

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17591682
 研究課題名（和文）
 精細胞由来腫瘍に対する新光線力学療法の開発
 研究課題名（英文） Effects of New Photodynamic Therapy to Testicular Tumor Cells

研究代表者
 鎌野 寛 (KAMANO HIROSHI)
 香川大学・保健管理センター・教授
 研究者番号：60284337

研究成果の概要：

新光線力学療法とは、新しい光感受性物質 13,17-bis(1-carboxypropionyl) carbamoyl ethyl-3,8-bis(1-decanyloxyethyl)-2,7,12,18 tetramethyl-porphyrinato gallium, 又は、誘導体を細胞に取り込ませ、可視光線照射を行い、細胞に変化を誘導する方法である。細胞に光感受性物質を添加し、翌日、光感受性物質を除去、可視光線を照射し、培養持続した。新しい光感受性物質の構造式の違いにより効果に差があることを見いだした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	900,000	0	900,000
2006年度	1,100,000	0	1,100,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,400,000	420,000	3,820,000

研究分野：臨床医学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器学

キーワード：newphotodynamictherapy, metalloporphyrin

1. 研究開始当初の背景

睾丸腫瘍は、取扱い規約により seminoma と non-seminoma に分類される。seminoma は最も未熟で全能性を持つ totipotential germ cell 由来の腫瘍である。組織学的には germ cell に似た大型円形の明るい細胞質で、核は核小体が目立つと言われている。

non-seminoma は多分化能性をもつ細胞から生じた腫瘍であり、embryonal carcinoma, yolk sac tumor, choriocarcinoma, teratoma 等に分類される。embryonal carcinoma は多分化能を持つ腫瘍であり、組織学的には塩基性で大きな細胞質と未分化で大型の核と核小体を持っている。yolk sac tumor は多分化

能を持つ腫瘍が胎児外成分の卵黄嚢様に分化したものであり、組織学的には未熟な内皮様細胞によって構成されている。免疫組織学的には alphafetoprotein (AFP) が陽性を示す。choriocarcinoma は多分化能を持つ腫瘍が胎児外成分である胎盤絨毛に分化したものであり、組織学的には、単核の合胞体性栄養細胞と濃染性の細胞質と多核の栄養膜細胞の2種類の腫瘍細胞により構成されている。teratoma は多分化能を持つ腫瘍が体細胞系列に分化し内胚葉、中胚葉、外胚葉を示すもので、組織学的には3型あり、高分化組織により構成される成熟型、未成熟な組織より構成される未熟型、teratoma 構成成分が悪性化した悪性型に分類される。その他、tumor of more than one histological type と呼ばれる2つ以上の組織型を持つものがある。tumor of more than one histological type は embryonal carcinoma と teratoma の組み合わせが最も多く teratocarcinoma と呼ばれている。

辜丸腫瘍の病期分類ではI期は転移を認めないもの。II期は横隔膜以下のリンパ節のみ転移を認めるもので、IIAは後腹膜転移巣の長径が5cm未満のもの。IIBは後腹膜転移巣の長径が5cm以上のものをいう。III期は遠隔転移があるもので、III0は腫瘍マーカーが陽性であるが、転移部位を確認し得ないもの。IIIAは縦隔または鎖骨上リンパ節(横隔膜以上)に転移を認めるが、その他の遠隔転移を認めないもの。IIIBは肺に遠隔転移を認めるもので、B1はいずれかの肺野で転移巣が4個以下でかつ長径が2cm未満のもの。B2はいずれかの肺野で転移巣が5個以上、または長径が2cm未満のもの。IIICは肺以外の臓器にも遠隔転移を認めるものである。

