

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592246

研究課題名(和文) ポルフィリン化合物の放射線増感効果を利用した骨肉腫治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new radiosensitizer for osteosarcoma

研究代表者

吉田 行弘 (YOSHIDA, Yukihiro)

日本大学・医学部・講師

研究者番号：20201022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：光増感剤2-(1-Hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheophorbide-a (HPPH)の誘導体の1つである化合物717が、各種骨肉腫細胞株に対し放射線増感効果を示したことから、その作用機序を解析する研究を進めたが、717が枯渇したため再度合成したところ放射線増感効果が確認できなくなった。合成は何回か繰り返したが効果のあるものは得られなかった。並行して、新規の化合物を設計・合成し効果を検討したところ、放射線増感効果は確認されなかったものの、通常の光増感剤より長波長の680nmの光に対する増感効果が確認できたため、新規の光増感剤として開発を続けている。

研究成果の概要(英文)：Since we found that compound 717, one of the derivatives of 2-(1-Hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheophorbide-a (HPPH) used in photo dynamic therapy, has a radiosensitizing effect on osteosarcoma cell lines, we sought to analyze the mechanism of this. However we have never confirmed this effect with newly synthesized 717. We have tried to synthesize 717 several times, but never obtained the one with radiosensitizing effect. In parallel, we designed new compounds and tested their radiosensitizing activity on tumor cells. Even though none of them did not work as radiosensitizer for tumor cells, we found that some compounds exhibit cytotoxicity upon visible light with λ_{max} 680nm, which is longer wavelength than those of existing compound used for PDT. Since wavelength 650-700 nm is suitable to treat tissues located deep beneath the skin, we have conducted further analysis of those new compounds.

研究分野：整形外科学

キーワード：骨肉腫 放射線増感剤 光増感剤

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は悪性骨腫瘍の中で最も発生頻度が高く、高率に肺転移をきたす予後不良の疾患である。放射線療法、既存の化学療法に対する感受性は低く、摘出術が唯一有効な治療であるが再発率は高い。骨肉腫に対する化学療法はこの20年間大きな進歩をみとらず、新規の有効な治療法の開発が強く切望されている。

光線力学療法(PDT: Photo-Dynamic Therapy)は、光増感剤を全身または局所投与後、癌組織に特定波長のレーザー光を照射し、光化学反応を引き起こし、癌細胞を死滅させる治療法である。化合物自体に細胞毒性はほとんどないが、レーザー光により励起され光化学反応を起こし、発生した活性酸素により細胞死を誘導する。

PDT はレーザー光を用いた治療であるため、正常部位への侵襲が少ないという利点を持つ反面、一般的に PDT で用いられている増感剤の吸収帯波長のレーザー光が深部に到達せず、表層部から遠い位置にある腫瘍には有効ではないという限界もある。

最近我々は、PDT 効果が確かめられている HPPH 誘導体である 531 および類似化合物 717、Gd-HPPH (図1)について、放射線増感作用の有無を検討し、717 に放射線増感効果があることを確認した。717 投与後に X 線照射を行った細胞株では、X 線のみ、もしくは化合物のみの群と比べて顕著に細胞死が誘導されることが、乳癌、膀胱癌、さらに骨肉腫細胞株一種で確認できた。

2. 研究の目的

I および Gd はいずれも X 線吸収性を示し、放射線造影剤に含有されるため、細胞に対して放射線増感作用を示す事が期待されたが、実際は 531 や Gd-HPPH には効果がなく、I や Gd の放射線吸収能とは関係しないメカニズムで HPPH 誘導体が放射線増感効果を発揮している可能性が考えられた。

