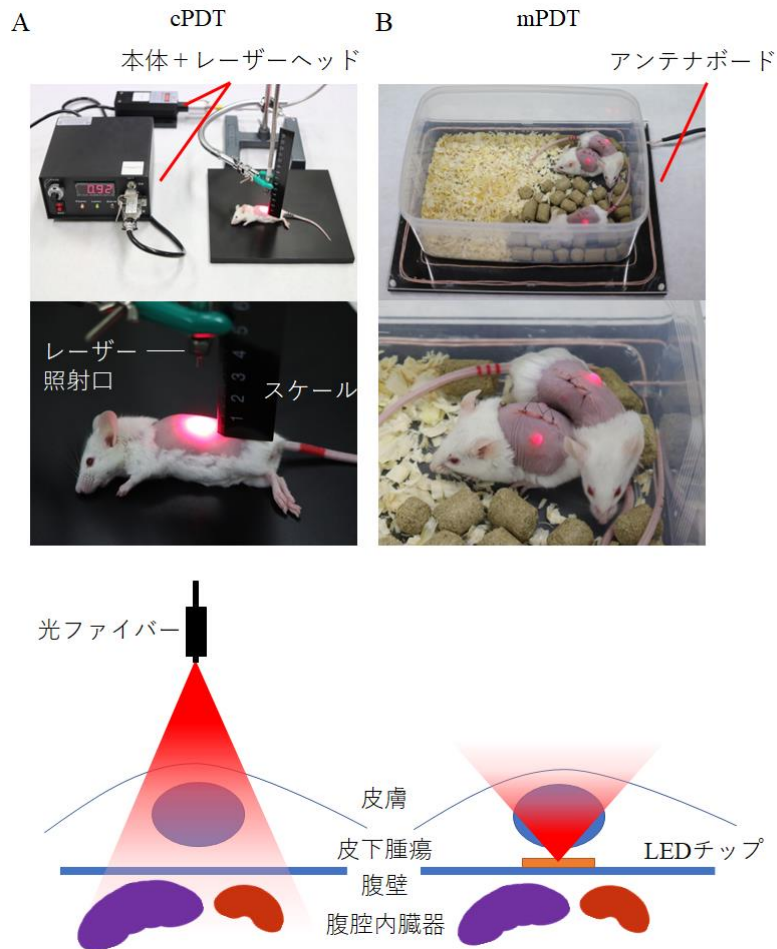


図4 cPDT と mPDT の治療方法

(A) cPDT 施行中の様子。本体およびレーザーヘッドからレーザーが照射され、光ファイバーを用いて任意の部位にレーザーを誘導することが可能となる。腫瘍表面から 3 cm の距離から照射を行った。

(B) mPDT 施行中の様子。マウス背側皮下腫瘍の下に LED チップを埋設し、アンテナボード上にマウスケージを設置する。アンテナボードからの無線給電により LED が発光し、マウスケージ内で持続的な光照射が可能となる。



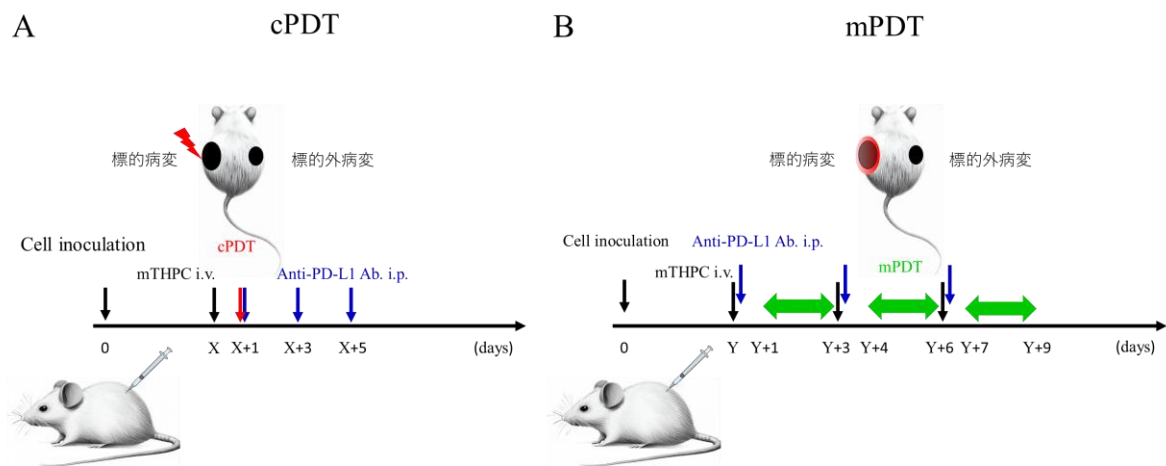


図5 実験プロトコール

(A) cPDT：腫瘍移植後 X 日目に mTHPC (0.3 mg/kg) を経静脈的に投与し、24 時間後に cPDT (30 mW/cm<sup>2</sup>、4 J/cm<sup>2</sup>) を施行。抗 PD-L1 抗体薬を併用する場合には、腫瘍移植後 X+1、X+3、X+5 日目に Atezolizumab (2.5 mg/kg) を腹腔内投与した。

Control として全身麻酔後に cPDT と同様にマウスを固定し、光照射を行わないものとした。

(B) mPDT：腫瘍移植後 Y 日目に mTHPC (0.3 mg/kg) を静脈内注射し、24 時間後より mPDT を 48 時間施行した。腫瘍移植後 Y+3、Y+6 日目にも同様の処置を行った (mPDT として計 144 時間)。抗 PD-L1 抗体薬を併用する場合には、腫瘍移植後 Y、Y+3、Y+6 日目に Atezolizumab (2.5 mg/kg) を腹腔内投与した。

