

令和元年5月27日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19358

研究課題名(和文) 癌細胞と腫瘍会合性マクロファージを標的とした光線力学的療法の癌性腹膜炎への応用

研究課題名(英文) A novel photodynamic therapy targeting tumor-associated macrophages

研究代表者

林 則之 (Hayashi, Noriyuki)

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：60745404

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)：光線力学的療法(Photodynamic Therapy, 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。マンノース連結クロリン(Mクロリン)は、癌細胞のみならず癌間質のマクロファージ(TAM)の両者に殺細胞効果を発揮し、これまでで最強の抗腫瘍効果を示した。消化管癌の腹膜播種、癌性腹膜炎は標準的治療法がない難治性の病態である。MクロリンPDTを用いた腹膜播種の新たな治療法を検討し、PDTの抗腫瘍免疫誘導効果を含めたメカニズムを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MクロリンPDTが、現在治療困難な癌性腹膜炎の治療の有力な治療の候補の1つとなる。癌種を選ばないことがマンノース連結クロリンを用いたPDTの長所であるので、MクロリンPDTは消化管癌のみならず、婦人科や胆膵領域、泌尿器科など幅広い癌疾患の治療を可能にする。

研究成果の概要(英文)：Photodynamic therapy (PDT) is an attractive, minimally invasive modality for cancer treatment that utilizes the interaction of light and photosensitizer. To improve the efficacy of PDT, development of cancer specificity and selectivity of the photosensitizer is needed.

Macrophages migrating to tumor stroma are called tumor-associated macrophages (TAMs). TAMs play several pro-tumoral roles including tumor cell growth, angiogenesis, matrix remodeling, and metastases. TAMs are known to specifically express abundant levels of CD206, a mannose receptor. We evaluated the anticancer effects of targeting TAM via PDT with M-chlorin. The specific suppression of TAM in cancer stroma significantly suppressed tumor growth in allograft models. Such therapeutic targeting of TAMs as well as cancer cells may represent a new strategy for anticancer therapy.

研究分野：消化器内科

キーワード：光線力学療法

## 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。現在、本邦では第1世代のPorfimer sodiumが食道癌、胃癌、肺癌、子宮頸癌に、第2世代のTalaporfin sodium (TS)が肺癌、脳腫瘍、さらに本年食道癌にも保険適用となったが、癌細胞特異性、選択性は不十分で、より癌細胞集積性の高い光感受性物質の開発が望まれている。

Warburg効果からも知られるように、癌細胞はTCAサイクルではなく嫌氣的解糖系を主な代謝経路とすることから多くのグルコースを取り込むことが知られ、この現象はPET-CTに応用されている。生体適合性分子であるグルコース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)は、現在実臨床で使用されているレザフィリン®に比べ約50倍の殺細胞効果を示した(Anticancer Res. 2011;31(3):763-9)。また癌細胞のみならず、消化管間質から発生するGIST(Gastrointestinal stromal tumor)にも、高い細胞集積性を示し強力な殺細胞効果を引き起こすことを証明した(Mol Cancer Ther.2014;13(4):767-75)。

近年、癌間質に存在するマクロファージは腫瘍会合性マクロファージ(tumor-associated macrophage:TAM)と呼ばれており、癌細胞の増殖、浸潤、腫瘍血管新生、転移の促進、腫瘍免疫の抑制、癌幹細胞維持に関与することが報告され、癌治療における重要な標的の1つと認識されている。TAMにはマンノースレセプターが発現していることが知られており、我々はTAMをターゲットとして、マンノース連結クロリン(Mクロリン)を共同開発した。MクロリンPDTは癌細胞に対してはGクロリンと同等の殺細胞効果を示し、さらに腫瘍間質に存在するTAMにも選択的にGクロリンよりも有意に殺細胞効果を示し、今まで開発した光感受性物質の中で最強の抗腫瘍効果を示した(Hayashi.N, et al. Mol Cancer Ther. 2015 Feb;14(2):452-60、特許出願2013年8月2日)。

スキルス胃癌に代表される腹膜播種を伴う消化器癌は効果的な治療法が無く予後不良である。癌性腹膜炎の腹水中の細胞の約80%はTAMであることが知られ、癌の腹膜播種病態においてTAMが癌細胞と協調し、重要な役割を果たしていることが推測されている。以上の事象から、癌細胞とTAMの両者に効果を示すMクロリンPDTは非常に有効な新治療法になることが予測される。本PDTで用いる赤色レーザー光線は660nmと長波長光線であり、組織深部まで透過性が証明され、マウスモデルでは、腹部皮膚表面からの照射で十分、腹腔内の癌性腹膜炎病巣まで光線は到達し、効果を発揮する。

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(Castano AP, et al. Nat Rev Cancer. 2006 Jul;6(7):535-45)。

## 2. 研究の目的

光線力学的療法(Photodynamic Therapy, 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、単糖であるグルコースやマンノースを光感受性物質であるクロリンに連結することにより、飛躍的な殺細胞効果を確認した。マンノース連結クロリン(Mクロリン)は、癌細胞のみならず癌間質のマクロファージ(TAM)の両者に殺細胞効果を発揮し、これまで最強の抗腫瘍効果を示した。消化管癌の腹膜播種、癌性腹膜炎は標準的治療法がない難治性の病態である。腹水中細胞の約80%はマクロファージ(TAM)であることが知られている。MクロリンPDTを用いた腹膜播種の新たな治療法を検討し、PDTの抗腫瘍免疫誘導効果を含めたメカニズムを解明する

