

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09178

研究課題名(和文)胆管癌の局所制御増強と光線過敏軽減による普及を目指した次世代光線力学的療法の開発

研究課題名(英文) Development of the enhanced effect and less invasiveness of new photodynamic therapy for biliary duct carcinoma

研究代表者

七島 篤志 (NANASHIMA, ATSUSHI)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：60380838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：胆管細胞株を用い、糖(グルコース)連結ポルフィリン錯体のG0、G4において一重項酸素生成効率が高い光増感剤を開発した。ポルフィリンと糖の連結リンカーであるエチレングリコールのユニット数を増加させることで、PDT活性はこれまで合成したものよりも効果が増強し、癌細胞への可視光殺細胞活性が増す成果が得られた。LED照射による温度変化を安定させヒト体温37度に均一に維持できるアルミニウム板・空気ギャップを備えた光照射機器を開発した。2020年までに2編の論文がなされた

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在のポルフィリン化合物に代わり、従来の癌細胞選択性や長時間遮光による光線過敏症の欠点を補う新たな光線力学的療法の治療創薬および機器開発につながる。2016年から宮崎大学医学部の基礎・臨床研究分野で組織構成された「蛍光物質や光治療による将来の臨床治療開発をすすめる研究プロジェクト」と「工学部スーパーマテリアル開発研究」の学部・ユニット横断型 医工連携の研究プロジェクトに独自性を持って取り組んでおり、本研究をプロジェクトで共有し、獣医学部とも連携して大型動物での検証にも取り組む。本研究の意義と将来展望であるPDT光増感剤の創薬として、胆管癌をはじめとする難治癌患者への次世治療ニーズ提供としたい。

研究成果の概要(英文)：Using bile duct cell lines, a photosensitizer having high singlet oxygen production efficiency was developed in G0 and G4 of sugar (glucose) linked porphyrin complexes. By increasing the number of units of ethylene glycol, which is a linkage linker between porphyrin and sugar, PDT activity was enhanced compared to those synthesized so far, and visible light cell-killing activity to cancer cells was increased. We have developed a light irradiation device equipped with an aluminum plate and air gap that can stabilize temperature changes due to LED irradiation and maintain a uniform human body temperature of 37 degrees. Two articles had been published.

研究分野：消化器外科

キーワード：光線力学的療法 消化器癌治療 胆管癌 LED 水溶性ポルフィリン 糖鎖連結型

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

難治性消化器癌の一つである胆管癌において、癌局所治療による高い病態制御効果を達成するため、ポルフィリン誘導体を新規水溶性光増感剤 (PS) として開発し、light emitted diode (LED)を用いた光励起による次世代の光線力学的療法 photodynamic therapy (PDT)開発の橋渡し基礎研究を行うことを目的とする。これまで研究代表者は臨床で胆管癌患者において既存の光増感剤による PDT の治療効果を確認し、基礎研究で胆管癌細胞株におけるアポトーシス誘導効果を解明してきた。

2. 研究の目的

未だ正常細胞における光増感剤残留による副作用も問題点であり、癌特異性と正常組織の代謝促進のため、より有効な光増感剤の開発と励起効果の高い光条件の確立した PDT 研究に取り組んでいる。本研究では PS に用いるポルフィリン錯体の軸配位修飾や癌細胞親和性を高める分子設計技術を駆使して新規水溶性 PS 合成研究を加速することで、より胆管癌に親和性が高くアポトーシスを誘導する新たな PDT を確立する。

3. 研究の方法

(1) 新規光感受性物質の合成 (図1): ポルフィリン錯体の軸配位に親水基・疎水基を導入・変換する方法で水溶性ポルフィリン Gn を合成。得られた化合物の溶解性、可視光吸収・蛍光特性、酸化還元特性、 を評価し最適な吸収波長が得られる水素化ポルフィリン骨格の合成を行う。

Gn の合成: n =0, 1, 2, 4 の Gn は、アセチル化グルコースにリンカーとしての EG ユニットを導入し、リン錯体の軸配位に連結させ脱アセチル化によって合成。

Gn の PDT 活性: 96 ウェルプレートに細胞を播種し 24 h 培養、各濃度の Gn を含む培養液に変更し Gn を細胞に添加し 24-48 h 集積。独自の LED 光機器 (645-660 nm, 光強度= 4.09 mWcm⁻²) で 30 分間マイクロプレート底から照射し MTT 試験で生存率を調べた。

(2) PS の癌細胞集積性の解析: 胆管癌細胞株 NOZ 細胞及び他の数種類の癌細胞株を対象に、細胞内への PS の蓄積と部位を組織選択性の蛍光プローブで二重蛍光染色、western blot で確認し、蓄積量を細胞抽出から定量測定する。

(3) PDT による抗腫瘍効果検証: 上記癌細胞株を対象に光線照射の各条件における癌細胞増殖活性や癌殺細胞効果 (cell viability %, アポトーシス、50%阻害濃度 IC50) の評価。

