

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460947

研究課題名(和文) 癌間質の腫瘍会合性マクロファージを標的とした糖連結光機能分子による光治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel photodynamic therapy with sugar-conjugated chlorin targeting tumor-associated macrophages in cancer stroma.

研究代表者

片岡 洋望 (KATAOKA, Hiromi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40381785

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)：癌間質に存在し癌の増殖や転移を促進しているTumor associated macrophage (TAM) (その表面にマンノース受容体を発現している)を標的としたマンノース連結クロリンによるPDTは、TAMのみでなく癌細胞にも強い殺細胞効果を示した。マウス移植腫瘍においてはグルコース連結クロリンPDTよりも強力な抗腫瘍効果を示した。また臨床応用を目指し、水溶性を向上させたオリゴ糖連結クロリンは、優れたPDT効果とともにPDD効果も発揮し、癌の高感度診断への応用が期待された。

研究成果の概要(英文)：Photodynamic therapy (PDT) using mannose-conjugated chlorin (M-chlorin) designed to target tumor-associated macrophages (TAMs) in cancer stroma (which express high level of mannose receptors) showed very strong cytotoxicity against not only TAMs but also cancer cells. We also synthesized oligosaccharide-conjugated chlorin (O-chlorin) with improved water-solubility. O-chlorin showed very excellent photodynamic diagnosis effects as well as PDT effects.

研究分野：消化器内科学

キーワード：光線力学的療法 光線力学的診断法 PDT PDD 光感受性物質 LED LASER

## 1. 研究開始当初の背景

光線力学療法 (Photodynamic Therapy: PDT)とは、ポルフィリン類などの腫瘍親和性光感受性物質が癌細胞に特異的に集積する特性を利用し、光感受性物質の集積した癌組織に特定波長の光線を照射し、活性酸素の惹起で癌細胞のみを選択的に破壊する治療法である。正常組織へのダメージが少なく副作用の頻度も低いと、超高齢化社会を迎えるわが国において低侵襲癌治療法として次世代 PDT 開発が期待されている。一方、PDT とは異なる波長の光線 (一般により短波長で低エネルギーな光線) 照射により励起される蛍光を感じ、癌の高感度診断に応用するのが光線力学診断法 (Photodynamic Diagnosis: PDD)で、消化管超早期癌の内視鏡的診断や脳外科手術における脳腫瘍の存在診断等の分野で臨床応用研究が始まっている。

わが国ではフォトフリン® (第1世代) とレザフィリン® (第2世代) の2種の光感受性物質による PDT が保険適用になっている。食道癌、胃癌、子宮頸癌、肺癌がフォトフリン® PDT において、レザフィリン® では肺癌、脳腫瘍、化学放射線療法後再発食道癌が保険適用になっている。レザフィリン® PDT は治療後の暗所滞在の短縮や、レーザー機器の高性能化、コストダウンなどの点で第1世代 PDT に比べかなりの進化がみられるが、問題点として腫瘍集積性、抗腫瘍効果の弱さがあげられる。

究極の生体適合性分子である「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) PDT は、癌細胞への優れた選択性、特異性を可能にした癌細胞標的感光医薬で、我々は、G クロリン PDT がレザフィリン® PDT に比べ 20 ~ 50 倍の抗腫瘍効果を有することを報告してきた。

癌組織間質に存在する腫瘍会合性マクロファージ (Tumor associated macrophage: TAM) は、癌細胞の増殖、浸潤、転移、腫瘍血管新生の促進、腫瘍免疫抑制、さらには癌幹細胞の維持に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。TAM 表面のマノース受容体に注目し、これまでの糖鎖工学技術を応用し、今回マノース連結クロリン (M クロリン) の合成に成功した。さらに我々は臨床応用を目指し、糖鎖連結クロリンの水溶性を向上させた薬剤につき合成の検討をおこなった。

## 2. 研究の目的

- (1) M クロリンの PDT 効果の検討。
- (2) 臨床応用を目指した水溶性を向上させたオリゴ糖クロリン (O クロリン) の PDD, PDT 効果の検討。

