

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15758

研究課題名(和文) 次世代糖鎖連結光感受性物質を用いた新規光線力学的医療の開発

研究課題名(英文) Development of novel photodynamic therapy using next generation photosensitizer

研究代表者

西江 裕忠(Nishie, Hirotada)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教

研究者番号：00812174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：PDTでは光化学反応によって誘導された活性酸素、一重項酸素によってアポトーシス、ネクローシスが誘導されているといわれている。また小胞体に、ゴルジ体において発生した一重項酸素を由来としてER-Ca<sup>+</sup>チャンネルの障害によりアポトーシスを誘導されているとの報告されている。今回我々が開発したAcN003HPはほかの光感受性物質よりも多くの一重項酸素を発生させており、小胞体に局在しているという結果であった。またG-cholrin e6よりも60分ほど取り込みのピークを遅らせることができた。そのため第2世代のTSよりも高い殺細胞効果を示した可能性があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光線力学療法(PDT)は様々な領域で臨床応用されており、消化器領域では化学放射線療法後の遺残再発食道癌に対し、TSを用いたPDTが保険収載されている。我々は以前から癌細胞が正常細胞より多くの糖を取り込む性質(Warburg効果)を応用して糖を連結したPSの開発を行っており、代謝、抗腫瘍効果にすぐれたGcholrin e6を開発した。ただし代謝が非常に早く、十分な腫瘍集積を得られているとは考えにくい状況であった。今回我々はAcN003HPを用いた光線力学療法の抗腫瘍効果などについて検討を行った。今後もさらに研究をつづけ改良を重ねることにより、有効性・安全性の向上を計る。

研究成果の概要(英文)：In PDT, apoptosis and necrosis are said to be induced by ROS and singlet oxygen induced by photochemical reactions. It has also been reported that apoptosis is induced in the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi apparatus through the disruption of ER-Ca<sup>+</sup> channel, which is derived from singlet oxygen generated in the ER and Golgi apparatus, respectively. Our results show that AcN003HP generates more singlet oxygen than other light-sensitive substances, and that it is localized in the endoplasmic reticulum. It also delayed peak uptake by 60 minutes more than G-cholrin e6. Therefore, it is possible that AcN003HP showed a higher cell-killing effect than the second-generation TS.

研究分野：消化器内科

キーワード：PDT 一重項酸素 アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

### 1) 低侵襲癌治療と光線力学的療法 (Photodynamic Therapy, PDT)

今日の癌治療の進歩は目覚ましいものがあるが、一方でその侵襲の大きさゆえに年齢、基礎疾患などを理由に施行できない場合もある。本邦では超高齢化社会の到来とともに癌患者の高齢化が進んでおり、有効かつ低侵襲な治療の需要は一層高まっている。

PDT は、光感受性物質が癌組織に集積する特性を利用し、特定波長の光線を照射し、一重項酸素に代表される活性酸素種を癌細胞内で発生させることにより癌細胞を破壊する低侵襲治療法である。本邦では現在、Talaporfin sodium と半導体レーザーによる第 2 世代の PDT が肺癌、脳腫瘍、再発食道癌に保険適用となっている。私たちの施設は、再発食道癌の医師主導治験に参加し、当初から臨床試験、治験に携わってきた。

しかし第 2 世代の Talaporfin sodium も、癌細胞のみならず正常細胞にも光感受性物質が少なからず集積するため、光線照射を受けた正常組織への障害発生も見られる。更なる低侵襲性を高めるため癌細胞集積性の高い光感受性物質の開発が望まれている。

### 2) 糖鎖連結光感受性物質の開発と研究結果

癌細胞は嫌氣的解糖系を利用してエネルギーを得るため正常細胞に比較し多くのグルコースを取り込むことが知られている。Warburg 効果として知られるこの性質は PET-CT に応用され高感度の癌診断として非常に威力を発揮している。私たちは、この性質を利用して糖を光感受性物質のクロリンに連結したグルコース連結クロリン (G クロリン) を開発した。G クロリン PDT は Talaporfin に比べ約 50 倍の殺細胞効果を示した (Anticancer Res. 2011;31(3):763-9)。この抗腫瘍効果は活性酸素種による細胞障害のみではなく、Calreticulin、high-mobility group box 1 (HMGB1)などを介した抗腫瘍免疫 (細胞性免疫) が重要な役割を果たしていることも報告した (Tanaka M, Nishie H, 他. Oncotarget. 2016)

