

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09806

研究課題名(和文) 婦人科癌へのHPMA-ZnPPを用いた光線力学的治療の臨床応用に向けた検討

研究課題名(英文) Clinical application of photodynamic therapy using HPMA-ZnPP for gynecologic cancer

研究代表者

築詰 伸太郎 (Shintaro, Yanazume)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師

研究者番号：40623343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：亜鉛プロトポルフィリン(ZnPP)に、生体親和性高分子ポリマーであるHPMAを結合したHPMA-ZnPPの光線力学的治療(PDT)における効果を検討した。婦人科がん細胞(耐性再発卵巣癌細胞株、子宮肉腫、Hela)での皮下組織樹立モデルを作成しHPMA-ZnPPの効果及び細胞内の取り込みをZnPPと比較した。光源照射装置の光量や波長、照射範囲等の条件設定のちに、様々な光照射量や回数で検証した。HPMA-ZnPPの腫瘍細胞での抗腫瘍効果(In vitro評価)はMTT法及びin vivoの検討でZnPPに比べ高い抗腫瘍効果を認め光照射による腫瘍毒性増強作用を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HPMA-ZnPPは従来のPDTの抗がん効果を腫瘍特異的に大幅に増強し、従来の抗がん治療で難治性であった進行婦人科がん特に子宮頸癌への効果が期待できる。正常組織では認めないが癌病巣・癌細胞には顕著な効果を示すことから、周囲臓器への影響が少なく副作用が少なくこの試みは交叉耐性を有する進行例を含めた固形がん治療に貢献する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The effect of photodynamic therapy (PDT) on HPMA-ZnPP, which is a combination of zinc protoporphyrin (ZnPP) and the biocompatible polymer polymer hydroxypropyl methacrylamide (HPMA) in gynecologic malignancies were investigated. Tumor models including resistant recurrent ovarian cancer cell line, uterine sarcoma, Hela which has implanted in the nude mice dorsal skin were established. After setting conditions such as the amount of light, wavelength, and irradiation range of the light source irradiation device, the antitumor effect of HPMA-ZnPP on tumors is higher than that of ZnPP in vivo. The cytotoxicity effect of light irradiation was confirmed as the amount of irradiation doses increased.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：HPMA ZnPP EPR効果 PDT ドラッグデリバリーシステム ナノメディシン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌や子宮肉腫において局所再発がしばしば問題となり、有効な治療法が無いのが現状である。子宮頸癌は、年間約 10,900 例が罹患し近年、罹患率、死亡率ともに若年層で増加傾向である。さらに、前がん病変である上皮内癌は年間 2 万人が罹患する。上皮内癌では円錐切除術やレーザー治療が行われるが、麻酔などを行った上での観血的侵襲を伴う治療である。合併症としては出血や手技によっては流早期が増加する。一方で進行例では手術や放射線治療が行われるが、これらは神経因性膀胱、粘膜炎、消化器症状など QOL の低下を伴う場合が多い。局所再発した場合は、化学療法を行うが奏効率は 10-20% と満足できるものではない。これらに対する副作用の少ない新規の治療選択肢が望まれていた。光線力学的治療 (PDT) は、光感受性物質と光照射による、侵襲の少ない癌治療法であるが光線過敏症の副作用や抗がん活性の改善及び腫瘍選択的な投与が重要な課題であった。光増感剤として従来の光化学反応での活性酸素による抗がん作用の機序に加えて、ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) を阻害する亜鉛プロトポルフィリン (ZnPP) を高分化ミセル化剤である HPMA (ヒドロキシプロピルメタアクリルアミド) を結合させた HPMA-ZnPP は既存の PDT と高度なナノメディスン技術の組み合わせるといって全く新しい新規薬剤の開発になると考えた。実際に皮膚への分布が極めて低く、担癌マウスで皮膚障害は認めず共同研究者の Fang らが主に消化器癌である大腸がんや食道がんでの応用を研究していた。HPMA は、前田博士らが開発した生体親和性高分子ポリマーであり HPMA に ZnPP を導入することで 83 ± 42 の分子サイズを示しサイズ排除クロマトグラフィーに薬 200kDa の分子挙動が確認されていた。HPMA-ZnPP は血中滞留性が高く、腫瘍組織への集積性も高いことも確認されている。ZnPP は安価な薬剤であり、PDT の研究は歴史がありその安全性も検討されてきている。低価格で合成できる HPMA-ZnPP 複合体は医療経済的にも優れているだけでなく、新たな機器の導入も必要なく静注で容易に投与でき場所や特別な技術は必要なく臨床導入が可能な条件がそろっており婦人科がんでの治療効果の検討が望まれる。

