

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790717

研究課題名(和文)糖鎖連結クロリンによる新規光線力学的療法の腫瘍免疫増強メカニズムの解明と臨床応用

研究課題名(英文) Immunogenic death of cells treated with new photodynamic therapy (PDT) with glucose-conjugated chlorin (G-chlorin)

研究代表者

田中 守 (TANAKA, MAMORU)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・臨床研究医

研究者番号：80617861

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：光線力学的療法(PDT)は、光感受性物質が選択的に集積した腫瘍組織にレーザー光を照射し腫瘍細胞を選択的に破壊する治療法である。我々は、癌細胞が糖を取り込む性質を利用し、糖をクロリンに連結することにより、飛躍的な腫瘍選択性と殺細胞効果を達成した。さらに糖鎖連結クロリンによるPDTは、強力な抗腫瘍免疫を誘導することを見出したが、その詳細なメカニズムは不明である。本研究では、糖鎖連結クロリンの標的腫瘍細胞内の動態、腫瘍免疫増強効果のメカニズムの解明を行う事により、宿主に対しては極めて低侵襲でかつ強力な殺腫瘍細胞効果を有する次世代PDTの臨床への応用を目指した。

研究成果の概要(英文)：Both the pre-apoptotic exposure to calreticulin (CRT) and the post-apoptotic release of high-mobility group box 1 protein (HMGB1) are required for immunogenic cell death. Photodynamic therapy (PDT) uses non-toxic photosensitizers and visible light at a specific wavelength in combination with oxygen to produce cytotoxic reactive oxygen species that kill malignant cells by apoptosis and/or necrosis, shut down the tumor microvasculature, and stimulate the host immune system. We have previously shown that glucose-conjugated chlorin (G-chlorin) had superior cancer cell selectivity, and it effectively suppressed the growth of xenograft tumors. In this study, we evaluated the immunogenicity of PDT with G-chlorin treatment in colon cancer cells.

研究分野：消化器内科

キーワード：PDT Calreticulin HMGB1 腫瘍免疫増強効果

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えるわが国において低侵襲な癌治療法の開発が望まれるが、この観点から注目を集めているのが光線力学的療法(Photodynamic Therapy, PDT)である。PDTとは、腫瘍親和性光感受性物質が癌組織や腫瘍血管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、一重項酸素などの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。抗癌剤耐性を示す癌幹細胞にも有効な新たな治療戦略として PDT は注目され、消化管粘膜に限局した癌のみならず肺癌、癌性腹膜炎、肝癌などへの応用も始まり、とくに肝癌に対しては米国で第 III 相臨床試験が進行中である。

腫瘍細胞が高率に糖を細胞内に取り込む事象は Warburg 効果として知られ PET 検査に応用されている。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糖鎖連結クロリンは、腫瘍細胞への高選択的な取り込みを可能にした世界初の癌細胞標的感光医薬である。これまでの我々の実験で現在実臨床で使用されているレザフィリン®に比べ約 50 倍の殺細胞効果をもち、ヒト大腸癌細胞のヌードマウス皮下移植モデルで、皮下に存在する腫瘍に対する単回照射にもかかわらず、周囲組織へのダメージをほとんど伴わずに強力な腫瘍縮小効果を確認した (Tanaka M., et al. *Anticancer Res.* 2011;31(3):763-9)。

2. 研究の目的

近年、腫瘍細胞、抗原提示細胞の免疫原性亢進、特異的細胞障害性 T 細胞(CTL)免疫誘導が殺腫瘍効果に結び付くという成果が注目されている。PDT においても、直接的な殺細胞効果のみではなく、腫瘍免疫増強効果が誘導されることが報告されているがそのメカニズムは不明である。

Calreticulin(CRT)は、粗面小胞体に局在する分子シャペロンで、CRT 融合蛋白は抗原蛋白とともに粗面小胞体へ移動し抗原ペプチドと MHC 分子との結合を促進するばかりでなく、抗原を細胞外に分泌させ抗原提示細胞のいわゆる cross-priming を経て、その抗原提示能を高めることが報告されている。また、High-Mobility Group Box-1 (HMGB1)は、自然免疫において重要な受容体である Toll-like receptor 4 (TLR4)に結合し活性化することが知られている。