Control として mPDT 用の LED チップと同様の大きさのダミーチップを挿入し、給電などの条件は同様とした。

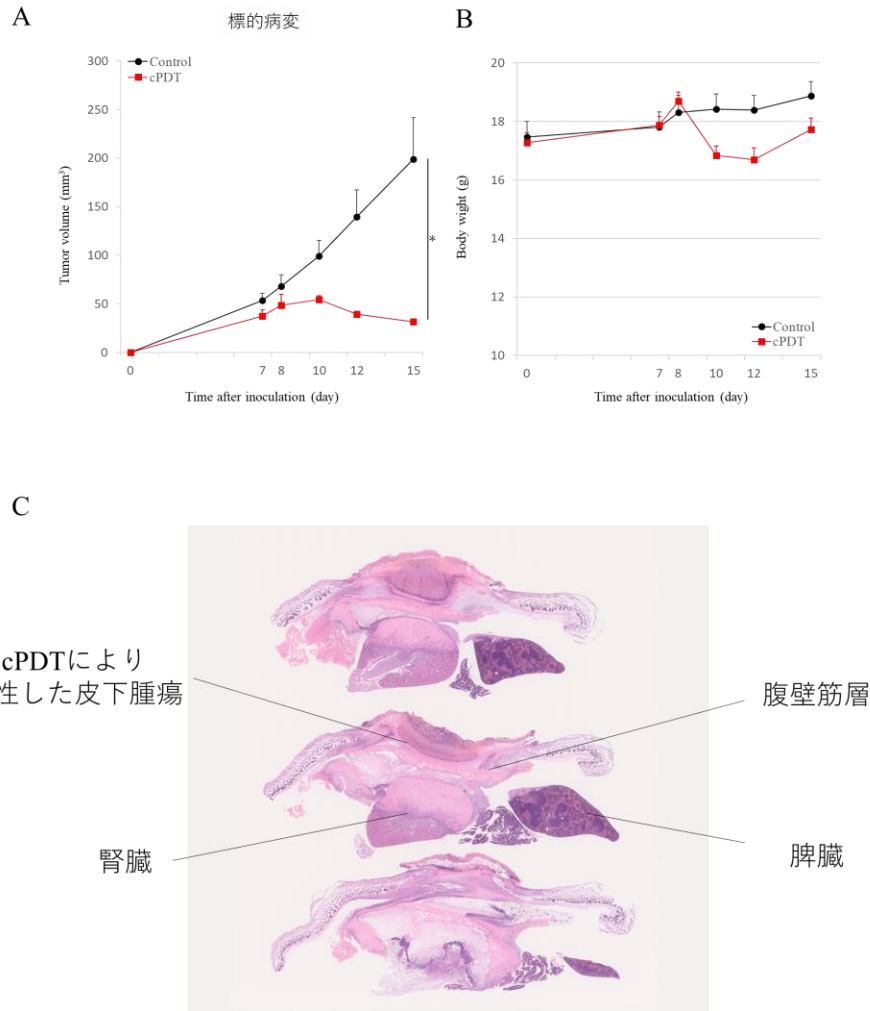


図6 至適 cPDT 条件設定のための予備実験 (30 mW/cm<sup>2</sup>、10 J/cm<sup>2</sup> の条件で施行、各群 N=4)

(A) cPDT 後の標的病変サイズの経時的推移。数値は平均値±標準誤差で表記、\* p < 0.05 (Wilcoxon 順位和検定を用いて解析)

(B) 治療後の体重の推移。cPDT 治療後に著明な体重減少を認める。

(C) cPDT 後 7 日目のレーザー照射部位の組織学的所見 (HE 染色)。腎臓、脾臓などの腹腔内臓器に変性を認める。cPDT による影響が腹腔内まで及んだと考えられる。