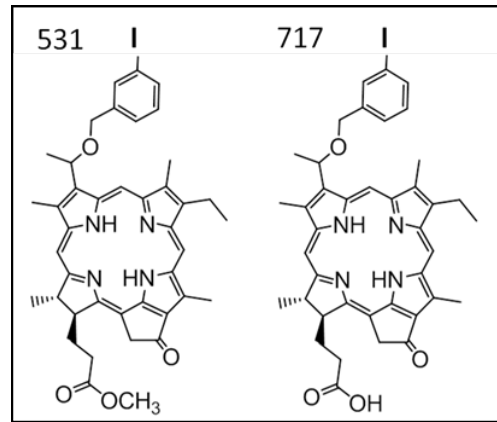


図1 HPPH 誘導体 531、717 の構造

HPPH-Gd は 531 の I を Gd に置換した構造である。

そこで我々は新規の骨肉腫治療法を開発を目指して、717 の放射線増感剤としての機能の汎用性を確認し、作用機序、最適条件を検討することを目的として研究を開始した。

しかしながら、途中から 717 の放射線増感効果が確認できなくなったため、これらの研究と並行して、新規の増感剤の合成を行い、その機能検証を行った。

3. 研究の方法

(1) 放射線増感効果の検討

細胞を 200 個/well の密度で 96 ウェルもしくは 6 ウェルプレートに播種し、24 時間後に化合物を添加した。さらにその 24 時間後に化合物なしの培地に置換した後、X 線を照射し、2 日目以降に細胞生存数の定量を行った。96 ウェルプレートにまいた細胞は照射後 1 日目、2 日目の生存率を MTT アッセイにより確認し、6 ウェルプレートにまいた細胞は 7 日から 10 日後に形成されたコロニーの個数を計測した。

化合物の濃度は 0.1 ~ 10 μ M の範囲とし、化合物のみでは細胞死を引き起こさない濃度で実験を行った。X 線照射は日立 MBR-1520R-3 を用いて行った。線量は 1 ~ 5Gy の範囲とし、波長は 33keV をピークとする X 線を照射した。

(2)光増感効果の検討

細胞の播種密度や濃度、化合物の投与スケジュールは(1)と同様であるが、X線照射の代わりに、特定の波長の光を $3\text{J}/\text{cm}^2$ の強さで照射した。化合物の吸光度は吸光度系で測定し、最大吸収を示す波長の光を細胞に照射した。

(3)化合物の細胞内局在の検討

化合物を取りこませた細胞をミトコンドリア染色試薬 Mito Tracker もしくはゴルジ体染色試薬 BODIPY FL(いずれもInvitrogen)にて染色し、共焦点レーザー顕微鏡(ライカ TCS-SP5)にて観察を行った。化合物自体の蛍光と、上記の染色試薬の蛍光の分布を重ね合わせ、化合物の細胞内での正確な局在を決定した。

4. 研究成果

(1) 717 による放射線増感効果

研究開始初期には、717 の放射線増感効果は調べた骨肉腫細胞株 4 種(MG63、HOS、G292、SAOS2) 全てに対して確認できた。いずれの細胞も 5Gy までの X 線照射では生存率にほとんど影響がないが、 $1\mu\text{M}$ の 717 投与後に 2Gy の X 線を照射したところ、ほぼ完全に細胞を死滅させた。しかしながら、研究途上で 717 を使い切り、新規に合成を行ったところ、放射線増感効果が確認できなくなった。何回か再合成を行ったが、活性のあるものは得られなかった。

(2) 新規化合物による放射線増感効果の検討

717 の再合成・解析と並行して、クロロフィル骨格を持つ新規の化合物 Chloro-X を複数種類合成し(図 2A)、放射線増感効果について検討を行ったが、放射線増感効果のあるものは得られなかった。しかしながら、これらの化合物は全て通常の光増感剤より長波長側の 680nm に吸収波長を持つことから、光増感剤として期待できたため光増感効果につい