## 3. 研究の方法

- (1) M クロリン PDT 効果の検討

各種癌細胞への M クロリンの細胞内取り込み後の細胞内局在の検討、PDT 効果の検討  
THP1 単球細胞株の M2 マクロファージ様細胞誘導と M クロリンの取り込み効果の検討、PDT 効果の検討

移植腫瘍モデルにおける M クロリン PDT の抗腫瘍効果の検討

移植腫瘍モデルにおける M クロリン PDT による腫瘍間質内 TAM の免疫組織学的検討

- (2) O クロリン PDD, PDT 効果の検討

O クロリンの水溶性の検討

各種癌細胞への O クロリンの取り込みの検討、PDD, PDT 効果の検討

移植腫瘍モデルにおける O クロリン PDD 効果の検討 (5-ALA との比較)

移植腫瘍モデルにおける O クロリン PDT の抗腫瘍効果の検討

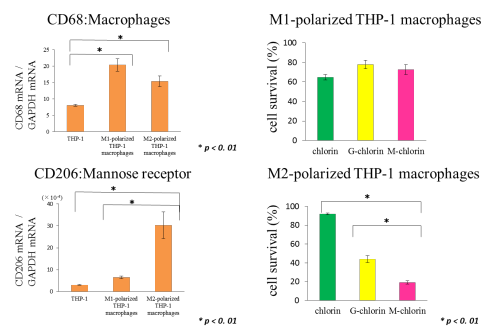
## 4. 研究成果

- (1)

癌細胞に対する M クロリンの PDT 効果は G クロリンとほぼ同等で、クロリン単体に比し約 10 - 40 倍の殺細胞効果を示した。共焦点でレーザー顕微鏡での検討では、M クロリンは小胞体、リソソームに、G クロリンはミトコンドリアに集積する傾向を示した。

THP-1 より分化誘導された M1, M2 マクロファージは THP-1 より CD68 を多く発現し、M1 マクロファージは TNFα を多く、M2 マクロファージはマンノースレセプター (CD206) を分化前よりも多く発現しており、刺激によって分化誘導されたことを確認した。M1 マクロファージに対する PDT 効果はクロリン、G クロリン、M クロリンとも同等の殺細胞効果であったが、M2 マクロファージ (TAM) に対しては、M クロリン PDT がクロリン、G クロリンと比べて有意な殺細胞効果を示した。

M-クロリンは、M2-polarized Macrophages に対して有意強力な殺細胞効果を示した

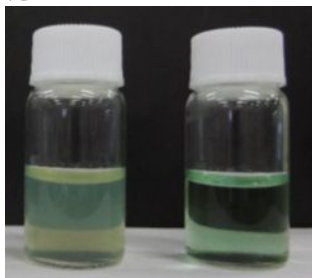


Allograft model に対する M クロリン PDT は、コントロール、クロリン、G クロリンに比し強力な腫瘍縮小効果を示した (P<0.05)。免疫組織化学の検討では、M クロリンはコ

ントロール, クロリン, G クロリンに比べて腫瘍組織間質の TAM の浸潤を有意に抑制した ( $P < 0.001$ )

(2)

O クロリンはこれまでのグルコース連結クロリン, マンノース連結クロリンと異なり, Talaporfin とほぼ同様の優れた水溶性を示した.

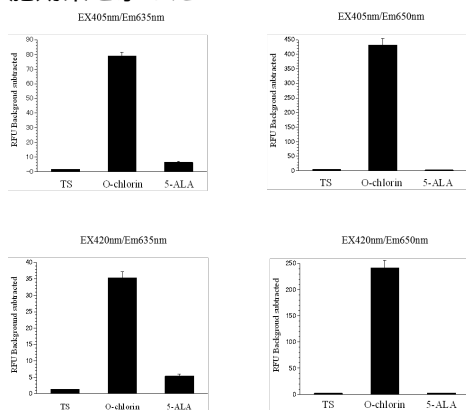


左: グルコース連結クロリン (溶解度 ~ 8 $\mu$ g/ml)