(4) PS の糖鎖連結による癌細胞膜結合の選択性 (特異性) の検証: グルコシル基と結合する GLUT1 阻害剤投与による取り込み量と cell viability での抗腫瘍効果抑制を測定。

(5) PDT の基礎研究開発用の波長 645nm-LED 照射装置の作製: LED 点灯後の水温の変化 (96 ウェルプレート使用) を純粹上で水温の時間変化を測定し、外気温を調整しながら温度安定化を図るため、LED のプレート間に絶縁板を用いてヒト体温に近い温度による最適な装置を作成する。

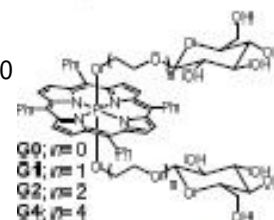


図1 Gnの構造

4. 研究成果

2019 年度の研究では NOZ に対してエチレングリコール (EG) 型リンポルフィリン錯体を用いた場合に高い PDT 活性を示し IC50 は 37.6 nM で細胞膜と親和性があり、 は高い事がまず証明された。しかし肝癌細胞 (HepG2) に対して活性なく細胞選択性に乏しかった。

(1) Gn の光機能性: G0-G4 の蛍光特性を評価するため、蛍光スペクトルから蛍光量子収率 () と蛍光寿命 (T) を測定した。G0, G1 は EG 型錯体と同等の を示した。蛍光特性は n 値による明確な違いは得られなかったが、EG リンカーが長くなるにつれ が減少した。

(2) Gn の PDT 活性: NOZ に対する PDT 活性は、G0 において (610 nm 光照射下)、G0 濃度依存的に細胞の生存率は減少し、暗下では減少が見られなかった。EG リンカーを導入した場合、IC50 はリンカーの伸長によって PDT での IC50 が低濃度化し、G4 の PDT では集積時間を長くすることで最も生存率低下が顕著であった。

* は n の増加にともなって減少したにも関わらず、PDT 活性は n の増加により上昇した (と PDT 活性に相関を示さない)。水溶性 PS の PDT 活性には、 が高いことも必要だが PS の癌細胞への取り込みが重要と考察された。さらに、これまで PDT 抵抗性であった HepG2 において EG リンカー (n = 4) の導入で PDT 活性および取り込み量が向上した。

* 分子構造的には、G0 ではグルコシル基がポルフィリン環と立体的に混みあった状態で糖認識性が低い、G4 でグルコシル基がポルフィリン環より外部に位置し糖認識性が向上した。

(3) Gn の細胞への取り込み量および阻害剤効果：光機能性評価から、Gn のがん細胞への取り込みが PDT 活性に重要であることが示唆された。NOZ および HepG2 に対する細胞あたりの Gn の取り込み量を調べ、結果最も PDT 活性が高かった G4 で細胞の取り込み量が最大となった。

結果のまとめ：P-錯体の近傍にグルコース部位を連結すると高い λ_{max} を示したが、PDT 活性にがん細胞株依存性が見られた。この依存性は、軸配位子に EG アルキルエーテルを導入した P-錯体と同様の傾向であった。グルコース部位を、 $n = 4$ の EG リンカーを介して連結すると、 λ_{max} は低下した。しかし、PDT 活性に細胞への Gn の取り込み量に時間依存性が見られ、NOZ および HepG2 の両方で PDT 活性を示した。したがって、P-錯体へのグルコース部位の連結方法を最適化することで、Gn の取り込み過程が変化し PDT 活性が向上した。

(4) PDT の基礎研究開発用の波長 645nm-LED 照射装置の温度均一性の向上
リンポルフィリン錯体のイソバクテリオクロリン体、およびクロリン体の可視光吸収波長は 645nm と 660nm で、ヒト正常細胞に安全な波長での吸光を示した。厚手の銅ヒートシンクを持ち 645nm の LED 照射装置を開発した。点灯 30 分後の 96 ウェルプレートの水温が中央値で 26.1 に上昇する程度に LED の発熱の影響を抑えることができ、全体をインキュベーターのような保温槽内に入れれば、ヒトの体温に近い 36 度台での安定した環境で実験できる装置を開発した。しかしその装置には、LED 点灯によるウォーミングアップが必要なこと、各ウェルの温度に最大 ± 1.5 の温度差があることが問題で、必ずしも使いやすい装置ではなかった。そこで、プレートと照射装置の間に断熱材をいれ、LED の熱をプレートに伝えなくする工夫が必要と考え、様々な絶縁材料を挿入することでその効果を検証した。その結果、LED のヒートシンクである銅板上部に厚さ 1mm の空気層を設け、かつその上には LED 光の吸収が 5%以下のアルミ製ヒートシンクを増設・併用することで、点灯によるウォーミングアップなしに 30 分間 37 度台を維持でき、各ウェル間の温度差は最大で ± 0.2 におさえることが出来た。