辜丸腫瘍の治療はまず、高位精巣摘除術を行い、組織型を決定する。病期分類I期の治

療は、高位精巣除去術を行い、経過観察を行うことで生存率はほぼ100%である。II期以上の治療は、高位精巣除去術の後、放射線療法、化学療法、後腹膜リンパ節郭清が行われる。seminoma IIA期の治療は放射線療法が行われ、5年生存率は約80%以上と比較的予後良好であり、再発したときもcisplatinによる化学療法により治癒可能である。seminoma IIB期の治療は化学療法が行われ治癒率は約80%と比較的良好である。non-seminoma IIA期の治療は化学療法の外、後腹膜リンパ節郭清を行う。non-seminoma IIB及びIIIC期の治療は化学療法を行う。初期の化学療法としてはvinblastine, etoposide, cisplatinによるBEP療法が行われ、CR率は約60%と、多剤併用の化学療法により向上している。しかしIIIC期等の進行期症例等においては未だ予後が悪い。したがって新光線力学療法などの新しい治療法の開発は臨床的に重要な意味を持つと考えられる。新光線力学療法とは、我々が新しく合成した光感受性物質を用いて腫瘍細胞に生物学的変化をもたらす方法である。新たに合成した光感受性物質 13, 17-bis(1-carboxypropionyl) carbamoyl ethyl-3, 8-bis(1-decanyloxyethyl)-2, 7, 12, 18 tetramethyl-porphyrinato gallium (III) やその誘導体は次のような過程を経て合成される。Protoporphyrin dimethyl ester を用い、酢酸存在下において臭化水素酸を反応させmonobromo protoporphyrinを合成する。これにethylene glycol処理を行い、加水分解後、mono ethylene glycol体である 12-ethenyl-7-[1-(2-hydroxyethoxy)-ethyl]-3, 8, 13, 17-tetramethyl-porphine-2, 18-dipropanoic acidを合成、精製しNMRのスペクトルによりporphyrinのmono ethylene glycol体であることを確認する。この 12-ethenyl-7-[1-(2-hydroxyethoxy)

-ethyl]-3, 8, 13, 17-tetramethyl-porphine-2, 18-dipropanoic acidをpyridine中でGaCl₃と加熱反応させ、13, 17-bis(1-carboxypropionyl) carbamoylethyl-3, 8-bis(1-decanyloxyethyl)-2, 7, 12, 18 tetramethyl-porphyrinato gallium (III)や7, 12-bis[1-(2-hydroxyethoxy)-ethyl]-3, 8, 13, 17-tetramethyl-porphine-2, 18-dipropanoic acid gallium(III)及び、12-diethenyl-3, 8, 13, 17-tetramethyl-porphine-2, 18-dipropanoic acid gallium(III)を合成する。これらを用いて13, 17-bis(1-carboxypropionyl) carbamoylethyl-3, 8-bis(1-decanyloxyethyl)-2, 7, 12, 18tetramethyl-porphyrinato gallium (III)及びその誘導体を合成する。

2. 研究の目的

我々は、新たに合成した光感受性物質、13, 17-bis(1-carboxypropionyl) carbamoylethyl-3, 8-bis(1-decanyloxyethyl)-2, 7, 12, 18 tetramethyl-porphyrinato gallium (III)または、その誘導体を細胞に取り込ませた後に、可視光線照射を行った。この方法は新光線力学療法と呼ばれる方法であり、細胞内で光線力学的反応を惹起させることにより細胞に変化を起こさせる方法である。われわれは、辜丸腫瘍細胞などの細胞を用いてフェノールレッド無添加、ウシ胎児血清 FCS 無添加培地に13, 17-bis(1-carboxypropionyl) carbamoylethyl-3, 8-bis(1-decanyloxyethyl)-2, 7, 12, 18-tetramethyl-porphyrinato gallium (III)またはその誘導体を添加した。各種細胞を一晩インキュベートした。翌日、細胞をリン酸緩衝液(PBS)にて洗浄し、光感受性物質を除去した。そして、フェノールレッド無添加、FCS10%添加 培地を細胞に添加した。細胞に可視光線を照射した後、培養継続させ、その細胞に生じる変化を分析し、

新たに合成した光感受性物質の効果について基礎的な解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

細胞： F9 細胞を用いた。F9 細胞は terato carcinoma 由来の細胞である。その他の細胞として TII1 細胞, K562 細胞を用いた。

光源：高輝度 LED (light - emitting diode) を 18×20 (計 360 個) の面状配列させたものを用いた。

新しい光感受性物質：4 個のpyrrole環をメチン橋により閉環したものをporphinと呼び、このporphinのNHから 2 個のH⁺が取れた平面 4 配位子と金属元素が錯体を形成したものを metalloporphyrinと呼ぶ。新しい光感受性物質はpyrrole環の窒素原子にGaイオンが錯体を形成したものである。そして側鎖にはアルキル基、及び、アスパラギン酸を結合させた。アルキル基はC₂H₅ (C2), C₄H₉ (C4), C₆H₁₅ (C6), C₈H₁₇ (C8), C₁₀H₂₁ (C10) を用いた。

