

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462120

研究課題名(和文)糖鎖連結クロリンを用いた新しい光線力学的療法による胆管癌の次世代局所治療法の開発

研究課題名(英文)Development of Local Treatment for Bile Duct Carcinoma by PDT Applying the New Glucose-Conjugated Chlorin

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：光線力学的療法は、切除不能胆管癌に対する補助療法として効果が期待できる。一方で光線過敏症などの副作用もあり腫瘍特異性・抗腫瘍効果が高く、副作用の少ない光感受性物質の開発が望まれる。新規光感受性物質と期待される糖鎖連結クロリンを用いた胆道癌に対する光線力学的療法について、現在使用されているTalaporphin sodium(レザフィリン)と比較・検討した。細胞を用いた実験では殺細胞効果・アポトーシス誘導効果が高いことがわかり、動物実験においては増殖抑制効果が高いことがわかり、糖鎖連結クロリンが新規光感受性物質として期待できる結果を得た。

研究成果の概要(英文)：The effect of Photodynamic therapy can be expected as an adjunct therapy for unresectable cholangiocellular carcinoma. On the other hand, there are side effects such as ray hypersensitivity. Accordingly, the development of a new photosensitizer of high anti-cancer effects and high tumor specificity is expected. We compared the effects of photodynamic therapy for bile duct carcinoma using glucose-conjugated chlorine(G-PDT), which is expected as a new photosensitizer and talaporfin sodium(L-PDT), which is a photosensitizer that is currently used. In experiments with cells, apoptotic induction rate in the G-PDT showed more increased rate in comparison with that in the L-PDT. Cytocidal effect in the G-PDT was higher than in the L-PDT. In animal experiments, A treatment of the new G-PDT showed the high inhibition of tumor growth in the treatment of bile duct carcinoma cells.

研究分野：消化器外科

キーワード：光線力学的療法 糖鎖連結クロリン 胆管癌

1. 研究開始当初の背景

PDT は腫瘍内に特異的に集積する光感受性物質をレーザー光で励起し、活性酸素や血管障害効果により細胞を破壊する腫瘍特異的レーザー治療である。我々は胆管癌臨床例の局所治療において PDT の安全性と有効性を証明してきた⁽¹⁾。平成 21~23 年度の科学研究費助成事業基盤研究において、光増感剤 Talaporfin Na (レザフィリン) を用いた光線力学的治療 (PDT) が、Porfimer Na を用いた PDT¹ に比べて、胆管癌のマウス皮下移植モデルで腫瘍壊死効果、細胞増殖抑制とアポトーシス誘導率増加、新生血管阻害効果がより高く認められることを明らかにし⁽²⁾、さらに PDT と抗癌剤併用による増強効果を報告した⁽³⁾。現在、Talaporfin Na を用いた PDT による胆管癌の新たな臨床治療を 6 例に開始し、従来の PDT よりも高い安全性と局所制御力を確認しているが、基礎的・臨床的にも未だ十分な腫瘍制御に至っていない⁽⁴⁾。胆管癌・膵癌の広範な癌進展を完全に制御するにはさらなる有効性の高い光増感剤を用いた PDT の開発が必要である。

近年、矢野らによって開発され⁽⁵⁾、糖を機能発現素子としてより癌腫に高率に取り込まれやすく合成された PDT 用の糖鎖連結クロリン (H₂TFPC-SGlc) 光増感剤を用いて、Talaporfin Na-PDT の 50 倍高い殺細胞効果が Tanaka らの胃癌モデルで報告された⁽⁶⁾。高い癌腫での蓄積能から明瞭な腫瘍局在蛍光診断が可能で、増感剤の代謝も早く光線過敏症が軽減し、Talaporfin Na-PDT に代わる次代の胆膵癌における有望な局所治療法と考えられる。糖鎖連結クロリン - PDT を胆膵癌において抗癌剤や放射線治療に並ぶ、第 3 の新しく強力な化学局所療法として開発し、臨床治療に展開し応用することを目的に、糖鎖連結クロリン-PDT による胆管癌と膵癌細胞株とその動物皮下移植モデルにおける腫瘍制御効果と正常組織の安全性、抗癌剤併用効果および腫瘍の蛍光局在診断を主要課題とした基礎研究を行う。

2. 研究の目的

従来の光感受性物質に代わって近年本邦で開発され癌細胞選択性が格段に向上した糖鎖連結クロリンによる新しい光線力学的治療 (photodynamic therapy; PDT) を用いて、胆道癌細胞 (NOZ 細胞) における従来に勝る治療有効性と生体の安全性を明らかにし、胆管癌における新規糖鎖連結クロリン - PDT を用いた次世代の局所化学療法として臨床開発に展開する為の基礎研究基盤を確立する。