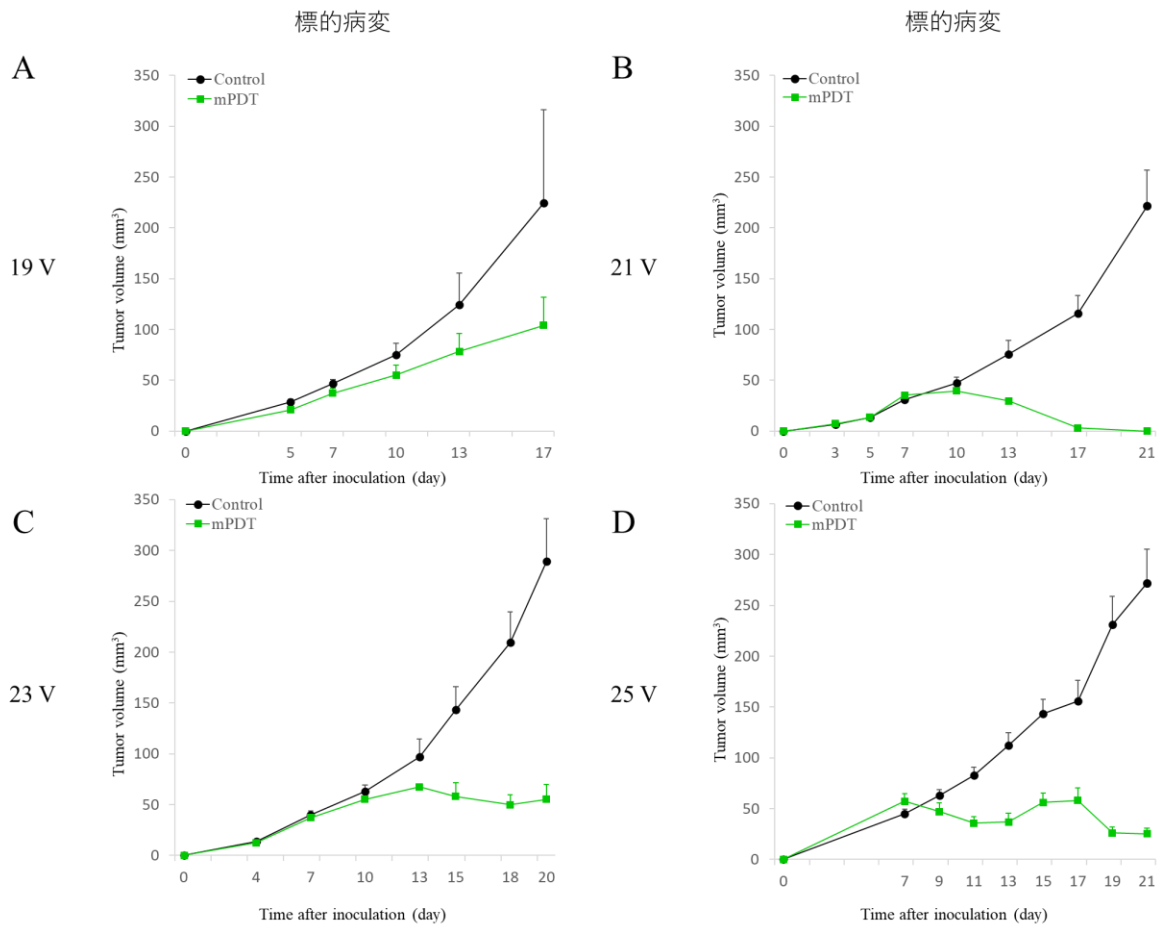
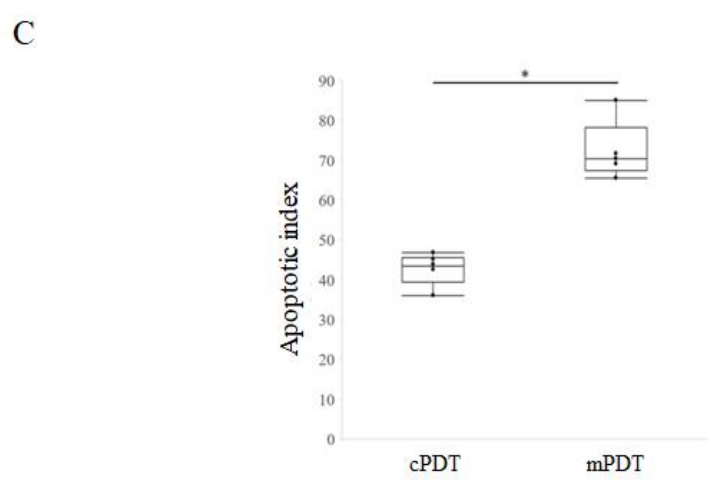
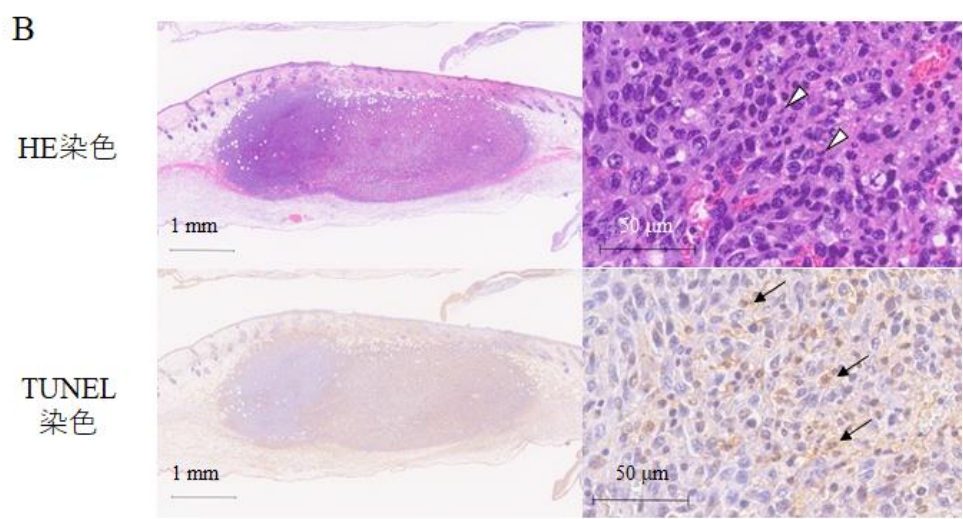
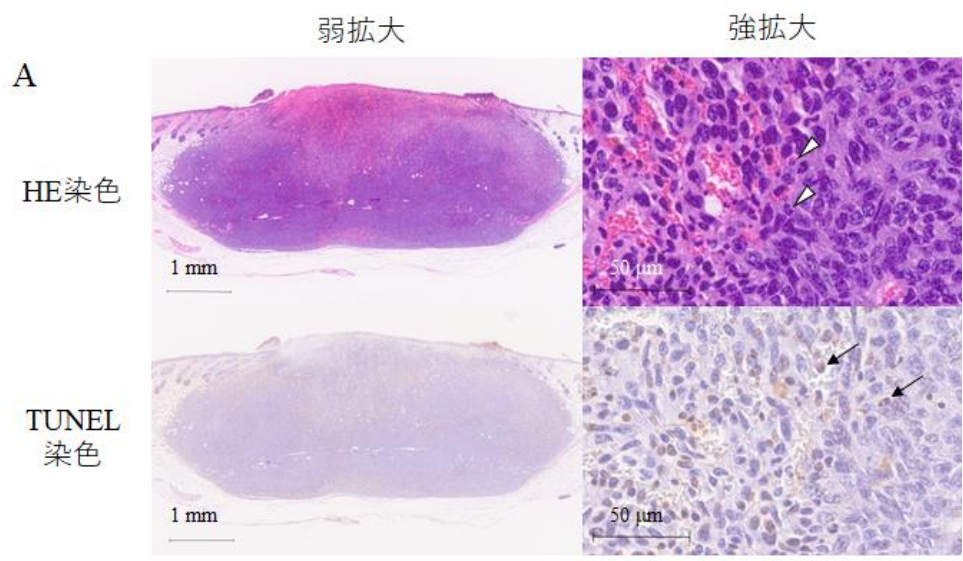


図7 至適 mPDT 条件設定のための予備実験

(A) アンテナボードの出力 19 V (各群 N=6)、(B) 21 V (各群 N=6)、(C) 23 V (各群 N=2)、(D) 25 V (各群 N=8) における標的病変サイズの経時的推移

アンテナボードの出力を 19 V に設定した場合には、Control と比較すると腫瘍縮小効果を認めたものの、経時的に標的病変は増大した (A)。一方、出力を 21 V ~25 V に設定した場合には Control と比較して腫瘍縮小効果を認め、さらに治療開始から 10 日目以降も標的病変の縮小を維持していた (B~D)。