C10:13, 17-bis(1-carboxypropionyl) carbamoylethyl-3, 8-bis(1-decanyloxyethyl)-2, 7, 12, 18-tetramethyl -porphyrinato gallium (III),

C8:13, 17-bis(1-carboxypropionyl) carbamoylethyl-3, 8-bis(1-octanyloxyethyl)-2, 7, 12, 18-tetramethyl -porphyrinato gallium (III),

C6:13, 17-bis(1-carboxypropionyl) carbamoylethyl-3, 8-bis(1-hexanyloxyethyl)-2, 7, 12, 18-tetramethyl -porphyrinato gallium (III),

C4:13, 17-bis(1-carboxypropionyl) carbamoylethyl-3, 8-bis(1-butanyloxyethyl)-2, 7, 12, 18-tetramethyl -porphyrinato gallium (III),

C2:13, 17-bis(1-carboxypropionyl) carbamoylethyl-3, 8-bis(1-ethanyloxyethyl)-2, 7, 12, 18-tetramethyl -porphyrinato

gallium (III)

そして、従来の光線力学試薬であるポルフィリンナトリウム ppNa も用いた。

新光線力学実験：細胞を培養し、対数増殖期にある細胞を集め、PBSに懸濁し、フェノールレッドとウシ胎児血清FCSを2回洗浄除去した。ウシ胎児血清無添加、フェノールレッド無添加のRPMI1640に新しい光感受性物質を添加し、その培地に細胞を懸濁した。その細胞を37.0°C、5%CO₂条件下で約10時間培養した。その後、細胞をPBSにて洗浄し、光感受性物質を除去した。細胞を10%ウシ胎児血清添加、フェノールレッド無添加のRPMI1640に懸濁し、37.0°C、5%CO₂存在下にて高輝度LEDにより光線を照射した。その後、細胞培養を開始し観察をした。

細胞染色：メイグリュンワルド ギムザ染色法を用いた。

4. 研究成果

新しい光感受性試薬の種類による細胞への影響

新しい光感受性物質C2, C4, C6, C8, C10の側鎖の長さによる効果の差異を、ppNaをコントロールとして用い確認した。各々の光感受性物質の濃度は250nMに設定した。細胞をPBSで洗浄後、光感受性物質を細胞に取り込ませた後、光線を60分間照射した。光線照射後、時間経過とともに細胞の死滅率を確認した。光線照射後48時間での細胞死滅率は以下の通りであった。C2では12%, C4は14%, C6は36%, C8は56%, C10は100%, ppNaは14%。当初、作業仮説として、C2はC₂H₅O-Ga-Asp, C4はC₄H₉O-Ga-Asp, C6はC₆H₁₃O-Ga-Asp, C8はC₈H₁₇O-Ga-Asp, C10はC₁₀H₂₁O-Ga-Aspであり、側鎖の短いC2が分子の大きさが小さいので、最も細胞への取り込みが大きく効果が大きいのではと考えた。ところが側鎖の長さが増加するにつれ、腫瘍細胞の死滅率が増加する

ことが判明した。このメカニズムは、炭化水素側鎖基の長さが増すにつれ、脂質親和性が増加したため、細胞膜の脂質タンパク質を利用して細胞内に取り込まれ、その結果、側鎖の最も長いC10の効果が最も顕著に表れたと考えている。また、現在、臨床に使用されているppNaが腫瘍細胞に及ぼす影響は、C2やC4とほぼ同じ強さであることが明らかになった。念のため、ppNaを500nM, 1μM, 2μMと濃度を増加させて、細胞への影響を観察したがppNaでは細胞の死滅率が飛躍的に増加することはなかった。すなわち細胞死滅率においてはppNaの濃度を増加させるよりも、新しい光感受性物質の側鎖をC₆H₁₃O-, C₈H₁₇O-, C₁₀H₂₁O-にする方がより効果的であると考えられた。