3. 研究の方法

使用細胞と細胞培養

胆道癌細胞株 (NOZ, JCRB1033) を DMEM (10%FBS, グルタミン酸 (0.6mg/ml), ペニシリン含有) を用いて 37 °C で培養 (5%CO₂)。

光感受性物質

糖鎖連結クロリンは岡山理科大学自然科学研究所 赤司らにより合成。対象薬剤として Talaporfin Na (レザフィリン[®], Meiji Seika ファルマ株式会社) を使用。

光源

植物研究用パワーLED フラットライト (LEDRB-660DL, オプトコード株式会社) を使用。

In vitro

(1) 細胞生存率

NOZ 細胞に対する PDT 療法の有効性を MTS assay を用いて生存率で以下の項目を比較検討した。

試薬: CellTiter96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (プロメガ株式会社)

吸光度測定器: model NJ-2000 (Nihon Inter Med)

検出波長: 490nm

糖鎖連結クロリンの細胞毒性

PDT の至適条件の設定

設定条件での糖鎖連結クロリンを用いた PDT (G-PDT) と Talaporfin Na (L-PDT) を用いた PDT の IC₅₀ の検討

(2) 細胞死の検出

IC₅₀ での濃度の糖鎖連結クロリン (2.02 μg/ml (1.16 μM)), Talaporfin Na (4.14 μg/ml (5.17 μM)) を用いて PDT (5J/cm²) を施行し、The Apoptotic/Necrotic/Healthy Cells Detection kit (PK-CA707-30018 / D25517, タカラバイオ株式会社) を用いて FITC-Annexin V, Ethidium Homodimer III, Hoechst 33342 で染色し観察。

蛍光染色

蛍光顕微鏡を用いて観察

フローサイトメトリー

BD FACS Canto II (07B1X00003000102, BD バイオサイエンス) を用いて、FITC と propidium iodide の蛍光を検出。

In vivo

(1) 皮下移植マウスでの検討

ヌードマウス (BALB/cANcrj nu/nu, Charles River Inc) の背部に NOZ 細胞 (1 × 10⁶ 個) を皮下移植。腫瘍 volume が 100mm³ になったところで経静脈的に Talaporfin Na、糖鎖連結クロリンを 6.25 μmol/kg 投与し 4 時間後に PDT を施行 (光エネルギー: 37.5J/cm²)。PDT 前、PDT 後 1 日目、3 日目、5 日目、7 日目