(5) EG 型錯体 PS の癌細胞内局在

EG 型錯体 PS と LED による PDT により MitoTracker 蛍光を用い PS の在がミトコンドリアであることを確認し、OXPHOS 活性低下からミトコンドリア障害誘導機序を解明した。FCM により PDT によるアポトーシス誘導を確認しアポトーシス抑制因子である Bcl-xL の低下、促進因子である Bax、cytochrome C、cleaved caspase-3 増加を証明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nanashima A, Hiyoshi M, Imamura N, Hamada T, Nishida T, Kawakami H, Ban T, Kubota Y, Nakashima K, Yano K, Wada T, Takeno S, Kai M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Two cases of bile duct carcinoma patients who underwent the photodynamic therapy using talaporfin sodium (Laserphyrin)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 102-109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12328-019-01006-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mai NNH, Yamaguchi Y, Chojookhuu N, Matsumoto J, Nanashima A, Takagi H, Sato K, Tuan LQ, Hishikawa Y.	4. 巻 53
2. 論文標題 Photodynamic Therapy Using a Novel Phosphorus Tetrphenylporphyrin Induces an Anticancer Effect via Bax/Bcl-xL-related Mitochondrial Apoptosis in Biliary Cancer Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Histochem Cytochem.	6. 最初と最後の頁 61-72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1267/ahc.20-00002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Atsushi Nanashima et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Two cases of bile duct carcinoma patients who underwent the photodynamic therapy using talaporfin sodium (Laserphyrin).	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 102-109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12328-019-01006-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 今村直哉, 七島篤志, 甲斐健吾, 池之上実, 旭吉雅秀, 河上洋.
2. 発表標題 光線力学的療法における独自のポルフィリン錯体化合物を用いた新たな光感受性物質の開発
3. 学会等名 日本消化器病学会九州支部第115回例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 NNH Mai, 山口優也, 松本仁, 七島篤志, N Chojookhuu, 菱川善隆
2. 発表標題 The biological mechanism of novel phosphorus porphyrin for photodynamic therapy in human biliary cancer cells.
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会,
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 牧平広大, 田尻大海, 松本 仁, Nguyen Nhat Huynh Mai, 山口優也, 菱川善隆, 今村直哉, 甲斐健吾, 七島 篤志.
2. 発表標題 軸配位子にグルコースを連結したリンポルフィリン錯体の光増感作用とPDT活性.
3. 学会等名 2020年光化学討論会.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本 仁, 田尻大海, 牧平広大, Nguyen Nhat Huynh Mai, 山口優也, 菱川善隆, 今村直哉, 甲斐健吾, 七島篤志.
2. 発表標題 軸配位子にグルコースを連結したリンポルフィリン錯体の光増感作用とPDT活性.
3. 学会等名 第42回日本光医学・光生物学会.
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 松本仁, 田尻大海, NNH Mai, 山口優也, 菱川善隆, 今村直哉, 池ノ上実, 七島篤志.
2. 発表標題 糖連結リンポルフィリン錯体の癌細胞に対する光線力学活性.
3. 学会等名 日本レーザー医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 甲斐健吾、七島篤志ら
2. 発表標題 胆管癌に対するTalaporfin sodiumを用いた光線力学療法の前向き臨床試験2治験例
3. 学会等名 第29回日本光線力学学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田尻大海、・牧平広大、松本 仁、 Nguyen Nhat Huynh Mai、山口優也、菱川義隆、今村直哉、池ノ上実、七島篤志
2. 発表標題 軸配位子にグルコースを導入した水溶性ポルフィリン錯体の癌細胞に対する光線力学活性
3. 学会等名 宮崎大学産学・地域連携センター第26回技術・研究発表交流会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田尻大海、松本仁、 Nguyen Nhat Huynh Mai、山口優也、菱川善隆、今村直哉、池ノ上実、七島篤志
2. 発表標題 配位子にグルコースを導入したP-ポルフィリン錯体の癌細胞に対する光線力学活性
3. 学会等名 第99春季年日本化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nguyen Nhat Huynh Mai, Yuya Yamaguchi, Jin matsumoto, Atsushi Nanashima, Narantsog Choijookhuu, Yoshitaka Hishikawa
2. 発表標題 The anticancer effect of photodynamic therapy using newly synthesized phosphorus porphyrin in human biliary cancer cells.
3. 学会等名 The 13th Japan-China Joint Seminar. (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	菱川 善隆 (YOSHITAKA HISHIKAWA) (60304276)	宮崎大学・医学部・教授 (17601)	
研究分担者	松本 仁 (JIN Matsumoto) (90363572)	宮崎大学・工学部・准教授 (17601)	
研究分担者	徐 岩 (Jo Gan) (40506763)	宮崎大学・医学部・教授 (17601)	
研究分担者	横谷 篤至 (Yokotani atushi) (00183989)	宮崎大学・工学部・教授 (17601)	
研究分担者	山口 優也 (Yuya Yamaguchi) (60779966)	東邦大学・医学部・助教 (32661)	
研究分担者	甲斐 健吾 (Kengo Kai) (90851585)	宮崎大学・医学部・助教 (17601)	
研究分担者	池ノ上 実 (ikenoue makoto) (40612370)	宮崎大学・医学部・助教 (17601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------