## 3. 研究の方法

### (1) マンノース連結クロリンの合成、精製

クロリン1分子に4個のマンノースを結合させ合成した。

### (2) マンノース連結クロリンの細胞内取り込みのメカニズム、細胞内局在の解析

ヒト大腸癌細胞株HT29、HCT116を用いる。癌細胞を96wellプレートに培養し、Mクロリンとレザフィリンを投与する。蛍光プレートリーダー(Spectra Max、Molecular Devices、Tokyo、Japan)を用いて薬剤の取り込みを計測した。

また、薬剤投与後にLED機器(LED-660DL、Optocode Corporation: 波長660nm 照射エネルギー30.8mW/cm<sup>2</sup>)の照射をし、数日後にWST8アッセイを用いて殺細胞効果を計測した。

次に、細胞内での局在をin vitroで観察し、lysosome、mitochondria、Golgi body、

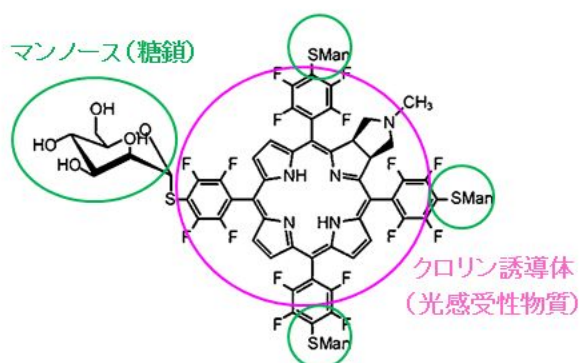
endoplasmic reticulum などの細胞内小器官のどこに蓄積し、殺細胞効果を最終的に発揮するのか、癌細胞種による M クロリンの細胞内局在と殺細胞効果との関連性につき検討した。細胞内小器官は、各々 LysoTracker Green、Mito Tracker Green FM、NBD C8-ceramide、ER-Tracker Green(Invitrogen, Tokyo, Japan)でラベルし、蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡(共焦点レーザー顕微鏡システム A1+, Nikon, Japan)下に細胞内局在を観察した。

### (3) マンノース連結クロリンによる PDT の癌性腹膜炎モデルへの効果の検討

ルシフェラーゼ遺伝子導入胃癌細胞 (MKN45-LUC) を腹腔内投与後、M クロリンを腹腔内投与する。ルシフェラーゼ基質である D-ルシフェリンカリウム(D-Luciferin Potassium Salt, Wako, Japan) を投与しルシフェラーゼの生物発光イメージングシステム (Multi-functional In vivo Imaging System, MOLECULAR DEVICES, JAPAN) でマウスを撮影した。コントロールと M クロリン投与した群と検出に違いがないか確認した。また M-クロリン投与後数時間から 24 時間後に、赤色または緑色レーザーを照射し、生存期間や体重の増減、腹水の有無等計測した。

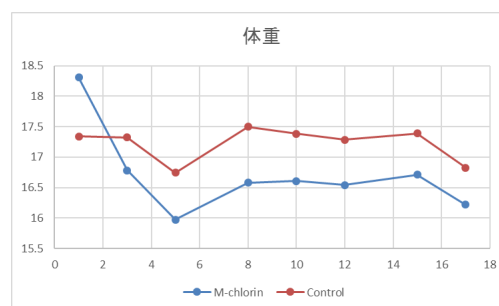
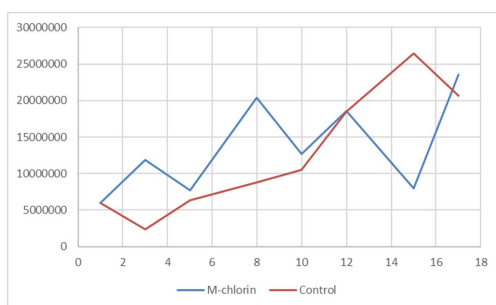
## 4 . 研究成果

(1) 右図に示すようにクロリン 1 分子に 4 個のマンノースを結合させ合成した。化学合成は共同研究施設である奈良先端大学院大学、大阪府立大学工学部で施行した。



(2) マンノース連結クロリンの殺細胞効果を測定した IC50 は 0.5 ~ 5  $\mu$ M と強い殺細胞効果を示した。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マンノース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。

(3) コントロールと M クロリン投与した群と検出に違いは認めなかった。(図左下) また M-クロリン投与後数時間から 24 時間後に、赤色または緑色レーザーを照射し、体重の減少、腹水の減量を確認した(図右下)。



## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

1. Kataoka H, Nishie H, **Hayashi N**, Tanaka M, Nomoto A, Yano S, Joh T. New photodynamic therapy with next-generation photosensitizers. Ann Transl Med. 8:183, 2017. 査読有
2. Shimura T, Ebi M, Yamada T, Yamada T, Katano T, Nojiri Y, Iwasaki H, Nomura S, **Hayashi N**, Mori Y, Kataoka H, Moses MA, Joh T. Urinary kallikrein 10 predicts the incurability of gastric cancer. Oncotarget. 17:29247-29257, 2017. 査読有

3. 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.* 6:1124-1132, 2017. 査読有
4. **Hayashi N**, Kataoka H, Yano S, Kikuchi JI, Tanaka M, Nishie H, Kinoshita Y, Hatano M, Nomoto A, Ogawa A, Inoue M, Mizoshita T, Shimura T, Mori Y, Kubota E, Tanida S, Joh T. Anticancer Effects of a New Aminosugar-conjugated Platinum Complex Agent Against Cisplatin-resistant Gastric Cancer. *Anticancer Res.* 11:6005-6009, 2016. 査読有

## 6 . 研究組織