## 図8 cPDT および mPDT における病理学的検討

(A) cPDT 施行 24 時間後に治療病変を採取し、HE 染色および TUNEL 染色を行った。皮膚表面方向からの光照射を施行した（写真上方から光照射）。HE 染色では好酸性細胞質を示す PDT により変性した領域を認め、この領域では核の濃縮や細胞の縮小を示す腫瘍細胞を認めた（矢頭）。TUNEL 染色ではこの変性した領域内に TUNEL 染色陽性細胞を認めた（矢印）。

(B) mPDT (23V) 48 時間 1 セット施行後、治療病変を採取し、HE 染色および TUNEL 染色を行った。皮下に設置した LED デバイスから体表方向へ向けて mPDT を施行した（写真下方から光照射）。cPDT と同様の組織変性や（矢頭）、TUNEL 染色陽性細胞を多く認めた（矢印）。

(C) cPDT と mPDT 後の変性領域内の任意の異なる 5 点で TUNEL 染色陽性細胞数を測定し、総細胞数で除した apoptotic index を算出した。その結果、mPDT の apoptotic index は  $72.2 \pm 2.7$  と、cPDT の  $42.6 \pm 2.7$  と比較して有意に高値であった。数値は平均値 ± 標準誤差で表記、\*  $p < 0.05$  (Wilcoxon 順位和検定を用いて解析)。

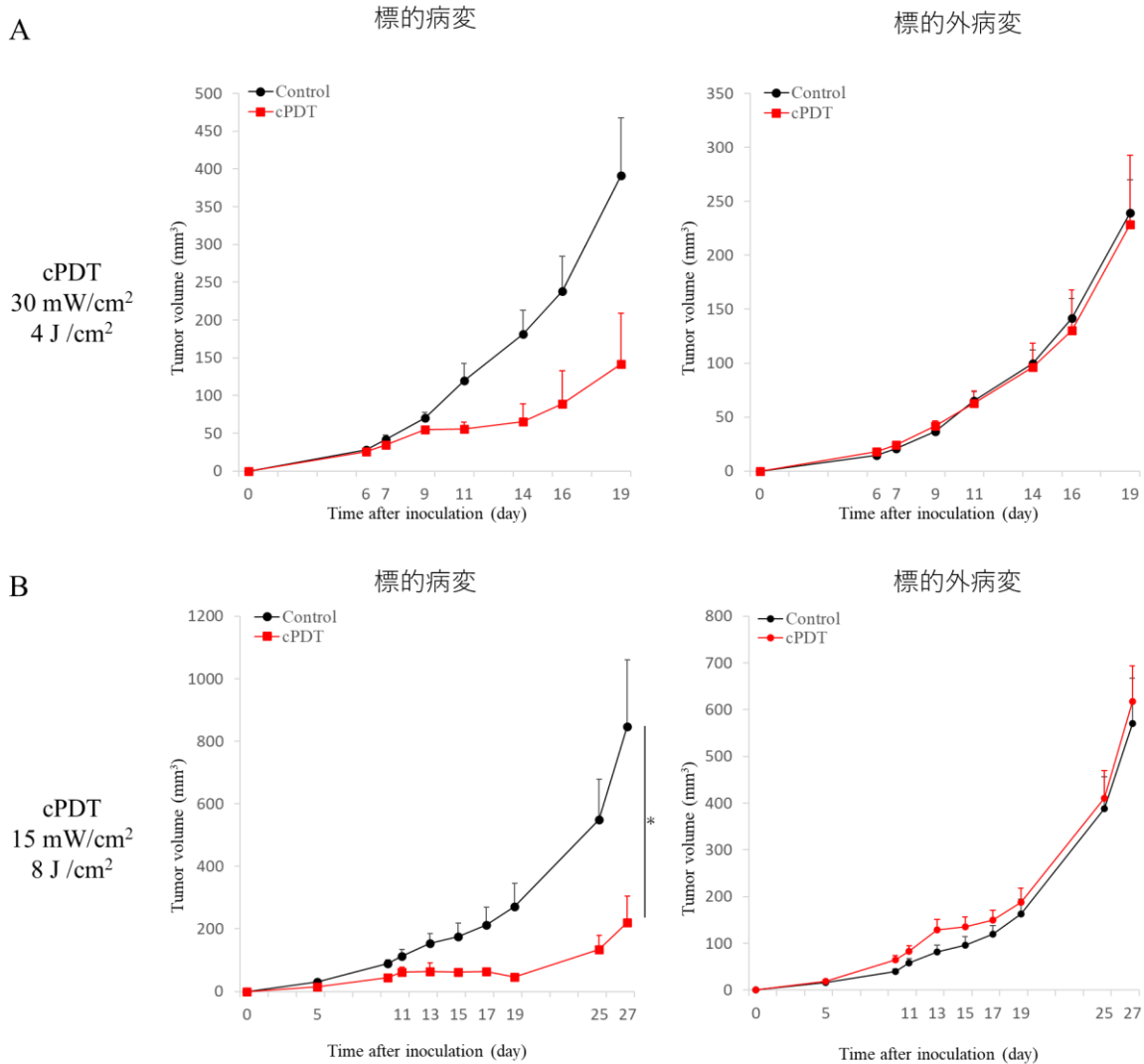


図9 cPDTによる標的病変および標的外病変に与える影響

(A) fluence rate: 30 mW/cm<sup>2</sup>、light dose: 4 J/cm<sup>2</sup>でcPDT施行。(Control群 N=6、cPDT群 N=5)

(B) fluence rate: 15 mW/cm<sup>2</sup>、light dose: 8 J/cm<sup>2</sup>でcPDT施行。(各群 N=4)

cPDTを施行した標的病変はいずれの条件下においても腫瘍縮小効果を認めたが、標的外病変には腫瘍増殖抑制効果は認められなかった。数値は平均値±標準誤差で表記、\* p < 0.05 (Wilcoxon 順位和検定を用いて解析)