光感受性物質からの蛍光を感知することにより、微小癌の高感度診断を行う光線力学診断法 (Photodynamic Diagnosis, PDD) も臨床応用が始まっている。私たちは G クロリンの側鎖をオリゴ糖に置換することにより、水溶性を向上させ、さらに高い PDD としての機能をもつオリゴ糖連結クロリンの合成に成功し、PDT, PDD を一薬剤で可能な薬剤として臨床応用に向けて検討を継続している (Nishie H, 他. Oncotarget. 2016). (特許出願公開 2015-147758), (図 1)

### 3) 新規糖鎖連結光感受性物質の開発

IC<sub>50</sub>: 50% 癌細胞殺細胞濃度 (μM)

	Talaporfin	Gクロリンe6	効果比率(倍)
胃癌細胞株 MKN45	10,900	0.56	18,474
大腸癌細胞株 HT29	14,700	1.60	9,187
食道癌細胞株 OE21	15,800	0.46	34,347
食道癌細胞株 KYSE30	45,600	0.28	16,285

各群 n=8



表1. Gクロリンe6, Talaporfin PDT殺細胞効果の比較

図1. オリゴ糖連結クロリンによる腹膜播種モデルPDD

現在、クロリン e6 骨格に糖鎖を付加したグルコースクロリン e6 (G クロリン e6)の開発に至り、*in vitro* での殺細胞効果は Talaporfin の約 30,000 倍と驚異的な威力を確認している(表 1)

さらに、薬剤の安定化を目指し糖鎖の一部をアセチル基に置換したアセチル化クロリン (A クロリン)、分子を大きくし癌組織への Drug Delivery System 効果を目標に糖鎖連結クロリンにポリエチレングリコール (Peg)を施した Peg 化クロリン (P クロリン) も共同開発した。

## 2 . 研究の目的

光線力学療法 (PDT) は様々な領域で臨床応用されており、消化器領域では化学放射線療法後の遺残再発食道癌に対し、Talaporfin sodium (TS)を用いた PDT が保険収載されている。我々は以前から癌細胞が正常細胞より多くの糖を取り込む性質(Warburg 効果)を応用して糖を連結した PS の開発を行っており、代謝、抗腫瘍効果にすぐれた Gcholrin e6 を開発した。ただし代謝が非常に早く、十分な腫瘍集積を得られているとは考えにくい状況であった。そのため排泄を遅らせつつ腫瘍集積性の向上と低毒性を目指して、新たに Gcholrin e6 へアセチル基を結合させた AcN003HP を開発した。今回我々は AcN003HP を用いた光線力学療法の抗腫瘍効果などについて検討を行った。

## 3 . 研究の方法

1. 食道扁平上皮癌細胞株(OE21)、胃癌細胞株(MKN45)、大腸癌細胞株(HT29)に対し AcN003HP を投与後 660nm の LED 照射を行い、50%殺細胞濃度を TS と比較した。
2. MKN45 細胞株へ 1  $\mu$  mol/L AcN003HP 投与し、共焦点顕微鏡下を用いて薬剤の細胞内局在を観察した。
3. MKN45 細胞株へ 1  $\mu$  mol/L AcN003HP を投与後フローサイトメーターで蛍光を測定し、細胞内への薬剤の取り込みを比較した。
4. MKN45 細胞株へ 1  $\mu$  mol/L AcN003HP 及び Singlet Oxygen Sensor Green Reagent を投与後、660nm の LED 照射を行った後にプレートリーダーで蛍光を測定し、一重項酸素発生の比較検討を行った。
5. 同種移植腫瘍モデルを用いて 1.56  $\mu$  mol/kg の Gcholrin e6、AcN003HP を尾静脈注射で投与し、投与後 30 分毎にスペクトロメーターで蛍光の測定を行った。
6. 同種移植腫瘍モデルを用いて 1.56  $\mu$  mol/kg の TS、AcN003HP を尾静脈注射 90 分後に薬剤を投与しないコントロールを含め 664nm、100 J/cm<sup>2</sup> のレーザー照射を行い 3 群で PDT 効果を検証した。腫瘍を 3 日ごとに計測を行い、腫瘍量の評価を行った。