2. 研究の目的

HPMA-ZnPP による婦人科がんへの実用性の検討を行う。HPMA-ZnPP は光増感剤として血中滞留性が高く、腫瘍組織への集積性も高いことが確認されている。子宮頸部上皮内腫瘍、現在有効な薬剤のない再発進行子宮頸癌、子宮肉腫や薬剤耐性卵巣癌に対する有用性を実験腫瘍を用いて検証すること

3. 研究の方法

- (1) HPMA-ZnPP が癌細胞膜のトランスポーター機能により高率に癌細胞内に取り込まれることを確認する。複数の耐性再発卵巣癌細胞株と、入手した子宮平滑筋肉腫などの樹立細胞株を用いる。ZnPP と比較するが、経時的に細胞内取り込みを蛍光顕微鏡または HPLC で細胞内薬物量を比較する。亢進が確認されたらトランスポーター阻害剤で細胞内取り込み促進が抑制されることを確認する。腫瘍細胞での抗腫瘍効果を明らかにする (In vitro 評価)。婦人科がん細胞 (耐性再発卵巣癌細胞株、子宮肉腫、Hela) の生存率を MTT 法で測定し HPMA-ZnPP 単独、並びに光照射による細胞毒性増強作用を検証する。
- (2) HPMA-ZnPP がマウス皮下移植腫瘍の治療実験で有効か確認する。
担癌マウスに対し尾静脈より投与し経時的に癌組織、正常組織および血漿を採取し、HPLC で薬物濃度を定量する。腫瘍組織の一部はホルマリン固定し、パラフィン切片を作成し

HPMA-ZnPPの腫瘍内分布、細胞内取り込みの経時的変化を共焦点顕微鏡(LSM700, 本学医学部共同機器室)にて検討する。続いて、皮下に担癌させたマウスにZnPP、HPMA-ZnPPを静注投与し、それぞれの抗腫瘍効果を腫瘍縮小率で、薬剤毒性をマウス体重と外観で経時的に評価する。

4. 研究成果

- (1) 入手したヒト子宮肉腫細胞株MES-SA、GPF細胞株 (MEA-SA C9) および転移能の高い (MEA-SA C9high) 上皮性卵巣細胞株A2780、シスプラチン耐性細胞株A2780 / cis、およびDOX耐性細胞株A2780 / ADRを細胞培養した。その培養器にHPMA-ZnPPを転嫁し経時的に細胞内への取り込み量をHPLCを用いてZnPPと比較した。内在化の時間依存的な増加が観察され蛍光顕微鏡を使用して視覚化した。光照射による細胞毒性増強効果についての検討を行った。光照射装置として特殊な光源照射装置が必要であり、複数の機材で試みる必要があり想定外の社会事情 (コロナ感染) で機材調達の遅延を見たが光量や波長、照射範囲等の条件を調整の上で検討した。HPMA-ZnPPの細胞内取り込みは、ZnPPの2~10分の1であった。これらの発見は、HPMA-ZnPPが効果を発揮するためにZnPPの放出が必要であることを示唆した。いずれの細胞株においてもHPMA-ZnPPはZnPPと同様に容量依存的な細胞毒性を示した。光照射により細胞毒性増強効果を認め照射時間依存的に治療効果は増加した。トランスポーター阻害剤によりこれらの薬剤の細胞内取り込みが抑制されていることを確認した。
- (2) In vitro実験同様にヒト子宮肉腫細胞株MES-SA、GPF細胞株 (MEA-SA C9) および転移能の高い (MEA-SA C9高) HeLa細胞株、上皮性卵巣細胞株A2780、シスプラチン耐性細胞株A2780 / cis、およびDOX耐性細胞株A2780 / ADRをヌードマウスに担癌させ径1cmの段階でHPMA-ZnPP及びZnPPを尾静脈から投与した。光照射(27 J/cm² (90 mW/cm²))投与後24h、48hにそれぞれ5分ずつ施行した。経時的に測定したが上皮性卵巣癌株、HeLa細胞株では、HPMA-ZnPPは腫瘍増殖を有意に抑制し、ZnPPの効果よりもはるかに優れていたが明らかな体重差は認めなかった。治療36日後のHPMA-ZnPP治療群の腫瘍重量は対照群 (p < 0.001) とZnPP治療群 (p < 0.001) の両方よりも有意に低かったが、ZnPP治療群では腫瘍重量の有意な減少は見られなかった。それ以外のヒト子宮肉腫細胞株、A2780/cis、A2780/ADRについても同様に腫瘍増殖を有意に抑制したが卵巣癌株やHeLa細胞株ほどの効果は認めなかった。また、明らかな体重減少は観察されなかった。