我々のヌードマウスの実験では腫瘍の縮小は認めたが消失しなかったのに対し、共同実験施設の正常免疫マウスの肺癌細胞移植実験では、完全に腫瘍が消失した。この結果より、糖鎖連結クロリンによる PDT が強い腫瘍免疫増強を持つこと、この腫瘍免疫増強効果において CRT と HMGB1 が重要な役割を果たしていることが予想された。本研究において、糖鎖連結クロリンを用いた新規光線

力学的療法の抗腫瘍効果の基礎的解析を、腫瘍免疫増強効果を中心に解明を目指した。

3. 研究の方法

(1)マウス大腸癌細胞株である CT26 を用いて、細胞に取り込まれた糖鎖連結クロリンの細胞内での局在を *in vitro* で観察し、ミトコンドリア・ゴルジ体・小胞体・ライソソームの細胞内小器官のどこに蓄積し、殺細胞効果を最終的に発揮するのか、癌細胞種による糖鎖連結クロリンの細胞内局在と殺細胞効果との関連性につき検討した。細胞内小器官は、各々 LysoTracker Green, Mito Tracker Green FM, NBD C8-ceramide, ER-Tracker Green, でラベルし、共焦点レーザー顕微鏡下に細胞内局在を観察した。

(2) 光線力学的療法では一般に光感受性物質が特定波長光線により励起され、細胞内に細胞死を誘導するとされている。糖鎖連結クロリン、レザフィリン®を投与後、660nm の赤色半導体レーザーを 16 J/cm² 照射し、reactive oxygen species (ROS) detection reagent (carboxy-H₂ DCFDA), Caspase-3 FITC, PI でラベルし FACS Calibur にて活性酸素の誘導、アポトーシス、ネクローシスを検討した。

(3) 正常免疫マウス (BALB/c), ヌードマウス (nu/nu BALB/c) 背部皮下に CT26 を移植し、皮下腫瘍移植モデルを作成し、移植皮下腫瘍が成長した時点で糖鎖連結クロリンを静脈投与 4 時間後に 660nm の赤色半導体レーザーを 40 J/cm² 照射し、腫瘍体積の経時的変化を測定し、免疫の有無により腫瘍縮小効果を比較した。

(4) 低濃度の糖鎖連結クロリンを投与後、660nm の赤色半導体レーザーを 16 J/cm² 照射し 24 時間後のアポトーシスを誘導した CT26 細胞を免疫原として正常免疫マウスに皮下投与し(左側腹部)、癌抗原による CTL を介した細胞性免疫誘導を惹起させ、その 7 日後に未処理の CT26 細胞を反対側の右側腹部に移植した。その後約 30 日間にわたり Tumor-free mice (%)を検討することにより、腫瘍免疫増強効果を測定した。

(5) 糖鎖連結クロリンによる PDT 処理した細胞の CRT と HMGB1 を、各々の抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、その発現を蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。

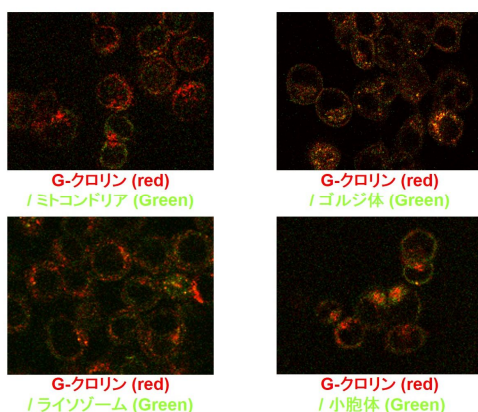
(6) CRT small interfering RNA (siRNA CRT), HMGB1 small interfering RNA (siRNA HMGB1)により、CRT もしくは HMGB1 を knockdown した CT26 の細胞株

を作成した。それらの細胞株に PDT 処理を行い免疫原とし、腫瘍免疫増強効果を評価した。

4. 研究成果

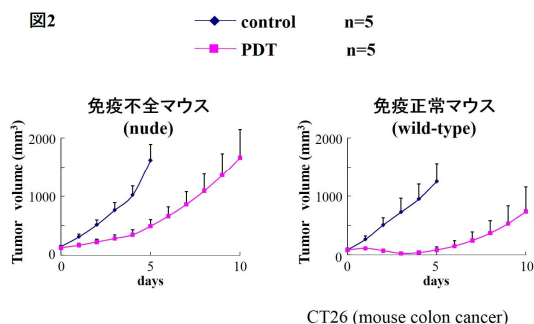
(1) 細胞内小器官局在マーカーと共焦点レーザー顕微鏡により糖鎖連結クロリンの細胞内局在を確認したところ、ミトコンドリア・ゴルジ体・小胞体・ライソソームのすべてに局在を示したがゴルジ体にもっとも強い局在を示した。(図1)