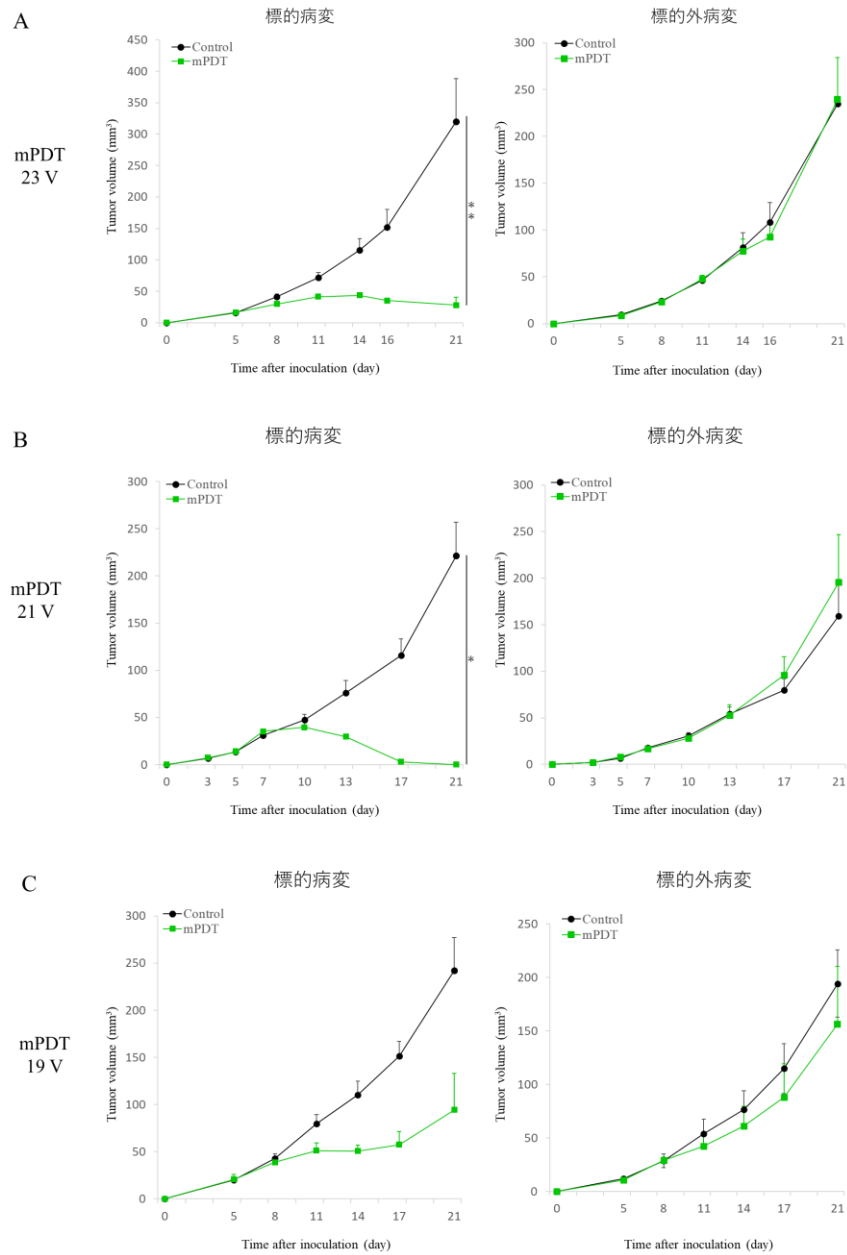


図 10 mPDT による標的病変および標的外病変に与える影響

- (A) アンテナボード出力 23 V で mPDT を施行。(各群 N=6)
- (B) アンテナボード出力 21 V で mPDT を施行。(各群 N=4)
- (C) アンテナボード出力 19 V で mPDT を施行。(各群 N=4)

mPDT (アンテナボード出力：19 V～23 V) を施行した標的病変は腫瘍縮小効

果を認めたが、標的外病変には腫瘍増殖抑制効果は認められなかった。数値は平均値±標準誤差で表記、\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  (Wilcoxon 順位和検定を用いて解析)