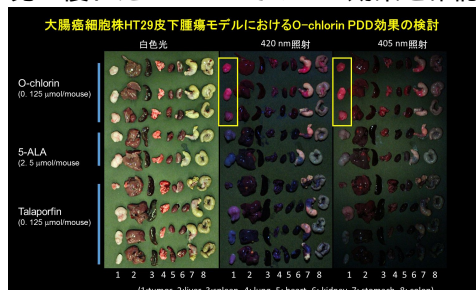
右: オリゴ糖連結クロリン (溶解度 > 37mg/ml)

\* Talaporfin は 25mg/ml で臨床使用

O クロリンを取り込んだ癌細胞に 405nm-420nm の紫色光線を照射すると赤色蛍光を発生し, 5ALA に比べ 7-23 倍の優れた PDD 効果を示した. In vitro での食道癌, 胃癌, 大腸癌細胞に対する PDT 効果も強力に Talaporfin の 9.1 倍から 52.7 倍の PDT 殺細胞効果を示した.



移植腫瘍モデルでは他の常臓器には PDD の蛍光は認めず, 腫瘍細胞のみに PDD 効果による赤色蛍光を確認した. 5ALA, Talaporfin に比べ優れた in vivo での PDD 効果を確認した.



MKN45 の xenograft モデルでの検討では Talaporfin よりも有意に強力な PDT 効果を示した.

## 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 7 件)

Kato A, Kataoka H, Yano S, Hayashi K, Hayashi N, Tanaka M, Naitoh I, Ban T, Miyabe K, Kondo H, Yoshida M, Fujita Y, Hori Y, Natsume M, Murakami T, Narumi A, Nomoto A, Naiki-Ito A, Takahashi S, Joh T. Maltotriose conjugation to a chlorin derivative enhances the antitumor effects of photodynamic therapy in peritoneal dissemination of pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther.* 2017 Mar 14. pii:molcanther.0670.2016. (査読有り) doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0670.

Nishie H, Kataoka H, Yano S, Kikuchi JI, Hayashi N, Narumi A, Nomoto A, Kubota E, Joh T. A next-generation bifunctional photosensitizer with improved water-solubility for photodynamic therapy and diagnosis. *Oncotarget.* 2016 Nov 8; 7(45): 74259-74268. doi:10.18632/oncotarget.12366. (査読有り)

Murakami G, Nanashima A, Nonaka T, Tominaga T, Wakata K, Akashi H, Okazaki S, Kataoka H, Nagayasu T. Photodynamic Therapy Using Novel Glucose-conjugated Chlorin Increases Apoptosis of Cholangiocellular Carcinoma in Comparison with Talaporfin Sodium. *Anticancer Res.* 36(9): 4493-501, 2016. (査読有り)

Tanaka M, Kataoka H, Yano S, Sawada T, Akashi H, Inoue M, Suzuki S, Inagaki Y, Hayashi N, Nishie H, Shimura T, Mizoshita T, Mori Y, Kubota E, Tanida S, Takahashi S, Joh T.

Immunogenic cell death due to a new photodynamic therapy (PDT) with glycoconjugated chlorin (G-chlorin). *Oncotarget.* 2016 Jul 26;7(30):47242-47251. doi: 10.18632/oncotarget.9725. (査読有り)

Narumi A, Tsuji T, Shinohara K, Yamazaki H, Kikuchi M, Kawaguchi S, Mae T, Ikeda A, Sakai Y, Kataoka H, Inoue M, Nomoto A, Kikuchi J, Yano S. Maltotriose-conjugation to a fluorinated chlorin derivative generating a PDT photosensitizer with improved water-solubility. *Org Biomol Chem.*

2016 Apr 14;14(14):3608-13. doi: 10.1039/c6ob00276e. (査読有り)  
Hayashi N, Kataoka H, Yano S, Tanaka M, Moriwaki K, Akashi H, Suzuki S, Mori Y, Kubota E, Tanida S, Takahashi S, Joh T. A novel photodynamic therapy targeting cancer cells and tumor-associated macrophages. *Mol Cancer Ther*. 2015 Feb;14(2):452-60. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0348. (査読有り)