図1



(2) 細胞内への取り込みは、投与後経時的に上昇した。糖鎖連結クロリンはレザフィリンに比べ有意に高い細胞内への取り込みを認めた。また、アポトーシス・活性酸素の誘導に関しても糖鎖連結クロリンはレザフィリンに比べ有意に高い誘導能があることを確認した。これより糖鎖連結クロリンによる PDT が活性酸素を発生させアポトーシスを誘導させることを確認した。

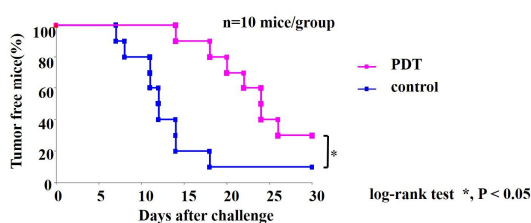
(3) 免疫不全マウスに比べ、正常免疫マウスにおいてより強い腫瘍縮小効果をもとめた。(図2) これより糖鎖連結クロリンによる PDT と免疫の関与が示唆された。



(4) 未処理の CT26 細胞を投与した群に比べ、PDT 処理をした細胞を投与した群において高い Tumor-free mice (%) を認め (図3)、腫瘍免疫増強効果を確認した。

(5) 糖鎖連結クロリンによる PDT 処理した細胞より CRT と HMGB1 の発現を共焦点レーザー顕微鏡下で確認した。

図3



(6) siRNA CRT, siRNA HMGB1 により、CRT もしくは HMGB1 を knockdown することにより腫瘍免疫増強効果の消失を確認した。

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2件)

A novel photodynamic therapy targeting cancer cells and tumor-associated macrophages.

Hayashi N, Kataoka H, Yano S, Tanaka M, Moriwaki K, Akashi H, Suzuki S, Mori Y, Kubota E, Tanida S, Takahashi S, Joh T.

Mol Cancer Ther. 2015 Feb;14(2):452-60. (査読有) doi:10.1158/1535-7163.

Antitumor effects in gastrointestinal stromal tumors using photodynamic therapy with a novel glucose-conjugated chlorin.

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.

Mol Cancer Ther. 2014 Apr;13(4):767-75. (査読有) doi:10.1158/1535-7163.

[学会発表](計10件)

田中 守, 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13日, 福岡日航ホテル(福岡県・福岡市)

田中 守, 消化管癌に対する新規光療法における抗腫瘍免疫増強メカニズムの検討
第100回日本消化器病学会総会

2014年5月14日, 東京国際会議場(東京都)

Mamoru Tanaka, Novel photodynamic therapy with glucose conjugated chlorine for GIST

The 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International
2014年3月23日, 京都国際会議場(京都府京都市)

Mamoru Tanaka, Immunogenic death of

cells treated with new photodynamic therapy (PDT) with glucose conjugated chlorin (G-chlorin)

12th International Congress On Targeted Anticancer Therapies 2014 (TAT 2014)

2014年3月5日,ワシントンDC(アメリカ)

Mamoru Tanaka, ANTITUMOR EFFECTS OF NOVEL PHOTODYNAMIC THERAPY WITH GLUCOSE CONJUGATED CHLORIN FOR GIST

21st United European Gastroenterology Week

2013年10月15日,ベルリン(ドイツ)

Mamoru Tanaka, 糖鎖連結クロリンによる新規光線力学的治療の腫瘍免疫増強効果
第72回日本癌学会学術総会

2013年10月4日,パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

田中 守, GIST に対する糖鎖結光感受性物質を用いた新規光線力学的治療効果の基礎的検討

第24回日本消化器癌発生学会

2013年9月5日,石川県立音楽堂(石川県・金沢市)

田中 守, 「消化管癌に対する次世代PDTの現状と展望」

第45回胃病態機能研究会

2013年8月3日,名古屋市立大学(愛知県・名古屋市)

田中 守, GIST に対するグルコース連結光感受性物質を用いた新規光線力学的治療の基礎的検討

JDDW 2012 Kobe

2012年10月11日,神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)

⑩ 田中 守, Antitumor effects of novel photodynamic therapy with glucose conjugated chlorine for GIST

第71回日本癌学会学術総会

2012年9月19日,ロイトン札幌(北海道・札幌市)

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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