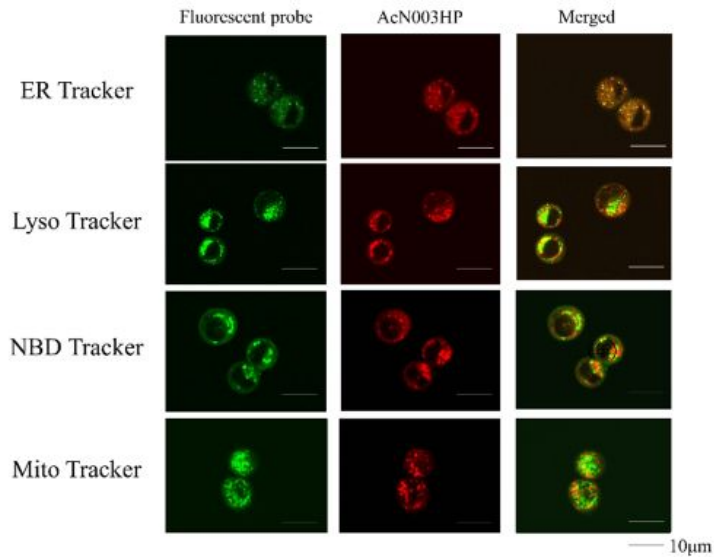
## 4 . 研究成果

1. AcN003HP は TS と比較して 12,500 ~ 38,000 倍と高い抗腫瘍効果を示した。

	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]			比
		Talaporfin (mM)	AcN003HP (mM)	
食道癌	OE21	15.8	0.00048	X 32,916
食道癌	KYSE30	4.56	0.00056	X 8,142
胃癌	MKN45	10.9	0.00088	X 12,386
大腸癌	HT29	14.7	0.00148	X 9,932

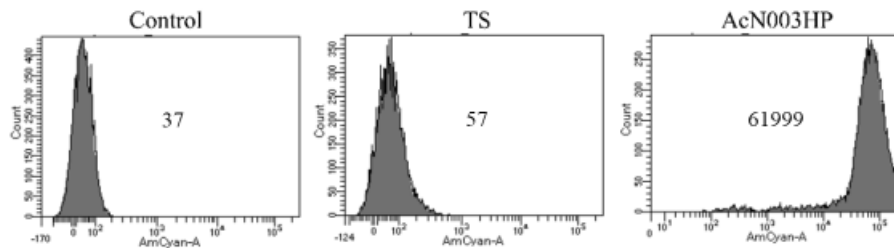
WST-8 cell proliferation assay (n=8)

2. AcN003HP は小胞体に取り込まれていた。

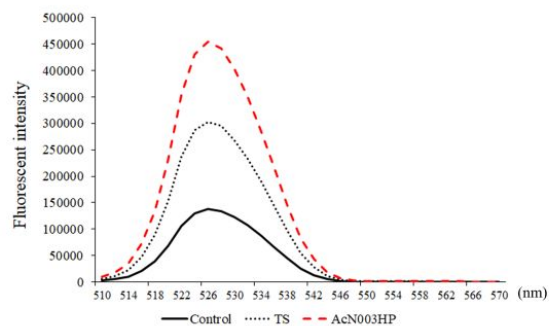


3. AcN003HP は TS と比較して細胞内への高い取り込みを認めた。

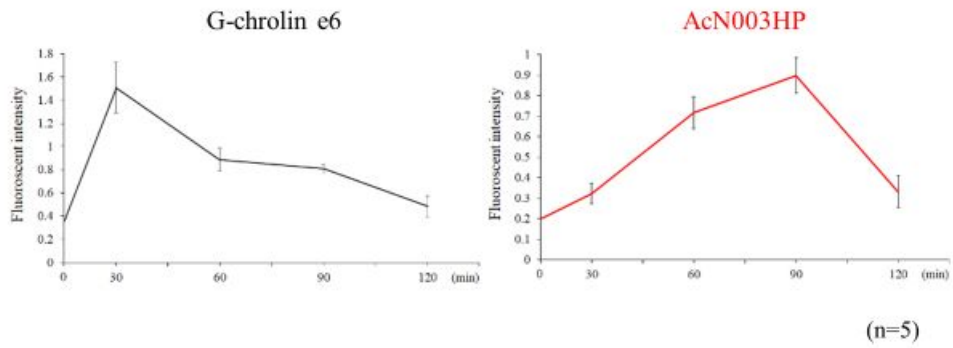
MKN45 cell, FACS CANTOII, Excitation: 405nm Emission: 680nm