以上の様に、当初予想した通り ZnPP に比較し HPMA-ZnPP は難治性婦人科がんモデルである薬剤耐性再発卵巣癌株や子宮肉腫株も含め明らかな効果を示した。今回の実験においては薬剤耐性株の細胞培養とヌードマウス腫瘍モデル作成にも難渋した。また追記による結果の確認と至適光照射量や回数の検証などの未検証部分の追加実験中であるが、HPMA-ZnPP は従来の PDT の抗がん効果を腫瘍特異的に大幅に増強し、従来の抗がん治療で難治性であった進行婦人科がん特に臨床応用として子宮頸癌への効果が期待できると思われる。前田、Fang らの他癌腫による基礎研究によると HPMA-ZnPP 複合体は癌病巣に到達した後の薬剤の動きが画期的であり EPR 効果 (Enhanced Permeability and Retention effect) により腫瘍組織への移行性・集積性は正常組織の 10-30 倍高い。さらに癌で特異的に高発現する膜上の輸送系 (トランスポーター親和性) の活性が正常細胞の 10 倍程高いため高速かつ大量に癌細胞内に取り込まれる。腫瘍の微酸性環境下で活性本体の ZnPP の離脱が生じやすくなっており、推定 10~100 倍も自由拡散することが

知られている。正常組織では認めないが癌病巣・癌細胞には顕著な効果を示すことから、周囲臓器への影響が少なく副作用が少なくこの試みは交叉耐性を有する進行例を含めた固形がん治療に貢献する可能性がある。

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 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yanazume Shintaro, Fang Jun, Islam Rayhanul, Gao Shanghui, Kobayashi Hiroaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Effect of Tumor Targeted-Anthracycline Nanomedicine, HPMA Copolymer-Conjugated Pirarubicin (P-THP) against Gynecological Malignancies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine	6. 最初と最後の頁 814 ~ 814
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jpm12050814	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Jun Fang, Rayhanul Islam, Shanghui Gao, Cheng Zhang, Ryotaro Kunisaki, Shogo Sakaguchi, Naoya Honda, Jian-Rong Zhou, Kazumi Yokomizo	4. 巻 Dec; 11(12)
2. 論文標題 Expression Dynamics of Heme Oxygenase-1 in Tumor Cells and the Host Contributes to the Progression of Tumors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine	6. 最初と最後の頁 1340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jpm11121340	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Jun Fang, Hinata Nema, Rina Yanagibashi, Niho Yoneda, Natsumi Watanabe, Yuki Yasuda, Naoki Nuita, Jian-Rong Zhou, Kazumi Yokomizo	4. 巻 Oct 19;9(10)
2. 論文標題 Styrene Maleic Acid Copolymer-Based Micellar Formation of Temoporfin (SMA@ mTHPC) Behaves as A Nanoprobe for Tumor-Targeted Photodynamic Therapy with A Superior Safety	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines.	6. 最初と最後の頁 1493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines9101493.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shintaro Yanazume, Shintaro Yanazume, Jun Fang, Rayhanul Islam, Shanghui Gao and Hiroaki Kobayashi
2. 発表標題 Effect of tumor targeted anthracycline nanomedicine with HPMA copolymer-conjugated pirarubicin (P-THP) against gynecological malignancies
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2022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	方 軍 (Jun Fang) (20412736)	崇城大学・薬学部・准教授 (37401)	

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