光線照射時間による細胞への影響

光線照射の時間を0分, 15分, 30分, 60分と変化させ細胞の死滅率がどのように変化するか検討した。光線照射後48時間での細胞死滅率は以下の通りであった。照射時間0分では1%, 照射時間15分では22%, 照射時間30分では86%, 照射時間60分では100%に及んだ。光線照射時間の長さが増加するにつれ、腫瘍細胞の死滅率が増加することが判明した。光線照射時間は60分以上が望ましいと考えられる。この際に留意する点は以下の通りである。我々は高輝度LEDを用いて光線照射を行った。高輝度LEDは、光照射をしても他の光源より、温度上昇をもたらすことが比較的少ないと考えられている。しかし、照射時間が長くなるに伴い、庫内の温度が上がらないように、換気手段を用いて気温の上昇を防ぐことが大切である。また、対照として用いる光線照射を行わない細胞に対して、完全に光線が当たらないように被覆することが重要である。

光感受性試薬濃度の細胞増殖に及ぼす影響

光感受性物質として最も効果の高い 13,17-bis(1-carboxypropionyl) carbamoyl ethyl-3,8-bis(1-decanyloxyethyl)-2,7,12,18-tetramethyl-porphyrinato gallium (III) を用いた。光感受性物質の濃度は 0nM, 10nM, 25nM, 50nM, 100nM, 250nM, 500nM に設定した。細胞を PBS で洗浄後、光感受性物質を細胞に取り込ませた後、光線を 60 分間照射した。光線照射後、時間経過とともに細胞の死滅率を確認した。光線照射後 48 時間での TII1 細胞死滅率は以下の通りであった、0nM では 2%, 10nM では 29%, 25nM では 4%, 50nM では 34%, 100nM では 75%, 100nM で光線照射が無い場合は 4%であった。光線照射後 72 時間での細胞死滅率は 0nM では 2%, 10nM では 2%, 25nM では 5%, 50nM では 17%, 100nM では 74%, 100nM で光線照射が無い場合は 3%であった。K562 細胞においては、0nM では 0%, 50nM では 29%, 100nM では 49%, 250nM では 82-96%, 500nM では 100%, 500nM で光線照射が無い場合は 0%であった。光線照射後 72 時間での細胞死滅率は 0nM では 2%, 50nM では 16%, 100nM では 41%, 250nM では 100%, 500nM では 100%, 500nM で光線照射が無い場合は 2%であった。また、F9 細胞は新しい 100nM 光感受性物質存在下で光線照射があると、細胞が膨化し死滅することが観察された。またこの細胞をメイグリュンワルド ギムザ染色法にて染色すると細胞核の分節化が観察され細胞がアポトーシスを起こしていると考えられた。100nM 光感受性物質存在下でも光線照射がなければ細胞死滅は観察されなかった、細胞の種類により細胞死滅の割合が異なることが判明した。これらの差は細胞の種類により細胞膜の構造的な差、細胞内のアポトーシス機構の差などがあると考えられ、今後この解明が必要であると考察する。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

- ① Kamano H, Kubota Y, Tanaka T, Okamoto K, Sakata I,
13,17-BIS(1-CARBOXYPROPIONYL) CARBAMOYLETHYL-3,8-BIS(1-DECANYLOXYETHYL)-2,7,12,18-TETRAMETHYL-PORPHYRINATO GALLIUM (III) INDUCED THE DECREMENT OF THE HUMAN LEUKEMIA CELLS PROLIFERATION , 28th World Congress of Internal Medicine 2006年11月12日, Taipei, Taiwan.
- ② Kamano H, Sakata I,
13,17-BIS(1-CARBOXYPROPIONYL) CARBAMOYLETHYL-3,8-BIS(1-DECANYLOXYETHYL)-2,7,12,18-TETRAMETHYL-PORPHYRINATO GALLIUM (III) TO THE TESTICULAR TUMOR AND OTHER CELLS, The 2nd World Congress on Controversies in Urology, 2009年2月7日, Lisbon, Portugal.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎌野 寛 (KAMANO HIROSHI)

香川大学・保健管理センター・教授

研究者番号：60284337