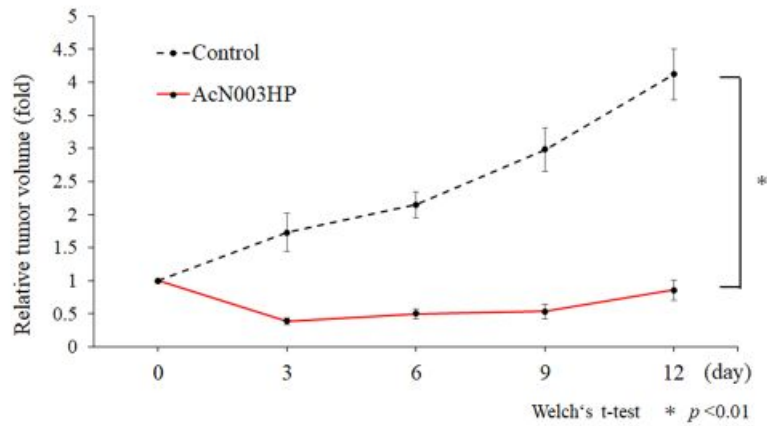
4. AcN003HP は TS よりも多くの一重項酸素を惹起した ( $p < 0.01$ )



5. 薬剤の腫瘍への取り込みのピークは Gcholrin e6 では 30 分 , AcN003HP では 90 分であった。



6. 皮下腫瘍モデルでは , TS 群は有害事象により全例死亡したが , AcN003 群ではコントロール群と比較して有意に腫瘍増大を抑制した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0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 Tanaka Mamoru, Sasaki Makiko, Suzuki Taketo, Nishie Hirotsada, Kataoka Hiromi	4. 巻 539
2. 論文標題 Combination of talaporfin photodynamic therapy and Poly (ADP-Ribose) polymerase (PARP) inhibitor in gastric cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.12.073	査読の有無 無
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 Kataoka Hiromi, Nishie Hirotsada, Tanaka Mamoru, Sasaki Makiko, Nomoto Akihiro, Osaki Tomohiro, Okamoto Yoshiharu, Yano Shigenobu	4. 巻 10
2. 論文標題 Potential of Photodynamic Therapy Based on Sugar-Conjugated Photosensitizers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 841~841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm10040841	査読の有無 無
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 Suzuki Taketo, Tanaka Mamoru, Sasaki Makiko, Ichikawa Hiroshi, Nishie Hirotsada, Kataoka Hiromi	4. 巻 12
2. 論文標題 Vascular Shutdown by Photodynamic Therapy Using Talaporfin Sodium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2369~2369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12092369	査読の有無 無
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8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西江裕忠、佐々木慎子、鈴木健人、市川 紘、田中 守、片岡洋望
2. 発表標題 食道癌に対する光線力学療法とアルゴンプラズマ焼灼療法の治療選択
3. 学会等名 第74回日本食道学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西江裕忠
2. 発表標題 当院におけるNon HP ・ non NSAIDs 胃潰瘍の現状
3. 学会等名 GI Week2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西江裕忠
2. 発表標題 糖連結光感受性物質を用いた新規光線力学的診断法（PDD）の検討
3. 学会等名 第15回日本消化管学会総会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市川紘、西江裕忠
2. 発表標題 アセチル基を新たに結合させた糖連結光感受性物質を用いた光線力学療法の検討
3. 学会等名 第78回 癌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市川紘、西江裕忠
2. 発表標題 アセチル基を結合させた糖連結光感受性物質による光線力学療法の検討
3. 学会等名 第27回 日本消化器関連学会週間
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西江 裕忠
2. 発表標題 糖連結光感受性物質による癌細胞選択的次世代PDT, PDDの開発
3. 学会等名 第72回 日本食道学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西江 裕忠
2. 発表標題 糖連結光感受性物質を用いた新規光線力学的診断法(PDD)の検討
3. 学会等名 第15回日本消化管学会総会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mamoru Tanaka, Hirotada Nishie
2. 発表標題 EFFICACY OF PHOTODYNAMIC THERAPY WITH A NEW PHOTOSENSITIZER (TALAPORFIN SODIUM) AS A SALVAGE TREATMENT FOR LOCAL FAILURE AFTER DEFINITIVE CHEMORADIOTHERAPY FOR ESOPHAGEAL CANCER.
3. 学会等名 DDW 2018 ASGE (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------