Tanaka M, Kataoka H, Yano S, Ohi H, Moriwaki K, Akashi H, Taguchi T, Hayashi N, Hamano S, Mori Y, Kubota E, Tanida S, Joh T. Antitumor effects in gastrointestinal stromal tumors using photodynamic therapy with a novel glucose-conjugated chlorin. *Mol Cancer Ther*. 2014 Apr;13(4):767-75. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0393. (査読有り)

#### 〔学会発表〕(計 17 件)

片岡洋望, 中村哲也, 城 卓志. 内 W17-3 ワークショップ 17. 上部消化管の advanced diagnostic endoscopy. 新規光感受性物質を用いた上部消化管癌に対する photodynamic diagnosis の検討. JDDW2016(消化器内視鏡学会・消化器がん検診学会). 2016 年 11 月 5 日, ポートピアホテル南館大輪田 A (兵庫県, 神戸市).  
西江裕忠, 片岡洋望, 林 則之, 市川 紘, 林 香月, 久保田英嗣, 鳴海 敦, 野元明宏, 矢野重信, 城 卓志. 00-1: 総会賞選奨セッション. オリゴ糖連結光感受性物質を用いた次世代光線力学療法の検討. 第 37 回日本レーザー医学会総会. 2016 年 10 月 21 日, 旭川グランドホテル(北海道, 旭川市).

加藤晃久, 片岡洋望, 矢野重信, 吉田道弘, 林 香月, 高橋 智, 城 卓志. J-1057 膵癌腹膜播種に対するオリゴ糖連結クロリンを用いた新規光線力学療法. 第 75 回日本癌学会学術総会. 2016 年 10 月 6 日, パシフィコ横浜(神奈川県, 横浜市).

西江裕忠, 片岡洋望, 林 則之, 稲垣佑祐, 野村智史, 片野敬仁, 尾関啓司, 志村貴也, 溝下 勤, 森 義徳, 久保田英嗣, 谷田諭史, 城 卓志. 0-033 オリゴ糖連結光感受性物質を用いた次世代光線力学療法の検討. 第 102 回日本消化器病学会総会. 平成 28 年 4 月 21 日, 京王プラザホテル(東京都, 新宿区).

片岡洋望, 田中 守, 林 則之, 矢野重信, 城 卓志. シンボジウム ヘム関連分子の医薬への新しいチャレンジ. 糖鎖連結光感受性物質による次世代 Photodynamic therapy (PDT) の開発. 日本薬学会第 136 年会 2016 年 3 月 27 日, パシフィコ横浜(神奈川県, 横浜市).

片岡洋望, 林 則之, 田中 守, 西江裕忠, 稲垣祐祐, 片野敬仁, 尾関啓司, 溝下 勤, 森 義徳, 久保田英嗣, 谷田 諭史, 城 卓志. 028-1 臨床応用を目指した糖鎖連結光感受性物質を用いた次世代光線力学療法の開発. 第 12 回日本消化管学会総会学術集会. 2016 年 2 月 27 日, 京王プラザホテル(東京都, 新宿区).

Hiromi Kataoka. #1630 Cancer cell selective photodynamic therapy using glucose- and oligosaccharide-conjugated chlorins. *Asian Pacific Digestive Week 2015, Dec. 4 (3-6), 2015, Taipei International Convention Center (TICC), Taipei (Taiwan)*.

林 則之, 片岡洋望, 矢野重信, 久保田英嗣, 城 卓志. 01-3 消化器癌の微小環境. 腫瘍会合性マクロファージ(TAM)を標的とした糖鎖連結光感受性物質を用いた新規光線力学療法 (Photodynamic therapy: PDT) の検討. 第 26 回日本消化器癌発生学会総会. 平成 27 年 11 月 19 日. 米子全日空ホテル(鳥取県, 米子市).

片岡洋望, 林 則之, 久保田英嗣, 城 卓志. WS82 胃 7 胃がんのバイオマーカー探索(2) WS82-4 糖鎖連結光感受性物質による癌細胞・腫瘍会合性マクロファージ標的の新規光線力学療法. 第 53 回日本癌治療学会学術集会. 平成 27 年 10 月 29 日-31 日(30 日). グランドプリンスホテル 京都(京都府, 京都市).