に腫瘍 volume (mm³) を測定し細胞増殖率を control (non PDT) 群と G-PDT 群と L-PDT 群と比較した。

マウスの麻酔はケタミン (90mg/kg) とキシラジン (10mg/kg) を腹腔内投与し使用。

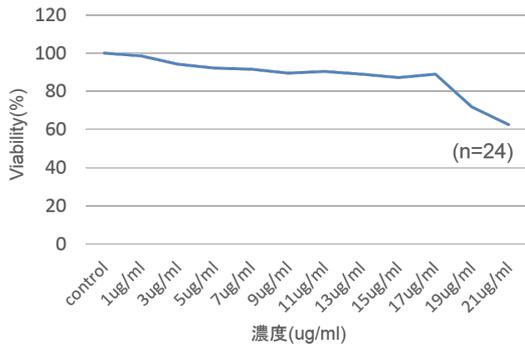
4. 研究成果

In vitro

糖鎖連結クロリンの薬剤毒性

NOZ細胞を 96well プレートで培養しそれぞれの濃度の糖鎖連結クロリンを投与し、24 時間後に MTS assay 施行。

17 μg/ml 以上の濃度において細胞毒性が生じてくる。

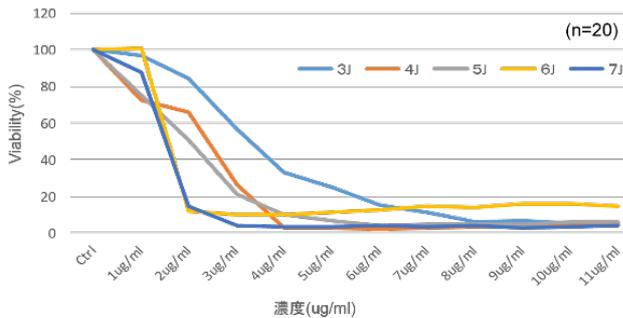


PDT の至適条件の設定

NOZ細胞を 96well プレートで培養し糖鎖連結クロリンを 1~17 μg/ml の濃度に加え、光エネルギーを変えて MTS assay にて生存率を測定。

糖鎖連結クロリンでの PDT は濃度依存で殺細胞効果を認める。

光エネルギーの至適条件を 5J/cm² に設定。



光エネルギー 5J/cm² での糖鎖連結クロリンと Talaporfon Na を用いた PDT での IC50 を比較検討

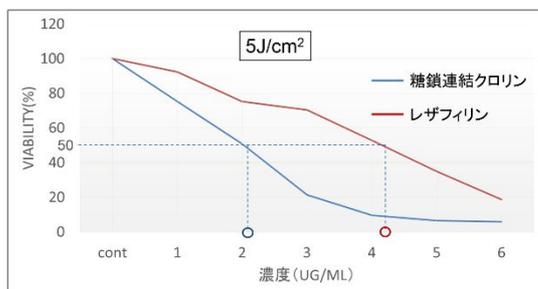
IC50 は以下の式より算出

$$IC50 = 10(\text{LOG}(A/B) \times (50-C) / (D-C) + \text{LOG}(B))$$

A: 50% を挟む高い濃度

B: 50% を挟む低い濃度 C: B での阻害率

D: A での阻害率



Group	Tumor volume [mm ³]					Increased rate of tumor volume (%)				
	day0	day1	day3	day5	day7	day0	day3	day5	day7	
non-PDT	0.112	0.136	0.216	0.368	0.51	0	42.9	92.9	228.5	355.4
G-PDT	0.28	0.184	0.49	0.88	1.06	0	37.1	75	214.3	278.4
L-PDT	0.08	0.1	0.144	0.21	0.41	0	25	80	167	225
Mean	0.024	0.032	0.05	0.072	0.09	0	33.3	150	200	275
Mean	0.123 ± 0.112	0.168 ± 0.153	0.228 ± 0.187	0.383 ± 0.354	0.538 ± 0.804	0	34.6 ± 7.5	99.5 ± 34.5	201.2 ± 28.6	333.5 ± 71.4
SD	0.08	0.075	0.101	0.12	0.17	0	4.25	26.3	50	112.5
G-PDT	0.06	0.105	0.113	0.134	0.14	0	75	88.3	123.3	123.3
L-PDT	0.06	0.12	0.11	0.138	0.138	0	100	50	130	130
Mean	0.21	0.21	0.32	0.342	0.398	0	52.4	62.9	89.5	89.5
SD	0.245	0.245	0.31	0.345	0.346	0	0	0	0	8.6
G-PDT	0.016	0.008	0.008	0.075	0.12	0	31.3	108.1	233.3	233.3
L-PDT	0.168	0.28	0.27	0.315	0.365	0	66.7	60.7	87.5	117.3
Mean	0.15	0.48	0.58	0.576	0.620	0	37.1	50.9	64.6	72
Mean	0.15 ± 0.112	0.198 ± 0.141	0.223 ± 0.160	0.298 ± 0.171	0.267 ± 0.172	0	38.2 ± 39.5	45.2 ± 26.0*	78.3 ± 43.2*	108.7 ± 67.4**
SD	0.096	0.323	0.153	0.186	0.253	0	28.1	59.4	93.8	163.5
G-PDT	0.84	1.02	1.428	1.784	2.436	0	30	70	112.4	150
L-PDT	0.084	0.124	0.1608	0.186	0.239	0	47.6	74.8	123.4	184.5
Mean	0.048	0.072	0.088	0.096	0.129	0	50	83.3	100	108.8
SD	0.406	0.51	0.651	0.702	0.952	0	25.6	60.3	72.9	134.5
G-PDT	0.4	0.42	0.586	0.711	0.899	0	75	46.5	77.8	124.8
L-PDT	0.075	0.093	0.122	0.136	0.175	0	24	62.7	80	133.3
Mean	0.253	0.366	0.389	0.401	0.512	0	44.3	53.8	58.5	149.8
SD	0.272 ± 0.270	0.369 ± 0.344	0.482 ± 0.454	0.572 ± 0.561	0.725 ± 0.769	0	32.2 ± 14.4	63.9 ± 11.8	86.6 ± 21.2*	156.2 ± 24.4**

*: p<0.01 vs. control group by the Scheffe's multiple comparison test

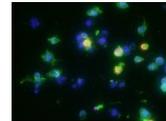
** p=0.015 vs. L-PDT group

G-PDT での IC50 は 2.02 μg/ml (1.16 μM)、L-PDT での IC50 は 4.14 μg/ml (5.17 μM) であり、糖鎖連結クロリンの方がより少ない濃度での PDT が可能であり、それにより光線過敏症などの副作用の軽減が見込まれる。

(2) 細胞死の検出

蛍光染色

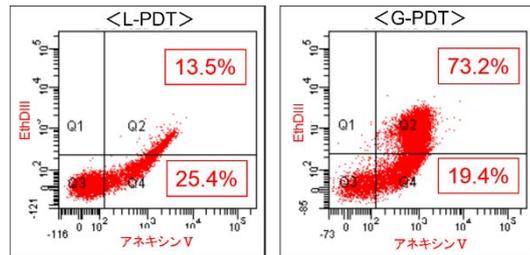
多数のアポトーシス誘導細胞を確認。



フローサイトメトリー

プロット図を Q1、Q2 (後期アポトーシス)、Q3 (非アポトーシス、生細胞)、Q4 (早期アポトーシス) の領域に分け、Q2+Q4 の細胞数 / 総細胞数 × 100 (%) をアポトーシス誘導率として測定し比較。