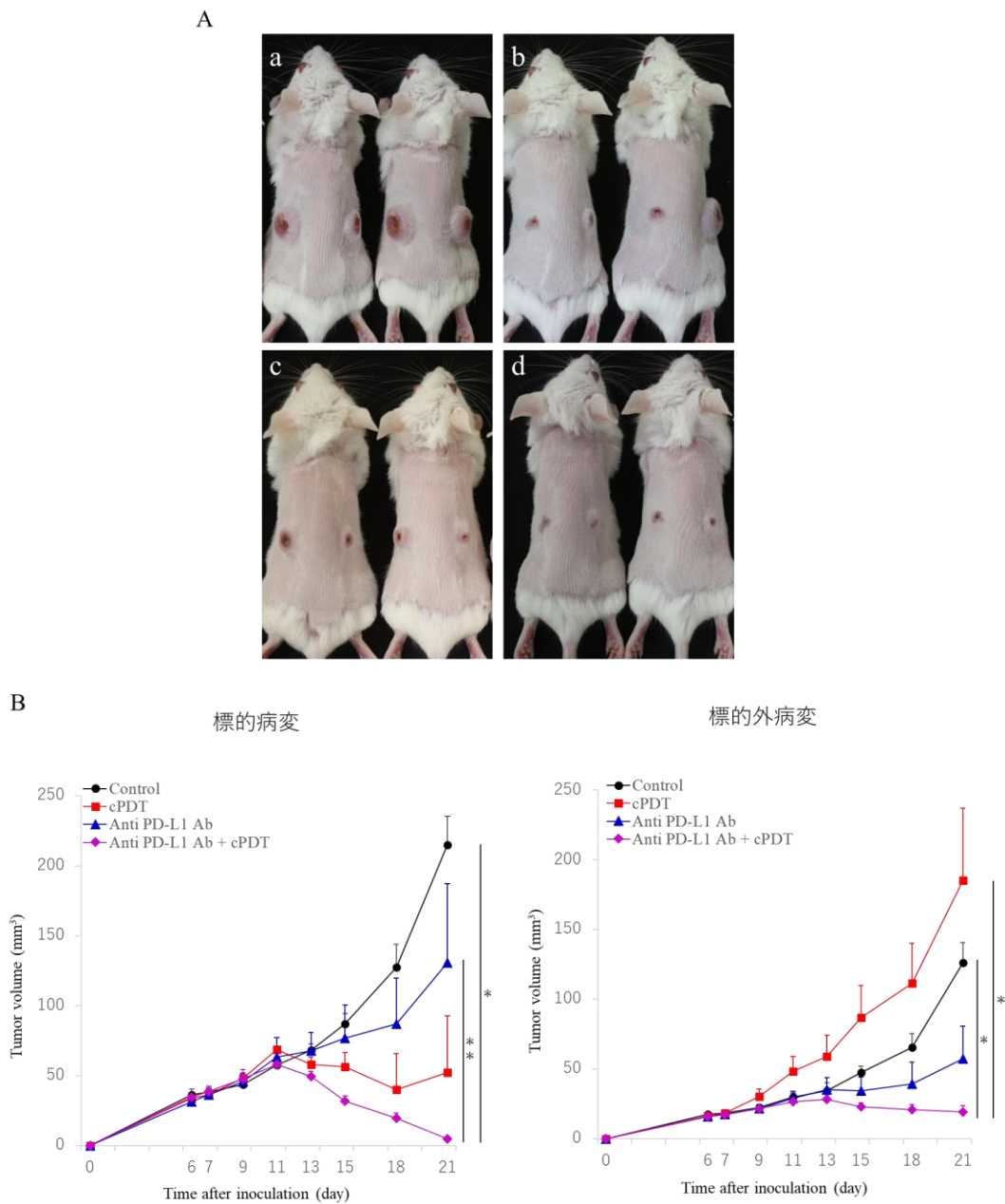


図 11 抗 PD-L1 抗体薬併用 cPDT が標的病変および標的外病変に与える影響

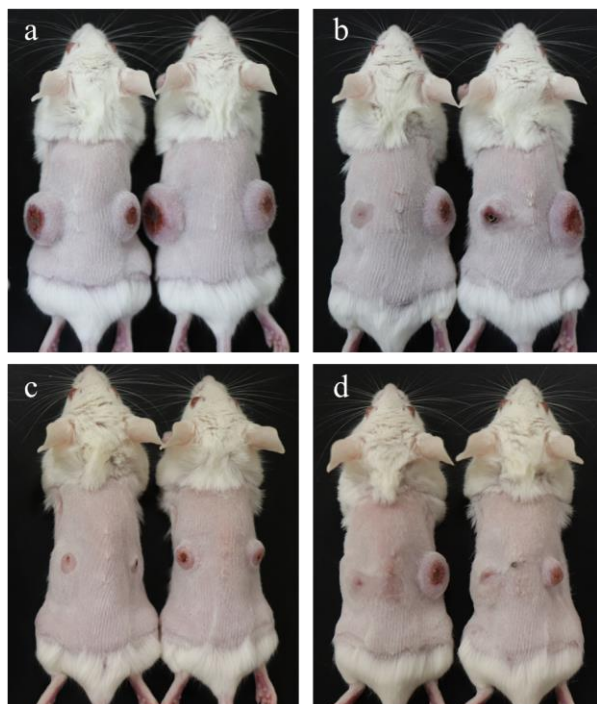
(A) 腫瘍移植後 21 日目のマウス背側皮下腫瘍の肉眼所見

a : Control 群、b : cPDT 群、c : 抗 PD-L1 抗体薬群、d : cPDT+抗 PD-L1 抗体薬群

(B) 腫瘍サイズの経時的推移 (Control 群 N=4、cPDT 群 N=4、抗 PD-L1 抗体薬群 N=8、cPDT+抗 PD-L1 抗体薬群 N=9)

cPDT 単独と比較し、cPDT+抗 PD-L1 抗体薬群ではより効果的な標的病変の縮小を認めた。また標的外病変に関しては、Control 群と比較して抗 PD-L1 抗体薬群において腫瘍の増殖抑制効果を認めたが、抗 PD-L1 抗体薬に cPDT を加えることでさらに腫瘍が縮小する傾向を認めた。数値は平均値±標準誤差で表記、\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  (Steel-Dwass 検定を用いて解析)

A



B

標的病変

標的外病変

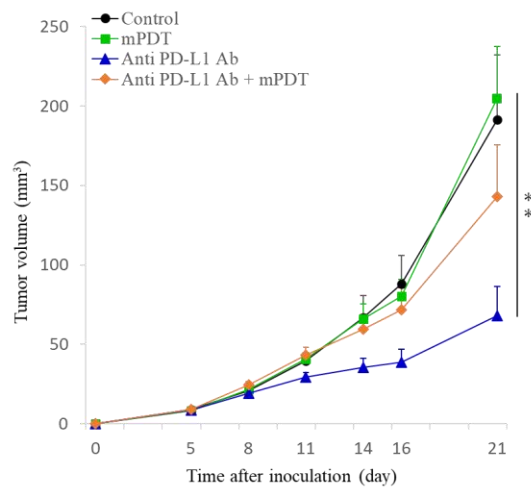
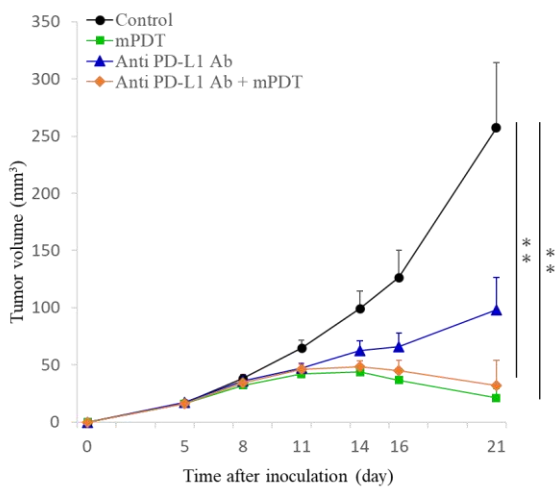