林 則之, 片岡洋望, 林 香月, 矢野重信, 城 卓志. S2-2 主題演題 II 消化器領域における光を用いた診断と治療. 消化管癌の高感度診断を目指した新規光感受性物質を用いた光線力学診断法の開発. 第 36 回日本レーザー医学会総会. 2015 年 10 月 24 日(24-25 日), 栃木県総合文化センター(栃木県, 宇都宮市).

H. Kataoka, N. Hayashi, E. Kubota, M. Tanaka, S. Yano, Y. Sakai, T. Joh. P. 139 Early Drug Development. Cancer cell specific and selective photodynamic therapy using newly developed glucose- and oligosaccharide-conjugated chlorins. *European Cancer Congress 2015 (ECC 2015) (18<sup>th</sup> ECCO-40<sup>th</sup> ESMO), September 25-29, 2015, Vienna, Austria, (September 27), The Messe Wien*

Exhibition & Congress Centre, Vienna (Austria).  
N. Hayashi, H. Kataoka, E. Kubota, S. Yano, Y. Sakai, T. Joh. P173  
Gastrointestinal Malignancies - Noncolorectal Cancer. New photodynamic therapy targeting tumor-associated macrophages and cancer cells. European Cancer Congress 2015 (ECC 2015) (18<sup>th</sup> ECCO-40<sup>th</sup> ESMO), September 25-29, 2015, Vienna, Austria, (September 28), The Messe Wien Exhibition & Congress Centre, Vienna (Austria).  
片岡洋望, 林 則之, 矢野重信, 城 卓志. シンポジウム 1 (PDD/PDT の精度向上に向けて) S-1-4 糖鎖連結光感受性薬剤による PDT の開発. 第 25 回日本光線力学学会学術講演会. 2015 年 7 月 11 日 (10 日 11 日), 京王プラザホテル (東京都, 新宿区).  
林 則之, 片岡洋望, 矢野重信, 城 卓志. 一般口演 (基礎 2: 新規光感受性物質) 0-9 腫瘍会合性マクロファージ (TAM) に対する新規糖鎖連結クロリンを用いた光線力学的治療法 (Photodynamic Therapy; PDT) の検討. 第 25 回日本光線力学学会学術講演会 2015 年 7 月 10 日 (10 日 11 日), 京王プラザホテル (東京都, 新宿区).  
林 則之, 片岡洋望, 城 卓志. W02-03 ワークショップ 2 臨床応用に向けた次世代消化器内視鏡とその周辺機器開発の現況. 消化管癌の高感度診断を目指した光線力学的診断法の開発. 第 89 回日本消化器内視鏡学会総会, 2015 年 5 月 31 日 (29-31 日), 名古屋国際会議場 (愛知県, 名古屋市).  
田中 守, 片岡洋望, 溝下 勤, 森 義徳, 久保田英嗣, 矢野重信, 城 卓志. RS-1 (平成 25 年度研究奨励賞 発表セッション) 新規光感受性物質である糖鎖連結クロリンによる抗腫瘍免疫増強メカニズムの検討. 第 25 回日本消化器癌発生学会総会. 2014 年 11 月 14 日, ホテル日航福岡 (福岡県, 福岡市).  
田中 守, 片岡洋望, 林 則之, 海老正秀, 溝下 勤, 森 義徳, 久保田英嗣, 城 卓志. (P-15-5 新規腫瘍診断法) P-2369 糖鎖連結クロリンを用いた新規光線力学的がん診断法. 第 73 回日本癌学会学術総会. 2014 年 9 月 26 日 (会期 9/25-9/27), パシフィコ横浜 (神奈川, 横浜市).

#### (1) 研究代表者

片岡 洋望 (KATAOKA, Hiromi)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号: 40381785

#### (2) 研究分担者

矢野 重信 (YANO, Shigenobu)  
奈良先端大学・物質創成科学研究科・教授  
研究者番号: 60011186

鈴木 周五 (SUZUKI, Shugo)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員  
研究者番号: 60363933

#### (3) 連携研究者

中村 哲也 (NAKAMURA, Testuya)  
獨協医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 90348029

田中 守 (TANAKA, Mamoru)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・臨床研究医  
研究者番号: 80617861