G-PDT では 92.6% であり、L-PDT では 38.9% であり、糖鎖連結クロリン PDT の方がアポトーシス誘導効果は高いことがわかった。



In vivo

腫瘍量で比較すると、Control 群に比べて G-PDT 群、L-PDT 群の方が明らかに増殖は抑制されていた。増殖率で見ると、

day3,5,7 では明らかに control 群より G-PDT、L-PDT 群の方が抑制されていた (p<0.01)。また、day7 をみても、明らかに L-PDT より G-PDT の方が増殖率は低く抑えられていた (p<0.05)。

糖鎖連結クロリンによる光線力学的療法は、殺細胞効果、アポトーシス誘導効果、腫瘍増殖抑制効果が高いことがわかり、次世代の光感受性物質として期待できる。

<引用文献>

1. Nanashima et al. J. Gastroenterology 39:1095-101, 2004.
2. Nonaka et al. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 18:592-600, 2011
3. Nonaka et al. J Surg Research 2012 doi.org/10.1016/j.jss.2012.06.047
4. 七島ら. 胆道 25 巻 2 号; p220-7, 2011

5. Yano et al. J. Photochem. Photobiol., C, 12;42-67, 2011.
6. Tanaka et al. Anticancer Res, 31;763-769, 2011

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 4 件)

1. Isomoto, H., Nanashima, A. et. al. In vivo Fluorescence Navigation of Gastric and Upper Gastrointestinal Tumors by 5-Aminolevulinic Acid Mediated Photodynamic Diagnosis with a Laser-equipped Video Image Endoscope. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 12(2):201-208 , 2015 (査読有)
2. Nanashima, A., Isomoto, H. et. al. How to access photodynamic therapy for bile duct carcinoma. Ann Transl Med. 2(3): 2014, (査読有)
doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.03.04
3. 村上豪志、七島篤志ら 術後光線力学的療法. 臨床外科 70 巻 1 号, 2015, pp88-91. (査読有)
4. Murakami, G., Nanashima, A., et. al. Effects of photodynamic therapy using talaporfin sodium (Laserphyrin®) on wound healing in an animal model. Acta Medica Nagasakiensia 58(3) 2013, pp73-77, (査読有)
DOI: 10.11343/amn.58.73

[学会発表](計 8 件)

1. 村上豪志ら 胆管癌に対する光線力学療法の臨床と研究. JDDW2015, 2015.10.8. 東京都港区
2. 村上豪志ら 進行胆管癌における局所補助治療としての光線力学的療法. 第 70 回消化器外科学会総会, 2015.7.17 静岡県浜松市
3. 七島篤志:胆道癌における光線力学的療法 (photodynamic therapy ; PDT) のこれまでの取り組みと展望. 第 25 回日本光線力学学会学術講演会, 2015.07.10-11. 東京都港区
4. 村上豪志ら:胆管癌に対する糖鎖連結クロリンを用いた光線力学療法の有効性の検討 JDDW 2014, 2014.10.24. 兵庫県神戸市
5. 村上豪志ら 胆管癌に対する糖鎖連結クロリンを用いた光線力学療法の基礎研究、第 50 回日本胆道学会学術集会. 2014.9.26. 東京都港区
6. 七島篤志:進行胆管癌における局所補助治療としての第二世代光線力学的療法-基礎的研究成果と臨床試験への展開、第 69 回日本消化器外科学会総会, 2014.7.17. 福島県郡山市
7. Nanashima, A.:How to access photodynamic therapy for bile duct carcinoma. 第 24 回光線力学学会, 2014.6.28. 静岡県浜松市

8. 村上豪志ら 胆管癌に対する糖鎖連結クロリンを用いた光線力学療法の基礎研究. 第 24 回光線力学学会, 2014.6.28. 静岡県浜松市

[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:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/surgery>

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

旭吉 雅秀 (HIYOSHI Masahide)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号: 60381117

矢野 公一 (YANO Koichi)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号: 30627344

阿保 貴章 (ABO Takahumi)
長崎大学・病院 (医学系)・助教
研究者番号: 70404267

永安 武 (NAGAYASU Takeshi)
長崎大学・医歯薬総合研究科 (医学系)・教授
研究者番号: 80284686

磯本 一 (ISOMOTO Hajime)
長崎大学・病院 (医学系)・准教授
研究者番号: 90322304

(3)連携研究者