図 12 抗 PD-L1 抗体薬併用 mPDT が標的病変および標的外病変に与える影響

(A) 腫瘍移植後 21 日目のマウス背側皮下腫瘍の肉眼所見

a : Control 群、b : mPDT 群、c : 抗 PD-L1 抗体薬群、d : mPDT + 抗 PD-L1

## 抗体薬群

### (B) 腫瘍のサイズの経時的推移 (各群 N=10)

mPDT では抗 PD-L1 抗体薬併用の有無にかかわらず標的病変を縮小させることが可能であったが、標的外病変においては抗 PD-L1 抗体薬単独と比較して mPDT を併用した場合には腫瘍増殖抑制効果を認めず、むしろその効果が減弱する結果であった。数値は平均値±標準誤差で表記、\*\*  $p < 0.01$  (Steel-Dwass 検定を用いて解析)

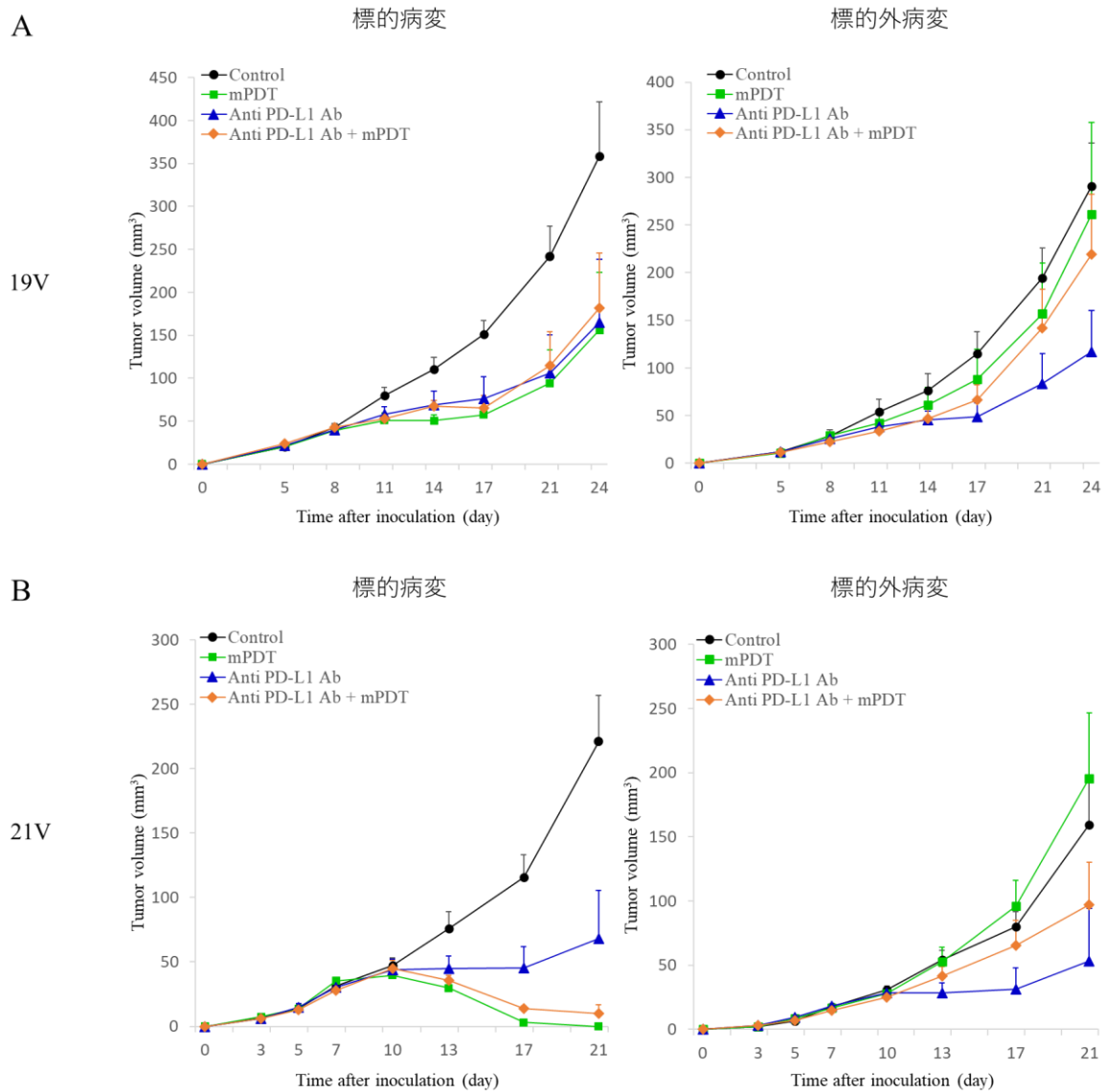


図 13 抗 PD-L1 抗体薬併用 mPDT が標的病変および標的外病変に与える影響 2

(A) 移植後 day 5 に mTHPC 0.3 mg/kg を i.v. と抗 PD-L1 抗体薬 2.5 mg/kg を i.p. 投与した。24 時間後から 19 V の出力で mPDT を 48 時間施行。day 8 と day 11 にも mTHPC と抗 PD-L1 抗体薬を追加投与し、投与 24 時間経過後から 48 時間の mPDT を行った (mPDT として計 144 時間)。(Control 群 N=4、mPDT 群 N=4、抗 PD-L1 抗体薬群 N=8、mPDT + 抗 PD-L1 抗体薬群 N=9)

(B) 移植後 day 3 に mTHPC 0.3 mg/kg を i.v. と抗 PD-L1 抗体薬 2.5 mg/kg を i.p. 投与した。3 時間後から 21 V の出力で mPDT を 45 時間施行。day 5 と day 7 にも mTHPC と抗 PD-L1 抗体薬を追加投与し、投与 3 時間経過後から 45 時間の mPDT を行った (mPDT として計 135 時間)。(Control 群 N=4、mPDT 群 N=4、抗 PD-L1 抗体薬群 N=3、mPDT + 抗 PD-L1 抗体薬群 N=5)