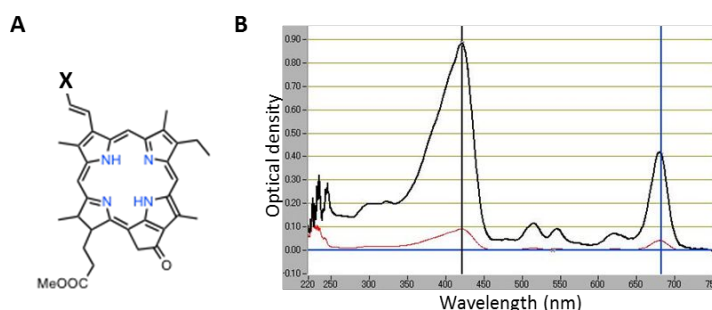


図 2 新規化合物 Chloro-X の構造(A) と吸光スペクトル (B)。化合物 A~D は側鎖 X がそれぞれ異なっている。

ても検討を行った。

(3) 新規化合物による、長波長の光に対する増感効果の検討

側鎖 X が異なる Chloro-A,B,C,D 4 種類の化合物は全て 405nm と 680nm に吸収波長のピークを持つが(図 2B)、いずれのものも 405nm の光照射では細胞死を誘導できなかった。一方、Chloro-A, B の 2 種類は光増感効果を示し、 $3\mu\text{M}$ 以上の濃度で細胞に投与した際に、 $3\text{J}/\text{cm}^2$ の光照射により、MG63 細胞を完全に死滅させた。光を照射しない場合は、細胞は殆ど死滅せず、少なくとも $10\mu\text{M}$ までは化合物自体の毒性は観察されなかった(図 3)。

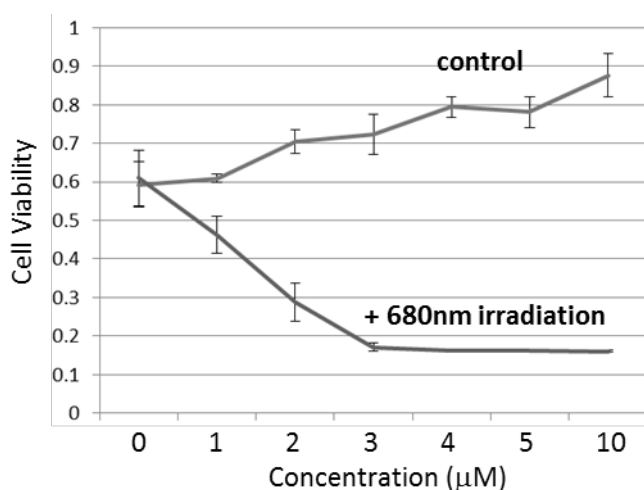


図 3 Chloro-A の光増感効果

(4) 化合物の細胞内局在

化合物 A,B,C,D いずれも、核ではなくミトコンドリアもしくはゴルジ体に局在し、光増感効果の有無は細胞内局在の違いでは説明

できなかった。

650~700nm の波長は、生体組織由来の物質に吸収されず、深部に到達できることから、光増感剤として非常に有望である。基本骨格が同じで、吸収波長や細胞内局在に違いが無いにもかかわらず、側鎖の種類によって増感効果が異なる原因は不明であるが、これを解明することで、光増感剤の作用機序が明らかになると思われるため、今後もこの点について研究を進めていく。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Ishibashi N, Fujiwara K, Pandey R, Kataba M, Oguni A, Igarashi J, Soma M, Shizukuishi T, Maebayashi T, Abe K, Abe O, Takahashi M, Tanaka Y. AN IODINE LABELED PORPHYRIN AS A NEW RADIATION SENSITIZER IN HUMAN BLADDER CANCER CELLS IN VITRO AND IN VIVO, COMBINING PHOTODYNAMIC THERAPY (PDT) WITH PHOTON ACTIVATION THERAPY (PAT). 日大医学雑誌 2013, 72(4):212-219 (査読有)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉田 行弘 (YOSHIDA, Yukihiro)

日本大学・医学部・講師

研究者番号: 20201022

(2)研究分担者

藤原 恭子 (FUJIWARA, Kyoko)

日本大学・医学部・助教

研究者番号: 40595708

(3)連携研究者

永瀬 浩喜 (NAGASE, Hiroki)

千葉県がんセンター・研究局・研究所長

研究者番号: 90322073