19V、21V いずれにおいても抗 PD-L1 抗体薬併用 mPDT 群の標的外病変は抗 PD-L1 抗体薬単独群と比較して増大する傾向を認めた。数値は平均値 ± 標準誤差で表記、Steel-Dwass 検定を用いて解析したが、各群間に有意差は認められなかった。

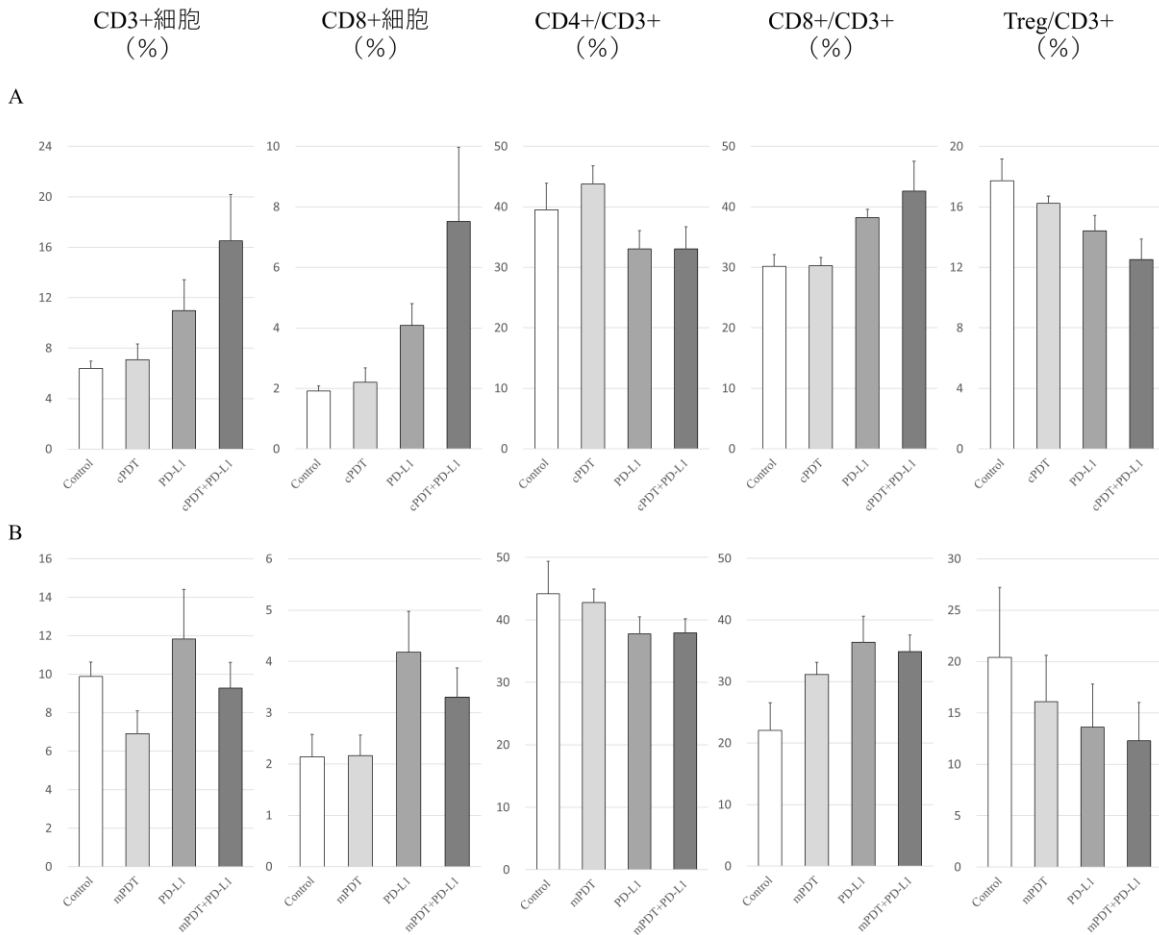


図 14 標的外病変における腫瘍浸潤免疫細胞の検討

(A) 腫瘍移植後 21 日目 (cPDT 14 日後) にマウスを犠死させ、標的外病変を採取し Flowcytometry により腫瘍浸潤免疫細胞の解析を行った。(Control 群 N=6、cPDT 群 N=5、抗 PD-L1 抗体薬群 N=6、cPDT+抗 PD-L1 抗体薬群 N=6)、

cPDT と抗 PD-L1 抗体薬投与により腫瘍浸潤 CD3<sup>+</sup>細胞、CD8<sup>+</sup>細胞は増加する傾向を認めた。また、CD3<sup>+</sup>細胞中の CD8<sup>+</sup>細胞割合も増加する傾向が見られた。Treg に関しては、抗 PD-L1 抗体薬併用 cPDT において減少する傾向を認めた。

(B) 腫瘍移植後 21 日目 (mPDT 終了 7 日後) にマウスを犠死させ、標的外病変を採取し FCM により腫瘍浸潤免疫細胞の解析を行った。(Control 群 N=5、

mPDT 群 N=6、抗 PD-L1 抗体薬群 N=6、mPDT+抗 PD-L1 抗体薬群 N=6)

抗 PD-L1 抗体薬の投与により CD3<sup>+</sup>細胞、CD8<sup>+</sup>細胞の増加を認めたが、抗 PD-L1 抗体薬併用 mPDT では抗 PD-L1 抗体薬単独投与と比較し、CD3<sup>+</sup>細胞、CD8<sup>+</sup>細胞は減少する傾向を認めた。Treg に関しては、cPDT と mPDT で各群同様の動きを示した。

数値は平均値±標準誤差で表記、Steel-Dwass 検定を用いて解析したが、各群間に有意差は認められなかった。



表1 抗PD-L1抗体薬併用mPDTにおいて標的外病変の増殖抑制効果を認めなかった要因の考察

1. 腫瘍抗原に関するもの
  - a. 細胞死の過程の相違による可能性
  - b. 腫瘍抗原の放出量の違いによる可能性
2. 抗原提示が十分に行われなかった可能性
3. 抗腫瘍免疫に抑制的に働く細胞群の影響の可能性
4. 腫瘍増殖に作用するサイトカイン等が放出された可能性